

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/517 (2020.02); A61K 39/39558 (2020.02); A61K 45/06 (2020.02); C07K 16/18 (2020.02); C07K 16/2863 (2020.02); C07K 16/3038 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017125053, 23.12.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.12.2015Дата регистрации:
30.12.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.12.2014 US 62/096,741

(43) Дата публикации заявки: 24.01.2019 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 30.12.2020 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 24.07.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/000237 (23.12.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/105503 (30.06.2016)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.",
Парамонова Ксения Витальевна

(72) Автор(ы):

ЧОЙ Юндジョン (US),
КАББАРАХ Омар (US),
КИМ Дорис (US)(73) Патентообладатель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: MOOSO BENJAMIN A. The Role of
EGFR Family Inhibitors in Muscle Invasive
Bladder Cancer: A Review of Clinical Data and
Molecular Evidence. J Urol. 23.08.2014; 193(1): 19-
29. JINSUNG PARK M.D. Do molecular
biomarkers have prognostic value in primary
T1G3 bladder cancer treated with bacillus
Calmette-Guerin intravesical therapy? Urologic
Oncology: (см. прод.)C2
2
9
9
4
2
7
3
9

RU

R U
2 7 3 9 9 4 2
C 2(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ДЛЯ
РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан способ диагностики рака мочевого пузыря у пациента, включающий следующие этапы: а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента; и б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем увеличение

уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент страдает раком мочевого пузыря. Также описан способ прогноза пациента, который страдает НМИРМП, включающий: а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента; б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного

вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, и в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. Также представлен способ прогноза пациента, который страдает раком мочевого пузыря, включающий: а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от

пациента; б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. Изобретение может быть использовано для диагностики и прогноза течения рака мочевого пузыря. 3 н. и 86 з.п. ф-лы, 18 ил., 4 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

Seminars and Original Investigations. Volume 31, Issue 6, August 2013, Pages 849-856. WUN-JAE KIM. A Four-Gene Signature Predicts Disease Progression in Muscle Invasive Bladder Cancer. MOL.MED. 2011 May-Jun; 17(5-6): 478-485. WO 2014135655 A1, 12.09.2014. CHAKRAVARTI A. Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invading bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: a report from the Radiation Therapy Oncology Group. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Jun 1;62(2):309-17. MAZZOLA CLARISSE R. Dovitinib: rationale, preclinical and early clinical data in urothelial carcinoma of the bladder. Expert Opinion on Investigational Drugs. Volume 23, 2014 - Issue 11. GUST KILIAN M. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 is a Rational Therapeutic Target in Bladder Cancer. Mol Cancer Ther. 2013 Jul; 12(7): 1245-1254..

R U 2 7 3 9 9 4 2 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11)

2 739 942⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/517 (2020.02); A61K 39/39558 (2020.02); A61K 45/06 (2020.02); C07K 16/18 (2020.02); C07K 16/2863 (2020.02); C07K 16/3038 (2020.02)

(21)(22) Application: 2017125053, 23.12.2015

(24) Effective date for property rights:
23.12.2015

Registration date:
30.12.2020

Priority:

(30) Convention priority:
24.12.2014 US 62/096,741

(43) Application published: 24.01.2019 Bull. № 3

(45) Date of publication: 30.12.2020 Bull. № 1

(85) Commencement of national phase: 24.07.2017

(86) PCT application:
US 2015/000237 (23.12.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/105503 (30.06.2016)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Paramonova
Kseniya Vitalevna

(54) THERAPEUTIC, DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC METHODS FOR BLADDER CANCER

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a method for diagnosing bladder cancer in a patient, involving the following steps: a) determining the expression level of at least one of the following genes: FGFR3, TP53 and EGFR, in the sample obtained from the patient; and b) comparing the expression level of at least one of said gene with a control level of at least one of said gene, wherein the increase in the expression level of at least one of said gene in the patient's sample relative to the reference level indicates that the patient suffers bladder cancer. What is also described is a method for predicting

(72) Inventor(s):

CHOI, Younjeong (US),
KABBARAH, Omar (US),
KIM, Doris (US)

(73) Proprietor(s):

GENENTECH, INC. (US)

R U 2 7 3 9 9 4 2 C 2

a patient suffering NMIDMP, including: a) determining the expression level of at least one of the following genes: FGFR3, TP53 and EGFR, in the sample obtained from the patient; b) comparing the expression level of at least one of said gene with a reference level of at least one of said gene, and c) determining a patient's prediction, wherein an unfavorable prognosis is noted, if the level of expression of at least one above gene in the patient's sample is increased relative to the reference level. Also disclosed is a method of predicting a patient suffering bladder cancer, involving: a) determining the expression level of at least one of the following genes:

R U 2 7 3 9 4 2 C 2

FGFR3, TP53 and EGFR, in the sample obtained from the patient; b) comparing the expression level of at least one of said gene with a control level of at least one of said gene; and c) determining a patient's prediction, wherein the unfavorable prognosis is observed if the

level of expression of at least one above gene in the patient's sample is increased relative to the control level.

EFFECT: invention can be used for diagnosing and predicting the clinical course of bladder cancer.

89 cl, 18 dwg, 4 tbl, 6 ex

R U 2 7 3 9 9 4 2 C 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение направлено на способы лечения, диагностики и прогнозирования рака, например, рака мочевого пузыря.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- 5 Рак остается одной из наиболее смертоносных угроз для здоровья человека. В США ежегодно рак поражает почти 1,3 миллиона новых пациентов и является второй по значимости причиной смерти после сердечных заболеваний, составляя приблизительно 1 из 4 смертей. Большую часть этих смертей вызывают твердые опухоли.
- 10 Злокачественные опухоли быстро метастазируют и растут неконтролируемым образом, что чрезвычайно затрудняет их своевременное обнаружение и лечение.

Рак мочевого пузыря является пятым по распространенности злокачественным заболеванием во всем мире, с почти 400000 впервые диагностированных случаев, и приблизительно 150000 связанных смертей, зарегистрированных за год. Приблизительно у 75-80% больных раком мочевого пузыря при первоначальной диагностике выявляют

15 немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (НМИРМП). Хотя они ограничены собственной пластинкой (лат. lamina propria) и, как правило, не опасны для жизни, приблизительно 50-80% случаев НМИРМП рецидивируют, что часто требует дорогостоящего клинического вмешательства. Примерно в 20-30% случаев НМИРМП может развиться в более серьезный мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря

20 (МИРМП). МИРМП (T2 и T3) составляют лишь ~10-15% новых случаев, но они обуславливают более высокий риск развития метастатического рака мочевого пузыря (pT4). На сегодняшний день метастатический рак мочевого пузыря связывают с неблагоприятной вероятностью выживания в течение 5 лет и представляет собой серьезную нерешенную медицинскую проблему с незначительным количеством

25 эффективных способов терапии.

Следовательно, остается потребность в эффективных средствах лечения, диагностики и прогнозирования рака, например, рака мочевого пузыря.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Настоящее изобретение направлено на способы лечения, диагностики и
- 30 прогнозирования рака, например, рака мочевого пузыря.

В одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения пациента, который страдает раком мочевого пузыря; данный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, при том, что уровень экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR

35 - в образце, полученном от пациента, был определен как повышенный относительно контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена.

В другом аспекте данное изобретение представляет собой способ диагностики рака мочевого пузыря у пациента, который включает следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR

40 - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент страдает раком мочевого пузыря. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (в) информирование пациента о том, что у него рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (г) выбор противораковой терапии для лечения указанного пациента, когда обнаружено увеличение уровня экспрессии по меньшей

мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (д) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии.

- 5 В другом аспекте данное изобретение относится к способу прогноза пациента, который страдает раком мочевого пузыря; данный способ включает (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и (в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения прогноз представляет собой прогноз выживаемости. В некоторых вариантах реализации изобретения способ
- 10 проводится до введения пациенту противораковой терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (г) определение пациента, на которого применение противораковой терапии, вероятно, окажет положительный эффект, когда у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (д)
- 15 введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, если у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости. В. В некоторых вариантах реализации изобретения выживаемость представляет собой выживаемость без признаков заболевания или общую выживаемость.
- 20

В другом аспекте данное изобретение относится к способу определения для пациента,

- 25 который страдает раком мочевого пузыря, вероятности ответа на лечение противораковой терапией; данный способ включает (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на пациента, который, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает: (в) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии.
- 30
- 35

- 40 В другом аспекте данное изобретение относится к способу оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, который страдает раком мочевого пузыря; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на пациента, который, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает (в) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии.
- 45

В другом аспекте данное изобретение относится к способу лечения пациента, который

страдает раком мочевого пузыря; данный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, отличной от вакцины бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ) (*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)), причем уровень экспрессии TP53 в образце, полученном от пациента, был определен как повышенный относительно контрольного уровня TP53.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов противораковая терапия включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая терапия включает антагонист FGFR3 и антагонист EGFR. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист FGFR3, антагонист EGFR или антагонист TP53 представляет собой антитело или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист FGFR3 представляет собой антитело против FGFR3 или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист EGFR представляет собой антитело против EGFR или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист TP53 представляет собой антитело против TP53 или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR представляет собой низкомолекулярный антагонист. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист FGFR3 или антагонист EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист EGFR представляет собой эрлотиниб (TARCEVA™). В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая терапия дополнительно включает: (i) агент, выбранный из группы, которая состоит из антинеопластического агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, и цитотоксического агента, (ii) лучевую терапию или (iii) их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения мРНК. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах реализации изобретения ПЦР анализ представляет собой количественный ПЦР анализ.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения белка. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов образец, полученный от пациента, представляет собой образец опухоли. В некоторых вариантах реализации изобретения образец опухоли представляет собой зафиксированный в формалине и залитый парафином (ЗФЗП) образец опухоли.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов способ дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере двух из этих генов. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает определение уровня экспрессии всех трех из этих генов.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере

в 2 раза относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных

5 аспектов уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 8 раз относительно контрольного уровня.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных

10 аспектов способ дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, которая состоит из DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1, MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 и FGF2, в образце,

15 полученном от пациента, при этом уровень экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена изменяется относительно контрольного уровня по меньшей мере одного дополнительного гена.

В некоторых вариантах реализации изобретения по любому из вышеуказанных аспектов рак мочевого пузыря представляет собой немышечно-инвазивный рак мочевого 20 пузыря, мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря или метастатический рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах реализации изобретения немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря представляет собой рецидивирующий немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

25 ФИГУРА 1 представляет собой таблицу, которая предоставляет информацию о пациентах и клинико-патологических особенностях препаратов опухолей рака мочевого пузыря, которые были проанализированы в разделе «Примеры» (например, Примеры 1-6).

ФИГУРЫ 2А и 2Б представляют собой графики, которые показывают метод главных 30 компонент (АГК) для экспрессии 18000 генов из Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12): 3377-3386, 2012 (фигура 2А), и использование только 82 генов, которые перекрываются с изготовленной на заказ панелью Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря, которая описана в разделе «Примеры» (см., например, таблицу 1) (фигура 2Б). Оба анализа показывают сходное распределение образцов, которые относятся к 35 подтипам рака мочевого пузыря, которые описаны в Sjödahl et al. (см. выше).

ФИГУРЫ 2В и 2Г представляют собой графики, которые показывают, что 40 перекрестная проверка с помощью центроидного классификатора дает аналогичную классификационную точность подтипов рака мочевого пузыря по Sjödahl et al. (см. выше) на основе 1000 генов (фигура 2В) и на основе 82 генов, которые перекрываются с изготовленной на заказ панелью Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря (фигура 2Г). Данные, представленные на фигурах 2А-2Г, показывают, что 45 изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря может точно классифицировать рак мочевого пузыря по молекулярно-определенным подтипам. Линейные маркеры предназначены для наглядности и не обозначают точки данных.

ФИГУРЫ 3А и 3Б представляют собой графики, которые показывают, что входное количество РНК не влияло на результаты анализа Fluidigm, как показано для FGFR3 (фигура 3А) и для PIK3CA (фигура 3Б) с уменьшением входных количеств универсальных

РНК (уРНК) контролей.

ФИГУРЫ 3В и 3Г представляют собой графики, которые показывают высокую воспроизводимость данных от пробега к пробегу для клинических тканей при использовании изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря. На фигуре 3В (HP-52719) и фигуре 3Г (HP-50331) показаны два типичных РНК образца, полученные от зафиксированных в формалине и залитых парафином (ЗФЗП) образцов, каждый из которых показывает значения $R^2 > 0,98$ между испытаниями в разные дни.

ФИГУРА 3Д представляет собой график, который показывает высокую воспроизводимость данных от чипа к чипу при использовании изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря.

ФИГУРА 4А представляет собой тепловую карту кластеров тканей, определенных по транскрипции при Fluidigm анализе (ткани), и групп совместно регулируемых генов (гены). Зеленая, желтая и красная группы тканей содержали большую часть образцов.

ФИГУРА 4Б представляет собой график, который показывает, что зеленые, желтые и красные кластеры тканей (см., например, фигуру 4А) связаны с различными вероятностями выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ). Образцы в красной группе имели наилучший профиль ВБПЗ (красная в противопоставление желтой: отношение рисков (Hazard ratio) HR=0,54, P=0,03), а образцы зеленой группы были связаны с наихудшими показателями ВБПЗ (красная в противопоставление зеленой: HR=0,29, P=0,004).

На фигуре 4В представлен график, который показывает неинвазивные и инвазивные/метастазирующие случаи по данным гистологии, которые указывают, что зеленая и красная группы включали значительно больше неинвазивных образцов, чем желтая группа, которая включала в основном инвазивные ткани и все метастазы (зеленая в противопоставление красной: P=0,1029, несущественное (НС); зеленая в противопоставление желтой и красная в противопоставление желтой: P<0,0001 для обоих сравнений).

ФИГУРА 4Г представляет собой график, который показывает частоту опухолей с микропапиллярной гистологической структурой в трех основных кластерах тканей. Более высокую частоту микропапиллярной гистологической структуры наблюдали в желтой группе (зеленая в противопоставление красной: P=0,2351, НС; зеленая в противопоставление желтой: P=0,1167; НС; красная в: P противопоставление желтой: P=0,0063).

ФИГУРА 4Д представляет собой график, который показывает отсутствие существенных различий между зеленой, красной и желтой группами по отношению к распространенности иммунных инфильтрационно-положительных образцов (зеленая в противопоставление красной: P=0,3332, НС; зеленая в противопоставление желтой: P=0,5197, НС; красная в противопоставление желтой: P=1, НС).

ФИГУРА 4Е представляет собой график, который показывает распределение частоты терапии для трех групп. Зеленая группа подвергалась более интенсивной терапии, чем красная и желтая группы (P<0,0001 для обоих сравнений), а для красной и желтой группы проводили терапию с сопоставимой интенсивностью (P=0,8836, НС). Терапии включали вакцину бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ), химиотерапию, облучение или их комбинации.

ФИГУРА 5А представляет собой тепловую карту, которая показывает, что анализ экспрессии с помощью изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря, которая описана в примере 2, идентифицировал 3 основных

субпопуляции тканей, которые представлены зеленой, желтой и красной группами, и 2 второстепенных подтипа, которые представлены синей и пурпурной группами.

ФИГУРА 5Б представляет собой тепловую карту, которая показывает, что анализ экспрессии с помощью изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря, как описано в примере 2, идентифицировал 4 основных кластера экспрессии генов, которые связаны с различными особенностями. Стрелки указывают на типичные гены для каждого кластера, включая TP53 и FGFR3 (розовый кластер I); гены эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), такие как ZEB1/2, и гены фосфоинозитид 3-киназы (PI3K), такие как PIK3CA и PIK3R1 (светло-голубой кластер II); другие PI3K гены, такие как PTEN и AKT1 (фуксиновый кластер III); и лиганды и рецепторы фактора роста фибробластов (ФРФ) (светло-коричневый кластер IV).

ФИГУРА 5В представляет собой график, который показывает, что подтипы тканей, которые описаны на фигуре 5А, были связаны с различными показателями выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ). Линейные маркеры предназначены для наглядности и не обозначают точки данных.

ФИГУРЫ 6А-6Г представляют собой типичные участки, окрашенные гематоксилином и эозином (ГиЭ), которые показывают гистологические признаки (фигура 6А) немышечного инвазивного рака мочевого пузыря; (фигура 6Б) мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря; (фигура 6В) ткани с лимфоидной инфильтрацией; и (фигура 6Г) опухоли мочевого пузыря с микропапиллярной гистологической структурой. Масштабная метка соответствует 100 мкм.

ФИГУРА 7А представляет собой цветовую карту, которая показывает статус мутаций FGFR3, иммуногистохимию (ИГХ) FGFR3, и гистопатологию, вызываемую препаратами, в зеленой, красной и желтой группах.

ФИГУРА 7Б представляет собой график, который показывает, что уровни транскрипта FGFR3 были выше в мутанте (МТ) по сравнению с образцами дикого типа (ДТ) ($P<0,0001$), как определено с помощью Fluidigm анализа экспрессии генов.

ФИГУРА 7В представляет собой график, который показывает, что мутантные образцы FGFR3 накапливали более высокие уровни белка, чем ткани дикого типа, как измерено ИГХ ($P<0,0001$).

ФИГУРА 7Г представляет собой график, который показывает, что процентная доля мутаций FGFR3 была значительно выше в зеленой группе по сравнению с красной и инвазивной/ метастатической желтой группами ($P<0,0001$ для обоих сравнений).

ФИГУРА 7Д представляет собой график, который показывает, что образцы в зеленой группе экспрессировали значительно более высокие уровни транскрипта FGFR3, чем образцы в красной и желтой группах ($P<0,0001$ для обоих сравнений).

ФИГУРА 7Е представляет собой график, который показывает, что уровни белка FGFR3, измеренные с помощью ИГХ, были выше в зеленой группе, чем в красной группе, и были самыми низкими в желтой группе (зеленая в противопоставление красной: $P=0,0343$; красная в противопоставление желтой: $P<0,0001$).

ФИГУРА 7Ж представляет собой серию круговых диаграмм, которые показывают экспрессию FGFR3 при неинвазивном, инвазивном и метастазирующем раке мочевого пузыря. Высокие уровни белка FGFR3 (ИГХ 2+/3+) наблюдались в 66%, 32% и 33% случаев, соответственно.

ФИГУРА 7З представляет собой серию графиков, которые показывают 3- или 5-летние показатели ВБПЗ для пациентов с инвазивными опухолями и метастазирующим раком мочевого пузыря при высоком и низком уровне FGFR3, что демонстрирует более

низкие показатели ВБПЗ в опухолях с высокой экспрессией в обоих окружениях (порог экспрессии = 50-ому процентилю).

ФИГУРА 7И представляет собой серию графиков, которые показывают, что показатели общей выживаемости (OB) для 3 и 5 лет ниже в случаях с высоким уровнем FGFR3 в противопоставление к случаям с низким уровнем экспрессии (порог экспрессии = 25-ому процентилю, высокий уровень FGFR3, N=15, низкий уровень FGFR3, N=24).

ФИГУРА 7К показывает анализ общедоступного набора данных от Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010, что свидетельствует о значительно худшем профиле OB для пациентов с прогрессирующим раком мочевого пузыря, при котором FGFR3 экспрессируется на высоком («В») уровне по сравнению с низким («Н») уровнем, как следует из графиков Каплана-Майера (левая панель), так и из 3- и 5-летнего показателя OB (правая панель) (порог экспрессии = 75-ому процентилю, высокий уровень FGFR3, N=10, низкий уровень FGFR3, N=52).

ФИГУРА 8 представляет собой график, который показывает, что анализ

программного обеспечения INGENUITY® (Qiagen, Redwood City, CA) идентифицировал сигнальные пути p53, PI3K-АКТ, ЭМП и ERBB и FGFR3 как дифференциально экспрессируемые между неинвазивной быстро рецидивирующими зеленой группой и менее агрессивной красной группой. В качестве исходных данных для анализа использовались 45 из 96 генов, которые были существенно дифференциально экспрессируемыми между зеленой и красной группами ($P<0,05$ при правильном многократном тестировании).

ФИГУРА 9А представляет собой цветовую карту результатов секвенирования нового поколения (СНП) и статус мутаций, как определено анализом Fluidigm (MutMap, см. Schleifman et al. PloS One 9:e90761, 2014) в образцах зеленой, желтой и красной групп.

Проверенными мутациями считались те, которые были идентифицированы как путем СНП, так и MutMap.

ФИГУРА 9Б представляет собой схематическую диаграмму (диаграмму в форме "леденца на палочке" (lollipop plot) для гена TP53, которая показывает мутации TP53, которые идентифицированы с помощью СНП в образцах зеленой, красной и желтой групп. Цветные блоки обозначают распределение группы тканей. Блоки с одинаковыми числами указывают на то, что мутации совместно обнаружены в одних и тех же образцах. Большинство мутаций кластеризуются в ДНК-связывающем домене и не являются перекрывающимися.

ФИГУРА 9В представляет собой график, который показывает, что в процентная

доли мутаций TP53 в быстро рецидивирующей зеленой группе была значительно выше по сравнению с таковой в более доброкачественной красной группе ($P=0,03$). Частоты TP53 мутаций существенно не различались между красной и желтой или зеленой и желтой группами ($P=0,1227$, НС и $P=0,3605$, НС).

ФИГУРА 9Г представляет собой график, который показывает, что уровни экспрессии

TP53 были выше в зеленой группе по сравнению как с красной, так и с желтой группами, как определено с помощью Fluidigm анализа экспрессии генов ($P=0,0187$ и $P=0,0020$, соответственно).

ФИГУРА 9Д представляет собой график, который показывает, что уровни экспрессии транскрипционной мишени TP53 p21 были значительно выше в зеленой группе по сравнению как с красной, так и с желтой группами ($P<0,0001$ для обоих сравнений), как определено с помощью Fluidigm анализа экспрессии генов.

ФИГУРА 9Е представляет собой график, который показывает, что образцы мутантов TP53 экспрессировали более высокие уровни белка TP53, чем при вариантах дикого

типа ($P=0,0201$), как определено ИГХ.

ФИГУРА 9Ж представляет собой график Каплана-Мейера, который показывает аналогичные профили ВБПЗ для случаев с высоким и низким уровнями TP53 из общего массива рака мочевого пузыря, описанного в примере 1 (все стадии опухоли; $P=0,4218$, 5 высокий уровень TP53, $N=53$, низкий уровень TP53, $N=73$). В, высокий уровень; Н, низкий уровень.

ФИГУРА 9З представляет собой график Каплана-Мейера, который показывает, что в неинвазивных опухолях высокая экспрессия TP53 связана с тенденцией к худшей вероятности ВБПЗ ($HR=1,99$; $P=0,1292$).

ФИГУРА 9И представляет собой график Каплана-Мейера, который показывает, что при неинвазивном опухолевом окружении высокая экспрессия TP53 связана со значительно худшими показателями ВБПЗ у пациентов, которые получали БЦЖ ($HR=4,2$; $P=0,0405$).

ФИГУРА 9К представляет собой график Каплана-Мейера, который показывает, что высокая экспрессия TP53 в неинвазивных опухолях не связана с плохими показателями ВБПЗ у пациентов, которые не получали лечения ($HR=0,57$; $P=0,5749$).

ФИГУРА 10 представляет собой цветовую карту Fluidigm анализа экспрессии лигандов и рецептора сигнального пути ERBB в субпопуляциях препаратов рака мочевого пузыря, и перекрывающиеся мутации и изменения числа копий в ключевых 20 сигнальных путях в тех же образцах. Анализ экспрессии ERBB рецепторов и лиганда, мутационный анализ и анализ числа копий проводили на изготовленных на заказ панелях Fluidigm (Schleifman et al. PloS One 9:e90761, 2014). Для Fluidigm анализа мутаций: темно-серая метка - мутант; средне-серая метка - нет ответа по техническим причинам; белая метка - не применялось; светло-серая метка - дикий тип. Для Fluidigm анализа 25 числа копий ДНК: темно-серая метка - увеличение числа копий ДНК; средне-серая метка - нет ответа по техническим причинам; светло-серая метка - отсутствие изменения числа копий ДНК; белая метка - не применялось.

ФИГУРА 11А представляет собой график, который показывает, что EGFR экспрессировался на значительно более высоких уровнях в зеленой группе по сравнению 30 как с красной, так и с желтой группами, как определено с помощью Fluidigm анализа ($P=0,012$ и $P=0,0012$, соответственно).

ФИГУРА 11Б представляет собой график, который показывает, что при неинвазивных опухолях рака мочевого пузыря высокие уровни экспрессии EGFR были связаны с пониженными показателями 3- и 5-летней ВБПЗ (порог экспрессии = 25-ому 35 процентилю, высокий уровень EGFR, $N=22$, низкий уровень EGFR, $N=66$).

ФИГУРА 11В представляет собой график, который показывает, что высокие уровни экспрессии EGFR были связаны с пониженным показателем ВБПЗ у пациентов с метастазами рака мочевого пузыря (порог экспрессии = 25-ому процентилю, высокий уровень EGFR, $N=6$, низкий уровень EGFR, $N=4$).

ФИГУРА 11Г представляет собой график, который показывает, что у пациентов с метастазами рака мочевого пузыря высокие уровни экспрессии EGFR были связаны со сниженными 3- и 5-летними показателями ОВ (порог экспрессии = 50-ому процентилю, высокий уровень EGFR, $N=3$, низкий EGFR, $N=7$).

ФИГУРА 11Д представляет собой график, который показывает анализ независимого 45 набора данных из Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012. График показывает, что высокая экспрессия EGFR была связана с худшими 3- и 5-летними частотами ОВ (порог экспрессии = 50-ому процентилю, высокий уровень EGFR, $N=23$, низкий уровень EGFR, $N=28$).

ФИГУРА 11Е представляет собой график, который показывает анализ независимого набора данных из Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010. График показывает, что высокая экспрессия EGFR была связана со сниженным 3- и 5-летним показателем ОВ (порог экспрессии = 25-ому процентилю, высокий уровень EGFR N=48, низкий уровень EGFR N=14).

ФИГУРА 11Ж представляет собой график, который показывает, что лечение клеточных линий рака мочевого пузыря с помощью ингибитора EGFR эрлотиниба (TARCEVA™) идентифицировало три чувствительные клеточные линии, которые проявляют >25% ингибирования роста (ИР) (UMUC5, UMUC10 и UMUC17) и четыре 10 резистентные клеточные линии, которые проявляют ИР<25% в ответ на лечение (RT112, UMUC3, SW780 и BFTC905).

ФИГУРА 11З представляет собой график, который показывает, что EGFR экспрессируется на значительно более высоких уровнях в клеточных линиях рака мочевого пузыря, которые чувствительны к эрлотинибу (TARCEVA™) (ИР>25%), чем 15 в клеточных линиях, которые проявляют минимальный ИР в ответ на лечение (P=0,0106).

ФИГУРА 12А представляет собой диаграмму Венна, которая показывает гены, содержащиеся в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря, которая описана в примере 1 (например, таблица 1), который 20 иллюстрирует перекрывающиеся и уникальные гены, принадлежащие трем основным группам сигнальных путей на основе INGENUITY® анализа: (1) сигнальные пути FGFR, RTK, MAPK и PI3K; (2) сигнальные пути развития и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП); и (3) сигнальные сети TP53, стабильности генома и регулирования клеточного цикла. Числа соответствуют числу уникальных генов в каждой части 25 диаграммы Венна.

ФИГУРА 12Б представляет собой график, который показывает результаты неконтролируемой иерархической кластеризации выборок из большого набора данных общего пользования, и соответствующую степень злокачественности опухоли, стадию и молекулярный класс, как определено в Sjödahl et al., см. выше.

ФИГУРА 12В представляет собой серию графиков, которые показывают кривые 30 перекрестно-проверенных ошибок неверного классификации для опухолей из Sjödahl et al. (см. выше), которые основаны на наборе данных по уменьшению числа зондов Illumina по сравнению с зондами, которые соответствуют изготовленной на заказ панелью Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря. Каждый 35 график показывает количество ошибок классификации, сделанных при попытке предсказать степень злокачественности опухоли, стадию TNM или молекулярный класс, с использованием ближайшего сжатого центроидного классификатора с субпопуляцией общих генов. Число генов показано вдоль верхней оси X с соответствующим «коэффициентом сжатия», который показан на нижней оси X.

ФИГУРА 12Г представляет собой серию графиков, которые показывают 40 неконтролируемую иерархическую кластеризацию выборок из четырех наборов данных общего пользования на основе сигналов зондов, которые соответствуют генам в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа экспрессии генов рака мочевого пузыря и которые соответствуют опубликованному базальному/люминальному статусу 45 (Damrauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:3110-3115, 2014).

ФИГУРА 13А представляет собой серию графиков, которые показывают линейные характеристики шести типичных анализов и их необработанных значений порогового цикла (ПЦ) по отношению к увеличению вводимых количеств универсальных РНК

(уРНК) контролей.

ФИГУРА 13Б представляет собой серию графиков, которые показывают воспроизводимость данных от пробега к пробегу для архивных ЗФЗП тканей, как видно из пробега в разные дни двух типичных РНК образцов, полученных от ЗФЗП 5 образцов.

ФИГУРА 14А представляет собой тепловую карту, которая показывает результаты неконтролируемой кластеризации генов и образцов из наборов данных общего 10 пользования, а также НМИРМП, МИРМП и метастазы (МЕТ) из массива ЗФЗП ткани рака мочевого пузыря, описанного в примерах 1 и на фигуре 1. Белые блоки представляют собой гены, которые не найдены в соответствующих наборах данных.

ФИГУРА 14Б представляет собой график, который показывает базальный профиль (красные метки) и люминальный профиль (синие метки) для генов панели рака мочевого пузыря, рассчитанные по идентифицированным образцам согласно Damrauer et al. (см. выше). Среднее центрирование и нормализацию единичной дисперсии применяли для 15 логарифмически преобразованных значений экспрессии, а средние логарифмически нормализованные уровни экспрессии вычисляли независимо для базальных и люминальных групп образцов для формирования окончательных профилей.

ФИГУРА 14В представляет собой диаграмму, которая показывает методику, использованную для вычисления базальных/люминальных признаков из данных общего 20 пользования, а затем применения этих признаков к данным панели мочевого пузыря для измерения базального/люминального сходства образцов.

ФИГУРА 15А показывает результаты неконтролируемой иерархической кластеризации (среднее сцепление, 1 - коэффициент корреляционного расстояния Пирсона) из 204 ЗФЗП образцов (см. пример 1 и фигуру 1), которая основана на панели 25 экспрессии генов рака мочевого пузыря и соответствующих баллов Б/Л, гистологии и мутационном статусе генов, которые относятся к раку. См. пример 6 для получения дополнительной информации.

ФИГУРЫ 15Б-15Д представляют собой графики, которые показывают статистический анализ баллов Б/Л (фигура 15Б), распределение НМИРМП, МИРМП 30 и МЕТ (фигура 15В), частоту случаев FGFR3 мутаций (фигура 15Г) и оценки ИГХ FGFR3 (фигура 15Д) в образцах из люминальных и базальных кластеров, определенных по транскрипции, на фигуре 15А.

ФИГУРА 15Е показывает оценки активации сигнального пути INGENUITY® на основе экспрессии генов, которые были существенно дифференциально

35 экспрессируемыми между люминальными и базальными образцами на фигуре 15А.

ФИГУРА 16А представляет собой график, который показывает корреляционное поле между баллами Б/Л в первичных опухолях (ось X) и соответствующими баллами Б/Л в сопоставленных метастазах (ось Y) от одних и тех же пациентов. Точечная окраска отражает значимость образцов, подбираемых для одного и того же пациента 40 на основе SNP-генотипирования. Log10 (р-значение)=-4 (P=0,0001), Log10 (р-значение) =-3 (P=0,001) и Log10 (р-значение)=-2 (P=0,01). Пунктирные линии представляют собой 95%-ный доверительный интервал, за пределами которого метастазы и оценки первичных образцов Б/Л различаются при р-значении равном 0,05.

ФИГУРА 16Б представляет собой таблицу, которая показывает баллы Б/Л в первичных опухолях («перв»), сопоставимых метастазах («мет») и соответствующие 45 р-значения для дивергенции в состоянии Б/Л в согласованных парах.

ФИГУРЫ 17А и 17Б представляют собой диаграммы, которые изображают результаты INGENUITY® анализа, которые показывают предсказуемую активацию

рецептора эстрогена в люминальных образцах по сравнению с базальными образцами на основе генов, существенно дифференциально экспрессируемых между двумя группами в ЗФЗП тканях.

ФИГУРА 18 представляет собой корреляционную матрицу Пирсона, которая

использует данные секвенирования нового поколения (СНП) AMPLISEQ™, которые сравнивают частоту аллелей на всех вариационных сайтах по меньшей мере со 100-кратным охватом чтения и частотой >10% (в среднем 120 сайтов сравнивались между любыми двумя образцами).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Введение

Настоящее изобретение относится к терапевтическим, диагностическим и прогностическим способам и композициям для лечения рака, например, рака мочевого пузыря. Данное изобретение основано на открытии того, что определение уровней экспрессии (например, измененного уровня экспрессии относительно контрольного образца) по меньшей мере одного из генов, которые приведены далее в таблице 1, включая FGFR3, TP53, и/или EGFR, применимо для лечения пациента, страдающего раком; для диагностики пациента, страдающего раком; для определения прогноза пациента, страдающего раком; для определения вероятности ответа пациента, страдающего раком, на лечение противораковой терапией и/или для оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком. В некоторых вариантах реализации изобретения для пациента может быть выбрана противораковая терапия, и, дополнительно, пациенту может необязательно вводиться противораковая терапия.

II. Определения

Термины «экспрессионный уровень», «уровень экспрессии» или «уровень» используются взаимозаменяющими, и, как правило, относятся к количеству полинуклеотида (например, матричной РНК (мРНК)), или аминокислотного продукта, или белка в биологическом образце. «Экспрессия», как правило, относится к процессу, посредством которого информация, закодированная в генах, преобразуется в структуры, которые присутствуют и работают в клетке. Следовательно, согласно данному изобретению «экспрессия» гена может относиться к транскрипции в полинуклеотид (например, мРНК), трансляции в полипептид (например, белок) или даже посттрансляционной модификации полипептида. Фрагменты транскрибированного полинуклеотида, транслированного полипептида или посттрансляционно-модифицированного полипептида также следует рассматривать как экспрессированные, независимо от того, происходят ли они из транскрипта, полученного путем альтернативного сплайсинга или деградированного транскрипта, или от посттрансляционного процессинга белка, например, путем протеолиза. «Экспрессированные гены» включают такие, которые транскрибируются в полинуклеотид в виде мРНК, а затем транслируются в белок, а также такие, которые транскрибируются в РНК, но не транслируются в белок (например, транспортные и рибосомальные РНК).

В данном документе термины «маркер» и «биомаркер» используются взаимозаменяющими для обозначения ДНК, РНК, белка, углевода или молекулярного маркера на основе гликолипида, экспрессия или присутствие которых в образце субъекта или пациента может быть обнаружена стандартными способами (или способами, описанными в данном документе), и может быть полезной, например, для диагностики рака мочевого пузыря у пациента; для прогноза пациента, страдающего раком мочевого пузыря; для определения вероятности ответа пациента, страдающего раком мочевого

пузыря, на лечение противораковой терапией; для оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком мочевого пузыря, и/или для терапевтических способов, которые включают определение уровня экспрессии такого маркера. Такие биомаркеры включают, но не ограничиваются этими, 5 гены, представленные в таблице 1. В некоторых вариантах реализации изобретения ген может быть одним или более из FGFR3, TP53 и EGFR. В некоторых вариантах реализации изобретения ген представляет собой FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения ген представляет собой TP53. В некоторых вариантах реализации изобретения ген представляет собой EGFR. В других вариантах реализации изобретения 10 ген(ы) может быть выбран из DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1, MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 или FGF2. Экспрессия такого биомаркера может быть определена как более высокая или более низкая в образце, полученном от пациента, чем контрольный 15 уровень. Индивидуумы, у которых уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена больше или меньше, чем контрольный уровень экспрессии, могут быть идентифицированы как субъекты/ пациенты, страдающие раком мочевого пузыря, как пациенты, которые имеют конкретный прогноз (например, благоприятный или неблагоприятный прогноз), или как такие, которые, вероятно, ответят на лечение 20 противораковой терапией.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе термин «контрольный уровень» относится к предопределенному значению. Как будет оценено квалифицированным специалистом, контрольный уровень предопределен и задан таким образом, чтобы соответствовать требованиям в отношении, например, специфичности 25 и/или чувствительности. Эти требования могут варьироваться, например, от регулирующего органа к регулирующему органу. Может быть, например, что чувствительность или специфичность анализа, соответственно, должны быть заданы в определенных пределах, например, 80%, 90%, 95% или 99%. Эти требования могут также определяться сточки зрения положительных или отрицательных прогностических 30 значений. Тем не менее, основываясь на идее, данной в настоящем изобретении, всегда будет возможно достичь контрольного уровня, который соответствует этим требованиям. В одном варианте реализации изобретения контрольный уровень определяют у здоровых индивидуумов. Контрольный уровень в одном варианте реализации изобретения был предопределен в нозологической форме, к которой 35 относится пациент (например, тип рака, такой как рак мочевого пузыря, или подтип рака мочевого пузыря). В определенных вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан на любом процентиле между 20^{ым} и 95^{ым} процентилем (например, 20^й, 25^й, 30^й, 35^й, 40^й, 45^й, 50^й, 55^й, 60^й, 65^й, 70^й, 75^й, 80^й, 85^й, 90^й или 95^й 40 процентиль) от общего распределения значений в исследуемой нозологической форме. В конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень задается на 25^й процентиль от общего распределения значений в исследуемой нозологической форме. В других конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень задается на 50^й процентиль от общего распределения значений в исследуемой 45 нозологической форме. В других вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан, например, по медиане, третилях, квартилях или квинтилях, как определено из общего распределения значений в исследуемой нозологической форме или в данной популяции. В других вариантах реализации изобретения

контрольный уровень может быть задан, например, по среднему значению, как определено из общего распределения значений в исследуемой нозологической форме или в данной популяции.

В некоторых вариантах реализации изобретения термин «увеличение» или «выше»

- 5 относится к уровню на контрольном уровне или к общему увеличению на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 6-кратному, 7-кратному, 8-кратному, 9-кратному, 10-кратному, 11-кратному, 12-кратному, 13-кратному, 14-кратному, 15-кратному или более, уровня маркера (например, FGFR3, TP53 или EGFR), который обнаруживаются способами,
- 10 описанными в данном документе, по сравнению с уровнем контрольного образца.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе термин «снижение» или «ниже» относится к уровню ниже контрольного уровня или к общему снижению на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, уровня маркера (например, FGFR3, TP53 или EGFR), который обнаруживаются способами, описанными в данном документе, по сравнению с уровнем контрольного образца.

В некоторых вариантах реализации изобретения термин «на контролльном уровне» относится к уровню маркера (например, FGFR3, TP53 и/или EGFR), который совпадает с уровнем, который обнаруживаются способами, описанными в данном документе, для

- 20 контрольного образца.

Термин «диагноз» используется в данном документе для обозначения идентификации или классификации молекулярного или патологического состояния, заболевания или условия (например, рака, включая рак мочевого пузыря). Например, «диагноз» может относиться к идентификации конкретного типа рака. «Диагноз» может также относиться

- 25 к классификации конкретного подтипа рака, например, по гистопатологическим критериям или по молекулярным признакам (например, подтип, который характеризуется экспрессией одного биомаркера или комбинацией биомаркеров (например, конкретных генов или белков, которые кодируются упомянутыми генами)). В некоторых вариантах реализации изобретения подтипов рака может быть немышечно-
- 30 инвазивный рак мочевого пузыря (НМИРМП, T0, T1), мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП, T2, T3) или метастатический рак мочевого пузыря.

«Ответ» пациента или «отвечаемость» пациента на лечение или терапию, например, лечение, которое включает эффективное количество противораковой терапии (например, противораковой терапии, которая включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или

- 35 антагонист EGFR), относится к клиническому или терапевтическому лечебному эффекту, предоставляемому пациенту, которому грозит рак или который страдает раком (например, раком мочевого пузыря), от или как результат лечения. Такой лечебный эффект может включать клеточные или биологические ответы: полный ответ, частичный ответ, стабильное заболевание (без прогрессирования или рецидива) или ответ с отсроченным
- 40 рецидивом пациента от или как результат лечения антагонистом. Специалист в данной области техники легко сможет определить, реагирует ли пациент. Например, в отношении рака мочевого пузыря ответ может быть выражен в уменьшении страдания от рака мочевого пузыря, таком как уменьшенный и/или остановленный рост опухоли, уменьшение размера опухоли и/или уменьшение интенсивности одного или более
- 45 симптомов рака мочевого пузыря, например, крови в моче (гематурии), изменения в мочеиспускании, другие симптомы мочеиспускания, боли в спине или тазовые боли. В некоторых вариантах реализации изобретения ответ может быть выражен в уменьшении или уменьшенных показателях метастатической конверсии рака или показателей рака,

например, предотвращение образования метастазов или уменьшения количества или размера метастазов. Например, ответ может быть в виде уменьшения размеров опухоли, выживаемости без признаков заболевания, выживаемости без прогрессирования или общей выживаемости у пациента, у которого диагностировали повышенный или

5 пониженный уровень экспрессии одного или более биомаркеров, которые приведены далее в таблице 1 (например, FGFR3, TP53 и EGFR), относительно контрольного уровня.

Термины «образец» и «биологический образец» используются взаимозаменяющими для обозначения любого биологического образца, который получен от индивидуума, включая биологические жидкости организма, ткань организма (например, ткань

10 опухоли), клетки или другие источники. К биологическим жидкостям организма относятся, например, лимфа, сыворотка крови, свежая цельная кровь, мононуклеарные клетки периферической крови, замороженная цельная кровь, плазма (включая свежую или замороженную), моча, слюна, сперма, синовиальная жидкость и спинномозговая жидкость. Образцы также включают ткань груди, ткань почек, ткань толстой кишки,

15 ткань мозга, мышечную ткань, синовиальную ткань, кожу, волоссяной фолликул, костный мозг и опухолевую ткань. Способы получения тканевых биопсий и биологических жидкостей у млекопитающих хорошо известны в данной области техники.

В данном документе "образец опухоли" представляет собой образец, который получен из опухоли или содержит опухолевые клетки пациента. В данном документе примеры 20 образцов опухолей включают, но не ограничиваются этими, биопсию опухоли, циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие белки плазмы, асцитную жидкость, культуры первичных клеток или клеточные линии, которые получены из опухолей или обладающие опухолеподобными свойствами, а также сохраненные образцы опухоли, такие как зафиксированные в формалине и залитые парафином образцы опухоли или 25 замороженные образцы опухоли.

«Антагонист» (взаимозаменяющими называемый «ингибитором») целевого полипептида представляет собой агент, который препятствует активации или функционированию целевого полипептида, например, частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность, опосредованную целевым полипептидом.

30 Например, антагонист полипептида X относится к любой молекуле, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность, опосредованную полипептидом X. Примеры ингибиторов включают антитела; антитела к лигандам; низкомолекулярные антагонисты; антисмысловые и ингибирующие молекулы РНК (например, малую шпилечную РНК). Предпочтительно ингибитор

35 представляет собой антитело или малую молекулу, которые связываются с целевым полипептидом. В конкретном варианте реализации изобретения ингибитор имеет аффинность связывания (константу диссоциации) с целевым полипептидом около 1000 нМ или менее. В другом варианте реализации изобретения ингибитор имеет аффинность связывания с целевым полипептидом около 100 нМ или менее. В другом варианте

40 реализации изобретения ингибитор имеет аффинность связывания с целевым полипептидом около 50 нМ или менее. В конкретном варианте реализации изобретения ингибитор ковалентно связан с целевым полипептидом. В конкретном варианте реализации изобретения ингибитор подавляет передачу сигнала целевого полипептида при половинной максимальной ингибирующей концентрации (IC50) 1000 нМ или менее.

45 В другом варианте реализации изобретения ингибитор подавляет передачу сигнала целевого полипептида при IC50 500 нМ или менее. В другом варианте реализации изобретения ингибитор подавляет передачу сигнала целевого полипептида при IC50 50 нМ или менее. В некоторых вариантах реализации изобретения антагонист снижает

или ингибитирует по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более уровень экспрессии или биологической активности целевого полипептида. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой FGFR3 или лиганд FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой EGFR или лиганд FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой TP53.

