



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108780091 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780013872.3

(22)申请日 2017.01.02

(30)优先权数据

15307192.3 2015.12.31 EP

16305138.6 2016.02.05 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/050033 2017.01.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/114972 EN 2017.07.06

(71)申请人 普莱戈斯瑞恩癌症有限责任公司

地址 卢森堡卢森堡市

(72)发明人 A·普里厄

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

C07K 16/26(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书3页 说明书23页

序列表10页 附图2页

(54)发明名称

用于检测和治疗卵巢癌的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及用于体外诊断卵巢癌的方法,和涉及用于预防或治疗卵巢癌的组合物和方法,其中所述组合物包含结合前胃泌素的抗体并且所述方法包括使用结合前胃泌素的抗体。

1. 一种用于体外诊断受试者中卵巢癌的方法,其包括以下步骤:
 - a) 使来自所述受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触,
 - b) 检测所述前胃泌素结合分子与所述样品中前胃泌素的结合,其中所述结合表明所述受试者中存在卵巢癌。
2. 权利要求1的方法,其中步骤b) 进一步包括确定前胃泌素浓度的步骤,并且其中所述生物样品中至少5pM的前胃泌素浓度表明所述受试者中卵巢癌的存在。
3. 权利要求2的方法,其包括以下另外的步骤:
 - c) 确定参考样品中前胃泌素的参考浓度,
 - d) 比较所述生物样品中前胃泌素的浓度与所述前胃泌素参考浓度,
 - e) 从步骤d) 的比较来确定卵巢癌的存在。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述前胃泌素结合分子是抗体,或其抗原结合片段。
5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合分子选自N末端抗前胃泌素单克隆抗体和C末端抗前胃泌素单克隆抗体。
6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述与前胃泌素结合的抗体是选自下组的单克隆抗体:
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列4、5和6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列7、8和9的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列10、11和12的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列13、14和15的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列16、17和18的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列19、20和21的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列22、23和24的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列25、26和27的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列28、29和30的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列31、32和33的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,和
 - 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列34、35和36的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列37、38和39的

CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述生物样品与结合前胃泌素第一部分的第一个分子和结合前胃泌素的第二部分的第二分子接触。

8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中生物样品选自:血液、血清和血浆。

9. 权利要求1-9中任一项的方法,其中所述生物样品是血浆,并且其中至少5pM的前胃泌素浓度表明所述受试者中卵巢癌的存在。

10. 一种用于在预防或治疗卵巢癌中使用的组合物,其中所述组合物包含前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段。

11. 权利要求10的组合物,其中所述前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段选自人源化抗体、单链抗体、骆驼化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体和IgM抗体。

12. 权利要求10或11中任一项的组合物,其中所述前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段选自N末端抗前胃泌素抗体和C末端抗前胃泌素抗体。

13. 权利要求10-12中任一项的组合物,其中所述前胃泌素结合分子或其抗原结合片段是中和抗体。

14. 权利要求10-13中任一项的组合物,其中所述前胃泌素结合分子是选自以下的人源化抗体:

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列号4、5和6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列号7、8和9的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列10、11和12的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列13、14和15的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列16、17和18的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列19、20和21的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列22、23和24的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列25、26和27的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列28、29和30的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列31、32和33的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,和

- 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列34、35和36的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含

以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列37、38和39的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

15. 权利要求10-14中任一项中所述的前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于体外诊断卵巢癌用途。

用于检测和治疗卵巢癌的组合物和方法

[0001] 前言

[0002] 本发明涉及癌症的体外诊断、预防和治疗,更具体地其涉及用于体外诊断卵巢癌的方法、和涉及用于预防和治疗卵巢癌的方法和组合物。根据本发明的组合物包含前胃泌素结合分子,特别是抗hPG抗体,而根据本发明的方法包括使用前胃泌素结合分子,并且特别是抗hPG抗体。

[0003] 卵巢癌起源于喉咙和胃之间的区域中的卵巢细胞,且已经被描述为第八位最常见癌症,对男性的影响超过女性,且在各国间的比例差异很大。

[0004] 卵巢癌的两大最常见类型是卵巢鳞状细胞癌和卵巢腺癌。还已知许多更罕见的亚型。鳞状细胞癌起源于食管的上皮细胞,而腺癌起源于存在于食管下部的腺细胞。

[0005] 临床诊断基于在计算机断层扫描或超声波下进行的活组织检查。此疾病的不良结果特别是由于晚期诊断,特别是由于没有早期迹象和症状。迄今为止,没有已经转变为卵巢癌广泛临床实践的分子生物标记物(Kaz et al., Cancer Letters, 2014)。治疗取决于该癌症的发展,且通常包括用于小局部肿瘤的手术,或者化疗,可能与放射疗法组合。

[0006] 因此,仍然存在对于允许快速、可靠和成本划算的卵巢癌诊断的方法的需求,同时仍然存在对于新的用于预防和治疗卵巢癌的组合物和方法的需求。说明

[0007] 这是本发明的目的。

[0008] 现在本发明提供了用于体外诊断卵巢癌的方法,其中所述方法包括在来自受试者的生物样品中检测前胃泌素。优选地,确定所述样品中前胃泌素的量,因此允许前胃泌素的量化。本发明还提供一种用于预防或治疗卵巢癌的组合物,其中所述组合物包含与前胃泌素结合的抗体,和用于预防或治疗卵巢癌的方法,所述方法包括单独或与任何其它已知的针对卵巢癌的预防或治疗方法组合使用包含与前胃泌素结合的抗体的组合物。

[0009] 人前胃泌素原,一种101个氨基酸的肽(氨基酸序列参考号:AAB19304.1),其为胃泌素基因的初级翻译产物。前胃泌素通过从前胃泌素原切割前21个氨基酸(信号肽)而形成。前胃泌素的80个氨基酸的链被切割和修饰酶进一步处理成一些生物活性的胃泌素激素形式:包含前胃泌素的第38-71位氨基酸的胃泌素34 (G34) 和甘氨酸延伸的胃泌素34 (G34-Gly),包含前胃泌素的第55-71位氨基酸的胃泌素17 (G17) 和甘氨酸延伸的胃泌素17 (G17-Gly)。

[0010] 抗人前胃泌素(抗-hPG)单克隆抗体和其用于诊断或治疗的用途已经在以下文件中描述:用于结肠直肠癌的WO 2011/083 088,用于乳腺癌的WO 2011/083 090,用于胰腺癌的WO 2011/083 091,用于结肠直肠癌和胃肠癌的WO 2011/116 954,和用于肝脏病理的WO 2012/013 609和WO 2011/083089。

[0011] 从本文给出的详细描述和附图将会更加全面地理解本发明,其仅通过示例性说明的方式给出,并且不限制本发明的预期范围。

[0012] 在第一方面,本发明涉及一种用于体外评价卵巢癌存在风险的方法,其中所述方法包括检测来自受试者的生物样品中前胃泌素的步骤。样品中存在孕酮指示有存在卵巢癌的风险。本发明者首次表明卵巢癌患者中的前胃泌素水平在比健康受试者中的更高。相反

地,先前的研究得出的结论是卵巢胃泌素表达的生理意义难以评估。

[0013] 因此,在第一个实施方案中,本发明涉及一种用于评价受试者中存在卵巢癌的风险的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0014] a) 使来自所述受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触,和

[0015] b) 检测所述前胃泌素结合分子与所述样品中的前胃泌素的结合,其中所述结合指示存在卵巢癌的风险。

[0016] 可以通过本领域技术人员可得的多种测定检测前胃泌素结合分子的结合。虽然任何适当的用于执行该测定的方法都包括在本发明中,但是可以特别提到的是FACS、ELISA、RIA、western印迹和IHC。

[0017] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的用于体外评价受试者中存在卵巢癌的风险的方法包括以下步骤:

[0018] a) 使所述生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触,和

[0019] b) 确定所述生物样品中前胃泌素的浓度,其中所述生物样品中至少10pM的前胃泌素浓度指示存在卵巢癌的风险。

[0020] 一旦确定了样品中存在的前胃泌素的浓度,将该结果与以与测试样品类似的方式获得的但是来自已知患有卵巢癌的个体的对照样品中的前胃泌素浓度进行比较。如果测试样品中的前胃泌素的浓度显著更高,可以得出结论,该样品所来源的受试者患有卵巢癌的可能性增加。

[0021] 因此,在一个更优选的实施方案中,本发明的方法进一步包括以下另外的步骤:

[0022] c) 确定参考样品中前胃泌素的参考浓度,

[0023] d) 比较所述生物样品中前胃泌素的浓度与所述前胃泌素参考浓度,

[0024] e) 从步骤d) 的比较来评价存在卵巢癌的风险。

[0025] 根据另一方面,本发明涉及一种用于受试者中卵巢癌诊断的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0026] a) 使来自所述受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触,和

[0027] b) 检测所述前胃泌素结合分子与所述样品中的前胃泌素的结合,其中所述结合指示所述受试者中卵巢癌的存在。

[0028] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种用于受试者中卵巢癌的体外诊断的方法,其包括以下步骤:

[0029] a) 使所述生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触,和

[0030] b) 确定所述生物样品中前胃泌素的浓度或浓度,其中所述生物样品中至少5pM的前胃泌素浓度指示所述受试者中卵巢癌的存在。

[0031] 在根据本发明的一个方法的一个更具体的实施方案中,所述生物样品中至少5pM, 10pM, 至少20pM, 至少30pM的前胃泌素浓度指示所述受试者中卵巢癌的存在。

[0032] 在一个更优选的实施方案中,本发明的方法包括以下另外的步骤:

[0033] c) 确定参考样品中的前胃泌素参考浓度,

[0034] d) 比较所述生物样品中前胃泌素的浓度与所述前胃泌素参考水平或浓度,

[0035] e) 从步骤d) 的比较来诊断卵巢癌的存在。

[0036] 根据另一方面,本发明涉及一种用于诊断受试者中转移性卵巢癌的体外方法,所

述方法包括以下步骤：

[0037] a) 使来自所述受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触，和

[0038] b) 检测所述前胃泌素结合分子与所述样品中的前胃泌素的结合，其中所述结合指示所述受试者中存在转移的卵巢癌。

[0039] 在一个优选的实施方案中，本发明涉及一种用于在受试者中从所述受试者的生物样品体外诊断转移的卵巢癌的方法，其包括以下步骤：

[0040] a) 使所述生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触，和

[0041] b) 通过生物化学测定确定所述生物样品中前胃泌素的水平或浓度，其中所述生物样品中至少5pM或更高的前胃泌素浓度指示所述受试者中转移的卵巢癌的存在。

[0042] 在根据本发明的一个方法的一个更具体的实施方案中，在所述生物样品中至少5pM, 10pM, 至少20pM, 至少30pM, 至少40pM或至少50pM的前胃泌素浓度指示所述受试者中存在转移的卵巢癌。

