

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034689**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.06

(51) Int. Cl. **C12N 15/10** (2006.01)

(21) Номер заявки
201491977

(22) Дата подачи заявки
2013.04.27

(54) МОЛЕКУЛА АНТИТЕЛА К GCC И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К GCC-НАЦЕЛЕННОЙ ТЕРАПИИ

(31) **61/639,376**

(56) **US-A1-20110110936**

(32) **2012.04.27**

WO-A1-2010065293

(33) **US**

BHANDARI et al., "Functional Inactivation of the Human Guanylyl Cyclase C Receptor: Modeling and Mutation of the Protein Kinase-like Domain", Biochemistry, 7 August 2001 (07.08.2001), Vol. 40, No. 31, Pgs. 9196-9206, entire document

(43) **2015.04.30**

(86) **PCT/US2013/038542**

(87) **WO 2013/163633 2013.10.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МИЛЛЕННИУМ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Фрэнк Хелен Элисон, Макдональд
Элис А., О'Киф Тереза Л. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты антитела против гуанилилциклазы C (GCC) или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определенные последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи и легкой цепи. Также раскрыты выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая указанные антитела, модифицированная клетка для экспрессии указанного антитела против GCC, способ получения антитела против GCC, вектор экспрессии, а также способы обнаружения экспрессии белка GCC в биологическом образце и определения чувствительности раковых клеток к GCC-нацеленной терапии и/или оценки того, является ли пациент потенциальным кандидатом для проведения GCC-нацеленной терапии.

B1

034689

034689

B1

Родственные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет преимущество и приоритет предварительной заявки США № 61/639376, поданной 27 апреля 2012 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Изобретение относится к молекулам антител, которые связывают GCC, и способам их применения для отбора пациентов для лечения с применением GCC-нацеленной терапии, такой как терапии с применением иммуноконъюгата, содержащего молекулу антитела к GCC или ее фрагмент, конъюгированные с веществом, таким как терапевтическое вещество.

Уровень техники

Гуанилилциклаза C ("GCC") является рецептором поверхности трансмембранных клеток, функция которого заключается в поддержании кишечной жидкости, электролитного гомеостатза и клеточной пролиферации, см., например, Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:3018-3020 (2003). GCC экспрессируется в клетках слизистой оболочки, выстилающей тонкую кишку, толстую кишку и прямую кишку (Carrithers et al., Dis. Colon. Rectum. 39:171-181 (1996)). Экспрессия GCC поддерживается при неопластической трансформации кишечных эпителиальных клеток с экспрессией во всех первичных и метастатических опухолях толстой и прямой кишки (Carrithers et al., Dis. Colon. Rectum. 39:171-181 (1996); Buc et al. Eur. J. Cancer. 41:1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology, 107:1653-1661 (1994)).

Сущность изобретения

Изобретение базируется, по меньшей мере частично, на обнаружении новых антител к GCC. Соответственно, в одном аспекте изобретение описывает молекулу антитела к GCC, как раскрыто в данном документе. Молекулы антител к GCC пригодны в качестве "голых" молекул антител и в качестве компонентов иммуноконъюгатов. Соответственно, в другом аспекте изобретение описывает иммуноконъюгаты, содержащие молекулу антитела к GCC, описанного в данном документе, и терапевтическое вещество или метку. Изобретение также описывает способы применения молекулы антител к GCC и иммуноконъюгатов, описанных в данном документе, например, для определения GCC и клеток или тканей, которые экспрессируют GCC. Такие методы пригодны, среди прочего, для диагностирования, прогнозирования, визуализации или определения стадии GCC-опосредованного заболевания. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение описывает способы идентификации субъекта для лечения GCC-нацеленной терапией, например терапией антителом к GCC, например, иммуноконъюгатом, содержащим антитело к GCC, конъюгированным с терапевтическим веществом. Изобретение также описывает способ *in vitro* или *in vivo* определения субъекта, страдающего раком, являющегося потенциальным кандидатом для GCC-нацеленной терапии, например GCC-нацеленной терапии, описанной в данном документе.

Антитела к GCC, например антитела к GCC, описанные в данном документе, также пригодны, например, для модулирования активности или функции белка GCC и для лечения GCC-опосредованного заболевания, как описано в данном документе. В некоторых аспектах лечение включает приобретение знаний и/или оценивание образца или субъекта для определения уровней экспрессии GCC и касательно того, экспрессирует ли субъект GCC, когда получает GCC-нацеленную терапию, например GCC-нацеленную терапию, описанную в данном документе. В других аспектах способ описывает персонализированный протокол лечения, например протокол GCC-нацеленного лечения, путем получения образца от субъекта и определения уровней экспрессии GCC, например, с помощью способа определения, описанного в данном документе, например, с применением антитела к GCC, описанного в данном документе, и исходя из определения, выбора протокола нацеленного лечения для субъекта.

В другом аспекте изобретение также описывает выделенные и/или распознанные нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности антитела к GCC, а также векторы и клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и способы продуцирования молекул антител к GCC. Также в данном документе описаны реакционные смеси и наборы, содержащие антитела к GCC, например иммуноконъюгат, описанный в данном документе, а также анализы *in vitro*, например, включающие антитело к GCC, описанное в данном документе, для выявления экспрессии GCC.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Другие характерные особенности, объекты и преимущества изобретения(ий), раскрытого в данном документе, будут очевидными из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой кольцевую карту экспрессирующего белок вектора, использованного для получения слитого белка человеческого GCC (hGCC) внеклеточного домена (ECD) мышиного Fc (mFc) (hGCC-ECD-mFc) согласно изобретению.

На фиг. 2А-2D представлены гистограммы, суммирующие объединенные/общие (апикальные и цитоплазматические) Н-оценки распределения экспрессии GCC по типам опухолей от раковых пациентов, отобранных для зачисления в исследование C26001, фазы I клинического испытания GCC-нацеленного иммуноконъюгата. На фиг. 2А проиллюстрировано объединенное общее распределение Н-оценок по отобранным пациентам с раком толстой и прямой кишки; на фиг. 2В представлено объединенное общее распределение Н-оценок по отобранным пациентам с раком желудка; на фиг. 2С представлено объединенное общее распределение Н-оценок по отобранным пациентам с раком поджелудочной железы; на фиг. 2D представлено объединенное общее распределение Н-оценок по отобранным пациентам с раком пищевода.

На фиг. 3А-3С представлены гистограммы, суммирующие объединенные/общие (апикальные и цитоплазматические) Н-оценки распределения экспрессии GCC по разным опухолеспецифическим микроматрицам, которые были отобраны. На фиг. 3А проиллюстрировано объединенное общее распределение Н-оценок по образцам на разных микроматрицах опухолей толстой и прямой кишки, отобранных для экспрессии GCC; на фиг. 3В проиллюстрировано объединенное общее распределение Н-оценок по образцам на микроматрице опухоли желудка для экспрессии GCC; на фиг. 3С представлено объединенное/общее распределение Н-оценок по образцам на разных микроматрицах опухоли поджелудочной железы, отобранных для экспрессии GCC.

Подробное описание

Гуанилилциклаза С (GCC) (также известная как STAR, рецептор ST, GUC2C и GUCY2C) является рецептором поверхности трансмембранных клеток, который функционирует в поддержании кишечной жидкости, электролитного гомеостаза и клеточной пролиферации (Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:3018-3020 (2003); Mann et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:463-466 (1997); Pitari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:2695-2699 (2003)); GenBank Accession No. NM004963, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылок во всей своей полноте). Эта функция медируется через связывание гуанилина (Wiegand et al., FEBS Lett. 311:150-154 (1992)). GCC также является рецептором для термостойкого энтеротоксина (ST, например, имеющего аминокислотную последовательность NTFYCCELCNRPACAGCY, SEQ ID NO: 1), который является пептидом, продуцируемым *E. coli*, а также другими инфекционными организмами (Rao, M.C. Ciba Found. Symp. 112:74-93 (1985); Knoop F.C. and Owens, M. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 28:67-72 (1992)). Связывание ST с GCC активирует сигнальный каскад, который вызывает кишечное заболевание, например диарею.

Нуклеотидная последовательность человеческой GCC (GenBank Accession No. NM004963; SEQ ID NO: 2):

```

1 gaccagagag aagcgtgggg aagagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg
61 gattccctgc ctccttagga gcccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatgggt
121 ctaacgtgat tggggtcatg aagacgttgc tgttggactt ggctttgtgg tcactgctct
181 tccagcccggt gtggctgtcc ttagttccc aggtgagtca gaactgccac aatggcagct
241 atgaaatcag cgtcctgatg atgggcaact cagcctttgc agagcccctg aaaaacttgg
301 aagatgcggt gaatgagggg ctggaaatag tgagaggacg tctgcaaat gctggcctaa
361 atgtgactgt gaacgtactt tcatgtatt cggatggctt gattcataac tcaggcgact
421 gccggagtag cacctgtgaa ggcctcgacc tactcaggaa aatttcaat gcacaacgga
481 tgggctgtgt cctcataggg ccctcatgta cactccac ctccagatg taccttgaca
541 cagaattgag ctacccatg atctcagctg gaagtttgg attgtcatgt gactataaag
601 aaacctaac caggctgatg tctccagcta gaaagttgat gtactcttg gttactttt
661 ggaaaacaa cgatctgccc tcaaaaactt attcctggag cacttcgtat gtttacaaga
721 atggtacaga aactgaggac tgtttctggt acctaatgc tctggaggct agcgtttcct
781 atttctcca cgaactcggc ttaaggtgg tgtaagaca agataaggag ttccaggata
841 tctaatgga ccacaacagg aaaagcaatg tgattattat gtgtggtggt ccagagttcc
901 tctacaagct gaagggtgac cgagcagtgg ctgaagacat tgtcattatt ctagtggatc
961 tttcaatga ccagtacttt gaggacaatg tcacagcccc tgactatatg aaaaatgtcc
1021 ttgttctgac gctgtctctt gggaattccc ttctaaatag ctctttctcc aggaatctat
1081 caccaacaaa acgagacttt gctcttgctt atttgatgg aatcctgctc ttggacata
1141 tgctgaagat atttctgaa aatggagaaa atattaccac ccccaaattt gctcatgctt
1201 tcaggaaatc cacttttgaa gggatgacg gtccagtac ctggatgac tgggggggatg
1261 ttgacagtac catggtgctt ctgtatacct ctgtggacac caagaaatac aaggttcttt
1321 tgacctatga taccacgta aataagacct atcctgtgga tatgagcccc acattcattt
1381 ggaagaactc taaacttctt aatgatatta caggccgggg ccctcagatc ctgatgattg
1441 cagtcttcac cctcactgga gctgtggtgc tgctcctgct cgtcgtctc ctgatgctca
1501 gaaaatatag aaaagattat gaacttcgtc agaaaaaatg gtccacatt cctcctgaaa
1561 atatctttcc tctggagacc aatgagacca atcatgttag cctcaagatc gatgatgaca
1621 aaagacgaga tacaatccag agactacgac agtgcaaata cgacaaaaag cgagtgtattc
1681 tcaaagatct caagcacaat gatgtaatt tcactgaaaa acagaagata gaattgaaca
1741 agttgcttca gattgactat tacaacctga ccaagtctca cggcacagtg aaacttgata
1801 ccatgatctt cggggtgata gaatactgtg agagaggatc cctccgggaa gttttaaatg
1861 acacaatttc ctacctgat ggcacattca tggattggga gtttaagatc tctgtcttgt
1921 atgacattgc taagggaatg tcatactgc actccagtaa gacagaagtc catggtcgtc
1981 tgaaatctac caactgcgta gtggacagta gaatggtggt gaagatcact gattttggct

```

2041 gcaattccat ttacctcca aaaaaggacc tgtggacagc tccagagcac ctccgccaag
 2101 ccaacatctc tcagaaagga gatgtgtaca gctatgggat catcgcacag gagatcatcc
 2161 tgcggaaga aaccttctac actttgagct gtcgggaccg gaatgagaag attttcagag
 2221 tggaaaatc caatggaatg aaaccttcc gccagattt attttggaa acagcagagg
 2281 aaaaagagct agaagtgtac ctactttaa aaaactgttg ggaggaagat ccagaaaaga
 2341 gaccagattt caaaaaaatt gagactacac ttccaagat atttggaactt ttcatgacc
 2401 aaaaaatga aagctatatg gataccttga tccgacgtct acagctatat tctcgaacc
 2461 tggaaatctt gglagaggaa aggacacagc tglacaaggc agagagggac agggctgaca
 2521 gacttaactt tatgttgcct ccaaggctag tggtaaagtc tctgaaggag aaaggctttg
 2581 tggagccgga actatatgag gaagtacaa tctacttcag tgacattgta ggtttcacta
 2641 ctatctcaa atacagcacc cccatggaag tggtaggacat gctaatgac atctataaga
 2701 gttttgacca cattgttgat catcatgatg tctacaaggt ggaaccatc ggtgatgcgt
 2761 acatgggtgc tagtggtttg cctaagagaa atggcaatcg gcatgcaata gacattgcc
 2821 agatggcctt ggaatcctc agcttcattg ggaccttga gctggagcat ctctctggcc
 2881 tcccaatatg gattgcatt ggagttcact ctggtccctg tgctgctgga gttgtgggaa
 2941 tcaagatgcc tcgtattgt ctatttgag atacggtcaa cacagcctct aggatggaat
 3001 ccactggcct cctttgaga attcacgtga gtggctccac catagccatc ctgaagagaa
 3061 ctgagtgcc gttccttat gaagtgaag gagaacata cttaaaggga agaggaaatg
 3121 agactaccta ctggctgact gggatgaagg accagaaatt caacctgcca accctccta
 3181 ctgtggagaa tcaacagcgt ttgcaagcag aattttcaga catgattgcc aactcttac
 3241 agaaaagaca ggcagcaggg ataagaagcc aaaaaccag acgggtagcc agctataaaa
 3301 aaggcactct ggaatactg cagctgaata ccacagacaa ggagagcacc tatttttaa

Аминокислотная последовательность человеческой GCC (GenPept Accession No. NP004954; SEQ ID NO: 3):

1 mktllldlal wslfqpqgw sfssqvsqnc hngsyseisvl mmgnsafaep lknledavne
 61 gleivrglrq naglnvtvna tfmysdglh nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli
 121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktnld
 181 pfkyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdilmhdn
 241 rksnviiemg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
 301 pgnslnssf srnlspktrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnltf
 361 egydgpvtld dwgdvdsmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms pttfwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavfllt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqkydk krvilkdikh ndgnfteqkq ielnklqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrrkstnc vvdsrmvski tdfgensilp pkkdltwtape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeiiirketf ytlscrdrne kifrvnsng mkpfrpdlfl etaeeklev
 721 yllvknwwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrllehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkrngnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvvgikmpy clfgdtvnta smestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprv asykkgtley lqlnttdkes tyf

Белок GCC имеет несколько общераспространенных доменов, каждый из которых вносит отдельную функцию в молекулу GCC. Участки GCC включают сигнальную последовательность (для наведения

белка к клеточной поверхности) от аминокислотного остатка 1 до около остатка 23 или от остатка 1 до около остатка 21 в SEQ ID NO: 3 (вырезанные для созревания с получением функционального зрелого белка из остатков аминокислот от 22 или 24 до 1073 в SEQ ID NO: 3), экстрацеллюлярный домен для лиганда, например гуанилина или ST, связывающий от около остатка 24 до около остатка 420 или от около остатка 54 до около остатка 384 в SEQ ID NO: 3, трансмембранный домен от около аминокислотного остатка 431 до около остатка 454 или от около остатка 436 до около остатка 452 в SEQ ID NO: 3, киназно гомологичный домен, предположительно имеющий тирозинкиназную активность от около аминокислотного остатка 489 до около остатка 749 или от около остатка 508 до около остатка 745 в SEQ ID NO: 3 и гуанилилциклазокаталитический домен от около остатка 750 до около остатка 1007 или от около остатка 816 до около остатка 1002 в SEQ ID NO: 3.

В нормальных человеческих тканях GCC экспрессируется в клетках слизистой оболочки, например в апикальных мембранах щеточной каймы, выстилающих тонкую кишку, толстую кишку и прямую кишку (Carrithers et al., *Dis. Colon. Rectum*. 39:171-181 (1996)). Экспрессия GCC поддерживается при неопластической трансформации кишечных эпителиальных клеток с экспрессией во всех первичных и метастатических опухолях толстой и прямой кишки (Carrithers et al., *Dis. Colon. Rectum*. 39:171-181 (1996); Buc et al., *Eur. J. Cancer*. 41:1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology*, 107:1653-1661 (1994)). Неопластические клетки из желудка, пищевода и желудочно-пищеводного соединения также экспрессируют GCC (см., например, патент США № 6767704; Debruyne et al. *Gastroenterology*, 130:1191-1206 (2006)). Тканеспецифическая экспрессия и связь с раком, например, желудочно-кишечного происхождения, (например, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак пищевода или рак тонкой кишки) могут быть использованы для применения GCC в качестве диагностического маркера для этого заболевания (Carrithers et al., *Dis. Colon. Rectum*. 39:171-181 (1996); Buc et al., *Eur. J. Cancer*. 41:1618-1627 (2005)). Кроме того, как продемонстрировано в примерах данного документа, несколько разных типов рака желудочно-кишечного происхождения, как было показано, экспрессировали GCC, включая рак поджелудочной железы, рак легких, саркомы мягких тканей (например, лейомиосаркома и рабдомиосаркома), желудочно-кишечные или бронхолегочные нейроэндокринные опухоли и нейроэктодермальные опухоли, но не ограничиваясь ими.

Как белок клеточной поверхности GCC также может служить в качестве диагностической или терапевтической мишени для рецепторсвязывающих белков, таких как антитела или лиганды. В нормальной кишечной ткани GCC экспрессируется на верхней стороне плотных соединений эпителиальных клеток, которые образуют непроницаемый барьер между просветной средой и сосудистым компартментом (Almenoff et al., *Mol. Microbiol.* 8:865-873); Guarino et al., *Dig. Dis. Sci.* 32:1017-1026 (1987)). Само по себе системное внутривенное введение GCC-связывающего белкового терапевтического средства будет иметь минимальный эффект на кишечные рецепторы GCC, несмотря на то, что имеется доступ к неопластическим клеткам желудочно-кишечной системы, включая клетки инвазивного или метастатического рака толстой кишки, внекишечных или метастатических опухолей толстой кишки, опухолей пищевода или опухолей желудка, аденокарциномы в желудочно-пищеводном соединении. Кроме того, GCC интернализирует через рецептор, опосредующий эндоцитоз во время связывания лиганда (Buc et al., *Eur. J. Cancer*. 41:1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem. Biophys. Acta*. 1245: 29-36 (1995)).

Поликлональные антитела, вызванные против внеклеточного домена GCC (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)), были способны ингибировать связывание пептида ST с человеческим или крысиным GCC и ингибировать ST-опосредованное продуцирование с GMP человеческой GCC.

GCC характеризуется как белок, вовлеченный в рак, включая рак толстой кишки. См. также Carrithers et al., *Dis. Colon. Rectum*. 39:171-181 (1996); Buc et al., *Eur. J. Cancer*. 41:1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology*, 107:1653-1661 (1994); Urbanski et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1245:29-36 (1995). Таким образом, молекулы антител, направленных на GCC, могут быть использованы самостоятельно в несвязанной форме для ингибирования GCC-экспрессирующих раковых клеток. Кроме того, молекулы антител, направленных на GCC, могут быть использованы "голыми" или в меченой форме для выявления GCC-экспрессирующих раковых клеток. Молекулы антител к GCC согласно изобретению могут связывать человеческий GCC. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC согласно изобретению может ингибировать связывание лиганда, например гуанилина или термостойкого энтеротоксина, с GCC. В других вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC согласно изобретению не ингибирует связывание лиганда, например гуанилина или термостойкого энтеротоксина, с GCC.

Моноклональные антитела, специфичные к GCC, включают GCC:B10 (Nandi et al., *J. Cell. Biochem.* 66:500-511 (1997)), GCC:4D7 (Vijayachandra et al., *Biochemistry*, 39:16075-16083 (2000)) и GCC:C8 (Bakre et al. *Eur. J. Biochem.* 267:179-187 (2000)). GCC:B10 имеет каппа легкую цепь и изотип IgG2a и перекрестно реагирует с крысиной, свиной и обезьяньей GCC. GCC:B10 связывает первые 63 аминокислоты внутриклеточного домена GCC специфически к остаткам 470-480 в SEQ ID NO: 3 (Nandi et al., *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998)). GCC:4D7 связывает киназогомологичный домен в пределах остатков 491-568 в GCC (Bhandari et al., *Biochemistry*, 40:9196-9206 (2001)). GCC:C8 связывает протеинкиназоподобный домен в цитоплазматической части GCC.

Определения

Если в данном документе не указано иное, то научные и технические термины, использованные в связи с настоящим изобретением, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники. Как правило, номенклатура, использованная в связи с методами, культурой клеток и тканей, молекулярной биологией и химией белка и олиго- или полинуклеотидов и гибридизацией, описанных в данном документе, является той, которая известна в данной области. Инвентарные номера GenBank или GenPept и полезные последовательности нуклеиновых кислот и пептидов можно найти на веб-сайте, поддерживаемом Национальным центром биотехнологической информации, Bethesda Md. Для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культуры тканей и трансформации и трансфекции используются стандартные методы (например, электропорация, липофекция). Ферментные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с требованиями изготовителя или как обычно достигается в данной области или как описано в данном документе. Предшествующие методы и процедуры, как правило, выполняются в соответствии со способами, известными в данной области, например, как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) или см., Harlow, E. and Lane, D. (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Номенклатуры, используемые в связи с лабораторными методиками и приемами, описанными в данном документе, являются известными в данной области. Кроме того, если иное не предусмотрено контекстом, то форма единственного числа должна включать множественное число и термины во множественном включают термины в единственном числе.

В контексте данного изобретения термин "молекула антитела" относится к антителу, белку антитела или иммуноглобулину, или антигенсвязывающему фрагменту любого из упомянутого выше, например, антитела. Молекулы антител включают одноцепочечные молекулы антител, например scFv, см., например, Bird et al. (1988), *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883), и однодоменные молекулы антител, см., например, WO 94/04678. Хотя и не в пределах термина "молекулы антител", изобретение также включает "аналог(и) антитела", другие немоллекулярные антительные базирующиеся на белках структуры, например, слитые белки и/или иммуноконъюгаты, которые используют CDR для обеспечения специфичности антигенного связывания.

"Молекула антитела к GCC" относится к молекуле антитела (т.е., антителу, антигенсвязывающему фрагменту антитела или аналогу антитела), которая взаимодействует с или распознает, например связывает (например, специфично связывает) GCC, например, человеческую GCC. Примерами молекул антител к GCC являются те, которые представлены в табл. 1 и 2.

В контексте данного изобретения термин "антитело", "белок(и) антитела" или "иммуноглобулин" относятся к одноцепочечным, двуцепочечным и многоцепочечным белкам и гликопротеинам. Термин "антитело" включает поликлональные, моноклональные, химерные, CDR-привитые и человеческие или гуманизированные антитела. Все они более подробно будут рассмотрены в другом разделе данного документа. Также этим термином охватываются верблужьи антитела, см., например, US2005/0037421, и нанотела, например IgNAR (акулий антитела), см., например, WO 03/014161. Термин "антитело" также включает синтетические и генетически сконструированные антитела.

В контексте данного изобретения термин "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится, например, к фрагментам Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, одноцепочечным антителам, функциональным тяжелоцепочечным антителам (нанотелам), а также части антитела, имеющей специфичность по меньшей мере к одному эпитопу, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание (например, фрагмент, имеющий последовательности CDR и имеющий достаточно последовательностей каркаса, чтобы специфически связать эпитоп). Например, антигенсвязывающий фрагмент может конкурировать за связывание эпитопа, который связывается антителом, из которого был получен фрагмент. Полученный фрагмент, как использовано в этом и подобных контекстах, не предполагает какой-либо конкретный метод или процесс получения, но может относиться просто к сходству последовательностей. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью рекомбинантных технологий или путем ферментного или химического расщепления интактного антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" при использовании с одиночной цепью, например тяжелой цепью антитела, имеющего тяжелую и легкую цепи, означает, что фрагмент цепи является достаточным, таким, что когда образует пару с полным вариабельным участком другой цепи, например легкой цепи, он позволяет связывать по меньшей мере 25, 50, 75, 85 или 90% видимого, с целой тяжелой и легкой вариабельными областями.

Термин "антигенсвязывающая группа CDR" или "количество CDR, достаточное для связывания" (и подобные определения) в контексте данного изобретения относится к достаточным CDR цепи, например тяжелой цепи, таким, что когда размещаются в каркасе и образуют пару с полным вариабельным участком другой цепи или с частью вариабельного участка другой цепи подобной длины и имеющей такое же количество CDR, например легкой цепи, то позволяют связывать, например, по меньшей мере 25, 50, 75, 85 или 90% видимого, с целой тяжелой и легкой вариабельными областями.

В контексте данного изобретения термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое получено из нечеловеческого антитела, например кроличьего, грызунов (например, мышинового), овечьего или козьего, которое сохранило или в основном сохранило антигенсвязывающие свойства родительского антитела, но менее иммуногенно для людей. "Гуманизированное" в контексте данного изобретения предназначено включать деиммунизированные антитела. Обычно гуманизированные антитела включают нечеловеческие CDR и человеческие или полученные из человеческих каркасы и константные области.

Термин "модифицированное" антитело в контексте данного изобретения относится к антителам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таким как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантных экспрессирующих векторов, трансфицированных в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител, антитела, выделенные из нечеловеческого животного (например, кролика, мыши, крысы, овцы или козы), которые являются трансгенными для иммуноглобулиновых генов, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательности человеческих иммуноглобулиновых генов с другими последовательностями ДНК. Такие модифицированные антитела включают гуманизированные, CDR-привитые (например, антитело, имеющее CDR из первого антитела и каркасную область из другого источника, например, другого антитела или консенсусного каркаса), химерные, полученные *in vitro* (например, с помощью фагового дисплея), антитела и необязательно могут включать переменные или константные области, полученные из человеческих зародышевых иммуноглобулиновых или человеческих иммуноглобулиновых генов или антител, которые приготовлены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью любых других способов, которые включают сплайсинг последовательностей человеческих иммуноглобулиновых генов с альтернативными иммуноглобулиновыми последовательностями. В вариантах реализации изобретения модифицированная молекула антитела включает молекулу антитела, имеющую последовательность, отличающуюся от контрольного антитела.

Термин "моноспецифическое антитело" относится к антителу или препарату антитела, который демонстрирует единичную связывающую специфичность и аффинность для определенного эпитопа. Этот термин включает "моноклональное антитело" или "композицию моноклональных антител".

Термин "биспецифическое антитело" или "бифункциональное антитело" относится к антителу, которое демонстрирует двойную связывающую специфичность для двух эпитопов, где каждый сайт связывания различает и распознает другой эпитоп.

Термины "неконъюгированное антитело" и "голое антитело" используются взаимозаменяемо для обозначения молекулы антитела, которая не конъюгирована с неантителным фрагментом, например веществом или меткой.

Каждый из терминов "иммуноконъюгат", "конъюгат антитело-лекарственное вещество" и "конъюгат антитела" используются взаимозаменяемо и обозначают антитело, которое конъюгировано с неантителным фрагментом, например веществом или меткой. Термин "вещество" использован в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы и экстракта, полученного из биологических материалов. Термин "терапевтическое вещество" относится к веществу, которое имеет терапевтическую активность. Примерами терапевтических веществ являются химиотерапевтические вещества.

Термин "противораковое вещество" или "химиотерапевтическое вещество" используется в данном документе для обозначения веществ, которые обладают функциональным свойством ингибировать развитие и прогрессирование новообразования у человека, особенно злокачественного (ракового) повреждения, такого как карцинома, саркома, лимфома или лейкемия. Ингибирование метастазов или ангиогенеза зачастую является свойством противораковых или химиотерапевтических веществ. Химиотерапевтическое вещество может быть цитотоксическим или цитостатическим веществом. Термин "цитостатическое вещество" относится к веществу, которое ингибирует или угнетает рост клеток и/или размножение клеток.

"Цитотоксические вещества" относятся к соединениям, которые в первую очередь вызывают гибель клеток путем непосредственного вмешательства в функционирование клеток, и включают алкилирующие агенты, ингибиторы фактора некроза опухоли, интеркаляторы, ингибиторы микротрубочек, киназные ингибиторы, протеасомные ингибиторы и топоизомеразные ингибиторы, но не ограничиваются ими. "Нагрузка токсином" в контексте данного изобретения относится к достаточному количеству цитотоксического агента, который после доставки в клетку приводит к гибели клеток. Доставка токсичной нагрузки может быть достигнута путем введения достаточного количества иммуноконъюгата, содержащего антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и цитотоксический агент. Доставка токсичной нагрузки может быть достигнута путем введения достаточного количества иммуноконъюгата, содержащего цитотоксический агент, где иммуноконъюгат содержит другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые распознают и связывают антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению.

В контексте данного изобретения определение "последовательность, полученная из" или "специфические для указанной последовательности" относится к последовательности, которая содержит непрерывную последовательность по меньшей мере из 6 около нуклеотидов или по меньшей мере 2 аминокислот, по меньшей мере около 9 нуклеотидов или по меньшей мере 3 аминокислот, по меньшей мере около 10-12 нуклеотидов или 4 аминокислот или по меньшей мере около 15-21 нуклеотидов или 5-7 аминокислот, соответствующих, т.е. идентичных или комплементарных, например, непрерывной области из обозначенной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность включает все обозначенные последовательности нуклеотидов или аминокислот. Последовательность может быть комплементарной (в случае полинуклеотидной последовательности) или совпадать с областью последовательности, которая является уникальной в определенной последовательности, как определено с помощью способов, известных в данной области техники. Области, из которых последовательности могут быть получены, включают области, кодирующие специфические эпитопы, области, кодирующие CDR, области, кодирующие каркасные последовательности, области, кодирующие константные области домена, области, кодирующие переменные области домена, а также нетранслируемые и/или нетранскрибируемые области, но не ограничиваются ими. Полученная последовательность не обязательно будет получена физически из представляющей интерес последовательности при исследовании, но может быть получена любым способом, включая химический синтез, репликацию, обратную транскрипцию или транскрипцию, исходя из информации, предоставленной последовательностью оснований в области(ях), из которой получен полинуклеотид, но не ограничиваясь ими. В этой связи она может представлять собой либо смысловую, либо антисмысловую ориентацию исходного полинуклеотида. Кроме того, комбинации областей, соответствующие тем, что в указанной последовательности могут быть изменены или объединены способами, известными в данной области техники, чтобы быть совместимыми с предполагаемым применением. Например, последовательность может содержать две или более смежные последовательности, которые содержат часть обозначенной последовательности и разомкнуты областью, которая не идентична указанной последовательности, но предназначена представлять последовательность, полученную из указанной последовательности. Что касается молекул антител, "полученные из нее" включают молекулу антитела, которое функционально или структурно связано с антителом сравнения, например "полученные из нее" включают молекулу антитела, имеющую аналогичные или, по существу, ту же последовательность или структуру, например имеющие те же или похожие CDR, каркас или переменные области. "Полученные из них" по отношению к антителам также включает остатки, например один или несколько, например 2, 3, 4, 5, 6 или более остатков, которые могут или не могут быть смежными, но которые определены или идентифицированы в соответствии со схемой нумерации или гомологией с общей структурой антитела или трехмерной пространственной близости, т.е. в пределах CDR или каркасной области, последовательности сравнения. Термин "полученное из него" не ограничивается физически получаемыми из него, но включает получение любым способом, например путем использования информации о последовательности из антитела сравнения для разработки другого антитела.

В контексте данного изобретения определение "кодируется" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептидную последовательность, где последовательность полипептида или его часть содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере из 3-5 аминокислот, по меньшей мере из 8-10 аминокислот или по меньшей мере из 15-20 аминокислот из полипептида, кодируемого последовательностью нуклеиновой кислоты.

В контексте данного изобретения термин "рак толстой и прямой кишки", также общеизвестный как рак толстой кишки или колоректальный рак, относится к раку от неконтролируемого роста клеток в толстой или прямой кишке (части толстой кишки) или в аппендиксе.

Термины "рак желудка" или "желудочный рак" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Вычисления "гомологии" между двумя последовательностями могут быть выполнены следующим образом. Последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, могут быть введены пробелы в одну или обе, первую и вторую, аминокислотные или нуклеиново-кислотные последовательности для оптимального выравнивания, а негомологичными последовательностями для целей сравнения можно пренебречь). Длина референсной последовательности, выровненной с целью сравнения, составляет по меньшей мере 30, 40 или 50, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 100% от длины исходной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Когда положение в первой последовательности занимают те же аминокислотные остатки или нуклеотиды, что и в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении (как использовано в данном документе "идентичность" аминокислоты или нуклеиновой кислоты эквивалентна "гомологии" аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, общих для последовательностей, принимая во внимание количество пробелов и длину каждого разрыва, которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента гомологии между двумя последовательностями могут быть достигнуты с использованием математического алгоритма. Процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью любого способа, известного в данной области. Например, Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970), алгоритм, который был включен в программу GAP в пакете программ GCG, с использованием матрикса Blossum 62 или матрикса PAM250 и штрафа за открытие гэпа, составляющего 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продолжение гэпа, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент гомологии между двумя нуклеиновыми последовательностями также может быть определен с помощью программы GAP в пакете программ GCG (Accelrys, Inc. San Diego, Calif.) с использованием матрикса NWSgapdna.CMP, и штрафа за открытие гэпа, составляющего 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продолжение гэпа, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Примером набора параметров для определения гомологии является оценочная матрица Blossum 62 со штрафом за пропуск в последовательности 12, штрафом за продолжение делеции 4 и штрафом за пропуск в сдвиге рамки считывания 5.

В контексте данного изобретения термин "гибридируется в жестких условиях" описывает условия гибридизации и промывания. Руководство для выполнения реакций гибридизации можно найти в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Могут быть использованы водные и неводные методы, упомянутые в данном документе. Специфическими условиями гибридизации, упомянутыми в данном документе, являются следующие: 1) гибридизация в условиях пониженной жесткости - в 6X хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при около 45°C с последующими двумя промываниями в 0,2X SSC, 0,1% SDS по меньшей мере при 50°C (температура промывания может быть повышена до 55°C условий пониженной жесткости); 2) гибридизация в условиях умеренной жесткости - в 6X SSC при около 45°C с последующими одним или двумя промываниями в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 60°C; 3) гибридизация в условиях повышенной жесткости - в 6X SSC при около 45°C с последующими одним или двумя промываниями в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 65°C и 4) гибридизация в условиях очень высокой жесткости - в 0,5 M фосфате натрия, 7% SDS при 65°C с последующими одним или двумя промываниями в 0,2X SSC, 1% SDS при 65°C. Условия очень высокой жесткости (4) часто являются предпочтительными условиями, и они, если не указано иное, должны быть использованы.

Понятно, что антитела и их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут иметь дополнительные консервативные или заменимые аминокислотные замещения, которые не имеют существенного влияния на полипептидные функции. Будет ли конкретное замещение толерантным или нет, т.е. не будет отрицательно влиять на желательные биологические свойства, такие как связывающая активность, можно определить, как описано у Bowie, J.U. et al., *Science*, 247:1306-1310 (1990) или Padlan et al., *FASEB J.* 9:133-139 (1995). "Консервативное аминокислотное замещение" является тем, при котором аминокислотный остаток замещают на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

"Заменимым" аминокислотным остатком является остаток, который может быть заменен в последовательности дикого типа связывающего вещества, например антитела, не отменяя или без существенного изменения биологической активности, в то время как "незаменимый" аминокислотный остаток приводит к такому изменению. В антителе незаменимый аминокислотный остаток может быть остатком, определяющим специфичность (SDR).

В контексте данного изобретения термин "выделенный" относится к материалу, который удаляется из своей первоначальной среды (например, природная среда, если она природного происхождения). Например, в природе полинуклеотид или полипептид присутствует в живом организме животного не изолировано, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, или ДНК, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе, изолирован. Такой полинуклеотид или полипептид может быть частью вектора и/или частью композиции, например смеси, раствора или суспензии, или, включая выделенную клетку или культивируемую клетку, которая содержит полинуклеотид или полипептид, продолжать быть выделенным, так как вектор или композиция не являются частью его естественной среды.

В контексте данного изобретения термин "репликон" относится к любому генетическому элементу, такому как плазмида, хромосома или вирус, который ведет себя как автономная единица полинуклеотидной репликации в клетке.

В контексте данного изобретения термин "функционально связанный" относится к ситуации, когда описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предназначенным им способом. Таким образом, например, управляющая последовательность, "функционально связанная" с

кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с управляющей последовательностью.

В контексте данного изобретения термин "вектор" относится к репликону, в котором другой полинуклеотидный сегмент присоединен, например, чтобы вызвать репликацию и/или экспрессию присоединенного сегмента.

В контексте данного изобретения термин "управляющая последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая необходима для осуществления экспрессии кодирующей последовательности, к которой она лигирована. Природа таких управляющих последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина. У прокариот такие управляющие последовательности, как правило, содержат промотор, сайт связывания рибосом и терминаторы и в некоторых случаях энхансеры. Таким образом, термин "управляющая последовательность" предназначен охватывать, как минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых является желательным, например лидерные последовательности.

В контексте данного изобретения термин "очищенный продукт" относится к подготовке продукта, который был выделен из клеточных составляющих, с которыми продукт обычно связан, и/или от других типов клеток, которые могут присутствовать в представляющем интерес образце.

В контексте данного изобретения термин "эпитоп" относится к белку, определяющему способность специфически связываться с антителом. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики зарядов. Некоторые эпитопы являются линейными эпитопами, тогда как другие являются конформационными эпитопами. Линейный эпитоп является эпитопом, в котором непрерывная исходная аминокислотная последовательность включает распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 и обычно по меньшей мере 5, например, от около 8 до около 10 смежных аминокислот. Конформационный эпитоп может возникать в результате по меньшей мере двух ситуаций, таких как а) линейная последовательность, которая подвергается воздействию только связывания антител в некоторых белковых конформациях, например, в зависимости от связывания лиганда или в зависимости от модификации (например, фосфорилирования) с помощью сигнальных молекул, или б) сочетание структурных особенностей из более чем одной части белка или в мультисубъединичных белках из более чем одной субъединицы, в которых конструктивные компоненты находятся достаточно близко в 3-мерном пространстве, чтобы участвовать в связывании.

В контексте данного изобретения термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM, IgA, IgE или IgG), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

В контексте данного изобретения термины "обнаруживаемое вещество", "метка" или "меченый" используются для обозначения включения обнаруживаемого маркера в полипептид или гликопротеин. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области техники и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, индий (^{111}In), йода (^{131}I или ^{125}I), иттрия (^{90}Y), лютеция (^{177}Lu), актиния (^{225}Ac), висмута (^{212}Bi или ^{213}Bi), серы (^{35}S), углерода (^{14}C), трития (^3H), родия (^{188}Rh), технеция (^{99}Tc), празеодима или фосфора (^{32}P) или позитрон-излучающие радионуклиды, например углерод-11 (^{11}C), калий-40 (^{40}K), азот-13 (^{13}N), кислород-15 (^{15}O), фтор-18 (^{18}F), галлий-68 (^{68}Ga) и йод-121 (^{121}I)), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы (которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина, например, молекулы, содержащей стрептавидиновый фрагмент и флуоресцентный маркер или ферментативную активность, что может быть обнаружено с помощью оптических или калориметрических методов) и предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей лейциновой "молнии", сайты связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки), но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации изобретения метки прикреплены с помощью спейсерных плеч различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия.

В контексте данного изобретения термины "специфическое связывание", "связанные специфически" или "связывая специфически" означают для молекулы антитела к GCC, что молекула антитела связывает GCC, например человеческий белок GCC с большей аффинностью, чем она связывает не-GCC белок, например BSA. Обычно анти-GCC молекула имеет K_d для не-GCC белка, например BSA, которая больше чем в 2 раза, больше чем в 10 раз, больше чем в 100 раз, больше чем в 1000 раз, больше чем в 10^4 раз, больше чем в 10^5 раз или больше чем в 10^6 раз чем ее K_d для GCC, например белка GCC человека. При определении K_d , K_d для GCC и не-GCC белка, например BSA, должно быть сделано в тех же условиях.

Термин "аффинность" или "аффинность связывания" относится к условной константе ассоциации или K_a . K_a представляет собой обратную величину константы диссоциации (K_d). Антитело может, например, иметь аффинность связывания по меньшей мере 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} и 10^{11} M^{-1} для кон-

кретной молекулы-мишени. Более высокая аффинность связывания антитела с первой мишенью по сравнению со второй мишенью может указывать на более высокую K_A (или меньшее числовое значение K_D) для связывания первой мишени, чем K_A (или числовое значение K_D) для связывания второй мишени. В таких случаях антитело обладает специфичностью для первой мишени (например, белка в первой конформации или ее имитации) по сравнению со второй мишенью (например, тем же белком во второй конформации или ее имитацией, или другим белком). Различия в аффинности связывания (например, в отношении специфичности или других сравнений) может составлять по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000 или 10^5 раз.

Аффинность связывания может быть определена с помощью различных методов, в том числе равновесного диализа, равновесного связывания, гель-фильтрации, ИФА, поверхностного плазмонного резонанса или спектроскопии (например, с помощью флуоресцентного анализа). Например, относительная аффинность молекулы антитела к GCC может быть измерена по измерениям ELISA против белка GCC (например, иммуногена, используемого для поднятия молекул антител к GCC), по результатам измерений FACS с клетками, экспрессирующими GCC.

Примеры условий для оценки аффинности связывания представлены в TRIS-буфере (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 при pH 7,5). Эти методы могут быть использованы для измерения концентрации связанного и свободного связывающего белка в зависимости от концентрации связывающего белка (или мишени). Концентрация связанного связывающего белка ([связанный]) связана с концентрацией свободного связывающего белка ([свободный]) и концентрацией сайтов связывания связывающего белка на мишени, где (N) представляет собой количество сайтов связывания на мишень-молекулу по следующему уравнению:

$$[\text{связанный}] = N \times [\text{свободный}] / ((1/K_A) + [\text{связанный}]).$$

Не всегда требуется точное определение K_A , хотя иногда достаточно получить количественное измерение аффинности, например, определенной с использованием способа, такого как ELISA или анализ FACS, которая пропорциональна K_A и, таким образом, может быть использована для сравнений, например для определения того, является ли более высокая аффинность, например выше в 2 раза, для получения качественного измерения аффинности или для получения вывода об аффинности, например по активности в функциональном анализе, например в анализе *in vitro* или *in vivo*. Аффинность молекул антител к GCC также может быть измерена с использованием технологий, таких как анализ биомолекулярного взаимодействия в режиме реального времени (BIA) (см., например, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 и Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). В контексте данного изобретения термины "BIA" или "поверхностный плазмонный резонанс" обозначают технологию для изучения биспецифических взаимодействий в режиме реального времени, без маркировки какого-либо из взаимодействующих компонентов (например, BIACORE™). Изменения в массе возле поверхности связывания (индикативное событие связывания) приводят к изменениям показателя преломления света вблизи поверхности (оптическое явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR)), результатом чего является обнаруживаемый сигнал, который может быть использован в качестве указания реального времени реакции между биологическими молекулами.

Измерение аффинности молекул антител к GCC с использованием системы BIACORE™ T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) описывается в примере 1 заявки на патент США № 2011/0110936, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Вкратце, антитела анти-GCC (Prer A) разбавляют до соответствующей концентрации (например, 20 мкг/мл) 10 mM ацетата натрия, pH 4,0, а референсное/контрольное антитело (Prer B) разбавляют до соответствующей концентрации (например, 10 мкг/мл) в 10 mM ацетата натрия, pH 4,0. Каждое антитело ковалентно иммобилизируют на нескольких чипах CM4 BIACORE с использованием стандартного для связывания амина. Для каждого подготовленного чипа CM4 иммобилизируют антитело Prer A на двух проточных ячейках в пределах 75-100 RU, а антитело Prer B иммобилизируют в одной проточной ячейке в пределах 70-80 RU. Оставшаяся четвертая проточная ячейка каждого чипа CM4 используется в качестве референсной проточной ячейки. Концентрация белка GCC может быть определена с использованием методов, описанных Pace et al., in Protein Science, 4:2411 (1995) и Pace and Grimsley in Current Protocols in Protein Science 3.1.1-3.1.9 (2003). Для каждого подготовленного чипа CM4 белок GCC вводят в течение 2 мин в диапазоне концентраций 202-1,6 nM (двухсерийное разведение) с последующей 7-минутной диссоциацией. Образцы случайным образом вводят в трех повторностях с несколькими циклами буферных инъекций попеременно для двойной ссылки. Для получения более значительных данных снижения скорости диссоциации три дополнительных инъекции белка GCC по 101 nM и три дополнительных инъекции буфера выполняются с 2-минутной инъекцией и 4-часовым временем диссоциации. Скорость потока в 100 мкл/мин используется для всех экспериментов, и все поверхности восстанавливают 20-секундным вытеснением 10 mM глицина-HCl (pH 2,0). Все образцы получают в подвижном буфере (например, HEPES-буферном растворе, 0,005% полисорбата 20, pH 7,4 (HBS-P)) с добавленными 100 мкг/мл BSA. Все данные сенсограмм (участок поверхностного плазмонного резонанса относительно времени) могут быть обработаны с помощью программного обеспечения Scrubber 2.0 (BioLogic Software, Campbell, Australia) и глобально

подходят к модели взаимодействия 1:1, включая время константы переноса массы k_m с использованием программного обеспечения CLAMP™ (Myszka and Morton Trends Biochem. Sci. 23:149-150 (1998)).

В контексте данного изобретения термин "лечить" или "лечение" определяется как введение молекулы антитела к GCC субъекту, например пациенту, или введение, например, путем применения в изолированной ткани или клетке от субъекта, которые возвращаются субъекту. Молекулы антитела к GCC могут быть введены отдельно или в комбинации с другим агентом. Лечение может быть вылечиванием, заживлением, облегчением, уменьшением, изменением, временным облегчением, улучшением, смягчением, улучшением или влиянием на расстройство, симптомы расстройства или предрасположенность к расстройствам, например раку. Без привязки к теории, лечение, как полагают, вызывает торможение, абляции или уничтожение клетки *in vitro* или *in vivo* или другим путем снижает потенциал клетки, например аномальной клетки, которая опосредует нарушение, например нарушение, как описано в данном документе (например, рак).

В контексте данного изобретения термин "субъект" предназначен для охвата млекопитающих, приматов, людей и нечеловеческих животных. Например, субъект может быть пациентом (например, пациентом-человеком или ветеринарным пациентом), страдающим от рака, при котором, по меньшей мере, некоторые из клеток экспрессируют GCC, такой как рак желудочно-кишечного происхождения (например, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкой кишки или рак пищевода), рак поджелудочной железы, рак легких (например, плоскоклеточная карцинома, аденосквамозная карцинома, аденокарцинома), саркома мягких тканей (например, лейомиосаркома или рабдомиосаркома), нейроэндокринные опухоли (например, желудочно-кишечные или бронхолегочные) или нейроэктодермальные опухоли; симптом такого экспрессирующего GCC рака или предрасположенность к таким экспрессирующим GCC раковым болезням. В качестве другого примера субъект может быть пациентом, имеющим желудочно-кишечное нарушение, при котором, по меньшей мере, некоторые из клеток желудочно-кишечного тракта экспрессируют GCC, такое как синдром воспаленного кишечника, болезнь Крона и запор. В качестве еще одного примера субъектом может быть пациент, имеющий неврологические нарушения, при которых, по меньшей мере, некоторые нейроны центральной нервной системы пациента экспрессируют GCC, такие как болезнь Паркинсона. Термин "нечеловеческие животные" согласно изобретению включает всех нечеловеческих позвоночных, например других млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии, мыши, крысы, кроли или козы и т.д., если не указано иное. В варианте реализации изобретения "субъект" исключает одного или более или всех мышей, крыс, кролей или коз.

В контексте данного изобретения количество молекулы антитела к GCC, термины "эффективное" или "достаточное для лечения расстройства" или "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически достаточное количество", относится к количеству молекулы антитела, которое является эффективным при однократном или многократном введении дозы пациенту при лечении клетки, например раковой клетки (например, GCC-экспрессирующих опухолевых клеток) или в продлении выздоровления, смягчения, облегчения или улучшения состояния субъекта с нарушением, как описано в данном документе, помимо того, что ожидается в отсутствии такого лечения. В контексте данного изобретения термин "ингибирование роста" опухоли или рака относится к замедлению, прерыванию, задержке или остановке ее роста и/или метастазов и не обязательно указывает на полную ликвидацию роста опухоли.

