

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201591304 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.01.29

(51) Int. Cl. G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.02.11

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА, ОБЛЕГЧАЮЩЕГО ТРАНСКРИПЦИЮ ХРОМАТИНА (FACT), ПРИ РАКЕ

(31) 61/763,266; 61/883,802

(32) 2013.02.11; 2013.09.27

(33) US

(86) PCT/US2014/015854

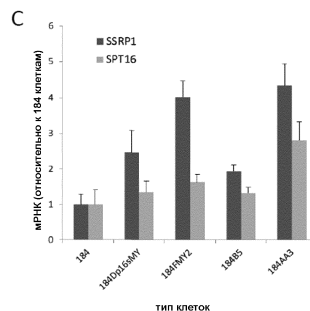
(87) WO 2014/124454 2014.08.14

(71) Заявитель:
ИНКУРОН ЭЛЭЛСИ (US)

(72) Изобретатель:
Гурова Катерина (US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Котов И.О., Буре Н.Н.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится inter alia к определению по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), для оценки опухоли, включая, например, определение агрессивности опухоли и назначение лечения.



A1

201591304

201591304

A1

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЛЕКСА, ОБЛЕГЧАЮЩЕГО ТРАНСКРИПЦИЮ ХРОМАТИНА (FACT), ПРИ РАКЕ

ПРИОРИТЕТ

[001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/763266, поданной 11 февраля 2013 г., и предварительной заявке на патент США № 61/883802, поданной 27 сентября 2013 г., содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящее изобретение относится, в частности, к способам, полезным для оценки опухолей в образцах, полученных от человека, и к способам выбора персонализированных схем лечения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Основным недостатком существующих на сегодня способов лечения рака является выбор активных агентов, подходящих для пациента. Как правило, предоставление пациенту недостаточно оптимальной химиотерапии приводит к безуспешному лечению, включая смерть, прогрессирование заболевания, излишнюю токсичность и высокие затраты на здравоохранение. Кроме того, некоторые пациенты реагируют лучше без назначения химиотерапии, при применении, например, неoadъювантной или адъювантной терапии и хирургического вмешательства.

[004] Были разработаны анализы для индивидуализации и оптимизации лечения рака, например, анализы реакции на химиотерапию, чтобы прогнозировать потенциальную эффективность химиотерапевтических агентов для данного пациента до их введения. Тем не менее, использование таких анализов не получило широкого распространения, в частности, из-за трудностей интерпретации данных клинически значимым образом. Например, считается, что многие такие анализы не подходит для обеспечения точных оценок выживаемости пациентов при использовании определенных схем лечения (*см., например, Fruehauf et al., Endocrine-Related Cancer 9:171-182 (2002)*).

[005] Таким образом, остается потребность в способах, полезных для оценки рака и связанных с ним заболеваний. В частности, существует потребность в способах, которые могут направлять планирование лечащим врачом лечения пациента с раковым заболеванием на основании знаний о характеристиках опухоли пациента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Таким образом, настоящее изобретение относится к способам оценки рака, включая, например, способы определения агрессивности рака и к использованию такой информации, чтобы направлять лечение пациента с раковым заболеванием.

[007] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ оценки опухоли, включающий определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках, который, необязательно, дополнительно включает стадию определения субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения процент злокачественных клеток, экспрессирующих FACT, определяют количественно и используют для определения пациентов в группы низкого или высокого риска.

[008] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ оценки опухолевой клетки, включающий определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках, который, необязательно, дополнительно включает стадию классификации опухолевой клетки как раковой стволовой клетки на основании наличия по меньшей мере одного компонента FACT.

[009] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение эффективного количества противоракового агента субъекту-человеку, при этом рак характеризуется наличием, отсутствием или уровнем по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее

клетках. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение противоракового агента для лечения рака, при этом рак характеризуется как FACT⁺.

[0010] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака, включающий (а) определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека (например, в злокачественном компоненте образца) или в культивированных из нее клетках; (b) определение субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT (например, в злокачественном компоненте образца); и (с) введение эффективного количества терапевтического средства субъектам-людям с оценкой FACT⁺. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение терапии для лечения рака, включающее (а) определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека (например, в злокачественном компоненте образца) или в культивированных из нее клетках; (b) определение субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT (например, в злокачественном компоненте образца); и (с) введение эффективного количества терапевтического средства субъектам-людям с оценкой FACT⁺.

[0011] Подробности настоящего изобретения изложены в прилагаемом ниже описании. Хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, иллюстративные способы и материалы описаны ниже. Другие свойства и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из описания и формулы изобретения. В данной спецификации и прилагаемой формуле изобретения считается, что формы единственного числа включают также множественное число, если только в контексте прямо не указывается иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту с обычной квалификацией в области техники, к которой принадлежит это изобретение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] На **Фиг. 1А, 1В и 1С** проиллюстрировано, что FАСТ повышается при трансформации *in vitro*, но не при иммортализации клеток-фибробластов человека и мыши.

[0013] На **Фиг. 1А** проиллюстрировано, что нормальные и иммортализованные фибробласты имеют сопоставимые уровни субъединиц FАСТ. Вестерн-блоттинг экстрактов опухоли (HT1080), нормальных человеческих (WI38) или мышинных (MEFwt) фибробластов и фибробластов человека, иммортализованных с использованием ферментативной субъединицы теломеразы (WI38-T) или фибробластов мыши от нокаутных по p53 животных (MEFp53KO), зондированных указанными антителами.

[0014] На **Фиг. 1В** проиллюстрирована экспрессия мутантного онкогена H-Ras12V в иммортализованных BJ-фибробластах человека, сопровождающаяся подъемом уровня субъединиц FАСТ. Вестерн-блоттинг экстрактов BJ-клеток с регулируемой тамоксифеном (TMX) экспрессией H-Ras12V.

[0015] На **Фиг. 1С** проиллюстрирована повышение SSRP1 в фокусах, образованных клетками, трансформированными с использованием онкогена H-RasV12. Клетки MEFp53KO инфицировали лентивирусом с кДНК H-RasV12 или контрольным пустым вирусом и позволяли им расти до слияния и образования фокусов. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к SSRP1 (зеленый цвет) различных областей плотности на планшетах с трансдукцией вирусом H-RasV12 или контрольным пустым вирусом. ДНК контрастно окрашивали Hoechst33342 (голубой цвет).

[0016] На **Фиг. 2А, 2В и 2С** проиллюстрировано, что уровни субъединиц FАСТ повышаются в процессе трансформации эпителиальных клеток молочной железы человека.

[0017] На **Фиг. 2А** проиллюстрировано иммунофлуоресцентное (ИФ) окрашивание первичных (184, 240L), иммортализованных (184Dp16sMY, 240Lp16sMY, 184B5) и полностью трансформированных (184FMY2, 184AA3) клеток антителами к SSRP1. Показаны ИФ и фазово-контрастные изображения тех же полей зрения.

[0018] На **Фиг. 2В** проиллюстрирован вестерн-блоттинг экстрактов одинаковых клеток, зондированных указанными антителами.

[0019] На **Фиг. 2С** проиллюстрирован анализ кПЦР мРНК SSRP1 и SPT16 в клетках панели 184.

[0020] На **Фиг. 3А** и **3В** проиллюстрирована экспрессия мРНК SSRP1 в разных образцах.

[0021] На **Фиг. 3А** проиллюстрирована точечная диаграмма всех проанализированных образцов (ось X) с нормализованными уровнями экспрессии (ось Y) анатомически и патологически упорядоченным образом. Цветные образцы (цвета согласно пояснениям в верхней части) представляют собой те, в которых тип ткани имеет стандартное отклонение уровня экспрессии 1 выше средней экспрессии всех тканей того же типа (здоровых, раковых или другого заболевания), или 90-й перцентиль экспрессии в ткани равен или более чем в 2 раза превышает интерквартильный диапазон и 75-й перцентиль того же типа. Тем не менее, анатомический или раковый тип не окрашен, если имеется меньше, чем десять информационных точек для каждого типа ткани.

[0022] На **Фиг. 3В** проиллюстрированы уровни мРНК SSRP1 в различных типах опухолей.

[0023] На **Фиг. 4А, 4В, 4С, 4D** и **Е** проиллюстрировано, что различные типы опухолей человека экспрессируют белок SSRP1. На панелях 4А-4D проиллюстрированы примеры иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания антителами к SSRP1 нормальных (N) и опухолевых (T) тканей различных видов рака.

[0024] На **Фиг. 4А** проиллюстрирован рак легких.

[0025] На **Фиг. 4В** проиллюстрирован рак толстого кишечника.

[0026] На **Фиг. 4С** проиллюстрирован рак поджелудочной железы.

[0027] На **Фиг. 4D** проиллюстрирован рак молочной железы.

[0028] На **Фиг. 4Е** проиллюстрировано соотношение образцов с экспрессией SSRP1 ("положительная" – означает >1, "высокая" означает >4) из всех образцов одного и того же органа, проанализированных среди видов рака различных органов.

[0029] На **Фиг. 5А, 5В, 5С, 5D** проиллюстрирована экспрессия мРНК SSRP1 и белка при раке молочной железы.

[0030] На **Фиг. 5А** проиллюстрированы диаграммы типа "ящик с усами" уровней мРНК SSRP1 в образцах нормальной молочной железы (1), при раке протоков молочной железы (2), долек молочной железы (3), медуллярном виде (4) и других видах (5) рака.

[0031] На **Фиг. 5B** проиллюстрированы образцы рака молочной железы, сгруппированные на основании сигнатуры экспрессии генов;

[0032] На **Фиг. 5C** проиллюстрированы образцы опухолей разных степеней злокачественности и стадий. Проиллюстрировано р-значение критерия Манна-Уитни-Вилкоксона между указанными образцами. Р-значения $>0,05$ не проиллюстрированы.

[0033] На **Фиг. 5D** проиллюстрировано сравнение доли SSRP1-положительных образцов среди пациентов в различных категориях рака молочной железы на основе ИГХ-окрашивания. Проиллюстрированы р-значения точного критерия хи-квадрата Фишера между различными категориями.

[0034] На **Фиг. 6A-6F** проиллюстрировано, что пациенты с SSRP1-отрицательными опухолями имеют лучшую общую выживаемость. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для всех видов рака и различных локализаций рака. Р-значение рассчитывали с использованием логарифмического рангового критерия.

[0035] На **Фиг. 6A** проиллюстрированы все проанализированные пациенты с раком.

[0036] На **Фиг. 6B** проиллюстрированы пациенты с раком легких.

[0037] На **Фиг. 6C** проиллюстрированы пациенты с раком протоков поджелудочной железы.

[0038] На **Фиг. 7A-7H** проиллюстрирован рост опухолевых (HT1080, RCC45, MCF7) и нормальных (WI38, NKE, MCF10A) клеток при нокдауне (KD) субъединиц FACT. Окрашивание метиленовым синим (A) или количество колоний (B, C) клеток, трансдуцированных мшРНК (малые РНК, образующие шпильки) указанного лентивируса и выбранных в присутствии пурамицина. Столбцы представляют собой средние количества относительно клеток мшЗФБ того же типа. Столбцы ошибок – стандартное отклонение между тремя повторами в эксперименте. Звездочка указывает на образцы, которые значительно отличаются от соответствующего контроля (р-значение $<0,05$). D-F. Уровни субъединиц FACT в клетках, проиллюстрированных на панели A, после отбора с пурамицином, детектированные с использованием вестерн-блоттинга. G. Распределение клеток с высокими и низкими уровнями белка SSRP1, детектированных с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания среди клеток HT1080 через 120 и 144 часа после трансдукции мшРНК в SSRP1 (верхние панели). На трех нижних панелях проиллюстрировано содержание ДНК в клетках HT1080, трансдуцированных мшРНК в ЗФБ или SSRP1. Клетки с высокими и низкими

уровнями SSRP1 анализировали отдельно. Н. включение EDU в различные клетки через 3 дня после трансдукции указанными лентивирусными мшРНК. I. Доля мертвых клеток, детектированных с использованием окрашивания аннексином V и пропидиййодидом (двойное положительное) среди клеток HT1080 через 5 дней после трансдукции указанными лентивирусными мшРНК.

[0039] На **Фиг. 7А** проиллюстрировано окрашивание метиленовым синим.

[0040] На **Фиг. 7В** проиллюстрировано количество колоний клеток, трансдуцированных указанными лентивирусными мшРНК и отобранных на RCC45 и NKE в присутствии пурамицина.

[0041] На **Фиг. 7С** проиллюстрировано количество клеток, трансдуцированных указанными лентивирусными мшРНК и отобранных на MCF7 и MCF10A в присутствии пурамицина.

[0042] На **Фиг. 7D-F** проиллюстрированы уровни субъединиц FACT в клетках, проиллюстрированных на панели 7А, после отбора с пурамицином, детектированные с использованием вестерн-блоттинга.

[0043] На **Фиг. 7G** проиллюстрировано распределение клеток с высокими и низкими уровнями белка SSRP1, детектированных с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания среди клеток HT1080 через 120 и 144 часа после трансдукции мшРНК в SSRP1 (верхние панели). На трех нижних панелях проиллюстрировано содержание ДНК в клетках HT1080, трансдуцированных мшРНК в ЗФБ или SSRP1. Клетки с высокими и низкими уровнями SSRP1 анализировали отдельно.

[0044] На **Фиг. 7H** проиллюстрировано включение EDU в различные клетки через 3 дня после трансдукции указанными лентивирусными мшРНК.

[0045] На **Фиг. 7I** проиллюстрирована доля мертвых клеток, детектированных с использованием окрашивания аннексином V и пропидиййодидом (двойное положительное) среди клеток HT1080 через 5 дней после трансдукции указанными лентивирусными мшРНК.

[0046] На **Фиг. 8А** проиллюстрирован вестерн-блоттинг экстрактов эпителиальных клеток молочной железы человека в отношении субъединиц FACT и поверхностных маркеров раковых стволовых клеток (CD44^{Высокий}/CD24^{Низкий}).

[0047] На **Фиг. 8В** проиллюстрирован анализ способом проточной цитометрии клеток аденокарциномы протока поджелудочной железы PANC1 и MIA PaCa, окрашенных совместно антителами к поверхностным маркерам, присутствующим на CSC (CD44+/CD24+/CD326+) поджелудочной железы и SSRP1 субъединице FACT.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] Настоящее изобретение основано, отчасти, на обнаружении того факта, что наличие в злокачественных клетках комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), полезно для оценки опухоли, включая, например, предоставление признака агрессивности опухоли, вероятности того, что опухоль является резистентной к обычным лекарственным средствам и/или возможности рецидива после лечения, и, следовательно, руководство по решениям относительно лечения пациентов.

[0049] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ оценки опухоли, включающий определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках, который, необязательно, дополнительно включает стадию определения субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли оценивается как FACT⁺ или FACT⁻ на основании относительного уровня FACT, в частности, в злокачественных клетках.

[0050] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение эффективного количества противоракового агента субъекту-человеку, при этом рак характеризуется как FACT⁺. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение противоракового агента для лечения рака, при этом рак характеризуется наличием, отсутствием или уровнем по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека, или в злокачественных клетках, или в культивированных из них клетках.

[0051] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака, включающий (а) определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в

образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках; (b) определение субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT; и (c) введение эффективного количества терапевтического средства субъекту-человеку. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение терапии для лечения рака, включающее (a) определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках; (b) определение субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT; и (c) введение эффективного количества терапевтического средства субъекту-человеку. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациента классифицируют как FACT⁺ или FACT⁻, как описано в настоящем документе, и эту классификацию используют для определения лечения этого пациента.

[0052] В одном варианте реализации настоящего изобретения оценка включает что-либо одно из диагностики, прогноза и ответа на лечение.

[0053] В другом варианте реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой одно или более из первичной или рецидивирующей опухоли или метастатического поражения. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль является какой-либо опухолью молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, печени, почек, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, шейки матки, головы и шеи, кожи, центральной и периферической нервной системы.

[0054] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения компонент FACT содержит один или более из SSRP1 и SPT16.

[0055] В другом варианте реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня белка. В другом варианте реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей компонент FACT (*например*, ПЦР или анализ гибридизации нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение включает использование агента, который специфически связывается с одним из белков SSRP1 и SPT16, и этот агент может представлять собой, например, антитело. В разных вариантах реализации настоящего

изобретения измерение уровней одного или более из белков SSRP1 и SPT16 представляет собой что-либо из иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, анализа клеточных вестернов, иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа ELISA и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (ФАКС).

[0056] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли человека представляет собой биопсию и/или что-либо из образца свежей ткани, образца замороженной опухолевой ткани, культивированных клеток (*например*, первичные культуры из образцов опухоли, циркулирующих опухолевых клеток) и фиксированного формалином и залитого парафином образца опухолевой ткани.

[0057] В другом варианте реализации настоящего изобретения классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от неоадьювантной и/или адьювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от неоадьювантной и/или адьювантной химиотерапии.

[0058] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения классификация высокого риска включает высокий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: высокая степень злокачественности опухоли, агрессивный гистологический подтип, низкая общая выживаемость, высокая вероятность метастазирования и наличие опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.

[0059] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения классификация низкого риска включает низкий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: низкая степень злокачественности опухоли, высокая общая выживаемость, менее агрессивный гистологический подтип, низкая вероятность метастазирования и отсутствие и/или снижение уровня опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.

[0060] В другом варианте реализации настоящего изобретения классификация высокого риска означает и предписывает назначение неоадьювантной и/или адьювантной терапии. В другом варианте реализации настоящего изобретения пациенту с классификацией высокого риска назначают неоадьювантную и/или адьювантную терапию.

[0061] В другом варианте реализации настоящего изобретения классификация низкого риска означает и предписывает отмену неоадьювантной и/или адьювантной терапии. В другом варианте реализации настоящего изобретения пациенту с классификацией низкого риска не назначают неоадьювантную и/или адьювантную терапию.

[0062] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ оценки опухолевой клетки, включающий определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в злокачественных клетках образца опухоли субъекта-человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках, который, необязательно, дополнительно включает стадию классификации опухолевой клетки как раковой стволовой клетки на основании наличия по меньшей мере одного компонента FACT.

[0063] В другом варианте реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой одно или более из первичной или рецидивирующей опухоли или метастатического поражения. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль является какой-либо опухолью молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, печени, почек, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, шейки матки, головы и шеи, кожи, центральной и периферической нервной системы.

[0064] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения компонент FACT содержит один или более из SSRP1 и SPT16.

[0065] В другом варианте реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня белка. В другом варианте реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня экспрессии нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение включает использование агента, который специфически связывается с одним из белков SSRP1 и SPT16, и этот агент может представлять собой, например, антитело. В разных вариантах реализации настоящего изобретения измерение уровней одного или более из белков SSRP1 и SPT16 представляет собой что-либо из иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, анализа клеточных вестернов, иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа ELISA и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (ФАКС).

[0066] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли человека представляет собой биопсию и/или что-либо из образца замороженной опухолевой ткани, культивированных клеток (*например*, первичные культуры из образцов опухоли, циркулирующих опухолевых клеток) и фиксированного формалином и залитого парафином образца опухолевой ткани.

[0067] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения FACT является суррогатным маркером раковых стволовых клеток, который можно использовать в качестве замены или дополнения к известным маркерам для таких клеток. Такое применение в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения дополняет другие виды использования FACT для оценки опухоли, описанной в настоящем документе (*например*, как индикатор агрессивности опухоли).

[0068] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация типа опухолевых клеток как включающего стволовые раковые клетки посредством детекции FACT указывает на тип рака (*например*, стволовую раковую клетку), который проявляет резистентность к обычной химиотерапии. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациенту с опухолью, классифицированной как содержащая стволовые раковые клетки посредством детекции FACT, назначают химиотерапию, направленную на стволовые раковые клетки и/или известную своей эффективностью против стволовых раковых клеток.

[0069] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация типа опухолевых клеток как включающего стволовые раковые клетки посредством детекции FACT указывает на тип рака с вероятностью рецидива. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT у пациента, получавшего лечение по поводу опухоли, может предписывать дальнейшее наблюдение после лечения. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT у пациента, получавшего лечение по поводу опухоли, может предписывать назначение адъювантной или неoadъювантной терапии из-за вероятности рецидива.

[0070] Комплекс, облегчающий транскрипцию хроматина (англ. Facilitates Chromatin Transcription (FACT) complex) является гетеродимером, состоящим из двух субъединиц: субъединицы с массой 80 кДа и субъединицы с массой 140 кДа. Эти субъединицы представляют собой белок 1 специфического распознавания структуры (англ. Structure Specific Recognition Protein 1 (SSRP1)) и супрессор Ty (SPT16 или SUPT16H). При

использовании в контексте настоящего изобретения FACT относится к гетеродимеру SSRP1 и SPT16 или к отдельным субъединицам SSRP1 и SPT16. Без связи с какой-либо теорией FACT вовлечен в ремоделирование хроматина через модуляцию нуклеосомной стабильности. FACT может быть вовлечен во многие процессы с участием хроматина, такие как, например, транскрипция, репликация, рекомбинация, повреждение ДНК и восстановление. FACT специфически взаимодействует с гистонами H2A/H2B для влияния на разборку нуклеосом и пролонгации транскрипции. Кураксины (*например*, кураксин-137), малые молекулы, обладающие широкой противораковой активностью в различных моделях рака (*см.* международная публикация патента № WO 2010/042445, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте), вызывают функциональную инактивацию FACT (*см.* публикацию Gasparian, *et al.* Sci. Trans. Med. 3: 95ra74 (2011), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте).

[0071] Белок, который кодируется геном белка 1 специфического распознавания структуры (SSRP1) (мПНК у людей: NM_003146.2, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, мПНК у мыши: NM_001136081.1, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме) является субъединицей гетеродимера, который вместе с SPT16 образует FACT. SSRP1 является субъединицей с массой 80 кДа. FACT и ДНК, поврежденная цисплатином, могут иметь решающее значение для противоракового механизма цисплатина. Белок, который кодируется SSRP1 (у людей: NP_003137.1, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, у мыши: NP_001129553.1, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме) содержит белок box из группы с высокой подвижностью, который, без привязки к какой-либо теории, может составлять элемент распознавания структуры для модифицированной цисплатином ДНК. SSRP1 также является компонентом комплекса CK2-SPT16-SSRP1, который образует после УФ-облучения, содержащего SSRP1, SUPT16H, CSNK2A1, CSNK2A2 и CSNK2B. Было продемонстрировано, что SSRP1 взаимодействует с NEK9, серин/треонин-протеинкиназой. Белок SSRP1 также функционирует как коактиватор активатора транскрипции p63 (включая, например, изоформу гамма TP63). SSRP1 повышает активность полноразмерного p63, но не оказывает никакого влияния на

вариант p63 с удаленным N-концом (DeltaN-p63). SSRP1 также взаимодействует с FYTDD1/UIF и SRF.

