



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.01

(21) Номер заявки
201790504

(22) Дата подачи заявки
2015.09.24

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ МОНОСЛОЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ИЛИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

(31) 14186286.2; 62/055,390

(32) 2014.09.24; 2014.09.25

(33) EP; US

(43) 2017.09.29

(86) PCT/EP2015/072046

(87) WO 2016/046346 2016.03.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕММ ФОРШУНГСЦЕНТРУМ
ФЮР МОЛЕКУЛАРЕ МЕДИЦИН
ГМБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:
**Суперти-Фурга Джулио, Снийдер
Беренд, Владимир Грегори Иэн (АТ)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С., Хмара М.В., Дощечкина В.В.,
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)**

(56) Douglas D. Richman ET AL. "In Vitro Evaluation of Experimental Agents for Anti-HIV Activity" In: "Current Protocols in Immunology", 1 May 2001 (2001-05-01), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, XP055178553, ISBN: 978-0-47-114273-7 DOI: 10.1002/0471142735.im1209s08, page 12.9.6 - page 12.9.10

MARIE-YVONNE AKOUME ET AL. "Cell-based Assay Protocol for the Prognostic... | Protocol",

JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS (JOVE), vol. 80, 1 October 2013 (2013-10-01), page e50768, XP055178755, abstract, section "protocol"

Peter F. Ambros ET AL. "Combined Immunofluorescence and FISH: New Prospects for Tumor Cell Detection/Identification" In: "Current Protocols in Cytometry", 1 November 2004 (2004-11-01), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, XP055179342, ISBN: 978-0-47-114295-9 DOI: 10.1002/0471142956.cy0813s26, the whole document

T. PEMOVSKA ET AL. "Individualized Systems Medicine Strategy to Tailor Treatments for Patients with Chemorefractory Acute Myeloid Leukemia", CANCER DISCOVERY, vol. 3, no. 12, 20 September 2013 (2013-09-20), pages 1416-1429, XP055179364, ISSN: 2159-8274, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0350, the whole document, especially the abstract, section "DSRT" on pages 1426-1427

Kim Rm Blenman: "Cytospin: Cytospin Cell Resuspension Solution", Sanguine Bioscience Blog, 20 August 2013 (2013-08-20), XP055179228, Retrieved from the Internet: URL: <https://technical.sanguinebio.com/techniques-in-cytology-cytospin-cytospin-cell-resuspension-solution/>, [retrieved on 2015-03-25], the whole document

"IHC/ICC Protocol Guide", 25 October 2011 (2011-10-25), XP055179351, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.rndsystems.com/resources/images/6903.pdf>, [retrieved on 2015-03-25], the whole document

(57) Изобретение относится к применению полученного in vitro монослоя мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или монослоя клеток костного мозга для определения того, страдает ли донор PBMC или донор клеток костного мозга от заболевания или имеет ли он предрасположенность к заболеванию, а также к применению указанных монослоев для определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание. Также изобретение относится к способу диагностики у донора PBMC или донора костного мозга заболевания или предрасположенности к заболеванию, к способу определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, а также к способу выбора фармацевтической композиции для лечения заболевания, которые включают применение монослоя PBMC или монослоя клеток костного мозга, культивируемых в соответствии со способом согласно изобретению.

Изобретение относится к применению полученного *in vitro* монослоя мононуклеарных клеток периферической крови (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) или монослоя клеток костного мозга для определения того, страдает ли донор PBMC или донор клеток костного мозга от заболевания или имеет ли он предрасположенность к заболеванию, а также к применению указанных монослоев для определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание. Заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или заболевание представляет собой миелопролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, нарушение клеточного роста, нарушение клеточного хемотаксиса, метаболическое нарушение или аутоиммунное нарушение.

В некоторых аспектах данное изобретение также относится к способу диагностики у донора PBMC или донора костного мозга заболевания или предрасположенности к заболеванию, включающему применение полученного *in vitro* монослоя PBMC или монослоя клеток костного мозга, культивируемых в соответствии со способом согласно изобретению, к способу определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, а также к способу выбора фармацевтической композиции, содержащей соединение для применения в лечении заболевания у индивидуума, имеющего указанное заболевание, где указанная фармацевтическая композиция выбрана по меньшей мере из двух или более тестируемых соединений, о которых известно, что они эффективны в лечении гематологической злокачественной опухоли и/или злокачественной опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани, где каждое из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений испытывают в анализе, основанном на применении полученного *in vitro* монослоя PBMC или монослоя клеток костного мозга, в котором во время формирования монослоя поддерживаются природные взаимодействия между клетками и целостность мембраны. Монослой PBMC или монослой клеток костного мозга получают способом, включающим (а) выделение PBMC из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; и (b) инкубацию PBMC или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм² до примерно 30000 клеток на 1 мм².

Понимание поведения клеток в глобальном масштабе после пертурбации значительно облегчается анализом на уровне отдельных клеток, включая межклеточное разрешение и разрешение отношений клетка-клетка. Область высококачественной визуализации постоянно представляет доказательства того, что изменчивость от клетки к клетке и клеточное микроокружение при детальном анализе фенотипов клеточных популяций необходимы для определения чувствительных фенотипов (обзор в Snijder et al. (2011) *Nature Reviews* 12, 119). Вариации клеточного фенотипа на глобальном уровне во многом определяются присущими им свойствами развивающихся клеточных популяций, которые создают специализированные нишевые микросреды, включая плотность клеток, межклеточные контакты, относительное расположение и клеточное пространство. Более того, на уровне отдельных клеток может быть охарактеризована гетерогенность клеточных ответов на одну и ту же пертурбацию (Slack et al. (2008) *PNAS* 105 (49): 19306-11). Сложность клеточной гетерогенности (в отношении исследования степени, в которой раковые клетки реагируют на противораковые лекарственные препараты) обнаруживает функциональное значение для широкого влияния, которому пациенты могут подвергаться на клеточном уровне во время химиотерапии.

Тем не менее, исследования, которые легли в основу популяционно-характеристического анализа, обусловленного субклеточным и одноклеточным разрешением, основываются на генетически идентичных клеточных линиях, которые не являются физиологически релевантными для человеческого здоровья и заболеваний. В этом отношении способы предшествующего уровня техники включают разделение/выделение популяций клеток и/или другие средства, которые разрушают природные межклеточные взаимодействия и/или целостность мембраны посредством, среди прочего, применения гравитационных сил, в частности центрифугирования или вращения, или лизиса клеток. Соответственно, образцы клеток и/или способы, описанные в Douglas et al. (2001) *Current Protocols in Immunology* (May 1st 2001), в Katrien Princen et al. (2002) *Cytometry Part A*, 51A, no. 1, pp. 35-45, или в Peter Ambros et al. (2004) *Current Protocols in Cytometry* (November 1st 2004), не отражают физиологически релевантные состояния и/или не способны анализировать физиологически релевантные образцы клеток. То же самое справедливо и в отношении анализов Cytospin®, в которых для получения образцов клеток используются гравитационные силы, когда почти не сохраняются природные межклеточные взаимодействия; см., например, Ikeda et al. (2011) *Diagnostic cytopathology* 39(6), pp. 395-401. Более того, актуальность поиска лекарственных препаратов для лечения заболеваний человека на клеточных линиях была недавно поставлена под сомнение после выявления несоответствий в опубликованной работе (Haibe-Kains et al. (2013) *Nature* 504, 389-93).

Кроме того, прогностическая химиотерапия для гемопоэтических раков, например, персонализированная диагностика или персонализированная медицина, является новой областью с постоянно развивающимися технологиями. До настоящего времени такие исследования зависели от выделения конкретных популяций клеток или от средних параметров популяции, т.е. клеточного размера, жизнеспособности, активности, и зависели от сортировки путем проточной цитометрии раковых бластов на основании CD-маркеров мембран, измеряя только гибель клеток (высвобождение АТФ) после инкубации с лекарст-

венными препаратами в сравнении со случайными здоровыми донорами (Pemovska et al., (2013) *Cancer Discov* 3, 1416-29). Ни одно исследование еще не использовало возможности высокопроизводительного химиотерапевтического тестирования с высокоточным микроскопом для интеграции жизнеспособности клеток (целостности мембраны), отслеживания биомаркеров, активации/кульминации пути и пространственной связи клеток друг с другом в физиологически релевантной среде крови. Более того, ни одна из методик, известных в данной области, не использует весь образец пациента (здоровые и раковые клетки, т.е. для глобальной перспективы), а скорее использует проточную цитометрию с сортировкой только популяции бластов, что приводит к потере клеток и рискам снижения здоровья клеток во время сортировки. Тем не менее, известно, что химические соединения, например лекарственные препараты, оказывают влияние на межклеточные взаимодействия между клетками разных подгрупп/субпопуляций, которые, тем не менее, не поддерживаются/не могут быть проанализированы с помощью средств и способов, известных в данной области.

Поэтому существует потребность в средствах и способах получения систем, которые отражают ситуацию *in vivo*, где эти системы могут быть использованы для РВМС и/или клеток костного мозга, чтобы отражать ситуацию *in vivo* и/или представление клеток *in vivo*, где эти системы могут быть использованы в способах диагностики заболевания или предрасположенности к заболеванию, в скрининге лекарственных препаратов, а также в оценке результатов лечения или предрасположенности к лечению.

Таким образом, данное изобретение относится к применению полученного *in vitro* монослоя мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) или монослоя клеток костного мозга, где в указанных монослоях сохраняются природные межклеточные взаимодействия и/или целостность мембраны в ходе формирования указанного монослоя, причем указанный монослой представляет собой физиологически релевантное состояние большинства клеток, входящих в указанный(ые) монослой(и), а также к средствам и способам получения таких монослоев.

Как видно из представляемых примеров, клеточные слои предшествующего уровня техники не могут использоваться для визуализации/применения/отслеживания/оценки межклеточных взаимодействий, что, в частности, обусловлено гравитационными силами, прикладываемыми к образцу (в частности, в ходе формирования слоев клеток предшествующего уровня техники). Такими гравитационными силами может быть, в частности, центрифугирование. Кроме того, в способах предшествующего уровня техники применяют методики, которые приводят к нежелательному лизису клеток и т.п., которые разрушают целостность мембраны и природное межклеточное взаимодействие. Напротив, в монослоях РВМС или клеток костного мозга согласно настоящему изобретению межклеточные взаимодействия и целостность мембраны, обнаруженные в природной среде, удивительным и неожиданным образом сохраняются в ходе формирования монослоя РВМС или клеток костного мозга. Сохранение межклеточных взаимодействий и/или целостности мембраны в ходе формирования монослоя позволяет оценить/определить/визуализировать любой эффект, основанный на межклеточных взаимодействиях и/или на целостности мембраны, с использованием монослоев согласно данному изобретению. Как показано в представляемых примерах, межклеточные взаимодействия можно визуализировать с использованием монослоя РВМС или клеток костного мозга согласно данному изобретению; см., например, фиг. 15В (верхнее правое изображение) и пример 13. Напротив, способы предшествующего уровня техники, в частности, описанные в Douglas et al. и в Katrien Princen et al., приводят к скоплению клеток и не способны визуализировать природные межклеточные взаимодействия; см., например, фиг. 15С и пример 13.

Например, известно, что клетки, в частности, полученные из гемопоэтических стволовых клеток, в частности, РВМС или клетки костного мозга, взаимодействуют друг с другом, среди прочего, через мембранные рецепторы и/или сахарные группировки на поверхностях клеток. Например, известно, что Т-клетки и дендритные клетки взаимодействуют после инфицирования. Тем не менее, Т-клетки и дендритные клетки проявляют меньшее или только относительное взаимодействие у пациентов, не страдающих заболеванием. Соответственно, монослои, в частности монослои РВМС и/или монослои клеток костного мозга согласно данному изобретению, позволяют определить, страдает ли донор заболеванием/инфекцией и/или может ли донор отвечать на лечение. Кроме того, монослои, в частности монослои РВМС или монослои костного мозга согласно данному изобретению, могут быть использованы в способах скрининга лекарственных препаратов, в которых межклеточные взаимодействия и/или целостность мембраны изменяются вследствие влияния лекарственного препарата.

Используемый в данном документе термин "межклеточные взаимодействия" относится к прямым взаимодействиям между поверхностями клеток, которые играют решающую роль в развитии и функционировании многоклеточных организмов. Эти взаимодействия позволяют клеткам взаимодействовать друг с другом в ответ на изменения в их микросреде. Такие межклеточные взаимодействия могут быть стабильными, такими как те, которые происходят через клеточные соединения. Эти соединения участвуют во взаимодействии и организации клеток в определенной ткани. Другие являются преходящими или временными, такими как соединения между клетками иммунной системы или взаимодействия, вовлеченные в тканевое воспаление. Эти типы межклеточных взаимодействий отличаются от других типов, таких как взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом.

Сохранение межклеточных взаимодействий означает, что клетка, взаимодействующая с другой

клеткой в природной среде, также будет взаимодействовать с указанной другой клеткой или клеткой того же клеточного типа в монослоях, предложенных в данном документе. Т.е. общие межклеточные взаимодействия сохраняются, тогда как клетки не обязательно сохраняют взаимодействие с одной и той же взаимодействующей клеткой.

Межклеточные взаимодействия, описанные выше, сохраняются в ходе формирования монослоя согласно изобретению. Как правило, в образце, содержащем РВМС или клетки костного мозга, используемые для формирования монослоя согласно данному изобретению, происходят природные межклеточные взаимодействия. Эти природные межклеточные взаимодействия сохраняются на последующих этапах создания монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга согласно данному изобретению, полученного *in vitro*. Специалист в данной области сможет определить, являются ли межклеточные взаимодействия природными и сохраняются ли они в монослое РВМС и/или монослое клеток костного мозга согласно данному изобретению. В частности, специалист в данной области может использовать способы, хорошо известные в данной области. В частности, межклеточные взаимодействия сохраняются при добавлении обнаруживаемых меток и/или красителей, в частности, витального красителя. После формирования монослоя межклеточные взаимодействия могут быть разорваны, например, путем фиксации монослоя перед визуализацией.

Межклеточные взаимодействия, сохраняющиеся в ходе формирования монослоя согласно данному изобретению и сохраняющиеся в способах согласно данному изобретению, включают, например, следующие межклеточные взаимодействия, которые указывают на специфические заболевания и/или указывают на здоровых доноров.

Состояние/ Заболевание	Диагностический клеточный маркер 1	Диагностический клеточный маркер 2	Диагностический клеточный маркер 3
Природный у здоровых доноров	CD11C (+)	CD3 (+)	
Природный у здоровых доноров	CD14 (+)	CD3 (+)	
Природный у здоровых доноров	CD11C (+)	CD4 (+)	
Природный у здоровых доноров	CD11C (+)	CD8 (+)	
Природный у здоровых доноров	CD19 (+)	CD3 (+)	
Острый или хронический миелоидный лейкоз	CD117 (+)	CD34 (+)	
Первичный миелофиброз	CD34 (+)	pSTAT5 (+)	
Острая В- лимфобластическая лейкемия	CD19 (+)	CD34 (+)	CD10 (+)
Острая Т-клеточная лимфобластическая лейкемия	CD3 (+)	CD10 (+)	
Хроническая лимфоцитарная лейкемия	CD19 (+)	CD5 (+)	
Множественная миелома	CD28 (+)	CD117 (+)	CD138 (+)

Соответственно, природные межклеточные взаимодействия могут быть определены/оценены/обнаружены с использованием клеточных маркеров. В частности, природные межклеточные взаимодействия могут быть определены/оценены/обнаружены с использованием маркеров, показанных в приведенной выше таблице. Например, природные межклеточные взаимодействия, указывающие на здорового донора, могут быть обнаружены, среди прочего, с использованием пар клеточных маркеров для

CD11C и CD3, CD14 и CD3, CD11C и CD8, CD19 и CD3. При обнаружении межклеточных взаимодействий, положительных по этим маркерам, донор может быть отнесен к категории здоровых.

Когда клетки, содержащиеся в монослое РВМС или монослой клеток костного мозга, обнаруживают/метят с использованием предложенных выше клеточных маркеров, указывающих на специфические заболевания, у донора клеток можно диагностировать ассоциированное заболевание и/или можно оценить лечение ассоциированного заболевания. Кроме того, когда клетки, содержащиеся в монослое РВМС или в монослой клеток костного мозга согласно данному изобретению, обнаруживают/метят с использованием маркеров, указывающих на здоровых доноров, у таких здоровых доноров можно оценить/определить природные межклеточные взаимодействия. Другие клеточные маркеры, указывающие на заболевания, описаны ниже.

Как обсуждалось выше, специалисты в данной области осведомлены о средствах и способах определения/оценки/отслеживания/верификации межклеточных взаимодействий. В частности, специалист в данной области сможет различить природные межклеточные взаимодействия и те взаимодействия, которые возникли в ходе получения образца клеток. По существу специалист в данной области понимает, что клетки одного и того же типа и/или клетки разных типов взаимодействуют в живом организме. Большинство клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, сохраняют их природные межклеточные взаимодействия. Т.е. большинство клеток, в частности, по меньшей мере 50% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, взаимодействуют с одной и той же клеткой или с клеткой того же клеточного типа, что и *in vivo*. Межклеточные взаимодействия можно верифицировать/оценить/определить с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, конфокальную микроскопию можно использовать для оценки/определения/верификации того, происходят ли межклеточные взаимодействия между клетками, взаимодействующими в природной среде, или же между клетками, которые не проявляют взаимодействия в природной среде. Такие неприродные межклеточные взаимодействия могут возникать, среди прочего, в результате скопления клеток. Как видно из прилагаемых примеров, такие природные межклеточные взаимодействия нельзя оценить/определить/верифицировать с использованием способов предшествующего уровня техники, в частности, с использованием средств и способов, описанных в Douglas et. или в Katrien Princen et al.; см., например, пример 12 и фиг. 15.

Это отличает монослой согласно данному изобретению от известных образцов клеток, содержащих РВМС и/или клетки костного мозга, которые демонстрируют случайные взаимодействия клеток и/или межклеточные взаимодействия, которые обычно не обнаруживаются или не обнаруживаются в той же степени *in vivo*, например, скопления клеток. Соответственно, монослой РВМС и монослой клеток костного мозга согласно данному изобретению отражают физиологически релевантное состояние, что дополнительно подтверждается соотношением/числом клеток, присутствующих в монослоях РВМС и монослоях клеток костного мозга согласно данному изобретению, которые отражают соотношение/число клеток, найденные *in vivo*.

Соответственно, способом согласно данному изобретению получают *in vitro* физиологически релевантный монослой РВМС и физиологически релевантный монослой клеток костного мозга. Термин "полученный *in vitro*" означает, что монослой получают вне живого организма, например, в лаборатории, т.е. вне нормального биологического контекста клеток, содержащихся в монослое. Как правило, исследования *in vitro* позволяют исследовать различные биологические функции в условиях, которые желательно должны напоминать ситуацию *in vivo*. Что касается клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, то ситуация *in vivo* в некоторой степени напоминает такую, которая делает возможными различные исследования и выводы, предусмотренные в данном документе, которые не могут быть получены из существующих образцов клеток. Таким образом, условия *in vitro*, напоминающие ситуацию *in vivo* РВМС или клеток костного мозга, т.е. обеспечивающие физиологически релевантное состояние таких клеток, обеспечивают различные преимущества по сравнению с известными способами, как описано в данном документе.

В то время как природные межклеточные взаимодействия сохраняются в ходе формирования монослоя согласно данному изобретению, процесс формирования может также включать сохранение целостности мембраны. Это означает, что биологические мембраны, поскольку они встречаются в природной среде, сохраняются в процессе формирования монослоя согласно данному изобретению. Многие из описанных выше межклеточных взаимодействий зависят от интактных мембран. Поэтому в процессе формирования монослоя согласно данному изобретению целостность мембраны предпочтительно сохраняется в такой степени, которая позволяет сохранять межклеточные взаимодействия, присутствующие *in vivo*. Этого можно достичь, избегая применения буферов, оказывающих влияние на целостность мембраны, например, буферов, взаимодействующих с биологическими мембранами, таких как буферы, содержащие детергенты. Например, следует избегать буферов, содержащих Triton или SDS (додecilсульфат натрия). Сохранение целостности мембраны во время формирования монослоя согласно данному изобретению приводит к формированию монослоя, содержащего клетки, находящиеся в физиологически релевантном состоянии. Как только монослой согласно данному изобретению формируется, целостность

мембраны может быть нарушена. Нарушение целостности мембраны может обеспечить доступность меток, специфических для одной или более чем одной из субпопуляций, включенных в монослой согласно данному изобретению. Например, монослой может быть зафиксирован перед оценкой/визуализацией. Средства и способы, используемые для фиксации, могут включать нарушение целостности мембраны. Соответственно, формируется монослой согласно данному изобретению, в котором во время формирования сохраняется целостность мембраны.

Соответственно, монослой РВМС или клеток костного мозга согласно данному изобретению представляют полученное *in vitro* представление физиологически релевантного состояния. Специалисту в данной области хорошо известны способы оценки того, является ли клеточный образец, например, монослой согласно данному изобретению, "физиологически релевантным состоянием" клеток, содержащихся в указанном образце клеток. В этом отношении термин "физиологически релевантное состояние" или аналогичные термины, используемые в данном документе, относятся к состоянию, напоминающему/отражающему ситуацию *in vivo*, которая была обнаружена в живом организме, причем указанный организм может быть здоровым или больным. В частности, в "физиологически релевантном состоянии" межклеточные взаимодействия и/или целостность мембраны предпочтительно сохраняются такими же, как *in vivo*. Соответственно, большинство клеток, в частности, по меньшей мере 50% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно находятся в состоянии, которое отражает ситуацию *in vivo* в отношении стадии в ходе жизненного цикла клеток и/или в отношении межклеточных взаимодействий, описанных выше, и/или отражает представление субпопуляций, присутствующих *in vivo*. Как правило, специалист в данной области хорошо осведомлен о том, что клеточный образец, в частности монослой согласно данному изобретению, содержит клетки различных субпопуляций, причем каждая клетка каждой субпопуляции может находиться в состоянии, среди прочего, живой, мертвой и/или умирающей клетки. Т.е. в монослоях согласно данному изобретению число/отношение клеток в каждом состоянии, т.е. живых, мертвых или умирающих клеток, и клеток каждой субпопуляции предпочтительно соответствует числу/соотношению, которое было обнаружено *in vivo*. Т.е. физиологически релевантное состояние, в котором находятся клетки, входящие в состав монослоя согласно данному изобретению, предпочтительно лишено клеток, которые находятся в отличающемся состоянии, т.е. в состоянии живой, мертвой или умирающей клетки, от того, в котором они были обнаружены *in vivo*, или клеток, которые принадлежат другой субпопуляции. Это требует получения монослоя, предложенного в данном документе, без изменения числа/соотношения клеток в каждом состоянии и/или в каждой субпопуляции, обнаруженной *in vivo*. Соответственно, для сохранения числа/соотношения клеток каждой субпопуляции предпочтительным является, чтобы пипетирование было уменьшено. В связи с этим образцы, используемые в данном документе, содержат адгезивные (прилипающие) и неадгезивные (неприлипающие) клетки. Поэтому пипетирование супернатанта до формирования монослоя может предпочтительно удалять неадгезивные клетки, таким образом изменяя общее представление субпопуляций, содержащихся в образце, используемом для формирования монослоя. Поэтому в способах согласно данному изобретению и/или в способах, используемых для получения монослоя согласно данному изобретению, предпочтительным является минимальный начальный объем, который позволяет избегать стадий пипетирования.

Референсный образец, называемый *in vivo* образцом/состоянием/ситуацией, соответствует образцу, полученному от донора, в частности от здорового или от больного донора, в параллели с образцом, используемым в способах согласно данному изобретению. Для различных заболеваний, включая гематологические злокачественные опухоли, хорошо задокументировано число/соотношение субпопуляций клеток, содержащихся в РВМС и/или клетках костного мозга. Соответственно, такие числа/соотношения также могут рассматриваться как референсный образец, представляющий ситуацию *in vivo*.

Для получения монослоя, отражающего ситуацию *in vivo*, предпочтительно, чтобы гравитационная сила, применяемая в ходе получения монослоя, т.е. в способах согласно данному изобретению, не превышала 1 g. Предпочтительно это достигается за счет исключения применения центрифугирования и/или вращения. Соответственно, способы согласно данному изобретению предпочтительно не включают центрифугирование и/или вращение после выделения клеток. Кроме того, предпочтительно, чтобы монослой согласно данному изобретению сохранялся в растворах/буферах, которые позволяют поддерживать физиологически релевантное состояние. Как правило, целостность мембраны предпочтительно сохраняется в монослоях согласно данному изобретению, т.е. клетки предпочтительно не лизируются в ходе получения монослоя согласно данному изобретению. В соответствии с вышесказанным большая часть клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, в частности по меньшей мере 50% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно находятся в физиологически релевантном состоянии, т.е. когда сохраняются межклеточные взаимодействия и/или сохраняется целостность мембраны.

Соответственно, чтобы получить *in vitro* монослой мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) или монослой клеток костного мозга, в котором сохраняются природные межклеточные взаимо-

действия и целостность мембраны, в ходе формирования монослоя РВМС или клетки костного мозга сохраняются/обрабатываются/анализируются примерно при 1 g, т.е. при $9,81 \text{ м/с}^2$. В этом отношении 1 g соответствует стандартной гравитации на планете Земля, т.е. $9,81 \text{ м/с}^2$. Это условие включает тот факт, что в ходе процесса формирования монослоя согласно данному изобретению исследователи избегают центрифугирования и/или вращения, т.е. не подвергают образец центрифугированию и/или вращению. Соответственно, в данном изобретении получают *in vitro* монослой моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) или монослой клеток костного мозга, в котором в ходе формирования монослоя сохраняются природные межклеточные взаимодействия и целостность мембраны, где после выделения РВМС или клетки костного мозга сохраняются/обрабатываются/анализируются примерно при 1 g, т.е. при $9,81 \text{ м/с}^2$.

Вышеизложенное не исключает того факта, что монослой согласно изобретению можно сохранять/обрабатывать/анализировать в другом месте, отличающемся от планеты Земля. Например, монослой согласно данному изобретению можно сохранять/обрабатывать/анализировать в месте, где отсутствует или почти отсутствует гравитационная сила. В таких обстоятельствах может быть искусственно применена гравитационная сила, достаточная для осаждения клеток. Примеры включают космические станции, самолеты с уменьшенной гравитацией (маневр в условиях невесомости), другие планеты, такие как Марс или Венера, или естественные спутники, такие как Луна Земли.