В контексте данного изобретения белок "GCC", также известный как "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" или "рецептор ST", относится к белку GCC млекопитающего, предпочтительно человеческому белку GCC. Человеческая GCC относится к белку, показанному в SEQ ID NO: 3, и его аллельных белковых вариантах природного происхождения. Аллель в SEQ ID NO: 3 может кодироваться соответствующей GCC последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 2. Другие варианты известны из уровня техники. См., например, номер доступа Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatics Institute и Wellcome Trust Sanger Institute, у которого остаток лейцина находится в положении 281; SEQ ID NO: 14 в патентной публикации США № 20060035852; или GenBank номер доступа AAB 19934. Как правило, в природе аллельный вариант имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95, 97 или 99% идентичную последовательности GCC из SEQ ID NO: 3. Транскрипт кодирует белковый продукт из 1073 аминокислот и описан в GenBank номер доступа: NM004963. Белок GCC характеризуется как белок поверхностных рецепторов трансмембранных клеток и, как полагают, играет важную роль в поддержании кишечной жидкости, электролитного гомеостаза и пролиферации клеток.

Антитела к GCC.

Описанные в данном документе молекулы антител к GCC полезны, среди прочего, для обнаружения экспрессии GCC. Молекулы антител к GCC, например, полезные для обнаружения GCC, могут содержать молекулу нечеловеческих антител к GCC (например, молекулы нечеловеческих и не мышиных антител), которые специфически связывают GCC, например, с аффинностью связывания по меньшей мере 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} и 10^{11} M^{-1} для GCC. Молекула антитела к GCC может быть молекулой нечеловеческого, не мышиного и не крысиного антитела, например молекулой кроличьего антитела к GCC, например, как описано в данном документе.

В некоторых аспектах изобретение относится к молекулам антител к GCC, которые содержат характерные особенности, такие как те, что обобщены в табл. 1 и 2. В других аспектах изобретение относится к молекулам антител к GCC, которые содержат характерные особенности, такие как те, что обобщены в табл. 3-5 и/или 6.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC является кроличьим гибридным антителом и представляет собой одно из антител MIL-44-148-2 или MIL-44-67-4. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC получена из антитела MIL-44-148-2 или MIL-44-67-4.

В варианте реализации молекула антитела к GCC будет иметь аффинность к GCC, например, как измерено с помощью анализов прямого связывания или конкурентного связывания. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC имеет K_d меньше 1×10^{-6} М, меньше 1×10^{-7} М, меньше 1×10^{-8} М, меньше 1×10^{-9} М, меньше 1×10^{-10} М, меньше 1×10^{-11} М, меньше 1×10^{-12} М или меньше 1×10^{-13} М. В варианте реализации изобретения молекула антитела является IgG или антигенсвязывающим фрагментом и имеет K_d меньше 1×10^{-6} М, меньше 1×10^{-7} М, меньше 1×10^{-8} М или меньше 1×10^{-9} М. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC, например антитело MIL-44-148-2 или антитело, полученное из него, имеет K_d от около 80 до около 200 пМ, предпочтительно от около 100 до около 150 пМ или около 120 пМ. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC, например антитело MIL-44-148-2 или антитело, полученное из него, имеет k_a от около 0,9 до около $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, предпочтительно около $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В варианте реализации изобретения молекула антитела представляет собой ScFv и имеет K_d меньше, чем 1×10^{-6} М, меньше, чем 1×10^{-7} М, меньше, чем 1×10^{-8} М, меньше, чем 1×10^{-9} М, меньше, чем 1×10^{-10} М, 1×10^{-11} М, меньше, чем 1×10^{-12} М или меньше, чем 1×10^{-13} М.

В вариантах реализации изобретения молекулы антител не являются иммуноконъюгатами, т.е. представляют собой "голые" антитела и в вариантах реализации изобретения вызывают клеточную реакцию при связывании с GCC. В родственных вариантах реализации изобретения клеточная реакция осуществляется GCC-экспрессирующей клеткой, с которой связывается антитело. Такая клеточная реакция может быть сигнальной трансдукцией, опосредованной GCC, например, если молекула антитела является агонистом GCC (см., например, публикацию патентной заявки США №. 20040258687). В других вариантах реализации изобретения клеточная реакция осуществляется другой клеткой, например, иммунной эффекторной клеткой (например, природными клетками-киллерами), которая распознает молекулу антитела, связанного с GCC на первой клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения контрольные молекулы, например комплементарные молекулы, контактируют с GCC-связанной молекулой антитела до клеточной реакции. Клеточные реакции в этих вариантах могут вызвать гибель GCC-экспрессирующей клетки.

В дополнительных вариантах реализации изобретения молекулы антител, которые являются иммуноконъюгатами, могут вызывать клеточную реакцию при связывании с GCC и интернализировать для доставки агента к GCC-экспрессирующей клетке, с которой он связывается.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC согласно изобретению может блокировать связывание лиганда с GCC.

В варианте реализации изобретения молекула антитела не является GCC:B10, GCC:4D7 или GCC:C8. В другом варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC не связывается с внутриклеточным доменом GCC возле аминокислотного остатка в положениях от 455 до 1073 из SEQ ID NO: 3. Например, в этом варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC не связывает домен киназной гомологичности или домен гуанилилциклазы в GCC.

Структурная единица природного антитела млекопитающего является типичным представителем тетрамера. Каждый тетрамер состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, изначально отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, ответственную, главным образом, за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи могут быть классифицированы как каппа и лямбда легкие цепи. Тяжелые цепи могут быть классифицированы как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены "J" областью из около 12 или более аминокислот с тяжелой цепью, также включающей область "D" из около 10 или более аминокислот. См., особенно, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют сайт связывания антитела. Предпочтительными изотипами для молекул антител к GCC являются IgG иммуноглобулины, которые можно разделить на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, имеющие разные гамма тяжелые цепи. Большинство терапевтических антител являются человеческими, химерными или гуманизированными антителами изотипа IgG1. В конкретном варианте осуществления молекула антитела к GCC представляет собой антитело IgG кролика.

Вариабельные области каждой пары тяжелой и легкой цепей образуют сайт связывания антигена. Таким образом, интактное IgG антитело имеет два связывающих сайта, которые являются одинаковыми. Тем не менее, бифункциональные или биспецифические антитела представляют собой искусственные гибридные конструкции, которые имеют две различные пары тяжелых/легких цепей, дающих два разных сайта связывания.

Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, которые также называются определяющими комплементарность областями или CDR(ами). CDR(ы) из двух цепей каждой пары выровнены каркасными областями, давая возможность связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Приписывание аминокислот к каждому домену осуществляется в соответствии с определениями последовательностей Kabat белков, представляющих иммунологический интерес (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:878-883 (1989). В контексте данного изобретения CDR относятся как к тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3), так и к легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Молекула антитела к GCC может содержать все или антигенсвязывающее подмножество CDR(ы) одной или обеих как тяжелой, так и легкой цепей одного из вышеупомянутых антител кролика. Аминокислотные последовательности гибридного кроличьего антитела, включая вариабельные области и CDR, можно найти в табл. 3 и 5.

Таким образом, в варианте реализации изобретения молекула антитела содержит одно или оба из следующего:

(а) одна, две, три или антигенсвязывающее количество CDR(ы) легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) одного из вышеупомянутых гибридных антител кролика. В вариантах реализации изобретения CDR(ы) могут содержать аминокислотную последовательность одной или нескольких или всех LCDR1-3 следующим образом: LCDR1 или модифицированная LCDR1, в которой от одной до семи аминокислот консервативно заменены; LCDR2 или модифицированная LCDR2, в которой от одной до двух аминокислот консервативно заменены; или LCDR3 или модифицированная LCDR3, в которой от одной до двух аминокислот консервативно заменены; и

(b) одна, две, три или антигенсвязывающее количество CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3) одного из вышеупомянутых гибридных антител кролика. В вариантах реализации изобретения CDR(ы) может содержать аминокислотную последовательность одной или нескольких или всех HCDR1-3 следующим образом: HCDR1 или модифицированная HCDR1, в которой от одной до двух аминокислот консервативно заменены; HCDR2 или модифицированная HCDR2, в которой от одной до четырех аминокислот консервативно заменены; или HCDR3 или модифицированная HCDR3, в которой от одной до двух аминокислот консервативно заменены.

Полезные иммуногены для получения молекул антител к GCC включают GCC, например GCC-экспрессирующие клетки человека (например, опухолевые клеточные линии, например, клетки Т84 или свежие или замороженные клетки рака толстой кишки, рекомбинантные клетки, экспрессирующие GCC); мембранные фракции GCC-экспрессирующих клеток (например, клеточная линия опухоли толстой кишки, например, клетки Т84) или свежие или замороженные толстокишечные опухолевые клетки; рекомбинантные клетки, экспрессирующие GCC; выделенную или очищенную GCC, например белок GCC человека (например, биохимически выделенная GCC, например, выделенная из желудочно-кишечных опухолевых клеток или рекомбинантной клетки, экспрессирующей GCC или ее вариант) или ее часть (например, внеклеточный домен GCC, область киназной гомологии GCC или каталитический домен гуанилатциклазы GCC или пептид, соответствующий его части, например, содержит по меньшей мере около 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 или 32 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 3) или иммуноген, включающий SEQ ID NO: 46 или содержащий его зрелую часть без сигнальной последовательности (т.е. без аминокислотных остатков от 1 до около 21 или 23 из SEQ ID NO: 46), например, зрелого белка hGCC (ECD)-mIgG2a FcR γ-mutII (также упоминается в данном документе как "pLKTOK108"), SEQ ID NO: 48.

Иммуногены могут быть слитыми с гетерологичными последовательностями, чтобы помочь в биохимических манипуляциях очистки, иммунизации или измерения титра антитела. Такие иммуногены могут содержать часть GCC, например внеклеточный домен и часть, содержащую не-GCC полипептид. Существует много вариантов для построения слитых белков для облегчения очистки или иммобилизации на твердом носителе, например аффинной колонке или планшете для микротитрования или другом пригодном аналитическом субстрате/чипе. Например, слитый фрагмент может добавить домен, например глутатион-S-трансферазы/киназы (GST), который может связывать глутатион; Fc-область иммуноглобулина, которая может связываться с белком А или белком G; аминокислотные остатки, например два, три, четыре, пять, предпочтительно шесть остатков гистидина, которые могут связываться с никелем или кобальтом на аффинной колонке; эпитопную метку, например часть онкогена с-тус (тус- маркер), маркер FLAG (патент США № 4703004), маркер гемагглютинина (НА), маркер 10 гена Т7, маркер V5, маркер HSV или маркер VSV-G, который может связать маркерспецифическое антитело; или кофактор, например, биотин, который может связать стрептавидина.

Иммуногены, которые содержат часть Fc иммуноглобулина, могут держать GCC, либо в растворе, либо прикрепленной к клетке, в конфигурации, которая делает возможным структурный доступ к эпитопам GCC принимающими компонентами иммунного надзора для эффективной генерации антител. Потому что тяжелые цепи иммуноглобулина, содержащие области Fc, связываются в димеры посредством межцепочечных дисульфидных связей, иммуногены, полученные в результате слияния с областями Fc, являются димерами. Валентность слитых белков может отражать тип привнесенной иммуноглобулиновой области Fc. Например, слияния с белками IgG могут дать димеры, IgA слияния могут дать тетрамерные иммуногены, а IgM слияния могут дать декамерные иммуногены, два последних способствуют ко-трансфекции с J-цепью. Примером иммуноглобулина для слитого белка Fc является IgG1. Обычно используемая часть, как правило, имеет один шарнир IgG1, домены CH2 и CH3, кодируемые одним экзон. Поскольку этот экзон также имеет часть области CH1, которая имеет цистеин, ориентированный на дисульфидную связь с цистеином в легкой цепи, полезной модификацией является мутирование цистеина CH1, например, в серин, чтобы гарантировать отсутствие неспаренного цистеина в слитом белке. Такая мутация также увеличивает гибкость шарнира.

Часть Fc, полученная из видов-хозяев, например, области Fc человеческого Ig, для сплавления в иммуноген для иммунизации видов-хозяев, например мышей, крыс, кроликов, коз, выступает в качестве вспомогательного средства. Эта адъювантная функция может вызвать специфические антитела против Fc и эпитопов GCC. Fc-реактивные антитела могут быть идентифицированы и отброшены при скрининге. Часть Fc может иметь последовательность дикого типа или последовательность, которую мутировали для изменения эффекторной функции. Например, мутантная константная область (вариант) может быть включена в виде слитого белка, чтобы минимизировать связывание с Fc-рецепторами и/или способность к фиксации комплемента (см., например, Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351). В предпочтительном примере лизин 235 и глицин 237, пронумерованные в соответствии со стандартами области Fc, мутируют, например, в аланин. Иммуноген/слитый белок с Fc-мутировавшим IgG могут снизить взаимодействие с рецепторами Fc у хозяина. Предпочтительным растворимым иммуногенным слитым белком (после созревания расщепляет сигнальный пептид и секрецию) является hGCC (ECD) mIgG2a FcR r-mutII (pLK TOK108), который состоит из аминокислотных остатков от 24 до 430 из SEQ ID NO: 3, слитый с мутированным иммуноглобулиновым Fc мышинного IgG2a (вместе SEQ ID NO: 48).

Чтобы получить экспрессирующий клетки иммуноген, иммуноглобулиновая часть может быть построена таким образом, чтобы имитировать иммуноглобулиновую часть В-клеточного рецептора. Например, Fc-область иммуноглобулина может быть дополнительно слитой с полипептидом, содержащим трансмембранную область иммунного рецептора, такого как рецепторы Fc γ , рецепторы Fc α -рецепторов, Fc α / μ -рецептор или рецепторы Fc ϵ . Надлежащая ориентация такого Fc-рецептора клеточносвязанного иммуногена с соответствующим местоположением на клеточной поверхности может быть улучшена, если клетка, экспрессирующая слитый иммуногенный белок, дополнительно содержит дополнительные компоненты рецепторного комплекса антигена, например В-клеточный рецептор IgM или рецептор IgD. Пригодные компоненты комплекса включают иммуноглобулиновые (Ig) белки внешней оболочки, такие как MB-1 и B29 (CD79A и CD79B; Hombach et al., Eur. J. Immunol. 20:2795-2799 (1990) для рецептора IgM), которые образуют гетеродимер. Белки внешней оболочки Ig могут быть предоставлены эндогенно путем трансфекции клетки, например при трансфекции В-клеточной лимфомной клеточной линии; или путем ко-трансфекции иммуногена оболочечными белками, например, в отдельном векторе или в том же векторе.

Полезные эпитопы, например референсные эпитопы, из молекулы GCC, с которой молекулы антител к GCC, например кроличьи моноклональные антитела или их гуманизированные версии, как описано в данном документе, могут связываться, можно найти на внеклеточной части GCC. Такие эпитопы GCC могут связывать молекулы антител на поверхности клеток, например на наружной части клетки.

Например, эпитоп для молекулы антитела к GCC может находиться в пределах или включать остатки 1-50 из SEQ ID NO: 3 или ее фрагмента, который связывает молекулу антитела к GCC согласно изобретению, например, его MIL-44-148-2-связывающий фрагмент. Такие фрагменты могут содержать остатки 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 или 33-50 из SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации изобретения эпитоп для молекулы антитела к GCC, например антитела MIL-44-148-2, представляет собой конформационный эпитоп, дополнительно содержащий один или несколько дополнительных аминокислотных остатков в последовательности аминокислот GCC за пределами остатка 50, т.е. выбранного из от около остатка 50 до остатка 1073 в SEQ ID NO: 3.

Антитела, полученные против таких эпитопов или внеклеточного домена, например эпитопов, которые находятся в пределах или включают остаток(ки) из аминокислотных остатков от 24 до 420 из SEQ ID NO: 3 или ее референсной части, например остатки от 24 до 75, от 75 до 150, от 150 до 225, от 225 до 300, от 300 до 375 или от 375 до 420 из GCC или молекулы антител, полученных из нее, могут быть полезны в качестве терапевтических или диагностических антител, как описано в данном документе.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC имеет одно или более из следующих свойств:

а) она конкурирует за связывание, например связывание с GCC клеточной поверхности или очищенной GCC, с одной из вышеперечисленных молекул антител к GCC, обобщенных в табл. 1 и 2, например кроличьего гибридного антитела (например, MIL-44-148-2);

б) она связывается с тем же или, по существу, таким же эпитопом на GCC как и одна из вышеупомянутых молекул антител к GCC, обобщенных в табл. 1 и 2, например кроличьего гибридного антитела (например, MIL-44-148-2). В варианте реализации изобретения антитело связывается с тем же эпитопом, как определено с помощью одного или более из массива пептидных анализов или путем связывания с усеченными мутантами, химерами или точечными мутантами, экспрессированными на клеточной поверхности, или мембранными препаратами, например, как те анализы, описанные в данном документе;

с) она связывается с эпитопом, который имеет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 или 20 смежных аминокислотных остатков, общих с эпитопом одной из вышеупомянутых молекул антител к GCC, обобщенных в табл. 1 и 2, например, кроличьего гибридного антитела (например, MIL-44-148-2);

д) она связывает область человеческой GCC, которая связана с антителом к GCC согласно изобретению, в котором область например внеклеточная или цитоплазматическая область, составляет 10-15, 10-20, 20-30 или 20-40 остатков в длину, а связывание определяется, например, путем связывания с усеченными мутантами; в варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC связывает внеклеточную область человеческой GCC. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC может связывать часть внеклеточного домена человеческой GCC, определенную аминокислотными остатками 24-420 в SEQ ID NO: 3. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC может связывать именной сайт гуанилилциклазы у аминокислотных остатков 931-954 в SEQ ID NO: 3; или

е) она связывает референсный эпитоп, описанный в данном документе.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC связывает последовательность GCC ILVDFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTL (SEQ ID NO: 8).

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC связывает последовательность GCC FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO: 9).

В варианте реализации изобретения молекула антитела связывает конформационный эпитоп. В других вариантах реализации изобретения молекула антитела связывает линейный эпитоп.

Молекулы антител к GCC могут быть поликлональными антителами, моноклональными антителами, моноспецифическими антителами, химерными антителами (см. патент США № 6020153) или гуманизированными антителами или фрагментами антител или их производными. Синтетические или генетически сконструированные варианты (см. патент США № 6331415) любого из вышеупомянутых антител также охватываются настоящим изобретением. Моноклональные антитела могут быть получены с помощью различных методик, включая обычную методику мышиных моноклональных антител (например, стандартную методику гибридизации соматических клеток по Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975); см., Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) и методику кроличьих моноклональных антител и обслуживание, обеспеченное Eptomics (Burlingame, CA), который производит на заказ кроличьи моноклональные антитела (RabMAbs®) с использованием кролик-кроличьих гибридом, генерируемых путем слияния изолированных В-клеток из иммунизированного кролика с собственной партнерной клеточной линии сраствления Eptomics, как описано в патентах США № 7402409, 7429487, 7462697, 7575896, 7732168 и 8062867, которые включены в данный документ путем ссылки во всей их полноте.

Иммунизацию белком, например GCC или растворимой частью, или слитым белком, содержащим часть GCC (например, hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII (pLK TOK108), или клетками или их мембранными фракциями, например клетками, экспрессирующими находящуюся на поверхности GCC или ее часть (например, продукт pLK TOK4), можно проводить с иммуногеном, приготовленным для инъекции таким образом, чтобы индуцировать ответ, например, с адъювантом, например полным адъювантом Фрейнда. Другие пригодные адъюванты включают адъювант Titermax Gold® (CYTRX Corporation, Los Angeles, Calif.) и квасцы. Небольшие пептидные иммуногены могут быть присоединены к большим молекулам, таким как гемоцианин лимфы улитки. Инъекции мышам и кролям можно осуществлять разными способами, например подкожно, внутривенно или внутримышечно в ряде мест, например в брюшину (i.p.), основу хвоста или подушку ступни или комбинируя места введения, например, i.p. и основу хвоста (VIP). Активные иммунизации могут включать один и тот же или другой иммуноген и могут дополнительно включать адъювант, например неполный адъювант Фрейнда. Иммунизацию ДНК, например ДНК, кодирующей GCC или ее часть, или слитый белок, содержащий GCC или ее часть (например, кодирующий hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII), можно осуществить с помощью генной пушки. Например, ДНК загружают в микроскопические частицы золота и инъецируют мышам или кролям через частые интервалы в течение короткого периода времени.

Обычно, когда желательными являются моноклональные антитела, то гибридому получают путем слияния подходящей клетки из бессмертной линии клеток (например, линии миеломных клеток, таких

как SP2/0, P3X63Ag8.653 или гетеромиеломных) с антителопродуцирующими клетками. Антителопродуцирующие клетки могут быть получены из периферической крови, предпочтительно из селезенки или лимфатических узлов, человека, трансгенных животных относительно человеческих антител или других пригодных животных (например, кролей), иммунизированных представляющим интерес антигеном. Клетки, которые продуцируют антитела человеческого происхождения (например, человеческие антитела), могут быть получены с использованием пригодных методов, например слиянием продуцирующей человеческое антитело клетки и гетеромиеломы или триомы или иммортализацией активированной В-клетки человека через инфицирование вирусом Эпштейна-Барра. (См., например, патент США № 6197582 (Trakht); Niedbala et al., *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella et al., *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson et al., *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991)). Слитые или иммортализованные клетки, продуцирующие антитела (гибридомы), могут быть выделены с использованием селективных условий культивирования и клонироваться путем лимитирующего разведения. Клетки, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, могут быть идентифицированы с помощью подходящего анализа (например, ELISA (например, с иммуногеном, например, hGCC (ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII, иммобилизованных на микротитрационном планшете) или с помощью FACS на клетке, экспрессирующей GCC или ее часть, например клетке, экспрессирующей продукт pLTKO4). Например, если GCC-иммуноген включает слитый фрагмент, который представляет собой аффинный реагент, то эта часть может обеспечивать слитый белок, включающий GCC или ее часть для связывания с матрицей, например, микропланшетами или аналитическими чипами, покрытыми белком G, стрептавидином, производными глутатиона или антителами, которые затем комбинируют с иммунной сывороткой или кондиционированной средой из гибридомы или рекомбинантной клетки, экспрессирующей антитело, а смесь инкубируют в условиях, благоприятных для образования комплекса (например, при физиологических условиях для соли и pH). После инкубации ячейки микротитрационного планшета или ячейки чипа промывают для удаления несвязанных компонентов и измеряют связывание антитела к GCC.

В вариантах реализации изобретения для терапевтического применения антитела согласно настоящему изобретению представляют собой гуманизированные антитела. Преимуществом гуманизированных антител является то, что они потенциально уменьшают или устраняют иммуногенность антитела у реципиента-хозяина, тем самым обеспечивая повышение биодоступности и снижение возможности неблагоприятной иммунной реакции, таким образом, потенциально позволяя вводить несколько антител.

Модифицированные антитела включают гуманизированные, химерные или CDR-привитые антитела. Ответы на человеческое антимышиное антитело (НАМА) привели к развитию химерных или иным образом гуманизированных антител. Несмотря на то что химерные антитела имеют человеческую константную область и нечеловеческую переменную область, можно ожидать, что будут наблюдаться реакции на определенные человеческие антихимерные антитела (НАСА), особенно при постоянных или многодозовых использованиях антитела. Наличие таких нечеловеческих (например, мыши, крысы, кролика, овцы или козы) полученных белков может привести к быстрому выведению антител или может привести к генерации иммунного ответа против антитела пациентом. Для того чтобы избежать использования нечеловеческих полученных антител, гуманизированные антитела, где последовательности внесены в последовательности антитела, чтобы сделать его ближе к последовательности человеческого антитела, или полностью человеческие антитела, полученные путем введения функции человеческого антитела в нечеловеческие виды, такие как мыши, крысы, кролики, овцы или козы, были разработаны таким образом, что нечеловеческие виды будут производить антитела, имеющие полностью человеческие последовательности. Человеческие антитела позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами, которые имеют переменные и/или константные области кролей, грызунов, овец или коз.

Гуманизация и дисплейные технологии и модификации антител.

Гуманизированные молекулы антител могут минимизировать иммуногенные или аллергические реакции, присущие нечеловеческим или нечеловеческим дериватизированным mAb, и тем самым повышать эффективность и безопасность вводимых антител. Применение гуманизированной молекулы антител может обеспечить значительное преимущество при лечении хронических и рекуррентных болезней человека, таких как воспаление, аутоиммунные заболевания и рак, которые требуют повторных введений антител.

Получение гуманизированных антител со сниженной иммуногенностью может быть осуществлено в связи с методами гуманизации и дисплейными технологиями с использованием соответствующих библиотек. Следует понимать, что антитела от нечеловеческих видов, таких как мыши, крысы, кролики, овцы, козы и т.д., можно гуманизировать или приматизировать, используя методы, известные в данной области. См., например, Winter and Harris *Immunol Today*, 14:43-46 (1993) и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Представляющее интерес антитело может быть сконструировано с помощью методов рекомбинантной ДНК, чтобы заменить CH1, CH2, CH3, шарнирные домены и/или каркасный домен соответствующей последовательностью человека (см. WO 92/02190 и патенты США № 5530101, 5585089, 5693761, 5693792, 5714350 и 5777085). Также из уровня техники известно использование кДНК Ig для конструирования химерных иммуноглобулиновых генов (Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:3439 (1987) и *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). Матричную РНК выделяют из гибридомы или другой

клетки, продуцирующей антитело, и используют для получения кДНК. Представляющая интерес кДНК может быть усилена с помощью полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров (патенты США № 4683195 и 4683202).

Альтернативно, методика фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990)) может быть использована для получения человеческих антител или антител от других видов, а также фрагментов антител *in vitro*, из генов вариабельных доменов (V) иммуноглобулинов, например из набора от иммунизированных доноров. Согласно этой методике гены домена V антитела клонируют в рамке считывания в ген основного или меньшего белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и отображают в качестве функциональных фрагментов антител на поверхности фаговых частиц. Поскольку нитевидная частица содержит одноцепочечную копию ДНК фагового генома, селекция на основе функциональных свойств антитела также приводит к селекции гена, кодирующего антитело, проявляющее эти свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей можно осуществлять в разных форматах, для их обзора см., например, Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников V-генных сегментов. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) выделили разнотипный спектр анти-оксазолонных антител из небольшой случайной комбинаторной библиотеки генов V, полученных из селезенки иммунизированных мышей. Может быть сконструирован набор генов V от неиммунизированных людей-доноров, а антитела к ряду разнотипных антигенов (включая аутоантигены) могут быть выделены, в основном исходя из методов, описанных Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) или Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). См. также патенты США № 5565332 и 5573905. Дисплейные библиотеки могут содержать антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые содержат искусственные аминокислотные последовательности. Например, библиотека может содержать фрагменты Fab, которые содержат искусственные CDR(ы) (например, случайные аминокислотные последовательности) и каркасные области человека. (См., например, патент США № 6300064 (Knappik, et al.)).

Последовательности генов константных областей человека могут быть найдены у Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. publication no. 91-3242. Гены C-областей человека легко доступны из известных клонов. Выбор изотипа основывается на желательных эффекторных функциях, таких как реакция связывания комплемента или участие в антителосвязанной клеточной цитотоксичности. Изотипами могут быть IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В частных вариантах реализации изобретения молекулы антител согласно изобретению представляют собой IgG1 и IgG2. Могут быть использованы константные области каппа или лямбда легких цепей. Химерные или гуманизированные антитела затем экспрессируются с помощью традиционных методов.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC согласно изобретению может повлечь антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) к клетке, экспрессирующей GCC, например опухолевой клетке. Антитела с изотипом IgG1 и IgG3 полезны для выявления эффекторной функции в антителозависимой цитотоксической нагрузке вследствие их способности связывать рецептор Fc. Антитела с изотипом IgG2 и IgG4 полезны для сведения к минимуму ответа ADCC по причине их низкой способности связывать рецептор Fc. В родственных вариантах замещения в области Fc или изменения в составе гликозилирования антитела, например путем роста в модифицированной эукариотической клеточной линии, могут быть осуществлены для повышения способности рецепторов Fc распознавать, связывать и/или медиировать цитотоксичность клеток, с которыми антитела к GCC связываются (см., например, патенты США № 7317091, 5624821 и публикации, включая WO 00/42072, Shields, et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh et al., *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело человеческого происхождения, человеческое антитело) может включать аминокислотные последовательности или замены, которые изменяют или подстраивают функцию (например, эффекторную функцию). Например, константная область человеческого происхождения (например, константная область $\gamma 1$, константная область $\gamma 2$) может быть разработана для снижения активации комплемента и/или связывания рецептора Fc. (См., например, патенты США № 5648260 (Winter et al.), 5624821 (Winter et al.) и 5834597 (Two et al.), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Предпочтительно аминокислотная последовательность константной области человеческого происхождения, которая содержит такие аминокислотные последовательности или замены, по меньшей мере примерно на 95% идентична по всей длине аминокислотной последовательности неизменной константной области человеческого происхождения, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 99% идентична по всей длине аминокислотной последовательности неизменной константной области человеческого происхождения.

В еще одном варианте реализации изобретения эффекторные функции также могут быть изменены путем модулирования гликозилирования антитела. Под изменением имеется в виду удаление одной или нескольких углеводных групп, находящихся в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в антителе. Например, антитела с повышенной активностью ADCC со зрелой углеводной структурой, которые испытывают недостаток фукозы, присоединенной к Fc-области антитела, описаны в патентной публикации США № 2003/0157108 (Presta). См. также

патентную публикацию США № 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi также разработала клеточные линии дрожжей, способные продуцировать конкретные гликоформы антител.

Дополнительно или в качестве альтернативы антитела могут быть сделаны таким образом, чтобы иметь измененный тип гликозилирования, такие как гипофукозилированные антитела, имеющие уменьшенные количества фукозильных остатков, или антитела, имеющие увеличенные бисекторные структуры GlcNac. Такие измененные структуры гликозилирования, как было показано, повышают ADCC-способность антител. Такие модификации углеводов могут быть достигнуты путем, например, экспрессирования антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, которые сконструированы для экспрессии рекомбинантных антител согласно изобретению таким образом, чтобы произвести антитела с измененным гликозилированием. Например, EP 1176195 (Hang et al.) описывает клеточную линию с функционально разрушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазы, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование. Публикация PCT № WO 03/035835 (Presta) описывает вариант клеточной линии CHO, клетки Lec13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам тоже в результате гипофукозилирования антител, экспрессирующихся в такой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Публикация PCT № WO 99/54342 (Umana et al.) описывает клеточные линии, сконструированные для экспрессирования гликопротеинмодифицированных гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) так, что антитела, экспрессирующиеся сконструированными клеточными линиями, демонстрируют повышенные бисекторные структуры GlcNac, которые приводят к повышенной ADCC-активности антител (см. также Umana et al., 1999, Nat. Biotech. 17:176-180).

Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием подхода привитых CDR. Методики получения таких гуманизированных антител известны из уровня техники. Как правило, гуманизированные антитела производят путем получения последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют переменные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела, которое связывает GCC, идентифицируя определяющую комплементарность область или "CDR" в переменных последовательностях тяжелой и легкой цепей, и прививая последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующие CDR, на каркасную последовательность нуклеиновой кислоты человека, (см., например, патенты США № 4816567 и 5225539). Месторасположение CDR и каркасных остатков можно определить; см., Kabat, E.A., et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 и Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Молекулы антител к GCC, описанные в данном документе, имеют аминокислотные последовательности CDR и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR, перечисленные в табл. 5 и 6. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательности из табл. 5 и 6 могут быть вставлены в молекулы, которые распознают GCC, для применения в способах лечения или диагностики, описанных в данном документе. Выбранный человеческий каркас является пригодными для введения *in vivo*, означая, что он не обладает иммуногенностью. Например, такое определение может быть сделано с помощью предшествующего опыта с использованием *in vivo* таких антител и исследований сходства аминокислот. Пригодная каркасная область может быть выбранной из антитела человеческого происхождения, имеющего по меньшей мере около 65% идентичность аминокислотной последовательности и предпочтительно по меньшей мере около 70, 80, 90 или 95% идентичность аминокислотной последовательности по всей длине в каркасной области в пределах аминокислотной последовательности эквивалентной части (например, каркасной области) донорного антитела, например, молекулы антитела к GCC (например, 3G1). Аминокислотную идентичность можно определить с использованием подходящего алгоритма выравнивания аминокислотных последовательностей, такого как CLUSTAL W, используя параметры по умолчанию (Thompson J.D. et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 (1994)).

После того как CDR и FR(ы) клонированного тела, которое будет гуманизоваться, определены, идентифицируют аминокислотные последовательности кодируемого CDR(ов) и соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты прививают на выбранные человеческие FR(ы). Это можно осуществить, используя известные праймеры и линкеры, выбор которых известен из уровня техники. Все CDR конкретного человеческого антитела могут быть заменены по меньшей мере частью нечеловеческой CDR или только некоторые CDR могут быть заменены нечеловеческими CDR. Необходимо только заменить CDR(ы), необходимый для связывания гуманизированного антитела с предварительно определенным антигеном. После того как CDR(ы) прививают на выбранные человеческие FR(ы), полученные "гуманизированные" переменные последовательности тяжелой и легкой цепей экспрессируются для получения гуманизированного Fv или гуманизированного антитела, которые связываются с GCC. Предпочтительно CDR-привитое (например, гуманизированное) антитело связывает белок GCC с аффинностью, схожей с белком с аффинностью, аналогичной, по существу, такой же или лучшей, чем у донорного антитела. Как правило, гуманизированные переменные последовательности тяжелой и легкой цепей экспрессируют в виде слитого белка с последовательностями константных доменов человека, так что получается интактное антитело, которое связывается с GCC. Тем не менее, может быть получено гуманизи-

ванное антитело Fv, которое не содержит константные последовательности.

Также в объем изобретения входят гуманизированные антитела, в которых конкретные аминокислоты были заменены, удалены или добавлены. В частности, гуманизированные антитела могут иметь аминокислотные замены в каркасной области, например, для улучшения связывания с антигеном. Например, выбранное небольшое количество акцепторных каркасных остатков гуманизированной цепи иммуноглобулина может быть заменено соответствующими аминокислотами донора. Места замен включают аминокислотные остатки, прилегающие к CDR или которые способны взаимодействовать с CDR (см., например, патент США № 5585089 или 5859205). Акцепторный каркас может быть каркасной последовательностью зрелого человеческого антитела или консенсусной последовательностью. В контексте данного изобретения термин "консенсусная последовательность" относится к последовательности, обнаруживаемой наиболее часто или разработанной с наиболее распространенными остатками в каждом положении в последовательности в участке среди родственных членов семьи. Доступен ряд консенсусных последовательностей человеческих антител, в том числе консенсусных последовательностей для различных подгрупп человеческих переменных областей (см., Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). База данных Kabat и ее приложения имеются в свободном доступе on line, например, с помощью IgBLAST в Национальном центре биотехнологической информации, Bethesda, Md. (также см., Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids Research*, 29:205-206 (2001)).

Другие способы гуманизации антител описаны в Padlan et al., EP 519596 A1, опубликованном 23 декабря 1992 г.

Молекула анти-антитела GCC включает другие гуманизированные антитела, которые также могут быть модифицированы путем делеции определенных эпитопов Т-клеток человека или "деиммунизации" с помощью способов, описанных в публикациях PCT № WO 98/52976 и WO 00/34317, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Вкратце, кроличьи или других нечеловеческих видов переменные области тяжелой и легкой цепей антитела к GCC могут быть проанализированы для пептидов, которые связываются с классом II МНС. Эти пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Для обнаружения потенциальных эпитопов Т-клеток можно использовать подход компьютерного моделирования, названный "пептидным протягиванием", и в дополнение к базе данных человеческого класса II МНС можно подыскивать связывающие пептиды для мотивов, присутствующих в последовательностях кроличьих VH и VL, как описано в публикациях PCT № WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR-аллотипов класса II МНС и тем самым образуют потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть устранены путем замены небольших количеств аминокислотных остатков в переменных областях или, предпочтительно, путем единичных аминокислотных замещений. Насколько это возможно, осуществляют консервативные замещения, часто, но необязательно, может быть использована аминокислота, общепринятая в этом положении в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты у Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.* 227:776-798 (1992); Cook, G.P. et al., *Immunol. Today*, Vol. 16(5):237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Biol.* 227:799-817 (1992). Директория V Каталог БАЗА предоставляет полный каталог человеческих переменных областей иммуноглобулина (составленный Tomlinson, I.A. et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). После деиммунизации VH и VL антитела к GCC конструируют с помощью мутагенеза генов кроличьих VH и VL, мутировавшая переменная последовательность может, при необходимости, сливаться с человеческой константной областью, например IgG1 человека или К (каппа) константными областями.

В других вариантах реализации изобретения снижение иммуногенной реакции с помощью CDR-привитого антитела может достигаться путем изменений, например, делеций, замещений аминокислотных остатков в CDR (Kashmiri et al., *Methods*, 36:25-34 (2005), патент США № 6818749, Tan et al., *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006)). Например, остатки в положениях, участвующих в контакте с антигеном, предпочтительно не будут изменяться. Как правило, такие остатки, определяющие специфичность остатков (SDR(ы)), находятся в положениях, которые показывают высокие уровни изменчивости среди антител. Консенсусные последовательности, полученные, например, с помощью метода Clustal (Higgins D.G. et al., *Meth. Enzymol.* 266:383-402 (1996)), из молекул антител к GCC, например из антител, описанных в данном документе, помогают в идентификации SDR(ов). В молекулах антител к GCC, описанных в данном документе, SDR являются следующими, по меньшей мере, первым остатком или в некоторых вариантах осуществления первыми четырьмя остатками из CDR1 тяжелой цепи; по меньшей мере, N-концевым участком, например первыми семью, десятью или 13 остатками из CDR2 тяжелой цепи CDR2; почти всей CDR3 тяжелой цепи; C-концевым участком, например после остатка шесть, восемь или девять из CDR1 легкой цепи; около первого, среднего и/или последнего остатка CDR2 легкой цепи; и большинством из CDR3 легкой цепи или, по меньшей мере, после остатка два или три. Соответственно, для поддержания связывания с белком GCC после гуманизации или модификации молекулы антитела к GCC такие остатки SDR в CDR(ax) из молекул антител к GCC меньше поддаются изменениям, например из кроличьих остатков в консенсусные человеческие остатки, чем остатки в других остатках CDR или

каркасных областей. Наоборот, это может быть выгодно для изменения остатков в нечеловеческих, например кроличьих CDR, в остатки, идентифицированные как консенсусные в человеческих CDR, например CDR(ы) молекул антител к GCC, описанных в опубликованной патентной заявке США № 20110110936, содержание которой включено в данный документ путем ссылки во всей его полноте.

Антитела к GCC, которые не являются интактными антителами, также пригодны согласно этому изобретению. Такие тела могут быть получены из любого антитела, описанного выше. Пригодные молекулы антител этого типа включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из фрагментов VL и VH одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)), состоящий из домена VH; (vii) однодоменное функциональное тяжелоцепочечное антитело, которое состоит из домена VHH (известного как нанотело), см., например, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64:2853-2857 (2004) и ссылки, указанные в данном документе; и (vii) выделенный CDR, например, один или более выделенных CDR(ов) вместе с достаточным каркасом для обеспечения антигенсвязывающего фрагмента. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH соединяются в пару для образования моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv(scFv); см., например, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела также задуманы быть охваченными термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием традиционных методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты отбирают по полезности таким же способом, что и интактные антитела. Фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')₂ и Fab, могут быть получены путем расщепления интактного белка, например путем протеазного или химического расщепления.

В вариантах реализации изобретения несколько или все последовательности CDR(ов) одной или обеих тяжелой и легкой цепей могут быть использованы в другой молекуле антитела, например в CDR-привитой, гуманизированной или химерной молекуле антитела.

Варианты реализации изобретения включают молекулу антитела, которая содержит достаточные CDR(ы), например все шесть CDR(ов) из одного кроличьего гибридного антитела, описанного в данном документе, для обеспечения связывания с GCC клеточной поверхности.

В варианте реализации изобретения CDR(ы), например все HCDR, или все LCDR(ы), или все шесть, вставлены в человеческую каркасную область или в каркасную область, полученную из человеческой. Примеры человеческих каркасных областей включают человеческие зародышевые каркасные последовательности, человеческие зародышевые последовательности, которые были подвергнуты созреванию аффинности (любому *in vivo* или *in vitro*), или синтетические человеческие последовательности, например консенсусные последовательности. В варианте реализации изобретения тяжелоцепочечный каркас представляет собой каркас IgG1 или IgG2. В варианте реализации изобретения легкоцепочечный каркас представляет собой каппа-каркас.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC, например CDR-привитая или гуманизированная молекула антитела, содержит достаточные CDR(ы), например все шесть CDR(-ов) из одного антитела, описанного в данном документе, например последовательности, перечисленные в табл. 5, для обеспечения связывания с GCC (примеры нуклеиново-кислотных последовательностей, которые кодируют аминокислотные последовательности CDR, перечисленные в табл. 5, представлены в табл. 6 в данном документе). В частных вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC может содержать CDR(ы) из MIL-44-148-2 или MIL-44-67-4.

Фрагменты антител для *in vivo* терапевтического или диагностического применения могут извлекать пользу из модификаций, которые улучшают их время полужизни в сыворотке. Пригодные органические фрагменты, предназначенные повысить время полужизни в сыворотке *in vivo* антитела, могут включать один, два или более неразветвленных или разветвленных фрагмента, выбранных из гидрофильной полимерной группы (например, неразветвленного или разветвленного полимера (например, полиалкангликоля, такого как полиэтиленгликоль, монометоксиполиэтиленгликоль и подобные), карбогидрата (например, декстрана, целлюлозы, полисахарида и подобного), полимера гидрофильной аминокислоты (например, полилизина, полиаспартата и подобного), полиалканоксида и поливинилпирролидона), жирнокислотной группы (например, монокарбоксильной кислоты или дикарбоксильной кислоты), жирнокислотной эстерной группы, липидной группы (например, диацилглицерольной группы, сфинголипидной группы (например, церамида) или фосфолипидной группы (например, фосфатидилэтаноламиногруппы)). Предпочтительно органический фрагмент связывается с предварительно определенным сайтом, причем органический фрагмент не ухудшает функцию (например, снижает антигенсвязывающую аффинность) полученного иммуноконъюгата в сравнении с неконъюгированным фрагментом антитела. Органический фрагмент может иметь молекулярный вес от около 500 до около 50000 Да, предпочтительно около 2000, 5000, 10000 или 20000 Да. Примеры и методы модификации полипептидов, например анти-

тел, органическими фрагментами можно найти, например, в патенте США № 4179337 и 5612460, публикации PCT № WO 95/06058 и WO 00/26256 и патентной публикации США № 20030026805.

Молекула антитела к GCC может содержать все или антигенсвязывающий фрагмент варибельной области одной или обеих тяжелой или легкой цепи одной из указанных выше гибридом кроличьих антител.

В варианте реализации изобретения аминокислотная последовательность легкой цепи (а) может отличаться от одной из референсных аминокислотных последовательностей(и), упомянутых в (а)(i-ii), 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15 остатками. В вариантах реализации изобретения отличия представляют собой консервативные замещения. В вариантах реализации изобретения отличия находятся в каркасных областях. В варианте реализации изобретения последовательность тяжелой цепи (b) может отличаться от одной из референсных аминокислотных последовательностей, упомянутых в (b)(i-ii) 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15 остатками. В вариантах реализации изобретения отличия представляют собой консервативные замещения. В вариантах реализации изобретения отличия находятся в каркасных областях.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC содержит одну или обе:

(a) все аминокислотные последовательности легкой цепи или антигенсвязывающий фрагмент (i) аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи из табл. 3, например SEQ ID NO: 13, или (ii) аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, кодируемой нуклеотидной последовательностью из табл. 4, например SEQ ID NO: 12; и

(b) все аминокислотные последовательности тяжелой цепи или антигенсвязывающий фрагмент (i) аминокислотной последовательности варибельной области из табл. 3, например SEQ ID NO: 11, или (ii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи, кодируемой нуклеотидной последовательностью из табл. 4, например SEQ ID NO: 10.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC одну или более:

а) варибельную область легкой цепи или ее антигенсвязывающий фрагмент, имеющий по меньшей мере 85, 90, 95, 97 или 99% гомологию с варибельной областью легкой цепи молекулы антитела к GCC согласно изобретению; и

(b) варибельную область тяжелой цепи или ее антигенсвязывающий фрагмент, имеющий по меньшей мере 85, 90, 95, 97 или 99% гомологию с варибельной областью тяжелой цепи молекулы антитела к GCC согласно изобретению.

Аминокислотные последовательности варибельных областей антитела к GCC согласно изобретению могут быть найдены в табл. 3.

В одном подходе консенсусные последовательности, кодирующие J-области тяжелой и легкой цепей, могут быть применены для конструирования олигонуклеотидов для применения в качестве праймеров для введения полезных сайтов рестрикции в J-область для последовательного присоединения сегментов области V к сегментам человеческой области C. C-область кДНК можно модифицировать с помощью сайт-направленного мутагенеза в точке локализации сайта рестрикции в аналогичном положении в человеческой последовательности.

Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, космиды, эписомы, полученные из YAC, EBV и подобное. Пригодный вектор является вектором, который кодирует функционально укомплектованную иммуноглобулиновую последовательность человеческих CH или CL с приемлемыми сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы любую последовательность VH или VL можно было легко вставить и экспрессировать. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между донорным сайтом сплайсинга во вставленной J-области и акцепторным сайтом сплайсинга, предшествующим человеческой C-области, а также в сплайсинговых областях, находящихся в пределах экзонов человеческой CH. Пригодные векторы экспрессии могут содержать ряд компонентов, например начало репликации, ген селективируемого маркера, один или более контролирующих экспрессию элементов (например, промотор, энхансер, терминатор) и/или один или более сигналов трансляции, сигнальную последовательность или лидерную последовательность и подобное. Полиадениляция и терминирование транскрипции происходит в нативных хромосомальных сайтах справа, ниже кодирующих областей. Полученное химерное антитело может соединяться с любым сильным промотором. Примеры пригодных векторов, которые могут быть применены, включают те, которые подходят для хозяев-млекопитающих и основаны на вирусных системах репликации, таких как обезьяний вирус 40 (SV40), вирус саркомы Рауса (RSV), аденовирус 2, коровий папилломавирус (BPV), паповавирусный ВК мутант (ВКV) или мышинный или человеческий цитомегаловирус (CMV) и вирус мышинного лейкоза Молони (MMLV), нативные промоторы Ig и т.п. Множество пригодных векторов известно из уровня техники, включая векторы, которые поддерживаются в единственной копии или множестве копий или которые интегрируются в хромосому клетки-хозяина, например, через LTR(ы) или искусственные хромосомы, сконструированные с мультиплетными интеграционными сайтами (Lindenbaum et al., Nucleic Acids Res. 32:e172 (2004), Kennard et al., Biotechnol. Bioeng. Online May 20, 2009). Дополнительные примеры пригодных векторов перечислены ниже.

Таким образом, изобретение предусматривает вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, гуманизированного, хи-

мерного антитела или антигенсвязывающий фрагмент любого из упомянутых выше), цепь антитела (например, тяжелую цепь, легкую цепь) или антигенсвязывающую часть цепи антитела, которая связывает белок GCC.

Экспрессия в эукариотических клетках-хозяевах является полезной, потому что такие клетки являются более подобными, чем прокариотические клетки, для сборки и секретирования надлежащим образом сложенного и иммунологически активного антитела. Однако любое антитело, полученное как неактивное из-за ненадлежащей сборки, может быть ренатурировано согласно известным методам (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, p. 459-89 (1982)). Возможно, клетки-хозяева будут продуцировать части интактных антител, такие как димеры легких цепей или димеры тяжелых цепей, которые также являются гомологами антител согласно настоящему изобретению.

Кроме того, как описано в данном документе, антитела или антитела от человеческих или нечеловеческих видов могут быть получены с помощью дисплейных технологий, включая, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомальный дисплей и другие методы, использующие технологии, хорошо известные из уровня техники и приводящие к образованию молекул, которые могут подвергаться дополнительному созреванию, такому как созревание аффинности; сами по себе технологии известны из уровня техники. Winter and Harris *Immunol Today*, 14:43-46 (1993) и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes and Plutchau *PNAS USA*, 94:4937-4942 (1997) (рибосомальный дисплей), Parmley and Smith *Gene*, 73:305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott *TIBS*, 17:241-245 (1992), Cwirla et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6378-6382 (1990), Russel et al., *Nucl. Acids Research*, 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al., *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIB-TECH* 10:80-84 (1992) и патент США № 5 733 743. Если для получения антител, которые не являются человеческими, используют дисплейные технологии, то такие антитела можно гуманизировать, как описано выше.

Следует понимать, что антитела, которые создаются первоначально, не должны иметь конкретный желаемый изотип, но, скорее, антитело как генерируемое может быть любого изотипа. Например, антитело, продуцируемое гибридомой кролика MIL-44-148-2, имеет изотип IgG. Изотип антител может быть включен после этого, например, в IgG2 или IgG3, чтобы вызвать реакцию ADCC, когда антитело связывается с GCC на клетке, с использованием обычных методов, которые известны в данной области. Такие методики включают использование прямых рекомбинантных методов (см., например, патент США № 4816397), методы слияния клеток (см., например, патент США № 5916771) и др. В методах слияния клеток получают миеломную или другие клеточные линии, которые имеют тяжелую цепь с любым желательным изотипом, и получают другую миеломную или другие клеточные линии, которые имеют легкую цепь. Такие клетки впоследствии могут сливаться, и может быть выделена клеточная линия, экспрессирующая интактное антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC является кроличьим анти-GCC IgG1 антителом. Поскольку такие антитела обладают желательным связыванием с молекулой GCC, то любое одно из таких антител может быть легко переключено с одного изотипа в получение другого изотипа, одновременно обладая той же вариабельной областью (которая определяет специфичность и аффинность антитела, в определенной степени). Соответственно, в качестве кандидатов антител получают те, которые отвечают желательным "структурным" атрибутам, как описано выше, они, как правило, могут иметь, по меньшей мере, некоторые дополнительные "функциональные" атрибуты, которые являются желательными по причине переключения изотипов.

