



(51) МПК
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/57434 (2017.08); *G01N 33/4915* (2017.08); *G01N 33/582* (2017.08); *G01N 33/577* (2017.08); *G01N 2800/52* (2017.08)

(21)(22) Заявка: 2014126358, 29.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2012

Дата регистрации:
23.01.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.11.2011 US 61/629,886;
19.09.2012 US 61/703,099

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2016 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 23.01.2018 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.06.2014

(86) Заявка РСТ:
US 2012/066998 (29.11.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/082249 (06.06.2013)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭТВОЛ, Симиндер (US),
ХОНГО, Джо-Энн (US),
ЛЭКНЕР, Марк (US),
ПУННУС, Элизабет (US),
РУБИНФЕЛД, Бонни (US),
ВИДЖ, Раджеш (US)

(73) Патентообладатель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008052187 A2, 02.05.2008. US
6046048 A, 04.04.2000. RU 2235131 C2,
27.08.2004.

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ АНАЛИЗА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области медицины, в частности к онкологии. Предложены способ диагностики рака предстательной железы и способ мониторинга реакции на терапию рака предстательной железы, включающие контактирование раковых клеток эпителиального происхождения с анти-STEAP-1 антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером STEAP-1 с

$K_D \leq 1000$ нМ, где анти-STEAP-1 антитело представляет собой антитело 15A5, продуцированное клеткой гибридомы, имеющей номер депонирования микроорганизмов РТА-12259. Предложенная группа изобретений обеспечивает эффективные способы диагностики и мониторинга рака предстательной железы. 2 н. и 15 з.п. ф-лы, 11 ил., 8 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/57434 (2017.08); *G01N 33/4915* (2017.08); *G01N 33/582* (2017.08); *G01N 33/577* (2017.08); *G01N 2800/52* (2017.08)

(21)(22) Application: **2014126358, 29.11.2012**(24) Effective date for property rights:
29.11.2012Registration date:
23.01.2018

Priority:

(30) Convention priority:
29.11.2011 US 61/629,886;
19.09.2012 US 61/703,099(43) Application published: **27.01.2016** Bull. № 3(45) Date of publication: **23.01.2018** Bull. № 3(85) Commencement of national phase: **30.06.2014**(86) PCT application:
US 2012/066998 (29.11.2012)(87) PCT publication:
WO 2013/082249 (06.06.2013)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ETVOL, Siminder (US),
KHONGO, Dzho-Enn (US),
LEKNER, Mark (US),
PUNNUS, Elizabet (US),
RUBINFELD, Bonni (US),
VIDZH, Radzhesh (US)

(73) Proprietor(s):

DZHENENTEK, INK. (US)(54) **COMPOSITIONS AND METHODS FOR PROSTATE CANCER ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method for prostate cancer diagnosis and a method for monitoring of the response to prostate cancer therapy, involving contacting of cancerous cells of epithelial origin with an anti-STEAP-1 antibody that specifically binds to the prostate-specific STEAP-1

marker with $K_D \leq 1000$ nM, wherein the anti-STEAP-1 antibody is the 15A5 antibody produced by a hybridoma cell having a microbial deposition number PTA-12259.

EFFECT: effective methods for diagnosis and monitoring of prostate cancer.

17 cl, 11 dwg, 8 ex

C 2
8
9
6
1
4
9
R UR U
2
6
4
1
9
6
8
C 2

Родственные заявки

[0001] Эта заявка заявляет приоритет согласно 35 USC 119(e) на основании Предварительной заявки на патент США с номером 61/629886, поданной 29 ноября 2011 года, и Предварительной заявки на патент США с номером 61/703099, поданной 19 сентября 2012 года, содержания которых включены здесь посредством ссылки в их полном виде.

Область техники, к которой относится данное изобретение

[0002] Данное изобретение относится к области онкологии и диагностики рака и, более конкретно, к композициям и способам скрининга рака предстательной железы, определения стадии и мониторинга лечения.

Уровень техники

[0003] Рак предстательной железы является одним из наиболее преобладающего вида рака у мужчин. Хотя большинство видов рака предстательной железы при раннем появлении являются бессимптомными и медленно растущими, некоторые виды рака предстательной железы являются более агрессивными, болезненными и приводят к летальному исходу. В настоящее время, два основных типа неинвазивных тестов скрининга являются доступными для детектирования рака предстательной железы у мужчин. Один является пальцевым ректальным исследованием (DRE), которое позволяет доктору детектировать аномальности предстательной железы введением пальца в перчатке в прямую кишку и пальпированием предстательной железы, и другое является тестом на антиген поверхности предстательной железы (PSA-тестом), который измеряет уровень PSA-антигена в образце крови. Хотя FDA (Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США) одобрил применение PSA-теста вместе с DRE для содействия детектированию рака предстательной железы у мужчин, PSA-тест является противоречивым в скрининге, так как неясно, действительно ли тест спасает жизнь. В частности, United States Preventive Services Task Forces рекомендовала не проводить PSA-скрининг у здоровых людей, на основе открытий, что PSA-скрининг не уменьшает или мало уменьшает летальность рака предстательной железы, приводя к обработкам или тестам, которые вызывают ненужную боль и побочные эффекты (см., например, R. Chou et al, Ann. Intern. Med., October 7, 2011 E-375; Djulbegovic et al, BMJ 200, 341: c4543). Наиболее достоверной диагностикой рака предстательной железы является биопсия, где небольшой кусочек предстательной железы пациента с подозрением на заболевание удаляют для микроскопического испытания на присутствие опухолевых клеток. Несомненно, такая процедура является довольно инвазивной и менее желательной в раннем скрининге и раннем детектировании.

[0004] Как и во многих других видах рака, главной причиной смерти пациентов с раком предстательной железы является не первичная опухоль, а скорее метастазирование. Некоторые первичные опухолевые клетки могут сами отделяться от исходной ткани и входить в кровоток. Клетки называют циркулирующими опухолевыми клетками (CTC). Как только CTC засевают сами подходящий участок в теле, они могут развиваться в метастатические колонии, которые трудно детектировать, но могут быть угрожающими жизни, когда они прогрессируют во вторичные опухоли. Предпринимались попытки детектирования CTC. Однако, не были установлены способы, которые могут различать, происходят ли CTC из предстательной железы и каким образом прогрессирует рак предстательной железы. Ввиду недавнего открытия, что скрининг PSA не может уменьшать смертность, существует существенная потребность в развитии агентов и способов, которые могут обеспечивать достоверные результаты в диагностике и прогнозе рака предстательной железы.

Сущность изобретения

[0005] В одном аспекте данное описание обеспечивает способы диагностирования рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающие: а) контактирование раковых клеток эпителиального происхождения с антителом, которое специфически связывается со специфическим для предстательной железы маркером, где раковые клетки являются клетками из образца крови, взятого у испытуемого субъекта; и б) определение, экспрессируют ли раковые клетки простата-специфический маркер, где присутствие раковых клеток, которые экспрессируют специфический для предстательной железы маркер, является прогностическим в отношении рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0006] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает определение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер, где такое количество является прогнозирующим стадию рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает определение уровня экспрессии простата-специфического маркера на раковых клетках.

[0008] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает распределение по группам раковых клеток на основе их уровней экспрессии простата-специфического маркера и определение процентного содержания раковых клеток в каждой группе.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает расчет оценки (обычно балльной) для каждой группы умножением процентного содержания раковых клеток в группе с уникальным номером группы, приписанным к группе, на основе уровня экспрессии простата-специфического маркера, и суммирование всех оценок групп для получения Н-оценки, где Н-оценка указывает на стадию рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0010] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки идентифицируют из образца крови с захватыванием композиции, содержащей лиганд, который специфически связывается с раковыми клетками эпителиального происхождения. В некоторых вариантах осуществления лигандом является антитело, которое специфически связывается с эпителиальным антигеном, экспрессируемым на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления эпителиальным антигеном является Молекула Адгезии Эпителиальных Клеток (Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)).

[0011] В некоторых вариантах осуществления идентифицированные раковые клетки являются обогащенными в клеточной фракции, отделенной от образца клеток. В некоторых вариантах осуществления эту клеточную фракцию отделяют в присутствии магнитного поля. В некоторых вариантах осуществления лиганд в захватывающей композиции связывается с магнитной частицей.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером, содержит анти-STEAP-1 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP1-антитело связывается со STEAP-1 с $KD \leq 1000$ нМ. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антитело является мышинным моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антителом является 15A5, продуцируемый гибридной клеткой, имеющей номер депонирования микроорганизмов РТА-12259.

[0013] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки идентифицируют с одним или несколькими реагентами, которые позволяют детектирование раковых клеток эпителиального происхождения. В некоторых вариантах осуществления реагенты

содержат лиганд, который специфически связывается с цитокератином, и где лиганд является необязательно конъюгированным со второй детектируемой меткой. В некоторых вариантах осуществления реагенты дополнительно содержат краситель, который отличает клетки от неклеточных компонентов. В некоторых вариантах осуществления реагенты дополнительно содержат лиганд, который специфически связывается с маркером лейкоцитов.

[0014] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки детектируют способом на основе иммунофлуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, волоконно-оптической сканирующей цитометрии или лазерной сканирующей цитометрии.

[0015] В другом аспекте данное раскрытие сущности изобретения обеспечивает способы прогнозирования эффективности терапии рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0016] В другом аспекте данное раскрытие обеспечивает способы мониторинга реакции на терапию рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0017] В другом аспекте данное раскрытие обеспечивает антитела, которые связываются по существу с тем же самым эпитопом, с которым связывается антитело 15A5, где антитело 15A5 продуцируется клеткой гибридомы, имеющей номер депозирования микроорганизмов РТА-12259.

[0018] В другом аспекте данное раскрытие обеспечивает линию клеток гибридомы, имеющую номер депонирования микроорганизмов РТА-12259.

[0019] В другом аспекте данное изобретение обеспечивает тест-наборы для детектирования присутствия раковых клеток предстательной железы, экспрессирующих STEAP-1 в образце крови, содержащие антитело, которое специфически связывается со STEAP-1. В некоторых вариантах осуществления тест-наборы дополнительно содержат одну или несколько композиций, выбранных из группы, состоящей из магнитных частиц, связанных с первым лигандом, который специфически связывается с раковыми клетками эпителиального происхождения, вторым лигандом, который специфически связывается с эпителиальным маркером, третьим лигандом, который специфически связывается с маркером лейкоцитов, и красителя, который отличает клетки от неклеточных компонентов.

Краткое описание чертежей

[0020] Фигура 1 изображает репрезентативные количественные критерии для СТС на основе уровня окрашивания анти-STEAP-1-антителом.

[0021] Фигура 2 изображает экспрессию STEAP-1 и Н-оценки различных клеточных линий, определенные на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела, мышинового моноклонального анти-STEAP-1-антитела 37, и кроличьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела: (а) экспрессию на LB50-клетках; (b) экспрессию на РС3-клетках; (с) Н-оценку клеток LB50 и (d) Н-оценку клеток РС3.

[0022] Фигура 3 изображает экспрессию STEAP-1 и Н-оценки различных spiked-in образцов (образцов крови с введением клеток), определенные на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела: (а) экспрессия, (b) Н-оценки.

[0023] Фигура 4 изображает Н-оценки образцов крови 11 пациентов, определенные на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела.

[0024] Фигуры 5 изображают Н-оценки образцов крови 10 пациентов, определенные на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-

антитела (а), и сравнение с результатами ИНС (иммуногистохимии) на образцах опухолевой ткани из тех же самых пациентов (b-c).

5 [0025] Фигура 6 изображает экспрессию STEAP-1 и H-оценки различных spiked-in образцов (образцов крови с введением клеток), определенные на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела (a-b) и мышинового моноклонального анти-STEAP-1-антитела 15A5 (c-d).

[0026] Фигура 7 изображает воспроизводимость СТС-подсчета в дублируемых образцах пациента, как показано СТС-подсчет/пациент (а), и воспроизводимость уровней экспрессии биомаркера STEAP1 в СТС из дублируемых образцов пациента, как показано 10 Н-оценка/пациент (b).

[0027] Фигура 8 изображает сильную корреляцию в подсчете СТС из образцов крови, взятой при линии фона 1 и 2.

[0028] Фигура 9 изображает изменение в указанное число раз в СТС-подсчетах пациентов во время терапии с увеличением доз от Дозы 1-7 пред-дозы и пост-дозы.

15 [0029] Фигура 10 изображает изменение в СТС-подсчетах пациентов во время увеличения доз терапии от Дозы 1-7 пред-дозы и пост-дозы.

[0030] Фигура 11 изображает изменение в СТС-подсчетах пациентов во время увеличения доз терапии от Дозы 1-7 пред-дозы и пост-дозы.

Подробное описание данного изобретения

20 I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0031] Термин "опухоль" или "рак", используемые взаимозаменяемо здесь, относится к любому медицинскому состоянию, характеризующему неопластическим или злокачественным ростом клеток, пролиферацией или метастазированием, и включает как солидные опухоли, так и не-солидные опухоли, такие как лейкоз.

25 [0032] Термины "рак предстательной железы" или "опухоль предстательной железы", используемые здесь, относятся в данном контексте к раку или опухоли, которые происходят из ткани простаты (предстательной железы).

[0033] Термин "стадия" в контексте заболевания (такого как рак или опухоль) относится к состоянию прогрессирования заболевания, которое указывает на тяжесть 30 заболевания.

[0034] Термин "определение стадии", используемый здесь, относится к идентификации конкретной стадии, при которой заболевание прогрессировало.

35 [0035] Термин "диагноз" (вместе с его грамматическими вариациями, такими как "диагностика" или "диагностический") относится к идентификации молекулярного или патологического состояния, заболевания или состояния, например, идентификации рака, или относится к идентификации ракового пациента, который может иметь пользу от режима конкретного лечения.

[0036] Термин "прогноз" (и его грамматические вариации, такие как "прогнозирование" или "прогностический") относится к прогнозированию вероятности 40 пользы от лечения, например, противораковой терапии.

