

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043033**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.19

(21) Номер заявки
201891478

(22) Дата подачи заявки
2017.01.02

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОЦЕНКИ РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАКА, СООТВЕТСТВУЮЩИЕ
НАБОР, БЛОК ХРАНЕНИЯ ДАННЫХ И ОБРАБАТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/EP2017/050034**

(87) **WO 2017/114973 2017.07.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИНСЕРЮ С.А Р.Л. (LU)

(72) Изобретатель:
Флош Жан-Франсуа (FR)

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

(56) **WO-A2-2011083090**
WO-A1-2012164035
WO-A1-2011083089
WO-A2-2011083088

**POMILA SINGH ET AL.: "Progastrin Peptides
Increase the Risk of Developing Colonic Tumors:
Impact on Colonic Stem Cells", CURRENT
COLORECTAL CANCER REPORTS, CURRENT
SCIENCE INC, NEW YORK, vol. 8, no. 4,
23 September 2012 (2012-09-23), pages 277-289,
XP035133076, ISSN: 1556-3804, DOI: 10.1007/
S11888-012-0144-3, abstract, pg 280, col 1, para 1-2**

(57) Изобретение предлагает способ оценки риска возникновения рака у испытуемого человека, у которого ранее не диагностировали рак, включающий стадии а) определения уровня прогастрина в образце указанного испытуемого, включающего приведение в контакт указанного образца по меньшей мере с моноклональным антителом Mab14, продуцированным гибридомой, депонированной в CNCM под ссылочным номером I-5158, и измерение связывания указанного моноклонального антитела с прогастрином; и b) определения риска того, что у указанного испытуемого будет развиваться рак, на основании уровня стадии (а), посредством сравнения уровня стадии (а) с эталонным уровнем, где указанный эталонный уровень составляет 0 пМ. Кроме того, предложены набор, содержащий указанное антитело, а также блок хранения данных и обрабатывающая система для осуществления указанного способа.

B1**043033****043033****B1**

Введение

Рак представляет собой многофакторное заболевание, при котором группа клеток проявляет неуправляемый рост, инвазию, которая внедряется в смежные ткани и уничтожает их, и в некоторых случаях метастазы или распространение в другие местоположения в теле через лимфу или кровь. Эти три пагубных свойства рака отличают его от доброкачественных опухолей, которые не инвазируют и не метастазируют.

В настоящее время существует несколько способов лечения каждого из типов рака, включая хирургию, радиотерапию, химиотерапию и прицельную терапию. Успешная терапия рака направлена на первичную опухоль и любые метастазы, клинически выраженные или микроскопические.

Выбор подходящего лечения является критически важным для пациента. Принципиально важно знать, в какой момент необходимо незамедлительно использовать протокол интенсивного и агрессивного лечения для того, чтобы предотвратить распространение агрессивного рака. И наоборот, выполнение интенсивного и агрессивного лечения опухоли пациента в отсутствие необходимости так же неблагоприятно для пациента. Более того, интенсивное и агрессивное лечение всегда приводит к тяжелым интоксикациям, которые могут значительно нарушать качество жизни пациента. Например, такое лечение по большей части является мутагенным и, таким образом, имеет тенденцию к индуцированию вторичных опухолей. В дополнение, такое интенсивное и агрессивное лечение обычно является очень дорогим и должно выполняться только в случае необходимости.

В настоящее время выбор лечения солидных опухолей основан на оценке стадии распространения опухоли, которую обычно выполняют, используя тест-системы классификации злокачественных опухолей опухоль/уплотнение/метастазы (TNM, от англ. - tumor/node/metastasis) Американского объединенного комитета по раку (AJCC). Система TNM присваивает число на основании трех категорий. "Т" указывает размер опухоли, "N" - степень вовлечения лимфатических узлов, а "M" - степень метастазирования. Ярко выраженной стадии рака обычно дают оценку числом I, II, III, IV, выводимым из значения TNM, сгруппированным по прогнозу; большее число указывает на более позднюю стадию рака и с большой вероятностью плохой результат лечения.

Общепризнано, что, несмотря на то что данный тест и система оценки стадии предлагают некоторую имеющую ценность информацию о стадии, на которой солидный рак был диагностирован у пациента, они являются неточными и недостаточными. В частности, они ограничены солидными опухолями. Опухоли жидких тканей, с другой стороны, по большей части характеризуют выявлением клеточных альтераций.

Что особенно важно, тест TNM не позволяет выявить самые ранние стадии прогрессирования опухоли. Эти ранние стадии предоставляют наиболее перспективное терапевтическое окно. Обнаружение рака в самом начале его развития позволяет проводить прицельную, эффективную терапию с пониженными побочными эффектами. Поэтому важно выявить пациентов на наиболее ранней стадии в рамках скрининга всей популяции. Рак таким образом можно выявить в сообществе на ранней стадии, что обеспечивает возможность более раннего вмешательства и проведение лечебной тактики для снижения смертности и страданий от указанной болезни. Существует реальная потребность в более качественных прогнозирующих тестах возникновения рака, не только для улучшения глобальной выживаемости пациентов, но и для улучшения их качества жизни, и сохранения интенсивной и дорогостоящей химиотерапии для пациентов, которые действительно получают от нее пользу. В частности, существует потребность в тесте, оценивающем риск развития рака у испытуемого.

Описание

Настоящее изобретение предлагает простой и эффективный способ прогнозирования возникновения рака у испытуемых, у которых рак никогда не диагностировали ранее. Авторы настоящего изобретения показали, что присутствие прогастрина в образце испытуемого является хорошим и надежным показателем того, будет ли развиваться рак у испытуемого. Эта взаимосвязь не зависит от возраста или любого другого параметра. Прогастрин, таким образом, предлагает простой и эффективный инструмент для определения рисков развития рака у испытуемого. Прогастрин, таким образом, является маркером самых ранних стадий рака.

Прогностические тесты, основанные на уровне прогастрина, были описаны ранее. Однако такие тесты ограничены предсказанием риска развития неоплазии толстой кишки для пациента с гиперпластическим полипом после резекции указанного гиперпластического полипа (WO 2012/164035, Do et al., Cancer Prev. Res., 5(4): 675-684, 2012). Таким образом, такие тесты имеют узкое применение, поскольку они ограничены прогнозом уже известного рака. Они не могут использоваться для оценки риска у испытуемого, у которого нет признаков рака при развитии этого заболевания.

В первом аспекте изобретение относится к способу оценки риска возникновения рака у испытуемого, у которого ранее не диагностировали рак, причем указанный способ содержит стадии, на которых:

- а) определяют уровень прогастрина в образце указанного испытуемого;
- б) определяют риск того, что у указанного испытуемого будет развиваться рак, на основании уровня, полученного на стадии (а).

Анализ клинических данных ROC-кривой (Receiver Operating Characteristic) показал, что присутст-

вие прогастрина является высокоспецифичным и чувствительным маркером. Прогастрин в большинстве случаев не детектируем в образцах испытуемых, у которых не развивается рак. С другой стороны, у испытуемого, у которого никогда не диагностировали рак, риск развития рака в будущем будет существенным, если прогастрин детектируют в его/ее образце.

Способ согласно изобретению позволяет легко и надежно оценить риск развития рака у испытуемого, у которого ранее рак не диагностировали. Другими словами, этот способ также позволяет выявить испытуемых, у которых будет развиваться рак, даже если в настоящее время симптомы не проявляются. У таких пациентов уже есть рак, даже если они не различают никаких симптомов.

Выражение "оценка риска развития рака у испытуемого" означает определение относительной вероятности проявления симптомов рака у данного испытуемого в будущем. Способ в соответствии с изобретением представляет собой инструмент для оценки указанного риска в комбинации с другими способами или показателями, такими как клиническое обследование, биопсия и определение уровня известного биомаркера рака, такого как, например, CA125 и/или OVA1.

"Испытуемый", который может быть подвергнут описанной здесь методике, может быть любым млекопитающим, включая человека, собаку, кошку, крупнорогатый скот, коз, свиней, поросят, овец и обезьян. Испытуемый человек называется "пациентом". Предпочтительно "испытуемый" представляет собой млекопитающее, не страдающее от рака, у которого рак не подозревают и не диагностировали ранее. Используемый здесь "испытуемый, страдающий от рака", относится к млекопитающему, страдающему от рака, у которого проявляются его симптомы, или у которого рак диагностировали. У испытуемого "диагностировали рак" в том случае, когда медицинский тест, проведенный практикующим врачом, выявил наличие рака.

Используемый здесь термин "симптом" представляет собой любое субъективное свидетельство заболевания, например рака. Под "симптомом" понимают отклонение от нормальной функции или чувства, которое отмечается пациентом, отражающее присутствие необычного состояния или заболевания, например рака. Заболевание рассматривают как бессимптомное, если пациент является носителем указанного заболевания, но симптомы у него не проявляются. Бессимптомные состояния могут быть не выявлены до тех пор, пока пациента не подвергнут медицинским тестам, например, таким как измерение уровня прогастрина.

Настоящий способ является также, в частности, полезным, поскольку позволяет выявить рак у испытуемого, даже когда у испытуемого никогда не диагностировали рак и/или у него не проявляются никакие симптомы рака. Прогастрин является высокоспецифичным и чувствительным маркером рака. Обнаружение прогастрина у испытуемого указывает на то, что существует высокая вероятность того, что у указанного испытуемого будет развиваться рак. Таким образом, прогастрин является, в частности, важным биомаркером для выявления испытуемых, у которых будет развиваться рак, даже если пока у них не проявляются никакие симптомы. Перспективность изобретения, в частности, заключается в том, что оно позволяет провести скрининг популяции по внешнему виду здоровых испытуемых, т.е. тех, у кого никогда не диагностировали рак и/или у кого не проявлялись какие-либо симптомы, и выявить тех, у кого развивается рак. Под "скринингом" здесь упоминается способ, используемый для выявления внутри популяции возможного присутствия пока еще недиагностированного заболевания у индивидуумов без признаков или симптомов. Сюда можно включить индивидуумов с предсимптоматическим или нераспознанным симптоматическим заболеванием. Специалисту в данной области будет ясно, что скрининг-тесты уникальны тем, что их выполняют на людях, по внешнему виду являющихся здоровыми. Ближайшей целью скрининга рака является выявление рака ранней стадии или предраковых поражений, прежде чем у человека начнут развиваться симптомы, а также в точке траектории болезни, когда лечение с большей вероятностью приведет к излечению.

В еще одном аспекте изобретение предлагает способ прогнозирования рака у испытуемого, у которого ранее не диагностировали рак, причем указанный способ содержит стадии, на которых:

- а) определяют уровень прогастрина в образце указанного испытуемого;
- б) прогнозируют рак на основании уровня стадии (а).

Термин "прогноз", используемый здесь, означает вероятность нормализации после болезни, или предсказание возможного развития или исхода заболевания. Например, если образец испытуемого на присутствие прогастрина отрицательный, то "прогноз" для этого испытуемого лучше, чем если образец на прогастрин положительный.

