



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012120722/15, 20.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.10.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.10.2009 US 61/253,393;
16.02.2010 US 61/305,084;
23.04.2010 US 61/327,487;
15.09.2010 US 61/383,037

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2013 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 2009108637 A1, 03.09.2009.
US2005214301 A1, 29.09.2005. WO 9853317 A1,
26.11.1998. WO 2007061684 A1, 31.05.2007.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.05.2012

(86) Заявка РСТ:
US 2010/053386 (20.10.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/050069 (28.04.2011)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

СИНГХ Шарат (US),
ЛИУ Ксиньдзунь (US)

(73) Патентообладатель(и):

НЕСТЕК С.А. (CN)

(54) СПОСОБЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОГЕННЫХ СЛИТЫХ БЕЛКОВ, ОСНОВАННЫЕ НА АНАЛИЗЕ
БЛИЗКОГО ВЗАИМНОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений раскрывает антительные матрицы для определения активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков в таких биологических образцах, как цельная кровь или раковая ткань, а также способы их применения. В некоторых случаях активационное состояние и/или общее количество онкогенного слитого белка в образце может быть измерено в сочетании

с одной или несколькими молекулами сигнальной трансдукции. Композиции и способы настоящего изобретения обладают преимуществами специфичности, связанной с ферментным иммуносорбентным анализом, чувствительности, связанной с амплификацией сигнала, и высокопроизводительного мультиплексирования, связанного с микроматрицами. 6 н. и 25 з.п. ф-лы, 32 ил., 10 пр., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012120722/15, 20.10.2010**

(24) Effective date for property rights:
20.10.2010

Priority:

(30) Convention priority:
20.10.2009 US 61/253,393;
16.02.2010 US 61/305,084;
23.04.2010 US 61/327,487;
15.09.2010 US 61/383,037

(43) Application published: **27.11.2013 Bull. № 33**

(45) Date of publication: **10.08.2015 Bull. № 22**

(85) Commencement of national phase: **21.05.2012**

(86) PCT application:
US 2010/053386 (20.10.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/050069 (28.04.2011)

Mail address:
**109012, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO "Sojuzpatent",
E.V.Vorob'evoy**

(72) Inventor(s):

**SINGK^h Sharat (US),
LIU Ksin'dzun' (US)**

(73) Proprietor(s):

NESTEK S.A. (CH)

(54) **METHOD OF DETECTING ONCOGENIC FUSED PROTEINS, BASED ON ANALYSIS OF CLOSE MUTUAL LOCATION**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: group of inventions discloses antibody matrices for the determination of an activation condition and/or the total quantity of one or several oncogenic fused proteins in such biological samples as whole blood or a cancer tissue, as well as methods of application thereof. In some cases the activation condition and/or the total quantity of oncogenic fused

protein in a sample can be measured in a combination with one or several molecules of signal transduction.

EFFECT: compositions and methods of the claimed invention possess advantages of specificity, associated with enzyme-linked immunosorbent assay, sensitivity, associated with signal amplification, and highly productive multiplexing, associated with micromatrices.

31 cl, 32 dwg, 10 ex, 3 tbl

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка претендует на приоритет от Предварительной заявки на патент США No. 61/253,393, поданной 20 октября 2009 г., Предварительной заявки на патент США No. 61/305,084, поданной 16 февраля 2010 г., Предварительной заявки на патент США No. 61/327,487, поданной 23 апреля 2010 г., и Предварительной заявки на патент США No. 61/383,037, поданной 15 сентября 2010 г., содержание которых включено путем ссылки во всей полноте на все случаи.

Уровень техники

Слитые белки, также известные как химерные белки, - это белки, созданные путем соединения двух или нескольких генов, кодирующих отдельные белки. Трансляция такого слитого гена дает один полипептид с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков. Химерные мутантные белки возникают тогда, когда крупномасштабная мутация, как правило, хромосомная транслокация, создает новую кодирующую последовательность, содержащую части кодирующих последовательностей из двух различных генов. Встречающиеся в природе слитые белки важны при раковых заболеваниях, когда они функционируют как онкобелки.

Слитый белок BCR-ABL является хорошо известным примером онкогенного слитого белка. Он считается основным онкогенным фактором хронической миелогенной лейкемии (CML), а также связан с острой лимфобластической лейкемией (ALL). Так, отличительным цитогенетическим признаком CML служит хромосома Philadelphia (Ph), которая вызывает образование слитого гена BCR-ABL, кодирующего белок в 210 кД. При этом возникающий слитый белок BCR-ABL является активной тирозинкиназой, которая играет решающую роль в патогенезе CML. Несмотря на то, что в настоящее время первейшим средством для новодиагностированных пациентов с CML является иматиниб (Gleevec®), около 20-25% больных не достигают стойких и полных цитогенетических ответов. Исследования показали, что главной причиной устойчивости при непрерывном лечении иматинибом является реактивация сигнального пути BCR-ABL. У большинства пациентов реактивация возникает вследствие мутаций в киназном домене BCR-ABL которые нарушают связывание иматиниба и вызывают устойчивость к препарату. При этом измерение активности BCR-ABL оказывается полезным для предсказания реакции на лечение такими ингибиторами тирозинкиназ, как иматиниб, а также для выявления пациентов, у которых возникает устойчивость к таким ингибиторам.

Существующие в настоящее время способы определения активности BCR-ABL основываются на измерении фосфорилированного CRKL (pCRKL), субстрата BCR-ABL. Например, в La Rosee et al. (Haematologica, 93:765-9 (2008)) описан анализ общих лизатов лейкоцитов методом Вестерн-блот с определением уровня pCRKL в качестве заменителя активности BCR-ABL (также см. Hochhaus et al., Leukemia, 16:2190-6 (2002); White et al., J. Clin. Oncol., 25:4445-51 (2007)). Аналогичным образом в Khorashad et al. (Haematologica, 94:861-4 (2009)) описан способ измерения уровня pCRKL на основе метода проточной цитометрии для оценки активности BCR-ABL (также см. Hamilton et al., Leukemia, 20:1035-9 (2006)). Однако эти способы не обладают той специфичностью и чувствительностью, которые необходимы для определения наличия или уровня активности BCR-ABL в образцах, так как они основываются на определении фосфорилирования белка-замениителя с помощью одного единственного антитела. Соответственно, необходимы специфические и чувствительные способы детектирования активности BCR-ABL, а также активности других онкогенных слитых белков для диагностических, прогностических и терапевтических целей. Настоящее изобретение

удовлетворяет эту потребность, а также дает и другие связанные с этим преимущества.

Сущность изобретения

Настоящим изобретением предусмотрены антительные матрицы для определения активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков в таких биологических образцах, как цельная кровь (например, в лизате, полученном из выделенных редких циркулирующих клеток или лейкоцитов) или раковая ткань (например, в тонкоигольном пункционном биоптате), и способы их применения. В некоторых случаях активационное состояние и/или общее количество онкогенного слитого белка(ов) в образце может быть измерено в сочетании с одной или несколькими молекулами сигнальной трансдукции. Композиции и способы настоящего изобретения обладают преимуществами специфичности, связанной с ферментным иммуносорбентным анализом, чувствительности, связанной с амплификацией сигнала, и высокопроизводительного мультиплексирования, связанного с микроматрицами.

В одном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения уровня или активационного состояния онкогенного слитого белка, который включает:

(а) контактирование клеточного экстракта с первой связывающей молекулой, специфичной к первому домену полноразмерного первого белка в условиях, подходящих для преобразования первого полноразмерного белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий первый полноразмерный белок и первую связывающую молекулу, причем первый домен первого полноразмерного белка отсутствует в соответствующем онкогенном слитом белке, содержащем второй другой домен первого полноразмерного белка, слитый с первым доменом второго другого полноразмерного белка;

(b) удаление из клеточного экстракта комплекса из стадии (а) с получением клеточного экстракта, лишенного первого полноразмерного белка;

(с) контактирование клеточного экстракта из стадии (b) со второй связывающей молекулой, специфичной ко второму другому домену первого полноразмерного белка в условиях, подходящих для преобразования онкогенного слитого белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, содержащий онкогенный слитый белок и вторую связывающую молекулу; и

(d) определение уровня или активационного состояния комплекса из стадии (с), тем самым определяя уровень или активационное состояние онкогенного слитого белка.

В определенных воплощениях определение уровня или активационного состояния онкогенного слитого белка включает измерение уровня экспрессии (например, концентрации) и/или активационного состояния (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка (например, в клеточном экстракте).

В предпочтительных воплощениях стадии (с) и (d) способа настоящего изобретения включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), метод проточной цитометрии, метод сортировки по тегам или метод двойного детектирования сближения, как описано здесь.

В одном определенном воплощении метода двойного детектирование сближения настоящим изобретением предусмотрен способ определения уровня и/или активационного состояния онкогенного слитого белка, который включает:

(а) инкубирование клеточного экстракта с серийными разведениями захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, с получением множества захваченных онкогенных слитых белков, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке, при этом онкогенный слитый белок содержит первый домен, соответствующий первому белку, и второй домен, соответствующий второму другому

белку, и при этом захватывающие антитела специфичны к первому домену слитого белка;

(b) инкубирование множества захваченных онкогенных слитых белков с по меньшей мере двумя типами детектирующих антител, специфичных ко второму домену онкогенного слитого белка, с получением множества детектируемых захваченных онкогенных слитых белков, причем детектирующие антитела включают:

(1) множество независимых от активационного состояния антител, помеченных содействующей молекулой, и

(2) множество зависимых от активационного состояния антител, помеченных первым членом пары амплификации сигнала,

причем содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(с) инкубирование множества детектируемых захваченных онкогенных слитых белков со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала; и

(d) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В другом определенном воплощении метода двойного детектирования сближения настоящим изобретением предусмотрен способ определения уровня и/или

активационного состояния онкогенного слитого белка, который включает:

(a) инкубирование клеточного экстракта с серийными разведениями захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, с получением множества захваченных онкогенных слитых белков, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке, при этом онкогенный слитый белок содержит первый домен, соответствующий первому белку, и второй домен, соответствующий второму другому белку, и при этом захватывающие антитела специфичны к первому домену слитого белка;

(b) инкубирование множества захваченных онкогенных слитых белков с по меньшей мере двумя типами детектирующих антител с получением множества детектируемых захваченных онкогенных слитых белков, причем детектирующие антитела включают:

(1) множество независимых от активационного состояния антител, помеченных содействующей молекулой, причем независимые от активационного состояния антитела специфичны к первому домену слитого белка, и

(2) множество зависимых от активационного состояния антител, помеченных первым членом пары амплификации сигнала, причем зависимые от активационного состояния антитела специфичны ко второму домену слитого белка,

причем содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(с) инкубирование множества детектируемых захваченных онкогенных слитых белков со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала; и

(d) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В другом аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации лечения и/или снижения токсичности у субъекта, страдающего раком и получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) измерение уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в клеточном экстракте описанным здесь способом;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка, измеренным ранее во время курса терапии; и

(е) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс лечения, исходя из сравнения на стадии (d).

В некоторых воплощениях определяется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции, присутствующих в клеточном экстракте, вдобавок к одному или нескольким онкогенным слитым белкам. Примеры молекул сигнальной трансдукции включают, без ограничения, рецепторные тирозинкиназы, нерецепторные тирозинкиназы, тирозинкиназы компонентов сигнального каскада и/или субстраты для одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, субстраты BCR-ABL). В некоторых случаях молекулы сигнальной трансдукции детектируются описанными здесь способами за исключением того, что, в зависимости от методики, на один и тот же белок направлены два антитела (т.е. захватывающее антитело и детектирующее антитело) или же три антитела (т.е. захватывающее антитело и два детектирующих антитела). В других случаях молекулы сигнальной трансдукции детектируются любым способом, известным специалистам в данной области. В некоторых воплощениях одна или несколько молекул сигнальной трансдукции, присутствующих в клеточном экстракте, детектируются в сочетании с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, используя описанные здесь методы (например, иммуноанализа).

В некоторых воплощениях настоящим изобретением также предусмотрены наборы для выполнения описанных здесь методов двойного детектирования сближения, включающие: (а) серийные разведения одного или нескольких захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке, причем захватывающие антитела специфичны к одному или нескольким анализируемым веществам (например, онкогенным слитым белкам или молекулам сигнальной трансдукции); и (b) несколько (например, по меньшей мере два типа) детектирующих антител для каждого анализируемого вещества. Наборы также могут необязательно содержать и другие реагенты, такие, к примеру, как первый и второй члены пары амплификации сигнала.

Другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения станут понятными специалистам из следующего подробного описания и фигур.

Краткое описание фигур

На фиг.1 представлено одно воплощение способа определения по настоящему изобретению, которое основывается на совместной локализации двух дополнительных детектирующих антител, соединенных с ферментами для последующего канализирования по каждому из связавшихся онкогенных слитых белков.

На фиг.2 представлена схема применения матриц изобретения для отбора лекарств на протяжении курса лечения рака.

На фиг.3A-D представлены различные воплощения способа определения по настоящему изобретению для выявления уровня экспрессии и активации таких онкогенных слитых белков, как BCR-ABL.

На фиг.4 представлен сигнал BCR-ABL в клетках K562 после удаления свободного BCR.

На фиг.5 представлен сигнал BCR в клетках K562 после удаления свободного BCR.

На фиг.6 представлено детектирование общего уровня и фосфорилированного BCR-

ABL в клетках K562.

На фиг.7 представлен уровень фосфорилирования ("фосфо-BCR-ABL") и общее количество («общий BCR-ABL») BCR-ABL при детектировании в клетках K562 из хронической миелогенной лейкемии человека с удалением или без удаления свободного

5 BCR с помощью шариков, конъюгированных с антителом против С-концевого BCR.

На фиг.8 представлен сигнал фосфорилированного BCR-ABL в клетках K562 с удалением или без удаления свободного BCR с помощью шариков, конъюгированных с антителом против С-концевого BCR. В частности, на фиг.8А представлено сравнение на микроматрице сигнала фосфорилированного BCR-ABL при определении в лизатах

10 клеток K562 с удалением или без удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.8 В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции

15 (ОЕФ) в зависимости от количества клеток.

На фиг.9 представлен общий сигнал BCR-ABL в клетках K562 с удалением или без удаления свободного BCR с помощью шариков, конъюгированных с антителом против С-концевого BCR. В частности, на фиг.9А представлено сравнение на микроматрице общего сигнала BCR-ABL при определении в лизатах клеток K562 с удалением или без

20 удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.9 В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в зависимости от

25 количества клеток.

На фиг.10 представлено удаление свободного полноразмерного BCR из экстракта клеток K562 после обработки клеточного экстракта шариками, конъюгированными с антителом против С-концевого BCR. В частности, на фиг.10А представлено сравнение на микроматрице общего сигнала BCR при определении в лизатах клеток K562 с

30 удалением или без удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.10 В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции

35 (ОЕФ) в зависимости от количества клеток.

На фиг.11 показано, что в лейкоцитах (WBCs) присутствуют свободные полноразмерные белки BCR и ABL, но не слитый белок BCR-ABL.

На фиг.12 показано, что свободный полноразмерный BCR, присутствующий в лейкоцитах, ингибирует сигнал фосфо-BCR-ABL в экстрактах клеток K562, когда в

40 такие экстракты клеток K562 добавляли экстракты лейкоцитов (WBCs).

На фиг.13 представлен общий сигнал BCR-ABL в клетках K562 с добавлением экстрактов WBCs после удаления свободного BCR с помощью шариков, конъюгированных с антителом против С-концевого BCR. В частности, из фиг.13А видно, что сигнал свободного BCR насыщается при добавлении в экстракты клеток

45 K562 экстрактов WBCs. После обработки шариками, конъюгированными с антителом против С-концевого BCR, свободный BCR удаляется. Из фиг.13 В видно, что в том же эксперименте сигнал BCR-ABL не изменяется при обработке или без обработки шариками.

На фиг.14 показано, что ингибитор BCR-ABL иматиниб (Gleevec®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562.

На фиг.15 показано, что ингибитор BCR-ABL нилотиниб (Tasigna®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562.

На фиг.16 показано, что ингибитор BCR-ABL дазатиниб (Sprycel®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562.

На фиг.17 показано, что CRKL присутствует и активируется (т.е. фосфорилируется) в клетках K562.

На фиг.18 показано, что CRKL присутствует в клетках A431 из эпидермоидной карциномы человека и активируется (т.е. фосфорилируется) после обработки EGF.

На фиг.19 показано, что CRKL присутствует в раковых клетках T47D эпителия молочных протоков человека, но не активируется (т.е. не фосфорилируется) после обработки EGF.

На фиг.20 показано, что CRKL присутствует в клетках T47D и активируется (т.е. фосфорилируется) на низком уровне после обработки херегулином (HRG).

На фиг.21 показано, что CRKL присутствует в клетках MCF-7 из аденокарциномы молочной железы человека и активируется (т.е. фосфорилируется) на низком уровне после обработки херегулином (HRG).

На фиг.22 показано присутствие активированного (т.е. фосфорилированного) CRKL в лейкоцитах (WBCs) от различных доноров.

На фиг.23 показано, что JAK2 активируется (т.е. фосфорилируется) в клетках K562 и клетках A431.

На фиг.24 показано, что фосфорилированный BCR-ABL можно детектировать и измерять в клеточных лизатах, приготовленных из клеток K562, выделенных из крови с помощью магнитных шариков анти-СВ45.

На фиг.25 показано, что общий уровень BCR-ABL не изменяется при нанесении антитела против С-концевой части нативного полноразмерного BCR (эта С-концевая часть отсутствует в BCR-ABL) на ту же пластинку в те же самые площадки, что и антитело против N-концевой части BCR-ABL.

На фиг.26 показано, что сигнал свободного нативного BCR, детектируемый с помощью антитела, специфичного к N-концевой части BCR, снижается при нанесении на ту же пластинку в те же самые площадки антитела против С-концевой части нативного BCR.

Раскрытие сущности изобретения

I. Введение

Гематологические раковые заболевания представляют собой такие типы рака, которые затрагивают кровь, костный мозг и лимфатические узлы. Поскольку все три непосредственно связаны через иммунную систему, то заболевание, затрагивающее одно из них, часто затрагивает и всех остальных. Например, хотя лимфома технически является заболеванием лимфатических узлов, но она часто распространяется на костный мозг и на кровь. Такие заболевания обычно вызывают хромосомные транслокации, создающие слитые белки с новыми кодирующими последовательностями, содержащими части кодирующих последовательностей из двух различных генов, но они реже вызывают образование твердых опухолей. При этом для того, чтобы обеспечить надлежащий прогноз и лечение пациентов с таким типом раковых заболеваний, важно установить

присутствие и/или активность онкогенных слитых белков, связанных с гематологическими раковыми заболеваниями.

Например, слитый белок BCR-ABL связан с хронической миелогенной лейкемией (CML), а также с острой лимфобластической лейкемией (ALL). В частности, белок BCR-ABL является активной тирозинкиназой, которая играет решающую роль в патогенезе CML. Несмотря на то, что в настоящее время первейшим средством для новодиагностированных пациентов с CML является иматиниб (Gleevec®), около 20-25% больных не достигают стойких и полных цитогенетических ответов. Исследования показали, что главной причиной устойчивости при непрерывном лечении иматинибом является реактивация киназной активности BCR-ABL. При этом измерение активности BCR-ABL оказывается полезным для предсказания реакции на лечение такими ингибиторами тирозинкиназ, как иматиниб, а также для выявления пациентов, у которых возникает устойчивость к таким ингибиторам.

Настоящим изобретением предусмотрен способ детектирования активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких слитых белков (одних или в комбинации с одной или несколькими молекулами сигнальной трансдукции) в выделенных клетках с помощью системы анализа матриц на основе антител. В описанных здесь способах особенно применимы клеточные экстракты, полученные из выделенных лейкоцитов, циркулирующих клеток или других типов клеток. В некоторых воплощениях мультиплексные высокопроизводительные способы иммуноанализа по настоящему изобретению способны детектировать активационное состояние одного или нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции на уровне единичных клеток. В самом деле, такие молекулы сигнальной трансдукции, как EGFR, можно детектировать с чувствительностью в 100 пептомоль и динамическим диапазоном линейности от 100 пептомоль до 100 фемтомоль. При этом детектирование в единичных клетках активационного состояния одного или нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции облегчает прогнозирование и диагностику раковых заболеваний, а также разработку персонализированной прицельной терапии.

На фиг.1 представлен типичный метод двойного детектирования сближения по настоящему изобретению, в котором онкогенный слитый белок типа BCR-ABL связывается с захватывающим антителом и двумя детектирующими антителами (т.е. независимым от активационного состояния антителом и зависимым от активационного состояния антителом). Захватывающее антитело 1 связывается с BCR-частью слитого белка независимо от его активационного состояния. В то время как независимое от активационного состояния антитело 2 связывается с ABL-частью слитого белка независимо от его активационного состояния, зависимое от активационного состояния антитело 3 связывается с ABL-частью слитого белка в зависимости от его активационного состояния (например, зависимое от активационного состояния антитело 4 будет связываться только с активированной формой BCR-ABL, содержащей фосфорилированный остаток). Независимое от активационного состояния антитело метится содействующей молекулой 4 («фермент А»), а зависимое от активационного состояния антитело метится первым членом пары амплификации сигнала 5 («фермент В»). Связывание обоих детектирующих антител с ABL-частью слитого белка приводит содействующую молекулу на достаточно близкое расстояние к первому члену пары амплификации сигнала, так что сигнал, генерированный содействующей молекулой, может канализироваться на первого члена пары амплификации сигнала, вызывая генерирование детектируемого и/или амплифицируемого сигнала. Различные методы

канализирования при сближении описаны здесь, а также известны в данной области, включая, без ограничения, FRET, FRET с временным разрешением флуоресценции, LOCI и др. Преимущество канализирования при сближении в применении к способам настоящего изобретения состоит в том, что отдельный детектируемый сигнал генерируется только для тех анализируемых веществ (например, слитых белков или молекул сигнальной трансдукции), с которыми свяжутся все три антитела, что приводит к повышению специфичности определения, снижению фона и упрощению детектирования.

Как разъясняется более подробно ниже, для оценки потенциальной противораковой терапии для индивидуального пациента можно проинкубировать выделенные клетки с одним или несколькими противораковыми препаратами при различных дозах. Затем можно провести стимуляцию фактором роста в течение нескольких минут (например, 1-5 мин) или нескольких часов (например, 1-6 ч). Дифференциальная активация сигнальных путей в присутствии и в отсутствие противораковых препаратов поможет выбрать подходящую противораковую терапию в надлежащей дозе для каждого индивидуального пациента. Также можно выделить клетки у пациента во время лечения противораковым препаратом и простимулировать их одним или несколькими факторами роста, чтобы определить, не следует ли произвести изменения в терапии. При этом из фиг.2 видно, что способы настоящего изобретения наилучшим образом помогают врачам обеспечить правильный противораковый препарат в нужной дозе в нужное время для каждого пациента.

II. Определения

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

Термин «рак» охватывает всех представителей класса заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток. Термин охватывает все известные раковые и неопластические заболевания, будь то злокачественные, доброкачественные, мягкие или твердые (солидные), а также рак на всех стадиях и всякой степени, включая пре- и пост-метастатический рак. Неограничивающими примерами различных типов рака являются гематологические злокачественности (например, лейкемия, лимфома); остеогенные саркомы (например, саркома Юинга); саркомы мягких тканей (например, выступающая дерматофибросаркома (DFSP), рабдомиосаркома); другие злокачественности мягких тканей, папиллярная карцинома щитовидной железы; рак простаты; рак желудка; рак молочной железы; рак легких (например, немелкоклеточный рак легких); рак пищеварительного тракта (например, рак толстой и прямой кишки, желудочно-кишечные стромальные опухоли, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак заднего прохода, рак желчных протоков и рак тонкой кишки); рак пищевода; рак желчного пузыря; рак печени; рак поджелудочной железы; рак червеобразного отростка (аппендикса); рак яичников; рак почек (например, почечно-клеточная карцинома); рак центральной нервной системы; рак кожи; хориокарцинома; и рак головы и шеи. При этом «опухоль» включает одну или несколько раковых клеток.

«Гематологическая злокачественность» охватывает любые раковые заболевания, которые затрагивают кровь, костный мозг и/или лимфатические узлы. Примерами гематологической злокачественности являются, без ограничения, лейкемия, лимфома и множественная миелома. Неограничивающие примеры различных видов лейкемии включают хроническую миелогенную лейкемию (CML), острую лимфобластическую лейкемию (ALL), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL), острую миелогенную

лейкемию (AML) и крупно-гранулярную лимфоцитарную лейкемию. Подтипы CML включают, например, хроническую моноцитарную лейкемию. Подтипы ALL включают например, острую лимфобластическую лейкемию предшественников В-клеток, острую лимфобластическую лейкемию про-В-клеток, острую лимфобластическую лейкемию предшественников Т-клеток и острую бифенотипическую лейкемию. Подтипы CLL включают, например, пролимфоцитарную В-клеточную лейкемию. Подтипы AML включают, например, острую промиелоцитарную лейкемию, острую миелобластическую лейкемию и острую мегакариобластическую лейкемию. Примеры различных типов лимфомы включают, без ограничения, лимфому Ходжкина (четыре подтипа) и лимфому не-Ходжкина, как-то, например, малую лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную большую В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому (FL), мантиевидноклеточную лимфому (MCL), волосковидно-клеточную лейкемию (HCL), лимфому маргинальной зоны (MZL), лимфому Буркитта (BL), пост-трансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD), Т-клеточную пролимфоцитарную лейкемию (Т-PLL), В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию (В-PLL), макроглобулинемию Вальденстрема (также известна как лимфоплазмацитарная лимфома) и другие НК- или Т-клеточные лимфомы.

Термин «определяемое вещество (аналит)» охватывает любые молекулы, обычно макромолекулы типа полипептидов, которых наличие, количество и/или идентичность определяется. В определенных случаях анализом является клеточный компонент раковых клеток, предпочтительно онкогенный слитый белок или молекула сигнальной трансдукции.

Термин «преобразовывать» или «преобразование» охватывает физические и/или химические изменения анализа или образца для того, чтобы экстрагировать анализ либо изменить или модифицировать анализ определенным образом. В настоящем изобретении экстракция, обработка, химическая преципитация, ELISA, комплексообразование, иммуноэкстракция, физическая или химическая модификация анализа или образца для измерения уровня или концентрации или активационного состояния анализа - все это составляет преобразование. Иными словами, если анализ или образец не идентичны до и после стадии трансформации, то изменение или модификация составляет преобразование.

В настоящем изобретении термин «серийное разведение» означает ряд понижающихся концентраций определенного образца (например, клеточного лизата) или реагента (например, антитела). Серийное разведение обычно получают смешиванием отмеренного количества образца или реагента в исходной концентрации с разбавителем (например, разбавляющим буфером) с получением меньшей концентрации образца или реагента и повторением процесса достаточное количество раз до получения нужного числа серийных разведений. Образец или реагент может быть серийно разведен по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 или 1000 раз, получая серийные разведения, содержащие по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 понижающихся концентраций образца или реагента. Например, серийные разведения, составляющие 2-кратное серийное разведение реагента захватывающего антитела при исходной концентрации в 1 мг/мл, можно получить смешиванием одного объема захватывающего антитела в исходной концентрации с равным объемом разбавляющего буфера, получая концентрацию захватывающего антитела в 0,5 мг/мл, и повторением этого процесса до получения концентраций захватывающего антитела в 0,25 мг/мл, 0,125 мг/мл, 0,0625 мг/мл, 0,0325 мг/мл и т.д.

Термин «превосходный динамический диапазон» в настоящем изобретении означает способность метода измерения детектировать специфический аналит всего лишь в одной клетке или же во многих тысячах клеток. Например, описанные здесь методы иммуноанализа обладают превосходным динамическим диапазоном, так как они хорошо детектируют определенный слитый белок или нужную молекулу сигнальной трансдукции в 1-10000 клеток (например, в 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 или 10000 клеток) при использовании серийных разведении захватывающего антитела.

Термин «слитый белок» или «химерный белок» охватывает белки, образовавшиеся при соединении двух или нескольких генов, исходно кодирующих отдельные белки. Такие слияния генов обычно происходят тогда, когда хромосомная транслокация замещает терминальные экзоны одного гена интактными экзонами из второго гена. При этом образуется один ген, который может транскрибироваться, подвергаться сплайсингу и транслироваться с образованием функционального слитого белка. В определенных воплощениях слитый белок является онкогенным слитым белком, т.е. слитым белком, вовлеченным в онкогенез. Примеры онкогенных слитых белков включают, без ограничения, BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG и TPR-MET.

Термин «молекула сигнальной трансдукции» или «передатчик сигналов» включает белки и другие молекулы, осуществляющие процесс, посредством которого клетка превращает внеклеточный сигнал или раздражитель в ответ, обычно включающий упорядоченную последовательность биохимических реакций внутри клетки. Примеры молекул сигнальной трансдукции включают, без ограничения, тирозинкиназы рецепторов, таких как EGFR (например, EGFR/HER-1/ErbB1, HER-2/Neu/ErbB2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (например, PDGFRA, PDGFRB), c-Met, c-KIT/SCFR, INSR (инсулиновый рецептор), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (рецептор, родственный инсулиновому рецептору), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYR03, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-кадгерин, LTK (тирозинкиназа лейкоцитов), ALK (киназа анапластической лимфомы), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, RTK 106, и укороченные формы тирозинкиназ рецепторов, такие как p95ErbB2; нерецепторные тирозинкиназы, такие как Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, и LIMK; тирозинкиназы компонентов сигнального каскада, такие как Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38. She (p66), PI3K, Ras (например, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, киназа p70 S6, p53, циклин D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 и паксиллин; ядерные гормональные рецепторы, такие как эстрогенный рецептор (ER), прогестероновый рецептор (PR), андрогенный рецептор, глюкокортикоидный рецептор, минералокортикоидный рецептор, рецептор витамина A, рецептор витамина D, ретиноидный рецептор, рецептор тиреоидного гормона и рецепторы-«сироты», коактиваторы и репрессоры ядерных рецепторов и их комбинации.

Термин «образец» в настоящем изобретении охватывает любые биологические образцы, полученные от пациента. Образцы включают, без ограничения, цельную кровь, плазму, сыворотку, смывную жидкость протоков, аспират из сосков, лимфу (например, рассеянные опухолевые клетки лимфатических узлов), аспират костного мозга, слюну, мочу, кал (т.е. фекалии), мокроту, смывную жидкость бронхов, слезы,

тонкоигольный аспирационный биоптат (например, взятый при случайной периареолярной тонкоигольной аспирации) и любые другие жидкости организма, образцы тканей (например, опухолевой ткани), как-то биоптаты опухолей (например, игольные биоптаты) или лимфатических узлов (например, биоптат «сторожевого» лимфоузла) и клеточные экстракты из них. В некоторых воплощениях образец представлен цельной кровью или ее фракционированным компонентом, таким как плазма, сыворотка, эритроциты, лейкоциты, как-то мононуклеары периферической крови и/или редкие циркулирующие клетки. В некоторых воплощениях образец получают путем выделения лейкоцитов или циркулирующих клеток твердой опухоли из цельной крови или ее клеточных фракций, используя любые известные способы. В других воплощениях образцом является фиксированный формалином заключенный в парафин (FFPE) образец раковой ткани, например, из твердой опухоли.

В настоящем изобретении термин «циркулирующие клетки» охватывает внеопухолевые клетки, которые метастазировали или микрометастазировали из твердой опухоли. Примеры циркулирующих клеток включают, без ограничения, циркулирующие опухолевые клетки, раковые стволовые клетки и/или клетки, которые мигрируют в опухоль (например, циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники, циркулирующие эндотелиальные клетки, циркулирующие про-ангиогенные миелоидные клетки, циркулирующие дендритные клетки и др.).

«Биопсия» означает процесс взятия образца ткани для диагностической или прогностической оценки, а также сам образец ткани. В отношении способов и композиций настоящего изобретения можно применять любые методы биопсии, известные в данной области. Применяемые методы биопсии в общем зависят от типа ткани, подлежащей исследованию, и от размера и типа опухоли (т.е. твердой или суспензированной (т.е. кровь или асциты), среди других факторов. Репрезентативные методы биопсии включают эксцизионную биопсию, инцизионную биопсию, игольную биопсию (например, пункционную игольную биопсию, тонкоигольную аспирационную биопсию и др.), хирургическую биопсию и биопсию костного мозга. Методы биопсии приведены, к примеру, в *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper et al., eds., 16th ed., 2005, Chapter 70, включая Part V. Специалистам должно быть известно, что методы биопсии могут применяться для идентификации раковых и/или предраковых клеток в данном образце ткани.

Термин «субъект» или «пациент» или «индивидуум» обычно включает человека, но также может включать и других животных, таких, например, как другие приматы, грызуны, собаки, кошки, лошади, овцы, свиньи и т.п.

«Матрица» или «микроматрица» содержит отдельный набор и/или серийные разведения захватывающих антител, иммобилизованных или фиксированных на твердой подложке, такой, к примеру, как стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики (например, магнитные шарики, полистироновые шарики и др.), бумага, мембрана (например, нейлоновая, нитроцеллюлозная, поливинилиденфторидная (PVDF) и др.), пучки волокон или любой другой подходящий субстрат. Захватывающие антитела обычно иммобилизуют или фиксируют на твердой подложке посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий (например, ионных связей, гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, диполь-дипольных связей). В некоторых воплощениях захватывающие антитела содержат захватывающие теги, которые взаимодействуют с захватывающими агентами, фиксированными на твердой подложке. Матрицы, используемые в способах настоящего изобретения, как правило, содержат несколько различных захватывающих антител и/

или концентраций захватывающих антител, конъюгированных на поверхности твердой подложки в различных известных/адресуемых положениях.

Термин «захватывающее антитело» обозначает иммобилизированные антитела, которые специфичны (т.е. связывают, связываются или образуют комплекс с) к одному или нескольким представляющим интерес анализам в образце типа клеточного экстракта лейкоцитов или редких циркулирующих клеток. В предпочтительных воплощениях захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке в матрице. Подходящие захватывающие антитела для иммобилизации любых из целого ряда онкогенных слитых белков или молекул сигнальной трансдукции на твердой подложке доступны от Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) и BD Biosciences (San Jose, CA).

Термин «детектирующее антитело» в настоящем изобретении включает антитела, содержащие детектируемую метку, которая специфична (т.е., связывает, связывается или образует комплекс с) к одному или нескольким представляющим интерес анализам в образце. Термин также охватывает антитела, специфичные к одному или нескольким анализам, при этом само антитело может связываться другим антителом, содержащим детектируемую метку. Примеры детектируемых меток включают, без ограничения, биотин/стрептавидиновые метки, метки из нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов), реакционно-химические метки, флуоресцентные метки, ферментные метки, радиоактивные метки и их комбинации. Подходящие детектирующие антитела для детектирования активационного состояния и/или общего количества любых из целого ряда онкогенных слитых белков доступны от Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) и BD Biosciences (San Jose, CA). В качестве примера, без ограничения, фосфоспецифичные антитела к различным фосфорилированным формам таких молекул сигнальной трансдукции, как EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Rafn MEK, доступны от Santa Cruz Biotechnology.

Термин «зависимое от активационного состояния антитело» охватывает детектирующие антитела, которые специфичны (т.е. связывают, связываются или образуют комплекс с) к определенному активационному состоянию одного или нескольких анализом в образце. В предпочтительных воплощениях независимое от активационного состояния антитело детектирует состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексования одного или нескольких онкогенных слитых белков или молекул сигнальной трансдукции. В некоторых воплощениях фосфорилирование киназного домена ABL слитого белка BCR-ABL детектируется с помощью независимого от активационного состояния антитела. В других воплощениях фосфорилирование тирозинкиназ представителей семейства рецепторов EGFR и/или образование гетеродимерных комплексов между представителями семейства EGFR детектируется с помощью зависимых от активационного состояния антител.

Неограничивающие примеры активационных состояний онкогенных слитых белков, которые подходят для детектирования с помощью зависимых от активационного состояния антител, включают фосфорилированные формы BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-

ERG и TPR-MET. Примеры активационных состояний (приведены в скобках) молекул сигнальной трансдукции, которые подходят для детектирования с помощью зависимых от активационного состояния антител, включают, без ограничения, EGFR (EGFRvIII, фосфорилированный (p-) EGFR, EGFR: She, убиквитинированный (u-) EGFR, p-EGFRvIII); ErbB2 (p95:укороченный (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-Met (p-c-Met или комплекс c-Met/HGF), ER (p-ER (S118, S167)); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1PLCg, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCy, VEGFR2:Src, YECPP2:гепаринсульфат, VEGFR2:VE-кадгерин); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tiel (p-Tiel); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFkB и/или 1kB (p-1kB (S32), p-NFkB (S536), p-P65:1kB); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad:14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); и паксиллин (фосфо-паксиллин (Y118)).

Термин «независимое от активационного состояния антитело» охватывает детектирующие антитела, которые специфичны (т.е. связывают, связываются или образуют комплекс с) к одному или нескольким анализам в образце независимо от их активационного состояния. Например, независимое от активационного состояния антитело может детектировать и фосфорилированные, и нефосфорилированные формы одного или нескольких анализатов, как-то одного или нескольких онкогенных слитых белков или молекул сигнальной трансдукции.

Термин «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид» охватывает дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и их полимеры в одноцепочечном или двухцепочечном виде, такие, к примеру, как ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов либо остатки или связи с модифицированным остовом, как синтетического, естественного происхождения, так и не встречающиеся в природе, и обладающие такими же свойствами связывания, как и базовая нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты (PNAs). Если специально не оговорено, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги естественных нуклеотидов, обладающие такими же свойствами связывания, как и базовая нуклеиновая кислота. Если не указано иначе, последовательность определенной нуклеиновой кислоты также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты и комплементарные последовательности, а также приведенную в явном виде последовательность.

Термин «олигонуклеотид» относится к одноцепочечным олигомерам или полимерам РНК, ДНК, гибридам РНК/ДНК и/или их миметикам. В некоторых случаях олигонуклеотиды состоят из естественных (т.е. немодифицированных) оснований нуклеозидов, Сахаров и межнуклеозидных (каркасных) связей. В некоторых других случаях олигонуклеотиды содержат модифицированные основания нуклеозидов, сахара и/или межнуклеозидные (каркасных) связи.

В настоящем изобретении термин «несовпадающий мотив» или «несовпадающий

участок» относится к той части олигонуклеотида, которая не комплементарна на все 100% к своей комплементарной последовательности. Олигонуклеотид может содержать по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть или больше несовпадающих участков. Несовпадающие участки могут быть смежными или могут разделяться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или больше нуклеотидами. Несовпадающие мотивы или участки могут содержать всего один нуклеотид или могут содержать два, три, четыре, пять или больше нуклеотидов.

Выражение «жесткие условия гибридизации» означает такие условия, при которых олигонуклеотид будет гибридизироваться со своей комплементарной последовательностью, но не с другими последовательностями. Жесткие условия зависят от последовательности и отличаются в различных обстоятельствах. Более длинные последовательности гибридизируются при более высоких температурах. Всестороннее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes*, «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays» (1993). Обычно жесткие условия выбираются так, чтобы они были на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) для данной последовательности при заданной ионной силе и pH. T_m - это температура (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зонда, комплементарного мишени, гибридизируется с последовательностью мишени в состоянии равновесия (поскольку последовательность мишени присутствует в избытке, то в точке T_m будет связано 50% зонда в состоянии равновесия). Жесткие условия также могут достигаться добавлением таких дестабилизирующих агентов, как формамид. При избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал по меньшей мере в два раза превышает фон, предпочтительно в 10 раз.

Термины «существенно идентичны» или «существенная идентичность» в контексте двух или нескольких нуклеиновых кислот относятся к таким двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые одинаковы или содержат заданный процент одинаковых нуклеотидов (т.е. по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичны на заданном участке) при сравнении и совмещении на максимальное соответствие по окошку сравнения или заданному участку с помощью алгоритма сравнения последовательностей либо при совмещении вручную и визуальном осмотре. Данное определение, если контекст позволяет, равным образом относится и к комплементарной последовательности. Предпочтительно существенная идентичность существует на участке, имеющем длину по меньшей мере в 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 нуклеотидов.

