

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680040388.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101389959A

[22] 申请日 2006.11.2

[21] 申请号 200680040388.1

[30] 优先权

[32] 2005.11.4 [33] US [31] 11/267,948

[86] 国际申请 PCT/US2006/043050 2006.11.2

[87] 国际公布 WO2007/056192 英 2007.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2008.4.28

[71] 申请人 贝克曼考尔特公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 西北大学 健康网络大学

西储大学 阿勒格尼辛格研究所

[72] 发明人 查尔斯·古尔斯比

文森特·T·尚奇 戴维·赫德利

詹姆斯·雅克伯格 斯坦利·沙克尼

[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

代理人 傅强国 涂勇

权利要求书6页 说明书22页 附图8页

## [54] 发明名称

用于血癌分析与临床处理的细胞抗原及靶信号转导蛋白的复合分布

## [57] 摘要

本发明的目的在于提供一种为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布的方法。本发明的复合标志物分布可以用于鉴别个体的肿瘤性转化状态相关亚群的预后和治疗、以及预测个体的疾病进程。本发明的方法为罹患肿瘤性转化状态的个体提供用于选择治疗方式的工具，包括确定危险人群的方法、预测复发风险增加的方法、预测发生继发性并发症风险增加的方法、为个体选择治疗方案的方法、确定对个体治疗效果的方法、确定个体的预后的方法。特别地，本发明的方法公开了一种建立复合标志物分布的方法，其可用作预后指示来预测个体肿瘤性转化状态的进程是攻击性还是惰性，从而帮助临床工作者处理病人和评估将要

发明的目的在于建立用于白血病的复合标志物分布，该白血病选自慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CML) 和急性骨髓性白血病 (ALL) 所构成的组。

1. 一种为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；

(b) 通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，所述标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；以及

(c) 将每个正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与一靶蛋白的存在关联起来，从而为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白为活化磷酸化信号转导蛋白。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进一步包括确定靶蛋白修饰方式。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述癌选自慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性骨髓性白血病 (CML)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 所构成的组。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述细胞群相关标志物包括选自下组的细胞表面标志物：CD3、CD5、CD10、CD11b、CD13、CD15、CD14、CD15、CD16、CD19、CD22、CD23、CD56、CD45、CD33、CD34、CD15、CD16、MPL (髓过氧化物酶)、CD64、CD79a、CD79b 和 CD117 (c-kit 受体)。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述标志物进一步包括 $\kappa$ -和 $\lambda$ -免疫球蛋白轻链以用于检测克隆性。

7. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述癌为 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL)。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白选自 ZAP-70、激活诱导的 C-型凝集素 (AICL)、脂蛋白脂肪酶以及 IM68532 所构成的组。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 所述 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 是 Ig-突变的 B-CLL。

10. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞群相关标志物选自由 CD3、CD5、CD19、CD23、CD38、CD56、CD79b 和 fmc7 所构成的组。

11. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述细胞群相关标志物可以鉴定包括白血病 B 细胞的细胞群。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其特征在于, 所述白血病 B 细胞呈 ZAP-70 阳性。

13. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述的一种或多种细胞群包括 ZAP-70 阴性细胞群。

14. 如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述的一种或多种细胞群包括正常 B 细胞。

15. 如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于, 所述 ZAP-70 阴性细胞群包括粒细胞。

16. 一种用于预测个体 Ig 未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 临床进程的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 提供来自于该个体的生物样品;

(b) 使生物样品与结合分子集反应, 其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子, 其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群;

(c) 通过检测标志物水平和标志物结合情况, 来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在, 所述标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群;

(d) 将每个正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与至少一种信号转导蛋白的存在关联起来, 从而为来自疑有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 的个体的样品建立复合标志物分布, 其中该复合分布代表了所述信号转导蛋白水平的相对量化; 以及

(e) 将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较, 其中该比较可以用于预测 Ig 未突变的 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的临床进程。

17. 一种为从疑有慢性骨髓性白血病 (CML) 的个体所获得的样品建立复合标志物分布的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；

(b) 通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；  
以及

(c) 将每个正常细胞群的和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为来自疑有慢性骨髓性白血病（CML）的个体的样本建立复合标志物分布，其中所述靶蛋白选自由活化磷酸化信号转导蛋白、增殖标志物、分化标志物和凋亡标志物所构成的组。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述细胞群相关标志物选自由 CD45、CD34、CD11b、CD13、CD15、CD14、CD33、CD79a、CD79b、CD22、CD10、CD16、Bcr/Abl 和 TdT 所构成的组。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是活化磷酸化信号转导蛋白。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述活化磷酸化信号转导蛋白选自由 Abl、CRKL、Hck、STAT1、STAT3、STAT5、Akt/PKB 以及 S6 所构成的组。

21. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是增殖标志物或凋亡标志物。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是选自由细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白 A2 所构成的组的增殖标志物。

23. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是选自由胱天蛋白酶-3 和 Bcl-XI 所构成的组的凋亡标志物。

24. 一种为个体预测慢性骨髓性白血病（CML）的临床进程的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 提供来自于该个体的生物样品；

(b) 使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；

(c) 通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，其中所述标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；

(d) 将每个正常细胞群的和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为从疑有慢性骨髓性白血病（CML）的个体所获得的样品建立复合标志物分布，其中所述靶蛋白选自由活化磷酸化信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组；以及

(e) 将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测慢性骨髓性白血病（CML）的临床进程。

25. 一种为从疑有急性骨髓性白血病（AML）的个体所获得的样品建立复合标志物分布的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；

(b) 通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，其中所述标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；以及

(c) 将每个正常细胞群的和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为来自疑有急性骨髓性白血病（AML）的个体的样品建立复合标志物分布，其中所述靶蛋白选自由活化磷酸化信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述细胞群相关标志物选自由 CD45、CD33、CD34、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、MPL（髓过氧化物酶）、CD64 和 CD117（c-kit 受体）所构成的组。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其特征在于，所述细胞群相关标志物可以鉴别包含白血病粒细胞或白血病单核细胞的细胞群。

28. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是活化磷酸化信号转导蛋白。

29. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于，所述活化磷酸化信号转导蛋白选自由 Abl、CRKL、Hck、STAT1、STAT3、STAT5、Akt/PKB 以及 S6 所构成的组。

30. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是增殖标志物或凋亡标志物。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其特征在于，所述靶蛋白是选自由细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白 A2 所构成的组的增殖标志物。

32. 如权利要求 30 所述的方法，其特征在于，所述的该靶蛋白是选自由胱天蛋白酶-3 和 Bcl-X1 所构成的组的凋亡标志物。

33. 一种为个体预测急性骨髓性白血病（AML）的临床进程的方法，该方法包括以下步骤：

(b) 使从该个体获得的生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；

(c) 通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，其中所述标志物水平和结合情况可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；

(d) 将每个正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为从疑有急性骨髓性白血病（AML）的个体所获得的样品建立复合标志物分布，其中所述靶蛋白选自由活化磷酸化信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组；以及

(e) 将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测急性骨髓性白血病（AML）的临床过程。

34. 一种试剂盒，用于建立如权利要求 1 所述的复合标志物分布，该试剂盒包括：

(a) 结合分子集合，其中该结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中该标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群，以及

(b) 至少一种对靶蛋白具有特异性的结合分子，用于为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布。

35. 如权利要求 34 所述的试剂盒，其特征在于，所述肿瘤性转化状态选自由白血病、淋巴瘤和多种骨髓瘤所构成的组。

36. 如权利要求 35 所述的试剂盒，其特征在于，所述白血病选自慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）所构成的组。

37. 如权利要求 34 所述的试剂盒，其特征在于，所述细胞群相关标志物包括细胞表面标志物。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其特征在于，所述细胞表面标志物选自 CD3、CD5、CD10、CD11b、CD13、CD15、CD14、CD15、CD16、CD19、CD22、CD56、CD45、CD33、CD34、CD15、CD16、MPL（髓过氧化物酶）、CD64、CD79a、CD79b 和 CD117（c-kit 受体）所构成的组。

## 用于血癌分析与临床处理的细胞抗原及靶信号转导蛋白的复合分布

### 背景技术

白血病是骨髓和血液中的一种恶性肿瘤。白血病表现为异常白细胞的过度增生，充满骨髓和/或外周血。这导致正常血细胞的生长减少和功能减弱。慢性淋巴细胞性白血病（CLL）是人类罹患的四种主要类型白血病中的一种，其余为急性骨髓性白血病（AML）、慢性髓性白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）。

白血病患者经历不同的临床进程。白血病的治疗很复杂并且取决于白血病类型。在白血病患者中发现缓解期存在大量的临床可变性，哪怕是在那些接受了一个疗程治疗的患者身上也会发生。有的患者在没有接受确切治疗的情况下能够存活很长时间，而有的患者接受攻击性治疗后仍然迅速死亡。那些对治疗有抗性的患者只能存活很短时间，不管抗性何时发生。虽然目前已有各种的分期系统用于对付这种临床多样性，但是它们并不能精确地预测一个早期或中期的患者是否经历疾病的惰性期还是攻击期。确切的说，因为这些系统考虑了疾病的总体表现，包括血液水平和骨髓中淋巴细胞计数、淋巴结的大小及分布、脾的大小、贫血度数以及患者血液中血小板数，它们只能通过当疾病发展到更进一步的状态时采用有限的预测结果来鉴别病人。

慢性淋巴细胞白血病（CLL）是美国和欧洲最常见的白血病，2004年美国新诊断的CLL患者超过1万人，其中大多数患者为40岁以上的男性。CLL表现为小淋巴细胞的克隆性增生，大部分显明与B-淋巴细胞亚型一致的表面标志物CD5和CD19。在大多数病例中，疾病呈现一种惰性状态，患者在不接受确切治疗的情况下仍能存活较长时间。此外，性别与CLL相关，因为患者中男女比例约为2:1。在少数病例中，尽管接受攻击性治疗，但疾病仍呈现迅速发展情况频繁发生在年轻患者身上。在大多数情况下，疾病呈现缓慢发展的状态，并且在若干年内都不会引起患者不舒适或者疼痛的感觉。

CLL表现为大量的癌性成熟淋巴细胞和变大的淋巴结。癌细胞淹没了骨髓和淋巴结中的正常细胞。患者发生贫血，而且血液中正常白细胞和血小板的数目减少，但是由于异常白细胞的增殖导致血液总白细胞数增加。抗体的水平和活性也会下降。因此，患者的免疫系统受损。CLL患者经常死于受损免疫系统带来的后果如感染等，而不是CLL本身。

CLL的临床阶段的特征有Rai分期系统（0-IV期）和Binet分期系统（A-C期），其仍然是CLL患者强大的预测者。这两个系统都是基于相关淋巴组织的数量和贫血和/或血小板减

少的表现。总而言之，晚期患者具有明显的不良预后和短期存活。Rai 分期中IV期患者或者Binet 分期中 C 期患者平均存活时间为 1.5 到 2 年。

目前，仍没有一个已知的针对 B-CLL 的治疗，其能明显延长患者的存活期望。因此，只对归为 B-CLL 高级阶段的患者考虑进行攻击性治疗，包括化疗、放疗、手术、免疫治疗或移植。这些治疗措施可能会让患者产生生理和情绪上的严重代价，但是却不能取得必要的好转结果；在某些病例中，B-CLL 患者甚至死于这些治疗的严酷性，而不是死于 B-CLL 的影响。B-CLL 早期的患者，因为具有较好的生理状态，所以能接受攻击性或者实验性治疗，只要状态维持稳定，他们通常不接受治疗，原因有两个：第一，目前可用的治疗并不能延长存活期；第二，目前还不能为早期患者是否会好转或者恶化提供可靠的指示。进一步说，疾病不可预知的进程可以为临床治疗困难的结果提供解释，因为一些早期病人甚至在不接受治疗的情况下将进入惰性期。