Если не указано иное, используемый в данном документе термин «полипептид» относится к любому нативному целевому полипептиду (например, белку) из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). Данный термин охватывает «полноразмерный», непроцессированный полипептид, а также любую форму полипептида, которая возникает в результате процессинга в клетке. Данный термин также охватывает варианты полипептида, которые встречаются в природе, например, сплайсированные варианты или аллельные варианты. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид представляет собой FGFR3. В других вариантах реализации изобретения полипептид представляет собой TP53. В других вариантах реализации изобретения полипептид представляет собой EGFR.

Термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», которые используются в данном документе взаимозаменяющими, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами, или любым субстратом, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или с помощью синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Модификация, если таковая имеется, нуклеотидной структуры может быть осуществлена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после синтеза, например, путем конъюгации с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэпы», замещение одного или более нуклеотидов, которые встречаются в природе, аналогом, межнуклеотидные модификации, такие, например, которые имеют незаряженные связи (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфорамицаты, карбаматы и т.д.) и заряженные связи (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.); такие, которые содержат боковые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.); такие, которые имеют интеркалирующие агенты (например, акридин, псорален и т.д.); такие, которые содержат хелатирующие агенты (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.); такие, которые содержат алкилирующие агенты; такие, которые имеют модифицированные связи (например, альфа аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.); а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Дополнительно, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующая в сахараах, может быть заменена, например, на фосфонатные группы, фосфатные группы, защищена стандартными защитными группами или активирована для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или может быть конъюгирована с твердыми или полутвердыми подложками. 5'- и 3'-концевая OH группа может быть фосфорилирована или замещена аминами или компонентами органической кэпирующей группы от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксили также могут быть получены для стандартных защитных групп. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы

рибозных или дезоксирибозных сахаров, которые, как правило, известны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, α -аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара,
5 седогептулозы, ациклические аналоги и аналоги нуклеозидов без азотистых оснований, такие как метилрибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваются этими, варианты модификаций, в которых фосфат замещен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), «(O)NR2 («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO
10 или CH2 ("формацеталь"), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), который необязательно включает эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предыдущее описание относится ко всем полинуклеотидам, которые упоминаются в данном документе, включая РНК
15 и ДНК.

Термин «малая молекула» относится к любой молекуле с молекулярной массой около 2000 дальтон или менее, предпочтительно около 500 дальтон или менее.

В данном документе термин «антитело» используется в широком смысле слова и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этими,
20 моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую антиген-связывающую активность.

Термины «антитело против целевого полипептида» и «антитело, которое связывается с» целевым полипептидом, относятся к антителу, которое способно связывать целевой
25 полипептид с достаточной аффинностью, так что антитело применимо в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на целевой полипептид. В одном варианте реализации изобретения степень связывания антитела, против целевого полипептида, с белком, несоответствующим целевому полипептиду, составляет менее, чем около 10% от связывания антитела с целевым полипептидом, как
30 измеряно, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, которое связывается с целевым полипептидом, имеет константу диссоциации (K_d) $\leq 1 \text{ мкM}$, $\leq 100 \text{ нM}$, $\leq 10 \text{ нM}$, $\leq 1 \text{ нM}$, $\leq 0,1 \text{ нM}$, $\leq 0,01 \text{ нM}$ или
35 $\leq 0,001 \text{ нM}$ (например, 10^{-8} M или менее, например, от 10^{-8} M до 10^{-13} M , например, от 10^{-9} M до 10^{-13} M). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против целевого полипептида связывается с эпитопом целевого полипептида, который является консервативным среди целевых полипептидов у разных видов. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой EGFR. В некоторых вариантах реализации изобретения целевой полипептид представляет собой TP53.
40

«Блокирующее антитело» или «антитело-антагонист» представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, с которым оно связывается. Предпочтительные блокирующие антитела или антагонистические антитела существенно или полностью ингибируют биологическую активность антигена.
45

«Аффинность» относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности

связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары по связыванию (например, антитела и антигена). Аффинность молекулы X для своего партнера Y, как правило, может быть представлена константой диссоциации (Кд). Аффинность может быть измеряна обычными способами, известными в данной области техники, включая те, которые описаны в данном документе.

"Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с тем же антигеном, с которым связывается интактное антитело. "Функциональный фрагмент" представляет собой фрагмент антитела, который сохраняет функцию полноразмерного антитела.

Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или вида, тогда как оставшаяся часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

В данном документе термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» используются взаимозаменяющими обозначениями антитела, которое имеет структуру по существу сходную с нативной структурой антитела или которое имеет тяжелые цепи, включающие Fc область.

Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое получено из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, которые содержатся в популяции, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов антител, например тех, которые содержат мутации, возникающие естественным путем или при получении препарата моноклональных антител, причем такие варианты, как правило, присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные на различные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело из препарата моноклональных антител направлено на одну детерминанту антигена. Таким образом, определение «моноклональный» указывает на характер антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые должны использоваться в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методами, включая, но не ограничиваясь этими, метод гибридом, методы рекомбинантных ДНК, способы фагового дисплея и способы, которые используют трансгенных животных, которые содержат все или часть локусов иммуноглобулина человека, такими способами и другими типовыми способами получения моноклональных антител.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело человека, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или которое получено из источника нечеловеческого происхождения, который использует репертуары человеческого антитела или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Это определение человеческого антитела специфически исключает гуманизированное антитело, которое содержит антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения.

«Гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, которое содержит

аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения в гипервариабельных областях (HVR), и аминокислотные остатки человека в каркасных областях (FR). В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух, вариабельных доменов,

- 5 в которых все или по существу все HVR (например, области, определяющие комплементарность (CDR)) соответствуют таковым из антитела нечеловеческого происхождения, а все или по существу все FR соответствуют таковым из антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, полученного из человеческого антитела.
- 10 «Гуманизированная форма» антитела, например, антитела нечеловеческого происхождения, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

«Иммуноконьюгат» представляет собой антитело, конъюгированное с одной или более гетерологической молекулой (молекулами), включая, но не ограничиваясь этим, цитотоксический агент.

- 15 Если не указано иное, используемые в данном документе термины «рецептор 3 фактора роста фибробластов» и «FGFR3» относятся к любому нативному FGFR3 из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). Данный термин охватывает «полноразмерный», непроцессированный FGFR3, а также любую форму FGFR3, которая
- 20 возникает в результате процессинга в клетке. Данный термин также охватывает варианты FGFR3, которые встречаются в природе, например, сплайсированные варианты или аллельные варианты. Типовая последовательность человеческого FGFR3 полипептида дикого типа включает аминокислотную последовательность из базы данных UniProt P22607-1 или P22607-2.

- 25 Используемый в данном документе термин «антагонист FGFR3» и «ингибитор FGFR3» относится к любому антагонисту FGFR3, который в настоящее время известен в данной области техники или который будет идентифицирован в будущем, и включает любую химическую частицу, которая после введения пациенту, ведет к ингибированию биологической активности, связанной с активацией FGFR3 у пациента, включая любые
- 30 последующие биологические эффекты, возникающей в ином случае в результате связывания FGFR3 с его природным лигандом. Такие антагонисты FGFR3 включают любой агент, который может блокировать активацию FGFR3 или любой из последующих биологических эффектов активации FGFR3, которые имеют отношение к лечению рака у пациента. Такой антагонист может действовать путем непосредственного связывания
- 35 с внутриклеточным доменом рецептора и ингибирования его киназной активности. В альтернативном варианте такой антагонист может действовать посредством занимания сайта или его части связывания лиганда с рецептором FGFR3, тем самым делая receptor недоступным для его природного лиганда, так что его нормальная биологическая активность предотвращается или снижается. В альтернативном варианте такой
- 40 антагонист может действовать путем модуляции димеризации FGFR3 полипептидов или взаимодействия FGFR3 полипептида с другими белками, или усиливать убиквитинирование и эндоцитозную деградацию FGFR3. Антагонисты FGFR3 включают, но не ограничиваются этими, низкомолекулярные ингибиторы, антитела или фрагменты антител, антисмысловые конструкции, малые ингибирующие РНК (то есть, РНК-интерференцию посредством дРНК; РНК-интерференцию) и рибозимы. В
- 45 предпочтительном варианте реализации изобретения антагонист FGFR3 представляет собой малую молекулу или антитело, которые специфически связывается с человеческим FGFR3. Иллюстративные антитела-антагонисты FGFR3 описаны, например, в патенте

США №8410250, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Например, в патенте США №8410250 описаны клоны антитела-антагониста FGFR3 184.6, 184.6.1 и 184.6.1N54S (эти клоны также именуются «R3 Mab»).

- Термины «рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)», «ErbB1», «HER1» и «EGFR киназа» используются в данном документе взаимозаменяющими и относятся к EGFR, как описано, например, в Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987), включая их мутантные формы, возникающие естественным путем, (например, делеционный мутантный EGFR у Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)). EGFR или ERBB1 относится к гену, который кодирует белковый продукт EGFR.
- 10 Аминокислотная последовательность типового белка человека EGFR может быть найдена, например, в базе данных UniProt под кодовым номером P00533.

Используемый в данном документе термин «антагонист EGFR» и «ингибитор EGFR» относится к любому антагонисту EGFR, который в настоящее время известен в данной области техники или который будет идентифицирован в будущем, и включает любую химическую частицу, которая после введения пациенту, ведет к ингибированию биологической активности, связанной с активацией рецептора EGFR у пациента, включая любые последующие биологические эффекты, возникающей в ином случае в результате связывания EGFR с его природным лигандом. Такие антагонисты EGFR включают любой агент, который может блокировать активацию EGFR или любой из последующих биологических эффектов активации EGFR, которые имеют отношение к лечению рака у пациента. Такой антагонист может действовать путем непосредственного связывания с внутриклеточным доменом рецептора и ингибирования его киназной активности. В альтернативном варианте такой антагонист может действовать посредством занимания сайта или его части связывания лиганда с рецептором EGF, тем самым делая receptor недоступным для его природного лиганда, так что его нормальная биологическая активность предотвращается или снижается. В альтернативном варианте такой антагонист может действовать путем модуляции димеризации EGFR полипептидов или взаимодействия EGFR полипептида с другими белками, или усиливать убиквитинирование и эндоцитозную деградацию EGFR. Антагонисты EGFR включают, но не ограничиваются этими, низкомолекулярные ингибиторы, антитела или фрагменты антител, антисмысловые конструкции, малые ингибирующие РНК (то есть, РНК-интерференцию посредством днРНК; РНК-интерференцию) и рибозимы. В предпочтительном варианте реализации изобретения антагонист EGFR представляет собой малую молекулу или антитело, которые специфически связывается с человеческим EGFR.

Иллюстративные антагонисты EGFR, подходящие для использования в данном изобретении, включают, например, низкомолекулярные антагонисты EGFR, включая хиназолиновые ингибиторы EGFR киназы, пиридопиримидиновые ингибиторы EGFR киназы, пиридинопиримидиновые ингибиторы EGFR киназы, пирролопиримидиновые ингибиторы EGFR киназы, пиразолопиримидиновые ингибиторы EGFR киназы, фениламинопиримидиновые ингибиторы EGFR киназы, оксиндоловые ингибиторы EGFR киназы, индолокарбазоловые ингибиторы EGFR киназы, фталазиновые ингибиторы EGFR киназы, изофлавоновые ингибиторы EGFR киназы, хинолоновые ингибиторы EGFR киназы и тирфостиновые ингибиторы EGFR киназы, такие как описанные в нижеследующих патентных публикациях, и все фармацевтические приемлемые соли и сольваты ингибиторов EGFR киназы: Международные патентные публикации №№ WO 96/33980, WO 96/30347, WO 97/30034, WO 97/30044, WO 97/38994, WO 97/49688, WO 98/02434, WO 97/38983, WO 95/19774, WO 95/19970, WO 97/13771, WO

98/02437, WO 98/02438, WO 97/32881, WO 98/33798, WO 97/32880, WO 97/3288, WO 97/02266, WO 97/27199, WO 98/07726, WO 97/34895, WO 96/31510, WO 98/14449, WO 98/14450, WO 98/14451, WO 95/09847, WO 97/19065, WO 98/17662, WO 99/35146, WO 99/35132, WO 99/07701 и WO 92/20642; Европейские патентные заявки №№ EP 520722, EP 566226, EP 787772, EP 837063 и EP 682027; патенты США №№ 5747498, 5789427, 5650415 и 5656643; и немецкая патентная заявка № DE 19629652. Дополнительные неограничивающие примеры низкомолекулярных антагонистов EGFR включают любой из ингибиторов киназы EGFR, которые описаны в Traxler, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12) :1599-1625 (1998).

10 Конкретные предпочтительные примеры низкомолекулярных антагонистов EGFR, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают [6,7-бис(2-метоксиэтокси)-4-хиназолин-4-ил]-(3-этинилфенил) амин (также известный как OSI-774, эрлотиниб или TARCEVA™ (эрлотиниб HCl); OSI Pharmaceuticals/Genentech/Roche) (патент США № 5747498; Международная патентная публикация № WO 01/34574 и Moyer et al. Cancer Res. 57:4838-4848 (1997)); CI-1033 (ранее известный как PD183805, Pfizer) (Sherwood et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:723 (1999)); PD-158780 (Pfizer); AG-1478 (Калифорнийский университет); CGP-59326 (Novartis); PKI-166 (Novartis); EKB-569 (Wyeth); GW-2016 (также известный как GW-572016 или лапатиниба дитозилат; GSK); и гефитиниб (также известный как ZD1839 или IRESSA™, AstraZeneca) (Woodburn et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38:633 (1997)). В частности предпочтительным низкомолекулярным ингибитором EGFR киназы, который можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, является [6,7-бис(2-метоксиэтокси)-4-хиназолин-4-ил]-(3-этинилфенил) амин (то есть эрлотиниб), его гидрохлоридная соль (т.е. эрлотиниб HCl, TARCEVA™) или другие формы солей (например, эрлотиниба мезилат).

25 Типичные антитела-антагонисты EGFR включают те, которые описаны в Modjtahedi, et al., Br. J. Cancer 67:247-253 (1993); Teramoto et al., Cancer 77:639-645 (1996); Goldstein et al., Clin. Cancer Res. 1:1311-1318 (1995); Huang, et al., Cancer Res. 59:59(8):1935-40 (1999); и Yang et al., Cancer Res. 59:1236-1243 (1999). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитело-антагонист EGFR может быть моноклональным антителом Mab E7.6.3 (Yang et al. Cancer Res. 59:1236-43 (1999)), или Mab C225 (ATCC кодовый № HB-8508), или антителом или фрагментом антитела, которые обладают специфичностью связывания. Подходящие моноклональные антитела-антагонисты EGFR включают, но не ограничиваются этими, IMC-C225 (также известный как цетуксимаб или ERBITUX™; Imclone Systems), ABX-EGF (Abgenix), EMD 72000 (Merck KgaA, Дармштадт), RH3 (York Medical Bioscience Inc.) и MDX-447 (Medarex/ Merck KgaA).

30 Термины «TP53», «клеточный опухолевый антиген p53» и «p53», которые используются в данном документе взаимозаменямо, относятся к высокоактивному белку-супрессору опухоли, который кодирует фосфопротеин из 393 аминокислот. Во многих случаях при раке TP53 отрицательно регулируется или мутируется. Отсутствие или инактивация TP53 может способствовать развитию рака. Существует большое разнообразие мутаций TP53. В некоторых случаях рак может сверхэкспрессировать TP53, в частности, мутантные версии TP53. TP53 «дикого типа» представляет собой TP53, который обнаружен в нормальных (то есть не раковых клетках), или TP53, 45 который не имеет мутации, коррелирующей с раком. Статус TP53 в образце (например, включает ли образец дикий тип или мутантный TP53) может быть оценен, например, как описано в патенте США № 6090566, который выдан Vogelstein et al., или с использованием стандартных методов, таких как описанные в данном документе или

известные в данной области техники. Молекула TP53 может включать, без ограничения, полипептиды, которые содержат последовательности по существу идентичные тем последовательностям, которые приведены далее, например, в базе данных UniProt под кодовым № P04637, и молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируются этими 5 последовательностями.

«Ингибитор тирозинкиназы» представляет собой антагонистическую молекулу, которая ингибирует до некоторой мере тирозинкиназную активность тирозинкиназы, такой как рецептор EGFR или рецептор FGFR3.

«Вакцина из бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ)» относится к вакцине, которая

используется для профилактики туберкулеза (ТБ) у людей, которые подвержены высокому риску заболевания туберкулезом, или в местах, где распространен туберкулез. Она получена из ослабленной формы бактерии, которая называется *Mycobacterium bovis* (бацилла Кальметта-Герена), которая схожа с бактериями, которые вызывают ТБ. Вакцина может помочь иммунной системе организма выработать антитела для 15 разрушения ТБ бактерий. Она также может помочь иммунной системе вызывать гибель раковых клеток и используется, например, в качестве лечения рака мочевого пузыря.

Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. В это определение включены доброкачественные и злокачественные опухоли.

Под термином «рак на ранней стадии» или «опухоль на ранней стадии» подразумевается рак, который не является инвазивным или метастатическим или классифицируется как рак на стадии 0, I или II. Примеры рака включают, но не ограничиваются этими, карциному, лимфому, бластому (включая медуллобластому и ретинобластому), саркому (включая липосаркому и саркому синовиальной клетки), нейроэндокринные опухоли 25 (включая карциноидные опухоли, гастриному и рак островковых клеток), мезотелиому, шванному (включая акустическую невриному), менингиому, аденокарциному, меланому и лейкемию, или лимфоидные злокачественные опухоли. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак (например, плоскоклеточный рак эпителия), рак легкого, включая мелкоклеточную 30 рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), аденокарциному легкого и плоскоклеточный карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, гепатому, рак молочной железы (включая метастатический рак молочной железы), рак толстой кишки, 35 ректальный рак, рак ободочной и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, карциному полового члена, рак яичек, рак пищевода, опухоли желчных путей, а также рак головы и шеи и множественную миелому.

40 Термин «предраковый» относится к состоянию или росту, которое, как правило, предшествует или развивается в рак. «Предраковый» рост будет иметь клетки, которые характеризуются нарушением регуляции клеточного цикла, пролиферации или дифференциации, которые могут быть определены маркерами регуляции клеточного цикла, клеточной пролиферации или дифференциации.

45 Используемый в данном документе термин «опухоль» относится ко всему неопластическому клеточному росту и пролиферации, как злокачественным, так и доброкачественным, и ко всем предраковым и раковым клеткам и тканям. Термины «рак», «раковый», «клеточное пролиферативное нарушение» и «опухоль» не являются

взаимоисключающими, как указано в настоящем описании.

Под «метастазами» понимают распространение рака с его первичного участка в другие места в организме. Раковые клетки могут отрываться от первичной опухоли, проникать в лимфатические и кровеносные сосуды, циркулировать по кровотоку и расти в отдаленном очаге (метастазировать) в нормальных тканях других частей тела. Метастазы могут быть локальными или удаленными. Метастаз представляет собой последовательный процесс, возможный при условии отрыва опухолевых клеток от первичной опухоли, передвижением их по кровотоку и остановке в отдаленном участке. На новом участке клетки создают кровоснабжение и могут расти, образуя опасное для жизни новообразование. Как стимуляторные, так и ингибиторные молекулярные сингальные пути в опухолевой клетке регулируют такое поведение, существенными также являются взаимодействия между опухолевой клеткой и клетками хозяина в отдаленном участке.

Термин «неметастатический» означает рак, который представляет собой

доброкачественный или который остается на первичном участке и не проникает в лимфатическую систему, или систему кровеносных сосудов, или в ткани, отличные от первичного участка. Как правило, неметастатический рак представляет собой любой рак, который находится на стадии 0, I или II рака, а иногда на стадии III рака.

Термин « противоопухолевая терапия» относится к терапии, полезной при лечении

рака. Примеры противораковых терапевтических агентов включают, но не ограничиваются этими, антагонисты, химиотерапевтические агенты, агенты, ингибирующие рост, цитотоксические агенты, агенты, используемые в лучевой терапии, агенты против ангиогенеза, апоптотические агенты, антитубулиновые агенты и другие агенты для лечения рака, анти-CD20 антитела, ингибиторы фактора роста тромбоцитов (например, GLEEVECTTM (иматиниба мезилат)), ингибитор COX-2 (например, целеококсиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более из перечисленных мишней: рецептор(ы) ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA или VEGF, TRAIL/Apo2 и другие биологически активные и органические химические агенты и т.д. В конкретных вариантах реализации изобретения антагонист представляет собой антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR. В данное изобретение также включены их комбинации.

Под «лучевой терапией» подразумевается использование направленных гамма-лучей или бета-лучей для того, чтобы причинить достаточное повреждение клетке, так, чтобы ограничить ее способность нормально функционировать или вообще разрушить клетку.

Должно быть понятно, что для данной области техники будет известно много способов определения дозировки и продолжительности лечения. Типичные способы лечения осуществляются в виде однократного применения, а типичные дозы лежат в диапазоне от 10 до 200 единиц (Грейс) в день.

Используемый в данном термин «лечение», «лечению» или другие его грамматические

варианты относится к клиническому вмешательству при попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума или клетки, подвергаемой лечению, и может быть осуществлено либо для профилактики, либо в ходе течения клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных

патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление болезненного состояния, и ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах реализации изобретения противораковая терапия (например, противораковая терапия, которая

включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR) используется для замедления развития заболевания или нарушения.

«Эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение требуемых периодов времени для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

«Терапевтически эффективное количество» вещества/ молекулы по данному изобретению, агонист или антагонист может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также в зависимости от способности вещества/ молекулы, агониста или антагониста вызвать

желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое, при котором любые токсические или вредные эффекты вещества/ молекулы, агониста или антагониста перевешиваются в сторону терапевтически полезных эффектов. Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела, полипептида или антагониста по данному

изобретению, эффективное для «лечения» заболевания или нарушения у млекопитающего (например, пациента). В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшать число раковых клеток; уменьшить размер или массу опухоли; ингибировать (то есть замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические

органы; ингибировать (то есть замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазы опухолей; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. В той же мере, в которой лекарство может предотвращать рост и/или вызывать гибель существующих раковых клеток, оно может быть цитостатическим и/или

цитотоксическим. В одном варианте реализации изобретения терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое ингибирует рост. Для терапии рака эффективность *in vivo* может быть измерена, например, путем оценки продолжительности выживания, времени до прогрессирования болезни (ВДП), продолжительности выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ),

продолжительности выживаемости без прогрессирования (ВБПр), показателями ответа (ПкО), продолжительностью ответа и/или качеством жизни.

Термин «выживание» относится к пациенту, оставшемуся в живых, и включает общую выживаемость, а также выживаемость без признаков заболевания.

Термин «общая выживаемость» относится к пациенту, оставшемуся в живых в течение определенного периода времени, такого как 1 год, 5 лет и т.д. с момента постановки диагноза или лечения.

Фраза «выживание без прогрессирования» в контексте настоящего изобретения относится к промежутку времени, в процессе и после лечения, при котором, согласно оценке лечащего врача или исследователя, заболевание пациента не ухудшается, т.е. не прогрессирует. Как будет оценено квалифицированным специалистом, выживаемость пациента без прогрессирования улучшается или повышается, если пациент проявляет более длительный период времени, в течение которого болезнь не прогрессирует, по сравнению со средним значением или средним временем выживания без прогрессирования у контрольной группы пациентов, находящихся в аналогичных условиях.

Фраза «выживаемость без признаков заболевания (ВБПЗ)» относится к промежутку времени после первичного лечения рака, которое завершилось, в течение которого пациент выживает без каких-либо признаков или симптомов этого рака.

Под термином «продление выживания» понимают увеличение выживаемости, например, общей выживаемости или выживаемости без признаков заболевания, у леченного пациента по сравнению с нелеченным пациентом (то есть по сравнению с пациентом, который не получал противораковую терапию (например, противораковую 5 терапию, которая включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR), или по сравнению с пациентом, который не экспрессирует FGFR3, TP53 и/или EGFR на установленном контрольном уровне.

Используемый в данном документе термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или 10 вызывает разрушение клеток. Термин предполагает включение радиоактивных изотопов (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтических агентов, например, метотрексата, адриамицина, алкалоидов барвинка (винкристина, винбластина, этопозида), доксорубицина, мелфалана, 15 митомицина С, хлорамбуцила, даунорубицина или других интеркалирующих агентов, ферментов и их фрагментов, таких как нуклеолитические ферменты, антибиотиков и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая 20 их фрагменты и/или их варианты, а также различных противоопухолевых или противораковых агентов, раскрытых далее. Другие цитотоксические агенты описаны далее. Туморицидный агент вызывает разрушение опухолевых клеток.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, полезное при лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, 25 метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включающие альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметиломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан 30 (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; калистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофилютоксин; подофильтиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); 35 элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотсодержащие соединения горчицы, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урацил горчицы; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как 40 антибиотики энедиина (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма1I и калихеамицин omegal1 (см., например, Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динемицин, включая динемицин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромопротеиновые энедииновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, 45 карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идаруцицин, марцелломицин,

митомицины, такие как митомицин С, микофенольная кислота, ногаламицин, оливоцицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флуадарбин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пириимицина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуродин, эноцитабин, флоксуродин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитеостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; средство, компенсирующее фолиевую кислоту, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бэстрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидайнин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксанtron; мопиданмоль; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирапубицин; лозоксанtron; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецины (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; винdezин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пибрброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); тиотепу; таксоиды, например, паклитаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™, не содержащий кремофор, композицию модифицированных альбумином наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Иллинойс) и доцетаксел TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлоранбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейкововин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтические приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанного; а также комбинации двух или более из вышеуказанных веществ, таких как CHOP, аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, аббревиатура для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATTIN™) в сочетании с 5-ФУ и лейкововином. Дополнительные химиотерапевтические агенты включают цитотоксические агенты, которые используются в качестве лекарственных конъюгатов антител, такие как, например, майтансиноиды (например, DM1) и ауристатины MMAE и MMAF.

«Химиотерапевтические агенты» также включают «антигормональные агенты», которые действуют для регулирования, уменьшения, блокирования или ингибирования эффектов гормонов, которые могут способствовать росту рака, и часто являются формой системного, или тотального, лечения. Они сами по себе могут быть гормонами. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (СМРЭ), включая, например, тамоксилен (включая тамоксилен NOLVADEX®), раилоксилен EVISTA®, дролоксилен, 4-гидрокситамоксилен, триоксилен, кеоксилен, LY117018, онапристон и торемифен FARESTON®; антипрогестероны; супрессоры

рецепторов эстрогена (СРЭ); агенты, которые функционируют для подавления или остановки деятельности яичников, например, агонисты гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (ГВЛГ), такие как LUPRON® и лейпролида ацетат ELIGARD®, гозерелина ацетат, бусерелина ацетат и триптерелин; другие

- 5 антиандrogenные препараты, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует производство эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглютетимид, мегестрола ацетат MEGASE®, экземестан AROMASIN®, форместани, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастразол ARIMIDEX®. Кроме
- 10 того, такое определение химиотерапевтических агентов включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат DIDROCAL®, NE-58095, золедроновую кислоту/ золедронат ZOMETA®, алендронат FOSAMAX®, памидронат AREDIA®, тилудронат SKELID®, или ризедронат ACTONEL®, а также троксацитабин (аналог 1,3-диоксолан нуклеозид цитозина); антисмыловые
- 15 олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной клеточной пролиферации, такие как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы
- 20 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; лапатиниба дитозилат (низкомолекулярный ингибитор двойной тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтические приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных соединений.

Используемый в данном документе термин «агент, ингибирующей рост» относится к соединению или композиции, которое(ая) ингибирует рост и/или пролиферацию клетки (например, клетки рака мочевого пузыря) либо в условиях *in vitro*, либо в условиях *in vivo*. Таким образом, агент, который ингибирует рост, может быть таким, который значительно снижает процент клеток в S-фазе. Примеры агентов, ингибирующих рост, включают агенты, которые блокируют прогрессирование клеточного цикла (в отличном от S-фазы положении), такие, как агенты, которые индуцируют остановку G1 и остановку M-фаз. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как антрациклический антибиотик доксорубицин ((8S-цис)-10-[3-амино-2,3,6-тридезокси- α -L-ликсогексапиранозил]окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-8-(гидроксиацетил)-1-

- 25 метокси-5,12-нафтацендион), эпиребицин, дауноребицин, этопозид и блеомицин. Те агенты, которые угнетают G1 фазу, что также перетекает в угнетение S-фазы, например, алкилирующие ДНК агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ара-C. Дополнительную информацию можно найти в книге «The Molecular Basis of Cancer» Mendelsohn и Israel, eds., главе 1, озаглавленной «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», Murakami et al. (WB Saunders:Philadelphia, 1995), в частности с. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой противоопухолевые препараты, оба полученные из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), который получен из европейского тиса, представляет собой полусинтетический аналог паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел способствуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизации микротрубочек путем предотвращения деполимеризации, что в результате приводит к ингибированию митоза в клетках.

Используемые в данном документе термины «пациент» или «субъект» используются взаимозаменяющими и относятся к любому единичному животному, более предпочтительно млекопитающему (включая не относящихся к человеку животных, таких как, например, собаки, кошки, лошади, кролики, животных из зоопарков, коровы, свиньи, овцы и 5 приматы, не относящиеся к человеку), которому требуется лечение. В данном документе наиболее предпочтительно пациент представляет собой человека.

Используемый в данном документе термин «введение» означает способ предоставления дозы лекарственного вещества (например, антагониста) или фармацевтической композиции (например, фармацевтической композиции, которая 10 включает антагонист) субъекту (например, пациенту). Введение может осуществляться любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное, и, при необходимости местного лечения, внутриочаговым введением. Парентеральные инфузии включают, например, внутримышечное, внутривенное, 15 внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим путем, например, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратким или продолжительным. В данном документе рассматриваются различные режимы дозирования, включая, но не ограничиваясь этими, однократное или многократное введение через различные временные точки, болюсное введение и 20 пульсирующую инфузию.

Термин «эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, которое эффективно для лечения нарушения, например, для лечения рака.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к стерильному препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической 25 активности лекарственного средства, и которая не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить препарат.

«Стерильная» композиция представляет собой асептическую или свободную от всех живых микроорганизмов и их спор.

Используемый в данном документе термин «вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, которые обычно включают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов или лекарственных средств, которые содержат информацию о показаниях, использовании, дозировке, введении, противопоказаниях, других терапевтических продуктах, которые следует комбинировать с упакованым продуктом, и/или 30 35 предупреждения, которые касаются использования таких терапевтических продуктов или лекарственных средств, и т.д.

«Набор» представляет собой любую продукцию (например, пакет или контейнер), которая содержит по меньшей мере один реагент, например, лекарственное средство для лечения рака (например, рака мочевого пузыря) или зонд для специфического 40 выявления гена или белка биомаркера по данному изобретению. Продукцию предпочтительно продвигают, распределяют или продают как единицу для осуществления способов по данному изобретению.

Слово «метка», при использовании в данном документе, относится к соединению или композиции, которое(ая) конъюгировано(а) или слито(а) непосредственно или 45 опосредованно с реагентом, таким как зонд нуклеиновой кислоты или антитело, и облегчает обнаружение реагента, с которым оно(а) конъюгировано(а) или слито(а). Метка может быть обнаружена сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментной метки, может катализировать

химическое изменение субстратного соединения или композиции, которое можно обнаружить. Термин предполагает схватывание непосредственного мечения зонда или антитела посредством связывания (то есть физического соединения) обнаруживаемого вещества с зондом или антителом, а также опосредованного мечения зонда или антитела посредством реакционной способности с другим реагентом, который непосредственно мечен. Примеры опосредованного мечения включают обнаружение первичного антитела с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела и обнаружение ДНК-зонда, меченного на конце биотином таким образом, чтобы его можно было обнаружить флуоресцентно меченным стрептавидином.

10 III. Терапевтические способы

Настоящее изобретение относится к способам лечения пациента, страдающего от рака. Термин «рак» охватывает коллекцию пролиферативных нарушений, включая, но не ограничиваясь этими, предраковые опухоли, доброкачественные опухоли и злокачественные опухоли. Доброкачественные опухоли остаются локализованными в

15 месте их возникновения и не имеют возможности инфильтрировать, инвазировать или метастазировать в отдаленные места. Злокачественные опухоли будут инвазировать и повреждать другие ткани вокруг них. Они также могут получить способность отрываться от исходного места и распространяться в другие части организма (метастазировать), обычно через кровоток или через лимфатическую систему, где

20 располагаются лимфатические узлы. Первичные опухоли классифицируются по типу ткани, из которой они возникают; метастатические опухоли классифицируются по типу ткани, из которой получены раковые клетки. Со временем клетки злокачественной опухоли становятся более атипичными и оказываются менее похожими на нормальные клетки. Это изменение в появлении раковых клеток называется степенью опухоли, и

25 раковые клетки описываются как хорошо дифференцированные (низкая степень злокачественности), умеренно дифференцированные, слабодифференцированные или недифференцированные (высокая степень злокачественности). Хорошо дифференцированные клетки вполне normally выглядят и напоминают нормальные клетки, из которых они возникли. Недифференцированные клетки представляют собой 30 клетки, которые стали настолько атипичными, что уже невозможно определить происхождение этих клеток. В конкретных вариантах реализации изобретение относится к способам лечения рака мочевого пузыря.

Системы определения стадии рака описывают, как далеко рак распространился анатомически и попытаются поставить пациентов с аналогичным прогнозом и лечением 35 в одну и ту же стадийную группу. Можно провести несколько тестов, чтобы помочь определить стадию рака, включая биопсию и определенные тесты по изображению, такие как рентген грудной клетки, маммограмма, сканирование костей, компьютерная томография и сканирование МРТ. Анализы крови и клиническая оценка также используются для оценки общего состояния здоровья пациента и выявления того, 40 распространился ли рак на определенные органы.

Для обозначения стадии рака Американский объединенный комитет по раку сначала указывает рак, особенно твердые опухоли, по категории букв, используя классификационную систему TNM. Раковые заболевания обозначаются буквами T (размер опухоли), N (пальпируемые узлы) и/или M (метастазы). T1, T2, T3 и T4 45 описывают увеличение размера первичного очага поражения; N0, N1, N2, N3 указывает на постепенное продвижение поражения узла; а M0 и M1 отражают отсутствие или наличие отдаленных метастазов.

Во втором способе обозначения стадии рака, также известном как группирование

общей стадии или обозначения стадий римскими цифрами, раковые заболевания разделяют на стадии от 0 до IV, которые включают размер первичных поражений, а также наличие узлового распространения и отдаленных метастазов. В этой системе случаи сгруппированы в четыре стадии, обозначенные римскими цифрами с I по IV,

5 или классифицированы как «рецидивирующие». Для некоторых видов рака стадию 0 называют «*in situ*» или «Tis», такой как протоковая карцинома *in situ* или лобулярная карцинома *in situ* при раке молочной железы. Низкодифференцированные аденоны также могут быть классифицированы как стадия 0. В целом, рак I стадии - это небольшие локализованные раковые образования, которые обычно излечимы, в то время как IV

10 стадия обычно представляет собой неоперабельный или метастатический рак. Раковые заболевания II и III стадии обычно развиты локально и/или выявляют участие локальных лимфатических узлов. В целом, более высокие числа стадий указывают на более обширное заболевание, включая больший размер опухоли и/или распространение рака в близлежащие лимфатические узлы и/или органы, прилегающие к первичной опухоли.

15 Эти стадии точно определены, но определение отличается для каждого вида рака и известно квалифицированному специалисту.

Многие регистры рака, такие как программа NCI «Наблюдение, эпидемиология и конечные результаты» (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER)), используют сводное определение стадии. Эта система используется для всех типов рака.

20 Она группирует случаи заболевания раком в пять основных категорий:

In *situ* представляет собой ранний рак, который присутствует только в слое клеток, в котором он начался.

Локализованный представляет собой рак, который ограничен органом, в котором он начался, без признаков распространения.

25 Местно-распространенный представляет собой рак, который распространился за пределы исходного (первичного) участка в близлежащие лимфатические узлы или органы и ткани.

Отдаленный представляет собой рак, который распространился от первичного участка к отдаленным органам или отдаленным лимфатическим узлам.

30 Неизвестный используется для описания случаев, для которых недостаточно информации для указания стадии.

Кроме того, при раковом заболевании распространен возврат через месяцы или годы после удаления первичной опухоли. Рак, который рецидивирует после того как все видимые опухоли были искоренены, называется рецидивирующим заболеванием.

35 Заболевание, которое рецидивирует в области первичной опухоли, представляет собой местный рецидив, а заболевание, которое рецидивирует как метастазы, называется отдаленным рецидивом.

Опухоль может быть твердой опухолью, или нетвердой опухолью, или опухолью мягких тканей. Примеры опухолей мягких тканей включают лейкемию (например, 40 хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз у взрослых, острый миелоидный лейкоз, зрелый В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз или волосатоклеточный лейкоз) или лимфому (например, неходжкинскую лимфому, Т-клеточную лимфому кожи или болезнь Ходжкина). Твердая опухоль 45 включает любой рак тканей тела, кроме крови, костного мозга или лимфатической системы. Твердые опухоли можно дополнительно разделить на те, которые имеют эпителиальное клеточное происхождение и неэпителиальное клеточное происхождение. Примеры твердых опухолей эпителиальных клеток включают опухоли мочевого пузыря,

желудочно-кишечного тракта, толстой кишки, груди, предстательной железы, легкого, почки, печени, поджелудочной железы, яичника, головы и шеи, полости рта, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкой кишки, толстой кишки, анального отверстия, желчного пузыря, губы, носоглотки, кожи, матки, мужского полового органа, мочевых органов и кожи. Твердые опухоли не эпителиального происхождения включают саркомы, опухоли головного мозга и опухоли костей. Другие примеры опухолей описаны в разделе «Определения».

В некоторых вариантах реализации изобретения способы по данному изобретению включают введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, причем уровень экспрессии по меньшей мере одного из биомаркеров по данному изобретению (например, биомаркера, который указан в таблице 1) в образце, полученном от пациента, был определен как измененный относительно контрольного уровня биомаркера по данному изобретению. Например, в некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу лечения рака (например, рака мочевого пузыря), который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, причем уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, который указан в таблице 1 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96, которые перечислены в таблице 1), был определен как измененный относительно контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена.

В другом примере в некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу лечения рака (например, рака мочевого пузыря), который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, причем уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, который указан в таблице 4 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, которые перечислены в таблице 4), был определен как измененный относительно контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение представляет собой повышение. В других вариантах реализации изобретения изменение представляет собой понижение.

В конкретных вариантах реализации изобретения способы по изобретению включают введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, причем уровень экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и/или EGFR в образце, полученном от пациента, был определен как повышенный относительно контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена. Уровень экспрессии биомаркеров по данному изобретению (например, гена, который указан в таблице 1, например, FGFR3, TP53 и/или EGFR) может быть определен с использованием любого из способов или анализов, которые описаны в данном документе (например, способов или анализов, которые описаны в разделе IV «Подробного описания изобретения» или в «Примерах»). В некоторых вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря представляет собой НМИРМП. В других вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря представляет собой МИРМП. В еще других вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря представляет собой метастатический рак мочевого пузыря. Пациент может необязательно иметь

прогрессирующую, рефракторную, рецидивирующую и/или устойчивую к химиотерапии форму рака. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения пациент может иметь рецидивирующий рак мочевого пузыря, например, рецидивирующий НМИРМП.

В любом из предшествующих способов изобретения уровень экспрессии биомаркера

- ⁵ по данному изобретению (например, гена, который указан в таблице 1, например, FGFR3, TP53 и/или EGFR) в образце, полученном от пациента, может быть изменен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера. Например, в некоторых
- ¹⁰ вариантах реализации изобретения уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера. В других вариантах реализации
- ¹⁵ изобретения уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, может быть снижен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера.

- ²⁰ В конкретных вариантах реализации изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного (например, 1, 2 или 3) из следующих генов: FGFR3, TP53 и/или EGFR, в образце, полученном от пациента, может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно
- ²⁵ контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена. Например, уровень экспрессии FGFR3 может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня FGFR3. В другом случае уровень экспрессии TP53 может быть повышен по
- ³⁰ меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня TP53. Еще в одном случае уровень экспрессии EGFR может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13
- ³⁵ раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня EGFR.

- В некоторых вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть установлен на любом процентиле, например, между 20^M процентилем и 99^M процентилем (например, на 20^M, 25^M, 30^M, 35^M, 40^M, 45^M, 50^M, 55^M, 60^M, 65^M, 70^M, 75^M, 80^M, 85^M, 90^M, 95^M или 99^M процентиле) от общего распределения уровня экспрессии биомаркера (например, FGFR3, TP53 или EGFR) в данном типе рака (например, рака мочевого пузыря). В конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан на 25^й процентиле общего распределения значений при раке мочевого пузыря. В других конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан на 50^й процентиль от общего распределения значений при раке мочевого пузыря. В других вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть медианой для общего распределения значений при раке мочевого пузыря.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы по данному изобретению

включают введение пациенту противораковой терапии, которая включает одно или более (например, 1, 2 или 3) из следующих веществ: антагонист FGFR3, TP53 и/или антагонист EGFR. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения способы по данному изобретению включают введение противораковой терапии, которая

5 включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR. В иных случаях способ может включать введение противораковой терапии, которая включает антагонист FGFR3 и антагонист EGFR. В иных случаях способ может включать введение противораковой терапии, которая включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и антагонист EGFR TP53.

10 В любом из предшествующих способов антагонист FGFR3 может быть антителом-антагонистом FGFR3 или низкомолекулярным антагонистом FGFR3. Типовые антитела-антагонисты FGFR3, такие как 184.6, 184.6.1 и 184.6.1N54S, описаны, например, в патенте США №8410250, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный антагонист 15 FGFR3 представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

В любом из предшествующих способов антагонист TP53 может быть антителом-антагонистом TP53 или низкомолекулярным антагонистом TP53.

20 В любом из предшествующих способов антагонист EGFR может быть антителом-антагонистом EGFR или низкомолекулярным антагонистом EGFR. В некоторых вариантах реализации изобретения низкомолекулярный антагонист FGFR3 представляет собой ингибитор тирозинкиназы. В конкретных вариантах реализации изобретения низкомолекулярный антагонист FGFR3 представляет собой эрлотиниб (TARCEVA™).

25 Иллюстративные антагонисты EGFR, которые можно использовать в способах по данному изобретению, включают, например, низкомолекулярные антагонисты EGFR, включая хиназолиновые ингибиторы EGFR киназы, пиридопиrimидиновые ингибиторы EGFR киназы, пиридинопиrimидиновые ингибиторы EGFR киназы, пиразолопирамидиновые ингибиторы EGFR киназы, фениламинопирамидиновые ингибиторы EGFR киназы, оксиндоловые ингибиторы EGFR киназы, индолокарбазоловые ингибиторы EGFR киназы, фталазиновые ингибиторы EGFR киназы, изофлавоновые ингибиторы EGFR киназы, хинолоновые ингибиторы EGFR киназы и тиофостиновые ингибиторы EGFR киназы, такие как описанные в нижеследующих патентных публикациях, и все фармацевтические приемлемые соли и сольваты ингибиторов EGFR киназы:

30 Международные патентные публикации №№ WO 96/33980, WO 96/30347, WO 97/30034, WO 97/30044, WO 97/38994, WO 97/49688, WO 98/02434, WO 97/38983, WO 95/19774, WO 35 95/19970, WO 97/13771, WO 98/02437, WO 98/02438, WO 97/32881, WO 98/33798, WO 97/ 32880, WO 97/3288, WO 97/02266, WO 97/27199, WO 98/07726, WO 97/34895, WO 96/31510, WO 98/14449, WO 98/14450, WO 98/14451, WO 95/09847, WO 97/19065, WO 98/17662, WO 99/35146, WO 99/35132, WO 99/07701 и WO 92/20642; Европейские патентные заявки №№ EP 520722, EP 566226, EP 787772, EP 837063 и EP 682027; патенты США №№ 5747498, 5789427, 5650415 и 5656643; и немецкая патентная заявка № DE 19629652.

40 Дополнительные неограничивающие примеры низкомолекулярных антагонистов EGFR включают любой из ингибиторов киназы EGFR, которые описаны в Traxler, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625 (1998).