В варианте реализации изобретения вариабельная область или ее антигенсвязывающий фрагмент могут быть соединены с константной областью (или ее фрагментом), отличающейся от константной области, с которой он генерируется, например с константной областью (или ее фрагментом) из другого антитела или синтетической константной областью (или ее фрагментом). В вариантах реализации изобретения константная область представляет собой константную область IgG1 или IgG2 (или ее фрагмент). Изменения в последовательностях могут быть осуществлены в вариабельной или константной областях для модифицирования эффекторной активности молекулы антитела.

Конструирование и получение других терапевтических средств.

Антитела, которые получены и охарактеризованы в данном документе в отношении GCC, предусмотрены для конструирования других терапевтических средств, включая другие антитела, другие антагонисты или химические фрагменты, отличные от антител. Такие средства включают, без ограничения, антитела, имеющие подобную связывающую активность или функциональность, усовершенствованные терапевтические антитела, такие как биспецифические антитела, иммуноконъюгаты и радиомеченные терапевтические средства, получение пептидных терапевтических средств, в частности интрател и небольших молекул. Кроме того, как обговаривалось выше, эффекторная функция антител согласно изобретению может быть изменена путем изотипного переключения к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE или IgM для разного терапевтического применения.

В связи с антителами биспецифические антитела могут быть получены как содержащие (i) два антитела, одно со специфичностью к GCC, а другое - ко второй молекуле, которые сконъюгированы вме-

сте, (ii) единое антитело, которое имеет одну цепь, специфическую к GCC, и вторую цепь, специфическую к другой молекуле, или (iii) одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность к GCC и другой молекуле. Такие биспецифические антитела могут быть получены с использованием известных технологий. Например, биспецифические антитела могут быть получены путем перекрестного сшивания двух или более антител (одного типа или разных типов). Пригодные линкеры для перекрестного сшивания включают те, которые являются гетеробифункциональными, имеющими две отчетливо реактивные группы, разделенные приемлемым спейсером (например, м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир), или гомобифункциональными (например, дисукцинимидила суберат). Такие линкеры можно приобрести у Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. См. также, например, Fanger et al., *Immunomethods* 4:72-81 (1994) и Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) и Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992) и в связи с (iii) см., например, Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Кроме того, также могут быть получены "каппа-тела" (Ill. et al., "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), "мини-тела" (Martin et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994), патент США № 583,821), "диатела" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)) или "двуликие" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al., *Int. J. Cancer Suppl.* 7:51-52 (1992)).

Нуклеиновые кислоты и полипептиды.

В другом варианте реализации изобретения настоящее изобретение относится к полинуклеотидным или полипептидным последовательностям, которые кодируют или презентуют молекулы антител, описанных в данном документе. Такие полинуклеотиды кодируют вариабельные и константные области как тяжелой, так и легкой цепей, хотя другие комбинации также предполагаются настоящим изобретением в связи с композициями, описанными в данном документе. Настоящее изобретение также предполагает олигонуклеотидные фрагменты, полученные из раскрытых полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот, комплементарных этим полинуклеотидам.

Полинуклеотиды могут быть в виде РНК или ДНК. Полинуклеотиды в виде ДНК, к ДНК геномной ДНК, нуклеинокислотных аналогов и синтетических ДНК находятся в объеме согласно настоящему изобретению. ДНК может быть двуцепочечной или одноцепочечной, а если одноцепочечной, то может быть кодирующей (смысловой) цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности, представленной в данном документе, или может быть другой кодирующей последовательностью, кодирующей последовательности, которая в результате избыточности или вырожденности генетического кода кодирует полипептид так же, как и ДНК, представленная в данном документе.

В предусмотренных вариантах реализации изобретения полинуклеотиды кодируют по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи и по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи согласно настоящему изобретению, например, как показано в табл. 4.

Настоящее изобретение также включает вариантыные полинуклеотиды, содержащие модификации, такие как полинуклеотидные делеции, замещения или добавки, и любую полинуклеотидную модификацию, полученную из вариантной полинуклеотидной последовательности. Полинуклеотид согласно настоящему изобретению может также иметь кодирующую последовательность, которая является вариантом кодирующей последовательности, предусмотренной данным документом. Например, вариантный полинуклеотид может иметь по меньшей мере 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 97% идентичность с полинуклеотидами, перечисленными в табл. 4. В вариантах реализации изобретения, вариантный полинуклеотид кодирует молекулу антитела к GCC.

Настоящее изобретение дополнительно относится к полипептидам, которые представляют собой антитела согласно настоящему изобретению, а также фрагменты, аналоги и производные таких полипептидов. Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть рекомбинантными полипептидами, полипептидами природного происхождения или синтетическими полипептидами. Фрагмент, производные или аналоги полипептидов согласно настоящему изобретению могут быть теми, у которых один или более из аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным остатком (предпочтительно консервативным аминокислотным остатком), и такой замещенный аминокислотный остаток может или не может быть остатком, кодируемым генетическим кодом; или он может быть тем, в котором один или более из аминокислотных остатков содержит замещающую группу; или он может быть тем, в котором полипептид слит с другим соединением, таким как соединение для увеличения времени полужизни полипептида (например, полиэтиленгликолем); или он может быть тем, в котором дополнительные аминокислоты слиты с полипептидом, например в качестве лидера или секреторной последовательности или последовательности, которая используется для очистки полипептидной или пропротеиновой последовательности. Такие фрагменты, производные и аналоги находятся в пределах объема согласно настоящему изобретению. В разных аспектах полипептиды согласно изобретению могут быть частично очищенным или очищенным продуктом.

Полипептид согласно настоящему изобретению может иметь аминокислотную последовательность, которая идентична последовательностям антител, описанным в данном документе, например, представленным в табл. 2 или 3, или которая отличается по незначительным вариациям вследствие одного или более аминокислотных замещений. Изменение может быть "консервативной заменой", как правило, в диапазоне около от 1 до 5 аминокислот, в котором замещенная аминокислота имеет аналогичные структурные или химические свойства, например замена лейцина на изолейцин или треонина на серин; замена лизина аргинином или гистидином. В отличие от этого, варианты могут включать неконсервативные изменения, например замену глицина триптофаном. Подобные незначительные изменения могут также включать делеции аминокислот или инсерции или то и другое. Руководство в определении того, какие и сколько аминокислотных остатков могут быть замещены, вставлены или удалены без изменения биологической или иммунологической активности, могут быть найдены с помощью компьютерных программ, известных в данной области техники, например программного обеспечения DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.).

В другом аспекте изобретение предусматривает выделенные и/или распознанные нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы антител к GCC. В вариантах реализации изобретения нуклеиновые кислоты кодируют одну или более молекул антител, тяжелых цепей, легких цепей, переменных областей легкой цепи, переменных областей тяжелой цепи, частей тяжелых цепей и легких цепей молекулы антител, описанных в данном документе (например, фрагмент переменной области легкой цепи, который в паре с полноразмерной переменной областью тяжелой цепи является антигенсвязывающим, или фрагмент переменной области тяжелой цепи, который, когда в паре с полноразмерной переменной областью легкой цепи, является антигенсвязывающим) и CDR(ы). Варианты реализации изобретения включают такие нуклеиновые кислоты, расположенные в векторах, например экспрессирующих векторах. Более того, данное изобретение охватывает молекулы антител, продуцируемые клетками-хозяевами, например экспрессирующими молекулы антител, кодируемых такими плазмидами.

В варианте реализации изобретения предусмотрен вектор, например экспрессирующий вектор, содержащий одну или обе из

последовательностей, кодирующих переменную область легкой цепи, например переменную область легкой цепи, описанную в табл. 3, например последовательность, представленную в табл. 4, ее антигенсвязывающий фрагмент или одну, две или три CDR легкой цепи (и необязательно каркасную область), описанные в данном документе, например, CDR, описанные в табл. 5, например CDR, кодируемую последовательностью в табл. 6; и

последовательностей, кодирующих переменную область тяжелой цепи, например переменную область тяжелой цепи, описанную в табл. 3, например последовательность, представленную в табл. 4, ее антигенсвязывающий фрагмент или одну, две или три CDR тяжелой цепи (и необязательно каркасную область), описанные в данном документе, например, CDR, описанные в табл. 5, например, CDR, кодируемую последовательностью в табл. 6.

В вариантах реализации изобретения предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи или по меньшей мере одну переменную область легкой цепи антител согласно настоящему изобретению. В вариантах реализации изобретения предусмотрены полинуклеотиды, которые могут кодировать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи и одну переменную область легкой цепи антител согласно настоящему изобретению.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC содержит одну или обе:

(a) переменную область легкой цепи или ее антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые нуклеиновой кислотой, которая гибридизирует в выбранных жестких условиях с (i) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей комплемент молекулы антитела к GCC, описанного в данном документе, например, в табл. 4 или (ii) любой последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь молекулы антитела к GCC согласно изобретению, например, одного из вышеуказанных кроличьих антител, представленных в табл. 1 и 2; и

(b) переменную область тяжелой цепи или ее антигенсвязывающий фрагмент, кодируемые нуклеиновой кислотой, которая гибридизирует в выбранных условиях жесткости с (i) последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей комплемент молекулы антитела к GCC, описанного в данном документе, например, в табл. 4, или (ii) любой последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь молекулы антитела к GCC согласно изобретению, например, одного из вышеуказанных кроличьих антител, представленных в табл. 1 и 2.

В варианте реализации изобретения выбранными условиями жесткости являются условия высокой жесткости или очень высокой жесткости, например, как те условия, которые описаны в данном документе.

Настоящее изобретение также предусматривает векторы, которые содержат полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, клетки-хозяева, полученные с помощью генной инженерии с векторами согласно настоящему изобретению, и получение антител согласно настоящему изобретению с помощью рекомбинантных технологий.

Подходящая последовательность ДНК может быть встроена в вектор с помощью различных процедур. В общем, последовательность ДНК вставляется в соответствующие эндонуклеазные сайты рестрикции с помощью процедур, известных в данной области. Полинуклеотидная последовательность в экспрессирующем векторе функционально связана с соответствующей последовательностью контроля экспрессии (т.е. промотором) для прямого синтеза мРНК. Примеры таких промоторов включают LTR вируса саркомы Рауса или ранний или поздний промотор SV40, *E. coli lac* или *trp*, промотор P_L фага-лямбда и другие промоторы, известные для управления экспрессией генов у прокариотических (например, *tac*, промоторы T3, T7 *E. coli*) или эукариотических (например, цитомегаловирусный промотор, аденовирусный поздний промотор, промотор EF-1a) клеток или их вирусов, но не ограничиваются ими. Экспрессирующий вектор также содержит рибосомосвязывающий сайт для инициации трансляции и терминирования транскрипции. Вектор также может содержать подходящие последовательности для амплификации экспрессии. Например, вектор может содержать энхансеры, которые являются последовательностями ДНК вирусного происхождения, стимулирующими транскрипцию, такими как те, которые были получены из вируса обезьян, такого как SV40, вируса полиомы, цитомегаловируса, вируса папилломы крупного рогатого скота или вируса саркомы Молони, или геномного происхождения. Вектор предпочтительно также содержит точку начала репликации. Вектор может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать экзогенную точку начала репликации, или такая точка начала репликации может быть получена из SV40 или другого вирусного источника или с помощью механизма хромосомной репликации клетки-хозяина.

Кроме того, вектор необязательно может содержать маркерный ген для выбора трансфицированных клеток-хозяев, такой как маркерные гены дигидрофолатредуктазы, чтобы сделать возможным отбор с помощью метотрексата среди множества хозяев или антибиотиков, такой как ген бета-лактамазы (устойчивость к ампициллину), ген Tet (устойчивость к тетрациклину), используемые в прокариотических клетках, или неомицин, GA418 (генетицин, производное неомицина), *gpt* (микофенольная кислота), гены устойчивости к ампициллину или гигромицину или гены, которые дополняют генетическое повреждение клеток-хозяев, такое как отсутствие тимидинкиназы, гипоксантинфосфорибозилтрансферазы, дигидрофолатредуктазы и т.д. Гены, кодирующие генный продукт аутокотрофных маркеров хозяина (например, LEU2, URA3, HIS3), часто используют в качестве селективируемых маркеров в дрожжах.

С целью получения антител согласно настоящему изобретению одну или более полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют вариабельные области легкой и тяжелой цепей и константные области легкой и тяжелой цепей антител согласно настоящему изобретению, вводят в вектор. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие легкую и тяжелую цепи антител согласно настоящему изобретению, могут быть введены в один или множество векторов, а затем вводиться в клетки-хозяева.

Пригодные экспрессирующие векторы для экспрессии в млекопитающих клетках включают, например, pCDM8, pcDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, Calif), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., Biotechniques, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)), Bicistronic GPEX® Retrovector (Gala Biotech, Middleton, Wis.) и подобные. Экспрессирующие векторы, которые подходят для применения в разных экспрессирующих хозяевах, таких как прокариотические клетки (*E. coli*), клетки насекомых (*Drosophila* Schneider S2 клетки, Sf9) и дрожжей (*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*), также доступны. Примером векторов являются pLK TOK58 (последовательность Fc дикого типа IgG1) и pLK TOK59 (последовательность Fc мутировавшего IgG1) (см. публикацию патентной заявки США № 20060147445).

Как будет понятно, антитела в соответствии с настоящим изобретением могут экспрессироваться в клеточных линиях, отличных от гибридных клеточных линий. Последовательности, кодирующие кДНК или геномные клоны для конкретного антитела, могут быть использованы для подходящих млекопитающих или немлекопитающих клеток-хозяев. Трансформирование может быть осуществлено с помощью любого известного метода для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку полинуклеотида в вирус (или в вирусный вектор) и трансдукцию клетки-хозяина вирусом (или вектором), или с помощью процедур трансфекции, известных из уровня техники, для введения гетерогенных полинуклеотидов в млекопитающие клетки, например, опосредованная декстраном трансфекция, кальцийфосфатная преципитация, опосредованная полибренном трансфекция, протопластное слияние, электропорация, энкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямые микроинъекции в молекулу ДНК. Используемая трансформационная процедура зависит от хозяина, который будет трансформироваться. Способы ведения гетерогенных полинуклеотидов в млекопитающие клетки известны из уровня техники и включают опосредованную декстраном трансфекцию, кальцийфосфатную преципитацию, опосредованную полибренном трансфекцию, протопластное слияние, электропорацию, бомбардировку частицами, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямые микроинъекции ДНК в ядро, но не ограничиваются ими.

В другом аспекте изобретение предполагает клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В вариантах реализации изобретения клетка экспрессирует молекулу антитела или ее компонент, описанные в данном документе. Еще дополнительный вариант реализации

изобретения предусматривает способ получения молекулы антитела к GCC, описанного в данном документе, например молекулы кроличьего антитела или его гуманизированную версию, включающий поддержание клетки-хозяина в условиях, пригодных для экспрессии, тем самым экспрессируя иммуноглобулиновые цепи и получая молекулу антитела. Дополнительный вариант реализации изобретения предполагает клетку-хозяина, содержащую вышеупомянутые экспрессирующие векторы, кодирующие последовательности легкой и тяжелой цепей антитела. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например клеткой млекопитающего, клеткой насекомых, дрожжевой клеткой или прокариотической клеткой, например *E. coli*. Например, клетка млекопитающего может быть культивируемой клеткой или клеточной линией. Примеры клеток млекопитающего включают лимфоцитные клеточные линии (например, NS0), овариальные клетки китайского хомячка (CHO), клетки COS. В частном варианте реализации изобретения культивируемой клеткой-хозяином является клетка CHO, содержащая последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулу антитела MIL-44-148-2. В другом варианте реализации изобретения клеткой-хозяином является гибридома MIL-44-148-2 (PTA-8132). Дополнительные клетки включают овоцитные клетки и клетки от трансгенных животных, например эпителиальные клетки млекопитающего. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулу антитела, описанного в данном документе, могут экспрессироваться в трансгенном нечеловеческом животном.

Млекопитающие клеточные линии, пригодные в качестве хозяев для экспрессии, известны из уровня техники и включают многие иммортализованные линии клеток, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC), включая овариальные клетки китайского хомячка (CHO), клетки NS0, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2) и ряд других клеточных линий, но не ограничиваясь ими. Также для экспрессирования рекомбинантных антител могут быть использованы немлекопитающие клетки, включая бактериальные, дрожжевые клетки, клетки насекомых и растений, но не ограничиваясь ими. Сайт-направленный мутагенез домена CH2 антитела для удаления гликозилирования может быть осуществлен с целью предупреждения изменений в иммуногенности, фармакокинетике и/или эффекторных функций в результате нечеловеческого гликозилирования. Методы экспрессии выбирают для определения того, какая система генерирует повышенные уровни экспрессии и продуцирует антитела с конститутивными GCC-связывающими свойствами.

Еще дополнительный вариант реализации изобретения предполагает способ получения молекулы антитела к GCC, например молекулы кроличьего антитела или его гуманизированной версии, включающий поддержание клетки-хозяина, содержащей нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, например, одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, перечисленных в табл. 4 или 6, в условиях, пригодных для экспрессирования иммуноглобулина, тем самым экспрессируя цепи иммуноглобулина и продуцируя молекулу антитела, например молекулу кроличьего антитела или его гуманизированную версию, которые связывают GCC или ее фрагмент или вариант. Например, способы экспрессирования молекулы антител включают применение клеток-хозяев, где первая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела, например легкую цепь кроличьего антитела или его гуманизированной версии, и вторая молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу антитела, например тяжелую цепь кроличьего антитела или его гуманизированной версии, содержатся в одном экспрессирующем векторе. В других вариантах реализации изобретения они находятся в отдельных векторах. Способ может дополнительно включать этап выделения или восстановления антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента антител, если это желательно.

Например, молекулу нуклеиновой кислоты (т.е. одну или более молекул нуклеиновых кислот), кодирующую тяжелую и легкую цепи кроличьего (или гуманизированного) антитела, которое связывает белок GCC, или экспрессирующий конструктор (т.е. один или более конструкторов), содержащий такую молекулу(ы) нуклеиновой(ых) кислоты(кислот), можно вводить в пригодную клетку-хозяин для создания рекомбинантной клетки-хозяина с использованием любого метода, пригодного для выбранной клетки-хозяина (например, трансформирование, трансфекция, электропорация, инфицирование) так, что нуклеинокислая молекула(ы) функционально связывается с одним или более элементами, управляющими экспрессией (например, в векторе, в конструкторе, созданном с помощью процессов в клетке, интегрированных в геном клетки-хозяина). Полученную клетку-хозяин можно поддерживать в условиях, пригодных для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в подходящем нечеловеческом животном, в подходящей культуральной среде, дополненной приемлемыми солями, факторами роста, антибиотиками, пищевыми добавками и т.д.), тем самым продуцируя кодируемые полипептиды. Если желательно, то кодируемый белок можно выделить или восстановить (например, из животного, клетки-хозяина, среды, молока). Этот процесс охватывает экспрессию в клетке-хозяине трансгенного нечеловеческого животного (см., например, WO 92/03918, GenPharm International) или растения.

Кроме того, экспрессию антител согласно изобретению (или других их фрагментов) из продуцирующих клеточных линий можно увеличить, используя ряд известных методик. Например, глутаминсинтетаза и генная экспрессирующая система DHFR являются общепринятыми подходами для повышения экспрессии в определенных условиях. Высокоэкспрессирующие клеточные клоны можно идентифици-

ровать, используя обычные методики, такие как ограниченное разбавительное клонирование, микрокапельная технология или любые другие методы, известные из уровня техники. Система GS обсуждена в целом или частично в связи с европейскими патентами № 0216 846, 0256055 и 0323997 и европейской патентной заявкой № 89303964.4.

В примерной системе для рекомбинантной экспрессии модифицированного антитела или его антигенсвязывающей части согласно изобретению рекомбинантный экспрессирующий вектор, кодирующий как тяжелую цепь антитела, так и легкую цепь антитела, вводят в клетки dhfr-СНО с помощью опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном экспрессирующем векторе гены тяжелой и легкой цепей антитела функционально связаны с энхансерными/ промоторными регуляторными элементами (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как регуляторный элемент энхансер CMV/промотор AdMLP или регуляторный элемент энхансер SV40/промотор AdMLP) для приведения в действие высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также несет ген DHFR, который позволяет отобрать клетки СНО, которые были трансфицированы вектором с использованием метотрексатной селекции/амплификации. Выбранные трансформированные клетки-хозяева культивируют для обеспечения экспрессии тяжелых и легких цепей антитела, а интактное антитело извлекают из культуральной среды. Стандартные методы молекулярной биологии используются для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфекции клеток-хозяев, выбора трансформантов, культуры клеток-хозяев и извлечения антитела из культуральной среды.

Антитела согласно изобретению могут быть также получены трансгенно генерацией млекопитающего или растения, которые являются трансгенными по иммуноглобулиновым последовательностям тяжелой и легкой цепей, представляющих интерес, и путем производства антител в их восстановительной форме. В связи с трансгенным производством у млекопитающих антитела могут быть получены в или извлечены из молока коз, коров или других млекопитающих. См., например, патенты США № 5827690, 5756687, 5750172 и 5741957.

Антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, цепи и их антигенсвязывающие участки, описанные в данном документе, могут быть также получены в подходящих экспрессирующих системах *in vitro* с помощью химического синтеза или с помощью любого другого подходящего метода.

Слитые белки и иммуноконъюгаты.

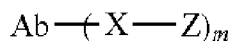
Антитела к GCC, описанные в данном документе, могут функционально присоединяться с помощью любого пригодного метода (например, химического связывания, генетического слияния, нековалентного связывания или другим способом) к одной или более неантительной молекулярной единице.

Могут быть получены слитые белки, в которых молекула антитела к GCC, как описано в данном документе, и неантительный фрагмент являются компонентами одной непрерывной полипептидной цепи. Неантительный фрагмент может находиться у N-конца, С-конца или внутри относительно фрагмента антитела. Например, некоторые варианты реализации изобретения могут быть получены с помощью вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулиновые последовательности, в пригодный экспрессирующий вектор, такой как вектор pET (например, pET-15b, Novagen), фаговый вектор (например, pCNATAB 5E, Pharmacia) или другой вектор, например pRIT2T-белок А слитый вектор, Pharmacia). Полученный конструктор может экспрессироваться для получения цепей антитела, которые содержат неантительный фрагмент (например, гистидиновая метка, Е-метка или связывающий домен белка А IgG). Слитые белки могут быть выделены или извлечены с использованием пригодных методик, таких как хроматография с использованием подходящих матриц аффинности (см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., eds., Vol. 2, Suppl. 26, p. 16.4.1-16.7.8(1991))).

Изобретение предусматривает молекулу антител к GCC, которые направлены на и в вариантах реализации изобретения интернализованы в клетки. Они способны доставлять терапевтические вещества или обнаруживаемые вещества в клетки или к ним, экспрессирующие GCC, но не к клеткам или в клетки, в которых мишень не экспрессируется. Таким образом, изобретение также предусматривает анти-GCC иммуноконъюгаты, содержащие молекулу антитела к GCC, как описано в данном документе, которая конъюгирована с терапевтическим веществом или обнаруживаемым веществом. В вариантах реализации изобретения аффинность GCC анти-GCC иммуноконъюгата составляет по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 80, 90 или 95% от аффинности неконъюгированного антитела. Это можно определить, используя GCC поверхности клеток или выделенную GCC. В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC, например иммуноконъюгат, имеет LD₅₀, как определено в анализе, описанном в данном документе, составляющее меньше чем 1000, 500, 250, 100 или 50 пМ.

Молекула антитела к GCC может модифицироваться, чтобы действовать как иммуноконъюгат, с использованием методик, известных из уровня техники. См., например, Vitetta Immunol. Toda, 14:252 (1993). См. также патент США № 5194594. Приготовление радиомеченых антител также можно легко осуществить, используя методики, которые известны из уровня техники, См., например, Junghans et al., в Cancer Chemotherapy and Biotherapy, 655-686 (2nd edition, Chaffer and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). См. также патенты США № 4681581, 4735210, 5101827, 5102990 (U.S. Re. Pat. No. 35,500), 5648471 и 5697902.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела и неантителный фрагмент соединяются с помощью линкера. В таких вариантах реализации изобретения иммуноконъюгат представлен формулой (I)



где Ab представляет собой молекулу антитела к GCC, описанную в данном документе;

X представляет собой, который соединяет Ab и Z, например, остаток линкера, описанного в данном документе, после ковалентного связывания с одним или обеими Ab и Z;

Z представляет собой терапевтическое вещество или метку;

m варьирует от около 1 до около 15.

Переменная m представляет собой количество фрагментов -X-Z на молекулу антитела в иммуноконъюгате формулы (I). В разных вариантах реализации изобретения m варьирует от 1 до 15, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах реализации изобретения m варьирует от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах реализации изобретения m представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В композициях, содержащих множество иммуноконъюгатов формулы (I), m представляет собой среднее количество фрагментов -X-Z на Ab, также именуемое как среднее содержание лекарственного вещества. Среднее содержание лекарственного вещества может варьировать от 1 до около 15 фрагментов -X-Z на Ab. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда m представляет собой среднее содержание лекарственного вещества, m составляет около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7 или около 8. В примерных вариантах реализации изобретения m составляет от около 2 до около 8. В одном варианте реализации изобретения m составляет около 8. В другом варианте реализации изобретения m составляет около 4. В другом варианте реализации изобретения m составляет около 2.

Среднее количество фрагментов -X-Z на Ab может быть охарактеризовано с помощью обычных средств, таких как масс-спектропия, анализ ELISA и HPLC. Количественное распределение иммуноконъюгатов относительно m также можно определить. В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенных иммуноконъюгатов, когда m имеет определенное значение, в отличие от иммуноконъюгатов с другими содержаниями лекарственного средства, может достигаться с помощью средств, таких как обратнотазовая HPLC или электрофорез.

Иммуноконъюгаты формулы (I) могут существовать в виде смесей, в которых каждый компонент смеси имеет отличное значение m. Например, иммуноконъюгат формулы (I) может существовать в виде смеси двух отдельных иммуноконъюгатных компонентов: одного иммуноконъюгатного компонента, у которого m составляет 7, и другого иммуноконъюгатного компонента, у которого m составляет 8.

В одном варианте реализации изобретения иммуноконъюгат формулы (I) существует в виде смеси трех отдельных иммуноконъюгатов, у которых m составляет 1, 2 и 3 соответственно; 3, 4 и 5 соответственно; 5, 6 и 7 соответственно; 7, 8 и 9 соответственно; 9, 10 и 11 соответственно; 11, 12 и 13 соответственно или 13, 14 и 15 соответственно.

Из уровня техники известно множество пригодных линкеров (например, гетеробифункциональных реагентов для соединения молекулы антитела с терапевтическим веществом или меткой) и способов получения иммуноконъюгатов. (См., например, Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)). Линкер может быть расщепляемым, например, в физиологических условиях, например во внутриклеточных условиях, таким как расщепление линкера, высвобождающее лекарственное средство (т.е., терапевтическое вещество или метку) во внутриклеточную среду. В других вариантах реализации изобретения линкер не является расщепляемым, а лекарственное средство высвобождается, например, путем деградации антитела.

Линкер может связываться с химически реактивной группой на фрагменте антитела, например со свободной амино, имино, гидроксильной, тиольной или карбоксильной группой (например, с N- или C-концами, с эпсилон-аминогруппой на одном или более лизиновых остатках, свободной карбоксильной группой на одном или более остатков глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты или с сульфгидрильной группой на одном или более цистеиновых остатках). Сайт, к которому присоединяется линкер, может быть природным остатком в аминокислотной последовательности антителного фрагмента или он может вводиться в антителный фрагмент, например, с помощью технологии рекомбинантных ДНК (например, путем введения цистеина или протеазно расщепляемого сайта в аминокислотную последовательность) или с помощью белковой биохимии (например, восстановлением, регулированием pH или протеолизом).

Одним из наиболее часто используемых неспецифических методов ковалентного присоединения является карбодиимидная реакция для присоединения карбоксигруппы (или аминогруппы) соединения к аминогруппам (или карбоксигруппам) молекулы антитела. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидоэстеры, могут быть использованы для соединения аминогруппы соединения с аминогруппами молекулы антитела. Также пригодной для присоединения лекарственного средства (т.е. терапевтического вещества или метки) к молекулам антител является реакция основания Шиффа. Этот метод включает периодатное окисление лекарственного средства, которое содержит гликоль или гидро-

ксигруппы, тем самым образуя альдегид, который затем реагирует с молекулой антитела. Присоединение происходит через образование основания Шиффа с аминогруппами молекулы антитела. Изотиоцианаты также могут быть использованы в качестве соединительных агентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к молекуле антитела. Другие методики известны из уровня техники специалисту в данной области техники и находятся в сфере рассмотрения согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения промежуточное соединение, которое является предшественником линкера (X), реагирует с лекарственным средством (Z) в приемлемых условиях. В некоторых вариантах реализации изобретения используются реактивные группы на лекарственном средстве и/или промежуточном соединении. Продукт реакции между лекарственным средством (т.е. терапевтическим веществом или меткой) и промежуточным соединением или дериватизированным лекарственным средством, затем реагирует с молекулой антитела в приемлемых условиях.

Иммуноконъюгаты можно очистить от реагирующих веществ путем использования методологий, хорошо известных специалистам в данной области техники, например колоночной хроматографией (например, аффинной хроматографией, ионообменной хроматографией, гель-хроматографией, хроматографией с гидрофобным взаимодействием), диализом, диалфильтрацией или преципитацией. Иммуноконъюгаты можно оценить путем использования методологий, хорошо известных специалистам в данной области техники, например, SDS-PAGE, масс-спектроскопией или методом капиллярного электрофореза.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер расщепляется с помощью расщепляющего вещества, которое присутствует во внутриклеточной среде (например, в лизосомах или эндосомах, или ямках). Линкером может быть, например, пептидный линкер, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазным ферментом, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу, но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах реализации изобретения пептидный линкер в длину составляет по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие вещества могут включать катепсины В и D и плазмин, все они известны для гидролиза производных дипептидных лекарственных средств, приводящего к высвобождению активного лекарственного средства (т.е. терапевтического вещества или метки) внутри клеток-мишеней (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics*, 83:67-123). Более типичными являются пептидные линкеры, которые расщепляются ферментами, которые присутствуют в GCC-экспрессирующих клетках. Например, может быть использован пептидный линкер, который расщепляется тилозависимой протеазой катепсином-В, который в высокой степени экспрессируется в раковых тканях (например, линкер Phe-Leu или линкер Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 319)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в патенте США № 6214345, включенном в данный документ путем ссылки во всей полноте и для всех целей. В отдельном варианте реализации изобретения пептидным линкером, расщепляемым внутриклеточной протеазой, является линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, патент США № 6214345, который описывает синтез доксорубина с линкером val-cit). Одно преимущество использования внутриклеточного протеолитического высвобождения лекарственного средства (т.е. терапевтического вещества или метки) состоит в том, что лекарственное средство, как правило, растворяется при конъюгации, и стабильность конъюгатов в сыроворотке, как правило, выше.

В других вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер является pH-чувствительным, т.е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Обычно pH-чувствительный линкер является гидролизуемым в кислой среде. Например, можно использовать кислотно-лабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитамид, ортоэстер, ацеталь, кеталь или подобные). (См., например, патент США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics*, 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, такого как в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0 (средний pH лизосомы). В некоторых вариантах реализации изобретения гидролизуемым линкером является тиоэфирный линкер (такой как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому веществу через ацилгидразонную связь (см., например, патент США № 5622929).

В еще других вариантах реализации изобретения линкер расщепляется в условиях восстановления (например, дисульфидный линкер). Множество дисульфидных линкеров известно из уровня техники, включая, например, те, которые могут быть получены с использованием SATA (N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)-толуол)-, SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., *In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4 880 935).

В еще других специфических вариантах реализации изобретения линкером является малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg. Med. Chem.* 3(10):1299-1304) или аналог 3'-N-амида (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

В еще других вариантах реализации изобретения линкерное соединение не расщепляется, а лекарственное средство (т.е. терапевтическое вещество или метка) высвобождается путем деградации антитела. (См., например патентную публикацию США № 20050238649, включенную путем ссылки в данный документ во всей своей полноте и для всех целей).

Как правило, линкер, по существу, не является чувствительным к внеклеточной среде. В контексте данного изобретения "по существу, не является чувствительным к внеклеточной среде" в контексте линкера означает, что не более чем около 20%, обычно не более чем около 15%, наиболее часто не более чем около 10% и еще более часто не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров в образце иммуноконъюгата расщепляется, когда иммуноконъюгат присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме). Является ли линкер нечувствительным к внешклеточной среде можно определить, например, путем инкубирования иммуноконъюгата с плазмой в течение предварительно определенного времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч) и последующего количественного определения свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме.

В других не взаимоисключающих вариантах линкер способствует клеточной интернализации. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер способствует клеточной интернализации, когда конъюгирован с терапевтическим веществом или меткой (Z). В еще других вариантах реализации изобретения линкер способствует клеточной интернализации при конъюгировании с фрагментом Z и молекулой антитела к GCC.

Множество примерных линкеров, которые могут быть использованы с композициями согласно настоящему изобретению, и способы описаны в WO 2004/010957, патентной публикации США № 20060074008, патентной публикации США № 20050238649 и патентной публикации США № 20060024317 (каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки во всей их полноте и для всех целей).

Примеры линкеров, которые могут быть использованы для присоединения молекулы антитела к терапевтическому веществу или метке, включают, например:

малеимидапроил (mc); малеимидапроил-п-аминобензилкарбамат;
малеимидапроил-пептид-аминобензилкарбаматные линкеры, например малеимидапроил-L-фенилаланин-L-лизин-п-аминобензилкарбамат и малеимидапроил-L-валин-L-цитруллин-п-аминобензилкарбамат (vc);

N-сукцинимидила 3-(2-пиридилдитио)пропионат (также известный как N-сукцинимидила 4-(2-пиридилдитио)пентаноат или SPP);

4-сукцинимидил-оксикарбонил-2-метил-2-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT);

N-сукцинимидила 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP);

N-сукцинимидила 4-(2-пиридилдитио)бутират (SPDB); 2-иминотиолан;

S-ацетилантарный ангидрид; дисульфидбензилкарбамат; карбонат; гидразоновые линкеры;

N-(α -малеимидацетокси)сукцинимидный сложный эфир;

N-[4-(п-азидосалициламидо)бутил]-3'-(2'-пиридилдитио)пропионамид (AMAS);

N-[β -малеимидопропилокси]сукцинимидный сложный эфир (BMPS);

[N- ϵ -малеимидапроилокси]сукцинимидный сложный эфир (EMCS);

N-[γ -малеимидобутилокси]сукцинимидный сложный эфир (GMBS);

сукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбокси-[6-амидокапроат] (LC-SMCC);

сукцинимидила 6-(3-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат (LC-SPDP);

м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир (MBS);

N-сукцинимидил[4-йодоацетил]аминобензоат (SIAB);

сукцинимидила 4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC);

N-сукцинимидила 3-[2-пиридилдитио]пропионамид (SPDP);

[N- ϵ -малеимидапроилокси]сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-EMCS);

N-[γ -малеимидобутилокси]сульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-GMBS);

4-сульфосукцинимидил-6-метил- α -(2-пиридилдитио)толуамидо]гексаноат (сульфо-LC-SMPT);

сульфосукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио]пропионамидо)гексаноат (сульфо-LC-SPDP);

м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидный сложный эфир (сульфо-MBS);

N-сульфосукцинимидил[4-йодоацетил]аминобензоат (сульфо-SIAB);

сульфосукцинимидила 4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC);

сульфосукцинимидила 4-[п-алеимидофенил]бутират (сульфо-SMPB);

этиленгликоль-бис-(янтарной кислоты N-гидроксисукцинимидный сложный эфир) (EGS);

дисукцинимидила тартрат (DST);

1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (DOTA);

диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) и тиомочевинные линкеры.

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическое вещество является цитостатическим веществом. Примеры включают, без ограничения, антиметаболиты (например, азатиоприн, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин, пентостатин, кладрибин, 5-фторурацил (5FU), флоксурин

(FUDR), цитозина арабинозид (цитарабин), метотрексат, триметоприм, пириметамин, пеметрексед); алкилирующие вещества (например, циклофосфамид, мехлорэтамин, урамустин, мелфалан, хлорамбуцил, тиотепа/хлорамбуцил, ифосфамид, кармустин, ломустин, стрептозоцин, бусульфан, дибромоманитол, цисплатин, карбоплатин, недаплатин, оксалиплатин, сатраплатин, триплатина тетранитрат, прокарбазин, альтретамин, дакарбазин, митозоломид, темозоломид); антрациклины (например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, валрубицин); антибиотики (например, дактиномицин, блеомицин, митрамицин, антрамицин, стрептозотоцин, грамицидин D, митомицины (например, митомицин C), дуокармицины (например, CC-1065), калихемицины); антимитотические агенты (включая, например, майтанзиноиды, ауристатины, доластатины, криптофицины, винкаалкалоиды (например, винкристин, винбластин, виндезин, винорелбин), таксаны (например, паклитаксел, доцетаксел или новый таксан (см., например, международную патентную публикацию № WO 01/38318, опубликованную 31 мая 2001 г.)) и колхицины; ингибиторы топоизомераз (например, иринотекан, топотекан, амасарцин, этопозид, тенипозид, митоксантрон); и ингибиторы протеасом (например, пептидилборные кислоты).

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическим веществом является майтанзиноид. Майтанзиноидные соединения и способы их конъюгации с антителами описаны, например, у Chari et al., *Cancer Res.*, 52:127-131 (1992); Widdison et al., *J. Med. Chem.* 49:4392-4408 (2006) и патентах США № 5208020 и 6333410. Примеры майтанзиноидов включают аналоги майтанзина, имеющие модифицированное ароматическое кольцо (например, C-19-дехлоро, C-20-деметокси, C-20-ацилокси), и те, которые имеют модификации в других положениях (например, C-9-CH, C-14-алкоксиметил, C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил, C-15-гидрокси/ацилокси, C-15-метокси, C-18-N-диметил, 4,5-дезоксид). В некоторых вариантах реализации изобретения майтанзиноид является N.sup.2'-деацетил-N.sup.2'-(4-меркапто-1-оксопентил)майтанзином (DM3), N.sup.2'-деацетил-N.sup.2'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзином (DM1) или N.sup.2'-деацетил-N.sup.2'-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтанзином (DM4).

Майтанзиноидные соединения, которые содержат сульфгидрильную группу, могут соединяться с антителами с использованием гетеробифункционального линкера, который присоединяется к майтанзиноидному соединению путем образования тиоэфирной или дисульфидной связи. В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер соединяется с аминогруппой на антителе (например, концевой аминогруппой или эpsilon-аминогруппой лизинового остатка). В некоторых вариантах реализации изобретения гетеробифункциональным линкером, который используют для присоединения майтанзиноидных соединений к антителу, является N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (также известный как N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат или SPP), 4-сукцинимидилоксикарбонил-2-метил-2-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT), N-сукцинимидил 4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP); N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутират (SPDB), 2-иминотиолан или S-ацетилилтантарный ангидрид.

В некоторых других вариантах реализации изобретения терапевтическим веществом является доластин. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическим веществом является ауристин, такой как ауристин E (также известный в уровне техники как производное доластатина-10), или его производные. Ауристиновые соединения и способы их конъюгирования с антителами описаны, например, у Doronina et al., *Nature Biotech.*, 21:778-784 (2003); Hamblett et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:7063-7070 (2004); Carter and Senter, *Cancer J.*, 14:154-169 (2008); патентах США № 7498298, 7091186, 6884869; 6323315; 6239104; 6034065; 5780588; 5665860; 5663149; 5635483; 5599902; 5554725; 5530097; 5521284; 5504191; 5410024; 5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444 и 4486414; патентных публикациях США № 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649 и 20030083236 и международных патентных публикациях № WO 04/010957 и WO 02/088172, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

Ауристином может быть, например, сложный эфир, образованный между ауристином E и кетокислотой. Например, ауристин E может реагировать с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой до образования АЕВ и АЕВВ, соответственно. Другие типичные ауристатины включают ауристинфенилаланилфенилендиамин (AFP), монометилауристин E (MMAE) и монометилауристин F (MMAF).

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическим веществом является радионуклид. Примеры радионуклидов, полезных в качестве токсинов в радиационной терапии, включают: ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁹Pd, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Pb и ²¹²В. Другие радионуклиды, которые могут быть использованы специалистами в данной области техники, включают ³²P и ³³P, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁵Rh, ¹¹⁹Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ¹⁹³Mp, ¹⁹⁷Hg, все бета-негативные и/или Оже излучатели. Некоторые предпочтительные радионуклиды включают ⁹⁰Y, ¹³¹I, ²¹¹At и ²¹²Pb, ²¹²Bi.

Специалист в данной области техники сможет получить конъюгат молекулы антитела к GCC с радионуклидом, используя хорошо известные методики. Например, Magerstadt, M. (1991), *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla. и Barchel, S.W. and Rhodes, B.H., (1983), *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y., каждый из которых включен в данное описание путем ссылки, касается соединения различных терапевтических и диагностических радионуклидов с аминокислотами антител. Такие реакции можно применять для получения конъюгатов радионуклидов с молеку-

лами антител к GCC согласно изобретению с приемлемым хелатирующим веществом и/или линкером.

Последовательности антител к GCC.

Кроличьи моноклональные антитела к GCC могут быть получены несколькими способами, как более детально обсуждено в примерах. Кратко, кроличьи моноклональные антитела MIL-44-148-2 и MIL-44-67-4 были получены с помощью традиционной технологии иммунизации кроликов. Подлинные кроличьи гибридомы были получены от Eritomics (Burlingame, CA) путем слияния выделенных В-клеток из иммунизированных кролей с линией сливающихся клеток Eritomic (см. патенты США № 7402409; 7429487; 7462697; 7575896; 7732168 и 8062867). Специфичность антител против GCC была проверена путем ELISA и проточной цитометрии (FCM).

В табл. 1 приведены кроличьи моноклональные антитела к GCC согласно изобретению, созданные с помощью hGCC (ECD)/mIgG2a FcR-mutII иммуногена.

Последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепей, определенные в табл. 2, представляют собой сумму SEQ ID NO переменных областей нескольких антител. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующие переменным областям каждой тяжелой и легкой цепи кроличьего антитела к GCC, показаны в табл. 3 и 4 соответственно.

Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты для каждой CDR тяжелой и легкой цепей антитела к GCC показаны в табл. 5 и 6 соответственно.

Секвенирование CDRs позволило определить избыток остатков, которые могли бы служить в качестве токсинных конъюгационных сайтов. Например, неспаренный свободный цистеин в антигенсвязывающей области может быть сайтом для конъюгации ауристинина, а лизин может быть сайтом для конъюгации майтанзина. Токсинная конъюгация с аминокислотой CDR вызовут обеспокоенность относительно изменения аффинности связывания антитела с GCC. Таким образом, в вариантах реализации изобретения CDR не имеют аминокислот, которые могут конъюгировать с терапевтическим веществом.

Таблица 1

SEQ ID NO тяжелых и легких цепей анти-GCC кроличьих mAb

mAb	цепь IgG	нуклеинокислотная SEQ ID №	аминокислотная SEQ ID №
MIL-44-148-2 H2	тяжелая	4	42
MIL-44-148-2 L5	легкая	5	43
MIL-44-67-4 H2	тяжелая	6	44
MIL-44-67-4 L4	легкая	7	45

Нуклеиновая кислота, соответствующая MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 4):

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGCCAGTGT
CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGAGGCCCTTCAAGCCAACGGATACCTGACACT
CACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAATGAAGTGGGTCCGCCA
GACTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACAT
ACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACAGAAACACGAGGAGAAC
ACGGTGACTCTGAAATGACAGTCTGACAGCCGCGACACGGCCACTTATTTCTGT
GCCAGAGAGGATAGTATGGGGTATTATTTTACTGTGGGGCCAGGCACCTGGTCTC
ACCATCTCTCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGTGCGGGGACACACCC
AGCTCCACGGTGACCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGAGCCAGTGAC
CGTGACCTGGAACCTCGGGACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCG
GCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCC
AGCCCGTCACTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGAGACAAGACC
GTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCACCCCTGAACCTCTGGGGGG
ACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCACGCAC
CCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCGAGGTGACGT
TCACATGGTACATAAACAAGCAGCAGGTGCGCACCCGCGCGCCGCTACGGGAG
CAGCAGTTCAACAGCAGATCCGCGTGGTCAACACCTCCCCATCGCGACCCAGGA
CTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCC
CCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTAC
ACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGGTCAACCTGACCTGCAT
GATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAAGGGAAGG
CAGAGGACAACATAAGACACGCGCGCGTGTGGACAGCGACGGCTCTACTTC
CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTCAC
CTGTCCGTGATGCAGAGGCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCG
CTCTCCGGTAAATGA

Аминокислота MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 42):

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQT
PGKGLEWIAIITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDS
MGYYFDLWGPGLVTISSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTW
NSGTLTNGVTRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCS
KPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRT
ARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEP
KVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGGSYF
LYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Нуклеиновая кислота, соответствующая MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 5):

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGT
GCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGA
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAAGTGGTTAGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCT
GGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTGACGAGACTTA
TACTAATAATCATCTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA
GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCA
ACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTC
ACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAAACACC
GCAGAAATCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCAC
ACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAGGGTGACCCAGGGCACGACCTCAG
TCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

Аминокислота MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 43):

MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISNWLAW
YQQKPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADEATYYCQQTYTNN
HLDNFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVD
GTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSLTLTSTQYNHKEYTCRVTQGTTSVVQSFNRGD
C

Нуклеиновая кислота, соответствующая MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 6):

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT
CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT
CACCTGCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACTATGCAATATCCTGGGTCCGCCA
GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAAGTATAT
ACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACG
GTGGATCTGGAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTGTGCC
AGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCCTGGTCACC
GTCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCC
 AGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGAC
 CGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCG
 GCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCC
 AGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGACAAAGACC
 GTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCCACCCCTGAACTCCTGGGGGG
 ACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCAC
 CCCCAGGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCGAGGTGCAGT
 TCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGCCGCGCTACGGGAG
 CAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAGCACCTCCCCATCGCGCACCAAGGA
 CTGGGTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGGCC
 CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTAC
 ACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCGTCAGCCTGACCTGCAT
 GATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGG
 CAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTC
 CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTAC
 CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGCAACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCG
 CTCTCCGGGTAAATGA

Аминокислота MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 44):

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAP
 GKLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVLEITSPTTEDTATYFCAREDSATY
 SPNLWPGTLTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSG
 TLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT
 CPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVRTAR
 PPLREQQFNSTIRVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKV
 YTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTTAVLSDSGSYFLY
 SKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Нуклеиновая кислота, соответствующая MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 7):

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGT
 GCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGA
 GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCCTG
 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTC
 TGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTC
 TCACCATCAGCGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTT
 ATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCACA
 GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCCACAGCTGCTGATCAGGTGGCA
 ACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTCCCGATGTCACCGTC
 ACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAACAGTAAAACACC
 GCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCAC
 ACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAG
 TCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

Аминокислота MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 45):

MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSINTYLAWY
 QQKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISGVECADEATYYCQQGYSYN
 NLDRAFGGGTEVVVTGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVD
 GTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTSSVVQSFNRGD
 C

Таблица 2

SEQ ID NO переменных областей анти-GCC кроличьих mAb

mAb	цепь IgG	нуклеинокислотная SEQ ID №	аминокислотная SEQ ID №
MIL-44-148-2 H2	Тяжелая	10	11
MIL-44-148-2 L5	Легкая	12	13
MIL-44-67-4 H2	Тяжелая	14	15
MIL-44-67-4 L4	Легкая	16	17

Таблица 3

Аминокислотные последовательности переменных областей mAb
анти-GCC кроличьих mAb

mAb	цепь IgG	SEQ ID №	аминокислотная последовательность
MIL-44-148-2	тяжелая	11	QSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQTPGKGLEWIA IITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR EDSMGYYPDLWGPGTLVTISS
MIL-44-148-2	легкая	13	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQISNWLAWYQQ KPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADEAATYYC QQTYTNNHLDNGFGGGTEVVVK
MIL-44-67-4	тяжелая	15	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAPG KGLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVDLTSPTTEDTATYF CAR EDSATYSPNLWGPGTLVTVSS
MIL-44-67-4	легкая	17	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQINTYLAWYQQ KPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFRGSGSGTEFTLTISGVECADEAATYYC QQGYSYNNLDRAFGGGTEVVVT

Таблица 4

Последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующие
вариабельным областям mAb анти-GCC кроличьих mAb

mAb	цепь IgG	SEQ ID №	последовательность нуклеиновой кислоты
MIL-44-148-2	тяжелая	10	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGAT ACCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTC ATAGAATGAACTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCGAGCTG GGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGAACAC GGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCAC TTATTTCTGTGCCAGAGAGGATAGTATGGGTATTATTTTGACTTG TGGGGCCAGGCACCCTGGTCACTCCTCA
MIL-44-148-2	легкая	12	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGG GAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA ACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCCAAGC CCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGTCTCATCGCG GTTTCAAGGAGTGGATCTGGGACACAGTTCCTCTCACCATCAGT GGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGCAGCTT ATACTAATAATCATCTTGATAATGGTTTCGGCGAGGGACCGAGGT GGTGGTCAAA
MIL-44-67-4	тяжелая	14	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACA CCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAAT ATGCAATATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT TCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAGTATATACTACGCGAGCTG GGCGAAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGT GGATCTGGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTA TTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTGG GGCCAGGCACCCTGGTCACTCCTCA
MIL-44-67-4	легкая	16	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGG GAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACA CCTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCGTCCCAAGC TCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGTCTCATCGCG GTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCCTCTCACCATCAG CGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGT TATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCTTCGGCGAGGGACCGAGG TGGTGGTCACA

Таблица 5

Аминокислотные последовательности CDR анти-GCC кроличьих mAb

mAb	IgG	SEQ ID №	аминокислотная последовательность
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	21	SHRMN
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	22	IITHNSITYYASWAKS
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	23	EDSMGYFFDL
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	27	QASQISNWLA
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	28	RASTLAS
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	29	QQTYTNNHLDNG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	33	NYAIS
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	34	YISYGKSIYYASWAKG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	35	EDSATYSPNL
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	39	QASQSINTYLA
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	40	RASTLAS
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	41	QQGYSYNNLDRA

Таблица 6

Последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующие
CDR анти-GCC кроличьих mAb

mAb	IgG	SEQ ID №	последовательность нуклеиновой кислоты
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	18	AGTCATAGAATGAAC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	19	ATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAA GC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	20	GAGGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTG
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	24	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGGTTAGCC
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	25	AGGGCATCCACTCTGGCATCT
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	26	CAGCAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGT
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	30	AACTATGCAATATCC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	31	TATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAG GC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	32	AGTCCTAACTTG
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	36	CAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCC
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	37	AGGGCATCCACTCTGGCATCT
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	38	CAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCT

Терапевтическое применение.

