

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040793

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.28

(21) Номер заявки
201892663

(22) Дата подачи заявки
2017.06.14

(51) Int. Cl. G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

(54) АНАЛОГИ ФОСФОЛИПИДНОГО ЭФИРА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВЫДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

(31) 62/349,713

(32) 2016.06.14

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/US2017/037549

(87) WO 2017/218702 2017.12.21

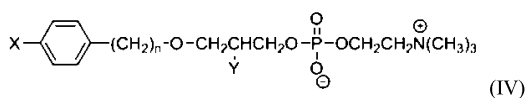
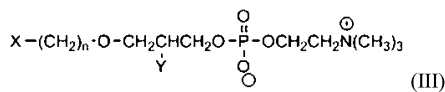
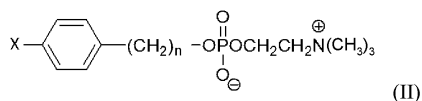
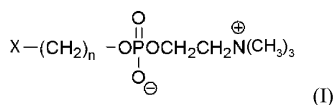
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЛЕКТАР БАЙОСАЙЕНСИС,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Вайхерт Джейми, Пак Чором, Пинчук
Анатолий, Козак Кевин, Лонжино
Марк (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Угрюмов В.М. (RU)

(56) US-A1-20120178645
US-A1-20070020178
US-A1-20090047656

(57) Настоящее изобретение относится к способу идентификации, выделения и обеспечения последующего анализа циркулирующих опухолевых клеток, включающему приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с соединением, содержащим аналог фосфолипидного эфира, связанный с люминесцентной молекулой (соединения I-IV), и подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии



B1

040793

040793

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку(и)

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 62/349713, поданной 14 июня 2016 года, полное содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Циркулирующие опухолевые клетки ("СТС") являются маркером на основе крови, который гипотетически имеет предсказательное и прогностическое значение в отношении обнаружения и оценки прогрессирования рака. В частности, циркулирующие опухолевые клетки (СТС) теоретически являются минимально инвазивным источником опухолевых клеток, как из первичной опухоли, так и из метастатических участков. (Alix-Panabieres C, et al., Challenges in circulating tumour cell research, *Nat Rev Cancer*, 2014 Sep, 14(9), 623-31 и Yap T, et al., Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker, *Clin Cancer Res*, 2014 May 15, 20(10), 2553-68.) Многие типы рака, как известно или предсказывается, вызывают появление СТС, включая множественную миелому. Paiva B, et al., Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile, *Blood*, 2013 Nov 21, 122(22), 3591-3598. Кроме того, раковые стволовые клетки ("CSC"), другой возможный тип раковых клеток, как предсказывается, имеющий прогностическое значение, теоретически являются субпопуляцией СТС. Scatena R et al., Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function, phenotype and differentiation with potential clinical applications, *Biochim Biophys Acta*, 2013 Apr; 1835(2), 129-143; Faltas B. Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells, *Front Oncol*, 2012 Jul 3, (2)68. Согласно определению, СТС представляет собой ядродержащую, CD45-негативную, положительную к молекуле адгезии эпителиальных клеток ("ЕpCAM") и положительную к пан-цитокератину клетку. Однако идентификация и выделение СТС из цельной крови является технически затруднительным, поскольку СТС являются исключительно редкими, и всего лишь 1 клетка может содержаться в 7,5 миллилитрах ("мл") крови (то есть 1 на несколько миллиардов клеток).

В настоящее время единственным принятым и одобренным показанием для СТС является количественное определение в качестве прогностического маркера прогрессирования рака. Система CellSearch® (CellSearch является зарегистрированной торговой маркой компании Johnson & Johnson Corp) представляет собой единственный анализ, одобренный Управлением по контролю над пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA), для количественного определения СТС. (Ignatiadas M, et al., Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality?, *Ann Oncol*, 2014 Dec, 25(12), 2304-13 и Toss A, et al., CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine, *Ann Transl Med*, 2014 Nov, 2(11):108, 1-16.) К сожалению, система CellSearch® одобрена только для метастатического рака молочной железы, колоректального рака и рака предстательной железы. (Hayes DF, et al., Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival, *Clin Cancer Res*, 2006 Jul 15, 12(1), 4218-24; Cristofanilli M, et al., Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *N Engl J Med*, 2004 Aug 19, 351(8), 781-91; De Bono JS, et al., Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer, *Clin Cancer Res*, 2008 Oct 1, 14(19), 6302-9; и Cohen SJ, et al., Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol*, 2008 Jul 1, 26(19), 3213-21.)

Согласно действующему определению остаются трудности, связанные с идентификацией СТС. Во-первых, существует вероятность ложно-положительных обнаружений, обусловленных ЕpCAM-положительными циркулирующими эпителиальными клетками. Во-вторых, ложно-отрицательные обнаружения могут возникать вследствие того, опухолевые клетки подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу, что приводит к пониженной экспрессии эпителиальных маркеров. (Yu M, et al., Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition, *Science*, 2013 Feb 1, 339(6119), 580-4.) В третьих, в литературе появляется все больше данных о том, что не все СТС экспрессируют ЕpCAM, и что некоторые типы рака, такие как рак почки, имеют низкую или гетерогенную экспрессию ЕpCAM. (Eichelberg C, et al., Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma, *Int J Cancer*, 2013 Jun 15, 132(12), 2948-55 и Spizzo G, et al., ЕpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis, *J Clin Pathol*, 2011 May, 64(5):415-20.) Таким образом, существует клиническая необходимость в экономически выгодном и надежном анализе с использованием маркера для широкого спектра опухолей, который может идентифицировать потенциально все СТС без систематической ошибки. Нацеленные на рак аналоги алкилфосфохолина ("APC") предлагают новый способ идентификации и выделения СТС из широкого спектра различных типов рака.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на способ идентификации одной или нескольких циркулирующих опухолевых клеток, включающий

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с компози-

цией, содержащей аналог фосфолипидного эфира (phospholipid ether, "PLE"), связанный с изделием, выбранным из группы, состоящей из люминесцентной молекулы; и

(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу выделения одной или нескольких циркулирующих опухолевых клеток, включающему следующие стадии:

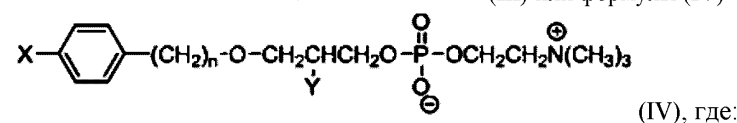
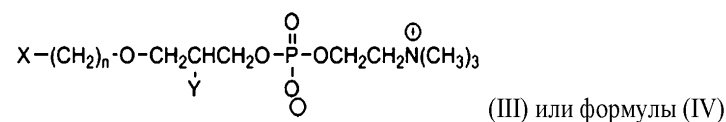
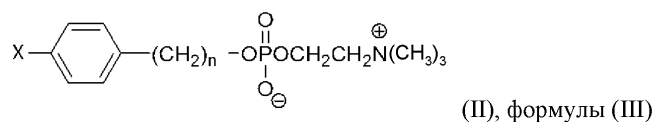
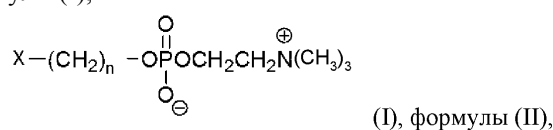
(i) введение субъекту композиции, содержащей аналог PLE, связанный с изделием, выбранным из группы, состоящей из люминесцентной молекулы; и

(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, проточной цитометрии,

при этом если изделие представляет собой люминесцентную молекулу, то образец крови или сыворотки крови, полученный от субъекта, подвергают проточной цитометрии.

В одном варианте осуществления одна или несколько циркулирующих опухолевых клеток представляют собой раковые стволовые клетки.