Под "прогастрином" здесь упоминается пептид прогастрина млекопитающих. Прогастрин образуется путем расщепления первых 21 аминокислот (сигнального пептида) из препрогастрина, пептида из 101 аминокислоты (ссылочный номер аминокислотной последовательности: AAB19304.1), который является первичным продуктом трансляции гена гастрин. 80-аминокислотную цепь прогастрина дополнительно обрабатывают путем расщепления и модификации ферментов до нескольких биологически активных форм гормона гастрин: гастрин-34 (G34) и удлиненный глицином гастрин-34 (G34-Gly), содержащий аминокислоты с 38 по 71 прогастрина, гастрин-17 (G17) и удлиненный глицином гастрин-17 (G17-Gly), содержащий аминокислоты с 55 по 71 прогастрина.

В предпочтительном варианте осуществления пептид прогастрина согласно изобретению представ-

ляет собой прогастрин человека. Более предпочтительно выражение "прогастрин человека" относится к PG (прогастрину, от англ. - progastrin) человека с последовательностью SEQ ID NO: 1. Примечательно, что прогастрин человека содержит N-концевой и C-концевой домены, которые отсутствуют в биологически активных формах гормона гастрина, упомянутых выше. Предпочтительно последовательность указанного N-концевого домена представлена SEQ ID NO: 2. В другом предпочтительном варианте осуществления последовательность указанного C-концевого домена представлена SEQ ID NO: 3.

Настоящее изобретение предлагает способы обнаружения прогастрина в образцах, особенно биологических образцах, таких как биологические жидкости и клетки, ткани, образцы биопсии и участки органов и т.д.

Под "биологическим образцом" здесь упоминается любой образец, который может быть отобран у испытуемого. Такой образец должен давать возможность определять уровень экспрессии прогастрина. Известно, что прогастрин является секретируемым белком. Предпочтительные биологические образцы для определения уровня белка прогастрина, таким образом, включают биологические жидкости. Используемая здесь "биологическая жидкость" означает любую жидкость, которая включает материал биологического происхождения. Предпочтительные биологические жидкости для использования в настоящем изобретении включают физиологические жидкости животного, например млекопитающего, предпочтительно испытуемого человека. Физиологическая жидкость может быть любой физиологической жидкостью, включая, но не ограничиваясь, кровь, плазму, сыворотку крови, лимфу, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), слюну, пот и мочу. Предпочтительно указанные предпочтительные жидкие биологические образцы включают образцы, такие как образец крови, образец плазмы или образец лимфы. Более предпочтительно биологический образец представляет собой образец крови. Более того, такой образец крови может быть получен полностью безопасным забором крови у пациента и, таким образом, делает возможной неинвазивную оценку рисков развития опухоли у испытуемого.

Используемый здесь "биологический образец" также включает образец солидного рака тестируемого пациента в том случае, если рак представляет собой солидный рак. Такой образец солидного рака делает возможным для специалиста в данной области техники выполнение любого типа измерения уровня биомаркера согласно изобретению. В некоторых случаях способы согласно изобретению могут дополнительно содержать предварительную стадию отбора образца солидного рака у пациента. Под "образцом солидного рака" здесь упоминается образец опухолевой ткани. Даже у пациента, страдающего раком, ткань, в которой локализуется опухоль, по-прежнему содержит неопухолевую здоровую ткань. Таким образом, "образец рака" должен быть ограничен опухолевой тканью, взятой у пациента. Указанный "образец рака" может представлять собой образец биопсии или образец, отобранный при хирургической резекционной терапии.

Согласно одному аспекту образец, отобранный у пациента, представляет собой раковую клетку или раковую ткань.

Этот образец может быть отобран и при необходимости подготовлен согласно способам, известным специалисту в данной области. В частности, в данной области хорошо известно, что образец следует отбирать у испытуемого натощак.

Раковая клетка или раковая ткань в настоящем изобретении особенно не ограничиваются.

Используемый здесь термин "рак" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемой клеточной пролиферацией, или описывает такое состояние. Термины "рак" и "раковый", используемые здесь, предназначены для охвата всех стадий заболевания. Используемый здесь "рак" представляет собой любое злокачественное новообразование, вызванное нежелательным ростом, инвазией и при определенных условиях метастазами поврежденных клеток в организме. Клетки, дающие начало раку, повреждены генетически и обычно теряют способность контролировать клеточное деление, динамику миграции клеток, дифференцировочный статус и/или механизм гибели клеток. Большинство видов рака образуют опухоль, за исключением некоторых гематопоэтических видов рака, таких как лейкомия.

Таким образом, "рак", используемый здесь, может включать как доброкачественные, так и злокачественные раковые образования. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкомию или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретно, вид рака в соответствии с настоящим изобретением может быть выбран из группы, содержащей плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, орофарингеальный рак, назофарингеальный рак, ларингеальный рак, рак брюшной полости, эзофагеальный рак, гепатоцеллюлярный рак, гастриальный рак или рак желудка, включая гастроинтестинальный рак и гастроинтестинальный стромальный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак мозга, рак нервной системы, цервикальный рак, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевого тракта, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, ректальный рак, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почек или ренальный рак, рак предстательной железы, рак желчного пузыря, рак вульвы, рак яичек, рак щитовидной железы, саркому Капоши, карциному печени, анальную карциному, пениальную карциному, немеланомный рак кожи, меланому,

меланому кожи, поверхностную распространяющуюся меланому, предраковый меланоз Дюбрея, акральную лентигинозную меланому, узловую меланому, множественную миелому и В-клеточную лимфому (включая лимфому Ходжкина; неходжкинскую лимфому, такую как, например, фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ) низкой степени злокачественности; мелкоклеточная лимфоцитарная (SL) НХЛ; фолликулярная НХЛ средней степени злокачественности; диффузная НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластная НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластная НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточная НХЛ с нерассеченными ядрами высокой степени злокачественности; массивная лимфаденопатия НХЛ; лимфома из клеток мантийной зоны; СПИД-ассоциированная лимфома; и макроглобулинемия Вальденстрема); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ); острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (ПТЛЛ), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факотомозами, отеком (например, ассоциированным с опухолями головного мозга), синдромом Мейга, мозгом, а также рак головы и шеи, включая губу и ротовую полость, и ассоциированные метастазы.

В предпочтительном варианте осуществления указанный рак представляет собой рак легких, рак губы и ротовой полости, орофарингеальный рак, назофарингеальный рак, ларингеальный рак, рак предстательной железы, эзофагеальный рак, рак желчного пузыря, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, гастральный рак или рак желудка, включая гастроинтестинальный рак и гастроинтестинальный стромальный рак, рак поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкомию, множественную миелому, саркому Капоши, рак почек, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, ректальный рак, колоректальный рак, гепатому, карциному печени, анальную карциному, рак щитовидной железы, немеланомный рак кожи, меланому кожи, рак мозга, рак нервной системы, рак яичек, цервикальный рак, рак матки, рак эндометрия, рак яичника или рак молочной железы.

В более предпочтительном варианте осуществления указанный рак представляет собой эзофагеальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, гастральный рак или рак желудка, включая гастроинтестинальный рак и гастроинтестинальный стромальный рак, рак поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, рак толстой кишки, ректальный рак, колоректальный рак, гепатому, карциному печени, анальную карциному, немеланомный рак кожи, меланому кожи, цервикальный рак, рак матки, рак эндометрия, рак яичника или рак молочной железы.

Риск развития рака у испытуемого предпочтительно определяют на стадии (б) путем сравнения уровня стадии (а) с эталонным уровнем.

Термин "эталонный уровень", используемый здесь, относится к уровню экспрессии рассматриваемого маркера рака, т.е. прогастрина, в эталонном образце. Используемый здесь "эталонный образец" означает образец, полученный у заведомо здоровых испытуемых, предпочтительно двух или более испытуемых, или в альтернативном варианте от общей популяции. Подходящие эталонные уровни экспрессии маркера рака могут быть определены путем измерения уровней экспрессии указанного маркера рака у нескольких подходящих испытуемых, такие эталонные уровни могут быть скорректированы для конкретной популяции испытуемых. Эталонное значение или эталонный уровень может быть абсолютным значением; относительным значением; значением, имеющим верхний или нижний предел; диапазоном значений; средним значением; медианным значением, математическим ожиданием или значением по сравнению с конкретным контрольным или базовым значением. Эталонное значение может быть основано на значении отдельного образца, например, полученном из образца тестируемого испытуемого, но в более ранний момент времени. Эталонное значение может быть основано на большом числе образцов, таком как популяция испытуемых из группы, подобранной по хронологическому возрасту, или на основе пула образцов, включающих или исключающих тестируемый образец.

Преимущественно "эталонный уровень" представляет собой заранее определенный уровень прогастрина, полученный из биологического образца испытуемого с известным частным статусом в отношении рака. В частных вариантах осуществления эталонный уровень, используемый для сравнения с тестируемым образцом на стадии (б), можно получить из биологического образца здорового испытуемого, или из биологического образца испытуемого, страдающего раком; предполагается, что профиль эталонной экспрессии можно также получить из пула биологических образцов здоровых испытуемых или из пула образцов испытуемых, страдающих раком. Авторы настоящего изобретения показали, что уровень прогастрина у здоровых испытуемых натощак составляет 0 пМ. В предпочтительном варианте осуществления эталонный уровень составляет 0 пМ.

Уровень прогастрина можно измерить любым способом, известным специалисту в данной области.

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

Измерение уровня экспрессии на белковом уровне можно, в частности, выполнить с использованием специфических связывающих прогастрин молекул, таких как, например, антитела, в частности используя хорошо известные технологии, такие как окрашивание клеточной мембраны с использованием биотинилирования, или другие эквивалентные методы, с последующей иммунопреципитацией специ-

фичными антителами, вестерн-блоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ тИФА (ELISA) или метод иммуноферментных пятен (ELISPOT), твердофазный иммуноферментный анализ тИФА (ELISA), радиоиммунный анализ (РИА), иммуногистохимию (ИГХ), иммунофлуоресценцию (ИФ), микрочипы антител или тканевые микрочипы, соединенные с иммуногистохимией. Другие подходящие методы включают флуоресцентный резонансный перенос энергии ФППЭ (FRET) или биолуминесцентный резонансный перенос энергии БППЭ (BRET), микроскопические или гистохимические методы единичной клетки с использованием длин волн единичного или множественного возбуждения и применение любого из приспособленных оптических методов, таких как электрохимические методы (методы вольтамперметрии и амперометрии), атомно-силовая микроскопия и радиочастотные способы, например многополярная резонансная спектроскопия, конфокальная и неконфокальная, обнаружение флуоресценции, люминесценции, хемилюминесценции, поглощения, отражения, пропускания, и двулучепреломления или преломления (например, поверхностный плазмонный резонанс, эллипсометрия, метод резонансного зеркала, метод волноводного решетчатого светоделиителя или интерферометрия), клеточный тИФА (ELISA), проточная цитометрия, радиоизотопная, магнитно-резонансная томография, анализ электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез, англ. - SDS-PAGE); ВЭЖХ-масс-спектропия; жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия ЖХ-МС/МС (LC-MS/MS)). Все эти методы хорошо известны в данной области техники и не нуждаются в дальнейшей детализации. Данные различные методы могут быть использованы для измерения уровня прогастрина.

Связывающие прогастрин молекулы согласно настоящему изобретению, особенно антитела к прогастрину, в частности, полезны в иммунохимическом анализе. Иммунохимический анализ может представлять собой твердофазный иммуноферментный анализ тИФА (ELISA), радиоиммунный анализ (РИА), иммунодиффузионный анализ или иммунологический анализ, такой как поверхностный плазмонный резонансный анализ (например, анализ Biacore®), анализ ELISPOT, слот-блоттинг или вестерн-блоттинг. В качестве общего руководства по таким методам, см., например, Ausubel et al. (ред.) (1987) в "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, N.Y.

