



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2013142287/14, 16.02.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.02.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
17.02.2011 US 61/444,044;  
25.05.2011 US 61/489,998

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2015 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 27.03.2016 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 02/24256 A1, 28.03.2002. EP 1424131 A2, 02.06.2004. EP 2260943 A1, 15.12.2010. EP 0616816 A2, 28. 09. 1994. US 4915848 A, 10. 04. 1990. RU 2285543 C2, 10. 07. 2006.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 17.09.2013

(86) Заявка РСТ:  
US 2012/025491 (16.02.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2012/154257 (15.11.2012)

Адрес для переписки:  
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО  
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

**СИНГХ Шарат (US),  
ЛИУ Ксиньдзунь (US),  
ХЕСТЕР Келли Д. (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**НЕСТЕК С.А. (CN)**

**(54) УСТРОЙСТВО И СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ И РАКОВЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ ФИЛЬТРОВАНИЯ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине. Устройство включает фильтрационные устройства. Каждое фильтрационное устройство содержит верхнюю камеру, которая является цилиндрической трубкой, нижнюю камеру, которая является цилиндрической трубкой, и сложенные в стопку фильтровальные мембраны между верхней и нижней камерами. Сложенные в стопку фильтровальные мембраны способны задерживать лейкоциты. Внутренние диаметры верхней и нижней камер одинаковы, чтобы создать цилиндрическую трубку, что позволяет

жидкостям протекать через нее. Сложенные в стопку фильтровальные мембраны помещены между резьбой верхней камеры и нижней камеры. Камеры скреплены друг с другом. Приемный сосуд для сбора эритроцитов из образца цельной крови выбран из приемной пробирки, многолучного приемного сосуда или мультипробирочного приемного сосуда. Фильтрационное устройство размещается над приемным сосудом. Устройство предназначено для использования вместе с центрифугой. Раскрыт способ получения лизата лейкоцитов из образца

цельной крови без существенного разбавления терапевтического средства. Изобретения обеспечивают получение клеточных лизатов из выделенных клеток типа лейкоцитов и/или

циркулирующих опухолевых клеток без существенного разбавления терапевтического средства, как-то противоракового препарата. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 2 табл., 32 ил.

R U 2 5 7 8 8 4 8 C 2

R U 2 5 7 8 8 4 8 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013142287/14, 16.02.2012**  
 (24) Effective date for property rights:  
**16.02.2012**  
 Priority:  
 (30) Convention priority:  
**17.02.2011 US 61/444,044;**  
**25.05.2011 US 61/489,998**  
 (43) Application published: **27.03.2015 Bull. № 9**  
 (45) Date of publication: **27.03.2016 Bull. № 9**  
 (85) Commencement of national phase: **17.09.2013**  
 (86) PCT application:  
**US 2012/025491 (16.02.2012)**  
 (87) PCT publication:  
**WO 2012/154257 (15.11.2012)**  
 Mail address:  
**109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Sojuzpatent"**

(72) Inventor(s):  
**SINGKH SHarat (US),**  
**LIU Ksindzun (US),**  
**KHESTER Kelli D. (US)**  
 (73) Proprietor(s):  
**NESTEK S.A. (CH)**

(54) **DEVICE AND METHOD FOR LEUKOCYTE AND CANCER CELL RECOVERY BY FILTRATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine. A device comprises filtration manifolds. Each filtration manifold comprises an upper chamber, which is a cylinder tube, a lower chamber, which is a cylinder tube, and stacked filtration membranes between the upper and lower chambers. The stacked filtration membranes are able to trap leukocytes. Internal diameters of the upper and lower chambers are equal to create the cylindrical tube that enables the fluid to flow through it. The stacked filtration membranes are enclosed between a thread of the upper chamber and lower chamber. The chambers are attached to each

other. A receiving vessel for erythrocyte collection from a whole blood sample is specified in a receiving test tube, multi-well receiving vessel or multi-tube receiving vessel. The filtration manifold is mounted above the receiving vessel. The device is applicable together with a centrifuge. What is disclosed is a method for producing leukocyte lysate from the whole blood sample without substantial dilution of the therapeutic agent.

EFFECT: inventions provide producing cell lysates from the recovered cells like leukocytes and/or circulating tumour cells without substantial dilution of the therapeutic agent, such as an anti-tumour agent.

14 cl, 2 tbl, 32 dwg

C 2  
8 4 8 8 7 5 2  
R U

R U  
2 5 7 8 8 4 8  
C 2

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящее изобретение претендует на приоритет по предварительной заявке на патент США №61/444044, поданной 17 февраля 2011 г., и №61/489998, поданной 25 мая 2011 г., содержание которых включено сюда путем отсылки во всей полноте на все случаи.

Уровень техники

Рак является второй ведущей причиной смертности в США. Существует постоянно растущая потребность в точном анализе онкогенных маркеров для диагностики и прогнозирования рака. Например, выявление массива онкогенных маркеров даст возможность врачам обнаруживать рак на ранней стадии и отслеживать течение рака. Зная восприимчивость больного к противораковой терапии до начала приема лекарства, врачи бы могли выбрать самый лучший курс лечения для каждого отдельного больного. Кроме того, рутинный анализ эффективности препарата во время курса лечения может выявить невосприимчивость пациента к определенным противораковым препаратам. Такая информация могла бы использоваться для лучшего выбора схемы приема препарата.

Современные методы анализа онкогенных маркеров основываются на выявлении злокачественных клеток в гетерогенной смеси нормальных и раковых клеток типа цельной крови. Такие методы, как система выделения тотальной РНК LeukoLOCK (Ambion), выхватывают циркулирующие злокачественные клетки из цельной крови путем пропускания образца крови через одноразовые фильтры, задерживающие лейкоциты. Как правило, при извлечении злокачественных клеток эти задерживающие фильтры промывают буфером типа PBS. Эта стадия промывки изменяет внутриклеточные концентрации противораковых препаратов, ранее попавших в клетки, и тем самым может вызвать de novo сигнальные ответы внутри клеток и изменить экспрессию онкогенных маркеров. Следовательно, экспрессия онкогенных маркеров в анализируемом образце может не точно отражать реакцию больного на определенную противораковую терапию. Это может привести к неправильной оценке диагноза и/или прогноза. Настоящее изобретение преодолевает этот потенциальный источник ошибки путем обеспечения способов и устройств для выделения субпопуляций клеток крови без изменения внутриклеточной концентрации противоракового препарата.

Сущность изобретения

Настоящим изобретением предусмотрено устройство и способы выделения, сбора и/или извлечения субпопуляций клеток крови, таких как нормальные лейкоциты, пораженные болезнью лейкоциты, злокачественные лейкоциты, лейкоэмические клетки, пенистые клетки и/или циркулирующие опухолевые клетки (CTCs) из образца крови путем фильтрования без изменения внутриклеточной (in vivo) концентрации терапевтического средства, т.е. противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназы). В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены устройства для выделения клеток, включающие фильтрационное устройство и приемную пробирку.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено устройство для выделения и отделения лейкоцитов от эритроцитов в образцах цельной крови, которое включает:

фильтрационное устройство, содержащее верхнюю камеру, нижнюю камеру и одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран между верхней и нижней камерами, причем одна или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран способны задерживать лейкоциты; и

приемную пробирку для сбора эритроцитов из образца цельной крови, причем

фильтрационное устройство размещается над приемной пробиркой, при этом эритроциты отделяются от лейкоцитов и попадают в приемную пробирку после центрифугирования. В предпочтительном аспекте нижняя камера располагается между верхней камерой и приемной пробиркой.

5 В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ получения лизата лейкоцитов из образца цельной крови без существенного разбавления средства (например, противоракового препарата), который включает:

(а) внесение образца цельной крови в (фильтрационное) устройство для выделения клеток, такое как устройство, описанное здесь;

10 (b) центрифугирование устройства для захвата лейкоцитов на одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран для отделения эритроцитов в приемную пробирку; и

(с) лизис лейкоцитов, захваченных на одну или нескольких сложенных в стопку фильтровальных мембран, с помощью буфера для лизиса, но без стадии промывки между стадиями (b) и (с), получая при этом лизат лейкоцитов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ мониторинга эффективности противоракового препарата у субъекта, причем субъект страдает гематологическим раковым заболеванием, который включает:

15 введение противоракового препарата субъекту, причем первое введение противоракового препарата происходит во время  $T_1$ ;

измерение активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL во время  $T_2$  в образце от субъекта; и

20 определение курса лечения на основе активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL.

25 В некоторых воплощениях способ дополнительно включает измерение активационного состояния BCR-ABL во время  $T_0$ , т.е. перед первым введением противоракового препарата. В некоторых случаях гематологическое раковое заболевание представлено лимфомой или лейкоемией типа хронической миелогенной лейкемии (CML). Разница во времени между  $T_1$  и  $T_2$  составляет от 1 недели до 6 месяцев, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24  
30 недели. Разница во времени между  $T_0$  и  $T_1$  составляет от 1 дня до 3 недель. В некоторых других аспектах способы дополнительно включают измерение уровня экспрессии и/или активации по меньшей мере еще одной молекулы передачи сигналов типа CRKL, AKT, STAT5 и SRC.

35 В некоторых аспектах курс лечения выбирают из изменения дозы противоракового препарата, замены противоракового препарата, в том числе дополнительного противоракового препарата, изменения продолжительности лечения и поддержания существующего курса лечения.

40 В некоторых аспектах образец включает экстракт выделенных клеток. В некоторых аспектах выделенные клетки инкубируют *in vitro* по меньшей мере с одним противораковым препаратом (например, 2 противораковыми препаратами) во время  $T_0$  (до начала лечения). В других случаях выделенные клетки инкубируют *in vitro* по меньшей мере с двумя противораковыми препаратами во время  $T_2$ , перед определением  
45 курса лечения.

В следующем воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ выбора противоракового препарата у субъекта, причем субъект страдает гематологическим раковым заболеванием, который включает:

измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в выделенных клетках из образца от субъекта;

инкубирование выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения;

5 измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в инкубированных клетках; и

выбор курса лечения на основе уровня активационного состояния BCR-ABL.

В некоторых аспектах курс лечения выбирается из группы, состоящей из выбора противоракового препарата, выбора дозы противоракового препарата и определения продолжительности лечения. В некоторых других аспектах способы дополнительно включают измерение уровня экспрессии и/или активации по меньшей мере еще одной молекулы передачи сигналов типа CRKL, AKT, STAT5 и SRC.

Таким образом, настоящим изобретением предусмотрен способ выбора противоракового препарата для субъекта с гематологическим раковым заболеванием, который включает:

1) измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в выделенных клетках из образца от субъекта;

2) инкубирование выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения;

3) измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в инкубированных клетках; и выбор курса лечения на основе уровня активационного состояния BCR-ABL.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ мониторинга эффективности противоракового препарата у субъекта, причем субъект страдает гематологическим раковым заболеванием, который включает:

а) измерение активационного состояния BCR-ABL во время  $T_0$ , перед первым введением противоракового препарата;

б) введение противоракового препарата субъекту, причем первое введение противоракового препарата происходит во время  $T_1$ ;

30 с) измерение активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL во время  $T_2$  в образце от субъекта; и

д) определение курса лечения на основе активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL.

Другие цели, особенности и преимущества настоящего изобретения станут понятными специалистам в данной области из последующего подробного описания и рисунков.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена блок-схема одного воплощения настоящего изобретения.

На фиг. 2A-G представлен один вариант устройства для выделения клеток. На фиг. 2A представлен один вариант верхней камеры. На фиг. 2B-C представлена верхняя камера с крышкой; на фиг. 2D-E - нижняя камера; а на фиг. 2F-G - приемная пробирка.

На фиг. 3A-D представлены варианты нижней камеры с воронками различной функциональности.

На фиг. 4A-D представлены варианты устройства для выделения клеток. На фиг. 4A представлен вариант верхней и нижней камеры; на фиг. 4B - другой вариант верхней и нижней камеры; на фиг. 4C - вариант приемной пробирки; а на фиг. 4D - вариант сборки из верхней камеры, нижней камеры и приемной пробирки.

На фиг. 5A-D представлен другой вариант устройства для выделения клеток. На фиг. 5A представлен вариант верхней и нижней камеры; на фиг. 5B - вариант верхней и

нижней камеры с крышкой; на фиг. 5С - вариант приемной пробирки с крышкой; а на фиг. 5D - вариант нижней камеры и воронки.

На фиг. 6А-С представлен еще один вариант устройства для выделения клеток. На фиг. 6А представлен вариант верхней и нижней камеры; на фиг. 6В - вариант верхней и нижней камеры со средним рукавом; на фиг. 6С - вариант нижней камеры.

На фиг. 7А-В показано, что в клеточных лизатах, полученных из клеток К562 путем фильтрации, выявляется и измеряется как общий, так и фосфорилированный BCR-ABL. Уровень общего BCR-ABL в клетках после фильтрации близок уровням, наблюдающимся в нефилтрованных образцах. Кроме того, из фиг. 7В видно, что уровни фосфорилированного BCR-ABL в клетках К562 после фильтрации сравнимы с уровнями, обнаруженными в необработанных клетках.

На фиг. 8А-В показано, что в клеточных лизатах выявляется и измеряется уровень как общего (фиг. 8А), так и фосфорилированного BCR-ABL (фиг. 8В), при этом клеточные лизаты были получены из образцов крови с добавлением клеток К562, профильтрованы через фильтровальные мембраны и подвергнуты анализу на микроматрицах типа описанного здесь иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении. На фиг. 8В представлено сравнение выхода общего и фосфорилированного BCR-ABL в различных образцах, которые центрифугировали с различной скоростью. Самый высокий уровень сигнала фосфо-BCR-ABL (63, 60%) и общего BCR-ABL (141, 55%) получали при использовании фильтровальной мембраны PALL и центрифугировании при 600 об/мин.

На фиг. 9А-В показано, что уровень фосфорилированного BCR-ABL (А) выявляется и измеряется в клеточных лизатах, полученных из образцов крови с добавлением различного количества клеток К562, профильтрованных через фильтровальные мембраны и подвергнутых анализу на микроматрицах типа описанного здесь иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении. Способы по настоящему изобретению можно использовать для определения уровня фосфо-BCR-ABL в образцах с добавлением клеток К562. В частности, измеренный уровень фосфорилированного BCR-ABL зависит от числа клеток К562, добавленных в образцы крови. На фиг. 9В показан выход общего BCR-ABL.

На фиг. 10 представлены пациенты, подвергавшиеся анализу в одном воплощении настоящего изобретения. Пациент 1 страдает активным СМЛ и находится на лечении с декабря 2006 г. Пациент 2 также страдает активным СМЛ и получает иматиниб с января.

На фиг. 11А-В показано, что пациент 1 (А) имеет меньшее содержание фосфо-BCR-ABL на мл (например, 10979 ед/мл  $\pm$  1245 ед/мл) крови по сравнению с пациентом 2 (например, 185934 ед/мл  $\pm$  11019 ед/мл) (В), свидетельствуя, что пациент 1 реагирует на лечение иматинибом. Значения определяли без вычитания фона крови.

На фиг. 12А-В представлено выявление уровня активированного (фосфорилированного) BCR-ABL при определении описанными здесь способами. Образцы клеточных лизатов, полученные от пациента 1, разводили 1:5 и 1:20 в соответствии со способами, описанными в примере 6. Стандартный образец представляет лизаты необработанных клеток К562 с различным числом клеток на 80 мкл лизата (например, 10000, 3000, 1000, 300, 100, 30, 10 или 0 клеток / 80 мкл). Сверху на фиг. 12А представлены снимки анализа BCR-ABL методом CEER.

На фиг. 13А-В показано, что обработка иматинибом *in vitro* образца крови от пациента 1 резко уменьшает содержание фосфорилированного BCR-ABL по сравнению с обработкой нилотинибом. На фиг. 13А представлены снимки анализа BCR-ABL

методом CEER.

На фиг. 14 показано, что уровни активированного BCR-ABL в образце крови от пациента 1 изменяются при обработке возрастающими количествами ингибитора BCR-ABL (например, иматиниба или нилотиниба). Различные концентрации препарата инкубировали с образцом крови пациента 1 в течение 1,5 ч при 37°C. Среднее значение составило 26 ед. после обработки 1 мкМ иматиниба и 110 ед. после обработки 0,1 мкМ иматиниба. Сверху на фиг. 13 представлены снимки анализа BCR-ABL методом CEER.

На фиг. 15А-В показано, что иматиниб более эффективно, чем нилотиниб, снижает уровень активированного белка BCR-ABL в образце крови пациента 1. Из гистограмм видно, что обработка 1 мкМ иматиниба снижает уровень активированного BCR-ABL (А) по сравнению с необработанным образцом. Фиг. 15В - после вычитания фона крови.

На фиг. 16А-Д представлен профиль других фосфорилированных компонентов пути передачи сигналов, таких как CRKL (А), АКТ (В), STAT5 (С) и SRC (D). Из него видно, что терапия дасатинибом снижает уровни активированного АКТ, STAT4 и SRC в образце крови пациента 1. Обработка *in vitro* образцов крови пациента 1 мкМ дасатиниба была более эффективной, чем 10 мкМ иматиниба или 10 мкМ нилотиниба.

На фиг. 17 показано, что образец крови пациента 1 содержит очень высокий уровень общего BCR (около 8000000 ед/мл).

На фиг. 18А-В показано, что нилотиниб по сравнению с иматинибом более эффективно снижает уровень активированного BCR-ABL в обработанных *in vitro* образцах крови от пациента 2. Из фиг. 18А видно, что инкубация *in vitro* образца крови пациента 2 с 10 мкМ нилотиниба наиболее эффективно снижала выход сигнала фосфо-BCR-ABL. Уровни фосфорилированного BCR-ABL выявляли и измеряли после обработки *in vitro* образцов крови пациента различными дозами ингибиторов BCR-ABL в течение 1,5 ч при 37°C. Из фиг. 18В видно, что увеличение дозы нилотиниба снижает уровень активированного BCR-ABL, в то время как иматиниб не оказывает влияния на образец крови пациента 2. Выход сигнала фосфо-BCR-ABL снижался до 39,35% при 10 мкМ нилотиниба и только до 96,46% при 10 мкМ иматиниба.

На фиг. 19А-Д показано, что обработка *in vitro* образца крови пациента 2 дасатинибом уменьшает уровни активированного CRKL (А), АКТ (В), STAT5 (С) и SRC (D). С другой стороны, такая же обработка иматинибом или нилотинибом снижает только фосфорилированный АКТ.

На фиг. 20А-Д показано, что уровень фосфорилированного CRKL выявляется и измеряется в нескольких образцах крови пациентов, которые также обрабатывали ингибиторами тирозинкиназы *in vitro*. Ингибиторы BCR-ABL, такие как иматиниб и нилотиниб, снижали уровень CRKL только в образцах крови пациента 1, но не пациента 2. Из фиг. 20А-В видно, что уровень фосфо-CRKL (ед/мл крови) уменьшался в образцах крови от пациента 1, обработанных *in vitro* 10 мкМ иматиниба или 10 мкМ нилотиниба, по сравнению с необработанным образцом. Точно так же из фиг. 20С-Д видно, что выход сигнала фосфо-CRKL в образцах от пациента 1 уменьшался после обработки *in vitro*. Аналогичного ответа не наблюдалось в образцах от пациента 2.

На фиг. 21А-Д показано, что пациент 1 и пациент 2 не одинаково реагируют на иматиниб и нилотиниб. Активированный АКТ повышался в образцах от пациента 1 после обработки иматинибом, но уменьшался в образцах от пациента 2. В ответ на нилотиниб уровень АКТ оставался в основном неизменным в образцах от пациента 1 по сравнению с необработанными образцами, причем он сильно снижался в образцах от пациента 2. На фиг. 21А-В представлены результаты, рассчитанные в пикограммах активированного АКТ на 1000 проанализированных клеток. На фиг. 21С-Д представлены



результаты при определении в процентах от сигнала АКТ, полученного при анализе методом CEER.

На фиг. 22А-В представлены профили активированного STAT5 в обработанных *in vitro* образцах крови от пациента 1 (А) и пациента 2 (В). Обработка дасатинибом снижала уровень фосфо-STAT5 в образцах от пациента 1 и пациента 2. Обработка иматинибом или нилотинибом не влияла на активированный STAT5 в такой же степени.

На фиг. 23А-Д показано, что образцы от пациентов 1 и 2 имеют более низкие уровни фосфо-SRC в ответ на иматиниб, нилотиниб и дасатиниб. На фиг. 23А-В представлены уровни фосфо-SRC, рассчитанные в пикограммах на 1000 проанализированных клеток. На фиг. 23С-Д представлены уровни фосфо-SRC в процентах от сигнала фосфо-SRC.

На фиг. 24 представлен список пациентов, участвовавших в данном исследовании. Пациенты с диагнозом CML получали целенаправленное лечение. У этих пациентов отслеживали модуляции ингибирования BCR-ABL *in vivo* методом CEER.

На фиг. 25 представлен список некоторых пациентов, участвовавших в данном исследовании. Звездочкой обозначены образцы крови, которые были обработаны с использованием пробирочного варианта устройства для выделения клеток настоящего изобретения. Другие образцы крови обрабатывали с использованием варианта с 96-луночным планшетом.

На фиг. 26 представлен уровень экспрессии BCR-ABL, BCR и ABL в образце крови от нормального, здорового субъекта.

На фиг. 27А-В представлен уровень активированного BCR-ABL у пациентов 1 (А) и 7 (В) в различные моменты времени. WBC = лейкоциты. pBCR-ABL=фосфо-BCR-ABL. tBCR-ABL = общий BCR-ABL. %P/T=фосфо-BCR-ABL/tBCR-ABL в процентах.

На фиг. 28А-С представлен профиль BCR-ABL у пациента 2 в различные моменты времени. Из фиг. 28А видно, что соотношение pBCR-ABL/WBC уменьшалось в крови, взятой 5/11, и возрастало к 10/12. Звездочка означает, что данные по pBCR-ABL умножали на 10, чтобы они были видны на графике. Из фиг. 28В видно, что соотношение pBCR-ABL/общий BCR-ABL было самым низким на 5/11. На фиг. 28С представлены результаты количественного анализа RT-PCR с использованием набора MolecularMD для BCR-ABL при низких уровнях мРНК. Процент BCR-ABL/ABL изменяется в зависимости от количества мРНК в образце.

На фиг. 29А-В представлено количество лейкоцитов WBC и соотношение pBCR-ABL/WBC у пациента 3 в различные моменты времени (А). На фиг. 29В представлены изменения уровней общего и активированного BCR-ABL и проценты мРНК.

На фиг. 30А-В представлены уровни общего и активированного BCR-ABL у пациента 8 в различные моменты времени (А). На фиг. 30В представлены изменения уровней общего и активированного BCR-ABL и проценты мРНК после перевода лечения с иматиниба на дасатиниб.

На фиг. 31А-В представлены уровни общего и активированного BCR-ABL у пациентов 14(В) и 18(А) в различные моменты времени.

На фиг. 32А-В представлена реакция пациента 14 на обработку иматинибом или нилотинибом *in vitro*. Уровни общего и фосфо-BCR-ABL уменьшались после обработки препаратами.

Раскрытие сущности изобретения

Введение

Настоящим изобретением преимущественно предусмотрены новые устройства и способы выделения или извлечения субпопуляций клеток крови, таких как нормальные и/или злокачественные лейкоциты, лейкоэмические клетки, пенистые клетки и/или

циркулирующие опухолевые клетки (СТСs), из образцов крови путем фильтрования без изменения внутриклеточной концентрации терапевтического средства, как-то противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ, такого, например, как иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (РТК787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). В отличие от предшествующего уровня техники, устройства и способы настоящего изобретения дают клеточные лизаты из выделенных клеток, таких как лейкоциты, лейкемические клетки, пенстые клетки и/или циркулирующие опухолевые клетки, без существенного разбавления терапевтического средства, как-то противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ).

Слитый белок BCR-ABL человека связан с хронической миелогенной лейкемией (CML), а также с острой лимфобластной лейкемией (ALL). В частности, белок BCR-ABL является активной тирозинкиназой, которая играет важную роль в патогенезе рака.

Хотя в настоящее время иматиниб (Gleevec<sup>®</sup>) является препаратом первого ряда для недавно диагностированных пациентов с CML, однако примерно 20-25% больных не достигают устойчивого полного цитогенетического ответа. Исследования показали, что главной причиной резистентности является реактивация BCR-ABL киназной активности при продолжительном лечении иматинибом. Таким образом, измерение активности BCR-ABL найдет применение при прогнозировании ответа на терапию такими ингибиторами тирозинкиназ, как иматиниб, а также при идентификации тех пациентов, у которых возникает устойчивость к таким ингибиторам.

В некоторых воплощениях устройства и способы настоящего изобретения могут применяться для выделения или извлечения нужных клеток (например, лейкоцитов, лейкемических клеток, пенстых клеток и/или циркулирующих опухолевых клеток) из таких образцов, как кровь, и получения из них клеточных лизатов, при этом такие анализы, как, например, BCR-ABL, которые присутствуют в полученном лизате, можно подвергнуть анализу на уровень их экспрессии и/или активации таким методом, как совмещенный усиленный ферментом реактивный иммуноанализ (Collaborative Enzyme Enhanced Reactive ImmunoAssay, CEER<sup>™</sup>), также известный как совмещенный иммуноанализ, основанный на близком взаиморасположении (Collaborative Proximity ImmunoAssay, COPIA). CEER<sup>™</sup> описан в следующих патентных документах, которые включены сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи: публикация РСТ No. WO 2008/036802; публикация РСТ No. WO 2009/012140; публикация РСТ No. WO 2009/108637; публикация РСТ No. WO 2010/132723; публикация РСТ No. WO 2011/008990; и публикация РСТ No. РСТ/US 2010/053386, поданная 20 октября 2010 г.

В определенных воплощениях выявление профиля экспрессии/активации одного или нескольких онкогенных слитых белков, их субстратов и/или других белков пути передачи сигналов (например, BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1, AKT, SRC, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, PI3K и др.) может выполняться на клеточных лизатах, полученных с применением устройств и способов настоящего изобретения, для определения эффективности ингибиторной терапии у пациентов с опосредованными BCR-ABL заболеваниями (например, хронической миелогенной лейкемией). В некоторых случаях пациенты могут получать ингибиторную терапию типа лечения ингибиторами

тирозинкиназ, как описано здесь. В определенных случаях лейкемические клетки выделяют из образцов крови таких пациентов без существенного разбавления ингибитора тирозинкиназ. В некоторых других случаях выявление профиля экспрессии/активации онкогенных слитых белков и/или компонентов пути передачи сигналов в образцах после обработки ингибиторами тирозинкиназ *in vitro* может дать ценную информацию, позволяющую врачу выбрать эффективный режим терапии.

В качестве неограничивающего примера, можно подвергнуть анализу образец крови от пациента, получающего терапию ингибитором тирозинкиназ, чтобы определить эффективность лечения. Можно взять кровь у пациента и выделить нужные клетки, как-то лейкоциты, лейкемические клетки и/или циркулирующие опухолевые клетки, фильтрационным методом с применением устройств и способов по изобретению. Затем клетки подвергают лизису и анализируют таким методом, как SEER™, чтобы определить эффект лечения ингибитором тирозинкиназ на активационное состояние и/или общее количество одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов (например, таких субстратов BCR-ABL, как CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV и/или VAP-1) и/или других молекул передачи сигналов. В определенных воплощениях можно определить число лейкоцитов, лейкемических клеток и/или циркулирующих опухолевых клеток и профиль фосфорилированного BCR-ABL и других компонентов пути передачи сигналов. При этом также можно рассчитать соотношение сигналов фосфорилирования и использовать его для определения прогноза у пациента. В определенных воплощениях можно отслеживать эффективность терапии ингибиторами тирозинкиназ у пациента путем введения ингибитора тирозинкиназ во время T<sub>1</sub>, измерения активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL во время T<sub>2</sub> в образце от пациента и определения курса лечения, исходя из активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL.

В качестве другого неограничивающего примера, можно инкубировать образец крови от пациента (например, не получающего лечения ингибитором тирозинкиназ) *in vitro* с одним или несколькими ингибиторами перед выделением лейкоцитов, лейкемических клеток и/или циркулирующих опухолевых клеток (CTCs). В определенных случаях образцы цельной крови, взятые у пациентов с диагнозом СМЛ, обрабатывают одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ (например, иматинибом, нилотинибом, дасатинибом и др.). Представляющие интерес клетки, как-то лейкемические клетки, выделяют путем фильтрования с применением устройств и способов настоящего изобретения. Клетки затем подвергают лизису и анализируют таким методом, например, как SEER™, для определения эффекта лечения ингибитором тирозинкиназ на активационное состояние и/или общее количество одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов (например, таких субстратов BCR-ABL, как CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV и/или VAP-1) и/или других молекул передачи сигналов. В определенных воплощениях можно выбрать подходящий ингибитор тирозинкиназ для пациента на основе измерения активационного состояния или уровня BCR-ABL в выделенных клетках из образца, инкубации выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом, как-то с одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ до начала лечения, измерения активационного состояния или уровня BCR-ABL в проинкубированных клетках и выбора курса лечения, исходя из активационного состояния или уровня BCR-ABL.

#### Определения

В настоящем изобретении следующие термины имеют приписываемые им значения,

если не указано иначе.

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

"Гематологические раковые заболевания" включают любые типы рака, которые затрагивают кровь, костный мозг и/или лимфатические узлы. Примерами гематологических раковых заболеваний являются, без ограничения, лейкемия, лимфома и множественная миелома. Неограничивающими примерами различных видов лейкемии являются хроническая миелогенная лейкемия (СМЛ), острая лимфобластическая лейкемия (ALL), хроническая лимфоцитарная лейкемия (CLL), острая миелогенная лейкемия (AML) и крупно-гранулярная лимфоцитарная лейкемия. Разновидности СМЛ включают, например, хроническую моноцитарную лейкемию. Разновидности ALL включают, например, острую лимфобластическую лейкемию предшественников В-клеток, острую лимфобластическую лейкемию про-В-клеток, острую лимфобластическую лейкемию предшественников Т-клеток и острую бифенотипическую лейкемию. Разновидности CLL включают, например, пролимфоцитарную В-клеточную лейкемию. Разновидности AML включают, например, острую промиелоцитарную лейкемию, острую миелобластическую лейкемию и острую мегакариобластическую лейкемию. Примеры различных типов лимфомы включают, без ограничения, лимфому Ходжкина (четыре подтипа) и неходжкинскую лимфому, как-то, например, малую лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную крупно-В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому (FL), лимфому клеток мантии (MCL), волосковидно-клеточную лейкемию (HCL), лимфому маргинальной зоны (MZL), лимфому Беркитта (BL), пост-трансплантационную лимфопролиферативную болезнь (PTLD), Т-клеточную пролимфоцитарную лейкемию (Т-PLL), В-клеточную пролимфоцитарную лейкемию (В-PLL), макроглобулинемию Вальденстрома (также известна как лимфоплазмацитарная лимфома) и другие NK- или Т-клеточные лимфомы.

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

Термин "трансформация" или "преобразование" охватывает физические и/или

химические изменения аналита или образца для того, чтобы экстрагировать аналит либо изменить или модифицировать его определенным образом. В настоящем изобретении экстракция, обработка, химическая преципитация, ELISA, комплексобразование, иммуноэкстракция, физическая или химическая модификация аналита или образца для измерения уровня или концентрации или активационного состояния аналита - все это составляет преобразование. Иными словами, если аналит или образец не идентичны до и после стадии трансформации, то изменение или модификация составляет преобразование.

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

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

Термин "молекула передачи сигналов" или "сигнальный трансдуктор" включает белки и другие молекулы, осуществляющие процесс, посредством которого клетка преобразует внеклеточный сигнал или раздражитель в ответ, который как правило включает упорядоченную последовательность биохимических реакций внутри клетки. Примеры молекул передачи сигналов включают, без ограничения, рецепторные тирозинкиназы, такие как EGFR (например, EGFR/HER-1/ErbB1, HER-2/Neu/ErbB2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (например, PDGFRA, PDGFRB), c-Met, c-KIT/SCFR, INSR (инсулиновый рецептор), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (рецептор, родственник инсулиновому рецептору), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-кадгерин, LTK (тирозинкиназа

лейкоцитов), ALK (киназа анапластической лимфомы), ROR 1-2, MUSK, ААТҮК 1-3, RTK 106, и укороченные формы рецепторных тирозинкиназ, такие как p95ErbB2; нерцепторные тирозинкиназы, такие как Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack и LIMK; тирозинкиназы компонентов сигнального каскада, такие как Акт, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, She (p66), PI3K, Ras (например, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, киназа p70 S6, p53, циклин D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, P27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 и паксиллин; ядерные рецепторы гормонов, такие как эстрогеновый рецептор (ER), прогестероновый рецептор (PR), андрогеновый рецептор, глюкокортикоидный рецептор, минералокортикоидный рецептор, рецептор витамина А, рецептор витамина D, ретиноидный рецептор, рецептор тиреоидного гормона и рецепторы-"сироты", ко-активаторы и репрессоры ядерных рецепторов; и их комбинации.

Термин "образец" в настоящем изобретении охватывает любые биологические образцы, полученные от пациента. Образцы включают, без ограничения, цельную кровь, плазму, сыворотку, смывную жидкость протоков, аспират из сосков, лимфу (например, рассеянные опухолевые клетки лимфатических узлов), аспират костного мозга, слюну, мочу, кал (т.е. фекалии), мокроту, смывную жидкость бронхов, слезы, тонкоигольный аспирационный биоптат (например, взятый при рандомной периареолярной тонкоигольной аспирации) и любые другие жидкости организма, образцы тканей (например, опухолевой ткани), как-то биоптаты опухолей (например, игольные биоптаты) или лимфатических узлов (например, биоптат индикаторного лимфоузла) и клеточные экстракты из них. В некоторых воплощениях образец представлен цельной кровью или ее фракционным компонентом, таким как плазма, сыворотка, эритроциты, лейкоциты типа мононуклеаров периферической крови и/или редкие циркулирующие клетки. В некоторых воплощениях образец получают путем выделения лейкоцитов или циркулирующих клеток твердой опухоли из цельной крови или ее клеточных фракций, используя любые известные способы. В других воплощениях образцом является фиксированный формалином заключенный в парафин (FFPE) образец раковой ткани, например, из твердой опухоли.

В настоящем изобретении термин "циркулирующие клетки" охватывает внеопухолевые клетки, которые дали метастазы или микрометастазы из твердой опухоли. Примеры циркулирующих клеток включают, без ограничения, циркулирующие опухолевые клетки, раковые стволовые клетки и/или клетки, которые мигрируют в опухоль (например, циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники, циркулирующие эндотелиальные клетки, циркулирующие проангиогенные миелоидные клетки, циркулирующие дендритные клетки и др.).

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

данном образце ткани.

Термин "субъект" или "пациент" или "индивид" обычно означает человека, но может включать и других животных, таких, например, как другие приматы, грызуны, собаки, кошки, лошади, овцы, свиньи и т.п.