Понятие "большинство клеток", используемое в данном документе, означает, что по меньшей мере 50% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, предпочтительно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, находятся в физиологически релевантном состоянии. Указанные выше проценты клеток в физиологически релевантном состоянии, содержащиеся в монослоях согласно изобретению, определяются/измеряются/оцениваются с использованием способов, хорошо известных в данной области. В частности, содержит ли клеточный образец, в частности монослой согласно данному изобретению, клетки, находящиеся в физиологически релевантном состоянии, определяют путем количественной оценки клеток, содержащихся в монослое. Это может быть сделано с использованием способов, хорошо известных в данной области. В частности, количественная оценка может быть выполнена с помощью анализа изображения в сравнении с клетками периферической крови или костного мозга от референсного индивидуума или нескольких референсных индивидуумов, например, от одного или более чем одного здорового донора, где образец РВМС или клеток костного мозга получен от больного донора. Количественная оценка клеток является стандартным диагностическим инструментом. Пороговые значения клеточных субпопуляций, содержащихся в РВМС и/или клетках костного мозга, хорошо задокументированы для здоровых доноров и больных доноров. Соответственно, на основе различий в образцах, подлежащих оценке с использованием средств и способов согласно данному изобретению, можно определить физиологическую релевантность. Документацию клеточных субпопуляций, содержащихся в гемопоэтических клетках, можно найти, например, в Hallek et al. (2008) Blood 111(12). Соответственно, количественная оценка и дополнительные средства и способы, например, определение межклеточных взаимодействий с использованием микроскопии, позволяют определить, представляет ли клеточный образец физиологически релевантное состояние.

Монослой может обеспечить уникальную модельную систему, которая может быть использована, среди прочего, в биологических, биохимических и биофизических исследованиях. Кроме того, монослой может быть использован в медицинских диагностических и скрининговых способах, например, в автоматизированных медицинских диагностических и скрининговых способах. Некоторые монослой РВМС и монослой клеток костного мозга, представленные в данном документе, требуют минимального донорского материала; таким образом, стандартные количества донорского материала, например, полученного в соответствии со стандартными протоколами анализа крови, могут быть использованы для тестирования или анализа большего числа пертурбаций (например, отдельных тестируемых состояний) на каждого донора, чем это возможно с использованием современных способов, известных в данной области. Кроме того, определенные монослой РВМС и монослой клеток костного мозга, представленные в данном документе, могут обеспечить быструю оценку результатов с использованием анализа на основе визуализации, например, путем оценки микроскопических изображений окрашенных образцов (например, флуоресцентного окрашивания за счет меченых антител), что приводит к автоматизированной обработке, значительно сокращая потребности в рабочей силе и время обработки/анализа.

Монослой, применяемые в различных аспектах согласно данному изобретению, могут, среди прочего, обеспечить визуализацию и/или микроскопический анализ популяций РВМС или популяций клеток костного мозга. Соответственно, используемый в данном документе монослой подразумевает один слой клеток, находящихся преимущественно в одной и той же фокальной плоскости устройства для визуализации, например микроскопа или автоматизированной камеры, известного в данной области или описанного в данном документе. Термин "один слой" используется для обозначения того, что клетки в этом слое формируют культуру, которая преимущественно является двухмерной, т.е. культура преимущественно представляет собой слой отдельных клеток. Таким образом, в данной культуре большинство клеток не располагаются на других клетках или над ними и не находятся в агрегатах (например, состоящих

из групп клеток, которые простираются над слоем отдельных клеток посредством включения клеток, которые располагаются на других клетках или над ними). Таким образом, монослой РВМС в терминах данного изобретения предпочтительно содержит горизонтальный слой клеток РВМС, имеющий толщину, равную высоте одной единственной РВМС. Аналогично, монослой клеток костного мозга в терминах данного изобретения предпочтительно содержит горизонтальный слой клеток костного мозга, имеющий толщину, равную высоте одной единственной клетки костного мозга. Используемый в данном документе термин "монослой" не исключает того, что внутри культурального сосуда могут присутствовать клеточные агрегаты или многослойные конструкции (т.е. области с клеточными культурами, имеющими высоту более одной клетки РВМС или более одной клетки костного мозга, соответственно) или области без клеток. Скорее, этот термин используется для обозначения того, что культуры согласно данному изобретению будут иметь большую часть их визуализируемой или видимой области (например, микроскопическими способами), состоящую из одного слоя клеток. Это наиболее легко осуществимо в виде получения отдельного слоя клеток на поверхности клеточной культуры. Как они понимаются в данной области, РВМС, выделенные из образцов крови, или очищенные клетки костного мозга содержат преимущественно неадгезивные клетки и, таким образом, обычно не формируют сильные контакты с поверхностями клеточной культуры или сильные межклеточные контакты. Следовательно, в различных аспектах данного изобретения не предполагается, что монослой РВМС должны быть эквивалентны монослоям адгезивных клеток, как они понимаются в данной области, т.е. включать слой клеток, прочно прикрепленных, равномерно распределенных и охватывающих большую часть культуральной поверхности. Скорее, в некоторых воплощениях монослой РВМС согласно данному изобретению может содержать культуры высокой плотности, содержащие большинство клеток, находящихся в прямом контакте с одной или более чем одной другой клеткой, но не обязательно прикрепленных к поверхности культуры, или может содержать культуры низкой плотности, в которых клетки находятся в монослое, но не имеют (прямого физического) контакта с любой другой клеткой в культуре. Монослой, предложенные в некоторых аспектах данного изобретения, также могут содержать культуры промежуточной плотности, имеющие дискретные области, в которых клетки находятся в контакте с одной или более чем одной клеткой, и другие области, в которых клетки не контактируют с другими клетками.

Поскольку предложенные в данном документе монослой позволяют впервые использовать информацию, полученную из физиологически релевантных образцов РВМС или образцов клеток костного мозга, в которых в ходе формирования монослоев сохраняются природные межклеточные взаимодействия и целостность мембраны, указанная информация может быть использована в различных применениях, в частности, в медицинских и/или диагностических целях.

Таким образом, данное изобретение относится, среди прочего, к способу выбора фармацевтической композиции, содержащей соединение для применения в лечении заболевания, в частности, гематологической злокачественной опухоли и/или злокачественной опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани индивидуума, где указанную фармацевтическую композицию выбирают по меньшей мере из двух или более тестируемых соединений, где каждое из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений испытывают в анализе, включающем стадии (а) получения монослоя гемопоэтических клеток, в частности, монослоя РВМС или клеток костного мозга согласно данному изобретению, с использованием гемопоэтических клеток указанного индивидуума, в частности, его РВМС или клеток костного мозга; (b) определения одной или более чем одной биологической функции одной или более чем одной из субпопуляций, содержащихся в монослое гемопоэтических клеток, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга; (c) добавления одного из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений к монослою гемопоэтических клеток, в частности, к монослою РВМС или монослою клеток костного мозга; и (d) определения/отслеживания/оценки/верификации изменений указанной одной или более чем одной биологической функции одной или более субпопуляции, содержащейся в гемопоэтическом монослое, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга, при этом анализ повторяют для каждого из по меньшей мере двух или более соединений, и соединение, оказывающее наиболее благоприятное воздействие на указанную одну или более чем одну биологическую функцию указанных одной или более чем одной субпопуляции, выбрано для лечения указанного индивидуума.

В описанном выше процессе могут быть определены различные биологические функции. В частности, можно определить, находятся ли клетки, содержащиеся в монослое, в физиологически релевантном состоянии. Физиологически релевантное состояние может быть охарактеризовано межклеточными взаимодействиями, сохраняющимися в ходе формирования монослоя, и/или жизнеспособностью клеток, содержащихся в монослое, и/или целостностью мембраны, сохраняющейся в ходе формирования монослоя. Соответственно, предпочтительно, чтобы биологические функции, определенные в указанном выше процессе, представляли собой жизнеспособность и/или межклеточные взаимодействия клеток, содержащихся в монослое.

Жизнеспособность и/или межклеточные взаимодействия клеток, содержащихся в монослое, могут быть определены, и/или изменения жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий могут быть определены/оценены/отслежены/верифицированы с помощью обнаруживаемых меток/маркеров/красителей. Такие метки/маркеры/красители могут быть специфическими для одной или более чем одной из

субпопуляций, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению. Там, где используются такие специфические метки/маркеры/красители, они могут быть выбраны для типов клеток, которые играют роль в различных заболеваниях и/или, как известно, имеют биологическую функцию при заболевании, в частности, при гематологической злокачественной опухоли и/или злокачественной опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани.

Соответственно, в конкретных аспектах фармацевтическая композиция может содержать соединение для применения в лечении острой или хронической миелоидной лейкемии у индивидуума, где указанную фармацевтическую композицию выбирают по меньшей мере из двух или более тестируемых соединений, где каждое из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений испытывают в анализе, включающем стадии (а) получения монослоя гемопоэтических клеток, в частности, монослоя РВМС или клеток костного мозга согласно данному изобретению, с использованием гемопоэтических клеток указанного индивидуума, в частности, РВМС или клеток костного мозга; (b) определения жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий CD117- и/или CD34-положительных клеток, содержащихся в монослое гемопоэтических клеток, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга; (с) добавления одного из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений к монослою гемопоэтических клеток, в частности, к монослою РВМС или монослою клеток костного мозга; и (d) определения/отслеживания/оценки/верификации изменений жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий CD117- и/или CD34-положительных клеток, содержащихся в гемопоэтическом монослое, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга, при этом анализ повторяется для каждого из по меньшей мере двух или более соединений, и соединение, наиболее значимо снижающее жизнеспособность/межклеточные взаимодействия, выбрано для лечения указанного индивидуума. В конкретных аспектах фармацевтическая композиция может содержать соединение для применения в лечении первичного миелофиброза у индивидуума, где указанную фармацевтическую композицию выбирают по меньшей мере из двух или более тестируемых соединений, где каждое из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений испытывают в анализе, включающем стадии (а) получения монослоя гемопоэтических клеток, в частности, монослоя РВМС или клеток костного мозга согласно данному изобретению, с использованием гемопоэтических клеток указанного индивидуума, в частности, РВМС или клеток костного мозга; (b) определения жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий CD34- и/или pSTAT5-положительных клеток, содержащихся в монослое гемопоэтических клеток, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга; (с) добавления одного из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений к монослою гемопоэтических клеток, в частности, к монослою РВМС или монослою клеток костного мозга; и (d) определения/отслеживания/оценки/верификации изменений жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий CD34- и/или pSTAT5-положительных клеток, содержащихся в гемопоэтическом монослое, в частности, в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга, при этом анализ повторяется для каждого из по меньшей мере двух или более соединений, и соединение, наиболее значимо снижающее жизнеспособность/межклеточные взаимодействия, выбрано для лечения указанного индивидуума.

Согласно данному изобретению фармацевтическая композиция включает соединение, выбранное по меньшей мере из двух или более чем двух тестируемых соединений. Тестируемые соединения конкретно не ограничены до тех пор, пока они подходят для применения в качестве фармацевтических препаратов. Тем не менее, предпочтительно, чтобы указанные тестируемые соединения были выбраны среди соединений, которые известны как эффективные в лечении заболевания, в частности, гематологической злокачественной опухоли и/или злокачественной опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани. Соединения, которые, как известно, являются эффективными в лечении таких заболеваний, включают химические соединения и биологические соединения, такие как, например, антитела. Примеры соединений, которые, как известно, эффективны в лечении таких заболеваний, включают, но не ограничиваясь ими, алемтузумаб, анагрелид, триоксид мышьяка, аспарагиназу, АТРА, азацитидин, бендамустин, блинатумомаб, бортезомиб, босутиниб, брентуксимаб ведотин, бусульфан, цеппен, хлорамбуцил, кладрибин, клофарабин, циклофосфамид, цитарабин, дазатиниб, даунорубицин, децитабин, денилейкин дифтитокс, дексаметазон, доксорубицин, дувелизиб, EGCG - эпигаллокатехин галлат, этопозид, филграстим, флударабин, гемтузумаб озогамин, гистамин дигидрохлорид, гомогаррингтонин, гидроксимочевину, ибрутиниб, идарубин, иделалисиб, ифосфамид, иматиниб, интерферон альфа-2а рекомбинантный, интерферон альфа-2b рекомбинантный, внутривенный иммуноглобулин, L-аспарагиназу, леналидомид, мазитиниб, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, мидостаурин, митоксантрон, МК-3475 - пембролизумаб, nilотиниб, пегаспаргазу, пегинтерферон альфа-2а, пликсифор, понатиниб, преднизолон, преднизон, R115777, RAD001 (эверолимус), ритуксимаб, риксолотиниб, селинексор (KPT-330), сорафениб, сунитиниб, талидомид, топотекан, третиноин, винбластин, винкристин, вориностат, золедронат, ABL001, АВТ-199 - венетоклакс, АВТ-263 - навитоклакс, АВТ-510, АВТ-737, АВТ-869 - линифаниб, AC220 - квизартиниб, АЕ-941 - неовастат, AG-858, AGRO100, аминокперин, аспарагиназу из *Erwinia chrysanthemi*, AT7519, AT9283, AVN-944, бафетиниб, бектумомаб, бестатин, бета-алетин, бексаротен, BEZ235, BI 2536, бупарлисиб (BKM120), карфилзомиб, кармустин, церитиниб, CGC-11047, CHIR-258, CHR-2797, CMC-544 - инотузумаб озогамин, CMLVAX100, CNF1010, CP-4055, креноланиб, кризотиниб, эллаговую кислоту, элза-

митруцин, эпоэтин зета, эпратузимаб, FAV-201, фавлд, флавопиридол, G4544, галиксимаб, мальтотат галлия, нитрат галлия, гивиносат, GMX1777, GPI-0100, Grn163I, GTI 2040, IDM-4, интерферон альфа-кон-1, IPH 1101, ISS-1018, иксабепилон, JQ1, лестортиниб, мехлорэтамин, MEDI4736, MGCD-0103, MLN-518 - тандутиниб, мотексафин гадолиния, природный альфа-интерферон, неларабин, обатоклак, обинутузимаб, OSI-461, панобиносат, PF-114, PI-88, пивалоилоксиметилбутират, пиксантон, помалидомид, PPI-2458, пралатрексат, пролейкин, PU-H71, ранолазин, ребастиниб, самария (153Sm) лексидроном, SGN-30, лучевую терапию, направленную на скелет, тацедиалин, тамибаротен, темсиролиму, тиюганин, троксацилин, виндезин, VNP 40101M, воласертиб или XL228. Приведенные примеры иллюстрируют выгодные эффекты описанных в данном документе средств и способов. Как можно видеть на фиг. 12, средства и способы, представленные в данном документе, могут использоваться для определения/оценки того, является ли эффективным лечение и/или является ли эффективным лечебный режим. Предыдущие способы основаны на общем числе убитых PBMC. Напротив, средства и способы, предложенные в данном документе, позволяют проводить оценку на основании субпопуляций, содержащихся в монослоях PBMC или монослоях клеток костного мозга согласно данному изобретению, с использованием, например, маркеров, специфических для таких субпопуляций. Таким образом, решение о лечении может быть принято на основе влияния лекарственного препарата на конкретную субпопуляцию или субпопуляции, содержащиеся в монослое PBMC или в монослое клеток костного мозга согласно данному изобретению. После тестирования множества одобренных лекарственных препаратов, которые используются для лечения гематологических злокачественных заболеваний, было решено изменить схему лечения для пациента, проходящего курс лечения руксолитинибом. В частности, было решено дополнительно использовать азацитидин, что значительно сократило число больных клеток; см. фиг. 12D. Соответственно, средства и способы, предложенные в данном документе, были успешно использованы для постановки диагноза пациенту с заболеванием и для оценки того, реагирует ли указанный пациент на лечение, и будет ли указанный пациент реагировать на альтернативное лечение.

Жизнеспособность клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, можно определить/оценить/верифицировать с использованием способов, хорошо известных в данной области. Как правило, специалист в данной области хорошо осведомлен о способах определения/оценки/верификации стадии клетки, например, является ли клетка жизнеспособной, живой, мертвой или подвергается процессу изменения своей стадии, например, умирает, как при апоптозе или некрозе. Соответственно, в способах согласно данному изобретению могут быть использованы известные маркеры/красители, которые специфически распознают/метят клетки, находящиеся на конкретной стадии. Они включают красители/метки, которые являются селективными для клеток с неинтактными мембранами, или красители/метки, которые являются селективными для поздней стадии клеточной гибели или раннего апоптоза. Например, можно использовать краситель fixable live/dead green (ThermoFisher, кат. номер L-23101), антитела против цитохрома C, определяющие оборот ДНК или пролиферацию клеток за счет применения красителей. Дополнительные средства и способы определения/оценки/верификации жизнеспособности клеток, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению, описаны ниже и известны специалистам в данной области.

Определение/отслеживание/оценка/верификация изменений жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий одной или более чем одной из субпопуляций, содержащихся в гемопоэтическом монослое, в частности, в монослое PBMC или монослое клеток костного мозга, могут быть проведены с помощью способов, известных в данной области. Например, используя микроскопию, можно определять/отслеживать/оценивать/верифицировать изменения с помощью оптического восприятия. Тем не менее, для высокоточных применений предпочтительно использовать автоматизированный способ, который определяет/отслеживает/оценивает/верифицирует изменения жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий отдельных субпопуляций, содержащихся в монослоях согласно данному изобретению. Такой способ включает выявление субпопуляций, содержащихся в монослое, например, с помощью обнаруживаемых меток. Также можно определить, демонстрируют ли меченые/обнаруженные субпопуляции межклеточные взаимодействия, при этом межклеточные взаимодействия могут включать прямые контакты через плазматические мембраны (как описано выше) или косвенные контакты. Соответственно, вводится параметр расстояния между мечеными клетками, который определяет клетку, контактирующую или не контактирующую с другой клеткой. Затем определяют фракцию, т.е. соотношение, клеток субпопуляции, которые находятся в контакте с другими клетками. Полученное число сравнивают с числом, ожидаемым при случайной функции распределения, т.е. при случайных межклеточных взаимодействиях, как если бы они наблюдались в образцах, демонстрирующих образование скоплений. Затем можно вычислить показатель взаимодействия, который определяет, является ли взаимодействие случайным или направленным. Следуя такому протоколу до и после того, как одно или более чем одно из анализируемых веществ было добавлено к монослою согласно данному изобретению, можно определять/отслеживать/оценивать/верифицировать изменения межклеточных взаимодействий в результате действия одного или более чем одного тестируемого соединения.

Кроме того, данное изобретение предлагает способ культивирования PBMC или клеток костного мозга, включающий (а) выделение PBMC из образца крови или выделение клеток костного мозга из ко-

стного мозга; и (b) инкубацию PBMC или клеток костного мозга при плотности примерно от 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 .

Соответственно, данное изобретение предлагает способы культивирования или инкубации мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в форме монослоя, включающие (a) выделение PBMC из образца крови и (b) инкубирование PBMC при определенной плотности. В частности, плотность является такой плотностью, которая сохраняет культуру монослоя PBMC в течение всего времени культивирования монослоя, например, от момента введения в устройство для культивирования до окончательной обработки перед визуализацией. Например, максимальная плотность является такой, что общее число клеток, (a) введенных в устройство для культивирования или (b) предположительно присутствующих в устройстве для культивирования после культивирования и до обработки для визуализации, не превышает это число, присутствующее при максимальной плотности для монослоя PBMC, описанного в данном документе. Плотности согласно данному изобретению, как правило, являются более низкими, чем обычно используемые для посева в лунки при культивировании PBMC согласно практике в данной области. PBMC согласно данному изобретению могут быть введены и/или культивированы, имея в устройстве для культивирования плотность от примерно 100 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Соответственно, данное изобретение предлагает способ культивирования PBMC, включающий (a) выделение PBMC из образца крови; и (b) инкубацию PBMC при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 .

Данное изобретение предлагает способы культивирования или инкубации первичных гемопоэтических клеток, в частности, клеток костного мозга, в виде монослоя, включающие (a) выделение из образца первичных гемопоэтических клеток, в частности, клеток костного мозга, и (b) инкубацию клеток костного мозга при определенной плотности. В частности, плотность является такой плотностью, которая сохраняет культуру монослоя PBMC в течение всего времени культивирования монослоя, например, от момента введения в устройство для культивирования до окончательной обработки перед визуализацией. Например, максимальная плотность является такой, что общее число клеток, (a) введенных в устройство для культивирования или (b) предположительно присутствующих в устройстве для культивирования после культивирования и до обработки для визуализации, не превышает это число, присутствующее при максимальной плотности для монослоя клеток костного мозга, описанного в данном документе. Плотности согласно данному изобретению, как правило, являются более низкими, чем обычно используемые для посева в лунки при культивировании клеток костного мозга согласно практике в данной области. Клетки костного мозга согласно данному изобретению могут быть введены и/или культивированы, имея в устройстве для культивирования плотность от примерно 100 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, клетки костного мозга инкубируют при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, клетки костного мозга инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Соответственно, данное изобретение предлагает способ культивирования клеток костного мозга, включающий (a) выделение клеток костного мозга из костного мозга; и (b) инкубацию клеток костного мозга при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 .

Термин "примерно", используемый в данном документе, будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. В частности, в некоторых воплощениях PBMC согласно данному изобретению вводят и/или культивируют так, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от примерно 90 до примерно 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от примерно 27000 до примерно 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от примерно 450 до примерно 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от примерно 18000 до примерно 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от примерно 900 до примерно 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от примерно 9000 до примерно 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от примерно 900 до примерно 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от примерно 4500 до примерно 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от примерно 900 до примерно 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от примерно 2700 до примерно 3300, клеток на 1 мм^2 . Наиболее предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от примерно 1800 до примерно 2200 клеток на 1 мм^2 площади роста.

Первичные гемопоэтические клетки, в частности, PBMC и/или клетки костного мозга, для приме-

нения в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут быть выделены из образца, полученного от здорового субъекта, например, у которого не подозревается заболевание или подозревается предрасположенность к заболеванию, либо могут быть выделены из образца, полученного от субъекта, о котором известно, что он страдает заболеванием, или у него подозревается заболевание. Диагноз болезненного состояния субъекта устанавливается стандартными способами, которые обычно используются специалистами в данной области, например, врачами. Соответственно, данное изобретение предлагает в некоторых воплощениях монослой первичных гемопоэтических клеток, в частности, монослой РВМС или монослой клеток костного мозга, для применения в диагностическом способе для определения того, будет ли заболевание отвечать или отвечает ли на терапевтический агент. Монослои РВМС и монослои клеток костного мозга, описанные в данном документе, позволяют визуализировать клеточный ответ и активность (например, как на макроуровне (например, межклеточные взаимодействия), на субклеточном уровне (например, субклеточные изменения активности), так и на глобальном уровне (например, изменения в целой популяции) и, таким образом, обеспечивают уникальные системы, позволяющие оценивать реакцию РВМС или реакцию костного мозга, соответственно, на один или более чем один терапевтический агент. Таким образом, монослои РВМС или монослои клеток костного мозга, описанные в данном документе, могут быть, среди прочего, использованы в качестве общих моделей, позволяющих оценивать терапевтический ответ или вероятность терапевтического ответа, например, когда клетки РВМС/костного мозга выделены из образцов, полученных от здоровых субъектов. Терапевтический ответ двух или более монослоев РВМС или монослоев клеток костного мозга, соответственно, выделенных из образцов, полученных от двух или более здоровых доноров, может быть использован для разработки стандартного, исходного или ожидаемого репрезентативного ответа здоровой популяции, например, не страдающей или не предрасположенной к заболеванию. Аналогично, терапевтический ответ двух или более монослоев РВМС или монослоев клеток костного мозга, соответственно, выделенных из образцов, полученных от двух или более доноров, страдающих одним и тем же заболеванием и/или предрасположенных к одному и тому же заболеванию (или их комбинации), может быть использован для разработки прогностического стандартного, исходного или ожидаемого ответа, репрезентативного для популяции, страдающей этим заболеванием или предрасположенной к нему. Альтернативно или дополнительно, монослой РВМС или монослой клеток костного мозга, описанный в данном документе, может быть использован в диагностическом способе для прогнозирования того, страдает ли от заболевания или предрасположен ли к заболеванию донор, от которого получен образец, из которого выделены клетки РВМС/клетки костного мозга, и/или будет ли донор РВМС/донор клеток костного мозга отвечать или отвечает ли на лечение данным терапевтическим агентом.

Анализ терапевтического ответа монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга может быть прогностическим для ответа болезненного состояния у донора РВМС или донора костного мозга, соответственно; в этой связи способы, предложенные в различных аспектах данного изобретения, обеспечивают преимущества перед существующими способами, доступными в данной области. Например, описанные в данном документе монослои РВМС могут состоять из нормальных, например здоровых, клеток, и больных клеток, если они выделены из образца, полученного от донора, имеющего заболевание или предрасположенного к заболеванию, например, клетки, таким образом, могут иметь аномальный фенотип или генотип сам по себе или репрезентативный для болезненного состояния (например, увеличение или уменьшение концентрации относительно ожидаемых концентраций у здорового человека). Следовательно, монослои РВМС, описанные в данном документе, содержат здоровые клетки или здоровые клеточные популяции, которые могут выступать в качестве самоконтроля в способах, предложенных в данном документе. Как правило, терапевтический ответ клеток в болезненном состоянии можно непосредственно сравнивать с ответом здоровых клеток в том же образце и без необходимости сравнивать с исходными ответами и/или без необходимости создавать отдельные контрольные культуры. Монослои согласно данному изобретению, содержащие здоровые и больные клетки, если они выделены из образца, полученного от донора, имеющего заболевание или предрасположенного к заболеванию, также могут быть использованы для определения/визуализации/отслеживания межклеточных взаимодействий между больными клетками, здоровыми клетками или между больными и здоровыми клетками. Изменения межклеточных взаимодействий и/или жизнеспособности клеток после лечения или по сравнению с референсом могут предсказывать способность отвечать на лечение или предрасположенность к заболеванию. Референс может быть вторым образцом, взятым у того же донора, либо образцом, взятым у референсного донора, например, у здорового донора, у донора с предрасположенностью или без нее, либо у больного донора.

Данное изобретение также относится к способу диагностики заболевания или предрасположенности к заболеванию у донора РВМС и к способу определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, при этом указанный способ включает (а) выделение РВМС из образца крови, полученного от указанного субъекта/донора; (b) инкубацию указанных РВМС при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 площади роста; (c) контактирование указанных РВМС с указанным терапевтическим агентом; и (d) оценку ответа РВМС на терапевтический агент.