45 Конкретные предпочтительные примеры низкомолекулярных антагонистов EGFR, которые могут быть использованы в способах по данному изобретению, включают [6,7-бис(2-метоксиэтокси)-4-хиназолин-4-ил]-(3-этинилфенил) амин (также известный как OSI-774, эрлотиниб или TARCEVA™ (эрлотиниб HCl); OSI Pharmaceuticals/Genentech/

Roche) (патент США №5747498; Международная патентная публикация № WO 01/34574 и Moyer et al., Cancer Res. 57:4838-4848 (1997)); Cl-1033 (ранее известный как PD183805, Pfizer) (Sherwood et al., 1999, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:723); PD-158780 (Pfizer); AG-1478 (Калифорнийский университет); CGP-59326 (Novartis); PKI-166 (Novartis); EKB-569 (Wyeth); GW-2016 (также известный как GW-572016 или лапатиниба дитозилат; GSK); и гефитиниб (также известный как ZD1839 или IRESSA™, AstraZeneca) (Woodburn et al., 1997, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38:633).

Типичные антитела-антагонисты EGFR, которые можно использовать в способах поданному изобретению, включают те, которые описаны в Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67:247-253 (1993); Teramoto et al. Cancer 77:639-645 (1996); Goldstein et al., Clin. Cancer Res. 1:1311-1318 (1995); Huang, et al., Cancer Res. 15:59(8):1935-40 (1999); и Yang et al., Cancer Res. 59:1236-1243 (1999). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения антитело-антагонист EGFR может быть моноклональным антителом Mab E7.6.3 (Yang et al., Cancer Res. 59:1236-43 (1999)), или Mab C225 (ATCC кодовый № HB-8508), или 15 антителом или фрагментом антитела, которые обладают специфичностью связывания. Подходящие моноклональные антитела-антагонисты EGFR включают, но не ограничиваются этими, IMC-C225 (также известный как цетуксимаб или ERBITUX™; Imclone Systems), ABX-EGF (Abgenix), EMD 72000 (Merck KgaA, Дармштадт), RH3 (York Medical Bioscience Inc.) и MDX-447 (Medarex/ Merck KgaA).

20 В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3: амплифицированный FGFR3, транслоцированный FGFR3 и/или мутированный FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует активированный FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3 (например, транслокация (4; 14)). В некоторых вариантах 25 реализации изобретения рак конститутивно экспрессирует FGFR3. В некоторых вариантах реализации изобретения конститутивно экспрессирующйся FGFR3 содержит мутацию в тирозинкиназном домене, и/или окломембранным домене, и/или лигандсвязывающем домене. В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует лиганд-независимый FGFR3. В некоторых вариантах реализации 30 изобретения рак экспрессирует лиганд-зависимый FGFR3.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3, который содержит мутацию, которая соответствует FGFR3-III b^{S248C} . В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3-III b^{S248C} и/или FGFR3-III c^{S248C} .

35 В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3, который содержит мутацию, которая соответствует FGFR3-III b^{K652E} . В некоторых вариантах реализации рак экспрессирует FGFR3-III b^{K652E} и/или FGFR3-III c^{K650E} .

FGFR3, который содержит мутацию, которая соответствует FGFR3-III b^{S249C} . В 40 некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3-III b^{S249C} и/или FGFR3-III c^{S249C} .

В одном аспекте рак экспрессирует FGFR3 который содержит мутацию, которая соответствует FGFR3-III b^{G372C} . В некоторых вариантах реализации изобретения рак 45 экспрессирует FGFR3-III b^{G372C} и/или FGFR3-III c^{G370C} .

В одном аспекте рак экспрессирует FGFR3, который содержит мутацию, которая соответствует FGFR3-III b^{Y375C} . В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3-III b^{Y375C} и/или FGFR3-III c^{Y373C} .

В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует а) FGFR3-III β ^{K652E} и (б) один или более FGFR3-III β ^{R248C}, FGFR3-III β ^{Y375C}, FGFR3-III β ^{S249C} и FGFR3-III β ^{G372C}.

5 В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует а) FGFR3-III β ^{R248C} и (б) один или более FGFR3-III β ^{K652E}, FGFR3-III β ^{Y375C}, FGFR3-III β ^{S249C} и FGFR3-III β ^{G372C}.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует а) FGFR3-III β ^{G372C} и (б) один или более FGFR3-III β ^{K652E}, FGFR3-III β ^{Y375C}, FGFR3-III β ^{S249C} и FGFR3-III β ^{R248C}.

10 В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует FGFR3-III β ^{R248C}, FGFR3-III β ^{K652E}, FGFR3-III β ^{Y375C}, FGFR3-III β ^{S249C} и FGFR3-III β ^{G372C}.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак экспрессирует повышенные уровни фосфо-FGFR3, фосфо-FRS2 и/или фосфо-MAPK относительно контрольного образца (например, образца нормальной ткани) или уровня.

15 Композиция, которая включает противораковую терапию, например, противораковую терапию, которая включает антагонист (например, антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR), будет составляться, дозироваться и вводиться по форме подходящей медицинской практики. Факторы, которые следует при этом учитывать, включают конкретный тип рака, который лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину рака, место доставки агента, возможные побочные эффекты, тип антагониста, способ введения, планирование введения и другие факторы, известных практикующим врачам. Эффективное количество антагониста, которое вводят, будет определяться исходя из этих соображений.

25 Терапевтические агенты по данному изобретению вводят пациенту-человеку в соответствии с известными способами, такими как внутривенное болюсное введение или внутривенное введение путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, введение: внутримышечное, внутрибрюшинное, интракереброспинальное, подкожное, внутрисуставное, внутрисиновиальное, интрапекальное, пероральное, местное или через ингаляционные пути. Стратегия ex vivo также может быть использована для терапевтического применения. Стратегии ex vivo включают трансфекцию или трансдуцирование клеток, полученных от субъекта, с помощью полинуклеотида, который кодирует антагонист. Трансфицированные или трансдуцированные клетки затем переносят обратно к субъекту. Клетки могут быть любыми из широкого диапазона типов, включая, без ограничения, кроветворные клетки (например, клетки костного мозга, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, Т-клетки или В-клетки), фибробlastы, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты или мышечные клетки.

40 Например, если противораковая терапия включает антитело-антагонист (например, антитело-антагонист FGFR3, антитело-антагонист TP53 или антитело-антагонист EGFR), антитело вводят любым подходящим способом, включая парентеральное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное, и, если необходимо для местной иммуносупрессивной терапии, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело подходит для введения путем пульсирующей инфузии, в частности при снижении доз антитела. Предпочтительно дозирование осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно путем внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратким или продолжительным.

В другом примере антагонистическое соединение вводят локально, например, путем прямых инъекций, когда это допустимо при нарушении или местонахождении опухоли, и инъекции можно периодически повторять. Антагонист также можно доставлять системно субъекту или непосредственно опухолевым клеткам, например, к опухоли или к ложу опухоли после хирургического удаления опухоли, с целью предотвращения или уменьшения локального рецидивирования или метастазирования.

Противораковая терапия может быть объединена в фармацевтическую комбинированную композицию, или в режим дозирования в виде комбинированной терапии, по меньшей мере с одним дополнительным соединением, которое обладает противораковыми свойствами. ППо меньшей мере одно дополнительное соединение фармацевтической комбинированной композиции или режима дозирования предпочтительно имеет комплементарные активности для композиции антагониста, так что они не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга.

Противораковая терапия может включать химиотерапевтический агент,

цитотоксический агент, цитокин, агент, ингибирующий рост, антигормональный агент и их комбинации. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для указанной цели. Например, фармацевтическая композиция, которая содержит антагонист (например, антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR), может также включать терапевтически эффективное количество антineопластического агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, цитотоксического агента или их комбинации.

Введение терапевтических агентов в комбинации, как правило, проводят в течение определенного периода времени (обычно минут, часов, дней или недель в зависимости от выбранной комбинации). Комбинированная терапия предполагает охватить введение этих терапевтических агентов последовательным способом, то есть, когда каждый терапевтический агент вводят в разное время, а также введение этих терапевтических агентов или по меньшей мере двух терапевтических агентов по существу одновременным способом.

Терапевтический агент можно вводить одним и тем же путем или различными путями.

Например, антитело-антагонист в комбинации можно вводить путем внутривенной инъекции, в то время как химиотерапевтический агент в комбинации можно вводить перорально. В альтернативном варианте, например, оба терапевтических агента могут быть введены перорально или оба терапевтических агента могут быть введены путем внутривенной инъекции, в зависимости от конкретных терапевтических агентов.

Последовательность, в которой вводят терапевтические агенты, также варьируется в зависимости от конкретных агентов.

В зависимости от типа и тяжести заболевания, доза от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг каждого терапевтического агента представляет собой начальную кандидатную дозу для введения пациенту, например, посредством одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может варьироваться от около 1 мкг/кг до около 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых ранее факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение поддерживается до тех пор, пока рак не будет пролечен, что измеряется описанными ранее способами. Однако могут быть целесообразными другие режимы дозирования. Графики подготовки и дозировки компонентов противораковой терапии, например, противораковой терапии, которая включает один или более антагонистов (например, антагонисты FGFR3, антагонисты TP53 и/или антагонисты EGFR), химиотерапевтических агентов и т.д. могут быть использованы в соответствии

с инструкциями производителя или как определено эмпирическим путем практикующим специалистом. Графики подготовки и дозирования такой химиотерапии также описаны в «Chemotherapy Service», Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md (1992).

Комбинированная терапия может обеспечить «синергизм» и демонстрировать

- 5 «синергетический» эффект, то есть эффект, которого достигают, когда активные ингредиенты, используемые совместно, превышает сумму эффектов, которые возникают в результате использования соединений по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: 1) комбинированные и введенные, или одновременно внесенные в смешанную композицию разовой дозы; 2) вносятся
- 10 поочередно или параллельно в виде отдельных композиций; или 3) при каким-либо другом режиме. При внесении поочередной терапии синергетический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или вносят последовательно, например, различными инъекциями в отдельных шприцах. В целом, во время поочередной терапии эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть
- 15 поочередно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно.

Помимо введения пациенту противораковой терапии традиционными путями, как отмечено ранее, настоящее изобретение включает введение посредством генной терапии. Такое введение нуклеиновых кислот, которые кодируют антагонист, охватывается 20 выражением «введение эффективного количества противораковой терапии». См., например, WO 1996/07321, касающуюся применения генной терапии для генерирования внутриклеточных антител. Такой способ может быть полезным, например, для нацеливания внутриклеточных белков, таких как TP53.

- Существует два основных подхода к получению нуклеиновой кислоты (необязательно 25 содержащейся в векторе) в клетках пациента: *in vivo* и *ex vivo*. При внесении *in vivo* нуклеиновую кислоту иньектируют непосредственно в пациента, обычно в место, где необходим антагонист. При лечении *ex vivo* клетки пациента удаляют, в эти 30 изолированные клетки вводят нуклеиновую кислоту, и модифицированные клетки вводят пациенту либо непосредственно, либо, например, инкапсулируют в пористые мембранны, которые имплантируют (см., например, патенты США №№4892538 и 5283187). Существует различные методы доступные для введения нуклеиновых кислот в жизнеспособные клетки. Методы варьируют в зависимости от того, переносится ли нуклеиновая кислота в культивируемые клетки *in vitro* или в клетки предполагаемого хозяина *in vivo*. Методы, пригодные для переноса нуклеиновой кислоты в клетки 35 млекопитающих *in vitro*, включают использование липосом, электропорацию, микроинъекцию, слияние клеток, DEAE-декстрин, метод осаждения фосфатом кальция и т.д. Вектор, который часто используется для внесения гена *ex vivo*, представляет собой ретровирус.

- В настоящее время предпочтительные методы переноса нуклеиновых кислот *in vivo* 40 включают трансфекцию вирусными векторами (такими как аденоовирус, вирус простого герпеса типа I или аденоассоциированный вирус) и системами на основе липидов (полезные липиды для липид-опосредованного переноса гена представляет собой, например, DOTMA, DOPE и DC-Chol). В некоторых ситуациях необходимо обеспечить источник нуклеиновой кислоты агентом, который специфичный для целевых клеток, 45 таким как антитело, специфичное к мембранным белкам клеточной поверхности на целевой клетке, лиганд для рецептора на целевой клетке и т.д. Там, где используются липосомы, белки, которые связываются с мембранным белком клеточной поверхности, который связан с эндоцитозом, могут быть использованы для нацеливания и/или

облегчения поглощения, например, капсидные белки или их фрагменты, имеющие тропизм к конкретному типу клеток, антитела для белков, которые подвергаются интернализации в эндосомы, и белки, которые нацеливаются на внутриклеточную локализацию и усиливают внутриклеточный период полужизни. Метод рецептор-
 5 опосредуемого эндоцитоза описана, например, в Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); и Wagner et al. PNAS USA 87:3410-3414 (1990). Протоколы генного маркирования и генной терапии описаны, например, в Anderson et al., Science 256:808-813 (1992) и WO 1993/2 5673.

IV. Диагностические и прогностические способы

10 Настоящее изобретение относится к способам диагностики пациента, страдающего раком; определения прогноза пациента, страдающего раком; определения возможности пациента, страдающего раком, реагировать на лечение противораковой терапией; и оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком. Эти способы, среди прочего, полезны для диагностики подтипов
 15 рака, для прогнозирования результатов лечения и для увеличения вероятности того, что введение пациенту противораковой терапии будет эффективным. В нескольких вариантах реализации изобретения способы включают определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из биомаркеров по данному изобретению (например, биомаркера, который указан в таблице 1) в образце, полученном от пациента, и
 20 сравнение уровня экспрессии с контрольным уровнем биомаркера по данному изобретению. В конкретных вариантах реализации изобретения способы включают определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и/или EGFR в образце, полученном от пациента, и сравнения уровня экспрессии с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена. Уровень
 25 экспрессии биомаркеров по данному изобретению (например, FGFR3, TP53 и/или EGFR) может быть определен с использованием любого из способов или анализов, описанных ниже, или любого из способов или анализов, известного в данной области техники. В конкретных вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря
 30 представляет собой НМИРМП. В других вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря представляет собой МИРМП. В еще других вариантах реализации изобретения рак мочевого пузыря представляет собой метастатический рак мочевого пузыря. Пациент может необязательно иметь прогрессирующую, рефракторную, рецидивирующую и/или устойчивую к химиотерапии форму рака. Например, в некоторых
 35 вариантах реализации изобретения пациент может иметь рецидивирующий рак мочевого пузыря, например, рецидивирующий НМИРМП.

Например, в некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу диагностики рака у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице
 40 1 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96, которые
 45 перечислены в таблице 1) в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком. В некоторых вариантах

реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря. Например, в конкретных вариантах реализации изобретение относится к способу диагностики рака

- 5 у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного (например, 1, 2 или 3) из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем повышение уровня экспрессии по меньшей мере одного
- 10 вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу диагностики рака у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии FGFR3 в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии FGFR3 с контрольным уровнем FGFR3, причем повышение уровня экспрессии FGFR3 в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

- 20 20 В некоторых случаях данное изобретение относится к способу диагностики рака у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии TP53 в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии TP53 с контрольным уровнем TP53, причем повышение уровня экспрессии TP53 в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком.
- 25 25 В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу диагностики рака у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии EGFR в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии EGFR с

- 30 30 контролльным уровнем EGFR, причем повышение уровня экспрессии EGFR в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В другом примере в некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу диагностики рака у пациента; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 4 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, которые перечислены в таблице 4) в образце, полученном от пациента; и (б)

- 40 40 сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем, изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня определяет, что пациент страдает раком. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением.
- 45 45 В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать (в)

информирование пациента о том, что у него рак. В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать (г) выбор противораковой терапии для лечения пациента, когда обнаруживается повышение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно образца. В любом из

5 предшествующих вариантов реализации изобретения способ может дополнительно включать введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, например, как описано в разделе III «Подробного описания изобретения».

В иных случаях данные изобретения относятся к способу прогноза пациента, который страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня

10 экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 1 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96, которые

15 перечислены в таблице 1), в образце, полученном от пациента; (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и (в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента изменен относительно

20 контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Например, в некоторых случаях данное изобретение относится к способу прогноза 25 пациента, который страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и (в) определение прогноза пациента, причем 30 отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу прогноза пациента, который страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение 35 уровня экспрессии FGFR3 в образце, полученном от пациента; (б) сравнение уровня экспрессии FGFR3 с контрольным уровнем FGFR3; и (в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет 40 собой рак мочевого пузыря.

В других случаях данное изобретение относится к способу прогноза пациента, который страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии TP53 в образце, полученном от пациента; (б) сравнение уровня экспрессии TP53 с контрольным уровнем TP53; и (в) определение прогноза пациента, 45 причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Например, в некоторых случаях данное изобретение относится к способу прогноза пациента, который страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня экспрессии EGFR в образце, полученном от пациента; (б) сравнение уровня экспрессии EGFR с контрольным уровнем EGFR; и (в) определение прогноза 5 пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В иных случаях данные изобретения относится к способу прогноза пациента, который

страдает раком; способу, включающему следующие этапы: (а) определение уровня 10 экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 4 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, которые перечислены в таблице 4), в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение 15 уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и (в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента изменен относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может 20 быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В любом из предыдущих способов прогноз может быть прогнозом выживаемости.

В некоторых случаях этот способ проводят до введения пациенту противораковой 25 терапии. В других вариантах реализации изобретения способ проводят во время введения противораковой терапии пациенту. В других вариантах реализации изобретения способ проводят после введения пациенту противораковой терапии.

В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать 30 определение пациента для возможного лечебного эффекта от применения противораковой терапии, когда у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости. В иных случаях способ может дополнительно включать определение пациента, для которого менее вероятна польза от применения противораковой терапии, когда у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости.

В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать 35 введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, если у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости, как описано, например, в разделе III «Подробного описания изобретения».

В любом из предшествующих способов выживаемость может быть выживаемостью без признаков заболевания, выживаемостью без прогрессирования или общей 40 выживаемостью.

В других случаях данное изобретение относится к способу определения вероятности ответа пациента, страдающего раком, на лечение противораковой терапией; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 1 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 45 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96, которые перечислены в таблице 1) в образце, полученном от

пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно,

5 ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Например, в некоторых случаях данное изобретение относится к способу определения

10 пациента, который страдает раком, который, вероятно, ответит на лечение противораковой терапией; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного

15 вышеупомянутого гена, причем увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

20 Например, в некоторых случаях данное изобретение относится к способу определения пациента, который страдает раком, который, вероятно, ответит на лечение противораковой терапией; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии FGFR3 в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии FGFR3 с контрольным уровнем FGFR3, причем повышение уровня экспрессии FGFR3 в образце

25 пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В других случаях данное изобретение относится к способу определения пациента, страдающего раком, который, вероятно, ответит на лечение противораковой терапией; 30 данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии TP53 в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии TP53 с контрольным уровнем TP53, причем повышение уровня экспрессии TP53 в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации 35 изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Еще в иных случаях данное изобретение относится к способу определения пациента, страдающего раком, который, вероятно, ответит на лечение противораковой терапией; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии EGFR в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии EGFR с контрольным 40 уровнем EGFR, причем повышение уровня экспрессии EGFR в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В других случаях данное изобретение относится к способу определения пациента, 45 страдающего раком, который, вероятно, ответит на лечение противораковой терапией; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 4 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37,

38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, которые перечислены в таблице 4) в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 1 (например, генов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96, которые перечислены в таблице 1), в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

Например, в некоторых случаях данное изобретение относится к способу оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного (например, 1, 2 или 3) из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR - в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии FGFR3 в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии FGFR3 с контрольным уровнем FGFR3, причем повышение уровня экспрессии FGFR3 в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах

реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу оптимизации

терапевтической эффективности противораковой терапии для пациента, страдающего раком; данный способ включает: (а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из генов, которые перечислены в таблице 4 (например, гены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 или 48, которые перечислены в таблице 4), в образце, полученном от пациента; и (б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем изменение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, которое включает противораковую терапию. В некоторых вариантах реализации изобретения изменение может быть повышением. В других вариантах реализации изобретения изменение может быть понижением. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать определение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена,

выбранного из группы, которая состоит из: DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1, MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 и FGF2, в образце, полученном от пациента, при этом уровень экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена изменяется

относительно контрольного уровня по меньшей мере одного дополнительного гена.

В некоторых случаях данное изобретение относится к способу лечения пациента, который страдает раком мочевого пузыря; данный способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, отличной от вакцины бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ) (*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)), причем

уровень экспрессии TP53 в образце, полученном от пациента, был определен как повышенный относительно контрольного уровня TP53.

В любом из предшествующих способов способ может дополнительно включать введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, как описано, например, в разделе III «Подробного описания изобретения».

В любом из предшествующих способов уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению, например, гена, который указан в таблице 1, например, FGFR3, TP53 и/или EGFR, может быть определен посредством измерения матричной РНК (мРНК), например, как описано ниже, или способами, известными в данной области техники. В некоторых случаях уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых случаях ПЦР анализ представляет собой количественный ПЦР анализ. В некоторых вариантах реализации изобретения количественный ПЦР анализ представляет собой TAQMAN® анализ. В некоторых вариантах реализации изобретения анализ выполняют с использованием анализа Fluidigm.

В любом из предшествующих способов уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению, например, гена, который указан в таблице 1, например, FGFR3, TP53 и/или EGFR, может быть определен посредством измерения белка, например, как описано ниже, или способами, известными в данной области техники. В некоторых случаях

уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, определяют иммуногистохимическим методом.

Типовый способ определения уровня экспрессии FGFR3 иммуногистохимическим методом приводится ниже. Подобные анализы могут быть использованы для других биомаркеров по данному изобретению.

В одном варианте реализации изобретения сверхэкспрессия FGFR3 может быть проанализирована с помощью ИГХ. Вкладываемые парафином участки ткани из биопсии опухоли могут быть подвергнуты анализу ИИС и предоставлены критерии интенсивности окрашивания белка FGFR3 следующим образом.

10 Балл 0: окрашивание не наблюдается или окрашивание мембранны наблюдалось менее чем в 10% опухолевых клеток.

Балл 1+: наблюдается слабое/ едва заметное окрашивание мембранны в более чем 10% опухолевых клеток. Клетки окрашиваются только в части своей мембранны.

15 Балл 2+: слабое или умеренное полное окрашивание мембранны наблюдалось в более чем 10% опухолевых клеток.

Балл 3+: наблюдается умеренное или сильное окрашивание мембранны более чем в 10% опухолевых клеток.

20 В некоторых вариантах реализации изобретения те опухоли, которые имеют баллы 0 или 1+ в результате оценки сверхэкспрессии FGFR3, могут быть охарактеризованы как не сверхэкспрессирующие FGFR3, тогда как те опухоли, которые имеют баллы 2+ или 3+ могут быть охарактеризованы как сверхэкспрессирующие FGFR3.

25 В некоторых вариантах реализации изобретения опухоли, сверхэкспрессирующие FGFR3, могут быть оценены с помощью иммуногистохимических показателей, которые соответствуют количеству копий FGFR3 молекул, которые экспрессируются на одну клетку, и могут быть определены биохимически:

0=0-90 копий/ клетку,

1+ = по меньшей мере около 100 копий/клетку,

2+ = по меньшей мере около 1000 копий/ клетку,

3+ = по меньшей мере около 10000 копий/клетку.

30 В некоторых случаях образец, полученный от пациента, представляет собой образец опухоли.

В любом из предшествующих способов изобретения уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению (например, гена, который указан в таблице 1) в образце, полученном от пациента, может быть изменен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 35 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 40 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера. В других вариантах реализации изобретения уровень экспрессии биомаркера по данному изобретению в образце, полученном от пациента, может быть снижен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня биомаркера.

В конкретных вариантах реализации изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного (например, 1, 2 или 3) из следующих генов: FGFR3, TP53 и/или EGFR, в

образце, полученном от пациента, может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня по меньшей мере одного вышеупомянутого гена. Например,

- 5 уровень экспрессии FGFR3 может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня FGFR3. В другом случае уровень экспрессии TP53 может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза,
- 10 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня TP53. В еще другом случае уровень экспрессии EGFR может быть повышен по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз и 14 раз, 15 раз, 16 раз или более относительно контрольного уровня EGFR.

- 15 В некоторых вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть установлен на любом процентиле, например, между 20^M процентилем и 99^M процентилем (например, на 20^M, 25^M, 30^M, 35^M, 40^M, 45^M, 50^M, 55^M, 60^M, 65^M, 70^M, 75^M, 80^M, 85^M, 90^M, 95^M или 99^M процентиле) от общего распределения уровня экспрессии биомаркера (например, FGFR3, TP53 или EGFR) в данном типе рака (например, рака мочевого пузыря). В конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан на 25^й процентиле общего распределения значений при раке мочевого пузыря. В других конкретных вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть задан на 50^й процентиль от общего распределения значений при раке мочевого пузыря. В других вариантах реализации изобретения контрольный уровень может быть медианой для общего распределения значений при раке мочевого пузыря.
- 20
- 25

- 30 Раскрытие способов и анализы обеспечивают удобные, эффективные и потенциально экономически эффективные средства для получения данных и информации, полезных при оценке подходящих или эффективных терапий для лечения пациентов. Например, пациент может предоставить образец (например, биопсию опухоли или образец крови) для диагностики конкретного рака или подтипа рака. В некоторых случаях диагноз может быть связан с раком мочевого пузыря. В других случаях диагноз может быть в отношении подтипа рака мочевого пузыря, например, НМИРМП, МИРМП или метастатического рака мочевого пузыря. В других случаях пациент может предоставить образец (например, биопсию опухоли или образец крови) перед лечением противораковой терапией, и образец можно исследовать с помощью различных анализов *in vitro*, с целью определения возможной чувствительности клеток пациента к противораковой терапии, например, противораковой терапии, которая включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR.
- 35
- 40

- 45 Специалисту в области медицины, особенно имеющему отношение к применению диагностических тестов и лечению терапевтическими средствами, будет понятно, что биологические системы являются несколько изменчивыми и не всегда полностью предсказуемыми, и поэтому многие хорошие диагностические тесты или терапевтические средства иногда оказываются неэффективными. Таким образом, в конечном счете, решением лечащего врача определяется наиболее подходящий курс лечения для отдельного пациента, основанный на результатах испытаний, состоянии пациента и его анамнеза, а также на своем собственном опыте. Даже могут быть случаи, например, когда врач выберет лечение пациента противораковой терапией, например,

противораковой терапией, которая включает антагонист (например, антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR), даже если не предполагается, что пациент будет особенно чувствительным к антагонистам VEGF на основании данных диагностических тестов или других критериев, в частности, если все или большинство

5 других очевидных вариантов лечения потерпели неудачу или если ожидается какой-либо синергизм при назначении другого лечения.

Образец может быть взят у пациента, у которого подозревают или диагностировали наличие ракового заболевания (например, рака мочевого пузыря), и, следовательно, вероятно, он нуждается в лечении, или у нормального индивидуума, у которого не

10 подозревают наличие какого-либо нарушения. Для оценки экспрессии маркера, образцы пациентов, такие как те, которые содержат клетки, или белки, или нуклеиновые кислоты, продуцируемые этими клетками, могут быть использованы в способах настоящего изобретения. В способах данного изобретения уровень биомаркера может

15 быть определен путем оценивания количества (например, абсолютного количества или концентрации) маркеров в образце, предпочтительно в образце ткани (например, образце опухолевой ткани, таком как биопсия). Кроме того, уровень биомаркера может быть оценен в биологических жидкостях или экскрециях, которые содержат определяемые уровни биомаркеров. Биологические жидкости или секреты, которые используются в качестве образцов в настоящем изобретении, включают, например, кровь, мочу, слону,

20 каловые массы, плевральную жидкость, лимфатическую жидкость, мокроту, асцит, простатическую жидкость, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) или любой другой биологический секрет или ее производные. Слово «кровь» означает цельную кровь, плазму, сыворотку или любую производную крови. Оценка биомаркера в таких биологических жидкостях или экскрециях иногда может быть предпочтительной, в

25 случаях, когда инвазивный метод отбора образца является неуместным или неудобным. Однако в случае образцов, которые представляют собой биологические жидкости, образец, который должен быть протестирован, в данном документе предпочтительно представляет собой кровь, синовиальную ткань или синовиальную жидкость, на наиболее предпочтительно - кровь.

30 Образец может быть замороженым, свежим, зафиксированным (например, зафиксированным в формалине), центрифужированным и/или залитым (например, залитый парафином) и т.д. Образец клеток, конечно, можно подвергнуть различным хорошо известным методам подготовки и хранения отобранного образца (например, экстракции нуклеиновой кислоты и/или белка, фиксации, хранению, замораживанию,

35 ультрафильтрации, концентрированию, выпариванию, центрифугированию и т.д.) перед оцениванием количества маркера в образце. Аналогичным образом, биопсии также можно подвергнуть методам подготовки и хранения отобранного образца, например, фиксации.

Как отмечалось ранее, любой из предшествующих способов, необязательно, дополнительно может включать выбор противораковой терапии для введения пациенту и, необязательно, дополнительно включать введение противораковой терапии пациенту.

А. Обнаружение экспрессии генов

Описанные в данном документе генетические биомаркеры могут быть обнаружены с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, образцы тканей или клеток млекопитающих могут быть успешно проанализированы, например, по мРНК или ДНК целевого генетического биомаркера с использованием анализов: нозерн-блоттинга, дот-блоттинга или полимеразной цепной реакции (ПЦР), гибридизации на чипах, анализе защиты от РНКаз или с использованием SNP ДНК-

микрочипов, которые являются коммерчески доступными, включая снимки ДНК-микрочипов. Например, анализы ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), такие как количественные ПЦР анализы, хорошо известны в данной области техники. В иллюстративном варианте реализации изобретения способ обнаружения мРНК целевого генетического биомаркера в биологическом образце включает получение кДНК из образца путем обратной транскрипции с использованием по меньшей мере одного праймера; амплификацию полученной таким образом кДНК; и выявления присутствия амплифицированной кДНК. Кроме того, такие способы могут включать одну или более стадий, которые позволяют определять уровни мРНК в биологическом образце (например, путем одновременного изучения уровней контрольной последовательности мРНК гена «домашнего хозяйства», такого как член актинового семейства). Необязательно можно определить последовательность амплифицированной кДНК. Иллюстративные способы для определения уровня экспрессии FGFR3 приведены, например, в опубликованной патентной заявке США №2014/0030259 и в патенте США №8410250, оба из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

1. Обнаружение нуклеиновых кислот

В одном конкретном варианте реализации изобретения экспрессия генов, которые приведены далее в таблице 1, может быть выполнена с помощью метода ПЦР-РВ. Зонды, которые используются для ПЦР, могут быть мечены детектируемым маркером, таким как, например, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, биолюминесцентное соединение, хемилюминесцентное соединение, хелатирующий металл или фермент. Такие зонды и праймеры могут быть использованы для обнаружения присутствия экспрессированных генов, которые приведены далее в таблице 1, в образце. Как будет понятно специалисту в данной области техники, большое количество различных праймеров и зондов может быть получено на основе последовательностей, представленных в данном документе, и эффективно использовано для амплификации, клонирования и/или определения присутствия и/или уровней экспрессированных генов, которые приведены далее в таблице 1 и/или таблице 4. В некоторых вариантах реализации изобретения ПЦР-РВ может представлять собой количественную ПЦР-РВ. В некоторых случаях количественная ПЦР-РВ может быть выполнена на микрожидкостном устройстве, например, на платформе Fluidigm BIOMARK™ ВМК-M-96.96.

Другие способы включают протоколы, которые проверяют или обнаруживают мРНК по меньшей мере одного из генов, которые приведены далее в таблице 1 (например, мРНК FGFR3, TP53 и EGFR), в образце ткани или клетки методами микрочипов. Используя микрочипы нуклеиновых кислот, образцы testируемой и контрольной мРНК из testируемых и контрольных образцов ткани подвергают обратной транскрипции и метят для получения зондов кДНК. Затем зонды гибридизуют с чипом нуклеиновых кислот, иммобилизованных на твердом носителе. Чип скомпонован таким образом, что последовательность и положение каждого из элементов чипа известны. Например, на твердой подложке может быть размещен набор генов, которые потенциально могут экспрессироваться при определенных болезненных состояниях. Гибридизация меченого зонда с конкретным элементом чипа указывает на то, что образец, из которого был получен зонд, экспрессирует данный ген. Дифференциальный анализ экспрессии генов из большой ткани может обеспечить ценную информацию. Технология микрочипов использует методы гибридизации нуклеиновых кислот и вычислительные методы для оценки профиля экспрессии мРНК тысяч генов в одном

эксперименте (см., например, WO 2001/75166). См., например, патент США 5700637, патент США 5445934 и патент США 5807522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); и Cheung et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) для обсуждения изготовления чипов.

- 5 Кроме того, может быть использован способ профилирования и обнаружения ДНК с использованием микрочипов, описанных в EP 1753878. Этот метод быстро идентифицирует и разпознает разные последовательности ДНК с использованием анализа короткого tandemного повтора (STR) и ДНК-микрочипов. В одном варианте реализации изобретения меченая целевая STR последовательность гибридизуется с
- 10 ДНК-микрочипом, который несет комплементарные зонды. Эти зонды различаются по длине, чтобы охватить диапазон возможных STR. Меченные одноцепочечные области ДНК-гибридов избирательно удаляют с поверхности микрочипа, используя ферментативное расщепление после гибридизации. Количество повторов в неизвестной мишени устанавливается на основе образца целевой ДНК, которая остается
- 15 гибридизированной с микрочипом.

Одним из примеров микрочипового процессора является система Affymetrix GENECHIP®, которая является коммерчески доступной и содержит чипы, изготовленные путем прямого синтеза олигонуклеотидов на стеклянной поверхности. Могут быть использованы другие системы, известные специалисту в данной области техники.

- 20 Другие методы определения уровня биомаркера, помимо ПЦР-РВ или другого метода на основе ПЦР, включают методы протеомики, а также индивидуализированные генетические профили, которые необходимы для лечения рака на основе реакции пациента на молекулярном уровне. В данном документе специализированные микрочипы, например, олигонуклеотидные микрочипы или кДНК-микрочипы, могут
- 25 содержать один или более биомаркеров, которые имеют профили экспрессии, которые коррелируют либо с чувствительностью, либо с устойчивостью к одной или более противораковым терапиям. Другие способы, которые могут быть использованы для обнаружения нуклеиновых кислот, с целью использования в данном изобретении, включают анализ экспрессии последовательности РНК с высокой пропускной
- 30 способностью, включая геномный анализ на основе РНК, такой как, например, секвенирование РНК.

Имеется много ссылок, которые предоставляют рекомендации по применению вышеуказанных методов (Kohler et al., Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982); и Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)). Нозерн-блоттинг анализ является общепринятой методикой, которая хорошо известна в данной области техники, и которая описана, например, в Molecular Cloning, a Laboratory Manual, second edition, 1989, Sambrook, Fritch, Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 10 Skyline Drive, Plainview, NY 11803-2500. Типичные протоколы для оценки статуса генов и продуктов генов находятся, например, в Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, разделы 2 (Нозерн блоттинг), 4 (Саузерн блоттинг), 15 (Иммуноблоттинг) и 18 (ПЦР анализ).

45 2. Обнаружение белков

Что касается обнаружения белковых биомаркеров, таких как те, которые перечислены в таблице 1 (например, FGFR3, TP53 и/или EGFR), доступны различные анализы белка, включая, например, методы на основе антител, а также масс-спектроскопию и другие

подобные способы, известные в данной области техники. В случае методов на основе антител, например, образец может контактировать с антителом, специфическим для указанного биомаркера, в условиях, достаточных для образования комплекса антитело-биомаркер, а затем обнаружения указанного комплекса. Обнаружение присутствия

- 5 белкового биомаркера может быть выполнено несколькими способами, такими как вестерн-блоттинг (с иммунопреципитацией или без нее), двумерный ДСН-ПААГ электрофорез, иммунопреципитация, сортировка клеток с активированной флуоресценцией (СКАФ), проточная цитометрия и методы ИФА, для анализа широкого спектра тканей и образцов, включая плазму или сыворотку. Имеется широкий диапазон
- 10 методов иммуноанализа, которые используют такой формат анализа, см., например, патенты США №№4016043, 4424279 и 4018653. К ним относятся как одностадийный, так и двустадийный, или «сэндвич», анализы неконкурентных типов, а также в традиционные конкурентные анализы связывания. Эти анализы также включают прямое связывание меченого антитела с целевым биомаркером.

- 15 «Сэндвич» анализы представляют собой одни из наиболее полезных и часто используемых анализов. Существует ряд вариантов метода «сэндвич» анализа, и предполагается, что все они охватываются настоящим изобретением. Вкратце, в типичном прямом анализе немеченое антитело иммобилизуют на твердой подложке, а тестируемый образец вносят для контакта с связанной молекулой. После необходимого
- 20 периода инкубации в течение времени, достаточного для образования комплекса антитело-антigen, и затем добавляют вторичное антитело, специфическое к антигену, который мечен репортерной молекулой, способной продуцировать детектируемый сигнал, и инкубируют в течение времени, достаточного для образования второго комплекса антитело-антigen-меченое антитело. Любой непрореагировавший материал
- 25 вымывается, и присутствие антигена определяется наблюдением сигнала, который продуцирует репортерная молекула. Результаты могут быть оценены либо качественно, простым наблюдением видимого сигнала, либо количественно, путем сравнения с контрольным образцом, который содержит известные количества биомаркера.

- 30 Вариации прямого анализа включают одновременный анализ, при котором оба образца и меченные антитела добавляют к связанному антителу одновременно. Эти методы хорошо известны специалистам в данной области техники, включая любые незначительные вариации, которые будут очевидны. В типичном прямом «сэндвич» анализе первичное антитело, которое имеет специфичность к биомаркеру, ковалентно или пассивно связано с твердой поверхностью. Твердая поверхность, как правило,
- 35 представляет собой стекло или полимер, наиболее часто используемые полимеры представляют собой целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен. Твердые носители могут быть в форме трубок, шариков, дисков для микропланшетов или любой другой поверхности, которая подходит для проведения иммунологического анализа. Процессы связывания хорошо известны в данной области
- 40 техники и, как правило, состоят из перекрестно-сшивящих, ковалентно-связывающих или физически адсорбирующихся; комплекс полимер-антитело промывают при подготовке тестируемого образца. Затем аликвоту тестируемого образца добавляют к твердофазному комплексу и инкубируют в течение достаточного периода времени (например, 2-40 мин или в течение ночи, если это более удобно) и при подходящих
- 45 условиях (например, от комнатной температуры до 40°C, например, в пределах от 25°C до 32°C включительно), для того, чтобы обеспечить связывание любой субъединицы, которая присутствует в данном антителе. После инкубационного периода субъединицу антитела на твердой фазе промывают, сушат и инкубируют со вторичным антителом,

которое специфическое для части биомаркера. Вторичное антитело связано с репортерной молекулой, которая используется для обозначения связывания второго антитела с молекулярным маркером.

Альтернативный метод включает иммобилизацию целевых биомаркеров в образце,

- 5 а затем воздействие на иммобилизованную мишень специфическим антителом, которое может быть или не быть помечено репортерной молекулой. В зависимости от количества мишени и силы сигнала репортерной молекулы, связанная мишень может быть обнаружена путем прямого мечения антителом. В альтернативном варианте вторичное меченое антитело, специфичное к первичному антителу, подвергают воздействию
- 10 комплекса мишень-первичное антитело для образования третичного комплекса мишень-первичное антитело-вторичное антитело. Комплекс обнаруживают по сигналу, излучаемому репортерной молекулой. Используемый в данном документе термин «репортерная молекула» означает молекулу, которая, по своей химической природе, обеспечивает аналитически идентифицируемый сигнал, который позволяет обнаруживать
- 15 антигенсвязанное антитело. Наиболее часто используемые репортерные молекулы в этом типе анализа представляют собой либо ферменты, флуорофоры, либо содержащие радионуклид молекулы (т.е. радиоизотопы) и хемилюминесцентные молекулы.

В случае иммуноферментного анализа фермент конъюгируют со вторичным антителом, как правило, с помощью глутаральдегида или периодата. Однако, как

- 20 несложно будет понять, существует широкий спектр различных методов конъюгирования, которые легко доступны квалифицированному специалисту. Обычно используемые ферменты включают, среди прочего, пероксидазу хрена, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу и щелочную фосфатазу. Субстраты, которые следует использовать со специфическими ферментами, как правило, выбирают для получения, в результате
- 25 гидролиза соответствующим ферментом, заметного изменения цвета. Примеры подходящих ферментов включают щелочную фосфатазу и пероксидазу. Также возможно использовать флуорогенные субстраты, которые дают флуоресцентный продукт, вместо хромогенных субстратов, отмеченных ранее. Во всех случаях меченое ферментом антитело добавляют к комплексу первичное антитело-молекулярный маркер, которому
- 30 дают возможность связаться, и затем избыток реагента смывается. Затем к комплексу антитело-антigen-антитело добавляют раствор, который содержит подходящий субстрат. Субстрат будет реагировать с ферментом, который связан со вторичным антителом, обеспечивая качественный визуальный сигнал, который может быть дополнительно оценен количественно, обычно спектрофотометрическим способом,
- 35 для определения количества биомаркера, который присутствует в образце. В альтернативном варианте флуоресцентные соединения, такие как флуоресцеин и родамин, могут быть химически связаны с антителами без изменения их связывающей способности. При активации освещением со светом определенной длины волны антитело, меченное флюорохромом адсорбирует световую энергию, вызывая состояние
- 40 возбуждения в молекуле с последующим испусканием света характерного цвета, который визуально определяется с помощью светового микроскопа. Как и при ИФА, флуоресцентно меченому антителу дают возможность связаться с первичным комплексом антитело-молекулярный маркер. После отмывания не связавшегося реагента, оставшийся третичный комплекс затем подвергают воздействию света
- 45 соответствующей длины волны; наблюдаемая флуоресценция указывает на присутствие целевого молекулярного маркера. Иммунофлюоресценция и методы ИФА хорошо зарекомендовали себя в данной области техники. Однако могут быть использованы и другие репортерные молекулы, такие как радиоизотопные, хемилюминесцентные или

биолюминесцентные молекулы.

Б. Наборы

Данное изобретение также предлагает наборы или промышленные изделия для использования при обнаружении биомаркеров. Такие наборы могут использоваться,

- 5 например, для диагностики пациента, который страдает раком или у которого подозревают рак (например, рак мочевого пузыря), для обеспечения прогноза пациента, страдающего раком, например, раком мочевого пузыря, и/или для определения возможности пациента с раком (например, раком мочевого пузыря) эффективно реагировать на противораковую терапию. Такие наборы могут включать средства-
- 10 носители, упорядоченные таким образом, чтобы получить в близком размещении одно или более контейнерных средств, таких как флаконы, трубы и т.п., причем каждое из контейнерных средств содержит один из отдельных элементов, которые должны использоваться в способе. Например, одно контейнерное средство может содержать зонд, который маркирован или может быть маркирован с возможностью
- 15 детектирования. Такой зонд может быть антителом или полинуклеотидом, специфическим к белку или транскрипту, соответственно. Если набор используется для гибридизации нуклеиновых кислот для детектирования целевой нуклеиновой кислоты, набор также может содержать контейнеры, которые содержат нуклеотид(ы) для амплификации последовательности целевой нуклеиновой кислоты, и/или контейнер,
- 20 который содержит репортерное средство, такое как биотин-связывающий белок, например, avidin или стрептавидин, связанный с репортерной молекулой, такой как ферментативная, флуоресцентная или радиоизотопная метка.

Такой набор, как правило, будет содержать контейнер, описанный ранее, и один или более других контейнеров, которые содержат материалы, необходимые с коммерческой 25 пользовательской точки зрения, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению. На контейнере может быть приклеена этикетка для указания того, что композиция используется для конкретного применения, и также может иметь предписания для использования *in vivo* или *in vitro*, такие как описанные ранее.

- 30 Наборы согласно данному изобретению имеют несколько вариантов реализации. Типичный вариант реализации изобретения представляет собой набор, который содержит контейнер, этикетку на указанном контейнере, и композицию, которая содержится в указанном контейнере, причем композиция включает первичное антитело, которое связывается с белком или биомаркерным аутоантителом, а этикетка на
- 35 указанном контейнере указывает, что композиция может быть использована для оценки присутствия таких белков или антител в образце, и причем набор включает инструкции к использованию антитела для оценки присутствия белков биомаркера в конкретном типе образца. Набор может дополнительно содержать ряд инструкций и материалов для подготовки образца и нанесения антитела на образец. Набор может включать как
- 40 первичное, так и вторичное антитело, причем вторичное антитело конъюгировано с меткой, например, с ферментативной меткой.