5 "Матрица" или "микроматрица" содержит отдельный набор и/или серийное разведение захватывающих антител, иммобилизованных или фиксированных на твердой подложке, такой, к примеру, как стекло (например, предметное стекло), пластик, чипы, иглы, фильтры, шарики (например, магнитные шарики, полистироновые шарики и др.), бумага, мембрана (например, нейлоновая, нитроцеллюлозная, поливинилиденфторидная (PVDF)  
10 и др.), пучки волокон или любые другие подходящие субстраты. Захватывающие антитела обычно иммобилизуют или фиксируют на твердой подложке посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий (например, ионных связей, гидрофобных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, диполь-дипольных связей). В некоторых воплощениях захватывающие антитела содержат захватывающие теги, которые взаимодействуют с захватывающими агентами,  
15 фиксированными на твердой подложке. Матрицы, используемые в способах настоящего изобретения, как правило, содержат несколько различных захватывающих антител и/или концентраций захватывающих антител, конъюгированных на поверхности твердой подложки в различных известных/адресуемых положениях.

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

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

Термин "зависимое от активационного состояния антитело" охватывает такие детектирующие антитела, которые специфичны (т.е. связывают, связываются или

образуют комплекс с) к одному или нескольким анализам в образце, которые находятся в определенном состоянии активации. В предпочтительных воплощениях зависимое от активационного состояния антитело детектирует степень фосфорилирования, убиквитинирования и/или комплексования одного или нескольких анализатов, как-то  
 5 одного или нескольких онкогенных слитых белков или молекул передачи сигналов. В некоторых воплощениях с помощью зависимого от активационного состояния антитела детектируется фосфорилирование киназного домена ABL слитого белка BCR-ABL. В других воплощениях с помощью зависимых от активационного состояния антител детектируется фосфорилирование тирозинкиназ представителей семейства  
 10 рецепторов EGFR и/или образование гетеродимерных комплексов между представителями семейства EGFR.

Неограничивающие примеры активационных состояний онкогенных слитых белков, которые подходят для детектирования с помощью зависимых от активационного состояния антител, включают фосфорилированные формы BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-  
 15 PBX1, RAR $\alpha$ -PML, IREL-URG, CBF $\beta$ -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C $\alpha$ 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG и TPR-MET. Примеры активационных состояний (приведены в скобках) молекул передачи сигналов, которые подходят для детектирования с помощью зависимых от  
 20 активационного состояния антител, включают, без ограничения, EGFR (EGFRvIII, фосфорилированный (p-) EGFR, EGFR:Shc, убиквитинированный (u-) EGFR, p-EGFRvIII); ErbB2 (p95:укороченный (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-Met (p-c-Met или комплекс c-Met/HGF), ER (p-  
 25 ER (S118, S167); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFR $\alpha$  (p-PDGFR $\alpha$ ); PDGFR $\beta$  (p-PDGFR $\beta$ ); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLC $\gamma$ , VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLC $\gamma$ , VEGFR2:Src, VEGFR2:гепаринсульфат, VEGFR2:VE-кадгерин); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-  
 30 FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tie1 (p-Tie1); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NF $\kappa$ B и/или IKK (p-IK (S32), p-NF $\kappa$ B (S536), p-p65:IKK $\alpha$ ); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad: 14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S200)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); и паксиллин (фосфо-паксиллин (Y118)).

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

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" охватывает дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и их полимеры в одноцепочечном или  
 45 двухцепочечном виде, такие, к примеру, как ДНК и РНК. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов либо модифицированные остатки или связи в остове, как синтетического, так и естественного



происхождения или не встречающиеся в природе, и обладающие такими же свойствами связывания, как и исходная нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты (PNAs).

5 Если не оговорено специально, то термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие такими же свойствами связывания, как и исходная нуклеиновая кислота. Если не указано иначе, то последовательность определенной нуклеиновой кислоты также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты и комплементарные последовательности, а также приведенную в явном виде последовательность.

Термин "ингибитор тирозинкиназ" охватывает целый ряд терапевтических средств или препаратов, действующих как избирательные или неизбирательные ингибиторы рецепторных и/или нерцепторных тирозинкиназ. Не придерживаясь какой-либо определенной теории, ингибиторы тирозинкиназ обычно ингибируют тирозинкиназы мишени посредством связывания с АТФ-связывающим сайтом фермента. Примеры ингибиторов тирозинкиназ включают, без ограничения, иматиниб (Gleevec<sup>®</sup>; STI571), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>; SU11248), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>; OSI-1774), лапатиниб (GW572016; GW2016), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), их производные, аналоги и комбинации. Другие ингибиторы тирозинкиназ, пригодные для применения в настоящем изобретении, описаны, например, в патентах США Nos. 5,618,829, 5,639,757, 5,728,868, 5,804,396, 6,100,254, 6,127,374, 6,245,759, 6,306,874, 6,313,138, 6,316,444, 6,329,380, 6,344,459, 6,420,382, 6,479,512, 6,498,165, 6,544,988, 6,562,818, 6,586,423, 6,586,424, 6,740,665, 6,794,393, 6,875,767, 6,927,293 и 6,958,340. Специалистам в данной области должны быть известны и другие ингибиторы тирозинкиназ, пригодные для применения в настоящем изобретении. В определенных случаях ингибиторы тирозинкиназ вводятся в фармацевтически приемлемой форме, включая, без ограничения, соли щелочных или щелочноземельных металлов, как-то соли алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия или цинка; соли аммония, как-то третичные или четвертичные соли аммония; и соли кислот, как-то соли сукцината, тартрата, битартрата, дигидрохлорида, салицилата, гемисукцината, цитрата, изоцитрата, малата, малеата, месилата, гидрохлорида, гидробромида, фосфата, ацетата, карбамата, сульфата, нитрата, формиата, лактата, глюконата, глюкуроната, пирувата, оксалоацетата, fumarата, пропионата, аспартата, глутамата или бензоата.

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

40 Термин "курс терапии" включает любые терапевтические подходы, предпринимаемые для облегчения или предотвращения одного или нескольких симптомов, связанных с раком типа гематологических раковых заболеваний (например, лейкемии, лимфомы и т.п.). Термин охватывает введение любых соединений, препаратов, процедур и/или режимов, применимых для улучшения здоровья индивидуума, страдающего раком, и включает любые описанные здесь терапевтические средства. Специалистам должно быть известно, что курс лечения или дозировка при текущем курсе лечения может быть изменена (например, увеличена или уменьшена) на основании уровня экспрессии и/или активации одного или нескольких онкогенных слитых белков и/или молекул передачи

сигналов, установленных способами настоящего изобретения.

#### Описание воплощений

Настоящим изобретением преимущественно предусмотрены новые устройства и способы выделения или извлечения субпопуляций клеток крови, таких, например, как лейкоциты (например, нормальные и/или злокачественные лейкоциты), лейкоэмические клетки, пенстые клетки и/или циркулирующие опухолевые клетки (CTCs) из образцов крови путем фильтрования без изменения внутриклеточной концентрации терапевтического средства, как-то противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ, такого, например, как иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). В отличие от предшествующего уровня техники, устройства и способы настоящего изобретения обеспечивают клеточные лизаты из выделенных клеток, таких как лейкоциты, лейкоэмические клетки, пенстые клетки и/или циркулирующие опухолевые клетки, без существенного разбавления терапевтического средства, как-то противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ).

В некоторых случаях настоящим изобретением предусмотрены устройства и способы выделения опухолевых клеток из гомогената, лизата или клеточного экстракта твердой опухоли.

В определенных воплощениях устройства и способы настоящего изобретения в значительной степени удаляют плазму, которая содержит протеазы и фосфатазы, которые могут разрушать или дефосфорилировать нужные белки типа представляющих интерес аналитов, а также в значительной степени удаляют мешающие белки, которые могут повлиять на анализ нужного белка.

На фиг. 1 представлено одно воплощение способа выделения и сбора опухолевых клеток по настоящему изобретению. Специалисты должны распознать другие изменения и модификации способа в рамках настоящего изобретения.

В одном способе 100 выделяют и собирают опухолевые клетки от пациентов типа больных, страдающих СМЛ (необязательно проходящих лечение). Как видно из фиг. 1, собирают цельную кровь ПО и фильтруют для удаления эритроцитов. В некоторых случаях цельную кровь от пациентов можно обработать или не обрабатывать противораковым препаратом типа ингибитора BCR-ABL перед выделением.

Преимущественно данные способы гарантируют, что количество и концентрация ингибитора или терапевтического средства, присутствующего в клетке *in vivo*, сохранится *in vitro*. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрен способ получения лизата лейкоцитов из образца цельной крови без существенного разбавления или практически без разбавления терапевтического средства, как-то противоракового препарата. Собранную цельную кровь вносят в устройство, как описано здесь. В некоторых аспектах отбирают свежую кровь перед выделением лейкоцитов. Если свежий образец крови недоступен, образцы крови можно обрабатывать в течение какого-то времени, например, в течение 3 ч, 6 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч (1 день), 36 ч, 48 ч и т.п. после взятия крови. Как правило, образцы, держат при комнатной температуре перед обработкой. В некоторых аспектах в образцы крови 110 может быть добавлен ингибитор протеаз и/или фосфатаз. После этого кровь перемешивают, например, осторожно переворачивая вверх-вниз в пробирке или флаконе.

После этого удаляют эритроциты 121, обычно центрифугированием через фильтр или мембрану. В некоторых аспектах используется специально разработанное фильтрационное устройство, как показано здесь. Предпочтительно после центрифугирования эритроциты находятся в пробирке. В одном аспекте способ включает центрифугирование устройства с флаконом или пробиркой для захвата или выделения лейкоцитов 142 на фильтровальной мембране типа комплекта сложенных в стопку фильтровальных мембран (одного или нескольких фильтров) и отделения эритроцитов (и плазмы) в приемную пробирку.

После фильтрации или центрифугирования эритроцитов (и плазмы) для лизиса захваченных лейкоцитов 167 используется буфер для лизиса. В одном аспекте используется безбелковый буфер для лизиса. После захвата лейкоциты подвергают лизису, но без стадии промывки после захвата, получая при этом лизат лейкоцитов. Концентрация терапевтического средства в клетках цельной крови одинакова до и после процедуры 100. В некоторых случаях концентрация препарата составляет 10 мкМ до процедуры 100 и 10 мкМ после процедуры 100. В других случаях концентрация препарата составляет 1 мкМ до процедуры 100 и 1 мкМ после процедуры 100. В других случаях концентрация препарата составляет 0,1 мкМ до процедуры 100 и 0,1 мкМ после процедуры 100. Затем лизат собирают 173 во вторую приемную пробирку, например, путем центрифугирования. Лизат из лейкоцитов получается без существенного разбавления или практически без разбавления терапевтического средства типа противоракового препарата. То есть внутриклеточная концентрация терапевтического средства (например, противоракового препарата) *in vivo* будет в основном или практически такая же, как и концентрация терапевтического средства (например, противоракового препарата) *in vitro* в клеточном лизате.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения лизата лейкоцитов (например, нормальных, злокачественных и/или пораженных болезнью лейкоцитов) из образца цельной крови без существенного разбавления терапевтического средства (например, противоракового препарата), который включает:

(а) внесение образца цельной крови в (фильтрационное) устройство для выделения клеток типа устройства, описанного здесь;

(b) центрифугирование устройства с захватом лейкоцитов на одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран и отделением эритроцитов (и плазмы) в приемную пробирку; и

(c) лизис лейкоцитов, захваченных на одной или нескольких уложенных в стопку фильтровальных мембранах, буфером для лизиса, но без стадии промывки между стадиями (b) и (c), получая при этом лизат лейкоцитов.

В некоторых воплощениях способ по изобретению дополнительно включает замену приемной пробирки на вторую приемную пробирку между стадиями (b) и (c). В некоторых других воплощениях способ по изобретению дополнительно включает центрифугирование устройства, содержащего вторую приемную пробирку, после лизиса лейкоцитов на стадии (c) и сбор лизата лейкоцитов во вторую приемную пробирку.

В некоторых воплощениях образец цельной крови берут у субъекта, получающего терапевтическое средство (например, противораковый препарат). В других воплощениях образец цельной крови инкубируют *in vitro* с терапевтическим средством (например, противораковым препаратом) перед внесением в устройство.

В других воплощениях образец цельной крови берут у субъекта, страдающего или предположительно страдающего атеросклерозом или получающего лечение от атеросклероза (например, терапию статином). В других воплощениях образец цельной

крови берут у субъекта, страдающего или предположительно страдающего раком, как-то гематологическим раковым заболеванием (например, лейкемией типа хронической миелогенной лейкемии (СМЛ)) или получающего лечение от рака (например, терапию противораковым препаратом).

5 В определенных воплощениях в лизате лейкоцитов измеряют уровень экспрессии и/или активации по меньшей мере одного онкогенного слитого белка и/или молекулы передачи сигналов. В предпочтительных воплощениях по меньшей мере один онкогенный слитый белок представлен BCR-ABL. Дополнительные примеры представляющих интерес онкогенных слитых белков и/или молекул передачи сигналов  
10 описаны здесь.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено устройство для выделения и отделения лейкоцитов (например, нормальных, злокачественных и/или пораженных болезнью лейкоцитов) от эритроцитов (и плазмы) в образце цельной крови, которое включает:

15 фильтрационное устройство, содержащее верхнюю камеру, нижнюю камеру и одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран между верхней и нижней камерой, причем одна или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран способны удерживать лейкоциты; и

приемную пробирку для сбора эритроцитов (и плазмы) из образца цельной крови,  
20 причем фильтрационное устройство размещается над приемной пробиркой, при этом эритроциты (и плазма) отделяются от лейкоцитов и собираются в приемную пробирку после центрифугирования.

В некоторых воплощениях образец цельной крови вносится в верхнюю камеру фильтрационного устройства. В других воплощениях фильтрационное устройство  
25 содержит две, три или четыре сложенные в стопку фильтровальные мембраны. В некоторых воплощениях верхняя камера дополнительно содержит защелкивающуюся крышку, прикрепленную к ней.

В других воплощениях устройство дополнительно содержит вторую приемную пробирку, причем (первая) приемная пробирка, содержащая эритроциты (и плазму),  
30 заменяется на вторую приемную пробирку после (первого) центрифугирования. В некоторых случаях лизат лейкоцитов собирается во вторую приемную пробирку после добавления лизирующего буфера в верхнюю камеру и (второго) центрифугирования. В определенных случаях буфер для лизиса добавляется в верхнюю камеру без промывания одной или нескольких сложенных в стопку фильтровальных мембран. В  
35 некоторых воплощениях лизирующий буфер инкубируют над фильтром по меньшей мере в течение 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 или 120 минут, предпочтительно от 15 до 30 минут, при 4°C (или на льду) перед центрифугированием и сборанием во вторую приемную пробирку.

В альтернативных воплощениях устройство дополнительно содержит вторую  
40 приемную пробирку, при этом одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран вынимают из фильтрационного устройства (например, пинцетом) после центрифугирования и помещают во вторую приемную пробирку. В некоторых случаях вторая приемная пробирка содержит лизирующий буфер, а лейкоциты подвергаются лизису после того, как одну или несколько сложенных в стопку мембран помещают  
45 или инкубируют во второй приемной пробирке.

В некоторых случаях лизат, полученный с помощью устройства настоящего изобретения, содержит клеточный экстракт нормальных и/или злокачественных (например, раковых) лейкоцитов типа гранулоцитов (полиморфноядерных лейкоцитов),

в том числе, например, нейтрофилов, базофилов и эозинофилов; агранулоцитов (однойядерных лейкоцитов), в том числе, например, мононуклеаров периферической крови типа лимфоцитов и моноцитов; лейкоэмических клеток, в том числе, например, клеток хронической миелогенной лейкемии (СМЛ); макрофагов, в том числе, например, пенистых клеток; и их смеси.

В некоторых воплощениях лейкоциты, лейкоэмические клетки, пенистые клетки, циркулирующие клетки или другие клетки, присутствующие в образце цельной крови, можно простимулировать *in vitro* одним или несколькими факторами роста до, во время и/или после инкубации с одним или несколькими терапевтическими средствами типа одного или нескольких представляющих интерес противораковых препаратов.

Стимулирующие факторы роста включают, без ограничения, фактор роста эпидермиса (EGF), херегулин (HRG), TGF- $\alpha$ , PIGF, ангиопоэтин (Ang), NRG1, PGF, TNF- $\alpha$ , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, цитокины и др. Методики стимуляции и лизиса клеток, встречающихся в цельной крови, описаны в публикации РСТ No. WO 2008/036802, которая включена сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи.

В некоторых воплощениях образец цельной крови берут у субъекта, страдающего раком или с подозрением на рак. В некоторых случаях рак может быть вызван образованием онкогенного слитого белка вследствие хромосомной транслокации в раковых клетках. Неограничивающие примеры такого рака включают гематологические раковые заболевания, остеогенную саркому, саркому мягких тканей и их комбинации. В определенных воплощениях гематологическое раковое заболевание представлено лейкемией или лимфомой. В одном предпочтительном воплощении лейкемия представлена хронической миелогенной лейкемией (СМЛ). В других случаях субъект получает либо не получает лечение противораковым препаратом.

В некоторых других воплощениях противораковый препарат содержит противосигнальное средство (т.е. цитостатик) типа моноклонального антитела или ингибитора тирозинкиназ; антипролиферативное средство; химиотерапевтическое средство (т.е. цитотоксический препарат); гормональное терапевтическое средство; радиотерапевтическое средство; вакцину; и/или любое другое соединение, способное уменьшить или устранить неконтролируемый рост аномальных клеток типа раковых клеток. В некоторых воплощениях выделенные клетки обрабатывают одним или несколькими противосигнальными средствами, антипролиферативными средствами и/или гормональными терапевтическими средствами в сочетании по меньшей мере с одним химиотерапевтическим средством.

Примеры противосигнальных средств включают, без ограничения, моноклональные антитела, такие как трастузумаб (Herceptin<sup>®</sup>), алемтузумаб (Campath<sup>®</sup>), бевацизумаб (Avastin<sup>®</sup>), цетуксимаб (Erbix<sup>®</sup>), гемтузумаб (Mylotarg<sup>®</sup>), панитумумаб (Vectibix<sup>™</sup>), ритуксимаб (Rituxan<sup>®</sup>) и тоситумомаб (BEXXAR<sup>®</sup>); ингибиторы тирозинкиназ, такие как иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Тукерб<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (РТК787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), понатиниб (AP24534) и вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474); и их комбинации.

Примеры антипролиферативных средств включают ингибиторы mTOR, такие как сиролимус (рапамацин), темсиролимус (CCI-779) и эверолимус (RAD001); ингибиторы Akt, такие как 1L6-гидроксиметил-хиро-инозитол-2-(R)-2-O-метил-3-O-октадецил-sn-

глицерокарбонат, 9-метокси-2-метилэллиптициний-ацетат, 1,3-дигидро-1-(1-((4-(6-фенил-1H-имидазо[4,5-g]хиноксалин-7-ил)фенил)метил)-4-пиперидинил)-2H-бензимидазол-2-он, 10-(4'-(N-диэтиламино)бутил)-2-хлорфеноксазин, 3-формилхромон-тиосемикарбазон (комплекс с Cu(II)Cl<sub>2</sub>), API-2, 15-мерный пептид, происходящий из аминокислот 10-24

5 протоонкогена TCL1 (Hiromura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1 и соединения, описанные в Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc, 125:1144-1145 (2003) и Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003); а также их комбинации.

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

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

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

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

В некоторых других воплощениях образец цельной крови берут у субъекта, страдающего или предположительно страдающего атеросклерозом (также известным как артериосклеротическая сосудистая болезнь или ASVD). Атеросклероз - заболевание, которое обычно поражает артериальные кровеносные сосуды в виде хронических воспалительных реакций в стенках артерий, которые в значительной степени обусловлены накоплением макрофагов типа пенистых клеток, чему способствуют липопротеины низкой плотности (белки плазмы, переносящие холестерин и триглицериды) без адекватного удаления жиров и холестерина из макрофагов

функциональными липопротеинами высокой плотности (HDL). Примеры препаратов, пригодных для лечения атеросклероза, включают, без ограничения, статины, такие как аторвастатин (Lipitor и Torvast), флувастатин (Lescol), ловастатин (Mevacor, Altacor, Altoprev), мевастатин (Compactin), питавастатин (Livalo, Pitava), правастатин (Pravachol, Selektine, Lipostat), росувастатин (Crestor), симвастатин (Zocor, Lipex), их комбинации, а также такие комбинированные препараты, как эзетимиб и симвастатин (Vytorin), ловастатин и ниацин (Advicor), аторвастатин и амлодипин безилат (Caduet), и симвастатин и ниацин (Simcor). В некоторых случаях субъект получает либо не получает лечение препаратом против атеросклероза типа статина.

В других воплощениях образец цельной крови инкубируют *in vitro* с одним или несколькими терапевтическими средствами, как-то с одним или несколькими противораковыми препаратами, перед выделением лейкоцитов. В определенных воплощениях лейкоциты, которые удерживаются или захватываются на фильтровальных мембранах, включают нормальные лейкоциты, злокачественные лейкоциты или их комбинации.

В определенных воплощениях устройства по изобретению обеспечивают получение лизата или клеточного экстракта из образцов цельной крови путем извлечения или выделения представляющих интерес клеток, таких как злокачественные лейкоциты (например, клетки хронической миелогенной лейкемии (СМЛ)) без каких-либо стадий промывки после извлечения или выделения клеток. Полученный таким образом клеточный экстракт можно подвергнуть анализу на уровень экспрессии и/или активации одного или нескольких онкогенных слитых белков типа BCR-ABL, их субстратов, путей или их комбинаций. Не придерживаясь какой-либо конкретной теории, устранение потребности в какой-либо стадии промывки после выделения клеток является выгодным, поскольку нужные клетки можно получить из крови без изменения внутриклеточной концентрации терапевтического средства типа противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ). Как изложено в нижеприведенных примерах, выделение клеток с помощью описанных здесь устройств, без каких-либо стадий промывки, противоречит общепринятой практике промывания клеток после выделения и дает клеточные экстракты из выделенных клеток без существенного разбавления терапевтического средства, как-то противоракового препарата (например, ингибитора тирозинкиназ, такого, например, как Gleevec<sup>®</sup>, Tassigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup> и др.) внутри клеток.

В определенных воплощениях устройства настоящего изобретения существенно близки или идентичны приведенным здесь устройствам. Специалистам должно быть понятно, что размеры одного или нескольких компонентов описанного и представленного здесь устройства могут варьировать с учетом таких параметров, к примеру, как объем образца, вносимого в устройство, тип центрифуги, используемой для центрифугирования устройства, объем буфера для лизиса, добавляемого в верхнюю камеру устройства и т.д.

Обращаясь теперь к фиг. 2А-Г, рассмотрим представленное там фильтрационное устройство или устройство для сбора образцов. На фиг. 2А представлена верхняя часть или камера устройства 201, которая представляет собой цилиндрическую трубку с наружной резьбой 210. Верхняя часть с крышкой 215 представлена на фиг. 2В-С. Эта верхняя часть 201 необязательно может иметь крышку 215, которая защелкивается и предотвращает разливание образца. В некоторых воплощениях защелкивающаяся крышка 215 с помощью полоски материи 217 прикреплена к верхней части и может использоваться для надежного закрывания отверстия в верхней камере после добавления образца и/или реагента в фильтрационное устройство. Верхняя камера 201 устройства

по настоящему изобретению предпочтительно прикрепляется к нижней части или камере 222, как показано на фиг. 2D-E. Резьба 210 из верхней части прочно входит во внутреннюю нарезку 221 нижней части или камеры 222. Предпочтительно внутренние диаметры верхней и нижней камеры близки, так что получается цилиндрическая трубка, через которую может проходить жидкость.

В некоторых аспектах нижняя камера 222 фильтрационного устройства представляет собой цилиндрическую трубку с внутренней винтовой резьбой на конце 221 (фиг. 2E). В некоторых аспектах между винтовой резьбой верхней камеры и нижней камеры помещается одна или несколько (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) сложенных в стопку фильтровальных мембран перед привинчиванием камер друг к другу. Фильтры расположены на цевочном колесе 225 нижней камеры, как показано на фиг. 2E.

В определенных аспектах фильтровальные мембраны могут быть 2-4 (например, 2, 3 или 4) слоями фильтров типа фильтров Pall (например, Leukosorb Medium). В других аспектах фильтрационное устройство представляет собой набор из отдельных камер и фильтров, которые соединяют вместе перед использованием, как в комплекте.

Фильтрационное устройство может размещаться над приемной пробиркой 250, как показано на фиг. 2F-G, для отделения эритроцитов (и плазмы) из образца крови пациента. Части из фиг. 2A, фиг. 2D и фиг. 2F соединяются друг с другом, составляя одно воплощение блока фильтрационного устройства настоящего изобретения.

Фильтрационное устройство (верхняя и нижняя камеры) может размещаться над приемным сосудом 250 для отделения эритроцитов из образца крови пациента. Нижняя камера собранного фильтрационного устройства вставляется в приемный сосуд через отверстие 255, а верхняя камера находится сверху над отверстием приемного сосуда.

Примеры приемного сосуда 250 включают, без ограничения, пробирки типа пластиковых пробирок для культур на 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 14 мл, 16 мл и т.д.

В некоторых аспектах нижняя часть фильтрационного устройства настоящего изобретения имеет встроенную или вставочную воронку в нижней части. Как видно из фиг. 3A-E, воронка может иметь определенные угловые размеры, гарантирующие, что образец будет проходить в нижнюю камеру и через нее в приемную пробирку, не стекая по внутренней стенке нижней части. Например, на фиг. 3A представлена внутренняя воронка 301 примерно на  $2^\circ$  от горизонтали. На фиг. 3B представлена внутренняя воронка 310 примерно на  $7^\circ$  от горизонтали. В некоторых других аспектах, на фиг. 3C представлена внутренняя воронка примерно на  $12^\circ$  от горизонтали. На фиг. 3D и фиг. 3E представлены и другие воплощения дизайна воронки настоящего изобретения.

Специалистам должно быть понятно, что воронка может находиться под любым углом с тем, чтобы фильтрат не попадал на стенки нижней части. Подходящие углы включают  $1^\circ$ ,  $2^\circ$ ,  $3^\circ$ ,  $4^\circ$ ,  $5^\circ$ ,  $6^\circ$ ,  $7^\circ$ ,  $8^\circ$ ,  $9^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $11^\circ$ ,  $12^\circ$ ,  $13^\circ$ ,  $14^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $16^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$ ,  $19^\circ$ ,  $20^\circ$  или больше для детали воронки. В альтернативном воплощении, на фиг. 3E представлена вставная воронка 325, входящая в нижнюю часть фильтрационного устройства настоящего изобретения.

В некоторых аспектах фильтрационное устройство настоящего изобретения представлено на фиг. 4A-D. На фиг. 4A представлены верхняя часть или камера 410, нижняя часть или камера 420 и сложенная стопка фильтров 412 между ними (вид в разобранном состоянии). На фиг. 4A представлен вид устройства сверху 405 и вид устройства снизу 422. На фиг. 4B представлена верхняя часть 430 и нижняя камера или часть 420, привинченные друг к другу. На фиг. 4B представлен вид устройства сверху 405 и вид устройства снизу 425. На фиг. 4C представлена приемная пробирка 435. В



процессе работы, в некоторых аспектах, приемная пробирка 435 предпочтительно содержит эритроциты. На фиг. 4С представлен вид устройства сверху 434 и вид устройства снизу 440. На фиг. 4D представлена приемная пробирка 435, соединенная с верхней камерой 410 и нижней камерой или частью 420. На фиг. 4D представлен вид устройства сверху 405 и вид устройства снизу 461.

В некоторых воплощениях, в процессе работы, в верхнюю камеру собранного блока для выделения клеток вносится объем (например, 1 мл) крови пациента, обработанной раствором смеси, содержащей ингибиторы протеаз и/или фосфатаз. Блок можно центрифугировать в настольной или клинической центрифуге, например, в центрифуге Allegra 6R (Beckman), в центрифуге Sorvall Legend (Thermo Scientific) или центрифуге Heraeus Megafuge (Kendro). В некоторых аспектах блок центрифугируют в течение 5-30 мин при 600-2000 об/мин при 4°C. После центрифугирования приемный сосуд, содержащий эритроциты (и плазму), вынимают из устройства для выделения клеток, закрывают крышкой и убирают.

В других воплощениях к фильтрационному устройству приставляется второй приемный сосуд. Неограничивающие примеры второй приемной пробирки для лизата клеток включают микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл и 2 мл. Без стадии промывки в верхнюю камеру фильтрационного устройства добавляется буфер для лизиса. Верхнюю камеру закрывают крышкой и фильтрационное устройство и вторую приемную пробирку сильно встряхивают. В некоторых случаях аппарат для выделения инкубируют при 4°C в течение по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 или 120 мин, предпочтительно от 15 до 30 мин. Затем блок можно центрифугировать (например, 3000 об/мин на 5 мин). Клеточный лизат можно перенести в другой центрифужный сосуд типа микроцентрифужной пробирки для хранения при -70°C.

На фиг. 5A-D представлено альтернативное воплощение фильтрационного устройства или блока 500 для сбора образцов настоящего изобретения. В этом воплощении имеется верхняя часть 501 и нижняя часть или камера 530 с рукавом или соединительной муфтой 522. Соединительная муфта или рукав 522 необязательно может по желанию прикрепляться к верхней части 501 или нижней части 530. Как видно из фиг. 5B, в некоторых аспектах верхняя часть имеет резьбу и может прикрепляться к рукаву или нижней части. На фиг. 5B представлен блок с крышкой 510. Из фиг. 5C видно, что нижняя часть 530 может по желанию иметь крышку 534, сохраняющую эту часть запечатанной. На фиг. 5D представлена нижняя камера или часть 522, на которой четко видна внутренняя резьба. Эта часть может по желанию прикрепляться к нижней части таким образом, чтобы рукав составлял одно целое с нижней частью устройства.

На фиг. 6A-C представлен еще один аспект настоящего изобретения. На фиг. 6A представлено поперечный разрез устройства по настоящему изобретению, в котором нижняя часть 610 соединяется с верхней частью 625 через соединительный рукав 633. На врезке на фиг. 6B крупным планом представлены части, соединяемые друг с другом резьбой 625, и срединный срез 633 со срезом воронки. Также представлена приемная камера 610. На фиг. 6C представлен срединный разрез с геометрией колеса со спицами. На этом колесе необязательно находится стопка фильтров.

В некоторых других воплощениях, после центрифугирования устройства для выделения клеток и сбора эритроцитов в приемную пробирку, верхнюю камеру отделяют от нижней камеры фильтрационного устройства (например, отвинчивают). С помощью пинцета фильтровальные мембраны 422 (фиг. 4A), содержащие отделенные лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки, помещают во второй приемный сосуд, содержащий буфер для лизиса клеток. Неограничивающие примеры второго приемного

сосуда включают микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл и 2 мл. В некоторых случаях второй приемный сосуд дополнительно инкубируют при 4°C по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 или 120 мин, предпочтительно от 15 до 30 мин. В других аспектах второй приемный сосуд ставят на лед и обрабатывают на вибротрясающей платформе по 10 сек через каждые 5 10 мин на протяжении 30 мин. В некоторых воплощениях клеточный лизат хранится при -70°C. В других воплощениях сосуд, содержащий лизат, центрифугируют для удаления фильтровальных мембран и фрагментов клеток. Супернатант из клеточного лизата можно перенести в другую пробирку для хранения при -70°C.

В некоторых воплощениях устройства по изобретению представлены в виде 10 стерильного комплекта. В некоторых случаях стерильный комплект содержит фильтрационное устройство, включающее верхнюю камеру (необязательно с прикрепленной защелкивающейся крышкой), нижнюю камеру и стопку из одной или нескольких фильтровальных мембран (например, 1, 2, 3 или 4 слоя фильтровальных мембран) и одну или несколько приемных пробирок (необязательно с 15 защелкивающимися крышками). Каждый из компонентов может быть упакован по отдельности, а собранный комплект или каждый из компонентов помещен в стерильную упаковку. В других случаях стерильный комплект включает трубкообразный фильтровальный блок и одну или несколько приемных пробирок (необязательно с защелкивающимися крышками). Трубнообразный фильтровальный блок содержит 20 цилиндрическую трубку с прикрепленными с одного конца одной или несколькими (например, множеством из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или больше) фильтровальными мембранами, причем мембраны способны удерживать здоровые и злокачественные лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки из образцов цельной крови. В определенных случаях фильтровальные мембраны 25 составляют 2-4 (например, 2, 3 или 4) слоя фильтровальных мембран типа Pall (например, Leukosorb Medium). В других случаях стерильный комплект содержит трубкообразный фильтровальный блок, пластиковый адаптер и одну или несколько приемных пробирок (необязательно с защелкивающимися крышками). Адаптер устанавливается в отверстие приемной пробирки и прочно прикрепляется к фильтровальной мембране 30 трубкообразного фильтровального блока.

В других воплощениях устройство настоящего изобретения содержит несколько фильтрационных устройств или трубкообразных фильтровальных блоков и приемный сосуд из нескольких пробирок или нескольких лунок типа 2-луночного, 12-луночного, 35 24-луночного, 48-луночного или 96-луночного планшета. В некоторых случаях множество фильтрационных устройств может быть практически таким же, как по меньшей мере два или несколько устройств, представленных на фиг. 4D. В некоторых других воплощениях набор фильтрационных устройств может быть представлен многолуночным планшетом типа 96-луночного планшета для выделения клеток. Например, первый 96-луночный фильтрационный планшет может быть оснащен 40 фильтровальными мембранами типа LeukoLOCK (Life Technologies) или Acroprep (PALL) или Leukosorb (PALL) или же мембранами, практически аналогичными им. В других воплощениях первый 96-луночный фильтрационный планшет практически аналогичен или представлен коммерчески доступным многолуночным планшетом, оснащенным 45 фильтровальными мембранами, такими, без ограничения, как Millipore кат. № MAMIC8510 и № MSBCS1210. В некоторых случаях коммерчески доступные многолуночные планшеты являются стерильными и включают первый многолуночный планшет, оснащенный фильтровальными мембранами, и второй многолуночный планшет, который расположен под первым многолуночным планшетом и может

использоваться в качестве приемного сосуда. В этих воплощениях свежесобранная кровь вносится в лунки первого 96-луночного планшета для выделения клеток. Первый многолуночный планшет аналогичен верхней и нижней камерам приведенного выше фильтрационного устройства. Второй 96-луночный планшет может служить приемным планшето

5 планшето

10 для крови (который аналогичен приемной пробирке) и может располагаться под первым многолуночным планшетом, т.е. планшетом для выделения клеток с фильтровальными мембранами. Этот комплект планшетов можно центрифугировать при комнатной температуре в течение 5 мин в диапазоне скоростей от 600 об/мин до 3000 об/мин, как-то, например, 600 об/мин, 1000 об/мин, 2000 об/мин и 3000 об/мин.