[0072] SPT16 (SUPT16H) представляет белок, который у людей кодируется геном *SUPT16H* (мРНК у людей: NM_007192.3, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, мРНК у мыши: NM_033618.3, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Белок SPT16 (у людей: NP_009123.1, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, у мыши: NP_291096.2, данная последовательность включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме) представляет собой субъединицу в комплексе FACT с массой 140 кДа. SPT16 также является компонентом комплекса CK2-SPT16-SSRP1, который образует после УФ-облучения, содержащего SSRP1, SUPT16H, CSNK2A1, CSNK2A2 и CSNK2B. Кроме того, SPT16 является компонентом комплекса WINAC, содержащего по меньшей мере SMARCA2, SMARCA4, SMARCB1, SMARCC1, SMARCC2, SMARCD1, SMARCE1, ACTL6A, BAZ1B/WSTF, ARID1A, SUPT16H, CHAF1A и TOP2B. Было продемонстрировано, что SPT16 взаимодействует с BAZ1B, тирозин-протеинкиназой. SPT16 также взаимодействует с NEK9, субъединицей 2 общего фактора транскрипции IIЕ (GTF2E2), и связывается с гистонами H2A-H2B.

[0073] В разных аспектах настоящее изобретение включает оценку опухоли. В разных вариантах реализации настоящего изобретения оценка может быть выбрана из диагностики, прогноза и ответа на лечение.

[0074] Диагностика относится к процессу попыток определения или идентификации возможного заболевания или расстройства, такого как, например, рак. Прогнозирование относится к предсказанию вероятного исхода заболевания или расстройства, такого как, например, рак. Полный прогноз часто включает ожидаемую продолжительность, зависимость и описание течения заболевания, такое как прогрессирующее ухудшение, периодический кризис или внезапный непредсказуемый кризис. Ответ на лечение представляет собой прогнозирование медицинского исхода у пациента при получении лечения. Ответами на лечение могут быть, в качестве не ограничивающего примера, патологический полный ответ, выживаемости и вероятность рецидива.

[0075] В одном варианте реализации настоящего изобретения классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от неоадьювантной и/или адьювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от неоадьювантной и/или адьювантной химиотерапии.

[0076] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения неоадьювантная химиотерапия относится к химиотерапии для уменьшения и/или снижения степени злокачественности опухоли перед любым оперативным вмешательством. Таким образом, при использовании в контексте настоящего изобретения термин неоадьювантная химиотерапия означает химиотерапию, которую вводят пациентом с раком перед оперативным вмешательством. Виды рака, для которых обычно рассматривается применение неоадьювантной химиотерапии, включают, например, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, шейки матки, мочевого пузыря, и легких.

[0077] Адьювантная терапия, которая также называется адьювантным уходом, представляет собой лечение, которое назначают в дополнение к первичному, основному или начальному лечению. В качестве неограничивающего примера, адьювантная терапия может представлять собой дополнительное лечение (*например*, химиотерапию), которое обычно назначают после оперативного вмешательства, когда все детектируемые очаги заболевания были удалены, но при этом остается статистический риск рецидива в связи с невыявленным заболеванием.

[0078] В разных вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается оценка опухолей на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 и классификация опухолей в группу высокого и низкого риска. В разных вариантах реализации настоящего изобретения FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 измеряется в образце пациента, включая, например, сортировку/подсчет между нормальными и злокачественными клетками и количественное определение злокачественных клеток, экспрессирующих FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, например, в процентах. В разных вариантах реализации настоящего изобретения такие измерения могут оценить схожесть окрашивания для FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. В разных вариантах реализации настоящего изобретения измерения могут выполняться компьютером.

[0079] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация высокого риска включает высокий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность

характеризуется одним или более из: высокой степени злокачественности опухоли, агрессивного гистологического подтипа, низкой общей выживаемости, высокой вероятности метастазирования и наличия опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.

[0080] В еще одном варианте реализации настоящего изобретения классификация низкого риска включает низкий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: низкой степени злокачественности опухоли, менее агрессивного гистологического подтипа, высокой общей выживаемости, низкой вероятности метастазирования и отсутствия и/или снижения уровня опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.

[0081] Степень злокачественности опухоли представляет собой систему, используемую для классификации раковых клеток, исходя из того, насколько патологически они выглядят под микроскопом, и из вероятности того, насколько быстро опухоль будет расти и распространяться. При определении степени злокачественности опухоли учитываются многие факторы, в том числе модель структуры и роста клеток. Конкретные факторы, используемые для определения степени злокачественности опухоли, могут меняться в зависимости от типа рака и являются известными в данной области техники.

[0082] Гистологическая степень злокачественности, также называемая дифференциацией, относится к тому, сколько опухолевых клеток напоминают нормальные клетки того же типа ткани. Ядерная степень злокачественности относится к размеру и форме ядра в опухолевых клетках и к проценту делящихся опухолевых клеток.

[0083] На основании микроскопического вида раковых клеток, патологоанатомы обычно описывают степень злокачественности опухоли четырьмя уровнями тяжести: Степени злокачественности 1, 2, 3 и 4. Клетки опухоли со степенью злокачественности 1 напоминают нормальные клетки и, как правило, растут и размножаются медленно. Поведение опухолей со степенью злокачественности 1 обычно считается менее агрессивным. И наоборот, клетки опухолей с 3 или 4 степенью злокачественности не похожи на нормальные клетки того же типа. Опухоли с 3 и 4 степенью злокачественности, как правило, быстро растут и распространяются быстрее, чем опухоли с более низкой степенью злокачественности. Американский объединённый онкологический комитет дает следующие рекомендации для классификации опухолей:

GX-степень не может быть определена (неопределяемая степень); G1-высокодифференцированная (низкая степень); G2-умеренно дифференцированная (промежуточная степень); G3-низкодифференцированная (высокая степень); и G4-недифференцированная (высокая степень).

[0084] Системы определения степени злокачественности различны для каждого типа рака. Например, для описания уровня дифференциации клеток рака предстательной железы, патологоанатомы используют систему Глисона. В системе Глисона используют оценку в баллах от степени 2 до степени 10. Более низкие баллы по системе Глисона описывают высокодифференцированные, менее агрессивные опухоли. Более высокие баллы по системе Глисона описывают низкодифференцированные, более агрессивные опухоли. Другие системы определения степени злокачественности включают, например, систему Блума-Ричардсона для рака молочной железы и систему Фурмана для рака почек.

[0085] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль оценивают посредством определения FАСТ, и наличие и/или высокий уровень FАСТ свидетельствует о более высокой степени злокачественности рака. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от агрессивного рака, и применяется агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе, например, адъювантную и неoadъювантную терапию. Кроме того, эти обстоятельства могут предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0086] Наоборот, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ, и отсутствие и/или низкий уровень FАСТ свидетельствует о более низкой степени злокачественности рака. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от менее агрессивного рака, и применяется менее агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе. В этих вариантах реализации настоящего изобретения применение адъювантной и неoadъювантной терапии может быть ограничено или его можно вообще избежать.

[0087] В разных вариантах реализации настоящего изобретения агрессивное лечение может включать комбинацию хирургического вмешательства, лучевой терапии и

химиотерапии или комбинацию хирургического вмешательства и лучевой терапии, или комбинацию хирургического вмешательства и химиотерапии.

[0088] Гистологические подтипы относятся к использованию гистологии для классификации подтипов рака. Например, при раке молочной железы примерами подтипов являются муцинозный и тубулярный. Эти подтипы рассматривать как благоприятные или менее агрессивные.

[0089] В некоторых вариантах реализации способы настоящего изобретения замещают или расширяют использование гистологических подтипов в руководстве лечения рака.

[0090] Выживаемость при раке или статистика выживаемости может относиться к проценту людей, выжившие при определенном типе рака в течение определенного периода времени. В онкологической статистике часто используют уровень общей пятилетний выживаемости. Например, уровень общей пятилетний выживаемости для рака мочевого пузыря составляет 80 процентов, *т.е.* 80 из каждых 100 человек, которым установлен диагноз рака мочевого пузыря, прожили после постановки диагноза пять лет и 20 из каждых 100 человек умерли в течение пяти лет после постановки диагноза рака мочевого пузыря. Могут быть использованы другие типы выживаемости, например: выживаемость без признаков заболевания (количество людей, больных раком, которые достигли ремиссии) и выживаемость без прогрессирования заболевания (количество людей, у которых все еще есть раковое заболевание, но это заболевание не прогрессирует).

[0091] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ, и наличие и/или высокий уровень FАСТ свидетельствует о более низкой вероятности общей выживаемости. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от агрессивного рака, и применяется агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе, например, адъювантную и неoadъювантную терапию. Кроме того, эти обстоятельства могут предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0092] Наоборот, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ, и отсутствие и/или низкий уровень FАСТ свидетельствует о более высокой вероятности общей выживаемости. В этих

вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от менее агрессивного рака, и применяется менее агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе. В этих вариантах реализации настоящего изобретения применение адъювантной и неоадъювантной терапии может быть ограничено или его можно вообще избежать.

[0093] Вероятность метастазирования относится к вероятности того, что рак будет приобретать метастатические свойства.

[0094] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ, и наличие и/или высокий уровень FАСТ свидетельствует о более высокой вероятности метастазирования. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от агрессивного рака, и применяется агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе, например, адъювантную и неоадъювантную терапию. Кроме того, эти обстоятельства могут предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0095] Наоборот, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ и отсутствие и/или низкий уровень FАСТ свидетельствует о более низкой вероятности метастазирования. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от менее агрессивного рака, и применяется менее агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе. В этих вариантах реализации настоящего изобретения применение адъювантной и неоадъювантной терапии может быть ограничено или его можно вообще избежать.

[0096] Маркеры раковых клеток относятся к свойствам рака или злокачественности, включая экспрессию определенных генов/белков, свидетельствующих о раке. Эти маркеры известны в данной области техники. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определенные маркеры раковых клеток свидетельствуют об агрессивных видах рака, тогда как другие – нет. Например, при раке молочной железы: базальный, тройной отрицательный, ЭР-отрицательный и Her2-положительный свидетельствуют об агрессивных видах рака. Наоборот, люминальный, гормон-рецептор-положительный, ЭР-положительный и Her2-отрицательный свидетельствуют о менее агрессивных видах рака.

[0097] Для немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), недифференцированная крупноклеточная карцинома указывает на агрессивный рак, в то время как другие виды рака легких означают менее агрессивные виды рака. Для почечно-клеточной карциномы (ПКК), папиллярная и саркоматоидная карциномы указывают на агрессивные виды рака, тогда как отсутствие этих карцином свидетельствует о менее агрессивных видах рака.

[0098] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ и наличие и/или высокий уровень FАСТ свидетельствует о наличии маркеров раковых клеток, связанных с агрессивными видами рака. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от агрессивного рака, и применяется агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе, например, адъювантную и неоадъювантную терапию. Кроме того, эти обстоятельства могут предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0099] Наоборот, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценку опухоли проводят посредством определения FАСТ, и отсутствие и/или низкий уровень FАСТ свидетельствует об отсутствии маркеров раковых клеток, связанных с агрессивными видами рака. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент страдает от менее агрессивного рака, и применяется менее агрессивный режим лечения, включающий виды лечения, описанные в этом документе. В этих вариантах реализации настоящего изобретения применение адъювантной и неоадъювантной терапии может быть ограничено или его можно вообще избежать.

[00100] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация низкого риска является показанием к отмене неоадъювантной и/или адъювантной терапии. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациент с классификацией низкого риска не получает неоадъювантную и/или адъювантную терапию.

[00101] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация высокого риска свидетельствует о предоставлении неоадъювантной и/или адъювантной терапии. В некоторых вариантах реализации настоящего

изобретения пациент с классификацией высокого риска получает неоадьювантную и/или адьювантную терапию.

[00102] В настоящем изобретении также предлагаются преимущества, которые могут отличаться в зависимости от типа и стадии рака. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль не поражала подлежащую ткань, и оценка была полезной для подсказки схемы лечения для предотвращения прогрессирования злокачественного образования и предотвращения дальнейшей инвазивности. В этих вариантах реализации настоящего изобретения схема лечения необязательно является менее агрессивной, чем могла бы быть при агрессивном раке. В еще других вариантах реализации настоящего изобретения рак поражал подлежащую ткань, но отсутствовало вовлечение лимфоузлов или метастазирование, и оценка была полезной для подсказки схемы лечения для предотвращения прогрессирования злокачественного образования и предотвращения дальнейшей инвазивности. В этих вариантах реализации настоящего изобретения схема лечения необязательно является более агрессивной, чем могла бы быть, если бы опухоль не поражала подлежащую ткань. В других вариантах реализации настоящего изобретения существует вовлечение местных лимфатических узлов, но метастазы в отдаленные участки отсутствуют, и оценка является полезной для подсказки схемы лечения для предотвращения прогрессирования злокачественного образования и предотвращения дальнейшей инвазивности. В таких вариантах реализации настоящего изобретения схема лечения необязательно является очень агрессивной. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни. В еще других вариантах реализации настоящего изобретения рак имеет множественные метастатические очаги, и оценка является полезной для подсказки схемы лечения для предотвращения прогрессирования злокачественного образования и предотвращения дальнейшей инвазивности. В таких вариантах реализации настоящего изобретения схема лечения необязательно является очень агрессивной. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной

помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0100] Оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе может указывать на стадию рака. В качестве неограничивающего примера, используя общую группировку стадий, раковые заболевания на стадии I локализованы в одной части тела; раковые заболевания на стадии II являются местно-распространенными, так же, как и раковые заболевания на стадии III. Обозначен ли рак как имеющий стадию II или стадию III, может зависеть от конкретного типа рака. В одном неограничивающем примере, II стадия болезни Ходжкина означает поражение лимфатических узлов только с одной стороны диафрагмы, в то время как III стадия означает поражение лимфатических узлов выше и ниже диафрагмы. Конкретные критерии для стадий II и III, таким образом, различаются в зависимости от диагноза. Раковые заболевания IV стадии часто метастазируют или распространяются в другие органы или по всему организму.

[0101] Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рак находится на I стадии и не является местно-распространенным. В соответствии с этими вариантами реализации настоящего изобретения, оценка опухоли, описанная в настоящем документе, может предписывать менее агрессивное лечение. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рак находится на стадии II или III, то есть рак может быть местно-распространенным. В соответствии с этими вариантами реализации настоящего изобретения, оценка опухоли, описанная в настоящем документе, может предписывать более агрессивное лечение. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни. В еще других вариантах реализации настоящего изобретения рак находится на стадии IV или является метастатическим. В соответствии с этими вариантами реализации настоящего изобретения, оценка опухоли, описанная в настоящем документе, может предписывать более агрессивное лечение. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной

помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0102] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рак является неоперабельным. Неоперабельный рак является злокачественным образованием, которое не может быть удалено хирургическим путем, либо вследствие ряда метастатических очагов, или потому, что оно находится в хирургически опасной зоне. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценка предписывает лечение, которое подготавливает пациента и/или уменьшает объем опухоли перед химиотерапией и/или лучевой терапией, и может снизить необходимую дозу химиотерапии или облучения.

[0103] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения рак имеет множественную лекарственную резистентность. Например, пациент может пройти один или более курсов химиотерапии без существенного ответа. Альтернативно или в дополнение, опухоль имеет один или более маркеров множественной лекарственной резистентности. Такие маркеры могут включать анализы ответа на химиотерапевтические средства или молекулярные анализы. Таким образом, при использовании в контексте настоящего изобретения, термин множественная лекарственная резистентность означает, что рак демонстрирует отсутствие ответа по меньшей мере на один курс комбинированной химиотерапии, или, альтернативно, был оценен (диагностически) как резистентный по меньшей мере к двум (в том числе, сравнимым агентам) из доцетаксела, паклитаксела, доксорубицина, эпирубицина, карбоплатина, цисплатина, винбластина, винкристина, оксалиплатина, кармустина, фторурацила, гемцитабина, циклофосфида, ифосфамида, топотекана, эрлотиниба, этопозида и митомицина. В таких вариантах реализации настоящего изобретения оценка опухолей на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 может предписывать агрессивное лечение. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0104] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациент находится в ремиссии. Для пациентов, которые достигли ремиссии, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, может предписывать менее

агрессивное лечение (*например*, лечение для того, чтобы избежать или отсрочить рецидив) или лечение, подходящее для поддержания ремиссии, или отсутствие лечения.

[0105] В других вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой рецидив после обычной химиотерапии начального рака. Часто при рецидивирующем раке развивается лекарственная резистентность и, таким образом, рак особенно трудно поддается лечению и часто имеет неблагоприятный прогноз для выживания. В таких вариантах реализации настоящего изобретения оценка опухолей на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, может предписывать агрессивное лечение. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0106] В других вариантах реализации настоящего изобретения определение FACT в образце, полученном от человека, свидетельствует, что пациент имеет плохой прогноз выживаемости при применении традиционной терапии. Например, может ожидаться прогноз (*например*, с вероятностью более чем около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%) выживаемости менее чем около пяти лет, менее чем около трех лет, менее чем около двух лет или менее чем около одного года. Прогноз может быть основан на типе рака, включая частоту ответа популяции с определенным типом рака на лучевую терапию и/или химиотерапию, и/или может быть основаны на молекулярной характеристике опухолевых клеток, включая уровни экспрессии не только FACT, но также, например, VEGF, PDGFR β , CD31, HER2, PTEN, ERCC1, BRCA1, TOPO2 α , Ki-67, P53, TS, ER, PR или мутации в одном или более из EGFR, ALK, KRAS, BRAF и PI3K. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения наличие высоких уровней FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. В этих вариантах реализации настоящего изобретения наличие высоких уровней FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 может предписывать агрессивное лечение. В этих вариантах реализации настоящего изобретения наличие высоких уровней FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 может быть причиной назначения пациенту агрессивного лечения.

[0107] Кроме того, в дополнение к FACT, прогноз может быть основан на сигнатуре экспрессии гена рака, свидетельствующей о резистентности к химиотерапии, вероятности рецидива рака или принадлежности к группе высокого риска в отношении выживаемости. Сигнатуры экспрессии генов становятся все более доступными для прогнозирования ответа опухоли на терапию и/или для другой классификации опухолей для прогноза. Примеры сигнатур экспрессии генов описаны в публикации PCT/US2012/022594 (рак толстого кишечника), патенте США № 8211643 (НМРЛ), публикации патента США № 2010-0331210 (рак молочной железы), патенте США № 7056674, патенте США № 7081340, патенте США № 7569345 и патенте США № 7526387, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

[0108] В тех вариантах реализации настоящего изобретения, в которых оценка опухоли, включающая определение FACT, указывает на неблагоприятный прогноз, это может предписывать назначение очень агрессивной схемы лечения. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0109] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценка опухоли выполняется для определения общего состояния. Общее состояние можно оценить количественно с помощью любой системы и способов оценивания общего состояния пациента в баллах, известных в данной области техники. Такое определение часто используется, чтобы оценить, может ли пациент получать химиотерапию, для коррекции дозы, а также для определения интенсивности паллиативной помощи. Существуют различные системы оценки в баллах, в том числе оценка по шкале Карновского и оценка по шкале Зуброд. Параллельные системы оценивания в баллах включают шкалу общей оценки функционального статуса (GAF), которая была включена в качестве пятой оси в Руководство по диагностике и статистике психических расстройств (DSM). Основным недостатком использования шкал для оценки общего состояния является субъективность и, следовательно, настоящее изобретение, в некоторых вариантах реализации, решает эту проблему.

[0110] Более высокая оценка общего состояния (*например*, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 70% при использовании системы оценки по шкале Карновского)

может означать назначение лечения для предотвращения прогрессирования состояния заболевания и повышение способности пациента принимать химиотерапевтическое лечение и/или лучевую терапию. Например, в этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент является ходячим и способен к самообслуживанию. В других вариантах реализации настоящего изобретения оценка свидетельствует о возможности того, что пациент с низкой оценкой общего состояния (*например*, менее 50%, менее 30% или менее 20% при использовании системы оценки по шкале Карновского) сможет переносить обычную лучевую терапию и/или химиотерапию. В этих вариантах реализации настоящего изобретения пациент в основном ограничен нахождением в кровати или кресле и неспособен даже к самообслуживанию.

[0111] В одном варианте реализации настоящего изобретения детекция и/или высокий уровень FACT в образце опухоли человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках свидетельствует о низкой оценке общего состояния. В таких вариантах реализации настоящего изобретения анализ FACT, описанный в настоящем документе, предписывает назначение очень агрессивного лечения. В качестве альтернативы, оценка на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, в этих обстоятельствах, может предписывать прекращение агрессивного лечения и применение паллиативной помощи, чтобы избежать ненужной токсичности от неэффективных химиотерапевтических средств для улучшения качества жизни.

[0112] В одном варианте реализации настоящего изобретения отсутствие детекции и/или низкий уровень FACT в образце опухоли человека (включая, например, биопсию) или в культивированных из нее клетках свидетельствует о высокой оценке общего состояния. В таких вариантах реализации настоящего изобретения анализ FACT, описанный в настоящем документе, предписывает назначение менее агрессивного лечения, чтобы избежать ненужной токсичности.

