(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2013-174616
(P2013-174616A)
(43)公開日　平成25年9月5日(2013.9.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B029
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	102	4B063
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/53	U	
C12Q 1/26	(2006.01)	G01N	33/543	501D	
C12Q 1/54	(2006.01)	C12Q	1/26		

審査請求 有　請求項の数 15　ＯＬ　外国語出願　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-102165 (P2013-102165)
(22)出願日　平成25年5月14日 (2013.5.14)
(62)分割の表示　特願2010-547852 (P2010-547852)の分割
原出願日　平成21年2月24日 (2009.2.24)
(31)優先権主張番号　61/031,319
(32)優先日　平成20年2月25日 (2008.2.25)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/106,404
(32)優先日　平成20年10月17日 (2008.10.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/108,384
(32)優先日　平成20年10月24日 (2008.10.24)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　599132904
ネステク　ソシエテ　アノニム
スイス国，ブベイ，アブニュー　ネスレ　５５
(74)代理人　100088155
弁理士　長谷川　芳樹
(74)代理人　100114270
弁理士　黒川　朋也
(74)代理人　100128381
弁理士　清水　義憲
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100140453
弁理士　戸津　洋介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体に基づくアレイを用いた乳癌療法のための薬物選択

(57)【要約】　（修正有）
【課題】腫瘍細胞中のシグナル伝達経路の成分の活性化状態を検出するための組成物および方法を提供する。
【解決手段】細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程を含み、切断受容体は、ｐ９５ＥｒｂＢ２であり、前記全長受容体は、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である切断受容体の存在を検出するための方法であって、シグナル伝達経路の成分の活性化状態に関する情報は、癌の診断、予後診断、および癌治療の設計において使用できる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤を選択するための方法であって：
（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；
（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；
（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）前記抗癌剤が、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍の治療のために適切であるか、または不適切であるかを決定する工程と、を含む方法。
【請求項２】
前記乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記乳管癌は、浸潤性乳管癌または非浸潤性乳管癌である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記小葉癌は、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌である、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記細胞は、前記乳房腫瘍の循環細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によってサンプルから単離される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記サンプルは、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記循環細胞は、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞は、腫瘍組織から単離される、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項９に記載の方法。
【請求項１２】
前記単離した細胞は、増殖因子を用いてインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で刺激される、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン療法薬、放射線療法薬、ワクチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記モノクローナル抗体は、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商

標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（登録商標））、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

前記チロシンキナーゼ阻害剤は、ゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、ラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ＢＡＹ４３－９００６）、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名）；ＺＤ６４７４）、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。

【請求項１６】

前記化学療法薬は、ペメトレキセド（ＡＬＩＭＴＡ（登録商標））、ゲムシタビン（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、シロリムス（ラパマイシン）、ラパマイシンアナログ、白金化合物、カルボプラチン、シスプラチン、サトラプラチン、パクリタキセル（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、ドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ（登録商標））、テムシロリムス（ＣＣＩ－７７９）、エベロリムス（ＲＡＤ００１）、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。

【請求項１７】

前記ホルモン療法薬は、アロマターゼ阻害剤、選択的エストロゲン受容体調節剤、ステロイド、フィナステリド、ゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト、それらの薬学的に許容される塩、それらの立体異性体、それらの誘導体、それらのアナログ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。

【請求項１８】

前記放射線療法薬は、^{47}Ｓｃ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{89}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{87}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{117m}Ｓｎ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{211}Ａｔ、および^{212}Ｂｉ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１３に記載の方法。

【請求項１９】

前記１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項２０】

前記複数のシグナル伝達分子は、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記複数のシグナル伝達分子は、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ１）、ＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－３（ＥｒｂＢ３）、ＨＥＲ－４（ＥｒｂＢ４）、Ｒａｆ、ＳＲＣ、Ｍｅｋ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴｏｒ、ＰＩ３Ｋ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、ｃＭｅｔ、ＦＧＦＲ、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、Ｆｌｔ－３、ｃＦＭＳ、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、Ｋｉｔ、ＨＧＦＲ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＩＧＦ－１Ｒ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１９に記載の方法。

【請求項２２】

前記複数のシグナル伝達分子は、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ＥＲ、ＰＲ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１９に記載の方法。

【請求項２３】
前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
前記固体支持体は、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
前記捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
前記アッセイは、工程（ｃ）において：
（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を前記対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする工程と；
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
前記活性化状態依存性抗体は、結合対の第１メンバーを含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記結合対の第１メンバーは、ビオチンである、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、前記結合対の第２メンバーを含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項３０】
前記結合対の第２メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、ペルオキシダーゼである、請求項２９に記載の方法。
【請求項３２】
前記ペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記シグナル増幅対の第２メンバーは、チラミド試薬である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３４】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記増幅シグナルは、活性化チラミドを生成するために前記ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記活性化チラミドは、直接検出される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記活性化チラミドは、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】

前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせである、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記発色試薬は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記アッセイは、工程（ｃ）において：
（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を、前記複数の活性化状態非依存性抗体および前記対応する分析物に対して特異的である複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、
前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４２】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記促進成分を用いて直接的に標識される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記促進成分を用いて、活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと前記促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって標識される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記活性化状態依存性抗体は、前記シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
前記活性化状態依存性抗体は、前記シグナル増幅対の第１メンバーを用いて、前記活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーと前記シグナル増幅対の第１メンバーに結合された前記結合対の第２メンバーとの間の結合によって標識される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４６】
前記結合対の第１メンバーは、ビオチンである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記結合対の第２メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記促進成分は、グルコースオキシダーゼである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４９】
前記グルコースオキシダーゼおよび前記活性化状態非依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子へ結合される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、５００ｋＤａの分子量を有する、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】

前記酸化剤は、過酸化水素（H_2O_2）である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５２】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、ペルオキシダーゼである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記ペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記シグナル増幅対の第２メンバーは、チラミド試薬である、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記増幅シグナルは、活性化チラミドを生成するために前記ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記活性化チラミドは、直接検出される、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記活性化チラミドは、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項５６に記載の方法。
【請求項５９】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせである、請求項５８に記載の方法。
【請求項６１】
前記発色試薬は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答を同定するための方法であって：
（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；
（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；
（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に応答性または非応答性であると同定する工程と、を含む方法。
【請求項６３】
前記乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記乳管癌は、浸潤性乳管癌または非浸潤性乳管癌である、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記小葉癌は、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌である、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
前記細胞は、前記乳房腫瘍の循環細胞を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６７】

前記循環細胞は、免疫磁気分離法によってサンプルから単離される、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】

前記サンプルは、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記循環細胞は、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６６に記載の方法。

【請求項７０】

前記細胞は、腫瘍組織から単離される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７１】

前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項７０に記載の方法。

【請求項７３】

前記単離した細胞は、増殖因子を用いてインビトロで刺激される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７４】

前記抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン療法薬、放射線療法薬、ワクチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７５】

前記１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む、請求項６２に記載の方法。

【請求項７６】

前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７７】

前記固体支持体は、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７８】

前記捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される、請求項６２に記載の方法。

【請求項７９】

前記アッセイは、工程（ｃ）において：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を前記対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする工程と；

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項６２に記載の方法。

【請求項８０】

前記アッセイは、工程（ｃ）において：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列

とインキュベートする工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を、前記複数の活性化状態非依存性抗体および前記対応する分析物に対して特異的である複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、
前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項８１】
抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍を有する被験者の応答を予測するための方法であって：
（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；
（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；
（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記被験者が前記抗癌剤を用いた治療に応答する可能性を予測する工程と、を含む方法。
【請求項８２】
前記乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
前記乳管癌は、浸潤性乳管癌または非浸潤性乳管癌である、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記小葉癌は、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌である、請求項８２に記載の方法。
【請求項８５】
前記細胞は、前記乳房腫瘍の循環細胞を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８６】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によってサンプルから単離される、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記サンプルは、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記循環細胞は、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項８５に記載の方法。
【請求項８９】
前記細胞は、腫瘍組織から単離される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９０】
前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項８９に記載の

方法。
【請求項９２】
前記単離した細胞は、増殖因子を用いてインビトロで刺激される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９３】
前記抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン療法薬、放射線療法薬、ワクチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９４】
前記１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項９５】
前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９６】
前記固体支持体は、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９７】
前記捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される、請求項８１に記載の方法。
【請求項９８】
前記アッセイは、工程（ｃ）において：
（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を前記対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする工程と；
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項９９】
前記アッセイは、工程（ｃ）において：
（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために前記細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を、前記複数の活性化状態非依存性抗体および前記対応する分析物に対して特異的である複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、
前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項１００】
固体支持体上に固定された複数の希釈系列の捕捉抗体を含む優れたダイナミックレンジを有するアレイであって、各希釈系列中の捕捉抗体は細胞抽出物中のシグナル伝達経路の成分に対応する１つ以上の分析物に対して特異的である、アレイ。
【請求項１０１】
前記シグナル伝達経路は、細胞増殖に関係している、請求項１００に記載のアレイ。

【請求項１０２】
前記捕捉抗体は、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＭＥＴ、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、Ｓｈｃ、ＰＩ３Ｋ、Ｅｒｋ、Ｒｓｋ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、およびＡＩＢ１と反応性である抗体からなる群より選択される１つ以上のメンバーを含む、請求項１０１に記載のアレイ。
【請求項１０３】
前記シグナル伝達経路は、腫瘍血管新生に関係している、請求項１００に記載のアレイ。
【請求項１０４】
前記捕捉抗体は、Ｓｈｃ、ＰＩ３Ｋ、Ｅｒｋ、Ｒｓｋ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、Ｔｉｅ２、Ｖ－カドヘリン－Ｒ２複合体、ＰＤＧＦＲＡ、およびＰＤＧＦＲＢと反応性である抗体からなる群より選択される１つ以上のメンバーを含む、請求項１０３に記載のアレイ。
【請求項１０５】
切断受容体の存在を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は前記切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉された切断受容体を前記対応する切断受容体に対して特異的である検出抗体とインキュベートする工程と；
（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法。
【請求項１０６】
前記切断受容体は、ｐ９５ＥｒｂＢ２である、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
前記全長受容体は、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０８】
細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な前記複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、前記ストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０９】
前記抗体は、前記全長受容体の前記ＥＣＤ結合領域に対して特異的である、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記細胞抽出物は、乳房腫瘍の循環細胞を溶解させる工程によって生成される、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１１１】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によってサンプルから単離される、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
前記サンプルは、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１

１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記細胞抽出物は、腫瘍組織から単離した細胞を溶解させる工程によって生成される、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１１４】
前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１６】
前記単離した細胞は、増殖因子を用いてインビトロで刺激される、請求項１１１または１１３に記載の方法。
【請求項１１７】
前記単離した細胞は、成長因子刺激の前に抗癌剤とインキュベートされる、請求項１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
前記抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン療法薬、放射線療法薬、ワクチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】
前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体の活性化状態が調べられる（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｅｄ）、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１２０】
前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
前記検出抗体は、結合対の第１メンバーを含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１２２】
前記結合対の第１メンバーは、ビオチンである、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、前記結合対の第２メンバーを含む、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１２４】
前記結合対の第２メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項１２３に記載の方法。
【請求項１２５】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、ペルオキシダーゼである、請求項１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
前記ペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２７】
前記シグナル増幅対の第２メンバーは、チラミド試薬である、請求項１２５に記載の方法。
【請求項１２８】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、請求項１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
前記増幅シグナルは、活性化チラミドを生成するために前記ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１３０】
前記活性化チラミドは、直接検出される、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
前記活性化チラミドは、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項１２９に記載の方法。
【請求項１３２】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３３】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせである、請求項１３１に記載の方法。
【請求項１３４】
前記発色試薬は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
切断受容体の存在を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は前記切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉された切断受容体を、前記対応する切断受容体に対して特異的である複数の活性化状態非依存性抗体および複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、
（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法。
【請求項１３６】
前記切断受容体は、ｐ９５ＥｒｂＢ２である、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３７】
前記全長受容体は、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３８】
細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な前記複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、前記ストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３９】
前記抗体は、前記全長受容体の前記ＥＣＤ結合領域に対して特異的である、請求項１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
前記細胞抽出物は、乳房腫瘍の循環細胞を溶解させる工程によって生成される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１４１】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によってサンプルから単離される、請求項１４０に記

載の方法。
【請求項１４２】
前記サンプルは、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１４１に記載の方法。
【請求項１４３】
前記細胞抽出物は、腫瘍組織から単離した細胞を溶解させる工程によって生成される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１４４】
前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項１４３に記載の方法。
【請求項１４５】
前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項１４３に記載の方法。
【請求項１４６】
前記単離した細胞は、増殖因子を用いてインビトロで刺激される、請求項１４１または１４３に記載の方法。
【請求項１４７】
前記単離した細胞は、成長因子刺激の前に抗癌剤とインキュベートされる、請求項１４６に記載の方法。
【請求項１４８】
前記抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン療法薬、放射線療法薬、ワクチン、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１４７に記載の方法。
【請求項１４９】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記促進成分を用いて直接的に標識される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１５０】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記促進成分を用いて、活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと前記促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって標識される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１５１】
前記活性化状態依存性抗体は、前記シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１５２】
前記活性化状態依存性抗体は、前記シグナル増幅対の第１メンバーを用いて、前記活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーと前記シグナル増幅対の第１メンバーに結合された前記結合対の第２メンバーとの間の結合によって標識される、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１５３】
前記結合対の第１メンバーは、ビオチンである、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
前記結合対の第２メンバーは、ストレプトアビジンである、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５５】
前記促進成分は、グルコースオキシダーゼである、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１５６】
前記グルコースオキシダーゼおよび前記活性化状態非依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子へ結合される、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５７】

前記スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、５００ｋＤａの分子量を有する、請求項１５６に記載の方法。
【請求項１５８】
前記酸化剤は、過酸化水素（H_2O_2）である、請求項１５５に記載の方法。
【請求項１５９】
前記シグナル増幅対の第１メンバーは、ペルオキシダーゼである、請求項１５８に記載の方法。
【請求項１６０】
前記ペルオキシダーゼは、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項１５９に記載の方法。
【請求項１６１】
前記シグナル増幅対の第２メンバーは、チラミド試薬である、請求項１５９に記載の方法。
【請求項１６２】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６３】
前記増幅シグナルは、活性化チラミドを生成するために前記ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される、請求項１６２に記載の方法。
【請求項１６４】
前記活性化チラミドは、直接検出される、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６５】
前記活性化チラミドは、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６６】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６７】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせである、請求項１６５に記載の方法。
【請求項１６８】
前記発色試薬は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項１６７に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【関連出願の相互参照】
【０００１】
本出願は、２００８年２月２５日に出願された米国特許仮出願第６１／０３１，３１９号明細書、２００８年１０月１７日に出願された米国特許仮出願第６１／１０６，４０４号明細書、２００８年１０月２４日に出願された米国特許仮出願第６１／１０８，３８４号明細書、２００８年１１月２５日に出願された米国特許仮出願第６１／１１７，９０８号明細書、および２００８年１２月２３日に出願された米国特許仮出願第６１／１４０，５５８号明細書に対する優先権を主張する２００９年２月２４日に出願された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０３５０１３号明細書の継続出願であり、前記特許は、あらゆる目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【技術分野】
【０００２】
細胞内のシグナル伝達のプロセスは、少数の例を挙げると細胞の分裂および死、代謝、免疫細胞活性化、神経伝達、ならびに感覚的知覚を含む様々な生物学的機能に関与している。したがって、細胞内の正常シグナル伝達の混乱は、糖尿病、心疾患、自己免疫、および癌などの多数の疾患状態を引き起こす可能性がある。

【背景技術】
【０００３】
１つの明確に特徴付けられたシグナル伝達経路は、細胞内における上皮成長因子（ＥＧＦ）から細胞増殖促進へシグナルを伝達することに関与するＭＡＰキナーゼ経路である（図１参照）。ＥＧＦは、ＥＧＦの結合によって活性化される上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）である膜貫通受容体結合チロシンキナーゼに結合する。ＥＧＦのＥＧＦＲへの結合は、受容体の細胞質ドメインであるチロシンキナーゼ活性を活性化する。このキナーゼ活性化の１つの結果は、チロシン残基上でのＥＧＦＲの自己リン酸化である。活性化されたＥＧＦＲ上のリン酸化チロシン残基は、例えばＧＲＢ２などのアダプタータンパク質を含有するＳＨ２ドメインの結合のためのドッキング部位を提供する。アダプターとしてのその機能において、ＧＲＢ２は、ＧＲＢ２上のＳＨ３ドメインによって、グアニンヌクレオチド交換因子であるＳＯＳへさらに結合する。複合体ＥＧＦＲ－ＧＲＢ２－ＳＯＳの形成は、ＲａｓからのＧＤＰの除去を促進するグアニンヌクレオチド交換因子のＳＯＳ活性化をもたらす。ＧＤＰが除去されると、ＲａｓはＧＴＰに結合し、活性化されるようになる。
【０００４】
活性化後、Ｒａｓは、セリン／トレオニン特異的プロテインキナーゼであるＲＡＦキナーゼに結合して、そのプロテインキナーゼ活性を活性化する。その後には、細胞増殖を導くプロテインキナーゼカスケードの活性化が続く。概略を述べると、ＲＡＦキナーゼは次に、また別のセリン／トレオニンキナーゼであるＭＥＫをリン酸化して活性化する。活性化されたＭＥＫは、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）をリン酸化して活性化する。特にＭＡＰＫによるまた別のリン酸化の標的は、４０Ｓリボソームタンパク質Ｓ６キナーゼ（ＲＳＫ）である。ＭＡＰＫによるＲＳＫのリン酸化は、ＲＳＫの活性化を生じさせ、これは順にリボソームタンパク質Ｓ６をリン酸化する。ＭＡＰＫのまた別の公知の標的は、様々な癌において変異している細胞増殖のために重要な遺伝子である癌原遺伝子ｃ－Ｍｙｃである。ＭＡＰＫはさらに、また別のプロテインキナーゼであるＭＮＫもリン酸化して活性化するが、これは順に転写因子であるＣＲＥＢをリン酸化する。間接的には、ＭＡＰＫはさらに細胞増殖に関係しているまた別の転写因子をコードするＦｏｓ遺伝子の転写も調節する。そのような転写因子のレベルおよび活性を変化させることによって、ＭＡＰＫは、ＥＧＦから細胞周期の進行のために重要である遺伝子の変化した転写へオリジナルの細胞外シグナルを伝達する。
【０００５】
シグナル伝達経路が細胞増殖において中心的な役割を果たすことを前提にすると、多数の癌が細胞増殖経路の異常な活性化を生じさせるシグナル伝達成分における突然変異およびその他の変化の結果として発生することは驚くには当たらない。例えば、ＥＧＦＲの過剰発現もしくは活動過剰は、多発性膠芽腫、大腸癌および肺癌を含む多数の癌と関連付けられてきた。これは肺癌のためのゲフィチニブおよびエルロチニブ、ならびに大腸癌のためのセツキシマブを含む、ＥＧＦＲに向けられた抗癌療法薬の開発を促進してきた。
【０００６】
セツキシマブは、ＥＧＦＲの細胞外リガンド結合ドメインに結合するモノクローナル抗体阻害剤の一例であり、そこでＥＧＦＲチロシンキナーゼを活性化するリガンドの結合を妨害する。これとは対照的に、ゲフィチニブおよびエルロチニブは、細胞内に局在するＥＧＦＲチロシンキナーゼを阻害する低分子である。キナーゼ活性の非存在下では、ＥＧＦＲは、ＧＲＢ２などの下流アダプタータンパク質に結合するための前提条件である、チロシン残基での自己リン酸化を受けることができない。成長のためにこの経路に依存する細胞内のシグナル伝達カスケードを停止させることによって、腫瘍の増殖および移動が減少させられる。
【０００７】
さらに、他の試験は、ヒト黒色腫の約７０％およびこれより低い割合の他の腫瘍が、ＭＡＰＫ経路の持続性活性化をもたらすＲａｆ遺伝子における点変異（Ｖ５９９Ｅ）を有することを証明している（例えば、Ｄａｖｉｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，４１７：９４９－９５

４（２００２）を参照されたい）。そのような結果は、特にシグナル伝達経路における突然変異は特定のタイプの腫瘍の特性である可能性がある、そしてそのような特異的な、変化したシグナル伝達経路は、化学療法薬によるインターベンションにとって前途有望な標的であることを示唆している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

様々な癌治療、特別には癌化学療法が、細胞増殖または細胞死の各々に関係する細胞シグナル伝達経路を遮断または活性化するいずれかによって直接的または間接的いずれかで機能できることを前提に、癌の特定形態における所定のシグナル伝達経路の活性は、様々な癌治療の有効性についての優れたインジケータとして機能できる可能性がある。したがって、その他の必要を満たすことに加えて、本発明は、個別患者にとって有望な抗癌療法の有効性を評価するための方法を提供する。したがって本発明は、医師が各患者のために適切な用量および適切な時点で適合する癌療法を選択することを支援するための方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本発明は、腫瘍細胞（例えば、乳房腫瘍の循環細胞）中のシグナル伝達経路の成分の活性化状態を検出するための組成物および方法を提供する。本発明の実施から引き出されるシグナル伝達経路の成分の活性化状態に関する情報は、癌の診断、予後診断、および癌治療の設計において使用できる。

【００１０】

１つの態様では、本発明は、乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤を選択するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記抗癌剤が、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍の治療のために適切であるか、または不適切であるかを決定する工程と、を含む方法を提供する。

【００１１】

好ましい実施形態では、乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤を選択するための方法は：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；

（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少している場合は、前記抗癌剤が前記乳房腫瘍の治療のために適切であることを指示する工程と、を含む。

【００１２】

一部の実施形態では、本発明の方法は、乳房腫瘍の治療のために適切な抗癌剤の選択を

補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、乳房腫瘍の治療のために適切な抗癌剤の選択を改善するために有用な可能性がある。

【００１３】

また別の態様では、本発明は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答を同定するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に応答性または非応答性であると同定する工程と、を含む方法を提供する。

【００１４】

好ましい実施形態では、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答を同定するための方法は：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；

（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少している場合は、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に応答性であることを指示する工程と、を含む。

【００１５】

一部の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定を補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定を改良するために有用な可能性がある。

【００１６】

さらにまた別の態様では、本発明は、乳房腫瘍を有する被験者の抗癌剤を用いた治療への応答を予測するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記被験者が前記抗癌剤を用いた治療に応答する可能性を予測する工程と、を含む方法を提供する。

【００１７】

好ましい実施形態では、乳房腫瘍を有する被験者の抗癌剤を用いた治療への応答を予測するための方法は：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；
（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少している場合は、前記被験者が前記抗癌剤を用いた治療に応答する可能性が高いことを指示する工程と、を含む。

【００１８】

一部の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療へ被験者が応答する見込みの予測を補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療へ被験者が応答する見込みの予測を改良するために有用な可能性がある。

【００１９】

また別の態様では、本発明は、固体支持体上に固定された複数の希釈系列の捕捉抗体を含む優れたダイナミックレンジを有するアレイであって、各希釈系列中の捕捉抗体は細胞抽出物中のシグナル伝達経路の成分または他のタンパク質（例えば、核ホルモン受容体）の成分に対応する１つ以上の分析物に対して特異的であるアレイを提供する。本明細書に記載したアドレス可能なアレイは、乳癌に関係するシグナル伝達分子および他のタンパク質の発現および／または活性化状態を決定するために特に有用である。

【００２０】

追加の態様では、本発明は、切断受容体（truncated receptor）の存在（または非存在）を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉された切断受容体を前記対応する切断受容体に対して特異的である検出抗体とインキュベートする工程と；
（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法を提供する。

【００２１】

関連態様では、本発明は、切断受容体の存在（または非存在）を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉され

た切断受容体を、前記対応する切断受容体に対して特異的である複数の活性化状態非依存性抗体および複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、

前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーへチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、

（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；

（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法を提供する。

【００２２】

本発明のその他の目的、特徴、および利点は、当業者には以下の詳細な説明および図面から明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】本発明の実施において使用できる細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の１つの実施例を示す図である。マイトジェンシグナルを細胞増殖に変換させるために細胞によって使用されるＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路の成分が描出されている。

【００２４】

【図２】本明細書で記載した近接アッセイが単細胞感受性を備えるリン酸化ＥＧＦＲ（ｐＥＧＦＲ）およびリン酸化ＨＥＲ－２（ｐＨＥＲ－２）を検出した、本発明の１つの実施形態を示す図である。

【００２５】

【図３】本明細書に記載した近接アッセイがＨＥＲ－２を発現する細胞中でのみ単細胞レベルでのＨＥＲ－２の検出のための高度に特異的なアッセイを生じさせたことを示す図である。

【００２６】

【図４】癌治療の全経過を通して薬物選択のための本発明のアドレス可能なアレイの適用を略図によって示す図である。

【００２７】

【図５】例えばＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路におけるような、受容体チロシンキナーゼ経路の成分への抗体の希釈液を含むアドレス可能なアレイの実施例を略図によって示す図である。抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の希釈液中で３回ずつプレーティングされる。

【００２８】

【図６】腫瘍血管新生において活性化されたシグナル伝達経路の成分への抗体の希釈液を含むアドレス可能なアレイの実施例を略図によって示す図である。抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の希釈液中で３回ずつプレーティングされる。

【００２９】

【図７】腫瘍血管新生において活性化されたシグナル伝達経路の成分への抗体の希釈液を含むまた別のアドレス可能なアレイの実施例を略図によって示す図である。抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の希釈液中で３回ずつプレーティングされる。

【００３０】

【図８】腫瘍血管新生において活性化された受容体チロシンキナーゼ経路およびシグナル伝達経路の成分への抗体の希釈液を含むアドレス可能なアレイの実施例を略図によって示す図である。抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の希釈液中で３回ずつプレーティングされる。

【００３１】

【図９】腫瘍血管新生において活性化された受容体チロシンキナーゼ経路およびシグナル伝達経路の成分への抗体の希釈液を含むまた別のアドレス可能なアレイの実施例を略図に

よって示す図である。抗体は、アドレス可能なアレイ上の希釈系列中で３回ずつプレーティングすることができる。

【００３２】

【図１０】５例の乳癌および６例の正常サンプルについてのＥＧＦＲの相対リン酸化レベルを示す図である。データは、表４０にも示した。

【００３３】

【図１１】５例の乳癌および６例の正常サンプルについてのＨＥＲ－２の相対リン酸化レベルを示す図である。データは、表４１にも示した。

【００３４】

【図１２】５例の乳癌患者についてのＶｅｒｉｄｅｘ　ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）システム上でのＣＴＣ染色の画像を示す図である。細胞系コントロールは、Ａ４３１（ＥＧＦＲについて陽性）およびＳＫＢｒ３（ＨＥＲ－２について陽性）である。

【００３５】

【図１３】全長ＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）は、ポリスチレンビーズもしくはポリマーデキストランに付着させたＥｒｂＢ２の細胞外ドメインに結合する抗体を用いて患者サンプルから取り除けることを示す図である。

【００３６】

【図１４】例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するための本発明の１つの実施形態を示す図である。ＳＡ＝ストレプトアビジン；ＨＲＰ＝西洋ワサビペルオキシダーゼ；ＴＳＡ＝チラミドシグナル増幅。

【００３７】

【図１５】ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に向けられた抗体でコーティングされたビーズを用いた前処理が、ＥｒｂＢ２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）シグナルに影響を及ぼすことなく全長ＥｒｂＢ２シグナルをほぼ完全に除去したことを示す図である。

【００３８】

【図１６】ＡＰＭＡ（（４－アミノフェニル）酢酸第二水銀）処理は、ＢＴ－４７４細胞内でのｐ９５ＥｒｂＢ２リン酸化を増加させたことを示す図である。

【００３９】

【図１７】ヘレグリン（ｈｅｒｅｇｕｌｉｎ）がＴ４７Ｄ細胞内でのｐ９５ＥｒｂＢ２リン酸化を増加させたことを示す図である。

【００４０】

【図１８】特定患者のために適切な乳癌療法を選択することに関して本発明の方法を臨床実践に影響を及ぼすために使用できる複数の時点を示す図である。

【００４１】

【図１９】結合した各標的タンパク質毎のその後のチャネリング事象のためには酵素と連結した２つの追加の検出抗体の共局在化に依存する、本発明のアッセイフォーマットの１つの実施形態を示す図である。

【００４２】

【図２０】ｐＨＥＲ－１およびｐＨＥＲ－２アッセイに対する単細胞感受性を示す図である。

【００４３】

【図２１】様々な細胞系におけるＥＧＦまたはＨＲＧβ処理を用いたＥｒｂＢ発現／活性化を示す図である。

【００４４】

【図２２】ＥＧＦまたはＨＲＧβ刺激を用いたＴ４７Ｄ　ＥｒｂＢ　ＲＴＫプロファイルを示す図である。

【００４５】

【図２３】ＥｒｂＢ経路アレイの典型的な実施形態を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００４６】
Ｉ．はじめに
上述したように、細胞増殖に関係するシグナル伝達経路の活性化および細胞死に関係する経路の非活性化は、多数の異なるタイプの癌を特性付ける分子的特徴の非限定的な例である。多数の場合において、特定のシグナル伝達経路の活性、およびそれらの成分は、所定タイプの癌のための分子シグニチャーとして機能することができる。そのような活性化された成分は、治療介入のために有用な標的をさらに提供することができる。したがって、治療前、治療中、および治療後に癌細胞内での特定シグナル伝達系の活性レベルに関する知識は、採用するべき適切な治療経過を選択するために使用できる高度に重要な情報を医師に提供する。さらに、癌細胞内で治療が進行するにつれて活性になるシグナル伝達経路の持続的監視は、例えば、同一もしくはまた別のシグナル伝達経路のいずれかを活性化するまた別の異常を通して癌細胞が治療に耐性になった場合は、医師に特定の治療コースを持続するか、または別の治療ラインへ切り替えるかを促すように、医師に治療の有効性に関する追加の情報を提供することができる。
【００４７】
したがって、本発明は、特異的多重高スループットアッセイにおいて固形腫瘍の希少循環細胞などの腫瘍組織または腫瘍外細胞中での複数の無秩序のシグナル伝達分子の発現および活性化状態を検出するための方法および組成物を提供する。本発明は、無秩序なシグナル伝達経路をダウンレギュレートまたは活動停止させるために適切な療法（単剤または薬物の組み合わせ）を選択するための方法および組成物もさらに提供する。そこで、本発明を使用すると、癌患者に合わせた個別の療法の設計を促進することができる。
【００４８】
単細胞のレベルでのシグナル伝達経路の活性の決定を通しての循環中で腫瘍細胞を検出および同定する能力は、本発明の重要な利点である。腫瘍細胞は、「微小転移」（播種性腫瘍細胞）としての様々な初期段階の癌を備える患者の血液中で見いだされることが多く、転移性癌においても見いだされる。血液中の腫瘍細胞の数は、腫瘍の病期およびタイプに依存するであろう。生検標本は典型的には原発腫瘍上で入手され、ほとんどの転移腫瘍では生検が行われないので、そのような腫瘍サンプルについて分子分析を行うことが極めて困難である。腫瘍転移中には、大多数の進行性腫瘍細胞は原発腫瘍を離れ、血液系およびリンパ系を通って移動し、遠隔部位に達する。そこで、血液由来の循環腫瘍細胞は、腫瘍細胞の最も進行性で均質な集団を表す。しかし、血液中の転移腫瘍細胞の数は、極めて少ないことが多く、血液１ｍＬ当たり１個～数千個まで様々である。そのような希少細胞中でシグナル伝達経路を単離してアッセイし、この情報をより効果的な癌治療に向けて適用する能力は、本発明の１つの目的である。
【００４９】
一部の実施形態では、本発明の多重高スループットイムノアッセイは、固形腫瘍の循環細胞内における１つ以上のシグナル伝達分子の単細胞レベルでの活性化状態を検出することができる。実際に、ＥＧＦＲなどのシグナル伝達分子は、約１００ゼプトモルの感受性ならびに約１００ゼプトモル～約１００フェムトモルの線形ダイナミックレンジで検出することができる。そこで、希少循環細胞中の複数シグナル伝達物質の活性化状態の単細胞検出は、癌の予後診断および診断ならびに個別の標的療法の設計を促進する。
【００５０】
希少循環細胞には、固形腫瘍から転移または微小転移している固形腫瘍の循環細胞が含まれる。循環腫瘍細胞、癌幹細胞、および、例えば循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環前血管新生骨髄性細胞、および循環樹状細胞などの腫瘍へ移動している（例えば、化学走化性に起因する）細胞は、固形腫瘍と関連している循環細胞の一部の例である。
【００５１】
当該のシグナル伝達分子は、典型的にはそれらのインサイチュー（ｉｎ　ｓｉｔｕ）活性化状態を維持するために循環細胞が単離された直後に、好ましくは約２４、６、もしくは１時間以内、およびより好ましくは約３０、１５、もしくは５分間以内に抽出される。

単離した細胞は、さらにまた通常はナノモル～ミクロモル濃度の１つ以上の成長因子とともに、シグナル伝達分子の活性化を復活させる、または刺激するために約１～３０分間にわたりインキュベートすることができる（例えば、Ｉｒｉｓｈら、Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）を参照されたい）。

【００５２】

以下でより詳細に説明するように、個別患者のために見込みのある抗癌療法を評価するために、単離した細胞は様々な用量で１つ以上の抗癌剤とインキュベートすることができる。成長因子の刺激は、次に数分間（例えば、約１～５分間）または数時間（例えば、約１～６時間）にわたり実施することができる。抗癌剤を用いた、および用いないシグナル伝達経路の示差的活性化は、各個別患者のために適正用量での適切な癌療法の選択において役立つことができる。循環細胞は、さらにまた抗癌剤治療中の患者サンプルから単離し、療法の変更を実施すべきかどうかを決定するために１つ以上の成長因子を用いて刺激することもできる。したがって、本発明の方法は、有利にも、医師が各患者のために正しい時点に正しい用量で適正な抗癌剤を提供することを支援する。

【００５３】

乳癌に関連して、現行の試験選択肢は不十分であるが、それは乳癌患者における原発腫瘍および転移腫瘍療法の治療が、疾患の初期段階に採取された生検サンプルからの１回限りの診断に基づいているからである。詳細には、乳癌の初期および転移期の両方についての治療介入は、転移癌患者からの生検サンプル入手が実行不可能であるために、疾患の初期段階に採取された生検サンプルからの初期診断のみに基づいている。しかし乳房腫瘍は、時間および治療の関数として進化するので、乳房腫瘍の時間的監視は乳癌患者の最適な管理のために極めて重要である。例えば、受容体チロシンキナーゼのＥｒｂＢ（ＨＥＲ）ファミリーの１つ以上の活性化状態における変化は、再発時の治療選択に影響を及ぼす可能性がある。実際に、原発癌と転移癌との間のＨＥＲ－２状態における不一致は、全乳癌患者の３７％までがＨＥＲ－２陰性原発腫瘍からＨＥＲ－２陽性転移癌へ変化するために、一般的である。さらに、患者はＨＥＲ－１／２活性化に起因してホルモン療法に対する新規耐性を有する、または獲得耐性を発生する場合がある。一部の場合には、患者は、ｐ９５ＨＥＲ－２を発現する腫瘍細胞の存在に起因してＥｒｂＢ標的療法への新規耐性を有する、または獲得耐性を発生する可能性がある。結果として、現行技術には感受性および特異性が欠けており、療法下の患者を監視するためには使用できない、そして個別治療決定を誘導するために経路プロファイリングを利用しないので、医師が適切な時点に適切な癌療法を処方することを支援するアッセイに対する満たされていない臨床的必要が存在する。

【００５４】

現在利用できる乳癌検査の選択肢とは対照的に、本発明の方法は、例えば血液および／または細針吸引液（ＦＮＡ）由来の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などのサンプルを使用して固形乳房腫瘍の「リアルタイム生検」を提供することによって、疾患の全病期を通して乳癌患者を監視することを可能にする。非限定的実施例として、本明細書に記載した乳癌アッセイは、疾患の初期段階に患者における乳癌の初期診断に使用することができる。適切な癌療法の選択は、本明細書に記載した単一検出および近接二重検出アッセイを使用して、抗癌剤を用いて、および用いずに特異的シグナル伝達経路の活性化状態をプロファイリングすることによって誘導される。有利にも、本発明の方法は、疾患の任意の段階に採取され、単一検出および近接二重検出アッセイを使用して分析されるサンプルに基づいて治療的介入を行うことができるので、疾患の進行または退行を監視するためにも使用できる。したがって、乳癌の初期および転移期のために適切な癌療法の選択は、リアルタイム診断および特異的シグナル伝達経路分子の活性化状態の分析によって誘導される。

【００５５】

本発明の方法は、有利にも癌管理における重要な問題に対応し、乳癌患者のためにより高度の標準看護を提供できるように適合させられるが、それは前記方法が（１）増加した感受性を提供する（例えば、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２などの全およびリン酸化シグナル

伝達分子を検出するために単細胞検出を達成できる）、（２）増加した特異性を提供する（例えば、３抗体近接アッセイはリン酸化シグナル伝達分子を検出するための特異性を増強する）、（３）経路プロファイリングを可能にする（例えば、特異的シグナル伝達分子の活性化状態は患者由来のＣＴＣおよびＦＮＡ中で検出できる）、および（４）患者サンプルを入手することに伴うあらゆる問題を排除する（例えば、アッセイはほんの少数の腫瘍細胞上で実施できる）からである。本明細書に記載した新規アッセイではあらゆるサンプルを使用できるが、ＣＴＣは最も進行性の腫瘍細胞を表し、各腫瘍はＣＴＣを遊離させることが公知であり、遺残腫瘍もしくは接近するのが困難な転移腫瘍の唯一の起源である可能性があり、そしては血中で見いだされるので、特に有用である。したがって本発明の方法は、乳房腫瘍組織の連続サンプリングを可能にし、時間および療法の関数として腫瘍細胞内で発生する変化に関する貴重な情報を生じさせ、そして迅速に発生する癌経路シグニチャーを監視するための手段を医師に提供する。

【００５６】

これらをまとめると、本発明の方法は有利にも、多重化された、抗体に基づく単一検出および近接アッセイを使用して、容易にアクセス可能な腫瘍細胞について経路プロファイリングを実施することによって標的療法から利益が得られる可能性が最も高い癌患者（例えば、乳癌患者）の正確な選択および監視を提供する。

【００５７】

ＩＩ．用語の定義

本明細書で使用するように、以下の用語は、他に特に規定しない限り、それらに与えられた意味を有する。

【００５８】

用語「癌」は、異常細胞の制御されない増殖を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーを含めることが意図されている。この用語は、悪性、良性、軟組織、もしくは固形、または転移前および転移後癌を含むあらゆる病期および悪性度の癌のいずれであると特徴付けられようと、あらゆる公知の癌および腫瘍状態を含む。様々な癌のタイプの例には、乳癌；肺癌（例えば、非小細胞肺癌）；結腸直腸癌、消化管間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、および胃癌などの消化器および消化管癌；食道癌；胆嚢癌；肝臓癌；膵臓癌；虫垂癌；卵巣癌；腎臓癌（例えば、腎細胞癌）；中枢神経系の癌；皮膚癌；リンパ腫；絨毛腫；頭頸部癌；骨原性肉腫；ならびに血液癌が含まれるがそれらに限定されない。本明細書で使用する「腫瘍」は、１つ以上の癌性細胞を含む。１つの好ましい実施形態では、乳房腫瘍は、浸潤性もしくは非浸潤性の乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する。また別の好ましい実施形態では、乳房腫瘍は、再発性もしくは転移性乳癌を備える患者に由来する。

【００５９】

用語「分析物」には、任意の当該の分子、典型的にはその存在、量、および／または同一性が決定される、ポリペプチドなどの高分子が含まれる。所定の場合には、分析物は、固形腫瘍の循環細胞の細胞成分、好ましくはシグナル伝達分子である。

【００６０】

本明細書で使用する用語「希釈系列」は、特定サンプル（例えば、細胞溶解物）または試薬（例えば、抗体）の一連の減少する濃度を含むことが意図されている。希釈系列は、典型的には、低濃度のサンプルまたは試薬を作成するために測定された量の出発濃度のサンプルまたは試薬を希釈液（例えば、希釈緩衝液）と混合するプロセスと、さらに所望の数の連続希釈液を得るために十分な回数にわたり前記プロセスを繰り返す工程によって生成される。サンプルまたは試薬は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、もしくは５０の下降濃度のサンプルまたは試薬を含む希釈系列を生成するために少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、５００、もしくは１，０００倍で連続的に希釈することができる。例えば、１ｍｇ／ｍＬの出発濃度で２倍の連続希釈率の捕捉抗体試薬を含む希釈系

列は、０．５ｍｇ／ｍＬ濃度の捕捉抗体を作成するためにある量の出発濃度の捕捉抗体を等量の希釈緩衝液と混合する工程と、０．２５ｍｇ／ｍＬ、０．１２５ｍｇ／ｍＬ、０．０６２５ｍｇ／ｍＬ、０．０３２５ｍｇ／ｍＬなどの捕捉抗体濃度を得るために前記プロセスを繰り返すことによって生成できる。

【００６１】

本明細書で使用する用語「優れたダイナミックレンジ」は、１個という少ない細胞内または数千個という多数の細胞内で特異的分析物を検出するためのアッセイの能力を意味する。例えば、本明細書に記載したイムノアッセイは、有利には希釈系列の捕捉抗体濃度を用いて約１～１０，０００ｃｅｌｌｓ（例えば、約１、５、１０、２５、５０、７５、１００、２５０、５００、７５０、１，０００、２，５００、５，０００、７，５００、もしくは１０，０００ｃｅｌｌｓ）中で当該の特定シグナル伝達分子を検出するので、優れたダイナミックレンジを有する。

【００６２】

用語「シグナル伝達分子」もしくは「シグナル伝達物質」は、それにより細胞が細胞外シグナルもしくは刺激を応答に変換するプロセスであって、典型的には細胞の内部での順序付けられた生化学反応の順序を含むプロセスを実施するタンパク質およびその他の分子を含む。シグナル伝達分子の例には、例えばＥＧＦＲ（例えば、ＥＧＦＲ／ＨＥＲ－１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ－２／Ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－３／ＥｒｂＢ３、ＨＥＲ－４／ＥｒｂＢ４）、ＶＥＧＦＲ－１／ＦＬＴ－１、ＶＥＧＦＲ－２／ＦＬＫ－１／ＫＤＲ、ＶＥＧＦＲ－３／ＦＬＴ－４、ＦＬＴ－３／ＦＬＫ－２、ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ）、ｃ－ＫＩＴ／ＳＣＦＲ、ＩＮＳＲ（インスリン受容体）、ＩＧＦ－ＩＲ、ＩＧＦ－ＩＩＲ、ＩＲＲ（インスリン受容体関連性受容体）、ＣＳＦ－１Ｒ、ＦＧＦＲ１－４、ＨＧＦＲ１－２、ＣＣＫ４、ＴＲＫＡ－Ｃ、ＭＥＴ、ＲＯＮ、ＥＰＨＡ１－８、ＥＰＨＢ１－６、ＡＸＬ、ＭＥＲ、ＴＹＲＯ３、ＴＩＥ１－２、ＴＥＫ、ＲＹＫ、ＤＤＲ１－２、ＲＥＴ、ｃ－ＲＯＳ、Ｖ－カドヘリン、ＬＴＫ（白血球チロシンキナーゼ）、ＡＬＫ（未分化リンパ腫キナーゼ）、ＲＯＲ１－２、ＭＵＳＫ、ＡＡＴＹＫ１－３、ＲＴＫ１０６などの受容体チロシンキナーゼ、例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの受容体チロシンキナーゼの切断形；例えばＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｓｒｃ、Ｆｒｋ、Ｂｔｋ、Ｃｓｋ、Ａｂｌ、Ｚａｐ７０、Ｆｅｓ／Ｆｐｓ、Ｆａｋ、Ｊａｋ、Ａｃｋ、およびＬＩＭＫなどの非受容体チロシンキナーゼ；例えばＡｋｔ、ＭＡＰＫ／ＥＲＫ、ＭＥＫ、ＲＡＦ、ＰＬＡ２、ＭＥＫＫ、ＪＮＫＫ、ＪＮＫ、ｐ３８、Ｓｈｃ（ｐ６６）、ＰＩ３Ｋ、Ｒａｓ（例えば、Ｋ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ）、Ｒｈｏ、Ｒａｃ１、Ｃｄｃ４２、ＰＬＣ、ＰＫＣ、ｐ７０　Ｓ６キナーゼ、ｐ５３、サイクリンＤ１、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ＰＩＰ２、ＰＩＰ３、ＰＤＫ、ｍＴＯＲ、ＢＡＤ、ｐ２１、ｐ２７、ＲＯＣＫ、ＩＰ３、ＴＳＰ－１、ＮＯＳ、ＰＴＥＮ、ＲＳＫ１－３、ＪＮＫ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｒｂ、ＣＲＥＢ、Ｋｉ６７、およびパキシリンなどのチロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分；例えばエストロゲン受容体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）、アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体、ビタミンＡ受容体、ビタミンＤ受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、およびオーファン受容体などの核ホルモン受容体；例えば各々乳癌－１（ＡＩＢ１）および核受容体コリプレッサー１（ＮＣＯＲ）内で増幅させられるような核受容体コアクチベーター類およびリプレッサー類；ならびにそれらの組み合わせなどが含まれるがそれらに限定されない。

【００６３】

本明細書で使用する用語「循環細胞」は、固形腫瘍から転移した、または微小転移したいずれかである腫瘍外細胞を含む。循環細胞の例には、循環腫瘍細胞、癌幹細胞、および／または腫瘍へ移動中である細胞（例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環前血管新生骨髄性細胞、循環樹状細胞など）が含まれるがそれらに限定されない。

【００６４】

本明細書で使用する用語「サンプル」は、患者から得られた任意の生物学的標本を含む。サンプルには、制限なく、全血、血漿、血清、赤血球、白血球（例えば、末梢血単核球

）、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液（例えば、リンパ節の播種性腫瘍細胞）、骨髄吸引液、唾液、尿、便（すなわち大便）、痰、気管支洗浄液、涙液、細針吸引液（例えば、無作為小室周囲細針吸引によって採取される）、任意の他の体液、例えば腫瘍の生検（例えば、針生検）もしくはリンパ節（例えば、センチネルリンパ節生検）の生検などの組織サンプル（例えば、腫瘍組織）、ならびにそれらの細胞抽出液が含まれる。一部の実施形態では、サンプルは、全血または例えば血漿、血清、もしくは細胞ペレットなどのそれらの分画成分である。好ましい実施形態では、サンプルは、当業者には公知である任意の技術を使用して全血またはその細胞分画から固形腫瘍の循環細胞を単離することによって入手される。他の実施形態では、サンプルは、例えば乳房の固形腫瘍由来のホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）腫瘍組織サンプルである。

【００６５】

「生検」は、診断的もしくは予後診断的評価のために組織サンプルを切除する工程および組織標本自体を意味する。当分野において公知の任意の生検技術は、本発明の方法および組成物に適用することができる。適用される生検技術は、一般には、他の因子の中でも特に、評価対象の組織タイプ、ならびに腫瘍のサイズおよびタイプ（すなわち、固形もしくは浮遊型（すなわち、血液もしくは腹水））に依存するであろう。代表的な生検技術には、切除生検、切開生検、針生検（例えば、コア針生検、細針吸引生検など）、外科生検、および骨髄生検が含まれる。生検技術については、例えば、Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｋａｓｐｅｒら編集、第１６版、２００５年、第７０章、および第Ｖ部全体において考察されている。当業者であれば、所定の組織サンプル中で癌性および／または前癌性細胞を同定するために生検技術を実施できることを理解するであろう。

【００６６】

用語「被験者」または「患者」または「個人」は、典型的にはヒトを含むが、さらに例えば他の霊長類、齧歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどの他の動物も含むことができる。

