

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580051478.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月10日

[11] 公开号 CN 101322031A

[22] 申请日 2005.7.5

[21] 申请号 200580051478.6

[30] 优先权

[32] 2005.7.1 [33] US [31] 11/174,051

[86] 国际申请 PCT/US2005/023858 2005.7.5

[87] 国际公布 WO2007/005027 英 2007.1.11

[85] 进入国家阶段日期 2008.3.3

[71] 申请人 细胞信号技术有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 K·瑞科瓦 R·波拉基维茨

郭爱兰 K·克罗斯比

Q·曾(已故) K·李

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 57 页 序列表 10 页
附图 12 页

[54] 发明名称

表达 PDGFR α 的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的
鉴定

[57] 摘要

本发明公开了先前未确诊的哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)的亚类,血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)在其中表达且引发疾病,而且提供了鉴定属于表达PDGFR α 的NSCLC肿瘤亚类的哺乳动物NSCLC肿瘤的方法,提供了鉴定可能响应PDGFR α -抑制治疗剂的NSCLC肿瘤的方法。本发明还提供了一种抑制表达PDGFR α 的哺乳动物NSCLC肿瘤发展的方法;以及确定化合物是否抑制表达PDGFR α 的哺乳动物NSCLC肿瘤的发展的方法。

1、一种鉴定属于表达血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的方法, 所述方法包括使用至少一种 PDGFR α 特异性药剂确定 PDGFR α 是否在含有来自 NSCLC 肿瘤的生物样品中表达的步骤, 其中在该生物样品中 PDGFR α 的表达鉴定了该 NSCLC 肿瘤为属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类。

2、权利要求 1 的方法, 其中所述哺乳动物是人。

3、权利要求 1 的方法, 其中鉴定所述 NSCLC 肿瘤为属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类鉴定了该 NSCLC 肿瘤可能响应含有至少一种 PDGFR α -抑制治疗剂的组合物。

4、权利要求 3 的方法, 其中所述 PDGFR α -抑制治疗剂含有 PDGFR α 的小分子抑制剂。

5、权利要求 4 的方法, 其中所述 PDGFR α 的小分子抑制剂是甲磺酸伊马替尼(STI-571)。

6、权利要求 4 的方法, 其中所述 PDGFR α 的小分子抑制剂是甲磺酸伊马替尼(STI-571)类似物。

7、权利要求 6 的方法, 其中所述甲磺酸伊马替尼 (STI-571)类似物是选自 BAY 43-93006、XL-999 和 SU11248 组成的组。

8、权利要求 1 的方法, 其中所述生物样品含有从肿瘤活组织检查、肿瘤细针抽吸或胸腔积液得到的细胞。

9、权利要求 1 的方法, 其中所述 PDGFR α -特异性药剂含有 PDGFR α 特异性抗体。

10、权利要求 9 的方法, 其中所述 PDFGR α -特异性抗体是磷酸化位点特异性抗体。

11、权利要求 1 的方法, 其中所述 PDGFR α -特异性药剂含有对应于 PDGFR α 肽序列的重同位素标记的肽(AQUA 肽)。

12、权利要求 11 的方法，其中所述 AQUA 肽是具有选自 SEQ ID NOs: 3-8 组成的组的序列的肽。

13、权利要求 1 的方法，其中所述方法应用于流式细胞术(FC)、免疫组织化学(IHC)或免疫荧光(IF)测定方式中。

14、一种确定化合物是否抑制属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法，所述方法包括确定该化合物是否抑制该 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的表达和/或活性的步骤。

15、权利要求 14 的方法，其中 PDGFR α 的表达和/或活性的抑制是通过检查含有来自所述 NSCLC 肿瘤的细胞的生物样品确定的。

16、权利要求 14 的方法，其中 PDGFR α 的表达和/或活性的抑制使用至少一种 PDGFR α 特异性药剂测定。

17、权利要求 16 的方法，其中所述 PDGFR α 特异性药剂包括磷酸化位点特异性抗体。

18、一种抑制属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法，所述方法包括抑制该肿瘤中 PDGFR α 的表达和/或活性的步骤。

19、权利要求 19 的方法，其中 PDGFR α 的表达和/或活性由含有甲磺酸伊马替尼(STI-571)和/或甲磺酸伊马替尼(STI-571)类似物的组合物抑制。

20、权利要求 19 的方法，其中所述类似物选自 BAY 43-93006、XL-999 和 SU 11248 组成的组。

表达 PDGFR α 的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的鉴定

发明领域

本发明总体涉及癌症和抗体，抗体在表征癌症中的应用。

发明背景

很多癌症特征在于细胞信号途径的中断，导致细胞过程的异常控制，或者产生不受控制的细胞生长及增殖。这些中断常常是由于磷酸化状态的改变，以及由此导致的具体信号蛋白质活性的改变而引起的。这些癌症包括非小细胞肺癌(NSCLC)。NSCLC 是美国癌症死亡的主要原因，占有所有肺癌的约 87%。在美国每年大约有 151,000 的 NSCLC 的新发病例，估计在美国每年超过 120,000 的病人将死于此疾病。参见“*Cancer Facts and Figures 2003*”美国癌症学会。包括三种不同亚型的 NSCLC 通常只是在其迁移之后检测到，因此在诊断的两年内的死亡率是 75%。

像大多数癌症，NSCLC 涉及信号转导途径的缺陷。受体酪氨酸激酶(RTKs)在这些信号途径中具有关键作用，传递细胞外分子信号进入细胞的细胞质和/或细胞核。在这当中，RTKs 是多肽生长因子如表皮生长因子(EGF)、胰岛素、血小板衍生的生长因子(PDGF)、神经营因子(即，NGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)的受体。所述 RTKs 的磷酸化激活其细胞质区域激酶功能，其激活下游信号分子。因此，RTKs 是细胞信号发送以及这种 RTKs 及其底物的过表达和活化引起的肿瘤生成的关键介导体。由于其在正常和异常信号中的关键作用，RTK 作为治疗一些类型的癌症的潜在药物靶越来越受到重视。例如，Herceptin®，HER2/neu 的抑制剂，是

目前批准的用于特定亚类的乳腺癌的治疗。Iressa™(ZD1839)和 Tarceva™ (OSI-774), 均是 EGFR 的小分子抑制剂, 已经批准用于治疗 NSCLC。

血小板衍生的生长因子(PDGF)及其受体(PDGFRs)是一类这样的 RTKs, 其在正常细胞生长和分化的调节中具有重要作用。PDGFRs 在多种病理过程中涉及, 包括动脉粥样硬化、瘤形成、组织修复和炎症(参见, 例如 Ross 等人, *Cell* 46: 155-169 (1986); Ross 等人, *Adv. Exp. Med. Biol.* 234: 9-21 (1988))。PDGFRs, 其是由两种亚型(alpha(α)和 beta(β))构成, 是膜蛋白质-酪氨酸激酶, 一旦结合 PDGF 则被激活, 并且通过募集含 H2 区域的效应分子, 启动协调细胞响应的不同或重叠信号级联。

组成型活性 PDGFR 的表达导致细胞转化(参见 Gazit 等人, *Cell* 39: 89-97 (1984)), 而且提示在正常细胞中, PDGFR 活性必须密切调节以对抗其下游区效应物的连续活化。例如 PDGFR β 已知是在大量肿瘤中过表达, PDGF 治疗在多种实验系统中引起转化和恶性肿瘤(参见 Heldin 等人, *Physiol. Rev.* 79(4): 1283-1316 (1999))。因此已提出, PDGF 受体的过表达或组成型活化在某些癌细胞起源或肿瘤发生中起作用。已经报道, 在患有慢性骨髓单核细胞性白血病(CML)的病人亚类中, PDGFR 通过与转录因子 TEL 融合而被活化(参见 Ide 等人, *PNAS* 99(22): 14404-14409 (2002))。PDGFR 活化还与某些实体瘤如成胶质细胞瘤的生长有关(参见, 例如 Vassbotn 等人, *J. Cell. Physiol.* 158: 381-389 (1994))。

因此, PDGFR 及其下游途径的抑制已经成为愈发受到药物研发关注的方面。PDGFR 的特异性抑制剂如小分子药物 Gleevec® (STI-571、甲磺酸伊马替尼), 最近已经被研发并用于治疗某些癌症包括前列腺癌和卵巢癌的临床试验。已显示, Gleevec®在患有与 PDGFR 活化有关的慢性骨髓增生性疾病的病人中诱导持久的响应(参见,

Apperley 等人, *N. Engl. J. Med* 347(7): 481-7 (2002))。然而, 虽然 PDGFR 表达与一些癌症如 CML 和成胶质细胞瘤的发展有关联, 在很多其他类型的癌症中却没有这种关联。类似地, 尽管导致 NSCLC 发展的某些信号缺陷已经被鉴定(包括 EGFR 过表达), 引发该疾病的精确细胞机制没有完全理解。

某一研究报道, 在检查的几乎 100% 的人肺癌肿瘤中 PDGFR α (α) 明显表达, 报道了 Gleevec® 对肺癌细胞系 A549 的生长抑制, 该作用推测是通过 PDGFR 抑制介导的(参见 Zhang 等人, *Mol. Cancer* 2(1): 1-10 (2003))。然而, 该报道是不确定的, 因为研究中采用的抗体随后(由本发明人)显示是非特异性的, 与 PDGFR α 之外的多种蛋白交叉反应; 因此, 不清楚在张的研究中实际检测到的蛋白质。此外, PDGFR α 在该研究中采用的 A549 细胞系中检测不到-这与本发明人无法再现用 Gleevec® 抑制此细胞系的生长是一致的-进一步证明 Zhang 报道的观察是错误的或是由非 PDGFR α 表达和抑制的一些机制介导的。

因为新一代抗 RTKs 靶向治疗剂如 PDGFR 和 EGFR 是高度特异性的, 对于鉴定实际上是由这些药物靶向的 RTK 引发的特定肿瘤存在持续和紧迫的需要, 事实上这些肿瘤是由 RTK 引发的并由这些药物靶向的, 因为这样的肿瘤是最有可能响应抑制剂的。目前广泛接受的是大多数类型的癌症具有被不同信号途径引发的不同亚类的肿瘤。例如, 两种不同亚类的乳腺癌是已知存在的, 其中一个是由 Her2/Neu 信号引发而另一个是由 EGFR 信号引发的, 但是只有前者响应 Her2-靶向治疗剂 Herceptin®。可能的是, 大多数类型的癌症包括其中 RTK 已经被鉴定(且靶向)为疾病的引发子的那些, 实际上具有受其他目前未知 RTKs 和途径引发的多种亚型。的确, 由此在多种高度特异性靶向治疗剂(包括抗 EGFR 和 PDGFR 的那些)的临床试验中进一步观察到的适中响应速率证明很多治疗的癌症事实上可能包含非完全靶向的其他 RTKs 和途径引发的亚类。

因此，持续和迫切需要鉴定特定信号分子包括 RTKs，事实上其表达和/或活化引发确定类型的癌症(或该癌症的亚类)。这种信号发送分子的鉴定将能够发展新的和改善的诊断和/或预测分析以有助于确保特定患者得到最可能有效抵抗这些疾病的靶向治疗，并提供治疗这些癌症的新药物靶。一些癌症如 NSCLC 常常直至疾病已经转移之后才检测到，使迅速和有效的治疗变得极为重要。因此，鉴定由目前未靶向的 RTKs 和信号途径引起的癌症亚类的能力将大大地有助于开发选择性的和更有利的治疗策略，避免向对其不可能响应的患者开无效处方。

发明概述

根据本发明，目前已鉴定哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的以前未知的亚类，其中血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)被表达并引发该疾病。鉴定 PDGFR α 在其中表达并引发疾病的 NSCLC 肿瘤的能力，能够鉴定可能响应 PDGFR α 抑制剂如甲磺酸伊马替尼 (Imatinib mesylate)(STI-571、Gleevec®)的 NSCLC 肿瘤。因此本发明提供鉴定属于其中表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的方法，还提供了鉴定可能响应 PDGFR α -抑制治疗剂的 NSCLC 肿瘤的方法。本发明还提供测定化合物是否抑制表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤发展的方法，提供通过抑制 PDGFR α 的活性来抑制表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤发展的方法。

附图简述

本专利和申请文件包含至少一副彩色图。经请求且支付必要的费用，具有彩色附图的此专利或专利申请公开的复印件将是由专利局提供

附图 1 – 是人 PDGFR alpha(α)的氨基酸序列 (1 -字母代码) (SEQ ID NO: 1) (SwissProt 登录号 P16234)。

附图 2 – 是具有已知/报道的标记的酪氨酸磷酸化位点的人 PDGFR α 激酶的图示。

附图 3 – 是编码人 PDGFR α 的 DNA 序列 (登录号 NM_006206)。

附图 4 – 是对来自人 NSCLC 细胞系的提取物的 Western 印迹分析, 所述分析使用制备的多种抗 PDGFR α 抗体, 证明一些商业上购得的抗体事实上对于 PDGFR α 并非是特异性的。

附图 5 – 是对来自三种不同细胞系的提取物的两种 Western 印迹分析, 所述分析使用不同抗-PDGFR α 抗体, 证明一些商业上购得的抗体错误地检测 A549 细胞中的 PDGFR α 。

附图 6 – 是对来自 PDGF $\alpha\alpha$ 诱导的两种 NSCLC 细胞系的提取物的 Western 印迹分析, 所述分析使用制备的抗 PDGFR α 、磷酸-PDGFR α 的抗体, 并对于下游激酶, 使用抗磷酸-AKT 抗体, 证明 H1703 细胞系表达可由 PDGF $\alpha\alpha$ 活化的 PDGFR α , 而 A549 细胞系不表达所述受体且不响应于 PDGF $\alpha\alpha$ 。

附图 7 – 是使用制备的两种抗 PDGFR α 抗体探测的 H1703 异种移植物样品的 IHC 分析。结果表明商业购买的一种抗体检测到异种移植物中的非特异性染色, 与细胞系的 Western 结果一致。

附图 8 – 显示了 Gleevec® 治疗对于 NSCLC 细胞系中细胞生长和细胞凋亡的影响。图 A 显示了用增加浓度的 Gleevec® 处理的四种细胞系的生长曲线, 证明了 H1703 细胞系对于 Gleevec® 是敏感的。图 B 显示 Western 印迹结果, 证明了 Gleevec® 诱导 H1703 细胞系中的细胞凋亡, 如 PARP 的裂解所示。图 C 是棒图, 显示了 H1703 细胞中由于给药 Gleevec® 诱导的细胞凋亡, 如使用流式细胞术确定裂解的 Caspase-3 的存在所示。

附图 9 – 是来自用 EGF、Gleevec® 和 Iressa® 处理的 H1703 细胞的提取物的 Western 印迹分析。结果证明细胞系具有组成型活化的 PDGFR α , 其导致 AKT 活化, 而且证明此活化可以用 Gleevec® 而不

是 Iressa®来抑制。

图 10 – 描述了在小鼠中 Gleevec®对表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤异种移植物的抑制。图 A 显示用该 PDGFR α 抑制剂治疗的小鼠中肿瘤体积的减少。图 B 是来自小鼠异种移植物的肿瘤细胞提取物的 Western 印迹分析，证明异种移植体暴露于 Gleevec®与 PDGFR α 磷酸化的丢失有关，并且总的 AKT 水平没有改变。

图 11 – 是来自用 PDGFR α -抑制剂 Gleevec® (STI-571)处理(图 B)或者未用 PDGFR α -抑制剂 Gleevec® (STI-571)处理(图 A)的小鼠 NSCLC 肿瘤异种移植体(表达 PDGFR α)的细胞的免疫组织化学(IHC)分析，证明了暴露于 Gleevec 导致 PDGFR α 和 AKT 的磷酸化的显著减少，同时受体的总水平没有改变。

发明详述

根据发明，先前未知的哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤亚类已经被鉴定，其中血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)被表达并引发该疾病。表皮生长因子受体(EGFR)表达/活化已知在多数 NSCLC 肿瘤中发生(参见，Neal 等人，上述的；Sainsbury 等人，上述的)，目前该受体是 NSCLC 治疗的治疗靶点。然而，尽管已知 PDGFR 的活化引发某些癌症亚类例如前列腺癌，NSCLC 肿瘤的亚类中 PDGFR α 表达的关联先前没有确定报道。

先前的研究(Zhang 等人，上述的)报道了几乎 100%的受检人肺癌肿瘤中 PDGFR α 均明显表达。这种研究还报道了 Gleevec® (STI-571)，一种具有抗 PDGFR 活性的小分子抑制剂，可以抑制肺癌细胞系 A549 的进展，因此作者该推测作用是通过这些细胞中 PDGFR α 的抑制介导的。然而，如目前所示(参见实施例 2)，此研究(由 Santa Cruz 生物技术得到的)中采用的可能抗体对于 PDGFR α 不是特异性的，事实上其与多种其他蛋白交叉反应。因此，不清楚在 Zhang 的研究中实际上检测到哪些蛋白质以及 PDGFR α 是否是在受检细胞

中表达。的确，如先前所示(参见实施例 2)，在 Zhang 的研究中采用的 A549 细胞系事实上不表达可检测的 PDGFR α 。在这种细胞系中 PDGFR α 表达的不足与目前发现 Gleevec®事实上不抑制此细胞系的生长的情况一致，进一步证明 Zhang 的研究中报道的观察结果是错误的或是通过除 PDGFR α 抑制以外的一些机制介导的。

本发现是令人吃惊的，因为尽管对 NSCLC 肿瘤亚类进行了大量治疗性开发，PDGFR α 表达和该类癌症之间的关联直到现在也没有明确建立。表达 PDGFR α 的不同 NSCLC 肿瘤亚类的鉴定对于控制和治理这种常见疾病具有重要含意。NSCLC 是美国癌症死亡的首位原因，在发生转移之前，其常常难以诊断，增加了有效治疗或治愈这种疾病的难度。NSCLC 的死亡率因此在诊断的两年之内是 75%。参见美国癌症协会(American Cancer Society)，见上文。尽管靶向的 EGFR-抑制剂目前已经批准用于治疗 NSCLC，有可能的是，这种治疗对于患有其中 PDGFR α (非 EGFR 或除 EGFR 之外)被表达并引发疾病的肿瘤的患者亚群将是全部或者部分无效的。

本发明对于由 PDGFR α 的表达引发的 NSCLC 肿瘤亚类的发现使得精确鉴定表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的重要新方法成为可能，因为这些肿瘤可能响应 PDGFR α -抑制治疗剂如甲磺酸伊马替尼(STI-571, Gleevec®)。尽可能早地鉴定这些肿瘤的能力将大大地有助于临床上确定哪种治疗剂或治疗剂的组合最适于特定 NSCLC 肿瘤，借此有助于避免在这种抑制剂可能部分或全部无效的情况下(即，在所述肿瘤中并非所述药物靶向的受体全部或部分引发疾病)开 EGFR-抑制剂的处方。因此，本发明部分提供了鉴定属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的方法。这种肿瘤的鉴定识别了这样的肿瘤，其可能响应于含有一种或多种 PDGFR α -抑制治疗剂如 Gleevec®的组合物。

本发明还提供了通过测定化合物是否抑制这种 NSCLC 肿瘤中

PDGFR α 的表达或活性，确定化合物是否抑制属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法。本发明进一步提供的是通过抑制 PDGFR α 的表达或活性抑制表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤发展的方法。

本发明其他方面、益处和实施方案在以下更详细描述。本文引用的所有参考文献在此引入作为参考。

A. 表达 PDGFR α 亚类的 NSCLC 肿瘤.

令人吃惊地，在来自已知人 NSCLC 肿瘤细胞系(包括四种细胞系：A549、H441、H 1373 和 H 1703 细胞系)的提取物的全面磷酸化肽图谱的检查中，鉴定不同亚类的人 NSCLC 肿瘤，PDGFR α 在其中表达并引发疾病。这些细胞系的磷酸化图谱使用用于对来自复杂混合物的修饰肽进行分离和质谱表征的最近描述的技术阐明(参见，美国专利公开号 20030044848, Rush 等人“Immunoaffinity Isolation of Modified Peptides from Complex Mixtures” (“IAP”技术)，其在本文的实施例 1 中进一步描述。使用磷酸酪氨酸-特异性抗体的 IAP 技术 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, MA, 2003/04 Cat. #9411)鉴定了表达 PDGFR α 的 H1703 细胞，相对于其他细胞系，其缺乏 PDGFR α 但是常常表达 EGFR (表 1, 实施例 1 列出了仅仅在 H 1703 细胞系中观察到的 PDGFR α 磷酸位点)。这种新发现表明存在先前未鉴定的表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类，而且尽管临床上仅仅靶向 EGFR 途径，这种肿瘤亚类可能存活。

这种最初的发现随后用包含来自 304 个不同人 NSCLC 患者的肿瘤活检组织样品的组织微阵列的免疫组织化学(IHC)分析证实。其进一步描述在下文的实施例 3 中。17/305 的肿瘤(或者 6%的所有检查的肿瘤)属于表达 PDGFR α 的亚类，表明这种 NSCLC 肿瘤的亚类的发生率是很低的(参见实施例 3 的表 2)。在表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类之中，腺癌和细支气管肺泡癌占 76%(11/17)的肿瘤，表达

PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤发生于女人的情况(65%，11/17)超过男人。

在此公开的低频率表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤(在检查的大病人样本群中)与使用小(33 样本)患者群的 Zhang 等人见上文中报道的几乎 100% 的频率形成鲜明对比。此对比表明 Zhang 早期报道是错误的，或者归因于使用事实上非 PDGFR α 特异性的但是结合多种其他蛋白的抗体(参见，以下实施例 2)。的确，如现在所示(实施例 2)的，在 Zhang 的研究使用的 A549 NSCLC 细胞系未明显地表达 PDGFR α ，而且此细胞系的生长不由 PDGFR α -抑制化合物 Gleevec®(STI-571)抑制。参见图 10。

