



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 180 963** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **G 01 N 33/48, C 12 Q 1/68**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 98119525/14, 25.03.1997
(24) Дата начала действия патента: 25.03.1997
(30) Приоритет: 26.03.1996 NO 961221
(43) Дата публикации заявки: 20.08.2000
(46) Дата публикации: 27.03.2002
(56) Ссылки: LIFNG A. et al. Science, v.257, 967-972, 1992. RU 2089242 C1, 10.09.1997. RU 2045966 C1, 20.10.1995. RU 1748512 A1, 20.10.1995.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 26.10.1998
(86) Заявка РСТ: NO 97/00083 (25.03.1997)
(87) Публикация РСТ: WO 98/36004 (02.10.1998)
(98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", А.П.Агурееву

(71) Заявитель: ФОДСТАД Эйстейн (NO)
(72) Изобретатель: ФОДСТАД Эйстейн (NO), ЭНГЕБРОТЕН Олав (NO), РЕЕ Анне Хансен (NO), ХОВИГ Йоханнес Эйвинн (NO)
(73) Патентообладатель: ФОДСТАД Эйстейн (NO)
(74) Патентный поверенный: Агуреев Александр Павлович

(54) **ИММУНОМАГНИТНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С САЙТ-ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫМ ОБРАЗОВАНИЕМ МЕТАСТАЗОВ РАКА**

(57) Изобретение относится к медицине. Способ идентификации генов с сайт-специфической или с сайт-предпочтительной экспрессией в клетках-мишенях, которые были предварительно обнаружены и выделены с помощью неоднократных процедур иммуномагнитным методом. Затем очищенные клетки-мишени подвергают известным

процедурам клонирования. Предпочтительными клетками-мишенями являются злокачественные клетки, например метастатические клетки. Методами клонирования генов могут быть метод дифференциального отображения или метод субтрактивной гибридизации. Способ обеспечивает точность идентификации. 2 с. и 9 з.п. ф-лы.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 180 963** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **G 01 N 33/48, C 12 Q 1/68**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98119525/14, 25.03.1997
(24) Effective date for property rights: 25.03.1997
(30) Priority: 26.03.1996 NO 961221
(43) Application published: 20.08.2000
(46) Date of publication: 27.03.2002
(85) Commencement of national phase: 26.10.1998
(86) PCT application:
NO 97/00083 (25.03.1997)
(87) PCT publication:
WO 98/36004 (02.10.1998)
(98) Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", A.P.Agureevu

(71) Applicant:
FODSTAD Ehjstejn (NO)
(72) Inventor: FODSTAD Ehjstejn (NO),
EhNGEBROTEN Olav (NO), REE Anne Khansen
(NO), KhOVIG Jokhannes Ehjvinn (NO)
(73) Proprietor:
FODSTAD Ehjstejn (NO)
(74) Representative:
Agureev Aleksandr Pavlovich

(54) **IMMUNOMAGNETIC SEPARATION OF CELLS USED FOR IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH SITE-PREFERABLE CANCER METASTASIS FORMATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology, molecular biology. SUBSTANCE: invention relates to method of identification of genes with site-specific or site-preferable expression in target-cells that have been detected and isolated preliminary by multiple procedures using immunomagnetic method. Then the

purified target-cells are subjected for the known cloning procedures. Malignant cells, for example, metastatic cells, are preferable target-cells. Method of differential image or method of subtractive hybridization can be used for genes cloning. EFFECT: enhanced precision of identification. 11 cl

Настоящее изобретение относится к новому способу обнаружения новых генов с сайт-специфическим типом экспрессии в опухолевых клетках, присутствующих в различных тканях.

Хорошо известно, что многие типы рака имеют типичный характер распространения, при котором метастазы образуются предпочтительно в определенных тканях и органах, часто в четко определенном порядке. Так, например, метастазы рака молочной железы сначала появляются в лимфоузлах, тогда как главным и наиболее распространенным очагом (50%) последующего распространения этих метастазов является костная мозг/кости. Что касается других тканей, то очагами распространения метастазов рака молочной железы становятся печень, легкие и центральная нервная система (до 20%). Аналогичным образом, рак предстательной железы дает метастазы в позвоночник: рак толстой кишки - в лимфоузлы и печень; остеосаркома - в легкие; а злокачественная меланома - в лимфоузлы, печень, легкие и головной мозг. О факторах, определяющих такое тканеспецифическое распространение рака, известно очень мало, за исключением некоторых свойств опухолевых клеток, которые причастны к такому распространению, например, таких как их способность возвращаться обратно в орган-мишень, перемещаться и внедряться в ткань хозяина, реагировать на локальные факторы роста, индуцировать ангиогенез или вступать в реакции неизвестными в настоящее время способами. Эти свойства должны быть ассоциированы с экспрессией специфических белков, продуцируемых известными или неизвестными генами. Поэтому выявление механизмов образования метастазов, очевидно, послужит новым шагом или даст новый ключ к идентификации таких генов и может иметь важное значение для диагностики и лечения рака.

