



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209635 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480013265. 3

(22) 申请日 2014. 03. 13

(30) 优先权数据

61/786062 2013. 03. 14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/025156 2014. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/159797 EN 2014. 10. 02

(71) 申请人 雅培分子公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 I. 索科罗瓦 J. 舒尔斯

O. 科恩菲尔德 J. 潘拉 M. 宋

S. 西泰罗 F. 波利奇特 G. 布朗

E. 佩斯托瓦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 杜艳玲 黄希贵

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书4页 说明书31页

(54) 发明名称

细胞制备物和细胞支持物及其在治疗性诊断中的用途

(57) 摘要

从包含组织或细胞团块的患者样本制备细胞的方法;原位杂交(ISH)或免疫组织化学(IHC)的方法;治疗性诊断患者对靶向酪氨酸激酶途径的活性剂响应的方法;包括ISH或IHC方法的治疗性诊断方法的改进;细胞支持物,在其表面上是细胞,所述细胞已用ISH或IHC方法与可检测标记的探针接触;和试剂盒,所述试剂盒包含(a)细胞支持物和/或至少一种用于ISH或IHC的探针,和(b)用于在细胞支持物上进行ISH或IHC方法的说明书。

1. 从包含组织或细胞团块的患者样本制备细胞的方法,所述方法包括:
 - (i) 在包含还原剂和螯合剂的预加温的平衡盐溶液中浸泡所述患者样本;
 - (ii) 转移所述患者样本到包含还原剂、钙离子来源和极性非质子溶剂的新鲜的平衡盐溶液中并混合;
 - (iii) 从所述新鲜的平衡盐溶液中移除所述患者样本并且(a) 离心溶液以使解聚的细胞沉淀或(b) 过滤溶液以收集解聚的细胞;和
 - (iv) 在(iii) (a) 之后,丢弃上清液,重悬在残留上清液中沉淀的细胞,并将重悬的细胞置于固定剂中,或在(iii) (b) 之后,将过滤的细胞置于固定剂中;由此制备来自包含组织或细胞团块的患者样本的细胞。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述患者样本是(a) 新鲜样本,(b) 融化的新鲜冷冻样本,或(c) 部分固定的样本。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其进一步包括在(i) 之前在平衡盐溶液中润洗所述患者样本。
4. 权利要求 3 的方法,其包括:
 - 在室温下在 Hank 氏缓冲液中润洗所述患者样本,
 - 在 37°C 在含有 20mM DTT (二硫苏糖醇)和 5mM EDTA (乙二胺四乙酸)的预加温 Hank 氏缓冲液中浸泡所述患者样本约 5 分钟,
 - 将经润洗和浸泡的患者样本转移到含有 20mM DTT、5mM CaCl₂和 10% DMSO(二甲亚砜)的新鲜 Hank 氏缓冲液中,并混合约 5 秒至约 10 秒,
 - 从所述新鲜 Hank 氏缓冲液移除患者样本,并且(a) 在约 1000×g 离心该溶液约 10 分钟以沉淀解聚的细胞或(b) 过滤该溶液以收集解聚的细胞,和
 - 在离心后,丢弃上清液,重悬残留上清液中沉淀的细胞,并将重悬的细胞置于溶液中,或者在过滤后,将过滤的细胞置于溶液中,其中所述溶液包含从约 30wt. % 至约 60wt. % 的甲醇、从约 40wt. % 至约 70wt. % 的水、缓冲剂和防腐剂,并且其中所述溶液在室温下保持过夜。
5. 权利要求 1、2、3 或 4 的方法,其进一步包括:
 - (v) 将所述细胞施加到细胞支持物上。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述细胞支持物是细胞学载玻片,并且其中所述方法进一步包括:
 - (vi) 在水-醇溶液中浸泡所述载玻片,
 - (vii) 在固定剂中浸泡所述载玻片,和
 - (viii) 干燥所述载玻片。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述水-醇溶液是 95% 乙醇且所述载玻片在室温下在乙醇中浸泡约 15 分钟,其中所述固定剂是 Carnoy 氏溶液并且所述载玻片在室温下在 Carnoy 氏溶液中浸泡约 30 分钟,并且其中所述载玻片在室温下干燥。
8. 进行原位杂交 (ISH) 或免疫组织化学 (IHC) 的方法,所述方法包括在从患者移除样本小于约 14 小时内,使已经根据权利要求 1、2、3 或 4 所述方法制备的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触,并可视化所述可检测标记。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述可检测标记的探针是荧光标记的核酸探针或荧光标记

的抗体(或其抗原反应性片段)探针。

10. 权利要求 8 的方法,其中所述细胞已被施加到细胞支持物。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述细胞支持物包括至少两个离散区域并且所述细胞已被施加到所述离散区域,在这种情况下,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以被区分。

12. 权利要求 11 的方法,其中各离散区域分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针和用于 9p21 的基因座特异性探针,
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

13. 进行原位杂交 (ISH) 或免疫组织化学 (IHC) 的方法,所述方法包括在从患者移除样本小于约 14 小时内,使已从选自细针抽吸、芯针活检、切除活检和切除的样本解聚的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触,并可视化所述可检测标记。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述可检测标记的探针是荧光标记的核酸探针或荧光标记的抗体(或其抗原反应性片段)探针。

15. 权利要求 13 的方法,其中所述细胞已被施加到细胞支持物。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述细胞支持物包括至少两个离散区域并且所述细胞已被施加到所述离散区域,在这种情况下,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以

被区分。

17. 权利要求 16 的方法, 其中各离散区域分别与可检测标记的探针的混合物接触, 其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针和用于 9p21 的基因座特异性探针,
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP, 或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

18. 治疗性诊断患者对用靶向酪氨酸激酶途径的活性剂治疗的响应的方法, 所述方法包括根据权利要求 12 的方法进行 ISH 或 IHC。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述靶向酪氨酸激酶途径的活性剂是克唑替尼、沃利替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

20. 治疗性诊断患者对用靶向酪氨酸激酶途径的活性剂治疗的响应的方法, 所述方法包括根据权利要求 17 的方法进行 ISH。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述靶向酪氨酸激酶途径的活性剂是克唑替尼、沃利替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

22. 在治疗性诊断方法中, 改进包括使用权利要求 10、11 或 12 的方法。

23. 在治疗性诊断方法中, 改进包括使用权利要求 15、16 或 17 的方法。

24. 细胞支持物, 在其表面上是细胞, 所述细胞已根据权利要求 11 或 12 的方法与可检测标记的探针接触。

25. 细胞支持物, 在其表面上是细胞, 所述细胞已根据权利要求 16 或 17 的方法与可检测标记的探针接触。

26. 试剂盒,其包含:

- (a) 细胞支持物和 / 或至少一种用于 ISH 或 IHC 的探针,和
- (b) 用于进行权利要求 11 或 12 的方法的说明书。

27. 试剂盒,其包含:

- (a) 细胞支持物和 / 或至少一种用于 ISH 或 IHC 的探针,和
- (b) 用于进行权利要求 16 或 17 的方法的说明书。

28. 试剂盒,其包含:

- (a) 细胞支持物和 / 或至少一种用于 ISH 或 IHC 的探针,和
- (b) 用于进行权利要求 18 或 19 的方法的说明书。

29. 试剂盒,其包含:

- (a) 细胞支持物和 / 或至少一种用于 ISH 或 IHC 的探针,和
- (b) 用于进行权利要求 20 或 21 的方法的说明书。

细胞制备物和细胞支持物及其在治疗性诊断中的用途

[0001] 对相关应用的交叉引用

本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的美国临时专利申请号 61/786,062 的优先权,并且其以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及制备细胞的方法(所述细胞从组织或细胞团块中获得)、包含这些细胞的细胞支持物、原位杂交(ISH)、免疫组织化学(IHC)、染色体异常的检测、治疗性诊断(theranosis)和试剂盒。

[0003] 背景

用于治疗癌症(诸如肺癌)的靶向治疗的选择需要在短时期内用相关癌症生物标志物测试活检样本。对于存在多个,诸如三个或更多,相关生物标志物的情况并不少见。由于疾病和伴随疾病的晚期,细针抽吸(FNA)或芯针活检(core needle biopsy)常常是从患者获得的唯一样本。由于样本仅包含少量细胞、组织或生物液体,诸如在肺癌情况下的支气管抽吸,对于样本的最大化利用变得很重要。

[0004] 通常,FNA 或芯针活检以与切除活检或手术切除活检类似的方式进行。样本置于甲醛中固定 24-48 小时。接下来,固定的样本包埋在石蜡中。在石蜡中包埋固定的样本可花费额外 24 小时。样本被固定和包埋后,将样本切成约 4-6 微米厚度的切片。然后将切片置于载玻片上用于干燥。干燥切片可以占用另外 24 小时。表面是干燥的切片的载玻片在进行荧光原位杂交(FISH)之前需要烘烤。烘烤载玻片可以占用约 2 小时至约 18 小时。因此,制备用于 FISH 的样本花费约 5 天。例如,当患者在疾病的晚期或罹患侵袭性形式的癌症时,时间变成患者结果和存活的关键因素。

[0005] Li 等(Laboratory Investigation 86: 619-627 (2006))尝试通过如下改进癌症诊断:开发针对原发肺癌相关基因的特异性基因组探针,并设计涉及四种不同探针组合物在盖玻片上的排列的多重 FISH 阵列。每种组合物对于两个染色体的每一个包含一种基因特异性探针和着丝粒探针,总共 4 种探针,每种都用不同颜色标记。盖玻片倒置在载玻片上悬浮在杂交缓冲液中的细胞上。Li 等的方法是不利的,因为其需要基因特异性基因探针的产生。此外,细胞的单个悬浮液上分区的盖玻片的倒置可以导致盖玻片的一个或多个区被倒置在不含有细胞或含有不足以用于分析的细胞数量的载玻片的区域上。并且,Li 等仅公开了采用支气管洗液的方法的使用,并没有教导如何制备用于该方法的其它类型的样本。的确,Li 等指示该方法最可能在临床样本如支气管洗液中成功,并且可能不适合用于小的活检样本或固定的组织,其中在象限之一存在假阴性风险。

[0006] Abramovich 等(RU2410663;俄罗斯申请号 RU20090134364,2009 年 9 月 14 日公开)似乎公开了将通过标准方法制备的细胞悬浮液(5 μ L)施加到显微镜载玻片的表面上通过穿孔封口膜(parafilm)条的密封连接形成的孔。封口膜条为 26 x 56 mm²并包含 8 个孔,所述孔直径为 9mm,间距 4mm 并距离载玻片边缘 2mm。作为用于同时 FISH 的多重离散的区域描述结果。

[0007] 非常希望在样本收集的数小时内开始 FISH 并且能够同时分析两个或更多, 诸如多个生物标志物。相应地, 本公开的目标是提供, 在样本收集的约一个半小时内制备用于原位杂交 (ISH) 诸如荧光 ISH (即, FISH), 特别是多重 FISH, 以及免疫组织化学 (IHC) 的细胞的方法, 由此使得 ISH 和 IHC 结果能够在样本收集的少于约 14 个小时内获得。此目标和其它目标和优点, 以及本发明的特征, 将从本文提供的详细说明中变得显而易见。

[0008] 概述

提供了从包含组织或细胞团块的患者样本制备细胞的方法。所述方法包括:

- (i) 在含有还原剂和螯合剂的预加温的平衡盐溶液中浸泡患者样本;
- (ii) 转移患者样本到包含还原剂、钙离子来源和极性非质子溶剂新鲜的平衡盐溶液中并混合;
- (iii) 从新鲜的平衡盐溶液中移除患者样本并(a) 离心溶液以使解聚的细胞沉淀或(b) 过滤溶液以收集解聚的细胞; 和
- (iv) 在(iii) (a) 之后, 丢弃上清液, 重悬在残留上清液中的沉淀细胞, 并将重悬的细胞置于固定剂中, 或在(iii) (b) 后, 将过滤的细胞置于固定剂中。患者样本可以是(a) 新鲜样本, (b) 融化的新鲜冷冻样本, 或(c) 部分固定的样本。所述方法可以进一步包括在(i) 之前在平衡盐溶液中润洗患者样本。

[0009] 所述方法的一个实施方案包括, 在室温下在 Hank 氏缓冲液中润洗患者样品, 在 37°C 在含有 20mM DTT (二硫苏糖醇) 和 5mM EDTA (乙二胺四乙酸) 的预加温 Hank 氏缓冲液中浸泡患者样本约 5 分钟, 将润洗和浸泡的患者样本转移到含有 20mM DTT、5mM 的 CaCl_2 和 10% DMSO (二甲亚砜) 的新鲜 Hank 氏缓冲液中, 混合约 5 秒至约 10 秒, 从新鲜 Hank 氏缓冲液移除患者样本, 并且(a) 在约 1000×g 离心该溶液约 10 分钟以沉淀解聚细胞或(b) 过滤溶液以收集解聚的细胞, 并且, 或者在离心后, 丢弃上清液, 重悬残留上清液中沉淀的细胞, 并将重悬的细胞置于溶液中, 或者在过滤后, 将过滤的细胞置于溶液中, 其中所述溶液包含从约 30wt. % 至约 60wt. % 的甲醇、从约 40wt. % 至约 70wt. % 的水、缓冲剂和防腐剂, 并且其中所述溶液在室温下保持过夜。

[0010] 所述方法可以进一步包括(v) 将细胞施加到细胞支持物上。如果细胞支持物是细胞学载玻片, 该方法可以进一步包括:(vi) 在水-醇溶液中浸泡载玻片, (vii) 固定剂中浸泡载玻片, 及(viii) 干燥载玻片。水-醇溶液可以是 95% 的乙醇, 并且可以在乙醇中在室温下浸泡约 15 分钟。固定剂可以是 Carnoy 氏溶液, 可以在室温下将载玻片浸泡在 Carnoy 氏溶液中约 30 分钟。可以在室温下干燥载玻片。

[0011] 还提供了进行原位杂交 (ISH) 或免疫组织化学 (IHC) 的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括在从患者移除样本小于约 14 小时内, 使已经根据上文所述方法制备的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触, 并可视化所述可检测标记。在另一个实施方案中, 所述方法包括在从患者移除样本小于约 14 小时内, 使已从选自细针抽吸、芯针活检、切除活检和切除的样本解聚的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触, 并可视化所述可检测标记。可检测标记的探针可以是荧光标记核酸探针, 诸如荧光 ISH (FISH) 探针, 或荧光标记的抗体探针, 诸如用于免疫组织化学 (IHC) 探针。优选地, 细胞已被施加到细胞支持物。在一个优选的实施方案中, 所述细胞支持物包括至少两个离散区域并且所述细胞已被施加到离散区域, 在这种情况下, 每个区域与至少一种可检测标记的探针接触, 并且, 如果一个