[0113] Оценки по шкале Карновского находятся в диапазоне от 100 до 0, где 100 означает "идеальное" здоровье, а 0 означает смерть. Интервал оценки может составлять 10, при этом: 100% – нормальное состояние, отсутствие жалоб, отсутствие признаков заболевания; 90% – способен к нормальной деятельности, есть незначительные симптомы или признаки заболевания, 80% – способен к нормальной деятельности с некоторыми трудностями, есть некоторые симптомы или признаки заболевания; 70% – обслуживает себя самостоятельно, не способен к нормальной деятельности или работе;

60% – нуждается в некоторой помощи, но способен сам удовлетворять значительную часть своих потребностей; 50% – часто нуждается в помощи и медицинском уходе; 40% – инвалид, нуждается в специальном уходе и помощи; 30% – тяжелая инвалидность, показана госпитализация, хотя риск смерти отсутствует; 20% – очень тяжелый больной, необходима срочная госпитализация, необходимы поддерживающие мероприятия или лечение; и 10% – агонирующий пациент, быстро прогрессируют процессы смертельного заболевания.

[0114] Шкала оценки общего состояния Зуброд включает: 0, пациент полностью активен, способен выполнять все виды деятельности, как и до заболевания, без ограничений; 1, ограничен в выполнении тяжелой физической нагрузки, но является ходячим и может выполнять легкую или сидячую работу *например*, легкую домашнюю или офисную работу; 2, ходячий, способен к самообслуживанию, но не может какую-либо выполнять работу, активен более 50% времени бодрствования; 3, способен лишь к ограниченному самообслуживанию, проводит в кресле или постели более 50% времени бодрствования; 4, полный инвалид, совершенно не способен к самообслуживанию, прикован к креслу или постели; 5, смерть.

[0115] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гистологические образцы опухоли оценивают на степень злокачественности в соответствии с публикацией Elston & Ellis, *Histopathology*, 1991, 19:403-10, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

[0116] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения FACT является суррогатным маркером раковых стволовых клеток, который можно использовать вместо известных маркеров для таких клеток. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения FACT является маркером раковых стволовых клеток, который можно использовать в комбинации с известными маркерами, чтобы повысить вероятность точного прогнозирования того, имеет ли пациент такую клетку.

[0117] Раковые стволовые клетки обладают способностью к самообновлению и мультипотентности. Гипотеза в отношении раковых стволовых клеток утверждает, что, хотя раковые стволовые клетки представляют собой редкую популяцию клеток в опухоли, их высокая канцерогенная мощность управляет канцерогенезом. Раковые стволовые клетки имеют огромный потенциал пролиферации; способны к асимметричному делению клеток, чтобы генерировать один или несколько видов дифференцированного потомства с пониженным потенциалом пролиферации или

развития; и способны к симметричному делению клеток для самообновления или самоподдержания. Из-за врожденных свойств раковых стволовых клеток, подобных свойствам стволовых клеток, пролиферация раковых стволовых клеток производит больше стволовых раковых клеток и всех дифференцированных типов клеток, которые составляют основную часть опухоли. Как было показано, нераковые стволовые клетки в опухоли пролиферируют быстрее, чем раковые стволовые клетки, но имеют небольшой потенциал инициации опухоли. Поскольку раковые стволовые клетки демонстрируют повышенную резистентность к токсичным и химическим повреждениям, это конкретные субпопуляции клеток, как полагают, лежат в основе резистентности к химиотерапии и рецидивам заболевания. Фактически, в модели стволовых клеток рака утверждается, что все раковые стволовые клетки должны быть уничтожены, чтобы устранить опухоль и предотвратить ее рецидив.

[0118] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация типа опухолевых клеток как включающего стволовые раковые клетки посредством детекции FACT указывает на тип рака, который проявляет резистентность к обычной химиотерапии. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациенту с опухолью, классифицированной как содержащая стволовые раковые клетки посредством детекции FACT, назначают химиотерапию, направленную на стволовые раковые клетки и/или известную своей эффективностью против стволовых раковых клеток. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такую химиотерапию, направленную на раковые стволовые клетки и/или известную своей эффективностью против раковых стволовых клеток, выбирают из BBI608, BBI50, агентов, которые связываются с высокой аффинностью и специфичностью с каталитическим сайтом теломеразы (*например*, иметелстат (GRN163L)), GRNOPC1, гликолитического ингибитора 3-бром-2-оксопропионат-1-пропилового сложного эфира (3-BrOP) (в том числе, например, в условиях гипоксии), кармустина, метформина, тиоридазиан, ингибиторов фокальной адгезии киназы (FAK) (например, дефактиниба (VS-6063)), VS-4718, VS-5584, сабутоклакса, антител, направленных на дельтаподобный лиганд 4 (DLL4) (включая, например, демцизумаб), агентов направленных на рецептор интерлейкина-3 (IL-3R) (включая, например, SL-401) или их комбинации. Наоборот, отсутствие FACT может означать, что пациент не имеет раковых стволовых клеток и, возможно, потребует применения обычной химиотерапии,

которая не обязательно должна быть направлены на раковые стволовые клетки и/или быть известной своей эффективностью против раковых стволовых клеток.

[0119] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения классификация типа опухолевых клеток как включающего стволовые раковые клетки посредством детекции FACT указывает на тип рака с вероятностью рецидива. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT у пациента, получавшего лечение по поводу опухоли, может предписывать дальнейшее наблюдение после лечения. Например, обычное наблюдение после лечения часто происходит не более одного раза каждые 3-4 месяца в первые 1-2 года после ремиссии и один раз в 6 месяцев в последующие годы. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT может предписывать усиленное наблюдение, например, еженедельное, раз в две недели, ежемесячное, раз в два месяца и т.д., с использованием обычных анализов для детекции рецидива рака. Частота наблюдения может оставаться высокой даже после первых 1-2 лет после ремиссии, например, быть еженедельной, раз в две недели, ежемесячной, раз в два месяца и т.д., с использованием обычных анализов для детекции рецидива рака. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT может предписывать наблюдение, например, от 1 до 10 раз в год или по меньшей мере один раз через год с использованием обычных анализов для детекции рецидива рака. Наоборот, отсутствие FACT может означать, что пациент не имеет раковых стволовых клеток и, возможно, потребует обычное наблюдение после лечения.

[0120] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT у пациента, получавшего лечение по поводу опухоли, может предписывать назначение адъювантной или неоадъювантной терапии из-за вероятности рецидива. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения детекция FACT указывает на наличие раковых стволовых клеток и высокую вероятность рецидива и, следовательно, такой пациент может получать адъювантную или неоадъювантную терапию, как описано в настоящем документе. Наоборот, отсутствие FACT может означать отсутствие раковых стволовых клеток и, возможно, отмену адъювантной или неоадъювантной терапии.

[0121] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения использование FACT для прогнозирования наличия раковых стволовых клеток проводят в сочетании с другими видами использования FACT для оценки опухоли, описанными в данном документе (*например*, в качестве индикатора агрессивности опухоли). Например,

пациенты FACT⁺ могут получать агрессивное лечение из-за вероятности агрессивности их опухолей, и из-за этого лечение может быть выбрано из химиотерапии, эффективной против раковых стволовых клеток. Дополнительно, пациенты FACT⁺ могут не только получать агрессивное лечение, но также проходить наблюдение чаще, чем обычно после успешного лечения.

[0122] Способы, описанные в настоящем документе, применимы к различным видам рака, включая солидные опухоли и лейкозы. В разных вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, фибросаркому, миосаркому, остеогенную саркому, ангиосаркому, эндотелиосаркому или эпителиальный рак. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гистологически опухоль представляет собой серозную аденокарциному, эндометриоидную аденокарциному, муцинозную аденокарциному, недифференцированную аденокарциному, переходно-клеточную аденокарциному или аденокарциному. Примеры видов рака включают рак легких, включая МРЛ и НМРЛ, мезотелиому, рак головного мозга, глиобластому, рак головы и шеи, рак пищевода, рак молочной железы, лимфому, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак почек, толстой кишки или рак толстой и прямой кишки, рак яичников, рак эндометрия, рак шейки матки, рак яичка и меланому. В еще других вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой лейкоз, например, хронический миелолейкоз (ХМЛ) или острый лимфолейкоз (ОЛЛ).

[0123] В разных вариантах реализации настоящего изобретения рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой одну или более первичных или рецидивирующих опухолей или метастатическое поражение.

[0124] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухоль является какой-либо опухолью молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, печени, почек, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, шейки матки, головы и шеи, кожи, центральной и периферической нервной системы.

[0125] В разных вариантах реализации настоящего изобретения оценка опухолей на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 предписывает лечение пациента. Пациенты с оценкой FACT⁺ могут получать одну или несколько из следующего в качестве схемы первичного, адъювантного или неоадъювантного лечения: химиотерапевтическая схема

(включая, например, монотерапию и комбинированную терапию). Химиотерапия может представлять собой, например, но, не ограничиваясь перечисленным, паклитаксел, доксорубин, митрамицин, доцетаксел, химиотерапевтические средства на основе платины (включая, среди прочего, цисплатин и карбоплатин), митомицин, метотрексат, фторурацил, 5-фторурацил (5-ФУ), винорелбин, топотекан, иринотекан, блеомицин, блеомицин гидроксимочевина, митомицин, актиномицин, ингибиторы топоизомеразы I и II, антрациклины, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, валрубицин, этопозид, тенипозид, рубитекан и их производные. Химиотерапия может включать таксан и/или антиметаболит, и/или их производные.

[0126] В дополнение или в качестве альтернативы, пациент может получать химиотерапию, выбранную из антрациклина, таксола или таксоида, алкалоида барвинка, алкилирующего агента, интеркалирующего агента, ингибитора киназы или азотистого иприта. Неограничивающие примеры агентов включают один или более из ингибиторов топоизомеразы (I или II), индуктор апоптоза, ингибитор протеазы, ингибитор микротрубочек, ингибитор митоза, антиметаболит, ингибитор трансдукции сигнала, ингибитор рецептора эстрогена, ингибитор EGFR, ингибитор Her2 или ингибитор ароматазы.

[0127] В дополнение или в качестве альтернативы, пациент может получить химиотерапевтический агент, который включает один или более из даунорубина, доксорубина, эпирубина, идарубина, адриамина, винкристина, кармустина, цисплатина, 5-фторурацилатамоксифена, продазона, сандостатина, митомина С, фоскарнета, паклитаксела, доцетаксела, гемцитабина, флударабина, карбоплатина, лейковорина, тамоксифена, гозерелина, кетоконазола, лейпролида, флутамида, винбластина, виндезина, винорелбина, камптотецина, топотекана, иринотекана гидрохлорида, этопозид, митоксантрона, тенипозид, амсакрина, мербарона, гидрохлорида пироксантрона, метотрексата, 6-меркаптопурина, 6-тиогуанина, цитарабина (Ага-С), триметрексата, ацивицина, аланозина, пиразофурина, пентостатина, 5-азацитидина, 5-азацитидина, 5-Aza-5-Aza-2'-дезоксидитидина, аденозин арабинозида (Ага-А), кладрибина, фторафура, УФТ (комбинация урацила и фторафура), 5-фтор-2'-дезоксидитидина, 5-фторуридина, 5'-дезоксид-5-фторуридина, гидроксимочевина, дегидроленхлорамбуцила, тиазофурина, оксалиплатина, мелфалана, тиотепы, бусульфана, хлорамбуцила, пликамина, дакарбазина, ифосфамид фосфата, циклофосфамида, пипобромана, 4-ипомеанола,

дигидроленперона, спиромустина, гелденамицина, цитохалазинов, депсипептида, 4'-циано-3-(4-(*например*, ZOLADEx) и 4'-циано-3-(4-фторфенилсульфонил)-2-гидрокси-3-метил-3'-(трифторметил)пропионанилида.

[0128] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациент может получать одно или более антител к Her2/neu, например, герцептин, и антитело к EGFR, например, эрбитукс, антитело к рецептору фактора роста, например, авастин, малую молекулу-ингибитор, например, тарцева, иресса или сунитиниб, или антитело к CD20, например, ритуксан. В еще других вариантах реализации настоящего изобретения пациент получает эрлотиниб, гефитиниб, лапатиниб цетуксимаб, панитумумаб или иматиниб.

[0129] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценка опухоли на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, может предписывать пациенту лечение соединениями карбазола, такими как, например, те, что описаны в международной публикации патента № WO 2010/042445, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения соединение карбазола представляет собой кураксин, такой как, например, CBLC000, CBLC100 и CBLC137 (*см., например, публикацию Gasparian, et al. Sci. Trans. Med. 3: 95ra74 (2011), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте*).

[0130] Оценка опухолей на основе FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, описанная в настоящем документе, может предписывать пациенту лечение, включающее лучевую терапию. Лучевая терапия может представлять собой, например, внешнюю лучевую терапию (ВЛТ) или лучевую терапию с модулированной интенсивностью (ЛТМИ). ВЛТ доставляет пучок рентгеновских лучей высокой энергии к местоположению опухоли. Пучок генерируется снаружи тела пациента (как правило, с помощью линейного ускорителя) и направлен к местоположению опухоли. Эти рентгеновские лучи могут уничтожать раковые клетки и тщательное планирование лечения позволяет защищать окружающие нормальные ткани. Радиоактивные источники не помещают в организм пациента. ЛТМИ – это более прогрессивный режим высокоточной радиотерапии, в котором используют компьютерно-управляемые рентгеновские ускорители, чтобы доставить точные дозы облучения в злокачественную опухоль или конкретные участки опухоли. Доза облучения сконструирована в соответствии с

трехмерной (3-D) формой опухоли путем модуляции или управления, интенсивность пучка излучения фокусирует более высокую дозу облучения в опухоли при минимизации лучевой нагрузки на здоровые клетки. Может быть использована также и брахитерапия, для которой используют закрытые радиоактивные источники, имплантированные в область лечения, которые могут быть временными или постоянными.

[0131] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения пациент с высоким риском получает химиотерапию и лучевую терапию.

[0132] Дозы лечения, установленные в результате представленного в настоящем изобретении оценивания опухолей известны в данной области техники, например, посредством ссылки на публикацию *Physicians' Desk Reference*, 66th Edition, PDR Network; 2012 Edition (December 27, 2011), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Чтобы помочь в определении оптимальных диапазонов доз, также могут быть использованы анализы *in vitro* или *in vivo*. Доза может зависеть от нескольких факторов, включая тяжесть ракового заболевания, возраст, массу тела и состояние здоровья субъекта, а также фармакогеномные параметры.

[0133] Способы введения включают, но, не ограничиваются перечисленным, пероральный, подкожный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, интраназальный, эпидуральный, подъязычный, интраназальный, внутричерепной, интравагинальный, трансдермальный, ректальный, путем ингаляции или местный, в частности, в уши, нос, глаза или на кожу. Способ введения может быть оставлен на усмотрение практикующего врача. Композиции для лечения могут необязательно содержать подходящее количество фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения субъекту.

[0134] В разных вариантах реализации настоящее изобретение включает определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT. Например, в некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает определение SSRP1 и/или SPT16.

[0135] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение SSRP1 и/или SPT16 включает применение агента, который специфически связывается с одним из белков SSRP1 и SPT16. Например, такой агент может представлять собой антитело.

[0136] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение SSRP1 и/или SPT16 включает применение агента, который специфически связывается с нуклеиновыми кислотами одного из белков SSRP1 и SPT16. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения этот агент может представлять собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения этот агент может представлять собой праймер или зонд.

[0137] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня белка. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение включает использование агента, который специфически связывается с одним из белков SSRP1 и SPT16, и этот агент может представлять собой, например, антитело. В разных вариантах реализации настоящего изобретения измерение уровней одного или более из белков SSRP1 и SPT16 представляет собой что-либо из иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, анализа клеточных вестернов, иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа ELISA и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (ФАКС).

[0138] Способы настоящего изобретения могут включать приведение в контакт антитела (*например*, против FACT и/или SSRP1, и/или SPT16) с образцом опухоли (*например*, материалом биопсии или тканью, или биологической жидкостью организма) для того, чтобы определить эпитоп, специфичный для ткани или биологической жидкости организма, и свидетельствующий о состоянии ракового заболевания (*например*, FACT и/или SSRP1, и/или SPT16).

[0139] Как правило, существует две стратегии, используемые для обнаружения эпитопов на антигенах в биологических жидкостях организма или тканях, прямые способы и косвенные способы. Прямой способ включает одноэтапное окрашивание и может включать меченое антитело (*например*, антисыворотка, конъюгированная с FITC), взаимодействующее непосредственно с антигеном в биологической жидкости организма или в образце ткани. Косвенный способ включает немеченое первичное антитело, которое реагирует с антигеном биологической жидкости или ткани, и меченое вторичное антитело, реагирующее с первичным антителом. Метки могут включать радиоактивные метки, флуоресцентные метки, гаптенотные метки, такие как

биотин, или фермент, такой как пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. Способы проведения этих анализов хорошо известны в данной области техники. См., например, Harlow *et al.* (Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988), Harlow *et al.* (Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1999), Virella (Medical Immunology, 6th edition, Informa HealthCare, New York, 2007) и Diamandis *et al.* (Immunoassays, Academic Press, Inc., New York, 1996). Наборы для проведения этих анализов коммерчески доступны, например, от компании Clontech Laboratories, LLC. (Mountain View, CA).

[0140] В разных вариантах реализации настоящего изобретения антитела включают целые антитела и/или любой антигенсвязывающий фрагмент (например, антигенсвязывающий участок), и/или их одиночные цепи (например, антитело, содержащее по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и $CH1$; $F(ab)_2$ -фрагмент, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и $CH1$; Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одной группы антитела; и т.п.). В разных вариантах реализации настоящего изобретения используются поликлональные и моноклональные антитела, а также выделенные человеческие или гуманизированные антитела или их функциональные фрагменты.

[0141] Стандартные анализы, для оценки связывающей способности антител в отношении мишени различных видов известны в данной области, включая, например, анализы ELISA, вестерн-блоттинг и RIA. Показатели кинетики связывания (например, аффинность связывания) антител также можно оценивать посредством стандартных анализов, известных в данной области, таких как анализ Biacore.

[0142] В другом варианте реализации настоящего изобретения определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня нуклеиновой кислоты.

[0143] Специалисту в данной области техники будет очевидно, что для обнаружения или количественного определения уровней ДНК/РНК FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 может быть использован ряд способов.

[0144] Экспрессия генов может быть измерена посредством, например, анализов одновременного генотипирования от низкого до среднего количества аналитов

включая, но, не ограничиваясь перечисленным, анализы репортерного гена, нозерн-блоттинг, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Экспрессия генов может быть также измерена посредством, например, анализов одновременного генотипирования более высокого количества аналитов включая, но не ограничиваясь перечисленным, последовательный анализ экспрессии генов (SAGE), микрочипы ДНК. Чип высокой плотности (tiling array), РНК-секвенирование полного транскриптома методом "выстрела из дробового ружья" (WTSS), высокопроизводительное секвенирование, мультиплексная ПЦР, мультиплексная амплификация лигированных зондов (MLPA), секвенирование ДНК посредством лигирования и Luminex/XMAP.

[0145] Специалисту в данной области техники будет понятно, что для обнаружения или количественного определения уровня РНК-продуктов биомаркеров в образце может быть использован ряд способов, в том числе чипы, такие как микрочипы, ОТ-ПЦР (включая количественную ПЦР), анализы с нуклеазной защитой и анализы нозерн-блоттинг.

[0146] В разных вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается определение FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, что предоставляет информацию о наличии или отсутствии, что направляет предписание лечения пациента.

[0147] В других вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается определение FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, чтобы количественно определить уровень FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается количественное определение числа злокачественных/опухолевых клеток и определения процентного количества этих клеток, экспрессирующего FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения высокий уровень FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 свидетельствует об агрессивном раковом заболевании, в то время как низкий уровень FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 свидетельствует о менее агрессивном раковом заболевании.

[0148] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения применяется система оценивания FACT в баллах, отражающая интенсивность окрашивания и долю положительных опухолевых клеток. Может быть использована любая подходящая система оценивания в баллах, в том числе системы пороговых значений и непрерывного оценивания. Например, в системе оценки может использоваться шкала

от 0 до по меньшей мере 4. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения различные оценки FACT, которые "отсекаются", это: (i) образцы с высоким уровнем FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 SSRP1 (*например* индексы >4) в сравнении с образцами с низкими и отрицательными уровнями (*например*, индексы ≤ 4); (ii) положительный FACT и/или SSRP1 и/или SPT16 (*например*, индексы >1) и слабый/отрицательный (*например*, индексы ≤ 1); и (iii) полностью отрицательные образцы (*например*, индексы = 0, отсутствие определяемых FACT и/или SSRP1, и/или SPT16-положительных клеток) в сравнении со всеми положительными образцами (*например*, индексы >0 , любое соотношение FACT и/или SSRP1, и/или SPT16-положительных клеток, включая очень слабые уровни или менее чем, *например*, 10%).

[0149] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения получают корреляцию выживаемости и уровня FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 и сравнивают положительные или отрицательные образцы FACT и/или SSRP1, и/или SPT16.

[0150] Используемый в настоящем описании термин FACT-положительный относится к положительному определению FACT или его субъединицы (*например*, SSRP1 и/или SPT16). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения FACT-положительный образец включает в себя те, в которых количество злокачественных клеток составляет по меньшей мере около 5% или по меньшей мере около 10%. В разных вариантах реализации настоящего изобретения FACT-положительные образцы включают содержащие злокачественные клетки, при этом более чем около 10% или около 20%, или около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 100% злокачественных клеток экспрессирует FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. Например, порог FACT для различения высоких или низких групп риска находится в пределах от около 5% до около 50%, например, в пределах от около 10% до 30%.

[0151] В разных вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается проведение биопсии опухоли пациента и, необязательно, идентификация и/или измерение злокачественных клеток в образце биопсии посредством, например, подсчета процентного содержания злокачественных клеток и, необязательно, идентификация и/или измерение злокачественных клеток, экспрессирующих FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предлагается количественное определение процентного содержания злокачественных клеток, экспрессирующих FACT и/или SSRP1, и/или SPT16, что

позволяет оценивание FACT по шкале в баллах, как описано в настоящем документе (и, соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, предписывает лечение). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения оценка FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 в баллах устанавливает пороговые уровни, описанные в данном документе, чтобы определить, например, характеристики заболевания (*например*, агрессивность опухоли). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения в определении злокачественных клеток можно использовать различные биомаркеры, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения в определении злокачественных клеток можно использовать различные экспериментальные методики, описанные в настоящем документе.