Термин «ингибитор тирозинкиназы» охватывает целый ряд терапевтических агентов или лекарств, действующих как избирательные или неизбирательные ингибиторы рецепторных и/или нерецепторных тирозинкиназ. Не придерживаясь какой-либо определенной теории, ингибиторы тирозинкиназ обычно ингибируют тирозинкиназы мишени посредством связывания с АТФ-связывающим сайтом фермента. Примеры ингибиторов тирозинкиназ включают, без ограничения, иматиниб (Gleevec®; STI571), нилотиниб (Tasigna®), дасатиниб (Sprycel®), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa®), сунитиниб (Sutent®; SU11248), эрлотиниб (Tarceva®; OSI-1774), лапатиниб (GW572016; GW2016), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima™; ZD6474), их производные, аналоги и комбинации. Другие ингибиторы тирозинкиназ, пригодные

для применения в настоящем изобретении, описаны, например, в патентах США Nos. 5.618,829, 5.639,757, 5,728,868, 5,804,396, 6,100,254, 6,127,374. 6,245.759, 6,306,874, 6,313,138, 6,316,444, 6,329,380, 6,344,459, 6,420,382, 6,479,512, 6,498,165, 6,544,988, 6,562,818, 6,586,423, 6,586,424, 6,740,665, 6,794,393, 6,875,767, 6,927,293 и 6,958,340. Специалистам в данной области известны и другие ингибиторы тирозинкиназ, пригодные для применения в настоящем изобретении. В определенных случаях ингибитор тирозинкиназ вводится в фармацевтически приемлемой форме, включая, без ограничения, соли щелочных или щелочноземельных металлов, как-то соли алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия или цинка; соли аммония, как-то третичные или четвертичные соли аммония; и соли кислот, как-то соли сукцината, тартрата, битартрата, дигидрохлорида, салицилата, гемисукцината, цитрата, изоцитрата, малата, малеата, месилата, гидрохлорида, гидробромида, фосфата, ацетата, карбамата, сульфата, нитрата, формиата, лактата, глюконата, глюкуроната, пирувата, оксалоацетата, fumarата, пропионата, аспартата, глутамата или бензоата.

Термин «инкубирование» применяется как синоним «контактирования» и «обработки» и не подразумевает каких-либо определенных требований относительно времени или температуры, если не указано иначе.

Термины «полный цитогенетический ответ», «полная цитогенетическая ремиссия», «CCyR» и «CCgR» включают клинически приемлемые критерии, которыми считается отсутствие клеток, положительных по хромосоме Philadelphia в метафазе, среди популяции из по меньшей мере 20 клеток в метафазе при анализ дифференциального окрашивания хромосом в клетках, выделенных из костного мозга. В некоторых случаях, когда нельзя получить метафазные клетки, выделенные из костного мозга, или проанализировать их хромосомы с помощью дифференциального окрашивания, термин может определяться как присутствие <1% BCR-ABL-положительных ядер из по меньшей мере 200 исследованных ядер при определении методом интерфазной флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) на клетках крови. Метод интерфазной FISH может выполняться, например, с помощью зондов на BCR-ABL для экстрасигнальной, двухцветной, с двойным слиянием или гибридизации in situ. Дополнительное описание этих терминов, например, см. в O'Brien et al., N. Engl. J. Med., 348:994-1004 (2003); Hughes et al., N. Engl. J. Med., 349:1423-1432 (2003); и Bacarani et al., J. Clin. Oncol, 27:6041-6051 (2009).

«Сильный молекулярный ответ», «сильная молекулярная ремиссия» или «MMR» достигается, когда уровень онкогенного слитого белка типа BCR-ABL снижается по меньшей мере на 2-3 log-единицы от уровня одного или нескольких контрольных белков типа полноразмерного BCR и/или полноразмерного ABL. В некоторых воплощениях сильный молекулярный ответ достигается, когда отношение уровня онкогенного слитого белка (например, уровня BCR-ABL) к уровню контрольного белка (например, уровню BCR или ABL) во время терапии противораковым препаратом (например, ингибитором тирозинкиназы) снижается на меньшей на 2-3 log-единицы по сравнению с соотношением тех же самых белков до терапии противораковым препаратом. В отличие от определений сильного молекулярного ответа, основанных на определении уровня транскриптов мРНК, методы двойного детектирования сближения на основе антител по настоящему изобретению преимущественно дают возможность детектировать одну раковую (например, CML) клетку на фоне 100000 клеток от здорового донора, тем самым позволяя определить сильный молекулярный ответ путем измерения и сравнения уровней белков BCR-ABL, BCR и/или ABL. В других воплощениях сильный молекулярный ответ - это клиническая классификация, определяемая как снижение по

меньшей мере на 3 log-единицы от стандартизованной исходной величины по логарифмической шкале (с основанием 10) соотношения транскриптов мРНК BCR-ABL к транскриптам мРНК ABL или BCR, выраженное в процентах от уровня транскриптов мРНК ABL или BCR. В некоторых случаях уровень транскриптов мРНК определяется методом количественной RT-ПЦР в реальном времени (кПЦР). В других воплощениях сильный молекулярный ответ означает такое состояние, когда соотношение между транскриптами мРНК BCR-ABL и ABL, BCR или контрольной мРНК при определении методом кПЦР составляет 0.1% по международной шкале (IS). IS привязана к уменьшению по log-шкале, установленной лабораториями, участвующими в клиническом исследовании International Randomized Study of Interferon versus STI571 (IRIS). Например, см. Hughes et al., N. Engl. J. Med., 349:1423-1432 (2003); Hughes et al., Blood, 108:28-37 (2006); Brand et al., Blood, 112:3330-3338 (2008); и Baccarani et al., J. Clin. Oncol., 27:6041-6051 (2009).

«Полный молекулярный ответ», «полная молекулярная ремиссия» или «CMR» достигается, когда уровень онкогенного слитого белка типа BCR-ABL снижается по меньшей мере на 3-4 log-единицы от уровня одного или нескольких контрольных белков типа полноразмерного BCR и/или полноразмерного ABL. В некоторых воплощениях полный молекулярный ответ достигается, когда отношение уровня онкогенного слитого белка (например, уровня BCR-ABL) к уровню контрольного белка (например, уровню BCR или ABL) во время терапии противораковым препаратом снижается по меньшей мере на 3-4 log-единицы по сравнению с соотношением тех же самых белков до терапии противораковым препаратом (например, ингибитором тирозинкиназы). В отличие от определений полного молекулярного ответа, основанных на определении уровня транскриптов мРНК, методы двойного детектирования сближения на основе антител по настоящему изобретению преимущественно дают возможность детектировать одну раковую (например, CML) клетку на фоне 100000 клеток от здорового донора, тем самым позволяя определить полный молекулярный ответ путем измерения и сравнения уровней белков BCR-ABL, BCR и/или ABL. В других воплощениях полный молекулярный ответ - это клиническая классификация, по которой транскрипты мРНК не обнаруживаются методом кПЦР и/или гнездовой ПЦР по меньшей мере в двух последовательных пробах крови достаточного качества, дающего возможность детектировать падение уровня мРНК BCR-ABL на 4.0-4.5 log-единиц. В некоторых случаях полный молекулярный ответ определяется как снижение по меньшей мере на 4.5 log-единицы от стандартизованной исходной величины по логарифмической шкале соотношения между транскриптами мРНК BCR-ABL и ABL, BCR или контрольной мРНК, выраженное в процентах. Например, см. Press et al., Blood, 107:4250-4256 (2006); Muller et al., Leukemia, 23:1957-1963 (2009); и Baccarani et al., J. Clin. Oncol., 27:6041-6051 (2009).

Термин «курс терапии» включает любые терапевтические подходы, предпринимаемые для облегчения или предотвращения одного или нескольких симптомов, связанных с раком типа гематологической злокачественности (например, лейкемии, лимфомы и т.п.). Термин охватывает введение любых соединений, препаратов, процедур и/или режима, применимых для улучшения здоровья индивидуума, страдающего раком, и включает любые описанные здесь терапевтические агенты. Специалистам должно быть известно, что курс лечения или дозировка текущего курса лечения может быть изменена (например, увеличена или уменьшена) на основании уровня экспрессии и/или активации одного или нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции, установленных способами настоящего изобретения.

III. Описание воплощений

Настоящим изобретением предусмотрены матрицы на основе антител для детектирования активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции в биологических образцах типа клеточных экстрактов или лизатов. Настоящим изобретением также предусмотрены способы применения таких матриц для облегчения прогнозирования и диагностики рака, предсказания или идентификации устойчивости к применению препарата и разработки персонализированной прицельной терапии. В определенных воплощениях композиции и способы настоящего изобретения преимущественно выявляют тех пациентов, которые устойчивы к терапии ингибитором тирозинкиназ типа иматиниба вследствие мутаций в протеинкиназе мишени (например, BCR-ABL), несоблюдения режима терапии и/или введения субоптимальной дозы препарата.

В одном определенном воплощении настоящим изобретением предусмотрены способы анализа, такие, например, как методы иммуноанализа для детектирования в реальном времени уровня экспрессии и/или степени активации (например, фосфорилирования) BCR-ABL, его субстратов и/или других молекул сигнальной трансдукции в биологических образцах типа клеточных экстрактов или лизатов. При этом настоящее изобретение преимущественно приносит пользу пациентам с гематологической злокачественностью типа CML, получающими одну или несколько прицельных терапий, посредством скрининга и мониторинга их по всему курсу лечения и определения того, следует ли перевести их на альтернативную прицельную терапию, такую, например, как нилотиниб (Tasigna®), чтобы эффективно ингибировать молекулы мишени (например, BCR-ABL) с минимальной токсичностью.

В некоторых воплощениях настоящим изобретением предусмотрен способ, обладающий наилучшим диапазоном чувствительности для детектирования онкогенных слитых белков типа BCR-ABL. Текущие методы иммуноанализа для детектирования белков BCR-ABL в клеточных экстрактах в общем способны детектировать одну BCR-ABL-положительную лейкоэмическую клетку среди 10-100000 нормальных клеток, что эквивалентно чувствительности детекции в 10-0.001% (например, см. Jilani et al., Leuk. Res., 32:936-943 (2008); Weerkamp et al., Leukemia, 23:1106-1117 (2009); Raponi et al., Haematologica, 94:1767-1770 (2009); и U.S. Patent Publication No. US 2006/0172345).

Описанные здесь методы анализа сближения для определения преимущественно обеспечивают увеличение чувствительности до 1:100000-10000000 клеток (т.е. одной лейкоэмической клетки на 100000-10000000 нормальных клеток, что эквивалентно чувствительности детекции примерно в 0.001-0.00001%) или до 1:1000000-10000000 клеток (т.е. одной лейкоэмической клетки на 1000000-10000000 нормальных клеток, что эквивалентно чувствительности детекции примерно в 0.0001-0.00001%), включая, например, 1:100000 клеток, 1:200000 клеток, 1:300000 клеток, 1:400000 клеток, 1:500000 клеток, 1:600000 клеток, 1:700000 клеток, 1:800000 клеток, 1:900000 клеток, 1:1000000 клеток, 1:2000000 клеток, 1:3000000 клеток, 1:4000000 клеток, 1:5000000 клеток, 1:6000000 клеток, 1:7000000 клеток, 1:8000000 клеток, 1:9000000 клеток, 1:10000000 клеток, 1:100000-500000 клеток, 1:100000-1000000 клеток, 1:500000-1000000 клеток, 1:100000-5000000 клеток, 1:500000-10000000 клеток, 1:2000000-10000000 клеток, 1:5000000-10000000 клеток, 1:1000000-7500000 клеток, 1:1000000-5000000 клеток и любые другие диапазоны в этих пределах. Чувствительность описанных здесь способов может быть сравнима или превосходить таковую стандартных методов определения BCR-ABL на основе нуклеиновых кислот (например, кПЦР или гнездовой ПЦР), которая попадает в

диапазон детекции 1 лейкоцитарной клетки на 10000-1000000 нормальных клеток. Дополнительное описание диапазона чувствительности методов определения BCR-ABL на основе нуклеиновых кислот, например, см. в Press et al., Blood, 107:4250-4256 (2006); и Radish JT, Blood, 114:3376-3381 (2009).

5 В некоторых воплощениях способы анализа сближения на основе антител по настоящему изобретению преимущественно обеспечивают большую степень чувствительности и/или специфичности при детектировании наличия, уровня и/или активационного состояния онкогенных слитых белков типа BCR-ABL по сравнению с текущими методами иммуноанализа и методами на основе нуклеиновых кислот для
10 детектирования BCR-ABL, обеспечивая при этом более точное определение таких индикаторов ответа, к примеру, как полный цитогенетический ответ, сильный молекулярный ответ, полный молекулярный ответ и их комбинаций. В качестве неограничивающего примера: текущие методы на основе нуклеиновых кислот
15 транскриптов BCR-ABL в образцах от пациентов, так что определение полного молекулярного ответа текущими методами на основе нуклеиновых кислот не обязательно означает, что больной излечился и у него больше нет вызванного BCR-ABL заболевания (например, CML).

В одном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения уровня
20 или активационного состояния онкогенного слитого белка, который включает:

(а) контактирование клеточного экстракта с первой связывающей молекулой, специфичной к первому домену первого полноразмерного белка в условиях, подходящих для превращения первого полноразмерного белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, содержащий первый полноразмерный белок и первую
25 связывающую молекулу, причем первый домен первого полноразмерного белка отсутствует в соответствующем онкогенном слитом белке, содержащем второй другой домен первого полноразмерного белка, слитый с первым доменом второго другого полноразмерного белка;

(b) удаление из клеточного экстракта комплекса из стадии (а) с получением
30 клеточного экстракта, лишенного первого полноразмерного белка;

(с) контактирование клеточного экстракта из стадии (b) со второй связывающей молекулой, специфичной ко второму другому домену первого полноразмерного белка в условиях, подходящих для преобразования онкогенного слитого белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий онкогенный слитый
35 белок и вторую связывающую молекулу; и

(d) определение уровня или активационного состояния комплекса из стадии (с), тем самым определяя уровень или активационное состояние онкогенного слитого белка.

В одном воплощении клеточный экстракт включает экстракт клеток, выделенных из образца. В некоторых случаях образец выбирается из цельной крови, сыворотки,
40 плазмы, тонкоигольного аспирационного биоптата (FNA), мочи, мокроты, смывной жидкости бронхов, слез, аспирата из сосков, лимфы, слюны и их комбинаций. В другом воплощении образец берут у больного раком. В некоторых случаях рак может быть вызван образованием онкогенного слитого белка вследствие хромосомной транслокации в раковых клетках. Примерами таких раковых заболеваний являются, без ограничения,
45 гематологические злокачественности, остеогенная саркома, саркома мягких тканей и их комбинации. В некоторых воплощениях гематологическая злокачественность представляет собой лейкемию или лимфому. В одном предпочтительном воплощении лейкемия представляет собой хроническую миелогенную лейкемию (CML). В другом

воплощении выделенные клетки, из которых получают клеточный экстракт или лизат, могут включать циркулирующие опухолевые клетки, лейкоциты или их комбинации. В определенных воплощениях выделенные клетки подвергают стимуляции *in vitro* факторами роста. В некоторых случаях выделенные клетки перед стимуляцией фактором роста подвергают инкубации с противораковым препаратом. В других случаях выделенные клетки после стимуляции фактором роста подвергают лизису для получения клеточного экстракта.

В некоторых воплощениях клеточный экстракт получают из свежевыделенного или замороженного костного мозга или образцов цельной крови. В качестве неограничивающего примера: образец цельной крови, обработанный антикоагулянтами (например, EDTA, гепарином и/или цитратной декстрозой (ACD)), сначала разделяют на фракцию плазмы или сыворотки и клеточную фракцию. Клеточную фракцию можно подвергнуть гипотоническому лизису эритроцитов хлоридом аммония и/или центрифугированию в градиенте плотности Ficoll-НуРаге для выделения лейкоцитов из образца крови. Выделенные клетки, присутствующие в клеточной фракции, можно подвергнуть лизису и тем самым преобразовать выделенные клетки в клеточный экстракт любым известным способом типа тех, что описаны в Raponi et al., *Leuk Res*, 32:923-43 (2008); Weerkamp et al, *Leukemia*, 23:1106-1117 (2009); и U.S. Patent Nos. 6,610,498 и 6,686,165.

В некоторых случаях выделенные лейкоциты перед лизисом можно обработать одним или несколькими проникающими в клетки ингибиторами протеаз. Проникающие в клетки ингибиторы протеаз включают, без ограничения, диизопропилфторфосфат (DFP), 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил фторид-гидрохлорид (AEBSF), фенилметансульфонил фторид (PMSF) и их смеси. В качестве не ограничивающего примера: выделенные лейкоциты инкубируют в течение 10-30 мин на льду в буфере, содержащем 20 mM AEBSF и 1 mM PMSF в PBS. Клетки осторожно центрифугируют 5 мин при 520×g при 4°C для отделения супернатанта от выделенных лейкоцитов. Обработка выделенных лейкоцитов ингибиторами протеаз описана, например, в Weerkamp et al., *Leukemia*, 23:1106-1117 (2009).

В некоторых случаях выделенные лейкоциты можно инкубировать вплоть до 30 мин на льду в лизирующем буфере RIPA, содержащем один или несколько ингибиторов протеаз. Буфер RIPA содержит или в основном состоит из 50 mM трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40 и 0.1% додецилсульфата натрия. В некоторых других случаях буфер RIPA не содержит дезоксихолата натрия. После инкубации смесь клеток центрифугируют при $\geq 18,000g$ в течение 1-10 мин при 4°C для отделения клеточного экстракта от обломков клеток. Клеточный экстракт собирают. Дополнительные описания методик лизиса клеток, например, см. в Raponi et al., *Haematologica*, 94:1767-1770 (2009); Weerkamp et al., *Leukemia*, 23:1106-1117 (2009); и U.S. Patent Publication No. US 2006/0172345.

В некоторых воплощениях плазму получают из образцов свежей цельной периферической крови, собранной и обработанной одним или несколькими антикоагулянтами (например, EDTA, гепарином или ACD), как описано в Jilani et al., *Leuk. Res.*, 32:936-943 (2008). В качестве неограничивающего примера: образцы крови можно разделить на фракцию плазмы или сыворотки и клеточную фракцию. Плазму можно хранить при -70-80°C до анализа либо проводить анализ в течение 96 часов после взятия образца крови.

В некоторых воплощениях онкогенный слитый белок выбирается из группы, состоящей из BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-

ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET и их комбинаций. В определенных воплощениях онкогенным слитым белком является BCR-ABL. В некоторых случаях первым полноразмерным белком является BCR, первый домен первого полноразмерного белка содержит С-концевой участок BCR (BCR-C), а второй другой домен первого полноразмерного белка содержит N-концевой участок BCR (BCR-N). В некоторых других случаях вторым другим полноразмерным белком является ABL, первый домен второго другого полноразмерного белка содержит С-концевой участок ABL (ABL-C), а второй другой домен второго другого полноразмерного белка содержит N-концевой участок ABL (ABL-N). В одном альтернативном воплощении первым полноразмерным белком является ABL, и вторым другим полноразмерным белком является BCR.

В некоторых воплощениях активационное состояние выбирается из группы, состоящей из состояния фосфорилирования, состояния убиквитинирования, состояния комплексования и их комбинаций. В одном предпочтительном воплощении онкогенным слитым белком является BCR-ABL, а активационным состоянием является состояние фосфорилирования.

В других воплощениях способы определения по настоящему изобретению дополнительно включают определение уровня или активационного состояния одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции. В определенных воплощениях одна или несколько молекул сигнальной трансдукции включают субстрат BCR-ABL, такой, например, как CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 и их комбинации.

В одном определенном воплощении первая связывающая молекула включает первое антитело. В некоторых случаях первое антитело фиксировано на твердой подложке. Неограничивающие примеры твердых подложек включают стекло, пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики, бумагу, мембрану, пучки волокон и их комбинации. В предпочтительных воплощениях первое антитело фиксировано на шариках (например, магнитных шариках, полистиреновых шариках и др.), а шарики функционируют в качестве извлекающих тегов для удаления первого полноразмерного белка из клеточного экстракта.

В другом определенном воплощении вторая связывающая молекула включает второе антитело. В некоторых случаях второе антитело фиксировано на твердой подложке. Неограничивающие примеры твердых подложек включают стекло, пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики, бумагу, мембрану, пучки волокон и их комбинации. В одном предпочтительном воплощении второе антитело фиксировано на твердой подложке типа мембраны (например, нейлоновой, нитроцеллюлозной, PVDF и др.) в адресуемой матрице. В другом воплощении второе антитело фиксировано на шариках (например, магнитных шариках, полистиреновых шариках и др.), при этом шарики необязательно могут содержать краситель типа флуорофора (например, окрашенные шарики). В тех случаях, когда используется несколько разных шариков, каждый из них может содержать выбранный независимо краситель типа флуорофора (например, красный или инфракрасный флуорофор) различной интенсивности или с разными спектрами возбуждения и/или эмиссии.

В предпочтительных воплощениях стадии (c) и (d) включают определение методом двойного детектирования сближения (также известным как Collaborative Proximity ImmunoAssay («COPIA»)), как описано в настоящем изобретении. В других воплощениях стадии (c) и (d) включают определение методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), проточной цитометрии или сортировки по тегам, как описано в

настоящем изобретении.

В тех воплощениях, в которых стадии (с) и (d) включают анализ методом двойного детектирования сближения, стадия (с) может дополнительно включать:

(с') контактирование клеточного экстракта из стадии (b) с третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой в условиях, подходящих для преобразования онкогенного слитого белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий онкогенный слитый белок и вторую, третью и четвертую связывающие молекулы;

причем третья связывающая молекула помечена содействующей молекулой и специфична (например, специфически связывается с) к одному или нескольким эпитопам, находящимся в следующих доменах или последовательностях: (i) первом домене второго другого полноразмерного белка; (ii) втором другом домене первого полноразмерного белка; или (iii) месте слияния между вторым другим доменом первого полноразмерного белка и первым доменом второго другого полноразмерного белка;

причем четвертая связывающая молекула помечена первым членом пары амплификации сигнала и специфична к первому домену второго другого полноразмерного белка, и

при этом содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала.

В тех воплощениях, в которых стадии (с) и (d) включают анализ методом двойного детектирования сближения, стадия (d) может дополнительно включать:

(d') инкубирование комплекса из стадии (с') со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала; и

(d'') детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В некоторых воплощениях клеточный экстракт из стадии (b) может подвергаться контактированию с серийными разведениями второй связывающей молекулы с образованием нескольких комплексов, включающих онкогенный слитый белок и вторую связывающую молекулу. В некоторых воплощениях третья и четвертая связывающая молекула могут включать третье и четвертое антитело, соответственно. В некоторых случаях третье и четвертое антитело оба являются независимыми от активационного состояния антителами. В таких случаях амплифицированный сигнал, генерируемый первым и вторым членами пары амплификации сигнала, коррелирует с общим количеством онкогенного слитого белка. В других случаях третье антитело является независимым от активационного состояния, а четвертое антитело является зависимым от активационного состояния. В таких случаях амплифицированный сигнал, генерируемый первым и вторым членами пары амплификации сигнала, коррелирует с количеством активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка.

В других воплощениях третья связывающая молекула может быть непосредственно помечена содействующей молекулой. А в других воплощениях четвертая связывающая молекула непосредственно помечена первым членом пары амплификации сигнала. В альтернативных воплощениях четвертая связывающая молекула помечена первым членом пары амплификации сигнала посредством связывания между первым членом связывающей пары, конъюгированным со вторым детектирующим антителом, и вторым членом связывающей пары, конъюгированным с первым членом пары амплификации сигнала. В этих воплощениях первым членом связывающей пары является биотин и/или вторым членом связывающей пары является стрептавидин.

В дальнейших воплощениях содействующей молекулой является глюкозооксидаза. В некоторых случаях глюкозооксидаза и третья связывающая молекула конъюгированы с активированной сульфгидрилом молекулой декстрана. В таких случаях активированная сульфгидрилом молекула декстрана имеет молекулярную массу около 500 кД. В других случаях окислителем является перекись водорода (H_2O_2). В таких случаях первым членом пары амплификации сигнала является пероксидаза, такая, например, как пероксидаза хрена (HRP), и/или вторым членом пары амплификации сигнала является тирамидный реагент, такой, например, как биотин-тирамид. В определенных воплощениях амплифицированный сигнал генерируется при окислении пероксидазой биотин-тирамида с образованием активированного тирамида. В некоторых случаях активированный тирамид детектируется непосредственно. В некоторых других случаях активированный тирамид детектируется после добавления детектирующего сигнал реагента. Неограничивающие примеры детектирующих сигнал реагентов включают меченные стрептавидином флюорофоры и комбинации из меченной стрептавидином пероксидазы и хромогенного реагента, такого, например, как 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ).

В некоторых воплощениях способы определения по настоящему изобретению дополнительно включают:

(е) контактирование клеточного экстракта с пятой связывающей молекулой, специфичной ко второму домену второго другого полноразмерного белка в условиях, подходящих для преобразования второго другого полноразмерного белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий второй другой полноразмерный белок и пятую связывающую молекулу, причем второй домен второго другого полноразмерного белка отсутствует в онкогенном слитом белке; и

(f) удаление из клеточного экстракта комплекса из стадии (е) для получения меточного экстракта, лишенного второго другого полноразмерного белка, причем стадия (е) проводится до, во время или после стадии (а).

В одном предпочтительном воплощении пятая связывающая молекула включает пятое антитело. В некоторых случаях пятое антитело фиксировано на твердой подложке. Нелимитирующие примеры твердых подложек включают стекло, пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики, бумагу, мембраны, пучки волокон и их комбинации. В предпочтительных воплощениях пятое антитело фиксировано на шариках (например, магнитных шариках, полистиреновых шариках и др.), а шарики функционируют как извлекающие теги для удаления второго другого полноразмерного белка из клеточного экстракта.

На фиг.3А представлен типичный метод анализа сближения (300) для детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) онкогенного слитого белка типа BCR-ABL (310). Онкогенный слитый белок, кодируемый химерным геном BCR-ABL, варьирует по размеру в зависимости от точки разрыва в гене BCR. Слитый ген BCR-ABL образуется при реципрокной транслокации гена ABL, расположенного на длинном плече хромосомы 9, и гена BCR, расположенного на длинном плече хромосомы 22, что приводит к появлению слитого онкогенного гена на хромосоме 22q-, также именуемой хромосомой Philadelphia. Например, см. Kurzock et al., N. Engl. J. Med. 319:990-8 (1988); Rosenberg et al., Adv. in Vims Res. 35:39-81 (1988).

В зависимости от точек хромосомных разрывов, по которым ген ABL переносится на N-конец гена BCR, образуются слитые гены BCR-ABL разной длины. Установлено, что точки разрыва у гена ABL распределяются на протяжении примерно 200 т.о. между экзонами 1b и a2, а точки разрывов гена BCR группируются на трех участках: главная

точка разрыва (M-BCR) находится между экзонами 13-15 (b2-b4); второстепенная точка разрыва (m-BCR) между альтернативными экзонами 1 и 2 (e1 и e2); микроточка разрыва (mu-BCR) в интроне 19 (e19). Таким образом, в зависимости от перегруппировки генов BCR-ABL образуются уникальные белки BCL-ABL. Например, см. Konopka et al., Cell 37:1035-42 (1984); van Dongen JJM, Leukemia 19:1292-5 (2005).

Белок p210 BCR-ABL образуется из генных транскриптов b3a2 (e14a2) и/или b2a2 (e13a2), которые выявляются у более чем 95% случаев CML и в подгруппе ALL. Этот белок содержит 1790 аминокислот и состоит из домена олигомеризации (OLI) от BCR на N-конце, за которым следует киназный домен S/T от BCR, вставка аминокислотной последовательности из BCR, которая не присутствует в нормальном BCR, после чего следуют киназные домены SH3, SH2 и Y от ABL, а также C-концевой обогащенный пролином домен ABL. Слитый белок p190 BCR-ABL кодируется слитым генным транскриптом e1a2, который в основном связан с Ph-положительной ALL. Редкие случаи CML обусловлены транслокацией генов BCR-ABL типа p190, и при этом заболевание зачастую имеет заметную моноцитарную компоненту, напоминающую хроническую миеломоноцитарную лейкемию (CMML). Белок p230 BCR-ABL образуется из генного транскрипта e19a2, который связывали с нейтрофильной CML, классической CML и AML. Например, см. Konopka et al., Cell 37:1035-42 (1984); van Dongen JJM, Leukemia 19:1292-5 (2005). Были описаны исключительные случаи CML с точками разрыва BCR вне трех определенных кластерных участков или с необычными точками разрыва в ABL (например, см. Melo, Baillieres Clin. Haematol, 10:203-22 (1997)). Описанный здесь метод анализа сближения способен детектировать уровень общего и активированного белка BCR-ABL, кодируемого химерным геном BCR-ABL, имеющим точку разрыва в любом положении внутри гена BCR.

Как видно из фиг.3А, сначала можно удалить полноразмерный белок BCR из образца пациента при помощи извлекающего тега, специфичного к C-концевому участку полноразмерного BCR (331). Неограничивающим примером такого извлекающего тега является шарик, к которому прикреплено антитело, специфичное к C-концевому участку полноразмерного BCR (321b). После удаления полноразмерного BCR из образца для захвата полноразмерного BCR-ABL используется захватывающее антитело, специфичное к N-концевому участку BCR (BCR-N). После захвата BCR-ABL посредством связывания между BCR-N и захватывающим антителом, специфичным к BCR-N, определяется общая концентрация BCR-ABL (340), а также измеряется активированный BCR-ABL (350). В некоторых воплощениях с антителом, специфичным к C-концевому участку ABL (ABL-C), конъюгирована содействующая молекула (например, GO), а первый член пары амплификации сигнала (например, HRP) конъюгирован с антителом, специфичным к ABL-C по другому эпитопу, чем тот, который распознается антителом, конъюгированным с содействующей молекулой. В некоторых случаях антитело, конъюгированное с парой амплификации сигнала, является независимым от активационного состояния антителом, которое связывается с ABL-C независимо от его активационного состояния и тем самым измеряет общую концентрацию BCR-ABL (340). В некоторых других случаях антитело, конъюгированное с парой амплификации сигнала, является зависимым от активационного состояния антителом, которое связывается с фосфо-ABL-C (например, pY245, pY412) и тем самым измеряет концентрацию активированного BCR-ABL (350). В одном альтернативном воплощении содействующая молекула (например, GO) конъюгирована с антителом, специфичным к BCR-N по другому эпитопу, чем тот, который распознается захватывающим BCR-ABL антителом, а первый член пары амплификации сигнала (например, HRP) конъюгирован с антителом,

специфичным к ABL-C. Как описано здесь, конъюгированное с парой амплификации сигнала антитело может быть независимым от активационного состояния или зависимым от активационного состояния антителом.

В некоторых воплощениях дополнительно или альтернативно из образца пациента может быть удален полноразмерный белок ABL перед захватом и детектированием экспрессии и/или активации BCR-ABL при помощи извлекающего тега, специфичного к N-концевому участку полноразмерного ABL (330). Неограничивающим примером такого извлекающего тега является шарик, к которому прикреплено антитело, специфичное к N-концевому участку полноразмерного ABL (321a). В этих воплощениях после захвата BCR-ABL посредством связывания между ABL-C и захватывающим антителом, специфичным к ABL-C, определяется общая концентрация BCR-ABL (360), а также измеряется активированный BCR-ABL (370). В некоторых воплощениях с антителом, специфичным к ABL-C по другому эпитопу, чем тот, который распознается захватывающим BCR-ABL антителом, конъюгирована содействующая молекула (например, GO), а первый член пары амплификации сигнала (например, HRP) конъюгирован с антителом, специфичным к BCR-N. В некоторых случаях антитело, конъюгированное с содействующей молекулой, является независимым от активационного состояния антителом, которое связывается с ABL-C независимо от его активационного состояния и тем самым измеряет общую концентрацию BCR-ABL (360). В некоторых других случаях антитело, конъюгированное с содействующей молекулой, является зависимым от активационного состояния антителом, которое связывается с фосфо-ABL-C (например, pY245, pY412) и тем самым измеряет концентрацию активированного BCR-ABL (370).

В тех воплощениях, в которых содействующей молекулой является GO, а первым членом пары амплификации сигнала является HRP, одновременное связывание и конъюгированного с GO антитела, и конъюгированного с HRP антитела со слитым белком BCR-ABL приводит молекулу GO на достаточно близкое расстояние к молекуле HRP, так что сигнал, генерируемый молекулой GO (т.е. H_2O_2), может канализироваться на молекулу HRP, вызывая генерацию детектируемого и/или амплифицируемого сигнала. Преимущество канализирования при сближении, применяемого в описанных здесь способах, состоит в том, что единственный детектируемый сигнал, коррелирующий с уровнем общего или активированного белка BCR-ABL, генерируется только после связывания всех трех антител (например, захватывающего антитела, конъюгированного с содействующей молекулой антитела и конъюгированного с парой амплификации сигнала антитела), что приводит к повышению специфичности определения, снижению фона и упрощению детектирования.

На фиг.3В представлено альтернативное воплощение (400) детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) BCR-ABL (410) с использованием стыковочных антител. Опять же для удаления полноразмерных белков BCR и/или ABL, например, по их C- и N-концам, соответственно, применяются шарики (421a и/или 421b). Затем, посредством захвата N-концевой части BCR-ABL с помощью специфически связывающейся молекулы, иммобилизованной на твердой подложке, определяется общая концентрация BCR-ABL (440), а также измеряется активированный BCR-ABL (450). Общий уровень BCR-ABL (460) и активированного белка (470) также можно определить путем захвата ABL-C и использования стыковочного антитела для измерения общего уровня BCR-ABL либо использования специфичного к фосфорилированному ABL антитела для измерения уровня активированного BCR-ABL.

В частности, из фиг.3В (440) видно, что общее количество BCR-ABL, присутствующего в биологическом образце типа сыворотки, можно детектировать путем контактирования захваченного анализата с (i) первым детектирующим антителом (т.е. стыковочным антителом), специфичным к месту или точке слияния между N-концевым участком BCR (BCR-N) и C-концевым участком ABL (ABL-C), и (ii) вторым детектирующим антителом, специфичным к ABL-C. И первое, и второе детектирующие антитело связываются с BCR-ABL независимо от его активационного состояния. Первое детектирующее антитело (т.е. стыковочное антитело) помечено глюкозооксидазой (GO), а второе детектирующее антитело помечено пероксидазой хрена (HRP). Одновременное связывание и первого, и второго детектирующего антитела со слитым белком BCR-ABL приводит молекулу GO на достаточно близкое расстояние к молекуле HRP, так что сигнал, генерируемый молекулой GO (т.е. H_2O_2), может канализироваться на молекулу HRP, вызывая генерацию детектируемого и/или амплифицируемого сигнала.

Далее из фиг.3В (450) видно, что количество активированного BCR-ABL, присутствующего в биологическом образце типа сыворотки, можно детектировать путем контактирования захваченного анализата с (i) первым детектирующим антителом (т.е. стыковочным антителом), специфичным к месту или точке слияния между BCR-N и ABL-C, и (ii) вторым детектирующим антителом, специфичным к активированной (например, фосфорилированной) форме BCR-ABL. Первое детектирующее антитело связывается с BCR-ABL независимо от его активационного состояния, тогда как второе детектирующее антитело связывается с сайтом активации (например, фосфорилирования), находящимся на домене ABL-C слитого белка. Первое детектирующее антитело (т.е. стыковочное антитело) помечено глюкозооксидазой (GO), а второе детектирующее антитело помечено пероксидазой хрена (HRP). Одновременное связывание и первого, и второго детектирующего антитела со слитым белком BCR-ABL приводит молекулу GO на достаточно близкое расстояние к молекуле HRP, так что сигнал, генерируемый молекулой GO (т.е. H_2O_2), может канализироваться на молекулу HRP, вызывая генерацию детектируемого и/или амплифицируемого сигнала.

В тех воплощениях, в которых стадии (c) и (d) включают ELISA, метод ELISA может включать «сэндвич»-ELISA. Для захвата и детектирования методом «сэндвич»-ELISA может использоваться любая подходящая пара антител. Специалистам должно быть известно, как выбрать подходящую пару антител для определения. Обычно выбираются два антитела, которые связываются с данной мишенью, например, BCR-ABL, по различным эпитопам, так что связывание первого (захватывающего) антитела не мешает связыванию второго (детектирующего) антитела. В предпочтительных воплощениях первое (захватывающее) антитело связывается со вторым другим доменом первого полноразмерного белка (например, BCR-N), а второе (детектирующее) антитело связывается с первым доменом второго другого полноразмерного белка (например, ABL-C). В некоторых воплощениях детектирующее антитело должно быть конъюгировано с ферментом, к примеру, пероксидазой хрена (HRP) или щелочной фосфатазой (AP), способствующей детектированию комплекса. В других воплощениях при определении может применяться вторичное антитело, конъюгированное с ферментом (например, HRP или AP), которое связывается с детектирующим антителом. Обычно после этого комплекс детектируется при помощи люминесцентного субстрата, например, Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); и CPSD (двухзамещенный 3-(4-метоксиспиро {1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлоро)трицикло[3.3.1.1^{3,7}]декан}-4-ил)фенилфосфат натрия;

Tropix, Inc). Субстрат CPSD может находиться в системах хемилюминесцентного детектирования, таких, например, как ELISA-Light™ System (Applied Biosystems). В одном предпочтительном воплощении «сэндвич»-EE18A на BCR-ABL включает применение антитела против BCR-N в качестве захватывающего антитела, причем захватывающее антитело фиксировано на твердой подложке типа лунки микропланшета, и конъюгированного с HRP антитела против ABL-C в качестве детектирующего антитела, причем детектирующее антитело может составлять независимое от активационного состояния антитело или зависимое от активационного состояния (например, фосфоспецифичное) антитело.

На фиг.3С представлены типичные воплощения «сэндвич»-ELISA (500) для детектирования наличия (общего количества) и/или активационного состояния (уровня фосфорилирования) BCR-ABL (510). Для удаления полноразмерных белков BCR и/или ABL, например, по их С- и N-концам, соответственно, применяются шарики (521a и/или 521b). Затем методом ELISA с захватом N-концевой части BCR-ABL с помощью специфически связывающейся молекулы определяется общая концентрация BCR-ABL (540), а также измеряется активированный BCR-ABL (550). Общий уровень BCR-ABL (560) и активированного белка (570) также можно определить путем захвата ABL-C и последующего контактирования захваченного слитого белка BCR-ABL с детектирующим антителом, специфичным к BCR-N, или детектирующим антителом, специфичным к сайту фосфорилирования на ABL-C, соответственно, при помощи ELISA.

В тех воплощениях, в которых стадии (c) и (d) включают определение методом проточной цитометрии (FCM), метод FCM может включать флуоресцентно активируемую сортировку клеток (FACS). Проточная цитометрия - это метод подсчета и исследования микроскопических частиц, как-то клеток, путем суспендирования их в потоке жидкости и пропускания через прибор электронного детектирования. Проточная цитометрия дает возможность одновременного мультипараметрического анализа физических и/или химических характеристик тысяч частиц в секунду. При проточной цитометрии на гидродинамически сфокусированный поток жидкости направляется луч света (обычно лазерный луч) одной длины волны. На точку, в которой поток проходит через луч света, нацелены несколько детекторов: один в направлении луча света (прямое рассеяние, или FSC) и несколько перпендикулярно ему (боковое рассеяние, или SSC), а также один или несколько детекторов флуоресценции. Каждая взвешенная частица размером от 0.2 до 150 мкм, проходящая через луч, рассеивает свет, а флуоресцентные вещества, находящиеся в частице или прикрепленные к ней, при возбуждении их будут испускать свет при большей длине волны, чем источник света. Такое сочетание рассеянного и флуоресцентного света воспринимается детекторами, при этом путем анализа флуктуации яркости на каждом детекторе (по одному на каждый пик излучения флуоресценции) можно извлечь разнообразную информацию о физической и химической структуре каждой отдельной частицы. FSC коррелирует с объемом частиц, а SSC зависит от внутренней сложности данной частицы. В некоторых проточных цитометрах не требуется флуоресценция в них измеряется только светорассеяние, тогда как в других проточных цитометрах изображение формируется из флуоресценции, светорассеяния и светопропускания по каждой отдельной частице.

