



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 21 2006 000 071 U1** 2008.08.28

(12)

Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **21 2006 000 071.1**
 (22) Anmeldetag: **14.11.2006**
 (86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2006/044136**
 (87) PCT-Veröffentlichungstag: **31.05.2007**
 (87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2007/061684**
 (47) Eintragungstag: **24.07.2008**
 (43) Bekanntmachung im Patentblatt: **28.08.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
60/738,141 **18.11.2005** **US**

(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, Austin, Tex., US

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
Viering, Jentschura & Partner, 81675 München

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

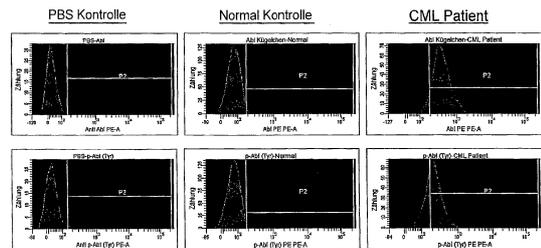
(54) Bezeichnung: **Quantifizierung von Fusionsproteinen und ihrer Aktivität in Folge chromosomaler Translokation**

(57) Hauptanspruch: Verwendung einer ersten und einer zweiten Sonde zum Überwachen einer Therapie eines Individuums, welches mindestens eine Therapierunde durchlaufen hat, wobei die Therapie auf ein Fusionsprotein aus einer Chromosomen-Translokation gerichtet ist, wobei das Protein einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich aufweist,

wobei das Überwachen erfordert, dass die erste und die zweite Sonde zum Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums verwendet werden, wobei das Untersuchen aufweist:

die Probe der ersten Sonde aussetzen, wobei die erste Sonde den ersten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der ersten Sonde an den ersten Bereich einen ersten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt,

den ersten Sonde/Fusionsproteinkomplex der zweiten Sonde aussetzen, wobei die zweiten Sonde den zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der zweiten Sonde an den zweiten Bereich einen zweiten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt, und den zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplex detektieren, wobei das Detektieren zum untersuchen...



Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der vorläufigen U.S.-Patentanmeldung mit der Seriennummer 60/738,141, die am 18. November 2005 eingereicht wurde, die hiermit in ihrer Gänze aufgenommen wird.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Die vorläufige Erfindung betrifft zumindest die Gebiete der Molekularbiologie, Zellbiologie und Medizin. Zum Gebiet der vorliegenden Erfindung zählt insbesondere auch die Krebstherapie.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Chromosomale Translokationen verbinden zwei zuvor nicht verknüpfte Bereiche des Genoms miteinander. Sie können in bestimmten Fällen die Synthese eines neuen Fusionsproteins induzieren und dadurch zu einer Erkrankung führen. Dieses Phänomen ist von Bedeutung, wenn der Bruchpunkt der Translokation zum Beispiel ein Onkogen betrifft und Krebs zur Folge hat.

[0004] Das beispielhaft genannte BCR/ABL-Fusionsprotein ist eine konstitutiv-aktive Tyrosinkinase, die bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) sowie bei Patienten mit akuter lymphoplastischer Leukämie (ALL) mit der Philadelphia-Chromosomen-(9:22)Translokation zu finden ist. Vor kurzem ist dieses Tyrosinkinase-Fusionsprotein erfolgreich als Angriffspunkt in der Therapie verwendet worden, indem ein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor wie zum Beispiel STI571 (Gleevec) eingesetzt wird. Trotz des Erfolges eines solchen Arzneimittels sprach eine bedeutende Anzahl von Patienten (10–30%) schlecht darauf an. Diese Patienten entwickelten auch eine Resistenz gegen die Therapie. Daher ist es zunehmend von Bedeutung, dass man in der Lage ist, die Aktivität des BCR/ABL-Proteins in Reaktion auf die Therapie zu überwachen. Dabei kann das BCR/ABL-Protein dann als Mittel zum Überwachen der Wirksamkeit (engl. efficacy) und der Reaktion, sowie als ein potentiell diagnostisches Werkzeug dienen. Auch zum Vorhersagen der Reaktion oder der Prognose kann es dann dienen. Die Entdeckung der Resistenz gegen die Therapie mit Gleevec aufgrund mutationsbedingter Anomalien innerhalb des BCR/ABL-Gens oder anderer beispielhafter Mechanismen führte zur Entstehung neuer Arzneimittel, wie zum Beispiel BMS-354825 und AMN107, die auf diese Resistenzformen des BCR/ABL-Proteins abzielen. Daher besteht ein erheblicher Bedarf an der Entwicklung von Mitteln, die in frühen Stadien zum Überwachen der Folgen der Gleevec-Therapie geeignet sind.

[0005] Das direkte Auswerten der Aktivität (Phosphorylierung) oder des Niveaus des BCR/ABL-Proteins ist bislang durch die enorme Größe des Proteins (190 oder 210 kD) erschwert. Die Auswertung basiert für gewöhnlich im wesentlichen auf Westernblot- oder Immunpräzipitationstechniken, die beide in klinischen Laboren für Patientenproben schwierig zu implementieren sind. Daher sind in der Signaltransduktionskaskade stromabwärts gelegene Modulatoren wie AKT oder CRK-L-Proteine verwendet worden, um die BCR/ABL-Aktivität zu überwachen. Zwar hat sich die Überwachung solcher stromabwärts gelegenen Signalmoleküle als wirksam herausgestellt – hauptsächlich mittels Westernblotanalysen – jedoch ist eine direkte und quantitative Messung der Niveaus und der Aktivierung des BCR/ABL-Proteins selbst wünschenswert.

[0006] Die LightCycler-Quantifizierungs-Kits (Roche Molecular Biochemicals) transkribieren cDNA aus RNA um und ein Teilfragment der mRNA wird unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Danach wird das Amplikon unter Verwendung spezifischer Hybridisierungssonden detektiert.

[0007] Talpaz et al. (2000) beschreiben Autoantikörper gegen Abi- und Bcr-Proteine bei Philadelphia (Ph) Chromosomenpositiver Leukämie.

[0008] Valk et al. (2003) beschreiben die qualitative RT-PCR-Untersuchungsverfahren und quantitative Echtzeit-RT-PCR-Untersuchungsverfahren unter Verwendung kommerziell erhältlicher Sequenzdetektionssysteme, besonders zum Detektieren der erhöhten Sensitivität minimaler Residualerkrankungsstudien.

[0009] van Denderen et al. (1990) offenbaren ein polyklonales Antiserum gegen ein synthetisches Peptid, das der bcr-abl-Kontaktstelle in P190^{bcr-abl} entspricht. Eine Immunpräzipitation mit dagegen gerichteten Antikörpern zeigte eine Spezifität gegen P190^{bcr-abl}, nicht jedoch gegen P210^{bcr-abl}.

[0010] Wallace et al. (2003) beschreiben ein zweistufiges Multiplexverfahren, das eine Polymerasekettenreaktion mit Multiplexdetektion auf Mikroarrays von spektroskopisch ansprechbaren Flüssig-Kügelchen umfasst, wie zum Beispiel zum Identifizieren von sieben beispielhaft genannten Fusionstranskripten bei der lymphoplas-

tischen Leukämie.

[0011] U.S. Patent Nr. 5,369,008 betrifft das Detektieren von BCR-ABL, in einer Probe, indem die Bindung eines Antikörpers an BCR-ABL untersucht wird, besonders beim Binden des Antikörpers an den SH2-Bereich des ABL-Genprodukts.

[0012] WO 95/15331 betrifft die Detektion spezifischer Fusionsproteine, indem zum Beispiel eine Probe mit zwei Antikörpern in Kontakt gebracht wird, wobei jeder Antikörpern einen anderen Bereich des Fusionsprotein binden kann.

[0013] U.S. Patent Nr. 6,686,165 offenbart das Detektieren chromosomaler Veränderungen durch Binden separat ausgerichteter Sonden für ein tumorspezifisches Protein und ihre Detektion mittels Durchflusszytometrie. In spezifischen Ausführungsformen werden die chromosomalen Veränderungen als Ziele zum Überwachen des Niveaus der residualen Erkrankung während und nach der Therapie eingesetzt.

[0014] Wünschenswert ist eine spezifische und in bestimmten Aspekten quantitative Messung der Niveaus und der Aktivierung eines Fusionsproteins selbst. Eine solche wird durch die Offenbarung der vorliegenden Erfindung bereitgestellt. Die vorliegende Erfindung setzt auch neue Verwendungen von Sonden sowie neue Verfahren ein, die dem Überwachen der Therapie für eine Erkrankung dienen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Detektion von Fusionsproteinen und ihrer Aktivität. Sie betrifft auch ein Diagnostikum, das auf dieser Detektion basiert. Die Fusionsproteine wurden in Folge chromosomaler Translokation in einer oder mehreren Zellen erzeugt. In einigen Aspekten sind die Fusionsproteine für eine Erkrankung in einem Individuum repräsentativ, wie zum Beispiel Krebs. Das Diagnostikum der Erfindung ist daher im Allgemeinen für Krebserkrankungen vorgesehen. In bestimmten Aspekten werden die Fusionsproteine oder ihre Aktivität (ihre Aktivierung spiegelt sich in beispielhaften Ausführungsformen im Phosphorylierungszustand wieder) als ein Indikator zur Vorhersage der Erkrankung und/oder dem Ansprechen einer Therapie darauf verwendet. Demnach werden zum Beispiel Verfahren zum Überwachen einer Therapie, zur Vorhersagen des Ansprechens auf die Therapie, zum Erstellen einer Diagnose, und/oder Detektieren einer minimalen residualen Erkrankung und/oder zur Prognose der Erkrankung eines Individuums bereitgestellt. In einigen Ausführungsformen der Erfindung betrifft diese das Überwachen einer Therapie an einem Individuum, das eine oder mehrere Zellen hat, die das Fusionsprotein aufweisen. Beim Überwachen der Behandlung oder der Entwicklung einer Erkrankung können zu verschiedenen Zeitpunkten Proben von einem Individuum genommen werden. Dies kann zum Beispiel vor, während und/oder nach der Therapie für eine Erkrankung, zum Beispiel Krebs, erfolgen. In einigen Ausführungsformen wird die Menge eines Sonden/Fusionsprotein-Komplexes oder Niveaus ihrer Aktivität (die sich zum Beispiel in ihrem Phosphorylierungszustand widerspiegeln) in einer Probe eines Individuums und/oder der Betrag eines oder mehrerer Charakteristika von Fusionsproteinen aus einer Probe eines Individuums mit ihrem entsprechenden, zu einem anderen Zeitpunkt erhaltenen, Gegenstück verglichen. Ein Unterschied in der Menge des Sonden/Fusionsprotein-Komplexes und/oder dem Betrag eines oder mehrerer Charakteristika (wie zum Beispiel der Aktivierung, einschließlich der Phosphorylierung) von Fusionsproteinen wird zum Beispiel mit dem Erfolg der Therapie und/oder dem Voranschreiten der Erkrankung korreliert.

[0016] Wie bereits erwähnt, stellt die Erfindung ein Diagnostikum bereit. Das Diagnostikum weist ein Paar einer ersten Sonde und einer zweiten Sonde auf. Die erste Sonde weist eine Affinität zu einem ersten Bereich eines Fusionsproteins aus einer Chromosomen-Translokation auf (s. o.). Die erste Sonde ist somit imstande, den ersten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen. Die zweite Sonde weist eine Affinität zu einem zweiten Bereich des Fusionsproteins auf. Die zweite Sonde ist somit imstande, einen zweiten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen. Die Erfindung betrifft auch eine Verwendung eines Paares einer ersten Sonde und einer zweiten Sonde als Diagnostikum. Beispiele für entsprechende Verwendungen sind im Vorangegangenen und im Folgenden genannt. Zu ihnen zählen z. B. die Diagnose, die Beurteilung des Krankheitsstadiums, die Beurteilung der Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Therapie, die Vorhersage des Krankheitsverlaufs und das Überwachen einer Therapie einer Krebserkrankung eines Individuums.

[0017] In bestimmten Ausführungsformen stellt die Erfindung die Verwendung einer ersten und einer zweiten Sonde zum Überwachen einer Therapie eines Individuums bereit. In diesem Zusammenhang gibt es auch ein Verfahren zum Überwachen der Therapie für ein Individuum. Die Therapie, für die die Verwendung und das

Verfahren eingesetzt werden, ist auf ein Fusionsprotein von einer Chromosomen-Translokation gerichtet. Das Fusionsprotein weist einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich auf. Das Überwachen erfordert, dass die erste und die zweite Sonde zum Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums verwendet werden. Zum Untersuchen zählt es, die Probe der ersten Sonde auszusetzen (s. o.). Das Binden der ersten Sonde an den ersten Bereich erzeugt einen ersten Sonde/Fusionsprotein-Komplex. Zum Untersuchen zählt es weiterhin, den ersten Sonde/Fusionsproteinkomplexe der zweiten Sonde auszusetzen (s. o.). Das Binden der zweiten Sonde an den zweiten Bereich erzeugt einen zweiten Sonde/Fusionsprotein-Komplex. Zum Untersuchen zählt es auch, den zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplex zu detektieren. Das Detektieren führt zum untersuchen von einem oder mehreren Charakteristika des Fusionsproteins.

[0018] In einigen Ausführungsformen weist eine Verwendung und ein Verfahren der Erfindung auf: ein erstes Untersuchen von einem oder mehreren Charakteristika eines Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums, das Individuum gegenüber der Therapie aussetzen und ein zweites untersuchen einer Probe des Individuums auf eines oder mehrere Charakteristika eines Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums. In weiteren Ausführungsformen ist die Therapie eine Krebstherapie (zum Beispiel ein allgemeines zytotoxisches Arzneimittel), wobei es jedoch nicht auf ein Fusionsprotein von einer chromosomalen Translokation ausgerichtet ist.

[0019] Beim Einsatz einer Verwendung, eines Verfahrens oder eines Diagnostikums gemäß der Erfindung vor der Therapie können die verwendete erste und zweite Sonde die gleiche erste und zweite Sonde sein, die auch zum Überwachen einer bereits begonnenen Therapie eingesetzt werden. Jedoch können die beiden Sondenpaare, d. h. vor und während einer Therapie, unabhängig voneinander gewählt werden. So kann beispielsweise ein erstes Sondenpaar als Diagnostikum für ein Individuum eingesetzt werden, das noch keiner Therapie unterliegt. Sollte eine Entscheidung für eine Therapie getroffen werden, so kann sich die Verwendung eines anderen Sondenpaars während der Therapie anschließen. Das Untersuchen und Detektieren kann dementsprechend für das erste und das zweite Sondenpaar nach unterschiedlichen Protokollen erfolgen.

[0020] In einigen Ausführungsformen der Erfindung schließt die Verwendung bzw. das Verfahren das Überwachen einer Therapie eines Individuums ein. In bestimmten Aspekten ist die Therapie auf ein oder mehrere Charakteristika eines Fusionsprotein, das durch Chromosomen-Translokation in mindestens einer Zelle des Individuums entstanden ist, gerichtet. In besonderen Aspekten umfasst die Therapie zum Beispiel einen Kinaseinhibitor, einen Antikörper oder ein cytotoxisches Arzneimittel. In bestimmten Aspekten betrifft das eine Charakteristikum oder betreffen die mehreren Charakteristika eine oder mehrere Eigenschaften des Proteins, die überwacht werden können, wie zum Beispiel eine postranslationale Modifikation oder eine Mutation. In weiteren Aspekten umfasst das gewünschte eine oder mehrere Charakteristikum/Charakteristika die Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, eine Mutation, wie zum Beispiel eine Deletion, Insertion, Reversion oder Punktmutation oder eine Kombination davon.

[0021] In einigen Aspekten wird das Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika weiter definiert als das Quantifizieren eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins, zum Beispiel das Quantifizieren der Phosphorylierung eines oder mehrerer Fusionsproteine in der Probe. Eine erste oder zweite Sonde kann eine Mutation im Fusionsprotein detektieren, wie zum Beispiel eine Mutation, die dem Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie verleiht. In spezifischen Ausführungsformen gibt es eine Korrelation zwischen dem Niveau des Fusionsproteins und dem Niveau der Fusions-mRNA aus einer Probe.

[0022] In spezifischen Ausführungsformen der Erfindung wird das Individuum nach dem Untersuchen des Fusionsproteins einer alternativen Therapie unterzogen. Die alternative Therapie kann nach dem Bestimmen der als nicht erfolgreich erachteten Therapie eingesetzt werden, zum Beispiel basierend auf der Bestimmung des einen Charakteristikums oder der mehreren Charakteristika nach der Krebstherapie. Eine alternative Therapie kann weiterhin auch die ursprüngliche Therapie umfassen und eine zusätzliche Therapie einschließen. In anderen Ausführungsformen wird ausschließlich eine alternative Therapie verwendet, die ursprüngliche Therapie jedoch in Gänze nicht.

[0023] Das Überwachen des Fusionsproteins kann weiterhin definiert werden als das Bestimmen der Resistenz gegenüber einer Krebstherapie des Individuums, wie zum Beispiel das Bestimmen der Resistenz gegenüber einem Kinaseinhibitor, einem Antikörper oder einem zytotoxischen Arzneimittel. In bestimmten Aspekten entwickelt das Individuum eine Resistenz gegenüber Gleevec. Wenn das Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie aufweist, kann dem Individuum eine alternative Krebstherapie verabreicht werden.

[0024] In einigen Aspekten der Erfindung findet bei der Detektion des Fusionsproteins ein Substrat Verwendung, wie Partikel, zum Beispiel Kügelchen. Die Sonde kann mit dem Substrat kovalent, koordinativ oder nicht-kovalent verknüpft sein. In bestimmten Aspekten umfasst das Substrat eine erste Sonde, die das Fusionsprotein binden kann. Beispielsweise können als erste Sonde Antikörpern gegen einen ersten Bereich des Fusionsproteins verwendet werden, wie auch z. B. zum Immunpräzipitieren des Fusionsproteins. Dann wird eine zweite Sonde, die einen zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann – wie zum Beispiel ein Antikörper zum Detektieren des Fusionsproteins – verwendet. Diese(r) kann anders strukturiert sein, um im Fusionsprotein/Substrat-Komplex detektierbar zu sein. Wenn die zweite Sonde markiert ist, wie zum Beispiel mit einem Fluorochrom, kann das fusionierte Protein mittels dieser Markierung detektiert und quantifiziert werden.

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft das Identifizieren chromosomaler Translokationen aus einer Probe in einem Individuum, wobei die Chromosomen-Translokationen durch Untersuchen auf dadurch erzeugte Fusionsproteine identifiziert werden. Das Untersuchen nach Fusionsproteinen umfasst das Verwenden eines Substrates (wie zum Beispiel Kügelchen) und Antikörper für jeden der separaten Bereiche der Fusionsproteine. In einem besonderen Aspekt ist ein erster Antikörper für einen ersten Bereich eines Fusionsproteins an ein Kügelchen gebunden. Eine Probe, die ein Fusionsprotein aufweist, das aufgrund einer Chromosomen-Translokation entstanden ist, wird dem am ersten Kügelchen fixierten Antikörper präsentiert. Wenn das Fusionsprotein erkannt wird und an den auf dem ersten Kügelchen fixierten Antikörper bindet, wird ein Fusionsprotein-Kügelchen-Komplex erzeugt. Der Fusionsprotein-Kügelchen-Komplex wird gegenüber einem zweiten Antikörper ausgesetzt, der einen zweiten Bereich des Fusionsproteins erkennt. Der zweite Bereich ist mit dem ersten Bereich nicht identisch. Das Identifizieren mindestens eines detektierbaren Restes auf dem zweiten Antikörper weist das Binden des zweiten Antikörpers am zweiten Bereich des Fusionsproteins nach, das durch den ersten Antikörper auf den Fusionsprotein-Kügelchen-Komplex gebunden ist. In spezifischen Ausführungsformen weist die Detektion bzw. der Einsatz eines entsprechenden Diagnostikums nach, dass eine Chromosomen-Translokation aufgetreten ist. In manchen Ausführungsformen weist das Identifizieren einer chromosomalen Translokation und/oder der Nachweis eines oder mehrerer Fusionsproteine in der Probe daraufhin, dass das Individuum mindestens eine krebserregende Zelle aufweist oder Gefahr läuft, Krebs zu entwickeln. Dabei ist der Krebs durch die Gegenwart des Fusionsproteins gekennzeichnet.

[0026] In bestimmten Aspekten der Erfindung weist das Fusionsprotein, das durch die chromosomale Translokation entstanden ist, als Folge des Translokationsereignisses mindestens zwei Teile auf: Ein erster Teil des Fusionsproteins wird durch mindestens einen Teil eines Polynukleotids (das man als ein Gen bezeichnen kann) auf einem Chromosom kodiert, das ein Protein kodiert. Ein zweiter Teil des Fusionsproteins wird durch mindestens eine Teil eines anderes Polynukleotid (das man ebenfalls als ein Gen bezeichnen kann) auf einem Chromosom kodiert, das auch ein Protein kodiert. Typischerweise sind die beiden Proteine, die von den beiden Polynukleotiden kodiert werden, verschieden. In der Erfindung erkennen die ersten und zweiten Antikörper verschiedene Teile des Fusionsproteins.

[0027] Besondere Ausführungsformen der Erfindung schließen das Überwachen der Phosphorylierung vor und nach der Therapie ein. Dies kann zum Beispiel vor und nach dem Verabreichen einer oder mehrerer Krebstherapien erfolgen, wobei mindestens eine Krebstherapie einen Kinaseinhibitor umfasst. In spezifischen Ausführungsformen wird das Niveau der Phosphorylierung überwacht. Die Menge der Phosphorylierung in einer repräsentativen Anzahl von Fusionsproteinen kann vor und nach einer Therapie, die auf die Phosphorylierung gerichtet ist, bestimmt werden. In bestimmten Aspekten lassen Phosphorylierungsniveaus vor der Therapie Rückschlüsse auf ein Ansprechen auf die Therapie zu. In bestimmten Aspekten wird zum Beispiel ein Individuum identifiziert, für das eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, gegenüber einer Therapie resistent zu sein. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung wird eine alternative Therapie angewandt, wie zum Beispiel durch das Verwenden einer Kombinationstherapie anstelle eines einzelnen Wirkstoffes. Darüber hinaus kann nach dem Beginn der Therapie das Identifizieren der Phosphorylierungsniveaus von Vorteil sein. Die Erfinder haben gezeigt, dass es in einigen Individuen eine Auswahl von Zellen gibt, die eine größere Phosphorylierung nach dem Beginn der Therapie aufweisen. In diesem bestimmten Fall sterben die durchschnittlichen Zellen (wie zum Beispiel Zellen mit Fusionsproteinen mit durchschnittlichen Phosphorylierungsmengen), die ursprünglich dominant waren (wobei die Gesamtposphorylierung vor der Therapie nicht erhöht ist) im Verlauf der Therapie und die Zellen mit Fusionsproteinen mit einer hohen Phosphorylierung bleiben in Takt und werden dominant. Daher kann das Überwachen der Phosphorylierung während der Therapie von Vorteil für das Individuum sein, wie zum Beispiel durch das Vorhersagen des Ansprechens oder der Ansprechwahrscheinlichkeit auf die Therapie, die auf die Phosphorylierung gerichtet ist, einschließlich Kinaseinhibitoren.

[0028] Für den Einsatz eines Diagnostikums, eine Verwendung oder ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann eine Probe aus verschiedenen physiologischen Herkunftsstellen in einem Individuum, wie zum

Beispiel einem Patienten, verwendet werden. Beispiele sind, aber nicht beschränkt auf, Gesamtblut, Knochenmark, Plasma, cerebrospinale Flüssigkeit, Samen, Urin, Brustwarzenaspirat, oder zum Beispiel einem festen Tumor aus dem Rückenmark. Feste Tumore können durch dem Fachmann bekannte Mittel oder Techniken, wie zum Beispiel Homogenisierung, vor der Analyse zerstört werden.

[0029] In der Erfindung verwendete Antikörper können Markierungen umfassen wie zum Beispiel Radioisotope, Enzyme, Fluorogene, Chromogene und Chemolumineszenzmarkierungen. Geeignete radioaktive Markierung schließen Tritium, Kohlenstoff 14, Phosphor 32, Iod 125 oder 131, Yttrium-90, Technetium-99 m oder Schwefel 35 ein. Beispiele für verschiedene geeignete radioaktive Markierungen werden im U.S. Patent Nr. 4,062,733 beschrieben. Zu Beispielen für verschiedene enzymatische Markierungen zählen die alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase, Luciferase, β -Galactosidase, Glucoseoxidase, Lysozym, Malatdehydrogenase und ähnliche. Geeignete Substrate für die enzymatischen Systeme schließen einfache Chromogene und Fluorogene ein, wie zum Beispiel Paranitrophenyl, Phosphat, β -D-Glucose, Homovanillinsäure, o-Dianisidin, Bromcresol-Purpur, 4-Methyl-Umbelliferon und Indoxylphosphat. Chromogene Markierungen sind Verbindungen, die Licht im sichtbaren ultravioletten Wellenlängenbereich absorbieren. Solche Verbindungen sind für gewöhnlich Farbstoffe. Fluorogene Verbindungen emittieren Licht im ultravioletten oder im sichtbaren Wellenlängenbereich nach der Exposition auf eine Energiequelle wie z. B.

[0030] Bestrahlung mit Licht. Repräsentative Auflistungen geeigneter Fluorogene werden in den U.S. Patenten Nr. 4,366,241 und 3,996,345 beschrieben. Chemilumineszenzmarkierungen schließen zum Beispiel solche ein, die im U.S. Patent Nr. 4,104,029 identifiziert sind. Abhängig von der Natur der Markierung oder des verwendeten Signal-erzeugenden Systems kann ein Signal durch jedwedes geeignete und dem Fachmann bekannte Mittel detektiert werden. Zum Beispiel kann man im Falle einer radioaktiven Markierung einen Röntgenfilm verwenden, um das Signal zu entwickeln. Für Fluoreszenzmarkierungen kann man ein Signal durch Bestrahlen mit Licht und Beobachten des Fluoreszenzniveaus in einem Fluorometer messen. Für enzymkatalysierte Systeme kann eine Farbveränderung visuell für eine positive Reaktion detektiert werden, wenn eine chromogene Markierung verwendet wird. Eine weitere Quantifizierung einer enzymatischen Reaktion kann mit einer densitometrischen Analyse durchgeführt werden.