【００６７】

「アレイ」もしくは「マイクロアレイ」は、例えば、ガラス（例えば、ガラススライド）、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ（例えば、磁気ビーズ、ポリスチレンビーズなど）、紙、膜（例えば、ナイロン、ニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）など）、繊維束、または任意の他の適切な基質などの固体支持体上に固相化もしくは固定された個別セットおよび／または希釈系列の捕捉抗体を含む。捕捉抗体は、一般に共有または非共有相互作用（例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｗａａｌｓ）力、双極子間結合）を介して固体支持体上に固相化または固定される。所定の場合には、捕捉抗体は、固体支持体に結合した捕捉剤と相互作用する捕捉タグを含む。本発明のアッセイにおいて使用されるアレイは、典型的には、複数の異なる捕捉抗体および／または異なる公知／アドレス可能な場所で固体支持体の表面に結合している捕捉抗体濃度を含む。

【００６８】

用語「捕捉抗体」は、例えば固形腫瘍の循環細胞の細胞抽出物などのサンプル中の１つ以上の当該の分析物に対して特異的である（すなわち、結合する、それに結合される、または複合体をともに形成する）固相化された抗体を含むことが意図されている。好ましい実施形態では、捕捉抗体は、アレイ内の固体支持体上に固定される。固体支持体上に様々なシグナル伝達分子のいずれかを固定化するのに適切な捕捉抗体は、Ｕｐｓｔａｔｅ社（カリフォルニア州テメキュラ）、Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ社（カリフォルニア州カマリロ）、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（マサチューセッツ州ダンバーズ）、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社（ミネソタ州ミネアポリス）、Ｌａｂ Ｖｉｓｉｏｎ社（カリフォルニア州フレモント）、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社（カリフォルニア州サンタクルーズ）、Ｓｉｇｍａ社（ミズーリ州セントルイス）、およびＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社（カリフォルニア州サンノゼ）から入手できる

。

【００６９】

本明細書で使用する用語「検出抗体」は、サンプル中の当該の１つ以上の分析物に対して特異的である（すなわち、結合する、それに結合される、または複合体をともに形成する）検出可能な標識を含む抗体を含む。この用語はさらに、当該の１つ以上の分析物に対して特異的である抗体を含み、前記抗体は検出可能な標識を含むまた別の種に結合されることができる。検出可能な標識の例には、ビオチン／ストレプトアビジン標識、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）標識、化学的に反応性の標識、蛍光標識、酵素標識、放射活性標識、ならびにそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。様々なシグナル伝達分子のいずれかの活性化状態および／または総量を検出するのに適切な検出抗体は、Ｕｐｓｔａｔｅ社（カリフォルニア州テメキュラ）、Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ社（カリフォルニア州カマリロ）、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（マサチューセッツ州ダンバーズ）、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社（ミネソタ州ミネアポリス）、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ社（カリフォルニア州フレモント）、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社（カリフォルニア州サンタクルーズ）、Ｓｉｇｍａ社（ミズーリ州セントルイス）、およびＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社（カリフォルニア州サンノゼ）から入手できる。非限定的な例として、例えばＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－Ｓｒｃ、ＦＬＫ－１、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｋｔ、ＭＡＰＫ、ＰＴＥＮ、Ｒａｆ、およびＭＥＫなどのシグナル伝達分子の様々なリン酸化形に対するリン特異的抗体は、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社から入手できる。

【００７０】

用語「活性化状態依存性抗体」は、サンプル中の当該の１つ以上の分析物の特定活性化状態に対して特異的である（すなわち、結合する、それに結合される、または複合体をともに形成する）検出抗体を含む。好ましい実施形態では、活性化状態依存性抗体は、例えば１つ以上のシグナル伝達分子などの１つ以上の分析物のリン酸化、ユビキチン化、および／または複合体形成状態を検出する。一部の実施形態では、受容体チロシンキナーゼのＥＧＦＲファミリーのメンバーのリン酸化および／またはＥＧＦＲファミリーメンバー間のヘテロ二量体複合体の形成は、活性化状態依存性抗体を用いて検出される。活性化状態依存性抗体を用いて検出するのに適切な活性化状態（括弧内に列挙した）の非限定的例には：ＥＧＦＲ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ、リン酸化（ｐ－）ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲ：Ｓｈｃ、ユビキチン化（ｕ－）ＥＧＦＲ、ｐ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ）；ＥｒｂＢ２（ｐ９５：切断（Ｔｒ）－ＥｒｂＢ２、ｐ－ＥｒｂＢ２、ｐ９５：Ｔｒ－ｐ－ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－２：Ｓｈｃ、ＥｒｂＢ２：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ２：ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ４）；ＥｒｂＢ３（ｐ－ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ｐ－ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ３：Ｓｈｃ）；ＥｒｂＢ４（ｐ－ＥｒｂＢ４、ＥｒｂＢ４：Ｓｈｃ）；ＥＲ（ｐ－ＥＲ（Ｓ１１８、Ｓ１６７）；ＩＧＦ－１Ｒ（ｐ－ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＧＦ－１Ｒ：ＩＲＳ、ＩＲＳ：ＰＩ３Ｋ、ｐ－ＩＲＳ、ＩＧＦ－１Ｒ：ＰＩ３Ｋ）；ＩＮＳＲ（ｐ－ＩＮＳＲ）；ＫＩＴ（ｐ－ＫＩＴ）；ＦＬＴ３（ｐ－ＦＬＴ３）；ＨＧＦＲＩ（ｐ－ＨＧＦＲＩ）；ＨＧＦＲ２（ｐ－ＨＧＦＲ２）；ＲＥＴ（ｐ－ＲＥＴ）；ＰＤＧＦＲａ（ｐ－ＰＤＧＦＲａ）；ＰＤＧＦＲＰ（ｐ－ＰＤＧＦＲＰ）；ＶＥＧＦＲＩ（ｐ－ＶＥＧＦＲＩ、ＶＥＧＦＲＩ：ＰＬＣｇ、ＶＥＧＦＲ１：Ｓｒｃ）；ＶＥＧＦＲ２（ｐ－ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ２：ＰＬＣｙ、ＶＥＧＦＲ２：Ｓｒｃ、ＶＥＧＦＲ２：ヘパリン硫酸、ＶＥＧＦＲ２：ＶＥ－カドヘリン）；ＶＥＧＦＲ３（ｐ－ＶＥＧＦＲ３）；ＦＧＦＲ１（ｐ－ＦＧＦＲ１）；ＦＧＦＲ２（ｐ－ＦＧＦＲ２）；ＦＧＦＲ３（ｐ－ＦＧＦＲ３）；ＦＧＦＲ４（ｐ－ＦＧＦＲ４）；Ｔｉｅｌ（ｐ－Ｔｉｅｌ）；Ｔｉｅ２（ｐ－Ｔｉｅ２）；ＥｐｈＡ（ｐ－ＥｐｈＡ）；ＥｐｈＢ（ｐ－ＥｐｈＢ）；ＮＦＫＢおよび／またはＩＫＢ（ｐ－ＩＫ（Ｓ３２）、ｐ－ＮＦＫＢ（Ｓ５３６）、ｐ－Ｐ６５：ＩＫＢａ）；Ａｋｔ（ｐ－Ａｋｔ（Ｔ３０８、Ｓ４７３））；ＰＴＥＮ（ｐ－ＰＴＥＮ）；Ｂａｄ（ｐ－Ｂａｄ（Ｓ１１２、Ｓ１３６）、Ｂａｄ：１４－３－３）；ｍＴｏｒ（ｐ－ｍＴｏｒ（Ｓ２４４８））；ｐ７０Ｓ６Ｋ（ｐ－ｐ７０Ｓ６Ｋ（Ｔ２２９、Ｔ３８９））；Ｍｅｋ（ｐ－Ｍ

ｅｋ（Ｓ２１７、Ｓ２２１））；Ｅｒｋ（ｐ－Ｅｒｋ（Ｔ２０２、Ｙ２０４））；Ｒｓｋ－１（ｐ－Ｒｓｋ－１（Ｔ３５７、Ｓ３６３））；Ｊｎｋ（ｐ－Ｊｎｋ（Ｔ１８３、Ｙ１８５））；Ｐ３８（ｐ－Ｐ３８（Ｔ１８０、Ｙ１８２））；Ｓｔａｔ３（ｐ－Ｓｔａｔ－３（Ｙ７０５、Ｓ７２７））；Ｆａｋ（ｐ－Ｆａｋ（Ｙ５７６））；Ｒｂ（ｐ－Ｒｂ（Ｓ２４９、Ｔ２５２、Ｓ７８０））；Ｋｉ６７；ｐ５３（ｐ－ｐ５３（Ｓ３９２、Ｓ２０））；ＣＲＥＢ（ｐ－ＣＲＥＢ（Ｓ１３３））；ｃ－Ｊｕｎ（ｐ－ｃ－Ｊｕｎ（Ｓ６３））；ｃＳｒｃ（ｐ－ｃＳｒｃ（Ｙ４１６））；およびパキシリン（ｐ－パキシリン（Ｙ１１８））が含まれる。

【００７１】

用語「活性化状態非依存性抗体」は、それらの活性化状態とは無関係にサンプル中の当該の１つ以上の分析物の特定活性化状態に対して特異的である（すなわち、結合する、それに結合される、または複合体をともに形成する）検出抗体を含む。例えば、活性化状態非依存性抗体は、例えば１つ以上のシグナル伝達分子などの１つ以上の分析物のリン酸化および非リン酸化形の両方を検出することができる。

【００７２】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡなどの一本鎖または二本鎖形いずれかにあるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを含む。核酸には、合成、天然型、および非天然型である、ならびに参照核酸と類似の結合特性を有する、公知のヌクレオチドアナログまたは修飾バックボーン残基もしくはリンケージを含有する核酸が含まれる。そのようなアナログの例には、制限なく、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルホスホネート、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、およびペプチド－核酸（ＰＮＡ）が含まれる。特別に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有する天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有する核酸を含む。他に特に規定しない限り、特定核酸配列は、さらにまた黙示的に保存的に修飾されたそれらの変異体および相補的配列ならびに明示的に指示された配列を含む。

【００７３】

用語「オリゴヌクレオチド」は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド、および／またはそれらのミメティックの一本鎖オリゴマーもしくはポリマーを意味する。所定の場合には、オリゴヌクレオチドは、天然型（すなわち、未修飾）核酸塩基、糖、およびインターヌクレオシド（バックボーン）結合から構成される。所定の他の場合には、オリゴヌクレオチドは、修飾された核酸塩基、糖、および／またはインターヌクレオシド結合を含む。

【００７４】

本明細書で使用する用語「ミスマッチモチーフ」もしくは「ミスマッチ領域」は、その相補的配列に対して１００％相補性を有していないオリゴヌクレオチドの一部分を意味する。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１、２、３、４、５、６以上のミスマッチ領域を有してもよい。ミスマッチ領域は、連続してもよい、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２以上のヌクレオチドによって分離されてもよい。ミスマッチモチーフもしくは領域は、単一ヌクレオチドを含んでもよい、または２、３、４、５以上のヌクレオチドを含んでもよい。

【００７５】

語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、オリゴヌクレオチドがその相補性配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を意味する。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況では異なるであろう。長い配列は、詳細には高温でハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広汎な指針は、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ｐｒｏｂｅｓ，「Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ

ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ａｓｓａｙｓ」（１９９３）において見いだされる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度ｐＨで特異的配列に対して熱融点（T_m）より約５～１０℃低いように選択される。T_mは、標的に相補的であるプローブの５０％が平衡状態（標的配列が過剰に存在するので、T_mでは、プローブの５０％は平衡状態で占められる）で標的配列にハイブリダイズする温度（規定のイオン強度、ｐＨ、および核濃度下で）である。ストリンジェントな条件は、さらにまたホルムアミドなどの不安定化剤を添加して達成することもできる。選択的または特異的ハイブリダイゼーションのために、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも２倍、好ましくはバックグラウンドハイブリダイゼーションの１０倍である。

【００７６】

用語「実質的に同一」もしくは「実質的同一性」は、２つ以上の核酸の状況においては、配列比較アルゴリズムを用いて、または手動アラインメントおよび目視検査によって測定したように比較窓もしくは指定領域にわたって最高対応について比較およびアライメントした場合に、同一であるまたは同一である規定パーセンテージのヌクレオチド（すなわち、規定領域にわたって少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％同一性）を有する２つ以上の配列を意味する。この定義は、その状況が示す場合は、配列の相補体を同様に意味する。好ましくは、実質的同一性は、長さが少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、または１００ヌクレオチドである領域にわたって存在する。

【００７７】

用語「インキュベートする工程」は、「接触させる工程」および「曝露させる工程」と同義的に使用され、他に規定しない限り任意の特定の時間または温度要件を意味しない。

【００７８】

ＩＩＩ．実施形態の説明

１つの実施形態では、本発明は、特異的多重高スループットアッセイにおいて固形腫瘍の腫瘍組織に由来する腫瘍細胞または循環細胞中での複数の無秩序のシグナル伝達物質の発現および活性化状態を検出するための方法を提供する。本発明は、１つ以上の無秩序なシグナル伝達経路をダウンレギュレートまたは活動停止させるために適切な療法を選択するための方法および組成物もさらに提供する。そこで、本発明の実施形態は、所定の患者の腫瘍において活性化されたシグナル伝達タンパク質の収集によって提供される特定分子シグニチャーに基づいて個別の療法の設計を促進するために使用できる。

【００７９】

固形腫瘍の循環細胞には、癌幹細胞もしくは腫瘍に（例えば、化学誘因に起因して）移動中である細胞、例えば内皮前駆細胞、循環内皮細胞、周皮細胞、循環前血管新生性骨髄性細胞、樹状細胞などの、固形腫瘍から転移した、または微小転移したのいずれかである細胞が含まれる。循環細胞を含有する患者サンプルは、任意の接近可能な生体液（例えば、全血、血清、血漿、痰、気管支洗浄液、尿、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液など）から入手できる。所定の場合には、全血サンプルは、血漿もしくは血清分画および細胞分画（すなわち、細胞ペレット）に分離される。細胞分画は、典型的には、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、循環内皮前駆細胞（ＣＥＰＣ）、癌幹細胞（ＣＳＣ）、リンパ節の播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせなどの、固形腫瘍の赤血球、白血球、および／または循環細胞を含有する。血漿または血清分画は、通常は、特に、固形腫瘍の循環細胞によって遊離される核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）およびタンパク質を含有する。

【００８０】

循環細胞は、典型的には、例えば免疫磁気分離法（例えば、Ｒａｃｉｌａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：４５８９－４５９４（１９９８）；Ｂｉｌｋｅｎｒｏｔｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９２：５７７－５８２（２００１）を参照されたい）、Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ社（ペンシルバニア州ハンティントン・バレー）によるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法（例えば、Ｍｏｈ

ａｍｅｄら、ＩＥＥＥ Ｔｒａｎｓ．Ｎａｎｏｂｉｏｓｃｉ．，３：２５１－２５６（２００４）；Ｌｉｎら、Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．５１４７，９７ｔｈ ＡＡＣＲ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（２００６））、ＦＡＣＳ（例えば、Ｍａｎｃｕｓｏら、Ｂｌｏｏｄ，９７：３６５８－３６６１（２００１））、密度勾配遠心分離法（例えば、Ｂａｋｅｒら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３））、および枯渇法（例えば、Ｍｅｙｅら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２）を参照されたい）を含む１つ以上の分離方法を使用して患者サンプルから単離される。

【００８１】

インサイチュー活性化状態を維持するために、シグナル伝達物質は、有利には細胞が単離された直後に、好ましくは９６、７２、４８、２４、６、もしくは１時間以内に、より好ましくは３０、１５、もしくは５分間以内に抽出される。単離した細胞は、有利には、さらにまた通常はナノモル～ミクロモル濃度の１つ以上の成長因子とともに、シグナル伝達物質の活性化を復活させる、または刺激するために約１～３０分間にわたりインキュベートすることもできる（例えば、Ｉｒｉｓｈら、Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）を参照されたい）。刺激性成長因子には、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ヘレグリン（ＨＲＧ）、ＴＧＦ－α、ＰＩＧＦ、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、ＮＲＧ１、ＰＧＦ、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、サイトカインなどが含まれる。個別患者のための潜在的抗癌療法を評価するためには、成長因子を刺激する前に、単離した細胞を様々な用量の１つ以上の抗癌剤とインキュベートすることができる。成長因子の刺激は、数分間または数時間（例えば、１～５分間から１～６時間）にわたり実施することができる。抗癌剤を用いた、および用いないシグナル伝達経路の示差的活性化は、各個別患者のために適正用量で適切な癌療法の選択において役立つ。単離、抗癌剤治療、および／または成長因子刺激後には、細胞は当分野において公知の任意の技術を用いてシグナル伝達物質を抽出するために溶解させられる。好ましくは、細胞溶解は、成長因子刺激の約１～３６０分間後に、およびより好ましくは２つの異なる時間間隔で：（１）成長因子刺激の約１～５分間後；および（２）成長因子刺激の約３０～１８０分間後に開始される。または、溶解物は、使用時まで－８０℃で保存することができる。

【００８２】

一部の実施形態では、抗癌剤は、癌細胞中の活性化シグナル伝達経路成分の機能を妨害する物質を含む。そのような作用物質の非限定的な例には、以下の表１に列挙した作用物質が含まれる。

【表１】

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	HER-4 (ErbB4)標的
セツキシマブ パニツムマブ マツズマブ ニモツズマブ ErbB1 ワクチン	トラスツズマブ (Herceptin(登録商標)) パーツズマブ(DNA) BMS-599626*	抗体(U3)	
	*ヘテロ二量体化 HER-1/2;第 1 相		
EGFR (ErbB1) (B)	**HER-2 (ErbB2) (D)**	**ErbB1/2 (F)**	**ErbB1/2/4 (G)**
エルロチニブ ゲフィチニブ EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer 社)	ラパチニブ(Tykerb(登録商標)) HKI-272* HKI-357 (前臨床試験) BIBW 2992**	カネルチニブ* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth 社、不可逆性、II CRC) **(Wyeth 社、不可逆性、前臨床試験)		*Wyeth 社、不可逆性、I/II NSCLC、乳癌 ** Boehringer Ingelheim 社、不可逆性、前立腺癌 I/II 期、卵巣癌、乳癌	*Pfizer 社、不可逆性、II NSCLC、乳癌
Raf (H)	**SRC (H)**	**Mek:(I)**	**NFkB-IkB (I)**
ソラフェニブ PLX4032 (Plexxikon 社)	AZ	PD-325901 (II:NSCLC) AZD6244 - Array/Az XL518 Exelisis/DNA	
mTor (J)	**PI3K (J)**	**VEGFR2 および VEGFR1 (K)**	**VEGFR1/2/3:**
Rad 001 :エベロリムス* テムシロリムス** AP-23573***	PX-866*	Avastin(登録商標) (DNA) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171 (NSCLC, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)
*エベロリムス(Novartis 社、ゲフィチニブ/エルロチニブとの併用:I/II:NSCLC, 神経膠芽腫) **テムシロリムス (Wyeth 社、ゲフィチニブ/エルロチニブとの併用:I/II:NSCLC、神経膠芽腫) ***AP-23573 (Ariad 社、I/II : 子宮内膜)	*P110α の特異的阻害;ProlX Pharma 社;前臨床 NSCLC	* (PDL)抗-VEGFa **Regeneron/Aventis 社(受容体模擬薬) (第 2 相)	

VEGFR2 標的(L)			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** 完全ヒト化 IMC1121B CDP-791*** パゾパニブ****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 (Eisai 社) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, PDGFR)	Bay-579352 (+ PDGFR) ABT-869* BMS-540215 (+FGFR1) KRN-951 BBIW	
*Imclone 社(第 2/3 相?) **VEGFR2 に対するキメラ IgG1 ***Celltech 社、R2 に対する pegalated di-Fab 抗体 **** GSK 社、多発性骨髄腫、卵巣癌、RCC 第 3 相登録完了、II 肉腫)	*OSI, PFIZER 社 :(+ ErbB1 + PDGFR) (NSCLC、卵巣癌 第 2 相) **Pfizer 社 :VEGFR1,2 および PDGFRβ) (RCC II) ***(VEGFR1,2 FGFR3,PDGFR)	*(+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)	

VEGFR 2/ErbB1/2 (ErbB1)/cMet/FGFR (M)	VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N)	TIE 1/2	VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit (O)
ZD6474* XL647** AEE 788***	ソラフェニブ*		PTK787 (非 cFMS, FLT-3) スニチニブ XL-999 SU-6668 (Pfizer 社) GSK AZ (AZD2171) BMS Novartis 社(AEE-788) Amgen 社 その他
*(バンデタニブ) (第 III 相:甲状腺癌、NSCLC) **(Exelixis 社 ; さらに EPHB2):(エルロチニブに抵抗性の患者; アジア人の患者) (第 2 相) ***(Novartis 社、第 1/2 相)	*(RCC, HCC, NSCLC(III)、黒色腫(III))		

PDGFR 標的(P)	Abl 標的:(Q)	FTL 3	RET
タンヅチニブ ニロチニブ	イマチニブ ダサチニブ ニロチニブ AT-9283 AZD-0530 ボスチニブ		

Kit 標的(R)	HGFR1/2	FGFR1-4	IGF-1R 標的(S)
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron 社	Merck 社 Pfizer 社 Novartis 社
HSP90 阻害剤:	抗有糸分裂薬:	その他の標的:	
IPI-504* 17-AAG**	ドセタキセル* パクリタキセル** ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン***	HDAC 阻害剤 BCL2 化学療法薬(破壊) プロテオソーム阻害剤	
*(Infinity Pharma 社、変異 ErbB1、I/II 多発性骨髄腫、GIST) **(Kosan 社、I/II 固形腫瘍)	*(微小管安定剤;アジュバントおよび進行性乳癌; NSCLC、アンドロゲン非依存性前立腺癌) **(微小管安定剤;アジュバントおよび進行性乳癌; NSCLC、卵巣癌、AIDS 関連性カポジ肉腫) ***(微小管脱安定剤)		

【００８３】

また別の実施形態では、本発明は、固体支持体上に固定された複数の希釈系列の捕捉抗体を含む優れたダイナミックレンジを有するアドレス可能なアレイであって、各希釈系列中の捕捉抗体はシグナル伝達経路の成分および他の標的タンパク質に対応する１つ以上の分析物に対して特異的であるアレイを提供する。様々な態様では、この実施形態は、特定の腫瘍に特徴的なシグナル伝達経路、例えば乳癌細胞中で活性なシグナル伝達経路の成分を含むアレイを含む。そこで本発明は、有利にも、癌を誘発する潜在的発現もしくは活性化欠損を備える当該の各シグナル伝達分子または他のタンパク質が単一アレイもしくはチップ上で提示されるように実施することができる。一部の態様では、特定腫瘍細胞中で活性な所定のシグナル伝達経路の成分は、細胞内のシグナル伝達経路を通って情報が伝えられる配列に対応する直鎖状配列で整列させられる。そのようなアレイの例は、図５から図９に示した。特定腫瘍細胞中で活性な所定のシグナル伝達経路の１つ以上の成分に対して特異的な捕捉抗体は、さらにまたあらゆる表面関連アーチファクトを最小限に抑えるために無作為方法でプリントすることもできる。

【００８４】

本発明を使用して調べる（interrogated）ことのできるシグナル伝達経路の非限定的な例には、表２に示したものが含まれる。

【表２】

経路1	ErbB1	ErbB1 リン	ErbB1 Shc	ErbB1 ユビキチン	ErbB1-PI3K	PTEN		
経路 2	ErbB1	ErbB1VIII	ErbB1VIII リン	ErbB1VIII Shc	ErbB1VIII ユビキチン	ErbB1VIII PI3K	PTEN	
経路 3	ErbB2	ErbB2 リン	HER-2 Shc	ErbB2: PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン	PTEN		
経路 4	ErbB2	p95 切断 ErbB2	ErbB2 リン	p95 切断 ERBB2 リン	HER-2 Shc	ERBB2: PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン	P95ErbB2:PI3K
経路 5	ErbB3	ErbB3 リン	ErbB3:PI3K 複合体	ErbB3 PI3K リン	ErbB3:Shc			
経路 6	ErbB4	ErbB4 リン	ErbB4:Shc					
経路 7	IGF-1R	IGF-1R リン	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	リン IRS	IGF-1R :PI3K		
経路 8	INSR	INSR リン						
経路 9	KIT	KIT リン						
経路 10	FLT3	FLT3 リン						
経路 11	HGFR1	HGFR1 リン						
経路 12	HGFR2	HGFR2 リン						
経路 13	RET	RET リン						
経路 14	PDGFRα	PDGFRα リン						
経路 15	PDGFRβ	PDGFRβ リン						
経路 16	VEGFR1	VEGFR1 リン	VEGFR1:PLCγ複合体	VEGFR1:Src				
経路 17	VEGFR2	VEGFR2 リン	VEGFR2:PLCγ複合体	VEGFR2:Src	VEGFR-2/ヘパリン硫酸複合体	VEGFR-2、VE-カドヘリン複合体		
経路 18	VEGFR3	VEGFR3 リン						
経路 19	FGFR 1	FGFR 1 リン						
経路 20	FGFR 2	FGFR 2 リン						
経路 21	FGFR 3	FGFR 3 リン						
経路 22	FGFR 4	FGFR 4 リン						
経路 23	TIE 1	TIE 1 リン						
経路 24	TIE 2	TIE 2 リン						
経路 25	EPHA	EPHA リン						
経路 26	EPHB	EPHB リン						
経路 27	NFkB-IkB 複合体	リン-IκB (S32)全 IkB	全 NFκB リン NFκB(S536)	全 P65 IkBa リン P65 IkBa				
経路 28	ER	リン ER	ER-AIB1	その他の ER 複合体				
経路 29	PR	リン Pr		PR 複合体				
経路 30	Hedgehog 経路							

経路 31	Wnt 経路							
経路 32	Notch 経路							
経路 33	全 Mek リン Mek(S217/S221)	全 Erk リン Erk (T202/Y204)	全 Rsk-1 リン Rsk-1(T357/S363)	全 Stat3 リン Stat-3 (Y705)(S727) 全 Stat 1 リン Stat1 (Y 701)	リン Bad (S112) Bad (全)	全 Fak リン Fak (Y576)	全 cSrc リン cSrc(Y416)	全 Ras リン Ras
経路 34	Akt(全) リン Akt (T473)	リン Akt(T308)	リン Bad (S112) Bad (全)	リン Bad (S136)	Bad:14-3-3 複合体	全 mTor リン mTor (S2448)	全 p70S6K リン p70S6K (T229) (T389)	GSK3 β 全(リン Ser 9)
経路 35	全 Jnk リン Jnk(T183/Y185)	全 P38 リン P38 (T180/Y182)	全 Rb リン Rb (S249/T252) リン Rb (S780)	全 p53 リン p53 (S392) リン p53 (S20)	リン -CREB(S133)全 CREB	全 c-Jun リン-c-Jun; (S63)	全パキシリン リンパキシリン (Y118)	
経路 36	Ki67	開裂したカスパーゼ 3,8,9 その他	TOPO2					
経路 37	TGFβ							

【００８５】

所定の実施形態では、抗癌剤は、例えばモノクローナル抗体もしくはチロシンキナーゼ阻害剤などの抗シグナル伝達剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）；抗増殖剤；化学療法薬（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン治療薬；放射線療法薬；ワクチン；および／または例えば癌性細胞などの異常な細胞の制御されない増殖を減少または無効にさせる能力を備える任意の他の化合物を含む。一部の実施形態では、単離された循環細胞は、少なくとも１つの化学療法薬と組み合わせて１つ以上の抗シグナル伝達剤、抗増殖剤、および／またはホルモン治療薬を用いて治療される。

【００８６】

本発明において使用するのに適切な抗シグナル伝達剤の例には、制限なく、例えばトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、およびトシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（登録商標））などのモノクローナル抗体；例えばゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、ラパチニブ（ＧＷ－５７２０１６；Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ＢＡＹ４３－９００６；Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標））、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、およびバンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名）；ＺＤ６４７４）などのチロシンキナーゼ阻害剤；ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

【００８７】

典型的な抗増殖剤には、例えばシロリムス（ラパマイシン）、テムシロリムス（ＣＣＩ－７７９）、およびエベロリムス（ＲＡＤ００１）などのｍＴＯＲ阻害剤；例えば１Ｌ６－ヒドロキシメチル－キロ－イノシトール－２－（Ｒ）－２－Ｏ－メチル－３－Ｏ－オクタデシル－ｓｎ－グリセロカーボネート、９－メトキシ－２－メチルエリプチシニウムアセテート、１，３－ジヒドロ－１－（１－（（４－（６－フェニル－１Ｈ－イミダゾ［４，５－ｇ］キノキサリン－７－イル）フェニル）メチル）－４－ピペリジニル）－２Ｈ－ベンズイミダゾール－２－オン、１０－（４’－（Ｎ－ジエチルアミノ）ブチル）－２－

クロロフェノキサジン、３－ホルミルクロモンチオセミカルバゾン（Ｃｕ（ＩＩ）Ｃｌ$_2$複合体）、癌原遺伝子ＴＣＬ１のアミノ酸１０～２４に由来する１５－ｍｅｒペプチドであるＡＰＩ－２（Ｈｉｒｏｍｕｒａら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７９：５３４０７－５３４１８（２００４）、ＫＰ３７２－１、およびＫｏｚｉｋｏｗｓｋｉら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２５：１１４４－１１４５（２００３）およびＫａｕら、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ，４：４６３－４７６（２００３）に記載の化合物などのＡｋｔ阻害剤；ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

【００８８】

化学療法薬の非限定的な例には、白金に基づく薬物（例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロプラチン、イプロプラチン、サトラプラチンなど）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イフォスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、チオテパ、ニトロソウレアなど）、代謝拮抗薬（例えば、５－フルオロウラシル、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ロイコボリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、ペメトレキセド（ＡＬＩＭＴＡ（登録商標））、ラルチトレキセドなど）、植物アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタキセル（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、ドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ（登録商標））など）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（ＶＰ１６）、リン酸エトポシド、テニポシドなど）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシンなど）、それらの薬学的に許容される塩、それらの立体異性体、それらの誘導体、それらのアナログ、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

【００８９】

ホルモン治療薬の例には、制限なく、アロマターゼ阻害剤（例えば、アミノグルテチミド、アナストロゾール（Ａｒｉｍｉｄｅｘ（登録商標））、レトロゾール（Ｆｅｍａｒａ（登録商標））、ボロゾール、エキセメスタン（Ａｒｏｍａｓｉｎ（登録商標））、４－アンドロステン－３，６，１７－トリオン（６－ＯＸＯ）、１，４，６－アンドロスタトリエン－３，１７－ジオン（ＡＴＤ）、フォルメスタン（Ｌｅｎｔａｒｏｎ（登録商標））など）、選択的エストロゲン受容体調節剤（例えば、バゼドキシフェン、クロミフェン、フルベストラント、ラソフォキシフェン、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェンなど）、ステロイド剤（例えば、デキサメタゾン）、フィナステリド、およびゴセレリンなどのゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（ＧｎＲＨ）、それらの薬学的に許容される塩、それらの立体異性体、それらの誘導体、それらのアナログ、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。

【００９０】

本発明において有用な癌ワクチンの非限定的な例には、Ａｃｔｉｖｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ社からのＡＮＹＡＲＡ、Ｎｏｒｔｈｗｅｓｔ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ社からのＤＣＶａｘ－ＬＢ、ＩＤＭ Ｐｈａｒｍａ社からのＥＰ－２１０１、Ｐｈａｒｍｅｘａ社からのＧＶ１００１、Ｉｄｅｒａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社からのＩＯ－２０５５、Ｉｎｔｒｏｇｅｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ社からのＩＮＧＮ ２２５およびＢｉｏｍｉｒａ／Ｍｅｒｃｋ社からのＳｔｉｍｕｖａｘが含まれる。

【００９１】

放射線療法薬の例には、制限なく、腫瘍抗原に向けられた抗体に任意で結合させた、例えば^{47}Ｓｃ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{89}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{87}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{117m}Ｓｎ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{211}Ａｔ、および^{212}Ｂｉなどの放射性核種が含まれる。

【００９２】

一部の実施形態では、各希釈系列の捕捉抗体は、一連の下降する捕捉抗体濃度を含む。所定の場合には、捕捉抗体は、アレイ上にスポットされる１セット数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５以上）の下降する捕捉抗体濃度を含む希釈系列を生成するために少なくとも２倍（例えば、２、５、１０、２０、５０、１００、５００、もしくは１，０００倍）で連続的に希釈される。好ましくは、各捕捉抗体希釈液が少なくとも２、３、４、５、または６回ずつアレイ上にスポットされる。

【００９３】

他の実施形態では、固体支持体は、ガラス（例えば、ガラススライド）、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜（例えば、ナイロン、ニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）など）、繊維束、または任意の他の適切な基質を含む。好ましい実施形態では、捕捉抗体は、例えばＷｈａｔｍａｎ社（ニュージャージー州フローラムパーク）から市販で入手できるＦＡＳＴ（登録商標）スライドなどの、ニトロセルロースポリマーでコーティングされたガラススライド上に（例えば、共有結合もしくは非共有結合相互作用によって）固定される。

【００９４】

一部の実施形態では、細胞抽出物は、固形腫瘍の循環細胞の抽出物を含む。循環細胞は、典型的には、例えば、免疫磁気分離法、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法、ＦＡＣＳ、密度勾配遠心分離法、および枯渇法を含む、当分野において公知の１つ以上の分離法を用いて患者サンプルから単離される。

【００９５】

他の実施形態では、患者サンプルは、例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、および／または細針吸引液サンプルなどの体液サンプルを含む。所定の場合には、全血サンプルは、血漿もしくは血清分画および細胞分画（すなわち、細胞ペレット）に分離される。細胞分画は、典型的には、ＣＴＣ、ＣＥＣ、ＣＥＰＣ、リンパ節の播種性腫瘍細胞、および／またはＣＳＣなどの、固形腫瘍の赤血球、白血球、および／または循環細胞を含有する。血漿または血清分画は、通常は、特に、固形腫瘍の循環細胞によって遊離される核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）およびタンパク質を含有する。

【００９６】

一部の場合には、単離された循環細胞は、１つ以上の当該の抗癌剤を用いたインキュベーションの前、中、および／または後に１つ以上の成長因子を用いてインビトロ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で刺激することができる。刺激性成長因子については上記に記載した。他の場合には、単離された循環細胞は、当分野において公知の任意の技術を用いて細胞抽出物（例えば、細胞溶解物）を生成するために、例えば成長因子の刺激および／または抗癌剤処理に続いて、溶解させることができる。好ましくは、細胞溶解は、成長因子刺激の約１～３６０分間後に、およびより好ましくは２つの異なる時間間隔をあけて：（１）成長因子刺激約１～５分間後；および（２）成長因子刺激の約３０～１８０分間後に開始される。または、細胞溶解物は、使用時まで－８０℃で保存することができる。

【００９７】

好ましい実施形態では、例えば固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞中の複数のシグナル伝達分子の発現および／または活性化状態は、下記で記載するように単一検出または近接二重検出アッセイを用いて検出される。

【００９８】

したがって、１つの態様では、本発明は、乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤を選択するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であ

って、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；および
（ｄ）前記抗癌剤が、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍の治療のために適切であるか、または不適切であるかを決定する工程と、を含む方法を提供する。
【００９９】
所定の場合には、本発明の方法は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｄ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。所定の他の場合には、本発明の方法は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｄ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。
【０１００】
好ましい実施形態では、乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤を選択するための方法は：
（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；
（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；
（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；
（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少している場合は、前記抗癌剤が前記乳房腫瘍の治療のために適切であることを指示する工程と、を含む。
【０１０１】
所定の場合には、好ましい実施形態は、工程（ｆ）として、または工程（ｅ）として、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少していない場合は、前記抗癌剤が前記乳房腫瘍の治療のために不適切であることを指示する工程をさらに含むことができる。
【０１０２】
所定の他の場合には、好ましい実施形態は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｅ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。さらになお他の場合には、好ましい実施形態は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｅ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。
【０１０３】
一部の実施形態では、例えばシグナル伝達分子などの分析物の活性化状態は、抗癌剤の非存在下におけるより少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、もしくは９５％未満活性化されている場合は、抗癌剤の存在下において「実質的に減少している」と見なされる。他の実施形態では、例えばシグナル伝達分子などの分析物の活性化状態は、（１）抗癌剤を用いない場合の分析物の高もしくは強活性化から抗癌剤を用いる場合の分析物の中、弱、低、もしくは超弱活性化への変化が見られる場合、または（２）抗癌剤を用いない場合の分析物の中活性化から抗癌剤を用いた場合の分析物の弱、低、もしくは超弱活性化への変化が見られる場合に、抗癌剤の存在下において「実質的に減少している」と見なされる。
【０１０４】
一部の実施形態では、本発明の方法は、乳房腫瘍の細胞が単離される乳房腫瘍を有する被験者からサンプルを入手する工程をさらに含むことができる。サンプルは、乳癌被験者から、抗癌剤治療の前（例えば、抗癌剤を用いたインキュベーションの前）または抗癌剤

の投与後（例えば、癌治療の経過を通していずれかの時点に）入手することができる。適切なサンプルには、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液（ＦＮＡ）、およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、サンプルは、全血またはＦＮＡサンプルである。この実施形態では、乳房腫瘍の循環細胞は全血サンプルから単離できる、または乳癌細胞はＦＮＡサンプルから単離できる。単離した細胞が抗癌剤を用いた治療を受けていない被験者から入手される場合は、単離した細胞は、工程（ｃ）において検出すべき１つ以上の分析物を標的とする抗癌剤の１つまたはカクテルとインビトロの適切な条件下でインキュベートすることができる。

【０１０５】

乳房腫瘍の循環細胞は、当分野において任意の公知の技術によって、例えば、免疫磁気分離法、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法、ＦＡＣＳ、密度勾配遠心分離法、および枯渇法によってサンプルから単離することができる（実施例１を参照されたい）。サンプルから単離できる循環細胞の例には、制限なく、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせが含まれる。例えば循環細胞などの単離した細胞は、当分野において公知である任意の技術によって単離した細胞を細胞抽出物へ転換させるために溶解させることができる（実施例１を参照されたい）。

【０１０６】

１つの実施形態では、乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する。乳管癌の例には、浸潤性乳管癌または非浸潤性乳管癌が含まれるがそれらに限定されない。小葉癌の非限定的な例には、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌が含まれる。

【０１０７】

所定の場合には、乳房腫瘍の細胞は、腫瘍組織から単離される。腫瘍組織は、例えば、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織であってもよい。１つの好ましい実施形態では、細胞は、細針吸引液（ＦＮＡ）サンプルとして腫瘍組織から単離される。

【０１０８】

一部の実施形態では、単離した細胞は、本明細書に記載したように成長因子を用いてインビトロで刺激される。他の実施形態では、抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンを含むがそれらに限定されない、本明細書に記載した１つ以上の治療薬を含むことができる。

【０１０９】

好ましい実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む。シグナル伝達分子の例には、制限なく、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー、およびそれらの組み合わせが含まれる。所定の場合には、複数のシグナル伝達分子は、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ１）、ＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－３（ＥｒｂＢ３）、ＨＥＲ－４（ＥｒｂＢ４）、Ｒａｆ、ＳＲＣ、Ｍｅｋ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴｏｒ、ＰＩ３Ｋ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、ｃＭｅｔ、ＦＧＦＲ、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、Ｆｌｔ－３、ｃＦＭＳ、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、Ｋｉｔ、ＨＧＦＲ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＩＧＦ－１Ｒ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。好ましくは、複数のシグナル伝達分子は、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ＥＲ、ＰＲ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【０１１０】

一部の実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物について検出された活性化状態は、例えば、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、またはそれら

の組み合わせであってもよい。他の実施形態では、固体支持体は、例えば、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせを含むことができる。さらに他の実施形態では、捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される。

【０１１１】

所定の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉分析物の複合体に変換させる）ために前記細胞抽出物を前記複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を、前記捕捉分析物および前記活性化状態依存性抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために、前記複数の捕捉分析物を対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０１１２】

一部の場合には、活性化状態依存性抗体は、結合対の第１メンバー（例えば、ビオチン）を含む。他の場合には、シグナル増幅対の第１メンバー（例えば、ＨＲＰなどのペルオキシダーゼ）は、結合対の第２メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。所定の場合には、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１１３】

所定の他の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉抗体の複合体に変換させる）ために前記細胞抽出物を前記複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を捕捉分析物および検出抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために前記複数の捕捉分析物を、前記複数の活性化状態非依存性抗体および対応する分析物に対して特異的な複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、

前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーへチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０１１４】

活性化状態非依存性抗体は、促進成分を用いて直接的に標識できる、または促進成分を用いて、例えば活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと促進成分に結

合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって間接的に標識することができる。同様に、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識することができる、またはシグナル増幅対の第１メンバーを用いて、例えば活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーとシグナル増幅対の第１メンバーに結合された結合対の第２メンバーとの間の結合によって間接的に標識することができる。所定の場合には、結合対の第１メンバーはビオチンであり、結合対の第２メンバーは、例えばストレプトアビジンまたはニュートラビジンなどのアビジンである。

【０１１５】

一部の実施形態では、促進成分は、例えば、グルコースオキシダーゼであってもよい。所定の場合には、グルコースオキシダーゼおよび活性化状態非依存性抗体は、例えば実施例１６および１７に記載したように、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。前記スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、または７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施形態では、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であってもよい。さらにまた別の実施形態では、シグナル増幅対の第１メンバーは、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼであってもよい。別の実施形態では、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォアおよびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１１６】

所定の場合には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび活性化状態依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ｋＤａ）の分子量を有する。

【０１１７】

一部の実施形態では、本発明の方法は、乳房腫瘍の治療のために適切な抗癌剤の選択を補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、乳房腫瘍の治療のために適切な抗癌剤の選択を改善するために有用な可能性がある。

【０１１８】

また別の態様では、本発明は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答を同定するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に応答性または非応答性であると同定する工程と、を含む方法を提供する。

【０１１９】

所定の場合には、本発明の方法は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｄ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。所定の他の場合には、

本発明の方法は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｄ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。

【０１２０】

好ましい実施形態では、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答を同定するための方法は：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；

（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少している場合は、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に応答性であることを指示する工程と、を含む。

【０１２１】

所定の場合には、好ましい実施形態は、すなわち工程（ｆ）として、または工程（ｅ）として、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少していない場合は、前記乳房腫瘍が前記抗癌剤を用いた治療に対して非応答性であることを指示する工程をさらに含むことができる。

【０１２２】

所定の他の場合には、好ましい実施形態は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｅ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。さらになお他の場合には、好ましい実施形態は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｅ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。

【０１２３】

分析物（例えば、シグナル伝達分子）の活性化状態は、上述したように抗癌剤の存在下では「実質的に減少している」可能性がある。一部の実施形態では、本明細書に記載した方法は、それから乳癌細胞が単離される乳房腫瘍を有する被験者からサンプルを入手する工程をさらに含むことができる。サンプルは、乳癌被験者から、抗癌剤治療の前（例えば、抗癌剤を用いたインキュベーションの前）または抗癌剤の投与後（例えば、癌治療の経過を通していずれかの時点に）入手することができる。適切なサンプルには、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液（ＦＮＡ）、およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、サンプルは、全血またはＦＮＡサンプルである。この実施形態では、乳房腫瘍の循環細胞は全血サンプルから単離できる、または乳癌細胞はＦＮＡサンプルから単離できる。単離した細胞が抗癌剤を用いた治療を受けていない被験者から入手される場合は、単離した細胞は、工程（ｃ）において検出すべき１つ以上の分析物を標的とする抗癌剤の１つまたはカクテルを用いた適切な条件下においてインビトロでインキュベートすることができる。

【０１２４】

乳房腫瘍の循環細胞は、当分野において任意の公知の技術によって、例えば、免疫磁気分離法、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法、ＦＡＣＳ、密度勾配遠心分離法、および枯渇法によってサンプルから単離することができる（実施例１を参照されたい）。サンプルから単離できる循環細胞の例には、制限なく、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせが含まれる。例えば循環細胞などの単離した細胞は、当分野において公知である任

意の技術によって単離した細胞を細胞抽出物へ転換させるために溶解させることができる（実施例１を参照されたい）。

【０１２５】

一部の実施形態では、乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する。乳管癌の例には、浸潤性乳管癌および非浸潤性乳管癌が含まれるがそれらに限定されない。小葉癌の非限定的な例には、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌が含まれる。

【０１２６】

所定の場合には、乳房腫瘍の細胞は、腫瘍組織から単離される。腫瘍組織は、例えば、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織であってもよい。１つの好ましい実施形態では、細胞は、細針吸引液（ＦＮＡ）サンプルとして腫瘍組織から単離される。

【０１２７】

一部の実施形態では、単離した細胞は、本明細書に記載したように成長因子を用いてインビトロで刺激される。他の実施形態では、抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンを含むがそれらに限定されない、本明細書に記載した１つ以上の治療薬を含むことができる。

【０１２８】

好ましい実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む。シグナル伝達分子の例には、制限なく、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー、およびそれらの組み合わせが含まれる。所定の場合には、複数のシグナル伝達分子は、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ１）、ＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－３（ＥｒｂＢ３）、ＨＥＲ－４（ＥｒｂＢ４）、Ｒａｆ、ＳＲＣ、Ｍｅｋ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴｏｒ、ＰＩ３Ｋ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、ｃＭｅｔ、ＦＧＦＲ、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、Ｆｌｔ－３、ｃＦＭＳ、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、Ｋｉｔ、ＨＧＦＲ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＩＧＦ－１Ｒ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。好ましくは、複数のシグナル伝達分子は、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ＥＲ、ＰＲ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【０１２９】

一部の実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物について検出された活性化状態は、例えば、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、またはそれらの組み合わせであってもよい。他の実施形態では、固体支持体は、例えば、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、またはそれらの組み合わせを含むことができる。さらに他の実施形態では、捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される。

【０１３０】

所定の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉抗体の複合体に変換させる）ために、前記細胞抽出物を複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を、前記捕捉分析物および前記活性化状態依存性抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために、前記複数の捕捉分析物を対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０１３１】

一部の場合には、活性化状態依存性抗体は、結合対の第１メンバー（例えば、ビオチン）を含む。他の場合には、シグナル増幅対の第１メンバー（例えば、ＨＲＰなどのペルオキシダーゼ）は、結合対の第２メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。所定の場合には、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１３２】

所定の他の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉分析物の複合体に変換させる）ために細胞抽出物を前記複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を捕捉分析物および検出抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために前記複数の捕捉分析物を、複数の活性化状態非依存性抗体および前記対応する分析物に対して特異的な複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、

前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０１３３】

活性化状態非依存性抗体は、促進成分を用いて直接的に標識できる、または促進成分を用いて、例えば活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと前記促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって間接的に標識することができる。同様に、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識することができる、またはシグナル増幅対の第１メンバーを用いて、例えば活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーとシグナル増幅対の第１メンバーに結合された結合対の第２メンバーとの間の結合によって間接的に標識することができる。所定の場合には、結合対の第１メンバーはビオチンであり、結合対の第２メンバーは、例えばストレプトアビジンまたはニュートラビジンなどのアビジンである。

【０１３４】

一部の実施形態では、促進成分は、例えば、グルコースオキシダーゼであってもよい。所定の場合には、グルコースオキシダーゼおよび活性化状態非依存性抗体は、例えば実施例１６および１７に記載したように、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、または７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施形態では、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であってもよい。さらにまた別の実施形態では、シグナル

増幅対の第１メンバーは、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼであってもよい。別の実施形態では、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１３５】

所定の場合には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび活性化状態依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ｋＤａ）の分子量を有する。

【０１３６】

一部の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定を補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定を改良するために有用な可能性がある。

【０１３７】

さらにまた別の態様では、本発明は、乳房腫瘍を有する被験者の抗癌剤を用いた治療への応答を予測するための方法であって：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較することによって、前記被験者が前記抗癌剤を用いた治療に応答する可能性を予測する工程と、を含む方法を提供する。