В предпочтительном варианте осуществления аналог PLE, связанный с изделием, согласно настоящему изобретению, представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения формулы (I),

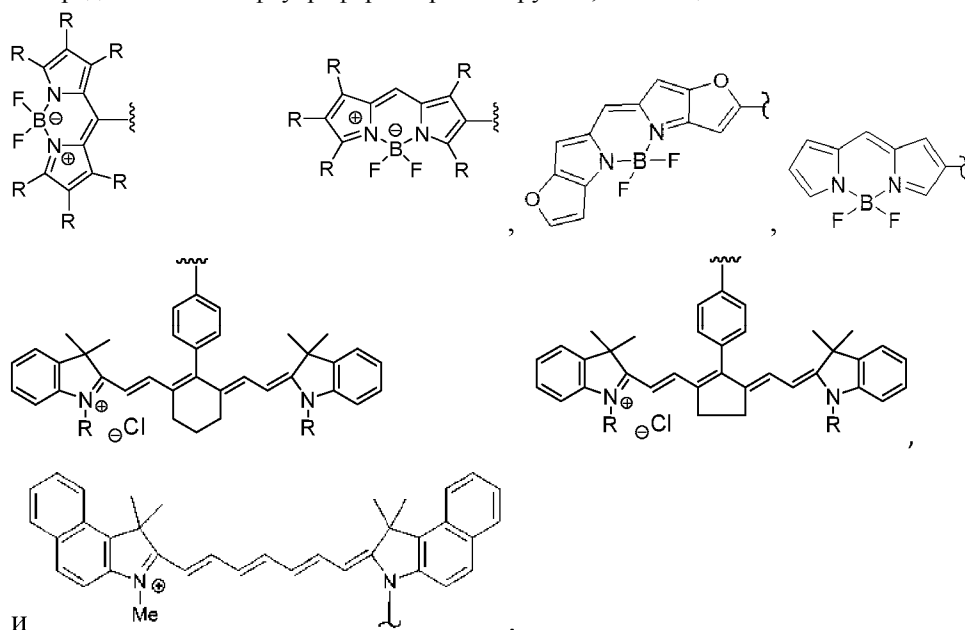


n представляет собой целое число от 16 до 30, предпочтительно 18;

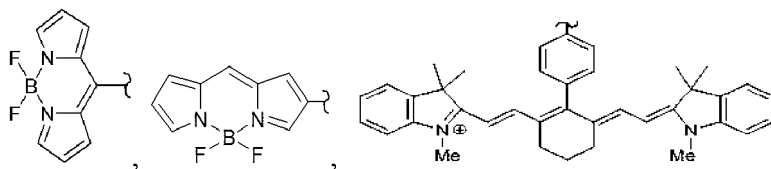
Y выбран из группы, состоящей из -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH и -OC(O)R¹, где R¹ представляет собой алкил; и

X представляет собой люминесцентную молекулу.

В предпочтительном варианте осуществления люминесцентная молекула представляет собой флуорофор, более предпочтительно флуорофор выбран из группы, состоящей из



где каждый R независимо выбран из H, CH₃, C₂H₅ и C₃H₇, наиболее предпочтительно



В другом предпочтительном варианте осуществления одна или несколько циркулирующих опухолевых клеток согласно настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, рака легких, рака щитовидной железы, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и колоректального рака, клетки множественной миеломы, раковой стволовой клетки, предпочтительно клетки рака молочной железы, рака легкого, рака щитовидной железы, рака шейки матки, плоскоклеточной карциномы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и колоректального рака, и более предпочтительно клетки рака предстательной железы или клетки рака поджелудочной железы.

Краткое описание чертежа

Диаграмма с изображением CD45-, CD34- клеток, выделенных у пациента 108 (колоректальный рак). На панели А показаны клетки, окрашенные на все маркеры, за исключением CD14. На панели В показаны клетки, окрашенные на все маркеры. Верхний левый квадрант указывает на CD14-/CLR1501+ клетки, верхний правый указывает на CD14+/CLR1501+, нижний правый указывает на CD14+/CLR1501-, и нижний левый указывает на CD14-/CLR1501.

Подробное описание изобретения

Аналоги PLE обладают способностью идентифицировать, выделять и осуществлять последующий анализ CTC всех типов. Раковые клетки имеют в пять-десять раз больше липидных рафтов, чем здоровые клетки. Липидные рафты являются особыми участками фосфолипидного бислоя мембраны, которые содержат высокие концентрации холестерина и сфинголипидов и служат для организации клеточной поверхности и внутриклеточных сигнальных молекул (например, фактор роста и рецепторы цитокинов, путь выживания фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K)/Akt). Данные свидетельствуют о том, что липидные рафты служат в качестве точек входа для PLE. Выраженная селективность этих соединений в отношении раковых клеток по сравнению с нераковыми клетками объясняется высоким сродством PLE к холестерину и избыточным количеством богатых холестерином липидных рафтов в раковых клетках. Ключевая роль липидных рафтов обуславливается тем, что разрушение архитектуры липидного рафта подавляет накопление PLE в раковых клетках. Было показано, что после блокирования образования липидных рафтов поглощение PLE уменьшилось на 60%.

Все предварительные результаты, полученные при исследовании более 55 ксенотрансплантатов и моделей спонтанных опухолей, показали, что CLR1404 подвергается селективному поглощению и длительному удерживанию в опухолях. Weichert, JP et al., Alkylphosphocholine analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy, Sci Transl Med, 2014, Jun 11, 6(240ra75). Ранее было неизвестно, способны ли аналоги PLE поглощаться CTC до такой степени, чтобы CTC могли быть идентифицированы и выделены.

Настоящее изобретение направлено на способ идентификации одной или нескольких циркулирующих опухолевых клеток, включающий

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с композицией, содержащей аналог фосфолипидного эфира ("PLE"), связанный с изделием, выбранным из группы, состоящей из люминесцентной молекулы и магнитной частицы; и

(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии,

при этом, если изделие представляет собой магнитную частицу, указанное изделие связано с PLE посредством линкера.

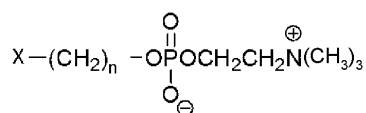
Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу выделения одной или нескольких циркулирующих опухолевых клеток, включающему следующие стадии:

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с композицией, содержащей аналог PLE, связанный с изделием, выбранным из группы, состоящей из люминесцентной молекулы и магнитной частицы; и

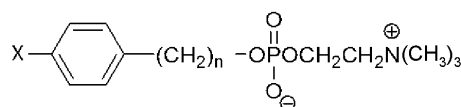
(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, проточной цитометрии, предпочтительно, сортировке клеток, активированной флуоресценцией или с помощью магнитной активации,

при этом, если изделие представляет собой магнитную частицу, указанное изделие связано с PLE посредством линкера, и образец крови или сыворотки крови, полученный от субъекта, подвергают воздействию магнитного поля, и при этом, если аналог PLE связан с люминесцентной молекулой, то образец крови или сыворотки крови, полученный от субъекта, подвергают проточной цитометрии.