Специализированным типом проточной цитометрии является FACS. Он обеспечивает способ сортировки гетерогенной смеси в два или несколько контейнеров, по одной частице за раз, исходя из конкретных характеристик светорассеяния и флуоресценции каждой частицы. Это полезный научный инструмент, так как он обеспечивает быструю и количественную регистрацию флуоресцентных сигналов от индивидуальных частиц,

а также физическое разделение частиц, представляющих особый интерес. Суспензия частиц вовлекается в центр узкого, быстро текущего потока жидкости. Поток организован так, что имеется большое разделение между частицами по диаметру. Вибрирующий механизм вызывает разбивание потока частиц на отдельные капельки.

5 Система настроена так, что возможность попадания более одной частицы на капельку очень низка. Непосредственно перед тем, как струя разбивается на капли, она проходит через установку измерения флуоресценции, где измеряется флуоресцентная характеристика каждой частицы. Именно в той точке, где струя разбивается на капли, помещается электрическое зарядное кольцо. На кольцо подается заряд, исходя из
10 измерения флуоресценции непосредственно перед этим, а капелька получает противоположный заряд, когда она отрывается от струи. Затем заряженные частицы проходят через электростатическую отклоняющую систему, которая отводит капельки в контейнеры согласно их заряду. В некоторых системах заряд подается непосредственно на струю, а отрывающаяся капелька сохраняет заряд того же знака, что и струя. Струя
15 снова становится нейтральной после того, как оторвется капелька. Метод FACS может выполняться на проточном цитометре FACS Calibur фирмы BD Biosciences (San Jose, CA).

В некоторых воплощениях определение методом FACS проводится с помощью двух антител, которые связываются с нужной мишенью, например, BCR-ABL, по различным
20 эпитопам, так что связывание первого (захватывающего) антитела не мешает связыванию второго (детектирующего) антитела. В предпочтительных воплощениях первое (захватывающее) антитело связывается со вторым другим доменом первого полноразмерного белка (например, BCR-N), а второе, детектирующее антитело связывается с первым доменом второго другого полноразмерного белка (например,
25 ABL-C). В некоторых воплощениях захватывающие антитела фиксированы на шариках типа полистироновых шариков, а шарики изнутри окрашены флуорофорами. В некоторых воплощениях детектирующее антитело конъюгировано с флуорофором или ферментом, способствующим детектированию комплекса. Детектирующее антитело может включать независимое от активационного состояния антитело или зависимое
30 от активационного состояния (например, фосфоспецифичное) антитело. В других воплощениях при определении может использоваться флуорофор, фермент или другая детектирующая молекула, которая связывается с детектирующим антителом. Обычно комплекс детектируется, как описано выше.

В тех воплощениях, в которых стадии (c) и (d) включают метод сортировки по тегам, метод сортировки по тегам может включать определение на приборе Luminex. Приборы Luminex® доступны, например, от Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). В некоторых случаях метод сортировки по тегам включает мультиплексный формат Luminex®. В
35 общем, выбираются два антитела, которые связываются с нужной мишенью, например, BCR-ABL, по различным эпитопам, так что связывание первого (захватывающего) антитела не мешает связыванию второго (детектирующего) антитела. В предпочтительных воплощениях первое (захватывающее) антитело связывается со вторым другим доменом первого полноразмерного белка (например, BCR-N), а второе, детектирующее антитело связывается с первым доменом второго другого полноразмерного белка (например, ABL-C). В некоторых воплощениях захватывающие
40 антитела фиксированы на полистироновых шариках, а шарики изнутри окрашены красным и инфракрасным флуорофорами различной интенсивности. В некоторых воплощениях детектирующее антитело конъюгировано с флуорофором или ферментом, способствующим детектированию комплекса. Детектирующее антитело может включать

независимое от активационного состояния антитело или зависимое от активационного состояния (например, фосфоспецифичное) антитело. В других воплощениях при определении может использоваться флуорофор, фермент или другая детектирующая молекула, которая связывается с детектирующим антителом. Обычно комплекс затем детектируется, например, при помощи такой системы детекции, как Luminex® 100™ или 200™, при этом шарики считываются по одному сдвоенным лазером для классификации и количественного определения каждого анализата.

На фиг.3D представлены типичные воплощения проточной цитометрии и сортировки по тегам (600) для детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) BCR-ABL (610). Для удаления полноразмерных белков BCR и/или ABL, например, по их С- и N-концам, соответственно применяются шарики (621a и/или 621b). Затем используются шарики, специфичные к захватываемой N-концевой части BCR-ABL с помощью специфически захватывающей молекулы, и шарики, специфичные к С-концу ABL. Общий белок (640) определяется подсчетом молекул с двумя специфичными тегам или окрашенных шариков. Аналогичным образом можно определить количество активированного белка, используя шарики с захватывающим антителом, специфичным к фосфорилированной части ABL и N-концу BCR-ABL. количество активированного BCR-ABL (650). Общий уровень BCR-ABL (660) и активированного белка (670) также можно определить посредством захвата С-конца ABL специфичными захватывающими шариками и контактирования захваченного слитого белка BCR-ABL с шариками, специфичными к BCR-N, или с шариками, специфичными к фосфорилированной части ABL. Подсчетом этих двух специфически окрашенных шариков или тегов можно измерить общее количество (660) или количество активированного белка (670) BCR-ABL.

Неограничивающие примеры антител, пригодных для использования в способах измерения общего уровня и/или активированного BCR-ABL, представленных на фиг.3A-3D, приведены ниже в табл.1.

Таблица 1.				
Типичные антитела для определения BCR-ABL по настоящему изобретению				
Мишень	Антитело	Клон	Эпитоп	Поставщик
BCR	AF5129		N-концевой	R&D
	sc-48422	H-5	N-концевой	Santa Cruz
	1684	EP535Y	C-концевой	Epitomics
ABL	AF5414		C-концевой	R&D
	4G10		фосфотирозин	Millipore
	ab62189		pY245	Abeam
	PAB0397		pY245	Novus
	ab47315		pY412	Abeam
	ab55284		pY412	Abeam
	NB100-92665		pY412	Novus

Дополнительные примеры антител, связывающихся с опухолеспецифичными слитыми белками BCR-ABL и неонкогенными нативными полноразмерными белками BCR или ABL, включают, без ограничения, специфичное к эпитопу b2 BCR моноклональное антитело 7C6, которое распознает белки p210 b2a2 BCR-ABL, p210 b3a2 BCR-ABL, p160 BCR и p130 BCR, описанные в Dhut et al., Oncogene, 3:561-6 (1988); специфичное к домену SH2 антитело 8E9, которое распознает белки p190 e1a2 BCR-ABL, b2a2, b3a2 и p145 ABL, описанные в U.S. Patent Nos. 5,369,008 и 6,610,498; специфичное к N-концу BCR антитело, описанное в U.S. Patent No. 6,107,457; и специфичное к С-концу ABL (24-11) мышинное моноклональное антитело #SC-23 фирмы Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa

Cruz, CA).

Примеры стыковочных антител, пригодных для связывания по месту или точке слияния внутри химерного белка BCR-ABL включают, без ограничения, специфичное к стыку b2a2 BCR-ABL (L99H4) мышинное моноклональное антитело #3908 фирмы Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA); специфичные к слитому белку p210 BCR-ABL выделенные антитела, описанные в U.S. Patent Publication No. 20050214301; специфичное к стыку b3a2 BCR-ABL поликлональное антитело BP-2, описанное в van Denderen et al., Leukemia, 6:1107-12 (1992); и специфичное к стыку e1a2 BCR-ABL моноклональное антитело (ER-FP1), описанное в van Denderen et al., Leukemia, 8:1503-9 (1994).

Стыковочные антитела к BCR-ABL могут применяться для детектирования слитых белков BCR-ABL, которые связаны с Ph-положительными типами лейкемии, но не ограничиваются этим.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения предусматривают получение клеточного экстракта из свежевыделенного или замороженного костного мозга (например, аспирата костного мозга) или образцов цельной крови путем извлечения или выделения нужных клеток типа лейкоцитов (например, клеток хронической миелогенной лейкемии (CML)), например, методом захвата магнитными шариками с антителами против CD45 и/или против CD 15, без какой-либо отмывки после извлечения или выделения клеток. Полученный при этом клеточный экстракт можно анализировать на уровень экспрессии и/или активации одного или нескольких онкогенных слитых белков типа BCR-ABL, их субстратов, сигнальных путей или их комбинаций. Не придерживаясь какой-либо определенной теории, исключение потребности в отмывке после выделения клеток дает преимущество в том, что нужные клетки могут быть выделены из образцов крови или костного мозга без изменения внутриклеточной концентрации противоракового препарата, как-то ингибитора тирозинкиназ. Как изложено ниже в Примере 9, выделение клеток без какой-либо отмывки, как описано здесь, идет вразрез с общепринятой практикой отмывания клеток после выделения (например, отмывания связанных с шариками клеток) и дает клеточные экстракты из выделенных клеток без существенного разбавления противоракового препарата, как-то ингибитора тирозинкиназ (например, Gleevec®, Tasigna®, Sprycel® и т.п.), внутри клеток.

В альтернативных воплощениях способы настоящего изобретения предусматривают одновременное детектирование общего количества и/или активационного состояния онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в сочетании с одним или обоими нативными полноразмерными белками, содержащими последовательности или домены, находящиеся внутри онкогенного слитого белка (например, с полноразмерным BCR и/или ABL). В одном определенном воплощении настоящий способ обеспечивает детектирование и/или измерение как общего уровня белка BCR-ABL, так и общего уровня нативного полноразмерного BCR и/или ABL в таких биологических образцах, как кровь или аспират костного мозга. В некоторых воплощениях уровень нативного белка (например, полноразмерного BCR и/или ABL) определяется вместе с уровнем онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в мультиплексном формате на одной и той же пластинке. В этих воплощениях нативный полноразмерный белок предпочтительно можно выделить вместе с онкогенным слитым белком таким образом, что уровни этих молекул определяются на одном и том же планшете.

Как изложено ниже в Примере 10, эти альтернативные воплощения способов настоящего изобретения могут применяться для детектирования и/или измерения общего уровня BCR-ABL, а также общего уровня нативного полноразмерного BCR или ABL,

причем можно рассчитать отношение общего уровня BCR-ABL к уровню нативного полноразмерного BCR или ABL. В некоторых случаях отношение уровня BCR-ABL к уровню нативного полноразмерного BCR или ABL рассчитывается для более точного определения таких индикаторов ответа, к примеру, как сильный молекулярный ответ (MMR), полный молекулярный ответ (CMR), полный цитогенетический ответ (CCyR) и их комбинации. В других случаях эти альтернативные воплощения способов настоящего изобретения могут применяться для отслеживания изменений экспрессии BCR-ABL относительно контроля типа нативного полноразмерного BCR или ABL (например, путем вычисления отношения общего уровня BCR-ABL к уровню нативного полноразмерного BCR или ABL) в зависимости от терапии (например, терапии ингибитором тирозинкиназ).

Способы настоящего изобретения особенно подходят для определения активационного состояния (например, фосфорилирования) одного или нескольких онкогенных слитых белков типа BCR-ABL у пациентов, подвергающихся риску возникновения, с подозрением на наличие или с диагнозом рака типа гематологической злокачественности (например, лейкемии, лимфомы и т.п.). В определенных случаях способы настоящего изобретения помогают, способствуют или облегчают диагностику рака у субъекта путем измерения уровня активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, уровня фосфо-BCR-ABL), чтобы установить, экспрессируется ли у субъекта активированная форма онкогенного слитого белка (например, у BCR-ABL-положительного пациента). В других воплощениях способы настоящего изобретения выполняются на субъекте, у которого уже установлена экспрессия активированной формы онкогенного слитого белка, для оптимизации лечения, снижения токсичности и/или мониторинга эффективности терапевтического лечения. В одном определенном аспекте этих воплощений можно определить уровень активированного белка BCR-ABL у BCR-ABL-положительного пациента во время курса терапии (например, когда пациент находится в процессе терапии противораковым препаратом типа Gleevec®, Tasigna®, Sprycel® и т.п.) для оптимизации лечения, снижения токсичности и/или мониторинга эффективности терапевтического лечения. В некоторых воплощениях измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение уровня активированного онкогенного слитого белка к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). В некоторых воплощениях отношение уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) можно рассчитывать относительно уровня одного или нескольких контрольных белков, таких, например, как один или оба нативных полноразмерных белка, содержащих последовательности или домены, находящиеся внутри онкогенного слитого белка (например, BCR и/или ABL для слитого белка BCR-ABL). В предпочтительных воплощениях на общий уровень контрольного белка не влияет или его существенно не изменяет терапия противораковым препаратом.

Способы настоящего изобретения также особенно подходят для определения активационного состояния (например, фосфорилирования) одной или нескольких

молекул сигнальной трансдукции в одном или нескольких метаболических путях, связанных с онкогенным слитым белком типа BCR-ABL, у пациентов, подвергающихся риску возникновения, с подозрением на наличие или с диагнозом рака типа гематологической злокачественности (например, лейкемии, лимфомы и т.п.). Типичные молекулы сигнальной трансдукции включают субстраты BCR-ABL, такие, например, как CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 и их комбинации. В определенных случаях способы настоящего изобретения помогают, способствуют или облегчают диагностику рака у субъекта путем измерения уровня активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, уровня фосфо-BCR-ABL) и уровня активированной (например, фосфорилированной) молекулы сигнальной трансдукции (например, уровня фосфо-CRKL, фосфо-JAK2, фосфо-STAT5 и др.), чтобы установить, экспрессируется ли у субъекта активированная форма онкогенного слитого белка (например, у BCR-ABL-положительного пациента) и/или активированная форма одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции этого пути. В других воплощениях способы настоящего изобретения выполняются на субъекте, у которого уже установлена экспрессия активированной формы онкогенного слитого белка, для оптимизации лечения, снижения токсичности и/или мониторинга эффективности терапевтического лечения. В одном определенном аспекте этих воплощений можно определить уровень активированного белка BCR-ABL и одного или нескольких компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK и др.) у BCR-ABL-положительного пациента во время курса терапии (например, когда пациент находится в процессе терапии противораковым препаратом типа Gleevec, Tasigna, Sprycel® и т.п.) для оптимизации лечения, снижения токсичности и/или мониторинга эффективности терапевтического лечения. В некоторых воплощениях измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение уровня активированного онкогенного слитого белка к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). В других воплощениях измеряется уровень и общего, и активированного компонента пути передачи сигналов и рассчитывается отношение уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи сигналов (например, отношение фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5) (например, относительно уровня одного или нескольких контрольных белков), которое можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень компонента пути передачи сигналов с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). В определенных случаях уровень экспрессии онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) можно скоррелировать или связать с уровнем активации (например, фосфорилирования) нижележащих компонентов пути передачи сигналов типа CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK и др.

В одном определенном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъекта, страдающего раком и

получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата (например, одного или нескольких ингибиторов тирозинкиназ типа Gleevec®, Tassigna®, Sprycel® и др.);

5 (b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) измерение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка, измеренным
10 ранее во время курса терапии; и

(e) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс терапии, исходя из сравнения на стадии (d).

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется и уровень экспрессии, и уровень активации онкогенного слитого белка, например, одним из
15 описанных здесь методов анализа сближения. В некоторых предпочтительных воплощениях онкогенный слитый белок включает BCR-ABL. В некоторых других предпочтительных воплощениях у субъекта экспрессируется активированная форма онкогенного слитого белка. В особенно предпочтительном воплощении субъект является BCR-ABL-положительным (например, у субъекта установлен детектируемый уровень
20 фосфо-BCR-ABL до назначения противоракового препарата).

В некоторых воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение уровня активированного к общему уровню
25 онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии
30 противораковым препаратом). Как видно из нижеприведенного Примера 6, отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) при ингибировании противораковым препаратом коррелирует с процентом ингибирования сигнала активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, фосфо-BCR-ABL) при применении противоракового препарата (например,
35 см. фиг.14C, 15C и 16C). В других воплощениях отношение уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) можно рассчитать относительно уровня одного или нескольких контрольных белков, таких, например, как один или оба полноразмерных нативных белка, содержащих последовательности или домены, находящиеся внутри онкогенного
40 слитого белка (например, BCR и/или ABL для BCR-ABL). В предпочтительных воплощениях на общий уровень контрольного белка не влияет или его существенно не изменяет терапия противораковым препаратом.

В некоторых аспектах описанных здесь способов оптимизации терапии ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка
45 (например, BCR-ABL) у субъекта меньше чем на 50% указывает на необходимость увеличения последующей дозы в курсе терапии или назначения другого курса терапии (например, изменения текущего курса терапии переходом на другой противораковый препарат) для того, чтобы предотвратить или уменьшить риск рецидива рака у субъекта.

В качестве неограничивающего примера: в тех случаях, когда субъект находится на терапии препаратом Gleevec®, ингибирование степени фосфорилирования слитого белка BCR-ABL меньше чем на 50% указывает на необходимость увеличения последующей дозы Gleevec® или перевода субъекта на терапию препаратом Tasigna®.

- 5 В некоторых воплощениях на необходимость увеличения последующей дозы в курсе терапии или изменения текущего курса терапии указывает ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) у субъекта меньше чем на 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых воплощениях процент
- 10 ингибирования степени активации онкогенного слитого белка можно определить путем расчета отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например, полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL), и сравнения отношения фосфо/общий
- 15 уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). Специалистам должны быть известны подходящие более высокие или низкие дозы, на которые можно перевести текущий курс терапии с тем, чтобы оптимизировать терапию, например,
- 20 последующая доза должна быть по меньшей мере в 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз больше или меньше текущей дозы.

- В некоторых других аспектах способов оптимизации терапии ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка (например, BCR-
- 25 ABL) у субъекта меньше чем на 50% указывает на несоблюдение субъектом режима терапии (например, субъект принимает противораковый препарат нерегулярно или не так, как предписано врачом) и/или на наличие возможных побочных эффектов или токсичности, связанных с курсом терапии. В этих воплощениях рекомендуется тщательно проверить (например, врачом или другим персоналом) соблюдение текущего курса
- 30 терапии или назначить другой курс терапии (например, перевести текущий курс терапии на другой противораковый препарат) с тем, чтобы усилить соблюдение и/или предотвратить или уменьшить риск побочных эффектов. В некоторых случаях на несоблюдение субъектом режима терапии и/или на наличие возможных побочных эффектов или токсичности, связанных с курсом терапии, указывает ингибирование
- 35 степени активации онкогенного слитого белка у субъекта меньше чем на 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых воплощениях процент ингибирования степени активации онкогенного слитого белка можно определить путем расчета отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий
- 40 уровень белка BCR-ABL), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например, полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL) и сравнения отношения фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии
- 45 противораковым препаратом).

В других аспектах описанных здесь способов оптимизации терапии ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) у субъекта больше чем на 80% указывает на то, что субъект

получает правильную терапию с правильной дозировкой. В некоторых случаях на то, что субъект получает правильную терапию с правильной дозировкой, указывает ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) у субъекта больше чем на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых воплощениях процент ингибирования степени активации онкогенного слитого белка можно определить путем расчета отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например, полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL), а затем сравнения отношения фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом).

В родственном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъекта, страдающего раком и получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата (например, одного или нескольких ингибиторов тирозинкиназы типа Gleevec®, Tasigna, Sprycel® и др.);

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) измерение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка и одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции в этом пути описанным здесь способом определения;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции, измеренным ранее во время курса терапии; и

(е) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс терапии, исходя из сравнения на стадии (d).

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется и уровень экспрессии, и уровень активации онкогенного слитого белка и одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции, например, одним из описанных здесь методов анализа сближения. В некоторых предпочтительных воплощениях онкогенный слитый белок включает BCR-ABL. В некоторых других предпочтительных воплощениях молекулы сигнальной трансдукции включают субстраты BCR-ABL, такие, например, как CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1 и их комбинации. В следующих воплощениях у субъекта экспрессируется активированная форма онкогенного слитого белка. В особенно предпочтительном воплощении субъект является BCR-ABL-положительным (например, у субъекта установлен детектируемый уровень фосфо-BCR-ABL до назначения противоракового препарата).

В некоторых воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) и компонента пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и отношение уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи

сигналов (например, отношение фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), которые можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка и компонента пути передачи сигналов с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). В других воплощениях отношение уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и отношение уровня активированной к общему уровню молекулы сигнальной трансдукции (например, отношение фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5) можно рассчитывать относительно уровня одного или нескольких контрольных белков, таких, например, как один или оба нативных полноразмерных белка, содержащих последовательности или домены, находящиеся внутри онкогенного слитого белка (например, BCR и/или ABL для BCR-ABL). В предпочтительных воплощениях на общий уровень контрольного белка не влияет или его существенно не изменяет терапия противораковым препаратом.

В некоторых аспектах описанных здесь способов оптимизации терапии ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта меньше чем на 50% указывает на необходимость увеличения последующей дозы в курсе терапии или назначения другого курса терапии (например, изменения текущего курса терапии переходом на другой противораковый препарат) для того, чтобы предотвратить или уменьшить риск рецидива рака у субъекта. В качестве неограничивающего примера: в тех случаях, когда субъект находится на терапии препаратом Gleevec®, ингибирование степени фосфорилирования слитого белка BCR-ABL и/или компонента передачи сигналов типа CRKL, JAK2 и/или STAT5 меньше чем на 50% указывает на необходимость увеличения последующей дозы Gleevec® или перевода субъекта на терапию препаратом Tasigna. В некоторых случаях на необходимость увеличения последующей дозы в курсе терапии или изменения текущего курса терапии указывает ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта меньше чем на 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых случаях процент ингибирования степени активации онкогенного слитого белка и/или молекулы сигнальной трансдукции можно определить путем расчета отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и/или отношения уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи сигналов (например, отношения фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например, полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL), и сравнения рассчитанного отношения фосфо/общий уровень с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом). Специалистам должны быть известны подходящие более высокие или низкие дозы, на которые можно перевести текущий курс терапии с тем, чтобы оптимизировать терапию, например, последующая доза должна быть по меньшей мере в 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз больше или меньше текущей дозы.

В некоторых других аспектах способов оптимизации терапии ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта меньше чем на 50%

5 указывает на несоблюдение субъектом режима терапии (например, субъект принимает противораковый препарат нерегулярно или не так, как предписано врачом) и/или на наличие возможных побочных эффектов или токсичности, связанных с курсом терапии. В этих воплощениях рекомендуется тщательно проверить (например, врачом или другим персоналом) соблюдение текущего курса терапии или назначить другой курс терапии

10 (например, перевести текущий курс терапии на другой противораковый препарат) с тем, чтобы усилить соблюдение и/или предотвратить или уменьшить риск побочных эффектов. В некоторых случаях на несоблюдение субъектом режима терапии и/или на наличие возможных побочных эффектов или токсичности, связанных с курсом терапии, указывает ингибирование степени активации одного, двух, трех, четырех, пяти, шести

15 или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта меньше чем на 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. В некоторых воплощениях процент ингибирования степени активации онкогенного слитого белка и/или молекулы сигнальной трансдукции можно определить путем расчета

20 отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и/или отношения уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи сигналов (например, отношения фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например,

25 полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL), и сравнения отношения фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом).

В других аспектах описанных здесь способов оптимизации терапии ингибирование

30 степени активации (например, фосфорилирования) одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта больше чем на 80% указывает на то, что субъект получает правильную терапию с правильной дозировкой. В некоторых случаях на то, что субъект получает правильную терапию с правильной

35 дозировкой, указывает ингибирование степени активации (например, фосфорилирования) одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или больше онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или компонентов пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) у субъекта больше чем на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых воплощениях

40 процент ингибирования степени активации онкогенного слитого белка и/или молекулы сигнальной трансдукции можно определить путем расчета отношения уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношения фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и/или отношения уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи сигналов (например, отношения фосфо/

45 общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), необязательно относительно уровня одного или нескольких контрольных белков (например, полноразмерного BCR и/или ABL для BCR-ABL), а затем сравнения отношения фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например,

ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом).

В других аспектах описанных здесь способов оптимизации терапии активация альтернативного пути передачи сигналов указывает на необходимость изменения или
 5 коррективки текущего курса терапии (например, перехода на другой противораковый препарат). В качестве неограничивающего примера: в тех случаях, когда субъект получает терапию препаратом Gleevec®, активация (например, фосфорилирование) альтернативного пути передачи сигналов типа Src указывает на необходимость перевода субъекта на терапию препаратом Sprycel® или Tasigna®.

10 В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

15 (с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь методом определения; и

(d) определение того, подходит или не подходит противораковый препарат для лечения рака путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации
 20 онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

В предпочтительном воплощении способ выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед
 25 инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим
 30 серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(е) установление того, что противораковый препарат подходит для лечения рака,
 35 если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для помощи или содействия в выборе подходящего противоракового препарата для лечения
 40 рака, такого, например, как гематологическая злокачественность. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака, такого, например, как гематологическая злокачественность. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает стадию установления того, что противораковый препарат
 45 не подходит для лечения рака, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других воплощениях наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками в клеточном экстракте

детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется, подходит или не подходит противораковый препарат.

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения; и

(d) идентификацию рака как реагирующего или не реагирующего на лечение противораковым препаратом путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

В предпочтительном воплощении способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(e) установление того, что рак реагирует на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для помощи или содействия в идентификации реакции рака, такого, например, как гематологическая злокачественность, на лечение противораковым препаратом. В

других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения идентификации реакции рака, такого, например, как гематологическая злокачественность, на лечение противораковым препаратом. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает стадию установления того, что

рак не реагирует на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других воплощениях наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул

сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется, что рак реагирует или не реагирует на лечение противораковым препаратом.

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ предсказания реакции субъекта, страдающего раком, на лечение противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

и
(d) предсказание вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

В предпочтительном воплощении способ предсказания реакции субъекта, страдающего раком, на лечение противораковым препаратом включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(e) установление того, что субъект должен будет реагировать на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для помощи или содействия в предсказании реакции субъекта на лечение противораковым препаратом для такого рака, например, как гематологическая злокачественность. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения предсказания реакции субъекта на лечение противораковым препаратом для такого рака, например, как гематологическая злокачественность. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает стадию установления того, что субъект вряд ли будет реагировать на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации. В других воплощениях наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» предсказывается вероятность того, что субъект будет реагировать на лечение.

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например,

фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения; и

(d) определение того, что субъект не поддается или поддается лечению противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время.

В предпочтительном воплощении способ определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более

раннее время; и

(e) установление того, что субъект не поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для помощи или содействия в идентификации субъектов, страдающих раком, которые не поддаются лечению противораковым препаратом, или в установлении того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, причем субъект страдает таким раком, например, как гематологическая злокачественность. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения идентификации субъектов, страдающих раком, которые не поддаются лечению противораковым препаратом, или установления того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, причем субъект страдает таким раком, например, как гематологическая злокачественность.

В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает стадию установления того, что субъект поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации. Неограничивающие примеры причин, по которым субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, включают наличие одной или нескольких мутаций в данном онкогенном слитом белке (например, BCR-ABL), несоблюдение режима лечения и/или применение субоптимальной дозы препарата. В отношении субоптимальной дозы препарата способ может дополнительно включать стадию увеличения следующей или последующей дозы противоракового препарата, назначенного субъекту. В других воплощениях наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» субъект идентифицируется как не поддающийся или

поддающийся лечению.

В определенных воплощениях уровень экспрессии (например, общий уровень) и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции считается «измененным» в присутствии противоракового препарата, если он экспрессируется или активируется по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% больше или меньше, чем в отсутствие противоракового препарата. В одном воплощении уровень экспрессии (например, общий уровень) и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции считается «существенно меньшим» в присутствии противоракового препарата, если он экспрессируется или активируется по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% меньше, чем в отсутствие противоракового препарата. В других воплощениях уровень экспрессии (например, общий уровень) и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции считается «существенно меньшим» в присутствии противоракового препарата, если (1) имеется изменение от сильной экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции в отсутствие противоракового препарата к умеренной, слабой или очень слабой экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции в присутствии противоракового препарата, либо (2) имеется изменение от умеренной экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции в отсутствие противоракового препарата к слабой или очень слабой экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции в присутствии противоракового препарата.

В некоторых воплощениях уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции выражается в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ), которые соответствуют интенсивности сигнала для данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа описанного здесь иммуноанализа совместного сближения (СОРІА). В других воплощениях уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансакции выражается как «-», «±», «+», «++», «--» или «--», что соответствует повышению интенсивности сигнала для данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА. В некоторых случаях необнаруживаемый или минимально обнаруживаемый уровень экспрессии и/или активации данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА может быть выражен как «-» или «±». В других случаях низкий уровень экспрессии и/или активации данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА может быть выражен как «+». Еще в других случаях умеренный уровень экспрессии и/или активации данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА может быть выражен как «++». Еще в других случаях высокий уровень экспрессии и/или активации данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА может быть выражен как «+++». Еще в других случаях очень высокий уровень экспрессии и/или активации данного анализита при определении, например, методом анализа сближения типа СОРІА может быть выражен как «++++».

В других воплощениях уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции определяется количественно путем калибровки или нормировки значений ОЕФ, определенных, например, методом анализа сближения типа СОРІА, по стандартной кривой, составленной для данного анализита. В

некоторых случаях по стандартной кривой можно вычислять расчетные единицы (РЕ или СУ). В других случаях значения РЕ могут быть выражены как «-», «±», «+», «++», «+++» или «++++» в соответствии с приведенным выше описанием для интенсивности сигнала.

5 В некоторых воплощениях уровень экспрессии или активации данного анализита при выражении его как «-», «±», «+», «++», «+++» или «++++» может соответствовать такому уровню экспрессии или активации, который по меньшей мере в 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз выше или ниже (например, в 1.5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 10 5-10, 5-15, 5-20 или 5-50 раз выше или ниже) контрольного уровня экспрессии или активации, например, при сравнении с отрицательным контролем типа контроля на IgG, при сравнении со стандартной кривой, составленной для данного анализита, при сравнении с положительным контролем типа общего контроля на СК, при сравнении с уровнем экспрессии или активации, определенным в присутствии противоракового 15 препарата, и/или при сравнении с уровнем экспрессии или активации, определенным в отсутствие противоракового препарата. В некоторых случаях корреляция специфична к анализиту. В качестве неограничивающего примера: уровень экспрессии или активации «+» при определении, например, методом анализа сближения типа СОРА, может соответствовать повышению экспрессии или активации в 2 раза для одного анализита и 20 в 5 раз для другого анализита по сравнению с контрольным уровнем экспрессии или активации.

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется и общий уровень, и уровень активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) или молекулы сигнальной трансдукции в соответствии с 25 методами на основе антител по настоящему изобретению, а затем рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) или отношение активированной к общему уровню молекулы сигнальной трансдукции (например, отношение фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), которое можно сравнивать с таким же 30 отношением, рассчитанным на основе контрольного профиля экспрессии или активации, полученного в отсутствие противоракового препарата.

В некоторых воплощениях контрольный уровень экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемый на 35 стадии (с), получают на нормальных клетках, как-то нераковых клетках от здорового лица, не страдающего раком типа гематологической злокачественности. В некоторых других воплощениях контрольный уровень экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемый на стадии (с), получают на раковых клетках из образца (например, клеточного экстракта) от больного раком типа лейкемии или лимфомы.

40 В некоторых воплощениях контрольный уровень экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемый на стадии (с), получают на клетках (например, раковых клетках, полученных из образца от больного), не подвергавшихся обработке противораковым препаратом. В 45 определенных воплощениях клетки, не подвергавшиеся обработке противораковым препаратом, получают из того же образца, что и выделенные клетки (например, подлежащие исследованию клетки), используемые для получения клеточного экстракта. В некоторых случаях снижение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции по сравнению с контрольным уровнем

экспрессии или активации указывает на то, что противораковый препарат подходит для лечения рака (например, повышается вероятность того, что опухоль будет реагировать на противораковый препарат). В некоторых других случаях идентичность, близость или повышение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции по сравнению с контрольным уровнем экспрессии или активации указывает на то, что противораковый препарат не подходит для лечения рака (например, снижается вероятность того, что опухоль будет реагировать на противораковый препарат).

В альтернативных воплощениях контрольный уровень экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемый на стадии (с), получают на клетках, чувствительных к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом. В таких воплощениях идентичность, близость или снижение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции по сравнению с контрольным уровнем экспрессии или активации указывает на то, что противораковый препарат подходит для лечения рака (например, повышается вероятность того, что опухоль будет реагировать на противораковый препарат). В некоторых других альтернативных воплощениях контрольный уровень экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемый на стадии (с), получают на клетках, устойчивых к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом. В таких воплощениях идентичность, близость или повышение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции по сравнению с контрольным уровнем экспрессии или активации указывает на то, что противораковый препарат не подходит для лечения рака (например, снижается вероятность того, что опухоль будет реагировать на противораковый препарат).

В некоторых воплощениях повышение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемого на стадии (с), считается имеющим место в клеточном экстракте, если уровень экспрессии или активации по меньшей мере в 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз выше (например, в 1.5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 или 5-50 раз выше), чем контрольный уровень экспрессии или активации соответствующего аналита в клетках (например, раковых клетках, полученных из образца от больного), не подвергавшихся обработке противораковым препаратом), в клетках, чувствительных к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом, или в клетках, устойчивых к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом.

В других воплощениях снижение уровня экспрессии или активации онкогенного слитого белка или молекулы сигнальной трансдукции, определяемого на стадии (с), считается имеющим место в клеточном экстракте, если уровень экспрессии или активации по меньшей мере в 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или 100 раз ниже (например, в 1.5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 или 5-50 раз ниже), чем контрольный уровень экспрессии или активации соответствующего аналита в клетках (например, раковых клетках, полученных из образца от больного), не подвергавшихся обработке противораковым препаратом), в клетках, чувствительных к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом, или в клетках, устойчивых к противораковому препарату и обработанных противораковым препаратом.

А. Антительные матрицы

В одном аспекте настоящим изобретением предусмотрены матрицы, обладающие превосходным динамическим диапазоном, включающие несколько серийных разведений захватывающих антител, специфичных к одному или нескольким анализам в клеточном экстракте, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке.

5 В некоторых воплощениях клеточный экстракт получают из образца цельной крови, мочи, мокроты, смывной жидкости бронхов, слез, аспирата из сосков, лимфы, слюны и/или тонкоигольного аспирационного биоптата (FNA). В качестве неограничивающего примера: образец цельной крови сначала разделяют на фракцию сыворотки или плазмы и клеточную фракцию (т.е. осадок клеток). Клеточная фракция обычно содержит
10 эритроциты, лейкоциты и/или циркулирующие клетки из твердой опухоли, как-то циркулирующие раковые клетки (CTCs), циркулирующие эндотелиальные клетки (CECs), циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники (CEPCs), раковые стволовые клетки (CSCs) и их комбинации. Выделенные клетки, находящиеся в клеточной фракции, можно подвергнуть лизису и тем самым преобразовать выделенные клетки в клеточный
15 экстракт любым известным методом.

В некоторых случаях клеточный экстракт включает экстракт циркулирующих клеток из твердой опухоли. Циркулирующие клетки обычно выделяют из образца от пациента с помощью одного или нескольких методов разделения, в том числе, к примеру, иммуномагнитного разделения (например, см. Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:
20 4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), микрожидкостного разделения (например, см. Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (например, см. Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661 (2001)), центрифугирования в градиенте плотности (например, см. Baker et al., Clin. Cancer Res., 13:4865-4871 (2003)), и методами
25 истощения (например, см. Meye et al., Clin. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

В других случаях клеточный экстракт включает экстракт лейкоцитов типа гранулоцитов (полиморфноядерных лейкоцитов), который включает, например, нейтрофилы, базофилы и эозинофилы; агранулоцитов (мононуклеарных лейкоцитов), который включает, например, мононуклеары периферической крови типа лимфоцитов
30 и моноцитов, и макрофагов, а также их смеси. Лейкоциты можно выделить из цельной крови любым известным методом разделения, включая, например, центрифугирование в градиенте плотности Ficoll-НуРаque, гипотонический лизис эритроцитов и с помощью таких сред для градиентов плотности, как Lymphoprep™ и Polymorphprep™ (Axis-Shield; Oslo, Норвегия).

35 В некоторых воплощениях выделенные лейкоциты, циркулирующие клетки или другие клетки (например, клетки, полученные из твердой опухоли методом тонкоигольной аспирации) можно подвергнуть стимуляции *in vitro* одним или несколькими факторами роста до, во время или после инкубации с одним или несколькими противораковыми препаратами. Стимулирующие факторы роста
40 включают, без ограничения, фактор роста эпидермиса (EGF), херегулин (HRG), TGF- α , IGF, ангиопозтин (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, цитокины и т.п. В других случаях выделенные клетки можно подвергнуть лизису, например, после стимуляции фактором роста и/или обработки противораковым препаратом, чтобы получить клеточный экстракт (например, лизат клеток) любым известным методом.
45 Предпочтительно лизис клеток начинают через 1-360 мин после стимуляции фактором роста, более предпочтительно через два различных промежутка времени: (1) через 1-5 мин после стимуляции фактором роста; и (2) через 30-180 мин после стимуляции фактором роста. С другой стороны, лизат клеток можно хранить при -80°C до

использования. Методики выделения, стимуляции и лизиса циркулирующих клеток описаны в PCT Publication No. WO 2008/036802, которая включена путем ссылки во всей полноте на все случаи. Методики получения экстрактов раковых клеток из тканей, биоптатов или первичных культур описаны в PCT Publication No. WO 2009/108637, которая включена путем ссылки во всей полноте на все случаи.

В некоторых воплощениях противораковый препарат включает противосигнальное средство (т.е. цитостатический препарат) типа моноклонального антитела или ингибитора тирозинкиназ; антипролиферативное; химиотерапевтическое средство (т.е. цитостатический препарат); средство гормональной терапии; радиотерапевтическое средство; вакцину; и/или любое другое соединение, способное уменьшить или прекратить неконтролируемый рост аномальных клеток типа раковых клеток. В некоторых воплощениях выделенные клетки подвергают обработке одним или несколькими противосигнальными средствами, антипролиферативными средствами и/или средствами гормональной терапии в сочетании с по меньшей мере одним химиотерапевтическим средством.

Примеры противосигнальных средств включают, без ограничения, такие моноклональные антитела, как трастузумаб (Herceptin®), алемтузумаб (Campath®), бевацизумаб (Avastin®), цетуксимаб (Erbix®), гемтузумаб (Mylotarg®), панитумумаб (Vectibix™), ритуксимаб (Rituxan®) и тоситумомаб (BEXXAR®); такие ингибиторы тирозинкиназ, как иматиниб мезилат (Gleevec®), нилотиниб (Tasigna®), дасатиниб (Sprycel®), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa®), сунитиниб (Sutent®), эрлотиниб (Tarceva®), лапатиниб (GW-572016; Tykerb®), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar®), лефлуномид (SU101) и вандетаниб (ZACTIMA™; ZD6474); а также их комбинации.

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

Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают препараты на основе платины (например, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, спироплатин, ипроплатин, сатраплатин и др.), алкилирующие реагенты (например, циклофосфамид, ифосфамид, хлорамбуцил, бусульфан, мефалан, мехлорэтамин, урамустин, тиотепа, различные нитрозомочевины и др.), антиметаболиты (например, 5-фторурацил, азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, лейковорин, капецитабин, цитарабин, флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar®), пеметрексед (ALIMTA®), ралтитрексед и др.), растительные алкалоиды (например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндесин, подофиллотоксин, паклитаксель (Taxol®), доцетаксель (Taxotere®) и др.), ингибиторы топоизомераз (например, иринотекан, топотекан, амсакрин, этопозид (VP16), этопозид фосфат, тенипозид и др.), противораковые антибиотики (например, доксорубицин, адриамицин, даунорубицин, эпирубицин, актиномицин, блеомицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин и др.), их фармацевтически приемлемые соли, стереоизомеры, производные, аналоги и их комбинации.

Примеры средств гормональной терапии включают, без ограничения, ингибиторы ароматаз (например, аминоглутетимид, анастрозол (Arimidex®), летрозол (Femara), ворозол, эксеместан (Aromasin®), 4-андростен-3,6,17-трион (6-OXO), 1,4,6-андростатриен-3,17-дион (ATD), форместан (Lentaron®) и др.), избирательные модуляторы эстрогеновых рецепторов (например, базедоксифен, кломифен, фулвестрант, лазофоксифен, ралоксифен, тамоксифен, торемифен и др.), стероиды (например, дексаметазон), финастерид и такие агонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH), как гoserелин, их фармацевтически приемлемые соли, стереоизомеры, производные, аналоги и их комбинации.