15 После центрифугирования фильтровальные мембраны можно перенести в центрифужные пробирки, а клетки на первой мембране обработать объемом буфера для лизиса (например, 300 мкл буфера для лизиса) и быстро обработать на вибромешалке, чтобы лизировать клетки. Центрифужные пробирки, содержащие клеточные лизаты, можно поставить на лед примерно на 30 мин и недолго обрабатывать на вибромешалке через каждые 10 мин. После этого пробирки можно центрифугировать примерно 15 мин для

20 отделения обломков клеток от супернатанта. Супернатанты, содержащие лизаты, нужно собрать и проанализировать. В некоторых аспектах несколько фильтрационных устройств обрабатываются роботизированными руками под контролем компьютера. Выполняется анализ образцов с высокой производительностью и анализируется множество образцов. Такие стадии процедуры 100, как добавление буфера для лизиса захваченных лейкоцитов 167, необязательно выполняются на компьютеризированной роботизированной установке. В некоторых аспектах обработка образцов крови пациентов противораковым препаратом *in vitro* и анализ образцов, как описано здесь, выполняется с высокой производительностью.

25 **Выбор препарата и оптимизация противораковой терапии**

В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены способы мониторинга эффективности противораковой терапии у субъектов с гематологическими раковыми заболеваниями. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрены способы выбора соответствующих методов лечения, чтобы подавить или отключить один или несколько разрегулированных сигнальных путей. В некоторых других аспектах

30 настоящего изобретения предусмотрены способы оптимизации терапии и/или снижения токсичности у субъектов, страдающих раком и получающих курс терапии для лечения рака. Таким образом, настоящее изобретение может применяться для облегчения разработки персонализированной терапии на основе конкретной молекулярной

35 сигнатуры, представленной набором активированных онкогенных слитых белков и/или белков передачи сигналов при раковом заболевании у данного пациента.

Соответственно, в одном определенном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ мониторинга эффективности противоракового препарата у субъекта, причем субъект страдает гематологическим раковым заболеванием, который

40 включает:

(а) введение противоракового препарата субъекту, причем первое введение противоракового препарата происходит во время  $T_1$ ;

(b) выделение раковых клеток во время  $T_2$  из образца от субъекта;

45 (с) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(d) измерение активационного состояния и/или уровня экспрессии онкогенного слитого белка во время  $T_2$  в образце от субъекта; и

(е) определение курса лечения, исходя из активационного состояния и/или уровня

экспрессии онкогенного слитого белка.

В некоторых воплощениях способ дополнительно включает измерение активационного состояния онкогенного слитого белка во время  $T_0$ , т.е. до первого введения противоракового препарата. В некоторых случаях онкогенный слитый белок представлен BCR-ABL. В некоторых случаях гематологическое раковое заболевание представлено лимфомой или лейкемией, как-то хронической миелогенной лейкемией (СМЛ). Разница во времени между  $T_1$  и  $T_2$  составляет от 1 недели до 6 месяцев, как-то 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 недели. Разница во времени между  $T_0$  и  $T_1$  составляет от 1 дня до 3 недель. В некоторых других аспектах способы дополнительно включают измерение уровня экспрессии и/или активации по меньшей мере одной молекулы передачи сигналов типа CRKL, AKT, STAT5 и SRC.

В некоторых аспектах курс лечения выбирается из изменения дозы противоракового препарата, замены противоракового препарата, в том числе дополнительного противоракового препарата, изменения продолжительности лечения и продолжения существующего курса лечения.

В некоторых аспектах образец включает экстракт выделенных клеток. В некоторых аспектах выделенные клетки инкубируют *in vitro* по меньшей мере с одним противораковым препаратом (например, 2 противораковыми препаратами) во время  $T_0$  (до начала лечения). В других случаях выделенные клетки инкубируют *in vitro* по меньшей мере с двумя противораковыми препаратами во время  $T_2$ , перед определением курса лечения.

В других воплощениях настоящего изобретения предусмотрен способ выбора противоракового препарата у субъекта с гематологическим раковым заболеванием, который включает:

- (a) выделение раковых клеток от субъекта;
- (b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) измерение уровня активации онкогенного слитого белка в выделенных клетках из образца от субъекта;
- (d) инкубацию выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения;
- (e) лизис выделенных клеток, проинкубированных по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения, для получения клеточного экстракта;
- (f) измерения уровня активации онкогенного слитого белка в проинкубированных клетках; и
- (g) выбор курса лечения, исходя из уровня активации онкогенного слитого белка.

В другом воплощении настоящего изобретения предусмотрен способ выбора противоракового препарата у субъекта с гематологическим раковым заболеванием, который включает:

- (a) выделение раковых клеток от субъекта;
- (b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) измерение уровня активации BCR-ABL в выделенных клетках из образца от субъекта;
- (d) инкубацию выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения;
- (e) лизис выделенных клеток, проинкубированных по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения, для получения клеточного экстракта;
- (f) измерение уровня активации BCR-ABL в инкубированных клетках; и

(g) выбор курса лечения, исходя из уровня активации BCR-ABL.

В некоторых аспектах курс лечения выбирается из группы, состоящей из выбора противоракового препарата, выбора дозы противоракового препарата и определения продолжительности лечения. В некоторых других аспектах способы дополнительно  
5 включают измерение уровня экспрессии и/или активации по меньшей мере одной другой молекулы передачи сигналов типа CRKL, AKT, STAT5 и SRC.

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

10 (a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата (например, одного или нескольких ингибиторов тирозинкиназ типа Gleevec<sup>®</sup>, Tasigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup> и др.);

(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

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

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

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

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

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

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

(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

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

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

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

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

(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

(c) определение уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования)

онкогенного слитого белка в клеточном экстракте способом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;

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

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

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для облегчения выбора подходящего противоракового препарата для лечения рака, как-то, например, гематологического ракового заболевания. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения выбора подходящего  
15 противоракового препарата для лечения рака, как-то, например, гематологического ракового заболевания. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает установление того, что противораковый препарат не подходит для лечения рака, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного  
20 слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других воплощениях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул передачи сигналов и на основании этого "молекулярного профиля" определяется, подходит или не подходит противораковый препарат.

25 В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ определения реакции рака на лечение противораковым препаратом, который включает:

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

(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

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

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

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

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

40 (b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;

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

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

(e) установление того, что рак реагирует на лечение противораковым препаратом,

если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

5 В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для облегчения определения реакции рака, как-то, например, гематологического ракового  
заболевания, на лечение противораковым препаратом. В других воплощениях способы  
настоящего изобретения могут применяться для улучшения определения реакции рака,  
как-то, например, гематологического ракового заболевания, на лечение противораковым  
10 препаратом. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно  
включает установление того, что рак не реагирует на лечение противораковым  
препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого  
белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с  
контрольным профилем экспрессии или активации. В других воплощениях, наряду с  
15 одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте  
детектируется одна или несколько молекул передачи сигналов и на основании этого  
"молекулярного профиля" определяется, что рак реагирует или не реагирует на лечение.

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

- 20 (a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед  
инкубацией с противораковым препаратом;  
(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;  
(c) определение уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования)  
онкогенного слитого белка в клеточном экстракте описанным здесь способом; и  
25 (d) предсказание вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение  
противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или  
активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или  
активации, полученным в отсутствие противоракового препарата.

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

- (a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед  
инкубацией с противораковым препаратом;  
(b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;  
(c) определение уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования)  
35 онкогенного слитого белка в клеточном экстракте способом определения, включающим  
серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому  
белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;  
(d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого  
белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие  
40 противоракового препарата; и  
(e) установление того, что субъект, вероятно, будет реагировать на лечение  
противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации  
онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по  
сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

45 В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для  
облегчения предсказания вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение  
противораковым препаратом рака, как-то, например, гематологического ракового  
заболевания. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут

применяться для улучшения предсказания вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение противораковым препаратом рака, как-то, например, гематологического ракового заболевания. В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает установление того, что субъект, вероятно, не будет реагировать на лечение противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. В других воплощениях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул передачи сигналов и на основании этого "молекулярного профиля" определяется вероятность того, что субъект будет реагировать на лечение.

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

- 15 (a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;
- (b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- (c) определение уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка в клеточном экстракте описанным здесь способом; и
- 20 (d) определение того, что субъект не поддается или поддается лечению противораковым препаратом, путем сравнения выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время.

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

- (a) выделение раковых клеток после введения противоракового препарата или перед инкубацией с противораковым препаратом;
- (b) лизис выделенных клеток для получения клеточного экстракта;
- 30 (c) определение уровня экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка в клеточном экстракте способом определения, включающим серийные разведения захватывающих антител, специфичных к онкогенному слитому белку, причем захватывающие антитела фиксированы на твердой подложке;
- (d) сравнение выявленного уровня экспрессии и/или активации онкогенного слитого
- 35 белка с контрольным профилем экспрессии и/или активации, полученным в отсутствие противоракового препарата или в присутствии противоракового препарата в более раннее время; и
- (e) установление того, что субъект не поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации онкогенного слитого
- 40 белка не изменяется (например, существенно не уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии и/или активации.

В некоторых воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для облегчения идентификации субъектов, страдающих раком, которые не поддаются лечению противораковым препаратом, или определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, при этом субъект страдает таким раком, например, как гематологическое раковое заболевание. В других воплощениях способы настоящего изобретения могут применяться для улучшения идентификации субъектов, страдающих раком, которые не поддаются лечению



противораковым препаратом, или определения того, что субъект, страдающий раком, не поддается лечению противораковым препаратом, при этом субъект страдает таким раком, например, как гематологическое раковое заболевание.

В некоторых воплощениях способ дополнительно или альтернативно включает установление того, что субъект поддается лечению противораковым препаратом, если выявленный уровень экспрессии и/или активации (например, фосфорилирования) онкогенного слитого белка изменяется (например, существенно уменьшается) по сравнению с контрольным профилем экспрессии или активации. Неограничивающие примеры причин, по которым субъекты, страдающие раком, не поддаются лечению противораковым препаратом, включают наличие одной или нескольких мутаций у данного онкогенного слитого белка (например, BCR-ABL), несоблюдение режима лечения и/или применение субоптимальной дозы препарата. В отношении субоптимальной дозы противоракового препарата способ может дополнительно включать повышение следующей или последующей дозы противоракового препарата, вводимого субъекту. В других воплощениях, наряду с одним или несколькими онкогенными слитыми белками, в клеточном экстракте детектируется одна или несколько молекул передачи сигналов и на основании этого "молекулярного профиля" определяется, что субъект поддается или не поддается лечению.

#### Онкогенные слитые белки

В определенных воплощениях выявление профиля экспрессии/активации одного или нескольких онкогенных слитых белков, само по себе или в сочетании с выявлением профиля экспрессии/активации их субстратов и/или других белков передачи сигналов, может проводиться на клеточных лизатах, полученных с использованием устройств и способов настоящего изобретения, например, для определения эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ у нуждающихся в этом пациентов (например, пациентов с опосредованным BCR-ABL заболеванием типа хронической миелогенной лейкемии). Онкогенные слитые белки и другие анализы преимущественно определяются в клеточных лизатах, полученных при помощи устройств и способов изобретения без изменения внутриклеточной концентрации ингибиторов тирозинкиназ.

В некоторых воплощениях к транслокациям в опухолях человека, вызывающим образование онкогенных слитых белков и связанных с ними новообразований, относятся, без ограничения, следующие транслокации.

Хроническая миелогенная лейкемия (СМЛ): Филадельфийская хромосома - результат транслокации, при которой образуется BCR/ABL (киназа);

Острая лимфобластическая лейкемия (ALL): химерными онкогенными белками являются:

Цитогенетическая транслокация	Молекулярно-генетическая аномалия	%
криптическая t(12;21)	TEL/AML1 (киназа)	25,4%
t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX (PBX1)	4,8%
t(9;22)(q34;q11)	слияние BCR/ABL (P185)	1,6%
t(4;11)(q21;q23)	слияние MLL/AF4	1,6%
t(8;14)(q24;q32)	слияние IGH/MYC	
t(11;14)(p13;q11)	слияние TCR/RBTN2	

Лимфома Беркитта: транслокация t(8;14)(q24;q32) гена c-myc; самым распространенным химерным онкогенным белком является c-myc/IGH;

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

образованию химерного онкогенного белка (киназы) TEL/TrkC.

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

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

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

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

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

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

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

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

Рак простаты: химерный онкогенный белок TMRSS/ERG (киназа).

Дополнительные примеры транслокаций в опухолях человека, вызывающих образование онкогенных слитых белков и связанных с ними новообразований:

Онкоген	Новообразование
<i>bcr/abl</i>	хроническая миелогенная лейкемия; острая лимфоцитарная лейкемия
<i>dek/can</i>	острая миелоидная лейкемия
<i>E2A/pbx1</i>	острая пре-B-клеточная лейкемия
<i>PML/RAR</i>	острая промиелоцитарная лейкемия
<i>?/erg</i>	миелоидная лейкемия
<i>irel/urg</i>	B-клеточная лимфома
<i>CBFB/MYH11</i>	острая миелоидная лейкемия
<i>aml1/mtg8</i>	острая миелоидная лейкемия
<i>ews/fli</i>	саркома Юинга
<i>lyt-10/Cal</i>	B-клеточная лимфома
<i>hrx/enl</i>	острая лейкемия
<i>hrx/af4</i>	острая лейкемия
<i>NPM/ALK</i>	крупноклеточная лимфома

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

Примеры

Следующие примеры приводятся для пояснения заявленного изобретения и не предназначены для ограничения объема заявленного изобретения.

Пример 1. Образцы устройства для выделения клеток

В этом примере описаны образцы устройства для выделения клеток, служащие для выделения лейкоцитов из цельной крови пациентов фильтрационным методом. Варианты и аспекты устройств для выделения клеток по настоящему изобретению приведены на фиг. 2-6.

Устройство для выделения клеток по настоящему изобретению применяется для отделения эритроцитов от других клеток, присутствующих в цельной крови. В частности, лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки отделяются от значительного количества эритроцитов и плазмы, присутствующих в цельной крови. Устройство для  
5 выделения клеток по настоящему изобретению включает фильтрационное устройство и приемный сосуд. Фильтрационное устройство представляет собой комплект, содержащий верхнюю камеру, нижнюю камеру и одну или несколько (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) сложенных в стопку  
10 фильтровальных мембран между верхней и нижней камерами. Верхняя и нижняя камеры могут быть изготовлены из таких материалов, без ограничения, как полипропилен и полистирен. В некоторых воплощениях фильтровальные мембраны имеют размер пор 8 мкм и толщину в 355,6-558,8 мкм, а степень удержания лейкоцитов составляет 70-80%. Неограничивающим примером фильтровальной мембраны является White Blood Cell Isolation (Leukosorb) Medium (PALL Cat. No. BSP0669).

15 Как правило, в верхнюю камеру устройства для выделения клеток вносят 1 мл крови пациента, обработанной ингибиторами протеаз и ингибиторами фосфатаз. Этот блок центрифугируют 5-30 мин при 600-2000 об/мин (например, 800 об/мин) при 4°C в настольной центрифуге типа центрифуги Allegra 6R (Beckman), центрифуги Sorvall Legend (Thermo Scientific) или центрифуги Heraeus Megafuge (Kendro). В некоторых случаях из  
20 устройства для выделения клеток вынимают первый приемный сосуд, содержащий эритроциты, и вставляют второй приемный сосуд. Без стадий отмывки в верхнюю камеру фильтрационного устройства добавляют от 200 мкл до 1 мл буфера для лизиса. Верхнюю камеру закрывают крышкой, и фильтрационное устройство и второй приемный сосуд энергично встряхивают в течение 15-30 мин при 4°C. Фильтрационное устройство  
25 и второй приемный сосуд вставляют в центрифугу и центрифугируют со скоростью около 3000 об/мин в течение 5 мин. Клеточный лизат можно перенести в другой сосуд для хранения при -70°C.

В других случаях из устройства для выделения клеток вынимают первый сосуд, содержащий эритроциты, и разбирают фильтрационное устройство, содержащее  
30 фильтровальные мембраны. Верхнюю камеру отвинчивают от нижней камеры. С помощью пинцета фильтровальные мембраны, содержащие отделенные лейкоциты, помещают во второй приемный сосуд, содержащий буфер для лизиса. Неограничивающими примерами второго приемного сосуда являются микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл и 2 мл. В некоторых случаях второй приемный  
35 сосуд затем инкубируют при 4°C в течение по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 или 120 мин, предпочтительно от 15 до 30 мин. В других случаях второй приемный сосуд ставят на лед и обрабатывают на вибромешалке по 10 сек через каждые 10 мин на протяжении 30 мин. В некоторых воплощениях клеточный лизат хранится при -70°C. В других воплощениях сосуд, содержащий лизат, центрифугируют для удаления  
40 фильтровальных мембран и фрагментов клеток. Супернатант из клеточного лизата переносят в другую пробирку для хранения при -70°C.

В другом воплощении устройство для выделения клеток включает трубкообразный фильтровальный блок и приемный сосуд (фиг. 26). Трубкообразный фильтровальный блок содержит цилиндрическую трубку с прикрепленными с одного конца одной или  
45 несколькими (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или больше) фильтровальными мембранами, причем мембраны способны удерживать здоровые и злокачественные лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки из образцов цельной крови. В определенных случаях фильтровальные

мембраны составляют 2-4 (например, 2, 3 или 4) слоя фильтров типа фильтров Pall (например, Leukosorb Medium). В некоторых случаях каждый фильтр имеет размер пор 8 мкм и толщину в 355,6-558,8 мкм, а степень удержания лейкоцитов составляет 70-80%. В некоторых случаях трубкообразный фильтровальный блок прикрепляется к приемному сосуду посредством пластикового адаптера. Фильтровальная мембрана трубкообразного фильтровального блока прочно прикрепляется к адаптеру, который устанавливается в отверстие приемной пробирки. Примеры приемных сосудов включают, без ограничения, пластиковые пробирки для культур на 3 мл, 5 мл, 8 мл, 14 мл и 16 мл. В некоторых воплощениях в верхнюю часть трубкообразного фильтровального блока устройства для выделения клеток вносят 1 мл цельной крови пациента, обработанной ингибиторами протеаз и ингибиторами фосфатаз. Устройство центрифугируют 5-30 мин при 600-2000 об/мин (например, 800 об/мин) при 4°C в настольной центрифуге типа центрифуги Allegra 6R (Beckman), центрифуги Sorvall Legend (Thermo Scientific) или центрифуги Heraeus Megafuge (Kendro). В некоторых случаях из устройства для выделения клеток вынимают первый приемный сосуд, содержащий эритроциты, и вставляют второй приемный сосуд. Без стадий отмывки в отверстие трубкообразного фильтровального блока устройства для выделения клеток добавляют от 200 мкл до 1 мл буфера для лизиса. Устройство закрывают крышкой, а затем энергично встряхивают в течение 15-30 мин при 4°C. Устройство для выделения клеток центрифугируют примерно при 3000 об/мин в течение 5 мин в настольной центрифуге. После этого клеточный лизат можно перенести из приемного сосуда в другой сосуд для хранения при -70°C.

В еще одном воплощении устройство для выделения клеток по настоящему изобретению включает несколько фильтрационных устройств или трубкообразных фильтровальных блоков и приемный сосуд из нескольких лунок или нескольких пробирок. Вышеописанные фильтрационные устройства и трубкообразные фильтровальные блоки могут прикрепляться к лункам многолуночного планшета типа 12-луночного, 24-луночного, 48-луночного или 96-луночного планшета.

Пример 2. Методика выделения опухолевых клеток из крови больных CML фильтрационным методом с помощью устройства для выделения клеток

В этом примере изложена методика, применяемая для выделения и сбора опухолевых клеток CML в цельной крови отдельных пациентов способом настоящего изобретения. Цельная кровь от пациента может обрабатываться или не обрабатываться *in vitro* ингибиторами BCR-ABL перед выделением.

Для выделения опухолевых клеток лучше всего подходят свежесобранные образцы крови. Если невозможно получить свежие образцы, то можно обрабатывать образцы крови в пределах 1-3 дней после сбора. Образцы, собранные в EDTA (Becton Dickenson cat. no. #366643, стерильные пробирки с EDTA (K2)), направляются для обработки в тот день, когда они получены. Образцы должны храниться при комнатной температуре до обработки. Важно избежать охлаждения или замораживания образцов на этой стадии.

Образцы крови, полученные в пробирках с EDTA (BD #366643), обрабатывают ингибиторами протеаз и фосфатаз. Пробирку с кровью осторожно перемешивают, медленно переворачивая вверх-вниз 4-6 раз, а затем добавляют 0,05 мл коктейля из ингибиторов протеаз и фосфатаз на 1 мл крови. На этой стадии методики можно выделить опухолевые клетки и лейкоциты из образца крови, переходя к разделу данного примера, озаглавленному "Выделение и лизис опухолевых клеток и лейкоцитов". Образец крови необязательно можно обработать препаратом до перехода к этому разделу.

Обработка образцов крови пациентов препаратами

Препарат типа ингибитора BCR-ABL разводят в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) перед добавлением в образец крови. В пробирку вносят 1,0 мл образца крови пациента. В каждую порцию крови пациента добавляют требуемую концентрацию препарата. Например, в пробирку добавляют 10 мкл, 1 мкл или 0,1 мкл, что  
5 соответствует концентрации препарата в 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ. В качестве контроля можно использовать один миллилитр (1 мл) необработанной крови в отдельной пробирке. Затем пробирки инкубируют в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. После этого образцы, обработанные препаратом, можно далее обрабатывать  
10 по методике из следующего раздела для того, чтобы выделить и подвергнуть лизису опухолевые клетки и лейкоциты в образце.

#### Выделение и лизис опухолевых клеток и лейкоцитов

Образец крови, вносимый в фильтрационное устройство, осторожно перемешивают, медленно переворачивая пробирку вверх-вниз 4-6 раз. С помощью пипетки на 1 мл  
15 вносят 1 мл образца крови в верхнюю камеру фильтрационного устройства, вставленного в приемную пробирку. После внесения образца фильтрационное устройство плотно защелкивают. Устройство для выделения клеток помещают в центрифугу Allegra 6R и центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин при 4°C. После центрифугирования устройство для выделения клеток вынимают из центрифуги. Из  
20 фильтрационного блока вынимают первую приемную пробирку, содержащую эритроциты, и заменяют на вторую, чистую приемную пробирку. Первую приемную пробирку, содержащую кровь, закрывают крышкой и хранят при комнатной температуре для дальнейшего использования.

В верхнюю камеру фильтрационного устройства, содержащего мембрану с лейкоцитами, добавляют 200 мкл буфера для лизиса (хранившегося на льду), после чего  
25 весь блок плотно защелкивают. Устройство для выделения клеток помещают на платформу для встряхивания (вращения), хранившуюся при 4°C. Качающаяся платформа вместе с устройством для выделения клеток проходит три цикла, состоящие из встряхивания в течение 2 мин, а затем 5 мин отдыха за цикл. После этого устройство для выделения клеток центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин при 4°C.  
30 Клеточный лизат, находящийся во второй приемной пробирке, переносят в центрифужную пробирку на 2 мл с помощью пипетки на 1 мл для использования при иммуноанализе методом CEER типа анализа на BCR-ABL и при анализе других маркеров пути. Необязательно клеточный лизат хранится при -70°C.

Пример 3. Выделение и сбор лейкоцитов фильтрационным методом из цельной крови  
35 без разбавления противоракового препарата

В этом примере изложена методика выделения и лизиса лейкоцитов из цельной крови пациентов фильтрационным методом. Наряду с нормальными, здоровыми лейкоцитами из цельной крови можно выделить злокачественные лейкоциты, как-то опухолевые  
40 клетки хронической миелогенной лейкемии (CML), без разбавления концентрации препарата и без вызывающих помехи примесных эритроцитов. В некоторых воплощениях перед выделением цельная кровь от пациента обрабатывается или не обрабатывается in vitro одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ, такими, например, как иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>),  
45 босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации. Хроническая

миелогенная лейкемия является раковым заболеванием лейкоцитов. Эта форма лейкемии характеризуется усиленным и нерегулируемым ростом преимущественно миелоидных клеток в костном мозге и накоплением этих клеток в крови. Поэтому определение уровня онкогенных маркеров в опухолях СМЛ у пациентов путем извлечения опухолевых клеток вместе с лейкоцитами отдельно от значительного числа эритроцитов и плазмы крови имеет решающее значение для диагностической и прогностической оценки. В этом примере описан фильтрационный метод, который позволяет выделять лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки из крови пациентов без разбавления противоракового препарата.

10 Как правило, кровь пациентов отбирают в пробирки для сбора крови, содержащие EDTA или другие антикоагулянты, и перемешивают, осторожно переворачивая вверх-вниз. Образцы крови хранят при комнатной температуре и обрабатывают в пределах 24-72 ч, не подвергая их охлаждению или замораживанию. Пробирки, содержащие цельную кровь, перемешивают, осторожно переворачивая вверх-вниз, и обрабатывают 15 раствором смеси, содержащей ингибиторы протеаз и ингибиторы фосфатаз. Раствор смеси может содержать ортованадат натрия (200 мМ, до конечной концентрации 2 мМ), ингибитор протеаз Sigma (50×; до конечной концентрации 1×) и ингибитор фосфатаз Halt (100×; до конечной концентрации 2×), и его смешивают с образцом крови пациента. Примеры ингибиторов протеаз и ингибиторов фосфатаз включают, без ограничения, 20 коктейль Halt из ингибиторов протеаз и ингибиторов фосфатаз (Therma Scientific); комплекты ULTRA и PhosSTOP (Roche Applied Science); набор ингибиторов протеаз (EMD Chemicals); и наборы I-IV различных ингибиторов фосфатаз (EMD Chemicals).

Для отделения эритроцитов в образце крови пациента от других клеток, таких как лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки, применяется устройство для 25 выделения клеток. Устройство для выделения клеток включает фильтрационное устройство и приемный сосуд, как показано на рисунке. В некоторых аспектах фильтрационное устройство собирают, вставляя одну или несколько (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) удерживающих лейкоциты фильтровальных мембран между верхней камерой и нижней камерой 30 фильтрационного устройства. Фильтровальные мембраны могут иметь размер пор 8 мкм и толщину в 355,6-558,8 мкм, а степень удержания лейкоцитов составляет 70-80%. Неограничивающим примером фильтровальной мембраны является White Blood Cell Isolation (Leukosorb) Medium (PALL Cat. No. BSP0669). Собранное фильтрационное устройство вставляется в верхнюю часть приемного сосуда. Устройство для выделения 35 клеток открывают перед внесением в него образца крови. Примеры приемных сосудов включают, без ограничения, пробирки типа пластиковых пробирок для культур на 3 мл, 5 мл, 8 мл, 14 мл или 16 мл.

Типичный способ выделения и лизиса лейкоцитов и/или циркулирующих опухолевых клеток из образца крови пациента включает следующие стадии. 1 мл образца крови, 40 предварительно обработанного ингибиторами протеаз и ингибиторами фосфатаз, осторожно перемешивают, переворачивая вверх-вниз. Затем 1 мл образца крови вносят в верхнюю камеру устройства для выделения клеток, собранного как описано выше. Устройство для выделения клеток помещают в клиническую или настольную центрифугу типа центрифуги Allegra 6R (Beckman), центрифуги Sorvall Legend (Thermo Scientific) или 45 центрифуги Heraeus Megafuge (Kendro). Как правило, клетки центрифугируют 5-30 мин при 600-2000 об/мин (например, 800 об/мин) при 4°C. Для закрепления устройства для выделения клеток в роторе центрифуги во время центрифугирования можно использовать адаптеры. После центрифугирования устройство для выделения клеток

вынимают из центрифуги, а фильтрационное устройство отсоединяют от приемного сосуда, который содержит эритроциты, прошедшие через фильтрационное устройство. Приемный сосуд с эритроцитами можно закрыть крышкой для биобезопасности и куда-нибудь убрать.

5 В некоторых воплощениях под фильтрационное устройство подставляют новый приемный сосуд, как-то, без ограничения, другую приемную пробирку или микроцентрифужную пробирку. Без дополнительных стадий промывки в верхнюю камеру фильтрационного устройства добавляют от 200 мкл до 1 мл буфера для лизиса. Верхнюю камеру закрывают крышкой, а фильтрационное устройство и новый приемный  
10 сосуд энергично встряхивают в течение 15-30 мин при 4°C. Фильтрационное устройство и новый приемный сосуд помещают в центрифугу типа микроцентрифуги и центрифугируют примерно при 3000 об/мин около 5 мин. Клеточный лизат можно перенести в другой центрифужный сосуд типа микроцентрифужной пробирки для хранения при -70°C.

15 В другом воплощении, после удаления устройства для выделения клеток из центрифуги и отсоединения фильтрационного устройства от приемной пробирки, содержащей эритроциты, извлекают одну или несколько фильтровальных мембран между верхней и нижней камерами фильтрационного устройства. Верхнюю и нижнюю камеры отсоединяют (например, отвинчивают), а фильтровальные мембраны извлекают  
20 с помощью пинцета. Мембраны помещают в новый приемный сосуд типа микроцентрифужной пробирки на 1,5 мл или 2,0 мл, содержащей 1 мл буфера для лизиса. Для лизиса клеток на фильтровальных мембранах новый приемный сосуд немедленно обрабатывают на вибромешалке. Затем сосуд ставят на лед и обрабатывают на вибромешалке по 10 сек через каждые 10 мин на протяжении 30 мин. Клеточный лизат  
25 затем переносят в другой сосуд типа микроцентрифужной пробирки на 1,5 мл или 2,0 мл и хранят при -70°C.

Пример 4. Выделение клеток фильтрационным методом с помощью 96-луночного устройства для выделения клеток

В этом примере представлено получение выделенных клеток из таких образцов, к  
30 примеру, как цельная кровь, сыворотка, плазма, моча, мокрота, смыв из бронхов, слезы, аспират сосков, лимфа, слюна и/или тонкоигольный аспират (FNA), с применением фильтрационного метода или фильтрационного метода в сочетании с захватом на магнитные шарики, причем выделенные клетки могут использоваться в настоящем изобретении для выявления активационного состояния и/или общего количества одного  
35 или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K и др.). В частности, в этом примере представлено получение клеток K562 (т.е. клеток из клеточной линии хронической миелогенной лейкемии человека) из крови, в которую добавили клетки K562, с  
40 применением фильтрационного метода самого по себе или фильтрационного метода после захвата на магнитные шарики с антителами против CD45, с последующим получением лизата клеток K562 и определением экспрессии и/или активационного состояния одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов, путей или их комбинаций. В этом примере также представлено получение  
45 субпопуляции клеток крови (т.е. лейкоцитов) из образцов крови пациентов с применением фильтрационного метода или же фильтрационного метода до захвата на магнитные шарики с антителами против CD45, с последующим получением клеточного лизата и определением экспрессии и/или активационного состояния одного или нескольких

онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL), их субстратов, путей или их комбинаций. Устраняя потребность в каких-либо стадиях промывки после сбора образцов пациентов и выделения клеток, описанные здесь способы выгодны, поскольку 5  
нужные клетки можно получить из крови без изменения внутриклеточной концентрации противораковых препаратов типа ингибиторов тирозинкиназ. В отличие от предшествующего уровня техники, описанные в этом примере способы дают клеточные лизаты из полученных клеток без существенного разбавления противораковых 10  
препаратов типа ингибиторов тирозинкиназ (например, Gleevec<sup>®</sup>, Tassigna<sup>®</sup>, Sprycel<sup>®</sup> и т.п.).

Для выделения лейкоцитов и/или клеток K562 из свежесобранной крови можно приспособить 96-луночный планшет для выделения клеток. Сначала из 96-луночного 15  
фильтровального планшета нужно удалить первоначальную мембрану и заменить ее фильтровальными мембранами, например, LeukoLOCK (Life Technologies), Acroprep (PALL) или Leukosorb (PALL). В этих воплощениях свежесобранная кровь с добавлением клеток K562 или без них вносится в лунки 96-луночного планшета для выделения клеток. В качестве приемного планшета для отходов крови может служить второй 96-луночный 20  
микропланшет, который следует поместить под планшет для выделения клеток с фильтровальными мембранами. Комплект планшетов можно центрифугировать при комнатной температуре примерно 5 мин со скоростью в пределах от 600 об/мин до 3000 об/мин, как-то, например, 600 об/мин, 1000 об/мин, 2000 об/мин или 3000 об/мин. После центрифугирования фильтровальные мембраны переносят в центрифужные 25  
пробирки, а клетки на фильтровальных мембранах обрабатывают объемом буфера для лизиса (например, 300 мкл буфера для лизиса) и сразу же обрабатывают на вибромешалке, чтобы лизировать клетки. Центрифужные пробирки, содержащие клеточные лизаты, ставят на лед примерно на 30 мин и недолго обрабатывают на вибромешалке через каждые 10 мин. Пробирки нужно центрифугировать примерно 15 мин, чтобы отделить обломки клеток от супернатанта. Супернатанты, содержащие лизаты, можно собрать и проанализировать на микроматрице, например, 30  
иммуноанализом, основанном на близком взаиморасположении, для выявления онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K и др.).

Свежесобранную кровь с добавлением клеток K562 или без них можно подвергнуть 35  
описанному здесь фильтрационному способу выделения клеток после первичной обработки методом захвата на магнитные шарики с помощью антител против CD45. Свежесобранную кровь с добавлением клеток K562 или без них можно проинкубировать с отмытыми магнитными шариками, конъюгированными с антителами против CD45, например, с CD45 DynaBeads (Invitrogen). Отмытые магнитные шарики можно получить в соответствии с инструкциями производителя. Например, процедура может включать 40  
следующие стадии: 1) внести 100 мкл магнитных шариков, конъюгированных с антителами против CD45, в центрифужную пробирку на 1,5 мл; 2) добавить 1 мл буфера и осторожно перемешать; 3) поставить центрифужную пробирку на магнит на 1 мин; 4) удалить супернатант; и 5) снять пробирку с магнита и ресуспендировать магнитные шарики в 100 мкл буфера. В определенных случаях можно добавить по 100 мкл отмытых 45  
шариков в каждый из образцов крови с добавлением K562. Затем образцы нужно инкубировать на вертушке в холодной комнате при 4°C или при комнатной температуре в течение от 20 мин до 2 часов. Время инкубации может составлять, например, по меньшей мере 20 мин, 30 мин, 1 ч, 1,5 ч или 2 ч. Затем образцы нужно поставить на



магнит (например, на магнит DynaMag). Супернатанты можно собрать и внести в лунки 96-луночного планшета для выделения клеток. Способ выделения клеток фильтрационным методом можно выполнять, как описано выше.

