



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/395 (2006.01); A61K 2121/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016140271, 16.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.04.2015

Дата регистрации:
19.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.04.2014 US 61/983,951

(45) Опубликовано: 19.04.2018 Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 24.11.2016

(86) Заявка РСТ:
IB 2015/052796 (16.04.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/162532 (29.10.2015)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

МАРТИНИ Жан-Франсуа Андре (US),
ТАРАЗИ Джамал Кристо (US),
УИЛЛЬЯМС Джеймс Эндрю (US)

(73) Патентообладатель(и):
Пфайзер Инк. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2395090 C2 20.07.2010. RU
2480769 C2 27.04.2013. US 2014018375 A1
16.01.2014. US 2014045715 A1 13.02.2014.
ИМЯНИТОВ Е.Н. "сТАНДАРТНЫЕ И
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРЕДИКТИВНЫЕ
МАРКЕРЫ ПРИ ОПУХОЛЯХ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА".
пРАКТИЧЕСКАЯ ОЕНКОЛОГИЯ 2012,
Т.13, NO.4, С.219-228. MOTZER R.J. et al. "
Axitinib versus sorafenib as second-line
treatment for (см. прод.)

(54) ЛЕЧЕНИЕ РАКА

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к медицине, а именно к онкологии, и касается лечения рака. Для этого идентифицируют опухоли, чувствительные к лечению акситинибом. Для определения чувствительности используют измерение уровней экспрессии полипептида CD68 в образце ткани из опухоли, а также процентное содержание CD68-положительных клеток и

плотность CD68-положительных клеток в опухоли. Это обеспечивает высокую вероятность определения эффективности или неэффективности лечения аксинитинибом и, соответственно, выбора наиболее адекватной терапии для каждого конкретного больного. 8 н. и. 7 з.п. ф-лы, 2 пр., 11 ил.

(56) (продолжение):

advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial". Lancet Oncology, 16 April 2013, vol.14, p. 552-562. PAL S.K. et al. "Tivozanib: current status and future directions in the treatment of solid tumors". Expert Opinion on Investigational Drugs, 1 December 2012, vol.21, no.12, h.1851-1859.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 39/395 (2006.01); **A61K 2121/00** (2006.01)

(21)(22) Application: **2016140271, 16.04.2015**

(24) Effective date for property rights:
16.04.2015

Registration date:
19.04.2018

Priority:

(30) Convention priority:
24.04.2014 US 61/983,951

(45) Date of publication: **19.04.2018** Bull. № 11

(85) Commencement of national phase: **24.11.2016**

(86) PCT application:
IB 2015/052796 (16.04.2015)

(87) PCT publication:
WO 2015/162532 (29.10.2015)

Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**MARTINI Jean-francois Andre (US),
TARAZI Jamal Christo (US),
WILLIAMS James Andrew (US)**

(73) Proprietor(s):

Pfizer Inc. (US)

(54) **CANCER TREATMENT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present group of inventions refers to medicine, namely to oncology, and concerns the treatment of cancer. For this purpose, tumors sensitive to axitinib treatment are identified. To determine the sensitivity, measurement of the expression levels of the CD68 polypeptide in a tissue sample from a tumor, as

well as the percentage of CD68-positive cells and the density of CD68-positive cells in the tumor are used.

EFFECT: this provides a high probability of determining the effectiveness or ineffectiveness of treatment with axitinib and, accordingly, choosing the most appropriate therapy for each particular patient.

15 cl, 2 ex, 11 dwg

Область изобретения

Область описания настоящего изобретения охватывает молекулярную биологию, онкологию и клиническую диагностику.

Предшествующий уровень техники

5 Большинство противораковых лекарственных средств эффективны у некоторых пациентов, но не у других. Последнее может быть следствием генетической вариации среди опухолей, и может быть обнаружено даже среди опухолей у одного и того же пациента. Варьирование реакции у пациента особенно выражено в отношении
10 направленных терапевтических средств. Таким образом, полный потенциал направленных терапевтических средств не может быть реализован без подходящих тестов для определения того, в отношении каких пациентов какие лекарственные средства окажут положительное действие. В соответствии с Национальными Институтами Здравоохранения (NIH) термин "биомаркер" определяют как
15 "характеристику, которую объективно измеряют и оценивают как показатель нормальных биологических или патогенных процессов или фармакологическую реакцию на терапевтическое вмешательство".

Разработка улучшенных диагностических средств, основанных на открытии биомаркеров, обладает потенциалом к ускорению разработки новых лекарственных средств путем досрочной идентификации тех пациентов, которые наиболее вероятно
20 продемонстрируют клиническую реакцию на данное лекарственное средство. Такие диагностические средства обладают потенциалом к значительному уменьшению размера, длительности и стоимости клинических испытаний. Способы, такие как геномика, протеомика и молекулярная визуализация, в настоящее время обеспечивают быстрое, чувствительное и достоверное обнаружение специфических генных мутаций, уровней
25 экспрессии конкретных генов и других молекулярных биомаркеров. Несмотря на доступность различных способов молекулярного исследования опухолей, клиническое использование биомаркеров рака остается в значительной степени нереализованным, поскольку открыто относительно немного биомаркеров рака. Например, в недавней обзорной статье утверждается:

30 Сложность представляет собой открытие биомаркеров рака. Хотя существует клинический успех в нацеливании на молекулярно определенные подгруппы нескольких типов опухолей - таких как хроническая миелоидная лейкемия, желудочно-кишечная стромальная опухоль, рак легкого и мультиформная глиобластома - с использованием молекулярных агентов направленного действия, способность к применению такого
35 успеха в более широком контексте весьма ограничена отсутствием эффективной стратегии оценки агентов направленного действия у пациентов. Проблема в основном заключается в неспособности отобрать пациентов с молекулярно определенными видами рака для клинических испытаний для оценки этих многообещающих новых лекарственных средств. Для этого решения требуются биомаркеры, которые надежно
40 идентифицировали бы пациентов, которые наиболее вероятно испытывали бы благоприятное действие от конкретного агента (Sawyers, 2008, Nature 452:548-552, на стр. 548).

Комментарии, такие как вышеприведенный, иллюстрируют понимание необходимости обнаружения клинически полезных биомаркеров и диагностических способов,
45 основанных на таких биомаркерах.

Существуют три отдельных типа биомаркеров рака: (1) прогностические биомаркеры, (2) предиктивные биомаркеры и (3) фармакодинамические (PD) биомаркеры. Прогностический биомаркер используют для классификации рака, например солидной

опухоли в соответствии с агрессивностью, то есть скоростью роста и/или метастазирования и реакции на лечение. Он иногда называется как отличающий опухоли "с хорошим исходом" от опухолей "с плохим исходом". Предиктивный биомаркер используют для определения вероятности того, что конкретный пациент испытает благоприятное действие от лечения конкретным лекарственным средством. Например, пациенты, страдающие от рака молочной железы, у которых амплифицируется ген ERBB2 (HER2 или NEU), вероятно испытывают благоприятное действие от лечения трастузумабом (HERCEPTIN[®]), тогда как маловероятно, что пациенты без амплификации гена ERBB2 испытывают благоприятное действие от лечения трастузумабом. Биомаркер PD представляет собой показатель действия(действий) лекарственного средства на пациента, пока пациент принимает лекарственное средство. Соответственно, биомаркеры PD часто используют для установления уровня доз и частоты введения доз на ранних стадиях клинической разработки нового лекарственного средства. Обсуждение раковых биомаркеров смотри, например, в Sawyers, 2008, Nature 452:548-552.

Акситиниб (также известный как Inlyta[®]) представляет собой низкомолекулярный перорально вводимый ингибитор рецептора тирозинкиназы, который действует на рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR). Полагают, что акситиниб уменьшает рост и метастазирование опухоли путем ингибирования ангиогенеза и уменьшает рост опухоли и вызывает ремиссию путем действия непосредственно на клетки, которые экспрессируют и зависят от этих рецепторов. Акситиниб мультинационально одобрен для лечения метастатического почечно-клеточного рака (mRCC) после прогрессирования заболевания после применения цитокинов или сунитиниба (также известного как Sutent[®]) или устойчивости к ним.

Несмотря на большое количество доклинических и клинических исследований, сфокусированных на ингибиторах VEGFR, механизмы, ответственные за противоопухолевую активность таких ингибиторов, не полностью понятны. В частности, роль инфильтрирующихся в опухоль лимфоцитов при влиянии на прогноз mRCC у пациентов и чувствительность/устойчивость к антиангиогенным агентам не полностью понятна (например, смотри Polimeno et al., 2013, BJU Int 112:686-696). Как с другими типами направленной терапии, некоторые, но не все пациенты, испытывают благоприятное действие терапии акситинибом. Таким образом, существует потребность в диагностических способах, основанных на предиктивных биомаркерах, которые могут быть использованы для идентификации пациентов, страдающих от опухолей, которые вероятно (или маловероятно) реагируют на лечение акситинибом.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как в данном описании будет обсуждаться подробнее, описание настоящего изобретения частично относится к обнаружению того, что инфильтрация в опухоль миелоидных клеток (то есть кластер дифференцировки 68 "CD68") (например, повышенные уровни CD68 в выражениях процентного содержания CD68-положительных клеток и плотности CD68-положительных клеток) в образце ткани из опухоли млекопитающего коррелирует с повышенной выживаемостью без прогрессирования заболевания при использовании ингибиторов VEGFR, таких как акситиниб. Соответственно, в описании настоящего изобретения предложены способы идентификации опухоли, которая более вероятно положительно реагирует на лечение ингибиторами, такими как акситиниб, и к способам лечения субъектов, страдающих от опухолей, которые, как идентифицировано, с большей вероятностью реагируют на ингибиторы VEGFR, такие как акситиниб.