Антитела являются ключевыми реагентами в многочисленных методах анализа, используемых в медицинских, ветеринарных и других областях иммунологического анализа. Такие тесты включают многие рутинно используемые методы иммунохимического анализа, такие как, например, иммуноферментный тИФА (ELISA), РИА (RIA), ИГХ (ИНС) и ИФ (IF). Уровень прогастрина предпочтительно анализируют любым способом, известным специалисту в данной области, с использованием антител, направленных против указанного белка. Предпочтительно уровень прогастрина определяют, используя иммуноферментный анализ, предпочтительно на основе методов, выбранных между РИА (RIA) и тИФА (ELISA) по меньшей мере с одной связывающей прогастрин молекулой. Наиболее предпочтительно указанный уровень определяют с помощью тИФА (ELISA), с помощью по меньшей мере одной связывающей прогастрин молекулы. Более предпочтительно уровень прогастрина измеряют с помощью одной связывающей прогастрин молекулы, используя иммуноферментный анализ, наиболее предпочтительно - анализ тИФА (ELISA).

В одном, в частности, полезном варианте осуществления способ оценки риска возникновения рака в соответствии с изобретением содержит определение уровня прогастрина в биологическом образце испытуемого с использованием иммуноферментного анализа, предпочтительно на основе методов, выбранных между РИА (RIA) и тИФА (ELISA), с помощью связывающей прогастрин молекулы.

Эти методы являются, в частности, полезными, поскольку позволяют специалисту в данной области техники анализировать присутствие прогастрина с помощью простого, воспроизводимого и надежного теста. Способ предшествующего уровня техники основывался на полуколичественном тесте, т.е. ИГХ (ИНС) окрашивании эпителиальных клеток во всем полипе. Такой способ достаточно ненадежен. В частности, из-за степени субъективности, связанной с анализом, трудно сравнивать результаты, полученные разными патологоанатомами. Напротив, способ согласно настоящему изобретению является полностью количественным, объективным и высокочувствительным.

В еще одном, в частности, полезном варианте осуществления способ согласно изобретению содержит определение уровня прогастрина в биологическом образце испытуемого с использованием иммуноферментного анализа, предпочтительно на основе методов, выбранных между РИА (RIA) и тИФА (ELISA), с помощью связывающей прогастрин молекулы.

Таким образом, уровень прогастрина определяют на стадии (а) настоящего способа путем определения количества прогастрина, которое связывает связывающая прогастрин молекула, предпочтительно антитело, распознающее прогастрин.

"Связывающая прогастрин молекула" относится здесь к любой молекуле, которая связывает прогастрин, но не связывает гастрин-17 (G17), гастрин-34 (G34), гастрин-17, удлинённый глицином, (G17-Gly) или гастрин-34, удлинённый глицином (G34-Gly). Связывающая прогастрин молекула согласно настоящему изобретению может представлять собой любую связывающую прогастрин молекулу, такую как, например, молекула антитела или молекула рецептора. Предпочтительно связывающая прогастрин молекула представляет собой антитело к прогастрину или его антигенсвязывающий фрагмент.

Под терминами "связывающая", "связывает" и т.п. здесь подразумевается, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который в физиологических условиях относительно стабилен. Способы определения связывания двух молекул друг с другом хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и тому подобное. В частном варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают прогастрин с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности к связыванию с неспецифической молекулой, такой как бычий сывороточный альбумин БСА (BSA) или казеин. В более частном варианте осуществления указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается только с прогастрином.

В частном варианте осуществления биологический образец испытуемого приводят в контакт по меньшей мере с одной связывающей прогастрин молекулой, причем аффинность связывания указанного агента с прогастрином 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, как определено способом, описанным выше.

В частном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки риска возникновения рака у испытуемого, у которого ранее не диагностировали рак, причем способ содержит обнаружение концентрации прогастрина в биологическом образце испытуемого, у которого не диагностировали рак, при этом указанный биологический образец приводят в контакт с антителом против прогастрина человека (анти-hPG антителом) или его антигенсвязывающим фрагментом.

В частном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу прогноза рака, содержащему обнаружение концентрации прогастрина в биологическом образце испытуемого, у которого не диагностировали рак, причем указанный биологический образец приводят в контакт с анти-hPG антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Используемый здесь термин "антитело" включает поликлональные и моноклональные антитела. Антитело (или "иммуноглобулин") состоит из гликопротеина, содержащего по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область (или домен) тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен C_L . Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые "определяющими комплементарность областями" (CDR) или "гипервариабельными областями", которые в первую очередь ответственны за связывание эпитопа антигена и которые перемежаются с областями, являющимися более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антитела могут принадлежать к различным изотипам (а именно IgA, IgD, IgE, IgG или IgM).

В более частном варианте осуществления указанный биологический образец приводят в контакт со связывающим прогастрин антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, выбранным из группы, состоящей из: поликлональных антител, моноклональных антител, химерных антител, гуманизированных антител, одноцепочечных антител, верблужьего антитела, IgA1-антител, IgA2-антител, IgD-антител, IgE-антител, IgG1-антител, IgG2-антител, IgG3-антител, IgG4-антител и IgM-антител.

В дополнение, специалист в области синтеза антител легко выберет и осуществит способ синтеза поликлональных и/или моноклональных антител к заданному антигену. Также специалист в данной области владеет способом определения CDR в легких и тяжелых цепях антитела.

"Поликлональное антитело" представляет собой антитело, продуцированное между или в присутствии одного или нескольких других, неидентичных антител. В общем случае поликлональные антитела продуцируют 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, полученное из примерно гомогенной популяции антител, причем популяция содержит идентичные антитела за исключением малого числа возможных природных мутаций, которые можно обнаружить в минимальных пропорциях. Моноклональное антитело получается при росте одноклеточного клона, такого как гибридома, и характеризуется тяжелыми цепями одного класса или подкласса, и легкими цепями одного типа. Моноклональные антитела к человеческому прогастрину (анти-hPG) и их использование для диагностики или терапии уже известны в

уровне техники, см., например, WO 2011/083088 для колоректального рака, WO 2011/083090 для рака молочных желез, WO 2011/083091 для рака поджелудочной железы, WO 2011/116954 для колоректального и гастроинтестинального рака и WO 2012/013609 и WO 2011/083089 для патологий печени.

Под выражением "антигенсвязывающий фрагмент" антитела указан любой пептид, полипептид или фермент, сохраняющий способность к связыванию с мишенью (также в общем случае обозначаемую антигеном) указанного антитела, в общем случае того же эпитопа, и содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере из 5 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 последовательных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 последовательных аминокислотных остатков или по меньшей мере 200 последовательных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности антитела.

В частном варианте осуществления указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR антитела, производным которого он является. Вместе с тем в предпочтительном варианте осуществления указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит 2, 3, 4 или 5 CDR, более предпочтительно 6 CDR антитела, производным которого он является.

"Антигенсвязывающие фрагменты" можно выбрать, без ограничения, из группы, состоящей из Fv, scFv (sc для единичной цепи), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc фрагментов или димеров, или слитных белков с неупорядоченными пептидами, такими как XTEN (удлинённый рекомбинантный полипептид) или PAS (Per-ARNT-Sim) мотивов, или любого фрагмента, время полужизни которого можно увеличить химической модификацией, такой как присоединение поли(алкилен)гликоля, такого как поли(этилен)гликоль (PEG) ("пегилирование") (пегилированные фрагменты называются Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG), или включением в липосому, причем указанные фрагменты имеют по меньшей мере одну характеристическую CDR антитела согласно изобретению. Предпочтительно указанные "антигенсвязывающие фрагменты" состоят из или содержат частичную последовательность тяжелой или легкой вариабельной цепи антитела, производными которого они являются, при этом указанная частичная последовательность достаточна для сохранения такой же специфичности связывания, как у антитела, производным которого она является, и имеют достаточную аффинность к мишени, предпочтительно по меньшей мере равную 1/100, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 1/10, от аффинности антитела, производным которого она является.

В еще одном частном варианте осуществления биологический образец испытуемого приводят в контакт по меньшей мере с одним антителом, связывающим проагстрин, причем указанное антитело получают иммунизационным методом, известным специалисту в данной области техники, при этом в качестве иммуногена используют пептид, аминокислотная последовательность которого содержит полный набор или часть аминокислотной последовательности проагстрина. Указанное антитело может быть поликлональным или моноклональным. Когда используют более одного антитела (например, 2), способ согласно изобретению выполняют либо на антителах только одинакового типа (например, два моноклональных антитела), либо на антителах, принадлежащих к разным типам (например, одно моноклональное и одно поликлональное).

В еще одном частном варианте осуществления указанный биологический образец приводят в контакт с одним таким антителом. Более предпочтительно, указанный иммуноген содержит пептид, который выбирают из:

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

пептида, аминокислотная последовательность соответствует части аминокислотной последовательности проагстрина, в частности полноразмерного человеческого проагстрина SEQ ID NO: 1;

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует целой аминокислотной последовательности N-концевой части проагстрина или ее части, и, в частности, пептида, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 2);

пептида, аминокислотная последовательность которого соответствует целой аминокислотной последовательности C-концевой части проагстрина или ее части, и, в частности, пептида, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 3);

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

прогастрина.

Специалист в данной области легко придет к выводу, что такая иммунизация может быть, по желанию, использована для синтеза как поликлональных, так и моноклональных антител. Способы получения каждого из таких типов антител хорошо известны в уровне техники.

Примеры моноклональных антител, которые были синтезированы с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность "SWKPRSQQPDAPLG", соответствующую аминокислотной последовательности 1-14 человеческого прогастрина (N-терминальный конец), включают, но не ограничиваются, моноклональные антитела, обозначенные как mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20, как описано в последующих табл. 1-4. Были описаны также и другие антитела, однако неясно, связывают ли эти антитела прогастрин (WO 2006/032980). Экспериментальные результаты картирования эпитопов показывают, что mAb3, mAb4, mAb16, mAb19 и mAb20 специфически связывают эпитоп в указанной N-концевой аминокислотной последовательности hPG.

Поликлональные антитела, специфически распознающие эпитоп в N-конце прогастрина, представленного SEQ ID NO: 2, были описаны в уровне техники (см., например, WO 2011/083088).

Таблица 1

Депозитарный номер гибридомы	mAb	Аминокислотная последовательность		SEQ ID NO
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYFTSYW	SEQ ID NO 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	SEQ ID NO 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	SEQ ID NO 6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO 7
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO 8
		VL CDR 3	FQGSHVPFT	SEQ ID NO 9

Таблица 2

Депозитарный номер гибридомы	mAb	Аминокислотная последовательность		SEQ ID NO
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	SEQ ID NO 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	SEQ ID NO 11
		VH CDR 3	ATDGNYDFAY	SEQ ID NO 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO 13
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	SEQ ID NO 15

Таблица 3

Депозитарный номер гибридомы	mAb	Аминокислотная последовательность		SEQ ID NO
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYFTSYYY	SEQ ID NO 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	SEQ ID NO 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO 18
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 19
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO 20
		VL CDR 3	WQGTSPYT	SEQ ID NO 21

Таблица 4

Депозитарный номер гибридомы	mAb	Аминокислотная последовательность		SEQ ID NO
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	SEQ ID NO 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	SEQ ID NO 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	SEQ ID NO 24
		VL CDR 1	SQHRTYT	SEQ ID NO 25
		VL CDR 2	VKKDGS	SEQ ID NO 26
		VL CDR 3	GVGDAIKGQSVFV	SEQ ID NO 27

Примеры моноклональных антител, которые могут быть синтезированы с использованием иммуногена, содержащего аминокислотную последовательность "QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN" (С-концевая часть прогастрина), соответствующую аминокислотной последовательности 55-80 человеческого прогастрина, включают, но не ограничиваются, антитела, обозначенные как mAb8 и mAb13 в представленных далее табл. 5 и 6. Экспериментальные результаты картирования эпитопов показали, что mAb13 специфически связывает эпитоп в указанной С-концевой аминокислотной последовательности hPG.