Для исследования генов, которые имеют высокую степень экспрессии в определенных, а не в каких-либо других, популяциях клеток, было использовано несколько методов, включая такие методы, как клонирование путем субтрактивной гибридизации, и методы дифференциального отображения. Большинство таких методов клонирования предусматривали использование *in vitro* клеточных линий или клонов в качестве исходного материала. Однако известно, что клеточные линии могут значительно отличаться от опухолевых клеток, от которых они происходят, и что условия *in vitro*-культивирования могут оказывать стимулирующее или суппрессирующее действие на экспрессию генов, ответственных за способность клеток внедряться во внеклеточный матрикс и стромальную ткань, а также за их общую способность к метастазированию.

Логически альтернативным решением при выборе клеточных линий для сравнения экспрессии генов транскриптов или нужных белков должно быть использование образцов опухолевых тканей от первичных опухолей и метастатических опухолей пациентов. Однако такой подход может привести к некоторым ошибкам, а также имеет определенные технические трудности. При использовании

опухолевых клеток от разных пациентов экспрессия генов признаков у каждого из таких пациентов должна быть скорректирована перед тем, как будет проведено сравнение типов экспрессии исследуемых генов. Это значительно усложняет такое клонирование генов. Поэтому было бы желательно иметь возможность сравнивать типы экспрессии генов в раковых клетках, полученных от уже обнаруженных опухолей, локализованных в различных участках организма одного и того же индивидуума. Это можно осуществить путем сбора опухолевой ткани от первичной опухоли и явных метастазов, обнаруженных и удаленных при хирургической операции, и/или путем хирургической операции или биопсии при рецидиве заболевания, или от вторичных опухолей у пациентов с прогрессирующим заболеванием, которые получали или не получали другого лечения после хирургической операции по удалению первичной опухоли.

При любой стратегии клонирования гена важно использовать по возможности чистые популяции клеток-мишеней, что позволит избежать нерелевантных сигналов от клеток, которые не являются мишенями и которые могут повлиять на сравниваемый характер экспрессии. Это трудно достигнимо для образцов, взятых от твердых опухолей, поскольку образцы опухолевых клеток, полученные после хирургической операции и биопсии, будут смешаны с клетками нормальной соединительной ткани, включая стромальные и эндотелиальные клетки, а стандартные методы получения тканевых препаратов не дают возможность удалить эти клетки на должном уровне. При гематологических раковых заболеваниях злокачественные клетки имеют те же детерминанты, что и соответствующие субпопуляции нормальных клеток, что не позволяет отделить эти два типа клеток друг от друга.

При попытке идентификации генов, участвующих в ранних стадиях диссеминации опухолей, важно получить опухолевые клетки из соответствующих участков организма, когда размер вторичных опухолей мал, или даже, если это возможно, из субклинического очага опухоли или клеток. В качестве примера могут служить злокачественные клетки, присутствующие в крови или в костном мозге до того, как могут быть обнаружены твердые метастазы, диагностированные стандартными методами. Другим примером могут служить раковые клетки, присутствующие в спинно-мозговой жидкости, в моче, или в выпотах в плевральной или брюшной полости до того, как эти клетки будут обнаружены стандартными морфологическими методами. Кроме того, при операции первичной опухоли или при подозрении на возникновение метастазов часто удаляют лимфатические узлы, если они увеличены. Однако в тех случаях, где имеется очень ограниченное число опухолевых клеток, морфологическое исследование может дать отрицательные результаты. Во всех примерах настоящего изобретения описаны способы обнаружения и отбора опухолевых клеток-мишеней для клонирования генов.