Неограничивающие примеры противораковых вакцин включают ANYARA фирмы Active Biotech, DCVax-LB фирмы Northwest Biotherapeutics, EP-2101 фирмы IDM Pharma, GV1001 фирмы Pharmexa, 10-2055 фирмы Idera Pharmaceuticals, INGN 225 фирмы Introgen Therapeutics и Stimuvax фирмы Biomira/Merck.

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

В определенных воплощениях один или несколько аналитов, находящихся в клеточном экстракте, включают один или несколько онкогенных слитых белков, самих или в комбинации с одной или несколькими молекулами сигнальной трансдукции. Неограничивающие примеры представляющих интерес онкогенных слитых белков и молекул сигнальной трансдукции описаны выше.

В некоторых воплощениях каждая серия разведения захватывающих антител включает серию понижающихся концентраций захватывающих антител. В некоторых случаях захватывающие антитела последовательно разводят по меньшей мере в 2 раза (например, в 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 или 1000 раз), получая серийные разведения, содержащие заданное количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или больше) понижающихся концентраций захватывающих антител, которые наносятся на матрицу. Предпочтительно на матрицу наносят по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 повторов каждого разведения захватывающих антител.

В других воплощениях твердая подложка включает стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики, бумагу, мембраны (например, нейлоновые, нитроцеллюлозные, поливинилиденфторидные (PVDF) и др.), пучки волокон или любые другие подходящие субстраты. В предпочтительном воплощении захватывающие антитела фиксируют (например, посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий) на стеклянных пластинках, покрытых нитроцеллюлозным полимером, таких, к примеру, как FAST® Slides, которые коммерчески доступны от Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

В качестве неограничивающего примера: адресуемая микроматрица настоящего изобретения может содержать серию разведения захватывающих антител для определения активационного состояния BCR-ABL в клеточном экстракте, причем захватывающие антитела могут быть направлены против домена BCR слитого белка BCR-ABL, а детектирующие антитела (например, зависимые от активационного состояния или независимые от активационного состояния антитела) направлены против домена ABL. В альтернативном воплощении и захватывающие, и независимые от активационного состояния антитела направлены против домена BCR слитого белка BCR-ABL, а зависимые от активационного состояния антитела направлены против домена ABL. Матрицы могут дополнительно содержать несколько различных

захватывающих антител, направленных против других слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции, в виде ряда понижающихся концентраций (т.е. серийных разведениях), причем захватывающие антитела конъюгированы к поверхности твердой подложки в различных адресуемых положениях.

5 Специалистам должно быть известно, что матрица может иметь любую конфигурацию, позволяющую детектировать дискретные сигналы для каждого активированного онкогенного слитого белка и/или молекулы сигнальной трансдукции. Например, матрица может представлять собой ряд или решетку из отдельных участков (например, точек или пятен) на поверхности подложки, причем каждый участок
10 содержит другое захватывающее антитело или захватывающий реагент (для связывания захватывающего тега, находящегося на захватывающем антителе). Матрица может быть настроена на применение в таких методах, в которых детектируется активационное состояние нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции при одновременном, мультиплексном определении. В различных воплощениях
15 «несколько» составляет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции. В определенных воплощениях «несколько» включает слитый белок BCR-ABL в сочетании с по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 и больше другими онкогенными слитыми белками и/или молекулами сигнальной трансдукции.

20 В. Методы двойного детектирования сближения

В определенных аспектах способы настоящего изобретения для детектирования активационного состояния определенного аналита в клеточном экстракте лейкоцитов или других типов клеток типа циркулирующих клеток твердой опухоли представляют собой мультиплексные, высокопроизводительные методы анализа сближения (с тремя
25 антителами), обладающие превосходным динамическим диапазоном.

В качестве неограничивающего примера: в тех случаях, когда аналит представляет собой единственный белок (например, EGFR), три антитела, используемые в методе анализа сближения, могут включать: (1) захватывающее антитело, специфичное к аналиту; (2) детектирующее антитело, специфичное к активированной форме аналита
30 (т.е. зависимое от активационного состояния антитело); и (3) детектирующее антитело, которое детектирует общее количество аналита (т.е. независимое от активационного состояния антитело). Зависимое от активационного состояния антитело способно детектировать, к примеру, состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексования аналита. Независимое от активационного состояния антитело в
35 общем способно детектировать и активированную, и неактивированную формы аналита.

В качестве другого неограничивающего примера: в тех случаях, когда аналит представляет собой слитый белок (например, BCR-ABL), содержащий первый домен, соответствующий одному белку (например, BCR), который слит со вторым доменом, соответствующим другому белку (например, ABL), три антитела, используемые в методе
40 анализа сближения, могут включать: (1) захватывающее антитело, специфичное к первому домену слитого белка; (2) детектирующее антитело, специфичное к активированной форме второго домена слитого белка (т.е. зависимое от активационного состояния антитело); и (3) детектирующее антитело, которое детектирует общее количество слитого белка путем специфического связывания со вторым доменом слитого
45 белка независимо от его активационного состояния (т.е. независимое от активационного состояния антитело). Зависимое от активационного состояния антитело способно детектировать, к примеру, состояние фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексования слитого белка. Независимое от активационного состояния антитело

в общем способно детектировать и активированную, и неактивированную формы слитого белка.

В предпочтительном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ выполнения мультиплексного, высокопроизводительного иммуноанализа, обладающего

5 превосходным динамическим диапазоном, который включает:

(а) инкубирование клеточного экстракта с одной или несколькими сериями разведения захватывающих антител, специфичных к одному или нескольким слитым белкам, с образованием нескольких захваченных слитых белков, причем захватывающие антитела

10 фиксированы на твердой подложке, а каждый слитый белок содержит первый домен, соответствующий первому белку, и второй домен, соответствующий второму другому белку, при этом захватывающие антитела специфичны к первому домену слитых белков;

(b) инкубирование нескольких захваченных слитых белков с детектирующими антителами, специфичными ко второму домену слитых белков, с образованием

15 нескольких детектируемых захваченных слитых белков, причем детектирующие антитела включают:

(1) несколько независимых от активационного состояния антител, помеченных содействующей молекулой, и

(2) несколько зависимых от активационного состояния антител, помеченных первым членом пары амплификации сигнала,

20 при этом содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(с) инкубирование нескольких детектируемых захваченных слитых белков со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала;

и

25 (d) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В одном альтернативном аспекте способ выполнения мультиплексного, высокопроизводительного иммуноанализа, обладающего превосходным динамическим

30 диапазоном, включает:

(а) инкубирование клеточного экстракта с одной или несколькими сериями разведения захватывающих антител, специфичных к одному или нескольким слитым белкам, с образованием нескольких захваченных слитых белков, причем захватывающие антитела

35 фиксированы на твердой подложке, а каждый слитый белок содержит первый домен, соответствующий первому белку, и второй домен, соответствующий второму другому белку, при этом захватывающие антитела специфичны к первому домену слитых белков;

(b) инкубирование нескольких захваченных слитых белков с детектирующими антителами с образованием нескольких детектируемых захваченных слитых белков, причем детектирующие антитела включают:

(1) несколько независимых от активационного состояния антител, помеченных содействующей молекулой, причем независимые от активационного состояния антитела

40 специфичны к первому домену слитых белков, и

(2) несколько зависимых от активационного состояния антител, помеченных первым членом пары амплификации сигнала, причем зависимые от активационного состояния антитела специфичны ко второму домену слитых белков,

45 при этом содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(с) инкубирование нескольких детектируемых захваченных слитых белков со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала;

и

(d) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В другом альтернативном аспекте способ выполнения мультиплексного, высокопроизводительного иммуноанализа, обладающего превосходным динамическим диапазоном, включает:

(a) инкубирование клеточного экстракта с одной или несколькими сериями разведения захватывающих антител, специфичных к одному или нескольким слитым белкам, с образованием нескольких захваченных слитых белков, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке, а каждый слитый белок содержит первый домен, соответствующий первому белку, и второй домен, соответствующий второму другому белку, при этом захватывающие антитела специфичны к первому домену слитых белков;

(b) инкубирование нескольких захваченных слитых белков с детектирующими антителами с образованием нескольких детектируемых захваченных слитых белков, причем детектирующие антитела включают:

(1) несколько независимых от активационного состояния антител, помеченных содействующей молекулой, причем независимые от активационного состояния антитела специфичны к последовательности, месту или точке слияния между первым и вторым доменом слитых белков (т.е. это стыковочные антитела), и

(2) несколько зависимых от активационного состояния антител, помеченных первым членом пары амплификации сигнала, причем зависимые от активационного состояния антитела специфичны ко второму домену слитых белков,

при этом содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(c) инкубирование нескольких детектируемых захваченных слитых белков со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала; и

(d) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

В некоторых воплощениях наряду с одним или несколькими слитыми белками в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции. Примеры представляющих интерес молекул сигнальной трансдукции описаны выше и включают, без ограничения, рецепторные тирозинкиназы, нерецепторные тирозинкиназы и/или компоненты сигнального каскада тирозинкиназ. Молекул сигнальной трансдукции можно детектировать описанными здесь способами, за исключением того, что все три антитела (т.е. захватывающее антитело и два детектирующих антитела) направлены на один и тот же белок, или же любым методом, известным специалистам. Кроме того, молекулы сигнальной трансдукции можно детектировать методами одиночного детектирования (т.е. с двумя антителами), описанными в PCT Publication No. WO 2008/036802, включенной путем ссылки во всей полноте на все случаи. В определенных воплощениях одна или несколько молекул сигнальной трансдукции детектируются вместе с одним или несколькими слитыми белками, используя описанные здесь способы иммуноанализа и матрицы.

В некоторых случаях клеточный экстракт инкубируют с захватывающими антителами, уже фиксированными на твердой подложке. В других случаях клеточный экстракт сначала инкубируют с захватывающими антителами в растворе, а затем контактируют с твердой подложкой, чтобы иммобилизовать захваченные аналиты, например, посредством захватывающих тегов, находящихся на захватывающих антителах, которые

взаимодействуют с захватывающими агентами, связанными на твердой подложке.

В некоторых воплощениях детектирующие антитела инкубируют с аналитами, которые связаны с захватывающими антителами в растворе или фиксированными на твердой подложке. В некоторых случаях клеточный экстракт, содержащий несколько аналитов, сначала инкубируют с детектирующими антителами в растворе, а затем контактируют с захватывающими антителами в растворе или фиксированными на твердой подложке. В некоторых других случаях клеточный экстракт, содержащий несколько аналитов, сначала инкубируют с захватывающими антителами и детектирующими антителами в растворе, а затем контактируют с твердой подложкой, чтобы иммобилизовать комплексы антитело-аналит, например, посредством захватывающих тегов, находящихся на захватывающих антителах или детектирующих антителах, которые взаимодействуют с захватывающими агентами, связанными на твердой подложке. Перед стадией детектирования можно подвергнуть отмывке иммобилизованные комплексы для удаления не образовавшихся комплексы антител, а отмытые комплексы последовательно отделить от поверхности подложки и детектировать канализование при сближении каждого из определяемых аналитов подходящим из описанных здесь способов.

В тех воплощениях, в которых поверхность подложки содержит захватывающие агенты, фиксированные в матрице, стадия инкубации может включать контактирование клеточного экстракта, содержащего несколько аналитов в растворе, с захватывающими антителами и детектирующими антителами при избытке всех трех антител, чтобы довести реакцию до завершения. В одном варианте этого способа образовавшиеся комплексы антитело-аналит фиксируют на твердой фазе и промывают для удаления несвязавшихся антител. Как видно из фиг.2 в PCT Publication No. WO 2008/036802, которая включена путем ссылки во всей полноте на все случаи, захватывающее антитело 1 может содержать захватывающий тег 10. Комплексы прикрепляются к твердой фазе 12 через захватывающего агента 11, который прилипает к твердой фазе и связывается с захватывающим тегом, тем самым иммобилизуя комплекс. Иммобилизованный комплекс отмывают подходящим буфером, а затем отделяют от твердой фазы добавлением отделяющего агента 13. Отделяющий агент может действовать по любому механизму, вызывающему отделение отмытого комплекса. В одном воплощении захватывающий тег содержит расщепляемый сайт, который распознается и расщепляется отделяющим агентом. В другом воплощении, представленном на фиг.2, отделяющий агент конкурирует с захватывающим тегом за связывание с захватывающим агентом. Например, захватывающим агентом может быть первый олигонуклеотид, который гибридизируется с частично комплементарным олигонуклеотидом (захватывающим тегом), прикрепленным к захватывающему антителу, а отделяющим агентом может быть олигонуклеотид, который полностью комплементарен захватывающему агенту, вызывая смещение нити и отделение отмытого комплекса от твердой фазы. Другие примеры подходящих захватывающих тегов/захватывающих агентов/отделяющих агентов, которые можно использовать, включают, без ограничения, 2,4-динитрофенол (BMP)/антитело против DNP/2,4-DNP-лизин; T2/антитело против T3/T3; убаин/антитело против дигоксина/дигоксин, и детиобиотин/стрептавидин/биотин (например, см. Ishikawa et al., J. din. Lab Anal., 12:98-107 (1998)).

После отделения отмытого комплекса от твердой фазы он либо: (1) контактирует с поверхностью подложки, содержащей захватывающие молекулы, фиксированные в матрице, которые специфически связывают захватывающие теги на захватывающем антителе, либо (2) диссоциирует, а диссоциированные детектирующие антитела вступают

в контакт с поверхностью подложки, содержащей захватывающие агенты, которые специфически связывают захватывающие теги на детектирующих антителах. На фиг.2 в PCT Publication No. WO 2008/036802 представлено воплощение, в котором отмытый комплекс диссоциирует, а диссоциированные детектирующие антитела вступают в
 5 контакт с поверхностью подложки 14. На поверхности подложки содержится несколько захватывающих молекул, фиксированных в «адресуемой» или «индексированной» матрице. Каждый отдельный участок матрицы содержит уникальный захватывающий агент 9, который специфически связывается с захватывающим тегом 8, находящимся на независимом от активационного состояния антителе 2 или зависимом от
 10 активационного состояния антителе 3, тем самым фиксируя и организовывая содержащие теги захватывающие антитела в матрице. В предпочтительном воплощении захватывающие реагенты и захватывающие теги представляют собой олигонуклеотиды, которые специфически гибридизируются друг с другом. Адресуемые матрицы, содержащие олигонуклеотидные захватывающие молекулы, хорошо известны в данной
 15 области (например, см. Keramas et al., Lab Chip, 4:152-158 (2004); Delrio-Larreniere et al., Diag. Microbiol. Infect. Dis., 48:23-31 (2004)).

Присутствие детектирующих антител в каждом отдельном участке матрицы можно прямо или косвенно детектировать с помощью молекулы типа содействующей молекулы или первого члена пары амплификации сигнала. Примеры молекул, которые можно
 20 детектировать непосредственно, включают флуорофоры, хромофоры, коллоидное золото, окрашенный латекс и т.п. В одном воплощении обе молекулы представляют собой выбранные независимо флуорофоры. Можно использовать любую пару флуорофоров, обеспечивающих различимые сигналы при нахождении на близком расстоянии друг от друга, такие, к примеру, как $Cy3/Cy5$, $Cy5$ /фикоэритрин и др. С
 25 другой стороны, если используется олигонуклеотидная адресуемая матрица, то обе молекулы могут представлять собой один и тот же флуорофор, нанесенный на различные зоны. Для детектирования молекул флуорофоров, фиксированных на матрице, можно использовать лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. В тех методах, в
 30 которых комплексы отделяются от матрицы перед определением, как-то в методах со смещением нитей, подходящие методы детектирования молекул флуорофоров включают конфокальную индуцированную лазером флуоресценцию в капиллярном потоке, нано-
 HPLC, микрокапиллярный электрофорез и др.

В некоторых воплощениях независимые от активационного состояния антитела дополнительно содержат детектируемую молекулу. В таких случаях количество
 35 детектируемой молекулы будет коррелировать с количеством одного или нескольких аналитов в клеточном экстракте. Примеры детектируемых молекул включают, без ограничения, флуоресцентные метки, реакционно-химические метки, ферментные метки, радиоактивные метки и т.п. Предпочтительно детектируемая молекула представляет собой флуорофор, как-то краситель Alexa Fluor® (например, Alexa Fluor® 647),
 40 флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Oregon Green™, родамин, техасский красный, тетрародамин-изотиоцианат (TRITC), флуорофор типа CyDye™ (например, $Cy2$, $Cy3$, $Cy5$) и др. Детектируемая молекула может быть конъюгирована прямо или косвенно с независимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов.

В некоторых случаях независимые от активационного состояния антитела непосредственно метятся содействующей молекулой. Содействующая молекула может быть конъюгирована прямо или косвенно с независимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов. Подходящие для применения в

настоящем изобретении содействующие молекулы включают любые молекулы, способные вырабатывать окислитель, который канализируется на (т.е. направляется к) и реагирует (т.е. связывает, связывается или образует комплекс) с другой молекулой, находящейся на близком расстоянии (т.е. пространственно близко или вблизи) от содействующей молекулы. Примеры содействующих молекул включают, без ограничения, такие ферменты, как глюкозооксидаза (GO) и любые другие ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием молекулярного кислорода (O_2) в качестве акцептора электронов, и такие фотосенсибилизаторы, как метиленовый синий, бенгальский розовый, порфирины, скваратные красители, фталоцианины и др. Неограничивающие примеры окислителей включают перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород и любые другие соединения, которые переносят атомы кислорода или присоединяют электроны в окислительно-восстановительных реакциях. Предпочтительно в присутствии подходящего субстрата (например, глюкозы, света и т.п.) содействующая молекула (например, глюкозооксидаза, фотосенсибилизатор и т.п.) вырабатывает окислитель (например, перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород и т.п.), который канализируется на и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала (например, пероксидазой хрена (HRP), гаптенем, защищенной блокирующей группой, ферментом, инактивированным тиоэфирной связью с ингибитором, и т.п.), когда две молекулы находятся на близком расстоянии друг от друга.

Получение модифицированных сульфгидрилами молекул декстрана и их применение при получении конъюгатов между антителом и содействующей молекулой типа глюкозооксидазы (GO) описано в PCT Publication No. WO 2009/108637, которая включена путем ссылки во всей полноте на все случаи.

В некоторых других случаях независимые от активационного состояния антитела косвенно метятся содействующей молекулой посредством гибридизации между олигонуклеотидным линкером, конъюгированным с независимым от активационного состояния антителом, и комплементарным олигонуклеотидным линкером, конъюгированным с содействующей молекулой. Олигонуклеотидные линкеры можно конъюгировать с содействующей молекулой или с независимым от активационного состояния антителом с помощью хорошо известных методов. В некоторых воплощениях олигонуклеотидный линкер, конъюгированный с содействующей молекулой, на 100% комплементарен олигонуклеотидному линкеру, конъюгированному с независимым от активационного состояния антителом. В других воплощениях пара олигонуклеотидных линкеров содержит по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть или больше несовпадающих участков, например, при гибридизации в жестких условиях.

Специалистам должно быть известно, что независимые от активационного состояния антитела, специфичные к различным анализам, можно конъюгировать либо с одним и тем же олигонуклеотидным линкером, либо с разными олигонуклеотидными линкерами.

Длина олигонуклеотидных линкеров, конъюгируемых с содействующей молекулой или с независимым от активационного состояния антителом, может быть разной. В общем, последовательность линкера может составлять по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 нуклеотидов. Как правило, для конъюгирования создают случайные последовательности нуклеиновой кислоты. В качестве неограничивающего примера: можно разработать библиотеку олигонуклеотидных линкеров, содержащих три разных смежных домена: спейсерный домен, сигнатурный домен и конъюгационный домен. Предпочтительно Олигонуклеотидные линкеры разрабатываются для

эффективного конъюгирования без устранения функции содействующей молекулы или независимых от активационного состояния антител, с которыми их конъюгируют.

Последовательности олигонуклеотидных линкеров можно составить так, чтобы предупредить или свести к минимуму образование вторичных структур при различных условиях определения. Температура плавления обычно тщательно отслеживается по каждому сегменту в пределах линкера с тем, чтобы они участвовали в общем процессе определения. Обычно диапазон температур плавления сегментов последовательности линкера составляет не более 5°C. Для определения температуры плавления, вторичной структуры и шпилькообразных структур при заданных концентрациях ионов можно использовать компьютерные алгоритмы (например, OLIGO 6.0) для анализа каждого из трех разных доменов у каждого линкера. Также можно проанализировать целую объединенную последовательность на предмет структурных характеристик и сравнимости с другими последовательностями конъюгированных олигонуклеотидных линкеров, например, будут ли они гибридизироваться при жестких условиях гибридизации с комплементарным олигонуклеотидным линкером.

Спейсерный участок олигонуклеотидного линкера обеспечивает адекватное отделение конъюгационного домена от сайта перекрестного сшивания олигонуклеотида. Конъюгационный домен функционирует, связывая молекулы, помеченные комплементарной последовательностью олигонуклеотидного линкера, с конъюгационным доменом при гибридизации с нуклеиновой кислотой. Гибридизация с нуклеиновой кислотой может проводиться либо до, либо после образования комплекса антитело-аналит (т.е. антиген), обеспечивая более гибкий формат определения. В отличие от многих прямых методов конъюгирования антител, присоединение относительно небольших олигонуклеотидов к антителам или другим молекулам оказывает минимальное влияние на специфическое сродство антител к своим мишеням-аналитам или на функционирование конъюгированных молекул.

В некоторых воплощениях последовательность сигнатурного домена олигонуклеотидного линкера может использоваться при комплексном мультиплексном анализе белков. Можно конъюгировать несколько антител с олигонуклеотидными линкерами, имеющими различные сигнатурные последовательности. При мультиплексном иммуноанализе для детектирования перекрестной гибридизации между антителами и их антигенами в мультиплексном формате определения можно использовать последовательности репортерных олигонуклеотидов, помеченных соответствующими зондами.

Олигонуклеотидные линкеры можно конъюгировать с антителами или другими молекулами с помощью нескольких различных методов. Например, можно синтезировать Олигонуклеотидные линкеры с тиоловой группой на 5'- или 3'-конце. Тиоловую группу можно деблокировать с помощью восстановителей (например, TCEP-HCl), а сами линкеры можно очистить на обессоливающей колонке. Полученные деблокированные Олигонуклеотидные линкеры можно конъюгировать с первичными аминами антител или других типов белков с помощью гетеробифункциональных сшивающих реагентов типа SMCC. С другой стороны, 5'-фосфатные группы на олигонуклеотидах можно обработать водорастворимым карбодиимидом EDC с образованием фосфатных эфиров, а затем конъюгировать с аминокислотными молекулами. В некоторых случаях диол на остатке 3'-рибозы можно подвергнуть окислению до альдегида, а затем конъюгировать с аминокислотными группами антител или других типов белков методом восстановительного аминирования. В некоторых других случаях можно синтезировать олигонуклеотидный линкер с модификацией биотином на 3'- или

5'-конце и конъюгировать с меченными стрептавидином молекулами.

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

Получение и применение конъюгированных с олигонуклеотидами антител для одновременного детектирования общих и фосфорилированных аналитов описано в PCT Publication No. WO 2008/036802, которая включена путем ссылки во всей полноте на все случаи.

В некоторых случаях зависимые от активационного состояния антитела непосредственно метятся первым членом пары амплификации сигнала. Член пары амплификации сигнала может быть конъюгирован с зависимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов. В некоторых случаях зависимые от активационного состояния антитела метятся первым членом пары амплификации сигнала косвенным образом, посредством связывания между первым членом связывающей пары, конъюгированным с зависимыми от активационного состояния антителами, и вторым членом связывающей пары, конъюгированным с первым членом пары амплификации сигнала. Члены связывающей пары (например, биотин/стрептавидин) могут быть конъюгированы с членом пары амплификации сигнала или с зависимыми от активационного состояния антителами с помощью хорошо известных методов. Примеры членов пары амплификации сигнала включают, без ограничения, такие пероксидазы, как пероксидаза хрена (HRP), каталаза, хлорпероксидаза, пероксидаза цитохрома с, пероксидаза эозинофилов, глутатион-пероксидаза, лактопероксидаза, миелопероксидаза, тиреоидная пероксидаза, деиодиназа и др. Другие примеры членов пары амплификации сигнала включают гаптены, блокированные защитной группой, и ферменты, инактивированные тиоэфирной связью с ингибитором фермента.

Захватывающие антитела, независимые от активационного состояния антитела и зависимые от активационного состояния антитела обычно выбирают так, чтобы свести к минимуму конкуренцию между ними в отношении связывания аналита (т.е. все антитела могут одновременно связываться со своими слитыми белками или молекулами сигнальной трансдукции, соответственно).

В одном примере канализирования при сближении содействующей молекулой является глюкозооксидаза (GO), а первым членом пары амплификации сигнала - пероксидаза хрена (HRP). При контакте GO с субстратом типа глюкозы вырабатывается окислитель (т.е. перекись водорода (H_2O_2)). Если HRP находится на канализирующем расстоянии от GO, то H_2O_2 , вырабатываемый GO, направляется к ней и образует комплекс HRP- H_2O_2 , который, в присутствии второго члена пары амплификации сигнала (например, хемилюминесцентного субстрата типа люминола или изолюминола либо флуорогенного субстрата типа тирамида, например, биотин-тирамида, гомованилиновой кислоты или 4-гидроксифенил-уксусной кислоты), генерирует амплифицированный сигнал. Способы применения GO и HRP в методах анализа сближения описаны, например, в Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999). При использовании биотин-тирамида в качестве второго члена пары амплификации сигнала комплекс HRP- H_2O_2

окисляет тирамид с образованием реакционного радикала тирамида, который ковалентно связывается с ближайшим нуклеофильным остатком. Активированный тирамид детектируется либо непосредственно, либо после добавления генерирующего сигнал детектирующего реагента, такого, к примеру, как меченный стрептавидином флуорофор или комбинация из меченной стрептавидином пероксидазы и хромогенного реагента. Примеры флуорофоров, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, краситель Alexa Fluor® (например, Alexa Fluor® 555), флуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), Oregon Green™, родамин, тexasский красный, тетрародамин-изотиоцианат (TRITC), флуорофор типа CyDye™ (например, Cy2, Cy3, Cy5) и др. Стрептавидиновая метка может быть конъюгирована прямо или косвенно с флуорофором или пероксидазой с помощью хорошо известных методов. Неограничивающие примеры хромогенных реагентов, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB), 3,3'-диаминобензидин (DAB), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS), 4-хлор-1-нафтол (4CN) и/или порфириноген.

В другом примере канализирования при сближении содействующей молекулой является фотосенсибилизатор, а первым членом пары амплификации сигнала - большая молекула, меченная несколькими гаптенами, которые блокированы защитными группами, предупреждающими связывание гаптенов с партнером по специфическому связыванию (например, лигандом, антителом и т.д.). Например, членом пары амплификации сигнала может быть молекула декстрана, меченная блокированными молекулами биотина, кумарина и/или флуоресцеина. Подходящими защитными группами являются, без ограничения, фенокси-, анилино-, олефиновые, тиоэфирные и селеноэфирные защитные группы. Другие фотосенсибилизаторы и блокированные молекулы гаптенов, пригодные для применения в методах анализа сближения настоящего изобретения, описаны в U.S. Patent No. 5,807,675. При возбуждении фотосенсибилизатора светом вырабатывается окислитель (т.е. синглетный кислород). Если молекулы гаптенов находятся на канализирующем расстоянии от фотосенсибилизатора, то синглетный кислород, вырабатываемый фотосенсибилизатором, направляется к ним и реагирует с тиоэфирами на защитных группах гаптенов, образуя карбонильные группы (кетонов или альдегидов) и сульфоновую кислоту и высвобождая защитные группы из гаптенов. После этого незаблокированные гаптены могут специфически связываться со вторым членом пары амплификации сигнала (например, партнером по специфическому связыванию, способным генерировать детектируемый сигнал). Например, если гаптеном является биотин, то партнером по специфическому связыванию может быть помеченный ферментом стрептавидин. Примеры ферментов включают щелочную фосфатазу, (3-галактозидазу, HRP и др. После отмывки для удаления несвязавшихся реагентов можно вызвать детектируемый сигнал при добавлении детектируемого (например, флуоресцентного, хемилюминесцентного, хромогенного) субстрата фермента и детектировать его с помощью соответствующих методов и приборов. С другой стороны, детектируемый сигнал можно амплифицировать путем амплификации сигнала тирамидом и детектировать активированный тирамид либо непосредственно, либо после добавления генерирующего сигнал детектирующего реагента, как описано выше.

В следующем примере канализирования при сближении содействующей молекулой является HRP, а первым членом пары амплификации сигнала - комплекс фермент-ингибитор. Фермент и ингибитор (например, меченный фосфоновой кислотой декстран) соединяются расщепляемым линкером (например, тиоэфиром). При возбуждении

фотосенсибилизатора светом вырабатывается окислитель (т.е. синглетный кислород). Если комплекс фермент-ингибитор находится на канализирующем расстоянии от фотосенсибилизатора, то синглетный кислород, вырабатываемый фотосенсибилизатором, направляется к нему и реагирует с расщепляемым линкером, высвобождая ингибитор из фермента и тем самым активируя фермент. Добавляется субстрат фермента, генерируя детектируемый сигнал, либо добавляется амплифицирующий реагент, генерируя амплифицированный сигнал.

В следующем примере канализирования при сближении содействующей молекулой является HRP, а первым членом пары амплификации сигнала - блокированный гаптен или комплекс фермент-ингибитор, как описано выше, причем защитные группы содержат пара-алкоксифенол. При добавлении фенилендиамин и H_2O_2 образуется реакционный фенилендиимин, который направляется к блокированному гаптену или комплексу фермент-ингибитор и реагирует с п-алкоксифенольными защитными группами, образуя открытые гаптены либо реакционный фермент. Амплифицированный сигнал генерируется и детектируется, как описано выше (например, см. U.S. Patent Nos. 5,532,138 и 5,445,944).

Специалистам должно быть известно, что можно использовать и другие партнеры по связыванию, чем антитела, для иммобилизации и/или детектирования одного или нескольких аналитов из клеточного экстракта в соответствии с описанными здесь методами анализа сближения (с тремя антителами). Неограничивающими примерами таких партнеров по связыванию являются лиганды или рецепторы аналита, субстраты аналита, связывающие домены (например, РТВ, SH2 и т.п.), аптамеры и др.

Типичная методика для выполнения описанных здесь методов анализа сближения приведена в Примере 1.

В следующем воплощении настоящим изобретением предусмотрены наборы для выполнения вышеописанных методов анализа сближения, включающие: (а) серийные разведения нескольких захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке; и (б) несколько детектирующих антител (например, независимых от активационного состояния антител и зависимых от активационного состояния антител). В некоторых случаях наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению наборов для детектирования активационного состояния одного или нескольких слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции. Наборы также могут содержать любые дополнительные реагенты, описанные выше в отношении выполнения конкретных способов настоящего изобретения, такие, к примеру, как первый и второй члены пары амплификации сигнала, реагенты для амплификации сигнала тирамидом, субстраты для содействующей молекулы, буфера для отмывки и др.

IV. Конструирование антительных матриц

В определенных аспектах настоящим изобретением предусмотрены матрицы на основе антител для детектирования активационного состояния одного или нескольких слитых белков в клеточном экстракте с использованием серийных разведений захватывающих антител, фиксированных на твердой подложке. Как правило, матрицы, используемые в способах определения по настоящему изобретению, содержат несколько разведений одного или нескольких различных захватывающих антител при нескольких концентрациях захватывающих антител, которые конъюгированы к поверхности твердой подложки в различных адресуемых положениях.

Твердая подложка может включать любые подходящие субстраты для иммобилизации белков. Примеры твердых подложек включают, без ограничения, стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики (например, магнитные

шарики, полистироновые шарики и т.п.). бумагу, мембраны, пучки волокон, гели, металл, керамику и др. Для применения в качестве твердой подложки в матрицах настоящего изобретения подходят такие мембраны, как нейлоновые (Biotrans™, ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa, CA)); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)),

5 нитроцеллюлозные (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) и PVDF (Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA)). Предпочтительно захватывающие антитела фиксируют на стеклянных пластинках, покрытых нитроцеллюлозным полимером, например, на пластинках FAST Slides, которые коммерчески доступны от Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

10 Желательные особенности твердых подложек включают способность к связыванию больших количеств захватывающих антител, способность связываться с захватывающими антителами с минимальной денатурацией и неспособность связываться с другими белками. Другое желательное свойство состоит в том, чтобы твердая подложка проявляла минимальное растекание при нанесении на нее растворов,

15 содержащих захватывающие антитела. Твердая подложка с минимальным растеканием позволяет наносить небольшие порции растворов захватывающих антител с образованием небольших, сформированных пятен иммобилизованных захватывающих антител.

Захватывающие антитела обычно прямо или косвенно (например, через

20 захватывающие теги) фиксируют на твердой подложке посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий (например, ионных связей, гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, диполь-дипольных связей). В некоторых воплощениях захватывающие антитела ковалентно присоединяют к твердой подложке с помощью гомобифункционального или гетеробифункционального

25 сшивающего реагента, используя стандартные методы и условия сшивания. Подходящие сшивающие реагенты коммерчески доступны от таких поставщиков, например, как Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Способы получения матриц настоящего изобретения включают, без ограничения, любые методы, используемые для получения матриц белков или нуклеиновых кислот.

30 В некоторых воплощениях захватывающие антитела наносят на матрицу с помощью микроспоттера, который обычно представляет собой роботизированный принтер, снабженный многоигольной, тупоигольной или струйной печатающей головкой. Подходящие роботизированные системы для печатания описанных здесь антительных матриц включают робот PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) с многоигольной

35 головкой ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA), а также другие роботизированные принтеры, доступные от BioRobics (Woburn, MA) и Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Предпочтительно на матрицу наносят по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 повторов каждого разведения захватывающих антител.

Другой метод получения антительных матриц настоящего изобретения включает

40 нанесение известного объема разведения захватывающих антител на каждое выбранное положение матрицы при контактировании капиллярного дозатора с твердой подложкой в условиях, при которых из дозатора на подложку выделяется заданный объем жидкости, причем процесс повторяется с использованием выбранных разведений захватывающих антител по каждому выбранному положению матрицы до полного заполнения матрицы.

45 Метод может применяться при формировании нескольких таких матриц, при этом стадия нанесения раствора осуществляется по выбранным положениям на каждой из нескольких твердых подложек при каждом повторении цикла. Подробное описание такого метода приведено, например, в U.S. Patent No. 5,807,522.

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

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

В некоторых случаях каждое пятно на твердой подложке представляет другое захватывающее антитело. В некоторых других случаях несколько пятен на твердой подложке представляют одно и то же захватывающее антитело, например, в виде серийных разведений, включающих ряд понижающихся концентраций захватывающего антитела.

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

Способы сканирования антительных матриц известны в данной области и включают, без ограничения, любые методы, используемые для сканирования матриц белков или нуклеиновых кислот. Сканеры для микроматриц, пригодные для применения в настоящем изобретении, доступны от PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) и Axon Instruments (Union City, CA). В качестве неограничивающего примера: можно использовать GSI ScanArray3000 для детектирования флуоресценции с программой ImaGene для количественного анализа.

V. Выбор и оптимизация препаратов для противораковой терапии

В определенных аспектах настоящим изобретением предусмотрены способы выбора надлежащей терапии для подавления или отключения одного или нескольких разрегулированных сигнальных путей. В некоторых других аспектах настоящим изобретением предусмотрены способы оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъектов, страдающих раком и получающих курс терапии для лечения рака. Таким образом, настоящее изобретение может применяться для облегчения разработки индивидуализированной терапии на основании конкретной молекулярной сигнатуры, представленной набором активированных онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции при раковом заболевании данного пациента.

Соответственно, в одном конкретном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъекта, страдающего раком и получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата (например, одного или нескольких ингибиторов тирозинкиназы типа Gleevec®, Tassigna®, Sprycel® и др.);

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) измерение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка, измеренным

ранее во время курса терапии; и

(е) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс терапии, исходя из сравнения на стадии (d).

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом).

В родственном аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъекта, страдающего раком и получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата (например, одного или нескольких ингибиторов тирозинкиназы типа Gleevec, Tasigna, Sprycel® и др.);

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) измерение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка и одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции в этом пути описанным здесь способом определения;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции, измеренным ранее во время курса терапии; и

(е) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс терапии, исходя из сравнения на стадии (d).

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) и компонента пути передачи сигналов (например, CRKL, JAK2, STAT5) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение уровня активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL) и отношение уровня активированного к общему уровню компонента пути передачи сигналов (например, отношение фосфо/общий уровень белка CRKL, JAK2 или STAT5), которые можно использовать для оценки курса терапии у субъекта, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка и компонента пути передачи сигналов с таким же отношением, рассчитанным для субъекта ранее (например, ранее во время курса терапии противораковым препаратом или в какой-то момент времени до терапии противораковым препаратом).

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например,

фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь методом определения; и

(d) определение того, подходит или не подходит противораковый препарат для лечения рака путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

В предпочтительном воплощении способ выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(e) установление того, что противораковый препарат подходит для лечения рака, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых случаях предпочтительное воплощение может дополнительно включать, т.е. в качестве стадии (f), или же в качестве альтернативы на стадии (e) включать

установление того, что противораковый препарат не подходит для лечения рака, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других случаях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется, подходит или не подходит противораковый препарат.

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для определения того, подходит или не подходит противораковый препарат для лечения рака, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным на основе контрольного профиля экспрессии или активации, полученного в отсутствие противоракового препарата.

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

и

(d) идентификацию рака как реагирующего или не реагирующего на лечение противораковым препаратом путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

В предпочтительном воплощении способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(e) установление того, что рак реагирует на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых случаях предпочтительное воплощение может дополнительно включать, т.е. в качестве стадии (f), или же в качестве альтернативы на стадии (e) включать установление того, что рак не реагирует на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других случаях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется, реагирует или не реагирует рак на лечение.

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для определения того, реагирует или не реагирует рак на лечение, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным на основе контрольного профиля экспрессии или активации, полученного в отсутствие противоракового препарата.

В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ предсказания реакции субъекта, страдающего раком, на лечение противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

и

(d) предсказание вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

5 В предпочтительном воплощении способ предсказания реакции субъекта, страдающего раком, на лечение противораковым препаратом включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

10 (c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата; и

(e) установление того, что субъект должен будет реагировать на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых случаях предпочтительное воплощение может дополнительно включать, т.е. в качестве стадии (f), или же в качестве альтернативы на стадии (e) включать установление того, что субъект не будет реагировать на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других случаях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется вероятность того, что субъект будет

30 реагировать на лечение. В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для предсказания того, будет ли субъект реагировать на лечение противораковым препаратом, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным на основе контрольного профиля экспрессии или активации, полученного в отсутствие

40 противоракового препарата. В следующем аспекте настоящим изобретением предусмотрен способ определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка описанным здесь способом определения;

и

(d) определение того, что субъект не поддается или поддается лечению противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время.

В предпочтительном воплощении способ определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка методом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время; и

(e) установление того, что субъект не поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых случаях предпочтительное воплощение может дополнительно включать, т.е. в качестве стадии (f), или же в качестве альтернативы на стадии (e) включать установление того, что субъект поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других случаях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул сигнальной трансдукции и на основании этого «молекулярного профиля» определяется, что субъект не поддается или поддается лечению противораковым препаратом.