[0043] 在一个更优选的实施方案中，本发明的方法包括以下另外的步骤：

[0044] c) 确定参考样品中的前胃泌素参考浓度，

[0045] d) 比较所述生物样品中前胃泌素的浓度与所述前胃泌素参考浓度或水平，

[0046] e) 从步骤d) 的比较来诊断存在转移的卵巢癌。

[0047] 在一个具体的实施方案中，本发明涉及一种用于受试者中卵巢癌的体外诊断的方法，其包括确定生物样品中前胃泌素的浓度和比较所述获得的值与参考样品中前胃泌素的浓度。

[0048] 在一个更具体地实施方案中，在根据本发明的一种用于诊断卵巢癌的方法中，使所述受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触，其中所述前胃泌素结合分子是抗体或其抗原结合片段。

[0049] 表述“评价受试者中存在卵巢癌的风险”是指当与参考受试者或参考值相比时，确定给定受试者患卵巢癌的相对概率。根据本发明的方法表示评价所述风险的工具，其与其它方法或指标例如临床检查、活组织检查和确定卵巢癌的已知生物标志物的水平相结合。

[0050] 根据具体的实施方案，本发明涉及卵巢癌的体外诊断方法，其包括确定来自受试者的生物样品中前胃泌素的浓度，其中受试者表现出卵巢癌的至少一个临床症状。卵巢癌的临床症状包括体重减轻、疼痛或吞咽困难、咳嗽、消化不良和胃灼热。

[0051] 根据另一个具体的实施方案，本发明涉及卵巢癌的体外诊断方法，其包括确定来自受试者的生物样品中前胃泌素的浓度，其中所述受试者表现出癌症和/或转移性癌症的至少一个临床症状。

[0052] 表述“体外诊断”意指确定受试者是否患有特定感染 (affection)。

[0053] 因此，根据本发明的一种用于体外诊断卵巢癌的方法可以被认为是在诊断过程中的一个工具。

[0054] 在一个更具体的实施方案中，本发明涉及一种用于受试者中卵巢癌体外诊断的方法，其包括确定所述生物样品中前胃泌素的浓度和确定卵巢癌的已知的生物标志物。

[0055] 术语“前胃泌素”是指哺乳动物前胃泌素肽，特别是人前胃泌素。为避免疑义，不需要任何说明，表述“人前胃泌素”是指序列序列1的人PG。人前胃泌素明显包含N末端和C末端结构域，该N末端和C末端在上文提及的生物活性胃泌素激素形式中不存在。优选地，所述N

末端结构域的序列由序列2表示。在另一个优选的实施方案中,所述C末端结构域的序列由序列3表示。

[0056] 在根据本发明的方法中,前胃泌素浓度的确定通过生物化学领域的普通技术人员已知的任何方法进行。

[0057] 优选地,确定样品中前胃泌素的浓度包括使所述样品与前胃泌素结合分子接触,和测定所述前胃泌素结合分子与前胃泌素的结合。

[0058] 当在蛋白质水平测定表达水平时,尤其可以使用特异性前胃泌素结合分子,诸如例如抗体,具体地使用公知的技术,诸如使用生物素化的细胞膜染色或其他相当的技术,然后用特异性抗体免疫沉淀、蛋白质印迹、ELISA或ELISPOT、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、抗体微阵列或组织微阵列联合免疫组织化学进行。其他合适的技术包括FRET或BRET,其使用单个或多个激发波长的单细胞显微术或组织化学方法,并应用任何适合的光学方法,诸如电化学方法(伏安法和电流分析技术),原子力显微镜和射频方法,例如,多极共振谱,共焦和非共焦,检测荧光、发光、化学发光、吸光度、反射率、透射率和双折射率或折射率(例如,表面等离子共振、椭圆偏振法、共振镜面法、光栅耦合器波导法或干涉测量法),细胞ELISA,流式细胞术,放射性同位素,磁共振成像,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析;HPLC-质谱法;液相色谱/质谱/质谱(LC-MS/MS)。所有这些技术是本领域公知的,并且在此不需要进一步详述。这些不同技术可用来测定前胃泌素水平。

[0059] 特别是,所述方法可以选自:基于免疫检测的方法、基于蛋白质印迹的方法、基于质谱的方法、基于色谱的方法和基于流式细胞术的方法。虽然任何合适的用于实施该测定的方法都包括在本发明中,但是诸如FACS、ELISA、RIA、蛋白质印迹和IHC方法用于执行本发明的方法是特别有用的。

[0060] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的用于体外诊断卵巢癌的方法包括使用免疫酶测定,优选基于选自RIA和ELISA的技术的免疫酶测定,使来自受试者的生物样品与前胃泌素结合分子接触。

[0061] 如本文所使用的“生物样品”是含有核酸或多肽(例如卵巢癌蛋白质的核酸或多肽)、多核苷酸或转录物的生物组织或液体的样品。这样的样品必须允许确定前胃泌素的表达水平。已知前胃泌素为分泌性蛋白。因此,用于确定前胃泌素蛋白的水平的优选的生物样品包括生物液体。如本文所使用的“生物液体”意指包含生物来源的物质的任何液体。用于本发明的优选的生物液体包括动物(例如哺乳动物,优选人受试者)的体液。体液可以是任何体液,包括但不限于血液、血浆、血清、淋巴液、脑脊髓液(CSF)、唾液、汗液和尿液。优选地,所述优选的液体生物样品包括诸如血液样品、血浆样品或血清样品的样品。更优选地,该生物样品为血液样品。实际上,这样的血液样品可通过完全无害地从患者中进行血液收集而获得,并且因此允许非侵入性评估受试者发生肿瘤的风险。

[0062] 当癌症是实体癌症时,如本文所使用的“生物样品”还包括待测试的患者的实体癌症样品。这样的实体癌症样品允许本领域技术人员对本发明的生物标志物的水平进行任何类型的测定。在一些情况下,根据本发明的方法可进一步包括从患者中取得实体癌症样品的预备步骤。“实体癌症样品”指肿瘤组织样品。即使在癌性患者中,肿瘤位置的组织仍包含非肿瘤的健康组织。因此“癌症样品”应该局限于从患者中取得的肿瘤组织。所述“癌症样

品”可以是活组织检查样品或从外科手术切除治疗中取得的样品。

[0063] 生物样品通常从真核生物体获得,最优选哺乳动物、鸟、爬行动物或鱼。事实上,可以经受本文所述的方法的“受试者”可以是任何哺乳动物,包括人、狗、猫、牛、山羊、猪(pig)、猪(swine)、绵羊和猴子;或鸟;爬行动物;或鱼。优选地,受试者是人类;人受试者可以被称为“患者”。

[0064] 在本文中“获得生物样品”意指获得用于本发明中所述的方法中的生物样品。最经常地,这会通过从动物中移出细胞样品来完成,但还可以通过使用以前分离的细胞(例如,由另一个人、在另一时间和/或用于另一目的分离的)或通过在体内进行本发明的方法来完成。具有治疗或结果历史的档案组织会是特别有用的。

[0065] 该样品可以根据本领域技术人员已知的方法获得并且如果需要的话根据本领域技术人员已知的方法制备。特别是,本领域公知,样品应该从空腹受试者提取。

[0066] 前胃泌素浓度的确定涉及确定已知体积的样品中前胃泌素的量。前胃泌素浓度可以相对于参考样品来表示,例如表示为比率或百分数。该浓度还可以表示为信号的强度或定位,这取决于用于确定所述浓度的方法。优选地,在标准化所述样品中相关化合物的总浓度之后再表示样品中一种化合物的浓度,例如标准化样品中蛋白质的总浓度之后再表示一种蛋白质的水平或浓度。

[0067] 优选地,通过将在所述生物样品中测定的前胃泌素的水平与参考水平进行比较,来确定所述受试者患卵巢癌的风险。

[0068] 本文所使用的术语“参考水平”指在参考样品中考虑的癌症标志物(即前胃泌素)的表达水平。如本文所使用的“参考样品”意指从已知不患有所述疾病的受试者,优选两个或更多个受试者,或可选地从一般群体中获得的样品。前胃泌素的合适的参考表达水平可通过测定一些合适的受试者中所述标志物的表达水平来确定,并且这样的参考水平可被调整到特定受试者群体。参考值或参考水平可以是绝对值;相对值;具有上限或下限的值;值的范围;平均值(an average value);中位值、平均值(a mean value)或与特定对照或基线值比较的值。参考值可以基于个体样品值,诸如例如从来自正在被测试的受试者但是是更早的时间点的样品中获得的值。参考值可以基于大量样品,诸如来自实足年龄(chronological age)匹配组的受试者的群体,或基于包括或排除待测样品的样品池(pool)。

[0069] 有利地,“参考水平”是从来自具有已知关于癌症的特定状态的受试者的生物样品中获得的预先确定的前胃泌素水平。在具体的实施方案中,用于与步骤(b)中的测试样品比较的参考水平可从来自健康受试者的生物样品或从来自患有癌症的受试者的生物样品获得;应该理解的是参考表达概况也可以从健康受试者的生物样品池或从来自患有癌症的受试者的样品池中获得。

[0070] 在本发明的方法的一个具体的实施方案中,从免除任何癌症的受试者中,并且优选地从免除任何病理的受试者中,采集参考样品。将会理解的是,根据从患者中采集的生物样品的性质,参考样品会是具有所述生物样品相同性质的生物样品。