[0031] In bestimmten Aspekten der Erfindung sind die erste Sonde, die zweite Sonde oder beide markiert. Die Markierungen können ein Chromogen, Radioaktivität, ein Fluorophor, Quantumpartikel (z. B. Quantumkügelchen) usw. umfassen. In bestimmten Aspekten ist das Verhältnis vom zweiten Sondenmolekül zur Markierung 1:1 (ein Molekül ein Chromogen), was eine spezifische und reproduzierbare Quantifizierung des detektierbaren Moleküls ermöglicht. Durch Vergleichen der Anzahl der detektierten Chromogene kann die Anzahl der detektierten Fusionsmoleküle in der Probe quantifiziert werden (zum Beispiel in 10 ml bzw. 10 Kubikzentimeter Plasma oder Serum oder in 100 Zellen).

[0032] In bestimmten Aspekten ist die vorliegende Erfindung zum Nachweis von Translokationen anwendbar, die durch herkömmliche Cytogenese schwierig zu detektieren sind. Nachgewiesen werden können ferner z. B. komplexe Translokationen, die mehrere Chromosome einschließen, cytogenetisch stille Translokationen und/oder Situationen, in denen Karyotyp-Studien fehlschlagen oder nicht überzeugend sind.

[0033] In bestimmten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung in freier Zirkulation bzw. frei im Kreislauf befindliches BCR-ABL-Protein und seine Phosphorylierung in überwachten Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie.

[0034] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Erfindung ein Diagnostikum, eine Verwendung und ein Verfahren zum Überwachen einer Therapie für ein Individuum bereit. Unter einem verwandten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung auch eine Verwendung einer ersten und einer zweiten Sonde zum Überwachen einer Therapie eines Individuums bereit. Das Individuum hat bei den genannten Verwendungen und Verfahren typischerweise mindestens eine Therapierunde durchlaufen. Die Therapie ist auf ein Fusionsprotein aus einer chromosomalen Translokation ausgerichtet. Das Protein weist einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich auf. Das Überwachen im Rahmen der genannten Verwendung erfordert, dass die erste und die zweite Sonde zum Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums verwendet werden, bzw. zum genannten Verfahren zählt das Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums. Das Untersuchen umfasst: Aussetzen der Probe gegenüber der ersten Sonde, die den ersten Bereich des Fusionsproteins binden kann, wobei das Binden der ersten Sonde an dem ersten Bereich einen ersten Sonde/Fusionsproteinkomplex erzeugt; Aussetzen des ersten Sonde/Fusionsproteinkomplexes gegenüber der zweiten Sonde, die den zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann, wobei das Binden der zweiten Sonde an den zweiten Bereich einen zweiten Sonde/Fusi-

onsproteinkomplex erzeugt. Zum Untersuchen zählt auch Detektieren des zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplexes, wobei das Detektieren zum Untersuchen des einen oder der mehreren Charakteristika führt.

[0035] Die Verwendungen und Verfahren der Erfindung können weiterhin das Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums vor dem Aussetzen des Individuums gegenüber der Therapie umfassen. In bestimmten Ausführungsformen umfasst das Untersuchen vor der Therapie das Aussetzen bzw. die Exposition der Probe gegenüber einer ersten Sonde, die einen ersten Bereich des Fusionsproteins binden kann, wobei das Binden der ersten Sonde am ersten Bereich einen ersten Sonde/Fusionsproteinkomplex erzeugt; Aussetzen des ersten Sonde/Fusionsproteinkomplexes gegenüber einer zweiten Sonde, die einen zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann, wobei das Binden der zweiten Sonde am zweiten Bereich einen zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplex erzeugt; und Detektieren des zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplexes.

[0036] In einer bestimmten Ausführungsform ist das Fusionsprotein weiterhin als ein aktiviertes Fusionsprotein definiert. In bestimmten Aspekten ist die Therapie auf ein oder mehrere Charakteristika des Fusionsproteins gerichtet. In spezifischen Ausführungsformen umfasst die Therapie einen Kinaseinhibitor, einen Antikörper oder ein cytotoxisches Arzneimittel. In bestimmten Aspekten zählt zu dem einen oder den mehreren Charakteristika die Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, eine Mutation oder eine Kombination davon. Die Mutation kann eine Deletion, Inversion oder Punktmutation sein. In spezifischen Ausführungsformen ist die erste Sonde mit einem Substrat verknüpft, wie zum Beispiel einem, das ein Kügelchen, eine Platte oder eine Säule umfasst; das Substrat kann auch immobilisiert sein. In einer bestimmten Ausführungsform ist das Fusionsprotein Bcr-Abl.

[0037] In zusätzlichen Ausführungsformen kann die Anzahl der Fusionsmoleküle quantifiziert werden, wenn das Substrat ein Kügelchen umfasst. In bestimmten Ausführungsformen verwendet die Quantifizierung die folgende Formel: Prozentsatz der Kügelchen, die ein oder mehrere Moleküle aufweisen \times durchschnittliche Anzahl von Molekülen auf den Kügelchen, die positiv sind = Anzahl der Moleküle in der Probe. Eine bestimmtes Therapieregime bzw. eine bestimmte therapeutische Anwendungsreihe kann nach der Quantifizierung angewendet werden.

[0038] Eine Probe der Erfindung kann weiterhin definiert werden als enthaltend: Zelllysat, Plasma, Blut, Serum oder Mischungen davon. In bestimmten Aspekten stammt die Probe aus cerebrospinaler Flüssigkeit, Blut, Urin, Serum, Plasma, Brustwarzenaspirat, Fäkalien, Wangenabstrich, Speichel, Biopsie, Ascites oder eine Mischung davon.

[0039] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird sowohl das erste Untersuchen, das zweite Untersuchen als auch ein oder mehrere Charakteristika weiter definiert als das Quantifizieren eines Charakteristikum des Fusionsproteins, wie zum Beispiel das Quantifizieren der Phosphorylierung eines oder mehrerer Fusionsproteine in der Probe. Die zweite Sonde kann weiter definiert werden als imstande, die Aktivierung des Fusionsproteins zu detektieren. In bestimmten Aspekten umfassen die erste Sonde, die zweite Sonde oder beide eine Anti-Phospho-Tyrosinaktivität oder Anti-Phospho-Serinaktivität. In bestimmten Ausführungsformen weist die zweite Sonde eine Markierung auf, wie zum Beispiel einen Chromagen, Radioaktivität, ein Fluorophor oder eine Kombination davon. Zum Quantifizieren kann das Verhältnis eines Moleküls der zweiten Sonde zur Markierung bei einem Verhältnis von etwa 1:1 liegen. Zu den Verfahren der Erfindung kann es weiterhin auch zählen, die Anzahl von Fusionsmolekülen in der Probe zu bestimmen, typischerweise basierend auf der Anzahl der markierten zweiten Sonden. In einem bestimmten Aspekt erkennen die erste Sonde, die zweite Sonde oder beide eine Mutation im Fusionsprotein, wie zum Beispiel, eine, die dem Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie verleiht. In bestimmten Aspekten identifiziert das Detektieren des zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplexes das Individuum als eines, das eine alternative Therapie erfordert.

[0040] Das Individuum kann Krebs haben, verdächtigt werden dass es Krebs hat oder dem Risiko ausgesetzt sein, Krebs zu entwickeln. Der Krebs kann Leukämie, Lymphoma, Gehirnkrebs, Lungenkrebs, Brustkrebs, Darmkrebs, Prostatakrebs, Leberkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, Hautkrebs, Eierstockkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Magenkrebs, Milzkrebs, Schilddrüsenkrebs, Hodenkrebs oder Knochenkrebs sein.

[0041] In einigen Ausführungsformen der Erfindung wird das Individuum nach dem zweiten Untersuchen einer alternativen Therapie unterzogen. In anderen Aspekten der Erfindung, wird das Überwachen weiterhin definiert als das Bestimmen der Resistenz gegenüber einer Krebstherapie des Individuums. Die Resistenz kann sich gegenüber einem Kinaseinhibitor, einem Antikörper oder einem cytotoxischen Arzneimittel entwickeln. Die

Resistenz kann sich gegenüber Gleevec entwickeln. In einer spezifischen Ausführungsform wenn das Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie aufweist, kann dem Individuum eine alternative Krebstherapie verabreicht werden.

[0042] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung wirkt die Therapie auf den Phosphorylierungsstatus eines Fusionsproteins aus einer Chromosomen-Translokation ein, wobei der erste Bereich eine Phosphorylierungsstelle umfasst und wobei das Untersuchen weiterhin definiert wird als Untersuchen des Phosphorylierungszustandes des Fusionsproteins.

[0043] In bestimmten Ausführungsformen wird das Verfahren weiterhin definiert als das Quantifizieren des Tumolvolumens im Individuum.

[0044] In einigen Aspekten der Erfindung ist die Resistenz gegenüber einer Krebstherapie zumindest teilweise die Folge der Unfähigkeit der Therapie, wie zum Beispiel Imatinib, das Fusionsprotein zum Beispiel BCR-ABL, aufgrund von Punktmutationen, Veränderungen im Phosphorylierungszustand oder andere posttranslationale Verarbeitungsschritte oder in Fällen in denen keine Mutation vorhanden ist, aufgrund der Aktivierung von anderen Wegen, die die Erkrankung resistent werden lassen, binden und unterdrücken.

[0045] Im Vorangehenden wurden eher allgemein die Merkmale und technischen Vorteile der vorliegenden Erfindung beschrieben, um das Verständnis der folgenden ausführlichen Beschreibung der Erfindung zu verbessern. Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden beschrieben, die auch den Gegenstand der Ansprüche der Erfindung bilden. Der Fachmann wird es zu schätzen wissen, dass die Konzeption und die aufgezeigten offenbarten Ausführungsform jederzeit als Basis für Veränderungen und zum Entwerfen anderer Strukturen für das Ausführen des gleichen Zweckes der vorliegenden Erfindung dienen können. Es sollte für den Fachmann auch deutlich werden, dass solche äquivalenten Entwürfe nicht vom Geist und Umfang der Erfindung, wie in den angehängten Ansprüchen beschrieben, abweichen. Die neuen Merkmale, von denen angenommen wird, dass sie für die Erfindung, sowohl für ihre Organisation als auch die Art der Ausführung, zusammen mit weiteren Gegenständen und Vorteilen, charakteristisch sind, werden anhand der folgenden Beschreibung, wenn zusammen mit den beigefügten Figuren betrachtet, leichter verstanden. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, dass jede Figur nur zum Zweck der Veranschaulichung und Beschreibung bereitgestellt wird und nicht als eine Angabe der Grenzen der vorliegenden Erfindung vorgesehen ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0046] Für ein vollständigeres Verständnis der vorliegenden Erfindung wird auf die folgende Beschreibungen im Zusammenhang mit den beigefügten Figuren Bezug genommen.

[0047] **Fig. 1** zeigt die Detektion des BCR-ABL-Proteins und seiner Phosphorylierung unter Verwendung von Kügelchen und Durchflusszytometrie. Plasmaproben, die aus dem peripheren Blut von normalen Probanden und CML-Patienten hergestellt waren, wurden mit mit Anti-BCR beschichteten Kügelchen inkubiert. Es schloss sich die Inkubation mit Antikörpern an, die gegen ABL (obere Reihe) oder phosphoryliertes Tyr-245 von ABL (untere Reihe) gerichtet sind. PBS diente als Negativkontrolle. Ein Lysat der von CML abstammenden Zelllinie K 562 diente als Positivkontrolle (nicht gezeigt).

[0048] **Fig. 2** verdeutlicht die Empfindlichkeit und Linearität des auf Kügelchen basierenden Untersuchungsverfahrens für das Gesamt- und phosphorylierte BCR-ABL-Protein. Kultivierte BCR-ABL-positive K 562-Zellen wurden im von normalen Probanden erhaltenen Plasma verdünnt. Das auf Kügelchen basierende Untersuchungsverfahren für BCR-ABL wurde wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt.

[0049] **Fig. 3** fasst die Ergebnisse der Wirkungen von beispielhaften Kinaseinhibitoren (Gleevec und AMN107) auf die BCR-ABL-Phosphorylierung zusammen, wenn diese mit der K562-Zelllinie inkubiert werden.

[0050] **Fig. 4** zeigt die Abnahme der Menge des BCR-ABL-Proteins, das nach der Behandlung von K-562-Zellen mit AMN107 an Tyr-245 phosphoryliert ist. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie des auf Kügelchen basierenden Untersuchungsverfahrens werden für kultivierte Zellen dargestellt, die mit dem BCR-ABL-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor AMN107 mit den angegebenen Konzentrationen (blaue Spuren) oder mit unbehandelter Kontrolle (schwarze Spuren) behandelt wurden.

[0051] **Fig. 5** zeigt die Niveaus an Gesamtprotein in CML-Patienten vor und während der Imatinib-Behandlung. Aus peripherem Blut von CML-Patienten hergestelltes Plasma wurde mittels des auf Kügelchen basie-

renden Verfahrens auf die Gesamtmenge an BCR-ABL-Protein hin untersucht.

[0052] [Fig. 6](#) zeigt die Niveaus an phosphoryliertem (Thr-735) BCR-ABL-Protein in CML-Patienten vor und während einer Imatinib-Behandlung. Aus peripherem Blut von CML-Patienten hergestelltes Plasma wurde mittels des auf Kügelchen basierenden Verfahrens auf phosphoryliertes (Thr-735) BCR-ABL-Protein hin untersucht.

[0053] [Fig. 7](#) zeigt die Niveaus an phosphoryliertem (Tyr-245) BCR-ABL-Protein in CML-Patienten vor und während einer Imatinib-Behandlung. Aus peripherem Blut von CML-Patienten hergestelltes Plasma wurde mittels des auf Kügelchen basierenden Verfahrens auf phosphoryliertes (Tyr-245) BCR-ABL-Protein hin untersucht.

[0054] [Fig. 8](#) zeigt keine signifikante Zunahme in den Niveaus der BCR-ABL-Phosphorylierung in CML-Patienten mit schlechtem molekularem Ansprechen auf die Imatinib-Behandlung. Ein schlechtes molekulares Ansprechen wurde als ein Verhältnis von BCR-ABL zu ABL-mRNA von $> 0,05$ definiert, was mittels RT-PCR nach dreimonatiger Behandlung bestimmt wurde. Die Verhältnisse am Gesamt-BCR-ABL-Protein, die an Thr735 (TH) und Tyr-245 (Tyr) phosphoryliert waren, sind vor und 3 Monate nach der Behandlung von CML-Patienten, die kein molekulares Ansprechen zeigten, gezeigt.

[0055] [Fig. 9](#) zeigt abnehmende Niveaus der BCR-ABL-Phosphorylierung in CML-Patienten mit einem molekularem Ansprechen auf die Imatinib-Behandlung. Ein molekulares Ansprechen wurde als ein Verhältnis von BCR-ABL zu ABL mRNA von $< 0,05$ definiert, was mittels RT-PCR nach dreimonatiger Behandlung bestimmt wurde. Die Verhältnisse von Gesamt-BCR-ABL-Protein, das an Thr-735 (TH) und Tyr-245 (Tyr) phosphoryliert war, sind vor und nach der dreimonatigen Behandlung von CML-Patienten, die kein molekulares Ansprechen zeigten, dargestellt.

[0056] [Fig. 10](#) zeigt für Patienten mit CML, die mit 600 mg AMN107 behandelt wurden, im Vergleich mit Patienten, die mit 400 mg behandelt wurden, eine signifikantere Verringerung der BCR-ABL-Phosphorylierung.

[0057] [Fig. 11](#) zeigt eine Tabelle, die den Zusammenhang zwischen den Niveaus an BCR-ABL und seiner Phosphorylierung mit verschiedenen Labor- und klinischen Befunden wiedergibt.

[0058] [Fig. 12](#) veranschaulicht die Messung des Tumolvolumens in Abhängigkeit von den BCR-ABL-Niveaus in unbehandelten CML-Patienten.

[0059] [Fig. 13A](#) und [13B](#) zeigen die BCR-ABL-Phosphorylierung von auf Imatinib ansprechenden und von Imatinib-resistenten CML-Patienten. Die Verhältnisse von p-BCR-ABL zu Gesamt-BCR-ABL-Protein zeigen, dass die Zellen von Imatinib-resistenten CML-Patienten signifikant niedrigere Niveaus an ([Fig. 13A](#)) p-BCR-ABL (Thr) und ([Fig. 13B](#)) p-BCR-ABL (Tyr245) aufweisen als Zellen von auf Imatinib ansprechenden Patienten.

[0060] [Fig. 14A](#) und [14B](#) zeigen die CrkL-Phosphorylierung in Zellen von auf Imatinib ansprechenden und von Imatinibresistenten CML-Patienten. In [Fig. 14A](#) zeigt die Quantifizierung der Intensitäten an p-CrkL (Moleküle/Zelle), dass die Imatinib-resistenten CML-Patienten signifikant niedrigere Niveaus an p-CrkL pro Zellen aufwiesen, als auf Imatinib ansprechende Patienten. In [Fig. 14B](#) zeigen repräsentative Durchflusszytometrie-histogramme von phosphorylierte CrkL-Intensitäten in Blast-Zellen eine verringerte p-CrkL-Intensität, jedoch eine erhöhte Anzahl an Zählungen (Blast-Zellen) in einer resistenten (violett) im Vergleich zu einer auf Imatinib ansprechenden (schwarz) Probe.

[0061] [Fig. 15A](#) und [15B](#) zeigen die Akt-Phosphorylierung in Zellen von auf Imatinib ansprechenden und von Imatinibresistenten CML-Patienten. In [Fig. 15A](#) zeigt die Quantifizierung der Intensitäten an p-Akt (Moleküle/Zelle), dass die Imatinib-resistenten CML-Patienten signifikant niedrigere Niveaus an p-Akt pro Zellen aufwiesen, als auf Imatinib ansprechende Patienten. In [Fig. 15B](#) zeigen repräsentative Durchflusszytometrie-histogramme von phosphorylierte akt-Intensitäten in Blast-Zellen eine verringerte p-Akt-Intensität, jedoch eine erhöhte Anzahl an Zählungen (Blast-Zellen) in einer resistenten (violett) im Vergleich zu einer auf Imatinib ansprechenden (schwarz) Probe.

[0062] [Fig. 16A](#) und [16B](#) zeigen die STAT5-Phosphorylierung in CML-Zellen von auf Imatinib ansprechenden und Imatinibresistenten Patienten. In [Fig. 16A](#) zeigt die Quantifizierung der p-STAT5-Intensitäten zwischen Imatinib-resistenten und auf Imatinib ansprechenden Patienten keinen signifikanten Unterschied in der mittleren

Anzahl von Molekülen pro CML-Zelle. In **Fig. 16B** illustrieren repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme der Intensitäten von phosphoryliertem STAT5 in Blast-Zellen eine vergleichbare Intensität für p-STAT5, jedoch eine erhöhte Anzahl Zählungen (Blast-Zellen) in einer resistenten (violett) im Vergleich zu einer auf Imatinib ansprechenden (schwarz) Probe.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

I. Definitionen

[0063] In Übereinstimmung mit der seit langem währenden Patentrechtskonvention bedeutet das Wort „ein“, ebenso wie „eine“, wenn es in der vorliegenden Beschreibung zusammen mit den Worten aufweisend oder umfassend verwendet wird, einschließlich der Ansprüche, "ein oder mehrere". Einige Ausführungsformen der Erfindung können aus einem oder mehreren Elementen, Verfahrensschritten, und/oder Verfahren der Erfindung bestehen oder im Wesentlichen daraus bestehen. Es sei darauf hingewiesen, dass jedes Verfahren, jede Verwendung und jede Zusammensetzung, die hier beschrieben wird, in Bezug auf jedes Verfahren, jede Verwendung und jede Zusammensetzung, die hier können beschrieben wird, implementiert werden.

[0064] Der Begriff "Aktivieren" bezieht sich, wenn hier verwendet, auf Veränderungen am Protein, die seine Funktionsfähigkeit erhöhen. Dies wird für gewöhnlich durch eine Phosphorylieren bestimmter Segmente des Proteins bewirkt. Es können jedoch auch andere Veränderungen, wie z. B. die Fenestration, Acetylierung und andere dem Fachmann bekannte Veränderungen eine Rolle bei der Aktivierung des Proteins spielen. Die vorliegende Erfindung ist so ausgestaltet, dass diese Modifikationen besonders detektiert werden.

[0065] Die Ausdrücke „Risiko, Krebs zu entwickeln“ und „Risiko der Krebsentstehung“ betreffen, wenn hier verwendet, ein Individuum, das einen oder mehrere Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs aufweist. In bestimmten Ausführungsformen ist die Erfindung für solche Fälle einsetzbar. ZU Beispielen für Risikofaktoren zählen der Familienhintergrund in Bezug auf Krebs, fortgeschrittenes Alter, bösartige Tumoren, Zellen mit abnormaler DNA, Umweltfaktoren, wie z. B. die Verwendung von Tabakprodukten, Sonnenexposition, Karzinogenexposition, z. B. Geschlecht, vorangegangene abnormale Biopsie, Rasse, Ernährungsgewohnheiten, gewählter Lebensstil, Strahlungsexposition oder Exposition gegenüber anderen Krebs erzeugenden Agenzien, bestimmte genetische Veränderungen und/oder Nahrungsmittel ein. Zu besonderen Risikofaktoren für das Entwickeln von Leukämie zählen z. B. Exposition gegenüber hohen Strahlungsniveaus, einschließlich aus der Umwelt oder durch medizinische Behandlung, Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien, wie z. B. Benzol oder Formaldehyd, Chemotherapie, wie z. B. mit Alkylierungsmitteln, Down-Syndrom (Trisomie 21) und bestimmte andere genetische Erkrankungen; Exposition gegenüber dem humanen T-Zell-Leukämievirus I (HTLV-I), der einen seltenen Typ der chronischen lymphocytischen Leukämie verursacht, der als humane T-Zell-Leukämie bekannt ist und myelodysplastisches Syndrom, das eine Bluterkrankung ist und bei dem betroffene Individuen ein erhöhtes Risiko für das Entwickeln der akuten Myelodischen Leukämie haben, ein.

[0066] Der Begriff „chromosomale Translokation“ betrifft, wenn hier verwendet, ein Ereignis, bei dem ein Fragment eines Chromosoms abbricht und dann an ein anderes Chromosom angeheftet wird. Das andere Chromosom kann in bestimmten Ausführungsformen von einem anderen Chromosomenpaar sein. In einigen Aspekten von Translokationen im Rahmen der Erfindung sind die Moleküle tumorspezifisch, da die chimäre RNA und das nachfolgende Proteinprodukt nur in der Zelle mit der chromosomalen Translokation vorhanden sind, die für diagnostische und therapeutische Anwendungen von Vorteil sind. In anderen Ausführungsformen sind Translokationen, die zu einer erzwungenen Proto-Onkogen-Expression führen, keine zellspezifische Diagnosegrundlage, da das Proto-Onkogen auch in normalen Zellen exprimiert wird. Die Translokationen treten im Allgemeinen zwischen nicht homologen Chromosomen auf. Sie können jedoch auch zwischen homologen Chromosomen auftreten. Besonders die Fusionsgenprodukte, die durch die chromosomale Translokation erzeugt werden, sind intrazellulär lokalisiert. Zu Polynukleotiden (die hier auch als Gene bezeichnet werden können), die durch chromosomale Translationen betroffen sein können, zählen Genfusionen, wobei die Bruchpunkte z. B. innerhalb von Introns der betroffenen Gene auf den zwei betreffenden Chromosomen liegen können.

[0067] Der Begriff „Fusionsprotein“ betrifft, wenn hier verwendet, ein Polypeptid, das durch ein Polynukleotid kodiert wird. Dieses Polynukleotid ist in Folge einer Fusion zwischen mindestens zwei Polynukleotiden entstanden, wie z. B. von zwei verschiedenen Genen, einschließlich der Polynukleotide, die sich nach einer chromosomalen Translokation ergeben. Mit anderen Worten weist das Fusionsprotein mindestens zwei verschiedene Bereiche auf: einen Bereich, der von einem Polynukleotid oder Gen kodiert wird, und einen zweiten Bereich, der von einem anderen Polynukleotid oder Gen kodiert wird.

[0068] Der Begriff „Resistenz“ oder „Therapieresistent“, wenn hier verwendet, betrifft einen medizinischen Zustand eines Individuums, der auf eine Therapie nicht anspricht, bei dem also eine Therapie keine Änderung oder zumindest keinen Erfolg herbeiführen kann. In einigen Ausführungsformen betreffen die Begriffe Krebs, der gegenüber einer Krebstherapie resistent ist oder gegenüber einer Krebstherapie resistent wird. In einigen Ausführungsformen können die Begriffe weiter definiert werden als einen Krebs betreffend, wobei die Krebszellen nicht durch die Therapie getötet werden oder sogar während der therapeutischen Behandlung proliferieren können oder kurz danach, wie z. B. im Laufe von Monaten, Wochen oder Tagen. Die Resistenz kann eine neu entstandene Resistenz oder eine erworbene Resistenz sein.

[0069] Der Begriff „Probe“ betrifft, wenn hier verwendet, eine repräsentative Einheit eines beliebigen Organismus, einschließlich z. B. eines Menschen, eines Tieres oder einer Pflanze, wie auch von Zellkulturen, rekombinanten Zellen, Zellbestandteilen und Umweltquellen. Sie können ein biologisches Gewebe, ein Fluid wie eine Flüssigkeit, oder ein bestimmtes Exemplar oder ein Probenstück umfassen. Proben können von jedem Tier erhalten werden, einschließlich eines Säugetiers, z. B. eines Menschen, Pferdes, Hundes, Schafs, einer Katze, Ziege, Kuh und eines Schweins. Die Proben können, ohne darauf beschränkt zu sein, amniotische Flüssigkeit, Blut, Blutzellen, zerebrospinale Flüssigkeit, Proben von einer Feinnadelbiopsie, Bauchfellflüssigkeit, Plasma, Brustfellflüssigkeit, Speichel, Samen, Serum, Sputum, Gewebe oder Gewebehomogenate, Gewebekulturmedium, Urin und ähnliches aufweisen oder daraus bestehen. Proben können auch be- und verarbeitet werden, wie z. B. durch Gewebesektion, Fraktionierung, Reinigung oder Trennung von Zellorganellen.