区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。在一个实施方案中,各离散区域分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离(break-apart) 探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针,
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP, 或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

[0012] 进一步提供了治疗性诊断患者对靶向酪氨酸激酶途径的活性剂响应的方法。所述方法包括根据使用细胞支持物的上文所述方法进行 ISH 或 IHC,所述细胞支持物包括至少两个离散的区域,细胞已被施加到所述区域上,并且所述区域分别与至少一种可检测标记的探针接触。如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以被区分。靶向酪氨酸激酶途径的活性剂可以是克唑替尼(crizotinib)、沃利替尼(volitinib)、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0013] 还进一步提供治疗性诊断方法的改进。所述改进包括使用上文所述进行 ISH 或 IHC 的方法,诸如在细胞支持物上,所述细胞支持物包括至少两个离散的区域,细胞已被施加到所述区域上,并且所述区域分别与至少一种可检测标记的探针接触,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以被区分。

[0014] 甚至仍然进一步提供的是根据上文所述进行 ISH 或 IHC 的方法的表面上是细胞的细胞支持物,所述细胞已与可检测标记的探针接触,诸如上文所述那些。所述细胞支持物包括至少两个离散区域,在这种情况下,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。

每个离散的区域可以分别与可检测标记的探针的混合物,诸如上文所述混合物接触。

[0015] 因此,还提供了试剂盒。试剂盒包含(a)细胞支持物和/或用于 ISH 或 IHC 至少一种探针,和(b)用于进行上文所述进行 ISH 或 IHC 的方法的说明书,诸如在细胞支持物上,所述细胞支持物包括至少两个离散的区域,细胞已被施加到所述区域上,并且所述区域与至少一种可检测标记的探针接触,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以被区分。额外地或可替代地,所述说明书可以包括用于进行上文所述治疗性诊断方法的说明书。

[0016] 详述

本公开提供制备从组织样品获得的细胞的方法、荧光原位杂交(FISH)的方法(特别是多重 FISH)、免疫组织化学(IHC)、治疗性诊断的方法、细胞支持物和试剂盒。制备细胞的方法使得能够在通过细针抽吸(FNA)、芯针活检、切除活检和手术切除等从患者获得组织样本后尽可能快地进行核酸杂交(例如, FISH, 诸如多重 FISH), 诸如在少于约 14 小时, 例如约 13.5 小时内。组织样本可以是(a)新鲜的, (b)融化的新鲜冷冻的, 或(c)部分固定的。通过避免使用固定和包埋的样本,可以更清楚地看到杂交结果,并且可以避免与包埋样本的切片有关的截断假象(truncation artifacts)。所述方法还使得能够相比在固定和包埋的样本上的 ISH (诸如 FISH) 减少,甚至是实质性减少用于 ISH, 诸如 FISH 所需的试剂(包括探针)的量。此外,所述方法使得 ISH (诸如 FISH) 能够在相对小的限定区域内进行,所述区域可以以其整体快速成像。因此,所述方法使得能够进行多重 ISH, 诸如多重 FISH。

[0017] 所述方法在治疗性诊断中具有实用性,所述治疗性诊断通常被称为伴随诊断,诸如用于选择比另一种治疗选择、预后、可能的治疗响应、预防或治疗处理的监测、疗效评价等更可能成功的治疗选项的目的。

[0018] 更具体的实例是用于癌症靶向治疗的伴随诊断。与化疗显著不同,其干扰所有快速分裂的细胞,靶向治疗(也称为分子靶向治疗)通过干扰对于癌症发生和肿瘤生长所需的特定靶向分子而阻断癌细胞的生长。预期靶向治疗对正常细胞更有效并且伤害更小。靶向治疗的主要类别是小分子、小分子药物缀合物和单克隆抗体。目前,对于乳腺癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、前列腺癌、黑色素瘤和其它癌症存在靶向治疗。

[0019] 如果患者已被诊断为具有癌症,或怀疑具有癌症,优选地并且甚至期望地,制备细胞样品用于使用多种(例如,超过 1 种,诸如两种、三种、四种、五种、六种或更多)探针的多重 ISH (例如多重 FISH),其中每种探针或探针的组合(例如,两种、三种或更多),例如,能够检测癌症标志物。在这方面,多重 FISH 优选地甚至期望地能够进行多种(即,超过 1 种,诸如两种、三种、四种、五种、六种或更多)癌症标志物的检测。尽管本公开主要是适于在癌症的情况下,特别是癌症的诊断、癌症的预后、癌症治疗(包括组合疗法)的选择、疗效的评价、治疗的监测、复发的监测等,但应当理解,本公开在适合于这样的通过多重 ISH (例如,多重 FISH) 的评价的其它疾病情况下也具有实用性。

[0020] 该方法在大量生产的预防剂和治疗剂的定制处方和定制施用中,以及这些试剂的定制生产和定制施用中,单独或与其它活性剂组合,诸如在丸剂和多效药片(polypill)(其包含个性化剂量水平的两种或更多种活性剂)的生产和处方中,也具有实用性。因此,该方法促进药物配合的传统实践,即为特定患者响应于该患者对剂量强度和/或制剂的特别需要制备药物。含有两种或更多种活性剂的多效药片的生产为使用大量生产的、固定剂量、组

合药物产品提供了一种替代。

[0021] 术语

下列术语与本公开相关

“约”指与所陈述的值大约 $\pm 10\%$ 的变化。应当理解,这样的变化总是包括在本文提供的任何给定的值内,无论是否具体提及它们。

[0022] “腺瘤”,是腺来源的良性肿瘤。“腺瘤”、“结肠腺瘤”、“结肠的腺瘤”和“结肠腺瘤”可在本文中用于指在结肠中的腺瘤,其也被称为腺瘤性息肉。腺瘤性息肉通常通过结肠镜检查发现并去除,因为它具有变成恶性的倾向。

[0023] “腺癌”、“结肠腺癌”、“结肠癌”和“结肠腺癌”可在本文中用于指在结肠中的恶性生长(即,癌症)。

[0024] “ALK”可在本文中用于指间变性淋巴瘤激酶(ALK)基因,该基因位于2号染色体。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 2p23,而 Ensembl 细胞遗传学带是 2p23.1。别名包括间变性淋巴瘤受体酪氨酸激酶、CD246、CD246 抗原、EC2.7.10.1、NBLST3、Ki-1、ALK 酪氨酸激酶受体和突变体间变性淋巴瘤激酶。本文也使用“ALK”指用于确定涉及 ALK 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 ALK 的参数的探针优选杂交到 2 号染色体的 p23 区域(2p23),其包含 ALK 基因。参考 DNA 序列包括但不限于 NC_000002.11 和 NT_022184.15。

[0025] “AURKA”可以用于本文指位于人染色体 20 上 q13 的极光激酶 A 基因。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 20q13,而 Ensembl 细胞遗传学带是 20q13.2。AURKA 的别名包括 ARK1、BTAK、STK15、STK6、ALK、PPP1R47、STK7、丝氨酸 / 苏氨酸激酶 6、极光 2、极光相关激酶 1、极光 /IPL1 相关激酶 1、乳腺肿瘤扩增激酶、丝氨酸 / 苏氨酸 - 蛋白激酶 15、丝氨酸 / 苏氨酸 - 蛋白激酶 6、丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶极光 -A、ARK-1、AURA、hARK1、AURORA2、AurA、丝氨酸 / 苏氨酸激酶 15、极光 /IPL1 样激酶、乳腺肿瘤扩增激酶、IPL1 相关激酶、蛋白磷酸酶 1 调节亚基 47、丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 15、AIRK1、AYK1、EC2.7.11.1 和 IAK1。本文也使用“AURKA”指用于确定涉及 AURKA 的染色体异常诸如拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 AURKA 的参数,诸如 AURKA 的拷贝数、涉及 AURKA 的拷贝数比或 AURKA 的百分比增加的探针,优选杂交到 20 号染色体的 q13 区域(20q13),其包含 AURKA 基因。DNA 参考序列包括但不限于 NC_000020.10 和 NT_011362.10。

[0026] 如国立卫生院定义的“生物标志物”是“作为正常生物过程,致病过程,或治疗干预的药理响应的指标被客观测量和评估的特征”。

[0027] “分离探针”本文可用于指两种不同的可检测标记的探针的组合,所述探针能够检测易位。例如,一个探针可以杂交在给定基因的 5' 端或附近并且在发出一种波长的荧光,而另一个探针可以杂交在给定基因的 3' 端或附近并且发出不同波长的荧光。当染色体在其天然状态时,颜色组合为单一颜色,例如黄色。当染色体经历易位时,颜色分离,例如红色和绿色。

[0028] “涂刷细胞学样本”是通过涂刷上皮表面,例如,胃肠道、肺或子宫颈获得的细胞样品。

[0029] “癌症诊断”通常是指一种类型的癌症的鉴定。

[0030] “癌症预后”通常是指癌症的可能过程(例如,疾病进展)或结果(例如,转移或死亡)

的预报或预测。

[0031] “CDKN2”可在本文中用于指细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 9p21, 而 Ensembl 细胞遗传学带是 9p21.3。别名包括细胞周期蛋白依赖性激酶 4 抑制剂 A、CDK4I、MLM、MTS1、MTS-1、CMM2、P16、ARF、INK4、INK4A、P14、P14ARF、P16-INK4A、P16INK4、P16INK4A、P19、P19ARF、TP16、CDK4 抑制剂 P16-INK4、细胞周期负调节因子 β 、p14ARF、p16-INK4、P16INK4a、P16INK4A 和 p19ARF。“CDKN2”也用于本文指用于确定涉及 CDKN2 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 CDKN2 的参数的探针优选杂交到 9 号染色体的 p21 区域(9p21), 其包含 CDKN2 基因。“CDKN2”和“P16”本文可以互换使用。DNA 参考序列包括 NC_000009.11、NT_008413.18 和 NC_018920.2。

[0032] “染色体计数探针(CEP)”或“着丝粒探针”是使得在细胞中的一个或多个特定染色体的数目能够被计数的任何探针。染色体计数探针通常识别并结合特定染色体的着丝粒附近区域(称为“周缘着丝粒”)或着丝粒区域, 典型地是重复 DNA 序列(例如, α 卫星 DNA)。染色体的着丝粒通常被认为代表该染色体, 因为着丝粒是细胞分裂过程中忠实分离所需的。特定染色体区域的缺失或扩增可以分化于其通常所在的整个染色体的丢失或增加(染色体异数(aneusomy)), 通过比较对应于特定基因座的信号数目(拷贝数)与对应着丝粒的信号数目。用于制造这种比较的一种方法是将代表基因座信号的数目除以代表着丝粒的信号数目。小于 1 的比值表示基因座的相对丢失或缺失并且比值大于 1 指示基因座的相对增加或放大。同样地, 可以在同一染色体上的两个不同的基因座上进行比较, 例如染色体的两个不同的臂上, 以指示染色体内不平衡的增加或丢失。代替用于染色体的着丝粒探针, 本领域技术人员将会认识到染色体臂探针可以替代地用于接近全染色体丢失或增加。然而, 这样的探针在计数染色体中不够精确, 因为对于这种探针的信号丢失可能并不总是指示整个染色体的丢失。染色体计数探针的实例包括: 购自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (formerly Vysis, Inc., Downers Grove, IL) 的 CEP® 探针。染色体计数探针或着丝粒探针的具体实例包括用于下列的探针: 1 号染色体、2 号染色体、3 号染色体、4 号染色体、5 号染色体、6 号染色体、7 号染色体、8 号染色体、9 号染色体、10 号染色体、11 号染色体、12 号染色体、13 号染色体、14 号染色体、15 号染色体、16 号染色体、17 号染色体、18 号染色体、19 号染色体、20 号染色体、21 号染色体、X 染色体和 Y 染色体。CEP® 探针的具体实例包括 CEP1、CEP2、CEP3、CEP4、CEP5、CEP6、CEP7、CEP8、CEP9、CEP10、CEP11、CEP12、CEP13、CEP14、CEP15、CEP16、CEP17、CEP18、CEP19、CEP20、CEP21、CEPX 和 CEPY。

[0033] “拷贝数”是对于无论是单个基因座、1 个或多个基因座或整个基因组的 DNA 的测量。“拷贝数”2 在人中是“野生型”(因为二倍体, 除了性染色体)。2 以外的“拷贝数”在人中(除了对于性染色体)偏离野生型。这些偏离包括扩增(即拷贝数增加), 和缺失(即, 拷贝数减少, 和甚至无拷贝数)。

[0034] “芯针活检”、“芯活检”或“切开活检”在本文中用于指使用针或切割以移除组织样品同时保留组织的组织学结构。

[0035] “DCC”本文可以用于指位于人 18 号染色体上 q21 区域中的结直肠癌基因的缺失。Entrez Gene 细胞遗传学带是 18q21.3, 而 Ensembl 细胞遗传学带是 18q21.2 并且 HGNC 细胞遗传学带是 18q21.1。别名包括 IGDC1、结直肠癌抑制子、免疫球蛋白超家族 DCC 亚类成员 1、肿瘤抑制蛋白 DCC、CRC18、CRCR1、结直肠癌抑制子、结直肠癌蛋白缺失和导蛋白受

体 DCC。“DCC”也可用于本文指可以用于确定涉及 DCC 的染色体异常诸如 DCC 拷贝数丢失的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 DCC 的参数,诸如 DCC 的拷贝数、涉及 DCC 的拷贝数或 DCC 的百分比增加的探针,优选杂交到 18 号染色体的 q21 区域(18q21),其包含 DCC 基因。DNA 参考序列包括但不限于 NC_000018.9 和 NT_010966.14。

[0036] “EGFR”本文可以用于指位于人 7 号染色体上 p12 区域中的表皮生长因子受体基因。Entrez Gene 细胞遗传学带和 HGNC 细胞遗传学带是 7p12,而 Ensembl 细胞遗传学带是 7p11.2。别名包括禽成红细胞白血病病毒(v-erb-b)癌基因同源物、ERBB、ERBB1、原癌基因 c-ErbB-1、受体酪氨酸蛋白激酶 erbB-1、HER1、EC2.7.10.1、PIG61、细胞生长抑制蛋白 40、细胞增殖诱导蛋白 61、mENA 和 EC2.7.10。“EGFR”也可用于本文指可以用于确定涉及 EGFR 染色体异常诸如 EGFR 拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 EGFR 的参数,诸如 EGFR 的拷贝数、涉及 EGFR 的拷贝数比例或 EGFR 的百分比增加的探针,优选杂交到 7 号染色体的 p12 区域(7p12),其包含 EGFR 基因。DNA 参考序列包括但不限于 NC_000007.13、NT_033968.6 和 NT_079592.2。