[0071] 在本发明的方法中,前胃泌素的水平通过确定被前胃泌素结合分子,优选被识别前胃泌素的抗体结合的前胃泌素的量来确定。

[0072] “前胃泌素结合分子”在本文中指结合前胃泌素但是不结合胃泌素-17(G17)、胃泌

素-34 (G34)、甘氨酸延伸的胃泌素-17 (G17-Gly) 或甘氨酸延伸的胃泌素-34 (G34-Gly) 的任何分子。本发明的前胃泌素结合分子可以是任何前胃泌素结合分子, 诸如, 例如, 抗体分子或受体分子。优选地, 前胃泌素结合分子是抗前胃泌素抗体或其抗原结合片段。

[0073] “结合 (binding, binds)” 及类似词语意指抗体或其抗原结合片段, 与在生理条件下相对稳定的抗原形成复合物。用于确定两个分子是否结合的方法是本领域公知的并且包括, 例如, 平衡透析、表面等离子共振等。在一个具体的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段以一亲和力与前胃泌素结合, 该亲和力比其与非特异性分子诸如BSA或酪蛋白结合的亲和力大至少两倍。在一个更具体的实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段仅与前胃泌素结合。

[0074] 在一个具体的实施方案中, 在根据本发明的一种用于诊断卵巢癌的方法中, 使来自受试者的生物样品与至少一种前胃泌素结合分子接触, 其中, 所述分子对于前胃泌素的亲和力是至少100nM、至少90nM、至少80nM、至少70nM、至少60nM、至少50nM、至少40nM、至少30nM、至少20nM、至少10nM、至少5nM、至少1nM、至少100pM、至少10pM或至少1pM, 如通过诸如上述方法确定的。

[0075] 在一个具体的实施方案中, 本发明涉及一种用于诊断卵巢癌的方法, 所述方法包括检测来自受试者的生物样品中前胃泌素的浓度, 其中将所述生物样品与抗hPG抗体或其抗原结合片段接触。

[0076] 如本文所使用的术语“抗体”意欲包括多克隆和单克隆抗体。抗体 (或“免疫球蛋白”) 由糖蛋白组成, 所述糖蛋白至少包含由二硫键互相连接的两个重 (H) 链和两个轻 (L) 链。每个重链包含重链可变区 (或结构域) (本文缩写为HCVR或VH) 和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每个轻链包含轻链可变区 (本文缩写为LCVR或VL) 和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域, CL。VH和VL区可进一步细分为具有超可变性的区, 称为“互补决定区” (CDR) 或“高变区”, 其主要负责结合抗原的表位, 并且其与较保守的区域 (称为框架区 (FR)) 散置在一起。用于鉴定抗体的轻链和重链中的CDR和用于确定其序列的方法是本领域技术人员公知的。为避免疑义, 在上下文中不存在任何相反指示, 表述CDR意指由IMGT定义的抗体的重链和轻链的高变区, 其中所述IMGT唯一编号提供框架区和互补决定区的标准化界定, CDR1-IMGT: 27至38, CDR2。

[0077] IMGT唯一编号已经被定义成比较可变结构域, 而不管抗原受体、链类型或种 [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。在IMGT唯一编号中, 保守氨基酸一直具有相同位点, 例如半胱氨酸23 (1st-CYS)、色氨酸41 (保守的TRP)、疏水性氨基酸89、半胱氨酸104 (2nd-CYS)、苯丙氨酸或色氨酸118 (J-PHE或J-TRP)。IMGT唯一编号提供了框架区 (FR1-IMGT: 第1-26位, FR2-IMGT: 第39-55位, FR3-IMGT: 第66-104位和FR4-IMGT: 第118-128位) 和互补决定区 (CDR1-IMGT: 第27-38位, CDR2-IMGT: 第56-65位和CDR3-IMGT: 第105-117位) 的标准化界定。由于空位表示未被占据的位置, CDR-IMGT长度 (在括号之间显示并且由点隔开, 例如[8.8.13]) 成为重要信息。IMGT唯一编号在二维图示中使用, 被命名为IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current

Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], 并且也在IMGT/3Dstructure-DB中的三维结构中使用 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]。

[0078] 每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成, 从氨基末端至羧基末端以以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和典型补体系统的第一组分(C1q))的结合。抗体可以是不同的同种型(即IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)。

[0079] 在一个更具体的实施方案中, 所述前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段选自由以下组成的组: 多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、骆驼化抗体、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体和IgM抗体。

[0080] “多克隆抗体”是在一种或多种其他不相同的抗体中或在一种或多种其他不相同的抗体存在下产生的抗体。一般, 在产生不相同的抗体的一些其他B淋巴细胞的存在下从一种B淋巴细胞中产生多克隆抗体。通常, 直接从免疫动物中获得多克隆抗体。

[0081] 术语“单克隆抗体”指从几乎同种的抗体群体中产生的抗体, 其中除了可最小比例发现的少数可能天然存在的突变之外, 群体包含相同抗体。单克隆抗体从单细胞克隆(诸如杂交瘤)的生长产生, 并且由一类和一个亚类的重链和一种类型的轻链表征。

[0082] 表述抗体的“抗原结合片段”意欲表示任何肽、多肽或蛋白质, 它们保持与所述抗体的靶标(一般还称为抗原)(一般是相同表位)结合的能力, 并且包含抗体的氨基酸序列的至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少60个连续氨基酸残基、至少70个连续氨基酸残基、至少80个连续氨基酸残基、至少90个连续氨基酸残基、至少100个连续氨基酸残基、至少125个连续氨基酸残基、至少150个连续氨基酸残基、至少175个连续氨基酸残基、或至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列。

[0083] 在一个具体的实施方案中, 所述抗原结合片段包含其来源的抗体的至少一个CDR。仍然在一个优选的实施方案中, 所述抗原结合片段包含其来源的抗体的2、3、4或5个CDR, 更优选地6个CDR。

[0084] “抗原结合片段”可选自不限于下组: Fv、scFv(sc指单链)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fc片段或双抗体, 或具有无序肽诸如XTEN(延伸的重组多肽)或PAS基序的融合蛋白, 或会通过化学修饰, 添加诸如聚(亚烷基)醇诸如聚乙二醇(“PEG化”)(PEG化片段称为Fv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEG或Fab'-PEG) (“PEG”为聚(亚烷基)醇), 或通过并入脂质体来增加半衰期的任何片段, 所述片段具有根据本发明的抗体的至少一个特征性CDR。优选地, 所述“抗原结合片段”是构建的, 或包含它们所来源的抗体的重可变链或轻可变链的部分序列, 所述部分序列足以保持与其所来源的抗体相同的结合特异性和足够的亲和力, 所述亲和力, 相对于靶标而言, 优选至少等于其所来源的抗体的亲和力的1/100, 在更优选的方式中等至少1/10。

[0085] 在另一个具体的实施方案中, 在根据本发明的一种用于诊断卵巢癌的方法中, 使来自受试者的生物样品与结合前胃泌素的抗体接触, 其中, 所述抗体已经通过本领域技术人员已知的免疫方法获得, 其中, 所述免疫方法使用氨基酸序列包含前胃泌素的全部或部

分氨基酸序列的肽作为免疫原。更具体地,所述免疫原包含选自以下的肽:

[0086] • 肽,其氨基酸序列包含全长前胃泌素并且特别是序列1的全长人前胃泌素的氨基酸序列或由其组成。

[0087] • 肽,其氨基酸序列对应于前胃泌素并且特别是序列1的全长人前胃泌素的氨基酸序列的一部分。

[0088] • 肽,其氨基酸序列对应于前胃泌素的N末端部分的一部分或对应于前胃泌素的N末端部分的全氨基酸序列,并且特别是对应于包含氨基酸序列SWKPRSQQPDAPLG (序列2) 或由其组成的肽,和

[0089] • 肽,其氨基酸序列对应于前胃泌素的C末端部分的一部分或对应于前胃泌素的C末端部分的全部氨基酸序列,并且特别是对应于包含氨基酸序列QGPWLEEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (序列3) 或由其组成的肽,

[0090] • 肽,其氨基酸序列对应于前胃泌素的C末端部分的氨基酸序列的一部分,并且特别是对应于包含对应于前胃泌素的第71-80位氨基酸的氨基酸序列FGRRSAEDEN (序列40) 的肽。

[0091] 技术人员会认识到,这样的免疫可用来生成多克隆或单克隆抗体,如所希望的。用于获得抗体的这些类型中的每种的方法是本领域中公知的。因此本领域技术人员会容易地选择和执行用于产生针对任何给定抗原的多克隆和/或单克隆抗体的方法。

[0092] 通过使用包含对应于人前胃泌素的氨基酸序列1-14 (N末端) 的氨基酸序列“SWKPRSQQPDAPLG”的免疫原生成的单克隆抗体的实例包括但不限于命名为以下的单克隆抗体:mAb3、mAb4、mAb16,和mAb19与mAb20,如下表1至表4所述。已经描述了其它单克隆抗体,但是不清楚这些抗体实际上是否结合前胃泌素(WO 2006/032980)。表位作图的实验结果显示mAb3、mAb4、mAb16,和mAb19与mAb20确实特异性结合所述hPG N末端氨基酸序列内的表位。本领域中已经描述了特异性识别由序列2表示的前胃泌素的N末端内的表位的多克隆抗体(参见例如WO 2011/083088)。

[0093] 表1

[0094]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	序列4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	序列5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	序列6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	序列7
		VL CDR 2	KVS	序列8
		VL CDR 3	FQGSHVPFT	序列9

[0095] 表2

[0096]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	序列10
		VH CDR 2	FLPGSGST	序列11
		VH CDR 3	ATDGN YDWFAY	序列12

		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	序列13
		VL CDR 2	KVS	序列14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	序列15

[0097] 表3

[0098]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSYY	序列16
		VH CDR 2	INPSNGGT	序列17

[0099]

		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	序列18
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	序列19
		VL CDR 2	LVS	序列20
		VL CDR 3	WQGTHSPYT	序列21

[0100] 表4

[0101]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	序列22
		VH CDR 2	ISFSGYT	序列23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYH FDY	序列24
		VL CDR 1	SQHRTYT	序列25
		VL CDR 2	VKKDGS	序列26
		VL CDR 3	GVGDAIKGQSVF V	序列27

[0102] 通过使用包含对应于人前胃泌素的氨基酸序列55-80的氨基酸序列

“QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN” (前胃泌素的C末端部分) 的免疫原生成的单克隆抗体的实例包括但不限于命名为以下的抗体: 下表5和6中的mAb8和mAb13。表位作图的实验结果显示mAb13的确特异性结合所述hPG C末端氨基酸序列中的表位。