[0070] Die Begriffe „Tumormasse“ und „Tumorlast“ betreffen, wenn hier verwendet, die Menge an Krebszellen, die Tumorgöße oder das Ausmaß an Krebs in einem Individuum. In bestimmten Ausführungsformen kann die Tumormasse als eine „Tumorbelastung“ beschrieben werden.

[0071] Bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung können, soweit nicht anders angegeben, herkömmliche Techniken der Molekularbiologie, Mikrobiologie, rekombinante DNA usw. zum Einsatz kommen, die auf dem Gebiet bekannt sind. Solche Techniken werden vollständig in der Literatur beschrieben. Siehe z. B. Sambrook, Fritsch und Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, zweite Ausgabe (1989), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait Ed., 1984), ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, Hrsg., 1987), die Reihe METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. M. Miller und M. P. Calos Hrsg. 1987), HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (D. M. Weir und C. C. Blackwell, Eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, und K. Struhl, Hrsg., 1987), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach und W. Strober, Hrsg., 1991); ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY; wie auch Monographien in Zeitschriften, wie z. B. ADVANCES IN IMMUNOLOGY.

II. Die vorliegende Erfindung

[0072] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen die Detektion von Fusionsproteinen und/oder ihrer Aktivierung einschließlich der sich aus einer chromosomalen Translokation ergebenden. Es wird insbesondere mit einem Diagnostikum, einer Verwendung und einem Verfahren der Erfindung das Ansprechen bzw. die Reaktion auf eine Therapie überwacht. In weiteren Aspekten wird eine Erkrankung, wie z. B. Krebs, vorhergesagt, diagnostiziert und/oder prognostiziert. In bestimmten Aspekten wird ein Diagnostikum, eine Verwendung, ein Verfahren und eine Zusammensetzung der Erfindung verwendet, um die Aktivität und/oder das Niveau eines Fusionsproteins zu überwachen. In bestimmten Ausführungsformen wird die vorliegende Erfindung verwendet um eines oder mehrere des Folgenden zu tun: 1) einen medizinischen Zustand diagnostizieren, einschließlich dem Bereitstellen von Informationen bezüglich des Stadiums eines medizinischen Zustandes; 2) das Ansprechen bzw. eine Reaktion vorhergesagte Reaktion eines Individuums mit einer Erkrankung, oder bei dem vermutet wird, dass es eine Erkrankung hat, vorhersagen oder eine entsprechende Prognose; und 3) das Überwachen der Wirksamkeit des Ansprechens auf eine Therapie.

[0073] In bestimmten Ausführungsformen wird eine erste Sonde, die einen ersten Bereich des Fusionsproteins erkennt, auf einem Substrat immobilisiert. Eine Probe, die das Fusionsprotein enthält oder von der vermutet wird, dass sie das Fusionsprotein aufweisen könnte, wird dem Substrat unter Bedingungen ausgesetzt, unter denen die erste Sonde zumindest einen Teil des ersten Bereichs des Fusionsproteins bindet. Der erste immobilisierte Sonde-Fusionsprotein-Komplex wird dann gegenüber einer zweiten Sonde zum Erkennen des Fusionsproteins ausgesetzt. Dies geschieht unter geeigneten Bedingungen, um die Detektion der zweiten Sonde oder das Binden der zweiten Sonde an den immobilisierten Komplex zu detektieren.

[0074] In einigen Ausführungsformen wird die vorliegende Erfindung zum Detektieren eines beispielhaften Fusionsproteins verwendet, das bei Krebs, wie z. B. Leukämie, eine Rolle spielt. Die Erfinder entwickelten vereinfachte Verfahren zum Messen der Niveaus des beispielhaften Fusionsproteins BCR/ABL und seiner Phosphorylierung. Diese Verfahren können in klinischen Routine-Laboratorien oder sogar für Anschlussuntersuchungen am Patienten verwendet werden. Das Untersuchungsverfahren kann wirksam für Zelllysate-Proben verwendet werden. Die Erfinder haben jedoch zuvor bereits gezeigt, dass Leukämie-Zellen ihre Proteine in den Kreislauf abgeben, wie z. B. cCD20 und cCD52. Daher prüften die Erfinder das Plasma von Patienten mit CML auf die Niveaus von BCR/ABL und dessen Phosphorylierung hin. Dies basiert auf der spezifischen Ausführungsform, dass aufgrund des Umsatzes und des Abbaus von Zellen Proteinkomplexe frei im Plasma oder Serum zirkulieren. Hier zeigen die Erfinder, dass das Plasma von Patienten mit CML eine hervorragende Quelle für das Testen der Niveaus von BCR/ABL-Protein wie auch seiner Phosphorylierung ist, und zwar mit einer Empfindlichkeit, die mit der von BCR-basierten Untersuchungsverfahren zum Messen minimaler residueller Erkrankung vergleichbar ist. Was noch bedeutsamer ist, das beispielhafte BCR/ABL-Protein-Untersuchungsverfahren stellt wertvolle Informationen bezüglich der Kinaseaktivität des BCR/ABL-Proteins bereit.

III. Beispielhafte durch Chromosomen-Translokation erzeugte Fusionsproteine

[0075] Chromosomen-Translokationen treten in vielen verschiedenen Krebsarten auf und die vorliegende Erfindung ist für die Identifizierung jedes Fusionsproteins geeignet, einschließlich aller durch chromosomale Translokation erzeugten Fusionsproteine. In einigen Ausführungsformen zählen zum betreffenden Krebs z. B. Leukämien, Lymphoma, Sarkoma und einige epitheliale Tumoren. Ein Zusammenbruch im normalen Prozess der Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptorgen-Umordnung kann Chromosomen-Translokationen in z. B. Leukämien und Lymphomen verursachen, die anstelle von normalen intrachromosomalen Umordnungen zu interchromosomalen Translokationen führen. Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsproteine, die durch jedwede Chromosomen-Translokation erzeugt werden. In bestimmten Aspekten können diese Fusionsproteine eine tumorspezifische Diagnose, Prognose, ein tumorspezifisches Überwachen einer Therapie und/oder tumorspezifische Angriffspunkte für Therapien, die auf eine Krebszelle zugeschnitten sind, bereitstellen.

[0076] Oft weisen insbesondere hämatopoietische Krebs-Blastzellen von Individuen mit akuter myeloider und lymphoider Leukämie bestimmte chromosomale Translokationen auf, die sich aus Fusionsproteinen ergeben können, die z. B. die normale hämatopoietische Homeostase beeinflussen können. Einige Chromosomen-Bruchpunkte führen zur akuten myeloiden Leukämie (AML), akuten Lymph-Leukämie (akute lymphoide Leukämie, ALL) und chronischer myeloider Leukämie (CML).

[0077] In einer beispielhaften Ausführungsform liegt das Bcr-Abl-Fusionsprotein vor, wie z. B. das Philadelphia (Ph⁺) positive ALL, das stark mit zwei Formen der chimären bcr-abl-Proteine assoziiert ist: P190^{bcr-abl} und P210^{bcr-abl}. In bestimmten Ausführungsformen ergibt sich AML aus t(8;21) und der Fusion AML1/ETO, t(15; 17) und dem Fusionsprotein PML/RAR α , sowie inv(16) und dem Fusionsprotein CBF β /MYH11, was jeweils zu den folgenden bestimmten Typen von AML führt: AML-M2, APL und AML-M4Eo. In weiteren bestimmten Ausführungsformen ergibt sich ALL aus t(9; 22) und dem Fusionsprotein BCR-ABL und t(4; 11) und dem Fusionsprotein MLL/AF4. CML kann sich aus t(9; 22) ergeben. TEL/AML1-Fusionen stehen im Zusammenhang mit Leukämie und sind mittels herkömmlicher Zytogenese, einschließlich des beispielhaften t(12; 21)(p13; q22), schwer zu erkennen. Das t(8; 14) Fusions-Protein, einschließlich des c-myc-Gens, lässt sich mittels der Erfindung ebenfalls angehen.

[0078] Ein weiteres gut studiertes Beispiel für eine durch eine Translokation erzeugte Krebsart findet man im Burkitt-Lymphom. In den meisten Fällen dieses B-Zellen-Tumors lässt sich eine Translokation feststellen, die das Chromosom 8 und eines von drei anderen Chromosomen (2, 14 oder 22) betrifft. In diesen Fällen wird ein Fusionsprotein zwar nicht erzeugt, jedoch wird das c-myc Proto-Onkogen auf dem Chromosom 8 unter die transkriptionelle Kontrolle eines Immunglobulin-Promotors gebracht. In B-Zellen sind Immunglobulinpromoter auf transkriptionaler Ebene sehr aktiv, was zu einer Überexpression von c-myc führt, was aus verschiedenen anderen Systemen für seine onkogenen Eigenschaften bekannt ist. Demzufolge führt diese Translokation zu einer abnormal hohen Expression eines onkogenen Proteins, was fast zwingend die Wurzel des Burkitt Tumors ist.

[0079] Beispiele weitere Translokationsbruchpunkte, die im Zusammenhang mit humanem Krebs stehen, sind u. a. die 14:18-Translokation in Follikel-B-Zellenlymphomen (bcl-2- und Immunglobulin-Gene), die 15:17-Translokation bei akuter promyelocytischer Leukämie (pml- und Retinolsäurerezeptorgene) und die 1:19-Translokation bei akuter Prä-B-Zellenleukämie (PBX-1- und E2A-Gene).

[0080] Bestimmte Fusionen findet man ausschließlich oder stark überwiegend in spezifischen Zelltypen wie z. B. FUS-CHOP in Adipozyten von einem Liposarkom und MLL-MLL3 in myeloiden Zellen einer akuten myeloiden Leukämie. Das PML/RAR-alpha-Protein, das durch die t(15; 17)-Translokation entsteht, kann mittels der Erfindung detektiert werden.

[0081] Der M4E₀-Subtyp der akuten myeloiden Leukämie (AML) kann durch eine chromosomale Abberation verursacht werden, die eine perizentrische Inversion des Chromosoms 16, inv(16), aufweist, die zur Fusion des Gens der β -Untereinheit des Kern-bindenden Faktors (CBFB-Gen, auch bekannt als PEBP2B) am Chromosomenband 16q22 und dem Gen des schweren Polypeptids 1 des Myosions (MYH1-Gen) am Chromosomenband 16p13 führen (das Fusionsprotein davon kann man als CBFB-MYH1 bezeichnen). Im M2-Subtyp von AML kann die t(8; 21) Translokation auftreten, die zur Fusion des AML1-Gens bei Chromosomenband 21q22 und dem myeloiden Translokationsgen auf Chromosom 8 (MTG8) bei Chromosomenband 8q22 führt, wodurch das AML1-MTG8-Fusionsprotein entsteht.

[0082] Zu Leukämiezellen von Patienten mit therapiebezogenen myelodysplastischen Syndromen und therapiebezogener akuter myelogener Leukämie (t-MDS/AML) zählen chimäre Fusionen von t(7; 11) und t(2; 11) von FXFG-Wiederholungen von NUP98 mit der Homöodomäne von HOXA9 bzw. HOXD13. Das inv(11)(p15q22) fusioniert die NUP98 FXFG-Wiederholungen mit DDX10 (Nakamura et al., 1996; Borrow et al., 1996; Raza-Egilmez et al., 1998; Yasuhito et al., 1997). Die t(11; 20)(p15; q11) Chromosomen-Translokation führt zur NUP98-TOP1-Fusion (Ahuja et al., 1999).

[0083] Translokationen in festen Tumoren, wie z. B. t(2; 7); t(4; 9); t(1; 13); t(9; 17) können ebenfalls detektiert werden.

IV. Herstellung des Substrat-Sonden-Komplexes

[0084] In bestimmten Aspekten setzt die vorliegende Erfindung eine Sonde zum Abtrennen eines durch eine Chromosomen-Translokation erhaltenen Fusionsproteins ein. Dabei ist die Sonde an einem Substrat angeheftet bzw. fixiert. In bestimmten Ausführungsformen kann das Substrat jedweder Art sein, solange es zum Anheften von Antikörpern geeignet ist und solange es sich dafür eignet, gegenüber einer Probe ausgesetzt zu werden, die ein durch eine Chromosomen-Translokation erhaltenes Fusionsprotein aufweist oder bei der man vermutet, dass sie ein durch eine Chromosome-Translokation erhaltenes Fusionsprotein aufweisen könnte. In weiteren bestimmten Ausführungsformen ist das Substrat ein Partikel wie z. B. ein Kügelchen. Dieses kann selbst immobilisiert sein oder es kann z. B. ein Mikroarray, eine Mikrotiterplatte oder ein Mikrotiterdeckglaschen sein.

[0085] Das Anheften der Sonden an das Substrat kann durch jedes geeignete Verfahren erreicht werden, solange die Sonden in geeigneter Weise angeordnet sind, so dass ein durch eine Chromosomen-Translokation entstandenes Fusionsprotein erkannt werden kann. Es gibt eine Vielzahl an Verfahren zum Anheften von Sonden an ein Substrat, obwohl in bestimmten Aspekten das Anheften chemischer Art ist. Es kann z. B. eine kovalente Anbindung zwischen dem Antikörper und dem Substrat, eine koordinative Anbindung, sowie auch eine nicht-kovalente Anbindung eingesetzt werden. In weiteren bestimmten Ausführungsformen findet das Anheften des Antikörpers an das Substrat über eine Proteinbindung statt. Andere Mittel zum Anheften, wie z. B. dopelaffine Antikörper oder eine Peptidbindung können z. B. auch verwendet werden.

[0086] Sonden können von jeder geeigneten Art sein, so dass sie in der Lage sind, einen Teil eines Fusionsproteins zu erkennen, obwohl in bestimmten und beispielhaften Ausführungsformen die Sonden Antikörper sind. Weitere Arten von Sonden sind z. B. Proteine, DNA, RNA, Peptide und/oder Kügelchen.

[0087] In einer bestimmten, aber beispielhaften Ausführungsform ist ein Substrat mit einem Antikörper beschichtet.

[0088] Man wird im Allgemeinen das Substrat entweder über Nacht oder für einen spezifischen Zeitraum von z. B. Stunden mit einer Lösung inkubieren, die einen Antikörper aufweist. Die Platte wird dann gewaschen, um das unvollständig adsorbierte Material zu entfernen. Jedwede verbleibenden zugänglichen Oberflächen des Substrats werden dann mit einem unspezifischen Protein "beschichtet", das in Bezug auf das Testantiserum antigenisch neutral ist. Dazu zählen z. B. Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder Lösungen aus Milchpulver. Das Beschichten ermöglicht das Blockieren unspezifischer Adsorptionsstellen auf der Immobilisierungs-Oberfläche. Es verringert dadurch den Hintergrund, der durch ein unspezifisches Binden von Antiserum auf der Oberfläche hervorgerufen wird. Nach dem Binden des Antikörpers an das Substrat, dem Beschichten mit ei-

nem nicht-reaktiven Material zum Verringern des Hintergrundes und Waschen und Entfernen von ungebundenem Material wird das Substrat mit der biologischen Probe in Kontakt gebracht, die bei Bedingungen untersucht werden soll, die eine wirksame Immunkomplex(Fusionsprotein/Antikörper)-Bildung zulassen. Zur Detektion des Immunkomplexes bedarf es dann eines detektierbaren sekundären Bindungsantikörpers, der gegen einen zweiten Bereich des Fusionsproteins gerichtet ist. Der Begriff "unter Bedingungen, die eine wirksame Immunkomplex(Antigen/Antikörper)-Bildung zulassen" bedeutet, dass zu den Bedingungen vorzugsweise das Verdünnen der Probe mit den Fusionsproteinen und/oder den Antikörpern mit einer Lösung, wie z. B. BSA, Rindergammaglobulin (BGG) oder Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS)/Tween zählt. Diese zugefügten Agenzien neigen ebenfalls dazu, zum Verringern des unspezifischen Hintergrundes beizutragen. Die "geeigneten" Bedingungen bedeuten auch, dass die Inkubation bei einer Temperatur oder über einen Zeitraum stattfindet, der ausreicht, um eine wirksame Bindung zu ermöglichen. Inkubationsschritte dauern für gewöhnlich von etwa 1 bis 2 bis 4 Stunden oder vergleichbar. Sie finden bei Temperaturen statt, die bevorzugt im Bereich von 25°C bis 27°C liegen, oder sie können über Nacht bei etwa 4°C oder vergleichbar erfolgen.

[0089] Nach allen Inkubationsschritten wird die kontaktierte Oberfläche gewaschen, um nicht-komplexiertes Material zu entfernen. Eine bevorzugte Waschprozedur schließt das Waschen mit einer Lösung, wie z. B. PBS/Tween oder Boratpuffer ein. Nach der Bildung von spezifischen Immunkomplexen zwischen der Testprobe und dem ursprünglich ungebundenen Material und nachfolgendem Waschen kann das Auftreten von selbst geringsten Mengen an Immunkomplexen bestimmt werden.

V. Detektion von Fusionsproteinen

[0090] In bestimmten Aspekten der Erfindung wird ein durch eine Chromosomen-Translokation entstandenes Fusionsprotein detektiert, wie z. B. aus einer Probe von einem Individuum. Besonders der erste Sonde/Substrat-Komplex wird im Allgemeinen beim Erkennen des entsprechenden zweiten Teils des Fusionsproteins durch die zweite Sonde erkannt. Demnach wird in bestimmten Aspekten die zweite Sonde oder deren Binden an den ersten Sonde/Substrat-Komplex detektiert.

[0091] Die Detektion kann mittels jedes geeigneten Verfahrens erfolgen, solange die zweite Sonde oder ihre Bindung and den Komplex nachweisbar ist. In bestimmten Aspekten ist die Detektion sichtbar, wie z. B. mit dem menschlichen Auge, oder einer Maschine oder beidem. Detektionsverfahren schließen Licht, Radioaktivität, Farbe, Kügelchen oder eine Kombination davon ein. Die Detektion kann in bestimmten Ausführungsformen quantifizierbar sein. Zusätzlich zur Detektion eines bestimmten Fusionsproteins kann die Erfindung verwendet werden, um eine Modifikation zu detektieren, die am Fusionsprotein auftritt, wie z. B. eine Phosphorylierung, eine Glycosylierung, eine Farnesylierung, eine Acetylierung, eine Mutation oder Kombinationen davon.

[0092] Die Detektion des Fusionsproteins kann direkt oder indirekt erfolgen. Zum Beispiel kann eine Markierung auf der zweiten Sonde durch ein anderes Molekül gebunden werden und das andere Molekül selbst wird detektiert.

VI. Detektion von Charakteristika von Fusionsproteinen

[0093] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung werden ein oder mehrere Charakteristika des Fusionsproteins durch eine erste Sonde detektiert, die einen ersten Bereich des Fusionsproteins bindet und/oder durch eine zweite Sonde, die einen zweiten Bereich des Fusionsproteins bindet. In einem bestimmten Aspekt erkennt die Sonde eine bestimmte Domäne, Mutation und/oder Modifikation des Fusionsproteins und in weiteren bestimmten Aspekten ist/sind die Modifikation(en) eine oder mehrere posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Myristoylierung, Farnesylierung, Alkylierung, Glutamylierung, Glycylierung, Isoprenylierung, Lypoylierung, Phosphantetheinylierung, Sulfatierung, Selenierung, Ubiquitinylierung, Citrullinierung, Deiminierung, Deamidatierung und so weiter.

[0094] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist/sind das eine oder die Charakteristika des Fusionsproteins der Gegenstand, zumindest zum Teil, einer Therapie, wie z. B. einer Krebstherapie. In weiteren spezifischen Ausführungsformen ist die besondere Gegenwart oder Abwesenheit des Charakteristikums informativ dafür ob die Therapie oder ob sie nicht ist oder eine resistente Therapie werden kann, einschließlich einer Krebstherapie, die eine resistente Krebstherapie ist.

VII. Detektion der Aktivierung von Fusionsproteinen

[0095] In bestimmten Aspekten der Erfindung detektieren die Verfahren die Aktivierung eines Fusionsprote-

ins. In weiteren Aspekten werden die Informationen, die vom Status der Fusionsproteinaktivierung gesammelt wurden, bei den Entscheidungen bezüglich einer Therapie eingesetzt. In bestimmten Ausführungsformen ist die Aktivierung eines Fusionsproteins aufschlussreich dafür ob eine Krebstherapie von Vorteil ist oder nicht. In bestimmten Aspekten wird der Status der Aktivierung eines Fusionsproteins nach einer oder mehreren Behandlungen, die auf das mit der Aktivierung in Verbindung stehende Charakteristikum abzielen, bestimmt. Zum Beispiel kann ein Kinaseinhibitor für die Krebstherapie verwendet werden. Es ist dann sinnvoll, die Phosphorylierung des Fusionsproteins durch Verfahren der Erfindung zu überwachen. Zusätzlich zur Phosphorylierung können andere Arten von Modifikationen ein Protein aktivieren, einschließlich z. B. der Farnesylierung, Acetylierung und Glycosylierung.

VIII. Proben die das Fusionsprotein umfassen

[0096] In bestimmten Ausführungsformen wird eine Probe, von der bekannt ist, dass sie ein Fusionsprotein aufweist, oder bei der man vermutet, dass sie ein Fusionsprotein aufweisen könnte, einem Substrat ausgesetzt, das eine erste Sonde umfasst, die einen ersten Teil des Fusionsproteins erkennen kann. In bestimmten Aspekten stammt die Probe von einem Individuum, wie z. B. einem Säugetier einschließlich eines Menschen. Die Probe kann von jedweder Art sein, so dass sie die Erkennung des Fusionsproteins durch die erste Sonde erlaubt. Die Probe kann ganze Zellen umfassen. Sie kann auch teilweise oder im Wesentlichen nicht-zellulär sein. Die Probe kann von jedem Gewebe oder jeder Ursprungsstelle in einem Individuum stammen. In bestimmten Ausführungsformen weist die Probe z. B. ein Zellysate, Blut, Plasma, Serum, zerebrospinale Flüssigkeit, Brustwarzenaspirat, Speichel, Urin, Fäkalien, Wangenabstrich, Biopsie usw. auf.

[0097] Proben können von jedem Individuum stammen oder sogar aus einer Sammlung von Proben. Beim Individuum kann bereits Krebs diagnostiziert worden sein oder es mag vermutet werden, dass es Krebs haben könnte oder entwickelt. Die Proben können vom Individuum unter Verwendung jedes geeigneten Mittels, einschließlich einer Spritze, eines Skalpells, eines Tupfers usw. erhalten werden.

IX. Identifizierung und/oder Überwachen einer Erkrankung und/oder Patiententherapie

[0098] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung wird die vorliegende Erfindung zum Identifizieren einer Erkrankung in einem Individuum verwendet, wie z. B. zum Identifizieren von Krebs in einem Individuum, durch Detektieren eines oder mehrerer Fusionsproteine, die dafür charakteristisch sind. Die Erfindung kann ebenfalls zum Identifizieren eines Individuums verwendet werden, das für eine bestimmte Therapie geeignet ist. Beispielsweise kann das Identifizieren eines oder mehrerer bestimmter Fusionsproteine darauf hinweisen, dass das Individuum für eine bestimmte Krebstherapie besonders geeignet ist oder dass es für eine bestimmte Krebstherapie nicht besonders geeignet ist. In bestimmten Aspekten umfasst das Identifizieren eines bestimmten Fusionsproteins das Identifizieren eines Markers, wie z. B. einer oder mehrerer Mutationen und/oder Proteinmodifikationen, die darauf hinweisen, dass das Individuum für eine bestimmte Therapie nicht empfänglich wäre, wie z. B., dass es resistent gegenüber der Therapie ist oder wahrscheinlich eine Resistenz gegenüber der Therapie entwickeln wird. In bestimmten Aspekten wird das Vorhandensein eines Fusionsproteins in einer Probe festgestellt. Die Fusionsproteine im Komplex vom Antikörper/Substratkomplex können auch entfernt werden, um sie einer weiteren Charakterisierung zu unterziehen. Zum Beispiel können die Fusionsproteine in der Probe detektiert werden, obwohl weitere Analysen von repräsentativen Fusionsproteinen aus der Probe oder aus dem Komplex weitere zusätzliche Informationen liefern können, wie z. B. Informationen, die beim Bestimmen oder Überwachen einer Therapie hilfreich sind.

[0099] In zusätzlichen Aspekten wird die vorliegende Erfindung zum Überwachen einer Therapie für einen Patienten verwendet. Zum Beispiel kann in einigen Fällen das Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie entwickeln. Die Erfindung kann zum Identifizieren von Fusionsproteinen verwendet werden, die die Entwicklung einer Resistenz oder das Risiko oder die Empfänglichkeit für die Entwicklung einer Resistenz anzeigen.

X. Quantifizierung eines Fusionsproteins

[0100] In bestimmten Aspekten der Erfindung werden Fusionsproteine quantifiziert, die durch eine Chromosomen-Translokation entstanden sind. In bestimmten Aspekten ist die Quantifizierung des Fusionsproteins hilfreich bezüglich einer Krebsart oder einer Therapie dagegen. Zum Beispiel kann die Quantifizierung aufschlussreich darüber sein, ob eine bestimmte Krebstherapie erfolgreich ist oder nicht. In einigen Aspekten detektiert die Quantifizierung das Fusionsprotein und/oder dessen Aktivierung.

[0101] Die Quantifizierung der Fusionsproteine oder der aktivierten Fusionsproteine kann mittels jedes im Stand der Technik bekannten geeigneten Verfahrens durchgeführt werden. Obwohl bei den bekannten Techniken Proteinfusionen auf Basis eines durchschnittlichen Moleküls pro Kügelchenoberfläche abgeschätzt werden, werden in bestimmten Aspekten der Erfindung die Fusionsproteine oder aktivierten Fusionsproteine mit einem genaueren und repräsentativeren Verfahren quantifiziert. In bestimmten Aspekten wird ein Index identifiziert, der die unterschiedliche Anzahl von Molekülen auf verschiedenen Kügelchen berücksichtigt. Wenn sich dies als Prozentsatz an positiven Kügelchen (Kügelchen mit Molekülen darauf) widerspiegelt, wird es mit dem Faktor multipliziert, der der Anzahl an Molekülen auf jedem Kügelchen entspricht. In bestimmten Ausführungsformen schlägt sich diese Beziehung in der folgenden Formel nieder: Prozentsatz an positiven Kügelchen (basierend auf einem detektierbaren Signal) × mittlerer Anzahl von Molekülen an Kügelchen, die positiv sind (dies kann man als Antikörperbindungskapazität (ABC) bezeichnen) = Anzahl von Molekülen in der Probe.