Другой вариант реализации изобретения представляет собой набор, который содержит контейнер, этикетку на указанном контейнере, и композицию, которая содержится в указанном контейнере, причем композиция включает один или более полинуклеотидов, 45 которые гибридизуются с комплементарным биомаркером, который приведен далее в таблице 1, в жестких условиях, а метка на указанном контейнере указывает, что композиция может быть использована для оценки присутствия биомаркера, который приведен далее в таблице 1, в образце, и еприне набор включает инструкции к

использованию полинуклеотида(ов) для оценки присутствия РНК или ДНК биомаркера в конкретном типе образца.

Другие необязательные компоненты набора включают один или более буферов (например, блокирующий буфер, промывочный буфер, субстратный буфер и т.д.),

5 другие реагенты, такие как субстрат (например, хромоген), который химически изменяется с помощью ферментной метки, раствор для демаскировки антитела, контрольные образцы (положительный и/или отрицательный контроль), контрольный (ые) слайд(ы) и т.д. Наборы могут также содержать инструкции для интерпретации результатов, полученных с использованием набора.

10 В дополнительных конкретных вариантах реализации изобретения, для наборов на основе антител, набор может включать, например: 1) первичное антитело (например, прикрепленное к твердому носителю), которое связывается с биомаркерным белком; и, необязательно, 2) вторичное, отличающееся антитело, которое связывается либо с белком, либо с первичным антителом и конъюгировано с детектируемой меткой.

15 Для наборов на основе олигонуклеотидов набор может включать, например: 1) олигонуклеотид, например, детектируемый меченный олигонуклеотид, который гибридизуется с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует биомаркерный белок, или 2) пару праймеров, полезных для амплификации молекулы нуклеиновой кислоты биомаркера. Также набор может содержать, например, буферный 20 агент, консервант или агент, стабилизирующий белок. Набор может дополнительно содержать компоненты, необходимые для детектирования детектируемой метки (например, фермента или субстрата). Также набор может содержать контрольный образец или серию контрольных образцов, которые могут быть проанализированы и сравнены с тестируемым образцом. Каждый компонент набора может находиться в 25 отдельном контейнере, и все разные контейнеры могут находиться в одной упаковке вместе с инструкциями для интерпретации результатов анализов, выполненных с использованием набора.

В некоторых вариантах реализации изобретения набор содержит любую из 30 нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, например, одну или более из SEQ ID №№1-51.

V. Фармацевтические композиции

Терапевтические композиции терапевтического(их) агента(ов) противораковой терапии, которые описаны в данном документе, (например, противораковые терапии, которые включают антагонисты, такие как антагонисты FGFR3, антагонисты TP53 и/35 или антагонисты EGFR), которые используется в соответствии с настоящим изобретением, приготовлены для хранения путем смешивания терапевтического(их) агента(ов), который имеет необходимую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме лиофилизованных композиций или водных растворов. Для получения общей 40 информации о композициях, см., например, Gilman et al., (eds.) (1990), The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Eastori, Pennsylvania; Avis et al., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York; Lieberman et al., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York; и Lieberman et al., 45 (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New York, Kenneth A. Walters (ed.) (2002) Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), Vol 119, Marcel Dekker.

Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы представляют собой

нетоксичные для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях, и включают: буферы, такие как фосфатный, цитратный и из других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, 5 бензетония хлорид, фенол, бутил или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, 10 гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные 15 поверхно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны, например, в патенте США №6267958 (Andya et al.). Такие лиофилизированные композиции могут быть восстановлены подходящим разбавителем до высокой концентрации белка, и восстановленную композицию можно вводить подкожно 20 млекопитающему, которое подлежит лечению согласно данному документу.

Предполагаются также кристаллизированные формы терапевтического агента(ов). См., например, US 2002/0136719 A1.

В данном документе композиция также может содержать более одного активного соединения (добавочное лекарственное средство, как указано ранее), предпочтительно 25 те, которые обладают комплементарными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Тип и эффективные количества таких лекарственных средств зависят, например, от количества и типа терапевтического агента(ов), который присутствует в композиции, и клинических параметров субъектов. Предпочтительные такие добавочные лекарственные средства указаны ранее.

Активные ингредиенты также могут быть помещены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросфера альбумина, микроэмulsionи, наночастицы и 35 нанокапсулы) или в макроэмulsionях. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A.Ed. (1980).

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полуупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, которые содержат антагонист, матрицы 40 которых находятся в форме готовых изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают полиэфиры, гидрогели (например, полигидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США №3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, не разлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-45 гликоловой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросфера, которые состоят из сополимера молочной кислоты-гликоловой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D-(−)-3-гидроксимаслянную кислоту.

Композиции, которые используются для введения *in vivo*, должны быть стерильными.

Это несложно осуществить путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембранны.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для иллюстрации, а не с целью ограничения, заявленного в данном документе, изобретения.

⁵ Пример 1. Материалы и методы

Образцы опухолей

Коллекция из 204 образцов рака мочевого пузыря, зафиксированных в формалине и залитый парафином (ЗФЗП), была получена из Cureline, Inc. (Южный Сан-Франциско, Калифорния) после одобрения Комитета по этике Санкт-Петербургской городской

¹⁰ клинической онкологической больницы и соответствующего подтверждения посредством письменного информированного согласия, или из MT Group (Ван-Найс, Калифорния) после одобрения Институциональным ревизионным советом по вопросам этики (Sterling Institutional Review Board). Клинические пробы точно отображали ожидаемое отношение около 80%/20% мужчин/женщинам, которое, как правило, наблюдается при раке

¹⁵ мочевого пузыря, и пропорции немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (НМИРМП, T0, T1), мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП, T2, T3) и метастазов составляли около 75% и около 25%, соответственно (фигура 1), что согласовалось с клинической частотой возникновения заболевания этих стадий в популяции рака мочевого пузыря (Jemal et al. CA Cancer J. Clin. 61(2):69-90, 2011; Heney, Urol. Clin. North Am. 19(3):429-433, 1992; Hall et al. Urology 52(4):594-601, 1998).

Разновидности случаев имели сопутствующую информацию о лечении, аннотацию о выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ) и общей выживаемости (ОВ), аналогичную ожидаемым клиническим параметрам для соответствующих групп (фигура 1, таблица 3).

²⁵ ³⁰ Окрашенные гематоксилином и эозином (ГиЭ) участки оценивались двумя независимыми патологами, а области опухолей для случаев с неопластической насыщенностью клетками менее 70% были отмечены патологом для макроразрешения. В целом, объем опухоли варьировал от 70 до 90%. РНК и ДНК экстрагировали из макроскопически препарированных образцов, как описано ранее (Schleifman et al. PLoS One 9(3): e90761; Schleifman et al. PLoS One 9(2): e88401).

Анализ экспрессии

Анализ экспрессии гена проводили по РНК, которую выделяли из макроскопически препарированных образцов ЗФЗП опухолей, с использованием микронабора High Pure FNAE (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) после депарафинизации с помощью

³⁵ ENVIRENE™, как описано ранее (Schleifman et al. PLoS One 9(2): e88401). Анализ экспрессии генов 96 уникальных транскриптов мРНК из генов, которые относятся к раку мочевого пузыря (см. таблицу 1), проводили на препаратах пациентов, начиная со 100 нг общей РНК, которую подвергали обратной транскрипции для получения кДНК, и предварительно амплифицировали в одной реакции с использованием

⁴⁰ SUPERSCRIPT® III/PLATINUM® Taq и реакционной смеси для предварительной амплификации (Invitrogen, Carlsbad, CA). Все 96 наборов праймеров/зондов TAQMAN® были включены в реакцию предварительной амплификации при 0,05-кратном окончательном разведении от начальной концентрации TAQMAN® анализа (Applied Biosystems, Foster City, CA). Условия термоциклирования были следующими: 1 цикл при

⁴⁵ 50°C в течение 15 мин, 1 цикл при 70°C в течение 2 мин, 14 циклов при 95°C в течение 15 с и 1 цикл при 60°C в течение 4 мин. Предварительно амплифициированную кДНК разбавляли в 2 раза и затем амплифицировали с использованием TAQMAN® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA) на платформе BIOMARK™ BMK-M-

96.96 (Fluidigm, South San Francisco, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Все образцы были проанализированы трижды. Значения порогового цикла (ПЦ) были преобразованы в относительную экспрессию с использованием метода $2^{-\Delta\text{ПЦ}}$ (Livak et al. Methods 25(4):402-408, 2001), где $\Delta\text{ПЦ}$ представляет собой среднее значение целевого гена минус среднее значение 96 значений ПЦ, вычисленное для соответствующего образца пациента. В таблице 2 показаны нуклеотидные последовательности, изготовленных на заказ зондов TAQMAN® и олигонуклеотидов, которые использовались для указанных генов.

Таблица 1. Изготовленная на заказ микроридкостная панель для рака мочевого пузыря и соответствующие анализы

Обозначение гена	Номенклатура генов согласно Организации по изучению генома человека (англ. Human Genome Organization, HUGO)	HGNC ID	Место нахождения	ID зонда в Applied Biosystems
ACER3	щелочная керамидаза 3	16066	11q13.5	Hs00218034_m1
ACVRL1	ген белка 1, подобный рецептору типа II активина A	175	12q13.13	изготовленный на заказ
ADAM9	ADAM металлопептидазный домен 9	216	8p11.23	Hs01106101_m1
AKT1	гомолог вирусного онкогена 1 v-akt мышиной тимомы	391	14q32.32-q32.33	Hs00178289_m1
AKT1S1	субстрат 1 AKT1 (богатый пролином)	28426	19q13.33	Hs00260717_m1
ARAF	гомолог вирусного онкогена V-raf мышиной саркомы 3611	646	Xp11.3-p11.23	Hs00176427_m1
AXL	AXL-рецепторная тирозинкиназа	905	19q13.1	Hs01064444_m1
BCL2	альфа изоформа: В-клеточная CLL/лимфома 2	990	18q21.3	изготовленный на заказ
BCL2	Бета изоформа: В-клеточная CLL/лимфома 2	990	18q21.3	изготовленный на заказ
BCL2L1	BCL2-подобный 1	992	20q11.21	изготовленный на заказ
BID	агонист BH3 взаимодействующего «домена смерти»	1050	22q11.2	изготовленный на заказ

	Обозначение гена	Номенклатура генов согласно Организации по изучению генома человека (англ. Human Genome Organization, HUGO)	HGNC ID	Место нахождения	ID зонда в Applied Biosystems
5	BMP2	костный морфогенетический белок 2	1069	20p12	Hs00154192_m1
	BMX	BMX нерецепторная тирозинкиназа	1079	Xp22.2	Hs01107407_m1
	BSG	базигин (группа крови Ok)	1116	19p13.3	Hs00936295_m1
10	CBLB	Cbl protoонкоген, E3 убиквитин белковая лигаза B	1542	3q	Hs00180288_m1
	CCND1	циклин D1	1582	11q13	Hs00765553_m1
	CCND2	циклин D2	1583	12p13	Hs00153380_m1
15	CDC20	гомолог цикла клеточного деления 20 (S. cerevisiae)	1723	1p34.1	Hs00415851_g1
	CDH1	кадгерин 1, тип 1, E-кадгерин (эпителиальный)	1748	16q22.1	Hs01023894_m1
	CDH2	кадгерин 2, тип 1, N-кадгерин (нейронный)	1759	18q12.1	Hs00983056_m1
20	CDKN1A	ингибитор циклинзависимой киназы 1A (p21, Cip1)	1784	6p21.1	Hs00355782_m1
	CDKN2A	ингибитор циклинзависимой киназы 2A	1787	9p21	Hs02902543_mH
	CSK	c-src тирозинкиназа	2444	15q24.1	Hs01062585_m1
25	CXCL1	лиганд 1 хемокина (мотив C-X-C) (активность, стимулирующая рост меланомы, альфа)	4602	4q13.3	Hs00236937_m1
	DUSP1	фосфатаза двойной специфичности 1	3064	5q35.1	Hs00610256_g1
	DUSP3	фосфатаза двойной специфичности 3	3069	17q21	Hs01115776_m1
	DUSP6	фосфатаза двойной специфичности 6	3072	12q22-q23	Hs00737962_m1
30	EIF4EBP1	связывающий белок 1 эукариотического фактора инициации трансляции 4E	3288	8p12	Hs00607050_m1
	EPAS1	белок 1 эндотелиального PAS домена	3374	2p21-p16	Hs01026149_m1
35	ERBB2	гомолог 2 вирусного онкогена v-erb-b2 эритробластического лейкоза, гомолог онкогена (птичьего), полученный из нейро/глиобластомы	3430	17q11.2-q12	изготовленный на заказ
	ERBB3	гомолог 3 вирусного онкогена v-erb-b2 эритробластического лейкоза (птичьего)	3431	12q13	Hs00176538_m1
40	FGF1	фактор роста фибробластов 1 (кислый)	3665	5q31.3-q33.2	Hs00265254_m1
	FGF10	фактор роста фибробластов 10	3666	5p13-p12	Hs00610298_m1
	FGF2	фактор роста фибробластов 2 (основный)	3676	4q26	Hs00266645_m1
	FGF7	фактор роста фибробластов 7	3685	15q21.2	Hs00940253_m1
45	FGF9	фактор роста фибробластов 9 (глия-активируемый фактор)	3687	13q11-q12	Hs00181829_m1

	Обозначение гена	Номенклатура генов согласно Организации по изучению генома человека (англ. Human Genome Organization, HUGO)	HGNC ID	Место нахождения	ID зонда в Applied Biosystems
5	FGFR1	рецептор 1 фактора роста фибробластов	3688	8p12	Hs00241111_m1
10	FGFR2	рецептор 2 фактора роста фибробластов	3689	10q25.3-q26	Hs01552926_m1
15	FGFR3	С изоформа: рецептор 3 фактора роста фибробластов	3690	4p16.3	изготовленный на заказ
20	FGFR3	В изоформа: рецептор 3 фактора роста фибробластов	3690	4p16.3	изготовленный на заказ
25	FGFR3	репцептор 3 фактора роста фибробластов	3690	4p16.3	изготовленный на заказ
30	FGFR4	рецептор 4 фактора роста фибробластов	3691	5q33-qter	Hs01106908_m1
35	FLT1	fms-родственная тирозинкиназа 1 (сосудистый эндотелиальный фактор роста/ рецептор фактора проницаемости сосудов)	3763	13q12	Hs01052961_m1
40	FN1	фибронектин 1	3778	2q34	Hs01549976_m1
45	FOSL1	FOS-подобный антиген 1	13718	11q13	Hs00759776_s1
	FRS2	рецепторный субстрат 2 фактора роста фибробластов	16971	12q15	Hs00183614_m1
	FRS3	рецепторный субстрат 3 фактора роста фибробластов	16970	6p21.1	Hs00183610_m1
	GATA3	GATA связывающий белок 3	4172	10p15	Hs00231122_m1
	GLI1	цинковый палец 1 GLI семейства	4317	12q13.2-q13.3	Hs01110766_m1
	HIF1A	индуцируемый гипоксией фактор 1, альфа субъединица (основный транскрипционный фактор спирали-петли-спирали)	4910	14q23.2	Hs00153153_m1
	HPSE	гепараназа	5164	4q21.3	Hs00935036_m1
	JAG1	jagged 1	6188	20p12.1-p11.23	Hs00164982_m1
	MAP2K2	митоген-активируемая протеинкиназа киназа 2	6842	19p13.3	Hs00360961_m1
	MAPK14	митоген-активируемая протеинкиназа 14	6876	6p21.3-p21.2	Hs00176247_m1
	MDM2	Mdm2, p53 гомолог (мышинный) E3 убиквитин белковой лигазы	6973	12q13-q14	Hs00234753_m1
	MET	met protoонкоген (рецептор фактора роста гепатоцитов)	7029	7q31	изготовленный на заказ
	MMP2	матриксная металлопептидаза 2 (желатиназа А, желатиназа 72 кДа, коллагеназа типа IV 72 кДа)	7166	16q13-q21	Hs01548727_m1

Обозначение гена	Номенклатура генов согласно Организации по изучению генома человека (англ. Human Genome Organization, HUGO)	HGNC ID	Место нахождения	ID зонда в Applied Biosystems
MMP9	матриксная металлопептидаза 9 (желатиназа B, желатиназа 92 кДа, коллагеназа типа IV 92 кДа)	7176	20q12-q13	Hs00234579_m1
MTOR	механическая мишень рапамицина (серин/треонинкиназа)	3942	1p36	Hs00234522_m1
MYC	гомолог вирусного онкогена v-myc миелоцитоматоза (птичьего)	7553	8q24	Hs00905030_m1
NF1	нейрофибромин 1	7765	17q11.2	Hs01035108_m1
NOTCH1	notch 1	7881	9q34.3	изготовленный на заказ
NOTCH2	notch 2	7882	1p13-p11	Hs01050702_m1
PIK3CA	фосфатидилинозитол-4,5-бисfosfat-3-киназа, каталитическая субъединица альфа	8975	3q26.3	изготовленный на заказ
PIK3CB	фосфатидилинозитол-4,5-бисfosfat-3-киназа, каталитическая субъединица бета	8976	3q21-qter	Hs00178872_m1
PIK3IP1	белок 1, взаимодействующий с фосфоинозитид 3-киназой	24942	22q12.2	Hs01018206_m1
PIK3R1	регуляторная субъединица 1 (альфа) фосфоинозитид 3-киназы	8979	5q13.1	Hs00381459_m1
POU5F1	гомеобокс 1 класс 5 POU	9221	6p21.33	Hs00999632_g1
PTCH1	patched 1	9585	9q22.1-q31	Hs00181117_m1
PTEN	гомолог фосфатазы и тензина	9588	10q23	Hs02621230_s1
PTGS2	простагландин-эндорексид-синтаза 2 (простагландин G/ H-синтаза и циклооксигеназа)	9605	1q25.2-q25.3	Hs00153133_m1
PTP4A1	протеинтироzinfosfataza типа IVA, член 1	9634	6q12	Hs00748591_s1
PTPN1	протеинтироzinfosfataza, нерецепторный тип 1	9642	20q13.1-q13.2	Hs00182260_m1
RB1	ретинобластома 1	9884	13q14.2	Hs01078066_m1
RPS6	рибосомальный белок S6	10429	9p21	Hs01058685_g1
S1PR1	сфингозин-1-фосфатный рецептор 1	3165	1p21	Hs00173499_m1
SMO	smoothened, рецептор семейства frizzled	11119	7q32.1	Hs01090242_m1
SNAI1	гомолог 1 гена snail (дрозофилы)	11128	20q13.2	Hs00195591_m1
SNAI2	гомолог 2 гена snail (дрозофилы)	11094	8q11.21	Hs00950344_m1

45

Обозначение гена	Номенклатура генов согласно Организации по изучению генома человека (англ. Human Genome Organization, HUGO)	HGNC ID	Место нахождения	ID зонда в Applied Biosystems
SP2	Фермент «домашнего хозяйства»: транскрипционный фактор Sp2	11207	17q21.3-q22	изготовленный на заказ
SPHK1	сфингозинкиназа 1	11240	17q25.2	Hs00184211_m1
SPRY1	гомолог 1 гена sprouty, антагонист передачи сигналов FGF (дрозофилы)	11269	4q	Hs01083036_s1
SRC	гомолог вирусного онкогена v-src саркомы (Шмидт-Руппина A-2) (птичего)	11283	20q12-q13	Hs01082246_m1
TIMP1	ингибитор 1 TIMP металлопептидазы	11820	Xp11.3-p11.23	Hs00171558_m1
TIMP2	ингибитор 2 TIMP металлопептидазы	11821	17q25	Hs00234278_m1
TP53	опухолевый белок p53	11998	17p13.1	изготовленный на заказ
TP63	опухолевый белок p63	15979	3q27-q29	изготовленный на заказ
TP73	опухолевый белок p73	12003	1p36.3	изготовленный на заказ
TSC1	туберозного склероза 1	12362	9q34	Hs01060648_m1
TSC2	туберозного склероза 2	12363	16p13.3	Hs01020387_m1
USP7	убиквитин-специфическая пептидаза 7 (ассоциированная с герпесвирусом)	12630	16p13.3	Hs00931763_m1
VEGFA	фактор роста эндотелия сосудов А	12680	6p12	Hs00900055_m1
VPS33B	Фермент «домашнего хозяйства»: гомолог В вакуолярного белка сортировки 33	12712	15q26.1	изготовленный на заказ
WNT2	член семейства 2 MMTV сайта интеграции типа wingless	12780	7q31	Hs01128652_m1
ZEB1	гомеобокс 1, связывающий Е-бокс цинкового пальца	11642	10p11.22	Hs00232783_m1
ZEB2	гомеобокс 2, связывающий Е-бокс цинкового пальца	14881	2q22.3	Hs00207691_m1

HGNC = HUGO комитет по номенклатуре генов.

Таблица 2: Олигонуклеотидные последовательности для изготовленных на заказ зондов TAQMAN® и праймеров

Обозначение гена	Зонд, изготовленный на заказ	Прамой праймер	Обратный праймер
ACVR1	CTGGCTGCAGACCCGGTCCT (SEQ ID № 1)	AGGTGGTGTGTGGATCAG (SEQ ID № 2)	CCGCATCATCTGAGCTAGG (SEQ ID № 3)

Обозна чение гена	Зонд, изготовленный на заказ	Прамой праймер	Обратный праймер	
5	BCL2 (альфа изофор ма)	TGCACACCTGGATCC (SEQ ID № 4)	CCTGTGGATGACTGAGTAC CTGAA (SEQ ID № 5)	GGGCCGTACAGTTCCACAAA (SEQ ID № 6)
10	BCL2 (бета изофор ма)	AGGCTGGTAGGTGC A (SEQ ID № 7)	ACCTGCACACCTGGATCCA (SEQ ID № 8)	GCCCAGACTCACATCACCAA (SEQ ID № 9)
15	BCL2L1	CGGCTGGGATACTT (SEQ ID № 10)	AATGACCACCTAGAGCCTTG GA (SEQ ID № 11)	CTCGGCTGCTGCATTGTT (SEQ ID № 12)
20	BID	AGAGGCAGATTCTG (SEQ ID № 13)	CACTCCCGCTGGGAAGAA (SEQ ID № 14)	CCTGGCAATATTCCGGATGA (SEQ ID № 15)
25	ERBB2	TTTGGACCGGGAGGCT G (SEQ ID № 16)	GAGTGTCAAGCCCCAGAACATG G (SEQ ID № 17)	GTGGGCACAGGCCACACA (SEQ ID № 18)
30	FGFR3 (С изофор ма)	TTAGCGCCCGCCGTCT TGAG (SEQ ID № 19)	GACGGCACACCCCTACGTTA C (SEQ ID № 20)	TCTAGCTCCTTGTGGTGGT (SEQ ID № 21)
35	FGFR3 (В изофор ма)	CGTCCCGCTCCGACA CATTG (SEQ ID № 22)	CTCAAGTCCTGGATCAGTGA GA (SEQ ID № 23)	GGTGGCTCGACAGAGGTACT (SEQ ID № 24)
40	FGFR3	CCTCGGGAGATGAC (SEQ ID № 25)	ACTTCAGTGTGGGGTGAC A (SEQ ID № 26)	CCTCGTCCTCCCCGTCTT (SEQ ID № 27)
45	MET	TGTCTGCCTGCAATC (SEQ ID № 28)	CGGGACATGGACTAACAG A (SEQ ID № 29)	TGCACTATTGGGAAAACCTT GT (SEQ ID № 30)
	NOTCH 1	TCTGCATGCCCGGCTA CGAG (SEQ ID № 31)	CACCTGCCTGGACCAGAT (SEQ ID № 32)	GTCTGTGTTGACCTCGCAGT (SEQ ID № 33)
	PIK3CA	TTCGACACTCTCAAG CCTGA (SEQ ID № 34)	CCCTGCTCATCAACTAGGAA ACC (SEQ ID № 35)	CAATTCAACCACAGTGGCCT TTT (SEQ ID № 36)
	SP2	TGGAGCAGCTTCCT (SEQ ID № 37)	GGCTCGAGACCAGCTCATC TA (SEQ ID № 38)	GAGATCTGCCTCAATGAATA AATCC (SEQ ID № 39)
	TP53	CAGATAGCGATGGTCT G (SEQ ID № 40)	GCTGCCCCCACCATGAG (SEQ ID № 41)	CCTTCCACTCGGATAAGATG CT (SEQ ID № 42)
	TP63	ACCTGGACGTATTCC (SEQ ID № 43)	GTCGAGCACCGCCAAGTC (SEQ ID № 44)	GCAATTGGCAGTAGAGTTT CTTCA (SEQ ID № 45)
	TP73	CTGGACGTACTCCC (SEQ ID № 46)	CCAGCACGGCCAAGTCA (SEQ ID № 47)	CTTGGCGATCTGGCAGTAGA G (SEQ ID № 48)

Обозна чение гена	Зонд, изготовленный на заказ	Прамой праймер	Обратный праймер
VPS33B	AGAAGAGGTCTGGAG AGC (SEQ ID № 49)	CCTGCACGTGTCCTCAACTG (SEQ ID № 50)	GGCACACGTGCTTCTTCTTG (SEQ ID № 51)

Мутационный анализ и секвенирование нового поколения

Мутационные анализы проводили на геномной ДНК, экстрагированной из

макроскопически препарированных тканей ЗФЗП, с использованием набора QIAAMP® FFPE (Qiagen, Valencia, CA) после депарафинизации с помощью ENVIRENE™ (Schleifman et al. PLoS One 9(3): e90761). Мутации в генах PIK3CA, EGFR, KRAS, NRAS, HRAS, FGFR3, MET, BRAF, KIT, AKT1 и FLT3 были обнаружены с использованием мутационно-

специфической количественной ПЦР, как описано ранее (Schleifman et al. PLoS One 9 (3): e90761). Секвенирование нового поколения (СНП) проводилось с использованием секвенирования нового поколения ION TORRENT™ с использованием ION AMPLISEQ™ Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA) в соответствии с рекомендациями производителя (см., например, Tsongalis et al. Clin. Chem. Lab. Med. 52(5):707-714, 2014).

В таблице 3 показана сводка результатов мутационного анализа СНП образцов рака мочевого пузыря (ДТ, дикого типа, МУТ, мутанта).

Таблица 3: Мутационный анализ СНП образцов рака мочевого пузыря

ID образца	Ген	Запрос СНП	Мутация СНП
HP-32278	PIK3CA	МУТ	H1047R
HP-32278	FGFR3	МУТ	Y373C
HP-44236	ERBB2	МУТ	V842I
HP-44242	KRAS	МУТ	G12D
HP-50330	VHL	МУТ	P86S
HP-50331	VHL	МУТ	P86S
HP-50332	KRAS	МУТ	G12A
HP-50335	FGFR3	ДТ	
HP-50336	FGFR3	МУТ	S249C
HP-50337	FGFR3	МУТ	S249C
HP-50684	FGFR3	МУТ	S249C
HP-50685	PIK3CA	МУТ	Q546R
HP-50685	FGFR3	МУТ	S249C
HP-50686	FGFR3	ДТ	
HP-50686	EGFR	МУТ	G721S
HP-50686	VHL	МУТ	P81S Q96*
HP-50686	KRAS	нет ответа	нет ответа
HP-50688	FGFR3	ДТ	
HP-50699	FGFR3	МУТ	S249C
HP-50699	EGFR	МУТ	G735S A767V

	ID образца	Ген	Запрос СНП	Мутация СНП
5	HP-50699	ERBB4	МУТ	S341L
	HP-50707	FGFR3	ДТ	
	HP-50707	EGFR	МУТ	A698T
	HP-50713	FGFR3	МУТ	S249C
10	HP-50713	EGFR	МУТ	R108K
	HP-50713	PIK3CA	МУТ	T1025T
	HP-50714	FGFR3	ДТ	
	HP-50715	FGFR3	МУТ	R248C
	HP-50715	EGFR	МУТ	H870Y
15	HP-50715	VHL	МУТ	W88*
	HP-50715	KRAS	МУТ	G12D
	HP-50722	PIK3CA	МУТ	E542K
	HP-50722	FGFR3	МУТ	R248C
	HP-50727	KRAS	МУТ	G13D
20	HP-50728	PIK3CA	МУТ	R88Q
	HP-50737	PIK3CA	МУТ	H1047R
	HP-50737	FGFR3	МУТ	R248C
	HP-50737	KRAS	ДТ	
25	HP-50737	VHL	МУТ	Q96*
	HP-50742	FGFR3	МУТ	Y373C
	HP-50885	FGFR3	МУТ	R248C
	HP-50888	HRAS	МУТ	Q61R
30	HP-50892	FGFR3	МУТ	Y373C
	HP-50893	PIK3CA	МУТ	E545K
	HP-50893	FGFR3	МУТ	G370C
	HP-50894	FGFR3	МУТ	G370C
	HP-50900	PIK3CA	МУТ	H1047R
35	HP-50900	FGFR3	МУТ	S249C
	HP-50906	HRAS	МУТ	Q61K
	HP-50907	FGFR3	МУТ	Y373C
	HP-50908	PIK3CA	МУТ	E542K
40	HP-50912	FGFR3	МУТ	S249C
	HP-50914	FGFR3	МУТ	S249C
	HP-50918	FGFR3	МУТ	R248C
	HP-50920	FGFR3	МУТ	S249C
	HP-50922	FGFR3	МУТ	S371C
45	HP-50923	PIK3CA	МУТ	E545K
	HP-50923	FGFR3	МУТ	S249C
	HP-50927	FGFR3	ДТ	

ID образца	Ген	Запрос СНП	Мутация СНП
5	HP-50927	IDH2	МУТ R140W
	HP-50928	FGFR3	МУТ G370C
	HP-50936	FGFR3	МУТ S249C
	HP-50942	PIK3CA	МУТ E542K
	HP-50942	FGFR3	МУТ S249C
	HP-50942	KRAS	МУТ G12V
10	HP-50949	FGFR3	МУТ S249C
	HP-51223	FGFR3	МУТ Y373C
	HP-51223	IDH2	МУТ G171D
	HP-51223	PIK3CA	МУТ E545K
	HP-51227	FGFR3	МУТ S249C
	HP-51227	PIK3CA	МУТ E542K
15	HP-51227	IDH2	МУТ G171D
	HP-51930	FGFR3	МУТ K650E
	HP-52710	PIK3CA	МУТ K111E
	HP-52715	FGFR3	ДТ
	HP-52716	FGFR3	ДТ
	HP-52717	PIK3CA	МУТ E545K
20	HP-52724	PIK3CA	МУТ R108H
	HP-52724	VHL	МУТ W117* C162Y Q164*

Иммуногистохимия FGFR3

Иммуногистохимию (ИГХ) выполняли на участке ЗФЗП ткани толщиной 4 мкм с использованием платформы Ventana DISCOVERY® XT Autostainer (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ). Для обнаружения FGFR3, препаративные срезы подвергались предварительной обработке с использованием разбавленного CC1 для демаскирования антигена, с последующим окрашиванием с помощью анти-FGFR3, клон 15C3 (Genentech), первичное антитело разводили до 1 мкг/ мл и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Для амплификации FGFR3 сигнала применяли неконьюгированное кроличье антимышиное линкерное антитело (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) в концентрации 1 мкг/ мл и инкубировали в течение 32 минут при комнатной температуре. Затем использовали набор антикроличьего-OMNIMAP™ с пероксидазой хрена (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ).

Участки контрастно окрашивали гематоксилином, обезвоживали, очищали и закрывали покровной пленкой для просмотра.

Исследования жизнеспособности клеточных линий

Клеточные линии рака мочевого пузыря были получены из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection) (ATCC, Manassas, VA) или из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany).

Клеточные линии были заархивированы на ранних пассажах в клеточный банк Genentech и аутентифицированы либо мультиплексным анализом с коротким tandemным повтором, либо, как описано ранее (O'Brien et al. Clin. Cancer Res. 16(14):3670-3683, 2010). Все клеточные линии поддерживались на среде RPMI 1640 или DMEM, дополненной 10%

эмбриональной телячьей сывороткой (Sigma, St.Louis, MO), заменимыми аминокислотами и 2 ммоль/л L-глутамином.

Эрлотиниб (TARCEVATM) представляет собой селективный и мощный ингибитор EGFR. Детали его структуры, селективности и биологических свойств были описаны ранее (Stamos et al. J.Biol.Chem. 277(48):46265-46272, 2002). Исследования жизнеспособности клеток проводили, как описано ранее (O'Brien et al. Clin. Cancer Res. 16(14):3670-3683, 2010). Клетки высевали в четырех повторностях с плотностью 2500 клеток на лунку в 384-луночные планшеты с нормальной средой для роста и оставляли для прикрепления на ночь. Зависимость «доза-ответ» эрлотиниба определяли путем обработки 10 концентрациями, основанными на серии 3-кратных разведений, начиная с дозы 5 мкМ. Жизнеспособность клеток измеряли спустя 72 часа с использованием анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® Luminescent (Promega, Madison, WI). Жизнеспособность, выраженная в процентах, для каждой концентрации рассчитывалась по сравнению с контролем, обработанным только ДМСО.

Статистические анализы

Для идентификации кластеров образцов тканей (подгрупп) выполнялась неконтролируемая иерархическая кластеризация с использованием Евклидового расстояния и полной связи. Непараметрические тесты Манна-Уитни (см., например, Mann and Whitney, Annals of Mathematical Statistics 18(1):50-60, 1947) и поправки Бонферрони (см., например, Bonferroni, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8:3-62, 1936 и Miller, Simultaneous Statistical Inference, 2nd Ed., Springer Verlag, страницы 6-8, 1981) применяли для дополнительной идентификации дифференциально экспрессируемых генов среди кластеров образцов мочевого пузыря. ВБПЗ определяли как время с момента операции до момента рецидива или смерти. ОВ определяли аналогичным образом как время с момента операции до даты смерти. Результаты выживания подвергали цензорной проверке в последний наблюдаемый момент времени, когда, как известно, пациент был безрецидивным (для ВБПЗ) или живым (для ОВ). Оценки Каплана-Мейера (см., например, Kaplan and Meier, Journal of the American Statistical Association 53(282):457-481, 1958) использовали для оценивания вероятности ВБПЗ и вероятности выживания с течением времени. 3-летнюю и 5-летнюю частоту ВБПЗ и частоту выживаемости также рассчитывали по оценкам кривой ВБПЗ/ ОВ Каплана-Мейера. Для оценки значимости частоты различающихся мутаций между кластерами был выполнен точный тест Фишера. Точный тест Фишера (см., например, Fisher, Journal of the Royal Statistical Society 85(1):87-94, 1922) и двусторонние t-тесты (см., например, Student, Biometrika 6(1):1-25, 1908) были выполнены для указания статистических сравнений.

Пример 2: Разработка изготовленной на заказ микроЖКДстной панели для экспрессии генов рака мочевого пузыря и ее применение для разделения архивных клинических образцов рака мочевого пузыря

В то время как геномные анализы дали ценную информацию о молекулярной основе рака мочевого пузыря, большинство предыдущих исследований основано на использовании замороженных тканей, которые дают высококачественные нуклеиновые кислоты и, как правило, не подходят для характеристики архивных образцов клинических испытаний. Однако, архивные образцы клинических испытаний часто связывают с сопутствующей информацией о лечении, информацией о выживаемости без признаков заболевания (ВБПЗ) и общей выживаемости (ОВ), и другой информацией, которая делает их прекрасной платформой для геномного анализа рака. В данном контексте мы разработали микроЖКДстную панель для экспрессии генов рака

мочевого пузыря, которая оптимизирована для анализа зафиксированных в формалине и залитых парафином тканей. Изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря состоит из 96 генов, которые были выбраны для выявления ключевых признаков биологии рака мочевого пузыря (см. таблицу 1). Изготовленная на заказ

5 панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, которая описана в таблице 1, включает два гена «домашнего хозяйства» для ведения контроля качества и нормализации данных, наряду с 91 уникальным геном, который связан с раком мочевого пузыря (см. фигуру 12А).

Мы оценили способность изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака

10 мочевого пузыря успешно идентифицировать подтипы рака мочевого пузыря в большом общедоступном наборе данных (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012). Сравнение диаграмм анализа главных компонент (АГК), которые основаны на экспрессии 18000 генов из Sjödahl et al. (см. выше), с диаграммами АГК с использованием 82 перекрывающихся генов из изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа

15 рака мочевого пузыря показало сопоставимые картины сегрегации образцов (фигура 2А-2Б). Затем мы провели анализ диагонального линейного дискриминантного анализа (Diagonal Linear Discriminant Analysis) (ДЛДА) (Diaz-Uriarte et al. BMC Bioinformatics 7:3, 2006) для того, чтобы оценить точность нашей панели при правильной классификации рака мочевого пузыря из исследования Sjödahl. Мы обнаружили, что приблизительно

20 200 из 18000 генов из Sjödahl et al. (см. выше) были необходимы для правильной классификации большинства подтипов, полученных в их исследовании, с точностью >80% (фигура 2В). Для сравнения, только лишь 20 генов из панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря правильно классифицировали набор данных Sjödahl с точностью >80% (рисунок 2Г). Это показало, что тщательно подобранные гены на панели

25 захватывают ключевые транскрипционные классы заболевания с высокой степенью точности.

Для подтверждения надежности и воспроизводимости панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря при измерении экспрессии генов в ЗФЗП образцах, мы провели серию экспериментов по контролю качества (фигуры 3А-3Д). Во-первых, мы выполнили 30 серийные разведения для оценки показателей для каждого из 96 анализов, переконструируя анализы, когда это было необходимо, для получения линейных кривых стандартных разведений для всех тестов (фигуры 3А и 3Б). Во-вторых, мы анализировали ряд РНК образцов, полученных из ЗФЗП, и наблюдали высокую согласованность результатов для повторяющихся образцов, которые анализировали в разные дни

35 (фигуры 3В и 3Г; $R^2 > 0,98$). В-третьих, мы отметили высокую степень воспроизводимости данных от чипа к чипу для контрольных образцов РНК, которые мы включили во все семь независимых испытаний (фигура 3Д; $R^2 > 0,92$). В целом результаты нашей качественной и количественной оценок свидетельствуют о том, что изготовленная на 40 заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря обеспечивает надежную и биологически значимую платформу для анализа раков мочевого пузыря, разделяемых по транскрипции генов.

Мы применили изготовленную на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря для анализа серии из 204 ЗФЗП тканей рака мочевого пузыря (см. пример 1 и 45 фигуру 1). Неконтролируемый иерархический анализ данных экспрессии Fluidigm генов выявил пять транскрипционно определенных тканевых кластеров опухолей рака мочевого пузыря, которые были связаны с определенными вероятностями ВБПЗ (фигуры 4А-4Е, фигуры 5А и 5В). Ведущими в тканевой кластеризации были пять основных групп совместно регулируемых генов, которые включали гены сигнальных

путей рецептора тирозин киназы (RTK), такие как члены сигнальных путей фактора роста фибробластов (FGFR) и эпидермального фактора роста (EGF), гены апоптоза, которые включали супрессорный ген опухоли TP53, а также гены эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (фигура 5Б).

- 5 Мы сосредоточили свое внимание на трех основных тканевых кластерах, потому что они включали большинство образцов пациентов, и с этого момента ссылались на них как на зеленую, желтую и красную группы (фигура 4А). Анализ Каплана-Мейера показал, что красная группа была связана с лучшими вероятностями ВБПЗ, чем желтая группа (фигура 4Б; HR=0,54, P=0,03), а в желтой группе были значительно лучшие
- 10 профили ВБПЗ, чем в зеленой группе (фигура 4Б; HR=0,29, P=0,004). Учитывая хорошо наложенную связь между гистологией рака мочевого пузыря и результатами лечения пациентов (Nargund et al. Semin. Oncol. 39(5):559-572, 2012; Resnick et al. Curr.Opin.Oncol. 25(3):281-288, 2013), мы затем исследовали гистопатологические характеристики зеленой, красной и желтой тканевых групп. Мы наблюдали, и это неудивительно, что
- 15 большинство образцов в красной группе, которые были связаны с лучшим профилем ВБПЗ, имели гистологию НМИРМП (фигуры 4Б и 4В, фигуры 6А-Г). Желтая группа включала значительно более высокую долю случаев МИРМП, чем красная группа, а метастатические случаи, которые кластеризованы исключительно в этой группе, не нуждались в контролльном анализе (фигура 4В).

- 20 Неожиданно, что зеленая группа, которая была связана с наихудшими показателями ВБПЗ, почти целиком состояла из образцов типичной неагgressивной гистологии НМИРМП (фигуры 4Б и 4В, фигуры 6А-Г). Неожиданным было наблюдение, которое предполагало, что на изготовленной на заказ панели Fluidigm можно было идентифицировать группу пациентов с быстро рецидивирующими НМИРМП, которые
- 25 могли бы получить пользу от тесного клинического мониторинга и терапевтического вмешательства. Чтобы исключить возможность того, что зеленая группа может представлять агрессивный гистологический вариант, мы провели всестороннее исследование тканей из зеленой, красной и желтой групп (см., например, фигуры 4Г и 4Д). Как и ожидалось, частота случаев преинвазивной микропапиллярной гистологии
- 30 в желтой группе с МИРМП и метастазами была значительно выше по сравнению с красной группой с НМИРМП (фигура 4Г, P=0,0063, фигуры 6А-6Г). Однако, мы не наблюдали статистически значимой разницы частоты случаев микропапиллярной гистологии в агрессивной зеленой группе с НМИРМП по сравнению с красной группой (фигура 4Г, P=0,2351, фигуры 6А-6Г). Мы также исследовали иммунный инфильтрат,
- 35 который, как сообщалось, был связан с клиническими результатами пациентов с раком мочевого пузыря (Otto et al. World J. Urol. 30(6):875-877, 2012), в трех группах тканей и не наблюдали существенной разницы между ними (фигура 4Д). Существенных различий по стадии и степени злокачественности образцов опухоли, которые принадлежали к зеленой и красной группе, не было. Таким образом, зеленая группа, которая определена
- 40 по транскрипции генов, по-видимому, не представляет подтип болезни, который гистологически отличается от красной группы, проявляющей благоприятный результат.

- Далее мы определяли, может ли быстрое рецидивирование болезни, наблюдавшееся в зеленой группе, быть связанным с неадекватным лечением пациентов из этой популяции. Мы исследовали частоту лечения вакциной бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ),
- 45 химиотерапией или лучевой терапией, а также их комбинациями, в трех группах, которые определены по транскрипции генов (фигура 4Е). Лечение получали сопоставимые фракции пациентов (>60%) из красной группы с НМИРМП и инвазивной/метастатической желтой группы (фигура 4Е; P=0,8836). Пациентов из быстро

рецидивирующей зеленой группы с НМИРМП лечили со значительно более высоким процентным показателем, чем пациентов из красной и желтой групп (фигура 4Е, Р<0,0001 для обоих сравнений). Эти результаты показали, что быстрое рецидивирование случаев из зеленой группы не связано с неадекватным адъювантным лечением, и что могут существовать молекулярные стимулы агрессивных опухолей из этого подтипа НМИРМП.

Таким образом, изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря обеспечивает надежную платформу для разделения архивных клинических образцов рака мочевого пузыря. Анализ клинически аннотированного ряда образцов рака мочевого пузыря выявил на данной панели три подтипа рака мочевого пузыря с 10 отличающейся транскрипцией генов, включая зеленую группу с НМИРМП, которая была связана с низкой вероятностью ВБПЗ.

Пример 3: FGFR3 представляет собой гипермутированный и сверхэкспрессированный при быстро рецидивирующих НМИРМП, а его высокая экспрессия в субпопуляции 15 инвазивных и метастатических опухолей связана с неблагоприятными клиническими результатами

Одним из характерных признаков НМИРМП является то, что они несут соматические активирующие мутации в рецепторе 3 фактора роста фибробластов (FGFR3) примерно в 60-70% случаев (van Rhijn et al. J.Pathol. 198(2):245-251; Tomlinson et al. J.Pathol. 213(1): 20 91-98, 2007; Martinez-Torrecuadrada et al. Clin. Cancer Res. 11(17):6280-6290, 2005; Kompier et al. PLoS One 5(11): e13821, 2010; Juanpere et al. Hum. Pathol. 43(10): 1573-1582, 2012; Gust et al. Mol. Cancer Ther. 12(7): 1245-1254, 2013; Cappellen et al. Nat. Genet. 23(1):18-20, 1999; Ah-Ahmadi et al. J.Pathol. 224(2):270-279, 2011). Большинство FGFR3 мутаций представляют собой миссенс-замены во внеклеточном или околомембранных доменах, 25 которые приводят к лиганд-независимой димеризации рецептора и последующей активации (Tomlinson et al., см. выше; Cappellen et al., см. выше). Тот факт, что частота мутаций в FGFR3 снижается до 11-16% при инвазивном и метастатическом заболевании, приводит к неопределенности в отношении того, продолжает ли FGFR3 управлять онкогенезом при прогрессирующем заболевании или его онкогенная роль главным 30 образом ограничивается ранними стадиями развития рака мочевого пузыря (Tomlinson et al., см. выше, Al-Ahmadi et al., см. выше, Qing et al. J. Clin. Invest. 119(5):1216-1229, 2009; Liu et al. Mol. Res. 13(1) 1109-1120, 2014).