Предпочтительно, РВМС инкубируют на стадии (b) при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. В частности, в некоторых воплощениях РВМС согласно данному изобретению инкубируют на стадии (b) данного способа согласно изобретению так, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от 90 до 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от 27000 до 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от 450 до 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от 18000 до 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от 9000 до 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от 4500 до 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от 2700 до 3300, клеток на 1 мм^2 . Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от 1800 до 2200, клеток на 1 мм^2 площади роста. Согласно оценке на стадии (d) терапевтический режим субъекта может быть изменен. Например, терапевтический режим может быть реализован, или терапевтический режим может быть усилен в том случае, если ответ положительный; альтернативно, предложенный терапевтический режим может быть отклонен, или текущий реализуемый режим может быть остановлен, если оценка показывает отсутствие или потерю эффективного ответа.

Данное изобретение также относится к способу диагностики заболевания или предрасположенности к заболеванию у донора клеток костного мозга и к способу определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, при этом указанный способ включает (a) выделение клеток костного мозга от указанного субъекта/донора; (b) инкубацию указанных клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 площади роста; (c) контактирование указанных клеток костного мозга с указанным терапевтическим агентом; и (d) оценку ответа клеток костного мозга на терапевтический агент. Предпочтительно, клетки костного мозга инкубируют на стадии (b) при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, клетки костного мозга инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. В частности, в некоторых воплощениях клетки костного мозга согласно данному изобретению инкубируют на стадии (b) данного способа согласно изобретению так, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от 90 до 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от 27000 до 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, клетки костного мозга инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от 450 до 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от 18000 до 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от 9000 до 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от 4500 до 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от 2700 до 3300, клеток на 1 мм^2 . Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от 1800 до 2200, клеток на 1 мм^2 площади роста. Согласно оценке на стадии (d) терапевтический режим субъекта может быть изменен. Например, терапевтический режим может быть реализован, или терапевтический режим может быть усилен в том случае, если ответ положительный; альтернативно, предложенный терапевтический режим может быть отклонен, или текущий реализуемый режим может быть остановлен, если оценка показывает отсутствие или потерю эффективного ответа.

Таким образом, в данном изобретении предложены способы, использующие физиологически релевантные множественные популяции первичных гемопоэтических образцов в визуализирующих исследованиях для определения высокоточным образом: 1) влияния химиотерапии на биомаркеры на глобальном уровне на основании анализа отдельных клеток, 2) способности этой методики давать прогноз химиотерапии *ex vivo* в образцах пациентов, и 3) для интеграции набора данных от многих пациентов с течением времени для определения закономерностей в оценках лечения. Как известно специалистам в данной области, первичные гемопоэтические образцы, используемые в способах согласно данному изобретению, включают, среди прочего, РВМС и клетки костного мозга. Соответственно, монослой первич-

ных гемопоэтических клеток, предложенный в данном документе, может содержать РВМС и/или клетки костного мозга. Как правило, хотя средства и способы, представленные в данном документе, описаны для РВМС, специалист в данной области понимает, что идентичные средства и способы предложены и для клеток костного мозга. Соответственно, в данном документе предложены способы культивирования клеток костного мозга, способы определения того, страдает ли донор клеток костного мозга заболеванием или предрасположен ли он к заболеванию, способы диагностики заболевания или предрасположенности к заболеванию у донора костного мозга, и способы определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, при этом указанные способы включают применение клеток костного мозга. Кроме того, способы для скрининга лекарственных препаратов и другие способы, представленные в данном документе для РВМС, также раскрыты для других гемопоэтических клеток, например, клеток костного мозга.

В данном контексте костный мозг представляет собой гибкую ткань внутри костей. У людей эритроциты вырабатываются костным мозгом в головках длинных костей в процессе, известном как гемопоэз. Трансплантации костного мозга можно проводить для лечения тяжелых заболеваний костного мозга, включая некоторые формы рака, такие как лейкомию. Кроме того, стволовые клетки костного мозга успешно трансформируются в функциональные нервные клетки и могут также использоваться для лечения таких заболеваний, как воспалительное заболевание кишечника. Соответственно, клетки костного мозга представляют собой ценную мишень при лечении различных заболеваний, например раковых заболеваний или воспалительных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника. Таким образом, способы, предложенные в данном документе, использующие образцы костного мозга, полученные от донора, очень полезны в оценке/определении того, страдает ли донор таким заболеванием или предрасположен ли он к заболеванию. Кроме того, способы с использованием клеток костного мозга, предложенные в данном документе, предоставляют различные преимущества при высокоэффективном скрининге лекарственных препаратов и т.п.

К настоящему моменту из-за догмы, требующей наличия адгезивных клеток (макрофагов, HeLa и т.д.) для формирования окрашиваемого и визуализируемого монослоя, исследовательские группы не смогли реализовать методики скрининга одиночных клеток на основании визуализации первичных образцов от пациентов для высокоэффективного определения индуцированных химиотерапией молекулярных (биомаркерных) изменений и для оценки выживаемости раковых опухолей, в частности, когда болезненное состояние представлено или отражено в неадгезивных клетках, например, при заболеваниях или состояниях крови, таких как лимфомы и лейкомии. Для решения этой проблемы авторы данного изобретения предлагают новые средства и способы, а также новую методологию и конвейер анализа изображений, указываемый в данном документе как "фармакоскопия", который позволяет визуализировать адгезивные и неадгезивные клетки в одном изображении, обычно требуя только 1/10 материала, необходимого на каждую пертурбацию, по сравнению со способами, известными в данной области, а также увеличивая эффективность и скорость. Фармакоскопия может предоставлять такую же информацию, как собранная известными способами, например, путем проточной цитометрии, но предоставляет дополнительную полезную информацию, такую как измерение субклеточных фенотипов (локализация/колокализация белка) и клеточное микроокружение/соседство. Кроме того, в некоторых воплощениях описанные способы требуют меньшего количества клеток и, следовательно, меньшего количества материала от пациента, меньшего объема жидкости, и почти не требуют никакого вмешательства человека; тем самым, фармакоскопия значительно увеличивает число молекулярных пертурбаций, которые могут быть протестированы параллельно, и дает более подробные оценки. Кроме того, без необходимости сортировать раковые клетки от врожденных здоровых популяций фармакоскопия может отслеживать изменения биомаркеров, опосредованные лекарственными препаратами, одновременно контролируя побочные эффекты лекарственных препаратов "мимо мишени". Эти важные контроли осуществляются путем отслеживания жизнеспособности здоровых клеток от одного и того же донора, находящихся в одной и той же лунке и в одном и том же поле зрения, с анализом жизнеспособности и биомаркеров популяций клеток-мишеней.

Используя фармакоскопию, анализ индуцированных лекарственными препаратами изменений биомаркеров на субклеточном уровне и на уровне отдельной клетки в образцах крови пациентов может предсказать результаты клинической терапии, выполненные для отдельных пациентов. Стандартизация, совершенствование и доступность этой технологии для фундаментальных исследований, а также для специалистов в области медицины и клиник является преимуществом, среди прочего, для персонализированной медицины, прогностической фармакологии, а также для скрининга лекарственных препаратов и для терапевтической оценки.

Соответственно, в отличие от предшествующего уровня техники "фармакоскопия", предложенная в данном документе, может быть использована в различных применениях, например, в персонализированной медицине, программах скрининга лекарственных препаратов, общем скрининге лекарственных препаратов, персонализированном скрининге лекарственных препаратов, оценке реакции на лекарственные препараты, оценке лечения, верификации эффективности лечения, прогнозировании ответа на лекарственные препараты, ответов популяции (на лекарственные препараты) и т.п. Таким образом, предлагае-

мые в данном документе средства и способы, в частности, "фармакоскопия" на основе методики монослоя PBMC, делают возможным также скрининг лекарственных препаратов и поиск лекарственных препаратов, а также персонализированный (т.е. связанный с субъектом/пациентом/индивидуумом) поиск лекарственных препаратов или скрининг лекарственных препаратов. Например, при общем поиске лекарственных препаратов и/или скрининге лекарственных препаратов, которые предложены в данном документе, в частности, при "фармакоскопии", можно использовать и сравнивать PBMC здоровых людей и больных пациентов. Кроме того, объединенные образцы PBMC можно использовать в качестве исходного материала для монослоев согласно изобретению в средствах и способах, предложенных в данном документе. При персонализированном поиске лекарственных препаратов предпочтительно, чтобы использовались индивидуальные образцы PBMC субъектов/индивидуумов/пациентов в качестве исходного материала для монослоев PBMC согласно изобретению, которые должны использоваться в соответствии с изобретением. Тем не менее, объединенные образцы PBMC также могут быть полезны и ценны в этом контексте.

Современные стандарты поиска лекарственных препаратов для лечения лейкемии и лимфомы включают использование линий раковых клеток, которые далеки от физиологически релевантных, поскольку в таких модельных системах нет ключевых сигнальных путей между подгруппами лейкоцитарной популяции. Использование клеточных линий связано с трудностями масштабирования и оптимизации систем скрининга, использующих PBMC, особенно при визуализации для высокоточного сбора данных. Напротив, способы, предложенные в данном документе, позволяют в различных воплощениях проводить крупномасштабный скрининг увеличенного числа пертурбаций. Например, используя способы согласно данному изобретению, можно эффективно и быстро исследовать большое число пертурбаций с помощью большого числа монослоев PBMC, которые могут быть получены из одного образца, полученного от пациента. Как правило, на множестве монослоев PBMC, полученных из такого единственного образца, можно исследовать эффект по меньшей мере 1000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 8000, по меньшей мере 12000, по меньшей мере 16000, по меньшей мере 20000, по меньшей мере 24000, по меньшей мере 50000, по меньшей мере 75000 или до 90000 соединений или более. В некоторых воплощениях монослои, предложенные в данном документе, могут быть визуализированы и проанализированы одновременно с использованием множества каналов высокоточных данных. Число доступных каналов данных зависит только от конкретного программного обеспечения для визуализации и доступных методик окрашивания, область которых быстро развивается. Существующие в настоящее время методики позволяют одновременно визуализировать, обрабатывать и анализировать по меньшей мере два канала, а более типично 4, 5 или 8 каналов высокоточных данных.

Раскрытые способы преодолевают догму, что PBMC и/или клетки костного мозга (или другие неадгезивные клетки) не могут быть использованы в таких способах. Данное изобретение в некоторых аспектах предлагает способы и устройства, позволяющие формировать окрашиваемые и визуализируемые монослои PBMC или клеток костного мозга. В этой связи авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что инкубация определенной плотности PBMC или клеток костного мозга (т.е. числа клеток на область роста) приводит к формированию окрашиваемого и визуализируемого монослоя PBMC или клеток костного мозга, соответственно.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) представляют собой клетки крови, имеющие круглое ядро (в отличие от лопастного ядра). PBMC включают лимфоциты (В-клетки, Т-клетки (CD4- или CD8-положительные) и NK-клетки), моноциты (предшественники дендритных клеток и макрофагов), макрофаги и дендритные клетки. Эти клетки крови являются критическим компонентом иммунной системы для борьбы с инфекцией и адаптации к возбудителям. В контексте некоторых воплощений данного изобретения предпочтительно использовать PBMC, очищенные в градиенте плотности фикола, предпочтительно человеческие PBMC, для создания монослоя PBMC согласно данному изобретению или в устройстве для культивирования клеток, содержащем монослой PBMC, или для использования в способах, предложенных в некоторых аспектах согласно данному изобретению.

Клетки PBMC для использования в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут быть выделены из цельной крови с помощью любого подходящего способа, известного в данной области или описанного в данном документе. Например, может быть использован протокол, описанный в Panda et al. (Panda, S. and Ravindran, B. (2013). Isolation of Human PBMCs. Bio-protocol 3(3): e323). Предпочтительно для выделения используют центрифугирование в градиенте плотности. Такое центрифугирование в градиенте плотности разделяет цельную кровь на компоненты, разделенные слоями, например, на верхний слой плазмы, за которым следует слой PBMC и нижняя фракция полиморфно-ядерных клеток (таких как нейтрофилы и эозинофилы) и эритроцитов. Полиморфно-ядерные клетки могут быть далее выделены путем лизиса эритроцитов, т.е. безъядерных клеток. Стандартные градиенты плотности, применимые для такого центрифугирования, включают, но не ограничиваясь ими, фиколл (гидрофильный полисахарид, например Ficoll®-Paque (GE Healthcare, Упсала, Швеция) и SepMate™ (StemCell Technologies, Inc., Кельн, Германия).

Клетки костного мозга для использования в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут быть выделены из костного мозга с использованием любого подходящего способа, из-

вестного в данной области. В частности, для отделения клеток костного мозга от других компонентов таких образцов могут быть использованы магнитные шарики. Например, могут быть использованы реагенты для выделения клеток MACS (Miltenyi Biotec, Бергш-Гладбах, Германия).

Как известно в данной области, такие выделенные культуры могут содержать небольшой процент одной или более чем одной популяции другого типа клеток, например, безъядерных клеток, таких как эритроциты. РВМС могут быть дополнительно выделены и/или очищены от таких других популяций клеток, как известно в данной области и/или описано в данном документе; например, для отделения таких клеток от выделенных РВМС обычно используют способы лизиса эритроцитов. Тем не менее, способы согласно данному изобретению не зависят от дополнительных способов очистки, и выделенные согласно данному документу РВМС могут быть использованы напрямую. Соответственно, раскрытые в данном документе способы могут включать или не включать лизис эритроцитов в образце выделенных РВМС. Тем не менее, считается, что безъядерные клетки, например эритроциты, являющиеся, как правило, более мелкими, чем РВМС, осаждаются на поверхности культуры под и между РВМС и потенциально препятствуют формированию монослоя, подходящего для визуализации. Поэтому предпочтительно, чтобы концентрация безъядерных клеток, например эритроцитов, относительно РВМС составляла примерно 500:1, более предпочтительно примерно 250:1, наиболее предпочтительно примерно 100:1, при этом предпочтительная концентрация является настолько низкой, насколько это возможно. Таким образом, наиболее предпочтительно, чтобы выделенный образец РВМС в соответствии со способами, описанными в данном документе, содержал менее примерно 100 безъядерных клеток, например эритроцитов, на каждую РВМС.

В некоторых воплощениях способов данного изобретения РВМС инкубируют до выделения при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Соответственно, в некоторых воплощениях РВМС согласно данному изобретению инкубируют с помощью способов согласно данному изобретению так, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от 90 до 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от 27000 до 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от 450 до 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от 18000 до 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от 9000 до 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от 4500 до 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от 2700 до 3300, клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от 1800 до 2200, клеток на 1 мм^2 площади роста.

Число РВМС можно определить с использованием стандартных способов, известных в данной области. В частности, число РВМС можно определить путем подсчета клеток с использованием гемоцитометра или способом, описанным в Chan et al. (Chan et al., (2013) J. Immunol. Methods 388 (1-2), 25-32). Число клеток костного мозга также можно определить с использованием способов, хорошо известных в данной области. В частности, клетки костного мозга можно оценить с использованием подсчета клеток.

Инкубацию проводят в культуральной среде. Специалист в данной области хорошо осведомлен о подходящих способах сохранения жизнеспособности РВМС или клеток костного мозга. Тем не менее, культуральная среда, которая должна использоваться в способах согласно данному изобретению, не ограничена конкретным образом. В данном контексте среда означает жидкость с нутриентами и веществами, необходимыми для культивирования клеток. Жидкие культуральные среды для культивирования эукариотических клеток известны специалистам в данной области (например, DMEM, RPMI 1640 и т.д.). Подходящие среды могут быть выбраны в зависимости от типа клеток, которые необходимо культивировать. Например, РВМС или клетки костного мозга можно культивировать в RPMI 1640 с 10% FCS. Можно выбрать любые подходящие среды, тем не менее, следует выбирать компоненты среды, о которых известно, что они не оказывают искусственного влияния на реакцию РВМС и/или реакцию клеток костного мозга. Дополнения описывают вещества, которые нужно добавить в культуральные среды, чтобы индуцировать или модифицировать клеточную функцию (например, цитокины, факторы роста и дифференцировки, митогены, сыворотка). Дополнения известны специалистам в данной области. Одним из примеров сыворотки, обычно используемой для эукариотических клеток, является эмбриональная телячья сыворотка. Культуральные среды дополнительно могут быть дополнены антибиотиками, такими как пенициллин, стрептомицин, ципрофлоксацин и т.д. В одном воплощении тестируемые вещества и/или стимулирующие агенты могут быть добавлены к материалу живых клеток в каждом отдельном блоке по

отдельности. Испытуемыми веществами могут быть фармацевтические или лекарственные компоненты. Стимуляторы могут включать любое из веществ, которые поддерживают сохранение, рост или дифференцировку клеток. В конкретном воплощении стимуляторами являются вещества, которые воздействуют на иммунные клетки, например, путем активации иммунных клеток. Стимуляторы для активации иммунных клеток известны в данной области. Такими агентами могут быть полипептиды, пептиды или антитела и другие стимуляторы. Например, ОКТ-3, интерферон-альфа, интерферон-бета и интерферон-гамма, олиго-CPG, митогены (например, PWM, РНА, LPS) и т.д. Тестируемые вещества и стимуляторы могут быть введены в среду для культивирования клеток. Предпочтительно, РВМС культивируют в среде RPMI, дополненной FBS/FCS (сыворотка эмбриона телёнка) в концентрации 10% (предпочтительно, но не обязательно, имеющей низкие уровни эндотоксина, чтобы свести к минимуму активацию). Кроме того, культуры РВМС могут содержать человеческую сыворотку от донора РВМС.

Термин "зона роста" в значении согласно данному изобретению относится к поверхности в устройстве для культивирования, на которой располагаются клетки.

Термин "плотность" в значении согласно данному изобретению представляет собой число клеток на единицу площади поверхности внутри устройства, на которой располагаются клетки. Устройство для культивирования может быть изготовлено из любого материала, совместимого с клеточной культурой, в частности, из материала, проверенного на отсутствие цитотоксичности для клеточной культуры. Примерами такого материала являются пластиковые материалы, например, термопластичные или duroпластичные материалы. Примерами подходящих пластиков являются полиэтилен, полипропилен, полисульфон, поликарбонат, полиэфирэтилкетон (PEEK) или политетрафторэтилен (PTFE). В частности, данное устройство пригодно для культивирования и/или поддержания РВМС. Типичные устройства для культивирования, известные в данной области и используемые в данном изобретении, включают культуральные колбы, чашки, планшеты и многоруночные планшеты. В частности, используются многоруночные планшеты, которые обеспечивают возможность отдельно поддерживать множество культур, например, для множества пертурбаций, с минимальными требованиями материала, например, с минимальными требованиями среды. Предпочтительные культуральные устройства включают 96-луночные планшеты, 384-луночные планшеты и 1536-луночные планшеты. Как известно в данной области в связи с анализом культур путем визуализации, в частности, путем флуоресцентной визуализации, особенно предпочтительно использовать планшеты с черными стенками, специально предназначенные для визуализации, которые уменьшают фоновую флуоресценцию/фоновые оптические помехи с минимальным рассеянием света и уменьшенными перекрестными помехами. Устройство для культивирования может быть стерилизовано.

Данное устройство, в частности, используется в автоматизированных системах визуализации и анализа. Таким образом, предпочтительно, чтобы устройство/устройство для культивирования было пригодным для использования в таких системах. В неограничивающем примере устройство для культивирования может быть полупрозрачным. Культуральные чашки и планшеты для визуализации, например для флуоресцентной визуализации, хорошо известны в данной области и являются коммерчески доступными. Неограничивающим примером коммерчески доступного культурального планшета для осуществления данного изобретения является 384-луночный планшет Corning® с черной крышечкой и прозрачным дном, обработанный TC (tissue-culture) (Corning Inc., Массачусетс, США) или 384-луночный черный полистироловый микропланшет Corning® с плоским прозрачным дном, обработанный TC (продукт № 3712).

Соответственно, данное изобретение предлагает устройство, определенное в приведенном выше параграфе или в любом другом разделе этого описания, содержащее монослой РВМС или монослой клеток костного мозга. В частности, данное устройство может быть использовано для описанных в данном документе диагностических способов. Соответственно, предусмотрено использование устройства, предложенного в данном документе, в способах согласно данному изобретению. Устройство согласно данному изобретению или устройство, используемое в способах согласно данному изобретению, может содержать лунки с плоским дном. Кроме того, данное устройство может содержать лунки с покрытием, например лунки, покрытые полилизинном.

Помимо области роста в устройстве, например, в устройстве для культивирования, культуральной чашке или лунке, выбор устройства конкретно не ограничен. Тем не менее, данное устройство предпочтительно представляет собой устройство для культивирования, которое, как известно в данной области, подходит для культивирования РВМС или клеток костного мозга. Поскольку в некоторых аспектах описанное в данном документе изобретение заключается в получении монослоя РВМС, данное устройство должно допускать развитие и поддержание такого монослоя. Устройство, используемое для культивирования клеток костного мозга, должно допускать развитие и поддержание клеток костного мозга и, в частности, допускать формирование монослоя клеток костного мозга согласно данному изобретению. Соответственно, устройства для культивирования с круглым дном или устройства для культивирования с v-образным дном, которые допускают и/или способствуют развитию многослойных клеточных культур, клеточных скоплений и/или клеточных агрегатов, не являются предпочтительными. Наиболее предпоч-

тельными являются устройства для культивирования с плоским дном, например, лунки с плоским дном в многолуночной планшете, которые допускают и способствуют формированию монослоя. Устройство для культивирования также должно быть пригодным для культивирования РВМС при одновременном сохранении монослоя. Это означает, что среды в устройстве для культивирования можно удалять и/или заменять без разрушения или с минимальным разрушением клеточного монослоя. Таким образом, предпочтительно использовать устройства для культивирования, которые допускают слой среды или раствора высотой 3-15 мм над поверхностью монослоя. Поддерживая такой минимальный слой среды над клетками, среду можно удалить или заменить без разрушения монослоя. Чтобы свести к минимуму разрушение монослоя, следует избегать ненужных возмущений, например вихрей, в среде. Как объяснялось выше, таких возмущений можно избежать, поддерживая минимальное расстояние между монослоем и поверхностью среды, чтобы вихри и/или возмущения, возникающие на поверхности при удалении/замене среды, не проникали в самые нижние слои среды у поверхности монослоя. Роботизированные или другие автоматизированные аспираторы для удаления и замены среды, например системы пипетирования, также могут использоваться в осуществлении изобретения, например, для минимизации возмущений среды. Прямоугольные устройства для культивирования, например прямоугольные лунки, также являются предпочтительными для сведения к минимуму таких разрушающих эффектов, например, вихрей. Устройство для культивирования содержит множество блоков культивирования, каждый из которых содержит камеру для культивирования. В отношении организации блоков культивирования нет конкретных ограничений, и камера для культивирования может быть в миниатюрном формате при условии, что сохраняются требования к уменьшению нарушений среды, как объяснялось в данном документе. Например, как известно в данной области, при небольших объемах, используемых в многолуночных планшетах, например в 384-луночных планшетах, возмущения жидкости могут возникать из-за изменений сил поверхностного натяжения, например, изменений в мениске. Эти изменения могут быть результатом, например, изменений на среднем уровне вследствие испарения, которые могут быть вызваны непредвиденными причинами. Таким образом, следует избегать или сводить к минимуму испарение из устройства для культивирования клеток. Следовательно, камера для культивирования может быть обратимо закрыта сверху крышкой. Крышка может представлять собой крышку, которая покрывает несколько камер для культивирования. Альтернативно, отдельные камеры для культивирования могут закрываться индивидуально, например, покровными стеклами или полимерной пленкой.

Камера для культивирования может быть полупрозрачной для обеспечения микроскопического контроля клеток, присутствующих в камере для культивирования. Камера для культивирования может иметь рифленую или плоскую нижнюю сторону. Последний вариант особенно подходит для обеспечения микроскопического контроля клеток, присутствующих в камере для культивирования, и поэтому является предпочтительным. Как известно в данной области в связи с анализом культур путем визуализации, в частности, путем флуоресцентной визуализации, также особенно предпочтительно использовать планшеты с черными стенками, специально предназначенные для визуализации, которые уменьшают фоновую флуоресценцию/фоновые оптические помехи с минимальным рассеянием света и уменьшенными перекрестными помехами.

Устройство для культивирования (например, включая, но не ограничиваясь ими, камеру для культивирования, колбу, чашку, планшет, многолуночный планшет) можно покрывать или не покрывать и/или обрабатывать таким образом, чтобы способствовать адгезии клеток. Как известно в данной области, устройства для культивирования клеток и/или тканей можно обрабатывать таким образом, чтобы одна или более чем одна из поверхностей устройства усиливала клеточную адгезию; аналогично, как известно в данной области, устройство для культивирования альтернативно или дополнительно может быть покрыто молекулами или соединениями, которые способствуют адгезии клеток на одной или более чем одной из поверхностей устройства. Тем не менее, способы согласно данному изобретению не зависят от покрытия или обработки устройства для культивирования. Таким образом, данное изобретение охватывает использование устройств для клеточного культивирования, которые не обработаны или не имеют покрытия для усиления клеточной адгезии. Данное изобретение также относится к устройству для культивирования клеток, содержащему монослой РВМС, которое не обработано или не имеет такого покрытия, которое способствует клеточной адгезии. В некоторых воплощениях монослой РВМС может быть культивирован на устройстве, которое не обработано или не имеет такого покрытия, которое способствует клеточной адгезии (используемый в данном документе и на протяжении этого описания термин "культивирован" применительно к монослою РВМС не подразумевает какого-либо необходимого минимального времени; РВМС, выделенные из образца, помещенные в устройство для культивирования клеток и визуализированные, считаются культивированными на или в устройстве независимо от того, сколько времени они находились на или в данном устройстве).

Тем не менее, данное изобретение не исключает использование устройств для культивирования, которые были обработаны и/или имеют такое покрытие, которое способствует адгезии клеток на одной или более чем одной поверхности. В этом отношении данное изобретение также охватывает использование устройств для клеточного культивирования, которые были обработаны или имеют такое покрытие, которое способствует адгезии клеток. Данное изобретение также охватывает устройство для культивирования

клеток, содержащее монослой PBMC, которое было обработано или имеет такое покрытие, которое способствует адгезии клеток. Кроме того, данное изобретение может относиться к монослою PBMC, культивированному на устройстве, которое было обработано или имеет такое покрытие, которое способствует клеточной адгезии. Агенты для обработки или покрывающие агенты, которые способствуют адгезии клеток, хорошо известны в данной области. Неограничивающие примеры известных адгезионных агентов включают, но не ограничиваясь ими, полилизин, фибронектин или желатин. Кроме того, устройство для культивирования (например, включая, но не ограничиваясь ими, культуральную камеру, колбу, чашку, планшет, многолуночный планшет) может быть подходящим для использования в способе ИФА (ELISA) типа "сэндвич", где PBMC прилипают к поверхности камеры для культивирования за счет адгезионных молекул, прикрепленных к поверхности камеры для культивирования.

