(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-533842
(P2010-533842A)
(43)公表日　平成22年10月28日(2010.10.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	2G045
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z	4B065
G01N 33/574	(2006.01)	G01N	33/574	D	
G01N 37/00	(2006.01)	G01N	37/00	102	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 80 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-516264 (P2010-516264)
(86)(22)出願日　平成20年7月11日 (2008.7.11)
(85)翻訳文提出日　平成22年3月10日 (2010.3.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2008/069764
(87)国際公開番号　WO2009/012140
(87)国際公開日　平成21年1月22日 (2009.1.22)
(31)優先権主張番号　60/949,820
(32)優先日　平成19年7月13日 (2007.7.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508161207
プロメテウス　ラボラトリーズ　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、９２１２１　カリフォルニア州、サン　ディエゴ、キャロル　パーク　ドライブ　９４１０
(74)代理人　100095407
弁理士　木村　満
(74)代理人　100109449
弁理士　毛受　隆典
(74)代理人　100132883
弁理士　森川　泰司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体アレイを用いた肺癌治療のための薬剤選択

(57)【要約】
本発明は、腫瘍細胞中のシグナル伝達経路の構成因子の活性化状態を検出する組成物および方法を提供する。本発明の使用から導出されるシグナル伝達経路の構成因子の活性化状態に関する情報は、癌診断、予後予測、および癌治療の設計に使用され得る。
【選択図】図３

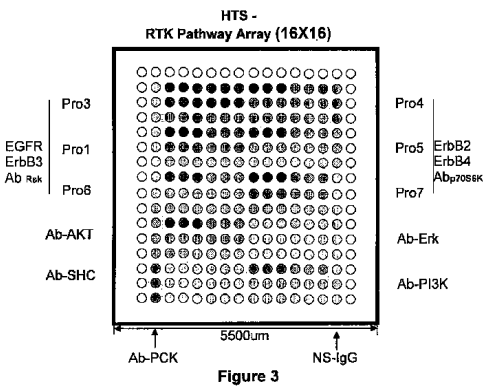


Figure 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
肺腫瘍の治療に適した抗癌剤を選択する選択方法であって、
前記選択方法は、
（ａ）抗癌剤の投与後または該抗癌剤とのインキュベーション前に、前記肺腫瘍の細胞を分離する工程、
（ｂ）該分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程、
（ｃ）固相担体上に固定されたキャプチャ抗体であって、一つ以上の分析物に特異的な複数の該キャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを使用して前記細胞抽出物中の前記一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程、および
（ｄ）前記一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、前記抗癌剤の非存在下において作製された参照活性プロファイルと、を比較することによって、前記抗癌剤が、前記肺腫瘍の前記治療に適しているか、または不適切であるかを決定する工程、
を備える、ことを特徴とする選択方法。
【請求項２】
前記肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を患う被検者由来である、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項３】
前記非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）は、扁平上皮細胞癌、腺癌、大細胞癌、気管支肺胞癌（ＢＡＣ）および燕麦細胞癌からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項２に記載の選択方法。
【請求項４】
前記細胞は、前記肺腫瘍の循環細胞を包含する、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項５】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によって試料から分離される、ことを特徴とする請求項４に記載の選択方法。
【請求項６】
前記試料は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項５に記載の選択方法。
【請求項７】
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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項４に記載の選択方法。
【請求項８】
前記細胞は、腫瘍組織から分離される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項９】
前記分離された細胞は、インビトロにおいて、増殖因子で刺激される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項１０】
前記分離された細胞は溶解され、増殖因子の刺激が後続して、前記細胞抽出液を作製する、ことを特徴とする請求項９に記載の選択方法。
【請求項１１】
前記抗癌剤は、癌細胞における活性化されたシグナル伝達経路の構成因子の機能を阻害する薬剤から構成される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項１２】
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、化学療法剤、放射線療法剤、ワクチン、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１１に記載の選択方法。