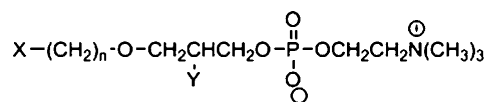
В предпочтительном варианте осуществления аналог PLE, связанный с изделием, в соответствии с настоящим изобретением представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из соединения формулы (I),



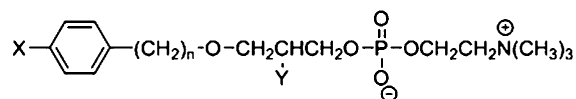
(I), формулы (II),



(II), формулы (III),



(III) или формулы (IV)



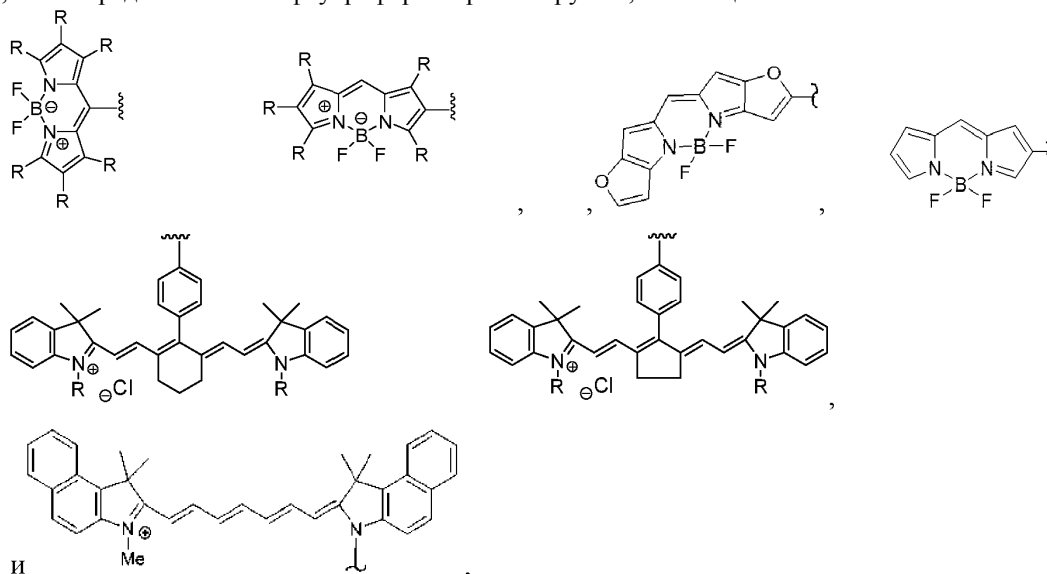
(IV), где:

n представляет собой целое число от 16 до 30, предпочтительно равно 18;

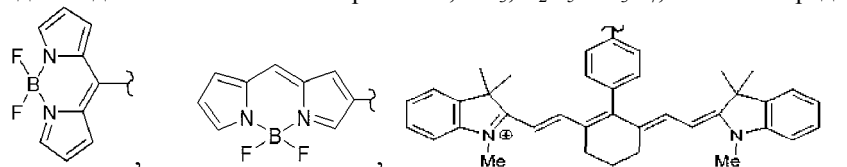
Y выбран из группы, состоящей из -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH и -OC(O)R¹, где R¹ представляет собой алкил; и

X представляет собой люминесцентную молекулу или магнитную частицу.

В предпочтительном варианте осуществления люминесцентная молекула представляет собой флуорофор, более предпочтительно флуорофор выбран из группы, состоящей из



где каждый R независимо выбран из H, CH₃, C₂H₅ и C₃H₇, наиболее предпочтительно



В другом предпочтительном варианте осуществления магнитная частица выбрана из группы, состоящей из наномангнитных частиц, микромагнитных частиц, парамагнитных частиц и суперпарамагнитных частиц, при этом магнитная частица связана с аналогом PLE посредством линкера, выбранного из группы, состоящей из биотин-стрептавидинового линкера, азетидинового линкера и линкера, содержащего аминную группу, азидную, алкиновую, карбоксильную и гидроксильную группу, и их комбинаций.

В другом предпочтительном варианте осуществления одна или несколько циркулирующих опухолевых клеток согласно настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из клеток рака молочной железы, рака легкого, рака щитовидной железы, рака шейки матки и плоскоклеточной карциномы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и колоректального рака, и раковой стволовой клетки и злокачественной клетки плазмы, предпочтительно клетки рака предстательной железы или клетки рака поджелудочной железы.

В другом предпочтительном варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению можно применять в дополнительных последующих технологиях получения данных, включая, но без ог-

раничения, выделение белка, выделение РНК, выделение ДНК, анализ транслокаций и/или амплификаций генов, и флуоресцентную гибридизацию *in situ*.

Определения

В целом, ссылка на "циркулирующую опухолевую клетку" относится к одной клетке, в то время как ссылка на "циркулирующие опухолевые клетки" или "кластер циркулирующих опухолевых клеток" относится к более чем одной раковой клетке. Однако специалисту в данной области техники должно быть понятно, что ссылка на "циркулирующие опухолевые клетки" включает популяцию циркулирующих опухолевых клеток, включая одну или несколько циркулирующих опухолевых клеток, в то время как ссылка на "циркулирующую опухолевую клетку" может включать более чем одну циркулирующую опухолевую клетку.

Термин "циркулирующая опухолевая клетка" или "циркулирующие опухолевые клетки", используемый в настоящем документе, относится к любой раковой клетке или кластеру раковых клеток, которые обнаруживаются в образце крови или сыворотки крови субъекта. СТС также могут содержать или состоять из раковой стволовой клетки или кластера раковых стволовых клеток, которые обнаруживаются в образце крови или сыворотки крови субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "раковая стволовая клетка" относится к раковой клетке, способной самообновляться и дифференцироваться в различные типы раковых клеток, обнаруживаемых в злокачественной опухоли.

Термин "рак", используемый в настоящем документе, относится, но без ограничения, к различным типам рака, включая рак молочной железы, в том числе рак молочной железы у мужчин; рак ЖКТ, в том числе рак анального канала, рак аппендикса, рак внепеченочного желчного протока, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак толстой кишки, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта ("GIST"), опухоль островков поджелудочной железы, первичный рак печени взрослых, рак печени у детей, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак тонкой кишки и рак желудка (ЖКТ); эндокринные и нейроэндокринные злокачественные опухоли, включая аденокарциному поджелудочной железы, аденокарциному, панкреатические нейроэндокринные опухоли, карциному из клеток Меркеля, немелкоклеточный нейроэндокринный рак легкого, мелкоклеточный нейроэндокринный рак легкого, рак паращитовидной железы, феохромоцитому, опухоль гипофиза и рак щитовидной железы; злокачественные опухоли глаз, включая внутриглазную меланому и ретинобластому; рак мочеполовой системы, включая рак мочевого пузыря, рак почки (почечно-клеточный), рак полового члена, рак предстательной железы, переходо-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, рак яичка, рак уретры и опухоль Вильмса; герминогенный рак, включая детский рак центральной нервной системы, детскую экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, эмбрионально-клеточную опухоль яичников и рак яичка; гинекологические злокачественные заболевания, включая рак шейки матки, рак эндометрия, гестационную трофобластическую опухоль, эпителиальный рак яичников, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, саркому матки, рак влагалища и рак вульвы; рак головы и шеи, включая рак глотки, рак гортани, рак губы и полости рта, метастазы плоскоклеточного рака в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага, рак рта, рак носоглотки, рак ротоглотки, рак околоносовых пазух и носовой полости, рак паращитовидной железы, рак глотки, рак слюнной железы и рак горла; лейкозы, включая острый лимфобластный лейкоз взрослых, детский острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз взрослых, детский острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз; множественную миелому, включая злокачественные клетки плазмы; лимфомы, включая связанную со СПИДом лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина взрослых, детскую лимфому Ходжкина, лимфому Ходжкина во время беременности, фунгоидный микоз, неходжкинскую лимфому взрослых, детскую неходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому во время беременности, первичную лимфому центральной нервной системы, синдром Сезари и макроглобулинемию Вальденстрема; скелетно-мышечные злокачественные опухоли, включая саркому Юинга, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, детскую рабдомиосаркому и саркому мягких тканей; неврологические злокачественные опухоли, включая опухоль головного мозга взрослых, детскую опухоль головного мозга, астроцитому, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, краниофарингиому, эпендимому, нейробластому, первичную лимфому центральной нервной системы (CNS); респираторные/грудные злокачественные опухоли, включая немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественную мезотелиому, тимому и рак вилочковой железы; и рак кожи, включая саркому Капоши, меланому и плоскоклеточную карциному.

