

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010105037/15, 11.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.07.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.07.2007 US 60/949,820

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2011 Бюл. № 23

(45) Опубликовано: 20.06.2014 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO2006119980 A1, 16.11.2006.
RU2165081 C2, 10.04.2001. RU2149404 C1,
20.05.2000. САМУИЛОВ В.Д.,
Иммуноферментный анализ, Соросовский
образовательный журнал,(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.02.2010(86) Заявка РСТ:
US 2008/069764 (11.07.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/012140 (22.01.2009)

Адрес для переписки:

109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

СИНГХ Шарат (US),
ХАРВИ Жанна (US)

(73) Патентообладатель(и):

НЕСТЕК С.А. (CN)

(54) ВЫБОР ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА ЛЕГКИХ С ПОМОЩЬЮ
МАТРИЦ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к выбору подходящего противоракового лекарственного средства для лечения рака легких, прогнозированию реакции опухоли легких на лечение противораковым лекарственным средством, а также к применению матрицы для выбора подходящего противоракового лекарственного средства для лечения рака легких.

Группа изобретений основана на детектировании активационных состояний компонентов путей передачи сигналов в раковых клетках, включающих Her3 (ErbB3). Группа изобретений помогает врачу выбрать подходящую противораковую терапию в надлежащей дозировке и в надлежащее время для каждого пациента. 4 н. и 8 з.п. ф-лы, 5 ил., 22 табл., 11 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010105037/15, 11.07.2008**

(24) Effective date for property rights:
11.07.2008

Priority:

(30) Convention priority:
13.07.2007 US 60/949,820

(43) Application published: **20.08.2011 Bull. № 23**

(45) Date of publication: **20.06.2014 Bull. № 17**

(85) Commencement of national phase: **15.02.2010**

(86) PCT application:
US 2008/069764 (11.07.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/012140 (22.01.2009)

Mail address:

109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"

(72) Inventor(s):

**SINGKh Sharat (US),
KhARVI Zhanna (US)**

(73) Proprietor(s):

NESTEK S.A. (CH)

(54) **SELECTION OF MEDICATIONS FOR LUNG CANCER THERAPY BY MEANS OF ANTIBODY-BASED MATRICES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to selection of a suitable anti-cancer medication for treating lung cancer, prediction of the lung tumour response to treatment with the anti-cancer medication, as well as to application of a matrix for selection of the suitable anti-cancer medication for lung cancer treatment. The

group of inventions is based on detection of activation states of components of signal transduction pathways in cancer cells, including Her3 (ErbB3).

EFFECT: group of inventions assists a doctor in selection of a suitable anti-tumour therapy in a proper dose and in proper time for each patient.

12 cl, 5 dwg, 22 tbl, 11 ex

Настоящая заявка претендует на приоритет Предварительной патентной заявки США №60/949,820, поданной 13 июля 2007 г., содержание которой включено в настоящее изобретение путем отсылки во всей полноте для всех целей.

Уровень техники

5 Процесс передачи сигналов в клетках отвечает за целый ряд биологических функций, включая деление и смерть клеток, метаболизм, активацию иммунных клеток, нейротрансмиссию и чувственное восприятие, если ограничиться лишь несколькими. Соответственно, нарушения нормальной передачи сигналов в клетках может вызвать ряд заболеваний, как то диабет, сердечные заболевания, аутоиммунные заболевания и

10 рак.

Одним из хорошо изученных путей передачи сигналов является MAP-киназный путь, который отвечает за передачу сигналов от фактора роста эпидермиса (EGF) до стимуляции пролиферации клеток (см. фиг.1). EGF связывается с тирозинкиназой, связанной с трансмембранным рецептором - рецептором фактора роста эпидермиса

15 (EGFR), который активируется при связывании EGF. Связывание EGF с EGFR активирует тирозинкиназную активность цитоплазматического домена рецептора. Одним из последствий активации этой киназы является аутофосфорилирование EGFR по остаткам тирозина. Фосфорилированные остатки тирозина на активированном EGFR образуют посадочное место для связывания содержащих домен SH2 адаптерных белков типа

20 GRB2. При функционировании в качестве адаптера GRB2 еще связывается и с фактором обмена гуаниновых нуклеотидов SOS посредством домена SH3 на GRB2. Образование комплекса EGFR-GRB2-SOS приводит к активации фактора обмена гуаниновых нуклеотидов SOS, который вызывает удаление GDP из Ras. После удаления GDP Ras связывает GTP и активируется.

После активации Ras связывается с и активирует протеинкиназную активность RAF-киназы - серин/треонин-специфичной протеинкиназы. После этого происходит активация протеинкиназного каскада, ведущая к пролиферации клеток. В общих чертах, RAF-киназа затем фосфорилирует и активирует MEK, другую сериновую/треониновую

25 киназу. Активированная MEK фосфорилирует и активирует митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK). В число мишеней для дальнейшего фосфорилирования MAPK входит киназа 40S-рибосомного белка S6 (RSK). Фосфорилирование RSK под действием MAPK вызывает активацию RSK, которая в свою очередь фосфорилирует рибосомный белок S6. Другой известной мишенью MAPK является протоонкоген с-Мус-ген, важный для пролиферации клеток, который подвергается мутации при различных раковых

30 заболеваниях. MAPK также фосфорилирует и активирует еще одну протеинкиназу - MNK, которая в свою очередь фосфорилирует фактор транскрипции CREB. Косвенным образом MAPK также регулирует транскрипцию гена Fos, кодирующего другой фактор транскрипции, участвующий в пролиферации клеток. Путем изменения уровня и активности таких факторов транскрипции MAPK переводит исходный внеклеточный

35 сигнал от EGF в изменение транскрипции генов, важных для прохождения клеточного цикла.

Учитывая, что пути передачи сигналов играют ключевую роль в развитии клеток, не удивительно, что многие раковые заболевания возникают в результате мутаций и других изменений компонентов передачи сигналов, что ведет к аномальной активации

40 путей пролиферации клеток. Например, суперэкспрессия или гиперактивность EGFR связывают с рядом раковых заболеваний, включая мультиформную глиобластому, рак толстой кишки и рак легких. Это привело к разработке средств противораковой терапии, направленных против EGFR, включая gefitinib и erlotinib при раке легких и

цетуксимаб при раке толстой кишки.

Цетуксимаб является примером моноклонального антитела-ингибитора, который связывается с внеклеточным доменом связывания лигандов EGFR, предотвращая тем самым связывание лигандов, активирующих тирозинкиназу EGFR. Напротив, гефитиниб и эрлотиниб представляют собой небольшие молекулы, которые ингибируют имеющую внутриклеточную локализацию тирозинкиназу EGFR. В отсутствие активности киназы EGFR не может подвергаться аутофосфорилированию по остаткам тирозина, что является предпосылкой для связывания нижележащих адаптерных белков типа GRB2. При торможении сигнального каскада в клетках, зависящих от этого пути для роста, уменьшается пролиферация и миграция опухолей.

Кроме того, другие исследования показали, что у человека около 70% меланом и меньшая доля других опухолей содержат точечную мутацию (V599E) гена Raf, которая ведет к постоянной активации пути MAPK (например, см. Davies et al., Nature, 417:949-954 (2002)). Такие результаты свидетельствуют, что мутации в определенных путях передачи сигналов могут быть характерными для определенных типов опухолей, и такие специфически измененные пути передачи сигналов могут оказаться перспективной мишенью для химиотерапевтического вмешательства.

Учитывая, что различные способы лечения рака, в частности химиотерапия рака, могут функционировать, прямо или косвенно, путем блокирования либо активации клеточных путей передачи сигналов, участвующих в пролиферации или гибели клеток, соответственно, активность данного пути передачи сигналов при определенной форме рака может служить хорошим индикатором эффективности различных способов лечения рака. Соответственно, наряду с выполнением других потребностей, настоящим изобретением предусмотрен способ оценки эффективности потенциальной противораковой терапии для индивидуального пациента. При этом настоящим изобретением предусмотрены способы, помогающие врачу выбрать подходящую противораковую терапию в надлежащей дозировке и в надлежащее время для каждого пациента.

Раскрытие изобретения

Настоящим изобретением предусмотрены композиции и способы детектирования активационных состояний компонентов путей передачи сигналов в раковых клетках (например, циркулирующих клетках опухоли легких). Информация об активационных состояниях компонентов путей передачи сигналов, полученная с применением изобретения, может использоваться для диагностики, прогнозирования рака и при разработке способов лечения рака.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ выбора подходящего противоракового лекарственного средства для лечения рака легких, который включает:

- (a) выделение клеток опухоли легких после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;
- (b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) детектирование активационного состояния одного или более анализируемых веществ в клеточном экстракте методом анализа, включающим несколько серийных разведений захватывающих антител, специфичных к одному или более анализируемым веществам, при этом захватывающие антитела фиксируются на твердой подложке; и
- (d) определение того, подходит или не подходит это противораковое лекарственное средство для лечения рака легких путем сравнения активационного состояния, обнаруженного у одного или более анализируемых веществ, со стандартным активационным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного

средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ выбора субъекта, страдающего раком легких, который будет подходящим кандидатом для лечения с помощью противоракового лекарственного средства, который включает:

- 5 (a) выделение клеток опухоли легких после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;
- (b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) детектирование активационного состояния одного или более анализируемых веществ в клеточном экстракте методом анализа, включающим несколько серийных
- 10 разведений захватывающих антител, специфичных к одному или более анализируемых веществ, при этом захватывающие антитела фиксируются на твердой подложке; и
- (d) определение того, подходит или не подходит данный субъект для лечения рака легких с помощью этого противоракового лекарственного средства путем сравнения активационного состояния, обнаруженного у одного или более анализируемых веществ,
- 15 со стандартным активационным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ идентифицирования реакции опухоли легких на лечение с помощью противоракового лекарственного средства, который включает:

- 20 (a) выделение клеток опухоли легких после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;
- (b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) детектирование активационного состояния одного или более анализируемых веществ в клеточном экстракте методом анализа, включающим несколько серийных
- 25 разведений захватывающих антител, специфичных к одному или более анализируемых веществ, при этом захватывающие антитела фиксируются на твердой подложке; и
- (d) идентификацию данной опухоли легких как реагирующей или не реагирующей на лечение с помощью этого противоракового лекарственного средства путем сравнения активационного состояния, обнаруженного у одного или более анализируемых веществ,
- 30 со стандартным активационным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ прогнозирования реакции субъекта, страдающего раком легких, на лечение с помощью противоракового лекарственного средства, который включает:

- 35 (a) выделение клеток опухоли легких после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;
- (b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) детектирование активационного состояния одного или более анализируемых веществ в клеточном экстракте методом анализа, включающим несколько серийных
- 40 разведений захватывающих антител, специфичных к одному или более анализируемых веществ, при этом захватывающие антитела фиксируются на твердой подложке; и
- (d) прогнозирование вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение с помощью этого противоракового лекарственного средства путем сравнения активационного состояния, обнаруженного у одного или более анализируемых веществ,
- 45 со стандартным активационным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ прогнозирования исхода болезни у субъекта, страдающего раком легких, при лечении с помощью

противоракового лекарственного средства, который включает:

(a) выделение клеток опухоли легких после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

5 (c) детектирование активационного состояния одного или более анализируемых веществ в клеточном экстракте методом анализа, включающим несколько серийных разведений захватывающих антител, специфичных к одному или более анализируемых веществ, при этом захватывающие антитела фиксируются на твердой подложке; и

(d) прогнозирование исхода болезни у субъекта, получающего это противораковое
10 лекарственное средство, путем сравнения активационного состояния, обнаруженного у одного или более анализируемых веществ, со стандартным активационным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрена матрица, обладающая превосходным динамическим диапазоном, которая включает несколько серийных
15 разведений захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке, причем захватывающие антитела в каждом серийном разведении специфичны к одному или нескольким анализируемым веществам, которые соответствуют компонентам пути передачи сигналов в клеточном экстракте.

Другие задачи, особенности и преимущества настоящего изобретения станут
20 понятными специалистам в этой области из следующего подробного описания и фигур.

Краткое описание фигур

На фиг.1 представлен пример пути передачи сигналов, участвующего в пролиферации клеток, который может использоваться при практическом применении изобретения. Представлены компоненты пути EGFR/MAPK/ERK, который используется клетками
25 для преобразования митогенного сигнала в пролиферацию клеток.

На фиг.2 представлена схема применения адресуемых матриц по изобретению для отбора лекарственных средств в ходе лечения рака.

На фиг.3 представлен схематический пример адресуемой матрицы, содержащей разведения антител к компонентам пути рецепторных тирозинкиназ, таких как
30 компоненты пути EGFR/MAPK/ERK.

На фиг.4 представлен схематический пример адресуемой матрицы, содержащей разведения антител к компонентам путей передачи сигналов, активируемым при ангиогенезе опухолей.

На фиг.5A-B представлено определение числа клеток CTC при помощи системы
35 Veridex CellSearch у пациента 2002 (A) и у пациента 2015 (B).

Осуществление изобретения

I. Введение

Как описано выше, активация путей передачи сигналов, участвующих в пролиферации клеток, и дезактивация путей, участвующих в клеточной смерти, являются отдельными
40 примерами молекулярных процессов, характерных для многих разных типов рака. Во многих случаях активность определенных путей передачи сигналов и их компонентов может служить молекулярной сигнатурой данного типа рака. К тому же такие активированные компоненты могут служить полезными мишенями для терапевтического вмешательства. Соответственно, знание уровня активности определенной системы
45 передачи сигналов в раковых клетках до, во время и после обработки дает врачу очень важную информацию, которая может использоваться для выбора надлежащего курса лечения. Более того, непрерывное наблюдение за путями передачи сигналов, действующими в раковых клетках, по ходу лечения может дать врачу дополнительную

информацию об эффективности лечения, побуждающую его либо продолжить определенный курс лечения, либо перейти к другому способу лечения, если, к примеру, раковые клетки стали устойчивыми к лечению из-за дальнейших отклонений, активирующих тот же самый либо другой путь передачи сигналов.

5 Соответственно, настоящим изобретением предусмотрены способы и композиции для детектирования экспрессии и активационных состояний нескольких разрегулированных молекул передачи сигналов в опухолевой ткани или внеопухолевых клетках типа редких циркулирующих клеток солидной опухоли специфическим, мультиплексным, высокопроизводительным методом. Изобретением также
10 предусмотрены способы и композиции для выбора надлежащей терапии (монотерапии или комбинированной терапии) для понижающей регуляции или отключения разрегулированного сигнального пути. Таким образом, изобретение может применяться для облегчения разработки индивидуализированной терапии для раковых пациентов.

Важным преимуществом настоящего изобретения является способность
15 детектировать и идентифицировать раковые клетки в кровотоке посредством определения активности путей передачи сигналов на уровне одиночных клеток. Раковые клетки часто обнаруживаются в крови пациентов на различных ранних стадиях рака в виде "микрометастазов" (рассеянных раковых клеток), а также обнаруживаются в раковых метастазах. Количество раковых клеток в крови зависит от стадии и типа
20 опухоли. Как правило, биопсия проводится на первичных опухолях, но не затрагивает большинство метастатических опухолей, что сильно затрудняет молекулярный анализ таких образцов опухолей. При метастазировании наиболее агрессивные раковые клетки выходят из первичной опухоли и проходят через кровь и лимфатическую систему, достигая удаленных мест. Таким образом, циркулирующие раковые клетки в крови
25 составляют наиболее агрессивную и однородную популяцию раковых клеток. Однако количество метастатических раковых клеток в крови зачастую бывает очень низким, от одной до нескольких тысяч клеток на мл крови. Одной из целей настоящего изобретения является способность выделять и определять пути передачи сигналов в таких редких клетках и применять эту информацию к более эффективным способам
30 лечения рака.

В некоторых воплощениях мультиплексный, высокопроизводительный способ иммуноанализа по настоящему изобретению способен детектировать уровень активации одной или нескольких молекул передачи сигналов в циркулирующих клетках солидной опухоли на уровне одиночных клеток. Фактически такие молекулы передачи сигналов,
35 как EGFR, можно детектировать с чувствительностью в 100 зептомоль и линейным динамическим диапазоном от 100 зептомоль до 100 фемтомоль. При этом одноклеточное детектирование активационных состояний множественных передатчиков сигналов в редких циркулирующих клетках способствует прогнозированию и диагностике рака, а также разработке индивидуализированных, адресных способов терапии.

40 Редкие циркулирующие клетки включают клетки солидной опухоли, которые дали метастазы либо микрометастазы из солидной опухоли. Циркулирующие опухолевые клетки, раковые стволовые клетки и клетки, мигрирующие к опухоли (например, вследствие химического притяжения), как то циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток, циркулирующие эндотелиальные клетки, циркулирующие
45 проангиогенные миелоидные клетки и циркулирующие дендритные клетки - вот некоторые примеры циркулирующих клеток, связанных с солидными опухолями.

Представляющие интерес молекулы передачи сигналов, как правило, экстрагируют вскоре после выделения циркулирующих клеток, чтобы сохранить их активационное

состояние *in situ*, предпочтительно в пределах 24, 6 или 1 часа, более предпочтительно в пределах 30, 15 или 5 минут. Выделенные клетки также можно инкубировать с одним или несколькими факторами роста, обычно в наномолярных или микромолярных концентрациях, в течение 1-30 минут, чтобы реанимировать или стимулировать активацию молекул передачи сигналов (например, см. Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)).

Как изложено более подробно в настоящем изобретении, для оценки потенциальной противораковой терапии для индивидуального пациента можно инкубировать выделенные клетки с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами в различных дозах. Затем можно провести стимуляцию фактором роста в течение короткого времени (например, 1-5 мин) или нескольких часов (например, 1-6 ч). Дифференциальная активация сигнальных путей в присутствии или в отсутствие противораковых лекарственных средств может способствовать выбору подходящей противораковой терапии в надлежащей дозе для каждого индивидуального пациента. Также можно выделить циркулирующие клетки из образца пациента во время лечения противораковым лекарственным средством и стимулировать их одним или несколькими факторами роста, чтобы определить, нужно ли сделать изменения в терапии. При этом способы настоящего изобретения будут способствовать клиницистам в выборе надлежащего противоракового лекарственного средства в надлежащей дозе в подходящее время для каждого пациента.

II. Определения

В настоящем изобретении следующие термины имеют приданные им значения, если не указано иначе.

Термин "рак" служит для обозначения любых представителей класса заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток. Термин охватывает все известные раковые и неопластические заболевания, которые характеризуются как злокачественные, доброкачественные, мягких тканей или солидных, и все стадии и степени рака, в том числе до и после метастазирования. Примеры различных типов рака включают рак легких (например, немелкоклеточный рак легких); рак пищеварительной системы и желудочно-кишечного тракта, как то рак толстого кишечника, желудочно-кишечные опухоли стромы, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак заднего прохода, рак желчных протоков, рак тонкого кишечника, рак желудка; рак пищевода; рак желчного пузыря; рак печени; рак поджелудочной железы; рак аппендикса; рак молочной железы; рак яичников; рак почек (например, почечноклеточная карцинома); рак центральной нервной системы; рак кожи; лимфома; хориокарцинома; рак головы и шеи; остеогенная саркома; и рак крови. В настоящем изобретении "опухоль" включает одну или несколько раковых клеток. В предпочтительном воплощении легочная опухоль происходит из субъекта с немелкоклеточным раком легких, таким, к примеру, как плоскоклеточная карцинома, аденокарцинома, крупноклеточная карцинома, бронхоальвеолярная карцинома (ВАС) или овсяноклеточная карцинома.

Термин "анализируемое вещество" обозначает любую представляющую интерес молекулу, как правило, макромолекулу типа полипептида, присутствие, содержание и/или идентичность которой подвергается определению. В некоторых случаях анализируемое вещество представляет собой клеточный компонент циркулирующих клеток солидной опухоли, предпочтительно молекулу передачи сигналов.

В настоящем изобретении термин "ряд разведений" служит для обозначения ряда понижающихся концентраций определенного образца (например, лизата клеток) или реагента (например, антител). Ряд разведений обычно получают при смешивании

отмеренного количества образца или реагента в исходной концентрации с разбавителем (например, разбавляющим буфером), получая меньшую концентрацию образца или реагента и повторяя этот процесс достаточное количество раз для получения требуемого числа серийных разведений. Образец или реагент может подвергаться серийному разведению по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 или 1000 раз, образуя ряд разведений, содержащий по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 понижающихся концентраций образца или реагента. Например, ряд разведений, содержащий 2-кратные серийные разведения реагента для захватывающих антител при исходной концентрации 1 мг/мл, может быть получен при смешивании одного объема захватывающих антител в исходной концентрации с равным объемом разбавляющего буфера, получая концентрацию захватывающих антител в 0,5 мг/мл и повторяя этот процесс до получения концентраций захватывающих антител в 0,25 мг/мл, 0,125 мг/мл, 0,0625 мг/мл, 0,0325 мг/мл и т.д.

Термин "превосходный динамический диапазон" относится к способности метода детектировать конкретное анализируемое вещество всего лишь в одной клетке, либо в тысячах клеток. Например, описанные в настоящем изобретении способы иммуноанализа обладают превосходным динамическим диапазоном, поскольку они способны детектировать определенную конкретную молекулу передачи сигналов в 1-10000 клеток при помощи ряда разведений захватывающих антител в различных концентрациях.

Термин "молекула передачи сигналов" или "передатчик сигналов" охватывает белки и другие молекулы, участвующие в процессе, при помощи которого клетка преобразует внеклеточный сигнал или раздражитель в ответ, который обычно включает упорядоченные последовательности биохимических реакций внутри клетки. Примеры молекул передачи сигналов включают тирозинкиназы таких рецепторов, как EGFR (например, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (например, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (инсулиновый рецептор), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (рецептор, родственный инсулиновому рецептору), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK (тирозинкиназа лейкоцитов), ALK (киназа анапластической лимфомы), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 и RTK 106; нереперторные тирозинкиназы, как то BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack и LIMK; компоненты сигнальных каскадов тирозинкиназ, как то Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNK, JNK, p38, She (p66), PI3K, Ras (например, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, киназа p70 S6, p53, циклин D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 и паксиллин; а также их комбинации.

В настоящем изобретении термин "циркулирующие клетки" охватывает внеопухолевые клетки, которые дали метастазы либо микрометастазы из солидной опухоли. Примеры циркулирующих клеток включают циркулирующие опухолевые клетки, раковые стволовые клетки и/или клетки, мигрирующие к опухоли (например, циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток, циркулирующие эндотелиальные клетки, циркулирующие проангиогенные миелоидные клетки, циркулирующие дендритные клетки).

Термин "образец" в настоящем изобретении обозначает любой биологический образец, полученный от пациента. Образцами служат цельная кровь, плазма, сыворотка, эритроциты, лейкоциты (например, мононуклеары периферической крови), слюна,

моча, кал, мокрота, смыв из бронхов, слезы, аспират из сосков, лимфа (например, диссеминированные опухолевые клетки лимфатических узлов), аспират тонкой иглой, любая другая жидкость организма, образец ткани (например, опухолевой ткани), как то биопсия из опухоли (например, биопсия иглой) и ее клеточные экстракты. В некоторых воплощениях образцом является цельная кровь или ее составная часть, как то плазма, сыворотка или клеточный осадок. В предпочтительных воплощениях образец получают путем выделения циркулирующих клеток солидной опухоли из цельной крови или ее клеточной фракции любым известным методом. В других воплощениях образцом является фиксированный формалином и заключенный в парафин (FFPE) образец опухолевой ткани, например, солидной опухоли легких, толстой или прямой кишки.

"Биопсия" относится к процессу взятия образца ткани для диагностической или прогностической оценки и к самому образцу ткани. Любой известный метод биопсии может применяться к способам и композициям настоящего изобретения. Используемый метод биопсии обычно зависит от типа исследуемой ткани и размера и типа опухоли - солидной или взвешенной (т.е. крови или асцитов), среди других факторов.

Репрезентативными методами биопсии являются эксцизионная биопсия, инцизионная биопсия, биопсия иглой (например, пункционная биопсия, аспирационная биопсия тонкой иглой и др.), хирургическая биопсия и биопсия костного мозга. Методы биопсии обсуждаются, к примеру, в *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper et al., eds., 16th ed., 2005, Chapter 70, и по всей Part V.

Термин "субъект" или "пациент" обычно означает человека, но может включать и других животных, как то других приматов, грызунов, собак, кошек, лошадей, овец, свиней и др.

"Матрица" или "микроматрица" включает отдельный набор и/или ряд разведений захватывающих антител, иммобилизованных или фиксированных на твердой подложке, такой, к примеру, как стекло (например, предметное стекло), пластик, чип, штырек, фильтр, шарики, бумага, мембрана (например, из нейлона, нитроцеллюлозы, поливинилиденфторида (PVDF) и др.), пучки волокон или любой другой подходящий субстрат. Захватывающие антитела обычно иммобилизуют или фиксируют на твердой подложке при помощи ковалентных или нековалентных взаимодействий (например, ионных связей, гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, дипольных связей). Матрицы, используемые в методах настоящего изобретения, как правило, содержат несколько различных захватывающих антител и/или концентраций захватывающих антител, сцепленных с поверхностью твердой подложки в различных известных/ адресуемых местах.

Термин "захватывающее антитело" служит для обозначения иммобилизованного антитела, которое специфично к (т.е. связывается или образует комплекс с) одному или нескольким представляющим интерес анализируемым веществам в образце. В предпочтительных воплощениях захватывающее антитело фиксировано на твердой подложке в матрице. Подходящие захватывающие антитела для иммобилизации любых из целого ряда молекул передачи сигналов на твердой подложке доступны от фирм Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) и BD Biosciences (San Jose, CA).