[0037] Термин "прогнозирование" или "предопределение", используемый здесь для обозначения вероятности того, что пациент будет отвечать либо благоприятно, либо неблагоприятно на конкретную терапию против рака предстательной железы. В одном варианте осуществления прогнозирование или предопределение относится к степени 45 этих реакций. В одном варианте осуществления прогнозирование или предопределение относится к тому, будет ли или не будет вероятность того, что пациент выживет или его состояние улучшится после лечения, например, лечения конкретным терапевтическим агентом, или в течение определенного периода времени не будет прогрессирования

заболевания.

[0038] Термин "польза" используется в самом широком смысле и относится к любому желаемому эффекту и, конкретно, включает клиническую пользу, как определено здесь.

[0039] "Индивидуум (индивид)" или "субъект" обозначает млекопитающее.

5 Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и приматов, не являющихся людьми, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект является человеком.

10 [0040] Термин «Шесть-Трансмембранный Эпителиальный Антиген предстательной железы 1» (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1), также называемый STEAP-1, относится к антигену клеточной поверхности, преимущественно экспрессируемому в ткани предстательной железы, и было обнаружено, что он регулируется повышающим образом во множественных раковых клеточных линиях.
15 Hubert et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(25), 14523-8. Один примерный STEAP-1 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, описанную в US 2009/0280056 A1, поданном 26 октября 2007 года, все описание которого особо включено здесь посредством ссылки.

[0041] Термины "анти-STEAP-1-антитело" и "антитело, которое связывается со STEAP-1", относятся к антителу, которое способно связывать STEAP-1 с достаточной
20 аффинностью, так что антитело применимо в качестве диагностического агента в нацеливании на STEAP-1. В одном варианте осуществления степень связывания анти-STEAP-1-антитела с неродственным, не-STEAP-1-белком является меньшим, чем приблизительно 10% связывания антитела со STEAP-1, как измерено, например, при
25 помощи радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается со STEAP-1, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах
30 осуществления анти-STEAP-1-антитело связывается с эпитопом STEAP-1, который является консервативным среди STEAP-1 из различных видов.

[0042] "Аффинность" относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между единственным связывающим сайтом молекулы (например, антитела) и его
35 партнером связывания (например, антигеном). Если нет других указаний, в данном контексте "аффинность связывания" относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть обычно представлена константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области, в том числе способами,
40 описанными здесь. Конкретные иллюстративные и примерные варианты осуществления для измерения аффинности связывания описаны в последующем описании.

[0043] Термин "антитело" используется здесь в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включающие, но не ограничивающиеся ими,
45 моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, пока они проявляют антигенсвязывающую активность.

[0044] "Фрагментом антитела" называют молекулу, другую, чем интактное антитело, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не

ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0045] "Антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом", что и ссылочное антитело, относится к антителу, которое блокирует связывание ссылочного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и, наоборот, ссылочное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Примерный конкурентный анализ обеспечен здесь.

[0046] Термин "антитело 15A5" относится в данном контексте к мышиному моноклональному анти-STEAP-1-антителу, продуцируемому гибридной клеточной линией, имеющей номер депонирования микроорганизмов РТА-12259. Информация депонирования микроорганизмов гибридной клеточной линии является следующей: ATCC Deposit №: РТА-12259; Дата депонирования: 17 ноября, 2011 года; и Депонированный материал: гибридома 15A5.1.1.1 (также называемая 7284), которая продуцирует антитело 15A5.

[0047] "Классом" антитела называют тип константного домена или константного района, имеющего его тяжелую цепь. Имеются пять главных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изоотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, названы α, δ, ε, γ и μ, соответственно.

[0048] Термин "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" используются здесь взаимозаменяемо для ссылки на антитело, имеющее структуру, по существу сходную со структурой нативного антитела, или имеющую тяжелые цепи, которые содержат Fc-область, как определено здесь.

[0049] Термин "моноклональное антитело" относится в данном контексте к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., индивидуальные антитела, содержащие эту популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих природно-встречающиеся мутации, или возникающих во время получения препарата моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. В противоположность препаратам поликлональных антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против единственной детерминанты на антигене. Таким образом, определение "моноклональный" указывает на характер антитела, которое было получено по существу из гомогенной популяции антител и не было сконструировано, как требует получение антитела по любому конкретному способу. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с данным изобретением могут быть изготовлены разнообразными способами, в том числе, но не только, гибридным способом, способами рекомбинантных ДНК, способами фагового дисплея и способами с использованием трансгенных животных, содержащих все или часть локусов иммуноглобулина человека, причем такие способы и другие примерные способы получения моноклональных антител описываются здесь.

[0050] Термин "нативные антитела" относится к природно-встречающимся молекулам иммуноглобулинов с варьирующимися структурами. Например, нативные антитела IgG являются гетеротетрамерными гликопротеинами приблизительно 150000 дальтон, состоящими из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей, которые

являются дисульфид-связанными. От N-конца до C-конца, каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), также называемую переменным тяжелым доменом или переменной домен тяжелой цепи, за которым следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Подобным образом, от N-конца до C-конца, каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), также называемую переменным легким доменом или переменным домен легкой цепи, за которым следует константный легкий (CL) домен. Легкая цепь антитела может быть отнесена к одному из двух типов, называемых kappa (κ) и lambda (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена.

[0051] Термин "цитотоксический агент" в данном контексте относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает клеточную функцию и/или вызывает смерть или деструкцию. Цитотоксические агенты включают, но не ограничиваются ими, радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu); химиотерапевтические агенты или лекарственные средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды винка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубин или другие интеркалирующие агенты); ингибирующие рост агенты; ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты; антибиотики; и токсины, такие как токсины с малой молекулой или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, в том числе, их фрагменты и/или варианты. Неограничивающие примеры цитотоксических агентов, подходящих для данного изобретения, включают агенты, описанные в US 2009/0280056 A1, поданном 26 октября 2007 года, полное описание которого особо включено здесь посредством ссылки. Например, в некоторых вариантах осуществления цитотоксическим агентом является монометилауристин E (ММАЕ).

[0052] "Выделенное" антитело является антителом, которое было отделено от компонента его природной среды. В некоторых вариантах осуществления антитело очищают до чистоты, большей, чем 95% или 99%, как определено, например, электрофорезом (например, ДСН-ПААГ-электрофорезом, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографически (например, ионообменной ВЖХ или ВЖХ с обращенной фазой). Для обзора способов определения чистоты антитела, см., например, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

[0053] Термин "выделенная" нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может быть выделена из компонента ее природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном местоположении, которое является отличающимся от ее природного хромосомного местоположения.

[0054] Термин "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-STEAP-1-антитело" относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела (или их фрагменты), в том числе такую молекулу (такие молекулы) нуклеиновых кислот в едином векторе или отдельных векторах, и такая молекула нуклеиновой кислоты (такие молекулы нуклеиновых кислот) присутствуют в одном или нескольких местоположениях в клетке-хозяине.

[0055] Термин "вектор", в данном контексте, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана.

Термин включает вектор в качестве самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются здесь "экспрессирующими векторами".

[0056] Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, в том числе к потомству таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичную трансформированную клетку и потомство, произведенное из них, без учета количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот с родительской клеткой, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое имеет ту же самую функцию или биологическую активность при скрининге или отборе на исходно трансформированную клетку, включено здесь.

[0057] Термин "вкладыш упаковки" используется в отношении инструкций, включенных в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировании, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предостережениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

II. СПОСОБЫ

[0058] В одном аспекте данное раскрытие изобретения обеспечивает способы диагностики или определения стадии рака у испытуемого субъекта, использующие образцы крови испытуемого субъекта. В частности, данное описание обеспечивает способ для диагностики или определения стадии рака предстательной железы у испытуемого субъекта определением, экспрессируют ли циркулирующие опухолевые клетки (СТС) один или несколько специфических для предстательной железы маркеров.

[0059] В способах, представленных здесь, СТС анализируют на экспрессию одного или нескольких специфических для предстательной железы маркеров. Детектирование специфических для предстательной железы маркеров на СТС обеспечивает дополнительную информацию в отношении диагностики и определения стадии рака предстательной железы.

[0060] В некоторых вариантах осуществления данное раскрытие изобретения обеспечивает способы диагностики или определения стадии рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающие: а) контактирование раковых клеток эпителиального происхождения с антителом, которое специфически связывается со специфическим для предстательной железы маркером, где раковые клетки являются клетками из образца крови, взятого у испытуемого субъекта; и б) определение, экспрессируют ли любые из раковых клеток специфический для предстательной железы маркер, где присутствие раковых клеток, которые экспрессируют специфический для предстательной железы маркер, является прогнозирующим наличие рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0061] Термин "раковые клетки эпителиального происхождения" относится к раковым клеткам, которые экспрессируют по меньшей мере один эпителиальный маркер. Термин "маркер" в данном контексте относится к молекуле антигена, которая преимущественно экспрессируется на конкретном типе клеток и способствует отличению этих клеток от других типов клеток. Например, эпителиальным маркером может быть молекула антигена, универсально экспрессируемая на эпителиальных клетках, но в норме не обнаруживаемая на лейкоцитах. Раковые клетки эпителиального происхождения могут

также экспрессировать опухолевый маркер, например, молекулу антигена, преимущественно обнаруживаемую на опухолевых клетках, но менее часто обнаруживаемую на нормальных клетках. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки эпителиального происхождения содержат СТС.

5 [0062] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки эпителиального происхождения экспрессируют по меньшей мере один эпителиальный маркер, который обнаруживается также преимущественно в раковых клетках. Детектирование такого эпителиального маркера служит признаком раковой клетки эпителиального происхождения. В некоторых вариантах осуществления таким эпителиальным маркером
10 является Молекула Адгезии Эпителиальной Клетки (Epithelial Cell Adhesion Molecule) (ЕрСАМ).

[0063] Раковые клетки эпителиального происхождения являются клетками из образца крови, полученного от испытуемого субъекта. Образцами крови может быть любой образец, который получен из крови человека, например, образец плазмы, образец
15 сыворотки, цельная кровь или кровь, которая была обработана определенными агентами, такими как антикоагулянт. Образцы крови могут быть получены непосредственно от испытуемых субъектов или могут быть получены из организаций, которые собирают образцы от испытуемых субъектов.

[0064] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки идентифицируют из
20 образца крови с захватывающей композицией. В некоторых вариантах осуществления захватывающая композиция содержит лиганд, который специфически связывается с раковыми клетками эпителиального происхождения. В некоторых вариантах осуществления лиганд является антителом, которое специфически связывается с эпителиальным антигеном, преимущественно экспрессируемым на раковых клетках.
25 В некоторых вариантах осуществления эпителиальным антигеном является ЕрСАМ.

[0065] Термин "идентичность" или "идентификация" относится в данном контексте по существу к дифференциации раковых клеток эпителиального происхождения от остальных компонентов в образце крови. Например, раковые клетки эпителиального происхождения могут быть связаны или захвачены захватывающей композицией, тогда
30 как остальные компоненты являются несвязанными или незахваченными.

[0066] Идентифицированные раковые клетки могут быть или могут не быть отделены от остальных компонентов в образце крови. В некоторых вариантах осуществления идентифицированные раковые клетки не являются отделенными или обогащенными от других компонентов в образце. Например, образец крови, например, образец
35 сыворотки, может быть нанесен на предметное стекло, идентифицирован захватывающей композицией, и, без любых операций разделения или обогащения, образец может быть контактирован с другими реагентами.

[0067] В некоторых вариантах осуществления идентифицированные раковые клетки отделяют от образца крови. Термин "обогащенные" относится в данном контексте к
40 плотности идентифицированных раковых клеток в клеточной фракции, которая является более высокой, чем в образце крови. Для отделения клеточной фракции могут быть использованы любые подходящие способы. Способы, обычно используемые в данной области, включают, без ограничения, гравитационное разделение, магнитное разделение или аффинное разделение, например, после того как раковые клетки образуют комплекс
45 с захватывающей композицией, который позволяет отделять раковые клетки. Для гравитационного разделения захватывающая композиция может быть связана с частицами или бусинами, которые могут центрифугироваться в результате направленного вниз спина частиц или бусин для обогащения идентифицированных

раковых клеток. Для магнитного разделения, захватывающая композиция может быть связана с магнитными частицами, которые могут быть отделены в подходящих магнитных полях. Для аффинного разделения, захватывающая композиция может быть иммобилизована на устройстве, таком как предметное стекло, и позволяет захватывание
5 идентифицированных клеток.

[0068] В некоторых вариантах осуществления клеточную фракцию отделяют под действием магнитного поля. В некоторых вариантах осуществления лиганд в захватывающей композиции связан с магнитной частицей.

[0069] Магнитные частицы, подходящие для описанных здесь способов, могут быть
10 получены с использованием способов, известных в данной области, см., например, патенты США 5597531, 5698271 и 6365362, а также процедур, описанных в Liberti et al., In Fine Particles Science and Technology, 777-90, E. Pelizzetti (ed.) (1996). Вкратце, магнитные частицы содержат магнитную сердцевину (магнитный кор) (например, оксиды железа), которая покрыта полимерами или белками (например, бычьим сывороточным
15 альбумином и казеином). Магнитная масса и размер магнита магнитных частиц могут регулироваться, так что магнитные частицы являются чувствительными к магниту, но по существу являются невидимыми для аналитических способов клеток, таких как детектирование иммунофлуоресценции. Подходящий размер магнитных частиц может быть меньшим, чем 200 нм, предпочтительно с подходящим диапазоном магнитных
20 частиц, например, в пределах 90-150 нм. Магнитная масса магнитных частиц может находиться между 70-90%.

[0070] В некоторых вариантах осуществления магнитная частица является коллоидной. Такие коллоидные магнитные частицы являются по существу стабильными в растворе на протяжении продолжительного периода времени, и не имеют тенденции
25 агрегировать при силе тяготения или в отсутствие приложенного магнитного поля. В некоторых вариантах осуществления магнитные частицы являются коллоидными наночастицами.