Описанным здесь фильтрационным методом можно выделять субпопуляции клеток крови (например, лейкоциты) из свежесобранных образцов крови больных СМЛ. В определенных случаях можно взять образцы крови у больных СМЛ, принимающих ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474) и их комбинации). Преимуществом настоящего изобретения является то, что образцы от пациентов, в том числе от пациентов, получающих тирозинкиназную терапию, не требуют дополнительного промывания или обработки. Точно так же, как описано выше, можно приготовить 96-луночный планшет для выделения клеток, удаляя исходную мембрану из 96-луночного фильтрационного планшета и заменяя ее мембранным фильтром (например, LeukoLOCK (Life Technologies) или Асгоргер (PALL)), способным захватывать нужные клетки крови (например, лейкоциты). Свежесобранную кровь от больных СМЛ можно внести в лунки 96-луночного планшета для выделения клеток и поместить под ним второй 96-луночный микропланшет с фильтровальными мембранами. Комплект планшетов можно центрифугировать при комнатной температуре примерно 5 мин со скоростью в пределах от 600 об/мин до 3000 об/мин, как-то, например, 600 об/мин, 1000 об/мин, 2000 об/мин или 3000 об/мин. После центрифугирования фильтровальные мембраны переносят в центрифужные пробирки. Для лизиса клеток в пробирки добавляют по 300 мкл буфера для лизиса, а затем пробирки недолго обрабатывают на вибромешалке. Пробирки, содержащие клеточные лизаты, ставят на лед примерно на 30 мин и недолго обрабатывают на вибромешалке через каждые 10 мин. Пробирки нужно центрифугировать примерно 15 мин, чтобы отделить клеточный материал от супернатанта. Супернатанты, содержащие лизаты, можно собрать и подвергнуть анализу на микроматрицах например, такому как описанный здесь иммуноанализ, основанный на близком взаиморасположении.

Перед проведением описанного здесь фильтрационного способа выделения клеток свежесобранную кровь от больных СМЛ можно сначала обработать методом захвата на магнитные шарики с помощью антител против CD45. В некоторых воплощениях отмытые магнитные шарики, конъюгированные с антителами против CD45 (например, CD45 DynaBeads (Invitrogen)) можно инкубировать с кровью, взятой у больных СМЛ. Отмытые магнитные шарики можно получить в соответствии с инструкциями производителя, например, процедура может включать следующие стадии: 1) внести 100 мкл магнитных шариков, конъюгированных с антителами против CD45, в центрифужную пробирку на 1,5 мл; 2) добавить 1 мл буфера и осторожно перемешать; 3) поставить центрифужную пробирку на магнит на 1 мин; 4) удалить супернатант; и 5) снять пробирку с магнита и ресуспендировать магнитные шарики в 100 мкл буфера. В определенных случаях можно добавить по 100 мкл отмытых шариков в каждый из образцов крови с добавлением K562. Затем образцы нужно инкубировать на вертушке в холодной комнате при 4°C или при комнатной температуре в течение от 20 мин до 2 часов. Время инкубации может составлять, например, по меньшей мере 20 мин, 30 мин, 1 ч, 1,5 ч или 2 ч. Затем образцы нужно поставить на магнит. Супернатанты можно

собрать и внести в лунки 96-луночного планшета для выделения клеток. Способ выделения клеток фильтрационным методом можно выполнять, как описано выше.

Из фиг. 7 видно, что в клеточных лизатах, полученных из клеток K562, выделенных методом фильтрации лейкоцитов по настоящему изобретению из образцов крови с добавлением клеток K562, можно выявить и измерить как общий, так и фосфорилированный BCR-ABL. Из фиг. 7А видно, что уровень общего BCR-ABL в клетках после фильтрации был близок уровню, наблюдавшемуся в нефилтрированных образцах. Кроме того, из фиг. 7В видно, что уровень фосфорилированного BCR-ABL в клетках K562 после фильтрации был сравним с уровнем, наблюдавшимся в необработанных клетках.

Из фиг. 8А-В видно, что в клеточных лизатах выявляется и измеряется уровень как общего, так и фосфорилированного BCR-ABL, при этом клеточные лизаты получали из образцов крови с добавлением клеток K562, фильтровали через фильтровальные мембраны и анализировали на микроматрицах методом основанном на близком взаиморасположении типа совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке РСТ No. РСТ/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. В частности, при анализе BCR-ABL методом SEER использовали 5000 клеток, выделенных описанными здесь способами.

Сравнивали степень выхода общего и фосфорилированного BCR-ABL в различных образцах, которые центрифугировали с различной скоростью. Из фиг. 8А видно, что выход общего сигнала BCR-ABL составил 141,55% в выделенных клетках K562 при выделении клеток способом настоящего изобретения, который включает фильтрационное устройство с фильтровальными мембранами PALL и центрифугирование при 600 об/мин. Для сравнения, когда способ выделения клеток включал фильтровальные мембраны LeukoLock и центрифугирование при 600 об/мин, выход общего сигнала BCR-ABL составил 128,88%. Отметим, что степень выхода снижалась до 62,71%) при повышении скорости центрифугирования до 1000 об/мин. На фиг. 8В представлена степень выхода сигнала фосфорилированного BCR-ABL в клетках, выделенных способами настоящего изобретения из образцов крови в 1 мл с добавлением клеток K562. Сигнал фосфорилированного BCR-ABL составил 63,60% в клетках K562, выделенных фильтрационным методом, который включал выделение клеток с помощью фильтровальных мембран PALL и центрифугирование фильтрационного устройства при 600 об/мин. Сигнал фосфорилированного BCR-ABL составил 59,64% в клетках K562, выделенных фильтрационным методом, который включал выделение клеток с помощью фильтровальных мембран LeukoLOCK и центрифугирование фильтрационного устройства при 1000 об/мин. При снижении скорости центрифугирования до 600 об/мин степень выхода с мембранами LeukoLock уменьшилась до 57,89%).

Из фиг. 9А видно, что уровень фосфорилированного BCR-ABL выявляется и измеряется в клеточных лизатах, полученных из образцов крови с добавлением различного количества клеток K562 и профильтрованных через фильтровальные мембраны, при анализе на микроматрицах методом типа описанного здесь иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении. Для выявления уровня фосфо-BCR-ABL в образцах с добавлением клеток K562 применяли способы настоящего изобретения. В частности, измеренный уровень фосфорилированного BCR-ABL зависит от числа клеток K562, добавленных в образцы крови. Степень выхода сигнала фосфорилированного BCR-ABL составила 123,32% для образца с добавлением 300000

клеток K562, 75,21% для образца с добавлением 100000 клеток K562, 63,16% для образца с добавлением 30000 клеток K562 и 159,12% для образца с добавлением 10000 клеток K562.

На фиг. 9В представлен сигнал BCR-ABL в клетках K562, полученных после  
5 фильтрования при добавлении этих клеток в кровь. Степень выхода сигнала фосфорилированного BCR-ABL для образца с добавлением 1000000 клеток K562 составила 63,60%, а общего - 108,61%.

Пример 5. Методика выделения опухолевых клеток из крови больных CML  
фильтрационным методом с помощью 96-луночного устройства для выделения клеток  
10 В этом примере представлена методика выделения и сбора опухолевых клеток хронической миелогенной лейкемии (CML) из цельной крови пациентов фильтрационным методом. В предпочтительном воплощении перед выделением цельная кровь от пациента обрабатывается или не обрабатывается *in vitro* одним или несколькими ингибиторами тирозинкиназ, такими, например, как иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>),  
15 дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>),  
20 лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации. Хроническая миелогенная лейкемия является раковым заболеванием лейкоцитов. Эта форма лейкемии характеризуется усиленным и нерегулируемым ростом преимущественно миелоидных клеток в костном мозге и накоплением этих клеток в крови. 95% раковых клеток CML экспрессируют онкобелок BCR-ABL. Поэтому  
25 определение уровня BCR-ABL в опухолях CML у пациентов путем извлечения опухолевых клеток вместе с лейкоцитами отдельно от значительного числа эритроцитов и плазмы крови имеет решающее значение. В этом примере описан фильтрационный метод, который позволяет выделять опухолевые клетки (например, лейкоциты и другие клетки крови) из крови пациентов.

Как правило, кровь пациентов собирают в пробирки для сбора крови, содержащие  
30 EDTA, и осторожно перемешивают, переворачивая их вверх-вниз. Образцы цельной крови хранят при комнатной температуре и обрабатывают в пределах 24 ч. Фильтрационный планшет составляет 96-луночный планшет с мембраной на дне ячеек, которая позволяет выделять белые клетки крови (например, лейкоциты) из цельной  
35 крови. Если фильтрационный планшет коммерчески недоступен, то его можно изготовить через ряд стадий, таких, без ограничения, как а) удаление исходной фильтровальной мембраны из 96-луночного планшета Whatman Unifilter; б) извлечение фильтровальной мембраны LeukoLOCK Total RNA из ее кассеты; в) штамповку отверстий диаметром 0,25 дюйма в фильтровальной мембране LeukoLOCK Total RNA таким  
40 образом, чтобы образовавшиеся при этом кружочки мембраны помещались в лунки 96-луночного фильтрационного планшета; и д) осторожно вставить новые кружочки фильтровальной мембраны LeukoLOCK Total RNA в 96-луночный планшет Whatman Unifilter без его исходной мембраны. После этого под 96-луночный фильтрационный  
45 планшет ставится 96-луночный микропланшет и оба планшета скрепляются клейкой лентой, образуя сдвоенный фильтрационный планшет. 96-луночный микропланшет служит для сбора проходящей крови.

Фильтрационный метод может включать следующие стадии. Образцы крови пациентов перемешивают с помощью пипетки на 1 мл, набирая в нее и выпуская 5-10 раз. С помощью пипетки на 1 мл вносят по 300 мкл крови пациентов в лунки готового

сдвоенного фильтрационного планшета. Сдвоенный планшет центрифугируют в настольной центрифуге (например, Allegra 6R (Beckman Coulter)) в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. После центрифугирования сдвоенный планшет вынимают из центрифуги. Удаляют ленту и рассоединяют планшеты. С помощью 5 препаровального пинцета на 114 мм (4 1/2") кружочки фильтровальной мембраны LeukoLOCK вынимают из лунок фильтрационного планшета и помещают в центрифужные пробирки на 2 мл, содержащие по 300 мкл буфера для лизиса белка. Затем центрифужные пробирки сразу же обрабатывают на вибромешалке. Центрифужные пробирки ставят на лед и обрабатывают на вибромешалке по 10 сек 10 через каждые 10 мин на протяжении 30 мин. Лизаты переносят в новые центрифужные пробирки на 2 мл с помощью пипетки на 1 мл. После этого лизаты хранятся при -70°C либо используются при анализе для выявления активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, 15 VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K и др.).

Фильтрационный метод может включать еще и следующие стадии. Образцы крови пациентов обрабатывают ингибиторами тирозинкиназ перед фильтрованием для выделения опухолевых клеток (например, лейкоцитов и других клеток крови) из крови 20 пациентов. В определенных случаях 1,2 мл свежесобранной крови пациента переносят в пробирку для культур и добавляют препараты - ингибиторы тирозинкиназ в определенном диапазоне концентраций, как-то 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ дасатиниба; 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ иматиниба; и 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ нилотиниба. Кровь инкубируют в течение от 1 до 24 ч (например, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 или 24 ч) при 37°C в инкубаторе с CO<sub>2</sub> или при комнатной температуре.

25 Пример 6. Методика иммуноанализа методом SEER на микроматрицах для определения уровня фосфо-BCR-ABL, общего BCR-ABL и BCR в образцах крови пациента 2 от первого и второго взятия крови

В этом примере представлена методика выполнения иммуноанализа методом SEER 30 на микроматрицах для детектирования экспрессии и активации BCR-ABL в образцах крови пациентов. Лейкоциты и циркулирующие опухолевые клетки выделяют в соответствии с описанными здесь способами. Выделенные клетки подвергают лизису и используют при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, типа совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке PCT No. PCT/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., 35 и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. В определенных воплощениях методика включает обработку образцов крови пациентов магнитными шариками, связывающими BCR.

Разведение лизатов клеток K562 для иммуномикроматриц SEER

40 Лизаты необработанных клеток K562 получали в соответствии со способами настоящего изобретения, как описано в Примерах 2 и 3. Серийные разведения лизатов необработанных клеток K462 в буфере для разведения и определения делали в соответствии с табл.1. Клеточные лизаты подвергали скринингу на трех слайдах для SEER.

45

Таблица 1

Конечная концентрация клеток	Объем клеток K562	Объем буфера для разведения	К-во клеток на 80 мкл
125 клеток/мкл	10 мкл (5 617 клеток/мкл)	440 мкл	10 000
37,5 клеток/мкл	135 мкл (125 клеток/мкл)	315 мкл	3 000
12,5 клеток/мкл	135 мкл (37,5 клеток/мкл)	270 мкл	1 000
3,75 клеток/мкл	135 мкл (12,5 клеток/мкл)	315 мкл	300
1,25 клеток/мкл	135 мкл (3,75 клеток/мкл)	270 мкл	100
0,375 клеток/мкл	135 мкл (1,25 клеток/мкл)	315 мкл	30
0,125 клеток/мкл	135 мкл (0,375 клеток/мкл)	270 мкл	10
0 клеток/мкл	0	450 мкл	0

Разведение лизата клеток из образцов крови пациентов для иммуноматриц CEER

Лизаты клеток, полученных из образцов крови пациентов, готовили в соответствии со способами настоящего изобретения, как описано в примерах 1, 2 и 10. Процедура разведения клеточных лизатов пациентов для трех слайдов CEER представлена в табл.2.

Таблица 2

Степень разведения лизата	Объем лизата	Объем буфера для разведения	Отбирать после разведения f
1:2,5	160 мкл сборного лизата клеток пациентов	240 мкл	150 мкл (инкубировать со 150 мкл шариков; 1:5)
1:5	150 мкл из разведения 1:2,5	150 мкл	
1:10	75 мкл из разведения 1:2,5	225 мкл	150 мкл (инкубировать со 150 мкл шариков; 1:20)
1:20	150 мкл из разведения 1:10	150 мкл	

Процедура для иммуноматриц CEER

1. Блокирование слайда (матрицы)

1.1. Промыть слайд 2 раза TBST.

1.2. Блокировать слайд с помощью 80 мкл свободного от белка блокирующего буфера (TBS) в течение 1 ч.

1.3. Промыть 2 раза TBST после блокирования.

1.4. Добавить 10 мкл 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> на 1 мл буфера для разведения и определения (2% BSA/0,1% тритон/10 мМ EDTA/TBS).

2. Инкубация с клеточным лизатом

2.1. Сделать серийные разведения клеточного лизата с помощью буфера для разведения и определения, как описано в табл. 1 и 2.

2.2. Отобрать порцию клеточного лизата для инкубации с шариками и добавить эквивалентный объем буфера для разведения и определения в те порции лизата, которые не будут инкубироваться с магнитными шариками (например, шариками BCR-1684).

2.3. Добавить 80 мкл клеточного лизата на слайд и запечатать слайд.

2.4. Инкубировать в течение ночи при комнатной температуре.

2.5. Отмывать слайд 5 раз так, чтобы первая отмывка представляла быструю промывку 1,25 мл TBST, а остальные длились по 3 мин.

### 3. Инкубация с детектирующим антителом

3.1. Развести меченые антитела до соответствующих концентраций в буфере для разведения и определения.

3.1.1 4G10-HRP: развести 1:320 (Millipore # 05-777)

5 3.1.2 BCR-GO-AF5129: развести 1:80 и 1:160 (R&D # AF5129)

3.1.3 Abl-HRP-AF5414: развести 1:900 (R&D # AF5414)

3.1.4 BCR-HRP-1684-B-Dextran: развести 1:80 (Epitomics # 1684-B)

3.1.5 GO-Dextran: развести 1:80

10 3.2. Добавить 80 мкл раствора антитела на соответствующий слайд и инкубировать 2 часа при комнатной температуре.

3.2.1 Для слайда на свободный BCR: BCR-HRP 1:80, GO-Dextran 1:80.

3.2.2 Для слайда на общий BCR-ABL: Abl-HRP 1:900, BCR-GO 1:80.

3.2.3 Для слайда на фосфо-BCR-ABL: 4G10-HRP 1:320, BCR-GO 1:160.

15 3.3. Отмывать слайд 5 раз так, чтобы первая отмывка представляла быструю промывку 1,25 мл TBST, а остальные длились по 3 мин.

4. Усиление сигнала тирамидом

4.1. Добавить 80 мкл биотин-тирамида в разведении 1:320 в 50 мМ растворе глюкозы/PBS (для BCR-HRP+GO-Dextran).

20 4.2. Добавить 80 мкл биотин-тирамида при 6,25 мкг/мл в 50 мМ растворе глюкозы/PBS-RK (для 4G10-HRP+BCR-GO и ABL-HRP+BCR-GO).

4.3. Инкубировать 15 мин в темноте.

4.4. Отмывать слайд 5 раз так, чтобы первая отмывка представляла быструю промывку 1,25 мл TBST, а остальные длились по 3 мин.

5. Инкубация с конъюгатом Alexa Fluor со стрептавидином

25 5.1. Инкубировать с 80 мкл стрептавидин-Alexa 647 при 0,4 мкг/мл в буфере для разведения и определения (разведение 1:4000) в течение 40 мин.

5.2. Отмывать слайд 5 раз так, чтобы первая отмывка представляла быструю промывку 1,25 мл TBST, а остальные длились по 3 мин.

5.3. Промыть один раз водой.

30 5.4. Снять рамку и промыть слайд пару раз водой.

5.5. Центрифугировать слайд при 1500 об/мин в пробирке на 50 мл в течение 3 мин.

6. Сушка и сканирование слайда на сканнере Perkin Elmer при соответствующей настройке лазера

6.1. Высушить слайд.

35 6.2. Сканировать слайд на сканнере Perkin Elmer при соответствующей настройке лазера.

6.3. Сохранить снимки и настройки сканирования в файлы и на сервер.

Пример 7. Способ выбора противораковой терапии для пациентов с гематологическими раковыми заболеваниями по уровню активированного BCR-ABL

40 В этом примере представлен способ выбора противораковой терапии для больных с опосредованными BCR-ABL заболеваниями (например, хронической миелогенной лейкемией). Больные ранее не подвергались лечению от опосредованного BCR-ABL заболевания и не получали таких препаратов, как ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб

(Zactima™; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). Берут образец крови пациента и инкубируют его с различными противораковыми препаратами при различных дозах в течение 1,5 ч при 37°C. После этой обработки препаратом *in vitro* из крови пациента выделяют лейкоциты и/или циркулирующие опухолевые клетки. Выделенные клетки подвергают лизису и используют при анализе методом, который основан на близком взаиморасположении, типа совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке РСТ No. РСТ/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. В обработанных образцах пациента определяются профили сигнальных путей на основе профилей экспрессии/активации анализируемых белков путей передачи сигналов (например, BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT, SRC) в присутствии противоракового препарата. Эти профили используются для выбора режима противоракового лечения, направленного на достижение положительного клинического результата.

При этом настоящим изобретением предусмотрен способ выбора противоракового препарата для субъекта с гематологическим раковым заболеванием, который включает: 1) измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в выделенных клетках из образца от субъекта, 2) инкубацию выделенных клеток по меньшей мере с одним противораковым препаратом до начала лечения; 3) измерение уровня активационного состояния BCR-ABL в инкубированных клетках; и выбор курса лечения, исходя из уровня активационного состояния BCR-ABL. Настоящим изобретением также предусмотрен способ мониторинга эффективности противоракового препарата у субъекта, причем субъект страдает гематологическим раковым заболеванием, который включает: 1) измерение активационного состояния BCR-ABL во время T<sub>0</sub>, перед первым введением противоракового препарата; 2) введение противоракового препарата субъекту, причем первое введение противоракового препарата происходит во время T<sub>1</sub>; 3) измерение активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL во время T<sub>2</sub> в образце от пациента; и 4) определение курса лечения, исходя из активационного состояния и/или уровня экспрессии BCR-ABL.

Пример 8. Пациентка 1: составление профиля пути для определения эффективности лечения и/или выбора наилучшей стратегии лечения на основе профиля ингибирования BCR-ABL *in vitro*

В этом примере представлено определение эффективности лечения ингибиторами для больных с опосредованными BCR-ABL заболеваниями (например, хронической миелогенной лейкемией) на основе профиля экспрессии/активации анализируемых белков пути передачи сигналов (например, BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT, SRC) в образцах крови субъекта. В определенных случаях пациенты могут получать лечение ингибиторами, как-то принимать ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниб мезилат (Gleevec®), нилотиниб (Tasigna®), дасатиниб (Sprycel®), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa®), сунитиниб (Sutent®), эрлотиниб (Tarceva®), лапатиниб (GW-572016; Tykerb®), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar®), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima™; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). В других воплощениях измеряется присутствие и/или активационное состояние субстрата BCR-ABL типа CRKL, AKT, STAT5 и SRC методом, основанном на близком взаиморасположении, типа

совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке РСТ No. РСТ/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. Кроме того, составление 5 профиля экспрессии/активации киназ и других компонентов путей передачи сигналов в образцах пациента после обработки ингибиторами тирозинкиназ *in vitro* может дать ценную информацию, позволяющую врачу выбрать эффективный режим лечения.

В типичном примере анализировали образцы крови пациентов (пациентки 1) для определения эффективности лечения больных иматинибом. Пациентка №1 - 55-летняя 10 белая женщина с первичным диагнозом хронической миелогенной лейкемии (СМЛ). У нее активная форма СМЛ и она получала иматиниб сразу после установления диагноза. У больной брали кровь и выделяли лейкоциты описанными выше способами. Вкратце, образец цельной крови пациентки №1 фильтровали через фильтрационный планшет для получения лейкоцитов и циркулирующих опухолевых клеток. Затем клетки 15 лизировали и использовали при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении (например, СЕЕР и СОPIA) для выявления активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K). В 20 определенных случаях при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, использовали серийные разведения захватывающих антител 1:5 или 1:20 для получения требуемых концентраций. Методом, основанном на близком взаиморасположении, определяли количество лейкоцитов и профили 25 фосфорилированного BCR-ABL и других компонентов пути передачи сигналов. При анализе также рассчитывали соотношение сигналов фосфорилирования, которое использовали для составления прогноза для больной.

В предпочтительном воплощении образцы крови пациентов инкубируют *in vitro* с обработкой ингибитором перед выделением лейкоцитов или циркулирующих опухолевых 30 клеток. В определенных случаях образцы цельной крови, взятые у пациентов с диагнозом СМЛ, обрабатывают при 0,1 мкМ, 1 мкМ или 10 мкМ ингибитора BCR-ABL (например, иматиниба, нилотиниба или дасатиниба) в течение 1,5 ч при 37°C. Из цельной крови выделяют лейкоциты или циркулирующие опухолевые клетки фильтрационным методом и подвергают лизису известными в данной области методами. Затем клеточные лизаты 35 используют при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, для определения эффекта терапии ингибиторами BCR-ABL на активационное состояние и/или общее количество одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов. В некоторых воплощениях обработка ингибиторами BCR-ABL *in vitro* может снизить уровень фосфорилированного CRKL. В некоторых случаях активация CRKL в образцах пациентов может быть вызвана 40 активацией BCR-ABL. В другом воплощении определенный ингибитор типа дасатиниба может уменьшить активированные формы АКТ, STAT5 и SRC. А в других случаях другие ингибиторы, такие как иматиниб и нилотиниб, могут и не снижать уровень фосфорилированного АКТ и STAT5 у того же самого пациента. В определенных случаях сигнализация фосфорилированного АКТ и STAT может не зависеть от активационного 45 состояния BCR-ABL. В другом аспекте пациент, получающий в настоящее время иматиниб, вероятно, будет реагировать на и должен получать комбинированную терапию типа иматиниба и дасатиниба вследствие слабой экспрессии/активации таких субстратов BCR-ABL, как CRKL, STAT5 и SRC.



На фиг. 10 описаны пациенты, анализируемые в этом исследовании. У пациентки 1 активная форма CML и она получала лечение на протяжении по меньшей мере 5 лет. Пациент 2, у которого тоже активная форма CML, получал лечение иматинибом в течение 1 года. Из фиг. 11А-В видно, что у пациентки 1 был более низкий уровень фосфо-BCR-ABL на 1 мл крови, чем у пациента 2 (10979 ед./мл против 185934 ед./мл), свидетельствуя о том, что пациентка 1 реагировала на лечение иматинибом. На фиг. 12А-В представлено детектирование уровней общего и активированного (фосфорилированного) BCR-ABL при определении методом сэндвич-ELISA, после фильтрационного выделения лейкоцитов и других циркулирующих опухолевых клеток. Основанный на близком взаиморасположении метод способен детектировать уровень фосфо-BCR-ABL в клетках K562. Из фиг. 13 А-В видно, что обработка иматинибом *in vitro* образца крови от пациентки 1 привела к резкому снижению количества фосфорилированного BCR-ABL по сравнению с обработкой нилотинибом. Из фиг. 14 и 15 видно, что уровень активированного BCR-ABL в образцах крови пациентки 1 изменялся при обработке возрастающими количествами ингибитора BCR-ABL. В этом эксперименте образцы крови пациентки 1 обрабатывали в течение 1,5 ч *in vitro* различными количествами ингибиторов BCR-ABL (например, 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ иматиниба, либо 10 мкМ, 1 мкМ или 0,1 мкМ нилотиниба). Результаты показывают, что среднее значение сигнала фосфо-BCR-ABL составляло 84 ед. для 10 мкМ иматиниба, 26 ед. для 1 мкМ иматиниба и 10 ед. для 0,1 мкМ иматиниба. Средний уровень сигнала активированного BCR-ABL составлял 47 ед. для 10 мкМ нилотиниба, 61 ед. для 1 мкМ нилотиниба и 306 ед. для 0,1 мкМ нилотиниба. Из фиг. 15А-В видно, что иматиниб более эффективно, чем нилотиниб, снижал активированный белок BCR-ABL в образцах крови пациентки 1. Выход сигнала активированного BCR-ABL составил - 18,46% в образце, обработанном *in vitro* 1 мкМ иматиниба, и 19,15% в образце, обработанном 1 мкМ нилотиниба (фиг. 15В). На фиг. 16А-Д представлен профиль других фосфорилированных компонентов пути передачи сигналов, таких как CRKL (А), АКТ (В), STAT5 (С) и SRC (D). Из него видно, что терапия дасатинибом, но не иматинибом или нилотинибом, приводит к снижению уровня активированного АКТ, STAT4 и SRC в образцах крови пациентки 1. Из фиг. 17 видно, что образец крови пациентки 1 содержал очень высокий уровень общего BCR (8 млн. ед./мл).

Пример 9. Пациент 2: составление профиля пути для определения эффективности лечения и/или выбора наилучшей стратегии лечения на основе профиля ингибирования BCR-ABL *in vitro*

В этом примере представлено определение эффективности лечения ингибиторами для больных с опосредованными BCR-ABL заболеваниями (например, хронической миелогенной лейкемией) на основе профиля экспрессии/активации анализируемых белков пути передачи сигналов (например, BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, АКТ, SRC) в образцах крови субъекта. В определенных случаях пациенты могут получать лечение ингибиторами, как-то принимать ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKI-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). В других воплощениях измеряется присутствие и/или активационное состояние субстрата BCR-ABL типа CRKL, АКТ, STAT5 и SRC методом, основанном на близком взаиморасположении, типа

совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке РСТ No. РСТ/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. Кроме того, составление

5 профиля экспрессии/активации киназ и других компонентов путей передачи сигналов в образцах пациента после обработки ингибиторами тирозинкиназ *in vitro* может дать ценную информацию, позволяющую врачу выбрать эффективный режим лечения.

В типичном примере пациентом (пациент 2) является 39-летний белый мужчина с диагнозом CML, поставленным в январе. Пациент №2 принимал иматиниб сразу после

10 диагноза и имеет активную форму заболевания. В предпочтительном воплощении у пациента берут кровь и выделяют лейкоциты описанными выше способами. Вкратце, образец цельной крови пациента №2 фильтровали через фильтрационный планшет для получения лейкоцитов и циркулирующих опухолевых клеток. Затем клетки лизировали и использовали при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении,

15 (например, SEER и COPIA) для выявления активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K). В определенных случаях при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, использовали

20 серийные разведения захватывающих антител 1:5 или 1:20 для получения требуемых концентраций. Основанном на близком взаиморасположении методом определяли количество лейкоцитов и профили фосфорилированного BCR-ABL и других компонентов пути передачи сигналов. При анализе также рассчитывали соотношение сигналов фосфорилирования, которое использовали для составления прогноза для больного.

В предпочтительном воплощении образцы крови пациентов инкубируют *in vitro* с

25 обработкой ингибитором перед выделением лейкоцитов или циркулирующих опухолевых клеток. В определенных случаях образцы цельной крови, взятые у пациентов с диагнозом CML, обрабатывают при 1 мкМ ингибитора BCR-ABL (например, иматиниба, нилотиниба или дасатиниба) в течение 1,5 ч при 37°C. Из цельной крови выделяют

30 лейкоциты или циркулирующие опухолевые клетки фильтрационным методом и подвергают лизису известными в данной области методами. Затем клеточные лизаты используют при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, для определения эффекта терапии ингибиторами BCR-ABL на активационное состояние и/или общее количество одного или нескольких онкогенных слитых белков (например,

35 BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов. В некоторых воплощениях обработка *in vitro* нилотинибом, но не иматинибом может снизить выход фосфо-BCR-ABL в образцах крови пациента. В определенных случаях пациент с таким профилем пути, вероятно, будет лучше реагировать на терапию нилотинибом, чем иматинибом. В других

40 воплощениях обработка *in vitro* ингибиторами BCR-ABL может не влиять на фосфорилированный CRKL. В другом воплощении определенный ингибитор типа дасатиниба может уменьшать активированные формы AKT, STAT5 и SRC. А в других случаях другие ингибиторы, такие как иматиниб и нилотиниб, могут снижать уровень фосфорилированного AKT и STAT5 в образцах того же самого пациента. Еще в других

45 случаях фосфорилированные формы STAT5 и SRC уменьшаются примерно на 20% вследствие обработки *in vitro* иматинибом и нилотинибом. В другом аспекте пациент, получающий в настоящее время иматиниб, вероятно, будет лучше реагировать на и должен получать лечение дасатинибом вследствие слабой экспрессии/активации таких субстратов BCR-ABL, как CRKL, STAT5 и SRC.

Из фиг. 18А-В видно, что фосфорилированный BCR-ABL выявляется и измеряется после обработки *in vitro* образцов крови пациента 2 различными дозами ингибиторов BCR-ABL в течение 1,5 ч при 37°C. Также видно, что нилотиниб более эффективно, чем иматиниб уменьшает активированный BCR-ABL в обработанных *in vitro* образцах крови пациента 2. Повышение концентрации нилотиниба (например, 0,1 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ) уменьшает активированный BCR-ABL, тогда как изменение концентрации иматиниба производит меньший эффект (фиг. 18В). Иматиниб производил очень слабый эффект на уровень активированного BCR-ABL у пациента 2. Из фиг. 19А-Д видно, что обработка *in vitro* образца крови пациента 2 дасатинибом снижает уровень активированного АКТ (В), STAT5 (С) и SRC (D). С другой стороны, аналогичная обработка как иматинибом, так и нилотинибом снижает только фосфорилированный АКТ (например, 55,54%) в образце, обработанном 10 мкМ иматиниба, по сравнению со 100% в необработанном образце).

Пример 10. Сравнение профилей пути в образцах крови от пациентов, получающих иматиниб при хронической миелогенной лейкемии

В этом примере показано, что можно определять и сравнивать профили путей на основе профилей экспрессии/активации анализируемых белков путей передачи сигналов (например, BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, АКТ, SRC) в образцах крови субъекта для определения эффективности различных режимов лечения. В предпочтительных воплощениях измеряется присутствие и/или активационное состояние субстрата BCR-ABL типа CRKL, АКТ, STAT5 и SRC методом, основанном на близком взаиморасположении, типа совмещенного иммуноанализа, основанного на близком взаиморасположении (COPIA), описанного в Заявке РСТ No. РСТ/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи. В других воплощениях пациенты могут получать лечение ингибиторами, как-то принимать ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниб мезилат (Gleevec<sup>®</sup>), нилотиниб (Tasigna<sup>®</sup>), дасатиниб (Sprycel<sup>®</sup>), босутиниб (SKJ-606), гефитиниб (Iressa<sup>®</sup>), сунитиниб (Sutent<sup>®</sup>), эрлотиниб (Tarceva<sup>®</sup>), лапатиниб (GW-572016; Tykerb<sup>®</sup>), канертиниб (CI 1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сорафениб (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), лефлуномид (SU101), вандетаниб (Zactima<sup>™</sup>; ZD6474), понатиниб (AP24534) и их комбинации). В других воплощениях образцы крови пациентов обрабатывают ингибиторами тирозинкиназ *in vitro* в течение 1,5 ч при 37°C. После этого из образцов крови выделяют циркулирующие опухолевые клетки и/или лейкоциты описанными здесь фильтрационными методами. Выделенные клетки подвергают лизису и используют при анализе методом, основанном на близком взаиморасположении, (например, SEER и COPIA) для выявления активационного состояния и/или общего количества одного или нескольких онкогенных слитых белков (например, BCR-ABL) и/или молекул передачи сигналов (например, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-IR, SHC, PI3K, CRKL, АКТ, STAT5, SRC). Измеренные уровни этих белков можно сравнивать между образцами от одного и того же пациента или от разных пациентов. Сравнение профилей путей позволяет врачу выбрать наиболее эффективную терапию для больных с опосредованными BCR-ABL заболеваниями.

Из фиг. 20А-Д видно, что уровень фосфорилированного CRKL детектируется и измеряется в образцах крови, которые обрабатывали ингибиторами тирозинкиназ *in vitro*. В этом эксперименте захватывающие антитела при анализе методом, основанном

на близком взаиморасположении, разводили 1:10 или 1:50 для получения требуемых концентраций. Пациентка 1 проявляла более высокий уровень активированного CRKL, чем пациент 2. Ингибиторы тирозинкиназ типа иматиниба и нилотиниба снижали уровень CRKL только в образцах крови пациентки 1, но не пациента 2.

5 Из фиг. 21A-D видно, что пациентка 1 и пациент 2 по-разному реагировали на иматиниб и нилотиниб. После обработки иматинибом уровень активированного АКТ повышался в образцах пациентки 1, но уменьшался в образцах пациента 2. В ответ на нилотиниб уровень АКТ почти не изменялся в образцах пациентки 1, но сильно уменьшался в образцах пациента 2.

10 Из фиг. 22A-B видно, что обработка дасатинибом *in vitro* снижает уровень фосфо-STAT5 в образцах пациентки 1 (A) и пациента 2 (B). Уровни активированного STAT5 были близкими в образцах как пациентки 1, так и пациента 2 в отсутствие обработки, при 10 мкМ иматиниба или 10 мкМ нилотиниба.

15 Из фиг. 23A-D видно, что в образцах как пациентки 1, так и пациента 2 уровень фосфо-SRC снижается в ответ на иматиниб, нилотиниб и дасатиниб. Дасатиниб более эффективно, чем иматиниб и нилотиниб снижал уровень фосфо-SRC в образцах как пациентки 1, так и пациента 2.