Таблица 5

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

Таблица 6

Депозитарный номер гибридомы	mAb	Аминокислотная последовательность		SEQ ID NO
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	SEQ ID NO 34
		VH CDR 2	INTFGDRT	SEQ ID NO 35
		VH CDR 3	ARGTGTY	SEQ ID NO 36
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO 37
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO 38
		VL CDR 3	WQGTHTFPQT	SEQ ID NO 39

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

В более частном варианте осуществления способа согласно изобретению указанный биологический образец приводят в контакт по меньшей мере с одним анти-hPG антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предпочтительно с одним анти-hPG антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, при этом указанное анти-hPG антитело выбирают из N-концевых и С-концевых анти-hPG антител.

Термины "N-концевые анти-hPG антитела" и "С-концевые анти-hPG антитела" обозначают антители-

ла, связывающие эпитоп, содержащий аминокислоты, расположенные в N-концевой части hPG, или эпитоп, содержащий аминокислоты, расположенные в C-концевой части hPG соответственно. Предпочтительно термин "N-концевые анти-hPG антитела" относится к антителам, связывающим эпитоп, расположенный в домене прогастрина с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 2. В еще одном предпочтительном варианте осуществления термин "C-концевые анти-hPG антитела" относится к антителам, связывающим эпитоп, расположенный в домене прогастрина с последовательностью, представленной SEQ ID NO: 3.

Термин "эпитоп" означает область антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут определяться, как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы в общем случае являются разновидностью структурных эпитопов и содержат аминокислоты, которые непосредственно обуславливают аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными. В конкретных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, представляющие собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепочки сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в конкретных вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, и/или специфические зарядовые характеристики. Определение эпитопа, связанного антителом, можно выполнить любым методом эпитопного картирования, известным специалисту в данной области техники. Эпитоп может содержать различные аминокислоты, расположенные последовательно в пределах аминокислотной последовательности фермента. Эпитоп также может содержать аминокислоты, которые расположены непоследовательно в пределах аминокислотной последовательности фермента.

В частном варианте осуществления способа согласно изобретению указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и

98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно;

моноклонального антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 34, 35 и 36 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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 CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно; и

моноклонального антитела, продуцированного гибридомой, депонированной в Национальной коллекции культур микроорганизмов НККМ (CNCM), Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, CEDECS 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылкой номером I-5158.

Используемое здесь "процентное отношение идентичности" или "% идентичности" между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот относится к процентному отношению идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков между двумя последовательностями при их сравнении, полученному после оптимального выравнивания и являющемуся статистическим, а различия между двумя последовательностями в случайном порядке распределены по всей их длине. Сравнение двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот традиционно производят путем сравнения последовательностей после их оптимального выравнивания, при этом сравнение возможно производить по сегментам или используя "окно выравнивания". Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно производить вручную и посредством способов, известных специалисту в данной области техники.

Предпочтительные примеры аминокислотной последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% идентичностью с эталонной аминокислотной последовательностью, включают последовательности, содержащие эталонную последовательность, а также конкретные модификации, а именно делецию, присоединение или замену по меньшей мере одной аминокислоты, усечение или удлинение. В случае замены одной или более последовательных или непоследовательных аминокислот, предпочтительными являются варианты замены, в которых замещенные аминокислоты заменяют "эквивалентными" аминокислотами. Здесь выражение "эквивалентные аминокислоты" указывает на любые аминокислоты, возможная замена которых на одну из структурных аминокислот не приводит к модификации биологической активности соответствующих антител, а также специфических примеров, определяемых ниже.

Эквивалентные аминокислоты можно определить либо на основании их структурной гомологии с замещающими их аминокислотами, либо на основании результатов сравнительных тестов по биологической активности между разными с большой вероятностью синтезируемыми антителами.

В еще одном частном варианте осуществления используемое в способе согласно изобретению антитело является гуманизированным антителом.

Используемое здесь "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое содержит области CDR, происходящие из антител нечеловеческого происхождения, при этом другие части молекулы антитела происходят из одного или нескольких человеческих антител. В дополнение, некоторые остатки скелетных сегментов (называемые FR для каркаса) в случае необходимости можно модифицировать для сохранения аффинности связывания, используя методы, хорошо известные специалистам в данной области техники (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986). Целью гуманизации является понижение иммуногенности чужеродного антитела, такого как мышиное антитело, для введения в человека при сохранении полной аффинности связывания антигена и специфичности антитела.

Антитела можно гуманизировать, используя множество методов, включая трансплантацию антигенсвязывающей области (CDR) (EP 0239400; WO 91/09967; U.S. патенты № 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 0592106; EP 0519596; Padlan E.A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka G.M. et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:969-973), и перестановку цепей (U.S. патент № 5565332). Человеческие антитела можно получить множеством способов, известных в уровне техники, включая способы фагового дисплея. См. также U.S. патенты № 4444887, 4716111, 5545806 и 5814318 и международные патентные заявки с номерами публикаций WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741.

В более частном варианте осуществления антитело, используемое в способе согласно изобретению, представляет собой гуманизированное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

гуманизированного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну,

гуманизированного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно;

гуманизированного антитела, содержащего тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно по меньшей мере две, предпочтительно три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% 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, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно или последовательностей с идентичностью после оптимального выравнивания по меньшей мере 80, предпочтительно 85, 90, 95 и 98% с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно; и

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

В первом варианте осуществления способ согласно изобретению содержит приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, предпочтительно с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, причем указанный эпитоп расположен в С-концевой части hPG. В альтернативном варианте способ согласно изобретению содержит приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, предпочтительно с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, причем указанный эпитоп расположен в N-концевой части hPG.

В более конкретном варианте осуществления способ согласно изобретению содержит приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, предпочтительно с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, причем указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, выбранной из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 10-14 hPG, аминокислотам 9-14 hPG, аминокислотам 4-10 hPG, аминокислотам 2-10 hPG и аминокислотам 2-14 hPG, при этом аминокислотная последовательность hPG характеризуется SEQ ID NO: 1.

В более конкретном варианте осуществления способ согласно изобретению содержит приведение в контакт биологического образца по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, предпочтительно с одним анти-hPG антителом, связывающим эпитоп hPG, причем указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина, выбранной из 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, при этом аминокислотная последовательность hPG характеризуется SEQ ID NO: 1.

В частном варианте осуществления способ согласно изобретению содержит стадию, на которой биологический образец испытуемого приводят в контакт с первым агентом, который связывает первую часть прогастрина, и со вторым агентом, который связывает вторую часть прогастрина. В более частном варианте осуществления, в котором указанная связывающая прогастрин молекула представляет собой антитело, биологический образец испытуемого приводят в контакт с антителом, которое связывает первый эпитоп прогастрина, и вторым антителом, которое связывает второй эпитоп прогастрина.

Согласно предпочтительному варианту осуществления указанное первое антитело связано 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, связывающее эпитоп hPG, при этом указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно, указанное первое антитело является моноклональным антителом Mab14, продуцированным гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 депонирована по Будапештскому договору в НККМ (CNCM), Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, СЕДЕКС 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылочным номером I-5158.

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления к указанному второму антителу присоединяют метку в виде детектируемого фрагмента молекулы, как описано ниже. Связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает возможность обнаружения молекул прогастрина, присутствующих в биологическом образце. Дополнительно, связывание прогастрина вторым антителом обеспечивает возможность количественного определения молекул прогастрина, присутствующих в биологическом образце. Предпочтительно указанное второе антитело представляет собой антитело, связывающее эпитоп hPG, при этом указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное N-концевое антитело является поликлональным антителом, как описано выше. В альтернативном варианте можно использовать моноклональное антитело, связывающее эпитоп в N-конце прогастрина, такое как, например, N-концевое моноклональное антитело, как описано 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 частном предпочтительном варианте осуществления первое антитело связано с нерастворимым или частично растворимым носителем, а ко второму антителу присоединяют метку в виде детектируемого фрагмента молекулы.

В частном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению содержит определение концентрации прогастрина в биологическом образце испытуемого человека, у которого ранее не диагностировали рак.

В еще одном частном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению содержит определение концентрации прогастрина в биологическом образце испытуемого человека, у которого ранее не диагностировали рак, при этом указанный биологический образец выбирают из крови, сыворотки крови и плазмы.

В более частном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению содержит приведение в контакт образца плазмы указанного испытуемого по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, а именно с одним анти-hPG антителом, и определение концентрации прогастрина в указанном образце, при этом концентрация прогастрина, превышающая 10 пМ в указанной плазме, является индикатором риска развития рака у указанного испытуемого. Другими словами, концентрация прогастрина, превышающая 10 пМ в указанной плазме, является индикатором плохого прогноза для указанного испы-

туемого.

Вместе с тем, более предпочтительно способ согласно настоящему изобретению содержит приведение в контакт образца плазмы указанного испытуемого по меньшей мере с одним анти-hPG антителом, а именно с одним анти-hPG антителом, и определение концентрации прогастрина в указанном образце, при этом концентрация прогастрина, превышающая 10 пМ, предпочтительно 20 пМ, более предпочтительно 30 пМ, еще более предпочтительно 40 пМ и даже более предпочтительно 50 пМ в указанном образце плазмы, является индикатором риска развития рака у указанного испытуемого.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, у которого никогда не диагностировали рак, при этом указанный способ содержит стадии, на которых:

- а) оценивают риск развития рака у указанного пациента любым способом, описанным выше; и
- б) проводят лечение указанного рака в случае обнаружения риска на стадии (а).

Способ согласно изобретению является, в частности, полезным, поскольку позволяет выявить рак на очень ранней стадии. Из уровня техники известно, что чем раньше выявляют рак, тем выше шансы ремиссии. В дополнение проводят лечение пациента противораковыми препаратами, которые не являются слишком агрессивными, тем самым снижая шансы побочных эффектов при сохранении терапевтической эффективности.

В частном варианте осуществления способ согласно изобретению содержит сравнение концентрации прогастрина в биологическом образце, полученном у пациента с определенным заранее значением концентрации прогастрина в образце, в более частном варианте осуществления указанное, заранее определенное значение выбирают из: математического ожидания или среднего значения для образца, на основании определения математического ожидания или среднего значения концентрации прогастрина в здоровой популяции, причем значение концентрации прогастрина получают в момент, когда было известно, что пациент здоров.