Термин "детектирующее антитело" в настоящем изобретении охватывает антитела, содержащие детектируемую метку, которая специфична к (т.е. связывается или образует комплекс с) одному или нескольким представляющим интерес анализируемым веществам в образце. Термин также охватывает такие антитела, специфичные к (т.е. связывающиеся

или образующие комплекс с) одному или нескольким представляющим интерес анализируемым веществам в образце, которые могут связываться с другими антителами, содержащими детектируемую метку. Примеры детектируемых меток включают метки типа биотин/стрептавидин, метки из нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов), химически активные метки, флуоресцентные метки, ферментные метки, радиоактивные метки и их комбинации. Подходящие детектирующие антитела для детектирования активационных состояний любых из целого ряда молекул передачи сигналов доступны от фирм Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) и BD Biosciences (San Jose, CA). Для примера, фосфо-специфичные антитела против различных фосфорилированных форм таких молекул передачи сигналов, как EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK/ERK, PTEN, Raf и MEK, доступны от фирмы Santa Cruz Biotechnology.

Термин "зависимое от активационного состояния антитело" охватывает детектирующие антитела, которые специфичны к (т.е. связываются или образуют комплекс с) определенному активационному состоянию одного или нескольких представляющих интерес анализируемых веществ в образце. В предпочтительных воплощениях зависимое от активационного состояния антитело детектирует состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексообразования одного или нескольких анализируемых веществ типа одной или нескольких молекул передачи сигналов. В некоторых воплощениях с помощью зависимых от активационного состояния антител детектируют фосфорилирование тирозинкиназ представителей семейства рецепторов EGFR и/или образование гетеродимерных комплексов между представителями семейства EGFR. Неограничивающие примеры активационных состояний (перечисленных в скобках), пригодных для детектирования с помощью зависимых от активационного состояния антител, включают: EGFR (EGFRvIII, фосфорилированный (p-) EGFR, EGFR:Shc, убиквитинированный (u-) EGFR, p-EGFRvIII); ErbB2 (p85:укороченный (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p85:Tr-p-ErbB2, Her2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLCg, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCg, VEGFR2:Src, VEGFR2: гепаринсульфат, VEGFR2:VE-кадгерин); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tiel (p-Tiel); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFkB и/или IKB (p-IK (S32), p-NFkB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad:14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); и паксиллин (p-paxillin (Y118)).

Термин "независимое от активационного состояния антитело" охватывает детектирующие антитела, которые специфичны к (т.е. связываются или образуют комплекс с) одному или нескольким представляющим интерес анализируемым веществам в образце независимо от их активационного состояния. Например, независимое от активационного состояния антитело может детектировать как фосфорилированные, так и нефосфорилированные формы одного или нескольких анализируемых веществ

типа одной или нескольких молекул передачи сигналов.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" охватывает дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и их полимеры в одноцепочечном или двухцепочечном виде, такие, к примеру, как ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты включают и такие нуклеиновые кислоты, которые содержат известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи в остове, как синтетические или природные, так и не встречающиеся в природе, но обладающие такими же свойствами связывания, как у стандартной нуклеиновой кислоты. Примеры таких аналогов включают фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептид-нуклеиновые кислоты (PNA). Если не указаны конкретные ограничения, то термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов и обладающие такими же свойствами связывания, как у стандартной нуклеиновой кислоты. Если не указано иначе, то определенная последовательность нуклеиновой кислоты также неявно охватывает и ее подвергнутые консервативным модификациям варианты и комплементарные последовательности, а также указанную в явном виде последовательность.

Термин "олигонуклеотид" обозначает одноцепочечный олигомер или полимер РНК, ДНК, гибрида РНК/ДНК и/или миметика. В некоторых случаях олигонуклеотиды состоят из природных (т.е. немодифицированных) оснований нуклеотидов, сахаров и межнуклеозидных (в главной цепи) связей. В некоторых других случаях олигонуклеотиды содержат модифицированные основания нуклеотидов, сахара и/или межнуклеозидные связи.

В настоящем изобретении термин "несовпадающий мотив" или "участок несовпадения" обозначает ту часть олигонуклеотида, которая не на все 100% комплементарна своей комплементарной последовательности. Олигонуклеотид может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше участков несовпадения. Участки несовпадения могут быть смежными или же отстоять на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше нуклеотидов. Несовпадающие мотивы или участки могут содержать один единственный нуклеотид или же 2, 3, 4, 5 или больше нуклеотидов.

Выражение "строгие условия гибридизации" относится к условиям, при которых олигонуклеотид будет гибридизироваться со своей комплементарной последовательностью, но не с другими последовательностями. Строгие условия зависят от последовательности и будут различными при различных обстоятельствах. В частности, более длинные последовательности гибридизуются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Обычно строгие условия выбирают так, чтобы они были на 5-10°C меньше температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при заданной ионной силе и pH. Точка T_m - это температура (при заданной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой в равновесном состоянии с последовательностью мишени гибридизуется 50% зонда, комплементарного мишени (поскольку последовательность мишени находится в избытке, то в равновесном состоянии в точке T_m будет связано 50% зонда). Строгие условия также достигаются добавлением дестабилизирующих реагентов типа формамида. При избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал по меньшей мере в два раза превышает фон, а предпочтительно

в 10 раз превышает фоновую гибридизацию.

Термины "по существу идентичны" или "существенная идентичность" в контексте двух или нескольких нуклеиновых кислот означают то, что эти две или несколько последовательностей или подпоследовательностей одинаковы либо имеют заданный процент одинаковых нуклеотидов (т.е. идентичность составляет по меньшей мере 60%, предпочтительно по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% на заданном участке) при сравнении и выравнивании по максимальному соответствию на всем окне сравнения или заданном участке и при измерении с помощью алгоритма сравнения последовательностей или при выравнивании вручную и визуальном контроле. Данное определение, если это вытекает из контекста, также относится и к комплементарной последовательности. Предпочтительно существенная идентичность отмечается на участке, длина которого составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 нуклеотидов.

III. Описание воплощений

В одном воплощении настоящего изобретения предусмотрены способы детектирования экспрессии и активационного состояния нескольких разрегулируемых молекул передачи сигналов в раковых клетках из опухолевой ткани или циркулирующих клетках солидной опухоли специфическим, мультиплексным, высокопроизводительным методом. Изобретением также предусмотрены способы и композиции для выбора надлежащей терапии для понижающей регуляции или отключения одного или нескольких разрегулируемых сигнальных путей. Таким образом, воплощения изобретения могут применяться для облегчения разработки индивидуализированной терапии на основе определенной молекулярной сигнатуры, образуемой набором активированных белков передачи сигналов в опухоли данного пациента.

Циркулирующие клетки солидной опухоли включают клетки, которые дали метастазы либо микрометастазы из солидной опухоли, включая раковые стволовые клетки или клетки, мигрирующие к опухоли (например, вследствие химического притяжения), как то циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток, циркулирующие эндотелиальные клетки, перициты, циркулирующие проангиогенные миелоидные клетки, дендритные клетки и др. Образцы от пациентов, содержащие циркулирующие клетки, могут быть получены из любой доступной биологической жидкости (например, цельной крови, сыворотки, плазмы, мокроты, смыва из бронхов, мочи, аспирата из сосков, лимфы, слюны, аспирата тонкой иглой и др.). В некоторых случаях образец цельной крови разделяют на фракцию плазмы или сыворотки и клеточную фракцию (т.е. осадок клеток). Клеточная фракция обычно содержит эритроциты, лейкоциты и/или циркулирующие клетки солидной опухоли, как то циркулирующие опухолевые клетки (СТС), циркулирующие эндотелиальные клетки (СЕС), циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток (СЕРС), раковые стволовые клетки (CSC), клетки диссеминированных опухолей лимфатических узлов и их комбинации. Фракция плазмы или сыворотки обычно содержит, среди прочего, нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК) и белки, которые выделяются циркулирующими клетками солидной опухоли.

Циркулирующие клетки обычно выделяют из образца пациента с помощью одного или нескольких методов разделения, включая, к примеру, иммуномагнитное разделение (например, см. Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), систему CellTrack™ фирмы Immunicon (Huntingdon Valley, PA), микрофлюидное разделение (например, см. Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), метод FACS (например, см. Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661

(2001)), центрифугирование в градиенте плотности (например, см. Baker et al., *Int. J. Cancer Res.*, 13:4865-4871 (2003)), и методы обеднения (например, см. Meye et al., *Int. J. Oncol.*, 21:521-530 (2002)).

В одном воплощении, чтобы сохранить активационное состояние *in situ*, молекулы передатчиков сигналов предпочтительно экстрагируют вскоре после выделения клеток, предпочтительно в пределах 96, 72, 48, 24, 6 или 1 часа, более предпочтительно в пределах 30, 15 или 5 минут. Выделенные клетки также можно инкубировать с факторами роста, обычно в наномолярных или микромолярных концентрациях, в течение 1-30 минут, чтобы реанимировать или стимулировать активацию молекул передатчиков сигналов (например, см. Irish et al., *Cell*, 118:217-228 (2004)). Стимулирующие факторы роста включают фактор роста эпидермиса (EGF), герегулин (HRG), TGF- α , PIGF, ангиопоетин (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, цитокины и т.п. Для оценки потенциальной противораковой терапии для индивидуального пациента, перед стимуляцией фактором роста, выделенные клетки можно инкубировать с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами в различных дозах. Стимуляция фактором роста может проводиться в течение нескольких минут или часов (например, от 1-5 мин до 1-6 ч). Дифференциальная активация сигнальных путей в присутствии или в отсутствие противораковых лекарственных средств будет способствовать выбору подходящей противораковой терапии в надлежащей дозе для каждого индивидуального пациента. После выделения, обработки противораковым средством и/или стимуляции фактором роста клетки подвергают лизису, чтобы экстрагировать передатчики сигналов с помощью любого известного метода. Предпочтительно лизис клеток начинают через 1-360 минут после стимуляции фактором роста, более предпочтительно через два различных промежутка времени: (1) через 1-5 минут после стимуляции фактором роста; и (2) через 30-180 минут после стимуляции фактором роста. В качестве альтернативы лизат может храниться при -80°C до использования.

В некоторых воплощениях противораковое лекарственное средство включает средство, которое нарушает функционирование активированных компонентов пути передачи сигналов в раковых клетках. Неограничивающие примеры таких средств включают средства, перечисленные ниже.

Таблица А

EGFR (A) (ErbB1) Her 2 (C) (ErbB2) Her 3 (ErbB3)(E) Her4 (ErbB4) как мишень

Cetuximab Trastuzumab Антитело (U3)

Panitumumab (Herceptin)

Matuzumab Pertuzumab (ДНК)

Nimotuzumab BMS-599626 (гетеродимеризация Her1/2; фаза 1)

Вакцина против EGFR

EGFR (B) (ErbB1) Her 2 (D) (ErbB2)

Erlotinib CP-724714 (Pfizer)

Gefitinib

EKB 569 (Wyeth, необратимое, II CRC)

CL-387-785 (Wyeth, необратимое, доклиническая фаза)

ErbB1/2 (F)

Lapatinib

HKI-272 (Wyeth, необратимое, I/II NSCLC (немелкоклеточный рак легких), молочная железа)

HKI-357 (доклиническая фаза)

BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim, необратимое, I/II, простата, яичники, молочная железа)

ErbB1/2/4 (G)

Canertinib (Pfizer, необратимое, II NSCLC, молочная железа)

ARRY-334543

JNJ-26483327

JNJ-26483327

Raf (H) SRC

Sorafenib AZ

PLX4032 (Plexxikon)

Mek (I) NFκB-IκB

PD-325901 (II: NSCLC)

AZD6244 - Array/Az

XL518 Exelisis/ДНК

5

mTor как мишень (J)

Rad 001: Everolimus (Novartis, в комбинации с Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, глиобластома)

10

Temsirolimus (Wyeth, в комбинации с Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, глиобластома)

AP-23573 (Ariad, I/II: эндометрий)

PI3K

15

PX-866 (специфическое ингибирование P110-α; ProIX Pharma; доклиническая фаза NSCLC)

VEGF как мишень (действуют на VEGFR2 и VEGFR1) (K)

20

Avastin (ДНК)

HuMV833 (PDL) против VEGFa

VEGF-Trap - Regeneron/Aventis (рецепторный миметик) (фаза 2)

25

VEGFR-2 (L) как мишень EPH A-D

DC101 - Imclone (фаза 2/3?)

IMC-IC11: химерное антитело типа IgG1 против VEGFR2

30

IMC1121B: полностью гуманизированное

CDP-791 (Celltech, ПЭГилированное антитело типа di-Fab против R2)

Razoranib (GSK) (множественная миелома, яичники, RCC фаза 3, набор завершен, саркома II)

35

CDP-791 (UCB)

CP-547632 (OSI, Pfizer): (+ EGFR + PDGFR) (NSCLC, яичники, фаза 2)

AG13736 (Pfizer): VEGFR1,2 и PDGFR-β (RCC II)

E-7080 (Eisai)

40

CHIR-258 (VEGFR1,2 FGFR3, PDGFR)

OSI-930 (+ cKit, PDGFR)

Bay-579352 (+ PDGFR)

45

ABT-869 (+CSF1R, Erk, Flt-3,PDGFR)

BMS-540215 (+FGFR1)

KRN-951

BBIW

VEGFR 1/2/3

5 AZD 2171 (NSCLC, CRC)

AMG-706 (+ PDGFR)

10 VEGFR 2/ErbB1/2 (EGFR)/cMet/FGFR (M)

ZD6474 (vandetanib) (фаза III: щитовидная железа, NSCLC)

XL647 (Exelixis; также EPHB2): (пациенты, устойчивые к Erlotinib; пациенты из Азии)
(фаза 2)

15 AEE 788 (Novartis, фаза 1/2)

VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N) TIE 1/2

20 Sorafenib (RCC, HCC, NSCLC (III), меланома (III))

VEGFR2/1/3,Flt-3,cFMS, PDGFR/cKit/ (O) PDGFR как мишень (P)

PTK787 (не cFMS, FLT-3)

Tandutinib

25 Sunitinib

Nilotinib

XL-999

SU-6668 (Pfizer)

GSK

30 AZ (AZD2171)

BMS

Novartis (AEE-788)

Amgen

35 Другие

Abl как мишень (Q)

FTL 3

RET

40 Imatinib

Dasatinib

Nilotinib

AT-9283

45 AZD-0530

Bosutinib

Kit как мишень (R) HGFR1/2 FGFR1-4

AMG-706

Chiron

5 XL-880

XL-999

IGF-1R как мишень (S)

10 Merck

Pfizer

Novartis

15 **Ингибиторы HSP90**

IPI-504 (Infinity Pharma, мутантный EGFR, I/II множественная миелома, GIST)

17-AAG (Kosan, I/II солидные опухоли)

20 **Антимитотические лекарственные средства**

Доцетаксел (стабилизатор микротрубочек; адъювантная терапия и запущенный рак молочной железы; NSCLC, независимый от андрогенов рак простаты)

25 Паклитаксел (стабилизатор микротрубочек; адъювантная терапия и запущенный рак молочной железы; NSCLC, рак яичников, связанная со СПИД саркома Капоши)

Винбластин, винкрестин, винорелбин (дестабилизаторы микротрубочек)

30 **Другие мишени**

Ингибиторы HDAC

BCL2

Средства химиотерапии (разрушение)

35 Ингибиторы протеасом

В другом воплощении настоящего изобретения предусмотрена адресуемая матрица, обладающая превосходным динамическим диапазоном, которая включает несколько серийных разведений захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке, причем захватывающие антитела в каждом серийном разведении специфичны к одному или нескольким анализируемым веществам, которые соответствуют компонентам пути передачи сигналов. В различные аспекты этого воплощения входят матрицы, охватывающие компоненты путей передачи сигналов, характерных для определенных опухолей, например путей передачи сигналов, действующих в клетках рака легких.

45 Таким образом, изобретение может с пользой применяться на практике, при этом каждый тип рака представлен на одной матрице или чипе. В некоторых аспектах компоненты данного пути передачи сигналов, действующего в клетках определенной опухоли, располагаются в линейном порядке, который соответствует тому порядку, в

котором передается информация через путь передачи сигналов в клетке. Примеры таких матриц представлены на фиг.3 и 4.

Неограничивающие примеры путей передачи сигналов, которые можно исследовать с помощью настоящего изобретения, включают пути, представленные в табл.1.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 1								
Путь 1	EGFR	фосфо-EGFR	EGFR-Shc	EGFR-убиквитин	EGFR-PI3K	PTEN		
Путь 2	EGFR	EGFR VIII	фосфо-EGFR	EGFR-Shc	EGFR-убикви- тин	фосфо-EGFR VIII	PTEN	
Путь 3	ERBB2	фосфо-ERBB2	Her 2-Shc	комплекс ERBB2: PI3K	ErbB2-убикви- тин	PTEN		
Путь 4	ERBB2	P85 укороч. ERBB2	фосфо- ERBB2	P85 укороч. фосфо- ERBB2	Her 2-Shc	комплекс ERBB2: PI3K	ErbB2-уби- кви-тин	
Путь 5	ERBB3	фосфо-ERBB3	комплекс ERBB3: PI3K	фосфо-ERBB3: PI3K	ERBB3: She			
Путь 6	ERBB4	фосфо-ERBB4	ERBB4: She					
Путь 7	IGF-1R	фосфо-IGF-1R	IGF-1R: IRS	IRS:PI3K	фосфо-IRS	IGF-1R: PI3K		
Путь 8	INSR	фосфо-INSR						
Путь 9	KIT	фосфо-KIT						
Путь 10	FLT3	фосфо-FLT3						
Путь 11	HGFR1	фосфо-HGFR 1						
Путь 12	HGFR2	фосфо-HGFR2						
Путь 13	RET	фосфо-RET						
Путь 14	PDGFR-α	фосфо-PDGFR-α						
Путь 15	PDGFR-β	фосфо-PDGFR-β						
Путь 16	VEGFR 1	фосфо-VEGFR 1	комплекс VEGFR 1: PLCv	VEGFR1: Src				
Путь 17	VEGFR 2	фосфо-VEGFR 2	комплекс VEGFR 2: PLCy	VEGPR 2:Src	комплекс VEGFR-2/ ге- парин-суль- фат	комплекс VEGFR-2, VE- кадгерин		
Путь 18	VEGFR 3	фосфо-VEGFR 3						
Путь 19	FGFR1	фосфо-FGFR 1						
Путь 20	FGFR2	фосфо-FGFR2						
Путь 21	FGFR3	фосфо-FGFR3						
Путь 22	FGFR4	фосфо-FGFR4						
Путь 23	TIE1	фосфо-TIE 1						
Путь 24	TIE 2	фосфо-TIE 2						
Путь 25	EPHA	фосфо-EPHA						
Путь 26	EPHB	фосфо-EPHB						
Путь 27	комплекс NfκB-IκB	фосфо-IκB (S32) тотальный IκB	тотальный NfκB фосфо- NfκB (S536)	тотальный P65: IκBa фосфо-P65: IκBa				
Путь 28	ER	фосфо-ER	ER-AIB1	другие комплексы ER				
Путь 29	PR	фосфо-Pr		комплексы PR				
Путь 30	путь Hedgehog							
Путь 31	путь Wnt							
Путь 32	путь Notch							
Путь 33	тотальный Mek фос- фо-Mek (S217/S221)	тотальный Erk фосфо-Erk (T202/ Y204)	тотальный Rsk-1 фосфо- Rsk-1(T357/ S363)	Тотальный Stat 3 фосфо-Stat 3 (Y705) (S727) весь Stat 1 фос- фо-Stat 1 (Y701)	фосфо-Bad (S112) тоталь- ный Bad	тотальный Fak фосфо- Fak (Y576)	тотальный cSrc фос- фо-cSrc (Y416)	тоталь- ный Ras фосфо- Ras
Путь 34	Акт (тоталь- ный) фосфо-Akt (T473)	фосфо-Akt (T308)	фосфо-Bad (S112) Bad то- тальный	фосфо-Bad (S136)	комплекс Bad: 14-3-3	тотальный mTor фосфо- mTor (S2448)	тотальный p70S6K фосфо- p70S6K (T229) (T389)	тоталь- ный GSK3-P (фос- фо- Ser9)
Путь 35	тотальный Jnk фосфо- Jnk (T183/ Y185)	тотальный P38 фосфо-P38 (T180/ Y182)	тотальный Rb фосфо-Rb (S249/ T252) фосфо-Rb	тотальный p53 фос- фо-p53 (S392) фосфо- p53 (S20)	фосфо-CREB (S133) тоталь- ный CREB	тотальный c- Jun фосфо-c- Jun (S63)	тотальный Paxillin фосфо- Paxillin	

			(S780)				(Y118)	
Путь 36	Ki67	расщепление каспазой 3, 8, 9 и др.						
Путь 37	TGF- β							

В некоторых воплощениях противораковое лекарственное средство включает антисигнальное средство (например, цитостатическое лекарственное средство) типа моноклонального антитела или ингибитора тирозинкиназ; антипролиферативное средство; средство химиотерапии (например, цитотоксическое лекарственное средство); средство радиотерапии; вакцину; и/или любое другое соединение, обладающее способностью уменьшить или остановить неконтролируемый рост аномальных клеток типа раковых клеток. В некоторых воплощениях выделенные циркулирующие клетки подвергаются обработке антисигнальным средством и/или антипролиферативным средством в комбинации с одним или несколькими средствами химиотерапии.

Примеры антисигнальных средств, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают такие моноклональные антитела, как трастузумаб (Herceptin[®]), алемтузумаб (Campath[®]), бевацизумаб (Avastin[®]), цетуксимаб (Erbix[®]), гемтузумаб (Mylotarg[®]), панитумумаб (Vectibix[™]), ритуксимаб (Rituxan[®]) и тоситумомаб (Bexxar[®]); такие ингибиторы тирозинкиназ, как гефитиниб (Iressa[®]), сунитиниб (Sutent[®]), эрлотиниб (Tarceva[®]), лапатиниб (GW-572016), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU 5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar[®]), иматиниб мезилат (Gleevec[®]), лефлуномид (SU 101) и вандетаниб (Zactima[™]; ZD6474); а также их комбинации.

Примеры антипролиферативных средств включают такие ингибиторы mTOR, как сиролимус (рапамицин), темсиролимус (CCI-779) и эверолимус (RAD001); такие ингибиторы Akt, как 1L6-гидроксиметил-хиро-инозитол-2-(R)-2-O-метил-3-O-октадецил-sn-глицерокарбонат, 9-метокси-2-метилэллиптициний ацетат, 1,3-дигидро-1-(1-((4-(6-фенил-1H-имидазо[4,5-g]хиноксалин-7-ил)фенил)метил)-4-пиперидинил)-2H-бензимидазол-2-он, 10-(4'-(N-диэтиламино)бутил)-2-хлорфеноксазин, 3-формилхромон-тиосемикарбазон (комплекс с Cu(II)Cl₂), API-2, 15-мерный пептид, состоящий из аминокислот 10-24 протоонкогена TCL1 (Hiromura et al., J.Biol.Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1) и соединения, описанные в Kozikowski et al., J.Am.Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) и Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003); а также их комбинации.

Неограничивающие примеры средств химиотерапии включают лекарственные средства на основе платины (например, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, спироплатин, ипроплатин, сатраплатин и др.), алкилирующие вещества (например, циклофосфамид, ифосфамид, хлорамбуцил, бусульфан, мелфалан, мехлорэтамин, урамустин, тиотепа, нитрозомочевина и др.), антиметаболиты (например, 5-фторурацил, азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, лейковорин, капецитабин, цитарабин, флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar[®]), пеметрексед (Alimta[®]), ралтитрексед и др.), растительные алкалоиды (например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин, подофиллотоксин, паклитаксел (Taxol[®]), доцетаксел и др.), ингибиторы топоизомеразы (например, иринотекан, топотекан, амсакрин, этопозид (VP16), этопозид фосфат, тенипозид и др.), противораковые антибиотики (например, доксорубицин, адриамицин, даунорубицин, эпирубицин, актиномицин, блеомицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин и др.), их фармацевтически приемлемые соли, стереоизомеры, производные, аналоги и комбинации.

Неограничивающие примеры противораковых вакцин, применимых в настоящем изобретении, включают Anyara фирмы Active Biotech, DCVax-LB фирмы Northwest Biotherapeutics, EP-2101 фирмы IDM Pharma, GV1001 фирмы Pharmexa, IO-2055 фирмы Idera Pharmaceuticals, INGN 225 фирмы Introgen Therapeutics и Stimuvax фирмы Biomira/Merck.

Примеры средств радиотерапии включают такие радионуклиды, как ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At и ^{212}Bi , необязательно конъюгированные с антителами против раковых антигенов.

В некоторых воплощениях каждый ряд разведений захватывающих антител содержит ряд понижающихся концентраций захватывающих антител. В некоторых случаях захватывающие антитела подвергаются серийному разведению по меньшей мере в 2 раза (например, в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 или 1000 раз), образуя ряд разведений, содержащий заданное число (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или больше) понижающихся концентраций захватывающих антител, которые наносятся на матрицу. Предпочтительно на матрицу наносят по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 повторов каждого разведения захватывающих антител.

В других воплощениях твердая подложка включает стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, штырьки, фильтры, шарики, бумагу, мембраны (например, из нейлона, нитроцеллюлозы, поливинилиденфторида (PVDF) и др.), пучки волокон или любой другой подходящий субстрат. В предпочтительном воплощении захватывающие антитела фиксируют (например, через ковалентные или нековалентные взаимодействия) на предметных стеклах, покрытых нитроцеллюлозным полимером, к примеру на стеклах FAST[®] Slides, которые коммерчески доступны от Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

В некоторых воплощениях клеточный экстракт включает экстракт циркулирующих клеток солидной опухоли. Циркулирующие клетки обычно выделяют из образца пациента с помощью одного или нескольких известных методов разделения, включая, к примеру, иммуномагнитное разделение, систему CellTrack[™], микрофлюидное разделение, метод FACS, центрифугирование в градиенте плотности и методы обеднения.