【０１３８】

所定の場合には、本発明の方法は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｄ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。所定の他の場合には、本発明の方法は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｄ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。

【０１３９】

好ましい実施形態では、乳房腫瘍を有する被験者の抗癌剤を用いた治療への応答を予測するための方法は：

（ａ）抗癌剤の投与後、または抗癌剤とのインキュベーション前に乳房腫瘍の細胞を単離する工程と；

（ｂ）細胞抽出物を生成するために前記単離した細胞を溶解させる工程と；

（ｃ）前記細胞抽出物中の１つ以上の分析物の活性化状態を、前記１つ以上の分析物に対して特異的である複数の希釈系列の捕捉抗体を含むアッセイを用いて検出する工程であって、前記捕捉抗体が固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態を前記抗癌剤の非存在下で作成された対照活性化プロファイルと比較する工程と；

（ｅ）前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が前記対照活性化プロファ

イルと比較して実質的に減少している場合は、前記被験者が前記抗癌剤を用いた治療に応答する可能性が高いことを指示する工程と、を含む。

【０１４０】

所定の場合には、好ましい実施形態は、すなわち工程（ｆ）として、または工程（ｅ）として、前記１つ以上の分析物について検出された活性化状態が対照活性化プロファイルと比較して実質的に減少していない場合は、被験者が抗癌剤による治療に対して応答する可能性が低い（例えば、応答する機会を有していない、または応答する確率が低い）ことを指示する工程をさらに含むことができる。

【０１４１】

所定の他の場合には、好ましい実施形態は、医師、例えば癌専門医または一般開業医に工程（ｅ）の結果を送る、または報告する工程をさらに含むことができる。さらになお他の場合には、好ましい実施形態は、コンピュータデータベースもしくは他の適切な機械、または例えば研究所で情報を保存するためのデバイスに工程（ｅ）の結果を記録または保存する工程をさらに含むことができる。

【０１４２】

分析物（例えば、シグナル伝達分子）の活性化状態は、上述したように抗癌剤の存在下では「実質的に減少している」可能性がある。一部の実施形態では、本明細書に記載した方法は、それから乳癌細胞が単離される乳房腫瘍を有する被験者からサンプルを入手する工程をさらに含むことができる。サンプルは、乳癌被験者から、抗癌剤治療の前（例えば、抗癌剤を用いたインキュベーションの前）または抗癌剤の投与後（例えば、癌治療の経過を通していずれかの時点）に入手することができる。適切なサンプルには、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液（ＦＮＡ）、およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、サンプルは、全血またはＦＮＡサンプルである。この実施形態では、乳房腫瘍の循環細胞は全血サンプルから単離できる、または乳癌細胞はＦＮＡサンプルから単離できる。単離した細胞が抗癌剤を用いた治療を受けていない被験者から入手される場合は、前記単離した細胞は、工程（ｃ）において検出すべき１つ以上の分析物を標的とする抗癌剤の１つまたはカクテルを用いた適切な条件下においてインビトロでインキュベートすることができる。

【０１４３】

乳房腫瘍の循環細胞は、当分野において任意の公知の技術によって、例えば、免疫磁気分離法、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法、ＦＡＣＳ、密度勾配遠心分離法、および枯渇法によってサンプルから単離することができる（実施例１を参照されたい）。サンプルから単離できる循環細胞の例には、制限なく、循環腫瘍細胞、循環内皮細胞、循環内皮前駆細胞、癌幹細胞、播種性腫瘍細胞、およびそれらの組み合わせが含まれる。例えば循環細胞などの単離した細胞は、当分野において公知である任意の技術によって単離した細胞を細胞抽出物へ転換させるために溶解させることができる（実施例１を参照されたい）。

【０１４４】

一部の実施形態では、乳房腫瘍は、乳管癌または小葉癌を有する被験者に由来する。乳管癌の例には、浸潤性乳管癌および非浸潤性乳管癌が含まれるがそれらに限定されない。小葉癌の非限定的な例には、浸潤性小葉癌または上皮内小葉癌が含まれる。

【０１４５】

所定の場合には、乳房腫瘍の細胞は、腫瘍組織から単離される。腫瘍組織は、例えば、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織であってもよい。１つの好ましい実施形態では、細胞は、細針吸引液（ＦＮＡ）サンプルとして腫瘍組織から単離される。

【０１４６】

一部の実施形態では、単離した細胞は、本明細書に記載したように成長因子を用いてインビトロで刺激される。他の実施形態では、抗癌剤は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンを含むがそ

れらに限定されない、本明細書に記載した１つ以上の治療薬を含むことができる。

【０１４７】

好ましい実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物は、複数のシグナル伝達分子を含む。シグナル伝達分子の例には、制限なく、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー、およびそれらの組み合わせが含まれる。所定の場合には、複数のシグナル伝達分子は、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ１）、ＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ－３（ＥｒｂＢ３）、ＨＥＲ－４（ＥｒｂＢ４）、Ｒａｆ、ＳＲＣ、Ｍｅｋ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴｏｒ、ＰＩ３Ｋ、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、ｃＭｅｔ、ＦＧＦＲ、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、Ｆｌｔ－３、ｃＦＭＳ、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、Ｋｉｔ、ＨＧＦＲ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＩＧＦ－１Ｒ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。好ましくは、複数のシグナル伝達分子は、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、ＶＥＧＦＲ－３、ＥＲ、ＰＲ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

【０１４８】

一部の実施形態では、細胞抽出物中に存在する１つ以上の分析物について検出された活性化状態は、例えば、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、またはそれらの組み合わせであってもよい。他の実施形態では、固体支持体は、例えば、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせを含むことができる。さらに他の実施形態では、捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される。

【０１４９】

所定の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉分析物の複合体に変換させる）ために前記細胞抽出物を複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を、前記捕捉分析物および前記活性化状態依存性抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために、前記複数の捕捉分析物を対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０１５０】

一部の場合には、活性化状態依存性抗体は、結合対の第１メンバー（例えば、ビオチン）を含む。他の場合には、シグナル増幅対の第１メンバー（例えば、ＨＲＰなどのペルオキシダーゼ）は、結合対の第２メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。所定の場合には、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１５１】
所定の他の実施形態では、工程（ｃ）におけるアッセイは：
（ｉ）複数の捕捉分析物を形成する（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、前記分析物および捕捉抗体を含む捕捉抗体の複合体に変換させる）ために前記細胞抽出物を複数の希釈系列の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；
（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成する（例えば、捕捉分析物の複合体を捕捉分析物および検出抗体を含む検出可能な捕捉分析物の複合体に変換させる）ために前記複数の捕捉分析物を、前記複数の活性化状態非依存性抗体および対応する分析物に対して特異的な複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、
前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、
（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。
【０１５２】
活性化状態非依存性抗体は、促進成分を用いて直接的に標識できる、または促進成分を用いて、例えば活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと前記促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって間接的に標識することができる。同様に、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識することができる、またはシグナル増幅対の第１メンバーを用いて、例えば活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーとシグナル増幅対の第１メンバーに結合された結合対の第２メンバーとの間の結合によって間接的に標識することができる。所定の場合には、結合対の第１メンバーはビオチンであり、結合対の第２メンバーは、例えばストレプトアビジンまたはニュートラビジンなどのアビジンである。
【０１５３】
一部の実施形態では、促進成分は、例えば、グルコースオキシダーゼであってもよい。所定の場合には、グルコースオキシダーゼおよび活性化状態非依存性抗体は、例えば実施例１６および１７に記載したように、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、または７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施形態では、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であってもよい。さらにまた別の実施形態では、シグナル増幅対の第１メンバーは、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼであってもよい。別の実施形態では、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォアおよび、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。
【０１５４】
所定の場合には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび活性化状態依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０、５５、６０

、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ｋＤａ）の分子量を有する。

【０１５５】

一部の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療へ被験者が応答する見込みの予測を補助または支援するために有用な可能性がある。他の実施形態では、本発明の方法は、抗癌剤を用いた治療へ被験者が応答する見込みの予測を改良するために有用な可能性がある。

【０１５６】

また別の態様では、本発明は、固体支持体上に固定された複数の希釈系列の捕捉抗体を含む優れたダイナミックレンジを有するアレイであって、各希釈系列中の前記捕捉抗体は細胞抽出物中のシグナル伝達経路の成分または他のタンパク質（例えば、核ホルモン受容体）の成分に対応する１つ以上の分析物に対して特異的であるアレイを提供する。

【０１５７】

所定の実施形態では、シグナル伝達経路は、細胞増殖に関係する可能性がある。そのような実施形態では、捕捉抗体は、例えば、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＭＥＴ、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、Ｓｈｃ、ＰＩ３Ｋ、Ｅｒｋ、Ｒｓｋ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、およびＡＩＢ１と反応性である抗体からなる群より選択される１つ以上のメンバーを含むことができる。所定の他の実施形態では、シグナル伝達経路は、腫瘍血管新生に関係する可能性がある。そのような実施形態では、捕捉抗体は、例えば、Ｓｈｃ、ＰＩ３Ｋ、Ｅｒｋ、Ｒｓｋ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ－１、ＶＥＧＦＲ－２、Ｔｉｅ２、Ｖ－カドヘリン－Ｒ２複合体、ＰＤＧＦＲＡ、およびＰＤＧＦＲＢと反応性である抗体からなる群より選択される１つ以上のメンバーを含むことができる。したがって、本明細書に記載したアドレス可能なアレイは、乳癌に関係するシグナル伝達分子および他のタンパク質の発現および／または活性化状態を決定するために特に有用である。

【０１５８】

追加の態様では、本発明は、切断受容体の存在（または非存在）を検出するための方法であって：

（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成する（例えば、細胞抽出物を特異的全長受容体または全長受容体のファミリーを含まない細胞抽出物に変換させる）ために前記全長受容体を取り除く工程と；

（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、前記複数の捕捉抗体は切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成する（例えば、全長受容体欠失細胞抽出物中に存在する切断受容体を切断受容体および捕捉抗体の複合体へ変換させる）ために固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成する（例えば、捕捉された切断受容体の複合体を、捕捉された切断受容体および活性化状態依存性抗体を含む検出可能な捕捉された切断受容体の複合体に変換させる）ために、前記複数の捕捉された切断受容体を対応する切断受容体に対して特異的な検出抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法を提供する。

【０１５９】
切断受容体は、典型的には全長受容体のフラグメントであり、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を全長受容体と共有する。所定の実施形態では、全長受容体は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を含む。何らかの特定の理論によって結び付けられなくても、切断受容体は、全長受容体のＥＣＤのタンパク質分解プロセッシングを通して、または例えば短縮ＥＣＤを備える切断受容体または膜関連もしくは細胞質ＩＣＤフラグメントを含む切断受容体を作成するために、膜貫通ドメイン前、内、または後に所在するメチオニン残基からの翻訳の選択的開始によって発生する可能性がある。

【０１６０】
所定の好ましい実施形態では、切断受容体はｐ９５ＥｒｂＢ２であり、対応する全長受容体はＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である。しかし当業者であれば、切断タンパク質を検出するための本明細書に記載した方法は、ＥＧＦＲ　Ｖ１１１変異体（膠芽細胞腫、結腸直腸癌などに関係すると見なされている）、または他の切断受容体であるチロシンキナーゼ、カスパーゼなどを含むがそれらに限定されない多数の様々なタンパク質に適用できることを理解するであろう。実施例１２は、優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを使用して希少循環細胞中のｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するための、本発明のアッセイ方法の典型的な実施形態を提供している。

【０１６１】
一部の実施形態では、ＥＣＤ結合領域に対して特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、このときストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している。所定の場合には、抗体は、全長受容体のＥＣＤ結合領域に対して特異的である。他の実施形態では、細胞抽出物は、例えば乳房腫瘍などの固形腫瘍の循環細胞を溶解させる工程によって生成される。循環細胞は、本明細書に記載した任意の技術、例えば免疫磁気分離法によってサンプルから単離することができる。適切なサンプルには、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、サンプルは、全血である。または、細胞抽出物は、例えば乳房腫瘍組織などの腫瘍組織から単離した細胞を溶解させる工程によって生成される。腫瘍組織は、例えば、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織であってもよい。１つの好ましい実施形態では、細胞は、細針吸引液（ＦＮＡ）サンプルとして腫瘍組織から単離される。

【０１６２】
一部の実施形態では、単離した細胞は、本明細書に記載したように成長因子を用いてインビトロで刺激される。他の実施形態では、単離した細胞は、成長因子刺激の前に抗癌剤とインキュベートされる。適切な抗癌剤には、例えば、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンなどの本明細書に記載した１つ以上の治療薬が含まれる。

【０１６３】
所定の実施形態では、複数の検出可能な捕捉された切断受容体の活性化状態が調べられる（interrogated）。調べる（interrogate）べき活性化状態は例えば、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、またはそれらの組み合わせであってもよい。所定の他の実施形態では、複数の捕捉抗体が固定される固体支持体は、例えば、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせを含むことができる。別の実施形態では、複数の捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される。

【０１６４】
一部の場合には、検出抗体は、結合対の第１メンバー（例えば、ビオチン）を含む。他の場合には、シグナル増幅対の第１メンバー（例えば、ＨＲＰなどのペルオキシダーゼ）は、結合対の第２メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。所定の場合には、シ

グナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１６５】

関連態様では、本発明は、切断受容体の存在（または非存在）を検出するための方法であって：

（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成する（例えば、細胞抽出物を特異的全長受容体または全長受容体のファミリーを含まない細胞抽出物に変換させる）ために前記全長受容体を取り除く工程と；

（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、前記複数の捕捉抗体は切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成する（例えば、全長受容体欠失細胞抽出物中に存在する切断受容体を切断受容体および捕捉抗体の複合体へ変換させる）ために固体支持体上に固定される工程と；

（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成する（例えば、前記捕捉された切断受容体の複合体を、前記捕捉された切断受容体および検出抗体を含む検出可能な捕捉された切断受容体を含む複合体に変換させる）ために、前記複数の捕捉された切断受容体を、複数の活性化状態非依存性抗体および前記対応する切断受容体に対して特異的な複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする（例えば、接触させる）工程であって、

前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、

（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体を前記シグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする（例えば、接触させる）工程と；

（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法を提供する。

【０１６６】

切断受容体は、典型的には全長受容体のフラグメントであり、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を全長受容体と共有する。所定の実施形態では、全長受容体は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を含む。何らかの特定の理論によって結び付けられなくても、切断受容体は、全長受容体のＥＣＤのタンパク質分解プロセッシングを通して、または例えば短縮ＥＣＤを備える切断受容体または膜関連もしくは細胞質ＩＣＤフラグメントを含む切断受容体を作成するために、膜貫通ドメイン前、内、または後に所在するメチオニン残基からの翻訳の選択的開始によって発生する可能性がある。

【０１６７】

所定の好ましい実施形態では、切断受容体はｐ９５ＥｒｂＢ２であり、対応する全長受容体はＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である。しかし当業者であれば、切断タンパク質を検出するための本明細書に記載した方法は、ＥＧＦＲ　Ｖ１１１変異体（膠芽細胞腫、結腸直

腸癌などに関係すると見なされている）、または他の切断受容体であるチロシンキナーゼ、カスパーゼなどを含むがそれらに限定されない多数の様々なタンパク質に適用できることを理解するであろう。実施例１２は、優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを使用して希少循環細胞中のｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するための、本発明のアッセイ方法の典型的な実施形態を提供している。

【０１６８】

一部の実施形態では、ＥＣＤ結合領域に対して特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、このときストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している。所定の場合には、抗体は、全長受容体のＥＣＤ結合領域に対して特異的である。他の実施形態では、細胞抽出物は、例えば乳房腫瘍などの固形腫瘍の循環細胞を溶解させる工程によって生成される。循環細胞は、本明細書に記載した任意の技術、例えば免疫磁気分離法によってサンプルから単離することができる。適切なサンプルには、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液、細針吸引液、およびそれらの組み合わせが含まれるがそれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、サンプルは、全血である。または、細胞抽出物は、例えば乳房腫瘍組織などの腫瘍組織から単離した細胞を溶解させる工程によって生成される。腫瘍組織は、例えば、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織であってもよい。１つの好ましい実施形態では、細胞は、細針吸引液（ＦＮＡ）サンプルとして腫瘍組織から単離される。

【０１６９】

一部の実施形態では、単離した細胞は、本明細書に記載したように成長因子を用いてインビトロで刺激される。他の実施形態では、単離した細胞は、成長因子刺激の前に抗癌剤とインキュベートされる。適切な抗癌剤には、例えば、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンなどの本明細書に記載した１つ以上の治療薬が含まれる。

【０１７０】

所定の実施形態では、複数の検出可能な捕捉された切断受容体の活性化状態が調べられる（interrogated）。調べる（interrogate）べき活性化状態は例えば、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、またはそれらの組み合わせであってもよい。所定の他の実施形態では、複数の捕捉抗体が固定される固体支持体は、例えば、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、およびそれらの組み合わせを含むことができる。別の実施形態では、複数の捕捉抗体は、アドレス可能なアレイ内の固体支持体上に固定される。

【０１７１】

活性化状態非依存性抗体は、促進成分を用いて直接的に標識できる、または前記促進成分を用いて、例えば活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドと前記促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションによって間接的に標識することができる。同様に、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識することができる、または前記シグナル増幅対の第１メンバーを用いて、例えば活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーとシグナル増幅対の第１メンバーに結合された結合対の第２メンバーとの間の結合によって間接的に標識することができる。所定の場合には、結合対の第１メンバーはビオチンであり、結合対の第２メンバーは、例えばストレプトアビジンまたはニュートラビジンなどのアビジンである。

【０１７２】

一部の実施形態では、促進成分は、例えば、グルコースオキシダーゼであってもよい。所定の場合には、グルコースオキシダーゼおよび活性化状態非依存性抗体は、例えば実施例１６および１７に記載したように、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６

５０、７００、または７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施形態では、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であってもよい。さらにまた別の実施形態では、シグナル増幅対の第１メンバーは、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼであってもよい。別の実施形態では、シグナル増幅対の第２メンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であってもよい。好ましくは、増幅したシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに変換させる）ためにビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化によって生成される。活性化チラミドは、直接的に検出できる、または例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出できる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア、およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼと例えば３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの発色試薬との組み合わせが含まれる。

【０１７３】

所定の場合には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび活性化状態依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子に結合させることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００ｋＤａ）の分子量を有する。

【０１７４】

一部の実施形態では、例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体の存在（または非存在もしくはレベル）を検出するための本発明のアッセイ方法は、癌の診断、予後診断、または癌治療の設計において役立つ、または支援するために、例えば（ｉ）乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤の選択、（ｉｉ）抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定、または（ｉｉｉ）抗癌剤を用いた治療に被験者が応答する見込みの予測において役立つ、または支援することによって有用な可能性がある。

【０１７５】

他の実施形態では、例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体の存在（または非存在もしくはレベル）を検出するための本発明のアッセイ方法は、癌の診断、予後診断、または癌治療の設計を改良するために、例えば（ｉ）乳房腫瘍を治療するのに適切な抗癌剤の選択、（ｉｉ）抗癌剤を用いた治療への乳房腫瘍の応答の同定、または（ｉｉｉ）抗癌剤を用いた治療に被験者が応答する見込みの予測を改良することによって有用な可能性がある。

【０１７６】

ＩＶ．乳癌

乳癌は、肺癌、胃癌、肝臓癌、および大腸癌に続く、世界中の癌死亡の５番目に多い原因である。２００５年には、乳癌のために世界中で５０２，０００人が死亡した。特に世界中の女性については、乳癌は癌死亡の最大の原因である。

【０１７７】

米合衆国では、乳癌は、肺癌および大腸癌に続く癌死亡の３番目に多い原因である。２００７年には、乳癌は米合衆国内で４０，０００人を超える死亡を引き起こした。米合衆国の女性については、乳癌は最も一般的な癌であり、癌死亡の２番目に多い原因である。実際に、米合衆国内の女性は、８人中１人は生存期間中に浸潤性乳癌を発生する可能性があり、乳癌３３例中１例は死亡を引き起こす可能性がある。

【０１７８】

世界中の乳癌の症例数は１９７０年代以降に大きく増加してきており、一部には西洋世界における現代のライフスタイルに原因があるとされる現象である。乳房は男性および女性において同一組織から構成されるので、乳癌は、余り一般的ではないが、男性においても発生する。

【０１７９】

分類

乳癌は、各々が下記の基準に基づく４種の分類スキームを用いて説明することができる：

１．病理学。病理学者は、その組織学的外観および他の基準に基づいて各腫瘍を分類することができる。乳癌の最も一般的な病理学的タイプは、浸潤性乳管癌および浸潤性小葉癌である。

２．腫瘍の悪性度。組織学的悪性度は、病理学者が顕微鏡下で決定することができる。高分化型（低悪性度）腫瘍は正常組織に似ている。低分化型（高悪性度）腫瘍は組織化されていない細胞から構成され、正常組織のようには見えない。中分化型（中悪性度）腫瘍は、その中間のどこかにある。

３．タンパク質および遺伝子発現の状態。乳癌は、例えば、エストロゲン受容体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）、およびＨｅｒ２／Ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２などのシグナル伝達分子の発現および／または活性化について試験することができる。本明細書に記載したように、所定の腫瘍の発現プロファイルはその予後診断の予測に役立ち、癌専門医が最も適切な治療を選択する際に支援する。

４．腫瘍の病期。乳癌は、ＴＮＭ分類システムにしたがって病期分類することができる：

ａ．腫瘍。浸潤性癌の存在もしくは非存在、浸潤性癌の寸法、および乳房の外側（例えば、乳房の皮膚または下部の筋肉もしくは胸郭）での浸潤の存在もしくは非存在に依存する５つの値（Ｔｉｓ、Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、またはＴ４）。

ｂ．リンパ節。リンパ節内の転移性沈着物の数、サイズ、および所在位置に依存する４つの値（Ｎ０、Ｎ１、Ｎ２、またはＮ３）。

ｃ．転移。リンパ節以外の転移（例えば、骨、脳、肺などへのいわゆる遠隔転移）の存在もしくは非存在に依存する２つの値（Ｍ０またはＭ１）。

【０１８０】

病理学

病理学に関して、ＷＨＯ（世界保健機関）の乳房腫瘍の分類は、以下の組織学的タイプを規定している：

１．例えば、浸潤性乳管癌（例えば、基底細胞様癌、混合型癌、多形細胞癌、破骨巨細胞を備える癌、絨毛膜癌の特徴を備える癌、黒色性の特徴を備える癌）、浸潤性小葉癌、管状腺癌、浸潤性篩状癌、髄様癌、粘液性癌、および豊富なムチンを備えるその他の腫瘍（例えば、粘液性癌、嚢胞腺癌および円柱細胞粘液性癌、印環細胞癌）、神経内分泌腫瘍（例えば、固形神経内分泌癌（乳房のカルチノイド）、非定型カルチノイド腫瘍、小細胞／燕麦細胞癌、大細胞神経内分泌癌）、浸潤性乳頭状癌、浸潤性微小乳頭状癌、アポクリン腺癌、化生性癌（例えば、混合上皮／間葉性化生性癌または例えば扁平上皮癌、紡錘細胞化生を伴う腺癌、腺扁平上皮癌、および粘液性類表皮癌などの純粋上皮化生性癌）、脂質の多い癌、分泌性乳癌、膨大細胞癌、腺様嚢胞癌、膵腺房細胞癌、グリコーゲン富裕明細胞癌、皮脂腺癌、炎症性乳癌、および両側乳癌などの浸潤性乳癌；

２．例えば小葉腫瘍（例えば、上皮内小葉癌）、乳管内増殖性病変（例えば、通常の乳管過形成、扁平上皮過形成、非定型乳管過形成、非浸潤性乳管癌）、微小癌、および管内乳頭腫瘍（例えば、中枢性乳頭腫、末梢性乳頭腫、非定型乳頭腫、管内乳頭癌、嚢胞内乳頭癌、良性上皮性病変）などの前駆病変；

３．例えば、変形（例えば、硬化性腺症、アポクリン腺疾患、閉塞性腺症、微小乳腺腺症、腺筋上皮腺腫）を含む腺症、放射状瘢痕／複合硬化性病変、および腺腫（例えば、管状腺腫、乳汁分泌性腺腫、アポクリン腺腫、多形腺腫、乳管腺腫）などの良性上皮性病変；

４．例えば、筋上皮症、腺筋上皮腺症、腺筋上皮腫、および悪性筋上皮腫などの筋上皮病変；

５．例えば肉腫、血管腫、血管腫症、血管外皮細胞腫、偽血管腫性間質過形成、筋繊維芽細胞腫、線維腫症（進行性）、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、脂肪腫（例えば、血管脂肪腫）、顆粒細胞腫、神経線維腫、神経鞘腫、血管肉腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、

平滑筋腫、および平滑筋肉腫などの間葉腫瘍；
６．例えば線維腺腫、葉状腫瘍（例えば、良性、境界型、悪性）、低悪性度乳管周囲間質性肉腫、および乳腺過誤腫などの線維上皮腫瘍；
７．例えば、乳頭腺腫、乳頭の汗管腺腫、および乳頭のページェット（Ｐａｇｅｔ）病などの乳頭の腫瘍；
８．悪性リンパ腫；
９．転移性腫瘍；および
１０．例えば、女性化乳房および上皮内癌もしくは浸潤性癌などの男性乳房の腫瘍。

【０１８１】

乳管癌は、女性における乳癌の最も一般的なタイプであり、乳房の乳管内での癌細胞の発達を意味する。乳管癌は、２つの形態：浸潤性の悪性腫瘍である浸潤性乳管癌（ＩＤＣ）；および非浸潤性腫瘍である非浸潤性乳管癌（ＤＣＩＳ）に分けられる。ＩＤＣは、浸潤性乳癌の中で最も一般的な形態である。ＩＤＣは、乳癌のあらゆるタイプの約８０％を占める。マンモグラフィでは、ＩＤＣは、通常は辺縁から放射状に広がる微細な棘を備える塊として視認される。理学的検査では、通常この塊は、良性乳房病変よりはるかに硬く、または締まっているように感じられる。顕微鏡検査では、癌性細胞は、周囲の正常組織に浸潤して取って代わる。ＤＣＩＳは、女性における非浸潤性乳癌の中で最も一般的なタイプである。スクリーニング用マンモグラフィがより広く行き渡るにつれて、ＤＣＩＳは、最も一般的に診断される乳房条件の１つとなってきた。ＤＣＩＳは、「病期０期」乳癌と呼ばれることが多い。ＤＣＩＳは、通常はマンモグラムを通して微小石灰化として公知である極めて小さなカルシウム片として発見される。しかし、微小石灰化の全部が、生検によって確認されなければならないＤＣＩＳの存在を示す訳ではない。ＤＣＩＳは、多病巣性の場合があり、治療は、癌から離れた部位を残して、異常な乳管要素全部を切除することを目指す。切除後、治療は局所放射線療法を含むことが多い。適切な治療を行うと、ＤＣＩＳは、浸潤性癌に発達する可能性が低い。放射線を伴う外科的切除は、ＤＣＩＳが再発する、または浸潤性乳癌が発生するリスクを低下させる。

【０１８２】

浸潤性小葉癌（ＩＬＣ）は、小葉内で始まり、周囲乳房組織に広がる一タイプの乳癌である。初期段階で治療されないと、ＩＬＣは、例えば子宮もしくは卵巣などの身体の他の部分内に移動する可能性がある。ＩＬＣは、全乳癌症例の約１０～１５％を占める、浸潤性乳癌の２番目に多いタイプである。ＩＬＣは、通常は乳頭の上方で腕に向かう区間である、乳房の一領域の一般的肥厚化を特徴とする。ＩＬＣは、マンモグラム上に出現する可能性が低い。ＩＬＣが出現する場合は、ＩＬＣは辺縁から放射状に広がる微細な棘を備える塊として現れる、またはもう一方の乳房に比較して非対称性に見える場合がある。

【０１８３】

療法

乳癌では、重要なシグナル伝達成分における多数の変化が証明されてきた。これらには：活性化を生じさせるＥＧＦＲ突然変異；例えばｃＭｅｔなどの他の受容体チロシンキナーゼの活性化；ＨＥＲ－２およびＨＥＲ－３の活性化もしくはＨＥＲ－２の増幅を伴うＥＧＦＲ活性化；ＰＩ３Ｋ突然変異を伴うＥＧＦＲ活性化；ＰＴＥＮ欠失を伴うＥＧＦＲ活性化；およびＲａｓ突然変異を伴うＥＧＦＲ活性化が含まれる。シグナル伝達経路の異なる成分における様々な変化は、様々な形態の化学療法の標的とされてきた。

【０１８４】

同時に、血管新生と呼ばれるプロセスである腫瘍細胞への新規血管の形成を標的とすることができる。ＶＥＧＦは、新規な血管の形成のために必須である内皮細胞生存因子である。したがって、ＶＥＧＦ媒介性血管新生の調節のための１つのアプローチは、ＶＥＧＦタンパク質自体またはＶＥＧＦＲに対して向けられた抗体を使用する方法である。ＶＥＧＦに対する組換えヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブは、化学療法と相乗作用的に作用し、結腸直腸癌、乳癌、および肺癌を備える患者における生存率を改良することが証明されている。

【０１８５】
すべての内分泌療法は、固有の方法でエストロゲン受容体（ＥＲ）機能を遮断するように設計されている。例えば、タモキシフェンなどの選択的エストロゲン受容体調節因子（ＳＥＲＭ）はＥＲに結合し、その活性を部分的に遮断する。卵巣切除、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、ならびに例えばアナストロゾール（Ａｒｉｍｉｄｅｘ（登録商標））、レトロゾール（Ｆｅｍａｒａ（登録商標））およびエキセメスタン（Ａｒｏｍａｓｉｎ（登録商標））などのアロマターゼ阻害剤は、エストロゲンのレベルを減少させ、ＥＲのリガンド誘発性活性化を阻害する。理想的なＳＥＲＭは、乳房および子宮内で抗エストロゲンとして、ならびに骨格系、心血管系、および中枢神経系、ならびに消化管および膣内での部分的エストロゲンアゴニストとして機能するはずである。

【０１８６】
フルベストラントなどのステロイド性抗エストロゲンは、ＥＲへより緊密に結合するので、その機能を完全に遮断し、受容体分解を誘導する。

【０１８７】
選択的エストロゲン受容体（ＥＲ）調節因子であるタモキシフェンは、ＥＲ陽性乳癌を治療するために最も広く使用されている薬物である。タモキシフェンのアジュバント療法試験は、再発および死亡率の確率における４０％～５０％減少を示している。タモキシフェンはさらに、転移性疾患を備える患者の３０％～５０％において一時的緩解を提供し、さらに乳癌の予防においても有効である。

【０１８８】
アロマターゼ阻害剤は、乳癌を備える閉経後女性の治療において看護の標準となっているが、閉経前女性においては依然としてタモキシフェンが標準である。アロマターゼ阻害剤はタモキシフェンよりわずかに有効性が高い可能性があるが、アロマターゼ阻害剤は、アジュバント療法のためのこれらの薬剤と順々に実証された利点のために、そして転移性疾患において役割を有し続けるであろうために、依然として重要な薬物である。

【０１８９】
耐性

タモキシフェンに対する新規（初期療法に非応答；一次耐性）および獲得耐性（療法に対する初期応答を示した後の疾患再発もしくは進行；二次耐性）は、重要な問題である。結果として、腫瘍生物学および耐性のメカニズムに関する理解は、有意な臨床上の意義を提供することができる。

【０１９０】
ＥＲ／ＰＲ生物学：ＥＲおよびＰＲは、それらがリガンドに結合した場合に核内の転写因子として機能する核ホルモン受容体である。ＥＲおよびＰＲは、類似の構造を有し、ＤＮＡ結合ドメイン、二量体化ドメイン、ホルモン結合ドメイン、および幾つかの転写活性化ドメインを含有する。ＥＲ陽性、ＰＲ陰性腫瘍を備える患者に比較して、ＥＲ陽性、ＰＲ陽性腫瘍を備える患者については、再発に対するリスクのより大きな減少が認められた。

【０１９１】
ＥＲ機能：ＥＲに結合するホルモンは、リン酸化を通してタンパク質を活性化し、熱ショックタンパク質９０などのシャペロンタンパク質を解離させ、その立体配座を変化させる。ホルモン結合（「活性化」）ＥＲは、次に他の受容体と二量体化し、二量体は、エストロゲン応答遺伝子のプロモータ内に存在するエストロゲン応答素子（特異的ＤＮＡ配列）に結合する。プロモータ結合ＥＲ二量体は、エストロゲン応答遺伝子の転写に影響を及ぼすように協調的に機能する乳癌１内で増幅したような共調節因子タンパク質（ＡＩＢ１またはＳＲＣ３）と複合体を形成する。典型的には、コアクチベーターは、受容体がエストロゲンに結合されるとＥＲに結合するが、コリプレッサーはＥＲがタモキシフェンに結合された場合に結合する。ＡＩＢ１は乳癌の６５％において過剰発現し、対応する遺伝子は５％において増幅する。高レベルのＡＩＢ１は、エストロゲンアゴニスト活性を強化する（例えば、アロマターゼ阻害剤を用いて治療する）ことによってＳＥＲＭ耐性に寄与す

ることができる。ＥＲ二量体は、さらに所定の遺伝子（例えば、ＨＯＸＢ１３）の遺伝子発現をダウンレギュレートするためにＮＣＯＲなどのコリプレッサータンパク質と複合体を形成する。

【０１９２】

成長因子シグナル伝達ネットワーク内の幾つかのキナーゼは、さらにリガンド非依存性活性化と呼ばれるプロセスにおいてＥＲを活性化することもできる。例えば高ＥｒｂＢファミリー活性（例えば、高ＨＥＲ－２もしくはＨＥＲ－１活性）などの所定の条件下では、ＥＲはＡＩＢ１とのタモキシフェン複合体に結合し、タモキシフェンの増加したエストロゲンアゴニスト活性を生じさせた（例えば、キナーゼ阻害剤と一緒にフルベストラントもしくはアロマターゼ阻害剤を用いて治療する）。

【０１９３】

この非核ＥＲ作用もしくは膜開始ステロイドシグナル伝達（ＭＩＳＳ）は、エストロゲンの添加後数分間以内に発生する。例えばタモキシフェンなどのＳＥＲＭは、さらに膜ＥＲを活性化することもできる。これらの受容体は、骨、神経、子宮、脂肪、および内皮細胞中で見いだされている。それによりエストロゲンが膜ＥＲ機能を活性化するメカニズムは、解明されつつある。ＥＲと、例えばインスリン様成長因子１受容体、ＰＩ３Ｋのｐ８５調節サブユニット、Ｓｒｃ、および様々な成長因子チロシンキナーゼ受容体へＥＲを直接的に結合させることのできるタンパク質であるＳｈｃなどの様々な膜シグナル伝達分子との間の直接相互作用が観察されてきた。エストロゲンによるこれらの経路の活性化は、ＡｋｔおよびＭＡＰＫの活性化により強力な細胞生存および細胞増殖性シグナルを送信する。さらに、これらのキナーゼは、ＥＲおよびその共調節因子をリン酸化することができ、核ＥＲシグナル伝達を強化する。これらのタンパク質のリン酸化は、さらにタモキシフェンおよび他のＳＥＲＭのエストロゲンアゴニスト様活性を増加させることもできる。

【０１９４】

純粋抗エストロゲン性フルベストラントは、この方法では膜ＥＲを活性化しない；しかしタモキシフェンなどのＳＥＲＭは、エストロゲンに類似する方法で膜ＥＲを活性化する。その核活性のようなＥＲの膜作用は、細胞、受容体サブタイプ、およびリガンド特異的である可能性があり、さらにまた例えばＥｒｂＢ１もしくはＨＥＲ－２を過剰発現する乳癌においてはるかにより顕著である成長因子シグナル伝達環境によって影響を受ける場合がある。タモキシフェンおよび他のＳＥＲＭによるＥＲのＭＩＳＳ活性の刺激は、一部には、ＨＥＲ－２過剰発現腫瘍において時々観察されるこれらの作用物質への耐性を説明することができる。

【０１９５】

核および血漿膜と関連するＥＲ機能（膜開始ステロイドシグナル伝達；ＭＩＳＳ）に加えて、ＥＲは、他の経路分子とコンジュゲート化してその後の腫瘍進行を促進する。この分子クロストークは、アロマターゼ阻害剤を用いると最良に治療できるが、ＳＥＲＭでは治療できない。

【０１９６】

ＥＲは、少なくとも２つの主要機能を有する。ＥＲは、エストロゲン調節遺伝子のための転写因子および核内の他の転写因子のためのコアクチベーターとして機能する。ＥＲは、成長因子シグナル伝達を活性化するために細胞質内および血漿膜内でも機能する。一部の乳房腫瘍、特にＨＥＲ－２増幅などの高度に活性の成長因子シグナル伝達経路を備える乳房腫瘍では、エストロゲンが成長因子シグナル伝達を活性化し、成長因子シグナル伝達経路がさらにＥＲを活性化するという悪循環が確立される。そのような腫瘍内でのエストロゲンは、腫瘍進行において重要な複数の経路を活性化することによって支配的な因子であると予測されるであろう。この分子クロストークは、乳癌を治療するための重要な意義を有する。１つの例として、アロマターゼ阻害剤を用いたエストロゲン剥脱療法は、ＥＲの核開始ステロイドシグナル伝達およびＭＩＳＳ活性の両方を停止させることによってＨＥＲ－２増幅腫瘍においてはＳＥＲＭより有効であるはずである。

【０１９７】

転移性疾患

乳房腫瘍の３分の２以上は、増殖に関してエストロゲン依存性である。転移性乳癌を治療するためには、多数のエストロゲン遮断剤を使用できる。これらの作用物質への治療応答は予測できないが、エストロゲンもしくはプロゲステロンに対する受容体を備える転移性乳癌を備える患者の約３分の１は、ホルモン療法から利益が得られない。転移性乳癌を備えるほぼ全患者は、ホルモン受容体が未だ存在するという事実にもかかわらず、最終的にはホルモン療法に対して耐性になる。

【０１９８】

療法の選択は、シグナル伝達経路の活性化または腫瘍生物学に関するより明確な理解に基づいて決定される。本発明は、有利にも、癌専門医が個別患者のための最善の治療を決定する際に役立つように診断的／予後診断的チップと一緒にアッセイ方法を提供する。

【０１９９】

Ｖ．抗体アレイの構築

所定の態様では、例えば固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞の細胞抽出物中の複数のシグナル伝達分子の活性化状態は、固体支持体上に固定された希釈系列の捕捉抗体を含む抗体に基づくアレイを用いて検出される。これらのアレイは、典型的には、異なるアドレス可能な場所における固体支持体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度で複数の異なる捕捉抗体を含む。

【０２００】

固体支持体は、タンパク質を固相化するために任意の適切な基質を含むことができる。固体支持体の例には、ガラス（例えば、ガラススライド）、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、ゲル、金属、セラミックなどが含まれるがそれらに限定されない。ナイロン（Ｂｉｏｔｒａｎｓ（商品名）、ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ社（カリフォルニア州コスタメサ）；Ｚｅｔａ－Ｐｒｏｂｅ（登録商標）、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社（カリフォルニア州ハーキュリーズ））、ニトロセルロース（Ｐｒｏｔｒａｎ（登録商標）、Ｗｈａｔｍａｎ社（ニュージャージー州フローラムパーク））、およびＰＶＤＦ（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ（商品名）、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社（マサチューセッツ州ビルリカ））などの膜は、本発明のアレイにおける固体支持体として使用するのに適切である。好ましくは、捕捉抗体は、例えばＷｈａｔｍａｎ社（ニュージャージー州フローラムパーク）から市販で入手できるＦＡＳＴ（登録商標）スライドなどのニトロセルロースポリマーでコーティングされたガラススライド上に固定される。

【０２０１】

所望である固体支持体の特定の態様には、大量の捕捉抗体に結合する能力および最小の変性で捕捉抗体に結合する能力が含まれる。また別の適切な態様は、固体支持体が、捕捉抗体を含有する抗体溶液が前記支持体に適用される場合に最小の「ウィッキング（ｗｉｃｋｉｎｇ）」を提示することである。最小のウィッキングを備える固体支持体は、前記支持体に適用された捕捉抗体溶液の小量のアリコートが固相化捕捉抗体の小さな規定スポットを生じさせることを可能にする。

【０２０２】

捕捉抗体は、典型的には、共有または非共有相互作用（例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子間結合）を介して固体支持体上に直接的または間接的に（例えば、捕捉タグによって）固定される。一部の実施形態では、捕捉抗体は、標準架橋方法および条件を使用して、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性架橋剤を用いて前記固体支持体へ共有結合させられる。適切な架橋剤は、例えばＰｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社（イリノイ州ロックフォード）などの製造供給元から市販で入手できる。

【０２０３】

本発明において使用するのに適切なアレイを生成するための方法には、タンパク質または核酸アレイを構築するために使用される任意の技術が含まれるがそれらに限定されない

。一部の実施形態では、捕捉抗体は、典型的にはスプリットピン、ブラントピン、またはインクジェット印刷を装備したロボット型プリンターである、マイクロスポッタを用いてアレイ上にスポットされる。本明細書に記載した抗体アレイを印刷するのに適切なロボットシステムには、ＣｈｉｐＭａｋｅｒ２スプリットピン（ＴｅｌｅＣｈｅｍ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社、カリフォルニア州サニーベール）を備えるＰｉｘＳｙｓ ５０００ロボット（Ｃａｒｔｅｓｉａｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カリフォルニア州アーヴィン）ならびにＢｉｏＲｏｂｉｃｓ社（マサチューセッツ州ウォバーン）およびＰａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ社（コネチカット州メリデン）から入手できる他のロボット型プリンターが含まれる。好ましくは、各捕捉抗体希釈液が少なくとも２、３、４、５、または６回ずつアレイ上にスポットされる。

【０２０４】

本発明において使用するのに適切なアレイを生成するためのまた別の方法は、支持体上に規定量の液体を引き出すために有効な条件下で固体支持体上に毛細管ディスペンサを接触させることによって、各選択されたアレイ位置で公知の量の捕捉抗体希釈液を分注する工程を含み、このプロセスは完全アレイを作成するために各選択されたアレイ位置で選択された捕捉抗体希釈液を用いて繰り返される。本方法は、複数のそのようなアレイを形成する際に実施することができるが、このとき溶液沈着工程は各反復サイクルで複数の固体支持体各々の上の選択された位置に適用される。そのような方法についての詳細な説明は、例えば米国特許第５，８０７，５２２号明細書の中に見いだすことができる。

【０２０５】

所定の場合には、抗体アレイを生成するためには、紙に印刷するためのデバイスを使用することができる。例えば、所望の捕捉抗体希釈液は、デスクトップ型ジェットプリンターのプリントヘッド内に装填し、適切な固体支持体上に印刷することができる（例えば、Ｓｉｌｚｅｌら、Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，４４：２０３６－２０４３（１９９８）を参照されたい）。

【０２０６】

一部の実施形態では、固体支持体上で生成されたアレイは、少なくとも約５スポット／ｃｍ^2、および好ましくは少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１，０００、２，０００、３，０００、４，０００、５，０００、６，０００、７，０００、８，０００もしくは９，０００、または１０，０００スポット／ｃｍ^{2}の密度を有する。

【０２０７】

所定の場合には、固体支持体上のスポットは各々、異なる捕捉抗体を表す。所定の他の場合には、固体支持体上の複数のスポットは、例えば、一連の下降する捕捉抗体濃度を含む希釈系列と同一捕捉抗体を表す。

【０２０８】

固体支持体上で抗体アレイを調製して構築するための方法の追加の例は、米国特許第６，１９７，５９９号明細書、第６，７７７，２３９号明細書、第６，７８０，５８２号明細書、第６，８９７，０７３号明細書、第７，１７９，６３８号明細書、および第７，１９２，７２０号明細書；米国特許出願公開第２００６０１１５８１０号明細書、第２００６０２６３８３７号明細書、第２００６０２９２６８０号明細書、および第２００７００５４３２６号明細書；ならびにＶａｒｎｕｍら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６４：１６１－１７２（２００４）に記載されている。

【０２０９】

抗体アレイをスキャンするための方法は当分野において公知であり、そして制限なく、タンパク質または核酸アレイをスキャンするための任意の技術が含まれる。本発明において使用するのに適切なマイクロアレイスキャナーは、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社（マサチ

ューセッツ州ボストン）、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社（カリフォルニア州パロアルト）、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ社（ワシントン州イサクアー）、ＧＳＩ Ｌｕｍｏｎｉｃｓ社（マサチューセッツ州ビルリカ）、およびＡｘｏｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ社（カリフォルニア州ユニオンシティ）から入手できる。非限定的例として、蛍光検出のためのＧＳＩ ＳｃａｎＡｒｒａｙ３０００は、定量のためにＩｍａＧｅｎｅソフトウエアとともに使用できる。

【０２１０】

ＶＩ．単一検出アッセイ

一部の実施形態では、例えば固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞の細胞抽出物中の当該の特定分析物（例えば、シグナル伝達分子）の活性化状態を検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット２抗体アッセイである。非限定的例として、本アッセイにおいて使用される２つの抗体は：（１）分析物に対して特異的な捕捉抗体；および（２）前記分析物の活性化形に対して特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態依存性抗体）を含むことができる。活性化状態依存性抗体は、例えば、前記分析物のリン酸化、ユビキチン化、および／または複合体形成状態を検出することができる。または、検出抗体は、細胞抽出物中の前記分析物の総量を検出する、活性化状態非依存性抗体を含む。活性化状態非依存性抗体は、一般に、分析物の活性化および非活性化形の両方を検出することができる。

【０２１１】

１つの好ましい実施形態では、２抗体アッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を前記対応する分析物に対して特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートする工程と；

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０２１２】

本明細書に記載した２抗体アッセイは、典型的には、異なるアドレス可能な場所における固体支持体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度で複数の異なる捕捉抗体を含む抗体に基づくアレイである。本発明において使用するのに適切な固体支持体の例については、上記に記載されている。

【０２１３】

捕捉抗体および検出抗体は、好ましくは、分析物結合に関するそれらの間の競合を最小限に抑えるために選択される（すなわち、捕捉および検出抗体の両方は、それらの対応するシグナル伝達分子へ同時に結合することができる）。

【０２１４】

１つの実施形態では、検出抗体は結合対の第１メンバー（例えば、ビオチン）を含み、シグナル増幅対の第１メンバーは前記結合対の第２メンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。結合対メンバーは、当分野において周知の方法を使用して、検出抗体へ、またはシグナル増幅対の第１メンバーへ直接的または間接的に結合させることができる。所定の場合には、シグナル増幅対の第１メンバーはペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、チトクロームｃペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨウ素酵素など）であり、シグナル増幅対の第２メンバーはチラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）である。これらの場合には、増幅シグナルは、過酸化水素（H_2O_2）の存在下において活性化チラミドを生成するためにチラミド試薬のペルオキシダーゼ酸化によって生成される。

【０２１５】
活性化チラミドは、直接的に検出される、または、例えばストレプトアビジン標識フルオロフォアまたはストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせなどのシグナル検出試薬の添加に基づいて検出される。本発明において使用するのに適切なフルオロフォアの例には、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素（例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５５５）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオロフォア（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などが含まれるがそれらに限定されない。ストレプトアビジン標識は、当分野において周知の方法を用いてフルオロフォアまたはペルオキシダーゼに直接的または間接的に結合させることができる。本発明において使用するのに適切な発色試薬の非限定的例には、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）、２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）、４－クロロ－１－ナフトール（４ＣＮ）、および／またはポルフィリノーゲンが含まれる。