В определенных воплощениях в клеточном экстракте измеряется уровень и общего, и активированного (например, фосфорилированного) онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в соответствии с методами настоящего изобретения на основе антител и рассчитывается отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка (например, отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL), которое можно использовать для определения того, поддается или не поддается субъект лечению противораковым препаратом, например, сравнивая отношение фосфо/общий уровень онкогенного слитого белка с таким же отношением, рассчитанным на основе контрольного профиля экспрессии или активации, полученного в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут дополнительно включать передачу или представление результатов из стадии (d) врачу, например, онкологу или терапевту. В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут дополнительно включать регистрацию или хранение результатов из стадии (d)

в компьютерной базе данных или другом подходящем приборе или устройстве для хранения информации, например, в лаборатории.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут дополнительно включать стадию получения образца от субъекта, страдающего раком, из которого можно выделить клетки типа раковых клеток. Образец может быть взят у субъекта либо до лечения противораковым препаратом (например, перед инкубацией с противораковым препаратом), либо после введения противоракового препарата (например, в любое время на протяжении курса лечения рака). Подходящими образцами являются, без ограничения, цельная кровь, плазма, сыворотка, смывная жидкость протоков, аспират из сосков, лимфа (например, рассеянные раковые клетки лимфатических узлов), аспират костного мозга, слюна, моча, кал (т.е. фекалии), мокрота, смывная жидкость бронхов, слезы, тонкоигольный аспирационный биоптат (например, взятый при случайной периареолярной тонкоигольной аспирации), любые другие жидкости организма, образцы тканей (например, опухолевой ткани), как-то биоптаты опухолей (например, игольные биоптаты) или лимфатических узлов (например, биоптат сторожевого лимфоузла) и клеточные экстракты из них. В некоторых воплощениях образец представлен цельной кровью или ее фракционированными компонентами, такими как плазма, сыворотка, эритроциты, лейкоциты, как-то мононуклеары периферической крови и/или редкие циркулирующие клетки. В некоторых воплощениях образец получают путем выделения лейкоцитов или циркулирующих клеток твердой опухоли из цельной крови или ее клеточных фракций, используя любые известные способы. Если выделенные клетки получают от субъекта, не получавшего лечения противораковым препаратом, то выделенные клетки можно проинкубировать *in vitro* в соответствующих условиях с одним или несколькими противораковыми препаратами, мишенью которых является один или несколько аналитов, детектируемых на стадии (с).

В некоторых воплощениях раковым заболеванием является гематологическая злокачественность (например, лейкомия, лимфома), остеогенная саркома (например, саркома Юинга), саркома мягких тканей (например, DFSP, рабдомиосаркома); другие злокачественности мягких тканей, папиллярная карцинома щитовидной железы или рак простаты. В определенных воплощениях раковое заболевание вызвано образованием онкогенного слитого белка вследствие хромосомной транслокации в раковых клетках или опухоли.

В некоторых воплощениях выделенные клетки подвергают стимуляции *in vitro* факторами роста, как описано здесь. В других воплощениях противораковый препарат может включать одно или несколько описанных здесь терапевтических средств, включая, без ограничения, моноклональные антитела, ингибиторы тирозинкиназ, химиотерапевтические средства, средства гормональной терапии, радиотерапевтические средства и вакцины.

В некоторых воплощениях активационное состояние, детектируемое у онкогенного слитого белка в клеточном экстракте, может представлять собой, например, состояние фосфорилирования, состояние убиквитинирования, состояния комплексования или их комбинации. В других воплощениях твердая подложка может включать, например, стекло, пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики, бумагу, мембрану, пучки волокон и их комбинации. В предпочтительных воплощениях захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке в адресуемой матрице.

В некоторых воплощениях определение на стадии (с) включает:

(i) инкубирование (например, контактирование) клеточного экстракта с серийными

разведениями захватывающих антител с образованием множества захваченных онкогенных слитых белков (например, с преобразованием онкогенных слитых белков, находящихся в клеточном экстракте, в комплексы захваченных онкогенных слитых белков, включающие онкогенные слитые белки и захватывающие антитела);

- 5 (ii) инкубирование (например, контактирование) множества захваченных онкогенных слитых белков с детектирующими антителами, включающими независимые от активационного состояния антитела и зависимые от активационного состояния антитела, специфичные к одному и тому же или к разным доменам онкогенного слитого белка, с образованием множества детектируемых захваченных онкогенных слитых белков
10 (например, с преобразованием комплексов захваченных онкогенных слитых белков в комплексы детектируемых захваченных онкогенных слитых белков, включающие онкогенные слитые белки и детектирующие антитела);

причем независимые от активационного состояния антитела помечены содействующей молекулой, зависимые от активационного состояния антитела помечены первым членом
15 пары амплификации сигнала, а содействующая молекула вырабатывает окислитель, который направляется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

- (iii) инкубирование множества детектируемых захваченных аналитов со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала;
и

- 20 (iv) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала.

Независимые от активационного состояния антитела могут быть непосредственно помечены содействующей молекулой или же косвенно помечены содействующей молекулой, например, посредством гибридизации между олигонуклеотидом,
25 конъюгированным с независимыми от активационного состояния антителами, и комплементарным олигонуклеотидом, конъюгированным с содействующей молекулой. Точно так же зависимые от активационного состояния антитела могут быть непосредственно помечены первым членом пары амплификации сигнала или же косвенно помечены первым членом пары амплификации сигнала, например, посредством
30 связывания между первым членом связывающей пары, конъюгированным с зависимыми от активационного состояния антителами, и вторым членом связывающей пары, конъюгированным с первым членом пары амплификации сигнала. В определенных случаях первым членом связывающей пары является биотин, а вторым членом связывающей пары является авидин, как-то стрептавидин или нейтравидин.

35 В некоторых воплощениях содействующей молекулой может быть, к примеру, глюкозооксидаза. В некоторых случаях глюкозооксидаза и независимые от активационного состояния антитела могут быть конъюгированы с активированной сульфгидрилом молекулой декстрана. Как правило, активированная сульфгидрилом молекула декстрана имеет молекулярную массу около 500 кД (например, 250, 300, 350,
40 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 или 750 кД). В других воплощениях окислителем может быть, к примеру, перекись водорода (H_2O_2). А еще в других воплощениях первым членом пары амплификации сигнала может быть, к примеру, пероксидаза, как-то пероксидаза хрена (HRP). В следующих воплощениях вторым членом пары амплификации сигнала может быть, к примеру, тирамидный реагент (например, биотин-тирамид). Предпочтительно амплифицированный сигнал генерируется при окислении пероксидазой биотин-тирамида с образованием активированного тирамида (например, с превращением биотин-тирамида в активированный тирамид). Активированный тирамид может детектироваться прямо или косвенно, например, после добавления

детектирующего сигнал реагента. Неограничивающие примеры детектирующих сигнал реагентов включают меченные стрептавидином флуорофоры и комбинации из меченной стрептавидином пероксидазы и хромогенного реагента, такого, например, как 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ).

В определенных случаях HRP и зависимые от активационного состояния антитела могут быть конъюгированы с активированной сульфгидрилом молекулой декстрана. Как правило, активированная сульфгидрилом молекула декстрана имеет молекулярную массу около 70 кД (например, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 кД).

VI. Получение антител

Получение и отбор таких антител, которые недоступны коммерческим путем, для анализа активационного состояния онкогенных слитых белков или молекул сигнальной трансдукции в биологических образцах типа клеточных экстрактов или лизатов в соответствии с изобретением может осуществляться несколькими способами. Например, один способ заключается в экспрессировании и/или очистке нужного полипептида (т.е. антигена) известными методами экспрессирования и очистки белков, тогда как другой заключается в синтезе нужного полипептида известными методами твердофазного синтеза пептидов. Например, см. Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol.182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol.289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60 (1995); и Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31 (1996). Затем очищенный или синтезированный полипептид может быть введен, к примеру, мышам или кроликам для вырабатывания поликлональных или моноклональных антител. Специалистам должно быть известно, что для получения антител есть много методик, например, описанных в Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Специалистам также должно быть известно, что можно получить связывающие фрагменты или Fab-фрагменты, имитирующие антитела (например, сохраняющие их функциональные связывающие участки), исходя из генетической информации по различным методикам. Например, см. Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); и Huse et al., J. ImmunoL, 149:3914-3920 (1992).

Кроме того, в многочисленных публикациях сообщалось о применении технологии фагового дисплея для получения и скрининга библиотек полипептидов на связывание с заданным антигеном (например, см. Cwiria et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al. Science, 249:404-406 (1990); Scott et al. Science, 249:386-388 (1990); и Ladner et al, U.S. Patent No. 5,571,698). Основная идея методов фагового дисплея состоит в установлении физической связи между полипептидом, кодируемым ДНК фага, и искомым антигеном. Такая физическая связь обеспечивается фаговой частицей, на которой полипептид выступает в составе капсиды, окружающей геном фага, кодирующий полипептид. Установление физической связи между полипептидами и их генетическим материалом позволяет проводить одновременный скрининг очень большого числа фагов, несущих различные полипептиды. Фаги с полипептидами, проявляющими сродство к антигену мишени, связываются с этим антигеном, а сами фаги подвергаются обогащению при скрининге на сродство к данному антигену. Идентичность полипептидов, выделяемых из этих фагов, можно установить из соответствующих им геномов. При этом полипептид, идентифицированный как обладающий сродством связывания к нужному антигену, можно затем синтезировать в большом количестве стандартными методами (например, см. U.S. Patent No. 6,057,098).

Антитела, полученные этими методами, можно затем подвергнуть отбору, сначала подвергая их скринингу на сродство и специфичность к заданному очищенному полипептидному антигену, а затем, если нужно, сравнивая результаты со сродством и специфичностью антител к другим полипептидным антигенам, которые должны быть
 5 исключены из связывания. Процедура скрининга может включать иммобилизацию очищенных полипептидных антигенов в отдельных лунках микропланшетов. Затем в соответствующие лунки микропланшета вносят раствор, содержащий потенциальное антитело или группу антител, и инкубируют от 30 мин до 2 ч. Затем лунки микропланшета отмывают, добавляют в них меченое вторичное антитело (например,
 10 антитело против мыши, конъюгированное со щелочной фосфатазой, если полученные антитела являются мышиными антителами) и инкубируют около 30 мин, а затем отмывают. В лунки добавляют субстрат и там, где есть антитело к иммобилизованному полипептидному антигену, проявляется цветная реакция.

Идентифицированные при этом антитела можно подвергнуть дальнейшему анализу на сродство и специфичность. При разработке иммуноанализа на искомый белок этот очищенный белок будет действовать в качестве стандарта, по которому можно оценить чувствительность и специфичность иммуноанализа с помощью отобранных антител. Поскольку сродство связывания у различных антител может отличаться, например, некоторые комбинации антител могут создавать стерические препятствия друг для
 15 друга, то поведение антитела при анализе может оказаться более важным показателем, чем абсолютное сродство и специфичность этого антитела.

Специалистам должно быть известно, что при получении антител или их связывающих фрагментов и при скрининге и отборе на сродство и специфичность к различным искомым полипептидам можно предпринимать различные подходы, но эти подходы
 25 не изменяют объема настоящего изобретения.

А. Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно вырабатывают у животных при помощи множественных подкожных (sc) или внутривенных (iv) инъекций нужного полипептида и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование данного полипептида
 30 с таким белковым носителем, который иммуногенен у подвергаемого иммунизации вида, таким, например, как гемоцианин моллюска блюдечко, сывороточный альбумин, бычий тироглобулин или ингибитор трипсина сои с помощью бифункционального или функционализирующего реагента. Неограничивающие примеры бифункциональных или функционализирующих реагентов включают малеимидобензоильный эфир
 35 сульфосукцинимид (конъюгация по остаткам цистеина), N-гидроксисукцинимид (конъюгация по остаткам лизина), глутаральдегид, янтарный ангидрид, SOCl_2 и $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R_1 означают различные алкильные группы.

Животных иммунизируют против нужного полипептида или его иммуногенного конъюгата или производного путем объединения, например, 100 мкг (для кроликов)
 40 или 5 мкг (для мышей) антигена или конъюгата с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и интрадермального введения раствора в нескольких местах. Через месяц животным делают повторную иммунизацию, используя от 1/5 до 1/10 первоначального количества полипептида или конъюгата в неполном адъюванте Фрейнда при подкожном введении в нескольких местах. Через 7-14 дней у животных берут кровь и анализируют
 45 сыворотку на титр антител. Как правило, повторную иммунизацию делают до тех пор, пока титр не выйдет на плато. Предпочтительно повторную иммунизацию делают конъюгатом одного и того же полипептида, но можно конъюгировать с другим иммуногенным белком и/или с помощью другого сшивающего реагента. Конъюгаты

также можно получить в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. В некоторых случаях для усиления иммунного ответа можно использовать такие агрегирующие средства, как квасцы.

В. Моноклональные антитела

Моноклональные антитела обычно получают из популяции практически однородных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны за исключением возможных естественных мутаций, которые могут быть в небольшом количестве. Таким образом, определение «моноклональные» указывает на то, что они не являются смесью разных антител. К примеру, моноклональные антитела можно получить гибридным методом, описанным в Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или любым известным методом рекомбинантной ДНК (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567).

В гибридном методе мышь или другое подходящее животное (например, хомяка) подвергают иммунизации, как описано выше, чтобы вызвать появление лимфоцитов, вырабатывающих или способных вырабатывать антитела, специфические связывающиеся с полипептидом, использовавшимся для иммунизации. В качестве альтернативы лимфоциты иммунизируют *in vitro*. Затем иммунизированные лимфоциты сливают с клетками миеломы с помощью подходящего сливающего реагента типа полиэтиленгликоля, получая клетки гибридомы (например, см. Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp.59-103 (1986)). Полученные при этом клетки гибридомы высевают и культивируют в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживаемость не слившихся, исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы нет фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT), то в культуральную среду для клеток гибридомы обычно добавляют гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефектных клеток.

Предпочтительными клетками миеломы являются клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень продукции антител выбранными антителообразующими клетками и/или чувствительны к таким средам, как среда HAT. Примерами таких предпочтительных линий клеток миеломы являются, без ограничения, линии миеломы мыши типа тех, что происходят из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11 (доступны из Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), клетки SP-2 или X63-Ag8-653 (доступны из American Type Culture Collection; Rockville, MD) и линии клеток миеломы человека или гетеромиеломы мыши-человека (например, см. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); и Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.51-63 (1987)).

Культуральная среда, в которой культивируются клетки гибридомы, может быть подвергнута анализу на продукцию моноклональных антител, направленных против искомого полипептида. Предпочтительно определяется специфичность связывания моноклональных антител, вырабатываемых клетками гибридомы, методом иммунопреципитации или связывания *in vitro* типа радиоиммуноанализа (RIA) или ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA). Сродство связывания моноклональных антител можно определить, например, методом анализа по Скэтчарду согласно Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации клеток гибридомы, вырабатывающих антитела с требуемой специфичностью, сродством и/или активностью, эти клоны можно субклонировать методом предельных разведений и культивировать стандартными методами (например,

см. Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp.59-103 (1986)). Подходящими культуральными средами для этой цели являются, к примеру, среда D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно культивировать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно выделить из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки стандартными методами очистки антител, такими, к примеру, как хроматография на сефарозе с белком А или гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, можно легко выделить и просеквенировать с помощью стандартных методов (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Предпочтительным источником такой ДНК служат клетки гибридомы. После выделения можно ввести ДНК в экспрессионный вектор, которым можно трансфецировать такие клетки хозяина, как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичников китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые без этого не вырабатывают антитела, чтобы индуцировать синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках хозяина. Например, см. Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); и Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992). Также можно подвергнуть модификации ДНК, к примеру, путем подстановки кодирующей последовательности константных доменов тяжелых и легких цепей человека вместо гомологичных последовательностей мыши (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности другого полипептида, чем иммуноглобулин.

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

С. Гуманизированные антитела

Методы гуманизирования нечеловеческих антител известны в этой области. Предпочтительно гуманизированные антитела содержат один или несколько аминокислотных остатков, введенных в них из другого источника, чем человек. Эти чужие аминокислотные остатки часто называют «импортированными» остатками, так как они обычно происходят из чужого вариативного домена. Гуманизация в основном может проводиться путем подстановки последовательностей гипервариативных участков нечеловеческого антитела вместо соответствующих последовательностей антитела человека. Например, см. Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); и Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988). Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (например, см. U.S. Patent No. 4,816,567), в которых почти весь вариативный домен человека заменен на соответствующую последовательность из другого вида. На

практике гуманизированными антителами являются такие антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельных участков и по возможности некоторые остатки каркасных участков (FR) заменены на остатки из аналогичных участков антител грызунов.

- 5 Выбор вариабельных доменов человека из легкой и тяжелой цепи, используемых при получении описанных здесь гуманизированных антител, является важным фактором уменьшения антигенности. В соответствии с так называемым методом «наилучшего соответствия», последовательность вариабельного домена антитела грызуна
- 10 подвергается скринингу против всей библиотеки известных последовательностей вариабельных доменов человека. Последовательность человека, стоящая ближе всего к грызунам, принимается в качестве FR человека для гуманизированного антитела (например, см. Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); и Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). В другом методе используется определенный FR, происходящий из
- 15 консенсусной последовательности всех антител человека из определенной подгруппы легких и тяжелых цепей. Один и тот же FR может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (например, см. Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); и Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

- Также важно то, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокого сродства к антигену и других полезных биологических свойств. Для этого в процессе
- 20 получения гуманизированных антител можно подвергнуть анализу исходные последовательности и различные концептуальные гуманизированные продукты на трехмерных моделях исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и известны специалистам в этой области. Имеются компьютерные программы, которые составляют и отображают вероятные
- 25 трехмерные конформационные структуры выбранных конкретных последовательностей иммуноглобулинов. Просмотр этих изображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании данной последовательности иммуноглобулина, т.е. проанализировать остатки, которые влияют на способность данного иммуноглобулина к связыванию своего антигена. При этом можно отобрать
- 30 и скомбинировать остатки FR из принимающих и импортируемых последовательностей таким образом, чтобы получить требуемые характеристики антител типа повышенного сродства к своим антигенам. В общем, остатки из гипервариабельных участков непосредственно и специфически влияют на связывание антигена.

- В соответствии с настоящим изобретением предусмотрены различные формы
- 35 гуманизированных антител. Например, гуманизированное антитело может представлять собой фрагмент антитела типа Fab-фрагмента. С другой стороны, гуманизированное антитело может представлять собой интактное антитело типа интактного антитела IgA, IgG или IgM.

D. Человеческие антитела

- 40 В качестве альтернативы гуманизации можно создавать человеческие антитела. В некоторых воплощениях можно получить трансгенных животных (например, мышей), способных при иммунизации вырабатывать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединительного участка (JH) тяжелых цепей антител у
- 45 химерных и гаметных мутантных мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных иммуноглобулинов. Перенос гаметного набора генов иммуноглобулина человека таким гаметным мутантным мышам приводит к продукции человеческих антител после антигенной пробы. Например, см. Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermarm et al., *Year in Immun*, 7:33 (1993); и U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369, 5,545,807.

С другой стороны, для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* можно использовать технологию фагового дисплея (например, см. McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990)), используя репертуары генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулина от неиммунизированных доноров. Согласно этому методу, гены V-доменов антител клонируют в одной рамке считывания с геном основного или второстепенного белка оболочки нитчатого бактериофага типа M13 или fd и выставляют в виде функциональных фрагментов антител на поверхности фаговых частиц. Поскольку нитчатые частицы содержат копию генома фага в виде одноцепочечной ДНК, то при отборе по функциональным свойствам антител также происходит отбор генов, кодирующих антитела, проявляющие эти свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей может осуществляться в различных форматах, как описано, например, в Johnson et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея можно использовать несколько источников сегментов V-генов. Например, см. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). Можно сконструировать репертуар V-генов человека от неиммунизированных доноров и выделить антитела к широкому спектру антигенов (включая селф-антигены), в основном следуя методикам, описанным в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993); и U.S. Patent Nos. 5,565,332, 5,573,905.

В некоторых случаях человеческие антитела могут вырабатываться активированными В-клетками *in vitro*, как описано, например, в U.S. Patent Nos. 5,567,610 и 5,229,275.

Е. Фрагменты антител

Разработаны различные методы получения фрагментов антител. По традиции эти фрагменты получали протеолитическим расщеплением интактных антител (например, см. Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако теперь эти фрагменты можно получать непосредственно с использованием рекомбинантных клеток хозяина. Например, фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, приведенных выше. С другой стороны, можно непосредственно выделить Fab'-SH-фрагменты из клеток *E. coli* и химически конъюгировать их с F(ab')₂-фрагментами (например, см. Carter et al., *BioTechnology*, 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab)₂-фрагменты можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток хозяина. Другие методы получения фрагментов антител должны быть известны специалистам. В других воплощениях предпочтительным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). Например, см. PCT Publication No. WO 93/16185; и U.S. Patent Nos. 5,571,894, 5,587,458. Фрагменты антител также могут представлять собой линейные антитела, как описано, например, в U.S. Patent No. 5,641,870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

Ф. Биспецифичные антитела

Биспецифичные антитела - это такие антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере к двум разным эпитопам. Типичные биспецифичные антитела могут связываться с двумя различными эпитопами одного и того же полипептида. В других биспецифичных антителах центр связывания для данного полипептида может сочетаться с центрами связывания для одного или нескольких дополнительных антигенов. Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифичных F

(ab')₂-антител).

Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. По традиции получение полноразмерных биспецифичных антител основывается на совместной экспрессии двух пар тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, при этом две цепи имеют различные специфичности (например, см. Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного сочетания тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) потенциально вырабатывают смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы обычно проводится методом аффинной хроматографии. Аналогичные методики приведены в PCT Publication No. WO 93/08829; и Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом, переменные домены антител с требуемой специфичностью связывания (центров связывания антитело-антиген) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние предпочтительно проводится с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирных участков и участков СН2 и СН3. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере в одном из слияний находился первый константный участок тяжелой цепи (СН1), содержащий сайт, необходимый для связывания с легкой цепью. ДНК, кодирующую слитые тяжелые цепи иммуноглобулина и, при желании, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессирующие вектора и совместно трансфецируют в подходящий организм хозяина. Этим обеспечивается большая гибкость при подгонке взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в тех воплощениях, в которых оптимальный результат дает неравное соотношение трех полипептидных цепей, используемых при конструировании. Однако можно вставить кодирующие последовательности двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных долях приводит к большему выходу или если эти соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном воплощении этого подхода биспецифичные антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридной пары тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) в другом плече. Такая асимметричная структура облегчает отделение требуемого биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифичных молекул облегчает их разделение. Например, см. PCT Publication No. WO 94/04690; и Suresh et al., Meth. Enzymol., 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в U.S. Patent No. 5,731,168, можно устроить контакт между парой молекул антител, чтобы довести до максимума выход гетеродимеров, получаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительный контакт включает по меньшей мере часть участка СН3 из константного домена антител. В этом методе одну или несколько боковых цепей аминокислот из границы контакта первой молекулы антител заменяют на более крупные (например, тирозина или триптофана). На границе контакта второй молекулы антител создаются компенсаторные «полости», такие же или близкие по размеру крупным боковым цепям, путем замены боковых цепей крупных аминокислот на меньшие (например, аланина или треонина). Этим обеспечивается механизм повышения выхода гетеродимера перед другими нежелательными конечными продуктами типа гомодимеров.

Биспецифичные антитела включают и поперечно-сшитые антитела или «гетероконъюгаты» антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть конъюгировано с авидином, а другое - с биотином. Гетероконъюгаты антител могут быть получены любым подходящим методом поперечного сшивания. Подходящие сшивающие реагенты и методики хорошо известны и изложены, например, в U.S. Patent No. 4,676,980.

Также известны подходящие методы получения биспецифичных антител из фрагментов антител. Например, биспецифичные антитела могут быть получены путем химического присоединения. В некоторых случаях биспецифичные антитела могут быть получены по методике, в которой интактные антитела подвергают протеолитическому расщеплению с образованием F(ab')₂-фрагментов (например, см. Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Эти фрагменты восстанавливают в присутствии дитиол-комплексобразующего реагента арсенита натрия, чтобы стабилизировать смежные дитиолы и предотвратить образование межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты преобразуют в производные тионитробензоата (TNB). После этого одно из производных Fab'-TNB обратно превращают в Fab'-тиол восстановлением с помощью меркаптоэтиламина и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB, получая биспецифичное антитело.

В некоторых воплощениях можно выделить Fab'-SH-фрагменты непосредственно из *E. coli* и химически конъюгировать их с образованием биспецифичных антител. Например, полностью гуманизированные молекулы биспецифичных F(ab')₂-антител можно получить методами, описанными в Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992). Каждый Fab'-фрагмент по отдельности выделяли из *E. coli* и подвергали прямой химической конъюгации *in vitro*, получая биспецифичные антитела.

Также описаны различные методы получения и выделения биспецифичных фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифичные антитела получали с использованием лейциновых «молний». Например, см. Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992). Пептиды лейциновых «молний» из белков Fos и Jun соединяли с Fab'-фрагментами двух разных антител методом слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали по шарнирному участку, получая мономеры, а затем подвергали окислению, получая гетеродимеры антител. Этим методом также можно получать гомодимеры антител. Технология «диател», описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм получения биспецифичных фрагментов антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) при помощи линкера, слишком короткого для образования пар между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены образовывать пары с комплементарными доменами V_H и V_L другого фрагмента, при этом образуются два антиген-связывающих центра. Другая стратегия получения биспецифичных фрагментов антител с использованием димеров одноцепочечных Fv (sFv) описана в Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

G. Очистка антител

При использовании рекомбинантных методов антитела вырабатываются внутри выделенных клеток хозяина, в периплазматическом пространстве клеток хозяина или прямо секретируются из клеток хозяина в среду. Если антитело вырабатывается внутри

клетки, то сначала удаляют обломки частиц, к примеру, центрифугированием или методом ультрафильтрации. В работе Carter et al., BioTech., 10:163-167 (1992) описана методика выделения антител, секретируемых в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, суспензию клеток оттаивают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Обломки клеток можно удалить центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, то супернатанты из таких систем экспрессии обычно концентрируют с помощью коммерческого фильтра для концентрирования белков, например, ультрафильтрационного блока Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предыдущих стадий можно включить ингибитор протеаз типа PMSF для ингибирования протеолиза и антибиотики для предотвращения роста случайных примесей.

Композицию антител, полученную из клеток, можно подвергнуть очистке, к примеру, методом хроматографии на гидроксиапатите, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-домена иммуноглобулина, находящегося в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител на основе тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (например, см. Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изотипов мыши и для $\gamma 3$ человека (например, см. Guss et al., EMBO J., 5:1567-1575 (1986)). Матриксом, к которому прикрепляется аффинный лиганд, чаще всего служит агароза, но имеются и другие матриксы. Механически устойчивые матриксы типа стеклянных шариков с контролируемым размером пор или поли(стирендивинил) бензола позволяют увеличить скорость потока и сократить время обработки по сравнению с агарозой. Если антитело содержит домен СНЗ, то для очистки подходит смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.). Применимы и другие методы очистки белков, как-то фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обратнофазовая HPLC, хроматография на кремнеземе, хроматография на гепарин-Sepharose™, хроматография на анионо- или катионообменнике (типа колонки с полиаспаратом), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от выделяемого антитела.

После предварительных стадий очистки смесь, содержащую нужное антитело и примеси, можно подвергнуть гидрофобной хроматографии при низком pH, используя элюирующий буфер при pH 2.5-4.5, предпочтительно при низкой концентрации соли (например, при 0-0.25 М соли).

Специалистам должно быть известно, что в способах и композициях настоящего изобретения можно использовать любые связывающие молекулы, имеющие функции, близкие антителам, например, связывающие молекулы или партнеры по связыванию специфичные к одному или нескольким представляющим интерес анализам в образце. Примеры подходящих антителоподобных молекул включают, без ограничения, доменные антитела, унитела, напотела, антиген-связывающие белки акулы, авимеры, аднектины, антикальмы, аффинные лиганды, филомеры, аптамеры, аффитела, тринектины и др.

VII. Способы введения

В соответствии со способами настоящего изобретения, описанные здесь противораковые препараты вводятся субъекту любым удобным способом, известным в этой области. Способы настоящего изобретения могут применяться для выбора подходящего противоракового препарата или комбинации противораковых препаратов для лечения рака (например, гематологической злокачественности) у субъекта. Способы изобретения также могут применяться для установления реакции рака (например,

гематологической злокачественности) у субъекта на лечение противораковым препаратом или комбинацией противораковых препаратов. Кроме того, способы изобретения могут применяться для предсказания реакции субъекта, страдающего раком (например, гематологической злокачественностью), на лечение противораковым препаратом или комбинацией противораковых препаратов. Более того, способы изобретения могут применяться для идентификации субъекта, страдающего раком (например, гематологической злокачественностью), как не поддающегося лечению противораковым препаратом или комбинацией противораковых препаратов.

Специалистам в этой области должно быть известно, что описанные здесь противораковые препараты могут применяться сами по себе или в составе комбинированной терапии вместе с традиционной химиотерапией, радиотерапией, гормональной терапией, иммунотерапией и/или хирургией.

В некоторых воплощениях противораковый препарат включает противосигнальное средство (т.е. цитостатический препарат) типа моноклонального антитела или ингибитора тирозинкиназ; антипролиферативное средство; химиотерапевтическое средство (т.е. цитостатический препарат); средство гормональной терапии; радиотерапевтическое средство; вакцину; и/или любое другое соединение, способное уменьшить или остановить неконтролируемый рост аномальных клеток типа раковых клеток. В некоторых воплощениях субъект получает одно или несколько противосигнальных средств, антипролиферативных средств и/или средств гормональной терапии в комбинации с по меньшей мере одним химиотерапевтическим средством. Примеры моноклональных антител, ингибиторов тирозинкиназ, антипролиферативных средств, химиотерапевтических средств, средств гормональной терапии, радиотерапевтических средств и вакцин приведены выше.

В некоторых воплощениях описанные здесь противораковые препараты могут вводиться вместе с обычными иммунотерапевтическими средствами, включая, без ограничения, иммуностимулянты (например, бациллы Кальметта-Герена (БЦЖ), левамизол, интерлейкин-2, альфа-интерферон и др.), иммунотоксины (например, конъюгат моноклонального антитела против CD33 с калихеамицином, конъюгат моноклонального антитела против CD22 с экзотоксином псевдомонад и др.) и средства радиоиммунотерапии (например, моноклональное антитело против CD20, конъюгированное с ^{111}In , ^{90}Y или ^{131}I).

Противораковые препараты могут вводиться вместе с подходящим фармацевтическим эксципиентом, как положено, и любым из принятых способов введения. Так, введение может осуществляться, к примеру, перорально, трансбуккально, под язык, гингивально, транспалатально, внутривенно, топически, подкожно, чрескожно, трансдермально, внутримышечно, в суставы, парентерально, внутриартериально, внутрикожно, интравентрикулярно, интракраниально, внутрибрюшинно, интравезикально, интратекально, интралезионально, интраназально, интраректально, интравагинально или путем ингаляции. «Совместное введение» означает, что противораковый препарат вводится в то же самое время, непосредственно перед или сразу же после введения второго препарата (например, другого противоракового препарата, препарата, применяемого для уменьшения побочных эффектов, связанных с терапией противораковым препаратом, радиотерапевтического средства, средства гормональной терапии, иммунотерапевтического средства и т.п.).

Терапевтически эффективное количество противоракового препарата может вводиться неоднократно, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше раз, или же доза может вводиться непрерывным вливанием. Доза может иметь вид твердого,

полутвердого вещества, лиофилизованного порошка или жидкой дозовой формы, как-то, к примеру, таблетки, пилюли, шарики, капсулы, порошки, растворы, суспензии, эмульсии, свечи, удерживающие клизмы, кремы, мази, лосьоны, гели, аэрозоли, пены и др., предпочтительно в стандартной дозовой форме, подходящей для простого

5 введения точных доз.

В настоящем изобретении термин «стандартная дозовая форма» обозначает физически дискретные единицы, пригодные в качестве стандартной дозировки для людей и других млекопитающих, причем каждая единица содержит заданное количество

10 противоракового препарата, рассчитанное на требуемое начало действия, переносимость и/или оказание терапевтических эффектов, вместе с подходящим фармацевтическим эксципиентом (например, ампулой). Кроме того, можно готовить более

концентрированные дозовые формы, из которых затем можно получить более разбавленные дозовые формы. Так, более концентрированные дозовые формы должны

15 6 7, 8, 9, 10 и больше раз противоракового препарата.

Способы приготовления таких дозовых форм известны специалистам (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Как правило, дозовые формы содержат стандартный фармацевтический носитель или эксципиент и могут дополнительно содержать другие лекарственные средства, носители,

20 вспомогательные вещества, разбавители, усилители проникновения в ткани, солюбилизаторы и др. Соответствующие эксципиенты могут быть подогнаны к конкретной дозовой форме и способу применения хорошо известными способами (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*).

Примерами подходящих эксципиентов являются, без ограничения, лактоза, декстроза,

25 сахароза, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, целлюлоза, вода, физраствор, сироп, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и полиакрилаты типа карбополов, например, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981 и т.п. Дозовые формы могут дополнительно включать

30 смазывающие вещества, как-то тальк, стеарат магния и вазелиновое масло; смачивающие вещества; эмульгирующие вещества; суспендирующие вещества; консерванты, как-то метил-, этил- и пропилгидроксibenзоаты (т.е. парабены); pH-регулирующие вещества, как-то неорганические и органические кислоты и основания; подсластители; и ароматизаторы. Дозовые формы также могут включать биоразрушимые полимерные

35 шарики, декстран и аддукты циклодекстрина.

При пероральном введении терапевтически эффективная доза может иметь вид таблеток, капсул, эмульсий, суспензий, растворов, сиропов, аэрозолей, леденцов, порошков и форм с замедленным высвобождением. Подходящими эксципиентами для перорального введения являются фармацевтического уровня маннитол, лактоза,

40 крахмал, стеарат магния, натриевый сахарин, тальк, целлюлоза, глюкоза, желатин, сахароза, карбонат магния и др.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза имеет вид пилюль, таблеток или капсул, поэтому дозовая форма может содержать, наряду с противораковым препаратом, любое из следующего: разбавитель, как-то лактоза, сахароза, двузамещенный фосфат кальция и др.; разрыхлитель, как-то крахмал или его производные; смазывающее вещество, как-то стеарат магния и др.; и связывающее

45 вещество, как-то крахмал, гуммиарабик, поливинилпирролидон, желатин, целлюлоза и ее производные. Противораковый препарат также может быть составлен в виде свечей

и заключен, к примеру, в носитель из полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Жидкие дозовые формы могут быть приготовлены растворением или диспергированием противоракового препарата и необязательно одного ИЛИ нескольких фармацевтически приемлемых адъювантов в носителе, таком, к примеру, как водный солевой раствор (например, 0.9% масс. хлорида натрия), водный раствор декстрозы, глицерин, этанол и др. с образованием раствора или суспензии, например, для перорального, топического или внутривенного введения. Противораковый препарат также может быть составлен в виде удерживающей клизмы.

При топическом введении терапевтически эффективная доза может иметь вид эмульсий, лосьонов, гелей, пены, кремов, желе, растворов, суспензий, мазей и трансдермальных пластырей. При введении путем ингаляции противораковый препарат может вводиться в виде сухого порошка или в жидком виде через распылитель. При парентеральном введении терапевтически эффективная доза может иметь вид стерильных растворов для инъекций и стерильных расфасованных порошков. Предпочтительно растворы для инъекций составляют при рН от 4.5 до 7.5.

Терапевтически эффективная доза также может быть представлена в лиофилизованном виде. Такие дозовые формы могут включать буфер, например, бикарбонат, для реконструкции перед введением, или же буфер может входить в лиофилизованную дозовую форму для реконструкции, например, с водой. Лيوфилизованная дозовая форма может дополнительно включать подходящее сосудосуживающее средство, например, адреналин. Лيوфилизованная дозовая форма может быть представлена в шприце, необязательно в упаковке с буфером для реконструкции с тем, чтобы реконструированная дозовая форма могла быть немедленно введена субъекту.

Субъект также может подвергаться наблюдению через периодические промежутки времени для оценки эффективности определенного терапевтического режима. Например, активационное состояние некоторых онкогенных слитых белков или молекул сигнальной трансдукции может измениться вследствие терапевтического эффекта лечения одним или несколькими описанными здесь противораковыми препаратами. Субъект может подвергаться наблюдению для оценки реакции и понимания эффектов некоторых препаратов или схем лечения при индивидуализированном подходе. Кроме того, субъекты, которые вначале реагируют на определенный противораковый препарат или комбинацию противораковых препаратов, могут стать невосприимчивыми к этому препарату или комбинации препаратов, что означает, что у этих субъектов возникла лекарственная устойчивость. Таким субъектам можно прервать текущую терапию и назначить альтернативное лечение в соответствии со способами настоящего изобретения.

В некоторых аспектах описанные здесь способы могут применяться в сочетании с комплектом маркеров экспрессии генов, прогнозирующих вероятность прогрессирования и/или рецидива рака в различных популяциях. Эти комплекты генов могут применяться для идентификации тех субъектов, у которых вряд ли произойдет рецидив и которым поэтому не нужна вспомогательная химиотерапия. Комплекты маркеров экспрессии могут использоваться для идентификации тех субъектов, которым наверняка можно отменить вспомогательную химиотерапию без отрицательных последствий на заболеваемость и общую выживаемость.

Кроме того, в некоторых других аспектах описанные здесь способы могут применяться в сочетании с комплектом маркеров экспрессии генов, идентифицирующих исходные опухоли при раке неизвестного происхождения (CUP). Такие комплекты генов могут применяться при идентификации субъектов с метастатическим раком,

которым должна помочь терапия, соответствующая той, что назначается субъектам с диагнозом такого же первичного рака. Подходящие системы включают, без ограничения, тест Aviara CancerTYPE ID Assay на основе анализа экспрессии методом RT-ПЦР, в котором измеряется 92 гена для установления первичного места происхождения 39 типов опухолей; и тест Pathwork® Tissue of Origin Test, в котором измеряется экспрессия более 1600 генов на микроматрице и сравнивается «сигнатура» экспрессии генов в опухоли с таковыми у 15 известных типов тканей.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приводятся для раскрытия, а не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1. Детектирование одиночных клеток методом ELISA с двойным детектированием сближения на микроматрице с амплификацией сигнала тирамидом

В этом примере представлен мультиплексный, высокопроизводительный метод «сэндвич»-ELISA с двойным детектированием сближения на микроматрице, обладающий превосходным динамическим диапазоном, который подходит для анализа активационного состояния слитых белков и молекул сигнальной трансдукции в клеточных экстрактах, полученных из выделенных клеток. В определенных воплощениях метод анализа сближения выполняется в формате адресуемой микроматрицы.

1) Захватывающее антитело наносили принтером на 16-площадную пластинку FAST (Whatman Inc.) при серийном разведении от 1 мг/мл до 0.004 мг/мл. В качестве альтернативы можно использовать ряд 2-кратных разведений каждого захватывающего антитела (0.25 мг/мл, 0.125 мг/мл и 0.0625 мг/мл) и делать двойные и четверные пятна для каждого разведения антител. При детектировании слитого белка BCR-ABL типичным захватывающим антителом является моноклональное или поликлональное антитело против BCR.

2) После высушивания в течение ночи пластинку блокировали блокирующим буфером Whatman.

3) На каждую площадку наносили 80 мкл лизата клеток при 10-кратном серийном разведении. Пластинку инкубировали 2 часа при комнатной температуре.

4) После 6 отмывок с помощью TBS-Tween на пластинку добавляли по 80 мкл детектирующих антител, разведенных TBS-Tween/2% BSA/1% FBS. При детектировании слитого белка BCR-ABL типичными детектирующими антителами являются: (1) моноклональное или поликлональное антитело против ABL, непосредственно конъюгированное с глюкозооксидазой (GO); и (2) моноклональное или поликлональное антитело, распознающее фосфорилированный ABL, непосредственно конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP). Инкубация составляет 2 часа при комнатной температуре.

5) В качестве альтернативы на стадии детектирования можно использовать биотинный конъюгат антитела, распознающего фосфорилированный ABL. В таких случаях после 6 отмывок включали дополнительную последующую стадию инкубации со стрептавидин-HRP в течение 1 часа.

6) В качестве альтернативы на стадии детектирования можно использовать опосредованный олигонуклеотидом конъюгат GO с антителом против ABL. Можно использовать непосредственно конъюгированное антитело или соединенный биотин-стрептавидином (SA) конъюгат HRP с антителом к фосфорилированному ABL.

7) Для амплификации сигнала добавляли 80 мкл биотин-тирамида при 5 мкг/мл и оставляли реагировать на 15 мин. Пластинку отмывали 6 раз с помощью TBS-Tween, 2 раза с помощью 20% DMSO/TBS-Tween и 1 раз с помощью TBS.

8) Добавляли 80 мкл SA-Alexa 555 и инкубировали 30 мин. После этого пластинку

отмывали 2 раза, сушили 5 мин и сканировали на сканере для микроматриц (Perkin-Elmer, Inc.).