Помимо использования раковых клеток, полученных из различных тканей или органов

пациентов, в настоящем изобретении также описан другой способ получения клеток метастатических опухолей человека в целях их использования для исследования генов с сайт-специфической экспрессией. Клетки, выделенные из нескольких опухолей человека, культивировали *in vitro* или *in vivo* в организме животных с иммунодефицитом, и эти клетки были использованы для получения экспериментальных моделей метастазов или моделей, в которых может быть осуществлено ортотопическое культивирование клеток, то есть в клинически релевантных тканях их образования; в злокачественных меланоммах кожи; в остеосаркомах в костях; в колоректальных раковых опухолях в стенке кишечника; в опухолях рака молочной железы в жировой подушке молочной железы, и т. п. Исходя из экспериментальных моделей метастазов с различным характером распространения опухолей, можно определить в зависимости от клеточной линии путь клеточной инъекции и тип используемого хозяина. Обычно в клинических образцах типы метастазов имитируют соответствующий тип опухоли. При использовании таких моделей можно также получить опухолевые клетки из участков метастазирования в организме пациентов, которые обычно являются недоступными, таких как ткани костного или головного мозга. И в этом случае для клонирования генов, во избежание проблем, связанных с генами, экспрессируемыми в нормальных клетках хозяина, может оказаться важным выбрать из клеток животных опухолевые клетки человека.

Ранее эксперименты по клонированию нужных генов в целях идентификации генов с сайт-специфической экспрессией было невозможно проводить с использованием образцов твердых опухолей и злокачественных клеток крови и костного мозга. Это обусловлено тем, что значительная фракция твердых опухолей и метастазов не является злокачественными клетками, а представляет собой соединительную ткань, которая поддерживается и развивается в промежутке между злокачественными клетками, и которая также содержит кровеносные сосуды, обеспечивающие необходимую доставку питательных факторов и кислорода в опухоль. При этом считалось, что осуществление адекватного отделения опухолевых клеток от нормальных клеток невозможно без использования промежуточной стадии культивирования клеток *in vitro*, включая манипуляции по освобождению от нормальных клеток. Однако такое *in vitro*-культивирование должно приводить к отбору субпопуляции опухолевых клеток в среде, абсолютно отличающейся от условий *in vivo*, что может индуцировать значительные изменения в характере экспрессии генов. Поэтому для идентификации генов, ассоциированных с процессом метастазирования, не может быть использовано культивирование опухолевых клеток, взятых от твердых метастазов. Кроме того, не было замечено какого-либо интереса специалистов в области клонирования генов к сравнению типов экспрессии генов в злокачественных клетках в не подвергавшихся лечению первичных и метастатических опухолях. Более того, в образцах опухолевых клеток крови и костного мозга, если они

присутствуют, имеется очень мало фракций из общего числа ядродержащих клеток, и, кроме того, злокачественные клетки в крови и костном мозге не рассматривались как интересные объекты с точки зрения попыток клонирования генов. Это обусловлено тем, что опухолевые клетки не могут быть адекватно отделены от нормальных клеток, а самое главное, тем, что специалисты в области клонирования генов не считают, что такие злокачественные клетки будут иметь характер экспрессии генов, существенно отличающийся от характера экспрессии этих генов в родительских опухолях.

Раковые клетки, выделенные из опухолей, метастазирующих в различные и клинически релевантные ткани- и органы-мишени у животных с иммунодефицитом, не были использованы в экспериментах по идентификации опухоли-ассоциированных генов с сайт-специфическим характером экспрессии, не только потому, что такие модели опухолей человека очень редки, но, что очень важно, также и потому, что не существует способов получения очищенных популяций раковых клеток.

Поэтому целью настоящего изобретения является разработка способа, благодаря которому клетки-мишени в целях идентификации последовательностей генов в этих клетках-мишенях могут быть отделены от клеточной популяции в среде, окружающей популяцию специфических клеток.

Эта цель может быть достигнута с помощью настоящего изобретения, охарактеризованного в прилагаемой формуле изобретения.

Поскольку целью настоящего изобретения является идентификация генов, специфически экспрессируемых на ранней стадии диссеминации опухоли, то твердые опухоли и метастазы должны иметь небольшие размеры, а злокачественные клетки в крови и костном мозге должны представлять так называемое микрометастатическое заболевание, то есть число присутствующих опухолевых клеток должно быть ограниченным. Если возможно, то такие опухолевые клетки должны быть собраны даже в тех случаях, когда указанные клетки не могут быть обнаружены методами стандартного морфологического исследования, либо обычными методами диагностики, такими как радиология и ЯМР-визуализация. Очевидно, что поскольку такие клетки не могут быть опознаны, то они не могут представлять интерес для клонирования генов. Использование иммуномагнитной техники позволяет выделить такие злокачественные клетки, даже когда они присутствуют в небольших количествах. Различные методы амплификации ДНК- и РНК-последовательностей позволяют клонировать гены с использованием таких небольших количеств злокачественных клеток, при условии, что эта клеточная популяция является достаточно чистой.