[0037] “ERG”可用于本文指 V-Ets 禽成红细胞增多症病毒 E26 癌基因同源基因。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 21q22.3,而 Ensembl 细胞遗传学带是 21q22.2。别名包括 V-Ets 禽成红细胞增多症病毒 E26 癌基因相关、转录调节子 ERG (转化蛋白 ERG)、V-Ets 成红细胞增多症病毒 E26 癌基因样、TMPRSS2-ERG 前列腺癌特异性、erg-3、ets 相关、p55、TMPRSS2/ERG 融合体、转录调节子 ERG, V-Ets 成红细胞增多症病毒 E26 癌基因同源基因和转化蛋白 ERG。“ERG”也用于本文指用于确定涉及 ERG 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 ERG 的参数的探针优选杂交到 21 号染色体的 q22 区域(21q22),其包含 ERG 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000021.8、NC_018932.2 和 NT_011512.11。

[0038] “切除活检”在本文中用于指除去整个肿块或可疑区域。

[0039] “FGFR1”可用于本文指成纤维细胞生长因子受体 1。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 8p12,而 Ensembl 细胞遗传学带是 8p11.22。别名包括 FLT2、KAL2、Fms 相关酪氨酸激酶 2、碱性成纤维细胞生长因子受体 1、Fms 样酪氨酸激酶 2、原癌基因的 C-Fgr、BFGFR、CEK、FGFBR、FGFR-1、FLG、FLT-2、HBGFR 和 bFGF-R-1、EC 2.7.10、EC2.7.10.1、OGD、法伊弗综合征、CD331、CD331 抗原、HH2、N-SAM、FGFR1/PLAG1 融合体、肝素结合生长因子受体、羟基芳基蛋白激酶、N-SAM、N-sam、FGFR1/PLAG1 融合体、肝素结合生长因子受体和羟基芳基蛋白激酶。“FGFR1”也用于本文指用于确定涉及 FGFR1 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 FGFR1 的参数的探针优选杂交到 8 号染色体的 p11-12 区域(8p11-12),其包含 FGFR1 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000008.10、NT_167187.1 和 NC_018919.2。

[0040] “FGFR2”可用于本文指成纤维细胞生长因子受体 2。Entrez Gene 细胞遗传学带是 10q26,而 Ensembl 细胞遗传学带是 10q26.13 并且 HGNC 细胞遗传学带是 10q25.3-q26。别名包括 FGFR-2、BEK、角质细胞生长因子受体、KGFR、CFD1、JWS、细菌表达的激酶、EC2.7.10.1、颅面骨发育不全 1、克鲁宗综合征、杰克逊-威斯综合征、菲佛综合征、BBDS、BFR-1、CD332、CD332 抗原、CEK3、ECT1、TK14、TK25、BEK 成纤维细胞生长因子受体、FGF 受体、羟基芳基蛋白激酶、蛋白酪氨酸激酶受体样 14、可溶性 FGFR4 变体 4、K-SAM、K-sam、KSAM 和 EC2.7.10。“FGFR2”也用于本文指用于确定涉及 FGFR2 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位

杂交诸如 FISH 检测涉及 FGFR2 的参数的探针优选杂交到 10 号染色体的 q14 区域(10q14), 其包含 FGFR2 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000010.10、NC_018921.2 和 NT_030059.13。

[0041] “细针抽吸”或“针吸活检”在本文中用于指使用针从组织移除细胞的样品而不保留从其中细胞被除去的组织的组织学结构。细针抽吸也可以用于移除样品流体,例如从囊肿。

[0042] “固定剂”包括,但不限于,醇溶液、酸丙酮溶液、醛类(如甲醛、多聚甲醛和戊二醛)、甲醇 / 乙酸和福尔马林。

[0043] “HER2”可在本文中用来指 V-Erb-B2 禽成红细胞白血病病毒癌基因同源物 2。Entrez Gene 和 Ensembl 细胞遗传学带是 17q12,而 HGNC 细胞遗传学带是 17q11.2-q12。别名包括 HER-2、HER-2/neu、TKR1、NGL、NEU、神经 / 成胶质细胞瘤来源的癌基因同源物、转移性淋巴结基因 19 蛋白、原癌基因 C-ErbB-2、原癌基因 Neu、酪氨酸激酶型细胞表面受体 HER2、MLN19、p185erbB2、EC2.7.10.1、V-Erb-B2 禽成红细胞白血病病毒癌基因同源物 2、CD340、C-Erb B2/Neu 蛋白、herstatin、成神经细胞瘤 / 成胶质细胞瘤衍生的癌基因同源物、受体酪氨酸蛋白激酶 ErbB-2、V-Erb-B2 成红细胞白血病病毒癌基因同源物 2、MLN19、CD340 抗原和 EC 2.7.10。“HER2”也用于本文指用于确定涉及 HER2 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 HER2 的参数的探针优选杂交到 17 号染色体的 q11-12 区域(17q11-12),其包含 HER2 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000017.10、NT_010783.15 和 NC_018928.2。

[0044] “标记的”、“标记有可检测标记物”和“可检测标记的”在本文可互换使用,表示一个实体(例如,探针)可以被检测到。“标记”和“可检测标记”是指连接到实体以使得实体可检测的部分,如连接到探针使得所述探针在结合到靶序列后可检测的部分。部分本身可能无法检测到,但可与另一部分反应后变得可检测。使用术语“可检测标记”意在包括这样的标记。可以选择可检测标记使得标记产生信号,所述信号可以被测量并且其强度与结合的实体的量成比例。很多种用于标记和 / 或检测分子诸如核酸的系统,例如探针,是熟知的。可以通过掺入或缀合标记来制备标记的核酸,所述标记通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学、化学或其他方式可以直接或间接被检测。合适的可检测标记包括放射性同位素、荧光团、发色团、化学发光剂、微粒、酶、磁性粒子、电子致密颗粒、质量标记物、自旋标记物、半抗原等。本文优选荧光团和化学发光剂。

[0045] “灌洗”在本文中用来指将流体引入体腔,诸如肺,并收集流体用于检查。

[0046] “基因座特异性探针”和“基因座特异性标识符(LSI)”在本文中可互换使用来指这样的探针,所述探针在染色体上的区域内选择性结合特定基因座,例如,已被确定经历转移的增加 / 丢失的基因座。探针可以靶向编码或非编码区,或者两者,包括外显子、内含子和 / 或调节序列,诸如启动子序列等。

[0047] “MET”可在本文中用来指所述 met 原癌基因。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 7q31,而 Ensembl 细胞遗传学带是 7q31.2。别名包括肝细胞生长因子受体、原癌基因 C-Met、分散因子受体、酪氨酸蛋白激酶 Met、HGF 受体、HGF/SF 受体、SF 受体、EC2.7.10.1、AUTS9、HGFR、RCCP2、c-Met、Met 原癌基因酪氨酸激酶和 EC2.7.10。“MET”也用于本文指用于确定涉及 MET 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 MET 的参数的探针优选杂交到 7 号染色体的 q31 区域(7q31),其包含 MET 基因。参考 DNA 序列

包括 NC_000007.13、NT_007933.15、NC_018918.2 和 NT_079596.2。

[0048] “MCL1”可在本文中用于指髓细胞白血病序列 1(BCL2 相关)。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 1q21, 而 Ensembl 细胞遗传学带是 1q21.3。别名包括 Bcl-2 样蛋白 3、Bcl-2 的相关蛋白 EAT/Mc11、BCL2L3、mc11/EAT、EAT、MCL1-ES、MCL1L、MCL1S、Mc1-1、TM、bc12-L-3、诱导骨髓白血病细胞分化蛋白 Mc1-1、髓细胞白血病 ES 和 Bcl2-L-3。“MCL1”也用于本文指用于确定涉及 MCL1 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 MCL1 的参数的探针优选杂交到 1 号染色体的 q21 区域(1q21), 其包含 MCL1 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000001.10、NC_018912.2 和 NT_004487.19。

[0049] “MYC”本文可以用于指位于人 8 号染色体上 q24 区域中的 c-myc 癌基因。Entrez Gene 和 Ensembl 细胞遗传学带是 8q24.21, 而 HGNC 细胞遗传学带是 8q24。别名包括 vHLHe39、c-Myc、V-myc 禽髓细胞增生病毒癌基因同源物、E 类基本螺旋-环-螺旋蛋白 39、原癌基因 c-Myc、转录因子 p64、MRTL、禽髓细胞增生病毒癌基因同源物、myc 原癌基因蛋白、myc 相关翻译/定位调控因子和 BHLHE39。“MYC”也可用于本文指可以用于确定涉及 MYC 染色体异常诸如 MYC 拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 MYC 的参数, 诸如 MYC 的拷贝数、涉及 MYC 的拷贝数比例或 MYC 的百分比增加的探针, 优选杂交到 8 号染色体的 q24 区域(8q24), 其包含 MYC 基因。DNA 参考序列包括但不限于 NC_000008.10 和 NT_008046.16。

[0050] “NTRK1”可用于本文指神经营养酪氨酸激酶受体 1 型。Ensemble 细胞遗传学带是 1q23.1, 而 Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 1q21-q22。别名包括 MTC、TRKA、高亲和力和神经生长因子受体、原肌球蛋白相关激酶 A、酪氨酸激酶受体 A、TRK、Trk-A、gp140trk、P140-TrkA、TRK1-转化酪氨酸激酶蛋白、EC2.7.10.1、TRK1、癌基因 TRK、神经营养酪氨酸激酶受体 1 型、酪氨酸激酶受体和 EC2.7.10。“NTRK1”也用于本文指用于确定涉及 NTRK1 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 NTRK1 的参数的探针优选杂交到 1 号染色体的 q21-23 区域(1q21-23), 其包含 NTRK1 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000001.10、NT_004487.19 和 NC_018912.2。

[0051] “核酸样品”是指包含以适用于与探针杂交形式的核酸的样品, 例如包含细胞核或从这种细胞核分离或纯化的核酸的样品。核酸样品可以包含全部或部分的(例如, 特定染色体)基因组 DNA、全部或部分的 mRNA (例如, 特定的染色体或基因), 或选择的序列。凝聚染色体(诸如存在于间期或中期)适合在原位杂交诸如 FISH 和多重 FISH 中用作靶。

[0052] “PIK3CA”可在本文中用来指磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶, 催化亚基 α 。Entrez Gene 细胞遗传学带是 3q26.3, 而 Ensembl 细胞遗传学带是 3q26.32 并且 HGNC 细胞遗传学带是 3q26.3。别名包括磷酸肌醇-3-激酶催化 α 多肽、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 同工型、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶 110kDa 的催化亚基 α 、磷脂酰肌醇 4-5, 二磷酸 3-激酶催化亚基 α 同工型、PI3 激酶 P110 亚基 α 、PI3-激酶(kinase)亚基 α 、PtdIns-3-激酶亚基 P110- α 、PtdIns-3-激酶亚基 α 、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PIK3CA、PI3K、PI3K- α 、CLOVE、EC2.7.1.153、EC2.7.11.1、CWS5、PI3K α 、MCAP、p110 α 、p110- α 、磷脂酰肌醇 3-激酶催化 110-KD α 、磷脂酰肌醇 3-激酶催化 α 多肽、MCM、MCMTC、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶 110kDa 催化亚基 α 、磷酸肌醇 3-激酶催化 α 多肽和 EC2.7.1。“PIK3CA”也用于本文指用于确定涉及 PIK3CA 的染色体异常的探针或探针

组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 PIK3CA 的参数的探针优选杂交到 3 号染色体的 q26 区域(3q26),其包含 PIK3CA 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000003.11、NC_018914.2 和 NT_005612.16。

[0053] “预定截止”和“预定水平”一般是指用于通过针对预定截止 / 水平比较测定结果评价诊断 / 预后 / 治疗效力结果的截止值,其中所述预定截止 / 水平已经链接或关联各种临床参数(例如,疾病的严重程度,进展 / 无进展 / 改善等)。

[0054] “探针”在本公开的上下文中是可以在允许或促进选择性杂交的条件下选择性杂交至靶序列的至少一部分的寡核苷酸或多核苷酸。通常,探针可以与 DNA 的编码链或正义(+)链互补或与 DNA 的非编码链或反义(-)链互补(有时被称为“反向互补”)。探针长度可以显著变化。约 10 至约 100 个核苷酸,例如约 15 至约 75 个核苷酸,例如约 15 至约 50 个核苷酸的长度在一些应用中可以是优选的,而约 $50-1 \times 10^5$ 核苷酸的长度可以优选用于染色体探针并且约 25,000 至约 800,000 个核苷酸的长度可以优选用于基因座特异性探针。探针也可在本文中用来指可检测标记的抗体或其抗原结合片段,例如,在 IHC 以及确认细胞为上皮细胞的情况下。

[0055] “预后”是疾病可能的过程和 / 或结果的预测,诸如恢复的可能性。因此,预后包括疾病状态的改善,疾病状态恶化,以及疾病状态无改变。

[0056] “PTEN”可在本文中用于指磷酸酶和张力蛋白同源物。Entrez Gene 细胞遗传学带是 10q23.3,而 Ensembl 细胞遗传学带是 10q23.31 并且 HGNC 细胞遗传学带是 10q23。别名包括磷酸酶和张力蛋白样蛋白、磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶和双特异性蛋白磷酸酶、PTEN1、多种晚期癌症中突变 1 (mutated in multiple advanced cancers 1)、MMAC1、10 号染色体上缺失的 MMAC1 磷酸酶和张力蛋白同源物、BZS、MHAM、TEP1、GLM2、10q23del1、CWS1、DEC、EC3.1.3.16、EC3.1.3.48 和 EC3.1.3.67。“PTEN”也用于本文指用于确定涉及 PTEN 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 PTEN 的参数的探针优选杂交到 10 号染色体的 q23 区域(10q23),其包含 PTEN 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000010.10、NC_018921.2 和 NT_030059.13。

[0057] “RB1”本文可以用于指位于人 13 号染色体上 q14 区域中的视网膜母细胞瘤基因。Entrez、Ensembl 和 HGNC 细胞遗传学带是 13q14.2。别名包括 OSRC、RB、P105-Rb、pRb、pp110、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤易感性蛋白、视网膜母细胞瘤相关蛋白和 Rb。“RB1”在本文中可以与“13q14”互换使用。“RB1”或“13q14”也可用于本文指可以用于确定涉及 RB1 或 13q14 染色体异常诸如 RB1 或 13q14 拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 RB1 或 13q14 的参数,诸如 RB1 或 13q14 的拷贝数、涉及 RB1 或 13q14 的拷贝数比例或 RB1 或 13q14 的百分比增加的探针,优选杂交到 13 号染色体的 q14 区域(13q14),其包含 RB1 基因。DNA 参考序列包括但不限于 NC_000013.10 和 NT_024524.14。