Например, в одном из воплощений описание относится к способу идентификации опухоли, чувствительной к лечению ингибитором VEGFR, включающему: (а) измерение уровня экспрессии полипептида CD68 в образце ткани из опухоли, полученной от пациента-человека, рассматриваемого для лечения ингибитором VEGFR; и (б) сравнение уровня экспрессии CD68 на стадии (а) против порогового уровня экспрессии CD68, определяемого путем измерения экспрессии полипептида CD68 в образцах ткани опухолей, полученных от пациентов-людей, которых ранее лечили ингибитором VEGFR, и которые, как было продемонстрировано, устойчивы к ингибитору VEGFR, и пациентов-людей, которых ранее лечили ингибитором VEGFR, и которые, как было продемонстрировано, чувствительны к ингибитору VEGFR, где уровень экспрессии CD68 выше порогового уровня свидетельствует о том, что опухоль чувствительна к лечению ингибитором VEGFR. В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб. В еще одном воплощении стадию измерения экспрессии полипептида CD68 осуществляют путем иммуногистохимии. В еще одном воплощении стадию измерения экспрессии полипептида CD68 путем иммуногистохимии осуществляют путем анализа изображения после сканирования всего слайда, при котором определяют процентное содержание CD68-положительных клеток в образце. В еще одном воплощении такие способы дополнительно включают стадию определения плотности CD68-положительных клеток в образце. В еще одном воплощении опухоль в любом из таких способов выбрана из группы, состоящей из опухоли молочной железы, опухоли легкого, опухоли почки, колоректальной опухоли и опухоли поджелудочной железы.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения mRCC, включающий введение ингибитора VEGFR пациенту, у которого определено наличие опухоли mRCC, чувствительной к ингибитору VEGFR в соответствии с любым из описанных в данном описании способов. В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий: а) определение процентного содержания CD68-положительных клеток в опухоли от субъекта; и б) введение этому субъекту ингибитора VEGFR, если указанное процентное содержание составляет по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 4,5%, по меньшей мере 4,6%, по меньшей мере 4,7%, по меньшей мере 4,8%, по меньшей мере 4,9%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 5,1%, по меньшей мере 5,2%, по меньшей мере 5,3%, по меньшей мере 5,4%, по меньшей мере 5,5%, по меньшей мере 5,6%, по меньшей мере 5,7%, по меньшей мере 5,8%, по меньшей мере 5,9%, по меньшей мере 6,0%, по меньшей мере 6,5%, по меньшей мере 7,0%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20%. В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий: а) определение плотности CD68-положительных клеток в опухоли от субъекта; и б) введение этому субъекту акситиниба, если указанная плотность клеток составляет по меньшей мере 0,05 клеток/мм², по меньшей мере 0,06 клеток/мм², по меньшей мере 0,07 клеток/мм², по меньшей мере 0,08 клеток/мм², по меньшей мере 0,09 клеток/мм², по меньшей мере 1,0 клетка/мм², по меньшей мере 1,1 клеток/мм², по меньшей мере 1,2 клеток/мм², по меньшей мере 1,3 клеток/мм², по меньшей мере 1,4 клеток/мм² или по меньшей мере 1,5 клеток/мм². В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, имеющему опухоль, ингибитора VEGFR, где по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 4,5%, по меньшей мере 4,6%, по меньшей мере 4,7%, по меньшей мере 4,8%, по меньшей мере 4,9%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 5,1%, по меньшей мере 5,2%, по меньшей мере 5,3%, по меньшей мере 5,4%, по меньшей мере 5,5%, по меньшей мере 5,6%, по меньшей мере 5,7%, по меньшей мере 5,8%, по меньшей мере 5,9%, по меньшей мере 6,0%, по меньшей мере 6,5%, по меньшей мере 7,0%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20% клеток в указанной опухоли являются CD68-положительными. В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, имеющему опухоль, ингибитора VEGFR, где плотность CD68-положительных клеток в указанной опухоли составляет по меньшей мере 0,05 клеток/мм², по меньшей мере 0,06 клеток/мм², по меньшей мере 0,07 клеток/мм², по меньшей мере 0,08 клеток/мм², по меньшей мере 0,09 клеток/мм², по меньшей мере 1,0 клетка/мм², по меньшей мере 1,1 клеток/мм², по меньшей мере 1,2 клеток/мм², по меньшей мере 1,3 клеток/мм², по меньшей мере 1,4 клеток/мм² или по меньшей мере 1,5 клеток/мм². В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий: а) определение процентного содержания C068-положительных клеток в опухоли от субъекта; б) определение плотности CD68-положительных клеток в этой опухоли; и в) введение этому субъекту ингибитора VEGFR, если указанное процентное содержание составляет по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 4,5%, по меньшей мере 4,6%, по меньшей мере 4,7%, по меньшей мере 4,8%, по меньшей мере 4,9%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 5,1%, по меньшей мере 5,2%, по меньшей мере 5,3%, по меньшей мере 5,4%, по меньшей мере 5,5%, по меньшей мере 5,6%, по меньшей мере 5,7%, по меньшей мере 5,8%, по меньшей мере 5,9%, по меньшей мере 6,0%, по меньшей мере 6,5%, по меньшей мере 7,0%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20%; и указанная клеточная плотность составляет по меньшей мере 0,05 клеток/мм², по меньшей мере 0,06 клеток/мм², по меньшей мере 0,07 клеток/мм², по меньшей мере 0,08 клеток/мм², по меньшей мере 0,09 клеток/мм², по меньшей мере 1,0 клетка/мм², по меньшей мере 1,1 клеток/мм², по меньшей мере 1,2 клеток/мм², по меньшей мере 1,3 клеток/мм², по меньшей мере 1,4 клеток/мм² или по меньшей мере 1,5 клеток/мм². В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, имеющему опухоль, ингибитора VEGFR, где по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 4,5%, по меньшей мере 4,6%, по меньшей мере 4,7%, по меньшей мере 4,8%, по меньшей мере 4,9%, по меньшей мере 5,0%, по меньшей мере 5,1%, по меньшей мере 5,2%, по меньшей мере 5,3%, по меньшей мере 5,4%, по меньшей мере 5,5%, по меньшей мере 5,6%, по меньшей мере 5,7%, по меньшей мере 5,8%, по меньшей мере 5,9%, по меньшей мере

мере 6,0%, по меньшей мере 6,5%, по меньшей мере 7,0%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20% клеток в указанной опухоли являются CD68-положительными; и где плотность CD68-положительных клеток в указанной опухоли составляет по меньшей мере 0,05
 5 клеток/мм², по меньшей мере 0,06 клеток/мм², по меньшей мере 0,07 клеток/мм², по меньшей мере 0,08 клеток/мм², по меньшей мере 0,09 клеток/мм², по меньшей мере 1,0 клетка/мм², по меньшей мере 1,1 клеток/мм², по меньшей мере 1,2 клеток/мм², по меньшей мере 1,3 клеток/мм², по меньшей мере 1,4 клеток/мм² или по меньшей мере
 10 1,5 клеток/мм². В одном из воплощений ингибитор VEGFR представляет собой акситиниб.

В еще одном воплощении в описании настоящего изобретения предложен любой из раскрытых в данном описании способов, где указанная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли молочной железы, опухоли легкого, опухоли почки,
 15 колоректальной опухоли и опухоли поджелудочной железы. В одном из воплощений в описании настоящего изобретения предложен любой из раскрытых в данном описании способов, где рак или опухоль представляет собой mRCC.

В других воплощениях осуществляют раскрытые в данном описании способы, где стадию измерения процентного содержания или плотности CD68-положительных клеток осуществляют с использованием иммуногистохимии и дополнительно используют анализ изображения после сканирования всего слайда из образца опухоли.

В некоторых воплощениях описания настоящего изобретения измерение содержания макрофагов осуществляют путем измерения присутствия или количества маркерного
 25 белка макрофагов. В других воплощениях измерение содержания макрофагов осуществляют путем определения количества макрофагов в данной клеточной популяции. Например, измерение содержания макрофагов может быть осуществлено путем иммуногистохимии, включающей обнаружение маркерного белка макрофагов. В еще одном воплощении измерение содержания макрофагов осуществляют путем
 30 измерения присутствия или количества мРНК, кодирующей маркерный белок макрофагов. Примеры маркерных белков макрофагов включают CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R и MSR1. Анализ определения пороговой величины может включать анализ при помощи рабочей характеристической кривой (receiver operator characteristic curve analysis). Способы в описании настоящего изобретения полезны для тестирования
 35 различных типов опухолей, включающих, например опухоли молочной железы, опухоли легкого, опухоли почки, колоректальные опухоли и опухоли поджелудочной железы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны демографические и базовые характеристики субъектов, включенных в исследование A4061032.

На Фиг. 2 показано обобщение процентного содержания и плотности положительных клеток в отношении биомаркеров CD3 и CD68 по слайдам по сравнению с блоками, которые были собраны как часть исследования A4061032.

На Фиг. 3 показан график Каплана-Мейера PFS (выживаемости без прогрессирования заболевания) для сравнения величин меньше медианы и больше, чем медиана или
 45 равных медиане процентного содержания и плотности клеток, положительных в отношении биомаркера CD68.

На Фиг. 4 показан график Каплана-Мейера PFS для сравнения величин меньше медианы и больше, чем медиана или равных медиане процентного содержания и плотности клеток, положительных в отношении биомаркера CD68, у пациентов, которых

ранее лечили Sutent[®].

На Фиг. 5 показан график Каплана-Мейера PFS для сравнения величин меньше медианы и больше, чем медиана или равных медиане процентного содержания и плотности клеток, положительных в отношении биомаркера CD3.

На Фиг. 6 показан график Каплана-Мейера PFS для сравнения величин меньше медианы и больше, чем медиана или равных медиане процентного содержания и плотности клеток, положительных в отношении биомаркера CD3, у пациентов, которых ранее лечили Sutent[®].

На Фиг. 7 показано обобщение OS (общей выживаемости) в соответствии с группой отсечения медианы меньше чем и больше чем или равной для каждого биомаркера CD3 и CD68 процентного содержания и плотности положительных клеток.

На Фиг. 8 показано обобщение OS в соответствии с группой отсечения медианы меньше чем и больше чем или равной для каждого биомаркера CD3 и CD68 процентного содержания и плотности положительных клеток у пациентов, которых ранее лечили Sutent[®].

На Фиг. 9 показан график Каплана-Мейера OS для сравнения величин меньше медианы и больше, чем медиана или равных медиане для биомаркеров CD3 и CD68 для процентного содержания и плотности положительных клеток у пациентов, которых ранее лечили Sutent[®].

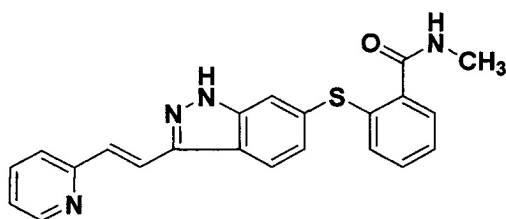
На Фиг. 10 показано обобщение для биомаркеров CD3 и CD68, процентного содержания и плотности положительных клеток в соответствии с категорией реакции.

На Фиг. 11 показано обобщение для биомаркеров CD3 и CD68, процентного содержания и плотности положительных клеток в соответствии с категорией реакции у пациентов, которых ранее лечили Sutent[®].

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Используемые здесь Inlyta[®], "AG-13736" и "акситиниб" обозначают 6-[2-(метилкарбамоил)фенилсульфанил]-3-E-[2-(пиридин-2-ил)этинил]индазол, имеющий следующую химическую структуру, включая его соли и полиморфные модификации:



Используемый здесь "маркерный белок макрофагов" обозначает белок клеточной поверхности макрофагов, обнаружение которого полезно для идентификации макрофагов среди других типов клеток, присутствующих в образце ткани из опухоли. Примеры маркерных белков человеческих макрофагов представляют собой CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R и MSRI. Другие маркерные белки макрофагов могут быть использованы в практическом применении описания настоящего изобретения.

Используемая здесь "рабочая характеристическая" (ROC) кривая обозначает график доли ложноположительных значений (чувствительность) относительно доли истинно положительных значений (специфичность) для бинарной системы классификации. При построении кривой ROC используют следующие определения:

- Доля ложноотрицательных значений "FNR" = 1 - TPR

- Доля истинно положительных значений "TPR" = истинно положительные значения / (истинно положительные + ложноотрицательные)

- Доля ложноположительных значений "FPR" = ложноположительные / (ложноположительные + истинно отрицательные)

5 Используемый здесь "реакция" или "реагирующий" в отношении лечения обозначает в отношении опухоли, которую лечат, что опухоль демонстрирует: (а) замедление роста, (б) прекращение роста или (в) ремиссию.

Используемый здесь "анализ определения порогового значения" обозначает анализ массива данных, представляющих данный тип опухоли, например рак почки у человека, для определения оценки порогового значения для данного конкретного типа опухоли. Массив данных, представляющих данный тип опухоли, может включать для каждой опухоли из группы таких опухолей: (а) реальные данные по реакции опухоли (реакция и отсутствие реакции на лечение, такое как акситиниб), и (б) содержание макрофагов и/или уровни экспрессии CD68.

15 Используемый здесь "оценка порогового значения" обозначает вышеприведенную оценку, где опухоль классифицируют как вероятно чувствительную к лечению, такому как лечение акситинибом.

Используемый здесь "уровень экспрессии CD68" или "уровень экспрессии полипептида CD68" обозначает уровень белка CD68, который экспрессируется в образце опухоли, и может быть определен при помощи любого подходящего аналитического способа, такого как иммуногистохимия. Кроме того, "уровень экспрессии CD68" может быть выражен различными терминами, включающими процентное содержание клеток в данном образце, которые определяют как "CD68-положительные", и плотность клеток в данном образце, которые определяют как "CD68-положительные".

25 Используемый здесь "CCR2" (хемокиновый (мотив C-C) рецептор 2, также известный как CD 192, CKR2, CMKBR2, MCP-I-R, CC-CKR-2, FLJ78302, MGC103828, MGC111760 и MGC168006) обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 729230, и его аллельными вариантами.

Используемый здесь "CD14" обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 929, и его аллельными вариантами.

Используемый здесь "CD68" (также известный как GP110; SCARD1; и DKFZp686M18236) обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 968, и его аллельными вариантами.