[0071] Лиганд в захватывающей композиции может быть связан с магнитными частицами с использованием любых подходящих способов, известных в данной области.
30 Например, захватывающая композиция может быть непосредственно связана с магнитной частицей с использованием гетеробифункциональных линкеров, таких как сукцинимидилпропионо-дитиопиридин (SPDP), и сульфосукцинимидил-4-[малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC)). Для другого примера, захватывающая композиция, содержащая биотинилированное антитело, может быть
35 связана с магнитной частицей, конъюгированной со стрептавидином. Захватывающая композиция и магнитные частицы могут быть также введены с другими конъюгирующими парами, которые могут осуществлять связывание, например, с парами авидин-биотин, белок А-антитело Fc, рецептор-лиганд и лектин-карбогидрат.

[0072] В некоторых вариантах осуществления захватывающая композиция содержит
40 антитело EpCAM, связанное с магнитными коллоидными наночастицами. В некоторых вариантах осуществления может быть использована система CellSearch[®] (Veridex, New Jersey) для выделения клеточной фракции, обогащенной идентифицированными клетками.

[0073] Раковые клетки эпителиального происхождения контактируют с антителом,
45 которое специфически связывается с простата-специфическим маркером. Термин "простата-специфический" в данном контексте указывает на то, что маркер преимущественно обнаруживается в тканях предстательной железы (простаты) и по существу отличает ткани или клетки предстательной железы от других тканей или

клеток. В некоторых вариантах осуществления простата-специфический маркер является маркером поверхности или мембраны клеток предстательной железы (простаты). В некоторых вариантах осуществления простата-специфический маркер выбран из группы, состоящей из: Шесть-трансмембранного эпителиального антигена предстательной
 5 железы (STEAP-1) (см., например, Hubert et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14523-14528), простата-специфического мембранного антигена (PSM) (см., например, Israeli, R. S. et al., (1993) Cancer Res. 53, 227-230), опухолевого антигена рака предстательной железы (PSTA-1) (см., например, Su, Z. Z. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7252-7257) и антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA) (см., например,
 10 Reiter, R. E. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 95, 1735-1740). Один примерный STEAP-1 человека имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, описанную в US 2009/0280056 A1, поданной 26 октября 2007 года, полное описание которой особо включено здесь посредством ссылки.

[0074] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически
 15 связывается с простата-специфическим маркером, содержит анти-STEAP-1-антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антитело связывается со STEAP-1 с $K_D \leq 1000$ нМ. Анти-STEAP-1-антитело может быть поликлональным антителом или моноклональным антителом и может быть антителом любого подходящего вида, таким как, например, овечье антитело, кроличье антитело или мышинное антитело.

[0075] В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антителом является
 20 мышинное моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антителом является 15A5, продуцируемое гибридомной клеткой, имеющей номер депозита микроорганизмов РТА-12259. В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антителом является антитело, которое связывается по существу с тем же самым эпитопом, с которым связывается антитело 15A5.

[0076] В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антитело конъюгировано
 с первой детектируемой меткой. Могут быть использованы любые детектируемые метки. В некоторых вариантах осуществления детектируемой меткой является
 30 флуоресцентная метка, такая как, например, fluorophore AF-488, производные цианиновых красителей, флуоресцеин, родамин, Техасский красный, аминотетилкумарин (АМСА), фикоэритрин, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), среди прочих. Способы конъюгирования антитела с детектируемой меткой хорошо известны в данной области, см., например, Hermanson, G. T., Bioconjugate techniques, Academic Press, 2008.

[0077] В некоторых вариантах осуществления анти-STEAP-1-антитело не является
 35 конъюгированным. Неконъюгированное анти-STEAP-1-антитело может быть детектировано вторым антителом, конъюгированным с детектируемой меткой (например, первой детектируемой меткой). Такое второе антитело может быть любым антителом, возникшим в другом виде, чем анти-STEAP-1-антитело, и узнает константный район анти-STEAP-1-антитела, как обычно используется в данной области.

[0078] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки идентифицируют с
 40 одним или несколькими реагентами, которые позволяют детектировать раковые клетки эпителиального происхождения.

[0079] В некоторых вариантах осуществления реагенты содержат лиганд, который
 45 специфически связывается с эпителиальным маркером. В некоторых вариантах осуществления эпителиальный маркер не является ЕрСАМ. В некоторых вариантах осуществления эпителиальный маркер является цитокератином. Цитокератины являются группой белков, обычно экспрессируемых в эпителиальных клетках, и образуют кератинсодержащие филаменты в цитоскелете эпителиальной ткани.

[0080] В некоторых вариантах осуществления лигандом, который специфически связывается с эпителиальным маркером, является анти-цитокератин-антитело, необязательно конъюгированное со второй детектируемой меткой. Может быть использована любая подходящая детектируемая метка, например, флуоресцентная метка, такая как фикоэритрин.

[0081] В некоторых вариантах осуществления реагенты дополнительно содержат клеточно-специфический краситель, который отличает клетки от неклеточных компонентов. Например, могут быть использованы красители, которые окрашивают ядро клетки. В некоторых вариантах осуществления красителем является 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI).

[0082] В некоторых вариантах осуществления реагенты дополнительно содержат лиганд, который специфически связывается с лейкоцитным маркером. Лейкоцитный маркер может быть выбран как универсально экспрессируемый на лейкоцитах, но обычно не на лейкоцитах, например, CD45 может быть подходящим лейкоцитным маркером. В некоторых вариантах осуществления лиганд, который специфически связывается с лейкоцитным маркером, конъюгирован с третьей детектируемой меткой. Например, лиганд может быть анти-CD45-антителом, конъюгированным с аллофикоцианином. Окрашивание идентифицированных клеток анти-CD45-антителом может способствовать исключению лейкоцитов из СТС эпителиального происхождения.

[0083] В случае использования более чем одной детектируемой метки (в том числе красителя) при тестировании, предпочтительно, чтобы детектируемые метки были выбраны таким образом, что каждая метка может быть независимо детектирована без существенной интерференции в отношении любых других детектируемых сигналов, присутствующих в образце. Например, детектируемые метки (в том числе краситель) могут быть разными флуоресцентными молекулами, показывающими различные окраски в условиях детектирования.

[0084] Детектирование может проводиться с использованием любого подходящего способа, например, способов на основе иммунофлуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, волоконно-оптической сканирующей цитометрии или лазерной сканирующей цитометрии.

[0085] В некоторых вариантах осуществления раковые клетки визуализируют с использованием флуоресцентной микроскопии после окрашивания клетко-специфическим красителем и различно мечеными антителами или лигандами для эпителиального маркера, простата-специфического маркера и лейкоцитного маркера. Клетки, положительные в отношении клетко-специфического красителя, эпителиального маркера и простата-специфического маркера, но отрицательные в отношении лейкоцитного маркера, классифицируются как раковые клетки эпителиального происхождения, которые экспрессируют простата-специфический маркер. Такие клетки могут быть также анализированы с использованием цитометрии, см., например, Cruz, I., et al., *Am J Clin Pathol*, Vol. 123: 66-74 (2005).

[0086] Альтернативно, раковые клетки могут быть также помещены на поверхности стеклянного предметного стекла и сканированы на клетки, положительные в отношении клетко-специфического красителя, эпителиального маркера и простата-специфического маркера, но отрицательные в отношении лейкоцитного маркера (см., например, Marginucci, D. et al., *Human Pathology*, Vol. 38, №3, 514-519 (2007)). Подобным образом, идентифицированные клетки, помещенные на стеклянном предметном стекле, могут быть также анализированы с использованием технологии лазерного сканирования (см., например, Pachmann, K. et al., *Breast Cancer Research*, Vol. 7, №6, R975-R979 (2005)).

[0087] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают определение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер, где такое количество является прогнозирующим стадию рака предстательной железы у испытуемого субъекта. Были сделаны предположения в отношении корреляции размера и/или агрессивности опухоли с количеством опухолевых клеток в периферической крови. Например, сообщается, что пациент с опухолью, имеющей диаметр 1 мм, может иметь частоту опухолевых клеток в периферической крови приблизительно 6 опухолевых клеток на 100 мл крови (см., например, патент США 6365362). При предположении, что увеличение в размере опухоли может быть пропорциональным частоте, могут быть установлены критерии для указания стадии рака у испытуемого субъекта. В некоторых вариантах осуществления клинические образцы крови пациентов с диагнозом ранней стадии или метастатического рака предстательной железы могут быть использованы для определения статистического уровня раковых клеток в периферической крови для пациентов и тем самым обеспечивают критерии для последующего детектирования и анализа.

[0088] В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают определение уровня экспрессии простата-специфического маркера на раковых клетках. Некоторые простата-специфические маркеры являются антигенами, уровень экспрессии которых может регулироваться повышающим образом в результате роста опухоли, метастазирования и/или продвинутой стадии рака. Некоторые простата-специфические маркеры могут включать, без ограничения, STEAP-1, PSMA, PCTA-1 и PSCA. Уровни экспрессии простата-специфических маркеров на раковых клетках могут быть определены подходящими способами, например, определением интенсивности флуоресцентного сигнала, соответствующего простата-специфическому маркеру.

[0089] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают определение стадии раковых клеток на основе их уровня экспрессии простата-специфического маркера и определение процента раковых клеток в каждой стадии. В некоторых вариантах осуществления раковые клетки, экспрессирующие высокий уровень, средний уровень и низкий уровень простата-специфического маркера, классифицируют соответственно. Критерии для "высокого уровня", "среднего уровня" и "низкого уровня" могут быть определены, например, с использованием установленных клеточных линий, имеющих известные уровни экспрессии маркера. Например, известно, что клеточная линия LB50 экспрессирует высокий уровень STEAP-1, известно, что клеточная линия LnCAPneg экспрессирует средний уровень STEAP-1 и известно, что клеточная линия PC3 экспрессирует низкий уровень STEAP-1. Таким образом, раковые клетки, детектированные как имеющие уровень экспрессии STEAP-1, сравнимый с клеточной линией LB50 или более высокий, чем линия LB50, могут быть классифицированы как "высокий уровень". Подобным образом, "средний уровень" может быть приписан раковым клеткам, уровень экспрессии STEAP-1 которых сравним с уровнем экспрессии клеточной линии LnCAPneg или является более высоким, чем уровень экспрессии клеточной линии LnCAPneg, но является более низким, чем уровень экспрессии клеточной линии LB50. Клеточные линии, имеющие уровень экспрессии STEAP-1, сравнимый с этим уровнем или более низкий, чем уровень экспрессии клеточной линии PC3, могут быть классифицированы как имеющие "низкий уровень".

[0090] Дополнительно может быть определено количество раковых клеток в каждой стадии. В некоторых вариантах осуществления в каждой стадии может быть рассчитан процент раковых клеток. Более высокий процент раковых клеток в стадии высокого

уровня может быть показателем более продвинутой стадии рака предстательной железы. Сходным образом, рак предстательной железы на ранней стадии может обнаруживать более низкий процент раковых клеток в стадии высокого уровня и/или более высокий процент раковых клеток в стадии с низким уровнем.

5 [0091] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают подсчет балльной оценки для каждой стадии умножением процента раковых клеток в стадии с уникальным номером стадии, приписанным стадии на основе уровня экспрессии простата-специфического маркера, и суммированием всех баллов
10 стадии для получения Н-оценки, где Н-оценка является показателем стадии рака предстательной железы у испытуемого субъекта. Например, номер стадии 3 может быть приписан стадии высокого уровня, 2 стадии среднего уровня и 1 стадии низкого уровня, который определяет диапазон Н-балла в пределах 0-300. Более высокий Н-балл является показателем большего числа клеток в стадии высокого уровня, т.е. более продвинутой стадии рака предстательной железы, и более низкий Н-балл является
15 показателем большего числа клеток в стадии низкого уровня, т.е. относительно ранней стадии рака предстательной железы.

[0092] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают определение присутствия маркера и/или частоты присутствия маркера. В некоторых вариантах осуществления присутствие маркера определяют посредством
20 иммуногистохимикалия ("ИНС"), Вестерн-блот анализа, иммунопреципитации, анализов молекулярного связывания, ELISA, ELIFA, клеточного сортирования с возбуждением флуоресценции ("FACS"), MassARRAY, протеомики, количественных анализов на основе крови (например, ELISA сыворотки), биохимических анализов ферментативной активности, гибридизации *in situ*, Нозерн-анализа, полимеразной цепной реакции
25 ("ПЦР"), включающей количественную ПЦР реального времени ("qRT-PCR") и других способов детектирования типа амплификации, таких как, например, разветвленные ДНК, SISBA, TMA и т.п.), RNA-Seq, FISH, микроэрей-анализ, анализ экспрессии большого числа генов, фиксированных на твердом носителе (чипе), профиль генной экспрессии и/или серийный анализ генной экспрессии ("SAGE"), а также любой из
30 большого разнообразия анализов, которые могут выполняться эррей-анализами белка, гена, и/или ткани. В некоторых вариантах осуществления присутствие маркера определяют флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH). В некоторых вариантах осуществления маркером является PTEN (гомолог фосфатазы и тензина, делегированный на хромосоме 10). В некоторых вариантах осуществления CTC является триплоидом.
35 В некоторых вариантах осуществления CTC является триплоидом с потерей PTEN. В некоторых вариантах осуществления определено посредством CEP10 FISH, что CTC является триплоидом. В некоторых вариантах осуществления определено посредством PTEN FISH, что CTC лишен PTEN.