Мы оценили мутационный статус FGFR3, используя специальную мультиплексную ПЦР панель, которая уловила подавляющее большинство известных мутаций FGFR3 35 (Schleifman et al. PLoS One 9(3): e90761). Анализ образцов НМИРМП красной группы показал ожидаемую частоту мутаций FGFR3 - приблизительно 60%, а образцы желтой группы с МИРМП и метастазами, как и ожидалось, выявляли значительно меньшую частоту мутаций FGFR - приблизительно 15% (фигура 7А). Сообщалось, что мутации в FGFR3 приводят к более высоким уровням экспрессии FGFR3 (Tomlinson et al., см. выше). Сопоставимо с этими сообщениями мы обнаружили значительно более высокие 40 уровни экспрессии FGFR3 у мутантов по сравнению с образцами дикого типа как на транскрипционном, так и на белковом уровнях (фигуры 7Б и 7В; Р<0,0001 для обоих сравнений). Мы полагали, что наличие высокой частоты мутаций FGFR3 в зеленой группе может быть дополнительным подтверждением того, что он принадлежит подтипу 45 НМИРМП. Действительно, мы наблюдали частые мутации FGFR3 в быстро рецидивирующей зеленой группе с НМИРМП (фигура 7А). Неожиданно, однако, подавляющая часть образцов из зеленой группы имела даже значительно более высокую частоту мутаций в FGFR3, чем частота мутаций, которую наблюдали в красной группе

с НМИРМП (фигуры 7А и 7Г, Р<0,0001). Гипермутация FGFR3 в зеленой группе была связана со значительно более высокой экспрессией FGFR, чем в красной группе с НМИРМП и инвазивной/ метастатической желтой группе, как на транскрипционном (фигура 7Д; Р<0,0001 для обоих сравнений), так и на белковом уровнях (фигура 7Е; Р= 5 0,0343 для зеленой группы против красной и Р<0,0001 для красной группы против желтой).

Описанные выше данные показывают, что гипермутация и сопутствующая сверхэкспрессия экспрессии FGFR3 коррелируют с быстро рецидивирующими НМИРМП. Если FGFR3 продолжает действовать как стимул рака на поздних стадиях заболевания, 10 тогда повышенная экспрессия FGFR3 должна поддерживаться во время развития рака мочевого пузыря по меньшей мере в некоторых случаях. Чтобы определить, так ли это, мы исследовали уровни экспрессии FGFR3 как на уровне РНК, так и на белковом уровне, и обнаружили, что 66% НМИРМП экспрессировали высокие уровни FGFR3, как определено с помощью имmunогистохимии (ИГХ) (фигура 7Ж). Хотя частота 15 встречаемости высокой экспрессии FGFR3 была снижена при МИРМП и метастазах рака мочевого пузыря, более 30% опухолей на этих более прогрессирующих стадиях поддерживали высокие уровни экспрессии FGFR3 (фигура 7Ж, баллы ИГХ 2+/3+), в соответствии с продолжающейся потребностью в FGFR3 при прогрессирующем заболевании.

20 В общем массиве рака мочевого пузыря в нашем исследовании мы наблюдали благоприятные вероятности выживаемости, ВБПЗ и ОВ, для случаев с высокой экспрессией FGFR3, что соответствует ранее опубликованным сообщениям (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012; Dyrskjot et al. Nat. Genet. 33(1):90-96, 2003; Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010). Неожиданно, однако, высокая экспрессия FGFR3 как в 25 МИРМП, так и в метастатическом окружении была связана с уменьшенной 3- и 5-летней вероятностью ВБПЗ (фигура 7З). Кроме того, высокая экспрессия FGFR3 при прогрессирующем заболевании (МИРМП и метастатическом раке мочевого пузыря) в нашей серии образцов была связана с уменьшенными показателями 3- и 5-летней ОВ (фигура 7И). Чтобы проверить эти наблюдения, мы исследовали несколько наборов 30 данных общего пользования, которые предоставляли данные как по экспрессии FGFR3, так и ОВ (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012; Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010). Хотя высокие уровни FGFR3 давали хороший прогноз для полной популяции в этих двух исследованиях, аналогично наблюдениям в нашем наборе данных, мы 35 отметили, из исследования Kim et al., см. выше, значительно худшие показатели ОВ для инвазивного/ метастатического рака мочевого пузыря при высоких уровнях экспрессии FGFR3 по сравнению с низкими уровнями, что обеспечивает независимое подтверждение наших результатов (фигура 7К). Мы также наблюдали тенденцию к ухудшению ОВ в опухолях на прогрессирующих стадиях с высоким уровнем FGFR3 против низкого из исследования Sjödahl et al. (см. выше).

40 Взятые в совокупности, эти данные подтверждают роль FGFR3 в качестве стимула для быстро рецидивирующих НМИРМП, а также в качестве провоцирующего фактора для агрессивного заболевания в инвазивном (МИРМП) и метастатическом окружениях. Несколько исследований продемонстрировали, что ингибирование FGFR3 подавляет рост опухолей с высоким уровнем экспрессии FGFR3 в мочевом пузыре *in vitro* и *in vivo* 45 (Martinez-Torrecuadrada et al. Clin. Cancer Res. 11(17):6280-6290, 2005; Gust et al. Mol. Cancer Ther. 12(7): 1245-1254, 2013; Qing et al. J. Clin. Invest. 119(5):1216-1229, 2009; Gomez-Roman et al. Clin. Cancer Res. 11(2 Pt 1):459-465, 2005; Lamont et al. Br.J.Cancer 104(1) 75-82, 2011, Tomlinson et al. Oncogene 26(40):5889-5899, 2007). Таким образом, пациенты с высоким

риском рака мочевого пузыря (например, пациенты с быстро рецидивирующими НМИРМП, МИРМП или метастатическим раком мочевого пузыря), при раковых заболеваниях которых FGFR3 экспрессируется на высоком уровне, представляют собой подходящих кандидатов для лечения антагонистами FGFR3.

⁵ Пример 4: Супрессор опухолей TP53 является мутированным и сверхэкспрессируется в быстро рецидивирующих НМИРМП

Изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря выявила агрессивную субпопуляцию НМИРМП, определенную по транскрипции. Сравнительный анализ экспрессии показал, что 45 из 96 генов (47%) были существенно дифференциально экспрессируемыми между быстро рецидивирующими НМИРМП зеленой группы и более доброкачественным НМИРМП красной группы ($P<0,05$ с коррекцией нескольких тестов). Дифференциально экспрессируемые гены принадлежали к сигнальному пути FGFR3, как описано ранее, а также к сигнальным путям супрессора опухолей TP53, онкогена В эритробластоза птиц (ERBB), эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы В (PI3K - АКТ) (фигура 8).

Для дальнейшей характеристики на мутационном уровне наших образцов, мы провели анализ СНП (Tsongalis et al. Clin. Chem. Lab. Med. 52(5):707-714, 2014). Как и ожидалось, данные СНП подтвердили наличие мутаций в FGFR3, описанных ранее и представленных на фигуре 7А, (фигура 9А, таблица 3). Кроме того, анализ СНП выявил мутации в нескольких других генах, включая TP53, PIK3CA, KRAS, VHL, EGFR, PTEN и IDH2, среди прочих (фигура 9А, таблица 3). Сообщалось о мутациях в TP53 при инвазивном и метастатическом раке мочевого пузыря и в меньшей степени при поверхностном заболевании (George et al. J. Clin. Oncol. 25(34):5352-5358, 2007). Мы отметили наличие мутаций TP53 в инвазивной/ метастатической желтой группе и в нескольких случаях в красной группе с НМИРМП (фигура 9А). Неожиданно, однако, мы наблюдали высокую частоту мутаций в TP53 в быстро рецидивирующей зеленой группе с НМИРМП (фигура 9А). Во всех случаях, за исключением трех, мутации, картированы на ДНК-связывающем домене TP53, и мутационные сайты TP53 в каждой из желтой, красной и зеленой групп были чаще всего неперекрывающимися (фигура 9Б).

Мы предположили, что мутации в TP53 могут способствовать неблагоприятным показателям ВБПЗ, которые наблюдаются в зеленой группе. В соответствии с этим, мы отмечали значительно большую частоту мутаций в TP53 при НМИРМП в быстро рецидивирующей зеленой группе по сравнению с красной группой, но статистически не отличающуюся от такой, которую наблюдали в инвазивной/ метастатической желтой группе (фигура 9В; $P=0,03$ и $P=0,3605$, соответственно). Уровни экспрессии TP53 также были значительно выше в зеленой, чем в красной и желтой группах (фигура 9Г; $P=0,0187$ и $P=0,002$, соответственно). Уровни экспрессии p21, транскрипционной мишени TP53, также были значительно выше в зеленой группе по сравнению с двумя другими, что дополнительно подтверждает увеличение уровней экспрессии TP53 (фигура 9Д; $P<0,0001$ для обоих сравнений). Мы наблюдали значительно более высокие уровни белка TP53 в мутантных образцах по сравнению с образцами дикого типа из массива исследования (фигура 9Е; $P=0,0201$). Эти данные показывают, что ген TP53 является мутированным и предпочтительно сверхэкспрессируется в быстро рецидивирующих НМИРМП зеленой группы.

Затем мы определили клиническое влияние сверхэкспрессии TP53 в нашей группе пациентов. Мы обнаружили, что в нашей общей популяции рака мочевого пузыря опухоли с высокими уровнями экспрессии TP53 имели тенденцию к более благоприятному профилю ВБПЗ, чем опухоли с низкими уровнями экспрессии (фигура

9Ж; P=0,4218). Интересно, что эта взаимосвязь между высокой экспрессией TP53 и лучшими вероятностями ВБПЗ была изменена в противоположном направлении, когда мы рассматривали экспрессию TP53 в группе НМИРМП отдельно от других групп (фигура 93). Мы обнаружили, что повышенные уровни супрессора опухолей в группе 5 НМИРМП способствуют худшему, хотя и статистически не достоверному, показателю ВБПЗ по сравнению со случаями с низкой экспрессией (фигура 93; HR=1,99, P=0,1292). Было показано, что TP53 признак связан с резистентностью к химиотерапии при инвазивном раке мочевого пузыря (Choi et al. Cancer Cell 25(2):152-165, 2014). В субпопуляции НМИРМП из массива нашего исследования высокая экспрессия TP53 10 была связана со значительно худшей ВБПЗ у пациентов, которых лечили с помощью БЦЖ; это лечение, которое обычно применяется для пациентов с раком мочевого пузыря (фигура 9И; HR=4,2, P=0,0405). Однако, эту связь между высокой экспрессией TP53 и неблагоприятной ВБПЗ при НМИРМП не наблюдали у нелеченых пациентов (то есть у пациентов, не получавших ранее лечение) (фигура 9К; HR=0,57, P=0,5749). 15 Наши данные свидетельствуют о том, что высокая частота мутации TP53 может способствовать агрессивному поведению опухоли у пациента с НМИРМП, и что это может быть вызвано отчасти малоэффективным лечением с помощью БЦЖ этой популяции пациентов.

Пример 5: Высокая экспрессия EGFR связана с неблагоприятными клиническими 20 результатами и обеспечивает чувствительность к эрлотинибу в клеточных линиях рака мочевого пузыря

Сообщалось о наличии мутаций в ERBB2 в опухолях с агрессивной микропапиллярной гистологией (Ross et al. Clin Cancer Res. 20(1):68-75, 2014). В нашем массиве пациентов мы не обнаружили мутаций в ERBB2; однако, мы идентифицировали мутации в EGFR 25 в опухолях из быстро рецидивирующей зеленой группы с НМИРМП, но не обнаружили в опухолях из более доброкачественной поверхностной красной группы или из инвазивной/ метастатической желтой группы (фигура 3А). Мы провели более углубленный геномный анализ лигандов и рецепторов семейства ERBB для изучения потенциальной роли этого сигнально пути в качестве стимула для рака мочевого пузыря 30 (фигура 10). Мы наблюдали увеличение числа копий EGFR в 2 из 39 (~5%) и ERBB2 в 1 из 39 (~10%) образцов из желтой группы, а также увеличение числа копий ERBB2 в 1 из 30 (~3%) образцов из красной группы (фигура 10). Эти результаты согласуются с предыдущими сообщениями (Weinstein et al. Nature 507(7492):315-322, 2014; Capellen et al. Nat. Genet. 23(1):18-20, 1999) и указывают на то, что данный сигнальный путь может 35 участвовать в канцерогенезе мочевого пузыря.

Хотя мы не обнаружили изменений числа копий ДНК у членов семейства ERBB при 40 быстро рецидивирующих НМИРМП, анализ данных Fluidigm показал, что уровни экспрессии EGFR были значительно выше в быстро рецидивирующей зеленой группе с НМИРМП по сравнению как с более доброкачественной красной группой с НМИРМП, так и с образцами из инвазивной/ метастатической желтой группы (фигура 11А; P=0,012 и P=0,0012, соответственно). Чтобы исследовать возможность того, что EGFR может способствовать по меньшей мере отчасти агрессивному поведению рака мочевого пузыря при НМИРМП, мы исследовали вероятности ВБПЗ у пациентов с 45 высокими уровнями экспрессии EGFR в опухоли в противопоставление пациентам с низкими уровнями экспрессии. В неинвазивном окружении пациенты с НМИРМП, которые экспрессировали высокие уровни EGFR, демонстрировали сниженные показатели 3- и 5-летней ВБПЗ по сравнению с пациентами, которые имели низкую экспрессию данного гена в злокачественных новообразованиях (фигура 11Б). В

прогрессирующем метастатическом окружении высокие уровни экспрессии EGFR также были связаны с уменьшенными вероятностями 3- и 5-летней ВБПЗ (фигура 11В). Кроме того, высокая экспрессия EGFR у пациентов из нашего массива с метастатическим заболеванием была связана с неблагоприятными 3- и 5-летними показателями ОВ по сравнению с показателями в случаях с низкой экспрессией (фигура 11Г).

Для подтверждения этих результатов мы оценили прогностическое значение уровней экспрессии EGFR в двух независимых наборах данных (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18 (12):3377-3386, 2012; Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010). В инвазивных/ метастатических случаях из этих двух исследований мы наблюдали, что высокая экспрессия EGFR

сопровождалась снижением вероятностью ОВ, как для 3-летнего, так для 5-летнего контрольных периодов наблюдения (фигура 11Д и 11Е). Таким образом, данные из нашего массива, а также данные двух независимых исследований, свидетельствуют в пользу того, что высокая экспрессия EGFR может способствовать по меньшей мере отчасти агрессивному поведению раковых заболеваний мочевого пузыря.

Для оценки уровней экспрессии EGFR в качестве прогностического биомаркера для ответа на анти-EGFR терапию при раке мочевого пузыря мы скринировали панель клеточных линий рака мочевого пузыря на чувствительность к низкомолекулярному ингибитору EGFR - эрлотинибу (Stamos et al. J. Biol. Chem. 277(48):46265-46272, 2002). Клеточные линии UMUC-5, UMUC-10 и UMUC-17 проявляли различную степень

чувствительности к эрлотинибу, начиная от >75% ингибирования роста (ИР) для UMUC-5 до приблизительно 40% ИР для UMUC-17 (фигура 11Ж). С другой стороны, четыре клеточные линии (RT-112, UMUC-3, SW780 и BFTC905) демонстрировали минимальное ИР в ответ на лечение эрлотинибом (фигура 11Ж). Затем мы исследовали уровни экспрессии EGFR в наших клеточных линиях. Клеточные линии, которые были

чувствительны (>25% ИР), экспрессировали значительно более высокие уровни EGFR по сравнению с нечувствительными клеточными линиями рака мочевого пузыря (минимальное ИР<25%) (фигура 11З; P=0,0106). Эти результаты показывают, что уровень экспрессии EGFR при раке мочевого пузыря предсказывает его чувствительность к ингибиторам сигнального пути EGFR (например, эрлотинибу).

Пример 6: Изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря точно классифицирует образцы рака мочевого пузыря в базальных и люминальных подтипах

В этом примере описывается дополнительная разработка и проверка *in silico* изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря для транскрипционного анализа рака мочевого пузыря, включая архивные ЗФЗП клинические образцы рака мочевого пузыря. Как описано в примерах 1 и 2, гены панели включают компоненты сигнальных путей рецепторной тирозинкиназы (RTK), такие как FGFR, ERBB, MET, PI3K/AKT и MAPK сигнальные пути; гены клеточного цикла и стабильности генома, такие как TP53; а также гены, которые участвуют в регуляции дифференцировки и развития клеток и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (фигура 12А).

In silico, мы оценили способность изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря (см. таблицу 1) выявлять ключевые молекулярные и гистологические признаки образцов из большого набора данных общего пользования (Sjödahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012). Неконтролируемая иерархическая кластеризация образцов, основанная на экспрессии 125 зондов, которые соответствуют генам в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, выявила две основные ветви (фигура 12Б). Левая ветвь была обогащена опухолями с

низкой степенью злокачественности (G1/G2), раками Т1 стадии и молекулярным классом MS1, как определено Sjödahl et al. (см. выше) (фигура 12Б). В правой ветви мы отметили преобладание G3/G4 опухолей и обогащение Т3/Т4 злокачественными опухолями, кокластеризацию MS2a класса рака мочевого пузыря и косегрегацию MS2b опухолей из определенного Sjödahl молекулярного подтипа (фигура 12Б).

Далее мы вычислили долю ошибок неверного классифицирования для степени злокачественности опухоли, TNM стадии и транскрипционных классов, как определено Sjödahl et al. (см. выше), с использованием либо всех 24394 наборов зондов Illumina, либо с использованием 125 наборов зондов, которые перекрываются с содержанием изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, и определили прогностические возможности уменьшающихся субпопуляций генов при использовании в центроидном классификаторе и оценили путем перекрестной проверки (Tibshirani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6567-6572, 2002) (фигура 12В). Мы обнаружили сопоставимые доли ошибок неверного классифицирования, которые составляли приблизительно 40% для степени злокачественности опухоли и TNM стадии, а частота ошибок неверного классифицирования для классов MS1, MS2a и MS2b составляла приблизительно 20% (фигура 12В). Аналогичное увеличение долей ошибок неверного классифицирования наблюдали для обоих случаев при уменьшении числа зондов (фигура 12 В). Эти результаты позволяют предположить, что гены в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря выявляют молекулярные классы с высокой степенью точности, а также степени злокачественности опухоли и TNM стадии, с аналогичной эффективностью как и при использовании всего содержимого микрочипа Illumina, который использовали в Sjödahl et al. (см. выше).

Учитывая биологическую и клиническую значимость недавно описанных базальных и люминальных подтипов рака мочевого пузыря (Damrauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:3110-3115, 2014; Choi et al. PLoS One 7:e30206, 2012), мы исследовали возможность изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря распознавать эти две молекулярные подгруппы в нескольких наборах данных общего пользования. Используя базальные/ люминальные распределения, определенные Damrauer et al. (см. выше) и Choi et al. (Cancer Cell 25:152-165, 2014) в их исследованных и проверочных массивах, мы использовали неконтролируемый подход к иерархическим выборкам кластеров, который основан на экспрессии зондов, которые соответствуют генам на панели Fluidigm рака мочевого пузыря (фигура 12Г). Этот подход правильно классифицировал 39 из 44 (80%) люминальных и 42 из 47 (89%) базальных образцов из Sjödahl et al. (см. выше) набора данных, и 10 из 12 (83%) люминальных и 17 из 18 (94%) базальных опухолей из массива Kim (Kim et al. Molecular Cancer 9:3, 2010) (фигура 12Г). Кроме того, данный подход точно классифицировал препараты из набора исследования Damrauer (Damrauer et al., см. выше) в люминальные и базальные подтипы в 33 из 33 (100%) и 23 из 28 (82%) случаях, соответственно (фигура 12Г). И, наконец, гены в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря могли правильно классифицировать образцы, которые основаны на люминальном и базальном статусе, из набора данных исследования Choi (Choi et al., 2012, см. выше) в 23 из 24 (96%) и 23 из 23 (100%) случаях, соответственно. Подводя итог, результаты этого анализа *in silico* демонстрируют, что тщательно подобранные гены в изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря точно обнаруживают базальный/ люминальный статус в четырех наборах данных общего пользования.

Для оценки надежности панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря и воспроизводимости при измерении экспрессии генов в ЗФЗП образцах, мы провели

серию экспериментов по контролю качества. Во-первых, мы провели серийные разведения для оценки эффективности каждого из анализов, переконструируя праймеры, когда это было необходимо, для получения линейных кривых стандартных разведений для всех тестов (фигура 13А). Также мы анализировали ряд РНК образцов, полученных из ЗФЗП, и наблюдали высокую согласованность в нормализированной экспрессии каждого гена на панели для повторяющихся образцов, которые анализировали в разные дни (фигура 13Б, R^2 диапазон = 0,98-0,99). Наконец, мы отметили высокую степень воспроизводимости данных от чипа к чипу для универсальной контрольной РНК человека, которая была включена в каждый из семи независимых прогонов (фигура 10 3Д, R^2 , диапазон = 0,91-0,98).

В целом результаты нашей качественной и количественной оценки свидетельствуют о том, что изготовленная на заказ панель Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря представляет собой технически надежную и может быть использована для анализа 15 ЗФЗП тканей рака мочевого пузыря, разделяемых по транскрипции генов. Чтобы дополнительно продемонстрировать практичность изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря для характеристики транскрипции генов в 20 ЗФЗП тканях, мы проанализировали ряд из 204 образцов, которые состояли из первичных НМИРМП, МИРМП, а также МЕТ в лимфатические узлы и дистальных 25 МЕТ, которые описаны ранее в примере 1 и таблице 1. Мы исследовали насколько эти образцы сопоставимы с образцами из нескольких наборов данных общего пользования по базальным/ люминальным транскрипционным признакам. Как и ожидалось, неконтролируемая иерархическая кластеризация выборок из четырех наборов данных общего пользования (Damrauer et al., 2014, см. выше; Kim et al., 2010, см. выше; Sjödahl 30 et al., 2012, см. выше; и Choi et al., 2014, см. выше) с использованием центрированной по медиане экспрессией зондов, которые соответствовали генам на нашей панели, выявила четкое разделение базальных и люминальных образцов (фигура 14А). Примечательно, что люминальные образцы у Kim кластеризовали с базальными образцами из трех других наборов данных и, таким образом, они имели резко выделяющиеся значения в 35 этом анализе (фигура 14А). Мы наблюдали, что НМИРМП в массиве рака мочевого пузыря, которые описаны в примере 1 и на фигуре 1, были кластеризованы с люминальными образцами, тогда как МИРМП и МЕТ оказались более базальными и были кластеризованы вместе с базальными образцами из наборов данных общего 40 пользования (фигура 14А).

Затем, для дополнительной оценки базальных/ люминальных (Б/ Л) 45 транскрипционных признаков 204 ЗФЗП образцов, которые описаны в примере 1 и на фигуре 1, мы ввели способ расчета баллов Б/ Л сходства для каждой из этих опухолей. Во-первых, мы центрировали по медиане экспрессию всех зондов, которые соответствовали генам на изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, в наборах данных общего пользования и вычисляли среднее значение экспрессии генов в базальных и люминальных группах, как определено в Damrauer et al. (см. выше) и Choi et al. (см. выше) (фигура 14Б). Это позволило нам получить усредненное представление об экспрессии каждого из этих генов в люминальной и базальной группах из наборов данных общего пользования (фигура 14Б и 14В).

Например, FGFR3 имеет самое высокое среднее значение экспрессии в люминальных образцах в сравнении с любым другим геном на нашей панели, а средний уровень экспрессии FGFR3 был одним из самых низких в базальных образцах из наборов данных общего пользования (фигура 14Б). Затем мы определили балл сходства Б/ Л для каждого ЗФЗП образца, путем вычисления корреляции с общедоступными базальными и

люминальными профилями (фигура 14В).

Неконтролируемая иерархическая кластеризация 204 ЗФЗП образцов, которые

описаны в примере 1 и на фигуре 1, показала две основные ветви с различными картинами экспрессии генов: 1) в правой ветви были кокластеризованы образцы с

5 низкими баллами Б/Л сходства (люминальноподобные); а 2) в левая ветвь состояла из образцов с высокими Б/Л баллами (базальноподобные) (фигура 15А). Статистический анализ подтвердил достоверно сниженный В/П балл в левой ветви, которая указывает на люминальный статус, и значительно более высокий Б/Л балл, который соответствует базальному статусу в правой части иерархического дерева (фигура 15Б, вверху слева).

10 Мы наблюдали значительно более высокую долю НМИРМП в люминальной группе по сравнению с базальной (фигура 15Б, вверху справа). МИРМП были представлены как в базальных, так и в люминальных группах; однако, значительно большое относительное содержание МИРМП наблюдали в базальной группе (фигура 15Б).

15 Интересно, что почти все МЕТ кластеризованы в базальной части иерархического дерева, это предполагает, что большинство МЕТ в массиве рака мочевого пузыря,

15 которые описаны в примере 1 и на фигуре 1, имеют базальный транскрипционный профиль (фигуры 15А и 15В).

Как описано ранее, одним из характерных признаков НМИРМП является то, что они несут соматические активирующие мутации в FGFR3 примерно в 60-80% случаев,

20 а частота мутаций при МИРМП и МЕТ, как сообщалось, намного ниже - примерно 15%. Мы оценили мутационный статус FGFR3 и других генов, имеющих отношение к раку, в образцах из массива с использованием изготовленной на заказ аллель-

специфичной ПЦР панелью (Schleifman et al., см. выше; Tomlinson et al., см. выше; van Rhijn et al., см. выше; Martinez-Torrecuadrada et al., см. выше; Cappellen et al., см. выше,

25 1999; и Al-Ahmadi et al., см. выше). Как ожидалось, мы обнаружили, что примерно 75% опухолей кокластеризованы с люминальной пометкой, это значительно более высокая доля, чем примерно 20%, которые наблюдали в образцах из базальной группы (фигуры 15А и 15Г). Сообщалось, что мутации в FGFR3 приводят к более высоким уровням экспрессии FGFR3 белка. Сопоставимо с этими сообщениями мы отметили

30 значительно более высокие уровни белка FGFR3, измеренные с помощью ИГХ, в образцах из люминальной группы по сравнению с образцами в базальной группе (фигуры 15А и 15Г). Данные о мутациях и об экспрессии FGFR3 обеспечивают молекулярное подтверждение люминального и базального статуса наших образцов.

Помимо транскрипционных Б/Л характеристик, мы оценили практичность 35 изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря при измерении экспрессии генов, которые принадлежат к сигнальным путям, которые, как известно, участвуют в канцерогенезе мочевого пузыря, таким как TP53 сигнальный путь, PI3K/AKT сигнальный путь, ERK/MAPK сигнальный путь и компоненты сигнального пути клеточного цикла. Мы использовали скорректированные р-значения

40 перестановок для контроля тестирования множественных гипотез, идентифицировали 49 из 91 уникальных генов, которые были существенно дифференциально экспрессируемыми между базальными и люминальными группами (таблица 4), и картировали эти гены по сигнальным путям с использованием программного обеспечения INGENUITY® (фигура 15Е).

45

Таблица 4: Гены дифференциаль но экспрессируемые между базальными и люминальными группами

Ген	индекс	Необраб отанное P значени е	Скоррек тирован ное значени е P	Среднее значение люминаль ного гена	Среднек вадратич еское отклонен ие люминал ьного ген а	Среднее значение базально го гена	Среднекв адратиче ское отклонен ие базально го гена
ACVRL1	4,470992	1,00E-04	6,00E-04	-0,377392	0,897960	0,202966	0,850912
ADAM12	10,714632	1,00E-04	1,00E-04	-1,007148	1,132818	1,073608	1,529736
ARAF	-5,315843	1,00E-04	2,00E-04	0,187836	0,418587	-0,159546	0,472994
AXL	7,402348	1,00E-04	1,00E-04	-0,568450	0,864129	0,468449	1,052838
BCL2	3,327797	0,0012	0,0392	-0,599461	2,561637	0,476490	1,529934
BMP2	-5,506106	1,00E-04	2,00E-04	0,511055	1,388453	-0,842703	1,982201
BMX	3,869332	3,00E-04	0,007	-0,365686	1,125407	0,432270	1,699462
CCND1	-6,648141	1,00E-04	1,00E-04	0,614065	1,302003	-0,828593	1,671470
CDH1	-6,186010	1,00E-04	1,00E-04	0,308209	0,626927	-0,554378	1,255825
CDH2	6,767331	1,00E-04	1,00E-04	-0,902216	1,477841	0,789598	1,949093
CDKN1A	-6,302967	1,00E-04	1,00E-04	0,379429	0,948515	-0,569761	1,10934
CXCL1	6,101031	1,00E-04	1,00E-04	-3,427841	5,233372	0,556695	2,950078
DUSP1	8,894016	1,00E-04	1,00E-04	-0,569185	1,050108	1,194473	1,662705
DUSP6	-4,465429	1,00E-04	6,00E-04	0,417010	1,107095	-0,372185	1,309016
ERBB3	-6,987278	1,00E-04	1,00E-04	0,389256	0,766742	-0,753400	1,450475
FGF1	4,885552	1,00E-04	3,00E-04	-0,540165	1,013078	0,318677	1,397265

30

35

40

45

	FGF10	7,953402	1,00E-04	1,00E-04	-2,155413	2,835254	0,693114	1,700124
5	FGF2	4,811158	1,00E-04	3,00E-04	-0,573742	1,578183	0,416837	1,088209
	FGF7	10,092045	1,00E-04	1,00E-04	-3,061246	3,278922	1,283664	2,317224
	FGFR1	9,680571	1,00E-04	1,00E-04	-0,951231	1,204470	0,572352	0,835639
	FGFR2	-4,331482	2,00E-04	0,0013	0,297819	0,883154	-0,529580	1,703266
	FGFR3	-8,404252	1,00E-04	1,00E-04	0,839686	1,482499	-1,598363	2,478029
10	FN1	8,759580	1,00E-04	1,00E-04	-1,026195	1,398537	0,927437	1,650205
	GATA3	-5,228866	1,00E-04	2,00E-04	0,302732	1,061456	-0,922919	2,105784
	HPSE	7,679572	1,00E-04	1,00E-04	-0,715992	1,228429	0,728751	1,332539
	JAG1	-4,036317	1,00E-04	0,0034	0,255673	0,778658	-0,289823	1,074384
	KDR	-4,325874	1,00E-04	0,0013	0,258180	0,953954	-0,394809	1,108172
15	MET	-5,005419	1,00E-04	2,00E-04	0,255420	0,616484	-0,350746	1,036428
	MMP9	8,924212	1,00E-04	1,00E-04	-2,041185	2,736507	1,112735	1,811595
	NF1	-6,641973	1,00E-04	1,00E-04	0,227033	0,418262	-0,248162	0,562626
	NOTCH1	-4,467071	1,00E-04	6,00E-04	0,330623	0,996084	-0,296385	0,882330
20	PIK3CB	-4,982987	1,00E-04	3,00E-04	0,202197	0,59353	-0,158992	0,530615
	PIK3IP1	-4,399226	1,00E-04	0,001	0,217791	0,743936	-0,333888	0,974954
	POU5F1	-4,881466	1,00E-04	3,00E-04	0,432596	0,827815	-0,253551	1,099119
	RB1	-4,511634	1,00E-04	6,00E-04	0,433954	0,990320	-0,250475	1,074869
25	S1PR1	3,347376	8,00E-04	0,0368	-0,936400	2,098207	0,115313	2,164647
	SMO	4,108037	2,00E-04	0,0029	-0,570215	1,316376	0,232323	1,330061
	SNAI1	9,720121	1,00E-04	1,00E-04	-0,738706	0,826979	0,693255	1,192486
	SPHK1	9,390921	1,00E-04	1,00E-04	-1,073262	1,331036	0,798386	1,373050
30	SRC	-8,409151	1,00E-04	1,00E-04	0,440559	0,616653	-0,588228	1,052038
	TIMP1	5,789346	1,00E-04	1,00E-04	-0,440995	0,777238	0,424382	1,265678
	TIMP2	7,997448	1,00E-04	1,00E-04	-0,693068	0,994608	0,562759	1,150134
	TP53	-6,756884	1,00E-04	1,00E-04	0,283202	0,585345	-0,359823	0,717235
	TP63	-9,036731	1,00E-04	1,00E-04	0,541066	1,058843	-1,725567	2,304475
35	TP73	-3,264090	0,0014	0,0477	0,355626	1,529634	-0,413410	1,679960
	TSC1	-4,289175	1,00E-04	0,0015	0,239069	0,686542	-0,196540	0,688436
	ZEB1	6,681040	1,00E-04	1,00E-04	-0,451146	0,807057	0,310871	0,720614
	ZEB2	9,851331	1,00E-04	1,00E-04	-0,718784	0,956315	0,632488	0,888236

Сигнальные пути, которые показали значительный балл активации в люминальных опухолях, включали сигнальные пути NF-кВ, TP53, ERK/MAP, G1/S контрольную точку клеточного цикла, HGF и VEGF (фигура 15Е). С другой стороны, сигнальные пути, 40 которые были значительно активированы в базальной группе, включали сигнальные пути PTEN, PI3K/AKT, церамида и регуляции клеточного цикла (фигура 15Е). Анализ активации вышерасположенных компонентов сигнального пути с использованием программного обеспечения INGENUITY® также показал, что образцы, которые принадлежат к люминальной группе, имеют профиль экспрессии, сопоставимый с активацией эстрогенового рецептора (ER), включая высокие уровни FGFR3, GATA3, CCND1 и ERBB3, низкие уровни AXL1, CXCL1, FGFR1 и BCL2, а также низкие уровни экспрессии генов ЭМП, таких как SNAI1 и ZEB1 (фигура 17А). В противоположность, 45 образцы, которые принадлежали к базальной группе, демонстрировали

противоположные профили экспрессии для данных генов (фигура 17Б). Эти результаты демонстрируют, что наша панель является информативной для измерения транскрипционного статуса сигнальных путей, которые относятся к раку мочевого пузыря, в ЗФЗП тканях.

- 5 Исторически гистопатологические признаки первичного рака мочевого пузыря влияли на принятие клинических решений в отношении пациентов с раком мочевого пузыря. С более глубоким пониманием генетических стимулов раковых заболеваний мочевого пузыря, проложены новые пути для терапевтического вмешательства, которое основывается на молекулярных признаках болезни. Однако, молекулярные
 10 характеристики первичных опухолей часто используются для управления клиническими решениями с помощью целевых агентов, даже для препаратов, которые разработаны в метастатическом окружении. Чтобы начать рассмотрение вопроса о том, являются ли ключевые молекулярные признаки первичных опухолей репрезентативными признаками для метастазирующего рака мочевого пузыря на транскрипционном уровне, мы
 15 сравнили Б/Л баллы 9 сопоставимых пар первичная опухоль - МЕТ от одних и тех же пациентов. Сначала мы исследовали данные секвенирования нового поколения (СНП) и обнаружили, что варианты всех 9 пар первичная опухоль - метастазы хорошо коррелировали, что подтвердило, что сопоставимые опухоли действительно были у тех же пациентов (фигуры 16А и 18). Корреляционный анализ между Б/Л баллами
 20 первичных опухолей и сопоставимыми МЕТ показал, что 5 из 9 пар имели почти идентичные Б/Л баллы, а 2 из 9 пар демонстрировали незначительные различия в своих Б/Л статусах (фигуры 17А и 17Б). Интересно, что мы наблюдали значительное изменение в Б/Л баллах в 2 из 9 случаях, оба из которых характеризовались как такие, которые имеют люминальные первичные опухоли и базальные МЕТ (фигуры 17А и
 25 17Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что Б/Л статус первичной опухоли не всегда отражает то, что наблюдается при метастатических поражениях, и указывает на то, что молекулярная характеристика метастазов рака мочевого пузыря может быть оправдана для более точного управления решениями касательно лечения в клинике.

Дополнительные материалы и методы для примера 6

30 Анализ общедоступных наборов данных

Для того, чтобы убедится в прогностической способности изготовленной на заказ панели генов Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, использовали несколько наборов данных общего пользования для выявления стадии, степени злокачественности опухоли и ключевых транскрипционных признаков болезни, таких как базальный/люминальный статус. Данные по экспрессии генов человека НТ-12 V3.0 Sjödahl Illumina (Sjödahl et al. 2012, см. выше) был загружены с веб-сайта Gene Expression Omnibus (GEO) (ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE32894). Данные экспрессии были нормализованы с

- использованием медианной обработки (Tukey et al. Exploratory Data Analysis, Addison-Wesley, издательство 1977). Для определения группирования образцов применяли анализ 40 неконтролируемой иерархической кластеризации с использованием среднего сцепления, 1 - коэффициента корреляционного расстояния Пирсона, и была использована указанная степень злокачественности образца опухоли, ТМН стадия и молекулярный класс (Sjödahl et al. 2012, см. выше). Оценивалась возможность 91 уникального гена на изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря для правильной 45 идентификации, степени злокачественности опухоли, ТМН стадия и молекулярный класс определяли с использованием метода центроидного классификатора. Кривые перекрестно-проверенных ошибок неверного классификации были созданы с использованием библиотеки PAMR R (Tibshirani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6567-

6572, 2002), с использованием всего чипа или соответствующей субпопуляции из 125 зондов из набора данных по экспрессии Sjödahl et al. (см. выше). Возможность генов на изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря определять базальноподобные и люминальноподобные образцы посредством транскрипционного профилирования оценивалась по четырем литературным наборам данных (GSE32894, GSE5287, GSE13507, GSE48075).

Базальные или люминальные классификации, сделанные по этим данным общего пользования, были такими, как описано Damrauer et al. (см. выше). Вкратце, Damrauer et al. (см. выше) исследованные образцы (N=30, чип Affymetrix Human Genome U133A) были загружены из NCBI Gene Expression Omnibus (GSE5287). Использовались зондовые наборы Affymetrix, которые соответствуют генам на изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря. Затем оставшуюся субпопуляцию логарифмически преобразованных данных по экспрессии было центрировано по среднему значению и нормализовано по единичной дисперсии. Затем вычисляли средние значения экспрессии генов для 91 уникального гена в 12 образцах, классифицированных как люминальноподобные, и 18 образцах, классифицированных как базальноподобные (классификации получили по соответствуанию авторам) для получения базальных и люминальных профилей экспрессии. Этот процесс повторяли для трех других наборов данных общего пользования (GSE32894, GSE13507, GSE48075).

20 Опухоли

В экспериментах, которые описаны в данном примере, использовали коллекцию из 204 зафиксированных в формалине и залитых парафином (ЗФЗП) образцов опухолей мочевого пузыря, как описано в примере 1. РНК и ДНК экстрагировали из макроскопически препарированных образцов, как описано в примере 1.

25 Анализ экспрессии ЗФЗП опухолей с помощью Fluidigm

Анализ экспрессии генов проводили по РНК, полученной из ЗФЗП макроскопически препарированных образцов, с использованием набора High Pure FFPE RNA Micro (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) после депарафинизации с помощью ENVIRENE®, как описано ранее (O'Brien et al. Clin. Cancer Res. 16:3670-3683, 2010). Анализ экспрессии генов 96 уникальных транскриптов мРНК из генов, которые относятся к раку мочевого пузыря, проводили на препаратах пациентов, начиная со 100 нг общей РНК, которую подвергали обратной транскрипции для получения кДНК, и предварительно амплифицировали в одной реакции с использованием Superscript III/ Platinum Таq и реакционной смеси для предварительной амплификации (Invitrogen, Carlsbad, CA). Все 96 наборов праймеров/ зондов Taqman были включены в реакцию предварительной амплификации при 0,05-кратном окончательном разведении от начальной концентрации TAQMAN® анализа (Applied Biosystems, Foster City, CA). Условия термоциклирования были следующими: 1 цикл при 50°C в течение 15 мин, 1 цикл при 70°C в течение 2 мин, 14 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 4 мин. Предварительно амплифициированную кДНК разбавляли в 2 раза и затем амплифицировали с использованием TAQMAN® Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA) на платформе BIOMARK™ BMK-M-96.96 (Fluidigm, South San Francisco, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Все образцы были проанализированы трижды. Значения порогового цикла (ПЦ) были преобразованы в относительную экспрессию с использованием способа ΔПЦ (O'Brien et al., см. выше), где ΔПЦ было средним значением целевого гена за вычетом геометрического среднего значения контрольных генов, вычисленных для соответствующего препарата пациента. Для генов, которые оценивали по изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого пузыря, значения порогового цикла

(ПЦ) были нормализованы с использованием медианной обработки (Tukey et al., см. выше). Иерархическую кластеризацию дифференциально экспрессируемых генов проводили на нормализованных данных способом среднего сцепления, с использованием 1 - коэффициента корреляционного расстояния Пирсона, и далее визуализировали с использованием R.

Мутационный анализ

Мутационные анализы проводили на геномной ДНК, экстрагированной из макроскопически препарированных тканей ЗФЗП, с использованием набора QIAamp FFPE (Qiagen, Valencia, CA) после депарафинизации с помощью ENVIRENE® (Lindgren et al. PLoS One 7:e38863, 2012). Мутации в PIK3CA, EGFR, KRAS, NRAS, HRAS, FGFR3, MET, BRAF, KIT, AKT1, FLT3 были обнаружены с использованием мутационно-специфической количественной ПЦР, как описано ранее (Schliefman et al. PLoS One 9: e88401, 2014).

Иммуногистохимия

Иммуногистохимию проводили как описано в примере 1.