В других воплощениях образец пациента включает образец цельной крови, сыворотки, плазмы, мокроты, смыва из бронхов, мочи, аспирата из сосков, лимфы, слюны и/или аспирата тонкой иглой. В некоторых случаях образец цельной крови разделяют на фракцию плазмы или сыворотки и клеточную фракцию (т.е. осадок клеток). Клеточная фракция обычно содержит эритроциты, лейкоциты и/или циркулирующие клетки солидной опухоли, как то CTCs, CECs, CEPs, клетки диссеминированных опухолей лимфатических узлов и/или CSCs. Фракция плазмы или сыворотки обычно содержит, среди прочего, нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК) и белки, которые выделяются циркулирующими клетками солидной опухоли.

В некоторых случаях выделенные циркулирующие клетки можно инкубировать *in vitro* с одним или несколькими факторами роста до, во время или после инкубации с одним или несколькими представляющими интерес противораковыми лекарственными средствами. Стимулирующие факторы роста описаны выше. В других случаях выделенные циркулирующие клетки можно подвергнуть лизису, например, после стимуляции фактором роста и/или обработки противораковым лекарственным средством, чтобы получить клеточный экстракт (например, лизат клеток) с помощью любого известного метода. Предпочтительно лизис клеток начинают через 1-360 минут после стимуляции фактором роста, более предпочтительно через два различных промежутка времени: (1) через 1-5 минут после стимуляции фактором роста; и (2) через 30-180 минут после стимуляции фактором роста. В качестве альтернативы лизат клеток

может храниться при -80°C до использования.

В предпочтительных воплощениях экспрессию и/или активационное состояние нескольких молекул передачи сигналов в таких раковых клетках, как циркулирующие клетки солидной опухоли, детектируют методом одинарного детектирования или двойного близостного детектирования, как описано ниже.

IV. Конструкция матриц антител

В некоторых аспектах активационное состояние нескольких молекул передачи сигналов в клеточном экстракте таких раковых клетках, как циркулирующие клетки солидной опухоли, детектируют с помощью антительной матрицы, содержащей ряд разведений захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке. Матрицы, как правило, содержат несколько различных захватывающих антител в различных концентрациях, которые сцеплены с поверхностью твердой подложки в различных адресуемых местах.

Твердая подложка может включать любой подходящий субстрат для иммобилизации белков. Примерами твердых подложек являются стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, штырьки, фильтры, шарики, бумага, мембраны, пучки волокон, гели, металл, керамические материалы и т.п. В качестве твердых подложек в матрицах настоящего изобретения подходят мембраны из нейлона (BiotransTM, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe[®], Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), нитроцеллюлозы (Protran[®], Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) и PVDF (ImmobilonTM, Millipore Corp. (Billerica, MA)). Предпочтительно захватывающие антитела фиксированы (например, через ковалентные или нековалентные взаимодействия) на предметных стеклах, покрытых нитроцеллюлозным полимером, например на стеклах FAST[®] Slides, которые коммерчески доступны от Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Определенные аспекты твердой подложки, которые являются желательными, включают способность к связыванию большого количества захватывающих антител и способность к связыванию захватывающих антител с минимальной денатурацией. Другим подходящим аспектом является то, чтобы твердая подложка проявляла минимальное "затекание" при нанесении на нее растворов, содержащих захватывающие антитела. Твердая подложка с минимальным затеканием способствует нанесению на нее небольших порций раствора захватывающих антител с образованием маленьких, четких пятен иммобилизованных захватывающих антител.

Захватывающие антитела обычно прямо или опосредованно (например, через захватные метки) фиксируют на твердой подложке при помощи ковалентных или нековалентных взаимодействий (например, ионных связей, гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, дипольных связей). В некоторых воплощениях захватывающие антитела ковалентно присоединяются к твердой подложке с помощью гомобифункционального или гетеробифункционального сшивающего линкера, используя стандартные методы и условия сшивания. Подходящие сшивающие линкеры коммерчески доступны, например, от таких поставщиков, как Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Способы создания матриц, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают любые методы, используемые для получения матриц белков или нуклеиновых кислот. В некоторых воплощениях захватывающие антитела наносят на матрицу с помощью микроспоттера, который обычно представляет собой роботизированный принтер, оснащенный расщепленными штырьками, тупыми штырьками или струйной печатью. Подходящими роботизированными системами для печатания описанных

матриц антител являются робот PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) с расщепленными штырьками ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA), а также другие роботизированные принтеры, доступные от BioRobics (Woburn, MA) и Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Предпочтительно на матрицу наносят по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 повторов каждого разведения захватывающих антител.

Другой способ создания матриц, пригодных для применения в настоящем изобретении, включает дозирование известного объема разведения захватывающих антител в каждом выбранном положении матрицы путем контактирования капиллярного дозатора с твердой подложкой в условиях, способствующих выделению заданного объема жидкости на подложку, причем этот процесс повторяется с использованием выбранных разведений захватывающих антител в каждом выбранном положении матрицы до создания полной матрицы. Метод может применяться при формировании нескольких таких матриц, при этом операция дозирования раствора применяется к выбранным положениям на каждой из нескольких твердых подложек при каждом повторении цикла. Более подробное описание такого метода, например, приводится в U.S. Patent No. 5,807,522.

В некоторых случаях для создания матриц антител можно использовать устройства для печатания на бумаге. Например, нужное разведение захватывающих антител можно внести в головку настольного струйного принтера и распечатать на подходящую твердую подложку (например, см. Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).

В некоторых воплощениях матрица, созданная на твердой подложке, имеет плотность по меньшей мере 5 пятен/см², предпочтительно по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 или 10000 пятен/см².

В некоторых случаях каждое пятно на твердой подложке представляет другое захватывающее антитело. В некоторых других случаях множественные пятна на твердой подложке представляют одно и то же захватывающее антитело, например, в виде ряда разведений, содержащего ряд понижающихся концентраций захватывающего антитела.

Дополнительные примеры методов получения и конструирования матриц антител на твердых подложках описаны в U.S. Patent Nos. 6,197,599, 6,777,239, 6,780,582, 6,897,073, 7,179,638 и 7,192,720; U.S. Patent Publication Nos. 20060115810, 20060263837, 20060292680 и 20070054326; и Vamum et al., Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004).

Методы сканирования матриц антител известны и включают любые методы, используемые для сканирования матриц белков или нуклеиновых кислот. Сканеры микроматриц, пригодные для применения в настоящем изобретении, доступны от Perkin Elmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) и Axon Instruments (Union City, CA). В качестве отдельного примера можно использовать GSI ScanArray3000 для детектирования флуоресценции вместе с программой ImaGene для количественного определения.

V. Способы одинарного детектирования

В некоторых воплощениях способ детектирования активационного состояния определенного представляющего интерес анализируемого вещества (например, молекулы передачи сигналов) в клеточном экстракте раковых клеток типа циркулирующих клеток солидной опухоли представляет собой мультиплексный, высокопроизводительный способ анализа с двумя антителами, который обладает превосходным динамическим диапазоном. В качестве отдельного примера используемые в этом способе два антитела могут включать: (1) захватывающее антитело, специфичное

к анализируемому веществу; и (2) детектирующее антитело, специфичное к активированной форме анализируемого вещества (т.е. антитело, зависимое от активационного состояния). Зависимое от активационного состояния антитело способно детектировать, к примеру, состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или

5 комплексообразования анализируемого вещества. В качестве альтернативы детектирующим антителом является независимое от активационного состояния антитело, которое детектирует общее количество анализируемого вещества в клеточном экстракте. Независимое от активационного состояния антитело в общем способно детектировать как активированную, так и неактивированную форму анализируемого вещества.

10 В предпочтительном воплощении способ анализа с двумя антителами включает:

(i) инкубирование клеточного экстракта с несколькими рядами разведений захватывающих антител, получая множество захваченных анализируемых веществ;

(ii) инкубирование множества захваченных анализируемых веществ с зависимыми от активационного состояния антителами, специфичными к соответствующим

15 анализируемым веществам, получая множество детектируемых захваченных анализируемых веществ;

(iii) инкубирование множества детектируемых захваченных анализируемых веществ с первым и вторым членами усиливающей сигнал пары, генерируя усиленный сигнал;

и

20 (iv) детектирование усиленного сигнала, исходящего от первого и второго члена усиливающей сигнал пары.

Способы анализа с двумя антителами, описанные в настоящем изобретении, как правило, составляют антительные матрицы, содержащие несколько различных захватывающих антител в различных концентрациях, которые сцеплены с поверхностью

25 твердой подложки в различных адресуемых местах. Примеры подходящих твердых подложек для применения в настоящем изобретении описаны выше.

Захватывающие антитела и детектирующие антитела предпочтительно выбираются так, чтобы свести к минимуму конкуренцию между ними в отношении связывания с анализируемым веществом (т.е. и захватывающие, и детектирующие антитела могут

30 одновременно связывать соответствующие им молекулы передачи сигналов).

В одном воплощении детектирующие антитела содержат первый член связывающей пары (например, биотин), а первый член усиливающей сигнал пары содержит второй член связывающей пары (например, стрептавидин). Члены связывающей пары могут быть конъюгированы, прямо или опосредованно, с детектирующими антителами или

35 с первым членом усиливающей сигнал пары с помощью хорошо известных методов. В некоторых случаях первым членом усиливающей сигнал пары является пероксидаза (например, пероксидаза хрена (HRP), каталаза, хлорпероксидаза, пероксидаза цитохрома с, пероксидаза эозинофилов, глутатион-пероксидаза, лактопероксидаза, миелопероксидаза, пероксидаза щитовидной железы, деиодиназа), а вторым членом

40 усиливающей сигнал пары является тирамидный реагент (например, биотин-тирамид). При этом усиленный сигнал генерируется при окислении пероксидазой тирамидного реагента с образованием активированного тирамида в присутствии перекиси водорода (H_2O_2).

Активированный тирамид детектируется либо непосредственно, либо после

45 добавления детектирующего сигнал реагента, такого, к примеру, как меченный стрептавидином флуорофор или комбинация из меченной стрептавидином пероксидазы и хромогенного реагента. Примеры флуорофоров, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают красители Alexa Fluor[®] (например, Alexa Fluor[®] 555),

флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Oregon Green™; родамин, тexasский красный, тетрародамин-изотиоцианат (TRITC), флуорофоры CyDye™ (например, Cy2, Cy3, Cy5) и др. Стрептавидиновая метка может быть конъюгирована, прямо или опосредованно, с флуорофором или пероксидазой с помощью хорошо известных методов. Отдельные примеры хромогенных реагентов, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), 3,3'-диаминобензидин (DAB), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS), 4-хлор-1-нафтол (4CN) и/или порфириноген.

Типичная методика проведения анализа с двумя антителами, описанного в настоящем изобретении, приведена в Примере 3.

В следующем воплощении настоящего изобретения предусмотрены наборы для проведения анализа с двумя антителами, описанного выше, которые включают: (а) ряд разведений нескольких захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке; и (б) нескольких детектирующих антител (например, независимые от активационного состояния антитела и/или зависимые от активационного состояния антитела). В некоторых случаях наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению набора для детектирования активационного состояния нескольких молекул передачи сигналов у циркулирующих клеток солидной опухоли. Наборы также могут содержать дополнительные реагенты, описанные выше в связи с осуществлением конкретных способов настоящего изобретения, такие, к примеру, как первый и второй члены усиливающей сигнал пары, усиливающие сигнал тирамидные реагенты, промывочные буфера и др.

VI. Способы двойного близостного детектирования

В некоторых воплощениях способ детектирования активационного состояния определенного представляющего интерес анализируемого вещества (например, молекулы передачи сигналов) в клеточном экстракте раковых клеток типа циркулирующих клеток солидной опухоли представляет собой мультиплексный, высокопроизводительный близостный (т.е. с тремя антителами) метод анализа, который обладает превосходным динамическим диапазоном. В качестве отдельного примера используемые в близостном способе три антитела могут включать: (1) захватывающее антитело, специфичное к анализируемому веществу; (2) детектирующее антитело, специфичное к активированной форме анализируемого вещества (т.е. антитело, зависимое от активационного состояния); и (3) детектирующее антитело, которое детектирует общее количество анализируемого вещества (т.е. антитело, независимое от активационного состояния). Зависимое от активационного состояния антитело способно детектировать, к примеру, состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексообразования анализируемого вещества. Независимое от активационного состояния антитело в общем способно детектировать как активированную, так и неактивированную форму анализируемого вещества.

В предпочтительном воплощении близостный способ анализа включает:

- (i) инкубирование клеточного экстракта с несколькими рядами разведений захватывающих антител, получая множество захваченных анализируемых веществ;
- (ii) инкубирование нескольких захваченных анализируемых веществ с детектирующими антителами, включающими множество независимых от активационного состояния антител и множество зависимых от активационного состояния антител, специфичных к соответствующим анализируемым веществам, получая множество детектируемых захваченных анализируемых веществ,

при этом независимые от активационного состояния антитела мечены содействующей

молекулой, зависимые от активационного состояния антитела мечены первым членом усиливающей сигнал пары, а содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом усиливающей сигнал пары;

(iii) инкубирование множества детектируемых захваченных анализируемых веществ со вторым членами усиливающей сигнал пары, генерируя усиленный сигнал; и

(iv) детектирование усиленного сигнала, исходящего от первого и второго членов усиливающей сигнал пары.

В качестве альтернативы зависимые от активационного состояния антитела могут быть помечены содействующей молекулой, а независимые от активационного состояния антитела могут быть помечены первым членом усиливающей сигнал пары.

Близостные способы анализа, описанные в настоящем изобретении, как правило, включают антительные матрицы, содержащие несколько различных захватывающих антител в различных концентрациях, которые сцеплены с поверхностью твердой подложки в различных адресуемых местах. Примеры подходящих твердых подложек для применения в настоящем изобретении описаны выше.

Захватывающие антитела, независимые от активационного состояния антитела и зависимые от активационного состояния антитела предпочтительно выбираются так, чтобы свести к минимуму конкуренцию между ними в отношении связывания с анализируемым веществом (т.к. все антитела могут одновременно связывать соответствующие им молекулы передачи сигналов).

В некоторых воплощениях независимые от активационного состояния антитела дополнительно содержат детектируемую молекулу. В таких случаях количество детектируемой молекулы коррелирует с количеством одного или нескольких анализируемых веществ в клеточном экстракте. Примеры детектируемых молекул включают флуоресцентные метки, химически активные метки, ферментные метки, радиоактивные метки и др. Предпочтительно детектируемая молекула представляет собой такой флуорофор, как краситель Alexa Fluor[®] (например, Alexa Fluor[®] 647), флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Oregon Green[™]; родамин, техасский красный, тетрародамин-изотиоцианат (TRITC), флуорофор CyDye[™] (например, Cy2, Cy3, Cy5) и др. Детектируемая молекула может быть конъюгирована, прямо или косвенно, с независимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов.

В некоторых случаях независимые от активационного состояния антитела непосредственно метят содействующей молекулой. Содействующая молекула может быть конъюгирована с независимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов. Подходящими содействующими молекулами для применения в настоящем изобретении являются любые молекулы, способные генерировать окислитель, который направляется к и реагирует (т.е. связывается или образует комплекс) с другой молекулой, находящейся поблизости (т.е. пространственно близко или рядом) от содействующей молекулы. Примеры содействующих молекул включают такие ферменты, как глюкозооксидаза или любые другие ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием молекулярного кислорода (O₂) в качестве акцептора электронов, и такие фотосенсибилизаторы, как метиленовый синий, бенгальский розовый, порфирины, скваратные красители, фталоцианины и др. Отдельные примеры окислителей включают перекись водорода (H₂O₂), синглетный кислород и любые другие соединения, которые переносят атомы кислорода или отбирают электроны в окислительно-восстановительных реакциях.

Предпочтительно, в присутствии подходящего субстрата (например, глюкозы, света), содействующая молекула (например, глюкозооксидаза, фотосенсибилизатор) вырабатывает окислитель (например, перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород), который направляется к и реагирует с первым членом усиливающей сигнал пары (например, пероксидазой хрена (HRP), гаптенем, защищенным блокирующей группой, ферментом, инактивированным тиоэфирной связью с ингибитором фермента), когда две молекулы находятся по соседству друг с другом.

В некоторых других случаях независимые от активационного состояния антитела метят содействующей молекулой косвенным образом посредством гибридизации между олигонуклеотидным линкером, конъюгированным с независимыми от активационного состояния антителами, и комплементарным олигонуклеотидным линкером, конъюгированным с содействующей молекулой. Олигонуклеотидные линкеры могут быть конъюгированы с содействующей молекулой или с независимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов. В некоторых воплощениях олигонуклеотидный линкер, конъюгированный с содействующей молекулой, на 100% комплементарен олигонуклеотидному линкеру, конъюгированному с независимыми от активационного состояния антителами. В других воплощениях пара олигонуклеотидных линкеров содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше участков несовпадения, например, при гибридизации в строгих условиях гибридизации. Специалистам должно быть ясно, что независимые от активационного состояния антитела, специфичные к различным анализируемым веществам, могут быть конъюгированы с одним и тем же олигонуклеотидным линкером или же с разными олигонуклеотидными линкерами.

Длина олигонуклеотидных линкеров, конъюгируемых с содействующей молекулой или с независимыми от активационного состояния антителами, может быть различной. В общем случае длина последовательности линкера может составлять по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 нуклеотидов. Как правило, для конъюгирования создаются случайные последовательности нуклеиновых кислот. В качестве отдельного примера можно разработать библиотеку олигонуклеотидных линкеров, имеющих три отдельных смежных домена: домен разделителя (спейсера), домен сигнатуры и домен конъюгирования. Предпочтительно олигонуклеотидные линкеры предназначены для эффективного конъюгирования без нарушения функции содействующей молекулы или независимых от активационного состояния антител, с которыми их конъюгируют.

Последовательности олигонуклеотидных линкеров можно составить так, чтобы предотвратить или свести к минимуму образование вторичных структур при различных условиях определения. Как правило, тщательно отмечают температуру плавления для каждого сегмента в пределах линкера с тем, чтобы они могли участвовать в суммарной процедуре определения. Обычно интервал температур плавления у сегмента последовательности линкера составляет 1-10°C. Для анализа каждого из трех различных доменов в каждом линкере можно использовать компьютерные алгоритмы (например, OLIGO 6.0) для определения температуры плавления, вторичной структуры и шпилек при заданной концентрации ионов. Также можно проанализировать все объединенные последовательности на предмет их структурных характеристик и сравнимости с последовательностями других конъюгируемых олигонуклеотидных линкеров, например будут ли они гибридизоваться при строгих условиях гибридизации с комплементарным олигонуклеотидным линкером.

Участок разделителя в олигонуклеотидном линкере обеспечивает адекватное

отделение домена конъюгации от места сшивки олигонуклеотидов. Домен конъюгации служит для соединения молекул, меченных последовательностью комплементарного олигонуклеотидного линкера, с доменом конъюгации через гибридизацию нуклеиновых кислот. Гибридизация с помощью нуклеиновых кислот может проводиться как до, так и после образования комплекса антитело-анализируемое вещество (т.е. антиген), что обеспечивает более гибкий формат анализа. В отличие от многих прямых методов конъюгирования антител, присоединение сравнительно небольших олигонуклеотидов к антителам или иным молекулам оказывает минимальное влияние на специфическое сродство антител к анализируемой мишени или на функционирование конъюгированных молекул.

В некоторых воплощениях домен последовательности сигнатуры олигонуклеотидного линкера может использоваться при комплексном мультиплексном анализе белков. Можно конъюгировать несколько антител с олигонуклеотидными линкерами, имеющими различные последовательности-сигнатуры. При мультиплексном иммуно-анализе можно использовать последовательности олигонуклеотидов-репортеров, меченных соответствующими зондами, для выявления перекрестной реактивности между антителами и их антигенами в формате мультиплексного анализа.

Олигонуклеотидные линкеры можно конъюгировать с антителами или иными молекулами с помощью различных методов. Например, можно синтезировать олигонуклеотидные линкеры с тиоловой группой на 5'- или 3'-конце. Тиоловую группу можно деблокировать с помощью восстановителей (например, TCEP-HCl), а полученный линкер очистить на обессоливающей центрифужной колонке. Полученный деблокированный олигонуклеотидный линкер можно конъюгировать с первичным амином антител или других типов белков с помощью гетеробифункциональных сшивающих реагентов типа SMCC. С другой стороны, можно обработать 5'-фосфатные группы олигонуклеотидов водорастворимым карбодиимидом EDC с образованием фосфатных эфиров, а затем конъюгировать с содержащими аминами молекулами. В некоторых случаях можно окислить диол на остатке 3'-рибозы до альдегидной группы, а затем конъюгировать с аминоклассами антител или других типов белков путем восстановительного аминирования. В некоторых других случаях можно синтезировать олигонуклеотидный линкер, модифицированный биотином на 3'- или 5'-конце, и конъюгировать с молекулами, мечеными стрептавидином.

Олигонуклеотидные линкеры можно синтезировать любым из целого ряда известных методов типа тех, что описаны в Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); и Wincott et al., Methods Mol. Biol., 74:59 (1997). В общем, при синтезе олигонуклеотидов используются распространенные группы для блокирования и конъюгирования нуклеиновых кислот, как то диметокситритил на 5'-конце и фосфор-амидаты на 3'-конце. Подходящие реагенты для синтеза олигонуклеотидов, методы деблокирования нуклеиновых кислот и методы очистки нуклеиновых кислот известны специалистам в этой области.

В некоторых случаях зависимые от активационного состояния антитела непосредственно метят первым членом усиливающей сигнал пары. Член усиливающей сигнал пары может быть конъюгирован с зависимыми от активационного состояния антителами с помощью известных методов. В некоторых других случаях зависимые от активационного состояния антитела косвенным образом метят первым членом усиливающей сигнал пары посредством связывания между первым членом связывающей пары, конъюгированным с зависимыми от активационного состояния антителами, и

вторым членом связывающей пары, конъюгированным с первым членом усиливающей сигнал пары. Члены связывающей пары (например, биотин/стрептавидин) могут быть конъюгированы с членом усиливающей сигнал пары или с зависимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов.

- 5 Примерами членов усиливающей сигнал пары являются пероксидазы типа пероксидазы хрена (HRP), каталаза, хлорпероксидаза, пероксидаза цитохрома с, пероксидаза эозинофилов, глутатион-пероксидаза, лактопероксидаза, миелопероксидаза, пероксидаза щитовидной железы, деиодиназа и др. Другими примерами членов усиливающей сигнал пары являются гаптены, защищенные блокирующей группой, и ферменты, инактивированные тиоэфирной связью с ингибитором фермента.

- 10 В одном примере близостного канализирования содействующей молекулой служит глюкозооксидаза (GO), а первым членом усиливающей сигнал пары служит пероксидаза хрена (HRP). При контакте GO с таким субстратом, как глюкоза, она вырабатывает окислитель (т.е. перекись водорода (H_2O_2)). Если HRP находится в пределах близости к GO, обеспечивающей канализирование, то вырабатываемая GO H_2O_2 направляется к и сочетается с HRP, образуя комплекс HRP- H_2O_2 , который в присутствии второго члена усиливающей сигнал пары (например, хемилюминесцентного субстрата типа люминола или изолюминола либо флуорогенного субстрата типа тирамида (например, биотин-тирамида), гомованилиновой кислоты или 4-гидроксифенилуксусной кислоты) генерирует усиленный сигнал. Способы применения GO и HRP в близостном методе описаны, например, в Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999). При использовании биотин-тирамида в качестве второго члена усиливающей сигнал пары комплекс HRP- H_2O_2 окисляет тирамид с образованием реакционноспособного радикала тирамида, который ковалентно связывается с близлежащими нуклеофильными остатками. Активированный тирамид детектируется либо непосредственно, либо после добавления детектирующего сигнал реагента, такого, к примеру, как меченный стрептавидином флуорофор или комбинация из меченной стрептавидином пероксидазы и хромогенного реагента. Примеры флуорофоров, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают красители Alexa Fluor[®] (например, Alexa Fluor[®] 555), флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Oregon Green[™]; родамин, техасский красный, тетрародамин-изотиоцианат (TRITC), флуорофоры CyDye[™] (например, Cy2, Cy3, Cy5) и др. Стрептавидиновая метка может быть конъюгирована, прямо или косвенно, с флуорофором или пероксидазой с помощью хорошо известных методов.
- 35 Отдельные примеры хромогенных реагентов, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), 3,3'-диаминобензидин (DAB), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS), 4-хлор-1-нафтол (4CN) и/или порфириноген.

- 40 В другом примере близостного канализирования содействующей молекулой служит фотосенсибилизатор, а первым членом усиливающей сигнал пары служит большая молекула, меченная несколькими гаптенами, которые защищены блокирующими группами, предотвращающими связывание гаптенов с партнером по специфическому связыванию (например, лигандом, антителом). Например, членом усиливающей сигнал пары может быть молекула декстрана, меченного блокированными молекулами биотина, кумарина и/или флуоресцеина. Подходящими блокирующими группами являются фенокси-, анилино-, олефино-, тиоэфирные и селеноэфирные группы. Дополнительные фотосенсибилизаторы и блокированные молекулы гаптенов, пригодные для применения в близостных методах настоящего изобретения, описаны в U.S. Patent No. 5,807,675.

При возбуждении фотосенсибилизатора светом он вырабатывает окислитель (т.е. синглетный кислород). Если молекулы гаптенa находятся в пределах канальной близости к фотосенсибилизатору, то вырабатываемый фотосенсибилизатором синглетный кислород направляется к и реагирует с тиоэфирами на блокирующих группах гаптенa с образованием карбонильных групп (кетонa или альдегидa) и сульфоновой кислоты и отделением блокирующих групп из гаптенa. После этого деблокированные гаптены могут специфически связываться со вторым членом усиливающей сигнал пары (например, партнером по специфическому связыванию, способным генерировать детектируемый сигнал). Например, если гаптенa будет биотин, то партнером по специфическому связыванию может быть меченный ферментом стрептавидин. Типичными ферментами являются щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, HRP и т.п. После отмычки для удаления несвязавшихся реагентов можно генерировать детектируемый сигнал добавлением детектируемого (например, флуоресцентного, хемилюминесцентного, хромогенного) субстрата фермента и детектировать, используя подходящие методы и приборы, известные в этой области. С другой стороны, детектируемый сигнал можно усилить с помощью усиливающего сигнала тирамида, а активированный тирамид детектировать либо непосредственно, либо после добавления детектирующего сигнала реагента, как описано выше.