考虑到白血病患者临床进程的多样性以及缓解期的巨大可变性，用于预测个体疾病进程的可靠的指示体系的需求变得重要，它可以帮助临床工作者鉴定出将进入发展状态的患者，并让他们能够选择在疾病的更早期接受攻击性或实验性治疗。此外，临床治疗中，可以根据患者预后情况，针对患者使用新药或者实验性治疗手段，从而发现临床治疗中的更多相关结果。

本发明满足了这种需求并且带来了相关的优点。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布的方法。本发明的复合标志物分布可以用于鉴别个体的肿瘤性转化状态相关亚群的预后和治疗、以及预测个体的疾病进程，本发明的方法为罹患肿瘤性转化状态的个体提供用于选择治疗方式的工具，包括用于确定危险人群的方法、预测复发风险增加的方法、预测发生继发性并发症风险增加的方法、为个体选择治疗方案的方法、预测个体对治疗的反应的方法、确定对个体治疗效果的方法、确定个体的预后的方法。特别地，本发明的方法公开了一种建立复合标志物分布的方法，其可用作预后指示来预测个体的肿瘤性转化状态的进程是攻击性还是惰性，从而帮助临床工作者处理病人和评估将要使用的治疗形式。

在特别公开的实施方式中，本发明的目的在于建立用于白血病的复合标志物分布，该白血病选自慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）所构成的组。公开的本方法所建立的复合标志物

分布可以用在罹患白血病的个体临床处理所有方面，包括：例如，确定罹患白血病的个体为白血病危险群体、预测罹患白血病的个体是否有复发的高风险、预测罹患白血病的个体是否有发生继发性并发症的高风险；这些本方法为罹患白血病的个体确定预后提供帮助、为罹患白血病的个体选择治疗方案、为接受一项或多项白血病治疗的个体监测疾病状态。

### 附图说明

图 1 为用于显示建立复合标志物分布的样品制备方法的示意图。

图 2 为由用于一例 CLL 样品中 ZAP-70 分析的门控策略方案所获得的流式细胞仪面板。

图 3 为由用于 CLL 样品中 ZAP-70 分析的门控策略所获得的流式细胞仪面板。

图 4 为描述一例 CLL 样品中存在的细胞空间中 ZAP-70 表达情况的示意图。（红色：B 细胞；绿色：正常 T 细胞；紫色：NK 细胞）

图 5 为描述一例 AML 样品中 mTOR 激活 S6 情况的流式细胞仪面板。

图 6 为外周血中动员干细胞（CD34+）的复合分布示意图。直方图提供了与未处理样品（红）相比，在用 PMA（蓝）、干细胞因子（绿）、或 IGF-1（橙）激活后每个动员干细胞、正常粒细胞、正常单核细胞和正常淋巴细胞中三种信号转导蛋白 P-ERK、P-S6 和 P-PKB/AKT 的反应情况比较。

图 7 为单个 AML 患者的复合分布示意图。等分血样用 PMA 刺激，用或者不用特异性信号转导通路抑制剂（图例见右下角）刺激，或用于干细胞因子刺激。反应结果用 P-ERK 对 P-S6 的双边量散点图检测（右侧面板），红色群表示 AML 胚细胞，蓝色表示内在淋巴细胞，绿色表示内在粒细胞。AML 胚细胞（红）、淋巴细胞（蓝）和粒细胞（绿）通过使用左边两个框中描述的 CD34 侧向散射来鉴定。

图 8 为 CLL 中 ZAP-70 表达的复合分布示意图。绿色：CD5 阴性 B 细胞；蓝色：CD5+B 细胞；粉色：T 细胞（CD5+/CD3+）；紫色：NK 细胞（CD5 阴性/CD56+）。每一个独立地被换算成亚型产生次数的柱状图显示出了重叠柱状图。

### 具体实施方式

本发明的目的在于提供用于为从疑有肿瘤性转化状态的个体得到的样品建立复合标志物分布的方法。本发明中的复合标志物分布可用来鉴别个体的肿瘤性转化状态预后和治疗相关亚群、以及用来预测个体的临床进程。本发明的方法为罹患肿瘤性转化状态的个体提供用于临床处理的工具，包括用于确定危险人群的方法、预测复发风险增加的方法、预测发生继发性并发症风险增加的方法、为个体选择治疗方案的方法、确定对个体治疗效果的方法、确定

个体预后的方法。

某种意义上，本发明基于这样一个发现：明显的细胞群相关标志物的出现与一种或更多选出的靶蛋白质相关联，这样就有可能制备一种复合标志物分布，该分布根据不同样品间的内在细胞群的阳性和阴性比较而表现为一种定量检测。

特别地，本发明的方法公开了一种建立复合标志物分布的方法，该复合标志物分布可作为一种预后指示物，用来预测个体的肿瘤性转化状态的临床进程是将具有攻击性还是惰性，从而帮助临床工作人员处理患者并评估将要使用的治疗形式。

在这里公开的实施方式中，本发明的方法目的在于建立用于白血病的复合标志物分布，该白血病选自由慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、急性淋巴细胞性白血病（ALL）所构成的组。通过公开的方法而建立的复合标志物分布可以用在罹患白血病的个体临床处理的所有方面，包括：比如，确定罹患白血病的个体为白血病危险群体、预测罹患白血病的个体是否具有复发的高风险、预测罹患白血病的个体是否具有发生继发性并发症的高风险；这些方法为罹患白血病的个体确定预后提供帮助、为罹患白血病的个体选择治疗方案、为接受一项或多项白血病治疗的个体监测疾病状态。

通过本发明的方法而建立的复合标志物分布包括将生物样品与一结合分子集发生反应，其中该结合分子集包括两组或两组以上对明显的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子。标志物的水平和标志物的结合可以鉴别出样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群，并且可以用于通过检测鉴别标志物水平和标志物结合情况来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，所述结合情况可鉴别样品内部正常细胞群和肿瘤性转化细胞群。最终，通过将每个正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与靶蛋白的存在相关联，本发明的方法可以为从疑有肿瘤性转化状态的个体所得到的样品建立复合标志物分布。

本发明的方法建立的复合分布具有预料不到的优点，并且基于生物样品中细胞标志物的存在，解决了疾病进程预测中遇到的各种困难。如此所说，本发明的靶蛋白可以通过参照样品中含有的、并且已知对所研究的细胞靶呈阴性和阳性的多种细胞群，来确定所研究的细胞靶的半定量水平。如本方法所述，所研究的细胞靶的存在和水平分别与样品中的多个阳性细胞群相关联，所述阳性细胞群为包含样品中的细胞群、以及特征为所研究的细胞靶水平可变的细胞群。此外，本方法将所研究的细胞靶分子的存在和水平与样品中一种或更多的已知呈靶蛋白阴性的内在细胞群相关联。因此，本发明的方法不是使用不相关的抗原来提供定量的内参，而是把多个对所研究的细胞靶呈阳性的内在细胞群联系起来，并可用于根据个体的复合分布来生成靶向治疗策略。本发明的方法可以用来对样品内具有阴性或阳性细胞群参照的

任何细胞靶进行定量。

在一个具体实施方式中，本发明提供了一种为从疑有肿瘤性转化状态的个体身上获得的样品建立复合标志物分布的方法，其包括如下步骤：使生物样品与结合分子集进行反应的步骤，其中所述结合分子集包括两组或两组以上的对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，并且其中标志物水平和标志物结合情况可鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；通过检测标志物水平和标志物结合情况来鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的存在，其中所述标志物水平和结合可鉴别样品内部正常细胞群和肿瘤性转化细胞群；以及然后将每个正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与靶蛋白的存在关联起来，从而建立复合标志物分布。

在一个特别的具体实施方式中，本发明的方法应用于一种进一步被定义为“血癌”的癌症，该术语是指造血组织的恶性肿瘤，包括白血病、淋巴瘤和多种骨髓瘤。白血病包括急性骨髓性白血病或急性髓细胞白血病（AML）、慢性骨髓性白血病或慢性髓细胞白血病（CML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性淋巴细胞性白血病（ALL）、毛细胞白血病（HCL）、胚芽型骨髓增生异常综合征（MDS）或慢性骨髓性白血病（CML-BP）、和通过形态学、组织学以及免疫学技术等本领域技术人员所定义的这些白血病的所有亚型。在本发明的一个特别具体实施方式中，血癌选自由慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）所构成的组。

最初白血病根据预期存活时间分为急性或慢性，但是现在根据细胞成熟度区分。急性白血病主要由未成熟细胞（通常为胚细胞形式）组成，而慢性白血病含有更多的成熟细胞。急性白血病表现为未成熟血细胞的快速生长。这种大量未成熟细胞的生长使骨髓不能产生健康的血细胞。急性白血病进一步分为成淋巴细胞性（ALL）和髓细胞性（AML）类型，其可根据法-美-英（FAB）分类法或免疫显型法的形态学和细胞化学表现而进一步细分。将特异的T细胞、B细胞和骨髓性抗原的单克隆抗体与流式细胞术结合起来，对于区分ALL和AML非常有帮助，这种区分对治疗至关重要。

急性白血病包括急性淋巴细胞性白血病（ALL）和急性骨髓性白血病（AML）。白血病细胞在骨髓中聚集，取代正常的血液细胞，并且扩散至肝脏、脾脏、淋巴结、中枢神经系统、肾脏以及性腺。因为这些细胞来自血液，因此它们可以渗透到任何一个器官和部位。ALL通常浸染中枢神经系统，而急性单核细胞白血病会浸染齿龈，而AML可以包括在任何部位形成的聚集体（粒细胞肉瘤或绿色瘤）。

慢性白血病分为慢性淋巴细胞性白血病（CLL）或慢性骨髓性白血病（CML）。CLL包

括涉及淋巴结和其余淋巴组织的外观成熟淋巴细胞的克隆性扩张，与对骨髓的进展性渗透有关并出现在外周血中。对 CLL 的传统描述已经成为最常见的亚型，特别是 B 细胞的形式几乎在所有病例中可见。在 2%到 3%的病例中，类型表现为 T 细胞的克隆性扩张，而且此类型依然具有亚型，特别是随血球减少的大颗粒淋巴细胞。另外，其他慢性白血病的形式也被归类到 CLL 名下：前淋巴细胞白血病，皮肤 T 细胞淋巴瘤的白血病样阶段（Sezary 综合症），毛细胞白血病，淋巴瘤白血病（恶性淋巴瘤发展阶段的白血病样改变）。这些典型 CLL 亚型的分化通常很容易辨别。

在一个具体实施方式中，本发明提供了一种方法，包括：通过使生物样品与结合分子集反应，从而为来自疑似 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病个体的样本建立复合标志物分布，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子；接着通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物结合情况可识别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；并且使正常和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与 ZAP-70 的存在相关联，从而为来自疑似 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）个体的样本建立复合标志物分布。