[0152] В разных вариантах реализации настоящего изобретения в настоящем изобретении предлагается проведение биопсии опухоли пациента и идентификация злокачественных клеток. Отдельные клетки могут быть идентифицированы с помощью подходящего окрашивания (*например*, с помощью окрашивания ДАПИ). Злокачественные клетки могут быть идентифицированы квалифицированным патологоанатомом и/или с использованием маркеров опухоли/злокачественного новообразования. Злокачественные части образца используют для оценки статуса FACT.

[0153] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения также можно выполнять определение схожести окрашивания FACT и/или SSRP1, и/или SPT16.

[0154] В разных вариантах реализации настоящего изобретения тестируют также и контрольный маркер.

[0155] В разных вариантах реализации настоящего изобретения используют одновременное или последовательное определение.

[0156] В разных вариантах реализации настоящего изобретения для измерений можно использовать автоматизированные или компьютерные способы, которые визуализируют окрашенный образец опухоли и позволяют количественное определение различных используемых маркеров, в том числе количественное определение клеток, которые экспрессируют множество маркеров. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения патологоанатом может проводить измерения, описанные в настоящем документе.

[0157] В разных вариантах реализации настоящего изобретения автоматизированные или компьютерные программные способы и/или патологоанатом может определить количество или процент FACT и/или SSRP1, и/или SPT16-положительных клеток в сравнении с количеством или процентом опухолевых/злокачественных клеток и рассчитать пороговое количество или балл, как описано в настоящем документе.

[0158] В разных вариантах реализации настоящего изобретения система оценивания в баллах связана с анализами для обнаружения, описанными в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения ИГХ окрашивание микрочипов ткани (ТМА), состоящих из образцов биопсий первичной опухоли и там, где доступно, сопоставление нормальных или метастатических поражений, используют для оценки уровня белка FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 в образцах опухоли человека.

[0159] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения определение FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 выполняют на компьютере. Соответственно, в некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предлагаются компьютерные программы и компьютерные программные продукты для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В одном варианте реализации настоящего изобретения в заявке предлагается компьютерный программный продукт для использования в сочетании с компьютером, имеющим процессор и память, соединенную с процессором, этот компьютерный программный продукт содержит машиночитаемый носитель, имеющий закодированный в нем компьютерный механизм, при этом механизм компьютерной программы может быть загружен в память компьютера и вызвать выполнение компьютером описанных в настоящем документе способов. В другом варианте реализации настоящего изобретения в заявке предлагается компьютерный программный продукт для выполнения прогнозирования или классификации субъекта по данным анализов FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. Такой компьютерный продукт может содержать средство для приема значений, соответствующих профилю экспрессии субъекта в образце от субъекта (*например*, FACT и/или SSRP1, и/или SPT16) и базу данных, содержащую справочные данные, связанные с прогнозом, при этом компьютерный программный продукт выбирает справочные данные наиболее близкие к профилю FACT и/или SSRP1, и/или SPT16 субъекта, чтобы таким образом предсказать прогноз или выполнить классификацию субъекта.

[0160] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает формирователь сигналов изображения, чтобы осуществить детекцию сигнала, обеспечивающего измерение.

[0161] В разных вариантах реализации настоящего изобретения автоматизированная устройство и/или компьютер могут использоваться для реализации способов, описанных в настоящем документе, включая, например, стадии визуализации, определения и/или количественного измерения. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такое автоматизированное устройство и/или компьютер может обеспечить автоматизацию измерений, описанных в настоящем документе.

[0162] Например, в одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает использование системы визуализации инфракрасной флуоресценции (*например*, "фотодинамический глаз", Hamamatsu Photonics, Japan, как описано, например, в публикации Kitai, T. *et al.*, Breast Cancer. 2005;12 (3):211–215, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Такие системы визуализации инфракрасной флуоресценции могут состоять из светоизлучающих диодов, например, на 760 нм, в качестве источника света, и телекамеры на приборах с зарядовой связью с фильтром с ограниченной полосой пропускания, например, 820 нм, в качестве детектора.

[0163] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к использованию лазерного визуализирующего устройства (*например*, система SPY, Novadaq Corp., Bonita Springs, FL, как описано, например, в публикации Jain, V. *et al.*, International Journal of Surgical Oncology Volume 2013 (2013), Article ID 904214), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Такое лазерное визуализирующее устройство может обеспечивать обнаружение флуоресцентного красителя в режиме реального времени.

[0164] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к использованию портативного устройства наблюдения за полем зрения для детекции флуоресценции (в качестве не ограничивающего примера, как описано в публикации Poh, C.F. *et al.*, Clin Cancer Res 2006;12(22) 2006, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте). Устройства наблюдения флуоресценции в поле зрения могут состоять из настольного источника света, соединенного с портативным блоком для прямой визуализации флуоресценции. Фотографии флуоресценции тканей могут быть получены с помощью освещения из

устройства наблюдения за полем зрения и цифрового однообъективного зеркального фотоаппарата (например, Fuji FinePix S2 Pro, Fujifilm, Odawara, Japan) с широкополосным фильтром (например, Schott GG475-3, Howard Glass, Worcester, MA). Однообъективный зеркальный фотоаппарат может быть оснащен макросъемочным объективом 105 мм f/2,8 (например, Nikkor-Micro, Nikon, Tokyo, Japan) и кольцевой вспышкой (например, Nikon Macro Speedlight SB-29s, Tokyo, Japan) для фотографий при естественном освещении.

[0165] В другом варианте реализации настоящее изобретение включает использование флуоресцентного микроскопа (например, Olympus Microscope, Olympus America, Center Valley, PA), как описано, например, в публикации Marcus, A. et al., *Am J Clin Pathol* 2012; 138 (4) 590-3, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

[0166] В другом варианте реализации в настоящем изобретении может использоваться система MDS (Applied Imaging Corp., Santa Clara, CA), как описано, например, в публикации Borgen, E. et al. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46:215–221 (2001), содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Система MDSTM содержит эпифлуоресцентный микроскоп с управляемым компьютером перемещаемым предметным столиком, механизм автоматической фокусировки, два сменных светофильтра для обнаружения множества/хромогенов/флуорохромов, черно-белую камеру на ПЗС, компьютер, монитор и запатентованное программное обеспечение для сканирования и анализа.

[0167] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к использованию портативной γ -камеры (например, Sentinella, S102; Oncovision), как описано, например, в публикации Kitai, T. et al., *Open Surgical Oncology Journal*, 2010, 2, 78-82 и Vermeeren, L. et al., *J of Nuclear Medicine* 2010; 51(5) 700-703, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Система γ -камеры состоит из предоперационной визуализации с гибридной камеры SymbiaT (Siemens) для получения ОФЭКТ/КТ изображений и использования портативного γ -зонда (Neoprobe; Johnson & Johnson Medical) вместе с γ -камерой для обеспечения большей чувствительности.

[0168] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает определение показателей образца опухоли, включая проведение биопсии или хирургического отбора образцов. В некоторых вариантах реализации настоящего

изобретения биопсия представляет собой биопсию, полученную от человека. В разных вариантах реализации настоящего изобретения биопсия представляет собой что-либо из образца замороженной опухолевой ткани, культивированных клеток, циркулирующих опухолевых клеток и фиксированного формалином и залитого парафином образца опухолевой ткани.

[0169] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли может представлять собой образец биопсии, например, образец замороженной опухолевой ткани (криосрез). Как известно в данной области техники, для выполнения криосреза можно использовать криостат, содержащий внутри замораживателя микротом. Хирургический образец помещают на металлический диск для ткани, который затем фиксируют в зажимном патроне и быстро замораживают до температуры от около -20 °C до около -30 °C. Образец заливают гелеобразной средой, состоящей из, например, полиэтиленгликоля и поливинилового спирта. Замороженные ткани нарезают в замороженном виде с помощью микротомной части криостата и срезы необязательно помещают на предметное стекло и окрашивают.

[0170] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли может представлять собой образец биопсии, например, культивированные клетки. Эти клетки могут быть обработаны с использованием обычных способов культивирования клеток, известных в данной области техники. Эти клетки могут представлять собой циркулирующие опухолевые клетки.

[0171] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли может представлять собой образец биопсии, например, фиксированный формалином и залитый парафином (ФФЗП) образец опухолевой ткани. Как известно в данной области техники, образец биопсии может быть помещен в контейнер с формалином (смесь воды и формальдегида) или с какой-либо другой жидкостью для его сохранения. Образец ткани может быть помещен в форму с горячим парафином. Парафин остывает с образованием твердого блока, который защищает ткань. Этот блок парафина с залитой тканью помещают на микротом, который нарезает очень тонкие срезы ткани.

[0172] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения образец опухоли содержит менее чем 100 мг ткани, или в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения содержит около 50 мг ткани или меньше. Образец опухоли (или биопсия) может содержать от около 20 мг до около 50 мг ткани, например, около 35 мг ткани.

[0173] Ткань может быть получена, например, как одно- или более (*например*, 1, 2, 3, 4 или 5) игольная биопсия (*например*, с использованием иглы 14-го калибра или другого подходящего размера) В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения биопсия представляет собой тонкоигольную аспирационную биопсию, при которой в подозрительную область вводят длинную тонкую иглу и для извлечения жидкости и клеток для анализа используют шприц. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения биопсия представляет собой толстоигольную биопсию, при которой для извлечения столбца ткани из подозрительного участка во время толстоигольной биопсии используется большая игла с режущим кончиком. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения биопсия представляет собой вакуумную биопсию, при которой всасывающее устройство увеличивает количество жидкости и клеток, которое извлекается через иглу. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения биопсия представляет собой биопсию под видеоконтролем, при которой игольную биопсию объединяют с процедурой визуализации, такой как, например, рентген, компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) или ультразвук. В других вариантах реализации настоящего изобретения образец может быть получен с помощью такого устройства, как система для MAMMOTOME®, которая представляет собой вакуумную систему для биопсии молочной железы с лазерным контролем.

[0174] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения связанные многоклеточные частицы (эксплантаты) получают из образца ткани пациента (*например*, из образца биопсии или хирургического образца) с использованием механической фрагментации. Эта механическая фрагментация эксплантатов может иметь место в среде, по существу свободной от ферментов, которые способны расщеплять эксплантаты. Некоторое ферментативное расщепление может происходить в определенных вариантах реализации настоящего изобретения. Как правило, образец ткани моно систематично нарезать ножницеобразными движениями с помощью двух стерильных скальпелей, или механически эквивалентными ручными или автоматизированными противостоящими лезвиями резцов. Эти движения поперечной нарезки создают гладкие края разреза на полученных в результате многоклеточных частицах ткани. Каждая из опухолевых частиц имеет размер от около 0,25 до около 1,5 мм³, например, около 1 мм³. После измельчения частицы могут быть высеяны в колбы для культур. Количество эксплантатов, высеянных в колбу для культуры, может

изменяться, например, от около одного до около 25, например, от около 5 до около 20 эксплантатов на колбу. Для целей иллюстрации, эксплантаты могут быть равномерно распределены по всей поверхности дна колбы с последующей начальной инверсией от около 10 до около 15 минут. Затем колбу можно поместить в неперевернутом положении в инкубатор с температурой 37 °C, CO₂ на период от около 5 до около 10 минут. Колбы регулярно проверяют на рост и загрязнения. В течение нескольких недель будет формироваться клеточный монослой. Кроме того, как полагают (без привязки к какой-либо теории), что опухолевые клетки растут из многоклеточных эксплантатов раньше стромальных клеток. Таким образом, изначальное поддержание тканевых клеток в эксплантатах и удаления эксплантатов в заранее определенное время (*например*, при от около 10 до около 50 процентов слияния, или от около 15 до около 25 процентов слияния), облегчает рост опухолевых клеток (в отличие от стромальных клеток) в монослой. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения опухолевые экспланты можно перемешивать, чтобы по существу высвободить опухолевые клетки из эксплантатов опухолей, и культивировать высвобожденные клетки для получения монослоя клеточной культуры. Применение этой процедуры для получения монослоя клеточной культуры помогает максимально увеличить рост представительных опухолевых клеток из образца ткани.

[0175] В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к идентификации отдельных клеток в образце и/или определению нормальных и/или злокачественных клеток в образце, и/или определению наличия, отсутствия и/или количества и/или схожести FАСТ и/или его субъединиц в злокачественных клетках. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такую идентификацию выполняют одновременно или последовательно. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения такая идентификация включает контрольное измерение одного или более маркеров опухолей/злокачественных новообразований, как описано в настоящем документе.

[0176] В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к одновременному определению отдельных клеток в образце и детекции одного или более маркеров опухолей/злокачественных новообразований и детекции наличия, отсутствия и/или количества и/или схожести FАСТ и/или его субъединиц для определения процента экспрессии и/или активности FАСТ и/или его субъединиц. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения процент злокачественных

клеток, экспрессирующих FACT и/или его субъединиц предписывает назначение лечения или отмену лечения, как описано в настоящем документе. В разных вариантах реализации настоящее изобретение включает стадию количественного определения числа опухолевых/злокачественных клеток, экспрессирующих FACT и/или одну из его субъединиц.

[0177] В общем, расположение отдельной клетки может быть детектировано с помощью различных цитогенетических анализов, анализов нуклеиновых кислот, белков или иммунохимических анализов. Наличие или отсутствие различных клеток может быть детектировано посредством приведения образца в контакт с лигандом, способным к специфическому связыванию или взаимодействию с маркером, наличие или отсутствие которого или повышение или уменьшение уровня наличия которого специфически связано с опухолью и/или злокачественным новообразованием.

[0178] В одном варианте реализации настоящего изобретения наличие или отсутствие отдельных клеток может быть определено с использованием антитела (в качестве неограничивающего примера, антител к MSN-1, антител к OXA, антител к OXB, антител к PTEN, антител к LeY, антител к CAGE, антител к UPAR, антител к Herpидin и антител к KLK4). В другом варианте реализации настоящего изобретения наличие или отсутствие различных клеток может быть определено с помощью зонда для нуклеиновой кислоты, способного к специфической гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты, в частности, связанной с определенными клетками, например, ОНП, мутации, механизмы сплайсинга интрон-экзон, транскрипты генов, связанные с определенными клетками, генетические последовательности или гены, связанные с определенными клеткам и т.д. Термин "последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеиновая кислота" или "зонд для нуклеиновой кислоты" может относиться к любой нуклеиновой кислоте, содержащей, например, от около 5 до около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более нуклеотидов. Термины включают: одно-, двух- или многоцепочечную ДНК или РНК, геномную ДНК, кДНК, гибриды ДНК-РНК или полимер, содержащий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или дериватизированные нуклеотидные основания.

[0179] В разных вариантах реализации настоящего изобретения для детекции клеток, описанной в настоящем документе, можно использовать любой реагент, пригодный для

целей обнаружения. Такой реагент для мечения может включать в себя, но, не ограничиваясь перечисленным, различные ферменты, протезные группы, флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки и радиоактивные метки. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают: пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, α -глицерофосфат, аспарагиназу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу, глюкозооксидазу и ацетилхолинэстеразу. Неограничивающие примеры подходящих комплексов протезных групп включают: стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают: умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид, аллофикоцианин, зеленый флуоресцентный белок, о-фталевый альдегид, фикоцианин и фикоэритрин. Примеры хемилюминесцентных материалов включают: соль акридиния, имидазол, сложный эфир щавелевой кислоты, тероматический сложный эфир акридиния, люминол и изолюминол. Неограничивающие примеры биолюминесцентных материалов включают: люциферазу, люциферин и экворин. Неограничивающие примеры подходящих радиоактивных материалов включают: ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{32}P и ^3H .

[0180] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения маркеры опухоли/злокачественного новообразования, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, одно или более из MYBL2, MKI67, MAD2L1, AURKA, BCL2, BUB1, BIRC5, ESRI, CENPN, CCNB1, ERBB2, MLFIIP, NUDT1, PLK1, RNASE4, GGH, RRM2, CKS2, MCM4, CDKN3, Cl6orf61, DLG7, H2AFZ, PFKP, KPNA2, GATA3, CENPF, KRT18, KRT5, CCNE2, MELK, CX3CR1, TRIP13, MCM6, CCND1, PDIA4, CENPA, UBE2S, NCF1, CDC25B, PGR, TGFB3, PSMD2, HMMR, XBPI, TROAP, KNTC2, PRAME, BTG2, KRT8, FOXM1, KYNU, NME1, MCM3, NUSAP1, PCTK1, IGFBP5, CDC2, ERBB3, CSEIL, PTTG1, PRC1, BRRN1, UBE2C, MUC1, KIF23, CDK2, PPP2R5C, RARRES3, PIR, CCT4, KIF14, SLPI, TOP2A, BBC3, RHOC, EZH2, HMGB3, GMPS, YIF1A, NP, DKFZp762E1312, MET, FABP5, DCK, CTSC, CCNB2, FLJ21062, VEGF, IL32, CDC20, TACC2, IGFBP2, IFI30, ID3, GPSM2, TIMP2, CCNE1, EIF4A1, RFC4, CST3, CCNA2, CENPE, SLC25A5, GSTM3, SLC7A5, LETMD1, RPS4X, TFF3, ATAD2, ACADSB, KRT17, YWHAZ, PSMB7, CNKSRI, EXT1, SMC4, MCM2, GATM, DDOST, PEX12, YY1, TFDPI, LMNB2, HPN, POLQ, PCNA, GTSE1, MAPRE1, PLAUR, PTDSSI, LRRC17, FEN1, NDP, ABCD3, SCUBE2, TP53, AURKB,

KIFC1, COL3A1, NPY1R, PTPLB, SFRS10, SDC1, CDC β , CD24, TCEAL1, Clorf198, FAM64A, CDCA3, MSN, MYO10, KIF2C, ASPM, TUBA1, VIL2, CYBRD1, CTSL, SFRS7, SESN1, LRP8, CP, KIT, CNAPI, TFRC, PL0D2, CKS1B, DUSP4, NDRG1, SLC35A1, CIS, CCT5, IFITM1, ITPR3, SAT, FABP7, OMD, ADAMTSL1, PPP1R12A, PRLR, FKBP1A, SNRPA1, CCNC, SCAP1, SPRR2C, FADS2, CTSL2, TLE3, PDAP1, IER2, ESPL1, CDH1, UBR2, RAB6A, CD44, FBXO5, F3, PTPRT, RACGAP1, CCT7, SLC25A1, C4orf18, TXNRD1, SLC3A2, Clorf35, INSR, SOD2, GABBR1, SNRPB, EIF2C2, ID1, CEP55, RLN1, PTMA, KIF11, SHMT2, FAM89B, TPX2, CFB, EXO1, EIF4EBP1, DHFR, HIPK2, SYNCRIP, BRCA1, ZNF43, LMNB1, PBXIP1, FIO, FCGRT, FUT8, RAD21, FRY, LDHA, VASH1, GRB7, ZMYM4, ACTB, CCL18, MTDH, MS4A7, C17orf27, LOC286052, TACC3, MTIX, TK1, CDH3, CDC42BPA, FUT3, GNAZ, YBX1, GPR126, ARPC4, AP2B1, COL6A1, CXCL9, C14orf45, DIAPH3, DNAJC12, LAPTM4B, TUBA3, DTL, ALDH4A1, ORC6L, ABLIM1, SHCBP1, FGFR1, ER- β , CIRBP, C20orf4 β , SLC16A1, SPARC, CYP2J2, AP2A2, SLC39A6, F2, SCD, ECT2, QSCN6L1, H3F3B, COL2A1, TBX19, EDN1, OXCT1, RP13-297E16.1, PALM2-AKAP2, HRB, TUBB, CTPS, CAD, CHI3L1, GREM1, ENO1, PLOD1, SORBS1, TSPAN1, STMN1, HIF1A, MMP7, STK3, G0LPH2, MT2A, FOXO1, SRM, COL1A2, GEMIN4, MAPRE2, PGK1, TIMP1, ZBTB4, CRABP1, MAP3K8, TGFB1, C10orf11 β , C14orf132, TP53INP1, BLM, CD- C25A, MSX2, MMP23B, ADM, CTSF, SFRP4, HMGA1, MRPS6, AP-BA2BP, STRA13, CDCA8, SQLE, ACSS2, FBP1, PSMA7, HTATIP2, PSMD14, HSPB2, APP, TAS2R5, NFIB, TNFAIP2, NAT1, SC4MOL, HNRPA, TUBG1, PAXIP1, SEC14L1, SATB1, CELSR2, RNASEH2A, TMEM45A, CDKN1A, PTGS2, ARF1, HDAC2, BCL6, CKAP4, JUNB, NOLA2, APOD, MMP1, EGFR, CCT6A, HDGFRP3, CES2, SMS, DEPDC1B, TSPAN4, BDH2, EE1A2, S100A8, WISP1, PGAM1, DYNLT1 и/или ADCY3.

[0181] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения маркеры опухоли/злокачественного новообразования, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, одно или более из: реаранжировки гена ALK, альфафетопротейна (AFP), бета-2-микроглобулина (B2M), бета-хорионического гонадотропина человека (бета-hCG), гибридного гена BCR-ABL, BRAF мутация V600E, CA15-3/CA27.29, CA19-9, CA-125, кальцитонина, раково-эмбрионального антигена (CEA), CD20, хромогранина А (CgA), хромосом 3, 7, 17 и 9p21, фрагментов цитокератинов 21-1, анализов на мутацию EGFR, эстрогенового рецептора (ER)/прогестеронового рецептора (PR), фибрина/фибриногена, HE4,

HER2/neu, иммуноглобулинов, KIT, анализов мутации KRAS, лактатдегидрогеназы, ядерного матричного белка 22, простатспецифического антигена (PSA), тиреоглобулина, урокиназного активатора плазминогена (uPA) и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), сигнатуры белка 5 (Ova1), сигнатуры гена 21 (Oncotype DX), сигнатуры гена 70 (Mammaprint).

[0182] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения маркеры опухоли/злокачественного новообразования, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, одно или более из: членов семейства белков SSX, например, SSX1, SSX4, SSX5 или их фрагменты MSN-1, OXA, OXB, PTEN, LeY, CAGE, UPAR, Hspcadin и KLK4. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения маркеры опухоли/злокачественного новообразования, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, одно или более из: простатспецифического антигена (PSA), простатспецифического мембранного антигена (PMSA), простатического секреторного белка (PSP), простатической кислой фосфатазы (PAP), человеческого железистого каллекреина 2 (HK-2), антигена стволовых клеток простаты (PSCA) и PTI-1. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения маркеры опухоли/злокачественного новообразования, используемые в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленным, одно или более из: β -актина, γ -актина, α -тубулина, цитокератина, цитокератина 8 (CK 8), цитоскелетного тропомиозина, кэппирующего белка F-актина, hsp 27, hsp 60, hsp 70, hsp 90, grp 78 (BIP), gr 96, глутатион-S-трансферазы, глутатионсинтетазы, супероксиддисмутазы, тиоредоксинпероксидазы, PA28 α , убикитинатиолэстеразы, триозофосфатизомеразы, альдозоредуктазы, эноил-СоА гидратазы, α -энолазы, аннексина II, IV и V, статмина, никотинамид N-метилтрансферазы, B23/нуклеофосмина и виментина.

