



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102388151 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 21

(21) 申请号 201080016088. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 11

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/151749 2009. 02. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/023818 2010. 02. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/093742 EN 2010. 08. 19

(71) 申请人 雅培制药有限公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 沃尔特及伊莱萨霍尔医学研究院

(72) 发明人 M. F. 范 德尔夫特 D. 黄 C. 谢

D. 塞米扎罗夫 T. 尤奇尔

R. R. 列斯尼夫斯基

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 刘健

权利要求书 4 页 说明书 19 页

序列表 3 页

(54) 发明名称

用于鉴定、分类和监控具有 BCL-2 家族抑制剂抗性肿瘤和癌症的受试者的方法和组合物

(57) 摘要

本发明涉及允许就 Bcl-2 家族抑制剂疗法鉴定、分类且监控癌症患者的方法和试剂盒。本发明的方法和组合物涉及测定癌或肿瘤细胞中的 Bcl-x_L 扩增, 或升高的 Bcl-x_L 多肽表达。

1. 一种分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:
 - (a) 提供来自患者的组织样品;
 - (b) 测定 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和
 - (c) 如果所述 Bcl-x_L 基因是扩增的,那么将所述患者分类为对于 Bcl-2 小分子抑制剂是抗性的。
2. 一种用于将具有癌症的患者鉴定为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格的方法,其包括:
 - (a) 提供来自患者的组织样品;
 - (b) 测定 Bcl-x_L 基因的表达是否是扩增的;和
 - (c) 如果所述 Bcl-x_L 基因不是扩增的,那么将所述患者分类为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂合格。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述 Bcl-2 家族抑制剂是 ABT-263。
4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述 Bcl-x_L 基因的扩增与 Bcl-x_L 多肽表达中的增加相互关联。
5. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述组织样品包括外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、淋巴结样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品、石蜡包埋的组织样品,或由外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品或石蜡包埋的组织样品中的任何一种产生的提取物或加工的样品。
6. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述测定步骤包括原位杂交。
7. 权利要求 8 的方法,其中所述原位杂交用可检测标记的核酸探针执行。
8. 权利要求 8 的方法,其中所述原位杂交用与所述 Bcl-x_L 基因的至少部分特异性杂交的核酸探针或肽核酸探针执行。
9. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述测定包括聚合酶链反应。
10. 权利要求 11 的方法,其中所述聚合酶链反应用与所述 Bcl-x_L 基因的核酸序列的至少部分特异性杂交的至少一种引物执行。
11. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述测定步骤包括核酸微阵列测定。
12. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述组织样品来自具有选自小细胞肺癌和淋巴瘤的癌症的患者。
13. 权利要求 2 的方法,其中所述患者分类为对于接受设计为与 Bcl-2、Bcl-w 和 Bcl-x_L 之一结合的反义试剂是合格的。
14. 一种用于监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:
 - (a) 提供来自癌症患者的测试样品;
 - (b) 鉴定在所述测试样品中的肿瘤或癌细胞,或从所述测试样品中提取肿瘤或癌细胞;
 - (c) 测定在所述肿瘤或癌细胞中 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(d)比较具有扩增的 Bcl-x_L 基因的肿瘤或癌细胞数目与在治疗前或在治疗开始时测定的此种肿瘤或癌细胞的基线水平。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述癌症选自小细胞肺癌和淋巴瘤。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述患者用 ABT-263 治疗。

17. 权利要求 14 的方法,其中所述 Bcl-x_L 基因的扩增与 Bcl-x_L 多肽表达中的增加相互关联。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述患者用设计为与 Bcl-2、Bcl-w 和 Bcl-x_L 中的至少一种结合的反义试剂治疗。

19. 权利要求 14 的方法,其中所述测定步骤包括原位杂交。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述原位杂交用可检测标记的核酸探针执行。

21. 权利要求 14 的方法,其中所述肿瘤细胞是循环肿瘤细胞。

22. 一种分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的测试样品;

(b) 测定在所述测试样品中:

(i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(ii) 在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量;

(c) 测定在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量;和

(d) 基于:

(i) 所述 Bcl-x_L 基因的扩增;和

(ii) 所述 Bcl-x_L 的量在测试样品中高于在对照中,

将所述患者分类为具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症。

23. 一种用于将具有癌症的患者鉴定为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的测试样品;

(b) 测定在所述测试样品中:

(i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(ii) 在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量;

(c) 测定在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量;和

(d) 基于:

(i) 所述 Bcl-x_L 基因的扩增;和

(ii) 所述 Bcl-x_L 的量在测试样品中高于在对照中,

将所述患者分类为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格。

24. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述 Bcl-2 家族抑制剂是 ABT-263。

25. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述组织样品包括外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、淋巴结样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品、石蜡包埋的组织样品,或由外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、

乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品或石蜡包埋的组织样品中的任何一种产生的提取物或加工的样品。

26. 权利要求 22 或 23 的方法,其中测定所述 Bcl-x_L 基因的扩增包括原位杂交。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述原位杂交用可检测标记的核酸探针执行。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述原位杂交用与所述 Bcl-x_L 基因的至少部分特异性杂交的核酸探针或肽核酸探针执行。

29. 权利要求 22 或 23 的方法,其中测定所述 Bcl-x_L 基因的扩增包括聚合酶链反应。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述聚合酶链反应用与所述 Bcl-x_L 基因的核酸序列的至少部分特异性杂交的至少一种引物执行。

31. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述测定步骤包括核酸微阵列测定。

32. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述组织样品来自具有选自小细胞肺癌和淋巴瘤的癌症的患者。

33. 权利要求 23 的方法,其中所述患者分类为对于接受设计为与 Bcl-2、Bcl-w 和 Bcl-x_L 之一结合的反义试剂是合格的。

34. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述测定步骤(b)(ii)通过免疫测定执行。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述免疫测定是夹心免疫测定。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述免疫测定是 ELISA。

37. 权利要求 34 的方法,其中所述测定步骤(b)(ii)在自动化免疫测定仪器上执行。

38. 权利要求 22 或 23 的方法,其中所述测定步骤(b)(ii)通过测量 Bcl-x_L mRNA 执行。

39. 一种用于监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自癌症患者的测试样品;

(b) 鉴定在所述样品中的肿瘤或癌细胞,或从所述样品中提取肿瘤或癌细胞;

(c) 基于所述 Bcl-x_L 基因扩增的存在或不存在,决定所述患者是否应继续用 Bcl-2 家族抑制剂治疗。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述癌症选自小细胞肺癌和淋巴瘤。

41. 权利要求 39 的方法,其中所述患者用 ABT-263 治疗。

42. 权利要求 39 的方法,其中所述 Bcl-x_L 基因的扩增与 Bcl-x_L 多肽表达中的增加相互关联。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述患者用设计为与 Bcl-2、Bcl-w 和 Bcl-x_L 中的至少一种结合的反义试剂治疗。

44. 权利要求 42 的方法,其中所述测定步骤包括原位杂交。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述原位杂交用可检测标记的核酸探针执行。

46. 权利要求 44 的方法,其中所述原位杂交用至少 2 种核酸探针执行。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述核酸探针之一设计为与 Bcl-x_L 基因杂交。

48. 权利要求 39 的方法,其中所述肿瘤细胞是循环肿瘤细胞。

49. 一种监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的测试样品;

(b) 测定在所述测试样品中:

- (i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的 ;和
- (ii) 在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量 ;
- (c) 测定在所述测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量 ;和
- (d) 基于 :

- (i) 所述 Bcl-x_L 基因是否是扩增的 ;
 - (ii) 所述 Bcl-x_L 的量在测试样品中是否高于在对照中,
- 决定所述患者是否应继续用 Bcl-2 家族抑制剂治疗。

50. 权利要求 49 的方法,其中所述 Bcl-2 家族抑制剂是 ABT-263。

51. 权利要求 49 的方法,其中所述组织样品包括外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、淋巴结样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品、石蜡包埋的组织样品,或由外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品或石蜡包埋的组织样品中的任何一种产生的提取物或加工的样品。

52. 权利要求 49 的方法,其中测定所述 Bcl-x_L 基因的扩增包括原位杂交。

53. 权利要求 52 的方法,其中所述原位杂交用可检测标记的核酸探针执行。

54. 权利要求 53 的方法,其中所述原位杂交用与所述 Bcl-x_L 基因的至少部分特异性杂交的核酸探针或肽核酸探针执行。

55. 权利要求 49 的方法,其中测定所述 Bcl-x_L 基因的扩增包括聚合酶链反应。

56. 权利要求 55 的方法,其中所述聚合酶链反应用与所述 Bcl-x_L 基因的核酸序列的至少部分特异性杂交的至少一种引物执行。

57. 权利要求 49 的方法,其中所述测定步骤包括核酸微阵列测定。

58. 权利要求 49 的方法,其中所述组织样品来自具有选自小细胞肺癌和淋巴瘤的癌症的患者。

59. 权利要求 49 的方法,其中所述患者分类为对于接受设计为与 Bcl-2、Bcl-w 和 Bcl-x_L 之一结合的反义试剂是合格的。

60. 权利要求 49 的方法,其中所述测定步骤(b) (ii) 通过免疫测定执行。

61. 权利要求 60 的方法,其中所述免疫测定是夹心免疫测定。

62. 权利要求 60 的方法,其中所述免疫测定是 ELISA。

63. 权利要求 60 的方法,其中所述测定步骤(b) (ii) 在自动化免疫测定仪器上执行。

64. 权利要求 49 的方法,其中所述测定步骤(b) (ii) 通过测量 Bcl-x_L mRNA 执行。

65. 一种试剂盒,其包括 :