35 Используемый здесь "CD68-положительная" клетка представляет собой клетку, в которой присутствие CD68 обнаруживают при помощи любого подходящего аналитического способа, такого как иммуногистохимия.

Используемый здесь "CD163" (также известный как MI 30 и MM 130) обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 9332, и его аллельными вариантами.

40 Используемый здесь "CSF1R" (рецептор колониестимулирующего фактора 1, также известный как CSFR, FMS, FIM2, C-FMS и CD115) обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 1436, и его аллельными вариантами.

Используемый здесь "MSR1" (фагоцитарный рецептор макрофагов 1, также названный CD204, SCARA1, SR-A, phSRI и phSR2) обозначает человеческий белок, кодируемый геном, идентифицированным как Entrez GeneID No. 4481, и его аллельными вариантами.

Используемый здесь "HR" обозначает отношение рисков. На Фиг. 3, 4, 5, 6 и 9, с допущением пропорциональных рисков, отношение рисков больше, чем 1 указывает

на уменьшение уровня рисков в сторону < медианы; отношение рисков меньше, чем 1 указывает на уменьшение уровня рисков в сторону $\geq$ медианы; и логранговые р-величины получали только тогда, когда $N \geq 10$ в обеих группах сравнения. На Фиг. 7 и 8, с допущением пропорциональных рисков, отношение рисков больше, чем 1 указывает на уменьшение уровня рисков в сторону < медианы; отношение рисков меньше, чем 1 указывает на уменьшение уровня рисков в сторону $\geq$ медианы; и логранговую р-величину получали только тогда, когда $N \geq 10$ в обеих группах сравнения; и статистику отношения рисков получали только тогда, когда $N \geq 5$ в обеих группах сравнения; тем не менее, логранговую р-величину и отношение рисков удаляли тогда, когда в обеих группах обнаруживали нулевую точку.

Клинические исследования

Inlyta[®], далее называемый как акситиниб, представляет собой перорально вводимый низкомолекулярный ингибитор рецептора тирозинкиназы, который действует на рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR). Ожидается, что акситиниб уменьшает опухолевый рост и метастазирование путем ингибирования ангиогенеза и уменьшает опухолевый рост и вызывает ремиссию путем действия непосредственно на клетки, которые экспрессируют и зависят от этих рецепторов. Акситиниб мультинационально одобрен для лечения метастатического почечно-клеточного рака (mRCC) после прогрессирования заболевания после применения цитокинов или сунитиниба или устойчивости к ним.

Исследование A4061032 (идентификатор клинических испытаний: NCT00678392 (Clinical Trials. gov Identifier)) представляло собой регистрационное испытание 3 фазы, озаглавленное "Акситиниб (AG-013736) в качестве терапии второй линии метастатического почечно-клеточного рака: осевое испытание". Это испытание было разработано для того, чтобы продемонстрировать то, что акситиниб превосходит сорафениб в отношении замедления прогрессирования опухоли у пациентов, страдающих от mRCC, после неудачи одной схемы первой линии. В общей сложности планировали включить 650 пациентов, и 723 субъекта в конечном счете были вовлечены в исследование.

Как подробнее описано в примерах, фиксированные в формалине погруженные в парафин (FFPE) образцы опухоли собирали у пациентов, которые принимали участие в A4061032, и которые предоставили специфическое согласие для сбора образца опухоли. Инфильтрацию опухоли миелоидными клетками (кластер дифференцировки 68 "CD68") или лимфоцитами (кластер дифференцировки 3 "CD3") оценивали путем иммуногистохимии (ИНС) в образцах опухолей 52 пациентов, которых лечили акситинибом. Задача заключалась в том, чтобы исследовать возможную ассоциацию этих биомаркеров с эффективностью, согласующуюся с гипотезой о том, что инфильтрация миелоидными клетками придает устойчивость к анти-ангиогенным агентам, нацеленным на путь VEGF-VEGFR2 (смотри Shojaei et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(8):911-920; и Lin et al. (2010) Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191).

Оценку CD3 и CD68 осуществляли путем анализа изображения после сканирования всего слайда. Интересующую область обводили кругом, и осуществляли алгоритм анализа изображения. Измеряли процентное содержание положительных клеток (количество положительных клеток/общее количество клеток) и плотность положительных клеток (например, количество положительных клеток/мм²). Некоторые пациенты были донорами блоков FFPE, а некоторые были донорами слайдов, нарезанных из блоков. Анализировали образцы всех пациентов, независимо от того, были ли они донорами материала для слайдов или блоков.

Для данных ИНС оценивали 52 пациента, 33 из которых ранее лечили Sutent[®] (сунтинибом). Отсутствовали корреляции между данными по CD3 и любым из измеряемых конечных результатов. Как подробнее описано в примерах, для CD68 процентное содержание положительных клеток и плотность клеток тесно коррелировали и были в два раза выше у пациентов с объективной реакцией по сравнению с пациентами, не демонстрирующими объективную реакцию.

Независимо от предшествующего лечения, медиана выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS) у пациентов с величинами $\geq$ медианы величин CD68 (отсечение = 5,21% положительных клеток или плотность клеток 0,08 клеток/мм²) составила 12,0 месяцев для обеих точек отсечения по сравнению с 3,7 и 3,8 месяцами, соответственно, для пациентов с величинами $<$ медианы величин для биомаркера (отношение рисков [HR]=0,42, логранговая р-величина $\leq$ 0,01). Для пациентов, которых ранее лечили Sutent[®], обнаружена похожая с PFS тенденция с пограничной статистической значимостью (р-величины: 0,066 и 0,056 для % положительных клеток и плотности клеток, соответственно). Похожие тенденции благоприятной эффективности обнаружены для объективной реакции и общей выживаемости (OS) пациентов с относительно более высоким количеством клеток CD68, хотя эти различия не были статистически значимыми, когда всех пациентов исследовали вместе или когда исследовали только пациентов, которых предварительно лечили Sutent[®].

Дополнительные анализы при помощи рабочей характеристической кривой (ROC) осуществляли для более хорошего понимания чувствительности и специфичности базовых уровней опухоли CD68 и для оптимизации определения отсекающих значений для CD68 на основании исходных выбранных значений медианы для CD68. Выбрали отсекающие значения по умолчанию 2, 4, 6 и 8 месяцев для PFS, и вновь обнаружили, что пациенты с более высоким процентным содержанием CD68-положительных клеток и плотностью клеток имели большие значения PFS (или эквивалентно меньшую вероятность прогрессирования заболевания или смерти) в каждый из четырех моментов времени PFS.

Как подробнее описано в примерах, самые высокие обнаруженные величины чувствительности, специфичности и величины площади под кривой (AUC) были обнаружены для PFS 2 месяца, где AUC для кривой ROC составили 0,776 и 0,809 для процентного содержания CD68-положительных клеток и плотности клеток, соответственно, что указывает на убедительную общую диагностическую точность для PFS с использованием уровней экспрессии CD68. Оптимальные отсекающие значения для предсказания PFS на уровне 6 месяцев составляли 4,41% и 0,06 клеток/мм² для процентного содержания и плотности CD68-положительных клеток, соответственно. Величины были похожими для пациентов, которых ранее лечили Sutent[®].

Анализ ROC также использовали для измерения CD68 по сравнению с ORR (частотой объективных реакций). Как подробнее описано в примерах, AUC составляли 0,791 и 0,784 для процентного содержания и плотности CD68-положительных клеток, соответственно, что вновь указывает на убедительную общую точность предсказания ORR с использованием уровней экспрессии CD68. Оптимальные отсекающие значения для предсказания ORR составили 9,42% и 0,13 клеток/мм² для процентного содержания и плотности CD68-положительных клеток, соответственно. Величины были похожими для пациентов, которых ранее лечили Sutent[®]. Для вероятности выживаемости через 21 месяц, представляющей собой величину медианы для испытания, анализ ROC не

продемонстрировал статистически значимую ассоциацию с AUC 0,559,

В заключение, независимо от предшествующего лечения благоприятные PFS обнаружены для пациентов с более высокими уровнями опухолевых CD68. Медиана PFS у пациентов с величинами > величины медианы CD68 составила 12,0 месяцев для
 5 обоих отсекающих значений по сравнению с 3,7 и 3,8 месяцами для пациентов с величинами < величин медианы для биомаркера (HR=0,42, логранговая р-величина ≤ 0,01). Анализ ROC свидетельствовал об убедительной предсказывающей величине для этих данных через 2, 4, 6 и 8 месяцев, и уточненных отсекающих значениях (через 6
 10 месяцев - 4,41% и 0,06 клеток/мм² для процентного содержания CD68-положительных клеток и плотности клеток).

Соответственно, описание настоящего изобретения относится к обнаружению того, что более высокая экспрессия CD68 ассоциируется с более высокими ORR и более длительными PFS для пациентов, которых лечили ингибитором VEGFR, таким как акситиниб. Отсутствие ассоциации с OS может быть следствием искажающего результат
 15 лечения после прогрессирования при применении акситиниба. Эти наблюдения согласуются с механизмом увеличенной продукции VEGF и ассоциированным ангиогенным статусом с более высокой инфильтрацией макрофагов, и, таким образом, большей чувствительностью к эффектам лечения акситинибом. ROC анализ PFS, представляющий собой регистрационный конечный результат, демонстрировал большую
 20 чувствительность и специфичность после двух месяцев лечения.

Ранее сообщали о том, что экспрессия CD68 ассоциирована с исходом для пациентов с mRCC, получающих лечение тивозанибом (Lin et al. (2010) Eur. J. Cancer Suppl. 8(7): 191). Также ранее показали, что миелоидные (CD11b Gr+) клетки придают устойчивость
 25 к бевацизумабу в животной модели рака легкого (Shojaei et al. (2007) Nat Biotechnol. 25 (8):911-920). Эти данные могут согласовываться с более плохими исходами для пациентов с более высокими опухолевыми уровнями CD68. Тем не менее, последнее не было обнаружено в этом исследовании.

Для пациентов RCC значимый прогресс был получен при идентификации прогностических биомаркеров, но не были идентифицированы никакие предиктивные
 30 маркеры эффективности для направленных ингибиторов VEGFR, таких как акситиниб. В соответствии с недавним обзором (Tonini G et al. (2011) Exper Rev Anticancer Ther 11 (6):921-930), выбор наиболее подходящей терапии для пациентов с RCC все еще зависит от критериев риска (MSKCC) и других прогностических критериев. Кроме того, авторы указывают на то, что эти комбинированные критерии обеспечивают информацию об
 35 исходе для пациента с RCC, и что необходимы эти предиктивные факторы реакции на терапию для mRCC. Существует необходимость в валидации потенциальных маркеров в рандомизированных клинических испытаниях (Id.). Стандартизация забора ткани и анализа также указывается как основная трудность в разработке молекулярных
 40 биомаркеров для потенциального направления терапии (Sonpavde G and Choueiri T, (2012) Br J Cancer 107(7):1009-1016).

Способы и аналитические методы, которые могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения, дополнительно раскрыты ниже.

Образец ткани

Образец ткани из опухоли от пациента-человека может быть использован в качестве
 45 источника РНК, источника белка или источника тонких срезов для иммуногистохимии (ИНС), таким образом, уровень экспрессии CD68 в образце может быть определен, как изложено в описании настоящего изобретения. Образец ткани может быть получен с использованием обычных приборов и процедур для биопсии опухоли. Эндоскопическая

биопсия, эксцизионная биопсия, инцизионная биопсия, тонкоигольная пункционная биопсия, штанцевая биопсия, бритвенная биопсия и биопсия кожи представляют собой примеры признанных медицинских процедур, которые могут быть использованы специалистом в данной области техники для получения образцов опухолей. Образец

5 опухолевой ткани должен быть достаточно большим для того, чтобы обеспечить достаточно РНК, белка или тонких срезов для измерения маркерного гена, например уровня экспрессии CD68 или визуализации макрофагов при помощи ИНС, например экспрессии CD68-положительных клеток.