Молекулы кроличьих антител к GCC, описанные в данном документе, имеют *in vitro* и *in vivo* полезность. Например, эти молекулы антител могут быть введены клеткам в культуре, например *in vitro* или *ex vivo* или быть введены субъекту, например, *in vivo* для лечения и/или предотвращения ряда заболеваний. В некоторых вариантах терапевтических реализаций согласно изобретению молекулы кроличьих антител к GCC согласно изобретению гуманизируют с использованием одного или более методов, описанных в данном документе выше.

Молекулы антител, иммуноконъюгаты и слитые белки, описанные в данном документе, могут быть применены для модулирования активности или функции белка GCC, таких как связывание лиганда (например, связывание ST или гуанилина), передача GCC-опосредованного сигнала, сохранение кишечной жидкости, электролитный гомеостаз, внутриклеточное высвобождение кальция (приток кальция), клеточная дифференцировка, клеточная пролиферация или клеточная активация.

В одном аспекте изобретение описывает способ лизиса клеток, ингибирование или модулирование роста или препятствование метаболизму клеток, экспрессирующих GCC. В одном варианте реализации изобретения изобретение предусматривает способ ингибирования GCC-опосредованного клеточного сигналинга или способ лизиса клетки. Способ может быть использован с любыми клетками или тканями, которые экспрессируют GCC, такими как раковые клетки. Примеры раковых клеток, которые экспрессируют GCC, включают клетки рака желудочно-кишечного происхождения (например, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкой кишки или рак пищевода), рака поджелудочной железы, рака легких (например, плоскоклеточная карцинома, аденосквамозная карцинома, аденокарцинома), саркомы мягких

тканей, таких как лейосаркома или рабдомиосаркома, желудочно-кишечные или бронхолегочные нейро-эндокринные опухоли или нейроэктодермальные опухоли или любые их метастатические поражения, но не ограничиваются ими. Неограничивающие примеры GСС-экспрессирующих клеток включают клетки Т84 толстокишечной аденокарциномы человека, свежие или замороженные клетки толстокишечной опухоли и клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую GСС или ее часть.

Способы согласно изобретению включают этапы контактирования клетки с молекулой анти-GСС антитела или его иммуноконъюгатом, как описано в данном документе, в эффективном количестве, т.е. количества, достаточного для ингибирования GСС-опосредованного клеточного сигналинга, или количества, достаточного для лизиса клетки. Способ может быть использован на клетках в культуре, например, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* или *in situ*. Например, клетки, которые экспрессируют GСС (например, клетки, собранные с помощью биопсии опухоли или метастатического повреждения; клетки из установленной раковой клеточной линии; или рекомбинантные клетки), могут культивироваться *in vitro* в культуральной среде, а этап контактирования может осуществляться путем добавления молекулы антитела к GСС или иммуноконъюгата в культуральную среду. Способ клеточного лизиса включает применение "голой" молекулы антитела к GСС или иммуноконъюгата, содержащего молекулу антитела к GСС и цитотоксическое вещество. Способ приводит к лизису клеток, экспрессирующих GСС, включая, в частности, опухолевые клетки, экспрессирующие GСС (например, толстокишечные опухолевые клетки).

Кроличьи моноклональные антитела согласно изобретению или их гуманизированные варианты могут быть исследованы по поводу клеточной интернализации после связывания GСС с использованием методов иммунофлуоресцентной микроскопии, хорошо известных из уровня техники. Такие антитела, которые подтвердили интернализацию, могут быть полезными, когда объединяются с цитотоксическим фрагментом для терапевтических целей или с фрагментом для клеточной визуализации. Антитела, которые не интернализируют, могут, однако, быть использованы для диагностических целей или в терапевтических способах, использующих "голое" антитело, предназначенное вызывать антителозависимый клеточно-опосредованный цитотоксический ответ, или, возможно, в способах доставки липосом.

Молекулы антител к GСС согласно настоящему изобретению связывают внеклеточные домены GСС или ее части в клетках, экспрессирующих антиген. В результате при применении способов согласно настоящему изобретению для лизиса, угнетения или выявления раковых клеток антитела или антиген-связывающие фрагменты связывают все такие клетки, а не только клетки, которые зафиксированы, или клетки, чьи внутриклеточные антигенные домены иным способом открыты для внеклеточной окружающей среды. Следовательно, связывание антител или антигенсвязывающих фрагментов концентрируется в областях, где находятся клетки, экспрессирующие GСС, независимо от того, зафиксированы эти клетки или нет, жизнеспособные они или некротические. Дополнительно или альтернативно, молекулы антител к GСС связываются с или интернализируются с GСС на связывающих клетках, экспрессирующих антиген.

Способ также можно проводить на клетках, присутствующих у субъекта, как часть протокола *in vivo*. В одном варианте реализации изобретения субъект является человеком. Альтернативно, субъект может быть млекопитающим, экспрессирующим антиген GСС, с которым молекула антитела к GСС, описанного в данном документе, перекрестно реагирует. Молекулу антитела к GСС или его иммуноконъюгат можно вводить человеку в терапевтических целях. Молекулу антитела к GСС или иммуноконъюгат также можно вводить нечеловеческому млекопитающему, экспрессирующему GСС-подобный антиген, с которым антитело перекрестно реагирует (например, примату, свинье или мышам), в ветеринарных целях или в качестве модельного животного болезни человека. Модельные животные могут быть пригодными для оценки терапевтической эффективности антител согласно изобретению (например, исследование дозирования или длительности курсов введения). Для вариантов реализации изобретения *in vivo* этап контактирования осуществляется у субъекта и включает введение молекулы антитела к GСС или его иммуноконъюгата субъекту в условиях, эффективных для возможности реализации изобретения связывания молекулы антитела с внеклеточным доменом GСС, экспрессированным на клетке, и лечения клетки.

В одном варианте реализации изобретения предусмотрен способ лечения рака путем введения молекулы антитела к GСС или иммуноконъюгата, включающий введение молекулы антитела к GСС и цитотоксического вещества пациенту, нуждающемуся в таком лечении. Способ может быть использован для лечения любого ракового нарушения, которое включает, по меньшей мере, несколько клеток, которые экспрессируют антиген GСС. Как использовано в данном документе, термин "рак" предназначен включать все типы раковых опухолей или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Термины "рак" и "опухоль" могут использоваться взаимозаменяемо (например, когда используются в контексте способов лечения, "лечение рака" и "лечение опухоли" имеют одинаковое значение).

В вариантах реализации изобретения лечение является достаточным для снижения или ингибирования роста опухоли у субъекта, снижения численности и размера метастатических поражений, снижения опухолевой нагрузки, снижения первичной опухолевой нагрузки, пролонгирования времени выживания или сохранения или улучшения качества жизни.

Примеры раковых нарушений включают солидные опухоли, опухоли мягких тканей и метастатические поражения, но не ограничиваются ими. Примеры солидных опухолей включают злокачественные опухоли, например саркомы, аденокарциномы и карциномы, разных систем органов, такие как те, что поражают толстую кишку. Аденокарциномы включают злокачественные опухоли, такие как немелкоклеточная карцинома легких. Метастатические поражения вышеупомянутых опухолей также могут подвергаться лечению или предотвращаться с применением способов и композиций согласно изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующая опухоль, подлежащая лечению, является первичным или метастатическим раком желудочно-кишечного происхождения, таким как рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкой кишки или рак пищевода. В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующий рак, подлежащий лечению, является первичным или метастатическим раком поджелудочной железы. В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующий рак, подлежащий лечению, является первичным или метастатическим раком легких, таким как плоскоклеточная карцинома, аденосквамозная карцинома или аденокарцинома. В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующий рак подлежащий лечению, является саркомой, такой как лейомиосаркома или рабдомиосаркома. В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующий рак, подлежащий лечению, является первичной или метастатической нейроэктодермальной опухолью, такой как афаэхромотоцитомой или параганглиомой. В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-экспрессирующий рак является первичной или метастатической бронхолегочной или бронхолегочной нейроэндокринной опухолью.

Способ может быть полезным при лечении релевантного нарушения на любой стадии или любого подкласса. Например, способ может быть использован для лечения ранней или поздней стадии рака толстой кишки или рака толстой кишки любой из стадий 0, I, IА, IВ, IС, IIА, IIВ, IIС и IV.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ лечения GCC-экспрессирующего рака (например, рака толстой и прямой кишки, рака желудка, рака тонкой кишки, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака легких, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, нейроэндокринной опухоли, нейроэктодермальной опухоли и так далее) включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, "голой" молекулы антитела к GCC, описанного в данном документе. В других вариантах реализации изобретения способ включает введение иммуноконъюгата, содержащего молекулу антитела к GCC, описанного в данном документе, цитотоксическое вещество, такое как майтанзиноид или ауристатин или их производные. Способы введения молекулы антител и иммуноконъюгатов описаны выше. Пригодные дозирования используемых молекул будут зависеть от возраста и веса субъекта и конкретного используемого соединения.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекулу антитела к GCC или иммуноконъюгат вводят в циклах лечения. "Цикл лечения" состоит из периода лечения, во время которого молекулу антитела к GCC или иммуноконъюгат вводят так, как описано выше, с последующим периодом отдыха, во время которого молекулу антитела к GCC или иммуноконъюгат не вводят. Цикл лечения можно повторять по мере необходимости до достижения желательного эффекта.

Антитела к GCC, описанные в данном документе (например, "голые" молекулы антител к GCC или иммуноконъюгаты, содержащие молекулу антитела к GCC и терапевтическое вещество), могут быть применены в комбинации с другими видами терапии. Например, комбинированная терапия может включать композицию согласно настоящему изобретению, скомбинированную с и/или совместно вводимую с одними или более дополнительными терапевтическими веществами, например одним или более противораковыми веществами, например цитотоксическими или цитостатическими веществами, гормональной терапией, вакцинами и/или другими иммунотерапиями. В других вариантах реализации изобретения антитела к GCC вводят в комбинации с другими лечебными, терапевтическими способами воздействия, включая хирургию, облучение, криохирургию и/или термотерапию. Такие комбинированные терапии могут выигрышно применять более низкие дозирования вводимых терапевтических веществ, тем самым избегая возможной токсичности или осложнений, связанных с разными монотерапиями.

Вводили "в комбинации" в контексте данного изобретения означает, что два (или более) разных лечения доставляли субъекту во время его болезни, например два или более лечения доставляли после диагностирования у субъекта заболевания и перед тем, как заболевание вылечили или устранили. В некоторых вариантах реализации изобретения доставка одного лечения все еще происходила, когда доставка другого начиналась, чтобы происходило перекрытие. Это иногда называется в данном документе "одновременной" или "конкурентной доставкой". В других вариантах реализации изобретения доставка одного лечения заканчивается перед началом другого лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения, в любом случае, лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе лечение является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается с меньшим вторым лечением или второе лечение снижает симптомы в большей степени, нежели наблюдалось бы, если бы второе лечение вводилось при отсутствии первого лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым лечением. В некоторых вариантах реализации изобретения доставка является такой, что снижение симптомов или других параметров, связанных с нарушением, является более высоким, нежели наблюдалось бы при одном лечении, доставляемом при отсутствии остальных. Эффект двух

лечений может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть такой, что эффект первого доставленного лечения все еще обнаруживается, когда доставляют второе лечение.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекулу антитела к GCC или его иммуноконъюгат используют в комбинации с химиотерапевтическим веществом. Неограничивающие примеры повреждающих ДНК химиотерапевтических веществ включают ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан, топотекан, кампотексин и их аналоги и метаболиты и доксорубин); ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, тенипозид и даунорубин); алкилирующие вещества (например, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, тиотепа, ифосфамид, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, декарбазин, метотрексат, митомицин C и циклофосфамид); интеркаляторы ДНК (например, цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин); интеркаляторы ДНК и генераторы свободных радикалов, такие как блеомицин; и нуклеозидные миметики (например, 5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин, флударабин, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и гидроксимочевина).

Химиотерапевтические вещества, которые срываю клеточную репликацию, включают паклитаксел, доцетаксел и родственные аналоги; винкристин, винбластин и родственные аналоги; талидомид, леналидомид и родственные аналоги (например, CC-5013 и CC-4047); ингибиторы протеин-тирозин киназы (например, иматиниба мезилат и гефитиниб); ингибиторы протеасом (например, бортезомид); ингибиторы NF-κB, включая ингибиторы киназы IκB; антитела, которые связывают белки, сверхэкспрессирующиеся в опухолях, и тем самым снижают клеточную репликацию (например, трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб и бевацизумаб); и другие ингибиторы белков или ферментов, известных как повышающиеся, сверхэкспрессирующиеся или активирующиеся в опухолях, ингибирование которых снижает клеточную репликацию.

Выбор терапевтического вещества(ств) или метода лечения, подлежащих комбинированию с молекулой антитела к GCC или иммуноконъюгатом согласно изобретению, будет зависеть от нарушения, подлежащего лечению. Дополнительное вещество(а) или метод лечения могут включать, например, стандартно применяемые терапии показаний, подлежащих лечению. Например, когда молекулу антитела к GCC или его иммуноконъюгат применяют для лечения рака толстой кишки, они могут быть применены в комбинации с, например, хирургией; радиационной терапией; 5-фторурацилом (5-FU), капецитабином, лековорином, иринотеканом, оксалиплатином, бевацизумабом, цетуксимабом, панитумом или их комбинациями (например, оксалиплатин/капецитабин (XELOX), 5-фторурацил/лековорин/оксалиплатин (FOLFOX), 5-фторурацил/лековорин/иринотекан (FOLFIRI), FOLFOX плюс бевацизумаб или FOLFIRI плюс бевацизумаб).

В другом аспекте изобретение описывает применение молекулы антитела к GCC или иммуноконъюгата, как описано в данном документе, в производстве медикамента. В варианте реализации изобретения медикамент предназначен для лечения рака, например желудочно-кишечного рака. В некоторых вариантах реализации изобретения медикамент содержит молекулу антитела к GCC, имеющую характерные особенности, описанные в табл. 1-6. В некоторых вариантах реализации изобретения медикамент содержит молекулу антител MIL-44-148-2 или MIL-44-67-4 или их гуманизированные варианты.

Мечение и обнаружение антител.

Молекулы антител к GCC, используемые в способах, описанных в данном документе, например, в обнаружении *in vitro* и *in vivo*, например способах диагностики, окрашивания или визуализации, можно прямо или опосредованно метить обнаруживаемым веществом для облегчения обнаружения связанного или несвязанного связывающего вещества. Пригодные обнаруживаемые вещества включают разные биологически активные ферменты, лиганды, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, хемилюминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, хромофорные материалы, электронноплотные материалы, парамагнитные (например, ЯМР-активные) материалы и радиоактивные материалы. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула антитела к GCC соединяется с радиоактивным ионом, например индием (^{111}In), йодом (^{131}I или ^{125}I), иттрием (^{90}Y), лютецием (^{177}Lu), актинием (^{225}Ac), висмутом (^{212}Bi или ^{213}Bi), серой (^{35}S), углеродом (^{14}C), тритием (^3H), родием (^{188}Rh), технецием ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), празеодимом или фосфором (^{32}P); или позитрон-излучающим радионуклидом, например углеродом-11 (^{11}C), калием-40 (^{40}K), азотом-13 (^{13}N), кислородом-15 (^{15}O), фтором-18 (^{18}F), галлием (^{68}Ga) и йодом-121 (^{121}I). Дополнительные радиоактивные вещества, которые могут конъюгироваться с антителами согласно изобретению для применения в способах диагностики/обнаружения *in vitro* или *in vivo*, описаны ниже.

Примеры меток включают флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, дансил, умбеллиферон, люцифераза, например, люцифераза светлячков и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин и 2,3-дигидрофалазиндионы. Другие примеры меток включают пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу, галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозооксидазу, галактозооксидазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантиноксидаза, соединенные с ферментом, который использует пероксид водорода для окисления исходного красителя, такого как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки,

бактериофаговые метки, стабильные свободные радикалы и подобное.

Меченные флуорофором или хромофором молекулы антител можно приготовить из стандартных частей, известных из уровня техники. Поскольку антитела и другие белки абсорбируют свет с длиной волны вплоть до около 310 нм, флуоресцентные фрагменты следует выбирать из тех, которые поглощают свет с длиной волны выше 310 нм и предпочтительно выше 400 нм. Множество пригодных флуоресцентных соединений и хромофоров описано Stryer Science, 162:526 (1968) и Brand, L. et al., Annual Review of Biochemistry, 41:843-868 (1972). Антитела можно метить флуоресцентными хромофорными группами с помощью обычных процедур, таких как те, которые раскрыты в патентах США № 3940475, 4289747 и 4376110.

Одну группу люминофоров, имеющих ряд предпочтительных свойств, описанных выше, представляют ксантеновые красители, которые включают флуоресцеины, полученные из 3,6-дигидрокси-9-фенилксантгидрола, и ресамины и родамины, полученные из 3,6-диамино-9-фенилксантгидрола, и лиссамин родамин В. Родаминовые и флуоресцеминовые производные 9-о-карбоксифенилксантгидрола имеют 9-о-карбоксифенильную группу. Флуоресцеиновые соединения, имеющие реактивные присоединенные группы, такие как amino и изоцианатные группы, такие как флуоресцеина изоцианат и флуоресцамин, легко доступны. Другую группу флуоресцентных соединений представляют нафтиламины, имеющие аминогруппу в α или β положении.

Меченые молекулы антител можно применять, например, диагностически и/или экспериментально в ряде ситуаций, включая применение для (i) выделения предварительно определенного антигена с помощью стандартных методов, таких как аффинная хроматография или иммунопреципитация; (ii) обнаружения предварительно определенного антигена (например, в клеточном лизате или клеточном супернатанте) с целью оценки относительного содержания и характера экспрессии белка; (iii) мониторинга уровней белка в тканях в качестве части клинического исследования, например, для определения эффективности заданной схемы лечения.

Диагностики *in vitro*.

Антитела к GCC и иммуноконъюгаты, описанные в данном документе, могут быть применены для обнаружения наличия или отсутствия GCC, например для обнаружения наличия или отсутствия GCC в биологическом образце *ex vivo*, полученном от субъекта (т.е. обнаружение *in vitro*), или для обнаружения наличия или распространения или отсутствия GCC у субъекта (т.е. обнаружение *in vivo*). Такие способы обнаружения полезны для определения или диагноза ряда заболеваний или для проведения выбора терапии. Термин "определение" в контексте данного изобретения охватывает количественное или качественное определение. Определение GCC или белка GCC, как использовано в данном документе, означает обнаружение интактного белка GCC или обнаружение части белка GCC, которая содержит эпитоп, с которым молекула антитела к GCC связывается.

Таким образом, в другом аспекте изобретение описывает способ обнаружения экспрессии GCC в биологическом образце, таком как клетка или ткань, например опухолевая клетка или опухоль, имеющая одну или более клеток, которые экспрессируют GCC. Способ включает контактирование биологического образца с молекулой антитела к GCC, описанного в данном документе (например, MIL-44-148-2 или MIL-44-67-4), в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между молекулой антитела к GCC и белком GCC; и обнаружение образования комплекса между молекулой антитела к GCC и белком GCC, тем самым обнаруживая наличие белка GCC, например обнаруживая клетку или опухоль, экспрессирующие GCC.

В варианте реализации изобретения молекула антитела к GCC представляет собой иммуноконъюгат, содержащий обнаруживаемую метку. Обнаруживаемая метка может быть радиоактивным веществом. Альтернативно, обнаруживаемая метка может быть нерадиоактивным веществом (например, флуорофором или хромофором, как описано выше).

В некоторых вариантах реализации изобретения биологический образец включает нормальные и/или раковые клетки или ткани, которые экспрессируют GCC. Примеры нормальных клеток или тканей, которые экспрессируют GCC, включают клетки или ткани желудочно-кишечного происхождения, особенно клетки или ткани толстой и прямой кишки, но не ограничиваются ими. Примеры раковых клеток или тканей, которые экспрессируют GCC, включают рак желудочно-кишечного происхождения, такой как рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкой кишки и рак пищевода; рак поджелудочной железы; рак легких, такой как плоскоклеточная карцинома, аденосквамозная карцинома и аденокарцинома; саркомы мягких тканей, такие как лейомиосаркома и рабдомиосаркома; желудочно-кишечные и бронхолегочные нейроэндокринные опухоли; и нейроэктодермальные опухоли, но не ограничиваются ими. В частных вариантах реализации изобретения нормальные и/или раковые клетки или ткани могут экспрессировать GCC при высоких уровнях по сравнению с другими тканями, например, такими как В-клетки и/или ткани, связанные с В-клетками.

Способы обнаружения, описанные в данном документе, *in vitro* или *in vivo* могут быть применены для оценки заболевания у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание является клеточно-пролиферативным заболеванием, таким как рак или опухоль, например рак толстой и прямой кишки, рак желудка или рак поджелудочной железы.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ обнаружения наличия или отсутствия белка GCC в биологическом образце *in vitro* (например, в образце, полученном от субъекта при биопсии клеток или тканей). Способ включает (i) контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с молекулой антитела к GCC или ее иммуоноконъюгатом и (ii) обнаружение образования комплекса между молекулой антитела к GCC и белком GCC. Образование комплекса указывает на наличие или уровень белка GCC в биологическом образце, в то время как отсутствие образования комплекса указывает на отсутствие белка GCC в биологическом образце.

Примеры биологических образцов для способов, описанных в данном документе, включают клетку, клетки, ткань или жидкость организма, такую как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, кишечная жидкость, образец кала. В частных вариантах реализации изобретения биологический образец включает раковые клетки или ткань. Например, образцом может быть образец, полученный при биопсии опухоли, например, при биопсии опухоли толстой или прямой кишки, опухоли желудка, опухоли пищевода, опухоли тонкой кишки, опухоли легких, саркомы мягких тканей, нейроэндокринной опухоли, нейроэктодермальной опухоли или из тканевого образца из любого сайта их метастаз. В других вариантах реализации изобретения биологическим образцом может быть кровь или другая жидкость, содержащая раковую клетку. Биологический образец можно получить с использованием любого из ряда методов уровня техники. Кроме того, биологический образец можно обработать фиксатором, таким как формальдегид, или покрыть парафином и сделать срезы для использования. Альтернативно, можно использовать свежую или замороженную ткань. В других вариантах реализации изобретения можно использовать тонкоигольные аспираты.

В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемую клетку или ткань получают от индивидуума с подозрением на наличие заболевания, связанного с экспрессией GCC. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемую клетку или ткань получают от индивидуума с подозрением на наличие заболевания, связанного с экспрессией GCC в местоположении, отличном от апикальной поверхности кишечных эпителиальных клеток (например, цитоплазматическая экспрессия GCC в кишечных эпителиальных клетках), или заболевания, связанного с экспрессией GCC в некишечных клетках или тканях, таких как панкреатические, легочные, мягкотканевые, или тканях нейроэндокринного или нейроэктодермального происхождения. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемую клетку или ткань получают от индивидуума с подозрением на наличие заболевания, связанного с повышенной экспрессией GCC.

В варианте реализации изобретения уровень GCC в образце от субъекта или у субъекта сравнивают с контрольным уровнем, например уровнем GCC в контрольном материале, например нормальной клетке того же тканевого происхождения, что и клетка субъекта, и клетке, имеющей уровни GCC, сравнимые с такими в нормальной клетке. Способ может включать, например, ответ на определенный уровень GCC, обеспечивая диагноз, прогноз и оценку эффективности лечения или стадирование заболевания. Повышенный уровень GCC в образце или у субъекта по сравнению с контрольным материалом свидетельствует о наличии заболевания, связанного с повышенной экспрессией GCC. Повышенный уровень GCC в образце или у субъекта по сравнению с контрольным материалом также свидетельствует об относительной недостаточности эффективности лечения, об относительно плохом прогнозе или поздней стадии заболевания. Уровень GCC можно также использовать для оценки или выбора будущего лечения, например, необходимости более или менее агрессивного лечения или необходимости переключения с одной схемы лечения на другую. В некоторых вариантах реализации изобретения способы дополнительно включают выбор GCC-нацеленной терапии, например GCC-нацеленной терапии, описанной в данном документе, исходя, по меньшей мере частично, из определения уровней GCC и необязательно введения выбранной GCC-нацеленной терапии субъекту.

Образование комплекса между молекулой антитела к GCC и GCC может быть определено путем измерения или визуализации антитела (или фрагмента антитела), связанного с антигеном GCC, или не связанной молекулы антитела. Специалист в данной области легко оценит множество путей для обнаружения связывания антитела к GCC с GCC. Такие методы включают анализы антигенного связывания, известные из уровня техники, такие как вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуоферментный анализ), "сэндвич" иммуоанализ, иммуопресипитационный анализ, флуоресцентный иммуоанализ, иммуоанализ с белком А и иммуогистохимию (ИНС), но не ограничиваются ими.

В частном варианте реализации изобретения GCC обнаруживают или измеряют с помощью иммуогистохимии с использованием антитела к GCC согласно изобретению. Иммуогистохимические методологии могут быть использованы для идентификации и, по существу, для окрашивания клеток, которые экспрессируют GCC. Такое "окрашивание" позволяет исследовать миграцию метастаз. Антитела к GCC, такие как описанные в данном документе, контактируют с фиксированными клетками и GCC, присутствующая в клетках, реагирует с антителами. Антитела являются обнаруживаемыми мечеными или их обнаруживают с использованием мечения другого антитела или белка А для окрашивания клеток. В одном частном варианте реализации изобретения антитело M1L-44-148-2 используют в анализе ИНС для обнаружения или измерения экспрессии GCC в биологическом образце.

Могут быть использованы другие традиционные методы обнаружения, например вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), "сэндвич" иммуноанализ, иммунопреципитационный анализ, флуоресцентный иммуноанализ, иммуноанализ с белком А и иммуногистохимия (IHC) или радиоиммуноанализ (RIA).

Альтернативно мечению молекулы антитела к GCC, наличие GCC может быть оценено в образце с помощью конкурентного иммуноанализа, использующего стандарты, меченные обнаруживаемым веществом, и немеченную молекулу антитела к GCC. В этом анализе биологический образец, меченые стандарты и связывающее GCC вещество объединяют и определяют количество меченого стандарта, связавшегося с немеченым антителом. Количество GCC в образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта, связавшегося с веществом, связывающим GCC.

Кроме того, можно непосредственно обнаружить образование комплекса GCC с молекулой антитела к GCC без дополнительной обработки или мечения какого-либо из компонентов (GCC или молекулы антитела), например, путем использования методики переноса энергии флуоресценции (FET, см., например, Lakowicz et al., патент США № 5631169; Stavrianopoulos, et al., патент США № 4868103). Флуорофорную метку на первой "донорной" молекуле выбирают таким образом, чтобы при возбуждении падающим светом соответствующей длины волны ее излучаемая флуоресцентная энергия поглощалась бы флуоресцентной меткой на второй "акцепторной" молекуле, которая, в свою очередь, способна флуоресцировать благодаря поглощенной энергии. Альтернативно, "донорная" белковая молекула может подобным образом использовать природную энергию флуоресценции триптофановых остатков. Выбирают такие метки, которые излучают различные длины волн света, например, так, чтобы метку на молекуле "акцептора" можно было отличить от метки на "доноре". Поскольку эффективность передачи энергии между метками связана с расстоянием, разделяющим молекулы, то могут быть оценены пространственные отношения между молекулами. В ситуации, в которой происходит связывание между молекулами, флуоресцентное излучение метки молекулы "акцептора" в анализе должно быть максимальным. Результат связывания FET можно легко измерить с помощью стандартного флуорометрического обнаружения способами, хорошо известными в данной области (например, с использованием флуориметра).

В другом примере определение способности молекулы антитела распознавать GCC может быть оценено без мечения какого-либо из компонентов (GCC или молекулы антитела) с использованием методики, такой как анализ взаимодействия биомолекул в режиме реального времени (BIA) (см., например, Sjolander, S и Urbaniczky, C, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 и Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). В контексте данного изобретения "BIA" или "поверхностный плазмонный резонанс" представляет собой метод для изучения биоспецифических взаимодействий в режиме реального времени без мечения какого-либо из взаимодействующих компонентов (например, BIACORE™). Изменения массы возле поверхности связывания (указывает на факт связывания) приводят к изменениям показателя преломления света вблизи поверхности (оптический феномен поверхностного плазмонного резонанса (SPR)), в результате чего получают обнаруживаемый сигнал, который может быть использован в качестве индикатора в режиме реального времени реакции между биологическими молекулами.

В некоторых аспектах описание предлагает реакционную смесь, которая содержит молекулу антитела, описанного в данном документе (например, иммуноконъюгат, который содержит молекулу антитела, описанную в данном документе, и, например, метку), и биологический образец, например биологический образец, описанный в данном документе. В других вариантах реализации изобретения реакционная смесь может содержать молекулу антитела, описанную в данном документе (например, иммуноконъюгат, который содержит молекулу антитела, описанную в данном документе, и, например, метку), и GCC, полученную из биологического образца, например биологического образца, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ, такой как описанный выше, включает обнаружение связывания антитела к GCC с GCC, экспрессированной на поверхности клетки или в мембранном препарате, полученном из клетки, экспрессирующей GCC на своей поверхности. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает контактирование клетки с антителом к GCC в условиях, позволяющих антителу к GCC связываться с GCC, и обнаружения того, образуется ли комплекс между антителом к GCC и GCC на клеточной поверхности. Примером анализа для обнаружения связывания антитела к GCC с GCC, экспрессированной на поверхности клетки, является анализ "FACS".

Диагностика *in vivo*.

В еще другом варианте реализации изобретения изобретение предусматривает способ обнаружения наличия или отсутствия GCC-экспрессирующих клеток или тканей *in vivo*. Способ включает (i) введение субъекту (например, пациенту, имеющему рак) молекулы антитела к GCC согласно изобретению (т.е. MIP-44-148-2 или MIP-44-67-4) или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с обнаруживаемой меткой или маркером; (ii) подвергание субъекта воздействию средств для обнаружения указанной метки или маркера на GCC-экспрессирующих тканях или клетках. Такие методы *in vivo* могут применяться для оценки, диагностирования, стадирования и/или прогнозирования пациента, страдающего заболеванием, таким как рак. Способ включает (i) введение субъекту молекулы антитела к GCC или его иммуноконъюгата и (ii) обна-

ружение образования комплекса между молекулой антитела к GCC и белком GCC. Образование комплекса свидетельствует о наличии уровня GCC у субъекта, тогда как отсутствие комплекса свидетельствует об отсутствии GCC у субъекта.

Такие индивидуумы могут быть диагностированы как страдающие от метастаз GCC-экспрессирующего рака, а метастазы GCC-экспрессирующих опухолевых клеток могут быть обнаружены введением индивидууму, предпочтительно путем внутривенного введения, фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и конъюгированное соединение, которое содержит молекулу анти-антитела GCC и активный фрагмент, причем активный фрагмент представляет собой радиоактивный агент, и обнаружения наличия локализованного накопления или агрегации радиоактивности, что указывает на наличие клетки, экспрессирующей GCC. В некоторых вариантах реализации изобретения согласно настоящему изобретению фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и конъюгированное соединение, которое содержит молекулу антитела к GCC и активный фрагмент, причем активный фрагмент является радиоактивным веществом, а молекула антитела к GCC является антителом MIL-44-148-2, описанным в данном документе, или его фрагментами или производными.

В одном частном варианте реализации изобретения радионуклиды могут конъюгировать с молекулой антитела к GCC согласно изобретению для применения в качестве красителя в процедурах окрашивания *in vivo*. Красители полезны в диагностических методах, а также методах, используемых для идентификации локализации метастазированных клеток. Например, индивидуумы могут быть диагностированы как страдающие от метастазирующего рака толстой и прямой кишки, а клетки метастазирующего рака толстой и прямой кишки могут быть обнаружены с помощью введения индивидууму, предпочтительно путем внутривенного введения, фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, и конъюгированного соединения, которое содержит молекулу антитела к GCC согласно изобретению и активный фрагмент, в котором активный фрагмент представляет собой радионуклид, и обнаружения присутствия локализованного накопления или агрегации радиоактивности, что указывает на присутствие клеток, которые экспрессируют GCC.

Окрашивание можно осуществлять с помощью многих методов, хорошо известных специалисту в этой области, а приемлемые красители, полезные в таких методах, могут конъюгировать с молекулой антитела к GCC согласно изобретению с помощью хорошо известных средств. Примерами меток, полезных для диагностического окрашивания согласно настоящему изобретению, являются радиометки, такие как ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{188}Rh , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, ^{99}Tc , ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb , ^{206}Bi и ^{213}Bi ; флуоресцентные метки, такие как родамин; ЯМР-активные метки; позитронно-активные изотопы кислорода, азота, железа, углерода или галлия (например, ^{68}Ga , ^{18}F), обнаруживаемые с помощью детектора для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии ("SPECT") или сканера позитрон-эмиссионной томографии ("PET"); хемилюминесценции, такие как люциферин; и ферментные маркеры, такие как пероксидаза или фосфатаза. Также могут быть использованы генераторы слабопроникающего излучения, такие как изотопы, обнаруживаемые с помощью детекторных зондов малой дистанльности, таких как трансректальный зонд. Окрашивание также можно осуществлять с помощью, например, радиосцинтиграфии, ядерной магнитно-резонансной томографии (MRI) или компьютерной томографии (сканирующая СТ). При окрашивании с помощью сканирующей СТ может использоваться тяжелый металл, такой как хелаты железа. При MRI могут использоваться хелаты гадолиния или марганца.

Антитела можно метить такими реагентами, используя методики, известные из уровня техники. Например, Magerstadt, M. (1991), *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; и Barchel, S.W. and Rhodes, B.H., (1983), *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y., каждый из которых включен в данный документ путем ссылки, касаются конъюгирования разных терапевтических и диагностических радионуклидов с аминокислотами антител. Такие реакции могут использоваться для конъюгирования радионуклидов с молекулами антител к GCC согласно изобретению с приемлемым хелатирующим агентом и/или линкером. См. также Wensel and Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y., для методик, касающихся радиомечения антител. См. также, D. Colcher et al., *Meth. Enzymol.* 121:802-816 (1986).

В случае радиоактивно меченого антитела его вводят пациенту, оно локализуется в опухоли, несущей антиген, с которым антитело реагирует, и обнаруживается или "отображается" *in vivo* с использованием известных методов, таких как радиоизотопное сканирование с использованием, например, гамма-камеры или эмиссионной томографии или компьютерной томографии. См., например, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), p. 65-85 (Academic Press 1985). Альтернативно, когда радиометка излучает позитроны (например, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , ^{68}Ga), может быть использован сканер для позитрон-излучающей трансаксиальной томографии, такой как специально предназначенный Pet VI из Брукхейвенской национальной лаборатории.

В других вариантах реализации изобретения предусматриваются способы определения дозы, например радиационной дозы, воздействию которой подвергаются различные ткани, когда субъекту, на-

пример человеку, вводят молекулу антитела к GCS, конъюгированного с радиоактивным изотопом. Способ включает (i) введение молекулы антитела к GCS, как описано в данном документе, например молекулы антитела к GCS, меченного радиоактивным изотопом, субъекту; (ii) измерение количества радиоактивного изотопа, находящегося в разных тканях, например опухоли или крови, в различные моменты времени, пока часть или весь радиоактивный изотоп не будет выведен из организма субъекта; и (iii) расчет общей дозы радиации, полученной каждой анализируемой тканью. Измерения могут проводиться в заданные моменты времени, например дни 1, 2, 3, 5, 7 и 12, после введения (день 0) радиоактивно меченой молекулы антитела к GCS субъекту. Концентрация изотопа, присутствующего в данной ткани, интегрированная по времени и умноженная на специфическую активность радиоизотопа, может быть использована для расчета дозы, которую получает данная ткань. Фармакологическая информация, полученная с помощью молекулы антитела к GCS, меченого радиоактивным изотопом, например γ -излучателем, например ^{111}In может быть использована для расчета ожидаемой дозы, которую та же ткань получит от другого радиоактивного изотопа, которую нельзя легко измерить, например β -излучателя, например ^{90}Y .

Дополнительная диагностика для GCS-нацеленной терапии.

Диагностические способы *in vitro* и *in vivo*, описанные в данном документе, могут быть применены для информирования пациента, страдающего от пролиферативного заболевания, такого как рак, или желудочно-кишечного расстройства, такого как синдром воспаленного кишечника, болезнь Крона или запор, или подлежащего лечению GCS-нацеленной терапией или другой терапией, исходящей из наличия или отсутствия, соответственно, экспрессии GCS на поверхности или внутри клеток или ткани пациента. Пациент, имеющий одну или более клеток, которые экспрессируют GCS на клеточной поверхности или внутри клетки, является кандидатом на лечение GCS-нацеленной терапией.

В некоторых аспектах изобретение предусматривает способ определения чувствительности пациента с подозрением на GCS-экспрессирующее заболевание или нарушение к GCS-нацеленной терапии, включающий следующие этапы: (i) контактирование биологического образца, полученного от субъекта, с молекулой антитела к GCS согласно изобретению; (ii) обнаружение образования комплекса между молекулой антитела к GCS и белком GCS; где образование комплекса свидетельствует о наличии уровня белка GCS в биологическом образце, а отсутствие образования комплекса свидетельствует об отсутствии белка GCS в биологическом образце, тем самым определяя чувствительность пациента к GCS-нацеленной терапии. В частном варианте реализации изобретения образование комплекса между молекулой антитела к GCS и белком GCS в биологическом образце обнаруживают с помощью иммуногистохимии с применением молекулы антитела, описанного в данном документе, например антитела MIP-44-1482, описанного в данном документе.

Примеры биологических образцов могут содержать клетку, клетки, ткань или жидкость организма, такую как воспалительный экссудат, кровь, сыворотку, кишечную жидкость, образец кала. В частных вариантах реализации изобретения биологический образец содержит раковую клетку(и) или ткань. Например, образец может представлять собой образец, полученный при биопсии опухоли, например при биопсии опухоли толстой и прямой кишки, опухоли желудка, опухоли пищевода, опухоли тонкой кишки, опухоли легких, саркомы мягких тканей, нейроэндокринной опухоли, нейроэктодермальной опухоли или из образца ткани из любого их метастазного сайта. В других вариантах реализации изобретения биологическим образцом может быть кровь или другая жидкость, содержащая раковую клетку. Биологический образец можно получить, используя любой из ряда известных из уровня техники методов. Кроме того, биологический образец можно обработать фиксатором, таким как формальдегид, залить парафином и сделать срезы для использования. Альтернативно, могут быть использованы свежие или замороженные ткани. В других вариантах реализации изобретения могут быть использованы ампиты, взятые с помощью тонкой иглы.

Примеры заболеваний/нарушений, которые могут быть оценены (например, диагностироваться) и которые можно лечить с применением дополнительных диагностических методов, описанных в данном документе, включают пролиферативные нарушения, в том числе рак толстой и прямой кишки, рак желудка, рак тонкой кишки, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легких (например, плоскоклеточная карцинома, аденосквамозная карцинома, аденокарцинома), саркому мягких тканей, такую как лейомиосаркома и рабдомиосаркома, желудочно-кишечные и бронхолегочные нейроэндокринные опухоли и нейроэктодермальные опухоли, желудочно-кишечные нарушения, такие как синдром воспаленного кишечника, болезнь Крона и констипация, и неврологические нарушения, такие как болезнь Паркинсона, но не ограничиваются ими.

Способы согласно изобретению проводятся в соответствии с решением врача о лечении пациента GCS-нацеленной терапией. Способы, предусмотренные в данном документе, позволяют также получить персонализированный отчет о лечении, например персонализированный отчет о лечении рака, например, GCS-нацеленной терапией, описанной в данном документе.

GCS-нацеленная терапия представляет собой терапевтическое вещество, которое лечит или предотвращает GCS-экспрессирующее заболевание или GCS-опосредованное заболевание, например,

GCC-экспрессирующее заболевание или GCC-опосредованное заболевание, описанное в данном документе. В некоторых аспектах согласно изобретению GCC-нацеленная терапия представляет собой GCC-лиганд, такой как молекула антитела к GCC или пептидный лиганд (например, пептид ST), конъюгированный с веществом, таким как терапевтическое вещество. Примеры GCC-лигандов, конъюгированных с терапевтическими веществами (т.е. иммуноконъюгатов), описаны, например, в публикации патентной заявки США № 20110110936, содержание которой включено в данный документ путем ссылки во всей его полноте. В частном варианте реализации изобретения GCC-нацеленным терапевтическим веществом является анти-GCC моноклональное антитело IgG1 человека, конъюгированное с цитотоксическим веществом, где mAb содержит переменную область легкой цепи (VL), имеющую три определяющие комплементарности области легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3), и переменную область тяжелой цепи (VH), имеющую три определяющие комплементарности области тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3), перечисленные в табл. 7 (аминокислотные последовательности) и 8 (соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты) ниже и переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, перечисленные в табл. 9 (аминокислотные последовательности) и в табл. 10 (соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты).

Таблица 7

Аминокислотная последовательность CDR VL и CDR VH

VH CDR1	SEQ ID № 67	GYYSWS
VH CDR2	SEQ ID № 68	EINHRGNTNDNPSLKS
VH CDR3	SEQ ID № 69	ERGYTYGNFDH
VL CDR1	SEQ ID № 70	RASQSVSRNLA
VL CDR2	SEQ ID № 71	GASTRAT
VL CDR3	SEQ ID № 72	QQYKTPRT

Таблица 8

Последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая CDR VL и CDR VH

VH CDR1	SEQ ID № 73	GGTTACTACTGGAGC
VH CDR2	SEQ ID № 74	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
VH CDR3	SEQ ID № 75	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
VL CDR1	SEQ ID № 76	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA GCC
VL CDR2	SEQ ID № 77	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
VL CDR3	SEQ ID № 78	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG

Таблица 9

Аминокислотная последовательность варибельной области mAb

Тяжелая цепь	SEQ ID № 79	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYY WSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRV TISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERG YTYGNFDHWGQGLVTVSS
Легкая цепь	SEQ ID № 80	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSG TEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRTFGQGT NVEIK

Таблица 10

Последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая варибельной области mAb

Тяжелая цепь	SEQ ID № 81	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGG ACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCT CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTCAG TGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGA CAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCA TATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC GCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGC GGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAG AACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGAC CACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGT CTCCTCA
Легкая цепь	SEQ ID № 82	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCAC CCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCA CCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA GCAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCC AGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACCTCACCATCGGCAGCCTGC AGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTC AGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTC GGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAA

Аминокислотные последовательности и соответствующие им последовательности нуклеиновой кислоты для непротессированной тяжелой цепи hIgG1 последовательности легкой цепи hКаппа, содержащие VL CDR и VH CDR, показанные в табл. 7 и 8, варибельные области тяжелой и легкой цепей, показанные в табл. 9 и 10, перечислены ниже.

Нуклеотидной последовательностью тяжелой цепи hIgG1 является:

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACA
GGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC
GGAGACCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTCAGTGGTACTACTGG
AGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCA
TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAG
ACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACG
GCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTC
ACAAAACCTCACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG

GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG
 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
 GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
 CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAG
 CAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
 GTAAATAATAGGATAACAGGGTAATACTAGAG (SEQ ID № 83)

Белковой последовательностью тяжелой цепи hIgG1 является:

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIRQ
 PPGKLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTVISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARE
 RGYTYGNFDHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID № 84)

Нуклеотидной последовательностью каппа легкой цепи является:

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTA
 CAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
 CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA
 GCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC
 ACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTT
 CACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCA
 GTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAACGTGGAATCAAACGTA
 CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
 AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
 CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGC
 AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
 CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA (SEQ ID № 85)

Белковой последовательностью hКаппа легкой цепи является:

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKP
 GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRTFGQ
 GTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
 ID № 86)

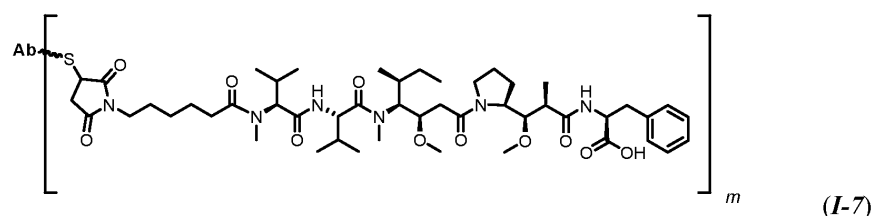
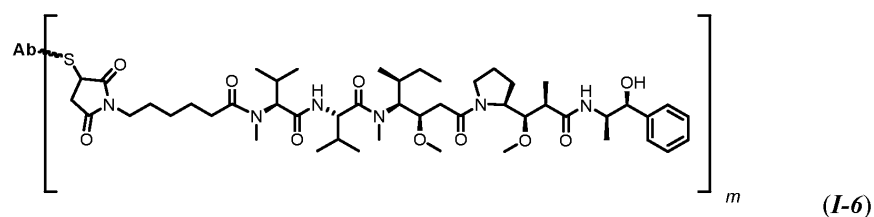
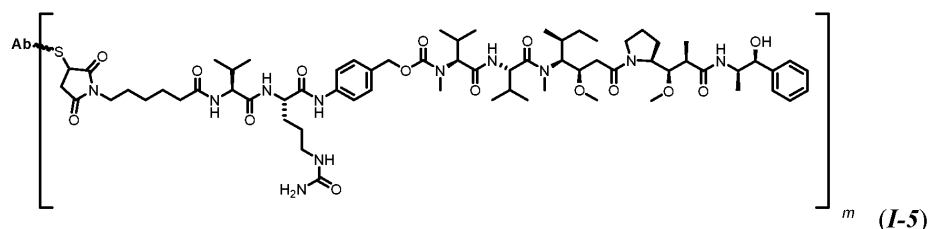
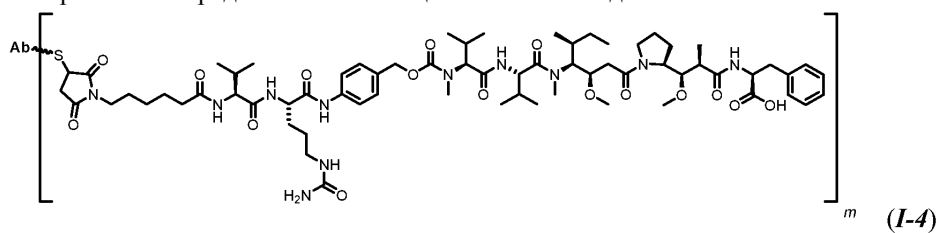
В одном частном аспекте согласно изобретению GCC-нацеленная терапия представляет собой иммуноконъюгат, имеющий молекулу антитела к GCC, конъюгированную с молекулой ауристати́на. В одном варианте реализации изобретения иммуноконъюгат содержит молекулу антитела к GCC, которая включает три области CDR тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 67, 68 и 69, и три области CDR легкой цепи (VL) CDR согласно SEQ ID NO: 70, 71 и 72, конъюгированные с молекулой ауристати́на. В другом варианте реализации изобретения иммуноконъюгат содержит молекулу антитела к GCC, которая включает вариabельную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 79 и вариabельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 80, конъюгированные с молекулой ауристати́на. В еще другом варианте реализации изобретения иммуноконъюгат содержит молекулу антитела к GCC, вариabельные области тяжелой и легкой цепей согласно SEQ ID NO: 79 и 80 соответственно, конъюгированные с молекулой ауристати́на.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула ауристатина связана с цистеиновым остатком на молекуле антитела к GCC с помощью линкера, содержащего малеимидный фрагмент, например малеимидокапроиловый фрагмент.