【０２１６】
本明細書に記載した２抗体アッセイを実施するための典型的なプロトコールは、実施例３に提供されている。

【０２１７】
また別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載した２抗体アッセイを実施するためのキットであって：（ａ）固体支持体上に固定された複数の捕捉抗体の希釈系列と；（ｂ）複数の検出抗体（例えば、活性化状態非依存性抗体および／または活性化状態依存性抗体）と、を含むキットを提供する。一部の場合には、本キットは、固形腫瘍の循環細胞の複数のシグナル伝達分子の活性化状態を検出するために本キットを使用する方法についての取扱説明書をさらに含有することができる。本キットは、例えば、シグナル増幅対の第１および第２メンバー、チラミドシグナル増幅試薬、洗浄緩衝液などの、本発明の特定方法を実施することに関連して上述した追加の試薬のいずれかを含有することができる。

【０２１８】
２抗体アプローチのまた別の実施形態では、本発明は、切断受容体の存在を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程であって、前記ＥＣＤ結合領域は全長受容体に対して特異的である工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は前記切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉された切断受容体を前記対応する切断受容体に対して特異的である検出抗体とインキュベートする工程と；
（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法を提供する。

【０２１９】
所定の実施形態では、切断受容体はｐ９５ＥｒｂＢ２であり、全長受容体はＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である。所定の他の態様では、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、このときビオチンは

ビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している（例えば、前記抗体は前記全長受容体のＥＣＤ結合領域に対して特異的である）。

【０２２０】

図１４Ａは、当該の受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に向けられた抗体でコーティングされたビーズが全長受容体（例えば、ＥｒｂＢ２）には結合するが、切断受容体（例えば、ｐ９５）には結合しないので、あらゆる全長受容体を本アッセイから取り除くことを示している。図１４Ｂは、切断受容体（例えば、ｐ９５）がいったん捕捉抗体に結合すると、その後は全長受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）に対して特異的な検出抗体（例えば、ＥｒｂＢ２）によって検出できることを示している。検出抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）へ直接的に結合させることができる。チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ）は、次に、検出すべきシグナルを生成するために実施できる。ｐ９５の活性化状態は、例えば、そのリン酸化状態、ユビキチン化状態、および／または複合体形成状態を決定するために調べる（interrogated）ことができる。

【０２２１】

ＶＩＩ．近接二重検出アッセイ

一部の実施形態では、例えば固形腫瘍の循環細胞などの腫瘍細胞の細胞抽出物中の当該の特定分析物（例えば、シグナル伝達分子）の活性化状態を検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット近接（すなわち、３抗体）アッセイである。非限定的例として、本近接アッセイにおいて使用される３つの抗体は：（１）分析物に対して特異的な捕捉抗体と；（２）分析物の活性化形に対して特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態依存性抗体）；および（３）前記分析物の総量を検出する検出抗体（すなわち、活性化状態非依存性抗体）を含むことができる。活性化状態依存性抗体は、例えば、分析物のリン酸化、ユビキチン化、および／または複合体形成状態を検出することができる。活性化状態依存性抗体は、一般に、分析物の活性化および非活性化形の両方を検出することができる。

【０２２２】

１つの好ましい実施形態では、近接アッセイは：

（ｉ）複数の捕捉分析物を形成するために細胞抽出物を捕捉抗体の複数の希釈系列とインキュベートする工程と；

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉分析物を形成するために、前記複数の捕捉分析物を、複数の活性化状態非依存性抗体および対応する分析物に対して特異的である複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートする工程であって、

前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成する工程と、

（ｉｉｉ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉分析物をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする工程と；

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む。

【０２２３】

または、活性化状態依存性抗体は促進成分を用いて標識することができ、活性化状態非依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーを用いて標識することができる。

【０２２４】

本明細書に記載した近接アッセイは、典型的には、異なるアドレス可能な場所における固体支持体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度で複数の異なる捕捉抗体を含む抗体に基づくアレイである。本発明において使用するのに適切な固体支持体の例については、上記に記載されている。

【０２２５】

捕捉抗体、活性化状態非依存性抗体、および活性化状態依存性抗体は、好ましくは、分析物結合に関してそれらの間の競合を最小限に抑えるために選択される（すなわち、全て

の抗体はそれらの対応するシグナル伝達分子へ同時に結合することができる）。

【０２２６】

一部の実施形態では、活性化状態非依存性抗体は、検出可能な成分をさらに含む。そのような場合には、検出可能な成分の量は、細胞抽出物中の１つ以上の分析物の量と相関している。検出可能な成分の例には、蛍光標識、化学的に反応性の標識、酵素標識、放射活性標識などが含まれるが、それらに限定されない。好ましくは、検出可能な成分は、例えばＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素（例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオロフォア（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などのフルオロフォアである。検出可能な成分は、当分野において周知の方法を用いて活性化状態非依存性抗体へ直接的または間接的に結合させることができる。

【０２２７】

所定の場合には、活性化状態非依存性抗体は、促進成分を用いて直接的に標識される。促進成分は、当分野において周知の方法を用いて活性化状態非依存性抗体へ結合させることができる。本発明において使用するのに適切な促進成分には、前記促進成分に近接する（すなわち、空間的に近い、または近接する）また別の分子へチャネリングし（すなわち、それに方向付けられ）て反応する（すなわち、結合する、それに結合される、またはそれと複合体を形成する）酸化剤を生成できる任意の分子が含まれる。促進成分の例には、制限なく、例えばグルコースオキシダーゼなどの酵素または電子受容体として分子酸素（O_2）を含む酸化／還元反応を触媒する任意の他の酵素、ならびに例えばメチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン、スクアレート色素、フタロシアニンなどの光感作剤が含まれる。酸化剤の非限定的例には、過酸化水素（H_2O_2）、一重項酸素、および酸化／還元反応において酸素原子を移動させる、または電子を獲得する任意の他の化合物が含まれる。好ましくは、適切な基質（例えば、グルコース、光線など）の存在下では、促進成分（例えば、グルコースオキシダーゼ、光感作剤など）は、２つの成分が相互に近接している場合は、シグナル増幅対の第１メンバー（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、保護基によって保護されたハプテン、酵素阻害剤へのチオエーテル結合によって不活性化された酵素など）へチャネリングして反応する酸化剤（例えば、過酸化水素（H_2O_2）、一重項酸素など）を生成する。

【０２２８】

所定の他の場合には、活性化状態非依存性抗体は、活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドリンカーと促進成分に結合された相補的オリゴヌクレオチドリンカーとの間のハイブリダイゼーションによって促進成分で間接的に標識される。オリゴヌクレオチドリンカーは、当分野において周知の方法を用いて促進成分または活性化状態非依存性抗体へ結合させることができる。一部の実施形態では、促進成分に結合されたオリゴヌクレオチドリンカーは、活性化状態非依存性抗体に結合されたオリゴヌクレオチドリンカーに１００％相補性を有する。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカー対は、例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイゼーションすると、少なくとも１、２、３、４、５、６以上のミスマッチ領域を含む。当業者であれば、異なる分析物に対して特異的な活性化状態非依存性抗体は、同一オリゴヌクレオチドリンカーに、または異なるオリゴヌクレオチドリンカーのいずれかに結合させることができることを理解するであろう。

【０２２９】

促進成分または活性化状態非依存性抗体に結合するオリゴヌクレオチドリンカーの長さは、様々であってもよい。一般には、リンカー配列は、長さが少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、または１００ヌクレオチドであってもよい。典型的には、結合のためにはランダム核酸配列が生成される。非限定的例として、３つの別個の隣接ドメイン：スペーサードメイン；シグニチャードメイン；および

結合ドメインを有する１ライブラリーのオリゴヌクレオチドリンカーを設計できる。好ましくは、オリゴヌクレオチドリンカーは、それらが結合される促進成分または活性化状態非依存性抗体の機能を破壊することなく効率的に結合するために設計される。

【０２３０】

オリゴヌクレオチドリンカー配列は、様々なアッセイ条件下で任意の二次構造形成を防止または最小限に抑えるように設計することができる。典型的には、全アッセイ手順においてそれらが関与できるように、リンカー内の各セグメントについて融解温度が注意深く監視される。一般には、リンカー配列のセグメントの融解温度の範囲は、１～１０℃である。規定イオン濃度下での融解温度、二次構造、およびヘパリン構造を決定するためのコンピュータアルゴリズム（例えば、ＯＬＩＧＯ　６．０）を使用すると、各リンカー内の３つの異なるドメイン各々について分析することができる。全結合配列は、例えば、それらの構造的特性および、それらがストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で相補的オリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするかどうかについてのように他の結合されるオリゴヌクレオチドリンカー配列とのそれらの比較可能性について分析することもできる。

【０２３１】

オリゴヌクレオチドリンカーのスペーサー領域は、結合ドメインのオリゴヌクレオチド架橋部位からの適正な分離を提供する。結合ドメインは相補的オリゴヌクレオチドリンカー配列で標識された分子を核酸ハイブリダイゼーションによって結合ドメインへ結合させるように機能する。核酸媒介性ハイブリダイゼーションは、抗体－分析物（すなわち、抗原）複合体形成の前または後のいずれかに実施することができるので、より柔軟性のアッセイフォーマットを提供する。多数の直接抗体結合方法とは相違して、相当に小さなオリゴヌクレオチドを抗体もしくは他の分子に結合させる工程は、それらの標的分析物に向かう抗体の特異的親和性または結合分子の機能にほとんど影響を及ぼさない。

【０２３２】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカーのシグニチャー配列ドメインは、複合多重タンパク質アッセイにおいて使用できる。様々なシグニチャー配列を備えるオリゴヌクレオチドリンカーと複数の抗体を結合させることができる。多重イムノアッセイでは、適切なプローブで標識されたレポーターオリゴヌクレオチド配列を使用すると、多重アッセイフォーマットにおいて抗体とそれらの抗原との間の交差反応性を検出することができる。

【０２３３】

オリゴヌクレオチドリンカーは、幾つかの異なる方法を使用して抗体または他の分子に結合させることができる。例えば、オリゴヌクレオチドリンカーは、５’または３’末端上のいずれかでチオール基と合成することができる。チオール基は、還元剤（例えば、ＴＣＥＰ－ＨＣｌ）を使用して脱保護することができ、生じたリンカーは、脱塩スピンカラムを使用することによって精製できる。生じた脱保護オリゴヌクレオチドリンカーは、例えばＳＭＣＣなどのヘテロ二官能性架橋剤を使用して抗体または他のタイプのタンパク質の第１級アミンに結合させることができる。または、オリゴヌクレオチド上の５’－リン酸基は、リン酸エステルを形成するため、および引き続いてアミン含有分子に結合させるために水溶性カルボジイミドＥＤＣを用いて処理することができる。所定の場合には、３’－リボース残基上のジオールは、アルデヒド基へ酸化させ、次に還元アミノ化反応を用いて抗体または他のタイプのタンパク質のアミン基に結合させることができる。所定の他の場合には、オリゴヌクレオチドリンカーは、３’または５’末端上のいずれかでビオチン修飾により合成し、ストレプトアビジン標識分子へ結合させることができる。

【０２３４】

オリゴヌクレオチドリンカーは、当分野において公知である様々な技術のいずれか、例えば、Ｕｓｍａｎら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０９：７８４５（１９８７）；Ｓｃａｒｉｎｇｅら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１８：５４３３（１９９０）；Ｗｉｎｃｏｔｔら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２３：２６７７－２６８４（１９

９５）；およびＷｉｎｃｏｔｔら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，７４：５９（１９９７）に記載されている技術を用いて合成することができる。一般に、オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、５’末端のジメトキシトリチルおよび３’末端のホスホルアミダイトなどの一般的な核酸保護基および結合基を利用する。オリゴヌクレオチド合成のために適切な試薬、核酸脱保護のための方法、および核酸精製のための方法は、当業者には公知である。

【０２３５】

所定の場合には、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて直接的に標識される。シグナル増幅対のメンバーは、当分野において周知の方法を用いて活性化状態依存性抗体へ結合させることができる。所定の他の場合には、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１メンバーを用いて、活性化状態依存性抗体に結合された結合対の第１メンバーとシグナル増幅対の第１メンバーに結合された結合対の第２メンバーとの間の結合によって間接的に標識される。結合対メンバー（例えば、ビオチン／ストレプトアビジン）は、当分野において周知の方法を用いてシグナル増幅対のメンバーまたは活性化状態依存性抗体へ結合させることができる。シグナル増幅対のメンバーの例には、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）などのペルオキシダーゼ、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、チトクロームｃペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨウ素酵素などが含まれるがそれらに限定されない。シグナル増幅対のメンバーの他の例には、保護基によって保護されたハプテンおよび酵素阻害剤へのチオエーテル結合によって不活性化された酵素が含まれる。

【０２３６】

近接チャネリングの１つの実施例では、促進成分はグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）であり、シグナル増幅対の第１メンバーは西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である。ＧＯがグルコースなどの基質と接触させられると、ＧＯは酸化剤（すなわち、過酸化水素（H_2O_2））を生成する。ＨＲＰがＧＯに近接するチャネリング内にあると、ＧＯによって生成されたH_2O_2は、ＨＲＰへチャネリングして複合体を形成し、ＨＲＰ－H_2O_2複合体を形成するが、これはシグナル増幅対の第２メンバー（例えば、ルミノールもしくはイソルミノールなどの化学発光基質またはチラミド（例えば、ビオチン－チラミド）、ホモバリン酸、もしくは４－ヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光発生基質）の存在下では増幅シグナルを生成する。近接アッセイにおいてＧＯおよびＨＲＰを使用する方法は、例えば、Ｌａｎｇｒｙら、Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ．ｏｆ Ｅｎｅｒｇｙ Ｒｅｐｏｒｔ Ｎｏ．ＵＣＲＬ－ＩＤ－１３６７９７（１９９９）に記載されている。ビオチン－チラミドがシグナル増幅対の第２メンバーとして使用される場合は、ＨＲＰ－H_2O_2複合体は、チラミドを酸化して求核残基の近くで共有的に結合する反応性チラミドラジカルを生成する。活性化チラミドは、直接的に検出される、または、例えばストレプトアビジン標識フルオロフォア、またはストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼおよび発色試薬の組み合わせなどのシグナル検出試薬の添加に基づいて検出される。本発明において使用するのに適切なフルオロフォアの例には、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素（例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標）５５５）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオロフォア（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などが含まれるがそれらに限定されない。ストレプトアビジン標識は、当分野において周知の方法を用いてフルオロフォアまたはペルオキシダーゼに直接的または間接的に結合させることができる。本発明において使用するのに適切な発色試薬の非限定的例には、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）、２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）、４－クロロ－１－ナフトール（４ＣＮ）、および／またはポルフィリノーゲンが含まれる。

【０２３７】

近接チャネリングのまた別の実施例では、促進成分は光感作剤であり、シグナル増幅対の第１メンバーは特異的結合パートナー（例えば、リガンド、抗体など）へのハプテンの結合を防止する保護基を用いて保護される複数のハプテンを用いて標識された巨大分子である。例えば、シグナル増幅対のメンバーは、保護されたビオチン、クマリン、および／またはフルオレセイン分子で標識されたデキストラン分子であってもよい。適切な保護基には、フェノキシー、アナリノー、オレフィンー、チオエーテルー、およびセレノエーテルー保護基が含まれるがそれらに限定されない。本発明の近接アッセイにおいて使用するのに適切な追加の光感作剤および保護ハプテン分子は、米国特許第５，８０７，６７５号明細書に記載されている。光感作剤が光線で励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）を生成する。ハプテン分子が光感作剤に近接するチャネリング内に存在する場合は、前記光感作剤によって生成された一重項酸素は、ハプテンの保護基上のチオエーテルへチャネリングして反応してカルボニル基（ケトンもしくはアルデヒド）およびスルフィン酸を産生し、結果としてハプテンから保護基を遊離させる。未保護ハプテンは次に、前記シグナル増幅対の第２メンバー（例えば、検出可能なシグナルを生成できる特異的結合パートナー）へ特異的に結合するために利用できる。例えば、ハプテンがビオチンである場合は、特異的結合パートナーは酵素標識ストレプトアビジンであってもよい。典型的な酵素には、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、ＨＲＰなどが含まれる。未結合試薬を取り除くために洗浄した後、検出可能なシグナルは、酵素の検出可能な（例えば、蛍光、化学発光、発色性などの）基質を添加することによって生成し、当分野において公知の適切な方法および器具類を使用して検出することができる。または、検出可能なシグナルは、チラミドシグナル増幅を用いて増幅させることができ、活性化チラミドは、直接的に検出できる、または上述したようにシグナル検出試薬の添加に基づいて検出することができる。

【０２３８】

近接チャネリングのまた別の実施例では、促進成分は光感作剤であり、シグナル増幅対の第１メンバーは酵素－阻害剤複合体である。酵素および阻害剤（例えば、リン酸標識デキストラン）は、開裂可能なリンカー（例えば、チオエーテル）によって一緒に結合される。光感作剤が光線で励起されると、光感作剤は酸化剤（すなわち、一重項酸素）を生成する。酵素－阻害剤複合体が光感作剤に近接するチャネリング内に存在する場合は、前記光感作剤によって生成された一重項酸素は、開裂可能なリンカーへチャネリングして反応し、酵素から阻害剤を遊離させ、それにより前記酵素を活性化する。検出可能なシグナルを生成するためには酵素基質が加えられる、または増幅シグナルを生成するためには増幅試薬が加えられる。

【０２３９】

近接チャネリングのまた別の実施例では、促進成分はＨＲＰであり、シグナル増幅対の第１メンバーは上述したように保護されたハプテンもしくは酵素－阻害剤複合体であり、保護基はｐ－アルコキシフェノールを含む。フェニレンジアミンおよびH_2O_2の添加は、保護されたハプテンもしくは酵素－阻害剤複合体にチャネリングしてｐ－アルコキシフェノール保護基と反応して露出したハプテンもしくは反応性酵素を産生する、反応性フェニレンジイミンを生成する。増幅シグナルは、上述したように生成され、検出される（例えば、米国特許第５，５３２，１３８号明細書および第５，４４５，９４４号明細書を参照されたい）。

【０２４０】

本明細書に記載した近接アッセイを実施するための典型的なプロトコールは、実施例４に提供されている。

【０２４１】

また別の実施形態では、本発明は、上述した近接アッセイを実施するためのキットであって：（ａ）固体支持体上に固定された複数の捕捉抗体の希釈系列；および（ｂ）複数の検出抗体（例えば、活性化状態非依存性抗体および活性化状態依存性抗体）を含むキットを提供する。一部の場合には、本キットは、固形腫瘍の循環細胞の複数のシグナル伝達分

子の活性化状態を検出するために本キットを使用する方法についての取扱説明書をさらに含有することができる。本キットは、例えば、シグナル増幅対の第１および第２メンバー、チラミドシグナル増幅試薬、促進成分のための基質、洗浄緩衝液などの、本発明の特定方法を実施することに関連して上述した追加の試薬のいずれかをさらに含有することができる。

【０２４２】

ＶＩＩＩ．抗体の生成

本発明による希少循環細胞などの腫瘍細胞中のシグナル伝達分子の活性化状態を分析するために未だ市販で入手可能にはなっていない抗体の生成および選択は、幾つかの方法によって実施できる。例えば、１つの方法は、当分野において公知のタンパク質発現および精製方法を使用して当該のポリペプチド（すなわち、抗原）を発現および／または精製する方法であるが、また別の方法は当分野において公知の固相ペプチド合成法を用いて当該のポリペプチドを合成する方法である。例えば、Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｍｕｒｒａｙ Ｐ．Ｄｅｕｔｃｈｅｒ，ｅｄ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，Ｖｏｌ．１８２（１９９０）；Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｇｒｅｇ Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ，ｅｄ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，Ｖｏｌ．２８９（１９９７）；Ｋｉｓｏら、Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，３８：１１９２－９９（１９９０）；Ｍｏｓｔａｆａｖｉら、Ｂｉｏｍｅｄ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，１：２５５－６０，（１９９５）；およびＦｕｊｉｗａｒａら、Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，４４：１３２６－３１（１９９６）を参照されたい。精製もしくは合成されたポリペプチドは、次にポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するために、例えば、マウスまたはウサギに注射することができる。当業者であれば、例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８８）に記載されているように、抗体を産生するためには多数の方法を利用できることを認識するであろう。当業者であれば、結合フラグメントまたは抗体を模倣する（例えば、抗体の機能的結合領域を保持する）Ｆａｂフラグメントもまたさらに様々な方法によって遺伝情報から調製できることも理解するであろう。例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ，Ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９９５）；およびＨｕｓｅら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４９：３９１４－３９２０（１９９２）を参照されたい。

【０２４３】

さらに、極めて多数の刊行物は、選択された標的抗原に結合するためのポリペプチドライブラリーを生成してスクリーニングするためのファージ提示技術の使用を報告している（例えば、Ｃｗｉｒｌａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：６３７８－６３８２（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：４０４－４０６（１９９０）；Ｓｃｏｔｔら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：３８６－３８８（１９９０）；およびＬａｄｎｅｒら、米国特許第５，５７１，６９８号明細書を参照されたい）。ファージ提示法の基本的概念は、ファージＤＮＡによってコードされたポリペプチドと標的抗原との間の物理的結合の確立である。この物理的結合は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを取り囲んでいるカプシドの一部としてポリペプチドを提示する、ファージ粒子によって提供される。ポリペプチドとそれらの遺伝物質との間の物理的結合の確立は、様々なポリペプチドを有する極めて多数のファージの同時マススクリーニングを可能にする。標的抗原との親和性を備えるポリペプチドを提示するファージは標的抗原に結合し、これらのファージは標的抗原への親和性スクリーニングによって濃縮される。これらのファージから提示されたポリペプチドの同一性は、それらの各ゲノムから決定することができる。これらの方法を使用すると、所望の標的抗原に対する結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、次に従来型手段によって大量に合成することができる（例えば

、米国特許第６，０５７，０９８号明細書を参照されたい）。

【０２４４】

これらの方法によって生成される抗体は、次に当該の精製されたポリペプチド抗原との親和性および特異性についての第１スクリーニングによって、および必要であれば、その結果を、結合から排除されることが望ましい他のポリペプチド抗原を備える抗体の親和性および特異性と比較することによって選択することができる。スクリーニング法は、マイクロタイタープレートの別個のウエル内への精製ポリペプチド抗原の固相化を含むことができる。潜在的抗体もしくは抗体群を含有する溶液は、次に各マイクロタイターウエル内に配置され、約３０分間～２時間にわたりインキュベートされる。マイクロタイターウエルは、次に洗浄され、標識された二次抗体（例えば、立てられた抗体がマウス抗体であればアルカリホスファターゼに結合した抗マウス抗体）がウエルに加えられ、約３０分間にわたりインキュベートされ、その後に洗浄される。基質がウエルに加えられ、固相化されたポリペプチド抗原に対する抗体が存在する場合は、呈色反応が出現するであろう。

【０２４５】

このように同定された抗体は、次に親和性および特異性についてさらに分析することができる。標的タンパク質のためのイムノアッセイの開発においては、精製された標的タンパク質は、選択されている抗体を使用して、それを用いてイムノアッセイの感受性および特異性を判断するための標準として機能する。様々な抗体の結合親和性は異なる、例えば所定の抗体の組み合わせが相互に立体的に干渉する場合があるので、抗体のアッセイ性能は、その抗体の絶対親和性および特異性よりはるかに重要な尺度となる可能性がある。

【０２４６】

当業者であれば、抗体もしくは結合フラグメントを生成する際に、そして当該の様々なポリペプチドに対して親和性および特異性についてスクリーニングおよび選択する際に多数のアプローチを実施できるが、これらのアプローチは本発明の範囲を変化させないことを認識するであろう。

【０２４７】

Ａ．ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは当該のポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）または腹腔内（ｉｐ）注射によって動物において立てられる。当該のポリペプチドを、二官能剤もしくは誘導体化剤を用いて、例えばアオガイヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤などの、免疫対象の種内で免疫原性であるタンパク質担体へ結合させるのが有利な可能性がある。二官能剤もしくは誘導体化剤の非限定的例には、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を通しての結合）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を通しての結合）、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、$SOCl_2$、および$R_1N=C=NR$（式中、ＲおよびＲ$_1$は異なるアルキル基である）が含まれる。

【０２４８】

動物は、例えば１００μｇ（ウサギに対して）もしくは５μｇ（マウスに対して）の抗原または３容量のフロイント（Ｆｒｅｕｎｄ）の完全アジュバントを結合し、複数の部位で溶液を皮内に注射することによって、当該のポリペプチドまたはそれらの免疫原性コンジュゲートもしくは誘導体に対して免疫される。１カ月後、動物は、複数部位での皮下注射によるフロイントの不完全アジュバント内のポリペプチドもしくはコンジュゲートのオリジナル量の約１／５～１／１０を用いて追加免疫される。７～１４日後に、動物から採血され、血清が抗体力価についてアッセイされる。動物は、典型的には力価が安定状態に達するまで追加免疫される。好ましくは、動物は同一ポリペプチドのコンジュゲートを用いて追加免疫されるが、異なる免疫原性タンパク質への、および／または異なる架橋試薬を通しての結合を使用できる。コンジュゲートは、融合タンパク質としての組換え細胞培養内で作成することもできる。所定の場合には、ミョウバンなどの凝集剤は、免疫応答を強化するために使用することができる。

【０２４９】

Ｂ．モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、一般には、実質的に均質な抗体の集団から入手される、すなわち、前記集団を含む個別抗体は小量で存在する可能性がある天然型変異を除いて同一である。そこで、修飾語句「モノクローナル」は、抗体の性質が離散的抗体の混合物ではないことを示している。例えば、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって記載されたハイブリドーマ法、または当分野において公知のあらゆる組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号明細書を参照されたい）を用いて作成することができる。

【０２５０】

ハイブリドーマ法では、マウスもしくはその他の適切な宿主動物（例えば、ハムスター）は、免疫のために使用される当該のポリペプチドへ特異的に結合する抗体を生成する、または生成することのできるリンパ球を引き出すために、上述したように免疫される。または、リンパ球は、インビトロで免疫される。免疫されたリンパ球は次に、ハイブリドーマ細胞を形成するために、例えばポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用して骨髄腫細胞と融合させられる（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．５９－１０３（１９８６）を参照されたい）。このように調製されたハイブリドーマ細胞は、融合していない、好ましくは親骨髄腫細胞の成長もしくは生存を阻害する１つ以上の物質を含有する適切な培養培地中で播種され、増殖させられる。例えば、親骨髄腫細胞に酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）が欠如する場合は、ハイブリドーマ細胞のための培養培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ欠損性細胞の増殖を防止する、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（ＨＡＴ培地）を含むであろう。

【０２５１】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合する、選択された抗体産生細胞による抗体の安定性高レベル産生を支持する、および／または例えばＨＡＴ培地などの培地に感受性である骨髄腫細胞である。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのそのような好ましい骨髄腫細胞系の例には、例えばＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍（Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ；カリフォルニア州サンディエゴから入手できる）、ＳＰ－２もしくはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞（アメリカンタイプ・カルチャーコレクション；メリーランド州ロックビルから入手できる）に由来する骨髄腫細胞などのマウス骨髄腫細胞系、およびヒト骨髄腫もしくはマウス－ヒト異種骨髄腫細胞系（例えば、Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；およびＢｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．５１－６３（１９８７）を参照されたい）が含まれるがそれらに限定されない。

【０２５２】

その中でハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地は、当該のポリペプチドに対して向けられたモノクローナル抗体を産生するためにアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法によって、または例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）もしくは酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）などのインビトロ結合アッセイによって決定される。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、ｔｈｅ Ｓｃａｔｃｈａｒｄ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｍｕｎｓｏｎら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）を使用して決定することができる。

【０２５３】

所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を生成するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは希釈方法を限定することによってサブクローニングし、標準方法によって増殖させることができる（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎ

ｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．５９－１０３（１９８６）を参照されたい）。この目的のために適切な培養培地には、例えば、Ｄ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地、腹水、または血清から、例えばタンパク質Ａ－セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動法、透析法、または親和性クロマトグラフィなどの従来型抗体精製方法によって分離することができる。

【０２５４】

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来方法を使用して容易に単離して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子へ特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）シーケンシングすることができる。ハイブリドーマ細胞は、そのようなＤＮＡの好ましい起源として機能する。単離されると、ＤＮＡは、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を誘導するために、さもなければ抗体を産生しない例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞内へトランスフェクトされる発現ベクター内に配置することができる。例えば、Ｓｋｅｒｒａら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６－２６２（１９９３）；およびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．，１３０：１５１－１８８（１９９２）を参照されたい。ＤＮＡはさらにまた、例えばヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのためのコーディング配列を同種マウス配列に変えて置換する工程によって（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号明細書；およびＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１（１９８４）を参照されたい）、または非免疫グロブリンポリペプチドに対するコーディング配列の全部もしくは一部を免疫グロブリンコーディング配列へ共有的に結合させることによって修飾することができる。

【０２５５】

別の実施形態では、モノクローナル抗体もしくは抗体フラグメントは、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４（１９９０）；Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）；およびＭａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載された技術を用いて生成された抗体ファージライブラリーから単離することができる。鎖シャフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）ヒトモノクローナル抗体の産生は、Ｍａｒｋｓら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されている。極めて大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換えの使用については、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２１：２２６５－２２６６（１９９３）に記載されている。そこで、これらの技術は、モノクローナル抗体を生成するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法にとって重要な代替法である。

【０２５６】

Ｃ．ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当分野において公知である。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである起源からその中に導入された１つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、典型的には「インポート」可変ドメインから採取される、「インポート」残基と呼ばれることが多い。ヒト化は、本質的には非ヒト抗体の超可変性領域配列をヒト抗体の対応する配列と置換することによって実施できる。例えば、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；およびＶｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８）を参照されたい。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号明細書を参照されたい）であるが、このとき決して実質的に完全ではないヒト可変領域は

、非ヒト種から対応する配列によって置換されている。実際に、ヒト化抗体は、典型的には一部の超可変領域残基およびおそらくは一部のフレームワーク領域（ＦＲ）残基は、齧歯類抗体の類似部位由来の残基と置換されているヒト抗体である。

【０２５７】

上述したヒト化抗体を作成する際に使用すべき軽鎖および重鎖両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を減少させるために重要な検討事項である。いわゆる「最良適合」法によると、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。齧歯類の配列に最も近いヒト配列は、次にヒト化抗体のためのヒトＦＲとして容認される（例えば、Ｓｉｍｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２２９６（１９９３）；およびＣｈｏｔｈｉａら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１（１９８７）を参照されたい）。また別の方法は、軽鎖もしくは重鎖の特定サブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定ＦＲを使用する。数種の異なるヒト化抗体のためには、同一ＦＲを使用できる（例えば、Ｃａｒｔｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；およびＰｒｅｓｔａら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３（１９９３）を参照されたい）。

【０２５８】

抗原に対する高親和性およびその他の好適な生物学的特性の保持を備える抗体をヒト化することもまた重要である。この目標を達成するために、ヒト化抗体は、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いて親配列および様々な概念的ヒト化生成物を分析するプロセスによって調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者であれば精通している。選択された候補免疫グロブリン配列のあり得る三次元立体配座構造を例示して提示するコンピュータプログラムを利用できる。これらの提示の検査は、候補免疫グロブリン配列の機能において残基が果たす可能性がある役割についての分析、すなわち前記候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析を許容する。この方法で、ＦＲ残基をレシピエントおよびインポート配列から選択して結合することができるので、例えば標的抗原に対する増加した親和性などの所望の抗体特性が達成される。一般に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的および特異的に関係している。

【０２５９】

様々な形態のヒト化抗体は、本発明によって企図されている。例えば、ヒト化抗体は、Ｆａｂフラグメントなどの抗体フラグメントであってもよい。または、ヒト化抗体は、例えば完全ＩｇＡ、ＩｇＧ、またはＩｇＭ抗体などの完全抗体であってもよい。

【０２６０】

Ｄ．ヒト抗体

ヒト化の代替法として、ヒト抗体を生成することができる。一部の実施形態では、免疫すると、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で全レパートリーのヒト抗体を生成できるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生成することができる。例えば、キメラおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（ＪＨ）遺伝子のホモ接合体欠失は内因性抗体産生の完全阻害を生じさせると記載されている。そのような生殖細胞系変異マウスへのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの導入は、抗原惹起投与後にはヒト抗体の産生を生じさせる。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎら、Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎ．，７：３３（１９９３）；ならびに米国特許第５，５９１，６６９号明細書、第５，５８９，３６９号明細書、および第５，５４５，８０７号明細書を参照されたい。

【０２６１】

または、ファージ提示技術（例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙら、Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５３（１９９０）を参照されたい）を使用すると、未免疫ドナーからの免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーを用いて、インビトロでヒト抗体およ

び抗体フラグメントを生成することができる。この技術に従うと、抗体Ｖドメイン遺伝子は、例えばＭ１３もしくはｆｄなどの線維状バクテリオファージの大もしくは小外皮タンパク質遺伝子のいずれかの中にインフレーム（ｉｎ－ｆｒａｍｅ）でクローン化し、ファージ粒子の表面上の機能的抗体フラグメントとして提示される。線維状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づいた選択は、さらにそれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択も生じさせる。そこで、ファージは、Ｂ細胞の特性の一部を模倣する。ファージ提示法は、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，３：５６４－５７１（１９９３）に記載されたような様々なフォーマットで実施できる。ファージ提示法のためには、Ｖ遺伝子セグメントの幾つかの起源を使用できる。例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。未免疫ヒトドナー由来のＶ遺伝子の一レパートリーを構築することができ、様々な抗原アレイに対する抗体（自己抗原を含む）は、Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）；Ｇｒｉｆｆｉｔｈら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１２：７２５－７３４（１９９３）；ならびに米国特許第５，５６５，３３２号明細書および第５，５７３，９０５号明細書に記載された技術に本質的にしたがって単離することができる。

【０２６２】

所定の場合には、ヒト抗体は、例えば米国特許第５，５６７，６１０号明細書および第５，２２９，２７５号明細書に記載されたように、インビトロ活性化Ｂ細胞によって生成することができる。

【０２６３】

Ｅ．抗体フラグメント

抗体フラグメントを生成するために、様々な技術が開発されてきた。伝統的には、これらのフラグメントは、完全抗体のタンパク質分解によって引き出された（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏら、Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈ．，２４：１０７－１１７（１９９２）；およびＢｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照されたい）。しかしこれらのフラグメントは、現在では組換え宿主細胞を用いて直接的に生成することができる。例えば、抗体フラグメントは、上記で考察した抗体ファージライブラリーから単離できる。または、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントを大腸菌細胞から直接的に回収し、化学的に結合させてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成することができる（例えば、Ｃａｒｔｅｒら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３－１６７（１９９２）を参照されたい）。他のアプローチによると、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体フラグメントを生成するための他の技術は、当業者には明白であろう。他の実施形態では、最適な抗体は、一本鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）である。例えば、国際公開第９３／１６１８５号パンフレット；ならびに米国特許第５，５７１，８９４号明細書および第５，５８７，４５８号明細書を参照されたい。抗体フラグメントは、さらに例えば米国特許第５，６４１，８７０号明細書に記載されたように線状抗体であってもよい。そのような線状抗体フラグメントは、単一特異的または二重特異的であってもよい。

【０２６４】

Ｆ．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。典型的な二重特異性抗体は、当該の同一ポリペプチドの２つの異なるエピトープに結合することができる。その他の二重特異性抗体は、当該のポリペプチドのための結合部位を１つ以上の追加の抗原のための結合部位と結合することができる。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調製することができる。

【０２６５】

二重特異性抗体を作成するための方法は、当分野において公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な生成法は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の共発現に基づいており、

このとき前記２本の鎖は異なる特異性を有する（例えば、Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３）を参照されたい）。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の任意組み合わせのために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ（ｑｕａｄｒｏｍａ））は１０個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成するが、そのうちの１つだけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常は親和性クロマトグラフィによって実施される。同様の方法は、国際公開第９３／０８８２９号パンフレットおよびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５－３６５９（１９９１）に開示されている。

【０２６６】

異なるアプローチによると、所望の結合特異性を備える抗体可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）は免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合させられる。この融合は、好ましくはヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを備えている。融合の少なくとも１つに存在する軽鎖結合のために必要な部位を含有する第１重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡ、および所望であれば免疫グロブリン軽鎖は、別個の発現ベクター内に挿入され、適切な宿主生物内にコトランスフェクトされる。これは、構築において使用される３本のポリペプチド鎖の不等比率が最適な収率を産生する場合に、実施形態において３つのポリペプチドフラグメントの相互比率を調整する際の大きな柔軟性を提供する。しかし、同等比率にある少なくとも２本のポリペプチド鎖の発現がより高い収率を生じさせる場合、または前記比率が特に有意ではない場合は、２本または全３本のポリペプチド鎖のためのコーディング配列を１つの発現ベクター内に挿入することができる。

【０２６７】

このアプローチの好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、１本のアームでは第１結合特異性を備えるハイブリッド免疫グロブリン重鎖、およびもう１本のアームでは（第２結合特異性を提供する）ハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対から構成される。この非対称性構造は、二重特異性分子の２分の１だけにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が容易な分離方法を提供するので、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を促進する。例えば、国際公開第９４／０４６９０号パンフレットおよびＳｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１２１：２１０（１９８６）を参照されたい。

【０２６８】

米国特許第５，７３１，１６８号明細書に記載されたまた別のアプローチによると、１対の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化するために遺伝子組み換えすることができる。好ましいインターフェースは、抗体定常ドメインのＣＨ３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１抗体分子の界面からの１つ以上の小さいアミノ酸側鎖は大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）と置換される。大きな側鎖と同一もしくは類似のサイズの代償性「腔」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）と置換することによって第２抗体分子の界面上で作成される。これは、例えばホモ二量体などの他の望ましくない最終生成物に比してヘテロ二量体の収率を増加させるメカニズムを提供する。

【０２６９】

二重特異性抗体には、架橋もしくは「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート内の抗体の１つはアビジンに、もう１つはビオチンに結合させることができる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便宜的な架橋法を用いて作成することができる。適切な架橋剤および架橋法は、当分野において周知であり、例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０２７０】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成するのに適切な技術もまた当分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製することができる。所定

の場合には、二重特異性抗体は、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生成するために完全抗体がタンパク質分解により開裂させられる方法によって生成することができる（例えば、Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照されたい）。これらのフラグメントは、隣接ジチオールを安定化させて分子間ジスルフィド形成を防止するために、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元させられる。生成したＦａｂ’フラグメントは、次にチオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換させられる。Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の１つは、次にメルカプトエチルアミンを用いた還元によってＦａｂ’－チオールへ再変換させられ、二重特異性抗体を形成するために等モル量の他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合される。

【０２７１】

一部の実施形態では、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントは、大腸菌から直接回収し、二重特異性抗体を形成するために化学的に結合させることができる。例えば、完全ヒト化二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子は、Ｓｈａｌａｂｙら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）に記載された方法によって生成することができる。各Ｆａｂ’フラグメントは大腸菌から別個に分泌させ、二重特異性抗体を形成するためにインビトロでの化学結合を受けさせた。

【０２７２】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体フラグメントを作成して単離するための様々な技術についてもまた記載されてきた。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて生成されてきた。例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照されたい。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結させた。抗体ホモ二量体は、モノマーを形成するためにヒンジ領域で還元させ、その後に抗体ヘテロ二量体を形成するために再酸化させた。この方法は、抗体ホモ二量体を生成するためにも利用できる。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって記載された「ディアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作成するための代替メカニズムを提供した。これらのフラグメントは、同一鎖上の２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。したがって、１つのフラグメントのＶＨおよびＶＬドメインは、強制的にまた別の相補的ＶＬおよびＶＨドメインと対合させられ、それによって２つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異性抗体フラグメントを作成するためのまたべつの戦略は、Ｇｒｕｂｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）に記載されている。

【０２７３】

２より多い価数を備える抗体もまた企図されている。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。例えば、Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：６０（１９９１）を参照されたい。

【０２７４】

Ｇ．抗体の精製

組み換え技術を使用すると、抗体は単離された宿主細胞の内側で、宿主細胞のペリプラスム間隙内において生成できる、または宿主細胞から培地中へ直接分泌させることができる。抗体が細胞内で生成されると、微粒子破片は最初に、例えば遠心分離または限外濾過によって除去される。Ｃａｒｔｅｒら、ＢｉｏＴｅｃｈ．，１０：１６３－１６７（１９９２）は、大腸菌のペリプラスム間隙内に分泌される抗体を単離するための方法について記載している。手短には、細胞ペーストは酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ、およびフェニルメチルスルホニルフロリド（ＰＭＳＦ）の存在下で約３０分間にわたり解凍させられる。細胞破片は、遠心分離によって取り除くことができる。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系からの上清は一般に、例えば、Ａｍｉｃｏｎ社またはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ社製限外濾過装置である市販で入手できるタンパク質

濃縮フィルターを用いて濃縮させられる。例えばＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するために上記の工程のいずれかに含めることができ、偶発的汚染物質の増殖を防止するためには抗生物質を含めることができる。

【０２７５】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動法、透析、および親和性クロマトグラフィを用いて精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体内に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種およびアイソタイプに左右される。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するために使用できる（例えば、Ｌｉｎｄｍａｒｋら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，６２：１－１３（１９８３）を参照されたい）。プロテインＧは、全マウスアイソタイプおよびヒトγ３に対して推奨されている（例えば、Ｇｕｓｓら、ＥＭＢＯ　Ｊ．，５：１５６７－１５７５（１９８６）を参照されたい）。親和性リガンドが付着させられるマトリックスは、アガロースであることが最も多いが、他のマトリックスも利用できる。例えば制御細孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定性のマトリックスは、アガロースを用いた場合より高速の流速および短いプロセッシング時間を達成できる。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合は、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商品名）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ；ニュージャージー州フィリップスバーグ）が精製のために有用である。例えばイオン交換カラム上での分別、ヘアピンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商品名）上のクロマトグラフィ、アニオンもしくはカチオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上のクロマトグラフィ、クロマト分画、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈降法などのタンパク質精製のための他の技術もまた、回収すべき抗体に依存して利用できる。

【０２７６】

予備精製工程後に、当該の抗体および汚染物質を含む混合物は、好ましくは低い塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍの塩）で実施された、約２．５～４．５のｐＨにある溶出緩衝液を用いて低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィにかけることができる。

【０２７７】

当業者であれば、抗体に類似する機能を有する任意の結合分子、例えばサンプル中の１つ以上の当該の分析物に対して特異的である結合分子もしくは結合パートナーもまた、本発明の方法および組成物において使用できることを理解するであろう。適切な抗体様分子の例には、ドメイン抗体、ユニボディ、ナノボディ、サメ抗原反応性タンパク質、アビマー、アドネクチン、アンチカルム（ａｎｔｉｃａｌｍ）、親和性リガンド、フィロマー（ｐｈｙｌｏｍｅｒ）、アプタマー、アフィボディ、トリネクチンなどが含まれるが、それらに限定されない。

【０２７８】

ＩＸ．投与方法

本発明の方法によると、本明細書に記載した抗癌剤は、当分野において公知の任意の便宜的手段によって被験者に投与される。本発明の方法は、被験者における腫瘍（例えば、乳房腫瘍）を治療するのに適切な抗癌剤または抗癌剤の組み合わせを選択するために使用できる。本発明の方法は、さらにまた抗癌剤または抗癌剤の組み合わせを用いた治療に対する被験者における腫瘍（例えば、乳房腫瘍）の応答を同定するためにも使用できる。さらに、本発明の方法は、抗癌剤または抗癌剤の組み合わせを用いた治療に対する腫瘍（例えば、乳房腫瘍）を有する被験者の応答を予測するためにも使用できる。当業者であれば、本明細書に記載した抗癌剤を単独で、または従来型化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法、および／または手術との併用治療アプローチの一部として投与できることを理解するであろう。

【０２７９】

所定の実施形態では、抗癌剤は、例えばモノクローナル抗体もしくはチロシンキナーゼ阻害剤などの抗シグナル伝達剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）；抗増殖剤；化学療法薬（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン治療薬；放射線療法薬；ワクチン；および／または例

えば癌性細胞などの異常な細胞の制御されない増殖を減少または無効にさせる能力を備える任意の他の化合物を含む。一部の実施形態では、被験者は、少なくとも１つの化学療法薬と組み合わせて、１つ以上の抗シグナル伝達剤、抗増殖剤、および／またはホルモン治療薬を用いて治療される。典型的なモノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、抗増殖剤、化学療法薬、ホルモン治療薬、放射線療法薬、およびワクチンは上述されている。

【０２８０】

一部の実施形態では、本明細書に記載した抗癌剤は、免疫賦活剤（例えば、カルメット・ゲラン桿菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ：ＢＣＧ）、レバミゾール、インターロイキン－２、α－インターフェロンなど）、免疫毒素（例えば、抗ＣＤ３３モノクローナル抗体－カリケアマイシンコンジュゲート、抗ＣＤ２２モノクローナル抗体－シュードモナス外毒素コンジュゲートなど）、および放射免疫治療（例えば、^{111}Ｉｎ、^{90}Ｙ、または^{131}Ｉなどに結合した抗ＣＤ２０モノクローナル抗体）を含むがそれらに限定されない従来型免疫治療薬と共投与することができる。

【０２８１】

抗癌剤は、必要に応じて適切な医薬賦形剤とともに投与することができ、許容された投与様式のいずれかによって実施することができる。そこで、投与は、例えば、経口、経口腔、舌下、経歯肉、経口蓋、静脈内、局所、皮下、経皮的、経皮性、筋肉内、関節内、非経口、動脈内、皮内、心室内、頭蓋内、腹腔内、膀胱内、髄腔内、病巣内、鼻腔内、直腸内、膣内、または吸入によってであってもよい。「共投与する」は、抗癌剤が第２薬（例えば、また別の抗癌剤、抗癌剤療法と関連する副作用を減少させるために有用な薬物、放射線療法薬、ホルモン治療薬、免疫治療薬など）の投与と同時に、投与前に、または投与直後に投与される。

【０２８２】

治療有効量の抗癌剤は、繰返し、例えば少なくとも２、３、４、５、６、７、８回以上投与できる、または、連続注入によって投与することができる。投与は、好ましくは正確な用量を単純に投与するのに適切な単位剤形にある、例えば錠剤、ピル剤、ペレット剤、カプセル剤、粉末剤、液剤、懸濁剤、エマルジョン、坐剤、停留浣腸、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、エアロゾル剤、フォーム剤などの固体、半固体、凍結乾燥粉末、もしくは液体剤の形態を取ることができる。

【０２８３】

本明細書で使用する用語「単位剤形」は、ヒト被験者およびその他の哺乳動物のための単一用量として適切な物理的不連続単位を意味しており、各単位は適切な医薬賦形剤（例えば、アンプル）と関連して、所望の発現、忍容性、および／または治療作用を生成するために計算された規定量の抗癌剤を含有する。さらに、それからより希釈した単位剤形を生成できる、より濃縮した剤形を調製することができる。そこでより濃縮した剤形は、抗癌剤の量より実質的に多い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０倍以上の量を含有するであろう。

【０２８４】

そのような剤形を調製するための方法は、当業者には公知である（例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，１８ＴＨ　ＥＤ．Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９９０）を参照されたい）。剤形は、典型的には、従来型医薬担体もしくは賦形剤を含み、さらに、他の薬剤、担体、アジュバント、希釈剤、組織透過強化剤、可溶化剤などを含むことができる。適切な賦形剤は、当分野において周知の方法によって、特定の剤形および投与経路に合わせて作成することができる（例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ、上記を参照されたい）。

【０２８５】

適切な賦形剤の例には、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース

、水、食塩液、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ならびに例えばＣａｒｂｏｐｏｌ、例えばＣａｒｂｏｐｏｌ　９４１、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８０、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８１などのポリアクリル酸が含まれるがそれらに限定されない。これらの剤形は、追加して、例えばタルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油などの潤滑剤；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；例えばメチル－、エチル－、およびプロピル－ヒドロキシ－ベンゾエート（すなわち、パラベン）などの保存料；例えば無機および有機の酸および塩基などのｐＨ調整剤；甘味料；ならびに香料添加剤を含むことができる。剤形は、生分解性ポリマービーズ、デキストラン、およびシクロデキストリン封入複合体をさらに含むことができる。