然后，PDGFR 活化和下游区信号的抑制是通过 H1703 细胞系证明的(参见图 9)。在相同的图中，结果表明，在这些细胞中的组成型细胞信号转导不受 Iressa™或 EGFR 抑制影响。这些结果揭示，Gleevec® 治疗可能抑制受 PDGFR α 引发的肿瘤中的肿瘤生长。此假设是使用衍生自 H 1703 细胞系的小鼠异种移植物检测的。的确，通过 PDGFR α 的小分子靶向抑制剂，Gleevec® (STI-571)处理患有表达 PDGFR α 人 NSCLC 肿瘤 (H1703)的小鼠异种移植物，显示了体内的 PDGFR α 活性抑制，如图 9 和 10 所示。

选择性鉴定属于 PDGFR α 在其中表达并引发该疾病(全部或部分)的 NSCLC 肿瘤的亚类的 NSCLC 肿瘤的能力使提供下述的重要新方法成为可能，其用于诊断目的准确地鉴定这样肿瘤，并获得有用信息以确定这样的肿瘤是否可能响应 PDGFR α -抑制治疗组合物，或者当给药为治疗 NSCLC 的单一药物时可能是部分地或全部地非响应于 EGFR 抑制剂。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了鉴定属于表达血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR)的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的方法，该方法包括使用至少一种 PDGFR α -特异性特异性药剂测定 PDGFR α 是否是在含有 NSCLC 肿瘤细胞的生物

样品中表达的步骤，其中在该生物样品中 PDGFR α 的表达鉴定了该 NSCLC 肿瘤属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类。

本发明实践中所用的生物样品在以下 B 部分进一步详细描述。在一个优选的实施方案中，哺乳动物 NSCLC 肿瘤是人肿瘤，而在另一个优选实施方案中，哺乳动物是狗、猫或马。在其他优选的实施方案中，生物样品包括从肿瘤活组织检查、肿瘤细针抽吸或胸腔积液中获得的细胞(或者细胞的溶解产物)。在另一个优选实施方案中，鉴定 NSCLC 肿瘤为属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类，鉴定了 NSCLC 肿瘤为可能响应于包含至少一种 PDGFR α -抑制治疗剂的组合物。本发明实践中所用的 PDGFR α -抑制治疗剂是进一步详细描述于以下 F 部分。在一个优选的实施方案中，PDGFR α -抑制治疗剂包括 PDGFR α 的小分子抑制剂。在其他优选的实施方案中，PDGFR α 的小分子抑制剂是甲磺酸伊马替尼(STI-571、Gleevec®)或其类似物，同时在另一个优选的实施方案中，PDGFR α 小分子抑制剂选自 BAY 43-93006、XL-999 和 SU 11248。

本发明方法实践所用的 PDGFR α -特异性药剂进一步详细描述以下 C 部分。在一个优选的实施方案中，PDGFR α -特异性药剂包括 PDGFR α -特异性抗体。在一个优选的实施方案中，这样的抗体可以是磷酸化位点-特异性抗体。在另一个优选的实施方案中，PDGFR α -特异性药剂包括对应 PDGFR α 肽序列的重同位素标记的磷酸肽(AQUA 肽)(其可以对应于 PDGFR α 中的磷酸化位点)。

以上所述的本发明的方法还可以任选地包括测定该生物样品中活化或表达的表皮生长因子受体(EGFR)的水平。对给定 NSCLC 肿瘤中的 PDGFR α 表达/活化和 EGFR 表达/活化的绘图可以提供关于哪个或那些途径引发疾病的有价值信息，以及哪种治疗法可能是最有利的。

鉴定属于 PDGFR α 活化的 NSCLC 肿瘤的亚类的哺乳动物

NSCLC 肿瘤的能力可以提供对于评估病人的肿瘤是否可能响应特定治疗(例如, EGFR 抑制剂或 PDGFR α 抑制剂)的有价值临床信息。因此, 在上述方法的一个优选的实施方案中, 当鉴定 NSCLC 肿瘤属于 PDGFR α 活化的 NSCLC 肿瘤的亚类时, 鉴定肿瘤为可能响应包含至少一种 PDGFR α -抑制治疗剂的组合物。本发明实践所用的 PDGFR α -抑制治疗剂进一步描述于以下的 E 部分。

本发明方法实践所用的 PDGFR α -特异性药剂, 包括抗体和 AQUA 肽, 是进一步详细描述于以下 C 部分。在一个优选的实施方案中, PDGFR α -特异性药剂是抗体, 在一个优选的实施方案中, 抗体是仅在磷酸化时特异性结合 PDGFR α 的磷酸化位点-特异性抗体。在另一个优选的实施方案中, PDGFR α -特异性药剂是符合 PDGFR α 肽序列的重同位素标记的磷酸肽(AQUA 肽)。

最近鉴定的不同的哺乳动物 NSCLC 肿瘤亚类, PDGFR α 在其中表达并引发疾病(全部或部分)-相对于其中仅有 EGFR 活化并引发癌症的肿瘤亚类-对于治疗 NSCLC 还具有重要含意。通过抑制 PDGFR α 的表达和/或活性(相对于仅靶向 EGFR, 其对于这种肿瘤亚类可能是全部或部分无效的), 属于 PDGFR α 引发的疾病亚类的 NSCLC 肿瘤的进展可以被抑制和停止。

因此, 本发明在某种程度上还提供了抑制属于 PDGFR α 表达的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法, 该方法包括抑制 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的活性和/或表达的步骤。在一优选的实施方案中, PDGFR α 的活性是用包含至少一种 PDGFR α -抑制治疗剂的组合物接触肿瘤来抑制。适于本发明方法的组合物和 PDGFR α -抑制化合物是进一步详细描述于以下 E 部分。在一优选的实施方案中, PDGFR α -抑制治疗剂包含 PDGFR α 的小分子抑制剂, 在一些优选的实施方案中, PDGFR α 的小分子抑制剂是甲磺酸伊马替尼 (STI-571、Gleevec®)或其类似物。在其他优选的实施方案中,

PDGFR α 的小分子抑制剂选自 BAY43-9006、XL-999 和 SU 11248 组成的组。NSCLC 肿瘤可以用治疗有效量这种 PDGFR α -抑制治疗剂接触，根据标准给药量和给药途径。

本发明在某种程度上还提供了确定化合物是否抑制属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法，此方法包括测定化合物是否抑制该 NSCLC 肿瘤中的 PDGFR α 表达和/或活性。在一优选的实施方案中，PDGFR α 活性的抑制是通过检查含有来自该 NSCLC 肿瘤的生物样品来测定。在另一个优选的实施方案中，使用至少一种 PDGFR α 活化状态-特异性药剂测定 PDGFR α 活性的抑制，而在一个优选实施方案中，活化-状态特异性试剂是磷酸化-位点特异性抗体。例如，化合物可以是激酶抑制剂，如小分子或抗体抑制剂。PDGFR α -抑制化合物是在以下 E 部分中进一步详细讨论。患者生物样品可以是在用抑制剂治疗之前或之后采集，然后使用以下 D 部分中所述的方法分析抑制剂对于 PDGFR α 磷酸化或下游蛋白磷酸化的生物效应。这样的药效学测定可以是用于测定可优选为最大耐受剂量的药物的生物活性剂量。这样的信息还可以用于通过证明药物作用的机制来提交批准的药物。

定义

如此说明书通篇所述，以下术语具有指出的含义：

“来自 NSCLC 肿瘤细胞”指的是来自 NSCLC 肿瘤或新生物物的完整细胞或细胞提取物。

关于生物样品中 PDGFR α 的“表达”或“被表达”指的是相对于其中 PDGFR α 未显著表达的对照样品而言的显著地表达。

“PDGFR α -特异性药剂”（PDGFR α -specific reagent）指的是任何可检测的化学或生物学的试剂，其可以特异性反应于、结合、检测和/或定量生物样品中的 PDGFR α ，而且相比试剂对于 PDGFR α 的反

应性，其基本上不与 PDGFR β (β)或其他 RTKs 或激酶反应。

“PDGFR α -抑制治疗剂”指的是任何含有一种或多种化学或生物学化合物的组合物，其直接或间接地抑制体内 PDGFR α 的表达和/或活性。

B. 生物样品

本发明方法实践所用的生物样品可以从存在或患 (developing) NSCLC 肿瘤的哺乳动物获得。在一个实施方案中，哺乳动物是人，而且此人可能是用于治疗 NSCLC 的 PDGFR α -抑制治疗的候选者。人类候选者可以是目前正在用或者考虑用 EGFR 抑制剂如 Tarceva™或 Iressa™治疗的病人。在另一个实施方案中，哺乳动物是大型动物如马或牛，而在其他实施方案中，哺乳动物是小型动物如狗和猫，所有这些动物已知患 NSCLC。

包含来自哺乳动物 NSCLC 肿瘤的细胞(细胞提取物)的任何生物样品适用于本发明的方法。在某一实施方案中，生物样品含有从肿瘤活组织检查获得的细胞。根据标准临床技术，可以从哺乳动物的肺中存在的原发 NSCLC 肿瘤中得到活组织检查样品，或者通过已经迁徙到其他组织的继发 NSCLC 肿瘤中得到活组织检查样品。在另一个实施方案中，生物样品含有从 NSCLC 肿瘤采集的细针抽吸物获得的细胞，而且获得这种抽吸物的技术是本领域熟知的(参见 Cristallini 等人, *Acta Cytol.* 36(3): 416-22 (1992))。

而在另一个优选的实施方案中，生物样品含有从 NSCLC 胸腔积液得到的细胞。胸腔积液(胸腔中肺外部形成的含有癌细胞的液体)已知可在很多患有早期 NSCLC 的病人中形成，这种渗出液的存在是较差的结果和短存活时间的预兆。参见 Mott 等人, *Chest* 119: 317- 318 (2001)。因此在这种情况下，有效和迅速的治疗是特别关键的。获得胸腔积液样品的标准技术已经描述而且是本领域熟知的(参见 *Sahn*

CHn Chest Med. 3(2): 443-52 (1982))。循环 NSCLC 细胞还可以是从使用肿瘤标记物、细胞角蛋白蛋白质标记物或根据所述的其他负选择方法从血清得到(参见 Ma 等人, *Anticancer Res.* 23(1 A): 49-62 (2003))。

生物样品可以含有来自 NSCLC 肿瘤细胞, 其中 PDGFR α 被表达和活化但是 EGFR 没有被表达和活化。任选, 样品可以含有来自 PDGFR α 和 EGFR α 均被表达和活化, 或者其中 EGFR α 被表达和活化而 PDGFR α 没有被表达和活化的 NSCLC 肿瘤细胞。

上述生物样品的细胞提取物可以根据标准技术制得, 其可为粗制的或部分(或全部)纯化的, 并用于本发明的方法。任选, 含有整个细胞的生物样品可以用于优选的测定方式如免疫组织化学(IHC)、流式细胞仪(FC)及免疫荧光法(IF), 如进一步在以下 D 部分描述的。这样的完整细胞测定法是有利的, 因为其使肿瘤细胞样品的处理最小化, 因此降低了改变细胞体内信号/活化状态和/或引入人工信号的风险。完整细胞测定法的优点还在于其仅仅表征肿瘤细胞中而不是肿瘤和正常细胞的混合物内的表达和信号。

在实施中, 对于公开确定化合物是否抑制表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤发展的方法, 含有来自哺乳动物异种移植物的细胞的生物样品也可以有利地使用。优选的异种移植物是小型哺乳动物如小鼠, 其携带表达 PDGFR α 的人 NSCLC 肿瘤。携带人 NSCLC 肿瘤的异种移植物是本领域熟知的(参见, KaI, *Cancer Treat Res.* 72: 155-69 (1995)), 携带人肿瘤的哺乳动物异种移植物的制备是充分描述的(参见 Winograd 等人 *in Vivo.* 1 (1): 1-13 (1987))。

在含有来自哺乳动物 NSCLC 肿瘤细胞的生物样品中的 PDGFR α 表达的评估中, 表示背景 PDGFR α 体内活化的对照样品可有利地用于比较目的。理想地, 对照样品含有来自代表不表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类的 NSCLC 肿瘤细胞。比较对照样品和试验生物样品中表达的 PDGFR α 的水平, 由此鉴定是否 PDGFR α 表达。任

选，因为 PDGFR α 在大多数 NSCLC 肿瘤(其不属于目前公开的肿瘤亚类)中不表达，类似地不表达 PDGFR α 的任何组织可以用作对照。

上述的方法对于哺乳动物 NSCLC 肿瘤将具有有价值的诊断实用性，并可用于据此做出治疗决策。例如，生物样品可以是先前没有诊断为患有 NSCLC 或者还未经受这种癌症的治疗的对象得到，方法是用于诊断性鉴定所述对象中的 NSCLC 肿瘤为属于表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的亚类。任选，生物样品可以是已经诊断为患有 NSCLC 并已经接受治疗如用于治疗这样癌症的 EGFR 抑制剂治疗(例如 TarcevaTM、IressaTM)的患者得到，而且本发明的方法是用于鉴定患者的 NSCLC 肿瘤是否属于这样的 NSCLC 亚类，其可能响应这样的治疗和/或是否选择性或另外的 PDGFR α -抑制治疗是期望的或认为正当。本发明的方法还可以用于监控患者用含有 PDGFR α -抑制治疗剂或治疗剂组合的组合物治疗之后表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的发展或抑制。

这样的诊断测定法可以随后实施，或者在早期评估或外科手术监测操作之前实施。本发明的鉴定可以有利地用作诊断来鉴定患有受 PDGFR α 操纵的肿瘤的 NSCLC 病人，该病人将是最可能响应抑制 PDGFR α 活性的靶向治疗剂如 STI-571 (Gleevec[®])或其类似物。选择这些病人的能力也将是在未来 PDGFR α -靶向治疗剂的功效益的临床评估以及在将来向 NSCLC 病人开出这样药物的处方时有用的。

C. PDGFR α -特异性药剂

本发明公开的方法中有用的 PDGFR α -活化状态-特异性药剂包括但不限于符合和适于检测和定量生物样品中的 PDGFR α 表达的 PDGFR α -特异性抗体和 AQUA 肽(重同位素标记的肽)。PDGFR α -特异性药剂是任何生物学或化学试剂，能够特异性结合、检测和/或定量生物样品中表达的 PDGFR α 的存在/水平。该术语包括，但不限于

以下讨论的优选的抗体和 AQUA 肽试剂，相当的试剂在本发明的范围之内。

抗体

适用于本发明方法实践的抗体包括 PDGFR α -特异性抗体和 PDGFR α 磷酸化位点-特异性抗体。PDGFR α -特异性抗体是分离的抗体，所述抗体不论其磷酸化状态而特异性结合 PDGFR α (α)蛋白(例如，人，参见 SEQ ID NO: 1)，但是包括蛋白质的磷酸化形式。PDGFR α 磷酸化位点-特异性抗体是分离的抗体，其仅仅在特定酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基上磷酸化时特异性结合 PDGFR α (α)蛋白，而且基本上不结合未磷酸化形式的蛋白质或者在不同于抗体特异性位点的位点磷酸化的蛋白质。

人 PDGFR α -特异性及磷酸化位点-特异性抗体还可以结合其他哺乳动物类中的高度同源和相当的表位肽序列，例如鼠或兔 PDGFR α ，反之亦然。本发明方法实践中有用的抗体包括(a)单克隆抗体、(b)特异性结合靶蛋白的纯化的多克隆抗体(例如，PDGF R α 的磷酸化形式、(c)如以上(a)-(c)中所述的结合其他非人种类(例如，小鼠、大鼠)中的相当和高度同源性表位或磷酸化位点的抗体，以及(d)以上(a)-(c)的结合由本文公开的示例性抗体结合的抗原(或着更优选表位)的片段。

如在此所用的术语“抗体”或“抗体”指的是所有类型的免疫球蛋白，包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。抗体可以是单克隆的或多克隆的，而且可以是任何种类来源的，包括(例如)小鼠、大鼠、兔、马或人，或者可以是嵌合抗体。参见，例如 M. Walker 等人，*Molec. Immunol.* 26: 403-11 (1989); Morrision 等人，*Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 81-6851 (1984); Neuberger 等人，*Nature* 312: 604 (1984))。抗体可以根据美国专利号 4,474,893(Reading)或美国专利号 4,816,567(Cabilly 等人)公开的方法制得的重组单克隆抗体。抗体还可以是根据美国专利号

4,676,980(Segel 等人)公开的方法制得的化学构造的特异性抗体。

PDGFR α -特异性抗体是商业上可购得的(参见 Cell Signaling Technology, 2005 Catalogue, #3164, and Santa Cruz Biotechnology, 2005 Catalogue, #338)。本发明方法的某些优选实施方案采用了磷酸化位点-特异性抗体, 其仅在已知是和蛋白活性有关的酪氨酸例如人 PDGFR α 蛋白质序列(SEQ ID NO: 1)的酪氨酸 720 和 754 上磷酸化时特异性结合 PDGFR α 。一些或者全部的这些磷酸化-位点特异性抗体是商业可购得的(参见 Cell Signaling Technology 2005 Catalogue, #2992, and Santa Cruz Biotechnology, 2005 Catalogue, # 12911。PDGFR α -特异性抗体的生产和使用已经公开。参见, 例如 Matsui 等人的 2003 年 11 月 9 日的美国专利号 6,660,488。

本发明 PDGFR α -特异性抗体的优选的表位位点是基本上包含人 PDGFR α 蛋白质序列 (SEQ ID NO: 1)的约 11-17 个氨基酸的肽片段。对于 PDGFR α 磷酸化位点-特异性抗体, 该表位含有特定磷酸化残基(酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸), 在其每一侧存在约 5-9 个氨基酸(例如, SEQ ID NO: 1 的残基 746-762, 在位 754 含有磷酸酪氨酸)。应当理解的是, 特异性结合 PDGFR α 内更短或更长肽表位的抗体是在本发明的范围之内。人 PDGFR α 的氨基酸序列已经公开(参见图 1 (SEQ ID NO: 1)), 其是来自其他种类的 PDGFR α 的序列。

本发明不限于使用抗体, 但是包括等同分子如蛋白结合区或核酸适体(aptamer), 且以融合蛋白的特异性方式基本上结合与本发明方法所用的 PDGFR α 抗体所结合的表位相同的表位。参见, 例如 Neuberger 等人, *Nature* 312: 604 (1984)。这样等同的非抗体试剂可适用于以下进一步描述的本发明的方法。

本发明方法实践中所用的多克隆的抗体可以根据标准技术制得, 通过用包含期望的 PDGFR α 表位的抗原免疫适合的动物(例如, 兔、羊等), 根据已知操作, 从动物采集免疫血清, 从免疫血清中分离多

克隆的抗体，纯化具有期望特异性的多克隆的抗体。抗原可以是根据熟知技术选择和构成的含有期望的表位序列的合成肽抗原。参见，例如 ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL,第 5 章, 75-76 页, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Czernik, *Methods In Enzymology*, 201: 264-283 (1991); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 21-49 (1962)。根据本文所述制得的多克隆的抗体可以是根据以下进一步描述的筛选和分离。

单克隆抗体也可以是有利地用于本发明的方法，可以是在杂交瘤细胞系中产生，这可根据 Kohler 和 Milstein 熟知的技术 *Nature* 265: 495-97 (1975); Kohler 和 Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511 (1976); 还参见 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel 等人. Eds. (1989)。如此制得的单克隆抗体是高度特异性的，提高了本发明提供的测定方法的选择性和特异性。例如，含有适当抗原(例如，包含 PDGFR α 内磷酸化位点的合成肽)的溶液可以注射进小鼠，在足够时间(用常规技术饲养)之后，小鼠被处死，获得脾细胞。脾细胞然后通过将其与骨髓瘤细胞融合而永生化，该过程通常是在聚乙二醇存在下进行，以产生杂交瘤细胞。例如，兔融合杂交瘤可以根据 1997 年 10 月 7 日出版的美国专利号 5,675,063,C(Knight)制得。杂交瘤细胞然后生长于适当选择的介质如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT)中，如下所述筛选用于具有期望的特异性的单克隆抗体的上清液。分泌的抗体可以通过常规方法如沉淀、离子交换或亲和层析法等从组织培养物上清液中回收。

单克隆的 Fab 片段还可以是在大肠杆菌中通过本领域技术人员已知的重组体技术制得。参见，例如 W. Huse, *Science* 246: 1275-81 (1989); Mullinax 等人, *Proc. Natl Acad. Sci.* 87: 8095 (1990)。如果某一同种型的单克隆抗体优选用于特定应用，特定的同种型可以通过从最初融合中选择来直接制得，或从分泌不同的同种型的单克隆抗体的

亲本杂交瘤，使用近亲选择技术以分离类别转换的变异体间接制得 (Steplewski 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 8653 (1985); Spira 等人, *J. Immunol. Methods*, 74: 307 (1984))。单克隆抗体的抗原结合位点可以通过 PCR 克隆，单链抗体作为大肠杆菌中显示噬菌体的重组体抗体或可溶抗体制得 (参见，例如 ANTIBODY ENGINEERING PROTOCOLS, 1995, Humana Press, Sudhir Paul editor.)