【請求項１３】
前記モノクローナル抗体は、トラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、アレムツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、セツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、ゲムツズマブ（ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、パニツムマブ（ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、リツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、トシツモマブ（ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）（ＢＥＸＸＡＲ（登録商標））、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１２に記載の選択方法。
【請求項１４】
前記チロシンキナーゼ阻害剤は、ゲフィチニブ（ｇｅｆｉｔｉｎｉｂ）（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））、スニチニブ（ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ）（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標））、エルロチニブ（ｅｒｌｏｔｉｎｉｂ）（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、ラパチニブ（ｌａｐａｔｉｎｉｂ）（ＧＷ－５７２０１６）、カネルチニブ（ｃａｎｅｒｔｉｎｉｂ）（ＣＩ　１０３３）、セマキシニブ（ｓｅｍａｘｉｎｉｂ）（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ｖａｔａｌａｎｉｂ）（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ｓｏｒａｆｅｎｉｂ）（ＢＡＹ　４３－９００６）、イマチニブメシレート（ｉｍａｔｉｎｉｂ　ｍｅｓｙｌａｔｅ）（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標））、レフルノミド（ｌｅｆｌｕｎｏｍｉｄｅ）（ＳＵ１０１）およびバンデタニブ（ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ）（ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標）；ＺＤ６４７４）、およびこれらの組み合わせからなる群から選択させる、ことを特徴とする請求項１２に記載の選択方法。
【請求項１５】
前記化学療法剤は、ペメトレキセド（ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ）（ＡＬＩＭＴＡ（登録商標））、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ）（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、シロリムス（ｓｉｒｏｌｉｍｕｓ）（ｒａｐａｍｙｃｉｎ）、ラパマイシン（ｒａｐａｍｙｃｉｎ）類似体、白金化合物、カルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）、シスプラチン（ｃｉｓｐｌａｔｉｎ）、サトラプラチン（ｓａｔｒａｐｌａｔｉｎ）、パクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、テムシロリムス（ｔｅｍｓｉｒｏｌｉｍｕｓ）（ＣＣＩ－７７９）、エベロリムス（ｅｖｅｒｏｌｉｍｕｓ）（ＲＡＤ００１）、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１２に記載の選択方法。
【請求項１６】
前記放射線療法剤は、^{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，^{212}Ｂｉ，およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１２に記載の選択方法。
【請求項１７】
前記抗癌剤は、カルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）、パクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、ペメトレキセド（ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ）（ＡＬＩＭＴＡ（登録商標））、エルロチニブ（ｅｒｌｏｔｉｎｉｂ）（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ）（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、ソラフェニブ（ｓｏｒａｆｅｎｉｂ）（ＢＡＹ　４３－９００６）、バンデタニブ（ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ）（ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標）；ＺＤ６４７４）、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される要素である、ことを特徴とする請求項１２に記載の選択方法。
【請求項１８】
前記一つ以上の分析物が、複数のシグナル伝達分子から構成される、ことを特徴とする

請求項１に記載の選択方法。
【請求項１９】
前記複数のシグナル伝達分子が、受容体型チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナル伝達カスケードの要素、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２０】
前記複数のシグナル伝達分子は、ＥＧＦＲ（ＥｒｂＢ１），Ｈｅｒ２（ＥｒｂＢ２），Ｈｅｒ３（ＥｒｂＢ３），Ｈｅｒ４（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，ＰＤＧＦＲ，ｃＫｉｔ，Ｆｌｔ－３，Ｔｉｅ－１，Ｔｉｅ－２，Ｆｌｔ－３，ｃＦＭＳ，ＰＤＧＦＲ，Ａｂｌ，ＦＴＬ　３，ＲＥＴ，Ｋｉｔ，ＨＧＦＲ，ＦＧＦＲ１，ＦＧＦＲ２，ＦＧＦＲ３，ＦＧＦＲ４，ＩＧＦ－１Ｒ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２１】
前記複数のシグナル伝達分子は、ＴＥｒｂＢ１，ＥｒｂＢ２，ＥｒｂＢ４、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２２】
前記複数のシグナル伝達分子は、ＶＥＧＦ，ＶＥＧＦＲ－１，ＶＥＧＦＲ－２，ＶＥＧＦＲ－３，Ｅｐｈ－ａ，Ｅｐｈ－ｂ，Ｅｐｈ－ｃ，Ｅｐｈ－ｄ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２３】
前記複数のシグナル伝達分子はＥｒｂＢ１，ＥｒｂＢ２，ＶＥＧＦＲ－２，ｃＭｅｔ，ＦＧＦＲ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２４】
前記複数のシグナル伝達分子は、ＶＥＧＦＲ－２，ＶＥＧＦＲ－３，Ｒａｆ，ＰＤＧＦＲ，ｃＫｉｔ，Ｆｌｔ－３，Ｔｉｅ－１，Ｔｉｅ－２、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２５】
前記複数のシグナル伝達分子は、ＶＥＧＦＲ－１，ＶＥＧＦＲ－２，ＶＥＧＦＲ－３，Ｆｌｔ－３，ＣＦＭＳ，ＰＤＧＦＲ，ｃＫｉｔ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１８に記載の選択方法。
【請求項２６】
前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、錯体形成状態、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項２７】
前記固相担体は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項２８】
前記キャプチャ抗体は、アドレス可能なアレイにおける固相担体上に固定される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項２９】
各希釈系列中の前記キャプチャ抗体は、少なくとも２倍で連続的に希釈される、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項３０】
前記工程（ｃ）における前記アッセイは、
（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベート

して、複数の捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅対の第１および第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の前記第１および第２の要素から生成された前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備える、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項３１】
前記活性化状態依存性抗体は、結合対の第１の要素から構成される、ことを特徴とする請求項３０に記載の選択方法。
【請求項３２】
前記結合対の第１の要素はビオチンである、ことを特徴とする請求項３１に記載の選択方法。
【請求項３３】
前記シグナル増幅対の前記第１の要素は、前記結合対の第２の要素から構成される、ことを特徴とする請求項３０に記載の選択方法。
【請求項３４】
前記結合対の前記第２の要素はストレプトアビジンである、ことを特徴とする請求項３３に記載の選択方法。
【請求項３５】
前記シグナル増幅対の前記第１の要素は、ペルオキシダーゼである、ことを特徴とする請求項３３に記載の選択方法。
【請求項３６】
前記ペルオキシダーゼは、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、ことを特徴とする請求項３５に記載の選択方法。
【請求項３７】
前記シグナル増幅対の前記第２の要素は、チラミド試薬である、ことを特徴とする請求項３５に記載の選択方法。
【請求項３８】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、ことを特徴とする請求項３７に記載の選択方法。
【請求項３９】
前記増幅されたシグナルは、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発生し、活性化されたチラミドを生じる、ことを特徴とする請求項３８に記載の選択方法。
【請求項４０】
前記活性化されたチラミドは、直接、検出される、ことを特徴とする請求項３９に記載の選択方法。
【請求項４１】
前記活性化されたチラミドは、シグナル検出試薬の添加によって検出される、ことを特徴とする請求項３９に記載の選択方法。
【請求項４２】
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、ことを特徴とする請求項４１に記載の選択方法。
【請求項４３】
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と発色試薬との組み合わせである、ことを特徴とする請求項４１に記載の選択方法。
【請求項４４】
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、ことを特徴とする請求項４３に記載の選択方法。

【請求項４５】
前記工程（ｃ）における前記アッセイは、
（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な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から構成される検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、前記シグナル増幅対の第１および第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の第１および第２の要素から生じた前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備え、
前記活性化状態非依存性抗体は、促進部位で標識され、前記活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の要素で標識され、前記促進部位は、前記シグナル増幅対の前記第１の要素に向けられ、該第１の要素と反応する酸化剤を生じる、ことを特徴とする請求項１に記載の選択方法。
【請求項４６】
前記活性化状態非依存性抗体は、さらに検出可能部位を備える、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項４７】
前記検出可能部位は、フルオロフォアである、ことを特徴とする請求項４６に記載の選択方法。
【請求項４８】
前記検出可能部位の量は、一つ以上の前記分析物の量と相関関係にある、ことを特徴とする請求項４６に記載の選択方法。
【請求項４９】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記促進部位で直接的に標識化される、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項５０】
前記活性化状態非依存性抗体は、前記活性化状態依存性抗体と共役されたオリゴヌクレオチドと、前記促進部位と共役された相補オリゴヌクレオチドと、の間のハイブリダイゼーションを介して、前記促進部位で標識される、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項５１】
前記活性化状態依存性抗体は、前記シグナル増幅対の前記第１の要素で直接的に標識される、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項５２】
前記活性化状態依存性抗体は、前記活性化状態依存性抗体と共役された結合対の第１の要素と、前記シグナル増幅対の前記第１の要素と共役した前記結合対の第２の要素と、の間の結合を介して、前記シグナル増幅対の前記第１の要素で標識される、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項５３】
前記結合対の前記第１の要素はビオチンである、ことを特徴とする請求項５２に記載の選択方法。
【請求項５４】
前記結合対の前記第２の要素はストレプトアビジンである、ことを特徴とする請求項５２に記載の選択方法。
【請求項５５】
前記促進部位はグルコースオキシダーゼである、ことを特徴とする請求項４５に記載の選択方法。
【請求項５６】

前記酸化剤は過酸化水素（H_2O_2）である、ことを特徴とする請求項５５に記載の選択方法。
【請求項５７】
前記シグナル増幅対の前記第１の要素は、ペルオキシダーゼである、ことを特徴とする請求項５６に記載の選択方法。
【請求項５８】
前記ペルオキシダーゼは、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、ことを特徴とする請求項５７に記載の選択方法。
【請求項５９】
前記シグナル増幅対の前記第２の要素は、チラミド試薬である、ことを特徴とする請求項５７に記載の選択方法。
【請求項６０】
前記チラミド試薬は、ビオチン－チラミドである、ことを特徴とする請求項５９に記載の選択方法。
【請求項６１】
前記増幅されたシグナルは、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発生し、活性化されたチラミドを生じる、ことを特徴とする請求項６０に記載の選択方法。
【請求項６２】
前記活性化されたチラミドは、直接的に検出される、ことを特徴とする請求項６１に記載の選択方法。
【請求項６３】
前記活性化されたチラミドは、シグナル検出試薬の添加によって検出される、ことを特徴とする請求項６１に記載の選択方法。
【請求項６４】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン－標識化フルオロフォアである、ことを特徴とする請求項６３に記載の選択方法。
【請求項６５】
前記シグナル検出試薬は、ストレプトアビジン－標識化ペルオキシダーゼと、発色試薬と、の組み合わせである、ことを特徴とする請求項６３に記載の選択方法。
【請求項６６】
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、ことを特徴とする請求項６５に記載の選択方法。
【請求項６７】
抗癌剤での治療に対する肺腫瘍の応答を同定する同定方法であって、
該同定方法は、
（ａ）前記抗癌剤の投与後、または前記抗癌剤とのインキュベーション前に、前記肺腫瘍の細胞を分離する工程、
（ｂ）前記分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程、
（ｃ）固相担体上に固定されたキャプチャ抗体であって、一つ以上の分析物に特異的な複数の前記キャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて前記細胞抽出物中の前記一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程、および
（ｄ）前記一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、前記抗癌剤の非存在下において生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、前記抗癌剤での治療に前記肺腫瘍が応答するか、または応答しないかを同定する工程、
を備える、ことを特徴とする同定方法。
【請求項６８】
前記肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を患う被検者由来である、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。
【請求項６９】