В описанном формате анализа сближения на микроматрице по преимуществу проявляется очень низкий фон (например, в сравнении с методом двух антител) вследствие повышения специфичности при детектировании близкого расстояния между двумя детектирующими антителами.

Пример 2. Составление активационных профилей для отбора лекарств

Композиции и способы настоящего изобретения могут применяться для отбора лекарств для лечения рака. В качестве неограничивающего примера: настоящее изобретение находит применение при установлении наличия и/или активности одного или нескольких онкогенных слитых белков, связанных с гематологической злокачественностью, для того, чтобы обеспечить надлежащее лечение больных этими раковыми заболеваниями. Типичная методика включает составление двух профилей: контрольного активационного профиля и исследуемого активационного профиля, которые затем сравнивают, чтобы определить эффективность данного режима лечения препаратом (см. фиг.2).

Контрольный активационный профиль

Для получения контрольного активационного профиля берут образец крови у пациента с определенным раковым заболеванием (например, лейкозией типа CML) перед лечением противораковым препаратом. Из образца крови выделяют раковые клетки, например, любым из способов, описанных здесь более подробно. Выделенные клетки можно подвергнуть стимуляции *in vitro* одним или несколькими факторами роста. Затем простимулированные клетки подвергают лизису для получения клеточного экстракта. Клеточный экстракт наносят на адресуемую матрицу, содержащую серийные разведения комплекта захватывающих антител, специфичных к одному или нескольким онкогенным слитым белкам (одним или в комбинации с одной или несколькими молекулами сигнальной трансдукции), активационное состояние которых может измениться при раковом заболевании у пациента. Выполняются определения методом одиночной детекции или методом анализа сближения с помощью соответствующих детектирующих антител (например, независимых от активационного состояния антител и/или зависящих от активационного состояния антител), чтобы определить активационное состояние каждого из нужных аналитов. При этом создается контрольный активационный профиль, представляющий активационные состояния определенных аналитов типа онкогенных слитых белков при раковом заболевании у пациента в отсутствие каких-либо противораковых препаратов.

Исследуемый активационный профиль

Для получения исследуемого активационного профиля берут второй образец крови у пациента с определенным раковым заболеванием (например, лейкозией типа CML) либо перед лечением противораковым препаратом, либо после применения противоракового препарата (например, в любое время на протяжении курса лечения рака). Из образца крови выделяют раковые клетки. Если выделенные клетки получены от пациента, не получавшего лечения противораковым препаратом, то выделенные клетки инкубируют с противораковыми препаратами, мишенью которых являются один или несколько активируемых онкогенных слитых белков и/или молекул сигнальной трансдукции, установленных из контрольного активационного профиля, описанного выше. Например, если из контрольного активационного профиля установлено, что активируется слитый белок BCR-ABL, то клетки можно проинкубировать с иматинибом (Gleevec®). После этого выделенные клетки можно подвергнуть стимуляции *in vitro*

одним или несколькими факторами роста. Затем простимулированные клетки подвергают лизису для получения клеточного экстракта. Клеточный экстракт наносят на адресуемую матрицу и выполняют определения методом одиночной детекции или методом анализа сближения, чтобы определить активационное состояние каждого из
5 нужных аналитов. При этом создается исследуемый активационный профиль, представляющий активационные состояния определенных аналитов типа онкогенных слитых белков при раковом заболевании у пациента в присутствии определенных противораковых препаратов.

Отбор препаратов

Противораковые препараты определяются как подходящие или не подходящие для
10 лечения рака у пациента путем сравнения исследуемого активационного профиля с контрольным активационным профилем. Например, если при применении препаратов большая часть или все онкогенные слитые белки и/или молекулы сигнальной трансдукции существенно меньше активируются, чем в отсутствие препаратов, например,
15 происходит изменение от сильной активации без препаратов к слабой или очень слабой активации в присутствии препаратов, то лечение определяется как подходящее для лечения рака у пациента. В таких случаях либо начинают лечение подходящим противораковым препаратом у пациента, не получавшего лекарственной терапии, либо продолжают текущее лечение подходящим противораковым препаратом у пациента,
20 уже получавшего этот препарат. Однако, если применение препарата будет признано не подходящим для лечения рака у пациента, то подбираются другие препараты, которые используются для составления нового исследуемого активационного профиля и затем сравнения его с контрольным активационным профилем. В таких случаях либо начинают лечение подходящим противораковым препаратом у пациента, не получавшего
25 лекарственной терапии, либо изменяют текущее лечение на подходящий противораковый препарат у пациента, получающего в настоящее время неподходящий препарат.

Методика, описанная в данном примере, также применима для идентификации пациентов, не поддающихся терапии ингибиторами тирозинкиназ типа иматиниба из-за мутаций в искомой протеинкиназе (например, BCR-ABL), несоблюдения режима
30 лечения и/или применения субоптимальной дозы препарата.

Пример 3. Типичные онкогенные слитые белки, связанные с раком

В этом примере представлен исчерпывающий список транслокаций в опухолях человека, вызывающих образование онкогенных слитых белков и связанных с ними новообразований.

Лимфома Беркитта: транслокация t(8;14)(q24;q32) гена с-мус. Самым распространенным химерным онкогенным белком является с-мус/IGH.

AML: транслокация части хромосомы 8 на хромосому 21. Образуется химерный онкогенный белок RUNX1/ETO. Другая транслокация t(12;15)(p13;q25) приводит к образованию химерного онкогенного белка (киназы) TEL/TrkC.

40 CML: хромосома Philadelphia - это транслокация, при которой образуется BCR/ABL (киназа).

Саркома Юинга: транслокация между хромосомами 11 и 22. Образуется химерный онкогенный белок EWS/FLI (фактор транскрипции).

ALL: химерные онкогенные белки:

Цитогенетическая транслокация	Молекулярно-генетическая аномалия	%
криптическая t(12;21)	TEL/AML1 (киназа)	25.4%
t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX (PBX1)	4.8%
t(9;22)(q34;q11)	слияние BCR/ABL (PI 85)	1.6%

t(4;11)(q21;q23)	слияние MLL/AF4	1.6%
t(8;14)(q24;q32)	слияние IGH/MYC	
t(11;14)(p13;q11)	слияние TCR/RBTN2	

DFSP: свыше 95% опухолей при DFSP содержат хромосомную транслокацию t(17; 22), при которой образуется химерный онкогенный белок COL1A1/PDGF (связывается с и активирует PDGFR).

Острая промиелоцитарная лейкемия: транслокация, которая обозначается как t(15; 17)(q22;q12). Образуется химерный онкогенный белок RAR α /PML (белок транскрипционного комплекса).

Про-В-клеточная острая лимфобластическая лейкемия: транслокация t(17;19), при которой образуется химерный онкогенный белок E2A/HLF (ингибитор апоптоза).

Острая пре-В-клеточная лейкемия: транслокация t(1;19). Химерный онкогенный белок E2A/Pbx1 (субстрат киназы).

Рабдомиосаркома: транслокация t(2;13)(q35;q14), при которой образуется химерный онкогенный белок PAX3/FKHR (фактор транскрипции).

Рак мягких тканей у очень маленьких детей: перестановка t(12;15)(p13;q25), при которой образуется следующий химерный онкогенный белок: тирозиновая протеинкиназа ETV6/NTRK3 (киназа).

Папиллярная карцинома щитовидной железы: химерный онкогенный белок RET/PTC (киназа).

Рак простаты: химерный онкогенный белок TMRSS/ERG (киназа). Дополнительные примеры транслокаций в опухолях человека, вызывающих образование онкогенных слитых белков и связанных с ними новообразований:

Онкоген	Новообразование
bcr/abl	хроническая миелогенная лейкемия; острая лимфоцитарная лейкемия
dek/can	острая миелоидная лейкемия
E2A/pbx1	острая пре-В-клеточная лейкемия
PML/RAR	острая промиелоцитарная лейкемия
?/erg	миелоидная лейкемия
irel/urg	В-клеточная лимфома
CBF β /MYH11	острая миелоидная лейкемия
aml1/mtg8	острая миелоидная лейкемия
ews/fli	саркома Юинга
lyt-10/C α 1	В-клеточная лимфома
hrx/enl	острая лейкемия
hrx/af4	острая лейкемия
NPM/ALK	крупноклеточная лимфома

Адаптировано из G.M.Cooper, Oncogenes, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett, 1995.

Пример 4. Иммуноанализ, основанный на близком взаимном расположении, для детектирования общего уровня и активированных онкогенных слитых белков

Введение

Онкоген BCR-ABL образуется при транслокации нормального гена ABL, расположенного на длинном плече хромосомы 9, на N-концевую часть гена BCR, расположенного на длинном плече хромосомы 22, с образованием хромосомы Philadelphia. В зависимости от того, в каком месте транслоцируемый ген ABL встраивается в N-концевую часть гена BCR, получают генные продукты BCR-ABL различной длины, при этом преобладает продукт p210 гена BCR-ABL как онкоген, вызывающий CML и подгруппу ALL. Также образуются и другие генные продукты,

как-то p185 и p230 BCR-ABL. В частности, именно продукт p210 гена BCR-ABL вызывает AML. Этот белок содержит 1790 аминокислот и состоит из олигомеризационного домена (OLI) из BCR на N-конце, за которым следует киназный домен S/T из BCR, вставка аминокислотной последовательности из BCR, отсутствующей в нормальном BCR, а затем киназные домены SH3, SH2 и Y из ABL, а также C-концевой богатый пролином домен ABL.

Клинические сведения

В то время как большинство пациентов с хронической миелогенной лейкемией (CML) в хронической фазе хорошо реагируют на иматиниб, некоторые пациенты не дотягивают до нужной конечной точки, а остальные могут оказаться невосприимчивыми к нему или не переносить его. В отношении лечения 400 мг/день иматиниба (Gleevec): отмечается полный цитогенетический ответ (CCyR) у 70-80% пациентов; отмечается потеря CCyR со скоростью 4-7% в год в первые 3 года, а затем 1-2% в год после этого; общая выживаемость через 7 лет составляет 90%, выживаемость без болезни через 7 лет составляет 81%; а частота рецидивов за 5 лет составляет 30%. Отмечается еще лучшая реакция на лечение 800 мг/день иматиниба (Gleevec): CCyR=95%; частота рецидивов=5%, но такая доза иматиниба также и более токсична. У нилотиниба эффективность близка 800 мг/день иматиниба, но он более токсичен, чем иматиниб.

Полное ингибирование BCR-ABL обеспечивает лучшую реакцию на Gleevec, а неполное ингибирование BCR-ABL вызывает ухудшение реакции на Gleevec. Поэтому детектирование в реальном времени уровня экспрессии и степени активации BCR-ABL принесет пользу больным CML при прицельной терапии тем, что можно корректировать дозу препарата так, чтобы эффективно ингибировать мишень и в тоже время свести к минимуму токсичность. Например, пациентам с неполным ингибированием при 400 мг/день Gleevec можно быстрее назначить более высокую дозу (например, 800 мг/день), чтобы обеспечить хорошую реакцию.

Диагностическая проблема

Высокий фоновый уровень полноразмерного BCR и ABL сильно затрудняет детектирование сравнительно редкого слитого белка BCR-ABL. Кроме того, текущие методы детекции степени фосфорилирования BCR-ABL не обладают чувствительностью для выявления фосфорилирования в клинических пробах крови. Более того, антитела против таких слитых белков, как BCR-ABL не очень специфичны к множественным вариантам слитого белка.

Новые методы детектирования BCR-ABL

На фиг.3А представлен типичный метод анализа сближения (300) для детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) такого слитого белка, как BCR-ABL (310). На фиг.3В представлен альтернативный метод (400) анализа сближения определения по настоящему изобретению для детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) BCR-ABL (410) с помощью стыковочных антител.

Неограничивающие примеры антител, пригодных для применения в способах измерения общего уровня BCR-ABL и/или активированного белка, представленных на фиг.3А-3В, включают антитела, приведенные выше в табл.1.

Результаты

На фиг.4 представлен сигнал BCR-ABL в клетках K562 (т.е. клетках из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека) после удаления свободного полноразмерного BCR с помощью антитела, специфичного к C-концевому участку полноразмерного BCR, конъюгированного с шариками, в соответствии с типичным

методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А. В частности, из фиг.4 видно, что на сигнал BCR-ABL не влияет удаление свободного BCR из образца от пациента при новом методе анализа сближения настоящего изобретения.

На фиг.5 представлен сигнал BCR в клетках K562 после удаления свободного BCR с помощью антитела, специфичного к С-концевому участку полноразмерного BCR, конъюгированного с шариками, в соответствии с типичным методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А. Как видно из фиг.5, уменьшение сигнала BCR при 10000 клеток свидетельствует о том, что удаляется только BCR при новом методе анализа сближения настоящего изобретения.

На фиг.6 представлено детектирование общего уровня и фосфорилированного BCR-ABL в клетках K562 типичным методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А.

Заключение

Этот пример свидетельствует, что типичные методы анализа сближения, приведенные на фиг.3А и 3В для детектирования наличия и/или активационного состояния BCR-ABL,

обладают преимуществом по крайней мере по следующим причинам: (1) полноразмерный белок BCR можно удалить из образца от пациента типа крови или аспирата костного мозга с помощью извлекающего тега, специфичного к С-концевому участку BCR; (2) после удаления полноразмерного BCR из образца от пациента захватывающие антитела, специфичные к N-концевому участку BCR, могут захватывать слитые белки BCR-ABL; и (3) после захвата слитых белков BCR-ABL их уровень экспрессии и активации можно детектировать с высокой чувствительностью посредством канализирования при сближении, при этом отдельный детектируемый сигнал, коррелирующий с общим уровнем или активированным белком BCR-ABL, генерируется только при связывании всех трех антител, что ведет к повышению специфичности определения, снижению фона и упрощению детектирования.

Пример 5. Детектирование общего уровня и активированного BCR-ABL без помех от полноразмерного BCR и/или ABL

В этом примере представлены дополнительные экспериментальные данные, свидетельствующие о преимуществах типичных методов анализа сближения приведенных на фиг.3А и 3В, для детектирования наличия (общего уровня) и/или активационного состояния (степени фосфорилирования) BCR-ABL. В одном определенном воплощении полноразмерные белки BCR удаляются из экстракта клеток (например, злокачественных лейкоцитов типа лейкемических клеток), полученных из образца от пациента, или из экстракта клеток, полученных из линии клеток (например, лейкемической линии) с помощью извлекающего тега, специфичного к С-концевому участку BCR. После удаления полноразмерного BCR из клеточного экстракта захватывающие антитела, специфичные к N-концевому участку BCR, могут захватывать слитые белки BCR-ABL. После захвата слитых белков BCR-ABL их уровень экспрессии и активации можно детектировать с высокой чувствительностью посредством канализирования при сближении, при этом отдельный детектируемый сигнал, коррелирующий с общим уровнем или активированным белком BCR-ABL, генерируется только при связывании всех трех антител, что дает преимущество повышения специфичности определения, снижения фона и упрощения детектирования.

На фиг.7 представлены степень фосфорилирования («фосфо-BCR-ABL») и общий уровень («общий BCR-ABL») BCR-ABL, выявленные в клетках K562 (т.е. клетках из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека) после удаления свободного полноразмерного BCR с помощью конъюгированного с шариками антитела, специфичного к С-концевому участку полноразмерного BCR, в соответствии с типичным

методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А. В частности, из фиг.7А и 7В видно, что сигналы фосфорилированного и общего BCR-ABL не изменялись после обработки клеток K562 шариками, конъюгированными с антителами, специфичными к С-концевому участку полноразмерного BCR, для удаления свободного белка BCR при новом методе анализа сближения настоящего изобретения. Из фиг.7С видно, что свободный полноразмерный BCR действительно удаляется из клеточного экстракта после обработки шариками, конъюгированными с антителом к С-концевому участку BCR.

На фиг.8 представлен другой пример сигнала фосфорилированного BCR-ABL в клетках K562 после удаления свободного BCR с помощью конъюгированного с шариками антитела, специфичного к С-концевому участку полноразмерного BCR, в соответствии с типичным методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А. В частности, на фиг.8А представлено сравнение на микроматрице сигнала фосфорилированного BCR-ABL при определении в лизатах клеток K562 с удалением или без удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.8В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в зависимости от количества клеток. Из этих рисунков видно, что сигнал фосфо-BCR-ABL не изменяется при удалении полноразмерного BCR из экстракта клеток K562 при новом методе анализа сближения настоящего изобретения.

На фиг.9 представлен другой пример сигнала общего BCR-ABL в клетках K562 после удаления свободного BCR с помощью конъюгированного с шариками антитела, специфичного к С-концевому участку полноразмерного BCR, в соответствии с типичным методом анализа сближения, приведенным на фиг.3А. В частности, на фиг.9А представлено сравнение на микроматрице сигнала общего BCR-ABL при определении в лизатах клеток K562 с удалением или без удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.9В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в зависимости от количества клеток. Из этих рисунков видно, что сигнал общего BCR-ABL не изменяется при удалении полноразмерного BCR из экстракта клеток K562 при новом методе анализа сближения настоящего изобретения.

На фиг.10 представлен другой пример удаления свободного полноразмерного BCR из экстракта клеток K562 после обработки клеточного экстракта шариками, конъюгированными с антителом к С-концевому участку BCR. В частности, на фиг.10А представлено сравнение на микроматрице общего сигнала BCR при определении в лизатах клеток K562 с удалением или без удаления полноразмерного BCR («не обработанные шариками» = без удаления BCR в сравнении с «обработанные шариками» = с удалением BCR с помощью шариков, содержащих конъюгированное с ними антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR). На фиг.10В приведено графическое представление данных из микроматриц в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в зависимости от количества клеток. Из этих рисунков видно, что полноразмерный BCR практически исчезал из клеточного экстракта при обработке шариками, содержащими антитело, специфичное к С-концевой части полноразмерного BCR. Так, клеточные экстракты, содержащие, например, менее 1000 клеток, не давали

сигнала BCR, значительно превышающего уровень фона (0 клеток), при инкубации с шариками, конъюгированными с антителом к С-концевой части BCR.

На фиг.11 показано, что в лейкоцитах (WBCs) присутствуют свободные полноразмерные белки BCR и ABL, но не слитый белок BCR-ABL. На фиг.12 показано, что свободный полноразмерный BCR, присутствующий в лейкоцитах, ингибирует сигнал фосфо-BCR-ABL в экстрактах клеток K562, когда в такие экстракты клеток K562 добавляли экстракты лейкоцитов (WBCs). На фиг.13 представлен общий сигнал BCR-ABL в клетках K562 с добавлением экстрактов WBCs после удаления свободного BCR с помощью шариков, конъюгированных с антителом, специфичным к С-концевому участку полноразмерного BCR. В частности, из фиг.13А видно, что сигнал свободного BCR насыщается при добавлении в экстракты клеток K562 экстрактов WBCs. После обработки шариками, конъюгированными с антителом против С-концевого BCR, свободный BCR удаляется. Из фиг.13В видно, что в том же эксперименте сигнал BCR-ABL не изменялся при обработке или без обработки шариками.

В некоторых воплощениях перед захватом и детектированием экспрессии и/или активации BCR-ABL можно дополнительно или альтернативно удалить полноразмерный белок ABL из экстракта клеток (например, злокачественных лейкоцитов типа лейкемических клеток), полученных из образца от пациента, или из экстракта клеток, полученных из линии клеток (например, лейкемической линии), с помощью извлекающего тега, специфичного к N-концевому участку полноразмерного ABL. Неограничивающим примером такого извлекающего тега являются шарики, к которым прикреплено антитело, специфичное к N-концевому участку полноразмерного ABL.

Пример 6. Детектирование общего уровня и активированного BCR-ABL в клетках, обработанных ингибиторами киназной активности BCR-ABL

Этот пример свидетельствует, что такие ингибиторы BCR-ABL, как иматиниб (Gleevec®), нилотиниб (Tasigna®) и дасатиниб (Sprycel®) дозозависимым образом ингибируют активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562 (т.е. клетках из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека).

В частности, из фиг.14А и 14В видно, что ингибитор BCR-ABL иматиниб (Gleevec®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562. На фиг.14С представлено отношение фосфо/общий уровень BCR-ABL при ингибировании иматинибом, которое коррелирует со степенью ингибирования сигнала фосфо-BCR-ABL при обработке иматинибом.

Из фиг.15А и 15В видно, что ингибитор BCR-ABL нилотиниб (Tasigna®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562. На фиг.15С представлено отношение фосфо/общий уровень BCR-ABL при ингибировании нилотинибом, которое коррелирует со степенью ингибирования сигнала фосфо-BCR-ABL при обработке нилотинибом.

Из фиг.16А и 16В видно, что ингибитор BCR-ABL дасатиниб (Tasigna®) дозозависимым образом ингибирует активацию (т.е. фосфорилирование), но не экспрессию (т.е. общий уровень) белка BCR-ABL в клетках K562. На фиг.16С представлено отношение фосфо/общий уровень BCR-ABL при ингибировании дасатинибом, которое коррелирует со степенью ингибирования сигнала фосфо-BCR-ABL при обработке дасатинибом.

Пример 7. Детектирование общего уровня и активированного субстрата BCR-ABL

- CRKL в различных линиях раковых клеток

В этом примере представлено детектирование общего уровня и активированного (фосфорилированного) субстрата BCR-ABL - CRKL при определении методом «сэндвич»-ELISA. В других воплощениях наличие и/или активационное состояние такого субстрата BCR-ABL, как CRKL можно измерить методом анализа сближения типа иммуноанализа совместного сближения (COPIA), описанного в заявке PCT Application No. PCT/US2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и US Patent Publication Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено путем ссылки во всей полноте и на все случаи.

Из фиг.17 видно, что CRKL присутствует и активируется (т.е. фосфорилируется) в клетках K562 (т.е. клетках из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека). Из фиг.18 видно, что CRKL присутствует в клетках A431 (т.е. клетках из линии клеток эпидермоидной карциномы человека) и активируется (т.е. фосфорилируется) после обработки EGF. Из фиг.19 видно, что CRKL присутствует в клетках T47D (т.е. клетках из линии раковых клеток эпителия молочных протоков человека), но не активируется (т.е. не фосфорилируется) после обработки EGF. Из фиг.20 видно, что CRKL присутствует в клетках T47D и активируется (т.е. фосфорилируется) на низком уровне после обработки херегулином (HRG). Из фиг.21 видно, что CRKL присутствует в клетках MCF-7 (т.е. клетках из линии клеток аденокарциномы молочной железы человека) и активируется (т.е. фосфорилируется) на низком уровне после обработки херегулином (HRG). Из фиг.22 видно присутствие активированного (т.е. фосфорилированного) CRKL в лейкоцитах (WBCs) из образцов от пациентов, при этом степень активации отличается у разных доноров.

Пример 8. Детектирование общего уровня и активированного субстрата BCR-ABL - JAK2 в различных линиях раковых клеток

В этом примере представлено детектирование уровня активированного (фосфорилированного) субстрата BCR-ABL - JAK2 при определении методом «сэндвич»-ЕИ8А. В других воплощениях наличие и/или активационное состояние такого субстрата BCR-ABL, как JAK2 можно измерить методом анализа сближения типа иммуноанализа совместного сближения (COPIA), описанного в заявке PCT Application No. PCT/US2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и US Patent Publication Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено путем ссылки во всей полноте и на все случаи.

Из фиг.23 видно, что JAK2 активируется (т.е. фосфорилируется) в клетках K562 (т.е. клетках из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека) и клетках A431 (т.е. клетках из линии клеток эпидермоидной карциномы человека).

Пример 9. Выделение клеток из крови без разбавления противоракового препарата

В этом примере представлено выделение клеток K562 (т.е. клеток из линии клеток хронической миелогенной лейкемии человека) из крови с добавленными клетками K562 методом захвата магнитными шариками с антителами против CD45, с последующим получением лизата клеток K562 и определением уровня экспрессии и/или активационного состояния одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов, путей или их комбинаций. В этом примере также представлено выделение лейкоцитов из образцов крови пациентов методом захвата магнитными шариками с антителами против CD45 и/или CD 15, с последующим получением лизата клеток и определением уровня экспрессии и/или активационного состояния одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов, путей или их комбинаций. Исключение из описанных здесь методов потребности в отмывке после

выделения клеток дает преимущество в том, что нужные клетки могут быть выделены из крови без изменения внутриклеточной концентрации противоракового препарата, как-то ингибитора тирозинкиназ. При этом описанные в этом примере методы идут вразрез с общепринятой практикой отмывания клеток после выделения (например, отмывания связанных с шариками клеток) и дают клеточные лизаты из выделенных клеток без существенного разбавления противоракового препарата, как-то ингибитора тирозинкиназ (например, Gleevec®, Tassigna®, Sprycel® и т.п.), внутри клеток.

Выделение клеток K562 из 1 мл крови с помощью шариков Dynabeads CD45

1. Приготовление буфера 1

1.1. Добавить 500 мг BSA в 500 мл PBS

1.2. Добавить 2 мл 0.5M EDTA

2. Получение крови и добавление клеток K562

2.1. Взять 10 мл цельной крови у донора

2.2. Развести кровь 1:1 буфером 1

2.3. Сделать подсчет клеток K562 на автоматизированном счетчике CellCounter

2.4. Добавить 5×10^6 , 1×10^6 , $0,1 \times 10^6$ и 0 клеток K562 по отдельности в 1 мл разведенной крови для каждой концентрации

3. Отмывка шариков DynaBeads (Invitrogen, кат. №111.53D)

3.1. Внести по 100 мкл шариков на каждые 1×10^7 клеток в микропробирки на 1,5 мл

3.2. Добавить 1 мл буфера 1 и осторожно перемешать

3.3. Поставить пробирки на магнит на 1 мин

3.4. Удалить супернатант

3.5. Снять пробирки с магнита и ресуспендировать в таком количестве буфера 1, которое равно исходному объему внесенных шариков

4. Выделение клеток

4.1. Добавить 100 мкл отмытых шариков в каждый образец крови с клетками K562

4.2. Инкубировать образцы на ротационной мешалке на холоду (или при комнатной температуре) в течение 20 мин, 2 ч или 1 ч

4.3. Поставить образцы на магнит и удалить супернатант

5. Приготовление лизата клеток

5.1. Добавить 1 мл холодного буфера для лизиса к шарикам, связанным с 5×10^6 клеток K562

5.2. Добавить 500 мкл буфера для лизиса к шарикам, связанным с 1×10^6 клеток K562

5.3. Добавить 100 мкл буфера для лизиса к шарикам, связанным с $0,1 \times 10^6$ клеток K562

5.4. Обработать на вибрационной мешалке и поставить на лед на 20 мин, перемешивая время от времени

5.5. Центрифугировать 15 мин при макс. скорости при 4°C

5.6. Перенести супернатант в микропробирку, предназначенную для микроматрицы, например, для выполнения описанных здесь методов иммуноанализа сближения.

Выделение клеток CML из образца крови пациента с помощью шариков Dynabeads CP45 и/или CP15

1. Приготовление буфера 1

1.1. Добавить 500 мг BSA в 500 мл PBS

1.2. Добавить 2 мл 0.5M EDTA

2. Получение крови пациента

2.1. Взять 2-3 мл цельной крови у пациента, используя в качестве антикоагулянта

EDTA (или гепарин)

2.2. Добавить или не добавлять ингибиторы протеаз

3. Отмывка шариков DynaBeads (Invitrogen, кат. №111.53D)

3.1. Внести по 100 мкл (200 мкл, 300 мкл) шариков на каждый 1 мл образца крови в микропробирки на 1,5 мл

3.2. Добавить 1 мл буфера 1 и осторожно перемешать

3.3. Поставить пробирки на магнит на 1 мин

3.4. Удалить супернатант

3.5. Снять пробирки с магнита и ресуспендировать в 100 мкл буфера 1 как исходном объеме внесенных шариков

4. Выделение клеток

4.1. Добавить 100 мкл отмытых шариков в 1 мл крови в микропробирке на 1,5 мл

4.2. Инкубировать образцы на ротационной мешалке на холоду (или при комнатной температуре) в течение 20 мин, 2 ч или 1 ч

4.3. Поставить образцы на магнит и удалить супернатант

5. Приготовление лизата клеток

5.1. Добавить 100 мкл буфера для лизиса к шарикам, связанным с клетками

5.2. Обработать на вибрационной мешалке и поставить на лед на 20 мин, перемешивая время от времени

5.3. Центрифугировать 15 мин при макс. скорости при 4°C

5.4. Перенести супернатант в микропробирку, предназначенную для микроматрицы, например, для выполнения описанных здесь методов иммуноанализа сближения.

Из фиг.24 видно, что фосфорилированный BCR-ABL можно детектировать и измерить в клеточных лизатах, приготовленных из клеток K562, выделенных из крови с помощью магнитных шариков анти-СВ45. В частности, для детектирования уровня фосфорилированного BCR-ABL использовали антитело 4G10 (Millipore), которое связывается с остатком фосфотирозина в происходящей из ABL части слитого белка. Аналогичное определение может выполняться на клеточных лизатах, полученных из лейкоцитов (например, лейкоцитов при хронической миелогенной лейкемии (CML)), выделенных из образцов крови пациентов с помощью магнитных шариков анти-CD45 и/или анти-СР15, для детектирования и измерения наличия и/или уровня фосфорилированного BCR-ABL.

Пример 10. Детектирование общего уровня онкогенного слитого белка и общего уровня нативного полноразмерного белка в образцах от пациентов

В этом примере представлен способ одновременного детектирования общего количества и/или активационного состояния онкогенного слитого белка в сочетании с одним или обоими нативными полноразмерными белками, содержащими последовательности или домены, встречающиеся в онкогенном слитом белке. В одном определенном воплощении данный способ позволяет детектировать и/или измерять как общий уровень BCR-ABL, так и общий уровень нативного полноразмерного BCR и/или ABL в биологических образцах типа крови или аспирационного биоптата костного мозга.

В некоторых воплощениях уровень нативного белка (например, полноразмерного BCR и/или ABL) определяется вместе с уровнем онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL) в мультиплексном режиме на одной и той же пластинке. В этих воплощениях нативный полноразмерный белок по преимуществу может быть выделен вместе с онкогенным слитым белком, так что уровень этих молекул определяется на одной и той же пластинке.

Из фиг.25 видно, что общий уровень BCR-ABL не изменяется при нанесении антитела против С-концевой части нативного полноразмерного BCR (эта С-концевая часть отсутствует в BCR-ABL) на ту же пластинку в те же самые площадки, что и антитело против N-концевой части BCR-ABL. Из фиг.26 видно, что сигнал свободного нативного BCR, детектируемый с помощью антитела, специфичного к N-концевой части BCR, снижается при нанесении на ту же пластинку в те же самые площадки антитела против С-концевой части нативного BCR.

В определенных воплощениях описанный в этом примере способ может применяться для детектирования и/или измерения общего уровня BCR-ABL вместе с общим уровнем нативного полноразмерного BCR или ABL, причем можно рассчитать отношение общего уровня BCR-ABL к общему уровню нативного полноразмерного BCR или ABL. В некоторых случаях отношение уровня BCR-ABL к уровню нативного полноразмерного BCR или ABL рассчитывается для того, чтобы более точно определять такие индикаторы ответа, к примеру, как сильный молекулярный ответ, полный молекулярный ответ, полный цитогенетический ответ и их комбинации. В других случаях описанный в этом примере способ может применяться для отслеживания изменений экспрессии BCR-ABL относительно контроля типа нативного полноразмерного BCR или ABL (например, путем вычисления отношения общего уровня BCR-ABL к уровню нативного полноразмерного BCR или ABL) в зависимости от терапии (например, терапии ингибитором тирозинкиназ).

Все публикации и патентные заявки, приведенные в этом описании, включены путем ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально включена путем ссылки. Несмотря на то, что данное изобретение было описано весьма подробно при помощи иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, специалистам в этой области в свете положений данного изобретения должно быть понятно, что в нем могут производиться определенные изменения и модификации, не отходящие от сути и не выходящие за рамки прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ определения уровня или активационного состояния онкогенного слитого белка, который включает:

(а) получение клеточного экстракта, содержащего экстракт клеток, выделенных из образца, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса с целью

получения клеточного экстракта;

(b) контактирование данного клеточного экстракта с первой связывающей молекулой, специфичной к первому домену первого полноразмерного белка, в условиях, подходящих для преобразования первого полноразмерного белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий первый полноразмерный белок и первую связывающую молекулу, причем первый домен первого полноразмерного белка отсутствует в соответствующем онкогенном слитом белке, содержащем второй другой домен первого полноразмерного белка, слитый с первым доменом второго другого полноразмерного белка;

(с) удаление из клеточного экстракта комплекса из стадии (b) с получением клеточного экстракта, лишенного первого полноразмерного белка;

(d) контактирование клеточного экстракта из стадии (с) со второй связывающей молекулой, третьей связывающей молекулой и четвертой связывающей молекулой в условиях, подходящих для преобразования онкогенного слитого белка,

присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, содержащий онкогенный слитый белок и вторую, третью и четвертую связывающие молекулы,

где вторая связывающая молекула специфична ко второму другому домену первого полноразмерного белка, где вторая связывающая молекула фиксирована на твердой подложке в адресуемой матрице,

где третья связывающая молекула помечена содействующей молекулой и специфична к одному из следующего: (i) первому домену второго другого полноразмерного белка; (ii) второму другому домену первого полноразмерного белка; или (iii) месту слияния между вторым другим доменом первого полноразмерного белка и первым доменом второго другого полноразмерного белка,

причем четвертая связывающая молекула помечена первым членом пары амплификации сигнала и специфична к первому домену второго другого полноразмерного белка, и

при этом содействующая молекула вырабатывает окислитель, который канализируется к и реагирует с первым членом пары амплификации сигнала;

(е) инкубирование комплекса из стадии (d) со вторым членом пары амплификации сигнала с генерированием амплифицированного сигнала; и

(f) детектирование амплифицированного сигнала, генерированного первым и вторым членами пары амплификации сигнала, тем самым определяя уровень или активационное состояние онкогенного слитого белка.

2. Способ по п.1, в котором образец выбран из группы, состоящей из цельной крови, сыворотки, плазмы, мочи, мокроты, смывной жидкости бронхов, слез, аспирата из сосков, лимфы, слюны, тонкоигольного аспирационного биоптата (FNA) и их комбинаций.

3. Способ по п.2, в котором образец взят у больного раком, указанный рак может быть вызван образованием онкогенного слитого белка вследствие хромосомной транслокации в раковых клетках, указанный рак может представлять собой гематологическую злокачественность, остеогенную саркому или саркому мягких тканей, указанная гематологическая злокачественность может представлять собой лейкомию или лимфому, указанная лейкомия может представлять собой хроническую миелогенную лейкомию (CML).

4. Способ по п.2, в котором выделенные клетки выбираются из группы, состоящей из циркулирующих раковых клеток, лейкоцитов и их комбинаций, или в котором выделенные клетки подвергаются стимуляции *in vitro* факторами роста, или в котором выделенные клетки подвергаются инкубации с противораковым препаратом перед стимуляцией фактором роста или где после стимуляции факторами роста выделенные клетки лизируют для получения клеточного экстракта.

5. Способ по п.1, в котором онкогенный слитый белок выбирается из группы, состоящей из BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET и их комбинаций.

6. Способ по п.5, в котором онкогенный слитый белок представлен BCR-ABL.

7. Способ по п.6, в котором первый полноразмерный белок представлен BCR, или в котором первый домен первого полноразмерного белка включает C-концевой участок BCR (BCR-C), или в котором второй другой домен первого полноразмерного белка включает N-концевой участок BCR (BCR-N), или в котором второй другой полноразмерный белок представлен ABL, или в котором первый домен второго другого

полноразмерного белка включает С-концевой участок ABL (ABL-C), или в котором первый полноразмерный белок представлен ABL, или в котором второй другой полноразмерный белок представлен BCR.

8. Способ по п.1, в котором активационное состояние выбирается из группы, состоящей из состояния фосфорилирования, состояния убиквитинирования, состояния комплексования и их комбинаций, или дополнительно включающий определение уровня или активационного состояния одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции, где указанная одна или несколько молекул сигнальной трансдукции могут быть представлены субстратом BCR-ABL, указанный субстрат BCR-ABL может быть выбран из группы, состоящей из CRKL, JAK2, STAT5, VAV, BAP-1 и их комбинаций.

9. Способ по п.1, в котором первая связывающая молекула включает первое антитело, указанное первое антитело может быть фиксировано на твердой подложке, указанная твердая подложка может быть выбрана из группы, состоящей из стекла, пластика, чипов, игловок, фильтров, шариков, бумаги, мембран, пучков волокон и их комбинаций.

10. Способ по п.1, в котором вторая связывающая молекула включает второе антитело, указанное второе антитело может быть фиксировано на твердой подложке, указанная твердая подложка может быть выбрана из группы, состоящей из стекла, пластика, чипов, игловок, фильтров, шариков, бумаги, мембран, пучков волокон и их комбинаций.

11. Способ по п.1, в котором стадии (d) и (f) включают ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), метод проточной цитометрии, метод сортировки по тегам или метод двойного детектирования сближения, указанный ELISA может включать «сэндвич»-ELISA, указанный метод проточной цитометрии может включать флуоресцентно активируемую сортировку клеток (FACS).

12. Способ по п.1, в котором клеточный экстракт из стадии (c) подвергается контактированию с серийными разведениями второй связывающей молекулы с образованием нескольких комплексов, включающих онкогенный слитый белок и вторую связывающую молекулу; указанные третья и четвертая связывающие молекулы могут включать третье и четвертое антитела, соответственно, указанные третье и четвертое антитела могут быть представлены независимыми от активационного состояния антителами, в котором амплифицированный сигнал, генерируемый первым и вторым членами пары амплификации сигнала, необязательно коррелирует с общим количеством онкогенного слитого белка.

13. Способ по п.12, в котором третье антитело представлено независимым от активационного состояния антителом, а четвертое антитело представлено зависимым от активационного состояния антителом, в котором амплифицированный сигнал, генерируемый первым и вторым членами пары амплификации сигнала, необязательно коррелирует с количеством активированного онкогенного слитого белка.

14. Способ по п.1, в котором третья связывающая молекула непосредственно помечена содействующей молекулой, или в котором четвертая связывающая молекула непосредственно помечена первым членом пары амплификации сигнала, или в котором четвертая связывающая молекула помечена первым членом пары амплификации сигнала посредством связывания между первым членом связывающей пары, конъюгированным со вторым детектирующим антителом, и вторым членом связывающей пары, конъюгированным с первым членом пары амплификации сигнала.

15. Способ по п.1, который дополнительно включает:

(g) контактирование клеточного экстракта с пятой связывающей молекулой, специфичной ко второму домену второго другого полноразмерного белка в условиях,

подходящих для преобразования второго другого полноразмерного белка, присутствующего в клеточном экстракте, в комплекс, включающий второй другой полноразмерный белок и пятую связывающую молекулу, причем второй домен второго другого полноразмерного белка отсутствует в онкогенном слитом белке; и

(h) удаление из клеточного экстракта комплекса из стадии (g) для получения клеточного экстракта, лишенного второго другого полноразмерного белка, причем стадия (g) проводится до, во время или после стадии (b).

16. Способ по п.15, в котором пятая связывающая молекула может включать пятое антитело, в котором пятое антитело может быть фиксировано на твердой подложке, в котором твердая подложка может быть выбрана из группы, состоящей из стекла, пластика, чипов, иглол, фильтров, шариков, бумаги, мембран, пучков волокон и их комбинаций.

17. Способ по п.6, где первая связывающая молекула является анти-BCR антителом, специфичным к С-концевому домену полноразмерного белка BCR, где вторая связывающая молекула необязательно является антителом, специфичным к N-концевому домену полноразмерного белка BCR, где, необязательно, третья связывающая молекула является анти-BCR антителом, специфичным к С-концевому домену полноразмерного белка ABL, и где четвертая связывающая молекула является, необязательно, антифосфотирозинным антителом, которое связывает фосфо ABL-С.

18. Способ по любому из пп.1-16, где содействующей молекулой является глюкозооксидаза.

19. Способ оптимизации терапии у субъекта, страдающего раком и получающего курс терапии для лечения рака, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса;

(c) измерение уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в клеточном экстракте в соответствии со способом по любому из пп.1-16;

(d) сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка, измеренным ранее во время курса терапии; и

(e) определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс лечения, исходя из сравнения на стадии (d).

20. Способ по п.19, в котором онкогенный слитый белок представлен BCR-ABL или в котором у субъекта установлено наличие раковых клеток, экспрессирующих онкогенный слитый белок, еще до назначения курса терапии, указанный субъект необязательно является положительным по BCR-ABL.