Предпочтительно использовать планшеты для культивирования. Планшеты для культивирования, предпочтительно используемые в способах согласно данному изобретению, имеют площадь дна для роста ("площадь роста") примерно $0,32 \text{ см}^2$ или менее. Типичные планшеты для культивирования, таким образом, представляя собой планшеты, имеющие 96 лунок или более.

Особенно предпочтительно использовать луночные планшеты с площадью роста от примерно $5,6 \text{ мм}^2$ до примерно 10 мм^2 на лунку. Таким образом, любые многолуночные планшеты, предлагающие поверхность роста в этом диапазоне, также охватываются способами согласно данному изобретению. Как описано далее, число PBMC на одну площадь роста предпочтительно находится в пределах от примерно 100 до примерно 30000 PBMC на 1 мм^2 площади роста, предпочтительно PBMC инкубируют при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Соответственно, PBMC согласно данному изобретению инкубируют так, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от 90 до 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от 27000 до 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от 450 до 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от 18000 до 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от 9000 до 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от 4500 до 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от 2700 до 3300, клеток на 1 мм^2 . Наиболее предпочтительно, PBMC инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от 1800 до 2200, клеток на 1 мм^2 площади роста.

Таким образом, например, в ячейке с площадью роста 10 мм^2 , т.е. в типичном 384-луночном планшете, число PBMC на лунку предпочтительно находится в диапазоне от примерно 1000 до примерно 300000 PBMC, более предпочтительно от примерно 5000 до примерно 200000 PBMC, более предпочтительно от примерно 10000 до примерно 100000 PBMC, еще более предпочтительно от примерно 10000 до примерно 50000 PBMC, и наиболее предпочтительно примерно 20000 PBMC на лунку. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Соответственно, число PBMC на лунку предпочтительно находится в диапазоне от 1000, т.е. от 900 до 1100, до 300000, т.е. от 270000 до 330000, более предпочтительно в диапазоне от 5000, т.е. от 4500 до 5500, до 200000, т.е. от 180000 до 220000, более предпочтительно в диапазоне от 10000, т.е. от 9000 до 11000, до 100000, т.е. от 90000 до 110000, наиболее предпочтительно в количестве 20000, т.е. от 18000 до 22000, PBMC.

Концентрация PBMC в растворе перед инокуляцией или посевом в лунки не является критичной до тех пор, пока концентрация позволяет ввести в лунку правильное число клеток (т.е. при плотности поверхностного роста, описанной в данном документе), сохраняя при этом минимальное наслоение жидкости/среды, как описано в данном документе (т.е. наслоение 3-15 мм выше поверхности монослоя). Подходящие концентрации растворов PBMC для инокуляции включают, но не ограничиваясь ими, растворы, содержащие от примерно 20 до примерно 6000 PBMC на 1 мкл среды для роста. Предпочтительно, чтобы концентрация PBMC составляла примерно 3000 PBMC на 1 мкл среды для роста, более предпочтительно 1500 PBMC на 1 мкл, более предпочтительно 1000 PBMC на 1 мкл. Наиболее предпочтительной является концентрация примерно 400 PBMC на 1 мкл среды для роста.

"Инкубация" PBMC в значении согласно данному изобретению осуществляется способами, хорошо известными в данной области. Например, может быть использован способ, описанный в Panda et al. (Panda, S. and Ravindran, B. (2013). *In vitro Culture of Human PBMCs*. Bio-protocol 3(3): e322). Условия культивирования определяются культуральными средами, добавками, матрицами, технически поддерживаемой микросредой и газоснабжением. Отдельные культуральные блоки могут обеспечивать сравнение условий. Условия культивирования могут быть выбраны в соответствии с типом клеток. Например, клетки

можно инкубировать при 37°C, 5% CO₂ и 20% кислорода. Культивируемые клетки могут быть обеспечены газом через газопроницаемую мембрану, которая закрывает по меньшей мере одну сторону камеры для культивирования.

Предпочтительно РВМС инкубируют при 37°C в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂. В качестве культуральной среды предпочтительно использовать RPMI. Продолжительность стадии инкубации в способах согласно данному изобретению конкретно не ограничена. Тем не менее, как известно в данной области, выделенные РВМС представляют собой хрупкую клеточную популяцию, которую трудно поддерживать в течение длительного времени; время культивирования более 36 часов, вероятно, приведет к началу клеточной гибели. Соответственно, если нужно использовать периоды инкубации более 36 ч, необходимо следить за состоянием культуры, чтобы гарантировать жизнеспособность монослоев. Как правило, культуры культивируют в течение периода от 1 до 24 ч (например, в течение ночи), что гарантирует жизнеспособность монослоев РВМС. Тем не менее, формирование визуализируемого монослоя РВМС, который может быть или не быть окрашен в соответствии со способами, известными в данной области и/или описанными в данном документе (включая как адгезивные, так и неадгезивные субпопуляции РВМС), обычно достигается после короткой инкубации, например, менее 1 ч. Когда монослой РВМС используются в способах согласно данному изобретению, включающих оценку ответа на терапевтический агент, могут потребоваться более длительные периоды инкубации, чтобы позволить агенту проявить свою активность, и/или для достижения наблюдаемого эффекта (тем не менее, клетки должны оставаться жизнеспособными во время этой инкубации, и, как объяснено в данном документе, эти более длительные инкубационные периоды обычно составляют максимум 24 ч). Кроме того, монослой РВМС включает как здоровые, так и больные клетки, которые впоследствии могут быть использованы для дальнейшего анализа.

Для того чтобы повысить стабильность монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга после культивирования для дальнейшего анализа, осуществление изобретения на практике может включать стадию фиксации РВМС или клеток костного мозга, когда монослой окрашивается и/или затем визуализируется. Фиксация может быть осуществлена с помощью средств и способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, монослой РВМС может быть зафиксирован в нижней области устройства для культивирования с помощью формальдегида или других известных фиксаторов. Фиксация обычно проводится непосредственно перед добавлением средств для визуализации клеток, клеточных компонентов и/или клеточных белков. Если нужно, для пермеабилзации клеток может быть добавлен детергент. Примером детергента для пермеабилзации является Triton-X114. Поскольку изобретение частично основано на монослое РВМС, фиксация и/или пермеабилзация должны быть реализованы таким образом, чтобы не разрушать монослой. В этом отношении способы, описанные для удаления и/или замены среды, также могут быть реализованы для использования фиксаторов и/или пермеабилзаторов. Как считают специалисты, после фиксации монослой будет более прочным, т.е. устойчивым к разрушению, например, в результате действия жидкостных сил. Соответственно, данное изобретение предлагает способ культивирования РВМС или клеток костного мозга, включающий (а) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; (b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм² до примерно 30000 клеток на 1 мм²; и (с) фиксацию указанных РВМС или клеток костного мозга.

Способы согласно данному изобретению также могут включать стадию добавления красителя перед фиксацией, например, витального красителя. Это можно сделать для того, чтобы убедиться, что клетки в монослое РВМС или монослое костного мозга жизнеспособны. Добавление красителя, например витального красителя, можно провести, например, путем частичного удаления супернатанта и добавления красителя, например витального красителя, известного как подходящий для визуализации жизнеспособности РВМС или клеток костного мозга. В частности, может быть добавлен витальный краситель, с помощью которого можно различить живые и мертвые РВМС или клетки костного мозга, чтобы определить жизнеспособность клеток до фиксации и/или пермеабилзации, необходимой для возможного внутриклеточного окрашивания антителами, или до удаления биологически опасных материалов с помощью фиксации формальдегидом. Витальное окрашивание основано на динамическом встраивании красителя в качестве агента для мечения в клеточную мембрану или в клеточные органеллы, либо на превращении предшественника красителя под действием клеточных ферментов, либо путем обнаружения промежуточных продуктов дыхательной цепи, либо путем интеркаляции в ДНК или РНК. Специалисту в данной области хорошо известно, что также можно использовать красители, подходящие для визуализации фиксированных РВМС или клеток костного мозга. Подходящие красители и протоколы их применения известны квалифицированным специалистам и задокументированы, например, в the Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. В качестве неограничивающего примера витальный краситель может быть добавлен в смесь 1:1000, растворенный в изотоническом растворе, например, в PBS. В связи с этим, в частности, может быть использован краситель live/dead fixable 488 от Invitrogen. Соответственно, данное изобретение предлагает способ культивирования РВМС или клеток костного мозга, включающий (а) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; (b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100

клеток на 1 мм² до примерно 30000 клеток на 1 мм²; и (с) добавление витального красителя к указанным РВМС или клеткам костного мозга.

Монослои согласно данному изобретению могут быть визуализированы в соответствии с любыми способами, известными в данной области и/или описанными в данном документе. Конкретный способ визуализации не является критическим и может быть решен в соответствии со знаниями специалиста в данной области. Для визуализации может потребоваться или может не потребоваться использование красителя или краски, визуализация может включать визуализацию как окрашенных, так и неокрашенных компонентов, и/или может включать визуализацию в таких условиях, когда краска видна или не видна (например, визуализация в ярком поле (в котором флуоресцентный краситель не был бы виден) и при ультрафиолетовом освещении (в котором флуоресцентный краситель был бы виден) или при их комбинациях. Визуализация в условиях яркого поля хорошо известна и обычно используется в данной области и может быть выполнена согласно стандартным способам и/или согласно описанию в данном документе. Дополнительно или альтернативно, в соответствии с данным изобретением может быть использована любая другая визуализация без использования меток. Такие способы без использования меток известны и включают, например, визуализацию PhaseFocus (Phase Focus Ltd, Шеффилд, Великобритания).

Осуществление данного изобретения на практике также может включать добавление к монослоям РВМС обнаруживаемой метки (либо в сочетании со способами без использования меток, либо независимо), которая может быть обнаружена с использованием микроскопических способов. Обнаруживаемые метки могут метить отдельные клеточные структуры, компоненты или белки, известные в данной области. Метка также может быть присоединена к антителам для специфического мечения и позволяет обнаруживать антиген данного антитела. В предпочтительном воплощении обнаруживаемая метка позволяет визуализировать метку в видимом или ультрафиолетовом свете. Таким образом, обнаруживаемая метка может быть флуоресцентной. Множество визуальных меток известно в данной области и пригодно для данного изобретения. Метки могут обнаруживаться без дополнительных действий, либо они могут обнаруживаться только после выполнения вторичной стадии, например, добавления субстрата, воздействия ферментативных реакций или воздействия определенных длин волн.

Субпопуляции РВМС (клетки-мишени) или субпопуляции клеток костного мозга могут быть выявлены за счет обнаруживаемых меток через экспрессию одного или более чем одного маркера на поверхности клетки-мишени или внутри клетки. Альтернативно или дополнительно, субпопуляции клеток РВМС могут быть определены отсутствием экспрессии одного или более чем одного маркера на поверхности клетки-мишени или внутри клетки-мишени. Может оказаться желательным проверить экспрессию или отсутствие экспрессии одного или более чем одного из маркеров (например, двух маркеров, трех маркеров, четырех маркеров и т.д.), чтобы обеспечить дополнительную уверенность в том, что клетка, экспрессирующая или не экспрессирующая маркер, действительно является клеткой-мишенью, например, членом нужного подкласса клеток РВМС. Например, антитела к различным маркерам в "коктейле" антител могут быть связаны (прямо или косвенно) с одной и той же меткой или с разными метками. В качестве примера, все антитела к различным маркерам в коктейле могут содержать мотив связывания, который связывает одну и ту же метку (например, каждое антитело может содержать Fc одного и того же вида, который распознается одним и тем же вторичным антителом, либо каждое антитело может быть биотинилировано и может специфически связываться с одной и той же меткой, связанной с авидином). Возможно, можно использовать два или более двух различных антител или коктейли антител. Предпочтительно, клетки окрашивают с помощью по меньшей мере двух меток, которые можно отличить друг от друга, что позволяет идентифицировать клетки, которые экспрессируют по меньшей мере два различных маркера целевого типа клеток. Клетки также могут быть окрашены с использованием по меньшей мере трех, четырех, пяти или более различных меток, которые можно отличать друг от друга, что позволяет выявлять клетки, которые экспрессируют большее число маркеров целевого типа клеток. Возможно, клетка может быть идентифицирована как клетка целевого типа, если она экспрессирует предварительно выбранное число маркеров или некоторые предварительно выбранные комбинации маркеров, либо клетка может быть идентифицирована как клетка целевого типа, если она не экспрессирует предварительно выбранный маркер. Дополнительно, маркер (маркеры) целевого типа клеток не обязательно должен быть уникальным для клеток-мишеней до тех пор, пока он позволяет отличать клетки-мишени от других клеток в популяции. Основные популяции клеток РВМС представлены CD11C для дендритных клеток, CD14 для макрофагов, CD3 (CD4 или CD8 с CD3) для Т-клеток и CD19 для В-клеток. Хотя приведенные выше маркеры перекрываются на подгруппах этих основных классов РВМС, окрашивание этими маркерами для идентификации субпопуляций РВМС широко принято в данной области. Другие маркеры, подходящие для использования в способах согласно данному описанию, можно найти в справочнике по CD-маркерам (Becton, Dickinson and Co., 2010, Калифорния, США). Основными клеточными субпопуляциями, содержащимися в клетках костного мозга, являются нейтрофильные метамиелоциты, нейтрофильные миелоциты, сегментоядерные нейтрофилы, нормобласты и лимфоциты.

В осуществлении данного изобретения на практике предпочтительно использовать антитела, конъюгированные с обнаруживаемыми метками. Такие антитела позволяют нацеливаться на отдельные клеточные структуры, и, таким образом, коктейли таких антител (каждое из которых может иметь отличаю-

щуюся метку) могут использоваться для одновременной визуализации множества мишеней/клеточных структур/клеточных компонентов. Опять же, поскольку данное изобретение основано на монослое РВМС, необходимо соблюдать осторожность во время окрашивания, чтобы избежать разрушения монослоя. Как признают специалисты в данной области, это особенно проблематично при использовании меток на основе антител, поскольку для их использования обычно требуется один или более чем один этап промывания, чтобы удалить несвязанную метку, которая могла бы помешать точной визуализации, т.е. привела бы к неспецифическому окрашиванию и/или "шуму" в анализе. Соответственно, данное изобретение охватывает способы окрашивания монослоев РВМС обнаруживаемой меткой, в частности, меткой на основе антитела, которая минимизирует или исключает требования в промывании после окрашивания. Способы согласно данному изобретению могут включать добавление обнаруживаемой метки (меток) в концентрациях, которые позволяют избежать образования шумового сигнала в отсутствие промывания, что может быть определено способами, хорошо известными в данной области и/или описанными в данном документе. Таким образом, данное изобретение охватывает использование меченых антител в концентрациях выше или ниже рекомендованных производителями антител.

Соответственно, данное изобретение предлагает способ культивирования РВМС или клеток костного мозга, включающий (а) выделение РВМС из клеток крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; (b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 ; (с) фиксацию указанных РВМС или клеток костного мозга, и (d) добавление обнаруживаемой метки к фиксированным РВМС/клеткам костного мозга. Предпочтительно, обнаруживаемая метка, используемая на стадии (d), представляет собой антитело.

Для некоторых иллюстративных типов клеток клетки могут считаться положительными для данного маркера только в том случае, если этот маркер демонстрирует характерную локализацию или паттерн внутри клетки. Например, клетку можно считать "положительной", если цитоскелетный маркер присутствует в цитоскелете, и "отрицательной", если имеет место некоторое диффузное цитоплазматическое окрашивание. В таком случае клетки можно культивировать в подходящих условиях (например, в виде неадгезивных культур) для установления характерной локализации или паттерна внутри клетки. Специалисты в данной области легко определяют подходящие условия культивирования и время для сборки цитоскелета (или других процессов для установления субклеточной организации), которые могут быть необходимы для надежного обнаружения данного маркера. Кроме того, они смогут легко выбрать маркеры, которые уменьшают или устраняют необходимость адгезивной культуры в качестве предварительного условия для надежного окрашивания.

Красители, применимые для мечения белков, известны в данной области. Как правило, краситель представляет собой молекулу, соединение или вещество, которое может обеспечить оптически обнаруживаемый сигнал, такой как колориметрический, люминесцентный, биолюминесцентный, хемилюминесцентный, фосфоресцентный или флуоресцентный сигнал. В предпочтительном воплощении данного изобретения краситель представляет собой флуоресцентный краситель. Неограничивающие примеры красителей, некоторые из которых являются коммерчески доступными, включают красители CF (Biotium, Inc.), красители Alexa Fluor (Invitrogen), красители DyLight (Thermo Fisher), красители Cy (GE Healthscience), IRDyes (Li-Cor Biosciences, Inc.) и красители HiLyte (Anaspec, Inc.). В некоторых воплощениях длина волны возбуждения и/или излучения красителя составляет от 350 до 900 нм, от 400 до 700 нм или от 450 до 650 нм.

Например, окрашивание может включать использование множества обнаруживаемых меток, например, антител, аутоантител или сыворотки пациента. Окрашивание может наблюдаться в видимом свете и в ультрафиолетовом свете. Окрашивание может включать антитело, прямо или косвенно связанное с окрашенным реагентом или ферментом, способным образовывать окрашенный реагент. Когда антитела используются в качестве компонента красителя, маркер может быть прямо или косвенно связан с антителом. Примеры косвенного связывания включают связывание авидина/биотины, связывание через вторичное антитело и их комбинацию. Например, клетки могут окрашиваться первичным антителом, которое связывает специфичный для мишени антиген, и вторичным антителом, которое связывает первичное антитело, либо молекула, связанная с первичным антителом, может быть связана с обнаруживаемым маркером. Использование косвенного связывания может улучшить соотношение сигнала и шума, например, за счет уменьшения фонового связывания и/или усиления сигнала.

Окрашивание также может включать использование первичного или вторичного антитела, прямо или косвенно связанного (как объяснено выше) с флуоресцентной меткой. Флуоресцентная метка может быть выбрана из группы, включающей: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 635, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750 и Alexa Fluor 790, флуоресцентный изотиоцианат (FITC), Texas Red, SYBR Green, DyLight Fluors, зеленый флуоресцентный белок (GFP), TRIT (тетраметилродамин изотиол), NBD (7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол), краситель Texas Red, фталевую кислоту, терефталевую кислоту, изофталевую кислоту, крезиловый быстрый фиолетовый, крезиловый синий фиолетовый, крезиловый блестящий синий, парааминобензойную кислоту, эритрозин, биотин, дигоксигенин, 5-карбоксихи-4',5'-дихлор-2',7'-

диметоксифлуоресцеин, ТЕТ (6-карбокси-2',4,7,7'-тетрахлорфлуоресцеин), HEX (6-карбокси-2',4,4',5',7,7'-гексахлорфлуоресцеин), краситель Joe (6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин), 5-карбокси-2',4',5',7'-тетрахлорфлуоресцеин, 5-карбоксифлуоресцеин, 5-карбоксиродамин, Тамга (тетраметилродамин), 6-карбоксиродамин, Rox (карбокси-X-родамин), R6G (родамин 6G), фталоцианины, азометины, цианины (т.е. Cy3, Cy3.5, Cy5), ксантины, сукцинилфлуоресцеины, N,N-диэтил-4-(5'-азобензотриазолил)-фениламин, аминокридин и квантовые точки.

В других иллюстративных воплощениях данного способа используются антитела, прямо или косвенно связанные с флуоресцентной молекулой, такой как бромид этидия, SYBR Green, флуоресцеин изотиоцианат (FITC), DyLight Fluors, зеленый флуоресцентный белок (GFP), TRIT (тетраметилродамин изотиол), NBD (7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол), краситель Texas Red, фталевая кислота, терефталевая кислота, изофталевая кислота, крезильовый быстрый фиолетовый, крезильовый синий фиолетовый, крезильовый блестящий синий, парааминобензойная кислота, эритрозин, биотин, диоксигенин, 5-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин, ТЕТ (6-карбокси-2',4,7,7'-тетрахлорфлуоресцеин), HEX (6-карбокси-2',4,4',5',7,7'-гексахлорфлуоресцеин), Joe (6-карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин)-5-карбокси-2',4',5',7'-тетрахлорфлуоресцеин, 5-карбоксифлуоресцеин, Тамга (тетраметилродамин), 6-карбоксиродамин, Rox (карбокси-X-родамин), R6G (родамин 6G), фталоцианины, азометины, цианины (т.е. Cy3, Cy3.5, Cy5), ксантины, сукцинилфлуоресцеины, N,N-диэтил-4-(5'-азобензотриазолил)-фениламин и аминокридин. Другие иллюстративные флуоресцентные молекулы включают квантовые точки, которые описаны в патентной литературе [см., например, патенты США №№ 620729, 6322901, 6576291, 6649138 (способы модификации поверхности, в которых агенты, переносящие смешанные гидрофобные/гидрофильные полимеры, связаны с поверхностью квантовых точек) патенты США №№ 6682596, 6815064 (для легированных или смешанных оболочек), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки] и в технической литературе [такой как "Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals," (Qu et al., Nano Lett., 1(6):333-337 (2001))]. Квантовые точки, имеющие различные поверхностные химические составы и флуоресцентные характеристики, коммерчески доступны от Invitrogen Corporation, Eugene, Oreg., Evident Technologies (Трой, Нью-Йорк) и Quantum Dot Corporation (Хейвард, Калифорния), среди прочих. "Квантовая точка" также включает легированные квантовые точки, такие как ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, SeSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, CdHgSeTe, InGaAs, GaAlAs и InGaN. Легированные квантовые точки и способы их получения раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2005/0012182 и в публикации PCT WO 2005/001889.

После мечения монослоя PBMC или монослоя клеток костного мозга согласно данному изобретению способ также может содержать обнаружение сигнала обнаруживаемой метки. В зависимости от типа сигнала, испускаемого обнаруживаемой меткой, способ обнаружения может быть соответствующим образом адаптирован. Предпочтительно использовать способ обнаружения, подходящий для обнаружения меток, испускающих флуоресценцию. Способ обнаружения также может быть автоматизирован в соответствии со стандартными способами, известными в данной области. Например, существуют различные вычислительные способы, которые позволяют специалисту в данной области анализировать и интерпретировать микроскопические изображения PBMC или клеток костного мозга, полученные путем фармакокопии, или устанавливать автоматизированные протоколы для их анализа. Программное обеспечение с открытым исходным кодом CellProfiler (например, версии 2.1.1) можно использовать для первичного анализа изображений, включая коррекцию смещения освещенности в микроскопических изображениях, идентификацию отдельных клеток в микроскопических изображениях и измерение интенсивностей и текстур маркеров, а также размера и формы ядер и клеток. Определение маркер-положительных клеток (таких как CD34⁺ клетки-предшественники или клетки, положительные по витальному красителю) может быть выполнено путем машинного обучения с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом CellProfiler Analyst (например, версии 2.0), и дважды или трижды положительные клетки могут быть определены с помощью стратегии последовательного гейтирования. С помощью CellProfiler Analyst также можно создавать обзоры планшетов для дальнейшего анализа и выбора наилучшего варианта.

Пакет cellHTS в Bioconductor (например, версии 2.14) или Pipeline Pilot (например, версии 9.0; Accelrys) могут быть использованы для анализа данных после первичного анализа изображений, включая нормирование влияния на планшет, нормирование на основе контроля и выбор наилучшего варианта.

В осуществлении изобретения на практике также могут использоваться коммерческие автоматизированные микроскопические системы, например, автоматизированный микроскоп PerkinElmer Operetta (PerkinElmer Technologies GmbH & Co. KG, Валлуф, Германия), которые могут включать соответствующее программное обеспечение для анализа изображений, например, программное обеспечение Harmony от PerkinElmer (например, версии 3.1.1). Такие автоматизированные и/или коммерческие системы могут использоваться для выполнения первичного анализа изображений, выбора положительной клетки и выбора наилучшего варианта из микроскопических изображений согласно способам изобретения.

Кроме того, данное изобретение предлагает монослой PBMC для использования в определении то-

го, страдает ли донор РВМС от заболевания или предрасположен ли он к заболеванию. Неожиданное преимущество описанного монослоя РВМС и способов, его использующих, заключается в том, что в монослое содержатся как здоровые, так и больные РВМС. "Больные РВМС" в значении данного изобретения относятся к РВМС, которые затронуты заболеванием и, таким образом, отличаются от здоровых РВМС. В частности, в некоторых воплощениях больные РВМС будут демонстрировать дифференциальную экспрессию молекул-маркеров, которые позволяют специфически их обнаруживать с использованием способов согласно данному изобретению. Например, больные РВМС могут демонстрировать экспрессию известных раковых маркеров, в частности, маркеров лимфомы или лейкемии, которые позволяют их обнаруживать и отличать их от здоровых РВМС.

Кроме того, данное изобретение предлагает монослой клеток костного мозга для использования их в определении того, страдает ли донор клеток костного мозга от заболевания или предрасположен ли он к заболеванию.

В некоторых воплощениях в дополнение к здоровым и больным РВМС или здоровым и больным клеткам костного мозга в монослоях согласно данному изобретению присутствуют как адгезивные, так и неадгезивные клетки. Таким образом, способы согласно данному изобретению могут обеспечивать уникальные преимущества по сравнению со способами, известными в данной области, позволяя получать общий обзор текущего состояния в отношении наличия или отсутствия субпопуляций РВМС или клеток костного мозга и/или распределения различных субпопуляций в крови донора РВМС или донора костного мозга. Напротив, способы, известные в данной области, основаны на предварительном выделении субпопуляций и, тем самым, пренебрегают информацией, содержащейся в межклеточных взаимодействиях между различными субпопуляциями. Таким образом, монослой РВМС согласно данному изобретению, например, полученный способами согласно данному изобретению, может использоваться в некоторых воплощениях для определения того, страдает ли донор РВМС от заболевания или имеет ли предрасположенность к заболеванию, путем добавления к монослою РВМС обнаруживаемой метки, которая является специфической для типа клеток, указывающего на наличие заболевания, или путем определения измененных соотношений различных субпопуляций клеток РВМС, которые указывают на заболевание или предрасположенность к заболеванию. Соответственно, в некоторых аспектах данное изобретение также предлагает способ диагностики у донора РВМС заболевания или предрасположенности к заболеванию, включающий РВМС, культивируемые в соответствии с любым из способов согласно данному изобретению. Таким образом, монослой РВМС согласно данному изобретению и способы согласно данному изобретению могут также использоваться для следования течению заболевания во время лечения заболевания или в отсутствие лечения.