前記非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）は、扁平上皮細胞癌、腺癌、大細胞癌、気管支肺胞癌（ＢＡＣ）および燕麦細胞癌からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項６８に記載の同定方法。

【請求項７０】

前記細胞は、前記肺腫瘍の循環細胞を包含する、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項７１】

前記循環細胞は、免疫磁気分離法によって試料から分離される、ことを特徴とする請求項７０に記載の同定方法。

【請求項７２】

前記試料は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項７１に記載の同定方法。

【請求項７３】

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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項７０に記載の同定方法。

【請求項７４】

前記細胞は、腫瘍組織から分離される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項７５】

前記分離された細胞は、インビトロにおいて、増殖因子で刺激される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項７６】

前記抗癌剤は、癌細胞における活性化されたシグナル伝達経路の構成因子の機能を阻害する薬剤から構成される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項７７】

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、化学療法剤、放射線療法剤、ワクチン、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項７６に記載の同定方法。

【請求項７８】

前記一つ以上の分析物が、複数のシグナル伝達分子から構成される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項７９】

前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、錯体形成状態、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項８０】

前記固相担体は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項８１】

前記キャプチャ抗体は、アドレス可能なアレイにおける前記固相担体上に固定される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項８２】

各希釈系列中の前記キャプチャ抗体は、少なくとも２倍で連続的に希釈される、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。

【請求項８３】

前記工程（ｃ）における前記アッセイは、

（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程、

（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅対の第１および第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の前記第１および第２の要素から生成された前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備える、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。
【請求項８４】
前記工程（ｃ）における前記アッセイは、
（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な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から構成される検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、前記シグナル増幅対の第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の前記第１および第２の要素から生成された前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備え、
前記活性化状態非依存性抗体は、促進部位で標識され、前記活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の要素で標識され、前記促進部位は、前記シグナル増幅対の前記第１の要素に向けられ、該第１の要素と反応する酸化剤を生成する、ことを特徴とする請求項６７に記載の同定方法。
【請求項８５】
抗癌剤での治療に対する、肺腫瘍を患う被検者の応答を予測する予測方法であって、
該予測方法は、
（ａ）前記抗癌剤の投与後、または前記抗癌剤とのインキュベーション前に、前記肺腫瘍の細胞を分離する工程、
（ｂ）前記分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程、
（ｃ）固相担体上に固定されたキャプチャ抗体であって、一つ以上の分析物に特異的な複数の前記キャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて前記細胞抽出物中の前記一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程、および
（ｄ）前記一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、前記抗癌剤の非存在下において生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、前記抗癌剤での治療に被検者が応答するであろう可能性を予測する工程、
を備える、ことを特徴とする予測方法。
【請求項８６】
前記肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を患う被検者由来である、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項８７】
前記非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）は、扁平上皮細胞癌、腺癌、大細胞癌、気管支肺胞癌（ＢＡＣ）および燕麦細胞癌からなる群から選択される、ことを特徴とする請求項８６に記載の予測方法。
【請求項８８】
前記細胞は、前記肺腫瘍の循環細胞を包含する、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項８９】
前記循環細胞は、免疫磁気分離法によって試料から分離される、ことを特徴とする請求項８８に記載の予測方法。
【請求項９０】
前記試料は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする

請求項８９に記載の予測方法。
【請求項９１】
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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項８８に記載の予測方法。
【請求項９２】
前記細胞は、腫瘍組織から分離される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９３】
前記分離された細胞は、インビトロにおいて、増殖因子で刺激される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９４】
前記分離された細胞は溶解され、増殖因子の刺激が後続して、前記細胞抽出物を作製する、ことを特徴とする請求項９３に記載の予測方法。
【請求項９５】
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、化学療法剤、放射線療法剤、ワクチン、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９６】
前記一つ以上の分析物が、複数のシグナル伝達分子から構成される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９７】
前記活性化状態は、リン酸化状態、ユビキチン化状態、錯体形成状態、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９８】
前記固相担体は、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、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項９９】
前記キャプチャ抗体は、アドレス可能なアレイにおける前記固相担体上に固定される、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項１００】
前記工程（ｃ）における前記アッセイは、
（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な活性化状態依存性抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅対の第１および第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および
（ｉｖ）前記シグナル増幅対の前記第１および第２の要素から生成された前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備える、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。
【請求項１０１】
前記工程（ｃ）における前記アッセイは、
（ｉ）前記複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに前記細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉ）前記複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な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から構成される検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程、
（ｉｉｉ）前記複数の検出可能な捕捉された分析物を、前記シグナル増幅対の第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程、および

（ｉｖ）前記シグナル増幅対の前記第１および第２の要素から生成された前記増幅されたシグナルを検出する工程、を備え、

前記活性化状態非依存性抗体は、促進部位で標識され、前記活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の要素で標識され、前記促進部位は、前記シグナル増幅対の前記第１の要素に向けられ、該第１の要素と反応する酸化剤を生成する、ことを特徴とする請求項８５に記載の予測方法。

【請求項１０２】

固相担体上に固定された複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成される高い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キャプチャ抗体は、細胞抽出物中のシグナル伝達経路の構成因子に対応する一つ以上の分析物に特異的である、ことを特徴とするアレイ。

【請求項１０３】

前記シグナル伝達経路は、細胞増殖に含まれる、ことを特徴とする請求項１０２に記載のアレイ。

【請求項１０４】

前記シグナル伝達経路は、腫瘍血管新生に含まれる、ことを特徴とする請求項１０２に記載のアレイ。

【請求項１０５】

前記キャプチャ抗体が、ＥＧＦＲ，ＥｒｂＢ２，ＥｒｂＢ３，ＥｒｂＢ４，Ｓｈｃ，ＰＩ３Ｋ，Ｅｒｋ，Ｒｓｋ，Ａｋｔ，Ｐ７０Ｓ６Ｋ，ＶＥＧＦＲ１，ＶＥＧＦＲ２，Ｔｉｅ２、およびＶ－Ｃａｄｈｅｒｉｎ－Ｒ２複合体と反応性を有する抗体からなる群から選択される一つ以上の要素から構成される、ことを特徴とする請求項１０２に記載のアレイ。

【請求項１０６】

前記細胞抽出物は、固形腫瘍の循環細胞の抽出物から構成される、ことを特徴とする請求項１０２に記載のアレイ。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本出願は、２００７年７月１３日に出願された米国特許仮出願第６０／９４９，８２０号の優先権を主張し、それらの開示は、すべての目的のため、その全体が参照により本明細書に援用される。

【０００２】

細胞におけるシグナル伝達のプロセスは、ほんの数例を挙げると、細胞分裂および細胞死、代謝、免疫細胞活性神経伝達および知覚を含む様々な生物学的機能に影響する。従って、細胞における正常なシグナル伝達の異常は、肥満、心臓病、自己免疫および癌といった多数の病状をもたらしうる。

【０００３】

一つのよく特徴付けられたシグナル伝達経路は、細胞における上皮細胞増殖因子（ＥＧＦ）から細胞増殖の促進への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を参照）。ＥＧＦは、ＥＧＦの結合によって活性化される、膜貫通受容体関連チロシンキナーゼ、上皮細胞増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に結合する。ＥＧＦのＥＧＦＲへの結合は、受容体の細胞質ドメインのチロシンキナーゼ活性を活性化する。このキナーゼ活性の一つの結果は、チロシン残基におけるＥＧＦＲへの結合の自己リン酸化である。活性型ＥＧＦＲ上のリン酸化されたチロシン残基は、ＧＲＢ２といったＳＨ２ドメインを含むアダプタータンパク質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機能において、ＧＢＲ２はさらに、ＧＢＲ２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、ＳＯＳに結合する。ＥＧＦＲ－ＧＲＢ２－ＳＯＳ複合体の形成は、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へのＳＯＳ活性化をもたらす。ＧＤＰの除去により、ＲａｓはＧＴＰに結合し、活性化される。