В еще одном примере близостного канализирования содействующей молекулой служит фотосенсибилизатор, а первым членом усиливающей сигнал пары служит комплекс фермент-ингибитор. Фермент и ингибитор (например, декстран, меченный фосфоновой кислотой) соединены расщепляемым линкером (например, тиоэфиром). При возбуждении фотосенсибилизатора светом он вырабатывает окислитель (т.е. синглетный кислород). Если комплекс фермент-ингибитор находится в пределах канальной близости к фотосенсибилизатору, то вырабатываемый фотосенсибилизатором синглетный кислород направляется к и реагирует с расщепляемым линкером, отделяя ингибитор от фермента и при этом активируя фермент. Добавляется субстрат фермента, чтобы генерировать детектируемый сигнал, или же добавляется усиливающий реагент, чтобы генерировать усиленный сигнал.

В следующем примере близостного канализирования содействующей молекулой служит HRP, первым членом усиливающей сигнал пары служит блокированный гаптен или комплекс фермент-ингибитор, как описано выше, а блокирующие группы содержат p -алкоксифенол. При добавлении фенилендиаминa и H_2O_2 образуется реакционноспособный фенилендиимин, который направляется к блокированному гаптену или комплексу фермент-ингибитор и реагирует с блокирующей группой p -алкоксифенола с образованием открытого гаптена или реакционноспособного фермента. Генерируется и детектируется усиленный сигнал, как описано выше (например, см. U.S. Patent Nos. 5,532,138 и 5,445,944).

Типичная методика проведения близостного анализа, описанного в настоящем изобретении, приведена в Примере 4.

В следующем воплощении настоящего изобретения предусмотрены наборы для проведения близостного анализа, описанного выше, которые включают: (а) ряд разведений множества захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке; и (б) множество детектирующих антител (например, независимые от активационного состояния антитела и зависимые от активационного состояния антитела). В некоторых случаях наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению набора для детектирования активационных состояний нескольких молекул передачи сигналов у циркулирующих клеток солидной опухоли. Наборы также могут содержать

дополнительные реагенты, описанные выше в связи с осуществлением конкретных способов настоящего изобретения, такие, к примеру, как первый и второй члены усиливающей сигнал пары, усиливающие сигнал тирамидные реагенты, субстраты для содействующей молекулы, промывочные буфера и др.

5 VII. Получение антител

Получение и отбор антител, еще не доступных коммерческим путем, для анализа активационных состояний молекул передачи сигналов в таких раковых клетках, как редкие циркулирующие клетки, в соответствии с настоящим изобретением может осуществляться несколькими способами. Например, один способ заключается в том, чтобы экспрессировать и/или очистить нужный полипептид (т.е. антиген) известными методами экспрессии и очистки белков, тогда как другой способ состоит в том, чтобы синтезировать нужный полипептид известными методами твердофазного синтеза пептидов. Например, см. *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol.182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol.289 (1997); Kiso et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1:255-60, (1995); и Fujiwara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 44:1326-31 (1996). Очищенный или синтезированный полипептид можно затем ввести, к примеру, мышам или кроликам для выработки поликлональных или моноклональных антител. Специалистам должно быть известно, что для получения антител существует много методик, например описанных в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Специалистам также должно быть известно, что по генетической информации различными методами можно получить и связывающие фрагменты или Fab-фрагменты, которые напоминают (например, сохраняют функциональные связывающие участки) антитела. Например, см. *Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); и Huse et al., *J. ImmunoL*, 149:3914-3920 (1992).

Кроме того, в многочисленных публикациях излагалось применение технологии фагового дисплея для получения и скрининга библиотек полипептидов на связывание с выбранным антигеном-мишенью (например, см. Cwiria et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Scott et al., *Science*, 249:386-388 (1990); и Ladner et al., U.S. Patent No. 5,571,698). Основная идея методов фагового дисплея заключается в установлении физической связи между полипептидом, кодируемым ДНК фага, и антигеном-мишенью. Эта физическая связь обеспечивается частицей фага, которая представляет полипептид в составе капсида, окружающего фаговый геном, кодирующий полипептид. Установление физической связи между полипептидами и их генетическим материалом позволяет одновременно делать массовый скрининг очень большого числа фагов, несущих различные полипептиды. Фаг, несущий полипептид, имеющий сродство к антигену-мишени, связывается с антигеном-мишенью, поэтому такие фаги обогащаются при скрининге по сродству к антигену-мишени. Идентичность полипептидов, проявляемых этими фагами, можно определить по соответствующим генам. С помощью этих методов можно затем в большом количестве синтезировать полипептид, идентифицированный как обладающий сродством к связыванию с требуемым антигеном-мишенью стандартными способами (например, см. U.S. Patent No. 6,057,098).

Антитела, полученные этими методами, можно затем подвергнуть отбору, сначала проводя скрининг на сродство и специфичность с помощью очищенного полипептидного антигена и, если нужно, сравнивая результаты со сродством и специфичностью антител с помощью других полипептидных антигенов, которые нужно исключить из связывания.

Процедура скрининга может включать иммобилизацию очищенных полипептидных антигенов в отдельных лунках микропланшетов. Затем в соответствующие лунки вносят раствор, содержащий потенциальное антитело или группу антител и инкубируют от 30 мин до 2 часов. Затем лунки отмывают и вносят в них меченое второе антитело (например, антитело против мыши, конъюгированное со щелочной фосфатазой, если получали мышинные антитела), инкубируют около 30 мин, а затем отмывают. В лунки добавляют субстрат и там, где были антитела к иммобилизованному полипептидному антигену, возникает цветная реакция.

Идентифицированные при этом антитела можно затем дополнительно подвергнуть анализу на сродство и специфичность. При разработке иммуноанализа на белок-мишень очищенный белок-мишень действует в качестве стандарта, по которому можно оценить чувствительность и специфичность иммуноанализа с помощью тех антител, которые были отобраны. Поскольку сродство связывания у различных антител может отличаться, например определенные комбинации антител могут стерически мешать друг другу, то поведение антитела при анализе может оказаться более важной мерой, чем абсолютное сродство и специфичность этого антитела.

Специалисты должны понимать, что при получении антител или связывающих фрагментов и скрининге и отборе по сродству и специфичности к различным представляющим интерес полипептидам можно применять многие подходы, но эти подходы не изменяют сферы действия настоящего изобретения.

А. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатывают у животных путем множественного подкожного (sc) или внутрибрюшинного (ip) введения представляющего интерес полипептида и адъюванта. Может оказаться полезным конъюгирование данного полипептида с таким белковым носителем, который иммуногенен у того вида, который подвергается иммунизации, как то, например, с гемоцианином моллюска блюдечка, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или ингибитором трипсина из соевых бобов с помощью бифункционального или функционализирующего реагента. Отдельные примеры бифункциональных или функционализирующих реагентов включают малеимидобензоилловый эфир сульфосукцинимид (конъюгирование по остаткам цистеина), N-гидроксисукцинимид (конъюгирование по остаткам лизина), глутаральдегид, янтарный ангидрид, SOCl_2 и $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R_1 означают разные алкильные группы.

Животных иммунизируют против данного полипептида или его иммуногенного конъюгата или производного, смешивая, например, 100 мкг (для кроликов) или 5 мкг (для мышей) антигена или конъюгата с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и вводя этот раствор интрадермально в нескольких местах. Через месяц животным делают повторную иммунизацию (бустер) с помощью 1/5 или 1/10 первоначального количества полипептида или конъюгата в неполном адъюванте Фрейнда путем подкожного введения в нескольких местах. Спустя 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антител. Как правило, животным делают бустер до выхода титра на плато. Предпочтительно бустер делают с помощью конъюгата того же самого полипептида, но можно использовать конъюгирование с другим иммуногенным белком и/или с помощью другого сшивающего реагента. Конъюгаты можно получать и в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. В некоторых случаях для усиления иммунного ответа можно использовать такие агреганты, как квасцы.

В. Моноклональные антитела

Моноклональные антитела обычно получают из популяции практически однородных

антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительном количестве. Таким образом, атрибут "моноклональные" означает то, что они не являются смесью отдельных антител. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридным методом, описанным в Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или любым известным методом рекомбинантной ДНК (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567).

В гибридном методе мышь или другое подходящее животное (например, хомяка) иммунизируют, как описано выше, чтобы вызвать появление лимфоцитов, вырабатывающих или способных вырабатывать антитела, которые специфически связываются с данным полипептидом, использовавшимся для иммунизации. В качестве альтернативы иммунизируют лимфоциты *in vitro*. Затем иммунизированные лимфоциты сливают с клетками миеломы с помощью подходящего вызывающего слияние реагента типа полиэтиленгликоля, получая клетки гибридомы (например, см. Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp.59-103 (1986)). Полученные при этом клетки гибридомы высеивают и культивируют в подходящей среде культивирования, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживаемость неслитых, исходных клеток миеломы. Например, если у исходных клеток миеломы отсутствует фермент гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза (HGPRT), то среда культивирования для клеток гибридомы, как правило, должна содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост дефектных по HGPRT клеток.

Предпочтительными клетками миеломы являются клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают устойчивую продукцию антител на высоком уровне выбранными продуцирующими антитела клетками и/или чувствительны к такой среде, как среда HAT. Примеры таких предпочтительных линий клеток миеломы для продукции моноклональных антител человека включают такие линии миеломы мыши, как те, что происходят из опухолей MOPC-21 и MPC-11 мыши (доступны из Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), клетки SP-2 или X63-Ag8-653 (доступны из American Type Culture Collection; Rockville, MD), и линии клеток миеломы человека или гетеромиеломы мыши-человека (например, см. Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); и Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.51-63 (1987)).

Культуральная среда, в которой растут клетки гибридомы, может быть подвергнута анализу на продукцию моноклональных антител против искомого полипептида.

Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, определяется методом иммунопреципитации или связывания *in vitro*, как то методом радиоиммуноанализа (RIA) или ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Сродство связывания моноклональных антител можно определить, например, анализом по Скэтчарду согласно Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После идентификации клеток гибридомы, вырабатывающих антитела требуемой специфичности, сродства и/или активности, клоны можно субклонировать методом предельного разведения и культивировать стандартными методами (например, см. Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp.59-103 (1986)). Подходящей культуральной средой для этой цели является, к примеру, среда D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно культивировать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами,

можно выделить из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки стандартными методами очистки антител, такими, к примеру, как хроматография на сефарозе с белком А, гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

5 ДНК, кодирующую моноклональные антитела, можно легко выделить и секвенировать по стандартным методикам (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Предпочтительным источником такой ДНК служат клетки гибридом. После выделения ДНК можно вставить в экспрессионный вектор, которым
10 затем можно трансфецировать клетки хозяина типа клеток *E. coli*, клеток COS обезьян, клеток яичника китайского хомячка (СНО) или клеток миеломы, не вырабатывающих антитела, чтобы индуцировать синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина. Например, см. Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5:256-262 (1993); и Pluckthun, Immunol Rev., 130:151-188 (1992). ДНК также может быть модифицирована,
15 к примеру, путем замены на кодирующую последовательность константных доменов тяжелой и легкой цепи человека вместо гомологичных последовательностей мыши (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)) или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности
20 неиммуноглобулинового полипептида.

В следующем воплощении моноклональные антитела или фрагменты антител можно выделить из фаговых библиотек антител, созданных с помощью методов, описанных, к примеру, в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); и Marks et al., J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991). Получение высокоаффинных (в
25 диапазоне нМ) моноклональных антител человека методом перетасовки цепей описано в Marks et al., BioTechnology, 10:779-783 (1992). Применение комбинаторного инфицирования и рекомбинации *in vivo* как стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек описано в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993). Таким образом, эти методы являются жизнеспособной альтернативой традиционным
30 гибридным методам получения моноклональных антител при создании моноклональных антител.

С. Гуманизированные антитела

Методы гуманизации не принадлежащих человеку антител известны в этой области. Предпочтительно гуманизированное антитело содержит один или несколько остатков
35 аминокислот, введенных в него из другого источника, чем человек. Эти не принадлежащие человеку аминокислотные остатки зачастую называют "импортными" остатками, которые обычно берут из "импортного" переменного домена. Гуманизация в основном проводится путем замены последовательностей гиперпеременных участков антител человека на соответствующие последовательности не принадлежащих человеку
40 антител. Например, см. Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); и Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988). Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567), у которых существенно меньшая часть, чем интактный переменный домен человека, была заменена соответствующей последовательностью
45 из вида иного, чем человек. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гиперпеременных участков и возможно некоторые остатки каркасных участков (FR) заменены остатками из аналогичных мест антител грызунов.

Для снижения антигенности важным соображением является выбор переменных доменов человека, легких и тяжелых, предназначенных для создания гуманизированных антител, описанных в настоящем изобретении. В соответствии с так называемым методом "наилучшего соответствия", последовательность переменного домена антител грызунов подвергается скринингу относительно всей библиотеки известных последовательностей переменных доменов человека. После этого в качестве FR человека для гуманизированного антитела принимается та последовательность человека, которая ближе всего к таковой грызунов (например, см. Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); и Chothia et al., J.Mol.Biol., 196:901 (1987)). В другом методе используется определенный FR, выведенный из консенсусной последовательности всех антител человека у определенной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же FR может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (например, см. Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); и Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Важно и то, чтобы антитела подвергались гуманизации с сохранением высокого сродства к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные антитела можно получить в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов теперь общедоступны и известны специалистам. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и воспроизводят вероятные трехмерные конформационные структуры отобранных последовательностей рассматриваемых иммуноглобулинов. Просмотр этих изображений позволяет проанализировать возможную роль остатков в функционировании рассматриваемой последовательности иммуноглобулина, т.е. проанализировать, какие остатки влияют на способность рассматриваемого иммуноглобулина к связыванию со своим антигеном. Таким образом можно отобрать остатки FR и комбинировать их со своими и импортными последовательностями с тем, чтобы была достигнута требуемая характеристика антитела, как то повышение сродства к антигену мишени. В общем случае во влиянии на связывание антигена непосредственно и специфически задействованы остатки гиперпеременной области.

В соответствии с настоящим изобретением предусмотрены различные формы гуманизированных антител. Например, гуманизированные антитела могут представлять собой фрагменты антител типа Fab-фрагмента. С другой стороны, гуманизированные антитела могут представлять собой интактные антитела типа интактных антител IgA, IgG или IgM.

D. Человеческие антитела

В качестве альтернативы для гуманизации можно создать человеческие антитела. В некоторых воплощениях можно получить трансгенных животных (например, мышей), которые способны, после иммунизации, вырабатывать полный репертуар антител человека в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединительного участка тяжелой цепи (JH) антител у химерных и гаметных мутантных мышей приводит к полному торможению эндогенной продукции антител. Перенос гаметного набора генов иммуноглобулинов человека таким гаметным мутантным мышам приводит к продукции человеческих антител после введения антигена. Например, см. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immun., 7:33 (1993); и U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 and 5,545,807.

С другой стороны, можно использовать технологию фагового дисплея (например, см. McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990)) для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro*, используя репертуары генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов от неиммунизованных доноров. В соответствии с этим методом

5 гены V-доменов антител клонируют в одной рамке считывания в ген основного или же второстепенного белка оболочки нитчатого бактериофага типа M13 или fd и представляют в виде функциональных фрагментов антител на поверхности частиц фага. Поскольку нитчатые частицы содержат копию одноцепочечной ДНК из генома фага, то при отборе по функциональным свойствам антитела также происходит отбор гена,

10 кодирующего антитело, проявляющее эти свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей может осуществляться в различных форматах, как описано, например, в Johnson et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников сегментов V-генов. Например, см. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). Можно сконструировать

15 репертуар V-генов от неиммунизированных людей-доноров и выделить антитела к целому набору антигенов (включая аутоантигены), в основном следуя методам, описанным в Marks et al., *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991); Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993); и U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

В некоторых случаях человеческие антитела могут вырабатываться активированными

20 *in vitro* В-клетками, как описано, например, в U.S. Patent Nos. 5,567,610 and 5,229,275.

Е. Фрагменты антител

Разработаны различные методы получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (например, см. Morimoto et al., *J.Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако теперь эти фрагменты можно получить

25 непосредственно, используя рекомбинантные клетки хозяина. Например, можно выделить фрагменты антител из фаговых библиотек антител, описанных выше. С другой стороны, можно прямо выделить Fab'-SH-фрагменты из клеток *E.coli* и химически конъюгировать их, получая P(ab')₂-фрагменты (например, см. Carter et al., *Bio Technology*,

30 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу F(ab')₂-фрагменты можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток хозяина. Специалистам должны быть известны и другие методы получения фрагментов антител. В других воплощениях предпочтительным антителом будет одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). Например, см. PCT Publication No. WO 93/16185; и U.S. Patent Nos. 5,571,894 and 5,587,458. Фрагмент

35 антитела также может представлять собой линейное антитело, как описано, например, в U.S. Patent No. 5,641,870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

Ф. Биспецифичные антитела

Биспецифичными антителами являются антитела, обладающие специфичностью

40 связывания по меньшей мере с двумя различными эпитопами. Типичные биспецифичные антитела могут связываться с двумя разными эпитопами одного и того же полипептида. В других биспецифичных антителах сайт связывания для данного полипептида может сочетаться с сайтами связывания для одного или нескольких дополнительных антигенов. Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител либо

45 фрагментов антител (например, биспецифичные антитела типа F(ab')₂).

Методы получения биспецифичных антител известны. Традиционное получение полноразмерных биспецифичных антител основывается на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, при этом две цепи обладают различными

специфичностями (например, см. Millstein et al, Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного ассортимента тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) вырабатывают потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одно имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы обычно проводится методом аффинной хроматографии. Аналогичные методики изложены в PCT Publication No. WO 93/08829; и Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Согласно другому подходу варьируемые домены антител с требуемыми специфичностями связывания (сайтами связывания антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние предпочтительно проводится с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирного участка и участки C_H2 и C_H3 .

Предпочтительно по меньшей мере в одном из слияний должен находиться первый константный участок тяжелой цепи (C_H1), содержащий сайт, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующую слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если нужно, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессионные векторы и котрансфицируют ими подходящий организм хозяина. Этим обеспечивается большая гибкость при подборе взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в тех воплощениях, в которых при конструировании используются неодинаковые соотношения трех полипептидных цепей для обеспечения оптимального выхода. Однако можно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных долях приведет к высокому выходу или если пропорции не имеют особого значения.

В предпочтительном воплощении этого подхода биспецифичные антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одном плече и гибридной пары тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина (дающей вторую специфичность связывания) на другом плече. Такая асимметричная структура облегчает отделение нужного биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифичной молекулы обеспечивает легкость разделения. Например, см. PCT Publication No. WO 94/04690; и Suresh et al, Meth. Enzymol, 121:210 (1986).

Согласно другому подходу, описанному в U.S. Patent No. 5,731,168, можно устроить границу раздела между одной парой молекул антител, чтобы довести до максимума процент гетеродимеров, выделяемых из культуры рекомбинантных клеток.

Предпочтительно граница включает по меньшей мере часть участка C_H3 из константного домена антител. В этом методе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из границы первой молекулы антитела заменяют на большие боковые цепи (например, тирозина или триптофана). На границе второй молекулы антитела создают компенсаторные "полости", по размеру идентичные или близкие большим боковым цепям, заменяя большие боковые цепи аминокислот на небольшие (например, аланина или треонина). Этим обеспечивается механизм для повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами типа гомодимеров.

Биспецифичные антитела включают сшитые или "гетероконъюгатные" антитела. Например, одно из антител гетероконъюгата может быть конъюгировано с авидином, а другое с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получить любым удобным

методом сшивания. Подходящие сшивающие реагенты и методы хорошо известны и изложены, например, в U.S. Patent No. 4,676,980.

Также известны подходящие методы создания биспецифичных антител из фрагментов антител. Например, можно получить биспецифичные антитела с помощью химической связи. В некоторых случаях биспецифичные антитела можно создать по методике, в которой интактные антитела подвергают протеолитическому расщеплению, получая $P(ab')_2$ -фрагменты (например, см. Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Эти фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплекса арсенита натрия, чтобы стабилизировать вицинальные дитиолы и предотвратить образование межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Одно из производных Fab'-TNB затем обратно превращают в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламинамином и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB, получая биспецифичное антитело.

В некоторых воплощениях можно выделить Fab'-SH-фрагменты непосредственно из E.coli и химически конъюгировать их, получая биспецифичные антитела. Например, можно получить молекулу полностью гуманизированного биспецифичного антитела $F(ab')_2$ методами, описанными в Shalaby et al., J. Exp.Med., 175: 217-225 (1992). Выделяли каждый Fab'-фрагмент по отдельности из E.coli и подвергали прямому химическому конъюгированию in vitro, получая биспецифичное антитело.

Также описаны различные методы получения и выделения биспецифичных фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифичные антитела получали с помощью лейциновых застежек-молний. Например, см. Kostelny et al., J.Immunol, 148:1547-1553 (1992). Пептиды с лейциновыми застежками-молниями из белков Fos и Jun соединяли с Fab'-фрагментами двух разных антител методом слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали на шарнирном участке с образованием мономеров, а затем обратно окисляли, получая гетеродимеры антител. Этот метод может применяться и для получения гомодимеров антител. Технология "диантител", описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм для получения биспецифичных фрагментов антител. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) при помощи слишком короткого линкера, который не позволяет спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены образовывать пары с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, при этом образуются два антигенсвязывающих сайта. Другая стратегия получения биспецифичных фрагментов антител при помощи димеров одноцепочечных Fv (sFv) описана в Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994).

Также предусмотрены антитела и с более чем двумя валентностями. Например, можно получить триспецифичные антитела. Например, см. Tutt et al., J.Immunol, 147:60 (1991).

Г. Очистка антител

При использовании рекомбинантных методов антитела могут вырабатываться внутри выделенных клеток хозяина, в периплазматическом пространстве клеток хозяина или секретироваться из клеток хозяина прямо в среду. Если антитела вырабатываются внутри клетки, то сначала удаляют клеточные обломки, например при помощи центрифугирования или ультрафильтрации. В работе Carter et al., BioTech., 10:163-167 (1992) описана методика выделения антител, секретируемых в периплазматическое

пространство E.coli. Вкратце, клеточную пасту оттаивают в присутствии ацетата натрия (рН 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Обломки клеток можно удалить центрифугированием. Если антитела секретируются в среду, то супернатанты из таких систем экспрессии обычно концентрируют с помощью коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например блока для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предшествующих стадий можно включить ингибитор протеаз типа PMSF для ингибирования протеолиза и можно включить антибиотики для предотвращения роста случайных загрязнений.

Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена, к примеру, методами хроматографии в гидроксипатите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и от того, какой изотип Fc-домена иммуноглобулина присутствует в антителе. Белок А может применяться для очистки антител, в основе которых лежат тяжелый цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (например, см. Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для $\gamma 3$ человека (например, см. Guss et al., EMBO J., 5:1567-1575 (1986)). Матриксом, к которому прикрепляется аффинный лиганд, чаще всего служит агароза, но имеются и другие матриксы. Механически устойчивые матриксы типа стекла с контролируемым размером пор или поли(стирендивинил) бензола обеспечивают более быструю скорость потока и более короткое время обработки, чем агароза. Если антитело содержит домен C_{H3} , то для очистки подходит смола Bakerbond ABX™ (J.T.Baker; Phillipsburg, N.J.). Доступны и другие методы очистки белков, как то фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обратнотазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-сефарозе, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (типа полиаспарагиновой кислоты), хроматофокусирование, электрофорез в ДДС-Na-ПААГ и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от подлежащего выделению антитела.

После предварительных стадий очистки смесь, содержащая искомое антитело и примеси, можно подвергнуть хроматографии гидрофобного взаимодействия при низком рН, используя буфер для элюирования при рН 2,5-4,5, предпочтительно при низкой концентрации соли (например, при 0-0,25 М соли).

Специалисты должны понимать, что в способах и композициях настоящего изобретения можно использовать и другие связывающие молекулы, обладающие функцией, аналогичной антителам, например связывающие молекулы или партнеры по связыванию, которые специфичны к одному или нескольким представляющим интерес анализируемым веществам в образце. Примеры подходящих антителоподобных молекул включают доменные антитела, унитела, нанотела, антигенреактивные белки акулы, авимеры, аднектины, антикарины, аффинные лиганды, филомеры, аптамеры, аффитела, тринектины и др.

VIII. Способы введения

Согласно способам настоящего изобретения описанные в нем противораковые лекарственные средства вводятся субъекту любым удобным способом, известным в этой области. Способы настоящего изобретения могут применяться для выбора подходящего противоракового лекарственного средства или комбинации противораковых лекарственных средств для лечения рака (например, рака легких) у субъекта. Кроме того, способы изобретения могут применяться для выбора субъекта, страдающего раком (например, раком легких), который будет подходящим кандидатом для лечения противораковым лекарственным средством или комбинацией противораковых лекарственных средств. Способы изобретения также могут применяться

для идентификации реакции опухоли (например, рака легких) у субъекта на лечение противораковым лекарственным средством или комбинацией противораковых лекарственных средств. Кроме того, способы изобретения могут применяться для прогнозирования реакции субъекта, страдающего раком (например, раком легких), на лечение противораковым лекарственным средством или комбинацией противораковых лекарственных средств. Специалисты в этой области должны понимать, что описанные в настоящем изобретении противораковые лекарственные средства могут вводиться сами по себе или в составе комбинированной терапии вместе с традиционной химиотерапией, радиотерапией, гормональной терапией, иммунотерапией и/или хирургией.