- (a) 检测扩增的 Bcl-x_L 基因的试剂 ;和
- (b) 说明书。

66. 权利要求 65 的试剂盒,其中检测扩增的 Bcl-x_L 基因的所述试剂包括与 Bcl-x_L 基因的至少部分杂交的可检测标记的多核苷酸。

用于鉴定、分类和监控具有 BCL-2 家族抑制剂抗性肿瘤和癌症的受试者的方法和组合物

[0001] 发明背景

发明领域。

[0002] 本发明涉及关于就 Bcl-2 家族抑制剂疗法鉴定、分类且监控癌症患者有用的诊断测定,并且具体涉及可以鉴定其癌症可能对大多数 Bcl-2 抑制剂抗性的患者的特定标记的测量。

[0003] 相关领域描述

癌症的遗传异质性是使有效癌症药物的开发复杂化的因素。当实施分子概况分析 (profiling) 时,根据传统组织学分类被视为单一疾病实体的癌症经常揭示多种基因组亚型。在一些情况下,分子分类证明比传统病理学更精确。靶向的癌症药物的功效可以与基因组特征例如基因扩增的存在相关 (Cobleigh 等人,1999 ;Lynch 等人,2004)。对于乳腺癌中的 Her-2,已证实与通过蛋白质超表达的免疫组织化学 (IHC) 的检测相比较,基因扩增的检测提供了优良的预后和治疗选择信息 (Pauletti 等人,2000)。因此存在关于基因组分类标记的需要,其可以改善患者对靶向的癌症疗法的应答率。

[0004] 肺癌是关于新靶向的癌症疗法的活跃研究领域。肺恶性肿瘤是癌症死亡率的主因,在 2006 年在美国约 160,000 例死亡。小细胞肺癌 (SCLC) 是肺癌的组织病理学亚型,其代表约 20% 的肺癌病例。关于这种亚型的存活率是低的 (长期存活 4-5%),并且尽管新化学治疗方案的引入,但在过去十年中仍没有得到显著改善。肺癌病例的剩余部分是非小细胞肺癌 (NSCLC),包括几个常见亚型的种类。在过去几年中,在用于 NSCLC 的靶向的疗法的开发中具有相当大进展,例如厄洛替尼 (erlotinib) 和吉非替尼 (gefitinib)。已发现了使 NSCLC 患者能够分成潜在应答者和无应答者的基因组生物标记。具体地,EGFR 激酶结构域中的突变和扩增显示与对于厄洛替尼和吉非替尼的应答相关。不幸的是,对于 SCLC 未达到此种进展,尽管 SCLC 细胞系和肿瘤的基因组分析已得到报道 (Ashman 等人,2002 ;Coe 等人,2006 ;Kim 等人,2006)。

[0005] 针对 Bcl-2 蛋白质家族成员的靶向的癌症疗法研究已得到报道,所述 Bcl-2 蛋白质家族成员是程序性细胞死亡的重要调节剂。抑制凋亡的 Bcl-2 家族成员在癌症中是超表达的,并且促成肿瘤发生。Bcl-2 表达已与对癌症疗法的抗性和减少的存活强烈相关。例如,前列腺癌中雄激素独立性的出现通过 Bcl-2 表达的高发生率得到表征 ($\geq 40\%$ 检查的群组) (Chaudhary 等人,1999),这也对应于对疗法增加的抗性。此外,已证实 Bcl-2 在 NSCLC 和 SCLC 细胞系中的超表达诱导对细胞毒剂的抗性 (Ohmori 等人,1993 ;Yasui 等人,2004)。Yasui 等人 (2004) 描述了在 Bcl-w (BCL2L2) 基因座上的拷贝数增益,并且得出结论为 Bcl-w 表达至少部分负责 SKOV3/VP 的化学抗性。Yatsui 等人 (2004) 未公开在任何其他癌症细胞系中 Bcl-2 家族拷贝数改变的鉴定。

[0006] Martinez-Climent 等人 (2003) 描述了在滤泡性淋巴瘤至大细胞淋巴瘤的转化中在 18q21 包括 Bcl-2 基因座上的拷贝数改变的鉴定 (Martinez-Climent 等人,2003)。Monni 等人 (1996) 报道了在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的多个拷贝数改变 (Monni 等人,1996)。

Galteland 等人(2005)报道了在 B 细胞非何杰金氏淋巴瘤中 Bcl-2 的染色体基因座的增益(Galteland 等人,2005)。Nupponen 等人(1998)描述了在复发的前列腺癌的 17 个样品中的 4 个中 Bcl-2 的低水平拷贝数增益(Nupponen 等人,1998)。Olejniczak 等人已报道在 SCLC 中在 18q21 上的增益,其包含 Bcl-2 基因且与对 Bcl-2 抑制剂 ABT-737 的敏感性相关(Olejniczak 等人,2007)。

[0007] 当今肿瘤学研究的关键领域是对于靶向的疗法获得的抗性的研究。靶向的疗法为患者提供了不可否认的利益;然而,在大多数情况下,这些利益是暂时的,因为肿瘤急需众多策略以逃避这些疗法的作用。这些抗性机制是复杂且多样的。一旦达到对这些机制的理解,就可以开发且采用靶向抗性机制的新疗法。

[0008] BH3 模拟物是工程改造为通过抑制特异性抗凋亡 Bcl-2 家族成员触发凋亡的高度靶向的化合物。对于这些药物的作用的抗性可能在治疗过程中出现。

[0009] 一种此种模拟物 ABT-737(经口形式,ABT-263)是 Bcl-2 家族成员 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bcl-w 的小分子抑制剂,并且已显示诱导实体瘤的消退(Oltersdorf 等人,2005)。ABT-737 已针对人癌症细胞系的不同实验对象组进行测试,并且已展示针对 SCLC 和淋巴瘤细胞系的选择性效力(Oltersdorf 等人,2005)。ABT-737 的化学结构由 Oltersdorf 等人(2005)在第 679 页提供。

[0010] 在许多肿瘤中, Bcl-2 家族去除损伤的细胞的能力被破坏,这是因为促存活(pro-survival) 家族成员是超表达的(Cory 等人,2003),或因为 p53 途径中的突变阻止 p53 介导的否则将触发凋亡的 BH3 唯一(BH3-only) 蛋白质的诱导(Jeffers 等人,2003; Shibue 等人,2003; Villunger 等人,2003)。然而,有趣的是,即使当对 Bcl-2 抑制剂家族的作用抗性时,肿瘤细胞中的凋亡机制仍保持完整。

[0011] 在超表达促存活 Bcl-2 家族成员的细胞的一项研究中,发现细胞对于 ABT-737 是抗性的,所述 ABT-737 通常触发 Bax/Bak- 介导的凋亡。Van Delft 等人(2006)发现细胞对于 ABT-737 是化学难治(chemo-refractive)的,因为另一种促存活相关物 Mcl-1 是超表达的。通过下调 Mcl-1,细胞变得对于 ABT-737 介导的凋亡敏感(van Delft 等人,2006)。Mcl-1 在致使癌细胞对 ABT-737 的作用难治中的作用由 Tahir 等人(2007)加以证实(Olejniczak 等人,2007)。在那项研究中,Tahir 等人(2007)观察到当小细胞肺癌系暴露于逐步升高剂量的 ABT-737 时,细胞获得 ABT-737 抗性,这与 Mcl-1 表达的上调相关。

[0012] 因此,存在能够鉴定对于 Bcl-2 家族成员的拮抗剂抗性的细胞的需要。

[0013] 发明概述

在第一个方面,本发明涉及分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的组织样品;

(b) 测定 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(c) 如果 Bcl-x_L 基因是扩增的,那么将患者分类为对于 Bcl-2 小分子抑制剂是抗性的。

[0014] 在第二个方面,本发明涉及将具有癌症的患者鉴定为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的组织样品;

(b) 测定 Bcl-x_L 基因的表达是否是扩增的;和

(c)如果 Bcl-x_L 基因不是扩增的,那么将患者分类为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂合格。

[0015] 在第一个和第二个方面,Bcl-2 家族抑制剂可以是 ABT-263,并且 Bcl-x_L 基因的扩增与 Bcl-x_L 多肽的表达中的增加相互关联。测定步骤可以包括原位杂交,例如用可检测标记的核酸探针。可替代地,PCR 可以用于测定基因扩增,其中使用与 Bcl-x_L 基因杂交的引物。扩增还可以使用微阵列测定进行测定。

[0016] 在第三个方面,本发明涉及监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

- (a) 提供来自癌症患者的测试样品;
- (b) 鉴定在测试样品中的肿瘤或癌细胞,或从测试样品中提取肿瘤或癌细胞;
- (c) 测定在肿瘤或癌细胞中 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和
- (d) 比较具有扩增的 Bcl-x_L 基因的肿瘤或癌细胞数目与在治疗前或在治疗开始时测定的此种肿瘤或癌细胞的基线水平。