[0103] 表5

[0104]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	序列28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	序列29

[0105]

		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	序列30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	序列31
		VL CDR 2	QMS	序列32
		VL CDR 3	AQNLELPLT	序列33

[0106] 表6

[0107]

杂交瘤保藏	mAb	氨基酸序列		序列
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	序列34
		VH CDR 2	INTFGDRT	序列35
		VH CDR 3	ARGTGTY	序列36
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	序列37
		VL CDR 2	LVS	序列38
		VL CDR 3	WQGTHFPQT	序列39

[0108] 其他实例包括通过使用包含序列40的氨基酸序列的免疫原生成的抗hPG单克隆和/或多克隆抗体。

[0109] 在一个更具体的实施方案中, 在根据本发明的方法中, 使所述生物样品与抗hPG抗体或其抗原结合片段接触, 其中所述抗hPG抗体在N末端抗hPG抗体和C末端抗hPG抗体中选择。

[0110] 术语“N末端抗hPG抗体”和“C末端抗hPG抗体”分别指与包含位于hPG的N末端部分的氨基酸的表位, 或与包含位于hPG的C末端部分的氨基酸的表位结合的抗体。优选地, 术语“N末端抗hPG抗体”指与位于其序列由序列2表示的前胃泌素的结构域中的表位结合的抗体。在另一个优选的实施方案中, 术语“C末端抗hPG抗体”指与位于其序列由序列3表示的前胃泌素的结构域中的表位结合的抗体。

[0111] 术语“表位”是指抗体结合的抗原区域。表位可能被定义为结构的或功能的。功能表位通常是结构表位的子集,并且具有直接有助于相互作用的亲和力的这些氨基酸。表位还可能是构象的。在某些实施方案中,表位可以包括决定簇,即分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基),并且在某些实施方案中,可具有特定的三维结构特征,和/或特定的电荷特征。可以通过由本领域技术人员已知的表位作图技术进行由抗体结合的表位的确定。表位可以包含顺序地(sequentially)位于蛋白质的氨基酸序列中的不同氨基酸。表位还可以包含未顺序地(sequentially)位于蛋白质的氨基酸序列中的氨基酸。

[0112] 在一个具体的实施方案中,所述抗体为选自下组的单克隆抗体:

[0113] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列4、5和6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列4、5和6最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列7、8和9的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列7、8和9最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0114] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链以下序列中的分别至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列10、11和12的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列序列10、11和12最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列13、14和15的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列序列13、14和15最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0115] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列16、17和18的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列序列16、17和18最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列19、20和21的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列19、20和21最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0116] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链以下序列中的包含至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列22、23和24的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列序列22、23和24最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列25、26和27的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列25、26和27最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0117] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列28、29和30的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列序列28、29和30最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列31、32和33的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列31、32和33最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,和

[0118] • 单克隆抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列34、35和36的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列34、35和36最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个,优选至少两个,优选三个:氨基酸序列分别为序列37、38和39的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列37、38和39最佳对齐后具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列。

[0119] 如本文所述,两个核酸序列或两个氨基酸序列之间的“百分比同一性”或“%同一性”指最佳对齐后获得的待比较的两个序列之间的相同核苷酸或氨基酸残基的百分比,该百分比完全是统计的,并且两个序列之间的差异是沿着它们的长度随机分配的。两个核酸或氨基酸序列的比较传统上通过在将它们对齐之后比较序列来进行,所述比较能够通过区段(segment)进行或通过使用“对齐窗口”进行。除了通过手工比较之外,还可以通过本领域技术人员已知的方法进行序列的最佳对齐以用于比较。

[0120] 对于展示出与参考氨基酸序列至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的氨基酸序列,优选的实例包括含有参考序列,某些修饰,特别是至少一个氨基酸的缺失、添加或置换,截短或延伸的那些。在置换一个或多个连续或非连续的氨基酸的情况下,这样的置换是优选的:其中置换的氨基酸被“等效(equivalent)”氨基酸代替。这里,措辞“等效氨基酸”意指可以置换为一个结构性氨基酸而不修改相应抗体的生物活性的任何氨基酸以及下面记载的那些具体实例的任何氨基酸。

[0121] 等效氨基酸可由它们与它们取代的氨基酸的结构相似性(homology)或由可能生成的多种抗体之间的生物活性的比较测试确定。

[0122] 在另一个具体的实施方案中,本发明的方法中使用的抗体是人源化抗体。

[0123] 如本文所使用的表述“人源化抗体”指含有源自非人源的抗体的CDR区的抗体,抗体分子的其他部分源自一种或几种人抗体。另外,一些骨架区段残基(称为框架FR)可根据本领域技术人员已知的技术(Jones et al.,Nature,321:522-525,1986)来修饰以保持结合亲和力。人源化的目的是减小用于将异种抗体(诸如鼠抗体)的免疫原性用于引入到人中,同时保持抗体的整个抗原结合亲和力和特异性。

[0124] 本发明的人源化抗体或其片段可以通过本领域技术人员已知的技术制备(诸如,例如,文件Singer et al.,J.Immun.,150:2844-2857,1992中所记载的那些)。这样的人源化抗体对于其在涉及体外诊断或体内预防性和/或治疗性治疗的方法中的使用是优选的。其它人源化技术也是本领域技术人员已知的。事实上,可以施用多种技术对抗体进行人源化,所述技术包括CDR-移植(EP 0 451 261;EP 0 682 040;EP 0 939 127;EP 0 566 647;US 5,530,101;US 6,180,370;US 5,585,089;US 5,693,761;US 5,639,641;US 6,054,297;US 5,886,152;and US 5,877,293),镶面(veneering)或表面重建(resurfacing)(EP 0 592 106;EP 0 519 596;Padlan E.A.,1991,Molecular Immunology28(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),和链调换(chain shuffling)(美国专利号5,565,332)。人抗体可通过本领域中已知的多种方法包括噬菌体展示方法制成。还参见美国专利号4,444,887、4,716,111、5,545,806和5,814,318;和国际专利申请公开号WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/

10741。

[0125] 在一个更具体的实施方案中,所述抗体是选自下组的人源化抗体:

[0126] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列4、5和6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列4、5和6最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列7、8和9CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列7、8和9最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0127] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为10、11和12的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列10、11和12最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链分别以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:序列13、14和15的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列13、14和15最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0128] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列16、17和18的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列16、17和18最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列19、20和21的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列19、20和21最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0129] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列22、23和24的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列22、23和24最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列25、26和27的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列25、26和27最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0130] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列28、29和30的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列28、29和30最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列31、32和33的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列31、32和33最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,和

[0131] • 人源化抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列34、35和36的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,或在分别与序列34、35和36最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,所述轻链包含以下序列中的至少一个、优选至少两个、优选三个:氨基酸序列分别为序列37、38和39的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,或在分别与序列37、38和39最佳对齐后,具有至少80%,优选85%、90%、95%和98%同一性的序列,

[0132] 其中,所述抗体还包含源自人抗体的轻链和重链的恒定区。

[0133] 在第一个实施方案中,根据本发明的方法包括使生物样品与结合hPG的表位的抗hPG抗体接触,其中所述表位位于hPG的C末端部分内,或使生物样品与结合位于hPG的N末端部分内的表位的抗hPG抗体接触。

[0134] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的方法包括使生物样品与结合hPG的表位的抗hPG抗体接触,其中所述表位包括对应于前胃泌素的N末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列,所述对应于前胃泌素的N末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列在对应于hPG的第10至14位氨基酸、hPG的第9至14位氨基酸、hPG的第4至10位氨基酸、hPG的第2至10位氨基酸和hPG的第2至14位氨基酸的氨基酸序列中选择,其中所述hPG的氨基酸序列为序列1。

[0135] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的方法包括使生物样品与结合hPG的表位的抗hPG抗体接触,其中所述表位包括对应于前胃泌素的C末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列,所述对应于前胃泌素的C末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列在对应于hPG的第71至74位氨基酸、hPG的第69至73位氨基酸、hPG的第71至80位氨基酸、hPG的第76至80位氨基酸和hPG的第67至74位氨基酸的氨基酸序列中选择,其中所述hPG的氨基酸序列为序列1。

[0136] 在第一个实施方案中,根据本发明的组合物包含识别表位的抗体,所述表位包含对应于前胃泌素的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0137] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的组合物包含识别前胃泌素的表位的抗体,其中所述表位包含对应于前胃泌素的N末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列可包含hPG的第10至14位残基、hPG的第9至14位残基、hPG的第4至10位残基、hPG的第2至10位残基或hPG的第2至14位残基,其中所述hPG的氨基酸序列为序列1。

[0138] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的组合物包含识别前胃泌素的表位的抗体,其中所述表位包含对应于前胃泌素的C末端部分的氨基酸序列的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列可包含hPG的第71至74位残基、hPG的第69至73位残基、hPG的第71至80位残基(序列40)、hPG的第76至80位残基或hPG的第67至74位残基,其中所述hPG的氨基酸序列为序列1。

[0139] 在根据本发明的用于体外诊断卵巢癌的方法的一个具体的实施方案中,所述方法包括使来自受试者的生物样品与结合前胃泌素的第一部分的第一分子以及与结合前胃泌素的第二部分的第二分子接触。在一个更具体的实施方案中,其中所述前胃泌素结合分子是抗体,来自受试者的生物样品与结合前胃泌素的第一表位的抗体以及与结合前胃泌素的第二表位的第二抗体接触。

[0140] 在一个优选的实施方案中,本发明的用于诊断卵巢癌的方法包括检测来自人受试者的生物样品中的前胃泌素。

[0141] 在一个更优选的实施方案中,本发明的用于诊断卵巢癌的方法包括检测来自人受试者的生物样品中前胃泌素的浓度。

[0142] 在另一个具体的实施方案中,本发明的用于诊断卵巢癌的方法包括检测来自人受试者的生物样品中前胃泌素的浓度,其中所述生物样品选自血液、血清和血浆。

[0143] 在一个另外的优选的实施方案中,本发明的方法包括使来自所述受试者的样品与上文所述的抗hPG抗体接触,其中所述抗hPG抗体在所述样品中的结合表明所述受试者中存在卵巢癌。