[0183] В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения перед оценкой уровней FACS, можно контролировать рост клеток и данные периодического подсчета можно использовать для определения скоростей роста, которые могут расцениваться или могут не расцениваться как параллельные скоростям роста тех же клеток у пациента *in vivo*.

[0184] Термин субъект, при использовании в настоящем документе, если не оговорено особо, означает млекопитающее, *например*, человек. Также включены экспериментальные животные, например, мышь, крыса, морская свинка, собака, кошка,

лошадь, корова, свинья или примат, не являющийся человеком, например, обезьяна шимпанзе или бабуин. В одном варианте реализации настоящего изобретения субъект представляет собой ветеринарного пациента, в том числе животных, описанных в настоящем документе. В одном варианте реализации настоящего изобретения субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения человек является ребенком. В других вариантах реализации настоящего изобретения субъект представляет собой взрослого человека, в том числе, например, пожилого человека.

[0185] В настоящем изобретении предлагаются наборы, которые могут упростить оценку образцов опухоли. Типичный набор по настоящему изобретению содержит различные реагенты в том числе, например, агент для обнаружения FACT и/или SSRP1, и/или SPT16. Набор также может содержать один или более реагентов для детекции, в том числе те, которые используются в различных способах детекции, таких, как, например, ELISA. Набор может дополнительно содержать материалы, необходимые для оценки, в том числе луночные планшеты, шприцы и т.п. Набор может дополнительно содержать этикетку или печатные инструкции, предписывающее использование описанных реагентов.

[0186] Это изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

[0187] Способы, используемые в настоящем описании, известны в данной области техники. Подробности некоторых из этих способов описаны ниже.

[0188] Реагенты: CBLC137 предоставлены компанией Cleveland BioLabs, Inc (Buffalo, NY).

[0189] Клетки. Клетки HT1080, WI-38, MCF7 и MCF10A получены от ATCC. Клетки HT1080, WI-38, MCF7 поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% термоинактивированной (ТИ) фетальной бычьей сыворотки ФБС и антибиотиков. Клетки MCF10A поддерживали в среде 1:1 DMEM/F12 с добавлением 5% лошадиной сыворотки, 20 нг/мл EGF, 500 нг/мл гидрокортизона), 0,01 мг/мл инсулина, 100 нг/мл холерного токсина и антибиотиков. Клетки RCC45 и NKE-hTERT уже были описаны (Gurova, *et al.* (2004). Cancer Res 64, 1951-1958). Эпителиальные клетки молочной

железы человека были получены из маммопластики по уменьшению груди и были модифицированы и поддерживались так, как известно в данной области техники. Клетки мышинные эмбриональные фибробласты (MEF) дикого типа и нокаутные по p53 были получены от беременных 13,5 дней мышей линии C57/B6 дикого типа или p53^{-/-} и поддерживались в среде DMEM с 10% ФБС и антибиотиками.

[0190] Плазмиды, трансфекция и трансдукция лентивирусов. pLV-H-Ras^{V12}-Bleo или лентивирусные векторы pLV-Bleo были любезно предоставлены Dr. Andrei Gudkov (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY). кДНК SSRP1 человека клонировали в новый лентивирусный вектор pLV и подтверждали секвенированием. кДНК SUPT16 синтезировали (Invitrogen, GeneArt AG) с использованием последовательности, которая была оптимизирована DAPCEL, Inc. (Cleveland, OH) с последующим использованием запатентованной DAPCEL, Inc стратегией оптимизации синонимичных кодонов для увеличения экспрессии белков в гомологичных и гетерологичных хозяевах. кДНК клонировали в лентивирусный вектор pMLV HygroR как фрагмент XbaI-BamHI. Mission® мшПНК к SSRP1, Spt16 или ЗФБ приобретали в компании Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, MO).

[0191] миПНК к SSRP1 (пул On-Target и SMART, номер по каталогу L-011783-00) SPT16 (пул On-Target и SMART, номер по каталогу L-009517-00) и миПНК не нацеленную на миCONTROL (номер по каталогу D-001210-01) приобретали в компании Thermo Scientific Dharmacon. Трансфекцию проводили с использованием реагента липофектамин 2000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Упаковку лентивируса и инфицирование проводили, как известно в данной области техники.

[0192] Протоколы вестерн-блоттинга, цитометрии флуоресцентно-активированных клеток и иммунофлуоресценции известны в данной области техники.

[0193] Показатели репликации и транскрипции в клетках измеряли с помощью наборов EDU и EU (Invitrogen) в соответствии с протоколами производителя.

[0194] Количественная ПЦР в реальном времени. Общую РНК выделяли с помощью реагента TRIzol (Ambion) в соответствии с протоколом производителя. Первую цепь кДНК синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием набора для синтеза кДНК iScript (BioRad) в соответствии с протоколом производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров, приобретенных в компании

Applied Biosystems: SSRP1 – Hs00172629_m1, SUPT16H – Hs00200446_m1 и 18S – Hs99999901_s1. кПЦР проводили с использованием смеси для анализа экспрессии генов TagMan gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), используя параметры по умолчанию системы обнаружения последовательности 7900HT (ABI PRISM; Applied Biosystems). Для сравнения экспрессии генов между образцами, значение порогового цикла (CT) нормализовали, используя среднее CT для эталонного гена, 18S рибосомальной РНК (рРНК). Нормализованный уровень мРНК был определен как $\Delta CT = CT \text{ (тестируемый ген)} - CT \text{ (среднее для эталонного гена)}$. Окончательные данные выражали как кратность разницы между тестируемым образцом и контрольным образцом, и были определены как $2^{(\Delta CT \text{ теста} - \Delta CT \text{ контроля})}$. Все реакции проводили в трех повторностях, и эксперименты повторяли по меньшей мере дважды. Результаты представлены как среднее значение по меньшей мере из двух экспериментов.

[0195] ТМА и популяция пациентов. Экспрессию белка SSRP1 у пациентов с раком оценивали с использованием 16 когорт пациентов с раком по ТМА. ТМА содержит очаг из одной ткани из не отобранных, фиксированных формалином и залитых парафином образцов с установленным диагнозом в 1994-2002 годах в институте рака Roswell Park Cancer Institute. Buffalo, NY. Возраст пациентов колебался от 25 до 82 лет со средним возрастом 56 лет. Опытный патологоанатом-хирург (С.М.) оценивал окрашенные гематоксилином и эозином срезы всех образцов перед созданием ТМА для того, чтобы идентифицировать репрезентативные участки опухоли. Гистологически все опухоли были классифицированы в соответствии с публикацией Elston & Ellis, Histopathology, 1991, 19:403-10, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Дополнительная клиническая информация, предоставленная сетью ресурсов гистопатологии или RPCI, была доступна для всех пациентов с раковым заболеванием со средним периодом последующего наблюдения в месяцах (диапазон 0-148 месяцев). Все пациенты, включенные в данное исследование дали информированное согласие на дальнейший анализ их ткани для научно-исследовательских целей и на публикацию данных. Наблюдательная комиссия института RPCI утвердила протокол.

Таблица 1А. Описание когорт пациентов, используемых для ТМА, используемых в настоящем исследовании

Тип рака	ТМА	Описание	Возраст	кол-во
----------	-----	----------	---------	--------

	ID		(средний/диапазон)	пациентов
Рак молочной железы	BrCa 25	Стадия 1 рак молочной железы, инвазивная протоковая опухоль, ER-положительная, Her 2-отрицательная. 58 пациентов x 3 опухолевых очага у каждого, 220 очагов всего, 174 очага в молочной железе, 46 очагов, не соответствующих норме.		58
Рак молочной железы	BrCa 38	Все включенные случаи имеют опухоль, а также включены соответствующие очаги метастатические очаги в лимфатических узлах. 45 пациентов x 6 опухолевых очагов у каждого. 330 очагов всего, 270 очагов в молочной железе, 60 нормальных, не соответствующих очагов. 3 очага опухоли и 3 метастатических очага были приняты за случай.		45
Рак толстого кишечника	GICa 3	Колоректальная опухоль и нормальные ткани. 144 очага всего, 114 колоректальных очагов всего, 90 колоректальных очагов опухоли, 24 нормальных колоректальных очагов, 30 очагов нормальных органов.		
Рак поджелудочной железы	GICa 5	7 пациентов включены в TMA: 2 пациента имели только первичную опухоль, 4 пациента имели первичную опухоль и нормальную ткань, 1 пациент имел первичную, метастатическую и нормальную ткань. Эти пациенты имели		7

		первичную опухоль из 1-2 очагов.		
Рак поджелуд очной железы	GICa 6	11 пациентов включены в ТМА: 9 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань, 2 пациента имели первичную, метастатическую и нормальную ткань. Эти пациенты имели первичную опухоль из 3 и 4 очагов.		11
Рак поджелуд очной железы	GICa 7	7 пациентов включены в ТМА: 5 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань, 5 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань. Эти пациенты имели первичную опухоль из 5 очагов.		7
Рак поджелуд очной железы	GICa 8	9 пациентов включены в ТМА: 7 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань, 1 пациент имел первичную опухоль и метастатическую опухоль, 1 пациент имел первичную, метастатическую и нормальную ткань. Эти пациенты имели первичную опухоль из 6 очагов.		9
Рак поджелуд очной железы	GICa 9	7 пациентов включены в ТМА: 7 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань.		7
Рак поджелуд очной железы	GICa 10	10 пациентов включены в ТМА: 8 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань. 2 пациента имели первичную, метастатическую и нормальную ткань.		10

Рак поджелуд очной железы	GICa 11	12 пациентов включены в ТМА: 2 пациента имели только первичную опухоль. 8 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань. 2 пациента имели первичную, метастатическую и нормальную ткань.		12
Рак поджелуд очной железы	GICa 12	7 пациентов включены в ТМА: 5 пациентов имели первичную опухоль и нормальную ткань, 1 пациент имел первичную опухоль и метастатическую опухоль, 1 пациент имел первичную, метастатическую и нормальную ткань.		7
ПКК	GUC a2 (почк и)	Всего случаев опухолей: 120. Всего случаев опухолей с соответствием нормальным тканям: 106. Всего случаев опухолей с генерически ТР нормальными почками: 17. Всего очагов из других нормальных тканей: 48. Всего очагов: 288.		120
ПКК	GUC a3 (почк и)	Всего случаев опухолей: 117. Всего случаев опухолей с соответствием нормальным тканям: 106. Всего случаев опухолей с генерически ТР нормальными почками: 11. Всего очагов из других нормальных тканей: 54. Всего очагов: 288.		117
Метастат ическая ПКК	GUC a4 (почк и)	Этот ТМА включает в общей сложности 75 пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком. у 31 пациента была представлена первичная, метастатическая и нормальная ткань; 6 пациентов имеют первичную и		75

		метастатическую ткань; у 38 пациентов была представлена только метастатическая ткань. Этот ТМА содержит всего 190 очагов. Очаги 143 пациентов. 47 нормальных, не соответствующих очагов.		
ТМА стадии 1, легкие	LUN GCa8	Всего 76 пациентов.		76
ТМА стадии 1, легкие	LUN GCa9	Всего 61 пациент		61

[0196] Иммуногистохимическое окрашивание выполняли так, как известно в данной области техники.

[0197] Интегрированная эталонная база данных экспрессии генов (MediSapiens Ltd) *in silico* Transcriptomics Online – это программное обеспечение с базой данных, которая содержит унифицированные данные экспрессии мРНК в различных здоровых и патологических тканях человека, с несколькими инструментами для анализа и визуализации этих данных. Аннотированные вручную клинические показатели, при их наличии, также были включены, и ткани были систематически классифицированы в специально разработанные раковые и анатомические группы. В настоящее время эта база данных содержит 20064 образца из 251 различного исследования, из которых 15392 образца являются раковыми образцами, включая 1227 образцов клеточных линий рака. Эти данные были собраны из общедоступных баз данных экспрессии, в которые были включены данные экспрессии, измеренной на чипах Affymetrix. Данные из файлов CEL различных типов поколений микрочипов Affymetrix были нормализованы вместе в специально разработанном трехэтапном процессе, чтобы создать большой комплексный сбор данных в различных исследованиях и поколениях чипов. Это позволяет сравнивать образцы из различных источников непосредственно друг с другом и использовать их в мета-анализах, что предоставляет новые возможности открытий, недостижимых в отдельных наборах данных.

[0198] Анализ и инструменты визуализации были реализованы с помощью статистического языка программирования R (R Development Core Team), встроенного в удобный графический интерфейс пользователя. В этом исследовании были использованы инструменты точечной диаграммы и ящичковой диаграммы для общей визуализации данных через транскриптом человека. Точечную диаграмму строили путем нанесения на график нормированных значений экспрессии SSRP1 или SPT16 в зависимости от определений ткани как различных точек данных, при этом график делили на пять сегментов на основе типов ткани: здоровые ткани, злокачественные ткани, другие заболевания, клеточные линии из здоровых тканей, и раковые клеточные линии; в этих сегментах использовали анатомические категории образцов. Также были рассчитаны описательные статистические данные, чтобы различить те образцы, которые отличаются от других в соответствующих сегментах, так чтобы на графике выделялся и окрашивался тип ткани, имеющий уровни экспрессии на одно стандартное отклонение выше, чем средняя экспрессия всех тканей в том же сегменте, или если 90-й процентиль экспрессии в этой ткани равен или более чем в 2 раза выше межквартильного диапазона плюс 75-й процентиль того же сегмента. Ящичковая диаграмма для каждого гена была построена как диаграмма типа "ящик с усами", визуализирующая экспрессию гена в здоровых и раковых тканях, с классификацией ткани, отображаемой на оси x. Все ткани по меньшей мере с пятью образцами были включены. Дно ящичковой диаграммы представляет собой 25-й процентиль данных, верхняя часть ящичковой диаграммы представляет собой 75-й процентиль, и горизонтальная линия является медианой. "Усы" распространяются до 1,5 межквартильного диапазона от краев ящичка, и любые точки данных за их пределами рассматриваются как выпадающие значения.

[0199] Для анализа связей между клинико-патологическими переменными и экспрессией генов значения экспрессии отобранных *in vivo* раковых образцов в зависимости от клинических признаков были нанесены на график с помощью программного обеспечения phenoplot от IST Online. Программное обеспечение phenoplot использует предопределенные подмножества образцов рака из различных типов рака, где образцы были отобраны на основе наличия соответствующих клинических переменных в соответствующих типах рака. Phenoplot является комбинацией ящичковой диаграммы и точечной диаграммы, где точки означают отдельные образцы, а визуализация типа "ящик с усами" показывает распределение

выше уровня значений данных. Каждая группа образцов с конкретным клиническим ковариативным значением показана как отдельный сегмент на оси X phenoplot. Если выемки любых двух ящиков не перекрываются по вертикали, это означает, что медианы двух групп образцов существенно различаются друг от друга с точки зрения экспрессии гена в предмете обсуждения (с p -значением $<0,05$).

[0200] Анализ ТМА. Данные SSRP1 были дихотомизированы. Точные тесты Фишера были выполнены, чтобы проверить связь между индексом экспрессии дихотомизированного SSRP1 и других дихотомизированных категориальных переменных, таких как возраст (≥ 60 , <60) или степень злокачественности опухоли (высокая, низкая), стадия (начальная, конечная) и экспрессия специфических маркеров заболевания там, где это доступно. Тесты с использованием критерия хи-квадрат проводились для проверки связи с категориальными переменными с более чем двумя уровнями. Анализы выживаемости Каплана-Мейера с логранговыми тестами были использованы для оценки корреляции между выживаемостью пациентов и индексом экспрессии SSRP1. Любой тест с p -значением $<0,05$ считается значительным. Все статистические анализы выполняли с помощью статистического языка программирования R.

Пример 1. Экспрессия FACT повышается при трансформации in vitro

[0201] Был определен паттерн экспрессии субъединиц FACT во время трансформации различных нормальных клеток *in vitro* а также в человеческих опухолевых тканях различных типов.

[0202] Индукцию FACT во время процесса трансформации *in vitro* исследовали посредством сравнения уровней SSRP1 и SPT16 между фенотипически нормальными клетками на разных стадиях трансформации *in vitro*. В частности, были исследованы конечная продолжительность жизни immortalized и трансформированных клеток.

[0203] Не наблюдалось почти никаких изменений уровней FACT между нормальными человеческими фибробластами и фибробластами immortalized с человеческой теломеразой, или мышинными первичные фибробластами от животных p53 дикого типа или нокаутных (Фиг. 1A). Однако при трансформации immortalized фибробластов с использованием активированного онкогена H-RAS^{V12} наблюдалось заметное увеличение уровней FACT как в человеческих, так и в мышинных клетках

(Фиг. 1В и Фиг. 1С). Все эти клетки-фибробласты (штаммы раннего пассажа, иммортализованные или злокачественно трансформированные) существенно не отличаются скоростью пролиферации и, следовательно, повышение уровней FАСТ не отражает ускоренную пролиферацию клеток.

[0204] Многие опухоли человека имеют эпителиальное происхождение. Поэтому также проводилась трансформация эпителиальных клеток *in vitro*. Была использована изогенная модель трансформации эпителиальных клеток молочной железы, известная в данной области техники. Были проанализированы штаммы с нормальной конечной продолжительностью жизни из двух образцов маммопластики для уменьшения размера молочной железы, 184 и 240L, и иммортализованные линии, полученные из нормальных клеток после воздействия либо химического канцерогена бензо(а)пирена (184В5, 184АА3) или набора известных генетических конструкций, которые могут преодолеть барьеры супрессоров опухоли (мшРНК к CDKN2A (p16) и/или протоонкогена с-Мyc) (184p16sMY, 184FMY2, 240Lp16sMY). Иммортализованные линии характеризуются независимым от прикрепления ростом (НПР) и способностью образовывать опухоли *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом. Клетки 184В5, 184p16sMY и 240Lp16sMY не продемонстрировали НПР. И 184FMY2, и 184АА3 продемонстрировали НПР, но только линия 184АА3 являлась туморогенной. Нормальные клетки эпителия молочной железы человека (НМЕС) почти не показали ядерного окрашивания, связанного с SSRP1, в то время как наивысший уровень связанной с SSRP1 иммунофлуоресценции наблюдался в линиях, обладающих НПР, 184АА3 и 184FMY2 (Фиг. 2А, 2В и 2С). Иммортализованные линии без НПР имели слабое иммунофлуоресцентное окрашивание различной интенсивности (Фиг. 2А), но при вестерн-блоттинге продемонстрировали значительно повышенные уровни как SPT16, так и SSRP1 по сравнению с нормальными клетками (Фиг. 2В). В трансформированных клетках НМЕС наблюдалась только некоторая пропорциональность повышения уровня мРНК SSRP1 и уровня белка, тогда как уровень мРНК SPT16 практически не изменился, в отличие от белка SPT16 (Фиг. 2С). Без связи с теорией, это может быть связано с зависимостью уровня белка SPT16 от SSRP1. На основании окрашивания PCNA пролиферация этих культур значительно не отличается (Фиг. 2В).

[0205] Эти эксперименты продемонстрировали *inter alia*, что трансформация эпителиальных клеток человека *in vitro* сопровождается повышением уровней белков

обеих субъединиц FACT и что увеличение может совпадать с приобретением трансформированными клетками злокачественных свойств.

Пример 2. Субъединицы FACT сверхэкспрессируются на уровнях РНК и белка в множестве образцов различных типов опухолей

[0206] Выполняли сравнение уровней мРНК SSRP1 и SPT16 в нормальных тканях и в различных опухолях. Высокое содержание данные микрочипов практически всех типов опухолей было рассмотрено в этих исследованиях. Для применения нормализации между технологиями и между исследованиями использовали программное обеспечение ICT online (Medisapience, Inc).

[0207] Этот анализ показал, что уровень мРНК SSRP1 повышен, в целом, в большинстве типов опухолей по сравнению со здоровыми нормальными тканями или тканями из других заболеваний (Фиг. 3А-3В). Тем не менее, есть образцы с почти нормальным уровнем мРНК SSRP1 и образцы с многократным увеличением SSRP1 (Фиг 3А). Кроме того, в этот анализ были включены данные из клеточных линий *in vitro*, обладающих наивысшим средним уровнем SSRP1 среди всех категорий (Фиг. 3А). Без связи с теорией, это может означать, например, что условия *in vitro* стимулируют сильное повышение уровня SSRP1 либо, что только клетки с повышенным уровнем SSRP1 могут расти в культуре *in vitro*.

[0208] Средний уровень экспрессии мРНК SPT16 в опухоли по сравнению с неопухолевыми образцами также был повышен, но менее существенно, чем SSRP1. Это различие между данными мРНК SSRP1 и SPT16 согласуется с наблюдаемой тенденцией, когда анализировали панель клеток НМЕС (Фиг. 2А-2С). Среди опухолевых образцов существует значительное количество выпадающих значений с очень высоким уровнем мРНК SPT16, аналогично SSRP1.

[0209] Для оценки уровня белка FACT в образцах опухолей человека использовали ИГХ-окрашивание микрочипов ткани (ТМА), состоящих из образцов биопсий первичной опухоли с возможностью сопоставления нормальных или метастатических поражений. Использовали несколько групп ТМА, состоящих из около 854 отдельных образцов из молочной железы, легкого, почки, предстательной железы и нескольких органов желудочно-кишечного тракта. Каждая группа была представлена различными типами опухолей пропорционально их частоте в общей популяции США. В качестве показателя общего уровня FACT в опухолях использовали ИГХ-окрашивание SSRP1 в

связи с ранее показанной высокой корреляцией между экспрессией белковых субъединиц SSRP1 и SPT16 в различных тканях. Без связи с какой-либо теорией, это соотношение может быть связано с зависимостью уровня белка SPT16 от количества SSRP1.