Используемый в настоящем документе термин "образец" относится к любому образцу, подходящему для способов, обеспеченных настоящим изобретением. Образец может представлять собой любой образец, который содержит циркулирующие опухолевые клетки, пригодные для обнаружения. Источники образцов включают цельную кровь, костный мозг, плевральную жидкость, перитонеальную жидкость, спинномозговую жидкость, мочу, слюну и бронхиальные промывки. В одном аспекте образец представляет собой образец крови, включая, например, цельную кровь или любую ее фракцию или компонент.

Образец крови, подходящий для использования в настоящем изобретении, может быть получен из любого известного источника, который содержит клетки крови или ее компоненты, такого как венозная, артериальная, периферическая, тканевая, пуповинная кровь и т.п. Например, образец может быть получен и обработан с использованием хорошо известных и рутинных клинических способов (например, процедур взятия и обработки цельной крови). В одном варианте осуществления иллюстративный образец может представлять собой периферическую кровь, взятую у субъекта, имеющего рак.

Используемый в настоящем документе термин "идентифицировать" или "идентификация" относится к визуализации присутствия СТС.

Используемый в настоящем документе термин "выделять" или "выделение" относится к физическому отделению СТС от других типов клеток, обнаруженных в образце, полученном от субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "контакт" или "приведение в контакт" относится к приведению в контакт субъекта, ткани, органа или клеток с аналогом PLE согласно настоящему изобретению. Как используется здесь, приведение в контакт может быть осуществлено *ex vivo* или *in vitro*, т.е. в пробирке, в клетках или тканях живых организмов, например, человека. Термин "пациент" или "субъект", используемый в настоящем документе, относится к млекопитающему, предпочтительно человеку.

Используемый в настоящем документе термин "алкил" относится к алкилу с разветвленной или прямой цепью, состоящему из насыщенной углеводородной группы, содержащей от 1 до 24 атомов углерода (C_1 - C_{24}), если не указано иное. Алкильная группа может быть циклической или ациклической.

Используемый в настоящем документе термин "амин" относится к функциональной группе, которая содержит атом азота с неподеленной парой электронов.

Используемый в настоящем документе термин "азид" относится к функциональной группе, которая содержит три последовательных атома азота.

Используемый в настоящем документе термин "алкин" относится к функциональной группе, которая содержит два атома углерода, которые соединены друг с другом тройной связью.

Используемый в настоящем документе термин "карбоксил" относится к функциональной группе, которая содержит структуру $C(O)O$.

Используемый в настоящем документе термин "гидроксил" относится к функциональной группе, которая содержит OH .

Используемый в настоящем документе термин "n" представляет собой целое число от 16 до 30.

Используемый в настоящем документе термин "Y" выбран из группы, состоящей из $-H$, $-OH$, $-OR$, $-C(O)OH$ и $-OC(O)R$.

Используемый в настоящем документе термин "R" относится к алкилу.

Используемый в настоящем документе термин "R" относится к H , CH_3 , C_2H_5 и C_3H_7 .

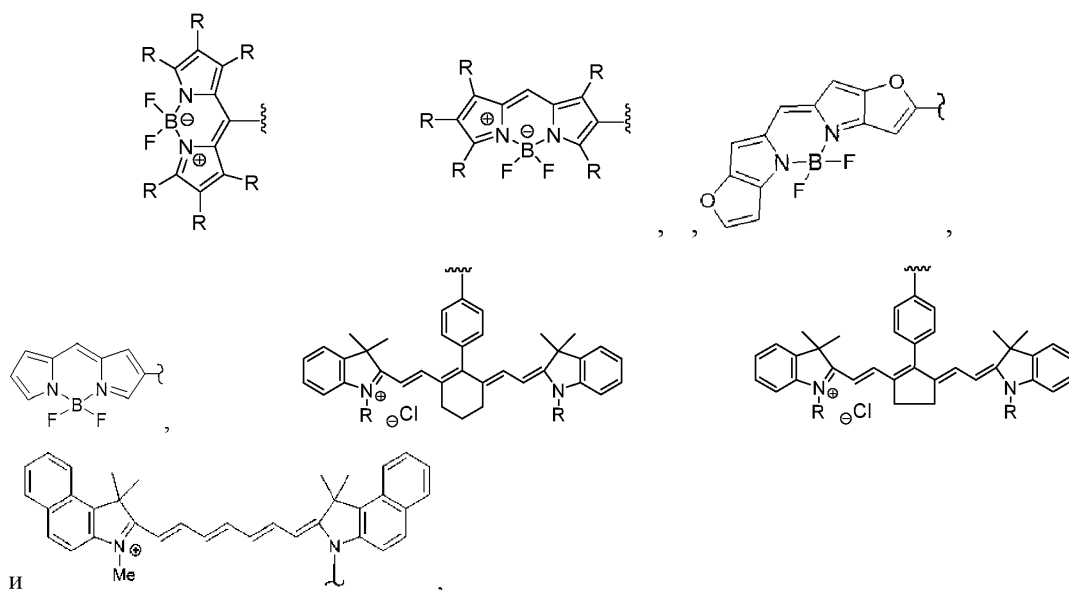
Используемый в настоящем документе термин "X" представляет собой люминесцентную молекулу или магнитную частицу, связанную с линкером.

Проточная цитометрия, используемая в настоящем изобретении, включает, но без ограничения, сортировку клеток с возбуждением флуоресценции ("FACS") и многоцветную проточную цитометрию.

Магнитные частицы, полезные в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, наномagnetные частицы, имеющие размер в нанометровом диапазоне и иногда называемые магнитными наночастицами, например, частицы 50 нМ MACS® (MACS является зарегистрированной торговой маркой фирмы Miltenyi Biotec GmbH), микромагнитные частицы, имеющие размер в микрометровом диапазоне, например, 1-3 мкМ Dynabeads® (Dynabeads представляет собой зарегистрированную торговую марку и доступны от фирмы DYNAL AS Corp), парамагнитные частицы и суперпарамагнитные частицы.

Люминесцентные молекулы, используемые в настоящем изобретении, включают флуорофоры.

Флуорофоры включают (но без ограничения) соединения Alexa Fluor® (Alexa Fluor является зарегистрированной торговой маркой и доступны от фирмы Molecular Probes, Inc.), включающие 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 и 790, соединения Brilliant Violet™ (Brilliant Violet доступны от фирмы BioLegend®), включая 420, 510, 605, 650, 711 и 786, соединения Brilliant Ultra-Violet™ (Brilliant Ultra-Violet доступны от фирмы BD Biosciences, Inc.), включая соединения со следующей частотой 395 и 737 нм, соединения Dylight® (Dylight является зарегистрированной торговой маркой и доступны от фирмы Pierce Biotechnology, Inc.), включая 350, 405, 488, 550, 594, 633, 650, 680, 755 и 800, Violetfluor® 450, Redfluor® 710, (Violetfluor и Redfluor являются зарегистрированной торговой маркой и доступны от фирмы Tonbo Biotechnologies Corporation), аллофикоцианин ("APC"), APC Alexa Fluor® 750, APC-Cy7, белки перидинин-хлорофилл ("PerCP"), PerCP-Cy5, PerCP-Cy5.5, PerCP-Cy7, пропидиум йодид ("PI"), фикоэритрин ("PE"), PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-Texas Red® (Texas Red является зарегистрированной торговой маркой фирмы Molecular Probes, Inc.), флуоресцеин ("FITC"), аминметилкурмарин ("AMCA"), Marina Blue®, Cascade Blue® (Marina Blue и Cascade Blue являются зарегистрированными торговыми марками и доступны от фирмы Molecular Probes, Inc.), Cascade Yellow, Pacific Blue, Qdot® 605 (Qdot является зарегистрированной торговой маркой фирмы Life Technologies Corp), тетраметилпродамин ("TRITC"), Cy3, Cy5, Cy5.5, Texas Red® и соединения, имеющие следующие структуры:



и где каждый R независимо выбран из H, CH₃, C₂H₅ и C₃H₇.