[0017] 在第四个方面,本发明涉及分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:

- (a) 提供来自患者的测试样品;
- (b) 测定在测试样品中:
 - (i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和
 - (ii) 在测试样品中 Bcl-x_L 的量;
- (c) 测定在测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量;和
- (d) 基于:
 - (i) Bcl-x_L 基因的扩增;和
 - (ii) Bcl-x_L 的量在测试样品中高于在对照中,

将患者分类为具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症。

[0018] 在第五个方面,本发明涉及将具有癌症的患者鉴定为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格的方法,其包括:

- (a) 提供来自患者的测试样品;
- (b) 测定在测试样品中:
 - (i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和
 - (ii) 在测试样品中 Bcl-x_L 的量;
- (c) 测定在测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量;和
- (d) 基于:
 - (i) Bcl-x_L 基因的扩增;和
 - (ii) Bcl-x_L 的量在测试样品中高于在对照中,

将患者分类为对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格。

[0019] 在第六个方面,本发明涉及监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

- (a) 提供来自癌症患者的测试样品;
- (b) 鉴定在样品中的肿瘤或癌细胞,或从样品中提取肿瘤或癌细胞;
- (c) 基于 Bcl-x_L 基因扩增的存在或不存在,决定患者是否应继续用 Bcl-2 家族抑制剂治疗。

[0020] 在第七个方面,本发明涉及监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

- (a) 提供来自患者的测试样品；
- (b) 测定在测试样品中：
 - (i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的；和
 - (ii) 在测试样品中 Bcl-x_L 的量；
- (c) 测定在测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量；和
- (d) 基于：
 - (i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的；
 - (ii) Bcl-x_L 的量在测试样品中是否高于在对照中，决定患者是否应继续用 Bcl-2 家族抑制剂治疗。

[0021] 测定步骤(b)(ii)通过免疫测定执行。

[0022] 在本发明的这前 7 个方面中，Bcl-2 家族抑制剂可以是 ABT-263，并且分别地，Bcl-x_L 基因的扩增与 Bcl-x_L 蛋白质的表达中的增加相互关联。测定步骤可以包括原位杂交，例如用可检测标记的核酸探针。可替代地，PCR 可以用于测定基因扩增，其中使用与 Bcl-x_L 基因杂交的引物。扩增还可以使用微阵列测定进行测定。在一些方面，Bcl-x_L 基因表达通过测量 mRNA 或多肽水平进行测定。多肽水平可以使用免疫测定例如夹心免疫测定、ELISAs 或甚至使用自动化免疫测定仪器进行测量。患者可以具体患有 SLCL 和淋巴瘤。肿瘤细胞可以是循环肿瘤细胞。

[0023] 在第八个方面，本发明涉及包括下述的试剂盒：

- (a) 检测扩增的 Bcl-x_L 基因的试剂；和
- (b) 说明书。

[0024] 试剂盒中的试剂可以是与 Bcl-x_L 基因的至少部分杂交的可检测标记的多核苷酸，或结合 Bcl-x_L 多肽的抗体。

[0025] 附图简述或几个视图

不可用

发明详述

本发明提供了关于对于 Bcl-2 家族抑制剂疗法的抗性监控癌症和肿瘤细胞的方法和组合物。本发明人出乎意料地发现编码已由 Bcl-2 家族抑制剂靶向的基因产物之一的区域的基因扩增引起 Bcl-2 家族抑制剂抗性。这个发现在理论上或从文献看来是完全未预料到的。

[0026] 本发明人发现通过使用基于微阵列的比较基因组杂交技术的扩增，以检测在全基因组规模上的基因拷贝数异常，从而提供了伴随 DNA 拷贝数中的变化的染色体畸变的全基因组视图。这种方法在 METHODS FOR ASSEMBLING PANELS OF CANCER CELL LINES FOR USE IN TESTING THE EFFICACY OF ONE OR MORE PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS 中完全公开，其于 2008 年 10 月 31 日提交，并且指定美国系列号 61/110,281，其内容整体引入本文。

[0027] 本发明提供了用于鉴定、分类且监控癌症患者的诊断测定，其包括评估在患者组织样品中的 Bcl-x_L 基因扩增和 / 或基因表达增加。本发明测定包括用于鉴定对于接受 Bcl-2 家族拮抗剂疗法合格的患者和用于监控对于此种疗法的患者应答的测定方法。本发明包括例如通过荧光原位杂交测定 Bcl-x_L 基因扩增的存在或不存在。分类为具有扩增的 Bcl-x_L 的患者对于接受抗 Bcl-2 家族疗法是不合格的，因为他们不太可能响应这种疗法。此

外,具有这种扩增的患者可以对其他癌症疗法是抗性的。因此,在癌症和肿瘤细胞中 Bcl-x_L 扩增的存在的测定是一般疗法分层标记。

[0028] 在一个实施方案中,本发明包括用于鉴定或分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的组织样品;

(b) 测定 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(c) 如果 Bcl-x_L 基因是扩增的,那么将患者分类为对于 Bcl-2 小分子抑制剂是抗性的。

[0029] 在这个实施方案中,基因扩增可以通过多彩色荧光原位杂交(FISH)测定进行测定,例如对肺癌肿瘤活组织检查样品执行的。在其他实施方案中,使用聚合酶链反应(PCR)。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于监控用抗 Bcl-2 家族试剂治疗的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自癌症患者的测试样品;

(b) 鉴定在测试样品中的肿瘤或癌细胞,或从测试样品中提取肿瘤或癌细胞;

(c) 测定在肿瘤或癌细胞中 Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(d) 比较具有扩增的 Bcl-x_L 基因的肿瘤或癌细胞数目与在治疗前或在治疗开始时测定的此种肿瘤或癌细胞的基线水平。

[0031] 再次,FISH 和 PCR 法可以用于检测 Bcl-x_L 扩增。

[0032] 本发明进一步包括分类具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症的患者的方法,其包括:

(a) 提供来自患者的测试样品;

(b) 测定在测试样品中:

(i) Bcl-x_L 基因是否是扩增的;和

(ii) 在测试样品中 Bcl-x_L 的量;

(c) 测定在测试样品中 Bcl-x_L 的量高于还是低于在对照中 Bcl-x_L 的量;和

(d) 基于:

(i) Bcl-x_L 基因的扩增;和

(ii) Bcl-x_L 的量在测试样品中高于在对照中,

将患者分类为具有对于 Bcl-2 家族抑制剂抗性的癌症。

[0033] 这些相同方法可以用于鉴定对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法合格的那些患者。

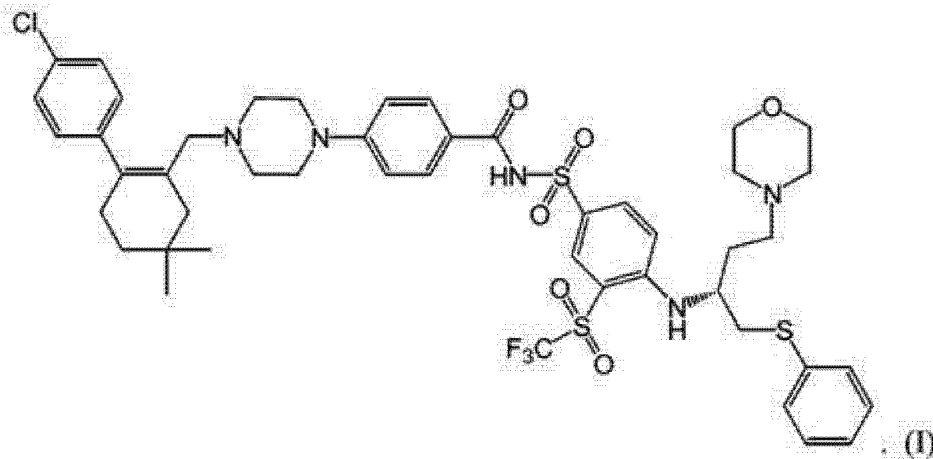
[0034] 本发明还涉及包装例如工程改造为作为 PCR 引物、FISH 探针等使用的多核苷酸的试剂盒。

[0035] 本发明具有提供用于癌症疗法且具体用于 Bcl-2 家族抑制剂疗法的改善的患者分层的显著能力。这些生物标记由本发明的评估还允许跟踪对于疗法的个别患者应答。

[0036] 定义

“Bcl-2 家族抑制剂”指任何类型的治疗化合物,包括基于小分子、抗体、反义、小干扰 RNA 或微小 RNA 的化合物,其与 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bcl-w 中的至少一种结合,并且拮抗 Bcl-2 家族相关核酸或蛋白质的活性。本发明的方法对于任何已知或将来开发的 Bcl-2 家族抑制剂都是有用的。Bcl-2 家族抑制剂的例子是 ABT-737, N-(4-(4-((4'-氯(1,1'-联苯基)-2-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(二甲氨基)-1-((苯基硫烷基)

甲基)丙基)氨基)-3-硝基苯磺酰胺,其与 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bcl-w 各自结合。另一种 Bcl-2 家族抑制剂是 ABT-263, N-(4-(4-((2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己-1-烯-1-基)甲基)哌嗪-1-基)苯甲酰基)-4-(((1R)-3-(吗啉-4-基)-1-((苯基硫烷基)甲基)丙基)氨基)-3-((三氟甲基)磺酰基)苯磺酰胺。ABT-263 的化学结构与 ABT-737 有关,并且其化学结构显示于式(I)中:



本发明的测定可以与靶向的癌症疗法一起使用,例如对于小细胞肺癌和淋巴瘤靶向的疗法。测定可以关于其中与 Bcl-x_L 扩增有关的任何癌症类型进行。此种癌症的其他例子包括上皮癌例如前列腺癌、卵巢和食道癌。本发明的测定对任何类型的患者组织样品或其衍生物执行,包括外周血,肿瘤或可疑肿瘤组织(包括新鲜冷冻和固定的石蜡包埋的组织),细胞分离物例如在血液样品、淋巴结组织、骨髓和细针抽吸物中分离或鉴定的循环上皮细胞。

[0037] Bcl-2 (也称为 BCL2)意指人 B 细胞 CLL/ 淋巴瘤 2 基因;Bcl-x_L (也称为 BCL2L1)意指人 BCL2 样 1 基因;Bcl-w (也称为 BCL2L2)意指人 BCL2 样 2 基因。

[0038] “特异性杂交”指核酸与第二种核酸可检测且特异性结合的能力。在使通过非特异性核酸的可检测结合的可估计量降到最低的杂交和洗涤条件下,多核苷酸与靶核酸链特异性杂交。

[0039] “靶序列”或“靶核酸序列”意指包含例如基因或其互补体或片段的核酸序列,其使用多核苷酸引物或探针扩增、检测或两者。另外,虽然术语靶序列有时指双链核酸序列;但靶序列还可以是单链的。在其中靶是双链的情况下,多核苷酸引物序列优选扩增靶序列的 2 条链。可以选择对于特定生物或多或少特异的靶序列。例如,靶序列可以对于生物整个属、超过一个属、物种或亚种、血清群 (serogroup)、营养型、血清型、品系、分离物或其他亚型是特异的。

[0040] “测试样品”意指得自受试者的样品或生物学流体,其中样品可以包含靶序列。测试样品可以得自任何来源,例如组织、血液、唾液、痰、粘液、汗、尿、尿道拭子、子宫颈拭子、泌尿生殖或肛门拭子、结膜拭子、眼睛晶状体流体、脑脊髓液等。测试样品可以 (i) 如得自来源那样直接使用;或 (ii) 在预处理后使用,以修饰样品的特征。因此,测试样品可以在使用前进行预处理,通过例如由血液制备血浆或血清,破裂细胞或病毒颗粒,由固体材料制备液体,稀释粘性流体,过滤液体,添加试剂,纯化核酸等。

[0041] “受试者”包括哺乳动物、鸟类或爬行动物。受试者可以是牛、马、犬、猫或灵长类动物。受试者还可以是人。受试者可以是活的或死的。

[0042] “多核苷酸”是核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、修饰的 RNA 或 DNA、或 RNA 或 DNA 模拟物(例如 PNAs)及其衍生物和其同源物的核酸聚合物。因此,多核苷酸包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷间(主链)键组成的聚合物,以及相似作用的具有非天然存在部分的聚合物。此种修饰或取代的核酸聚合物是本领域众所周知的,并且被称为“类似物”。寡核苷酸一般是约 10 到最高达约 160 或 200 个核苷酸的短多核苷酸。

[0043] “变体多核苷酸”或“变体核酸序列”意指与给定核酸序列具有至少约 60%核酸序列同一性,更优选至少约 61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%核酸序列同一性,且更加优选至少约 99%核酸序列同一性的多核苷酸。变体不包含天然核苷酸序列。

[0044] 一般地,变体多核苷酸长度至少约 8 个核苷酸,经常长度至少约 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60 个核苷酸,或甚至长度约 75-200 个核苷酸或更多。

[0045] 就核酸序列而言的“百分比(%)核酸序列同一性”定义为,在比对序列和若需要则引入缺口,以达到最大限度的百分比序列同一性后候选序列中与目的序列中的核苷酸等同的核苷酸百分比。为了测定%核酸序列同一性目的的比对可以在本领域技术内的各种方式达到,例如使用可公开获得的计算机软件,例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括达到在被比较的序列全长上的最大限度比对所需的任何算法。

[0046] 当比对核苷酸序列时,对于、关于或针对给定核酸序列 D 的给定核酸序列 C 的%核酸序列同一性(其可以可替代地用短语表示为具有或包括对于、关于或针对给定核酸序列 D 的特定%核酸序列同一性的给定核酸序列 C)可以如下计算:

$$\% \text{核酸序列同一性} = W/Z \times 100$$

其中

W 是通过序列比对程序或算法的 C 和 D 比对评分为等同匹配的核苷酸数目
和

Z 是 D 中的核苷酸总数目。

[0047] 当核酸序列 C 的长度不等同于核酸序列 D 的长度时, C 与 D 的%核酸序列同一性将不等同于 D 与 C 的%核酸序列同一性。

[0048] “基本上由具有%序列同一性的多核苷酸组成”意指多核苷酸在长度中没有相当大不同,但在序列中可能相当大地不同。因此,基本上由与 100 个核苷酸的已知序列“B”具有至少 80%序列同一性的多核苷酸组成的多核苷酸“A”意指多核苷酸“A”约 100 个 nts 长,但最高达 20 个 nts 可以与“B”序列不同。正被讨论的多核苷酸序列可以更长或更短,这是由于末端的修饰,例如 1-15 个核苷酸的添加,以产生特定类型的探针、引物和其他分子工具等,例如当添加基本上非等同的序列以产生预期二级结构时的情况。当序列通过“基本上由……组成”修饰时,此种非等同核苷酸在序列同一性计算中不予以考虑。

[0049] 单链 DNA 与互补片段杂交的特异性由反应条件的严格性决定。杂交严格性随着形成 DNA 双链体的倾向降低而增加。在核酸杂交反应中,可以选择严格性以支持特异性杂交(高严格性)。较不特异的杂交(低严格性)可以用于鉴定相关但并非确切的 DNA 分子(同源

但并非等同)或区段。

[0050] DNA 双链体通过下述得到稳定:(1)互补碱基对数目,(2)碱基对类型,(3)反应混合物的盐浓度(离子强度),(4)反应温度,和(5)降低 DNA 双链体稳定性的特定有机溶剂例如甲酰胺的存在。通常方法是改变温度:更高的相对稳定导致更严格的反应条件。(Ausubel 等人,1987)提供杂交反应的严格性的极佳解释。

[0051] 在“严格条件”下的杂交意指其中彼此至少 60%同源的核苷酸序列保持杂交的杂交规程。

[0052] 多核苷酸可以包括其他附加基团,例如肽(例如用于在体内靶向宿主细胞受体),或促进跨越细胞膜的转运的试剂。此外,寡核苷酸可以用杂交触发的切割试剂(van der Kroel 等人,1988)或嵌入剂(intercalculating agents)(Zon,1988)进行修饰。寡核苷酸可以与另一种分子缀合,例如肽、杂交触发的交联剂、转运试剂、杂交触发的切割试剂等。

[0053] 有用的多核苷酸类似物包括具有修饰的主链或非天然核苷间键的聚合物。修饰的主链包括保留主链中的磷原子的那些,例如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯,以及不再具有磷原子的那些,例如通过短链烷基或环烷基核苷间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或一种或多种短链杂原子或杂环核苷间键形成的主链。修饰的核酸聚合物(类似物)可以包含一种或多种修饰的糖部分。

[0054] 其中核苷酸单位的糖和核苷间键由新基团替换的作为 RNA 或 DNA 模拟物的类似物也是有用的。在这些模拟物中,维持碱基单位用于与靶序列杂交。已显示具有极佳杂交性质的此种模拟物的例子是肽核酸(PNA)(Buchardt 等人,1992;Nielsen 等人,1991)。

[0055] 核苷酸的范畴包括其中核酸分子已通过取代、化学、酶促或其他合适方法用除天然存在的核苷酸外的部分共价修饰的衍生物。

[0056] 多核苷酸包括与靶序列特异性杂交的引物,包括核酸序列的类似物和/或衍生物及其同源物。

[0057] 多核苷酸可以通过常规技术进行制备,例如使用商购可得设备的固相合成,例如可从 Applied Biosystems USA Inc. (Foster City, CA;USA)、DuPont (Wilmington, DE;USA)或 Milligen (Bedford, MA;USA)获得的那种。修饰的多核苷酸例如硫代磷酸酯和烷基化衍生物还可以通过本领域已知的相似方法容易地制备(Fino,1995;Mattingly,1995;Ruth,1990)。

[0058] “基因”指表达特定蛋白质的核酸片段,包括在编码序列前(5'非编码序列)和后(3'非编码序列)的调节序列。

[0059] “天然基因”指如在自然界中与其自身调节序列一起发现的基因。相比之下,“嵌合构建体”指在自然界中正常未一起发现的核酸片段的组合。因此,嵌合构建体可以包括衍生自不同来源的调节序列和编码序列,或衍生自相同来源但以与自然界中正常发现的那种不同的方式排列的调节序列和编码序列。(术语“分离的”意指序列从其天然环境中取出)。