[0058] “RET”可在本文中用于指位于 10 号染色体上的 ret 原癌基因。Entrez Gene 和 HGNC 细胞遗传学带是 10q11.2,而 Ensembl 细胞遗传学带是 10q11.21。别名包括 CDHF12、CDHR16、PTC、RET51、HSCR1、MEN2A、MEN2B、MTC1、EC2.7.10.1、EC2.7.10、钙粘蛋白家族成员 12、原癌基因 c-Ret、先天性巨结肠症 1、多发性内分泌腺瘤病和甲状腺髓样癌 1、RET-ELE1、钙粘蛋白相关家族成员 16、羟基芳基的蛋白激酶、原癌基因酪氨酸蛋白激酶受体 Ret、受体酪氨酸激酶和 RET 转化序列。“RET”也用于本文指用于确定涉及 RET 的染色体异常的探针

或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 RET 的参数的探针优选杂交到 10 号染色体的 q11 区域(10q11),其包含 RET 基因。参考 DNA 序列包括但不限于 NC_000010.10 和 NT_033985.7。

[0059] “进展的风险”在本文中用于指疾病状态恶化。

[0060] “ROS”在本文中用于指 C-Ros 癌基因 1,受体酪氨酸激酶。Entrez Gene 细胞遗传学带是 6q22,而 Ensembl 细胞遗传学带是 6q22.1 并且 HGNC 细胞遗传学带是 6q21-q22。别名包括 MCF3、V-Ros UR2 肉瘤病毒癌基因同源物 1、V-Ros 禽 UR2 肉瘤病毒癌基因同源物 1、V-Ros UR2 肉瘤病毒癌基因同源物 1 (禽类)、c-ros-1、原癌基因酪氨酸蛋白激酶、跨膜酪氨酸特异性的蛋白激酶、原癌基因 C-Ros、原癌基因 C-Ros-1、受体酪氨酸激酶 C-Ros 癌基因、C-Ros 受体酪氨酸激酶和 EC2.7.10.1。“ROS”也用于本文指用于确定涉及 ROS 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 ROS 的参数的探针优选杂交到 6 号染色体的 q22 区域(6q22),其包含 ROS 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000006.11、NC_018917.2 和 NT_025741.15。

[0061] 组织样品的“切片”是单一的组织样品的部分或片,例如从组织样品切下的组织或细胞薄片。可以取组织样品的两个或更多个切片并分析。如果需要,可以在多个水平分析单一切片,例如形态和分子水平(例如核酸和蛋白)。

[0062] 在本公开的背景中,“选择性杂交到”(以及,“选择性杂交”、“特异性杂交到”和“特异性杂交”)指在严格条件下核酸分子与特定核苷酸序列的优先结合、成双链或杂交。术语“严格条件”指这样的条件,在该条件下,探针将优先杂交到其靶序列并且以较低程度或根本不杂交到其它非靶序列。在核酸杂交的情况下(例如,如在阵列、Southern 杂交、Northern 杂交或 FISH 中)“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的并且在不同条件下不同。对于核酸杂交的详细指南见于,例如 Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Ch. 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, NY (1993)。通常,选择高度严格杂交和洗涤条件在确定的离子强度和 pH 下比特定序列的热解链点(T_m)低约 5 °C。 T_m 是这样的温度(在确定的离子强度和 pH 下),在这样的温度下,50%的靶序列杂交到完全匹配的探针。选择非常严格的条件为等于特定探针的 T_m 。在阵列上或在 Southern 或 Northern 印迹中滤膜上,互补核酸(具有超过 100 个互补残基)的杂交的严格杂交条件的一个例子是 42°C 使用标准杂交溶液(参见,例如 Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (2001))。

[0063] “STAT1”可以用于本文指位于人 2 号染色体上 q32 的转录 1 基因的信号转导蛋白和活化蛋白。Entrez Gene 和 Ensembl 细胞遗传学带是 2q32.3,而 HGNC 细胞遗传学带是 2q32.2-q32.3。STAT1 别名包括 STAT-1、ISGF-3、STAT91、转录因子 ISGF-3 组分 p91/p84、CANDF7 和转录 1- α/β 信号转导蛋白和活化蛋白。本文也使用“STAT1”指用于确定涉及 STAT1 的染色体异常诸如拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 STAT1 的参数,诸如 STAT1 的拷贝数、涉及 STAT1 的拷贝数比例或 STAT1 的百分比增加的探针,优选杂交到 2 号染色体的 q32 区域(2q32),其包含 STAT1 基因。DNA 参考序列包括但

不限于 NC_000002.11 和 NT_005403.17。

[0064] “靶序列”、“靶区域”和“核酸靶”指是位于其丢失和 / 或增加例如被确定的特定染色体位置的核苷酸序列。

[0065] “TERC”可在本文中用来指所述端粒酶 RNA 组分。Ensembl 和 HGNC 细胞遗传学带是 3q26.2, 而 Entrez Gene 细胞遗传学带是 3q26。别名包括 TR、TRC3、小卡哈尔体特异性 RNA 19、DKCA1、PFBMFT2、SCARNA19 和 hTR。“TERC”也用于本文指用于确定涉及 TERC 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 TERC 的参数的探针优选杂交到 3 号染色体的 q26 区域(3q26), 其包含 TERC 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000003.11、NC_018914.2 和 NT_005612.16。

[0066] “治疗性诊断”在本文中用来指这样的方法, 诸如诊断测试, 特别是采用 ISH 诸如 FISH 的诊断测试, 用于为患者定制治疗。通过治疗性诊断可以评价药物对于特定患者的治疗的适用性。此外, 可以评价患者用药物治疗的效力。

[0067] “ZNF217”可在本文中用于指锌指蛋白 217。Entrez Gene、Ensembl 和 HGNC 细胞遗传学带是 20q13.2。别名是 ZABC1。“ZNF217”也用于本文指用于确定涉及 ZNF217 的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 ZNF217 的参数的探针优选杂交到 20 号染色体的 q13 区域(20q13), 其包含 ZNF217 基因。参考 DNA 序列包括 NC_000020.10、NT_011362.10 和 NC_018931.2。

[0068] 本文所用的术语学目的仅在于描述特定实施方案, 并且不以其它方式意图是限制性的。

[0069] 细胞的制备方法

提供了制备细胞样品的方法。可以从包含组织或细胞团块的任何合适的患者样本制备细胞样品。典型地, 患者标本通过诸如细针抽吸(FNA)、芯针活检、切除活检、切除、灌洗(例如, 支气管灌洗)、刷涂, 等获得。还典型地, 患者样本可以是固定和包埋的、固定但不包埋的、部分固定的(例如, 在防腐剂如 PreservCyt® 中, 其是由 Hologic Inc., Marlborough, MA 制造的甲醇-水、缓冲防腐剂溶液)、冷冻的(例如, 新鲜冷冻), 或新鲜的。优选地, 患者样本通过 FNA、芯针活检、切除活检或切除获得。包含细胞团块(即, 聚集体或聚集)的组织样本或样本, 在某些情况下也可以通过灌洗并涂刷获得。优选地, 患者样本未包埋并且是(a) 新鲜的、(b) 解冻的, 新鲜冷冻的, 或(c) 部分地固定的, 因为本公开的一个目标是从患者获得样本后尽可能快(诸如在小于约 14 小时)用探针获得杂交的结果, 诸如 ISH (例如 FISH) 特别是多重 ISH (例如, 多重 FISH), 或与抗体结合(如在 IHC 中)。鉴于上述, 优选并且甚至期望在从患者获得样本后尽可能快(例如立即)地从患者样本制备细胞样品。如上所示, 通过避免使用包埋的样本, 可以避免包埋样本的切片有关的截断假象。

[0070] 方法包括解聚包含组织或细胞团块的患者样本。可以通过任何合适的方法解聚组织或细胞团块。优选地, 所述方法包括使用离心或细胞滤器。

[0071] 在一个实施方案中, 所述方法包括润洗患者样本, 所述样本可以是新鲜样本、融化的新鲜冷冻样本或部分固定的样本。优选地所述样本在环境温度(例如室温)下在平衡盐溶液中润洗, 所述溶液的组成在室温下维持 pH 和渗透压平衡并提供水和必需的无机离子(例如钠、钾、钙、镁和氯)。平衡盐溶液的实例包括, 但不限于, Hank 氏平衡盐溶液(购自 Life Technologies™ (Carlsbad, CA))、阿氏溶液、厄尔氏平衡盐溶液、Gey 氏平衡盐溶液、

Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水、Puck 氏平衡盐溶液、Ringer 氏平衡盐溶液、西姆氏平衡盐溶液、TRIS 缓冲盐水和台氏 (Tyrode's) 平衡盐溶液。优选的平衡盐溶液是 Hank 氏平衡盐溶液。润洗后,将样本浸泡在包含还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT) 和螯合剂诸如乙二胺四乙酸 (EDTA) 的平衡盐溶液中,诸如 Hank 氏平衡盐溶液。优选地,包含还原剂和螯合剂并有样本浸泡于其中的平衡盐溶液是预加温的。润洗和浸泡后,样本转移到新鲜的平衡盐溶液诸如 Hank 氏平衡盐溶液中,所述溶液包含还原剂诸如 DTT,钙离子来源诸如氯化钙和极性非质子溶剂,诸如二甲亚砜 (DMSO),并迅速混合,诸如约 5 秒至约 10 秒。

[0072] 在这时,将样本解聚,例如离心或过滤。如果离心,将所述样本在低速旋转(诸如 1000xg)以沉淀解聚的细胞。解聚的细胞将在若干分钟内沉淀,诸如少于约 15 分钟,诸如在约 10 分钟内。离心后,丢弃上清液,并且将沉淀的细胞重悬在残留上清液中。重悬的细胞置于固定液中,诸如包含缓冲剂、防腐剂和醇例如甲醇或乙醇、PreservCyt® 等的水溶液。如果过滤,则样本通过细胞滤器过滤,诸如可购自 Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 的细胞滤器,并且过滤的细胞置于固定液中,例如包含缓冲剂、防腐剂和醇例如甲醇或乙醇、PreservCyt® 等的水溶液。重悬的细胞允许处于固定液中一段时间,诸如若干分钟(例如约 15 分钟、约 30 分钟、或约 45 分钟)至多约 1 小时。

[0073] 在这时,重悬的细胞可以被施加到细胞支持物的表面。可以使用任何合适的细胞支持物。合适的细胞支持物的实例包括,但不限于,细胞学载玻片、细胞离心涂片器 (cyto-spin)、Tethis 载玻片和微流体相机。细胞支持物可以包含两个或更多个诸如多个(例如,3 个、4 个、5 个、6 个或更多个)离散的区域,其可以适用于核酸杂交和可视化。离散区域的实例包括凹腔,例如凹槽、孔、腔室等。重悬的细胞分配到两个或更多个诸如多个离散的区域使得能够在细胞支持物上用探针进行多重杂交,诸如 ISH,例如多重 FISH 和 / 或用抗体结合(诸如在 IHC 中)。杂交结果可以手动进行可视化(前提条件是在标记中使用的荧光团不是远红荧光团,其对于人眼是不可见的),或使用任何合适的成像系统。可商购获得的成像系统的实例包括但不限于可购自 Bioview, Inc. (Billerica, MA) 和 ASI 的那些成像系统。

[0074] 因此,鉴于上述,提供了从包含组织或细胞团块的患者样本制备细胞的方法。所述方法包括:

- (i) 在含有还原剂和螯合剂的预加温的平衡盐溶液中浸泡患者样本;
- (ii) 转移患者样本到包含还原剂、钙离子来源和极性非质子溶剂新鲜的平衡盐溶液中并混合;
- (iii) 从新鲜的平衡盐溶液中移除患者样本并(a) 离心溶液以使解聚的细胞沉淀或(b) 过滤溶液以收集解聚的细胞;和
- (iv) 在(iii) (a) 之后,丢弃上清液,重悬在残留上清液中的沉淀细胞,并将重悬的细胞置于固定剂中,或在(iii) (b) 后,将过滤的细胞置于固定剂中。患者样本可以是(a) 新鲜样本,(b) 融化的新鲜冷冻样本,或(c) 部分固定的样本。所述方法可以进一步包括在(i) 之前在平衡盐溶液中润洗患者样本。

[0075] 在优选的实施方案中,所述方法包括在室温下在 Hank 氏缓冲液中润洗患者样本诸如腺瘤样品,在 37°C 在含有 20mM DTT 和 5mM EDTA 的预加温 Hank 氏缓冲液中浸泡患者样本约 5 分钟,将润洗和浸泡的患者样本转移到含有 20mM DTT、5mM 的 CaCl_2 和 10% DMSO

的新鲜 Hank 氏缓冲液中,并混合约 5 秒至约 10 秒,从新鲜 Hank 氏缓冲液移除患者样本,并且(a)在约 $1000 \times g$ 离心该溶液约 10 分钟以沉淀解聚细胞或(b)过滤溶液以收集解聚的细胞,并且,或者在离心后,丢弃上清液,重悬残留上清液中沉淀的细胞,并将重悬的细胞置于溶液中,或者在过滤后,将过滤的细胞置于溶液中,其中所述溶液包含从约 30wt. % 至约 60wt. % 的甲醇、从约 40wt. % 至约 70wt. % 的水、缓冲剂和防腐剂,并且其中所述溶液在室温下保持过夜。

[0076] 所述方法可以进一步包括(v)将细胞施加到细胞支持物上。如果细胞支持物是细胞学载玻片,该方法可以进一步包括:(vi)在水-醇溶液中浸泡载玻片,(vii)固定剂中浸泡载玻片,及(viii)干燥载玻片。水-醇溶液可以是 95% 的乙醇,并且可以在乙醇中在室温下浸泡约 15 分钟。固定剂可以是 Carnoy 氏溶液,可以在室温下将载玻片浸泡在 Carnoy 氏溶液中约 30 分钟。可以在室温下干燥载玻片。