В еще одном аспекте изобретение также предлагает композицию для использования в способах, описанных выше. Согласно аспекту изобретения предлагается композиция для оценки риска возникновения рака у испытуемого, у которого ранее никогда не диагностировали рак, при этом указанная композиция содержит по меньшей мере одно связывающее прогастрин антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

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

В более конкретном варианте осуществления композиция согласно изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, причем указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности N-концевой части прогастрина, при этом указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 10-14 от hPG, остатки 9-14 от hPG, остатки 4-10 от hPG, остатки 2-10 от hPG или остатки 2-14 от hPG, причем аминокислотная последовательность hPG характеризуется SEQ ID NO: 1.

В более частном варианте осуществления композиция согласно изобретению содержит антитело, распознающее эпитоп прогастрина, при этом указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности C-концевой части прогастрина, причем указанная аминокислотная последовательность может включать остатки 71-74 от hPG, остатки 69-73 от hPG, остатки 71-80 от hPG (SEQ ID NO: 40), остатки 76-80 от hPG, остатки 67-74 от hPG, при этом аминокислотная последовательность характеризуется SEQ ID NO: 1.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает набор для использования в способах, описанных выше, при этом указанный набор содержит любые антитела согласно изобретению. В объем изобретения также входят упакованные материалы, содержащие комбинацию реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями по выполнению способов, описанных выше, например, наборы. Предпочтительно указанный набор содержит по меньшей мере одно антитело согласно изобретению, более предпочтительно два антитела согласно изобретению.

Например, в первом варианте осуществления указанный набор содержит первое антитело, связанное с нерастворимым или частично растворимым носителем. Предпочтительно указанное первое антитело представляет собой антитело, связывающее эпитоп hPG, при этом указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности в C-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное первое антитело представляет собой моноклональное антитело Mab14, продуцируемое гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088. Гибридома 2H9F4B7 депонирована по Будапештскому договору в НККМ (CNCM), Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, СЕДЕКС 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылкой номером I-5158. В еще одном варианте осуществления к поликлональным или моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам или производным, о чем подробно описывается здесь, присоединяют метки в виде детектируемых фрагментов молекулы таким образом, что их можно упаковать и использовать, например, в наборах для выявления клеток, имеющих вышеуказанный антиген, как перед секрецией, так и связанными с рецептором прогастрина. Не ограничивающие объем изобретения.

бретения примеры таких меток включают флуорофоры, такие как флуоресцирующий изотиоционат; хромофоры, радионуклиды, биотин или ферменты. Такие меченые антитела или связывающие фрагменты могут использоваться, например, для гистологической локализации антигена, тИФА (ELISA), сортировки клеток, а также других иммунологических методов для обнаружения или качественного определения прогастрина и клеток, несущие такой антиген. Предпочтительно указанное меченое антитело является антителом, связывающим эпитоп hPG, при этом указанный эпитоп включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности в N-концевой части прогастрина, как описано выше. Более предпочтительно указанное N-концевое антитело является поликлональным антителом, как описано выше. В альтернативном варианте также можно использовать моноклональное антитело, связывающее эпитоп в N-конце прогастрина, такое как, например, N-концевые моноклональные антитела, описанные выше, в частности 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.

Таким образом, в наиболее предпочтительном варианте осуществления набор согласно изобретению содержит:

первое антитело к прогастрину, при этом указанное антитело представляет собой первое антитело к прогастрину и является моноклональным антителом, продуцируемым гибридомой, депонированной в НККМ (CNCM), Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, СЕДЕКС 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылкой номером I-5158; и

второе антитело к прогастрину, причем указанное второе антитело к прогастрину является поликлональным антителом, связывающим эпитоп в N-конце прогастрина, или моноклональным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую следующие три области 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.

Изобретение включает наборы, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или производное являются мечеными.

Реагенты могут представлять собой сухие порошки, обычно лиофилизированные, включающие вспомогательные вещества, которые при растворении дают раствор реагента, имеющий подходящую концентрацию.

Набор содержит антитела для обнаружения и количественного определения прогастрина *in vitro*, например, с помощью тИФА (ELISA) или вестерн-блоттинга. Антитело согласно настоящему изобретению может быть предложено в наборе для обнаружения и количественного определения прогастрина *in vitro*, например, с помощью тИФА (ELISA) или вестерн-блоттинга. В случае, когда к антителу присоединяют метку в виде фермента, набор включает субстраты и кофакторы, необходимые для фермента (например, субстратный прекурсор, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор). В дополнение, могут быть включены другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или лизирующий буфер) и тому подобное. Такой набор может содержать резервуар с возможностью разделения на отсеки для вмещения одного или более контейнеров, таких как флаконы, пробирки и т.п., при этом такие контейнеры используются для хранения отдельных элементов изобретения. Например, один контейнер может содержать первое антитело, связанное с нерастворимым или частично растворимым носителем. Второй контейнер может содержать растворимое, детектируемое по метке второе антитело в лиофилизированной форме или в растворе. Емкость может также содержать третий контейнер для хранения детектируемого по метке третьего антитела в лиофилизированной форме или в растворе. Набор такого рода может быть использован в сэндвич-анализе согласно изобретению. Описание композиции, а также инструкции по предлагаемому использованию *in vitro* или диагностическому использованию могут быть представлены на этикетке или листке-вкладыше.

Также предложены наборы для использования в качестве положительного контроля очистки или иммунопреципитации прогастрина из клеток. Для изоляции и очистки прогастрина набор может содержать антитело, описанное здесь, или его антигенсвязывающий фрагмент или производное, связанное с гранулами (например, гранулы сефарозы). Могут быть предложены наборы, которые содержат антитела для обнаружения или качественного определения прогастрина *in vitro* или *ex vivo*, например, с помощью тИФА (ELISA) или вестерн-блоттинга. Такой набор содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш на упаковке, присоединенную к контейнеру, или на контейнере. В контейнере хранится композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело или его связывающий фрагмент или производное согласно изобретению. Могут быть включены дополнительные контейнеры, которые содержат, например, разбавители и буферы, контрольные антитела. Этикетка или листок-вкладыш на упаковке предлагают описание композиции, а также инструкции для предполагаемого *in vitro* или диагностического использования.

Изобретение также относится к продукту/компьютерной программе, содержащей набор инструкций, характерных для осуществления способа согласно изобретению.

Изобретение также относится к обрабатывающей системе, включающей вычислительный блок и

входной интерфейс, отличающейся тем, что указанная система включает средство для осуществления способа определения риска развития рака в соответствии с изобретением, раскрытым в данном документе.

В сноске к фиг. 13 устройство 1 согласно частному варианту осуществления настоящего изобретения включает вычислительный блок 10, выполненный с возможностью следования компьютерным инструкциям, а также с возможностью обработки данных. Один такой вычислительный блок 10 предпочтительно включает микропроцессор 110 любого типа, известного в уровне техники. Вычислительный блок 10 также имеет блок 100 хранения данных, выполненный с возможностью приема компьютерной программы, включающей набор инструкций, характерных для осуществления способа, а также выполненный с возможностью хранения данных.

Устройство 1 также включает входной интерфейс 12, соединенный с вычислительным блоком 10, обеспечивающим возможность оператору О устройства 1 вводить данные, которые должны быть обработаны. Один такой входной интерфейс 12 включает любой элемент, обеспечивающий возможность ввода таких данных, адресованных вычислительному блоку 10, такой как клавиатурный элемент, при необходимости соединенный с элементом координатно-указательного устройства.

Предпочтительно вычислительный блок 10 дополнительно включает выходной интерфейс 14, такой как экран, который, с одной стороны, обеспечивает возможность пользователю проверять безошибочность введенных данных, а с другой стороны - обеспечивает возможность взаимодействия вычислительного блока 10 с оператором О.

Устройство 1 может быть интегрировано в единую систему, такую как компьютер, смартфон или любую другую систему, известную в уровне техники, обеспечивающую возможность осуществления способа согласно изобретению. Оператор О может иметь любой профессиональный уровень и, таким образом, иметь или не иметь медицинской квалификации.

Частным вариантом осуществления настоящего изобретения в особенности предусмотрено, что данные, введенные оператором О, посылают через сеть (например, интернет), предпочтительно с защищенным доступом, на удаленный сервер, содержащий вычислительный блок, выполненный с возможностью осуществления способа согласно изобретению, и, таким образом, обрабатывать данные, полученные сервером. Необязательно, после указанной обработки сервер возвращает результат анализа пользователю через ту же сеть или через другую сеть. Необязательно, сервер записывает данные и/или результат анализа на записывающем средстве. Несомненно, может быть предусмотрено средство, гарантирующее анонимность физиологических/клинических характеристик донора и реципиента.

Так, одно такое устройство 1 обеспечивает возможность осуществления способа согласно изобретению, т.е. оно обеспечивает возможность осуществления следующих стадий:

ввод физиологических/клинических характеристик с использованием входного интерфейса 12 в вычислительный блок 10, стадия 22, при этом указанные характеристики включают уровень прогастрина в образце 10, стадия 23;

необязательно, нормирование указанного уровня прогастрина через обработку данных вычислительным блоком 10, стадия 24; и

анализ указанной степени риска для определения риска развития рака стадия 25.

Таким образом, способ согласно изобретению может осуществляться не только клиническим или госпитальным персоналом, но также всеми лицами, вовлеченными в клинические исследования (фармацевтическая индустрия, ученые, доктора, итд.), или даже неограниченным кругом лиц.

Следующие примеры представлены здесь исключительно для иллюстрации объема изобретения и содержания раскрытия изобретения. Специалист в данной области техники может разработать и сконструировать многочисленные модификации примеров, перечисленных ниже, не выходя из объема данного изобретения.

Описание фигур

Фиг. 1: ROC-кривая (функциональных характеристик приемника) для колоректального рака (верхняя панель) с площадью под ROC-кривой и статистическим анализом (нижняя панель).

Фиг. 2: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациента с колоректальным раком (n=148) и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, ***p<0,0001.

Фиг. 3: ROC-кривая для гепатоцеллюлярной карциномы (верхняя панель) с площадью под ROC-кривой и статистический анализ (нижняя панель).

Фиг. 4: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациента с колоректальным раком (n=47) и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, ***p<0,0001.

Фиг. 5: ROC-кривая для рака пищевода (верхняя панель) с площадью под ROC-кривой и статистический анализ (нижняя панель).

Фиг. 6: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=12) с раком пищевода и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, ***p<0,0001.

Фиг. 7: ROC-кривая для рака желудка (верхняя панель) с площадью под ROC-кривой и статистический анализ (нижняя панель).

Фиг. 8: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=15) с раком желудка и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, $**p<0,0001$.

Фиг. 9: ROC-кривая для рака поджелудочной железы (верхняя панель) с площадью под ROC-кривой и статистический анализ (нижняя панель).

Фиг. 10: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=44) с раком поджелудочной железы и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, $***p<0,0001$.

Фиг. 11: ROC-кривая для рака яичника (верхняя панель) с площадью под кривой ROC и статистический анализ (нижняя панель).

Фиг. 12: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=8) с раком яичника и у контрольных пациентов (n=103), с использованием комбинации N-концевого поликлонального антитела и C-концевого поликлонального антитела.

Фиг. 13: Схематическое представление обрабатывающей системы согласно частному варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 14: Функциональный граф, представляющий способ согласно частному варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 15: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=231) с различными типами рака и у контрольных пациентов (n=322), с использованием комбинации поликлонального и моноклонального антител.