[0060] 如本文使用的,“探针”或“引物”是长度至少 8 个核苷酸且与靶序列形成杂交体结构的多核苷酸,这是由于探针或引物中的至少一个序列与靶区域中的序列的互补性。探针的多核苷酸区可以由 DNA 和/或 RNA 和/或合成核苷酸类似物组成。优选地,探针不包含与在聚合酶链反应过程中用于引发靶序列的一个或多个序列互补的序列。

[0061] “表达”指功能终产物的产生。基因的表达涉及基因的转录和 mRNA 翻译成前体或成熟蛋白质。“反义抑制”指能够抑制靶蛋白质表达的反义 RNA 转录物的产生。“共抑制”指能够抑制等同或基本上相似的外来或内源基因表达的有义 RNA 转录物的产生(美国专利号 5, 231, 020)。

[0062] “重组体”指 2 个否则分离的序列区段的人工组合,例如通过化学合成或通过经由基因工程技术操作核酸的分离的区段。

[0063] “PCR”或“聚合酶链反应”是用于合成大量特定 DNA 区段的技术,由一系列重复的循环组成(Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT)。一般地,使双链 DNA 热变性,与靶区段的 3' 边界互补的 2 个引物在低温退火,并且随后在中间温度延伸。一组这 3 个连续步骤被称为循环。

[0064] PCR 是通过模板的反复复制,在短时间段内用于将 DNA 扩增数百万倍的强大技术。(Mullis 等人, 1986);Erlich 等人,欧洲专利申请号 50, 424 ;欧洲专利申请号 84, 796 ;欧洲专利申请号 258, 017, 欧洲专利申请号 237, 362 ;欧洲专利申请号 201, 184, 美国专利号 4, 683, 202 ;美国专利号 4, 582, 788 ;和美国专利号 4, 683, 194)。该方法使用特定体外合成的寡核苷酸组以引发 DNA 合成。引物的设计取决于待分析的 DNA 序列。该技术通过在高温使模板解链、允许引物与模板内的互补序列退火,并且随后用 DNA 聚合酶复制模板的许多循环(通常 20-50 个)执行。

[0065] PCR 反应的产物可以通过在琼脂糖凝胶中分离随后为溴化乙锭染色和用 UV 透照显现进行分析。可替代地,放射性 dNTPs 可以添加到 PCR 中,以将标记掺入产物内。在这种情况下,PCR 的产物通过使凝胶暴露于 x 射线片进行显现。放射性标记 PCR 产物的添加的优点是可以定量个别扩增产物的水平。

[0066] 实践本发明

多核苷酸测定

在本发明中有用的核酸测定法包括通过下述检测扩增的 DNA 区域:(i) 对于完整组织或细胞样品的原位杂交测定,(ii) 对于从组织样品中提取的染色体 DNA 的微阵列杂交测定,和(iii) 对于从组织样品中提取的染色体 DNA 的聚合酶链反应(PCR)或其他扩增测定。还可以使用在这些形式中的任何一种中使用核酸的合成类似物例如肽核酸的测定。

[0067] 本发明的测定用于鉴定扩增的 Bcl-x_L 区域,从而导致 Bcl-x_L 拷贝数生物标记中的增加,用于预测治疗应答和用于监控对于 Bcl-2 家族抑制剂疗法的患者应答。对于应答预测的测定可以在疗法开始前运行,并且显示一个或多个 Bcl-x_L 区域中的扩增的患者对于接受 Bcl-2 家族抑制剂疗法是合格的。拷贝数增益还可以指示对于其他癌症疗法的抗性,例如化学疗法或放射疗法。对于监控患者应答,测定在疗法起始时运行,以确立组织样品中的生物标记的基线水平,例如显示样品中的拷贝数增益的总细胞百分比或细胞数目。随后取样且测定相同组织,并且使生物标记的水平与基线比较。当水平保持相同或降低时,疗法可能是有效的且可以继续。当发生超过基线水平的显著增加时,患者可能不响应。

[0068] 本发明包括通过杂交测定检测基因组生物标记,其中使用基于可检测标记的核酸的探针,例如脱氧核糖核酸(DNA)探针或蛋白质核酸(PNA)探针,或设计 / 选择为与特定设计的染色体靶杂交的未标记的引物。未标记的引物在扩增测定中使用,例如通过聚合酶链反应(PCR),其中在引物结合后,聚合酶扩增靶核酸序列用于后续检测。在 PCR 或其他扩增

测定中使用的检测探针优选是荧光的,并且更加优选地,在“实时 PCR”中有用的检测探针。荧光标记对于在原位杂交中的使用也是优选的,但还可以使用在杂交技术中常用的其他可检测标记,例如酶促、生色和同位素标记。有用的探针标记技术在文献中描述(Fan, 2002)(引入作为参考)。在通过微阵列分析检测基因组生物标记中,应用这些探针标记技术,以标记来自患者样品的染色体 DNA 提取物,其随后与微阵列杂交。

[0069] 关于人 Bcl-x_L 的多核苷酸序列(SEQ ID NO:1 ;GenBank 登记号 NM_138578)显示于表 1 中。

表I

人Bcl-x_L的多核苷酸序列 (SEQ ID NO:1; GenBank登记号NM_138578)

ggaggaggaa	gcaagcgagg	gggctgggtc	ctgagcttcg	caattcctgt	gtcgccctct	60
gggctcccag	cctgccgggt	cgcatgatcc	ctcgggccgg	agctggtttt	tttgccagcc	120
accgcgaggg	cggctgagtt	acgggcatec	cgcagccac	ctcctctccc	gacctgtgat	180
acaaaagatc	ttcggggggc	tgcacctgcc	tgcctttgcc	taaggcggat	ttgaatctct	240
ttctctccct	tcagaatctt	atcttggctt	tggatcttag	aagagaatca	ctaaccagag	300
acgagaactca	gtgagtgagc	aggtgttttg	gacaatggac	tggttgagcc	catccctatt	360
ataaaaatgt	ctcagagcaa	cggggagctg	gtggttgact	ttctctccta	caagctttcc	420
cagaaaggat	acagctggag	tcagtttagt	gatgtggaag	agaacaggac	tgaggcccca	480
gaagggactg	aatcggagat	ggagaccccc	agtgccatca	atggcaacct	atcctggcac	540
ctggcagaca	gccccgggt	gaatggagcc	actggccaca	gcagcagttt	ggatgcccg	600
gaggtgatcc	ccatggcagc	agtaaagcaa	gcgctgaggg	aggcaggcga	cgagtttgaa	660
ctgcggtacc	ggcgggcatt	cagtgaacct	acatcccagc	tcacatcac	cccagggaca	720
gcataatcaga	gotttgaaca	ggtagtgaat	gaactcttcc	gggatggggg	aaactggggg	780
cgcattgttg	cccttttctc	cttcggcggg	gcactgtgcg	tggaaagcgt	agacaaggag	840
atgcaggtat	tggtagtg	gatgcagct	tggatggcca	cttacctgaa	tgaccaccta	900
gagccttgga	tcaggagaa	cggcggctgg	gatacttttg	tggaaactcta	tgggaacaat	960
gcagcagccg	agagccgaaa	gggcaggaa	cgcttcaacc	gctggttcct	gacgggcagt	1020
actgtggccg	gogtgggtct	gctgggctca	ctcttcagtc	ggaaatgacc	agacactgac	1080
catccactct	accctcccac	ccccttctct	gctccaccac	atcctccgtc	cagccgccat	1140
tgccaccagg	agaaccacta	catgcagccc	atgccacact	gcccacaca	gggttggggc	1200
cagatctggt	cccttgccagc	tagttttcta	gaatttatca	cacttctgtg	agacccccac	1260
acctcagttc	ccttggcctc	agaattcaca	aaatttccac	aaaatctgtc	caaaggaggc	1320
tggcaggtat	ggaaggggtt	gtggctgggg	gcaggagggc	cctacctgat	tggtgcaacc	1380
cttaccctct	agcctccctg	aaaatgtttt	tctgccaggg	agcttgaaag	ttttcagaac	1440
ctcttcccca	gaaaggagac	tagattgcct	ttgttttgat	gtttgtggcc	tcagaattga	1500
tcattttccc	cccactctcc	ccacaactaac	ctgggttccc	tttcttcca	tcctacccc	1560
ctaagagoca	tttagggggc	acttttgact	agggattcag	gctgcttggg	ataaagatgc	1620
aaggaccagg	actccctcct	caactctgga	ctggctagag	tcctcactcc	cagtccaaat	1680
gtcctccaga	agcctctggc	tagaggccag	ccccaccag	gagggagggg	gctatagcta	1740
caggaagcac	cccatgccaa	agctaggggt	goccttgacg	ttcagcacca	ccctagtccc	1800
ttccctccc	tggtcccct	gaccatactg	agggaccaac	tgggccaag	acagatgccc	1860
cagagctggt	tatggcctca	gctgcctcac	ttcctacaag	agcagcctgt	ggcatctttg	1920
ccttgggctg	ctcctcatgg	tgggttcagg	ggactcagcc	ctgaggtgaa	agggagctat	1980
caggaacagc	tatgggagcc	ccaggtctt	ccctacctca	ggcaggaagg	gcaggaagga	2040
gagcctgctg	catgggggtg	ggtagggctg	actagaaggg	ccagtctctg	ctggccaggc	2100

```

agatctgtgc cccatgectg tccagcctgg gcagccaggc tgccaaggcc agagtggcct 2160
ggccaggagc tcttcaggcc tccctctctc ttctgtccca ccttggcct gtctcatccc 2220
cagggggtccc agccaccccg ggctctctgc tgtacatatt tgagactagt ttttattcct 2280
tgtgaagatg atatactatt tttgttaagc gtgtctgtat ttatgtgtga ggagctgctg 2340
gcttgcagtg cgcgtgcacg tggagagctg gtgcccgag attggacggc ctgatgctcc 2400
ctcccctgcc ctgggtccagg gaagctggcc gagggtcctg gctcctgagg ggcactctgc 2460
cctcccccaa cccccacccc acacttggtc cagctctttg aaatagtctg tgtgaagggtg 2520
aaagtgcagt tcagtaataa actgtgttta ctcagtgaag aaaaaaaaaa aaaaa 2575