本发明方法中使用的抗体，无论是多克隆的或单克隆的，可以根据标准技术筛选表位和磷酸化-状态特异性。参见，例如 Czernik 等人, *Methods in Enzymology*, 201: 264-283 (1991)。例如，抗体可以通过 ELISA 的肽基因库筛选以确保对期望的抗原的特异性，并且在需要的情况下仅仅与磷酸化形式的抗原的反应性。抗体也可以是通过含有靶蛋白的细胞沉淀的 Western 印迹检测，以证实仅仅对于期望靶点的反应性并确保与 PDGFR 的其他亚型无可察觉的结合。

本发明方法中所用的 PDGFR α -特异性的以及磷酸化-特异性的抗体可以显示与非-PDGFR α 表位的一些有限的交叉反应性。这是意外的，因为大多数抗体显示了某些程度的交叉反应性，抗-肽抗体通常与具有与免疫肽的高度同源性或同一性的表位交叉反应。参见，例如上述的 Czernik。与非 PDGFR α 蛋白质的交叉反应性通过 Western 印迹以及分子量已知的标记物来表征的。可以检查交叉反应蛋白的氨基酸序列以鉴别同抗体结合的 PDGFR α 的序列高度同源或同一的位点。不期望的交叉反应性可以通过使用肽柱子上抗体纯化的负选择除去。

本发明方法实践中所用的 PDGFR α -特异性抗体对于人 PDGFR α 是理想上特异性的，但是不限于仅仅结合人类自身。本发明包括使用还结合其他哺乳动物种类(例如，小鼠、大鼠、猴)中的保守和高度同源性或同一性表位的抗体。其他种类中的高度同源性或同一性序列可以通过标准序列对照，如使用 BLAST，利用本文公开的人 PDGFR α 序列(SEQ ID NO: 1)轻易鉴定。

本发明方法采用的抗体可以进一步用特定测定方式例如 FC、IHC 和/或 ICC 表征和确认。在这种方法中抗 PDGFR α 的抗体的用途是在以下 D 部分中进一步描述的。抗体也可以是有利地结合荧光染料(例如, Alexa488, PE), 或者标记如量子点(quantum dots), 连同其他信号转导(磷酸-AKT, 磷酸-Erk 1/2)和/或细胞标记物(细胞角蛋白)抗体用于多参数分析, 如以下 D 部分进一步描述的。

在本发明方法的实践中, 在给定 NSCLC 肿瘤中 EGFR 的表达和/或活性也可以使用 EGFR-特异性抗体和/或 EGFR 磷酸化位点-特异性抗体有利地检测。EGFR-特异性的和磷酸化-位点特异性的抗体是商业上可购得的(参见 CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly MA, 2003/04 Catalogue, #'s 2231, 2232, and 2234-2237; and Santa Cruz Biotechnology, 2005 Catalogue, #03)。这样的抗体也可以是根据标准方法制得的, 如上述的。公开了人 EGFR 的氨基酸序列(参见, accession #NP-005219), 其是来自其他种类的 EGFR 的序列。在 NSCLC 肿瘤中, EGFR 表达和/或活化连同 PDGFR α 表达的检测可以提供关于是否 PDGFR α 单独引发肿瘤或者是否 EGFR 也可以活化并引发肿瘤的信息。这样的信息是在评估是否靶向单个或者两者上是临床上有用的, 受体可能是最有利于抑制 NSCLC 肿瘤的进展以及选择适合治疗或其组合。

应当理解的是, 不止一种抗体可用于上述方法的实践。例如, 一种或多种 PDGFR α -特异性抗体连同一种或多种特异于另外的激酶、受体或怀疑是或者可能在 NSCLC 肿瘤中活化的激酶底物的抗体, 可以同时用于检测包含来自这样 NSCLC 肿瘤的生物样品中所述其他信号分子的活性。

重同位素标记的肽(AQUA 肽)

公开的方法的实践中所用的 PDGFR α -活化状态-特异性药剂也可

以包含适于绝对定量生物样品中表达的 PDGFR α (优选是在公开的位点磷酸化)的重同位素标记的肽。绝对定量复杂混合物中的蛋白质(AQUA)的 AQUA 肽的制备和使用已经描述了。参见, WO/03016861, “Absolute Quantification of Proteins and Modified Forms Thereof by Multistage Mass Spectrometry,” Gygi 等人, 还有 Gerber 等人的 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 6940-5 (2003) (其教导在此以全文引入作为参考)。

AQUA 方法学采用了把已知量的至少一种重同位素标记的肽标准(其具有 LC-SRM 色谱法可检测的唯一标记)引入消化的生物样品, 以便通过与肽标准比较来测定生物样品中具有相同序列的肽的绝对量和蛋白质修饰。简要地, AQUA 方法具有两个阶段: 肽内标选择和确认及方法研发; 使用确认的肽内标完成检测和定量样品中的靶蛋白。此方法是检测和定量复杂的生物混合物如细胞溶解产物中的给定肽/蛋白质的有效技术, 例如可以用于定量作为药物治疗结果的蛋白质磷酸化的改变, 或者用于定量不同生物状态的蛋白水平的差异。

通常, 为了研发适合的内标, 靶蛋白质序列中特定的肽(或修饰的肽)可基于其氨基酸序列以及用于消化的特定蛋白酶选择。肽然后通过固相肽合成法产生, 以便一个残基被使用含有稳定同位素(^{13}C 、 ^{15}N)的相同残基代替。结果是化学上等同于其通过蛋白酶解形成的自然相对应的肽, 但是易于通过 7-Da 质量位移(mass shift 区别)。最新合成的 AQUA 内标肽然后通过 LC-MS/MS 评估。此方法提供了关于反相色谱法的肽保留、电离效率和经由碰撞引起解离的断裂的定性信息。选择用于天然和内标肽的组的有益且大量的碎片离子, 然后作为色谱保留的功能快速连续地特异性监测以形成基于肽标准的独特图谱的选择的反应监测(LC-SRM)方法。

AQUA 策略的第二阶段实现了测量复杂混合物中蛋白质或修饰蛋白质的量。全部细胞的裂解物通常是通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分

级的，与蛋白质迁移一致的凝胶的区域被切除。这种方法之后紧接着 AQUA 肽存在下的凝胶内蛋白酶解和 LC-SRM 分析(参见上述 Gerber 等人)。AQUA 肽被掺入用蛋白水解酶消化整个细胞裂解物获得的复杂的肽混合物，并接受如上述的免疫亲和纯化。由消化(例如，胰蛋白酶消化)形成的天然肽的保留时间和裂解谱是等同于先前测定的 AQUA 内标肽的保留时间和裂解谱；因此，使用 SRM 实验的 LC-MS/MS 分析导致内标和直接来自非常复杂肽混合物的分析物的高度特异且灵敏的测量。

因为加入绝对量的 AQUA 肽(例如，250 fmol)，曲线下面积的比例可以是用于确定最初细胞裂解物中蛋白质或磷酸化形式蛋白质的精确表达水平。此外，内标在形成天然肽的凝胶内消化中存在，以便来自凝胶碎片的肽提取效率、样品处理(包括真空离心)时的绝对损失以及引入 LC-MS 系统时的变异性不影响测定天然和 AQUA 肽丰度的比例。

发展 AQUA 肽标准用于先前用 IAP-LC-MS/MS 法鉴定的靶蛋白内的已知的磷酸化位点序列。可开发在所述位点之内掺入磷酸化形式的特定残基的第一种 AQUA 肽，以及掺入非磷酸化形式的残基的第二种 AQUA 肽。以这种方式，两个标准可用于检测和定量生物样品中磷酸化及非-磷酸化形式的位点。

肽内标也可以是通过检查蛋白质的初级氨基酸序列及测定蛋白酶分裂产生的肽的边界产生。任选，蛋白质事实上可以用蛋白酶消化，然后可以对产生的特定肽片段进行测序。适合的蛋白酶包括，但不限于丝氨酸蛋白酶(例如，胰蛋白酶、hepsin)、金属蛋白酶(例如，PUMP1)、糜蛋白酶、组织蛋白酶、胃蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、羧肽酶等等。

根据一种或多种标准选择靶蛋白内的肽序列来优化作为内标的肽的使用。优选地，选择肽的大小以使在其他非靶蛋白中肽序列在别

处重复的可能性降到最低。因此，所述肽是优选至少约 6 个氨基酸的肽。肽的大小也是优化使得电离频率最大化。因此，长度超过约 20 个氨基酸的肽是不优选的。优选的范围是约 7-15 个氨基酸。还选择在质谱法时不可能化学反应的肽序列，因此避免含有半胱氨酸、色氨酸或甲硫氨酸的序列。

可以选择不包含靶区的修饰区的肽序列，以便肽内标可用于测定所有形式的蛋白质的量。任选，包含修饰氨基酸的肽内标可以是期望仅仅用于检测和定量修饰形式的靶蛋白。修饰区域和未修饰区域的肽标准可以一起使用，用于测定特定样品中修饰的程度(即，以测定蛋白质总量何种部分是用修饰形式表示的)。例如，已知是在特定位点磷酸化的蛋白质的磷酸化和未磷酸化形式的肽标准可以用于定量样品中磷酸化形式的量。

肽是使用一种或多种标记氨基酸标记的(即，标记物是肽的真实部分)，或者较不优选地，根据标准方法，标记物可以在合成之后附着。优选地，标记物是质量改变的标记物，基于以下考虑进行选择：对于低背景的谱区的 MS 分析产生的位移片段质量(shift fragment mass)，质量应到是独特的；离子质量标记组分是优选在 MS 分析中表现出独特离子质量标记的标记组分的一部分；标记物的组成原子的质量之和优选是独特地不同于所有可能氨基酸的片段。因此，通过所得的质谱中的离子/质量图，标记的氨基酸和肽易于同未标记的氨基酸和肽中区分。优选地，离子质量标记组分给予不匹配 20 个天然氨基酸任一的残基质量的蛋白质片段以质量。

标记物在 MS 的碎裂条件下应当是坚固的，不发生不利的断裂。标记化学在一定范围的条件特别是变性条件下应当是有效的，标记的标记物优选保持溶解于选择的 MS 缓冲系统。标记物优选不抑制蛋白质的电离效率，而且不是化学反应的。标记物可以包含两种或多种同位素的不同种类的混合物，从而在各个标记的片段位置产生独特的

质谱图。适合的同位素如 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 或 ^{34}S ，是其中优选的标记物。可以制备掺入来不同同位素标记物的肽内标对。可以引入重同位素标记物的优选氨基酸残基包括亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸。

肽内标是根据其质量/电荷(m/z)比例表征的，优选地，还根据其在色谱柱(例如，HPLC 柱)上的保留时间表征。与同一序列的未标记的肽共洗脱的内标是选择为最佳内标。内标然后是通过任何适合方式例如通过使用例如氩气或氦气作为碰撞气体的碰撞引起的解离(CID)碎裂来分析肽。再分析片段以获得肽碎裂标记，例如通过获得片段离子谱的多级质谱法(MS^n)。优选地，肽片段在 m/z 比例方面具有显著差异，使符合各个片段的峰能很好分离的，从而获得对于靶肽是唯一的标记。如果适合的片段标记不是在第一阶段获得，需进行另外的 MS 阶段直至获得唯一的标记。

MS/MS 和 MS^3 谱中的碎片离子对于目标肽通常是高度特异性的，结合 LC 法，允许检测和定量含有很多数千或数万蛋白质的复杂蛋白质混合物如细胞裂解物中的靶肽/靶蛋白的高度选择性方法。可以测定可能含有目标的靶蛋白/肽的任何生物样品。优选使用粗制的或不完全纯化的细胞提取物。通常，样品具有至少 0.01 mg 的蛋白质，典型地为 0.1-10 mg/mL 的浓度，而且可以调节至期望的缓冲浓度和 pH。

然后把相应于检测/定量的靶蛋白的已知量的标记的肽内标，优选约 10 毫微微克分子，加入生物样品如细胞裂解物。掺入的样品然后用一种或多种蛋白酶消化适当的时间以使其消化。然后进行分离(例如，通过 HPLC、反相 HPLC、毛细管电泳、离子交换色谱等)以分离出标记的内标及其来自样品中其他肽的对应的靶肽。微毛细管 LC 是优选的方法。

各个分离的肽然后通过监测在 MS 中所选的反应检查。这包括使

用通过表征肽内标得到的现有知识, 然后需要 MS 来连续地监测目标肽和内标的 MS/MS 或 MSⁿ 谱中的特定离子。洗脱之后, 计算肽标和靶肽峰的曲线下面积(AUC)。两个面积的比提供了可以对于分析中所用的细胞数和蛋白质的分子量标准化的绝对量化, 从而提供每个细胞中蛋白质的精确拷贝数。AQUA 方法的进一步细节是在 Gygi 等人和 Gerber 等人中描述的, 见上文。

如上述的, AQUA 内部肽标准(重同位素标记的肽)可以合意地制得, 以检测任何磷酸化位点, 其用于相对于此 RTK 活性定量 PDGFR α 。例如, 可以制得 AQUA 磷酸肽, 其符合以下优选的 PDGFR α 酪氨酸磷酸化位点中的任一个: 酪氨酸 572、酪氨酸 742、酪氨酸 762、酪氨酸 768、酪氨酸 849 或酪氨酸 1018(人 PDGFR α 蛋白质序列 (SEQ ID NO: 1) 中;也参见表 1)。给定磷酸化位点(例如, 人 PDGFR α 中酪氨酸 572 位点)的肽标准可以针对磷酸化和非磷酸化形式的此位点来制备, 在 AQUA 方法中采用这样的标准以检测和定量生物样品中两种形式的所述磷酸化位点。

表 1 中鉴定的六种磷酸化位点肽序列(参见实施例 1) (SEQ ID NOs: 3-8)是特别适于发展对应的 AQUA 肽, 因为鉴定其的 IAP 法(参见上述 A 部分和实施例 1)固有地证实这样的肽实际上是通过酶消化(胰蛋白酶作用)生产, 而且实际上适于 MS/MS 中的分级/电离。例如, 包含可磷酸化的酪氨酸 742 (人 PDGFR α 序列)的肽序列 QADTTQyVPMLER (SEQ ID NO: 4; 参见表 1), 可以合意地被选择用以发展定量生物样品中磷酸化的(Y742)PDGFR α 的 AQUA 肽。这些优选肽(磷酸化和非磷酸化形式)任一标记的重同位素等同物可以易于合成并测定其唯一的 MS 和 LC-SRM 标记, 以便肽确认为 AQUA 肽并在定量实验中使用。

应当理解的是, 也可以构造含有 PDGFR α 磷酸化位点序列(其另外的残基下游区或上游区)的较大的 AQUA 肽。类似地, 含有少于这

种磷酸化位点序列(但是仍然含有目标的可磷酸化酪氨酸残基)的所有残基的较小的 AQUA 肽, 可以选择性地构成。这种较大或较短的 AQUA 肽也是在本发明的保护范围之内, 无论是定量总的 PDGFR α 或磷酸化 PDGFR α , 优选 AQUA 肽的选择和生产可以根据上述完成(参见 Gygi 等人和 Gerber 等人上述的)。

D.测定方式

在本发明方法实践中所用的免疫测定可以是同源的免疫测定或异源的免疫测定。在同源的测定法中, 通常免疫反应涉及 PDGFR α -特异性药剂(例如, PDGFR α -特异性抗体)、标记的分析物, 目标生物样品。一旦抗体结合标记的分析物, 将直接或间接地修改标记物产生的信号。免疫反应及程度的检测因此是在同源溶液中完成。可以使用的免疫化学标记物包括自由基、放射同位素、荧光染料、酶类、噬菌体、辅酶类等等。半导体纳米晶体标记物或“量子点”也可以是有利地使用, 其制备和使用已经很好描述了。通常参见, *K. Barovsky, Nanotech. Law & Bus.* 1(2): Article 14 (2004)及本文引用的专利。

在异源测定方法中, 试剂通常是生物样品、PDGFR α -特异性药剂(例如, 抗体)、产生可检测信号的适合工具。可以使用如以上部分所述的生物样品。抗体通常是固定在载体如小珠、平板或载玻片上, 接触怀疑含有抗原的液相形式的样品。载体然后从液相中分离出, 利用产生所述信号的工具检测载体相或液相的可检测信号。信号是与生物样品中分析物的存在有关。产生可检测信号的方式包括使用放射标记物、荧光标记物、酶标记物、量子点等等。例如, 如检测的抗原含有第二结合位点, 结合该位点的抗体可以结合可检测的基团并在分离步骤前加入液相反应溶液。固体载体上可检测基团的存在表明, 试验样品中存在抗原。适合免疫测定的实例是放射免疫测定法、免疫荧光法、酶-联免疫测定等等。

可用于完成本文公开方法的免疫测定方式及其变化是本领域熟知的。通常参见, E. Maggio, *Enzyme-Immunoassay*, (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.); 还参见, 例如美国专利号 4,727,022 (Skold 等人, “Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application”); 美国专利号 4,659,678 (Forrest 等人, “Immunoassay of Antigens”); 美国专利号 4,376,110 (David 等人, “Immunometric Assays Using Monoclonal Antibody”)。适于形成试剂-抗体缀合物的条件对于本领域技术人员来将是熟知的。参见同前。PDGFR α -特异性的或磷酸化位点-特异性的单克隆抗体可以用于“双位点”或“夹心”测定, 其中单个杂交瘤细胞系用作标记的单克隆抗体及结合的单克隆抗体的来源。这样的测定法是描述于美国专利号 4,376,110。可检测试剂的浓度应该是足够的, 以便 PDGFR α 的结合相对于背景是可检测的。

根据已知技术如沉淀, 可用于本发明公开方法实践的抗体可以结合适于诊断性测定的固体载体(例如, 小珠、平板、载玻片或良好成型的形成物质如乳胶或聚苯乙烯)。根据已知的技术, 抗体或其他 PDGFR α 结合试剂同样可以结合可检测的基团如放射标记物(例如, ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、酶标记物(例如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)以及荧光标记物(例如, 荧光素)。

基于细胞的测定法如流式细胞仪(FC)、免疫组织化学(IHC)或免疫荧光法(IF)在本发明的方法实践中是特别期望的, 因为这样的测定方式是临床上适合的, 允许检测体内 PDGFR α 活化, 避免为获得提取物操作从 NSCLC 肿瘤得到的细胞从而产生活性的人工改变的风险。因此, 在一些优选的实施方案中, 本发明的方法是应用在流式细胞仪(FC)、免疫组织化学(IHC)或免疫荧光法(IF)测定方式中。

在用抑制 PDGFR α 激酶活性的靶向药物治疗之前、之时和之后, 流式细胞仪(FC)可以应用于测定哺乳动物 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的活化状态。例如, 来自细针抽吸物的肿瘤细胞可以通过流式细胞术

分析 PDGFR α 表达和/或活化，以及如果需要可分析用于鉴定肺癌细胞类型的标记物等。流式细胞术可以根据标准方法完成。参见，例如 Chow 等人, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46: 72-78 (2001)。简要地，作为实施例，可以采用以下细胞计数分析的实验设计：在 37°C 下用 2% 低聚甲醛固定细胞 10 分钟，接着在 90% 甲醇中在冰上通透化 30 分钟。然后，细胞可以用第一 PDGFR α -特异性抗体染色，洗涤，用荧光标记的第二抗体标记。然后根据所用仪器的特定实验设计，在流式细胞器(例如，Beckman Coulter FC500)分析细胞。这样的分析将鉴定肿瘤中表达的 PDGFR α 蛋白的水平。肿瘤用 PDGFR α -抑制治疗剂处理之后相似的分析将揭示表达 PDGFR α 肿瘤对于靶向抑制剂或 PDGFR α 激酶的应答性。

免疫组织化学(IHC)染色也可以是应用于测定在用抑制 PDGFR α 活性的靶向药物处理之前、之时和之后哺乳动物 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的表达和/或活化状态。IHC 也可以根据熟知的技术完成。参见，例如，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, 第 10 章, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。简要地，作为实施例，石蜡包埋的组织(例如，来自活组织检查的肿瘤组织)被制备用于免疫组织化学染色，先用二甲苯接着用乙醇把组织切片去石蜡化；先在水中然后在 PBS 中水化；加热柠檬酸钠缓冲液中的载玻片暴露抗原；在过氧化氢中孵育切片；在封闭溶液中封闭；在第一抗-PDGFR α 抗体和第二抗体中孵育载玻片；最后使用生产商说明书的 ABC 抗生物素蛋白/生物素法检测。

免疫荧光法(IF)测定也是用于测定在用抑制 PDGFR α 激酶活性的靶向药物处理之前、之时和之后哺乳动物 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的表达和/或活化状态。IF 可以根据熟知的技术完成。参见，例如 J. M. polak 和 S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 第二版；ROYAL MICROSCOPY

SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37,

BioScientific/Springer-Verlag。简要地，作为实施例，病人样品可以在低聚甲醛接着甲醇中固定，用封闭溶液如马血清封闭，用抗 PDGFR α 的第一抗体孵育，接着用荧光染料如 Alexa 488 标记的第二抗体孵育，用外荧光(epifluorescent)显微镜分析。

用于上述测定的抗体可以有利地结合荧光染料(例如，Alexa488, PE)，或者其他标记物如量子点，连同其他信号传导(EGFR、磷酸-AKT、磷酸-Erk1/2)和/或细胞标记物(细胞角蛋白)抗体一起用于多参数分析。

相似地，用以检测/定量含有来自 NSCLC 肿瘤的细胞的生物样品中表达的 PDGFR α 的 AQUA 肽，可以被制备并用于标准 AQUA 测定，如以上 C 部分详细所述的。因此，在本发明方法的一些优选的实施方案中，PDGFR α -特异性药剂含有对应 PDGFR α 肽序列(例如，磷酸化位点)的重同位素标记的磷酸肽(AQUA 肽)，如以上 C 部分所述的。

用于本发明实践的 PDGFR α -特异性药剂还可以是可直接杂交至并检测生物样品中的 PDGFR α 表达转录物的 mRNA、寡核苷酸或 DNA 探针。简要地，并作为实施例，福尔马林-固定的、石蜡-包裹的病人样品可以用荧光素标记的 RNA 探针探测，接着用甲酰胺、SSC 和 PBS 洗涤，最后用荧光显微镜分析。

E. PDGFR α -抑制治疗剂

根据本发明，已经显示了，表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的不同亚类的发展可以在体内通过抑制所述肿瘤中 PDGFR α 的活性来抑制。这种新鉴定的 PDGFR α 活性及不同 NSCLC 肿瘤的亚类可以通过用 PDGFR α -抑制治疗剂如小分子 PDGFR α 抑制剂如甲磺酸伊马替尼 (STI-571 ;Gleevec®)接触肿瘤鉴定。如本文实施例 5 进一步所述的，表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的生长抑制可以通过使用示

例性的 PDGFR α -抑制治疗剂 Gleevec®抑制此 RTK 实现。因此，本发明在某种程度上提供了一种通过抑制肿瘤中 PDGFR α 的表达和/或活性来抑制表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法。

PDGFR-抑制治疗剂可以是含有至少一种生物学或化学上的化合物的任何组合物，所述化合物直接或间接地抑制体内 PDGFR α 的表达和/或活性，包括以下描述的示例性类别的化合物。这样的化合物包括直接作用于 PDGFR α 本身、或者作用于改变 PDGFR α 活性的蛋白或分子，或者通过抑制 PDGFR α 的表达间接作用的治疗剂。这样的组合物还包括仅含有单个 PDGFR α -抑制化合物的组合物，以及含有多个治疗剂(包括抗其他 RTKs 的那些治疗剂)的组合物，其还可以包括非特异性的治疗剂如化疗剂或一般的转录抑制剂。

小分子抑制剂.