[0210] Нормальные клетки этих органов, за исключением эпителиальных клеток дна кишечных крипт, не экспрессируют белок SSRP1 (Фиг. 3А). Таким образом, положительное окрашивание SSRP1 в опухолях этих органов означает, что по сравнению с нормальными тканями уровни FACT повышены.

[0211] Наблюдались различные степени гиперэкспрессии SSRP1 среди большинства типов опухолей (Фиг. 4А, 4В, 4С, 4D, 4Е). Незлокачественные стромальные клетки всегда были отрицательными в отношении SSRP1 (Фиг. 4А-4D).

[0212] Чтобы учесть вариабельность SSRP1-окрашивания между различными образцами в этом анализе, использовали систему оценки, которая отражает интенсивность окрашивания и пропорцию положительных опухолевых клеток с помощью шкалы от 0 до 3. Совокупный индекс SSRP1 представлял собой продукт деления на категории оценок интенсивности и пропорции. Образцы с "положительным SSRP1" с индексами >1 включают все положительные образцы, за исключением тех, в которых количество положительных клеток было меньше чем 10%, или окрашивание было очень слабым (Фиг. 4D). Образцы с "высоким SSRP1" с индексами >4 представляли собой образцы, в которых большинство опухолевых клеток были высоко SSRP1-положительным (Фиг. 4А, Фиг. 3В, Фиг. 3D). Наивысшая частота SSRP1-положительных образцов наблюдалась в опухолях поджелудочной железы (Фиг. 4С и Фиг. 4Е). Было очень мало SSRP1-положительных образцов среди пациентов с раком предстательной железы (Фиг. 4Е). В отличие от полученных для опухолевых клеточных линий человека данных *in vitro*, но в соответствии с данным экспрессии РНК, среди всех типов опухолей была определенная доля образцов опухоли без SSRP1-окрашивания (Фиг. 4Е).

Пример 3. Корреляция уровней субъединицы FACT и клинико-патологических особенностей опухолей

[0213] Исследовали корреляцию между экспрессией субъединиц FACT и клинико-патологическими особенностями различных типов опухолей.

[0214] Сравнивали экспрессию SSRP1 между различными гистологическими типами рака в нескольких органах (молочная железа, легкие и почки), в которых образцы были представлены различными подтипами.

[0215] Среди пациентов с раком молочной железы уровень мРНК SSRP1 выше при базальной карциноме по сравнению с люминальной карциномой (**Фиг. 5А**). Гиперэкспрессия белка SSRP1 чаще встречается при тройной отрицательной в сравнении с гормон-рецептор-положительной карциномой молочной железы (**Таблица 1В** и **Фиг. 5В**). Высокий уровень SSRP1 также коррелирует с ЭР-отрицательным и Her2-положительным статусом люминальных карцином молочной железы (**Таблица 1В** и **Фиг. 5В**).

[0216] Среди пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) наивысший уровень мРНК SSRP1 наблюдался при недифференцированной крупноклеточной карциноме по сравнению с другими типами рака легких (**Таблица 1В**). Такая же тенденция наблюдалась для белка SSRP1. Среди пациентов с почечно-клеточной карциномой (ПКК), гиперэкспрессия SSRP1 чаще наблюдалась в образцах папиллярной и саркоматоидной карцином (**Таблица 1В**) по сравнению с другими.

[0217] Все подтипы с более высокой частотой SSRP1-положительных образцов, за исключением папиллярной ПКК, имели худший прогноз, чем соответствующие SSRP1-отрицательные подтипы (*например*, при раке молочной железы: базальный по сравнению с люминальным, трижды отрицательный по сравнению с гормон-рецептор-положительным, ЭР-отрицательный по сравнению с положительным и Her2-положительный по сравнению с отрицательным).

[0218] Соответственно, SSRP1-положительные образцы представляли большинство среди более агрессивных подтипов рака.

[0219] Это было подтверждено с помощью анализа корреляции между экспрессией SSRP1 и общей выживаемостью, с использованием данных ТМА-окрашивания. Сравнивали данные с использованием отсечений различных оценок SSRP1 (i) образцы с высоким уровнем SSRP1 (индексы >4) в сравнении с образцами с низкими и отрицательными уровнями (индексы ≤ 4); (ii) положительный SSRP1 (индексы >1) и слабый/отрицательный (индексы ≤ 1); и (iii) полностью отрицательные образцы (индексы = 0, отсутствие каких-либо SSRP1-положительных клеток) в сравнении со

всеми положительными образцами (индексы >0 , любое соотношение SSRP1-положительных клеток, включая очень слабые уровни или менее чем 10%).

[0220] Для всех типов опухолей лучшая корреляция выживаемости и уровня SSRP1 была получена при сравнении положительных и отрицательных образцов SSRP1, как и ожидалось на основе сравнения экспрессии SSRP1 в нормальной и опухолевой ткани. Для всех 854 образцов ИГХ положительность SSRP1 была в значительной мере связана с худшей общей выживаемостью (**Фиг. 6A**). То же самое было верно, когда рак молочной железы анализировали отдельно (**Фиг. 6D**).

[0221] Не было обнаружено корреляции между стадией опухоли и экспрессией SSRP1 ни в одном из типов опухоли, который анализировали на уровень белка или мРНК, что без связи с какой-либо теорией означает, что экспрессия субъединиц FACT не изменяется с ростом опухоли или с прогрессированием заболевания (**Таблица 1B**). Однако при ряде типов рака была обнаружена корреляция между степенью злокачественности опухоли и уровнем субъединицы FACT (**Таблица 1B**). При карциномах молочной железы, толстого кишечника и папиллярной почечно-клеточной карциноме наблюдались значительно более высокие уровни мРНК SSRP1 и белков в низкодифференцированных опухолях с высокой степенью злокачественности (**Таблица 1B, Фиг. 5C, Фиг. 5D**). Такая же тенденция, увеличение мРНК SSRP1 и белка со степенью опухоли, наблюдалась у пациентов с раком легкого и среди пациентов с аденокарциномой легких 2-й стадии (**Таблица 1B**).

[0222] Было также продемонстрировано, что пациенты с раком молочной железы и почечно-клеточной карциномой, первичные опухоли у которых были SSRP1-положительными, имеют более высокую частоту метастатического заболевания, чем у пациентов с SSRP1-отрицательными первичными опухолями (**Фиг. 5D**). Уровень мРНК SSRP1 был также выше среди пациентов с метастазами рака легких и предстательной железы, чем среди пациентов без метастазов. Наблюдалось высокое совпадение статуса SSRP1 между первичными и метастатическими поражениями при всех видах раковых заболеваний, проанализированных посредством ИГХ ($>87\%$). Таким образом, наличие SSRP1 в первичных опухолях пациентов с раком молочной железы, ПКК, легких или предстательной железы указывает на метастатическое заболевание.

[0223] Анализ экспрессии SSRP1 в клинических образцах дал возможность предположить, что SSRP1 экспрессируется с более высокой частотой и уровнем при низкодифференцированных (с более высокой степенью злокачественности) и более

агрессивных опухолях, таких как (i) подтипы солидных опухолей с плохим прогнозом (рак молочной железы и легких), (ii) опухоли от пациентов с худшей общей выживаемостью, (iii) пациенты с метастатическим заболеванием (рак молочной железы, легкого, почек и предстательной железы).

[0224] Существует высокая корреляция SPT16 с экспрессией SSRP1 в различных образцах. Без связи с теорией, SSRP1 и SPT16 совместно регулируется таким образом, что уровень белка одного зависит от уровня белка другого. Например, существует сильная зависимость уровня белка SPT16 от мПНК SSRP1. Если опухолевые клетки начинают экспрессировать высокий уровень SSRP1, то уровень SPT16 также повышается.

[0225] Хотя уровень белка SPT16 повышается в тех же опухолях, в которых авторы настоящего изобретения наблюдают повышение SSRP1 на основе вестерн-блоттинга и ИГХ, в основных антителах к SPT16 наблюдается гораздо худшее качество, чем SSRP1, поэтому авторы настоящего изобретения не используют их для ТМА-окрашивания.

Пример 4. Рост и выживаемость опухолевых клеток зависит от экспрессии FACT.

[0226] Было исследовано, необходим ли FACT для опухолевых клеток или является ли его гиперэкспрессия маркером некоторых других специфичных для опухоли процессов. Ранее было отмечено, что трансдукция несколько линий опухолевых клеток мшПНК к субъединицам FACT приводила к снижению роста клеток по сравнению с контрольными мшПНК. В данном документе приведен список клеточных линий, который расширен и в котором также есть сравнение с влияниями мшПНК на FACT в опухоли и некоторых прототипах "нормальных" клеток. Последнее важно знать для оценки значимости таргетинга FACT для лечения рака. Авторы настоящего изобретения показали, что уровень обеих субъединиц FACT взаимно регулируются и, следовательно, использование мшПНК против одной из субъединиц FACT эффективно устраняет обе. Были использованы несколько пар опухолевых и нетрансформированных фенотипически "нормальных" клеток происхождения из той же ткани, в том числе клетки почечно-клеточной карциномы (RCC45) и нормальные эпителиальные клетки почки (NKE) иммортализованные с помощью ферментативной субъединицы теломеразы человека; клетки фибросаркомы человека (HT1080) и диплоидные фибробласты человека (Wi38); и клетки аденокарциномы молочной железы человека (MCF7) и иммортализованные эпителиальные клетки молочной железы (MCF10A). Все используемые трансформированные и нетрансформированные

клетки экспрессируют определенный уровень обеих субъединиц FACT *in vitro* в отличие от нормальных клеток *in vivo* (сравните **Фиг. 4А-4Е** и **Фиг. 7А-7Н**).

[0227] Рост этих клеток, трансдуцированных мшРНК к субъединицам FACT или ЗФБ в качестве контроля, оценивали с использованием колониобразующего анализа (для эпителиальных клеток) или оценивали общее количество клеток (для фибробластоподобных клеток, которые не образуют колоний). Супрессия экспрессии обеих субъединиц FACT приводила к снижению роста всех клеток, за исключением нормальных фибробластов, на рост которых не влияла никакая используемая мшРНК (**Фиг. 7А-С**). Уменьшение роста или образования колоний было значительно сильнее в случае опухолевых клеток, чем в случае других нетрансформированных клеток (**Фиг. 7А-С**). Анализ уровней субъединиц FACT в клетках, которые выжили при трансдукции мшРНК и селекции с пуромицином показал, что в двух из трех пар клеток (клетки почек и фибробласты) KD SSRP1 и SPT16 была очень слабой в опухолевых клетках, тогда как в парных нетрансформированными клетках снижение было существенным (**Фиг. 7D и 7E**). Без связи с теорией, эти данные означают, что только клетки с неэффективной KD FACT могут распространяться из опухолевых клеток, в то время как неопухолевые клетки могут расти при супрессии FACT.

[0228] Это было проверено посредством измерения уровней субъединиц FACT и роста клеток в различные моменты времени после трансдукции мшРНК с использованием пары клеток с максимальной KD SSRP1 и SPT16 в опухолевых клетках: MCF7/MCF10A. Было отмечено, что, хотя в конце селекции с пуромицином было меньше клеток MCF10A и MCF7 в случае KD FACT по сравнению с контрольными клетками мшЗФБ, после пересева резистентные к пуромицину MCF10A росли независимо от уровней субъединиц FACT, в то время как в случае MCF7 разница в росте клеток при пониженном уровне субъединиц FACT и в контрольных клетках мшЗФБ сохранялась вплоть до 8 дней наблюдения. Только клетки MCF7 с восстановленным уровнем FACT начали расти так же, как клетки мшЗФБ. Кроме того, тогда как клетки MCF10A сохраняют различие в уровне субъединицы FACT в течение периода наблюдения, в клетках MCF7 эта разница при пересевах уменьшается. Таким образом, это демонстрирует, что неопухолевые клетки с пониженным уровнем FACT растут одинаково с контрольными клетками, в отличие от опухолевых клеток. Иначе говоря, этот эксперимент показал, что опухолевые клетки (MCF7) не могут распространяться при KD FACT. Эти клетки либо не растут, либо растут только те, в

которых KD была неэффективной в начале роста и уровни FACT быстро восстановились. Наоборот, неопухолевые клетки (MCF10A) могут распространяться при сниженном уровне FACT и эти клетки могут расти при продолжающихся низких уровнях FACT.

[0229] Без связи с теорией, были исследованы возможные объяснения того, почему рост опухолевых клеток зависит от KD FACT. Доля клеток с низким уровнем SSRP1 уменьшается со временем в культуре мшSSRP1 (**Фиг. 7G**). Опухолевые клетки с низким уровнем FACT имеют сниженный уровень репликации (**Фиг. 7H**) и накапливаются в G1 (**Фиг. 7G**); более того, некоторые из них умирают (**Фиг. 7G и FIG. 7I**). Эти данные подтверждают роль FACT в репликации. Тем не менее, отсутствие остановки S-фазы, которая ожидается, если в клетках отсутствует фактор, необходимый только во время репликации, означает, что в клетках может существовать определенная сигнализация, ведущая к остановке роста G1 и/или что функция FACT в процессах, отличных от репликации (*т.е.* транскрипции), может быть также жизненно важной для опухолевых клеток.

Пример 5. Субъединицы FACT как маркеры раковых стволовых клеток

[0230] Было показано, что обнаружение субъединиц FACT является полезным для идентификации раковых стволовых клеток. Было обнаружено, что обе субъединицы FACT, Spt16 и SSRP1, экспрессируются на высоких уровнях в трансформированных *in vitro* эпителиальных клетках молочной железы (HMEC), которые экспрессируют поверхностные маркеры раковых стволовых клеток (CD44^{Высокий}/CD24^{Низкий}). Вестерн-блоттинг экстрактов HMEC, трансформированных указанными генетическими конструкциями, показан на **Фиг. 8A**. Варианты клеток, трансформированных при трансдукции всех конструкций, были сортированы с помощью проточной цитометрии на основе выявления антител, связанных с поверхностью CD44 и CD24. Наивысший уровень субъединицы SSRP1 FACT наблюдался в клетках с наивысшим уровнем экспрессии поверхностных маркеров стволовых клеток рака поджелудочной железы. Анализ способом проточной цитометрии клеток аденокарциномы протока поджелудочной железы PANC1 и MIA PaCa, окрашенных совместно антителами к поверхностным маркерам, присутствующим на CSC (CD44⁺/CD24⁺/CD326⁺) поджелудочной железы, и SSRP1 субъединице FACT, проиллюстрирован на **Фиг. 8B**.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0231] Специалисты в данной области техники поймут или будут способны установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов реализации настоящего изобретения, специально описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата объемом нижеследующей формулы настоящего изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0232] Все патенты и публикации, упомянутые в данном документе, включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оценки опухоли, включающий определение относительного уровня злокачественных клеток, которые экспрессируют по меньшей мере один компонент комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT) в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию определения субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT.
3. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что оценка включает что-либо одно из диагностики, прогноза и ответа на лечение.
4. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что опухоль является первичной или рецидивом опухоли.
5. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что компонент FACT содержит один или более из SSRP1 и SPT16.
6. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня белка.
7. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что определение включает приведение в контакт образца опухоли или культивированных из нее клеток с агентом, который специфически связывается с одним из белков: SSRP1 и SPT16.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что агент, который специфически связывается с белком SSRP1 или SPT16, является антителом.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что измерение уровней одного или более из белков SSRP1 и SPT16 включает одно или более из иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, анализа клеточных вестернов, иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа ELISA и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (ФАКС).
10. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что образец опухоли представляет собой биопсию, выбранную из образца замороженной опухолевой ткани, культивированных клеток, циркулирующих опухолевых клеток и фиксированного формалином и залитого парафином образца опухолевой ткани.

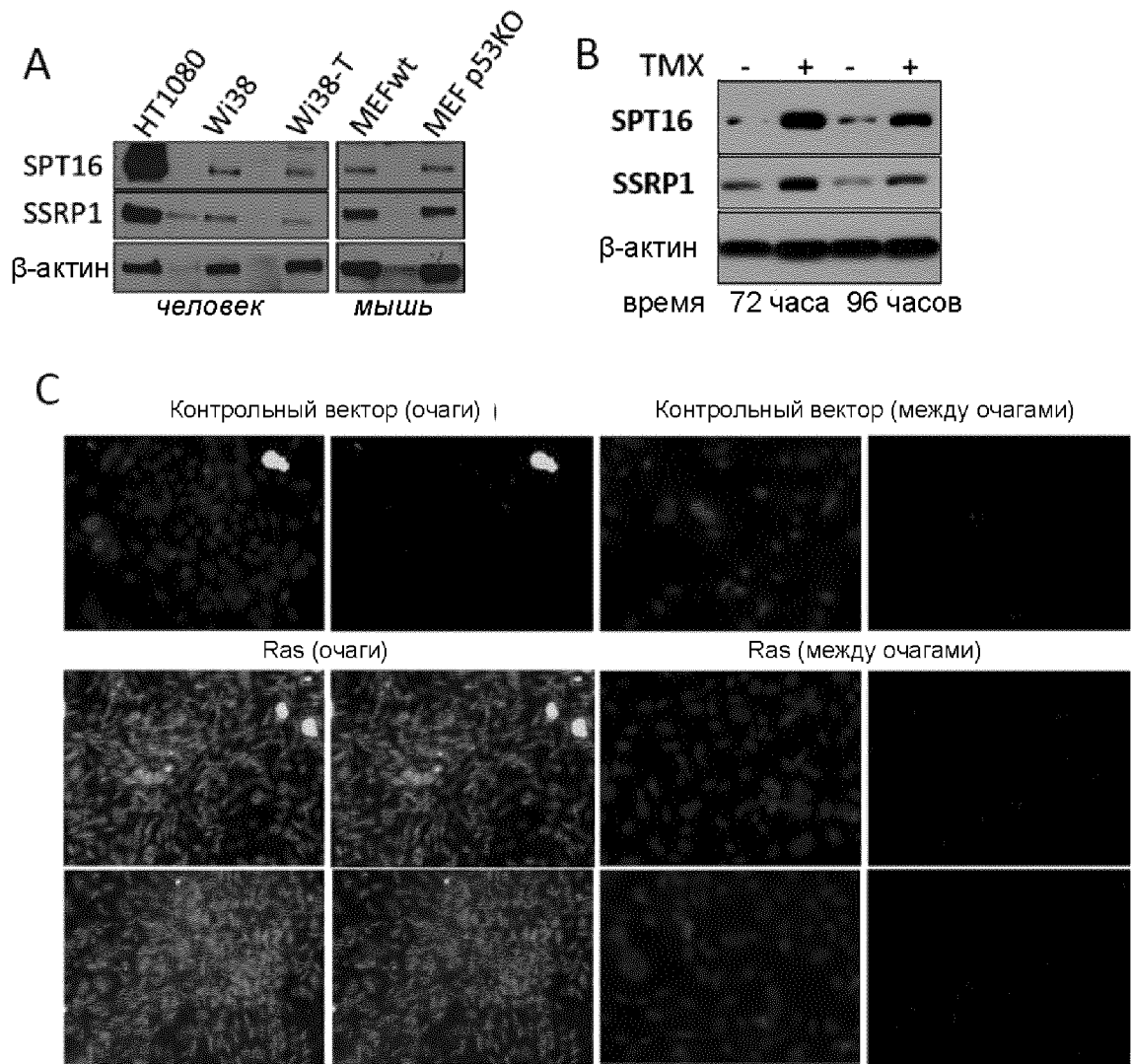
11. Способ по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что опухоль является какой-либо из опухоли молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, печени, почек, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, шейки матки, головы и шеи, кожи, центральной и периферической нервной системы.
12. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от неoadъювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от неoadъювантной химиотерапии.
13. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от адъювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от адъювантной химиотерапии.
14. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация высокого риска включает высокий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: высокой степени злокачественности опухоли, низкой общей выживаемости, высокой вероятности метастазирования и наличия опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.
15. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация низкого риска включает низкий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: низкой степени злокачественности опухоли, высокой общей выживаемости, низкой вероятности метастазирования и отсутствия и/или снижения уровня опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.
16. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация низкого риска означает отмену неoadъювантной терапии.
17. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что классификация низкого риска означает отмену адъювантной терапии.
18. Способ оценки опухолевой клетки, включающий определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT), в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках и классификацию

- опухолевой клетки как раковой стволовой клетки на основании наличия по меньшей мере одного компонента FACT.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что оценка включает что-либо одно из диагностики, прогноза и ответа на лечение.
 20. Способ по п. 18 или 19, отличающийся тем, что классификацию опухолевой клетки как раковой стволовой клетки предписывает одно или более из усиленного наблюдения и адъювантной или неоадъювантной терапии.
 21. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества противоракового агента субъекту-человеку, при этом рак характеризуется наличием, отсутствием или уровнем по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT) в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках.
 22. Способ лечения рака, включающий:
 - (a) определение наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента комплекса, облегчающего транскрипцию хроматина (FACT) в образце опухоли от субъекта-человека или в культивированных из нее клетках;
 - (b) определение субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT; и
 - (c) введение эффективного количества терапевтического средства субъекту-человеку.
 23. Способ по п. 22, дополнительно включающий стадию определения субъекта в группу высокого или низкого риска на основании наличия, отсутствия или уровня по меньшей мере одного компонента FACT.
 24. Способ по любому из пп. 21-23, отличающийся тем, что оценка включает что-либо одно из диагностики, прогноза и ответа на лечение.
 25. Способ по любому из пп. 21-24, отличающийся тем, что опухоль является первичной или рецидивом опухоли.
 26. Способ по любому из пп. 21-25, отличающийся тем, что компонент FACT содержит один или более из SSRP1 и SPT16.