Образец опухолевой ткани может находиться в любой форме, которая дает

10 возможность для измерения содержания макрофагов или, в частности, CD68. Другими словами, образец ткани должен быть достаточен для экстракции РНК, экстракции белка или приготовления тонких срезов. Соответственно, образец ткани может быть свежим, фиксированным при помощи подходящих криогенных способов или фиксированным при помощи некриогенных способов. Стандартный способ обработки образцов

15 клинической биопсии заключается в фиксации тканевого образца в формалине и затем его заключения в парафин. Образцы в этой форме обычно известны как фиксированная в формалине заключенная в парафин (FFPE) ткань. Подходящие способы приготовления ткани для последующего анализа хорошо известны специалистам в данной области техники.

20 Содержание макрофагов

При практическом применении описания настоящего изобретения определение уровня содержания макрофагов (например количество макрофагов или экспрессия макрофагального маркера, такого как CD68, например экспрессия маркерного белка макрофагов или экспрессия мРНК, кодирующей маркерный белок макрофагов, такой

25 как CD68) в образце ткани (например из опухоли) может быть осуществлено при помощи любого подходящего способа из нескольких существующих. Например, измерение содержания макрофагов опосредованно может быть осуществлено путем измерения экспрессии одного или более чем одного из генов, которые, как известно, полезны в качестве маркеров макрофагов, таких как CD68. В области техники известны различные

30 способы измерения экспрессии генов. Такие способы могут быть использованы при определении уровня маркерных белков макрофагов или мРНК, кодирующей маркерные белки макрофагов. Примеры маркерных генов человеческих макрофагов представляют собой CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R и MSR1. Также могут быть использованы другие маркеры макрофагов.

35 Анализ РНК

Обычный микроматричный анализ и количественная полимеразная цепная реакция (QPCR) представляют собой примеры способов определения уровня экспрессии маркерных генов макрофагов на уровне мРНК. В некоторых воплощениях описания РНК экстрагируют из клеток, опухоли или интересующей ткани с использованием

40 стандартных протоколов. В других воплощениях анализ РНК осуществляют с использованием способов, которые не требуют выделения РНК.

Выделение РНК

Способы быстрой и эффективной экстракции эукариотической мРНК, то есть поли

(а) РНК, из образцов тканей хорошо признаны и известны специалистам в данной

45 области техники. Смотри, например, Ausubel et al., 1997, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons. Образец ткани может представлять собой свежие, замороженные или фиксированные заключенные в парафин (FFPE) образцы, такие как образцы опухоли, полученные в результате клинического исследования. В общем, РНК,

выделенная из свежих или замороженных образцов ткани, имеет тенденцию к тому, чтобы быть менее фрагментированной, чем РНК из образцов FFPE. Тем не менее, образцы FFPE опухолевого материала легче доступны, и образцы FFPE представляют собой подходящие источники РНК для применения в способах в соответствии с описанием настоящего изобретения. Обсуждение образцов FFPE в качестве источников РНК для профилирования генной экспрессии при помощи RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой), смотри, например, Clark-Langone et al., 2007, BMC Genomics 8:279. Также смотри De Andres et al., 1995, Biotechniques 18:42044; и Baker et al., публикация заявки на патент США No. 2005/0095634. Применение имеющихся в продаже наборов с инструкциями производителя в отношении экстракции и получения РНК широко распространено и является обычным. Производители различных продуктов выделения РНК и полных наборов включают Qiagen (Valencia, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA), Ambion (Austin, TX) и Exiqon (Woburn, MA).

В общем, выделение РНК начинается с разрушения ткани/клеток. Во время разрушения ткани/клеток желательно минимизировать деградацию РНК РНКазы. Один из подходов к ограничению активности РНКазы во время процесса выделения РНК заключается в обеспечении того, что денатурирующий агент находится в контакте с клеточным содержимым во время разрушения клеток. Еще один обычный практический подход заключается в том, чтобы включать одну или более чем одну протеазу в способ выделения РНК. Возможно, что свежие образцы тканей погружают в раствор для стабилизации РНК при комнатной температуре при их сборе. Стабилизирующий раствор быстро проникает в клетки, стабилизируя РНК для хранения при 4 градусах Цельсия для последующего выделения.

В некоторых протоколах общую РНК выделяют из разрушенного опухолевого материала путем центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия. В общем, мРНК составляет приблизительно от 1 процента до 5 процентов от общей клеточной РНК. Имобилизованные олиго(dT), например олиго(dT)целлюлозу, обычно используют для отделения мРНК от рибосомальной РНК и транспортной РНК. При хранении после выделения РНК должна храниться в условиях без РНКазы. Способы стабильного хранения выделенной РНК известны в области техники. Существуют различные имеющиеся в продаже продукты для стабильного хранения РНК.

Микроматрица

Уровень экспрессии мРНК одного или более чем одного гена, кодирующего маркерные белки макрофагов, такие как CD68, может быть измерен с использованием обычного способа профилирования экспрессии ДНК на микроматрицах. Микроматрица ДНК представляет собой совокупность специфических сегментов ДНК или зондов, фиксированных на твердой поверхности или субстрате, таком как стекло, пластик или кремний, где каждый специфический сегмент ДНК занимает в матрице известное положение. Гибридизация с образцом меченой РНК, обычно в строгих условиях гибридизации, дает возможность для обнаружения и количественного определения молекул РНК, соответствующих каждому зонду в матрице. После отмывки в строгих условиях для удаления неспецифически связанного материала образца микроматрицу сканируют при помощи конфокальной лазерной микроскопии или другого подходящего способа обнаружения. Современные имеющиеся в продаже микроматрицы ДНК, часто известные как чипы ДНК, как правило, содержат десятки тысяч зондов, и, таким образом, одновременно могут измерять экспрессию десятков тысяч генов. Такие микроматрицы могут быть использованы при практической реализации описания настоящего изобретения. Альтернативно, специализированные чипы, содержащие

минимальное количество зондов, необходимое для измерения экспрессии одного или более чем одного гена, кодирующего маркерные белки макрофагов, такие как CD68, вместе с необходимыми контролями или стандартами, например, для нормализации данных, могут быть использованы при практической реализации описания изобретения.

Для облегчения нормализации данных может быть использован двухцветный микропланшетный ридер. В двухцветной (двухканальной) системе образцы метят первым флуорофором, который излучает при первой длине волны, тогда как стандарт РНК или кДНК мечен вторым флуорофором, который излучает при отличающейся длине волны. Например Cy3 (570 нм) и Cy5 (670 нм) часто используют вместе в двухцветных системах микроматриц.

Способ микроматриц ДНК хорошо разработан, имеется в продаже и широко используется. Таким образом, при осуществлении раскрытых в данном описании способов специалист в данной области техники без избыточных экспериментов может использовать способ микроматриц для измерения уровней экспрессии генов, кодирующих маркерные белки макрофагов, такие как CD68. Чипы микроматриц ДНК, реагенты (такие как реагенты для получения РНК или кДНК, мечения РНК или кДНК, гибридизации и промывающие растворы), приборы (такие как микроматричные ридеры) и протоколы хорошо известны в области техники и доступны из различных коммерческих источников. Производители систем микроматриц включают Agilent Technologies (Santa Clara, CA) и Affymetrix (Santa Clara, CA), но также могут быть использованы другие системы PCR.

Количественная RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой)

Уровень мРНК, представляющий отдельные гены, кодирующие маркерные белки макрофагов, такие как CD68, может быть измерен с использованием способа обычной количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (qRT-PCR). Преимущества qRT-PCR включают чувствительность, гибкость, количественную точность и способность различать близкородственные мРНК. Руководство, относящееся к обработке образцов ткани для количественной ПЦР, доступно из различных источников, включающих изготовителей и производителей имеющихся в продаже продуктов для qRT-PCR (например, Qiagen (Valencia, CA) и Ambion (Austin, TX)). Системы приборов для автоматизированного осуществления qRT-PCR имеются в продаже и стандартно используются во множестве лабораторий. Пример хорошо известной имеющейся в продаже системы представляет собой систему для PCR в реальном времени Applied Biosystems 7900HT Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA).

После выделения мРНК первая стадия в профилировании генной экспрессии путем RT-PCR представляет собой обратную транскрипцию матрицы мРНК в кДНК, которая затем экспоненциально амплифицируется в реакции PCR. Две обычно используемые обратные транскриптазы представляют собой обратную транскриптазу вируса миелобластома птиц (AMV-RT) и обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV-RT). Реакцию обратной транскрипции как правило иницируют специфическими праймерами, произвольными гексамерами или олиго(dT) праймерами. Получающийся в результате продукт кДНК может быть использован в качестве матрицы в последующей полимеразной цепной реакции.

Стадию PCR осуществляют с использованием термостабильной ДНК-зависимой ДНК полимеразы. Полимераза, чаще всего используемая в системах PCR, представляет собой полимеразу *Thermus aquaticus* (Taq). Избирательность PCR возникает в результате использования праймеров, которые являются комплементарными к области ДНК, предназначенной для амплификации, то есть областям кДНК, полученным путем

обратной транскрипции генов, кодирующих маркерные белки макрофагов, такие как CD68. Таким образом, когда в описании настоящего изобретения используют qRT-PCR, тогда праймеры, специфичные к каждому маркерному гену, основаны на последовательности кДНК этого гена. Имеющиеся в продаже технологии, такие как

5 SYBR[®] green или TaqMan[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA), могут быть использованы в соответствии с указаниями производителя. Уровни матричной РНК могут быть нормализованы для различий в загрузке между образцами путем сравнения уровней генов "домашнего хозяйства", таких как бета-актин или GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). Уровень экспрессии мРНК может быть выражен относительно
10 любого единичного контрольного образца, такого как мРНК из нормальной неопухолевой ткани или клеток. Альтернативно, он может быть выражен относительно мРНК совокупности опухолевых образцов или линий опухолевых клеток или в имеющемся в продаже наборе контрольных мРНК.

Подходящие наборы праймеров для анализа уровней экспрессии генов, кодирующих маркерные белки макрофагов, такие как CD68, путем PCR, могут быть сконструированы и синтезированы специалистом в данной области техники без чрезмерного экспериментирования. Альтернативно, наборы праймеров для PCR для практической реализации описания настоящего изобретения могут быть приобретены в коммерческих источниках, например Applied Biosystems. Праймеры для PCR предпочтительно имеют
20 длину приблизительно от 17 до 25 нуклеотидов. Праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь конкретную температуру плавления (T_m) при использовании обычных алгоритмов для оценки T_m. Программное обеспечение для конструирования праймеров и оценки T_m имеется в продаже, например Primer Express[™] (Applied Biosystems), и также имеется в интернете, например, Primer3 (Massachusetts
25 Institute of Technology). Путем применения общепринятых принципов конструирования праймеров для PCR большое количество различных праймеров может быть использовано для измерения уровня экспрессии любого заданного гена, включая маркерные гены макрофагов, такие как CD14, CD68, MSR1, CSFR1, CD163 и CCR2.

В некоторых воплощениях описания анализ РНК осуществляют с использованием способа, который не включает экстракцию или выделение РНК. Один из таких способов представляет собой количественный способ анализа с защитой от действия нуклеаз, имеющийся в продаже под товарным знаком qNPA[™] (High Throughput Genomics, Inc., Tucson, AZ). Этот способ может быть благоприятным в том случае, когда образцы
35 тканей опухолей, которые должны быть проанализированы, находятся в форме материала FFPE. Смотри, например Roberts et al., 2007, Laboratory Investigation 87:979-997.

Анализ белков

В способах в соответствии с описанием изобретения экспрессия маркерного гена макрофагов, такого как CD68, может быть обнаружена на уровне белка. Примеры способов измерения уровня экспрессии маркерного гена макрофагов на уровне белка включает твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ путем ИHC (иммуногистохимия).

ELISA

45 Для осуществления ELISA маркерного белка макрофагов, например ELISA CD68, требуется по меньшей мере одно антитело против маркерного белка макрофагов, то есть детектирующее антитело. В одном из примеров воплощений CD68 представляет собой маркерный белок макрофагов. Белок CD68 из анализируемого образца

иммобилизован на твердом носителе, таком как полистирольный титрационный микропланшет. Указанная иммобилизация может быть осуществлена путем неспецифического связывания CD68, например путем адсорбции на поверхности.