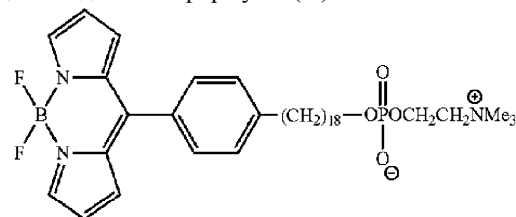
Линкеры, используемые в настоящем изобретении, включают, но без ограничения, связь, биотин-стрептавидиновый линкер, азетидиноновый линкер и линкер, содержащий аминогруппу, азидную, алкиновую, карбоксильную, гидроксильную группу и их комбинации.

Следующие предпочтительные варианты осуществления представлены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом.

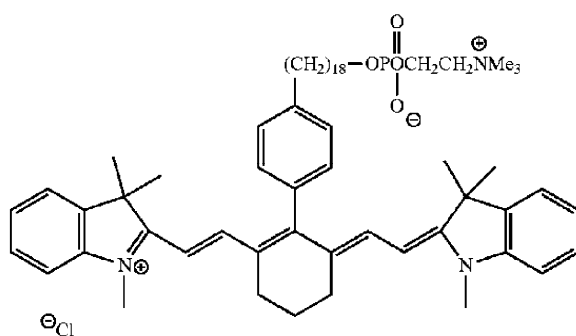
Предпочтительные варианты осуществления

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации циркулирующей клетки рака предстательной железы, включающему

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с композицией, содержащей соединение формулы (V)



(V) CLR1501, или формулы (VI):

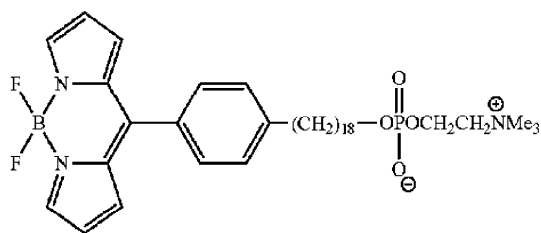


(VI) CLR1502; и

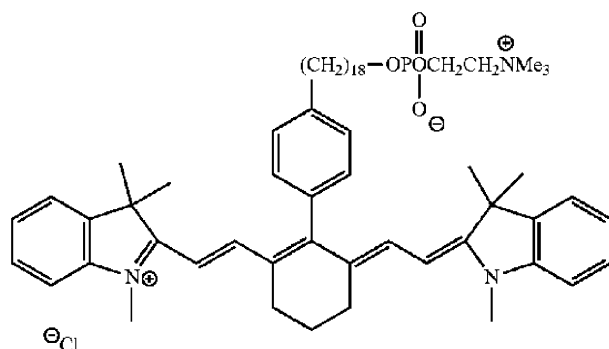
(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу выделения циркулирующей клетки рака предстательной железы, включающему

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с композицией, содержащей соединение формулы (V)



(V) CLR1501, или формулы (VI):



(VI) CLR1502; и

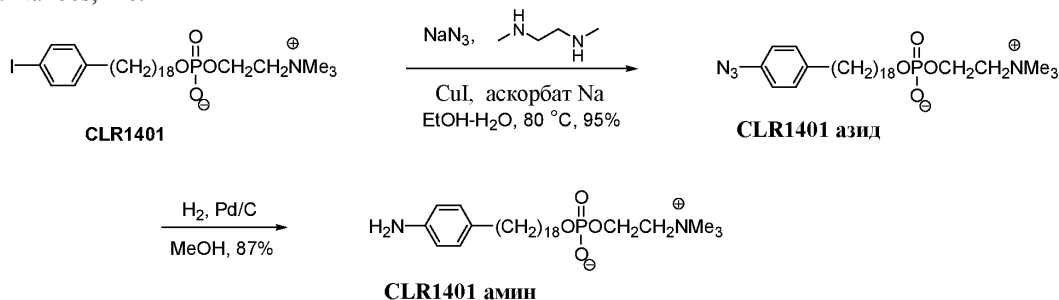
(ii) подвергание образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, сортировке клеток с возбуждением флуоресценции.

Следующие примеры представлены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Синтез конъюгата PLE-магнитная частица.

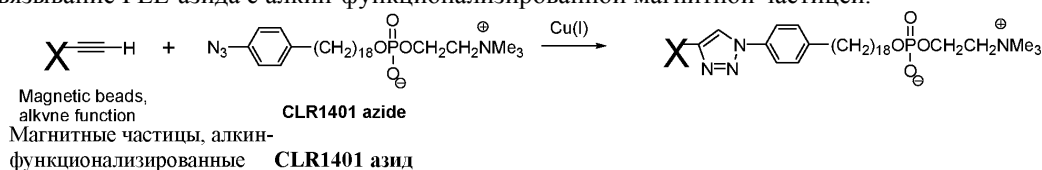
Сначала PLE формул I-IV и магнитную частицу, как описано в настоящем документе, каждые, присоединяли к их собственной функциональной группе. Функциональные группы затем соединяли посредством Click-химии. В качестве примера, PLE формулы I согласно настоящему изобретению может быть присоединен к азидной функциональной группе, и магнитная частица может быть присоединена к алкиновой функциональной группе. Затем азидная и алкиновая функциональные группы могут быть соединены посредством Click-химии, например, катализируемого медью азид-алкинового циклоприсоединения ("CuAAC"). В целом, магнитные частицы, присоединенные к функциональной группе, известны как "функционализированные магнитные частицы" и доступны от многочисленных поставщиков, например фирма Nanocs, Inc.



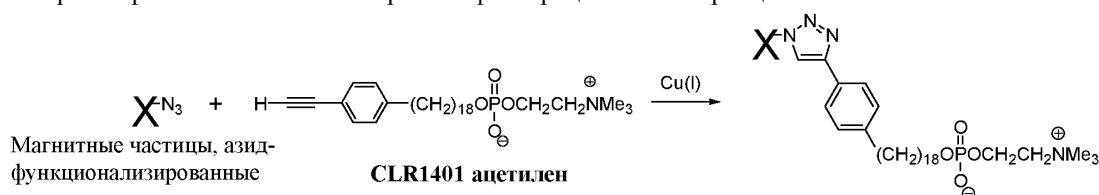
Синтез азида CLR1401.

В реакционном сосуде 18-(п-йодфенил)октадецилфосфохолин (4,01 г, 6,3 ммоль), азид натрия (818 мг, 12,6 ммоль) и аскорбат натрия (140 мг, 0,71 ммоль) растворяли в смеси дегазированного этанола (28 мл) и воды (12 мл). К реакционной смеси добавляли йодид меди(I) (120 мг, 0,63 ммоль) и N,N'-диметилендиамин (0,1 мл, 0,94 ммоль). Реакционный сосуд герметично закрывали и смесь перемешивали при 80°C в течение 45 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли воду (60 мл) и смесь перемешивали в течение 30 мин на открытом воздухе. Смесь переносили в делительную воронку, добавляли хлороформ (80 мл) и метанол (52 мл) и извлечение осуществляли путем встряхивания. Слой хлороформа удаляли и извлечение повторяли (2×80 мл хлороформа). Объединенные экстракты хлороформа промывали 0,01 N HCl, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали до сухого состояния. Остаток растворяли в хлороформе (4 мл) и при перемешивании медленно добавляли ацетон (170 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и фильтровали. Продукт промывали на фильтре ацетоном и сушили под высоким вакуумом с получением 3,31 г (95%) 18-(п-азидофенил)октадецилфосфохолина.

Связывание PLE-азида с алкин-функционализированной магнитной частицей.