[0093] В другом аспекте данное раскрытие изобретения обеспечивает также способы
40 прогнозирования эффективности терапии рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающие: а) контактирование раковых клеток эпителиального происхождения с антителом, которое специфически связывается со специфическим для предстательной железы маркером, где раковые клетки являются клетками из образца крови, взятого у испытуемого субъекта; и б) определение, экспрессируют ли любые из
45 раковых клеток специфический для предстательной железы маркер, где присутствие раковых клеток, которые экспрессируют специфический для предстательной железы маркер, является прогнозирующим наличие рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

[0094] Некоторые простата-специфические маркеры могут быть также терапевтическими мишенями для лечения рака предстательной железы. Таким образом, уровень экспрессии такого маркера на СТС и изменения в таком уровне могут быть прогнозирующими эффективностью терапий, которые нацелены на такой маркер.

5 [0095] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают определение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер, и/или определение уровня экспрессии простата-специфического маркера на раковых клетках. Например, уровень экспрессии простата-специфического маркера (например, STEAP-1) на раковых клетках из базового
10 предобработанного образца в клинических исследованиях ранней фазы мог быть коррелирован с клиническими конечными результатами (исходом), такими как прогрессирование выживаемости без рецидивов, изменения PSA, сообщенная пациентом боль в костях, общее выживание или другие, для определения, является ли экспрессия простата-специфического маркера выше определенного порога прогнозирующей
15 клиническую активность терапии рака предстательной железы (например, терапии на основе конъюгата STEAP-1-антитело-лекарственное средство (ADC)). Динамические изменения в уровне экспрессии простата-специфического маркера (например, STEAP-1) в раковых клетках (т.е. понижающая регуляция в образцах после лечения) можно также коррелировать с показателями клинического исхода для определения, являются
20 ли такие изменения, прогнозирующими терапевтическую активность. Такие способы могут быть использованы в качестве первой ступени в квалификации анализа в качестве кандидатного прогнозирующего биомаркера, который мог бы быть использован для отбора пациентов для терапии рака предстательной железы (например, терапии на основе STEAP-1 ADC), с последующей проспективной валидизацией в исследовании
25 подтверждающей фазы III.

[0096] В другом аспекте данное описание обеспечивает также способы мониторинга реакции на терапию рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающие: а) контактирование первой группы клеток эпителиального происхождения с антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером, где первая группа раковых клеток является клетками из
30 первого образца крови, взятого у испытуемого субъекта; б) определение количества раковых клеток в первой группе, которые экспрессируют простата-специфический маркер, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера в раковых клетках; в) контактирование второй группы раковых клеток эпителиального происхождения с антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером,
35 где вторая группа раковых клеток является клетками из второго образца крови, взятого у испытуемого субъекта после тест-периода терапии рака предстательной железы; д) определение количества раковых клеток в второй группе, которые экспрессируют простата-специфический маркер, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера в раковых клетках; и е) сравнение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера, как определено в б), с показателями в стадии д), где изменение в количестве раковых клеток, экспрессирующих простата-специфический маркер, и/или
40 уровне экспрессии простата-специфического маркера в раковых клетках является прогнозирующим реакцию на терапию рака предстательной железы у испытуемого субъекта. В некоторых вариантах осуществления простата-специфическим маркером является STEAP-1.

III. Антитела

[0097] В другом аспекте данное раскрытие изобретения обеспечивает антитела, которые связываются по существу с тем же самым эпитопом, с которым связывается антитело 15A5, где антитело 15A5 продуцируется гибридной клеткой, имеющей номер депонирования микроорганизмов РГА-12259.

5 [0098] В некоторых вариантах осуществления антитела, обеспеченные здесь, конкурируют с антителом 15A5 за связывание со STEAP-1. Конкурентные анализы могут быть использованы для идентификации антитела, которое конкурирует с анти-STEAP-1-антителом 15A5 за связывание со STEAP-1.

[0099] В одном примерном конкурентном анализе, иммобилизованный STEAP-1
10 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается со STEAP-1 (например, 15A5), и второе немеченое антитело, которое тестируют на его способность конкурировать с первым антителом за связывание со STEAP-1. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля, иммобилизованный STEAP-1 инкубируют в растворе, содержащем первое меченое
15 антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубирования при условиях, перmissивных для связывания первого антитела со STEAP-1, избыток несвязанного антитела удаляют и измеряют количество метки, ассоциированной с иммобилизованным STEAP-1. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным STEAP-1, является существенно уменьшенным в тест-образце относительно контрольного образца,
20 то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание со STEAP-1. См. Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0100] В некоторых вариантах осуществления обеспеченные здесь антитела имеют константу диссоциации (Kd) относительно STEAP-1 ≤ 1000 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1
25 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

[0101] В одном варианте осуществления Kd измеряют анализом связывания радиоактивно меченого антигена (RIA), выполняемым с Fab-версией представляющего
30 интерес антитела и его антигеном, как описано в следующем анализе. Аффинность связывания в растворе Fab в отношении антигена измеряют уравниванием Fab с минимальной концентрацией (125 I)-меченого антигена в присутствии серии титрований немеченого антигена, затем захватыванием связанного антигена покрытым анти-Fab-антителом планшетом (см., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Для
35 установления условий для анализа, MICROTITER[®] multi-well plates (многолуночные планшеты) (Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл захватывающего анти-Fab-антитела (Cappel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (pH 9,6) и затем блокируют 2% (м/о) бычьим сывороточным альбумином в ЗФР в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В одном не-адсорбентном планшете
40 (Nunc #269620), 100 пМ или 26 пМ [125 I]-антиген смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (например, в соответствии с оценением анти-VEGF-антитела, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако, инкубирование может продолжаться
45 в течение более продолжительного периода (например, в течение приблизительно 65 часов) для гарантии достижения уравнивания.

После этого, смеси переносят в захватывающий планшет для инкубирования при комнатной температуре (например, в течение 1 часа). Раствор удаляют и планшет

промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20[®]) в ЗФР. После высушивания планшетов, добавляют 150 мкл на лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20[™]; Packard) и планшеты считают на счетчике гамма-квантов TOPCOUNT[™] (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, который дает меньше 20% или 20% максимальное связывание, отбирают для использования в конкурентных анализах связывания.

[0102] Согласно другому варианту осуществления Kd измеряют с использованием анализов резонанса поверхностных плазмонов при помощи BIACORE[®]-2000 или

BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при ~10 единицах реакции (RU). Вкратце, карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (CM5, BIAcore, Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разводят 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией при скорости потока 5 мкл/мин до достижения приблизительно 10 единиц реакции (RU) связанного белка. После инъектирования антигена, 1 М этаноламин инъектируют для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики, двухкратные серийные разведения Fab (0,78 нМ - 500 нМ) инъектируют в ЗФР (PBS) с 0,05% поверхностно-активным веществом полисорбатом 20 (TWEEN-20[™]) (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой взаимно однозначной

модели связывания Langmuir (BIACORE[®] Evaluation Software version 3.2) одновременной подгонкой сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесной диссоциации (Kd) рассчитывают в виде отношения k_{off}/k_{on} . См. Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881

(1999). Если on-rate (скорость прямой реакции) превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при анализе резонанса поверхностных плазмонов, описанного выше, тогда on-rate (скорость прямой реакции) может быть определена с использованием способа тушения флуоресценции, который измеряет увеличение или уменьшение в интенсивности эмиссии флуоресценции (возбуждение = 295 нм; излучение = 340 нм, 16 нм полоса пропускания) при 25°C 20 нМ анти-антиген-антитела (Fab-формы) в ЗФР, pH 7,2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена при измерении в спектрометре, таком как оборудованный механизмом остановки потока спектрометр (Aviv Instruments) или спектрометр 8000-series SLM-AMINCO[™] (Thermo Spectronic) с перемешиваемой кюветой.

[0103] Измерения кинетического связывания могут также выполняться на приборе Octet Red (ForteBio, Menlo Park, CA, USA). Например, все промывки, разведения и измерения выполняют в Octet-буфере (0,2% додецилмальтозид или DDM, - ЗФР) со встряхиванием планшета при 1000 об/мин. Биосенсоры стрептавидина уравнивают в Octet-буфере в течение 10 минут и затем загружают биотинилированным STEAP-1 (из вирусного лизата в 1% DDM, разведенном 1:8 в Octet-буфере) в течение 5 мин и промывают в течение 10 мин. Для фазы ассоциации, покрытые лигандом наконечники стрептавидина погружают во фрагменты анти-STEAP-1-антител на 10 мин (восемь серийных двухкратных разведений, начинающихся при 500 или 50 нМ). Диссоциация комплекса Ab-STEAP-1 может быть измерена в лунках, содержащих только Octet-буфер, в течение 600 секунд. KD, Ka и Kd определяют с применением программы оценивания Octet v6.3 с использованием 1:1 модели связывания с глобальной подгонкой.

[0104] В некоторых вариантах осуществления обеспеченные здесь антитела включают,

без ограничения, мышинные антитела, овечьи антитела и кроличьи антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела являются мышинными моноклональными антителами.

[0105] В некоторых вариантах осуществления обеспеченные здесь антитела содержат по меньшей мере один из CDR-участков антитела 15A5. CDR-участки антитела могут
5 быть определены с использованием способов, известных в данной области. Примерные CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) встречаются при аминокислотных остатках 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35В Н1, 50-65 Н2 и 95-102 Н3.

(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). За исключением CDR1 в переменных
10 областях тяжелой цепи, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, которые образуют гипервариабельные петли. CDR содержат также "определяющие специфичность остатки" или "SDR", которые являются остатками, которые контактируют антиген. SDR содержатся в участках CDR, называемых укороченными (аббревированными CDR или a-CDR). Примерные a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-
15 H2 и a-CDR-H3) встречаются при аминокислотных остатках 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35В Н1, 50-58 Н2 и 95-102 Н3. (См. Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008).) Если нет другого указания, остатки CDR и другие остатки в переменном домене (например, FR-остатки) нумеруются здесь в соответствии с Kabat et al., supra.

[0106] В некоторых вариантах осуществления обеспеченные здесь антитела содержат
20 по меньшей мере одну из переменных областей тяжелой цепи антитела 15A5, или по меньшей мере один из переменных остатков легкой цепи антитела 15A5.

[0107] Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к тяжелой или легкой цепи домена антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного
25 антитела обычно имеют сходные структуры, с каждым доменом, содержащим четыре консервативных каркасных района (FR) и три гипервариабельных области (HVR). (См., например, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Единственный домен VH или VL может быть достаточным для придания
30 антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием VH- или VL-домена из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов, соответственно. См., например, Portolano et al., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

[0108] Фрагменты обеспеченных здесь антител также включены в данное описание. В некоторых вариантах осуществления обеспеченным здесь антителом является
35 фрагмент антитела. Фрагменты антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv и scFv и другие описанные ниже фрагменты. В отношении обзора некоторых фрагментов антител, см. Hudson et al. Nat. Med. 9: 129-134 (2003). В отношении scFv-фрагментов, см., например, Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenbürg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp.269-315 (1994); см. также WO 93/16185; и патенты США с номерами 5571894 и 5587458. В отношении обсуждения фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа
40 связывания рецептора реутилизации и имеющих увеличенный период полувыведения in vivo, см. патент США №5869046.

[0109] Диатела являются фрагментами антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть бивалентными или биспецифическими. См., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003) и Hollinger et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела описаны также в Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003).

[0110] Однодоменные антитела являются фрагментами антител, содержащими весь 5
вариабельный домен или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь
вариабельный домен или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В
некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело является однодоменным
антителом человека (Domantis, Inc., Waltham, MA; см., например, патент США №6248516
B1).

[0111] Фрагменты антител могут быть получены различными способами, 10
включающими, но не ограничивающимися ими, протеолитическое расщепление
интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами
(например, *E. coli* или фагом), как описано здесь.

[0112] В некоторых вариантах осуществления обеспеченными здесь антителами
являются антитело 15A5 или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0113] В некоторых вариантах осуществления обеспеченные здесь антитела 15
дополнительно конъюгируют с детектируемой меткой. Подходящие метки включают,
но не ограничиваются ими, метки или части молекул, которые детектируются
непосредственно (такие как флуоресцентные, хромофорные, электроноплотные,
хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также части молекул, такие как 20
ферменты и лиганды, которые детектируются непрямо, например, через ферментативную
реакцию или молекулярное взаимодействие. Примеры меток включают, но не
ограничиваются ими, радиоизотопы ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I , флуорофоры, такие как
редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные,
дансил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазу светляка и бактериальную 25
люциферазу (патент США U.S. №4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы,
пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу,
лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-
6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и 30
ксантиноксидаза, связанные с ферментом, который использует пероксид водорода для
окисления предшественника красителя, такого как HRP, лактопероксидазу или
микрпероксидазу, биотин/авидин, спиновые метки, бактериофаговые метки, стабильные
свободные радикалы и т.п.

IV. Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева

[0114] Антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных способов 35
и композиций, например, как описано в патенте США №4816567. В одном варианте
осуществления обеспечена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-STEAP-
1-антитело, описанное здесь. Такая нуклеиновая кислота может кодировать
аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную
последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи 40
антитела). В следующем варианте осуществления обеспечены один или несколько
векторов (например, экспрессирующих векторов), содержащих такую нуклеиновую
кислоту. В следующем варианте осуществления обеспечена клетка-хозяин, содержащая
такую нуклеиновую кислоту. В одном таком варианте осуществления клетка-хозяин
содержит (например, была трансформирована ею): (1) вектор, содержащий нуклеиновую 45
кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL
антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2)
первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную
последовательность VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту,

которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VN антитела. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой Яичников Китайского Хомячка (СНО) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NSO, Sp20). В одном варианте осуществления обеспечен способ получения анти-STEAP-1-антитела, где способ предусматривает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как обеспечено выше, при условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно извлечение антитела из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

[0115] Для рекомбинантного получения анти-STEAP-1 антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и инсертируют в один или несколько векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела).