Позитивная селекция опухолевых клеток-мишеней может быть достигнута с использованием техники, известной по существу и описанной в патентных заявках РСТ/NO93/00136(WO94/07139) и РСТ/NO95/00052. Поскольку в данном случае чистота конечной популяции клеток-мишеней является важным фактором, то способ

иммуномагнитной селекции может быть осуществлен более чем один раз, либо он может быть осуществлен методом позитивной селекции (с использованием моноклональных антител, распознающих клетки-мишени) в комбинации с методом негативной селекции (с использованием антител, которые связываются с нежелательными клетками). Эта техника может быть с успехом использована для выделения клеток-мишеней из крови, костного мозга, выпота из кровеносных сосудов в злокачественной опухоли, и из моноклеточной суспензии, полученной из ткани первичных твердых опухолей и из ткани метастазов в лимфатических сосудах и других метастазах. Аналогичным образом было также продемонстрировано отделение злокачественных клеток человека от нормальных стромальных или гемопоэтических клеток животных-хозяев, даже в тех случаях, когда эти опухолевые клетки находятся в тканях костей, костного мозга, позвоночника или головного мозга. Поскольку одна из целей такого выделения заключается в исследовании на обнаружение генов, продукты которых участвуют в ранних стадиях образования метастазов, то может случиться, что будет получено лишь относительно небольшое количество клеток, и в этих случаях чистота выделенных клеток имеет особенно важное значение. Такая методика позволяет получить более очищенную популяцию клеток-мишеней от пациентов и животных-хозяев любым другим способом, представляя тем самым уникальные возможности для клонирования генов с сайт-специфическим типом экспрессии.

Следующая стадия осуществления настоящего изобретения предусматривает использование известных способов клонирования генов, таких как использование метода дифференциального отображения, который был впервые описан Liang, A. & Pardee, A. B. (Science, Vol 257, 967-971, 1992). В этом методе полимеразную цепную реакцию осуществляют с использованием ферментов и праймеров, которые приводят к обратной транскрипции и рандомизированной амплификации генных транскриптов, присутствующих в клетках-мишенях. Затем кДНК-фрагменты, полученные от сравниваемых клеточных популяций, исследуют на секвенирующем геле, и сайт-специфические фрагменты экстрагируют и секвенируют. После этого нужные генные фрагменты подвергают дополнительному исследованию, включая исследование типа их экспрессии в материале, аналогичном материалу, используемому для клонирования. И в этом случае очень важно иметь в распоряжении популяции опухолевых клеток, очищенные от нежелательных клеток, которые не являются целевыми клетками, и которые вносят нежелательные искажения в результаты. Возможность использования опухолевых клеток человека, выделенных из метастатических моделей у животных с иммунодефицитом, имеет важное значение также потому, что эти модели являются надежным и постоянным источником опухолевых клеток-мишеней, используемых для проведения обширных исследований. Во

избежание нежелательных изменений в экспрессии генов, не связанных с целями идентификации генов, имеющих сайт-специфический характер экспрессии, важно также, чтобы клетки-мишени, взятые от пациентов или от моделей животных, были выделены и обработаны для исследования ДНК и РНК прямым и очень быстрым способом.

Различные методы, используемые для клонирования новых генов, имеют присущие им ограничения. Методы дифференциального отображения, основанные на технике полимеразной цепной реакции, могут иметь определенные недостатки, связанные с репрезентативностью и воспроизводимостью. Что касается нашей методики, то в последующем мы включили в нее стадии, позволяющие минимизировать эти недостатки. Это было достигнуто, главным образом, благодаря применению техники с использованием иммунных сфер, которые позволяют специфически и биологически исследовать репрезентативные клетки не только в первой стадии дифференциального отображения, но и также в стадиях, где гены-кандидаты исследуются на уровне экспрессии в соответствующих клетках и тканях.