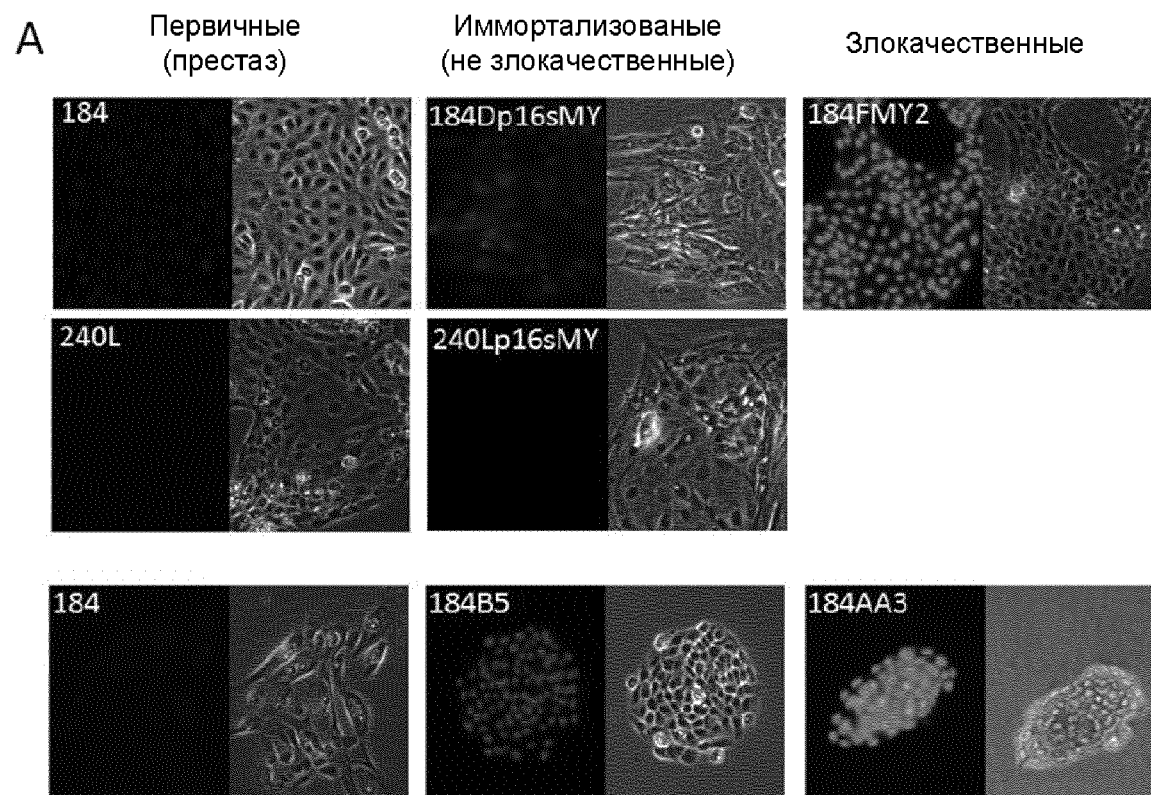
27. Способ по любому из пп. 21-26, отличающийся тем, что определение включает оценку наличия, отсутствия или уровня белка.
28. Способ по любому из пп. 21-27, отличающийся тем, что определение включает приведение в контакт образца опухоли или культивированных из нее клеток с агентом, который специфически связывается с одним из белков: SSRP1 и SPT16.
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что агент, который специфически связывается с белком SSRP1 или SPT16, является антителом.
30. Способ по любому из пп. 21-29, отличающийся тем, что измерение уровней одного или более из белков SSRP1 и SPT16 включает одно или более из иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, анализа клеточных вестернов, иммунофлуоресцентного окрашивания, анализа ELISA и сортировки флуоресцентно-активированных клеток (ФАКС).
31. Способ по любому из пп. 21-30, отличающийся тем, что образец опухоли представляет собой биопсию, выбранную из образца замороженной опухолевой ткани, культивированных клеток, циркулирующих опухолевых клеток и фиксированного формалином и залитого парафином образца опухолевой ткани.
32. Способ по любому из пп. 21-30, отличающийся тем, что опухоль является какой-либо из опухоли молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, легких, печени, почек, мочевого пузыря, толстой и прямой кишки, яичников, шейки матки, головы и шеи, кожи, центральной и периферической нервной системы.
33. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от неоадьювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от неоадьювантной химиотерапии.
34. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация высокого или низкого риска позволяет прогнозировать положительный ответ и/или получение пользы от адьювантной химиотерапии или отсутствие ответа и/или отсутствие получения пользы от адьювантной химиотерапии.
35. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация высокого риска включает высокий уровень агрессивности рака, при этом

агрессивность характеризуется одним или более из: высокой степени злокачественности опухоли, низкой общей выживаемости, высокой вероятности метастазирования и наличия опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.

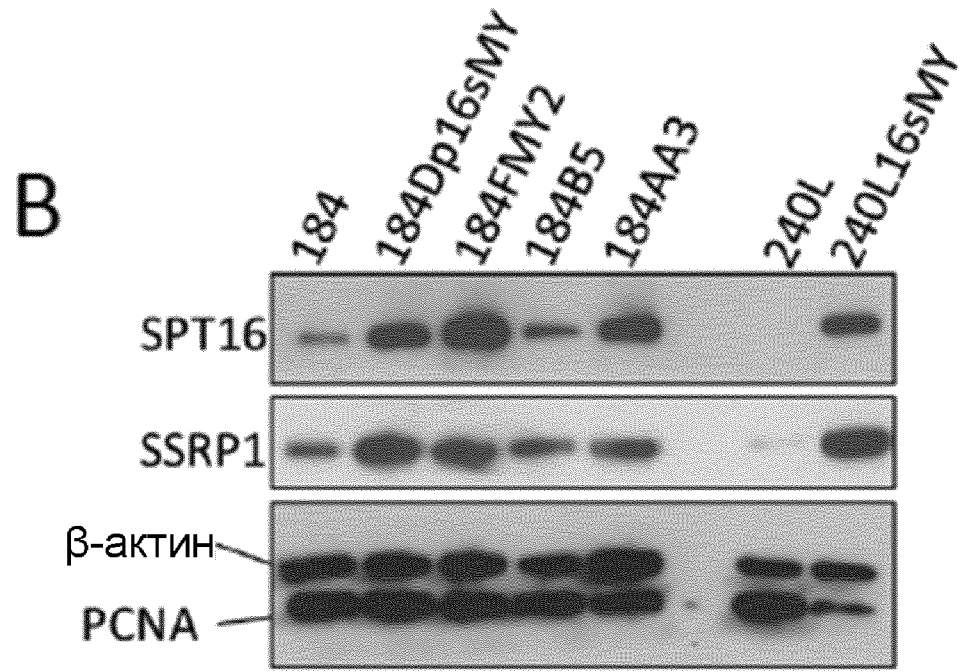
36. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация низкого риска включает низкий уровень агрессивности рака, при этом агрессивность характеризуется одним или более из: низкой степени злокачественности опухоли, высокой общей выживаемости, низкой вероятности метастазирования и отсутствия и/или снижения уровня опухолевого маркера, свидетельствующего об агрессивности.
37. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация низкого риска означает отмену неoadъювантной терапии.
38. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что классификация низкого риска означает отмену адъювантной терапии.



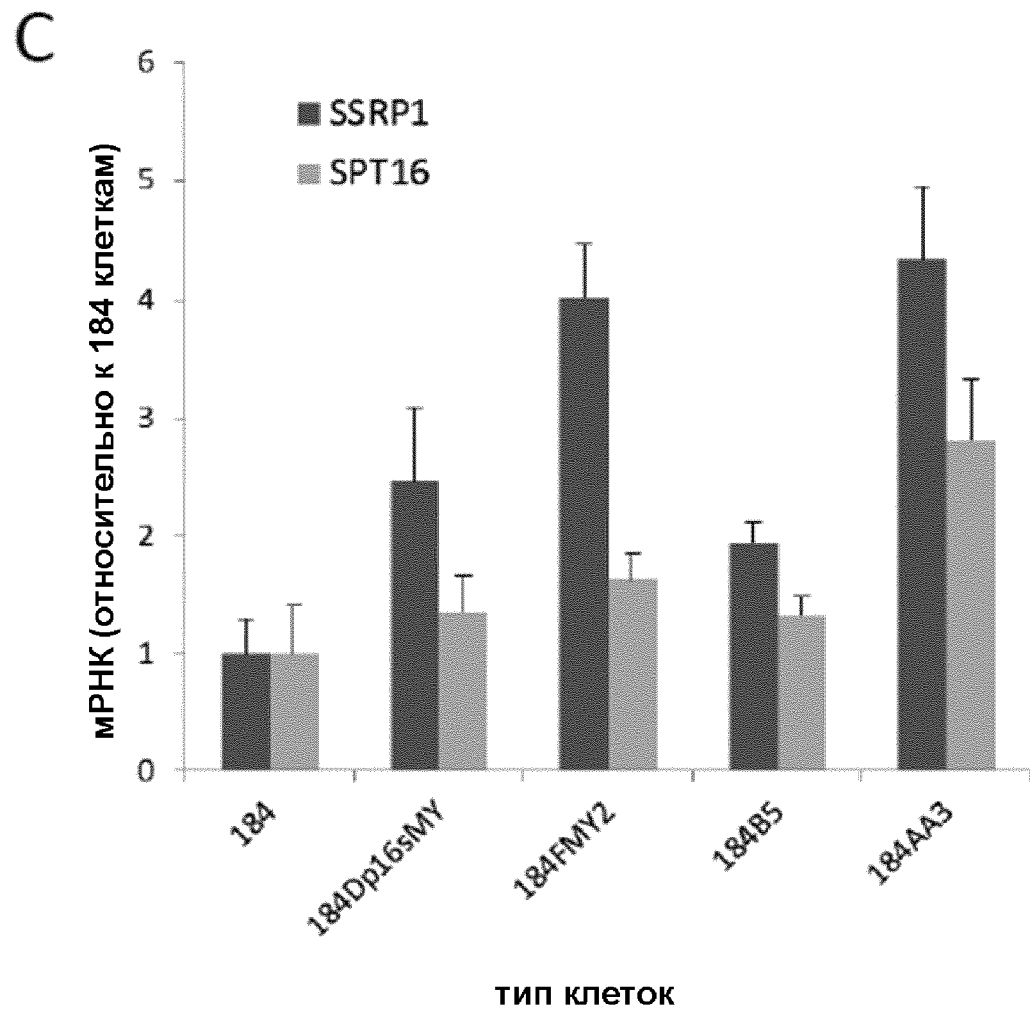
ФИГ. 1А, 1В, 1С



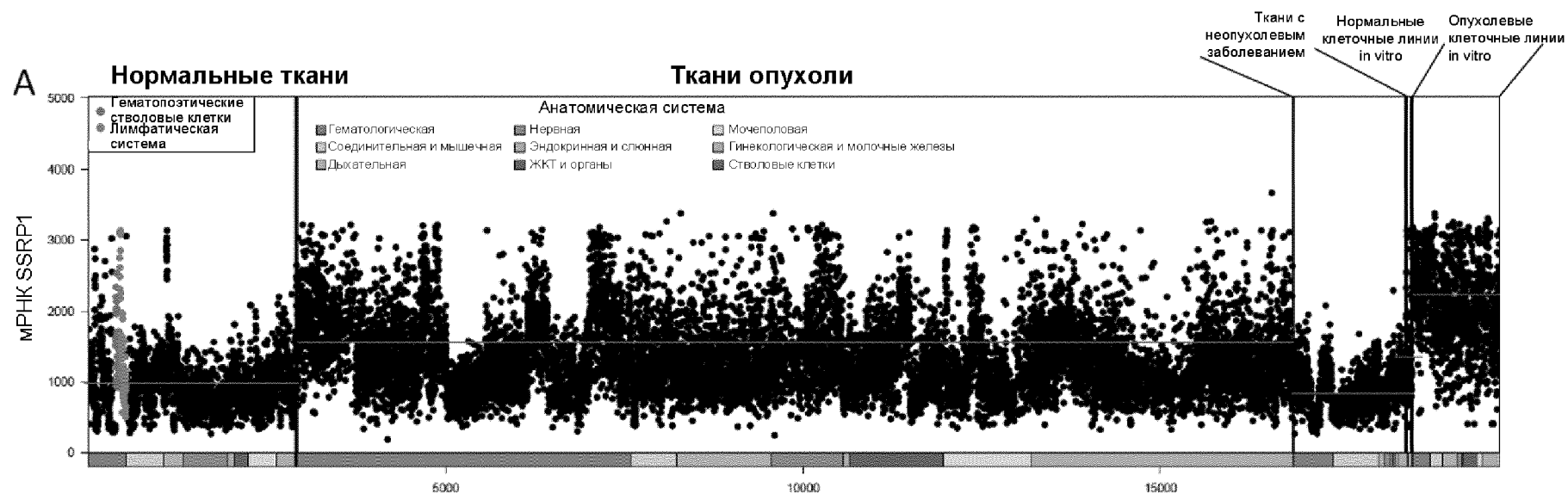
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