[0102] Eine Zunahme bei der Anzahl an Fusionsproteinen oder aktivierten Fusionsproteinen, eine Abnahme der Anzahl von Fusionsproteinen oder aktivierten Fusionsproteinen oder keine signifikante Veränderung (wie z. B. eine nicht statistisch signifikante Veränderung) in der Anzahl von Fusionsproteinen oder aktivierten Fusionsproteinen kann bezüglich des Erfolgs einer Krebstherapie aufschlussreich sein. In bestimmten Aspekten weist eine Zunahme der Anzahl von aktivierten Fusionsproteinen und/oder keine signifikante Veränderung bei der Anzahl von aktivierten Fusionsproteinen darauf hin, dass eine Krebstherapie unwirksam ist und dass eine alternative Krebstherapie verwendet werden sollte.

XI. Antikörper

[0103] In bestimmten Aspekten der Erfindung können zwei oder mehrere Antikörper, die gegen nicht identische Bereiche des durch Chromosomen-Translokation entstandenen Fusionsproteins gebildet werden. Beispielhafte Antikörpercharakteristika und Verwendungen werden im Folgenden beschrieben.

A. Verwendung von Antikörpern

[0104] Beim Beschichten eines Substrats mit Antikörpern wird man im Allgemeinen das Substrat mit einer Lösung des Antikörpers inkubieren, entweder über Nacht oder für eine spezifische Anzahl von Stunden. Das Substrat wird dann gewaschen werden, um unvollständig adsorbiertes Material zu entfernen. Jedwede verbliebenen zugänglichen Oberflächen der Vertiefungen werden dann mit einem unspezifischen Protein "beschichtet", das in Bezug auf das Testantiserum antigenisch neutral ist. Zu diesen zählen z. B. Rinderserumalbumin (BSA), Casein oder Lösungen von Milchpulver. Die Beschichtung ermöglicht das Blockieren von unspezifischen Adsorptionsstellen auf der Immobilisierungs-Oberfläche und verringert dadurch den Hintergrund, der durch unspezifische Bindung von Antiserum auf der Oberfläche entsteht.

[0105] Zu immunbindenden Verfahren zählen auch Verfahren zum Detektieren und Quantifizieren der Menge eines Fusionsproteins in einer Probe sowie das Detektieren und Quantifizieren eines Immunkomplexes, der während des Bindungsvorgangs gebildet worden ist. In diesem Fall kann man eine Probe gewinnen, von der vermutet wird, dass sie das Fusionsprotein enthalten könnte und die Probe mit einem Antikörper in Kontakt bringen, der gegen einen ersten Bereich des Fusionsproteins gerichtet ist. Dann kann die Menge des Immunkomplexes, der unter bestimmten Bedingungen gebildet wird, detektiert und quantifiziert werden.

[0106] In Bezug auf die Antigendetektion kann die zu analysierende biologische Probe jede Probe sein, bei der man vermutet, dass sie ein Fusionsprotein aufweist, wie z. B. ein Gewebsschnitt, ein Exemplar oder ein Probenstück, ein homogenisierter Gewebeextrakt, eine Zelle, eine Organelle, abgetrennte und/oder gereinigte Formen jedweder der oben genannten Antigen-enthaltenen Zusammensetzungen oder sogar irgendeine biologische Flüssigkeit, die mit der Zelle oder dem Gewebe in Kontakt kommt, einschließlich z. B. Blut, Plasma, Urin, zerebrospinale Flüssigkeit und/oder Serum umfasst.

[0107] Das Inkontaktbringen der ausgewählten biologischen Probe mit dem Antikörper unter wirksamen Bedingungen und über einen Zeitraum, der ausreicht, um die Bildung von Immunkomplexen (primäre Immunkomplexe) zu ermöglichen, kann im Allgemeinen dadurch bewirkt werden, dass die Antikörperzusammensetzung einfach zur Probe gegeben wird und das Gemisch für einen Zeitraum inkubiert wird, der lang genug ist, damit die Antikörper mit irgendeinem vorhandenen Fusionsprotein Immunkomplexe bilden können, d. h. daran binden können. Danach wird das Substrat, das die Proben-Antikörperzusammensetzung aufweist, im Allgemeinen gewaschen, um jegliche unspezifisch gebundenen Antikörperformen zu entfernen. Dadurch wird nur solchen Antikörpern ermöglicht, detektiert zu werden, die spezifisch im primären Immunkomplex gebunden sind.

[0108] Im Allgemeinen ist die Detektion der Immunkomplexbildung im Stand der Technik gut bekannt und kann durch den Einsatz verschiedener Vorgehensweisen leicht erreicht werden. Diese Verfahren basieren im Allgemeinen auf der Detektion einer Markierung, wie eines Anhängsels, auf dem zweiten Antikörper. Dabei kann es sich z. B. um einen der radioaktiven, fluoreszierenden, biologischen und enzymatischen Anhängsel handeln. U.S. Patente, die die Verwendung solcher Markierungen betreffen, schließen ein: 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 und 4,366,241. Selbstverständlich können sich durch die Verwendung eines zweiten Bindungsliganden, wie z. B. eines zweiten Antikörpers und/oder einer Biotin/Avidin Liganden-bindenden Anordnung, wie es dem Fachmann bekannt ist, zusätzliche Vorteile ergeben.

B. Antikörpercharakteristika und Herstellung von Antikörpern

[0109] Der Begriff „Antikörper“ wird, wenn hier verwendet, grundsätzlich im weitesten Sinne verstanden. Er umfasst jedes immunologische oder immunologisch einsetzbare Bindungsreagenz wie ein Immunglobulin oder Fragmente davon, solange sie eine gewünschte biologische Wirkung zeigen, sowie proteinöse Bindungsmoleküle mit Antikörperfunktion. Immunglobuline sind beispielsweise IgG, IgM, IgA, IgD oder IgE. In einigen Ausführungsformen ist die Verwendung von IgG und IgM vorteilhaft, da dies in vielen physiologischen Situationen die gängigsten Immunglobuline sind und da sie im Labormaßstab in der Regel am einfachsten herzustellen sind.

[0110] Der Begriff „Antikörper“ betrifft unter anderen ein Immunglobulin-ähnliches Molekül mit einem Antigenbindungsbereich. Der Begriff umfasst monoklonale oder polyklonale Immunglobuline, eine Immunglobulinzusammensetzung mit polyepitoper Spezifität, einen bispezifischer Antikörper, oder ein einkettiges Molekül. Zu Antikörperfragmenten zählen z. B. Immunglobulinfragmente wie Fab', Fab und F(ab')₂. Auch sogenannte Glubodies, Diabodies, ein Triabodies, Decabodies und andere Domänenantikörper (engl. DAB), Einzeldomänen-(engl. single domain)Antikörper, Fv, scFv (einzelnkettige Fv) und ähnliche Moleküle sind Beispiele geeigneter Antikörper. Techniken zur Herstellung und Charakterisierung von Immunglobulinen sind dem Fachmann gut bekannt (siehe z. B. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[0111] Monoklonale Antikörper (MAK, engl. MAb) sind Immunglobuline, denen vom Fachmann bestimmte Vorteile zugeschrieben werden, z. B. Reproduzierbarkeit und Herstellbarkeit im großen Maßstab. Ihre Verwendung kann in vielen Ausführungsformen vorteilhaft sein. Der Begriff „monoklonaler Antikörper“ bezieht sich, wenn hier verwendet, auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern geronnen wird, d. h. die individuellen Antikörper der Population sind bis auf mögliche natürlich vorkommende Mutationen, die in kleinen Mengen vorhanden sein können, identisch. Monoklonale Antikörper sind typischerweise Immunglobuline. Die Erfindung betrifft unter anderem monoklonale Antikörper, die z. B. von Menschen-, Maus-, Affen-, Ziegen-, Ratten-, Hamster-, Kaninchen- oder Huhn-Herkunft sind. In der Praxis werden oft murine (d. h. mit Maus-Herkunft) Antikörper eingesetzt werden, da sie sich besonders leicht herstellen lassen und die benötigten Reagenzien gut verfügbar sind.

[0112] In einigen Ausführungsformen können auch sog. „humanisierte“ Antikörper (eng. humanized antibodies) in der Form von chimären Antikörpern eingesetzt werden. Solche chimären Antikörper sind in der Regel Immunglobuline bzw. aus Immunglobulinen erzeugt. Sie können z. B. aus Maus, Ratte oder einer anderen Tierart stammen und eine Domäne mit einem konstanten und/oder eine variablen Bereich humanen Ursprungs aufweisen, entsprechende bispezifische Antikörper, rekombinante, bearbeitete oder künstlich hergestellte Antikörper oder Antikörperfragmente sein. Auch Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die z. B. für die Zahnerkrankung eines Patienten „maßgeschneidert“ sind, sind dem Fachmann bekannt. In einigen Ausführungsformen können auch derartige Antikörper eingesetzt werden.

[0113] Verfahren zur Herstellung monoklonaler Immunglobuline beginnen üblicherweise mit ähnlichen Techniken wie Verfahren zur Herstellung polyklonaler Immunglobuline. Kurz zusammengefasst, wird ein polyklonales Immunglobulin durch Immunisieren eines Tiers mit einer LEE- oder CEE-Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung und hergestellt, indem dem immunisierten Tier Antiserum abgenommen wird.

[0114] Ein großer Bereich an Tierarten kann zur Herstellung eines Antiserums eingesetzt werden. Typische Beispiele von Tieren, die zur Herstellung von Antiseren eingesetzt werden, sind ein Kaninchen, eine Maus, eine Ratte, ein Hamster, ein Meerschweinchen und eine Ziege. Bei der Auswahl der Tierart können Gesichtspunkte wie eine einfache Handhabung, Kosten oder die gewünschte Menge an Serum berücksichtigt werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0115] Wie dem Fachmann auch bekannt ist, kann die immunogene Aktivität einer bestimmten Immuno-

gen-Zusammensetzung dadurch erhöht werden, dass unspezifische Stimulatoren der Immunantwort eingesetzt werden, auch als Hilfsstoffe oder Adjuvantien bezeichnet. Zu geeigneten Adjuvantien zählen alle zulässigen immunstimulatorischen Verbindungen wie Zytokine, Chemokine, Kofaktoren, Toxine, Plasmodien, synthetische Zusammensetzungen oder LEEs oder CEEs, die für solche Adjuvantien kodieren.

[0116] Beispiele geeigneter Adjuvantien, die eingesetzt werden können, sind IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -Interferon, GMCSP, BCG, Albuminhydroxid, MDP-Verbindungen wie N-Acetylmuramyl-L-threonyl-D-isoglutamin (thur-MDP), N-Acetyl-desmethylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (nor-MDP), Muramyltripeptid-phosphatidylethanolamin (MTP-PE, CGP), der als „Lipid A“ bekannte Endotoxinbestandteil und Monophosphoryl-Lipid A (MPL). Weitere Beispiele sind RIBI, das drei aus Bakterien extrahierte Bestandteile enthält, MPL, Trehalose-dimycolinsäure (TDM) und Zellwandskelett in einer 2% Squalen/Tween 80-Emulsion. Auch Antigene des Haupt-(oder Mayor)Histokompatibilitätskomplexes (MHC-Antigene) können in einigen Ausführungsformen eingesetzt werden. Beispielfhaft zählen zu oft bevorzugten Adjuvantien komplettes Freund-Adjuvans (ein unspezifischer Stimulator der Immunantwort, der abgetötetes Mycobakterium tuberculosis enthält), inkomplettes Freund-Adjuvans und Aluminiumhydroxid-Adjuvans.

[0117] Die Menge an Immunogen-Zusammensetzung, die bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet wird, hängt von der Art des Immunogens und dem zur Immunisierung eingesetzten Tier ab. Eine Vielzahl an Zugangswegen kann zur Verabreichung des Immunogens verwendet werden, wie z. B., aber nicht beschränkt auf, subkutan, intramuskulär, intradermal, intraepidermal, intravenös und intraperitoneal. Die Herstellung polyklonaler Antikörper kann überwacht werden, indem zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung Blutproben des immunisierten Tiers entnommen werden.

[0118] Auch eine zweite Dosis, eine Auffrischungsdosis (z. B. in Form einer Injektion verabreicht) kann gegeben werden. Der Vorgang des Auffrischens und der Titerbestimmung wird wiederholt, bis ein geeigneter Titer erreicht ist. Wenn ein geeignetes Niveau an Immunogenität erhalten worden ist, kann man das immunisierte Tier ausbluten lassen und das Serum isoliert und gelagert werden oder das Tier kann zur Herstellung monoklonaler Antikörper eingesetzt werden.

[0119] Zur Herstellung polyklonaler Kaninchenantikörper kann man das Tier beispielsweise durch eine Ohrvene oder durch kardiale Punktur ausbluten lassen. Das entnommene Blut lässt man koagulieren. Es wird dann zentrifugiert, um Serumbestandteile von ganzen Zellen und Blutgerinnseln zu trennen. Das so gewonnene Serum kann dann direkt für verschiedene Verwendungen eingesetzt werden. Mittels dem Fachmann gut bekannter Verfahren kann auch eine gewünschte Immunglobulinfraktion gereinigt werden, z. B. durch Affinitätschromatographie mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, eines an eine Festmatrix gebundenen Peptids oder durch z. B. Protein A- oder Protein G-Chromatographie.

[0120] Monoklonale Antikörper lassen sich leicht durch Einsatz gut bekannter Techniken gewinnen, wie sie z. B. in U.S.-Patent 4,196,265 beschrieben sind. Zu einer solche Technik gehört typischerweise eine Immunisierung eines geeigneten Tiers mit einer ausgewählten Immunogen-Zusammensetzung, z. B. ein gereinigtes oder teilweise gereinigtes Protein, Polypeptid, Peptid oder eine gereinigte oder teilweise gereinigte Domäne. Dabei kann es sich um eine Wildtyp-Zusammensetzung oder eine Mutantenzusammensetzung oder ein Gemisch davon handeln. Die Zusammensetzung zum Immunisieren wird in einer Weise verabreicht, die darin wirksam ist, Antikörper-produzierende Zellen zu stimulieren.

[0121] Die Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper beginnen im Allgemeinen auf ähnliche Weise wie solche zur Herstellung polyklonaler Antikörper. Nagetiere wie Mäuse und Ratten können beispielsweise eingesetzt werden, auch Kaninchen, Schafe oder Froschzellen sind geeignete Beispiele. Die Verwendung von Ratten kann in einigen Ausführungsformen bestimmte Vorteile haben (Goding, 1986, Seiten 60, 61). Oft werden jedoch Mäuse bevorzugt sein, insbesondere die BALB/c-Maus, da sie am stärksten routinemäßig eingesetzt wird und im Allgemeinen einen höheren Prozentsatz stabiler Fusionen ergibt.

[0122] Den Tieren werden Antigene injiziert, in der Regel wie oben beschrieben. Das Antigen wird mit dem Adjuvans gemischt, wie komplettes Freund-Adjuvans oder inkomplettes Freund-Adjuvans. Wiederauffrischungs-Gaben mit dem gleichen Antigen oder mit einer Nukleinsäure wie DNA, die das Antigen kodiert, erfolgt typischerweise in Abständen von etwa zwei Wochen.

[0123] Bestimmte Beispiele von Antikörperkonjugaten sind solche Konjugate, in denen der Antikörper mit einer detektierbaren Markierung, z. B. in Form eines Anhängsels, versehen ist. Solche detektierbaren Markierungen sind Verbindungen und/oder Elemente, die sich auf Grund ihrer spezifischen Eigenschaften und/oder

chemischer Charakteristika nachweisen lassen. Die Verwendung einer solchen Markierung erlaubt es, den Antikörper, der mit ihr versehen ist, zu detektieren sowie/oder, wenn gewünscht, zu quantifizieren. Ein weiteres Beispiel ist die Bildung eines Konjugats, das einen Antikörper aufweist, der an ein zytotoxisches Agens oder an einen Anti-Zell-Wirkstoff gekoppelt ist. Ein solches Konjugat kann auch als „Immuntoxin“ bezeichnet werden.

[0124] Antikörperkonjugate können z. B. als diagnostische Reagenzien verwendet werden. Reagenzien zur Antikörperdiagnostik lassen sich grob in zwei Klassen unterteilen, nämlich in solche zur in vitro Diagnostik und solche zur in vivo Diagnostik. Reagenzien zur in vitro Diagnostik finden in einer Vielzahl von immunologischen Untersuchungsverfahren Verwendung. Reagenzien zur in vivo Diagnostik werden typischerweise in Protokollen verwendet, die unter dem Begriff „Antikörper-gerichtete Bildgebung“ (engl. „antibody directed imaging“) bekannt sind.

[0125] Viele geeignete Bildgebungsmittel sind dem Fachmann bekannt wie auch Verfahren zu ihrer Verknüpfung mit Antikörpern (siehe z. B. US-Patente Nr. 5,021,236, 4,938,948 und 4,472,509). Bildgebungssubstanzen und -substanzteile können z. B. paramagnetische Ionen, radioaktive Isotope, Fluorochrome, durch NMR nachweisbare Verbindungen und Verbindungen der Röntgenbildgebung sein.

[0126] Im Falle von paramagnetischen Ionen sind besonders Ionen wie Chrom (III), Mangan (II), Eisen (III), Eisen (II), Kobalt (II), Nickel (II), Kupfer (II), Neodymium (III), Samarium (III), Ytterbium (III), Gadolinium (III), Vanadium (II), Terbium (III), Dysprosium (III), Holmium (III) und/oder Erbium (III) erwähnenswert. Dabei wird in vielen Fällen Gadolinium besonders geeignet sein. Ionen, die in verwandtem Zusammenhang wie Röntgenbildgebung hilfreich sind, sind beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Lanthan (III), Gold (III), Blei (II) und insbesondere Wismut (III).

[0127] Im Fall radioaktiver Isotope zur therapeutischen und/oder diagnostischen Anwendung wären beispielsweise zu erwähnen Astatin 211, 14 Kohlenstoff, 51 Chrom, 36 Chlor, 57 Cobalt, 58 Cobalt, Kupfer 67, 152 Eu, Gallium 67, Tritium (3 Wasserstoff), Jod 123, Jod 125, Jod 131, Indium 111, 59 Eisen, 32 Phosphor, Rhenium 186, Rhenium 188, 75 Selen, 35 Schwefel, Technicium 99 m und/oder Yttrium 90. 125I wird in manchen Ausführungsformen bevorzugt und Technizium 99 m und/oder Indium 111 sind auf Grund ihrer niedrigen Energie und Eignung zur Detektion über im Verhältnis längere Distanzen auch oft vorteilhaft. Radioaktiv markierte monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung können gemäß gut bekannter Verfahren des Stands der Technik hergestellt werden. Monoklonale Antikörper können z. B. durch Kontakt mit Natrium- und/oder Kaliumiodid und einem chemischen Oxidationsmittel wie Natriumhypochlorit oder einem enzymatischen Oxidationsmittel wie Lactoperoxidase iodiert werden. Monoklonale Antikörper gemäß der Erfindung können z. B. durch einen Ligandenaustauschprozess mit Technetium 99 m markiert werden. Dies kann beispielsweise erfolgen, indem Pertechnat mit einer Zinnlösung reduziert wird, indem das reduzierte Technetium auf eine Sephadex-Säule chelatisiert wird und indem die Säule mit diesem Antikörper beschickt wird. In manchen Ausführungsformen können auch Direktmarkierungstechniken, also Techniken des „direct labeling“, eingesetzt werden. Als illustratives Beispiel sei eine Inkubation des Antikörpers mit Pertechnat, einem Reduktionsmittel wie SnCl₂ und einer Pufferlösung wie etwa einer Natrium/Kalium-Phtalatlösung genannt. Zu vermittelnden funktionellen Gruppen, die oft eingesetzt werden, um Radioisotope, die als Metallionen vorliegen, an einen Antikörper zu binden, zählen Diethylentriaminopentaessigsäure (DTPA) oder Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA).

[0128] Zu den Fluoreszenzfarbstoffen, die zur Verwendung als Konjugate eingesetzt werden können, zählen z. B. Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Kaskadenblau (engl. „Cascade Blue“), Cy3, Cy5, 6-FAM, Fluoreszein-Isotiocyanat, HEX, 6-JOE, Oregon Grün 488, Oregon Grün 500, Oregon Grün 514, Pazifik-Blau, REG, Rhodamin Grün, Rhodamin Rot, Renographin, ROX, TAMRA, TET, Tetramethylrhodamin, und/oder Texas Rot.

[0129] Ein weiteres Beispiel einer Form von im Rahmen der Erfindung geeigneten Antikörperkonjugaten sind Konjugate, die vorwiegend zum Einsatz in-vitro vorgesehen sind. Bei solchen Konjugaten ist der Antikörper mit einem zweiten Bindungsliganden und/oder mit einem Enzym (einem Enzym-Anhängsel) verknüpft, welches beim Kontakt mit einem chromogenen Substrat ein farbiges Produkt erzeugt. Beispiele geeigneter Enzyme sind Urease, alkalische Phosphatase, (Meerettich-)Wasserstoffperoxidase oder Glukoseoxidase. Beispiele geeigneter sekundärer Bindungsliganden sind Biotin und/oder Avidin und Streptavidin-Verbindungen. Der Einsatz solcher Markierungen ist dem Fachmann gut bekannt und z. B. in den U.S.-Patenten 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 und 4,366,241 beschrieben.

[0130] Wie oben erwähnt, fallen unter den Begriff „Antikörper“ auch proteinöse Bindungsmoleküle mit Anti-

körperfunktion. Zu solchen proteinösen Bindungsmolekülen zählen z. B. ein Protein, das auf dem Ankyrin- oder Krystallingerüst (WO 2001/04144) basiert, die von Skerra (2000) beschriebenen Proteine, ein AdNectin, ein Tetranectin, ein Avimer oder ein Peptoid. Ein Avimer enthält sog. A-Domänen, die als Abfolge mehrfacher Domänen in verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren vorhanden sind. Adnectine entstammen einer Domäne des humanen Fibronectins und enthalten drei Schleifen, die so konstruiert werden können, dass sie ähnlich einem Immunglobulinmolekül an ein Zielmolekül binden. Auch Tetranectine, die dem entsprechenden humanen homotrimeren Protein entstammen, enthalten Schleifenbereiche in einer Lectindomäne vom C-Typ, die für eine gewünschte Bindung konstruiert werden können. Peptide, die als Proteinliganden fungieren können, sind oligo(N-alkyl) Glycine, die sich von Peptiden dadurch unterscheiden, dass ihre Seitenkette mit dem Amid-Stickstoffatom verbunden ist und nicht mit dem α -Kohlenstoffatom. Peptide sind typischerweise gegen Proteasen und andere modifizierende Enzyme beständig und können eine deutlich höhere Zellgängigkeit zeigen als Peptide (siehe z. B. Kwon & Kodadek, 2007).

Beispiele

[0131] Die folgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung von Ausführungsformen der Erfindung. Der Fachmann wird zu schätzen wissen, dass die in den Beispielen offenbarten Techniken solche Techniken darstellen, die von den Erfindern als im Rahmen der Erfindung gut funktionierend befunden wurden. Sie können somit als bevorzugte Ausführungsformen für den Einsatz der verwendungen und Verfahren der Erfindung angesehen werden. Im Licht der vorliegenden Offenbarung sollte der Fachmann jedoch würdigen, dass viele Änderungen an den jeweiligen Ausführungsformen vorgenommen werden können, mit denen die gleichen oder ähnliche Ergebnisse erzielt werden können und die im Umfang der Erfindung liegen.

Beispiel 1

[0132] Die folgenden Materialien und Verfahren wurden bei der Erfindung eingesetzt, obwohl Änderungen im Rahmen des Umfangs der Erfindung möglich sind und vom Fachmann vorgenommen werden können.

[0133] Plasma wurde von Patienten mit CML gewonnen, die mit Gleevec im Rahmen eines vom IRB genehmigten Protokolls behandelt wurden. Als Kontrolle wurde auch peripheres Blut von 96 gesunden Probanden entnommen, nachdem in Anschluss an eine Aufklärung über die Instituts-Richtlinien deren Einverständnis gegeben wurde. Proben peripheren Bluts vor Behandlung, sowie nach 3 Monaten, nach 6 Monaten und nach 12 Monaten wurden soweit möglich genommen. Alle Proben wurden in EDTA(Etyhlendiaminotetraacetat)-Probenröhrchen gesammelt. Die Diagnose von CML wurde auf der Basis klinischer Befunde, der Cytogenese, FISH-Untersuchungen und einer RT/PCR-Analyse erstellt.

[0134] Carboxylierte Polystyrolkugelchen (Gang Laboratories, Inc., Fishers, Indien) wurden mit Antikörpern gegen das BCR-Protein beschichtet, wie vom Hersteller empfohlen und gemäß der Protokolle des Herstellers. Proben, Plasma oder Lysat wurden 1:50 in PBS verdünnt, das 5% BSA enthielt. Es wurde für 4 Minuten mit 2% SDS (Natriumdodecylsulfat) bei 96°C denaturiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 13.000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Mischen mit konjugierten Kugelchen inkubiert. Die Kugelchen wurden dann insgesamt dreimal mit PBS/5% BSA gewaschen und in 600 μ l der gleichen Lösung resuspendiert. Jede Probe wurde dann wie folgt weiter in drei Aliquots geteilt: ein Aliquot für die Bestimmung des Gesamt-BCR/ABL, eines für die Bestimmung des Phospho-ABL (Thr 735) und eines für die Bestimmung des Phospho-ABL (Thr 245). Zu jedem Aliquot wurden 5 μ l des entsprechenden Antikörpers gegeben. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kugelchen wurden dann dreimal mit PBS/5% BSA gewaschen und in 5% BSA in PBS resuspendiert. Zehn μ l von 1:1 PE-markierten Ant-Kaninchen-Antikörper aus Ziege (Maus- und human-adsorbiert) wurden zugegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen, das 5% BSA und 2% Nartiumazid enthielt, und in 500 μ l 5% BSA in PBS resuspendiert. Die Proben wurden mittels der BD FACSCanto-Durchflußzytometrie-Plattform analysiert.