[0144] 在一个更具体的实施方案中,本发明的方法包括使来自所述受试者的样品与上文

所述的抗hPG抗体接触,其中所述血浆中前胃泌素的浓度高于5pM表明所述受试者中存在卵巢癌。

[0145] 更优选地,本发明的方法包括使来自所述受试者的样品与上文所述的抗hPG抗体接触,其中所述样品中前胃泌素的浓度高于5pM、10pM、20pM、30pM或40pM表明所述受试者中存在卵巢癌。

[0146] 仍然更优选地,本发明的方法包括使来自所述受试者的样品与上文所述的抗hPG抗体接触,其中所述血浆中前胃泌素的浓度高于5pM、10pM、20pM、30pM、40pM表明所述受试者中存在转移的卵巢癌。

[0147] 本发明还涉及用于监测患者中卵巢癌治疗功效的方法,所述卵巢癌治疗诸如化学疗法、生物疗法、免疫疗法或抗体疗法,所述方法通过确定在治疗卵巢癌之前从患者获得的第一样品(诸如体液或卵巢癌的活组织检查)中前胃泌素的浓度,然后将所述第一样品中前胃泌素的浓度与在治疗后从同一患者获得的第二样品中前胃泌素的浓度进行比较,其中与所述第一样品相比,所述第二样品中前胃泌素浓度的降低表明治疗是有效的。

[0148] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的方法包括将从患者获得的生物样品中前胃泌素浓度与所述样品中前胃泌素浓度的预定值进行比较,在一个具体的实施方案中,所述预定值选自:基于无卵巢癌群体中平均(mean或average)确定值的样品值的平均值(mean)或平均数(average),当已知患者无卵巢癌时获得前胃泌素浓度值。

[0149] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于体外诊断卵巢癌的方法包括确定来自所述患者的样品中前胃泌素浓度和和第二卵巢癌诊断测试。在一个更具体的实施方案中,根据本发明的用于体外诊断卵巢癌的方法包括确定来自所述患者的样品中前胃泌素浓度和卵巢癌的第二诊断测试。

[0150] 在本发明的一个具体实施方案中,根据本发明的方法包括随时间确定来自已经或正在接受卵巢癌治疗的患者的样品中前胃泌素的水平。

[0151] 在另一方面,本发明的主题涉及一种用于预防或治疗卵巢癌的组合物,其中所述组合物包含前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段。

[0152] 用于本发明的方法的抗体组合物可以制备成不同的制剂,包括但不限于用于通过多种途径施用的水性悬液,所述途径包括但不限于肠胃外、鞘内、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、输注或大丸剂施用。在一些实施方案中,组合物被制备成用于肠胃外施用,并且在一些具体的实施方案中,通过输注静脉内注射。

[0153] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含范围为0.001mg/kg至约250mg/kg的有效剂量的本发明的抗前胃泌素抗体,该剂量可以在一次施用中给予,或者在多次间隔施用中给予。

[0154] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含选自以下的前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段:多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、骆驼化抗体、IgA1抗体、IGA2抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体和IgM抗体。优选地,所述抗体是上文所述的那些。更优选地,所述抗体是人源化抗体。

[0155] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含如通过诸如上文所述方法确定的对于前胃泌素具有至少5000nM、至少500nM、100nM、80nM、

60nM、50nM、40nM、30nM、20nM、10nM、7nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.5nM、0.1nM、50pM、10pM、5pM、1pM、或至少0.1pM的亲力的前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段。

[0156] 在一个甚至更具体的实施方案中,用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含前胃泌素结合抗体,其中所述前胃泌素结合分子或其抗原结合片段是中和抗体。

[0157] 表述“中和抗-PG抗体”是指结合PG并且阻断PG依赖型信号传导而导致抑制肿瘤细胞(特别是胃肿瘤细胞)中PG诱导的应答的抗体。抑制卵巢癌细胞的PG诱导的应答可以通过抑制细胞分化、抑制细胞死亡和/或刺激细胞增殖来介导。

[0158] 在另一个具体的实施方案中,用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含前胃泌素结合抗体,其中所述前胃泌素结合分子或其抗原结合片段是人源化抗体。

[0159] 在一个具体的实施方案中,用于预防或治疗卵巢癌的组合物包含前胃泌素结合抗体,其中所述前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性试剂。

[0160] 在另一个具体的实施方案中,用于预防或治疗患者卵巢癌的组合物包含前胃泌素结合抗体,其中所述患者已经通过根据本发明的方法被诊断患有卵巢癌,其中来自所述患者的生物样品中前胃泌素的浓度高于参考样品。

[0161] 在一个更具体的方面,本发明涉及用于根据本发明的预防或治疗卵巢癌的组合物,其中所述前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段选自N末端抗前胃泌素抗体和C末端抗前胃泌素抗体。

[0162] 在另一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物和药学上可接受的载体。更具体地,用于根据本发明的预防或治疗卵巢癌的药物组合物包含上文所述的抗体和药学上可接受的载体。

[0163] 在一个更具体的方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物和药学上可接受的载体,其中所述抗前胃泌素抗体以0.001mg/kg至250mg/kg的剂量,并且优选以至少0.005mg/kg、至少0.01mg/kg、至少0.05mg/kg、至少0.1mg/kg、至少0.5mg/kg、至少1mg/kg、至少5mg/kg、至少10mg/kg、至少50mg/kg或至少100mg/kg的剂量施用。在另一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物和抗癌治疗分子。

[0164] 事实上,使用如本文所述的抗PG单克隆抗体的治疗可以与其它疗法结合,或者辅助其它疗法。其它疗法的非限制性实例包括化学疗法治疗、放射疗法、手术切除和抗体疗法。

[0165] 在另一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含根据本发明的用于预防或治疗卵巢癌的组合物和选自化学疗法分子和靶向疗法分子的抗癌治疗分子。

[0166] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及一种试剂盒,其包含用于同时、顺次、或单独施用的根据本发明的用于治疗卵巢癌的组合物和化学疗法分子。用于该目的的有用的化学疗法分子包括但不限于,叶酸拮抗剂、嘌呤拮抗剂、嘧啶拮抗剂、DNA烷基化分子、DNA交联药、抗生素、铂配合物、蛋白酶体抑制剂、有丝分裂纺锤体毒素、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和其它。

[0167] 在另一个具体的实施方案中,本发明涉及试剂盒,其包含用于同时、顺次或单独施用的根据本发明的组合物和包含另一靶向疗法分子的组合物。这样的靶向疗法分子包括但不限于,靶向EGFR的抗体诸如西妥昔单抗或帕尼单抗,靶向VEGF的抗体诸如贝伐单抗,靶向

HER2的抗体诸如曲妥单抗或帕妥珠单抗,靶向PD-1和PDL-1的抗体诸如派姆单抗,靶向CTLA-4的抗体诸如伊匹单抗,靶向EGFR的小分子药物诸如埃罗替尼,靶向BRAF的小分子药物诸如维莫非尼或达拉菲尼,靶向VEGF的重组融合蛋白诸如阿柏西普。

[0168] 在另一个具体的方面,本发明涉及前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于诊断卵巢癌的用途。

[0169] 在另一个具体的方面,本发明涉及前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于预防或治疗卵巢癌的用途。

[0170] 在一个更具体的方面,本发明涉及前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于对于患者预防或治疗卵巢癌的用途,其中所述患者的生物样品中前胃泌素浓度已经确定,并且高于参考生物样品的前胃泌素浓度。

[0171] 在一个更具体的方面,本发明涉及前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于对于患者预防或治疗卵巢癌的用途,其中所述患者表现出转移。

[0172] 在一个甚至更具体的方面,本发明涉及前胃泌素结合抗体或其抗原结合片段用于对于患者预防或治疗卵巢癌的用途,其中所述患者表现出转移,并且其中所述患者的生物样品中前胃泌素浓度已经确定,并且高于参考生物样品的前胃泌素浓度。

[0173] 组成所述组合的组分可以同时、单独或顺次施用,以获得组合的最大功效;对于每个组分的施用,在其从快速施用到连续输注的期间内改变是可能的。

[0174] 如本文所使用的“同时施用”是指以单一且唯一的药物形式施用根据本发明的组合物中的两种化合物。如本文所使用的“单独施用”是指以不同的药物形式同时施用根据本发明的组合物的两种化合物。如本文所使用的“顺次施用”是指每种化合物以不同的药物形式连续施用根据本发明的组合物的两种化合物。

[0175] 如本文所使用的“治疗有效量”是指有效预防、缓解、减少或改善疾病的症状或延长正在治疗的患者的生存的一种或多种化合物的最小浓度或最小量。

[0176] 从下文的实施例的以下详细描述,本发明的实施方案的特征将变得更加显而易见。

附图说明

[0177] 图1:卵巢癌患者(n=8)中和对照患者(n=103)中的前胃泌素中值血浆浓度。

[0178] 图2:用20 μ g/ml人源化对照抗体(抗人FcG1,来自BioXCell)或20 μ g/ml抗hPG Hz (PG Hz)处理48h后SK-OV-3细胞的细胞计数——双尾t检验,*p<0.05。

[0179] 图3:在超低吸附条件下用对照(CT Hz)或抗PG人源化抗体(PG Hz)处理后形成的SK-OV-3球的数目——双尾t检验,***p<0.05。

实施例

[0180] 实施例1:使用多克隆抗体检测血浆前胃泌素浓度

[0181] 通过使用两个特异性抗前胃泌素抗体利用ELISA定量血浆前胃泌素水平:捕获抗体被包被在平板的孔上,而披露抗体(revelation antibody)用来检测前胃泌素并且介导信号的披露。

[0182] 在本实施例中,定量基于ELISA方法,其允许通过使用其反应发光的底物来分配

值,该值与结合由捕获抗体保持的抗原的抗体的发光量成比例。

[0183] 材料

[0184] 试剂和仪器列于表7:

[0185] 表7

[0186]

名称	供应商	保藏号
Plates MaxiSORP white Nunc, 96孔	Dutscher	# 055221
碳酸钠/碳酸氢钠	Sigma	# 21851
DPBS 1X	Lonza	# P04-36500
Tween-20	Biosolve	# 20452335
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
链霉亲和素-HRP	Pierce (Thermo)	# 21130
SuperSignal ELISA Femto最高灵敏度底物	Pierce (Thermo)	# 37074
抗前胃泌素多克隆抗体	Eurogentec	/