В некоторых вариантах реализации изобретения молекула ауристатина объединяется с молекулой антитела к GCC с применением гетеробифункционального линкера, который присоединяется к гидроксильной группе на молекуле ауристатина. В некоторых таких вариантах реализации изобретения линкер содержит гидразон. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой соединение гидразона, образованное в реакции малеимидокапроилгидразида с кетокрбионовой кислотой, например, 5-бензоилвалерьяновой кислотой. В частных вариантах реализации изобретения линкером является (Z)-6-(2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноил)гидразоно)-6-фенилгексанойная кислота.

В некоторых других вариантах реализации изобретения молекула ауристатина объединяется с молекулой антитела к GCC с применением гетеробифункционального линкера, который присоединяется к монометиламиногруппе на молекуле ауристатина. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит расщепляемый фрагмент, например пептидный фрагмент и саморазрушающийся п-аминобензилкарбаматный спейсер. Примеры линкеров включают малеимидокапроил (mc), малеимидокапроил-L-фенилаланин-L-лизин-p-аминобензилкарбамат и малеимидокапроил-L-валин-L-цитруллин-p-аминобензилкарбамат (vc).

В некоторых вариантах реализации изобретения GCC-нацеленная терапия представляет собой иммуоноконъюгат, характеризующийся формулой $Ab-(vc-MMAF)_m$ (формула (I-4)); $Ab-(vc-MMAE)_m$ (формула (I-5)); $Ab-(mc-MMAE)_m$ (формула (I-6)); или $Ab-(mc-MMAF)_m$ (формула (I-7)), где Ab - это молекула антитела к GCC, которая содержит элементы, такие как элементы, описанные в любой из табл. 7-9 или 10, S - это атом серы антитела и m находится в диапазоне от около 1 до около 15. В некоторых вариантах реализации изобретения m представляет собой целое число от 1 до около 5.



В некоторых вариантах реализации изобретения переменная m в формуле (I-4), (I-5), (I-6) или (I-7) находится в диапазоне от 2 до около 10, от около 6 до около 8, от около 4 до около 6, от около 3 до около 5 или от около 1 до около 3.

В некоторых частных вариантах реализации изобретения нацеленная GCC-терапия представляет собой иммуоноконъюгат формулы (I-4), (I-5), (I-6) или (I-7), где Ab - это молекула антитела, которая содержит три области CDR тяжелой цепи (VH) CDR согласно SEQ ID NO: 67, 68 и 69, и три области CDR

легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 70, 71 и 72, а m составляет от около 3 до около 5 (например, около 4). В некоторых аспектах Ab, которое содержит CDR тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 67, 68 и 69 и CDR(ы) легкой цепи согласно SEQ ID NO: 70, 71 и 72 соответственно, является человеческим моноклональным антителом, предпочтительно человеческим антителом IgG1.

В других частных вариантах реализации изобретения GCC-нацеленная терапия представляет собой иммуноконъюгат формулы (I-4), (I-5), (I-6) или (I-7), где Ab - это молекула моноклонального антитела, которая содержит вариabельную область тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 79 и вариabельную область легкой цепи согласно SEQ ID NO: 80, и m составляет от около 3 до около 5 (например, около 4). В некоторых аспектах Ab, которое содержит вариabельные области тяжелой и легкой цепей согласно SEQ ID NO: 79 и 80 соответственно, является человеческим моноклональным антителом, предпочтительно человеческим антителом IgG1.

В еще других некоторых вариантах реализации изобретения GCC-нацеленная терапия представляет собой иммуноконъюгат формулы (I-4), (I-5), (I-6) или (I-7), где Ab - это молекула человеческого моноклонального антитела IgG, которое содержит последовательность тяжелой цепи IgG1 согласно SEQ ID NO: 84 и последовательность каппа легкой цепи согласно SEQ ID NO: 86, и m составляет от около 3 до около 5 (например, около 4).

В еще другом варианте реализации изобретения GCC-нацеленная терапия представляет собой GCC-лигандный конъюгат, способный проникать через гематоэнцефалический барьер. Например, в некоторых аспектах изобретение относится к GCC-лиганду, конъюгированному с нейропротекторным веществом, таким L-допа, который способен проникать через гематоэнцефалический барьер. Примеры таких GCC-лигандных конъюгатов описаны в заявке PCT WO 2013/016662, содержание которой включено в данный документ путем ссылки во всей полноте. В вариантах реализации изобретения согласно изобретению пациенты, страдающие от неврологического расстройства или с подозрением на неврологическое расстройство (например, болезнь Паркинсона), нейроны которых экспрессируют GCC, будут считаться хорошими кандидатами для лечения GCC-лигандом, конъюгированным с нейропротекторным веществом.

В некоторых аспектах согласно изобретению GCC-нацеленная терапия представляет собой антагонист GCC. В одном варианте реализации изобретения GCC-нацеленная терапия представляет собой пептидный антагонист (например, пептид ST) или низкомолекулярный ингибитор GCC.

В некоторых аспектах GCC-нацеленная терапия представляет собой агонист GCC. В одном варианте реализации изобретения агонист GCC является пептидом ST. В частном варианте реализации изобретения агонист GCC является пептидом ST, содержащим аминокислотную последовательность: H-Cys¹-Cys²-Glu³-Tyr⁴-Cys⁵-Cys⁶-Asn⁷-Pro⁸-Ala⁹-Cys¹⁰-Thr¹¹-Gly¹²-Cys¹³-Tyr¹⁴-OH (SEQ ID NO: 87), в которой имеется три дисульфидные связи: между Cys¹ и Cys⁶, между Cys² и Cys¹⁰ и между Cys⁵ и Cys¹³. В частном варианте реализации изобретения агонист GCC является пептидным агонистом, который связывает GCC, таким как линаклотид (Ironwood Pharmaceuticals).

В некоторых вариантах реализации согласно изобретению пациенты, чьи опухолевые клетки экспрессируют GCC на своей поверхности, будут считаться хорошими кандидатами для лечения токсиноконъюгированной молекулой антитела к GCC, такой как иммуноконъюгат, как описано в данном документе, или токсиноконъюгированными антителами, как описано в патентной публикации США № 20110110936, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Без ограничения какой-либо теорией, пациенты, чьи опухолевые клетки экспрессируют низкие количества GCC на своей поверхности, не могут быть хорошими кандидатами для комбинирования GCC-нацеленной терапии с дополнительным способом лечения или быть кандидатами для терапии "голым" антителом. В другом примере доза GCC-нацеленной терапии может корректироваться с учетом количества молекул GCC, экспрессированных на поверхностях опухолевых клетках. Например, пациенты с высокими количествами молекул GCC на поверхностях их опухолевых клеток могут лечиться более низкими дозами GCC-нацеленной терапии, чем пациенты с низкими количествами молекул GCC, экспрессированных на поверхности опухолевых клеток. Обнаружение наличия GCC-экспрессирующих опухолевых клеток *in vivo* может позволить идентифицировать ткани в исходной GCC-экспрессирующей опухоли, имеющие метастазы. Знание тканей, которые имеют метастазы, может привести к нацеленному применению опухолевой терапии.

Как обсуждалось выше, молекулы антител, описанные в данном документе, предполагают оценку наличия белка GCC в нормальных тканях в сравнении с неопластическими тканями, через которую могут быть оценены наличие или тяжесть заболевания, прогрессирование заболевания и/или эффективность терапии. Например, могут контролироваться лечение и оцениваться эффективность. В одном примере белок GCC можно обнаружить и/или измерить в первом образце, полученном от пациента, имеющего пролиферативное заболевание, и может быть инициировано лечение. Позже, второй образец может быть получен от субъекта, и белок GCC в образце может быть обнаружен и/или измерен. Уменьшение количества белка GCC, обнаруженного или измеренного во втором образце, может свидетельствовать о терапевтической эффективности.

Без ограничения какой-либо теорией, может потребоваться васкуляризация для GCC-нацеленного

терапевтического средства для получения доступа к экспрессирующей GCC опухоли, особенно в тех случаях, когда GCC-нацеленное терапевтическое средство вводят внутривенно. Таким образом, в некоторых вариантах реализации способов согласно изобретению может быть полезной оценка или характеристика сосудистой системы опухоли в дополнение к или в сочетании с обнаружением белка GCC. Например, образец ткани может быть окрашен веществом, которое идентифицирует клетки сосудистого эндотелия, таким как анти-CD-31 антитело или молекула антитела против фактора фон Виллебранда, и антитело к GCC согласно изобретению для одновременного или продолжительного охарактеризования экспрессии GCC и васкуляризации ткани. В некоторых аспектах согласно изобретению такая одновременная или продолжительная характеристика экспрессии GCC и васкуляризации является полезной в качестве инструмента для отбора пациентов для нацеленного лечения.

В другом аспекте экспрессия GCC на клеточной поверхности может быть необходимой для GCC-нацеленного терапевтического средства для воздействия на гибель (killing) опухолевых клеток, экспрессирующих GCC. Например, некоторые опухолевые клетки могут экспрессировать GCC, но не на клеточной поверхности. Если терапевтическое средство зависит от экспрессии GCC на клеточной поверхности, то такое терапевтическое средство может быть не способным убивать клетку, когда GCC изначально является внутриклеточной. Таким образом, в некоторых вариантах реализации согласно изобретению диагностический или прогностический анализ может дополнительно включать анализ и/или количественный анализ клеточной локализации GCC, например способ, который может отличить и/или количественно определить экспрессию на поверхности клетки от внутриклеточной экспрессии. Без намерения быть ограниченными какой-либо теорией, пациент, чья опухоль изначально имеет внутриклеточную экспрессию GCC, не может быть хорошим кандидатом для молекулы антитела к GCC, которое связывает внеклеточный домен GCC. Альтернативно, такой аналитический результат может инициировать начальное лечение веществом, которое индуцирует экспрессию GCC на клеточной поверхности (см., например, публикацию PCT № WO 04/071436). После или одновременно с индукцией GCC клеточной поверхности можно вводить молекулу антитела к GCC, которая имеет доступ к или связывается только с внеклеточно экспрессированной GCC.

Наборы.

Также в объеме настоящего изобретения находятся наборы, содержащие молекулу антитела анти-GCC или иммуноконъюгат, как описано в данном документе. Кроме того, включены наборы, содержащие липосомные композиции, содержащие молекулу антитела анти-GCC или иммуноконъюгат. Набор может содержать один или несколько других элементов, включая инструкции по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, пригодный для хелатирования или связывания иным путем, антитела с меткой, или терапевтическим агентом, или радиозащитной композицией; устройства или другие материалы для подготовки антитела для введения; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения субъекту. Инструкции по применению могут включать инструкции для диагностических применений молекулы антитела анти-GCC или иммуноконъюгата для обнаружения GCC *in vitro*, например в образце, например образце, полученном при биопсии, или клетке от пациента, имеющего рак, или *in vivo*. Инструкции могут включать рекомендации для терапевтического применения, включая предложенные дозы и/или способы введения, например, у пациента с раком (например, раком желудочно-кишечного происхождения, таким как, например, рак толстой кишки, рак желудка, рак пищевода). Другие инструкции могут содержать инструкции по связыванию антитела с хелатором, меткой или терапевтическим агентом или для очистки конъюгированного антитела, например, от непрореагировавших компонентов конъюгации. Как уже говорилось выше, в комплект может входить метка, например, любая из меток, описанных в данном документе. Как обсуждалось выше, набор может содержать терапевтический агент, например терапевтический агент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело будет взаимодействовать с другими компонентами, например хелатором или меткой, или терапевтическим агентом, например радиоактивным изотопом, например иттрием и лютецием. В таких случаях набор может содержать один или более реакционных сосудов для проведения реакции или сепарационное устройство, например хроматографическую колонку, для применения при отделении готового продукта от исходных материалов или промежуточных продуктов реакции.

Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, такой как диагностическое или терапевтическое средство, например диагностическое или терапевтическое средство, как описано в данном документе, и/или одну или более дополнительных молекул антител к GCC или иммуноконъюгатов, полученных в зависимости от конкретного случая, в одном или более отдельных фармацевтических препаратах.

Набор может дополнительно содержать радиопротектор. Известны радиолитические по природе изотопы, например $^{90}\text{Yttrium}$ (^{90}Y). С целью преодоления этого радиолитического радиопротекторы могут быть включены, например, в реакционный буфер при условии, что такие радиопротекторы доброкачественные, а это означает, что они не ингибируют или иным образом негативно не влияют на реакцию меченая антитела, например, изотопом, таким как ^{90}Y . Состав буфера согласно настоящему изобретению может включать радиопротектор, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA) или аскорбат, кото-

рые минимизируют радиолизис за счет иттрия или других сильных радионуклидов. Другие радиопротекторы известны в данной области и могут быть также использованы в составе буфера согласно настоящему изобретению, т.е. поглотители свободных радикалов (фенол, сульфиты, глутатион, цистеин, гентизиновая кислота, никотиновая кислота, аскорбилпальмитат, $\text{НОР}(\text{:O})\text{H}_2\text{I}$ глицерин, натрия формальдегида сульфоксилат, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и SO_2 и т.д.).

Предусмотренный набор представляет собой набор, полезный для радиомечения хелатор-конъюгированного белка или пептида терапевтическим радиоизотопом для введения пациенту. Набор содержит (i) флакон, содержащий хелатор-конъюгированное антитело, (ii) флакон, содержащий буфер для стабилизации и введения меченного радиоактивным изотопом антитела пациенту, и (iii) инструкции для выполнения процедуры радиоактивного мечения. Набор предусматривает взаимодействие хелатор-конъюгированного антитела с радиоактивным изотопом или его солью в течение достаточного количества времени при благоприятных условиях, например, как рекомендовано в инструкции. Получается радиоактивно меченое антитело, имеющее достаточную чистоту, специфическую активность, и производится специфичность связывания. Радиоактивно меченое антитело может быть разбавлено до соответствующей концентрации, например, в буфере, и может вводиться непосредственно пациенту с или без дальнейшей очистки. Хелатор-конъюгированные антитела могут поставляться в лиофилизированной форме.

Следующие примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение слитого белка экстрацеллюлярного домена человеческой GCC и мышинного Fc (hGCC-ECD-mFc).

Получение слитого белка секретируемого экстрацеллюлярного домена (ECD) человеческой (h) гуанилилциклазы (hGCC) константного домена (Fc) тяжелой цепи мышинного иммуноглобулина (Ig)G2a (с мутацией рецепторсвязывающей области (FcRbr-mutII) (т.е. слитого белка hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII, также названных в данном документе pLKTOK108 и MIL-44) для иммунизации и скрининга осуществляли следующим образом. Антиген GCC готовили субклонированием части гена GCC, кодирующего последовательность, содержащую следующую последовательность GCC (сигнальную последовательность и экстрацеллюлярный домен), в экспрессионный вектор pLKTOK4:

```

MKTLALLDLALWSLLFPQGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEP
LKNLEDAVOTRIQLLEIVRGRLQNAAGLNVTVNATFMYSGLIHNSGDCRSSTC
EGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLS
CDYKETLTRLMSPARCLMYFLVNFWKTNLDPFKTYSWSTSYVYKNGTETE
DCFWYLNALASVSYSFSELGFKVVLQRQDKEFDILMDHNRKSNVIMCG
GPEFLYKLGKDRAVAEDIVILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS
PGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPK
FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTH
VNKTYPVDMSPFTFWKNSKL (SEQ ID № 46)

```

Аминокислотную последовательность Gly-Arg-Gly-Pro-Gln (SEQ ID NO: 66) в положениях от 427 до 430 выбрали для терминирования экстрацеллюлярного фрагмента GCC. В GCC эта последовательность непосредственно следует после Pro, что совпадает с Pro в положении, гомологичном Pro, которое традиционно используется для инициирования слитых белков Fc человеческого IgG1.

Область Fc мышинного IgG2a в pLKTOK108 была разработана, чтобы стартовать с аминокислотной последовательности, которая функционально является концом домена CH1 [Pro-Arg-Валин (Val)-Pro-Изолейцин (Ile)-Треонин (Thr)-Glu-Аспаргин (Asn)] (SEQ ID NO: 58). Две области мутировали в константной области мышинного IgG2a. В дополнение к мутациям лейцина (Leu)-Leu-Gly-Gly (SEQ ID NO: 59) в Leu-аланин (Ala)-Gly-Ala (SEQ ID NO: 60) (положения 234-237 лизин [Lys]-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 61) в Lys-Ala-Gly-Ala (SEQ ID NO: 62), другой рецепторный участок Fc в положениях 318-322 также мутировал следующим образом: глутаминовая кислота (Glu)-фенилаланин (Phe)-Lys-цистеин (Cys)-Lys (SEQ ID NO: 63) в Ala-Phe-Lys-Cys-Lys (SEQ ID NO: 64) а затем в Phe-Lys-Cys-Lys (SEQ ID NO: 65).

Как только была создана полная последовательность слитого белка, были добавлены фланкирующие последовательности рестрикционных ферментов для BamHI и XbaI, а также последовательность Козака (CTCACC) и терминальный стоп-кодон для завершения кДНК слитого белка. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности слитого белка pLKTOK108 (hGCC/mIgG2a FcRmutII) представлены ниже (сайты рестрикции BamHI и XbaI показаны строчными буквами в SEQ ID NO: 47).

Нуклеотидная последовательность человеческого GCC-ECD/Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO: 47):

cgcgatccctaccATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGCTTTGTGGTCACTGCTCTCCAG
 CCGGGTGGCTGTCCTTAGTTCCCAGGTGAGTCAGAACTGCCACAATGGCAGCTAT
 GAAATCAGCGTCCTGATGATGGGCAACTCAGCCTTTCAGAGCCCCTGAAAACTTG
 GAAGATGCGGTGAATGAGGGGCTGGAATAGTGAGAGGACGTCTGCAAAATGCTGG
 CCTAAATGTGACTGTGAACGCTACTTTCATGTATTCGGATGGTCTGATTCATAACTCA
 GCGACTGCCGGAGTAGCACCTGTGAAGGCCTCGACCTACTCAGGAAAATTTCAAA
 TGCACAACGGATGGGCTGTGTCCTCATAGGGCCCTCATGTACATACTCCACCTTCCA
 GATGTACCTTGACACAGAATTGAGCTACCCCATGATCTCAGCTGGAAGTTTGGATT
 GTCATGTGACTATAAAGAAACCTTAACCAGGCTGATGTCTCCAGCTAGAAAGTTGAT
 GTACTTCTTGGTTAACTTTTGGAAAACCAACGATCTGCCCTTCAAACTTATTCCTGG
 AGCACTTCGTATGTTTACAAGAATGGTACAGAACTGAGGACTGTTTCTGGTACCTT
 AATGCTCTGGAGGCTAGCGTTTCCTATTTCTCCACGAACTCGGCTTTAAGGTGGTGT
 TAAGACAAGATAAGGAGTTTCAGGATATCTTAATGGACCACAACAGGAAAAGCAAT
 GTGATTATTATGTGTGGTGGTCCAGAGTTCCTCTACAAGCTGAAGGGTGACCGAGCA
 GTGGCTGAAGACATTGTCAATTATTCTAGTGGATCTTTCAATGACCACTACTGGAG
 GACAATGTACAGCCCCCTGACTATATGAAAAATGTCTTGTCTGACGCTGTCTCCT
 GGAATTCCTTCTAAATAGCTCTTTCTCCAGGAATCTATCACCAACAAAACGAGAC
 TTTGCTCTTGCTATTTGAATGGAATCCTGCTCTTTGGACATATGCTGAAGATATTTT
 TTGAAAATGGAGAAAATATTACCACCCCCAAATTTGCTCATGCTTTCAGGAATCTCA
 CTTTTGAAGGGTATGACGGTCCAGTGACCTTGGATGACTGGGGGGATGTTGACAGTA
 CCATGGTGCTTCTGTATACCTCTGTGGACACCAAGAAATACAAGGTCTTTTGACCT
 ATGATACCCACGTAAATAAGACCTATCCTGTGGATATGAGCCCCACATTCATTGGA
 AGAACTCTAAACTTCCTAATGATATTACAGGCCGGGGCCCTCAGCCCAGAGTGCCCCA
 TAACACAGAACCCCTGTCTCCACTCAAAGAGTGTCCCCATGCGCAGCTCCAGACC
 TCGCAGGTGCACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGACTCATGA
 TCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAG
 ACGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAA
 ACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCCATCCAG
 CACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGCATTCAAATGCAAGGTCAACAACAGAGCCCT
 CCCATCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAACCCAGAGGGCCAGTAAGAGCTCCAC
 AGGTATATGTCTTGCTCCACCAGCAGAAGAGATGACTAAGAAAGAGTTCAGTCTG
 ACCTGCATGATCACAGGCTTCTTACCTGCCGAAATTGCTGTGGACTGGACCAGCAAT
 GGGCGTACAGAGCAAACTACAAGAACACCGCAACAGTCTGGACTCTGATGGTTC
 TACTTTCATGTACAGCAAGCTCAGAGTACAAAAGAGCACTTGGGAAAGAGGAAGTC
 TTTTCGCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCTTACGACTAAGACCA
 TCTCCCGTCTCTGGGTAAATAAtctagagca

Аминокислотная последовательность человеческого GCC-ECD/Fc мышиного IgG2a (SEQ ID NO: 48):

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAPLKNLEDAV
 ОТРИЦ. LEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDDLHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQR
 MGCVLIGPSTYSTFQMYLDELSTYPMISAGSFLSCDYKETLTRLMSPARKLMYFLVN
 FWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALASVSYSFHELGFKVVLQRDKE
 FQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLGKDRAVAEDIVILVDLFNDQYLEDNVTAPDY
 MKNVLVLTSPGNSLLNSSFSRNLSPTRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKF
 AHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVD
 MSPTFTWKNKLPNDITGRGPQRPVITQNPCPLKECPPCAAPDLAGAPSVFIFPPKIKD
 VLMISLSPMVTVCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPI
 QHQDWMGSAFKCKVNNRALPSPIETISKPRGPVRAQVYVLPPEEMTKKEFSLTC
 MITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSGYSFMYSKLRVQKSTWERGSLFAC
 SVVHEGLHNHLTTKTISRSLGK

Как указано выше, рекомбинантный белок pLKТОK108 объединяет экстрацеллюлярную область человеческой GCC, слитой с областью Fc мышиного IgG2a, в которой две мутантные рецепторсвязывающие области Fc (FcRs) подвергали мутации для предотвращения рецепторного связывания Fc (mIgG2a FcRmutII). Вставка рекомбинантной ДНК для pLKТОK108 была создана с помощью трехэтапного процесса PCR следующим образом: на первом этапе создали фрагменты ДНК экстрацеллюлярной человеческой GCC и адаптированной FcRmutII мышиного IgG2a, содержащие 35 нуклеотидов перекрывающихся последовательностей. В этих реакциях использовали матрицы и праймеры, описанные в табл. 11 и 12, с протоколом, описанным в табл. 13, для создания двух фрагментов. Эти фрагменты ДНК выделяли из 1% агарозного геля, используя гель-очищающий набор Qiagen (Valencia, CA). Матрица для человеческой GCC была обеспечена с помощью экспрессирующего белок вектора, содержащего последовательность человеческой GCC (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA). Матрица для домена Fc была получена из экспрессирующего конструктора для человеческого 1228, слитого с мышиным IgG2aFc с двумя мутантными рецепторсвязывающими областями Fc (FcRmutII), названными pLKТОK84, которые сами были созданы с использованием вектора pLKТОK61 (описанного в патенте США № 7053202, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте) в качестве матрицы.

Таблица 11

Матрицы, использованные на первом этапе сборочных реакций
PCR для создания рекомбинантной ДНК для pLKТОK108

номер	продукт	матрица	праймер 1	праймер 2	размер
1A	экстрацеллюлярная GCC	Human GCC-Vect	pGCCFC5	pGCCFCMuA	1300 п.о.
1B	IgG2a-FcRmutII мыши	pLKТОK84	pGCCFCMuB	pMICOS-4	700 п.о.

Таблица 12

Праймеры, используемые во всех реакциях PCR для создания pLKТОK108

Название праймера	последовательность	SEQ ID №
pGCCFC5	5'-CGCGGATCCCTCACCATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGC-3'	49
pGCCFCMuA	5'- TGGGCACTCTGGGCTGAGGGCCCCGGCCTGTAATATCATTAG - 3'	50
pGCCFCMuB	5'- CAGGCCGGGGCCCTCAGCCCAGAGTGCCCATACACAGAACCCC TGTCC -3'	51
pMICOS-4	5'-TGCTCTAGATTATTTACCCAGAGACCGGGAGATGGTCTTA	52
pSMUCH2	5'-ACCTGTGGAGCTCTTACTGG-3'	53
EF5S	5'-CATTTTCAGGTGTCGTGAGGA-3'	54
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	55
M13f	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	56
M13r	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	57

Таблица 13

Протокол реакций, используемый на первом этапе
сборочных реакций PCR для создания рекомбинантной ДНК
для pLKТОK108

Реакционная смесь	Регулировка режимов работы машины
1 мкл ДНК (1:100 минипрепа матрицы)	94 °C- 2 минуты
0,2 мкл 200 мМ праймера 1	
0,2 мкл 200 мМ праймера 2	30 циклов
10 мкл 10х буфера PCR	94 °C- 1 минута
3 мкл 50 мМ MgCl ₂	55 °C- 30 секунд
2 мкл 10 мМ микса dNTP	72 °C- 2 минуты
83,5 мкл H ₂ O	
0,5 мкл Taq полимеразы	72 °C- 10 минут

Вторая реакция PCR объединила матрицы в концентрациях, указанных в табл. 14. Протокол реакции, приведенный в табл. 15, создал единый рекомбинантный ген слитого белка. Продукт этой реакции используют непосредственно в качестве матрицы в третьей реакции PCR.

Таблица 14

Матрицы, используемые на втором этапе сборочных реакций PCR для создания рекомбинантной ДНК для pLKТОК108

Номер	матрица 1	матрица 2	концентрация
2A	внеклеточная GCC	IgG2a-FcRmutII мыши	10 мкМ (2,5 мкл каждой)
2B	внеклеточная GCC	IgG2a-FcRmutII мыши	30 мкМ (7,5 мкл каждой)

Таблица 15

Протокол реакции, используемый на втором этапе сборочных реакций PCR для создания рекомбинантной ДНК для pLKТОК108

Реакционная смесь	Регулировка режимов работы машины
2,5 или 7,5 мкл каждой ДНК	8 циклов
10 мкл 10x буфера PCR	94 °C- 1 минута
3 мкл MgCl ₂	скорость изменения температуры 30 сек.
2 мкл dNTP	72 °C- 2 минуты
79,5 или 69,5 мкл H ₂ O	скорость изменения температуры 30 сек.
0,5 мкл Taq	

В третьей реакции PCR использовали матрицы и праймеры, описанные в табл. 16 и 12 с протоколом, описанным в табл. 17, для создания полных фрагментов. Эти фрагменты ДНК были выделены из 0,7% агарозного геля с использованием набора для очистки Qiagen (Appendix F) и тиамин-аденозинового (ТА) "липкого" конца ДНК TOPO® TA из набора для клонирования (Appendix F). Были выделены уникальные клоны, а ДНК очищена с использованием ДНК-мини-препаративного набора Qiagen (Appendix F). ДНК секвенировали с праймерами M13f, M13r и pSMUCH2 для идентификации ДНК с желательной последовательностью. Промежуточный TOPO клон TOK108-15 содержал желательную последовательность рекомбинантной ДНК.

Таблица 16

Матрицы, используемые на третьем этапе сборочных реакций PCR для создания рекомбинантной ДНК для pLKТОК108

номер	продукт	матрица	праймер 1	праймер 2	размер
3A	Вставка TOK108	Реакция 2A (5 мкл)	pGCCFC5	pMICOS-4	2028 п.о.
3B	Вставка TOK108	Реакция 2B (5 мкл)	pGCCFC5	pMICOS-4	2028 п.о.

Таблица 17

Протокол реакции, использованный на третьем этапе сборочных реакций PCR для создания рекомбинантной ДНК для pLKТОК108

Реакционная смесь	Настройки машины
5 мкл PCR реакция 2A или 2B	94 оC- 2 минуты
0,2 мкл 200 мМ праймера 1	
0,2 мкл 200 мМ праймера 2	30 циклов
10 мкл 10x PCR буфера	94 оC- 1 минута
3 мкл 50 мМ MgCl ₂	55 оC- 30 секунд
2 мкл 10 мМ dNTP микс	72 оC- 2 минуты
79,5 мкл H ₂ O	
0,5 мкл Taq полимеразы	72 оC- 10 минут

Для создания экспрессирующего вектора pLKТОК4 использовали pcDNATM3.1 в качестве остова вектора. Он содержит ген неомидина (NEO) для резистентности к G-418 (Geneticin®) для создания возможности легкого отбора в условиях исследований. Сайт рестрикции удалили из pcDNATM3.1 с помощью сайт-направленного мутагенеза. Промотор EF-1 α из плазмиды pcDEF3 (по происхождению pEF-BOS⁴) вставили в pcDNATM3.1, тем самым удалив промотор CMV. Круговая карта экспрессирующего вектора pLKТОК4 представлена на фиг. 1.

Клонирование проводили на конечных продуктах PCR с использованием набора для клонирования TOPO® TA. После расщепления с рестрикционными ферментами BamHI и XbaI желательный фрагмент из клона TOPO сшивали с экспрессирующим вектором pLKТОК4, который также расщепляли с помощью BamHI и XbaI. Реакцию сшивания использовали для трансформирования химического компонента K12 клеток E.coli, а затем проводили отбор на агаровых чашках с бульоном Лурия и ампициллином. Выделяли плазмиды из отдельных клонов E. coli с использованием ДНК-мини-препаративного набора QIAGEN's и секвенировали с праймерами SP6 (SEQ ID NO: 55), EF5S (SEQ ID NO: 54) и pSMUCH2 (SEQ ID NO: 53).

С помощью ДНК-секвенирования было определено, что клон содержал желательную рекомбинантную ДНК и данный клон использовали для получения большого количества чистой плазмидной ДНК с применением макси-препаративного набора QIAGEN. Эту макси-препаративную ДНК использовали для трансфицирования в дефицитные по дигидрофолатредуктазе клетки яичников китайского хомячка (CHO-DG44).

Бессывороточную адаптированную суспензию клеточной линии CHO-DG44, названную S1-CHO-DG44, использовали для разработки клеточных линий, продуцирующих pLKТОК108. Кратко, трансфекции производили, используя устройство Nucleofector® от Amaxa Biosystems и набор Nucleofection® V, применяя нелинеализированную кольцевую ДНК или линеализированную плазмидную ДНК, обработанную рестрикционным ферментом Pvu I. Трансфицированные клетки поддерживали в питательной среде IS-CHO-V-GS в течение 48 ч до замены питательной средой G-418. Живые трансфицированные клетки подпитывали свежей селекционной средой G-418 и поддерживали в культуре до слияния (~10-14 дней). Продуктивность pLKТОК108 каждого трансфекционного пула оценивали, используя анализ ELISA с мышиным IgG2a, а клетки выращивали для создания банков замороженных клеток. С помощью ELISA с мышиным IgG2a был идентифицирован трансфекционный пул с самой высокой продуктивностью для ограниченного разбавлением клонирования, где клетки высевали в 5×96-луночные планшеты для культуры тканей с селекционной средой G-418 (около 1 клетка в каждую лунку).

Планшеты на 96 лунок инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 2 недель без питания. По 15 мкл супернатанта из каждой лунки, содержащей одну колонию, перенесли прямо в 96-луночный аналитический планшет для проведения анализа ELISA с мышиным IgG2a ELISA. Идентифицировали 23 клон с высокой продуктивностью и увеличивали последовательно через 24-луночные планшеты для культивирования клеток, а затем через 6-луночные планшеты для культивирования клеток. Титр антител в супернатанте от этих клонов измеряли при трех разных разведениях а анализе ELISA с мышиным IgG2a.

Лучшие шесть клонов, исходя из титра мышиного IgG2a, расширили в селекционной среде G-418 для создания банков замороженных клеток и адаптировали к бессывороточной суспензионной среде Sigma #21. Плотность и жизнеспособность клеток определяли, используя автоматический анализатор культуры клеток Cedex, а концентрацию белка в супернатанте измеряли, используя анализ ELISA с мышиным IgG2a. После того как клетки достигли логарифмической фазы роста, их собирали и замораживали при -80°C в течение ночи, а затем переносили в криокамеру с жидким азотом для хранения.

Для получения слитого белка клетки оттаивали, засеивали, а затем последовательно разложили в большие Т-колбы, а потом в колбы для встряхивания при начальной плотности 3,0×10⁵ клеток/мл и инкубировали в увлажненном инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO₂ в орбитальном шейкере при скорости 105 об/мин. Полученные культуры подкармливали 10% объемом специальной питательной среды Sigma #21 в дни 4 и 7 и 5% объемом в день 10. Питательная среда Sigma #21 состоит из среды Sigma #21, обогащенной 40 г/л глюкозы, 10 г/л L-глутамина, 10 г/л дрожжевого экстракта и 10 г/л соевого пептона. Культивируемую с использованием перемешивания культуру собирали центрифугированием. Супернатант, содержащий секретированный белок pLKТОК108, фильтровали через 0,2-мкм низкопротеиновый связывающий полиэфирсульфоновый (PES) мембранный фильтр, с сырым pLKТОК108-содержащим фильтратом, готовым для очистки или хранения при -80°C для дальнейшей очистки.

Первичная очистка включала циркулирование отфильтрованных супернатантов, содержащих pLKТОК108, через белок А при около 4°C. Смола затем промывали PBS при pH 7,4, а белок элюировали 0,1 М глицином в PBS при pH 3,0 и нейтрализовали 1 М фосфатом натрия при pH 6,5. Нейтрализованный элюат концентрировали, используя концентратор Vivaspin с отсечением по молекулярной массе (MWCO), составляющей 30 кДа, и загружали в колонку Superdex 200 для эксклюзионной хроматографии (SEC) (Appendix G), которую предварительно уравнивали PBS с pH 7,4 буфером с целью удаления агрегатов этого белка. Очищенный белок pLKТОК108 элюировал в виде одного пика с чистотой, подтвер-

жденной на SDS-PAGE и окрашиванием кумасси. Фракции, содержащие гомодимеры hGCC(ECD)/mIgG2a Fc, объединяли. После того как концентрация объединенного материала была определена с помощью УФ-абсорбции при 280 нм на спектрофотометре NanoDrop™ ND1000, очищенный белок pLKТОК108 поделили на аликвоты и отправили на хранение при -80°C.

Пример 2. Получение кроличьих mAb путем белковой иммунизации.

Кроличьи моноклональные антитела против слитого белка hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII (pLKТОК108) были получены с использованием RabMAb®, предоставляемых Eptomics (Burlingame, CA). Для получения MAб использовали слитый белок hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII (pLKТОК108), названный в данном документе как MIL-44.

Три кроля (ML1009, ML1010 и ML1011) иммунизировали MIL-44, используя обычные методы иммунизации. Сывороточные титры против MIL-44 и не-GCC обратноскрининговый антиген (hMadCAM-mFc) оценивали, используя тестовые кровопускания. Бустерные иммунизации осуществляли после исходных иммунизации. Кролика ML1010 с более высоким сывороточным титром выбрали в качестве кандидата на спленэктомия и моноклональное слияние с использованием патентованных партнерской клеточной линии для слияния клеток и методов Eptomics.

В два отдельных дня (день 1 и день 2), 200 млн лимфоцитных клеток сливали со 100 млн партнерскими клетками и высевали в 20 повторностях в 96-луночные планшеты соответственно. Планшеты содержали в инкубаторах для культуры тканей в стандартных условиях. Рост клеток исследовали через 2-3 недели после слияния, а эффективность слияния подсчитывали, используя количество лунок с ростом, деленное на общее количество обследованных лунок. Эффективность слияния для слияния в 1-й день была измерена при 72% эффективности слияния, в то время как эффективность слияния на 2-й день составила 79%. Как минимум два планшета были исследованы, как указано далее:

Скрининг всех 40 планшетов проводили, используя стандартные методы ELISA с планшетами, покрытыми 50 нг MIL-44/лунку. Расплывание ML1010 при разведении 1:10K использовали в качестве положительного контроля. 151 клон, имеющий O.D. больше чем 0,5, считались предположительно положительными и высевались в 24-луночный планшет.

Последующий подтверждающий скрининг проводили с помощью ELISA с использованием планшетов, покрытых 50 нг MIL-44 или 50 нг hMadCAM-mFc/лунку. 143 клон были подтверждены положительными против MIL-44, и среди них 72 были определены как MIL-44 специфические, т.е. они были отрицательными против белка hMadCAM-mFc.

После оценки мультиклонального супернатанта некоторые из специфических мультиклонов MIL-44 субклонировали, включая мультиклон #148 и #67. Субклонирование осуществляли, используя метод ограниченных клеточных разведений. Скрининг некоторых субклональных супернатантов осуществляли с помощью ELISA. Гибридомные клетки для субклонов #148-2 и #67-4 отбирали для заморозки/хранения и для дополнительного скрининга и анализа в качестве обнаруживающего GCC реагента в иммуногистохимическом анализе (ИНС) assay, как описано в примере 3.

Антитела MIL-44-148-2 и MIL-44-67-4 также клонировали в pcDNA3.1+ neo (Invitrogen) для продуцирования путем временной трансфекции в млекопитающие клетки и для секвенирования. Нуклеинокислотные и аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей антител MIL-44-148-2 и MIL-44-67-4 представлены ниже. Сигнальная последовательность в каждой цепи IgG показана жирным шрифтом; CDR показаны подчеркиванием.

Последовательность нуклеиновой кислоты MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 4):

*ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT
CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGAC
ACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAATGAACTGGGT
CCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATA
GTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAAC
ACCAGCGAGAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACAC
GGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGAGGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTGTG
GGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCC
AGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGAC
CGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACCTCCCGTCCGTCCG
GCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCC
AGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGAACAAGACC
GTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCCACCCCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCAC
CCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGT
TCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGCCGCGCTACGGGAG
CAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAGCACCTCCCCATCGCGCACCAAGGA
CTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGGCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCCCTGGAGCCGAAGGTCTAC
ACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCGTCAGCCTGACCTGCAT
GATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGG
CAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTC
CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTAC
CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCG
CTCTCCGGGTAAATGA*

Аминокислотная последовательность MIL-44-148-2 H2 (SEQ ID NO: 42):

*METGLRWLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQ
TPGKGLEWIAIITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCA
REDSMGYYFDLWGPGLVTISS
GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRFPSVRQSS
GLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVST
LPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSL
TCMINGFYPSDISVEWENKGAEDNYKTTPAVLSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFT
CSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK*

Последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 5):

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTTGGCTCCAGGTGC
CAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGG
AGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGGTTAG
CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCA
TCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTCAGAGGCAGTGGATCTGGGAC
ACAGTTCACTCTACCATCAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTA
CTGTACGACAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGAC
CGAGGTGGTGGTCAAA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCA
 ACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTCCCGATGTCACCGTC
 ACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAAGTGGCATCGAGAACAGTAAACACC
 GCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCAC
 ACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAGGGTGACCCAGGGCACGACCTCAG
 TCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

Аминокислотная последовательность MIL-44-148-2 L5 (SEQ ID NO: 43):

*MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCA***YDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISNWLAW**
YQKQKPGQSPKPLIYRASTLASGVSSRFRSGSGTQFTLTISGVECADEAATYYCQQTY
TNNHLDNGFGGGTEVVVK

GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQN
 SADCTYNLSSLTLTSTQYNHKEYTCRVQTGTTSVVQSFNRGDC

Последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 6):

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCA
GTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACA
CTCACCTGCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTA**AACTATGCAATATCTCTGGGTC**
CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAA
AAGTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCT
CGTCGACCACGGTGGATCTGGAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCC
ACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTTGGGGC
CCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCC
 AGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGAC
 CGTGACCTGGAACCTCGGGCACCTCACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCG
 GCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCC
 AGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACAAGACC
 GTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCCACCCCTGAACCTCTGGGGGG
 ACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCAC
 CCCCAGGGTCLATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGT
 TCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGCCGCGCTACGGGAG
 CAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCAAGGA
 CTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCC
 CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTAC
 ACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTGGTACGCTGACCTGCAT
 GATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGGAAGG
 CAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTC
 CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTCAC
 CTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCG
 CTCTCCGGGTAAATGA

Аминокислотная последовательность MIL-44-67-4 H2 (SEQ ID NO: 44):

*METGLRWLLLVAVLKGVCQSVVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQA
PGKGLEFIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVLEITSPTTEDTATYFCARED
SATYSPNLWPGTLTVSS*

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFSPVRQSS
GLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVST
LPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSL
TCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFT
CSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

Последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 7):

*ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGC
CAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGG
AGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAG
CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCA
TCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGAC
AGAGTTCACTCTACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACT
ACTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGA
CCGAGGTGGTGGTCACA*

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCA
ACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGGCGAATAAATACTTCCCGATGTCACCGTC
ACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAAGTGGCATCGAGAACAGTAAACACC
GCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCAC
ACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAG
TCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

Аминокислотная последовательность MIL-44-67-4 L4 (SEQ ID NO: 45):

*MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCAAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCOASQSINTYLAW
YQQKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSFGTEFTLTISGVECADEAATYYCQQG
YSYNLDRAFGGGTEVVVT*

GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQN
SADCTYNLSSTLTSTQYNHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

Пример 3. Иммуногистохимия с использованием антитела к GCC.

Обнаружение экспрессии GCC в моделях mCRC ксенотрансплантатов опухоли человека.

Анализ ИHC с использованием антитела MIL-44-148-2 был разработан для оценки экспрессии GCC в ксенотрансплантатных опухолях HEK293-GCC и нескольких ксенотрансплантатах исходных человеческих опухолей (PHTX), полученных из образцов метастатического рака толстой и прямой кишки (mCRC) самок мышей SCID.

Уровни белка GCC в зафиксированных формалином и залитых парафином (FFPE) тканях оценивали на срезах толщиной в 5 мкм и инкубировали с антителом MIL-44-148-2 (3,5 мкг/мл) в течение 1 ч на автоматизированном приспособлении для окраски Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) Discovery XT®. Антитела биотинилировали с кроличьим антикозьим вторичным антителом (Vector Laboratories) и проявляли с 3,3'-диаминобензидиновой (DAB) субстратной системой с управлением памятью (Ventana Medical Systems). Предметные стекла контрастно окрашивали гематоксилином и отображали с использованием сканирующей системы для цельных препаратов Aperio.

Уровни GCC значительно отличались среди этих опухолей с H-оценками (система подсчета очков, описанная ниже) от 4+ в опухолевых ксенотрансплантатах HEK293-GCC и от 1+, 1-2+, 2+, 2-3+ и 4+ в разных опухолевых ксенотрансплантатах PHTX. В целом, в опухолях с умеренно/хорошо дифференцированными опухолевыми клетками, которые сохранили поляризованную эпителиальную структуру, GCC сосредоточена на стороне просвета опухолевой ткани.

Обнаружение экспрессии GCC в образцах толстой кишки человека и опухолевых микроматрицах.

Антитела MIL-44-148-2 и MIL-44-67-4, описанные в данном документе, также были выбраны в качестве реагента для обнаружения GCC в протоколе ИHC, описанном выше, с использованием вышеупомянутых ксенотрансплантатов первичных человеческих опухолей (PHTX), HT29 и HEK293 GCC-трансфицированных клеточных пелет, в дополнение к злокачественным и доброкачественным об-

разцам толстой кишки человека (FFPE и опухолевые микроматрицы (ТМА)).

НТ-29 и НЕК293 GСС-трансфицированные клеточные пелеты окрасились, как и ожидалось. РНТХ продемонстрировали широкий спектр интенсивности окраски с клонами МІL-44-148-2 и МІL-44-67-4. И МІL-44-148-2, и МІL-44-67-4 окрашивались положительно в хорошо или в меру дифференцированных карциномах толстой кишки *in situ* или метастазах. Плохо дифференцированные опухоли окрашивались менее интенсивно. Нормальные ткани толстой кишки демонстрировали положительное апикальное окрашивание с использованием антител, продуцируемых субклонами МІL-44-148-2 и МІL-44-67-4.

Антитела из субклонов МІL-44-148-2 и МІL-44-67-4 обеспечили очевидно выраженное интенсивное и специфическое окрашивание в GСС-трансфицированных НЕК293 клетках и клетках НТ29, без какого-либо специфического окрашивания в родительских клеточных линиях НЕК293 и НТ29. Оба клон также положительно окрасились в хорошо или в меру дифференцированных карциномах толстой кишки *in situ* или метастазах. Менее интенсивное окрашивание наблюдалось для обоих субклонов в плохо дифференцированных карциномах. Нормальная толстая кишка демонстрировала положительное апикальное окрашивание для обоих клонов, как и ожидалось. МІL-44-148-2 продемонстрировал в целом более высокую чувствительность и специфичность, чем МІL-44-67-4 в ИНС, в то время как МІL-44-67-4 продемонстрировал лучший динамический диапазон, чем МІL-44-148-2, в клеточных пелетах, МІL-44-148-2 продемонстрировал высшую степень динамического диапазона, чем МІL-44-67-4, в ТМА. В целом, МІL-44-148-2 субклон показал превосходство над МІL-67-4, демонстрируя более высокую чувствительность и специфичность в ИНС и полный динамический диапазон в ТМА и интенсивную окраску (+2 оценка ИНС) в нормальной толстой кишке при низкой концентрации.

Исходя из результатов исходных экспериментов ИНС, описанных выше, субклон МІL-44-148-2 был выбран для разработки и проверки автоматизированного протокола, эквивалентного протоколу ИНС, описанному выше, с использованием автоматизированного приспособления для окраски Tek-Mate. Автоматизированный ИНС анализ является полезным инструментом для скрининга онкологических пациентов с GСС-экспрессирующими опухолями в качестве критерия отбора для клинических испытаний лекарственных средств, нацеленных на GСС-экспрессирующий рак, и в целом в качестве инструмента скрининга пациентов (например, раковых пациентов), которые должны получить GСС-нацеленную терапию.

Протокол ИНС, представленный в табл. 18, был разработан для обнаружения GСС в человеческих клетках FFPE и тканях, и около 53 опухоли толстой и прямой кишки и 20 нормальных тканей толстой кишки, а также 2 рака толстой кишки ТМА (приобретенные у US Biomax) были обследованы по поводу экспрессии GСС. Эти опухоли охватывают широкий круг степеней злокачественности опухоли, а также метастатических тканей рака толстой кишки.

Четырехмикронные срезы были получены из различных образцов ткани. Срезы тканей депарафинизировали с помощью 4,5-минутных замен ксилола с последующими сериями набора спиртов повышающей концентрации и дистиллированной воды. Индуцированное паром восстановление эпитопа (SHIER) использовали с раствором SHIER2 в течение 20 мин в капиллярном зазоре верхней камеры паровой установки Black and Decker.

Таблица 18А

Процедура ИНС

Этапы TechMate	Обнаружение UltraVision (UV)
1.	Блок UltraVision - 15 минут
2.	Инкубирование исходного антитела – в течение ночи
3.	Энхансер исходного антитела - 25 минут
4.	Блок перекиси водорода - 3 x 2,5 минуты каждый
5.	Обнаружение полимера- 25 минут
6.	DAB Chromogen- 3 x 5,0 минут каждый
7.	Контрастное окрашивание гематоксилином - 1 минута

Таблица 18В
 Спецификация реактивности антитела

Антитело	GCC
поставщик	MLNM Takeda фирменное антитело
№ каталога	N/A
источник/изотип	RbIgG
поставляемая партия #	Не определена
QualTek Lot #	R3512
клон	148-2
концентрация	0,475 мкг/мл
предлагаемое разбавление	1,0 мкг/мл
инкубационное время	в течение ночи
предварительная обработка	SHIER2, без фермента
протокол TechMate	MIP
система обнаружения	система обнаружения UltraVision
субклеточная локализация	цитоплазматическая и/или апикальная

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что энхансер исходного антитела может быть антикроличьим вторичным антителом, индуцированным в других видах, отличных от кролика (например, человеке, крысах, козах, мышах и т.д.), имеющим тот же изотип, что и кроличьи mAb MIL-44-148-2 или MIL-44-67 (кроличий IgG), или аналогичным реагентом, пригодным для усиления сигнала MIL-44.