[0135] Um das Signal zu quantifizieren, wurde das QuantiBrite-System (Becton Dickinson & Company, San Jose, CA) eingesetzt. Dies ermöglichte es, einheitlich die Intensität der Färbung auf der Kugelchenoberfläche zu bestimmen, da eine 1:1-PE-Markierung eingesetzt wurde. Zur Einstellung auf den Prozentsatz an Kugelchen, die positiv waren, setzten die Erfinder die folgende Formel ein: Prozent Positive \times Moleküle auf der Oberfläche jedes Kugelchens = Anzahl der Moleküle/100 Kugelchen/10 μ l Plasma. Diese Einheit wird in diesen Messungen als künstliche Einheit verwendet. In jedem Untersuchungsansatz wurde die gleiche Anzahl an Kugelchen verwendet.

Beispiel 2

Spezifität des Untersuchungsverfahrens

[0136] Im folgenden Beispiel wurde die Spezifität des Untersuchungsverfahrens geprüft. K-562-Zellysat wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Plasma aus Normal-Kontrollen zeigte kein signifikantes Signal und wurde als Hintergrundkontrolle eingesetzt. K 562-Lysat sowie Plasma von Patienten mit CML zeigten ein signifikant über den Negativkontrollen liegendes Signal ([Fig. 1](#)).

[0137] Plasmaproben von sechshundneunzig normalen Patienten wurden untersucht. Alle Proben ergaben ein negatives Ergebnis, was die Spezifität des Untersuchungsverfahrens bestätigte. Zusätzlich wurden 20 AML-Proben untersucht. Sie zeigten kein signifikant über der normalen Negativkontrolle liegendes Signal. Um weiterhin die Empfindlichkeit des Untersuchungsverfahrens zu prüfen, wurden Verdünnungen von K 562-Zellen in normalen Plasma zunächst denaturiert, um Zellproteinbestandteile im Plasma zu dispergieren, bevor sie dann analysiert wurden. Die Empfindlichkeit des Untersuchungsverfahrens lässt sich bis zu 10 Zellen pro Milliliter Plasma demonstrieren ([Fig. 2](#)).

[0138] Basierend auf fünf Wiederholungsuntersuchungen verschiedener Verdünnungen lag der CV-Wert (Prozentwert der Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert) der Untersuchung bei 10%. Um die Stabilität der Plasmaproben zu untersuchen, wurden K 562-Lysate in Plasma verdünnt. Sie waren für bis zu 72 Stunden stabil und auch Patientenproben waren für bis zu 72 Stunden stabil (Tabelle 1).

Tabelle 1: CV-Werte bei der Prüfung der Stabilität

Probe	Abl	p-Abl (Thr 735)	p-Abl (Tyr 245)	Verh. p-Abl (Thr): Abl	Verh. p-Abl (Tyr): Abl
Tag 1	789182	219480	556068	0,28	0,70
Tag 2	813776	243950	395736	0,30	0,49
Tag 3	689216	193680	422606	0,28	0,61
Tag 4	728411	210864	480260	0,29	0,66
Tag 5	615614	210780	433657	0,34	0,70
MW	727239,8	215750,80	457665,40	0,30	0,63
Std	79424,26	18335,84	62917,41	0,03	0,09
CV%	10,92	8,50	13,75	8,76	14,30

MW = Mittelwert; Verh. = Verhältnis

[0139] Um die Reproduzierbarkeit und die Präzision des Untersuchungsverfahrens zu prüfen, testeten die Erfinder K 562-Zellysat aus einer Kultur in fünf verschiedenen Experimenten.

[0140] Die Indexwerte sowie das Verhältnis von phosphoryliertem BCR/ABL-Protein zu Gesamt-BCR/ABL-Protein wurde untersucht. Alle CV-Werte lagen unter 10 Prozent. Dies wies eine hervorragende Genauigkeit des Untersuchungsverfahrens aus. Weiterhin wurde die Stabilität des Untersuchungsverfahrens über einen Zeitraum von 96 Stunden geprüft, indem K 562-Lysat aus einer Kultur mit den gleichen Kriterien wie bei der Präzisionsprüfung untersucht wurde. Auch hier zeigte das Untersuchungsverfahren mit CV-Werten unter 15 Prozent eine hervorragende Stabilität mit der Zeit.

Beispiel 3

Ex vivo-Überwachungswirkungen von Kinaseinhibitoren

[0141] Die Ergebnisse der Arzneimittelbehandlung in der Zellkultur weisen auf eine hervorragende klinische Brauchbarkeit zum Überwachen von Therapien hin ([Fig. 3](#)). Eine Behandlung mit niedriger Dosierung des Kinase-Inhibitors AMN107 (Novartis, Cambridge, MA; USA) zeigte eine 1,32(Thr)- und 1,42(Tyr)-fache Abnahme im Vehikel, während eine Behandlung mit hoher Dosierung (5,0 µM) eine 4,01(Thr)- und 9,30(Tyr)-fache Abnahme im Vehikel zeigte. In allen Fällen zeigte sich in Folge der Behandlung eine Abnahme der Aktivität. Ebenso zeigte eine Behandlung mit Gleevec in niedriger Dosierung (0,5 µM) ähnliche Ergebnisse mit einer 1,91(Thr)-

und 1,62-fachen Abnahme. Auch zeigte Gleevec in hoher Dosierung (5,0 μ M) ähnliche Ergebnisse mit einer 4,32(Thr)- und 4,62(Tyr)-fachen Abnahme im Vehikel als Ergebnis der Behandlung. Zelllysate der K 562-Zelllinie vor und nach Behandlung mit Gleevec (0,5 und 5,0 μ g) mit einem neuen Kinaseinhibitor (AMN107) zeigte eine signifikante Abnahme in der relativen Phosphorylierung von BCR/ABL (Tabelle 2).

Tabelle 2: Veränderungen (-fach) mit Gleevec und Kinaseinhibitoren

Probe	Verhältnis Thr:gesamt	Abnahme, -fach	Verhältnis Tyr:gesamt	Abnahme, -fach
Vehikel	0,36		0,53	
AMN niedrig	0,27	1,32	0,37	1,42
AMN hoch	0,09	4,01	0,06	9,30
Gleevec niedrig	0,19	1,91	0,32	1,62
Gleevec hoch	0,08	4,32	0,11	4,92
Normal	0,00		0,00	
PBS	0,00		0,00	

[0142] [Fig. 4](#) zeigt ein Beispiel von Veränderungen im Phospho-BCR-Abl (Tyr) im Lysat von K 562-Zellen nach Behandlung mit AMN107.

Beispiel 4

Überwachung von mittels Therapie behandelter Patienten

[0143] Mit Gleevec behandelte Patienten wurden vor und während der Medikation untersucht. Wie vermutet war das BCR/ABL-Protein in der Diagnose hoch und die Niveaus nahmen im Laufe der Therapie signifikant ab und zwar in einer Weise, die der in der RT-PCR beobachteten Abnahme glich. Daher kann das BCR/ABL-Protein im Plasma als alternatives Verfahren zum PCR-basierten Untersuchungsverfahren eingesetzt werden.

[0144] Die Proteinanalyse hat einen CV-Wert von etwa 6%, im Gegensatz zu den CV-Werten bei den meisten quantitativen PCR-Untersuchungsverfahren, die größer als 20% sind. Daher ist das BCR/ABL-Protein-Untersuchungsverfahren in zumindest einigen Ausführungsformen der Erfindung verlässlicher in der Detektion und Überwachung der minimalen residualen Erkrankung. Die Erfinder bestimmten ebenso auch die Änderungen des Niveaus des phosphorylierten BCR-ABL, das ein ähnliches Muster zeigte.

[0145] [Fig. 6](#) zeigt Veränderungen der Phospho(Tyr)-BCR-ABL-Proteinwerte bei CML-Patienten unter Gleevec.

[0146] Von 33 in drei Monaten untersuchten Proben waren beim Einsatz von PCR mittels peripherer Blutzellen 5 negativ. Sie waren im Protein-Untersuchungsverfahren alle positiv, das mit Plasma durchgeführt wurde ([Fig. 7](#)). Im BCR/ABL-Protein-Untersuchungsverfahren waren 5 Proben negativ, die alle in der PCR mittels peripherer Blutzellen positiv waren. Im Gegensatz dazu wurden im 6., im 9. und im 12. Monat der Therapie 32 Proben genommen. Davon waren 10 Patienten beim Einsatz von PCR mittels peripherer Blutzellen negativ. Von diesen Proben waren 6 im Protein-Untersuchungsverfahren, durchgeführt mit Plasma, negativ. Insgesamt gab es 9 Patienten mit negativem Ergebnis im Plasma-Protein-Untersuchungsverfahren, von denen 5 in der PCR, durchgeführt mit peripheren Blutzellen, negativ waren. Diese Daten zeigen, dass die Empfindlichkeit beider Untersuchungsverfahren bei 6, 9 und 12 Monaten mit Gleevec-Therapie ähnlich ist.

[0147] Tabelle 3 zeigt die Empfindlichkeit des BCR/ABL-Protein-Untersuchungsverfahrens mit Plasma im Vergleich zum RT-PCR-Verfahren mit Zellen.

Tabelle 3: Empfindlichkeit des Protein-Untersuchungsverfahrens vs. RT-PCR

Nach 3 Monaten			Nach 6, 9, 12 Monaten (32)		
	PCR+	PCR-		PCR+	PCR-
P Protein, neg #5	5	0	P Protein neg #9	4	5
	Protein+	Protein-		Protein+	Protein-
PCR neg #5	5	0	PCR neg #10	4	6

= Anzahl

[0148] Diese Proteinanalyse lässt einen Vergleich der Phosphorylierung zu. Insgesamt zeigte die BCR/ABL-Phosphorylierung ein ähnliches Muster in der Abnahme. Proben von Patienten, die mit Gleevec behandelt worden waren und nach RT-PCR ein relativ hohe Krankheitsniveau hatten (Verhältnis von BCR-ABL:ABL-mRNA > 0,05) hatten jedoch im Vergleich zu Patienten mit laut RT-PCR relativ niedrigem Krankheitsniveau (Verhältnis von BCR-ABL:ABL-mRNA < 0,05) keine signifikante Abnahme der Phosphorylierung. Es lässt sich eine schwächere Abnahme von Phospho-BCR-ABL in Patienten mit höheren Niveaus in der PCR (> 0,05) beobachten. [Fig. 8](#) zeigt nach 3 Monaten das Fehlen einer signifikanten Abnahme in der Phosphorylierung bei auf Gleevec schlecht ansprechenden Patienten.

[0149] [Fig. 9](#) zeigt, dass nach 3 Monaten ein gutes Ansprechen auf Gleevec und eine deutlichere Abnahme der Phosphorylierung (P = 0,01) miteinander einhergehen. In Patienten mit niedrigerer PCR (< 0,05) lässt sich eine Abnahme des Phospho-BCR-ABL beobachten.

[0150] [Fig. 10](#) zeigt eine deutlichere Abnahme der BCR-ABL-Phosphorylierung, wenn Patienten mit CML mit 600 mg AMN107 behandelt werden, verglichen mit Patienten mit 400 mg.

[0151] [Fig. 11](#) zeigt eine Tabelle, die eine Zuordnung von BCR-Abl-Niveau und seiner Phosphorylierung zu verschiedenen Laborbefunden und klinischen Befunden wiedergibt.

Beispiel 5

Detektion von anderen Fusionsproteinen als BCR-ABL

[0152] Die vorangegangenen Beispiele betreffen das Aufzeigen der beispielhaften Ausführungsform von BCR-Abl. Die vorliegende Erfindung lässt sich jedoch zur Detektion jedes beliebigen Fusionsproteins einsetzen. In einigen Ausführungsformen ist das Fusionsprotein durch eine Chromosomentranslokation entstanden, während es in anderen Ausführungsformen nicht durch eine Chromosomentranslokation entstanden ist. In Ausführungsformen, in denen das Fusionsprotein ein durch eine Chromosomentranslokation hervorgerufenen Genprodukt ist, kann jedes Fusionsprotein aus jeder Chromosomentranslokation detektiert werden, solange ein erster Antikörper gegen einen ersten Bereich den ersten Bereich erkennt und ein zweiter Antikörper gegen einen zweiten Bereich den zweiten Bereich erkennt und der erste und der zweite Bereich nicht identisch sind. In einigen Ausführungsformen ist das Fusionsprotein ein Fusionsprotein von Polypeptiden, die von einem chimären Polynukleotid kodiert werden. Ein solches chimäres Polynukleotid weist einen ersten Polynukleotidbereich eines ersten Gens und einen zweiten Polynukleotidbereich eines zweiten Gens auf. Dabei können beide Gene diejenigen sein, die an der Chromosomentranslokation beteiligt waren. In einigen Ausführungsformen erkennt ein erster Antikörper ein Polypeptid, das vom ersten Polynukleotidbereich kodiert wird und ein zweiter Antikörper erkennt ein Polypeptid, das vom zweiten Polynukleotidbereich kodiert wird.

Beispiel 6

Bestimmung des Tumolvolumens

[0153] Die vorliegende Erfindung kann nicht nur eingesetzt werden, um ein oder mehrere Charakteristika eines Fusionsproteins zu überwachen, sondern zusätzlich oder alternativ kann auch das Tumolvolumen gemessen werden. [Fig. 12](#) zeigt BCR-ABL-Niveaus in zuvor nicht behandelten CML-Patienten. Die entsprechende Probe entstammt dem Plasma. Das Tumolvolumen in 54 beispielhaften CML-Patienten ist angegeben, wobei das Ausmaß der Tumormasse vom niedrigsten (Patient Nr. 1) zum höchsten (Patient Nr. 54) angeordnet ist.

Auch die Niveaus der phosphorylierten Fusionsproteine sind gezeigt, entweder an Threonin oder Tyrosin phosphoryliert. In einigen Ausführungsformen der Erfindung wird die Krebstherapie an diesen CML-Patienten durchgeführt und anschließend die klinische Reaktion bestimmt. In einigen Ausführungsformen benötigen Patienten mit einem hohen Tumolvolumen eine höhere Therapiedosis als Patienten mit einem geringeren Tumolvolumen. Des Weiteren bindet das freie Protein im Kreislauf an das Therapiemittel und entzieht es dem Anteil an Therapiemittel, das die Zellen erreichen und abtöten kann. Der Anteil, der so dem Therapiemittel entzogen ist, korreliert mit den Niveaus an Fusionsprotein, das sich im Kreislauf befindet (Plasma/Serum). In weiteren Ausführungsformen wird ein Diagnostikum oder eine Verwendung der Erfindung eingesetzt, um das Tumolvolumen und/oder Fusionsproteincharakteristika von mindestens einigen dieser beispielhaften Patienten zu überwachen. In bestimmter Hinsicht können Patienten mit Krebs, die gegenüber der Therapie resistent sind, ein geringes Tumolvolumen, aber stark phosphorylierte Fusionsproteine aufweisen.

Beispiel 7

Beispielhafte Quantifizierung von Verfahren der Erfindung

[0154] In einigen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Quantifizierung des Fusionsproteins vorgenommen. Dies lässt sich durch jedes geeignete Verfahren der Erfindung erreichen. In einigen Ausführungsformen jedoch das Binden einer markierten Sonde an das Fusionsprotein gemessen, indem ein Signal wie z. B. Fluoreszenz detektiert wird, das mit der Sonde einhergeht. Es kann eine geeignete Kontrolle eingesetzt werden. Das Färbungsniveau auf den Kügelchen wird bestimmt, indem der Prozentsatz an positiven Kügelchen ermittelt wird und die mittlere Intensität des positiven Signals dieser Kügelchen ermittelt wird. Um beide Parameter zu erhalten, wurde das Konzept des INDEX entwickelt. Es ist an Hand der beispielhaften PE/FITC-Markierungen beschrieben.

[0155] Der Index (Molekül/100 Kügelchen) = (% positiver Kügelchen) × (mittlere Intensität)

[0156] Das relative Verhältnis der Bindung von PE(Phycoerthrin)-Sonde zu FITC(Fluorescein-Isothiocyanat)-Sonde weist auf die relative Menge an Fusionsprotein im Verhältnis zur Kontrolle in der Probe hin

[0157] Aus dem Prozentsatz der Bindung an Fusionsprotein im Vergleich zur Kontroll-Form des Proteins lässt sich der prozentuale Anteil an Zellen in einer Probe vom Individuum mit dem Fusionsprotein bestimmen. Dies kann mittels folgender Formel erfolgen:

$$\text{tatsächliche \%} = (200 X)/(X + Y)$$

X = Anzahl der durch eine Chromosomen-Translokation entstandenen Fusionsproteine

Y = Anzahl der Kontroll-Proteine

[0158] Diese Formel kann nur eingesetzt werden, wenn ein Fusionsprotein/Antikörpers mit einem Fluorochrom markiert ist.

[0159] Wenn man ein unabhängiges Protein als Kontrollwert verwendet, um den Prozentanteil an Zellen mit dem Fusionsprotein zu quantifizieren, lautet die Formel:

$$\text{tatsächliche \%} = 2 (Y - X)$$

[0160] Dabei wird angenommen:

X = durch eine chromosomale Translokation erhaltene Fusionsproteine

Y = Anzahl der Kontroll-Proteine

[0161] Diese Formel kann nur eingesetzt werden, wenn ein Molekül des Fusionsprotein/Antikörpers mit einem Fluorochrom markiert ist.

Beispiel 8

Niveaus der BCR-ABL-Phosphorylierung

[0162] CML-Zellen von Imatinib-resistenten Patienten wiesen signifikant niedrigere Niveaus von sowohl

p-BCR-ABL (Thr735) als auch p-BCR-ABL (Tyr245) auf als CML-Zellen von auf Imatinib ansprechenden Patienten. Das Durchschnittsverhältnis von p-BCR-ABL (Thr735) zu Gesamt-BCR-ABL lag bei 0,69 (Mittelwert 0,64; Bereich 0,03–1,63) bei resistenten Patienten und bei 0,84 (Mittelwert 0,80; Bereich 0,40–1,67) in auf Imatinib ansprechenden Patienten ($P < 0,001$; **Fig. 13A**). Das mittlere Verhältnis von p-BCR-ABL (Tyr245) zum Gesamt-BCR-ABL lag bei 0,71 (Mittelwert 0,71; Bereich 0,02–2,18) in resistenten Patienten und 0,84 (Mittelwert 0,80; Bereich 0,30–2,15) bei auf Imatinib ansprechenden Patienten ($P = 0,3$; **Fig. 13B**). Demnach entsprach das Niveau der BCR-ABL-Tyrosinaktivität dem Niveau der BCR-Threoninkinaseaktivität in beiden Zellpopulationen, was darauf hinweist, dass die BCR-ABL Tyrosinkinase in Imatinibresistenten Zellen nicht überexprimiert war.

Beispiel 9

Niveaus der CRKL-, AKT- und STAT5-Phosphorylierung

[0163] Im Vergleich zu CML-Zellen von auf Imatinib ansprechenden Patienten wiesen die CML-Zellen von Imatinibresistenten Patienten signifikant niedrigere Durchschnittsniveaus an p-CrkL (Mittelwert 4204 im Vergleich zu 5982 mol/Zelle, $P = 0,01$; **Fig. 14A**) und p-Akt (Mittelwert 4131 gegen 5949 mol/Zelle, $P = 0,008$; **Fig. 15A**) auf. Dies ließ sich trotz einer Zunahme im Gesamt-Prozentsatz an p-CrkL (**Fig. 14B**) und p-Akt (**Fig. 15B**)-positiven Zellen bei resistenten Patienten beobachten, was einer Zunahme der Blastzellen zuzuschreiben ist.

[0164] Die Durchschnitt-Niveaus an p-STAT5 waren zwischen den Zellen von auf Imatinib ansprechenden Patienten und Zellen von Imatinib-resistenten Patienten nicht signifikant verschieden (**Fig. 16A**). Der Prozentsatz an p-STAT5-positiven Zellen lag jedoch bei resistenten Patienten (Mittelwert 22% im Vergleich zu 8%, $P = 0,02$; **Fig. 16B**) signifikant höher, was darauf hinweist, dass die Proliferation von STAT5-exprimierenden Zellen nicht von der BCR-ABL-Kinaseaktivität bestimmt wurde.

[0165] Viele Mechanismen der Imatinib-Resistenz sind beobachtet worden. Es wird angenommen, dass der verbreitetste Mechanismus die Wiederherstellung der BCR-ABL Tyrosinkinaseaktivität mittels einer verringerten Arzneimittelbindung ist (Nardi et al., 2003). Die erste beschriebene Mutation, die dies bewirkte, war T315I (Gorre, 2001). Beschreibungen vieler weiterer folgten. Wenn das Schlüsselproblem bei der Resistenz in einem Versagen der Imatinib-Bindung liegt, sollte sich die Planung und Entwicklung von Arzneimitteln in bestimmten Ausführungsformen auf wirksamere Möglichkeiten konzentrieren, die BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität zu hemmen. Beispielhafte Daten der vorliegenden Erfindung haben jedoch gezeigt, dass die Phosphorylierungsniveaus von BCR-ABL und seiner in der Signalübertragung stromabwärts liegenden Effektoren CrkL und Akt bei Imatinib-resistenten Patienten niedriger waren als bei auf Imatinib ansprechenden Patienten. Dies weist darauf hin, dass die Imatinib-Resistenz in der Patientenpopulation nicht das Ergebnis einer schlechten Arzneimittelbindung und einer Rückkehr zu hohen Niveaus der BCR-ABL Signalgebung war. Während Bindungsstellenmutationen zweifelsfrei einen Überlebensvorteil bedeuten – insbesondere solche, die der Imatinib-Therapie vorausgehen – ist es wahrscheinlicher, dass sie in einer Subpopulation von leukämischen Klonen existieren, die zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen können (Nardi, 2003).

[0166] Der Befund, dass STAT5-Phosphorylierungsniveaus in Imatinib-resistenten Patienten und auf Imatinib ansprechenden Patienten sich – trotz der in den Proben von Resistenz-Patienten gezeigten Aktivitätsabnahme bekannter stromaufwärts liegender Signaleffektoren – nicht signifikant unterscheiden, unterstützt die Ausführungsform, dass eine Resistenz eine Folge der Aktivierung eines Signalweges sein kann, der von der allgemein bekannten BCR-ABL Signalkaskade abweicht. Die Kinasen Lyn und Hck der src-Familie, die durch BCR-ABL aktiviert werden, können auch in Imatinib-resistenten CML-Zellen mit supprimierter exhibierter Tyrosinkinaseaktivität exprimiert werden (Donato 2005). In spezifischen Ausführungsformen der Erfindung wird eine zusätzliche Charakterisierung der Resistenz durchgeführt, um spezifische Mutationen, die Aktivierung alternativer Signalwege und die Ausführungsform, dass ein Mechanismus mit einem anderen verbunden ist, zu untersuchen.

Beispiel 10

Bedeutung der vorliegenden Erfindung

[0167] Es wird angenommen, dass die deregulierte Kinaseaktivität von ABL Protein bei CML ein wesentliches Kennzeichen dieser Erkrankung ist und dass sie für das Wachstum und die verringerte Apoptose verantwortlich ist. Eine direkte Messung sowohl des BCR-ABL Proteins als auch seiner Aktivität wäre die genaueste Messung der Aktivität und des Voranschreitens der Erkrankung. Die spezifische Aktivität von Tyrosinkinaseinhibi-

toren, die als Therapie auf das BCR-ABL Protein gerichtet sind, führt zur Notwendigkeit einer direkten Messung der Aktivität des Proteins, auf das abgezielt wird. Jedoch begrenzen die instabile Natur des Proteins und seine enorme Größe die Möglichkeit, des Proteins, auf das abgezielt wird, mittels Standard-Westernblot-Analyse zu detektieren und seine Aktivität zu messen. Daher kann das Entwickeln eines Untersuchungsverfahrens, das schnell und im klinischen Labor durchführbar ist, sehr hilfreich sein. Der Einsatz von Immunpräzipitation mit Partikeln, z. B. Kügelchen, mit geringer Denaturierung scheint die Integrität dieses großen und komplexen Proteins zu erhalten. Diese Art der Immunpräzipitation bewahrt höchstwahrscheinlich die Gesamtstruktur des Proteins und hält möglicherweise das Protein in seiner komplexierten Form – und erhält daher dessen Integrität und Phosphorylierung. Die hier gezeigten Daten weisen darauf hin, dass dieser Ansatz einer Analyse sogar als Plasmaprotein zugänglich ist für. Die Erfinder haben bereits zuvor gezeigt, dass leukämische Zellen ihre Proteine, DNA und RNA ins Plasma abgeben. Hier verwendeten die Erfinder Plasma zum Detektieren des BCR-ABL-Fusionsproteins und dessen Phosphorylierung. Die Verwendung von Patientenplasma als ein Probentyp zum Detektieren von im Kreislauf befindlichem BCR-ABL-Protein stellt ein genaues und empfindliches Maß für die allgemeine Leukämieaktivität zur Verfügung, das nicht von einer Probennahme abhängig ist.

[0168] Die hier gezeigten Daten verdeutlichen, dass BCR/ABL tatsächlich in signifikanten Niveaus in im Kreislauf befindlicher Form im Patientenplasma detektierbar ist. Durch den Einsatz eines auf Kügelchen basierenden ELISA-Untersuchungsverfahrens sind die vorliegenden Erfinder in der Lage, das BCR und BCR/ABL anfänglich zu immunpräzipitieren und weiterhin die Translokation mittels Verwendung eines ABL-spezifischen Antikörpers zu detektieren. Die Aktivierung des Proteins wurde mit Antikörpern gegen die Phosphorylierung an zwei spezifischen Resten nachgewiesen. Die Spezifität des Assays wurde in 96 normalen Patientenplasma-proben validiert, die alle für die Translokation negative Testergebnisse ergaben, sowie auch sowohl K-562 und CML-Patientenplasma, welche als Positivkontrollen für das Untersuchungsverfahren verwendet wurden. Die Variationen, die innerhalb zirkulierender Niveaus von BCR/ABL bei Patienten mit CML beobachtet wurden, sind höchstwahrscheinlich ein Anzeichen für die Tumormasse, die Proliferationsrate, sowie in bestimmten Ausführungsformen für den Zell-Umsatz im Plasma.