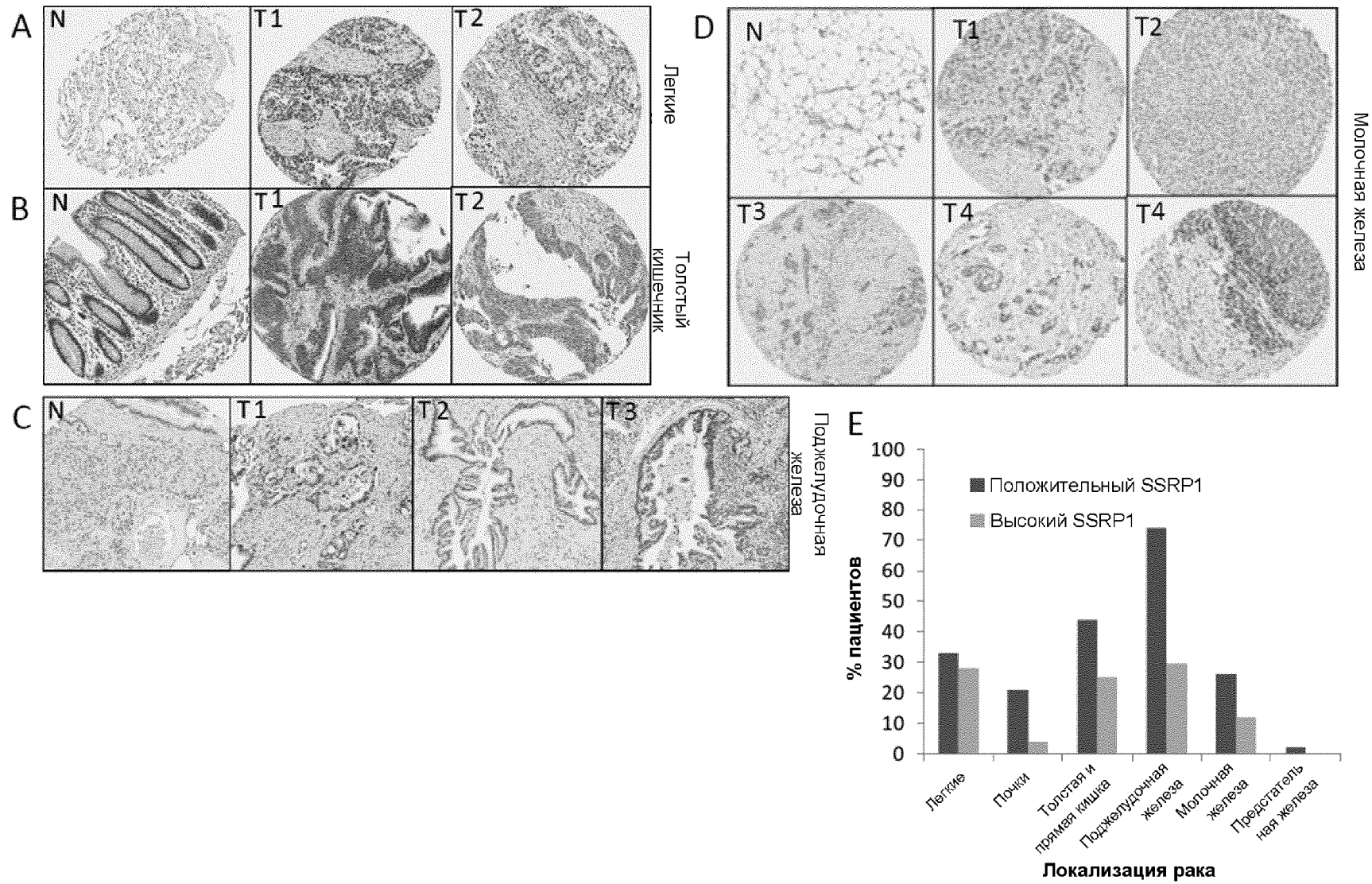


ФИГ. 2С

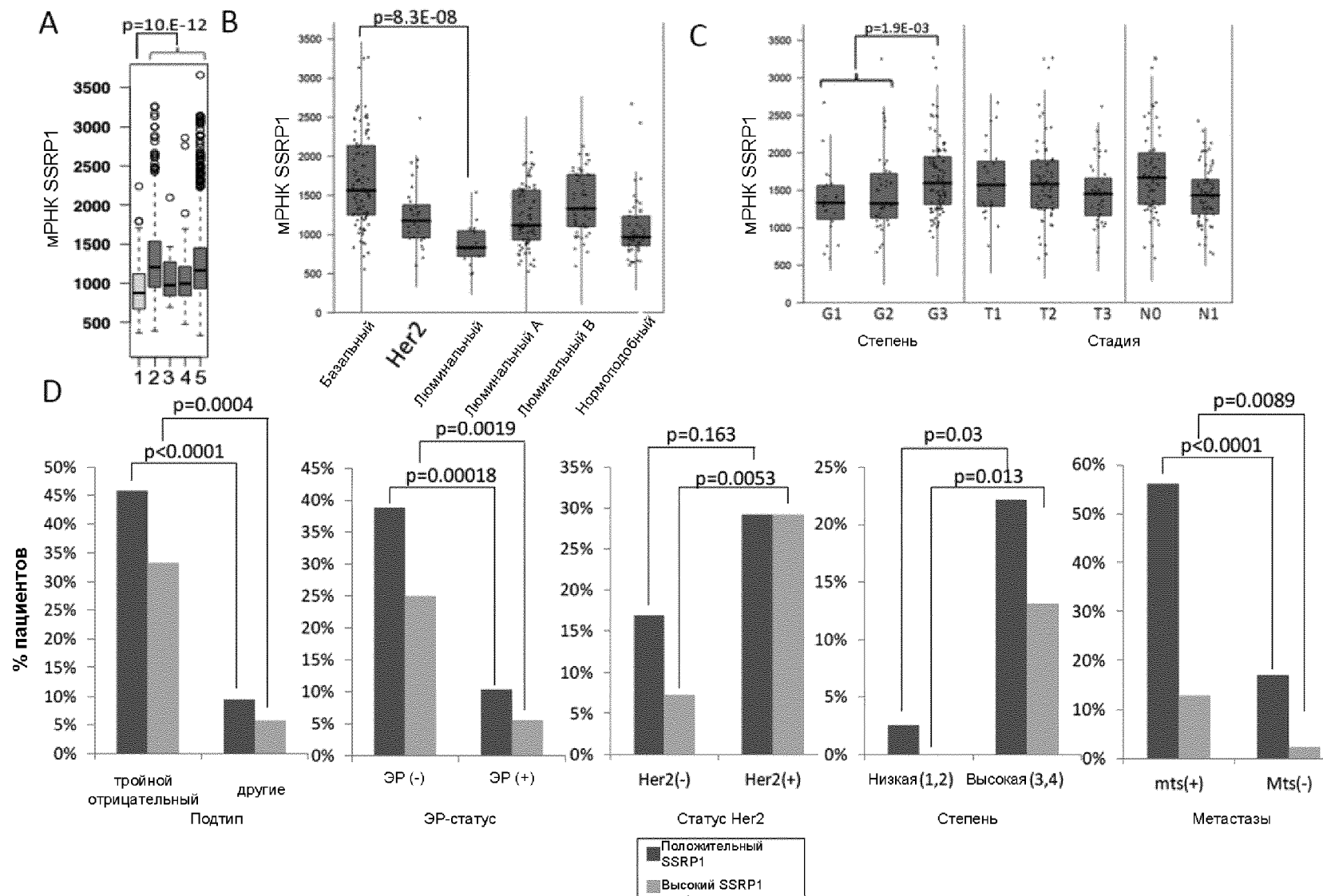


ФИГ. 3А

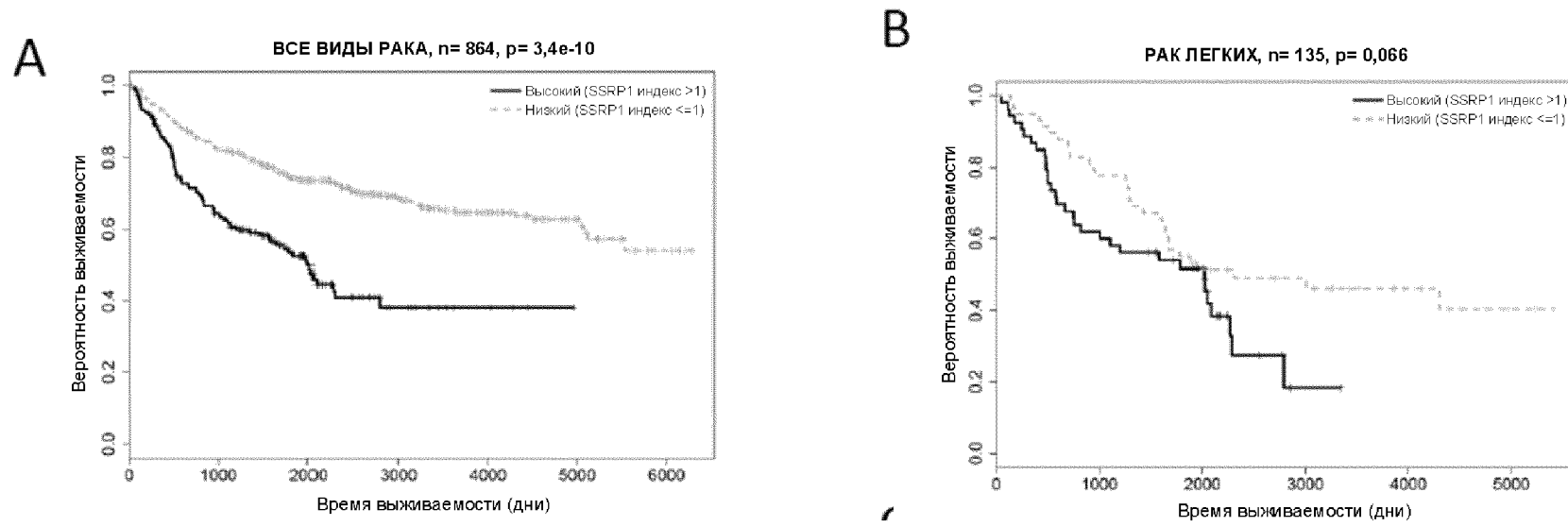
7/18



ФИГ. 4А, 4В, 4С, 4D, 4Е



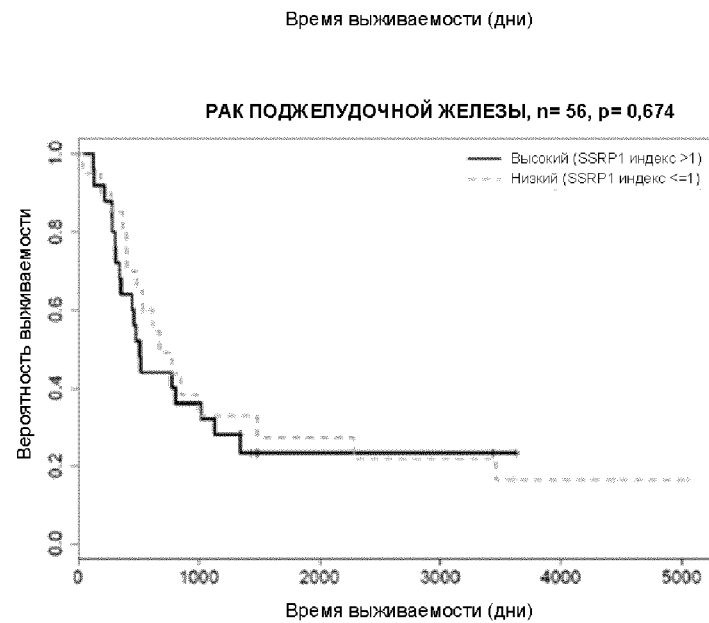
ФИГ. 5A, 5B, 5C, 5D



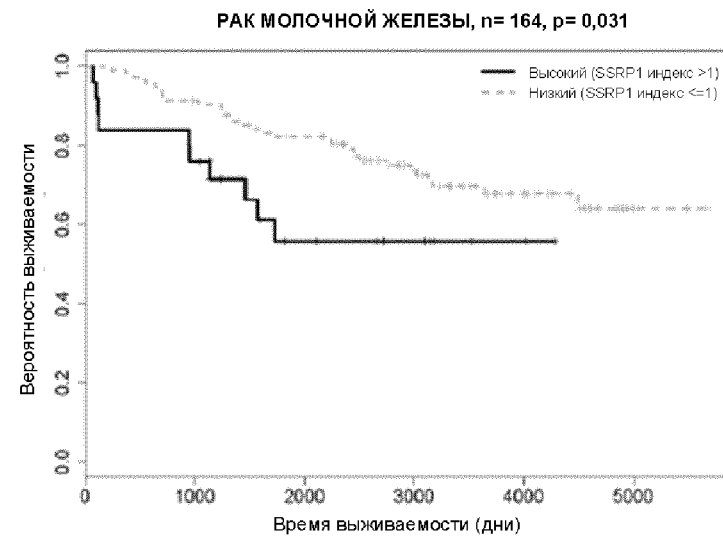
ФИГ. 6А, 6В

10/18

C

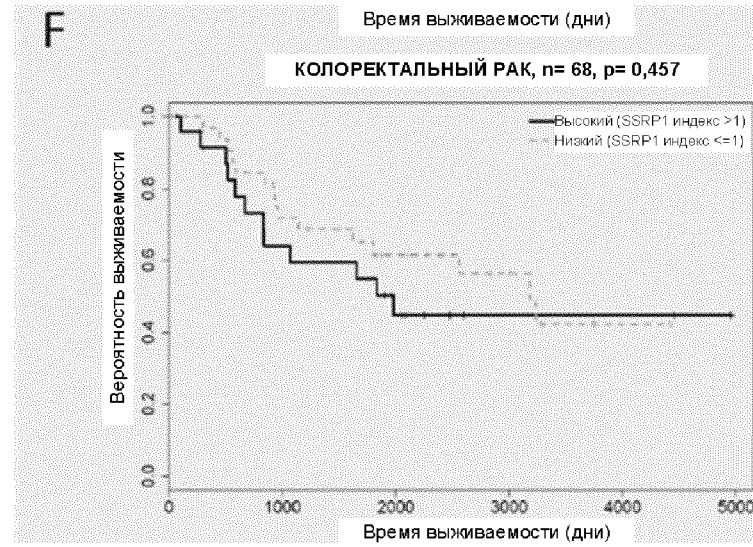
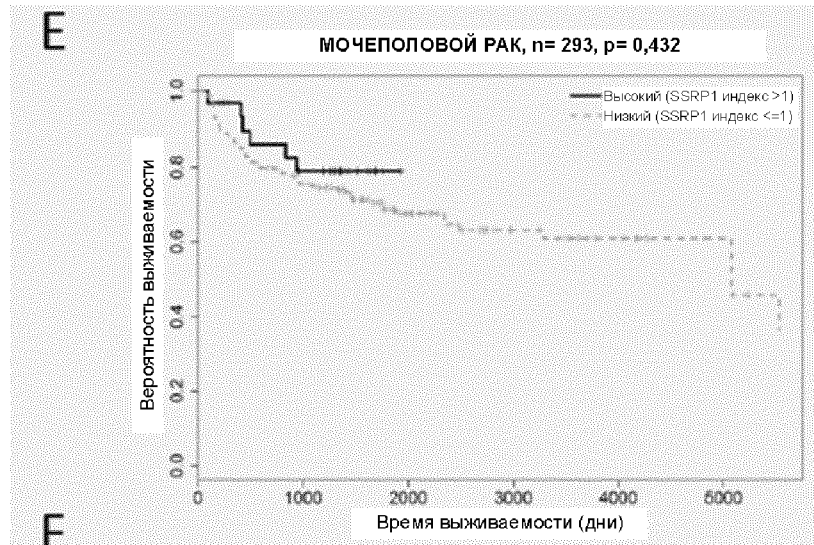


D

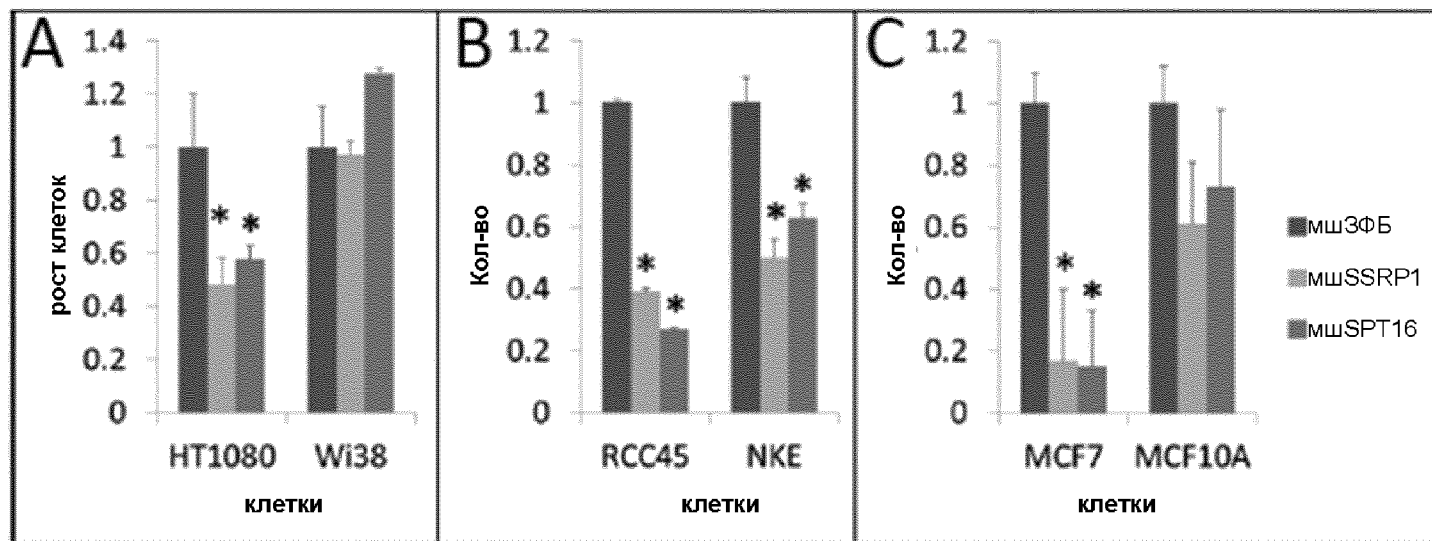


ФИГ. 6С, 6D

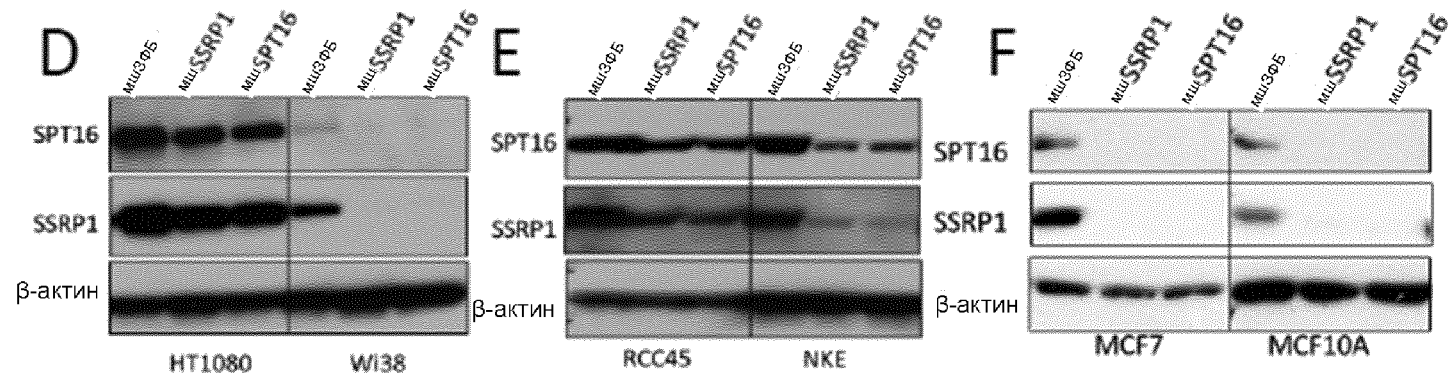
11/18



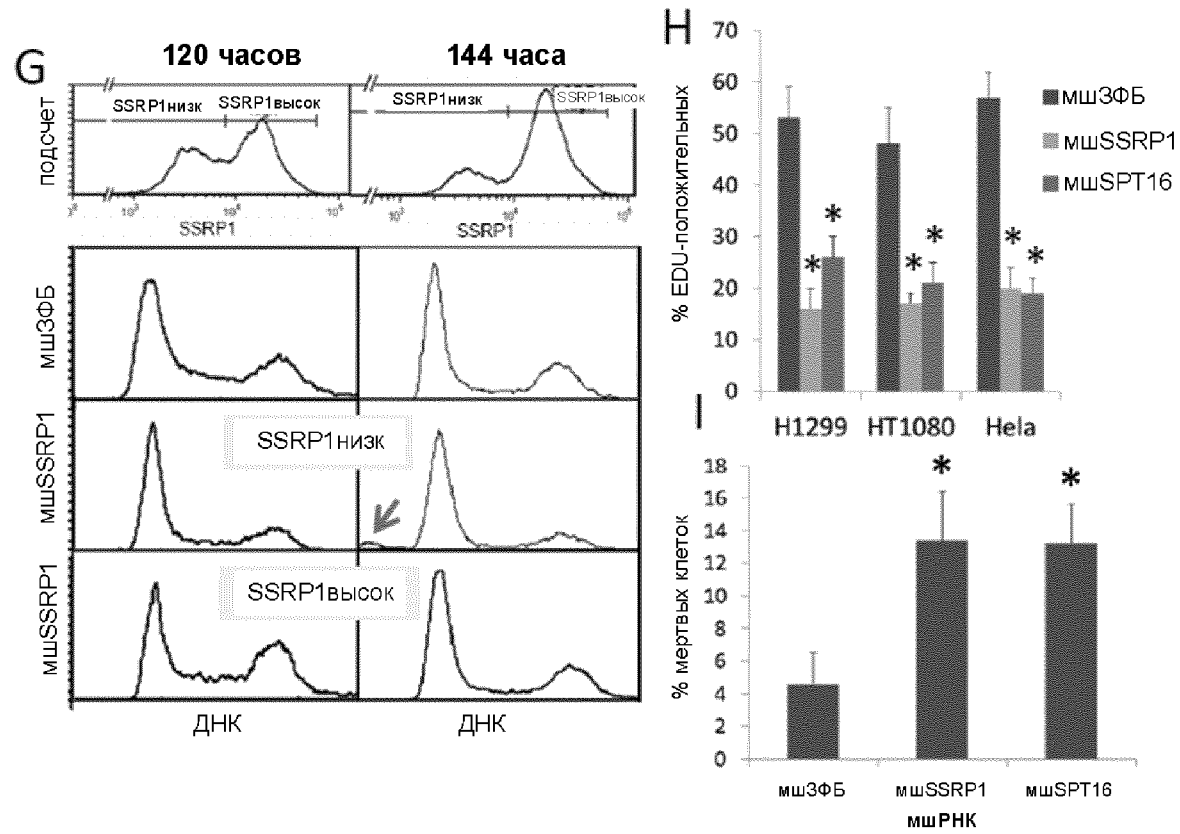
ФИГ. 6Е, 6F



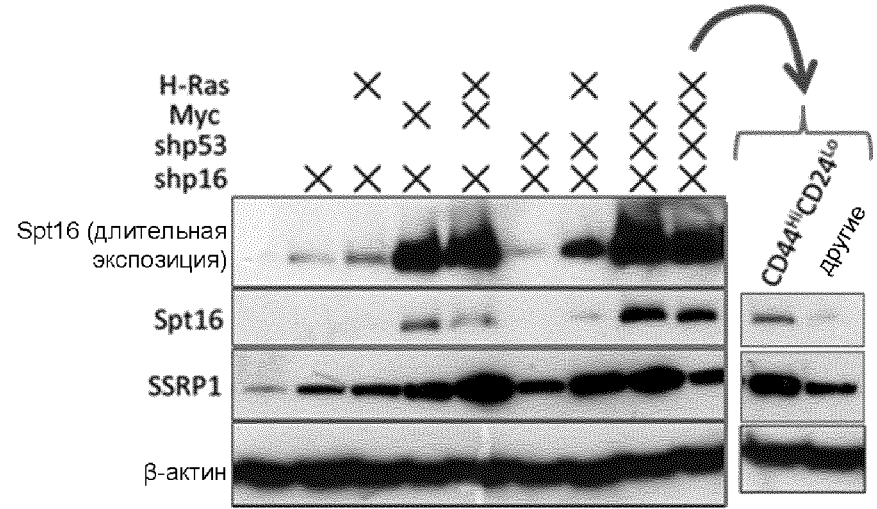
ФИГ. 7А, 7В, 7С



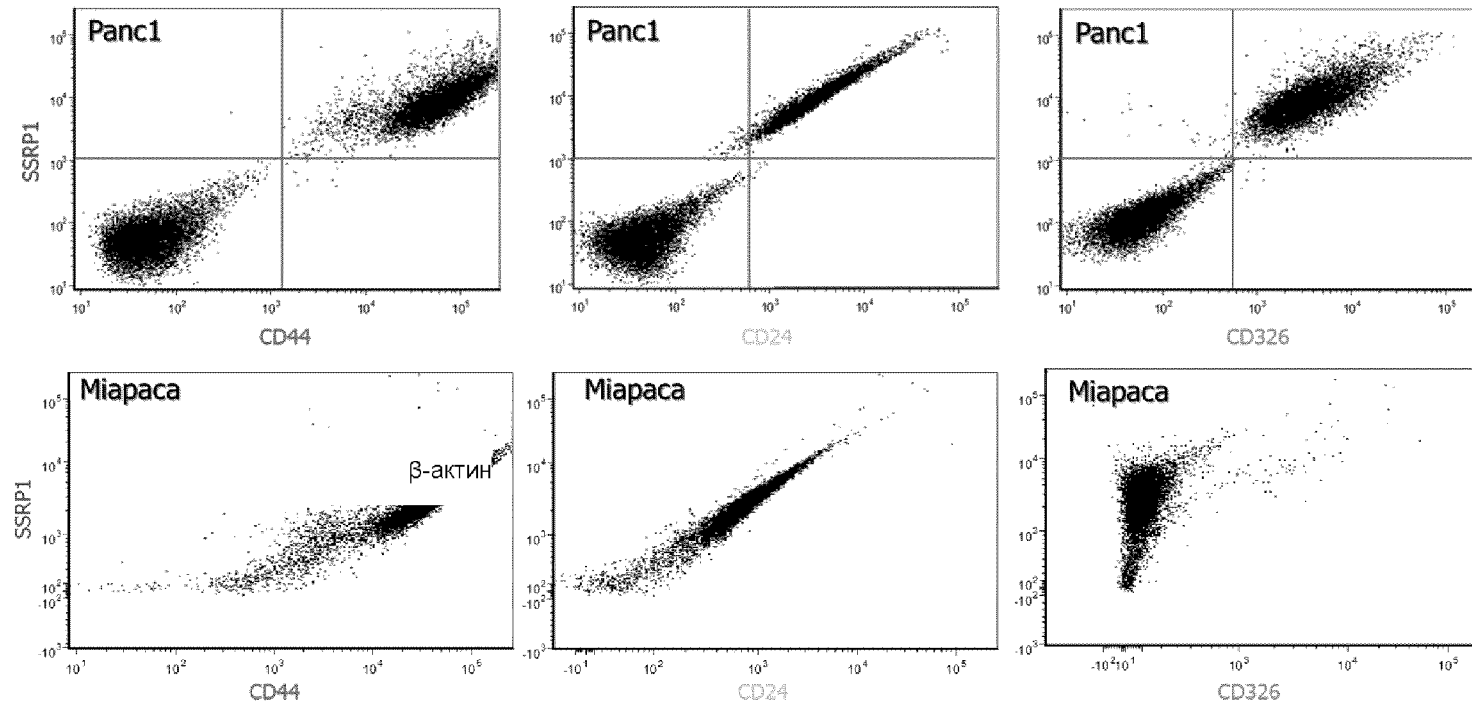
ФИГ. 7D, 7E, 7F



ФИГ. 7G, 7H



ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

Таблица 1В

Локализация рака	Тип рака	Клиническая категория		Окрашивание SSRP1				Количество образцов
				Положительное (>1 все, почки >0)	p-значение	Высокое (>4)	p-значение	
Молочной железы	аденокарцинома	Стадия	Ранняя (1-2)	44%	0,0580	11%	0,1300	133
			Поздняя (3-4)	26%		33%		27
		Степень	Низкая (1-2)	3%	0,0030	0%	0,0129	39
			Высокая (3-4)	22%		13%		122
		Статус ЭР	Отрицательный	39%	0,0002	25%	0,0190	36
			Положительный	10%		6%		126
		Статус ПР	Отрицательный	19%	0,4030	13%	0,2129	77
			Положительный	14%		7%		85
		Статус Her2	Отрицательный	17%	0,1650	7%	0,0053	124
			Положительный	29%		29%		24
		"Тройной отрицательный"	нет	9%	<0,0001	6%	0,0004	139
			да	46%		23%		24
Легочная	аденокарцинома	все		44%		19%		75
		Стадия	Ранняя (1-2)	43%	Нет данных	58%	Нет данных	74
			Поздняя (3-4)	100%		100%		1
		Степень	Низкая (1-2)	46%	0,6452	14%	0,2466	43
			Высокая (3-4)	41%		25%		32
		Степень (только стадия 2)	Низкая (1-2)	8%	0,0515	0%	0,0237	14
			Высокая (3-4)	50%		40%		10
	Плоскоклеточная карцинома	все		51%		23%		43
		Стадия	Стадия 1	54%	1,0000	25%	1,0000	24
			Стадия 2	50%		22%		18
		Степень	Низкая (1-2)	48%	0,5359	14%	0,2772	21
			Высокая (3-4)	62%		33%		21
	Крупноклеточная	все		64%		25%		16

Локализация рака	Тип рака	Клиническая категория		Окрашивание SSRP1				Количество образцов	
				Положительное (>1 все, почки >0)	p-значение	Высокое (>4)	p-значение		
	карцинома	Стадия	Ранняя (1-2)	64%	Нет данных	19%	Нет данных	14	
			Поздняя (3)	0%		0%		1	
		Степень	Высокая (3-4)	63%		25%		16	
Почка	Светлоклеточная ПКК	все		9%		2%		234	
		Стадия	Ранняя (1-2)	19%	0,1001	4%	0,1798	139	
			Поздняя (3-4)	9%		0%		63	
		Степень	Низкая (1-2)	13%	0,4000	3%	1,0000	126	
			Высокая (3-4)	9%		2%		91	
	Папиллярная ПКК	все		27%		7%		15	
		Стадия	Ранняя (1-2)	33%	1,0000	8%	1,0000	11	
			Поздняя (3-4)	66%		0%		4	
		Степень	Низкая (1-2)	11%	0,0230	1%	1,0000	9	
			Высокая (3-4)	80%		0%		6	
	Хромофобная ПКК	все		10%		0%		10	
	Саркоматоидная ПКК	все		22%		11%		9	
		все ПКК	Метастатический статус	нет	19%	0,0325	3%	0,4000	182
				да	34%		6%		50
Толстый кишечник	Рак толстого кишечника	Стадия	Ранняя (1-2)	33%	0,7419	17%	1,0000	12	
			Поздняя (3-4)	44%		14%		43	
		Степень	Умеренная	36%	0,0724	10%	0,0330	50	
			Высокая	64%		36%		14	
		Метастатический статус	нет	54%	0,5587	19%	1,0000	37	
			да	41%		18%		17	
Поджелудочная железа	Рак поджелудочной железы	Стадия	Ранняя (1-2)	74%	0,3799	38%	0,6620	8	
			Поздняя (3-4)	100%		25%		44	
		Степень	Умеренная	64%	0,7793	36%	0,2230	25	
			Высокая	57%		19%		26	
		Метастатический статус	нет	77%	0,3723	29%	0,7328	17	
			да	54%		22%		37	