Таким образом, монослой клеток костного мозга согласно данному изобретению, например, полученный способами согласно данному изобретению, может использоваться в некоторых воплощениях для определения того, страдает ли донор клеток костного мозга от заболевания или имеет ли предрасположенность к заболеванию, путем добавления к монослою клеток костного мозга обнаруживаемой метки, которая является специфической для типа клеток, указывающего на наличие заболевания, или путем определения измененных соотношений различных субпопуляций клеток костного мозга, которые указывают на заболевание или предрасположенность к заболеванию. Соответственно, в некоторых аспектах данное изобретение также предлагает способ диагностики у донора клеток костного мозга заболевания или предрасположенности к заболеванию, включающий клетки костного мозга, культивируемые в соответствии с любым из способов согласно данному изобретению. Таким образом, монослой клеток костного мозга согласно данному изобретению и способы согласно данному изобретению могут также использоваться для следования течению заболевания во время лечения заболевания или в отсутствие лечения.

Данный способ включает выделение РВМС или клеток костного мозга у субъекта, ранее или в настоящее время получающего лечение в связи с иммуно-опосредованным заболеванием, стимуляцию РВМС или клеток костного мозга, идентификацию субпопуляций РВМС или клеток костного мозга, сравнение данных для субпопуляций РВМС или субпопуляций клеток костного мозга с ответом субъекта на терапию и выбор маркерного профиля, связанного с положительным ответом на терапевтическое воздействие, и тем самым контроль курса терапии.

Иммуно-опосредованные заболевания можно разделить на несколько категорий, включая иммунодефицитные заболевания, аутоиммунные заболевания и состояния гиперчувствительности. Иммунодефицитные заболевания возникают, когда часть иммунной системы не функционирует надлежащим образом. Аутоиммунные заболевания являются результатом атаки на иммунную систему самого организма, а не патогенов. Состояния гиперчувствительности возникают тогда, когда иммунная система реагирует и приводит к повреждению организма.

Заболевание, которое нужно диагностировать с использованием монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга согласно данному изобретению или с использованием способов согласно данному изобретению, конкретным образом не ограничено до тех пор, пока оно может быть диагностировано с использованием РВМС или клеток костного мозга, соответственно, т.е. субъект с диагностируемым заболеванием демонстрирует измененный клеточный паттерн РВМС или клеток костного мозга, который может быть связан с заболеванием, например, соотношение субпопуляций РВМС или субпопуляций кле-

ток костного мозга, которые изменены по сравнению с ожидаемым у здорового донора. Например, заболевания, которые могут быть диагностированы с использованием монослоев согласно данному изобретению и/или способов согласно данному изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, гематологические злокачественные опухоли и/или злокачественные опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани. Заболевания, которые, в частности, могут быть диагностированы и/или предсказаны с помощью монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга согласно данному изобретению и с помощью способов согласно данному изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, миелопролиферативные нарушения (или общие виды рака крови), воспалительные нарушения, латентные вирусные инфекции, нарушения клеточного роста, нарушения клеточного хемотаксиса, метаболические нарушения, аутоиммунные нарушения (например, окрашивание собственным лигандом или сывороткой пациента для клональных антител или распознавание собственного антигена). Более того, монослой РВМС и способы согласно данному изобретению можно использовать для диагностики лейкемии (хронической и острой), лимфомы (зрелой В-клеточной, зрелой Т- и НК-клеточной, лимфомы Ходжкина), инфекции ВИЧ, подагры, шока и т.п.

Данное изобретение также предлагает способы определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий или предрасположенный к заболеванию. В соответствии с данным изобретением указанный способ может включать стадии (a) выделения РВМС из образца крови, полученного от указанного субъекта; (b) инкубации указанных РВМС при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 ; (c) контактирования указанных РВМС с указанным терапевтическим агентом; и (d) оценки реакции РВМС на терапевтический агент. Предпочтительно, РВМС инкубируют на стадии (b) при плотности от примерно 500 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000 клеток на 1 мм^2 площади роста, более предпочтительно от примерно 1000 клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000 клеток на 1 мм^2 площади роста. Термин "примерно" будет иметь значение в пределах 10%, более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Соответственно, в некоторых воплощениях РВМС согласно данному изобретению инкубируют в способах согласно данному изобретению таким образом, чтобы они имели в устройстве для культивирования плотность в диапазоне от примерно 100, т.е. от 90 до 110, клеток на 1 мм^2 площади роста, до примерно 30000, т.е. от 27000 до 33000, клеток на 1 мм^2 площади роста. Более предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности от примерно 500, т.е. от 450 до 550, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 20000, т.е. от 18000 до 22000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 10000, т.е. от 9000 до 11000, клеток на 1 мм^2 площади роста, от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 5000, т.е. от 4500 до 5500, клеток на 1 мм^2 площади роста, или от примерно 1000, т.е. от 900 до 1100, клеток на 1 мм^2 площади роста до примерно 3000, т.е. от 2700 до 3300, клеток на 1 мм^2 . Наиболее предпочтительно, РВМС инкубируют при плотности примерно 2000, т.е. от 1800 до 2200, клеток на 1 мм^2 площади роста.

Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предотвращение, ослабление или замедление (ослабление) целевого патологического состояния или нарушения или одного или более чем одного из симптомов, связанных с ним. Аналогично, "отвечающий" или "отвечает" и аналогичные термины относятся к указанию на то, что целевое патологическое состояние или один или более чем один из симптомов, связанных с ним, предотвращается, ослабляется или уменьшается. Данные термины также используются в данном документе для обозначения задержки начала, ингибирования (например, снижения или остановки роста), ослабления влияния или продления жизни пациента, страдающего от заболевания, в частности, миелопролиферативного заболевания, или для указания того, что такие маркеры были выполнены. Субъекты, которые нуждаются в лечении, включают тех, у которых диагностировано нарушение, тех, у которых подозревается наличие нарушения, тех, у кого имеется предрасположенность к нарушению, а также тех, у кого нарушение должно быть предотвращено. Следовательно, млекопитающему, подлежащему лечению согласно данному документу, может быть поставлен диагноз, что оно имеет нарушение или может быть предрасположено или восприимчиво к нарушению.

Термины "ответ" или "отвечающий" относятся к РВМС или субъекту, имеющему по меньшей мере одну измененную характеристику после лечения. Измененной характеристикой субъекта может быть ослабление или замедление целевого патологического состояния или нарушения.

Используемые в данном документе термины "предотвращать", "предотвращающий" и "предотвращение" относятся к предотвращению возникновения и/или повторения или появления одного или более чем одного из симптомов ракового заболевания у субъекта в результате введения профилактического или терапевтического агента.

Средства и способы, представленные в данном документе, описаны для первичных гемопоэтических клеток. Как понятно специалисту в данной области, первичные гемопоэтические клетки включают,

среди прочего, РВМС и клетки костного мозга. Соответственно, средства и способы, представленные в данном документе, которые описаны для РВМС, также раскрыты для клеток костного мозга.

В этой связи данное изобретение в различных воплощениях может предлагать многочисленные преимущества по сравнению с известными способами. В частности, образцы крови предпочтительно обрабатывают вскоре после выделения, что имеет несколько преимуществ: специфичность лекарственного препарата и токсичность, например, в отношении раковых клеток, непосредственно сравнивают с характеристиками здоровых клеток от этого пациента, и можно измерить комплексные аспекты ответов на лекарственные препараты, которые возникают в результате межклеточных взаимодействий, присутствующих в крови человека. Этот анализ *ex vivo* является сильным прогнозирующим показателем клинического ответа пациента, особенно в сложных генетических условиях, улучшая долгосрочные терапевтические преимущества. Например, можно оценить ответ пациентов с миелопролиферативными новообразованиями (MPN) на отдельное и комбинаторное лечение текущими и перспективными противораковыми агентами. Кроме того, одновременное измерение MPN-специфических биомаркеров, таких как экспрессия и локализация pSTAT5, и жизнеспособность предшественников CD34⁺ на периферии можно оценить с помощью способов согласно изобретению. Кроме того, возможно, что будущие пациенты будут иметь реакции на лекарственные препараты, охарактеризованные на нескольких этапах в ходе заболевания. Соответственно, в некоторых аспектах данное изобретение также предлагает монослой РВМС для использования в диагностическом способе для определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий или предрасположенный к заболеванию.

"Терапевтические агенты" в значении согласно данному изобретению представляют собой молекулы, включая, но не ограничиваясь ими, полипептиды, пептиды, гликопротеины, нуклеиновые кислоты, синтетические и природные лекарственные препараты, пептоиды, полиены, макроциклы, гликозиды, терпены, терпеноиды, алифатические и ароматические соединения и их производные. В предпочтительном воплощении терапевтический агент представляет собой химическое соединение, такое как синтетический и природный лекарственный препарат. В другом предпочтительном воплощении терапевтический агент вызывает ослабление и/или лечение заболевания, нарушения, патологии и/или связанных с ними симптомов. Полимеры могут инкапсулировать один или более чем один терапевтический агент.

Подходящие терапевтические агенты включают, но не ограничиваясь ими, те, которые представлены в Goodman and Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (например, 9-е издание) или в The Merck Index (например, 12-е издание). Создание терапевтических агентов включает, но не ограничиваясь ими, лекарственные препараты, которые влияют на воспалительные реакции, лекарственные препараты, которые влияют на состав жидкостей организма, лекарственные препараты, которые влияют на метаболизм электролитов, химиотерапевтические агенты (например, для лечения гиперпролиферативных заболеваний, в частности рака, для лечения паразитарных инфекций и микробных заболеваний), противоопухолевые агенты, иммунодепрессанты, лекарственные препараты, которые влияют на кровь и кроветворные органы, гормоны и антагонисты гормонов, витамины и питательные вещества, вакцины, олигонуклеотиды и генную терапию. Следует понимать, что данное изобретение также охватывает композиции, содержащие комбинации, например, смеси двух или более активных агентов, таких как два лекарственных агента.

В одном воплощении терапевтический агент может представлять собой лекарственный препарат или пролекарство, антитело или вакцину. Способ согласно данному изобретению можно использовать для оценки того, вызывает ли введение пациенту терапевтического агента ответ на терапевтический агент или компонент средства доставки, эксципиента, носителя и т.д., вводимого с терапевтическим агентом.

Точный характер терапевтического агента не ограничивает данное изобретение. В неограничивающих воплощениях способ согласно данному изобретению может быть использован для оценки реакции на синтетические малые молекулы, природные вещества, природные или полученные синтетическим путем биологические агенты или на любую комбинацию двух или более из перечисленных выше агентов, возможно в сочетании с эксципиентами, носителями или средствами доставки.

Термин "диагностика" (наряду с его грамматическими вариантами, такими как "диагностирование" или "диагностический") относится к выявлению молекулярного или патологического состояния, заболевания или нарушения, например, к выявлению рака, либо относится к выявлению пациента с раком, который может получить пользу от конкретного режима лечения.

Термин "прогноз" (и его грамматические варианты, такие как "прогнозирующий" или "прогностический") относится к предсказанию вероятности пользы лечения, такого как терапия рака.

Термины "предсказание" или "предсказывающий" используются в данном документе для обозначения вероятности того, что пациент будет реагировать благоприятно или неблагоприятно на конкретный терапевтический агент. В одном воплощении термины "предсказание" или "предсказывающий" относятся к степени этих реакций. В одном воплощении термины "предсказание" или "предсказывающий" относятся к тому, выживет ли пациент и улучшится ли его состояние после лечения, и/или к вероятности этого, например, после лечения конкретным терапевтическим агентом и в течение определенного периода времени без прогрессирования заболевания.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или в тестировании согласно данному изобретению, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае конфликта контрольным будет данное описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Общие способы и методики, описанные в данном документе, могут быть выполнены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в данной области и описанными в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются в данном документе, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Хотя аспекты данного изобретения проиллюстрированы и подробно описаны в графических материалах и приведенном выше описании, такие иллюстрации и описание следует рассматривать как иллюстративные или примерные, а не ограничительные. Следует понимать, что специалисты в данной области могут проводить изменения и модификации в пределах объема и сущности следующей далее формулы изобретения. В частности, данное изобретение охватывает дополнительные воплощения с любой комбинацией признаков из различных воплощений, описанных выше и ниже.

Данное изобретение также охватывает все дополнительные детали, показанные в графических материалах по отдельности, хотя они могут не быть описаны в предыдущем или последующем описании. Кроме того, отдельные альтернативы воплощений, описанные в графических материалах, и описание и отдельные альтернативы их признаков могут быть исключены из предмета другого аспекта данного изобретения.

Кроме того, в формуле изобретения слово "содержащий" не исключает другие элементы или этапы, а форма существительного в единственном числе не исключает множественное число. Отдельный блок может выполнять функции нескольких признаков, указанных в формуле изобретения. Термины "по существу", "примерно", "приблизительно" и т.п. касательно символа или значения, в частности, определяют такие же точно символы или значения, соответственно. Любые ссылочные обозначения в формуле изобретения не должны толковаться как ограничивающие сферу применения.

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один график, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации патентной заявки с цветным графиком (графиками) будут предоставляться Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

Данное изобретение также проиллюстрировано в некоторых аспектах следующими графическими материалами.

Фиг. 1: пример трехцветного 10× изображения монослоя РВМС в 384-луночном планшете, разделенного на три канала.

Фиг. 2: популяционное отслеживание РВМС от донора, анализируемое путем (А) проточной цитометрии или (В) цитометрии по изображениям.

Фиг. 3: результаты крупномасштабного скрининга жизнеспособности РВМС; соединения, отсортированные по уменьшению числа клеток и "показателю специфичности". Подчеркнутые соединения являются ключевыми кандидатами для лечения рака.

Фиг. 4: гистограммы, показывающие вызванную лекарственным препаратом цитотоксичность, специфическую в отношении клеточной популяции, для двух различных противораковых лекарственных препаратов.

Фиг. 5: тепловая карта наиболее эффективных HDACi и их популяционная специфичность.

Фиг. 6: результаты крупномасштабного персонализированного химиотерапевтического скрининга на РВМС от пациента, страдающего миелопролиферативным нарушением. Соединения отмечены на графике относительно процента жизнеспособных клеток, экспрессирующих два специфических для MPN биомаркера. Выделенные соединения являются ключевыми противораковыми препаратами.

Фиг. 7: кривая титрования нового наиболее эффективного анти-MPN-препарата в клиническом испытании, в данном случае примененного для комбинированной терапии с ингибитором JAK, который в настоящий момент принимает данный пациент. Кривая титрования лекарственного препарата ниже сравнивается непосредственно с кривой диметилсульфоксида (ДМСО) на уровне отдельных клеток, контролем являются здоровые клетки, которые не экспрессируют CD34.

Фиг. 8: иллюстрации и блок-схемы воплощений и конкретных воплощений, таких как иллюстративное окрашивание (анти-CD3/CD19, CD14/CD11, pSTAT5/CD34), и соответствующие результаты иллюстративного персонализированного поиска лекарственных препаратов в схематическом виде.

Фиг. 9: результаты фармакокопии для четырех пациентов. Эти четыре пациента страдают от раннего первичного миелофиброза (primary myelofibrosis, PMF) или первичного миелофиброза и прошли через скрининг 265 уникальных соединений, одобренных FDA. Выделенные соединения для каждого

пациента уменьшают процент жизнеспособных клеток, экспрессирующих отслеживаемые биомаркеры (либо CD34, либо pSTAT5, которые указывают на PMF), относительно контрольного соединения ДМСО. Выделены известные противораковые лекарственные препараты, известные в данной области как подходящие для лечения рака крови.

Фиг. 10: результаты для двух пациентов с ранним PMF или PMF, оба получали ингибитор JAK руксолитиниб во время фармакоскопии. Лучшим препаратом или высокообогащенным лекарственным препаратом является азациитидин, который находится в клинических испытаниях для лечения миелопролиферативных заболеваний в комбинации с руксолитинибом. Кроме того, контролирующей фармакоскопию врач использовал азациитидин для лечения двух пациентов с первичным миелофиброзом (PMF), уже получающих руксолитиниб (торговое название: Jakavi), которые хорошо реагировали на лечение. В заключение, эти данные, представленные на фиг. 10, подтверждают успешное применение аспектов способов согласно данному изобретению на основе методики монослоев PBMC/фармакоскопии. Можно получить ценные данные и информацию, а также можно получить технические и медицинские преимущества. В частности, эти данные подтверждают результаты, полученные параллельно в трудоемких клинических испытаниях и полученные из существующих данных реакций пациентов (контроль). Методика оптического/визуализируемого/окрашиваемого монослоя PBMC, предложенная в данном документе, подтверждает успешное применение прогнозируемого комбинаторного лечения, которое в настоящее время используется в клинических испытаниях. Соответственно, в некоторых воплощениях методика оптического/визуализируемого/окрашиваемого монослоя PBMC согласно данному изобретению может быть высоко прогнозируемой в скринингах лекарственных препаратов и/или в способах персонализированного протокола лечения, как показано в данном документе для лечения PMF с помощью азациитидина и руксолитиниба.

Фиг. 11: общий рабочий процесс для способов, предложенных в данном документе ("фармакоскопия"). Приведенный в данном документе способ является таким, что свежую кровь или костный мозг отбирают у индивидуума, а моноклеарные клетки из образца очищают в градиенте, либо замороженные образцы собирают с предыдущей очистки. Клетки разводят до нужной плотности в среде для культивирования клеток и высевают в 384-луночные планшеты, содержащие лекарственные препараты. Клетки инкубируют при 37°C с 5% CO₂ в течение указанного времени. Затем при необходимости добавляют витальный краситель, а затем клетки фиксируют и пермеабилзируют. Затем добавляют антитела, конъюгированные с флуоресцентными маркерами, вместе с DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) для обнаружения ядер. Планшеты визуализируют на автоматическом микроскопе.

Фиг. 12: данные пациента. (A) Жизнеспособность клеток CD34⁺ или pSTAT5⁺ от пациента с первичным миелофиброзом после инкубации с 265 различными соединениями, одобренными FDA. Серые пунктирные линии представляют средние значения популяции; выделенные соединения обладают известными противораковыми свойствами. (B) Жизнеспособность всех клеток CD34⁺ после обработки (C) азациитидином или (D) ДМСО; нижний правый угол графиков представляет жизнеспособные гемопоэтические клетки-предшественники, оставшиеся после лечения. (C) Общие жизнеспособные PBMC только после обработки каждым препаратом, подвергшимся скринингу в (B), показывающие, что без использования фармакоскопии наилучший результат не является таким же независимо от анализа отдельной клетки. (D) пациент из (A), получающий комбинированное лечение, определенное путем фармакоскопии (слева), или исходное стандартное лечение (справа).

Фиг. 13: вычислительный метод. (Слева) Иллюстративное изображение с типами соседних клеток в кругах. (Посередине) Создание показателя взаимодействия для оценки межклеточных контактов и клеточных соседей. (Справа) Пример использования показателя взаимодействия после активации PBMC с помощью VSV либо отдельно, либо с блокирующим антителом против MHC-II. MHC-II блокирует связь между CD11C- и CD3-положительными клетками.

Фиг. 14: изображения монослоев клеток костного мозга. Ядерное окрашивание и статус жизнеспособности костного мозга человека при 10× (фиг. 14A) и 20× увеличении (фиг. 14B). Прямоугольник на изображениях показывает примеры живых клеток в монослое, полученном с помощью этого способа.

Фиг. 15: изображения образцов клеток, полученные с использованием способов предшествующего уровня техники. Фиг. A (слева) представляет монослой, когда к монослою добавляются дополнительные центрифугические силы: утрата природных межклеточных взаимодействий, поскольку адгезия и взаимоотношения с другими клетками усиливаются. Справа приведен способ, представленный в данном документе, в котором клетки находятся только под действием природной силы тяжести, распределенной равномерно. Фиг. B представляет описанный в данном документе способ (SLP) в сравнении со способом, описанным в Douglas et al., где в каждую лунку добавляют 1e6 клеток, это в 50 раз больше, чем рекомендовано в представленном здесь протоколе. Стрелки указывают на скопления в перегруженной лунке, которые отсутствуют в SLP, поскольку он не перегружен, а наконечники стрелок указывают на морфологические характеристики, демонстрируемые клетками, которые не присутствуют в перегруженной лунке и, следовательно, не могут быть отслежены никаким способом, кроме представленного в данном документе. Фиг. (C) представляет протокол из Katrien Princen et al. в сравнении со способом согласно данному изобретению, где планшет подвергают медленному вращению и используют 5e5 клеток/лунка. Вра-

шение, даже при более низкой плотности клеток, создает скопление внутри лунки, которое не встречается в нашем способе, кроме того, взаимоотношения между клетками не могут быть измерены из-за дополнительной внешней силы.

Фиг. 16: сравнение популяций с использованием предыдущего способа (проточной цитометрии) и способа, предложенного в данном документе, в каждой лунке. Клетки внутри монослоя следуют тому же физиологически релевантному паттерну, который измеряется проточной цитометрией и анализом изображения монослоя. Эти значения являются стандартными для взрослых людей и обычно используются в диагностических целях.

Фиг. 17: перегруженная лунка создает физиологически нерелевантный монослой. Клетки, засеянные в планшет, как описано у Douglas et al. (2e6/лунка), увеличивают число адгезивных клеток, блокируя тем самым размещение неадгезивных клеток (в данном случае: Т-клеток). После удаления среды неадгезивные клетки удаляются из лунки и не садятся, оставляя лунку с непропорциональным числом клеток (верхний ряд, без Т-клеток, когда обычно Т-клетки составляют более 75% монослоя, а также присутствуют в качестве 75% популяции PBMC в периферической крови здорового взрослого человека). Внизу показано применение способа SLP, который сохраняет пропорциональное число Т-клеток.

Аспекты данного изобретения дополнительно описаны посредством следующих иллюстративных неограничивающих примеров, которые обеспечивают лучшее понимание воплощений данного изобретения и его многочисленных преимуществ. Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных воплощений данного изобретения. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методики, описанные в приведенных ниже примерах, представляют собой методики, используемые в данном изобретении, которые хорошо функционируют в осуществлении изобретения на практике и, таким образом, могут считаться предпочтительными для его осуществления на практике. Тем не менее, специалистам в данной области в свете данного описания должно быть понятно, что в конкретных воплощениях может быть сделано множество изменений, которые раскрыты и по-прежнему дают аналогичный или подобный результат, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

Если не указано иное, то применяют установленные методики рекомбинантных генов, описанные, например, в документе Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001), который включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте.

В данном документе приводится ряд документов, включая патентные заявки, руководства производителей и научные публикации. Раскрытие этих документов, хотя не считается релевантным для патентоспособности этого изобретения, включено в данное описание посредством ссылки во всей его полноте. Более конкретно, все справочные документы включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был конкретно и индивидуально включен посредством ссылки.

Пример 1.

Эксперимент: Установить протокол культивирования PBMC от здоровых доноров или пациентов, который приводит к образованию окрашиваемого монослоя (отдельной визуализируемой области/плоскости изображения) для визуализации в 384-луночных планшетах.

Способ: PBMC культивировали согласно протоколу, изобретенному для фармакокопии. На первой стадии кровь берут у (а) здорового пробанда (пробандов) или пациента (пациентов). Как правило, объем составляет от 9 до 500 мл, и кровь хранится в соответствующем контейнере, содержащем EDTA или гепарин. Затем образец крови смешивают в соотношении 1:1 с PBS-буфером. Для очистки 30 мл смеси крови/PBS наслаивают на 15 мл градиента плотности лимфопрепа в пробирках объемом 50 мл. Пробирки центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 30 мин при комнатной температуре без перерыва (не останавливая центрифугу). Лейкоцитарную пленку выше градиента плотности и ниже плазмы удаляют и помещают в другую пробирку объемом 50 мл. Как правило, удаляемый объем колеблется от 10 до 15 мл. Затем пробирку заполняют PBS до конечного объема 50 мл и снова центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 5 мин с остановкой центрифуги. Супернатант удаляют, а осадок суспендируют в RPMI с 20 мл 10% FCS и соответствующими антибиотиками. Осадок должен иметь полосу эритроцитов толщиной не более 5 мм. Затем клетки подсчитывают до 4×10^5 /мл и 50 мкл высевает с плотностью 20000 клеток/лунка в 384-луночные планшеты для визуализации с черными стенками от Corning. Клетки оставляют при комнатной температуре на 10-15 мин для осаждения и затем помещают в инкубатор с температурой 37°C и 5% CO₂. Затем планшеты инкубируют в течение заданного времени, в идеале не более чем в течение ночи. При добавлении витального красителя 30 мкл супернатанта осторожно удаляют вручную или с помощью робототехники, и добавляют 30 мкл смеси 1:1000 PBS с красителем live/dead fixable 488 от Invitrogen при комнатной температуре на 30 мин. Витальный краситель удаляют, как и изначальный супернатант, с помощью автоматизированной пипетки или робота. На этой стадии следует избегать нарушения монослоя. Сразу после добавления витального красителя или если его вообще не добавляют, вносят 30 мкл 2% формальдегида с 0,1% Triton-X114, и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. Супернатант удаляют (весь) путем постукивания. Поскольку монослой на этой стадии уже зафиксирован, это его не разрушит. Для окрашивания добавляют 30 мкл окрашивающего антитела. Протестированные коктейли представляют собой разведение 1:300 GFP-, PE- (фикоэритрин) или APC-меченных антител (аллофикоцианин), используемых для проточной цитометрии.

Такое разведение позволяет избежать стадии промывания. Планшеты инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Антитело удаляют путем постукивания, как указано выше, и добавляют разведение 1:100 DAPI в PBS в 50 мкл. Планшеты хранят при 4°C до визуализации. Визуализацию проводят при комнатной температуре с помощью автоматизированного конфокального микроскопа (PerkinElmer Operetta) с 4-мя неперекрывающимися каналами, и данные экспортируют для анализа.

Результаты: После культивирования РВМС с использованием нашего нового протокола адгезивные и неадгезивные РВМС формировали монослой, который можно было визуализировать в одной плоскости, используя автоматизированный конфокальный микроскоп и делая возможным автоматизированный скрининг лекарственных препаратов, минимизированный в 384-луночных планшетах. Микроскопия подтвердила, что 20000 клеток (плюс/минус 5%) могут быть визуализированы с помощью недавно разработанного способа, названного фармакоскопией.

Пример 2.

Эксперимент: Используя протокол, разработанный в эксперименте 1, основные антигены, присутствующие на больших популяциях РВМС, окрашивали с помощью меченых флуорохромом антител (CD11C-APC, CD14-PE, CD19-APC и CD3-PE), витального красителя для определения стабильности мембраны и ДНК-связывающего красителя для оценки окрашивания ядра (DAPI). Этот эксперимент показал важные популяции РВМС; многие из них являются неадгезивными в нормальных условиях культивирования и могут быть визуализированы этим способом.