Указанный выше протокол использовал инкубацию антитела MIL-44-148-2 в концентрации 1,0 мкг/мл в течение ночи с пероксидазным обнаружением без биотина (набор Ultravision от Thermo/Lab Vision) и с DAB в качестве хромогена. Эта процедура полностью автоматизирована с использованием TechMate 500 или TechMate 1000 (Roche Diagnostics). После окрашивания препаративные стекла обезвоживали с помощью серийных разведений этанола к абсолютному спирту с последующим полосканием в ксилоле. Препаративные стекла постоянно были закрыты покрывными стеклами и CytoSeal. Предметные стекла исследовали под микроскопом для оценки окрашивания. О положительном окрашивании свидетельствует наличие коричневого (DAB-HRP) продукта реакции. Гематоксилиновое контрастное окрашивание дает голубой ядерный краситель для оценки морфологии клеток и тканей.

По оценке окрашивания GCC было определено, что Н-оценочный подход будет самым лучшим подходом для количественного определения экспрессии GCC. Н-оценочный подход обеспечивает оптимальное разрешение данных для определения различия в интенсивности окрашивания и опухолевого процентного содержания окрашивания в пределах опухолевого типа и среди типов опухолей. Он также обеспечивает хороший инструмент для определения пороговых значений положительного окрашивания. В этом методе предусмотрен процент клеток (0-100) в опухоли с интенсивностью окраски в диапазоне от 0-3+. В настоящем методе были предусмотрены показатели с интенсивностью 0, 0,5, 1, 2 и 3. В зависимости от маркера, 0,5 окрашивание может оцениваться как положительное или отрицательное и отражает свет, но заметное окрашивание для маркера. Чтобы получить Н-оценку, процент опухолевых клеток ум-

ножается на каждую интенсивность и суммируется:

$$\text{H-оценка} = (\% \text{ опухоли} * 1) + (\% \text{ опухоли} * 2) + (\% \text{ опухоли} * 3).$$

Например, если опухоль на 20% отрицательна (0), то 30% +1, 10% +2, 40% +3, что дало бы H-оценку 170.

Максимальная H-оценка составляет 300 (100% * 3) для субклеточной локализации (т.е. апикальной или цитоплазматической), если 100% опухолевых клеток метятся с интенсивностью 3+. Изначально в качестве контроля для сравнения образцов не использовали лишь одну общую H-оценку, но оценивали в дополнение к обзору недействительного процента клеток в каждой интенсивности. Например, показатель 90 может представлять 90% опухолевых клеток, окрашенных с 1+ интенсивностью, или 30% клеток с 3+ интенсивностью. Эти образцы имеют одинаковую H-оценку, но сильно отличаются по экспрессии GSC. Процент клеток, подсчитанный при каждой интенсивности, может варьировать, но, как правило, засчитывается с шагом в 10%; тем не менее, небольшой процент подсчета одного компонента может оцениваться при 1 и 5% также для того, чтобы продемонстрировать, что присутствует некоторый уровень окрашивания. Для GSC, апикальное окрашивание может рассматриваться для оценки с низкоуровневым шагом, таким как 1 и 5%.

Две разные субклеточные локализации оценивали по GSC с помощью H-оценочного подхода. Они включали цитоплазматическое окрашивание и апикальное ассоциированное окрашивание. Цитоплазматический образец окрашивания наблюдался в основном в качестве диффузного по всей цитоплазме опухолевых клеток. Тем не менее, в некоторых случаях были варианты окрашивания цитоплазмы, которые включали интенсивное глобулярное окрашивание или точечное, крупнозернистое окрашивание. Интенсивное глобулярное окрашивание оценивали как 3+ цитоплазматическое окрашивание. Точечное окрашивание было связано с апикальным окрашиванием и не была дана отдельная оценка для этого типа цитоплазматического окрашивания (n=4 образца для точечного окрашивания). GSC-апикальное окрашивание наблюдалось, когда присутствовал просвет. Другие наблюдаемые образцы окрашивания GSC включали мембраноподобное, беспросветное окрашивание (один случай), а внеклеточное окрашивание присутствовало в опухолевом просвете. В нормальных тканях толстой кишки окрашивание в целом было апикальным наряду с диффузным цитоплазматическим окрашиванием.

Поскольку показатели H были получены как для цитоплазматической, так и для апикальной экспрессии GSC и поскольку не известно, один ли тип локализации является более важным по сравнению с другим для эффективности GSC-нацеленной терапии, то были взяты все данные и в некоторых случаях получали совокупный показатель H, используя сумму как апикальной, так и цитоплазматической экспрессии GSC. В таких случаях максимальный показатель H составлял 600 для суммы двух оценок (300 апикальной + 300 цитоплазматической).

В целом, окрашивание в образцах нормальной толстой кишки показало, что GSC анатомически привилегирована, когда экспрессируется на апикальной поверхности. GSC экспрессировалась на более чем 95% опухолевых образцов и в отличие от нормальной ткани продемонстрировала диффузное цитоплазматическое окрашивание в некоторых случаях. Сильное фокусное GSC-окрашивание в образцах CRC печеночных метастазов человека также наблюдалось.

Табл. 19А демонстрирует результаты H-оценки апикального и цитоплазматического окрашивания отобранных нормальных и опухолевых тканей. Данные, показанные в табл. 19А, разбиты в соответствии с происхождением образца (внутренний (обозначенный как MLNM), TMA (обозначенный как BIOMAX) и CRO (обозначенный как QualTek)) и степени дифференцировки опухоли. Суммарные данные положительности обеспечиваются при использовании порогов интенсивности окрашивания 0,5 и 1,0+. В общей сложности было оценено 173 образца опухоли. При использовании порогового значения 0,5+ для положительной интенсивности окрашивания для каждого цитоплазматического или апикального окрашивания 95% опухолей считаются положительными. При использовании порогового значения 1,0+ 92% образцов считаются положительными.

Источник тканей показывает изменение в процентах положительных опухолевых клеток, а также H-показатель. Для 1+ порога положительности окрашивания диапазон составляет от 84% (CRO опухолевых МТВ образцов) до 100% (внутренних образцов или CRO образцов одной ткани - отмечают меньшее количество образцов в этих группах). Внутренние опухолевые ткани продемонстрировали очень высокую H-оценку, составляющую 253 (n=9 образцов). Были также различия в результатах оценки 2 TMA. US Biomax TMA C0992 окрашивалось более сильно, чем C0701. Без намерения быть связанным с любой теорией, отличие в TMA может быть из-за разницы с фиксацией с источником ткани или из-за того, что один блок можно было бы сократить позже, чем другой.

Рассматривались стабильность антигена в вырезанном срезе и свежесть срезанных образцов. Образцы, изучаемые в безотлагательном исследовании, включали образцы, которые были вырезаны и хранились, а также свежесрезанные образцы, указывая на необходимость дальнейших исследований стабильности образцов ткани с течением времени.

Некоторые отличия наблюдались в GSC-положительности и степени злокачественности опухоли (см. табл. 19В), с большим положительным окрашиванием, связанным с хорошо дифференцированными опухолями в сравнении с низкодифференцированными опухолями (шесть опухолей из US Biomax не

включают степень). Опухоли 1-й степени 1 (n=20) показали 100% положительность; опухоли 2-й степени (n=95) метились в 98% положительных случаях; опухоли 3-й степени (n=44) метились при показателе положительности 88%. Плохо дифференцированные опухоли обычно не имеют просвета, что может объяснить некоторые из этого снижения окрашивания из-за отсутствия апикального окрашивания. Этот процент положительности основан на пороговом значении интенсивности окрашивания 0,5+. Семь из 7 дальних метастаз были положительными (из внутренних и тканей CRO). Метастатические опухоли от US Biomax TMA были перечислены как метастазы в лимфатические узлы.

В целом, GCC окрашивает очень высокий процент опухолей толстой кишки и тканей нормальной толстой кишки, независимо от источника ткани или степени дифференцировки опухоли.

Таблица 19А

Сводная информация об окрашивании рака толстой кишки по источникам образца

толстокишечные СА образцы	общее количество СА образцов	количество положительных образцов				средняя H-оценка	
		0.5+ & более		1.0+ & более		0-300	
		No.	%	No.	%	Cyto	Apical
MLNM Samples	9	9	100%	9	100%	83	253
QualTek Single Samples	4	4	100%	4	100%	69	98
QualTek Colon CA MTBS	43	39	91%	36	84%	66	118
BIOMAX C0992 Array	65	63	97%	63	97%	144	164
BIOMAX C0701 Array	52	49	94%	48	92%	98	118
всего	173	164	95%	160	92%	102	138

Таблица 19В

Сводная информация об окрашивании рака толстой кишки по степени злокачественности опухоли

образцы толстой кишки	количество положительных	общие образцы	%
нормальные	57	58	98%
Степень 1	20	20	100%
Степень 2	95	97	98%
Степень 3	44	50	88%
всего	216	225	96%

Точность параллельных определений GCC в анализе ИНС оценивали в одном подходе с использованием пяти повторов каждой из трех клеточных пелет и 14 разных тканей карциномы толстой кишки. Клеточные пелеты готовили на отдельных предметных стеклах. Образцы опухоли толстой кишки помещали в два разных мультиопухолевых блока. Эти ткани оценивали по поводу реактивности GCC в ИНС.

Точность окрашивания клеточных пелет: почти идентичное окрашивание наблюдалось во всех пяти внутрисерийных повторах трех клеточных пелет.

Точность окрашивания образцов опухоли толстой кишки: очень похожее на почти идентичное окрашивание наблюдалось среди пяти внутрисерийных повторов 14 образцов опухоли толстой кишки. Образцы оценивал сертифицированный патологоанатом с использованием H-показателя, как описано ранее выше. Стандартное отклонение показало, что во всех случаях разброс был минимальным, тем самым демонстрируя подходящую точность окрашивания в одной серии. В целом, наблюдалось полностью согласующееся внутрисерийное GCC ИНС окрашивание клеточной пелеты и исследуемых образцов карциномы толстой кишки.

Межсерийную изменчивость и вариативность анализа в связи с различными операторами оценивали в пяти отдельных сериях GCC ИНС окрашивания. Четыре серии проводились в разные дни одним оператором, а второй оператор проводил пятую серию. Окрашивание включало тестирование тех же тканей, что и в тестировании точности, описанном выше.

Воспроизводимость окрашивания клеточных пелет: почти идентичное окрашивание наблюдалось во всех пяти внутрисерийных повторностях трех клеточных пелет.

Воспроизводимость окрашивания образцов опухоли толстой кишки: очень похожее на почти идентичное окрашивание наблюдалось среди пяти межсерийных повторов 14 образцов опухоли толстой кишки. Образцы оценивал сертифицированный патологоанатом с использованием H-показателя, как описано ранее. Стандартное отклонение показало, что во всех случаях разброс был минимальным, тем самым демонстрируя подходящую воспроизводимость окрашивания изо дня в день и с другим оператором. В целом, наблюдалось полностью согласующееся межсерийное и независимое от оператора GCC ИНС окрашивание клеточной пелеты и исследуемых образцов карциномы толстой кишки.

Специфичность GCC ИНС анализа оценивали путем исследования панели нормальных человеческих тканей. Эти нормальные человеческие ткани включали 30 различных типов тканей: надпочечников, мо-

чевого пузыря, костного мозга, молочной железы, коры головного мозга, шейки матки, фаллопиевых труб, сердца, почки, печени, легких, лимфатических узлов, нервов, яичников, поджелудочной железы, околоушной (слюнной) железы), гипофиза, плаценты, предстательной железы, скелетных мышц, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, семенников, тимуса, щитовидной железы, миндалин, мочеточника и матки. Для каждого типа ткани по крайней мере три уникальных экземпляра были окрашены и оценены по поводу иммунореактивности GCC.

В целом, как было показано с помощью анализа ИНС, описанного в данном документе, анализ GCC ИНС с использованием антитела MIL-44-148-2 был в высшей степени специфическим для образцов опухоли толстой кишки по сравнению с окрашиванием нормальных тканей, особенно апикальным окрашиванием. Апикальное окрашивание было обнаружено только в двух из образцов желудка; однако это окрашивание наблюдалось также в отрицательном контроле. Цитоплазматическое окрашивание, обычно светлое, наблюдалось в нескольких типах тканей, включая фолликулу (1 из 3 образцов), кожу (фолликула и дерма, 2 из 3 образцов), париетальные клетки желудка (2 из 3 образцов), железистый эпителий предстательной железы (светлое в 3 из 3 случаев), гипофиз (2 из 3 случаев), эпителий матки (3 из 3 случаев), эпителий маточных труб (2 из 3 случаев), трофобласты плаценты (светлое в 2 из 3 случаев) и легкие (эндотелий в 3 из 3 случаев и эпителий бронхиол в 1 из 3 случаев). Самое сильное цитоплазматическое окрашивание (2+) присутствовало в одном случае маточной трубы и в одном случае гипофиза. В обоих случаях наблюдалось более светлое окрашивание в тех же отсеках в отрицательном контроле. Плазматические клетки были положительными в ряде тканей, в том числе селезенки, миндалин и лимфатическом узле. Гистиоциты были положительными в селезенке, легких и лимфатическом узле. Стромальное окрашивание присутствовало в яичках (2 из 3 случаев), матке (3 из 3 случаев) и яичниках (1 из 3 случаев). Внеклеточное окрашивание кровеносных сосудов наблюдалось повсеместно и возникало без специфического связывания сыворотки.

Анализ GCC с использованием кроличьего моноклонального антитела, MIL-44-148-2, окрашивание на платформе TechMate показывает последовательное меж- и внутрисерийное окрашивание опухолей и контрольных клеточных пеллет. Анализ GCC представляется весьма чувствительным в карциноме толстой кишки, так как окрашивает подавляющее большинство исследуемых образцов опухоли толстой кишки. Анализ GCC представляется гораздо более специфическим для опухолей толстой кишки по сравнению с нормальными тканями. Экспрессия GCC, наблюдаемая во многих опухолях толстой кишки, является более сильной, чем любое окрашивание, наблюдаемое на панели 30 нормальных тканей по меньшей мере с тремя повторностями каждого типа ткани. Не было обнаружено апикального окрашивания GCC в какой-либо нормальной ткани, тогда как апикальное окрашивание является обычным в большинстве образцов GCC. Только цитоплазматическое окрашивание наблюдается в некоторых типах нормальных тканей, и это окрашивание, как правило, является светлым. Антитело MIL-44-148-2 представляется воспроизводимым, чувствительным и относительно специфическим ИНС-маркером для окрашивания зафиксированных формалином, залитых парафином (FFPE) опухолей толстой кишки.

Пример 4. Дополнительная иммуногистохимия в неколоректальных РНТХ моделях и опухолевых микроципах и колоректальные и неколоректальные человеческие клинические образцы.

Автоматизированный ИНС анализ, описанный в примере 3, был использован для оценки экспрессии GCC (т.е. апикальной, цитоплазматической и/или агрегированной экспрессии GCC) в различных неколоректальных образцах из разных источников, включая ксенотрансплантаты исходных человеческих опухолей (РНТХ), полученных из образцов желудочного рака и рака поджелудочной железы самок мышей SCID и различных опухолевых микроципов (TMA), приобретенных у US BioMax, Pantomics и других коммерческих источников), специфичные для рака поджелудочной железы, желудочного рака, рака пищевода, рака легких лейомиосаркомы/рабдомиосаркомы. Экспрессию GCC также оценивали с помощью автоматизированного ИНС анализа, описанного в примере 3, в различных человеческих клинических образцах, включая образцы опухолей желудка, поджелудочной железы и пищевода, полученные из базы данных тканей, спецпродукт CRO (QualTek), занимающийся запуском автоматизированного ИНС анализа, рак толстой и прямой кишки, желудочный рак, рак поджелудочной железы, рак пищевода и рак тонкой кишки, полученные от раковых пациентов, исследованных по поводу экспрессии GCC перед зачислением в открытое многоцентровое с эскалацией доз впервые на человеке исследование GCC-нацеленного конъюгата антитело-лекарственное средство, обозначенного как MLN0264, у взрослых пациентов с развитыми желудочно-кишечными злокачественными заболеваниями, экспрессирующими гуанилилциклазу C (Study C26001, ClinicalTrials.gov identifier NCT01577758).

Результаты ИНС окрашивания различных нормальных и раковых образцов колоректальных тканей и неколоректальных тканей (желудочных, панкреатических, тонкокишечных, пищеводных, легочных, рабдомиосаркомных, лейомиосаркомных) из разных источников (РНТХ, человеческих клинических образцов и опухолевых микроципов) представлены в табл. 20-32. Табл. 20-32 включают показатели ИНС (0, 0,5+, 1+, 2+ и 3+) и соответствующие Н-показатели, рассчитанные исходя из показателей ИНС для апикального ("А") и цитоплазматического ("С" или "cito") окрашивания GCC в разных исследуемых тканях. Кроме того, табл. 32 иллюстрирует сравнение ИНС данных экспрессии GCC в человеческих клинических образцах первичного и метастазирующего рака, в каждом случае полученных от одного и того же паци-

ента. Как показано в первой левой колонке, образцы "А" (т.е. 1А, 2А, 3А, 4А, 5А, 6А, 7А, 8А, 9А 10А и т.д.) относятся к образцам первичной опухоли, тогда как образцы "В" (т.е. 1В, 2В, 3В, 4В, 5В, 6В, 7В, 8В, 9В, 10В и т.д.) относятся к образцам метастазирующей опухоли, полученным от того же пациента, у которого были взяты образцы первичной опухоли (соответствующий образец "А"). В других случаях обозначения "1А" и "1В" относятся к первичной и метастатической опухолям соответственно, полученным от того же самого пациента; обозначения "2А" и "2В" относятся к первичной и метастатической опухолям соответственно, полученным от другого пациента и так далее. Большинство образцов опухоли, показанных в табл. 32, были получены от пациентов, имеющих первичный и метастатический рак толстой и прямой кишки, кроме случаев, когда указано иное, отраженное в столбце "Комментарии", в этом случае указан определенный тип неканцерогенной толстой и прямой кишки. Как видно в колонке "Комментарии" в табл. 32, некоторые образцы нейроэндокринных опухолей, почечноклеточной карциномы, желудочных опухолей, желудочной GIST, панкреатических опухолей и маточной лейомиосаркомы также были исследованы по поводу экспрессии GCC с помощью анализа ИНС.

Таблица 20

ИНС анализ в моделях PNTX рака желудка человека

№ образца	Тип образца	GCC апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)										Н-оценка	
		0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Цито	Апикал
GAF-023	Желудочный СА Ксенотранспл.			100							100	50	300
GAF-025	Желудочный СА Ксенотранспл.		100			90		5		5		115	0
GAF-055	Желудочный СА Ксенотранспл.					70		30			100	130	300
GAF-074	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	90						10			0	20
GAF-075	Желудочный СА Ксенотранспл.	90	100	10								5	0
GAF-087	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAF-114	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAF-152	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAF-318	Желудочный СА Ксенотранспл.					60		40	20		80	140	280
GAF-019	Желудочный СА Ксенотранспл.					60		20		20	100	160	300
GAF-151	Желудочный СА Ксенотранспл.	50	50	50					40		10	25	110
GAM-006	Желудочный СА Ксенотранспл.		100	50		40		10				85	0
GAM-016	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAM-022	Желудочный СА Ксенотранспл.		100	100								50	0
GAM-031	Желудочный СА Ксенотранспл.	90	100	10								5	0
GAM-033	Желудочный СА Ксенотранспл.	70	30	20		10			40		30	20	170
GAM-037	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAM-042	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAM-044	Желудочный СА Ксенотранспл.					50		50	50		50	150	250
GAM-046	Желудочный СА Ксенотранспл.	50	100	50								25	0
GAM-060	Желудочный СА Ксенотранспл.					20		30		50	100	230	300
GAM-080	Желудочный СА Ксенотранспл.	80	100	20								10	0
GAM-093	Желудочный СА Ксенотранспл.	10	20	10		20	10	30	40	30	30	175	180
GAM-095	Желудочный СА Ксенотранспл.	80	100	10		10						15	0
GAM-098	Желудочный СА Ксенотранспл.		10	70		30			40		50	65	230
GAM-110	Желудочный СА Ксенотранспл.	50	100	50								25	0
GAM-119	Желудочный СА Ксенотранспл.		100					40		60		260	0
GAM-138	Желудочный СА Ксенотранспл.	100	100									0	0
GAM-139	Желудочный СА Ксенотранспл.	90	90	10			10					5	10

Таблица 21

Модель РНТХ рака поджелудочной железы человека

образец #	Тип опухоли	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛОЖ./	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н
		0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А	ОТРИЦ.			Цит о	Алика л
117	Желудочный		40	100	20		20		20	ПОЛОЖ.	100	60	100	120
118	Панкреатический		100	50		40		10		ПОЛОЖ.	100	0	160	0
119	Панкреатический		50		50	60		40		ПОЛОЖ.	100	50	240	50
120	Желудочный	30	70	70	30					ПОЛОЖ.	70	30	70	30
121	Панкреатический	20	20	80	70		10			ПОЛОЖ.	80	80	80	90
122	Панкреатический				50	50	50	50		ПОЛОЖ.	100	100	250	150
123	Желудочный		100			50		50		ПОЛОЖ.	100	0	250	0
124	Панкреатический	30	80	50	10	20	10			ПОЛОЖ.	70	20	90	30
125	Панкреатический				20	50	50	50	30	ПОЛОЖ.	100	100	250	210
126	Панкреатический		50	80	20	20	20		10	ПОЛОЖ.	100	50	120	90
127	Панкреатический	50		50			20		80	ПОЛОЖ.	50	100	50	280
128	Панкреатический			20		40		40	100	ПОЛОЖ.	100	100	220	300
129	Панкреатический	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
130	Панкреатический		80	80	20	20				ПОЛОЖ.	100	20	120	20
131	Панкреатический					50		50	100	ПОЛОЖ.	100	100	250	300
132	Панкреатический		30	20	30	40	30	40	10	ПОЛОЖ.	100	70	220	120
133	Панкреатический	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
134	Панкреатический			40	40	40	40	20	20	ПОЛОЖ.	100	100	180	180
135	Панкреатический		70	70	20	30	10			ПОЛОЖ.	100	30	130	40
136	Панкреатический		30		30	100	30		10	ПОЛОЖ.	100	70	200	120
137	Панкреатический					70	50	30	50	ПОЛОЖ.	100	100	230	250
138	Панкреатический		0	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
139	Панкреатический			50	40	50	30		30	ПОЛОЖ.	100	100	150	190
140	Панкреатический		50	100	50					ПОЛОЖ.	100	50	100	50
141	Панкреатический	30	40	40	30	30	30			ПОЛОЖ.	70	60	100	90
142	Панкреатический		100	30		70				ПОЛОЖ.	100	0	170	0
143	Панкреатический		30		30	50	20	50	20	ПОЛОЖ.	100	70	250	130
144	Панкреатический		20	50	20	50	20		40	ПОЛОЖ.	100	80	150	180
145	Панкреатический			40		30		30	100	ПОЛОЖ.	100	100	190	300

Таблица 22А

Гистохимическое окрашивание GCC в панкреатических опухолевых микроочагах (ТМА)

US Biomax P1921 USBiomax PA1921

Панкреатический ТМА

Положен ие чипа	Возр аст	Пол	патология	степен ь	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ/ ИЦ	% ПОЛ ОЖ	% ПОЛО Ж	Н	Н
					0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А					
A1	48	Ж	Протоковая аденокарцинома(х ронич. воспаление панкреат. тканей)	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A2	41	Ж	Протоковая аденокарцинома	1													
A3	57	М	Протоковая аденокарцинома	1	100							100	ПОЛ ОЖ	0	100	0	300
A4	42	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A5	47	Ж	Протоковая аденокарцинома	1													
A6	54	Ж	Протоковая аденокарцинома	1													
A7	40	Ж	Протоковая аденокарцинома	2			30		70			100	ПОЛ ОЖ	100	100	170	300
A8	54	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A9	48	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A10	41	Ж	Протоковая аденокарцинома(ре дко)	1	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A11	57	М	Протоковая аденокарцинома	1	100					50		50	ПОЛ ОЖ	0	100	0	250
A12	42	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A13	47	Ж	Протоковая аденокарцинома(ре дко)	1													
A14	54	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	50	10	50	40		40		10	ПОЛ ОЖ	50	90	50	150
A15	40	Ж	Протоковая аденокарцинома	1			30		70			100	ПОЛ ОЖ	100	100	170	300
A16	54	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B1	51	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B2	54	М	Протоковая аденокарцинома	2	80	80	20	20					ПОЛ ОЖ	20	20	20	20
B3	60	М	Протоковая аденокарцинома	1	90	90	10	10					ПОЛ ОЖ	10	10	10	10
B4	47	М	Протоковая аденокарцинома	1	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B5	39	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B6	54	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B7	62	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	100	80		10		10			ПОЛ ОЖ	0	20	0	30
B8	64	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B9	51	Ж	Протоковая	2	100	90		10					ПОЛ	0	10	0	10

			аденокарцинома										ОЖ.				
B10	54	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	70	50	30					ПОЛ ОЖ.	50	30	50	30
B11	60	М	Протоковая аденокарцинома	1	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
B12	47	М	Протоковая аденокарцинома	1	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B13	39	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
B14	54	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B15	62	Ж	Протоковая аденокарцинома	1	100	80		20					ПОЛ ОЖ.	0	20	0	20
B16	64	Ж	Протоковая аденокарцинома(редко)	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C1	67	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	90		10					ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
C2	65	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
C3	57	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	50		50					ПОЛ ОЖ.	0	50	0	50
C4	48	М	Протоковая аденокарцинома	2		50	100	50					ПОЛ ОЖ.	100	50	100	50
C5	76	М	Протоковая аденокарцинома	2		80	100	20					ПОЛ ОЖ.	100	20	100	20
C6	43	Ж	Протоковая аденокарцинома(фиброзная ткань)	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C7	57	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	70			30				ПОЛ ОЖ.	0	30	0	60
C8	49	М	Протоковая аденокарцинома	1	100	80		20					ПОЛ ОЖ.	0	20	0	20
C9	67	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	80		20					ПОЛ ОЖ.	0	20	0	20
C10	65	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	80	50	20	50					ПОЛ ОЖ.	20	50	20	50
C11	57	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
C12	48	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
C13	76	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	40	50	50		10			ПОЛ ОЖ.	50	60	50	70
C14	43	Ж	Протоковая аденокарцинома(хроническое воспаление фиброзной ткани)	-	90	90	10	10					ПОЛ ОЖ.	10	10	10	10
C15	57	М	Протоковая аденокарцинома	2													
C16	49	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D1	52	М	Протоковая	2		20	80	20		20	20	40	ПОЛ	100	80	140	180

			аденокарцинома											ОЖ.				
D2	72	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D3	53	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D4	55	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D5	51	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	90		10						ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
D6	57	М	Протоковая аденокарцинома(ф иброжировая ткань)	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D7	49	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D8	64	М	Протоковая аденокарцинома	2		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D9	52	М	Протоковая аденокарцинома	2		10	100	30		30		30		ПОЛ ОЖ.	100	90	100	180
D10	72	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D11	53	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	90		10						ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
D12	55	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	90		10						ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
D13	51	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D14	57	М	Протоковая аденокарцинома(х роническое воспаление фмброжировой ткани)	-	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D15	49	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D16	64	М	Протоковая аденокарцинома	2		90	100	10						ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
E1	57	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	50	50	50						ПОЛ ОЖ.	50	50	50	50
E2	72	М	Протоковая аденокарцинома(ре дко)	-	50	90	50	10						ПОЛ ОЖ.	50	10	50	10
E3	42	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	40	50	30		30				ПОЛ ОЖ.	50	60	50	90
E4	55	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
E5	47	М	Протоковая аденокарцинома(па нкреатический duct ткань)	-			100	10	0					ПОЛ ОЖ.	100	100	100	100
E6	44	М	Протоковая аденокарцинома	2														
E7	59	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E8	34	М	Протоковая аденокарцинома	1		50	100	30		20				ПОЛ ОЖ.	100	50	100	70

E9	57	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
E10	72	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	70	50	30					ПОЛ ОЖ.	50	30	50	30
E11	42	М	Протоковая аденокарцинома	2													
E12	55	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E13	47	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	50	50	50					ПОЛ ОЖ.	50	50	50	50
E14	44	М	Протоковая аденокарцинома	2													
E15	59	М	Протоковая аденокарцинома(ре- дко)	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E16	34	М	Протоковая аденокарцинома	1													
F1	61	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F2	39	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
F3	44	М	Протоковая аденокарцинома	2		90	100	10					ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
F4	59	М	Протоковая аденокарцинома	1	80		20	70		20		10	ПОЛ ОЖ.	20	100	20	140
F5	67	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F6	72	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	90	50	10					ПОЛ ОЖ.	50	10	50	10
F7	41	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F8	51	М	Протоковая аденокарцинома	2	80		20	70		30			ПОЛ ОЖ.	20	100	20	130
F9	61	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
F10	39	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F11	44	М	Протоковая аденокарцинома	2		70	80		20	30			ПОЛ ОЖ.	100	30	120	60
F12	59	М	Протоковая аденокарцинома	2			80	30	20	30		40	ПОЛ ОЖ.	100	100	120	210
F13	67	Ф	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F14	72	Ф	Протоковая аденокарцинома	2	50	90	50	10					ПОЛ ОЖ.	50	10	50	10
F15	41	Ф	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F16	51	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	50	50	40		10			ПОЛ ОЖ.	50	50	50	60
G1	41	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G2	58	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G3	60	М	Протоковая	2	50	50	50	50					ПОЛ	50	50	50	50

			аденокарцинома											ОЖ.				
G4	41	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	90	50	10						ПОЛ ОЖ.	50	10	50	10
G5	68	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G6	52	М	Протоковая аденокарцинома(редко) с некрозом	-	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G7	51	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		90	100	10						ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
G8	76	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		20	80	40	20	40				ПОЛ ОЖ.	100	80	120	120
G9	41	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G10	58	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G11	60	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	50	50	50						ПОЛ ОЖ.	50	50	50	50
G12	41	М	Протоковая аденокарцинома	2		50	100	30		20				ПОЛ ОЖ.	100	50	100	70
G13	68	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		80	100	20						ПОЛ ОЖ.	100	20	100	20
G14	52	М	Протоковая аденокарцинома(редко) с некрозом	-	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G15	51	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	50	50	50						ПОЛ ОЖ.	50	50	50	50
G16	76	Ж	Протоковая аденокарцинома	2														
H1	62	Ж	Аденокарцинома	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H2	51	М	Аденокарцинома	3	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
H3	60	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
H4	76	М	Протоковая аденокарцинома	2	60	100	30		10					ПОЛ ОЖ.	40	0	50	0
H5	78	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20						ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
H6	53	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H7	48	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
H8	55	М	Протоковая аденокарцинома	3	50	80	50	20						ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
H9	62	Ж	Аденокарцинома	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H10	51	М	Аденокарцинома	3	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
H11	60	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
H12	76	М	Протоковая аденокарцинома(фиброзная ткань и кровеносный	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0

			сосуд)														
H13	78	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
H14	53	Ж	Протоковая аденокарцинома	2		90	100	10					ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
H15	48	Ж	Протоковая аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H16	55	М	Протоковая аденокарцинома	2		100	90		10				ПОЛ ОЖ.	100	0	110	0
I1	59	М	Протоковая аденокарцинома	2--3	50	90	50	10					ПОЛ ОЖ.	50	10	50	10
I2	62	М	Протоковая аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I3	67	М	Аденокарцинома (редко)	-		100	50		50				ПОЛ ОЖ.	100	0	150	0
I4	66	Ж	Протоковая аденокарцинома	3	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
I5	49	М	Аденосквамозная карцинома (фиброзная ткань и кровеносный сосуд)	-													
I6	50	М	Плоскоклеточная карцинома	3	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
I7	73	М	Недифференцированный рак	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I8	65	М	Недифференцированный рак	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
I9	59	М	Протоковая аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
I10	62	М	Протоковая аденокарцинома(редко)	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I11	67	М	Аденокарцинома	3		100	50		50				ПОЛ ОЖ.	100	0	150	0
I12	66	Ж	Протоковая аденокарцинома	3	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
I13	49	М	Аденосквамозная карцинома	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
I14	50	М	Плоскоклеточная карцинома	3		80	100	20					ПОЛ ОЖ.	100	20	100	20
I15	73	М	Недифференцированный рак	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
I16	65	М	Недифференцированный рак	-													
J1	56	Ж	Недифференцированный рак	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J2	52	Ж	Карциноидная	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J3	51	М	Апикальная карциноидная	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J4	42	М	Нейроэндокринная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J5	52	Ж	Аденокарцинома	1	50	90	50	10					ПОЛ	50	10	50	10

															ОЖ.				
J6	45	Ж	Аденокарцинома	2	100	90		10							ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
J7	49	М	Аденокарцинома	2															
J8	65	М	Аденокарцинома	2															
J9	56	Ж	Недифференциро- ванный рак	-	90	100	10								ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
J10	52	Ж	Карциноидная	-	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J11	51	М	Апикальная карциноидная	-	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J12	42	М	Нейроэндокринная карцинома	-	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J13	52	Ж	Аденокарцинома (хронич. воспаление панкреат. тканей)	-		100	100								ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
J14	45	Ж	Аденокарцинома	2	50	80	50			20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	40
J15	49	М	Аденокарцинома	2															
J16	65	М	Аденокарцинома	2															
K1	52	М	Аденокарцинома	2		80	100	20							ПОЛ ОЖ.	100	20	100	20
K2	56	Ж	Аденокарцинома	2		90	100	10							ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
K3	76	Ж	Аденокарцинома	2	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K4	45	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K5	41	М	Аденокарцинома	3			50		50	50		50			ПОЛ ОЖ.	100	100	150	250
K6	62	М	Аденокарцинома	3															
K7	50	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K8	60	М	Аденокарцинома	3															
K9	52	М	Аденокарцинома	2	100	90		10							ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
K10	56	Ж	Аденокарцинома	2	50	80	50	20							ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
K11	76	Ж	Аденокарцинома (редко) печени	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K12	45	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K13	41	М	Аденокарцинома	3															
K14	62	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K15	50	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K16	60	М	Аденокарцинома	3	100	100									ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L1	56	М	Протоковая аденокарцинома	3															

L2	49	Ж	Аденосквамозная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L3	25	М	Аденокарцинома	2	100	90		10					ПОЛ ОЖ	0	10	0	10
L4	38	М	Аденокарцинома	2	50	90	50	10					ПОЛ ОЖ	50	10	50	10
L5	42	М	Протоковая аденокарцинома	2													
L6	59	М	Аденокарцинома (панкреатическая ткань)	-		100		50		50			ПОЛ ОЖ	100	0	250	0
L7	60	Ж	Протоковая аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L8	13	Ж	Солидная псевдопапиллярная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L9	56	М	Протоковая аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L10	49	Ж	Аденосквамозная карцинома	-	90	100	10						ПОЛ ОЖ	10	0	10	0
L11	25	М	Аденокарцинома (редко)	2	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L12	38	М	Аденокарцинома	2	100	90		10					ПОЛ ОЖ	0	10	0	10
L13	42	М	Протоковая аденокарцинома	2	100	40		40		20			ПОЛ ОЖ	0	60	0	80
L14	59	М	Аденокарцинома	3		100		50		50			ПОЛ ОЖ	100	0	250	0
L15	60	Ж	Протоковая аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
L16	13	Ж	Солидная псевдопапиллярная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0

Таблица 22В

Обобщенные результаты окрашивания GСС в панкреатических опухолевых микроципах (ТМА) US Biomax P1921

AVG % ПОЛОЖ.	AVG % ПОЛОЖ.	AVG Н	AVG Н	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
33	16	38	25	106	171	62%

Таблица 23А

Гистохимическое (ИНС) окрашивание GCC в панкреатических опухолевых микрочипах (TMA) US Biomax PA1002

USBiomax PA1002 Панкреатический TMA																	
					Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛО Ж. /	% ПОЛ ОЖ.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
Положе ние чипа	Воз раст	По л	патология	степен ь	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	ОТРИ Ц.	Цито	Алика л	Цито	Апикал
A1	65	М	Аденокарцинома	2													
A2	52	М	Аденокарцинома	1													
A3	45	Ж	Аденокарцинома	2		80	100			10		10	ПОЛО Ж.	100	20	100	50
A4	44	М	Аденокарцинома	2				10 0		100			ПОЛО Ж.	0	200	0	300
A5	47	М	Аденокарцинома (редко)	1		90	100			10			ПОЛО Ж.	100	10	100	20
B1	55	М	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
B2	57	М	Аденокарцинома (редко) с некрозом	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
B3	34	М	Аденокарцинома	1	80	80			20	20			ПОЛО Ж.	20	20	40	40
B4	56	Ж	Аденокарцинома	1	100	80				20			ПОЛО Ж.	0	20	0	40
B5	42	М	Аденокарцинома	1	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
C1	39	Ж	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
C2	44	М	Аденокарцинома	2		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
C3	59	М	Аденокарцинома	2	70	80	20	10					ПОЛО Ж.	20	10	20	10
													ПОЛО Ж.				
C4	65	М	Аденокарцинома (фиброзировавшая ткань)	-													
C5	67	Ж	Аденокарцинома (хронич. воспаление панкреат. тканей)	-	80	100	20						ПОЛО Ж.	20	0	20	0
D1	53	М	Аденокарцинома	1	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
D2	52	М	Аденокарцинома	2	80	60	20	20		20			ПОЛО Ж.	20	40	20	60
D3	72	Ж	Аденокарцинома	1	50	90	50	10					ПОЛО Ж.	50	10	50	10
D4	58	Ж	Аденокарцинома	2	30	100	70						ПОЛО Ж.	70	0	70	0
D5	41	М	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E1	51	М	Аденокарцинома	2	90	80	10	20					ПОЛО Ж.	10	20	10	20
E2	41	М	Аденокарцинома (редко)	-													
E3	68	Ж	Аденокарцинома	2	90	100	10						ПОЛО Ж.	10	0	10	0
E4	41	Ж	Аденокарцинома	2		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
E5	72	Ж	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0

F1	76	Ж	Аденокарцинома с некрозом	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F2	52	М	Аденокарцинома	2	30	100	70						ПОЛО Ж.	70	0	70	0
F3	60	Ж	Аденокарцинома	2	70	100	30						ПОЛО Ж.	30	0	30	0
F4	76	М	Аденокарцинома (редко)	2	80	90	20	10					ПОЛО Ж.	20	10	20	10
F5	78	М	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G1	41	М	Аденокарцинома	2	70	50	30			20		30	ПОЛО Ж.	30	50	30	130
G2	62	Ж	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G3	51	М	Аденокарцинома (редко)	-		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
G4	50	М	Аденокарцинома	3		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
G5	60	М	Аденокарцинома	2													
H1	53	Ж	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H2	59	М	Аденокарцинома	2		100	70		30				ПОЛО Ж.	100	0	130	0
H3	56	М	Аденокарцинома	3		100	50		50				ПОЛО Ж.	100	0	150	0
H4	60	Ж	Аденокарцинома	3													
H5	66	Ж	Аденокарцинома (фиброзная ткань и кровеносный сосуд)	-													
I1	40	М	Нормальная панкреатическая ткань	-	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
I2	47	М	Нормальная панкреатическая ткань	-										0	0	0	0
I3	25	М	Нормальная панкреатическая ткань	-		70	100		30				ПОЛО Ж.	100	30	100	60
I4	35	Ж	Нормальная панкреатическая ткань	-										0	0	0	0
I5	30	М	Нормальная панкреатическая ткань	-		70	100	30					ПОЛО Ж.	100	30	100	30
J1	50	М	Нормальная панкреатическая ткань	-		100	100						ОТРИ Ц.	100	0	100	0
J2	30	М	Нормальная панкреатическая ткань	-		100	100						ОТРИ Ц.	100	0	100	0
J3	40	М	Нормальная панкреатическая ткань	-										0	0	0	0
J4	35	М	Нормальная панкреатическая ткань	-										0	0	0	0
J5	21	Ж	Нормальная панкреатическая ткань	-										0	0	0	0

Таблица 23В

Обобщенные результаты окрашивания GCC в панкреатических опухолевых микрочипах (TMA) US Biomax PA1002

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
35	12	38	21	22	33	67%

Таблица 24А

Гистохимическое (ИНС) окрашивание GCC в панкреатических опухолевых микрочипах (TMA) Pantomics PAC481 - часть 1

Pantomics PAC481 Панкреатический TMA-Part 1																	
					Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛОЖ./	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н
Положен ие чипа	Возр аст	По л	патология	степен ь	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	ОТРИЦ.	Цито	Апика л	Цит о	Апика л
A01	46	М	Нормальная	-										0	0	0	0
A02	48	М	норма	-										0	0	0	0
A03	58	Ж	Нормальная	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A04	28	Ж	Опухоль островковых клеток	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A05	44	Ж	Аденокарцинома	I	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
A06	64	Ж	Аденокарцинома	I	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A07	39	Ж	Аденокарцинома	I			50		50			100	ПОЛОЖ.	100	100	150	300
A08	49	Ж	Аденокарцинома	I	90	100			10				ПОЛОЖ.	10	0	20	0
C01	56	Ж	Аденокарцинома	I													
C02	49	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
C03	52	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
C04	42	Ж	Аденокарцинома	II	90	100	10						ПОЛОЖ.	10	0	10	0
C05	54	М	Аденокарцинома	II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
C06	59	М	Аденокарцинома	II	100	100	30						ПОЛОЖ.	30	0	30	0
C07	34	Ж	Аденокарцинома	II		100	100	20					ПОЛОЖ.	100	20	100	20
C08	69	М	Аденокарцинома	II		100	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
E01	40	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТРИЦ.	0	0		
E02	79	Ж	Аденокарцинома	III	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
E03	76	Ж	Аденокарцинома	III	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
E04	52	М	Аденокарцинома	III	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
E05	51	Ж	Аденокарцинома	III	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
E06	42	Ж	Аденокарцинома	III													
E07	40	М	Аденокарцинома	III	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
E08	64	М	Метастатический рак	II													

Таблица 24В

Обобщенные результаты окрашивания GCC в панкреатических опухолевых микрочипах (TMA) Pantomics PAC481 - часть 1

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
29	7	34	19	10	18	56%

Гистохимическое (ИНС) окрашивание GCC в панкреатических опухолевых
микроочагах (ТМА) Pantomics PAC481 - часть 2
Pantomics PAC481 Панкреатический ТМА-Part 2

Положен ие чипа	Возр аст	Пол	патология	степен ь	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ/ ОТР ИЦ	% ПОЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
					0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А	ОТР ИЦ	Цито	Аликал	Цит о	Алика л
B01	46	М	Нормальная	-													
B02	48	М	Норма	-													
B03	58	Ж	Норма	-													
B04	28	Ж	Опухоль островковых клеток	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B05	44	Ж	Аденокарцинома	I	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B06	64	Ж	Аденокарцинома	I	70	70	30	30					ПОЛ ОЖ.	30	30	30	30
B07	39	Ж	Аденокарцинома	I			100					100	ПОЛ ОЖ.	100	100	100	300
B08	49	Ж	Аденокарцинома	I	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
D01	56	Ж	Аденокарцинома	I	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D02	49	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D03	52	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D04	42	Ж	Аденокарцинома	II	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
D05	54	М	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D06	59	М	Аденокарцинома	II	80	100	20						ПОЛ	20	0	20	0
													ОЖ.				
D07	34	Ж	Аденокарцинома	II		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D08	69	М	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F01	40	Ж	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F02	79	Ж	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F03	76	Ж	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F04	52	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F05	51	Ж	Аденокарцинома	III	60	100	40						ПОЛ ОЖ.	40	0	40	0
F06	42	Ж	Аденокарцинома	III	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F07	40	М	Аденокарцинома	III	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F08	64	М	Метастатический рак	II	100	70			30				ПОЛ ОЖ.	30	0	60	0

Таблица 24D

Обобщенные результаты окрашивания GCC в панкреатических
опухолевых микроочагах (TMA) Pantomics PAC481 - часть 2

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pst
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
21	7	21	17	10	21	48%

Таблица 25A

Гистохимическое (IHC) окрашивание GCC в панкреатических опухолевых
микроочагах (TMA) US Biomax STC1501 - часть 1

USBiomax STC1501 Желудочный TMA – Part 1																	
					Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ. /	% ПОЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
Положе ние чипа	Возр аст	По л	патология	степен ь	0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А	ОТР ИЦ.	Цито	Апика л	Цит о	Апика л
A1	35	М	Нормальная	-													
A2	83	М	Нормальная	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
A3	53	М	Хронический гастрит	-		70	100					30	ПОЛ ОЖ.	100	30	100	90
A4	54	М	Хронический гастрит	-			50		20	50	30	50	ПОЛ ОЖ.	100	100	180	250
A5	59	М	Желудочная стромальная опухоль	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A6	68	Ж	Перстневиднокл еточная аденокарцинома	-		100			100				ПОЛ ОЖ.	100	0	200	0
A7	42	М	Аденокарцинома	III		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
A8	44	Ж	Аденокарцинома	II~III		20	50		50	30		50	ПОЛ ОЖ.	100	80	150	210
A9	54	Ж	Аденокарцинома	I		50			100	20		30	ПОЛ ОЖ.	100	50	200	130
A10	51	М	Аденокарцинома	II~III		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
A11	61	М	Аденокарцинома	II~III					100	50		50	ПОЛ	100	100	200	250

													ОЖ.				
A12	50	М	Аденокарцинома	II		70			100			30	ПОЛ ОЖ.	100	30	200	90
A13	53	Ж	Аденокарцинома	III		100	70		30				ПОЛ ОЖ.	100	0	130	0
A14	55	М	Аденокарцинома	III		100			70			30	ПОЛ ОЖ.	100	0	230	0
A15	73	Ж	Аденокарцинома	II													
C1	47	F	Аденокарцинома	II~III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C2	70	М	Аденокарцинома	II~III	50	50	50					50	ПОЛ ОЖ.	50	50	50	150
C3	36	М	Аденокарцинома	I~II	100	50						50	ПОЛ ОЖ.	0	50	0	150
C4	65	М	Аденокарцинома	III	60	70			20			20	ПОЛ ОЖ.	40	30	100	90
C5	62	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C6	77	М	Аденокарцинома	II~III	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
C7	45	Ж	Аденокарцинома	I~II	100	30						70	ПОЛ ОЖ.	0	70	0	210
C8	67	М	Аденокарцинома	II~III	70	90	30				10		ПОЛ ОЖ.	30	10	30	20
C9	62	М	Аденокарцинома	II~III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C10	55	Ж	Аденокарцинома	II~III	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
C11	75	М	Аденокарцинома	III		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C12	73	М	Недифференци- рованный рак	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C13	41	М	Аденокарцинома	II~III	50	80	50	10			10		ПОЛ ОЖ.	50	20	50	30
C14	58	М	Аденокарцинома	II~III	70	80	30	20					ПОЛ ОЖ.	30	20	30	20
C15	52	Ж	Аденокарцинома	I~II		40			100	30		30	ПОЛ ОЖ.	100	60	200	150
E1	63	М	Желудочная стромальная опухоль	-	60	100	20		20				ПОЛ ОЖ.	40	0	60	0
E2	72	М	Аденокарцинома	II		100	20		30			50	ПОЛ ОЖ.	100	0	230	0
E3	57	М	Перстневиднокл- еточная аденокарцинома	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E4	60	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E5	66	Ж	Аденокарцинома	III													
E6	62	М	Аденокарцинома	I~II			10		60			30	ПОЛ ОЖ.	100	100	220	300
E7	48	Ж	Аденокарцинома	III	50	100	20		30				ПОЛ ОЖ.	50	0	80	0

E8	60	М	Аденокарцинома	II~III		100	20		30		50		ПОЛ ОЖ.	100	0	230	0
E9	56	М	Аденокарцинома	III		100	50				50		ПОЛ ОЖ.	100	0	200	0
E10	54	М	Аденокарцинома	III		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E11	64	Ж	Аденокарцинома	III		100	30				70		ПОЛ ОЖ.	100	0	240	0
E12	59	М	Аденокарцинома	III	80	100			20				ПОЛ ОЖ.	20	0	40	0
E13	75	М	Недифференцир ованный рак	-	30	100					70		ПОЛ ОЖ.	70	0	210	0
E14	65	М	Перстневиднокл еточная аденокарцинома	-		100					10 0		ПОЛ ОЖ.	100	0	300	0
E15	35	Ж	Аденокарцинома	III		100			70		30		ПОЛ ОЖ.	100	0	230	0
G1	71	М	Аденокарцинома	III	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
G2	38	М	Перстневиднокл еточная аденокарцинома	-	50	100			50				ПОЛ ОЖ.	50	0	100	0
G3	68	М	Желудочная стромальная опухоль	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G4	56	Ж	Аденокарцинома	I~II			50		30		20	100	ПОЛ ОЖ.	100	100	170	300
G5	45	М	Аденокарцинома	II		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G6	45	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G7	74	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G8	24	Ж	Аденокарцинома	II	30	50	50		20	50			ПОЛ ОЖ.	70	50	90	100
G9	51	М	Лимфома?	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G10	53	М	Перстневиднокл еточная аденокарцинома	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G11	58	Ж	Лимфома	-													
G12	58	Ж	Лимфома	-													
G13	81	М	Аденокарцинома	I~II	20	70	50	30	30				ПОЛ ОЖ.	80	30	110	30
G14	56	М	Перстневиднокл еточная аденокарцинома	-													
G15	35	М	Аденокарцинома	I~II			100				10 0		ПОЛ ОЖ.	100	100	100	200
I1	61	М	Аденокарцинома	II	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I2	42	М	Недифференцир ованный рак	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I3	78	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0