【０２８６】

経口投与のためには、治療有効量は、錠剤、カプセル剤、エマルジョン、懸濁化剤、液剤、シロップ、スプレー、ロゼンジ、粉末剤、および徐放性調製物の形態にある可能性がある。経口投与のために適切な賦形剤には、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石粉、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどが含まれる。

【０２８７】

一部の実施形態では、治療有効量は、ピル、錠剤、もしくはカプセル剤の形態を取るので、そこで剤形は、抗癌剤と一緒に、下記のいずれか：ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムなどの希釈剤；デンプンもしくはその誘導体などの錠剤分解剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；デンプン、アカシアガム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロースおよびそれらの誘導体などの結合剤を含有することができる。抗癌剤は、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）担体内に配置された坐剤内に調製することもできる。

【０２８８】

液体剤形は、例えば経口、局所、または静脈内投与のための液剤または懸濁剤を形成するために、例えば、食塩水（例えば、０．９（重量／容量）％塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの担体中に抗癌剤および任意で１つ以上の薬学的に許容されるアジュバントを溶解または分散させることによって調製できる。抗癌剤は、さらにまた停留浣腸に調製することもできる。

【０２８９】

局所投与のためには、治療有効量は、エマルジョン、ローション剤、ゲル剤、フォーム剤、クリーム剤、ジェリー剤、液剤、懸濁剤、軟膏剤、および経皮パッチの形態にあってもよい。吸入による投与のためには、抗癌剤は、乾燥粉末として、またはネブライザーによる液体形で送達することができる。非経口投与のためには、治療有効量は、無菌注射液および無菌包装粉末剤の形態にあってもよい。好ましくは、注射液は、約４．５～約７．５のｐＨで調製される。

【０２９０】

治療有効量は、さらに凍結乾燥形で提供することもできる。そのような剤形は、投与前の再構成のために、例えば重炭酸塩のような緩衝液を含むことができる、または緩衝液は例えば水を用いた再構成のための凍結乾燥剤形で含めることができる。凍結乾燥剤形は、適切な血管収縮剤、例えばエピネフリンをさらに含むことができる。凍結乾燥剤形は、再構成された剤形を被験者に直ちに投与できるように、再構成のための緩衝液と組み合わせて任意で包装されてシリンジで提供することができる。

【０２９１】

被験者は、所定の治療レジメンの有効性を評価するために定期的時間間隔で監視することもできる。例えば、所定のシグナル伝達分子の活性化状態は、本明細書に記載した１つ以上の抗癌剤を用いた治療の治療効果に基づいて変化する可能性がある。被験者は、個別のアプローチにおける所定の薬物または治療の応答を評価し、それらの作用を理解するために監視することができる。さらに、特定の抗癌剤または抗癌剤の組み合わせに最初に応答する被験者は、薬物または薬物の組み合わせに対して治療抵抗性になる可能性があり、

これはこれらの被験者が獲得薬物耐性を発生したことを示している。これらの被験者は、彼らの現行療法を中止し、代替療法が本発明の方法にしたがって処方することができる。

【０２９２】

所定の態様では、本発明に記載した方法は、例えば、リンパ節転移陰性疾患を備える女性の様々な集団における乳癌の予後診断および／または再発の可能性を予測する遺伝子発現マーカーのパネルと結び付けて使用できる。これらの遺伝子パネルは、再発を経験する可能性が低い、したがって、アジュバント化学療法からの利益が得られる可能性が低い女性を同定するために有用な場合がある。これらの発現パネルを使用すると、疾患のない、そして全生存期間転帰へ不都合な影響を及ぼさずに、アジュバント化学療法を安全に回避できる女性を同定することができる。適切なシステムには、Ｇｅｎｏｍｉｃ Ｈｅａｌｔｈ社からの２１遺伝子パネルであるＯｎｃｏｔｙｐｅ ＤＸ（商品名）；Ａｇｅｎｄｉａ社からの７０遺伝子パネルであるＭａｍｍａＰｒｉｎｔ（登録商標）；およびＶｅｒｉｄｅｘ社からの７６遺伝子パネルが含まれるがそれらに限定されない。

【０２９３】

さらに、所定の他の態様では、本明細書に記載した方法は、原発不明癌（ＣＵＰ）についての原発腫瘍を同定する遺伝子発現マーカーのパネルと結び付けて使用できる。これらの遺伝子パネルは、最初に乳癌を備えると診断された女性に与えられる療法と一致する療法から利益が得られるであろう転移性癌を備える女性を同定する際に有用な場合がある。適切なシステムには、３９の腫瘍タイプについての原発出現部位を同定するために９２の遺伝子を測定するＲＴ－ＰＣＲに基づく発現アッセイであるＡｖｉａｒａ Ｃａｎｃｅｒ ＴＹＰＥ ＩＤアッセイ；およびマイクロアレイ上で１，６００超の遺伝子の発現を測定し、１５の公知の組織タイプに対して腫瘍の遺伝子発現「シグニチャー」を比較するＰａｔｈｗｏｒｋ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ ｏｆ Ｏｒｉｇｉｎ Ｔｅｓｔが含まれるがそれらに限定されない。

【実施例】

【０２９４】

Ｘ．実施例

以下の実施例は、本発明を限定するためではなく例示するために提供する。

【０２９５】

《実施例１：循環細胞の単離、刺激、および溶解》

固形腫瘍の循環細胞は固形腫瘍から転移または微小転移したのいずれかである細胞を含み、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、癌幹細胞、および／または腫瘍へ移動中である細胞（例えば、循環内皮前駆細胞（ＣＥＰＣ）、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、循環前血管新生骨髄性細胞、循環樹状細胞など）が含まれる。循環細胞を含有する患者サンプルは、任意の接近可能な生体液（例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、尿、唾液、細針吸引液など）から入手できる。循環細胞は、例えば、免疫磁気分離法（例えば、Ｒａｃｉｌａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：４５８９－４５９４（１９９８）；Ｂｉｌｋｅｎｒｏｔｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９２：５７７－５８２（２００１）を参照されたい）、Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ社（ペンシルバニア州ハンティントン・バレー）によるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法（例えば、Ｍｏｈａｍｅｄら、ＩＥＥＥ Ｔｒａｎｓ．Ｎａｎｏｂｉｏｓｃｉ．，３：２５１－２５６（２００４）；Ｌｉｎら、Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．５１４７，９７ｔｈ ＡＡＣＲ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（２００６））、ＦＡＣＳ（例えば、Ｍａｎｃｕｓｏら、Ｂｌｏｏｄ，９７：３６５８－３６６１（２００１））、密度勾配遠心分離法（例えば、Ｂａｋｅｒら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３））、および枯渇法（例えば、Ｍｅｙｅｒら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２）を参照されたい）を含む１つ以上の分離方法を使用して患者サンプルから単離することができる。

【０２９６】

ＣＴＣの手動単離：

ＣＴＣの免疫磁気的分離－活性化アッセイを後に実施する手動単離：
１）事前に抗ＥｐＣＡＭモノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社、オランダ国ライデン）へ結合されている磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０；Ｄｙｎａｌ　ＡＳ社、ノルウェー国オスロ）を使用する。または、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の混合物を使用することもできる。
２）使用直前に、プレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で１回洗浄する。
３）２５μＬのプレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬのサンプルに加える。
４）この混合物を穏やかに傾斜および回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）この試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。
６）上清を廃棄し、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁させることで３回洗浄し、その後に磁気分離することによってビーズ結合細胞を洗浄する。
７）このサンプルを１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０２９７】
サンプルの分離：
１）ヒト被験者由来の末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に取り出す。穿刺した静脈から遊離される上皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
２）使用前に、０．９％　ＮａＣｌを用いて、１ｍＬの全血を１：３に希釈する。

【０２９８】
コントロールの調製：
１）細胞系コントロールは、ヒト癌細胞系をＨＬ－６０細胞内にスパイクすることによって作成する。
２）細胞系コントロールは、ヒト癌細胞系を健常ドナー由来の全血内にスパイクすることによって作成する。

【０２９９】
ＣＥＣおよびＣＥＰＣの手動単離：
非限定的な例として、生育可能なＣＥＣおよびＣＥＰＣは、Ｂｅｅｒｅｐｏｏｔら、Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１５：１３９－１４５（２００４）に記載された免疫磁気分離／濃縮法を使用すると単離できる。手短には、末梢血を抗ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）に事前に結合されている磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＩｇＧ$_1$）とともにインキュベートする。この抗体は、末梢血中で造血細胞もしくは上皮細胞以外の全系統の内皮細胞を認識する（Ｇｅｏｒｇｅら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，１３９：６５－７５（１９９１））。造血細胞および上皮細胞の陰性選択は、適切な抗体（例えば、白血球を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＣＤ４５ビーズ、単球を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＣＤ１４ビーズ、上皮細胞を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＥｐＣＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カリフォルニア州カールズバッド））に結合した磁気ビーズを用いた陽性選択の前に使用できる。この実施例では、陽性選択だけを使用する。

【０３００】
ＣＥＣおよびＣＥＰＣの免疫磁気的分離－活性化アッセイを後に実施する手動単離：
１）事前に抗ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社）へ結合されている磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０）を使用する。
２）使用直前に、プレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で１回洗浄する。
３）２５μＬのプレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬのサンプルに加える。
４）この混合物を穏やかに傾斜および回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）この試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。

６）上清を廃棄し、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁させることでビーズ結合細胞を３回洗浄し、その後に磁気分離にかける。
７）このサンプルを１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３０１】
サンプルの分離：
１）ヒト被験者由来の末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に取り出す。
２）穿刺した静脈から遊離される内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
３）使用前に、０．９％　ＮａＣｌを用いて、１ｍＬの全血を１：３に希釈する。

【０３０２】
コントロールの調製：
１）細胞系コントロールは、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）をＨＬ－６０細胞内にスパイクすることによって作成する。
２）細胞系コントロールは、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を健常者から提供された全血内にスパイクすることによって作成する。

【０３０３】
ＣＥＰＣ（ＣＥＣを含まない）の手動単離：
ＣＥＰＣは、様々な血管新生成長因子に応答して成熟内皮細胞に分化する能力を有する骨髄由来前駆細胞の循環サブタイプである。ＣＥＰＣは、表面マーカーＣＤ３４を認識する抗体を用いた選択によって単離することができる。ＣＤ１３３は、ＣＥＰＣから未成熟内皮前駆細胞（ＥＰＣ）または原子造血幹細胞（ＨＳＣ）を分化させる表面マーカーである。様々な起源からのＣＥＰＣの様々な単離方法は、接着培養または磁気マイクロビーズを用いて記載されている。本実施例では、Ａｓａｈａｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７５：９６４－９６７（１９９７）に記載されたプロトコールから修正されたプロトコールが使用される。

【０３０４】
ＣＥＰＣの免疫磁気的分離－活性化アッセイを後に実施する手動単離：
１）磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＣＤ３４）を使用する。これらのビーズは、ＣＤ３４表面抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を用いてコーティングする。
２）使用直前に、プレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で洗浄する。
３）２５μＬのプレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬのサンプルに加える。
４）この混合物を穏やかに傾斜および回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）この試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。
６）上清を廃棄し、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁させることでビーズ結合細胞を３回洗浄し、その後に磁気分離にかける。
７）このサンプルを１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３０５】
サンプルの分離：
１）ヒト被験者由来の末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に取り出す。穿刺した静脈から遊離される内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
２）平衡食塩液を用いて、１０ｍＬの全血を１：１に希釈する。
３）４ｍＬの希釈血は１０ｍＬの試験管中の３ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ上へ層状に重ねる。
４）試験管は１８～２０℃で３０～４０分間にわたり４００×ｇで回転させる。
５）無菌パスツールピペットを用いて血漿および血小板を含有する上層を取り出し、界面で平静である単核球の層を残す。

６）単核球は、無菌ピペットを用いて無菌遠心分離管に移す。
７）６ｍＬの平衡食塩液を加え、細胞を穏やかに再懸濁させる。
８）この混合物は、１８～２０℃で１０分間にわたり６０～１００×ｇで遠心させる。
９）上清を取り除き、各試験管からの単核球を１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁させる。

【０３０６】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステムを使用したＣＴＣ、ＣＥＣおよびＣＥＰＣの細胞単離：

Ｖｅｒｉｄｅｘ，ＬＬＣ（ニュージャージー州ウォーレン）は、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）Ｓｙｓｔｅｍ、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キット、およびＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）アナライザーから構成されるＣｅｌｌＳｅａｒｃｈシステムを市販している。ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）システムは、半自動サンプル調製システムである（Ｋａｇａｎら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｌｉｇａｎｄ　Ａｓｓａｙ，２５：１０４－１１０（２００２））。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キットは：上皮細胞に対して特異的な抗ＥｐＣＡＭ抗体がコーティングされた強磁性流体；サイトケラチン８、１８、および１９へのフィコエリトリン結合された抗体；アロフィコシアニンに結合された抗ＣＤ４５抗体；ＤＡＰＩ色素；ならびに細胞を洗浄する、透過させる、および再懸濁化させるための緩衝液から構成される。この実施例で使用するプロトコールは、同様にＡｌｌａｒｄら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１０：６８９７－６９０４（２００４）に記載されている。全ＶｅｒｉｄｅｘシステムはＣＴＣ計数のために使用できる、またはＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）システムを用いた単離後にサンプルを手動で取り除くことによって、分析前に経路活性化のための単離方法を提供することができる。ＣＴＣの数は、アルゴリズム開発のために情報を提供できる。

【０３０７】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－その後に計数が行われるＣＴＣ濃縮：

１）７．５ｍＬの血液を６ｍＬのバッファと混合し、１０分間にわたり８００×ｇで遠心し、次にＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）システム上に配置する。
２）機器が上清を吸引した後、この機器は強磁性流体を加える。
３）この機器はインキュベーション、およびその後の磁気分離工程を実施する。
４）未結合細胞および残留する血漿が吸引される。
５）蛍光染色のために透過緩衝液を結び付けて染色試薬を加える。
６）本システムによるインキュベーション後、細胞を再び磁気的に分離し、ＭａｇＮｅｓｔ（登録商標）細胞提示デバイスに再懸濁させる。
７）ＭａｇＮｅｓｔ（登録商標）細胞提示デバイスは、４色半自動蛍光顕微鏡であるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）アナライザー上に配置する。
８）Ｖｅｒｉｄｅｘ規定基準を満たす画像が捕捉され、最終手動選択のためにウエブベースのブラウザによって示される。
９）細胞計数の結果は、血液７．５ｍＬ当たりの細胞数として表示される。

【０３０８】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－その後に活性化アッセイが行われるＣＴＣ濃縮：

１）７．５ｍＬの血液を６ｍＬのバッファと混合し、１０分間にわたり８００×ｇで遠心し、次にＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）システム上に配置する。
２）機器が上清を吸引した後、この機器は強磁性流体を加える。
３）この機器はインキュベーション、およびその後の磁気分離工程を実施する。
４）未結合細胞および残留する血漿が吸引される。
５）このサンプルを１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３０９】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－その後に活性化アッセイが行われるＣＥＣおよびＣＥＰＣ濃縮：

１）Ｖｅｒｉｄｅｘは、抗ＣＤ１４６抗体を用いた捕捉を利用するＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）内皮細胞キットを供給する。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）内皮細胞キットは、血液サンプル調製のためにはＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（登録商標）システムと、および全血由来のＣＥＣおよびＣＥＰＣを計数して特性付けるためにはＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（登録商標）アナライザーと結び付けて使用される。プロトコールは、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キットについてのプロトコールと同一である。

【０３１０】

サンプルの調製：

１）計数：ヒト被験者由来の末梢血は、製造業者の取扱説明書にしたがってＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）保存用試験管内に採血する。穿刺した静脈から遊離される上皮または内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。

２）経路分析：ヒト被験者由来の末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に取り出す。穿刺した静脈から遊離される上皮または内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。

【０３１１】

ＣＳＣの手動単離：

腫瘍が固有の自己再生および生存メカニズムを備える小集団の推定癌幹細胞を含有するという証拠が確立されつつある（例えば、Ｓｅｌｌｓ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｎｃｏｌ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，５１：１－２８（２００４）；Ｒｅｙａら、Ｎａｔｕｒｅ，４１４：１０５－１１１（２００１）；Ｄｏｎｔｕら、Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｌ．，１５：１９３－１９７（２００４）；およびＤｉｃｋ，Ｎａｔｕｒｅ，４２３：２３１－２３３（２００３）を参照されたい）。癌幹細胞（ＣＳＣ）は、長時間にわたって、分化細胞を標的とする化学療法薬に耐性にさせる静穏状態で存在することができる。この癌開始集団は、選択的除去のための標的療法を受ける自己再生および生存経路の活性化について特徴付けることができる。ＣＳＣの単離方法は、接着培養または磁気マイクロビーズを用いて記載されている。本実施例では、Ｃｏｔｅら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎ．Ｒｅｓ．，１２：５６１５（２００６）に記載されたプロトコールから修正されたプロトコールを使用する。

【０３１２】

ＣＳＣの免疫磁気的分離－その後に活性化アッセイを実施する手動単離：

１）磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　ＡＳ；ノルウェー国オスロ）を使用する。これらのビーズは、ＣＤ３４またはＣＤ１３３表面抗原のいずれかに対して特異的なモノクローナル抗体を用いてコーティングする。

２）使用直前に、プレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で１回洗浄する。

３）１～10^7のプレコートされたＤｙｎａｂｅａｄｓを３ｍＬのサンプルに加える。

４）この混合物を穏やかに傾斜および回転させながら、２～８℃で６０分間インキュベートする。

５）この混合物を１ｍＬ部分に分割し、各試験管を少なくとも６分間にわたり磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に配置する。

６）上清を廃棄し、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁させることでビーズ結合細胞を３回洗浄し、その後に磁気分離にかける。

７）このサンプルを１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３１３】

サンプルの調製：

１）骨髄標本は、初期乳癌患者からインフォームドコンセントを得た後に入手する。

２）骨髄吸引液を処理する工程は、Ｂａｕｅｒら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎ．Ｒｅｓ．，６：３５５２－３５５９（２０００））に記載されたように実施する。任意の播種性腫瘍細胞を含有する単核球分画は、３５分間にわたり４，０００×ｇでＢｅｃｋｍａｎ社製ＧＳ－

６遠心分離装置を用いてＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ密度勾配遠心分離によって濃縮し、ＰＢＳを用いて２回洗浄する。

【０３１４】

単離ＣＴＣの細胞刺激および溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３１５】

薬物処理を用いた細胞の刺激：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３１６】

薬物処理を用いた細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）によって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３１７】

刺激したＣＴＣは、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ（ｍｉｃｒｏｆｕｇｅ）内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【表３】

溶解緩衝液処方(10mL)			
試薬	ストック液濃度	最終濃度	容量
10% Triton X-100	10	1	1.00
1M Tris、pH 7.5	1	0.05	0.05
1M NaF	1	0.05	0.05
5M NaCl	5	0.1	0.20
2M B-グリセロールホスフェート	1	0.05	0.50
0.1M Na_3VO_4	0.1	0.001	0.10
1 mg/mL ペプスタチン	1	0.10	
完全ミニプロテアーゼ			1錠
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		計 (ml)	3.00
		水 (ml)	7.00

【０３１８】

単離されたＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣの細胞刺激および溶解：

ＶＥＧＦは、ＣＥＰＣ（Ｌａｒｒｉｖｅｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７８：２２００６－２２０１３（２００３））および血管壁から剥がれ落ちていた成熟ＣＥＣ（Ｓｏｌｏｖｅｙら、Ｂｌｏｏｄ，９３：３８２４－３８３０（１９９９））の両方において

抗アポトーシス経路を活性化することによって生存を促進すると考えられている。ＶＥＧＦは、ＣＥＰＣまたは成熟ＣＥＣの増殖を刺激することもできるが、成熟ＣＥＣはＣＥＰＣに比較して限定された増殖能力しか有していないと思われる（Ｌｉｎら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０５：７１－７７（２０００））。これらの理由から、ＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣは、溶解前にＶＥＧＦファミリー成長因子とのインキュベーションによって活性化される。

【０３１９】

細胞の刺激：

１）各々が１００ｎＭにある成長因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ、および／またはＡｎｇを細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３２０】

薬物処理を用いた細胞の刺激：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）、Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標）、Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標）、および／またはラパマイシンとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ、および／またはＡｎｇを各々１００ｎＭで加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３２１】

薬物処理を用いた細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）、Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標）、Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標）、および／またはラパマイシンとインキュベートする。

２）細胞は、次にＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ、および／またはＡｎｇを各々１００ｎＭで加えることによって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３２２】

単離したＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣ細胞は、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【０３２３】

細胞刺激および単離ＣＳＣの溶解：

刺激された細胞：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３２４】

薬物処理を用いて刺激した細胞：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３２５】

薬物処理を用いて刺激した細胞（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３２６】

単離したＣＳＣ細胞は、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【０３２７】

《実施例２：組織、生検標本、または一次培養からの腫瘍細胞抽出物の調製》

この実施例は、腫瘍組織または生検標本から細胞を単離する、刺激する、および溶解させるための方法を例示する。この実施例は、組織、生検標本、または全血から単離した腫瘍細胞の一次培養を開始する、刺激する、および溶解させるための方法も例示する。化学療法薬をスクリーニングするための生物学的標本から腫瘍細胞を単離および培養するための追加の方法は、例えば、米国特許第第５，７２８，５４１号明細書；第６，４１６，９６７号明細書；第６，８８７，６８０号明細書；第６，９００，０２７号明細書；第６，９３３，１２９号明細書；第７，１１２，４１５号明細書ならびに米国特許出願公開第２００４００２３３７５号明細書および第２００５０２０２４１１号明細書に記載されている。この実施例によって調製される細胞抽出物は、本明細書に記載した単一検出または近接アッセイにおいて使用できる。

【０３２８】

原発性または転移性組織からの腫瘍細胞の単離：

細胞の単離および培養：

１）約５～１００ｍｇの非壊死性、非汚染腫瘍組織を外科的に採取し、無菌細胞培養培地（例えば、１０％　ＦＢＳおよび抗生物質を含むＲＭＰＩ－１６４０）を含有する１００ｍＬボトル内に配置する。

２）サンプルは、抽出後７２時間以内に室温で保管または輸送することができる。

３）サンプルは、細胞培養培地中で３回すすぎ洗う。

４）組織は外科用メスを用いて小片に細分化し、次に微細なワイヤーメッシュを通過させることによって細胞懸濁液内へ分解させる。

５）または、細分化した組織は、抗生物質を含有する血清無含有細胞培養培地中に希釈した０．２５％コラゲナーゼＩＩおよび０．００１％　ＤＮａｓｅを含有するカクテルで処理する。インキュベーションは、緩徐に攪拌しながら１５～２０分間行う。細胞培養培地を用いて３回洗浄することによって、処理後に酵素を取り除く。

６）細胞濃度を10^6／ｍＬへ調整し、細胞を６ウエルプレート内へ播種し、一晩沈降させる。翌日、細胞をトリプシン処理し、リガンドを用いた刺激および／または標的薬を用いた阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種する。

【０３２９】

細胞の刺激および解離させた腫瘍由来の細胞の溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３３０】

薬物処理を用いた細胞の刺激：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３３１】

薬物処理を用いた細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）によって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３３２】

刺激した細胞は、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、上記の表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【０３３３】

生検標本からの腫瘍細胞の単離：

細胞の単離および培養：

１）コア生検標本を外科的に抽出し（真空支援生検のための１～２片の生検標本とともに、１４ゲージ針については２つのコア、１６ゲージ針については３つのコア、および１８ゲージ心については４つのコア）、腫瘍標本のための細胞培養培地を含有する１０ｍＬ無菌バイアル内に配置する。

２）サンプルは、抽出後７２時間以内に室温で保管または輸送することができる。

３）コア生検標本由来の細胞物質は、微細なワイヤーメッシュを通過させることによって細胞懸濁液内へ分解させる。

４）または、生検標本は、抗生物質を含有する細胞培養培地中に希釈した０．２５％コラゲナーゼＩＩおよび０．００１％　ＤＮａｓｅを含有するカクテルで処理する。インキュベーションは、緩徐に攪拌しながら１５～２０分間行う。細胞培養培地を用いて３回洗浄することによって、処理後に酵素を取り除く。

５）細胞濃度を10^6／ｍＬへ調整し、細胞を６ウエルプレート内へ播種し、一晩沈降させる。翌日、細胞をトリプシン処理し、リガンドを用いた刺激および／または標的薬を用いた阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種する。

【０３３４】

細胞の刺激および生検標本由来の細胞の溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３３５】

薬物処理を用いた細胞の刺激：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３３６】

薬物処理を用いた細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）によって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３３７】

刺激した細胞は、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、上記の表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【０３３８】

組織、生検標本、または全血から単離した腫瘍細胞由来の一次培養の開始：

細胞の培養：

１）上述したように組織、生検標本、または全血から単離した腫瘍細胞は、単離した腫瘍細胞の数に依存して、小さな無菌フラスコ（例えば、Ｔ－２５）、ペトリ皿（例えば、１０ｍｍ）、またはプレート（例えば、２４ウエルプレート）内で培養する。

２）インキュベーションは、５％ CO_2 が補給された加湿３７℃インキュベーション内の細胞培養培地（例えば、２％ＦＢＳおよび抗生物質を含むＲＭＰＩ－１６４０）中で実施する。自然に、細胞は容器底部上で単層を形成し、分化し始める。細胞がコンフルエンスに近付くと、細胞はトリプシン処理され、リガンドを用いた刺激および／または標的薬を用いた阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種される。

【０３３９】

細胞の刺激ならびに組織、生検標本、または全血から単離した腫瘍細胞由来の一次培養の溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に加え、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３４０】

薬物処理を用いた細胞の刺激：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を加えることによって刺激し、３７℃で５分間にわたりインキュベートする。

【０３４１】

薬物処理を用いた細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）サンプルは、３７℃で３０分間にわたり治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、および／またはラパマイシンアナログとインキュベートする。

２）細胞は、次に因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）によって刺激し、３７℃で１２０分間にわたりインキュベートする。

【０３４２】

刺激した細胞は、下記のプロトコールを用いて溶解させる：

１）新鮮溶解緩衝液は、上記の表３に記載した試薬を混合することによって新しく調製する。

２）最終洗浄後、細胞は氷上で１００μＬの冷却緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間にわたり実施する。

４）この混合物は、溶解液からビーズを分離するために、１０分間にわたり最高速度でマイクロフュージ内で回転させる。

５）溶解液は、アッセイのために新しい試験管に移すか、または－８０℃で保管する。

【０３４３】

《実施例３：チラミドシグナル増幅を用いた単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡ》

この実施例では、希少循環細胞中でのシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに適切な優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡについて例示する。

１）捕捉抗体は、２倍の連続希釈液を用いて１６パッドのＦＡＳＴスライド（（Ｗｈａｔｍａｎ社；ニュージャージー州フローラムパーク）上にプリントした。

２）一晩乾燥させた後、スライドはＷｈａｔｍａｎ社製遮断緩衝液を用いて遮断した。

３）８０μＬの細胞溶解物は、１０倍の連続希釈液を含む各パッド上に加えた。スライドは、室温で２時間にわたりインキュベートした。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いた６回の洗浄後、８０μＬのビオチン標識検出抗体（例えば、ｐ－ＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体または活性化状態とは無関係にＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体）を室温で２時間にわたりインキュベートした。

５）６回の洗浄後、ストレプトアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＳＡ－ＨＲＰ）を加え、１時間にわたりインキュベートしてＳＡ－ＨＲＰをビオチン標識検出抗体に結合させた。

６）シグナル増幅のために、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを加え、１５分間にわたり反応させた。スライドはＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて２回、およびＴＢＳを用いて１回洗浄した。

７）８０μＬのＳＡ－Ａｌｅｘａ　５５５を加え、３０分間インキュベートした。このスライドを次に２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナー上でスキャンした（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ社、マサチューセッツ州ウォルサム）。

【０３４４】

《実施例４：チラミドシグナル増幅を用いた近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡ》

この実施例では、希少循環細胞中でのシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに適切な優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡについて例示する。

１）捕捉抗体は、１ｍｇ／ｍＬ～０．００４ｍｇ／ｍＬの範囲内の連続希釈液を含む１６パッドのＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ社）上でプリントした。

２）一晩乾燥させた後、スライドはＷｈａｔｍａｎ社製遮断緩衝液を用いて遮断した。

３）８０μＬのＡ４３１細胞溶解物は、１０倍の連続希釈液を含む各パッド上に加えた。スライドは、室温で２時間にわたりインキュベートした。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いた６回の洗浄後、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ／２％　ＢＳＡ／１％　ＦＢＳ中に希釈した近接アッセイのための８０μＬの検出抗体をスライドに加えた。使用した検出抗体は：（１）グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）に直接結合した抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体；および（２）西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に直接結合したリン酸化ＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体であった。インキュベーションは、室温で２時間にわたった。

５）または、検出抗体は、リン酸化ＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体のビオチン－コンジュゲートを利用した。これらの場合には、６回の洗浄後に、１時間にわたるストレプトアビジン－ＨＲＰを用いた追加の連続工程を含めた。

６）または、検出抗体は、抗ＥＧＦＲ抗体のオリゴヌクレオチド媒介性グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）コンジュゲートを利用した。リン酸化ＥＧＦＲ抗体に直接結合した、またはＨＲＰのビオチン－ストレプトアビジン（ＳＡ）結合コンジュゲートのいずれかを使用した。

７）シグナル増幅のために、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを加え、１５分間にわたり反応させた。スライドはＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて２回、およびＴＢＳを用いて１回洗浄した。

８）８０μＬのＡＳ－Ａｌｅｘａ　５５５を加え、３０分間にわたりインキュベートした。次にこのスライドを２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ社）上でスキャンした。

【０３４５】

図２は、本明細書で記載した近接アッセイが単細胞感受性を備えるリン酸化ＥＧＦＲ（ｐＥＧＦＲ）およびリン酸化ＨＥＲ－２（ｐＨＥＲ－２）を検出した、本発明の１つの実施形態を示している。図３は、本明細書に記載した近接アッセイがＨＥＲ－２を発現する細胞中でのみ単細胞レベルでのＨＥＲ－２の検出のための高度に特異的なアッセイを生じさせたことを示している。

【０３４６】

《実施例５：薬物選択のための活性化プロファイルの生成》

本発明の方法および組成物は、癌治療のための薬物選択のために適用できる。典型的なプロトコールは、その後に特定薬物治療レジメンの有効性を決定するために比較される、対照活性化プロファイルおよび試験活性化プロファイルの生成を必要としている（図４を参照されたい）。

【０３４７】

対照活性化プロファイル

対照活性化プロファイルを引き出すために、血液サンプルは、抗癌剤治療の前に特定タイプの癌（例えば、乳房腫瘍）を有する患者から入手する。癌性腫瘍由来の希少循環細胞は、例えば、本明細書により詳細に記載したような免疫磁気分離法を使用して、血液サンプルから単離する。単離した循環細胞は、１つ以上の成長因子を用いてインビトロで刺激することができる。刺激した細胞は、次に細胞抽出物を生成するために溶解させられる。細胞抽出物は、その活性化状態が患者の癌のタイプにおいて変化させられる可能性があるシグナル伝達分子に対して特異的な希釈系列の１パネルの捕捉抗体を含有するアドレス可能なアレイに適用する。単一検出または近接アッセイは、当該の各シグナル伝達分子の活性化状態を決定するために、適切な検出抗体（例えば、活性化状態非依存性抗体および／または活性化状態依存性抗体）を用いて実施する。表２に示した「経路選択」表は、患者の癌のタイプに基づいてどの活性化状態を検出すべきかを選択するために特に有用である。例えば、１人の患者は、表２の「経路１」に記載したＥＧＦＲ経路の活性化状態を提示する癌のタイプを有する可能性がある。または、他の患者は、表２の「経路２」に記載したＥＧＦＲ経路の活性化状態を提示するまた別の癌のタイプを有する可能性がある。そこで対照活性化プロファイルは、あらゆる抗癌剤の非存在下で患者の癌におけるシグナル伝達分子の活性化状態を提供するように生成される。

【０３４８】

試験活性化プロファイル

試験活性化プロファイルを入手するために、第２血液サンプルは、抗癌剤の投与前または抗癌剤の投与後のいずれかに（例えば、癌治療の全経過を通していずれかの時点に）特定タイプの癌（例えば、乳房腫瘍）を有する患者から入手する。癌性腫瘍に由来する希少循環細胞は、血液サンプルから単離する。単離した細胞が抗癌剤を用いた治療を受けていない被験者から入手される場合は、単離した細胞は上述した対照活性化プロファイルから

決定された１つ以上の活性化シグナル伝達分子を標的とする抗癌剤とインキュベートする。「薬物選択」表（表１）は、特異的活性化標的シグナル伝達分子を阻害する、承認されている、または臨床試験下の適切な抗癌剤を選択するために特に有用である。例えば、ＥＧＦＲが活性化されていることが対照活性化プロファイルから決定された場合は、その後に細胞を表１の欄「Ａ」または「Ｂ」に列挙した薬物の１つ以上とインキュベートすることができる。単離した細胞は、次に１つ以上の成長因子を用いてインビトロで刺激することができる。単離した細胞は、次に細胞抽出物を生成するために溶解させられる。細胞抽出物はアドレス可能なアレイに適用され、当該の各シグナル伝達分子の活性化状態を決定するために近接アッセイが実施される。そこで患者のための試験活性化プロファイルは、特定抗癌剤の存在下での患者の癌におけるシグナル伝達分子の活性化状態を提供するように生成される。

【０３４９】

薬物の選択

抗癌剤は、試験活性化プロファイルを対照活性化プロファイルと比較することによって、患者の癌を治療するのに適切であるか不適切であるかが決定される。例えば、薬物治療が、大多数もしくは全部のシグナル伝達分子が薬物の非存在下におけるより実質的に低く活性化される場合、例えば薬物を用いない場合の強度の活性化から薬物を用いた場合の弱度の、もしくは極弱度の活性化への変化を引き起こす場合は、その治療は患者の癌にとって適切であると決定される。そのような場合には、治療は薬物療法を受けていなかった患者において適切な抗癌剤を用いて開始される、または既に薬物を摂取している患者において適切な抗癌剤による治療が継続される。しかし、薬物治療が患者の癌の治療のために不適切と見なされる場合は、異なる薬物が選択されて新規な試験活性化プロファイルを生成するために使用され、その薬物が対照活性化プロファイルと比較される。そのような場合には、治療は薬物療法を受けていなかった患者において適切な抗癌剤を用いて開始される、またはその後の治療は現在不適切な薬物を摂取している患者では適切な抗癌剤へ変更される。

【０３５０】

《実施例６：活性化受容体チロシンキナーゼを分析するためのアドレス可能なアレイ》

図５は、本発明の典型的なアドレス可能な受容体チロシンキナーゼアレイを例示している。上記で考察したように、受容体チロシンキナーゼは、細胞増殖に関係する多数のシグナル伝達経路の重要な成分である。例えば、受容体チロシンキナーゼのＥｒｂＢファミリーは４つのファミリーメンバーを有し、細胞増殖、分化、および生存のような基本的な細胞プロセスにおいて重要な役割を果たす。この受容体チロシンキナーゼのファミリーは、多数の様々な癌において過剰発現すると報告されており、より不良な臨床転帰と関連付けられている。成長因子が結合すると、ＥｒｂＢ１／ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３／ＨＥＲ－３、およびＥｒｂＢ４／ＨＥＲ－４はホモおよびヘテロ二量体化して、様々な異なるシグナル伝達経路を活性化する。ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ－２は、成長因子には結合せず、全３つのファミリーメンバーにとって好ましいヘテロ二量体化パートナーである。ＥｒｂＢ２は、過剰発現するとホモ二量体化することもでき、シグナル伝達経路を活性化することができる。ＥｒｂＢファミリーのホモまたはヘテロ二量体化は、トランスリン酸化を生じさせる。自己もしくはトランス－リン酸化は、受容体チロシンキナーゼの阻害性立体配座を軽減し、完全キナーゼ活性化を可能にし、同時に例えばＳｒｃ、Ｓｈｃ、ＳＨＰ－１、ＳＨＥＰ－１、およびＰＩ３Ｋなどの多数のＳＨ２含有シグナル伝達分子のための結合部位を作り出す。Ｓｈｃ、Ｇｒｂ２、もしくはＰＩ３Ｋのようなアダプタータンパク質もしくはシグナル伝達タンパク質は、リン酸化受容体に動員される。アダプタータンパク質のリン酸化は、ＭＡＰＫおよびＡｋｔ経路の活性化を生じさせる。ＭＡＰＫ経路の活性化は、ＥｒｋおよびＲｓｋのリン酸化状態を決定することによって評価することができ、他方ＰＩ３Ｋ経路の活性化は、Ａｋｔおよびｐ７０Ｓ６Ｋのリン酸化状態を決定することによって評価することができる。

【０３５１】

そこで、図５に示したアドレス可能なアレイは、受容体チロシンキナーゼのＥｒｂＢファミリーの発現を決定できるだけではなく、それらの活性化状態も決定することを可能にする。ＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路両方の活性化もまたアドレス可能なチップ上で試験することができる。さらに、例えばＥＲ（エストロゲン受容体）およびＰＲ（プロゲステロン受容体）などの核ホルモン受容体、ならびに例えばＮＣＯＲ（核受容体コリプレッサー）、ＡＩＢ１（ａｍｐｌｉｆｉｅｄ ｉｎ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ－１）、ＩＧＦ－ＩＲ、ｃＭＥＴ、Ｋｉ６７、およびＴＯＰＯ ＩＩなどの他のタンパク質の発現および／または活性化状態もアドレス可能なチップ上で試験することができる。チップのまた別の特徴は、腫瘍もしくは腫瘍関連細胞（ＣＥＣ、ＣＥＰ、周皮細胞など）含量を決定するため、および任意の非特異的結合を決定するための非特異的ＩｇＧの存在である。

【０３５２】

《実施例７：血管新生におけるシグナル伝達経路を分析するためのアドレス可能なアレイ》

図６および７は、血管新生に関係するシグナル伝達成分の活性化状態を決定するためのアドレス可能なアレイの構造を示している。本明細書に記載したように、腫瘍血管新生は、多数の固形腫瘍の増殖のために極めて重要である。整列させた特に重要なシグナル伝達分子には、主として内皮細胞上で発現する受容体チロシンキナーゼのＶＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ、およびＴＩＥファミリーのメンバーが含まれる。ＰＤＧＦＲは、典型的には周皮細胞上で発現する。これらの受容体の発現および活性化状態は、個々の腫瘍標本における血管新生の優勢なメカニズムを決定する際に極めて重要である。ＶＥＧＦおよびＰＩＧＦのような成長因子は、ＶＥＧＦＲ－１およびＶＥＧＦＲ－２に結合し、ホモおよびヘテロ二量体化を開始する。二量体化の後にはこれらの受容体のリン酸化が続き、これには次にＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ／Ａｋｔシグナル伝達経路の活性化が続く。ＦＧＦＲ、ＴＩＥ、およびＰＤＧＦＲ受容体もまた同様の方法で活性化される。自己もしくはトランスリン酸化は、受容体チロシンキナーゼの阻害性立体配座を軽減し、完全キナーゼ活性化を可能にし、同時に例えばＳｒｃ、Ｓｈｃ ＳＨＰ－１、Ｖ－カドヘリン、ＳＨＥＰ－１、およびＰＩ３Ｋなどの多数のＳＨ２含有シグナル伝達分子のための結合部位を作り出す。Ｓｈｃ、Ｇｒｂ２、もしくはＰＩ３Ｋのようなアダプタータンパク質もしくはシグナル伝達タンパク質は、リン酸化受容体に動員される。アダプタータンパク質のリン酸化は、ＭＡＰＫおよびＡｋｔ経路の活性化を生じさせる。ＭＡＰＫ経路の活性化は、ＥｒｋおよびＲｓｋのリン酸化状態を決定することによって評価することができ、他方ＰＩ３Ｋ経路の活性化は、Ａｋｔおよびｐ７０Ｓ６Ｋのリン酸化状態を決定することによって評価することができる。

【０３５３】

そこで、図６および７に示したようなアドレス可能な血管新生チップは、患者サンプル中の血管新生に関係している全シグナル伝達成分の発現を決定できるだけではなく、それらの活性化状態も決定することを可能にする。ＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路両方の活性化もまたアドレス可能なチップ上で試験することができる。チップは、腫瘍もしくは腫瘍関連細胞（ＣＥＣ、ＣＥＰ、周皮細胞など）含量を決定するため、および任意の非特異的結合を決定するための内部コントロールを有する。

【０３５４】

図８および９は、受容体チロシンキナーゼのＥｒｂＢファミリーならびに血管新生に関係するシグナル伝達成分の発現および／または活性化状態を決定するための結合したアドレス可能なアレイを示している。さらに、例えばＥＲ（エストロゲン受容体）およびＰＲ（プロゲステロン受容体）などの核ホルモン受容体、ならびに例えばＮＣＯＲ（核受容体コリプレッサー）、ＡＩＢ１（ａｍｐｌｉｆｉｅｄ ｉｎ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ－１）、ＩＧＦ－ＩＲ、ｃＭＥＴ、Ｋｉ６７、およびＴＯＰＯ ＩＩなどの他のタンパク質の発現および／または活性化状態もこれらの結合したアドレス可能なチップ上で試験することができる。これらのチップのまた別の特徴は、腫瘍もしくは腫瘍関連細胞（ＣＥＣ

、ＣＥＰ、周皮細胞など）含量を決定するため、および任意の非特異的結合を決定するための非特異的ＩｇＧの存在である。

【０３５５】

《実施例８：乳癌を治療するための患者の選択》

癌治療の主要な挑戦課題は、所定の患者についての有効性を最大化して毒性を最小限に抑える治療レジメンの選択である。関連する課題は、正確な診断的、予後診断的、および予測的情報を提供する試みにある。

【０３５６】

現在、腫瘍は、一般にはＴＮＭ（腫瘍－リンパ節－転移）分類システム下で分類される。このシステムは、ＡＪＣＣ癌病期分類マニュアル（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，５ｔｈ ｅｄ．，ｐｐ．１７１－１８０（１９９７））に公表されたガイドラインにしたがって、腫瘍のサイズ、所属リンパ節内の腫瘍の存在もしくは非存在、ならびに遠隔転移の存在もしくは非存在を使用して腫瘍に病期を指定する。指定された病期は、適切な療法を選択するため、および予後診断のための基礎として使用される。ＴＮＭパラメータに加えて、腫瘍を腫瘍タイプにさらに分類し、それによって適切な療法の選択を支援するために、形態学的外観が使用される。しかし、このアプローチには重大な限界がある。例えば、類似の組織病理学的外観を備える腫瘍が臨床経過および療法への応答に関して有意な変動を示す可能性がある。さらに、一部の腫瘍は迅速に進行性であるが、他の腫瘍は進行性ではない。さらに、一部の腫瘍はホルモン療法もしくは化学療法へ容易に応答するが、他の腫瘍は抵抗性である。

【０３５７】

例えば、免疫組織化学を用いた細胞表面マーカーについてのアッセイは、所定の腫瘍タイプをサブクラスに分類するための手段を提供してきた。例えば、乳癌についての予後診断および治療決定において考察される１つの因子は、腫瘍サンプル中のエストロゲン受容体（ＥＲ）の存在または非存在である。ＥＲ陽性乳癌は、典型的には、乳腺組織中で抗エストロゲンとして機能するタモキシフェンなどのホルモン療法へＥＲ陰性腫瘍よりもはるかに容易に応答する。だが有用ではあるが、これらの分析は乳房腫瘍の臨床的挙動を一部にしか予測しない。現在の診断用ツールが検出するのに失敗する癌には、表現型多様性が存在する。結果として、転帰を最適化するために前途有望な治療間で患者を階層化する方法をめぐって今もなお多数の議論が存在する（例えば、乳癌については、「ＮＩＨ Ｃｏｎｓｅｎｓｕｓ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ Ｓｔａｔｅｍｅｎｔ：Ａｄｊｕｖａｎｔ Ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ，Ｎｏｖ．１－３，２０００」，Ｊ．Ｎａｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ，３０：５－１５（２００１）；およびＤｉ Ｌｅｏら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，７：２４５－２５３（２００２）を参照されたい）。

【０３５８】

本発明は、癌の生物学的病因論および疾患進行についての新規な洞察を提供するためにシグナル伝達経路を使用できるという認識を含む。本発明は、個別の治療レジメンを使用して様々な活性化されたシグナル伝達経路を備える癌を治療するための方法をさらに提供する。

【０３５９】

現在は、３つの異なる分子マーカーを使用して、重要な治療との関連を備える乳癌の４つの異なるサブクラスが規定されている。３つのマーカーは、ＥＲ、ＰＲ、およびＨＥＲ－２／ＥｒｂＢ２である。４つの主要サブクラスは、次の通りである：

１．ＥＲ＋／ＰＲ＋／ＥｒｂＢ２－
２．ＥＲ＋／ＥｒｂＢ２＋
３．ＥＲ－／ＥｒｂＢ２＋
４．ＥＲ－／ＰＲ－／ＥｒｂＢ２－

【０３６０】

１つの最新の理論は、乳癌を５つの分子サブタイプに分類している：ｌｕｍｉｎａｌ

Ａ；ｌｕｍｉｎａｌ　Ｂ；基底細胞様；ＨＥＲ－２／ｎｅｕ陽性；および正常乳腺様（例えば、Ｃａｒｅｙら、ＪＡＭＡ，２９５：２４９２－２５０２（２００６）；Ｆａｎら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．，３５５：５６０－５６９（２００６）；Ｈａｎｎｅｍａｎｎら、Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９５：１３３４－１３４１（２００６）；Ｐｏｔｅｍｓｋｉら、Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，６９：４７８－４８５（２００５）を参照されたい）。これらのサブタイプに関して現在までに公知であることの多くは、例えばホルモン受容体およびＨＥＲ－２／ｎｅｕ状態などの既に明確に理解されている特性と直接的に関連している。

【０３６１】

エストロゲンは乳癌の病因において重要な役割を果たし、そしてエストロゲン／ＥＲ媒介性シグナル伝達カスケードの選択的干渉は、ＥＲ陽性乳癌患者を治療する最も有効な手段である。ＥＲは、正常および悪性両方の乳腺細胞において増殖および分化を調節する。機能的ＥＲおよび／またはプロゲステロン受容体（ＰＲ）の発現は腫瘍が抗ホルモン療法に応答性（「ホルモン応答性」）であるために必須であり、多数の試験はＥＲの発現が抗ホルモン療法への応答を強力に予測することを証明してきたが、しかしその発現は予後診断的には極めて弱い。ＥＲは、単独では腫瘍増殖を刺激するために作用しない；むしろ、癌細胞の生存性を保証するためには複雑な相互作用ネットワークが機能する。このネットワークについての理解は、標的療法を選択するための化学的な合理的理由を提供する。

【０３６２】

下記の表４から表２２に示した典型的な患者プロファイルは、医師が乳房腫瘍のための有効な治療コース、例えば乳房腫瘍のサイズを減少させるための術前のネオアジュバント治療または局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者における治療を決定するのに役立たせるために、針生検から得られた血液もしくは癌細胞由来の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）中で活性な経路の分析をどのように使用できるかを例示している。手短には、ＣＴＣまたは生検由来癌細胞中でのＥｒｂＢおよび核ホルモン受容体経路の様々な成分の活性化レベルは、試験治療薬の様々な組み合わせの存在下または非存在下で決定できる。

【表４】

患者 4001: (ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	タモキシフェンを用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	高
プロゲステロン受容体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	中	中	中
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	中		弱
TOPO II	中		中

【０３６３】

患者（閉経前女性およびリンパ節陰性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した

。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者はタモキシフェンを用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、タモキシフェンに応答する。ＥＲは、例えばタモキシフェンなどのアンタゴニストの存在下ではコリプレッサータンパク質であるＮＣＯＲを動員すると考えられ、この動員は完全アンタゴニスト活性のために必須であると考えられる。

【表５】

患者 4002: (ER+/PR-/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	タモキシフェンを用いた治療＋ 化学療法
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	高
プロゲステロン受容体	低		弱
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO II	高		高