Способ: РВМС культивировали, фиксировали и окрашивали в соответствии с протоколом. 384-луночные планшеты визуализировали с использованием автоматизированного конфокального микроскопа в 4-х отдельных каналах. Комбинации окрашивания были следующими: CD11C/CD14, CD3/CD19, CD11C/CD3, CD14/CD19 - все с маркерами жизнеспособности и ядерным окрашиванием.

Результаты: С помощью автоматизированного конфокального микроскопа были визуализированы основные популяции клеток, включая неадгезивные клетки (CD19⁺-В-клетки и CD3⁺-Т-клетки), а также маркер жизнеспособности и ядерное окрашивание. Специфическая визуализация неадгезивных популяций имела важное значение для определения того, может ли этот способ отслеживать популяции, которые обычно не формируют отдельных визуализируемых монослоев, которые, как известно авторам данного изобретения, не визуализировались до разработки данного изобретения. Изображения CD19⁺- и CD3⁺-окрашенных клеток показаны на фиг. 1.

Пример 3.

Эксперимент: Проточная цитометрия представляет собой низкопропускной, широко используемый способ определения популяций РВМС. Чтобы решить, были ли визуализированные и оцененные с помощью фармакоскопии популяции идентичны результатам проточной цитометрии, мы сравнили эти две методики.

Способ: РВМС культивировали, фиксировали и окрашивали по протоколу фармакоскопии, описанному в примере 1. 384-луночные планшеты визуализировали с помощью автоматизированного конфокального микроскопа в 4-х отдельных каналах. Комбинации окрашивания были следующими: CD11C/CD14, CD3/CD19, CD11C/CD3, CD14/CD19, а также все одиночные окрашивания (CD11C, CD14, CD3, CD19.) Клетки от того же донора также окрашивали для проточной цитометрии с использованием стандартных методик. Проточная цитометрия позволяет проводить количественную оценку популяций и является в настоящее время стандартной методикой для анализа неадгезивных клеток.

Результаты: Как показано на фиг. 2, процентные доли популяций всех окрашиваний сравнимы независимо от того, анализировали ли их путем проточной цитометрии (сверху) или фармакоскопии (внизу).

Пример 4.

Эксперимент: Затем было установлено, что с помощью средств и способов, предложенных в данном документе, также называемых "фармакоскопией", можно обнаруживать пространственные отношения клеток, можно обнаруживать состояния активации каждой популяции путем окрашивания на активацию провоспалительного пути с внутриклеточным разрешением, а также можно обнаруживать изменения в размере/форме/структуре клетки и ядра для большого числа противовоспалительных препаратов (100) в различные моменты времени. Мы стимулировали здоровые донорские клетки вирусом, экспрессирующим GFP, и отслеживали активацию NF-κB с помощью антитела, специфического для фосфо-p65, и отслеживали клеточный тип, жизнеспособность, а также окрашивание и субклеточную локализацию фосфо-p65 (который при фосфорилировании активируется и транслируется в ядро, что приводит к сильному воспалительному ответу).

Способ: РВМС культивировали, фиксировали и окрашивали согласно протоколу фармакоскопии. 384-луночные планшеты визуализировали с использованием автоматизированного конфокального микроскопа в 4-х отдельных каналах. Комбинации окрашивания были следующими: CD11C/фосфо-p65, CD14/фосфо-p65, CD3/фосфо-p65, CD19/фосфо-p65, вирусная экспрессия GFP и ядерные маркеры. Клетки оставляли наивными или стимулировали с помощью VSV при множественности инфекции 10 в течение 30 мин, 1 ч, 6 ч и 12 ч.

Результаты: Клетки, обработанные вирусом, имели значительно больше "скоплений", чем необра-

ботанные культуры, что означает 1) состояние более высокой активации, и что 2) анализ путем фармакокопии может определять особые взаимодействия в культурах (измерение расстояния между клетками и типы клеток в зависимости от стимулов). Более того, это также значительно указывает на то, что культуры могут мигрировать на монослой до фиксации, и что сиадия фиксации в ходе фармакокопии является финальным моментом процесса. Кроме того, фармакокопия может отслеживать изменения в конкретной популяции, такие как размер клеток, морфология и текстура ядра, в течение периода стимуляции или введения лекарственного препарата, позволяя подтвердить еще один параллельный источник информации через изображения нового монослоя РВМС.

Заключение экспериментов 1-4: Создание протокола культивирования, фиксации, окрашивания и визуализации в основном неадгезивных РВМС в визуализируемом монослое представляет собой фундаментальный прорыв в нашей способности выполнять высокопроизводительный и высокоточный скрининг лекарственных препаратов непосредственно в физиологически релевантной системе. Фармакокопия позволяет систематически расшифровывать многочисленные параллельные строки ранее недостижимых данных. Строки данных, такие как: 1) обнаружение множественных популяций неадгезивных и адгезивных клеток в одной и той же культуре без необходимости вращения, ферментного расщепления, хелатирования или соскабливания клеток; 2) морфология ядра; 3) межклеточные взаимоотношения в высокопроизводительных изображениях, 4) рекапитуляция и визуализация активации пути в релевантных типах клеток, 5) субклеточная локализация белка и/или колокализация белков и многое другое. Кроме того, фармакокопия использует стандартные системы автоматизации и нуждается лишь в ограниченном донорском материале (почти в 10 раз меньше, чем в конкурирующих способах).

С использованием средств и способов, предложенных в данном документе, возможен автоматический скрининг фармацевтических препаратов, таких как противораковые соединения. Кроме того, средства и способы, предложенные в данном документе, могут использоваться в диагностике, например, в оценке вариантов лечения и т.п. или в прогностической химиотерапии и/или в отслеживании различных биомаркеров. Средства и способы, предложенные в данном документе, также позволяют проводить высокопроизводительный анализ сотен соединений одновременно. Кроме того, средства и способы, предложенные в данном документе, позволяют диагностировать заболевание или предрасположенность к заболеванию у донора РВМС/донора клеток костного мозга, при этом используют монослой РВМС или клеток костного мозга, культивируемых в соответствии со способами согласно данному изобретению. Кроме того, средства и способы, предложенные в данном документе, могут быть использованы для определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание.

Пример 5.

Эксперимент: Предложенные в данном документе средства и способы, в частности, монослой, образованный способами согласно данному изобретению, использовали для обнаружения противораковых лекарственных препаратов, специфически направленных против гемопозитических заболеваний, в физиологически релевантной системе. Клеточные линии предшествующего уровня техники далеки от релевантных, поскольку взаимодействия различных типов клеток, которые присутствуют *in vivo*, не учитываются. Скрининг РВМС с использованием средств и способов, предложенных в данном документе, в частности, с использованием высокоточного анализа с использованием средств и способов, предложенных в данном документе, позволяет гораздо более подробно описывать события. Кроме того, многие варианты химиотерапии цитотоксичны до такой степени, что оставляют пациента без функционирующей иммунной системы; наш способ скрининга будет определять специфические для популяции эффекты лекарственных препаратов.

Выборку из 1500 низкомолекулярных соединений вносили в двух повторах в 384-луночные планшеты, и комбинации субпопуляций РВМС, как и в эксперименте 2, окрашивали витальным красителем (целостность мембраны) и ядерным красителем (DAPI). Цель анализа состояла в определении глобальной картины изменений жизнеспособности РВМС. Поэтому основное внимание было сфокусировано на каждой отдельной популяции, чтобы расшифровать специфическое нацеливание. Этот скрининг выполняли в 3000 лунок в более чем десяти 384-луночных планшетах на уровне отдельных клеток, автоматически определяя адгезивные и неадгезивные популяции.

Способ: РВМС культивировали, фиксировали и окрашивали с использованием способов согласно данному изобретению, в частности, как описано в приведенных выше примерах. 1500 соединений, выбранных случайным образом из нашей библиотеки соединений, вносили в объеме 5 нл в 384-луночные планшеты. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 36 ч. Спустя 36 часов согласно протоколу фармакокопии добавляли маркер жизнеспособности. 384-луночные планшеты визуализировали с использованием автоматизированного конфокального микроскопа в 4-х отдельных каналах. Комбинации окрашивания были следующими: CD11C/CD14 и CD3/CD19. Каждую комбинацию окрашивания также окрашивали маркером жизнеспособности и DAPI.

Результаты: Этот скрининг дал большой набор данных, который был разбит на три визуализации: 1) измерение глобального изменения жизнеспособности клеток, которое было нормировано по способности лекарственного препарата специфически нацеливаться на отдельную окрашенную популяцию (фиг. 3).

На фиг. 3 показаны все 1500 соединений, каждое из которых представлено точкой, сравниваемые по общему числу убитых РВМС и "специфичности" соединения в нацеливании на один или более чем один конкретный клеточный тип, присутствующий при окрашивании. Выбранные соединения с наибольшей эффективностью, обозначенные черным цветом с названиями, представляют значительное обогащение лекарственными препаратами, предписанными для лечения гематологических раков. 2) Из определения специфической цитотоксичности популяции можно определить и было определено возможное перепрофилирование лекарственного препарата (лекарственные препараты, которые назначают при одном типе рака, но могут лучше подходить или также использоваться для нацеливания на другие популяции). Два примера перепрофилирования или нацеливания лекарственных препаратов показаны на фиг. 4. В то время как гивиностат (фиг. 4, наверху) находится в клинических испытаниях для лечения рецидивирующих лейкозов и миелом, основываясь на полученных результатах, он может быть неэффективным для раковых заболеваний, вызванных В-клетками, таких как хроническая В-клеточная лимфобластная лейкемия (В-CLL.) Кроме того, цитарабин (фиг. 4, внизу), одобренный FDA, может работать как противораковый препарат широкого спектра действия, тем не менее, он может быть более эффективным против миелоидных, чем при лимфоидных раках, благодаря его способности лучше нацеливаться на макрофаги и дендритные клетки, и в меньшей степени на В-клетки.

Хотя этот первоначальный крупномасштабный концептуальный скрининг был выполнен на здоровой донорской крови, он все же может выявить как новые противораковые соединения, так и определить клетки-мишени. На фиг. 5, например, показаны ингибиторы HDAC, которые были получены из скрининга жизнеспособности (т.е. имели высокие показатели специфичности) и лейкоцитарных субпопуляций, пораженных после 36 ч инкубации. В этот список также включены два недавно синтезированных ингибитора HDAC с неизвестными мишенями, обозначенные как "CMP_A" и "CMP_B." Используя их паттерн специфического уничтожения клеток в этом конкретном скрининге вместе с нашей собственной химиопротеомикой, можно определить молекулярные мишени и механизмы действия новых лекарственных препаратов, таких как эти, непосредственно в пораженной популяции клеток.

Заключение: Исследования, которые заложили основу для популяционно-характеристического анализа, основанного на субклеточном и одноклеточном разрешении, основаны на генетически идентичных клеточных линиях, которые не являются физиологически релевантными для здоровья и заболеваний человека. Более того, релевантность поиска лекарственных препаратов для лечения заболеваний человека на клеточных линиях недавно была поставлена под сомнение после того, как были выявлены несоответствия в опубликованной работе (Haibe-Kains et al., 2013). В данном документе мы описали систему обнаружения соединений, которые специфически нацелены на различные субпопуляции РВМС, даже с использованием здорового донора, что открывает двери для возможного скрининга еще большего числа библиотек на предмет лекарственных препаратов с еще более специфическим нацеливанием на популяцию. Соответственно, средства и способы, предложенные в данном документе, могут использоваться в скринингах лекарственных препаратов и/или способах определения того, страдает ли донор заболеванием, и/или будет отвечать/отвечает ли донор на лечение с использованием соединений, известных в данной области, и/или соединений, обнаруженных с использованием способов согласно данному изобретению.

Пример 6.

Эксперимент: На основе формирования методологии, описанной в экспериментах 1-4, т.е. с использованием монослоев согласно данному изобретению, а также результатов нашего нового скрининга соединений в эксперименте 5, прогностическая химиотерапия была реализована путем отслеживания подробных биомаркеров на уровне отдельной клетки и на глобальном уровне для более 350 лекарственных препаратов с использованием средств и способов согласно данному изобретению. В частности, наилучшие варианты химиотерапии у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями отслеживались на основе жизнеспособности миелоидных клеток-предшественников CD34⁺ и клеток, содержащих фосфорилирование STAT5; оба эти окрашивания известны как общие биомаркеры для множества типов МРН, включая ранний первичный миелофиброз и истинную полицитемию.

Способ: РВМС культивировали, фиксировали и окрашивали согласно протоколу, описанному в приведенных выше примерах. 384-луночные планшеты визуализировали с помощью автоматизированного конфокального микроскопа в 4-х отдельных каналах. Мы проводили окрашивание CD34-APC, pSTAT5-PE, GFP маркером жизнеспособности и ДНК-связывающее ядерное окрашивание. Материал от пациента культивировали с лекарственными препаратами в течение 18 ч перед добавлением маркера жизнеспособности. Эти изображения содержали как клональные бласты (почти все CD34⁺-клетки, которые присутствуют в периферической крови), активированные клетки (pSTAT5⁺-клетки), так и изначально здоровые клетки от того же донора. Уникально, что фармакоскопия позволила на уровне отдельных клеток контролировать воздействие лекарственных препаратов на рак у пациента, позволяя проводить прямое контролируемое сравнение со здоровыми популяциями клеток на тех же изображениях.

Результаты: Определили жизнеспособность клеток, которые специфически окрашивались либо на CD34, либо на pSTAT5. Из примерно 350 соединений, отобранных случайным образом, наиболее эффективные соединения, которые снижали жизнеспособность клеток, экспрессирующих биомаркеры (фиг. 6,

выделены), обычно назначают для лечения рака, а некоторые конкретно для лечения MPN или других миелом. Один лекарственный препарат, а именно азациитидин, в настоящее время демонстрирует успех в клиническом испытании лечения раннего PMF в сочетании с ингибиторами JAK, лечение которыми уже проходит этот пациент. Кроме того, при титровании азациитидина у того же пациента наблюдались зависящие от концентрации эффекты при отслеживании жизнеспособности CD34⁺-клеток по сравнению со здоровыми клетками и по сравнению с ДМСО (фиг. 7). Результаты этого эксперимента также показаны на фиг. 12.

Заключение: Анализ на уровне отдельных клеток с использованием монослоя PBMC согласно данному изобретению у пациентов, страдающих от рака крови, дал сильные химиотерапевтические препараты с наибольшей эффективностью, что привело к лучшим и более целенаправленным подходам к лечению. Хотя секвенирование и протеомика предлагают прогностическую персонализированную медицину, средства и способы, предложенные в данном документе, предлагают напрямую измеренное отслеживание фенотипа *ex vivo*, которое, как было продемонстрировано, непосредственно связано с реакцией *in vivo* на лекарственный препарат.

Пример 7.

Эксперимент: PBMC получали с использованием способов предшествующего уровня техники и способа согласно данному изобретению. В частности, следовали способу, описанному Douglas et al. (2001) *Current Protocols in Immunology* (опубликован 1 мая 2001 года), и способу, описанному Katrien Princen et al. (2002) *Cytometry Part A* vol. 51A, no. 1, pp 35-45. Т.е. монослои PBMC получали путем посева клеток с плотностью, отмеченной на стадии 15 параграфа 12.9.8 в Douglas et al., которая находится за пределами максимального диапазона, необходимого для создания заявленного монослоя PBMC/костного мозга. Второй слой формировали с использованием протокола, описанного в Katrien Princen et al., в котором стадия "низкоскоростного вращения" (т.е. 500 об/мин) проводится с низким ускорением и без прерыва.

Результаты: Полученные слои PBMC анализировали путем микроскопии. Изображения клеточных монослоев, которые сравнивают способы, предложенные в данном документе, со способами из Douglas et al. и Katrien Princen et al., соответственно, показаны на фиг. 15.

Использование методик, в которых применяется более значительная гравитационная сила, например центрифугическая гравитация, чем применяемая в способах согласно данному изобретению, например, как описано в примере 1 (нормальные гравитационные силы и силы мениска, если таковые имеются), нарушает процедуру посева и создает монослой, который строится сам по себе и не может быть полностью визуализирован - кроме того, центрифугирование нарушает межклеточные контакты, которые природным образом формируются при использовании протокола, описанного в примере 1. После применения силы либо клетки располагаются настолько плотно, что не могут свободно перемещаться, из-за чего взаимосвязь клеток друг с другом не может быть измерена, либо их измерение является нерелевантным для человека. Для сравнения получали монослои PBMC, как описано в примере 1. В способах согласно данному изобретению клетки находятся без воздействия дополнительных сил помимо тех, которые присутствуют в лунке, так что все межклеточные взаимодействия, места размещения и соседи являются физиологически релевантными (как они имеют место в человеческой системе), как и их изменения в присутствии лекарственных препаратов. Напротив, способы Douglas et al. и Katrien Princen et al. применяют гравитационную силу или лизис клеток, соответственно, что изменяет природные межклеточные взаимодействия и/или целостность мембраны.

Пример 8.

Костный мозг собирали путем аспирации костного мозга/пункции костного мозга и клетки очищали в градиенте плотности фиколла, как описано выше, следуя инструкциям производителя. Клетки высевали по протоколу, описанному в данной заявке, в пустые 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning). Клетки высевали при плотности 20000 клеток/лунка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Клетки инкубировали в течение ночи и добавляли витальный краситель (fixable live/dead green, Invitrogen, следуя инструкциям производителя). Клетки фиксировали и пермеабелизовали в PBS, содержащем 2% формальдегида с 0,1% Tween-x114, в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в двух каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP). Клетки в монослое окрашивали с использованием DAPI (ДНК-связывающий агент) для анализа числа и присутствия клеток, а также с использованием красителя fixable live/dead green от Invitrogen для определения жизнеспособности монослоя. Как показано на фиг. 14, монослои человеческих клеток костного мозга, полученные способами согласно данному изобретению, содержат жизнеспособные клетки в физиологически релевантном состоянии.

Пример 9.

PBMC из периферической крови пациента с диагностированным первичным миелофиброзом очищали в градиенте плотности фиколла, как описано выше, следуя инструкциям производителя. Клетки высевали по протоколу, описанному в данной заявке, в 384-луночные черные пластиковые планшеты для

визуализации (Corning), содержащие 350 одобренных FDA лекарственных препаратов в ДМСО в концентрации 10 мкМ. Клетки высевали при плотности 20000 клеток/лунка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Клетки инкубировали в течение ночи и добавляли витальный краситель (fixable live/dead green, Invitrogen, следуя инструкциям производителя). Клетки фиксировали и пермеабилizировали в PBS, содержащем 2% формальдегида с 0,1% Tween-x114, в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий антитело против CD34 и pSTAT5 (BD biosciences), на 1 ч. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). Используя конвейер анализа изображений, чувствительность раковых клеток (CD34- и pSTAT5-положительных) к каждому лекарственному препарату сравнивали с чувствительностью здоровых клеток (не CD34- и pSTAT5-положительных). Все результаты нормировали по контролю, содержащему только ДМСО. На фиг. 12A показаны результаты, где каждая точка представляет собой лекарственный препарат, а выделенные лекарственные препараты нацелены на конкретные клетки в монослое, которые являются положительными по "диагностическим маркерам" (т.е. метятся специфическими антителами). Эти результаты сравнивают с влиянием на здоровые клетки (т.е. отрицательные по маркерам) в монослое. Данные для одного лекарственного препарата вынесены на фиг. 12B и подчеркивают фенотипы введения отдельного лекарственного препарата (справа) в сравнении с контролем (слева) для обработанного монослоя (специфическое истощение CD34-клеток). Используя тот же способ, что описан выше, но только подсчитывая число клеток, фиг. 12C показывает влияние лекарственного препарата как в "предшествующем уровне техники" только с подсчетом общей гибели клеток после инкубации с лекарственными препаратами (таким образом, нет сравнения по тому, какие клетки являются больными или какие являются здоровыми). Если определяется только гибель клеток/число клеток, то наиболее важный лекарственный препарат (выделенный в 12A, 12B слева и 12D) не проявляется (за пределами пороговой пунктирной линии). На фиг. 12D представлены клинические данные, полученные с использованием стандартизованных больничных протоколов на основе крови и лабораторных больничных методик после введения соединения, показанного на фиг. 12A и 12B.

Пример 10.

PBMC из периферической крови здорового донора очищали в градиенте плотности фикола, как описано выше, следуя инструкциям производителя. Клетки высевали по протоколу, описанному в данной заявке, в 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning), содержащие 1500 одобренных FDA лекарственных препаратов в ДМСО в концентрации 10 мкМ, с дублированием в ходе всего скрининга. Клетки высевали при плотности 20000 клеток/лунка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Клетки инкубировали в течение 3 ч и затем добавляли вирус. Вирус везикулярного стоматита (VSV) действует как иммунный стимулятор и экспрессирует GFP в клетках при инфицировании; его добавляли при КОЕ 10. После инкубации в течение ночи клетки фиксировали и пермеабилizировали в PBS, содержащем 2% формальдегида с 0,1% Tween-x114, в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий антитело против CD11C, CD14, CD3 и/или CD19 (BD biosciences), на 1 час. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). Используя конвейер анализа изображений, определяли отношения соседних клеток друг с другом. Их определяли в каждой лунке и измеряли влияние лекарственных препаратов на эти межклеточные взаимоотношения по сравнению с контролем ДМСО. Результаты отмечали на графике как сгруппированные результаты аннотаций к лекарственным препаратам из крупномасштабного скрининга лекарственных препаратов, в котором в высокопропускном режиме определяли межклеточные взаимоотношения или "ближайших соседей" клетки. Более темные прямоугольники представляют взаимоотношения, которые были получены или потеряны по сравнению с контрольной лункой (ДМСО). Таким образом, с помощью способа, описанного в примере 1, отслеживаются лекарственные препараты и организуются библиотеки скрининга лекарственных препаратов на основе их способности увеличивать или уменьшать эти взаимодействия.

Пример 11.

Взятие образцов периферической крови или костного мозга проводили у индивидуума и мононуклеарные клетки очищали в градиенте плотности фикола, следуя протоколам производителя. Затем клетки высевали в 384-луночные черные с прозрачным дном планшеты для визуализации (Corning), в которых каждая лунка содержала либо положительный, либо отрицательный контроль, либо лекарственный препарат. Клетки инкубировали, и затем добавляли краситель для определения жизнеспособности всех клеток. Используемый краситель может изменяться в зависимости от стадии жизнеспособности или другого свойства, которое необходимо определить, либо краситель может быть заменен на антитело после следующей стадии. Затем клеточный слой фиксировали и пермеабилizировали, используя 2% формальдегид с 0,1% Triton-X114 в PBS. Затем монослой окрашивали антителами, направленными против диаг-

ностических антигенов, используемых при гемопозитических раках, или против других представляющих интерес антигенов. Затем клетки окрашивали DAPI для ядерной визуализации, следуя приведенным выше протоколам. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). С помощью конвейера анализа изображений жизнеспособность клеток в этом случае можно отслеживать, поскольку 1) они становятся положительными по жизнеспособности, или 2) они больше не присутствуют на изображении по сравнению с ДМСО (контроль).

Маркеры (краситель плюс флуоресцентное антитело или только флуоресцентные антитела) не должны перекрывать каналы, и если они перекрывают, то каналы должны быть компенсированы с использованием стандартных методик компенсации возбуждения/излучения. Общей схемой неперекрывающихся каналов является DAPI, GFP, PE и APC. Могут использоваться и другие.

Соответственно, с использованием средств и способов согласно данному изобретению можно оценить клетки, положительные по множеству биомаркеров, и/или множество клеток, положительных по различным биомаркерам.

Пример 12.

На фиг. 13 представлена схема определения взаимодействий клеток с использованием "показателя взаимодействия", и далее приведен пример показателя взаимодействия. Левая фигура получена путем сбора РВМС из периферической крови здорового донора, очищения в градиенте плотности фиколла, как описано выше, согласно указаниям производителя. Клетки высевали в соответствии с протоколом, приведенным в данной заявке, в 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning). Клетки высевали при плотности 20000 клеток/луночка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Клетки инкубировали в течение трех часов, а затем добавляли вирус. После инкубации в течение ночи клетки фиксировали и пермеабилizировали в PBS, содержащем 2% формальдегида с 0,1% Tween-x114, в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий антитело против CD11C, CD14, CD3 и/или CD19 (BD biosciences), на 1 ч. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). Круги представляют собой пример взаимодействия клеток либо вместе, либо в триплетах. В двух примерах клетки касаются друг друга, и в одном примере две отслеживаемые клетки отделены друг от друга одной клеткой. Средняя панель описывает расчет "показателя взаимодействия", который мы разработали, чтобы отслеживать клеточные взаимоотношения, которые происходят в монослоях, созданных только согласно протоколу в примере 1.

Взаимодействия, релевантные для данного конкретного сценария, можно отслеживать с помощью способов данного изобретения. Для этого РВМС из периферической крови здорового донора очищали в градиенте плотности фиколла, как описано выше, согласно указаниям производителя. Клетки высевали в соответствии с протоколом, приведенным в данной заявке, в 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning), пустые или содержащие антитело против человеческого МНС-II (Purified NA/LE Mouse Anti-Human HLA-DR, клон G46-6, BD biosciences). Клетки высевали с плотностью 20000 клеток/луночка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Клетки инкубировали в течение трех часов, а затем добавляли вирус. Вирус везикулярного стоматита (VSV) действует как иммунный стимулятор и экспрессирует GFP в клетках при инфицировании; его добавляли при КОЕ 10. После инкубации в течение ночи клетки фиксировали и пермеабилizировали в PBS, содержащем 2% формальдегида с 0,1% Tween-x114, в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий антитело против CD11C и CD3 (BD biosciences), на 1 ч. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). Используя конвейер анализа изображений, определяли межклеточные контакты клеток CD3-CD11C.

Например, во время вирусной инфекции (обозначенной как "+ стимулятор") вирусные пептиды представляются дендритными клетками через рецептор МНСII Т-клеткам (Boes et al., (2002) Nature 418, 983-8). Это взаимодействие можно отслеживать, используя способы согласно данному изобретению (-), и можно доказать, что это взаимодействие является реальным в средствах и способах согласно данному изобретению путем включения антитела против МНСII, которое блокирует связывание рецептора (+) (Peiser et al. (2007) Allergy 62(7)). Этот эксперимент является простым доказательством того, что физиологически релевантные клеточные взаимодействия можно определить с помощью способов согласно данному изобретению и использовать для нового скрининга лекарственных препаратов.