B-CLL 的特征表现为 CD5+细胞的克隆积累（Caligaris-Cappio, et al, J Exp Med 155: 623-8, 1982）。特异性细胞表面标志物的表达可以区别出人类 B 细胞的亚型，该亚型在不同分化和激活阶段是不同的，并且具有生物学特性（Clark and Lane, Ann Rev Immunol 9:97-127, 1991）。特别地，CD38 和 IgD 表达的分析在辨别 B 细胞处于从幼稚到成熟细胞的各个分化阶段中尤其有用（Pascual, et al., J Exp Med 180:329-339, 1994; Zupo, et al., Blood, 88:1365-1374, 1996）。

在另一个具体实施方式中，本发明提供了一种方法，包括：通过使生物样品与结合分子集反应，从而为来自疑似 CML 个体的样本建立复合标志物分布，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合情况可识别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；接下来通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；并且使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为来自疑似 CML 个体的样本建立复合标志物分布。在该实施方式中，该靶蛋白可选自由活化磷酸化信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组。

慢性骨髓性白血病（CML）是一种具有明显不同于其他种类白血病的临床和病理特征的白血病。普遍认为 CML 的病因是由于人 9 号染色体和 22 号染色体之间的特异性染色质易位。

易位后产生的异常染色体常常被叫做费城染色体 (Darnell, J. et al., *Molecular Cell Biology*, 2nd Ed., W. H. Freeman and Co., New York(1990), p. 992)。C-abl (ABL) 基因, 一个据认为有关生长调控的酪氨酸激酶, 定位于人 9 号染色体的末梢臂上, 而 c-bcr (BCR) 基因定位于 22 号染色体。易位将 ABL 启动子末梢包括编码酪氨酸激酶结构域的元件的三个外显子置于 BCR 的第一或者第二外显子的下游 (Chung, S. and Wong, P. M. C., *Oncogene*, 10:1261-1268 (1995))。人类 9 号和 22 号染色体间的易位产物是一个嵌合基因, BCR-ABL, 其编码一个融合蛋白, 取决于是否包含 BCR 的第二个外显子, 通常写作 p185<sup>bcr-abl</sup> 或者 p210<sup>bcr-abl</sup> (Bartarm, C. R., et al., *Nature*, 306:277-280(1983))。p185<sup>bcr-abl</sup> 会导致急性白血病, 典型的是成淋巴细胞性白血病; p210<sup>bcr-abl</sup> 通常导致 CML, 但是偶尔也能导致急性白血病。

CML 涉及恶性多能干细胞转化导致的克隆性骨髓增生, 临床特征为粒细胞的过度产生, 主要在骨髓, 也可见于髓外组织, (比如脾脏、肝脏)。尽管粒细胞增殖占主要地位, 但肿瘤性转化克隆还涉及 RBC、巨核细胞、单核细胞、甚至一些 T 和 B 细胞。正常干细胞仍然存在, 而且可以在药物抑制 CML 克隆后仍然会出现。骨髓富含细胞, 但是 20-30% 的病人会发生骨髓纤维变性, 通常是在几年后。对大多数病人而言, CML 复制会进入一个加速阶段, 最终导致胚细胞危机。在这时, 胚细胞瘤会发展至髓外组织, 包括骨、中枢神经系统 CNS、淋巴结和皮肤。

慢性髓性白血病 (CML) 表现出一个特别的病程, 最初为慢性粒细胞增生症, 然后总是由于某个低分化显型 (即, 疾病的胚细胞危象阶段) 的细胞克隆性扩增而进化为急性白血病。CML 是一个不稳定的疾病, 最终进行到终末阶段, 表现为急性白血病。2004 年, 在美国, 这个致命的疾病影响了大约 9730 位患者。化疗药物例如羟基脲和白消安可以降低淋巴细胞载量, 但是不影响患者的生存期 (例如大概 4 年)。所以, CML 患者是骨髓移植 (BMT) 疗法的候选人。但是对于 BMT 生存患者而言, 疾病复发仍然是一个主要的障碍 (Apperley et al., 1988 *Br. J. Haematol.* 69, 239)。

在另一个具体实施方式中, 本发明提供了一种方法, 包括: 通过使生物样品与结合分子集反应, 从而为来自疑似 AML 个体的样本建立复合标志物分布, 其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子, 其中标志物水平和标志物结合情况可识别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群; 接下来通过检测标志物水平和标志物结合情况, 来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在, 其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群; 并且使正常和肿瘤性转化细胞群标志物水平与至少一种靶蛋白的存在联系起来, 从而为来自疑似急性髓性白血病 (AML) 个体的样本建

立复合标志物分布。在该实施方式中，该靶蛋白可选自由信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组。

在另一个具体实施方式中，本发明提供了一种方法，包括：通过使生物样品与结合分子集反应，从而为来自疑似急性淋巴细胞白血病（ALL）个体的样本建立复合标志物分布，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合情况可识别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；接下来通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；并且使正常和肿瘤性转化细胞群标志物水平与至少一种靶蛋白的存在联系起来，从而为来自疑似 ALL 个体的样本建立复合标志物分布。在该实施方式中，该靶蛋白可选自由信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组。

在这里，术语“肿瘤性转化状态”指的是一种与细胞增殖有关的状态，其特征为正常控制的缺失，该缺失会导致一种或者多种症状，包括：不可调节的生长，分化缺失，所在组织侵袭，和转移。像在这里描述的那样，当为来自疑似有肿瘤性转化状态个体的样本建立复合标志物分布时，生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中相关标志物可鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群。

生物样品最好直接采集于个体，特别是被怀疑有癌症的个体，并且接下去以合适的方式为该样品建立复合分布。在一个具体实施方式中，生物液体可以是，例如，全血、外周血单个核细胞（PBMCs）、骨髓穿刺物或者淋巴组织。合适的生物液体包括任何身体组织或体液。在优选的实施方式中，身体组织可以是骨髓抽吸物、骨髓活检切片、淋巴结穿刺物、淋巴结切片、脾脏组织、细针穿刺物、皮肤活检切片或者器官组织活检切片，组织部分和脱落细胞。其他实施方式包括的体液样品是外周血、淋巴液、腹水、血浆和脑脊髓液。就急性白血病而言，全血和骨髓穿刺物是特别合适的生物样品。在一个生物样品包含全血的实施方式中，提供的样品可以包括固定和渗透的白细胞和红细胞的裂解液。可以理解的是，提供的包含很高水平红细胞的生物样品可以通过处理来去除红细胞，例如，通过低渗透压裂解、去垢剂处理和密度-梯度离心。

如同这里描述的那样，在本发明的方法中，生物样品与结合分子集相接触，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中相关标志物可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群。这里使用的术语“结合分子”指的是任

何可以通过足够的亲和力与抗原结合从而现示出选择性结合活性的分子。结合分子的例子包括抗体、抗体片段和抗体样分子。抗体可以通过 B 细胞、杂交瘤产生，并且可以是嵌合抗体或人源化抗体或其任何片段，例如，F(ab')<sub>2</sub> 和 Fab 片段、以及单链或单一结构域抗体。

在实践本发明方法中的有用结合分子可以是单链抗体，它由抗体的重链和轻链可变区通过一个通常含有 10 至 30 个氨基酸、优选为 15-25 个氨基酸的连接肽进行共价结合。所以，这样一个结构不包括重、轻链的恒定区，而且据认为这个小肽间隔区相比完整恒定区具有较弱的抗原性。在实践本发明方法中的有用结合分子也可以是嵌合抗体，它是这样一种抗体：重链或者轻链或两者的恒定区皆来源于人，而重、轻链的可变区都不是人源性的，比如是鼠源性的。在实践本发明方法中的有用结合分子还可以是人源化抗体，它的高变区（CDRs）不是人源性的，比如，是鼠源性的，而它的所有或者几乎所有其他免疫球蛋白部分、特别是恒定区和可变区的高度保守区域（特别是架构区域），是人源性的。人源化抗体可以在挨着高变区的架构区域保留一点来源于小鼠序列的氨基酸。高变区可以与任何架构区域相联，最好是鼠源性或者人源性的架构区域。合适的架构区域是众所周知的，在现有技术中也有描述。所有前面提到的结合分子都适于实践本发明的方法。

本发明方法中使用的结合分子集合包含两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，所述标志物可以辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群。这里使用的术语“细胞群相关标志物”指的是这样一种抗原，其单独或者与一个或者几个不同的抗原组合在一起用于依靠被选择性地结合于结合分子而辨别在生物样品内部的一个或更多细胞群。如本领域的技术人员理解的那样，细胞群可以基于与独特的标志物，例如，展示在细胞表面的细胞表面标志物进行结合而被识别。对于急性白血病而言，细胞群相关标志物包括，例如，CD45、CD2、CD3、CD7、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD33、CD34、CD56、CD71、CD117、HLA-DR。取决于使用者，可以加入补充标志物，例如，CD1a、cCD3、CD4、CD5、CD8、cCD22、CD61、血型糖蛋白 A 和 TdT。如同这里描述的，对于来自于疑似 AML 个体的生物样品，对于建立复合分布有用的细胞群相关标志物可以包括，例如，CD45、CD33、CD34、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、MPL（髓过氧化物酶）、CD64、CD117（c-kit 受体）。另外，对于 M6-M7 型白血病，取决于使用者，可以加入标志物例如 CD41、CD42、CD61、CD62P、CD71、血型糖蛋白 A、血红素。应当理解，当样品细胞性有限时，几乎没有标志物可以被分析。对于通过流式细胞术来鉴别和定量细胞群而言，CD 分子是方便的诊断标准物。流式细胞术是用于计数、检查和分类悬浮在液流中的显微微粒的技术。流式细胞术程序开始于细胞或者组织的获得，经过染色和洗涤，接下来通过在流式细胞仪上获得

流体数据，并且以数据分析和报告结果而告终。

在实施这里所说的方法时，所研究的细胞群包括不同种类的白细胞，特别是粒细胞，淋巴细胞和单核细胞。有三种粒细胞：中性粒细胞，嗜酸粒细胞和嗜碱粒细胞。白细胞还包括淋巴细胞，其包括 B 细胞、T 细胞和自然杀伤细胞。自然杀伤细胞或“NK 细胞”是健康个体内包含 2-15%外周血单核细胞的大颗粒淋巴细胞。虽然大多数 NK 细胞是 CD3<sup>+</sup>TCR<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>，在这个群体中仍然有相当的表型和功能异质性 (Trinchieri, *Adv. Immunol.*, 47:187 (1989))。例如，人们发现 CD56 的表面密度限定了功能独特的 NK 细胞群。CD56<sup>bright</sup> NK 细胞大部分是 CD16<sup>+</sup>，其为无颗粒淋巴细胞，在细胞溶解效应功能方面有缺陷，其在对外源性 IL-2 的反应上会剧烈增殖。CD56<sup>dim</sup> NK 细胞是具有潜在的细胞溶解效应功能的 CD16<sup>+</sup> LGLs，其在对 IL-2 的反应上不增殖。因为一些 T 细胞同时表达 CD16 和 CD56，这些分子本身不能限定 NK 细胞群(Trinchieri,1989)。另外，因为在功能分化的 NK 细胞群上 CD56 的表达较低，单克隆抗体与 CD56 的反应性不能可靠地用于将样品中 NK 细胞的亚群与其他细胞区分开来。除了能够区分正常细胞群外，在本发明的方法中可以使用结合分子，以便鉴定样品内部的肿瘤性转化细胞群。对于通过流式细胞术鉴别和定量细胞群而言，CD 分子是方便的诊断标准物。在本发明优选的实施方式中，细胞群相关标志物表达水平，例如 CD38<sup>+</sup>对于 B-CLL 的表达，是通过使用流式细胞术决定的，该过程中，细胞被标记了连接有荧光染料或者酶的单克隆抗体，虽然可见免疫荧光法或者其他方法也可以使用。在具体的实施方式中，分析了生物样品，用于分析细胞群相关性标志物结合性的表面表达，例如，通过多色免疫荧光，使用对某个特定细胞型相关群体具有特异性的结合分子集合进行分析。应当理解，结合分子的任何结合性都可以进行选择，所述结合性对于在生物样品中鉴别特定细胞性相关群体具有特异性。