[0169] Die direkte Korrelation zwischen einem Verringern der BCR/ABL-Phosphorylierung und der Arzneimittelbehandlung weist auf die klinische Einsetzbarkeit des Untersuchungsverfahrens zum Detektieren und Messen der Aktivität hin, die durch die Behandlung hervorgerufen wird. Zusätzlich weist die direkte Korrelation zwischen RT-PCR Niveaus und dem Ansprechen, als Maß der Aktivität, darauf hin, dass die Verhältnisse von phosphoryliertem BCR/ABL zu Gesamt-BCR/ABL als ein diagnostisches Werkzeug für das Ansprechen verwendet werden können. Patienten mit einem höheren Verhältnis von phosphorylierten Protein zu Gesamtproteinen zeigten nach dreimonatiger Behandlung mit Gleevec höhere RT-PCR Werte, was auf ein schlechteres Ansprechen auf die kinaseinhibitorische Funktion der Therapie hindeutet. Zusätzlich wies das Untersuchungsverfahren darauf hin, dass – im Vergleich zu Grundlinienniveaus – eine Abnahme der Gesamtniveaus wie auch der aktivierten Niveaus von BCR/ABL-Protein als Reaktion auf die Therapie vorlag, mit einer signifikanten Korrelation mit den RT-PCR Niveaus. In Kürze, die Messung der Niveaus von Gesamt- als auch von phosphoryliertem BCR/ABL mittels des auf Kügelchen basierenden Untersuchungsverfahrens erwies sich als ein einfaches und zuverlässiges diagnostisches Werkzeug und als ein umfassendes Maß für die Überwachung der Therapie. Dieser Ansatz ersetzt in bestimmten Ausführungsformen auf PCR basierende Untersuchungsverfahren, die schwer zu standardisieren und quantifizieren sind.

Referenzen

[0170] Alle Patente und Veröffentlichungen, die in dieser Beschreibung genannt werden, weisen auf den Kenntnisstand des Durchschnittsfachmanns auf diesem Gebiet hin, das diese Erfindung betrifft.

Patente und Patentanmeldungen

U.S. Patent Nr. 3,996,345

U.S. Patent Nr. 4,062,733

U.S. Patent Nr. 4,366,241

U.S. Patent Nr. 4,104,029

U.S. Patent Nr. 5,369,008

U.S. Patent Nr. 6,686,165

WO 95/15331

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Ahuja, H. G. et al. *Blood*, 94(9); 1999; S. 3258–3261.
Arai, Y., et al. *Blood* 89; 1997; S. 3936–3944.
Borrow, J. et al. *Nat. Genet.* 12; 1996; S. 159–167.
Dai Y, et al. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13; 279(33):34227–39.
Donato et al., *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2005, 106: Abstract 1087
Donato et al. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):690–8.
Donato et al. *Cancer Res.* 2004 Jan 15; 64(2):672-7.
Gorre et al. *Science.* 2001; 293:876–880.
Kwon, Y.-U., & Kodadek, T., *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129; 1508–1509.
Nakamura, T. et al. *Nat. Genet.* 12; 1996; S. 154–158.
Nardi V, et al. *Curr Opin Hematol.* 2003;11(1):35–43.
Raza-Egilmez, S. Z. et al. *Cancer Res.* 58; 1998; S. 4269–4273.
Skerra, J. *Mol. Recognit.* 2000; 13; 167–187.
Talpaz, M. et al. *Leukemia* 14(9); 2000; S. 1661–1666.
Valk, P. et al., "Molecular Diagnostics of Hematopoietic Diseases"; www.eur.nl/fgg/hema/nederlands/onderzoek/overige.html Aug. 27, 2003.
van Denderen, J. et al. *Blood* 76; 1990; S. 136–141.
Wallace, J. et al. *Leukemia* 17(7); 2003; S. 1404–1410.

[0171] Die vorliegende Erfindung und ihre Vorteile wurden zwar ausführlich beschrieben, dennoch wird verstanden, dass zahlreiche Abwandlungen und Änderungen erfolgen können, ohne dass vom Umfang der Erfindung abgewichen wird. Des Weiteren ist es nicht beabsichtigt, den Umfang des Diagnostikums, der Verwendungen und der Verfahren auf die Ausführungsformen zu beschränken, die im Vorangegangenen beschrieben sind. Diagnostika und Verwendungen mit im Wesentlichen gleichen oder vergleichbaren Wirkungen können ebenso verwendet werden, ohne dass diese ausdrücklich erwähnt sind. Zum Umfang der folgenden Ansprüche zählen daher auch solche Diagnostika und Verwendungen.

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 5369008 [\[0011, 0170\]](#)
- WO 95/15331 [\[0012, 0170\]](#)
- US 6686165 [\[0013, 0170\]](#)
- US 4062733 [\[0029, 0170\]](#)
- US 4366241 [\[0030, 0108, 0129, 0170\]](#)
- US 3996345 [\[0030, 0108, 0129, 0170\]](#)
- US 4104029 [\[0030, 0170\]](#)
- US 3817837 [\[0108, 0129\]](#)
- US 3850752 [\[0108, 0129\]](#)
- US 3939350 [\[0108, 0129\]](#)
- US 4277437 [\[0108, 0129\]](#)
- US 4275149 [\[0108\]](#)
- US 4196265 [\[0120\]](#)
- US 5021236 [\[0125\]](#)
- US 4938948 [\[0125\]](#)
- US 4472509 [\[0125\]](#)
- US 4278149 [\[0129\]](#)
- WO 2001/04144 [\[0130\]](#)

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Talpaz et al. (2000) [\[0007\]](#)
- Valk et al. (2003) [\[0008\]](#)
- van Denderen et al. (1990) [\[0009\]](#)
- Wallace et al. (2003) [\[0010\]](#)
- Sambrook, Fritsch und Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, zweite Ausgabe (1989) [\[0071\]](#)
- OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait Ed., 1984) [\[0071\]](#)
- ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, Hrsg., 1987) [\[0071\]](#)
- Reihe METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) [\[0071\]](#)
- GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. M. Miller und M. P. Calos Hrsg. 1987) [\[0071\]](#)
- HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (D. M. Weir und C. C. Blackwell, Eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, und K. Struhl, Hrsg., 1987) [\[0071\]](#)
- CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach und W. Strober, Hrsg., 1991) [\[0071\]](#)
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [\[0110\]](#)
- Goding, 1986, Seiten 60, 61 [\[0121\]](#)
- von Skerra (2000) [\[0130\]](#)
- Kwon & Kodadek, 2007 [\[0130\]](#)
- Nardi et al., 2003 [\[0165\]](#)
- Gorre, 2001 [\[0165\]](#)
- Nardi, 2003 [\[0165\]](#)
- Donato 2005 [\[0166\]](#)
- Ahuja, H. G. et al. Blood, 94(9); 1999; S. 3258–3261 [\[0170\]](#)
- Arai, Y., et al. Blood 89; 1997; S. 3936–3944 [\[0170\]](#)
- Borrow, J. et al. Nat. Genet. 12; 1996; S. 159–167 [\[0170\]](#)
- Dai Y, et al. J Biol Chem. 2004 Aug 13; 279(33):34227–39 [\[0170\]](#)
- Donato et al., ASH Annual Meeting Abstracts, 2005, 106: Abstract 1087 [\[0170\]](#)
- Donato et al. Blood. 2003 Jan 15; 101(2):690–8 [\[0170\]](#)
- Donato et al. Cancer Res. 2004 Jan 15; 64(2):672–7 [\[0170\]](#)
- Gorre et al. Science. 2001; 293:876–880 [\[0170\]](#)

- Kwon, Y.-U., & Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. 2007; 129; 1508–1509 [\[0170\]](#)
- Nakamura, T. et al. Nat. Genet. 12; 1996; S. 154–158 [\[0170\]](#)
- Nardi V, et al. Curr Opin Hematol. 2003;11(1):35–43 [\[0170\]](#)
- Raza-Egilmez, S. Z. et al. Cancer Res. 58; 1998; S. 4269–4273 [\[0170\]](#)
- Skerra, J. Mol. Recognit. 2000; 13; 167–187 [\[0170\]](#)
- Talpaz, M. et al. Leukemia 14(9); 2000; S. 1661–1666 [\[0170\]](#)
- Valk, P. et al., "Molecular Diagnostics of Hematopoietic Diseases" [\[0170\]](#)
- www.eur.nl/fgg/hema/nederlands/onderzoek/overige.html Aug. 27, 2003 [\[0170\]](#)
- van Denderen, J. et al. Blood 76; 1990; S. 136–141 [\[0170\]](#)
- Wallace, J. et al. Leukemia 17(7); 2003; S. 1404–1410 [\[0170\]](#)

Schutzansprüche

1. Verwendung einer ersten und einer zweiten Sonde zum Überwachen einer Therapie eines Individuums, welches mindestens eine Therapierunde durchlaufen hat, wobei die Therapie auf ein Fusionsprotein aus einer Chromosomen-Translokation gerichtet ist, wobei das Protein einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich aufweist, wobei das Überwachen erfordert, dass die erste und die zweite Sonde zum Untersuchen eines oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums verwendet werden, wobei das Untersuchen aufweist:
die Probe der ersten Sonde aussetzen, wobei die erste Sonde den ersten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der ersten Sonde an den ersten Bereich einen ersten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt,
den ersten Sonde/Fusionsproteinkomplexes der zweiten Sonde aussetzen, wobei die zweiten Sonde den zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der zweiten Sonde an den zweiten Bereich einen zweiten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt, und
den zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplex detektieren, wobei das Detektieren zum untersuchen des einen Charakteristikums oder der mehreren Charakteristika führt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, des Weiteren aufweisend: ein Charakteristikum oder mehrerer Charakteristika des Fusionsproteins aus einer Probe des Individuums untersuchen, bevor das Individuum die Therapie erhält.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei untersuchen vor der Therapie aufweist:
die Probe einer ersten Sonde aussetzen, wobei die erste Sonde den ersten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der ersten Sonde an den ersten Bereich einen ersten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt,
den ersten Sonde/Fusionsproteinkomplexes einer zweiten Sonde aussetzen, wobei die zweiten Sonde den zweiten Bereich des Fusionsproteins binden kann und wobei das Binden der zweiten Sonde an den zweiten Bereich einen zweiten Sonde/Fusionsprotein-Komplex erzeugt, und
den zweiten Sonde/Fusionsproteinkomplex detektieren.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–3, wobei die Therapie auf das eine Charakteristikum oder die mehreren Charakteristika gerichtet ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–4, wobei die Therapie einen Kinaseinhibitor, einen Antikörper oder ein cytotoxisches Arzneimittel aufweist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–5, wobei das eine Charakteristikum oder die mehreren Charakteristika eine Phosphorylierung, eine Glycosylierung, eine Acetylierung, eine Mutation oder eine Kombination davon aufweist.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Mutation eine Deletion, eine Inversion oder eine Punktmutation ist.
8. Verwendung eines Paares einer ersten Sonde und einer zweiten Sonde als Diagnostikum zur Diagnose, zur Beurteilung des Krankheitsstadiums, zur Beurteilung der Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Therapie, zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs und zum Überwachen einer Therapie einer Krebserkrankung eines Individuums,
wobei die erste Sonde eine Affinität zu einem ersten Bereich eines Fusionsproteins aus einer Chromosomen-Translokation aufweist, sodass sie imstande ist, den ersten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen und
wobei die zweite Sonde eine Affinität zu einem zweiten Bereich des Fusionsproteins aufweist, sodass sie imstande ist, den zweiten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–8, wobei das Fusionsprotein als ein aktiviertes Fusionsprotein definiert ist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–9, wobei die erste Sonde mit einem Substrat verbunden ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Substrat ein Kügelchen, eine Platte oder eine Säule aufweist.
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Substrat immobilisiert ist.
13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Substrat ein Kügelchen aufweist und wobei die Anzahl der Fusionsmoleküle quantifiziert werden kann.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Quantifizieren die folgende Formel verwendet: Prozentsatz an Kügelchen, die ein oder mehrere Moleküle aufweisen, \times durchschnittliche Anzahl von Molekülen auf den Kügelchen, die positiv sind = etwa die Anzahl der Moleküle in der Probe.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–14, wobei die Probe weiterhin definiert ist als Zelllysate, Plasma, Blut, Serum oder Mischungen davon aufweisend.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–15, wobei die Probe cerebrospinale Flüssigkeit, Blut, Urin, Serum, Plasma, Brustwarzenaspirat, Fäkalien, Wangenabstrich, Speichel, Biopsie, Ascites oder eine Mischung davon aufweist.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–16, wobei das erste Untersuchen, das zweite Untersuchen oder beide des einen Charakteristikums oder der mehreren Charakteristika des Weiteren als quantifizieren eines Charakteristikums des Fusionsproteins definiert sind.
18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei das erste Untersuchen, das zweite Untersuchen oder beide des einen Charakteristikums oder der mehreren Charakteristika des Weiteren als: die Phosphorylierung eines oder mehrerer Fusionsproteine in der Probe quantifizieren.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–18, wobei die zweite Sonde definiert ist als in der Lage, eine Aktivierung des Fusionsproteins zu detektieren.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–19, wobei erste Sonde, die zweite Sonde oder beide eine Anti-Phosphotyrosin-Aktivität oder eine Anti-Phosphoserin-Aktivität aufweisen.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–20, wobei die zweite Sonde eine Markierung aufweist.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Markierung ein Chromagen, Radioaktivität, ein Fluorophor oder eine Kombination davon aufweist.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22, wobei das Verhältnis eines Moleküls der zweiten Sonde zur Markierung etwa 1:1 beträgt.
24. Verwendung nach Anspruch 23, weiterhin aufweisend: bestimmen der Anzahl an Fusionsmolekülen in der Probe, basierend auf der Anzahl an markierten zweiten Sonden.
25. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–24, wobei die erste Sonde, die zweite Sonde oder beide eine Mutation im Fusionsprotein erkennen.
26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die Mutation dem Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie verleiht.
27. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–26, wobei das Individuum Krebs hat.
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei der Krebs Leukämie, ein Lymphom, Gehirnkrebs, Lungenkrebs, Brustkrebs, Darmkrebs, Prostatakrebs, Leberkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, Hautkrebs, Eierstockkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Magenkrebs, Milzkrebs, Schilddrüsenkrebs, Hodenkrebs oder Knochenkrebs ist.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–28, wobei das Fusionsprotein Bcr-Abl ist.
30. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–29, wobei das Individuum nach dem zweiten Untersuchen

einer alternativen Therapie unterzogen wird.

31. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–30, wobei das Überwachen weiterhin definiert ist als: bestimmen der Resistenz des Individuums gegenüber einer Krebstherapie.

32. Verwendung nach Anspruch 31, wobei die Resistenz gegen einen Kinaseinhibitor, einen Antikörper oder ein cytotoxisches Arzneimittel entwickelt wird.

33. Verwendung nach Anspruch 31 oder Anspruch 32, wobei die Resistenz gegen Gleevec entwickelt wird.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 31–33, wobei das Individuum eine Resistenz gegenüber einer Krebstherapie aufweist und dem Individuum eine alternative Krebstherapie verabreicht wird.

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–34, wobei die Therapie auf den Phosphorylierungszustand eines Fusionsproteins aus einer chromosomalen Translokation einwirkt, wobei der erste Bereich eine Phosphorylierungsstelle aufweist und wobei das Untersuchen weiterhin definiert wird als: untersuchen des Phosphorylierungszustandes des Fusionsproteins.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei der zweite Sonde/Fusionsproteinkomplex das Individuum als einer alternativen Therapie bedürftig identifiziert.

37. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–36, wobei das Überwachen einer Therapie weiterhin definiert ist als das Quantifizieren des Tumolvolumens im Individuum.

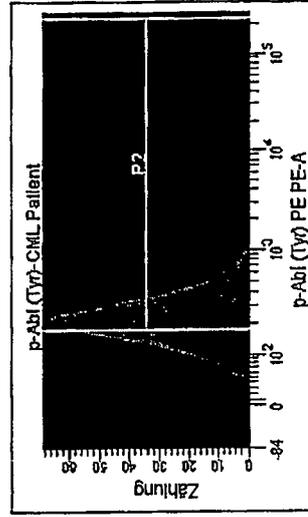
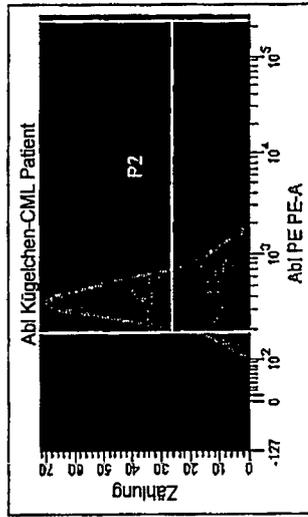
38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei beim Quantifizieren ein Therapieregime eingesetzt wird.

39. Diagnostikum, das ein Paar einer ersten Sonde und einer zweiten Sonde aufweist, wobei die erste Sonde eine Affinität zu einem ersten Bereich eines Fusionsproteins aus einer Chromosomen-Translokation aufweist, sodass die erste Sonde imstande ist, den ersten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen und wobei die zweite Sonde eine Affinität zu einem zweiten Bereich des Fusionsproteins aus einer Chromosomen-Translokation aufweist, sodass die zweite Sonde imstande ist, den zweiten Bereich des Fusionsproteins zu binden und einen Komplex mit dem Fusionsprotein einzugehen.

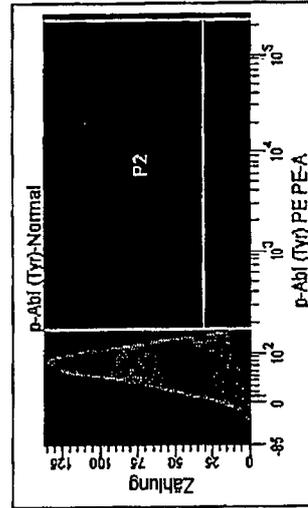
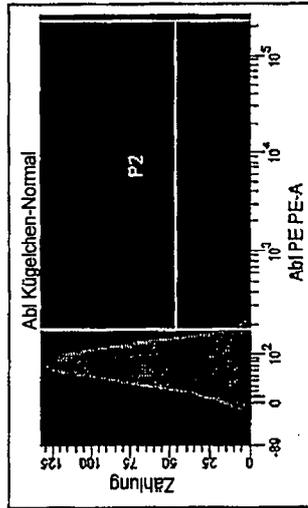
Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

CML Patient



Normal Kontrolle



PBS Kontrolle

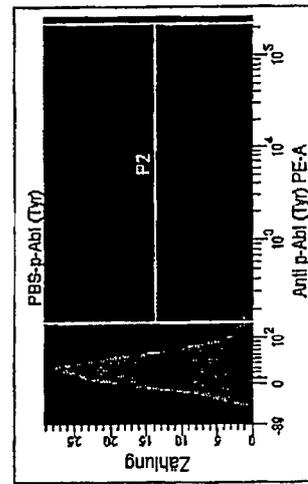
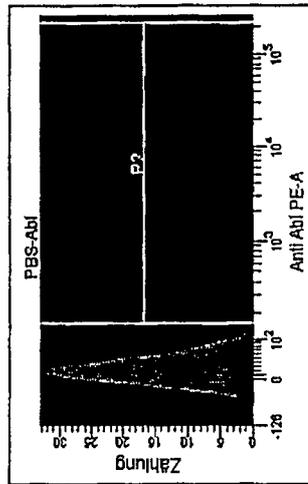


FIG. 1

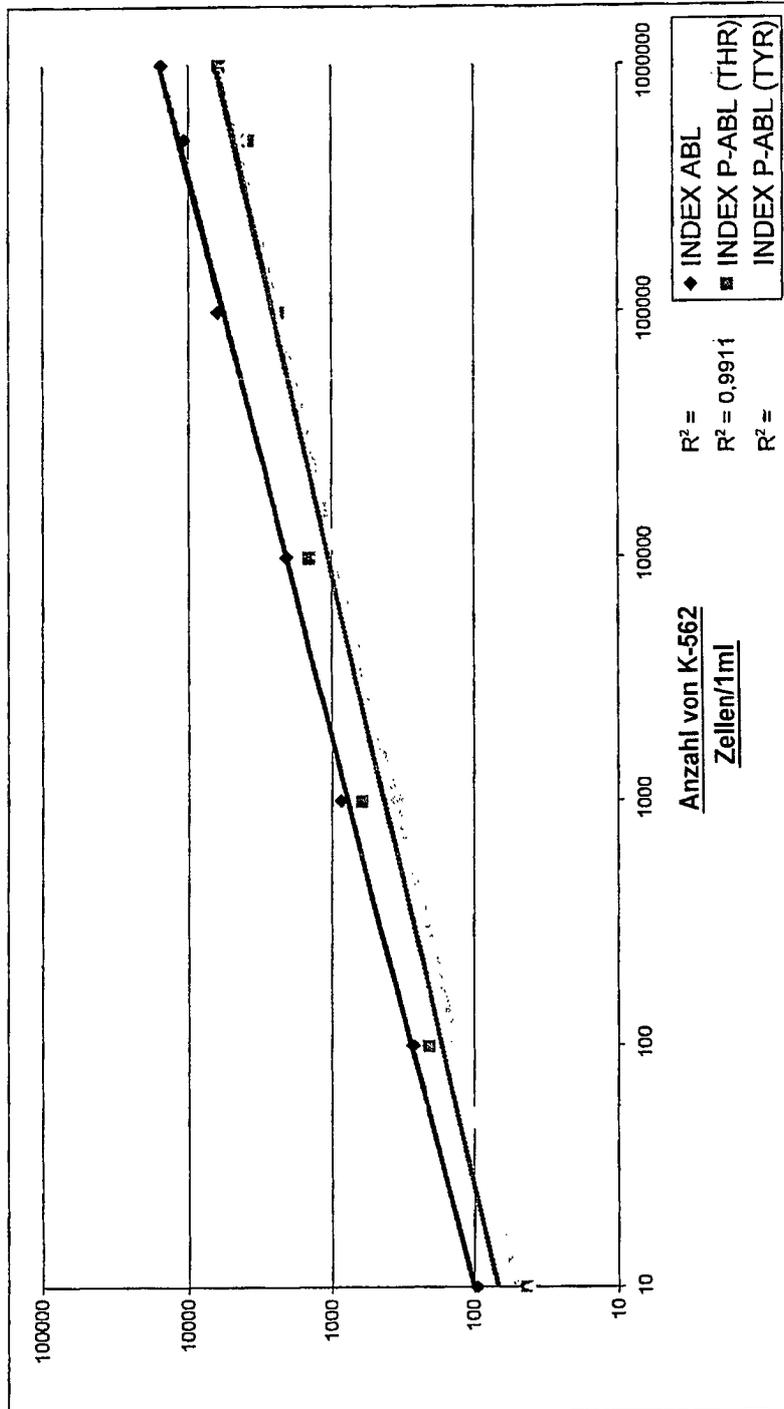
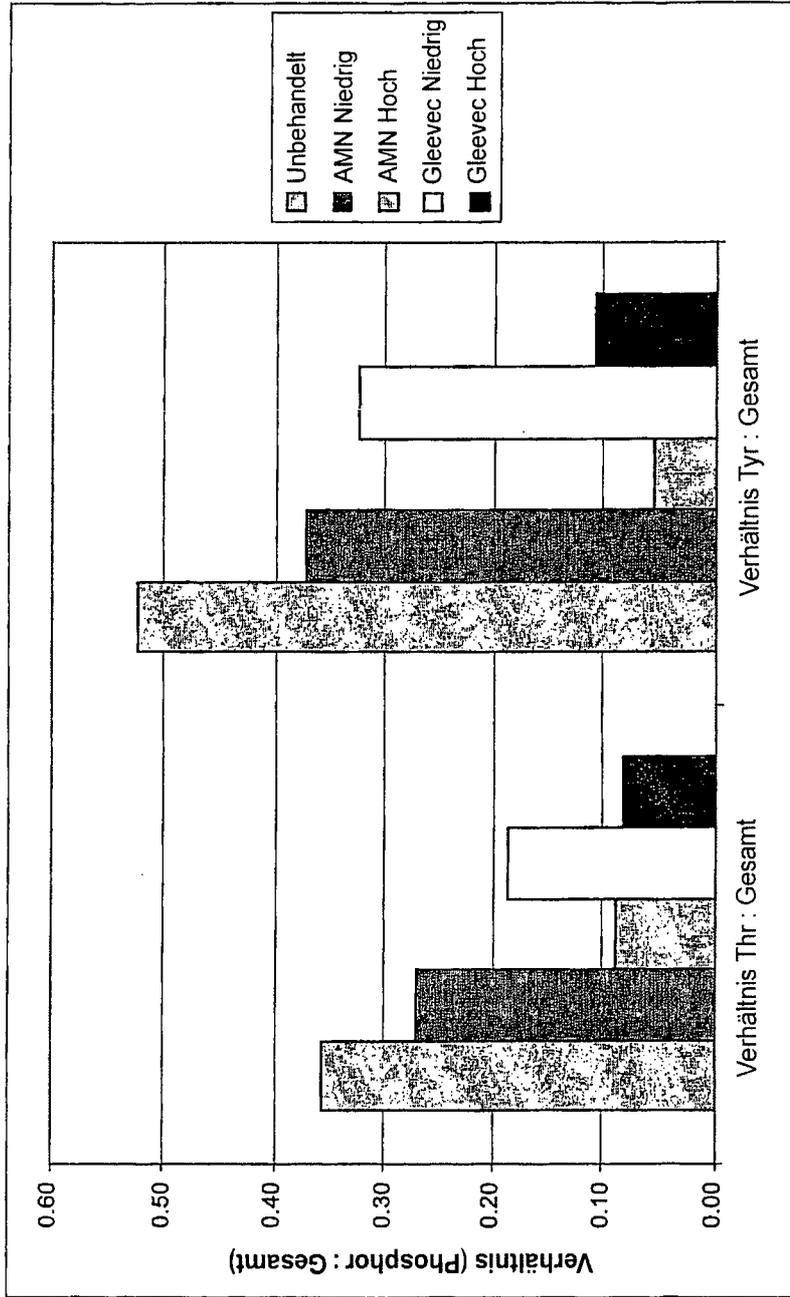