В некоторых воплощениях противораковое лекарственное средство включает антисигнальное средство (например, цитостатическое лекарственное средство) типа моноклонального антитела или ингибитора тирозинкиназ; антипролиферативное средство; средство химиотерапии (например, цитотоксическое лекарственное средство); средство радиотерапии; вакцину; и/или любое другое соединение, обладающее способностью уменьшить или остановить неконтролируемый рост аномальных клеток типа раковых клеток. В некоторых воплощениях субъект подвергается лечению антисигнальным средством и/или антипролиферативным средством в комбинации с одним или несколькими средствами химиотерапии. Типичные моноклональные антитела, ингибиторы тирозинкиназ, антипролиферативные средства, средства химиотерапии, средства радиотерапии и вакцины описаны выше.

Противораковые лекарственные средства, описанные в настоящем изобретении, также могут вводиться совместно с гормональными лечебными средствами, включая стероиды (например, дексаметазон), финастерид, ингибиторы ароматаз, тамоксифен и агонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) типа гoserелина.

Кроме того, описанные в настоящем изобретении противораковые лекарственные средства могут вводиться совместно с традиционными средствами иммунотерапии, включая иммуностимулянты (например, бациллы Кальметта-Герена (BCG), левамизол, интерлейкин-2, α -интерферон), иммунотоксины (например, конъюгат моноклональных антител против CD33 с калихеамицином, конъюгат моноклональных антител против CD22 с экзотоксином псевдомонад) и средства радиоиммунотерапии (например, моноклональные антитела против CD20, конъюгированные с ^{111}In , ^{90}Y или ^{131}I).

Противораковые лекарственные средства могут вводиться вместе с подходящим фармацевтическим наполнителем, если нужно, и любым из общепринятых способов применения. Так, введение может осуществляться, к примеру, перорально, буккально, под язык, гингивально, палатально, внутривенно, топически, подкожно, чрескожно, трансдермально, внутримышечно, внутрисуставно, парентерально, интраартериально, интрадермально, внутрижелудочно, интракраниально, внутрибрюшинно, интравезикально, интратекально, интралезионально, интраназально, интраректально, интравагинально или путем ингаляции. Под "совместным введением" понимается то, что противораковое лекарственное средство вводится одновременно, непосредственно до или сразу же после введения второго лекарственного средства (например, другого противоракового лекарственного средства, лекарственного средства, применяемого для уменьшения побочных эффектов, связанных с лечением противораковым лекарственным средством, средства радиотерапии, средства гормональной терапии, средства иммунотерапии).

Терапевтически эффективное количество противоракового лекарственного средства может вводиться неоднократно, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше

раз, либо доза может вводиться путем непрерывного вливания. Доза может иметь вид твердого, полутвердого вещества, лиофилизованного порошка или жидкой лекарственной формы, как то, к примеру, таблетки, пилюли, округлые таблетки, капсулы, порошки, растворы, суспензии, эмульсии, свечи, удерживающие клизмы, кремы, мази, лосьоны, гели, аэрозоли, пены и др., предпочтительно в стандартных лекарственных формах, подходящих для простого введения точных доз.

В настоящем изобретении термин "стандартная лекарственная форма" охватывает дискретные единицы, подходящие в качестве однократной дозировки для человека и других субъектов-млекопитающих, причем каждая единица содержит заданное количество противоракового лекарственного средства, рассчитанное так, чтобы привести к желаемому проявлению, переносимости и/или терапевтическим эффектам, вместе с подходящим фармацевтическим наполнителем (например, ампула). Кроме того, можно приготовить более концентрированные лекарственные формы, из которых впоследствии можно делать более разбавленные лекарственные формы. При этом более концентрированные лекарственные формы должны содержать существенно большее количество противоракового лекарственного средства, например по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше раз.

Способы получения таких лекарственных форм известны специалистам (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Лекарственные формы обычно включают стандартный фармацевтический носитель или наполнитель и могут дополнительно включать другие лекарственные средства, носители, вспомогательные вещества, разбавители, усилители проникновения в ткани, солюбилизаторы и др. Соответствующие наполнители можно приспособить к определенной лекарственной форме и пути введения хорошо известными способами (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*).

Примерами подходящих наполнителей являются лактоза, декстроза, сахароза, сорбитол, маннитол, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, целлюлоза, вода, физраствор, сироп, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и полиакрилаты типа карбополов, например Carborol 941, Carborol 980, Carborol 981 и т.д. Лекарственные формы могут дополнительно включать смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; увлажняющие вещества; эмульгирующие вещества; суспендирующие вещества; консервирующие вещества, такие как метил-, этил- и пропилгидроксibenзоаты (т.е. парабены); доводящие pH вещества, такие как неорганические и органические кислоты и основания; подслащивающие вещества; и ароматизаторы. Лекарственные формы также могут включать зерна биоразрушимого полимера, декстран и аддукты циклодекстрина.

Для перорального введения терапевтически эффективная доза может иметь вид таблеток, капсул, эмульсий, суспензий, растворов, сиропов, аэрозолей, лепешек, порошков и форм для продолжительного высвобождения. Подходящими наполнителями для перорального введения являются фармацевтические сорта маннитола, лактозы, крахмала, стеарата магния, натриевого сахараина, талька, целлюлозы, глюкозы, желатина, сахарозы, карбоната магния и др.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза имеет вид пилюли, таблетки или капсулы, при этом лекарственная форма может содержать, вместе с противораковым лекарственным средством, любое из следующего: разбавитель типа лактозы, сахарозы, двойного фосфата кальция; дезинтегрирующее вещество типа

крахмала или его производных; смазывающее вещество типа стеарата магния; и связующее вещество типа крахмала, гуммиарабика, поливинилпирролидона, желатина, целлюлозы и ее производных. Противораковое лекарственное средство также может быть включено в состав свечей, к примеру, в содержащем полиэтиленгликоль (PEG)

5 носители.

Жидкие лекарственные формы могут быть получены растворением или диспергированием противоракового лекарственного средства и необязательно одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ в носителе, таком, к примеру, как физраствор (например, 0,9% NaCl), водный раствор декстрозы, 10 глицерина, этанола и др., получая раствор или суспензию, например, для перорального, топического или внутривенного введения. Противораковое лекарственное средство также может быть включено в состав удерживаемой клизмы.

Для местного применения терапевтически эффективная доза может иметь вид эмульсии, лосьона, геля, пены, крема, желе, раствора, суспензии, мази или 15 трансдермального пластыря. Для введения путем ингаляции противораковое лекарственное средство может вводиться в виде сухого порошка или в жидком виде через распылитель. Для парентерального введения терапевтически эффективная доза может иметь вид стерильного раствора для инъекций и стерильного порошка в упаковке. Предпочтительно растворы для инъекций состояются при pH от 4,5 до 7,5.

20 Терапевтически эффективная доза также может быть представлена в лиофилизированном виде. Такие лекарственные формы могут включать и буфер, например бикарбонат для восстановления перед применением, или же буфер может содержаться в лиофилизированной лекарственной форме для восстановления, например, водой. Лيوфилизированная лекарственная форма может дополнительно содержать 25 подходящее сосудосуживающее средство, например адреналин. Лيوфилизированная лекарственная форма может быть представлена в шприце, необязательно в одной упаковке с буфером для восстановления, с тем чтобы восстановленная лекарственная форма могла быть немедленно введена субъекту.

30 Субъект может подвергаться обследованию через определенные промежутки времени для оценки эффективности определенного режима лечения. Например, может измениться активационное состояние некоторых молекул передачи сигналов в зависимости от терапевтического эффекта лечения с помощью одного или нескольких противораковых лекарственных средств, описанных в настоящем изобретении. Субъект может подвергаться наблюдению для оценки реакции и понимания эффектов некоторых 35 лекарственных средств или способов лечения при индивидуализированном подходе. Кроме того, субъект, первоначально реагирующий на конкретное противораковое лекарственное средство или комбинацию противораковых лекарственных средств, может стать невосприимчивым к этому лекарственному средству или комбинации лекарственных средств, что свидетельствует о том, что у этого субъекта возникла 40 приобретенная лекарственная устойчивость. Таким субъектам можно отменить текущую терапию и назначить альтернативное лечение в соответствии со способами настоящего изобретения.

В некоторых других случаях способы выполнения мультиплексного высокопроизводительного иммуноанализа и белковые матрицы раскрыты в WO 2008/ 45 036802, включенной в настоящее изобретение путем ссылки. В этой заявке раскрыты, среди прочего, антительные матрицы для детектирования активационного состояния и/или общего количества нескольких молекул передачи сигналов в редких циркулирующих клетках и способы применения этих матриц для облегчения

прогнозирования и диагностики рака и разработки индивидуализированных, адресных способов лечения. В этой заявке также раскрыта пленка-подложка, содержащая несколько захватывающих молекул, фиксированных в "адресуемой" или "индексированной" матрице. Каждый отдельный участок матрицы содержит уникальный захватывающий реагент, который специфически связывается с захватной меткой на независимом от активационного состояния антителе или на зависимом от активационного состояния антителе, тем самым фиксируя и организовывая меченые детектирующие антитела в матрице. В предпочтительном воплощении захватывающие агенты и захватные метки представляют собой олигонуклеотиды, которые специфически гибридизируются друг с другом.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1. Выделение, стимуляция и лизис циркулирующих клеток

Циркулирующие клетки солидной опухоли составляют клетки, которые дали метастазы либо микрометастазы из солидной опухоли, и включают циркулирующие опухолевые клетки (CTC), раковые стволовые клетки (CSC) и/или клетки, мигрирующие к опухоли (например, циркулирующие предшественники эндотелиальных клеток (CEPC), циркулирующие эндотелиальные клетки (CEC), циркулирующие проангиогенные миелоидные клетки, циркулирующие дендритные клетки и др. Образцы от пациентов, содержащие циркулирующие клетки, могут быть получены из любой доступной биологической жидкости (например, крови, мочи, аспирата из сосков, лимфы, слюны, аспирата тонкой иглой и др.). Циркулирующие клетки могут быть выделены из образца пациента с помощью одного или нескольких методов разделения, таких, к примеру, как иммуномагнитное разделение (например, см. Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), система CellTrack™ фирмы Immunicon (Huntingdon Valley, PA), микрофлюидное разделение (например, см. Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al. Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), метод FACS (например, см. Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661 (2001)), центрифугирование в градиенте плотности (например, см. Baker et al., Clin. Cancer Res., 13:4865-4871 (2003)), и методы обеднения (например, см. Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

Выделение клеток CTC вручную

Иммуномагнитное разделение - выделение клеток CTC вручную с последующим анализом на активацию:

- 1) используют магнитные шарики (Dynal M450; Dynal AS; Oslo, Норвегия), предварительно конъюгированные с моноклональным антителом против EpCAM (Kordia Life Sciences; Leiden, Нидерланды);
- 2) непосредственно перед использованием предварительно сенсibilизированные шарики Dynabeads промывают один раз равным объемом PBS с 0,01% BSA;
- 3) вносят 25 мкл сенсibilизированных шариков Dynabeads в 1 мл образца;
- 4) инкубируют смесь 20 мин при 2-8°C с осторожным встряхиванием;
- 5) пробирку помещают в магнитный сепаратор (магнит MPL-1) на 2 минуты;
- 6) супернатант отбрасывают, а связанные с шариками клетки промывают три раза путем ресуспендирования в PBS с 0,01% BSA с последующим магнитным разделением;
- 7) образец ресуспендируют в 100 мкл буфера для стимуляции.

Подготовка образцов:

- 1) отбирают периферическую кровь у человека-субъекта в силиконизированную

пробирку, содержащую 1 мг/мл EDTA. Первые 3-5 мл отбрасывают во избежание загрязнения эпителиальными клетками, выделяющимися из проколотов вены;

2) 1 мл цельной крови разбавляют 1:3 с помощью 0,9% NaCl перед использованием.

Подготовка контролей:

1) контроли на клеточные линии готовят добавлением клеток раковых линий человека в клетки HL-60;

2) контроли на клеточные линии используют при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Выделение клеток СЕС и СЕРС вручную

В качестве отдельного примера можно выделить жизнеспособные клетки СЕС и СЕРС методом иммуномагнитного выделения/обогащения, описанным в Beerepoot et al., Ann. Oncology, 15:139-145 (2004). Вкратце, периферическую кровь инкубируют с магнитными шариками (Dynal M450 IgG₁), предварительно конъюгированными с моноклональным антителом против CD 146 (Kordia Life Sciences). Это антитело распознает в периферической крови все линии эндотелиальных клеток, но не гематопоетические или эпителиальные клетки (George et al., J. Immunol. Meth., 139:65-75 (1991)). Перед положительным отбором можно провести отрицательный отбор гематопоетических и эпителиальных клеток с помощью магнитных шариков, конъюгированных с соответствующими антителами (например, шариков Dynal-CD45 для обеднения лейкоцитов, шариков Dynal-EpCAM для обеднения эпителиальных клеток (Invitrogen; Carlsbad, CA)). В данном примере применяется только положительный отбор.

Имуномагнитное разделение - выделение клеток СЕС и СЕРС вручную с последующим анализом на активацию:

1) используют магнитные шарика (Dynal M450), предварительно конъюгированные с моноклональным антителом против CD146 (Kordia Life Sciences);

2) непосредственно перед использованием предварительно сенсibilизированные шарика Dynabeads промывают один раз равным объемом PBS с 0,01% BSA;

3) вносят 25 мкл сенсibilизированных шариков Dynabeads в 1 мл образца;

4) инкубируют смесь 20 мин при 2-8°C с осторожным встряхиванием;

5) пробирку помещают в магнитный сепаратор (магнит MPL-1) на 2 минуты;

6) супернатант отбрасывают, а связанные с шариками клетки промывают три раза путем ресуспендирования в PBS с 0,01% BSA с последующим магнитным разделением;

7) образец ресуспендируют в 100 мкл буфера для стимуляции.

Подготовка образцов:

1) отбирают периферическую кровь у человека-субъекта в силиконизированную пробирку, содержащую 1 мг/мл EDTA. Первые 3-5 мл отбрасывают во избежание загрязнения эпителиальными клетками, выделяющимися из проколотов вены;

2) 1 мл цельной крови разбавляют 1:3 с помощью 0,9% NaCl перед использованием.

Подготовка контролей:

1) контроли на клеточные линии готовят добавлением эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) в клетки HL-60;

2) контроли на клеточные линии используют при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Выделение клеток СЕРС (без СЕС) вручную

Клетки СЕРС представляют собой циркулирующий подтип происходящих из костного мозга клеток-предшественников, обладающих способностью к дифференцировке в зрелые эндотелиальные клетки в ответ на различные ангиогенные факторы роста. Клетки СЕРС можно выделить при отборе с помощью антител, распознающих их

поверхностный маркер CD34. CD133 - поверхностный маркер, по которому незрелые предшественники эндотелиальных клеток (EPCs) или примитивные гематопоэтические стволовые клетки (HSCs) отличаются от CEPSCs. Описаны различные методики выделения CEPSCs из различных источников с использованием адгерентной культуры либо магнитных микрошариков. В данном примере используется методика, модифицированная из той, что описана в Asahara et al., Science, 275:964-967 (1997).

Иммуномагнитное разделение - выделение клеток CEPSC вручную с последующим анализом на активацию:

- 1) используют магнитные шарики (Dynal M450 CD34), которые сенсibilизированы моноклональным антителом, специфичным к поверхностному антигену CD34;
- 2) непосредственно перед использованием предварительно сенсibilизированные шарики Dynabeads промывают один раз равным объемом PBS с 0,01% BSA;
- 3) вносят 25 мкл сенсibilизированных шариков Dynabeads в 1 мл образца;
- 4) инкубируют смесь 20 мин при 2-8°C с осторожным встряхиванием;
- 5) пробирку помещают в магнитный сепаратор (магнит MPL-1) на 2 минуты;
- 6) супернатант отбрасывают, а связанные с шариками клетки промывают три раза путем ресуспендирования в PBS с 0,01% BSA с последующим магнитным разделением;
- 7) образец ресуспендируют в 100 мкл буфера для стимуляции.

Подготовка образцов:

- 1) отбирают периферическую кровь у человека-субъекта в силиконизированную пробирку, содержащую 1 мг/мл EDTA. Первые 3-5 мл отбрасывают во избежание загрязнения эпителиальными клетками, выделяющимися из проколотов вены;
- 2) 10 мл крови разбавляют 1:1 с помощью сбалансированного солевого раствора;
- 3) 4 мл разбавленной крови наслаивают на 3 мл Ficoll-Paque в пробирках на 10 мл;
- 4) пробирки центрифугируют при 400xg в течение 30-40 мин при 18-20°C;
- 5) верхний слой, содержащий плазму и тромбоциты, отсасывают стерильной пастеровской пипеткой, оставляя слой мононуклеаров нетронутым на границе раздела;
- 6) мононуклеары переносят в стерильную центрифужную пробирку с помощью стерильной пипетки;
- 7) добавляют 6 мл сбалансированного солевого раствора и осторожно ресуспендируют клетки;
- 8) центрифугируют смесь при 60-100xg в течение 10 мин при 18-20°C;
- 9) удаляют супернатант, а мононуклеары из каждой пробирки ресуспендируют в 1 мл PBS.

Выделение клеток CTC, CEC и CEPSC с помощью системы Veridex

Фирма Veridex (Warren, NJ) запустила систему CellSearch, которая состоит из системы CellPrep, набора для эпителиальных клеток CellSearch и анализатора CellSpotter. Система CellPrep - это полуавтоматическая система подготовки образцов (Kagan et al., J. Clin. Ligand Assay, 25:104-110(2002)). Набор CellSearch Epithelial Cell Kit состоит из:

ферромагнитной жидкости, конъюгированной со специфичными к эпителиальным клеткам антителами против EpCAM; конъюгированных с фикоэритрином антител к цитокератинам 8, 18 и 19; антитела против CD45, конъюгированного с аллофикоцианином; красителя DAPI; и буферов для отмывки, пермеабилзации и ресуспендирования клеток. Используемая в данном примере методика также описана в Allard et al., Clin. Cancer Res., 10:6897-6904 (2004). Полная система Veridex может использоваться для подсчета клеток CTC либо, при извлечении образца вручную после выделения с помощью системы CellPrep, может служить методом выделения перед анализом на активацию путей. Количество клеток CTC может оказаться информативным

для разработки алгоритма.

Система Veridex - обогащение клеток CTC с последующим подсчетом:

1) 7,5 мл крови смешивают с 6 мл буфера, центрифугируют при 800×g в течение 10 мин и помещают в систему CellPrep;

2) после всасывания супернатанта прибор добавляет ферромагнитную жидкость;

3) прибор осуществляет инкубацию и последующую операцию магнитного разделения;

4) несвязавшиеся клетки и остаток плазмы отсасываются;

5) добавляются окрашивающие реагенты вместе с буфером для пермеабилзации для флуоресцентного окрашивания;

6) после инкубации системой клетки подвергаются магнитному разделению и ресуспендируются в устройстве для презентации клеток MagNest для анализа с помощью анализатора CellSpotter;

7) устройство помещается в анализатор CellSpotter - 4-цветный полуавтоматический флуоресцентный микроскоп;

8) регистрируются изображения, удовлетворяющие определенным критериям Veridex, и отображаются через web-браузер для окончательного отбора вручную;

9) результаты подсчета клеток выражаются в количестве клеток на 7,5 мл крови.

Система Veridex - обогащение клеток CTC с последующим анализом на активацию:

1) 7,5 мл крови смешивают с 6 мл буфера, центрифугируют при 800×g в течение 10 мин и помещают в систему CellPrep;

2) после всасывания супернатанта прибор добавляет ферромагнитную жидкость;

3) прибор осуществляет инкубацию и последующую операцию магнитного разделения;

4) несвязавшиеся клетки и остаток плазмы отсасываются;

5) образец ресуспендируется в 100 мкл буфера для стимуляции.

Система Veridex - обогащение клеток CEC и CEPС с последующим анализом на активацию:

1) Veridex предлагает набор для эндотелиальных клеток CellTracks, в котором применяется захват с помощью антитела против CD 146. Набор CellTracks Endothelial Cell Kit используется вместе с системой фирмы Veridex CellTracks AutoPrep System для подготовки образцов крови и анализатором CellTracks Analyzer II для подсчета и характеристики клеток CEC и CEPС из цельной крови. Применяется та же методика, что и для набора CellSearch Epithelial Cell Kit.

Подготовка образцов:

1) отбирают периферическую кровь у человека-субъекта в пробирку CellSave с консервантом согласно инструкции производителя. Первые 3-5 мл отбрасывают во избежание загрязнения эпителиальными или эндотелиальными клетками, выделяющимися из проколотов вены.

Выделение клеток CSC вручную

Накапливаются данные о том, что опухоли содержат популяцию предполагаемых раковых стволовых клеток с уникальными механизмами самообновления и выживания (например, см. Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28 (2004); Reya et al., Nature, 414:1 OS-III (2001); Dontu et al., Trends Endocrinol. Metab., 15:193-197 (2004); и Dick, Nature, 423:231-233 (2003)). Раковые стволовые клетки (CSC) могут длительное время существовать в состоянии покоя, что делает их устойчивыми к лекарственным средствам,

воздействующим на делящиеся клетки. Эту запускающую рак популяцию можно исследовать на предмет активации путей самообновления и выживания, подвергающихся прицельной терапии для избирательного устранения. Описаны методики выделения клеток CSC с использованием адгерентной культуры либо магнитных микрошариков.

В данном примере используется методика, модифицированная из той, что описана в Cote et al., Clin. Can. Res., 12:5615 (2006).

Иммуномагнитное разделение - выделение клеток CSC вручную с последующим анализом на активацию:

- 5 1) используют магнитные шарики (Dynal AS; Oslo, Норвегия), которые сенсibiliзирова ны моноклональным антителом, специфичным к поверхностному антигену CD34 или CD 133;
- 2) непосредственно перед использованием предварительно сенсibiliзирова нные шарики Dynabeads промывают один раз равным объемом PBS с 0,01% BSA;
- 10 3) вносят $1-10^7$ предварительно сенсibiliзирова нных шариков Dynabeads в 3 мл образца;
- 4) инкубируют смесь 60 мин при 2-8°C с осторожным встряхиванием;
- 5) разделяют смесь на порции по 1 мл и каждую пробирку помещают в магнитный сепаратор (магнит MPL-1) по меньшей мере на 6 минут;
- 15 6) супернатант отбрасывают, а связанные с шариками клетки промывают три раза путем ресуспендирования в PBS с 0,01% BSA с последующим магнитным разделением;
- 7) образец ресуспендируют в 100 мкл буфера для стимуляции.

Подготовка образцов:

- 1) отбирают образцы костного мозга у пациентов на ранней стадии рака молочной 20 железы после информированного согласия пациента;
- 2) обработка аспиратов костного мозга проводится, как описано в Bauer et al., Clin. Can. Res., 6:3552-3559 (2000)). Фракцию моноклеаров, содержащую какие-либо рассеянные раковые клетки, обогащают центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Нугае на центрифуге Beckman GS-6 при 4000×g в течение 35 минут и промывают 25 два раза PBS.

Стимуляция и лизис выделенных клеток CTC

Стимуляция клеток:

- 1) к клеткам добавляют факторы роста TGF-α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

30 Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

- 1) образцы инкубируют с лекарственными средствами Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;
- 2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF-α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

35 Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

- 1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;
- 40 2) затем клетки стимулируют факторами TGF-α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 120 минут.

Простимулированные клетки CTC лизируют по следующей методике:

- 1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные в табл.2;
- 2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл 45 охлажденного буфера;
- 3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;
- 4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C .

Таблица 2			
Рецепт буфера для лизиса (10 мл)			
Реагенты	Исходная конц.	Конечная конц.	Объем
10% Triton X-100	10	1	1,00
1 М трис, pH 7,5	1	0,05	0,05
1 М NaF	1	0,05	0,05
5 М NaCl	5	0,1	0,20
2 М β -глицерофосфат	1	0,05	0,50
0,1 М Na_3VO_4	0,1	0,001	0,10
Пепстатин, 1 мг/мл	1	0,10	
Полный мини-набор ингибиторов протеаз			1 таблетка
0,5 М ЭДТА	0,5	0,005	0,10
Итого (мл)			3,00
Вода (мл)			7,00

15 Стимуляция и лизис выделенных клеток СЕС и/или СЕРС

VEGF, как полагают, стимулирует выживаемость, активируя антиапоптозные пути в клетках СЕРС (Larrivee et al., J.Biol. Chem., 278:22006-22013 (2003)) и зрелых клетках СЕС, отпавших от стенок сосудов (Solovey et al., Blood, 93:3824-3830 (1999)). VEGF также может стимулировать пролиферацию СЕРС или зрелых клеток СЕС, хотя зрелые СЕСs как будто обладают лишь ограниченной пролиферативной способностью по сравнению с СЕРСs (Lin et al., J. Clin. Invest, 105:71-77 (2000)). По этим причинам клетки СЕС и/или СЕРС подвергают активации путем инкубации с факторами роста из семейства VEGF перед лизисом.

Стимуляция клеток:

1) к клеткам добавляют факторы роста VEGF, FGF, PDGF, PIGF и/или Ang, каждый в концентрации 100 нМ, и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

1) образцы инкубируют с Avastin, Nexavar, Sutent и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C ;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов VEGF, FGF, PDGF, PIGF и/или Ang, каждый в концентрации 100 нМ, и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

1) образцы инкубируют с Avastin, Nexavar, Sutent и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C ;

2) затем клетки стимулируют факторами VEGF, FGF, PDGF, PIGF и/или Ang, каждый в концентрации 100 нМ, и инкубируют при 37°C в течение 120 минут. Выделенные клетки СЕС и/или СЕРС лизируют по следующей методике:

1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные в табл.2;

2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл охлажденного буфера;

3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;

4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C .