[0116] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии антителокодирующих векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные здесь. Например, антитела могут быть получены в бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и Fc-эффекторная функция. В отношении экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см., например, патенты США с номерами 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (В.К.С. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающие экспрессию фрагментов в *E. coli*). После экспрессии, антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

[0117] Кроме прокариотов, эукариотические микробы, такие как волокнистые грибы или дрожжи, являются подходящими клонирующими или экспрессионными хозяевами для антителокодирующих векторов, включающими грибковые и дрожжевые штаммы, пути гликозилирования которых "гуманизировали", с получением продукции антитела со структурой, частично или полностью одинаковой со структурой гликозилирования структуры человека. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004) и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0118] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела производят также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных, включают клетки растений и клетки насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые могут быть использованы вместе с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0119] Культуры клеток растений могут быть также использованы в качестве хозяев. См., например, патенты США с номерами 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

[0120] Позвоночные клетки могут также использоваться в качестве хозяев. Например, могут быть также использованы линии клеток млекопитающих, которые адаптированы для роста в суспензии. Другими примерами применимых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 клеток почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных клеток человека (клетки 293 или клетки 293, описанные, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки бэби-

хомячка (ВНК); клетки Sertoli мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, в Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки Африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки цервикальной карциномы человека (HELA); клетки собачьей почки (MDCK; клетки печени серой крысы (линии Buffalo) (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, в Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие применимые линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника Китайского Хомячка (CHO), включающие клетки DHFR-CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. В отношении обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для получения антител, см., например, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

[0121] Здесь также обеспечена линия клеток гибридомы, имеющая номер депонирования микроорганизмов РТА-12259. Линия клеток гибридомы продуцирует антитело 15А5.

V. Применение антител

[0122] Антитела, обеспеченные здесь, могут быть использованы в приготовлении диагностического реагента для рака предстательной железы. Антитела могут быть дополнительно конъюгированы с детектируемой меткой, подходящей для диагностической цели, и могут быть представлены в подходящей форме, такой как лиофилизированные порошки, или в форме подходящего раствора.

VI. Тест-Наборы

[0123] В другом аспекте данного изобретения, обеспечены тест-наборы, содержащие композиции, применимые для диагностики или прогнозирования рака предстательной железы.

[0124] Данное раскрытие сущности изобретения обеспечивает тест-наборы для детектирования присутствия раковых клеток предстательной железы, экспрессирующих STEAP-1, в образце крови, содержащие антитело, которое специфически связывается со STEAP-1.

[0125] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с первой детектируемой меткой. Может быть использована любая детектируемая метка, такая как флуоресцентная метка.

[0126] В некоторых вариантах осуществления антителом является анти-STEAP-1-антитело, обеспеченное здесь. В некоторых вариантах осуществления антителом является антитело 15А5.

[0127] В некоторых вариантах осуществления тест-наборы дополнительно содержат одну или несколько композиций, выбранных из группы, состоящей из: магнитных частиц, связанных с первым лигандом, который специфически связывается с раковыми клетками эпителиального происхождения; вторым лигандом, который специфически связывается с эпителиальным маркером; третьим лигандом, который специфически связывается с лейкоцитным маркером, и красителя, который отличает клетки от неклеточных компонентов.

[0128] В некоторых вариантах осуществления второй лиганд конъюгирован со второй детектируемой меткой, и/или второй лиганд и/или третий лиганд конъюгирован с третьей меткой. В некоторых вариантах осуществления когда тест-наборы содержат более, чем одну детектируемую метку (в том числе краситель), предпочтительно, детектируемые метки (в том числе краситель) отбираются таким образом, что каждая метка может

быть независимо детектирована без существенной интерференции с любыми другими детектируемыми сигналами, присутствующими в образце.

[0129] В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и/или третий лиганд содержит антитело. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд содержит анти-ЕрСАМ-антитело. В некоторых вариантах осуществления второй лиганд содержит анти-кератин-антитело. В некоторых вариантах осуществления третий лиганд содержит анти-CD45-антитело.

[0130] Тест-наборы могут дополнительно содержать контейнер и метку или вкладыш упаковки на контейнере или ассоциированным с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с IV-мешочками раствора и т.д. Контейнеры могут быть образованы из многочисленных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая находится одна или комбинирована с другой композицией, эффективной для диагностики состояния. По меньшей мере один реагент в композиции является антителом изобретения. Метка или вкладыш упаковки указывают на то, что композиция используется для диагностики *in vitro* выбранного состояния.

VII. ПРИМЕРЫ

[0131] Далее следуют примеры способов и композиций изобретения. Понятно, что на практике могут быть использованы различные другие варианты осуществления при наличии общего описания, обеспеченного выше.

Пример 1

Детектирование STEAP-1 на различных клеточных линиях

[0132] Три анти-STEAP-1-антитела использовали для детектирования экспрессии STEAP-1 на трех линиях раковых клеток предстательной железы с использованием анализа иммуногистохимии (ИНС). 293 LB50 использовали в качестве клеточной линии, экспрессирующей высокое количество STEAP-1; LnCAPneg использовали в качестве клеточной линии, экспрессирующей среднее количество STEAP-1; и PC3 использовали в качестве клеточной линии, экспрессирующей малое количество STEAP-1 или не экспрессирующей STEAP-1. Тестируемыми анти-STEAP-1-антителами были: антитело-37, которое является моноклональным анти-STEAP-1-антителом мыши; овечье поликлональное анти-STEAP-1-антитело и sc-25514, которое является кроличьим поликлональным анти-STEAP-1-антителом. Три антитела были конъюгированы с флуорофором AF-488.

[0133] Антитела инкубировали, соответственно, с тремя клеточными линиями. Связывания антитело-антиген визуализировали с использованием флуоресцентной микроскопии на сигнал AF-488. Результаты показали, что все три антитела давали ожидаемые интенсивности сигнала относительно уровней экспрессии трех клеточных линий, т.е. антитела показывали самое сильное окрашивание на клетках 293 LB50, среднее окрашивание на клетках LnCAPneg и низкое - отрицательное окрашивание на клетках PC3.

Пример 2

Детектирование экспрессии STEAP-1 в раковых клетках предстательной железы с использованием анти-STEAP-1-антител на системе CellSearch®

[0134] Три антитела (антитело-37 мыши, овечье поликлональное антитело и кроличье sc-25514) тестировали на системе CellSearch® на их способность детектировать экспрессию STEAP-1 на клетках LB50 и клетках PC3, соответственно.

[0135] Анализ с введением клеток в образец крови (spike-in) выполняли следующим образом. Клетки LB50 и клетки PC3 выращивали в колбах T75. Когда клетки достигали

80% конфлюэнтности, клетки промывали 10 мл ЗФР и затем обрабатывали 3 мл трипсина. К отделенным клеткам добавляли 7 мл среды и всю эту суспензию переносили в фальконизированную пробирку с последующим центрифугированием в течение 5 минут при 13000 об/мин. Супернатант удаляли и осадок повторно суспендировали в 10 мл ЗФР. 0,5 мл каждой клеточной суспензии переносили в *vicell*-пробирки и считали с использованием счетчика Beckman Coulter. Эту клеточную суспензию разводили до раствора 5000 клеток/мл в 10 мл среды. Подходящее количество клеток вводили в 10 мл крови, в которой 7,5 мл крови подлежали использованию в способе CellSearch. Для 100-клеточного spike in (введения), 26,6 мкл клеточной суспензии добавляли к 10 мл крови. Эту кровь с клетками spiked-in (введенными клетками) вращали в течение 20 минут.

[0136] Для гарантии того, что имелись 100 клеток, введенных в кровь (spiked into), 5 мкл каждой клеточной суспензии добавляли на предметные стекла с решеткой из поли-L-лизина (электронная микроскопия) с 5-кратным повторением. 5 мкл клеточной суспензии были равны приблизительно 25 клеткам. Клетки на каждом предметном стекле считали и количество клеток использовали для подсчета извлечения клеток подсчетом количества "СТС" (т.е. spiked-in (введенных) клеток), захваченных на CellSearch/ фактического количества клеток, подсчитанного на предметном стекле.

[0137] Когда кровь с клетками spiked-in (введенными клетками) осторожно смешивали, образцы крови пропускали на CellSearch с тремя анти-STEAP-1 антителами, соответственно, в соответствии с протоколом CellSearch СТС. Вкратце, каждый испытуемый образец смешивали с анти-ЕрСАМ антителом, конъюгированным с магнитными коллоидными наночастицами, и затем подвергали действию магнитного поля для создания возможности отделения клеточной фракции, обогащенной ЕрСАМ-положительными эпителиальными клетками в образце. Затем эту клеточную фракцию смешивали с фикоэритрин-конъюгированными анти-цитокератин-антителами, аллофикоцианин-конъюгированными анти-CD45-антителами, DAPI, и одним из трех анти-STEAP-1-антител, конъюгированных с AF-488, которые использовали в 4-ом фильтре. Конъюгированные анти-STEAP-1-антитела разводили до 1:50 в ЗФР (PBS). Образцы пропускали на CellSearch и СТС оценивали в баллах на анализаторе CellTracks. Клетки, окрашенные положительно на цитокератин и DAPI, но отрицательно на CD45, определяли как СТС. СТС на системах CellSearch autoprep, которые обнаруживали STEAP-1-окрашивание, отбирали и дополнительно определяли количественно на интенсивности флуоресценции анти-STEAP-1-антитела, которая указывала уровень экспрессии STEAP-1.

[0138] СТС с экспрессией STEAP-1 оценивали в баллах на основе интенсивности окрашивания, т.е. уровне экспрессии STEAP-1. СТС с высоким уровнем экспрессии, который демонстрировался сильной интенсивностью окрашивания, и минимальной до отсутствия фона, получал оценку в баллах 3, средняя интенсивность окрашивания с некоторым фоном получала оценку в баллах 2, и низкая интенсивность окрашивания с относительно высоким фоном и получала оценку в баллах 1. Один репрезентативный пример показан на фигуре 1.

[0139] Как показано на фигуре 2 (а), все три тестированных антитела детектировали высоко экспрессируемые STEAP-1 клетки LB50, клетки введенные (spiked in) в кровь, хотя диапазон динамики был различным. Как показано на фигуре 2 (b), овечье поликлональное антитело и кроличье sc-25514 также детектировали низко экспрессирующие STEAP-1 РС3-клетки, введенные (spiked-in) в кровь.

[0140] Н-оценку рассчитывали для СТС с экспрессией STEAP-1, из суммы (1 × процента

клеток, окрашивающихся слабо положительно) + (2 × процента клеток, окрашивающихся умеренно положительно) + (3 × процента клеток, окрашивающихся строго положительно) с максимальной оценкой 300 (McCall et al. (2008) British Journal of Cancer 98(6): 1094-1101).

5 [0141] Как показано на фигурах 2 (c)-(d) овечье поликлональное антитело демонстрировало наилучший динамический диапазон и, следовательно, овечье поликлональное антитело было выбрано для дальнейшего тестирования с клиническими образцами.

Пример 3

10 Анализ STEAP-1-экспрессирующих клеток в spiked-in (введенных в кровь) образцах с использованием овечьего поликлонального антитела на системе CellSearch®

[0142] Овечье поликлональное анти-STEAP-1-антитело использовали для определения экспрессии STEAP-1 на клетках, введенных (spiked-in) в образцы крови. Spike-in анализ (анализ с введением клеток в образцы крови) выполняли в процедуре, сходной с
15 описанной в примере 2 процедурой. Три клеточные линии, 293 LB50, LnCAPneg и PC3 вводили в соответствующие образцы крови и тщательно смешивали. Овечье поликлональное антитело разводили до 1:50 в ЗФР (PBS) и добавляли к образцу крови в 4-ом фильтре на CellSearch. Образцы пропускали на CellSearch и CTC оценивали в баллах на CellTracks-анализаторе. Клетки, окрашенные положительно на цитокератин
20 и DAPI, но отрицательно на CD45, определяли как CTC. CTC на системах CellSearch autorper, которые показывали окрашивание STEAP-1, отбирали и определяли количественно на интенсивности флуоресценции анти-STEAP-1-антитела, которая показала уровень экспрессии STEAP-1. Н-оценки также рассчитывали тем же самым способом, какой описан в примере 2.

25 [0143] Как показано на фигурах 3 (a)-(b), овечье поликлональное антитело детектировало экспрессию STEAP-1 на всех из трех тестируемых клеточных линий, и с хорошим динамическим диапазоном. Как детектировано овечьим поликлональным антителом, образец (spiked-in) с введенными клетками 293 LB50 имел более 60% CTC с высоким уровнем интенсивности, и Н-оценка была определена выше 200; образец с
30 введенными клетками LnCAPneg, имел Н-оценку приблизительно 100; и образец с введенными клетками PC3 имел Н-оценку ниже 100.

Пример 4

Детектирование экспрессии STEAP-1 в CTC пациентов с раком предстательной железы с использованием анти-STEAP-1-антитела на системе CellSearch®

35 [0144] Образцы крови из 11 пациентов с раком предстательной железы получали из клиники. Образцы крови анализировали на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1-антитела. Овечье поликлональное антитело разводили до 1:50 и добавляли к образцу крови в 4-ом фильтре на CellSearch. Образцы пропускали на CellSearch и CTC оценивали в баллах на CellTracks-анализаторе. Клетки,
40 окрашенные положительно на цитокератин и DAPI, но отрицательно на CD45, определяли как CTC. CTC на системах CellSearch autorper, которые показывали окрашивание STEAP-1, отбирали и определяли количественно на интенсивности флуоресценции анти-STEAP-1-антитела, которая показала уровень экспрессии STEAP-1. Количество CTC считали для каждого образца, и Н-оценку также рассчитывали, как
45 описано в примере 2. Результаты показаны на фигуре 4.

Пример 5

Корреляция CTC-анализа с иммуногистохимическим (ИНС) анализом

[0145] Образцы крови и образцы ткани опухоли собирали из 10 пациентов с раком

предстательной железы в клиническом исследовании фазы I.

[0146] Образцы крови анализировали на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального анти-STEAP-1 антитела. Количество CTC считали для каждого образца, и H-оценку также рассчитывали, как описано в примере 2. Результаты показаны на фигуре 5 (а).