[0077] 细胞支持物

还提供了包含从患者样本制备的细胞(诸如根据上述方法分离自腺瘤样品的细胞)的细胞支持物,诸如细胞学载玻片、细胞离心涂片器、Tethis 载玻片和微流体相机。所述细胞可以手工或通过使用仪器诸如 ThinPrep T-2000 加工仪(Hologic, Inc., Marlborough, MA)或另一种可商购获得的仪器施加到细胞支持物上。所述细胞支持物可以包含两个或更多个诸如多个(例如,3 个、4 个、5 个、6 个或更多个)离散的区域,其可以适用于 ISH(或 IHC)和可视化,用于根据上述方法从患者样本制备的细胞的施加。离散区域的实例包括凹腔,例如凹槽、孔、腔室等。在优选实施方案中,所述细胞支持物包括至少 6 个离散的区域。优选地,并且甚至是期望地,在每个离散区域中的细胞与至少一个可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以作为不同的探针被区分。优选地,离散区域的直径使得每个离散区域可以以其整体用成像系统观察。还优选地,在离散区域之间存在距离,并且所述距离使得在一个离散区域中由可检测标记诸如荧光标记产生的信号不会干扰在一个或多个邻近离散区域中可检测标记诸如荧光标记产生的信号的可视化。在这方面,可以选择可检测标记使得在邻近区域的可检测标记发射在不同波长的信号或荧光,其可视化彼此不会干扰。离散区域之间的距离不应太大以使得细胞支持物使用麻烦和/或与成像系统(如果使用成像系统的话)不相容。

[0078] 可以将细胞施加到细胞支持物诸如细胞学载玻片的表面,并且可以将细胞支持物在环境温度(即室温)下浸泡在醇-水溶液诸如 95% 乙醇中若干分钟,诸如约 15 分钟。之后,可以将细胞支持物在环境温度(即室温)浸泡在上述固定液诸如 Carnoy 氏液(其是 3:1 的甲醇:乙酸)中约 30 分钟,并干燥,诸如室温下。

[0079] 如果期望,细胞支持物诸如载玻片可以储存在 -20°C 直至使用。但是,优选并且甚至是期望地,所述细胞支持物立即使用,因为本公开的目标是在从患者获得样本后尽可能快地(诸如在小于约 14 小时内)获得 ISH(即,FISH),特别是多重 ISH(例如,多重 FISH)的结果。

[0080] 因此,鉴于上述,提供了细胞支持物,在其表面是细胞,所述细胞已根据本文所述方法与可检测标记的探针接触。所述细胞支持物包括至少两个离散区域并且所述细胞已被施加到离散区域,在这种情况下,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。例如,

各离散区域可以分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离(break-apart) 探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针、和用于 9p21 的基因座特异性探针,
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP, 或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

[0081] 原位杂交和免疫组织化学

提供了进行原位杂交 (ISH) 或免疫组织化学 (IHC) 的方法。所述方法包括在从患者移除样本小于约 14 小时内例如 13.5 小时内,使已经根据上文所述方法制备的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触,并可视化所述可检测标记。在一个实施方案中,所述方法在从患者移除样本小于约 14 小时内例如 13.5 小时内,使已从选自下列的样本解聚的细胞在杂交条件下与可检测标记的探针接触,并可视化所述可检测标记:细针抽吸、芯针活检、切除活检和手术切除。可检测标记的探针是可检测标记的核酸探针,诸如荧光标记的核酸探针,或可检测标记的抗体,诸如荧光标记的抗体(或其抗原反应性片段)探针。关于上述方法,例如,当使用基于寡聚的探针时,杂交和可视化可以在基本上少于约 14 小时诸如约 6.5 小时内发生。

[0082] 优选地,细胞已被施加到细胞支持物。优选地,所述细胞支持物包括至少两个离散区域并且所述细胞已被施加到离散区域,在这种情况下,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。所述离散区域可以分别与任何合适的可检测标记的探针接触。例如,各离散区域可以分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离(break-apart) 探针和用于 ROS1 的双色分离探针,

- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针，
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针，
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针，
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针，
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP，
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP，
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP，
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP，
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针、和用于 9p21 的基因座特异性探针，
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP，
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP，
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP，
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP，或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

[0083] 可以使用本领域已知的任何合适的检测方法进行上述方法。当在相同样品上同时或顺序使用两种或更多探针时，优选每种探针用不同标记物诸如不同荧光团可检测地标记。

[0084] 当通过原位杂交进行上述方法时，其中每种探针被可检测地标记（并且，当在相同样品上同时或顺序使用两种或更多探针时，不同地标记），诸如通过 FISH，其中每种探针用荧光团标记（并且，当在相同样品上同时或顺序使用两种或更多探针时，不同地标记），所述方法可以用根据本文所述方法从患者样本（诸如腺瘤）制备的细胞（诸如上皮细胞）进行。患者样本可以是（a）新鲜的（新鲜细胞可以培养 1-3 天并且可以向培养物添加阻断剂诸如秋水仙胺以在中期阻断细胞，在此期间染色体是高度凝聚的，并且可以被可视化），（b）融化的新鲜冷冻的，或（c）部分固定的（例如，在甲醇、乙醇或 PreservCyt® 中固定的），处理（例如用 RNase 和胃蛋白酶）以增加靶核酸（例如，DNA）的可接近性并减少非特异性结合，并然后经历与一种或多种探针杂交、洗涤去除任何未结合的探针和检测杂交的探针。

[0085] 可以使用 ThinPrep T-2000 处理器 (Hologic, Inc., Bedford, MA) 根据制造商的说明书制备细胞支持物诸如细胞学载玻片。载玻片可以在 73 °C 置于 2xSSC 中 2 分钟，与胃蛋白酶 (0.5 mg/mL) 一起在 37 °C 孵育 10 分钟，在室温下置于 1xPBS (磷酸缓冲盐水) 中 5 分钟，在室温下 1%NBF (中性缓冲的福尔马林) 中 5 分钟，以及在室温下 1xPBS 中 5 分钟。可以将载玻片置于 70% 乙醇、85% 乙醇和 100% 乙醇中各 1 分钟并然后风干来进行脱水。可以施加探针和盖玻片，密封盖玻片，并且将载玻片在 ThermoBrite 在 72°C 共变性 2 分钟并在

37°C 杂交至多 8 小时。完成杂交后,然后将载玻片在 73°C 用 0.4 x SSC/0.3% NP-40 处理 2 分钟和在室温用 2xSSC/0.1% NP-40 处理 1 分钟,并然后风干,用 4'6' 二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐水合物(DAPI) I 防褪色溶液(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) 封固,并用盖玻片覆盖。

[0086] 用如上述一种或多种探针使用上述细胞支持物的杂交可以在 37°C 在自动共变性仪器(HYBrite 或 ThermoBrite 变性/杂交系统, Abbot Molecular, Inc., Des Plaines, IL) 中根据制造商的说明书(这些方法通常涉及探针和靶核酸的变性)进行至多 8 小时。杂交后,细胞支持物例如细胞学载玻片可以在室温下置于洗涤缓冲液(2x 柠檬酸钠盐水/0.3%NP40,可获自 Abbott Molecular, Inc.)中 2-10 分钟以去除盖玻片并然后在 73 °C 浸没到洗涤缓冲液中 2 分钟,干燥并用 DAPI I 防褪色溶液(Abbott Molecular, Inc.)封固。优选地,细胞支持物,例如细胞学载玻片用装备有单带通滤光器的落射荧光显微镜(Abbott Molecular, Inc.)分析。

[0087] 检测前,任选地可以基于明显的细胞学异常预先选择细胞样品。预选择标识疑似细胞,由此允许筛选集中于那些细胞。预选择允许更快筛选并增加阳性结果不会被遗漏的可能性。来自生物学样品的细胞可以置于显微镜载玻片上并可视扫描通常与发育异常和肿瘤细胞相关的细胞学异常。这些异常包括核大小、核形和核染色中的异常,如通过用核酸染色剂或染料诸如碘化丙啶或 DAPI I 复染核所评价的,通常在探针杂交到它们的靶 DNA 之后。通常,肿瘤细胞含有增大、形状不规则和 / 或显示斑驳的染色模式的核。碘化丙啶通常以约 0.4 μg/ml 至约 5μg/ml 的浓度使用,是发红色荧光的 DNA 特异性染料,其可以在 614nm 波长的发射峰观察到。DAPI 通常以约 125 ng/ml 至约 1,000 ng/ml 的浓度使用,是发蓝色荧光的 DNA 特异性染色剂,其可以用低倍 DAPI 滤光器在 452nm 波长的发射峰观察到。在此情况下,仅预选择用于检测的那些细胞对染色体丢失和 / 或增加进行计数。优选地,以至少 100 个的量级的预选择的细胞,并且当使用 DAPI 滤光器似乎存在很多具有异常核的细胞时,优选更多的细胞被选择用于评价染色体丢失和 / 或增加。

[0088] 可选地,证明一些水平的发育异常或疑似病变的组织中的区域可以使用低倍 DAPI 滤光器定位,并且彻底检查包含异常拷贝数的任何探针的核的存在。在正常细胞中,将检测到两个拷贝的给定探针。在异常细胞中,将检测到更多或更少拷贝的给定探针。优选选择具有最显著拷贝数变化的区域用于计数。只要有可能,就选择大量异常区域,并且在每个异常区域中,在高倍(64 x 或 100 x 物镜)下分析至少约 10 个随机的细胞核,以便分析至少约 100 个细胞核。优选地,细胞核是非重叠的并且包含足够亮的信号。

[0089] 可选地,可以独立于细胞学或组织学特征选择用于检测的细胞。例如,可以评价在给定区域或在显微镜载玻片上的区域中所有非重叠的细胞的染色体丢失和 / 或增加。作为进一步的实例,可以选择在载玻片上的细胞,例如显示改变形态的细胞,以至少约 50 的量级,并且更优选地至少约 100 的量级,以在显微镜载玻片上以连续量级出现的数目,用于评价染色体丢失和 / 或增加。

[0090] 计数基因 / 基因座 / 染色体的拷贝。如果希望,拷贝数可以与预期的或“正常”的拷贝数(即,2 个拷贝)进行比较,其中大于 2 (即,对于增加)的拷贝数和小于 2 (即,对于丢失)的拷贝数和 / 或相比基于 LSI 探针拷贝数与着丝粒探针(本文也称为着丝粒计数探针(CEP))的比较的相对丢失(视情况而定),通过 FISH 指示细胞为异常。存在超过 2 个拷贝的

两个或更多个基因座指示多体性。单个基因座的拷贝数增加,诸如超过两个拷贝的单个基因座,指示单个基因座增加。尽管脱石蜡、预处理、染色和常规载玻片洗涤也可以根据本领域已知的方法进行,但是使用自动化系统,诸如 VP2000 处理器(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)降低制备用于评价的载玻片所需的时间量。当使用标准科普林氏缸进行杂交后洗涤时,可以大批量(如,50 个载玻片),而不是小批量(例如,4 个载玻片)制备载玻片。此外,载玻片的评分可利用自动成像完全自动化,从而降低了样本分析所需的实际操作时间的量。完全自动化也使得能够更频繁和一致地使用捕获更多异常细胞的成像算法。而且,尽管可以使用本领域已知的任何合适的载玻片制备方法,优选使用 ThinPrep 2000 (Hologic, Inc., Bedford, MA) 制备载玻片,其产生更均一和一致的单层细胞。

[0091] 用于通过原位杂交和类似方法进行分析的核酸靶的变性通常以保存细胞形态的方式完成。例如,染色体 DNA 可以被高 pH、热(例如温度从约 70–95 °C)、有机溶剂(例如甲酰胺)和其组合变性。另一方面,探针可以通过热在若干分钟内变性。

[0092] 变性后,进行杂交。用于使探针特异性杂交到它们的核酸靶的条件通常包括在给定的杂交程序中可以采用以产生特异杂交物的条件的组合,其条件可以被本领域普通技术人员容易地确定。这些条件通常包括受控的温度,液相和探针与靶的接触。杂交条件取决于很多因素变化,包括探针浓度、靶长度、靶和探针 G-C 含量、溶剂组成、温度和孵育持续时间。至少一个变性步骤可以在探针与靶接触之前。可选地,所述探针和靶彼此接触时可以一起经历变性条件,或随后探针与生物样品接触。可以如下实现杂交,例如后续在包含约 2–4 x SSC 和约 10–50% 甲酰胺的液相中孵育探针/样品,在约 25 至约 55°C 的温度范围,持续示例性地在约 0.5 至 96 小时范围的时间。为了增加特异性,可以使用封闭剂,诸如未标记的封闭核酸,如描述于美国专利号 5,756,696 (其内容通过引用以其整体并入本文,并且特别是使用封闭核酸的描述)。可以容易地采用其它条件用于特异性杂交探针到样品中存在的它们的核酸靶上,如本领域技术人员将容易显而易见的。杂交方案描述于,例如 Pinkel 等, PNAS USA 85: 9138–9142 (1988); *In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 33, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994); 和 Kallioniemi 等, PNAS USA 89: 5321–5325 (1992)。

[0093] 合适的孵育期完成后,可以通过系列洗涤将非特异性结合到样品 DNA 的染色体探针去除。适当地选择用于所需严格性的温度和盐浓度。所需严格性的水平取决于特定探针序列关于基因组序列的复杂度,并且可以通过系统地将探针杂交到已知遗传组成的样品来确定。通常,高严格洗涤可以在约 65 至约 80°C 的范围的温度下,约 0.2x 至约 2xSSC 和约 0.1% 至约 1% 非离子去垢剂诸如 Nonidet P-40 (NP40) 下进行。如果需要更低严格性的洗涤,可以在更低的温度用增加的盐浓度进行洗涤。

[0094] 当使用荧光标记的探针或探针组合物时,所述检测方法可以涉及荧光显微镜、流式细胞仪或其它用于确定探针杂交的工具。任何合适的显微镜成像方法都可以与本文所述方法结合使用用于观察多个荧光团。在采用荧光显微镜的情况下,可以在适用于激发每种荧光团的光下并使用适当的一种或多种滤光器查看杂交样品。可选地,可以使用自动数字成像系统诸如 MetaSystems, BioView 或 Applied 成像系统,连同信号计数和数据获得算法。

[0095] 取决于所采用的方法,可以使用数字图像分析系统帮助显示结果和改善检测荧光

强度中小的差异的灵敏性。示例性系统是 QUIPS (定量图像处理系统的缩写),其是基于标准荧光显微镜的自动图像分析系统,所述显微镜配备有自动载物台、聚焦控制和滤光轮(Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY)。滤光轮固定在显微镜的荧光激发路径中用于选择激发波长。分色镜中专门的滤光器(Chroma Technology, Brattleboro, VT)允许多种染料的激发而无图像配准移位。所述显微镜具有两个相机端口,其中一个具有增强型 CCD 相机(Quantex Corp., Sunnyvale, CA)用于灵敏的高速视频图像显示,其用于发现载玻片上令人感兴趣的区域,以及用于聚焦。另一个相机端口具有冷却的 CCD 相机(Photometrics Ltd., Tucson, AZ 的 200 型),其用于高分辨率和灵敏性的实际图像获得。冷却的 CCD 相机通过 VME 总线对接 SUN 4/330 工作站(SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA)。多色图像的整体获得使用图像处理软件包 SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Netherlands) 控制。