Пример 1

Опухолевые клетки, взятые из первичной опухоли и подмышечных лимфоузлов у пациента с раком молочной железы, получали физическими и ферментативными методами для приготовления моноклеточной суспензии. Образцы костного мозга (50 мл) были взяты путем биопсии, а образцы периферической крови были получены путем венозной пункции, после чего мононуклеарные клетки, полученные в обоих случаях, выделяли на Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Эти клеточные суспензии независимо инкубировали с моноклональными антителами MOC-31 и BM7, распознающими панэпителиальный антиген и генный продукт MUC-1 соответственно. После промывки и инкубирования добавляли сферы Dynabead M-450 SAN SD (Dynal, Oslo, Norway), которые связываются с Fc-областью "первых" антител. Затем опухолевые клетки с комплексом связанного антитела - Dynabead M-450 SAN SD отделяли от нормальных мононуклеарных клеток с использованием сильного магнита. Природа отобранных клеток была подтверждена микроскопически. Из различных клеточных популяций была экстрагирована РНК, и этот материал подвергали клонированию методом дифференциального отображения (Liang & Pardee, 1992), где частичные кДНК-последовательности из мРНК-субпопуляций, полученные путем обратной транскрипции, были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции. Сравнение кДНК-фрагментов от клеточных популяций различных опухолей проводили на секвенирующем геле, и фрагменты, специфически экспрессированные в клетках, полученных от одного из участков организма, экстрагировали и секвенировали. Из ряда представляющих интерес генных последовательностей со специфической экспрессией либо в опухолевых клетках, выделенных посредством нашей технологии с использованием магнитных иммуносфер из головного мозга, либо в опухолевых клетках,

выделенных с использованием иммуномагнитной техники из метастазов в лимфоузлах, мы помимо еще неидентифицированных генов обнаружили один фактор транскрипции, связанный с клеточным циклом, и один онкогенный продукт. Экспрессия этих двух идентифицированных генных последовательностей в биологически релевантных системах модели и в клиническом материале в настоящее время анализируются.

Пример 2

В этом примере были использованы клетки, выделенные из экспериментальной модели метастазов рака молочной железы человека. Бестимусным, "голым", крысам в большую цистерну (cisterna magna, CM) инъецировали клетки рака молочной железы человека MA-11, что приводило к распространению и росту злокачественных клеток в мягкой и паутинной оболочках мозга. Кроме того, клетки MA-11, инъецированные в отдел левого желудочка сердца (LV), образовывали метастазы в спинном мозге, что приблизительно через 35 дней приводило к развитию у животных паралича задних лап. Опухолевые клетки из обоих участков локализации были получены путем измельчения ткани хозяина и приготовления моноклеточных суспензий, после чего для позитивного отбора злокачественных клеток проводили процедуру с использованием иммуносфер, описанную в Примере 1. Затем осуществляли экстракцию РНК из клеток, полученных из двух указанных участков локализации, вместе с *in vitro*-культивированными клетками MA-11, и этот материал аналогичным образом подвергали процедуре клонирования методом дифференциального отображения, как уже было описано выше. Кроме того, мРНК, экстрагированную из соответствующей нормальной ткани крыс, использовали в качестве контроля. При этом следует отметить, что клеточная линия MA-11 была продуцирована иммуномагнитным методом из клеточных изоляторов микрометастатических опухолей, полученных из костного мозга от пациента с раком молочной железы на стадии II. Было обнаружено несколько фрагментов-кандидатов, которые являются специфичными для клеток, развивающихся в мягкой и паутинной оболочке мозга, или для метастатических клеток, развивающихся в спинном мозге. Анализ последовательностей показал, что эти фрагменты представляют собой как новые, так и известные гены. Из фрагментов, подтвержденных как фрагменты, дифференциально экспрессированные в клетках MA-11 и выделенные из метастатической клетки, четыре гена-кандидата исследованы в настоящее время более детально. Два из них, обозначенные LV1 и LV12, представляют особый интерес, LV1 обнаруживает высокую степень селективности в отношении экспрессии в опухолевых клетках метастазов в спинном мозге, тогда как LV12 обнаруживает негативную регуляцию в клетках, растущих в мягкой и паутинной оболочке мозга. Было установлено, что LV1 активируется в ряде клеточных линий, которые, как известно, обладают высокой степенью способности образовывать экспериментальные метастазы

у животных с иммунным дефицитом. В панели первичных опухолей, взятых от пациентов с раком молочной железы, низкий уровень экспрессии LV ассоциируется с короткой продолжительностью жизни этих пациентов. В целом результаты показывают, что мРНК LV1, очевидно, в высокой степени активируется в метастатических клетках, а уровень мРНК LV12 обратно пропорционально коррелирует с прогрессированием и метастазированием клеток рака молочной железы. Оба эти гена являются новыми. Кроме того, третий предполагаемый ген-кандидат, CM13, также является новым геном, позитивно регулируемым в опухолевых клетках, растущих в мягкой и паутинной оболочках мозга. Несколько других кандидатов пока анализируются. Для двух фрагментов LV1 и LV12 начато клонирование полноразмерной кДНК.