[0147] Образцы ткани опухоли испытывали с использованием общепринятых ИHC-способов, и уровень экспрессии STEAP-1 в ткани показан во всех оценках: 1+, 2+ и 3+. Более высокое количество указывает на более высокий уровень экспрессии STEAP-1.

[0148] Результаты CellSearch® и результаты ИHC показаны и сравниваются на фигуре 5 (b)-(c). Результаты CellSearch® показали хорошую корреляцию с результатами ИHC, показывая, что способ CellSearch®, использующий овечье поликлональное антитело, был эффективным в детектировании STEAP-1-экспрессирующие CTC в образце крови.

Пример 6

Сравнение овечьего поликлонального антитела с моноклональным антителом 15A5 мыши

[0149] Моноклональное антитело мыши 15A5 тестировали с использованием "spike-in" анализа на системе CellSearch® и сравнивали с овечьим поликлональным антителом. Клетки 293 LB50 (высокоэкспрессирующие), клетки LnCAPneg (среднеэкспрессирующие) и клетки PC3 (низкоэкспрессирующие) вводили в соответствующие образцы крови, как описано в примере 2. Образцы крови анализировали на системе CellSearch® с использованием овечьего поликлонального антитела и мышинового моноклонального антитела 15A5, соответственно. Рассчитывали также H-оценки. Процедура и способы были сходными с процедурой и способами, описанными в примере 2.

[0150] Как показано на фигуре 6 (a)-(d), оба антитела показывали сравнимые результаты в уровне интенсивности и в H-оценке. Мышиное моноклональное антитело 15A5 показывало также хороший динамический диапазон в анализе.

[0151] Существуют преимущества использования моноклонального антитела 15A5 в сравнении с поликлональным антителом. Например, моноклональное антитело будет показывать меньшую вариабельность от партии к партии, меньший фон и более высокую воспроизводимость среди экспериментов, в сравнении с поликлональным антителом.

Пример 7

Анализ STEAP-1-экспрессирующих клеток в образцах пациентов с использованием мышинового моноклонального антитела 15A5 на системе CellSearch®

[0152] Образцы крови пациентов с раком предстательной железы собирали и анализировали на системе CellSearch® с использованием анти-STEAP-1 моноклонального антитела 15A5. Антитело 15A5 разводят, например, до 1:50 в ЗФР и добавляют в образец крови. Образцы пропускают на CellSearch и CTC оценивают на CellTracks-анализаторе. Клетки, окрашенные положительно на цитокератин и DAPI, но отрицательно на CD45, определяют как CTC. CTC на системах CellSearch autoprep, которые обнаруживают окрашивание STEAP-1, отбирают и дополнительно количественно определяют на интенсивности флуоресценции анти-STEAP-1-антитела, которая представляет уровень экспрессии STEAP-1. Количество CTC считают для каждого образца, и H-оценки также рассчитывают, как описано на фигуре 2.

[0153] Кроме того, уровень экспрессии STEAP-1 на CTC в образцах крови, собранных из "базовой линии" (например, предобработанных) пациентов в клинических исследованиях, коррелируют с клиническими результатами, такими как выживание без прогрессирования, т.е. изменения PSA, сообщаемая пациентом боль в костях, общая выживаемость или другие, для определения, является ли экспрессия простата-

специфического маркера выше определенного порога прогнозирующей клиническую активность терапии рака предстательной железы (например, терапии на основе Конъюгата анти-STEAP-1-Антитело-Лекарственное средство). Динамические изменения в уровне экспрессии простата-специфического маркера (например, STEAP-1) в раковых клетках (т.е. понижающая регуляция в образцах после обработки) коррелирует с клиническими показателями исхода для определения, являются ли такие изменения прогнозирующими терапевтическую активность. Такие способы могут быть использованы в качестве первой стадии в квалификации анализа как кандидатного прогнозирующего биомаркера, который мог бы быть использован для отбора пациентов для терапии рака предстательной железы (например, терапии на основе анти-STEAP-1 ADC), с последующей проспективной валидизацией в подтверждающем исследовании фазы III.

Пример 8

Подсчет CTC в образцах пациентов

[0154] Образцы крови пациентов с раком предстательной железы брали в двух повторностях перед началом терапии (базовые образцы). Образцы анализировали на системе CellSearch® и число CTC оценивали на анализаторе CellTracks, как описано выше. Вкратце, клетки, окрашенные положительно на цитокератин и DAPI, но отрицательно на CD45, оценивали как CTC. Средние величины CTC и STDEV вычисляли для каждой сдвоенной пары, и ошибки (+SDEV) строили в виде гистограммы. Как показано на фигуре 7А, имелся большой динамический диапазон для средней величины CTC в пациентах, с плотными (компактными) величинами между сдвоенными образцами (с малыми стержнями ошибок), демонстрирующими высокую воспроизводимость в подсчете CTC с использованием системы.

[0155] Образцы крови пациентов с раком предстательной железы брали в двух повторностях перед началом терапии (базовые образцы). Образцы анализировали на системе CellSearch® с использованием анти-STEAP-1 моноклонального антитела 15A5 при 20 мкг/мл в канале A488. Подсчет CTC и экспрессию STEAP1 оценивали в баллах на анализаторе CellTracks, как описано в примере 2. Вкратце, отбирали CTC на системах CellSearch autoprep, которые обнаруживали окрашивание STEAP-1, и дополнительно определяли количественно на интенсивности флуоресценции анти-STEAP-1-антитела с использованием системы оценивания взвешенной интенсивности (Н-оценки, см. пример 2). Средние Н-оценки и STDEV вычисляли для каждой сдвоенной пары и строили ошибки (+SDEV). Как показано на фигуре 7В, имелся большой динамический диапазон для уровней экспрессии STEAP-1 в популяции пациентов, и эта фигура дополнительно показывает плотные Н-оценки между сдвоенными образцами, демонстрирующие высокую воспроизводимость в количественном измерении уровня экспрессии мишени с использованием системы CellSearch.

[0156] Образцы крови пациентов с раком предстательной железы брали в 2 различных временных точках перед началом терапии, Базовой линии 1 и Базовой линии 2, с интервалом 2-4 недели. Образцы крови анализировали на системе CellSearch® и подсчет CTC оценивали на анализаторе CellTracks, как описано выше. Для оценивания биологической вариабельности в подсчете CTC, подсчеты CTC сравнивали между 2 образцами базовой линии для каждого пациента.

[0157] На фигуре 8, каждая точка представляет пациента, с CTC, подсчитанными при базовой линии 1 на X-оси, и CTC подсчитывали при базовой линии 2 на Y-оси. График включает данные 14 пациентов и показывает сильную корреляцию между подсчетом CTC, взятых в различных временных точках, что позволяет предположить

низкую биологическую вариабельность в подсчете CTC перед началом лечения. Данные использовали для расчета нормальной вариабельности в подсчетах CTC, вычисленных в качестве 95% Доверительного Интервала для распределения подсчетов CTC перед лечением.

5 [0158] Доверительный Интервал использовали для определения значимости изменений CTC, наблюдаемых во время лечения. Уменьшение в подсчетах CTC выше вычисленного Доверительного Интервала использовали для оценивания эффектов доз и доказательства активности лекарственного средства. Образцы крови пациентов с раком предстательной железы брали в 2 различных временных точках перед предварительной дозой анти-STEAP1 ADC-терапии и после дозы анти-STEAP1 ADC-терапии. Образцы анализировали на системе CellSearch® и подсчет CTC и экспрессию STEAP1 оценивали на анализаторе CellTracks, как описано выше. Как показано на фигурах 9-11, наблюдали значимое уменьшение в подсчетах CTC при более высоких дозах на основе n-кратных-изменений в CTC после дозы и предварительной дозы, а также благоприятную прогностическую конверсию CTC.

15 Кроме того, более высокую экспрессию STEAP1-мишени наблюдали в пациентах со значимым уменьшением CTC после лечения (данные не показаны).

(57) Формула изобретения

20 1. Способ диагностики рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающий:

а) получение образца крови, содержащего раковые клетки эпителиального происхождения у испытуемого субъекта;

25 б) контактирование раковых клеток эпителиального происхождения с анти-STEAP-1 антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером STEAP-1 с $K_D \leq 1000$ нМ;

30 в) определение, присутствует ли STEAP на раковых клетках эпителиального происхождения путем контактирования образца крови с антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером STEAP-1, и определения связывания между STEAP-1 и антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером STEAP-1, и

д) диагностирование пациента с раком предстательной железы, если обнаружено присутствие STEAP-1 на раковых клетках эпителиального происхождения, где анти-STEAP-1 антитело представляет собой антитело 15A5, продуцированное клеткой гибридомы, имеющей номер депонирования микроорганизмов РТА-12259, и где определение осуществляется способом на основе иммунофлуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, волоконно-оптической сканирующей цитометрии или лазерной сканирующей цитометрии.

40 2. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий определение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер, где такое количество является прогнозирующим стадию рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

3. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий определение уровня экспрессии простата-специфического маркера на раковых клетках.

45 4. Способ по п. 1, дополнительно включающий распределение по группам раковых клеток на основе их уровня экспрессии простата-специфического маркера и определение процентного содержания раковых клеток в каждой группе.

5. Способ по п. 1, где раковые клетки идентифицируют из образца крови с

захватывающей композицией, содержащей лиганд, который специфически связывается с раковыми клетками эпителиального происхождения.

6. Способ по п. 5, где лиганд является антителом, которое специфически связывается с эпителиальным антигеном, преимущественно экспрессируемым на раковых клетках.

5 7. Способ по п. 6, где идентифицированные раковые клетки обогащены в клеточной фракции, отделенной от образца крови.

8. Способ по п. 7, где клеточную фракцию отделяют с использованием магнитного поля.

9. Способ по п. 8, где лиганд в захватывающей композиции связан с магнитной частицей.

10. Способ по п. 1, где анти-STEAP-1-антитело конъюгировано с первой детектируемой меткой.

11. Способ по п. 1, где раковые клетки идентифицируют с одним или более реагентами, которые позволяют детектировать раковые клетки эпителиального происхождения.

15 12. Способ по п. 11, где реагенты содержат лиганд, который специфически связывается с цитокератином, и где лиганд необязательно конъюгирован со второй детектируемой меткой.

13. Способ по п. 12, где реагенты дополнительно содержат краситель, который отличает клетки от неклеточных компонентов.

20 14. Способ по п. 13, где краситель является 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI).

15. Способ по п. 14, где реагенты дополнительно содержат лиганд, который специфически связывается с лейкоцитным маркером, и где лиганд является необязательно конъюгированным с третьей детектируемой меткой.

16. Способ по п. 15, где лиганд к лейкоцитному маркеру является антителом CD45.

25 17. Способ мониторинга реакции на терапию рака предстательной железы у испытуемого субъекта, предусматривающий:

а) контактирование первой группы раковых клеток эпителиального происхождения с анти-STEAP-1 антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером с $K_D \leq 1000$ нМ, где первая группа раковых клеток является клетками из

30 первого образца крови, взятого у испытуемого субъекта, и

б) определение количества раковых клеток в первой группе, которые экспрессируют простата-специфический маркер STEAP-1, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера STEAP-1 в раковых клетках;

35 в) контактирование второй группы раковых клеток эпителиального происхождения с анти-STEAP-1 антителом, которое специфически связывается с простата-специфическим маркером с $K_D \leq 1000$ нМ, где вторая группа раковых клеток является клетками из второго образца крови, взятого у испытуемого субъекта после тест-периода терапии рака предстательной железы;

40 д) определение количества раковых клеток во второй группе, которые экспрессируют простата-специфический маркер STEAP-1, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера STEAP-1 в раковых клетках, и

е) сравнение количества раковых клеток, которые экспрессируют простата-специфический маркер STEAP-1, и/или уровня экспрессии простата-специфического маркера STEAP-1, как определено в б), с этими показателями в д),

45 где анти-STEAP-1 антитело представляет собой антитело 15A5, продуцированное клеткой гибридомы, имеющей номер депонирования микроорганизмов РГА-12259,

где определение осуществляется способом на основе иммунофлуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии, волоконно-оптической сканирующей цитометрии

или лазерной сканирующей цитометрии, и

где уменьшение в количестве раковых клеток, экспрессирующих простата-специфический маркер STEAP-1, и/или уменьшение в уровне экспрессии простата-специфического маркера STEAP-1 в раковых клетках указывает на реакцию на терапию
5 рака предстательной железы у испытуемого субъекта.