Стимуляция и лизис выделенных клеток CSC

Стимуляция клеток:

1) к клеткам добавляют факторы роста TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100

нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

5 2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

10 1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 120 минут.

Выделенные клетки CSC лизируют по следующей методике:

1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные в табл.2;

15 2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл охлажденного буфера;

3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;

4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

20 5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C.

Пример 2. Приготовление экстрактов раковых клеток из ткани, биопсии или первичной культуры

Данный пример иллюстрирует методы выделения, стимуляции и лизиса клеток из образцов раковых тканей или биопсии. Данный пример также иллюстрирует методы
25 инициации, стимуляции и лизиса первичных культур раковых клеток, выделенных из ткани, биопсии или цельной крови. Дополнительно методы выделения и культивирования раковых клеток из биологических образцов для скрининга лекарственных средств описаны, например, в U.S. Patent Nos. 5,728,541; 6,416,967; 6,887,680; 6,900,027; 6,933,129; и 7,112,415; и в U.S. Patent Publication Nos. 20040023375 и 20050202411. Клеточные
30 экстракты, полученные в соответствии с данным примером, можно использовать при анализе описанными в настоящем изобретении методами одинарного или близостного (двойного) детектирования.

Выделение раковых клеток из первичных или метастатических тканей

Выделение и культивирование клеток:

35 1) приблизительно 5-100 мг не некротизированной и незагрязненной опухолевой ткани извлекают хирургическим путем и помещают во флакон на 100 мл, содержащий стерильную среду для культуры клеток (например, RMPI-1640 с 10% FBS и антибиотиками);

40 2) образцы можно хранить или транспортировать при комнатной температуре в пределах 72 часов от получения;

3) образцы промывают три раза средой для культуры клеток;

4) ткань нарезают скальпелем на мелкие кусочки, а затем получают клеточную суспензию пропусканием через тонкую проволочную сетку;

45 5) в качестве альтернативы нарезанную ткань обрабатывают коктейлем, содержащим 0,25% коллагеназы II и 0,001% ДНКазы в лишенной сыворотки среде для культуры клеток, содержащей антибиотика. Инкубируют в течение 15-20 мин с осторожным встряхиванием. После обработки ферменты удаляют промыванием три раза средой для культуры клеток;

б) концентрацию клеток доводят до 10^6 /мл, высеивают клетки в 6-луночные планшеты и оставляют оседать в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывают трипсином и высеивают в микропланшеты для стимулирования с помощью лигандов и/или ингибирования с помощью намеченных лекарственных средств.

5 Стимуляция и лизис клеток из размельченных опухолей

Стимуляция клеток:

1) к клеткам добавляют факторы роста TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

10 1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

15 1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 120 минут.

20 Простимулированные клетки СТС лизируют по следующей методике:

1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные выше в табл.2;

2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл охлажденного буфера;

3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;

25 4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C.

Выделение раковых клеток из образцов биопсии

Выделение и культивирование клеток:

30 1) извлекают биоптат хирургическим путем (2 биоптата для иглы 14 размера, 3 биоптата для иглы 16 размера и 4 биоптата для иглы 18 размера, 1-2 биоптата при вакуумной биопсии) и помещают в стерильный флакон на 10 мл, содержащий среду для культуры клеток, как для образцов опухолей;

2) образцы можно хранить или транспортировать при комнатной температуре в пределах 72 часов от получения;

3) клеточный материал из биоптатов превращают в клеточную суспензию пропусканием через тонкую проволочную сетку;

4) в качестве альтернативы биоптаты можно обработать коктейлем, содержащим 0,25% коллагеназы II и 0,001% ДНКазы в лишенной сыворотки среде для культуры клеток, содержащей антибиотиков. Инкубируют в течение 15-20 мин с осторожным встряхиванием. После обработки ферменты удаляют промыванием 3 раза средой для культуры клеток;

45 5) концентрацию клеток доводят до 10^6 /мл, высеивают клетки в 6-луночные планшеты и оставляют оседать в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывают трипсином и высеивают в микропланшеты для стимулирования с помощью лигандов и/или ингибирования с помощью намеченных лекарственных средств.

Стимуляция и лизис клеток от биопсии

Стимуляция клеток:

1) к клеткам добавляют факторы роста TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют факторами TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 120 минут.

Простимулированные клетки лизируют по следующей методике:

1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные выше в табл.2;

2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл охлажденного буфера;

3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;

4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C.

Получение первичных культур от раковых клеток, выделенных из ткани, биоптата или цельной крови

Культивирование клеток:

1) раковые клетки, выделенные из ткани, биоптата или цельной крови, как описано выше, культивируют в небольших стерильных колбах (например, T-25), чашках Петри (например, 10 мм) или планшетах (например, 24-луночных планшетах, в зависимости от количества выделенных раковых клеток;

2) инкубация проводится в среде для культуры клеток (например, RPMI-1640 с 2% FBS и антибиотиками) при 37°C в увлажненной атмосфере с добавлением 5% CO₂. С течением времени клетки образуют монослой на дне сосуда и начинают делиться. Когда клетки приближаются к конfluентности, их обрабатывают трипсином и высеивают в микропланшеты для стимулирования с помощью лигандов и/или ингибирования с помощью намеченных лекарственных средств.

Стимуляция и лизис клеток первичных культур от раковых клеток, выделенных из ткани, биоптата или цельной крови

Стимуляция клеток:

1) к клеткам добавляют факторы роста TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами:

1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют добавлением факторов TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 5 минут.

Стимуляция клеток с обработкой лекарственными средствами (контур обратной связи):

1) образцы инкубируют с Herceptin, Lapatanib, Tarceva и/или аналогами рапамицина в терапевтически эффективных концентрациях 30 мин при 37°C;

2) затем клетки стимулируют факторами TGF- α (100 нМ), Hrg (100 нМ) и/или IGF (100 нМ) и инкубируют при 37°C в течение 120 минут.

Простимулированные клетки лизируют по следующей методике:

1) готовят свежий буфер для лизиса, смешивая реагенты, приведенные выше в табл.2;

2) после заключительной отмывки клетки ресуспендируют на льду в 100 мкл охлажденного буфера;

3) проводят инкубацию на льду в течение 30 минут;

4) центрифугируют смесь в микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 10 минут, чтобы отделить шарики от лизата;

5) лизат переносят в новую пробирку для анализа или хранения при -80°C.

Пример 3. Метод ELISA с одинарным детектированием на микроматрице с усилением сигнала тирамидом

Этот пример иллюстрирует мультиплексный, высокопроизводительный метод ELISA с одинарным детектированием на микроматрице, который обладает превосходным динамическим диапазоном, пригодным для анализа активационного состояния молекул передачи сигналов в редких циркулирующих клетках:

1) захватывающее антитело наносили путем печати на предметное стекло FAST с 16 ячейками (Whatman Inc.; Florham Park, NJ) при 2-кратном серийном разведении;

2) после высушивания в течение ночи стекло блокировали специальным буфером фирмы Whatman;

3) на каждую ячейку наносили 80 мкл лизата клеток при 10-кратном серийном разведении. Стекло инкубировали два часа при комнатной температуре;

4) после 6 отмывок TBS-Tween проводили инкубацию с 80 мкл меченого биотином детектирующего антитела (например, моноклонального антитела, распознающего рEGFR, или моноклонального антитела, распознающего EGFR независимо от активационного состояния) в течение двух часов при комнатной температуре;

5) после 6 отмывок добавляли меченную стрептавидином пероксидазу хрена (SA-HRP) и инкубировали 1 час, чтобы обеспечить связывание SA-HRP с меченым биотином детектирующим антителом;

6) для усиления сигнала добавляли 80 мкл биотин-тирамида при 5 мкг/мл и оставляли для реакции на 15 минут. Стекло отмывали 6 раз TBS-Tween, 2 раза 20% DMSO/TBS-Tween и 1 раз TBS;

7) добавляли 80 мкл SA-Alexa 555 и инкубировали в течение 30 минут. Затем стекло промывали 2 раза, сушили 5 минут и сканировали на сканере для микроматриц (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

Пример 4. Близостный метод ELISA с двойным детектированием на микроматрице с усилением сигнала тирамидом

Этот пример иллюстрирует мультиплексный, высокопроизводительный близостный метод ELISA с двойным детектированием на микроматрице, который обладает превосходным динамическим диапазоном, пригодным для анализа активационного состояния молекул передачи сигналов в редких циркулирующих клетках:

1) захватывающее антитело наносили методом печати на предметное стекло FAST с 16 ячейками (Whatman Inc.) при серийном разведении от 1 мг/мл до 0,004 мг/мл;

2) после высушивания в течение ночи стекло блокировали специальным буфером фирмы Whatman;

3) на каждую ячейку наносили 80 мкл лизата клеток A431 при 10-кратном серийном разведении. Стекло инкубировали два часа при комнатной температуре;

4) после 6 отмывок TBS-Tween на стекло наносили 80 мкл детектирующих антител,

разведенных TBS-Tween/2% BSA/1% FBS. Использовали следующие детектирующие антитела: (1) моноклональное антитело против EGFR, непосредственно конъюгированное с глюкозооксидазой (GO); и (2) моноклональное антитело, распознающее фосфорилированный EGFR, непосредственно конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP). Инкубация составляла два часа при комнатной температуре;

5) в качестве альтернативы на стадии детектирования использовали биотиновый конъюгат моноклонального антитела, распознающего фосфорилированный EGFR. В этих случаях после 6 отмывок включали дополнительную очередную стадию инкубации со стрептавидин-HRP в течение 1 часа;

6) в качестве альтернативы на стадии детектирования использовали опосредованный олигонуклеотидом конъюгат антитела против EGFR с глюкозооксидазой (GO). Использовали либо непосредственно конъюгированный, либо соединенный с биотин-стрептавидином (SA) конъюгат HRP с антителом к фосфорилированному EGFR;

7) для усиления сигнала добавляли 80 мкл биотин-тирамида при 5 мкг/мл и оставляли для реакции на 15 минут. Стекло отмывали 6 раз TBS-Tween, 2 раза 20% DMSO/TBS-Tween и 1 раз TBS;

8) добавляли 80 мкл SA-Alexa 555 и инкубировали в течение 30 минут. Затем стекло промывали 2 раза, сушили 5 минут и сканировали на сканере для микроматриц (Perkin-Elmer, Inc.).

Пример 5. Создание активационных профилей для отбора лекарственных средств
Способы и композиции настоящего изобретения могут применяться для отбора лекарственных средств для лечения рака. Типичная методика требует создания двух профилей: контрольного активационного профиля и тестируемого активационного профиля, которые затем сравнивают, чтобы определить эффективность определенного режима лечения лекарственным средством (см. фиг.2).

Контрольный активационный профиль

Для получения контрольного активационного профиля берут образец крови у пациента, страдающего определенным типом рака (например, раком легких), до применения противоракового лекарственного средства. Из образца крови выделяют редкие циркулирующие клетки, происходящие из раковой опухоли, используя, к примеру, методы иммуномагнитного разделения, как описано более подробно в настоящем изобретении. Выделенные циркулирующие клетки можно подвергнуть стимуляции *in vitro* одним или несколькими факторами роста. Затем простимулированные клетки подвергают лизису для получения клеточного экстракта. Клеточный экстракт наносят на адресуемую матрицу, содержащую ряд разведений комплекта захватывающих антител, специфичных к тем молекулам передачи сигналов, активационное состояние которых может быть измененным при типе рака у пациента. Применяются методы одинарного детектирования или близостные методы с использованием соответствующих детектирующих антител (например, независимых от активационного состояния и/или зависимых от активационного состояния) для определения активационного состояния каждой представляющей интерес молекулы передачи сигналов. Приведенная в табл.1 "Выбор путей" таблица особенно полезна при выборе того, какие активационные состояния следует детектировать, исходя из типа рака у пациента. Например, у одного пациента может оказаться один тип рака, проявляющий активационные состояния пути EGFR, приведенные в графе "Путь 1" таблицы 1. С другой стороны, у другого пациента может оказаться другой тип рака, проявляющий активационные состояния пути EGFR, приведенные в графе "Путь 2" таблицы 1. Таким образом создается контрольный активационный профиль, представляющий активационные состояния молекул передачи

сигналов при раке у пациента в отсутствие противораковых лекарственных средств.

Тестируемый активационный профиль

Для получения тестируемого активационного профиля берут второй образец крови у пациента, страдающего определенным типом рака (например, раком легких), либо до применения противоракового лекарственного средства, либо после введения противоракового лекарственного средства (например, в любое время в ходе лечения рака). Из образца крови выделяют редкие циркулирующие клетки, происходящие из раковой опухоли. Если выделенные клетки получены от пациента, не получавшего лечения противораковым лекарственным средством, то выделенные клетки инкубируют с противораковыми лекарственными средствами, мишенью которых является одна или несколько активированных молекул передачи сигналов, определенных из контрольного активационного профиля, описанного выше. Таблица "Выбор лекарственных средств" (табл.А) особенно полезна для выбора надлежащих противораковых лекарственных средств, как разрешенных, так и проходящих клинические испытания, которые ингибируют определенные мишени - активированные молекулы передачи сигналов. Например, если из контрольного активационного профиля установлено, что активируется EGFR, то можно инкубировать клетки с одним или несколькими из лекарственных средств, перечисленных в столбце "А" или "В" таблицы А. Выделенные клетки можно затем подвергнуть стимуляции *in vitro* одним или несколькими факторами роста. Затем простимулированные клетки подвергают лизису для получения клеточного экстракта. Клеточный экстракт наносят на адресуемую матрицу и проводят анализ близостным методом, чтобы определить активационное состояние каждой представляющей интерес молекулы передачи сигналов. Таким образом создается тестируемый активационный профиль для пациента, представляющий активационные состояния молекул передачи сигналов при раке у пациента в присутствии конкретных противораковых лекарственных средств.

Отбор лекарственных средств

Противораковые лекарственные средства определяются как подходящие или не подходящие для лечения рака у пациента при сравнении тестируемого активационного профиля с контрольным активационным профилем. Например, если применение лекарственных средств вызывает значительное снижение активации у большинства или всех молекул передачи сигналов, чем в отсутствие лекарственных средств, например, переход от сильной активации в отсутствие лекарственных средств к слабой или очень слабой активации в присутствии лекарственных средств, то оно считается подходящим для лечения рака у пациента. В таких случаях либо начинают лечение подходящим противораковым лекарственным средством у пациента, не получавшего это лекарственное средство, либо продолжают текущее лечение подходящим противораковым лекарственным средством у пациента, уже получающего это лекарственное средство.

Однако если применение лекарственного средства будет признано нецелесообразным для рака у пациента, то выбирают другие лекарственные средства и используются для создания нового тестируемого активационного профиля, который затем сравнивают с контрольным активационным профилем. В таких случаях либо начинают лечение подходящим противораковым лекарственным средством у пациента, не получавшего это лекарственное средство, либо текущее лечение заменяют подходящим противораковым лекарственным средством у пациента, в данное время получающего неподходящее лекарственное средство.

Пример 6. Адресуемые матрицы для анализа активации рецепторных тирозинкиназ

На фиг.3 представлена адресуемая матрица для рецепторных тирозинкиназ по изобретению. Как уже обсуждалось, рецепторные тирозинкиназы являются ключевыми компонентами многих путей передачи сигналов, задействованных в пролиферации клеток. Например, семейство ErbB рецепторных тирозинкиназ содержит 4 представителя и играет важную роль в таких фундаментальных клеточных процессах, как пролиферация, дифференцировка и выживаемость клеток. Сообщалось, что это семейство рецепторных тирозинкиназ суперэкспрессируется при различных видах рака и связано с самым худшим клиническим исходом. При связывании фактора роста происходит гомо- и гетеродимеризация ErbB1 или EGFR, ErbB3 или HER3 и ErbB4 или HER4 с активацией ряда различных сигнальных путей. ErbB2 или HER2 не связывается с фактором роста и является предпочтительным партнером при гетеродимеризации для всех трех представителей семейства. При суперэкспрессии ErbB2 также может подвергаться гомодимеризации и активировать сигнальные пути. Гомо- или гетеродимеризация семейства ErbB приводит к трансфосфорилированию. Ауто- или трансфосфорилирование устраняет ингибиторную конформацию рецепторных тирозинкиназ, что вызывает полную активацию киназ и в то же время создает сайты связывания для многочисленных SH2-содержащих сигнальных молекул, как то Src, She, SHP-1, SHP-1 и PI(3)K. К фосфорилированным рецепторам привлекаются адаптерные белки или сигнальные белки типа She, Grb2 или PI3K. Фосфорилирование адаптерных белков приводит к активации путей MAPK и АКТ. Активацию пути MAPK можно оценить по состоянию фосфорилирования Erk и Rsk, а активацию пути PI3K можно оценить по состоянию фосфорилирования Akt и p70S6K.

Таким образом, адресуемая матрица для семейства ErbB, представленная на фиг.3, позволяет не только определять экспрессию четырех рецепторных тирозинкиназ, но и их активационное состояние. К тому же на адресуемой матрице можно изучать активацию обоих путей: MAPK и PI3K/Akt. Другая особенность матрицы - наличие внутренних контролей для определения содержания в опухоли и неспецифического IgG для определения неспецифического связывания.

Пример 7. Адресуемые матрицы для анализа путей передачи сигналов при ангиогенезе

На фиг.4 представлена конфигурация адресуемой матрицы для определения активационного состояния компонентов передачи сигналов, участвующих в ангиогенезе. Как описано в настоящем изобретении, ангиогенез опухолей является критическим для роста многих солидных опухолей. Среди представленных на матрице ключевых молекул передачи сигналов имеются представители семейства рецепторных тирозинкиназ VEGFR, FGFR и TIE, которые преимущественно экспрессируются на эндотелиальных клетках. PDGFR обычно экспрессируется на перицитах. Экспрессия и активационное состояние этих рецепторов имеет решающее значение при определении преобладающего механизма ангиогенеза в индивидуальных образцах опухолей. Факторы роста типа VEGF и PlGF связываются с VEGFR-1 и VEGFR-2 и вызывают гомо- и гетеродимеризацию. За димеризацией следует фосфорилирование этих рецепторов, после чего следует активация сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt. Рецепторы FGFR, TIE и PDGFR тоже активируются аналогичным образом. Ауто- или трансфосфорилирование устраняет ингибиторную конформацию рецепторных тирозинкиназ, что вызывает полную активацию киназ и в то же время создает сайты связывания для многочисленных SH2-содержащих сигнальных молекул, как то Src, She, SHP-1, V-кадгерина, SHP-1 и PI3K. К фосфорилированным рецепторам привлекаются адаптерные белки или сигнальные белки типа She, Grb2 или PI3K. Фосфорилирование адаптерных белков приводит к активации путей MAPK и АКТ.

Активацию пути MAPK можно оценить по состоянию фосфорилирования Erk и Rsk, а активацию пути PI3K можно оценить по состоянию фосфорилирования Akt и p70S6K.

Таким образом, адресуемые матрицы для ангиогенеза типа тех, что представлены на фиг.4, позволяют не только определять экспрессию всех рецепторных тирозинкиназ в образце от пациента, но и их активационное состояние. К тому же на адресуемой матрице можно изучать активацию обоих путей: MAPK и PI3K/Akt. На матрицу нанесены внутренние контроли для определения содержания в опухоли или ассоциированных с опухолью клетках (СЕС, СЕР, перицитах и т.д.) и неспецифический IgG для определения неспецифического связывания.

Пример 8. Отбор пациентов для лечения немелкоклеточного рака легких

Текущие способы лечения немелкоклеточного рака легких (NSCLC) требуют применения как химиотерапевтической, так и антиангиогенной терапии. В качестве первоочередной терапии врачи обычно используют карбоплатин (С) либо карбоплатин вместе с лекарственными средствами таксол (Т) и Avastin[®] для пациентов с неплоскоклеточным раком. К лекарственным средствам второй очереди относятся таксол, ALIMTA[®] и Tarceva[®] (для некурящих, женщин и азиатов). В продолжающихся клинических испытаниях тестируется эффективность различных комбинаций лекарственных средств, в том числе: Avastin[®]+Tarceva[®] при неплоскоклеточном раке; сорафениб + карбоплатин + таксол при всех NSCLC, включая плоскоклеточный рак; и ZD6474 (Zactima[™]) + карбоплатин + таксол при всех NSCLC, включая плоскоклеточный рак.

При NSCLC был показан ряд изменений в ключевых компонентах передачи сигналов. Они включают: мутации EGFR, приводящие к активации; активацию других рецепторных тирозинкиназ типа c-met; активацию EGFR вместе с активацией HER2 и 3 или амплификацией HER2; активацию EGFR вместе с мутацией PI3K; активацию EGFR вместе с делецией PTEN; и активацию EGFR вместе с мутацией Ras. На различные изменения в различных компонентах путей передачи сигналов воздействуют различные формы химиотерапии.

В то же время можно воздействовать и на процесс образования новых кровеносных сосудов для клеток опухолей, который именуется ангиогенезом. VEGF является фактором выживания эндотелиальных клеток, который необходим для образования новых кровеносных сосудов. Соответственно, один из подходов к модулированию обусловленного VEGF ангиогенеза заключается в применении антител, направленных против самого белка VEGF или VEGFR. Рекombинантное гуманизированное антитело к VEGF - бевацизумаб действует синергически с химиотерапией и, как было показано, улучшает выживаемость у пациентов с колоректальным раком, раком молочной железы и раком легких.

Нижеприведенный в табл.3 пример иллюстрирует, как анализ путей, действующих в эндотелиальных клетках или ЕСР, можно использовать для помощи врачам в выборе эффективного курса лечения. Вкратце, можно определить уровень активации различных компонентов пути VEGF в эндотелиальных клетках или ЕСР в присутствии или в отсутствие различных комбинаций тестируемых терапевтических средств.

Таблица 3

Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Avastin	Активация + С + Т + Avastin
VEGFR2	средняя	сильная	слабая	слабая
VEGFR1	средняя	сильная	слабая	слабая
Tie 2	слабая	слабая	слабая	слабая

Комплекс V-кадгерин-K2	слабая	средняя	слабая	слабая
Shc		сильная	слабая	слабая
PI3K		сильная	слабая	слабая
Erk		сильная	слабая	слабая
Rsk		сильная	слабая	слабая
Akt		сильная	слабая	слабая
P70S6K		сильная	слабая	слабая

Приведенные в табл.3 сведения показывают, что у компонентов передачи сигналов, проявляющих сильную активацию, судя по высокому уровню фосфорилирования, она уменьшается до слабого уровня при обработке лекарственными средствами Avastin или С + Т + Avastin. Таким образом, пациентов с активированными путями VEGFR-2 и VEGFR-1 следует лечить лекарственными средствами Avastin или С + Т + Avastin.

Примеры других терапевтических средств, воздействующих на ангиогенные пути передачи сигналов, которые можно использовать для получения тестируемых активационных профилей, представлены ниже в табл.4.

Таблица 4 Безопасность и эффективность ингибиторов тирозинкиназ VEGFR при NSCLC			
Ингибитор	Мишень	Общая токсичность	Клиническое действие при NSCLC
Ваталаниб	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	усталость, тошнота, рвота, повышение печеночных ферментов, гипертензия	нет данных
AZD2171	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR	усталость, понос, гипертензия, анорексия, одышка	SD
Сунитиниб-малат	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	усталость, сыпь, депигментация волос, обесцвечивание волос, гипертензия	PR
AG013736	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	гипертензия, кровохарканье, стоматит, тошнота, понос	кавитация опухоли
Сорафениб	VEGFR-2, -3, PDGFR, c-Kit, Raf	понос, повышение печеночных ферментов, гипертензия, усталость	SD
GW786034	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	гипертензия, эмболия легких, тошнота, усталость, депигментация волос	SD
ZD6474	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	понос, сыпь, гипертензия	PR
CP-547632	VEGFR-2	сыпь и сухость во рту	PR

В табл.4 перечислены мишени для новых антиангиогенных лекарственных средств. Настоящее изобретение позволяет разумно выбрать такие маркеры активации, которые лучше всего прогнозируют выживаемость. Наилучшие маркеры активации могут варьировать между различными лекарственными средствами и могут применяться в качестве ориентира для выбора между антиангиогенной монотерапией и комбинированной терапией.

Пример 9. Отбор пациентов для лечения с помощью других антиангиогенных лекарственных средств

Ниже представлены дополнительные примеры применения анализа путей, как изложено в настоящем изобретении, для определения пригодности различных лекарственных средств, приведенных в табл.4.

ZD6474

ZD6474 (Zactima™) в настоящее время проходит клинические испытания III фазы для лечения тех пациентов, у которых направленная на EGFR терапия оказалась неудачной. В частности, данное исследование проводится для оценки того, будет ли добавление ZD6474 к наилучшей поддерживающей терапии (BSC) более эффективным, чем одна лишь наилучшая поддерживающая терапия, при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легких, у которых произошел рецидив после предшествующей химиотерапии и ингибитора тирозинкиназ (TKI) EGFR. Противораковое лекарственное средство ZD6474

воздействует на рост новых кровеносных сосудов к опухоли и поэтому может замедлить скорость роста опухоли. Начальные исследования показали, что ZD6474 оказывает положительный эффект на время перехода опухоли в следующую стадию. В качестве терапии третьей очереди ZD6474 дают тем пациентам, у которых произошел рецидив при химиотерапии и TKI EGFR. Структура ZD6474 отличается от Tarceva®/Iressa®, поэтому ожидается, что он будет ингибировать EGFR и антиангиогенные пути (например, VEGFR-1, -2 и -3).