如同这里描述的那样，对于来自于疑似 CLL 的个体的生物样品，对于建立其复合分布，有用的细胞群相关标志物可以包括：例如，用于鉴别 T 细胞的 CD3，用于鉴别正常 T 细胞和恶性 B 细胞的 CD5，用于鉴别正常 B 细胞和恶性 B 细胞的 CD19，用于鉴别正常 NK 细胞的 CD56，用于鉴别激活的 B 细胞或者滤泡外套层 B 细胞的 CD23，用于鉴别细胞激活和分化的 CD38，作为细胞质 B 细胞系标志物的 CD79b，作为正常 B 细胞系标志物并且是特征性地在 B-CLL 中呈阴性的 FMC7。所以，对于鉴别 B-CLL 中细胞群有用的标志物结合包括：CD5 阳性与 CD19 阳性；CD5 阳性与 CD20 阴性；CD3 阳性或者 CD56 阳性；以及 CD3 阳性。

这个方法可以通过使用任何含有 B-CLL 细胞的组织而实现，所述组织包括但不限于脾脏、淋巴结、骨髓、淋巴液、外周血、来自于个体的全血样品、或者经过处理并进行外周血

单核细胞（PBMC）分离的全血样品。

作为早期造血前体细胞的肿瘤性转化结果，慢性髓性白血病（CML）的临床特点表现为外周血循环中未成熟和成熟的髓样细胞积累，细胞遗传学特点为费城染色体的出现。在 CML 中可表达髓系抗原 CD33、CD13、CD11、CD45 和它的同种型 CD45RO，但不表达有助于分辨 CML 与急性髓性白血病（AML）的 CD45RA。因为 CML 细胞表达 HLA-DR，它们可以与正常骨髓前体相区别。在本发明涉及疑似 CML 个体的实施方式中，细胞群相关标志物选自下组：用于鉴别未成熟或者“胚”细胞群的 CD45、CD34，用于鉴别正常和肿瘤性转化髓样细胞的 CD11b，用于鉴别正常和肿瘤性转化髓样细胞的 CD13、CD15，用于鉴别正常和肿瘤性转化 B 细胞的 CD14、CD33、CD79a 和 b，用于鉴别恶性细胞 CD22、CD10、CD16、Bcr/Abl，和用于鉴别正常和肿瘤性转化细胞群分化状态的末端脱氧核苷酸酶转移酶（TdT）。

如同这里描述的，细胞群可以基于独特的细胞群相关标志物的结合而被辨别，所述标志物例如是表达展示在细胞表面的细胞表面标志物。在本发明的方法中，正常和肿瘤性转化的内部细胞群的鉴别是基于细胞群相关性标志物的表达和水平，之前进行使每个细胞群与至少一种靶蛋白的存在相关联的步骤。因此，最初的内部细胞群相关性标志物结合情况用来鉴别正常和肿瘤性转化细胞群，随后与至少一种靶蛋白的存在相联系。应当理解，基于生物样品内部的特定细胞群，可以选择细胞群相关性标志物的出现和表达水平的结合方式，这些结合方式预期用于进一步与所研究的靶蛋白相关联。应当进一步理解，当通过在样品中外源性加入或者掺入合适的参照细胞群而在样品中不存在参照群体时，基于与内部细胞对照群体的比较进行的染色定量的方法可以推广至应用方面。

基于与 B-CLL 相关的实施方式的细胞群相关性标志物表达和水平而鉴定的特定正常和肿瘤性转化内部细胞，可以包含这样一个群体：CD5 阳性和 CD19 阳性；CD5 阳性和 CD20 阴性；CD3 阳性和 CD56 阳性；CD3 阳性。作为本发明原则的例子，正常的或者活性 T 细胞（CD3+）和 NK 细胞（CD56+）对于 ZAP-70 蛋白表达呈阳性，而正常 B 细胞（CD19+/CD5-）和正常粒细胞（通过单独或者与 CD45 交联后光散射特性而鉴定）对于 ZAP-70 蛋白表达呈阴性。这些样品内部的细胞群被用于确定 B-CLL（肿瘤性转化）群体中 ZAP-70 表达水平，还一起被用来建立复合体系，该 ZAP-70 蛋白是通过相对于内部阳性和阴性细胞群呈 CD19+/CD5+（有潜力与其他标志物例如 FCM7-偶联）而鉴定的。

在针对 CML 的实施方式中，细胞群相关性标志物可以鉴别细胞群，所述细胞群除了任何正常淋巴细胞、单核细胞、或者粒细胞外，还包含淋巴颗粒细胞和另一种包含淋巴单核细胞的细胞群。所以，本发明提供了一种方法，包括：通过使生物样品与结合分子集反应，从

而为来自疑似 CML 个体的样本建立复合标志物分布，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合情况可识别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；接下来通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；并且使正常和肿瘤性转化细胞群标志物水平与至少一种靶蛋白的存在关联起来，从而为来自疑似慢性髓性白血病（CML）个体的样本建立复合标志物分布。在该实施方式中，该靶蛋白可选自由信号转导蛋白、增殖标志物和凋亡标志物所构成的组。

生物样品经处理可以用于复合标志物分布的建立，该建立方法使用本领域技术人员可选的任何细胞准备方法和适合于样品的染色处理。应当理解，准备和染色步骤一般包括 RBC 裂解、染色、固定、渗透，这些步骤的次序可以有某些变化，只要所研究的细胞群相关性标志物仍然存在，允许进行这里描述的细胞群鉴别，就可以采用上述准备和染色步骤。合适的准备步骤已本领域技术人员所熟知，本文描述了，例如，使用低渗裂解对全血、骨髓、腹水等进行红细胞裂解（以获得纯化的 WBC 群），或者使用密度梯度离心技术（例如 Hypaque/Ficoll）以获得富含单核细胞的样品。

所以，在本发明为来自于疑似肿瘤性转化状态个体的样品建立复合标志物分布的方法中，使样品首先与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，以辨别正常和肿瘤性转化细胞群。如同上文所述，结合分子集可以被使用者选择，以便鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群。一旦正常和肿瘤性转化细胞群得到鉴别，还可以将该细胞群与靶蛋白的存在相关联，从而建立复合标志物分布。

这里使用的术语“靶蛋白”指的是这样一种蛋白，作为其在调节正常和肿瘤性转化细胞群的细胞反应、表现、功能中的作用，可以用于建立复合标志物分布。在建立本发明的复合标志物分布中，通常会测量一种或者更多种靶蛋白对调节性刺激物的功能反应，比较样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群。本发明方法中有用的靶蛋白可以是，比如，信号分子，其介导细胞代谢的相关效应、细胞生长、分化、凋亡，或者实现其他任何生理作用。相应地，靶蛋白的调节状态可以当其作为一个特异性或者合适的底物、分子转接蛋白、或者信号途径的组分而提高一个生物反应时得到测量。为了建立本发明的复合标志物分布，靶蛋白的调节状态例如磷酸化状态，可以通过样品内部的肿瘤性转化和正常细胞群来测定。

这里使用的术语“复合标志物分布”，指的是比较生物样品内部独特的细胞群靶蛋白表达水平矩阵，复合标志物分布代表了生物样品内量化的靶蛋白，该量化是基于肿瘤性转化细

胞内的靶蛋白表达相对于对靶蛋白呈阳性的正常细胞群中靶蛋白染色水平的标准化。对靶蛋白呈阳性的正常细胞群用作不同靶蛋白表达水平的阳性对照。一种或者多种内部不表达靶蛋白的正常细胞群可以作为阴性对照。在组织样品中，外周血污染可以导致足够的用作内部阴性对照的粒细胞。

在为来自于疑似 AML 或者 CML 的个体的样品建立复合标志物分布的方法中，靶蛋白可以是信号转导蛋白，例如，Abl、CRKL、Hck、STAT1、STAT3、STAT5、Flt3、Akt/PKB、ERK、mTOR 或 S6。图 5 显示了描述在 AML 样品中被 mTOR 激活的 S6 激活情况的流式细胞术仪面板。另外，在为来自于疑似 CML 个体的样品建立复合标志物分布的方法中，靶蛋白可以是增殖标志物，例如周期蛋白 D1 或者周期蛋白 A2，以及是一个凋亡标志，例如 cleaved-Caspase-3 或者 Bcl-XI。图 6 显示了一个通过比较在 CD34+干细胞至内参照群体（淋巴细胞，粒细胞和单核细胞）内三种不同信号转导蛋白 P-ERK、P-S6 和 P-PKB/AKT 对三种刺激的反应而建立外周血干细胞中动员干细胞的复合分布。图 7 描述了根据 AML 患者样本，通过测定血液样品中信号转导靶蛋白 P-ERK 和 P-S6 的表达情况，并将在 AML（红色）胚细胞中的表达与在内参照群淋巴细胞（蓝色）和粒细胞（绿色）中的表达相比较，从而建立的复合分布。

在本发明的特定实施方式中，B-CLL 中 ZAP-70 的量化检测可以通过相对于正常 T 和自然杀伤细胞中的 ZAP-70 染色水平进行标准化而实现，这两种细胞都是 ZAP-70 阳性。在本实施方式中，其目的在于为罹患特定复合标志物分布的个体建立复合标志物分布，所述特定复合标志物分布是为来自疑似 B-CLL 个体的样品建立的。本实施方式中，由于自然杀伤细胞相比 T 细胞有更明亮的染色，正常 T 细胞和自然杀伤细胞提供了两种不同亮度的阳性对照。在本实施方式中，外周血和骨髓生物样品中的粒细胞和正常 B 细胞是 ZAP-70 阴性的，可以作为阴性对照。

在此公开的特定实施方式中，检测靶蛋白用于可以和某个状况相联系的修饰，比如磷酸化状态。细胞很大程度上依靠细胞外分子，该分子作为一种手段以便从其所处外界环境接受刺激。这些细胞外信号对于正确调节不同的细胞过程比如分化、收缩、分泌、细胞分裂、接触抑制和代谢是必需的，还可以与异常的或者潜在有害的过程比如病毒-受体反应、炎症和细胞转化癌变相关联。该过程的中心特点即信号转导是某些蛋白的可逆磷酸化。磷酸化是一个包括竞争性磷酸化和去磷酸化的动态过程，任意给定瞬间的磷酸化水平反映了此时催化这些反应的蛋白酶和磷酸酶的相对活性。