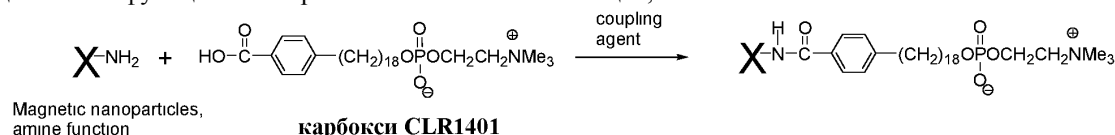


CLR1401 азид связывали с алкин-функционализированной магнитной частицей посредством Click-химии. Выше приведен пример CuAAC. Описание CuAAC содержится в работе Himo F, et al., Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates, J Am Chem Soc, 2005 Jan 12, 127(1), 210-216, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки. Вкратце, алкин-функционализированную магнитную частицу и CLR1401 азид смешивали в смеси 1:1 воды и трет-бутилового спирта в присутствии катализатора оксида меди ("Cu(I)") в течение 6-12 ч. При необходимости в смесь добавляли аскорбат натрия. Конечный конъюгат PLE-магнитная частица можно затем изолировать из раствора с использованием простой фильтрации или экстракции.



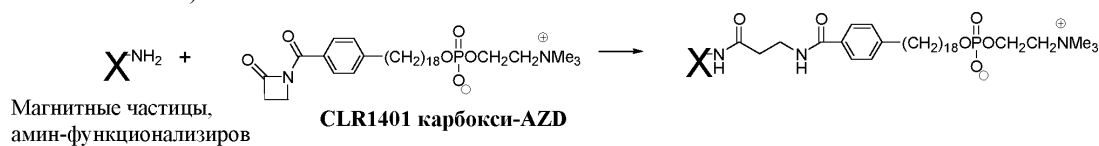
Связывание PLE-ацетилен с азид-функционализированной магнитной частицей.

CLR1401 ацетилен связывали с азид-функционализированной магнитной частицей посредством Click-химии. Можно использовать такую же реакцию CuAAC, используемую для связывания CLR1401 азида с алкин-функционализированной магнитной частицей, как описано выше.



Связывание карбокси-PLE с амин-функционализированной-магнитной наночастицей.

Карбокси-CLR1401 связывали с амин-функционализированной магнитной наночастицей посредством амидного связывания. Амидное связывание может быть достигнуто с использованием любого реагента для реакции сочетания, подходящего для образования амидной связи, такого как реагенты, используемые для пептидного синтеза, включая, но без ограничения, (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3,3-тетраметилурион гексафторфосфат) ("HBTU"), (1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридин-3-ил) гексафторфосфат ("HATU"), COMU® (COMU доступен от фирмы Sigma Aldrich Co, LLC и является зарегистрированной торговой маркой фирмы Luxembourg Biotechnologies Ltd.) и ангидрид пропанфосфоновой кислоты ("PPAA" или T3P®, T3P доступен и зарегистрирован под торговой маркой Euticals SPA.)



Связывание PLE карбокси-AZD с амин-функционализированной магнитной наночастицей.

В качестве альтернативы амидному связыванию, описанному выше, амин-функционализированные магнитные наночастицы могут быть связаны с карбокси-PLE посредством азетидинового ("AZD") линкера. Например, CCLR 1401 карбокси-AZD может быть связан с амин-функционализированной магнитной наночастицей посредством AZD линкера. Связывание AZD описано в работе Roberts LR et al., Kappa agonist CovX-Bodies, Bioorg Med Chem Lett, 2012 Jun 15, 22(12), 4173-4178 и Sato S et al., Chemically Programmed Antibodies AS HIV-1 Attachment Inhibitors, ACS Med Chem Lett, 2013 May 9, 4(5), 460-465.

Пример 2. Идентификация и количественное определение циркулирующих опухолевых клеток у пациентов, имеющих рак легкого, щитовидной железы, молочной железы, шейки матки, плоскоклеточную карциному и колоректальный рак с использованием флуоресцентного аналога PLE.

Способы.

Цельную кровь собирали в пробирки для сбора образцов крови Cell Save® или в пробирки для сбора образцов крови, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту ("EDTA"), у семи пациентов с раком легкого (пациенты 101 и 103), щитовидной железы (пациент 102), молочной железы (пациент 106), шейки матки (пациент 104), плоскоклеточной карциномой (107) и колоректальным раком (пациент 108) до (взятие 1) и после (взятие 2) терапии, по мере возможности. Мононуклеарные клетки выделяли из

цельной крови с использованием градиента плотности на Ficoll-Paque. Клетки от каждого пациента затем инкубировали с блокаторм Fc. Затем клетки окрашивали флуоресцентно-меченными антителами к CD45, CD14, CD34, EpCAM и пан-цитокератину (СК), и флуоресцентным аналогом PLE ("CLR1501") в течение 30 мин. Затем клетки анализировали проточной цитометрией для определения количества клеток из каждого образца цельной крови, которые были положительными и/или отрицательными по конкретному маркеру. В соответствии с действующим определением, CTC были идентифицированы как живые клетки, которые были CD45-, CD14-, CD34-, СК+ и EpCAM+ ("согласно определению"). Благодаря предшествующему опыту с CD14+ моноцитами/макрофагами (чертеж), CD14+ клетки удаляли из анализов из-за высокого поглощения CLR1501. CD34+ нормальные эпителиальные клетки также удаляли из анализов. Для сравнения, оставшиеся CD45+ и CD34+ клетки у одного и того же пациента не будут в большой степени поглощать CLR1501. Результаты, полученные в этом анализе, объясняются ниже и обобщены в табл. 1 и 2.

В первом ряду в табл. 1 и 2 показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые удовлетворяли определению CTC: CD45-, CD14-, CD34-, СК+ и EpCAM+, и содержали ядро. Во втором ряду показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые были CD45-, CD14-, CD34-, СК+, и содержали ядро. В третьем ряду показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые были CLR 1501+, CD45-, CD14-, CD34-, СК+, и содержали ядро. В четвертом ряду показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые были CD45-, CD14-, CD34- и EpCAM+, и содержали ядро. В пятом ряду показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые были CLR 1501+, CD45-, CD14-, CD34- и EpCAM+, и содержали ядро. В шестом ряду показано количество клеток из образцов крови каждого пациента, которые были CLR 1501+, CD45-, CD14-, CD34-, СК- и EpCAM- и содержали ядро.

Таблица 1. Идентификация и количественное определение циркулирующих опухолевых клеток в образцах крови пациентов с различными типами рака, собранных в пробирки для взятия образцов крови Cell Save®

Cell Save® (кол-во)	Рак легкого	Рак легкого	Рак щитов. железы	Рак щитов. железы	Рак легкого	Рак шейки матки
	101 (1)	101 (2)	102 (1)	102 (2)	103	104 (1)
CTC (согласно определению)	0	10	29,980	22,246	6,380	944
СК+	4,7М	10	1,0М	3,5М	3,3М	6,8М
СК+/CLR 1501+	4,7М	10	1,0М	3,3М	3,3М	6,8М
EpCAM+	20	41	38,594	24,674	10,610	1,087
EpCAM+/CLR 1501+	20	31	37,355	24,919	11,139	998
СК-/EpCAM- /CLR1501+	1,4М	121,696	6,7М	7,9М	5,3М	1,3М
Cell Save® (кол-во)	Рак шейки матки	Рак молочной железы	Карцинома	Колоректальный рак	Колоректальный рак	
	104 (2)	106	107	108 (1)	108 (2)	

СТС (по определению)	26	30	1,034	5	30
СК+	789	60	54,661	5	15,423
СК+/CLR 1501+	789	60	54,391	5	15,418
ЕрСAМ+	1069	105	6,968	40	222
ЕрСAМ+/CLR 1501+	942	75	6,686	15	109
СК-/ЕрСAМ-/CLR1501+	36,4М	278	611,622	1,062	1,1М

М обозначает миллион

Таблица 2. Идентификация и количественное определение циркулирующих опухолевых клеток в образцах крови от пациентов с различными типами рака, собранными в пробирки для взятия крови, содержащие EDTA