在一些优选的实施方案中，用于本发明方法实践的 PDGFR α -抑制治疗剂是靶向的小分子抑制剂如 Gleevec® (STI-571)及其类似物。如目前所示的(参见实施例 5)，向携带人 NSCLC 异种移植物的小鼠给药 Gleevec®选择性地抑制了具有表达 PDGFR α 的肿瘤的这些小鼠中疾病的发展。Gleevec®是商业上可购得的，其特异性结合并阻断 PDGFR α (以及 Bcr-Abl 激酶)的 ATP-结合位点，借此防止这种酶的磷酸化和活化，并且其性质是熟知的。Gleevec®的 PDGFR α -特异性的抑制性质已经描述了。参见，例如，Martinelli 等人，*Haematologica* 89(2): 236-7 (2004)。PDGFR 的其他优选的小分子抑制剂包括 BAY 43-93006、XL-999 和 SU 11248。这些化合物是在临床研究中，其 PDGFR α -特异性的抑制性质已经描述了。参见 Wilhelm 等人，*Cancer Res.* 64(19): 7099-109 (2004)和 Mendel 等人，*Clin Cancer Res.* 9(1): 327-37 (2003)。

小分子靶向抑制剂是一类典型地抑制其靶酶活性的分子，通过特

异性地且常常不可逆地结合酶的催化位点，和/或结合 ATP-结合裂缝或酶内的其他结合位点，防止酶采用其活性所需的构象。小分子抑制剂可以是使用 X-射线结晶学或计算机建模的 PDGFR α 三维结构合理地设计，或者可以通过抑制 PDGFR α 的化合物库的高通量筛选找到。这样的方法是本领域熟知的，已经描述了。例如，通过检查所述化合物抑制 PDGFR α 活性而不是激酶组中其他激酶活性的能力，和/或通过检查含有 NSCLC 肿瘤细胞的生物样品中 PDGFR α 活性的抑制，可以证实 PDGFR α 抑制的特异性，如上所述的。这样的筛选方法在以下进一步描述。

具有 PDGFR α -抑制剂特性的其他小分子如喹啉和喹噁啉(quinoxaline)化合物及其 1,3-二嗪化合物，已经描述了，参见，例如美国专利号 6,821,962、6,696,434、6,169,088。鉴定 PDGFR α 的拮抗剂的方法已经描述了。参见，例如 Escobedo 等人，2003 年 5 月 20 日的美国专利号 6,566,075。

抗体抑制剂

用于本发明方法的 PDGFR α -抑制治疗剂还可以是靶向抗体，特异性结合 PDGFR α 活性所需的关键的催化或抑制位点或区域，通过阻止底物或次级分子接近 PDGFR α 和/或防止酶采用其活性所需的构象来抑制激酶。人源化的靶-特异性抗体的生产、筛选和治疗应用已经较好的描述了。参见 Merluzzi 等人，*Adv CHn Path.* 4(2): 77-85 (2000)。用于人源化的靶-特异性的抑制抗体的高通量产生和筛选的商业上技术和系统如 Morphosys, Inc.'s Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL®)，是可得到的。

不同抗-受体激酶靶向抗体的生产及其抑制靶向受体活性的应用已经描述了。参见，例如美国专利公开号 20040202655，“Antibodies to IGF-I Receptor for the Treatment of Cancers,”2004 年 10 月 14 日，

Morton 等人；美国专利公开号 20040086503, “Human anti-Epidermal Growth Factor Recepto Single-Chain Antibodies,”2004 年 4 月 15 日, Raisch 等人；美国专利公开号 20040033543, “Treatment of Renal Carcinoma Using Antibodies Against the EGFr,”2004 年 2 月 19 日, Schwab 等人。生产和使用受体酪氨酸激酶活性-抑制抗体的标准方法是本领域已知的。参见, 例如欧洲专利号 EP1423428, “Antibodies that Block Receptor Tyrosine Kinase Activation, Methods of Screening for and Uses Thereof,”2004 年 6 月 2 日, Borges 等人。

噬菌体显示方法也可以用于生成 PDGFR α -特异性抗体抑制剂, 噬菌体库构造的实验设计及重组体抗体的选择是在熟知的参考文献 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Colligan 等人(Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), Chapter 17, Section 17.1 中提供。还参见美国专利号 6,319,690, 2001 年 11 月 20 日, Little 等人；美国专利号 6,300,064, 2001 年 10 月 9 日, Knappik 等人；美国专利号 5,840,479, 1998 年 11 月 24 日, Little 等人；美国专利公开号 20030219839, 2003 年 11 月 27 日, Bowdish 等人。

在噬菌体表面显示的抗体片段库可以产生(参见, 例如美国专利 6,300,064, 2001 年 10 月 9 日, Knappik 等人)并被筛选用于结合可溶二聚形式的受体蛋白酪氨酸激酶。结合用于筛选的可溶二聚形式的 RTK 的抗体片段是鉴定为阻断细胞中的靶 RTK 的构成型活化的候选分子。参见欧洲专利号 EP1423428, Borges 等人, 上述的。

在上述抗体库的筛选中鉴定的 PDGFR α -结合靶向抗体, 然后可以进一步根据其在体外激酶测定和体内细胞系和/或肿瘤中阻断 PDGFR α 活性的能力筛选。例如, 如上所述的, 通过检查所述抗体治疗剂抑制 PDGFR α 活性而不是激酶组中其他激酶活性的能力, 和/或通过检查含有 NSCLC 肿瘤细胞的生物样品中 PDGFR α 活性的抑制,

可以证实 PDGFR α 抑制。根据 PDGFR α 抑制筛选这种化合物的方法是以上进一步描述的。

间接抑制剂

用于公开方法实践的 PDGFR α -抑制化合物还可以是通过抑制除了 PDGFR α 本身之外的蛋白质或分子活性来间接抑制 PDGFR α 活性的化合物。这种抑制治疗剂也可以是调节关键调节激酶的活性的靶向抑制剂，所述关键调节激酶磷酸化或去磷酸化(且因此活化或去活化)PDGFR α 本身。由于具有其他受体酪氨酸激酶，PDGFR α 通过衔接蛋白和下游激酶的网络调节下游区信号发送。因此，细胞生长及由于 PDGFR α 活性的存活的抑制，可以通过靶向这些相互作用或下游蛋白来抑制。可以这种方式使用目前研发中的药物包括 AKT 抑制剂(RX-0201)和 mTOR 抑制剂(雷帕霉素及其类似物如 CC1-779、雷帕鸣和 RAD001)。

PDGFR α 活性也可以是使用抑制 PDGFR α 采用其活性构象必需的活化分子如血小板衍生的生长因子(PDGF)A 或 B 的结合的化合物间接地抑制。例如，抗-PDGF 抗体的制备和使用已经描述了。参见美国专利公开号 20030219839, “Anti-PDGF Antibodies and Methods for Producing Engineered Antibodies,” Bowdish 等人。抑制 PDGF 结合 PDGFR α 直接地下调节了 PDGFR α 活性。

PDGFR α 活性的间接抑制剂可以使用 X-射线结晶学或计算机建模的 PDGFR α 三维结构合理地设计，或者可以通过抑制关键上游区调节酶和/或必需结合分子的化合物库的高通量筛选找到，其导致抑制 PDGFR α 。这样的方法是本领域熟知的，已经描述了。例如，如上所述的，通过检查所述化合物抑制 PDGFR α 活性而不是激酶组中其他激酶活性的能力，和/或通过检查含有 NSCLC 肿瘤细胞的生物样品中 PDGFR α 活性的抑制，可以证实通过这种治疗剂的 PDGFR α 抑制。

鉴定抑制 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 活性的化合物的方法，是以下进一步描述的。

反义和/或转录抑制剂

PDGFR α -抑制治疗剂也可以包含通过阻断基因编码 PDGFR α 的转录抑制 PDGFR α 活性的反义和/或转录抑制化合物。通过治疗癌症的反义治疗抑制不同受体激酶包括 VEGFR、EGFR 和 IGFR, 及 FGFR, 已经描述了。参见, 例如美国专利号 6,734,017、6,710,174、6,617,162、6,340,674、5,783,683、5,610,288。

根据已知技术, 反义寡核苷酸可以设计、构造、使用作为抗靶基因的治疗剂。参见, 例如 Cohen, J., *Trends in Pharmacol. Sci.* 10(11): 435-437 (1989); Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172: 289-295 (1988); Weintraub, H., *Sci. AM.* 40-46 页 (1990); Van Der Krol 等人, *BioTechniques* 6(10): 958-976 (1988); Skorski 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 4504-4508。使用 EGFR 的反义 RNA 抑制剂抑制体内人癌瘤的生长最近已经描述了。参见, 美国专利公开号 20040047847, “Inhibition of Human Squamous Cell Carcinoma Growth In vivo by Epidermal Growth Factor Receptor Antisense RNA Transcribed from a Pol III Promoter”, 2004 年 3 月 11 日, He 等人。类似地, 含有至少一种抗哺乳动物 PDGFR α 基因的反义寡核苷酸的 PDGFR α -抑制治疗剂可以根据上述的技术制得。根据以下进一步描述的, 含有 PDGFR α -抑制反义化合物的药用组合物可以制备和给药。

小干扰 RNA

通过 RNA 干扰过程抑制 PDGFR α 的翻译及活性的小干扰 RNA 分子(siRNA)组合物也可以是期望用于本发明的方法。RNA 干扰, 以

及引入含有与编码靶蛋白的 mRNA 的序列互补性的外源性小双链 RNA 分子选择性沉默靶蛋白表达, 已经较好的描述了。参见例如美国专利公开号 20040038921, “Composition and Method for Inhibiting Expression of a Target Gene,” 2004 年 2 月 26 日, Kreutzer 等人; 美国专利公开号 20020086356, “RNA Sequence-Specific Mediators of RNA Interference”, 2003 年 6 月 12 日, Tuschl 等人; 美国专利公开号 20040229266, “RNA Interference Mediating Small RNA Molecules,” 2004 年 11 月 18 日, Tuschl 等人。

双链 RNA 分子(dsRNA)已经显示为阻断高度保守的调节机制中的基因表达, 这称为 RNA 干扰(RNAi)。简要地, RNase III Dicer 把 dsRNA 加工成大约 22 个核苷酸的小型干扰 RNAs(siRNA), 其用作通过 RNA-诱导的沉默复合 RISC 诱导靶-特异性 mRNA 裂解的指导序列(参见, Hammond 等人, Nature (2000) 404: 293-296)。RNAi 涉及催化类型反应, 借此通过较长 dsRNA 的连续分裂生成新 siRNAs。由此, 不像反义的, RNAi 以非化学计量的方式降解靶 RNA。当给药于细胞或生物时, 外源性 dsRNA 已经显示指导内源性信使 RNA(mRNA)通过 RNAi 的序列-特异性降解。

广泛的多种靶-特异性 siRNA 产物, 包括用于其在哺乳动物细胞中表达和使用的带菌体和系统, 是商业上购得的。参见, 例如 Promega, Inc. (www.promega.com); Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com)。关于用于 RNAi 的 dsRNA 的设计、构造、使用的详细技术手册是可得到的。参见例如 Dharmacon's “RNAi Technical Reference & Application Guide”; Promega's “RNAi: A Guide to Gene Silencing”。PDGFR α -抑制 siRNA 产品也是商业上可得到的, 而且可以适用于本发明的方法。参见, 例如 Dharmacon, Inc., Lafayette, CO (Cat Nos. M-003162-03, MU-003162-03, D-003162-07 thru -10 (siGENOME™ SMARTselection

and SMARTpool® siRNAs)。

近来已经确定的是，长度少于 49 个核苷酸，优选 19-25 个核苷酸的小 dsRNA，如果含有至少一个基本上等同于部分的靶 mRNA 序列的序列，而且 dsRNA 最佳在末端具有至少一个 1-4 个核苷酸的悬突，是在哺乳动物 RNAi 的调节中最有效的。参见美国专利公开号 20040038921, Kreutzer 等人，上述的；美国专利公开号 20040229266, Tuschl 等人，上述的。这样 dsRNA 的构造及其在停止体内靶蛋白的表达的药学制剂中的应用，是在这样的公开物中详细描述。

如果哺乳动物中靶向基因的序列是已知的，例如 21-23 nt RNAs，可以制得并检验其介导哺乳动物细胞如人或其他灵长类细胞中 RNAi 的能力。如果期望，可在合适的动物模型中检测显示调节 RNAi 的那些 21-23 nt RNA 分子，进一步评估其体内效力。已知的靶位点例如基于对其他核酸分子例如核酶或反义的研究测定是有效的靶位点的靶位点，或者已知是与疾病或症状如包含突变或缺失的那些位点有关的那些靶点，可以用于设计靶向这些位点的 siRNA 分子。

任选，有效 dsRNA 的序列可以合理地设计/预测，筛选用于靶位点的目标靶 mRNA，例如通过使用计算机折叠算法。使用 custom Perl script 或商业上的序列分析程序如 Oligo、MacVector 或 GCG Wisconsin Package，靶序列可以硅内(in silico)解析成特定长度例如 23 个核苷酸片段的全部片段或子序列的列表。

多种参数可以用于确定哪个位点是靶 RNA 序列内最适合的靶位点。这些参数包括但不限于第二或第三 RNA 结构，靶序列的核苷酸碱性组合物、靶序列的不同区域之间的同源性程度或 RNA 转录物中靶序列的相对位置。基于这些测定，可以选择 RNA 转录物内的靶位点的数量以根据效力筛选 siRNA 分子，例如通过使用体外 RNA 分裂测定、细胞培养物或动物模型。参见，例如美国专利公开号

20030170891, 2003年9月11日, McSwiggen J. 鉴定和选择 RNAi 靶位点的算法近来已经描述了。参见, 美国专利公开号 20040236517, “Selection of Target Sites for Antisense Attack of RNA”, 2004年11月25日, Drlica 等人。

通常使用的基因转移技术包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖、电穿孔和微注射及病毒方法(Graham 等人(1973) *Virology* 52: 456; McCutchan 等人, (1968), *J. Natl. Cancer Inst.* 41: 351; Chu 等人 (1987), *Nucl. Acids Res.* 15: 1311; Fraley 等人(1980), *J. Biol. Chem.* 255: 10431; Capecchi (1980), *Cell* 22: 479)。DNA 还可以使用阳离子脂质体引入细胞(Feigner 等人 (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 7413)。商业上得到的阳离子脂质体制剂包括 Tfx 50 (Promega) 或 Lipofectamin 200 (Life Technologies)。任选, 病毒载体可以用于传送 dsRNA 至细胞并调节 RNAi。参见, 美国专利公开号 20040023390, “siRNA-mediated Gene Silencing with Viral Vectors”, 2004年2月4日, Davidson 等人。

哺乳动物细胞中 RNAi 的转染及载体/表达系统是商业上可得到的, 已经很好描述了。参见, 例如 Dharmacon, Inc., DharmaFECT™ system; Promega, Inc., siSTRIKE™ U6 Hairpin system; 还参见 Gou 等人 (2003) *FEBS* 548, 113-118; Sui, G. 等人, A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 5515-5520; Yu 等人 (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6047- 6052; Paul, C. 等人 (2002) *Nature Biotechnology* 19, 505-508; McManus 等人 (2002) *RNA* 8, 842-850。

使用制备的 dsRNA 分子的哺乳动物中 siRNA 干扰可以受向哺乳动物给药含有 dsRNA 的药剂影响。药用组合物是以足以抑制靶基因表达的剂量给药。DsRNA 通常可以少于 5 mg dsRNA/千克体重/天的剂量给药, 并且足以抑制或完全禁止靶基因的表达。一般地 dsRNA

的适合剂量将是 0.01-2.5 毫克/千克体重患者/天，优选是 0.1-200 微克/千克体重/天，更优选是 0.1-100 微克/千克体重/天，甚至更优选是 1.0-50 微克/千克体重/天，最优选是 1.0-25 微克/千克体重/天。含有 dsRNA 的药用组合物是每天给药一次，或者以分剂量多次给药，例如，使用本领域熟知的持续释放制剂。这种药用组合物的制备和给药可以根据如以下所述的标准技术实施。

这样的 dsRNA 然后可以用于抑制 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 表达和活性，如上述的通过制备含有治疗有效量的这种 RNA 的药剂，通过直接注射进肿瘤向患有 PDGFR α -活化 NSCLC 肿瘤的人类病人给药制剂。使用 siRNA 抑制剂类似地抑制其他受体酪氨酸激酶如 VEGFR 和 EGFR 已经描述了。参见美国专利公开号 20040209832，2004 年 10 月 21 日，McSwiggen 等人；美国专利公开号 20030170891，2003 年 11 月 11 日，McSwiggen；美国专利公开号 20040175703，September 9, 2004 年 9 月 9 日，Kreutzer 等人。

治疗组合物；给药

用于本发明方法实践的 PDGFR α -抑制治疗组合物可以通过本领域已知的任何方式给药于哺乳动物，包括但不限于口服或腹膜途径，包括静脉、肌肉内、腹膜内、皮下、经皮、气道(气雾剂)、直肠、阴道和局部(包括含服和舌下)给药。

对于口服给药而言，PDGFR α -抑制治疗剂一般是以片剂或胶囊剂的形式提供，为散剂或颗粒，或为水性溶液或混悬液。口服使用的片剂可以包括混合药学上可接受的赋形剂如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、芳香剂、着色剂和防腐剂的活性成分。适合的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙、乳糖，同时玉米淀粉和藻朊酸是合适的崩解剂。粘合剂可包括淀粉和明胶，同时润滑

剂如果存在，通常是硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。如果期望，片剂可以使用材料如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯包衣以延迟在胃肠道中的吸收。

用于口服使用的胶囊包括其中活性成分是混合固体稀释剂的硬明胶胶囊，其中活性成分是混合水或油如花生油、液体石蜡或橄榄油的软明胶胶囊。对于肌内、腹膜内、皮下和静脉使用而言，本发明的药用组合物将通常以缓冲至适合的 pH 和等渗性的无菌的水性溶液或混悬液形式提供。适合的水性载体包括林格溶液及等张的氯化钠。

载体可以是由水性缓冲液唯一地组成(“唯一地”指的是没有可能影响或调节 PDGFR α -抑制治疗剂吸收的辅助剂或包封物质存在)。这样的物质包括，例如上述的胶束结构如脂质体或壳体。水性混悬液可以包括助悬剂如纤维素衍生物类、藻酸钠、聚乙烯吡咯酮及西黄蓍胶，湿润剂如卵磷脂。适于水性混悬液的防腐剂包括对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸正丙酯。

PDGFR α -抑制治疗剂组合物还可以包含使治疗剂(例如， dsRNA 化合物)免于从身体快速清除的包封的制剂，如控释制剂，包括埋植剂和微囊传递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、多正酯类及聚乳酸。制备这种制剂的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。材料也可以从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 商业上购得。脂质体混悬液(包含靶向用病毒抗原的单克隆抗体感染的细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以是根据本领域技术人员已知的方法制得，例如，如美国专利号 4,522,811、PCT 公布 WO 91/06309 及欧洲专利申请 EP-A-43075 中所述的。包封的制剂可以包含病毒包衣蛋白。病毒包衣蛋白可以衍生于病毒或与病毒有关，如多瘤病毒，或者其可以是部分或全部人造的。例如，包衣蛋白可以是多瘤病毒的

病毒蛋白 1 和/或病毒蛋白 2，或者是其衍生物。

PDGFR α -抑制组合物也可以包含给药与患者的传递载体，包括脂质体、载体和稀释剂及其盐，和/或可以存在于药学上可接受的制剂中。例如，传递核酸分子的方法是描述于 Akhtar 等人, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS, ed. Akhtar, 1995, Maurer 等人, 1999, *Mol. Membr. Biol.*, 16, 129-140; Hofland 和 Huang, 1999, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137, 165-192; 及 Lee 等人, 2000, *ACS Symp. Ser.*, 752, 184-192。Beigelman 等人的美国专利号 6,395,713 及 Sullivan 等人的 PCT WO 94/02595 进一步描述了传递核酸分子的一般方法。这些实验设计可以用于事实上任何核酸分子的传递。

PDGFR α -抑制治疗剂可以给药于哺乳动物肿瘤，通过多种本领域技术人员已知的方法，包括但不限于包封于脂质体中，通过离子电渗，或者通过掺入其他载体如水凝胶、环糊精、生物可降解的毫微囊，及生物粘附的微球，或者通过蛋白质性质的带菌体(O'Hare 和 Normand, 国际 PCT 公布号 WO 00/53722)。任选，治疗剂/载体组合是通过直接注射或通过使用输注泵局部传送。组合物的直接注射，不论皮下、肌肉或真皮内，可以使用标准针头和注射器方法进行，或者通过无针技术如在 Conry 等人, 1999, *CHn. Cancer Res.*, 5, 2330-2337 和 Barry 等人的国际 PCT 公布号 WO 99/31262 中所述的那些。