Пример 11. Детектирование и мониторинг активации BCR-ABL у больных CML

20 В этом примере представлены способы настоящего изобретения для мониторинга реакции на лечение у больных с диагнозом CML. В этом примере показано, что эти способы способны детектировать экспрессию и активационное состояние многих белков при ограниченном количестве клеток. Из этого примера видно, что способы с применением устройства для выделения клеток по настоящему изобретению и иммуноанализ методом CEER обеспечивают более чувствительный и количественный анализ функциональных изменений мишени, чем методы на основе мРНК.

25 Традиционные способы мониторинга реакции на лечение CML включают цитогенетическое тестирование, исследование мазков из пунктата костного мозга, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) хромосомы Ph и количественную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (Q-PCR). Как правило, цитогенетическое тестирование или исследование мазков из пунктата костного мозга проводится после 3, 6 и 12 месяцев лечения или до достижения CCyR. В настоящее время наиболее чувствительным тестом на реакцию на лечение является Q-PCR. В настоящем изобретении представлены способы мониторинга модуляции ингибирования киназы BCR-ABL *in vivo*, которые более чувствительны, чем Q-PCR, и не требуют удаления или разбавления препарата в образцах крови пациентов.

35 В этом исследовании анализировали уровни общего и активированного BCR-ABL у больных CML способами настоящего изобретения. На фиг. 24 представлена таблица по пациентам, обследованным в данном исследовании. Отмечена дата постановки диагноза и курс лечения пациента. Брали кровь в различные моменты времени в ходе исследования. Из образцов крови пациентов выделяли лейкоциты и циркулирующие опухолевые клетки и лизировали их описанными здесь способами. Клеточные лизаты обрабатывали и анализировали методами, описанными в Примере б. Определяли изменения экспрессии и активации BCR-ABL и других сигнальных молекул (например, АКТ, SRC, CRKL и STAT5) в образцах крови пациентов проксимитетным методом (например, COPIA или CEER). Подробное описание такого метода, как совмещенный иммуноанализ, основанный на близком взаиморасположении (COPIA), приведено в Заявке PCT No. PCT/US 2010/042182, поданной 15 июля 2010 г., и публикациях US Nos. 20080261829, 20090035792 и 20100167945, содержание которых включено сюда путем

ссылки во всей полноте на все случаи.

Мониторинг течения СМЛ у больных после лечения препаратом

На фиг. 25 представлены уровни общего и активированного BCR-ABL, выявленные в образцах пациентов способами настоящего изобретения. Дополнительные сведения об образцах пациентов приведены в данном примере.

Определяли общие уровни BCR, ABL и BCR-ABL в образцах крови нормальных, здоровых субъектов. Как и ожидалось, уровни BCR-ABL оказались отрицательными (см. фиг. 26).

Пациенту 1 был поставлен диагноз СМЛ в декабре 2006 г. и он получал лечение иматинибом (Gleevec). Для определения реакции пациента 1 на иматиниб анализировали уровни общего и активированного BCR-ABL в трех временных точках (31/01, 25/04 и 24/10). У пациента 1 соотношение фосфорилированный BCR-ABL/лейкоциты составляло 0,130 в 1-й точке, 0,133 во 2-й точке и 0,078 в 3-й точке (фиг. 27А). Изменения уровня фосфорилированного BCR-ABL по всем временным точкам не выявлялись при определении по экспрессии мРНК, так как значения мРНК составляли  $0,04 \pm 0,01\%$  и  $0,04\%$  в точках 2 и 3, соответственно. Анализ экспрессии РНК выявляет активные опухолевые клетки при уменьшении на 3 лог-единицы от исходного уровня. Преимущество иммуноанализа на микроматрицах СЕЕР состоит в том, что он выявляет фосфо-BCR-ABL при уменьшении больше чем на 3 лог-единицы.

Результаты пациента 7 показывают, что уровень BCR-ABL по уровню мРНК не выявляется, тогда как при иммуноанализе на микроматрицах СЕЕР выявляется уровень общего и активированного BCR-ABL. Способ настоящего изобретения оказался в 10 раз более эффективным при детектировании активированного BCR-ABL, чем общего BCR-ABL. В частности, иммуноанализ методом СЕЕР выявляет экспрессию и активационное состояние BCR-ABL у тех пациентов, у которых соотношение активных опухолевых клеток к общему числу лейкоцитов составляет  $0,05\%$ , что соответствует уменьшению больше чем на 4 лог-единицы от исходного уровня. Пациенту 7 был поставлен диагноз СМЛ в мае, а лечение иматинибом началось в апреле. Реакцию на лечение отслеживали по 2 временным точкам после лечения (например, в июне и феврале). Результаты свидетельствуют, что уровень фосфо-BCR-ABL снижался во времени (см. гистограмму и график на фиг. 27В).

Пациенту 2 был поставлен диагноз в январе, а лечение иматинибом началось в феврале. Из крови, взятой у пациента 2/02 и 2/03, выделяли лейкоциты и CTCs, используя 96-луночный вариант устройства для выделения клеток. Для крови, взятой 12/10 и 21/12, использовали пробирочный вариант устройства для выделения клеток по настоящему изобретению. Способами настоящего изобретения было установлено, что у пациента 2 активированный BCR-ABL экспрессировался на меньшем уровне в мае (например, см. гистограмму и график на фиг. 28А, В). Однако уровень повысился в октябре. Результаты иммуноанализа СЕЕР коррелируют с данными по экспрессии мРНК. Точность метода Q-PCR по стандартной методике (например, набор Molecular MD для BCR-ABL) при низких уровнях мРНК приведены на фиг. 28С. Соотношение % BCR-ABL/ABL варьировало с количеством мРНК в образце.

Мониторинг реакции на препарат *in vitro* в образцах пациентов

Для определения реакции пациента 2 на лечение препаратом *in vitro* образцы крови обрабатывали различным количеством иматиниба или нилотиниба и определяли уровень общего и активированного BCR-ABL. При иммуноанализе методом СЕЕР в образцах пациента 7 выявлялась реакция на лечение препаратом, свидетельствуя, что этот метод является полезным средством для определения наилучшей терапии для пациента.

Пациенту 3 был поставлен диагноз CML и он получал лечение дасатинибом (Sprycel). Уровни общего и активированного BCR-ABL определяли в 5 временных точках (7/02, 4/04, 25/07, 22/08 и 17/10). Кровь, взятую 7/02 и 4/04, обрабатывали с помощью 96-луночного варианта устройства для выделения клеток, а кровь, взятую 25/07 и 22/08, обрабатывали с помощью пробирочного варианта устройства по настоящему изобретению. Из фиг. 29А видно, что соотношение рBCR/лейкоциты было самым низким 17/10. Из фиг. 29В видно, что уровень фосфо-BCR-ABL достигал пика в образце от 25/07 и уменьшался до самого низкого уровня в образце от 17/10. Пациент 3 реагировал на дасатиниб и имел меньший уровень активированного BCR-ABL в последней временной точке, как видно из фиг. 29А. Результаты при определении фосфо-BCR-ABL методом SEER коррелируют с данными по экспрессии мРНК.

Пациенту 8 был поставлен диагноз CML в июле 2007 г. и он перешел на лечение дасатинибом с иматиниба 25/05. Брали кровь 18/05 и 20/06 и обрабатывали с помощью 96-луночного варианта устройства для выделения клеток по настоящему изобретению. Для выделения и лизиса лейкоцитов и CTCs из крови, взятой 18/07, 18/08 и 13/10, использовали пробирочный вариант настоящего изобретения. Из фиг. 30А видно, что соотношение фосфо-BCR-ABL/лейкоциты уменьшалось с 18/05 до 18/08, но повышалось 13/03. Соотношение фосфо-BCR-ABL/общий BCR-ABL повышалось в то время, когда пациент принимал дасатиниб (фиг. 30В), возможно, вследствие прогрессирования CML.

Пациент 18 реагировал на первоначальное лечение нилотинибом 20/08, а затем на лечение понатинибом 22/08. Всю кровь, взятую у пациента в этом исследовании, обрабатывали с помощью пробирочного варианта устройства для выделения клеток по настоящему изобретению. Результаты, полученные способами настоящего изобретения, показывают, что соотношение рBCR-ABL/лейкоциты снижалось по ходу лечения. Соотношение мРНК при определении стандартными известными методами также показало снижение BCR-ABL за этот период времени.

Пациенту 14 был поставлен диагноз CML в июне и он получал лечение гидроксимочевинной 28/06 и дасатинибом 29/08. Кровь, взятую 29/08 и 3/10, обрабатывали с помощью пробирочного варианта устройства для выделения клеток по настоящему изобретению. Из фиг. 31 В видно, что уровень активированного фосфо-BCR-ABL (соотношение рBCR-ABL/лейкоциты) снижался после первой временной точки (28/06) и достигал самого низкого уровня в последней временной точке (20 октября). Образцы крови пациента 14 обрабатывали *in vitro* при различных концентрациях иматиниба или нилотиниба. Из фиг. 32А-В видно, что у пациента 14 реакция на обработку препаратами *in vitro* приводила к снижению фосфорилированного BCR-ABL при обработке иматинибом или нилотинибом.

#### Заключение

В этом примере представлен анализ экспрессии и фосфорилирования BCR-ABL в клеточных лизатах, полученных от 20 больных CML. В этом примере представлено применение способов настоящего изобретения, включая способ выделения клеток и иммуноанализ методом SEER. В частности, из образцов цельной крови пациентов выделяли лейкоциты и циркулирующие опухолевые клетки без удаления или разбавления уровня препарата в крови. Наблюдались различные уровни ингибирования киназы BCR-ABL у пациентов, получающих направленное лечение. Этот пример также показывает, что детектирование BCR-ABL при иммуноанализе методом SEER обладает высоким уровнем функциональной чувствительности и может применяться для мониторинга течения CML. Способы настоящего изобретения могут применяться для скрининга и мониторинга эффективности препаратов, что принесет большую пользу

больным СМЛ, получающим направленное лечение. Точно так же эти способы могут помочь врачам при определении самых эффективных вариантов лечения для пациента.

5 Все публикации и патентные заявки, приведенные в этом описании, в том числе Заявка РСТ No. РСТ/US 2010/053386, поданная 20 октября 2010 г., включены сюда путем ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и индивидуально включена путем ссылки. Несмотря на то, что данное изобретение было описано весьма подробно при помощи иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, специалистам в этой области в свете положений данного изобретения должно быть понятно, что в нем могут производиться определенные изменения и модификации, не отходящие от сути и не выходящие за рамки прилагаемой формулы изобретения.

#### Формула изобретения

1. Устройство для выделения и отделения лейкоцитов от эритроцитов в образце цельной крови, где указанное устройство включает:

15 одно или несколько фильтрационных устройств, где каждое фильтрационное устройство содержит верхнюю камеру, которая является цилиндрической трубкой, нижнюю камеру, которая является цилиндрической трубкой, и одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран между верхней и нижней камерами, причем одна или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран способны задерживать лейкоциты, где внутренние диаметры верхней и нижней камер одинаковы, чтобы создать цилиндрическую трубку, что позволяет жидкостям протекать через нее, где указанные одна или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран помещены между резьбой верхней камеры и нижней камеры, где камеры скреплены друг с другом; и

25 приемный сосуд для сбора эритроцитов из образца цельной крови, где указанный сосуд выбран из приемной пробирки, многолуночного приемного сосуда или мультипробирочного приемного сосуда, причем указанное фильтрационное устройство размещается над приемным сосудом,

30 где указанное устройство предназначено для использования вместе с центрифугой.

2. Устройство по п. 1, где фильтрационное устройство включает две, три или четыре сложенные в стопку фильтровальные мембраны.

3. Устройство по п. 1, где верхняя камера дополнительно включает защелкивающуюся крышку, прикрепленную к ней.

35 4. Устройство по п. 1, где устройство представляет собой множество фильтрационных устройств.

5. Устройство по п. 1, где указанная верхняя камера является цилиндрической трубкой со спиральными выступами или резьбой.

40 6. Устройство по п. 3, где защелкивающаяся крышка с помощью полоски материи прикреплена к верхней камере.

7. Устройство по п. 1, где резьба из верхней части входит во внутреннюю резьбу нижней камеры.

8. Устройство по п. 1, где верхняя камера и нижняя камера привинчены друг к другу.

45 9. Способ получения лизата лейкоцитов из образца цельной крови без существенного разбавления терапевтического средства, который включает:

(а) внесение образца цельной крови в устройство по любому из пп. 1-8;

(б) центрифугирование устройства для захвата лейкоцитов на одну или несколько сложенных в стопку фильтровальных мембран и отделения эритроцитов в приемную

пробирку; и

(с) лизис лейкоцитов, захваченных на одну или нескольких сложенных в стопку фильтровальных мембран, с помощью буфера для лизиса, но без стадии промывки между стадиями (b) и (с), получая при этом лизат лейкоцитов.

5 10. Способ по п. 9, который дополнительно включает замену приемной пробирки на вторую приемную пробирку между стадиями (b) и (с).

11. Способ по п. 10, который дополнительно включает центрифугирование устройства, содержащего вторую приемную пробирку, после лизиса лейкоцитов на стадии (с), и сбор лизата лейкоцитов во вторую приемную пробирку.

10 12. Способ по п. 9, при этом образец цельной крови инкубируют *in vitro* с терапевтическим средством перед внесением в устройство.

13. Способ по п. 9, при этом в лизате лейкоцитов измеряют уровень экспрессии и/или активации по меньшей мере одного онкогенного слитого белка и/или молекулы передачи сигналов, где по меньшей мере один онкогенный слитый белок включает BCR-ABL.

15 14. Способ по п. 9, где указанные лейкоциты выбраны из группы, состоящей из нормальных лейкоцитов, злокачественных лейкоцитов, пораженных болезнью лейкоцитов и их комбинаций.

20

25

30

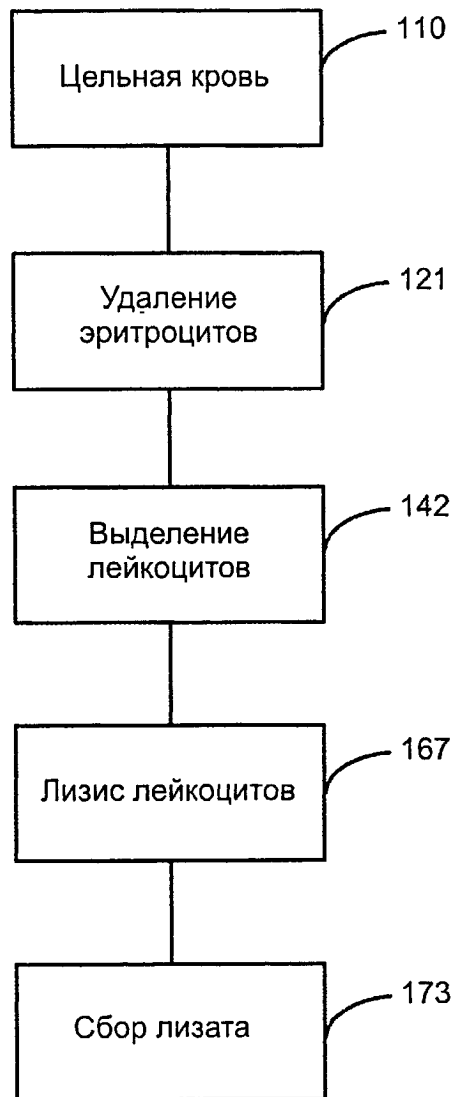
35

40

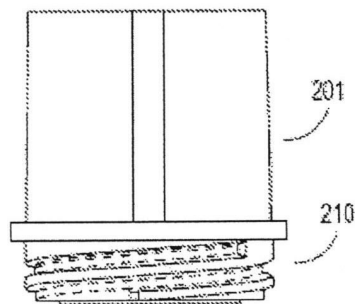
45



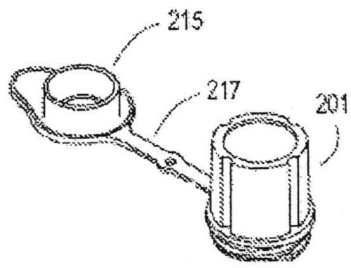
100



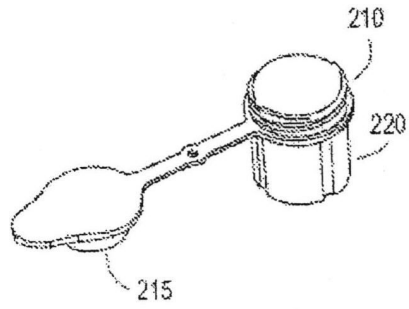
Фиг. 1



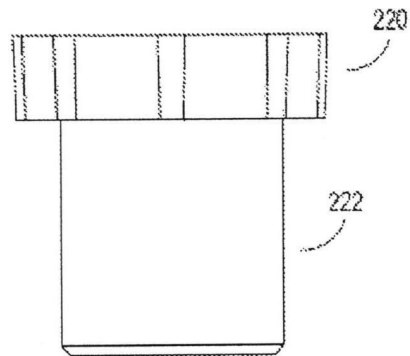
Фиг. 2А



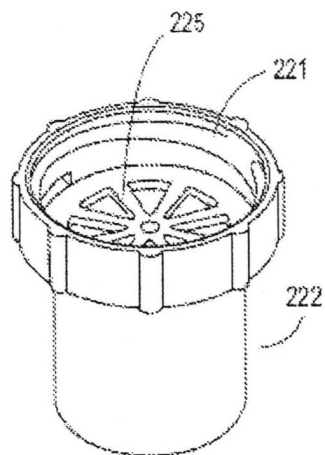
Фиг. 2В



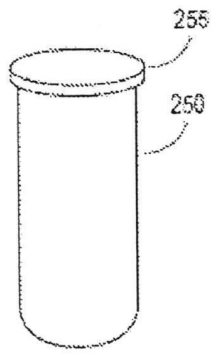
Фиг. 2С



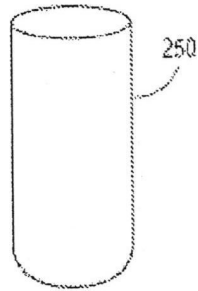
Фиг. 2D



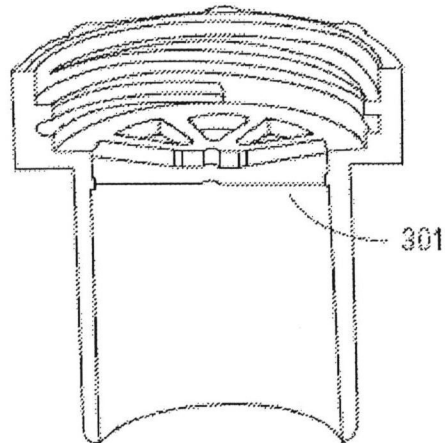
Фиг. 2Е



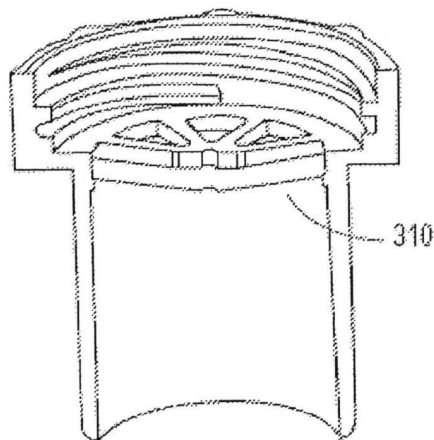
Фиг. 2F



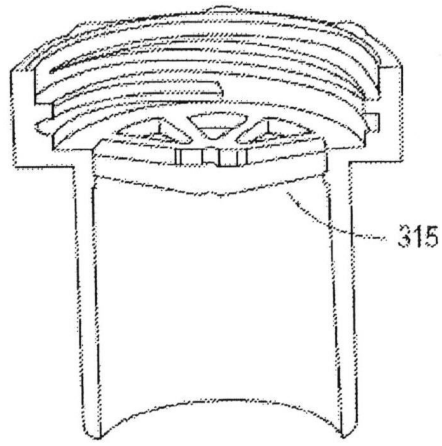
Фиг. 2G



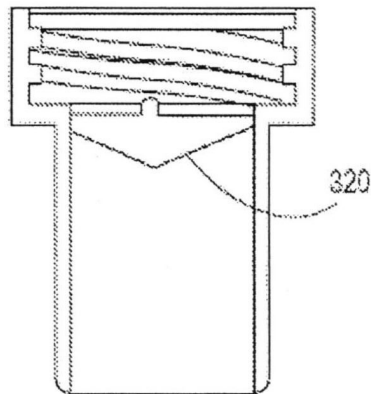
Фиг. 3A



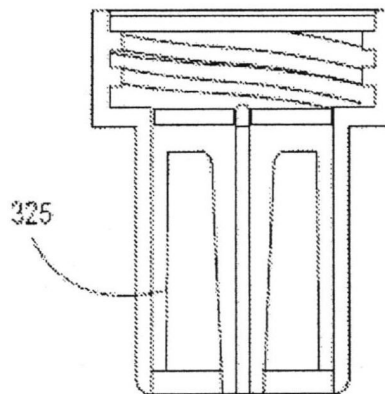
Фиг. 3B



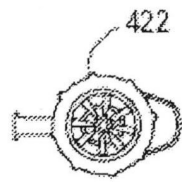
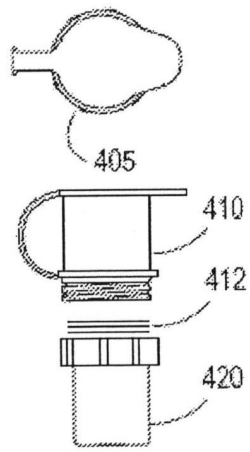
Фиг. 3С



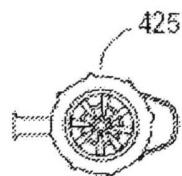
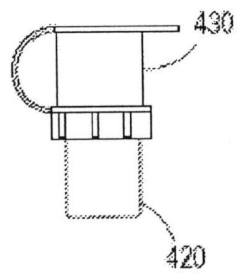
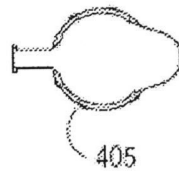
Фиг. 3D



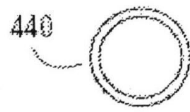
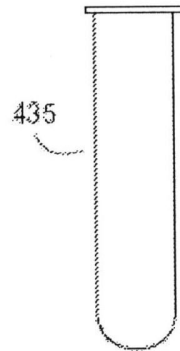
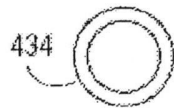
Фиг. 3F



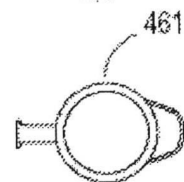
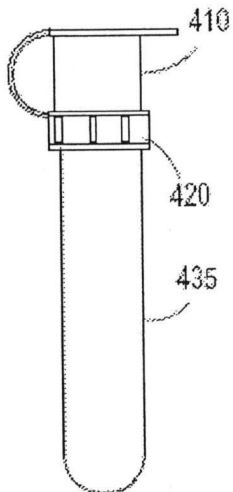
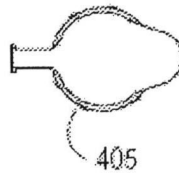
Фиг. 4А