EDTA (кол-во)	Рак легкого	Рак легкого	Рак щитов. железы	Рак щитов. железы	Рак легкого
	101 (1)	101 (2)	102 (1)	102 (2)	103
СТС (по определению)	26	0	730	8808	192
СК+	1,8М	0	46155	16797	13290
СК+/CLR 1501+	1,8М	0	46132	16755	13012
ЕрСAМ+	178	0	2353	10236	1517
ЕрСAМ+/CLR 1501+	153	0	2720	10375	1896
СК-/ЕрСAМ-/CLR1501+	1,8М	30222	1,5М	10,9М	2,5М

EDTA (кол-во)	Рак шейки матки	Рак молочной железы	Карцинома	Колоректальный рак	Колоректальный рак
	104	106	107	108 (1)	108 (2)

СТС (по определению)	22965	12	1896	0	76
СК+	9,6М	98	13805	76	968
СК+/CLR 1501+	9,6М	86	13788	76	917
ЕрСAМ+	24722	17	8088	662	433
ЕрСAМ+/CLR 1501+	23493	17	9469	382	229
СК-/ЕрСAМ-/CLR1501+	4,0М	19585	147641	29584	753387

М обозначает миллион

Результаты.

Все семь образцов содержали поддающиеся обнаружению CTC (согласно определению), которые показали положительное поглощение CLR1501 (сравните ряд 1 с рядами 3, 5 и 6 в табл. 1 и 2). На чертеже показано репрезентативное изображение проточной цитометрии, отражающее высокое поглощение CLR1501 в CD14+ клетках образцов крови от пациента 8. На чертеже верхний левый квадрант обозначает CD14-/CLR1501+ клетки, верхний правый указывает на CD14+/CLR1501+ клетки, нижний правый указывает на CD14+/CLR1501- клетки и нижний левый указывает на CD14-/CLR1501- клетки. На панели А клетки, негативные по CD45 и CD34 (т.е. возможные циркулирующие опухолевые клетки), выделенные из крови, взятой у пациента 108, показаны окрашенными всеми маркерами, за исключением Brilliant Violet 785™ CD14. Клетки, положительные по CD14, показаны по оси x, и клетки, положительные по CLR1501, показаны по оси y. Панель А использовали в качестве контроля для установки гейтов для Brilliant Violet 785™ CD14-положительных клеток. На панели В клетки, негативные по CD45 и CD34, выделенные из крови, взятой у пациента 108, показаны окрашенными всеми маркерами, включая Brilliant Violet 785™ CD14. Как показано, 99,7% клеток, положительных по CD14+, также являются положительными по CLR1501. Сравните чертеж, панель С с панелью А.

Кроме того, соединение CLR1501 смогло идентифицировать ~99-100% CK+ клеток (сравните ряд 2 с рядом 3 табл. 1 или 2) и ~35-100% EpCAM+ клеток (сравните ряды 4 или ряд 5 табл. 1 или 2) во всех типах рака независимо от того, какую использовали пробирку для взятия образца крови. Неожиданно было обнаружено большое количество клеток, которые являлись CLR 1501+, но CK-, EpCAM-, CD45-, CD14-, CD34- и содержали ядро (ряд 6, табл. 1, 2). Клетки, указанные в ряду 6 табл. 1 и 2, не являются типами клеток крови, но могут быть другими опухолевыми клетками, которые могут иметь пониженную экспрессию EpCAM и CK или ее отсутствие. Сообщалось, что многие злокачественные опухоли либо экспрессируют альтернативные опухолевые маркеры, имеют гетерогенную экспрессию EpCAM и/или CK, или могут подвергаться эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) и, таким образом, утрачивают экспрессию эпителиальных маркеров. Yu 2013, Eichelberg 2013 and Spizzo 2011. Таким образом, соединение CLR1501 способно идентифицировать циркулирующие опухолевые клетки, которые в ином случае останутся необнаруженными в текущих анализах с использованием одного и нескольких маркеров.

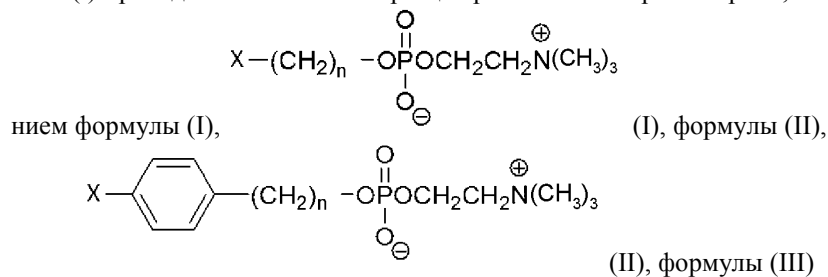
У пациентов 101, 102, 104 и 108 брали кровь до и после терапии (взятие 1 и 2 соответственно). Пациент 101 имел очень хороший частичный ответ на терапию; однако в период между взятиями 1 и 2 количество CTC согласно определению увеличилось с 0 до 10 у этого пациента, что указывает на прогрессирование рака (табл. 1). При использовании в качестве маркера опухолевых клеток только CK, количество опухолевых клеток у пациента 101 снизилось от 4,7 млн до 10 (табл. 1, сравните взятие 1 с взятием 2). При использовании в качестве маркера опухолевых клеток только EpCAM, количество опухолевых клеток у пациента 101 увеличилось с 20 до 41 (табл. 1, сравните взятие 1 с взятием 2). Однако общее количество опухолевых клеток у пациента 101 (количества CK+ и EpCAM+) уменьшилось в период между взятием 1 и взятием 2, что указывает на то, что отдельно взятые маркеры могут обеспечить более точное измерение клинического ответа, и что раковые клетки у пациента 101 имеют гетерогенную экспрессию CK и EpCAM. Кроме того, количество всех CLR 1501+ клеток у пациента 101 значительно уменьшилось в период между взятием 1 и взятием 2. Эта тенденция также наблюдалась в пробирках для сбора образцов крови, содержащих EDTA, для пациента 101 (табл. 2). Таким образом, взятое в отдельности CLR 1501 может обеспечить более точное измерение клинического ответа по сравнению с существующими анализами, устраняя необходимость в идентификации EpCAM и CK.

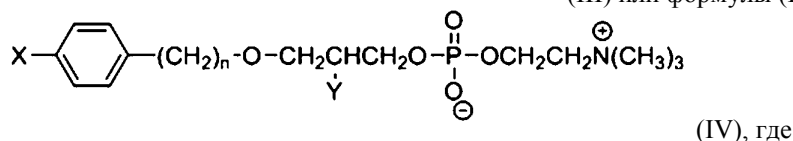
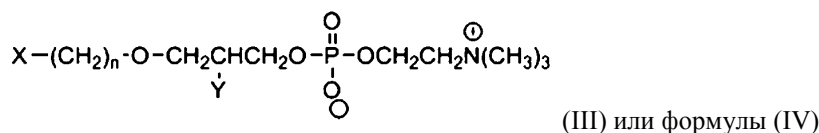
В целом, флуоресцентный аналог PLE CLR1501 успешно применяли для того, чтобы идентифицировать CTC у пациентов с раком легкого, щитовидной железы, молочной железы, шейки матки, плоскоклеточным раком и колоректальным раком.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации одной или более циркулирующих опухолевых клеток, включающий:

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с соедине-





n представляет собой целое число от 16 до 30;