PDGFR α -抑制剂治疗剂的药学上可接受的制剂包括上述化合物的盐，例如酸加成盐例如盐酸盐、氢溴酸盐、醋酸盐和苯磺酸盐。药用组合物或制剂涉及适于给药于细胞或患者包括人的形式的组合物或制剂，例如全身给药。某种程度上，适合形式取决于用途或给药途径，例如口服、透皮，或者通过注射。这样的形式不应当阻止组合物或制剂到达靶细胞。例如，注射进血流的药理学组合物应当是可溶的。

其他因素是本领域已知的,包括考虑如毒性和防止组合物或制剂发挥其功效的形式。

产生全身吸收(即,全身吸收或血流中药物的蓄积,接着通过全身分布)的给药途径是期望的并包括但不限于静脉、皮下、腹膜内、吸入、口服、肺内及肌肉内。这些给药途径各自使 PDGFR α -抑制治疗剂暴露于易接近的疾病组织或肿瘤。药物进入循环的速率已知是分子量或大小的作用。包含本发明的化合物的脂质体或其他药物载体的使用可以潜在地集中药物,例如在某些组织类型中,如网状内皮系统(RES)的组织。促进药物和细胞如淋巴细胞和巨噬细胞的表面缔合的脂质体制剂也是有用的。通过利用特异性的巨噬细胞和淋巴细胞免疫识别异常细胞如癌细胞,提供了提高传送药物至靶细胞的手段。

“药学上可接受的制剂”是指允许本发明的核酸分子有效分布于身体的更适于其期望活性的区域的组合物或制剂。适用于具有本发明的核酸分子的制剂的药物的非限制性实例包括: P-糖蛋白抑制剂(如 Pluronic P85), 其可以提高药物进入 CNS (Jolliet-Riant 和 Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26); 在脑内植入之后持续释放的生物可降解的聚合物如聚(DL-丙交酯-共乙交酯)微球(Emerich 等人, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58) (Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.); 及负载的毫微粒如由聚丁基氰基丙烯酸酯制得的那些, 其可以传递药物穿过血脑屏障并可以改变神经元摄取机制 (*Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, 23, 941-949, 1999)。用于本发明方法的 PDGFR α -抑制化合物的传送策略 的其他非限制性实例包括在 Boado 等人, 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308- 1315; Tyler 等人, 1999, *FEBS Lett*, 421, 280-284; Pardridge 等人, 1995, *PNAS USA.*, 92, 5592-5596; Boado, 1995, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 15, 73-107; Aldrian-Herrada 等人, 1998, *Nucleic Acids Res.*, 26, 4910-4916 和 Tyler

等人, 1999, *PNAS USA.*, 96, 7053-7058 中所述的物质。

包含含有聚(乙二醇)脂质(PEG-修饰的或长循环脂质体或隐秘脂质体)的表面修饰的脂质体治疗组合物也可以适用于本发明的方法。这些制剂提供了增加药物在靶组织蓄积的方法。此类药物载体耐调理作用和由于单核吞噬细胞系统(MPS 或 RES)的消除, 因此能够使包封药物长血液循环时间和提高的组织暴露成为可能(Lasic 等人 *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata 等人, *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011)。这样的脂质体已经显示了在肿瘤中选择性地蓄积, 由新形成血管的靶组织中的外渗物和捕获之物推测 (Lasic 等人, *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku 等人, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90)。长循环脂质体提高 DNA 和 RNA 的药物代谢动力学和药效学, 特别是同已知是在 MPS 组织中蓄积的常规阳离子脂质体相比(Liu 等人, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 24864-24870; Choi 等人, 国际 PCT 公布号 WO 96/10391; Ansell 等人的国际 PCT 公布号 WO 96/10390; Holland 等人的国际 PCT 公布号 WO 96/10392)。基于其避免在代谢侵袭性 MPS 组织如肝和脾中蓄积的能力, 长循环脂质体也同样可以使药物免于受核酸酶降解成与阳离子脂质体相比更大的程度。

治疗组合物可包含在药学上可接受载体或稀释剂中的药学上有效量的期望化合物。治疗剂使用的可接受的载体或稀释剂是药物领域熟知的, 例如描述于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)。例如, 防腐剂、稳定剂、染料和芳香剂可以提供。这些包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟苯甲酸的酯类。此外, 可以使用抗氧剂和助悬剂。

药学上有效剂量是预防疾病状态、抑制疾病状态的发生、或治疗(减轻一种症状至某种程度, 优选是所有症状)疾病状态所需的剂量。药学上有效剂量取决于疾病类型、所用的组合物、给药途径、治疗的

哺乳动物类型、考虑的特定哺乳动物的身体特征、同时的治疗及医药领域技术人员认识的其他因素。一般地, 给药 0.1 mg/kg-100 mg/kg 体重/天的量的活性成分, 根据负电荷聚合物的效力。

约 0.1 mg-约 140 mg/千克体重/天的定制的剂量水平是用于治疗以上指出的症状(约 0.5 mg-约 7 g/患者/天)。可以和载体物质组合以制成单个剂型的活性成分量是根据治疗的宿主及给药的特定模式而变化的。单位剂型通常含有约 1 mg-约 500 mg 的活性成分。应当理解, 用于任何患者的专门剂量水平取决于包括所用特定化合物的活性、年龄、体重、全身健康、性别、饮食、给药时间、给药途径、排泄率、药物组合和经历治疗的特定疾病的严重性的多种因素的变化。

对于给药于非人动物而言, 组合物还可以加入动物饲料或饮用水中。组合物可以便于配制成动物饲料和饮用水, 以便动物吸收连同其饮食一起的治疗适合量的组合物。组合物也可以便于存在为加入饲料或饮用水的预先混合物。

用于本发明实践的 PDGFR α -抑制治疗剂可以包含上述的单一化合物, 或者多种化合物的混合物, 不论是否处于同类的抑制(即, 抗体抑制剂), 或处于不同类(即, 抗体抑制剂和小分子抑制剂)。化合物的这样组合可以增加抑制哺乳动物中表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤的发展中的整个疗效。例如, 治疗组合物可以是小分子抑制剂, 如单独的 STI-571 (Gleevec®), 或者组合靶向 PDGFR α 活性的其他 Gleevec® 类似物和/或 EGFR 的小分子抑制剂如 Tarceva™或 Iressa™。除了一种或多种靶向抑制剂之外, 治疗组合物也可以包含一种或多种非-特异性化疗药。这样的组合最近已经显示了在很多癌症中, 提供了协同杀肿瘤效应。这种组合的抑制体内 PDGFR α 活性和 NSCLC 肿瘤生长的效力, 可以根据以下所述的测定。

PDGFR α -抑制化合物的鉴定

本发明在某种程度上，还提供了一种确定化合物是否抑制属于 PDGFR α 活化的 NSCLC 肿瘤亚类的哺乳动物 NSCLC 肿瘤的发展的方法，通过测定化合物是否抑制 NSCLC 肿瘤中 PDGFR α 的活性。在一优选的实施方案中，PDGFR α 活性的抑制是通过检查含有来自 NSCLC 肿瘤的细胞的生物样品测定的。在另一个优选的实施方案中，PDGFR α 活性的抑制是使用至少一种 PDGFR α 活化状态-特异性药剂测定的，而在一优选的实施方案中，活化状态特异性试剂是磷酸化-位点特异性抗体。

试验化合物可以是上述的任何类型的治疗剂或组合物。测定体外和体内化合物效力的方法是本领域很好建立和已知的。例如，可使用 PDGFR α 活化的细胞或细胞提取物检测组合物在体外抑制 PDGFR α 的能力。小组的化合物可以是用于化合物对 PDGFR α 的特异性(与其他靶点如 EGFR 或 PDGFR beta 对照)。

随后可检测发现是 PDGFR α 活性体外有效抑制剂的化合物在体内抑制 NSCLC 肿瘤生长的能力，其中使用例如携带表达 PDGFR α 的人 NSCLC 肿瘤的哺乳动物异种移植。在此操作中，把已知是受 PDGFR α 引发的细胞系皮下固定于小鼠中。然后，细胞生长视觉上可以监测的肿瘤块。小鼠然后用药物治疗。可以从外形上观察药物治疗对于肿瘤大小的作用。然后处死小鼠，摘除肿瘤用于 IHC 和 Western 印迹分析。以这种方式，药物的作用可以在最接近患者的生物学装置中观察到。药物改变肿瘤细胞或周围间质细胞中信号发送的能力，可以通过分析磷酸化-特异性抗体确定。药物诱导细胞死亡或细胞增殖的抑制的效力还可以通过细胞凋亡特异性标记物如裂解的细胞凋亡蛋白酶和裂解的 PARP 的分析观察到。

这种化合物的毒性和疗效可以通过细胞培养物或实验动物中的

标准药理学操作测定，例如测定 LD50(总体 50%致死的剂量)和 ED50(总体 50%治疗有效剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数，其可以表达为 LD50/ED50 比例。显示了高治疗指数的化合物是优选的。

以下的实施例仅仅是提供用于进一步说明发明，除了所附的权利要求，不是想要限制其范围。本发明包括在此教导方法的改良和变形，其对于本领域技术人员是显而易见的。

实施例 1

通过整体磷酸肽分布鉴定 NSCLC 细胞系中 PDGFR α -表达

四种人 NSCLC 细胞系 A549、H441、H1373 和 H1703 的整体磷酸化分布，是使用最近描述的有力的用于来自复杂混合物的修饰的肽的分离和质谱表征的技术来检验(“IAP”技术，参见 Rush 等人上述的)。IAP 技术使用磷酸酪氨酸-特异性抗体进行(CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC., Beverly, MA, 2003/04 Cat. #9411)以分离和随后表征来自 NSCLC 细胞系提取物的含磷酸酪氨酸的肽。

含胰蛋白酶的磷酸酪氨酸的肽从上述各个细胞系的提取物中纯化和分析，如下所述。细胞是在添加 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素的 DMEM 培养基或 RPMI 1640 培养基中培养。细胞通过低速离心分离采集。在培养基完全抽吸之后，细胞悬浮于 1 mL 溶胞缓冲液/1.25 x 10⁸ 个细胞(20 mM HEPES pH 8.0, 9 M 脲、1 mM 钒酸钠，添加或没有添加 2.5 mM 焦磷酸钠、1 mM β -磷酸甘油酯)并用超声处理。

超声处理的细胞的裂解物是通过 20,000 x g 下的离心分离清洁，蛋白质使用 DTT 在 4.1 mM 的最终浓度下还原，使 8.3 mM 的碘乙酰胺用烷基化。为了用胰蛋白酶消化，蛋白质提取物是在 20 mM HEPES pH 8.0 中稀释至 2 M 的最终浓度，脲和可溶的 TLCK-胰蛋白酶(Worthington)以 10-20 μ g/mL 加入。室温下消化 1-2 天。

三氟乙酸(TFA)加入蛋白质消化液至 1%的最终浓度,离心分离除去沉淀,将消化液上到用 0.1%TFA 平衡的 Sep-Pak C₁₈ 柱子(Waters)。每 2×10^8 个细胞使用 0.7-1.0 ml 的柱体积。柱子用 15 体积的 0.1%TFA 洗,接着用 4 体积的含 5%乙腈(MeCN)的 0.1 % TFA 洗。肽级分 I 使用通过用 2 体积的分别含有 8、12 和 15%MeCN 的 0.1 % TFA 洗脱柱子并合并洗脱液得到获得。级分 II 和 III 分别是合并用含 18、22、25% MeCN 的 0.1 % TFA 洗脱柱子之后的洗脱液,用含 30、35、40% MeCN 的 0.1 % TFA 洗脱柱子之后的洗脱液。所有肽级分冻干。

来自等于 2×10^8 个细胞的各个级分的肽溶解于 1 ml 的 IAP 缓冲液(20 mM Tris/HCl 或 50 mM MOPS pH 7.2, 10 mM 磷酸钠、50 mM NaCl),离心分离除去不溶物质(主要在肽级分 III 中)。分别对各个肽级分进行 IAP。磷酸酪氨酸单克隆抗体 P-Tyr-100 (Cell Signaling Technology, Inc., catalog number 9411)分别以 4 mg/ml 小珠结合在蛋白质 G(Roche)。固定的抗体(15 μ l, 60 μ g)作为 IAP 缓冲液中的 1:1 浆液加入 1 ml 的各个肽级分,混合物在 4 $^{\circ}$ C 下温和摇动下孵育整夜。固定的抗体小珠用 1 ml 的 IAP 缓冲液洗三次,用 1 ml 的水洗两次,所有均在 4 $^{\circ}$ C 下完成。通过在室温下用 75 μ l 的 0.1%TFA 孵育 10 分钟肽从小珠上洗脱。

任选,某一单个肽级分是从用 2 体积的各自含 10%、15%、20%、25%、30%、35%和 40%乙腈的 0.1% TFA 洗脱 Sep-Pak C₁₈ 柱子并合并所有洗脱液得到。对于此肽级分的 IAP 是根据如下完成:冻干之后,肽溶解于 1.4 ml 的 IAP 缓冲液(MOPS pH 7.2, 10 mM 磷酸钠、50 mM NaCl),不溶的物质是通过离心分离除去。固定抗体(40 μ l, 160 μ g)作为 IAP 缓冲液中的 1:1 浆液加入,混合物在 4 $^{\circ}$ C 下温和振摇下孵育整夜。固定的抗体小珠用 1 ml 的 IAP 缓冲液洗三次,用 1 ml

的水洗两次，所有均在 4°C 下完成。通过在室温下用 55 μl 的 0.15% TFA 孵育 10 分钟肽从小珠上洗脱(洗脱液 1)，接着用 45 μl 的 0.15% TFA 洗小珠(洗脱液 2)。合并两个洗脱液。

LC-MS/MS 质谱法的分析

40 μl 或更多的 IAP 洗脱液用 0.2 μl StageTips 或 ZipTips 纯化。肽用 1 μl 的 40% MeCN、0.1% TFA(级分 I 和 II)或 1 μl 的 60% MeCN、0.1% TFA(级分 III)从微型柱上洗脱进入 7.6 μl 的 0.4% 乙酸/0.005% 七氟丁酸。对于单个级分分析而言，1 μl 的 60% MeCN、0.1% TFA 是用于从微型柱上洗脱。使用具有惰性样品注射阀(Dionex)的 Famos 自动采样器将此样品装在填充 Magic C18 AQ 反相树脂(Michrom Bioresources)的 10 cm x 75 μm PicoFrit capillary 柱(New Objective)上。柱子然后用在 200 nL/分钟下流动的 45-分钟线性梯度的乙腈展开(Ultimate, Dionex)，串联质谱是以数据独立的方式用 LCQ Deca XP 加上离子收集器质谱仪收集。

数据分析&赋值

MS/MS 谱是使用提供作为 BioWorks 3.0 (ThermoFinnigan)一部分的 Sequest Browser package (v. 27, rev. 12)中的 TurboSequest 评估。个别的 MS/MS 谱是从原始数据文件中使用 Sequest Browser program CreateDta 提取，采用以下设置：底部 MW 为 700；顶部 MW 为 4,500；最小离子数为 20；最小 TIC 为 4×10^5 ；不是特定的前体电荷状态。在样品注射至洗脱梯度末之前，从原始数据文件的开始处中提取波谱。IonQuest 和 VuDta 程序不是用于进一步选择适于分离分析(sequest analysis)的 MS/MS 谱。MS/MS 谱使用以下 TurboSequest 参数评估：肽质量耐量为 2.5、碎片离子耐量为 0.0、每次修饰的差异氨基酸的最大数为 4、质量型根源(mass type parent)为平均的、质量型片段(mass

type fragment)为平均的、内部分裂位点的最大数为 10、由于 b 和 y 离子的水和氨水中性丧失是在相关分析中考虑。蛋白水解酶是指定的，但除了从弹性蛋白酶消化液收集波谱之外。

对 NCBI 人蛋白数据库(于 2003 年 4 月 29 日发布并含有 37,490 个蛋白质序列或于 2004 年 2 月 23 日发布并含有 27,175 个蛋白质序列)进行检索。半胱氨酸羧基氨基甲基化(carboxamidomethylation)指定为静电修饰，磷酸化允许在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上进行不同修饰或是单独在酪氨酸残基上进行不同修饰。确定的是，限制对酪氨酸残基的磷酸化对于指定的磷酸化位点的数量完全不具影响。

在蛋白组学研究中，期望的是，单独基于某一实验结果中单个肽的观察确认蛋白鉴定，以便表明蛋白质实际上是存在于样品中。这导致了仍然是未普遍接受的确认肽赋值的统计方法的发展，以及在此实施例中遵照的蛋白质和肽鉴定结果公开的指导方针(see Carr 等人, *Mol. Cell Proteomics* 3: 531-533 (2004))。然而，因为免疫亲和策略从未磷酸化肽中分离出磷酸化的肽，只观察到一个来自蛋白质的磷酸肽是常见结果，因为很多磷酸化的蛋白质仅仅具有一个磷酸化的酪氨酸位点。

就此原因，使用另外的标准来确认磷酸肽赋值是适当的。分配可能是正确的，条件是这些另外的标准之一被满足：(i)相同序列是指定为具有不同电荷状态的共洗脱离子，这是因为 MS/MS 谱随着电荷状态显著地改变；(ii)位点是在不止一个肽序列背景中发现，这是由于序列重叠形成不完全的蛋白酶解或使用非胰蛋白酶的蛋白酶；(iii) 位点是在不止一个肽序列背景中发现，这是由于同源性但非同一蛋白质同种型；(iv)位点是在不止一个肽序列背景中发现，这是由于物种之间同源但非同一的蛋白质；和(v)对应指定序列的合成磷酸肽的 MS/MS 分析确认的位点，因为离子收集器质谱仪产生高度重现性的

MS/MS 谱。最后的标准是常规地用于证实特定目标的新位点分配。

Sequest 制得的所有波谱和所有序列赋值被输入相关数据库。根据保守的两步过程，接受或拒绝指定的序列。在第一步中，得分高的序列亚类的赋值是通过过滤+1 的电荷状态的至少 1.5 的 Xcorr 值选择的，对于+2 为 2.2，且对于+3 为 3.3，允许最大 RSp 值为 10。在此亚类中的赋值是被拒绝的，条件是以下标准任一被满足：(i) 波谱含有至少一个主峰(至少 10%与波谱中最强离子一样强)，其不可能作为 a、b 或 y 离子绘制到指定序列，为由 b 或 y 离子的水或氨水的中性丧失而产生的离子，或者为增加(multiply)质子化的离子；(ii)波谱不含有等同于至少六种不间断的残基的一系列的 b 或 y 离子；或(iii)在进行的所有研究中，序列未被观察到至少五次(除了由于不完全蛋白酶解或使用非胰蛋白酶的蛋白酶的重叠序列)。在第二步中，具有阈值下得分的赋值是接受的，条件是得分低的波谱显示了同在另一个研究中收集的等分高波谱高度的相似性，其中另一个研究模拟了真实参考库-检索策略。支持被赋值的序列(而不是在此显示的)的最终列表的所有波谱是由至少三个科学家检查来建立其可靠性。

上述 IAP 分析鉴定了六种磷酸-酪氨酸位点存在于 H1703 细胞系中的 PDGFR α ，但是不存在检查的其他三个 NSCLC 细胞系中(参见下表 1)。与之相反，EGFR 中的磷酸-酪氨酸位点是在所有四种细胞系中鉴定的。此结果是令人惊奇的，因为在人 NSCLC 亚类中 PDGFR α 表达和/或磷酸化之间的联系是先前没有建立的。

表 1

激酶	磷酸化位点序列	磷酸化酪氨酸	SEQ ID NO:
PDGFR α	VIESISPDGHEyIYVDPMQLPYDSR	Y572	SEQ ID NO: 3
PDGFR α	QADTTQyVPMLER	Y742	SEQ ID NO: 4

PDGFR α	SLyDRPASYK	Y762	SEQ ID NO: 5
PDGFR α	SlyDRPASyK	Y768	SEQ ID NO: 6
PDGFR α	DIMHDSNyVSK	Y849	SEQ ID NO: 7
PDGFR α	LSADSGyIIPLPDIDPVPEEEDLGKR	Y1018	SEQ ID NO: 8

实施例 2

NSCLC 肿瘤细胞系和异种移植物中 PDGFR α 表达的 Western 印迹分析和 IHC

H 1703 NSCLC 肿瘤细胞系-但非其他 NSCLC 细胞系-表达 PDGFR α 的观察结果是通过细胞提取物的 Western 印迹分析证实的, 使用对 PDGFR α 和其他受体酪氨酸激酶(RTKs)及下游激酶特异的抗体。受体酪氨酸激酶的抗体特异性常常是难于获得的, 因为很多可能的变量, 包括抗体中的接近的同源性以及受体经历的次级修饰。因此, 通过 Western 印迹分析测定 PDGFR α 表达的第一步是鉴定对此蛋白特异性的抗体。

图 4 显示了使用两个抗体探测 PDGFR α 和使用一个抗体探测 PDGFR β 的三个细胞系分析的结果。U87 细胞系已知是表达 PDGFR β , H358 细胞系不表达 PDGFR, H118 细胞系强烈地表达两种亚型。异种移植物样品包括两种细胞系和周围的间质细胞。因此, 这些样品预期包括两种亚型。结果证明 CST(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)PDGFR α 和 PDGFR β 抗体(Cat. Nos 分别是 3164 和 3169)正确地检测适当的蛋白并不检测任何其他蛋白, 如所示 Western 印迹中附加谱带的缺失所示。与之相反, 来自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) (Cat. No. SC-338)的 PDGFR α 抗体检测多个蛋白质。用此抗体检测的一些蛋白质如在正确分子量的带一样强烈(参见图 4)。同时 Santa Cruz Biotechnology 提供了用于 PDGFR α 的多种抗体, SC-338