Альтернативно, иммобилизация может быть осуществлена путем специфического

5 связывания, например путем связывания белка CD68 из образца при помощи иммобилизованного антитела (антитело против CD68, отличающееся от детектирующего антитела) в ELISA "сэндвич". После иммобилизации CD68 добавляют детектирующее антитело, и детектирующее антитело образует комплекс со связанным CD68.

Детектирующее антитело связано с ферментом прямо или опосредованно, например 10 через вторичное антитело, которое специфически распознает детектирующее антитело.

Как правило, между каждыми стадиями планшет со связанным CD68 промывают раствором мягкого детергента. Типичные протоколы ELISA также включают одну или более чем одну блокирующую стадию, которая включает применение неспецифически связывающего белка, такого как бычий сывороточный альбумин, для блокирования

15 нежелательного неспецифического связывания белковых реагентов с планшетом. После окончательной стадии промывания планшет окрашивают путем добавления подходящего ферментного субстрата с образованием видимого сигнала, который

указывает на количество CD68 в образце. Субстрат может представлять собой, например хромогенный субстрат или флуорогенный субстрат. Способы, реагенты и оборудование

20 ELISA хорошо известны в области техники и имеются в продаже.

Понятно, что уровни экспрессии других маркерных белков макрофагов, например CCR2, CD14, CD163, CSF1R и MSR1, а также других специфических маркерных белков макрофагов могут быть измерены при помощи ELISA с использованием детектирующих антител, специфичных для каждого маркерного белка макрофагов.

25 Иммуногистохимия (ИНС)

Количество макрофагов в данной клеточной популяции может быть определено (например визуализировано) путем иммуногистохимии. Дополнительно, процентное содержание и плотность клеток в образце, которые являются положительными в отношении данного биомаркерного белка, такого как CD68, могут быть определены

30 при помощи иммунохимии. Для исследования маркерного белка макрофагов при помощи ИНС, например ИНС CD68, требуется по меньшей мере одно антитело против маркерного белка макрофагов, например, по меньшей мере одно антитело против CD68. Многочисленные антитела против CD68, подходящие для ИНС, имеются в продаже.

Например, подходящие антитела могут быть приобретены в Dako North America, Inc.

35 (Carpinteria, CA), abcam (Cambridge, MA), Abnova (Walnut, CA), R and D Systems (Minneapolis, MN) или Invitrogen (Carlsbad, CA). С использованием стандартных способов антитело против CD68 может быть использовано для обнаружения присутствия белка CD68 в срезах, например 5-микронных срезах, полученных из опухолей, включая срезы погруженных в парафин и замороженных опухолей.

Как правило, срезы опухолей 40 исходно обрабатывают таким образом, чтобы восстановить антигенную структуру белков, которые были фиксированы при исходном способе сбора и консервации материала опухоли. Слайды затем блокируют для предупреждения неспецифического связывания с детектирующим антителом против CD68.

Присутствие белка CD68 затем обнаруживают путем связывания антитела против CD68 с белком CD68. Детектирующее

45 (первичное) антитело связывается с ферментом прямо или опосредованно, например, посредством вторичного антитела или полимера, который специфически распознает детектирующее (первичное) антитело. Как правило, срезы опухолей между стадиями промывают и блокируют неспецифическим белком, таким как бычий сывороточный

альбумин. Слайд проявляют с использованием подходящего ферментного субстрата с получением видимого сигнала. Образцы могут быть докрашены гематоксилином.

Понятно, что экспрессия других маркерных белков макрофагов, например CCR2, CD14, CD163, CSF1R и MSR1, а также других специфических маркерных белков макрофагов может быть обнаружена при помощи ИНС аналогичным образом с использованием антител, специфичных для каждого маркерного белка макрофагов.

Интерпретация данных

Оценка опухоли при помощи макрофагов может быть интерпретирована по сравнению с пороговой величиной. Оценка при помощи макрофагов или уровень экспрессии конкретного биомаркера, такого как CD68, который равен или выше пороговой величины, может быть интерпретирован как прогнозирование того, что опухоль вероятно чувствительна (реагирует) на лечение ингибитором VEGFR, таким как акситиниб. Альтернативно, оценки при помощи макрофагов или уровень экспрессии конкретного биомаркера, такого как CD68, равные или меньше, чем пороговая оценка, могут быть интерпретированы как прогнозирующие то, что опухоль вероятно устойчива (не реагирует) на лечение ингибитором VEGFR, таким как акситиниб.

Оптимальная пороговая оценка для макрофагов или уровня экспрессии CD68 может быть определена (или по меньшей мере аппроксимирована) эмпирически путем осуществления анализа определения порогового значения. Предпочтительно, анализ определения порогового значения включает анализы при помощи рабочей характеристической кривой (ROC). Анализ при помощи рабочей характеристической кривой ROC представляет собой общепринятый статистический способ, применение которого находится в пределах знаний специалиста в данной области техники. Обсуждение анализа при помощи рабочей характеристической кривой ROC в целом смотри в Zweig et al., 1993, "Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine," Clin. Chem. 39:561-577; и Pepe, 2003. The statistical evaluation of medical tests or classification and prediction, Oxford Press, New York.

Оценки для макрофагов, уровни экспрессии CD68 и оптимальные пороговые оценки могут варьировать в зависимости от типа опухоли. Таким образом, анализ определения порогового значения предпочтительно осуществляют с использованием одного или более чем одного массива данных, представляющего любой заданный тип опухоли, который тестируют с использованием описания настоящего изобретения. Массив данных, используемый для анализа определения порогового значения, включает: (а) реальные данные о реакции (реакция или отсутствие реакции), и (б) оценка для макрофагов или уровня экспрессии CD68 для каждого образца опухоли из группы опухолей. После определения порогового значения для оценки для макрофагов или уровня экспрессии CD68 в отношении заданного типа опухоли данное пороговое значение может быть применено для интерпретации оценок для макрофагов или уровней экспрессии CD68 для опухолей данного типа.

Анализ при помощи рабочей характеристической кривой ROC может быть осуществлен следующим образом. Любой образец с оценкой для макрофагов или уровнем экспрессии CD68, большим, чем или равным пороговой величине, идентифицируют как демонстрирующий реакцию (чувствительный). Альтернативно, любой образец с оценкой для макрофагов или уровнем экспрессии CD68, меньшим, чем или равным пороговой величине, идентифицируют как не демонстрирующий реакцию (устойчивый). Для каждой оценки для макрофагов или уровня экспрессии CD68 из тестированной совокупности образцов "демонстрирующие реакцию" и "не демонстрирующие реакцию" (предполагаемые отклики) классифицируют с

использованием этой оценки, как пороговой. Это способ дает возможность для расчета TPR (вектор y) и FPR (вектор x) для каждой потенциальной пороговой величины путем сравнения предполагаемых откликов с реальными данными о реакции для совокупности данных. Затем строят кривую ROC путем построения точечной диаграммы с использованием вектора TPR и вектора FPR. Если кривая ROC находится выше диагонали от точки (0, 0) до точки (1, 0, 0, 5), то это свидетельствует о том, что результат теста для макрофагов представляет собой более хороший тест, нежели чем произвольный.

Кривая ROC может быть использована для идентификации самой лучшей рабочей точки. Самая хорошая рабочая точка представляет собой точку, которая обеспечивает лучшее равновесие между весовой оценкой ложноположительных значений и весовой оценкой ложноотрицательных значений. Эти весовые оценки не обязательно должны быть равны. Усредненную ожидаемую оценку классификации в точке x, y в пространстве ROC определяют при помощи следующей формулы.

$$C = (1-p) \alpha x + p \beta (1-y)$$

где:

α = весовая оценка ложноположительных значений,

β = весовая оценка потери положительных значений (ложноотрицательных), и

p = доля положительных случаев.

Ложноположительные и ложноотрицательные значения могут быть взвешены отличающимся образом путем присвоения отличающихся величин для α и β . Например, если решено включать больше пациентов в группу пациентов, демонстрирующую реакцию, за счет лечения большего количества пациентов, которые не демонстрируют реакцию, то можно придать α больший вес. В этом случае предполагается, что весовая оценка ложноположительных и ложноотрицательных значений будет одинаковой (α равен β). Таким образом, средняя ожидаемая весовая оценка классификации в точке x, y в пространстве ROC представляет собой:

$$C' = (1-p) x + p (1-y).$$

Самое меньшее значение C' может быть рассчитано затем с использованием всех пар ложноположительных и ложноотрицательных значений (x, y). Оптимальное пороговое значение весовой оценки рассчитывают как весовую оценку в точке (x, y) при C' .

Дополнительно к прогнозированию того, будет ли опухоль чувствительной или устойчивой к ингибитору VEGFR, такому как акситиниб, оценка для макрофагов или уровень экспрессии CD68 представляют приблизительный, но полезный показатель того, насколько вероятно опухоль является чувствительной или устойчивой.

Тестовые наборы

Описание включает диагностический тестовый набор, содержащий определенные компоненты для осуществления способов в соответствии с описанием настоящего изобретения. Диагностический тестовый набор повышает удобство, скорость и воспроизводимость при осуществлении диагностических анализов. Например, в примере воплощения в соответствии с описанием, основанного на qRT-PCR, основной диагностический тестовый набор включает праймеры для PCR для анализа экспрессии маркеров макрофагов, например CD68. В других воплощениях более тщательно проработанный тестовый набор содержит не только праймеры для PCR, но также буферы, реагенты и подробные инструкции по измерению уровней экспрессии CD68 с использованием способа PCR. В некоторых воплощениях набор включает протокол теста и все расходные материалы, необходимые для теста, за исключением образца(ов)

РНК.

В примере воплощения в соответствии с описанием, основанного на микроматрице ДНК, тестовый набор включает микрофлюидную карту (матрицу), разработанную для применения с конкретным оборудованием. Возможно, что микрофлюидная карта представляет собой устройство, изготовленное по заказу, специально разработанное для измерения экспрессии маркерных генов макрофагов. Такие изготовленные по заказу микрофлюидные карты имеются в продаже. Например, матрица TaqMan представляет собой 384-луночную микрофлюидную карту (матрицу), разработанную для применения с системой PCR в реальном времени Applied Biosystems 7900HT Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA). Пример флюидной карты может включать любую комбинацию зондов для измерения экспрессии CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R и/или MSR1 вместе с необходимыми контролями или стандартами, например для нормализации данных. Другие маркерные белки макрофагов также могут быть включены в флюидную карту для практической реализации описания изобретения.

В некоторых воплощениях описания изобретения тестовый набор содержит материалы для определения содержания макрофагов в опухоли при помощи ИНС. Набор для ИНС, например, может содержать первичное антитело против человеческого маркера макрофагов, например мышинное антитело против человеческого CD68, и вторичное антитело, конъюгированное с ферментом-репортером, например пероксидазой хрена. В некоторых воплощениях вторичное антитело заменено на конъюгированный полимер, который специфично распознает первичное антитело.

ПРИМЕРЫ

Описание настоящего изобретения дополнительно проиллюстрировано при помощи следующих примеров, которые не следует рассматривать как ограничивающие каким-либо образом объем или содержание описания.

Пример 1 - Процентное содержание и плотность CD3 и CD68-положительных клеток на слайдах по сравнению с блоками

Данное исследование представляло собой рандомизированное многоцентровое исследование третьей фазы в двух группах пациентов без контроля плацебо акситиниба по сравнению с сорафенибом у пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой (mRCC) после неудачи одной предшествующей систематической схемы введения первой линии, содержащей один или более чем один из следующих агентов: сунитиниб, бевацизумаб + IFN (интерферон) α, темсиrolimus или цитокин(ы). В общей сложности 723 пациента с mRCC произвольным образом распределяли и включали в это исследование, среди которых 52 подвергнутых лечению акситинибом пациента подвергались оценке в иммуногистохимическом (ИНС) анализе; кроме того, 33 из 52 пациентов ранее лечили Sutent®.