```

[0070] 优选地, 原位杂交用于检测在 Bcl-2 基因座以及通过探针 A_67_P04742617 和 A_53_P174456(可从 Agilent(Santa Clara, CA) 获得; 小鼠 CGH 微阵列 244A, 目录号 G4415A) 限定的基因座上的染色体拷贝数增加或基因扩增的存在。引物和探针可以通过本领域技术人员使用 SEQ ID NO:1 的序列进行制备。

[0071] 用于在本发明的原位杂交法中使用的探针归入 2 个广泛组: 染色体列举探针, 即与染色体区域通常为重复序列区域杂交, 并且指示整个染色体的存在或不存在的探针; 和基因座特异性探针, 即与在染色体上的特异性基因座杂交且检测特异性基因座的存在或不存在的探针。还可以使用染色体臂探针, 即与染色体区域杂交且指示特异性染色体的臂的存在或不存在的探针。优选使用可以检测在询问的基因座例如 Bcl-x_L 上的独特染色体 DNA 序列的改变的基因座特异性探针。关于使用独特序列探针用于原位杂交的方法在引入本文作为参考的美国专利 5, 447, 841 中描述。

[0072] 染色体列举探针可以与重复序列杂交, 所述重复序列位于着丝粒附近或从着丝粒中去除, 或可以与位于染色体上的任何位置的独特序列杂交。例如, 染色体列举探针可以与和染色体的着丝粒结合的重复 DNA 杂交。灵长类动物染色体的着丝粒包含含约 171 个碱基对的单体重复长度的 DNA 的长串联重复的复杂家族, 其被称为 α -卫星 DNA。针对染色体 14 和 18 各自的着丝粒荧光原位杂交探针从 Abbott Molecular (Des Plaines, IL) 商购可得。

[0073] 特别有用的原位杂交探针是直接标记的荧光探针, 例如引入本文作为参考的美国专利 5, 491, 224 中描述的。美国专利 5, 491, 224 还描述了使用超过一种荧光标记的探针的同时 FISH 测定。

[0074] 有用的基因座特异性探针可以以任何方式产生, 并且一般包含与长约 10, 000 - 约 1, 000, 000 个碱基的染色体 DNA 靶序列杂交的序列。优选地, 探针与在长至少 100, 000 个碱基 - 长约 500, 000 个碱基的靶基因座上的染色体 DNA 的靶序列段杂交, 并且还包括在探针混合物中未标记的封闭核酸, 如引入本文作为参考的美国专利 5, 756, 696 中公开的, 以避免探针的非特异性结合。还可能使用未标记的、合成的寡聚核酸或肽核酸作为封闭核酸。对于靶向特定基因座, 优选探针包括这样的核酸序列, 其跨越基因且从而与基因的整个基因组编码基因座的两侧杂交。探针可以从含人 DNA 的克隆例如细菌人工染色体 (BAC's) 等开始产生。用于人基因组的 BAC 文库可从 Invitrogen (Carlsbad, CA) 获得, 并且可以被进行研究用于有用克隆的鉴定。优选使用 University of California Santa Cruz Genome Browser, 以鉴定在靶基因座中的 DNA 序列。这些 DNA 序列随后可以用于合成 PCR 引物用于筛选 BAC 文库, 以鉴定有用克隆。克隆随后可以通过常规切口平移法进行标

记,并且作为原位杂交探针进行测试。

[0075] 可以在本文描述的原位杂交方法中使用的荧光团的例子是:7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸(AMCA), Texas Red™(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR);5-(和-6)-羧基-X-罗丹明;丽丝胺罗丹明 B,5-(和-6)-羧基荧光素;荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC);7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸,四甲基-罗丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯;5-(和-6)-羧基四甲基罗丹明;7-羟基-香豆素-3-羧酸;6-[荧光素 5-(和-6)-羧酰胺]己酸;N-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4-bora-3a,4a-二氮杂-3-indacene)丙酸;伊红-5-异硫氰酸酯;赤藓红-5-异硫氰酸酯;5-(和-6)-羧基罗丹明 6G;和 Cascade™ 蓝色乙酰叠氮化物(aectylazide)(Molecular Probes;Invitrogen 品牌)。

[0076] 探针可以用荧光显微镜和关于每种荧光团的合适滤光片观察,或通过使用双重或三重带通滤光片组以观察多重荧光团。参见例如,给予 Bittner 等人的美国专利号 5,776,688,其引入本文作为参考。任何合适的显微成像法都可以用于显现杂交的探针,包括自动化数字图像系统。可替代地,技术例如流式细胞术可以用于检查染色体探针的杂交模式。

[0077] 尽管由原位杂交产生的逐细胞(cell-by-cell)的基因扩增分析是优选的,但基因组生物标记还可以通过定量 PCR 进行检测。在这个实施方案中,从组织样品中提取染色体 DNA,并且随后通过 PCR 扩增,其中使用对于 Bcl-2、Bcl-x_L 或 Bcl-w 中的至少一种特异性的一对引物,或通过多重 PCR 扩增,其中使用多对引物。可以使用用于生物标记的任何引物序列。组织的拷贝数随后通过与参考扩增标准比较进行测定。

[0078] 还可以使用微阵列拷贝数分析。在这个实施方案中,在提取后的染色体 DNA 进行标记,用于与包括底物的微阵列杂交,所述底物具有以最高达几百万探针/平方厘米的底物表面的探针密度排列的多重固定的未标记的核酸探针。存在多重微阵列形式,并且可以使用这些中的任何一种,包括基于 BAC's 和寡核苷酸的微阵列,例如可从 Agilent Technologies (Palo Alto;CA)和 Affymetrix (Santa Clara;CA)获得的那些。当使用寡核苷酸微阵列检测扩增时,优选使用具有针对靶向的区域中的超过 3 个分开位置的探针序列的微阵列。

[0079] 检测表达:mRNA

Bcl-x_L 的基因表达水平可以通过评估测试样品中的一种或多种 mRNAs 的量进行测定。测量样品中的 mRNA 的方法是本领域已知的。为了测量 mRNA 水平,可以裂解测试样品中的细胞,并且通过本领域技术人员熟悉的任何多种方法可以测量裂解物中的 mRNA 水平或从裂解物中纯化或半纯化的 RNA 中的 mRNA 水平。此种方法包括使用可检测标记的 DNA 或 RNA 探针的杂交测定(即 RNA 印迹),或使用合适的寡核苷酸引物的定量或半定量 RT-PCR 方法。可替代地,使用例如组织切片或未裂解的细胞悬浮液和可检测标记的(例如荧光或酶标记的)DNA 或 RNA 探针,可以执行定量或半定量原位杂交测定。用于定量 mRNA 的另外方法包括 RNA 保护测定(RPA)、cDNA 和寡核苷酸微阵列、代表性差别分析(RDA)、差别展示、EST 序列分析和基因表达的系列分析(SAGE)。

[0080] 在合适的实施方案中,PCR 扩增用于检测测试样品中的 Bcl-x_L 基因。简言之,在 PCR 中,制备 2 种引物序列,其与标记序列例如 Bcl-x_L 基因的相反互补链上的区域互补。将过量脱氧核苷酸三磷酸连同 DNA 聚合酶例如 Taq 聚合酶一起添加到反应混合物中。如果靶

序列存在于样品中,那么引物将与序列结合,并且聚合酶将通过添加核苷酸引起引物沿着标记序列延伸。通过升高和降低反应混合物的温度,延伸的引物将与标记解离,以形成反应产物,过量引物将与标记和反应产物结合,并且重复该过程,从而生成扩增产物。可以执行逆转录酶 PCR 扩增程序,以定量扩增的 mRNA 量。

[0081] 可以扩增且检测 Bcl-x_L 基因的任何合适片段。设计用于 PCR 的有效引物在本领域普通技术内。一般地,用于检测的扩增片段长度约 50 - 300 个核苷酸。

[0082] 扩增产物可以以几种方式进行检测。扩增产物可以通过样品在凝胶中的电泳,并且随后用 DNA 结合染料例如溴化乙锭染色进行显现。可替代地,扩增产物可以用放射性或荧光核苷酸进行整合地标记,并且随后使用 x 射线片或在合适的刺激谱下显现。