是用于 IHC 的优选产品，且其是在文献中最常参考的产品。

先前的报道(Zhang 等人, (2003)上述的)采用 PDGFR α 抗体(来自 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)来尝试分析 A549 细胞系中 PDGFR α 的表达。此 Western 印迹现在使用来自 Santa Cruz Biotechnology 的 SC-338 抗体以及用于 PDGFR α 的 CST 抗体和用于 PDGFR β 的 CST 抗体(结果是图 5(a)所示的)重复的。NIH3T3 细胞系被包括作为正性对照，因为已知此细胞系表达 PDGFR 两种亚型。结果表明，Santa Cruz Biotechnology 抗体检测 A549 细胞中的多种蛋白，其中没有一个符合 PDGFR 的正确分子量。抗体检测 NIH3T3 细胞中具有正确分子量的蛋白。CST PDGFR α (#3164) 抗体检测 NIH3T3 细胞系而不是 A549 细胞中具有正确分子量的蛋白。同样的，CST PDGFR β (#3169)抗体检测 NIH3T3 细胞系中而不是 A549 细胞系中的 PDGFR β 。这些结果清楚地证明 Santa Cruz 抗体不是特异性用于 A549 细胞系中的 PDGFR α ，使用对于此蛋白不是特异性的抗体的 Western 表明 A549 细胞系不表达可检测水平的 PDGFR α 。本结果带来怀疑 Zhang 等人取得的结论，假设在该研究中使用的抗体是缺乏特异性的，作者检测到非 PDGFR α 表达的某些东西是可能的。

NSCLC 细胞系的最初的质谱筛选表明，H1703 细胞系表达 PDGFR α (参见实施例 1)。已经显示为特异性的 CST PDGFR 抗体用于图 5b 中此细胞系的蛋白印迹分析。A549 细胞系也包含在分析以及两个 Santa Cruz 生物技术 PDGFR α 抗体(SC-338 和 SC-431)之内。结果支持质谱结果，表明 H 1703 细胞系表达 PDGFR α ，而 A549 细胞系不表达。使用 Santa Cruz 生物技术的抗体的结果是类似的，尽管两种抗体在 A549 细胞系中显示了多种交叉反应谱带。

作为 PDGFR α 表达的最终测定，细胞是使用 PDGF $\alpha\alpha$ 生长因子刺激的。此同型二聚体形式的生长因子特异性激活 PDGFR α 而不激

活 PDGFR β 。因此，用此配体处理之后，表达 PDGFR α 的细胞将显示受体的磷酸化以及下游区信号发送的活化，同时缺乏受体的细胞将不显示响应。AKT 磷酸化用作下游区信号的标记物。

图 6 中的结果显示了，在 H 1703 细胞系中，PDGF $\alpha\alpha$ 处理导致 PDGFR α 和 AKT 的磷酸化。PDGF $\alpha\alpha$ 处理的 A549 细胞不产生 AKT 活化，没有检测到 PDGFR α 或磷酸-PDGFR α 。这些结果，连同以上提出的结果，清楚地证明 H1703 细胞系表达 PDGFR α ，而 A549 细胞系不表达。

最终，通过 Western 印迹分析观察到的抗体特异性，对于 IHC 中抗体的使用可能具有显著的含意。为了试验 IHC 中 PDGFR α 抗体的用途，A549 异种移植物用福尔马林固定并石蜡包封，用抗体探测。图 7 给出了 IHC 结果。如 Western 印迹结果期望的，Santa Cruz PDGFR α 抗体 SC-338 非特异性染色 A549 细胞，同时 CST #3164 抗体仅仅检测周围间质细胞中的 PDGFR α 。正常小鼠间质细胞的染色是适当的，因为这些细胞已知表达受体。

实施例 3 人 NSCLC 肿瘤样品中 PDGFR α 表达的免疫化学分析

其中表达 PDGFR α 的人 NSCLC 肿瘤不同亚类的存在是通过含有来自 304 个人 NSCLC 患者的肿瘤样品的多组织微数列的 IHC 分析进一步证实。组织是从多个来源包括商业上的以及公开的组织库获得。肿瘤的分类以及 IHC 染色的得分是通过受训的病理学家完成的。IHC 是使用 CST PDGFR α -特异性抗体 (#3164)进行，所述抗体通过 Western 印迹以及肽吸收(数据未显示)显示是特异性。IHC 筛选的结果总结在下表 2 中。

表 2 PDGFR α 是在人 NSCLC 肿瘤小亚类中的表达

病例	IHC 得分	病理诊断	年 龄	性别
HL001	2+	腺癌	40	女
HL002	2+	腺癌	62	女
HL003	1-2+	腺癌	52	男
HL004	1+	腺癌	51	女
HL005	1+	腺癌	60	女
HL006	2+	腺癌	50	男
HL007	1-2+	腺癌	56	女
HL008	1-2+	细支气管肺泡癌	58	男
HL009	3+	细支气管肺泡癌	57	女
HL010	2-3+	细支气管肺泡癌	52	女
HL011	1-2+	细支气管肺泡癌	54	男
HL012	1+	细支气管肺泡癌	52	女
HL013	1+	细支气管肺泡癌	48	女
HL014	1+	鳞状细胞癌	67	男
HL015	1+	Mucoepidermoid 癌	26	女
HL016	1-2+	腺样癌	54	女
HL017	3+	肉瘤样癌	59	男

如表 2 中所示的，在筛选的 304 NSCLC 肿瘤组织样品中，仅有 17 个(6%)显示了阳性 PDGFR α 染色。PDGFR α 表达是在细支气管肺泡癌(6 个病例)和腺癌(7 个病理) (13/17, 76%)中更经常看见，在肉瘤样癌(1 个病例) (1/17, 6%)中较少看见。与男性(6/17, 35%)相比，表达 PDGFR α 的 NSCLC 肿瘤在女性(11/17, 65%)中更经常发生。这些结果是很不同于上述 Zhang 等人 (2003)报道的 IHC 结果，并反映了相对

于非特异性 Santa Cruz 生物技术抗体, CST PDGFR α 抗体的特异性。Zhang 等人报道了 29 个 NSCLC 样品中 27 个 PDGFR α 表达。在 Zhang 研究中报道的极度高水平的染色是最可能是由于 IHC 分析中所用抗体的交叉反应性。值得注意的是, 在本次公开之前, 在 Zhang 等人的研究之后没有 NSCLC 中 PDGFR α 表达的其他报道。

实施例 4

Gleevec® 抑制表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 细胞系的生长

为了证实 PDGFR α 是操纵细胞生长并存活于其中表达 RTK 的 NSCLC 肿瘤的亚类中, 检查 PDGFR α -抑制剂 Gleevec®抑制 H 1703 细胞生长的能力。在 H 1703、A549、H 1373 和 K562 细胞系上使用一定浓度范围的 Gleevec®进行标准 MTT 细胞增殖测定(参见 Mosmann, J. Immunol Methods. 65(1-2): 55-63 (1983))。H1373 细胞系预测是对 Gleevec®不敏感的, 因为其认为是通过 erbB2 和 erbB3 引发(参见 Sithanandam, Carcinogenesis 24(10): 1581-92 (2003))。K562 细胞系已知是由 BCR/ABL 易位引发的, 其是通过 Gleevec®抑制的。测定的结果是在图 8(a)中给出。如预测的, H1373 细胞系对于 Gleevec®是不敏感的而 K562 细胞系在的 0.1 μ M 浓度下是敏感的。H 1703 细胞系在类似于利用 JK562 细胞系观察到的情况的浓度下对于 Gleevec®也是敏感的。与之相反, A549 细胞系在高达 10 μ M 的浓度时是不受 Gleevec®影响的。

为了证实 Gleevec®对于 H 1703 细胞系的作用, 在接触于一定范围浓度的 Gleevec®之后, 在细胞上进行 Western 印迹分析。图 8(b)提出了此分析的结果。如所示的, 增加 Gleevec®浓度导致分裂的 PARP 的增加, 表明 Gleevec® 治疗是导致细胞凋亡。PARP 分裂已知

细胞凋亡涉及的一种机制(参见 Lazebnik 等人, *Nature* 371 : 346-347 (1994))。在 Gleevec®处理 1、2 或 3 天之后, 用细胞的流式细胞仪分析 Caspase 3 裂解来分析细胞凋亡。如图 8(c)所示, Caspase 3 裂解是早在第 1 天处理时观察到的, 随着暴露时间增加而增加。与 PARP 裂解类似, Caspase 3 裂解是细胞凋亡熟知的标记物(参见 Femandes-Alnemri 等人, *J. Biol. Chem.* 269: 30761-30764 (1994))。这些结果证明, Gleevec® 治疗 H1703 细胞导致了生长抑制和细胞凋亡。

实施例 5

Gleevec® 抑制表达 PDGFR α 哺乳动物 NSCLC 细胞系中信号发送

如果 Gleevec®改变了 PDGFR α 引发 H1703 细胞增殖及存活的能力, 那么其必然干扰存在受体下游的细胞信号。为了试验这种假设, 在 Gleevec®处理以及 Iressa™处理和用 EGF 刺激之后, 对细胞进行 Western 印迹分析。Iressa™是靶向的 EGFR 抑制剂。测定 EGFR 受体、ERK 和 AKT 的磷酸化, 同时全部 PDGFR α 和 ERK1/2 被包括作为加载对照。图 9(a)呈现了这种分析的结果。在未处理的对照细胞中, AKT 和 ERK 均是磷酸化的, 而 EGFR 受体是非磷酸化的。如期望的是, EGF 处理诱导 EGFR 的磷酸化, 以及 ERK 和 AKT 磷酸化的增加。使用 Iressa™治疗降低了 EGFR 和 ERK 的磷酸化, 但是没有降低 AKT 的磷酸化。重要地, 细胞仅使用 Gleevec®处理导致了 AKT 磷酸化的降低。AKT 认为是细胞存活的主要驱动子(参见 Franke, *Cell* 88: 435-437 (1997))。

因此, 这些结果证明了, 当这些细胞表达可以被 Iressa™抑制的 EGFR 时, AKT 构成型活化仅仅是通过 PDGFR α 抑制的。图 9(b)呈现了对于 H 1703 细胞 Gleevec®的剂量响应分析。结果表明在低至

0.01 μM 的剂量时 Gleevec®治疗抑制 PDGFR α 磷酸化,而在 0.1 μM 的剂量时大大地抑制 AKT 磷酸化。这些结果是符合 Gleevec®通过抑制 PDGFR α 和 AKT 信号来抑制 H 1703 细胞生长和存活的假设。

实施例 6

Gleevec®抑制表达 PDGFR α 的哺乳动物 NSCLC 肿瘤异种移植物的生长

为了进一步证实 Gleevec®抑制表达 RTK 的 NSCLC 肿瘤亚类中细胞生长和存活的能力,在体内检查人肿瘤异种移植植物。在此模型中,人细胞系是注射进入免疫缺乏的小鼠中形成类似人肿瘤的异种移植植物肿瘤,其引起在人肿瘤中发现的血管化和其他特征。小鼠然后以和人患者相同方式给药。在药物治疗过程中,可以从视觉上监控肿瘤大小,肿瘤可以通过标准 IHC 操作摘除,固定和分析,或者通过 Western 印迹裂解和分析。

图 10(a)呈现了异种移植植物实验的结果,证明 Gleevec®治疗导致肿瘤体积显著地减少。在 5 只对照小鼠中,肿瘤平均直径大约是 190mm,而在 3 只治疗小鼠中平均肿瘤直径仅仅大约是 20mm。在治疗小鼠中肿瘤尺寸的显著减少强烈地表明,体内 Gleevec®治疗对受 PDGFR α 引发的肿瘤具有疗效。

为了进一步分析肿瘤尺寸这种减少背后的机制,对来自 4 只治疗小鼠的肿瘤裂解物进行 Western 印迹,同 1 只对照小鼠相比。图 10(b)中所示结果显示了,在这些异种移植植物中,Gleevec®抑制 PDGFR α 磷酸化(全部的 AKT 包含在 Western 中,作为加载对照)。这些结果符合先前揭示的 Gleevec®是通过抑制 PDGFR α 减少了肿瘤尺寸的结果。异种移植植物肿瘤还通过 IHC 分析(参见图 11),其中将对照肿瘤与 Gleevec®治疗的肿瘤比较。IHC 分析的结果再证明了 Gleevec®治疗

产生了 PDGFR α 和 AKT 磷酸化的降低。IHC 结果揭示了, 例如来自人类患者的哺乳动物肿瘤可以通过与测定 PDGFR α 抑制剂的生物学活性相似方式来进行 IHC 分析。

<110>细胞信号技术有限公司

Rikova, Klarisa
Polakiewicz, Robert
Guo, Ailan
Crosby, Katherine
Zeng, Qingfu
Lee, Kimberly

<120>表达 PDGFR α 的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的鉴定

<130> CST-219

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1089

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Thr Ser His Pro Ala Phe Leu Val Leu Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Ile Leu Cys Gln Leu Ser Leu Pro Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Asn Glu Asn Glu Lys Val Val Gln Leu Asn Ser Ser Phe Ser Leu Arg
35 40 45

Cys Phe Gly Glu Ser Gln Val Ser Trp Gln Tyr Pro Met Ser Glu Glu
50 55 60

Glu Ser Ser Asp Val Glu Ile Arg Asn Glu Glu Asn Asn Ser Gly Leu
65 70 75 80

Phe Val Thr Val Leu Glu Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala His Thr Gly
85 90 95

Leu Tyr Thr Cys Tyr Tyr Asn His Thr Gln Thr Glu Glu Asn Glu Leu
100 105 110

Glu Gly Arg His Ile Tyr Ile Tyr Val Pro Asp Pro Asp Val Ala Phe
 115 120 125

Val Pro Leu Gly Met Thr Asp Tyr Leu Val Ile Val Glu Asp Asp Asp
 130 135 140

Ser Ala Ile Ile Pro Cys Arg Thr Thr Asp Pro Glu Thr Pro Val Thr
 145 150 155 160

Leu His Asn Ser Glu Gly Val Val Pro Ala Ser Tyr Asp Ser Arg Gln
 165 170 175

Gly Phe Asn Gly Thr Phe Thr Val Gly Pro Tyr Ile Cys Glu Ala Thr
 180 185 190

Val Lys Gly Lys Lys Phe Gln Thr Ile Pro Phe Asn Val Tyr Ala Leu
 195 200 205

Lys Ala Thr Ser Glu Leu Asp Leu Glu Met Glu Ala Leu Lys Thr Val
 210 215 220

Tyr Lys Ser Gly Glu Thr Ile Val Val Thr Cys Ala Val Phe Asn Asn
 225 230 235 240

Glu Val Val Asp Leu Gln Trp Thr Tyr Pro Gly Glu Val Lys Gly Lys
 245 250 255

Gly Ile Thr Met Leu Glu Glu Ile Lys Val Pro Ser Ile Lys Leu Val
 260 265 270

Tyr Thr Leu Thr Val Pro Glu Ala Thr Val Lys Asp Ser Gly Asp Tyr
 275 280 285

Glu Cys Ala Ala Arg Gln Ala Thr Arg Glu Val Lys Glu Met Lys Lys
 290 295 300

Val Thr Ile Ser Val His Glu Lys Gly Phe Ile Glu Ile Lys Pro Thr
 305 310 315 320

Phe Ser Gln Leu Glu Ala Val Asn Leu His Glu Val Lys His Phe Val

325 330 335
 Val Glu Val Arg Ala Tyr Pro Pro Pro Arg Ile Ser Trp Leu Lys Asn
 340 345 350

 Asn Leu Thr Leu Ile Glu Asn Leu Thr Glu Ile Thr Thr Asp Val Glu
 355 360 365

 Lys Ile Gln Glu Ile Arg Tyr Arg Ser Lys Leu Lys Leu Ile Arg Ala
 370 375 380

 Lys Glu Glu Asp Ser Gly His Tyr Thr Ile Val Ala Gln Asn Glu Asp
 385 390 395 400

 Ala Val Lys Ser Tyr Thr Phe Glu Leu Leu Thr Gln Val Pro Ser Ser
 405 410 415

 Ile Leu Asp Leu Val Asp Asp His His Gly Ser Thr Gly Gly Gln Thr
 420 425 430

 Val Arg Cys Thr Ala Glu Gly Thr Pro Leu Pro Asp Ile Glu Trp Met
 435 440 445

 Ile Cys Lys Asp Ile Lys Lys Cys Asn Asn Glu Thr Ser Trp Thr Ile
 450 455 460

 Leu Ala Asn Asn Val Ser Asn Ile Ile Thr Glu Ile His Ser Arg Asp
 465 470 475 480

 Arg Ser Thr Val Glu Gly Arg Val Thr Phe Ala Lys Val Glu Glu Thr
 485 490 495

 Ile Ala Val Arg Cys Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gly Ala Glu Asn Arg
 500 505 510

 Glu Leu Lys Leu Val Ala Pro Thr Leu Arg Ser Glu Leu Thr Val Ala
 515 520 525

 Ala Ala Val Leu Val Leu Leu Val Ile Val Ile Ile Ser Leu Ile Val
 530 535 540

Leu Val Val Ile Trp Lys Gln Lys Pro Arg Tyr Glu Ile Arg Trp Arg
545 550 555 560

Val Ile Glu Ser Ile Ser Pro Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp
 565 570 575

Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Arg Trp Glu Phe Pro Arg Asp Gly
 580 585 590

Leu Val Leu Gly Arg Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val Val
 595 600 605

Glu Gly Thr Ala Tyr Gly Leu Ser Arg Ser Gln Pro Val Met Lys Val
 610 615 620

Ala Val Lys Met Leu Lys Pro Thr Ala Arg Ser Ser Glu Lys Gln Ala
625 630 635 640

Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Thr His Leu Gly Pro His Leu Asn
 645 650 655

Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Ser Gly Pro Ile Tyr Ile
 660 665 670

Ile Thr Glu Tyr Cys Phe Tyr Gly Asp Leu Val Asn Tyr Leu His Lys
 675 680 685

Asn Arg Asp Ser Phe Leu Ser His His Pro Glu Lys Pro Lys Lys Glu
 690 695 700

Leu Asp Ile Phe Gly Leu Asn Pro Ala Asp Glu Ser Thr Arg Ser Tyr
705 710 715 720

Val Ile Leu Ser Phe Glu Asn Asn Gly Asp Tyr Met Asp Met Lys Gln
 725 730 735

Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val Pro Met Leu Glu Arg Lys Glu Val Ser
 740 745 750

Lys Tyr Ser Asp Ile Gln Arg Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr
755 760 765

Lys Lys Lys Ser Met Leu Asp Ser Glu Val Lys Asn Leu Leu Ser Asp
770 775 780

Asp Asn Ser Glu Gly Leu Thr Leu Leu Asp Leu Leu Ser Phe Thr Tyr
785 790 795 800

Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys Val His
805 810 815

Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ile Val
820 825 830

Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Met His Asp Ser Asn
835 840 845

Tyr Val Ser Lys Gly Ser Thr Phe Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro
850 855 860

Glu Ser Ile Phe Asp Asn Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Asp Val Trp Ser
865 870 875 880

Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Thr Pro Tyr
885 890 895

Pro Gly Met Met Val Asp Ser Thr Phe Tyr Asn Lys Ile Lys Ser Gly
900 905 910

Tyr Arg Met Ala Lys Pro Asp His Ala Thr Ser Glu Val Tyr Glu Ile
915 920 925

Met Val Lys Cys Trp Asn Ser Glu Pro Glu Lys Arg Pro Ser Phe Tyr
930 935 940

His Leu Ser Glu Ile Val Glu Asn Leu Leu Pro Gly Gln Tyr Lys Lys
945 950 955 960

Ser Tyr Glu Lys Ile His Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp His Pro Ala
 965 970 975

Val Ala Arg Met Arg Val Asp Ser Asp Asn Ala Tyr Ile Gly Val Thr
 980 985 990

Tyr Lys Asn Glu Glu Asp Lys Leu Lys Asp Trp Glu Gly Gly Leu Asp
 995 1000 1005

Glu Gln Arg Leu Ser Ala Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro
 1010 1015 1020

Asp Ile Asp Pro Val Pro Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg Asn
 1025 1030 1035

Arg His Ser Ser Gln Thr Ser Glu Glu Ser Ala Ile Glu Thr Gly
 1040 1045 1050

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Ile Lys Arg Glu Asp Glu Thr Ile Glu
 1055 1060 1065