Пример 3

В модели, аналогичной модели, описанной в Примере 2, клетки рака молочной железы человека MT1 развивались в мягкой и паутинной оболочках мозга после инъекции CM, тогда как клетки с инъецированным LV метастазировали в костный мозг, а также в кости позвонков в позвоночнике и в длинные кости. Клетки из этих двух участков локализации, а также *in vitro*-культивированные клетки выделяли, и из клеток различных популяций экстрагировали РНК. Этот материал может быть подвергнут процедурам клонирования, аналогичным тем, что были описаны в Примере 2.

Пример 4

Опухолевые клетки, выделенные методами, описанными в Примере 1, были получены от других пациентов с раком молочной железы; от пациентов с колоректальным раком, где опухолевые клетки были выделены из первичных и рецидивирующих опухолей; из лимфоузлов и метастазов печени; из образцов крови и костного мозга; и от пациентов с раком предстательной железы, где клетки помимо образцов крови и костного мозга были выделены из образцов первичных или рецидивирующих опухолей, взятых из лимфоузлов. Выделенные клетки могут быть использованы для клонирования генов.

Помимо использования материала, описанного в Примерах 1-4, для клонирования генов он может быть также использован для исследования характера экспрессии всех представляющих интерес генных последовательностей.

Формула изобретения:

1. Способ идентификации генов с сайт-специфической или сайт-предпочтительной экспрессией в раковых клетках-мишенях, присутствующих в клеточном окружении, имеющем отличие от природного окружения или не являющимся их природным окружением, отличающийся тем, что указанные клетки-мишени вначале обнаруживают и выделяют с помощью неоднократных процедур, проводимых иммуномагнитным методом, в результате чего получают до 100 % специфических клеток-мишеней, после чего указанные клетки-мишени подвергают известной процедуре клонирования генов, где проводят сравнение неизвестных генов, имеющих различия в уровнях экспрессии мРНК в

клетках-мишенях, выделенных из различных тканей.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в нем используемыми клетками-мишенями являются злокачественные клетки, полученные от твердых первичных или рецидивирующих опухолей в лимфоузлы и/или от метастазов таких опухолей в лимфоузлы, и/или кровь, и/или костный мозг, и/или костную ткань, и/или печень, и/или легкие, и/или центральную, и/или нервную систему, и/или злокачественный плевральный выпот и асцит, мочу, и/или спинно-мозговую жидкость.

3. Способ по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что в нем злокачественные клетки выделяют из моноклеточных суспензий, полученных из диагностированных твердых опухолей, и/или из фракций мононуклеарных клеток, полученных из образцов костного мозга или крови, и/или из клеток, присутствующих в асците, моче, спинно-мозговой жидкости.

4. Способ по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что в нем используемыми злокачественными клетками являются *in vitro*-культивированные опухолевые клетки человека; и/или опухолевые клетки человека, растущие в специфических тканях у животных с иммунодефицитом; и/или экспериментальные метастазы опухолей человека, выращенные у этих животных.

5. Способ по пп. 1-4, отличающийся тем, что в нем из выделенных клеток экстрагируют РНК и/или ДНК.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что в нем экстрагированные нуклеиновые кислоты используют в целях клонирования генов.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что в нем

указанным методом клонирования генов является метод дифференциального отображения и метод субтрактивной гибридизации, либо любой другой метод, который может быть использован для идентификации генов с дифференциальной экспрессией.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что в нем амплифицированные кДНК, полученные из злокачественных клеток, отобранных из различных участков, исследуют и сравнивают на секвенирующем геле, а те из них, которые представляют интерес с точки зрения сайт-специфического или сайт-предпочтительного характера экспрессии, секвенируют и идентифицируют.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что в нем характер экспрессии идентифицированных генных последовательностей исследуют с использованием материала, полученного из всех участков релевантных опухолевых клеток, описанных в пп. 1-4.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что в нем ранее неизвестные гены, идентифицированные как описано в предыдущем пункте, используют для генной терапии, и/или в качестве мишеней для проведения процедур, направленных на изменение или инактивацию генов или их продуктов.

11. Способ получения специфических генных последовательностей и продуктов их экспрессии в раковых клетках-мишенях, присутствующих в клеточном окружении, включающий стадию идентификации генов согласно п. 1.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60