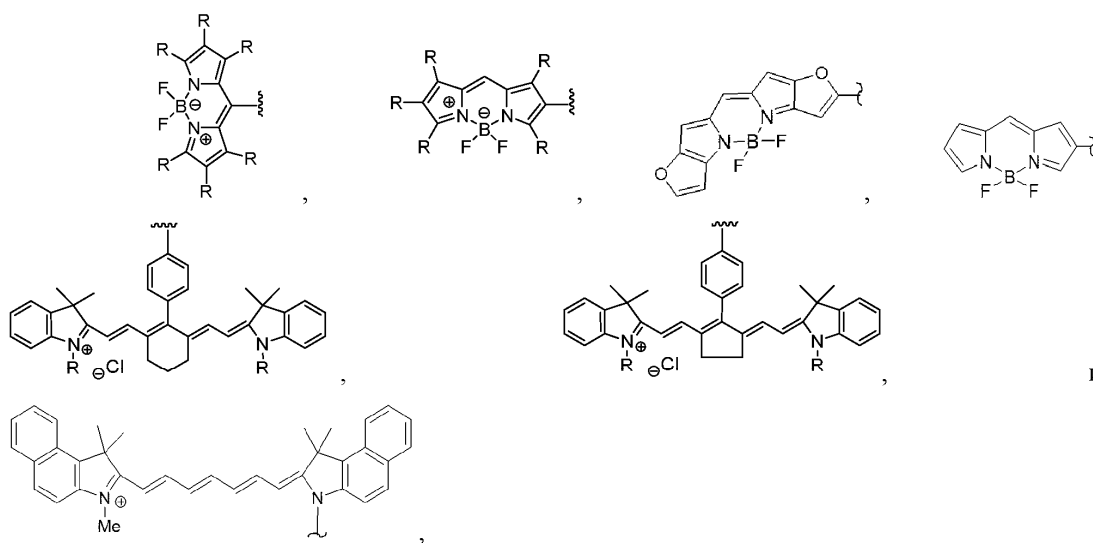
Y выбран из группы, состоящей из $-\text{H}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ и $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$, где R представляет собой C_1 - C_{24} алкил;

X представляет собой люминесцентную молекулу;

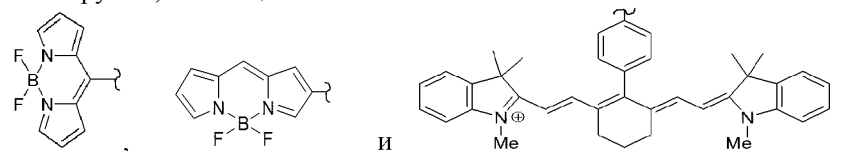
(ii) подвержение образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии.

2. Способ по п.1, в котором люминесцентная молекула представляет собой флуорофор.

3. Способ по п.2, в котором флуорофор выбран из группы, состоящей из



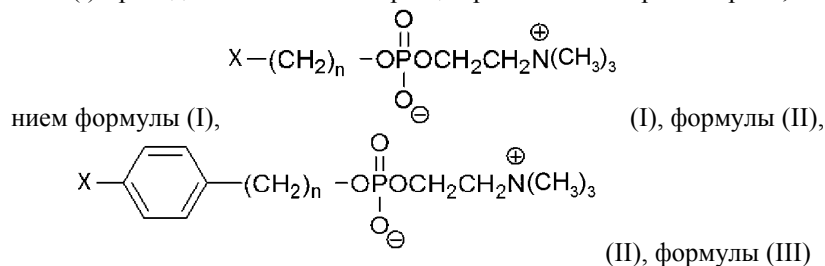
4. Способ по п.3, в котором соединение представляет собой соединение формулы (II) и флуорофор выбран из группы, состоящей из

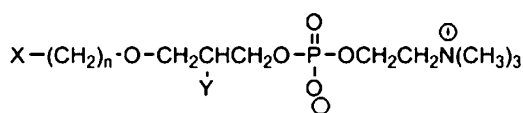


5. Способ по п.1, в котором одна или более циркулирующих опухолевых клеток выбраны из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, рака легкого, рака щитовидной железы, рака шейки матки, плоскоклеточного рака, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и колоректального рака, клетки множественной миеломы и раковой стволовой клетки.

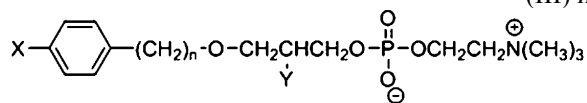
6. Способ изолирования одной или более циркулирующих опухолевых клеток (СТС), включающий следующие стадии:

(i) приведение в контакт образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, с соедине-





(III) или формулы (IV)



(IV), при этом

n представляет собой целое число от 16 до 30;

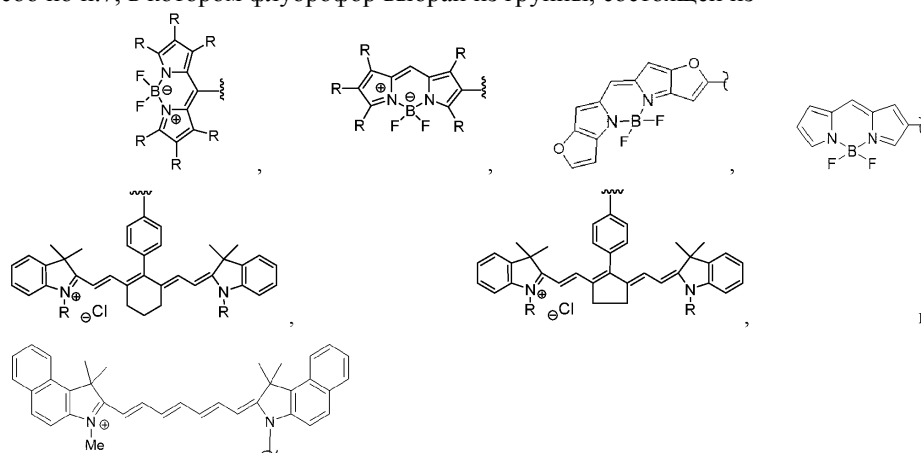
Y выбран из группы, состоящей из -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH и -OC(O)R¹, где R¹ представляет собой C₁-C₂₄ алкил; и

X представляет собой люминесцентную молекулу; и

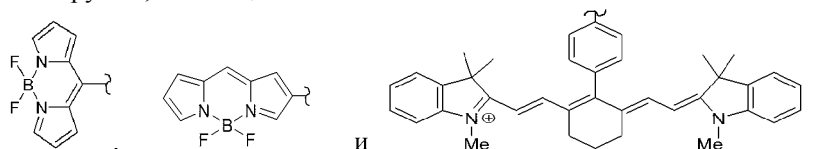
(ii) подвержение образца крови или сыворотки крови, полученного от субъекта, проточной цитометрии.

7. Способ по п.6, в котором люминесцентная молекула представляет собой флуорофор.

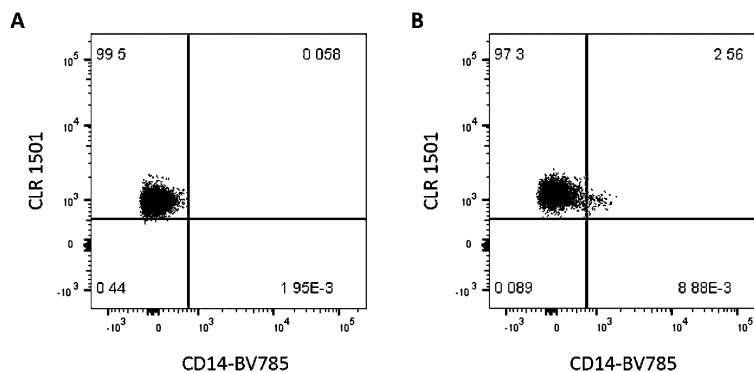
8. Способ по п.7, в котором флуорофор выбран из группы, состоящей из

где каждый R независимо выбран из H, CH₃, C₂H₅ и C₃H₇.

9. Способ по п.8, в котором соединение представляет собой соединение формулы (II) и флуорофор выбран из группы, состоящей из



10. Способ по п.6, в котором одна или более СТС выбраны из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, рака легкого, рака щитовидной железы, рака шейки матки, плоскоклеточного рака, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и клетки колоректального рака, клетки множественной миеломы и раковой стволовой клетки.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2