所以，本发明的复合标志物分布可以将靶蛋白的磷酸化或去磷酸化相关联，而不仅仅是

它的表达，因为被调节的蛋白的构象变化改变它们的生物学特性。当蛋白磷酸化主要发生在丝氨酸和苏氨酸的氨基酸残基时，酪氨酸残基的磷酸化也会发生，很多人对此感兴趣，因为发现很多致癌基因产物和生长因子受体具有内源性蛋白酪氨酸酶活性。生长因子信号转导、细胞周期过程和肿瘤性转化中的蛋白酪氨酸磷酸化的重要性现在已经全面确认了（Cantley et al., 1991, Cell 64:281-302; Hunter T., 1991, Cell 64:249-270; Nurse, 1990, Nature 344:503-508; Schlessinger et al., 1992, Neuron 9:383-391; Ullrich et al., 1990, Cell 61:203-212）。正常生长控制途径的破坏导致癌发生，表明是由于组成一大组主要致癌蛋白的蛋白酪氨酸酶的激活或者过度表达造成的。（Hunter, T.综述, 1991, Cell 64:249-270）。如同这里揭示的，本发明中的复合标志物分布可以将正常和肿瘤性转化细胞群的靶蛋白磷酸化水平与靶蛋白的存在相关联，从而为来源于疑似肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布。

在优选的实施方式中，所有构成复合标志物分布的细胞群都在生物样品内。当针对生物样品时，这里使用的术语“内部”是指所有的细胞群最初存在于样品中，而不是在建立复合标志物分布之前加入或者“掺入”的方式。在没有可以作为阴性对照的细胞群的情况下，通过比较对靶蛋白呈阳性的正常细胞和肿瘤性转化细胞的内部群体而建立对比矩阵，可以半定量地确定足够的靶蛋白水平，从而根据上面公开的方法建立复合标志物分布。可更进一步想到，可以将阳性或者阴性内部细胞参照群加入生物样品，假如在样品中不存在这些参照群的话。

如上所述，本发明提供了一种方法，其包括：通过使生物样品与结合分子集反应，从而为来自于疑似 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）个体的样本建立复合标志物分布，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子；并且通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；同时使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群标志物水平与 ZAP-70 的存在关联起来，从而为来自于疑似 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）个体的样品建立复合标志物分布。

通过相对于皆为 ZAP-70 阳性的正常 T 细胞和自然杀伤细胞的 ZAP-70 染色水平进行标准化，可以实现 B-CLL 中 ZAP-70 的量化。这就提供了两种不同亮度的阳性对照，其中自然杀伤细胞相比 T 细胞有更深的染色。在本实施方式中，外周血和骨髓生物样品中的粒细胞或正常 B 细胞是 ZAP-70 阴性的，可以作为阴性对照。

在组织样品中，外周血污染可以提供足够的粒细胞来作为内部阴性对照。当没有粒细胞时，其相对于正常 T 细胞的比例应足以进行半定量检测。在 CLL 中可以实现该半定量检测的

抗原的特异性组合体除了 ZAP-7 之外是 CD19、CD5 和 CD56。其他抗体组合可以用于选择相关恶性细胞和正常细胞群体。除了上面提到的以外，还可以包括，而限于 CD3、CD20、CD23、CD79a、MCF7 和免疫球蛋白轻链。这里提出的方法可以通过借助针对给定的表面或者细胞内靶蛋白进行特异性染色的样品来实施，其中正常细胞群对于相同靶蛋白既呈阳性又呈阴性，或者有可进行细胞染色的特性，该正常细胞群可以存在并可以作为生物参照用于决定所研究的细胞群对于相同的抗原或者标志物是否是呈阳性。内部生物细胞群还可以用作对照以确定所研究的细胞中抗体或者标志物的半定量目水平。内部细胞群可以基于其他细胞性质而进行挑选，包括但不局限于抗原检测和散射光特征。所需的特异性标志物取决于本发明方法的具体应用，本领域的技术人员可据此选择。

根据以上描述的用于为特定血癌制备复合标志物分布的实施方式可以延伸至诊断方法。根据本发明的方法而建立的复合标志物分布，通过与一个或者更多复合标志物分布进行比较，可以用于诊断罹患疑似肿瘤性转化状态的个体的肿瘤性转化状态，其中该比较可以用于预测肿瘤性转化状态的临床进程。

这里使用的术语“预测临床原因”意味着包含任何与状况或者治疗有关的因素的诊断和预后，包括：生存期，病程预后和治疗反应的预后。

当用于复合标志物分布内容中时，这里使用的术语“参照”指的是一个已知与某个特定参数相关的复合标志物分布，该参数与来自于待测生物样品的复合标志物分布进行比较。一个参照复合标志物分布可以代表一种特定的肿瘤性转化状态、肿瘤性转化状态的一个阶段，或者可以代表一个已知的疾病过程，例如是攻击性还是惰性病程。例如，用于本发明的诊断方法的参照复合标志物可以代表疑似患病个体的特定状态。参照复合标志物分布可以代表肿瘤性转化状态的一个特定阶段，或者可以代表已知的疾病过程，例如攻击性进程。

在本发明诊断和预后方法的优选实施方式中，将一个个体的复合标志物分布与一个以上参照复合标志物分布相比较。例如，在诊断应用中，可以将一个个体的复合标志物分布与代表临床阶段图谱的两个或者更多参照复合标志物分布的集合相比较，以便能够通过比较将个体疾病阶段进行细微分类。类似地，在预后应用中，可以将个体的复合标志物分布与两个或更多代表图谱的参照复合标志物分布的集合相比较，该图谱系列从非攻击性至攻击性、或者从治疗应答至不应答。

通过将用上述方法获得的复合标志物分布与一种或者多种参照复合标志物分布进行比较，根据本发明方法的复合标志物分布可以用于诊断疑似患有血癌个体的血癌，其中该对照分布可以用于预测血癌的临床病程，所述血癌选自慢淋巴细胞性白血病（CLL）、急性髓性

白血病（AML）、慢性髓系白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）所构成的组。

在一个实施方式中，通过将复合分布与和一种或多种参照复合分布相比较，根据本发明方法的复合标志物分布可以用于诊断疑似患病个体的 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL），其中该比较可以预测 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床病程（Hamblin et al., Blood 94: 1848-1854 (1999)）。本发明可以提供一种用于预测个体 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床病程的方法，包括：提供来源于个体的生物样品；使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合可以鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与 ZAP-70 的存在关联起来，从而为来源于疑似患有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）的个体的样品建立复合标志物分布，其中该复合分布代表 ZAP-70 的相对量化水平；将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床病程。

在另一个实施方式中，本发明可以提供一种预测个体 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）临床过程的方法，包括：提供来源于个体的生物样品；使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合可以鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与一靶蛋白的存在关联起来，从而为来源于疑似患有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）的个体的样品建立复合标志物分布，其中该靶蛋白选自由 ZAP-70、激活诱导的 C 型凝集素（AICL）和脂蛋白脂肪酶所构成的组，其中该复合分布代表 ZAP-70 的相对量化水平；将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床进程。

在一个实施方式中，通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，可以提供一种用于诊断疑似患病个体的 Ig-突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的方法，其中该比较可以用于预测 Ig-突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床过程。在另一个实施方式中，本发明可以提供一种预测个体 Ig-突变 B 细胞慢性淋巴细胞

性白血病（CLL）临床过程的方法，包括：提供来源于个体的生物样品；使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合可以鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与一靶蛋白的存在关联起来，从而为来源于疑似患有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）的个体的样品建立复合标志物分布，其中该靶蛋白选自由 IM68532、IM1286077 和 LCI15506 所构成的组，其中该复合分布代表靶蛋白的相对量化水平；将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测 Ig-突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床进程。

在另一个实施方式中，通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，可以提供一种用于诊断疑似罹患 CML 个体的 CML 的方法，其中该比较可以用于预测 CML 的临床进程。通过将根据上述方法获得的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，可以提供一种用于诊断疑似罹患 AML 个体的 AML 的方法，其中该比较可以用于预测 AML 的临床进程。在再一个实施方式中，通过将根据上述方法获得的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，可以提供一种用于诊断疑似罹患 ALL 个体的 ALL 的方法，其中该比较可以用于预测 ALL 的临床进程。

在本发明的另一个实施方式中，制备用于特定血癌的复合标志物分布的方法可以延伸至预后方法。特别是，根据上述方法获得的复合分布可以被用于为患有肿瘤性转化状态的个体选择合适的临床处理和形式。

根据本发明方法的复合标志物分布可以用于从无论治疗与否都永远不会发展至疾病较高阶段的个体中鉴别出预期对特定治疗产生有效应答的个体。因此，本发明的复合体系可以用于预测个体的临床进展，尽管还是在疾病的常规阶段，并且还可以帮助临床医生更好地评估治疗方法的选择，而且通过较好地区分特定治疗的效果，还会大大增强临床研究价值。

通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患有肿瘤性转化状态个体的任何肿瘤性转化状态的临床进展，其中该比较可以预测肿瘤性转化状态的临床病程。通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患有血癌个体的血癌的临床进展，其中该比较可以预测血癌的临床病程，所述血癌选自由慢淋巴细胞性白血病（CLL）、急性髓性白血病（AML）、慢性髓系白血病（CML）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）

所构成的组。

在一个实施方式中，通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患病个体的 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床进展，其中该比较可以预测 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床进程。因此，本发明可以提供一种预测个体 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）临床进程的方法，其包括：提供来源于个体的生物样品；使生物样品与结合分子集反应，其中所述结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，其中标志物水平和标志物结合可以鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；通过检测标志物水平和标志物结合情况，来鉴别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群的存在，其中标志物水平和结合情况可辨别样品内部的正常和肿瘤性转化细胞群；使正常细胞群和肿瘤性转化细胞群的标志物水平与 ZAP-70 的存在关联起来，从而为来源于疑似患有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）的个体的样品建立复合标志物分布，其中该复合分布代表 ZAP-70 的相对量化水平；并且将该复合分布与一种或多种参照复合分布相比较，其中该比较可以用于预测 Ig-未突变 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）的临床进程。

通过确定治疗方案是否会带来确实有效的作用或者是否值得冒相关的风险，根据本发明方法的复合标志物分布可用于帮助使用者为个体选择一个攻击性或试验性治疗方案。例如，一些 B-CLL 病人死于治疗和 B-CLL 的复合效应而不单是 B-CLL。通过可以鉴别已经处于 B-CLL 高级阶段的 B-CLL 病人而不用依赖常规的 Rai 和 Binet 分级体系，根据本发明方法的复合标志物分布可用于帮助选择更具攻击性的治疗方案，比如放疗、化疗、移植和免疫疗法。

在另一个实施方式中，通过将根据本发明方法的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患有 CML 个体的 CML 的临床进展，其中该比较可以用于预测 CML 的临床过程。在另一个实施方式中，通过将根据上述方法获得的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患有 AML 个体的 AML 的临床进展，其中该比较可以用于预测 AML 的临床过程。在再一个实施方式中，通过将根据上述方法获得的复合标志物分布与一种或多种参照复合分布相比较，该复合标志物分布可以用于预测疑似患有 CLL 个体的 CLL 的临床进展，其中该比较可以预测 CLL 的临床过程。

在又一个实施方式中，本发明的方法可以建立对监测患有血癌个体正在进行的治疗有用的复合分布。例如，对于 CML 病人，复合分布可以用于监测病人对格列卫（Gleevec）治疗的反应，而对于 AML 病人，则用于监测病人对抑制 mTOR 的雷帕霉素治疗的反应。另外，