[0096] 治疗性诊断

还提供了用于治疗性诊断的方法。所述方法包括下列方法,诸如诊断测试,特别是采用 FISH 例如多重 FISH、采用上述细胞支持物的诊断测试,用于为患者定制治疗。通过治疗性诊断可以评价药物对于特定患者的治疗的适用性。此外,尤其是,可以评价患者用药物治疗的效力。例如,如果在从患者样本制备的细胞中询问的一个或多个基因座是异常的(例如,拷贝数增加或减少或易位等),则肿瘤可能对于活性剂是敏感的,所述活性剂诸如小分子、靶向的单克隆抗体(mAb)、靶向的多克隆抗体(pAb)或其它活性剂,在这种情况下,活性剂可以而且可能应该施用给患者。如果没有检测到指示对于活性剂敏感性的染色体异常,则患者可能对活性剂治疗不响应或响应不理想。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常的减少,则可以认为用该活性剂治疗患者是有效的。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常的增加,则可以认为用该活性剂治疗患者是无效的。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常没有变化,则可以认为或不认为用该活性剂治疗患者是有效的。

[0097] 在一个实施方案中,可以使用包含至少两个离散区域的细胞支持物。在根据上述方法制备的细胞已被施加到离散区域后,每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。例如,各离散区域可以分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离(break-apart)探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,

-- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针,

-- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,

-- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,

-- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,

-- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP, 或

-- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

[0098] 所有上述实施方案的细胞支持物都可以用于患者对根据本文所述方法的靶向酪氨酸激酶途径的活性剂响应的治疗性诊断。例如, 如果在从患者样本制备的细胞中询问的一个或多个基因座是异常的(例如, 拷贝数增加或减少或易位等), 则肿瘤可能对于活性剂是敏感的, 所述活性剂靶向酪氨酸激酶途径, 诸如小分子酪氨酸激酶抑制剂(TKI)、靶向的 mAb、靶向的 pAb 或其它活性剂, 在这种情况下, 活性剂可以而且可能应该施用给患者。如果没有检测到指示对于活性剂敏感性的染色体异常, 则患者可能对活性剂治疗不响应或响应不理想。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常的减少, 则可以认为用该活性剂治疗患者是有效的。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常的增加, 则可以认为用该活性剂治疗患者是无效的。如果在患者被用活性剂治疗后检测到染色体异常没有变化, 则可以认为或不认为用该活性剂治疗患者是有效的。可以根据上述方法评价患者对其响应的活性剂的实例包括但不限于, 克唑替尼、沃利替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0099] 如果患者具有结直肠腺瘤, 则可以使用包含至少五个离散区域的细胞支持物。在根据上述方法制备的细胞已被施加到离散区域后, 每个区域与至少一种可检测标记的探针接触, 并且, 如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触, 则可检测标记的探针可以被区分。例如, 第一区域与 EGFR 基因座特异性探针接触, 第二区域与 DCC 基因座特异性探针接触, 第三区域与用于 18 号染色体的 CEP 接触, 第四区域与用于 13q14(13 号染色体 q 臂上 14 号带) 的基因座特异性探针接触, 并且第五区域与 MYC 基因座特异性探针接触。如果希望, 第六离散区域与对于 STAT1 基因座特异性探针或 AURKA 基因座特异性探针接触。可选地, 第六离散区域可以与 STAT1 基因座特异性探针接触, 并且第七离散区域可以与 AURKA 基因座特异性探针接触。上述细胞支持物可以用于预测结直肠腺瘤复发风险和结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的风险。没有染色体异常指示结直肠腺瘤复发的低风险和 / 或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的低风险, 而增加的 EGFR 拷贝数指示结直肠腺瘤复发的风险增加和 / 或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的风险增加, DCC 相对 CEP18 的拷贝数的减少指示结直肠腺瘤复发的风险增加和 / 或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的风险增加, 并且 EGFR 拷贝数增加进一步组合 DCC 相对 CEP18 拷贝数减少、13q14 拷贝数增加以及 MYC 拷贝数增加指示结直肠腺瘤复发的高风险和 / 或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的高风险。STAT1 拷贝数增加和 / 或 AURKA 拷贝数增加指示结直肠腺瘤复发的风险增加和 / 或结直肠腺瘤进展为结直肠腺

癌的风险增加。

[0100] 已将根据上述方法制备的细胞施加在其表面上离散区域的细胞支持物还可以用于下列情况：

— 如果患者具有非小细胞肺癌(NSCLC)并且所述患者对于 ALK 测试阳性,则可以将克唑替尼(Xalkori®)施用于该患者。如果患者具有 NSCLC 并且所述患者对于 ROS1 测试阳性,则所述患者对用克唑替尼的治疗可以是抗性的或可以变成抗性的。

— 增加的 ASCL1 和 RET 表达可以是用于鉴定吸烟相关肺癌的成功预后生物标志物。

— AURKA 的过表达,最可能由于 AURKA 拷贝数增加和 / 或 20 号染色体异数,在大部分晚期上皮性卵巢癌中看到,并且可差异性影响基于紫杉烷和不基于紫杉烷的辅助治疗的响应(Lassmann 等, Clin. Cancer Res. 13(14): 4083-4091 (July 15, 2007))。AURKA 过表达与接受紫杉醇 / 卡铂治疗的患者中改善的总体生存和在接受不基于紫杉烷治疗的患者中更差的总体生存相关(Lassmann 等,同上)。已经表明在尿路上皮细胞中 AURKA 拷贝数的增加是用于膀胱癌的检测的有希望的生物标志物(Park 等, J. Nat'l Cancer Inst. 100(19): 1401-1411 (Oct. 1, 2008))。

— 如果患者具有慢性髓性白血病(CML),则所述患者将可能对于 BCR-ABL 基因融合测试阳性(>95%的情况),其由于 9 号染色体和 22 号染色体之间相互易位)。甲磺酸伊马替尼(市售为格列卫;也称为 STI-571),其是一种酪氨酸激酶抑制剂,施用于患者以抑制 ABL 蛋白,所述 ABL 蛋白在蛋白信号转导中活动过度。波舒替尼(市售为 Bosulif)被施用给患者,所述患者具有 CML 并且不能用其它治疗来治疗,或用其它治疗未能变得更好。达沙替尼(市售为 Sprycel®)被施用给患者,所述患者具有对 BCR-ABL 基因融合(费城染色体)阳性的慢性 CML,并且对之前的治疗可以是或可以不是抗性 / 耐受性。达沙替尼也被施用给患者,所述患者具有对于费城染色体阳性的急性淋巴细胞白血病(ALL),并且对先前的治疗有抗性 / 耐受性。尼罗替尼(市售为 TasisignTM)被施用给患者,所述患者对于费城染色体是阳性的,并且新近诊断为慢性 CML 或先前对于慢性 CML 进行过治疗。

— 如果患者具有 NSCLC 并且所述癌症过表达 FGFR1 或 FGFR2,则施用一种新颖的、选择性的 FGFR 抑制剂,称为 AZD4547,并且其靶向 FGFR1、FGFR2 和 FGFR3 (参见 Cancer Lett. 307(1): 47-52 (August 2011))。

— 如果患者具有乳腺癌并且所述癌症过表达 HER2/neu 受体,则施用的单克隆抗体药物称为曲妥珠单抗(商品名包括 Herclon 和赫赛汀),其干扰 HER2/ neu 受体。如果肿瘤不过表达 HER2/neu 受体,则不施用曲妥珠单抗。如果患者具有 HER2 阳性、转移性乳腺癌,先前接受单独或组合地曲妥珠单抗和紫杉烷,并且先前对于转移接受治疗或在完成辅助治疗期间或六个月内发生疾病复发,则施用 ado- 曲妥珠单抗 emtansine (Kadcyla; Genentech)。

— NTRK1 与正常远端基因(例如, MPRIP 或 CD74)的融合体已在具有肺腺癌的非吸烟者中发现(见 Vaishnavi 等, Nature Medicine 19: 1469-1472 (2013))。

— 如果患者具有癌症且过表达 RET,则施用克里唑啉尼(crizotinib) (Xalkori®) 或凡德他尼(ZD6474)。卡博替尼(Cabozantinib)(XL 184)目前在临床实验中(Cancer Sci. 104(11): 1396-1400 (2013年11月))。

— 如果患者具有癌症且过表达 ROS,则施用克里唑啉尼(crizotinib) (Xalkori®)。

[0101] 可以通过使在离散区域中的细胞接触标记的抗 CAM5.2 抗体(即, IHC)验证上皮细

胞的存在。

[0102] 因此,在治疗性诊断的其它方法中,提供了治疗性诊断患者对靶向酪氨酸激酶途径的活性剂响应的方法。所述方法包括在包含至少两个离散区域的细胞支持物上进行 ISH,已经将如本文所述制备的细胞施加到所述离散区域上。每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且,如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则可检测标记的探针可以被区分。各离散区域可以分别与可检测标记的探针的混合物接触,其中所述混合物包含:

- 用于 ALK 的双色分离(break-apart)探针和用于 ROS1 的双色分离探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 c-MET 的探针,
- 用于 ALK 的双色分离探针、用于 ROS1 的双色分离探针和用于 RET 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 NTRK1 的双色分离探针,
- 用于 RET 的双色分离探针和用于 KIF5B 的探针,
- 用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 AURKA 的探针、用于 9p21 的基因座特异性探针、用于 3 号染色体的 CEP、用于 6 号染色体的 CEP 和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 DCC 的探针、用于 13q14 的基因座特异性探针和用于 18 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 TERC 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 MYC 的探针、用于 HER2 的探针、用于 ZNF217 的探针、和用于 9p21 的基因座特异性探针,
- 用于 MCL1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 MET 的探针、用于 EGFR 的探针和用于 7 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR2 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 3 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 PTEN 的探针、用于 ERG 的探针和用于 10 号染色体的 CEP,
- 用于 FGFR1 的探针、用于 FGFR2 的探针、用于 FGFR2 的双色分离探针、用于 8 号染色体的 CEP 和用于 10 号染色体的 CEP,或
- 用于 MET 的探针、用于 PIK3CA 的探针、用于 EGFR 的探针、用于 7 号染色体的 CEP 和用于 3 号染色体的 CEP。

[0103] 在这方面,在任何治疗性诊断方法的情况下都可以使用本文所述的进行 ISH 和 IHC 的方法。鉴于本文所述方法伴随的优点,其在治疗性诊断情况下的使用,相对现有的方法提供了改进。

[0104] 上述方法可用于对用治疗剂治疗潜在反应性的评价、监测复发和预防或治疗性治疗的功效的评价。因此,该方法可以帮助治疗决定,诸如用于治疗或预防的治疗剂的选择、相对手术的积极监测或治疗的选择、以及采用包括其选择的辅助治疗的决定。如果需要的话,本文所述方法可以与其它测试,诸如常规细胞学、组织学、抗原测定、列线图、甲基化、突变等结合使用。该方法也可用于验证先前或同时用其它预后方法获得的结果。

[0105] 例如,如果,在进行预测患者中结直肠腺瘤的上述方法的过程中,确定存在 EGFR 拷贝数增加,则可以做出决定用抗 EGFR 剂治疗患者。例如,抗 EGFR 抗体,诸如帕木单抗(维

克替比),其是人 IgG2 单克隆抗体(mAb),其结合人 EGFR,并且据说已经证明阻断表皮生长因子(EGF)结合 EGFR 从而阻断受体信号传导,并抑制肿瘤细胞的活化和增殖(见,例如,国际专利申请公开号 W098/50433 和美国专利号 6,235,883),或西妥昔单抗(爱必妥),其为批准用于治疗 KRAS 基因突变阴性、表达 EGFR 的转移性结直肠癌的嵌合 mAb,可施用给患者以抑制腺瘤进展为腺癌和 / 或抑制腺瘤的复发。额外地或可选地,可以做出决定在约一年内在患者中进行随访结肠镜检查。

[0106] 类似地,如果在进行预测患者中结直肠腺瘤的上述方法的过程中,确定存在 DCC 拷贝数减少,则可以做出决定用替代治疗诸如不包含抗 EGFR 剂的抗癌治疗来治疗患者。这些替代治疗剂的实例包括,但不限于,氟尿嘧啶、顺铂、阿霉素和环磷酰胺。额外地或可选地,可以做出决定在约一年内在患者中进行随访结肠镜检查。

[0107] 同样,如果在患者上进行结肠镜检查过程中发现腺瘤并且去除一个或多个腺瘤性息肉,则上述方法可用于监测患者腺瘤复发。同样地,如果,在患者中进行预测结直肠腺瘤的上述方法的过程中,确定所述患者腺瘤复发的风险低,诸如当确定不存在染色体异常时,则可以做出决定在大约五年内在患者身上进行随访结肠镜检查。

[0108] 如果,在患者中进行预测结直肠腺瘤的上述方法的过程中,确定关于 CEP18 存在 EGFR、MYC 和 13q14 的拷贝数增加和 DCC 的拷贝数减少,则可以做出决定用抗 EGFR 剂,诸如 penitumumab 和 / 或西妥昔单抗,单独或与替代或辅助治疗组合来治疗患者,替代或辅助治疗诸如氟尿嘧啶、顺铂、阿霉素和 / 或环磷酰胺。额外地,可以做出决定在约 6 个月内在患者中进行随访结肠镜检查。还额外地或可选地,上述方法可以用于通过随时间周期性地执行该方法和随时间比较结果,诸如从一个时间点到随后的或在先的时间点,来评价治疗的效力。

[0109] 如果上述方法被用于评价从其获得测试样品的患者的治疗效力,则所述方法任选还包括:根据需要,修改患者的治疗性 / 预防性治疗以提高效力。该方法可适用于自动化系统或半自动化系统。

[0110] 一般来说,当监测疾病进展和 / 或治疗时,染色体异常(存在或水平)可以是“未改变”、“有利的”(或“有利地改变的”)或“不利的”(或“不利地改变的”)。“升高的”或“增加的”指从患者样本(例如腺瘤)获得的细胞(例如上皮细胞)样品中染色体异常的水平,其高于正常或典型水平或范围,或高于另一参考水平或范围(例如,早先或基线样品)。术语“降低的”或“减少的”指来自患者样本(例如腺瘤)的细胞(例如上皮细胞)样品中染色体异常的水平,其低于正常或典型水平或范围,或低于另一参考水平或范围(例如,早先或基线样品)。术语“改变的”指来自患者样本(例如腺瘤)的细胞(例如上皮细胞)样品中染色体异常的水平,其相比正常或典型水平或范围,或相比另一参考水平或范围(例如,早先或基线样品)是改变的(增加或减少的)。