10

15

20

25

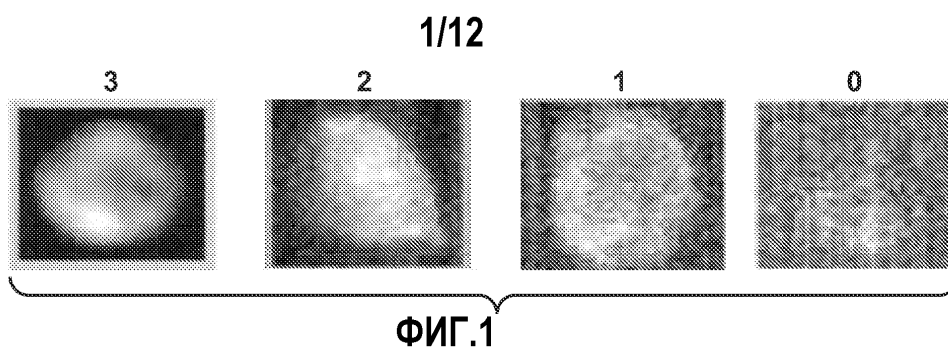
30

35

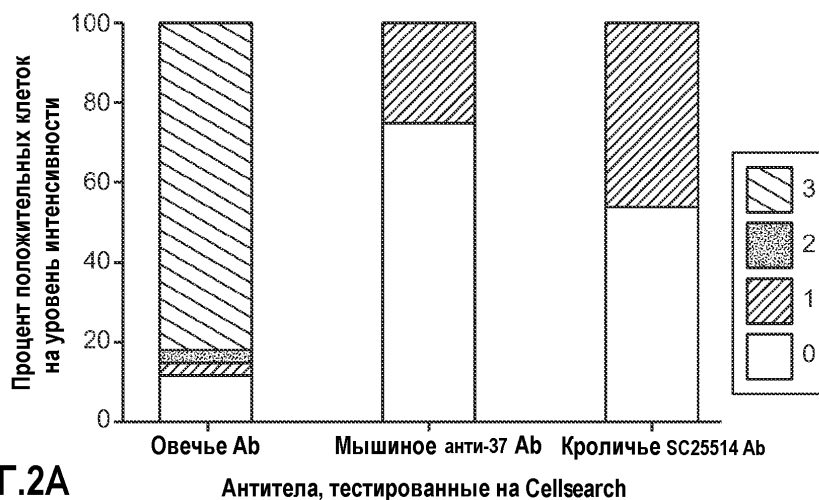
40

45

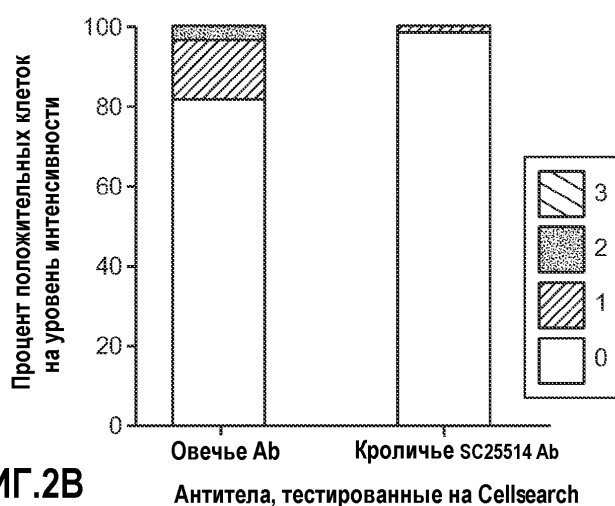
1



Экспрессия STEAP1 в клетках LB50, тестируемых с выбранными антителами



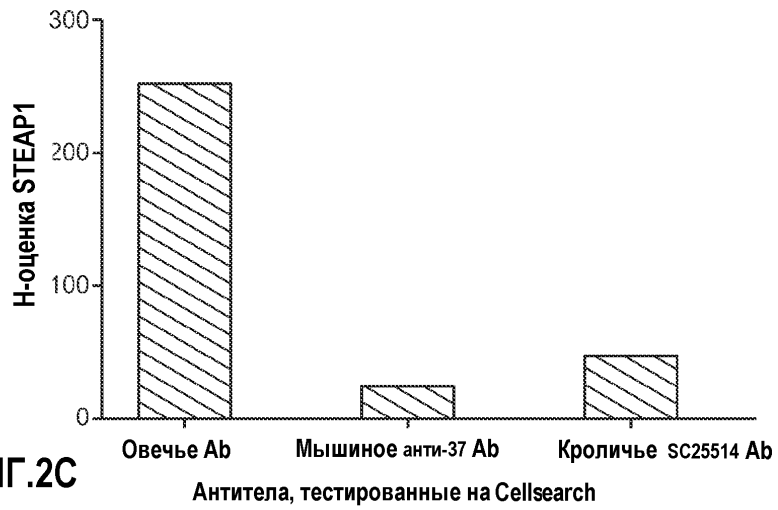
Экспрессия STEAP1 в клетках PC3, тестируемых с выбранными антителами



2

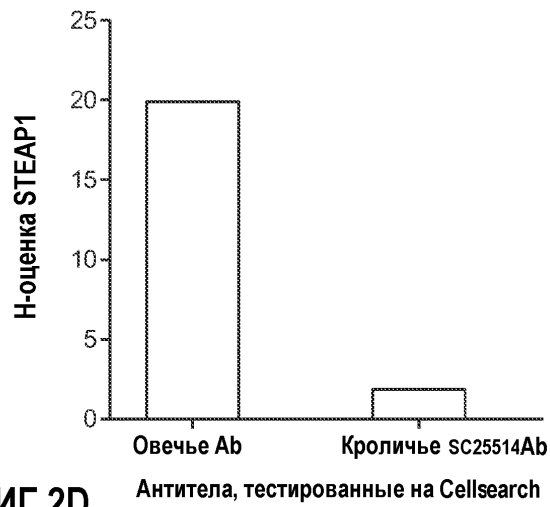
2/12

Н-оценка STEAP1 в клетках LB50, тестируемых с выбранными антителами



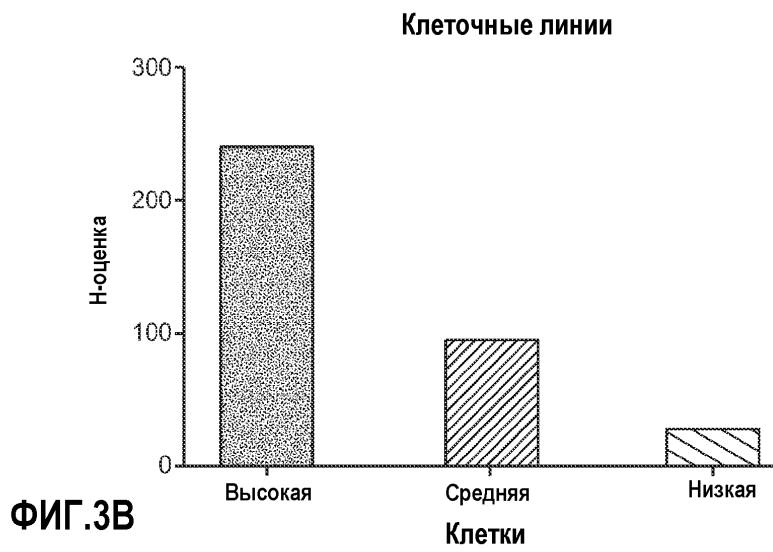
ФИГ.2С

Н-оценка STEAP1 в клетках PC3, тестируемых с выбранными антителами

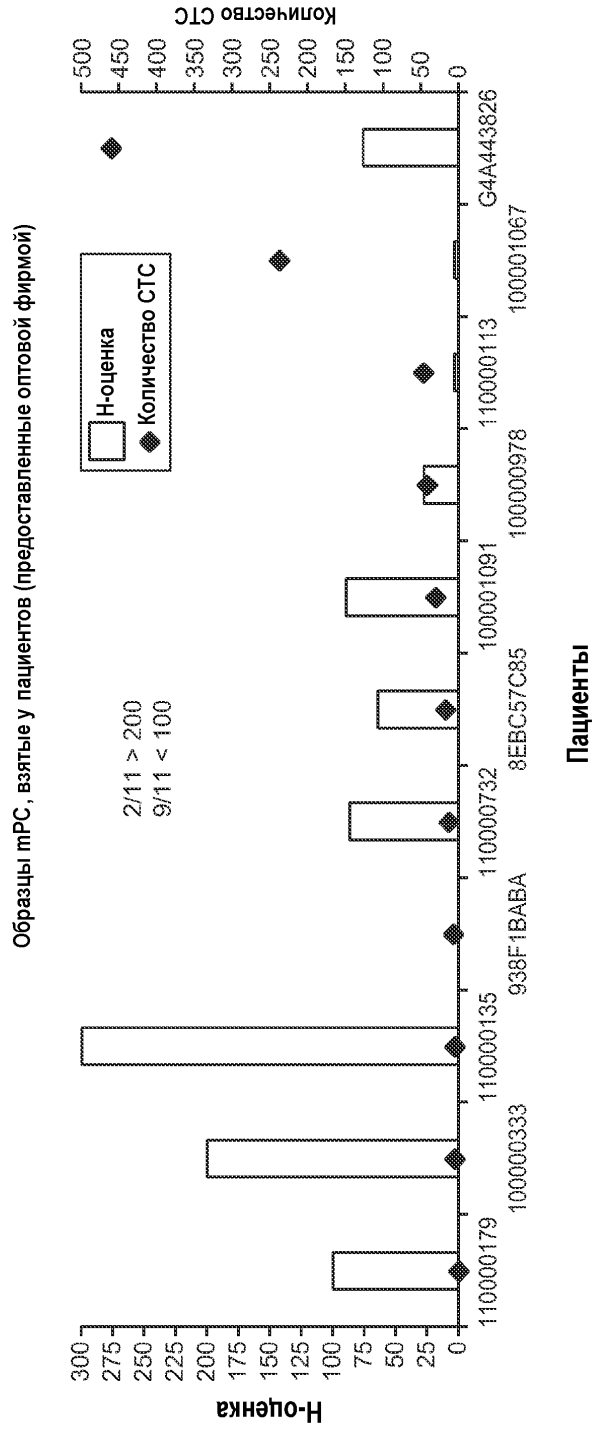


ФИГ.2D

3/12



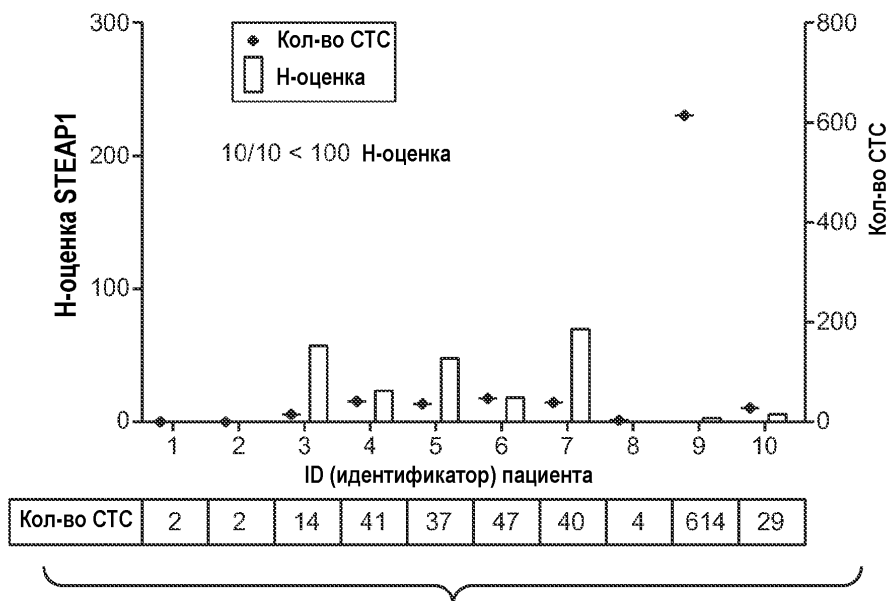
4/12



ФИГ.4

5/12

Н-оценка для экспрессии STEAP1 в CTC пациента



ФИГ.5А

Сравнение Н-оценки CTC STEAP1 с IHC STEAP1 в ткани демонстрирует некоторую корреляцию

ID (идентификатор) пациента	Н-оценка CTC STEAP1	IHC STEAP1
1	0	1+
2	0	1+
6	19	1+
4	24	1+
5	48	2+
3	57	2+
8	0	2+
7	70	3+
10	7	3+

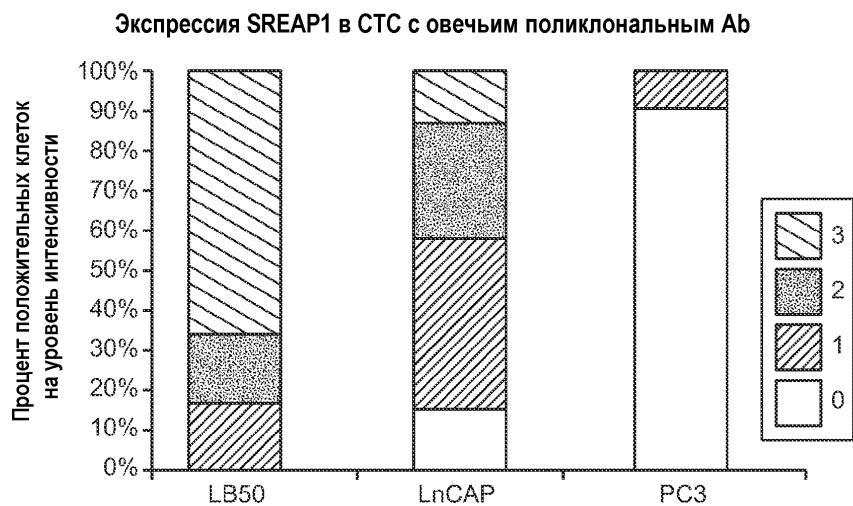
ФИГ.5В

6/12

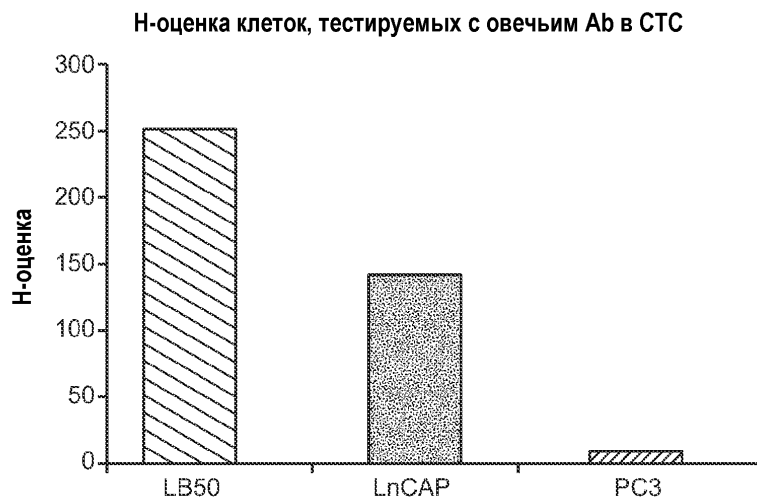
Источник	Номер пациента	Цито-мем 0	Цито-мем 1+	Цито-мем 2+	Цито-мем 3+	Оценка мембраны	Общая оценка (0, 1+, 2+, 3+)*
Ткань	101	87	10	3	0	16	1
СТС	101 Скрининг	2	0	0	0	0	
Ткань	102	0	0	5	95	295	3
СТС	Образец без скрининга						
Ткань	1003	0	95	5	0	105	1
СТС	1003 Скрининг	2	0	0	0	0	
Ткань	1004	20	10	40	30	180	2
СТС	1004 Скрининг	10	2	0	2	57	
Ткань	1005	0	55	35	10	155	1
СТС	1005 Скрининг	37	0	2	2	24	
Ткань	1006	0	10	65	25	215	
СТС	1006 Скрининг	23	10	4	0	48.6	
Ткань	1007	0	75	15	10	135	1
СТС	1007 Скрининг	40	5	2	0	19.14	
Ткань	1008	0	5	10	85	280	3
СТС	1008 Скрининг	26	4	6	4	70	
Ткань	1009	5	2	28	65	253	
СТС	1009 Скрининг	0	0	0	0	0	
Ткань	1010						
СТС	1010 Скрининг	592	22	0	0	3.6	
Ткань	1011	10	35	50	5	150	
СТС	1011 Скрининг	Недостаточно крови					
Ткань	1012						
СТС	1012 Скрининг	Неудавшийся скрининг					
Ткань	1013	0	0	0	100	300	
СТС	1013 Скрининг	27	2	0	0	6.9	