Фиг. 16: Медианная концентрация прогастрина в плазме у пациентов (n=10) с различными типами рака, с использованием комбинации поликлонального антитела и моноклонального антитела (mAb-pAb) или комбинации моноклональных антител (mAb-mAb) - двухвыборочный критерий Манна-Уитни, NS $p>0,05$.

Примеры

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

Уровень прогастрина в плазме количественно определяли методом тИФА (ELISA) с использованием двух специфичных антител к прогастрину: стенки пластины покрывали посадочными (иммобилизованными) антителами, а антитела для выявления использовали для обнаружения прогастрина и опосредованного выявления сигнала.

В настоящем примере количественное определение основано на способе тИФА (ELISA), который позволяет посредством использования субстрата, при реакции с которым испускается свет, присваивать значение, пропорциональное количеству люминесценции антител, связанных с антигеном, удерживаемым иммобилизованными антителами.

Материал.

Реагенты и оборудование перечислены в табл. 7.

Таблица 7

Название	Поставщик	Ссылка
Планшеты 96-луночные с плоским дном	Dutscher	# 055221

(MaxiSORP, Nunc)		
Карбонат/гидрокарбонат натрия	Sigma	# 21851
Фосфатно-солевой буфер Дюльбекко однократный (1X ФСБ) (DPBS 1X)	Lonza	# P04-36500
Полисорбат Твин-20	Biosolve	# 20452335
Бычий сывороточный альбумин BCA (BSA)	Euromedex	# 04-100-810-C
Стрептавидин-пероксидаза хрена (HRP)	Pierce (Thermo)	# 21130
Субстрат хемилюминесцентный SuperSignal для тИФА (ELISA), максимальной чувствительности (Femto Maximum Sensitivity Substrate)	Pierce (Thermo)	# 37074
Поликлональное антитело к прогастрину	Eurogentec	/

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

Характеристики связывания поликлональных антител к прогастрину, использованных в данном анализе, следующие: отсутствие связывания с G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание с полноразмерным прогастрином.

96-луночные планшеты покрывали следующим образом: готовили раствор карбоната - гидрокарбоната натрия, 50 мМ с pH 9,6 растворением содержимого одной капсулы в 100 мл воды, очищенной с помощью MilliQ. Раствор иммобилизованного антитела (3 мкг/мл), соответствующего поликлональным антителам, полученным с использованием C-концевого прогастрина FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), готовили в карбонатном буфере. 100 мкл раствора антител добавляли в каждую лунку и инкубировали при 4°C в течение 16 ч (1 ночь). Затем блокировали планшеты удалением раствора антитела и 3-кратной промывкой с 300 мкл раствора однократного фосфатно-солевого буфера 1X ФСБ (1X PBS) /0,1% Твин-20, затем добавлением 200 мкл блокирующего буфера (1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20/0,1% БСА) на лунку и инкубировали в течение 2 ч при 22°C. Затем блокирующий буфер удаляли, выполняли 3-кратную отмывку лунок раствором 300 мкл 1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20.

Разбавление плазмы выполняли следующим образом: плазму использовали в чистом виде, разбавленной в 1/2, 1/5 и 1/10. Разбавление готовили из чистой плазмы в растворе 1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20/0,1% БСА.

Для контрольного теста тИФА (ELISA) в присутствии прогастрина известной концентрации разбавление прогастрина готовили следующим образом: исходный раствор рекомбинантного PG (полноразмерный человеческий прогастрин, полученный в E.coli и аффинно очищенный глутатион-агарозой/удалением аффинной метки (вирус гравировки табака (Tev))/аффинной хроматографией на иммобилизованных ионах металла (IMAC counter purification)/диализом, из Института Пастера, Париж, Франция) готовили с концентрацией 0,45 мг/мл (45 мкМ) в трех растворах. Серия концентраций прогастрина готовили следующим образом:

Раствор А: предварительно разбавленный в соотношении 1/10, 2 мкл исходного раствора плюс 18 мкл буфера.

Раствор В: предварительно разбавленный в соотношении 1/100, 10 мкл раствора А плюс 90 мкл буфера.

Раствор С: предварительно разбавленный в соотношении 1/1000, 10 мкл раствора В плюс 90 мкл буфера.

Раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл раствора С плюс 494,5 мкл разбавителя.

Раствор E: 250 пМ, 250 мкл раствора D плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор F: 100 пМ, 200 мкл раствора E плюс 300 мкл разбавителя.

Раствор G: 50 пМ, 250 мкл раствора F плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор H: 25 пМ, 200 мкл раствора G плюс 200 мкл разбавителя.

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

Область рекомбинантного прогастрина является линейной и поэтому может быть более или менее широкой для используемого антитела.

Для приготовления тестовых образцов приблизительно по 500 мкл каждого образца оставляли и сохраняли до анализа (и подтверждения при необходимости) результатов. 100 мкл каждой точки из серии концентраций и/или плазмы анализировали в чистом виде, а также в разбавленном виде в соотношении 1/2, 1/5 и 1/10, и инкубировали в течение 2 ч при 22°C на планшетах.

Для выявления теста выполняли 3-кратную отмывку планшетов 300 мкл раствора 1X ФСБ (1X PBS) /0,1% Твин-20. Раствор поликлональных кроличьих антител к прогастрину, соединенный с биотином до 0,5 мкг/мл, причем указанные антитела получали с использованием N-концевой части прогастрина в качестве иммуногена, готовили разбавлением в 1X ФСБ (1X PBS) /0,1% Твин-20/0,1% БСА (BSA). 100 мкл этого раствора добавляли в каждую лунку. Проводили инкубирование в течение 1 ч при 22°C. Выявление теста с конъюгатом стрептавидин-пероксидазы (HRP) выполняли следующим образом: удаляли детекторное антитело и выполняли 3-кратную отмывку 300 мкл раствора 1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20, затем готовили раствор стрептавидин-пероксидазы с концентрацией 20 нг/мл, разбавленной в 1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20/0,1% БСА (BSA), при этом 100 добавок по 100 мкл данного раствора добавляли в каждую лунку перед инкубацией в течение 1 ч при 22°C.

Обнаружение проводили следующим образом: удаляли стрептавидин-пероксидазу и выполняли 3-кратную отмывку 300 мкл раствора 1X ФСБ (1X PBS)/0,1% Твин-20, затем добавляли 100 мкл раствора хемилюминесцентного субстрата на лунку. Раствор субстрата готовили смешением равных объемов двух растворов SuperSignal ELISA Femto Kit (набор субстрата SuperSignal для тИФА), 20 мл плюс 20 мл, за 30 мин до использования хранили при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию считывали через 5 мин инкубации при комнатной температуре в темноте.

Для каждого условия выполняли тест три раза, результаты для каждой серии представлены в виде графика, показывающего изменение в люминесценции в зависимости от концентрации прогастрина. Для каждого разбавления плазмы концентрацию прогастрина определяли, используя уравнение линейной регрессии для соответствующей серии (серия 1/10 для образца, разбавленного до 1/10).

Способы и результаты.

Уровень прогастрина определяли в образцах плазмы испытуемых, у которых, как стало известно, позднее обнаружили рак. Прогастрин захватывался поликлональными антителами, специфичными к C-концу. Обнаружение выполняли мечеными поликлональными антителами, специфичными к N-концу.

Важно отметить, что на момент отбора образцов у данных испытуемых никогда не диагностировали рак и никогда не проявлялись никакие симптомы рака. Контроль заключался в сборе образцов плазмы от общей популяции.

Результаты показаны на фиг. 1-12. Медианная концентрация прогастрина в плазме составила 17 пМ у пациентов, у которых позже наблюдали развитие колоректального рака (n=148), 100 пМ у пациентов, у которых позже наблюдали развитие гепатоцеллюлярной карциномы (n=47), 42,3 пМ у пациентов, у которых наблюдали развитие рака пищевода (n=12), 17,90 пМ у пациентов, у которых наблюдали развитие рака желудка (n=15), 16,6 пМ у пациентов, у которых наблюдали развитие рака поджелудочной железы (n=44) и 8,45 у пациентов, у которых наблюдали развитие рака яичника (n=8). Для сравнения медианная концентрация прогастрина в плазме у контрольных испытуемых составила 0 пМ (n=103).

Эти данные демонстрируют, что пациенты, у которых будет развиваться рак, имеют детектируемые уровни прогастрина в их плазме, тогда как здоровые контрольные индивиды - нет. Прогастрин можно обнаружить даже до того, как любой тип рака можно будет диагностировать, тем самым делая прогастрин полезным биомаркером возникновения рака. Анализ ROC-кривой подтвердил предсказательную природу прогастрина для каждого из описанного выше типов рака.

Эти данные демонстрируют, что пациенты с риском развития рака имеют более высокую концентрацию прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

Пример 2. Обнаружение концентрации прогастрина в плазме с использованием комбинации поликлональных антител и моноклональных антител.

В настоящем примере уровень прогастрина в плазме количественно определяли методом тИФА (ELISA), используя антитела, специфичные к человеческому прогастрину (hPG), предварительно нанесенному на 96-луночный планшет. Стандарты и образцы добавляли в лунки, и любой присутствующий hPG связывался иммобилизованным антителом. Лунки отмывали и добавляли конъюгаты анти-hPG детекторных антител с пероксидазой хрена (HRP), продуцируя "сэндвич" антитело-антиген-антитело. После второй отмывки добавляли раствор субстрата ТМБ (тетраметилбензидин), который продуцирует голубой цвет в прямой пропорции к количеству hPG, присутствующему в первоначальном образце. После изменения цвета с голубого на желтый с помощью стоп-реагента считывали лунки при 450 нм микропланшетным ридером.

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

Моноклональные антитела получали с использованием гибридом, продуцирующих антитела к N-концевому прогастрину (SEQ ID NO: 2) или к C-концевому прогастрину, соответствующему аминокислотам 71-80 hPG и имеющему последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), согласно стандартным протоколам.

Характеристики связывания поликлональных и моноклональных антител к прогастрину, использованного в данном анализе, следующие: отсутствие связывания к G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание к полноразмерному прогастрину.

Для контрольного теста тИФА (ELISA) в присутствии известной концентрации прогастрина разбавление прогастрина готовили следующим образом: исходный раствор рекомбинантного PG (полноразмерный человеческий прогастрин, полученный в E.coli и аффинно очищенный глутатион-агарозой/удалением аффинной метки (вирус гравировки табака T_{ev})/аффинной хроматографией на иммобилизованных ионах металла (IMAC counter purification)/и диализом, из Института Пастера, Париж, Франция) готовили с концентрацией 0,45 мг/мл (45 мкМ) в трех растворах. Серии концентраций прогастрина готовили следующим образом:

Раствор А: предварительно разбавленный в соотношении 1/10, 2 мкл исходного раствора плюс 18 мкл буфера.

Раствор В: предварительно разбавленный в соотношении 1/100, 10 мкл раствора А плюс 90 мкл буфера.

Раствор С: предварительно разбавленный в соотношении 1/1000, 10 мкл раствора В плюс 90 мкл буфера.

Раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл раствора С плюс 494,5 мкл разбавителя.

Раствор E: 250 пМ, 250 мкл раствора D плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор F: 100 пМ, 200 мкл раствора E плюс 300 мкл разбавителя.

Раствор G: 50 пМ, 250 мкл раствора F плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор H: 25 пМ, 200 мкл раствора G плюс 200 мкл разбавителя.

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

Область рекомбинантного PG является линейной и поэтому может быть более или менее широкой для используемого антитела.