[0187] 根据标准方案,通过用N末端前胃泌素(序列2)或用对应于hPG的第71至80位氨基酸并具有序列FGRRSAEDEN(序列40)的C末端前胃泌素免疫兔子,来获得多克隆抗体。

[0188] 本测定中使用的抗前胃泌素的多克隆抗体的结合特征如下:不结合G34-Gly、G34、G17-Gly、G17,结合全长前胃泌素。

[0189] 通过将一个胶囊的内容物溶解于100ml的MilliQ水中,通过制备50mM pH 9.6的碳酸盐-碳酸氢钠的溶液来包被96孔板。在碳酸盐缓冲液中制备捕获抗体(3 μ g/ml)的溶液,所述抗体对应于通过使用前胃泌素的C末端FGRRSAEDEN(序列40)获得的多克隆抗体。将100微升的抗体溶液添加至各孔并在4 $^{\circ}$ C孵育16小时(一夜)。然后通过去除抗体溶液来封闭板并用300 μ l 1X PBS/0.1% Tween-20洗涤3次,然后每个孔添加200 μ l的封闭缓冲液(1X PBS/0.1% Tween-20/0.1% BSA),并在22 $^{\circ}$ C孵育2小时,来封闭平板。然后去除封闭缓冲液,用300 μ l 1X PBS/0.1% Tween-20洗涤孔3次。

[0190] 血浆稀释如下进行:使用纯的、稀释1/2、1/5和1/10的血浆。在1X PBS/0.1% Tween 20/0.1% BSA中从纯的血浆制备稀释液。

[0191] 对于对照测试,在已知浓度的前胃泌素的存在下的ELISA,如下制备前胃泌素稀释液:以0.45mg/ml (45microM)的浓度制备储存重组PG(在大肠杆菌中产生并用谷胱甘肽琼脂糖/标签去除(Tev)/IMAC Counter纯化/透析亲和纯化的全长人前胃泌素,来自法国巴黎巴斯德研究所(Institut Pasteur, Paris, France)),一式三份。如下制备前胃泌素浓度的范

围:

- [0192] • 溶液A:预稀释1/10,2 μ l的储存液+18 μ l的缓冲液
- [0193] • 溶液B:预稀释1/100,10 μ l的A+90 μ l的缓冲液
- [0194] • 溶液C:预稀释1/1000,10 μ l的B+90 μ l的缓冲液
- [0195] • 溶液D:500pM,5,55 μ l的C+494.5 μ l的稀释剂
- [0196] • 溶液E:250pM,250 μ l的D+250 μ l的稀释剂
- [0197] • 溶液F:100pM,200 μ l的E+300 μ l的稀释剂
- [0198] • 溶液G:50pM,250 μ l的F+250 μ l的稀释剂
- [0199] • 溶液H:25pM,200 μ l的G+200 μ l的稀释剂
- [0200] • 溶液I:10pM,100 μ l的H+150 μ l的稀释剂

[0201] 重组PG的范围是线性的并且因此根据使用的抗体可以大致上是宽范围的。

[0202] 对于测试样品的制备,留出约500 μ l的每个样品并储存直到分析(并且确认,如果需要的话)结果。测定100 μ l的范围中的每一点和/或血浆(纯的、稀释至1/2、1/5和1/10的),并在22 $^{\circ}$ C在平板上孵育2小时。

[0203] 对于测试的披露,将平板用300 μ l 1X PBS/0.1%Tween-20洗涤3次。通过在1X PBS/0.1%Tween-20/0.1%BSA中稀释来制备0.5 μ g/ml的与生物素结合的多克隆兔抗前胃泌素抗体的溶液,其中所述抗体已经通过使用作为免疫原的前胃泌素的N-末端部分而获得。将100 μ l的该溶液添加至各孔。孵育在22 $^{\circ}$ C进行1小时。使用链霉亲和素-HRP的披露通过以下步骤进行:去除检测抗体,并且用300 μ l 1X PBS/0.1%Tween-20洗涤3次,然后制备在1X PBS/0.1%Tween-20/0.1%BSA中稀释的20ng/ml的链霉亲和素-HRP的溶液,其中将100加100 μ l的该溶液添加至各孔,然后在22 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0204] 检测由以下步骤组成:去除链霉亲和素-HRP,并且用300 μ l 1X PBS/0.1%Tween-20洗涤3次,然后每孔添加100 μ l的化学发光底物溶液。在使用前30分钟,通过混合等体积的两种溶液SuperSignal ELISA Femto试剂盒,20ml+20ml,来制备底物溶液,并在黑暗中保存在室温下。在黑暗中在室温下孵育5分钟后读取发光。

[0205] 对于每种条件,一式三份进行测试,并且该范围的结果会被作为图表呈现,该图表显示出取决于前胃泌素浓度的发光变化。对于每种血浆稀释液,使用相应范围(稀释到1/10的样品的范围为1/10)的线性回归线的方程,来确定前胃泌素的浓度。

[0206] 方法和结果

[0207] 在患有卵巢癌的患者(n=8)中的前胃泌素的中值血浆浓度为8.45pM,而在对照患者(n=103)中的前胃泌素的中值血浆浓度为0pM(图1)。这些数据证明,与健康对照个体相比,患有卵巢癌的患者在他们的血浆中具有更高的前胃泌素浓度。

[0208] 这些数据证明,与健康对照个体相比,患有卵巢癌的患者在他们的血浆中具有更高的前胃泌素水平。

[0209] 实施例2:使用单克隆抗前胃泌素抗体检测前胃泌素浓度

[0210] 将Nunc MaxiSORP 96孔板的孔用如下的第一前胃泌素特异性抗体包被。在MilliQ水中的50mM,pH 9.6的碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中,将对前胃泌素的羧基末端区域具有特异性的抗前胃泌素单克隆抗体稀释到3 μ g/ml的浓度。

[0211] 然后将总共100 μ l的该抗体溶液添加到96孔板的每个孔中,并且在4 $^{\circ}$ C下孵育过

夜。结合后,从孔中去除该抗体溶液,然后将孔用100 μ l洗涤缓冲液(IX PBS/0.1%Tween-20)洗涤三次。然后将总共100 μ l封闭缓冲液(IX PBS/0.1%Tween-20/0.1%BSA)添加到每个孔,并且在22 $^{\circ}$ C孵育2小时。然后去除封闭缓冲液,然后用洗涤缓冲液将孔洗涤三次。然后将从患者分离的血浆或血清样品添加到孔中,体积为100 μ l,稀释系列为典型的1:1,1:2,1:5和1:10稀释,并且然后在22 $^{\circ}$ C孵育2小时。一式两份分析血浆或血清样品。

[0212] 测定还包括两个标准曲线。第一标准曲线是使用最终量为每孔1ng,0.5ng,0.25ng,0.1ng,0.05ng,0.01ng和0ng的重组前胃泌素的稀释度制得的。作为阴性对照的第二标准曲线是由在封闭缓冲液中稀释的前胃泌素阴性的人血清以与测试样品相同的稀释度(即1:1,1:2,1:5和1:10)制得的。或者,当血浆样品被测定时,作为阴性对照的第二标准曲线是由在封闭缓冲液中稀释的前胃泌素阴性的人血浆以与测试样品相同的稀释度(即1:1,1:2,1:5和1:10)制得的。

[0213] 与血浆或血清样品孵育完成后,去除孔的内容物,并且用洗涤缓冲液以100 μ l/孔将孔洗涤三次,然后使用对于前胃泌素具有特异性的第二抗体检测与第一抗体结合的前胃泌素,如下所述。

[0214] 在封闭缓冲液中将前胃泌素的氨基末端区域具有特异性的生物素偶联的抗前胃泌素单克隆抗体稀释至0.1-10 μ g/ml的浓度,这取决于该抗体。然后将总共100 μ l的抗体溶液添加到每个孔,并且在22 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0215] 第二抗体结合完成后,将板用洗涤缓冲液100 μ l/孔洗涤三次,然后将100 μ l的链霉亲和素-HRP(在封闭缓冲液中25ng/ml)添加到每个孔,在22 $^{\circ}$ C孵育1小时。与链霉亲和素-HRP溶液孵育完成后,将板用洗涤缓冲液100 μ l/孔洗涤三次。此后,将100 μ l的用Pierce SuperSignal ELISA Femto最大灵敏度化学发光底物试剂盒制备的化学发光底物添加到每个孔,在黑暗中以室温下孵育5分钟,然后在光度计上读数。

[0216] 基于光度计读数,使用线性回归分析获得对应于标准曲线数据的线性方程。然后使用该方程计算不同患者样品的前胃泌素浓度。

[0217] 计算患有卵巢癌的患者中的中值血浆前胃泌素浓度,并且将其与对照患者血浆中的中值血浆前胃泌素浓度比较。这些数据证明,与健康对照个体相比,患有卵巢癌的患者在它们的血浆中具有升高的前胃泌素水平。

[0218] 实施例3:抗hPG抗在癌细胞系上的中和活性

[0219] 3.1抗hPG单克隆抗体的中和活性

[0220] PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3是通常用于研究卵巢癌的细胞系,其产生并且分泌前胃泌素。测试PG的单克隆抗体在这些不同细胞系中抑制增殖的能力。使用不同抗hPG单克隆抗体测试来自各个Caov-3、ES-2、KA0-III、AGS和MGC-803细胞系的细胞的存活。

[0221] 对于每个实验,将50,000个细胞接种到的6孔板的含有胎牛血清的培养基中,并且孵育8小时。将细胞血清饥饿过夜,然后在接种后24小时(时间“T0”)时开始,一式六份,每12小时处理一次,持续48小时,如下处理细胞:不存在胎牛血清情况下,使用1-20 μ g/ml的单克隆对照抗体(抗嘌呤霉素的单克隆抗体)(CT mAb),或使用1-20 μ g/ml的抗hPG mAb,其中所述mAb是C末端抗hPG单克隆抗体或N末端抗hPG单克隆抗体。

[0222] 所述mAb是选自以下的C末端抗hPG抗体:

[0223] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列28、29和30的CDR-H1、CDR-H2

和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列31、32和33的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0224] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列34、35和36的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列37、38和39的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0225] 或选自以下的N末端抗hPG抗体:

[0226] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列分别为序列4、5和6的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列7、8和9的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0227] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列分别为序列10、11和12的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列分别为13、14和15的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0228] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列分别为序列16、17和18的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列分别为序列19、20和21的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0229] -包含重链和轻链的抗体,所述重链包含氨基酸序列分别为序列22、23和24的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链包含氨基酸序列分别为序列25、26和27的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0230] 对于每个实验,计数对照孔中处于T0细胞的数量。

[0231] 具体地,在48小时时计数在对照和抗hPG mAb处理的孔二者中的活细胞的数目,然后计算每个细胞计数与在T0时确定的细胞计数之间的差值。然后将得到的抗hPG mAb处理的细胞的数目表示为对照mAb处理的细胞的数目的百分数。

[0232] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG单克隆抗体处理减少细胞数。使用单因素ANOVA使用图基(tukey)事后检验法确定统计学显著性:*= $p < 0.05$,**= $p < 0.01$ 和***= $p < 0.001$ 。在每个细胞系中,抗hPG抗体降低了细胞存活。

[0233] 3.2抗hPG人源化抗体在细胞存活上的中和活性

[0234] 测试抗PG的人源化抗体抑制PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系的增殖的能力。使用不同的抗hPG人源化抗体测试来自各个PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系的细胞的存活。

[0235] 对于每个实验,将80,000个细胞接种到的6孔板的含有胎牛血清的培养基中,并且孵育8小时。将细胞血清饥饿过夜,然后在接种后24小时(时间“T0”)时开始,一式六份,每12小时处理一次,持续48小时,如下处理细胞:不存在胎牛血清,使用20 μ g/ml的人源化对照抗体(抗人FcG1,来自BioXCell)(CT Hz),或使用20 μ g/ml的抗hPG Hz(PG Hz),其中所述Hz是C末端抗hPG人源化抗体或N末端抗hPG人源化抗体。对于每个实验,计数对照孔中处于T0细胞的数量。

[0236] 具体地,在48小时时计数在对照和抗hPG Hz处理的孔二者中的活细胞的数目,然后计算每个细胞计数与在T0时确定的细胞计数之间的差值。。

[0237] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG Hz抗体处理减少了细胞数。

[0238] 3.3.抗hPG单克隆抗体在癌症干细胞频率方面的中和活性

[0239] 使用极端有限稀释测定(Extreme Limiting Dilution Assay,ELDA)测试抗PG的单克隆抗体的减少PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系中癌症干细胞(CSC)频率的能力。使用不同的抗-hPG单克隆抗体测试来自各个PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细

胞系的CSC频率。

[0240] 对于每个实验,使用FACS Aria流式细胞仪将细胞以固定的每孔细胞浓度接种在超低吸附 (ULA) P96 (96孔板) 中,使用的浓度范围为从1至500个细胞/孔。将细胞培养在具有M11培养基 (Macari et al, Oncogene, 2015) 的ULA板中持续直至11天,并且每3天或4天用1-20 μ g/ml的单克隆对照抗体 (抗嘌呤霉素的单克隆抗体) (CT mAb) 或用1-20 μ g/ml的抗hPG mAb (其中所述mAb是C末端抗hPG单克隆抗体或N末端抗hPG单克隆抗体) 处理。

[0241] 具体地,在孵育阶段结束时,用相差显微镜观察板,评估每个细胞浓度的阳性孔的数目。最后,使用ELDA站点工具 (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) 计算每个处理组的CSC频率和测试组之间的任何统计学差异 (修改的卡方检验)。

[0242] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG单克隆抗体处理减少了CSC频率。

[0243] 3.4抗hPG人源化抗体在癌症干细胞频率方面的中和活性

[0244] ●球形成测定

[0245] 使用球形成测定测试抗PG的人源化抗体的减少Caov-3、ES-2和SK-OV-3细胞系中癌症干细胞 (CSC) 频率的能力。

[0246] 对于每个实验,将500个细胞接种在24孔超低吸附 (ULA) 中。将细胞培养在具有M11培养基 (Macari et al, Oncogene, 2015) 的ULA板中直至10天,并且每3天或4天用20 μ g/ml的人源化对照抗体 (抗人FcG1, 来自BioXCell) (CTHz) 或用20 μ g/ml的抗hPG Hz (PG Hz) (其中所述Hz是C末端抗hPG人源化抗体或N末端抗hPG人源化抗体) 处理。

[0247] 具体地,在孵育阶段结束时,用明场显微镜对孔拍照,分析照片,并且对平均直径高于30 μ m的球计数。

[0248] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG人源化抗体处理减少了CSC频率。

[0249] ●极端有限稀释测定

[0250] 使用极端有限稀释测定 (ELDA) 测试抗PG的人源化抗体的减少PA-1、Caov-3、SW626和SK-OV-3细胞系中癌症干细胞 (CSC) 频率的能力。使用不同的抗-hPG人源化抗体测试来自各个PA-1、Caov-3、SW626和SK-OV-3细胞系的CSC频率。

[0251] 对于每个实验,使用FACS Aria流式细胞仪将细胞以固定的每孔细胞浓度接种在超低吸附 (ULA) P96 (96孔板) 中,使用的浓度范围为从1至500个细胞/孔。将细胞培养在具有M11培养基 (Macari et al, Oncogene, 2015) 的ULA板中直至11天,并且每3天或4天用1-20 μ g/ml的人源化对照抗体 (抗人FcG1, 来自BioXCell) (CT Hz) 或用1-20 μ g/ml的抗hPG Hz (其中所述Hz是C末端抗hPG人源化抗体或N末端抗hPG人源化抗体) 处理。

[0252] 具体地,在孵育阶段结束时,用相差显微镜观察板,评估每个细胞浓度的阳性孔的数目。最后,使用ELDA站点工具 (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) 计算每个处理组的CSC频率和测试组之间的任何统计学差异 (修改的卡方检验)。

[0253] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG人源化抗体处理减少了CSC频率。

[0254] 3.5抗hPG单克隆抗体在WNT/ β 联蛋白途径方面的中和活性

[0255] PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3是通常用于研究卵巢癌、乳腺癌和结直肠癌的细胞系,其产生并且分泌前胃泌素。测试PG的单克隆抗体抑制这些不同的细胞系中WNT/ β 联蛋白途径的能力,使用蛋白质存活蛋白 (一种公知的WNT/ β 联蛋白途径靶向基因) 的表达作为读出。使用不同的抗hPG单克隆抗体测试来自各个PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系的存活蛋白

表达。

[0256] 对于每个实验,将50,000个细胞接种到的6孔板的含有胎牛血清的培养基中,并且孵育8小时。将细胞血清饥饿过夜,然后在接种后24小时开始,一式四份,每12小时处理一次,持续72小时,如下处理细胞:不存在胎牛血清情况下,使用1-20 μ g/ml的单克隆对照抗体(抗嘌呤霉素的单克隆抗体)(CTmAb),或使用1-20 μ g/ml的抗hPG mAb,其中所述mAb是C末端抗hPG单克隆抗体或N末端抗hPG单克隆抗体。

[0257] 具体地,处理72小时之后,收获细胞并且使用RIPA缓冲液提取总蛋白质。然后使用抗存活蛋白抗体(单克隆抗体,来自Cell Signaling的#2802)和抗肌动蛋白抗体作为上样对照(单克隆抗体,来自SIGMA的#A4700)对来自CTmAb或抗hPGmAb处理的细胞的等量蛋白质进行蛋白质印迹。使用来自Syngene的GBOX化学系统进行定量。

[0258] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG单克隆抗体处理减少了存活蛋白表达。使用非配对学生T检验确定统计学显著性:*= $p<0.05$,**= $p<0.01$ 和***= $p<0.001$ 。

[0259] 3.6抗hPG人源化抗体在WNT/ β 联蛋白途径方面的中和活性

[0260] 测试PG的人源化抗体抑制PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系中WNT/ β 联蛋白途径的能力,使用蛋白质存活蛋白(一种公知的WNT/ β 联蛋白途径靶向基因)的表达作为读出。使用不同的抗hPG人源化抗体测试来自各个PA-1、Caov-3、SW626、ES-2和SK-OV-3细胞系的存活蛋白表达。

[0261] 对于每个实验,将50,000个细胞接种到的6孔板的含有胎牛血清的培养基中,并且孵育8小时。将细胞血清饥饿过夜,然后在接种后24小时开始,一式四份每12小时处理一次持续72小时,如下处理细胞:不存在胎牛血清情况下,使用1-20 μ g/ml的人源化对照抗体(抗人FcG1,来自BioXCell)(CTHz),或使用1-20 μ g/ml的抗hPG Hz,其中所述Hz是C末端抗hPG人源化抗体或N末端抗hPG人源化抗体。

[0262] 具体地,处理72小时之后,收获细胞并且使用RIPA缓冲液提取总蛋白质。然后使用抗存活蛋白抗体(单克隆抗体,来自Cell Signaling的#2802)和抗肌动蛋白抗体作为上样对照(单克隆抗体,来自SIGMA的#A4700)对来自CT Hz或抗hPG Hz处理的细胞的等量蛋白质进行蛋白质印迹。使用来自Syngene的GBOX化学系统进行定量。

[0263] 与用对照抗体处理相比,用抗hPG人源化抗体处理减少了存活蛋白表达。使用非配对学生T检验确定统计学显著性:*= $p<0.05$,**= $p<0.01$ 和***= $p<0.001$ 。

序列表

<110> 普莱戈斯瑞恩癌症有限责任公司

<120> 用于检测和治疗卵巢癌的组合物和方法

<130> D34987

<140> PCT EP2017/050033

<141> 2017-01-02

<150> EP 16305138.6

<151> 2016-02-05

<150> EP 15307192.3

<151> 2015-12-31

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> SITE

<222> (1) .. (80)

<223> 人前胃泌素

<400> 1

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly

1 5 10 15

Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala

20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val

35 40 45

Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu

50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

65 70 75 80

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人前胃泌素的N端第1-14位氨基酸

<400> 2

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly

1 5 10

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> Amino acids 55-80, C-terminal extremity of human progastrin