ФИГ.5С

7/12



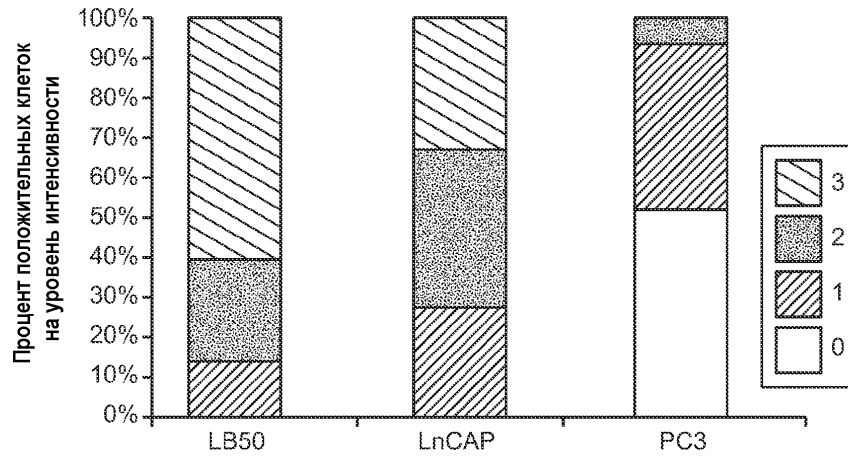
ФИГ.6А



ФИГ.6В

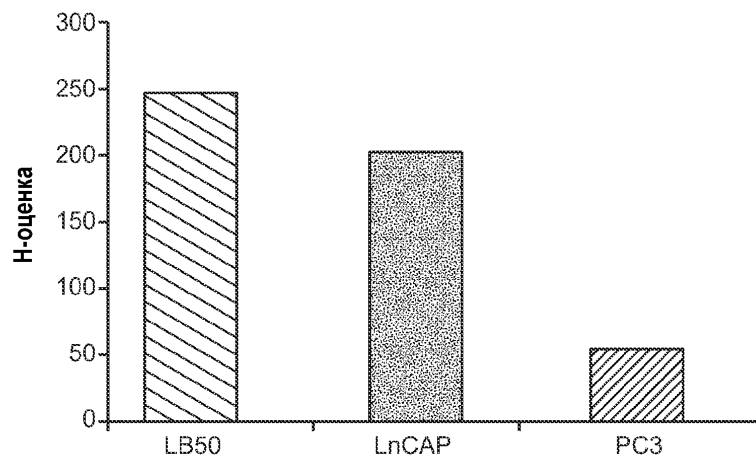
8/12

Экспрессия STEAP1 в СТС с мышинным моноклональным 15A5.1.1.1 Ab



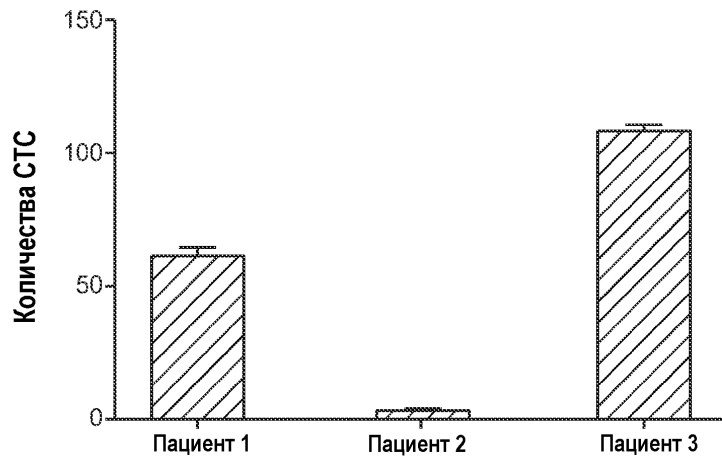
ФИГ.6С

Н-оценка клеток, тестируемых с мышинным 15A5Ab в СТС

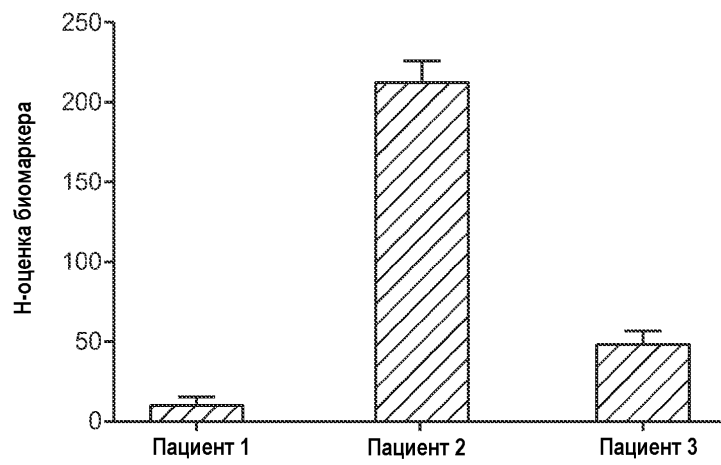


ФИГ.6D

9/12

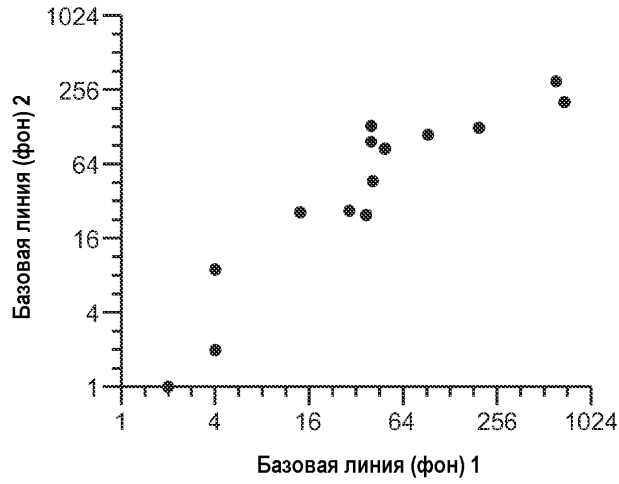


ФИГ.7А

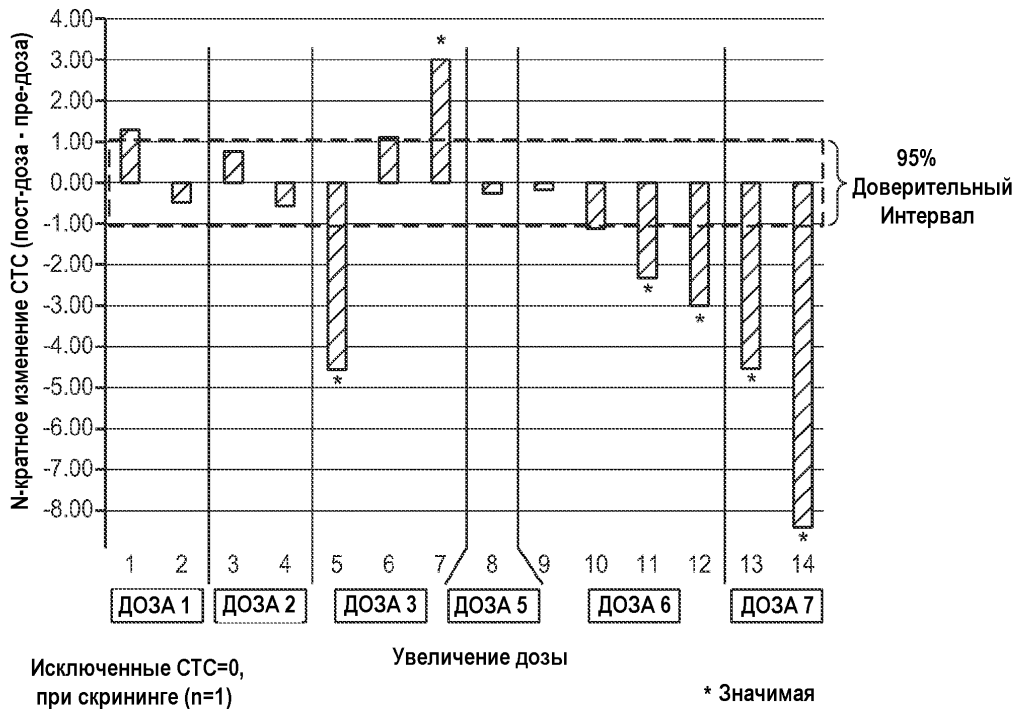


ФИГ.7В

10/12



ФИГ.8



ФИГ.9

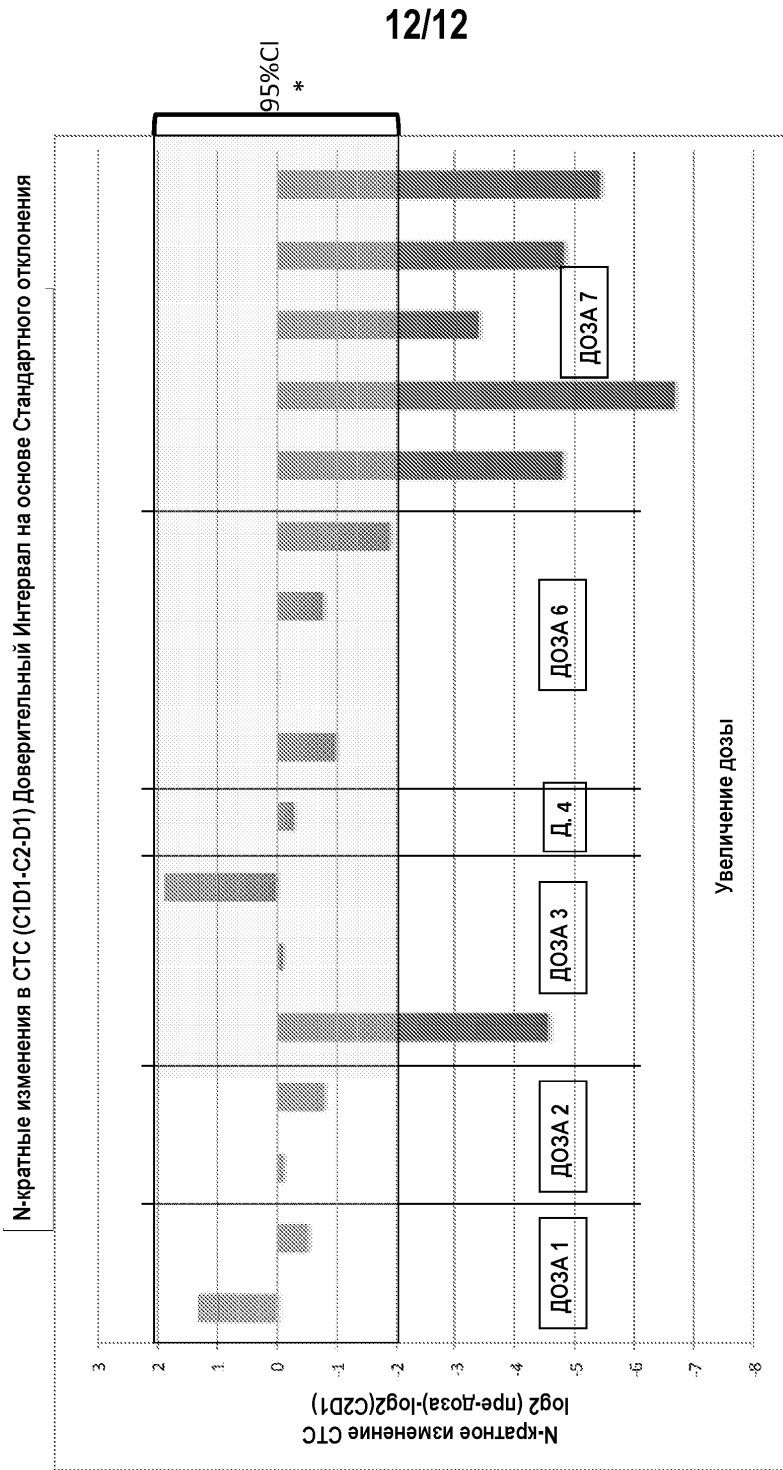
11/12

	Пациент	Пре-доза	Пост-доза	
Доза 1	1	2	5	* ← Значимое увеличение СТС N-кратным изменением
	2	102	71	
Доза 2	3	14	24	
	4	41	27	
Доза 3	5	47	2	* ← Значимое уменьшение СТС N-кратным изменением
	6	40	91	
	7	4	33	
Доза 5	8	27	22	
	9	446	392	
Доза 6	10	49	23	* ←
	11	5	1	
	12	4	0	
Доза 7	13	93	4	* ←
	14	692	2	

* Благоприятная прогностическая конверсия

* Неблагоприятная прогностическая конверсия

ФИГ.10



ФИГ.11