I4	65	Ж	Аденокарцинома	III	40	80	20		40			20	ПОЛ ОЖ.	60	20	100	60
I5	68	М	Аденокарцинома	II~III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I6	60	М	Аденокарцинома	II~III													
I7	53	М	Аденокарцинома	II	100	50						50	ПОЛ ОЖ.	0	50	0	150
I8	76	Ж	Муцинозный аденокарцинома	II		100			20		80		ПОЛ ОЖ.	100	0	280	0
I9	50	М	Аденокарцинома	II													
I10	74	М	Аденокарцинома	III	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
I11	75	Ж	Перстневиднокл сточная аденокарцинома	-		100					10 0		ПОЛ ОЖ.	100	0	300	0
I12	68	Ж	Аденокарцинома	II~III		70	100					30	ПОЛ ОЖ.	100	30	100	90
I13	56	Ж	Аденокарцинома	II~III													
I14	53	Ж	Лимфома	-													
I15	80	М	Аденокарцинома	II		100			100				ПОЛ ОЖ.	100	0	200	0

Таблица 25В

Обобщенные результаты окрашивания GCC
в желудочных TMA US Biomax STC1501 - часть 1

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pst
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
57	17	100	45	47	61	77%

Таблица 25С

Гистохимическое (ИНС) окрашивание GCC в желудочных опухолевых
микрочипах US Biomax STC1501 - часть 2

					Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ. /	% ПОЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
Положен ие чипа	Воз рас т	По л	патология	степен ь	0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А	ОТР ИЦ.	Цито	Апика л	Цит о	Апика л
B1	М	35	Нормальная	-	100	100								0	0	0	0
B2	М	83	Нормальная	-		90	100					10		100	10	100	30
B3	М	53	Хронический гастрит	-		100	100							100	0	100	0
B4	М	54	Хронический гастрит	-					50		50	100		100	100	250	300
B5	М	59	Желудочная стромальная опухоль	-	100	100								0	0	0	0
B6	Ж	68	Перстневиднокл сточная аденокарцинома	-	50	100			50					50	0	100	0
B7	М	42	Аденокарцинома	III		100	50		50					100	0	150	0
B8	Ж	44	Аденокарцинома	II~III		100			50		50			100	0	250	0

B9	Ж	54	Аденокарцинома	I					100	30		70		100	100	200	270
B10	М	51	Аденокарцинома	II~III		90	100			10				100	10	100	20
B11	М	61	Аденокарцинома	II~III					100			100		100	100	200	300
B12	М	50	Аденокарцинома	II													
B13	Ж	53	Аденокарцинома	III		100	90				10			100	0	120	0
B14	М	55	Аденокарцинома	III		100	40		30		30			100	0	190	0
B15	Ж	73	Аденокарцинома	II		100	100							100	0	100	0
D1	Ж	47	Аденокарцинома	II~III	100	100								0	0	0	0
D2	М	70	Аденокарцинома	II~III		50	100					50		100	50	100	150
D3	М	36	Аденокарцинома	I~II	100	50						50		0	50	0	150
D4	М	65	Аденокарцинома	III		100	20		30		50			100	0	230	0
D5	М	62	Аденокарцинома	III	90	90	10	10						10	10	10	10
D6	М	77	Аденокарцинома	II~III	40	100	30		30					60	0	90	0
D7	Ж	45	Аденокарцинома	I~II	100	50						50		0	50	0	150
D8	М	67	Аденокарцинома	II~III	80	90	10		10	10				20	10	30	20
D9	М	62	Аденокарцинома	II~III	100	100								0	0	0	0
D10	Ж	55	Аденокарцинома	II~III	100	100								0	0	0	0
D11	М	75	Аденокарцинома	III	50	100			50					50	0	100	0
D12	М	73	Недифференцированный рак	-	100	100								0	0	0	0
D13	М	41	Аденокарцинома	II~III					100			100		100	100	200	300
D14	М	58	Аденокарцинома	II~III	100	90				10				0	10	0	20
D15	Ж	52	Аденокарцинома	I~II		80			100			20		100	20	200	60
F1	М	63	Желудочная стромальная опухоль	-	80	100	20							20	0	20	0
F2	М	72	Аденокарцинома	II		100	20		30		50			100	0	230	0
F3	М	57	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-	100	100								0	0	0	0
F4	М	60	Аденокарцинома	III													
F5	Ж	66	Аденокарцинома	III		100	30		50		20			100	0	190	0
F6	М	62	Аденокарцинома	I~II					100			100		100	100	200	300
F7	Ж	48	Аденокарцинома	III	50	100	50							50	0	50	0
F8	М	60	Аденокарцинома	II~III	40	50			50	10	10	50		60	60	130	170

F9	М	56	Аденокарцинома	III		100			100					100	0	200	0
F10	М	54	Аденокарцинома	III	80	100	20							20	0	20	0
F11	Ж	64	Аденокарцинома	III		100	50		20		30			100	0	180	0
F12	М	59	Аденокарцинома	III	80	100			20					20	0	40	0
F13	М	75	Недифференцированный рак	-	100	100								0	0	0	0
F14	М	65	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-		100					100			100	0	300	0
F15	Ж	35	Аденокарцинома	III		100	30		50		20			100	0	190	0
H1	М	71	Аденокарцинома	III	90	100	10							10	0	10	0
H2	М	38	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-													
H3	М	68	Желудочная стромальная опухоль	-	100	100								0	0	0	0
H4	Ж	56	Аденокарцинома	I~II					100			100		100	100	200	300
H5	М	45	Аденокарцинома	II		100	100							100	0	100	0
H6	М	45	Аденокарцинома	III		100	100							100	0	100	0
H7	М	74	Аденокарцинома	III	100	100								0	0	0	0
H8	Ж	24	Аденокарцинома	II	80	80			20			20		20	20	40	60
H9	М	51	Лимфома?	-													
H10	М	53	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-	70	100	30							30	0	30	0
H11	Ж	58	Лимфома	-													
H12	Ж	58	Лимфома	-													
H13	М	81	Аденокарцинома	I~II		90	100	10						100	10	100	10
H14	М	56	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-													
H15	М	35	Аденокарцинома	I~II		70	80		20			30		100	30	120	90
J1	М	61	Аденокарцинома	II	80	100	20							20	0	20	0
J2	М	42	Недифференцированный рак	-													
J3	М	78	Аденокарцинома	III	100	100								0	0	0	0
J4	Ж	65	Аденокарцинома	III		50	50		50			50		100	50	150	150
J5	М	68	Аденокарцинома	II~III	100	80				20				0	20	0	40
J6	М	60	Аденокарцинома	II~III		100			50		50			100	0	250	0
J7	М	53	Аденокарцинома	II	50	80	50			10		10		50	20	50	50
J8	Ж	76	Муцинозный аденокарцинома	II													
J9	М	50	Аденокарцинома	II		40			100	30		30		100	60	200	150
J10	М	74	Аденокарцинома	III	100	100								0	0	0	0
J11	Ж	75	Перстневидноклеточная аденокарцинома	-		100					100			100	0	300	0
J12	Ж	68	Аденокарцинома	II~III	90	70	10			30				10	30	10	60
J13	Ж	56	Аденокарцинома	II~III													
J14	Ж	53	Лимфома	-													
J15	М	80	Аденокарцинома	II		100			100					100	0	200	0

Таблица 25D

Обобщенные результаты окрашивания GCC
в желудочных TMA US Biomax STC1501 - часть 2

%	%	Н	Н	Общее	Общее	Pct
ПОЛОЖ.	ПОЛОЖ.			количество	количество	
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
58	17	102	48	49	59	83%

Таблица 26A

ИНС-окрашивание GCC пищеводных опухолевых микрочипов Pantomics ESC1021
Pantomics ESC 1021 Пищеводный TMA

					Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛОЖ. /	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н
Положение чипа	Возраст	Пол	патология	степень	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	ОТРИЦ.	Цито	Апикал	Цито	Апикал
A01	56	М	Нормальная		100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A02	53	М	Нормальная		100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A03	53	М	Нормальная		100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A04	62	М	Эзофагит		100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A05	66	М	Эзофагит		100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A06	58	М	Плоскоклеточная карцинома	I	30	100			20		50		ПОЛОЖ.	70	0	190	0
A07	36	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A08	72	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I	50	100			50				ПОЛОЖ.	50	0	100	0
A09	62	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A10	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I	70	100			30				ПОЛОЖ.	30	0	60	0
A11	68	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A12	62	М	Плоскоклеточная карцинома	I	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
A13	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I	70	100	30						ПОЛОЖ.	30	0	30	0
B01	60	М	Плоскоклеточная карцинома	I	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B02	50	М	Плоскоклеточная карцинома	I	90	100					10		ПОЛОЖ.	10	0	30	0
B03	44	М	Плоскоклеточная карцинома	I	70	100			30				ПОЛОЖ.	30	0	60	0

B04	60	М	Плоскоклеточная карцинома	I	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B05	64	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I	70	100	30						ПОЛОЖ.	30	0	30	0
B06	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I	70	100	30						ПОЛОЖ.	30	0	30	0
B07	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I	60	100			20		20		ПОЛОЖ.	40	0	100	0
B08	48	М	Плоскоклеточная карцинома	I	80	100			20				ПОЛОЖ.	20	0	40	0
B09	51	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B10	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B11	71	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B12	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100			10		10		ПОЛОЖ.	20	0	50	0
B13	58	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	70	100	30						ПОЛОЖ.	30	0	30	0
C01	26	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II	30	100			70				ПОЛОЖ.	70	0	140	0
C02	56	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
C03	65	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	30	100			70				ПОЛОЖ.	70	0	140	0
C04	43	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	30	100	60		10				ПОЛОЖ.	70	0	80	0
C05	62	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100	10						ПОЛОЖ.	10	0	10	0
C06	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
C07	59	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	70	100			30				ПОЛОЖ.	30	0	60	0
C08	42	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100	10						ПОЛОЖ.	10	0	10	0
C09	61	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	20	100	80						ПОЛОЖ.	80	0	80	0
C10	57	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
C11	62	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II		100	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
C12	62	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100			10		10		ПОЛОЖ.	20	0	50	0
C13	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
D01	70	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
D02	68	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100	10						ПОЛОЖ.	10	0	10	0
D03	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100			10				ПОЛОЖ.	10	0	20	0
D04	65	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
D05	60	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II		100	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
D06	66	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
D07	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0

D08	68	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
D09	55	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	50	100	50						ПОЛО Ж.	50	0	50	0
D10	60	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100	20						ПОЛО Ж.	20	0	20	0
D11	61	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
D12	56	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
D13	71	Ж	Плоскоклеточная карцинома	I~II		100		100					ПОЛО Ж.	100	0	200	0
E01	57	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100	10						ПОЛО Ж.	10	0	10	0
E02	64	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	50	100	20		30				ПОЛО Ж.	50	0	80	0
E03	72	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	90	100	10						ПОЛО Ж.	10	0	10	0
E04	74	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E05	51	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	80	100			20				ПОЛО Ж.	20	0	40	0
E06	61	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E07	62	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E08	63	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E09	71	М	Плоскоклеточная карцинома	I~II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
E10	51	М	Плоскоклеточная карцинома	II													
E11	54	М	Плоскоклеточная карцинома	II	70	100	30						ПОЛО Ж.	30	0	30	0
E12	77	М	Аденокарцинома	II	80	70	20					30	ПОЛО Ж.	20	30	20	90
E13	64	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F01	45	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F02	52	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F03	59	М	Плоскоклеточная карцинома	II		100	50						ПОЛО Ж.	50	0	50	0
F04	68	М	Плоскоклеточная карцинома	II		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
F05	53	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F06	62	М	Плоскоклеточная карцинома	II		100			50		50		ПОЛО Ж.	100	0	250	0
F07	67	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F08	54	М	Плоскоклеточная карцинома	II	70	100	30						ПОЛО Ж.	30	0	30	0
F09	67	М	Плоскоклеточная карцинома	II	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
F10	56	Ж	Плоскоклеточная карцинома	II	80	100	20						ПОЛО Ж.	20	0	20	0
F11	56	М	Аденокарцинома	II	20				80			100	ПОЛО Ж.	80	100	160	300

F12	57	Ж	Плоскоклеточная карцинома	II~III	80	100			20				ПОЛО Ж.	20	0	40	0
F13	53	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	70	100			30				ПОЛО Ж.	30	0	60	0
G01	57	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G02	47	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G03	66	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G04	47	Ж	Плоскоклеточная карцинома	II~III	70	100	30						ПОЛО Ж.	30	0	30	0
G05	53	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
G06	57	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	90	100	10						ПОЛО Ж.	10	0	10	0
G07	59	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G08	42	М	Плоскоклеточная карцинома	II~III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
G09	49	М	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G10	48	М	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
G11	67	М	Плоскоклеточная карцинома	III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
G12	58	М	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H01	58	М	Аденокарцинома ?	III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
H02	56	М	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H03	61	Ж	Плоскоклеточная карцинома	III	90	100	10						ПОЛО Ж.	10	0	10	0
H04	72	Ж	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H05	60	М	Плоскоклеточная карцинома	III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
H06	49	М	Плоскоклеточная карцинома	III		100	50		50				ПОЛО Ж.	100	0	150	0
H07	56	М	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H08	53	М	Плоскоклеточная карцинома	III		100	100						ПОЛО Ж.	100	0	100	0
H09	66	Ж	Плоскоклеточная карцинома	III	100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H10	65	М	Карциноидная		100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H11	55	М	Аденосквамозная карцинома		100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0
H12	60	М	Недифференцированный рак		100	100							ОТРИ Ц.	0	0	0	0

Таблица 26В

Обобщенные результаты окрашивания GCC в пищеводных опухолевых микроципах Pantomics ESC1021

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
28	1	39	4	57	96	59%

Таблица 27А

ИНС-окрашивание GCC в пищеводных опухолевых микроципах US BioMax ES8010 - часть 1
USBioMax ES8010 Пищеводный TMA-Part 1

Положе ние чипа	Возр аст	По л	патология	степен ь	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ. / ОТР ИЦ.	% ПО ЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
A1	69	М	Плоскоклеточная карцинома	1	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
A3	56	М	Плоскоклеточная карцинома	1	50	100					50		ПОЛ ОЖ.	50	0	150	0
A5	62	М	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100			20				ПОЛ ОЖ.	20	0	40	0
A7	58	М	Плоскоклеточная карцинома	1		100			70		30		ПОЛ ОЖ.	100	0	230	0
A9	46	М	Плоскоклеточная карцинома	1	50	100			50				ПОЛ ОЖ.	50	0	100	0
B1	43	М	Плоскоклеточная карцинома	1	40	100	30				30		ПОЛ ОЖ.	60	0	120	0
B3	61	Ж	Плоскоклеточная карцинома	1	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B5	62	М	Плоскоклеточная карцинома	2	90	100					10		ПОЛ ОЖ.	10	0	30	0
B7	50	М	Плоскоклеточная карцинома	1	40	100	30		30				ПОЛ ОЖ.	60	0	90	0
B9	68	М	Плоскоклеточная карцинома	2	70	100	30						ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
C1	65	М	Плоскоклеточная карцинома	1	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C3	50	М	Плоскоклеточная карцинома	2	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
C5	60	М	Плоскоклеточная карцинома	2	70	100			30				ПОЛ ОЖ.	30	0	60	0
C7	49	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100			20				ПОЛ ОЖ.	20	0	40	0
C9	59	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100	20						ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
D1	43	М	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100			20				ПОЛ ОЖ.	20	0	40	0

D3	62	М	Плоскоклеточная карцинома	2	60	100	40					ПОЛ ОЖ.	40	0	40	0
D5	62	М	Плоскоклеточная карцинома	3	90	100		10				ПОЛ ОЖ.	10	0	20	0
D7	60	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2		100	70	30				ПОЛ ОЖ.	100	0	130	0
D9	54	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100	20					ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
E1	48	М	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100	20					ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
E3	57	М	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E5	58	М	Плоскоклеточная карцинома	2	80	100	20					ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
E7	53	Ж	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E9	56	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	30	100	70					ПОЛ ОЖ.	70	0	70	0
F1	76	М	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F3	60	М	Плоскоклеточная карцинома (редко ткань пищевода)	-	20	100	80					ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
F5	53	М	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F7	49	Ж	Карцинома in situ	-		100	10	0				ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
F9	62	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G1	48	Ж	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G3	57	М	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G5	45	М	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G7	55	Ж	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G9	53	Ж	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H1	68	М	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H3	64	М	Плоскоклеточная карцинома	2	90	100		10				ПОЛ ОЖ.	10	0	20	0
H5	55	М	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H7	63	Ж	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H9	54	Ф	Плоскоклеточная карцинома	3	100	100						ОТР ИЦ.	0	0	0	0

Таблица 27В

Обобщенные результаты окрашивания GCC в пищеводных
опухолевых микрочипах US BioMax ES8010 - часть 1

%	%	Н	Н	Общее	Общее	Pct
ПОЛОЖ.	ПОЛОЖ.			количество	количество	
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
25	0	38	0	24	40	60%

ИНС-окрашивание GCC в пищеводных опухолевых микрочипах
US BioMax ES8010 - часть 2
USBioMax ES8010 Пищеводный TMA (80 Cores)

Положе ние чипа	Возр аст	По л	патология	степен ь	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ. / ОТР ИЦ.	% ПО ЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
					0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А		Цит о	Апика л	Цит о	Апика л
A2	69	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A4	56	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
A6	62	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
A8	58	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-													
A10	46	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	20	100	80						ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
B2	43	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	70	100	30						ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
B4	61	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B6	62	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	70	100					30		ПОЛ ОЖ.	30	0	90	0
B8	50	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	20	100	80						ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
B10	68	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C2	65	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	70		30				ПОЛ ОЖ.	100	0	130	0
C4	50	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C6	60	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C8	49	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C10	59	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	30	100	70						ПОЛ ОЖ.	70	0	70	0
D2	43	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
D4	62	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (редко mucosa)	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D6	62	М	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D8	60	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D10	54	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E2	48	М	Рак рядом с нормальной	-		100	100						ПОЛ	100	0	100	0

			тканью пищевода											ОЖ.				
E4	57	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E6	58	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E8	53	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E10	56	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
F2	76	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-	70	100	30							ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
F4	60	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	20	100	80							ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
F6	53	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
F8	49	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
F10	62	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G2	48	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (гладкая мышца и ткань слизистой железы)	-	20	100	80							ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
G4	57	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (фиброзная ткань, кровеносный сосуд и гладкая мышца ткань)	-	20	100	80							ПОЛ ОЖ.	80	0	80	0
G6	45	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (гладкая мышца ткань)	-														
G8	55	F	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G10	53	F	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ	100	0	100	0
			тканью пищевода											ОЖ.				
H2	68	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-	70	100	30							ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
H4	64	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
H6	55	M	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
H8	63	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода (хроническое воспаление слизистой оболочки)	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
H10	54	Ж	Рак рядом с нормальной тканью пищевода	-		100	100							ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0

Таблица 27D

Обобщенные результаты окрашивания GCC
в пищеводных TMA US BioMax ES8010 - часть 2

% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
76	0	78	0	34	38	89%

ИНС-окрашивание GCC в легочных опухолевых микроципах US BioMax LC20813
US Biomax LC20813 Легкие ТМА

						Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ. /	% ПО ЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
Положе ние чипа	Возр аст	По л	орган	патология	степен ь	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	ОТР ИЦ.	Цит о	Апика л	Цит о	Апикал
A1	72	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	1	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A2	63	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A3	55	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A4	50	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A5	61	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A6	63	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома (редко)	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A7	73	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A8	53	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A9	69	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A10	66	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A11	61	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A12	64	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A13	48	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A14	59	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A15	51	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
A16	70	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B1	63	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B2	55	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B3	76	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B4	68	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
B5	45	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B6	54	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
B7	50	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0

B8	57	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B9	43	Ж	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B10	46	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B11	72	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B12	62	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B13	64	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома с некрозом	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B14	61	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома с некрозом	3	90	100	10							ПОЛОЖ.	10	0	10	0
B15	54	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
B16	61	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
			Легкие	Плоскоклеточная карцинома											ОТРИЦ.				
C1	35	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C2	53	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C3	76	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома (редко) с некрозом	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C4	53	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C5	66	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C6	76	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома (легкие ткани)	-	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C7	70	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома (опухолевый некроз)	-														
C8	64	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C9	68	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома (бронхи, фиброзная ткань и кровеносный сосуд)	-	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
C10	25	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2														
C11	66	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	90	100	10							ПОЛОЖ.	10	0	10	0
C12	66	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	90	100	10							ПОЛОЖ.	10	0	10	0
C13	53	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2		100	10							ПОЛОЖ.	100	0	100	0
C14	39	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	60	100	40							ПОЛОЖ.	40	0	40	0
C15	60	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	70	100	30							ПОЛОЖ.	30	0	30	0

			е	ая карцинома											ОЖ.				
C16	59	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома (хрящ, хроническое воспаление фиброзной ткани и кровеносных сосудов)	-														
D1	62	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D2	54	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D3	67	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D4	54	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D5	49	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D6	46	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D7	56	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	3	90	100			10					ПОЛ ОЖ.	10	0	20	0
D8	55	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D9	45	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	80	100	20							ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
D10	47	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D11	72	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D12	66	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
D13	62	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D14	48	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D15	57	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D16	70	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E1	55	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E2	64	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
E3	67	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E4	75	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E5	56	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E6	77	М	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E7	51	Ж	Легки е	Плоскоклеточн ая карцинома	2	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0

E8	64	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома (легкие ткань)	-													
E9	65	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома с некрозом	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E10	63	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E11	52	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2		100	10	0					ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E12	55	Ж	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2		100	10	0					ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E13	71	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2		100	50		30		20		ПОЛ ОЖ.	100	0	170	0
E14	52	М	Легкие	Плоскоклеточная карцинома	2		100	10	0					ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E15	63	Ж	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
E16	67	Ж	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-		100	50		40		10		ПОЛ ОЖ.	100	0	160	0
F1	46	Ж	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F2	61	М	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F3	54	М	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F4	55	Ж	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
F5	68	М	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-		100	50		50				ПОЛ ОЖ.	100	0	150	0
F6	54	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F7	61	М	Легкие	Аденокарцинома	2			80		20	50		50	ПОЛ ОЖ.	100	100	120	250
F8	60	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F9	62	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F10	38	М	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F11	42	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	50	80	50	20					ПОЛ ОЖ.	50	20	50	20
F12	56	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F13	59	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F14	33	М	Легкие	Аденосквамозная карцинома	-	80	100	20						ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
F15	68	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
F16	49	Ж	Легкие	Аденокарцинома с некрозом	2	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
G1	56	Ж	Легкие	Аденокарцинома (хроническое воспаление)	-													

				фиброзной ткани и кровеносных сосудов)														
G2	60	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	80	100	10		10				ПОЛ ОЖ.	20	0	30	0
G3	39	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	80	100	20						ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
G4	58	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2													
G5	56	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
G6	55	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
G7	62	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
				ма														
G8	64	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
G9	72	М	Легкие	Аденокарцинома	3	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
G10	53	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
G11	65	М	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	90	100			10				ПОЛ ОЖ.	10	0	20	0
G12	52	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2		100	10						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G13	47	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	70	100	20		10				ПОЛ ОЖ.	30	0	40	0
G14	71	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
G15	49	М	Легкие	Аденокарцинома	2		100	10						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
G16	58	М	Легкие	Аденокарцинома	2		100	10						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
H1	62	М	Легкие	Аденокарцинома	2	100	90		10					ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
H2	54	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H3	38	М	Легкие	Аденокарцинома с некрозом	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H4	68	М	Легкие	Аденокарцинома	2	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
H5	64	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H6	41	Ж	Легкие	Аденокарцинома	-	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
H7	40	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0

H8	58	Ж	Легкие	Аденокарцинома с некрозом	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H9	64	М	Легкие	Аденокарцинома с некрозом	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H10	56	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2		90	100	10					ПОЛОЖ.	100	10	100	10
H11	57	Ж	Легкие	Папиллярная аденокарцинома	2	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0
H12	62	Ж	Легкие	Аденокарцинома с некрозом	2		100	80		20				ПОЛОЖ.	100	0	120	0
H13	60	М	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H14	64	Ж	Легкие	Аденокарцинома	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
H15	82	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	90		10					ПОЛОЖ.	0	10	0	10
H16	60	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
			е	ма										ИЦ.				
I1	50	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3	50	100	50						ПОЛОЖ.	50	0	50	0
I2	46	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I3	69	М	Легкие	Аденокарцинома (редко)	3													
I4	51	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I5	70	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I6	67	М	Легкие	Аденокарцинома	3		10	60		20	30	20	60	ПОЛОЖ.	100	90	160	240
I7	36	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I8	49	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I9	60	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
			е	ма										ИЦ.				
I10	39	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I11	65	М	Легкие	Аденокарцинома	3		100	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
I12	69	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3		100	70		30				ПОЛОЖ.	100	0	130	0
I13	75	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I14	75	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
I15	61	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3		100	100						ПОЛОЖ.	100	0	100	0
I16	44	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	90		10					ПОЛОЖ.	0	10	0	10
J1	59	М	Легкие	Аденокарцинома	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
J2	68	Ж	Легкие	Аденокарцинома	3	80	100	20						ПОЛОЖ.	20	0	20	0

			е	ма											ОЖ.				
J3	65	М	Легки е	Аденокарцино ма с некрозом	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J4	65	М	Легки е	Аденосквамоз ная карцинома	-	70	100	30							ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
J5	39	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	80	100	20							ПОЛ ОЖ.	20	0	20	0
J6	74	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J7	50	М	Легки е	Аденокарцино ма	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J8	36	Ж	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J9	46	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	90	100	10							ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
J10	69	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
J11	30	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
			е	ма											ИЦ.				
J12	65	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J13	52	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J14	66	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J15	47	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
J16	52	Ж	Легки е	Аденокарцино ма	3	90	100	10							ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
K1	58	Ж	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K2	46	Ж	Легки е	Аденокарцино ма	3	50	100	50							ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
K3	69	М	Легки е	Аденокарцино ма	3	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K4	58	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
			е	ая карцинома											ИЦ.				
K5	51	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K6	63	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K7	63	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K8	60	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K9	63	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K10	66	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K11	71	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K12	60	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K13	31	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0

			е	ая карцинома											ИЦ.				
K14	61	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K15	52	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
K16	69	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L1	43	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L2	56	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L3	62	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L4	42	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L5	59	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома (фиброзная ткань и кровеносный сосуд)	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L6	55	Ж	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L7	28	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L8	39	М	Легки е	Мелкоклеточн ая карцинома	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L9	61	М	Легки е	Крупноклеточ ный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L10	72	Ж	Легки е	Крупноклеточ ный рак	-	90	100	10							ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
L11	46	М	Легки е	Крупноклеточ ный рак	-	70	100	30							ПОЛ ОЖ.	30	0	30	0
L12	64	Ж	Легки е	Крупноклеточ ный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L13	55	Ж	Легки е	Бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L14	52	М	Легки е	Бронхиоальвео лярный рак	-	90	100	10							ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
L15	55	М	Легки е	Бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
L16	64	Ж	Легки е	Бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
M1	59	М	Легки е	Муцинозный бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
M2	50	Ж	Легки е	Муцинозный бронхиоальвео лярный рак (редко)	-														
M3	27	М	Легки е	Муцинозный бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
M4	48	М	Легки е	Муцинозный бронхиоальвео лярный рак	-	100	100								ОТР ИЦ.	0	0	0	0
M5	56	М	Легки е	Мукоэпидермо идный рак	-	90	100	10							ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0

M6	51	М	Легкие	Мукоэпидермальный рак	-													
M7	48	М	Легкие	Мукоэпидермальный рак	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M8	58	М	Легкие	Мукоэпидермальный рак	-	90	100	10						ПОЛОЖ.	10	0	10	0
M9	49	М	Легкие	Апикальная карциноидная	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M10	47	М	Легкие	Апикальная карциноидная	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M11	67	М	Легкие	Апикальная карциноидная	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M12	65	М	Легкие	Крупноклеточная нейроэндокринная карцинома	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M13	43	М	Легкие	Смешанная крупноклеточная нейроэндокринная карцинома	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M14	58	М	Легкие	Гигантоклеточный рак	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M15	36	Ж	Легкие	Базальноклеточный рак	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
M16	66	М	Легкие	Плеоморфная карцинома	-	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0

Таблица 28В

Обобщенные результаты окрашивания GCC
в легочных TMA US BioMax LC20813

AVG % ПОЛОЖ.	AVG % ПОЛОЖ.	AVG N	AVG N	Общее количество	Общее количество	Pct
Цито	Апикал	Цито	Апикал	Полож.	N	Полож.
14	1	15	3	56	199	28%
11	0	12	0	15	74	20%
23	3	26	7	36	82	44%
0	0	0	0	0	21	0%
3	0	3	0	5	22	23%

Таблица 29А

ИНС-окрашивание GCC в опухолевых микрочипах лейомиосаркомы/рабдомиосаркомы

						Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛОЖ./ОТРИЦ.	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	N	N
Расположение центра	пол	возраст	Орган/ткань	Диагноз патологии/описание ткани	Тип	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
A1	М	85	Фиброзная ткань	Высоко злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A2	М	85	Фиброзная ткань	Высоко злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A3	М	26	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A4	М	26	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A5	Ж	56	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0

A6	Ж	56	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A7	Ж	74	Фиброзная ткань	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A8	Ж	74	Фиброзная ткань	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
A9	М	34	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B1	М	34	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IIA		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
B2	Ж	20	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IIIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B3	Ж	20	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IIIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B4	Ж	49	Жировая ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B5	Ж	49	Жировая ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	NET	100							n/a				
B6	Ж	34	Жировая ткань	Умеренно злокачественная эпителиоидная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B7	Ж	34	Жировая ткань	Умеренно злокачественная эпителиоидная лейомиосаркома	ПВ		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
B8	М	38	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
B9	М	38	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	80	100	20						ПОЛ ОЖ	20	0	20	0
C1	Ж	44	Связка	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IV	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
C2	Ж	44	Связка	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IV	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
C3	Ж	69	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0

C4	Ж	69	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
C5	Ж	88	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C6	Ж	88	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C7	Ж	54	Гладкая мышца	Злокачественная плеоморфная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C8	Ж	54	Гладкая мышца	Злокачественная плеоморфная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
C9	Ж	58	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D1	Ж	58	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D2	Ж	57	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	90	100	10						ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
D3	Ж	57	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
D4	М	78	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	NET	100							n/a				
D5	М	78	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	NET	100							n/a				
D6	Ж	52	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
D7	Ж	52	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	50	100	50						ПОЛ ОЖ.	50	0	50	0
D8	М	61	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
D9	М	61	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома (фиброзная ткань, кровеносный сосуд и гладкая мышца)	ПА		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
E1	Ж	33	Фиброзная ткань	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
E2	Ж	33	Фиброзная ткань	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА	100	100							ОТР	0	0	0	0

			ткань	рабдомиосаркома										ИЦ				
E3	М	21	Забрюшинное пространство	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIA		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
E4	М	21	Забрюшинное пространство	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIA		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
E5	Ж	51	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
E6	Ж	51	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
E7	М	16	Семенник	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
E8	М	16	Семенник	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IIA		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
E9	Ж	49	Матка	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
F1	Ж	49	Матка	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
F2	М	30	Поперечнополосатая мышца	Рабдомиосаркома	IIB	100	100							ОТР	0	0	0	0
			осатая мышца											ИЦ				
F3	М	30	Поперечнополосатая мышца	Рабдомиосаркома	IIB	70	100	30						ПОЛ ОЖ	30	0	30	0
F4	М	18	Язык	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
F5	М	18	Язык	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIA	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
F6	М	91	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
F7	М	91	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB		100	100						ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
F8	Ж	74	Пузырь	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
F9	Ж	74	Пузырь	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIB	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G1	Ж	67	Шейка	Плеоморфная	IIIB	100	100							ОТР	0	0	0	0

			матки	рабдомиосаркома										ИЦ				
G2	Ж	67	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G3	Ж	40	Брюшная полость	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G4	Ж	40	Брюшная полость	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G5	Ж	23	Полость таза	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G6	Ж	23	Полость таза	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G7	М	50	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
G8	М	50	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА		100	10	0					ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
G9	М	10	Поперечнополосатая мышца	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ		100	70		30				ПОЛ ОЖ	100	0	130	0
			осатая мышца															
H1	М	10	Поперечнополосатая мышца	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	50	100	50						ПОЛ ОЖ	50	0	50	0
H2	Ж	32	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПВ	70	100	30						ПОЛ ОЖ	30	0	30	0
H3	Ж	32	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
H4	М	48	Мягкая ткань	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	80	100	20						ПОЛ ОЖ	20	0	20	0
H5	М	48	Мягкая ткань	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
H6	М	40	Мягкая ткань	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IA	80	100	20						ПОЛ ОЖ	20	0	20	0
H7	М	40	Мягкая ткань	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IA	80	100	20						ПОЛ ОЖ	20	0	20	0
H8	М	49	Семенной канальчик	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ		100	10	0					ПОЛ ОЖ	100	0	100	0
H9	М	49	Семенной канальчик	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ		100	10	0					ПОЛ ОЖ	100	0	100	0

11	Ж	48	Матка	Гладкая мышца	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
12	Ж	8	Сердце	Сердечная мышца	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
13	Ж	14	Сердце	Сердечная мышца	-	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Пузырь	Нормальный пузырь	n/a	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			1007 (GCC29 3); Ксенот ранспл.	Ксенотрансплантат человеческой эмбриональной почки - GCC трансфектированная	n/a		100					10 0		ПОЛ ОЖ.	100	0	300	0
n/a			Почечн ая клеточн ая линия - 293 НЕК- GCC#2	Клеточная линия почки эмбриона человека - GCC трансфектированная	n/a		100					10 0		ПОЛ ОЖ.	100	0	300	0
n/a			Почечн ая клеточн ая	Клеточная линия почки эмбриона человека	n/a	100	100							ОТР ИЦ	0	0	0	0
			линия - 293 [НЕК- 293]															
n/a			Ткань 1	Рак толстой кишки МТВ	n/a	100					10		90	ПОЛ ОЖ.	0	100	0	290
n/a			Ткань 2	Рак толстой кишки МТВ	n/a	NET								n/a				
n/a			Ткань 3	Рак толстой кишки МТВ	n/a	80	60	20	10		20		10	ПОЛ ОЖ.	20	40	20	80
n/a			Ткань 4	Рак толстой кишки МТВ	n/a	90	90	10	10					ПОЛ ОЖ.	10	10	10	10
n/a			Ткань 5	Рак толстой кишки МТВ	n/a	NET								n/a				
n/a			Ткань 6	Рак толстой кишки МТВ	n/a	NET								n/a				
n/a			Ткань 7	Рак толстой кишки МТВ	n/a	40		40		20	50		50	ПОЛ ОЖ.	60	100	80	250
n/a			Ткань 8	Рак толстой кишки МТВ	n/a	80		20	20		30		50	ПОЛ ОЖ.	20	100	20	230

Таблица 29В

Результаты оценивания отрицательного контрольного Аб опухолевых микроципах лейомиосаркомы/рабдомиосаркомы

Расположение центра	п о л	в о з р а с т	Орган/ткань	Диагноз патологии/описание ткани	Тип	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ/ ОТР ИЦ.	% ПО ЛО Ж. Цит о	% ПО ЛО Ж. Апика л	Н Цит о	Н Апика л
						0С	0А	1+ С	1+ А	2+ С	2+ А	3+ С	3+ А					
A1	М	85	Фиброзная ткань	Высокозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A2	М	85	Фиброзная ткань	Высокозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A3	М	26	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A4	М	26	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A5	Ж	56	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A6	Ж	56	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A7	Ж	74	Фиброзная ткань	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
			ткань															
A8	Ж	74	Фиброзная ткань	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
A9	М	34	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B1	М	34	Фиброзная ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B2	Ж	20	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B3	Ж	20	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B4	Ж	49	Жировая ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
B5	Ж	49	Жировая ткань	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100							n/a				

B6	Ж	34	Жировая ткань	Умеренно злокачественная эпителиоидная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
B7	Ж	34	Жировая ткань	Умеренно злокачественная эпителиоидная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
B8	М	38	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
B9	М	38	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C1	Ж	44	Связка	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IB	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C2	Ж	44	Связка	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IB	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C3	Ж	69	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C4	Ж	69	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C5	Ж	88	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C6	Ж	88	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IA	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C7	Ж	54	Гладкая мышца	Злокачественная плеоморфная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C8	Ж	54	Гладкая мышца	Злокачественная плеоморфная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
C9	Ж	58	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D1	Ж	58	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	ПВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D2	Ж	57	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IB	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D3	Ж	57	Гладкая мышца	Низкозлокачественная лейомиосаркома	IB	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D4	М	78	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100								n/a				
D5	М	78	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100								n/a				
D6	Ж	52	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D7	Ж	52	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D8	М	61	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
D9	М	61	Гладкая мышца	Умеренно злокачественная лейомиосаркома (фиброзная ткань, кровеносный сосуд и гладкая мышца)	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E1	Ж	33	Фиброзная ткань	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E2	Ж	33	Фиброзная ткань	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0

E3	M	21	Забрюшинное пространство	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E4	M	21	Забрюшинное пространство	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E5	Ж	51	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E6	Ж	51	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E7	M	16	Семенник	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E8	M	16	Семенник	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
E9	Ж	49	Матка	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F1	Ж	49	Матка	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F2	M	30	Поперечнополосатая мышца	Рабдомиосаркома	IIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F3	M	30	Поперечнополосатая мышца	Рабдомиосаркома	IIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F4	M	18	Язык	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F5	M	18	Язык	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F6	M	91	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F7	M	91	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F8	Ж	74	Пузырь	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
F9	Ж	74	Пузырь	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G1	Ж	67	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G2	Ж	67	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G3	Ж	40	Брюшная полость	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G4	Ж	40	Брюшная полость	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G5	Ж	23	Полость таза	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G6	Ж	23	Полость таза	Эмбриональная рабдомиосаркома	IIIВ	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G7	M	50	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G8	M	50	Поперечнополосатая мышца	Плеоморфная рабдомиосаркома	IIА	100	100								ОТР ИЦ	0	0	0	0
G9	M	10	Поперечнополосатая мышца	Альвеолярная	IIВ	100	100								ОТР	0	0	0	0

			осатая мышца	рабдомиосаркома												ИЦ				
H1	М	10	Поперечнополосатая мышца	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H2	Ж	32	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H3	Ж	32	Шейка матки	Плеоморфная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H4	М	48	Мягкая ткань	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H5	М	48	Мягкая ткань	Альвеолярная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H6	М	40	Мягкая ткань	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IA	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H7	М	40	Мягкая ткань	Веретеноклеточная рабдомиосаркома	IA	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H8	М	49	Семенная	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
H9	М	49	Семенная	Эмбриональная рабдомиосаркома	ПВ	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
I1	Ж	48	Матка	Гладкая мышца	-	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
I2	Ж	8	Сердце	Сердечная мышца	-	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
I3	Ж	14	Сердце	Сердечная мышца	-	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Пузырь	Нормальная Пузырь	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			1007 (GCC293); Ксенотранспл.	Ксенотрансплантат человеческой эмбриональной почки - GCC Transfected	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Почечная клеточная линия - 293 HEK-GCC#2	Клеточная линия почки эмбриона человека - GCC Transfected	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Почечная	Клеточная линия почки эмбриона	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
			клеточная линия - 293 [HEK-293]	человека												ИЦ				
n/a			Ткань 1	Рака толстой кишки МТВ	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Ткань 2	Рака толстой кишки МТВ	n/a	NET										n/a				
n/a			Ткань 3	Рака толстой кишки МТВ	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Ткань 4	Рака толстой кишки МТВ	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Ткань 5	Рака толстой кишки МТВ	n/a	NET										n/a				
n/a			Ткань 6	Рака толстой кишки МТВ	n/a	NET										n/a				
n/a			Ткань 7	Рака толстой кишки МТВ	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0
n/a			Ткань 8	Рака толстой кишки МТВ	n/a	100	100									ОТР ИЦ	0	0	0	0

Таблица 30А

ИНС-окрашивание GCC в нераковых клинических образцах толстой и прямой кишки человека из базы данных CRO (QualTek)

QualTek Ткань Database Samples															
	QML стекло		Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛОЖ ./	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н
Образец	№	степен ь	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	ОТРИЦ.	Цито	Апикал	Цит о	Апика л
Панкреатический Ca	MIL#7	2	80	100	20						ПОЛОЖ .	20	0	20	0
Панкреатический Ca	MIL#7	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
Панкреатический Ca	MIL#7	2	60	80	30		10	10		10	ПОЛОЖ .	40	20	50	50
Желудочный Adeno	MIL#8	3	60	80	20	0	20	10	10	10	ПОЛОЖ .	50	20	90	50
Желудочный Adeno	MIL#9	3	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0
Желудочный Adeno	MIL#10	2-3	80	100	20						ПОЛОЖ .	20	0	20	0
Пищеводный Sq Ca	MIL#33	2	90	100	10						ПОЛОЖ .	10	0	10	0
Пищеводный Sq Ca	MIL#12	2	30		50		20				ПОЛОЖ .	70	0	90	0
Пищеводный Sq Ca	MIL#13	2	100	100							ОТРИЦ.	0	0	0	0

Таблица 30В

ИНС-окрашивание GCC в человеческих клинических образцах нормальной толстой кишки и рака толстой и прямой кишки (степень злокачественности опухоли 1, 2, 2&3 или 3) из базы данных тканей CRO (QualTek)

№ образца QualTek	№ образца MLNM	Тип образца	GCC Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)										Н-оценка	Н-оценка	Ткань
			0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	Цитоплазм	Апикал	степень
Q34	PRGNX000525	Толстокишечный							100	30		70	200	270	Нормальная
Q35	PRGNX000526	Толстокишечный			50		50					100	75	300	2
Q36	PRGNX000527	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q37	PRGNX000528	Толстокишечный			50		20		30			100	105	300	2
Q38	PRGNX000529	Толстокишечный			50		50			20		80	75	280	Нормальная
Q39	PRGNX000530	Толстокишечный					50			50	50	50	200	250	3
Q40	PRGNX000531	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q41	PRGNX000532	Толстокишечный		30	100			10		30		30	50	160	2

Q42	PRGNX000533	Толстокишечный					50		50	20		80	150	280	Нормальная
Q43	PRGNX000534	Толстокишечный					50		50	30		70	150	270	2
Q44	PRGNX000535	Толстокишечный		80	100			20					50	20	Нормальная
Q45	PRGNX000536	Толстокишечный					50		50			100	150	300	2
Q46	PRGNX000537	Толстокишечный							100	30		70	200	270	Нормальная
Q47	PRGNX000538	Толстокишечный			80		20					100	60	300	2
Q48	PRGNX000539	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q49	PRGNX000540	Толстокишечный							100	80		20	200	220	2
Q50	PRGNX000541	Толстокишечный			50		50	50		50			75	150	Нормальная
Q51	PRGNX000542	Толстокишечный							100			100	200	300	2
Q52	PRGNX000543	Толстокишечный					70		30			100	130	300	Нормальная
Q53	PRGNX000544	Толстокишечный					100					100	100	300	2
		й													
Q54	PRGNX000545	Толстокишечный			50		50					100	75	300	Нормальная
Q55	PRGNX000546	Толстокишечный		20	90		10			30		50	55	210	2
Q56	PRGNX000547	Толстокишечный			100	50		50					50	75	Нормальная
Q57	PRGNX000548	Толстокишечный			40		30		30			100	110	300	2
Q58	PRGNX000549	Толстокишечный			100			30		40		30	50	200	Нормальная
Q59	PRGNX000550	Толстокишечный			30		50		20			100	105	300	2
Q60	PRGNX000551	Толстокишечный					80		10	50	10	50	130	250	Нормальная
Q61	PRGNX000552	Толстокишечный	80	80			10		10			20	30	60	2 & 3
Q62	PRGNX000553	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q63	PRGNX000554	Толстокишечный					20		80			100	180	300	2
Q64	PRGNX000555	Толстокишечный					100			50		50	100	250	Нормальная

Q65	PRGNX000556	Толстокишечны й					90		10			100	110	300	2
Q66	PRGNX000557	Толстокишечны й			30		50		20	50		50	105	250	Нормальна я
Q67	PRGNX000558	Толстокишечны й													
Q68	PRGNX000559	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я
Q69	PRGNX000560	Толстокишечны й	50		50			20		30		50	25	230	2
Q70	PRGNX000561	Толстокишечны й			50		50	20		30		50	75	230	Нормальна я
Q71	PRGNX000562	Толстокишечны й													
Q72	PRGNX000563	Толстокишечны й		40	70		30	20		20		20	65	120	Нормальна я
Q73	PRGNX000564	Толстокишечны й			100							100	50	300	2
Q74	PRGNX000565	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я
Q75	PRGNX000566	Толстокишечны й			100			10		20		70	50	260	2
Q76	PRGNX000567	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
		Толстокишечны й													
Q77	PRGNX000568	Толстокишечны й	20				70		10			100	90	300	2
Q78	PRGNX000569	Толстокишечны й		30	100			20		30		20	50	140	Нормальна я
Q79	PRGNX000570	Толстокишечны й			100							100	50	300	2
Q80	PRGNX000571	Толстокишечны й					50		50			100	150	300	Нормальна я
Q81	PRGNX000572	Толстокишечны й			80		20					100	60	300	2
Q82	PRGNX000573	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я
Q83	PRGNX000574	Толстокишечны й			50		50			20		80	75	280	2
Q84	PRGNX000575	Толстокишечны й					100			20		80	100	280	Нормальна я
Q85	PRGNX000576	Толстокишечны й			50		20		30	20		80	105	280	2
Q86	PRGNX000577	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
Q87	PRGNX000578	Толстокишечны й			20		60		20			100	110	300	2

Q88	PRGNX000579	Толстокишечны й					50		50			100	150	300	Нормальна я
Q89	PRGNX000580	Толстокишечны й					50		50			100	150	300	3
Q90	PRGNX000581	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
Q91	PRGNX000582	Толстокишечны й			30		50		20	20		80	105	280	2
Q92	PRGNX000583	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
Q93	PRGNX000584	Толстокишечны й		20	100			30				50	50	180	2
Q94	PRGNX000585	Толстокишечны й			50		50			20		80	75	280	Нормальна я
Q95	PRGNX000586	Толстокишечны й													
Q96	PRGNX000587	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
Q97	PRGNX000588	Толстокишечны й					20		80			100	180	300	2
Q98	PRGNX000589	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я
Q99	PRGNX000590	Толстокишечны й			50		30		20	50		50	95	250	2
		й													
Q100	PRGNX000591	Толстокишечны й			50		50			50		50	75	250	Нормальна я
Q101	PRGNX000592	Толстокишечны й		20	100					50		30	50	190	2
Q102	PRGNX000593	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я
Q103	PRGNX000594	Толстокишечны й	100	100									0	0	3
Q104	PRGNX000595	Толстокишечны й			50		50			90		10	75	210	Нормальна я
Q105	PRGNX000596	Толстокишечны й			60		40	20		30		50	70	230	2
Q106	PRGNX000597	Толстокишечны й							100			100	200	300	Нормальна я
Q107	PRGNX000598	Толстокишечны й	10	10	10		30		30	40	20	50	155	230	2 & 3
Q108	PRGNX000599	Толстокишечны й							100			100	200	300	Нормальна я
Q109	PRGNX000600	Толстокишечны й	80	100			20						20	0	2
Q110	PRGNX000601	Толстокишечны й			50		50					100	75	300	Нормальна я

Q111	PRGNX000602	Толстокишечный	10		20		60		10			100	90	300	2
Q112	PRGNX000603	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q113	PRGNX000604	Толстокишечный			50		50			20		80	75	280	2
Q114	PRGNX000605	Толстокишечный			50		50			50		50	75	250	Нормальная
Q115	PRGNX000606	Толстокишечный			50				20		30	100	155	300	2
Q116	PRGNX000607	Толстокишечный					100			50		50	100	250	Нормальная
Q117	PRGNX000608	Толстокишечный		100	70		30						65	0	3
Q118	PRGNX000609	Толстокишечный					100			50		50	100	250	Нормальная
Q119	PRGNX000610	Толстокишечный			30		50		20			100	105	300	2
Q120	PRGNX000611	Толстокишечный					100			50		50	100	250	Нормальная
Q121	PRGNX000612	Толстокишечный			30		60		10	20		80	95	280	2
Q122	PRGNX000613	Толстокишечный					100					100	100	300	Нормальная
		й													я
Q123	PRGNX000614	Толстокишечный			30		50		20			100	105	300	2
Q124	PRGNX000615	Толстокишечный		60			100	20				20	100	80	Нормальная
Q125	PRGNX000616	Толстокишечный			100	20		20		30		30	50	180	2
Q126	PRGNX000617	Толстокишечный					100			30		70	100	270	Нормальная
Q127	PRGNX000618	Толстокишечный					80		20			100	120	300	2
Q128	PRGNX000619	Толстокишечный			50		50	40		40		20	75	180	Нормальная
Q129	PRGNX000620	Толстокишечный	100									100	0	300	2
Q130	PRGNX000621	Толстокишечный					80		20			100	120	300	Нормальная
Q131	PRGNX000622	Толстокишечный			20		30		50			100	140	300	2
Q132	PRGNX000623	Толстокишечный					70		30			100	130	300	Нормальная
Q133	PRGNX000624	Толстокишечный					70		30			100	130	300	2