Расчет баллов базального/ люминального сходства, анализ сопоставимых первичных опухолей и метастазов и статистический анализ

Баллы базального/ люминального сходства для образцов из 204 ЗФЗП образцов из массива рака мочевого пузыря, которые описаны в примере 1, определяли с помощью 20 первой производной базального/ люминального профилей экспрессии из набора данных общего пользования из исследования Damrauer et al., как описано ранее (Damrauer et al., см. выше). Затем были определены базальные и люминальные корреляции Пирсона между каждым профилем и каждым центрированным по среднему значению и нормализованным по единичной дисперсии ЗФЗП образцом. Эти две оценки корреляции 25 были объединены, чтобы получить общий балл Б/ Л сходства: Балл Б/ Л = (корреляция базального профиля - корреляция люминального профиля)/ 2,0. Шкала Б/ Л баллов находилась в диапазоне от +1,0 до -1,0: баллы выше нуля указывали на базальноподобный образец, а баллы ниже нуля указывали на люминальноподобный образец. Аналогичным образом баллы Б/ Л сходства вычисляли сходным образом для 30 9 сопоставимых первичных и метастазирующих образцов. Для подтверждения того, что соответствующие образцы были взяты у одних и тех же пациентов, было проведено секвенирование нового поколения (СНП) с использованием ION AMPLISEQ™ Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA) в соответствии с рекомендациями производителя (Tsangalis et al. CCLM/FESCC 52:707-714, 2014), и корреляция Пирсона 35 рассчитывали путем сравнения частоты аллелей на всех вариационных сайтах, где оба образца имели по меньшей мере 100-кратное охватывание считывания, и по меньшей мере один образец имел аллельную частота >10% (в среднем 120 сайтов сравнивались между любыми двумя образцами). Вероятность того, что первичные - метастазирующие образцы были несопоставимыми, была найдена путем сравнения их корреляционных 40 оценок с 3500 корреляциями случайных пар образцов. Различия в Б/Л баллах между первичными и сопоставимыми метастазами сравнивались с ожидаемыми различиями из-за типичной системной ошибки. Оценка системной ошибки была достигнута путем отбора генов из изготовленной на заказ панели Fluidigm для анализа рака мочевого 45 пузыря с заменой случайно отобранных образцов и перерасчета Б/ Л баллов при 100000 перестановок. Для оценки значимости частоты различающихся мутаций между кластерами был выполнен точный тест Фишера. Точный тест Фишера и двусторонние t-тесты использовали для всех других статистических сравнений.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110>	ДЖЕНЕНТЕК, ИНК.	
<120>	ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ДЛЯ РАКА МОЧЕВОГО	
<130>	50474-105WO2	
<150>	US 62/096,741	
<i>5</i>	<151> 2014-12-24	
	<160> 51	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
<i>10</i>	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 1	
<i>15</i>	ctggctgcag acccggtcct	20
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 2	
	aggtgtgttg tgtggatcag	20
	<210> 3	
<i>25</i>	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
<i>30</i>	<400> 3	
	ccgcacatcatc tgagctagg	19
	<210> 4	
	<211> 15	
	<212> DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 4	
	tgcacacacctg gatcc	15
<i>40</i>	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
	<400> 5	
	cctgtggatg actgagtacc tgaa	24
	<210> 6	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	6	
	gggccgtaca gttccacaaa	20
	<210> 7	
	<211> 16	
<i>10</i>	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 7	
<i>15</i>	aggctgggta ggtgca	16
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 8	
	acctgcacac ctggatcca	19
	<210> 9	
<i>25</i>	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
<i>30</i>	<400> 9	
	gcccagactc acatcaccaa	20
	<210> 10	
	<211> 14	
	<212> DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Synthetic Construct	
	<400> 10	
	cggctgggat actt	14
<i>40</i>	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
	<400> 11	
	aatgaccacc tagagcattg ga	22
	<210> 12	

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	12	
	ctcggctgct gcattgttc	19
<210>	13	
<211>	14	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	13	
<i>15</i>	agaggcagat tctg	14
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	14	
	cactcccgct tggaaagaa	19
<210>	15	
<i>25</i>	<211> 20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 15	
	cctggcaata ttccggatga	20
<210>	16	
<211>	16	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	16	
	tttggaccgg aggctg	16
<i>40</i>	<210> 17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	17	
	gagtgtcagc cccagaatgg	20
<210>	18	

<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	18	
	gtgggcacag gccacaca	18
<210>	19	
<211>	20	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	19	
<i>15</i>	ttagcgcccg ccgtcttgag	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	20	
	gacggcacac cctacgttac	20
<210>	21	
<i>25</i>	<211> 20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 21	
	tctagtcct tgtcgggtgg	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	22	
	cgtcccgctc cgacacattg	20
<i>40</i>	<210> 23	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	23	
	ctcaagtccct ggatcagtga ga	22
<210>	24	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	24	
	ggtggctcga cagaggtact	20
<210>	25	
<211>	14	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	25	
<i>15</i>	cctcgggaga tgac	14
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	26	
	acttcagtgt gcgggtgaca	20
<210>	27	
<i>25</i>	<211> 18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 27	
	cctcgtcctc cccgtctt	18
<210>	28	
<211>	15	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	28	
	tgtctgcctg caatc	15
<i>40</i>	<210> 29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	29	
	cgggacatgg actcaacaga	20
<210>	30	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	30	
	tgcactattt gggaaaacct tgt	23
<210>	31	
<211>	20	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	31	
<i>15</i>	tctgcatgcc cggtacgag	20
<210>	32	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	32	
	cacctgcctg gaccagat	18
<210>	33	
<i>25</i>	<211> 20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 33	
	gtctgtgttg acctcgagt	20
<210>	34	
<211>	21	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	34	
	ttcgacactc ttcaaggctg a	21
<i>40</i>	<210> 35	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	35	
	ccctgctcat caactaggaa acc	23
<210>	36	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	36	
	caattcaacc acagtggcct ttt	23
<210>	37	
<211>	14	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	37	
<i>15</i>	tggaggcagct tcct	14
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	38	
	ggctcgagac cagctcatct a	21
<210>	39	
<i>25</i>	<211> 25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 39	
	gagatctgcc tcaatgaata aatcc	25
<210>	40	
<211>	17	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	40	
	cagatagcga tggtctg	17
<i>40</i>	<210> 41	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	41	
	gctgccccca ccatgag	17
<210>	42	

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>5</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	42	
	ccttccactc ggataagatg ct	22
<210>	43	
<211>	15	
<i>10</i>	<212> DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	43	
<i>15</i>	acctggacgt attcc	15
<210>	44	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<i>20</i>	<220>	
<223> Synthetic Construct		
<400>	44	
	gtcgagcacc gccaaagt	18
<210>	45	
<i>25</i>	<211> 25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<i>30</i>	<400> 45	
	gcaatttggc agtagagttt cttca	25
<210>	46	
<211>	14	
<212>	DNA	
<i>35</i>	<213> Artificial Sequence	
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400>	46	
	ctggacgtac tccc	14
<i>40</i>	<210> 47	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<i>45</i>	<223> Synthetic Construct	
<400>	47	
	ccagcacggc caagtca	17
<210>	48	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
5 <223>	Synthetic Construct	
<400>	48	
	cttggcgatc tggcagtaga g	21
<210>	49	
<211>	18	
10 <212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic Construct	
<400>	49	
15 agaagaggc tggagagc		18
<210>	50	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
20 <220>		
<223>	Synthetic Construct	
<400>	50	
	cctgcacgtg tcccaactg	19
<210>	51	
25 <211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic Construct	
30 <400>	51	
	ggcacacgtg cttcttcttg	20

(57) Формула изобретения

1. Способ диагностики рака мочевого пузыря у пациента, включающий следующие

35 этапы:

а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента; и

б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, причем 40 увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня указывает на то, что пациент страдает раком мочевого пузыря.

2. Способ по п. 1, который дополнительно включает (в) информирование пациента о том, что у него рак мочевого пузыря.

45 3. Способ по п. 2, который дополнительно включает (г) выбор противораковой терапии для лечения указанного пациента, когда обнаружено увеличение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента относительно контрольного уровня.

4. Способ по п. 3, который дополнительно включает (д) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии.
5. Способ по п. 3 или 4, где противораковая терапия включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR.
- ⁵ 6. Способ по п. 5, где противораковая терапия включает антагонист FGFR3 и антагонист EGFR.
7. Способ по п. 5 или 6, где антагонист FGFR3, антагонист EGFR или антагонист TP53 представляет собой антитело или его функциональный фрагмент.
- ¹⁰ 8. Способ по п. 7, где антагонист FGFR3 представляет собой антитело против FGFR3 или его функциональный фрагмент.
9. Способ по п. 7, где антагонист EGFR представляет собой антитело против EGFR или его функциональный фрагмент.
10. Способ по п. 7, где антагонист TP53 представляет собой антитело против TP53 или его функциональный фрагмент.
- ¹⁵ 11. Способ по п. 5 или 6, где антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR представляет собой низкомолекулярный антагонист.
12. Способ по п. 11, где антагонист FGFR3 или антагонист EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы.
13. Способ по п. 12, где антагонист EGFR представляет собой эрлотиниб (²⁰ TARCEVA™).
14. Способ по любому из пп. 5-13, где противораковая терапия дополнительно включает: (i) агент, выбранный из группы, которая состоит из антинеопластического агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, и цитотоксического агента, (ii) лучевую терапию или (iii) их комбинацию.
- ²⁵ 15. Способ по любому из пп. 1-14, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения мРНК.
16. Способ по п. 15, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).
17. Способ по п. 16, где ПЦР анализ представляет собой количественный ПЦР анализ.
- ³⁰ 18. Способ по любому из пп. 1-14, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения белка.
19. Способ по п. 18, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода.
20. Способ по любому из пп. 1-19, где образец, полученный от пациента, представляет собой образец опухоли.
- ⁴⁰ 21. Способ по п. 20, где образец опухоли представляет собой зафиксированный в формалине и залитый парафином (ЗФЗП) образец опухоли.
22. Способ по любому из пп. 1-21, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере двух из этих генов.
23. Способ по п. 22, который дополнительно включает определение уровня экспрессии ⁴⁵ всех трех из этих генов.
24. Способ по любому из пп. 1-23, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 2 раза относительно контрольного уровня.
25. Способ по п. 24, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный

по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

27. Способ по п. 26, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный

⁵ по меньшей мере в 8 раз относительно контрольного уровня.

28. Способ по любому из пп. 1-27, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, которая состоит из DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1,
¹⁰ MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 и FGF2, в образце, полученном от пациента, при этом уровень экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена изменяется относительно контрольного уровня по меньшей мере одного дополнительного гена.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где рак мочевого пузыря представляет собой

¹⁵ немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (НМИРМП), мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (МИРМП) или метастатический рак мочевого пузыря.

30. Способ по п. 29, где НМИРМП представляет собой рецидивирующий НМИРМП.

31. Способ прогноза пациента, который страдает раком мочевого пузыря, включающий:

²⁰ а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента;

б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контролльным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена; и

²⁵ в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня.

32. Способ по п. 31, где прогноз представляет собой прогноз выживаемости.

33. Способ по п. 31 или 32, где способ проводят до введения пациенту противораковой терапии.

³⁰ 34. Способ по любому из пп. 31-33, который дополнительно включает (г) определение пациента, на которого применение противораковой терапии, вероятно, окажет положительный эффект, когда у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости.

³⁵ 35. Способ по п. 34, который дополнительно включает (д) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии, если у пациента определен неблагоприятный прогноз выживаемости.

36. Способ по любому из пп. 31-35, где выживаемость представляет собой выживаемость без признаков заболевания или общую выживаемость.

37. Способ по любому из пп. 33-36, где противораковая терапия включает антагонист
⁴⁰ FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR.

38. Способ по п. 37, где противораковая терапия включает антагонист FGFR3 и антагонист EGFR.

39. Способ по п. 37 или 38, где антагонист FGFR3, антагонист EGFR или антагонист TP53 представляет собой антитело или его функциональный фрагмент.

⁴⁵ 40. Способ по п. 39, где антагонист FGFR3 представляет собой антитело против FGFR3 или его функциональный фрагмент.

41. Способ по п. 39, где антагонист EGFR представляет собой антитело против EGFR или его функциональный фрагмент.

42. Способ по п. 39, где антагонист TP53 представляет собой антитело против TP53 или его функциональный фрагмент.

43. Способ по п. 37 или 38, где антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR представляет собой низкомолекулярный антагонист.

⁵ 44. Способ по п. 43, где антагонист FGFR3 или антагонист EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

45. Способ по п. 44, где антагонист EGFR представляет собой эрлотиниб (TARCEVATM).

¹⁰ 46. Способ по любому из пп. 33-45, где противораковая терапия дополнительно включает: (i) агент, выбранный из группы, которая состоит из антинеопластического агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, и цитотоксического агента, (ii) лучевую терапию или (iii) их комбинацию.

¹⁵ 47. Способ по любому из пп. 31-46, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения мРНК.

48. Способ по п. 47, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

²⁰ 49. Способ по п. 48, где ПЦР анализ представляет собой количественный ПЦР анализ.

50. Способ по любому из пп. 31-49, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения белка.

²⁵ 51. Способ по п. 50, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода.

52. Способ по любому из пп. 31-51, где образец, полученный от пациента, представляет собой образец опухоли.

³⁰ 53. Способ по п. 52, где образец опухоли представляет собой зафиксированный в формалине и залитый парафином (ЗФЗП) образец опухоли.

54. Способ по любому из пп. 31-53, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере двух из этих генов.

55. Способ по п. 54, который дополнительно включает определение уровня экспрессии всех трех из этих генов.

³⁵ 56. Способ по любому из пп. 31-55, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 2 раза относительно контрольного уровня.

57. Способ по п. 56, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

⁴⁰ 58. Способ по любому из пп. 31-57, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

59. Способ по п. 58, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 8 раз относительно контрольного уровня.

⁴⁵ 60. Способ по любому из пп. 31-59, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, которая состоит из DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1, MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 и FGF2, в образце, полученном от пациента, при этом уровень экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена изменяется относительно контрольного

уровня по меньшей мере одного дополнительного гена.

61. Способ по любому из пп. 31-60, где рак мочевого пузыря представляет собой НМИРМП, МИРМП или метастатический рак мочевого пузыря.

62. Способ по п. 61, где НМИРМП представляет собой рецидивирующий НМИРМП.

5 63. Способ прогноза пациента, который страдает НМИРМП, включающий:

а) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного из следующих генов: FGFR3, TP53 и EGFR, в образце, полученном от пациента;

б) сравнение уровня экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена с контрольным уровнем по меньшей мере одного вышеупомянутого гена, и

10 в) определение прогноза пациента, причем отмечается неблагоприятный прогноз, если уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце пациента повышен относительно контрольного уровня.

64. Способ по п. 63, который дополнительно включает (г) введение пациенту терапевтически эффективного количества противораковой терапии.

15 65. Способ по п. 63 или 64, где противораковая терапия включает антагонист FGFR3, антагонист TP53 и/или антагонист EGFR.

66. Способ по п. 65, где противораковая терапия включает антагонист FGFR3 и антагонист EGFR.

67. Способ по п. 65 или 66, где антагонист FGFR3, антагонист EGFR или антагонист

20 TP53 представляет собой антитело или его функциональный фрагмент.

68. Способ по п. 67, где антагонист FGFR3 представляет собой антитело против FGFR3 или его функциональный фрагмент.

69. Способ по п. 67, где антагонист EGFR представляет собой антитело против EGFR или его функциональный фрагмент.

25 70. Способ по п. 67, где антагонист TP53 представляет собой антитело против TP53 или его функциональный фрагмент.

71. Способ по п. 65 или 66, где антагонист FGFR3, антагонист TP53 или антагонист EGFR представляет собой низкомолекулярный антагонист.

72. Способ по п. 71, где антагонист FGFR3 или антагонист EGFR представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

30 73. Способ по п. 71, где антагонист EGFR представляет собой эрлотиниб (TARCEVATM).

74. Способ по любому из пп. 65-73, где противораковая терапия дополнительно включает: (i) агент, выбранный из группы, которая состоит из антинеопластического агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, и цитотоксического агента, (ii) лучевую терапию или (iii) их комбинацию.

75. Способ по любому из пп. 63-74, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения мРНК.

40 76. Способ по п. 75, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

77. Способ по п. 76, где ПЦР анализ представляет собой количественный ПЦР анализ.

78. Способ по любому из пп. 63-74, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют путем измерения белка.

45 79. Способ по п. 78, где уровень экспрессии по меньшей мере одного вышеупомянутого гена в образце, полученном от пациента, определяют с помощью

имmunогистохимического (ИГХ) метода.

80. Способ по любому из пп. 63-79, где образец, полученный от пациента, представляет собой образец опухоли.

81. Способ по п. 80, где образец опухоли представляет собой зафиксированный в

⁵ формалине и залитый парафином (ЗФЗП) образец опухоли.

82. Способ по любому из пп. 1-81, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере двух из этих генов.

83. Способ по п. 82, который дополнительно включает определение уровня экспрессии всех трех из этих генов.

¹⁰ 84. Способ по любому из пп. 63-83, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 2 раза относительно контрольного уровня.

85. Способ по п. 84, где уровень экспрессии FGFR3 был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

¹⁵ 86. Способ по любому из пп. 63-85, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 4 раза относительно контрольного уровня.

87. Способ по п. 86, где уровень экспрессии EGFR был определен как повышенный по меньшей мере в 8 раз относительно контрольного уровня.

²⁰ 88. Способ по любому из пп. 63-87, который дополнительно включает определение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена, выбранного из группы, которая состоит из DUSB3, FRS2, TSC1, ERBB3, CDKN1A, CCND1, TP63, MMP2, ZEB2, PIK3CB, PIK3R1, MDM2, SNAI2, AXL, ZEB1, BCL2B, TSC2, RB1, FGFR32, PIK3IP1, MTOR, PIK3CA, PTEN, AKT1, BCL2A, FRS3, ERBB2, FGFR31, FGF1, SNAI1, FGFR34, FGF9 и FGF2, в образце, полученном от пациента, при этом уровень экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена изменяется относительно контрольного

²⁵ уровня по меньшей мере одного дополнительного гена.

89. Способ любому из пп. 63-88, где НМИРМП представляет собой рецидивирующий НМИРМП.

30

35

40

45

	Число	Процент
Общее число образцов = 204		
Во время диагноза	65	
Медиана	35 - 91	
Диапазон		
Среднеквадр. отклонение	11.51	
Мужской	164	79%
Женский	43	21%
Первичный рак мочевого пузыря (T0-T4)	154	75.5%
Немыично-инвазивный (T0, T1, Tis)	93	45.5%
Мышечно-инвазивный (T2, T3)	61	30.0%
Метастатический рак мочевого пузыря (T4)	53	26.0%
Лимфатические узлы	45	22.0%
Отдаленные места		
	8	4.0%

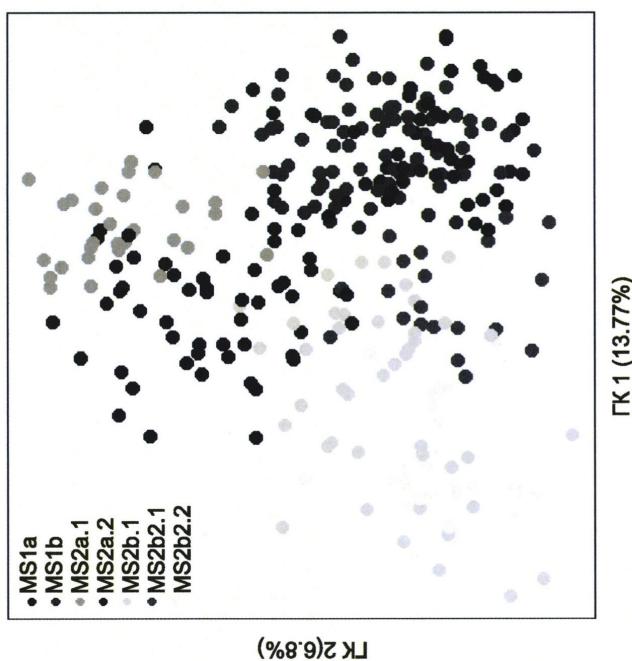
	Число	Цензорная провержка (%)	Медиана (года)
Все пациенты	142	50	4.6
Первичный рак мочевого пузыря	102	66	НД*
Метастатический рак мочевого пузыря	40	10	0.9
Без места			
Все пациенты	142	78	НД*
Первичный рак мочевого пузыря	102	100	НД*
Метастатический рак мочевого пузыря	40	23	1.3

* НД: не достигнута

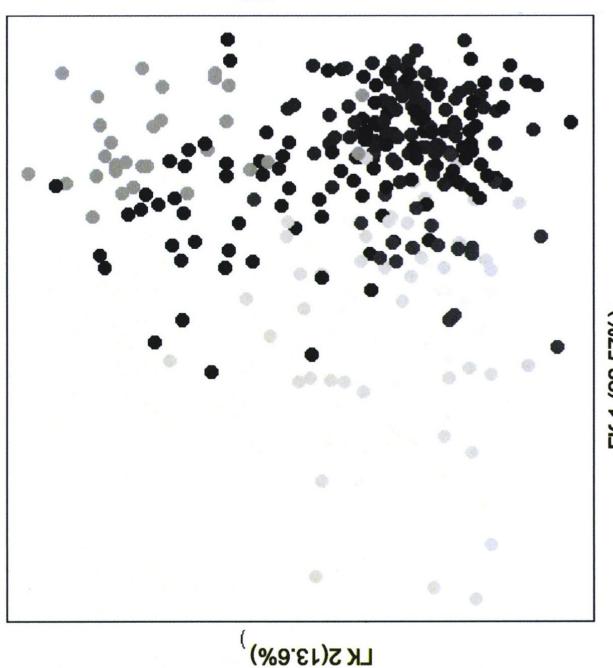
Фигура 1

2/56

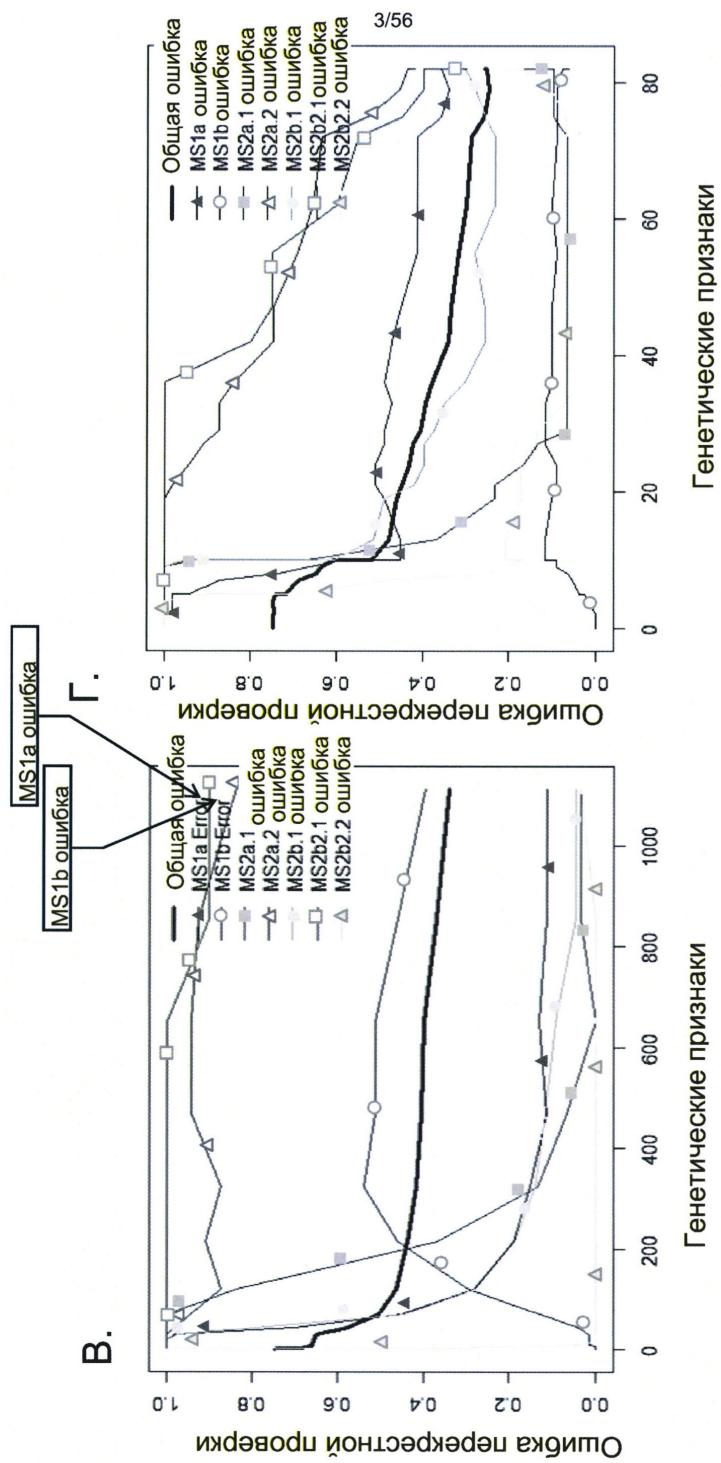
Б.



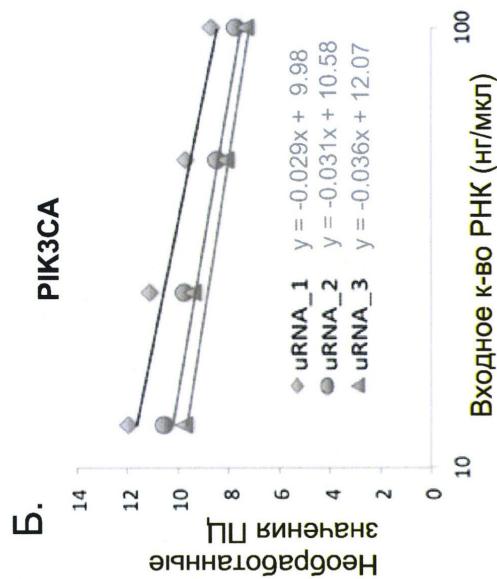
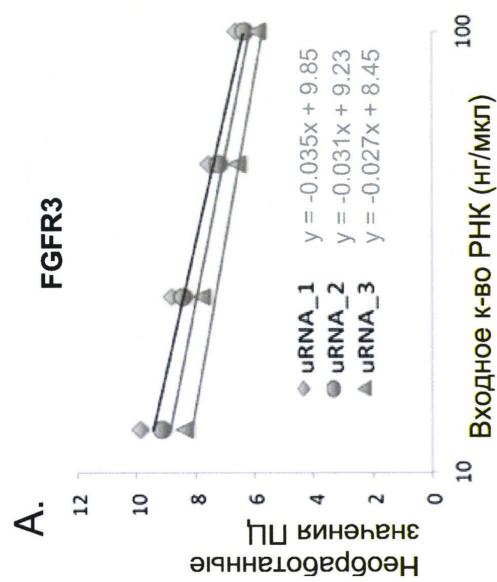
Фигуры 2А-2Б



Фигуры 2В-2Г



Фигуры 3А-3Б

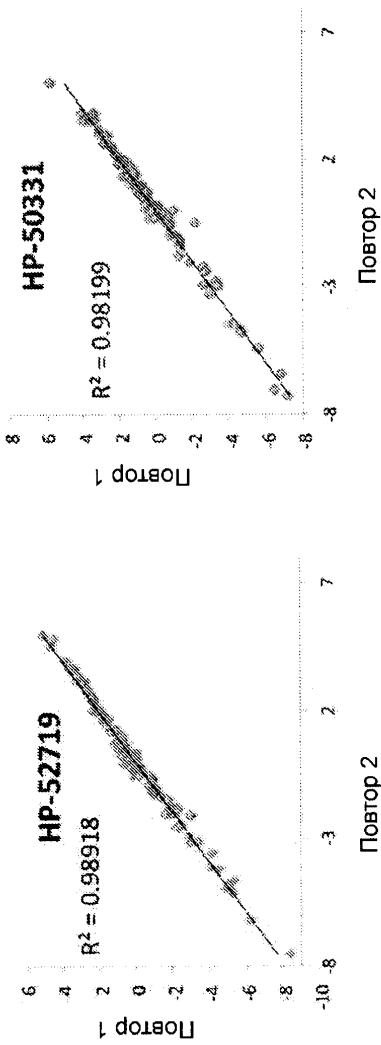


5/56

Фигуры 3В-3Г

B.

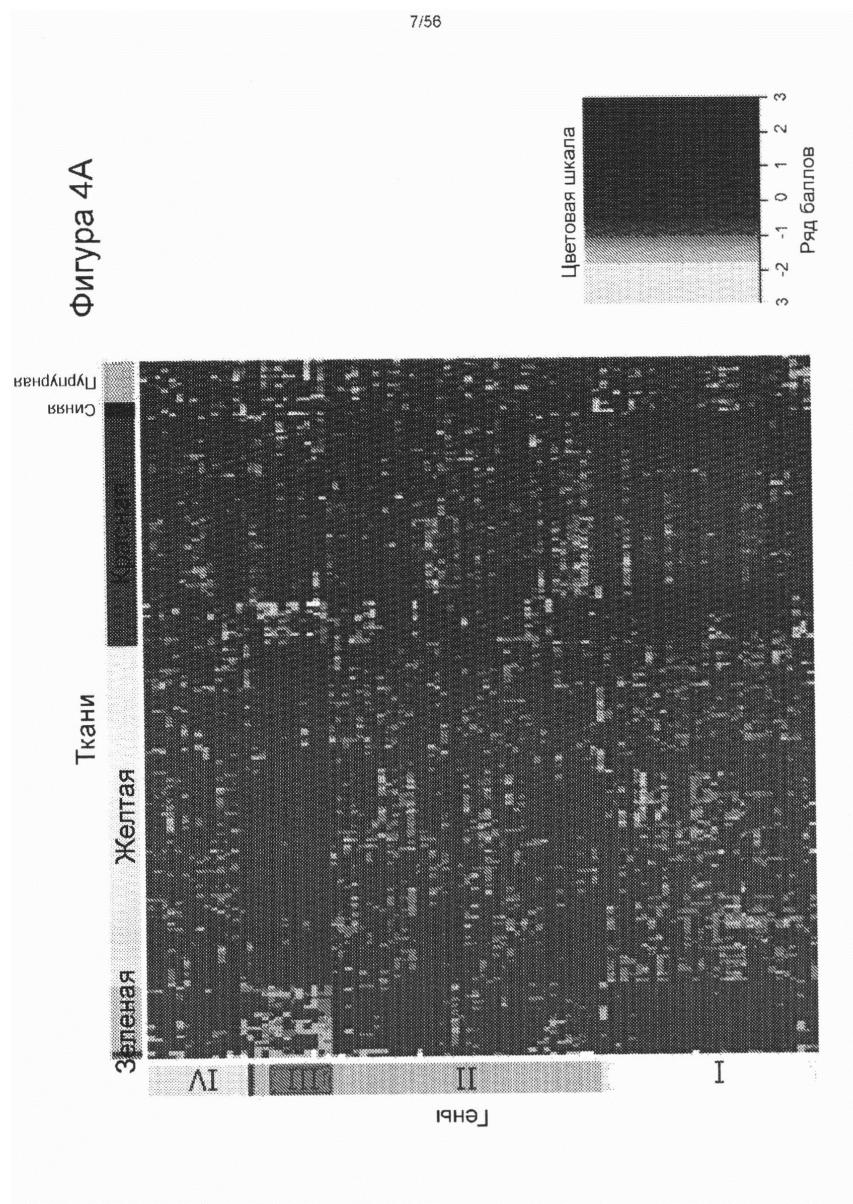
Г.

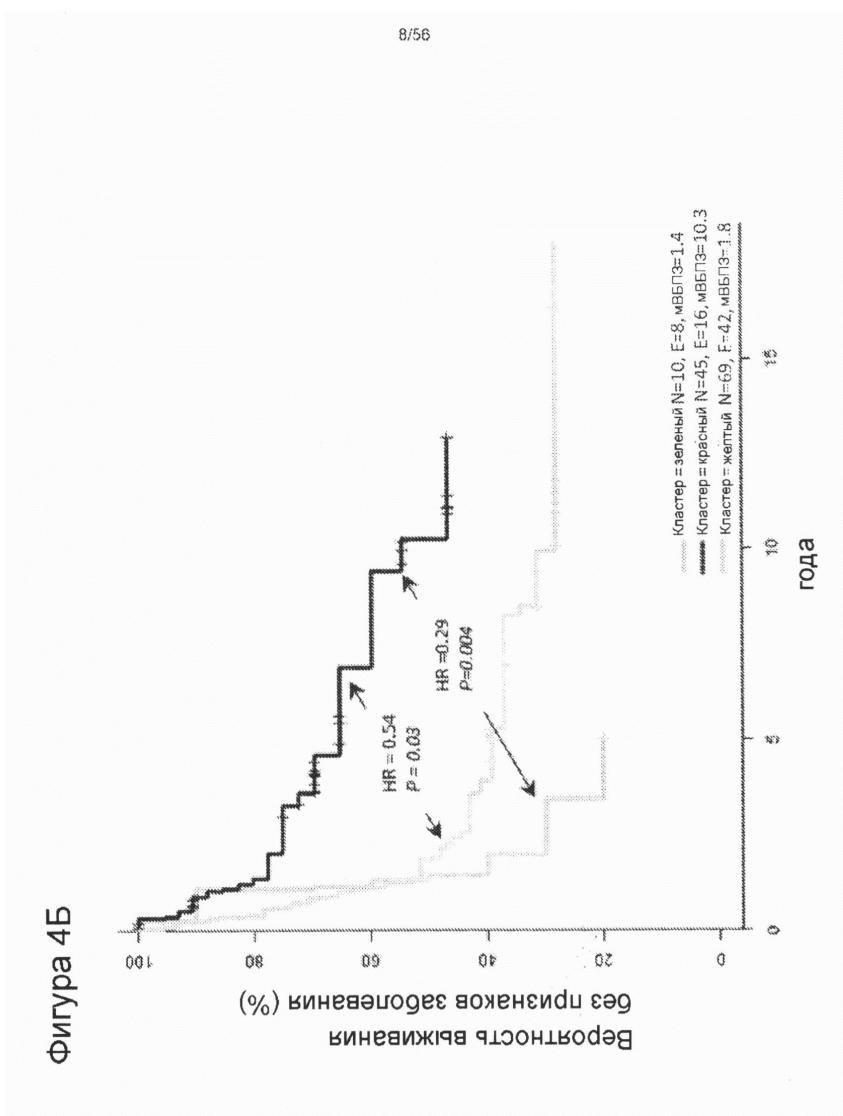


Чип.1								
0.92	Чип.2							
0.91	0.98	Чип.3						
0.91	0.94	0.93	Чип.4					
0.94	0.98	0.98	0.95	Чип.5				
0.96	0.96	0.96	0.94	0.98	Чип.6			
0.98	0.96	0.96	0.92	0.98	0.98	Чип.7		