【０００４】
活性化に続いて、Ｒａｓが、ＲＡＦキナーゼ、セリン／スレオニン特異的タンパク質キナーゼに結合し、そのタンパク質キナーゼ活性を活性化する。タンパク質キナーゼカスケードの活性化は、細胞増殖をもたらす。概略では、ＲＡＦキナーゼは、その後、ＭＥＫ、もう一方のセリン／スレオニンキナーゼをリン酸化し、活性化する。活性型ＭＥＫは、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（ＭＡＰＫ）をリン酸化し、活性化する。ＭＡＰＫによるさらなるリン酸化のためのターゲットには、４０Ｓリボソーム蛋白質Ｓ６キナーゼ（ＲＳＫ）がある。ＭＡＰＫによるＲＳＫのリン酸化は、次にリボソームタンパク質Ｓ６をリン酸化する、ＲＳＫの活性化をもたらす。ＭＡＰＫのもう一方の公知のターゲットは、プロトオンコジーン、ｃ－Ｍｙｃ、複数の癌において突然変異する細胞増殖にとって重要な遺伝子、である。ＭＡＰＫはまた、次に転写因子、ＣＲＥＢをリン酸化する、他のタンパク質キナーゼ、ＭＮＫをリン酸化し、活性化する。間接的に、ＭＡＰＫはまた、細胞増殖に含まれるさらに他の転写因子をコードするＦｏｓ遺伝子の転写を制御する。そのような転写因子の量および活性を変化させることによって、ＭＡＰＫは、ＥＧＦからの元々の細胞外シグナルを、細胞周期の進行に重要な遺伝子の転写の変更に変換する。

【０００５】
シグナル伝達経路が細胞増殖に働く中心的役割を考慮すると、多くの癌が、細胞増殖経路の異常な活性化の結果をもたらす、シグナル伝達構成因子における変異および他の変化の結果として生じることは驚くことではない。例えば、ＥＧＦＲの過剰発現または過活性は、多形性膠芽腫、結腸癌、肺癌を含む複数の癌に関連している。これは、肺癌のためのゲフィチニブ（ｇｅｆｉｔｉｎｉｂ）およびエルロチニブｅｒｌｏｔｉｎｉｂ、結腸癌のためのセツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）を含む、ＥＧＦＲに対する抗癌治療の開発を促進している。

【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、従って、ＥＧＦＲチロシンキナーゼを活性化するリガンドの結合を阻害する。一方、ゲフィチニブ及びエルロチニブは、細胞内に位置するＥＧＦＲチロシンキナーゼを阻害する小分子である。キナーゼ活性が欠如すると、ＥＧＦＲへの結合は、ＧＲＢ２といった下流のアダプタータンパク質の結合のために必要条件である、チロシン残基でのリン酸化を受けることができない。増殖のためにこの経路に頼るシグナルカスケードを停止することによって、腫瘍の増殖および転移が軽減される。

【０００７】
加えて、他の研究は、約７０％のヒト黒色腫および少ない割合の他の腫瘍が、ＭＡＰＫ経路の恒常的活性をもたらすＲａｆ遺伝子における点変異（Ｖ５９９Ｅ）を有することを示した（例えば、Ｄａｖｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，　４１７：９４９－９５４　（２００２）を参照）。そのような結果は、特定のシグナル伝達経路における変化が、特定の癌タイプの特徴を示しうること、およびそのような特定のシグナル伝達経路の変化が、化学療法の介入のための有望なターゲットでありうることを示唆する。

【０００８】
異なる癌治療、特に癌の化学療法は、細胞増殖または細胞死それぞれに含まれる細胞シグナル伝達経路を遮断または活性化することによって、直接的または間接的に機能しうることを考慮すると、特定の形態の癌における公知のシグナル伝達経路の活性は、様々な癌治療の有効性の良好な指標として役立ちうる。従って、他の必要性を満たすことに加えて、本発明は、個々の患者のための可能性のある抗癌治療の効果を評価する方法を提供する。そのように、本発明は、医師が、全ての患者に対し適正な量と適正な時間で適切な癌治療を選択する助けとなる方法を提供する。

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明は、腫瘍細胞（例えば、肺腫瘍の循環細胞）におけるシグナル伝達経路の構成因

子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。本発明の使用から導き出せるシグナル伝達経路の構成因子の活性化状態についての情報は、癌診断、予後診断および癌治療の設計のために使用されうる。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

一つの態様において、本発明は、肺癌治療のための適切な抗癌剤を選択する方法を提供し、該方法は、

（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肺癌細胞を分離する工程と、

（ｂ）分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程と、

（ｃ）固相担体上に拘束された、一つ以上の分析物に特異的な複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて、細胞抽出物中の一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程と、

（ｄ）一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、抗癌剤の非存在下において生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、抗癌剤が、肺癌治療に適しているか、また適していないかを決定する工程と、

を備える。

【００１１】

他の態様において、本発明は、抗癌剤を用いた治療のための適切な候補である、肺癌を患う被験者を選択する方法を提供し、該方法は、

（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、肺癌細胞を分離する工程と、

（ｂ）分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程と、

（ｃ）固相担体上に拘束された、一つ以上の分析物に特異的な複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて、細胞抽出物中の一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程と、

（ｄ）一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、抗癌剤の非存在かで生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、被験者が、抗癌剤による肺癌治療に適しているか、または適していないかを決定する工程と、