复合分布在药物研发和分子靶向治疗中也有作用。根据本文的公开，本领域技术人员应当理解，本发明的方法对于建立的复合分布会有进一步的应用，比如包括，用于确定单个病人在疾病的发生和/或发展阶段不同信号转导途径的相对重要性，从而运用于个性化治疗。

另一个方面，本发明还提供了一个试剂盒，其包含在本发明方法中有用的试剂，用于诊断和检测罹患肿瘤性转化状态例如白血病的个体的疾病阶段。这里指出的用于本发明方法的材料期望适合于试剂盒制备。这样的试剂盒可以包含携带工具，其划分为可以紧密收容一种或多种容器的限定空间，该容器着例如是药瓶、试管和类似物，每样容器都含有一个单独的用于本方法的组分。例如，容器之一可以包含有结合分子集，该结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，该标志物是或者可以被适合于诊断和预后目的的标志物所可检测地标记。另外，一个容器包含一种检测靶蛋白的手段，它是或者可以被适合于诊断和预后目的的标志物所可检测地标记。就诊断试剂盒而言，试剂盒还可以有含有参照样品、比较用的参照复合标志物分布的图标、缓冲液的容器和/或包含报告方法的容器，该报告方法，例如，是结合于报告分子的生物素结合蛋白比如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白，该报告分子例如是酶学或者荧光标记。如果需要，试剂盒还可以包括珠子，其提供了用于证实系统组分完整性目的的外部对照。

除了化学原料，当然使用该试剂盒的说明书也包括在内，优选用于预后和诊断应用。说明书可以写在瓶子、试管和类似物上，或者写在一张单独的纸上，或者在容器的外部或内部。说明书也可以是多媒体的形式，比如 CD、电脑光盘、录像等，其中标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群与肿瘤性转化细胞群。如果需要的话，该试剂盒可以包括辅助性试剂，如酶抑制剂和/或信号发生试剂或系统。此外，其他的辅助试剂也可以包含在该试剂盒内，比如，缓冲液、稳定剂以及类似物。

因此本发明提供了一种用于为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布的试剂盒，该试剂盒包括有结合分子集，该结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，该标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群，并且结合分子对靶蛋白具有特异性，从而为来自疑有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布。肿瘤性转化状态可以进一步是血癌如白血病，比如：急性骨髓性白血病或急性髓细胞白血病（AML）、慢性骨髓性白血病或慢性髓细胞白血病（CML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性淋巴细胞性白血病（ALL）、毛细胞白血病（HCL）、骨髓增生异常综合征（MDS）或慢性骨髓性白血病（CML-BP）。

更具体的说，本发明提供了一种用于为来自疑有 B-CLL 状态的个体的样品建立复合标志

物分布的试剂盒，该试剂盒包括有结合分子集，该结合分子集含有两组或者更多组对独特的细胞群相关标志物具有特异性的结合分子，该标志物的水平和标志物的结合可以鉴别样品内部的正常细胞群和肿瘤性转化细胞群，并且结合分子对 ZAP-70 或者其他靶信号转导蛋白（包括但不限于于本文公开的靶蛋白）具有特异性，从而为从疑有 B-CLL 的个体所获得的样品建立复合标志物分布。

通过使用该试剂盒，可以为多种类型临床样品建立复合分布，该样品可以包括全血（用任一可用试剂或试剂盒处理，以固定和透化白细胞并溶解红细胞）、骨髓、外周血单核细胞（PBMC's）、腹水等。那些含有显著水平红细胞的生物样品应该接受处理以移除红细胞（低渗溶解、清洁剂处理、密度梯度离心，等），然后与细胞群标志物反应，接着用适当的试剂（试剂盒中提供）固定和透化白细胞。接着细胞群与表征（细胞内）信号转导、增殖、凋亡等的标志物反应，并通过适当的技术（如流式细胞术、影像分析、手工显微镜检等）进行分析。

可以理解，那些不会实质性影响本发明的各种具体实施方式的活性的修饰也包括在本发明限定的范围内。因此，以下实施例是为了说明但不是为了限制本发明。

## 实施例 1

### 制备用于建立复合分布的样品

本实施例显示了用于为疑有 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（B-CLL）的个体建立复合分布的样品的制备过程。

概括地说，将混和有细胞表面标志物 CD5-FITC、+CD3-ECD、+CD56-PC5、+CD19-PC7 的 10 $\mu$ l 试剂加入小管，并加入 100 $\mu$ l 全血。室温孵育 20min，加入 64 $\mu$ l 固定液（10%甲醛）后室温孵育 10min。接着，加入 1mL 裂解/透化试剂（0.1% Triton X-100），室温孵育 30min 后离心。用缓冲液（含有 2%BSA 的 PBS）洗涤细胞两次，用 10 $\mu$ l 抗-ZAP-70-PE 和 90 $\mu$ l 的缓冲液重悬，室温孵育 30min，然后用缓冲液洗涤一次，用含有 0.1%多聚甲醛的缓冲液重悬。然后将样品用流式细胞仪分析。图 1 显示了用于建立复合标志物分布方法的样品制备的示例性模式图。

## 实施例 2

### 用于建立复合分布的样品的分析

本实施例显示了用流式细胞仪分析样品以建立复合分布。

如图 2 所示，采用 ZAP-70 门控/分析算法按如下方法建立复合分布：第一闸门正常全血样品用于通过光散射鉴别淋巴细胞（蓝色加绿色），如左上方直方图所示。如果需要的话，

CD45 侧向散射（线性刻度）可以用来为外周血中 CD45-亮型淋巴细胞设门以进行 CD4 计数，同时 CD45 侧向散射（对数刻度）可以用来鉴定骨髓中胚细胞群以进行显型。图 2 中，CD19 相对 CD5 的直方图鉴别了正常 B 细胞（紫色，左上象限）、正常 T 细胞（蓝色，右下象限）和正常外周血中的“前”B 细胞（CD19+5+，右上象限）。B-CLL 肿瘤性转化细胞也落入右上象限，但是与它们的正常细胞相比，B-CLL 肿瘤性转化细胞不表达 ZAP-70。图 2 的底部展示了叠加的散点图，综合了复合分布并且展示了 B-CLL 细胞落入该直方图（ZAP-70 表达），与内源性正常 B 细胞（CD19+）、正常 T 细胞（CD5+3+）和 NK 细胞（CD56+）相关。图 3 显示了用流式细胞仪由用于 CLL 样品中 ZAP-70 分析的门控策略而得到的面板。图 4 展示的图描述了一例 CLL 样品中存在的细胞空间中 ZAP-70 的表达情况。（红色：B 细胞；绿色：正常 T 细胞；紫色：NK 细胞）。

图 5 展示了描述一例 AML 样品中 mTOR 激活 S6 的流式细胞仪面板。

图 6 为外周血中动员干细胞（CD34+）的复合分布。直方图提供了与未处理样品（红）相比，在用 PMA（蓝）、干细胞因子（绿）、或 IGF-1（橙）激活后每个动员干细胞、正常粒细胞、正常单核细胞和正常淋巴细胞中三种不同的信号传导蛋白 P-ERK、P-S6 和 P-PKB/AKT 的反应情况比较。图中显示了体内首次处理以动员干细胞（CD34+）的（人）全血样品。左边的两幅直方图展示了 CD34+干细胞（底部）和正常粒细胞、单核细胞和淋巴细胞（顶部）如何被鉴别。在这些实验中，单个供体的多份样品用能刺激信号转导通路的下述因子进行了处理（体外）：PMA（蓝）、干细胞因子（绿）、或 IGF-1（橙），并与未处理样品（红）相对比。右边的组图展示了三种不同的信号传导蛋白 P-ERK、P-S6 和 P-PKB/AKT 的反应（或缺失）情况。这些结果将 CD34+干细胞的反应与内部参照细胞（淋巴细胞、粒细胞和单核细胞）群相比较，并证实了 CD34+细胞对这三种刺激产生了反应。

图 7 显示了单个 AML 患者的复合分布。等分血样用 PMA 刺激，用或者不用特异性信号转导通路抑制剂（图例见右下角）刺激，或用干细胞因子刺激。反应结果用 P-ERK 对 P-S6 的双边量散点图检测（右侧面板），红色群表示 AML 胚细胞，蓝色表示内在淋巴细胞，绿色表示内在粒细胞。AML 胚细胞（红）、淋巴细胞（蓝）和粒细胞（绿）通过使用左边两个框中描述的 CD34 侧向散射来鉴定。P-ERK 和 P-S6 在未处理（从顶部向下排列）、PMA 处理、PMA+U0126（P-ERK 抑制剂）、PMA+Rapamycin（mTOR>S6 抑制剂）、PMA+Ly294002（PKB/AKT 抑制剂）和干细胞因子处理（底部）的全血样品中的表达水平如图所示。在所有的 P-表位直方图中，长柱揭示了 P-ERK 和 P-S6 在未刺激样品中的水平，即为“基础”表达。直方图展示了不同的处理方式对 AML 胚细胞（红）相比淋巴细胞（蓝）和粒细胞（绿）的效

果比较。

图 8 显示了 CLL 复合分布。样品中的 B 细胞阴性峰和阳性峰表现一致，NK 细胞阳性峰的表达比 ZAP70 强阳性的样品更高，与样品的一致性较低。ZAP70+CLL 具有 0.2% “正常 B 细胞”，但该罕见的结果与其余样品中阴性峰的现象相当。中度表达 ZAP70 的 CLL 和正常的 B 细胞-S/N2.15 之间存在明显的位移。

在该申请的全文中，如括号内所示，引用了不同的著作。本申请中将所有这些出版物的公开合并为参考，以便对本发明所属领域中的现有技术作出更全面的描述。

虽然本发明已经用公开的具体实施方式作出了描述，本领域的技术人员很容易领悟这些具体的实施例和以上的研究细节只是用于说明本发明。在不违背本发明的宗旨的情况下，可以对本发明作出各种的修饰。因此，本发明要求附后的权利。