[0083] 扩增还可以使用“实时”法进行监控。实时 PCR 允许检测和定量核酸靶。一般地,定量 PCR 的这种方法利用荧光染料,其可以是双链特异性染料,例如 SYBR GREEN®. I.。可替代地,其他荧光染料(例如 FAM 或 HEX)可以与寡核苷酸探针或引物缀合。能够执行实时 PCR 的各种仪器是本领域已知的,并且包括例如 ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems) 和 LIGHTCYCLER® 系统(Roche)。在 PCR 的每个循环生成的荧光信号与 PCR 产物的量成比例。荧光与循环数目比较的图用于描述扩增的动力学,并且荧光阈值水平用于限定与初始模板浓度相关的分数循环数目。当在能够在热循环过程中阅读荧光的仪器上执行且检测扩增时,预期 PCR 产物可以使用解链分析与非特异性 PCR 产物加以区分。通过在扩增和信号生成后测量荧光中的变化同时逐渐增加反应的温度,可能测定一种或多种预期产物的 T_m 以及非特异性产物的那种。

[0084] 该方法可以包括扩增样品中的多种核酸,也称为“多重检测”或“多重化(multiplexing)”。“多重 PC”指涉及将超过一组 PCR 引物添加到反应中的 PCR,以检测且定量多重核酸,包括来自一种或多种靶基因标记的核酸。此外,用内部对照(例如 18S rRNA、GADPH 或 0-肌动蛋白)的多重化提供了无需反应用于 PCR 的对照。

[0085] 检测表达:多肽

本发明的方法和测定还部分涉及评价多肽表达,例如监控 Bcl-x_L 多肽表达。多肽表达的量可以进行定性或定量评估。在其他实施方案中,多肽表达的量在非肿瘤或癌细胞和肿瘤或癌细胞之间进行比较。本领域已知的任何方法都可以用于这点,但尤其方便的是免疫测定,其中使用与 Bcl-x_L 多肽特异性结合的抗体。商购可得的抗 Bcl-x_L 抗体的例子显示于表 3 中。

表3 商购可得的抗Bcl-x _L 抗体			
抗原	来源	目录号	类型*
Bcl-x _L	Trevigen (Gaithersburg, MD)	2300-MC	mAb
	Calbiochem (San Diego, CA)	AM05	mAb
	Sigma (St. Louis, MO)	B9429	mAb
	AnaSpec (San Jose, CA)	54177	pAb
* mAb, 单克隆抗体; pAb, 多克隆抗体。			

[0086] 存在 2 种基本类型的免疫测定, 竞争性和非竞争性的(例如分别地免疫测量(immunometric) 和夹心)。在 2 种测定中, 抗体或抗原试剂与固相共价或非共价附着。用于共价附着的连接试剂是已知的, 并且可以是固相的部分或在包被前衍生为其。在免疫测定中使用的固相的例子是多孔和无孔材料、胶乳颗粒、磁性颗粒、微粒、条、珠、膜、微量滴定孔和塑料管。固相材料和可检测标记抗原或抗体试剂的方法的选择基于所需测定形式性能特征决定。对于一些免疫测定, 不需要可检测标记。例如, 如果抗原在可检测颗粒例如红细胞上, 那么反应性可以基于凝集确立。可替代地, 抗原-抗体反应可以导致可见变化(例如径向免疫扩散)。在大多数情况下, 在免疫测定中使用的抗体或抗原试剂之一与信号生成化合物(可检测标记) 附着。这种信号生成化合物或标记自身是可检测的, 或可以与一种或多种另外化合物反应, 以生成可检测产物(还参见美国专利号 6, 395, 472 B1)。此种信号生成化合物的例子包括色原、放射性同位素(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 和 ^{14}C)、荧光化合物(例如荧光素、罗丹明)、化学发光化合物、颗粒(可见或荧光的)、核酸、络合剂、或催化剂例如酶(例如碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶和核糖核酸酶)。在酶使用的情况下, 生色底物、荧光底物或发光(lumo-genic) 底物的添加导致可检测信号的生成。其他检测系统例如时间分辨的荧光、内部反射荧光、扩增(例如聚合酶链反应) 和拉曼光谱学也是有用的。

[0087] 存在在人中常用于监控特异性抗体效价和类型的 2 种一般形式:(1) 抗原在固相上呈现, 如上所述, 允许包含特异性抗体的人生物学流体与抗原反应, 并且随后用与信号生成化合物偶联的抗人抗体检测与抗原结合的抗体, 和(2) 抗人抗体与固相结合, 允许包含特异性抗体的人生物学流体与结合的抗体反应, 并且随后添加与信号生成化合物附着的抗原, 以检测在流体样品中存在的特异性抗体。在 2 种形式中, 抗人抗体试剂可以识别所有抗体种类, 或可替代地, 对于特定种类或亚类的抗体特异, 这取决于预期测定目的。这些测定形式以及其他已知形式预期在本发明的范围内, 并且是本领域普通技术人员众所周知的。

[0088] 本文的任何示例性形式和根据本发明的任何测定或试剂盒可以对于在自动化和半自动化系统中使用(包括其中存在包括微粒的固相的那些) 进行适应或最佳化, 如例如美国专利号 5, 089, 424 和 5, 006, 309 中所述的, 并且如例如由 Abbott Laboratories(Abbott Park, IL) 商业销售的, 包括但不限于 Abbott's ARCHITECT®、AxSYM、IMX、PRISM 和 Quantum II 平台, 以及其他平台。

[0089] 本发明的测定和试剂盒可以对于及时现场护理(point-of-care) 测定系统进行适应或最佳化, 包括 Abbott's Point of Care (i-STAT™) 电化学免疫测定系统。在单用途的测试设备中制造和操作其的免疫传感器和方法例如在美国专利号 5, 063, 081 和公开的美国专利申请号 20030170881、20040018577、20050054078 和 20060160164 (在其关于这点的教导方面引入本文作为参考) 中描述。

[0090] 样品处理和测定性能

待通过本发明的方法测定的组织样品可以包括任何类型, 包括外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、淋巴结样品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品、石蜡包埋的组织样品, 或由外周血样品、肿瘤组织或可疑肿瘤组织、薄层细胞学样品、细针抽吸物样品、骨髓样品、淋巴结样

品、尿样品、腹水样品、灌洗样品、食管刷洗样品、膀胱或肺洗涤样品、脊髓液样品、脑液体样品、导管抽吸物样品、乳头排出物样品、胸膜积液样品、新鲜冷冻组织样品或石蜡包埋的组织样品中的任何一种产生的提取物或加工的样品。例如，患者外周血样品可以最初进行处理，以提取上皮细胞群体，并且这种提取物随后可以进行测定。还可以使用组织样品的显微解剖，以获得富含可疑肿瘤细胞的细胞样品。用于在本文中使用的优选组织样品是外周血，肿瘤组织或可疑肿瘤组织，包括细针抽吸物、新鲜冷冻组织和石蜡包埋的组织，和骨髓。

[0091] 组织样品可以通过用于执行原位杂交或其他核酸测定的任何所需方法进行处理。对于优选的原位杂交测定，使石蜡包埋的肿瘤组织样品或骨髓样品固定在玻璃显微镜载玻片上，并且用溶剂一般为二甲苯脱蜡。用于组织脱蜡和原位杂交的有用规程可从 Abbott Molecular Inc. (Des Plaines, Illinois) 获得。任何合适的使用仪器或自动化可以用于本发明测定的执行中。基于 PCR 的测定可以在 m2000 仪器系统 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) 上执行。自动化成像可以用于优选的荧光原位杂交测定。

[0092] 在一个实施方案中，样品包括来自患者的外周血样品，其进行处理以产生在 Bcl-x_L 基因座上具有扩增的循环肿瘤或癌细胞的提取物。循环肿瘤细胞可以通过免疫磁性分离技术例如可从 Immunicon (Huntingdon Valley, Pennsylvania) 获得的那种进行分离。显示至少一个拷贝数增益的循环肿瘤细胞数目随后与优选在治疗开始时测定的具有拷贝数增加的循环肿瘤细胞的基线水平比较。此种循环肿瘤细胞数目中的增加可以指示治疗失败。

[0093] 测试样品可以包括对于临床诊断足够的许多细胞，并且一般包含至少约 100 个细胞。在一般的 FISH 测定中，杂交模式在约 25-1,000 个细胞中进行评估。当发现在足够比例的样品中包含基因扩增时，测试样品一般被视为“测试阳性的”。一般而言，关于染色体拷贝数鉴定的且用于将特定样品分类为阳性的细胞数目随着样品中的细胞数目而改变。用于阳性分类的细胞数目也称为截止值。可以在测定中使用的截止值的例子包括约 5、25、50、100 和 250 个细胞，或样品群体中的 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50% 和 60% 细胞。低至一个细胞可以足以将样品分类为阳性的。在一般的石蜡包埋的组织样品中，对于具有染色体拷贝数增益，优选将至少 30 个细胞鉴定为阳性的，并且更优选将至少 20 个细胞鉴定为阳性的。例如，在一般的石蜡包埋的小细胞肺癌组织中具有 Bcl-x_L 扩增的 30 个细胞的检测将足以将组织分类为阳性的并且对于治疗是合格的。

[0094] 测定试剂盒

在另一个方面，本发明包括用于检测基因组生物标记的试剂盒，其包括包含对于与 Bcl-x_L 结合特异性的至少一种探针的容器。这些试剂盒还可以包括具有用于测定的其他相关试剂的容器。本发明的优选试剂盒包括分别包含能够与 Bcl-x_L 特异性结合的至少一种 FISH 探针的容器。本发明的试剂盒可以包括核酸探针类似物，例如肽核酸探针。最后，试剂盒可以进一步包括使用说明书。

[0095] 参考文献

- Ashman, J.N., J. Brigham, M.E. Cowen, et al. 2002. Chromosomal alterations in small cell lung cancer revealed by multicolour fluorescent *in situ* hybridization. *Int J Cancer*. 102:230-6.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, et al. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Buchardt, O., P. Nielsen, and R. Berg. 1992. PEPTIDE NUCLEIC ACIDS.
- Chaudhary, K.S., P.D. Abel, and E.N. Lalani. 1999. Role of the Bcl-2 gene family in prostate cancer progression and its implications for therapeutic intervention. *Environ Health Perspect*. 107 Suppl 1:49-57.