【０３６４】

患者（閉経前女性およびリンパ節陰性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化および高いＫｉ６７発現を明らかにした。この患者はタモキシフェン＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、タモキシフェン＋化学療法に応答する。ＥＲは、例えばタモキシフェンなどのアンタゴニストの存在下ではコリプレッサータンパク質であるＮＣＯＲを動員すると考えられ、この動員は完全アンタゴニスト活性のために必須であると考えられる。

【表６】

患者 4003: (ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	タモキシフェンを用いた治療＋ 化学療法
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	高
プロゲステロン受容体	高		弱
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO II	高		高

【０３６５】

患者（閉経前女性およびリンパ節陽性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者はタモキシフェン＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、タモキシフェン＋化学療法に応答する。ＥＲは、例えばタモキシフェンなどのアンタゴニストの存在下ではコリプレッサータンパク質であるＮＣＯＲを動員すると考えられ、この動員は完全アンタゴニスト活性のために必須であると考えられる。

【表７】

患者 4004: (ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	アロマターゼ阻害剤を 用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	中		弱
TOPO II	低		

【０３６６】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＭＩＳＳ（結果としてＥｒｂＢ１のクロストーク活性化を伴う細胞質内でのＥＲ活性化）を介してのＥｒｂＢ１の一部の活性化とともに、ＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲ関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤に応答する。

【表８】

患者 4005: (ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	アロマターゼ阻害剤を 用いた治療＋化学療法
ER	高	中	
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO II	高		

【０３６７】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＭＩＳＳ（結果としてＥｒｂＢ１のクロストーク活性化を伴う細胞質内でのＥＲ活性化）を介してのＥｒｂＢ１の一部の活性化とともに、ＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲ関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋化学療法に応答する。

【表９】

患者 4006: (ER+/PR-/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	アロマターゼ阻害剤またはタモキシフェンを用いた治療＋化学療法
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３６８】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＭＩＳＳ（結果としてＥｒｂＢ１のクロストーク活性化を伴う細胞質内でのＥＲ活性化）を介してのＥｒｂＢ１の一部の活性化とともに、ＥＲ（ＥＲ陰性腫瘍）の高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲ関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋化学療法に応答する。

【０３６９】

表１０は、内分泌療法および／または化学療法を受けていて再発した局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者の例を提供している。患者が局所的再発性もしくは転移性乳癌のためのアジュバント化学療法およびホルモン療法を受けてから少なくとも３週間が経過した。

【表１０】

患者 4007: (ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Ｔタモキシフェンまたはアロマターゼを 用いた治療+タキサン+Avastin(登録商標)
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３７０】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＭＩＳＳ（結果としてＥｒｂＢ１のクロストーク活性化を伴う細胞質内でのＥＲ活性化）を介してのＥｒｂＢ１の一部の活性化ならびにＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲおよびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋化学療法＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋化学療法＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）の併用に応答する。

【表１１】

患者 4008: (高 AIB1; ER+/PR+/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	フルベストラントを 用いた治療
ER	高		低
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB 複合体		超高	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	弱
プロゲステロン受容体	高		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３７１】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲ：ＡＩＢ１複合体の極めて高度の発現と一緒にＥＲ／ＰＲの高度の発現および活性化を明らかにした。患者は、ＥＲを分解させるためにフルベストラント（Ｆａｓｌｏｄｅｘ（登録商標））を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、フルベストラントに応答する。

【表１２】

患者 4009: (ER+/PR-/ErbB2-)

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	アロマターゼ阻害剤を 用いた治療＋化学療法
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３７２】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて

低レベルで発現した。この患者は、全ＥＲ関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋化学療法に応答する。

【表１３】

患者 4010: (ER+/PR-/ErbB1+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブまたは Erbitux (登録商標)を用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		弱	弱
P70S6K		弱	弱
Ki67	高		弱

【０３７３】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＥｒｂＢ１は活性化された。この患者は、全ＥＲ／ＥｒｂＢ１関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋ラパチニブもしくはＥｒｂｉｔｕｘ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブもしくはＥｒｂｉｔｕｘ（登録商標）の併用に応答する。

【表１４】

患者 4011: (ER+/PR-/ErbB1+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブまたは Erbitux (登録商標)を用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	高	高	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		高	弱
PI3K		弱	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		弱	弱
P70S6K		弱	弱
Ki67	高		弱

【０３７４】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＥｒｂＢ１は活性化された。この患者は、全ＥＲ／ＥｒｂＢ１関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋ラパチニブもしくはＥｒｂｉｔｕｘ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブもしくはＥｒｂｉｔｕｘ（登録商標）の併用に応答する。

【表１５】

患者 4012: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブを用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３７５】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患

者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＥｒｂＢ１およびＥｒｂＢ２は活性化された。この患者は、全ＥＲ／ＥｒｂＢ１／ＥｒｂＢ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤およびラパチニブを用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブに応答する。

【表１６】

患者 4013: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブを用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３７６】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、およびＥｒｂＢ３は活性化された。この患者は、全ＥＲ／ＥｒｂＢ１／ＥｒｂＢ２／ＥｒｂＢ３関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤およびラパチニブを用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブを用いた療法に応答する。

【０３７７】

表１７は、抗血管新生療法を受けていて再発した局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者の例を提供している。患者が局所的再発性もしくは転移性乳癌のためのアジュバント化学療法およびホルモン療法を受けてから少なくとも３週間が経過した。

【表１７】

患者 4014: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブまたは Avastin (登録商標)を用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３７８】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、およびＥｒｂＢ３は活性化された。この患者は、全ＥＲ＋ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）の併用に応答する。

【表１８】

患者 4015: (ER+/PR-/ErbB2-/IGF-1R+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+抗 IGF-1R Ab を 用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	高/中	高	弱
ErbB1	低	低	弱
ErbB2	低	低	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

【０３７９】

患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞の分析は、ＥＲの高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲは、極めて低レベルで発現した。ＩＧＦ－１Ｒは、活性化された。この患者は、全ＥＲ／ＩＧＦ－１Ｒ関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋抗ＩＧＦ－１Ｒ抗体に応答する。

【表１９】

患者 4016: (ER+/PR+/ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+Herceptin(登録商標)または Avastin(登録商標)を用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	高		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	低	低
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３８０】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲ、ＰＲ、およびＥｒｂＢ２の高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲ、ＥｒｂＢ２、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）の併用に応答する。

【表２０】

患者 4017: (ER+/PR+/ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/−GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブまたは Avastin (登録商標)を用いた治療
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N−CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	高		低
IGF−1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		高	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		高	弱
P70S6K		高	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V−カドヘリン−R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３８１】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲ、ＥｒｂＢ２、およびｐ９５ＥｒｂＢ２の高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥＲ、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ｐ９５ＥｒｂＢ２、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）の組み合わせ療法に応答する。

【表２１】

患者 4018: (ER+/PR-/ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+Herceptin(登録商標)を用いた治療 +タキサン類+Avastin(登録商標)
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	低	低
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３８２】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲおよびＥｒｂＢ２の高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲレベルは低かった。この患者は、全ＥＲ、ＥｒｂＢ２、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋タキサン類＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法の併用に応答する。

【表２２】

患者 4019: (ER+/PR-/ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	AI+ラパチニブまたは Avastin(登録商標) を用いた治療+化学療法
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 複合体		中	弱
ER:N-CoR 複合体		弱	中
プロゲステロン受容体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		高	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		高	弱
P70S6K		高	弱
Ki67	高		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３８３】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲ、ＥｒｂＢ２、およびｐ９５ＥｒｂＢ２の高度の発現および活性化を明らかにした。ＰＲレベルは低かった。この患者は、全ＥＲ、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ｐ９５ＥｒｂＢ２、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにアロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、アロマターゼ阻害剤＋ラパチニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法を用いた組み合わせ療法に応答する。

【０３８４】

したがって、所定の態様では、本発明は生存率を最上に予測する活性化マーカーの理にかなった選択を可能にする。最も適切な活性化マーカーは様々な薬物間で異なる場合があり、個別の標的療法を提供するために抗癌剤のカクテルを用いた併用療法に比較した抗癌剤単剤療法間で選択するための指針として使用できる。

【０３８５】

《実施例９：ＨＥＲ２－陽性乳癌を備える治療のための患者の選択》

米合衆国では、毎年約２００，０００例の乳癌症例が存在する。１８５ｋＤａ膜受容体

チロシンキナーゼであるＨＥＲ－２／ＥｒｂＢ２は乳癌の１８％～２０％において見いだされており、増加した比率の再発および死亡と関連付けられてきた。ＥｒｂＢ２は現在、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））などの療法から利点が得られる確立された予測マーカーである。

【０３８６】

最近の１０年間には、ＥｒｂＢ２＋乳癌の治療における大きな進歩が達成された。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）は、転移性およびアジュバント状況における疾患の自然史を変化させてきた。現在はＴｙｋｅｒｂ（登録商標）ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ社）として市販で入手できるラパチニブは、重要な追加薬であり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）後状況において利用できる多数の薬剤の中でも第一選択薬である。

【０３８７】

残念なことに、多数の症例、および転移状況ではほぼ全症例においてＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）への耐性が発生する。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）への新規耐性および獲得耐性のどちらも観察されている。

【０３８８】

Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に対して考えられる耐性様式は：

・変化した標的発現（ＥｒｂＢ２状態における変化）

・代替経路（ＩＧＦ－１Ｒ）によるシグナル伝達

・他の受容体（ＥｒｂＢ１またはＥｒｂＢ３）を用いた優先的二量体化

・準最適薬物送達（ＥｒｂＢ２乳癌を備える女性間でのＣＮＳ転移性疾患は特に一般的であると思われる。ＥｒｂＢ２＋転移性乳癌を備える患者におけるＣＮＳ転移性疾患の発生率は、ＥｒｂＢ２＋転移性疾患を備える患者の３分の１と高い可能性がある）。

・ＰＴＥＮの変化

・ＰＩ３Ｋの突然変異

・Ｐ９５ＥｒｂＢ２の発現またはＥｒｂＢ２の切断

・ｃＭＥＴの過剰発現または増幅である。

【０３８９】

療法の選択／有効性のマーカー：

・５－ＦＵ／ｃａｐｃｉｔｉｂｉｎｅ：チミジレートシンテターゼ（ＴＳ）の発現

・ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ（ＤＰＤ）の発現

・ＴＳ発現におけるＨＤＡＣの減少

・タキサン類：ＥｒｂＢ２

・アントラサイクリン類：ＴＯＰＯ２の過剰発現

・ＥｒｂＢ２陽性：（５－ＦＵまたはタキサン類またはアントラサイクリン類）

【０３９０】

多剤化学療法レジメンは、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）と併用して試験されてきた。好ましい併用は、転移性状況では、パクリタキセル、ドセタキセル、タキサン＋白金塩を用いた治療である。全ての標的療法は、併用して使用することもできる。

【０３９１】

下記の表２３から表２５に示した典型的な患者プロファイルは、生検から得られた血液もしくは癌細胞由来の循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）中で活性な経路の分析を使用して、医師がトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））に応答性である、そしてこのため乳房腫瘍を治療するためのそのような療法から利益が得られる可能性がある患者を選択できる方法を例示している。下記の表２６から表３１に示した典型的な患者プロファイルは、生検から得られた血液もしくは癌細胞由来のＣＴＣ中で活性な経路の分析を使用して、医師がデノボ耐性または獲得耐性いずれかの結果として生じたＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）再発後の患者にとって適切な療法を選択できる方法を例示している。手短には、ＣＴＣまたは生検由来癌細胞中でのＥｒｂＢ受容体経路などのすぐなる伝達経路の様々な成分の活性化レベルは、試験治療薬の様々な組み合わせの存在下または非存在下で決定できる。

【表２３】

患者 5001：(ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Herceptin(登録商標)+Avastin(登録商標) +タキサン類(任意)を用いた治療
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞：

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	中	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３９２】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ２の高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ２およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋タキサン＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法の併用に応答する。

【表２４】

患者 5002: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Herceptin(登録商標)+Avastin(登録商標) +FEC[フルオロウラシル、エピルビシン(アントラサイクリン)、 およびシクロホスファミド]を用いた治療
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	高		高

内皮細胞：

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱
VEGFR1	中	強	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱
Shc		強	弱
PI3K		強	弱
Erk		強	弱
Rsk		強	弱
Akt		強	弱
P70S6K		強	弱

【０３９３】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ２およびＴＯＰＯ２の高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ２、ＶＥＧＦＲ２、およびＴＯＰＯ２関連活性を停止させるためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋アントラサイクリン＋化学療法＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋アントラサイクリン＋化学療法＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）の組み合わせ療法に応答する。

【表２５】

患者 5003: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Herceptin(登録商標)+ソラフィニブまたはスニチニブ または AZD2171+タキサン類(任意)を用いた治療
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171またはソラフィニブまたは スニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９４】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ソラフィニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。ＰＤＧＦＲはＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ソラフィニブ＋化学療法の併用に応答する。

【表２６】

患者 5004: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	ラパチニブ+タキサン類+ソラフィニブまたはスニチニブ または AZD2171 を用いた治療
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	高	高	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	中	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブまたは スニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９５】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにラパチニブ＋ソラフィニブを用いて治療された。ＥｒｂＢ１およびＰＤＧＦＲはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性およびＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。ラパチニブは、ラパチニブがＥｒｂＢ１およびＥｒｂＢ２の両方を阻害するので、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の代わりに使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、ラパチニブ＋ソラフィニブ＋化学療法に応答する。

【表２７】

患者 5005: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Herceptin(登録商標)+タキサン類+ソラフィニブ またはスニチニブまたは AZD2171+抗 IGF-1R Ab を用いた治療
IGF-1R	高	高	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブまたは スニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標)を 用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９６】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＩＧＦ－１Ｒ、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＩＧＦ－１Ｒ、ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ソラフィニブ＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋ＩＧＦ－１Ｒ抗体（Ａｂ）を用いて治療された。ＩＧＦ－１ＲおよびＰＤＧＦＲはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性およびＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）と一緒のＩＧＦ－１Ｒは、ＩＧＦ－１ＲおよびＥｒｂＢ２の両方を阻害するために、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）単剤の代わりに使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ＩＧＦ－１Ｒ抗体＋ソラフィニブ＋化学療法に応答する。

【表２８】

患者 5006:(ErbB2+/PTEN 欠失)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	ラパチニブ+タキサン類+ソラフィニブまたはスニチニブ または AZD2171+ラパマイシンを用いた治療
IGF-1R	低	低	弱
ErbB1	中	中	中
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	中
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	低	低	低
Shc		中	弱
PI3K		中	中
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	高
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブまたは スニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９７】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者はさらに、ＰＴＥＮ欠失も有する。この患者は、全ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにラパチニブ＋ソラフィニブを用いて治療された。ｐ９５ＥｒＢ２およびＰＤＧＦＲはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性およびＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。ラパチニブは、ｐ９５ＥｒＢ２およびＥｒｂＢ２の両方を阻害するのでＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の代わりに使用され、ｍＴｏｒ阻害剤は、下流シグナル伝達活性を停止させるために使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、ラパチニブ＋ソラフィニブ＋ラパマイシン＋化学療法に応答する。

【表２９】

患者 5007: (ErbB2+/p95 ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/−GF) (リン酸化のレベル)	ラパチニブ+タキサン類+ソラフィニブまたはスニチニブ または AZD2171 を用いた治療
IGF-1R	低	低	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	高	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		高	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブ またはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９８】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにラパチニブ＋ソラフィニブを用いて治療された。ｐ９５ＥｒＢ２およびＰＤＧＦＲはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性およびＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。ラパチニブは、ｐ９５ＥｒＢ２およびＥｒｂＢ２の両方を阻害するためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の代わりに使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、ラパチニブ＋ソラフィニブ＋化学療法の併用に応答する。

【表３０】

患者 5008: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	ラパチニブ+タキサン類+ソラフィニブまたは スニチニブまたは AZD2171 を用いた治療
IGF-1R	低	低	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブ またはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０３９９】

転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ２およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、脳転移を有していた。この患者は、全ＥｒｂＢ２、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにラパチニブ＋ソラフィニブを用いて治療された。ＰＤＧＦＲはＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。ラパチニブは、この患者が脳転移を有していたので、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の代わりに使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、ラパチニブ＋ソラフィニブ＋化学療法に応答する。

【表３１】

患者 5009: (ErbB2+)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Herceptin(登録商標)+タキサン類+Avastin (登録商標)+ラパチニブを用いた治療
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブまたは スニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０４００】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３およびＰＤＧＦＲの高度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＰＤＧＦＲ、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ラパチニブ＋ソラフィニブを用いて治療された。ＥｒｂＢ１およびＰＤＧＦＲはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性およびＡｖａｓｔｉｎ（登録商標）耐性患者において過剰発現して活性化されるので、上記に提示した情報は、ＰＤＧＦＲならびにＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１もしくはソラフィニブがそのような腫瘍を治療するための最適な薬剤である可能性があることを示している。ラパチニブは、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２の両方およびＥｒｂＢを阻害するためにＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）とともに使用された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、ラパチニブ＋Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ソラフィニブ＋化学療法の併用に応答する。

【０４０１】

《実施例１０：ＥＲ、ＰＲ、およびＥｒｂＢ２陰性乳癌を治療するための患者の選択》

乳癌を備える女性の約１５～２０％は、三重陰性タイプの癌を有する。「三重受容体陰性乳癌」を備える患者は、進行性の臨床経過および治療選択肢の不足とともに、ホルモン

受容体ＥＲ、ＰＲ、およびＨＥＲ－２／ＥｒｂＢ２の完全な非存在を有する。唯一の治療選択肢は化学療法であり、これに関連して細胞増殖抑制剤の選択は限定される。三重陰性乳癌のための標準療法は、典型的には、化学療法、手術、および／または放射線療法の併用である。標準療法を用いて治療した場合、三重陰性乳癌を備える女性は、非三重陰性乳癌を備える女性に比較して不良な長期転帰を有する。三重陰性乳癌細胞は、通常は細胞表面上で発現したＥｒｂＢ１を有する。ＥｒｂＢ１陽性乳癌を備える女性は、腫瘍がＥｒｂＢ１を発現しない女性に比較して不良な長期転帰を有する。したがって当分野には、三重陰性乳癌患者のための治療選択肢をプロファイリングする、選択する、および予測する方法に対する必要がある。

【表３２】

患者 6001:(低 ErbB1 を伴う三重陰性)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	タキサン類+Avastin(登録商標)を用いた治療
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブまたはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標)を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０４０２】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥＲ、ＥｒｂＢ２、およびｐ９５ＥｒＢ２の低い発現および非活性化を明らかにした。この患者は、ＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにタキサン類＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法に応答する。

【表３３】

患者 6002:(三重陰性)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Tarceva(登録商標)+タキサン類+Avastin (登録商標)を用いた治療
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブ またはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０４０３】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＥｒｂＢ１の中程度の発現および活性化ならびにＶＥＧＦＲ２の活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ１およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＴａｒｖｅｖａ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｔａｒｖｅｖａ（登録商標）＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法に応答する。

【表３４】

患者 6003:(三重陰性)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Pan Her 阻害剤+タキサン類+Avastin (登録商標)を用いた治療
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	中	弱
P95 ErbB2	ゼロ	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	中		
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブ またはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン-R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０４０４】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、およびＥｒｂＢ３の中程度の発現および活性化を明らかにした。この患者は、全ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＰａｎ　Ｈｅｒ阻害剤＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｐａｎ　Ｈｅｒ阻害剤＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋化学療法の併用に応答する。Ｐａｎ　Ｈｅｒ阻害剤の例には、ＢＭＳ－５９９６２６およびＣＩ－１０３３が含まれるがそれらに限定されない。

【表３５】

患者 6004:(三重陰性)

受容体	発現	活性化(+/-GF) (リン酸化のレベル)	Pan Her 阻害剤+タキサン類+Avastin(登録商標) +ラパマイシンを用いた治療
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	中	弱
P95 ErbB2	ゼロ	ゼロ	ゼロ
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	ゼロ		
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化のレベル)	AZD2171 またはソラフィニブ またはスニチニブを用いた活性化	Avastin(登録商標) を用いた活性化
VEGFR2	中	強	弱	弱
VEGFR1	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン -R2 複合体	ゼロ	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		強	弱	弱
PI3K		強	弱	弱
Erk		強	弱	弱
Rsk		強	弱	弱
Akt		強	弱	弱
P70S6K		強	弱	弱

【０４０５】

局所的再発性もしくは転移性乳癌を備える患者（閉経前もしくは閉経後女性）を生検した、またはＣＴＣを血液から単離した。患者の腫瘍細胞および内皮細胞の分析は、ＶＥＧＦＲ２活性化とともに、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、およびＥｒｂＢ３の中程度の発現および活性化を明らかにした。ＰＴＥＮは、欠失していた。この患者は、全ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、およびＶＥＧＦＲ２関連活性を停止させるためにＰａｎ　Ｈｅｒ阻害剤＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋ｍＴｏｒ阻害剤を用いて治療された。患者は応答し、再生検では上記に示したタンパク質プロファイルを有していた。そこで、上記のタンパク質プロファイルを備える患者は、Ｐａｎ　Ｈｅｒ阻害剤＋Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標）＋ラパマイシン＋化学療法に応答する。

【０４０６】

《実施例１１：治療選択を誘導するためのＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ－２活性化について乳癌患者を監視する》

療法を受けた５例の乳癌患者を、本明細書に記載した近接アッセイを使用して、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）数、染色によるＣＴＳ上のＥＧＦＲ発現、ならびにＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２（ＥｒｂＢ２）リン酸化について試験した。患者の人口統計学データ、癌病歴、および現在の投薬については、各々表３６、３７、および３８に示した。エストロゲン受容

体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）、およびＨＥＲ－２についての原発性腫瘍に関する試験結果は、表３９に提供した。表４０および４１は、各サンプル中で検出されたＣＴＣの数ならびにＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２についての相対リン酸化レベルを示している。相対リン酸化レベルは、４つの緩衝液コントロールの平均値を使用して計算した。リン酸化情報は、図１０および１１にもプロットした。図１２は、ＥＧＦＲ、サイトケラチン（ＣＫ）についてのＣＴＣ染色、およびＤＡＰＩを用いたサイトケラチンの画像を示している。細胞系コントロールは、ＨＥＲ－２およびＥＧＦＲ発現各々について陽性であるＳＫＢｒ３およびＡ４３１であった。６人の正常個人由来の全血は、コントロールと同一プロトコールを用いて処理した。正常サンプルはいずれも、バックグラウンドを超えるＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２リン酸化を示さなかった。

【表３６】

本試験における５例の乳癌患者の人口統計学データ

患者番号	生年月日	性別	人種/民族
01-003	1951 年 4 月 1 日	女性	ヒスパニック/ラテン系
01-006	1929 年 10 月 15 日	女性	アジア人
01-014	1966 年 9 月 29 日	女性	ヒスパニック/ラテン系
01-019	1954 年 6 月 8 日	女性	アジア人
02-017	1954 年 10 月 3 日	女性	白人

【表３７】

本試験における５例の乳癌患者の癌病歴

患者番号	癌のタイプ	病期	転移の部位	進行中であればチェックする	治療のタイプ
01-003	乳癌	3 C	リンパ節左胸壁	チェックされている	化学療法
01-006	乳癌	4	リンパ節および肝臓	チェックされている	化学療法
01-014	乳癌	4	リンパ節	チェックされている	化学療法
01-019	乳癌	4	骨、肝臓	チェックされている	化学療法
02-017	乳癌	3	リンパ節	チェックされていない	放射線療法

【表３８】

本試験における５例の乳癌患者の現行投薬

患者番号	薬物名	治療に関連する診断	用量
01-003	BENADRYL(登録商標)	前化学療法薬	25mg Q 28 日間
01-003	DECADRON(登録商標)	前化学療法薬	25mg Q 28 日間
01-003	HERCEPTIN(登録商標)	乳癌化学療法薬	8mg Q 28 日間
01-003	TAGAMET(登録商標)	乳癌のための前化学療法薬	300mg Q 28 日間
01-003	TAXOTERE(登録商標)	乳癌化学療法薬	40mg Q 28 日間
01-003	TYLENOL(登録商標)	疼痛	1g Q 28 日間
01-003	ZOFRAN(登録商標)	乳癌のための前化学療法薬	32mg Q 28 日間
01-006	DECADRON(登録商標)	化学療法の前投薬	20mg Q 2 週間
01-006	GEMZAR(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	1,000mg Q 2 週間
01-006	HERCEPTIN(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	100mg Q 週間
01-006	KYTRIL(登録商標)	化学療法の前投薬	1mg Q 2 週間
01-006	TYLENOL(登録商標)	前投薬	1g Q 2 週間
01-014	カルボプラチン	乳癌のための化学療法薬	650mg Q 21 日間
01-014	DECADRON(登録商標)	化学療法の前投薬	20mg Q 21 日間
01-014	HERCEPTIN(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	270mg Q 21 日間
01-014	ROCEPHIN(登録商標)	解熱用抗生物質	必要に応じて 1000mg
01-014	TAXOTERE(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	100mg Q 21 日間
01-014	ZOFRAN(登録商標)	化学療法の前投薬	32mg Q 21 日間
01-019	AREDIA(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	90mg Q 21 日間
01-019	BENADRYL(登録商標)	化学療法の前投薬	25mg Q 21 日間
01-019	カルボプラチン	乳癌のための化学療法薬	580mg Q 21 日間
01-019	DECADRON(登録商標)	化学療法の前投薬	20mg Q 21 日間
01-019	KYTRIL(登録商標)	化学療法の前投薬	1mg Q 21 日間
01-019	硫酸モルヒネ	前投薬	必要に応じて 2mg
01-019	TAGAMET(登録商標)	化学療法の前投薬	300mg Q 21 日間
01-019	TAXOTERE(登録商標)	乳癌のための化学療法薬	110mg Q 21 日間
01-019	ZOCOR(登録商標)	高コレステロール血症	10mg 毎日 1 回
02-017	アドリアマイシン	乳癌	79mg QD 21 日間
02-017	BENADRYL(登録商標)	掻痒	25mg Q 21 日間
02-017	CYTOXEN(登録商標)	乳癌	790mg Q 21 日間
02-017	DECADRON(登録商標)	悪心	20mg Q 21 日間
02-017	VICODIN(登録商標)	癌性疼痛	325mg、必要に応じて 1 日 3 回
02-017	ZOFRAN(登録商標)	悪心および嘔吐	32mg Q 21 日間

【表３９】

本試験における５例の乳癌患者についてのＥＲ、ＰＲ、およびＨＥＲ－２に関する診断試験結果

患者番号	この被験者は ER 陽性ですか？	この被験者は PR 陽性ですか？	この被験者は HER2 陽性ですか？
01-003	いいえ	いいえ	はい
01-006	いいえ	いいえ	不明
01-014	いいえ	いいえ	はい
01-019	はい	いいえ	いいえ
02-017	いいえ	いいえ	いいえ

【表４０】

５例の乳癌および６例の正常サンプルについてのＣＴＣ数（７．５ｍＬ当たり）および相対ＥＧＦＲリン酸化レベル

	乳癌			正常		
連続番号	患者ID	CTC	相対EGFRレベル	患者ID	CTC	相対EGFRレベル
1	01-014	3	0.7	02-007	0	1.14
2	01-013	1	1.26	01-013	0	1.31
3	01-019	4	0.88	01-011	0	1.2
4	01-006	1	3.27	01-015	1	0.68
5	02-017	3	2.44	02-012	0	1.32
6				02-013	0	0.68

【表４１】

５例の乳癌および６例の正常サンプルについてのＣＴＣ数（７．５ｍＬ当たり）および相対ＨＥＲ－２リン酸化レベル

	乳癌			正常		
連続番号	患者ID	CTC	相対 HER-2 レベル	患者ID	CTC	相対 HER-2 レベル
1	01-014	3	0.66	02-007	0	1.13
2	01-013	1	1	01-013	0	1.15
3	01-019	4	0.94	01-011	0	1.31
4	01-006	1	2.52	01-015	1	0.76
5	02-017	3	2.14	02-012	0	1.07
6				02-013	0	0.59

【０４０７】

患者０１－０１９の試験結果は、原発性腫瘍においてＥＲについては陽性、ＰＲおよびＨＥＲ－２過剰発現については陰性を示した。この患者にはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）が投与されず、採血時にはＴａｘｏｔｅｒｅ（登録商標）＋カルボプラチンを用いて治療されていた。４個のＣＴＣが同定された。これらの細胞はいずれも、ＶｅｒｉｄｅｘＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）システムによるＥＧＦＲ発現について陽性染色されなかった。リガンドを用いた単離ＣＴＣの刺激後に、近接アッセイではＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２の検出可能なリン酸化が見られなかった。これらの状態は、患者の腫瘍細胞がＥＧＦＲ／ＨＥＲ－２経路によって駆動され続けないので、このため現行療法を変更する理由はないことを医師に知らせる。

【０４０８】

患者０１－００６についてはＨＥＲ－２試験は報告されなかったが、患者にはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）療法が与えられたので、患者はおそらくＨＥＲ－２陽性であった。この患者は、ＥＲおよびＰＲの両方について陰性であった。患者０１－００６は、染色によってＥＧＦＲ発現について陽性である１個のＣＴＣを有していた。ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２両方の有意な活性化が検出された。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）を含む療法にもかかわらず、ＥＧＦＲ経路もＨＥＲ－２経路も停止させられなかった。活性化は、ＥＦＧＲとＨＥＲ－２との間でのヘテロ二量体の形成の結果として生じる可能性があり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）阻害の回避を可能にする。これらのデータは、医師に療法を変更する必要があることを知らせる。ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２の両方を標的とする、例えばラパチニブ、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名）、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｉｒｅｓｓａ（登録商標）、またはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）などの薬剤を含む療法が指示されるであろう。

【０４０９】

患者０２－０１７の試験結果は、原発性腫瘍においてＥＲ、ＦＲ、およびＨＥＲ－２過剰発現について陰性を示した。この患者は、以前はアドリアマイシン＋サイトキセンを用いて治療されていたが、採血時点には癌療法を受けていなかった。このサンプルは３個のＣＴＣを含有し、それらの全部がＥＧＦＲ発現について陽性染色された。近接アッセイで

は、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２両方の有意な活性化が検出された。この患者の原発性腫瘍はＨＥＲ－２過剰発現について陰性であったが、ＥＧＦＲ／ＨＥＲ－２経路は活性であった。単独または化学療法薬と併用したＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）を用いた、または化学療法薬を単独で用いた治療は、この患者にとって適切な療法ではなかったであろう。これらのデータは、医師にＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２の両方を標的とする、例えばラパチニブ、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋ＺＡＣＴＩＭＡ（商標）、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｉｒｅｓｓａ（登録商標）、またはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）＋Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）などの薬剤を含む療法が指示されることを知らせる。

【０４１０】

患者０１－００３および０１－０１４の原発性腫瘍は、患者病歴においてＨＥＲ－２過剰発現について陽性であると報告された。どちらの患者も、ＥＲおよびＰＲについて陰性であった。患者０１－００３はＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）およびＴａｘｏｔｅｒｅ（登録商標）を用いて治療され、患者０１－０１４はＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、カルボプラチンおよびＴａｘｏｔｅｒｅ（登録商標）を用いて治療されていた。患者０１－００３は、染色によってＥＧＦＲ発現について陰性である１個のＣＴＣを有していた。ＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２いずれかのリン酸化は検出されなかった。これらのデータは医師に、原発性腫瘍中で最初に検出されたＨＥＲ－２駆動経路がもはや活性ではないことを知らせる。原発性腫瘍中でＨＥＲ－２抗体により実際に染色して陽性と判定された原発性腫瘍のパーセンテージが約１０％であることが多いことを前提にすると、再発と関連するＣＴＣはＨＥＲ－２を過剰発現しない可能性があることは予想外ではない。ＥＧＦＲ経路は、活性ではない。ＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２のいずれかに対して向けられた標的療法を用いてこの患者を治療する理由はない。患者０１－０１４は、３個のＣＴＣを有し、それら全部がＥＧＦＲ発現について陽性染色された。この患者についてＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２いずれかのリン酸化は検出されなかった。ＣＴＣがＥＧＦＲ発現を示したという事実にもかかわらず、ＥＧＦＲ経路は活性ではなかった。ＨＥＲ－２の非存在下での低レベルのＥＧＦＲは、癌細胞を活性化するために十分に高くない可能性がある。同様に、この患者をＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２のいずれかに対して向けられた標的療法を用いて治療する理由はない。

【０４１１】

表４２は、各患者についての診断的情報の要約および療法の勧告を示している。

【表４２】

結果として生じる療法指示を伴う、本試験における５例の癌患者に関する診断的情報の要約

患者番号	ERの状態	PRの状態	HER-2の状態	CTC番号	CTC EGFR	pEGFR	pHER-2	指示された療法（化学療法は組み合わせて加えることができる）
01-019	陽性	陰性	陰性	4	陰性	陰性	陰性	ホルモン療法
01-006	陰性	陰性	不明	1	陽性	陽性	陽性	ラパチニブ、 Herceptin（登録商標）+ZACTIMA（商品名）、 Herceptin（登録商標）+Erbitux（登録商標）、 Herceptin（登録商標）+Iressa（登録商標）、 Herceptin（登録商標）+Tarceva（登録商標）
02-017	陰性	陰性	陰性	3	陽性	陽性	陽性	ラパチニブ、 Herceptin（登録商標）+ZACTIMA（商品名）、 Herceptin（登録商標）+Erbitux（登録商標）、 Herceptin（登録商標）+Iressa（登録商標）、 Herceptin（登録商標）+Tarceva（登録商標）
01-003	陰性	陰性	陽性	1	陰性	陰性	陰性	（EGFR および/または HER-2 阻害剤なし）
01-014	陰性	陰性	陽性	3	陽性	陰性	陰性	（EGFR および/または HER-2 阻害剤なし）

【０４１２】

《実施例１２：ｐ９５ＥｒｂＢ２および他の切断受容体チロシンキナーゼまたは臨床サンプル由来のタンパク質を定量するための新規なアッセイ》

ＥｒｂＢ２としても公知であるＨＥＲ－２は、上皮成長因子受容体もしくはＨＥＲファ

ミリーの４つのメンバー（ＨＥＲ－１、ＨＥＲ－２、ＨＥＲ－３、およびＨＥＲ－４）のうちの１つである。全ＨＥＲ受容体は類似の構造：細胞外リガンド結合ドメイン；短い疎水性膜貫通領域；および細胞質チロシンキナーゼドメインを共有する。リガンド結合もしくは受容体過剰発現によって誘導されるＨＥＲ受容体のヘテロもしくはホモ二量体化は、受容体キナーゼの活性化および数個のチロシン残基のその後のリン酸化を導く。順に、受容体のカルボキシル末端内に位置するこれらのリン酸化チロシン残基は、メディエータ分子を動員し、シグナル伝達経路を活性化して、細胞の増殖、分化、および生存の修飾をもたらす。ＥｒｂＢ２は、ヒト乳癌の約１５％～２５％において過剰発現／増幅し、その過剰発現／増幅には進行性表現型が結び付いている。

【０４１３】

ＥｒｂＢ２の細胞外ドメインに高親和性で結合する組換えヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））は、ＥｒｂＢ２過剰発現もしくはＥｒｂＢ２遺伝子増幅進行性乳癌を備える患者において実質的利点を提供し、それが化学療法と併用された場合には生存率を向上させる。さらに、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）は最近、ＥｒｂＢ２過剰発現性初期乳癌を備える患者において再発の生じない生存および総生存率を改善することが証明されている。

【０４１４】

しかしＥｒｂＢ２過剰発現性乳癌を備える患者の７０％～８０％は、一次もしくは獲得耐性のいずれかに起因して単剤療法として投与された場合にＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に応答しない。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）耐性については幾つかの潜在的メカニズムがあり、そのメカニズムは：染色体１０番（ＰＴＥＮ）が欠失したホスファターゼおよびテンシンホモログの不活性化もしくは消失；インスリン様成長因子受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）を含む他のチロシンキナーゼ受容体の活性化；およびアミノ末端細胞外Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）結合ドメインが欠如するＥｒｂＢ２受容体の切断形の蓄積を含む。

【０４１５】

集合的にｐ９５ＥｒｂＢ２もしくはＣ末端フラグメントとして公知である細胞質カルボキシル末端フラグメントだけを含有する切断ＥｒｂＢ２ポリペプチドは、ＥｒｂＢ２発現性乳癌細胞系および腫瘍において見いだされることが多い。実際に、これらのフラグメントは、一部の腫瘍において優勢なＥｒｂＢ２形である。これらのフラグメントは全長ＥｒｂＢ２の細胞外ドメインのタンパク質分解プロセスを通して、または膜貫通ドメインの前および後の各々に位置する２つのメチオニン残基（アミノ酸６１１または６８７）からの翻訳の選択的開始によって生じる。

【０４１６】

ｐ９５ＥｒｂＢ２の生物学的機能は完全には特性解析されていないが、ｐ９５ＥｒｂＢ２の過剰発現は、ヌードマウスにおける腫瘍異種移植片の増殖をもたらすことが証明されている。ｐ９５ＥｒｂＢ２タンパク質はキナーゼ活性を有し、この活性は腫瘍増殖のために必要とされる。切断受容体ｐ９５ＥｒｂＢ２がＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）結合細胞外ドメインの非存在下においてキナーゼ活性を有するという事実は、ｐ９５ＥｒｂＢ２発現性腫瘍がＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に耐性であるが、例えばラパチニブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に耐性であるＥｒｂＢ２発現腫瘍を備える患者において活性を有するＥｒｂＢ２の低分子量チロシンキナーゼ阻害剤）などのｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤の阻害作用に感受性である可能性があることを示唆している。初期臨床試験データは、ｐ９５ＥｒｂＢ２を発現する患者９例中８例がＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に耐性であることを示している。さらに最近、ｐａｎ－ＨＥＲチロシンキナーゼ阻害剤およびＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）に対する獲得耐性がＥｒｂＢ３の過剰発現をもたらすフィードバックメカニズムまたはｐ９５ＥｒｂＢ２の形成をもたらすＥｒｂＢ２の可能性のある切断のいずれかを通して発生することも証明されている。

【０４１７】

Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）はＥｒｂＢ２切断を阻害するので、Ｈｅｒｃｅｐｔｉ

ｎ（登録商標）とｐａｎ－ＨＥＲチロシンキナーゼ阻害剤の併用が、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）および／またはｐａｎ－ＨＥＲチロシンキナーゼ阻害剤への獲得耐性を備える患者を治療するために理想的な可能性がある。

【０４１８】

ｐ９５ＥｒｂＢ２を検出するための現行方法に関して、ヒト乳房腫瘍中でのｐ９５ＥｒｂＢ２の存在は、ウエスタンブロット分析によって検出できる。しかしこの技術は、大量の新鮮凍結腫瘍組織を必要とするので、そのような組織を臨床サンプルから入手可能であることはまれなために重大な制限となる。免疫蛍光に基づくｐ９５ＥｒｂＢ２検出アッセイは、臨床サンプルからのルーチンのホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上で実施できる。この技術はｐ９５ＥｒｂＢ２が細胞質および細胞膜の両方に局在するが、全長ＥｒｂＢ２は局在しないという観察から構築される。本方法は、細胞内ドメインを標的とする抗ＥｒｂＢ２抗体を使用し、示差的細胞質染色に依存する。しかし、免疫蛍光に基づく方法は、感受性が限定されており（１細胞当たり約１０，０００個の受容体）、腫瘍増殖を駆動する低レベルのｐ９５ＥｒｂＢ２を検出できない。さらに、機能的ｐ９５ＥｒｂＢ２ポリペプチドは、細胞膜上に局在し、細胞質内には局在しない。さらに、細胞質内に内在化するＥｒｂＢ２と細胞質内のｐ９５ＥｒｂＢ２とを識別することは困難である。

【０４１９】

本明細書に記載した新規な超高感受性、および高特異性アッセイ法は、ｐ９５ＥｒｂＢ２を検出するための現行方法の限界を克服し、例えば細針吸引液、コア生検標本、および血液から得られた循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの極めて様々な臨床サンプルについて実施できる。ｐ９５ＥｒｂＢ２を測定することに加えて、本発明の方法は、微量の生物学的材料由来のＰＴＥＮおよびＩＧＦ－１Ｒと一緒にＥｒｂＢファミリーの全４つのメンバーの活性化を検出することができる。

【０４２０】

典型的な方法

図１３は、全長ＥｒｂＢ２は、ポリスチレンビーズもしくはポリマーデキストランに付着させたＥｒｂＢ２の細胞外ドメインに結合する抗体を用いて臨床サンプルから取り除けることを示している。このアッセイは、迅速な液相結合動態、ビーズに結合した受容体抗体による全長タンパク質の選択的抽出、およびビーズ結合タンパク質の平面アレイへ結合する不能力を利用する。または、磁気帯電したビーズを使用すると全長ＥｒｂＢ２後部を保持することができ、切断ｐ９５ＥｒｂＢ２だけがマイクロアレイに適用されるであろう。

【０４２１】

以下のアッセイ方法「Ａ」は、高感受性および特異性近接アッセイを用いたｐ９５ＥｒｂＢ２の検出を例示している。以下のアッセイ方法「Ｂ」は、単一抗体を用いたｐ９５ＥｒｂＢ２の検出を例示している。切断タンパク質を検出するためのこれらの方法は、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ　Ｖ１１１突然変異体（膠芽細胞腫、結腸直腸癌などに関係している）、その他の切断受容体チロシンキナーゼ、カスパーゼなどを含むがそれらに限定されない多数の様々なタンパク質に適用することができる。

【０４２２】

Ａ．チラミドシグナル増幅を用いたマイクロアレイＥＬＩＳＡを使用した切断受容体の近接二重検出。

この実施例は、希少循環細胞中でのｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するのに適切な優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡについて例示する：

１）捕捉抗体は、１ｍｇ／ｍＬ～０．００４ｍｇ／ｍＬの範囲内の連続希釈液を含む１６パッドのＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ社）上でプリントする。

２）一晩乾燥押させた後、スライドはＷｈａｔｍａｎ社製遮断緩衝液を用いて遮断する。

３）抗ＥｒｂＢ２（細胞外）抗体コーティングビーズを含む、または含まない８０μＬ

のＢＴ４７４細胞溶解物は、１０倍の連続希釈液を含む各パッド上に加える。スライドは、室温で２時間にわたりインキュベートする。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いた６回の洗浄後、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ／２％　ＢＳＡ／１％　ＦＢＳ中に希釈した近接アッセイのための８０μＬの検出抗体をスライドに加える。使用した検出抗体は：（１）グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）に直接結合したＥｒｂＢ２の細胞内ドメインに特異的である抗ＥｒｂＢ２抗体；および（２）西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に直接結合しているリン酸化ＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体である。インキュベーションは、室温で２時間にわたる。

５）シグナル増幅のために、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを加え、５０ｍＭのグルコースと一緒に１５分間にわたり反応させる。スライドはＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて２回、およびＴＢＳを用いて１回洗浄する。８０μＬのＡＳ－Ａｌｅｘａ　５５５を加え、３０分間にわたりインキュベートする。次にこのスライドを２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ社）上でスキャンする。

６）非限定的な例として、スライド１は全ＥｒｂＢ２活性化について報告できるが、スライド２は切断ＥｒｂＢ２活性化について報告できる。サンプル中の活性化または全切断ＥｒｂＢ２の量に基づくと、適切な療法を選択できる。

【０４２３】

Ｂ．チラミドシグナル増幅を用いたマイクロアレイＥＬＩＳＡを使用した切断受容体の検出。

この実施例は、希少循環細胞中でのｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するのに適切な優れたダイナミックレンジを有する多重高スループット近接単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡについて例示する：

１）捕捉抗体は、１ｍｇ／ｍＬ～０．００４ｍｇ／ｍＬの範囲内の連続希釈液を含む１６パッドのＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ社）上でプリントする。

２）一晩乾燥押させた後、スライドはＷｈａｔｍａｎ社製遮断緩衝液を用いて遮断する。

３）抗ＥｒｂＢ２（細胞外）抗体コーティングビーズを含む、または含まない８０μＬのＢＴ４７４細胞溶解物は、１０倍の連続希釈液を含む各パッド上に加える。スライドは、室温で２時間にわたりインキュベートする。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いた６回の洗浄後、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ／２％　ＢＳＡ／１％　ＦＢＳ中に希釈したアッセイのための８０μＬの検出抗体をスライドに加える。使用した検出抗体は、ＨＲＰに直接結合したＥｒｂＢ２の細胞内ドメインに対して特異的な抗ＥｒｂＢ２抗体である。インキュベーションは、室温で２時間にわたる。

５）シグナル増幅のために、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを加え、１ｍＭの過酸化水素と一緒に１５分間にわたり反応させる。スライドはＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎを用いて２回、およびＴＢＳを用いて１回洗浄する。

６）８０μＬのＡＳ－Ａｌｅｘａ　５５５を加え、３０分間にわたりインキュベートする。次にこのスライドを２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナー（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ社）上でスキャンする。

７）非限定的な例として、スライド１は全ＥｒｂＢ２活性化について報告できるが、スライド２は切断ＥｒｂＢ２活性化について報告できる。サンプル中の活性化または全切断ＥｒｂＢ２の量に基づくと、適切な療法を選択できる。

【０４２４】

例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断受容体を検出するための本発明の１つの実施形態は、図１４に示した。図１４Ａは、当該の受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に向けられた抗体でコーティングされたビーズが全長受容体には結合するが、切断受容体（例えば、ｐ９５）には結合しないので、あらゆる全長受容体を本アッセイから取り除くことを示している。図１４Ｂは、切断受容体がいったん捕捉抗体に結合すると、その後は全長受容体の

細胞内ドメイン（ＩＣＤ）に対して特異的な検出抗体によって検出できることを示している。検出抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）へ直接的に結合させることができる。チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ）は、次に、検出すべきシグナルを生成するために実施できる。

【０４２５】

ｐ９５ＥｒｂＢ２に関連して、図１５は、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に向けられた抗体でコーティングされたビーズを用いた前処理が、ＥｒｂＢ２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）シグナルに影響を及ぼすことなく全長ＥｒｂＢ２シグナルをほぼ完全に除去したことを示している。全長ＥｒｂＢ２シグナルの減少は、抗体結合ビーズの量が４μｇ／ｍＬから１２μｇ／ｍＬへ増加するにつれて全長ＥｒｂＢ２シグナルが９．５９％から２．８４％へ減少したので、本アッセイにおいて使用したＨＥＲ－２　ＥＣＤ抗体結合ビーズの濃度に依存した。

【０４２６】

図１６および１７は、ｐ９５ＥｒｂＢ２が上述したアッセイ方法を用いて特異的に検出されたことを確証している。図１６に示したように、ＡＰＭＡ（（４－アミノフェニル）酢酸第二水銀）処理は、ＢＴ－４７４細胞内でのｐ９５ＥｒｂＢ２リン酸化を増加させた。図１７は、ヘレグリン（ｈｅｒｅｇｕｌｉｎ）がＴ４７Ｄ細胞内でのｐ９５ＥｒｂＢ２リン酸化を増加させたことを示している。