[0111] 对于给定染色体异常的正常或典型水平或范围根据标准实践进行定义。因为染色体异常的水平在一些情况下会非常低,当与典型的或正常水平或范围比较存在任何净改变时,可以认为已发生了所谓的改变的水平或改变,其不能通过实验误差或样品变化来解释。因此,在特定样品中测量的水平将与在来自所谓正常受试者的类似样品中确定的水平或水平的范围进行比较。在此情况下,例如,“正常受试者”是不具有可检测的疾病的个体,并且“正常”或“对照”患者或群体分别是不展示可检测疾病的患者或群体。此外,由于在大部分

人群中通常不会高水平地发现染色体异常，“正常受试者”可以被认为是不具有实质上可检测的给定染色体异常的水平增加的个体，且“正常(有时称为“对照”)患者或群体是不展示实质上可检测的给定染色体异常的水平增加的患者或群体。“表面正常受试者”是其中染色体异常尚未被评价或正被评价的受试者。当给定染色体异常通常无法检测但是在测试样品中检测到时以及当分析物以高于正常的水平存在于测试样品中时，该给定的染色体异常的水平被称为“升高的”。

[0112] 方法还包括其它标志物的检测等。

[0113] 因此，当在患者中监测状况诸如癌症(例如腺癌)的治疗效力时，所述方法可以包括下列步骤：

(a) 在用治疗剂治疗之前，确定来自受试者的患者样本(例如，腺癌)的细胞(例如，上皮细胞)的样品中染色体异常；

(b) 在用所述治疗剂治疗之后，确定来自所述受试者的患者样本(例如，腺癌)的细胞(例如，上皮细胞)的后来的样品中染色体异常的水平；和

(c) 比较如步骤(b)中确定的染色体异常的水平与如步骤(a)中确定的染色体异常的水平，其中如果当相比步骤(a)中确定的水平，步骤(b)中的水平是未改变的或不利的，则确定所述状况，诸如癌症(例如，腺癌)在受试者中已继续，进展或恶化。通过比较，如果当与如步骤(a)中确定的水平比如时如步骤(b)中确定的水平是有利的，则所述状况，诸如癌症(例如，腺癌)在所述受试者中可能已经中断，消退或改善。任选地，所述方法进一步包括如果所述比较显示如步骤(b)中确定的水平，例如，相对步骤(a)确定的水平是不利的改变，则例如用一种或多种其它治疗剂、放射和/或激素治疗来治疗受试者一段时间。本领域技术人员可以确定受试者治疗的时间段(例如，时间段可以从约七(7)天至约两年，优选从约十四(14)天至约一(1)年)。

[0114] 在治疗过程中，随后从受试者获得第二和后续的腺癌细胞样品。样品的数目和其中从受试者获得所述样品的时间不是关键的。例如第二样品可以在受试者第一次治疗后七(7)天获得，第三样品可以在受试者第一次治疗后两(2)周获得，第四样品可以在受试者第一次治疗后三(3)周获得，第五样品可以在受试者第一次治疗后四(4)周获得等。

[0115] 在每个第二或后续样品从受试者获得后，确定在第二或后续样品中染色体异常的水平(例如使用本文所述方法或如本领域已知方法)。在每个第二和后续样品中确定的水平然后与如第一样品(例如，初始任选地与预定水平比较的样品)中确定的水平进行比较。如果当与如步骤(a)中确定的水平比较时如步骤(c)中确定的水平是有利的，则所述状况，诸如癌症(例如，腺癌)可能已经中断，消退或改善，并且受试者应当继续被治疗。但是，当与如步骤(a)中确定的水平比较时如果在步骤(c)中确定的水平未改变或不利的，则所述状况，诸如癌症(例如，腺癌)确定为已经继续，进展或恶化，并且所述受试者应当例如用更高剂量的药物组合物、放射或激素治疗，或者所述受试者应当被不同地治疗。

[0116] 通常，对于其中可以完成重复测试的测定(例如监测疾病进展和/或对治疗的响应)，在第一测试样品已从受试者获得之后的时间内定期获得第二或后续测试样品。具体而言，可以在第一测试样品已从受试者获得之后几分钟、几小时、几天、几周或几年从受试者获得第二测试样品。例如，第二测试样品可以以下列时间段从受试者获得：在获得来自受试者的第一测试样品后约1分钟、约5分钟、约10分钟、约15分钟、约30分钟、约45分钟、约

60 分钟、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 10 小时、约 11 小时、约 12 小时、约 13 小时、约 14 小时、约 15 小时、约 16 小时、约 17 小时、约 18 小时、约 19 小时、约 20 小时、约 21 小时、约 22 小时、约 23 小时、约 24 小时、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 9 周、约 10 周、约 11 周、约 12 周、约 13 周、约 14 周、约 15 周、约 16 周、约 17 周、约 18 周、约 19 周、约 20 周、约 21 周、约 22 周、约 23 周、约 24 周、约 25 周、约 26 周、约 27 周、约 28 周、约 29 周、约 30 周、约 31 周、约 32 周、约 33 周、约 34 周、约 35 周、约 36 周、约 37 周、约 38 周、约 39 周、约 40 周、约 41 周、约 42 周、约 43 周、约 44 周、约 45 周、约 46 周、约 47 周、约 48 周、约 49 周、约 50 周、约 51 周、约 52 周、约 1.5 年、约 2 年、约 2.5 年、约 3.0 年、约 3.5 年、约 4.0 年、约 4.5 年、约 5.0 年、约 5.5 年、约 6.0 年、约 6.5 年、约 7.0 年、约 7.5 年、约 8.0 年、约 8.5 年、约 9.0 年、约 9.5 年、约 10.0 年。

[0117] 此外,本公开还涉及确定易患或患有状况,诸如癌症(例如腺癌)或腺瘤的受试者是否将受益于治疗的方法。具体而言,本公开涉及伴随诊断方法和产品。因此,如本文所述“监测受试者中疾病治疗”的方法进一步最优还可以包括对于治疗选择或鉴定候选者。通常,受试者是经历疾病的一些症状或实际已诊断为患有这样的疾病或具有这样的疾病的风险,和/或展示不利的染色体异常水平的受试者,如本文所述。

[0118] 所述方法任选地包括如本文所述测定,其中在受试者治疗之前或之后评价染色体异常的水平。治疗之后不利的染色体异常水平的观察结果证实受试者将不会受益于接受进一步或继续的治疗,而治疗之后有利的染色体异常水平的观察结果证实受试者将会受益于接受进一步或继续的治疗。此证实有助于临床研究的管理和提供改善的患者护理。

[0119] 探针

ALK 探针的一个实例是 Vysis LSI ALK 双色分离重排探针,其可获自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL。所述探针(其杂交 ALK 基因的 3')的一部分是 ~300 kb。探针(其杂交 ALK 基因(3'端))的另一部分约 ~442 kb。

[0120] CDKN2 探针的一个实例是 Vysis LSI CDKN2A 橙色光谱 /CEP 9 绿色光谱探针组。CDKN2a 橙色光谱探针是 ~222 kb。

[0121] 用于 ERG 的分离探针可获自 Empire Genomics (Buffalo, NY)。所述探针的橙色部分是 ~181 kb,而所述探针的绿色部分是 ~189 kb。另一种分离探针(split probe),其采用德克萨斯红和 FITC,可获自 Abnova (Walnut, CA)。

[0122] FGFR1 FISH 探针,其是橙色的,可获自 Empire Genomics。所述探针是 ~193 kb。

[0123] FGFR2 FISH 探针,其是橙色的,可获自 Empire Genomics。所述探针是 ~174 kb。

[0124] HER2 探针的一个实例是 LSI HER-2,其可获自 Abbott Molecular, Inc。所述探针是橙色的并且是 ~190 kb。

[0125] MET 探针的一个实例是 LSI Met SpectrumRed,其可获自 Abbott Molecular, Inc。所述探针是红色的并且是 ~456 kb。

[0126] MCL1 FISH 探针可以 5 种不同颜色获自 Empire Genomics。

[0127] NTRK1 分离探针可获自 Abnova。一种探针用德克萨斯红标记并且是 ~420 kb,而另一种探针用 FITC 标记并且是 ~780kb。

[0128] PIK3CA 探针的一个实例是获自 Abbott Molecular Inc. 的 LSI PIK3CA

SpectrumGreen 探针。所述探针是 ~760 kb。

[0129] PTEN 探针的一个实例是获自 Abbott Molecular Inc. 的 LSI PTEN SpectrumOrange 探针。所述探针是 ~368 kb。

[0130] RET 分离探针可获自 Abbott Molecular, Inc.。一种探针是红色和 ~469 kb。另一种探针是绿色和 ~545 kb。

[0131] ROS 探针的一个实例是获自 Abbott Molecular Inc. 的 LSI ROS1 (Tel) SpectrumOrange 探针。所述探针是 ~317 kb。

[0132] TERC 探针的一个实例是获自 Abbott Molecular Inc. 的 LSI TERC SpectrumGold 探针。所述探针是 ~495 kb。

[0133] ZNF217 探针的一个实例是获自 Abbott Molecular Inc. 的 LSI ZNF217SpectrumOrange 探针。所述探针是 ~433 kb。

[0134] EGFR 探针的一个实例是 Vysis LSI EGFR, 其可获自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL。所述 EGFR 基因是 ~188 kb。所述探针在 5' 方向延伸超过基因 ~1 kb, 并在 3' 方向延伸超过基因 ~106 kb。整个探针是约 300 kb。

[0135] DCC 探针的一个实例是 Abnova DCC。Abnova DCC 由 Abnova Corporation, Taiwan 制造, 并由 by Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA 以目录号 89-028-963 经销。

[0136] 13q14 或 RB1 探针的一个实例是 Vysis LSI 13 (13q14), 其可获自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL。LSI 13 (13q14) 由包含 RB1 基因和侧翼区域的一组重叠的克隆组成。所述 RB1 基因是 180 kb。所述探针在 5' 方向延伸超过基因 110-170 kb, 并在 3' 方向延伸超过基因约 120 kb。整个探针大小约 440kb 并杂交到 7p11 区域。

[0137] MYC 探针的一个实例是 Vysis LSI MYC, 其可获自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL。所述 MYC 基因是 4.4 kb。所述探针在 5' 方向延伸超过基因 ~382 kb, 并在 3' 方向延伸超过基因 ~434 kb。整个探针约 821kb 并杂交到 8q24 区域。

[0138] STAT1 探针可以根据本领域普通技术人员已知的方法使用本领域已知的序列信息制备。参见, 例如登录号 NG_008294.1 的参考序列, 其可获自 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), 和 Haddad 等, Cytogenet. Cell Genet. 83(1-2): 58-59 (1998), 其被引入本文。额外的序列信息也可借助于 BAC 克隆 RP11-629B4 得到, 其可作为登录号 AC067945.4 获自 GenBank。

[0139] AURKA 探针的一个实例是 Vysis AURKA FISH 探针, 其可获自 Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL。

[0140] 用作染色体探针的合适的探针杂交到与染色体着丝粒相关的重复 DNA。灵长类动物染色体着丝粒包含 DNA 长串联重复序列的复杂家族, 其由长度约 171 碱基对 (bp) 的单体重复序列构成, 所述单体重复序列称为 α -卫星 DNA。染色体探针通常长度约 $50-1 \times 10^5$ 核苷酸。更长的探针通常包含长度约 100-500 核苷酸的更小片段。

[0141] 靶向染色体区域或亚区域的染色体计数探针 (CEP) 和基因座特异性探针可以商购获得或由本领域技术人员容易地制备。这些探针可以购自 Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL)、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) 或 Cytocell (Oxfordshire, UK)。例如染色体探针可以从下列制备: 蛋白质核酸 (PNA), 克隆的人 DNA 诸如包含人 DNA 序列插

入的质粒、细菌人工染色体(BAC)和P1人工染色体(PAC)。目标区域可以经由PCR扩增或克隆获得。在另一个实施方案中,所述染色体探针可以是寡聚探针。可替代地,染色体探针可以根据本领域已知方法合成制备。

[0142] 当希望靶向特定基因座时,可以优选沿靶向基因的全长杂交的探针,尽管不需要。可以设计基因座特异性探针以杂交到癌基因或肿瘤抑制基因,所述基因的遗传畸变与转移有关,例如MYC。

[0143] 可以通过本领域中已知的任何方法制备探针。可以合成或重组生产探针。这些探针长度范围可以从约25,000碱基对至约800,000碱基对。

[0144] 优选地,探针是可检测标记的,并且,当在相同样品上同时或顺序使用两种或更多种探针时,优选每种探针被不同地标记。优选地,所述探针用荧光团可检测标记。优选的荧光团的例子包括,但不限于,7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸(AMCA)、5-羧基-X-罗丹明、6-羧基-X-罗丹明、丽丝胺罗丹明B、5-羧基荧光素、6-羧基荧光素、荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸、四甲基罗丹明-5-异硫氰酸酯、四甲基罗丹明-6-异硫氰酸酯、5-羧基四甲基罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、7-羟基香豆素-3-羧酸、N-4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼杂-3 α ,4 α -二氮杂-3-苯并二茚丙酸、曙红-5-异硫氰酸酯、赤藓红-5-异硫氰酸酯、SpectrumRed™ (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumGold™ (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumGreen™ (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumAqua™ (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumOrange™ (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)、TEXAS RED (Molecular Probes, Inc.)、荧光黄和CASCADE蓝乙酰叠氮化物(Molecular Probes, Inc.)。所使用的具体标记物不是关键的;然而期望具体标记物不干扰探针的原位杂交和在任何其它探针上标记物的检测。希望标记物在尽可能低的拷贝数内是可检测的以最大化测定的灵敏度并且在高于任何背景信号是可检测的。还期望的是,所述标记物提供高度局部性的信号,由此提供高度空间分辨率。

[0145] 荧光团连接到核酸探针是本领域熟知的,并且可以通过任何已有手段完成。例如荧光团可以共价连接到特定核苷酸,并且使用标准技术将标记的核苷酸掺入探针,所述标准技术诸如切口平移、随机引发(Rigby等, J. Mol. Biol. 113: 237 (1997))、PCR标记、末端标记、通过特定残基的化学修饰直接标记等,所述残基诸如胞嘧啶残基(美国专利号5,491,224)。可选地,所述荧光团可以用活化的接头臂共价连接到已掺入探针的核苷酸,例如经由接头到探针的已经转氨基的脱氧胞苷核苷酸上。标记探针的方法描述于美国专利号5,491,224,和Morrison等, Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications, Chapter 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," pp. 21-40, Fan, Ed., Humana Press (2002),两者均关于它们的标记探针的描述通过引用并入本文。