Соответственно, проводятся следующие испытания:

- сравнительное исследование эффективности ZD6474 в комбинации с пеметрекседом и одного лишь пеметрекседа;
- сравнительное испытание Zactima™ в комбинации с доцетакселом и одного лишь доцетаксела при немелкоклеточном раке легких (NSCLC);
- вандетаниб, карбоплатин и паклитаксел при лечении пациентов с NSCLC I стадии, II стадии или III стадии, который может быть удален хирургическим путем; и
- сравнительное испытание эффективности ZD6474 с эрлотинибом при NSCLC после неудачи, как минимум, одной предшествующей химиотерапии.

Отбор пациентов, восприимчивых к комбинациям лекарственных средств, включающим ZD6474, с помощью способов и композиций настоящего изобретения, как представлено ниже в табл.5, мог бы не только уменьшить количество пациентов при клинических испытаниях III фазы, но и привести к улучшению лечения пациентов.

Таблица 5

Раковые клетки				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + ZD6474	Активация + Avastin
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	сильная
ErbB2	средняя	сильная	оч. слабая	сильная
ErbB3	слабая	средняя	оч. слабая	средняя
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	слабая
Shc		сильная	оч. слабая	сильная
PI3K		сильная	оч. слабая	сильная
Erk		сильная	оч. слабая	сильная
Rsk		сильная	оч. слабая	сильная
Akt		сильная	оч. слабая	сильная
P70S6K		сильная	оч. слабая	сильная

Таблица 6

Эндотелиальные клетки				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфо-рилирования)	Активация + ZD6474	Активация + Avastin
VEGFR2	средняя	сильная	слабая	слабая
VEGFR1	средняя	сильная	слабая	слабая
Tie 2	слабая	слабая	слабая	слабая
Комплекс V-кадгерин-R2	нет	средняя	слабая	слабая
Shc		сильная	слабая	слабая
PI3K		сильная	слабая	слабая
Erk		сильная	слабая	слабая
Rsk		сильная	слабая	слабая
Akt		сильная	слабая	слабая
P70S6K		сильная	слабая	слабая

Приведенные в табл.5 и 6 сведения показывают, что ZD6474 вызывает подавление путей как в эндотелиальных клетках, так и в раковых клетках.

AZD2171

Сейчас проводится ряд клинических испытаний лекарственного средства AZD2171, который ингибирует PDGFR и VEGFR. Например, проводится тестирование комбинации AZD2171 с дунатриевым пеметрекседом для лечения пациентов с рецидивами немелкоклеточного рака легких. Обоснование этой комбинации состоит в том, что пеметрексед может остановить рост раковых клеток, ингибируя ферменты, нужные для деления клеток. AZD2171 вносит дополнительный вклад в прекращение роста раковых клеток, блокируя приток крови к опухоли. Таким образом, введение AZD2171 вместе с дунатриевым пеметрекседом может оказывать синергическое действие, вызывая гибель большего числа раковых клеток.

В другом клиническом испытании AZD2171 сочетается с бевацизумабом (Avastin[®]) при лечении пациентов с метастатическими или нерезектабельными солидными опухолями или лимфомами. Обоснование этой комбинации состоит в том, что такие моноклональные антитела, как бевацизумаб могут блокировать рост опухолей множеством способов. Некоторые блокируют способность раковых клеток к росту и распространению. Другие разыскивают раковые клетки и способствуют их гибели или переносят к ним губительные для рака вещества. Бевацизумаб и AZD2171 также могут останавливать рост раковых клеток, блокируя приток крови к опухоли. Таким образом, введение бевацизумаба вместе с AZD2171 может синергическим образом вызывать гибель большего числа раковых клеток.

В других клинических испытаниях исследуется комбинация гемцитабина и карбоплатина с AZD2171 или без него в качестве первоочередной терапии при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легких IIIB стадии или IV стадии и комбинация паклитаксела и карбоплатина с AZD2171 или без него при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легких III или IV стадии.

Отбор пациентов, восприимчивых к комбинациям лекарственных средств, включающим AZD2171, с помощью способов и композиций настоящего изобретения представлен ниже в табл.7.

Таблица 7				
Эндотелиальные клетки и перициты				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + AZD2171	Активация + Avastin
VEGFR2	средняя	сильная	слабая	слабая
VEGFR1	средняя	сильная	слабая	средняя
Tie 2	слабая	слабая	слабая	слабая
Комплекс V-кадгерин-R2	нет	средняя	слабая	слабая
PDGFRα	средняя	сильная	слабая	сильная
PDGFRβ	средняя	сильная	слабая	сильная
Shc		сильная	слабая	слабая
PI3K		сильная	слабая	слабая
Erk		сильная	слабая	слабая
Rsk		сильная	слабая	слабая
Akt		сильная	слабая	слабая
P70S6K		сильная	слабая	слабая

Поскольку PDGF суперэкспрессируется у Avastin[®]-резистентных пациентов, то сведения, приведенные в табл.7, свидетельствуют о том, что AZD2171, который ингибирует как PDGFR, так и VEGFR, может оказаться предпочтительным средством для лечения таких опухолей.

Сорафениб

Сейчас также проводится ряд клинических испытаний лекарственного средства

сорафениб (BAY 43-9006). Например, проводятся следующие исследования: (1) сравнение карбоплатина и паклитаксела плюс-минус сорафениб у не подвергавшихся химиотерапии пациентов с немелкоклеточным раком легких; (2) рандомизированное контролируемое испытание по сравнению безопасности и эффективности карбоплатина и паклитаксела плюс-минус сорафениб у не подвергавшихся химиотерапии пациентов с немелкоклеточным раком легких III-IV стадии; и (3) сорафениб и бевацизумаб при лечении пациентов с рефракторными, метастатическими или нерезектабельными солидными опухолями.

Отбор пациентов, восприимчивых к комбинациям лекарственных средств, включающим сорафениб, с помощью способов и композиций настоящего изобретения представлен ниже в табл.8.

Таблица 8				
Эндотелиальные клетки и перициты				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация+сорафениб	Активация+Avastin
VEGFR2	средняя	сильная	слабая	слабая
VEGFR1	средняя	слабая	слабая	средняя
Tie 2	слабая	слабая	слабая	слабая
Комплекс V-кадгерин-R2	нет	средняя	слабая	слабая
PDGFRa	средняя	сильная	слабая	сильная
PDGFRb	средняя	сильная	слабая	сильная
Shc		сильная	слабая	слабая
PI3K		сильная	слабая	слабая
Erk		сильная	слабая	слабая
Rsk		сильная	слабая	слабая
Akt		сильная	слабая	слабая
P70S6K		сильная	слабая	слабая

Поскольку у Avastir[®]-резистентных пациентов суперэкспрессируется и VEGF, и PDGF, то комбинация авастина и сорафениба может эффективно подавлять оба пути. Кроме того, сорафениб ингибирует Raf и поэтому может ингибировать путь MAPK во всех типах клеток.

Пример 10. Другие комбинации антиангиогенной и антисигнальной терапии

Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия и рецептор фактора роста эпидермиса (EGFR) могут способствовать ангиогенезу в опухолевых тканях и совместно использовать нижележащие сигнальные пути. Следовательно, воздействие на оба пути могло бы в принципе оказывать аддитивные или синергические противоопухолевые эффекты. В недавнем исследовании I/II фазы оценивали комбинацию бевацизумаба с небольшой молекулой эрлотинибом - ингибитором тирозинкиназ (TKI) EGFR - у пациентов с неплоскоклеточным рефракторным запущенным немелкоклеточным раком легких (NSCLC). В исследованиях II фазы было показано, что бевацизумаб в комбинации с эрлотинибом как будто оказывает благотворное действие независимо от мутационного состояния тирозинкиназ EGFR (например, см. Herbst et al., J. Clin. Oncol, 23:2544-2555 (2005)). Таким образом, очевидно, что подавление обоих путей EGFR и VEGFR-2 будет благотворным для пациентов.

В числе проходящих сейчас клинических испытаний: (1) сравнительное исследование терапии бевацизумабом вместе с эрлотинибом или без него в качестве первоочередной терапии немелкоклеточного рака легких (ATLAS); это испытание IIIb фазы, многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое для оценки безопасности и эффективности химиотерапии + бевацизумаб, а затем бевацизумаб + эрлотиниб против

бевацизумаб + плацебо на субъектах с местно-распространенным или метастатическим NSCLC; (2) исследование для оценки эффективности бевацизумаба в комбинации с Tarceva® при запущенном немелкоклеточном раке легких; это исследование второй очереди III фазы, многоцентровое, плацебо-контролируемое, двойное слепое, рандомизированное. Примерно 650 пациентов будут случайным образом зачислены в отношении 1:1 в одну из двух опытных ветвей. Ветвь 1: Tarceva® + плацебо; ветвь 2: Tarceva®+бевацизумаб; (3) эрлотиниб и бевацизумаб при лечении пациентов с первичным немелкоклеточным раком легких IIIВ стадии или IV стадии, которые никогда не курили; (4) бевацизумаб и эрлотиниб, а затем цисплатин или карбоплатин и гемцитабин при лечении пациентов с недавно установленным или повторным немелкоклеточным раком легких IIIВ стадии или IV стадии; (5) комбинация RAD001 с карбоплатином, паклитакселом и бевацизумабом у пациентов с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), ранее не подвергавшихся системной терапии; (6) цетуксимаб, паклитаксель, карбоплатин и бевацизумаб при лечении пациентов с запущенным немелкоклеточным раком легких; (7) пазопаниб + лапатаниб; (8) иматиниб-мезилат и бевацизумаб после первоочередной химиотерапии и бевацизумаб при лечении пациентов с немелкоклеточным раком легких IIIВ стадии или IV стадии; и (9) испытание II фазы лекарственного средства AMG 706 или бевацизумаба в сочетании с химиотерапией при запущенном NSCLC.

Ниже представлены примеры отбора пациентов для лечения различными комбинациями лекарственных средств с помощью способов и композиций настоящего изобретения.

Таблица 9

Раковые клетки				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Avastin + Tarceva	Активация + Avastin
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	сильная
ErbB2	средняя	сильная	оч. слабая	сильная
ErbB3	слабая	средняя	оч. слабая	средняя
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	слабая
Shc		сильная	оч. слабая	сильная
PI3K		сильная	оч. слабая	сильная
Erk		сильная	оч. слабая	сильная
Rsk		сильная	оч. слабая	сильная
Akt		сильная	оч. слабая	сильная
P70S6K		сильная	оч. слабая	сильная

Таблица 10

Эндотелиальные клетки				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Avastin + Tarceva	Активация + Avastin
VEGFR2	средняя	сильная	слабая	слабая
VEGFR1	средняя	сильная	слабая	слабая
Tie 2	слабая	слабая	слабая	слабая
Комплекс V-кадгерин-R2	нет	средняя	слабая	слабая
Shc		сильная	слабая	слабая
PI3K		сильная	слабая	слабая
Erk		сильная	слабая	слабая
Rsk		сильная	слабая	слабая
Akt		сильная	слабая	слабая
P70S6K		сильная	слабая	слабая

Приведенные в табл.9 и 10 сведения показывают, что комбинация Avastin + Tarceva вызывает подавление путей как в эндотелиальных клетках, так и в раковых клетках.

Таблица 11				
Пациент 5001 (мутация EGFR)				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Erbitux
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	слабая
ErbB2	средняя	сильная	оч. слабая	слабая
ErbB3	слабая	средняя	оч. слабая	средняя
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	слабая
Shc		сильная	оч. слабая	слабая
PI3K		сильная	оч. слабая	средняя
Erk		сильная	оч. слабая	средняя
Rsk		сильная	оч. слабая	средняя
Akt		сильная	оч. слабая	средняя
P70S6K		сильная	оч. слабая	средняя

Приведенные в табл.11 сведения свидетельствуют, что пациента 5001 следует лечить лекарственным средством Tarceva[®], так как при его добавлении наблюдалось полное ингибирование фосфорилирования рецепторов и нижележащих эффекторов. Erbitux[®] не вызывл такого же уровня ингибирования. Решение о лечении лекарственным средством Tarceva[®] может основываться на:

- активировании путей (активационный профиль согласно адресуемой матрице) в раковых клетках;
- активировании путей при стимуляции; или
- ингибировании путей лекарственным средством Tarceva[®].

Таблица 12				
Пациент 5002 (мутация EGFR, устойчивая к Tarceva [®])				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + ЕКВ569
EGFR	сильная	сильная	сильная	слабая
ErbB2	средняя	сильная	сильная	слабая
ErbB3	слабая	средняя	средняя	слабая
ErbB4	слабая	слабая	слабая	слабая
Shc		сильная	сильная	слабая
PI3K		сильная	сильная	слабая
Erk		сильная	сильная	слабая
Rsk		сильная	сильная	слабая
Akt		сильная	сильная	слабая
P70S6K		сильная	сильная	слабая

Из приведенных в табл.12 сведений следует, что этого пациента нужно лечить лекарственным средством ЕКВ 569 исходя из профиля ингибирования. С другой стороны, пациента можно сначала лечить лекарственным средством Tarceva[®], а при рецидиве - лекарственным средством ЕКВ 569.

Таблица 13				
Пациент 5003 (амплификация cMet, рецидив от Tarceva [®])				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + РНВ + Tarceva
EGFR	сильная	сильная	сильная	слабая
ErbB2	средняя	сильная	сильная	слабая
ErbB3	слабая	средняя	средняя	слабая

ErbB4	слабая	слабая	слабая	слабая
cMet	сильная	сильная	сильная	слабая
Shc		сильная	сильная	слабая
PI3K		сильная	сильная	слабая
Erk		сильная	сильная	слабая
Rsk		сильная	сильная	слабая
Akt		сильная	сильная	слабая
P70S6K		сильная	сильная	слабая

Активационный профиль этого пациента проявляет высокий уровень экспрессии и фосфорилирования cMet. Следовательно, его нужно лечить комбинацией ингибиторов cMet и EGFR.

Таблица 14				
Пациент 5004 (активация EGFR вместе с активацией Her 2 и 3 (димер 2/3) или амплификацией Her2)				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Lapatanib
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	оч. слабая
ErbB2	сильная или средняя	сильная	сильная	слабая
ErbB3	слабая	сильная	сильная	слабая
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	оч. слабая
Shc		сильная	сильная	оч. слабая
PI3K		сильная	сильная	оч. слабая
Erk		сильная	средняя	оч. слабая
Rsk		сильная	средняя	оч. слабая
Akt		сильная	сильная	оч. слабая
P70S6K		сильная	сильная	оч. слабая

Приведенный в табл.14 профиль путей на основе фосфорилирования Her 3 предполагает применение общего ингибитора Her. Сильное ингибирование, наблюдавшееся в присутствии лапатаниба, убедительно свидетельствует о том, что это средство следует считать предпочтительным.

Таблица 15				
Пациент 5005 (активация EGFR плюс мутация P13K или делеция PTEN)				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Mek + ингибитор mTor
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	оч. слабая
ErbB2	средняя	средняя	слабая	слабая
ErbB3	слабая	слабая	слабая	слабая
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	оч. слабая
Shc		сильная	слабая	оч. слабая
PI3K		сильная	сильная	оч. слабая
Erk		сильная	средняя	оч. слабая
Rsk		сильная	средняя	оч. слабая
Akt		сильная	сильная	оч. слабая
P70S6K		сильная	сильная	оч. слабая

Таблица 16				
Пациент 5006 (активация EGFR плюс мутация Ras)				
Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Mek + ингибитор mTor
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	оч. слабая
ErbB2	средняя	средняя	слабая	слабая
ErbB3	слабая	слабая	слабая	слабая
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	оч. слабая
Shc		сильная	слабая	оч. слабая
PI3K		сильная	сильная	оч. слабая
Erk		сильная	средняя	оч. слабая

Rsk		сильная	средняя	оч. слабая
Akt		сильная	сильная	оч. слабая
P70S6K		сильная	сильная	оч. слабая

Пролиферация таких опухолей, которые имеют профили, приведенные в табл.15 и 16, вызывается не только семейством ErbB, но и активацией нижележащих событий (как правило, вследствие мутаций Ras или Raf). Таким образом, сведения о профиле означают, что таких пациентов следует лечить ингибитором EGFR вместе с лекарственными средствами, ингибирующими такие нижележащие пути, как пути MAPK и P13K.

Таблица 17
Пациент 5007 (применение комбинации Tarceva+Erbitux вследствие медленной интернализации (проблемы с транспортировкой))

Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Tarceva + Erbitux
EGFR	средняя	сильная	средняя	оч.слабая
ErbB2	средняя	сильная	средняя	слабая
ErbB3	слабая	сильная	средняя	слабая
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	оч. слабая
Shc		сильная	слабая	оч. слабая
PI3K		сильная	сильная	оч. слабая
Erk		сильная	средняя	оч. слабая
Rsk		сильная	средняя	оч. слабая
Akt		сильная	сильная	оч. слабая
P70S6K		сильная	сильная	оч. слабая

Вышеприведенные в табл.17 сведения показывают, что этого пациента следует лечить комбинацией Tarceva и Erbitux.

Таблица 18
Пациент 5008 (отбор пациентов, восприимчивых к TKI, но невосприимчивых к химиотерапии)

Рецептор	Экспрессия	Активация (уровень фосфорилирования)	Активация + Tarceva	Активация + Tarceva + Erbitux
EGFR	средняя	сильная	оч. слабая	оч. слабая
ErbB2	средняя	средняя	слабая	слабая
ErbB3	слабая	слабая	слабая	слабая
ErbB4	слабая	слабая	оч. слабая	оч. слабая
Shc		сильная	слабая	оч. слабая
PI3K		сильная	сильная	оч. слабая
Erk		сильная	средняя	оч. слабая
Rsk		сильная	средняя	оч. слабая
Akt		сильная	сильная	оч. слабая
P70S6K		сильная	сильная	оч. слабая

Вышеприведенные в табл.18 сведения показывают, что пациенты с мутациями Ras вряд ли будут восприимчивыми к химиотерапии. Поэтому пациенты с таким профилем могут быть кандидатами на лечение с помощью комбинаций TKI.

Пример 11. Мониторинг больных раком легких на активацию EGFR и/или HER-2 для ориентировки при выборе терапии

У 9 пациентов с раком легких проводили оценку числа клеток CTC при помощи системы CellSearch™ фирмы Veridex и фосфорилирования EGFR и HER-2 близостным методом настоящего изобретения. Пять из них также тестировали на экспрессию EGFR на клетках CTC по окрашиванию реагентом на EGFR для фенотипирования опухолей CellSearch™ Tumor Phenotyping Reagent EGFR фирмы Veridex. Демографические сведения о пациентах, история заболевания раком и текущее лечение приводятся в табл.19, 20 и 21 соответственно. В табл.22 приводятся число клеток CTC в каждом образце и

относительный уровень фосфорилирования EGFR и HER-2. Относительный уровень фосфорилирования рассчитывали, вычитая значения нормальных контролей, выставленных на микроматрицах. На фиг.5 (А и В) представлены снимки, у отдельных пациентов, окрашивания клеток CTC на EGFR, цитокератин (СК) и цитокератин с DAPI.

5 Контрольные линии клеток - SKBr3 и A431, которые положительны на экспрессию EGFR и HER-2, соответственно.

У пациента 2002 было обнаружено 2 клетки CTC в 7,5 мл крови при тестировании в системе CellSearch™. Этого пациента лечили авастинном. Лечение авастинном, само по себе либо в комбинации со средствами химиотерапии или одними лишь средствами

10 химиотерапии, не могло быть адекватной терапией для этого пациента. Эти данные подсказывают врачу, что показана терапия, включающая средства, воздействующие и на EGFR, и на HER-2, такие, к примеру, как лапатиниб, герцептин + Zactima, герцептин + Erbitux, герцептин + Iressa или герцептин + Tarceva.

У пациента 2015 было обнаружено 11 клеток CTC при анализе с помощью системы

15 CellSearch™. Многие из этих клеток также оказались положительными на экспрессию EGFR при тестировании с помощью набора Veridex. Отмечалась значительная активация EGFR и HER-2. Этого пациента лечили авастинном, гемзаром и таксотером. Лечение авастинном, само по себе либо в комбинации со средствами химиотерапии или одними лишь средствами химиотерапии, не могло быть адекватной терапией для этого пациента.

20 Эти данные подсказывают врачу, что показана терапия, включающая средства, воздействующие и на EGFR, и на HER-2, такие, к примеру, как лапатиниб, герцептин + Zactima, герцептин + Erbitux, герцептин + Iressa или герцептин + Tarceva.

У пациентов 1023, 2040, 1037 и 1035 не оказалось клеток CTC в 7,5 мл крови при тестировании в системе CellSearch™. Они также оказались отрицательными, как и

25 ожидалось, на фосфорилирование EGFR и HER-2 при тестировании близостным методом. Текущая терапия для этих пациентов состояла в следующем: пациент 1023 получал карбоплатин, пациент 2040 получал авастин, пациент 1037 получал авастин, карбоплатин и таксол, пациент 1035 получал авастин, карбоплатин и гемзар. Учитывая отсутствие клеток CTC в крови у этих пациентов, показана комбинация текущих способов терапии.

У каждого из пациентов 2016 и 1025 оказалось 3 клетки CTC в 7,5 мл крови при

30 тестировании в системе CellSearch™. В обоих случаях отмечалась экспрессия EGFR во всех клетках по окрашиванию на EGFR по Veridex. Однако ни один из образцов этих пациентов не давал положительной реакции на фосфорилирование EGFR или HER2. У этих пациентов еще не начали проводить системную терапию. Эти данные подсказывают

35 врачу, что раковые клетки пациента не управляются путями EGFR/HER-2, несмотря на то, что отмечается экспрессия EGFR в раковых клетках. Лечение этих пациентов с помощью прицельной терапии, направленной против EGFR или HER-2, не будет показанным.

У пациента 1012 оказалось 3 клетки CTC в крови при анализе в системе CellSearch™.

40 Не отмечалось окрашивания на EGFR с помощью набора Veridex. Не отмечалось фосфорилирования EGFR или HER2 при анализе близостным методом. Этого пациента лечили авастинном, карбоплатином и таксолом. Лечение этого пациента с помощью прицельной терапии, направленной против EGFR или HER-2, не будет показанным.

В табл.22 приведена сводка диагностической информации по каждому пациенту и

45 рекомендации для терапии на основе данных по числу клеток CTC и фосфорилированию EGFR и HER2.