Способы и результаты.

Уровни прогастрина определяли в образцах плазмы испытуемых, у которых, как стало известно, позднее обнаружили рак. Прогастрин захватывался C-концевым моноклональным антителом mAb14, продуцируемым гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088 (гибридома 2H9F4B7 депонирована по Будапештскому Договору в НККМ (CNCM), Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, СЕДЕКС 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылкой номером I-5158.). Обнаружение выполняли мечеными поликлональными антителами, специфичными к N-концу.

Важно отметить, что на момент отбора образцов у данных испытуемых не диагностировали рак и не проявлялись симптомы, относящиеся к раку. Контроль заключался в сборе образцов плазмы от общей популяции.

Результаты показаны на фиг. 15. Медианная концентрация прогастрина в плазме распределилась между 2,750 и 21,5 пМ у пациентов в зависимости от типа рака (n=231). Для сравнения, медианная концентрация прогастрина в плазме у контрольных испытуемых (n=322) составила 0 пМ.

Эти данные демонстрируют, что пациенты имеют детектируемый уровень прогастрина в плазме, если у них будет развиваться рак, в то время как здоровые контрольные индивиды - нет. Прогастрин можно обнаружить даже до того, как рак можно будет диагностировать, тем самым делая прогастрин полезным биомаркером возникновения рака.

Эти данные демонстрируют, что пациенты с риском развития рака имеют более высокую концентрацию прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

Пример 3. Обнаружение концентрации прогастрина в плазме с использованием комбинации моноклональных антител.

В настоящем примере уровень прогастрина в плазме количественно определяли с помощью тИФА (ELISA), используя антитело, специфичное к человеческому прогастрину (hPG), предварительно нанесенному на 96-луночный планшет. Стандарты и образцы добавляли в лунки, и любой присутствующий hPG связывался с иммобилизованным посадочным антителом. Лунки отмывали и добавляли конъюгаты анти-hPG детекторных антител с пероксидазой хрена (HRP), получая "сэндвич" антитело-антиген-антитело. После второй отмывки добавляли раствор субстрата ТМБ, продуцирующий голубой цвет в прямой пропорции к количеству hPG, присутствующему в первоначальном образце. После изменения цвета с голубого на желтый с помощью стоп-реагента считывали лунки при 450 нм микропланшетным ридером.

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

Моноклональные антитела получали с использованием гибридом, продуцирующих антитела к

N-концевому прогастрину (SEQ ID NO: 2) или к С-концевому прогастрину, соответствующему аминокислотам 71-80 hPG и имеющему последовательность FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), согласно стандартным протоколам.

Характеристики связывания поликлональных и моноклональных антител к прогастрину, использованных в данном анализе, следующие: отсутствие связывания к G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, связывание к полноразмерному прогастрину.

Для контрольного теста тИФА (ELISA) в присутствии известной концентрации прогастрина разбавление прогастрина готовили следующим образом: исходный раствор рекомбинантного PG (полноразмерный человеческий прогастрин, полученный в *E.coli* и аффинно очищенный глутатион-агарозой/удалением аффинной метки (вирус гравировки табака Tenv)/аффинной хроматографией на иммобилизованных ионах металла (IMAC counter purification)/диализом, из Института Пастера, Париж, Франция) готовили с концентрацией 0,45 мг/мл (45 мкмоль/мл) в трех растворах. Серии концентраций прогастрина готовили следующим образом:

Раствор А: предварительно разбавленный в соотношении 1/10, 2 мкл исходного раствора плюс 18 мкл буфера.

Раствор В: предварительно разбавленный в соотношении 1/100, 10 мкл раствора А плюс 90 мкл буфера.

Раствор С: предварительно разбавленный в соотношении 1/1000, 10 мкл раствора В плюс 90 мкл буфера.

Раствор D: 500 пМ, 5,55 мкл раствора С плюс 494,5 мкл разбавителя.

Раствор E: 250 пМ, 250 мкл раствора D плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор F: 100 пМ, 200 мкл раствора E плюс 300 мкл разбавителя.

Раствор G: 50 пМ, 250 мкл раствора F плюс 250 мкл разбавителя.

Раствор H: 25 пМ, 200 мкл раствора G плюс 200 мкл разбавителя.

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

Область рекомбинантного PG является линейной и поэтому может быть более или менее широкой для используемого антитела.

Способы и результаты.

Уровень прогастрина определяли в образцах плазмы испытуемых, у которых, как стало известно, позднее обнаружили рак. Прогастрин захватывался С-концевым моноклональным антителом mAb14, продуцируемым гибридомой 2H9F4B7, описанной в WO 2011/083088 (гибридома 2H9F4B7 депонирована по Будапештскому Договору в НККМ (CNCM) Институт Пастера, 25-28 ул. Docteur Roux, 75724, Париж, СЕДЕКС 15, Франция, 27 декабря 2016 г., под ссылкой номером I-5158.). Обнаружение выполняли мечеными моноклинальными антителами mAb16, описанными в WO 2011/083088, специфичными к N-концу.

Важно отметить, что на момент сбора образца у данных испытуемых не диагностировали рак и не проявлялись симптомы, относящиеся к раку. Контроль заключался в сборе образцов плазмы у общей популяции.

Результаты показаны на фиг. 16. Медианная концентрация прогастрина в плазме, полученная с использованием mAb-pAb и mAb-mAb, была одинаковой для медианы (8,2 по сравнению с 6,6 пМ соответственно) и математического ожидания (18,99 по сравнению с 16,79 пМ) соответственно (n=10).

Эти данные демонстрируют, что сэндвич-тесты тИФА (ELISA) как с использованием mAb-pAb, так и с использованием mAb-mAb позволяют обнаружить прогастрин в плазме пациентов. Важно отметить, что существенного различия в результатах двух тестов выявлено не было. В частности, чувствительность сэндвичей mAb-pAb и mAb-mAb была одинаково высокой. Поэтому сэндвич тИФА (ELISA) mAb-mAb можно надежно использовать для обнаружения прогастрина в плазме пациента еще до того, как у него диагностируют рак, делая прогастрин полезным биомаркером возникновения рака.

Эти данные демонстрируют, что пациенты с риском развития рака имеют более высокую концентрацию прогастрина в их плазме по сравнению со здоровыми контрольными индивидами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки риска возникновения рака у испытуемого человека, у которого ранее не диагностировали рак, включающий стадии:

- а) определение уровня прогастрина в образце указанного испытуемого, включающего:
 - приведение в контакт указанного образца по меньшей мере с моноклональным антителом Mab14, продуцированным гибридомой, депонированной в CNCM под ссылкой номером I-5158, и
 - измерение связывания указанного моноклонального антитела с прогастрином; и
- б) определение риска того, что у указанного испытуемого будет развиваться рак, на основании уровня стадии (а), посредством сравнения уровня стадии (а) с эталонным уровнем, где указанный эталонный уровень составляет 0 пМ.

2. Способ по п.1, где стадия (а) определения включает приведение в контакт указанного образца

дополнительно по меньшей мере с одной другой связывающей прогастрин молекулой, при этом указанная связывающая прогастрин молекула связывается с частью прогастрина, которая не связана Mab14.

3. Способ по п.2, где указанная другая связывающая прогастрин молекула представляет собой анти-тело к прогастрину или его антигенсвязывающий фрагмент.

4. Способ по п.3, где указанное антитело связывает N-конец прогастрина.

5. Способ по п.3 или 4, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело.

6. Способ по любому из пп.3-5, где указанное моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из:

моноклонального антитела mAb3, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три определяющие комплементарность области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

моноклонального антитела mAb4, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1 CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

моноклонального антитела mAb16, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно; и

моноклонального антитела mAb19, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно.

7. Способ по любому из пп.3-6, где моноклональное антитело Mab14 связано с нерастворимым или частично растворимым носителем, а ко второму антителу присоединяют метку в виде детектируемого фрагмента молекулы.

8. Способ по любому из пп.3-7, где уровень прогастрина определяют на стадии (а) с помощью твердофазного иммуоферментного анализа тИФА (ELISA).

9. Способ по любому из пп.1-8, где биологический образец выбирают из крови, сыворотки крови и плазмы.

10. Набор для оценки риска возникновения рака, отличающийся тем, что содержит моноклональное антитело Mab14, продуцированное гибридомой, депонированной в CNCM под ссылкой номером I-5158.

11. Набор по п.10, содержащий:

первое антитело к прогастрину, причем указанное первое антитело к прогастрину является моноклональным антителом Mab14, продуцированным гибридомой, депонированной в CNCM под ссылкой номером I-5158; и

дополнительно второе антитело к прогастрину, причем указанное второе антитело к прогастрину представляет собой:

поликлональное антитело, связывающее N-конец прогастрина, или

моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из:

моноклонального антитела mAb3, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

моноклонального антитела mAb4, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 11 и 12 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

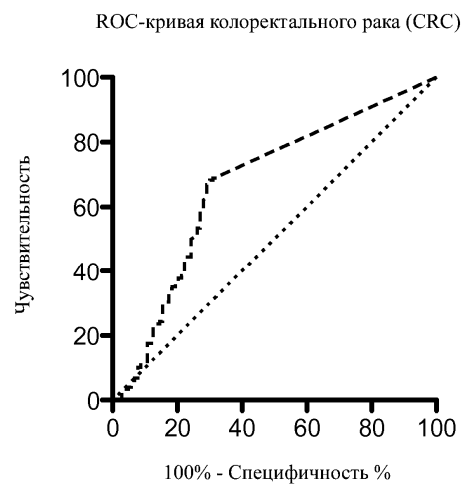
моноклонального антитела mAb16, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 19, 20 и 21 соответственно; и

моноклонального антитела mAb19, содержащего тяжелую цепь, содержащую следующие три области CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 22, 23 и 24 соответственно, и легкую цепь, содержащую следующие три области CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно.

12. Блок хранения данных, включающий компьютерную программу, содержащую набор инструкций, характерных для осуществления способа по любому из пп.1-9.

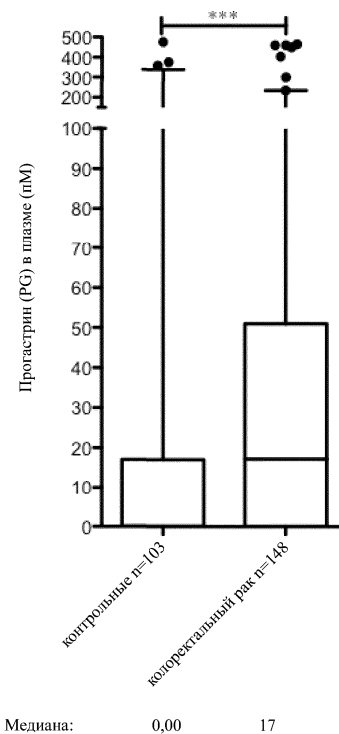
13. Обработка система, включающая вычислительный блок и входной интерфейс, где ука-

занная система включает средства для осуществления способа по любому из пп.1-9.