Asp Ile Asp Met Met Asp Asp Ile Gly Ile Asp Ser Ser Asp Leu
 1070 1075 1080

Val Glu Asp Ser Phe Leu
 1085

<210> 2

<211> 419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttctccccgc cccccagttg ttgtcgaagt ctggggggtg ggactggacc cctgattgc

gtaagagcaa aaagcgaagg cgcaatctgg aactggggag attcggagcg cagggagttt

agagaaactt ttatttgaa gagaccaagg ttgagggggg gcttatfoc tgacagctat

ttacttagag caaatgatta gtttagaag gatggactat aacattgaat caattacaaa

acgcggttt tgagccatt actgttgag ctacaggag agaaacagga ggagactgca

agagatcatt tgggaaggcc gtgggcacgc tcttactcc atgtgtggga cattcattgc

ggaataacat cggaggagaa gttccaga gctatggga cttccatcc ggcgttcctg
gtcttagct gtctctcac agggctgagc ctaatcctc gccagcttc attacctct
atcctccaa atgaaatga aaagggtg cagctgaatt catccttcc tctgagatgc
ttggggaga gtgaagtgag ctggcagtac cccatgtctg aagaagagag ctccgatgtg
gaaatcagaa atgaagaaaa caacagcggc cttttgtga cggcttggga agtgagcagt
gcctggcgg cccacacagg gttgtacct tgcattaca accacactca gacagaagag
aatgagctg aaggcaggca cattacatc tatgtccag acccagatgt agcctttgta
cotctaggaa tgacggatta ttagtcacg gtggaggatg atgattctgc cattatacct
tgtgcacaa ctgatccga gactcctgta acctacaca acagtgaggg ggtggtacct
gcctctacg acagcagaca gggctttaat gggacctca ctgtagggcc ctatatctgt
gaggccaccg tcaagggaaa gaagtccag accatccat ttaatgitta tgccttaaaa
gcaacatcag agctggatct agaaatggaa gctcttaaaa ccgtgtataa gtcaggggaa
acgattgtg tcacctgtc tgttttaac aatgaggtg ttgacctca atggacttac
ccctggagaag tgaaggcaa aggcatcaca atgctggaag aaatcaaagt cccatccatc
aaattggtg acactttgac ggtccccgag gccacggtga aagacagtgg agattacgaa
tgtgtgccc gccaggctac cagggaggtc aaagaaatga agaaagtcac tattctgtc
catgagaaag gttcattga aatcaaaccc acctcagcc agttggaagc tgcacactg
catgaagtca aacatttgt ttagaggtg cgggcctacc cacctcccag gatctctgg
ctgaaaaaca atctgactct gattgaaat ctactgaga tcaccactga tgtggaaaag
attcaggaaa taaggatcg aagcaaatta aagctgatcc gtgctaagga agaagacagt
ggccaltata ctattgtagc tcaaatgaa gatgctgtga agagctatac tttgaactg
ttaatcaag ttccttcatc cattctggac ttgtcgtatg atcaccatgg ctcaactggg
ggacagacgg tgaggtgcac agctgaaggc acgcccttc ctgatattga gtggatgata
tgcaagata ttaagaaatg taataatgaa acttctgga ctattttgc caacaatgc
tcaaacatca tcacggagat ccactcccga gacaggagta ccgtggaggg ccgtgtgact
ttgccaaag tggaggagac catgcctgt cgtgcctgg ctaagaatct ccttgagact

gagaaccgag agctgaagct ggtggctccc accctgcggt ctgaactcac ggtggctgct
gcagtcctgg tgctgttggg gattgtgac atctactta ttgtcctggt tgtcatttgg
aaacagaaac cgaggtatga aattcgctgg agggtcattg aatcaatcag cccggatgga
catgaatata tttatgtgga cccgatgcag ctgccttatg actcaagatg ggagtttcca
agagatggac tagtgcctgg tcgggtottg gggctcggag cgtttgggaa ggtggttgaa
ggaacagcct atggattaag ccggctccaa cctgtcatga aagttgcagt gaagatgcta
aaaccaogc ccagatccag tgaaaaaaa gctctcatgt ctgaactgaa gataatgact
cacctggggc cacattgaa cattgtaac tigctgggag cctgcaccaa gtcaggcccc
attfacatca tcacagatg ttgcttctat ggagatttgg tcaactattt gcataagaat
agggatagct tctgagcca ccaccagag aagccaaaga aagagctgga tatctttgga
tgaaccctg ctgatgaag cacacggagc tatgttattt taicttttga aaacaatggt
gactacatgg acatgaagca ggctgatact acacagtatg tccccatgct agaaaggaaa
gaggtttcta aatattcca catccagaga tcaactatg atcgtccagc ctcataaag
aagaaatcta tgttagactc agaagtcaaa aacctccttt cagatgataa ctcagaaggc
cttactttat tggatttgt gagcttcacc tatcaagtg cccgaggaat ggagttttg
gctcaaaaa attgttcca ccgtgatctg gctgctcga acgtcctcct ggcacaagga
aaaatttga agatcttga ctttggcctg gccagagaca tcatgcatga ttogaactat
gtgtogaag gcagtacctt tctgcccgtg aagtggatgg ctctgagag catctttgac
aacctciaca ccacactgag tgatgtctgg tcttatggca ttctgctctg ggagatctt
tcccttggg gcacccctta cccggcatg atggtggatt ctactttcta caataagatc
aagagtggg accgatggc caagcctgac cagctacca gtgaagtcta cgagatcatg
gtgaaatgct ggaacagtga gccggagaag agaccctcct titaccacct gactgagatt
gtggagaatc tgctgcctgg acaataaaa aagagtatg aaaaaattca cctggacttc
ctgaagagt accatcctgc tgtggcacgc atcgtgttgg actcagacaa tgcatacatt
gggtcacct acaaaaacga ggaagacaag ctgaaggact gggagggtg totggatgag
cagagactga gcgctgacag tggctacatc attcctctgc ctgacattga cctgtcct
gaggaggagg acctgggcaa gaggaacaga cacagctcgc agacctctga agagagtgcc

attgagacgg gttcagcag ttccacctc atcaagagag aggacgagac cattgaagac
 atcgacatga tggacgacat cggcatagac tctcagacc tggtggaaga cagcttctg
 taactggcgg attogagggg ttcttccac ttctggggcc acctctggat cccgttcaga
 aaaccacttt attgcaatgc ggaggttgag aggaggactt ggttgatgtt taaagagaag
 ttcccagcca agggcctcgg ggagcgttct aaatatgaat gaatgggata tttgaaatg
 aactttgtca gttgtgctc togcaatgcc toagtagcat ctcaagtgtg tgtgaagtt
 ggagatagat ggataagga ataataggcc acagaagggtg aactttgtc tcaaggaca
 ttggtgagag tccaacagac acaatttata ctgcgacaga acttcagcat tgtaattat

<210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Val Ile Glu Ser Ile Ser Pro Asp Gly His Glu Tyr Ile Tyr Val Asp
 1 5 10 15

Pro Met Gln Leu Pro Tyr Asp Ser Arg
 20 25

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Ala Asp Thr Thr Gln Tyr Val Pro Met Leu Glu Arg
 1 5 10

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr Lys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Leu Tyr Asp Arg Pro Ala Ser Tyr Lys
 1 5 10

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ile Met His Asp Ser Asn Tyr Val Ser Lys
 1 5 10

<210> 8
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Ser Ala Asp Ser Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Pro Asp Ile Asp Pro
 1 5 10 15

Val Pro Glu Glu Glu Asp Leu Gly Lys Arg
 20 25

10 20 30 40 50 60
 MGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPNENEKVVQ LNSSFSLRCF GESEVSWQYP
 70 80 90 100 110 120
 MSEEESSDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAAHTGLYTC YYNHTQTEEN ELEGRHIYIY
 130 140 150 160 170 180
 VPDPDVAFVP LGMTDYLVIV EDDDSAIIPC RTTDPETPVT LHNSEGVVPA SYDSRQGFNG
 190 200 210 220 230 240
 TFTVGPYICE ATVKGKKFQT IPFNVYALKA TSELDLEMEA LKTVYKSGET IVVTCVAFNN
 250 260 270 280 290 300
 EVVDLQWYTP GEVKGKGITM LEEIKVPSIK LVYTLTVPEA TVKDSDYEC AARQATREVK
 310 320 330 340 350 360
 EMKKVTISVH EKGFIKPT FSQLEAVNLH EVKHFVVEVR AYPPPRISWL KNNLTLIENL
 370 380 390 400 410 420
 TEITTDVEKI QEIRYRSLK LIRAKEEDSG HYTTIVAQNE AVKSYTFELL TQVPSSILDL
 430 440 450 460 470 480
 VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PLPDIEWMIC KDIKKCNET SWTILANNVS NIITEIHSRD
 490 500 510 520 530 540
 RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAA VLVLLVIVII
 550 560 570 580 590 600
 SLIVLVVIWK QKPRYBIRWR VIESISPDGH EYIYVPMQL PYDSRWEFPR DGLVLGRVLG
 610 620 630 640 650 660
 SGAFGKVVEG TAYGLSRSQP VMKVAVKMLK PTARSSEKQA LMSELKIMTH LGPHLNIVNL
 670 680 690 700 710 720
 LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHKNR DSFLSHHPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY
 730 740 750 760 770 780
 VILSFENNGD YMDMQADTT QYVPLERKE VSKYSDIQRS LYDRPASYKK KSMLDSEVKN
 790 800 810 820 830 840
 LLSDDNSEGL TLLDLLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAQGK IVKICDFGLA
 850 860 870 880 890 900
 RDIMHDSNYV SKGSTFLPVK WMAPESIFDN LYTTLSDVWS YGILLWEIIS LGGTPYPGMM
 910 920 930 940 950 960
 VDSTFYNKIK SGYMAKPDH ATSEVYEIMV KCWNSEPEKR PSFYHLSEIV ENLLPGQYKK
 970 980 990 1000 1010 1020
 SYEKIHLDFL KSDHPAVARM RVDSNAYIG VTYKNEEDKL KDWEGGLDEQ RLSADSGYII
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 PLPDIDPVPE EEDLGKRRH SSQTSEESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMMDDIGIDS
 SDLVEDSFL

图 1

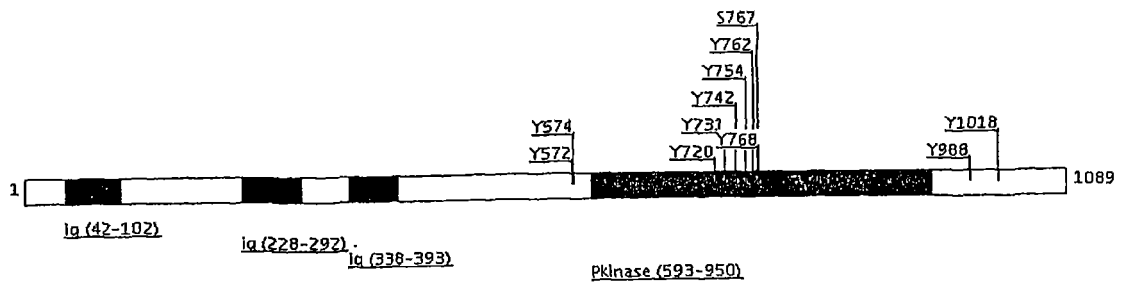


图2

ORIGIN

```

1  ttctccccgc  cccccagttg  ttgtcgaagt  ctggggggtg  ggactggacc  ccttgattgc
61  gtaagagcaa  aaagcgaagg  cgcaatctgg  acactggggg  attcgggagc  cagggagttt
121  gagagaaact  ttatttttga  agagaccaag  gttgaggggg  ggcttatttc  ctgacagcta
181  ttactttaga  gcaaatgatt  agttttagaa  ggtgggacta  taacattgaa  tcaattacaa
241  aacgcgggtt  ttgagcccat  tactgttggg  gctacagggg  gagaacacag  aggagactgc
301  aagagatcat  ttgggaaggc  cgtgggcacg  ctctttactc  catgtgtggg  acattcattg
361  cggaaataca  tcggaggaga  agtttcccag  agctatgggg  acttcccata  cggcgttcct
421  ggtccttagc  tgtcttctca  cagggctgag  cctaatacct  tgccagcttt  cattaccctc
481  tatccttcca  aatgaaaatg  aaaaggttgt  gcagctgaat  tcatcctttt  ctctgagatg
541  ctttggggag  agtgaagtga  gctggcagta  ccccatgtct  gaagaagaga  gctccgatgt
601  ggaatcaga  aatgaagaaa  acaacagcgg  cctttttgtg  acggctcttg  aagtgacgag
661  tgccctcggc  gcccacacag  ggtttgtcac  ttgctattac  aaccacactc  agacagaaga
721  gaatgactt  gaaggcaggc  acatttacat  ctatgtgcca  gaccagatg  tagcctttgt
781  acctctagga  atgacggatt  atttagtcac  cgtggaggat  gatgattctg  ccattatacc
841  ttgtcgcaca  actgatcccg  agactcctgt  aacctacac  aacagtggg  ggggtgtacc
901  tgctccttac  gagcagcagc  agggctttaa  tgggacctc  actgtagggc  cctatatctg
961  tgaggccacc  gtcaaaggaa  agaagtcca  gacctccca  tttaatggtt  atgctttaa
1021  agaacatca  gagctggatc  tagaaatgga  agctttaa  accgtgtata  agtcagggga
1081  aacgattgtg  gtcacctgtg  ctggttttaa  caatgaggtg  gttgaccttc  aatggactta
1141  ccctggagaa  gtgaaaggca  aaggcatcac  aatgtggaa  gaaatcaaag  tcccatccat
1201  caaattggtg  tacactttga  cggcccccga  ggccacgggt  aaagacagt  gagattacga
1261  atgtgctgcc  cgccaggcta  ccagggaggt  caaagaaatg  aagaaagtca  ctattctgt
1321  ccatgagaaa  ggtttcattg  aaatcaaacc  cacctcagc  cagttggaag  ctgtcaacct
1381  gcatgaagtc  aaacattttg  ttgtagaggt  gcgggctac  ccacctccca  ggatatcctg
1441  gctgaaaaac  aatctgactc  tgattgaaaa  tctcactgag  atccactg  atgtgaaaa
1501  gattcaggaa  ataaggatc  gaagcaaat  aaagctgatc  cgtgctaagg  aagaagacag
1561  tggcattat  actattgtag  ctcaaatga  agatgctgtg  aagagctata  cttttgaact
1621  gttaaactca  gttccttcat  ccattctgga  ctgtgctgat  gatccactg  gctcaactgg
1681  gggacagacg  gtgagggtca  cagctgaagg  cacgcgct  cctgatattg  agtggatgat
1741  atgcaaaagt  attaagaaat  aacttctctg  aacttctctg  actattttgg  ccaacaatgt
1801  ctcaaacatc  atcacggaga  tccactcccg  agacaggagt  accgtggagg  gccgtgtgac
1861  tttcgcacaa  gtggaggaga  ccatcgccgt  gcgatccctg  gctaagaatc  tccttggagc
1921  tgagaaccga  gagctgaagc  tgggtgctcc  caccctgcgt  tctgaactca  cggtggtgc
1981  tgcagctctg  gtgctgttgg  tgattgtgat  catctcaact  attgtcctgg  ttgtcatttg
2041  gaaacagaaa  ccgaggatg  aaattcgtg  gagggtcatt  gaatcaatca  gcccgatgg
2101  acatgaatat  atttatgtgg  acccgatgca  gctgccttat  gactcaagat  gggagtttcc
2161  aagagatgga  ctagtgtctg  gtcgggtcct  ggggtctgga  gcggtttgga  aggtggttga
2221  aggaacagcc  tatggattaa  gcgggtccca  acctgtcatg  aaagttgcag  tgaagatgct
2281  aaaacccacg  gccagatcca  gtgaaaaaca  agctctcatg  tctgaaotga  agataatgac
2341  tcacctgggg  ccacatttga  acattgtaaa  ctgtctggga  gcctgcacca  agtcaggccc
2401  catttacatc  atcacagagt  attgcttcta  tggagatttg  gtoaacatt  gtcataagaa
2461  tagggatagc  ttcctgagcc  accaccocga  gaagccaaag  aaagagctgg  atatccttgg
2521  attgaaacct  gctgatgaaa  gcacacggag  ctatgttatt  ttatcctttg  aaaacaatgg
2581  tgactacatg  gacatgaagc  aggotgatac  tacacagtat  gtccccatgc  tagaaaggaa
2641  agaggttct  aaatatccg  acatccagag  atcactctat  gatcgtccag  cctcatataa
2701  gaagaaatct  atgttagact  cagaagtcaa  aaocctcct  tcagatgata  actcagaagg
2761  ccttacttta  ttgatttgt  tgagcttcac  ctatcaagtt  gcccgaggaa  tggagttttt
2821  ggcttcaaaa  aattgtgtcc  accgtgatct  ggctgctcgc  aacgtcctcc  tggcacaagg
2881  aaaaattgtg  aagatctgtg  actttggcct  ggccagagac  atcatgcatg  attcgaacta
2941  tgtgtcgaaa  ggcagtacct  ttctgcccgt  gaagtggatg  gctcctgaga  gcatccttga
3001  caacctctac  accacactga  gtgatgtctg  gtcttatggc  attctgtctc  gggagatctt
3061  ttcccttgg  ggcaccocct  accocggcat  gatgggtggat  tctactttct  acaataagat
3121  caagagtggg  taccggatgg  ccaagcctga  ccagctacc  agtgaagtct  acgagatcat
3181  ggtgaaatgc  tggaacagt  agccggagaa  gagaccctcc  ttttaccacc  tgagtggatg
3241  tgtggagaat  ctgctcctg  gacaatataa  aaagagttat  gaaaaaattc  acctggactt
3301  cctgaagagt  gaccatcctg  ctgtggcacg  catcgtgtg  gactcagaca  atgcatacat
3361  tgggtgtcacc  tacaaaaacg  aggaagacaa  gctgaaggac  tgggggggtg  gctctggatga
3421  gcagagactg  agcgtgaca  gtggctacat  catctcctct  cctgacattg  accctgtccc
3481  tgaggaggag  gacctgggca  agaggaacag  acacagctcg  cagacctctg  aagagagtgc
3541  cattgagacg  ggttcagca  gttccacctt  catcaagaga  gaggacgaga  coattgaaga
3601  catcgacatg  atggacgaca  tcggcataga  ctcttcagac  ctggtggaag  acagcttcc
3661  gtaactggcg  gattcgagg  gttccttcca  ctctggggc  cacctctyga  tcccgttccg
3721  aaaaccactt  tattgcaatg  cggaggttga  gaggaggact  tggttgatgt  ttaagagaa
3781  gtcccagcc  aagggcctcg  gggagcgttc  taaatatgaa  tgaatgggat  atttgaaat
3841  gaactttgtc  agtgttgcct  ctgcgaatgc  ctcagtagca  tctcagtggt  ggtggaagtt
3901  tggagataga  tggataagg  aataatagcc  cacagaaggt  gaactttgtg  ctcaaggac
3961  attgggtgaga  gtccaacaga  cacaatttat  actcgcagac  aacttcagca  ttgtaattat

```



```

4021 gtaaataaact ctaaccaagc ctgtgtttag attgtattaa ctatcttctt tggacttctg
4081 aagagaccac tcaatccatc catgtacttc cctcttgaaa cctgatgtca gctgctgttg
4141 aacttttttaa agaagtgcac gaaaaacccat ttttgaacct taaaagggtac tggactactata
4201 gcatttttgct atctttttta gtgttaagag ataaagaata ataabtaacc aaccttgttt
4261 aatagatttg ggtcatttag aagcctgaca actcattttc atattgtaat ctatgtttat
4321 aatactacta ctgttatcag taatgctaaa tgtgtaataa tgtaacatga tttccctcca
4381 gagaaagcac aatttaaaac aatccttact aagtaggtga tgagtttgac agtttttgac
4441 atttatatta aataacatgt ttctctataa agtatggtaa tagctttagt gaattaaatt
4501 tagttgagca tagagaacaa agtaaaagta gtgttgcca ggaagtgcga atttttaact
4561 gtactgaata ggttccocaa tccatcgtat taaaaacaa ttaactgcc tctgaaataa
4621 tgggattaga aacaaacaaa actccttaagt cctaaaagtt ctcaatgtag aggcataaac
4681 ctgtgctgaa cataacttct catgtatatt acccaatgga aaatataatg atcagcaaaa
4741 agactggatt tgcagaagtt tttttttttt ttcttcatgc ctgatgaaag ctttggcaac
4801 cccaatataat gtattttttg aatctatgaa cctgaaaagg gtcagaagga tgcccagaca
4861 tcagcctcct tctttccacc cttaccocaa agagaagag tttgaaactc gagaccataa
4921 agatattctt tagtggaggc tggatgtgca tttagcctgga tcctcagttc tcaaatgtgt
4981 gtggcagcca ggatgactag atcctgggtt tccatccttg agattctgaa gtaagaagtc
5041 tgagggaaac cagagctctgt atttttctaa actccctggc tgttctgatc ggccagtttt
5101 cggaaacact gacttaggtt tcaggaagtt gccatgggaa acaataaatt tgaacttttg
5161 aacagggttg gaattcaacc acgcaggaag cctactatth aaatccttgg cttcaggtta
5221 gtgacattta atgccatcta gctagcaatt ggcaccttaa ttttaactttc cagtccttagc
5281 tgaggctgag aaagctaaaag tttggttttg acaggttttc caaaagtaa gatgctactt
5341 cccactgtat gggggagatt gaactttccc cgtctcccgt cttctgcctc ccactccata
5401 ccccgccaag gaaaggcatg tacaaaaaatt atgcaattca gtgttccaag tctctgtgta
5461 accagctcag tgttttggtg gaaaaaacat ttttaagtttt actgataaatt tgaggttaga
5521 tggggaggatg aattgtcaca tctatccaca ctgtcaaaca ggttgggtg ggttcattgg
5581 cattctttgc aatactgctt aattgctgat accatagaa tgaaacatgg gctgtgatta
5641 ctgcaatcac tgtgctatcg gcagatgatg ctttggaga tgcagaagca ataataaagt
5701 acttgactac ctactggtgt aatctcaatg caagccocaa ctttcttatc caactttttc
5761 atagtaagtg cgaagactga gccagattgg ccaattaaaa acgaaaacct gactaggttc
5821 ttagagacca attagacttg aaatagcttt gtgtttctag aatcacagct caagcattct
5881 gtttatcgct cactctccc tgtacagcct tattttggtg gtgctttgca ttttgatatt
5941 gctgtgagcc ttgcatgaca tcatgaggcc ggatgaaact tctcagtcca gcagttcca
6001 gtcctaacaa atgctcccac ctgaatttgt atatgactgc atttgtgggt gtgtgtgtgt
6061 tttcagcaaa ttccagattt gtttcccttt ggctcctgc aaagtctcca gaagaaatt
6121 tgccaatctt tctactttc tatttttatg atgacaatca .aagccggcct gagaaacact
6181 atttgtgact ttttaaacga ttagtgatgt ctttaaaatg tggctctgcca atctgtacaa
6241 aatgggtccta tttttgtgaa gagggacata agataaaatg atgttataca tcaatatgta
6301 tatatgtatt tctatataga cttggagaat actgcaaaa catttatgac aagctgtatc
6361 actgccttcg tttatatttt ttttaactgtg ataatcccca caggcacatt aactgttgca
6421 cttttgaatg tccaaaattt atattttaga aataataaaa agaaagatac ttacatgttc
6481 ccaaaacaat ggtgtggtga atgtgtgaga aaaactaact tgatagggtc taccataata
6541 aatgtatta cgaatgccc tgttcatgtt tttgttttaa aacgtgtaaa tgaagatcctt
6601 tatatttcaa taaatgatat ataattttaa gtt

```

图3续

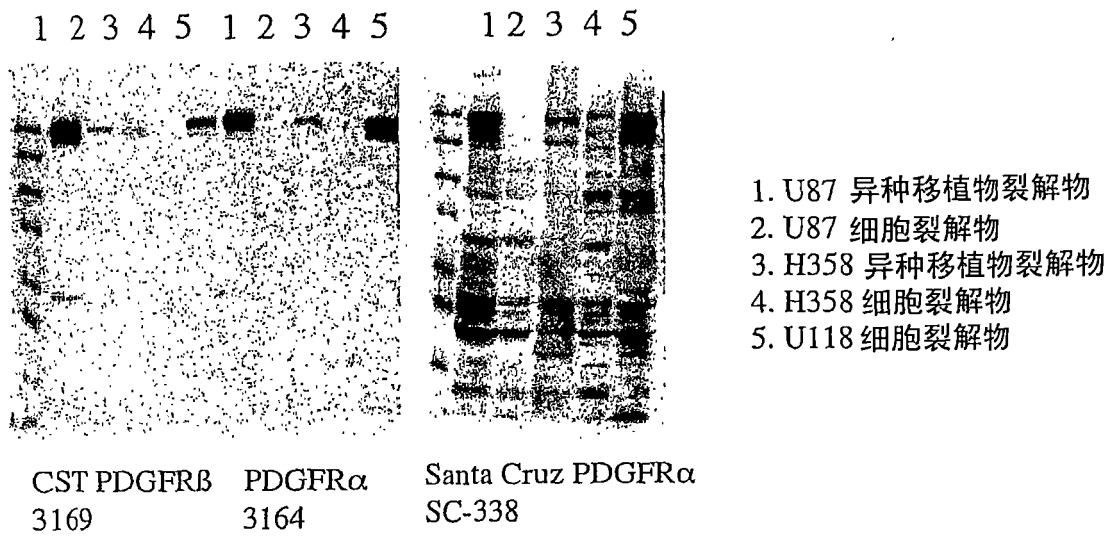


图4

A.