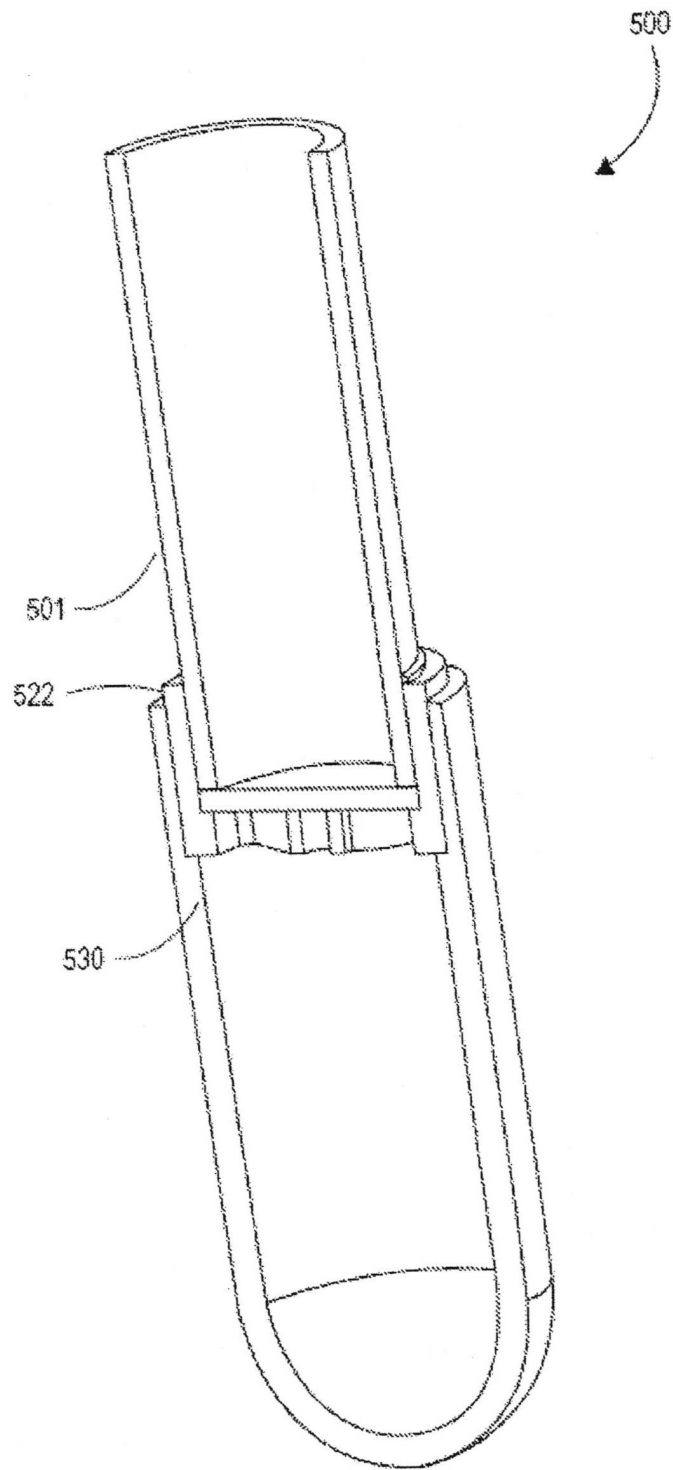
Фиг. 4В



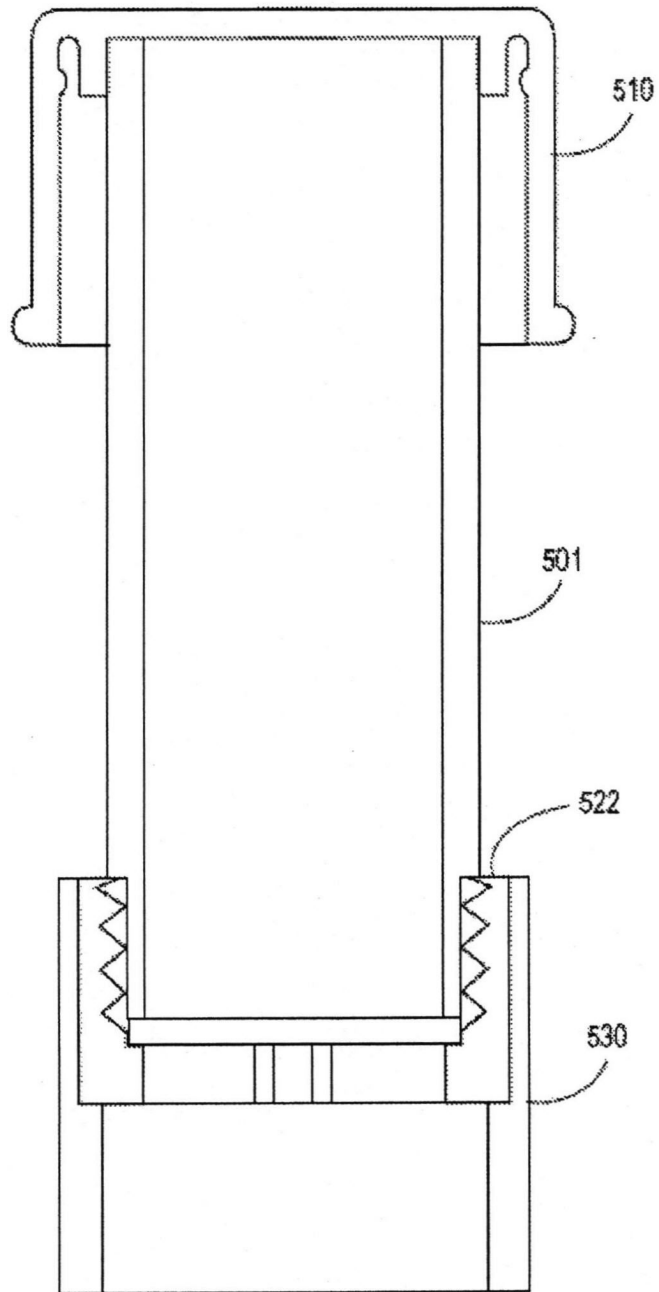
Фиг. 4С



Фиг. 4D

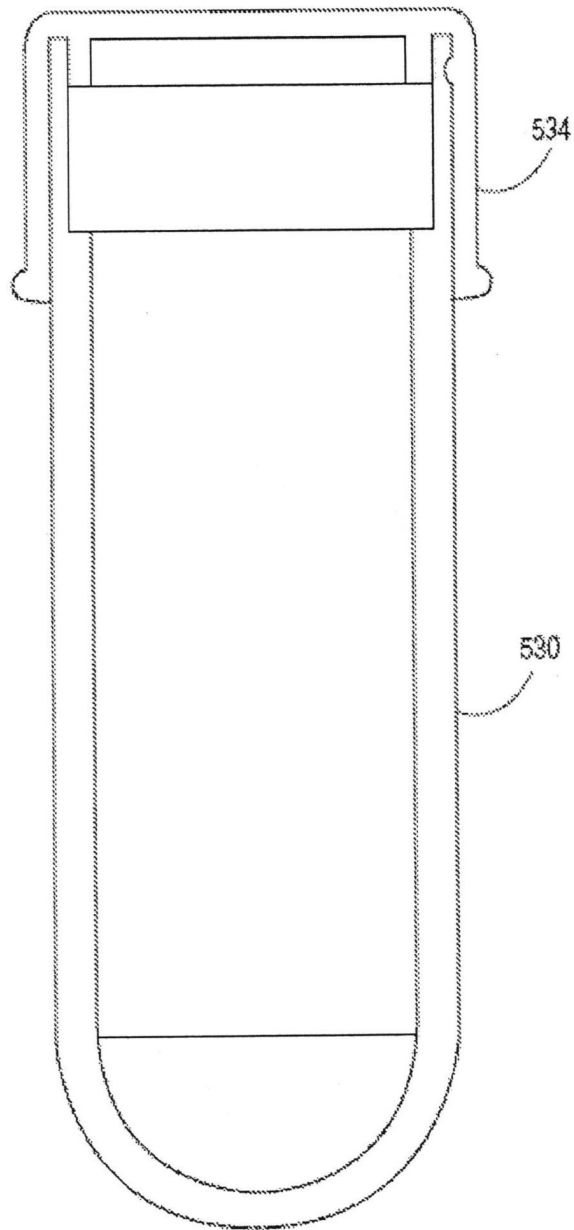


Фиг. 5А

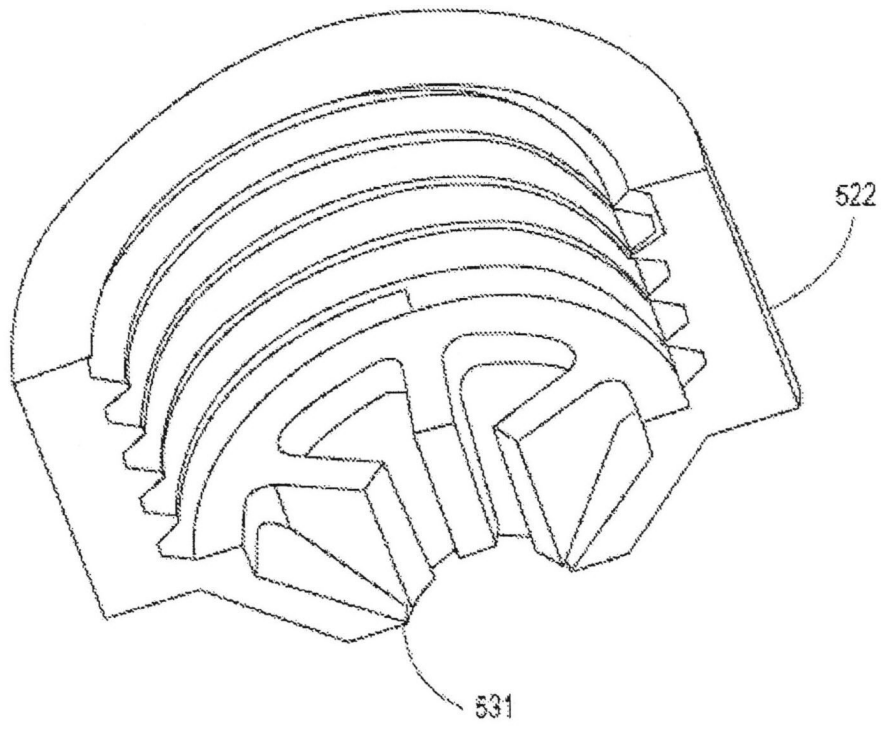


Фиг. 5В

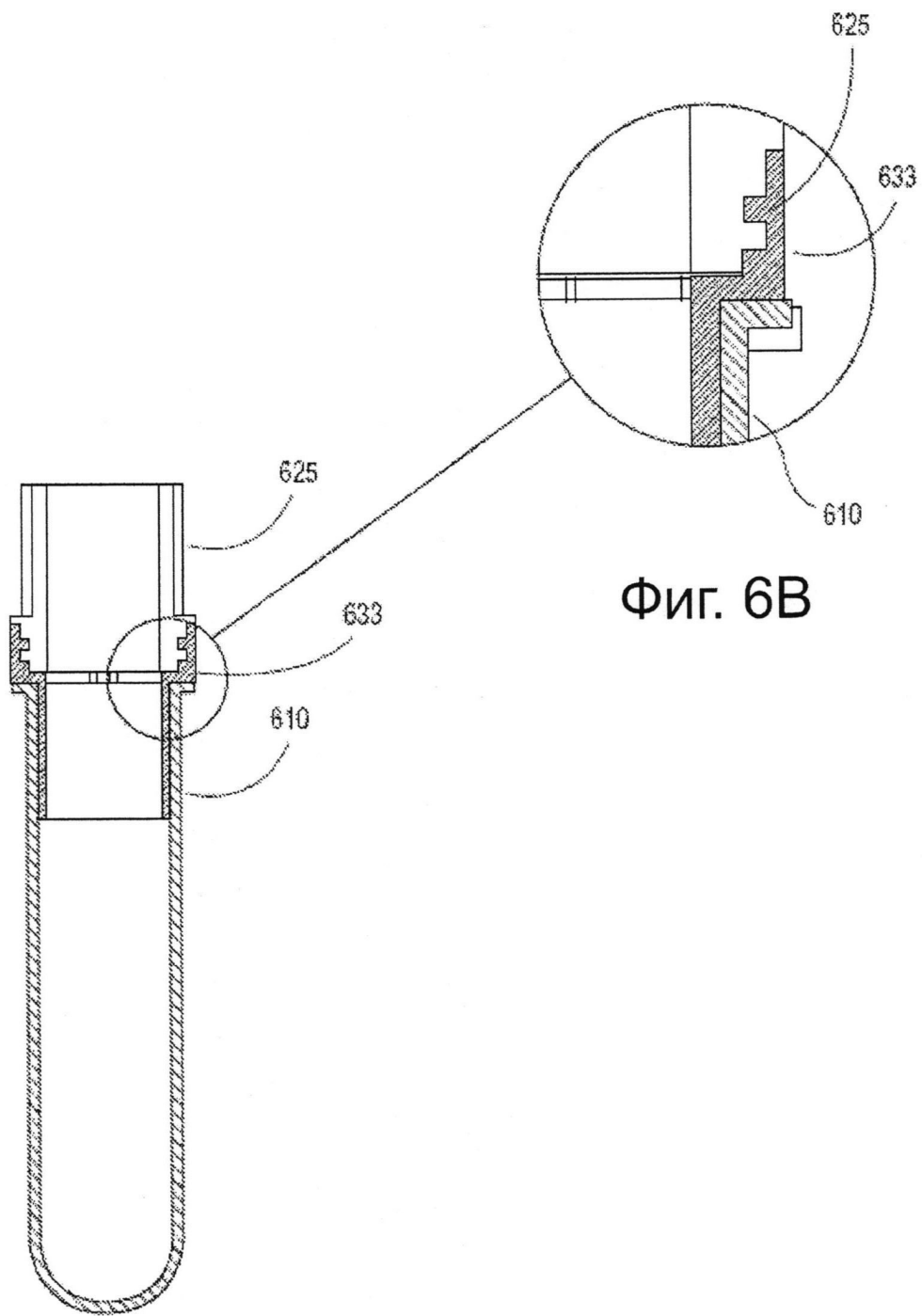




Фиг. 5С

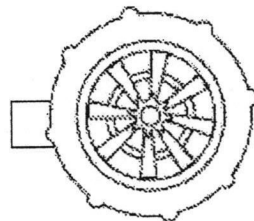


Фиг. 5D



Фиг. 6В

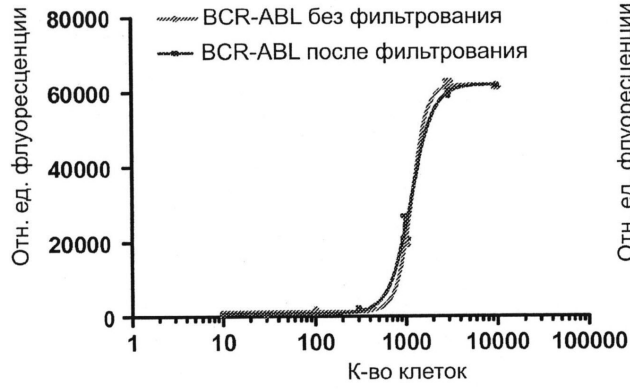
Фиг. 6А



Фиг. 6С

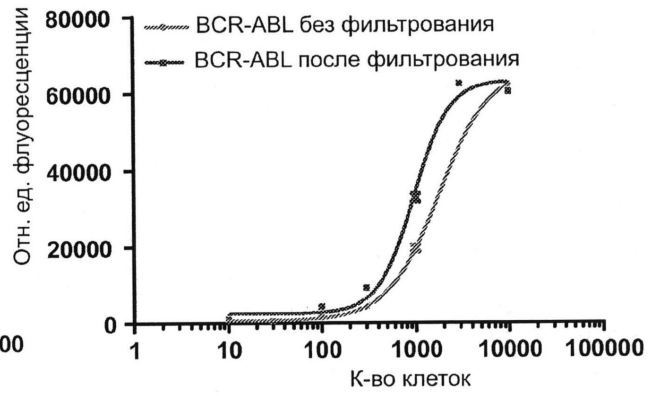
**A**

Общий уровень BCR-ABL



**B**

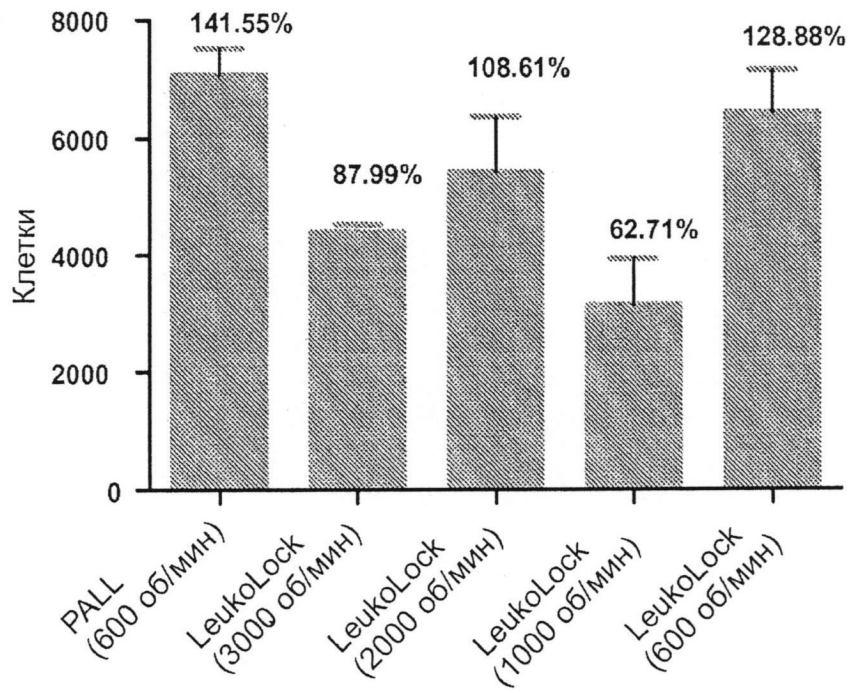
Уровень фосфо-BCR-ABL



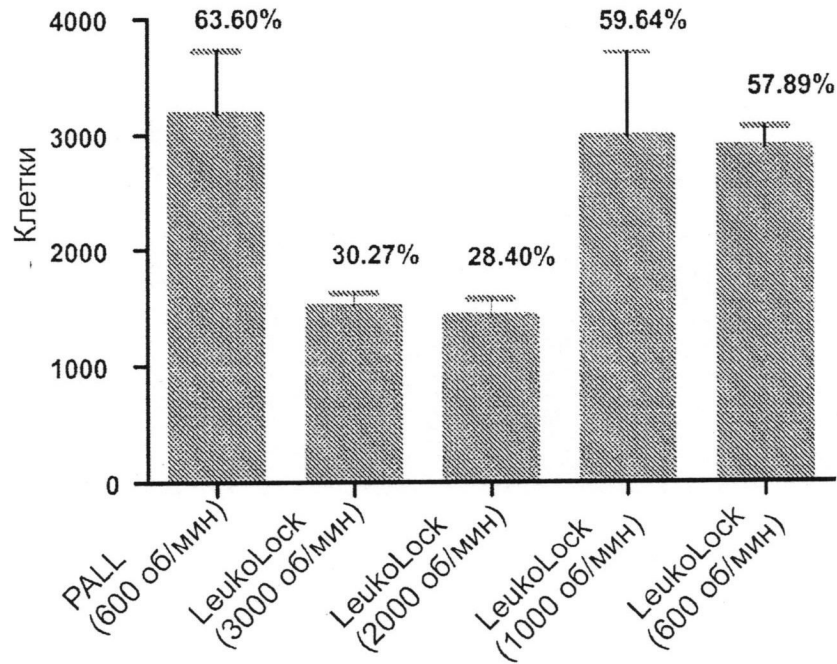
Фиг. 7

**A**

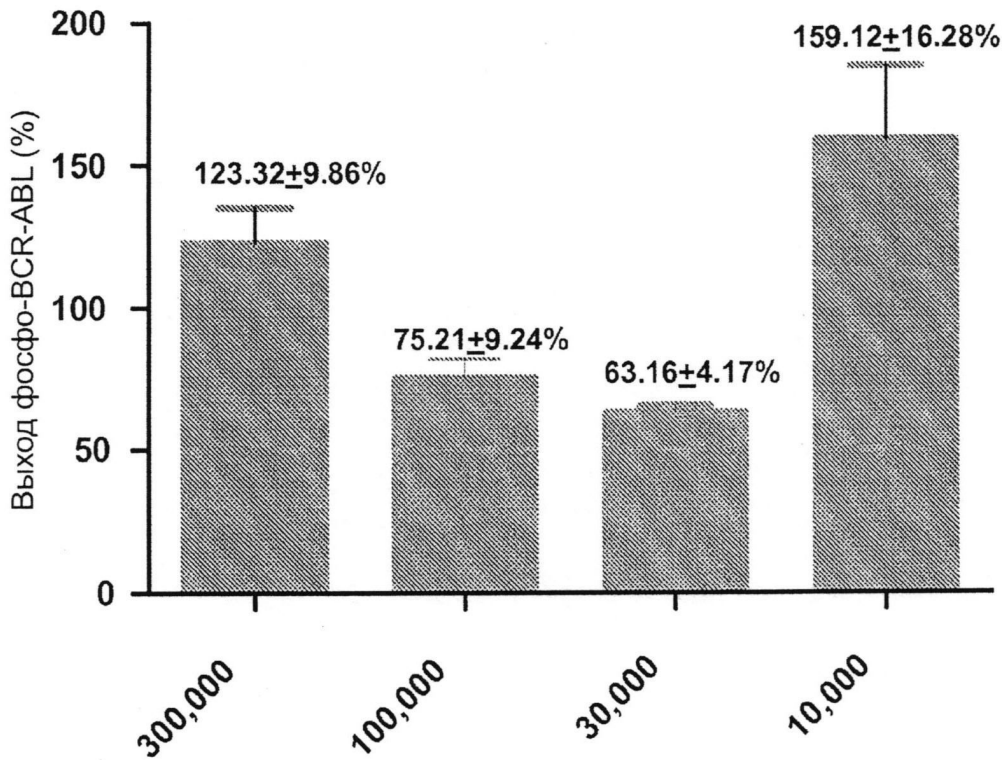
Общий выход BCR-ABL (сигнал в %) после выделения клеток

**B**

Выход фосфо-BCR-ABL (сигнал в %) после выделения клеток

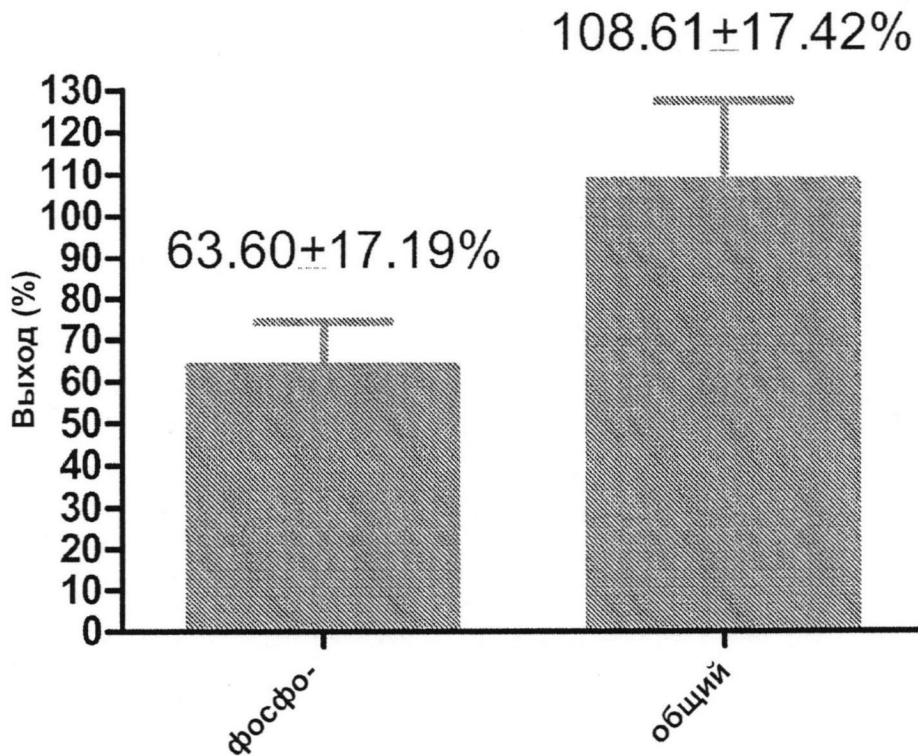


Фиг. 8



К-во добавленных клеток K562 на 1 мл крови

Фиг. 9А



BCR-ABL

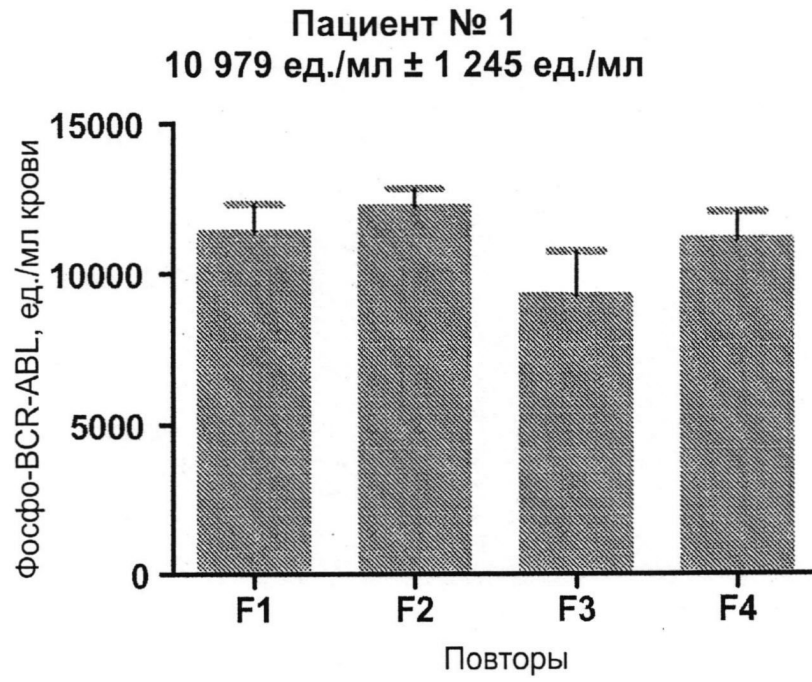
Добавлено 1 000 000 клеток K562 на 1 мл крови от нормального донора

Фиг. 9В

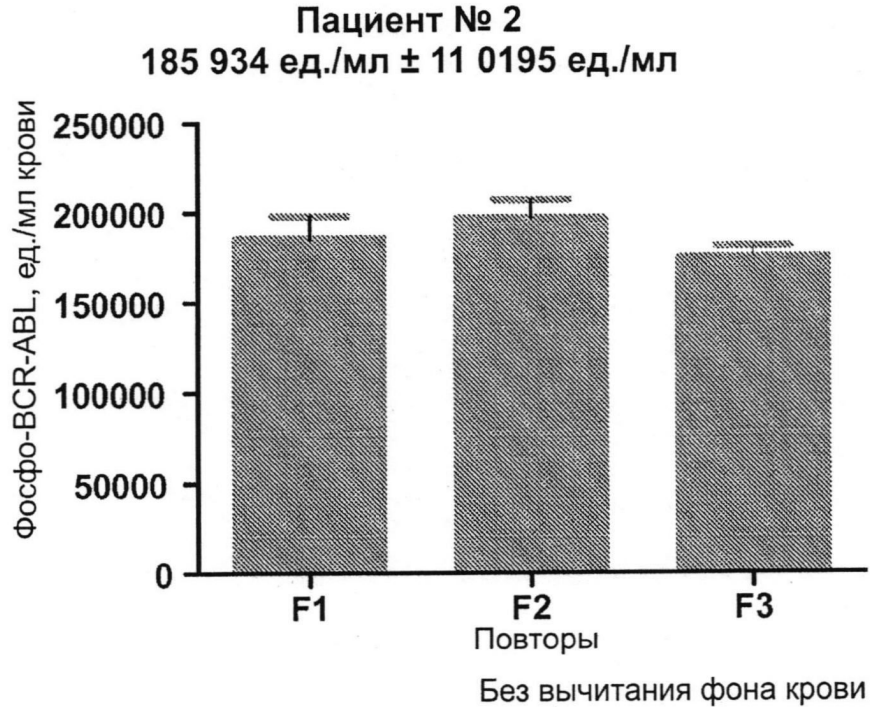
Пациент №	1	2		
Пол	жен	муж	муж	муж
Раса	белая	белая	белая	белая
Курение	курит сигареты	курит сигареты	курит сигареты	ранее курил
Употребление алкоголя	не было	не было	не было	употребляет
Первичный диагноз	CML	CML	CML	CML
Режим лечения	активный	активный	активный	активный
Препарат	иматиниб	иматиниб	дасатиниб	иматиниб
Дата получения образца	1/31	2/2	2/7	2/15
Лейкоциты: общее к-во	5,600,000	15,000,000	4,000,000	----
Лейкоциты: фосфо-BCR-ABL	11,000	156,000	----	----
Отношение сигнала фосфо при иматинибе	0.0019	0.0124	----	----
Предполагая ингибирование на 90%	0.019	0.124	----	----

Фиг. 10

**A**



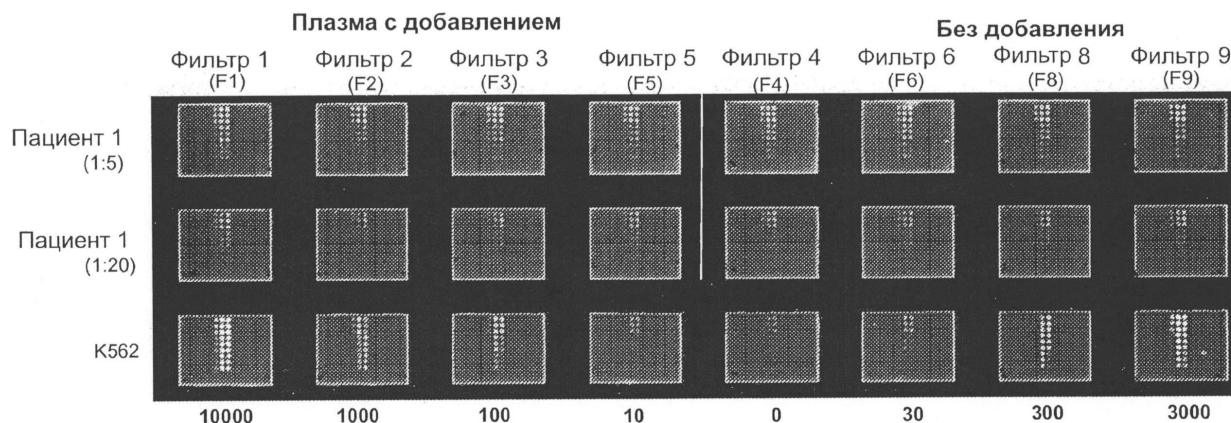
**B**



**Фиг. 11**



Профиль фосфо-BCR-ABL



Образец	Ед.			Среднее	Коэффициент вариации %	Среднее	Коэффициент вариации %	Ед./мл крови
F1 1:5	206.05	204.55	205.53	205.37	0.37	144.92	30.62	9,057
F2 1:5			141.93	141.93	-			
F3 1:5	74.39	105.16	117.36	98.97	22.37			
F5 1:5		120.69	146.11	133.40	13.47			
F4 1:5	164.29	185.51	194.30	181.37	8.51	175.66	11.34	10,979
F6 1:5	190.93	188.77	206.44	195.38	4.93			
F8 1:5	127.32	142.58	174.13	148.01	16.13			
F9 1:5	162.00	179.79	191.83	177.87	8.44			

Фиг. 12А

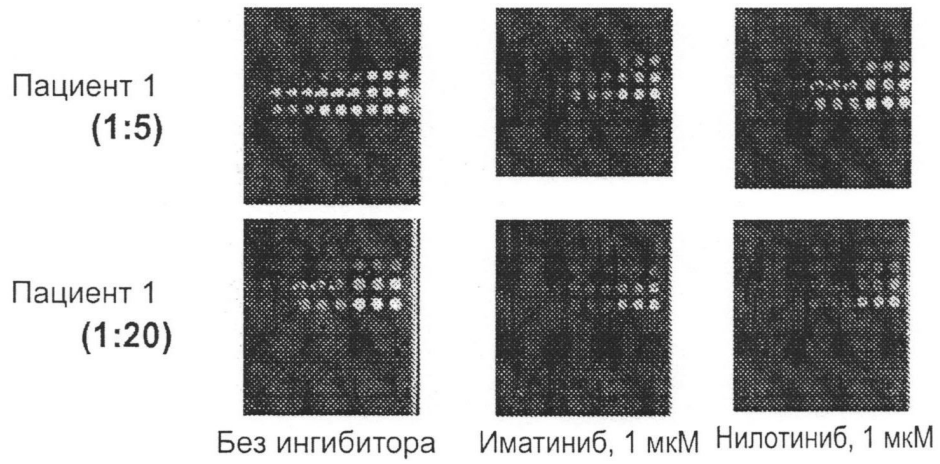
Профиль фосфо-BCR-ABL у пациента № 1

Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение	Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение	Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение
10,000	62316	0.18	77.77	S1 1:20	2258.7	10.9	2.8	S1 1:5	6381.7	0.7	8.0
Стандарт 1000	60249	1.16	75.19	S2 1:20	1146.3	7.9	1.4	S2 1:5	3411.3	15.5	4.3
100	6291.33333	0.81	7.85	S3 1:20	1302.0	10.2	1.6	S3 1:5	3457.3	4.7	4.3
10	1519.33333	6.65	1.90	S5 1:20	1602.3	3.7	2.0	S5 1:5	3622.0	14.1	4.5
0	801.333333	5.79	1.00	S4 1:20	1587.3	4.0	2.0	S4 1:5	5272.7	11.5	6.6
30	2157.66667	12.69	2.69	S6 1:20	1538.7	2.2	1.9	S6 1:5	5877.3	8.3	7.3
300	14526.3333	12.84	18.13	S8 1:20	1509.3	7.1	1.9	S8 1:5	4245.3	14.7	5.3
3000	62260.6667	0.07	77.70	S9 1:20	1885.0	3.4	2.4	S9 1:5	5130.3	11.2	6.4

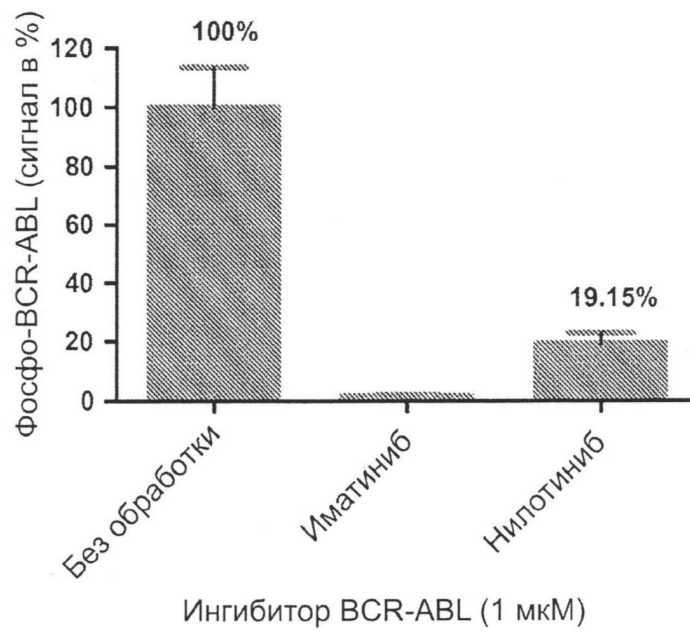
Фиг. 12В

**A**

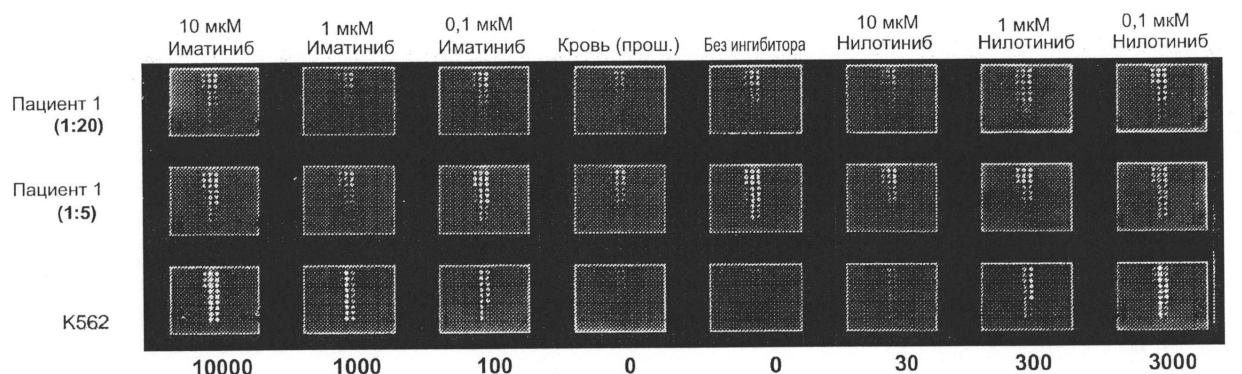
Профиль фосфо-BCR-ABL



**B**



**Фиг. 13**



Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение
10000	60239	0	86.9
1000	61109	2	88.2
100	8155	2	11.8
10	1159	7	1.7
0	693	21	1.0
30	1848	9	2.7
300	29893	2	43.1
3000	60534	0	87.4

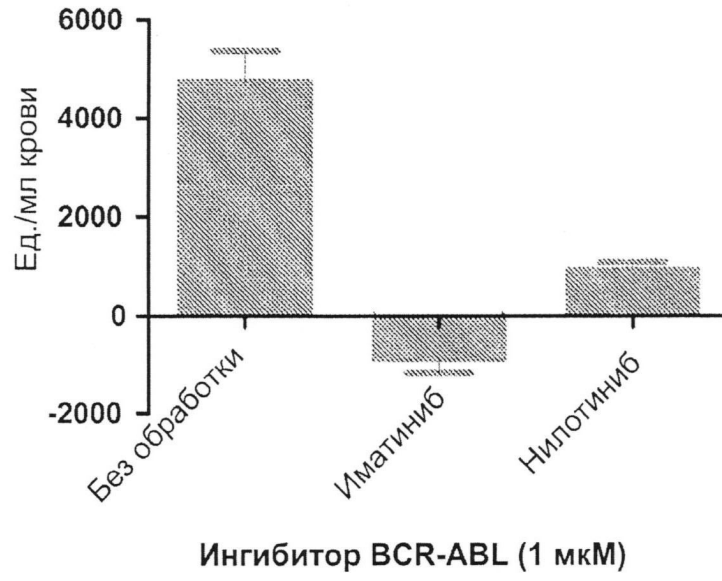
Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение
Иматиниб, 10 мкМ	5202	8	1.8
Иматиниб, 1 мкМ	2184	10	0.8
Иматиниб, 0,1 мкМ	7578	12	2.6
Кровь	2873	24	1.0
Фильтр 4 PS#1	8802	13	1.0
Иматиниб, 10 мкМ	2881	18	0.3
Иматиниб, 1 мкМ	3530	5	0.4
Иматиниб, 0,1 мкМ	31335	8	3.6

Образец	Среднее	Коэффициент вариации %	Отношение
Иматиниб, 10 мкМ	4010	14	2
Иматиниб, 1 мкМ	1985	21	1
Иматиниб, 0,1 мкМ	2942	11	2
Кровь	1809	16	1
Фильтр 4 PS#1	2715	17	2
Иматиниб, 10 мкМ	1504	21	1
Иматиниб, 1 мкМ	1949	4	1
Иматиниб, 0,1 мкМ	4179	8	2

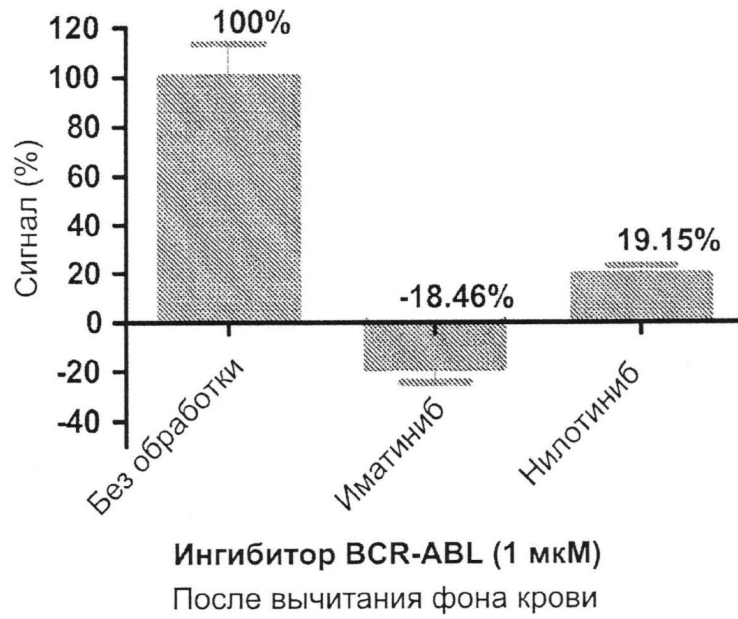
Образец	Ед.	Среднее	Коэффициент вариации %
Иматиниб, 10 мкМ	79	86	88
Иматиниб, 1 мкМ	15	29	35
Иматиниб, 0,1 мкМ	105	106	120
Кровь (прош.)	37	38	63
Без ингибитора	120	113	133
Нилотиниб, 10 мкМ	42	39	60
Нилотиниб, 1 мкМ	60	63	58
Нилотиниб, 0,1 мкМ	329	305	283