21. Способ по п.19, в котором в клеточном экстракте измеряется и уровень экспрессии, и уровень активации онкогенного слитого белка, указанная стадия (c) может дополнительно включать вычисление отношения активированного к общему уровню онкогенного слитого белка, указанная стадия (d) может включать сравнение рассчитанного отношения активированного к общему уровню онкогенного слитого белка с отношением активированного к общему уровню онкогенного слитого белка, рассчитанным для субъекта ранее.

22. Способ по п.21, в котором рассчитанное отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка коррелирует со степенью ингибирования активированного онкогенного слитого белка при лечении противораковым препаратом, или в котором рассчитанное отношение активированного к общему уровню онкогенного

слитого белка рассчитано относительно уровня контрольного белка, или в котором рассчитанное отношение активированного к общему уровню онкогенного слитого белка включает отношение фосфо/общий уровень белка BCR-ABL.

23. Способ по п.22, в котором контрольный белок включает нативный полноразмерный белок, содержащий последовательности или домены, находящиеся внутри онкогенного слитого белка, или в котором контрольный белок выбирается из группы, состоящей из полноразмерного BCR, полноразмерного ABL и их комбинаций.

24. Способ по п.19, в котором ингибирование степени активации онкогенного слитого белка меньше чем на 50% указывает на необходимость увеличения последующей дозы в курсе терапии или назначения другого курса терапии, или в котором ингибирование уровня активации онкогенного слитого белка меньше чем на 50% указывает на несоблюдение субъектом режима терапии, наличие возможных побочных эффектов или токсичности, связанных с курсом терапии, или их комбинации, или в котором ингибирование уровня активации онкогенного слитого белка больше чем на 80% указывает на то, что субъект получает правильный курс терапии с правильной дозой.

25. Способ по п.19, в котором рак представлен хронической миелогенной лейкемией (CML), или в котором противораковый препарат выбирается из группы, состоящей из моноклонального антитела, ингибитора тирозинкиназ, химиотерапевтического средства, средства гормональной терапии, радиотерапевтического средства, вакцины и их комбинаций, указанный ингибитор тирозинкиназ выбирается из группы, состоящей из иматиниба мезилата, нилотиниба, дасатиниба, босутиниба (SKI-606) и их комбинаций.

26. Способ по п.19, в котором стадии (с)-(е) альтернативно включают:

(с') измерение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и одной или нескольких молекул сигнальной трансдукции в этом пути;

(d') сравнение измеренного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции с уровнем экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка и молекул сигнальной трансдукции, измеренным ранее во время курса терапии; и

(е') определение последующей дозы в курсе терапии для субъекта или же того, следует ли назначить субъекту другой курс терапии, исходя из сравнения на стадии (d').

27. Способ выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в соответствии со способом по любому из пп.1-16; и

(d) определение того, подходит или не подходит противораковый препарат для лечения рака путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

28. Способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом, который включает:

(а) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в соответствии со способом по любому из пп.1-16; и

(d) идентификацию рака как реагирующего или не реагирующего на лечение противораковым препаратом путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

29. Способ предсказания реакции субъекта, страдающего раком, на лечение противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в соответствии со способом по любому из пп.1-16; и

(d) предсказание вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

30. Способ определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, который включает:

(a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;

(b) лизирование выделенных клеток для получения клеточного экстракта, где выделенные клетки не отмывают перед проведением лизиса;

(с) определение в клеточном экстракте уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка в соответствии со способом по любому из пп.1-17; и

(d) определение того, что субъект не поддается или поддается лечению противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время.

31. Способ по любому из пп.27-30, в котором рак представлен хронической миелогенной лейкемией (CML), или в котором противораковый препарат выбирается из группы, состоящей из моноклонального антитела, ингибитора тирозинкиназ,

химиотерапевтического средства, средства гормональной терапии, радиотерапевтического средства, вакцины и их комбинаций, указанное моноклональное антитело может быть выбрано из группы, состоящей из трастузумаба, алемтузумаба, бевацизумаба, цетуксимаба, гемтузумаба, панитумумаба, ритуксимаба, тоситумумаба и их комбинаций, указанный ингибитор тирозинкиназ может быть выбран из группы, состоящей из иматиниба мезилата, нилотиниба, дасатиниба, босутиниба (SKI-606), гефитиниба, сунитиниба, эрлотиниба, лапатиниба, канертиниба (CI 1033), семаксиниба (SU5416), ваталаниба (PTK787/ZK222584), сорафениба (BAY 43-9006), лефлуномида (SU101), вандетаниба (ZD6474) и их комбинаций, указанное химиотерапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из пеметрекседа, гемцитабина, сиролимуза (рапамицина), аналогов рапамицина, соединений платины, карбоплатина, цисплатина, сатраплатина, паклитакселя, доцетакселя (Taxotere®), темсиролимуза (CCI-779), эверолимуса (RAD001) и их комбинаций, указанное средство гормональной терапии может быть выбрано из группы, состоящей из ингибиторов ароматаз, избирательных

модуляторов эстрогеновых рецепторов, стероидов, финастерида, агонистов гонадотропин-высвобождающего гормона, их фармацевтически приемлемых солей, стереоизомеров, производных, аналогов и их комбинаций, указанное

5 радиотерапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi и их комбинаций.

10

15

20

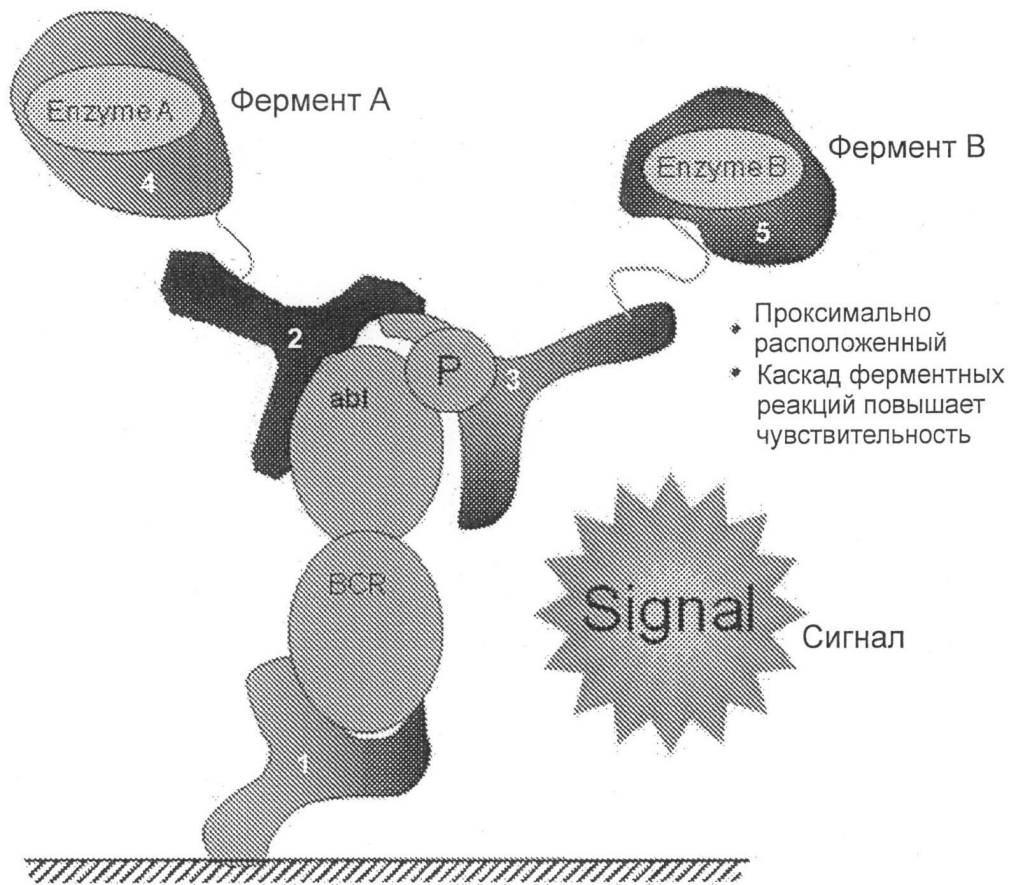
25

30

35

40

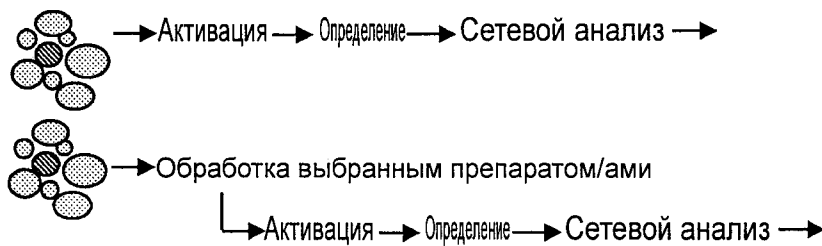
45



Фиг. 1

Исходная терапия

Выделение клеток – предобработка



Две разные точки времени для активации

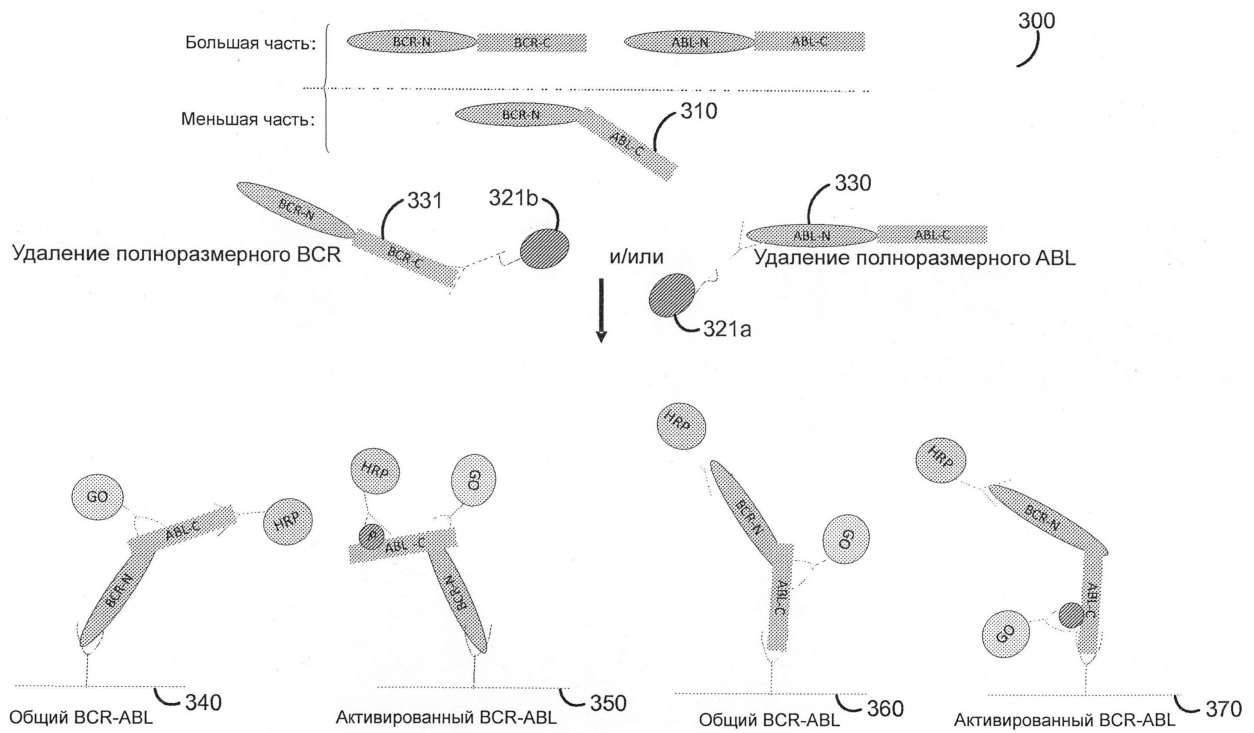
Последующее изменение терапии

Выделение клеток – по всему курсу лечения

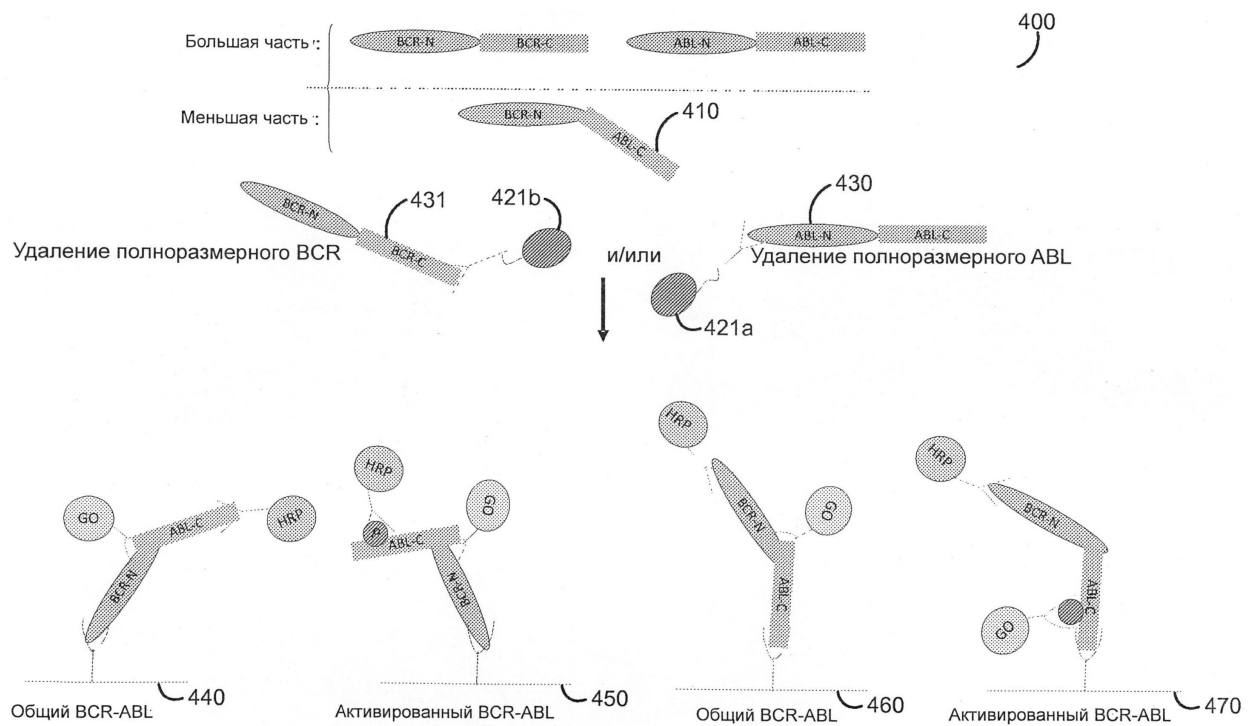


Правильный препарат
в правильной
дозе в нужное
время для
каждого пациента

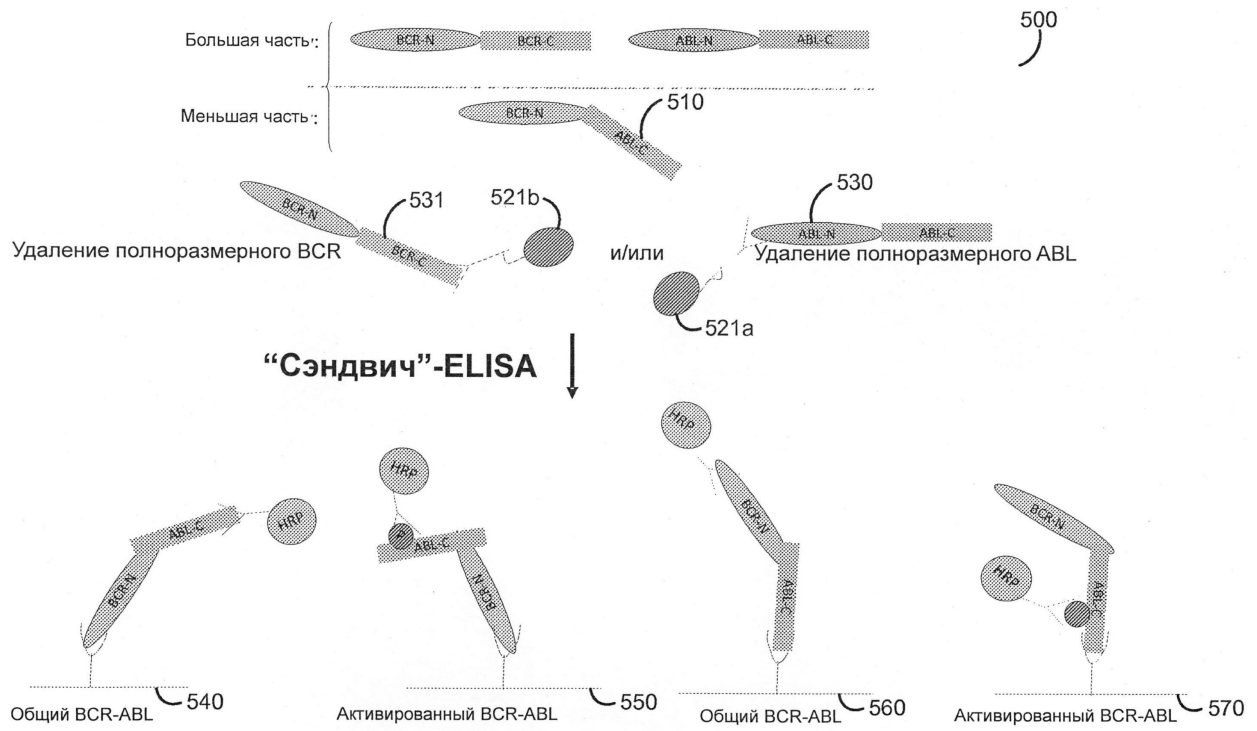
Фиг. 2



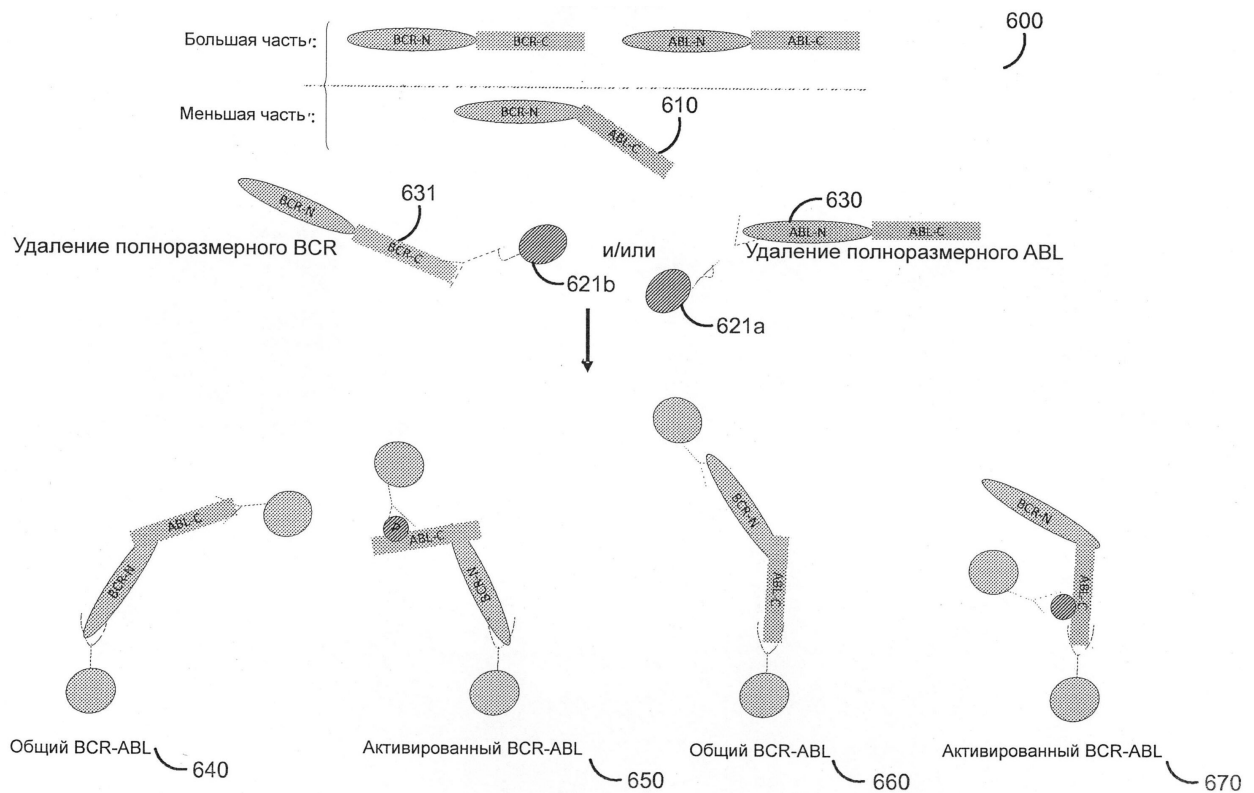
Фиг. 3А



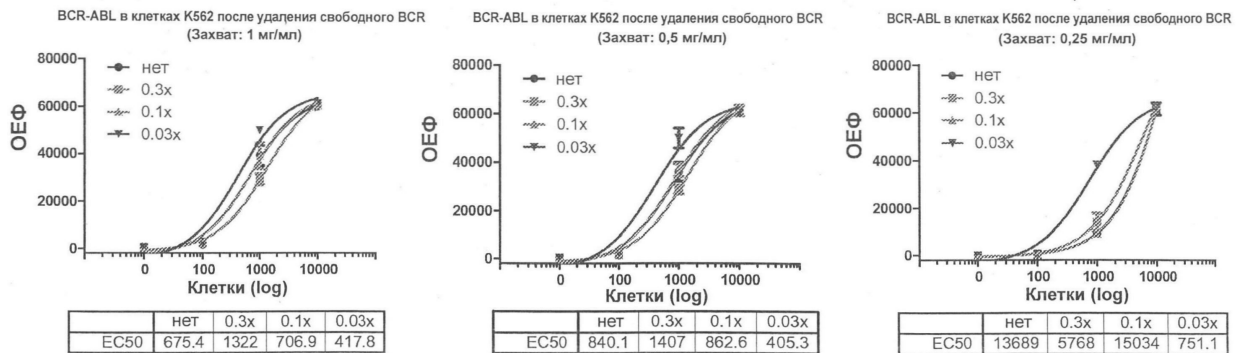
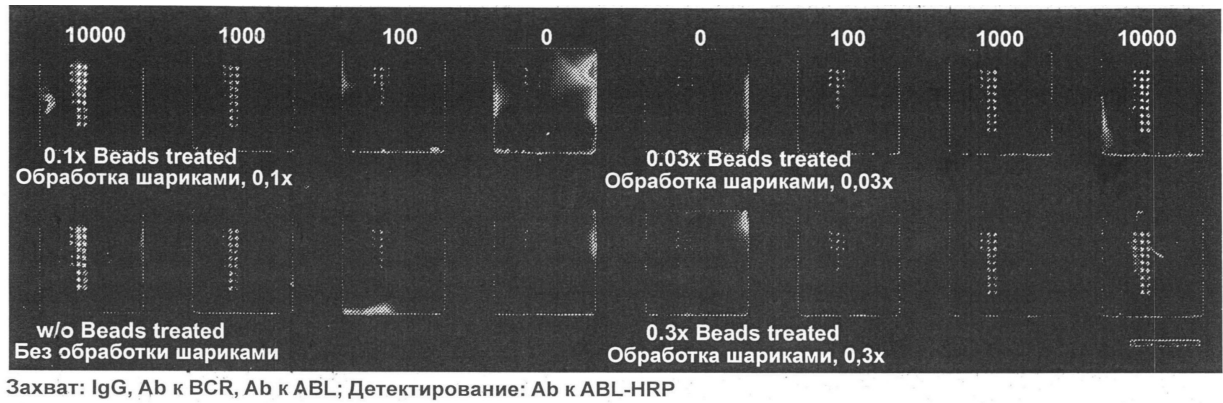
Фиг. 3В



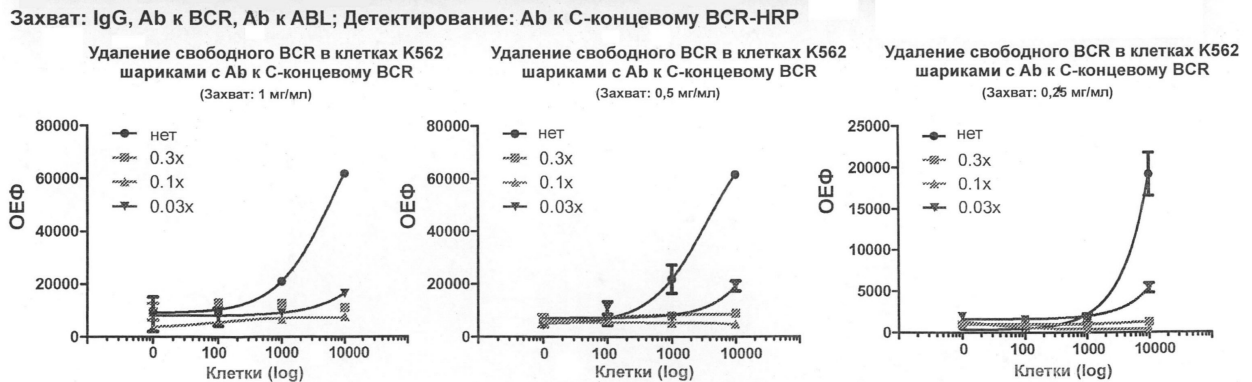
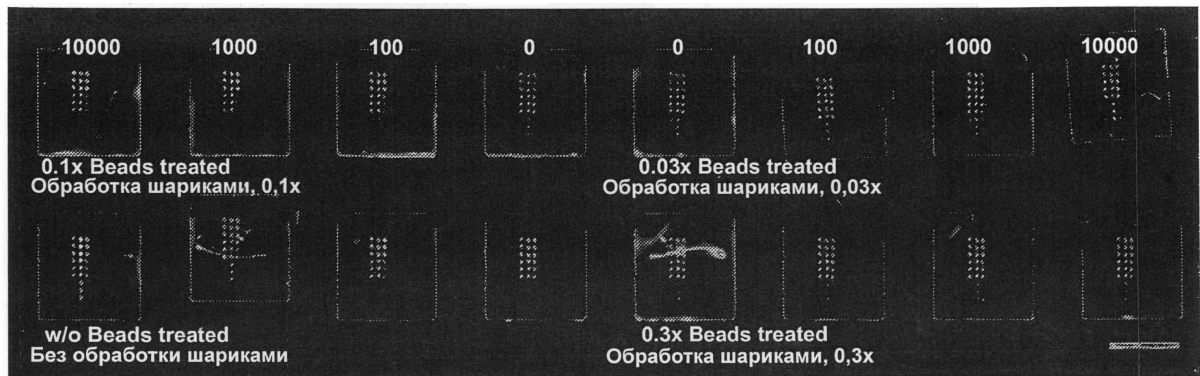
Фиг. 3С



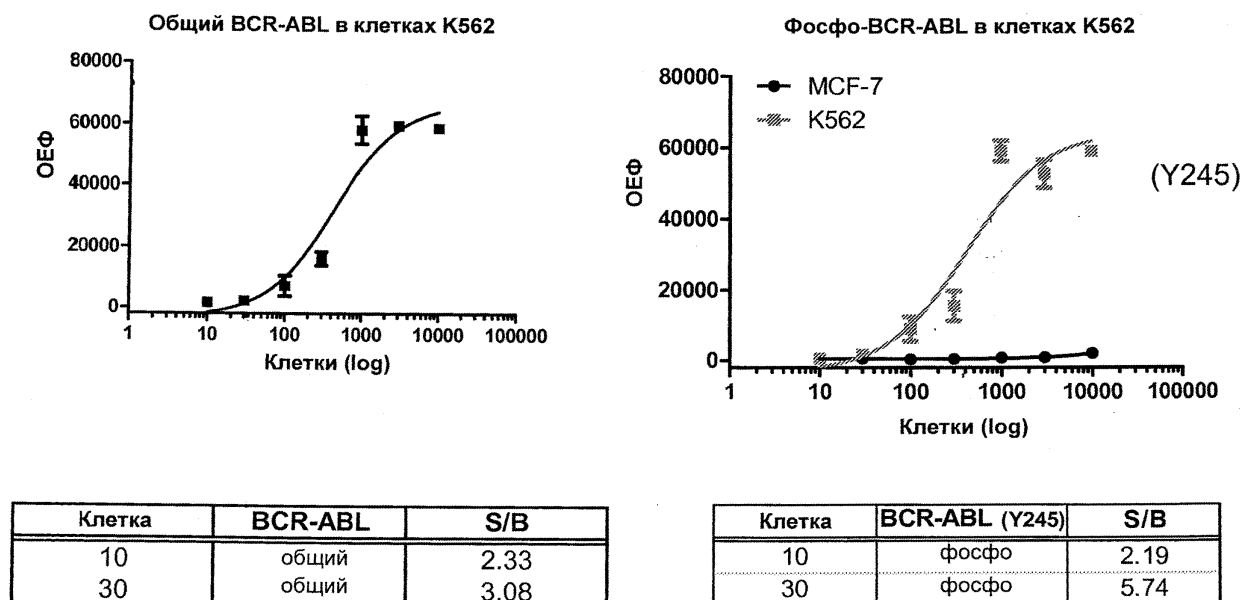
Фиг. 3D



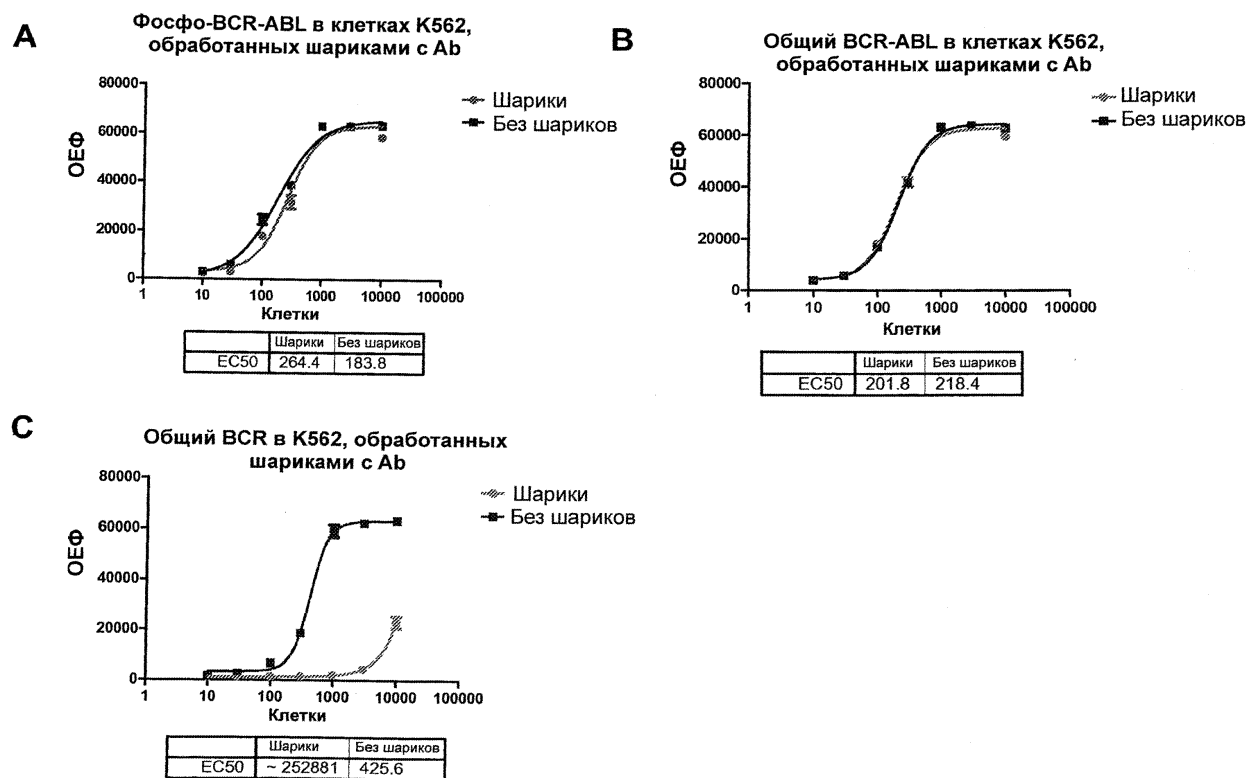
Фиг. 4



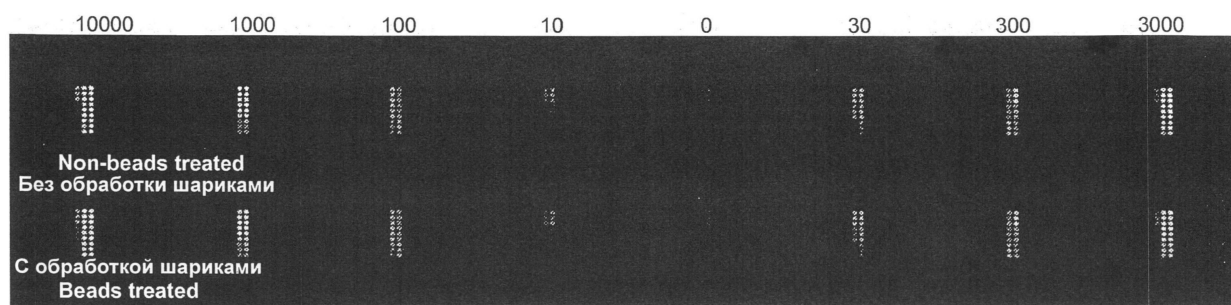
Фиг. 5



Фиг. 6



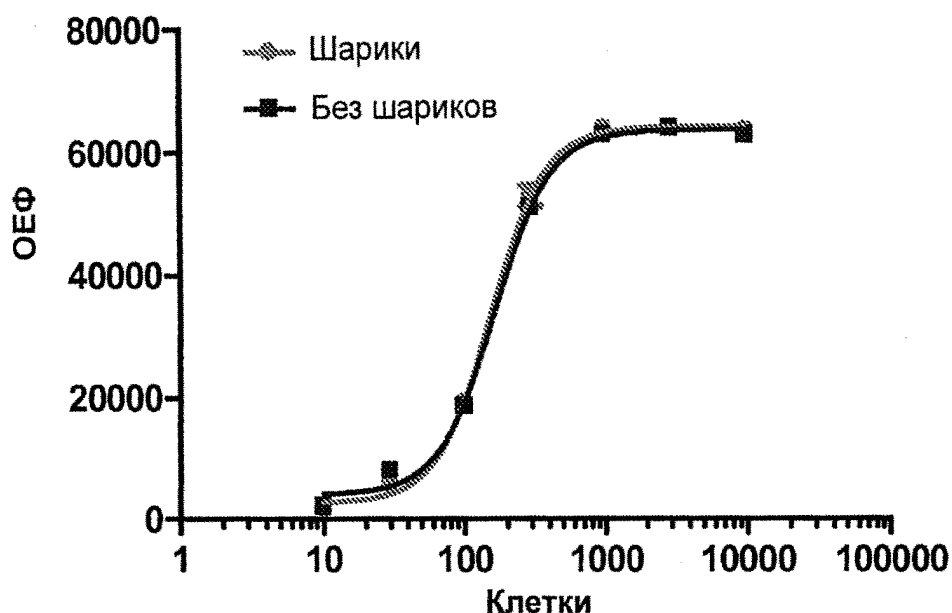
Фиг. 7



Захват: IgG, Ab к BCR, Ab к ABL

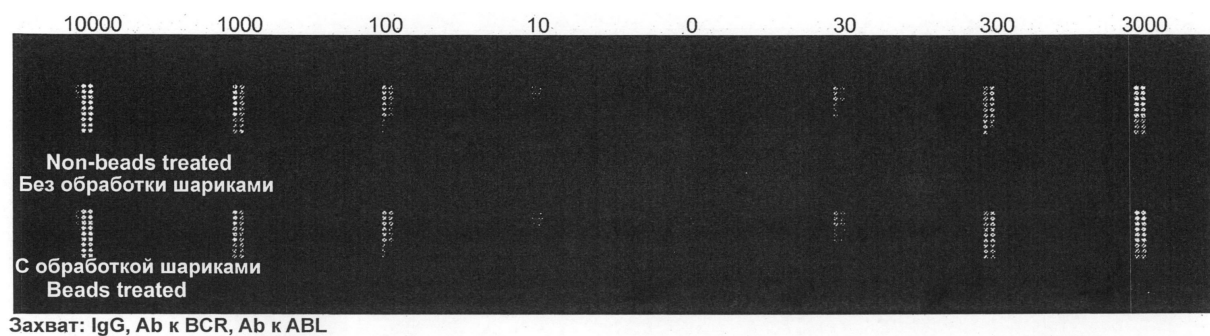
Клетки	Захват: 0,25 мг/мл					Захват: 0,5 мг/мл					Захват: 1 мг/мл							
	ОЕФ					ОЕФ					ОЕФ							
Без обработки шариками																		
10000	63728	61576	63198	62634	1.78	6283.40	62160	62102	62350	62204	0.21	396.20	62129	62443	62324	62299	0.25	88.09
3000	58009	60999	61433	60147	3.10	6014.70	61924	63730	63692	63115	1.63	402.01	63832	63269	63488	63530	0.45	87.79
1000	30943	29868	35428	32080	9.19	3207.97	63020	63118	63147	63085	0.11	401.68	62799	62520	62189	62503	0.49	86.37
300	11433	14001	14624	13353	12.67	1335.27	33621	34660	34190	34157	1.52	217.56	50956	51943	49470	50790	2.45	70.16
100	2218	3050	3639	2969	24.05	296.90	10645	10882	11156	10894	2.35	69.39	18662	17953	18893	18503	2.65	25.57
30	832	995	1094	974	13.59	97.37	3680	3707	3481	3623	3.41	23.07	7313	8113	8527	7964	7.73	11.03
10	129	128	168	142	16.10	14.17	650	744	659	664	7.58	4.36	1917	2156	2110	2081	6.15	2.65
0	3	12	15	10	62.45	1.00	152	162	157	157	3.18	1.00	664	779	728	724	7.96	1.00
С обработкой шариками																		
10000	61654	63091	63762	62836	1.71	4567.73	63632	63099	63967	63566	0.69	496.61	63537	62419	63206	63054	0.91	108.09
3000	61667	60526	61029	61074	0.94	4468.83	62966	61973	62009	62316	0.90	466.84	62760	63920	63912	63531	1.05	108.91
1000	34016	40372	42377	38922	11.22	2647.93	63213	64213	64074	63633	0.85	498.70	63425	63645	63603	63558	0.18	106.96
300	11696	13294	13730	12907	8.30	944.39	31131	31628	30076	30945	2.56	241.76	52792	54026	50796	52539	3.10	90.07
100	2568	3241	4260	3356	25.38	245.59	10771	11422	11801	11331	4.60	88.53	17766	19285	20232	19094	6.52	32.73
30	673	765	770	736	7.42	63.85	3125	2612	2273	2670	16.07	20.86	5786	5603	5481	5623	2.73	9.64
10	142	143	134	140	3.53	10.22	603	588	571	587	2.73	4.59	1623	1655	1586	1621	2.13	2.73
0	11	9	21	14	47.04	1.00	121	118	145	128	11.56	1.00	590	545	615	583	6.08	1.00