Как представлено на Фиг. 1, большинство пациентов, включенных в анализ ИНС, представляли собой белокожих (90,4% пациентов), мужчин (69,2% пациентов) и из Северной Америки (57,7% пациентов) и Европы (32,7%). В общем, среднее значение (стандартное отклонение) возраста, роста и массы тела составило 58,3 (11,0) лет, 173,0 (10,0) см и 84,6 (19,1) кг, соответственно. Все пациенты имели показатель общего состояния ECOG (Восточная объединенная онкологическая группа) 0 (51,9% пациентов) или 1 (48,1% пациентов). В общей сложности, 23,1% пациентов классифицировали как благоприятных и 34,6% и 42,3% пациентов как промежуточных и плохих, соответственно, для прогностических факторов для групп в модели выживания Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (MSKCC). Кроме того, группы риска MSKCC определяли с использованием следующих четырех факторов риска: высокого

уровня лактатдегидрогеназы ($>1,5 \times$ выше нормальной границы), низкого уровня гемоглобина в сыворотке крови (меньше, чем нижняя граница нормы), высокого скорректированного уровня кальция в сыворотке крови (>10 мг/дл), и отсутствия предшествующей нефрэктомии.

5 Все 52 пациента оценивали как для CD3, так и CD68. Из 52 пациентов, оцениваемых в отношении CD3 и CD68, у 26 готовили фиксированные в формалине погруженные в парафин (FFPE) опухолевые блоки, и у 26 готовили слайды для анализа. Mosaic Laboratories обеспечивали материал FFPE, представляющий нормальные человеческие образцы и человеческие раковые образцы. Образцы готовили в соответствии с
10 протоколом, пересмотренным IRB (Институциональный наблюдательный совет) (MOS001), который дает возможность для применения оставшихся, не идентифицированных или анонимных человеческих образцов для анализа *in vitro* в соответствии с руководствами, определяющими 'Исключение из исследования субъекта-человека', как определено в Office of Human Research Protection (Управление США по
15 защите при исследованиях у человека). Мышиное моноклональное CD68 антитело KP1 (Кат. # M0814, партия # 46406, срок годности: сентябрь 2011 года) приобрели в Dako (Carpinteria, California, United States) и хранили при $2-8^{\circ}\text{C}$ в соответствии с сопутствующей документацией. Мышиное контрольное антитело изотипа IgG (партия # 37211, срок
20 годности: июль 2010 года) приобрели в Dako и хранили при $2-8^{\circ}\text{C}$ в соответствии с сопутствующей документацией. ИHC осуществляли в соответствии с типовой инструкцией Mosaic Laboratories. Анализ ИHC CD68 был разработан и валидирован таким образом, чтобы быть совместимым с руководствами CLIA для валидации теста класса I "для собственного пользования".

Окрашивание оценивал патолог, и оценка реактивности включала комбинацию
25 следующих: клеточной локализации окрашивания CD68; интенсивности окрашивания; субклеточной локализации; и процентного содержания окрашенных клеток в первичном компоненте интересующего типа ткани. Микрофотографии (20x увеличение) получали при помощи охлаждаемой камеры с зарядовой связью Spot Insight QE Model 4,2 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, United States), присоединенной к микроскопу Nikon
30 Eclipse 50i.

Среднее процентное содержание CD3 и CD68-положительных клеток было несколько ниже на слайдах, чем в блоках; 13,61% по сравнению с 17,95% для CD3 и 5,83% по сравнению с 8,21% для CD68. Аналогично, несколько меньшая средняя плотность
35 клеток обнаружена на слайдах по сравнению с блоками; 489,15 клеток/ мм^2 по сравнению с 590,50 клетками/ мм^2 для CD3, и 0,08 клеток/ мм^2 по сравнению с 0,13 клетками/ мм^2 для CD68 (Фиг. 2).

Пример 2 - Более высокие уровни экспрессии CD68 положительно коррелируют с благоприятными ORR и PFS, но не с OS

40 Для анализа биомаркеров путем ИHC использовали набор для анализа биомаркеров, который включал всех пациентов, которые получали по меньшей мере одну дозу исследуемого лечения. Анализировали следующие критерии эффективности: PFS, OS и частота объективных реакций (ORR). Обобщенную статистику получали для процентного содержания и плотности положительных клеток в соответствии с
45 категорией реакции (полная реакция [CRJ + частичная реакция [PR] по сравнению со стабильным заболеванием [SDJ + прогрессирующим заболеванием [PD]) для каждого маркера). Критерий суммы рангов Уилкоксона осуществляли для тестирования различий между категориями реакции. Точный критерий Фишера использовали для тестирования ассоциации между категорией реакции и группой биомаркеров с использованием

величины медианы в качестве точки отсечения. Распределение OS и PFS сравнивали между группой биомаркеров по величинам медианы для биомаркеров в качестве точки отсечения с использованием способа Каплана-Мейера; р-величины не должны отображаться в том случае, когда $N < 10$ в любой из групп. Представлены оцениваемое отношение рисков (HR) и его 2-сторонние 95% доверительные интервалы (CI) и медиана времени до наступления события и его 2-сторонний 95% CI. Наилучшее процентное изменение реакции в отношении объема опухоли сравнивали между группами биомаркеров с медианой величин в качестве точки отсечения с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона.

Для значимых результатов теста ($p < 0,05$) в анализе ORR, PFS и OS между группами биомаркера рабочую характеристическую кривую (ROC) строили для дополнительной оценки возможности для использования в качестве маркеров отбора пациентов. Анализ ROC осуществляли на базовых величинах CD68 в качестве непрерывных диагностических маркеров в прогнозе двойной объективной реакции у пациента (CR + PR по сравнению с SD + PD). Для зависимых от времени клинических исходов PFS и OS зависимую от времени ROC, обозначенную как ROC(t), где t указывает на интересующий момент времени, применяли для анализа базовых величин CD68 в прогнозировании исходов выживаемости с использованием алгоритма оценки Каплана-Мейера (estimator20). Оптимальную точку отсечения для величины CD68 для прогноза клинических исходов получали с использованием точки на кривой ROC, имеющей минимальное расстояние от точки с величинами чувствительности и специфичности, равными 1. AUC рассчитывали с использованием правила трапеций.

Обнаружена более высокая экспрессия CD68, ассоциированная с более длительной PFS и более высоким ORR, тем не менее, никакая корреляция не обнаружена между экспрессией CD68 и OS у пациентов. Независимо от предшествующего лечения медиана PFS у пациентов с величинами $\geq$ медианы величин CD68 (отсечение = 5,21%

положительных клеток или $0,08 \text{ клеток/мм}^2$) составила 12,0 месяцев для обеих точек отсечения по сравнению с 3,7 и 3,8 месяцами, соответственно, для пациентов с величинами $<$ медианы величин для биомаркера ($HR = 0,42$, логранговая р-величина $\leq 0,01$), когда анализировали всех пациентов независимо от предшествующего лечения (Фиг. 3). Тем не менее, для пациентов, которых ранее лечили Sutent®, обнаружена похожая, но статистически незначимая тенденция в отношении PFS (Фиг. 4).

Отсутствовали статистически значимые ассоциации между уровнями CD3 и PFS независимо от предшествующего лечения или для пациентов, которых ранее лечили Sutent® (Фиг. 5 и 6).

Кроме того, независимо от предшествующего лечения медиана OS у пациентов с величинами $\geq$ медианы величин CD68 (отсечение = 5,21% положительных клеток или $0,08 \text{ клеток/мм}^2$) составила 20,0 месяцев и 22,6 месяцев по сравнению с 21,8 месяцами или 17,8 месяцами, соответственно, для пациентов с величинами $<$ медианы величин для биомаркера ($HR > 0,6$ во всех случаях, отсутствие статистической значимости), когда всех пациентов анализировали независимо от предшествующего лечения (Фиг. 7). Для пациентов, которых предварительно лечили Sutent®, не были обнаружены никакие статистически значимые ассоциации с OS. Отсутствовали статистически значимые ассоциации между уровнями CD3 и OS как независимо от лечения, так и у пациентов, которых ранее лечили Sutent® (Фиг. 8). С использованием анализа ROC благоприятные OS обнаружены для пациентов с более высоким количеством клеток CD68, хотя величина AUC 0,559 указывает на низкую достоверность прогностической величины уровней

CD68 (Фиг. 9).

В заключение, независимо от предшествующего лечения уровни CD68, измеренные с использованием процентного содержания положительных клеток (p -значение = 0,0059) или плотности клеток (p -значение = 0,0071), были в 2 раза выше у пациентов с терапевтическим эффектом (CR+PR) по сравнению с пациентами, у которых не достигается терапевтический эффект (SD+PD) (Фиг. 10). Для пациентов, которых ранее лечили Sutent[®], уровни CD68, измеренные с использованием процентного содержания положительных клеток (p -значение = 0,407) или плотности клеток (p -значение = 0,0762), были в 2 раза выше у пациентов с терапевтическим эффектом, чем у пациентов, у которых не достигается терапевтический эффект (Фиг. 11). В анализе ORR для пациентов, у которых биомаркер подлежал оценке, пациенты с более высоким процентом CD68 и плотностью положительных клеток имели тенденцию к тому, чтобы демонстрировать более хороший шанс объективной реакции в отношении опухоли. Анализ ROC демонстрирует прогностическую точность 0,818 и 0,795 для процентного содержания и плотности CD68 положительных клеток, соответственно. AUC 0,791 и 0,784 указывают на высокую общую прогностическую точность для ORR при использовании биомаркера CD68. Оптимальные пороговые значения для предсказания ORR составляли 9,42% и 0,13 клеток/мм² для процентного содержания CD68 положительных клеток и плотности клеток, соответственно.

Похожие результаты обнаружены в анализе ORR для пациентов, у которых оценивали биомаркер, подвергнутых предшествующему лечению Sutent[®]. Пациенты с более высоким процентным содержанием CD68-положительных клеток и плотностью демонстрируют тенденцию к более хорошему шансу объективной реакции против опухоли. Анализ ROC демонстрирует прогностическую точность 0,777 и 0,852, соответственно, для процентного содержания CD68-положительных клеток и плотности. AUC 0,809 и 0,764 указывают на высокую общую диагностическую точность для ORR при использовании биомаркера CD68. Оптимальные пороговые значения для прогнозирования ORR составляют 5,20% и 0,16 клеток/мм², соответственно, для процентного содержания CD68-положительных клеток и плотности.

(57) Формула изобретения

1. Способ идентификации опухоли, чувствительной к лечению акситинибом, включающий: (а) измерение уровня экспрессии полипептида CD68 в образце ткани из опухоли, полученной от пациента-человека, рассматриваемого для лечения акситинибом; и (б) сравнение уровня экспрессии CD68 на стадии (а) против порогового уровня экспрессии CD68, определяемого путем измерения экспрессии полипептида CD68 в образцах ткани опухолей, полученных от пациентов-людей, которых ранее лечили акситинибом и которые продемонстрировали устойчивость к акситинибу, и пациентов-людей, которых ранее лечили акситинибом и которые продемонстрировали чувствительность к акситинибу, где уровень экспрессии CD68 выше порогового уровня свидетельствует о том, что опухоль чувствительна к лечению акситинибом.

2. Способ по п. 1, где стадию измерения экспрессии полипептида CD68 осуществляют при помощи иммуногистохимии.

3. Способ по п. 2, где стадию измерения экспрессии полипептида CD68 при помощи иммуногистохимии осуществляют путем анализа изображения после сканирования всего слайда, при котором в образце определяют процентное содержание CD68-положительных клеток.

4. Способ по п. 3, дополнительно включающий стадию определения плотности CD68-положительных клеток в образце.

5 5. Способ по п. 1, где опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли молочной железы, опухоли легкого, опухоли почки, колоректальной опухоли и опухоли поджелудочной железы.

6. Способ лечения mRCC (метастатического почечно-клеточного рака), включающий введение акситиниба пациенту, у которого определено наличие опухоли mRCC, чувствительной к акситинибу, в соответствии с п. 1.

10 7. Способ лечения рака, включающий: а) определение процентного содержания CD68-положительных клеток в опухоли, полученной от субъекта; и б) введение акситиниба этому субъекту в том случае, если указанное процентное содержание составляет по меньшей мере 5%.