<400> 3

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp

1 5 10 15

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

20 25

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 6B5B11C10 CDR-H1

<400> 4

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 6B5B11C10 CDR-H2

<400> 5

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 6B5B11C10 CDR-H3

<400> 6

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr

1 5
<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 6B5B11C10 CDR-L1
<400> 7
Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10
<210> 8
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 6B5B11C10 CDR-L2
<400> 8
Lys Val Ser
1
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 6B5B11C10 CDR-L3
<400> 9
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 20D2C3G2 CDR-H1
<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Trp
1 5
<210> 11
<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 20D2C3G2 CDR-H2

<400> 11

Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 20D2C3G2 CDR-H3

<400> 12

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 20D2C3G2 CDR-L1

<400> 13

Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 20D2C3G2 CDR-L2

<400> 14

Lys Val Ser

1

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 20D2C3G2 CDR-L3

<400> 15

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1E9D9B6 CDR-H1

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1E9D9B6 CDR-H2

<400> 17

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1E9D9B6 CDR-H3

<400> 18

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1E9D9B6 CDR-L1

<400> 19

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1	5	10
<210> 20		
<211> 3		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 1E9D9B6 CDR-L2		
<400> 20		
Leu Val Ser		
1		
<210> 21		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 1E9D9B6 CDR-L3		
<400> 21		
Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr		
1	5	
<210> 22		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 1B3B4F11 CDR-H1		
<400> 22		
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala		
1	5	
<210> 23		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 1B3B4F11 CDR-H2		
<400> 23		
Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr		
1	5	
<210> 24		
<211> 14		

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1B3B4F11 CDR-H3

<400> 24

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1B3B4F11 CDR-L1

<400> 25

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1B3B4F11 CDR-L2

<400> 26

Val Lys Lys Asp Gly Ser His

1 5

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1B3B4F11 CDR-L3

<400> 27

Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1C10D3B9 CDR-H1

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1C10D3B9 CDR-H2

<400> 29

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1C10D3B9 CDR-H3

<400> 30

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1C10D3B9 CDR-L1

<400> 31

Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe

1 5 10

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 1C10D3B9 CDR-L2

<400> 32

Gln Met Ser

1
<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 1C10D3B9 CDR-L3
<400> 33
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1 5
<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 2C6C3C7 CDR-H1
<400> 34
Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5
<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 2C6C3C7 CDR-H2
<400> 35
Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
1 5
<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 2C6C3C7 CDR-H3
<400> 36
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr
1 5
<210> 37
<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 2C6C3C7 CDR-L1

<400> 37

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1

5

10

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 2C6C3C7 CDR-L2

<400> 38

Leu Val Ser

1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 2C6C3C7 CDR-L3

<400> 39

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1

5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 前胃泌素的第71-81位氨基酸

<400> 40

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

1

5

10

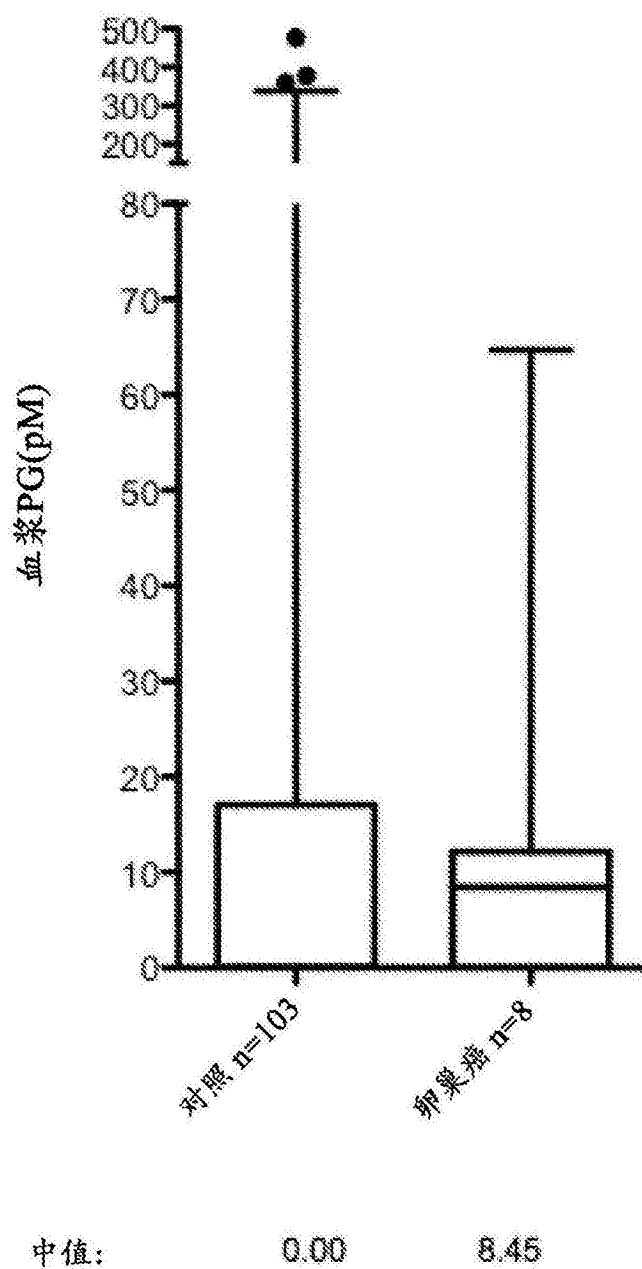


图1

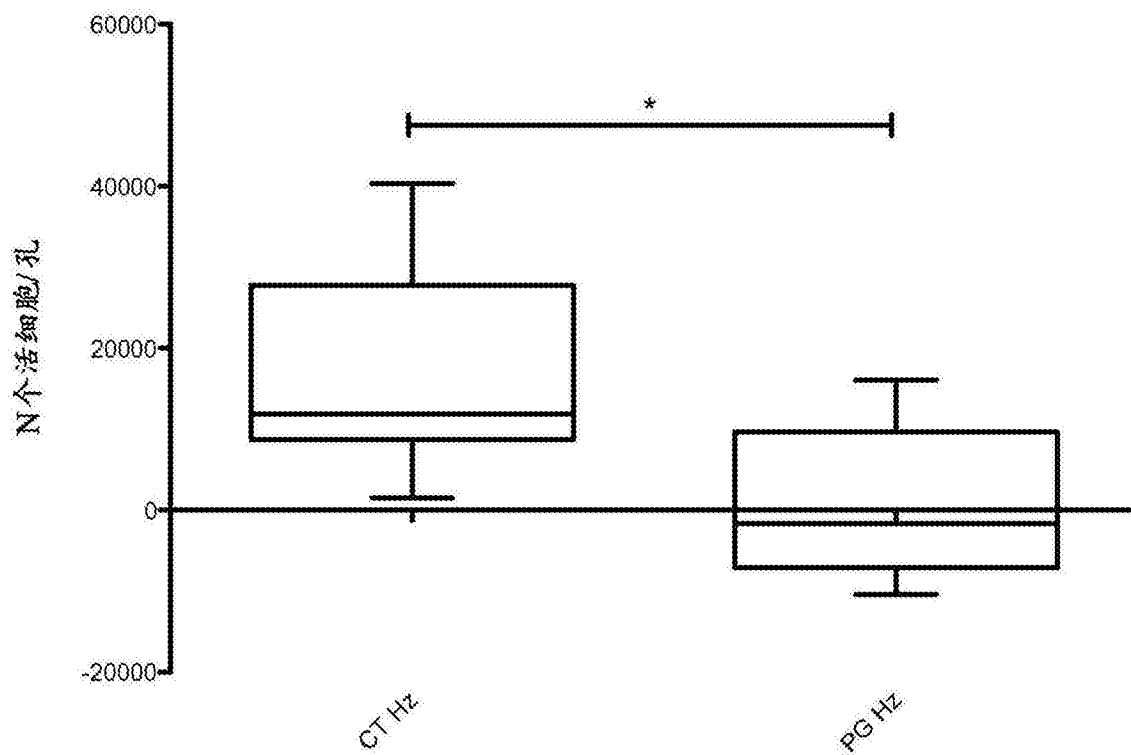


图2

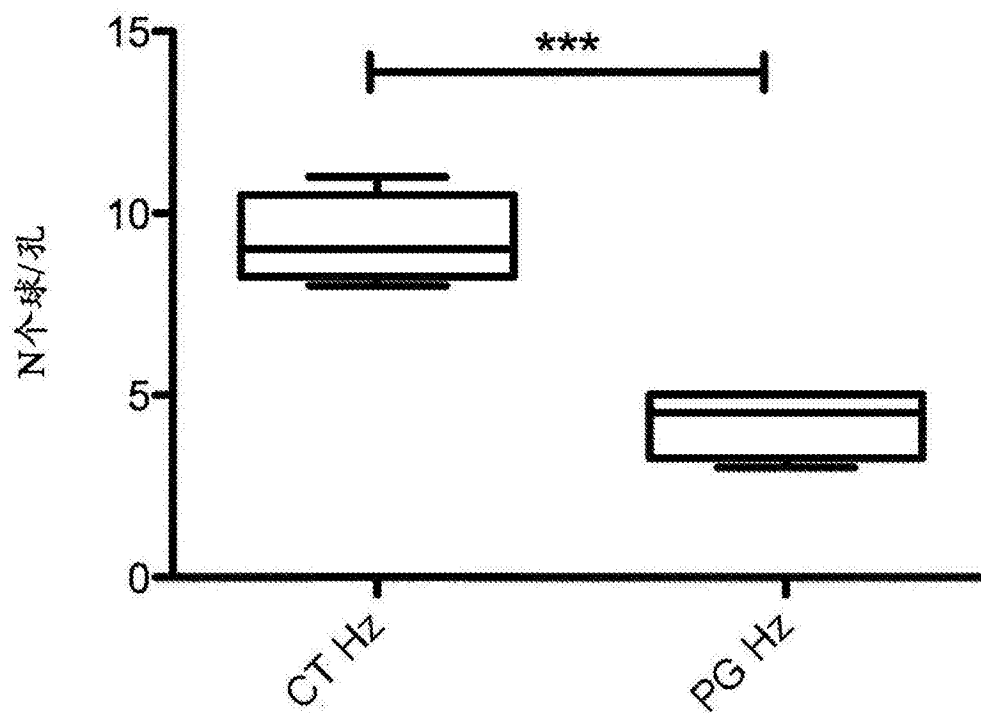


图3