[0146] 本领域技术人员将认识到可以使用其它试剂或染料代替荧光团作为含标记部分。发光试剂包括,例如,辐射发光、化学发光、生物发光和含磷光标记部分。可以用可见光检测的试剂包括花青染料。可选地,可以使用通过间接手段可视化的检测部分。例如,探针可以用生物素或地高辛使用本领域已知的常规方法标记,并然后进一步处理用于检测。含生物素探针的可视化可以经由后续缀合到可检测标志物的亲和素的结合来实现。所述可检测标志物可以是荧光团,在这种情况下可以如下所述实现探针的可视化和区分。

[0147] 杂交到靶区域的染色体探针可选地可以通过标记部分与用于产生不溶性颜色产物的合适底物的酶反应来可视化。通过选择不同标记部分,每种探针可以与套件内其它探针进行区分。组内含生物素的探针可以经由后续与缀合到碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)和适当底物的亲和素一起孵育而被检测。5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和硝基蓝四唑(NBT)充当底物用于碱性磷酸酶,而氨基苯甲酸充当用于 HRP 的底物。

[0148] 试剂盒

还提供了试剂盒。试剂盒包含(a)细胞支持物和/或用于 ISH 或 IHC 的至少一种探针,和(b)用于在细胞支持物上进行上文所述方法的说明书,所述细胞支持物包括至少两个离散的区域,如本文所述制备的细胞已被施加到所述区域上,在这种情况下每个区域与至少一种可检测标记的探针接触,并且如果一个区域与两种或更多种可检测标记的探针接触,则所述可检测标记的探针可以被区分。

[0149] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括(a)使得能够预测患者中结直肠腺瘤的一组探针,和(b)用于预测患者中结直肠腺瘤的说明书。因此,所述试剂盒可以包括(a)使得能够预测患者中结直肠腺瘤的一组探针,其中所述探针组包括下列或有由下列组成:EGFR 基因座特异性探针、DCC 基因座特异性探针、18 号染色体染色体计数探针(CEP18)、13q14 基因座特异性探针和 MYC 基因座特异性探针,和(b)用于预测患者中结直肠腺瘤的说明书,其中所述说明书包括确定从患者获得的结直肠腺瘤的样品(诸如细胞(例如上皮细胞)样品)中染色体异常的存在或不存在。所述探针组可以进一步包括一种或多种其它基因座特异性探针和/或着丝粒探针(CEP),诸如 STAT1 基因座特异性探针和/或 AURKA 基因座特异性探针。没有染色体异常指示结直肠腺瘤复发的低风险和/或结直肠腺瘤进展为结肠腺癌的低风险,而增加的 EGFR 拷贝数指示结直肠腺瘤复发的风险增加和/或结直肠腺瘤进展为结肠腺癌的风险增加,DCC 相对 CEP18 的拷贝数的减少指示结直肠腺瘤复发的风险增加和/或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的风险增加,并且 EGFR 拷贝数增加进一步组合 DCC 相对 CEP18 拷贝数减少、13q14 拷贝数增加以及 MYC 拷贝数增加指示结直肠腺瘤复发的高风险和/或结直肠腺瘤进展为结肠腺癌的高风险。STAT1 拷贝数增加和 AURKA 拷贝数增加指示结直肠腺瘤复发的风险增加和/或结直肠腺瘤进展为结直肠腺癌的风险增加。

[0150] 这种试剂盒还可以包括阻断剂或其它探针、有利于探针检测的各种标记物或标记试剂、用于杂交的试剂(例如,缓冲液)、中期展片(metaphase spread)等。

实施例

[0151] 下列实施例用于举例说明本公开。这些实施例并非意在以任何方式限制所要求保护的发明的范围。

[0152] 实施例 1

本实施例描述了上皮细胞从新鲜冷冻的结肠组织样品的分离和细胞来源的验证。

[0153] 冷冻的结肠组织样品在室温下融化。在室温下在 Hank 氏缓冲液中润洗组织。然后在 37°C 在具有 20mM DTT 和 5mM EDTA 的预加温 Hank 氏缓冲液中浸泡组织约 5 分钟。将组织转移到 10 mL Falcon 管中,所述管具有 2 mL 振荡溶液(在 4 °C 的具有 20 mM DTT、5 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂和 10% DMSO 的 Hank 氏缓冲液),并且将管旋涡振荡 5-10 秒。从 Falcon 管去除组织。上清液或者(i)通过细胞滤器过滤(诸如 100 μM 尼龙细胞滤器,可获自 Becton

Dickinson), 或者(ii)在 1,000 x g 离心 10 分钟以沉淀细胞, 之后丢弃上清液并将细胞用残留的上清液重悬。将细胞悬液转移到具有 20 mL PreservCyt® 溶液的 ThinPrep 小瓶中。细胞在室温下在 PreservCyt® 溶液中固定过夜。将小瓶储存在环境温度下直至制备载玻片。如果小瓶需要长期保存, 则将小瓶置于 2-8 °C。

[0154] 使用 ThinPrep T-2000 处理器根据制造商的说明书制备载玻片。将载玻片在 95% 乙醇中在室温下浸泡 15 分钟, 并且然后立即转移到 Carnoy 氏液(3:1 甲醇:乙酸固定剂)中在室温下 30 分钟。之后将载玻片在垂直位置在室温下干燥。如果载玻片需要长期保存, 则将载玻片置于 -20 °C 直至使用。

[0155] 上皮细胞从组织诸如新鲜的、新鲜冷冻的或福尔马林固定的、石蜡包埋的(FFPE)组织中的分离使用免疫荧光抗 CAM5.2 抗体根据下列程序进行验证。

[0156] 1. 用 1xPBS (磷酸缓冲盐水) 润洗载玻片。

[0157] 2. 向载玻片添加 100µL 制备在 PBS 中的 1% 新鲜封闭试剂(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), 并用封口膜覆盖。

[0158] 3. 在加湿盒中在 37°C 孵育载玻片 25 分钟。

[0159] 4. 去除封口膜并通过自来水冲洗将试剂从载玻片除去。

[0160] 5. 向载玻片施加 100 µL CAM5.2-FITC 抗体并用封口膜覆盖。

[0161] 6. 在加湿盒中在 37°C 孵育载玻片 1 小时。

[0162] 7. 在 1xPBST (含有 0.05% 吐温 -20 的 1xPBS) 中在 37°C 洗涤载玻片 5 分钟。重复两次。

[0163] 8. 施加 DAPI 并用盖玻片覆盖。

[0164] 9. 在常规荧光显微镜下用适当的滤光器查看载玻片。

[0165] 显微镜评价揭示 ≥ 95% 的分离的细胞是上皮来源。将所述上皮细胞平均分布在靶内, 并主要呈现为具有良好细胞与核形态学的单个细胞。

[0166] 实施例 2

本实施例描述在来自实施例 1 的载玻片上使用的荧光原位杂交(FISH)程序。

[0167] 将载玻片在 73°C 置于 2xSSC 中 2 分钟, 之后将载玻片与胃蛋白酶(0.5 mg/mL)在 37°C 一起孵育 10 分钟。后续地, 将载玻片在室温下置于 1xPBS 中 5 分钟, 室温下 1%NBF 中 5 分钟, 和室温下 1xPBS 中 5 分钟。通过将载玻片置于 70% 乙醇、85% 乙醇和 100% 乙醇中各 1 分钟来进行脱水并然后风干。将探针(10 µl)随后是盖玻片施加到载玻片上。盖玻片用橡胶胶水密封。载玻片在 ThermoBrite 中在 72 °C 共变性 2 分钟, 和在 37 °C 12-18 小时(过夜)。第二天用 0.4xSSC/0.3% NP-40 在 73 °C 处理载玻片 2 分钟, 和 2xSSC/0.1% NP-40 在室温下处理载玻片 1 分钟。载玻片然后风干, 用 DAPI I 防褪色溶液(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)封固并用盖玻片覆盖。

[0168] 杂交后, 使用具有 SpectrumGold™、SpectrumOrange™、SpectrumRed™、SpectrumGreen™、SpectrumAqua™和 DAPI 滤光器的荧光显微镜评价载玻片。如果其具有下列则认为细胞为染色体异常:

- i.) 每个细胞由 3 种或更多种信号代表的基因拷贝数增加,
- ii.) 和 / 或由一种或零个信号代表的基因拷贝数丢失,
- iii.) 和 / 或由 LSI 探针与 CEP 的比例小于 1.0 代表的相对丢失。

[0169] 在每个载玻片上指定靶区域中计数 50 个细胞,并且记录每种探针的拷贝数。

[0170] 在 6 个 CRC 样本和它们相应的正常邻近组织 (NAT) 上评价与结直肠癌 (CRC) 相关的 13 个基因组区域,以选择具有最高的染色体异常频率的 FISH 探针。基于此评价,选择 5 种候选探针 (EGFR 7p12、MYC 8q24、13q14、DCC 18q21 和 CEP18) 用于在诊断有结直肠腺瘤的 27 个冷冻组织样本组和 3 个正常邻近组织上进行额外的测试。对于 27 个测试的病例,11 名患者诊断有并发的结肠癌,而 16 名具有腺瘤的患者不具有并发的结肠癌。对于每个样本,由一个观察者记录 50 个细胞 / 核的 FISH 模式,并评价染色体异常细胞的数目。使用至少 10 个 FISH 异常细胞的截止点来对 FISH 阳性进行分类。当其相比 CEP18 对于 EGFR、MYC 和 13q14 探针具有拷贝数增加和对于 DCC 具有拷贝数丢失时,认为细胞是异常的。结果显示在结直肠腺瘤病例中鉴定了 4 个不同的 FISH 模式:所有四种探针不具有畸变(二体的);仅 DCC 基因丢失;仅 EGFR 基因增加;以及所有 4 种探针异常,即 MYC、13q14 和 EGFR 扩增和 DCC 缺失(参见表 1)。

[0171] 表 1

总腺瘤(27)	FISH 阴性	FISH 阳性		
	所有 FISH 探针正常	仅 DCC 丢失	仅 EGFR 增加	所有 FISH 探针异常
并发癌症(11)	9.1% (1/11)	36.4% (4/11)	18.2% (2/11)	36.4% (4/11)
无并发癌症(16)	62.5% (10/16)	0.0% (0/16)	18.8% (3/16)	18.8% (3/16)

[0172] 在此有限的样品组中,91% 的从具有并发的结直肠癌的患者获得的腺瘤样本被发现为 FISH- 阳性,而当从不呈现并发结直肠癌的患者获得时,仅 38% 的样本为 FISH- 阳性。

[0173] 该观察结果表明在腺瘤样本中不同遗传概况对于个性化医药可具有临床价值。不具有 FISH 异常(FISH 模式 1) 的患者可以具有最低的息肉复发和 / 或进展的风险,并且具有最佳预后,并且因此不需要治疗。对于这些患者可以推荐随访结肠镜检查,如 5 年后。相反,具有对所有探针结肠腺瘤息肉异常(FISH 模式 4) 的患者可以是处于息肉复发和 / 或进展的高风险中,并且因此,需要治疗(例如抗 EGFR 剂)。对于这些患者可以推荐随访结肠镜检查,如 6 个月后。EGFR 扩增(FISH 模式 2) 可以具有增加的息肉复发和 / 或进展的风险,并且因此,可以受益于靶向药物治疗(例如,抗 EGFR 剂)。对于这些患者可以推荐随访结肠镜检查,如 1 年后。具有单一的 DCC 基因丢失畸变(FISH 模式 3) 的患者的独特的组可以具有增加的息肉复发和 / 或进展的风险,并且因此,可以受益于另一种治疗并且可具有差的预后。对于这些患者可以推荐随访结肠镜检查,如 1 年后。

[0174] 说明书中提及的所有专利、专利申请公开物、杂志论文、教科书和其它公开物均指示所述公开内容涉及的本领域技术人员的水平。所有这些公开物通过引用并入本文,达到如同每个个别公开物具体和个别地被指示通过引用并入的相同程度。

[0175] 本文阐释性描述的本发明可以适当地在不存在本文没有具体公开的任何元件或限制的情况下实施。因此,例如,本文任何术语“包含”、“基本上由... 组成”和“由... 组成”的每个例子都可以用其它两个术语替换。类似地,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数方面,除非上下文清楚地另外指示。因此,例如提及“所述方法”包括本文所述的

和 / 或在本领域技术人员阅读本公开内容后将变得显而易见的一种或多种方法和 / 或类型的步骤。

[0176] 已经采用的术语和表达作为说明的术语并且不是限制的术语使用。在这方面,当某些术语在“术语”下列举并在“详述”中以其它方式定义、描述、解释或讨论时,所有这些定义、描述、解释和讨论都意在归于这些术语。在使用这些术语和表达中也没有意向排除所显示和描述的特征或其部分的任何等价形式。此外,当在“详述”中使用副标题,如“术语”时,这样的使用完全是为了便于参考,并无意将在一节中作出的公开内容限制仅限制在该节内;相反,在一个副标题下作出的任何公开内容都意在构成各个和每个其它副标题下的公开内容。

[0177] 应认识到,在所要求保护的发明的范围之内,各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管在优选实施方案和任选特征的情况下,本发明已具体公开,但是本领域技术人员可以将本文公开的概念诉诸修改和变化。这些修改和变化被认为在本文要求保护的本发明的范围之内。

专利名称(译)	细胞制备物和细胞支持物及其在治疗性诊断中的用途		
公开(公告)号	CN105209635A	公开(公告)日	2015-12-30
申请号	CN201480013265.3	申请日	2014-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培分子公司		
当前申请(专利权)人(译)	雅培分子公司		
[标]发明人	I 索科罗瓦 J 舒尔斯 O 科恩菲尔德 J 潘拉 M 宋 S 西泰罗 F 波利奇特 G 布朗 E 佩斯托瓦		
发明人	I.索科罗瓦 J.舒尔斯 O.科恩菲尔德 J.潘拉 M.宋 S.西泰罗 F.波利奇特 G.布朗 E.佩斯托瓦		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6806 C12Q1/6841 C12Q2537/16 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N1/30 G01N33/5091 G01N33/57419 G01N2001/305 C12Q2527/125 C12Q2543/10		
代理人(译)	杜艳玲		
优先权	61/786062 2013-03-14 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

从包含组织或细胞团块的患者样本制备细胞的方法；原位杂交（ISH）或免疫组织化学（IHC）的方法；治疗性诊断患者对靶向酪氨酸激酶途径的活性剂响应的方法；包括ISH或IHC方法的治疗性诊断方法的改进；细胞支持物，在其表面上是细胞，所述细胞已用ISH或IHC方法与可检测标记的探针接触；和试剂盒，所述试剂盒包含（a）细胞支持物和/或至少一种用于ISH或IHC的探针，和（b）用于在细胞支持物上进行ISH或IHC方法的说明书。