【０４２７】

したがって、患者サンプル中の例えばｐ９５ＥｒｂＢ２などの切断タンパク質を検出するための上述した方法は、現在利用可能な方法に比して少なくとも下記の利点を提供する：

１）単細胞から切断受容体を検出する能力を提供する高感受性。

２）より高い特異性。

３）単一タンパク質の代わりに多重マイクロアレイを使用して全経路上で報告する能力。

４）拡張可能性。

【０４２８】

《実施例１３：遺伝子発現パネルにより再発リスクを同定した後の病期Ｉ期またはＩＩ期リンパ節陰性浸潤性乳癌を有する患者を治療するための選択》

例えばリンパ節陰性疾患を備える様々な女性集団における乳癌の予後および／または再発の可能性を予測する遺伝子発現マーカーのパネルが開発されている。これらの遺伝子パネルは、再発を経験する可能性が低い、したがって、アジュバント化学療法からの利益が得られる可能性が低い女性を同定するために有用な場合がある。これらの発現パネルを使用すると、疾患のない、そして全生存期間転帰へ不都合な影響を及ぼさずに、アジュバント化学療法を安全に回避できる女性を同定することができる。適切なシステムには、Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ社からの２１遺伝子パネルであるＯｎｃｏｔｙｐｅ　ＤＸ（商品名）；Ａｇｅｎｄｉａ社（オランダ国アムステルダム）からの７０遺伝子パネルであるＭａｍｍａＰｒｉｎｔ（登録商標）；およびＶｅｒｉｄｅｘ社（ニュージャージー州ウォーレン）からの７６遺伝子パネルが含まれるがそれらに限定されない。これらのパネルは、上述の実施例に記載した方法を使用して選択された適切な標的療法とともに化学療法を含める必要を決定するために経路活性化の分析と結び付けて使用することができる。

【０４２９】

以下のプロトコールは、乳癌を治療するのに適切な標的療法または標的療法の組み合わせを選択するために活性化状態プロファイリングと結び付けて遺伝子発現プロファイリングが使用される、本発明の典型的な実施形態を提供する：

１）生検パンチを用いて、最小厚さ３ｍｍおよび最大厚さ５ｍｍを備える腫瘍サンプルを収集する。生検標本は、ＲＮＡＲｅｔａｉｎ（商品名）保存料を含有するサンプル試験管内に直接入れる。この試験管は、ＭａｍｍａＰｒｉｎｔ（登録商標）アッセイを用いて試験するためにＡｇｅｎｄｉａ社へ直ちに送付する。

２）Ａｇｅｎｄｉａ社からの試験報告書は、患者を「良好」シグニチャー／低リスク群または「不良」シグニチャー／高リスク群に指定する。患者が低リスク群に含まれる場合は、患者は疾患のない、そして全生存期間へ不都合な影響を及ぼさずに、アジュバント化学療法を安全に回避することができる。

３）ＭａｍｍａＰｒｉｎｔ（登録商標）アッセイは、ＥＲ陽性またはＥＲ陰性のいずれかである患者に適用できる。ＥＲおよびＥｒｂＢ２状態が決定されると、患者は実施例８に記載した乳癌のサブクラスの１つに指定される。４つの主要サブクラスは、次の通りである：

１．ＥＲ＋／ＰＲ＋／ＥｒｂＢ２－

２．ＥＲ＋／ＥｒｂＢ２＋

３．ＥＲ－／ＥｒｂＢ２＋

４．ＥＲ－／ＰＲ－／ＥｒｂＢ２

４）腫瘍細胞（例えば、ＣＴＣ）は、実施例１に記載したように血液から単離し、分析のために調製する。または、生検標本の一部分を使用して実施例２に記載した腫瘍細胞抽出物を調製することができる。細胞標本は、実施例３または実施例４に記載したようにアッセイされる。活性化プロファイルは、実施例８（表４から表２２）、実施例９（表２３から表３１）、および実施例１０（表３２から表３５）に記載された方法と類似方法で評価する。適切な標的療法または標的療法の組み合わせを選択する。患者が低リスク群に含まれる場合は、化学療法は加えられない。患者が高リスク群に含まれる場合は、臨床情報に基づいて医師が選択した化学療法が標的療法に加えられる。

【０４３０】

《実施例１４：遺伝子発現パネルによる一次起源組織決定後の治療のための患者の選択》

全転移性腫瘍の約３％～５％は、原発不明癌（ＣＵＰ）のカテゴリーに分類される。起源組織の正確な診断は、現行療法が多分に解剖学的部位に基づいているので、治療法の決定において重要である。遺伝子発現パネルは、最初に乳癌を備えると診断された女性に与えられる療法と一致する療法から利益が得られるであろう転移性癌を備える女性を同定する際に有用な場合がある。適切なシステムには、ｍｉｃｒｏＲＮＡの発現パターンの分析を通して癌および起源組織を分類するＲｏｓｅｔｔａ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　ＣＵＰアッセイ（例えば、国際公開第０８／１１７２７８号パンフレットを参照されたい）；３９の腫瘍タイプについて原発起源部位を同定するために９２種の遺伝子を測定するＲＴ－ＰＣＲに基づく発現アッセイであるＡｖｉａｒａ　ＤＸ（カリフォルニア州カールズバッド）ＣａｎｃｅｒＴＹＰＥ　ＩＤ（商品名）アッセイ；およびマイクロアレイ上で１，６００種を超える遺伝子の発現を測定して１５の公知の組織タイプと腫瘍の遺伝子発現「シグニチャー」を比較する、Ｐａｔｈｗｏｒｋ（商品名）起源組織検査（カリフォルニア州サニーベール）が含まれるがそれらに限定されない。患者の原発性癌の組織が乳房であると同定されると、経路活性化プロファイルを使用して治療スケジュールに含めるために適切な標的療法を選択することができる。

【０４３１】

以下のプロトコールは、乳癌を治療するのに適切な標的療法または標的療法の組み合わせを選択するために活性化状態プロファイリングと結び付けて遺伝子発現プロファイリングが使用される、本発明の典型的な実施形態を提供する：

１）転移性腫瘍から外科的または細針生検のいずれかによって切除された厚さ７μｍの組織切片を載せた２枚以上のガラススライドを患者から入手する。これらの細胞は、ホルマリン中で固定して、パラフィン（ＦＦＰＥ）内に包埋する。追加の１枚の同一腫瘍のＨ＆Ｅ染色スライドをＨ＆Ｅで染色する。

２）病理学者は、Ｈ＆Ｅスライドを精査し、ＣａｎｃｅｒＴＹＰＥ　ＩＤ（商品名）アッセイのために収集すべき領域を指示する。これらのスライドは、分析のためにＡｖｉａｒａ　ＤＸ社へ送付する。

３）Ａｖｉａｒａ　ＤＸ社からの試験報告書は、ｋ－最近傍分析から決定された上位５つの最も可能性が高い部位を指示し、予測が引き出される。患者のための予測が原発不明

腫瘍として乳腺を示す場合、患者の腫瘍細胞は経路活性化について評価することができる。

４）腫瘍細胞（例えば、ＣＴＣ）は、実施例１に記載したように血液から単離し、分析のために調製する。または、細針生検標本を使用して実施例２に記載した腫瘍細胞抽出物を調製することができる。細胞標本は、実施例３または実施例４に記載したようにアッセイされる。活性化プロファイルは、実施例８（表４から表２２）、実施例９（表２３から表３１）、および実施例１０（表３２から表３５）に記載された方法と類似方法で評価する。適切な標的療法または標的療法の組み合わせを選択する。

【０４３２】

《実施例１５：近接アッセイを使用した新規な乳癌検査セット》

背景：

２００８年には、合衆国内の女性において推定１８２，４６０例の浸潤性乳癌の新規症例が同定されるであろう。乳癌を備える女性の約２０％は、診断時点にＨＥＲ－２の過剰発現を有する。ＨＥＲ－２過剰発現（ＨＥＲ－２陽性）乳癌は、癌のより進行性形態と結び付いているので、このためより不良な生存率およびより高い再発率を生じさせる。ＨＥＲ－２陽性患者は、モノクローナル抗体薬であるトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））を用いて治療されることが多い。しかしＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）は、高価で潜在的に心臓毒性治療法である；このため臨床転帰を最適化するためには、候補患者の正確な同定が絶対に必要である。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）はＨＥＲ－２を遮断することによって機能するので、このため腫瘍細胞増殖を減少させる。ラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標））は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）両方が失敗した患者のために使用されることが多い低分子キナーゼ阻害剤である。

【０４３３】

現行のＨＥＲ－２検査選択肢：

ＨＥＲ－２の状態は、典型的には下記の一方または両方によって評価される：（１）免疫組織化学的アッセイ（ＩＨＣ）を用いた受容体タンパク質検査；または（２）蛍光インサイチューハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）試験法を用いた遺伝子増幅。しかし現行の検査法には精度が欠如していること、検査室間で高度に変動する可能性があること、さらに検査室へ受領される前の標本取り扱いにおける相違によって変動する可能性があることが広く認識されている。実際に、入手可能な証拠は、現行のＨＥＲ－２検査の約２０％は不正確な可能性があることを示唆している（ＡＳＣＯ／ＣＡＰ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｆｏｒ ＨＥＲ－２ Ｔｅｓｔｉｎｇ ｉｎ Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２００７））。

【０４３４】

近接アッセイに基づく乳癌検査：

この実施例に記載する新規な乳癌検査セットは、本明細書に記載した多重高スループット近接（すなわち、３抗体）アッセイを利用する。そのような診断検査は、乳癌を備える患者から採取した循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）または細針吸引液（ＦＮＡ）中のＨＥＲ－２の発現および活性化を決定することに特に有用であり、乳癌患者のための療法選択に役立つであろう。

【０４３５】

以下のプロトコールでは、この実施例において規定した全検査のために使用する標準フォーマットを記載する：

１．血液サンプルを収集する：

ａ．血液を２本の７．５ｍＬ試験管に採血する。

ｂ．他の血液成分から循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を分離するために上皮細胞に特異的な結合タンパク質を備えるＶｅｒｉｄｅｘ上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ）磁気ビーズを使用する。

ｃ．サンプルを洗浄する。

２．１つのサンプルを活性化し（生きている細胞だけが活性化される）、それらの細胞

を溶解させる。
３．他のサンプルの細胞を溶解させる。
４．（これは各検査間で変動性の工程である）全活性化タンパク質およびサイトケラチンを定量するために活性化サンプル中の２つのタンパク質（例えば、シグナル伝達タンパク質）およびサイトケラチンを検出するために近接マイクロアレイアッセイを使用する：
ａ．２つのタンパク質およびサイトケラチン（ＣＫ）に特異的である３つのモノクローナル抗体をマイクロアレイに固相化する。
ｂ．分析物をそれらに対して特異的なモノクローナル抗体に結合させるために、サンプルをマイクロアレイチップの上方に注入する。
ｃ．６つの追加のモノクローナル抗体の混合物をマイクロアレイチップ上に注入する（分析物１つ当たり２つのモノクローナル抗体）。蛍光を分析物の部位で発生させるために、全３種の特異的モノクローナル抗体（１つの固相化された抗体および２つの注入された抗体）がその分析物に結合しなければならない。
５．全タンパク質を定量するために不活性化サンプル中の２つのタンパク質のタンパク質マイクロアレイ分析。
６．各活性化タンパク質の結果は、不活性化サンプルを用いて較正される。これは、３つの分析物各々について「＋」または「－」の結果を備える定量的タンパク質結果を生じさせるであろう。
【０４３６】
生成物Ａ［Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）］：この検査は、ＨＥＲ－２活性化／リン酸化を検出するためのベースライン時ＥｒｂＢ活性化アッセイである。この検査は、ＨＥＲ－２不一致を決定するために病期ＩＩＩ期およびＩＶ期において使用するための増強ＥｒｂＢ活性化アッセイでもある。近接マイクロアレイアッセイは、全活性化タンパク質およびサイトケラチンを定量するために活性化サンプル中のＥｒｂＢ１／ＨＥＲ－１、ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ－２、およびサイトケラチンを検出するために実施する。ＥｒｂＢ１／ＨＥＲ－１およびＥｒｂＢ２／ＨＥＲ－２に対するモノクローナル抗体を使用するが、上皮細胞のためにはパンサイトケラチン抗体を使用する。定量的シグナルは、ＨＥＲ－２およびＨＥＲ－１タンパク質の活性化および発現について説明する。相対活性化スコアは、リン酸化対発現の比率から引き出される。本検査は：ＨＥＲ－２活性化（リン酸化）；ＨＥＲ－２発現；ＨＥＲ－１活性化（リン酸化）；ＨＥＲ－１発現；およびパンサイトケラチン（細胞数標準化のため）を定量する。本検査は、ＨＥＲ－２活性化が単一循環腫瘍細胞中で検出されるので、高感受性を有する。本検査はさらに、他のマーカーとの１％未満の交差反応性によって測定されるように≧９９％の特異性を有する。再現性（アッセイ内）：ＣＶ＝５～１５％．再現性（アッセイ間）：ＣＶ＝１０～２０％．検査報告書は、下記を提供する：（１）定量的量および陽性もしくは陰性として報告されるＨＥＲ－２およびＨＥＲ－１リン酸化；（２）定量的量および陽性もしくは陰性として報告されるＨＥＲ－２およびＨＥＲ－１の発現；ならびに（３）サイトケラチンの定量。ＨＥＲ－１もしくはＨＥＲ－２のレベルが正常であるがサイトケラチンのレベルが高い場合は、これは乳癌を診断するが、ＨＥＲ－１もしくはＨＥＲ－２標的療法の使用を指示しないであろう。
【０４３７】
生成物Ｂ［Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標）受入れ検査］：この検査は、ｐ９５ＨＥＲ－２およびＥＧＦＲの検出を含む強化ＥｒｂＢ活性化アッセイである。詳細には、これは、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）を用いた治療に失敗したＨＥＲ－２陽性患者のためのラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標））療法についての受入れ検査である。この検査は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）患者の選択および監視、ならびに患者をＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）からＴｙｋｅｒｂ（登録商標）療法へ切り換える際に役立つ。近接マイクロアレイアッセイは、全活性化タンパク質およびサイトケラチンを定量するために活性化サンプル中のＥｒｂＢ１／ＨＥＲ－１、ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ－２、ｐ９５ＨＥＲ－２、およびサイトケラチンを検出するために実施する。ＥｒｂＢ１／ＨＥＲ－１およびｐ９５ＨＥＲ－２に対するモノクローナル抗体を使用するが、上皮細胞のためにはパンサイトケラチ

ン抗体を使用する。本検査は：ｐ９５－ＨＥＲ－２活性化（リン酸化）；ｐ９５－ＨＥＲ－２発現；ＨＥＲ－１活性化（リン酸化）；ＨＥＲ－１発現；およびパンサイトケラチン（細胞数標準化のため）を定量する。この検査は、事前にＩＨＣもしくはＦＩＳＨに基づいてＨＥＲ－２陽性であると指定され、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）が失敗した、ｐ９５－ＨＥＲ－２疾患を備える転移性患者の臨床試験において妥当性確認することができる。近接アッセイに基づいてｐ９５－ＨＥＲ－２およびＨＥＲ－１の活性化を示す患者は、Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標）を用いて治療することができる。本試験は、Ｔｙｋｅｒｂ（登録商標）を用いて治療されたｐ９５－ＨＥＲ－２－陽性患者間で全生存率において利点を示すであろう。ｐ９５ＨＥＲ－２はＨＥＲ－２のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）結合細胞外ドメインが欠如するので、高ｐ９５ＨＥＲ－２レベルはＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）を除外し、代わりにＴｙｋｅｒｂ（登録商標）の使用を指示するであろう。しかしＨＥＲ－１もしくはＨＥＲ－２のレベルが正常であるがサイトケラチンのレベルが高い場合は、これは乳癌を診断するが、ＨＥＲ－１もしくはＨＥＲ－２標的療法の使用を指示しないであろう。

【０４３８】

図１８は、特定患者のために適切な乳癌療法を選択することに関して臨床実践に影響を及ぼすために本発明の方法を使用できる複数の時点を例示している。

【０４３９】

《実施例１６：スルフヒドリル活性化デキストランの調製》

この実施例では、遊離スルフヒドリル基をデキストラン分子に組み込むためのプロトコールを記載する。実施例１７に例示したように、スルフヒドリル修飾デキストラン分子は、本明細書に記載した単一検出および近接アッセイにおいて使用するための抗体およびグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）を備えるコンジュゲートを調製するために使用できる。一部の実施形態では、スルフヒドリル活性化５００ｋＤａデキストラン分子は、抗体：ＧＯ：デキストランの比率が２：１２：１であるように抗体およびＧＯへ結合させることができる。スルフヒドリル活性化５００ｋＤａデキストラン分子の抗体およびＧＯへの結合は、有利にはアッセイの感受性を約１０倍増強する。他の実施形態では、スルフヒドリル活性化７０ｋＤａデキストラン分子は、抗体および西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）へ結合させることができる。

【０４４０】

用語の定義および頭字語：

１．デキストラン＝グルコースポリマー
２．塩酸＝ＨＣｌ
３．Ｎ－（３－ジメチルアミノプロピル）Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩＝ＥＤＣ
４．リン酸緩衝食塩液＝ＰＢＳ
５．水酸化ナトリウム＝ＮａＯＨ
６．２－モルホリノエタンスルホン酸＝ＭＥＳ
７．エチレンジアミン四酢酸＝ＥＤＴＡ

【０４４１】

器具類および装置：

１．水浴（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ｉｓｏｔｅｍｐ　２１０）
２．ＥＬＩＳＡプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社、ＳｐｅｃｔｒａＭＡＸ１９００）
３．ＥＬＩＳＡプレート洗浄装置（Ｎｕｎｃ社、Ｎｕｎｃ－Ｉｍｍｕｎｏ　Ｗａｓｈ８）
４．ボルテックス・ミキサー（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ｖｏｒｔｅｘ　Ｍｉｘｅｒ）
５．凍結乾燥機（Ｖｉｒｔｉｓ社、Ｆｒｅｅｚｅｍｏｂｉｌｅ　１２）
６．遠心分離器（Ｂｅｃｋｍａｎ社、ＧＳ－６Ｒ）
７．マグネチック・スターラー（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、ＰＣ－４１０Ｄ）
８．ＮＡＮＯｐｕｒｅ水を生成するための装置（Ｂａｒｎｓｔｅａｄ社、ＮＡＮＯｐｕ

ｒｅ　Ｄｌａｍｏｎｄ）
　９．透析カセット（Ｐｉｅｒｃｅ社、６６３８０）
【０４４２】
試薬、化学薬品、および供給品：
　１．５００ｋＤａデキストラン（Ｆｉｓｈｅｒ社、ＢＰ１５８０－１００）
　２．ブロモ酢酸（Ｓｉｇｍａ社、２５９３５７）
　３．水酸化ナトリウム（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ｓ３１８－５００）
　４．イソプロパノール（Ｆｉｓｈｅｒｒ社、Ａ４５１－４）
　５．１２Ｎ塩酸（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ａ１４４－５００）
　６．システアミン（Ｓｉｇｍａ社、Ｍ９７６８）
　７．Ｎ－（３－ジメチルアミノプロピル）Ｎ’－エチルカルボジイミド塩酸塩（Ｐｉｅｒｃｅ社、２２９８０）
　８．リン酸緩衝食塩液（Ｃｅｌｌｇｒｏ社、２１－０４０－ＣＶ）
　９．０．５Ｍエチレンジアミン四酢酸溶液（ＧＩＢＣＯ、１５５７５－０３８）
　１０．２－モルホリノエタンスルホン酸（Ｆｌｕｋａ社、６９８９２）
　１１．１０×リン酸緩衝食塩液（Ｆｉｓｈｅｒ社、ＢＰ３９９－５００）
【０４４３】
緩衝液および溶液：
　１．２．９Ｍ　ＮａＯＨ：５．８ｇの水酸化ナトリウムを５０ｍＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水へ溶解させる。
　２．５０ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液：５．３３ｇの２－モルホリノエタンスルホン酸を５００ｍＬのＮＡＮＯｐｕｒｅ水中に溶解させ、１２Ｎ　ＨＣｌを使用してｐＨを４．５へ調整する。
　３．透析緩衝液：１０ｍＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液および１００ｍＬの１０×ＰＢＳを８９０ｍＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水へ加えて、ＰＢＳ中で最終濃度５ｍＭのＥＤＴＡを作成する。
【０４４４】
方法：
カルボキシル基のデキストランへの組み込み：
　１．５０ｍＬのポリプロピレン製スクリューキャップ付き試験管内の８．５ｍＬの２．９Ｍ　ＮａＯＨ中に溶解させた１ｇの５００ｋＤａデキストラン（２μｍｏｌ）に８５０ｍｇのブロモ酢酸を加える。ボルテックス・ミキサーにかけて完全に混合した後、試験管を５０℃の水浴中で一晩インキュベートする。
　２．インキュベーション後、カルボキシル化デキストランを沈降させるためにイソプロパノールを７０（容量／容量）％の最終濃度へ反応混合液を加える。ボルテックス・ミキサーを用いて混合した後、この溶液を１５分間にわたり室温のＢｅｃｋｍａｎ社製遠心分離装置において３，０００ｒｐｍで回転させ、上清を廃棄する。
　３．沈降物を１０ｍＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水中に再溶解させ、イソプロパノールを用いても沈降物が得られなくなるまで、イソプロパノールを用いた沈降を２～３回以上繰り返す。次に沈降物を再生成するためにボルテックス・ミキサーにかけながら１２Ｎ　ＨＣｌを用いて透明の７０％イソプロパノール溶液のｐＨを４へ調整し、この混合物を再びＢｅｃｋｍａｎ社製遠心分離装置において３，０００ｒｐｍで回転させてカルボキシル化デキストランを沈降させ、上清を廃棄する。
　４．残留ブロモ酢酸を取り除くために、沈降物を１０ｍＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水中に再溶解させ、ＨＣｌを用いてこの溶液のｐＨを４へ調整する。次にカルボキシル化デキストランを沈降させるために、イソプロパノールを７０容量％へ加える。ボルテックス・ミキサー内で混合した後、この溶液を１５分間にわたりＢｅｃｋｍａｎ社製遠心分離装置において３，０００ｒｐｍで回転させ、上清を廃棄する。この洗浄プロセスは、全３回繰り返した。
　５．最終洗浄後、沈降物を再び１０ｍＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水中に溶解させ、ＨＣｌを

取り除くために凍結乾燥機内で乾燥するまで凍結乾燥させる。
６．凍結乾燥したカルボキシル化デキストランを－７０℃で保存する。
カルボキシル化デキストラン上のカルボキシル基のスルフヒドリル基への変換：
１．２ｍＬの褐色ガラス管中の、０．５ｍＬの５０ｍＭ　ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ４．５）中に１０ｍｇの凍結乾燥したカルボキシル化デキストランを溶解させる。
２．このカルボキシル化デキストラン溶液に１．４２ｍｇのＥＤＣを加え、この混合液を４０℃で３０分間攪拌する。
３．次に１０ｍｇのシステアミンをこの混合液に加え、生じた溶液をさらに１時間、４℃で攪拌する。
４．攪拌した後、１０，０００の分子量カットオフを備える０．５～３．０ｍＬの透析カセットへ移し、５００ｍＬのＰＢＳ（ｐＨ７．４）に対して４℃で一晩透析する。
５．透析緩衝液を次に５ｍＭのＥＤＴＡ／ＰＢＳへ変更し、さらに２時間にわたり透析する。透析プロセスをもう１回繰り返す。
６．各５００ｋＤａデキストラン分子内に組み込まれたスルフヒドリル基の総数は、Ｅｌｌｍａｎのアッセイによって決定する。
７．５０μＬのアリコートのスルフヒドリルを組み込んだデキストラン溶液を１ｍＬのエッペンドルフ試験管内で調製し、アリコートを凍結乾燥する。凍結乾燥アリコートは、保存のために－７０℃で保持する。
【０４４５】
《実施例１７：ＨＥＲ－２抗体－グルコースオキシダーゼ－デキストランコンジュゲートの調製》
この実施例では、細胞外ドメイン指向性ＨＥＲ－２抗体およびグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）をスルフヒドリル活性化５００ｋＤａデキストラン分子へ結合するための方法を記載する。ＨＥＲ－２抗体－ＧＯ－デキストランコンジュゲートは、本明細書に記載した単一検出および近接アッセイにおいて使用できる。
【０４４６】
用語の定義および頭字語：
１．スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－（６－アミドカプロエート）＝ＬＣ－ＳＭＣ
２．ジメチルスルホキシド＝ＤＭＳＯ
３．水酸化ナトリウム＝ＮａＯＨ
４．濃塩酸＝ＨＣｌ
５．リン酸緩衝食塩液＝ＰＢＳ
６．エチレンジアミン四酢酸＝ＥＤＴＡ
７．２－（エチル水銀メルカプト）安息香酸ナトリウム塩＝チメロサール
８．ＨＰＬＣ＝高速液体クロマトグラフィ
【０４４７】
器具類および装置：
１．ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社；Ｓｅｒｉｅｓ１１００）
２．サイズ排除クロマトグラフィカラム（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社；ＢｉｏＳｅｐ－ＳＥＣ－Ｓ３０００）
３．分光光度計（Ｈｉｔａｃｈｉ社；Ｕ－２００）
４．遠心分離器（Ｂｅｃｋｍａｎ社、ＧＳ－６Ｒ）
５．マグネチック・スターラー（Ｃｏｒｎｉｎｇ社、ＰＣ－４１０Ｄ）
６．ＥＬＩＳＡプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社、ＳｐｅｃｔｒａＭＡＸ１９０）
７．ボルテックス・ミキサー（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社；０２－２１５－３６５．）
８．脱塩カラム（Ｐｉｅｒｃｅ社、４３２３０）

９．Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ　ＹＭ－１０装置（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社、４２０５）
１０．１ｍＬピペット（Ｒａｉｎｉｎ社、Ｌ－１０００）
１１．２００μＬピペット（Ｒａｉｎｉｎ社、Ｌ－２００）
１２．２０μＬピペット（Ｒａｉｎｉｎ社、Ｌ－２０）
１３．２μＬピペット（Ｒａｉｎｉｎ社、Ｌ－２）
１４．マルチチャンネルピペット（Ｒａｉｎｉｎ社、Ｌ８－２００）

【０４４８】

試薬、化学薬品、および供給品：

１．ＰＢＳ中で１ｍｇ／ｍＬのマウス抗ヒトＨＥＲ－２モノクローナル抗体（ＬａｂＶｉｓｉｏｎ社；ＭＳ－３０１－ＰＡＢＸ）
２．透析されたグルコースオキシダーゼ（Ｐｒｏｍｅｔｈｅｕｓ社）
３．スルフヒドリル活性化デキストラン（Ｐｒｏｍｅｔｈｅｕｓ社）
４．ＬＣ－ＳＭＣＣ＝スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－（６－アミドカプロエート）（Ｆｉｓｈｅｒ社；２２３６２）
５．ＤＭＳＯ＝ジメチルスルホキシド（Ｓｉｇｍａ社；Ｄ２６５０）
６．ウシ血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ社；Ａ３２９４）
７．水酸化ナトリウム（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ｓ３１８）
８．濃塩酸（Ｆｉｓｈｅｒ社、Ａ１４４－５００）
９．ＰＢＳ＝リン酸緩衝食塩液（Ｃｅｌｌｇｒｏ社、２１－０４０－ＣＶ）
１０．０．５Ｍエチレンジアミン四酢酸溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、１７５８）
１１．チメロサール（Ｓｉｇｍａ社、Ｔ８７８４）

【０４４９】

緩衝液および溶液：

１．脱気５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．２）：２ｍＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液を２００ｍＬのＰＢＳへ加え、次にアルゴンガスを５分間にわたり生じた溶液中へ気泡させて溶液中の他の全部の気体を取り除く。
２．１０％　ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液：１００ｍｇのＢＳＡを１０ｍＬのＰＢＳ中に溶解させ、この溶液を０．２μｍフィルターに通して濾過する。この溶液を－２０℃の冷凍庫内に保管する。
３．１０％チメロサール／ＰＢＳ溶液：１００ｍｇのチメロサールを１０ｍＬのＰＢＳ中に溶解させ、この溶液を０．２μｍフィルターに通して濾過する。この溶液を－２０℃の冷凍庫内に保管する。
４．０．１ＭのＰＢ（リン酸緩衝液）（ｐＨ６．８）

【０４５０】

方法：

活性化反応において即時使用するためのＬＣ－ＳＭＣＣ溶液の調製：

１．－２０℃の冷凍庫からＬＣ－ＳＭＣＣのボトルを取り出し、それを室温に加温させる。
２．１．５ｍＬエッペンドルフ試験管内に１～２ｍｇのＬＣ－ＳＭＣＣおよび適正量のＤＭＳＯを計量して４．５ｍｇ／ｍＬ（１０ｍＭ　ＬＣ－ＳＭＣＣ）溶液を作成する。残ったＬＣ－ＳＭＣＣを冷凍庫内に戻して保管する。

ＨＥＲ－２抗体のＬＣ－ＳＭＣＣ活性化：

１．２．３μＬの１０ｍＭ　ＬＣ－ＳＭＣＣ溶液を、５００μｇの抗体を含有する０．５ｍＬのＨＥＲ－２抗体溶液に加え、反応を開始させるために直ちにボルテックスにかける。ボルテックス・ミキサーにかけた後、この混合液を室温で保持して３０分間にわたり反応を継続させる。
２．次に、５０ｍＬの脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液で洗浄することによって、脱塩カラムを前平衡させる。
３．ＬＣ－ＳＭＣＣを用いたＨＥＲ－２抗体の活性化後、活性化混合液を脱塩カラム上に装填し、カラムを室温で脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液で溶出させる。溶出

した溶液を０．５ｍＬ分画で収集し、分光光度計を用いて２８０ｎｍの紫外線吸光度により監視する。

４．紫外線吸光度に基づいて活性化抗体を含有する分画をプールし、次の反応のために氷上に保存する。

グルコースオキシダーゼのＬＣ－ＳＭＣＣ活性化：

１．４ｍｇの酵素を含有する０．１６ｍＬの透析したグルコースオキシダーゼを取り出し、脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液を用いてその容量を０．５ｍＬへ調整する。

２．１２．４μＬの１０ｍＭ　ＬＣ－ＳＭＣＣ溶液を０．５ｍＬのグルコースオキシダーゼ溶液に加え、反応を開始させるために直ちにボルテックスにかける。ボルテックス・ミキサーにかけた後、この混合液を室温で保持して３０分間にわたり反応を継続させる。

３．次に、５０ｍＬの脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液で洗浄することによって、脱塩カラムを前平衡させる。

４．ＬＣ－ＳＭＣＣを用いたグルコースオキシダーゼの活性化後、活性化混合液を脱塩カラム上に装填し、カラムを室温で脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液で溶出させる。溶出した溶液を０．５ｍＬ分画で収集し、分光光度計を用いて２８０ｎｍの紫外線吸光度によって監視する。

５．紫外線吸光度に基づいて活性化グルコースオキシダーゼを含有する分画をプールし、次の反応のために氷上に保存する。

活性化ＨＥＲ－２抗体および活性化グルコースオキシダーゼのスルフヒドリル活性化デキストランへの結合：

１．凍結乾燥したスルフヒドリル活性化デキストランの１ｍｇアリコートに５０μＬのＮａｎｏｐｕｒｅ水を加え、２０ｍｇ／ｍＬのスルフヒドリル活性化デキストランの溶液を作成する。

２．プールした活性化抗体溶液に３ｍｇのグルコースオキシダーゼに対応するある容量の結合活性化グルコースオキシダーゼ溶液を加え、これに３４．３μＬのスルフヒドリル修飾デキストラン溶液を加えると２：１２：１のような抗体：グルコースオキシダーゼ：デキストランの適切なモル比が得られる。ボルテックス・ミキサーにかけた後、この混合液を４℃で一晩保管する。

３．修飾デキストラン上に残っている過剰なスルフヒドリル基は、脱気した０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液中の５６．４μＬの１ｍｇ／ｍＬのＮ－エチルマレイミドを加えることによって遮断し、遮断反応を４℃で３時間継続した。

ＨＥＲ－２抗体－グルコースオキシダーゼ－デキストランコンジュゲートの精製：

１．遮断反応後、ＨＥＲ－２抗体－グルコースオキシダーゼ－デキストランコンジュゲート溶液は、１０，０００分子量カットオフＹＭ－１０膜を装備したＣｅｎｔｒｉｃｏｎ装置内で約３００μＬへ濃縮する。

２．この濃縮液は１．５ｍＬのエッペンドルフ試験管内へ移し、この試験管を１６，０００ｇで３分間回転させて小量の沈降物を取り除く。

３．上清をＨＰＬＣサンプルバイアルへ移し、溶液の量は、ＨＰＬＣによる精製のために脱気した５ｍＭ　ＥＤＴＡ／ＰＢＳ緩衝液を用いて３２０μＬへ調整した。

４．１００μＬのコンジュゲート溶液をＡｇｉｌｅｎｔ　ＨＰＬＣシステム内のＢｉｏＳｅｐ－ＳＥ－Ｓ３００サイズ排除カラム上に注入し、４０分間にわたり０．５ｍＬ／分の流量で０．１Ｍ　ＰＢ（ｐＨ６．８）を備える溶出によって結合されたタンパク質を分離し、溶出した溶液は２８０ｎｍの紫外線吸光度によって監視する。

５．溶出分画からの最初の紫外線吸光ピークをプールし、氷上に保存する。

６．残っている２００μＬのコンジュゲート溶液をさらに同様に精製し、３回のＨＰＬＣランからの第１紫外線吸光ピークの全部をまとめてプールする。プールしたコンジュゲート溶液は１０％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液を用いて０．１％　ＢＳＡへ、そして－７０℃で長期保存するためには１０％チメロサール／ＰＢＳを用いて０．０２％チメロサールへ調整する。

７．ＨＥＲ－２抗体－グルコースオキシダーゼ－デキストランコンジュゲート中に存在するグルコースオキシダーゼ酵素活性は、グルコースオキシダーゼ機能的アッセイによって決定する。

８．ＨＥＲ－２抗体－グルコースオキシダーゼ－デキストランコンジュゲート中に存在する抗体活性は、競合的ＥＬＩＳＡアッセイによって決定する。

【０４５１】

《実施例１８：循環腫瘍細胞中のＥｒｂＢファミリー受容体チロシンキナーゼの活性化を検出するための新規な多重アッセイ》

概要：

腫瘍組織の連続サンプリング上のキナーゼおよび他のシグナル伝達経路分子についての発現／活性化プロファイリングは、時間および療法の関数としての腫瘍細胞内で発生する変化に関する重要な情報を提供する。腫瘍進行についてのこの時間的プロファイリングは、臨床医が各患者において迅速に発達する癌シグニチャーを監視することを可能にする。この実施例は、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）のＥｒｂＢファミリーの発現レベルおよびリン酸化度を検出するための新規で強固なアッセイを例示しており、単細胞レベル感受性を備えるそのような療法誘導診断システムを使用することの利点を証明する。本アッセイは一般に、例えば細針吸引液（ＦＮＡ）および血液などのサンプルに依存しており、そのようなサンプルから得られた限定された量の癌細胞を調べる（interrogate）ための高い感受性および特異性を達成する。

【０４５２】

はじめに：

癌の発病および進行は、シグナル伝達経路の受容体およびその他の成分の異常調節された発現および活性化と結び付けることができる。ＨＥＲ－１およびＨＥＲ－２の異常な活性化は、様々なタイプの癌の進行と結び付けられてきた。ＨＥＲ－１およびＨＥＲ－２リン酸化パターンをプロファイリングするための方法は、全疾患病因への貴重な洞察を提供することができるので、このため重要な疾患誘発分子を同定することによってより優れた療法選択を導く。本明細書に記載したアッセイは、（２）三重抗体－酵素チャネリングシグナル増幅プロセスと結合した、（１）多重タンパク質マイクロアレイプラットフォームに基づいている。このマイクロアレイプラットフォームは、多重マーカーに適用するために必要とされる拡張性ならびに商業的開発のために必要とされるスケーラビリティを提供する。本明細書に記載したアッセイの固有かつ新規な設計は、特異性を保持しながら超高感受性を付与する三重抗体－酵素アプローチによって提供される。このアッセイがリン酸化される、このために活性化される標的を検出および定量するために使用される実施形態では、本アッセイは下記の通りに実施できる：

１．選択された標的は、マイクロアレイ表面上で連続希釈でプリントされた標的特異的抗体によって捕捉される。図１９は、結合した各標的タンパク質毎のその後のチャネリング事象のためには酵素と連結した２つの追加の検出抗体の共局在化に依存する、本発明のアッセイの１つの実施形態を例示している。

２．図１９に示した実施形態では、捕捉抗体による初期標的結合および捕捉された標的分子上で代替エピトープを認識するグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）結合抗体の二次結合によって形成される免疫複合体は、グルコースなどのＧＯ基質の存在下においてH_2O_2を生成する。ＧＯは、10^5／分の代謝回転数（ＴＯＮ）を備える公知の最速酵素の１つである。

３．図１９に示した実施形態では、H_2O_2の標的特異的局所流入は、次に捕捉された標的上のリン酸化部位へ結合する西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ、10^4／分のＴＯＮを備える）へ結合したリン－ペプチド特異的抗体によって利用され、それにより標的特異的シグナルが増幅させられる。リン酸化標的を検出するための特異性は、３種のタイプの抗体の同時結合のための要件を前提にすると、協調的免疫検出および増幅プロセスを通して大きく増加させられる。

【０４５３】

約２～３×１０^{4}回という少ないリン酸化事象の検出および定量は、その検出を単細胞レベルにさせる本明細書に記載したアッセイによってルーチン的に達成される。この協調的なイムノアッセイの構成は、タンパク質相互作用および活性化状態を調査するためにさらに適用することができる。

【０４５４】

方法：

組織培養：ＳＫＢＲ３、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、Ｔ４７Ｄ、およびＢＴ４７４細胞系は、ＡＴＣＣから入手した。細胞は、５％ CO_2中の３７℃にある１００ｍｍ組織培養皿内の下記の増殖培地中で増殖させた：ＳＫＢＲ３－１０％ ＦＢＳを含むマッコイ（ＭａｃＣｏｙ）５Ａ培地；ＭＤＡ－ＭＢ－４６８－ＤＭＥＭ、１０％ ＦＢＳ；ＢＴ４７４－ＤＭＥＭ、１０％ ＦＢＳ；Ｔ４７Ｄ－ＲＰＭＩ １６４０、１０％ ＦＢＳ、０．２Ｕ／ｍＬのウシインスリン。細胞は、緩徐な分離プロセス（トリプシン処理＋その後の不活性化）を用いて７０～８０％のコンフルエンシーで採取し、引き続いて計数し、１×ＰＢＳで洗浄した。細胞の刺激は、１００μＭのＥＧＦもしくは２０μＭのヘレグリンβまたはその両方を用いて血清無含有増殖培地中で５分間にわたり実施した。その後、刺激し細胞は１×ＰＢＳで洗浄し、次に溶解させ、氷上で３０分間にわたり保持した。

【０４５５】

スライドプリンティング：捕捉抗体は、洗剤を含む１×ＰＢＳ中に希釈させた。接触マイクロアレイプリンター（Ｇｅｎｅｔｉｘ社）を利用して、１６パッド・ニトロセルロースＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ社）上でプリントした。スポットの径は約１７５μｍであり、プリントしたスライドは４℃の乾燥チャンバー内に保持した。

【０４５６】

多重近接アッセイ：スライドは１時間にわたり遮断緩衝液とインキュベートし、次にＴＢＳＴ緩衝液を用いて３回洗浄した。次に細胞溶解物を室温（ＲＴ）で一晩インキュベーションするために各パッド上に加えた。一次結合の完了後、溶解物を吸引し、次に各パッドをＴＢＳＴで数回洗浄した。次に、二次検出抗体（ＧＯもしくはＨＲＰと結合した）を室温で２時間にわたり各パッドに加えた。未結合二次検出抗体はＴＢＳＴを用いた洗浄によって除去し、グルコースおよびチオチン化チラミドを含有するシグナル増幅緩衝液を１５分間にわたり各パッドに加えた。過剰なビオチン化チラミドを除去した後、シグナル検出のためにＡｌｅｘａ－６４７結合したストレプトアビジンを加えた。

【０４５７】

データの分析：定量はＰｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ ＳｃａｎＡｒｒａｙ Ｅｘｐｒｅｓｓソフトウエアを使用して実施し、得られたデータは局所的および包括的バックグラウンド強度について補正した。ＧｅｎｅＰｉｘＡｒｒａｙ Ｌｉｓｔ（ＧＡＬ）ファイルを使用して記述的名称および識別子情報を提供し、画像解析出力ファイル内に組み入れた。三重スポットからのシグナルを平均化し、パッド間変動性について補正するためにデータを標準化した。対応する相対蛍光単位（ＲＦＵ）値について細胞等価量を定量するために非線形回帰モデルを使用した。このデータは、標準曲線を精製するために５パラメータＨｉｌｌ方程式へ当てはめた。各曲線を公知のコントロールに対して妥当性確認した。細胞の公知の数は、未知サンプルの強度での最高傾斜を備える曲線に対応する、適切な希釈について予測された。

【０４５８】

ウエスタンブロット：各細胞系について大まかに同等数の細胞溶解物を入手した後、それらを使い捨てバイアル内へ等分した。タンパク質濃度は、ビシンコニン酸（ＢＣＡ）タンパク質アッセイを用いて決定した。サンプルはβ－メルカプトエタノールを含有するサンプル緩衝液を用いて調製し、５分間にわたり沸騰させた後に室温へ冷却し、サンプルはプロテインラダーと一緒にＮｕＰａｇｅ ４～１２％ゲル上に装填した。電気泳動法の完了後、ゲル内の分離したタンパク質をニトロセルロース膜へ移した。この膜を洗浄し、５％の乳酒（ｍｉｌｋ ｂｌｏｔｔｏ）を用いて遮断し、最初に一次抗体、次に二次抗体とともにインキュベートし、その後にＮＢＴ／ＢＣＩＰを用いた検出プロセスを実施した。

【０４５９】

結果：

感受性：単細胞の感受性レベルでのＨＥＲ－１およびＨＥＲ－２の活性化および発現は、複数の細胞系（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、Ａ４３１、ＢＴ－４７４、およびＳＫＢｒ－３細胞系）において検出された。これらの細胞系は１細胞に付きそれらの細胞膜上で約１×１０^{6}の全ＲＴＫを発現するが、全ＲＴＫのサブセットだけがリン酸化され、そのようなリン酸化は経路活性化のために必要とされる。ＳＫＢＲ－３細胞は、その増幅に起因して特発性ＨＥＲ－２活性化を有し、このためにそれらは参照陽性コントロールを提供する。ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞はＨＥＲ－１リン酸化を誘導するためにはＥＧＦ（ＴＧＦ－α）を用いて刺激する必要があり、刺激前後のそれらのシグニチャーは、陰性および陽性コントロールとして使用できる。ＭＤＡ－ＭＢ－４６８は刺激前には境界的ＨＥＲ－１活性化を有するが、両方の細胞系はそれらの活性化されたＲＴＫの約２～５％でピークに達する（細胞１個当たり約０．５～１×１０^{5}回のリン酸化事象）。図２０は、本明細書に記載したアッセイフォーマットが単細胞感受性を備える１０^{5}回未満の活性化事象の検出を可能にする。

【０４６０】

特異性：本明細書に記載した協調的イムノアッセイフォーマットの分析特異性は、様々なＲＴＫレベルを備える複数の細胞系上で実施された比較試験に基づくと＞９９．９９％であった。使用した細胞系ならびにＥＧＦもしくはＨＲＧβ刺激後のそれらの優性ＥｒｂＢ発現およびＲＴＫ活性化は、図２１のウエスタンブロットで示した。極めて小量のＥｒｂＢ１を除いてＥｒｂＢ２およびＥｒｂＢ３の一部のレベルを発現する、Ｔ４７Ｄ細胞についてのＲＴＫ活性化プロファイルは、図２２に示した。ＥＣ２０（１２，０００ＲＦＵ）ｐＨＥＲ－１もしくはｐＨＥＲ－２を検出するために要求された細胞の数を使用して、表４３に示したように１細胞当たりのＲＴＫ活性化（ＲＦＵ／ｃｅｌｌ）を計算した。極めて小量のＨＥＲ－２を発現するＭＢ４６８細胞が使用された場合は、１反応パッドに付き約１，０００ｃｅｌｌｓを有することはＥＣ２０を達成するためには十分ではなく、他の細胞系におけるこのタイプの低もしくは非検出可能なシグナルは、表４３において「ＮＤ」と指示した。ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞は、ＥＧＦを用いて刺激した場合に約４，０００ＲＦＵ／ｃｅｌｌレベルのｐＨＥＲ－１を有するが、それでも検出可能なｐＨＥＲ－２を示さない。この協調的なイムノアッセイフォーマットは、単細胞以下レベル（１０^{4}～１０^{5}）の分子レベルアッセイ感受性を維持しながら、超高特異性を保証する。

【表４３】

	ErbB 発現の相対レベル			Per 細胞 RTK 活性化(RFU/cell)			
	ErbB1	ErbB2	ErbB3	EGF		HRG	
				pHER1	pHER2	PHER1	pHER2
MDA	10	---	2	4000	ND	4000	ND
MB 468 BT	---	10	3	96	1200	ND	1200
474 T47D	---	2	4	60	80	ND	165
SKBR3	3	10	2	360	1334	105	353

【０４６１】

結論：

本実施例では、希少循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を用いたその使用を可能にする感受性を備えるＥｒｂＢファミリー受容体メンバーのリン酸化状態を特異的に検出することが可能である新規なアッセイを例示する。ＣＴＣ中のＨＥＲ－１およびＨＥＲ－２活性化を同定することによって、このアッセイプラットフォームは、標的療法薬の初期選択のためだけではなく、療法の進行についてのその後の監視のためにもガイダンスを提供することができる。ＣＴＣの連続サンプリング上のキナーゼおよび他のシグナル伝達経路分子についての発現／活性化プロファイリングは、時間および療法の関数としての腫瘍細胞内で発生する変化に関する重要な情報を提供するであろう。この療法誘導診断アプローチは、図１８に示すように、疾患管理の様々な段階で差し込むことができる。本明細書に記載したアッセ

イフォーマットによって提供される腫瘍進行についてのこの時間的プロファイリングは、臨床医が各患者において迅速に発達する癌シグニチャーを監視することを可能にするであろう。その圧倒的な感受性および特異性のために、本実施例に記載したアッセイフォーマットは、希少ＣＴＣ中に存在するＥｒｂＢファミリー受容体メンバー内でのリン酸化事象を検出するために適用できる。したがってこの方法は、標的療法薬の初期選択のためだけではなく、療法の進行についてのその後の監視のためにもガイダンスを提供することができる。

【０４６２】

これらをまとめると、本明細書に記載した多重近接アッセイに基づく協調的なイムノアッセイフォーマットは、「個人的」癌プロファイル変化にしたがって癌専門医が各患者のための疾患治療選択肢を維持する、または調節する際に試験するために超高感受性および特異性で限定されたサンプルに関する貴重な臨床情報を提供する。

【０４６３】

《実施例１９：ＥｒｂＢファミリー受容体チロシンキナーゼの活性化を検出するための方法》

本出願は、単細胞レベル感受性でＥｒｂＢファミリー受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）におけるリン酸化事象を特異的に検出することのできる技術を提示する。所定の態様では、この多重タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、固有の「三重抗体－酵素チャネリング」免疫複合体の形成を利用する。１つの実施形態では、この複合体は、標的タンパク質が捕捉抗体に結合されると、対応するチャネリング酵素と結合した２つの検出抗体の共局在を必要とする。近接している２つの検出酵素であるグルコースオキシダーゼ（ＧＯ、抗ＲＴＫ抗体に結合している）および西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ、ＲＴＫ内の抗リン酸化部位に結合している）間のチャネリング事象は、超高感受性を備えるＲＴＫのプロファイリングを可能にした。この原理は、限定数の標的細胞：患者の全血（循環腫瘍細胞、ＣＴＣ）および細針吸引液（ＦＮＡ）サンプル中で見いだされる癌細胞を備える２つの乳癌モデル系に適用された。