15 8. Способ лечения рака, включающий: а) определение плотности CD68-положительных клеток в опухоли, полученной от субъекта; и б) введение акситиниба этому субъекту в том случае, если указанная плотность клеток составляет по меньшей мере 0,08 клеток/мм².

9. Способ лечения рака, включающий введение акситиниба субъекту, имеющему опухоль, где по меньшей мере 5% клеток в указанной опухоли являются CD68-положительными.

20 10. Способ лечения рака, включающий введение акситиниба субъекту, имеющему опухоль, где плотность CD68-положительных клеток в указанной опухоли составляет по меньшей мере 0,08 клеток/мм².

25 11. Способ лечения рака, включающий: а) определение процентного содержания CD68-положительных клеток в опухоли, полученной от субъекта; б) определение плотности CD68-положительных клеток в этой опухоли; и в) введение акситиниба этому субъекту в том случае, если указанное процентное содержание составляет по меньшей мере 5% и указанная плотность клеток составляет по меньшей мере 0,08 клеток/мм².

30 12. Способ лечения рака, включающий введение акситиниба субъекту, имеющему опухоль, где по меньшей мере 5% клеток в указанной опухоли являются CD68-положительными и где плотность CD68-положительных клеток в указанной опухоли составляет по меньшей мере 0,08 клеток/мм².

35 13. Способ по любому из пп. 7-12, где указанная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли молочной железы, опухоли легкого, опухоли почки, колоректальной опухоли и опухоли поджелудочной железы.

14. Способ по любому из пп. 7, 8 или 11, где стадию измерения процентного содержания или плотности CD68-положительных клеток осуществляют с использованием иммуногистохимии.

40 15. Способ по п. 14, где стадию измерения процентного содержания или плотности CD68-положительных клеток осуществляют с использованием иммуногистохимии и используют анализ изображения после сканирования всего слайда.

ФИГ. 1

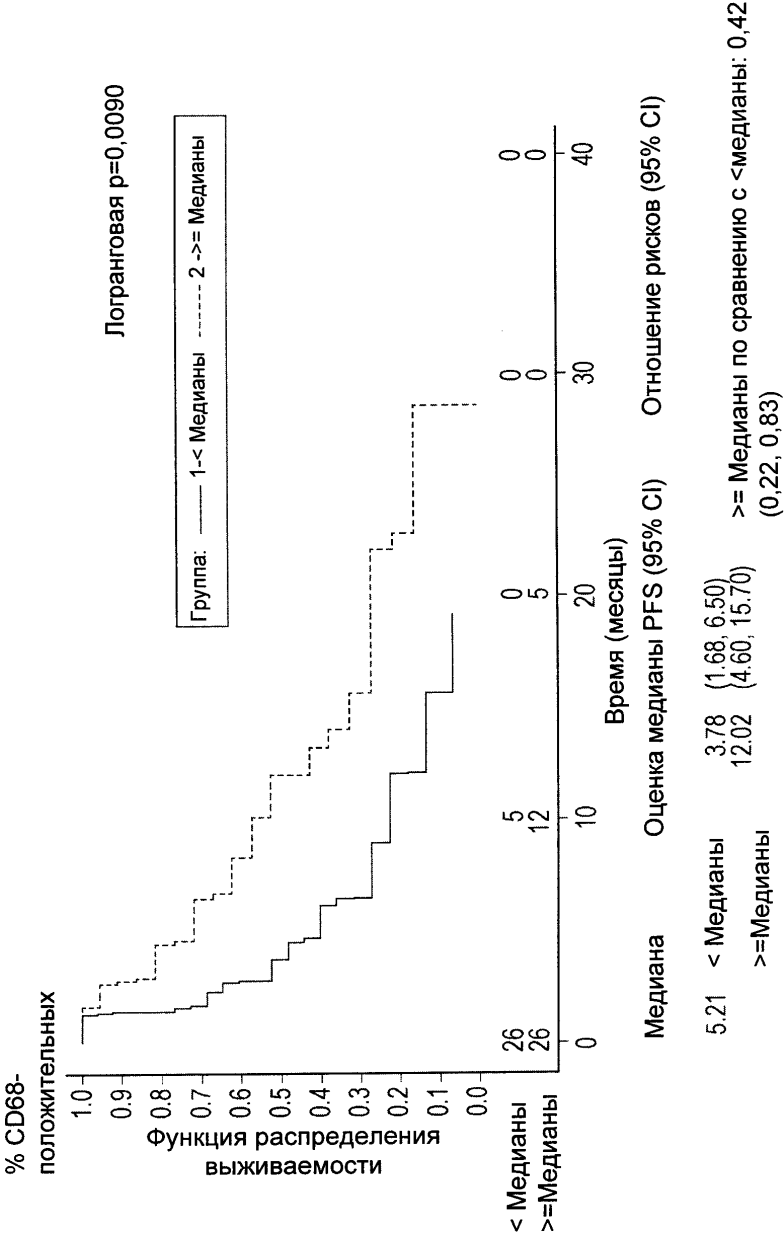
AG-013736 5,0 мг (BID)

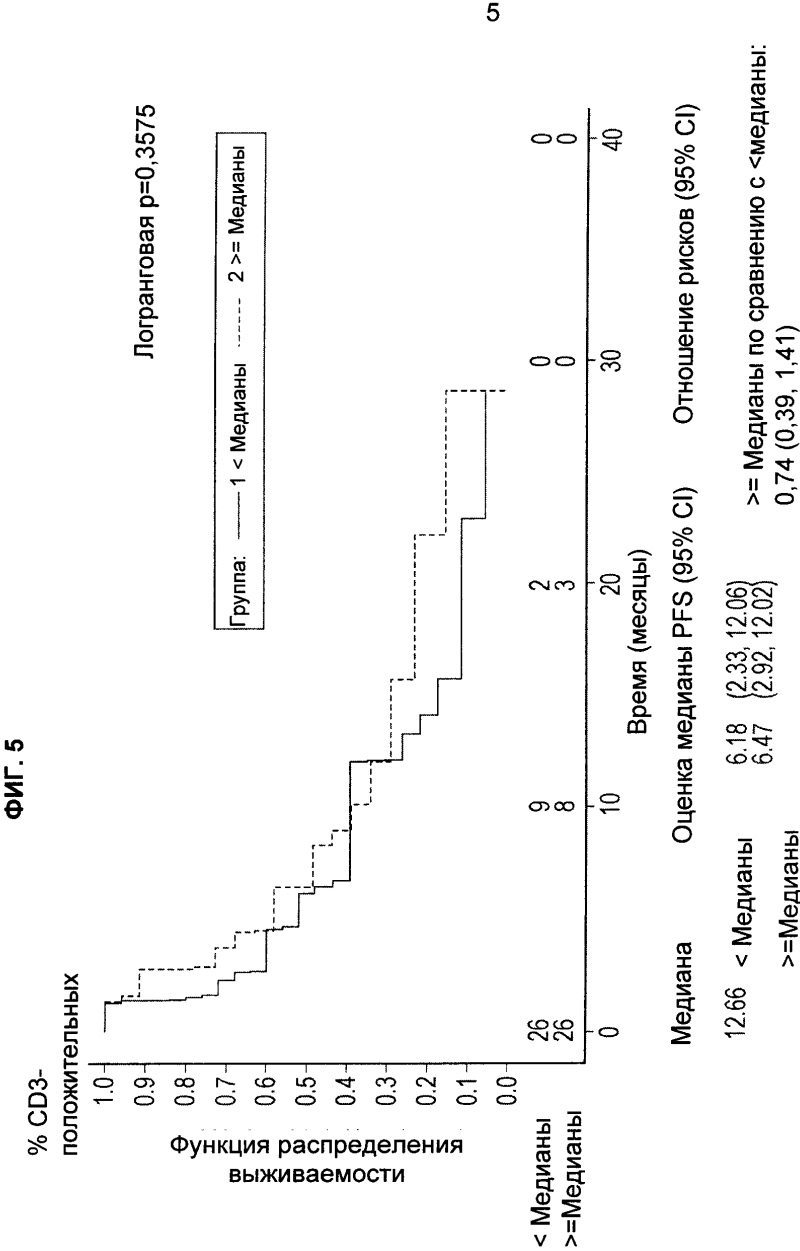
	<u>МУЖЧИНЫ</u>		<u>ЖЕНЩИНЫ</u>		<u>ИТОГО</u>	
Количество (%) субъектов	38		14		52	
Возраст (лет) :						
<65	25	(65,8)	11	(78,6)	36	(69,2)
>=65	13	(34,2)	3	(21,4)	16	(30,8)
Медиана	61,5		54,0		61,0	
Среднее значение	59,2		55,6		58,3	
СО	10,0		13,5		11,0	
Диапазон	39-82		22-78		22-82	
Раса:						
Европейцы	35	(92,1)	12	(85,7)	47	(90,4)
Азиаты	2	(5,3)	2	(14,3)	4	(7,7)
Другие	1	(2,6)	0		1	(1,9)
Масса (кг):						
Медиана	87,5		67,5		84,8	
Среднее значение	90,0		69,8		84,6	
СО	15,4		20,8		19,1	
Диапазон	62,4-121,2		41,0-106,2		41,0-121,2	
N	38	(100,0)	14	(100,0)	52	(100,0)
Рост (см):						
Медиана	177,3		159,0		174,6	
Среднее значение	177,9		159,6		173,0	
СО	5,7		5,8		10,0	
Диапазон	169,2-194,0		151,5-174,0		151,5-194,0	
N	38	(100,0)	14	(100,0)	52	(100,0)
ECOG:						
0	20	(52,6)	7	(50,0)	27	(51,9)
1	18	(47,4)	7	(50,0)	25	(48,1)
Географический регион						
Северная Америка	23	(60,5)	7	(50,0)	30	(57,7)
Европа	13	(34,2)	4	(28,6)	17	(32,7)
Азия	1	(2,6)	2	(14,3)	3	(5,8)
Другие	1	(2,6)	1	(7,1)	2	(3,8)
MSKCC:						
Благоприятные	8	(21,1)	4	(28,6)	12	(23,1)
Промежуточные	14	(36,8)	4	(28,6)	18	(34,6)
Плохие	16	(42,1)	6	(42,9)	22	(42,3)