Фиг. 8А



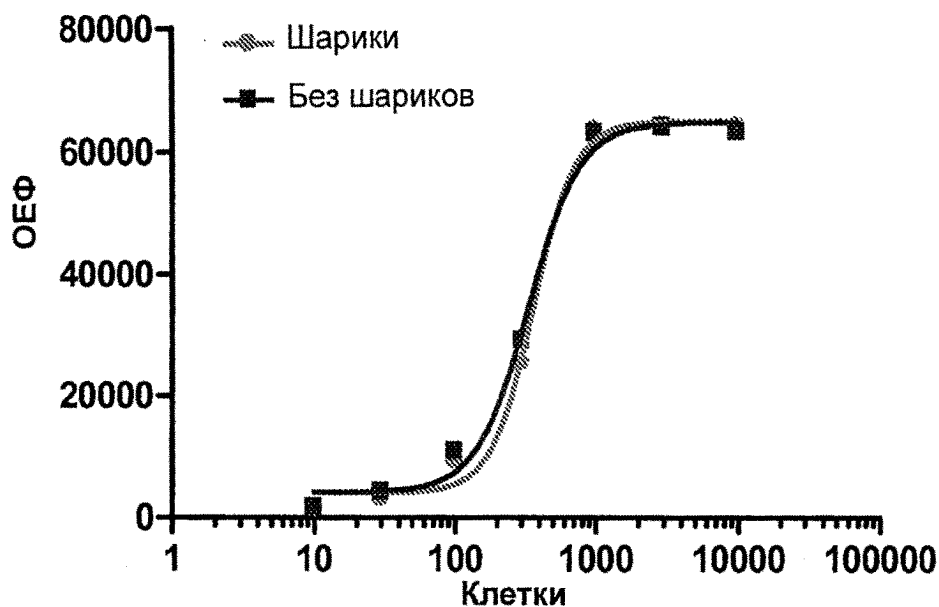
	Шарики	Без шариков
EC50	154.7	164.6

Фиг. 8В



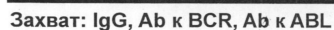
Клетки	Захват: 0,25 мг/мл					Захват: 0,5 мг/мл					Захват: 1 мг/мл				
	ОЕФ	среднее	%CV	отношение		ОЕФ	среднее	%CV	отношение		ОЕФ	среднее	%CV	отношение	
Без обработки шариками															
10000	62712	63245	63795	63251	0,86	2,551,80	62476	64288	62470	63078	1,66	290,66	62284	63074	62920
3000	44350	47234	53984	49523	10,19	2,159,38	63657	63581	64476	63905	0,78	299,89	64333	62133	64166
1000	29486	34863	40542	34964	15,81	1,621,68	61901	62300	62267	62158	0,36	289,61	62473	62321	63094
300	4957	5695	7462	6038	21,32	298,48	18648	19880	20179	19569	4,15	93,86	30343	27879	28717
100	1473	1726	2299	1833	23,09	91,96	5463	5815	5955	5744	4,41	27,70	10695	10487	11006
30	369	571	654	531	27,59	28,16	2108	2358	2257	2241	5,81	10,50	4492	3898	4136
10	133	160	159	151	10,16	6,36	597	694	685	669	8,14	3,19	1605	1754	1646
0	28	25	25	26	6,66	1,00	197	226	215	213	6,88	1,00	730	708	777
С обработкой шариками															
10000	64162	62131	61803	62696	2,04	1,979,96	64177	62433	63150	63253	1,39	352,71	64106	63051	63598
3000	48914	57196	61182	55764	11,22	1,760,97	61628	64002	63826	63152	2,09	352,15	64142	63870	63264
1000	30779	33439	35875	33364	7,64	1,053,61	63441	62972	61217	62543	1,87	346,75	62641	63248	63645
300	4300	5334	6324	5318	19,03	167,98	15408	16127	17185	16240	5,50	90,66	25423	25147	25361
100	1746	2250	2383	2126	15,80	67,15	5528	5536	5520	5528	0,14	30,83	8819	9318	9850
30	433	542	596	524	15,86	16,54	1610	1710	1587	1636	4,00	9,12	3313	3292	3083
10	165	176	200	180	9,92	6,69	624	646	607	626	3,13	3,49	1575	1499	1356
0	16	24	55	32	65,05	1,00	172	173	193	179	6,81	1,00	699	737	733

Фиг. 9А



	Шарики	Без шариков
EC50	363.4	334.7

Фиг. 9В



Клети	Захват: 0,25 мг/мл						Захват: 0,5 мг/мл						Захват: 1 мг/мл					
	ОЕФ			среднее	%CV	отношение	ОЕФ			среднее	%CV	отношение	ОЕФ			среднее	%CV	отношение
Без обработки шариками																		
10000	63733	61617	62036	62,462	1,79	1,658,28	63676	63065	63338	63,360	0,48	229,84	63487	62489	63935	63,304	1,17	73,76
3000	35414	53342	60909	49,815	26,10	1,322,53	64030	63240	63800	63,699	0,64	231,04	63432	63692	63529	63,561	0,21	74,94
1000	31455	31604	38580	33,880	12,02	899,46	63600	63427	64344	63,790	0,76	231,40	63494	63054	63254	63,267	0,35	73,71
300	4797	8354	11758	8,303	41,92	220,43	29250	31388	29414	30,017	3,96	108,89	45576	46622	45818	46,006	1,19	53,90
100	2155	2460	3410	2,675	24,47	71,02	9450	11465	10552	10,489	9,62	38,05	15669	17304	17535	16,836	6,04	19,61
30	471	855	1192	839	42,98	22,28	3362	3749	3248	3,460	7,50	12,55	6426	7071	7049	6,849	5,35	7,88
10	128	211	327	222	45,02	5,89	917	1080	916	9,71	9,72	3,52	2086	2544	2625	2,418	12,02	2,82
0	7	57	49	38	71,30	1,00	237	241	349	278	23,05	1,90	725	824	1026	5,58	17,87	1,00
С обработкой шариками																		
10000	1975	2642	3402	2,673	26,71	51,74	9552	10045	10622	10,073	5,32	40,13	15339	15550	16264	15,719	3,08	19,86
3000	273	302	364	313	14,85	6,06	1482	1131	1364	1,329	13,47	5,28	3102	2973	2869	3,021	2,33	3,82
1000	142	172	210	165	13,38	6,12	598	604	604	2,32	12,32	2,38	1586	1793	1676	1,676	4,46	1,10
300	24	71	99	65	58,61	1,25	304	322	381	338	12,00	1,34	840	894	1054	829	1,598	2,17
100	61	72	85	73	16,53	1,41	289	301	304	298	2,66	1,19	967	1016	1045	1,006	3,91	1,28
30	5	75	74	51	78,17	0,99	301	322	270	298	8,79	1,13	999	952	931	961	3,62	1,21
10	48	60	65	58	15,15	1,12	302	287	220	270	16,19	1,07	920	964	873	919	4,95	1,16
0	40	54	61	52	20,70	1,00	217	238	298	253	16,75	1,00	735	830	809	791	6,31	1,11

ОЕФ

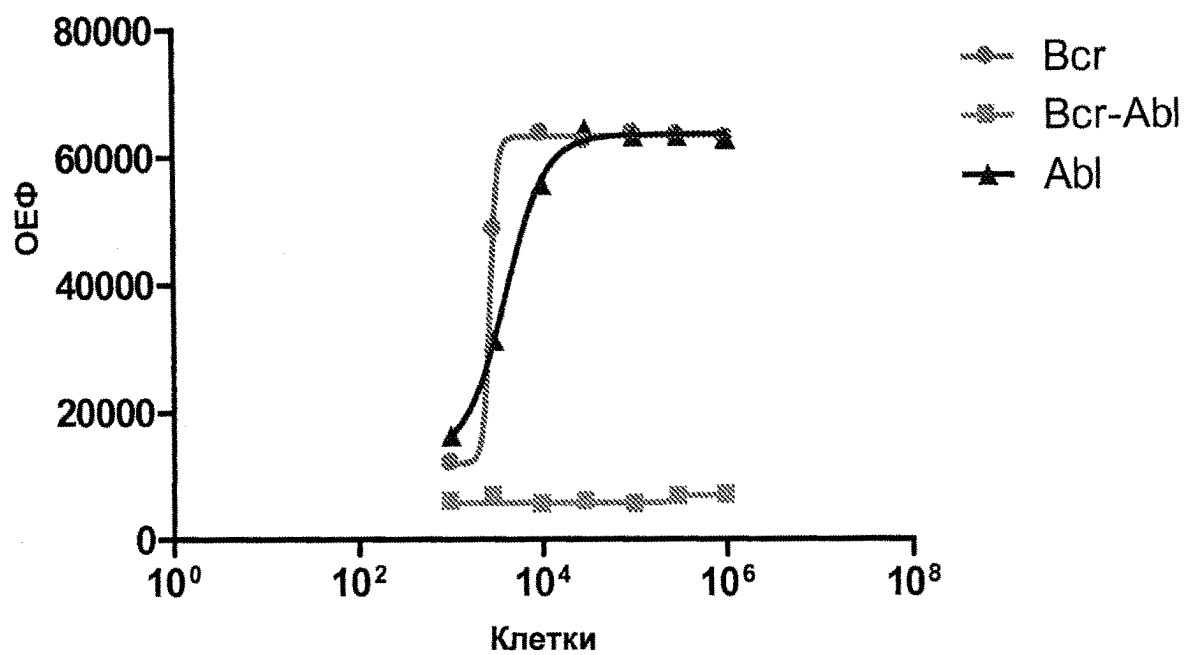
Шарики

Без шариков

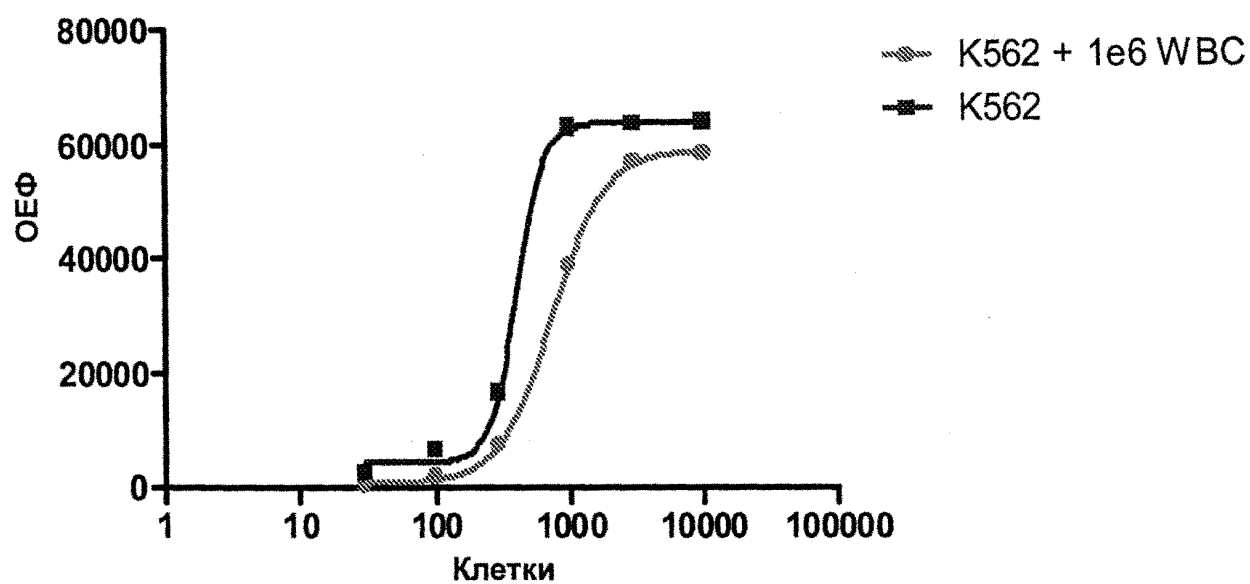
Клетки

	Шарики	Без шариков
ЕС50	~ 635001	191.7

Стр.: 105



Фиг. 11

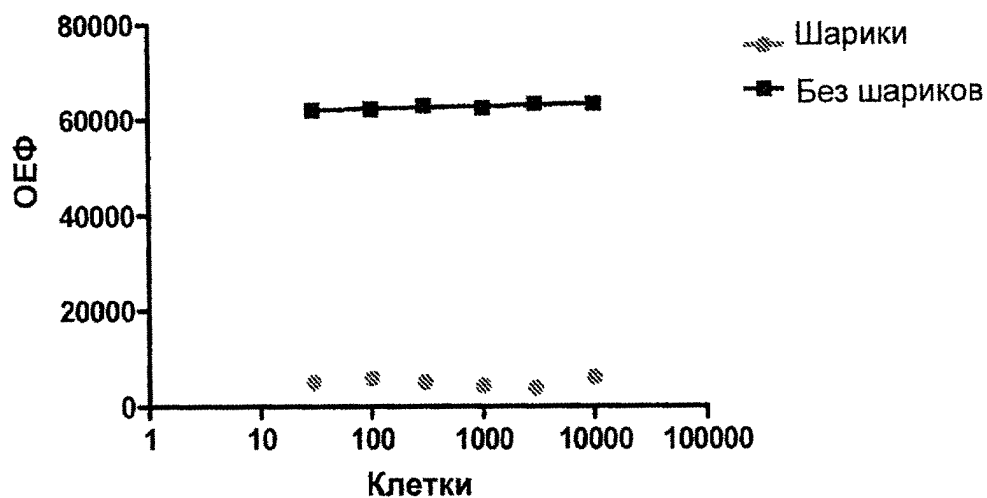


	K562 + 1e6 WBC	K562
EC50	747.2	408.6

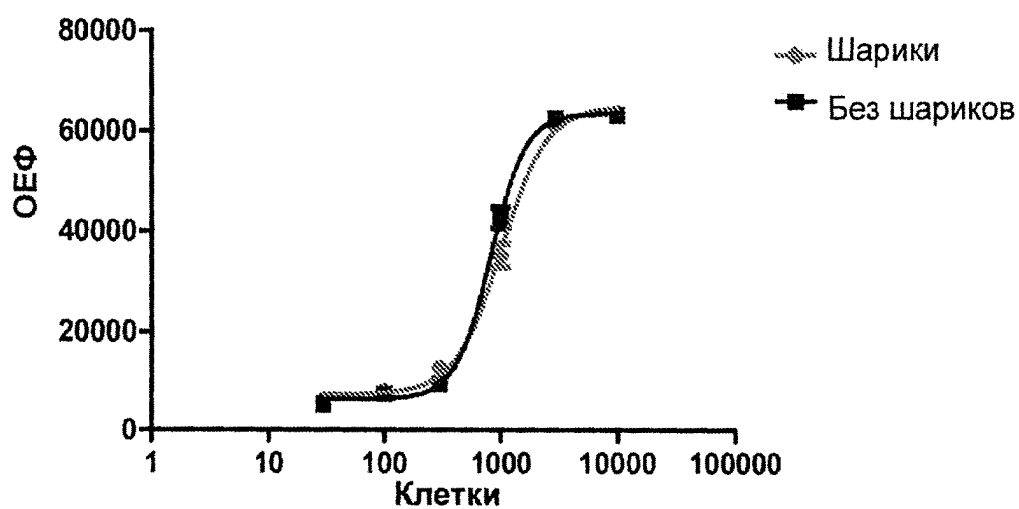
Фиг. 12

A

Общий BCR в K562 + 1×10^6 WBC после обработки шариками-1684
(Захват. Аб: 0,25 мг/мл)

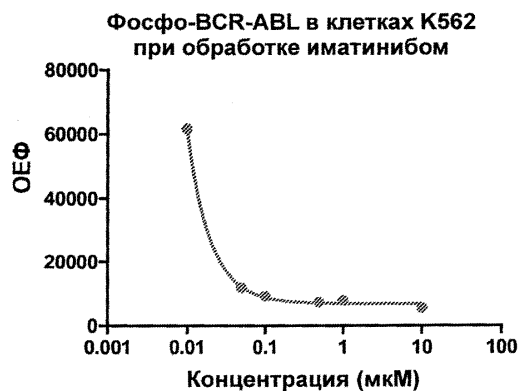
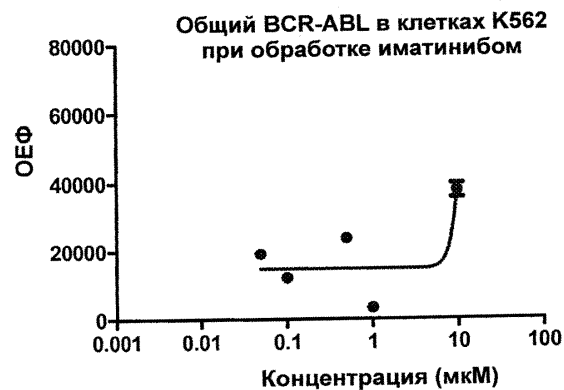
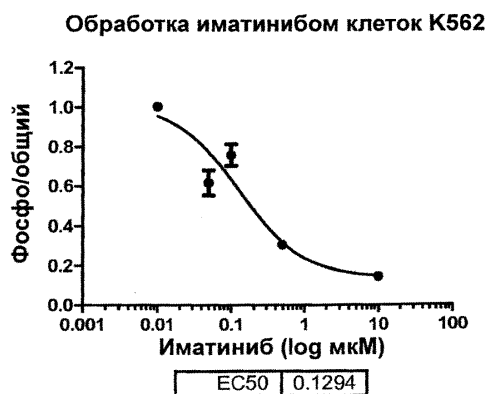
**B**

Общий BCR-ABL в K562 + 1×10^6 WBC после обработки шариками-1684
(Захват. Аб: 1 мг/мл)

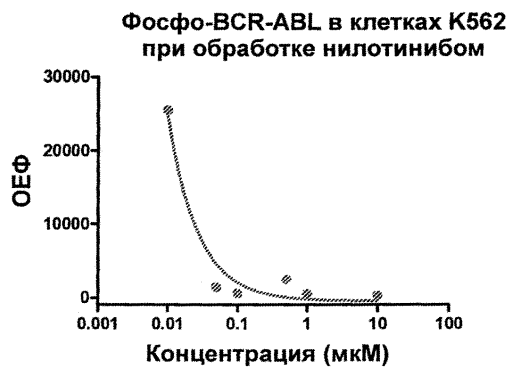
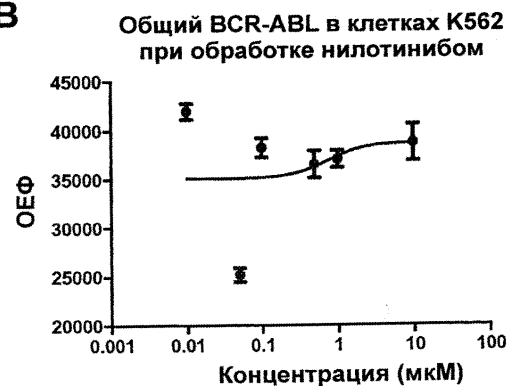
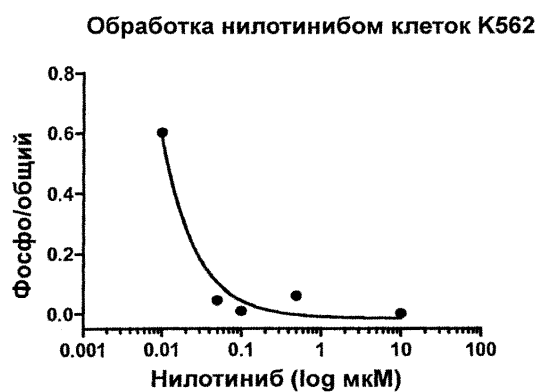


	Шарики	Без шариков
EC50	1006	819.8

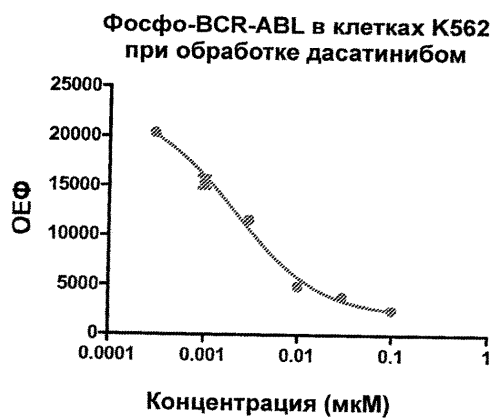
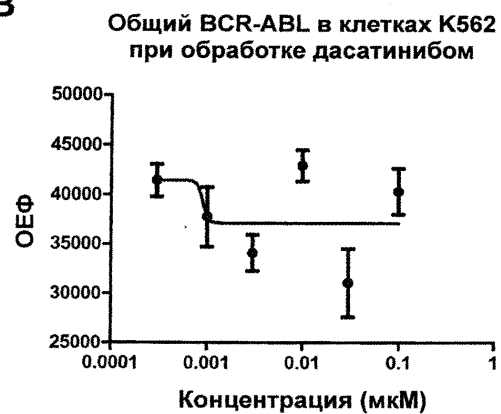
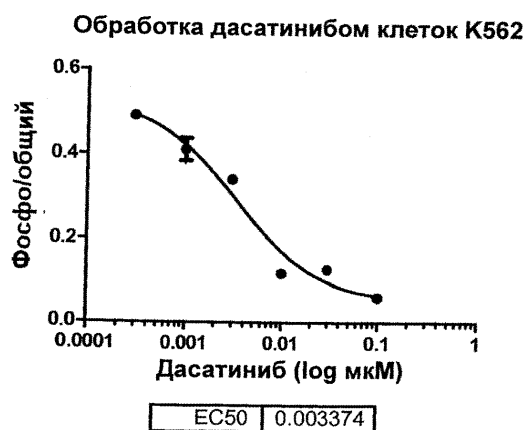
Фиг. 13

A**В****С**

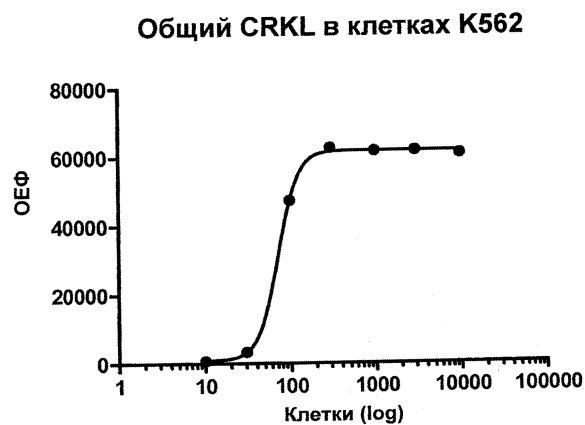
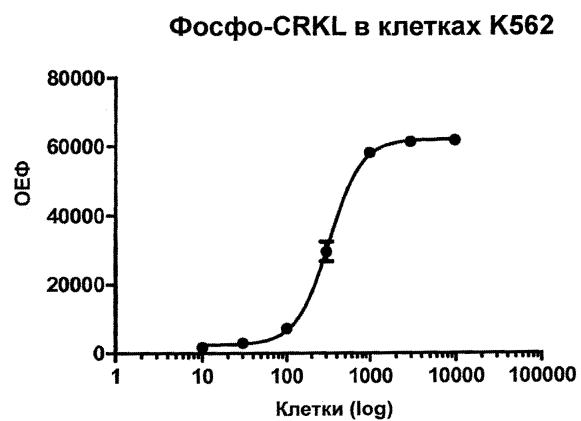
Фиг. 14

A**В****С**

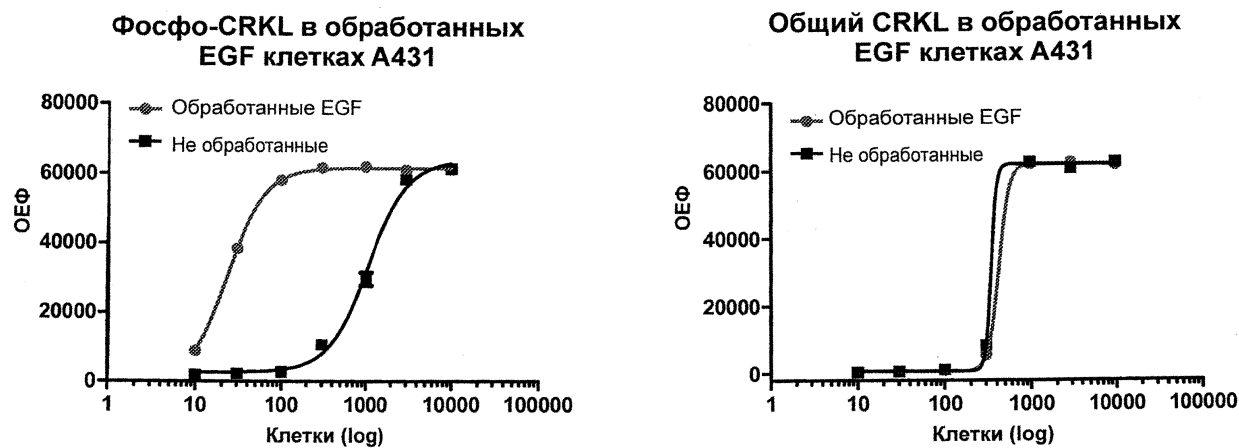
Фиг. 15

A**B****C**

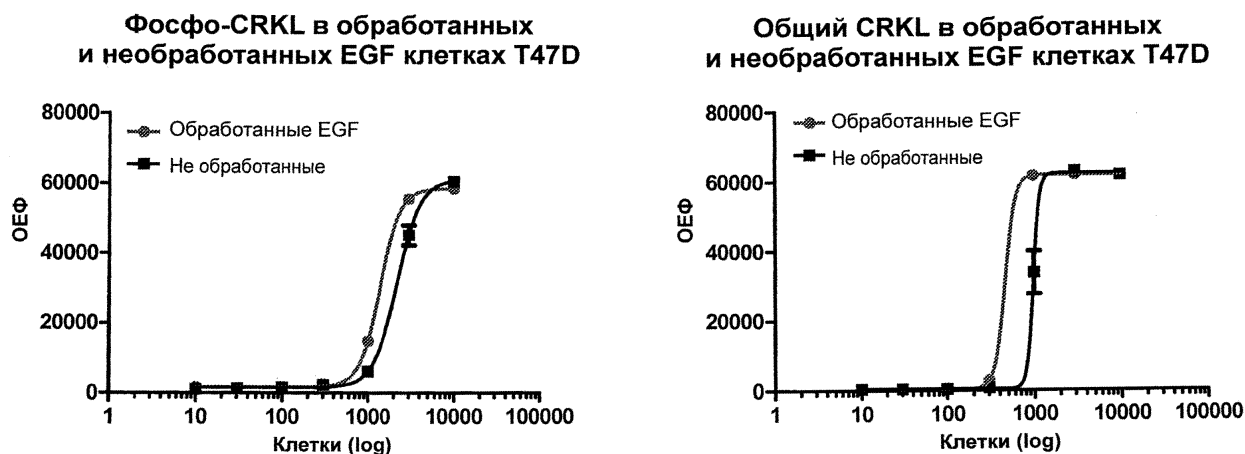
Фиг. 16



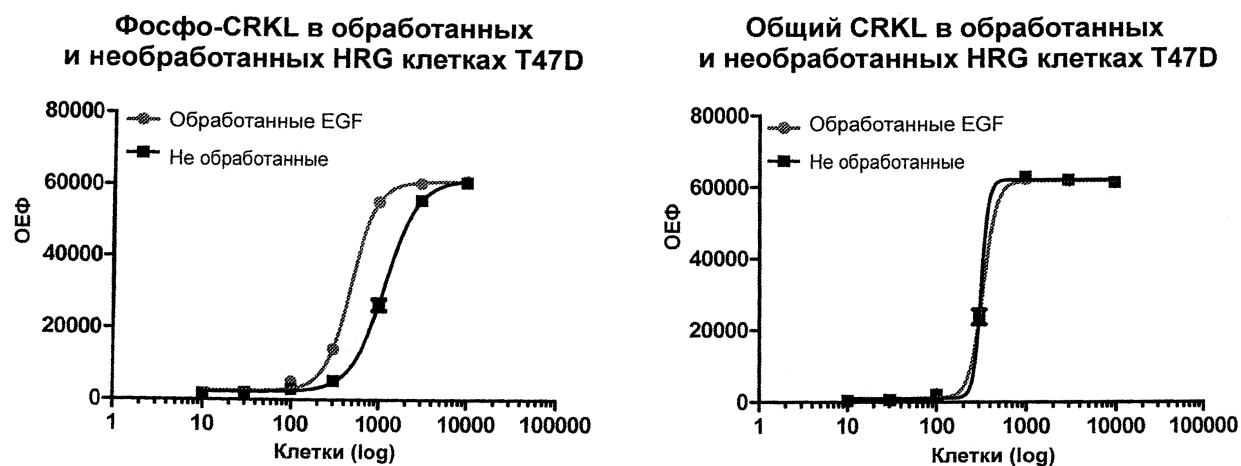
Фиг. 17



Фиг. 18

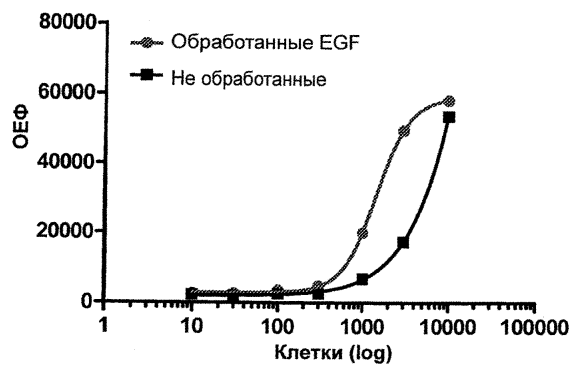


Фиг. 19

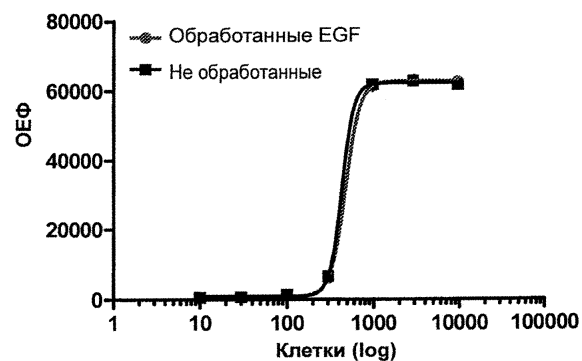


Фиг. 20

Фосфо-CRKL в обработанных и необработанных HRG клетках MCF-7

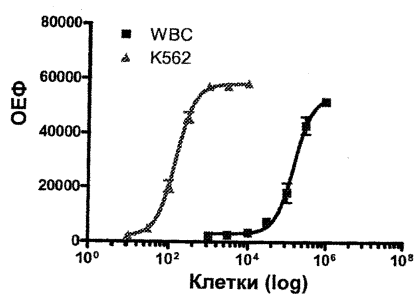


Общий CRKL в обработанных и необработанных HRG клетках MCF-7

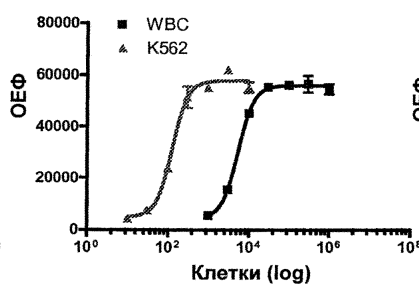


Фиг. 21

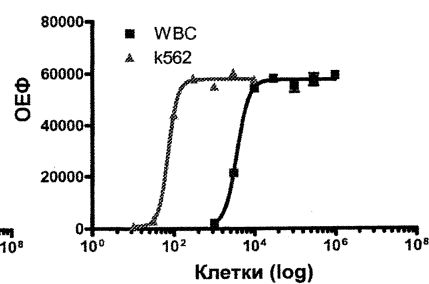
Донор 1



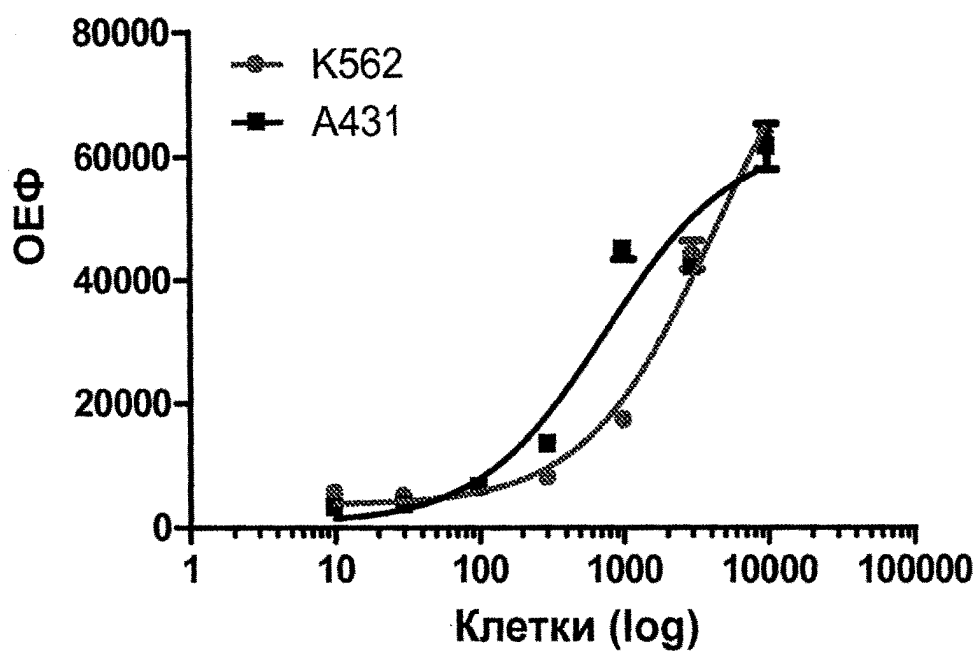
Донор 2



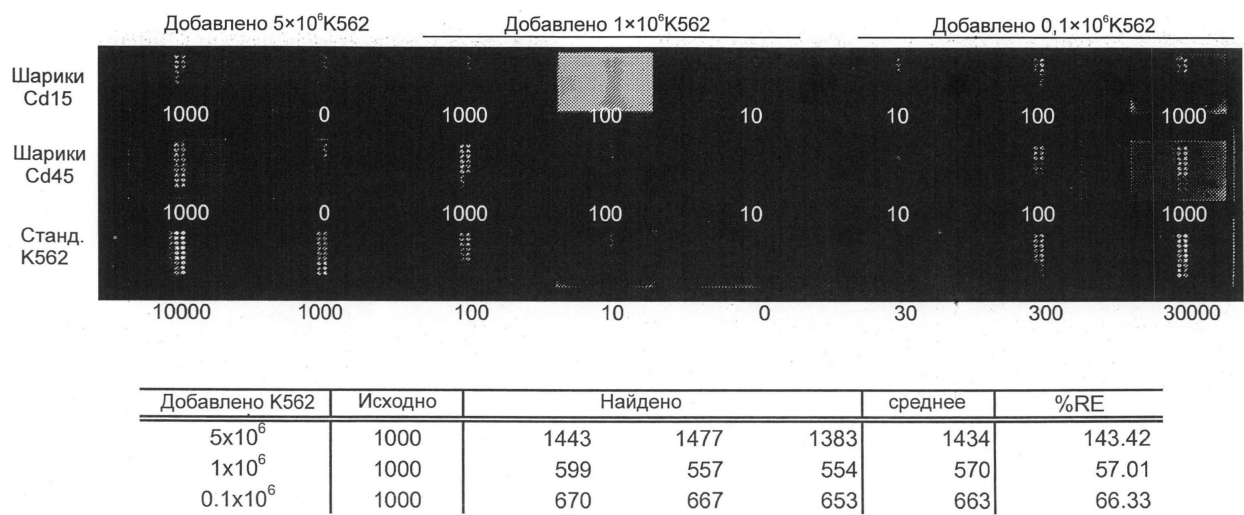
Донор 3



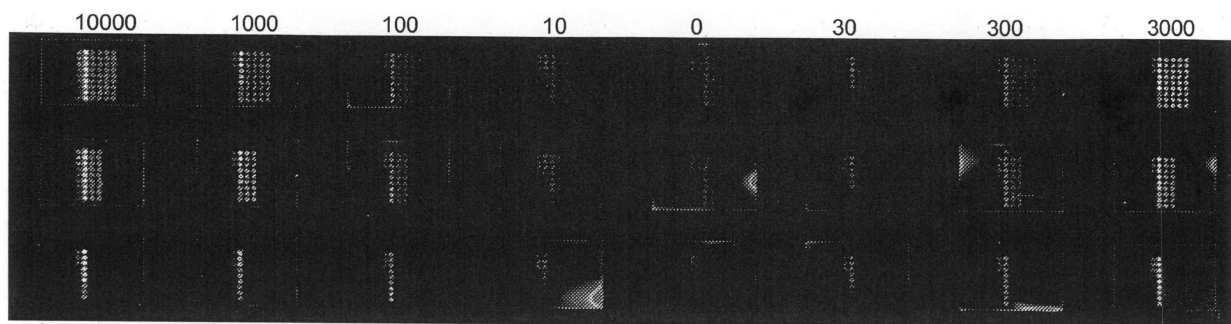
Фиг. 22



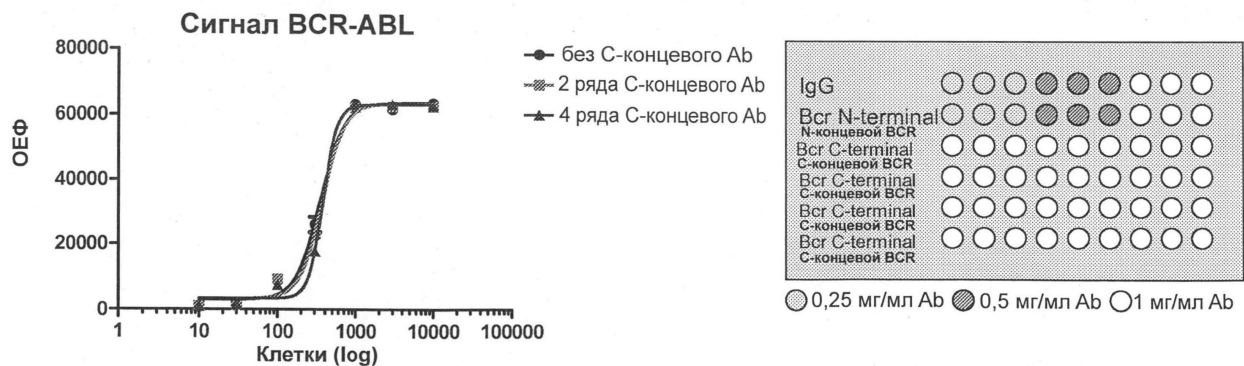
Фиг. 23



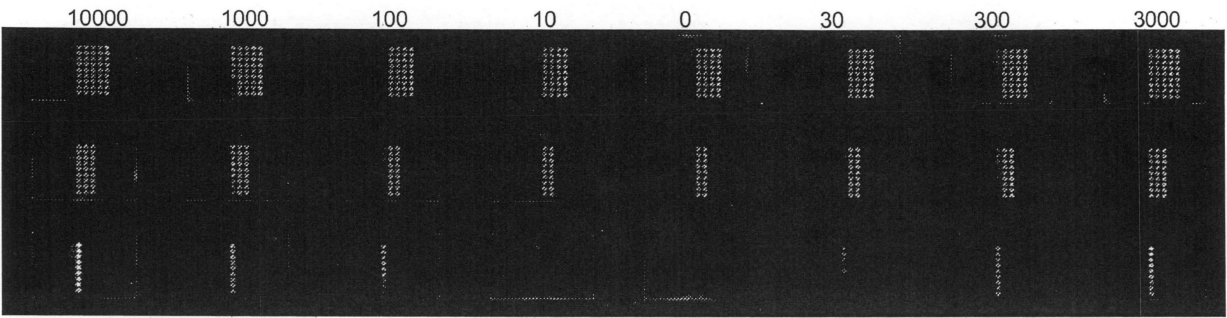
Фиг. 24



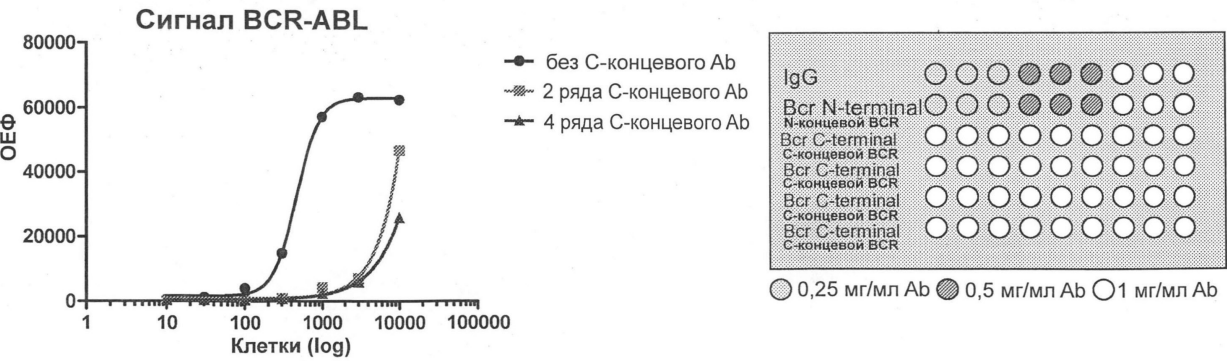
Захват. Ab: IgG, N-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR



Фиг. 25



Захват. Ab: IgG, N-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR, C-концевой BCR



Фиг. 26