【０４６４】

本明細書では、本発明者らはＣＴＣモデル系におけるＨＥＲ１およびＨＥＲ２の活性化（リン酸化）（ｐＨＥＲ１およびｐＨＥＲ２）の、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８およびＳＫＢｒ－３細胞系についての単細胞の感受性レベルでの検出に成功した例について報告した。「近接イムノアッセイ」フォーマットの分析特異性は、様々なＲＴＫレベルを備える複数の細胞系上で実施された比較試験に基づくと＞９９．９９％であった。さらに、本明細書には、ＦＮＡ（および転移性ＦＮＡ）サンプルを用いた潜在的適用を証明するために、様々なＥｒｂＢ－ＲＴＫ発現度を備える細胞系（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、およびＭＤＡ－ＭＢ－４３５）を用いて様々なタイプの乳癌についての異種移植モデルが提示されている。ＭＤ－ＭＢ－２３１異種移植片－ＦＮＡにおけるｐＨＥＲ２およびｐＨＥＲ１ならびにＭＤＡ－ＭＢ－４６８異種移植片から得られたＦＮＡ中の有意なｐＨＥＲ１の中等度のレベルを検出することは可能であったが、ＨＥＲ１またはＨＥＲ２活性化はＭＤＡ－ＭＢ－４３５異種移植片から得られたＦＮＡ中では検出されなかった。異種移植片－ＦＮＡモデル系からのこれらの所見は駆動細胞系プロファイルと一致しており、本方法が最小侵襲性方法から得られた任意のタイプのサンプル（例えば、ＣＴＣからＦＮＡまで）中でのＥｒｂＢ受容体の活性化を検出するために使用できることを証明している。

【０４６５】

本アッセイが限定量のサンプルを用いて標的ＲＴＫの活性化状態を監視する能力は、標的療法の成功は標的ＲＴＫのスイッチを切る（または脱リン酸化する）薬物の能力に依存するので，極めて有用である。さらに、この原理は入手可能な乳癌治療選択肢間でより優れた療法選択および効果的疾患監視のために他のシグナル伝達経路分子を調査するために適用できる。再発性乳癌においては疾患プロファイルが変化することが多いので、この固有のアッセイフォーマットを利用すると、「個人的」癌プロファイル変化にしたがって各

患者について癌専門医が疾患治療選択肢を調整する際に役立つように「発達中の疾患」から得られた限定されたサンプルに関する貴重な臨床情報を提供することができる。

【０４６６】

《実施例２０：近接媒介性マイクロアレイイムノアッセイを用いて循環腫瘍細胞中の受容体チロシンキナーゼの活性化を検出する方法》

背景：ＨＥＲ１およびＨＥＲ２の異常な活性化は様々なタイプの癌進行と結び付けられており、原発腫瘍と循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）との間の発現状態における変化は有意な頻度で発生すると報告されてきた。連続的に収集されたＣＴＣにおけるＨＥＲ１およびＨＥＲ２リン酸化を検出するための方法は、全疾患プロファイル変化に関する貴重な洞察を提供することができ、このためより良好な療法選択／調整を導くことができる。

【０４６７】

方法：三重抗体－酵素チャネリング多重タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、標的分子のリン酸化を検出するために開発されてきた。この多重タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、標的タンパク質がマイクロアレイ表面上に捕捉されると２つの検出酵素－結合抗体の共局在によって固有の免疫複合体形成を利用する。近接する２つの検出酵素間のチャネリング事象は、単細胞レベル感受性を用いて受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）のプロファイリングを可能にする。リン酸化標的を検出するための特異性は、３種のタイプの抗体の同時結合のための要件を前提にすると、大きく増加する。臨床サンプルに関して本方法の妥当性を確認するために、様々な療法レジメン上の癌患者７５例由来の活性化ＣＴＣについて実施した。

【０４６８】

結果：本発明者らは、ＣＴＣ中において活性化ＨＥＲ１を備える患者６例（８％）、活性化ＨＥＲ２を備える患者６例、二重ＲＴＫ活性化を備える患者１４例（１８．５％）を同定した。２５例の正常サンプルは、検出可能なＨＥＲ１／ＨＥＲ２活性化を示さなかった。本発明者らは、ＣＴＣ間のＨＥＲ２活性化状態間と乳癌癌患者間の対応する一次ＨＥＲ２－ＩＨＣ状態との間の不一致も観察した。活性化ＨＥＲ２を備えるＣＴＣは、ＨＥＲ２陰性原発性乳癌１６例中６例（３８％）において見いだされた。さらに５例中２例（４０％）のＨＥＲ２陽性患者は、明白なＨＥＲ２活性化を伴わないＣＴＣを有していた。

【０４６９】

結論：多重近接媒介性プラットフォームは、有利にも限定された量のサンプル中でＲＴＫの活性化を検出するための単細胞レベル感受性を提供する。したがって、転移期の癌において見出されるＣＴＣは、臨床実践に影響を及ぼすための貴重な情報を提供するために入手してプロファイリングすることができる。

【０４７０】

《実施例２１：近接媒介性マイクロアレイイムノアッセイを用いて転移病巣上の受容体チロシンキナーゼの活性化を検出する方法》

背景：原発部位と転移病巣間の腫瘍受容体の発現状態における変化は、有意な頻度（約１５～２０％）で発生することが公知である。結果として、転移性腫瘍上の受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）活性化パターンをプロファイリングする方法は、変化する疾患病因に関する貴重な洞察を提供することができる。

【０４７１】

方法：ＥｒｂＢファミリーＲＴＫにおけるリン酸化事象を特異的に検出することのできる新規な技術が開発されてきた。この多重タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、標的タンパク質がマイクロアレイ表面上に捕捉されると、２つの検出酵素－結合抗体の共局在を必要とする固有の免疫複合体の形成を利用する。近接している２つの検出酵素（例えば、グルコースオキシダーゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ）間のチャネリング事象は、高度の感受性でＲＴＫのプロファイリングを可能にする。実際に、分析特異性は、３種の異なる抗体の同時結合についての要件を前提として大きく強化される。本発明者らは、転移性細針吸引液（ｍＲＮＡ）ＲＴＫプロファイリングのためのモデル系として２９片の凍結乳癌組織（病期ＩＩ～ＩＶ期）を使用した。

【０４７２】

結果：Ｇ２３ゲージ針を使用して収集した腫瘍組織サンプルを１００μＬの溶解緩衝液中に溶解させ、可溶性サンプル（約１００～２００μｇのタンパク質）をＲＴＫ活性化状態について分析した。２９例のＦＮＡサンプル中、２７％（８／２９例）は高度に活性化されたＨＥＲ２を示し、サンプル２例（６％）は中間レベルの活性化ＨＥＲ２を示した。中間ＨＥＲ２活性化を備えるサンプルの１つは、さらにまた中間レベルのＨＥＲ１活性化も示した。８例のＨＥＲ２活性化サンプル中２例は、さらにまた有意なレベルのＨＥＲ１活性化も示した。１９例の活性化されたＨＥＲ２陰性サンプル中、３例は中レベルのＨＥＲ１活性化を示した。

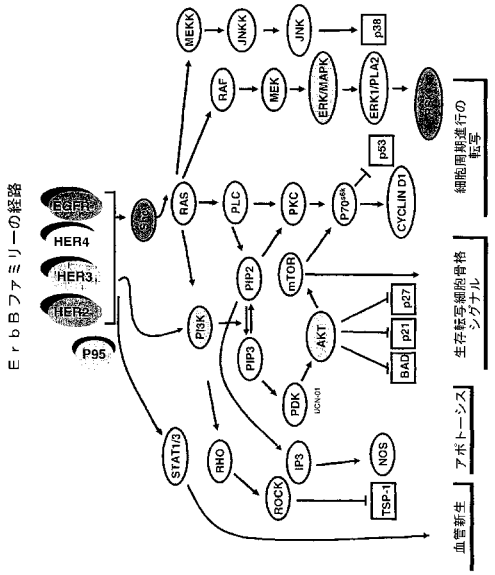
【０４７３】

結論：多重近接媒介性プラットフォームは、有利にも限定された量のｍＦＮＡ組織サンプル中でＲＴＫの活性化を検出するための標的リン酸化事象の単細胞レベル感受性を提供する。このため様々な転移部位で腫瘍をプロファイリングする能力は、それらの示差的転移能に関する貴重な情報を提供する。したがって、最小侵襲性の単一継代ｍＦＮＡサンプルを利用すると、疾患プロファイルが変化するにつれて療法選択肢を調整することができる。

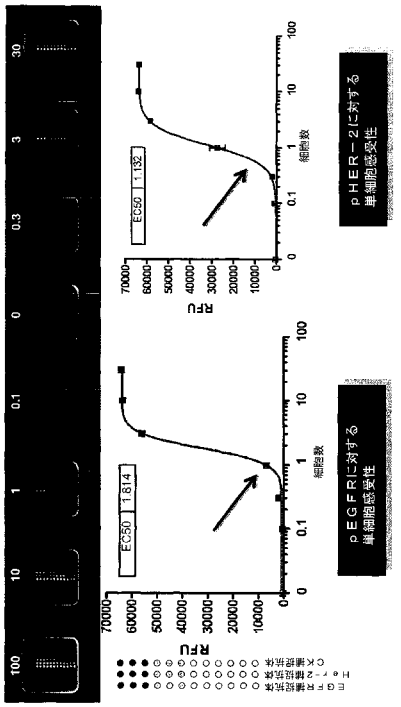
【０４７４】

本明細書に言及した全刊行物および特許出願は、各個別刊行物または特許出願が特別および個別に参照して本明細書に組み込まれると指示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。上記の本発明は明確に理解できるように例示および実施例によってある程度詳細に記載してきたが、当業者には、本発明の教示に照らせば、添付の特許請求項の精神または範囲から逸脱せずに所定の変更および修飾を加えられることは容易に明白になるであろう。

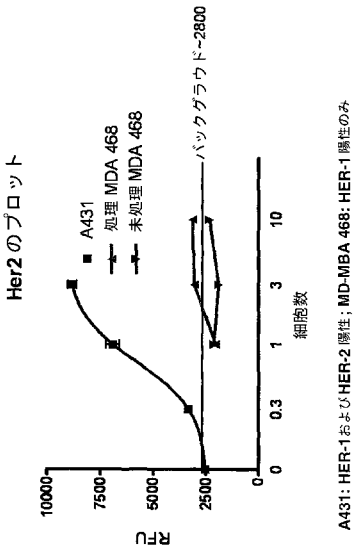
【図１】



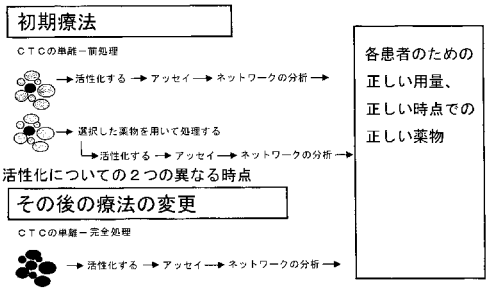
【図２】



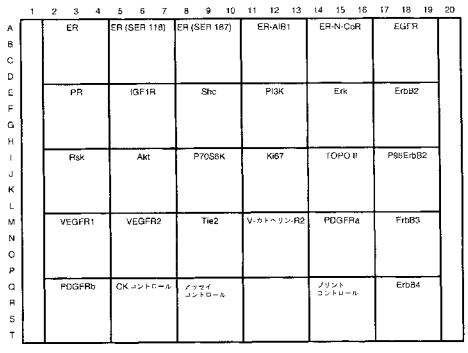
【図３】


Her2のプロット
A431
処理 MDA 468
未処理 MDA 468
バックグラウド~2800
RFU
10000
7500
5000
2500
0
0.3
1
3
10
細胞数
A431: HER-1およびHER-2陽性; MD-MBA 468: HER-1陽性のみ

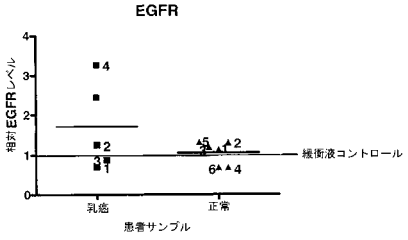
【図４】


初期療法
ＣＴＣの単離－前処理
活性化する
アッセイ
ネットワークの分析
選択した薬物を用いて処理する
活性化する
アッセイ
ネットワークの分析
活性化についての２つの異なる時点
その後の療法の変更
ＣＴＣの単離－完全処理
活性化する
アッセイ
ネットワークの分析
各患者のための
正しい用量、
正しい時点での
正しい薬物

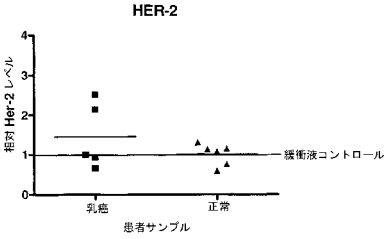
【図９】


ER
ER (SER 118)
ER (SER 167)
ER-AIB1
ER-N-CoR
EGFR
PR
IGF1R
Shc
PI3K
Erk
ErbB2
Rsk
Akt
P70S6K
Ki67
TOPO II
P85ErbB2
VEGFR1
VEGFR2
Tie2
V-カドヘリン-R2
PDGFRa
ErbB3
PDGFRb
CK コントロール
インサイ コントロール
ノリント コントロール
ErbB4

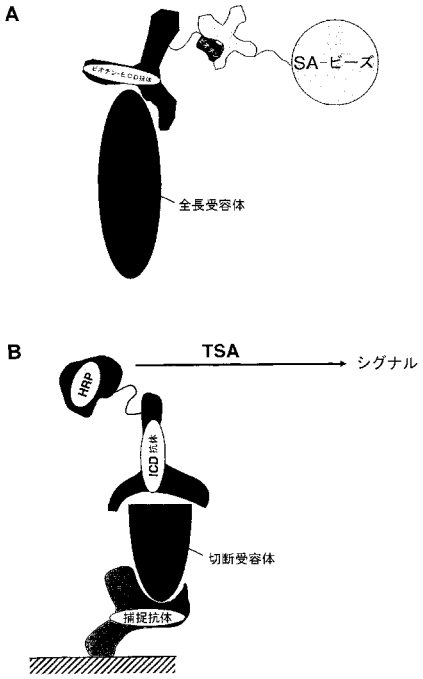
【図１０】


EGFR
相対EGFRレベル
緩衝液コントロール
乳癌
正常
患者サンプル

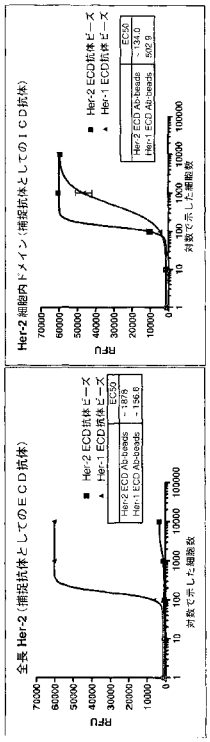
【図１１】



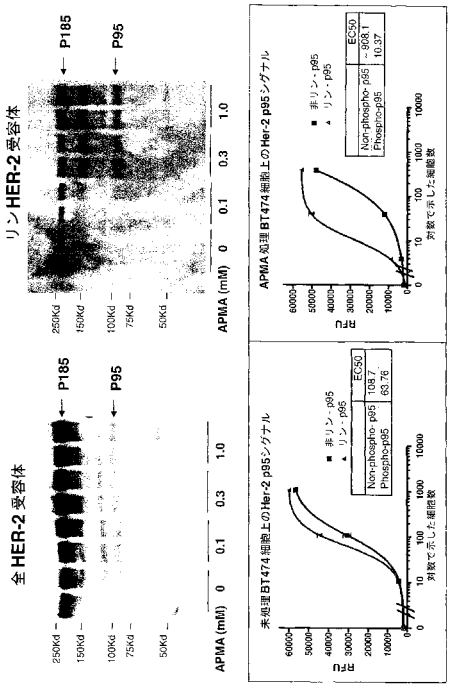
【図１４】



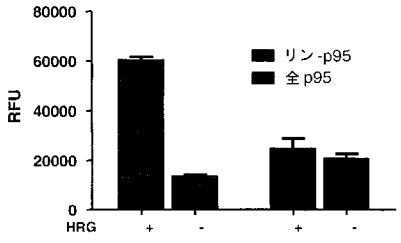
【図１５】



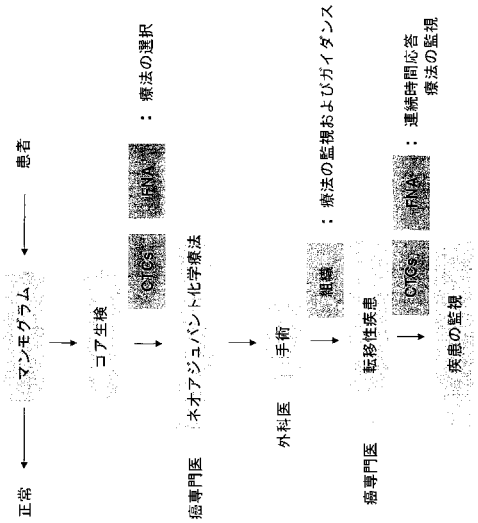
【図１６】



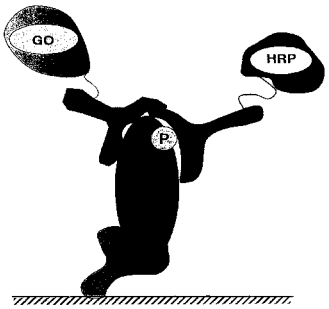
【図１７】



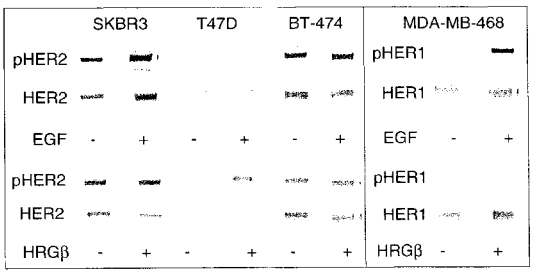
【図１８】



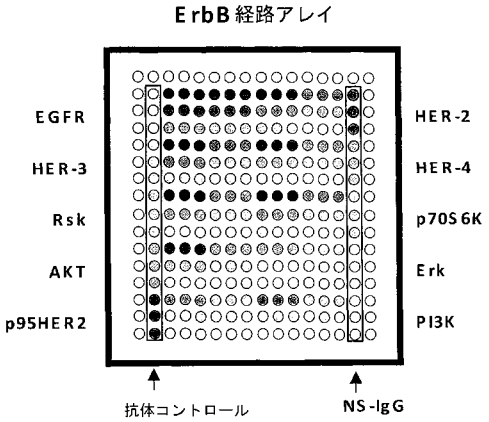
【図１９】



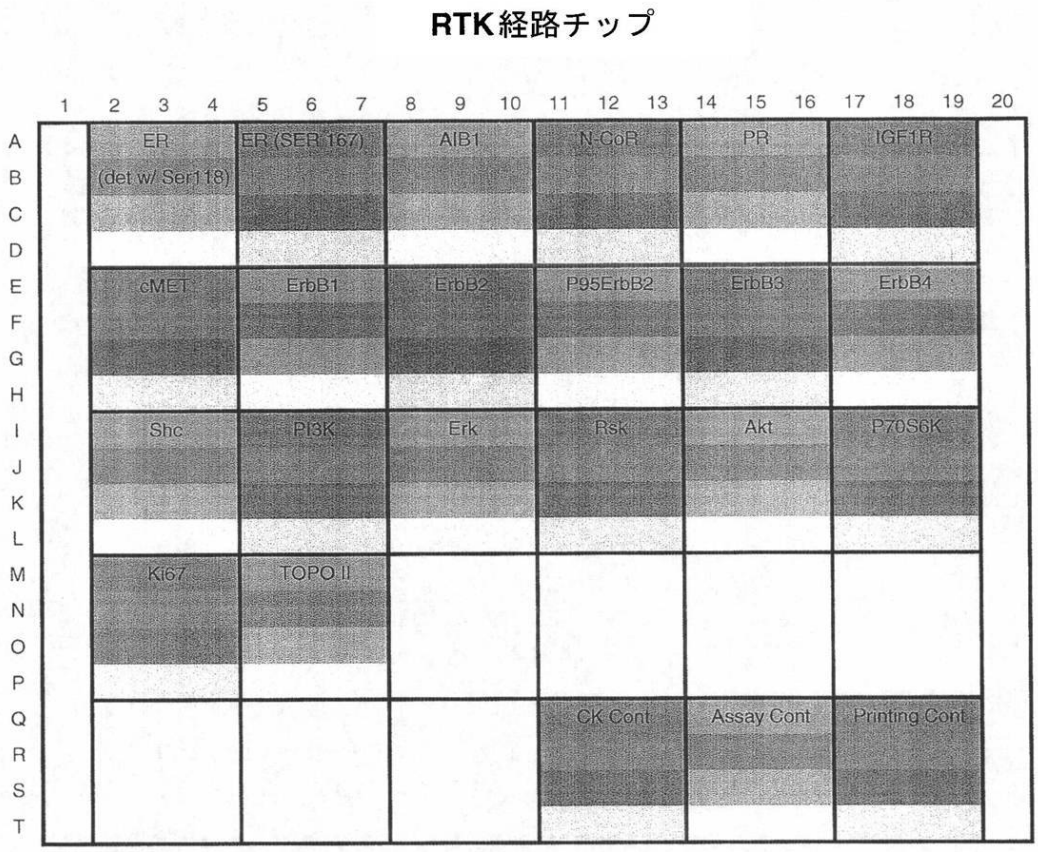
【図２１】



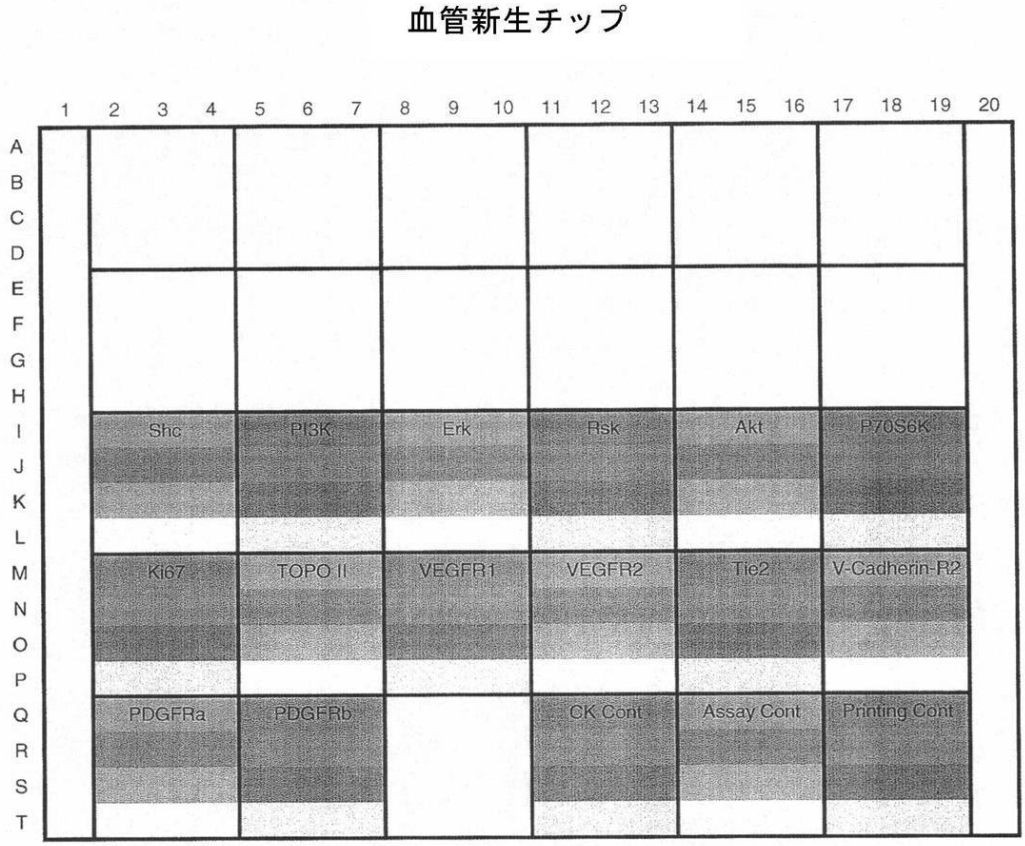
【図２３】


ErbB経路アレイ
EGFR
HER-3
Rsk
AKT
p95HER2
HER-2
HER-4
p70S6K
Erk
PI3K
抗体コントロール
NS-IgG

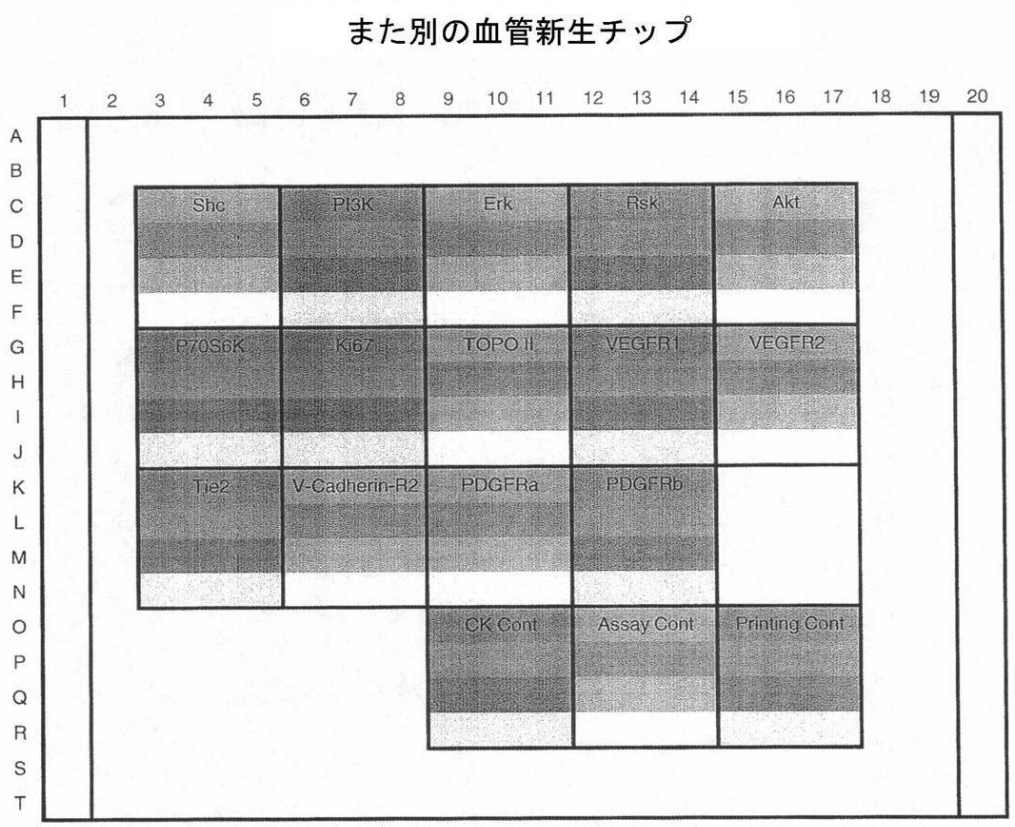
【図５】


RTK経路チップ
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
ER (det w/ Ser118)
ER (SER 167)
AIB1
N-CoR
PR
IGF1R
cMET
ErbB1
ErbB2
P95ErbB2
ErbB3
ErbB4
Shc
PI3K
Erk
Rsk
Akt
P70S6K
Ki67
TOPO II
CK Cont
Assay Cont
Printing Cont

【図６】

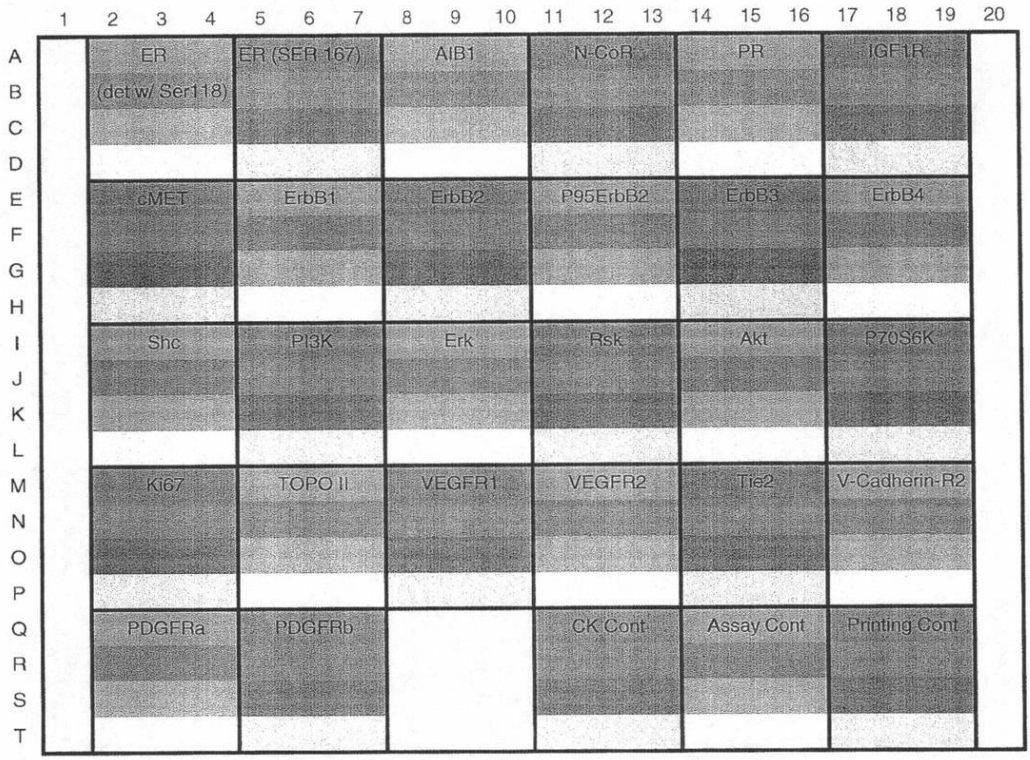

血管新生チップ
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
Shc
PI3K
Erk
Rsk
Akt
P70S6K
Ki67
TOPO II
VEGFR1
VEGFR2
Tie2
V-Cadherin-R2
PDGFRa
PDGFRb
CK Cont
Assay Cont
Printing Cont

【図７】

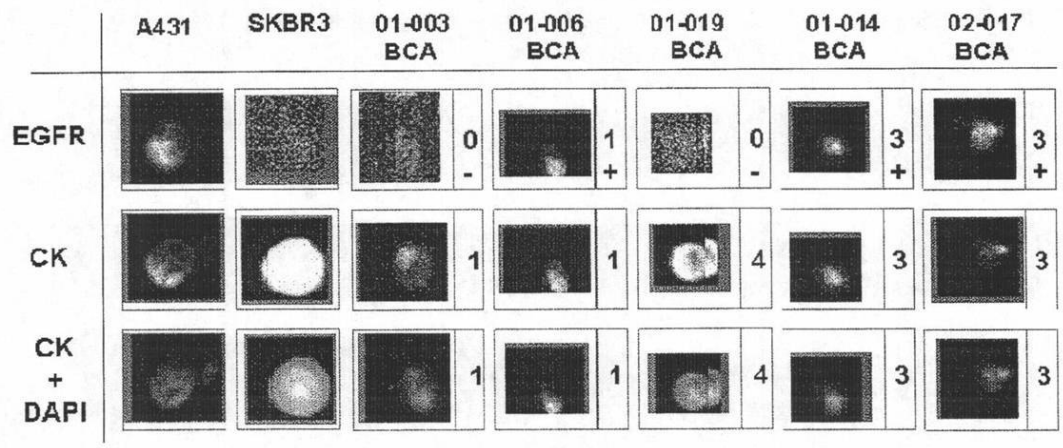

また別の血管新生チップ
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
Shc
PI3K
Erk
Rsk
Akt
P70S6K
Ki67
TOPO II
VEGFR1
VEGFR2
Tie2
V-Cadherin-R2
PDGFRa
PDGFRb
CK Cont
Assay Cont
Printing Cont

【図８】

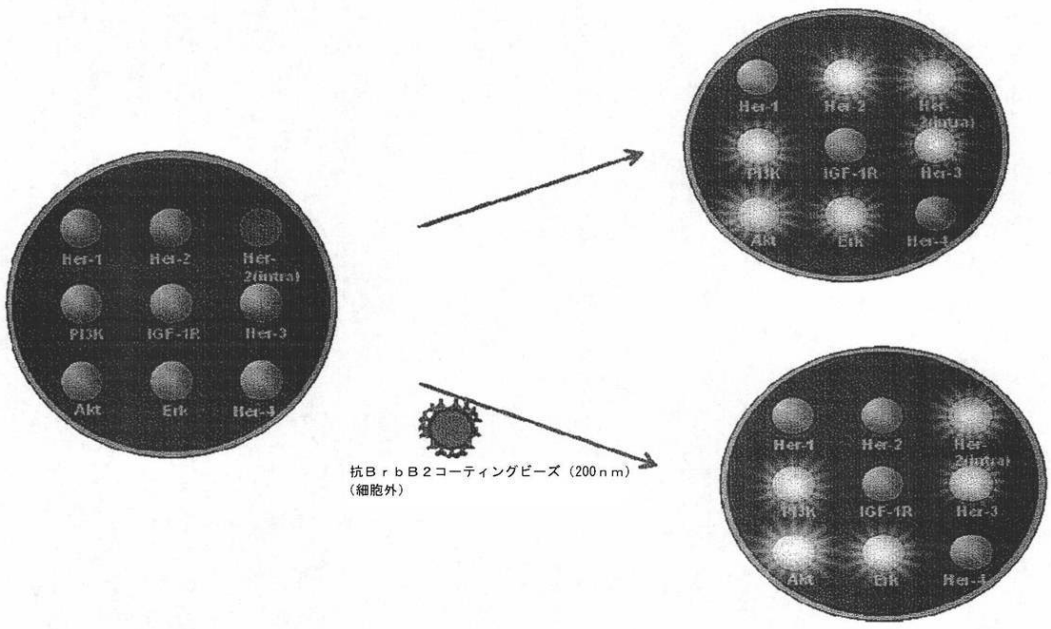
結合チップ


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
ER (det w/ Ser118)
ER (SER 167)
AIB1
N-CoR
PR
IGF1R
cMET
ErbB1
ErbB2
P95ErbB2
ErbB3
ErbB4
Shc
PI3K
Erk
Rsk
Akt
P70S6K
Ki67
TOPO II
VEGFR1
VEGFR2
Tie2
V-Cadherin-R2
PDGFRa
PDGFRb
CK Cont
Assay Cont
Printing Cont

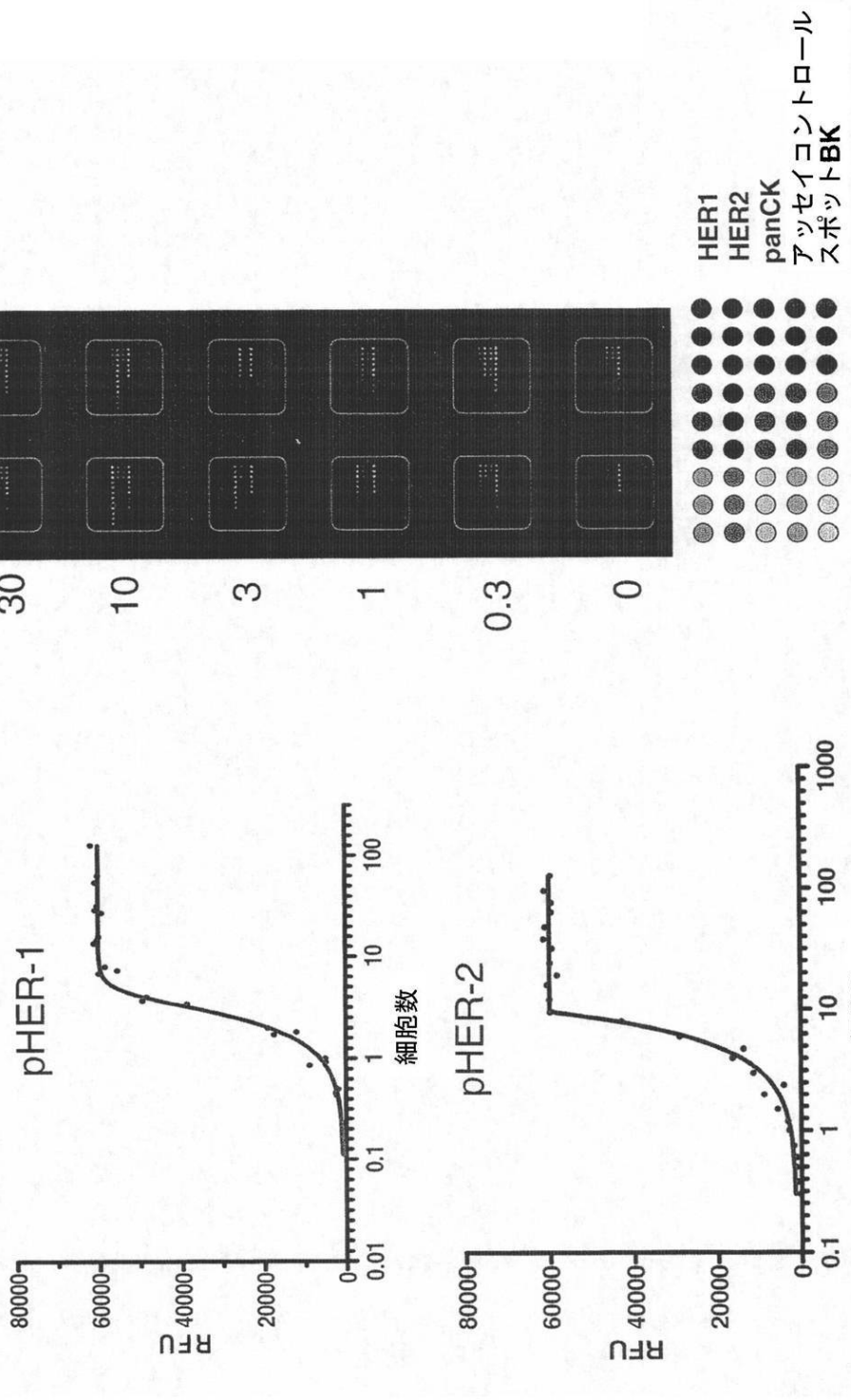
【図１２】


A431
SKBR3
01-003 BCA
01-006 BCA
01-019 BCA
01-014 BCA
02-017 BCA
EGFR
CK
CK + DAPI
0 -
1 +
0 -
3 +
3 +
1
1
4
3
3
1
1
4
3
3

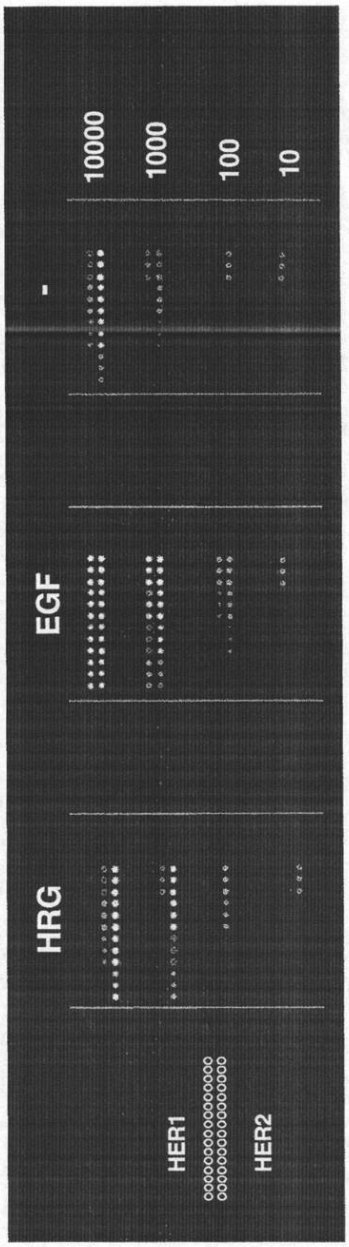
【図１３】


Her-1
Her-2
Her-2(intra)
PI3K
IGF-1R
Her-3
Akt
Erk
Her-4
抗ＢｒｂＢ２コーティングビーズ（200ｎｍ）
（細胞外）

【図２０】


MB468
SKBR3
30
10
3
1
0.3
0
HER1
HER2
panCK
アッセイコントロール
スポットBK
pHER-1
RFU
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
細胞数
pHER-2
RFU
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
細胞数

【図２２】



【手続補正書】

【提出日】平成25年5月14日(2013.5.14)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
切断受容体の存在を検出するための方法であって：
（ａ）細胞抽出物を全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な複数のビーズとインキュベートする工程と；
（ｂ）前記複数のビーズを前記細胞抽出物から取り除き、それによって前記全長受容体を含まない細胞抽出物を形成するために前記全長受容体を取り除く工程と；
（ｃ）前記全長受容体を含まない前記細胞抽出物を複数の捕捉抗体とインキュベートする工程であって、前記複数の捕捉抗体は前記切断受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に対して特異的であり、前記複数の捕捉抗体は複数の捕捉された切断受容体を形成するために固体支持体上に固定される工程と；
（ｄ）複数の検出可能な捕捉された切断受容体を形成するために、前記複数の捕捉された切断受容体を前記対応する切断受容体に対して特異的である検出抗体とインキュベートする工程と；
（ｅ）増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体をシグナル増幅対の第１および第２メンバーとインキュベートする工程と；
（ｆ）前記シグナル増幅対の第１および第２メンバーから生成された前記増幅シグナルを検出する工程と、を含む方法。
【請求項２】
前記対応する切断受容体に対して特異的である検出抗体が、複数の活性化状態非依存性抗体及び複数の活性化状態依存性抗体を含み、
前記活性化状態非依存性抗体は促進成分で標識され、前記活性化状態依存性抗体はシグナル増幅対の第１メンバーで標識され、前記促進成分は前記シグナル増幅対の第１メンバーにチャネリングして反応する酸化剤を生成し、
工程（ｅ）において、増幅シグナルを生成するために、前記複数の検出可能な捕捉切断受容体をシグナル増幅対の第２メンバーとインキュベートする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記切断受容体は、ｐ９５ＥｒｂＢ２である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記全長受容体は、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ－２）である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項５】
細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に対して特異的な前記複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチン対を含み、前記ストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項６】
前記抗体は、前記全長受容体の前記ＥＣＤ結合領域に対して特異的である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記細胞抽出物は、乳房腫瘍の循環細胞を溶解させる工程又は腫瘍組織から単離した細胞を溶解させる工程によって生成される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項８】
前記腫瘍組織は、原発性腫瘍組織または転移性腫瘍組織である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】

前記細胞は、細針吸引液サンプルとして腫瘍組織から単離される、請求項７に記載の方法。

【請求項１０】

前記複数の検出可能な捕捉された切断受容体の活性化状態が調べられる（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｅｄ）、請求項１に記載の方法。

【請求項１１】

前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、複合体形成状態、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

前記促進成分は、グルコースオキシダーゼである、請求項２に記載の方法。

【請求項１３】

前記グルコースオキシダーゼおよび前記活性化状態非依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子へ結合される、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、５００ｋＤａの分子量を有する、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

固体支持体上に固定された複数の希釈系列の捕捉抗体を含む優れたダイナミックレンジを有するアレイであって、各希釈系列中の捕捉抗体は細胞抽出物中のシグナル伝達経路の成分に対応する１つ以上の分析物に対して特異的である、アレイ。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｍ　1/34　(2006.01)	Ｃ１２Ｑ　1/54	
	Ｃ１２Ｍ　1/34　Ｆ	

(31)優先権主張番号　61/117,908
(32)優先日　平成20年11月25日(2008.11.25)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/140,558
(32)優先日　平成20年12月23日(2008.12.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(72)発明者　シン　シャラット
アメリカ合衆国，９２１２７　カリフォルニア州，ランチョ　サンタフェ，トップ　オブ　ザ　モーニング　ウェイ　８１７１
(72)発明者　ハーヴェイ　ジャンヌ
アメリカ合衆国，９４５５０　カリフォルニア州，リヴァーモア，アロヨ　ロード　１５５４
(72)発明者　キム　フィリップ
アメリカ合衆国，９２６１２　カリフォルニア州，アーヴァイン，エクセター　２８
(72)発明者　リュウ　シンジュン
アメリカ合衆国，９２１３０　カリフォルニア州，サン　ディエゴ，カミニート　ディエゴ　１２８９０
(72)発明者　リュウ　リミン
アメリカ合衆国，９２１３０　カリフォルニア州，サン　ディエゴ，キビングス　ロード　１３２８０
(72)発明者　バーラム　ロバート
アメリカ合衆国，９２０７８　カリフォルニア州，サン　マルコス，メドウラーク　ランチ　サークル　２０８１
(72)発明者　ネリ　ブルース
アメリカ合衆国，９２００８　カリフォルニア州，カールスバッド，キャリロ　ウェイ　２８２０

Ｆターム(参考)　4B029 AA07 BB11 BB17 CC10 FA04 FA12
4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ23 QQ79 QR03 QR48 QR72 QR77 QS02
QS33 QS39 QX01

【外国語明細書】
2013174616000001.pdf

专利名称(译)	基于抗体阵列的乳腺癌治疗药物选择		
公开(公告)号	JP2013174616A	公开(公告)日	2013-09-05
申请号	JP2013102165	申请日	2013-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
[标]发明人	シンシャラット ハーヴェイジャンヌ キムフィリップ リュウシンジュン リュウリミン バーラムロバート ネリブルース		
发明人	シン シャラット ハーヴェイ ジャンヌ キム フィリップ リュウ シンジュン リュウ リミン バーラム ロバート ネリ ブルース		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 C12Q1/26 C12Q1/54 C12M1/34		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/53.U G01N33/543.501.D C12Q1/26 C12Q1/54 C12M1/34.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/CC10 4B029/FA04 4B029/FA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ23 4B063/QQ79 4B063/QR03 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	长谷川良树 黑川智也 清水义 池田 成人		
优先权	61/031319 2008-02-25 US 61/106404 2008-10-17 US 61/108384 2008-10-24 US 61/117908 2008-11-25 US 61/140558 2008-12-23 US		
其他公开文献	JP5852047B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测肿瘤细胞中信号转导途径的组分的活化状态的组合物和方法。关于源自使用本发明的信号转导途径的组分的活化状态的信息可用于癌症诊断，预后和癌症治疗的设计。

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	HER-4 (ErbB4)標的
セツキシマブ パニツムマブ マツズマブ ニモツズマブ ErbB1 ワクチン	トラスツズマブ (Herceptin(登録商標)) パーツズマブ(DNA) BMS-599626*	抗体(U3)	
	*ヘテロ二量体化 HER-1/2;第 1 相		

EGFR (ErbB1) (B)	HER-2 (ErbB2) (D)	ErbB1/2 (F)	ErbB1/2/4 (G)
エルロチニブ ゲフィチニブ EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer 社)	ラパチニブ(Tykerb(登録商標)) HKI-272* HKI-357 (前臨床試験) BIBW 2992**	カネルチニブ* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth 社、不可逆性、II CRC) **(Wyeth 社、 不可逆性、前臨床試験)		*Wyeth 社、不可逆性、I/II NSCLC、乳癌 ** Boehringer Ingelheim 社、不可逆性、前立腺癌 I/II 期、膵臓癌、乳癌	*Pfizer 社、不可逆性、II NSCLC、乳癌

Raf (H)	SRC (H)	Mek:(I)	NFkB-IkB (I)
ソラフェニブ PLX4032 (Plexxikon 社)	AZ	PD-325901 (II:NSCLC) AZD6244 - Array/Az XL518 Exelisis/DNA	

mTor (J)	PI3K (J)	VEGFR2 および VEGFR1 (K)	VEGFR1/2/3:
Rad 001 :エベロリムス* テムシロリムス** AP-23573***	PX-866*	Avastin(登録商標)(DNA) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171 (NSCLC, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)
*エベロリムス(Novartis 社、ゲフィチニブ/エルロチニブとの併用:I/II:NSCLC、神経膠芽腫) **テムシロリムス (Wyeth 社、ゲフィチニブ/エルロチニブとの併用:I/II:NSCLC、神経膠芽腫) ***AP-23573 (Ariad 社、I/II:子宮内膜)	*P110α の特異的阻害;ProDi Pharma 社:前臨床 NSCLC	*(PDL)抗-VEGFa **Regeneron/Aventis 社(受容体模倣薬)(第 2 相)	