## 方案设计-样品制备

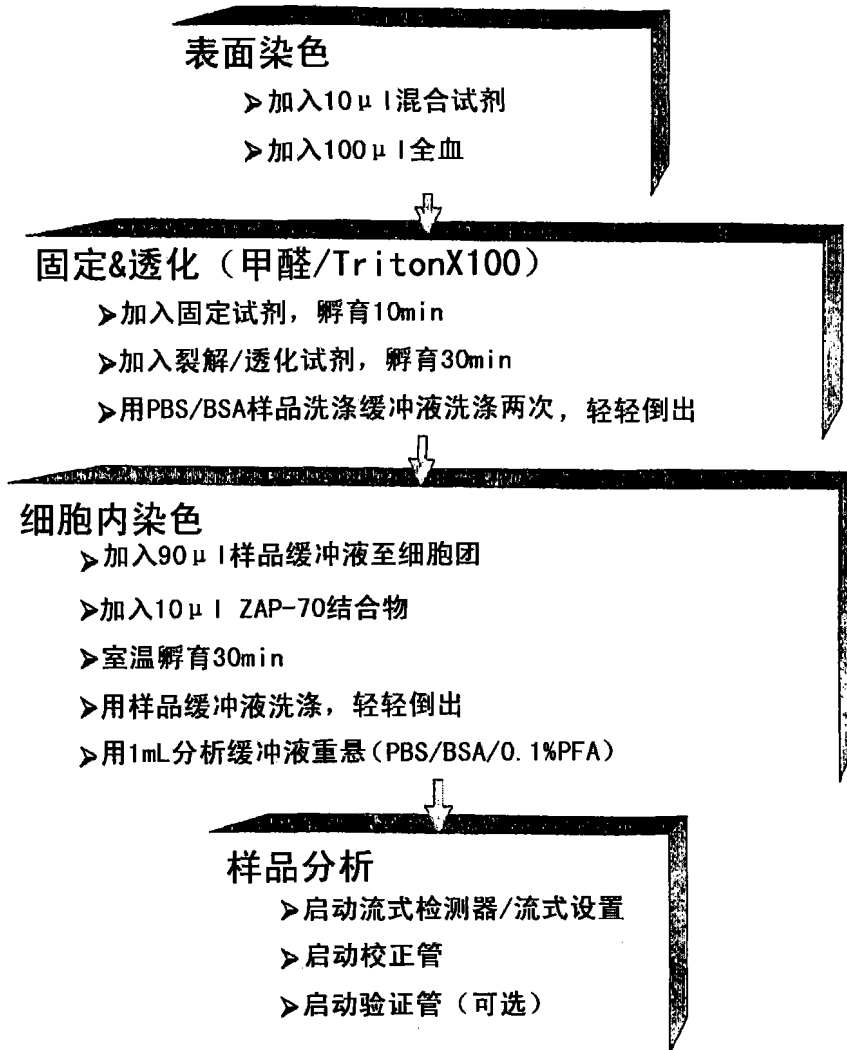


图 1

# 分析方案

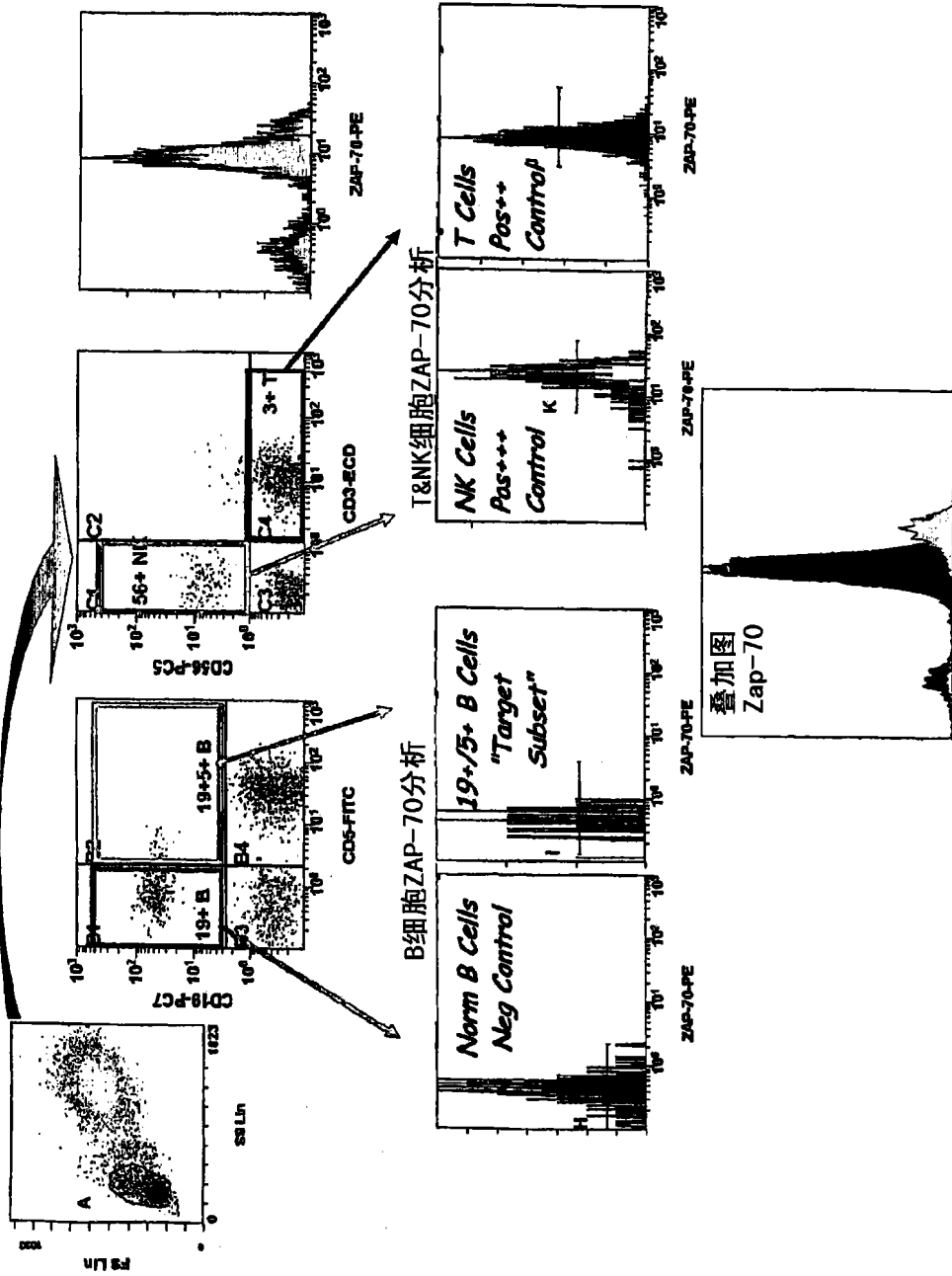


图 2

### CLL样品中的ZAP-70分析

门控策略：ZAP70分析CLL

(Zap70阴性对照：粒细胞)