FIG. 2



AMN Niedrig - 0,05 μ M Hoch - 5 μ M
 Gleevec Niedrig - 0,05 μ M Hoch - 5 μ M

FIG. 3

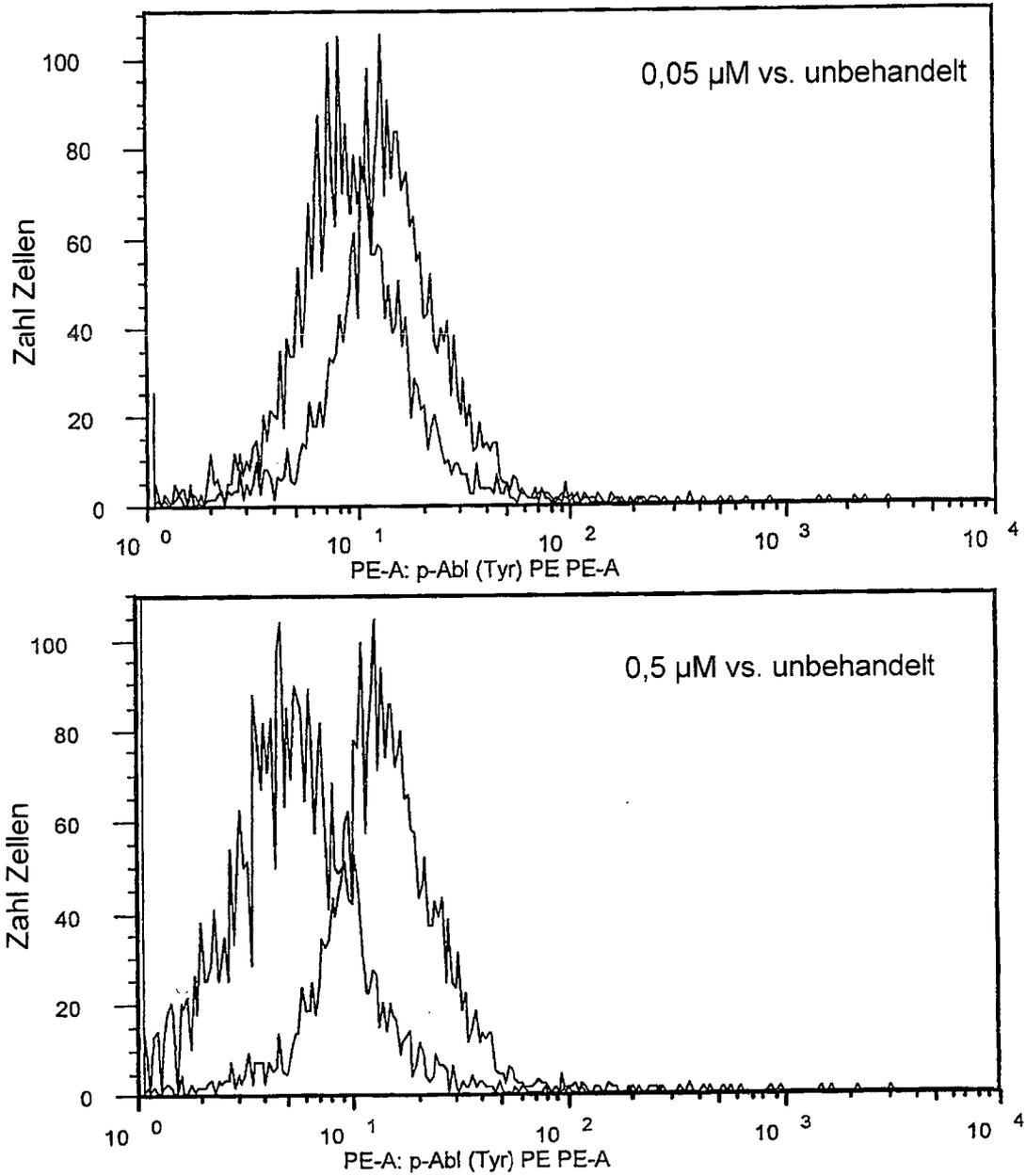


FIG. 4

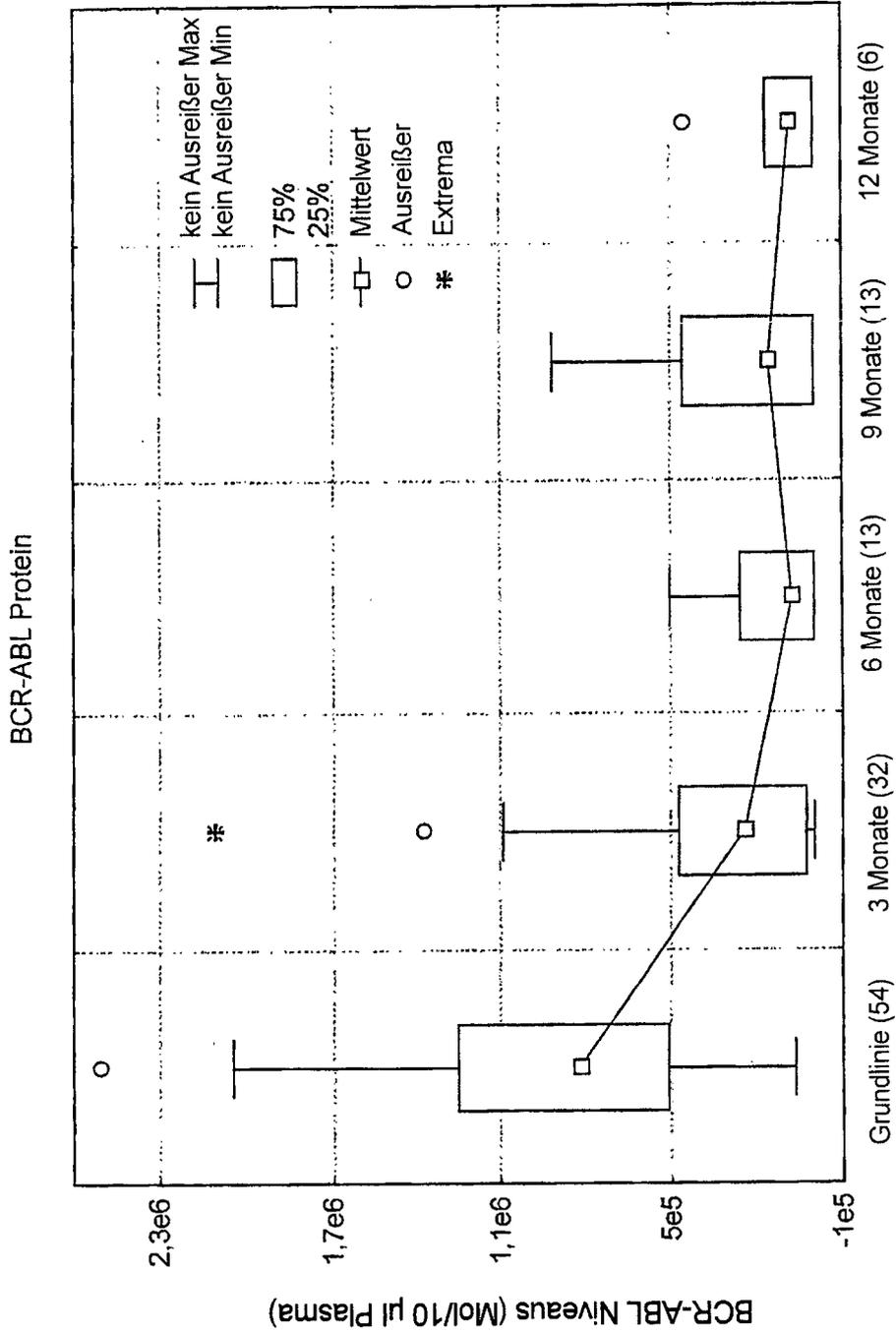


FIG. 5

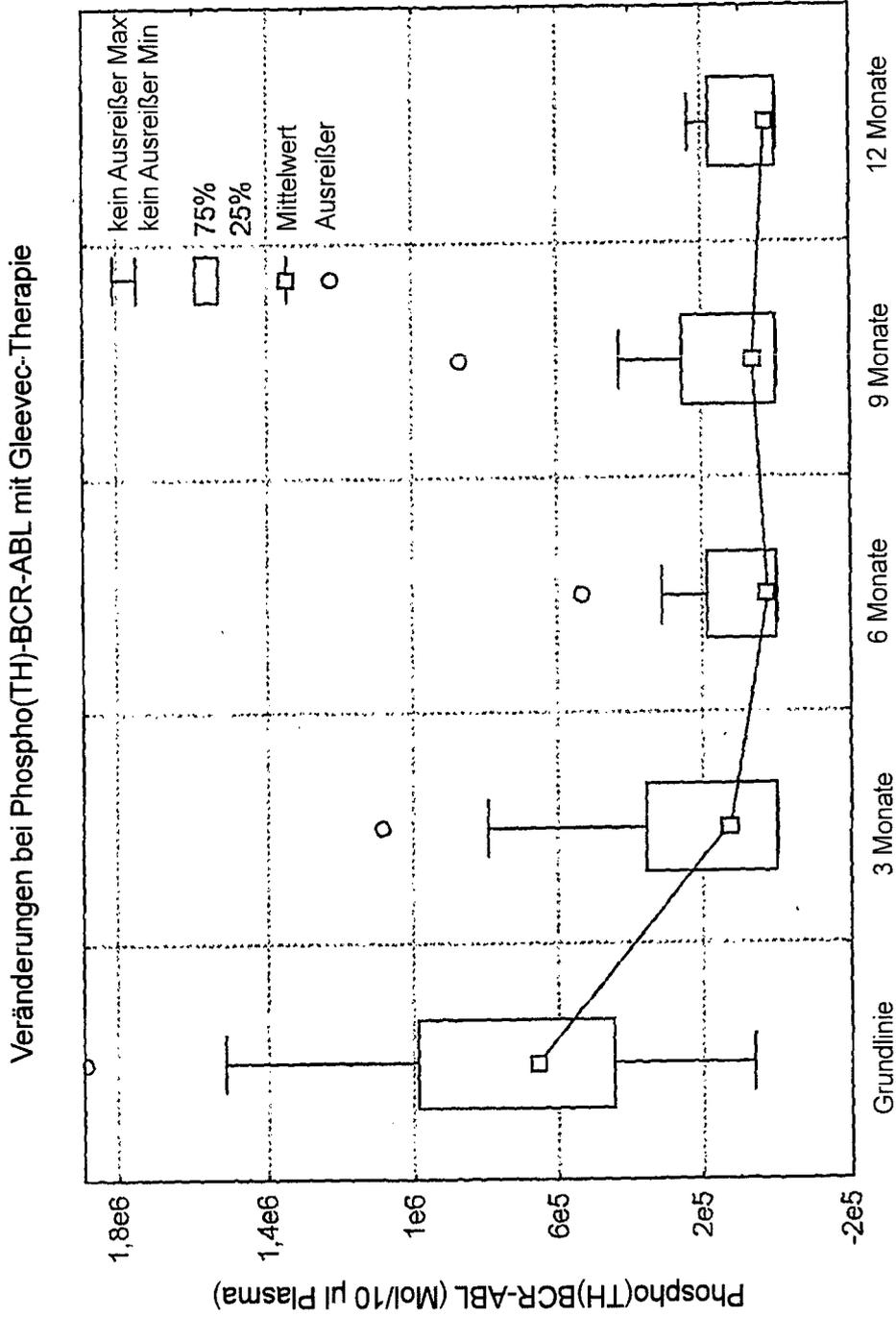


FIG. 6

Veränderungen bei Phospho(Tyr)BCR-ABL mit Gleevec-Therapie

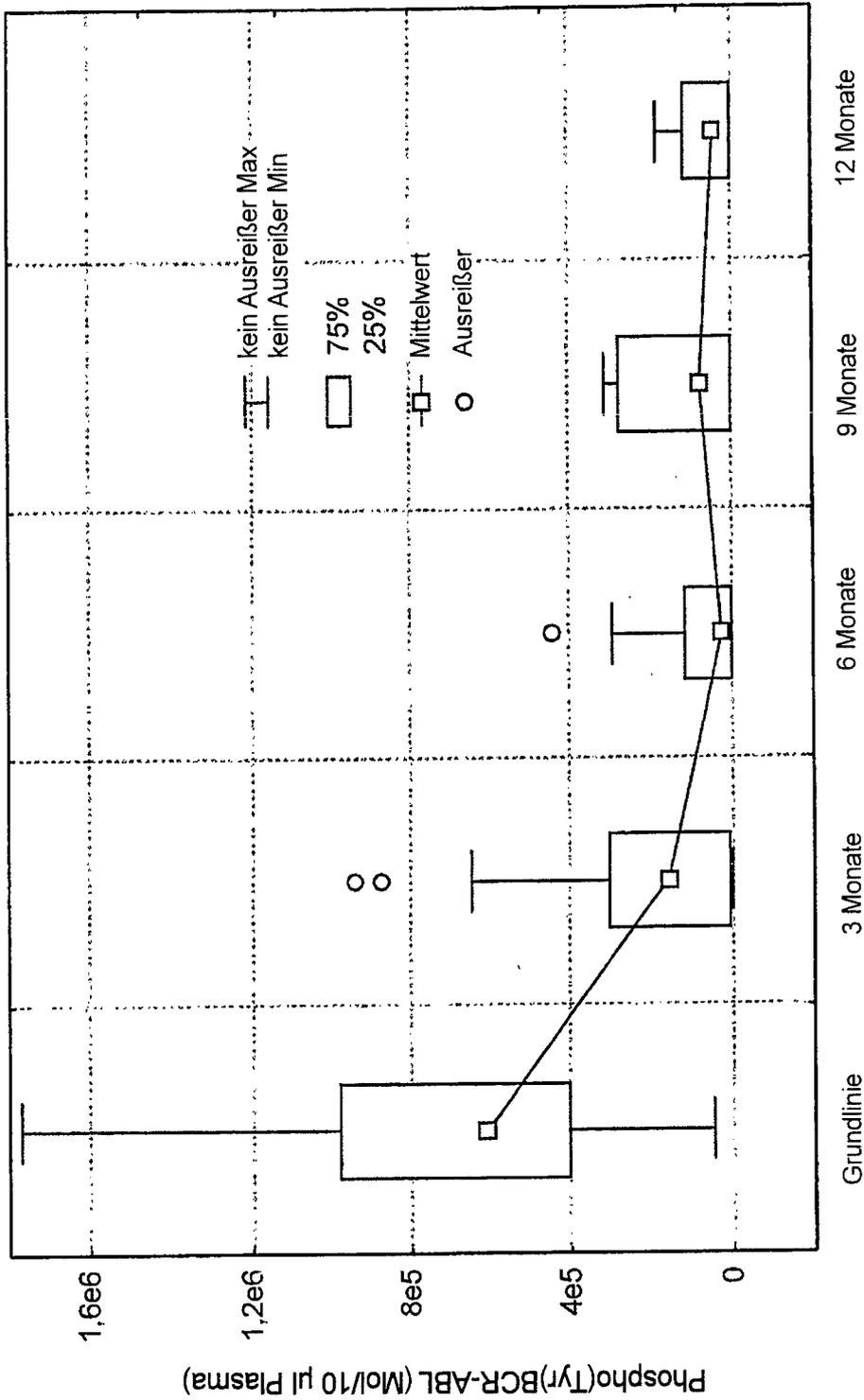


FIG. 7

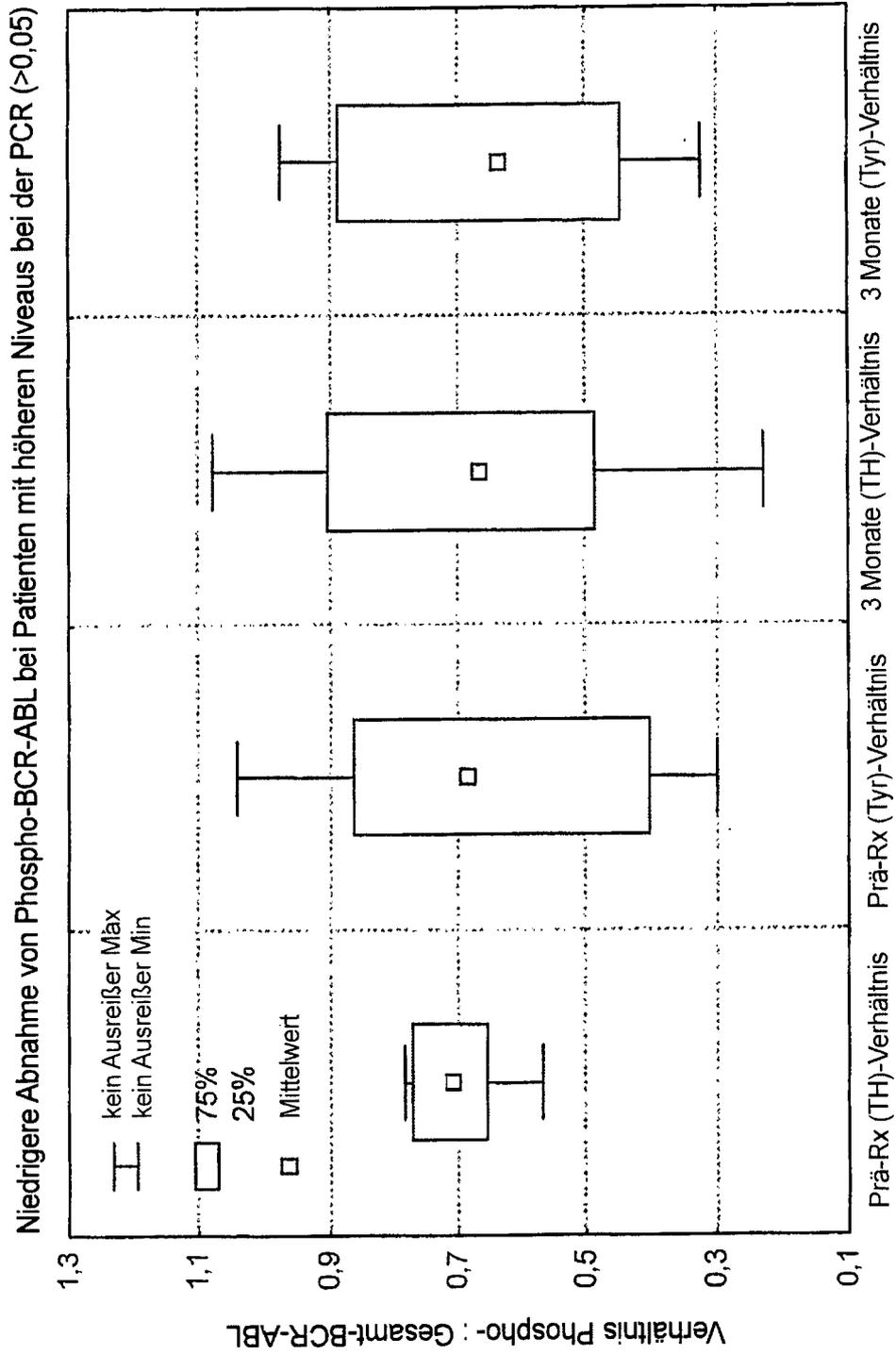


FIG. 8

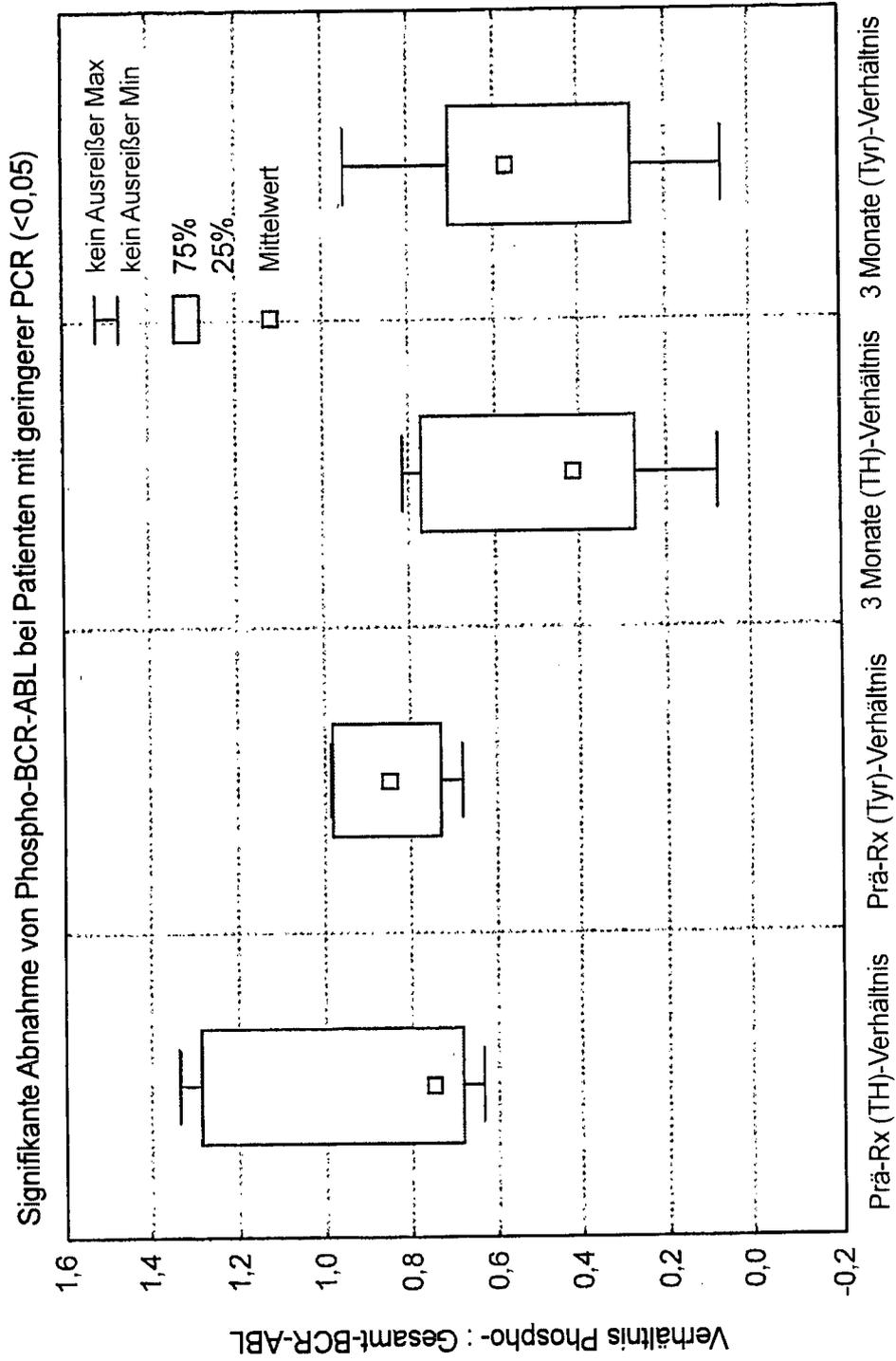


FIG. 9

C1D15, 24H
P=0,0008

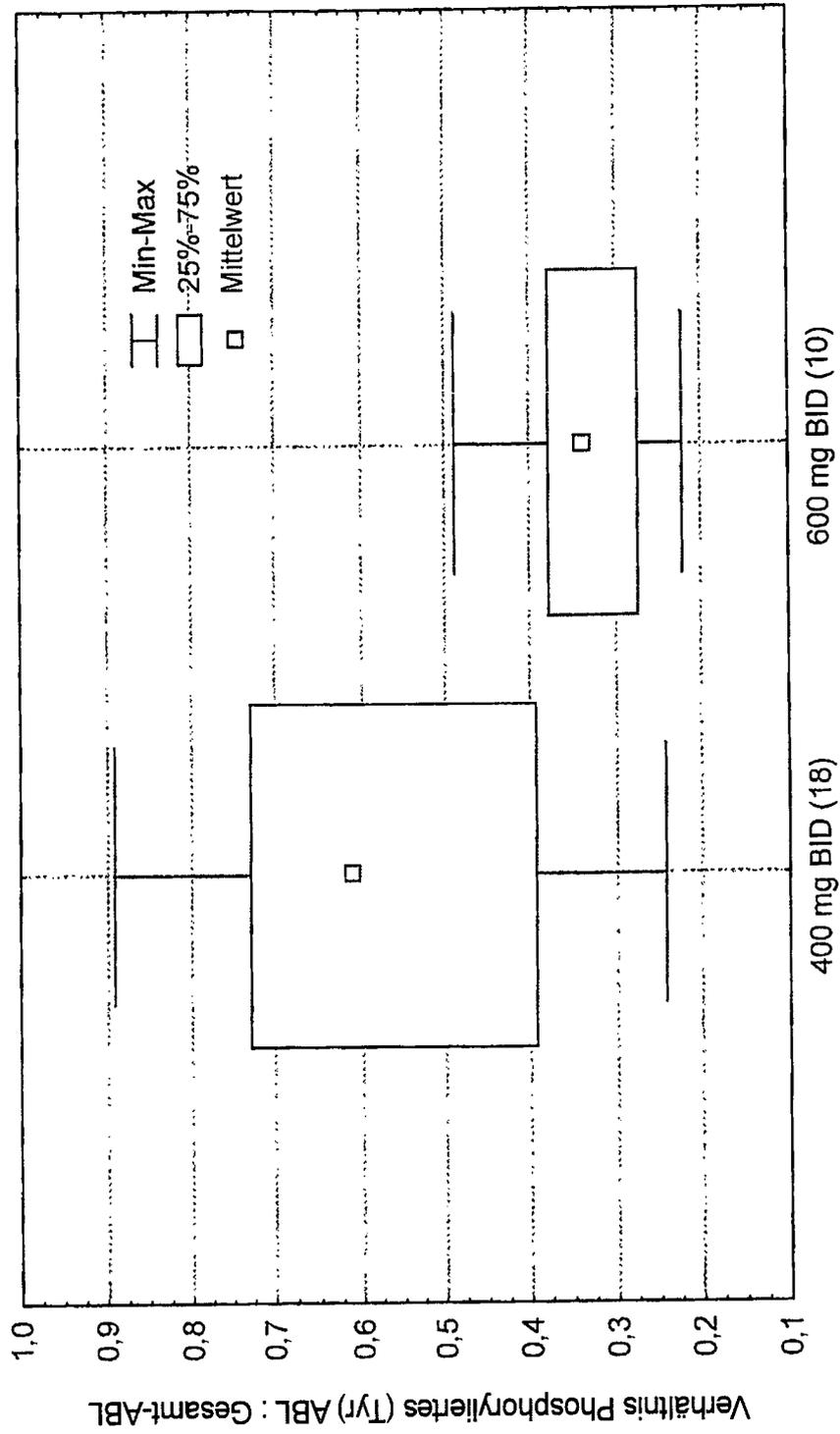


FIG. 10

Spearman'sche Korrelationskoeffizienten
MD paarweise gelöscht

FIG. 11

	N	R	t(N-2)	p-Niveau
BCR-ABL-Protein & Basislinie der PCR in Zellen	54	0,339127	2,599527	0,012121773
BCR-ABL-Protein & Basislinie der PCR im Plasma	51	0,415394	3,196598	0,00243563
Phospho-BCR-ABL(TH) & PCR-Verhältnis im Plasma	51	0,366298	2,755606	0,008202584
Phospho-BCR-ABL(Tyr) & PCR-Verhältnis im Plasma	51	0,42648	3,300577	0,001804277
Phospho-BCR-ABL(Tyr) & PCR-Verhältnis im BM-Plasma	51	-0,378759	-2,864748	0,006129863
BCR-ABL Protein & PROMYEL	23	0,401895	2,011295	0,057304591
BCR-ABL & HEMO	26	-0,38193	-2,024548	0,054178733
p(TH)BCR-ABL & PROMYEL	23	0,488162	2,563199	0,018115489
p(TH)BCR-ABL & MONO	25	-0,384982	-2,000501	0,057386871
p(TH)BCR-ABL & HEMO	26	-0,449008	-2,461792	0,021393355
p(Tyr)BCR-ABL & PROMYEL	23	0,45119	2,316842	0,030698555
p(Tyr)BCR-ABL & LDH	24	0,351304	1,75994	0,092317253
p(Th)BCR-ABL Verhältnis & PLATELET	26	0,375107	1,982392	0,058996316
p(Tyr)BCR-ABL Verhältnis & METAMYEL	23	0,361358	1,775958	0,090233423
BCR-ABL & PB3RESUL	18	0,354777	1,51784	0,148564741
BCR-ABL & DIF3 MON	18	-0,354777	-1,51784	0,148564741
BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten im Plasma, ABS	13	-0,543956	-2,150004	0,054646522
P(TH)BCR-ABL & PCR-Plasma nach 3 Monaten, abs	13	-0,521978	-2,029647	0,067291714
P(Tyr)BCR-ABL & PCR-Plasma nach 3 Monaten, abs	13	-0,483516	-1,832033	0,094134688
P(TH)BCR-ABL Verhältnis & PCR nach 3 Monaten	18	-0,392121	-1,705036	0,107523516
P(TH)BCR-ABL Verhältnis & PCR-Unterschied nach 3 Monaten	18	0,392121	1,705036	0,107523516
BCR-ABL nach 3 Monaten & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	0,707867	4,909532	5,22884E-05