1 2 1 2 1 2 1 2

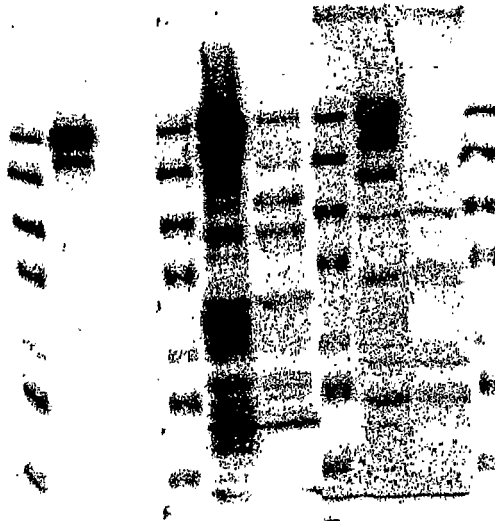


1. 3T3 裂解物
2. A549 裂解物

3169 3164 SC-338
PDGFRβ PDGFRα

B.

1 2 1 2 1 2



3164 SC-338 SC-431

1. H1703
2. A549

图5

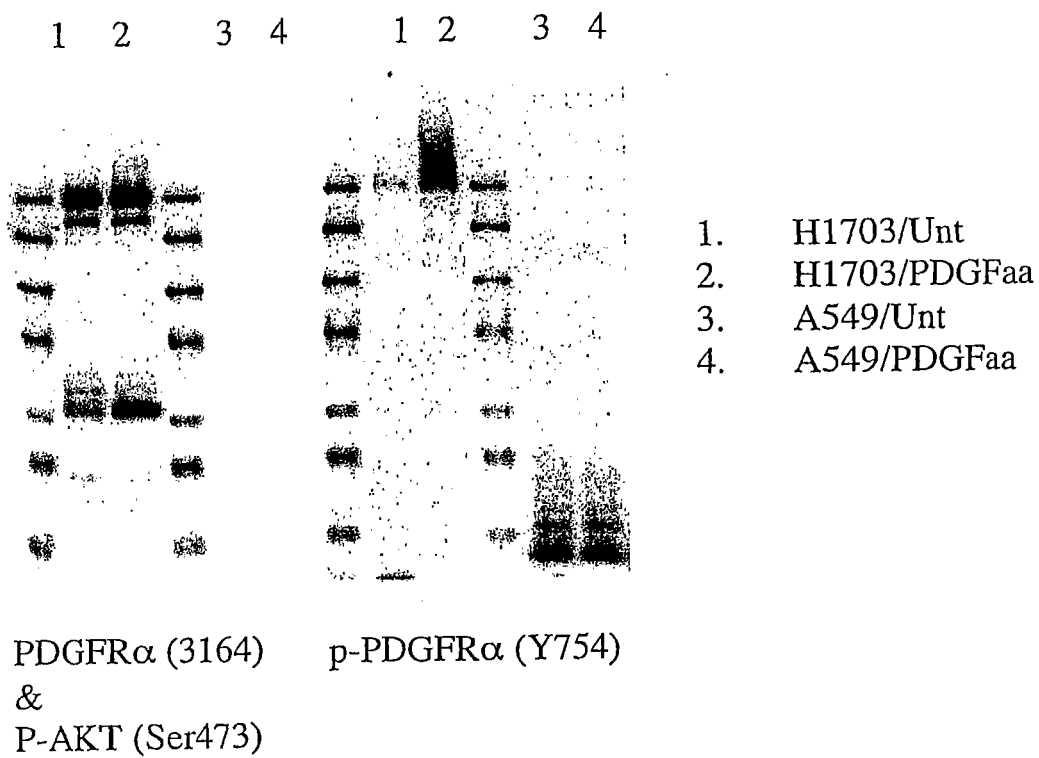


图6

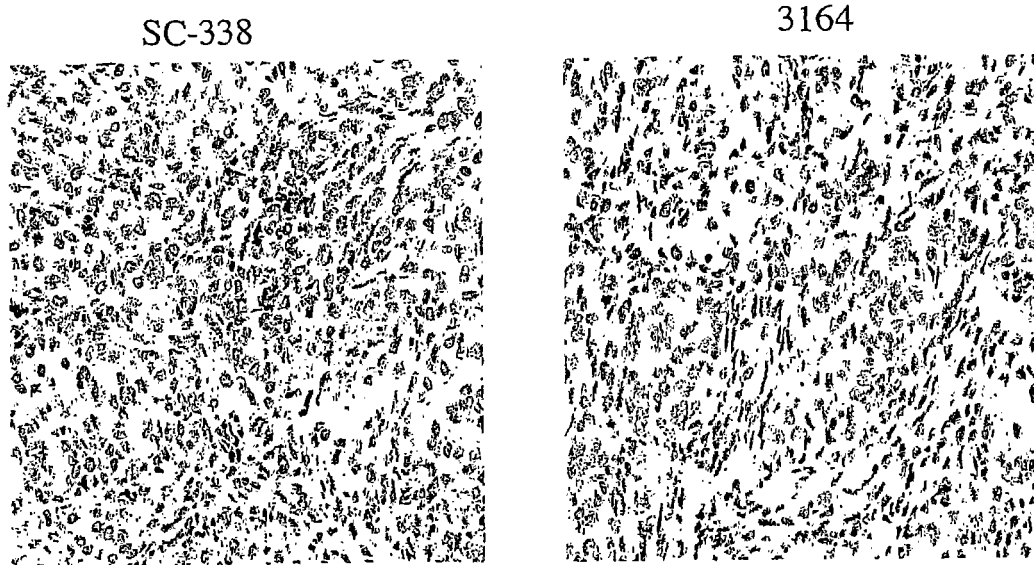


图7

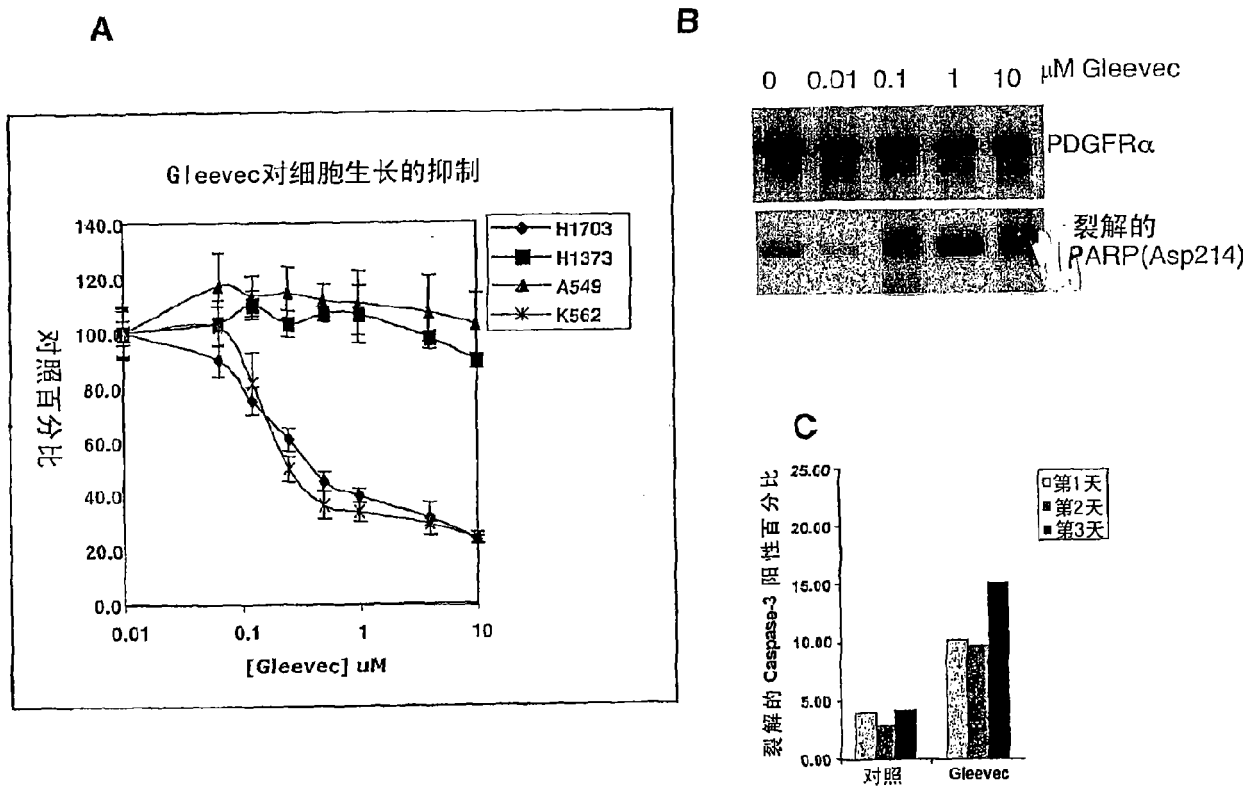


图8

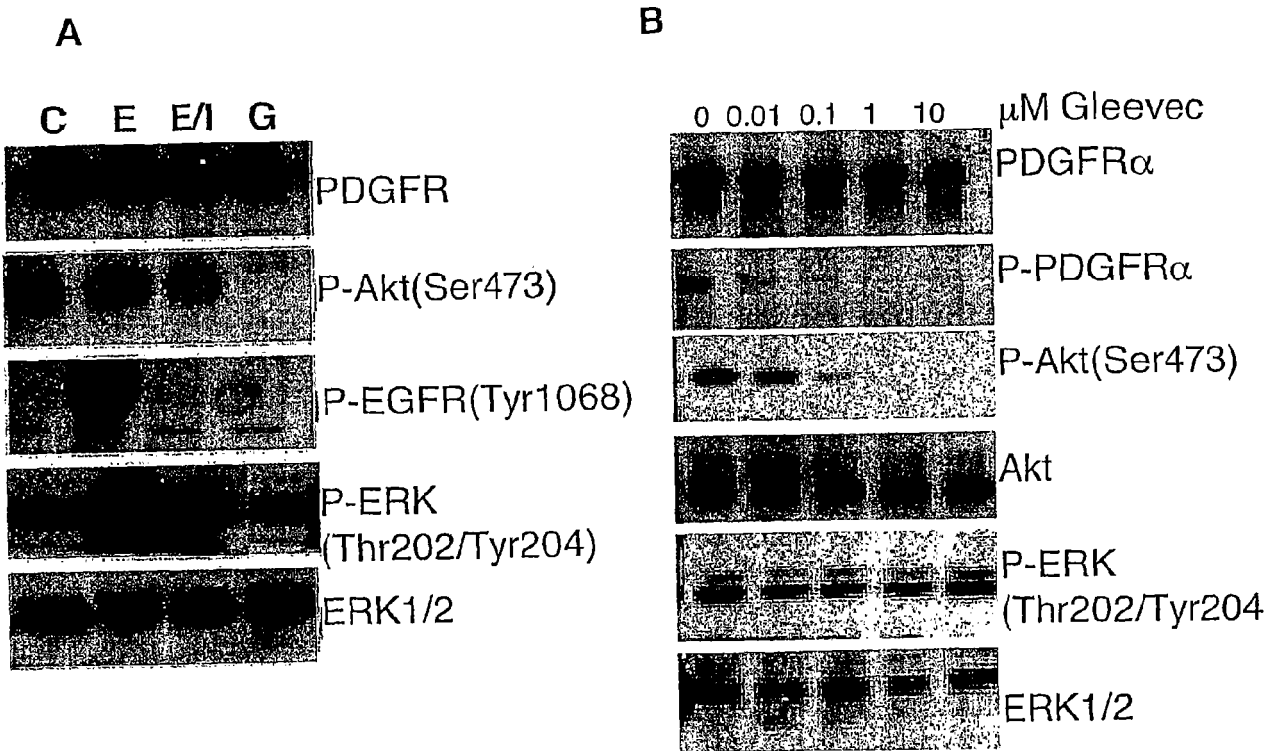


图9

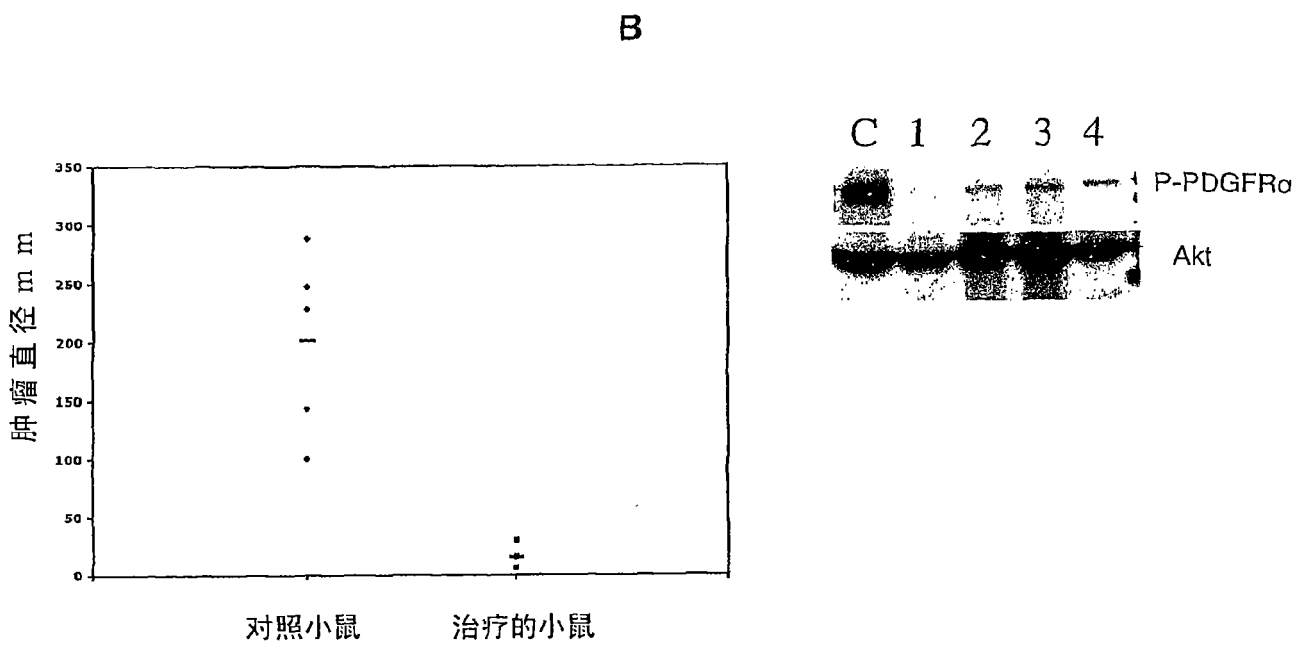


图10

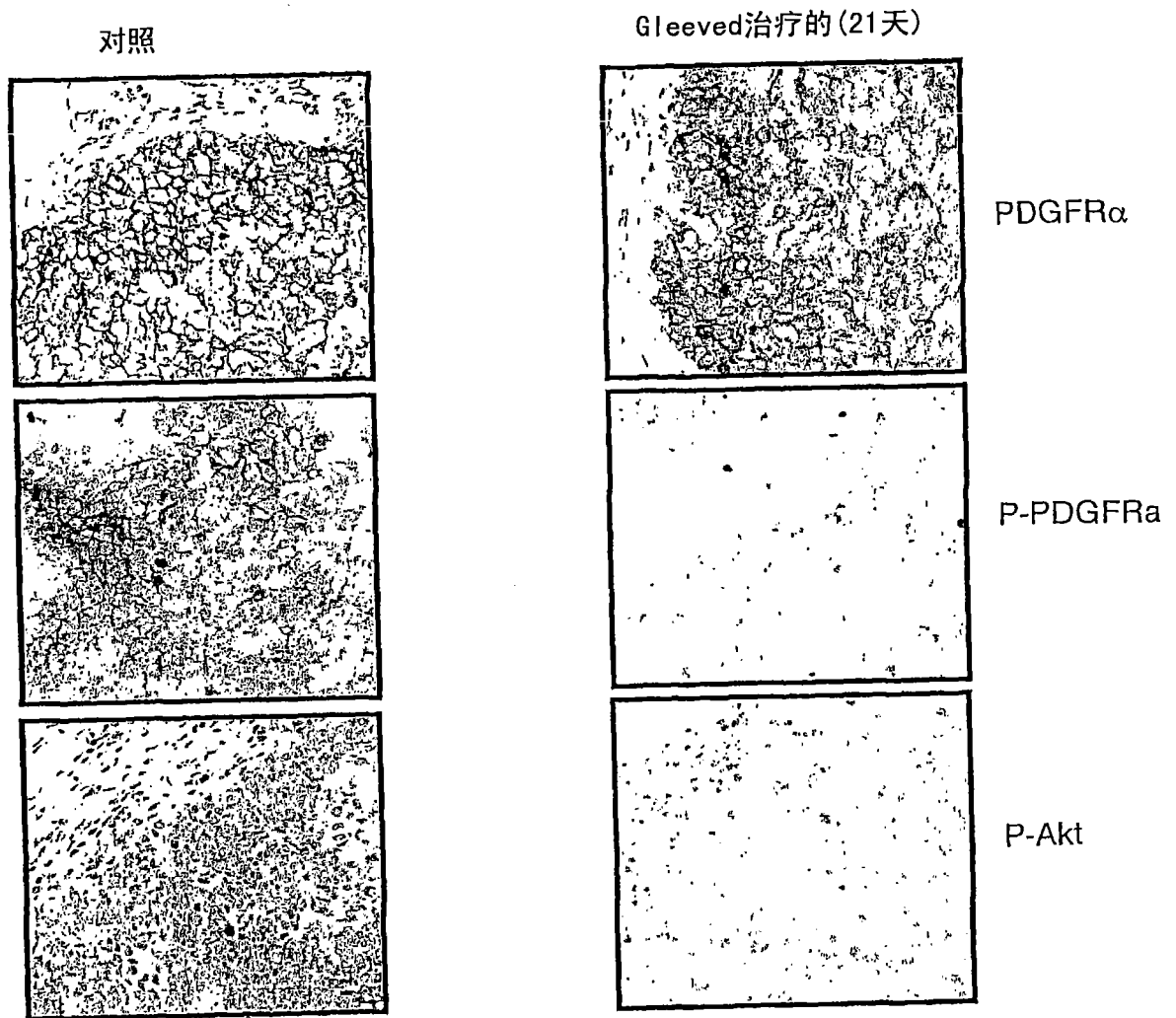


图 11

专利名称(译)	表达PDGFR α 的非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤的鉴定		
公开(公告)号	CN101322031A	公开(公告)日	2008-12-10
申请号	CN200580051478.6	申请日	2005-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	细胞信号技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	细胞信号技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	细胞信号技术有限公司		
[标]发明人	K瑞科瓦 R波拉基维茨 郭爱兰 K罗斯比 Q曾已故 K李		
发明人	K·瑞科瓦 R·波拉基维茨 郭爱兰 K·罗斯比 Q·曾(已故) K·李		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 A61K38/00 A61K35/00 A01N37/18		
CPC分类号	A61K31/506 G01N33/57423 G01N33/6893 G01N2333/71		
代理人(译)	林晓红		
优先权	11/174051 2005-07-01 US		
其他公开文献	CN101322031B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了先前未确诊的哺乳动物非小细胞肺癌(NSCLC)的亚类，血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)在其中表达且引发疾病，而且提供了鉴定属于表达PDGFR α 的NSCLC肿瘤亚类的哺乳动物NSCLC肿瘤的方法，提供了鉴定可能响应PDGFR α - 抑制治疗剂的NSCLC肿瘤的方法。本发明还提供了一种抑制表达PDGFR α 的哺乳动物NSCLC肿瘤发展的方法；以及确定化合物是否抑制表达PDGFR α 的哺乳动物NSCLC肿瘤的发展的方法。