Отслеживание изменений осуществляется с помощью собственного программного обеспечения. Межклеточные взаимодействия измеряются путем анализа частоты взаимодействия между двумя типами клеток в 2D-плоскости по изображениям среди всех клеток, присутствующих в луночке. "Взаимодействие" может быть прямым межклеточным контактом (т.е. две соседние клетки касаются друг друга своими плазматическими мембранами), либо когда две клетки находятся на некотором максимальном расстоя-

нии друг от друга и т.д.

На фиг. 13 (слева) каждая клетка окрашена ядерным красителем DAPI, и тип клеток А окрашен одним набором маркеров (например, CD11c), а тип В окрашен другим маркером (например, CD3). Для измерения аффинности взаимодействия этих двух типов клеток сначала рассчитывают долю клеток А, которые находятся в контакте с (т.е. находятся в пределах некоторого максимального расстояния между взвешенными центроидами их ядерных зон) клетками типа В относительно всех клеток А+. Это называется "наблюдаемой" ("набл.") фракцией клеток типа А, взаимодействующих с клетками типа В (прямоугольник на фиг. 13).

Набл. = число клеток А+, которые соседствуют с клетками В+/число всех клеток А+.

Затем это число нормируют ("набл.") по значению, как если бы фракция клеток А взаимодействовала с клетками В случайным образом. Наибольшей детерминантой того, сколько взаимодействий можно ожидать случайным образом, является общее число клеток на лунку или число клеток на область. Эмпирически установлено, что это значение определяет общую долю взаимодействующих клеток (между любыми типами клеток, которые мы называем "Fi").

Fi = число клеток по меньшей мере с одним соседом/число всех клеток.

Таким образом, доля клеток типа А, взаимодействующих с клетками типа В (т.е. "Е"), определяется вероятностью их случайной встречи, которая рассчитывается как "доля клеток типа А среди всех клеток" ("Fa") * "доля клеток типа В среди всех клеток" ("Fb") * "общая доля взаимодействующих клеток среди всех клеток" ("Fi"). Обратите внимание,

Fa = число клеток А+/число всех клеток,

Fb = число клеток В+/число всех клеток.

Ожидаемая доля клеток А+ среди всех клеток А+, которые можно было бы наблюдать взаимодействующими с клетками В+ при условии случайных данных, является следующей

$$E = Fa * Fb * Fi.$$

Наконец, показатель взаимодействия рассчитывается как log2-преобразованное изменение "набл."/"Е", так что отрицательные показатели взаимодействия указывают на частоту взаимодействия, меньшую, чем можно было бы ожидать при случайных данных (что свидетельствует об отталкивании или сильно конкурирующих аффинностях взаимодействий с другими типами клеток), тогда как положительный показатель взаимодействия указывает на частоту взаимодействия, большую, чем можно было бы ожидать при случайных данных (что свидетельствует об аффинности между клетками).

Обратите внимание, что взаимодействие может быть меньшим, чем можно было бы ожидать при случайных данных, но что отклонения (увеличения или уменьшения) от этого отрицательного показателя взаимодействия все еще указывают на изменения в клеточной аффинности.

Обратите внимание, что клеточные взаимодействия можно измерять различными способами, как обсуждалось выше. Например, путем наблюдения того, касаются ли плазматические мембраны клеток, или аппроксимационно путем измерения того, достаточно ли близко друг к другу находятся ядра двух клеток. Используется аппроксимация, основанная на расстоянии между ядрами, так как в этих конкретных изображениях отсутствует достоверное окрашивание плазматической мембраны для всех клеток.

Пример 13.

PBMC из периферической крови здорового донора очищали в градиенте плотности фикола, как описано выше, согласно указаниям производителя. Клетки высевали согласно протоколу, описанному данной заявке, в пустые 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning). Клетки высевали при плотности 20000 клеток/лунка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) с использованием микроскопии ближнего поля. Клетки на фиг. 15A (правая панель) могут свободно перемещаться и взаимодействовать со своими клетками-партнерами без физического вмешательства, таким образом распространяя пути в физиологически релевантных ситуациях, как *in vivo*. На фиг. 15B (нижняя часть) PBMC из периферической крови здорового донора человека очищали в градиенте плотности фикола, как описано выше, согласно указаниям производителя. Клетки высевали согласно протоколу, описанному данной заявке, в пустые 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning). Клетки высевали согласно Douglas et al. при плотности 1e6 клеток/лунка в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) с использованием микроскопии ближнего поля. На предшествующем уровне техники, таком как Douglas et al. и Katrien Princen et al., физические силы либо 1) за счет слишком большого числа клеток, либо 2) за счет дополнительного давления при вращении вызывают непропорциональное число взаимодействий, которые поэтому нерелевантны и не встречаются в природе, либо никак не влияют на лекарственный эффект. Стрелка - пример клеточного типа 1, наконечник стрелки - пример клеточного типа 2. В этом примере клеточный тип 1 и 2 на изображении слева имеет пространство, чтобы свободно двигаться, но на изображении справа никогда не будет возможности взаимодействия из-за физических помех всех других клеток или вращения. Перегрузка лунок также показана на фиг. 17. Перегруженная лунка создает физиологически нерелевантный монослой. Клетки, засеян-

ные согласно описанию в Douglas et al. (2еб/лунка), увеличивают число адгезивных клеток, блокируя таким образом размещение неадгезивных клеток (в данном случае: Т-клеток). После удаления среды неадгезивные клетки удаляются из лунки и не садятся, оставляя лунку с непропорциональным числом клеток (верхний ряд, без Т-клеток, тогда когда обычно Т-клетки составляют более 75% монослоя, а также присутствуют в качестве 75% популяции РВМС в периферической крови здорового взрослого). Внизу показано применение способа SLP, который сохраняет пропорциональное число Т-клеток.

Пример 14.

Сравнение четырех различных популяций в РВМС, измеренных с помощью проточной цитометрии или способа, представленного в данном документе (анализ изображения фармакоскопической лунки). РВМС из периферической крови здорового донора очищали в градиенте плотности фиколла, как описано выше, согласно указаниям производителя. Клетки для проточной цитометрии высевали при плотности 1еб/лунка в 96-луночный планшет с V-образным дном в 50 мкл. Лунки окрашивали антителом против CD11C, CD14, CD3 или CD19 (BD biosciences) в разведении 1:1000 в течение 1 ч на льду. Клетки промывали PBS с 2% FCS и центрифугировали со скоростью 2000 об/мин в течение 5 мин, повторяли дважды, а затем фиксировали в PBS, содержащем 2% формальдегида, и затем промывали еще раз. Полученные популяции измеряли на проточном цитометре (BD facsaria), и результаты анализировали с использованием FlowJo. Сравнимые популяции для визуализационного анализа с использованием фармакоскопии выполняли, помещая РВМС в пустые 384-луночные черные пластиковые планшеты для визуализации (Corning) при плотности 20000 клеток/лунка. Клетки высевали в 50 мкл RPMI, дополненной 5% FCS и 0,1% Pen/strep. После инкубации в течение ночи из всех лунок удаляли среду и клетки фиксировали и пермеабилizировали в PBS, содержащем 2% формальдегида, с 0,1% Tween-x114 в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем раствор заменяли PBS, содержащим антитело против CD11C, CD14, CD3 или CD19 (BD biosciences), на 1 ч. Затем раствор заменяли на PBS, содержащий DAPI в рекомендуемой производителем концентрации. Планшеты визуализировали при 10× увеличении на автоматическом конфокальном микроскопе Operetta (PE) в четырех каналах с использованием разделения света на полосовом фильтре (DAPI, GFP, PE, APC). Монослои оценивали количественно, используя конвейер анализа изображения, а числа, сравнимые с использованием MATLAB, давали значение окраски 0,98. Как можно видеть, субпопуляции, входящие в состав монослоя согласно изобретению, сравнимы с субпопуляциями, присутствующими в образцах РВМС, определенными путем проточной цитометрии. Соответственно, монослой согласно данному изобретению напоминает физиологически релевантное состояние гемопоэтических клеток, таких как РВМС или клетки костного мозга.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение полученного *in vitro* монослоя мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) или монослоя клеток костного мозга, или монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, полученного способом, включающим:

- (а) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; и
- (b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм² до примерно 30000 клеток на 1 мм²,

для определения того, страдает ли донор РВМС/донор клеток костного мозга от заболевания или имеет ли он предрасположенность к заболеванию,

где после выделения РВМС или клеток костного мозга образец не подвергают центрифугированию и/или вращению,

где заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или где заболевание представляет собой миелопролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, нарушение клеточного роста, нарушение клеточного хемотаксиса, метаболическое нарушение или аутоиммунное нарушение, и

где указанный монослой анализируют с использованием микроскопии.

2. Применение по п.1, где заболевание представляет собой лейкемию или лимфому.

3. Применение по п.1 или 2, где клетки РВМС или клетки костного мозга контактируют с диагностическим агентом.

4. Применение полученного *in vitro* монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, или монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, полученного способом, включающим:

- (а) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; и
- (b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм² до примерно 30000 клеток на 1 мм²,

для определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание,

где заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или где заболевание представляет собой миелопролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, нарушение клеточного роста, нарушение клеточного хе-

мотаксиса, метаболическое нарушение или аутоиммунное нарушение,
 где указанный монослой анализируют с использованием микроскопии, и
 где после выделения РМВС или клеток костного мозга образец не подвергают центрифугированию и/или вращению.

5. Применение по п.4, где заболевание представляет собой лейкемию или лимфому.

6. Применение по п.1 или 4, где указанный монослой анализируют с использованием конфокальной микроскопии.

7. Применение по любому из пп.1-6, где РВМС или клетки костного мозга отделены от безъядерных клеток, где образец РВМС или образец клеток костного мозга, подлежащий инкубации, содержит менее чем примерно 100 безъядерных клеток на одну клетку РВМС/костного мозга.

8. Применение по любому из пп.1-7, где монослой получают способом, дополнительно включающим стадию (с)/(iii) фиксации указанных РВМС или клеток костного мозга и/или фиксации сформированного монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга.

9. Применение по п.8, где монослой получают способом, дополнительно включающим после стадии (с)/(iii) стадию (d)/(iv), включающую добавление обнаруживаемой метки к фиксированным РВМС/клеткам костного мозга.

10. Применение по любому из пп.1-9, где монослой получают способом, дополнительно включающим стадию добавления витального красителя.

11. Применение по п.10, где добавление витального красителя происходит до фиксации сформированного монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга.

12. Применение по любому из пп.1-11, где после выделения РВМС или клетки костного мозга поддерживают/обрабатывают/анализируют примерно при стандартной гравитации 1 g, т.е. при $9,81 \text{ м/с}^2$.

13. Способ диагностики заболевания или предрасположенности к заболеванию у донора РВМС/донора клеток костного мозга, включающий применение полученного *in vitro* монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, культивируемых в соответствии со способом, включающим:

(a) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; и

(b) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 ,

где после выделения РМВС или клеток костного мозга образец не подвергают центрифугированию и/или вращению,

где заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или где заболевание представляет собой миелопролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, нарушение клеточного роста, нарушение клеточного хемотаксиса, метаболическое нарушение или аутоиммунное нарушение,

где указанный монослой анализируют с использованием микроскопии, и

где у донора РВМС/клеток костного мозга диагностируют заболевание, если показан измененный клеточный паттерн РВМС/клеток костного мозга, который может быть связан с этим заболеванием.

14. Способ по п.13, где культивируемые РВМС или клетки костного мозга контактируют с диагностическим агентом.

15. Способ по п.13 или 14, где заболевание представляет собой лейкемию или лимфому.

16. Способ определения того, будет ли отвечать или отвечает ли на лечение терапевтическим агентом субъект, страдающий от заболевания или у которого подозревается заболевание, включающий:

(a) выделение РВМС/клеток костного мозга из образца крови, полученного от указанного субъекта;

(b) инкубацию указанных РВМС/клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 ;

(c) контактирование указанных РВМС/клеток костного мозга с указанным терапевтическим агентом; и

(d) оценку ответа РВМС/клеток костного мозга на терапевтический агент, где заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или где заболевание представляет собой миелопролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, нарушение клеточного роста, нарушение клеточного хемотаксиса, метаболическое нарушение или аутоиммунное нарушение,

где после выделения РМВС или клеток костного мозга образец не подвергают центрифугированию и/или вращению,

где указанный монослой анализируют с использованием микроскопии, и

где субъект будет отвечать или отвечает на лечение, если показана по меньшей мере одна измененная характеристика РВМС/клеток костного мозга, которая связана с ослаблением или замедлением целевого заболевания.

17. Способ по п.16, где способ дополнительно включает (e) изменение или начало лечения субъекта указанным терапевтическим агентом на основании оценки на стадии (d).

18. Способ по любому из пп.16, 17, где заболевание представляет собой лейкемию или лимфому.

19. Способ выбора фармацевтической композиции, содержащей соединение для применения в ле-

чении заболевания у индивидуума, имеющего указанное заболевание, где указанная фармацевтическая композиция выбрана по меньшей мере из двух или более тестируемых соединений, о которых известно, что они эффективны в лечении гематологической злокачественной опухоли и/или злокачественной опухоли миелоидной и/или лимфоидной ткани, где каждое из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений испытывают в анализе, включающем стадии:

(а) изготовления монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, или использования монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга, полученного способом, включающим:

(i) выделение РВМС из образца крови или выделение клеток костного мозга из костного мозга; и

(ii) инкубацию РВМС или клеток костного мозга при плотности от примерно 100 клеток на 1 мм^2 до примерно 30000 клеток на 1 мм^2 ,

с использованием РВМС или клеток костного мозга указанного индивидуума;

(b) определения жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий одной или более чем одной субпопуляции, содержащейся в монослое РВМС или в монослое клеток костного мозга;

(c) добавления одного из по меньшей мере двух или более тестируемых соединений к монослою гемопоэтических клеток; и

(d) определения/отслеживания/оценки/верификации изменений жизнеспособности и/или межклеточных взаимодействий одной или более субпопуляции, содержащейся в монослое РВМС или монослое клеток костного мозга,

при этом анализ повторяют для каждого из по меньшей мере двух или более соединений, и где соединение, наиболее значимо снижающее жизнеспособность/межклеточные взаимодействия, выбрано для лечения указанного индивидуума,

где заболеванием является гематологическая злокачественная опухоль или злокачественная опухоль миелоидной и/или лимфоидной ткани, или, предпочтительно, где гематологическая злокачественная опухоль является острой или хронической миелоидной лейкемией или первичным миелофиброзом,

где указанный монослой анализируют с использованием микроскопии, и

где после выделения РВМС или клеток костного мозга образец не подвергают центрифугированию и/или вращению.

20. Способ по любому из пп.13, 16 и 19, где указанный монослой анализируют с использованием конфокальной микроскопии.

21. Способ по любому из пп.13-20, где РВМС или клетки костного мозга отделены от безъядерных клеток, где образец РВМС или образец клеток костного мозга, подлежащий инкубации, содержит менее чем примерно 100 безъядерных клеток на одну клетку РВМС/костного мозга.

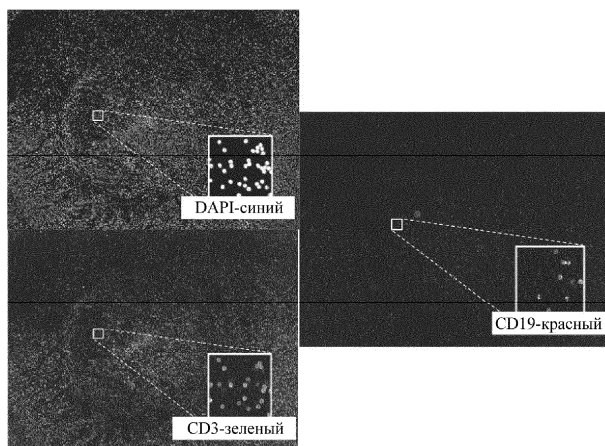
22. Способ по любому из пп.13-21, где способ дополнительно включает стадию (с)/(iii) фиксации указанных РВМС или клеток костного мозга и/или фиксации сформированного монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга.

23. Способ по п.22, где способ дополнительно включает после стадии (с)/(iii) стадию (d)/(iv), включающую добавление обнаруживаемой метки к фиксированным РВМС/клеткам костного мозга.

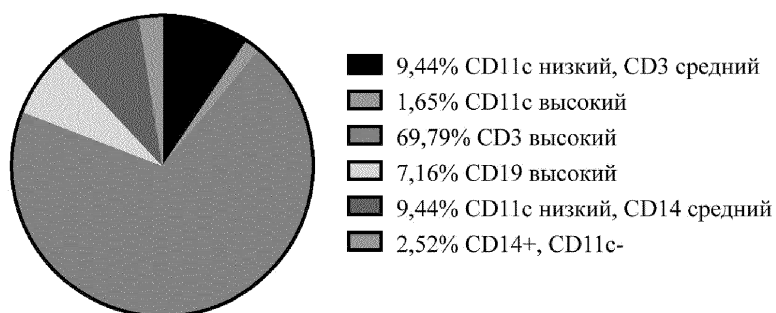
24. Способ по любому из пп.13-23, где способ дополнительно включает стадию добавления витального красителя.

25. Способ по п.24, где добавление витального красителя происходит до фиксации сформированного монослоя РВМС или монослоя клеток костного мозга.

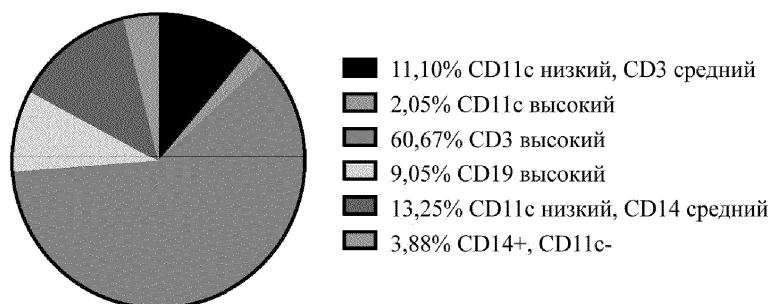
26. Способ по любому из пп.13-25, где после выделения РВМС или клетки костного мозга поддерживают/обрабатывают/анализируют примерно при стандартной гравитации 1 g , т.е. при $9,81 \text{ м/с}^2$.



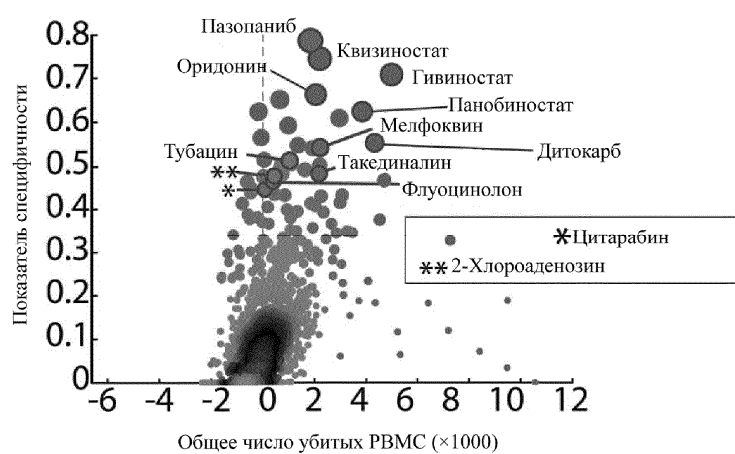
Фиг. 1



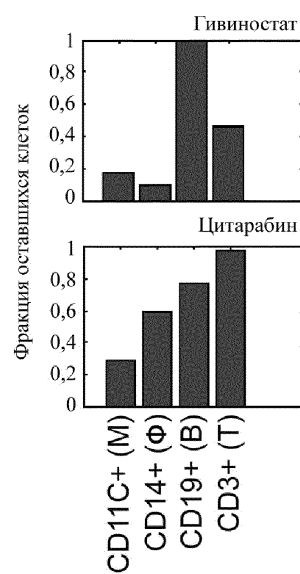
Фиг. 2А



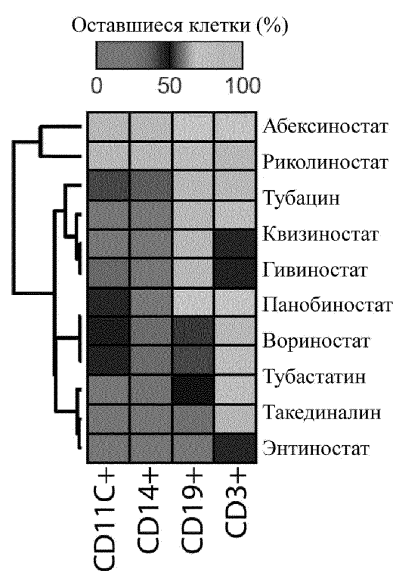
Фиг. 2В



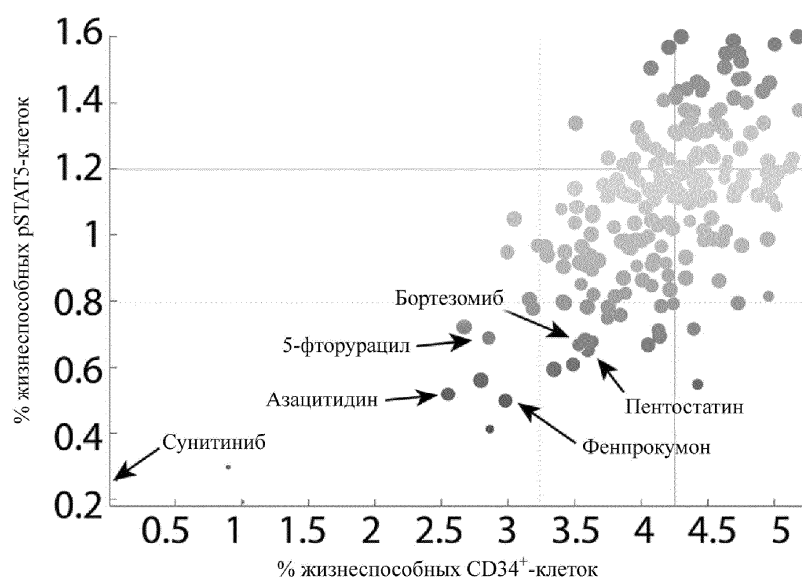
Фиг. 3



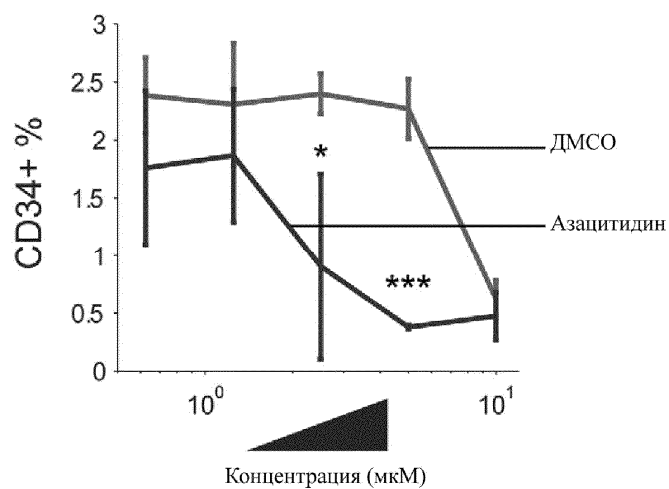
Фиг. 4



Фиг. 5

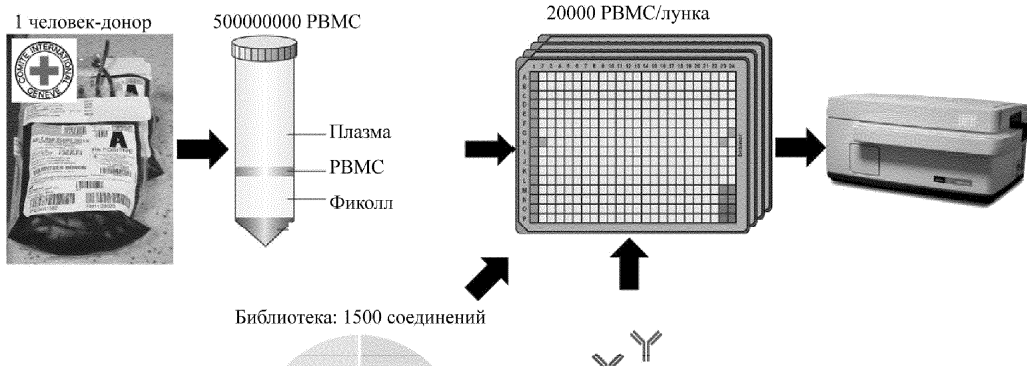


Фиг. 6



Фиг. 7

Скрининг жизнеспособности: рабочий процесс



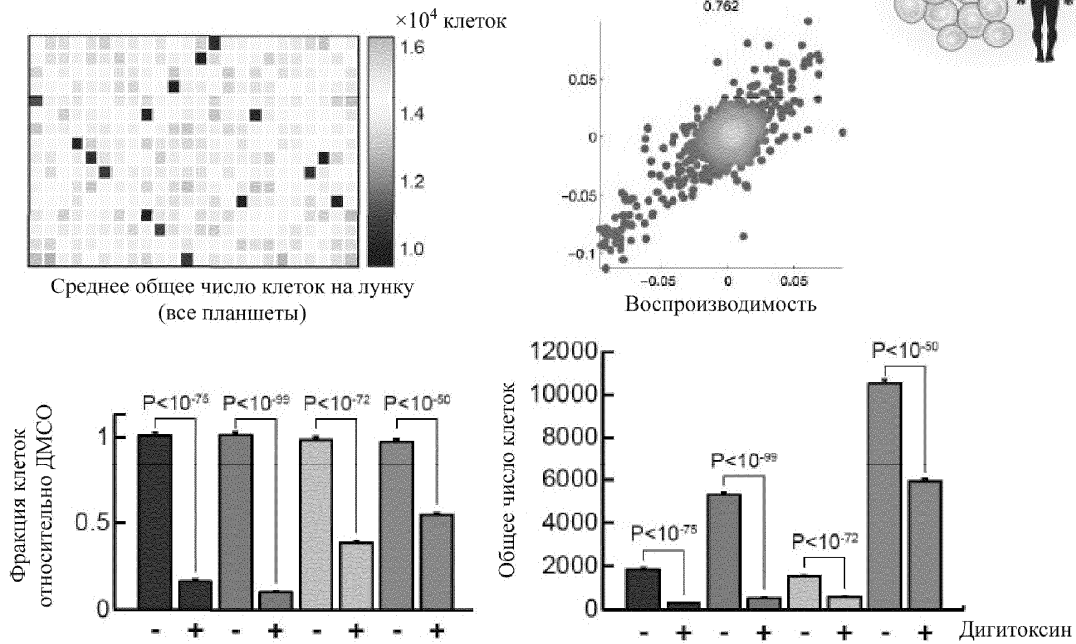
4 различных канала: DAPI – жизнеспособность – зеленый флуоресцентный белок(GFP) - 1) CD3-PE/CD19-APC
2) CD14-PE/CD11C-APC