Фиг. 14

**A**

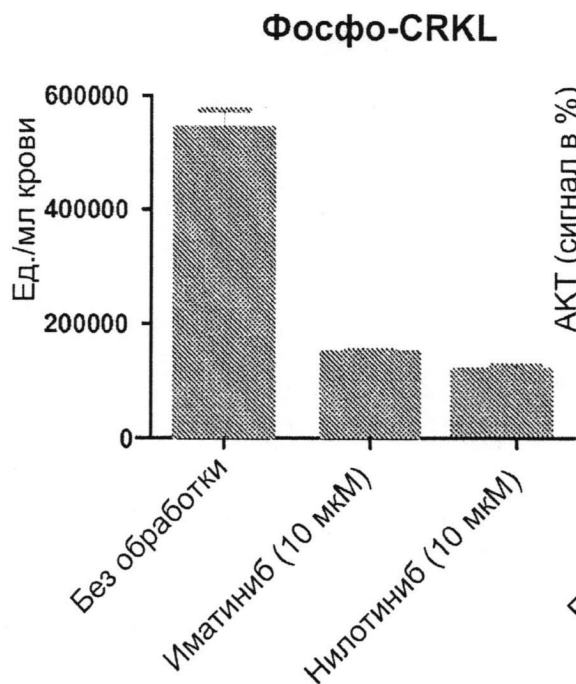


**B**

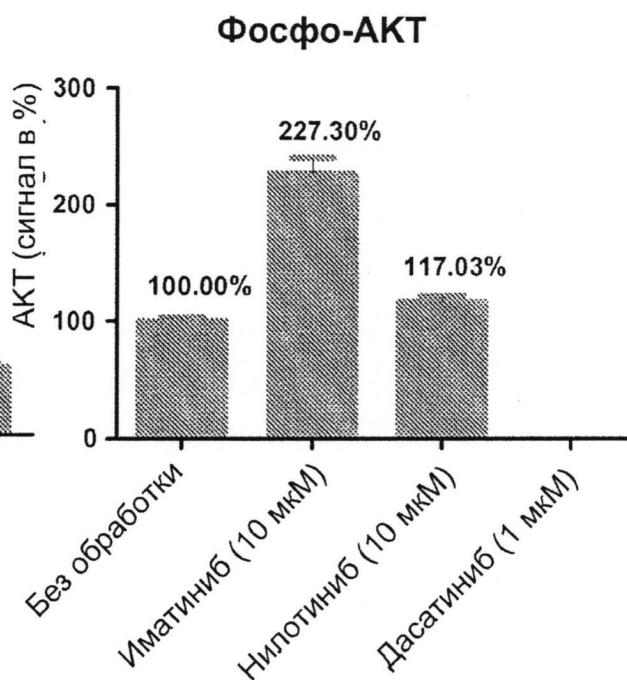


**Фиг. 15**

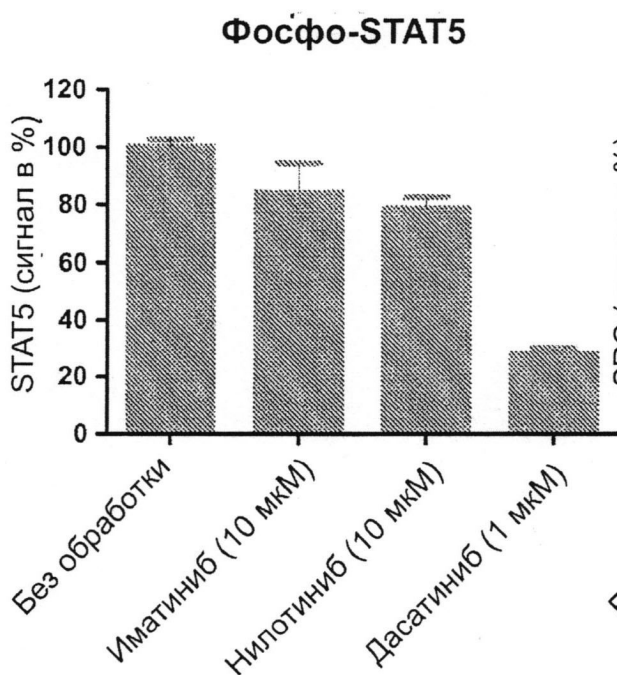
**A**



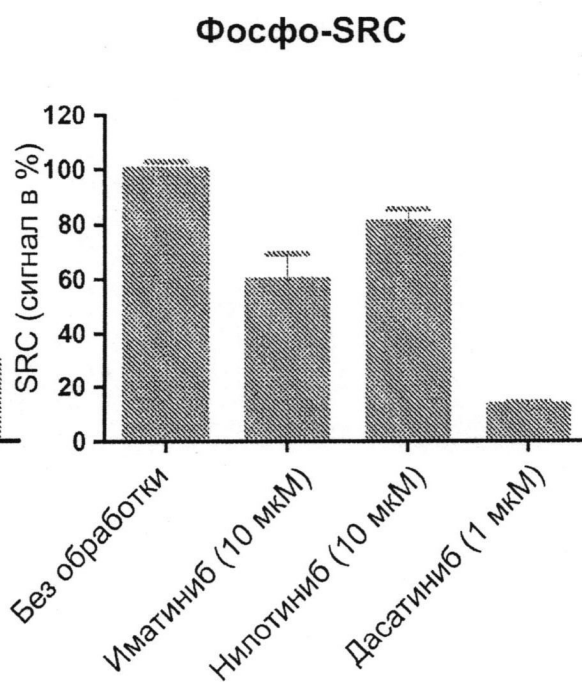
**B**



**C**



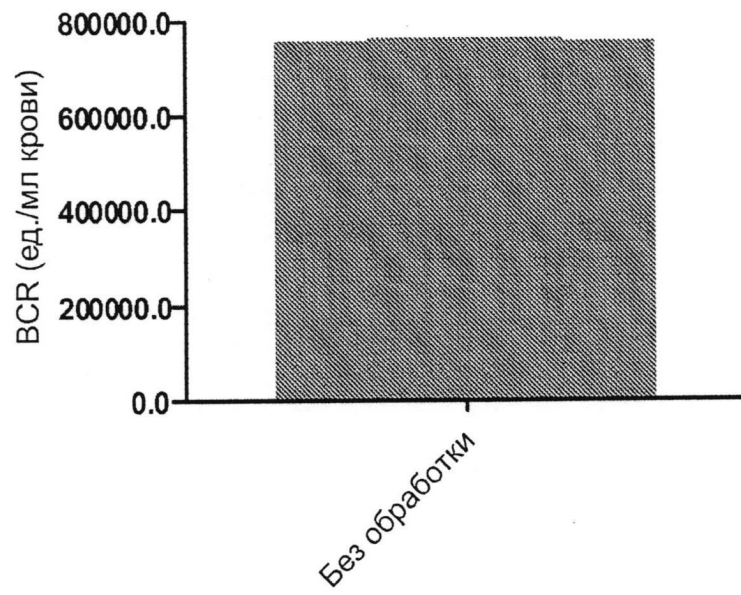
**D**



**Фиг. 16**

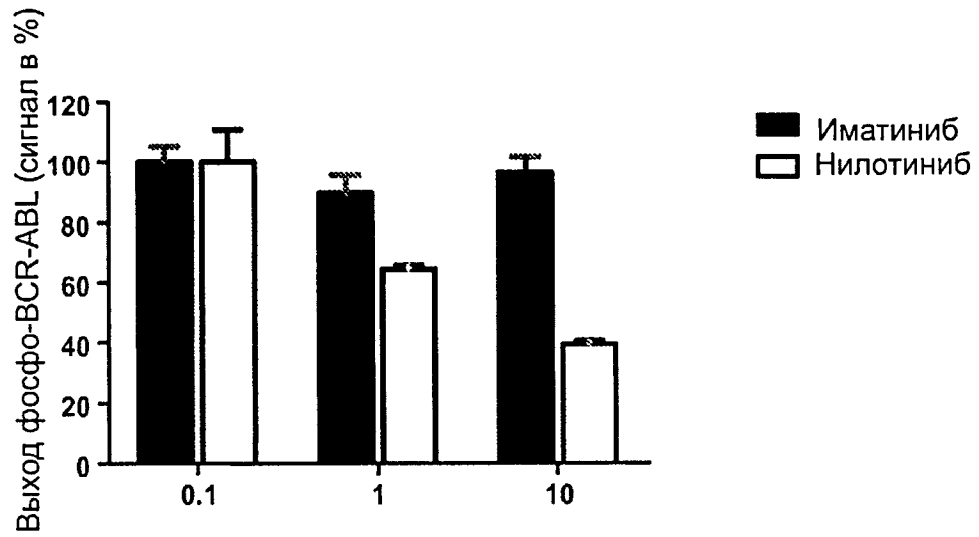
## Общий BCR

Пациент

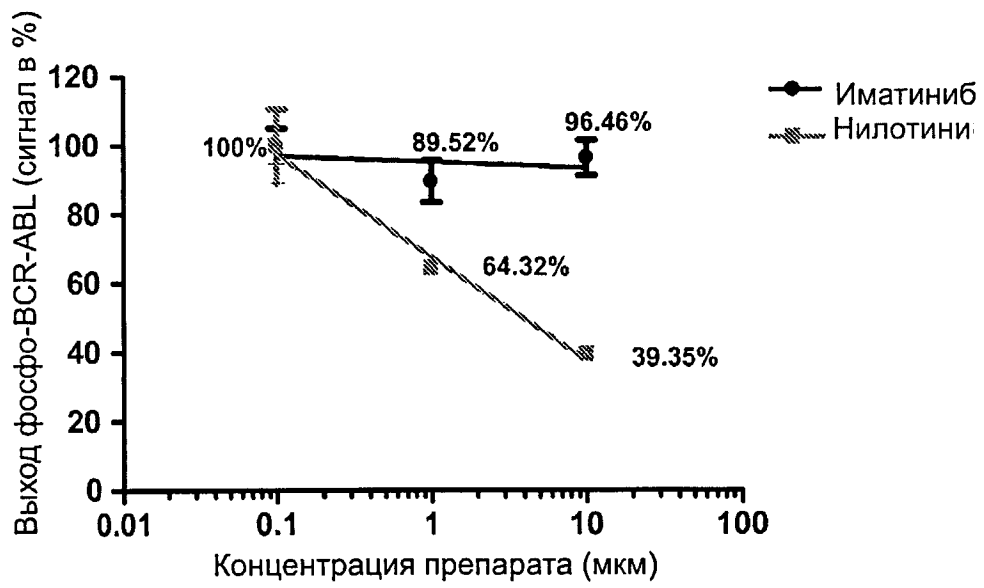


ФИГ. 17

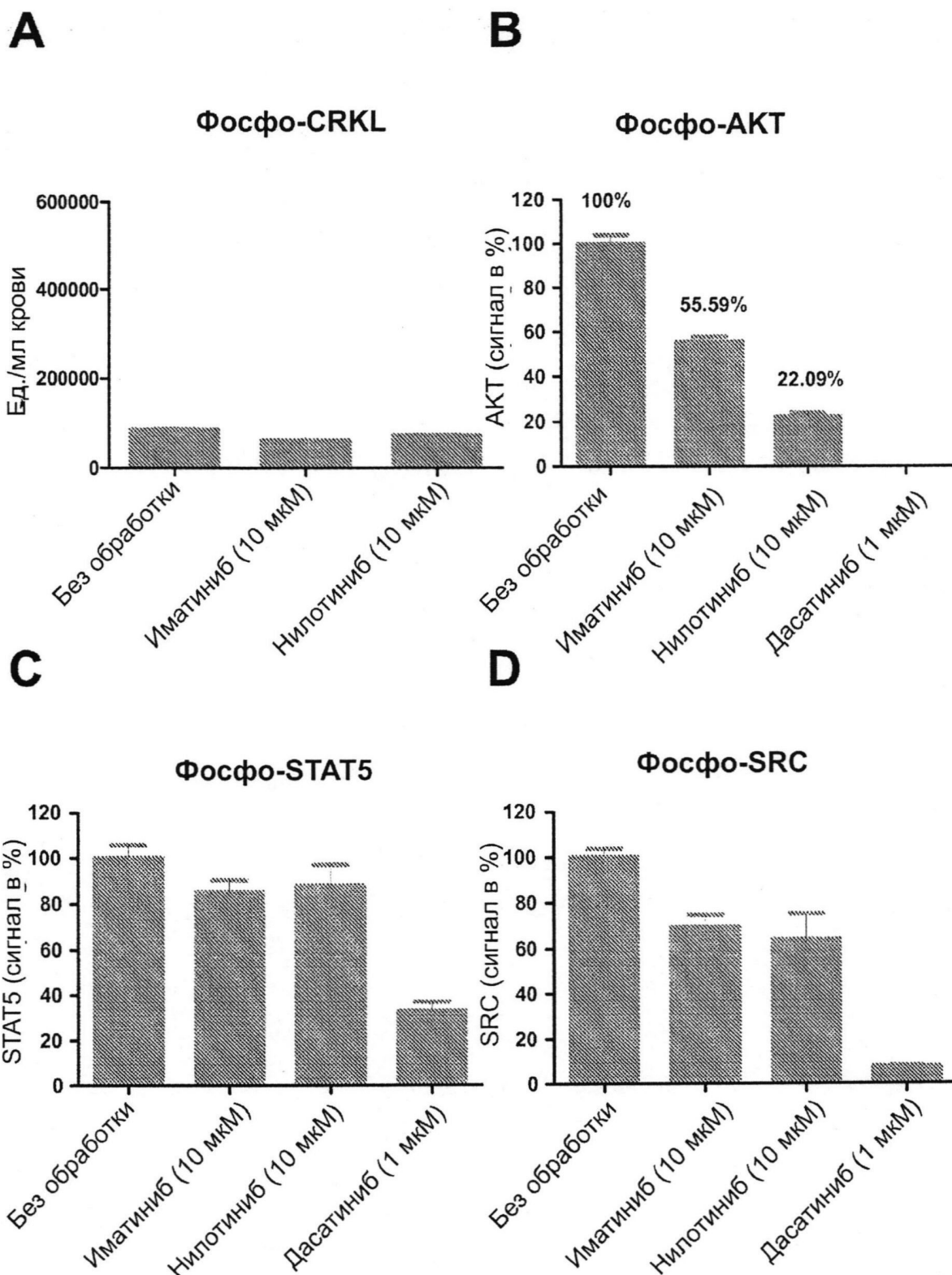
**A**



**B**



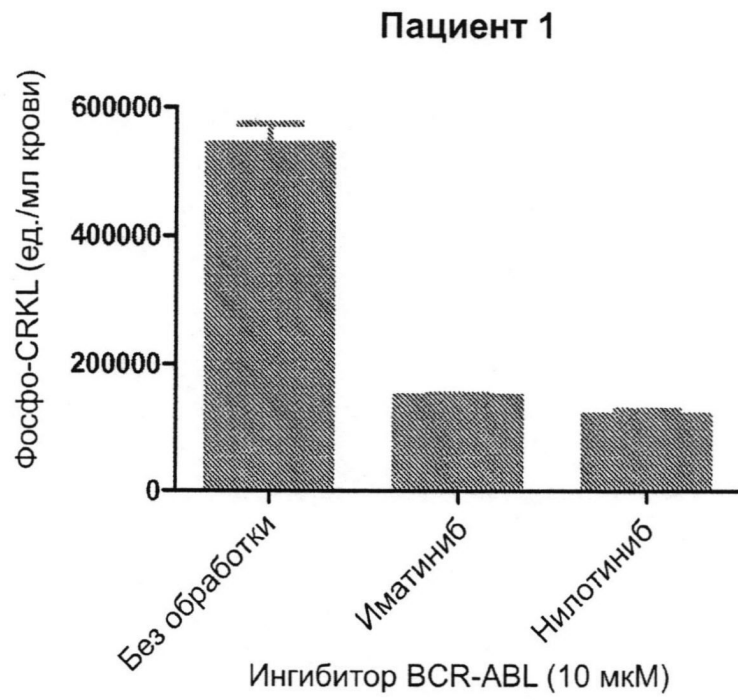
**Фиг. 18**



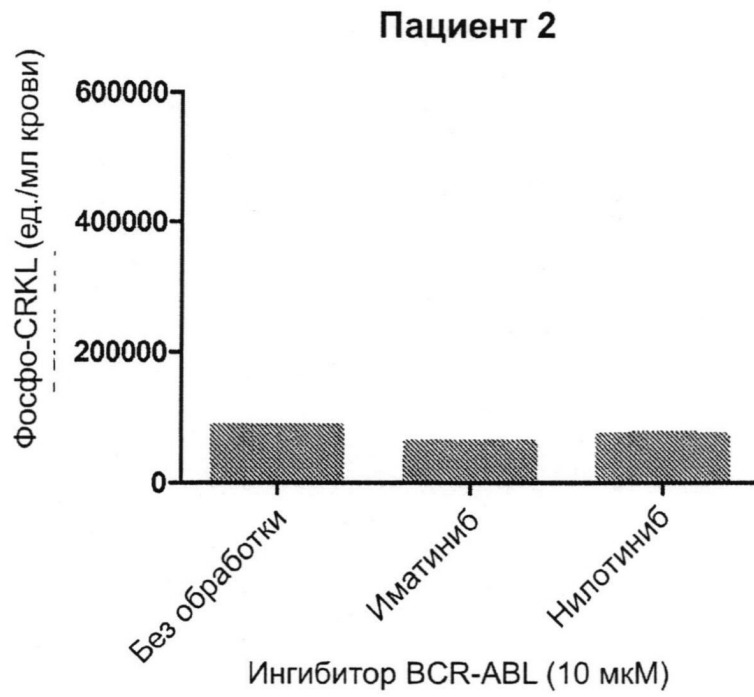
ФИГ. 19



**A**

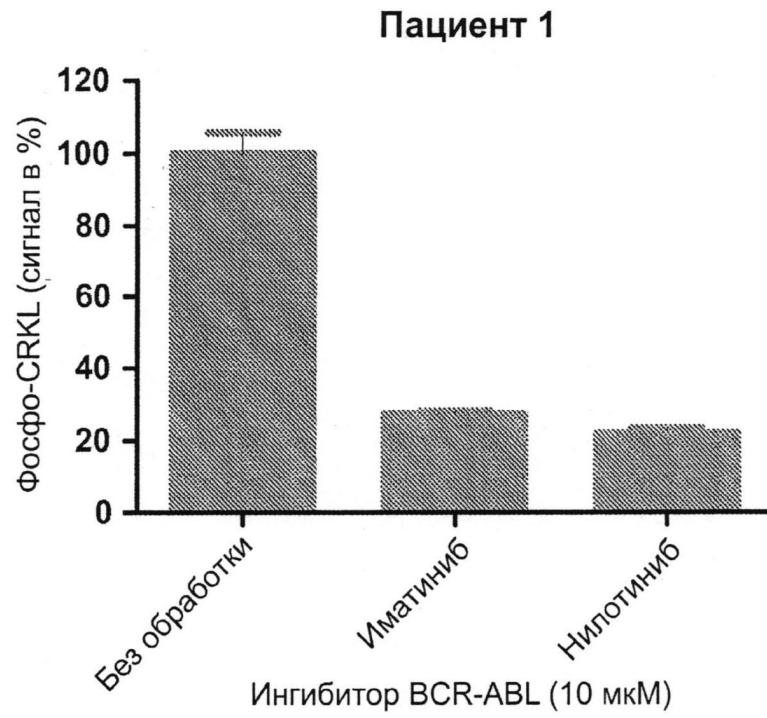


**B**

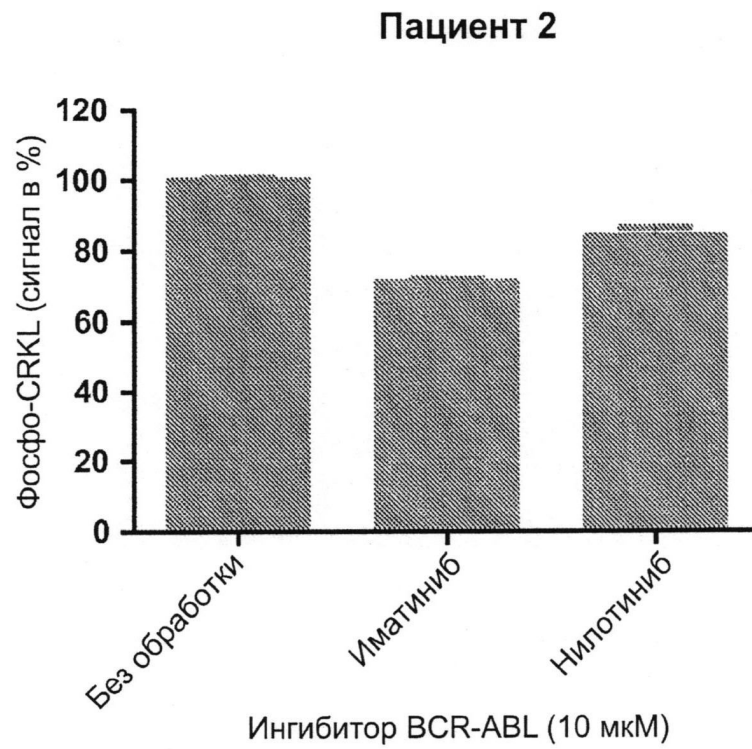


**Фиг. 20**

**C**

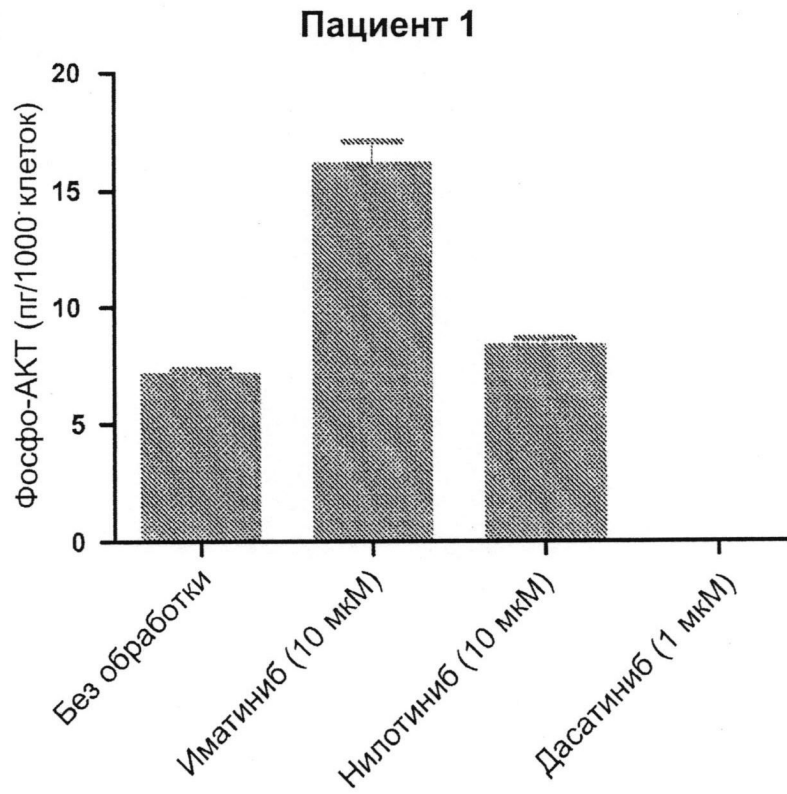


**D**

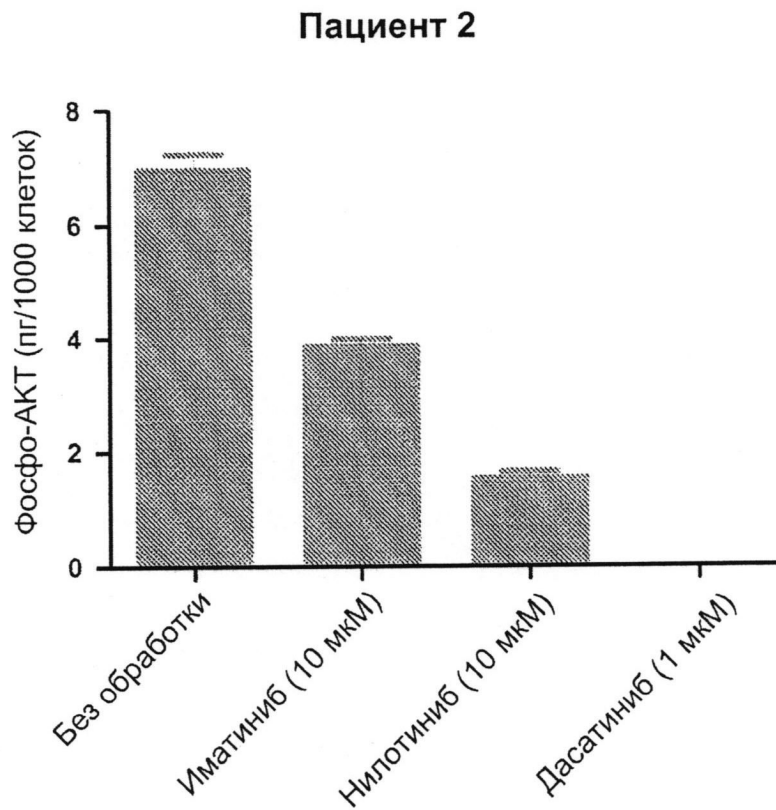


**Фиг. 20** (продолжение)

**A**

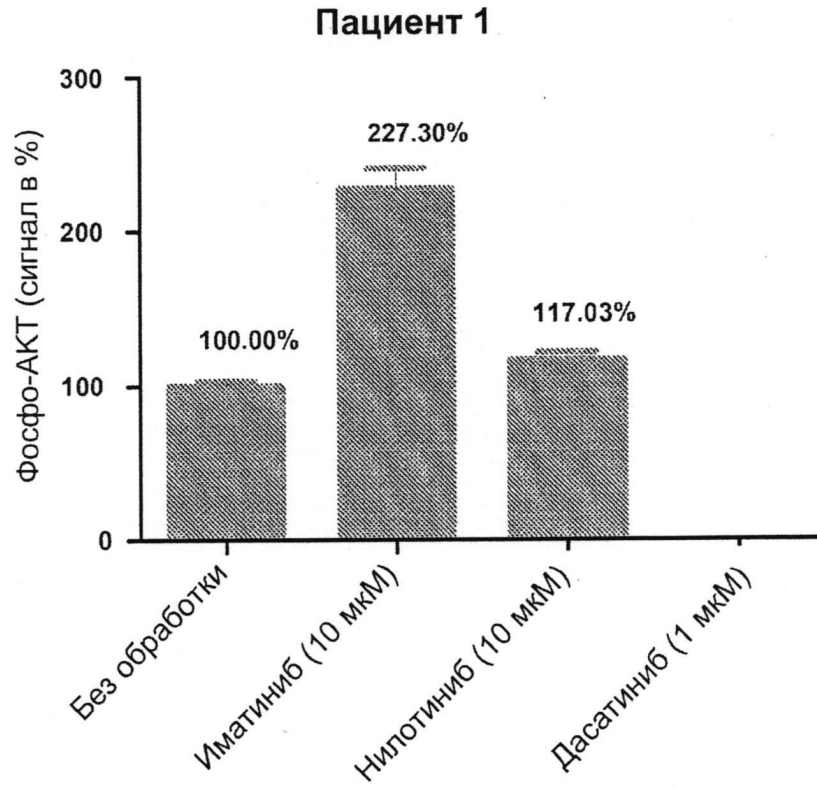


**B**

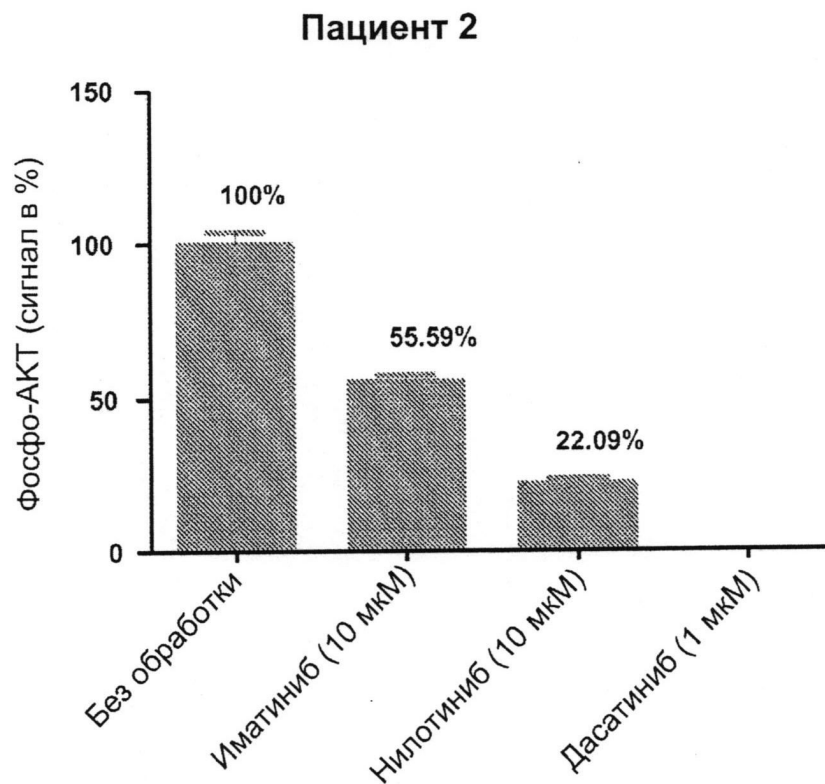


**Фиг. 21**

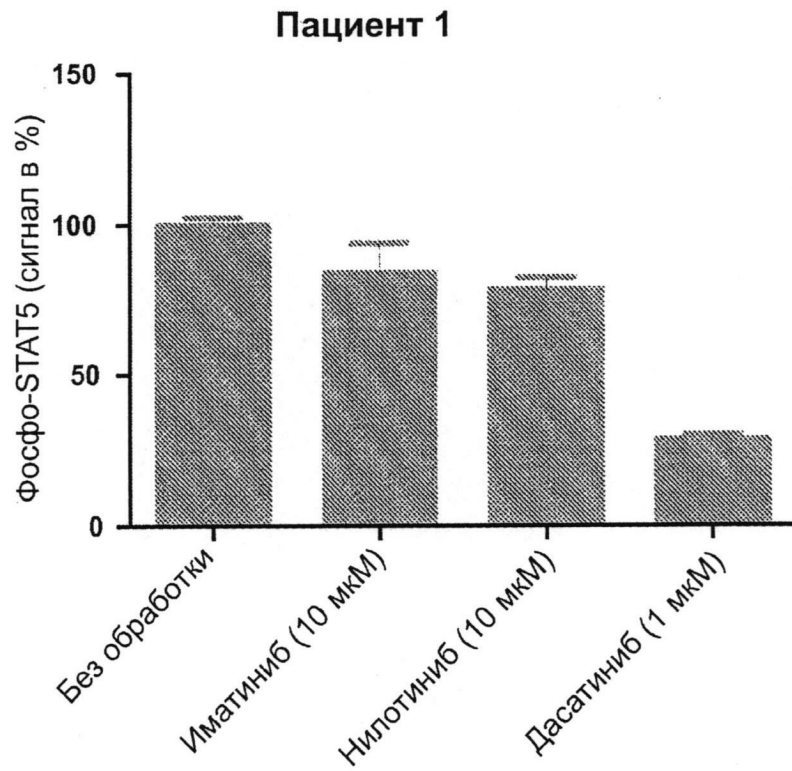
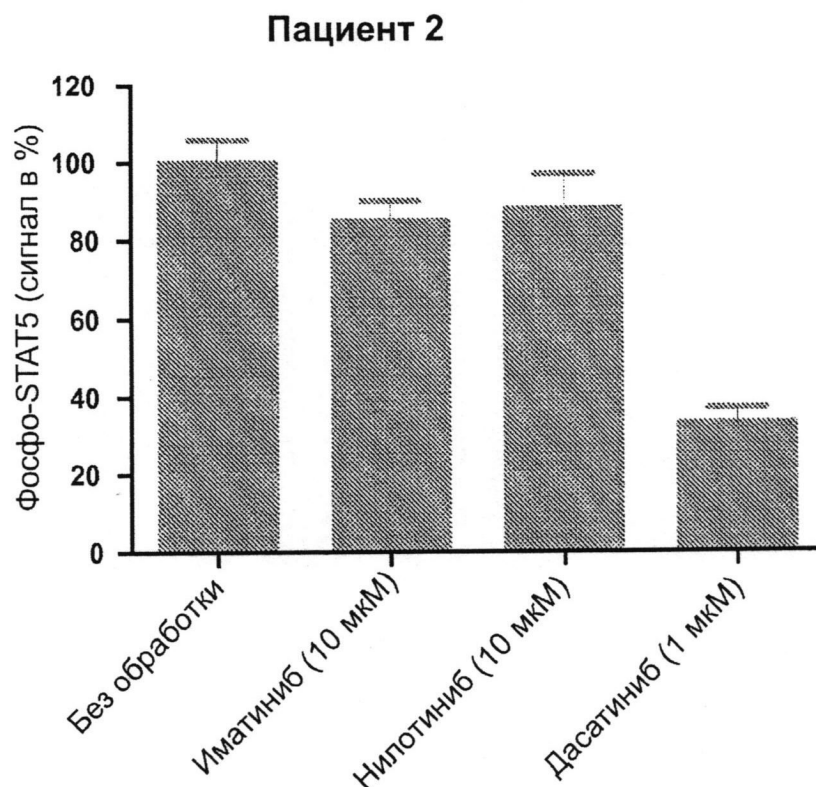
**C**



**D**

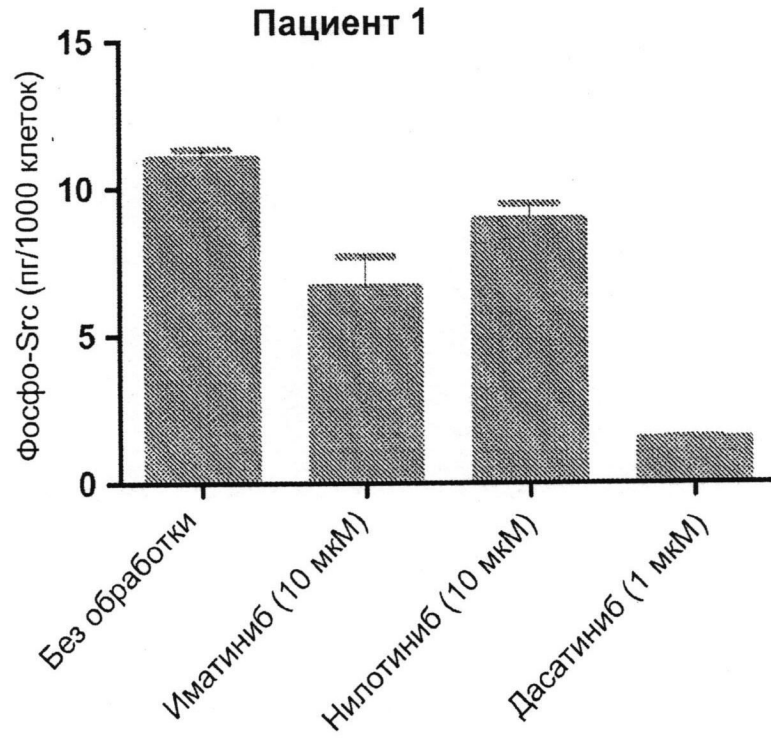


**Фиг. 21** (продолжение)

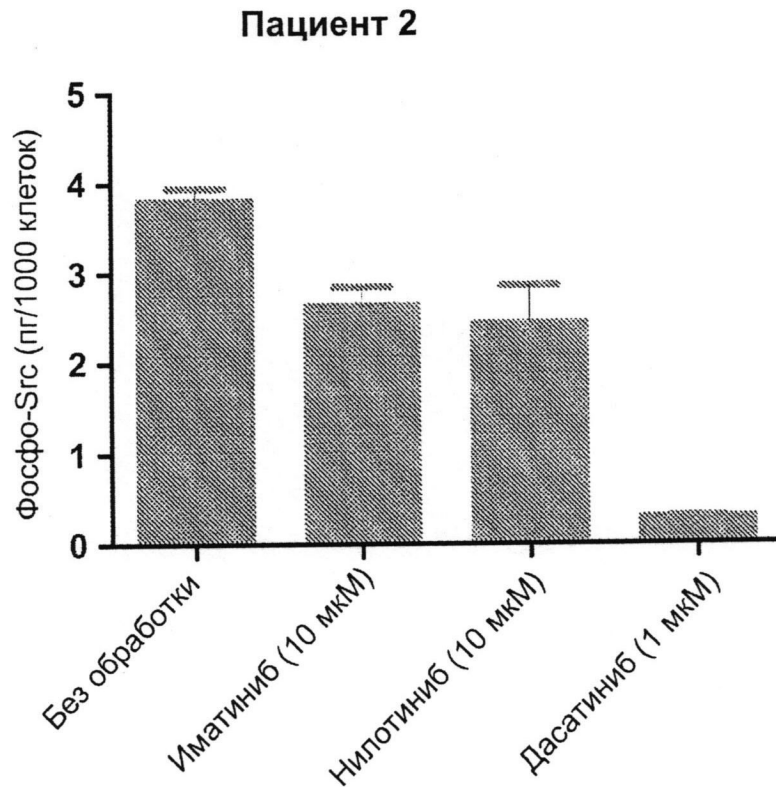
**A****B**

Фиг. 22

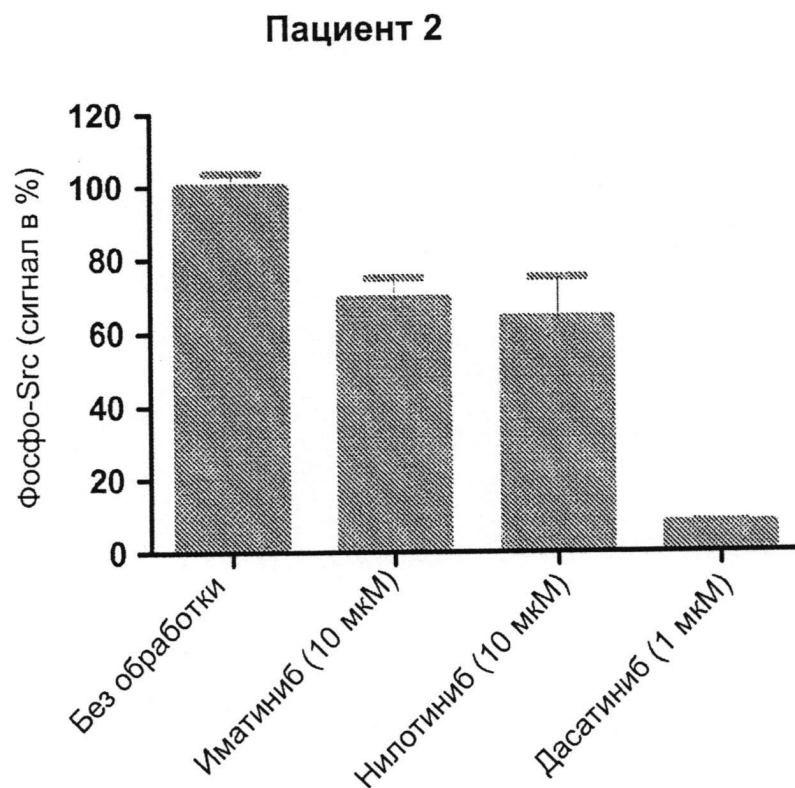
**A**



**B**



**Фиг. 23**

**C****D****ФИГ. 23** (продолжение)

Пациент	Взятие крови	Лечение	Примечания
1	3	Gleevec	
2	6	Gleevec	недавний диагноз
3	7	Sprycel	
4	4	Gleevec	
5	5	Gleevec	
6	12	Gleevec	
7	6	Gleevec	
8	5	возможно прогрессирование	переход на Sprycel
9	1	Gleevec	
10	3	Gleevec	
11	3	Gleevec	
12	3	Gleevec	
13	1	Gleevec	
14	9	Sprycel	новый диагноз
15	1	Gleevec	
16	1	после лечения	
17	4	Sprycel	
18	5	Posatinib	
19	3	Tasigna	новый диагноз
20	6	Sprycel	новый диагноз
21	2	гидроксимочевина	
22	1	Gleevec	
23	2	Gleevec	недавний диагноз
24	1	Gleevec	недавний диагноз
25	3	Tasigna	недавний диагноз
26	1	Gleevec	недавний диагноз
27	1	Gleevec	