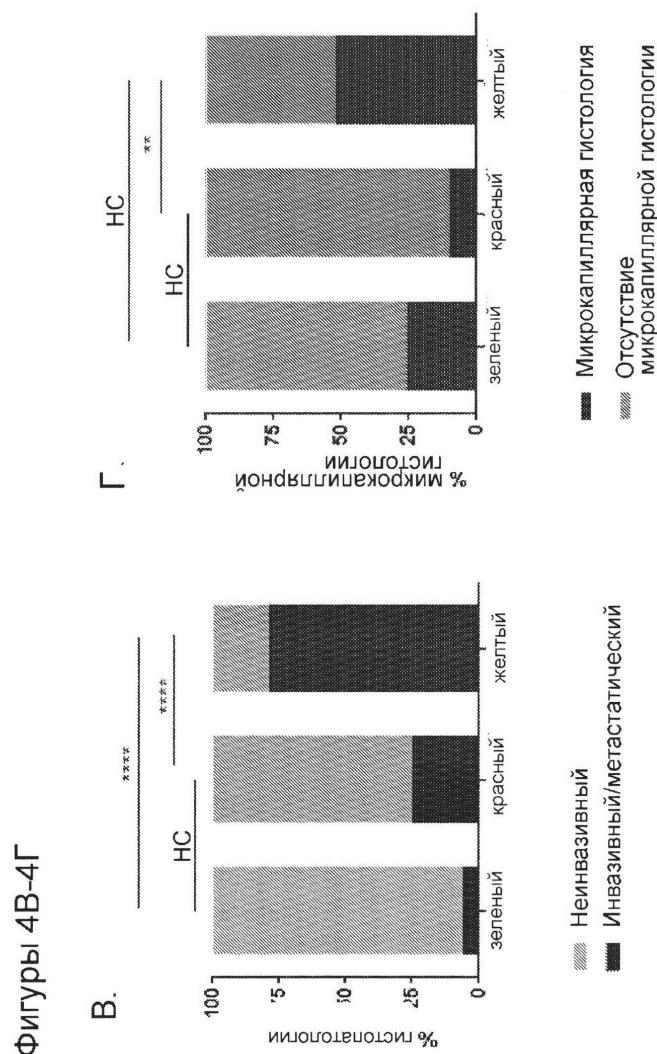
Фигура 3Л

7/56

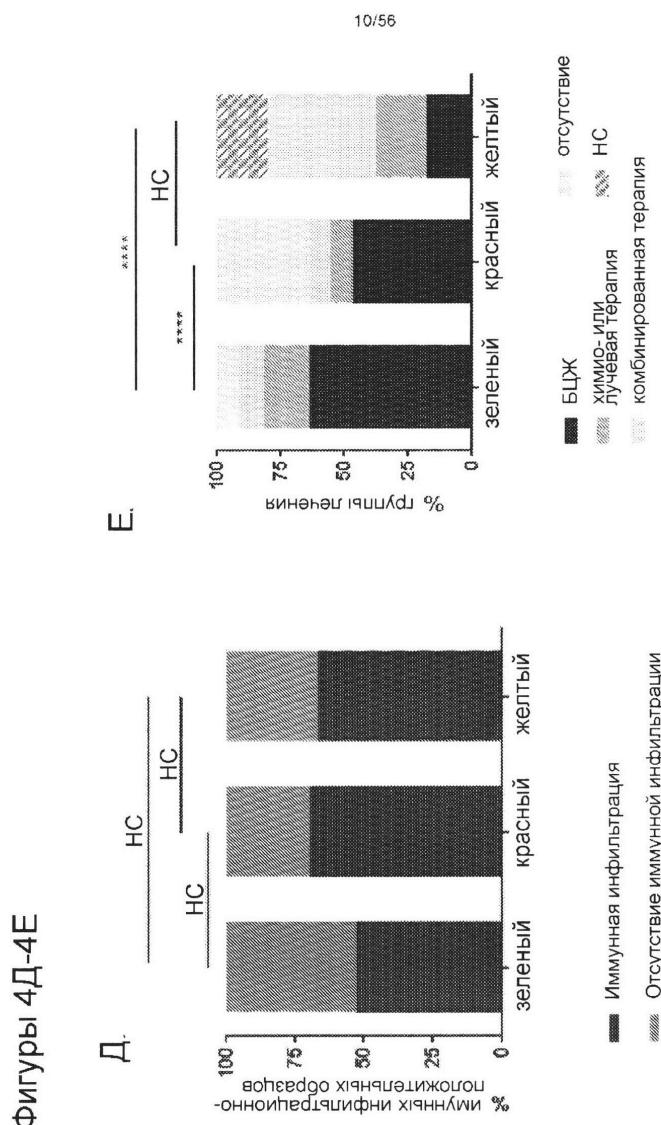




9/56



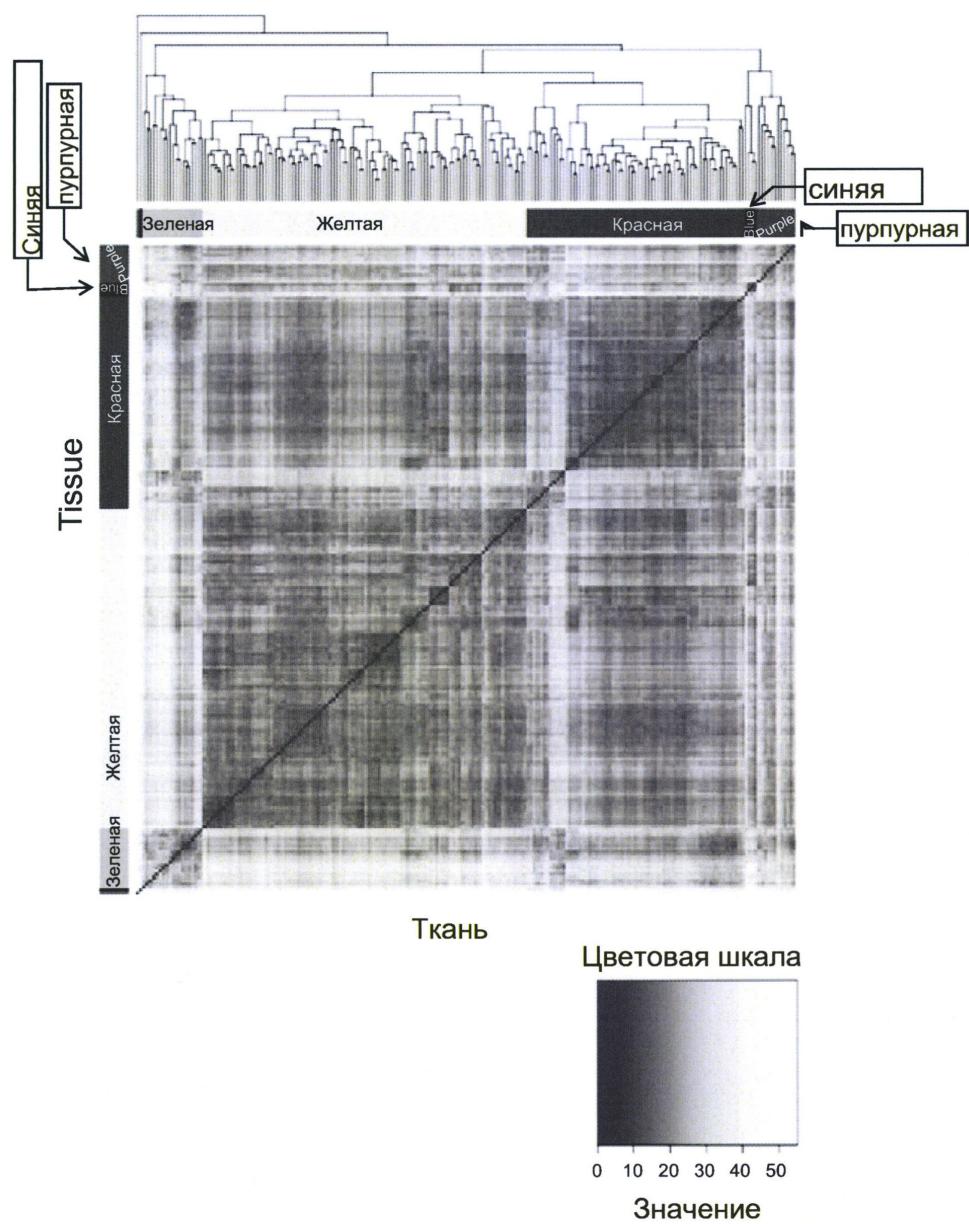
Фигуры 4В-4Г



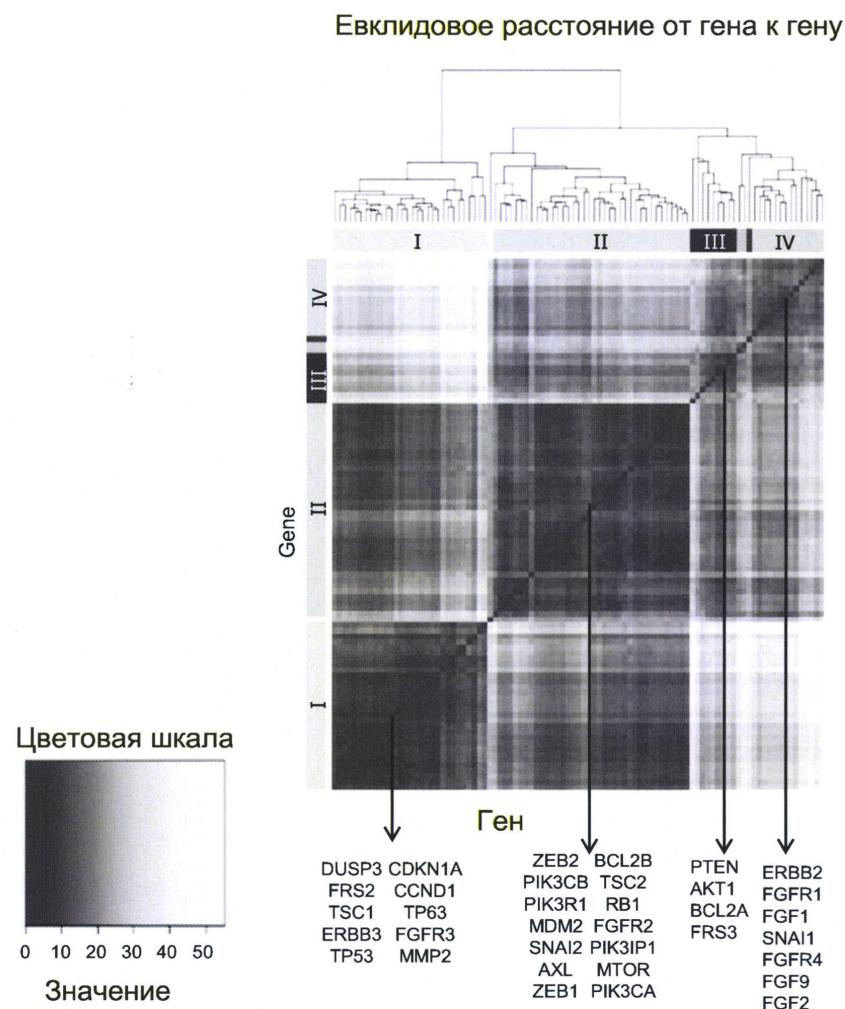
Фигуры 4Д-4Е

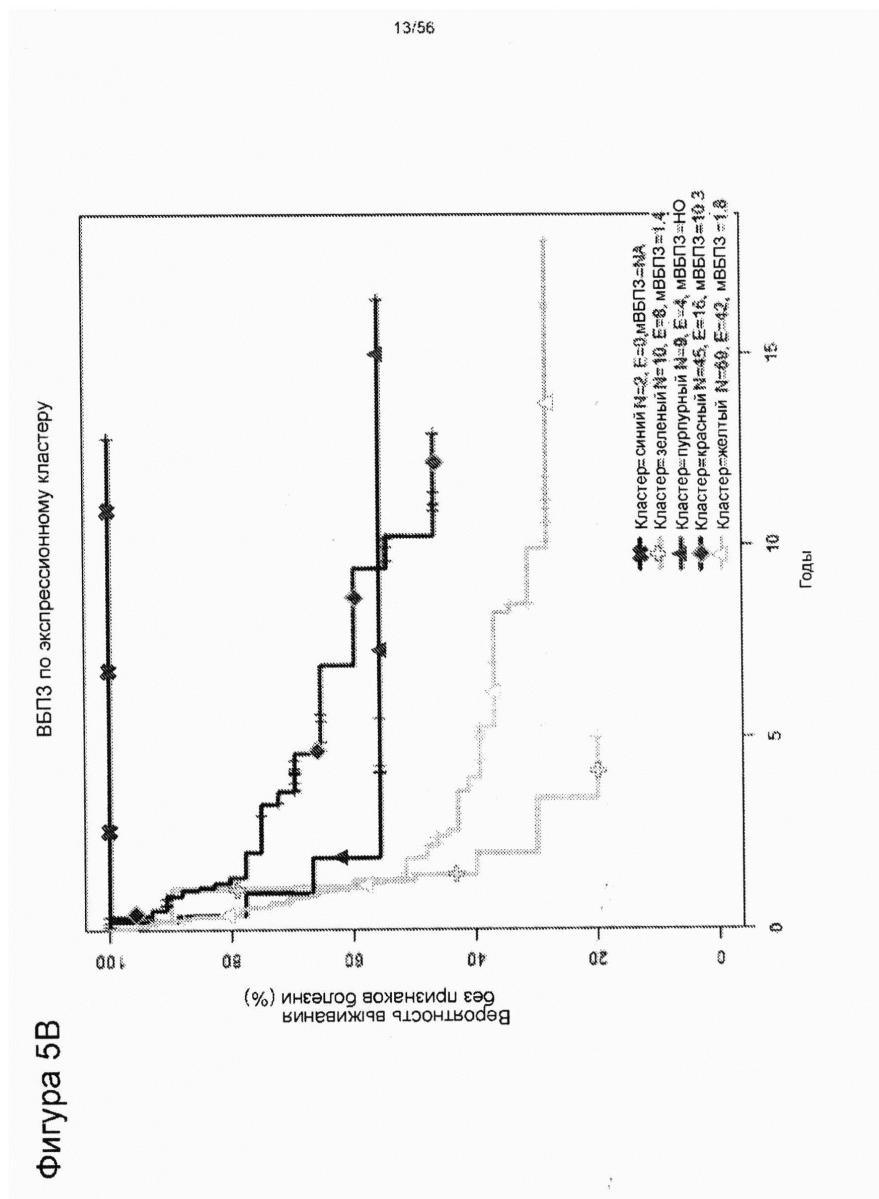
Фигура 5А

Евклидово расстояние от ткани к ткани

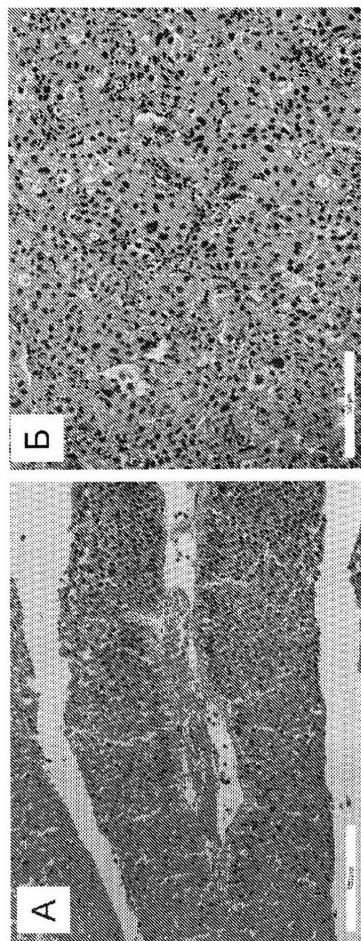


Фигура 5Б

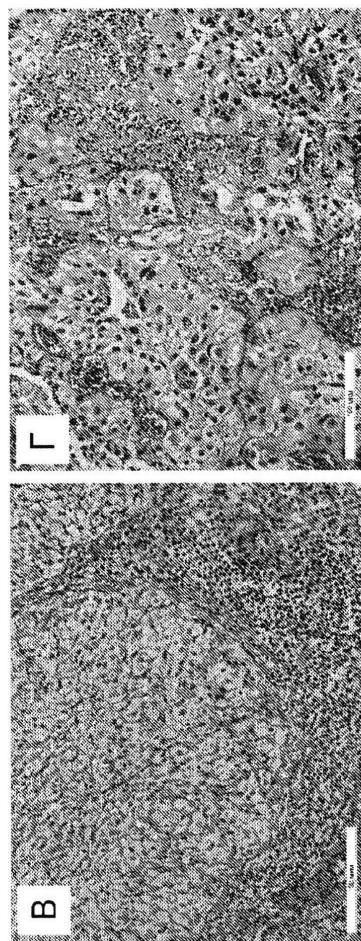




Фигуры 6А-6Б

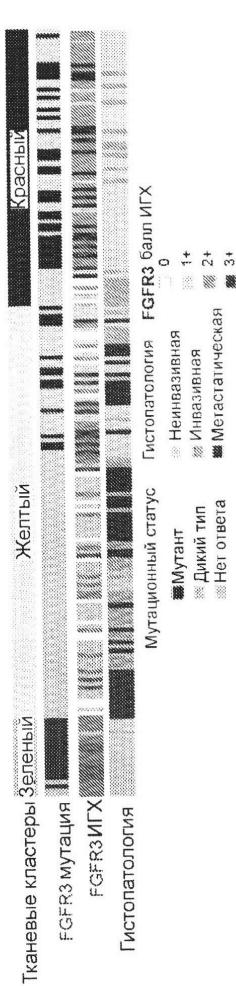


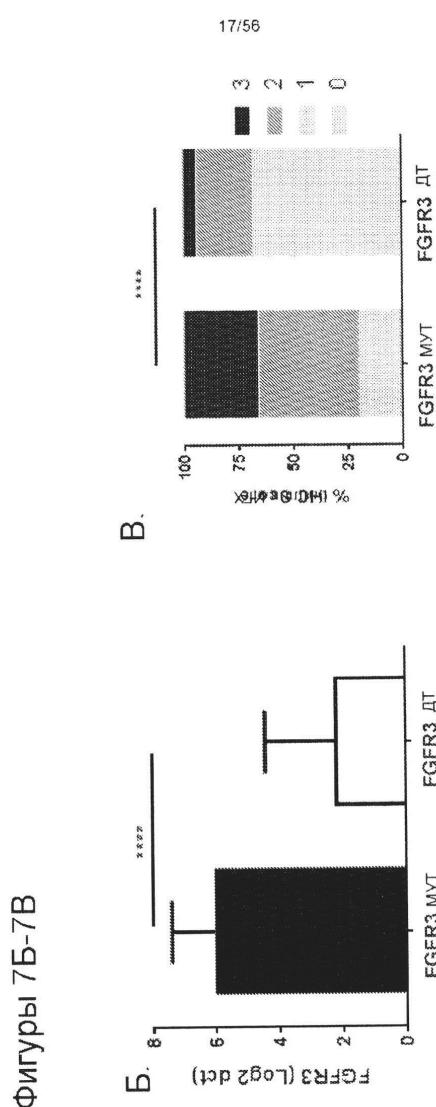
15/56



Фигуры 6В-6Г

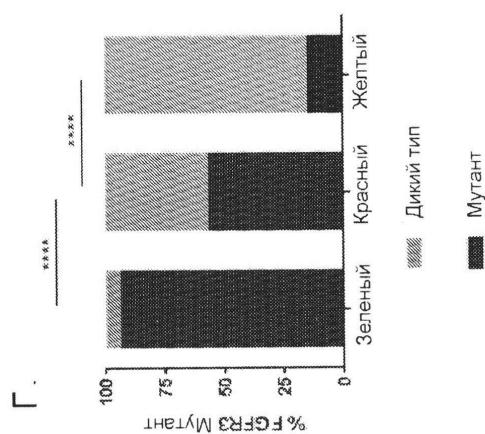
Фигура 7А



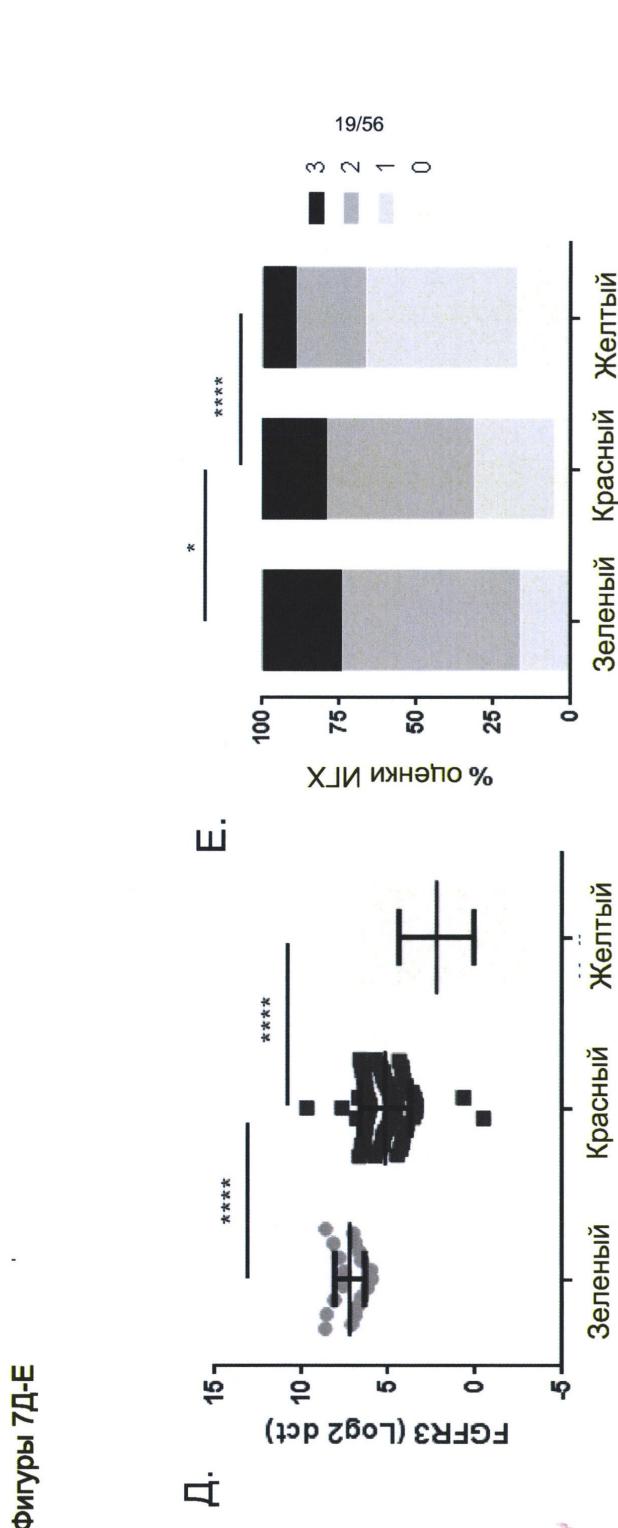


Фигуры 7Б-7В

18/56



Фигура 7Г



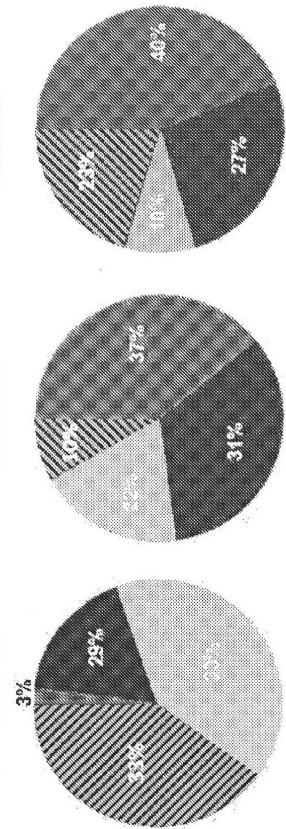
Фигуры 7Д-Е

20/56

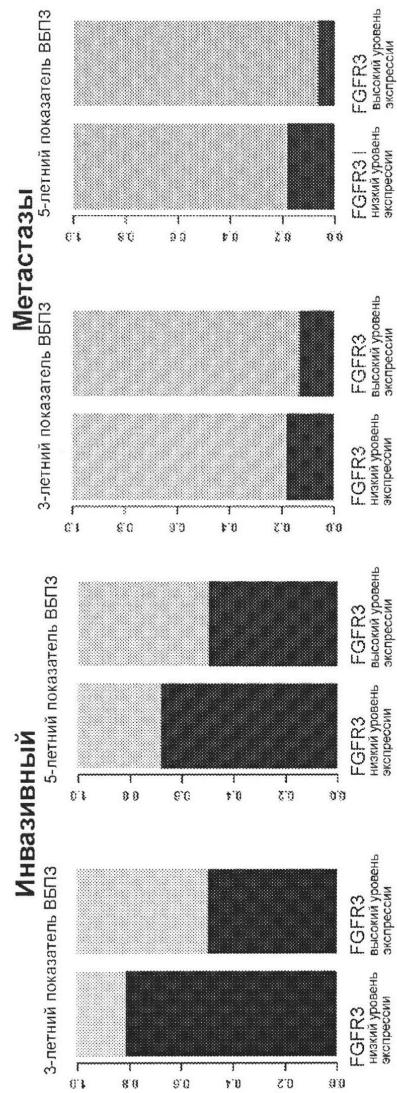
Фигуры 7Ж-7З

Ж. Инвазивный
Неинвазивный

Метастазы



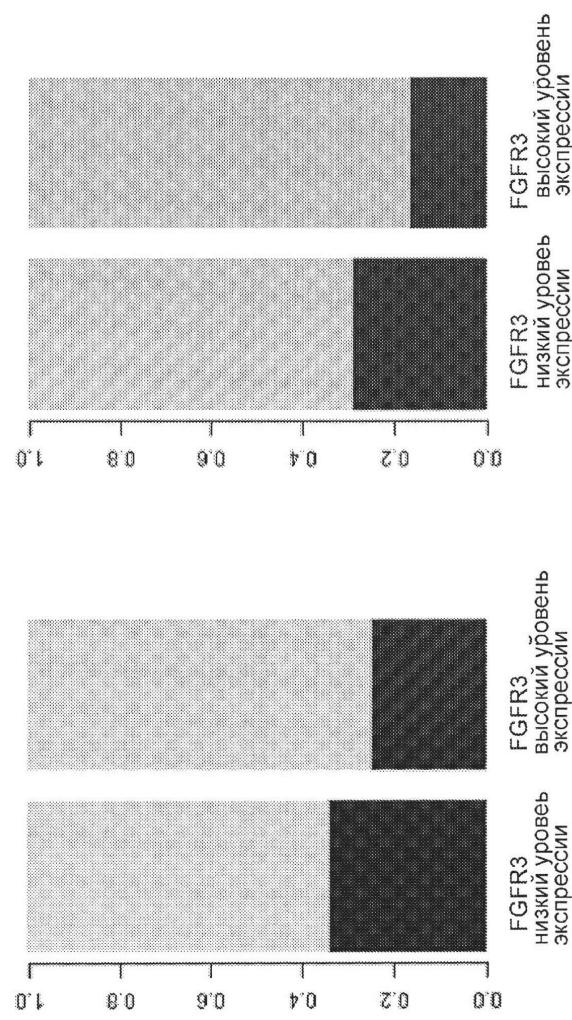
3.