BCR-ABL nach 3 Monaten & PCR-Unterschied nach 3 Monaten in den Zellen	26	-0,707867	-4,909532	5,22884E-05
BCR-ABL nach 3 Monaten & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,839737	6,741019	1,92981E-06
BCR-ABL nach 3 Monaten & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,839737	6,741019	1,92981E-06
p(TH)BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	0,693062	4,709952	8,68196E-05
p(TH)BCR-ABL & PCR-Unterschied nach 3 Monaten in den Zellen	26	-0,693062	-4,709952	8,68196E-05
p(TH)BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,873248	7,811574	2,38349E-07
p(TH)BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten im Plasma, abs	21	0,301596	1,378829	0,183965445
p(Tyr)BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	0,709589	4,933551	4,91969E-05
p(Tyr)BCR-ABL & PCR-Unterschied nach 3 Monaten in den Zellen	26	-0,709589	-4,933551	4,91969E-05
p(Tyr)BCR-ABL & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,814768	6,125516	6,88586E-06
p(TH)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	0,46996	2,608314	0,015411844
p(TH)BCR-ABL-Verhältnis & PCR-Unterschied nach 3 Monaten in den Zellen	26	-0,46996	-2,608314	0,015411844
p(TH)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,536827	2,773494	0,012101821
p(TH)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten im Plasma, abs	21	0,644587	3,675049	0,001608669
p(Tyr)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	0,383198	2,032425	0,053318262
p(Tyr)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten in den Zellen	26	-0,383198	-2,032425	0,053318262
p(Tyr)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten im Plasma	21	0,35679	1,664778	0,112361453
p(Tyr)BCR-ABL-Verhältnis & PCR nach 3 Monaten im Plasma, abs	21	0,757603	5,059349	6,96437E-05

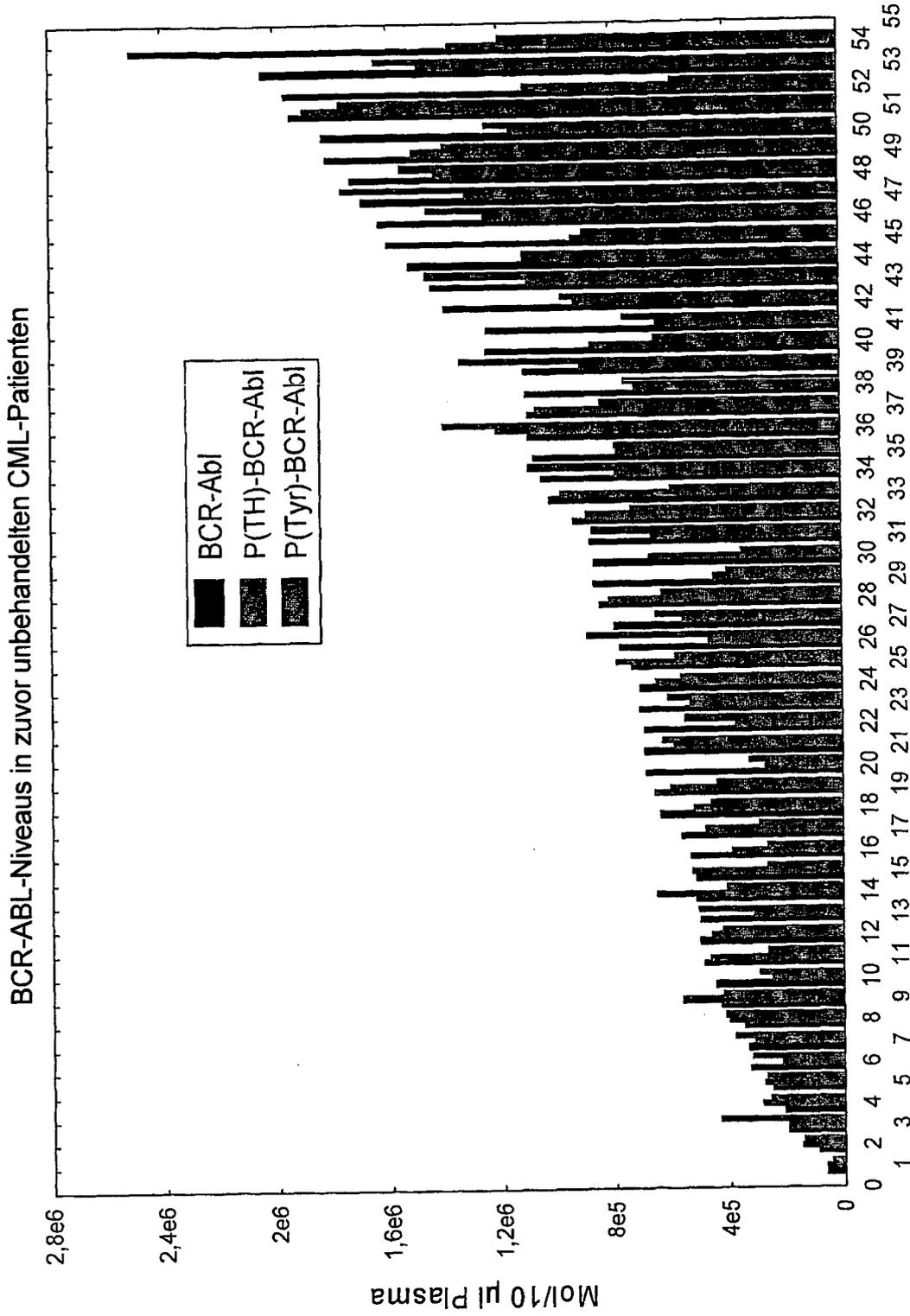


FIG. 12

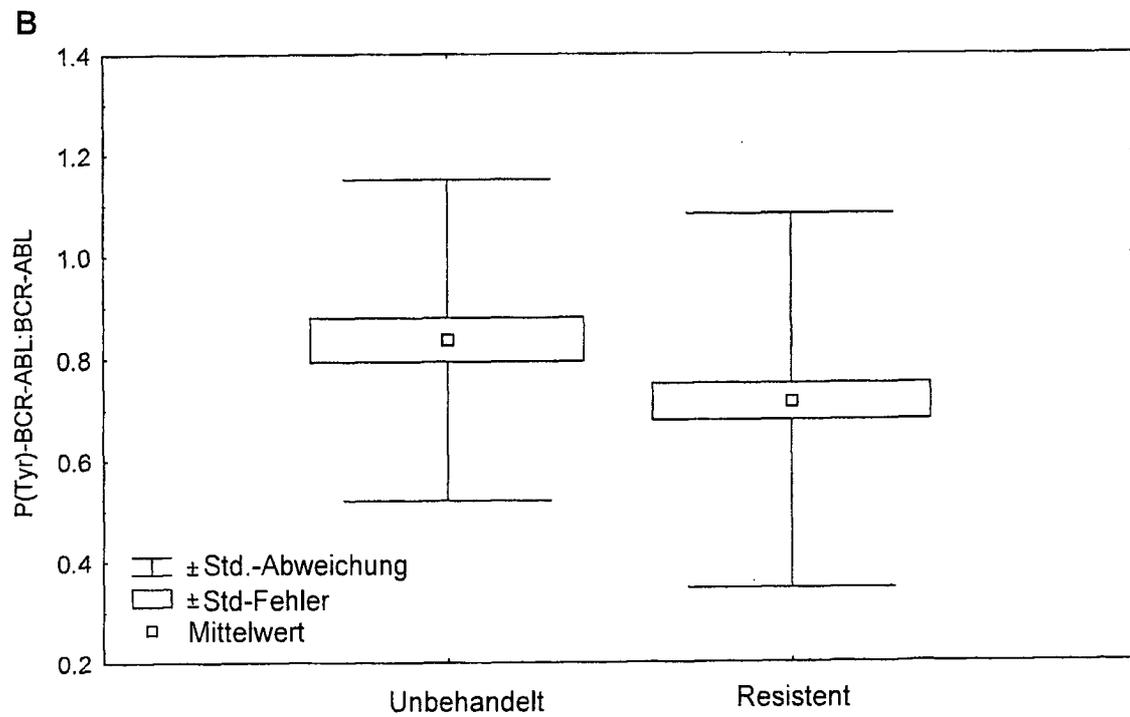
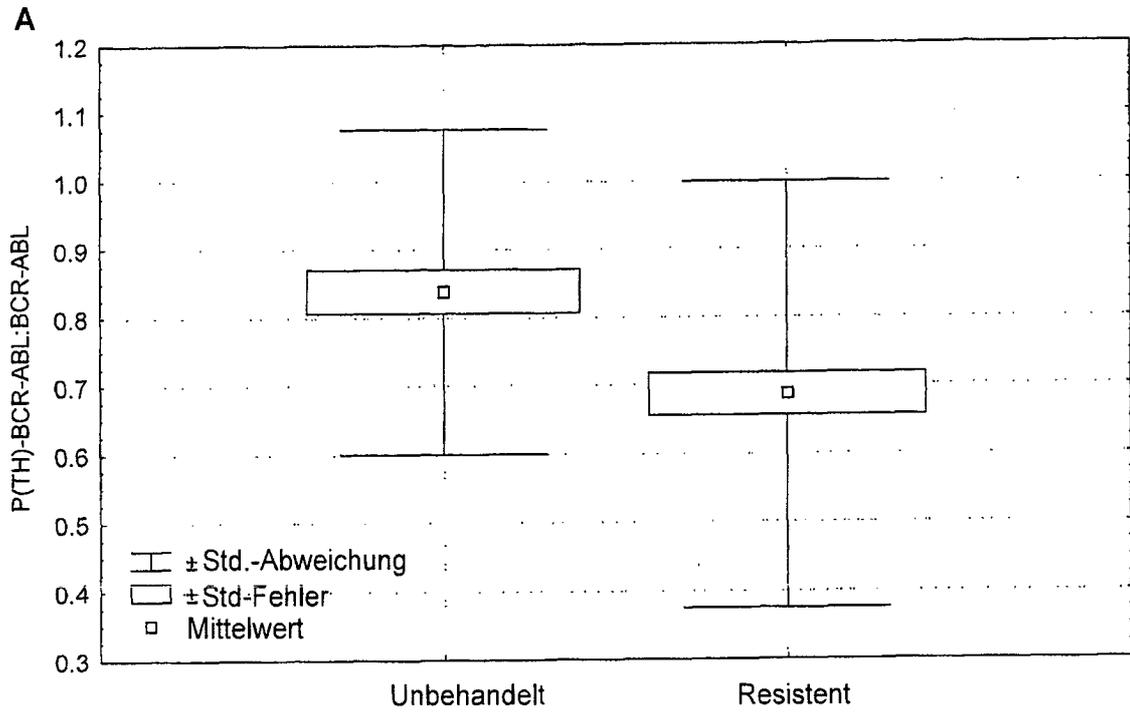


FIG. 13

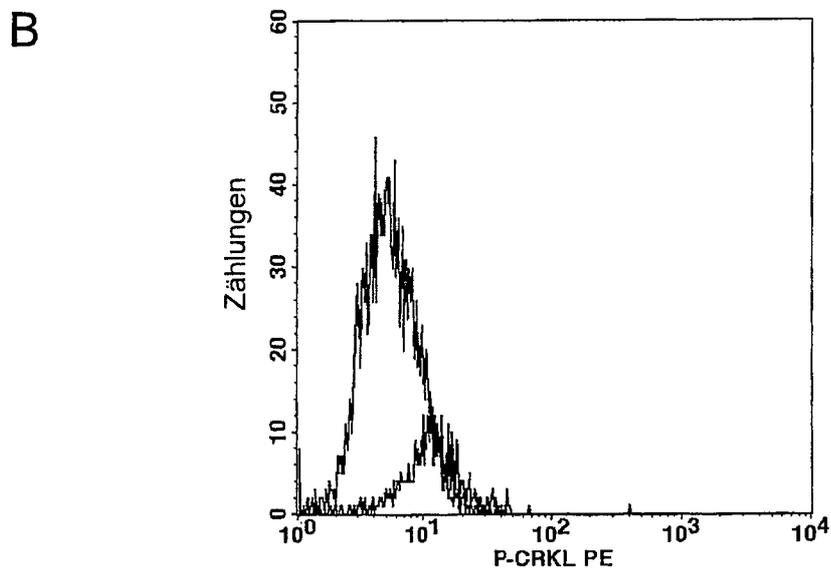
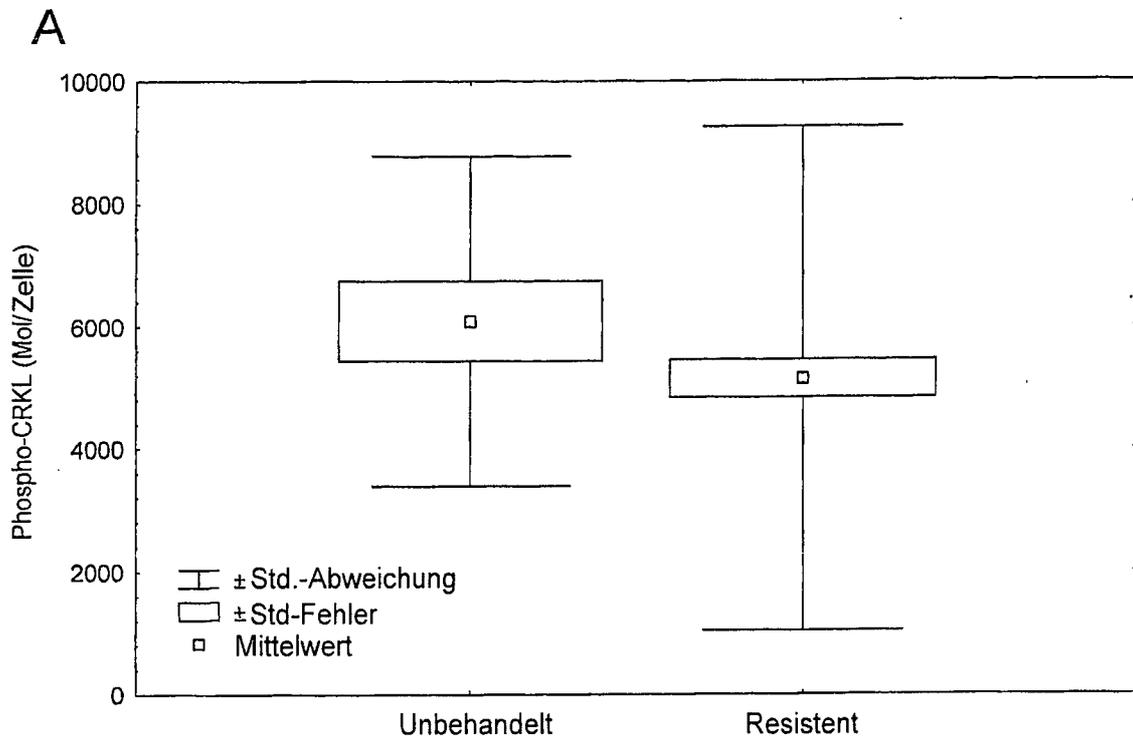


FIG. 14

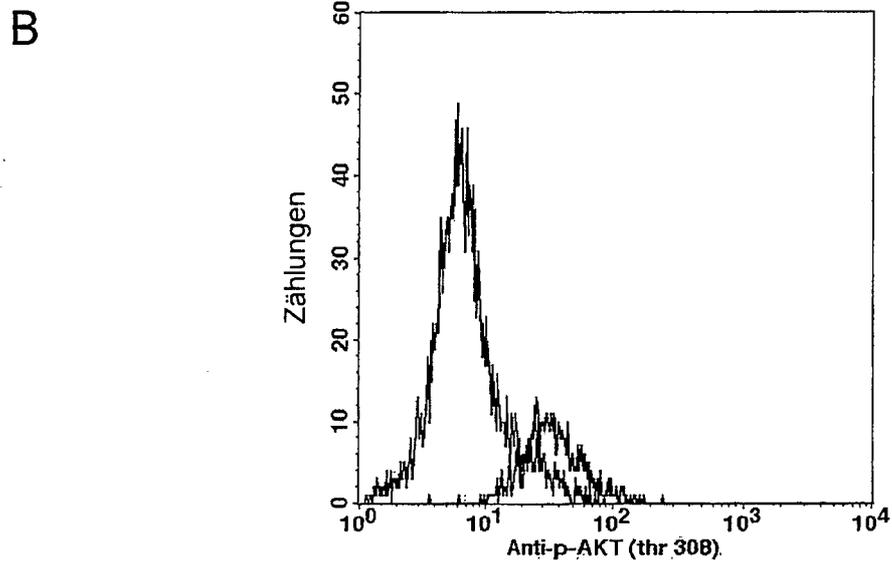
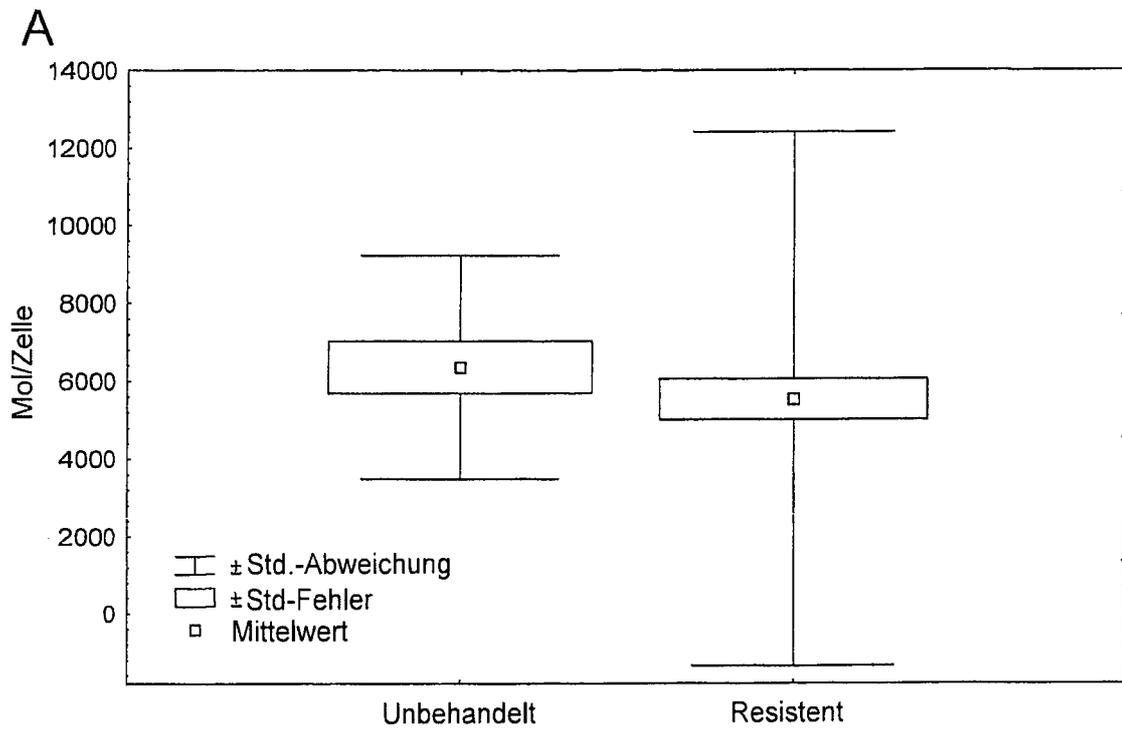
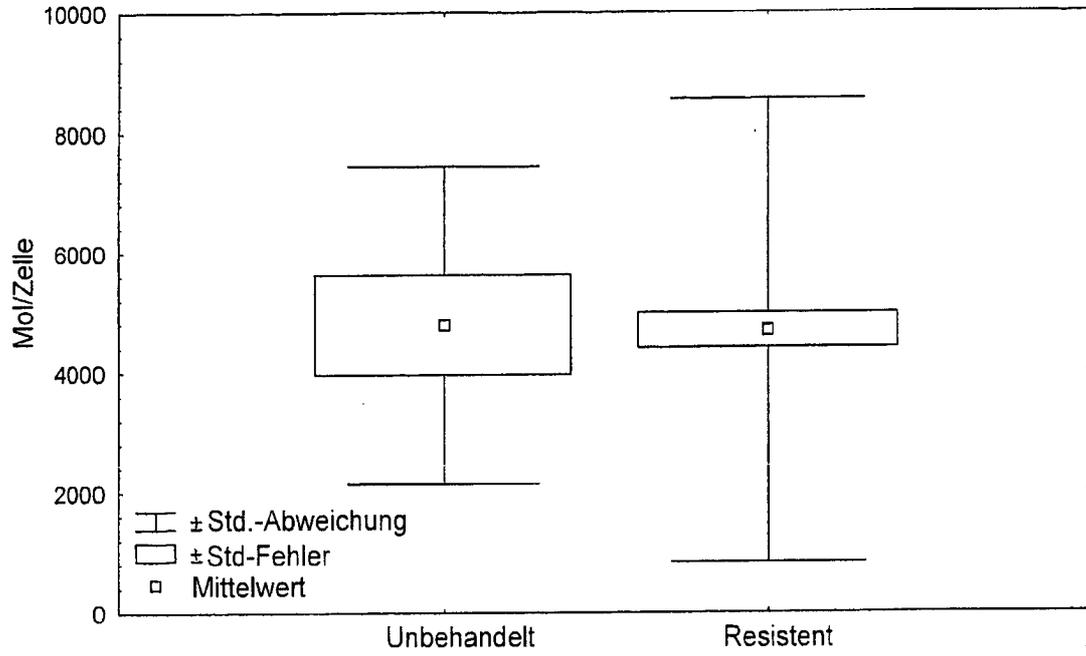


FIG. 15

A



B

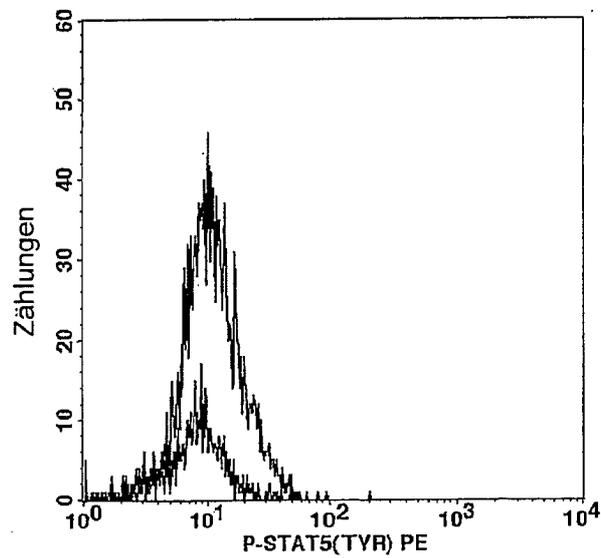


FIG. 16