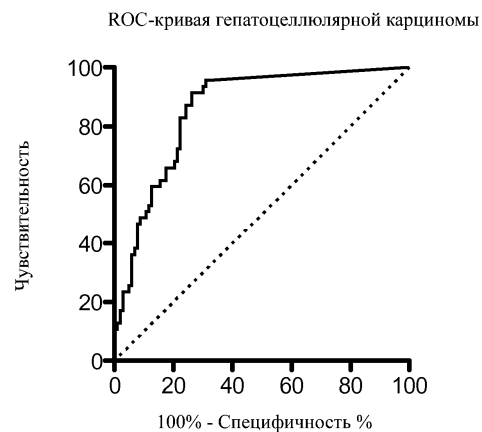


	Результаты
Площадь	0,6694
Стандартная ошибка среднего	0,03583
95% -доверительный интервал	0,5992-0,7396
P-значение	<0,0001
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (КРК n=148)	148

Фиг. 1

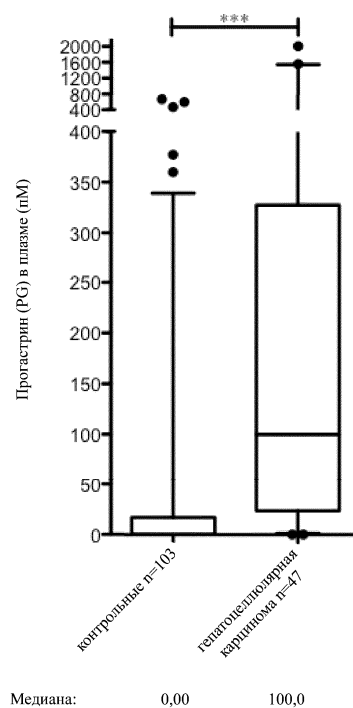


Фиг. 2

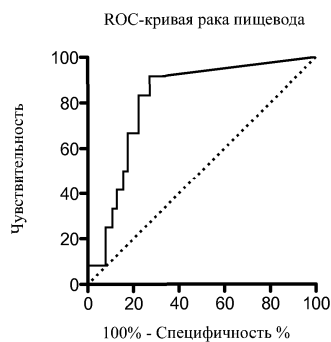


	Результаты
Площадь	0,8564
Стандартная ошибка среднего	0,03138
95% -доверительный интервал	0,7949-0,9180
P-значение	<0,0001
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (гепатоцеллюлярная карцинома = 47)	47

Фиг. 3

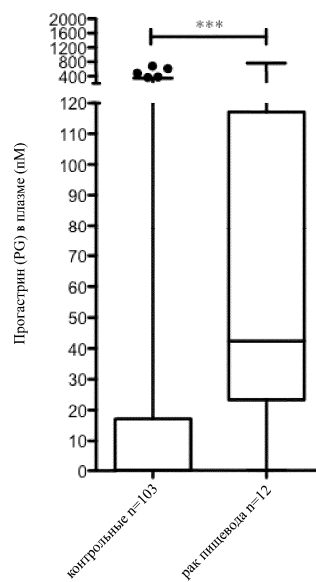


Фиг. 4



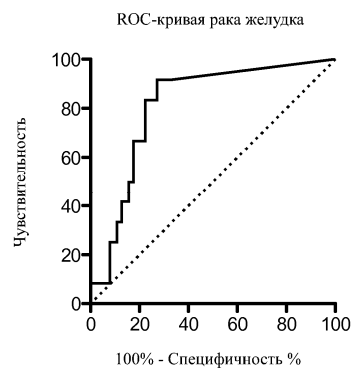
	Результаты
Площадь под ROC-кривой	
Площадь	0,8103
Стандартная ошибка среднего	0,05653
95% - доверительный интервал	0,6995-0,9211
P-значение	<0,0004547
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (эзофагеальный рак n=12)	12

Фиг. 5



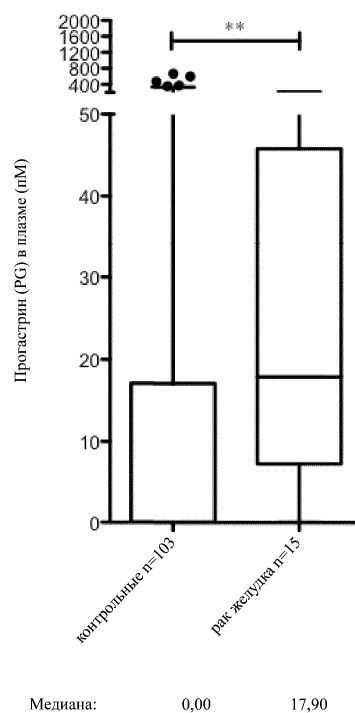
Медиана: 0,00 42,3

Фиг. 6



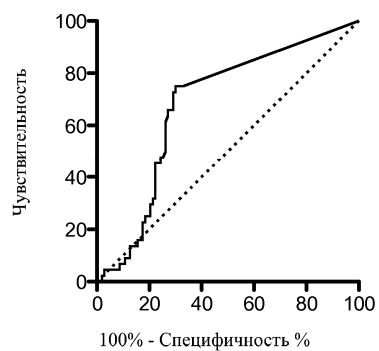
	Результаты
Площадь	0,7013
Стандартная ошибка среднего	0,06379
95% - доверительный интервал	0,5762-0,8264
P-значение	0,01202
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (рак желудка n=15)	15

Фиг. 7



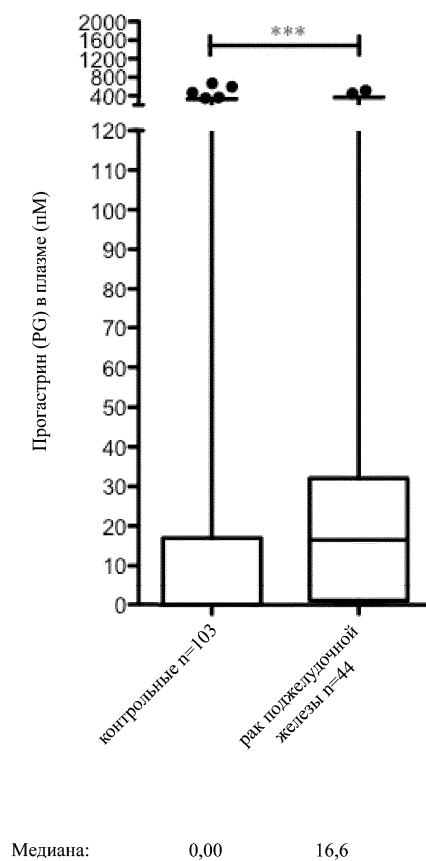
Фиг. 8

ROC-кривая рак поджелудочной железы

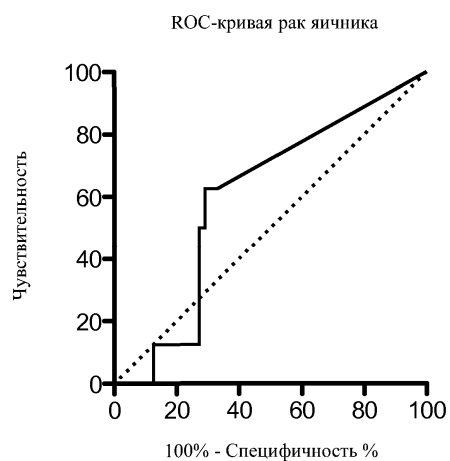


	Результаты
Площадь	0,6782
Стандартная ошибка среднего	0,04704
95% - доверительный интервал	0,5860-0,7704
Р-значение	0,0006417
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (рак поджелудочной железы n=44)	44

Фиг. 9

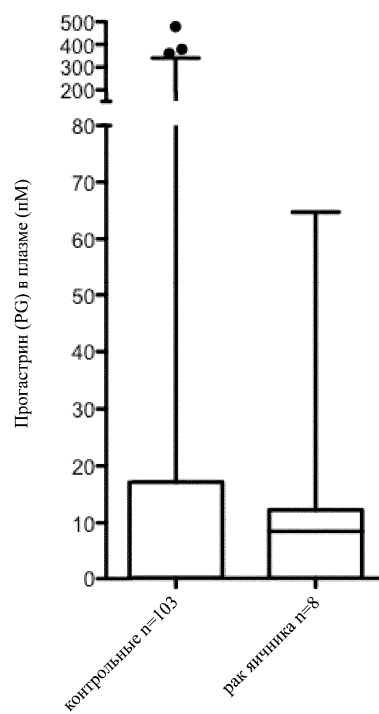


Фиг. 10



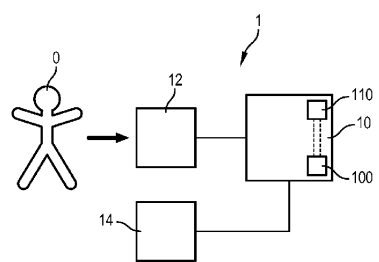
	Результаты
Площадь под ROC-кривой	
Площадь	0,5965
Стандартная ошибка среднего	0,09156
95% -доверительный интервал	0,4170-0,7760
P-значение	0,3647
Данные	
Контрольные (контрольные n=103)	103
Пациенты (овариальный рак n=8)	8

Фиг. 11

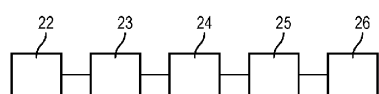


Медиана: 0,00 8,45

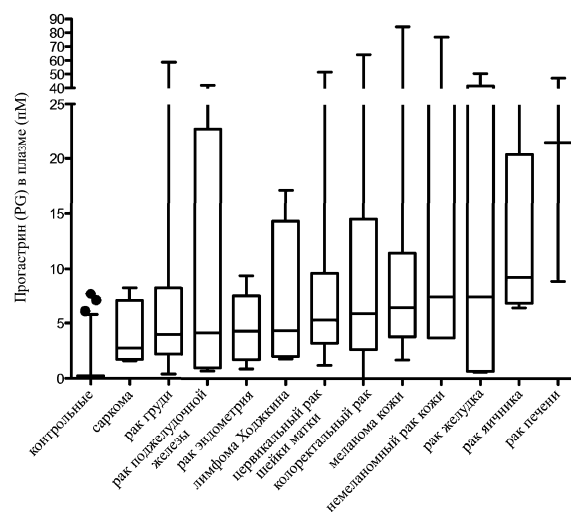
Фиг. 12



Фиг. 13

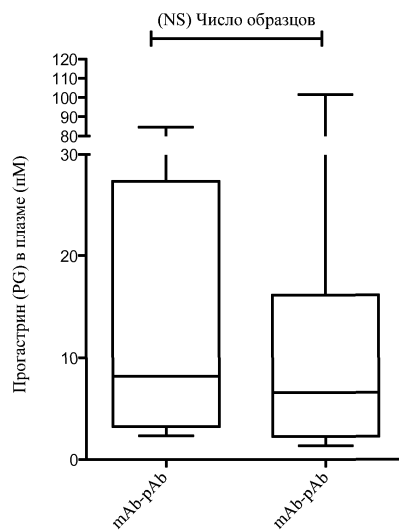


Фиг. 14



	Число образцов	Медиана
контрольные	322	0,000
саркома	4	2,750
рак груди	65	4,000
рак поджелудочной железы	6	4,150
рак эндометрия	5	4,300
лимфома Ходжкина	4	4,350
цервикальный рак	25	5,300
колоректальный рак	52	5,900
меланома кожи	46	6,450
немеланомный рак кожи	9	7,400
рак желудка	4	7,400
рак яичника	8	9,250
рак печени	3	21,50

Фиг. 15



	mAb-pAb	mAb-pAb
Число образцов	10	10
Медиана	8,200	6,600
Математическое ожидание	18,99	16,79

Фиг. 16