Таблица 19

Демографические сведения о 9 пациентах с раком легких

Номер пациента	Дата рождения	Пол	Расовая/этническая принадлежность
02-002	19 апр. 1945 г.	муж.	белый
01-012	20 июн. 1943 г.	муж.	белый
02-015	9 дек. 1950 г.	муж.	белый
02-016	5 мар. 1938 г.	жен.	белая
01-025	4 дек. 1942 г.	муж.	латиноамериканец
01-023	2 дек. 1951 г.	муж.	латиноамериканец
01-040	16 сент. 1963 г.	муж.	азиат
01-037	5 апр. 1955 г.	муж.	азиат
01-035	15 сент. 1947 г.	муж.	азиат

История заболевания раком у 9 пациентов с раком легких					
Номер пациен-та	Тип рака	Стадия	Локализация метастазов	Дата диагноза	Тип терапии
02-002	рак легких	4	надпочечники	01 июл. 2005	химиотерапия
01-012	рак легких	4	мозг	09 окт. 2007	лучевая, химиотерапия
02-015	рак легких	4	кости, мозг	24 окт. 2007	химиотерапия
02-016	рак легких	4	печень	18 авг. 2007	химиотерапия
01-025	рак легких	4	печень	18 апр. 2007	химиотерапия
01-023	рак легких	4	лимфатические узлы, ко- сти	29 авг. 2007	химиотерапия
01-040	рак легких	4	кости, надпочечники, мозжечок	06 дек. 2006	химиолучевая терапия
01-037	рак легких	4	правая нижняя доля пече- ни	25 окт. 2007	химиотерапия
01-035	рак легких	4	другое легкое	22 дек. 2006	химиотерапия

Текущий прием лекарств для 9 пациентов с раком легких			
Номер пациен-та	Наименование лекарствен-ного средства	Диагноз в связи с лечением	Дозировка
02-002	авастин	рак	1400 мг 1 раз в день
01-012	авастин	химиотерапия при раке легких	1000 мг на прот. 2 нед
01-012	бенадрил	премедикация к химиотерапии	25 мг на прот. 2 нед
01-012	беназеприл	гипертензия	20 мг 1 раз в день
01-012	беназеприл·НСI	гипертензия	10 мг 1 раз в день
01-012	карбоплатин	химиотерапия при раке легких	775 мг на прот. 2 нед.
01-012	декадрон	премедикация к химиотерапии	20 мг на прот. 2 нед
01-012	дексаметазон	премед. к химиотерапии рака	4 мг 3 раза в день
01-012	тагамет	премедикация к химиотерапии	300 мг на прот. 2 нед
01-012	таксол	химиотерапия при раке легких	315 мг на прот. 2 нед
01-012	зофран	премедикация к химиотерапии	32 мг на прот. 2 нед
01-012	золпидем	снотворное	10 мг 1 раз в день
02-015	актос	сахарный диабет 2 типа	30 мг 1 раз в день
02-015	авастин	рак легких	1400 мг на прот. 28 д
02-015	бенадрил	сыпь	25 мг на прот. 28 д
02-015	компазин	тошнота	10 мг каждые 6-8 ч
02-015	декадрон	тошнота	32 мг каждые 3 ч
02-015	декадрон	тошнота	20 мг на прот. 28 д
02-015	дилантин	судороги	800 мг каждые 3 ч
02-015	диован	гипертензия	120 мг 2 раза в день
02-015	эналаприл	гипертензия	80 мг 4 раза в день
02-015	фломакс	гиперплазия простаты	8 мг 2 раза в день
02-015	гемзар	рак легких	2200 мг на прот. 28 д
02-015	липитор	гиперхолестеринемия	20 мг 2 раза в день
02-015	Mag-Ox	медицинская добавка	800 мг 2 раза в день
02-015	морфин	раковая боль	15 мг каждые 12 ч
02-015	нейронтин	невропатия	2400 мг 3 раза в день
02-015	тагамет	GERD	300 мг на прот. 28 д

5	02-015	таксотер	рак легких	130 мг на прот.28 д
	02-015	викодин	боль	750 мг каждые 4 ч
	02-015	ксанакс	тревожность	1 мг 2 раза в день
	02-015	зофран	тошнота	32 мг на прот.28 д
	02-015	зофран	тошнота	8 мг раз в неск. ч
10	02-015	зомета	рак легких	4 мг на прот. 28 д
	02-016	диск Advair	эмфизема	500 мг 1 раз в день
	02-016	флоназе	сезонная аллергия	100 мкг 2 раза в день
	02-016	лазикс	гипертензия	40 мг 1 раз в день
	02-016	левахин	бронхит	500 мг 1 раз в день
15	02-016	левоксил	гипотиреоз	0,15 мг 1 раз в день
	02-016	липитор	гиперхолестеринемия	20 мг 1 раз в день
	02-016	лизиноприл	гипертензия	10 мг 1 раз в день
	02-016	лоразепам	бессонница	3 мг 3 раза в день
	02-016	нитростат	стенокардия	0,4 мг при необх.
20	02-016	нитроглицерин	стенокардия	5 мг 2 раза в день
	02-016	прокрит	анемия	40000 ед. 5 раз
	02-016	викодин	раковая боль	10-325 мг за 1 раз
	02-016	зантак	GERD	300 мг 2 раза в день
	01-025	аллопуринол	GERD	300 мг 1 раз в день
25	01-025	биаксин	профилактика	500 мг при необх.
	01-025	гидрохлоротиазид	гипертензия	50 мг 1 раз в день
	01-025	ибупрофен	боль	800 мг при необх.
	01-025	левотироксин	гипотиреоз	0,175 мг 1 раз в день
	01-025	лизиноприл	гипертензия	40 мг 1 раз в день
30	01-025	ловастатин	гиперхолестеринемия	40 мг 1 раз в день
	01-025	паксил	депрессия	20 мг 1 раз в день
	01-025	протоникс	GERD	40 мг 1 раз в день
	01-025	спирива	ХОЗЛ (COPD)	18 мг QHS
	01-025	верапамил	гипертензия	240 мг 2 раза в день
35	01-023	бенадрил	премедикация к химиотерапии	50 мг на прот.3 нед
	01-023	карбоплатин	химиотерапия	500 мг на прот.3 нед
	01-023	декадрон	премедикация к химиотерапии	20 мг на прот.3 нед
	01-023	китрил	премедикация к химиотерапии	1 мг на прот.3 нед
	01-023	физраствор	гидратация	250 мг при необх.
40	01-023	тагамет	премедикация к химиотерапии	300 мг на прот.3 нед
	02-040	авастин	рак легких	700 мг на прот.3 нед
	02-040	дульколокс	запор	10 мг 1 раз в день
	02-040	пепцид	GERD	10 мг при необх
	02-040	хинаприл	гипертензия	10 мг 1 раз в день
45	02-040	зомета	рак легких	4 мг на прот. 3 нед
	01-037	авастин	химиотерапия при раке легких	1200 мг на прот. 21 д
	01-037	бенадрил	премедикация к химиотерапии	50 мг на прот. 21 д
	01-037	биспролол	гипертензия	5 мг 1 раз в день
	01-037	карбоплатин	химиотерапия при раке легких	700 мг на прот. 21 д
50	01-037	декадрон	премедикация к химиотерапии	20 мг на прот. 21 д
	01-037	флуконазол	грибковое заболевание	200 мг 2 раза в день
	01-037	глибурид	диабет	2,5 мг 1 раз в день
	01-037	протоникс	кислотный рефлюкс	40 мг 1 раз в день
	01-037	тагамет	премедикация к химиотерапии	300 мг на прот. 21 д
55	01-037	таксол	химиотерапия при раке легких	340 мг на прот. 21 д
	01-037	зофран	премедикация к химиотерапии	32 мг на прот. 21 д
	01-035	авастин	химиотерапия при раке легких	1000 мг на прот. 21 д
	01-035	карбоплатин	химиотерапия при раке легких	700 мг на прот. 21 д
	01-035	декадрон	премедикация к химиотерапии	20 мг на прот. 21 д
60	01-035	гемзар	химиотерапия при раке легких	1800 мг на прот. 21 д
	01-035	мегаце	усиление аппетита	20 мг 1 раз в день

01-035	зофран	премедикация к химиотерапии	32 мг на прот. 21 д
--------	--------	-----------------------------	---------------------

Таблица 22

Число клеток CTC (на 7,5 мл), окрашивание на EGFR по Veridex и относительный уровень фосфорилирования EGFR и HER2 для 9 образцов рака легких. Рекомендации по терапии исходят из этих данных

Номер пациента	Число клеток CTC	Окрашивание на EGFR по Veridex	Относ. уровень pEGFR	Относ. уровень pHER2	Рекомендации по терапии
2002	2	+	1,62	1,89	ингибиторы EGFR/HER2 рекомендованы
1012	3		0,83	0,80	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
2015	11	+	1,74	1,72	ингибиторы EGFR/HER2 рекомендуются
2016	3	+	0,61	0,65	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
1025	3	+	0,94	0,69	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
1023	0	H/O	0,66	0,72	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
2040	0	H/O	1,00	1,00	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
1037	0	H/O	0,93	0,64	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны
1035	0	H/O	0,01	0,05	ингибиторы EGFR/HER2 не показаны

Все публикации и патентные заявки, процитированные в настоящем описании, включены в него путем отсылки, как если бы каждая индивидуальная публикация или патентная заявка была определенно и индивидуально указана как включенная путем отсылки. Несмотря на то что вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно в виде иллюстраций и примеров для четкого понимания, средним специалистам в этой области должно быть понятно в свете положений настоящего изобретения, что в нем могут осуществляться определенные изменения и модификации, не отходящие от сути или за рамки прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ выбора *in vitro* подходящего противоракового лекарственного средства для лечения рака легких, который включает:

(а) выделение циркулирующих клеток опухоли легких из образцов цельной крови после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) детектирование активированного состояния множества молекул передачи сигналов в клеточном экстракте методом анализа, включающим множество серий разведений захватывающих антител, специфичных к множеству молекул передачи сигналов, причем захватывающие антитела фиксируют на твердой подложке; и причем это множество молекул передачи сигналов включает Her3 (ErbB3), и

(d) определение, подходит или не подходит это противораковое лекарственное средство для лечения рака легких путем сравнения активированного состояния, обнаруженного у множества молекул передачи сигналов со стандартным активированным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

2. Способ идентификации *in vitro* реакции опухоли легких на лечение с помощью противоракового лекарственного средства, который включает:

(а) выделение циркулирующих клеток опухоли легких из образцов цельной крови после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) детектирование активированного состояния множества молекул передачи сигналов в клеточном экстракте методом анализа, включающим множество серий

разведений захватывающих антител, специфичных к множеству молекул передачи сигналов, причем захватывающие антитела фиксируют на твердой подложке; и причем это множество молекул передачи сигналов включает Her3 (ErbB3), и

(d) идентификацию опухоли легких как реагирующей или не реагирующей на лечение с помощью противоракового лекарственного средства путем сравнения активированного состояния, обнаруженного у этого множества молекул передачи сигналов со стандартным активированным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

3. Способ прогнозирования *in vitro* реакции субъекта, страдающего раком легких, на лечение с помощью противоракового лекарственного средства, который включает:

(a) выделение циркулирующих клеток опухоли легких из образцов цельной крови после введения противоракового лекарственного средства или до инкубации с противораковым лекарственным средством;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) детектирование активированного состояния у множества молекул передачи сигналов в клеточном экстракте методом анализа, включающим множество серий разведений захватывающих антител, специфичных к этому множеству молекул передачи сигналов, причем захватывающие антитела фиксируют на твердой подложке; и причем это множество молекул передачи сигналов включает Her3 (ErbB3), и

(d) прогнозирование вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение с помощью этого противоракового лекарственного средства путем сравнения активированного состояния, обнаруженного у этого множества молекул передачи сигналов, со стандартным активированным профилем, полученным в отсутствие противоракового лекарственного средства.

4. Способ по п.1, 2 или 3, в котором опухоль легких получена от субъекта с немелкоклеточным раком легких (NSCLC) типа плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы, крупноклеточной карциномы, бронхоальвеолярной карциномы (BAC) и овсяноклеточной карциномы.

5. Способ по п.1, 2 или 3, в котором противораковое лекарственное средство включает средство, которое нарушает функционирование активированных компонентов пути передачи сигналов в раковых клетках.

6. Способ по п.1, 2 или 3, в котором названное множество молекул передачи сигналов дополнительно включает EGFR (KrbB1), Her2 (ErbB2), Her4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, EOF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, PDGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFR, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-IR, или их комбинацию.

7. Способ по п.1, 2 или 3, в котором анализ на стадии (c) включает:

(i) инкубирование клеточного экстракта с множеством серий разведений захватывающих антител, получая множество захваченных молекул передачи сигналов;

(ii) инкубирование множества захваченных молекул передачи сигналов с зависимыми от активированного состояния антителами, специфичными к соответствующим молекулам передачи сигналов, с получением множества детектируемых захваченных молекул передачи сигналов;

(iii) инкубирование множества детектируемых захваченных молекул передачи сигналов с первым и вторым членами усиливающей сигнал пары, генерируя усиленный сигнал; и

(iv) детектирование усиленного сигнала, исходящего от первого и второго членов усиливающей сигнал пары.

8. Способ по п.1, 2 или 3, в котором анализ на стадии (с) включает:

(i) инкубирование клеточного экстракта с множеством серий разведений захватывающих антител, получая множество захваченных молекул передачи сигналов;

5 (ii) инкубирование множества захваченных молекул передачи сигналов с детектирующими антителами, включающими множество независимых от активированного состояния антител и множество зависимых от активированного состояния антител, специфичных к соответствующим молекулам передачи сигналов, получая множество детектируемых захваченных молекул передачи сигналов,

10 причем независимые от активированного состояния антитела мечены содействующей молекулой, зависимые от активированного состояния антитела мечены первым членом усиливающей сигнал пары, а содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом усиливающей сигнал пары;

(iii) инкубирование множества детектируемых захваченных молекул передачи сигналов со вторым членом усиливающей сигнал пары, генерируя усиленный сигнал;

15 и

(iv) детектирование усиленного сигнала, исходящего от первого и второго членов усиливающей сигнал пары.

9. Применение матрицы, для детектирования активированного состояния множества молекул передачи сигналов в клеточном экстракте из циркулирующих клеток опухоли легких в цельной крови, включающее множество серийных разведений захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке, причем захватывающие антитела в каждой серии разведений специфичны к множеству молекул передачи сигналов в клеточном экстракте, причем это множество молекул передачи сигналов включает Her3 (ErbB3) для выбора подходящего противоракового лекарственного средства для

25 лечения рака легких.

10. Применение по п.9, где молекулы передачи сигналов участвуют в пролиферации клеток или ангиогенезе опухолей.

11. Применение по п.9, где захватывающие антитела включают антитела реактивные к ErbB3 и дополнительно содержат один или более представитель группы, состоящей из антител, реагирующих с EGFR, ErbB2, ErbB4, Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, P70S6K, VEGFR1, VEGFR2, Tie 2 и комплексом V-кадгерин-R2.

30

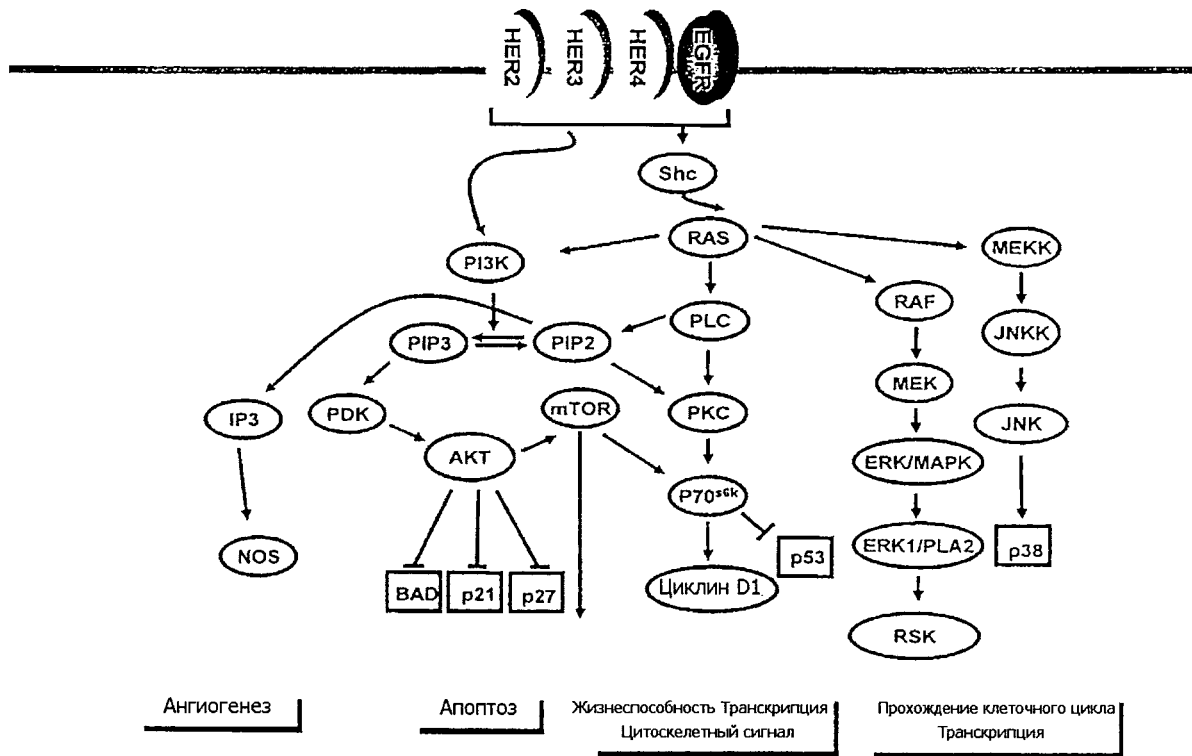
12. Применение по п.10, где клеточный экстракт включает экстракт циркулирующих клеток солидной опухоли.

35

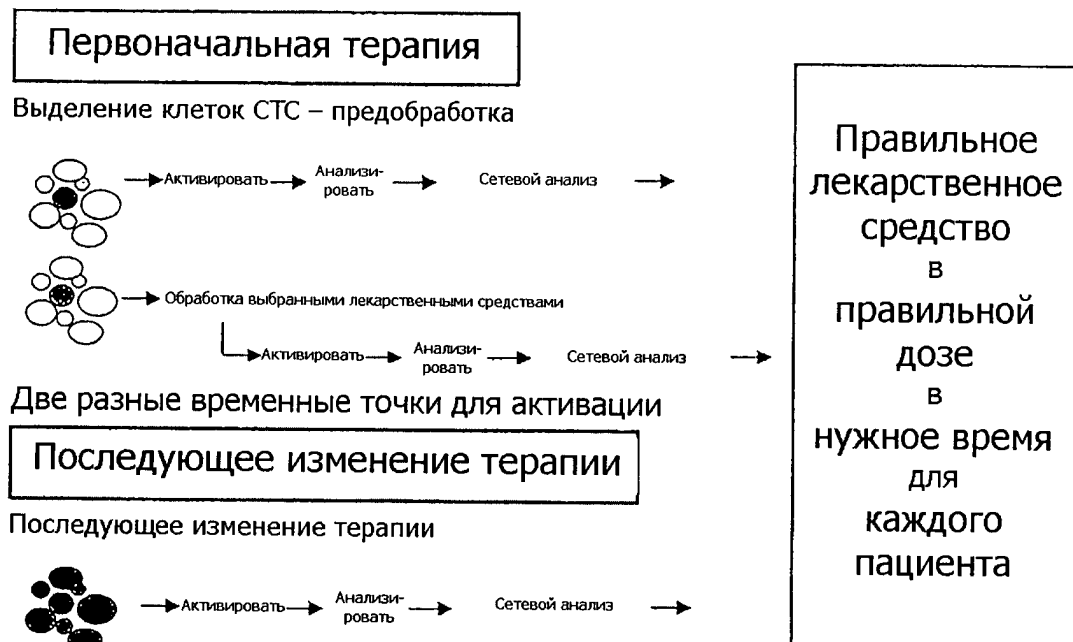
40

45

Пути семейства ErbB

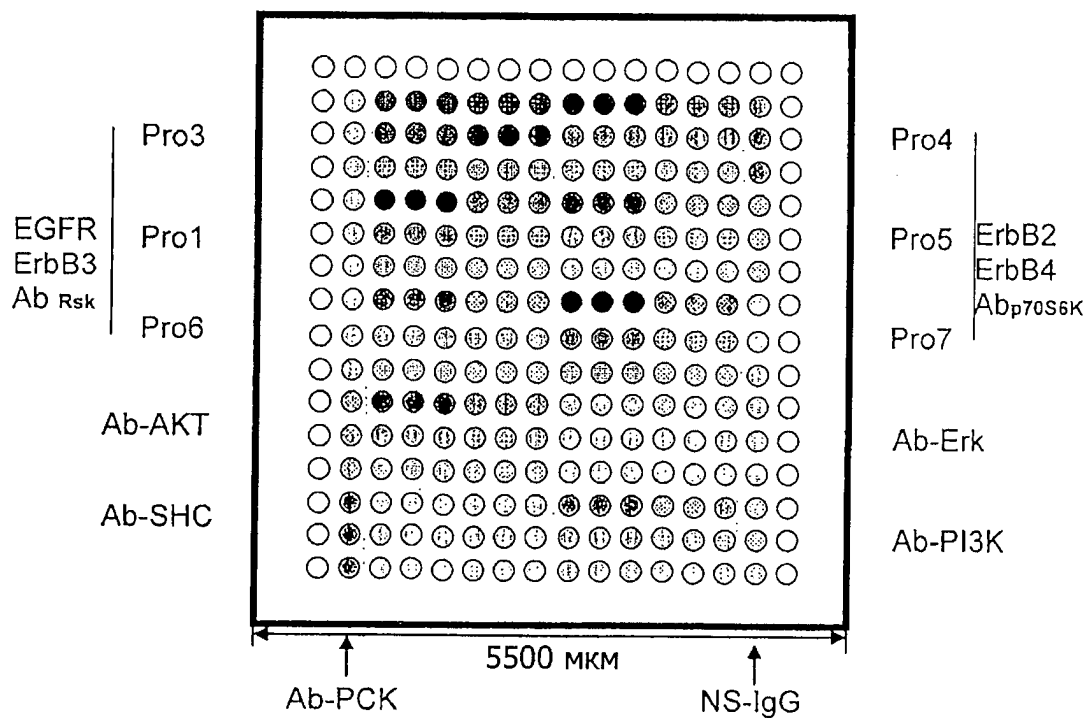


Фиг. 1



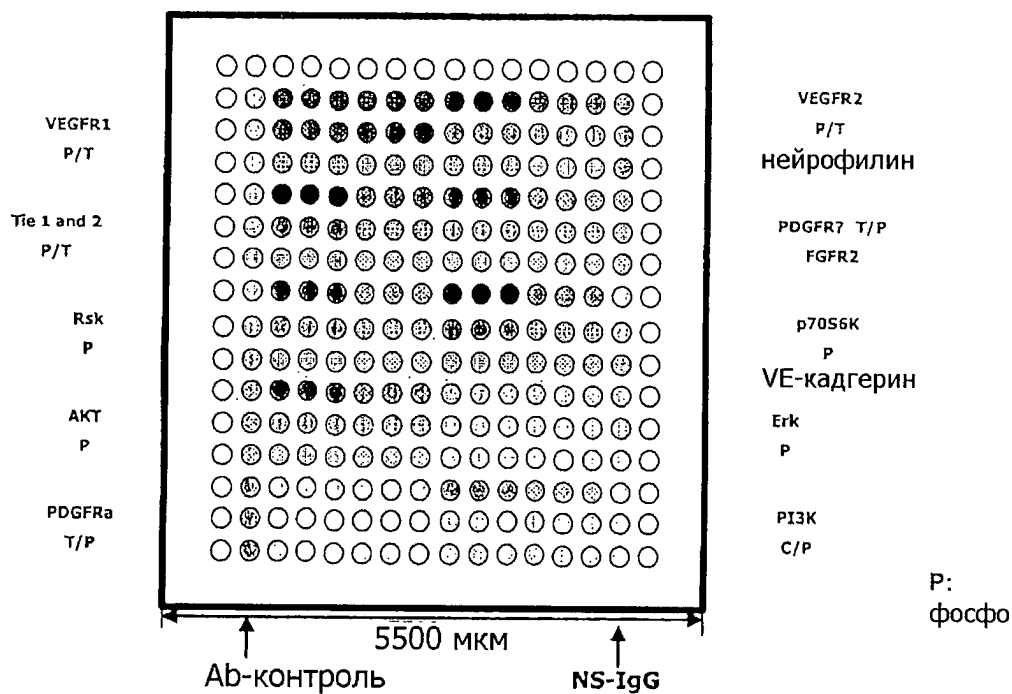
Фиг. 2

Матрица для путей HTS-RTK (16×16)



Фиг. 3

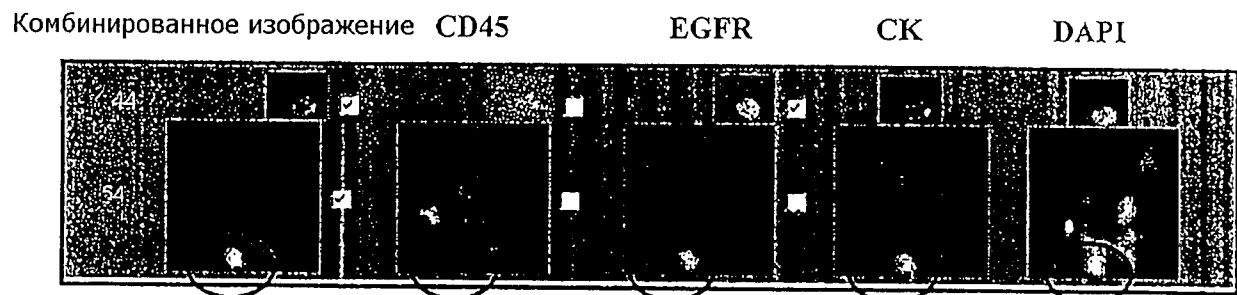
Матрица для ангиогенеза



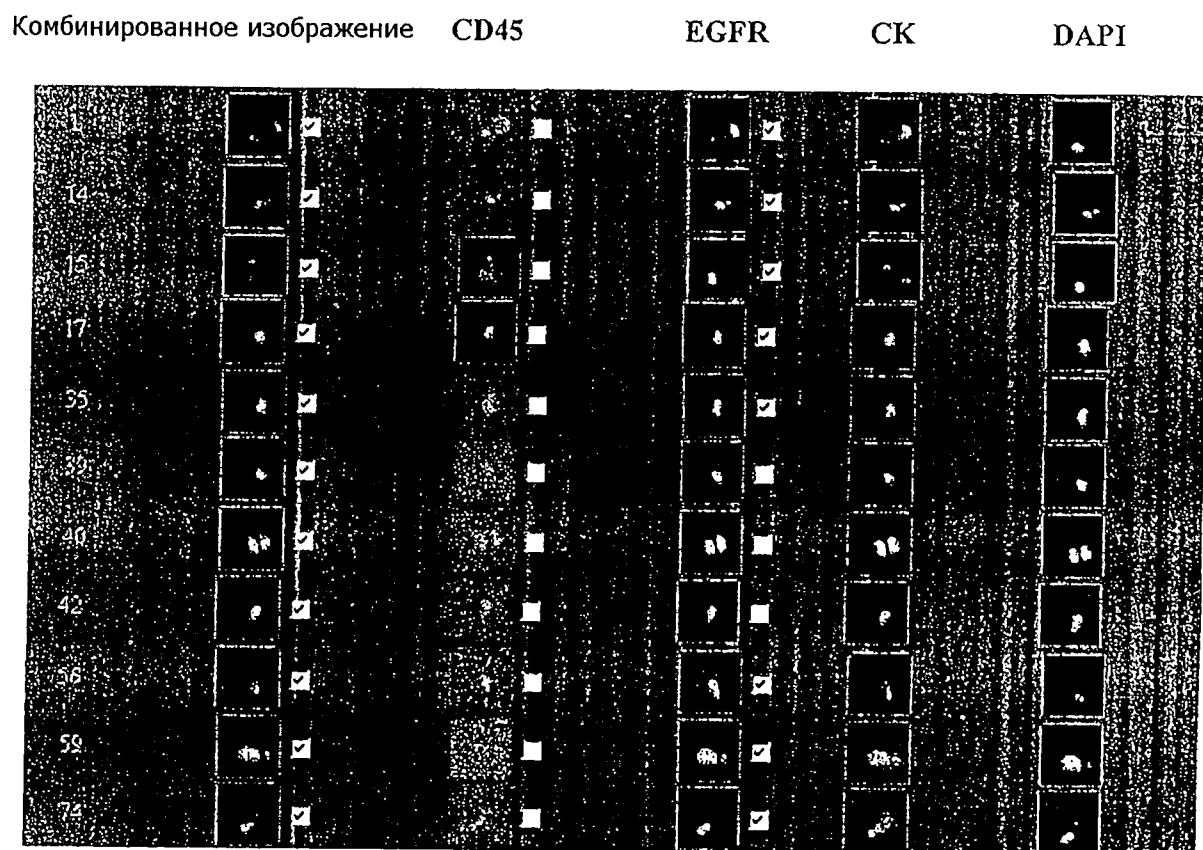
P:
фосфо

Фиг. 4

А. Пациент 2002 с 2 клетками CTC



В. Пациент 2015 с 11 клетками CTC



Фиг. 5