Рандомизированные дубликаты во всех планшетах для постоянства

□ Клинические испытания (185)
■ Другие (806)

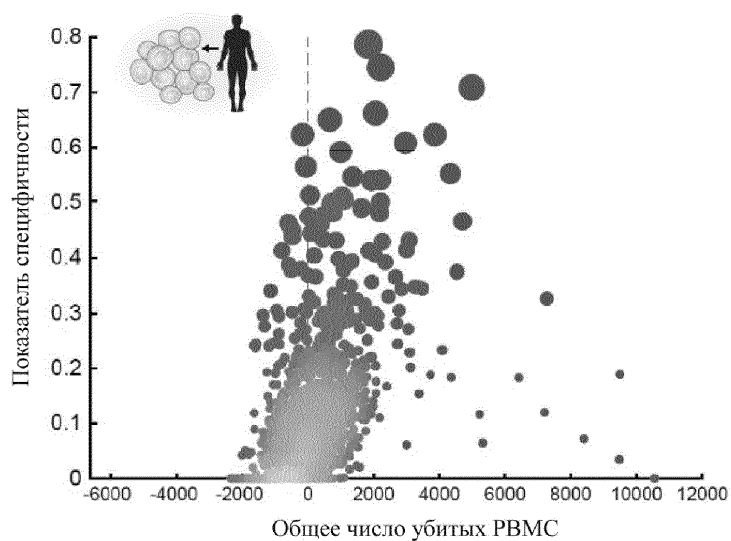
Фиг. 8А

Скрининг жизнеспособности: контроль с ДМСО и дигитоксином



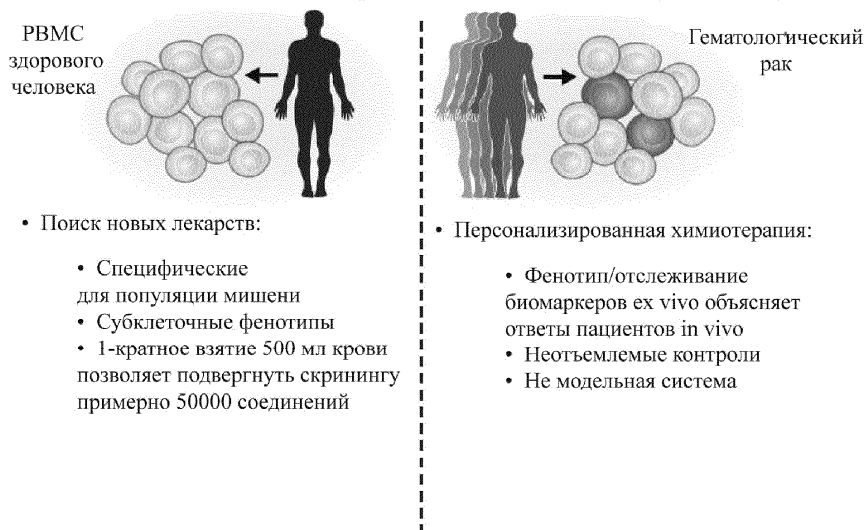
Фиг. 8В

Фармакоскопия делает возможным персонализированный поиск лекарственных препаратов



Фиг. 8С

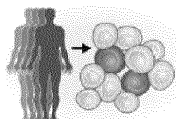
Фармакоскопия делает возможным персонализированный поиск лекарственных препаратов



Фиг. 8D

Фармакоскопия: персонализированный поиск лекарственных препаратов

Доказательство фокуса концепции:
Миелопролиферативные новообразования



Клональная экспансия аномальных гемопоэтических клеток-предшественников

Много визуальных маркеров: CD34+ миелоидные предшественники, pSTAT5, pJAK, локализация CARL, регуляция TROP

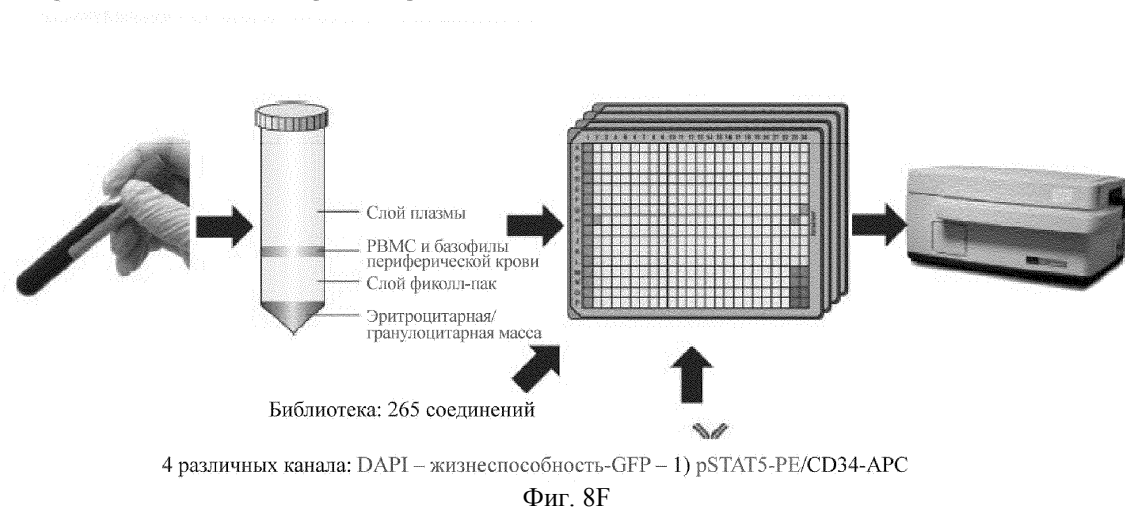


Планшеты «Библиотека SeMM уникальных лекарств»

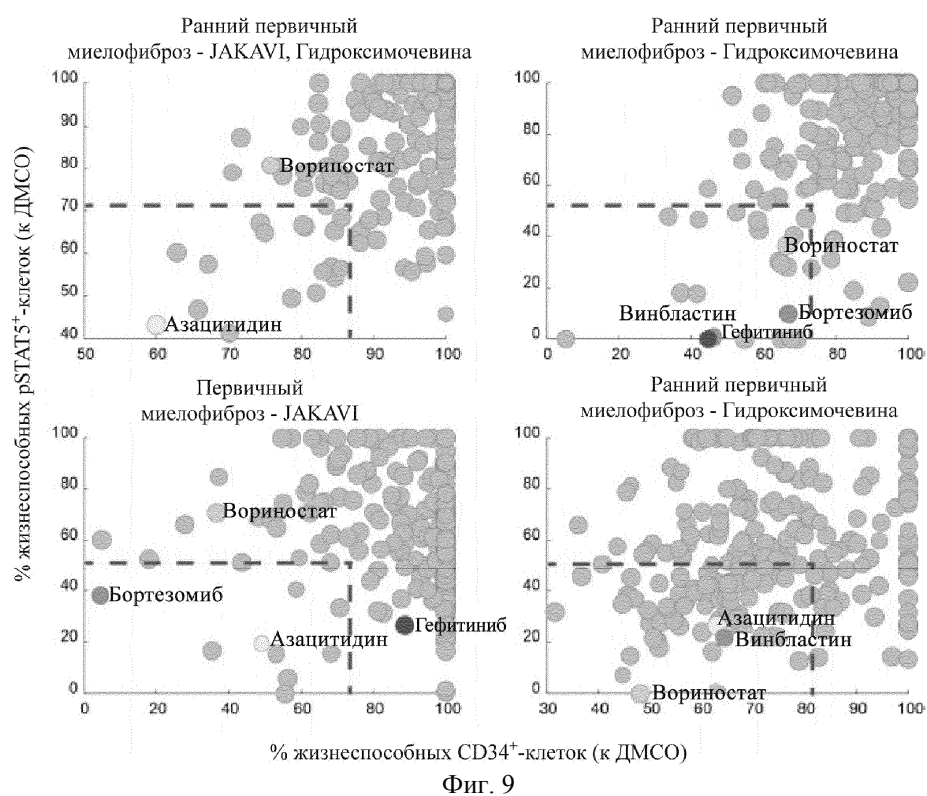
- 4 пациента в первых тестируемых планшетах;
- 265 лекарственных препаратов, одобренных FDA

Фиг. 8Е

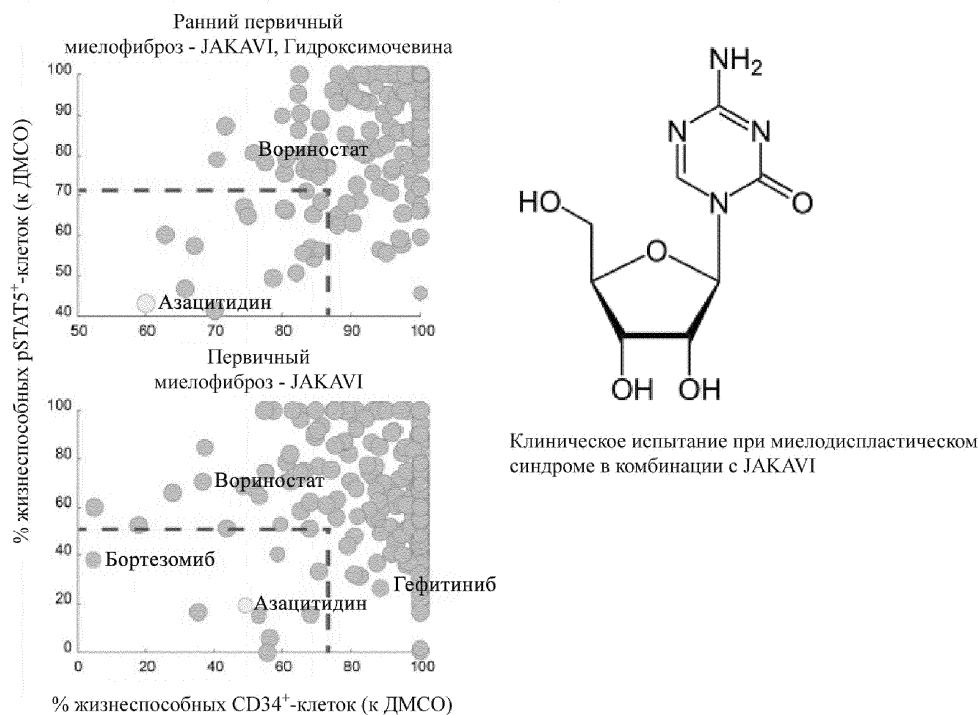
Скрининг жизнеспособности: рабочий процесс



Фармакоскопия: персонализированный поиск лекарственных препаратов

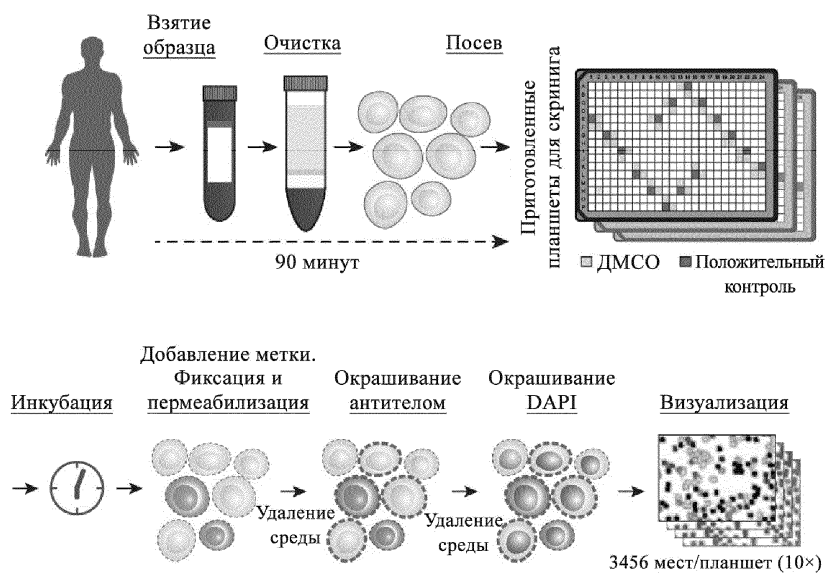


Фармакоскопия: персонализированный поиск лекарственных препаратов

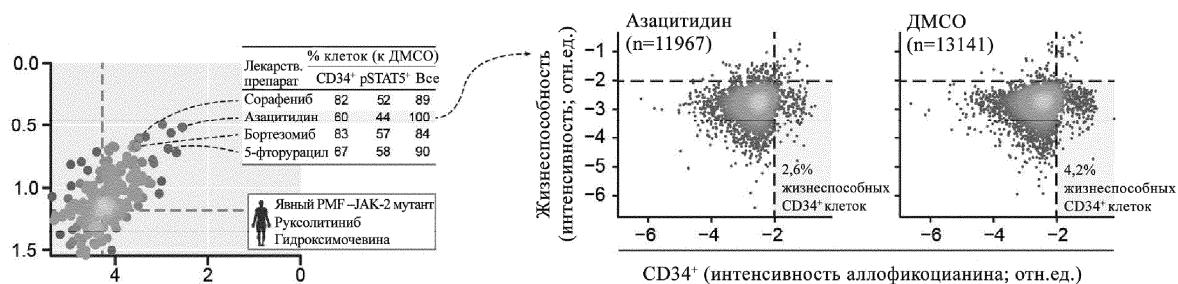


Фиг. 10

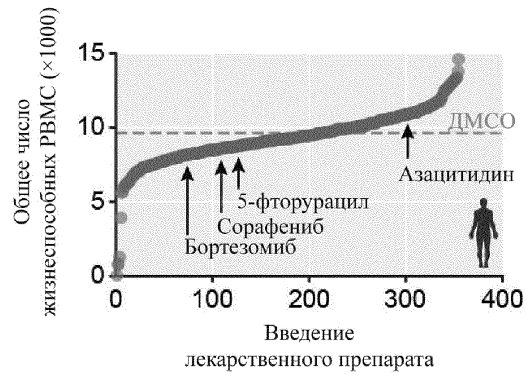
Рабочий процесс



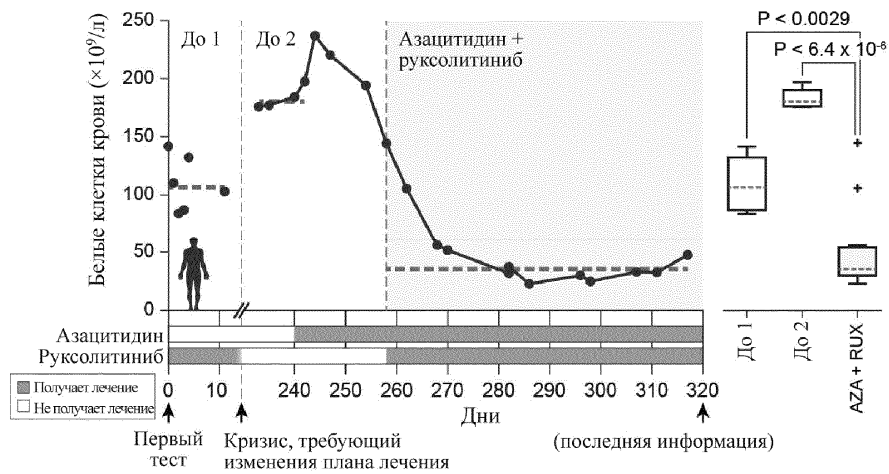
Фиг. 11



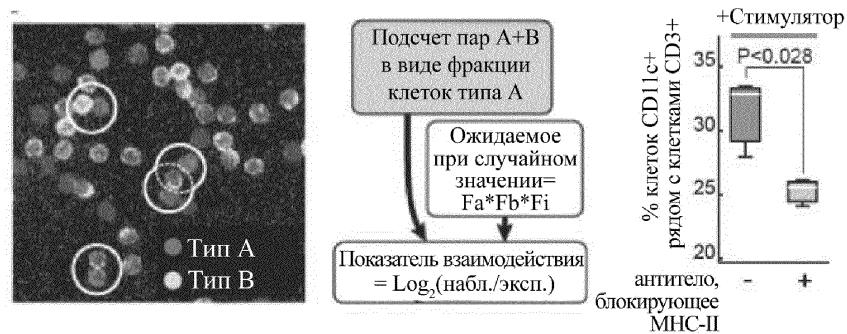
Фиг. 12A, B



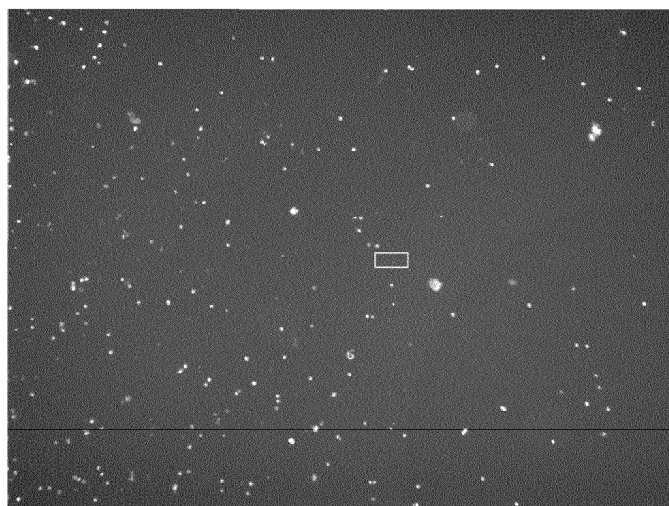
Фиг. 12С



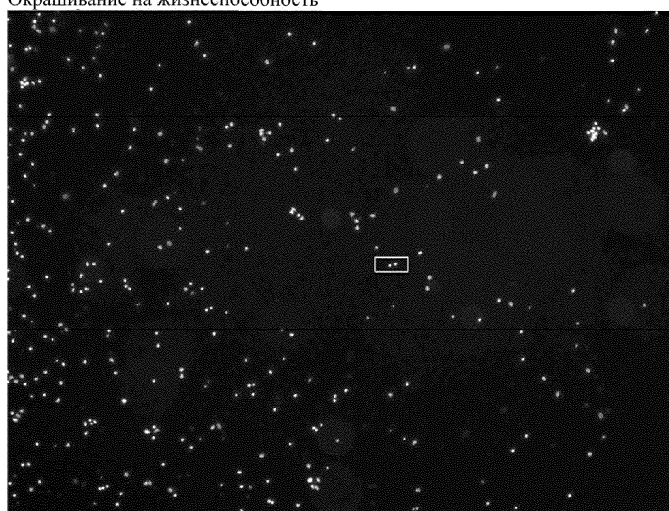
Фиг. 12D



Фиг. 13



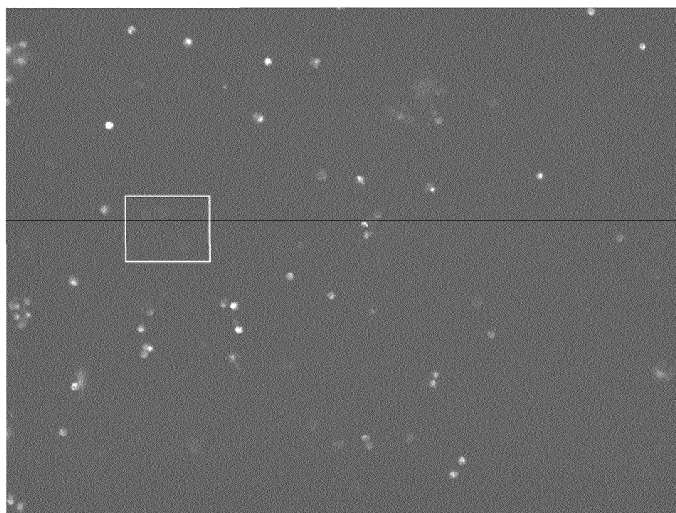
Окрашивание на жизнеспособность



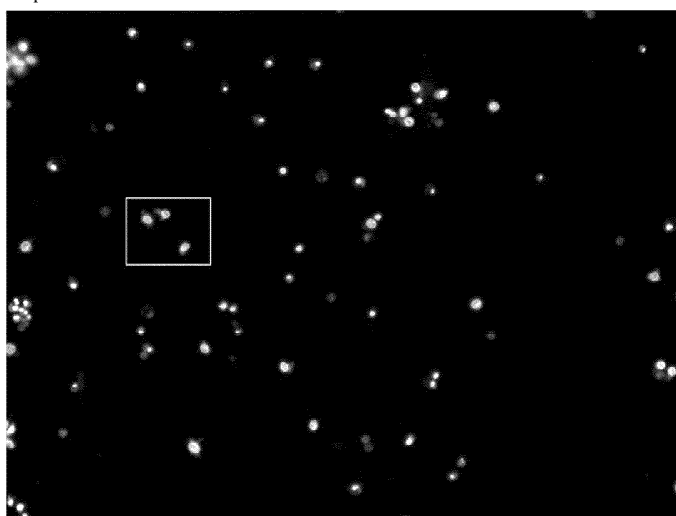
Ядерное окрашивание

10x

Фиг. 14А



Окрашивание на жизнеспособность



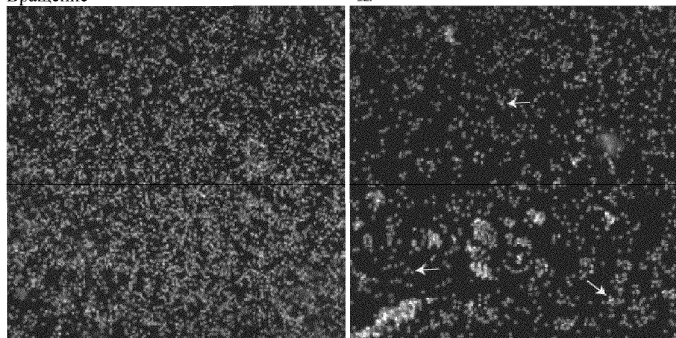
Ядерное окрашивание

20x

Фиг. 14В

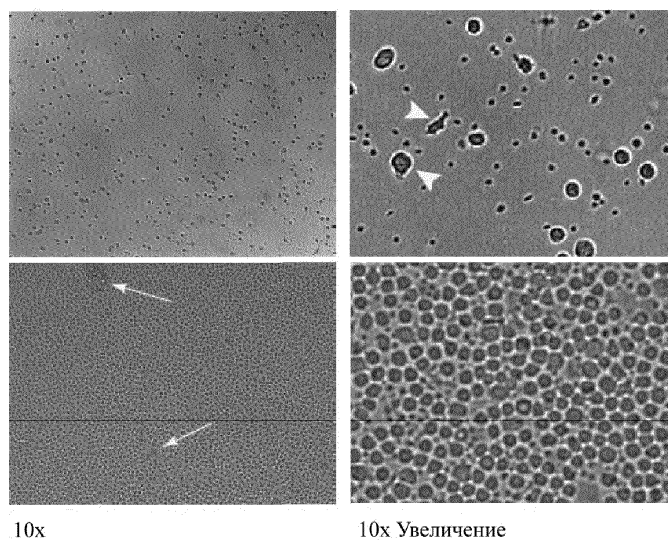
Вращение

SLP

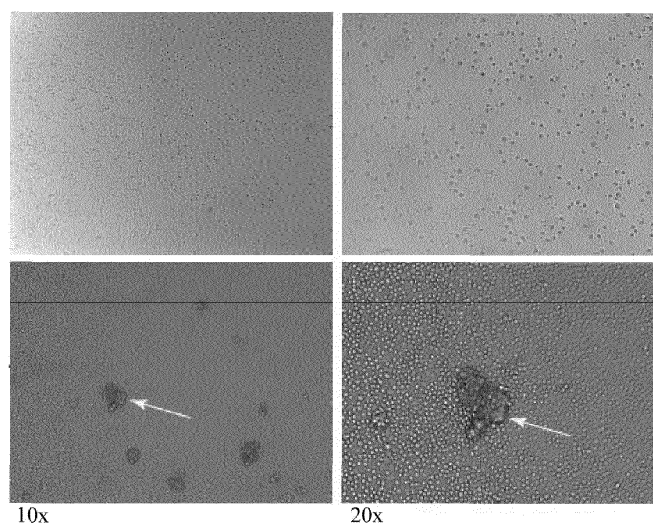


Стрелка – иллюстративные природные взаимодействия, потерянные при вращении планшета

Фиг. 15А

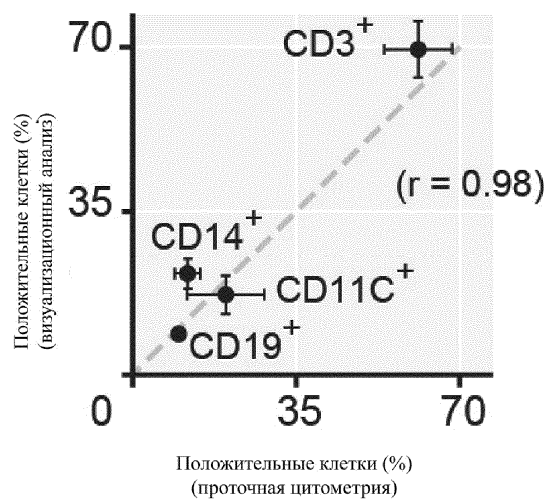


Стрелка – скопление
 Наконечник стрелки – морфологические характеристики
 Фиг. 15В

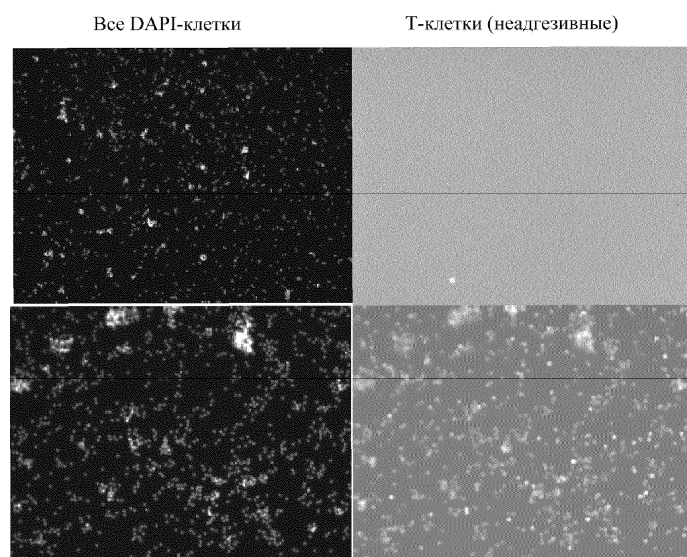


Стрелка – скопления

Фиг. 15С



Фиг. 16



Фиг. 17