- Cobleigh, M.A., C.L. Vogel, D. Tripathy, et al. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 17:2639-48.
- Coe, B.P., E.H. Lee, B. Chi, et al. 2006. Gain of a region on 7p22.3, containing MAD1L1, is the most frequent event in small-cell lung cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 45:11-9.
- Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22:8590-607.
- Fan, Y.-S. 2002. Molecular cytogenetics : protocols and applications. Humana Press, Totowa, N.J. xiv, 411 p. pp.
- Fino, J. US Patent No. 5,464,746. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR CARBAZOLE AND DIBENZOFURAN DERIVATIVES.
- Galteland, E., E.A. Sivertsen, D.H. Svendsrud, et al. 2005. Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. 19:2313-23.
- Jeffers, J.R., E. Parganas, Y. Lee, et al. 2003. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*. 4:321-8.
- Kim, Y.H., L. Girard, C.P. Giacomini, et al. 2006. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene*. 25:130-8.
- Lynch, T.J., D.W. Bell, R. Sordella, et al. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 350:2129-39.
- Martinez-Climent, J.A., A.A. Alizadeh, R. Segraves, et al. 2003. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood*. 101:3109-17.
- Mattingly, P. US Patent No. 5,424,414. 1995. HAPTENS, TRACERS, IMMUNOGENS AND ANTIBODIES FOR 3-PHENYL-A-ADAMANTANEACETIC ACIDS.
- Monni, O., H. Joensuu, K. Franssila, et al. 1996. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood*. 87:5269-78.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, et al. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73.
- Nielsen, P.E., M. Egholm, R.H. Berg, et al. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 254:1497-500.
- Nupponen, N.N., L. Kakkola, P. Koivisto, et al. 1998. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol*. 153:141-8.
- Ohmori, T., E.R. Podack, K. Nishio, et al. 1993. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 192:30-6.
- Olejniczak, E.T., C. Van Sant, M.G. Anderson, et al. 2007. Integrative genomic analysis of small-cell lung carcinoma reveals correlates of sensitivity to bcl-2 antagonists and uncovers novel chromosomal gains. *Mol Cancer Res*. 5:331-9.
- Oltersdorf, T., S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, et al. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 435:677-81.

- Pauletti, G., S. Dandekar, H. Rong, et al. 2000. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescent *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 18:3651-64.
- Ruth, J. US Patent No. 4,948,882. 1990. Ruth, J. 1990. SINGLE-STRANDED LABELED OLIGONUCLEOTIDES, REACTIVE MONOMERS AND METHODS OF SYNTHESIS.
- Shibue, T., K. Takeda, E. Oda, et al. 2003. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* 17:2233-8.
- van Delft, M.F., A.H. Wei, K.D. Mason, et al. 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* 10:389-99.
- van der Krol, A.R., J.N. Mol, and A.R. Stuitje. 1988. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques.* 6:958-76.
- Villunger, A., E.M. Michalak, L. Coultas, et al. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science.* 302:1036-8.
- Yasui, K., S. Mihara, C. Zhao, et al. 2004. Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res.* 64:1403-10.
- Zon, G. 1988. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res.* 5:539-49.

序列表

<110> Semizarov, Dimitri
Uziel, Tamar
Huang, David
Van Delft, Mark
Tse, Christin
Lesniewski, Richard R.

<120> 用于鉴定、分类和监控具有 BCL-2 家族抑制剂抗性肿瘤和癌症的受试者的方法和组合物

<130> 9778USL1

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2575

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

ggaggaggaa gcaagcgagg gggctggttc ctgagcttcg caattcctgt gtcgccttct 60

gggctcccag cctgccgggt cgcatgatcc ctccggccgg agctggtttt ttgcccagcc 120

accgcgaggc cggctgagtt accggcatcc ccgcagccac ctctctctcc gacctgtgat 180

acaaaagatc ttccgggggc tgcacctgcc tgcctttgcc taaggcggat ttgaatctct 240

ttctctccct tcagaatctt atcttggctt tggatcttag aagagaatca ctaaccagag 300

acgagactca gtgagtgagc aggtgttttg gacaatggac tggttgagcc catccctatt 360

ataaaaatgt ctgagagcaa ccgggagctg gtggttgact ttctctccta caagctttcc 420

cagaaaggat acagctggag tcagtttagt gatgtggaag agaacaggac tgaggcccca	480
gaagggactg aatcggagat ggagaccccc agtgccatca atggcaaccc atcctggcac	540
ctggcagaca gccccgcggt gaatggagcc actggccaca gcagcagttt ggatgcccg	600
gaggtgatcc ccatggcagc agtaaagcaa gcgctgaggg aggcaggcga cgagtttgaa	660
ctgcggtacc ggcgggcatt cagtgaacctg acatcccagc tccacatcac cccagggaca	720
gcata tcaga gctttgaaca ggtagtgaat gaactcttcc gggatgggggt aaactgggggt	780
cgcatgttg cctttttctc cttcggcggg gcactgtgcg tggaaagcgt agacaaggag	840
atgcaggtat tggtagtcg gatcgagct tggatggcca cttacctgaa tgaccaccta	900
gagccttga tccaggagaa cggcggctgg gatacttttg tggaactcta tgggaacaat	960
gcagcagccg agagccgaaa gggccaggaa cgcttcaacc gctggttcct gacgggcatg	1020
actgtggccg gcgtggttct gctgggctca ctcttcagtc ggaaatgacc agacactgac	1080
catccactct accctccac ccccttctct gctccaccac atcctccgtc cagccgccat	1140
tgccaccagg agaaccacta catgcagccc atgccacct gcccatcaca gggttgggcc	1200
cagatctggt cccttgcagc tagttttcta gaatttatca cacttctgtg agacccccac	1260
acctcagttc ccttggcctc agaattcaca aaatttcac aaaatctgtc caaaggaggc	1320
tggcaggtat ggaagggttt gtggctgggg gcaggagggc cctacctgat tgggtgaacc	1380
cttaccctt agcctccctg aaaatgtttt tctgccaggg agcttgaaag ttttcagaac	1440
ctcttcccca gaaaggagac tagattgcct ttgttttgat gtttgtggcc tcagaattga	1500
tcattttccc cccactctcc ccacactaac ctgggttccc tttcttcca tccctacccc	1560
ctaagagcca tttaggggcc acttttgact agggattcag gctgcttggg ataaagatgc	1620

aaggaccagg actccctcct cacctctgga ctggctagag tcctcactcc cagtccaaat	1680
gtcctccaga agcctctggc tagaggccag cccacccag gagggagggg gctatagcta	1740
caggaagcac cccatgccaa agctagggtg gcccttgca gttcagcacca ccctagtccc	1800
ttcccctccc tggctcccat gaccatactg agggaccaac tgggcccaag acagatgccc	1860
cagagctgtt tatggcctca gctgcctcac ttcctacaag agcagcctgt ggcatctttg	1920
ccttgggctg ctccctcatgg tgggttcagg ggactcagcc ctgaggtgaa agggagctat	1980
caggaacagc tatgggagcc ccagggtctt ccctacctca ggcaggaagg gcaggaagga	2040
gagcctgctg catgggggtg ggtagggtg actagaagg ccagtcctgc ctggccaggc	2100
agatctgtgc cccatgcctg tccagcctgg gcagccaggc tgccaaggcc agagtggcct	2160
ggccaggagc tcttcaggcc tccctctctc ttctgtcca cccttggcct gtctcatccc	2220
caggggtccc agccaccccg ggctctctgc tgtacatatt tgagactagt ttttattcct	2280
tgtgaagatg atatactatt ttgtttaagc gtgtctgtat ttatgtgtga ggagctgctg	2340
gcttgcaagt cgcgtgcacg tggagagctg gtgcccggag attggacggc ctgatgctcc	2400
ctcccctgcc ctggtccagg gaagctggcc gagggctctg gctcctgagg ggcatctgcc	2460
cctcccccaa cccccacccc acacttgctc cagctctttg aaatagtctg tgtgaaggtg	2520
aaagtgcagt tcagtaataa actgtgttta ctcagtga aa aaaaaaaaaa aaaaa	2575