を備える。

【００１２】

他の態様において、本発明は、抗癌剤を用いた治療に対する肺腫瘍の応答を確認する方法を提供し、該方法は、

（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肺癌細胞を分離する工程と、

（ｂ）分離された細胞を溶解し、細胞抽出物を作製する工程と、

（ｃ）固相担体上に拘束された、一つ以上の分析物に特異的な複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて、細胞抽出物中の一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程と、

（ｄ）一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、抗癌剤の非存在下で生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、抗癌剤治療に対して、該肺腫瘍が応答性であるまたは非応答性であると同定する工程と、

を備える。

【００１３】

さらに他の態様において、本発明は、肺癌を患う被験者の抗癌剤治療に対する反応性を予測する方法を提供し、該方法は、

（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、肺癌細胞を分離する工程と、

（ｂ）分離された細胞を溶解して、細胞抽出物を作製する工程と、

（ｃ）固相担体上に拘束された、一つ以上の分析物に特異的な複数のキャプチャ抗体の

希釈系列から構成されるアッセイを用いて、細胞抽出物中の一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程と、
（ｄ）一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、抗癌剤の非存在下で生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、被験者が抗癌剤での治療に応答するであろう可能性を予測する工程と、
を備える。
【００１４】
さらに他の態様において、本発明は、抗癌剤で治療された肺癌被験者のための臨床転帰を予測する方法を提供し、該方法は、
（ａ）抗癌剤の投与後に肺癌細胞を分離する工程と、
（ｂ）分離された細胞を溶解し、細胞抽出物を作製する工程と、
（ｃ）固相担体上に拘束された、一つ以上の分析物に特異的な複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成されるアッセイを用いて、細胞抽出物中の一つ以上の分析物の活性化状態を検出する工程と、
（ｄ）一つ以上の分析物について検出された活性化状態と、抗癌剤の非存在下で生成された参照活性プロファイルと、を比較することによって、抗癌剤で治療された被験者の臨床転帰を予測する工程と、
を備える。
【００１５】
更なる態様において、本発明は、固相担体上に拘束された、複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成される、高いダイナミックレンジを有するアレイを提供し、各希釈系列中のキャプチャ抗体は、細胞抽出物中のシグナル伝達経路の構成因子に対応する、一つ以上の分析物に特異的である。
【００１６】
本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から、当業者には明らかであるだろう。
【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１】本発明の実施において使用されうる細胞増殖に含まれるシグナル伝達経路の例を示す図である。細胞増殖シグナルを細胞増殖に変換するために細胞によって用いられるＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路の構成因子が描写される。
【図２】癌治療の過程にわたる薬剤選択のための本発明のアドレス可能なアレイの適用を概略的に示す図である。
【図３】ＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路における受容体チロシンキナーゼ経路といった受容体チロシンキナーゼ経路の構成因子に対する抗体の希釈物から構成されるアドレス可能なアレイの概略的な例を示す図である。
【図４】腫瘍の血管新生において活性化されるシグナル伝達経路の構成因子に対する抗体の希釈物から構成されるアドレス可能なアレイの概略的な例を示す図である。
【図５】ＡおよびＢは、患者２００２（Ａ）及び患者２０１５（Ｂ）におけるＶｅｒｉｄｅｘ　ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈシステムを用いたＣＴＣの測定を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
（Ｉ．序文）
上述したように、細胞増殖に含まれるシグナル伝達経路の活性化および細胞死に含まれる経路の不活性化は、多くの異なる種類の癌を特徴付ける分子特性の非限定的な例である。多くの場合、特定のシグナル伝達経路の活性化、及びそれらの構成因子は、所定の種類の癌のための分子署名として働きうる。そのような活性型構成因子はさらに、治療的介入のための有用なターゲットを提供しうる。従って、治療前、治療中、治療後における癌細胞内の特定のシグナル伝達システムの活性レベルを知ることは、採用される治療の適切な過程を選択するのに使用されうる、非常に関連した情報を医師に提供する。さらに、治療

効果として癌細胞中で活性なシグナル伝達経路の継続的なモニターは、治療の効果に関する付加的な情報を医師に提供し、医師がある特定の治療過程を継続する、または、例えば癌細胞が、同一または他のシグナル伝達経路のいずれかを活性化する、さらなる異常によって治療に耐性となった場合に、他の路線の治療に切り替えるように促す。

【００１９】

従って、本発明は、特異的な、多重の、ハイスループットのアッセイにおいて、腫瘍組織または固形腫瘍の希少循環細胞といった外部の腫瘍細胞中の、制御が解除された複数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方法および構成因子を提供する。本発明はまた、制御が解除されたシグナル経路を下方制御する、または遮断するように、適切な治療（単一の薬剤または薬剤の組み合わせ）の選択のための方法および構成因子を提供する。従って、本発明は、癌患者のための各個人用の治療の設計を助けるために使用されうる。