Таблица 31

Клинические образцы из фазы I испытания C260001 с эскалацией дозы
GCC-нацеленного терапевтического MLN0264

Пациент #	Тип рака	Пол	Дата сбора	Образец Тип/количество	Rcv'd дата	Апикальное цитоплазматическое окрашивание (процент)								ПОЛ ОЖ/ ОТР ИЦ	% ПО ЛО Ж.	% ПОЛО Ж.	Н	Н
						0C	0 A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		Цит о	Апика л	Ци то	Апи кал
58001 - 102**	CRC	М	03-09- 2008	5 неокрашенных стекол	5/22/2012	100	0	0	0	0	0	0	100	ПОЛ ОЖ.	0	100	0	300
58001 - 103**	CRC	Ж	17-02- 2010	5 неокрашенных стекол	5/22/2012	100	20	0	30	0	30	0	20	ПОЛ ОЖ.	0	80	0	150
58001 - 101**	Панкре атичес кий	Ж	15-05- 2012	1 парафиновый блок	5/22/2012	0	0	0	0	0	0	10 0	100	ПОЛ ОЖ.	100	100	300	300
58001 -104	CRC	М	12-04- 2011	5 неокрашенных стекол	6/6/2012	10	0	50	0	20	0	20	100	ПОЛ ОЖ.	90	100	150	300
58001 -105	Панкре атичес кий	М	23-08- 2006	20 неокрашенных стекол	7/3/2012	90	10 0	10	0	0	0	0	0	ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
58002 -103	Пищев одный	М	17-08- 2010	5 неокрашенных стекол	7/3/2012	90	10 0	0	0	10	0	0	0	ПОЛ ОЖ.	10	0	20	0
58002 -101	Панкре атичес кий	М	20-01- 2011	5 неокрашенных стекол	7/3/2012	90	10 0	10	0	0	0	0	0	ПОЛ ОЖ.	10	0	10	0
58002 -102	CRC	М	09-08- 2007	1 FFPE блок	7/3/2012	100	10 0	0	0	0	0	0	0	ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58002 -106	CRC	Ж	22-01- 2011	5 неокрашенных стекол	7/11/2012	100	10 0	0	0	0	0	0	0	ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58001 -107	CRC	Ж	28-11- 2008	5 неокрашенных стекол	7/24/2012	80	20	20	0	0	20	0	60	ПОЛ ОЖ.	20	80	20	220
58001 -107	CRC	Ж	28-11- 2008	5 неокрашенных стекол	7/24/2012	90	10	10	10	0	30	0	50	ПОЛ ОЖ.	10	90	10	220
58001 -107	CRC	Ж	28-11- 2008	5 неокрашенных стекол	7/24/2012	40	0	50	0	10	20	0	80	ПОЛ ОЖ.	60	100	70	280
58002 -111	CRC	Ж	23-10- 2009	5 неокрашенных стекол	7/25/2012	0	0	10 0	0	0	0	0	100	ПОЛ ОЖ.	100	100	100	300
58002 -112	CRC	Ж	01-12- 2011	5 неокрашенных стекол	7/25/2012	0	0	80	0	20	20	0	80	ПОЛ ОЖ.	100	100	120	280

58002-107	CRC	Ж	12-02-2007	5 неокрашенных стекол	7/26/2012	80	50	10	0	10	50	0	0	ПОЛ ОЖ.	20	50	30	100
58002-108	Желудочный	М	27-07-2012	5 неокрашенных стекол	7/31/2012	20	100	20	0	50	0	10	0	ПОЛ ОЖ.	80	0	150	0
58002-113	CRC	М	09-07-2008	5 неокрашенных стекол	7/31/2012	50	20	30	10	20	20	0	50	ПОЛ ОЖ.	50	80	70	200
58001-108	Пищеводный	М	12-05-2010	20 неокрашенных стекол	8/8/2012	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58002-114	CRC	Ж	12-09-2005	5 неокрашенных стекол	8/10/2012	100			10		80		10	ПОЛ ОЖ.	0	100	0	200
58002-105	CRC	М	19-04-2010	1 FFPE блок	8/16/2012	10		70		20	20		80	ПОЛ ОЖ.	90	100	110	280
58001-109	Пищеводный	М	20-09-2011	6 неокрашенных стекол	8/21/2012	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58002-115	CRC	М	24-08-2010	5 неокрашенных стекол	8/21/2012	100			10		20		70	ПОЛ ОЖ.	0	100	0	260
58002-109	Панкреатический	М	08-08-2012	5 неокрашенных стекол	8/22/2012	20	10	40	30	20	30	20	30	ПОЛ ОЖ.	80	90	140	180
58002-117	Панкреатический	М	28-02-2011	5 неокрашенных стекол	8/22/2012	40	10	40	50	20	30		10	ПОЛ ОЖ.	60	90	80	140
58002-118	CRC	М	22-11-2010	1 FFPE блок	9/7/2012		10		10	70	10	30	70	ПОЛ ОЖ.	100	90	230	240
58001-110	Тонкокишечный	Ж	31-08-2012	1 FFPE блок	9/11/2012		80			30		70	20	ПОЛ ОЖ.	100	20	270	60
58002-120	CRC	Ж	12-05-2010	1 FFPE блок	9/12/2012		70	30		40		30	30	ПОЛ ОЖ.	100	30	200	90
58002-121	Желудочный	Ж	03-05-2012	1 FFPE блок	9/12/2012	40	100	10		40		10		ПОЛ ОЖ.	60	0	120	0
58002-123	Панкреатический	Ж	20-05-2011	5 неокрашенных стекол	9/13/2012	100	80						20	ПОЛ ОЖ.	0	20	0	60
51001-101	CRC	М	03-08-2010	5 неокрашенных стекол	9/17/2012					100			100	ПОЛ ОЖ.	100	100	200	300
58002-119	CRC	М	09-11-2005	5 неокрашенных стекол + 2 H&E's	9/19/2012	40	20	40	20	20	20		40	ПОЛ ОЖ.	60	80	80	180

58002-122	Пищеводный	М	10-05-2010	1 FFPE блок и 2 H&E's	9/19/2012	20	100	20		30		30		ПОЛ ОЖ.	80	0	170	0
51001-102	CRC	М	23-11-2010	5 неокрашенных стекол	10/10/2012					50		50	100	ПОЛ ОЖ.	100	100	250	300
51001-103	Панкреатический	Ж	05-08-2009	5 неокрашенных стекол	10/15/2012	50	80	50		10		10		ПОЛ ОЖ.	50	20	50	50
51001-104	CRC	Ж	24-03-2010	5 неокрашенных стекол	10/22/2012	70		30		10		90		ПОЛ ОЖ.	30	100	30	290
58002-116	CRC	М	19-10-2010	5 неокрашенных стекол	10/24/2012					50		50	100	ПОЛ ОЖ.	100	100	250	300
51001-105	Панкреатический	М	29-12-2010	5 неокрашенных стекол	10/24/2012	90	90	10	10					ПОЛ ОЖ.	10	10	10	10
51001-106	CRC	Ж	17-09-2010	5 неокрашенных стекол	10/25/2012	80		20		20		80		ПОЛ ОЖ.	20	100	20	280
58001-111	CRC	Ж	05-02-2005	10 неокрашенных стекол	10/31/2012	90		10	10	10		80		ПОЛ ОЖ.	10	100	10	270
58003-105	CRC	Ж	09-01-2010	5 неокрашенных стекол	11/6/2012	70					30	100		ПОЛ ОЖ.	30	100	90	300
51001-107	CRC	М	31-08-2009	5 неокрашенных стекол	11/7/2012	80		20				100		ПОЛ ОЖ.	20	100	20	300
58002-127	Желудочный	Ж	03-08-2011	5 неокрашенных стекол	11/8/2012	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58003-101	CRC	Ж	13-09-2010	1 парафиновый блок	11/8/2012		10	70	10	30	10	70		ПОЛ ОЖ.	100	90	130	240
58003-107	Панкреатический	Ж	29-02-2012	5 неокрашенных стекол	11/8/2012	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58003-106	CRC	Ж	25-01-2009	5 неокрашенных стекол	11/9/2012	100			10	10		80		ПОЛ ОЖ.	0	100	0	270
58003-108	CRC	Ж	28-07-2011	5 неокрашенных стекол	11/9/2012	100				20		80		ПОЛ ОЖ.	0	100	0	280
51001-108	CRC	М	UK-UK-UK	5 неокрашенных стекол	11/9/2012			30	0	30	30	40	70	ПОЛ ОЖ.	100	100	210	270
51001-109	CRC	М	09-10-2007	5 неокрашенных	11/12/2012	70		30		30		70		ПОЛ ОЖ.	30	100	30	270

				стекло															
58003-103	Пищеводный	М	09-03-2011	5 неокрашенных стекол	11/13/2012	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
58001-112	CRC	М	11-01-2012	20 неокрашенных стекол	11/13/2012	30		30		30		10	100		ПОЛОЖ.	70	100	120	300
58003-110	CRC	Ж	30-05-2012	5 неокрашенных стекол	11/14/2012		100			30		70			ПОЛОЖ.	100	0	270	0
58003-102	CRC	М	17-03-2010	1 парафиновый блок	11/16/2012	20		30	10	40	20	10	70		ПОЛОЖ.	80	100	140	260
58002-126	Панкреатический	Ж	04-08-2011	5 неокрашенных стекол	11/16/2012			30		70					ПОЛОЖ.	100		170	
58003-112	Пищеводный	М	21-10-2011	5 неокрашенных стекол	11/29/2012	40	100	50		10					ПОЛОЖ.	60	0	70	0
58001-114	Панкреатический	М	30-11-2011	5 неокрашенных стекол	11/29/2012	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
58003-104	Панкреатический	М	16-03-2012	5 неокрашенных стекол	12/3/2012	20	100	40		20		20			ПОЛОЖ.	80	0	140	0
	кий			стекло															
51001-110	CRC	Ж	10-02-2009	5 неокрашенных стекол	12/3/2012		20	70	10	30	20		50		ПОЛОЖ.	100	80	130	200
51001-111	CRC	М	16-09-2009	5 неокрашенных стекол	12/7/2012		30	100	10		10		50		ПОЛОЖ.	100	70	100	180
58003-113	Желудочный	Ж	07-02-2011	5 неокрашенных стекол	12/13/2012	100	100								ОТРИЦ.	0	0	0	0
58001-113	Пищеводный	Ж	06-01-2012	5 неокрашенных стекол	12/21/2012			100							ПОЛОЖ.	100		100	
58002-128	Панкреатический	М	09-11-2011	1 парафиновый блок	12/21/2012														
58002-130	Панкреатический	М	10-12-2008	1 парафиновый блок	12/21/2012			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
58002-130	Панкреатический	М	10-12-2008	1 парафиновый блок	12/21/2012			50		50	25		75		ПОЛОЖ.	100	100	150	275
58002-130	Панкреатический	М	10-12-2008	1 парафиновый блок	12/21/2012			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300

	кий			блок														
58002-130	Панкреатический	М	13-04-2011	1 парафиновый блок	12/21/2012			25		75	25		75	ПОЛ ОЖ.	100	100	175	275
58003-114	CRC	М	29-03-2010	5 неокрашенных стекол	12/26/2012	25		50	25	25	25		50	ПОЛ ОЖ.	75	100	100	225
58003-117	CRC	Ж	20-05-2011	5 неокрашенных стекол	12/28/2012		100	70		30				ПОЛ ОЖ.	100	0	130	0
58001-116	Панкреатический	М	26-01-2006	5 неокрашенных стекол	1/4/2013 & 1/18/2013 **	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58001-115	Пищеводный	М	14-12-2010	5 неокрашенных стекол	1/9/2013	50		40		10			100	ПОЛ ОЖ.	50	100	60	300
58003-119	Пищеводный	М	27-12-2011	9 неокрашенных стекол	1/14/2013	70	10	30			10		80	ПОЛ ОЖ.	30	90	30	260
58002-132	Пищеводный	М	23-11-2010	5 неокрашенных стекол & 1 FFPE блок	1/16/2013		50	40		30	20	30	30	ПОЛ ОЖ.	100	50	190	130
51001-112	Желудочный	М	26-01-2009	5 неокрашенных стекол	1/16/2013	70	70	10		20			30	ПОЛ ОЖ.	30	30	50	90
58003-115	CRC	М	08-09-2009	5 неокрашенных стекол	1/17/2013	20		80					100	ПОЛ ОЖ.	80	100	80	300
58003-120	Пищеводный	М	15-11-2011	5 неокрашенных стекол	1/25/2013	10	10	60	10	30	10		70	ПОЛ ОЖ.	90	90	120	240
51001-113	CRC	М	20-07-2009	5 неокрашенных стекол	1/28/2013	50		50					100	ПОЛ ОЖ.	50	100	50	300
51001-114	Панкреатический	Ж	08-11-2007	5 неокрашенных стекол	1/28/2013	80	70	20	20		10			ПОЛ ОЖ.	20	30	20	40
58001-117	Желудочный	М	15-09-2012	5 неокрашенных стекол	1/29/2013		80	90		10	10		10	ПОЛ ОЖ.	100	20	110	50
58003-118	Желудочный	М	28-05-2010	5 неокрашенных стекол	2/4/2013	100			10		40		50	ПОЛ ОЖ.	0	100	0	240
58003-123	CRC	М	01-11-2011	5 неокрашенных стекол	2/6/2013			30		70			100	ПОЛ ОЖ.	100	100	170	300

58003-121	Панкреатический	М	07-09-2012	5 неокрашенных стекол	2/6/2013	100	95				5			ПОЛ ОЖ.	0	5	0	10
58003-125	Панкреатический	М	04-09-2012	5 неокрашенных стекол	2/11/2013		100	100						ПОЛ ОЖ.	100	0	100	0
58003-127	кишечный	М	11-04-2011	5 неокрашенных стекол	2/11/2013		20	100					80	ПОЛ ОЖ.	100	80	100	240
58002-135		Ж	19-12-2012	5 неокрашенных стекол	2/14/2013	100	20		30		50			ПОЛ ОЖ.	0	80	0	130
58001-119	Желудочный	М	29-10-2012	5 неокрашенных стекол	2/15/2013	100	95				5			ПОЛ ОЖ.	0	5	0	10
58001-120	CRC	Ж	22-05-2012	16 неокрашенных стекол	2/15/2013	100	20				40		40	ПОЛ ОЖ.	0	80	0	200
58003-126	CRC	М	29-12-2010	5 неокрашенных стекол	2/18/2013	70		30					100	ПОЛ ОЖ.	30	100	30	300
58003-129	Панкреатический	М	23-03-2012	5 неокрашенных стекол	2/18/2013		90	100	10					ПОЛ ОЖ.	100	10	100	10
58003-131	CRC	М	10-05-2012	5 неокрашенных стекол	2/18/2013	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58002-133	Панкреатический	М	03-03-2011	5 неокрашенных стекол	2/20/2013													
58002-133	Панкреатический	М	03-03-2011	5 неокрашенных стекол	2/20/2013													
58003-122	CRC	М	24-03-2009	5 неокрашенных стекол	2/25/2013			90		10			100	ПОЛ ОЖ.	100	100	110	300
58003-128	Панкреатический	М	21-12-2011	5 неокрашенных стекол	2/25/2013	100	100							ОТР ИЦ.	0	0	0	0
58001-121	CRC	Ж	22-01-2010	20 неокрашенных стекол	2/25/2013	100	90		10					ПОЛ ОЖ.	0	10	0	10
58001-115	Пищеводный	Ж	25-02-2011	5 неокрашенных стекол	2/25/2013	100	55		30		10		5	ПОЛ ОЖ.	0	45	0	65
58003-124	Желудочный	М	07-01-2012	5 неокрашенных стекол	2/28/2013		100	20		20		60		ПОЛ ОЖ.	100	0	240	0
58002-133	Панкреатический	М	03-03-2011	10 неокрашенных стекол	2/28/2013													
58002-129	Пищеводный	М	20-03-2012	5 неокрашенных стекол	2/28/2013			70		30			100	ПОЛ ОЖ.	100	100	130	300
58002-129	Пищеводный	М	08-03-2012*	5 неокрашенных стекол	2/28/2013		70	80		20			30	ПОЛ ОЖ.	100	30	120	90
58002-137		Ж	03-10-2011	1 парафиновый блок	3/1/2013	20	100	40		30		10		ПОЛ ОЖ.	80	0	130	0

Таблица 32

Гистохимическая (ИНС) экспрессия GCS в образцах первичных и метастатических толстокишечных опухолей

образец #	стекло #	Апикальное и цитоплазматическое окрашивание (процент)								комментарии	ПОЛОЖ./ОТРИЦ.	% ПОЛОЖ.	% ПОЛОЖ.	Н	Н
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			Цито	Апикал	Цито	Апикал
1A	1			20		80			100		ПОЛОЖ.	100	100	180	300
1B	2			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
2A	3		50	100	20		20		10		ПОЛОЖ.	100	50	100	90
2B	4		100	60		40					ПОЛОЖ.	100	0	140	0
3A	5			20		80			100		ПОЛОЖ.	100	100	180	300
3B	6			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
4A	7	50		50	50		20		30		ПОЛОЖ.	50	100	50	180
4B	8		50	100	20		30				ПОЛОЖ.	100	50	100	80
5A	9			80		20	20		80		ПОЛОЖ.	100	100	120	280
5B	10	50	40	30	20	20	20		20		ПОЛОЖ.	50	60	70	120
6A	11			80	10	20	30		60		ПОЛОЖ.	100	100	120	250
6B	12			50	10	50	20		70		ПОЛОЖ.	100	100	150	260
7A	13	30		50		20	20		80		ПОЛОЖ.	70	100	90	280
7B	14	30		50		20	20		80		ПОЛОЖ.	70	100	90	280
8A	15					100			100		ПОЛОЖ.	100	100	200	300
8B	16			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
9A	17		100			50		50		высокая степень – окрашивание в вакуолях	ПОЛОЖ.	100	0	250	0
9B	18		60	100	20		20				ПОЛОЖ.	100	40	100	60
10A	19			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
10B	20			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
11A	21	50	10	50	30		30		30		ПОЛОЖ.	50	90	50	180
11B	22	50	60	50	20		10		10		ПОЛОЖ.	50	40	50	70
12A	23			80		20	50		50		ПОЛОЖ.	100	100	120	250
12B	24				20	10	30	90	50	высокая степень – окрашивание, в основном, в вакуолях присутствует несколько просветов	ПОЛОЖ.	100	100	290	230
13A	25	50	20	50	10		20		50		ПОЛОЖ.	50	80	50	200
13B	26		80	100	10		10				ПОЛОЖ.	100	20	100	30
14A	27			80		20			100	компонент перстневидной не оценивали	ПОЛОЖ.	100	100	120	300

14B	28			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
15A	29	50	50	40	10	10	30		10		ПОЛОЖ.	50	50	60	100
15B	31	50	100	50							ПОЛОЖ.	50	0	50	0
16A	32	60	20	30	20	10	30		30	муцинозное	ПОЛОЖ.	40	80	50	170
16B	33			70		30			100		ПОЛОЖ.	100	100	130	300
17A	34			90		10			100		ПОЛОЖ.	100	100	110	300
17B	35	50	20	50	20		20		40		ПОЛОЖ.	50	80	50	180
18A	36			70	20	30	30		50		ПОЛОЖ.	100	100	130	230
18B	37	10	50	80	10	10	20		20		ПОЛОЖ.	90	50	100	110
19A	38			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
19B	39	70	70	30			20		10		ПОЛОЖ.	30	30	30	70
20A	40	80	100	20						нейроэндокринно е	ПОЛОЖ.	20	0	20	0
20B	41	50	90	20		30	10				ПОЛОЖ.	50	10	80	20
21A	42	50		50					100		ПОЛОЖ.	50	100	50	300
21B	43	NET								нет признаков опухоли					
22A	44	60	10	30	10	10	20		60		ПОЛОЖ.	40	90	50	230
22B	45		10	100			10		80		ПОЛОЖ.	100	90	100	260
23A	46	50	10	50					90		ПОЛОЖ.	50	90	50	270
23B	47			70		30			100		ПОЛОЖ.	100	100	130	300
24A	48		10	80		20	40		50		ПОЛОЖ.	100	90	120	230
24B	49	80	40	10		10	30		30	только небольшой АМТ опухоли	ПОЛОЖ.	20	60	30	150
25A	50	50	30	50	20		20		30		ПОЛОЖ.	50	70	50	150
25B	51			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
26A	52			80		20	50		50		ПОЛОЖ.	100	100	120	250
26B	53	Net								нет признаков опухоли					
27A	54	40	70	20	10	20	10	20	10		ПОЛОЖ.	60	30	120	60
27B	55			60		20	30	20	70		ПОЛОЖ.	100	100	160	270
28A	56			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
28B	57			30		50		20	100		ПОЛОЖ.	100	100	190	300
29A	58			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300

29B	59	50		40	20	10	30		50		ПОЛОЖ.	50	100	60	230
30A	61	10		70		20	20		80		ПОЛОЖ.	90	100	110	280
30B	62			50		50	50		50		ПОЛОЖ.	100	100	150	250
31A	63					50		50	100		ПОЛОЖ.	100	100	250	300
31B	64			50		50	50		50		ПОЛОЖ.	100	100	150	250
32A	65			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
32B	66	50	50	50					50		ПОЛОЖ.	50	50	50	150
33A	67			80		20	50		50		ПОЛОЖ.	100	100	120	250
33B	68			20		80			100		ПОЛОЖ.	100	100	180	300
34A	69			100			30		70		ПОЛОЖ.	100	100	100	270
34B	70			100	20		40		40		ПОЛОЖ.	100	100	100	220
35A	71			70		20		10	100		ПОЛОЖ.	100	100	140	300
35B	72			70		20		10	100		ПОЛОЖ.	100	100	140	300
36A	73			50	40	40	50	10	10		ПОЛОЖ.	100	100	160	170
36B	74			30	40	40	30	30	30		ПОЛОЖ.	100	100	200	190
37A	75		20	100	10		20		50		ПОЛОЖ.	100	80	100	200
37B	76	50	90	50					10		ПОЛОЖ.	50	10	50	30
38A	77	30		70			50		50		ПОЛОЖ.	70	100	70	250
38B	78	80		20					100		ПОЛОЖ.	20	100	20	300
39A	79			100			50		50		ПОЛОЖ.	100	100	100	250
39B	80			100					100		ПОЛОЖ.	100	100	100	300
40A	81			40		60	20		80		ПОЛОЖ.	100	100	160	280
40B	82	NE T								нет признаков опухоли					
41A	83	20	60	80	20		10		10		ПОЛОЖ.	80	40	80	70
41B	84	50	40	50	20		20		20		ПОЛОЖ.	50	60	50	120
42A	85		10	80	10	20	40		40		ПОЛОЖ.	100	90	120	210
42B	86		10	80	10	20	30		50		ПОЛОЖ.	100	90	120	220
43A	87		10	30	30	50	30	20	30		ПОЛОЖ.	100	90	190	180
43B	88			50		40	30	10	70		ПОЛОЖ.	100	100	160	270
44A	89			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
44B	91	60	10 0	30		10					ПОЛОЖ.	40	0	50	0

45A	92			30		50		20	100		ПОЛОЖ.	100	100	190	300
45B	93			70		20		10	100	гольджиподобное окрашивание в цитоплазме	ПОЛОЖ.	100	100	140	300
46A	94	90	90	10	10						ПОЛОЖ.	10	10	10	10
46B	95	20	80	80			10		10		ПОЛОЖ.	80	20	80	50
47A	96	50	10 0	50						аденома — нет опухоли	ПОЛОЖ.	50	0	50	0
47B	97		40	80	20	20	20		20		ПОЛОЖ.	100	60	120	120
48A	98	30		70			20		80		ПОЛОЖ.	70	100	70	280
48B	99	90		10			20		80		ПОЛОЖ.	10	100	10	280
49A	100	30		40		30	30		70		ПОЛОЖ.	70	100	100	270
49B	101	30	70	50		20			30		ПОЛОЖ.	70	30	90	90
50A	102		10	90	30	10			60		ПОЛОЖ.	100	90	110	210
50B	103	100	70		10				20		ПОЛОЖ.	0	30	0	70
51A	104	50	80	50			20				ПОЛОЖ.	50	20	50	40
51B	105	NE T								нет признаков опухоли					
52A	106	50	90	50			10				ПОЛОЖ.	50	10	50	20
52B	107	90	90	10	10						ПОЛОЖ.	10	10	10	10
53A	108		40	80	20	20	20		20		ПОЛОЖ.	100	60	120	120
53B	109	50	80	50	20						ПОЛОЖ.	50	20	50	20
54A	110		50	70	20	30	20		10		ПОЛОЖ.	100	50	130	90
54B	111		20	80		20	20		60		ПОЛОЖ.	100	80	120	220
55A	112	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
55B	113	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
56A	114	50	70	50	30						ПОЛОЖ.	50	30	50	30
56B	115	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
57A	116	50	70	50	10		10		10		ПОЛОЖ.	50	30	50	60
57B	117		80	50		50	10		10	небольшой объем опухоли	ПОЛОЖ.	100	20	150	50
58A	118	10		80	20	10	40		40		ПОЛОЖ.	90	100	100	220
58B	119		40	100	20		20		20	небольшой объем опухоли	ПОЛОЖ.	100	60	100	120

59A	121			70		30	30		70		ПОЛОЖ.	100	100	130	270
59B	122			30		70			100		ПОЛОЖ.	100	100	170	300
60A	123	50	70	50	10		10		10		ПОЛОЖ.	50	30	50	60
60B	124	10	30	70	20	20	20		30		ПОЛОЖ.	90	70	110	150
61A	125	50		30		20	50		50		ПОЛОЖ.	50	100	70	250
61B	126	100			20		30		50		ПОЛОЖ.	0	100	0	230
62A	127		80	100			10		10		ПОЛОЖ.	100	20	100	50
62B	128		90	80		20	10				ПОЛОЖ.	100	10	120	20
63A	129	10	50	80		10	20		30		ПОЛОЖ.	90	50	100	130
63B	130		100	90		10					ПОЛОЖ.	100	0	110	0
64A	131		90	80		20	10				ПОЛОЖ.	100	10	120	20
64B	132		60	70	10	30	20		10		ПОЛОЖ.	100	40	130	80
65A	133	50	90	50			10				ПОЛОЖ.	50	10	50	20
65B	134	70	100	30						опухоль высокой степени	ПОЛОЖ.	30	0	30	0
66A	135		30	80		20	50		20		ПОЛОЖ.	100	70	120	160
66B	136		100	100						небольшой объем опухоли	ПОЛОЖ.	100	0	100	0
67A	137	10	20	80		10			80		ПОЛОЖ.	90	80	100	240
67B	138	30	20	70			40		40		ПОЛОЖ.	70	80	70	200
68A	139	20	90			20		60	10	вакуолярное окрашивание	ПОЛОЖ.	80	10	220	30
68B	140		100	70				30			ПОЛОЖ.	100	0	160	0
69A	141		40	20		80	30		30		ПОЛОЖ.	100	60	180	150
69B	142		20	20	20	50	30	30	30		ПОЛОЖ.	100	80	210	170
70A	143			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
70B	144		10	40	30	40	30	20	30		ПОЛОЖ.	100	90	180	180
71A	145									только несколько опухолевых клеток оценено					
71B	71-2	60	50	20		20	20		30		ПОЛОЖ.	40	50	60	130
72A	72-1		50	50		30	20	20	30	высшая степень – атипичное негативное	ПОЛОЖ.	100	50	170	130

72B	72-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
73A	73-1	20	80	80					20		ПОЛОЖ.	80	20	80	60
73B	73-2	40	50	40	10	10	20	10	20		ПОЛОЖ.	60	50	90	110
74A	74-1							100	100	вакуолярное окрашивание	ПОЛОЖ.	100	100	300	300
74B	74-2		20	50	10	50	30		40		ПОЛОЖ.	100	80	150	190
75A	75-1			70		30	30		70		ПОЛОЖ.	100	100	130	270
75B	75-2	10	50	90	10		20		20		ПОЛОЖ.	90	50	90	110
76A	76-1		10	60	10	40	20		60		ПОЛОЖ.	100	90	140	230
76B	76-2			50	10	50	30		60		ПОЛОЖ.	100	100	150	250
77A	77-1		20	90	20	10	20		40		ПОЛОЖ.	100	80	110	180
77B	77-2	10	20	90	10		20		50		ПОЛОЖ.	90	80	90	200
78A	78-1			100					100		ПОЛОЖ.	100	100	100	300
78B	78-2			100					100		ПОЛОЖ.	100	100	100	300
79A	79-1			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
79B	79-2			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
80A	80-1	90		10					100		ПОЛОЖ.	10	100	10	300
80B	80-2			20		50		30	100		ПОЛОЖ.	100	100	210	300
81A	81-1			80		20	30		70		ПОЛОЖ.	100	100	120	270
81B	81-2		10	90	10	10	20		60		ПОЛОЖ.	100	90	110	230
82A	82-1			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
82B	82-2	20		80					100		ПОЛОЖ.	80	100	80	300
83A	83-1	30		70	50		20		30		ПОЛОЖ.	70	100	70	180
83B	83-2			80		20	20		80	гольджиподобное окрашивание в цитоплазме	ПОЛОЖ.	100	100	120	280
84A	84-1	80		20					100		ПОЛОЖ.	20	100	20	300
84B	84-2	100	60		20		10		10		ПОЛОЖ.	0	40	0	70
85A	85-1			100					100		ПОЛОЖ.	100	100	100	300
85B	85-2	100							100		ПОЛОЖ.	0	100	0	300
86A	86-1	10	40	80		10			60		ПОЛОЖ.	90	60	100	180
86B	86-2			50		50			100		ПОЛОЖ.	100	100	150	300
87A	87-1	10	10	80	20	10	20		50		ПОЛОЖ.	90	90	100	210

87B	87-2	10	10	50	30	30	30	10	30		ПОЛОЖ.	90	90	140	180
88A	88-1		30	80	20	20	20		30		ПОЛОЖ.	100	70	120	150
88B	88-2		10 0	50		50					ПОЛОЖ.	100	0	150	0
89A	89-1	100	10 0							клетка почечного эпителия	ОТРИЦ.	0	0	0	0
89B	89-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
90A	90-1	50	10 0	20					30	панкреатическое - нейроэндокринное	ПОЛОЖ.	50	0	110	0
90B	90-2		10 0			20			80	вакуолярное окрашивание	ПОЛОЖ.	100	0	280	0
91A	91-1	100	10 0							перитонеальное - липосаркома	ОТРИЦ.	0	0	0	0
91B	91-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
92A	92-1	100	10 0							желудочное GIST	ОТРИЦ.	0	0	0	0
92B	92-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
93A	93-1	50		30		20			100	гольджиподобное окрашивание в цитоплазме	ПОЛОЖ.	50	100	70	300
93B	93-2	50		30		20			100		ПОЛОЖ.	50	100	70	300
94A	94-1	50		50					100		ПОЛОЖ.	50	100	50	300
94B	94-2			80		20			100		ПОЛОЖ.	100	100	120	300
95A	95-1			40		50		10	100		ПОЛОЖ.	100	100	170	300
95B	95-2	50		50					100		ПОЛОЖ.	50	100	50	300
96A	96-1					100			100		ПОЛОЖ.	100	100	200	300
96B	96-2	100	40		20		20		20		ПОЛОЖ.	0	60	0	120
97A	97-1	100	10 0							панкреатическое	ОТРИЦ.	0	0	0	0
97B	97-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
98A	98-1		10 0						100	маточное - лейомиосаркома	ПОЛОЖ.	100	0	300	0
98B	98-2		10 0						100		ПОЛОЖ.	100	0	300	0
99A	99-1	10	10 0						90	панкреатическое - нейроэндокринное	ПОЛОЖ.	90	0	270	0
										с					
99B	99-2	100	10 0								ОТРИЦ.	0	0	0	0
100A	100-1			100			50		50	желудочное	ПОЛОЖ.	100	100	100	250
100B	100-2		20	60		40	40		40		ПОЛОЖ.	100	80	140	200

Обобщение результатов иммуногистохимического (ИНС) окрашивания GCS.

Результаты иммуногистохимического (ИНС) окрашивания GCS, представленные в примерах 3 и 4, демонстрируют, что GCS экспрессируется в различных злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта, включая толстокишечные, желудочные, тонкокишечные и пищеводные опухоли, а также не относящиеся к желудочно-кишечному тракту опухоли, включая панкреатические опухоли и легочные аденокарциномы, легочные плоскоклеточные карциномы, лейомиосаркомы и рабдомиосаркомы. Краткая информация об анализе различных опухолевых микроципов представлена в табл. 33.

Таблица 33

Анализ ТМА показывает экспрессию GCC в различных
злокачественных новообразованиях

тип опухоли	N тестированных	% GCC положительного окрашивания*		
		апикал./мембран.	цитоплазм.	% положительных
толстокишечная	298	76	90	95
желудочная	154	33,1	63	79
панкреатическая	221	15,4	43,4	63
пищеводная	138	1,4	30	30
легочная аденокарцинома	81	2,4	25,6	44
легочная сквамозная	74	0	10,8	10,8
лейомиосаркома	18	0	44,4	44,4
рабдомиосаркома	18	0	55,6	55,6

* (% положительных определяется показателем $N > 10$).

Клинические образцы злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта и связанных с желудочно-кишечным трактом злокачественных новообразований также дали положительный результат для различных уровней экспрессии GCC, как просуммировано в табл. 34.

Таблица 34

Процент отобранных опухолей в положительном C26001

	N	% любого положительного	% больше 400 (на комбинированной/агрегатной апикальной и цитоплазматической H-оценке)
толстокишечные	46	93,5	26,1
желудочные	9	77,8	0
пищеводные	14	78,6	7,1
панкреатические	22	81,8	22,7
тонкокишечные	2	100	0
всего	93	86,0	

(Положительный определяется как показатель $N \geq 10$ при апикальном или цитоплазматическом окрашивании).

Результаты, представленные в табл. 34, аналогичны результатам, наблюдаемым для ТМА, обобщенным в табл. 33.

Комбинированное/агрегатное распределение H-показателя экспрессии GCC по типам опухолей от пациента, зачисленного для испытания C26001, показано на фиг. 2A-2D.

Комбинированное/агрегатное распределение H-показателя экспрессии GCC, выбранных из различных толстокишечных, желудочных и панкреатических опухолевых микрочипов, показано на фиг. 3A-3C.

Так как данное изобретение было показано и описано со ссылками на предусмотренные варианты его реализации, специалистам в данной области техники будет понятно, что в форме и деталях настоящего изобретения могут быть сделаны различные изменения без отступления от объема изобретения, охватываемого приложенной формулой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против гуанилилциклазы C (GCC) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;
три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 27, 28 и 29 соответственно.
2. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, которые содержат переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11 и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13.
3. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, причем антитело против GCC представляет собой моноклональное антитело.
4. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, причем антитело против GCC представляет собой кроличье антитело, моноклональное кроличье антитело или гуманизированное кроличье антитело.
5. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, причем антитело против GCC представляет собой антитело IgG.
6. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, которые конъюгированы с обнаруживаемой меткой.
7. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, причем обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из пероксидазы хрена (HRP), щелочной фосфатазы, галактозидазы, глюкоамилазы, лизоцима, сахаридоксидазы, гетероциклической оксидазы, лактопероксидазы, микрופероксидазы, биотина, авидина, спинового метки, бактериофаговой метки, стабильного свободного радикала, флуорофора и радиоактивного агента.
8. Антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, причем флуорофор выбран из флуоросцеина, родамина, дансила, умбеллиферона, люциферазы, люциферина и 2,3-дигидрофалазиндиона и радиоактивный агент выбран из ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{188}Rh , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, ^{99}Tc , ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb , ^{206}Bi и ^{213}Bi .
9. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.
10. Модифицированная клетка для экспрессии антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту по п.9.
11. Способ получения антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, включающий культивирование клетки по п.10 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента.
12. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или обе легкие и тяжелые цепи антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5.
13. Способ обнаружения экспрессии белка GCC в биологическом образце, включающий приведение биологического образца в контакт с антителом против GCC или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-8 и определение образования комплекса антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента и белка GCC в биологическом образце, причем образование комплекса свидетельствует о наличии белка GCC в биологическом образце.
14. Способ по п.13, в котором обнаружение экспрессии белка GCC включает проведение иммуногистохимического анализа.
15. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий количественную оценку апикальной и/или цитоплазматической экспрессии белка GCC в биологическом образце.
16. Способ по п.15, где количественная оценка включает Н-оценочный подход.
17. Набор для детекции экспрессии белка GCC в биологическом образце, содержащий антитело против GCC или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и инструкции по применению.
18. Способ определения чувствительности раковых клеток к GCC-нацеленной терапии и/или оценки того, является ли пациент потенциальным кандидатом для проведения GCC-нацеленной терапии, включающий:
 - (i) получение образца раковых клеток пациента;
 - (ii) приведение указанного образца в контакт с антителом против GCC или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-8;
 - (iii) определение образования комплекса указанного антитела против GCC или его антигенсвязывающего фрагмента и белка GCC в образце, причем образование комплекса указывает на чувствительность раковых клеток к GCC-направленной терапии и/или на то, что пациент является кандидатом для проведения GCC-направленной терапии.
19. Способ по п.18, где раковые клетки выбраны из клеток рака толстой и прямой кишки, клеток рака желудка, клеток рака тонкой кишки, клеток рака пищевода, клеток рака поджелудочной железы,

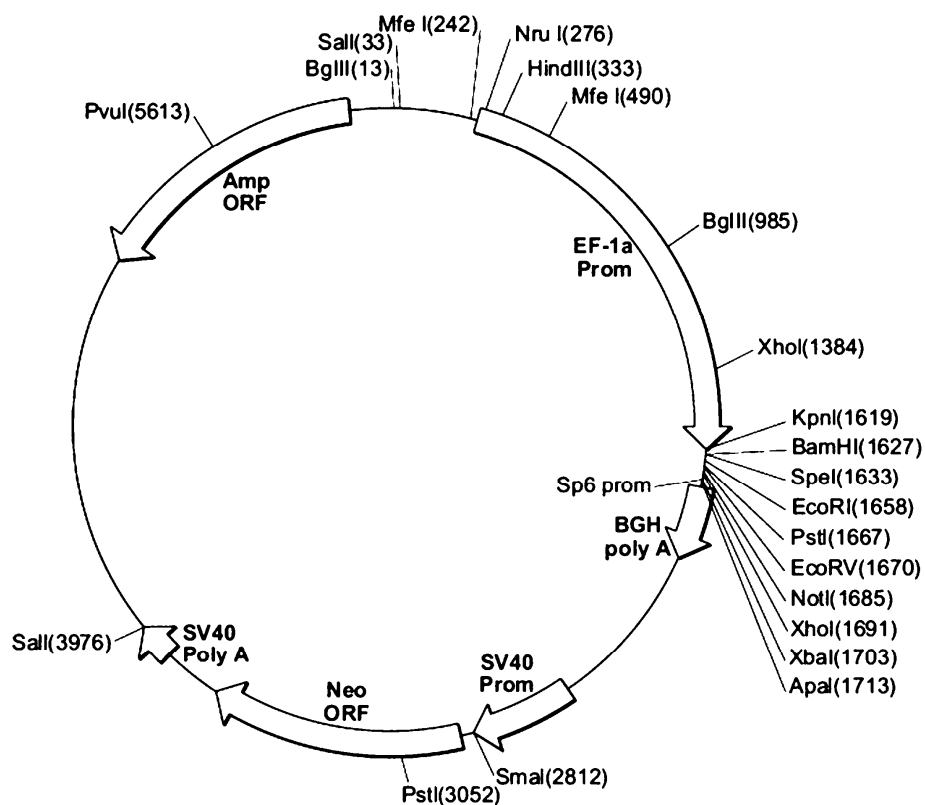
клеток рака легких, клеток саркомы мягких тканей, клеток нейроэктодермальной опухоли или клеток нейроэндокринной опухоли.

20. Способ по п.19, причем:

(a) клетки рака легкого представляют собой клетки плоскоклеточной карциномы или аденокарциномы;

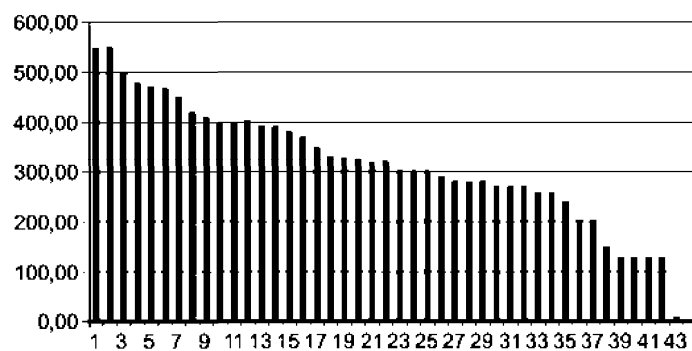
(b) клетки саркомы мягких тканей представляют собой клетки лейомиосаркомы или рабдомиосаркомы или

(c) клетки нейроэндокринной опухоли представляют собой клетки желудочно-кишечной или бронхолегочной нейроэндокринной опухоли.



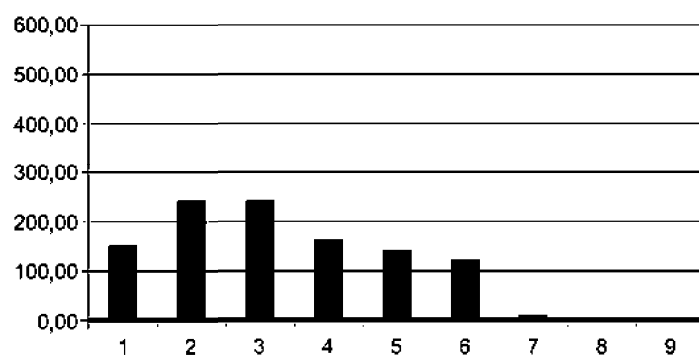
Фиг. 1

CRC



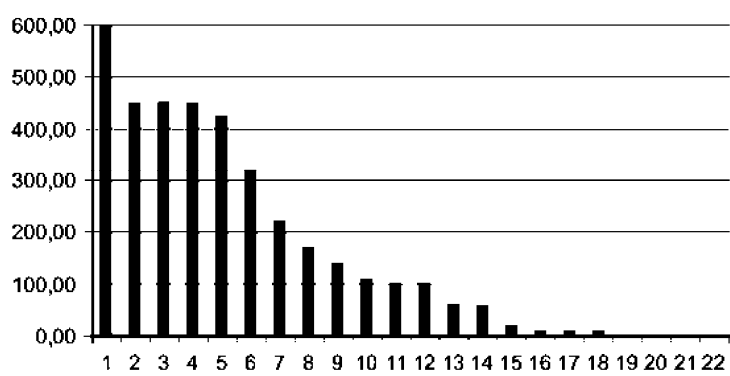
Фиг. 2А

Желудочный



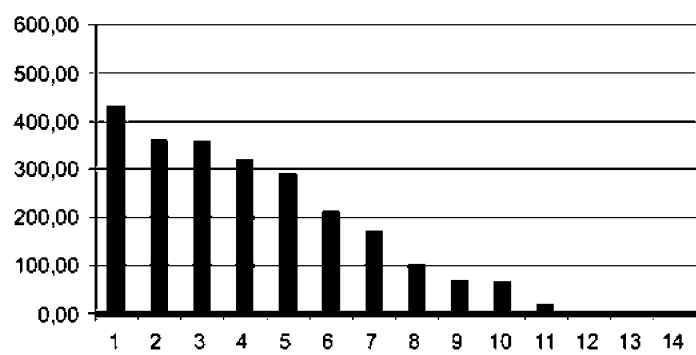
Фиг. 2В

Панкреатический

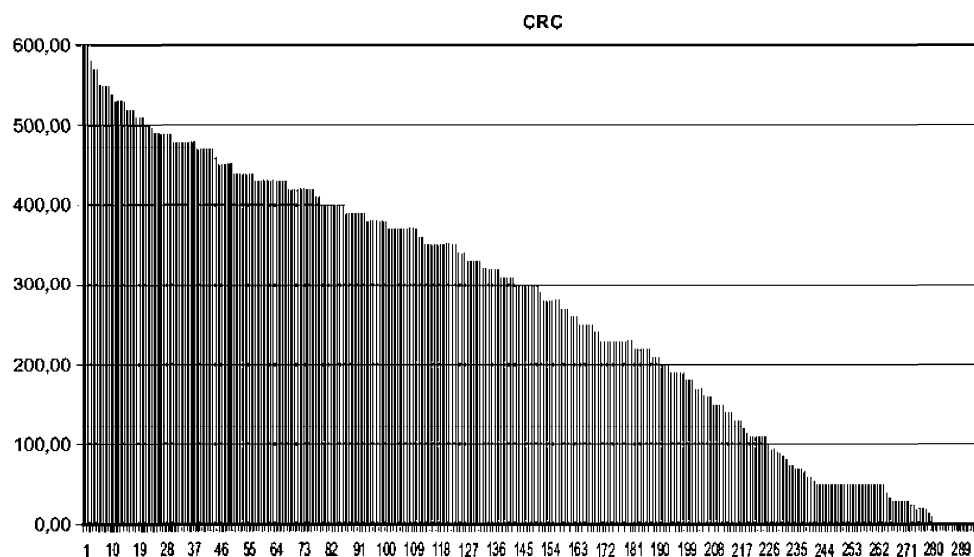


Фиг. 2С

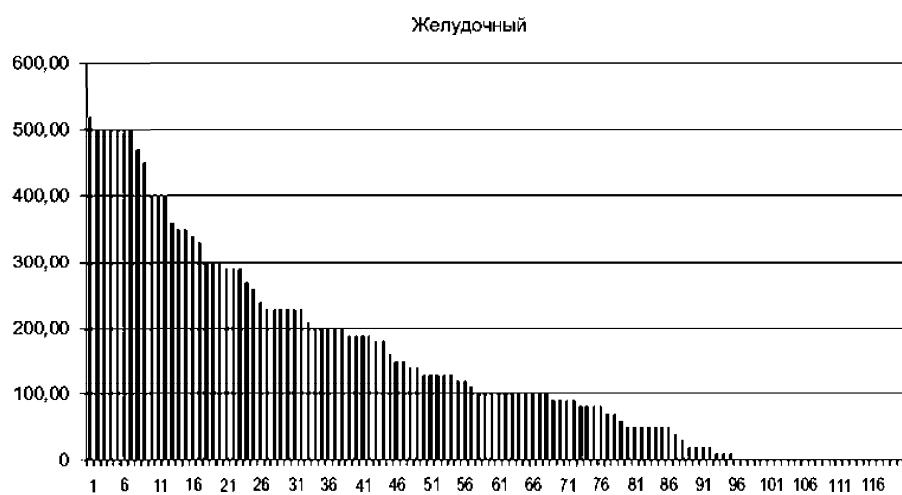
Пищеводный



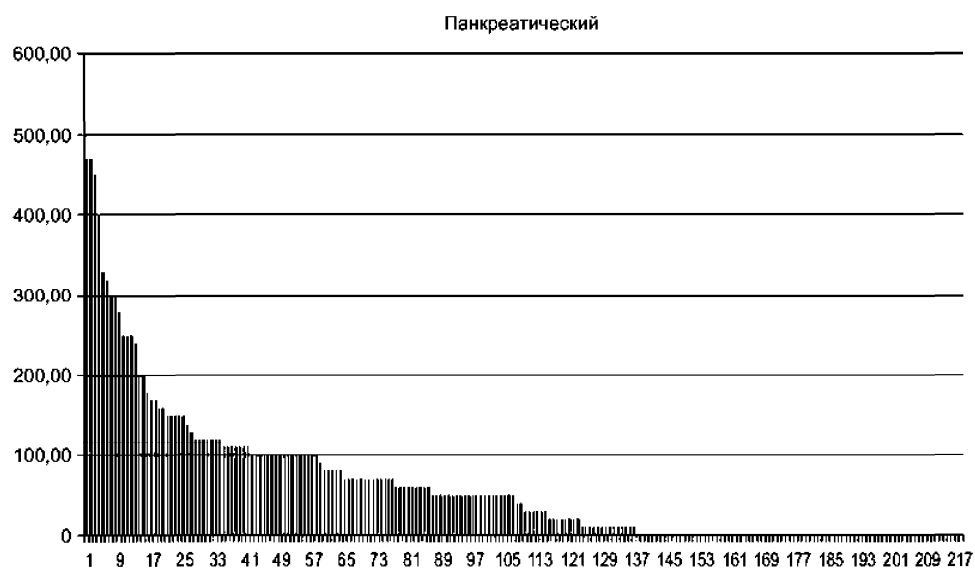
Фиг. 2D



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2