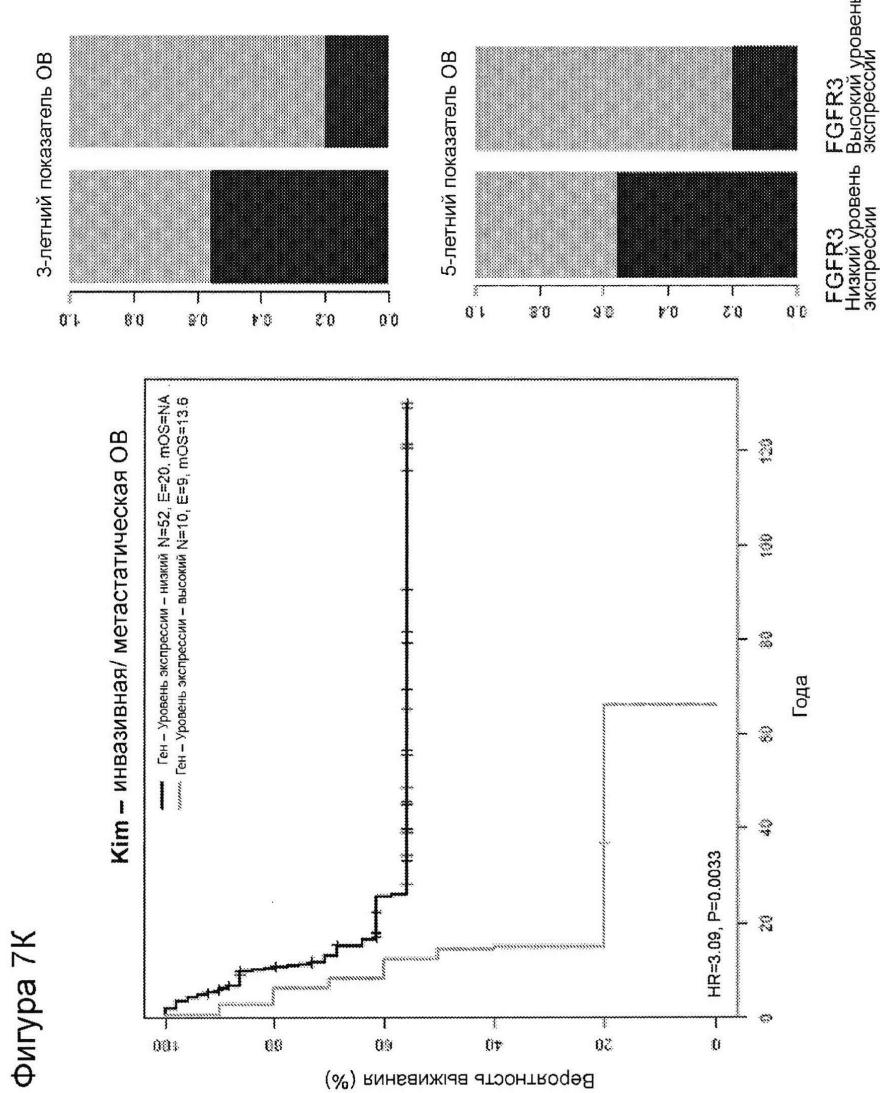
21/56

Фигура 7И

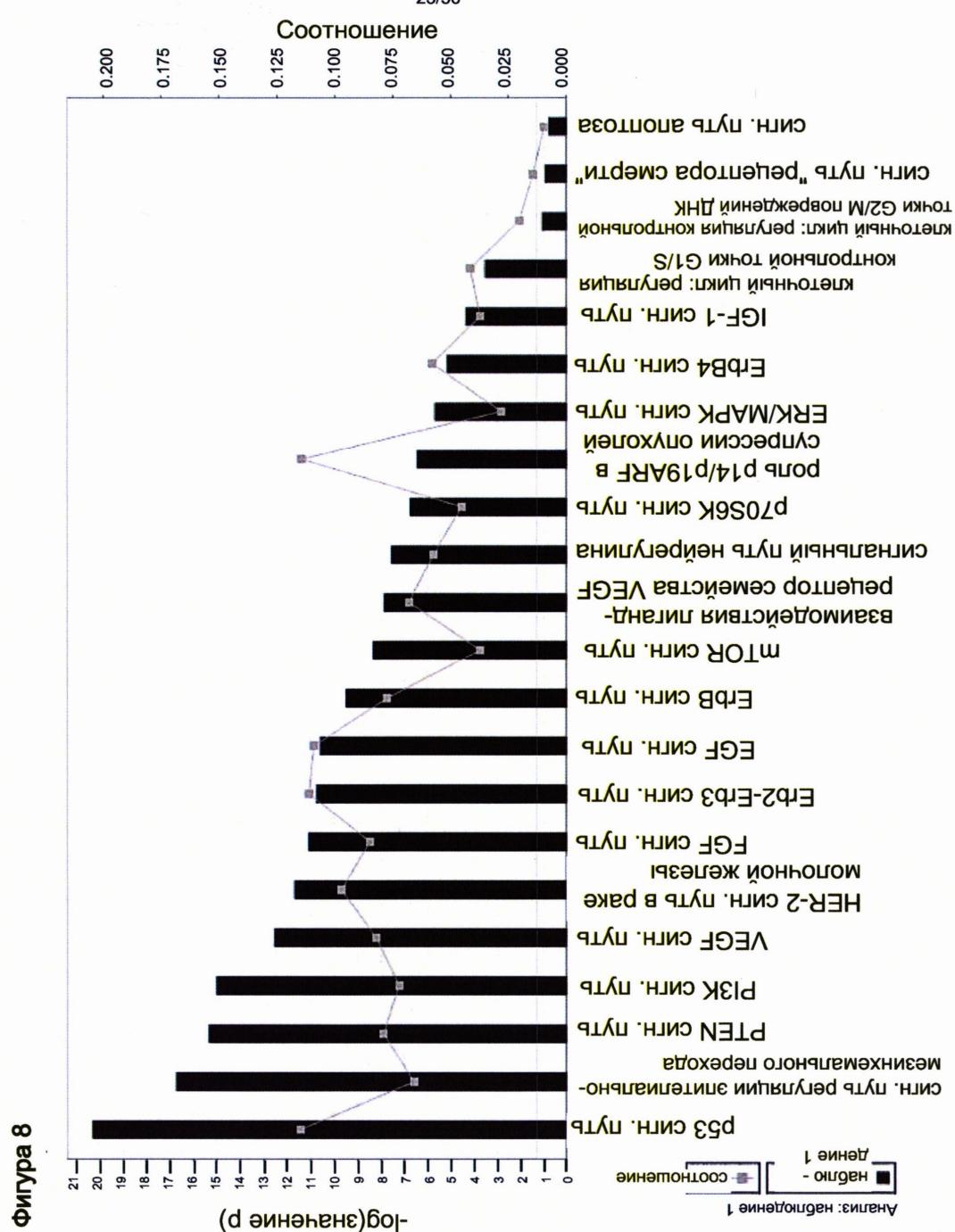
3-летний показатель ОВ



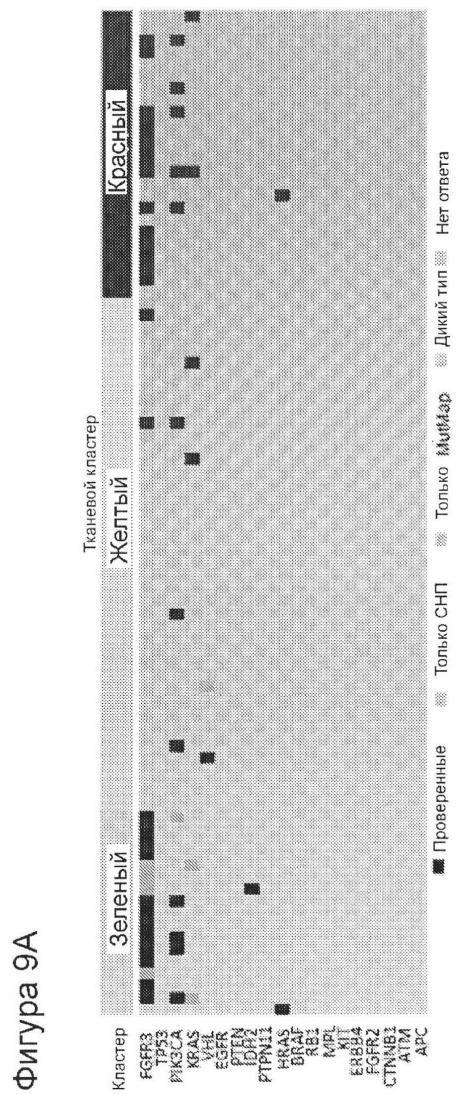
22/56



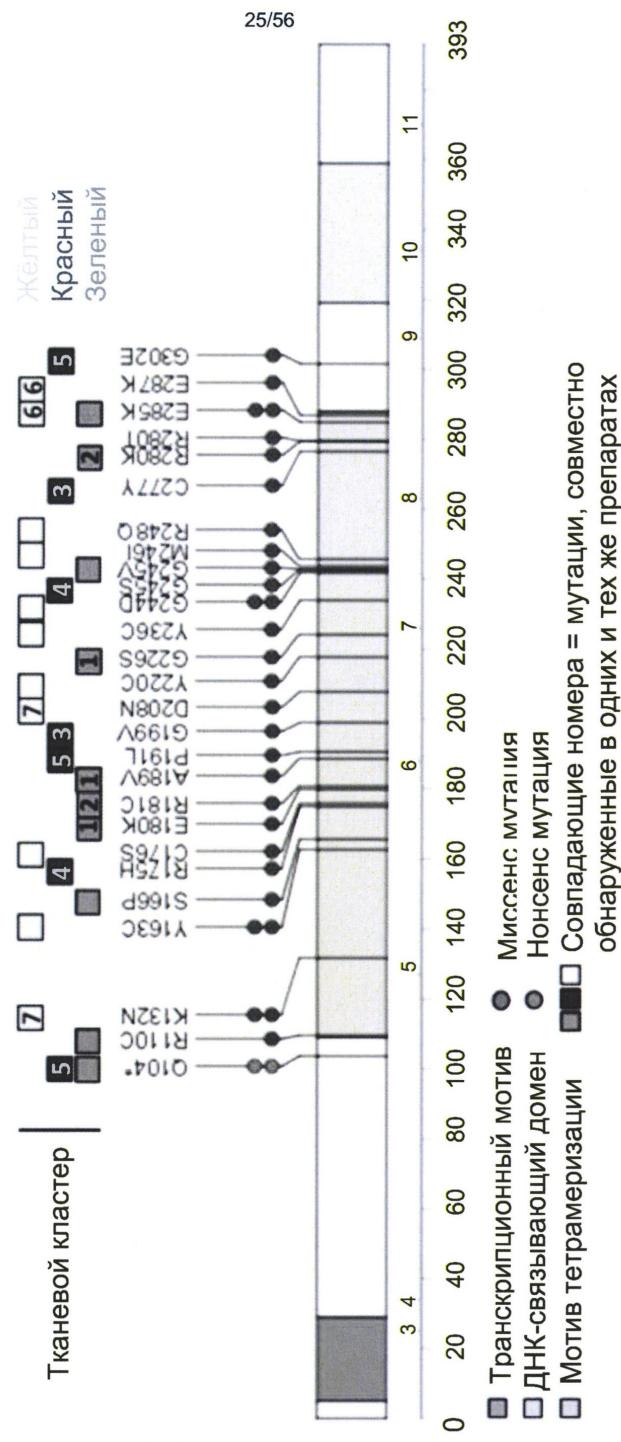
23/56



24/56

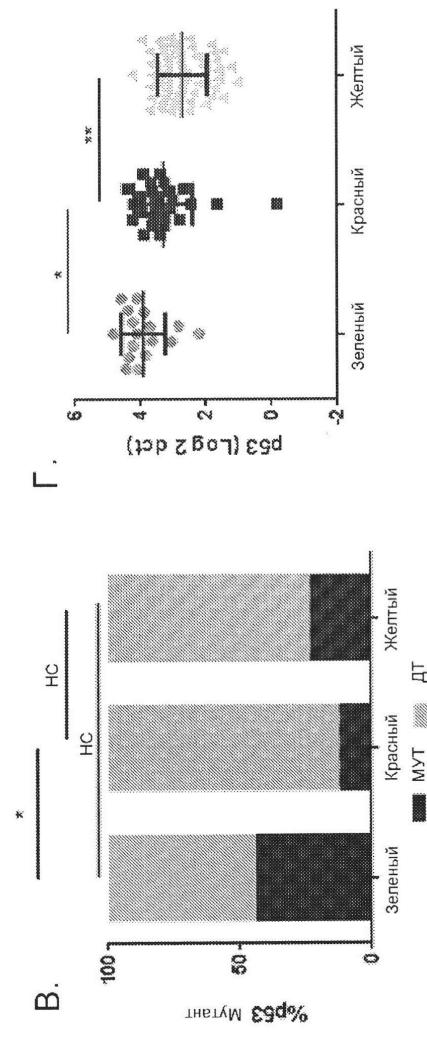


Фигура 9Б

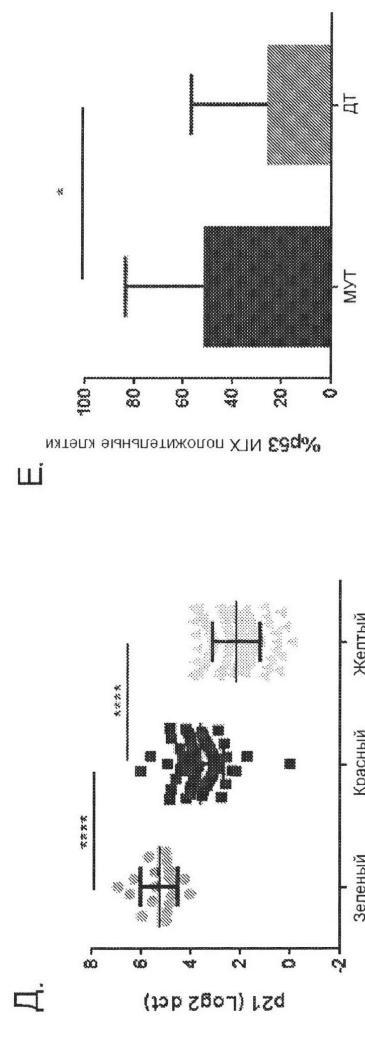


26/56

Фигуры 9В-9Г

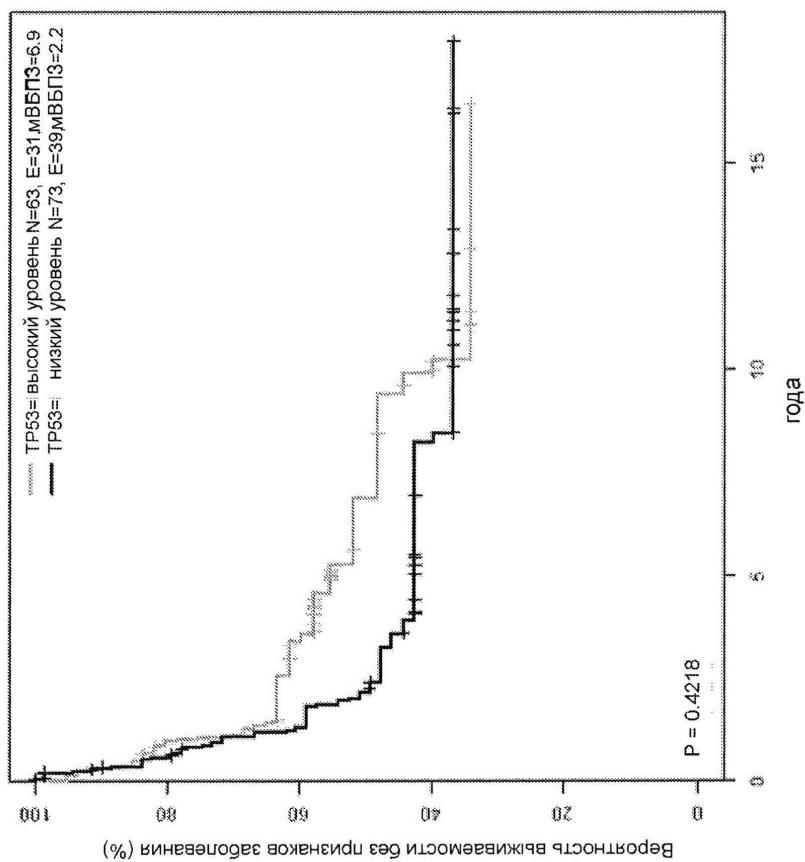


27/56

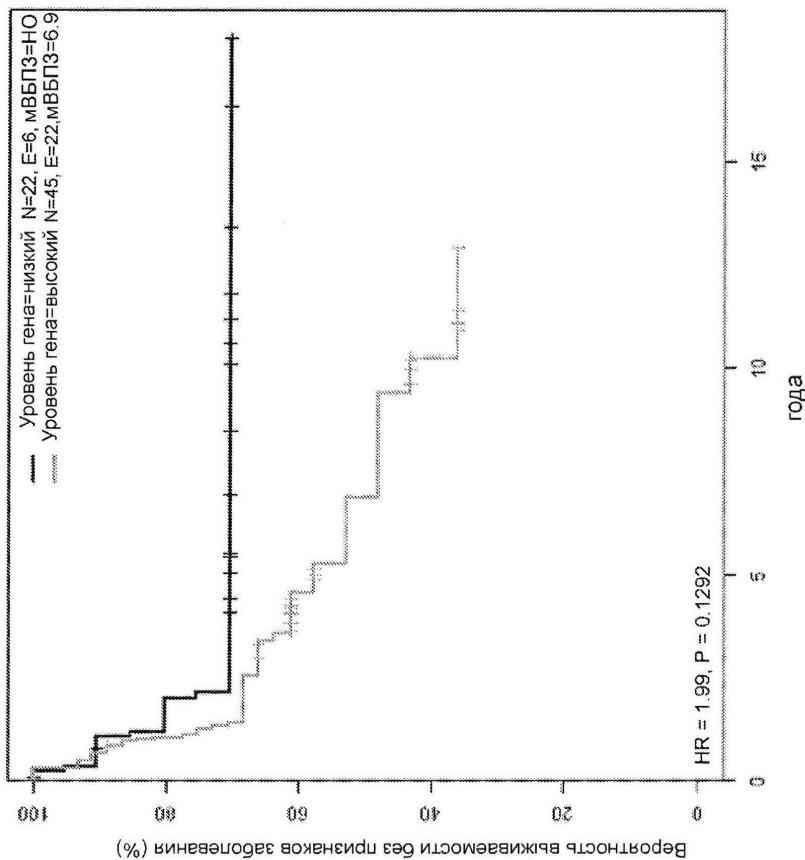


Фигуры 9Д-9Е

28/56

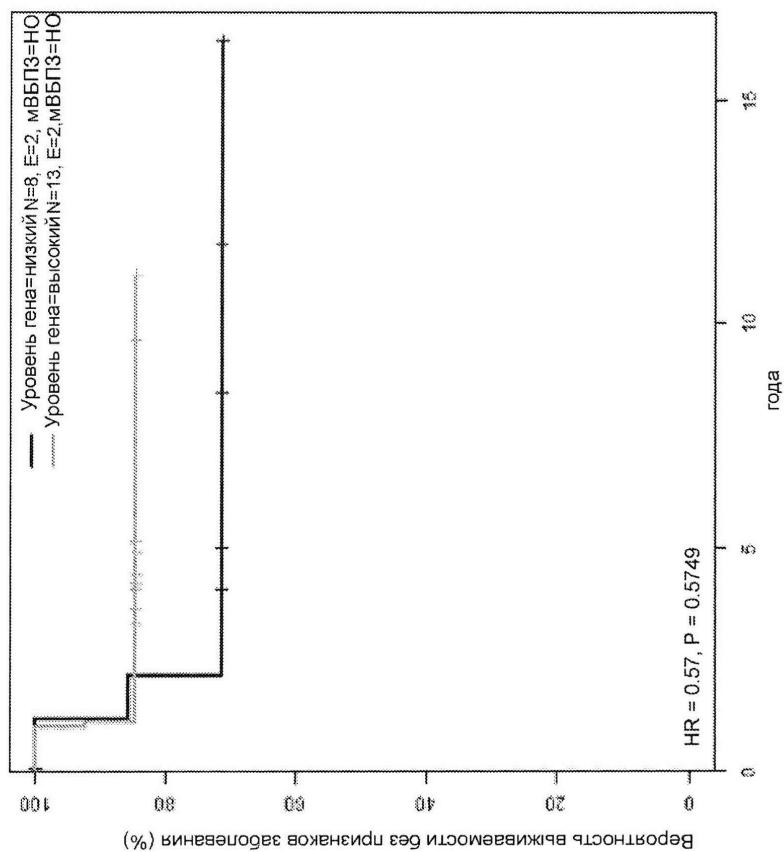


29/56



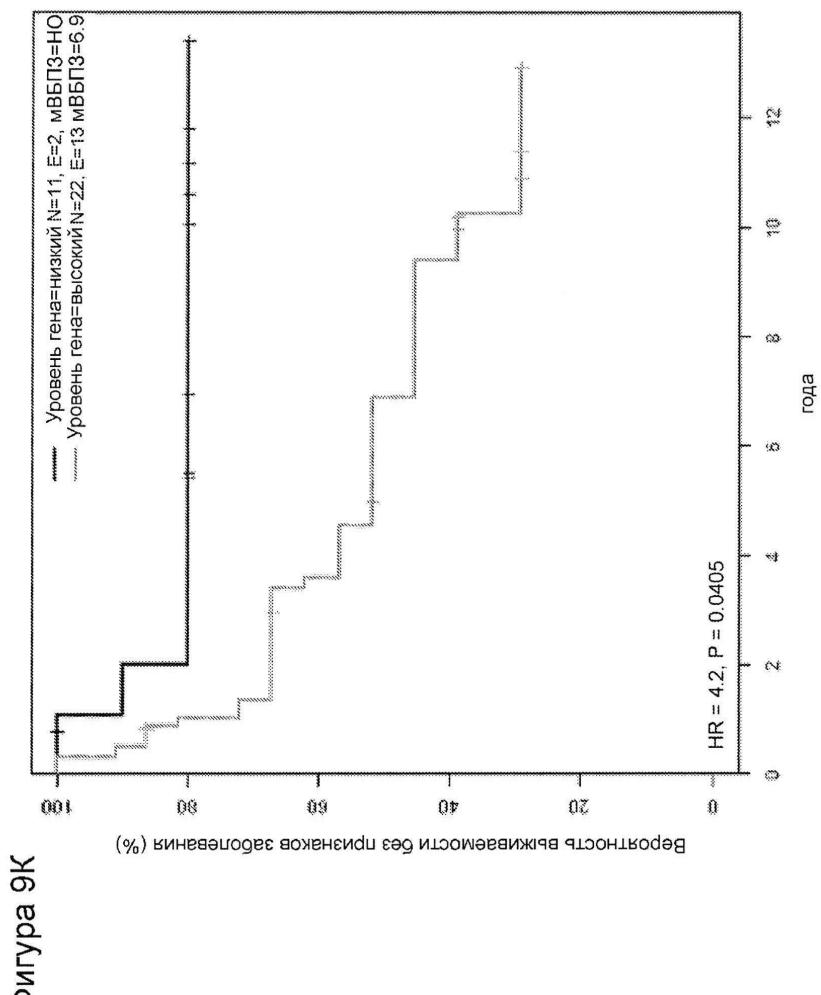
Фигура 93

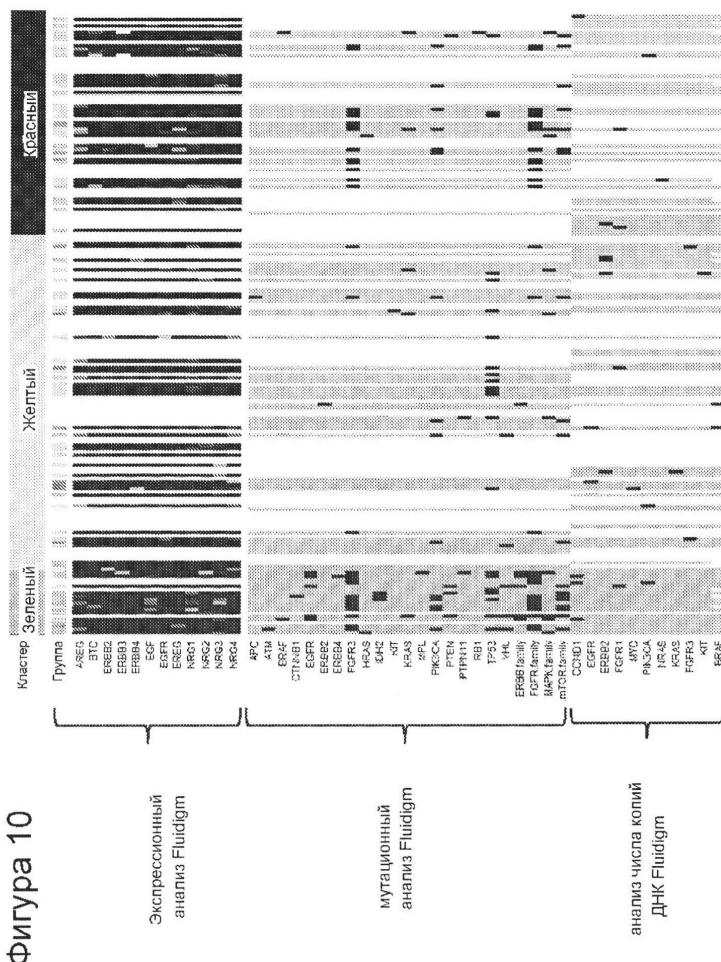
30/56



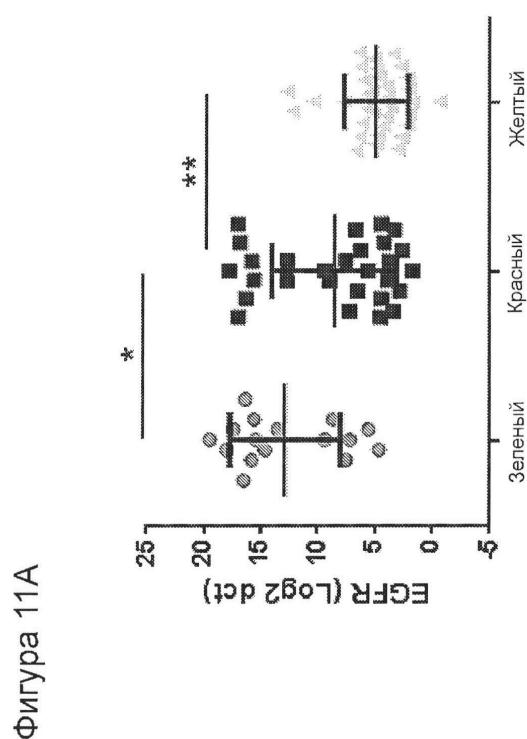
Фигура 9И

31/56

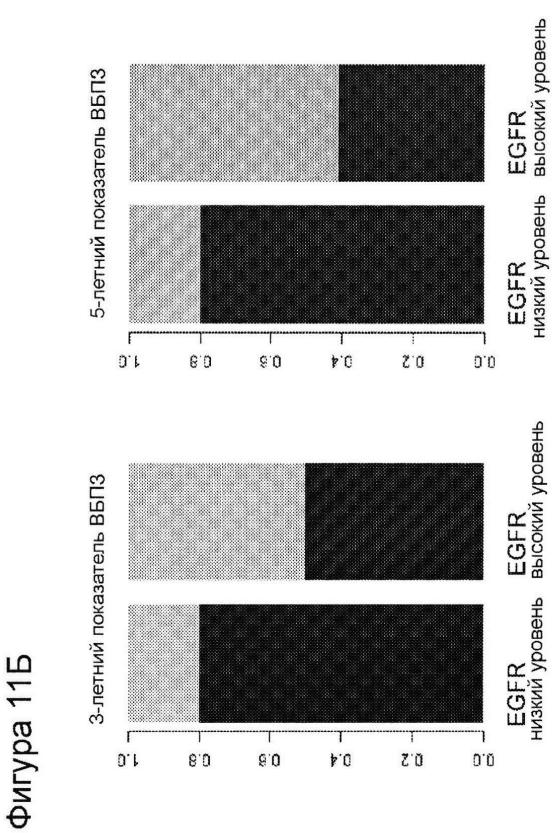




33/56

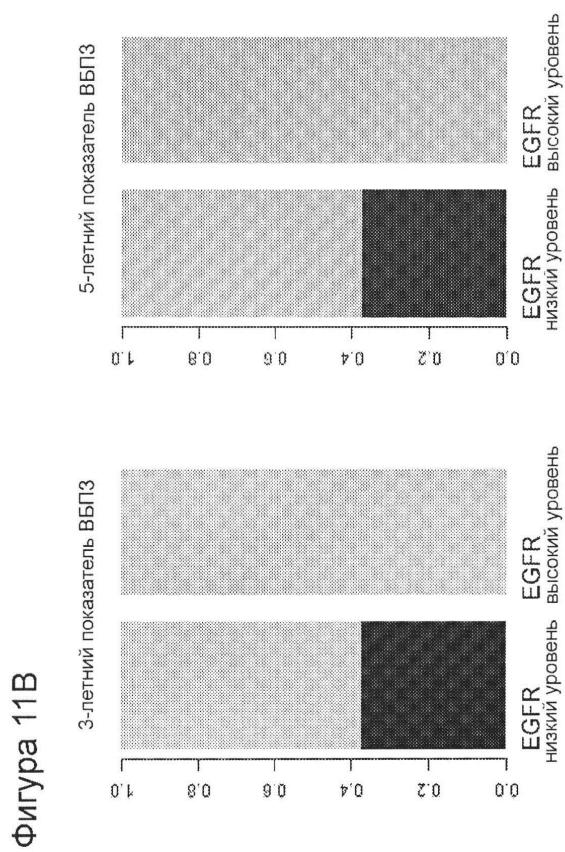


34/56

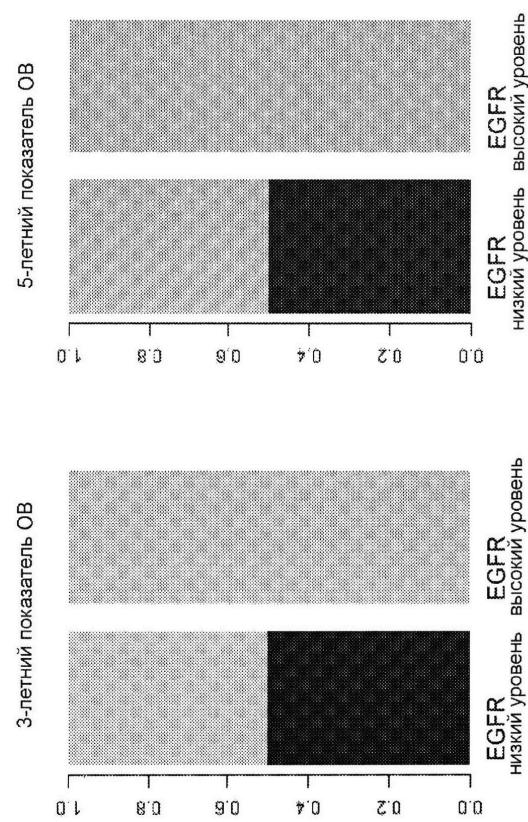


Фигура 11Б

35/56

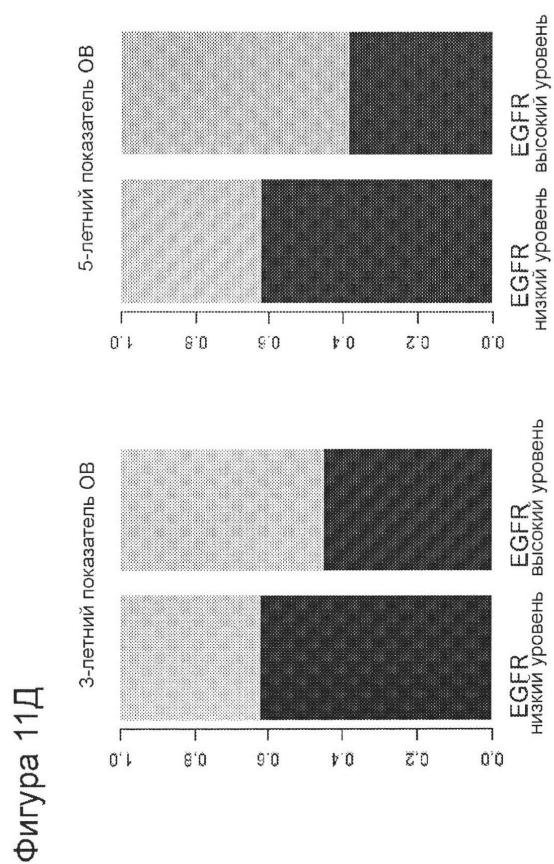


36/56

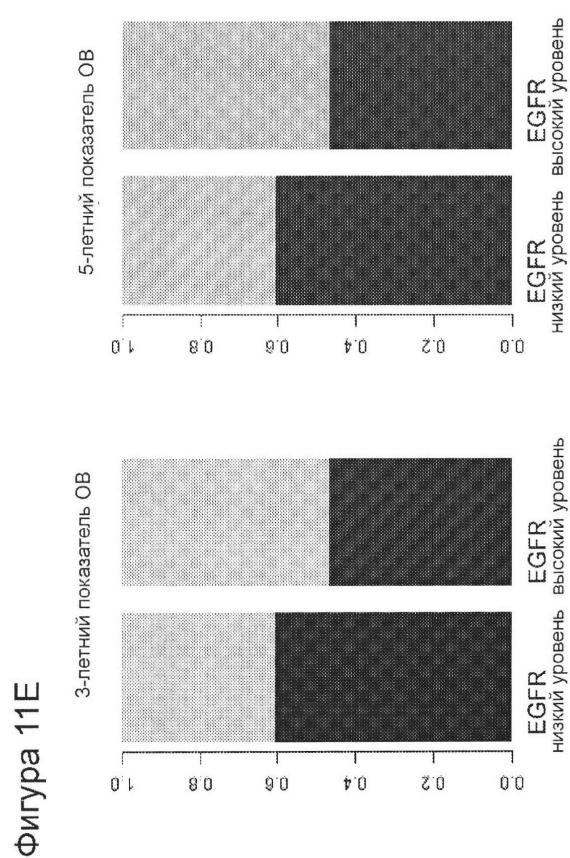


Фигура 11Г

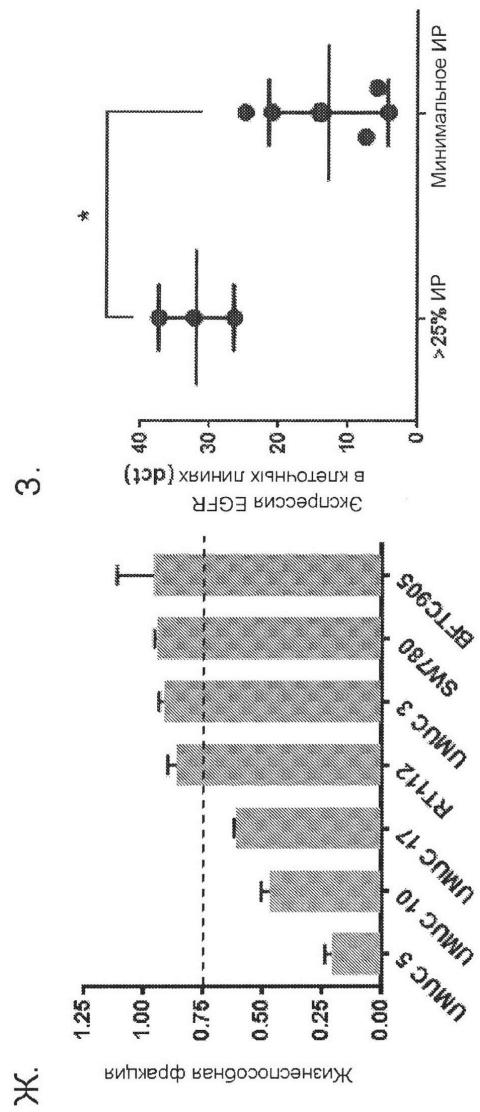
37/56



38/56



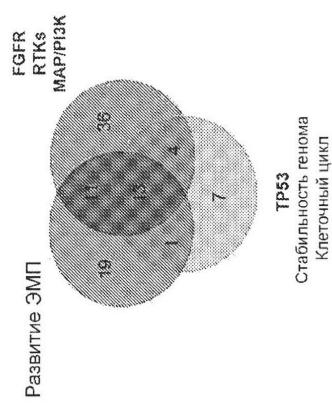
39/56



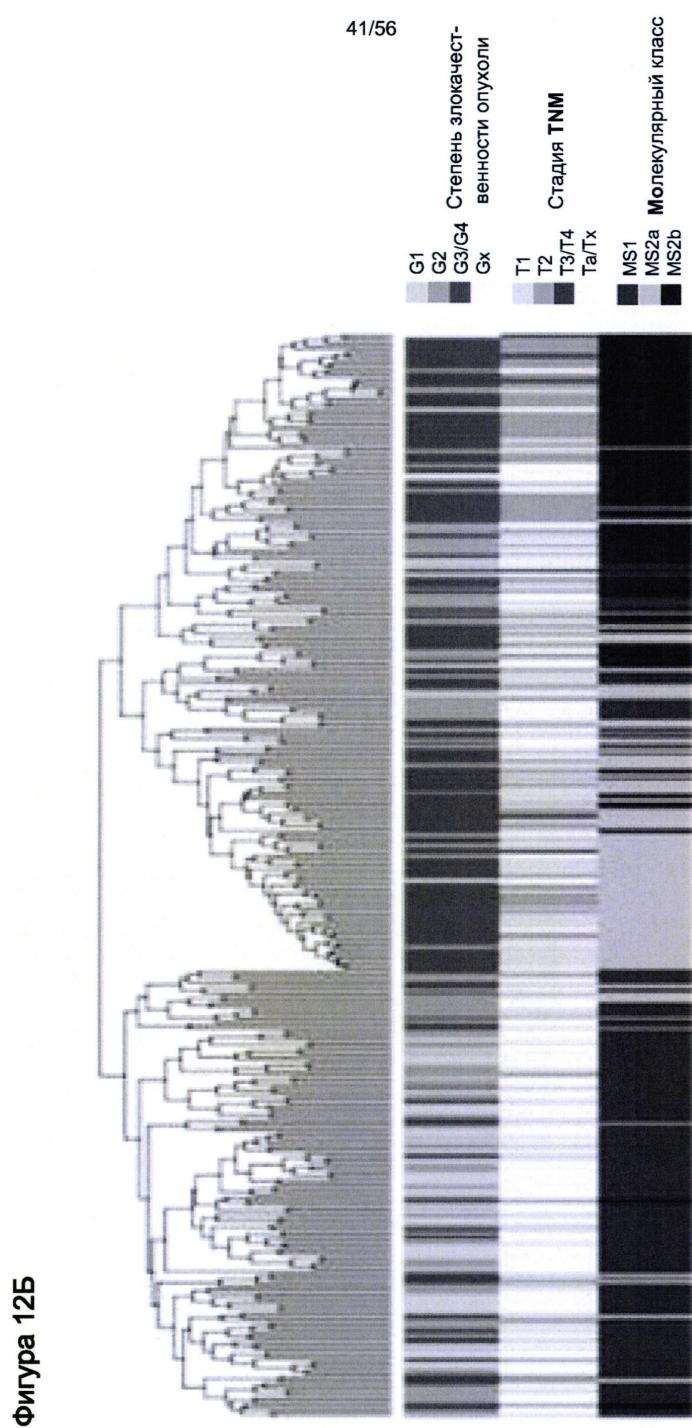
Фигуры 11Ж-11З

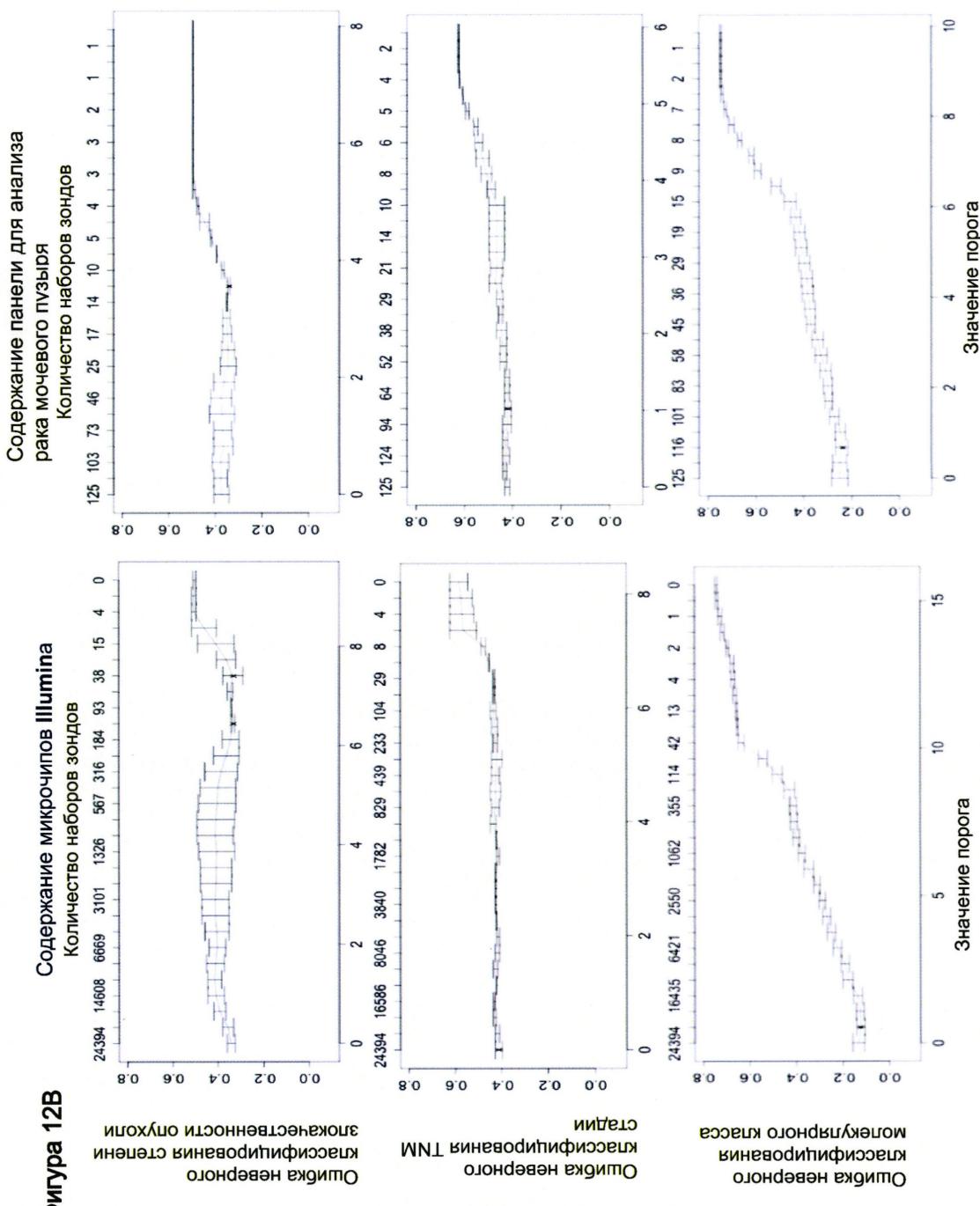
40/56

Фигура 12А

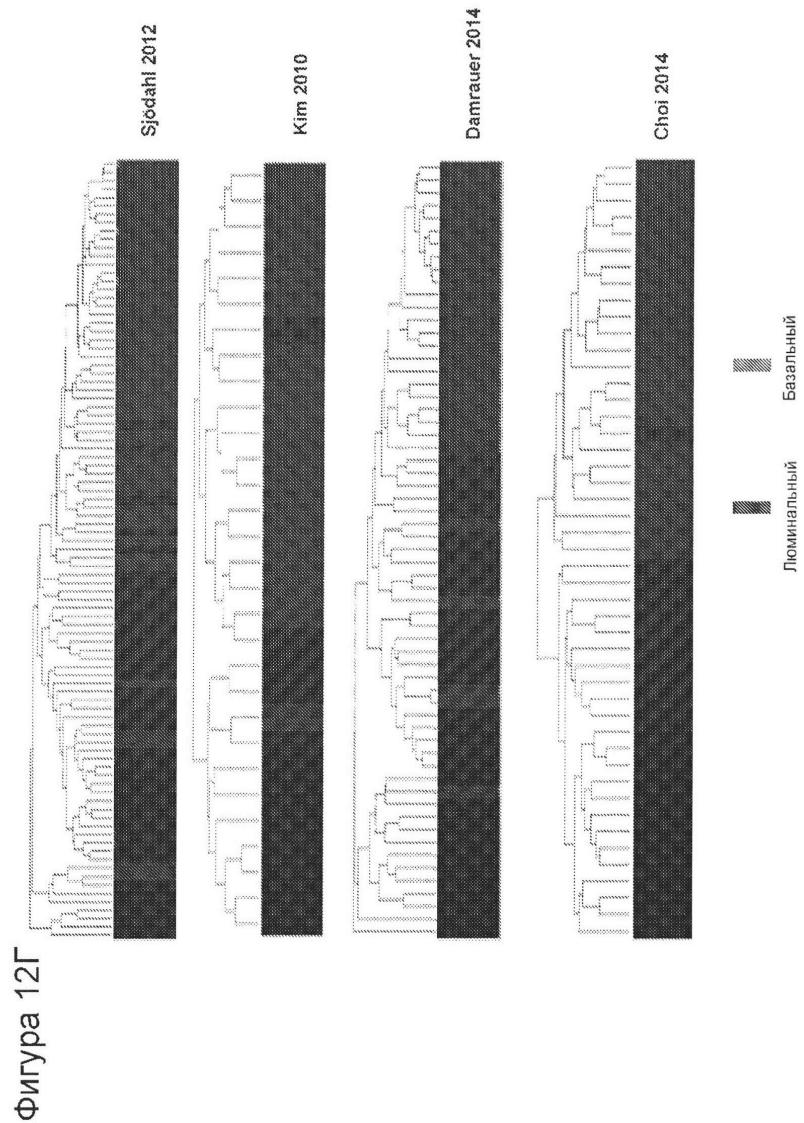


41/56

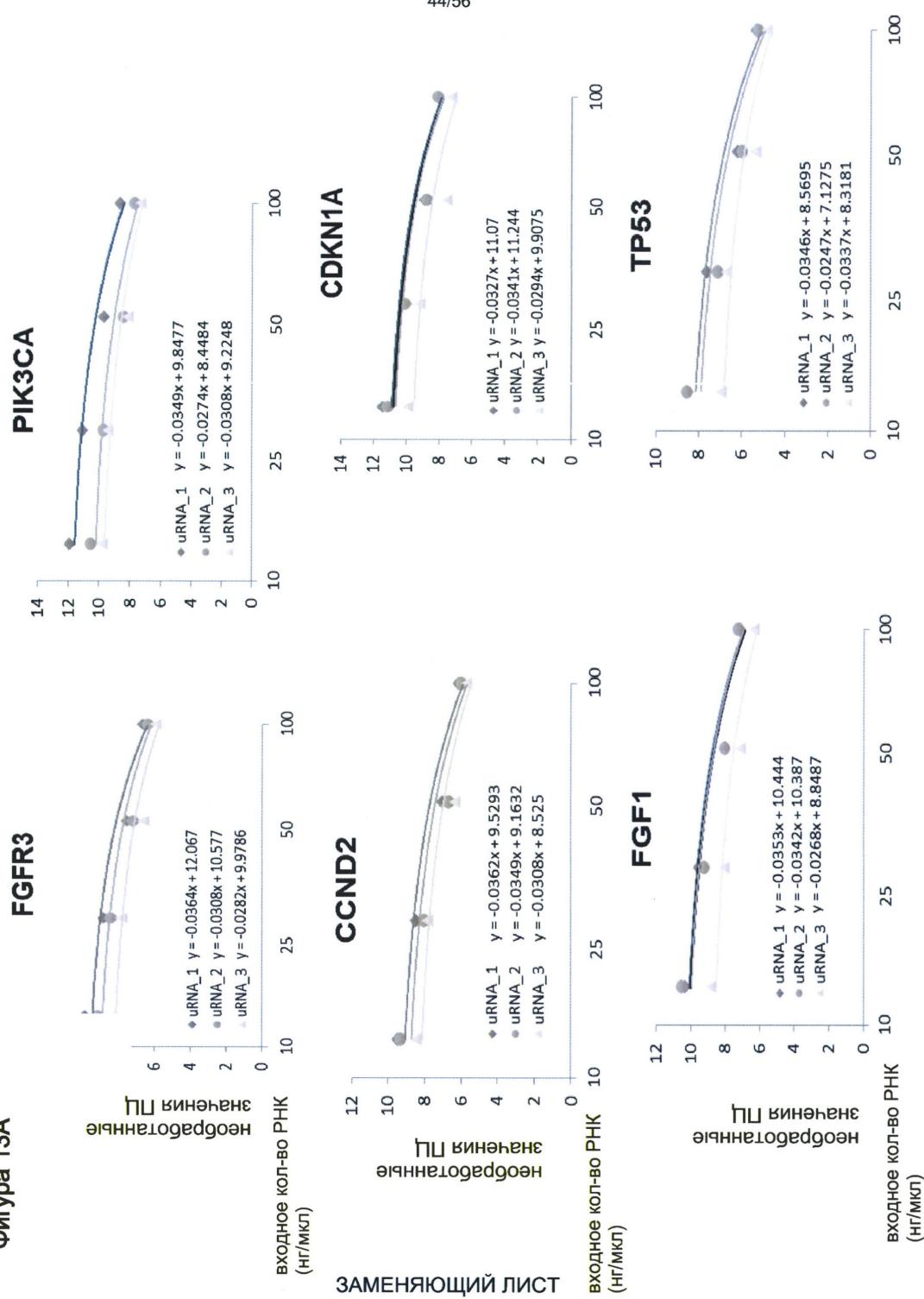




43/56

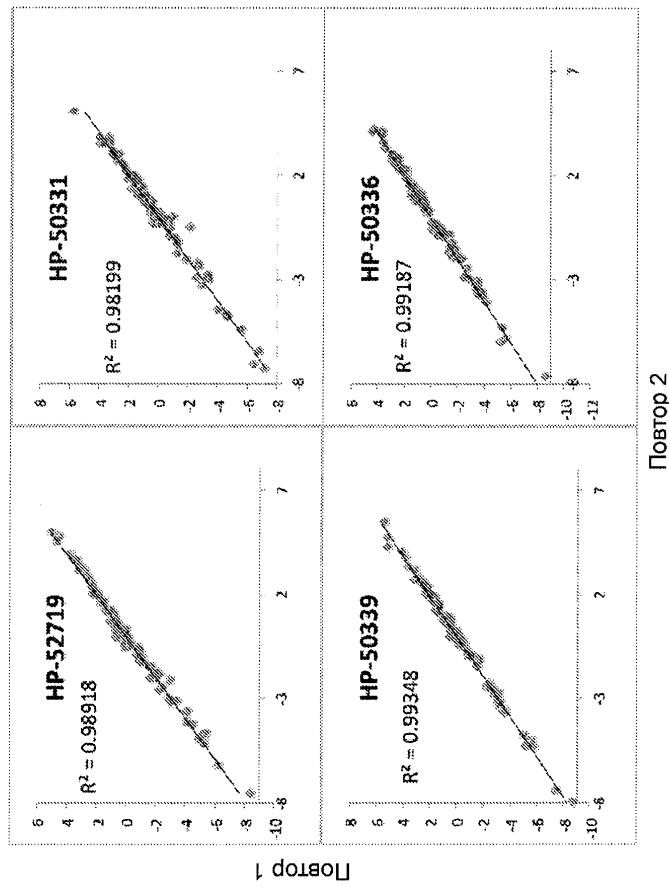


Фигура 13А

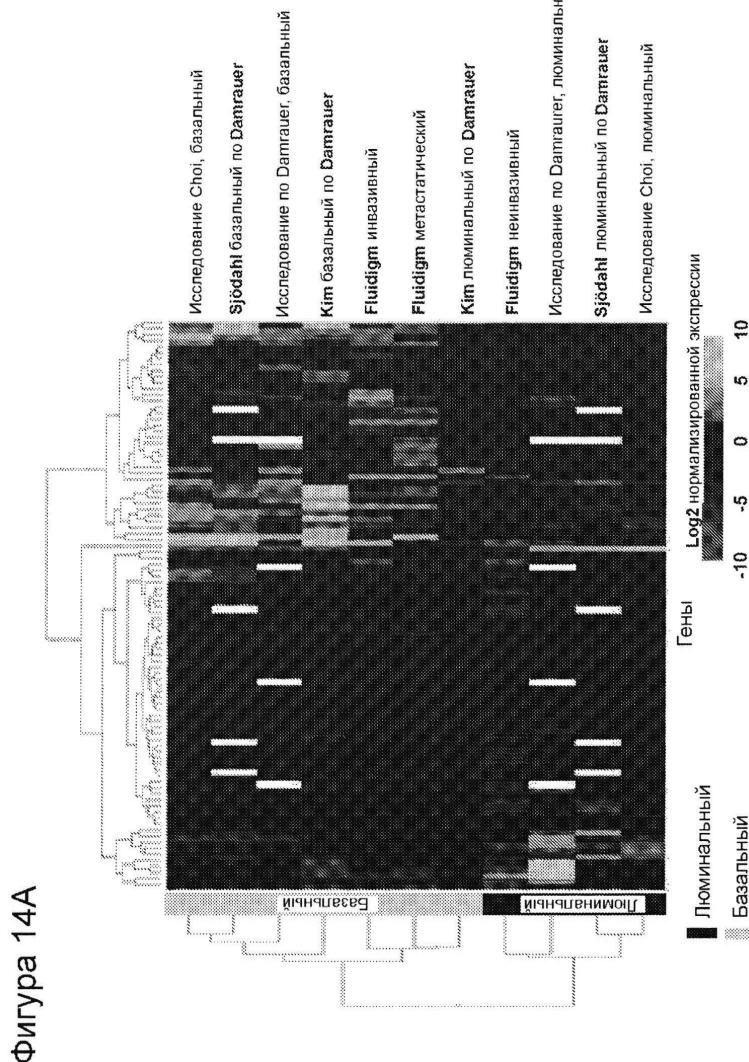


45/56

Фигура 13Б



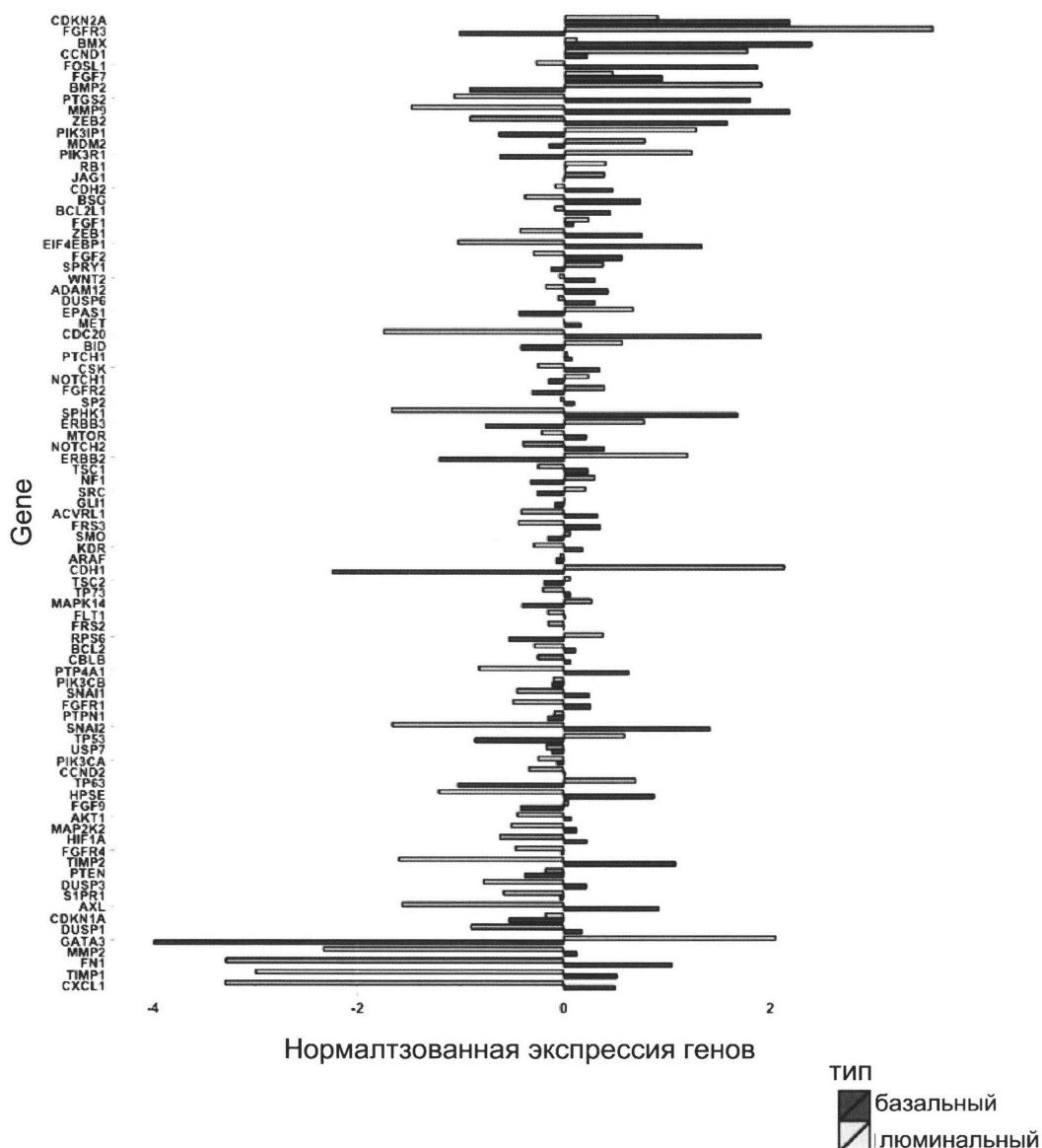
46/56



Фигура 14А

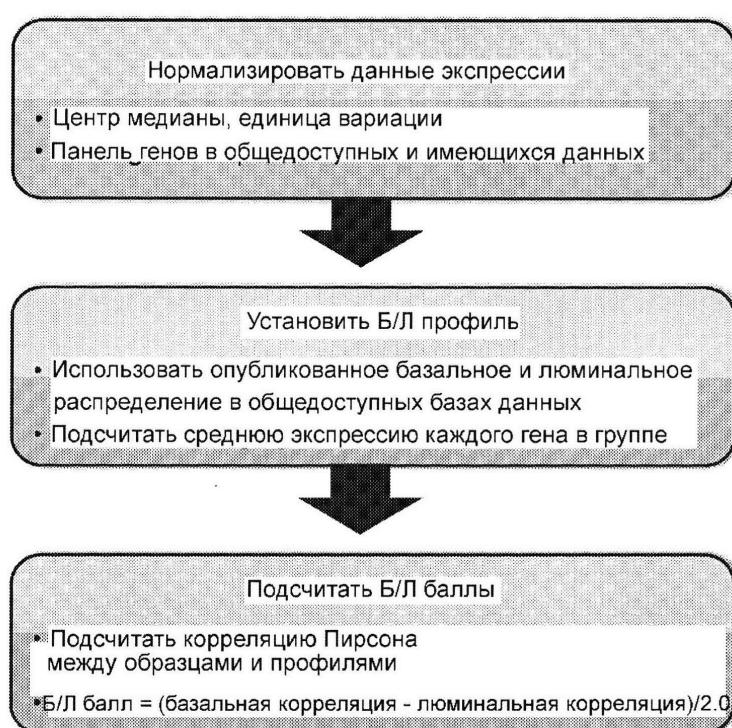
Фигура 14Б

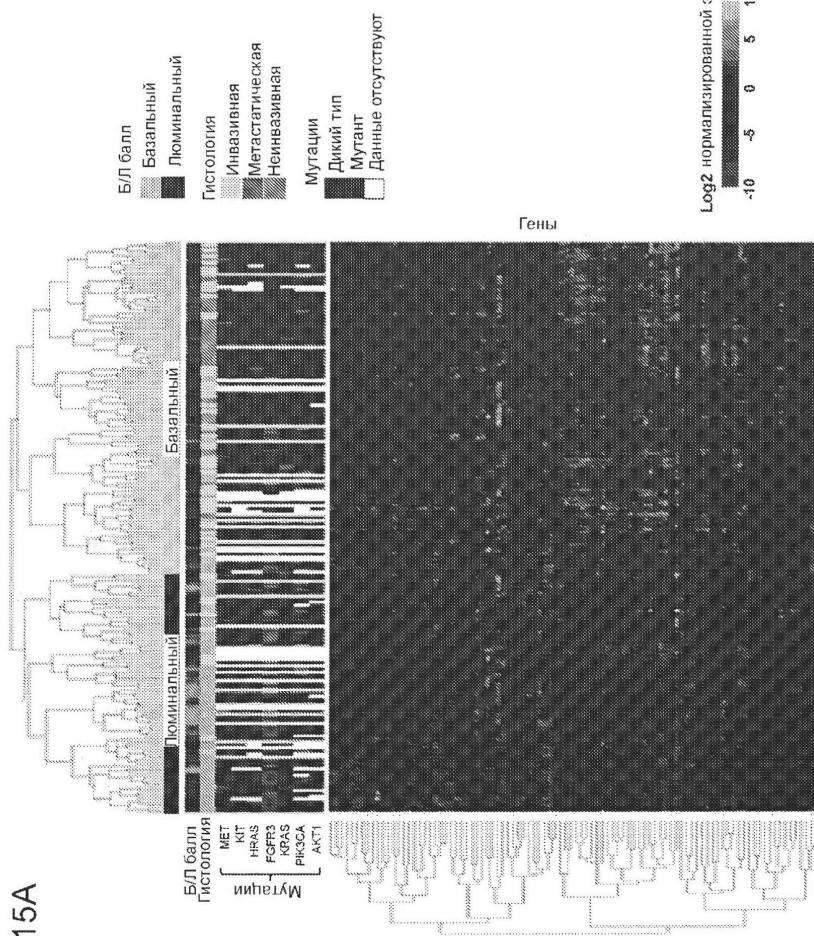
Базальный/люминальный профиль



48/56

Фигура 14В

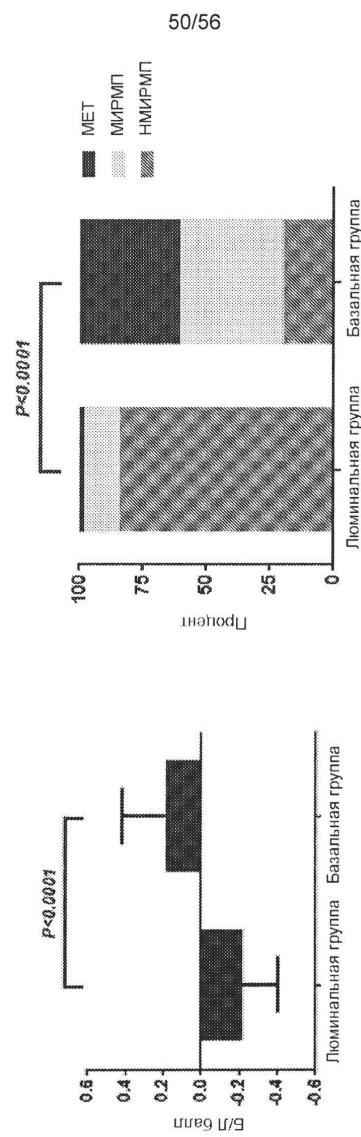




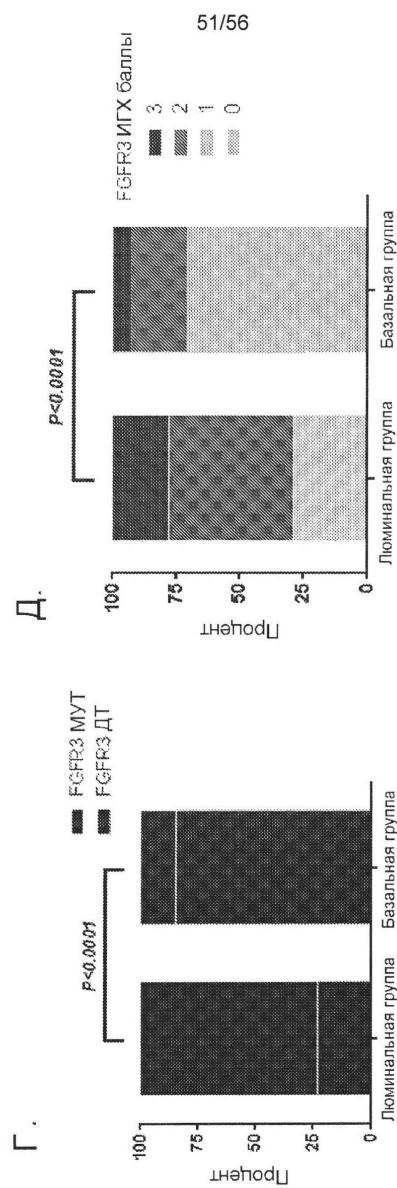
Фигура 15А

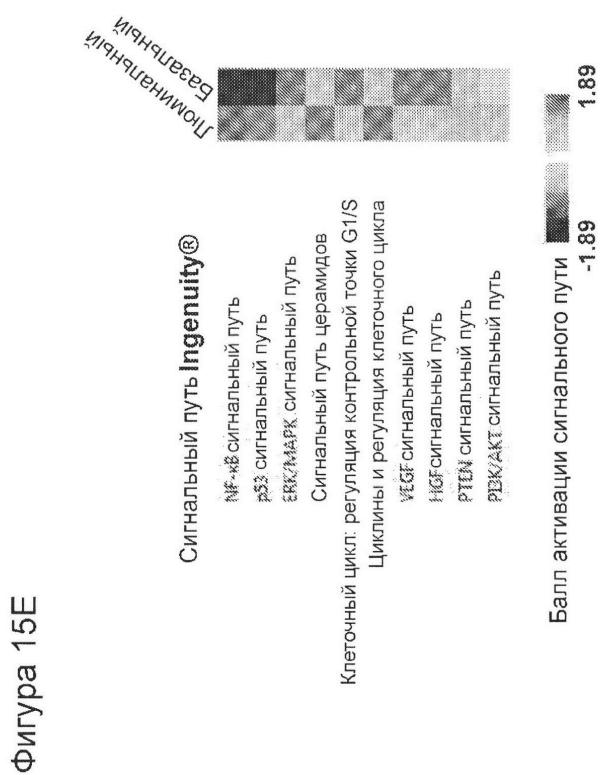
Фигуры 15Б-15В

Б.

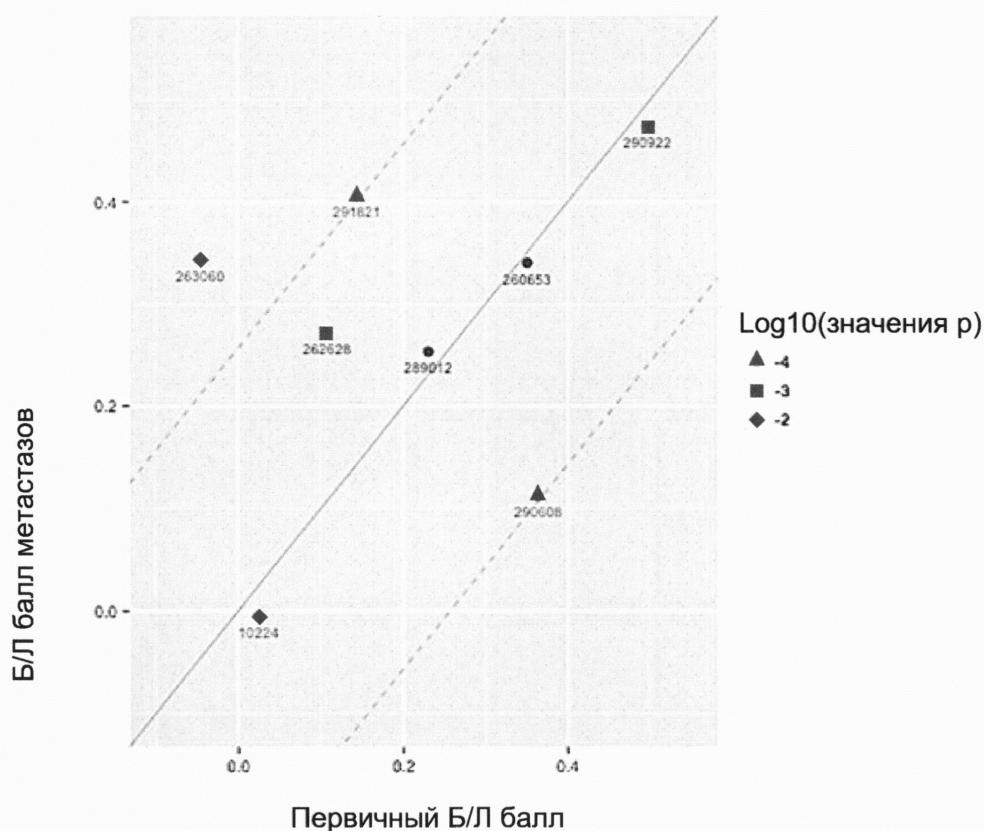


Фигуры 15Г-15Д





Фигура 15Е

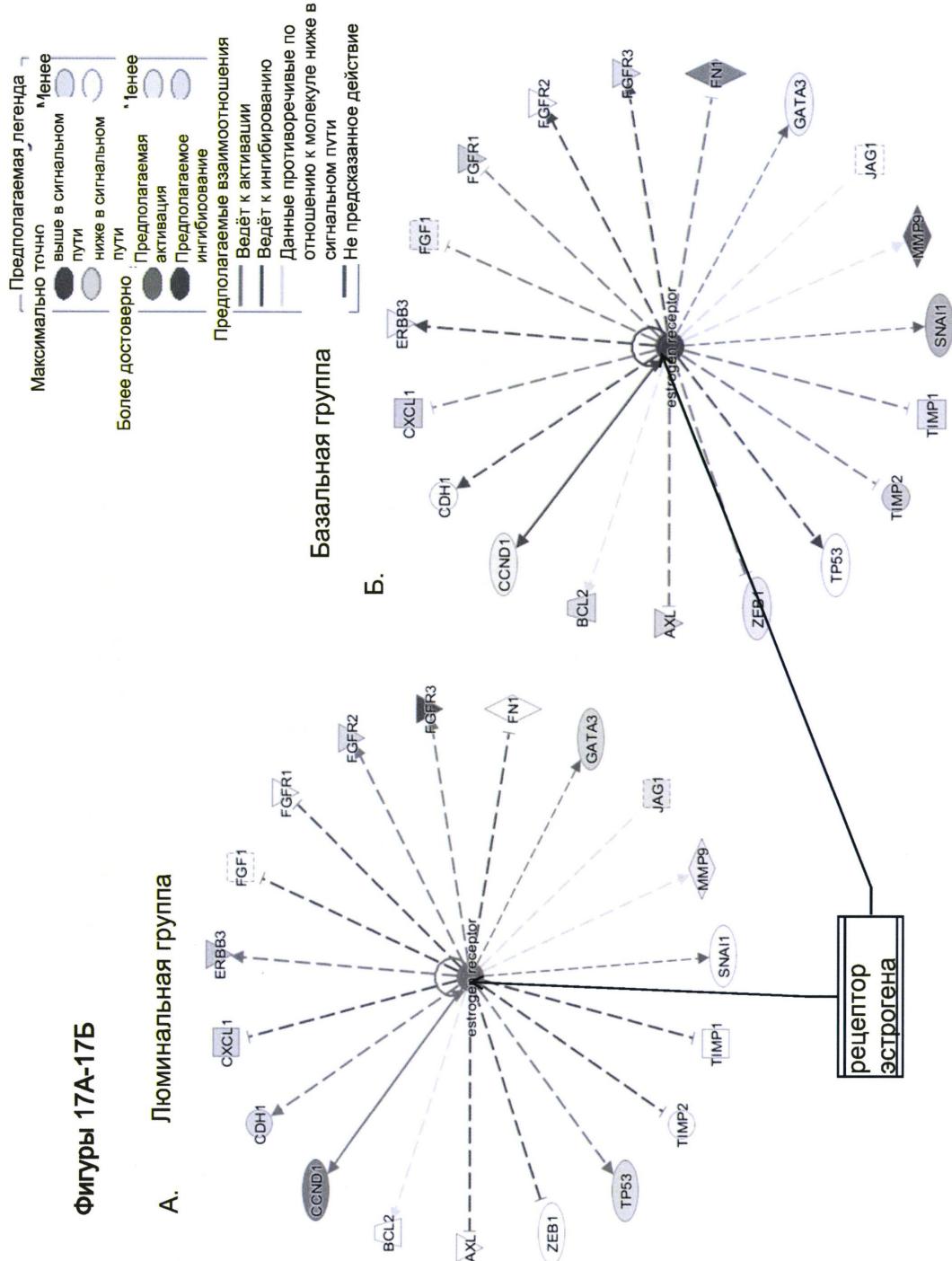
Фигура 16А

Фигура 16Б

Б/Л статус в сравнимых первичных (Перв) опухолях
в противопоставление сравнимым метастазам (МЕТ)

ID пациента	Перв Б/Л балл	МЕТ Б/Л балл	изменение р Перв-МЕТ Б/Л
10224	0.024	-0.005	0.813
10239			0.270
260653			0.934
262628	-0.407	0.177	0.194
263060	-0.046		0.005
289012	0.240	0.255	0.851
290608		0.110	0.054
290922			0.852
291821	0.145		0.046

Люминапальный
Базальный



Фигура 18