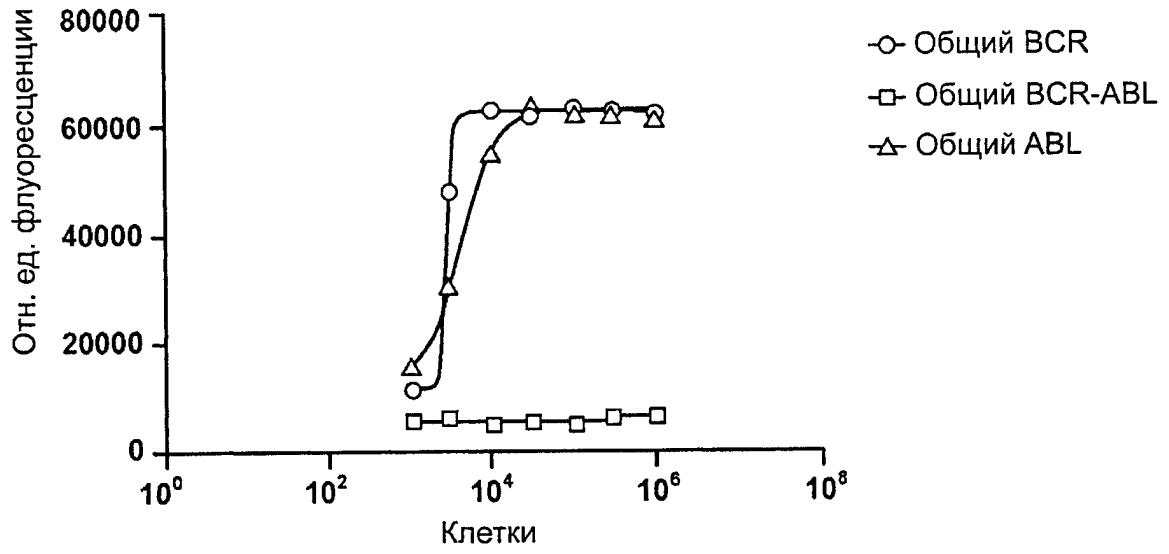
Фиг. 24



Пациент	Образец	Взятие крови	К-во клеток	Отношение мРНК	pVcr-Abl	Фосфо/лейк. (%)	Общ. Vcr-Abl	Общ./лейк. (%)	Фосфо/общ.	Примечания
2	2	2/2	1 49E+07	47.53%	128,592	0 866	не определяли			Gleevec
	5	3/2	6 00E+06	17.92%	49,101	0 820	42,062	0.701	1 17	
	16	5/11	3.45E+06	0.00%	1,517	0 044	15,177	0.440	0 09	
	20	6/1	5 55E+06	5.46%	3,340	0 060	10,217	0.180	0 33	
	60 *	10/12	6.75E+06	4.84%	17,084	0 253	16,316	0.242	1 05	
	89 *	12/21	5 50E+06	2 21%	13,666	0 248	11,508	0 209	1 19	
3	3	2/7	4 00E+06	0 00%	6,057	0 151	2,547	0.063	2 38	Sprycel
	9	4/4	8 50E+06	0 00%	7,823	0 092	1,836	0.022	4 26	
	35 *	7/25	7.65E+06	0 00%	2,657	0 035	2,777	0 036	0 96	
	45 *	8/22	4.90E+06	0 01%	8,615	0 176	9,370	0.191	0 92	
4	4	2/15	6 30E+06	1 72%	6,142	0 097	2,454	0 039	2 50	Gleevec
	7	3/22	4 40E+06	0 57%	2,008	0 046	3,132	0 071	0 64	
	27	6/28	3.55E+06	0.19%	7,011	0 197	5,770	0.1625	1 22	
	55 *	9/27	3 00E+06	0.13%	9,065	0 302	2,554	0 085	3 55	
8	18	5/18	6 90E+06	4.53%	5,353	0 077	45,644	0 662	0.12	возможно прогрессирование
	25	6/20	7 10E+06	1 32%	4,360	0 061	33,809	0 476	0 13	
	31 *	7/18	3.40E+06	0.35%	2,263	0 067	14,369	0 423	0.16	
	44 *	8/18	5 50E+06	0 04%	2,421	0 044	2,996	0.054	0 81	
	61 *	10/13	7.50E+06	0 01%	1,887	0 025	4,825	0 640	0 39	
14	28	6/28	1.36E+07	51.18%	83,761	0 616	115,074	0 846	0 73	гидроксимочевина
	48 *	8/29	5 25E+06	1.17%	8,257	0 157	32,735	0 624	0 25	
	57 *	10/3	6 75E+06	0 08%	5,616	0 083	3,585	0.053	1 56	
18	38 *	7/28	1 53E+07	36 19%	123,992	0 810	447,903	2 930	0 28	Tasigna
	41 *	8/11	1.65E+07	51.30%	104,505	0 630	286,432	1.740	0 36	
	50 *	9/7	2 60E+07	52.35%	95,679	0 370	705,569	2.710	0.14	Ponatinib
	71 *	11/9	5 25E+06	1 03%	12,157	0 232	24,805	0 472	0 49	

Фиг. 25

Из лейкоцитов нормального, здорового субъекта

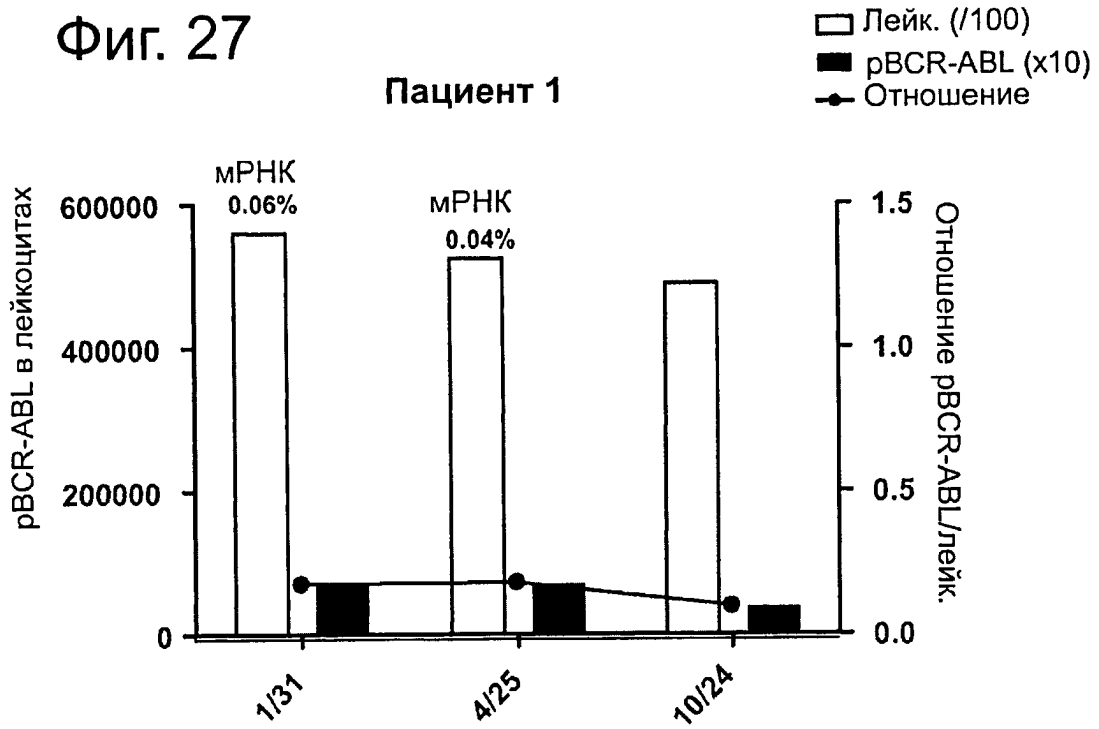


	BCR	BCR-ABL	ABL
EC50	~ 2744	~275875	4076

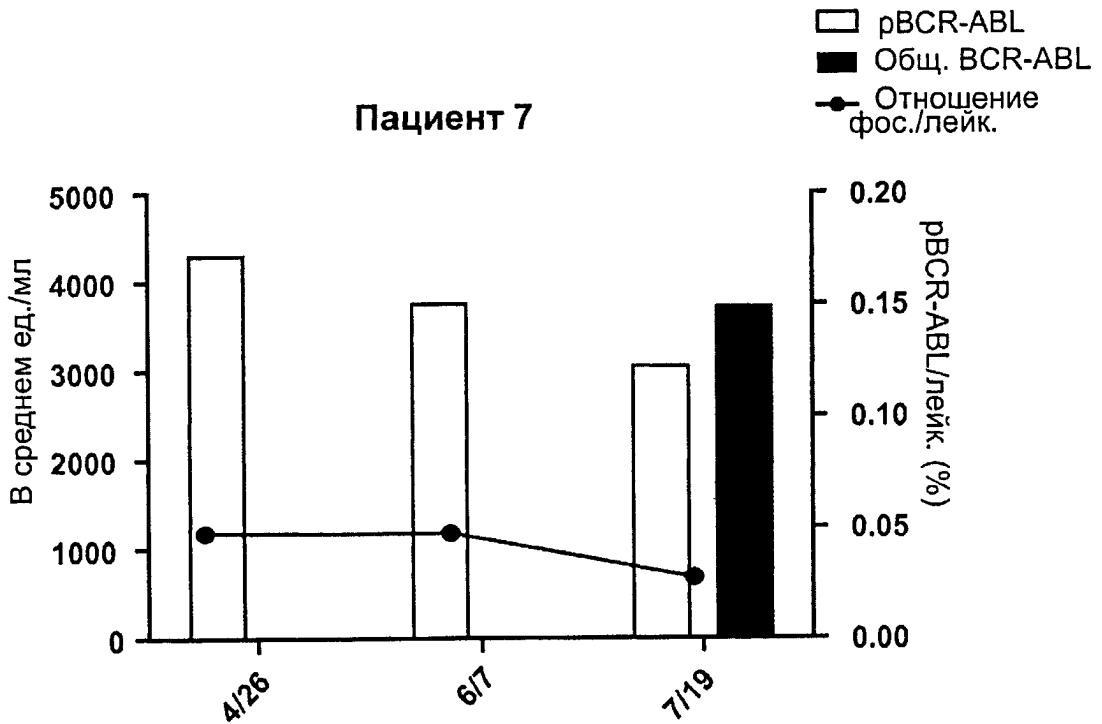
Фиг. 26

**A**

Фиг. 27

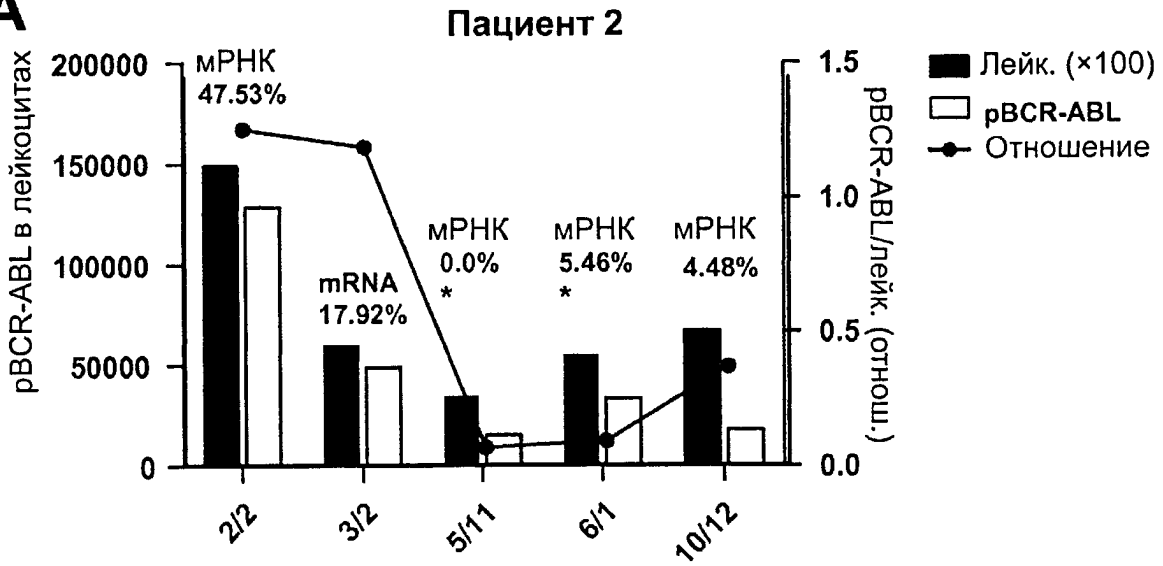


**B**

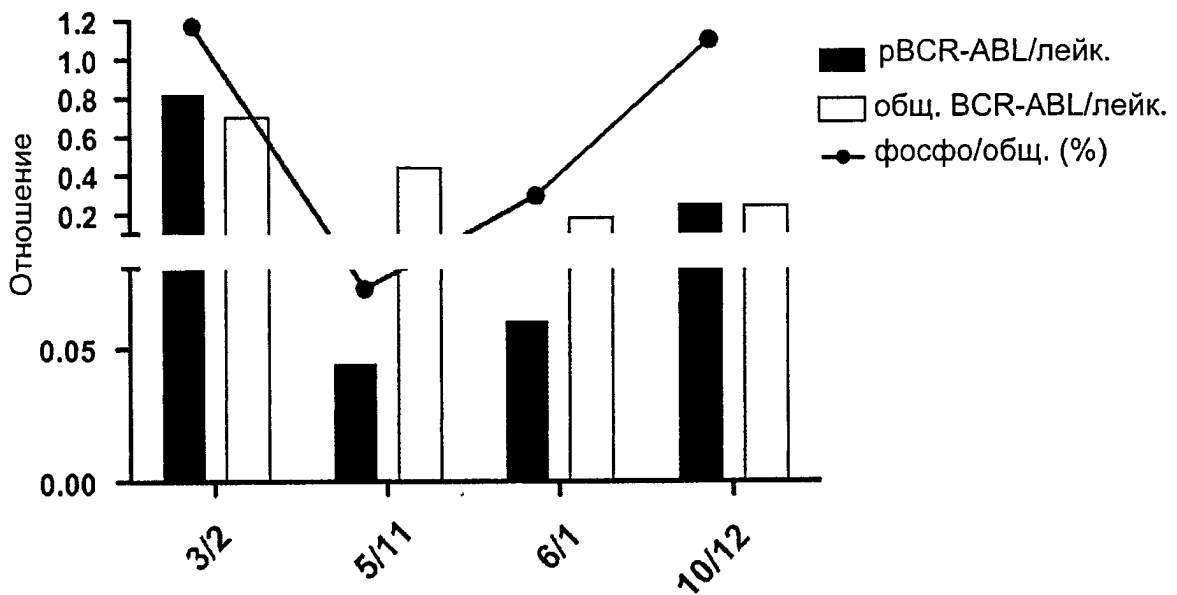


Фиг. 27

**A**



**B**



**C**

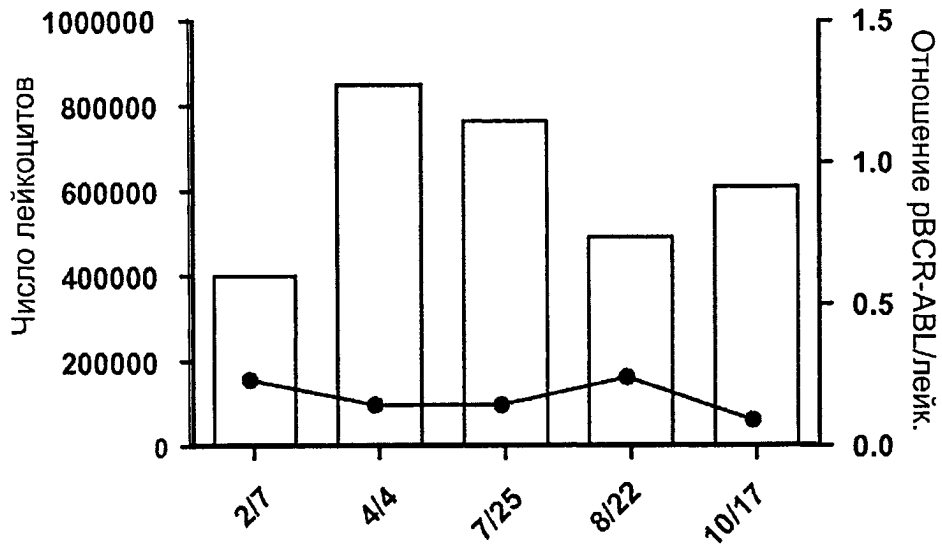


**Фиг. 28**

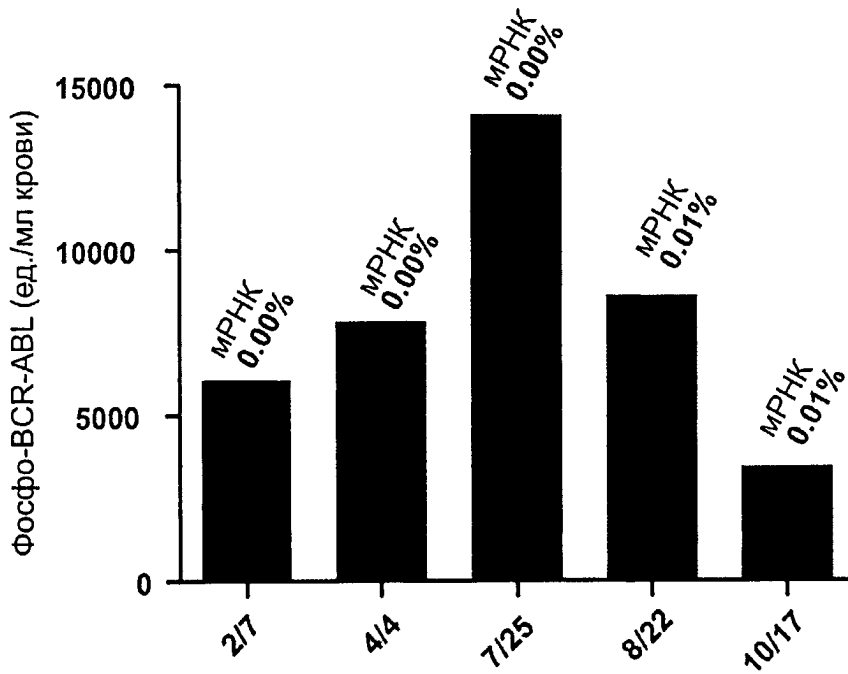
**А** Фиг. 29

Пациент 3

□ Лейк. (/10)  
● Отношение

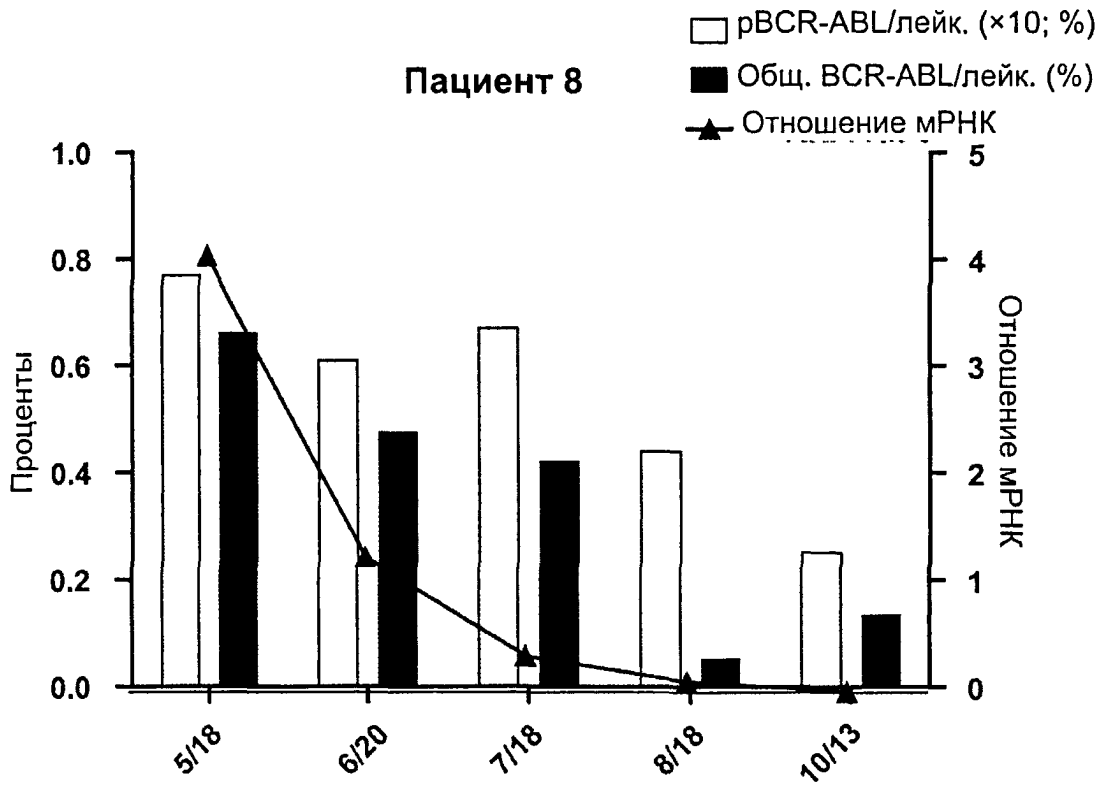


**В**

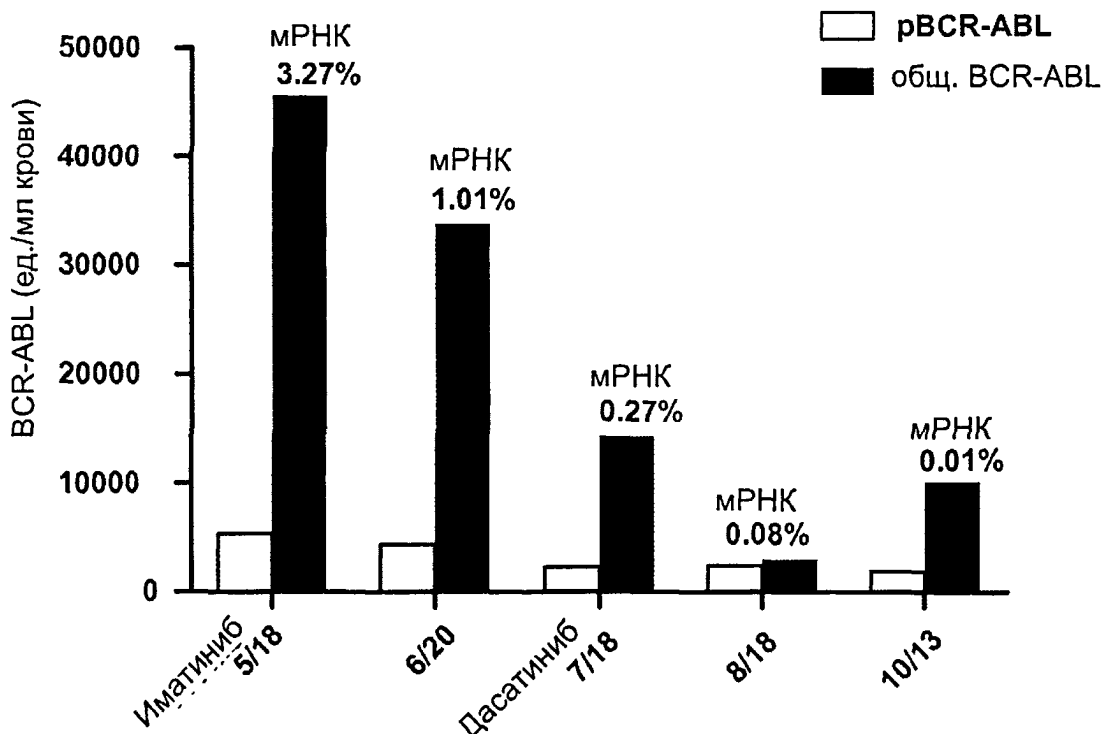


Фиг. 29

**A**

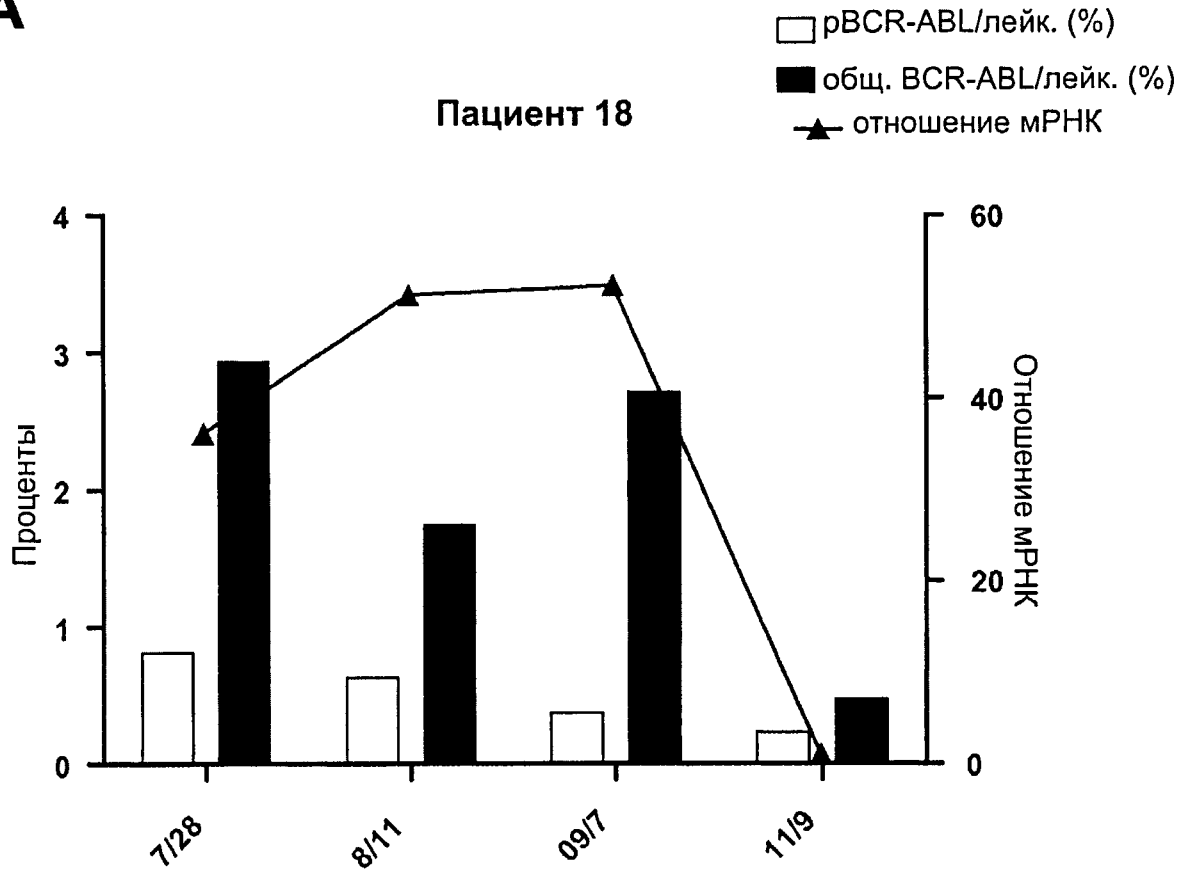


**B**

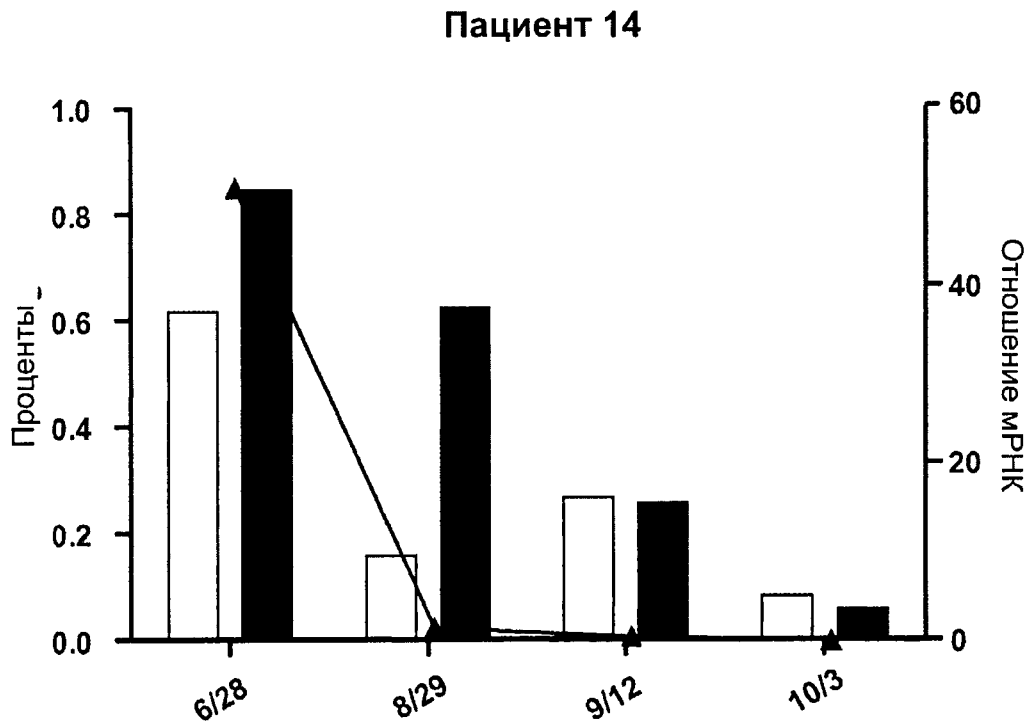


**Фиг. 30**

**A**



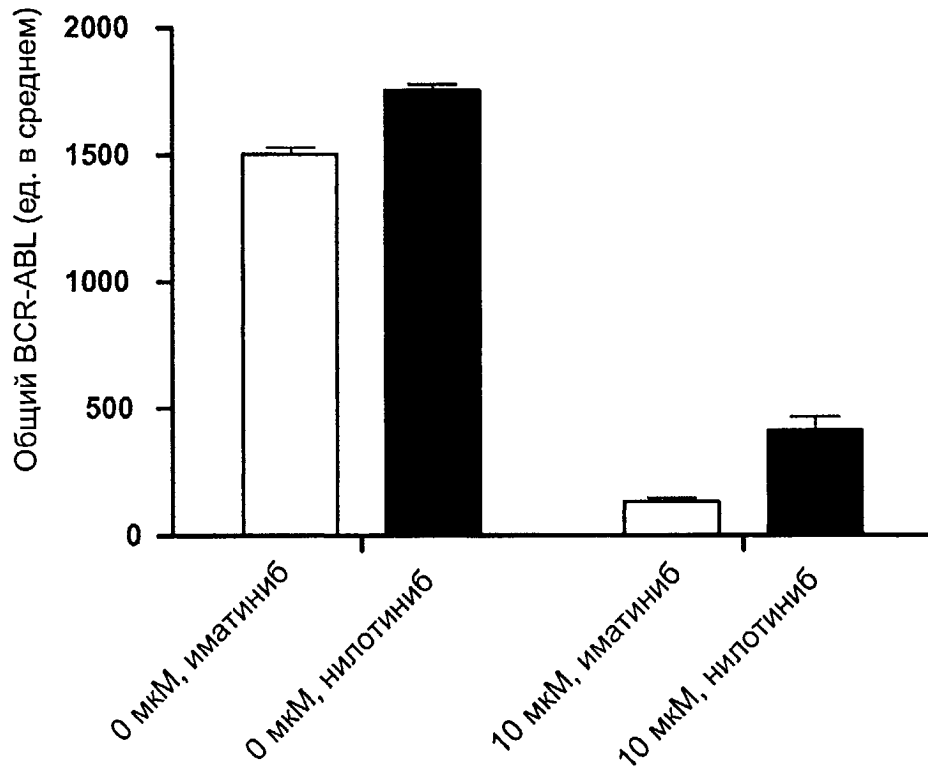
**B**



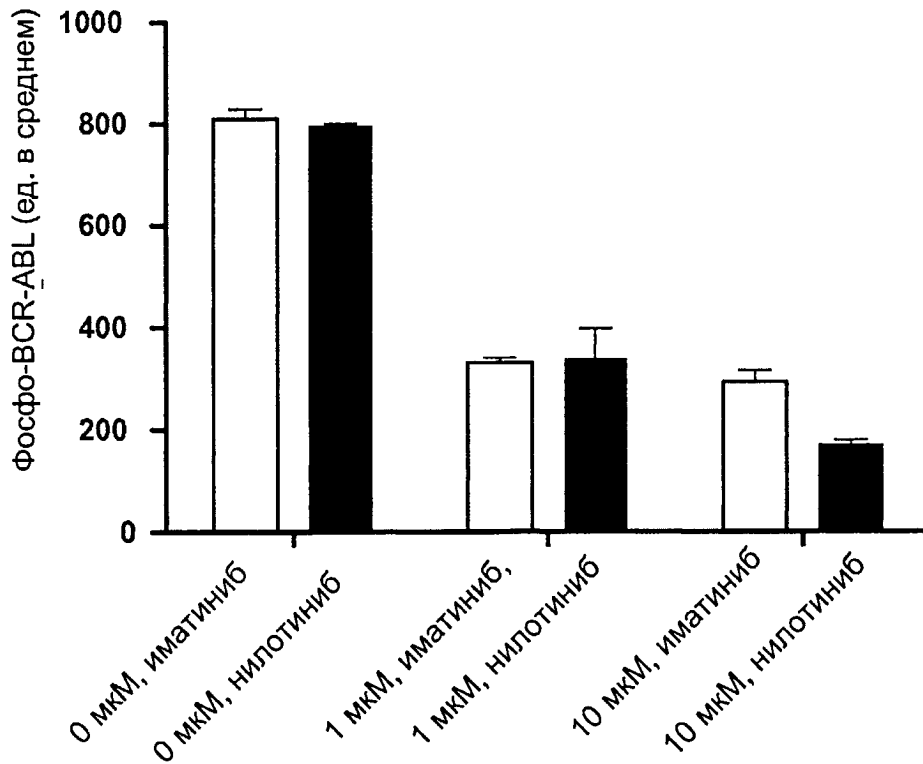
**Фиг. 31**

**A**

**Пациент 14**



**B**



**ФИГ. 32**