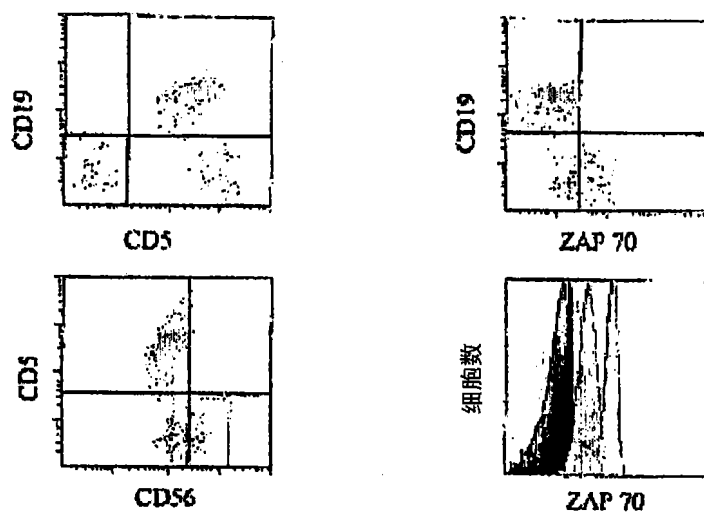


图 3

### CLL中ZAP-70表达

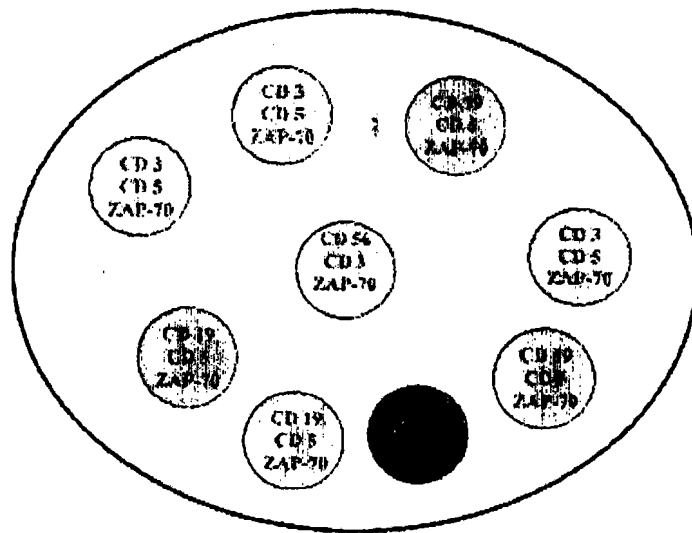


图 4

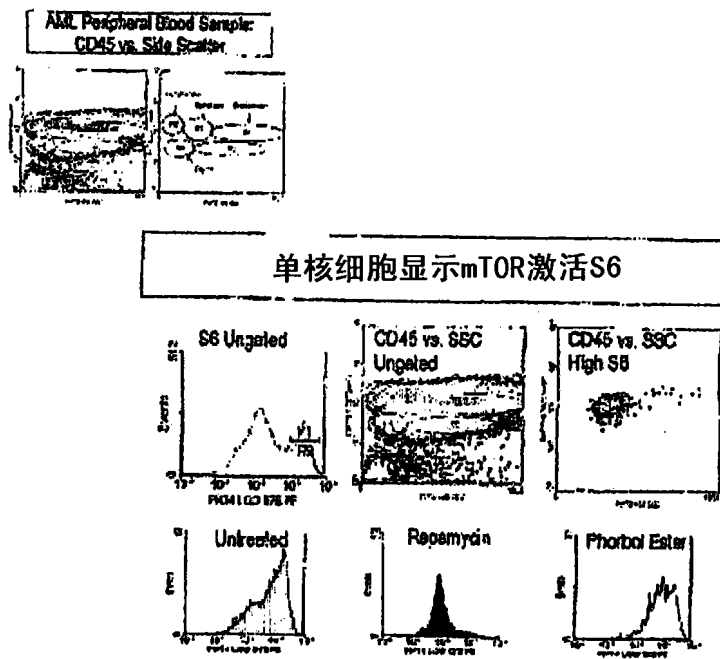


图 5

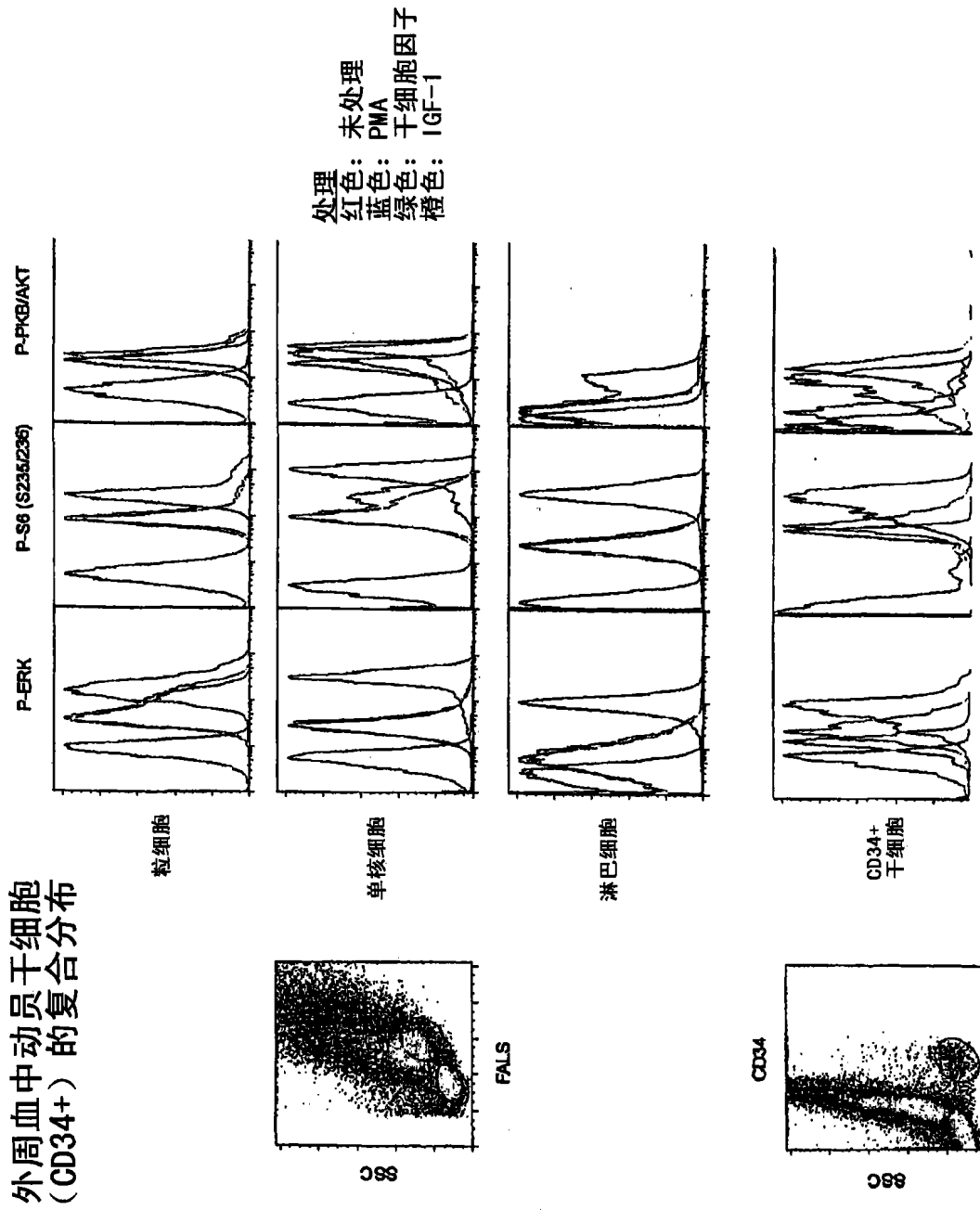


图 6

AML患者样品的复合分布

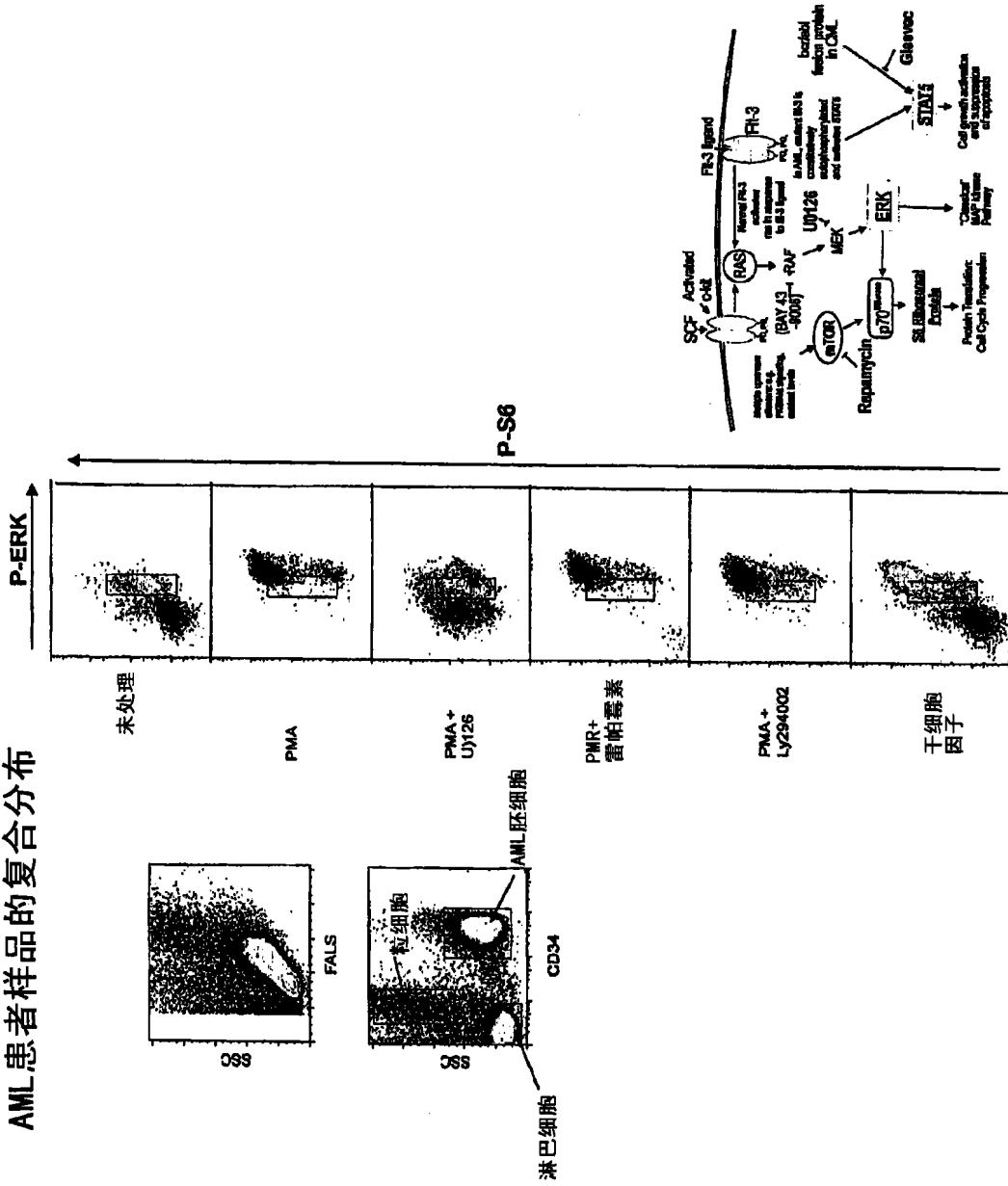


图 7

### CLL中ZAP-70表达的复合分布

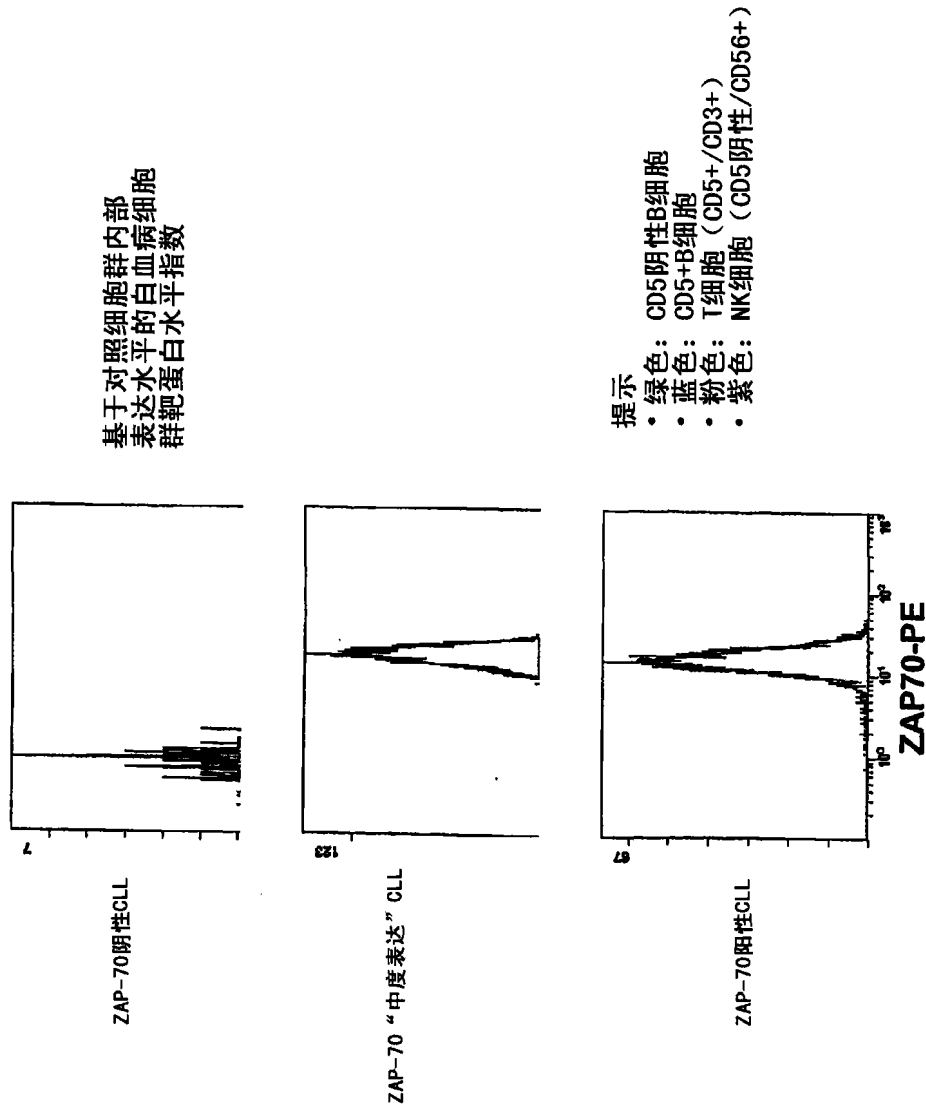


图 8

专利名称(译)	用于血癌分析与临床处理的细胞抗原及靶信号转导蛋白的复合分布		
公开(公告)号	<a href="#">CN101389959A</a>	公开(公告)日	2009-03-18
申请号	CN200680040388.1	申请日	2006-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司 健康网络大学		
申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司 西北大学 健康网络大学		
当前申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司 西北大学 健康网络大学		
[标]发明人	查尔斯古尔斯比 文森特T尚奇 戴维赫德利 詹姆斯雅克伯格 斯坦利沙克尼		
发明人	查尔斯·古尔斯比 文森特·T·尚奇 戴维·赫德利 詹姆斯·雅克伯格 斯坦利·沙克尼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/5052 G01N33/57426 G01N2800/52		
代理人(译)	涂勇		
优先权	11/267948 2005-11-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的目的在于提供一种为来自疑似有肿瘤性转化状态的个体的样品建立复合标志物分布的方法。本发明的复合标志物分布可以用于鉴别个体的肿瘤性转化状态相关亚群的预后和治疗、以及预测个体的疾病进程。本发明的方法为罹患肿瘤性转化状态的个体提供用于选择治疗方式的工具，包括确定危险人群的方法、预测复发风险增加的方法、预测发生继发性并发症风险增加的方法、为个体选择治疗方案的方法、确定对个体治疗效果的方法、确定个体的预后的方法。特别地，本发明的方法公开了一种建立复合标志物分布的方法，其可用作预后指示来预测个体肿瘤性转化状态的进程是攻击性还是惰性，从而帮助临床工作者处理病人和评估将要使用的治疗形式。在特别公开的实施方式中，本发明的目的在于建立用于白血病的复合标志物分布，该白血病选自慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CML)和急性骨髓性白血病(ALL)所构成的组。

方案设计-样品制备