ФИГ. 2**AG-013736 5,0 мг (BID)**

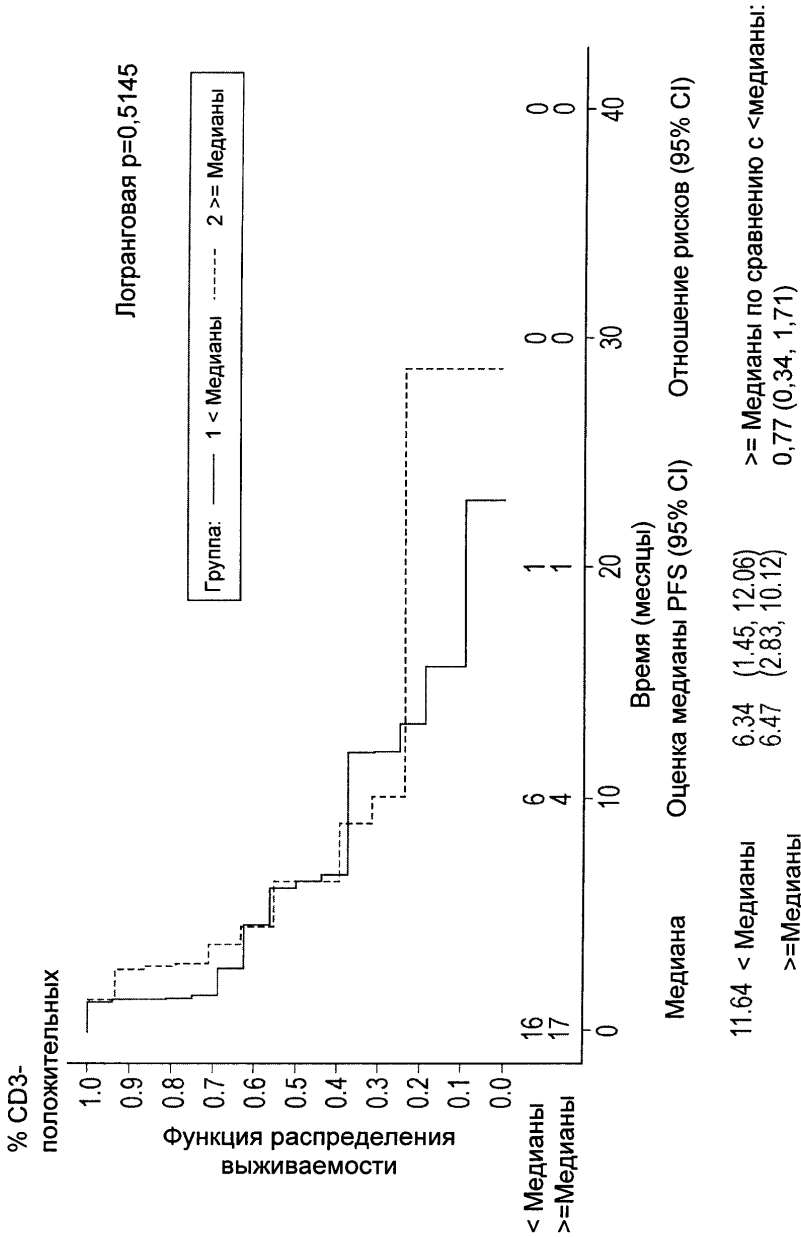
Биомаркеры	Слайды N=26	Блоки N=26	Итого N=52
%CD3			
положительных			
n	26	26	52
Среднее значение	13,61	17,95	15,78
Std	10,328	13,031	11,846
%CV	75,9	72,6	75,1
25й процентиль	5,00	7,00	7,00
Медиана	11,37	15,21	12,66
75й процентиль	20,50	29,40	24,00
(мин., макс.)	(0,57, 31,1)	(0,08, 44,85)	(0,08, 44,85)
Плотность клеток CD3			
n	26	26	52
Среднее значение	489,15	590,50	539,83
Std	516,170	513,747	512,448
%CV	105,5	87,0	94,9
25й процентиль	77,00	264,00	168,00
Медиана	336,50	414,50	399,50
75й процентиль	801,00	775,00	781,50
(мин., макс.)	(14, 2241)	(1, 2056)	(1, 2241)
% CD68			
положительных			
n	26	26	52
Среднее значение	5,83	8,21	7,02
Std	6,456	6,859	6,704
%CV	110,8	83,5	95,5
25й процентиль	1,00	4,00	2,80
Медиана	3,94	7,08	5,21
75й процентиль	8,10	10,00	9,70
(мин., макс.)	(0,2, 20,92)	(2,48, 36,89)	(0,2, 36,89)
Плотность клеток CD68			
n	26	26	52
Среднее значение	0,08	0,13	0,11
Std	0,087	0,101	0,096
%CV	103,3	80,5	91,2
25й процентиль	0,00	0,10	0,00
Медиана	0,05	0,10	0,08
75й процентиль	0,10	0,20	0,20
(мин., макс.)	(0, 0,29)	(0,03, 0,53)	(0, 0,53)

ФИГ. 3





ФИГ. 6



Лечение рака

7

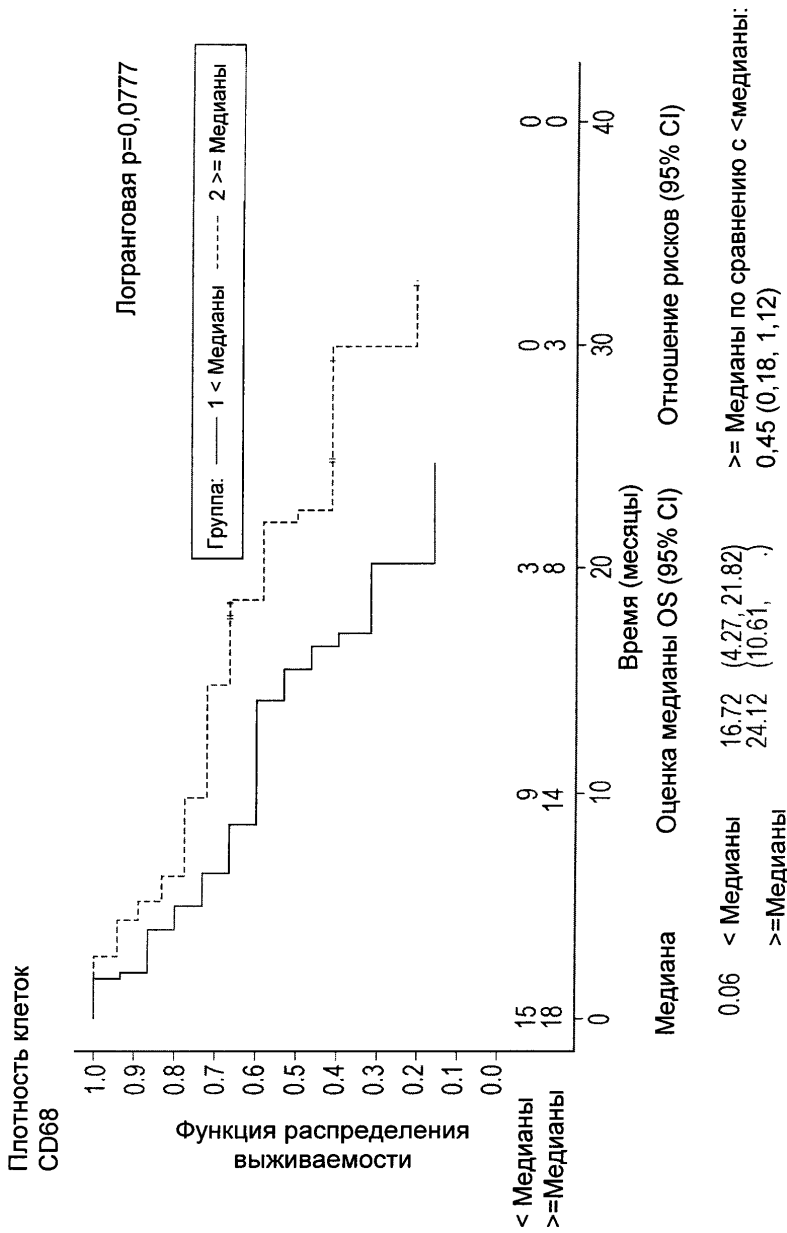
ФИГ. 7

Измеряемая величина	Величина медианы BM	N	Медиана OS (Месяцы)		Логранго-вая р-величина	Отношение рисков
			Величина < медианы BM (95% CI)	Величина >= медианы BM (95% CI)		
% CD3 положительных	12,66	26	20,0 (11,53, 32,36)	21,8 (9,33, 23,82)	0,5668	1,222 (0,615, 2,426)
Плотность клеток CD3	399,50	26	19,2 (10,61, 32,36)	22,6 (13,08, 24,41)	0,8153	0,922 (0,465, 1,826)
% CD68 положительных	5,21	26	21,8 (11,53, ,)	20,0 (10,61, 32,36)	0,9901	0,996 (0,497, 1,994)
Плотность клеток CD68	0,08	23	17,8 (7,03, 24,41)	22,6 (13,47, ,)	0,1733	0,619 (0,308, 1,243)

ФИГ. 8

Измеряемая величина	Величина медианы		Медиана OS (Месяцы)		Логранговая р-величина	Отношение рисков (95% CI)
	BM	N	Величина медианы BM (95% CI)	Величина медианы BM (95% CI)		
% CD3 положительных	11,64	16	21,4 (6,87, 32,36)	20,0 (5,65, 23,82)	0,6444	1,225 (0,517, 2,900)
Плотность клеток CD3	334,00	16	19,2 (10,61, 32,36)	21,8 (4,73, 24,41)	0,6802	1,198 (0,508, 2,824)
% CD68 положительных	5,20	16	18,2 (7,00, .)	23,8 (5,65, 32,36)	0,6576	0,818 (0,337, 1,989)
Плотность клеток CD68	0,06	15	16,7 (4,27, 21,82)	24,1 (10,61, .)	0,0777	0,451 (0,182, 1,116)

ФИГ. 9



ФИГ. 10

AG-013736 5,0 мг (BID)

Биомаркеры	CR+PR N=11	CD+PD N=33	*P-величина	Итого N=44
% CD3				
положительных				
n	11	33	0,1364	44
Среднее значение	19,54	12,93		14,58
Std	13,168	10,265		11,274
%CV	67,4	79,4		77,3
25й процентиль	9,20	5,00		6,00
Медиана	11,20	11,60		11,40
75й процентиль	30,20	19,20		19,90
(мин., макс.)	(5,01, 44,85)	(0,57, 39,15)		(0,57, 44,85)
Плотность клеток CD3				
n	11	33	0,174	44
Среднее значение	683,18	455,39		512,34
Std	635,836	479,921		524,766
%CV	93,1	105,4		102,4
25й процентиль	223,00	93,00		162,00
Медиана	415,00	295,00		356,00
75й процентиль	936,00	643,00		715,50
(мин., макс.)	(159, 2241)	(14, 2056)		(14, 2241)
% CD68				
положительных				
n	11	33	0,0059	44
Среднее значение	10,21	4,58		5,98
Std	6,206	4,235		5,328
%CV	60,8	92,6		89,0
25й процентиль	4,40	1,30		2,10
Медиана	10,02	3,73		4,34
75й процентиль	15,50	6,50		8,30
(мин., макс.)	(1,18, 20,66)	(0,2, 20,92)		(0,2, 20,92)
Плотность клеток CD68				
N	11	33	0,0071	44
Среднее значение	0,15	0,07		0,09
Std	0,085	0,055		0,072
%CV	58,3	82,0		82,4
25й процентиль	0,10	0,00		0,00
Медиана	0,16	0,05		0,08
75й процентиль	0,20	0,10		0,10
(мин., макс.)	(0,02, 0,29)	(0, 0,22)		(0, 0,29)

* P-величина для критерия суммы рангов Уилкоксона представляет собой двухстороннюю t-аппроксимацию.

ФИГ. 11

AG-013736 5,0 мг (BID)

Биомаркеры	CR+PR N=05	CD+PD N=22	*P-величина	Итого N=27
% CD3				
положительных				
n	5	22	0,1912	27
Среднее значение	17,83	11,88		12,98
Std	10,975	9,995		10,235
%CV	61,6	84,1		78,8
25й процентиль	9,20	4,50		5,00
Медиана	11,20	8,25		9,16
75й процентиль	29,40	18,60		19,40
(мин., макс.)	(9,15, 30,21)	(0,57, 39,15)		(0,57, 39,15)
Плотность клеток CD3				
n	5	22	0,4071	27
Среднее значение	744,20	410,23		472,07
Std	862,342	422,772		525,592
%CV	115,9	103,1		111,3
25й процентиль	223,00	93,00		111,00
Медиана	401,00	267,50		271,00
75й процентиль	697,00	643,00		697,00
(мин., макс.)	(159, 2241)	(14, 1744)		(14, 2241)
% CD68				
положительных				
n	5	22	0,0407	27
Среднее значение	10,15	3,52		4,74
Std	7,429	2,611		4,570
%CV	73,2	74,3		96,4
25й процентиль	5,40	0,90		1,00
Медиана	10,81	3,47		3,92
75й процентиль	12,70	5,20		6,50
(мин., макс.)	(1,18, 20,66)	(0,2, 8,71)		(0,2, 20,66)
Плотность клеток CD68				
n	5	22	0,0762	27
Среднее значение	0,14	0,06		0,07
Std	0,102	0,045		0,066
%CV	74,0	80,8		92,6
25й процентиль	0,10	0,00		0,00
Медиана	0,16	0,05		0,05
75й процентиль	0,20	0,10		0,10
(мин., макс.)	(0,02, 0,28)	(0, 0,16)		(0, 0,28)

* P-величина для критерия суммы рангов Уилкоксона представляет собой двухстороннюю t-аппроксимацию.