【００２０】

単一細胞レベルでのシグナル伝達経路の活性の決定によって、血液循環中の腫瘍細胞を検出し、同定することができることは、本発明の重要な利点である。腫瘍細胞は、しばしば、様々な早期癌を患う患者の血液中に「マイクロメタスターゼ（ｍｉｃｒｏｍｅｔａｓｔａｓｅ）」（播種性腫瘍細胞）として検出される。血液中の腫瘍細胞の数は、腫瘍のステージと種類に依存するだろう。生検は、概して原発巣腫瘍で得られるのに対し、殆どの転移性腫瘍は、生検が行われず、腫瘍試料の分子解析を非常に困難にする。腫瘍の転移の際、殆どの浸潤性腫瘍細胞は、原発巣を離れ、血液及びリンパ系を通って遠隔部位に達する。従って、血液からの循環腫瘍細胞は、最も浸潤性が高く均質な腫瘍細胞群を示す。しかしながら、血液中の転移性腫瘍細胞の数は、非常に低いことが多く、血液１ミリリットルあたり一つから数千細胞の範囲である。そのような希少な細胞においてシグナル伝達経路を分離および分析し、この情報をより効果的な癌治療に適用することができることは、本発明の一つの目的である。

【００２１】

ある実施形態において、本発明の多重でハイスループットのアッセイは、単一細胞レベルで固形腫瘍の循環細胞中の一つ以上のシグナル伝達分子の活性化状態を検出することができる。実際、ＥＧＦＲといった単一のシグナル伝達分子は、約１００ゼプトモルの感度で、約１００ゼプトモルから約１００フェムトモルまでの直線状のダイナミックレンジで検出されうる。そのように、希少循環細胞中の多数のシグナル伝達因子の活性化状態の単一細胞での検出は、各個人の、標的化された治療の設計と同様に、癌の予後診断および癌診断を助ける。

【００２２】

希少循環細胞は、固形腫瘍から転移したまたは微小転移した固形腫瘍の循環細胞を含む。循環腫瘍細胞、癌幹細胞、および循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環血管新生促進骨髄細胞および循環樹枝状細胞といった腫瘍へと（化学誘引によって）移動する細胞は、固形腫瘍に関連する循環性細胞の例の一部である。

【００２３】

対象となるシグナル伝達分子は、それらのｉｎ　ｓｉｔｕでの活性化状態を保存するために、概して、循環性細胞が分離された直後、好ましくは、約２４、６または１時間以内に、より好ましくは、約３０、１５、５分以内に抽出される。分離された細胞はまた、通常ナノモルからマイクロモル濃度で、約１～３０分間、シグナル伝達分子の活性を回復または刺激するために、一つ以上の増殖因子とインキュベートされる（例えば、Ｉｒｉｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｅｌｌ，　１１８：２１７－２２８（２００４）を参照）。

【００２４】

本明細書においてより詳細に説明するように、個々の患者のための可能性のある抗癌治療を評価するために、分離された細胞は、様々な量で一つ以上の抗癌剤とインキュベートされうる。増殖因子の刺激は、その後、短期間（例えば、約１～５分）または数時間（例えば、約１～６時間）実施されうる。抗癌剤存在下および抗癌剤非存在下でのシグナル経

路の異なる活性が、各個人の患者のための適した用量での適切な癌治療の選択を助けうる。循環性細胞はまた、抗癌剤治療の際、患者試料から分離され、一つ以上の増殖因子で刺激されて、治療の変更が実行されるべきかどうかを決定する。そのように、本発明の方法は、有利に、臨床医が、全ての患者に対し適正な量、適正な時間で適正な抗癌剤を与えるのを助ける。

【００２５】

（ＩＩ．定義）

本明細書では、以下の用語は、他に特定されない限り、以下の意味を有する。

【００２６】

「癌（ｃａｎｃｅｒ）」という用語は、異常な細胞の制御されない増殖によって特徴付けられる一種の疾患の任意のものを含むと意図される。その用語は、悪性、両性、軟組織、または固形組織に関わらず、全ての公知の癌および腫瘍性の状態、および転移前および転移後の癌を含む全てのステージ及びグレードの癌を含む。異なる種類の癌の例は、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、小腸癌および胃癌といった消化器および胃腸癌；食道癌；胆嚢癌；肝臓癌；膵臓癌；虫垂癌；乳癌；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；絨毛癌；頭頸部癌；骨肉腫；および血液癌を含むが、これに限定されるものではない。本明細書で使用されるように、「腫瘍（ｔｕｍｏｒ）」は、一つ以上の癌性細胞から構成される。好ましい実施形態において、肺腫瘍は、例えば、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、気管支肺胞癌（ＢＡＣ）または燕麦細胞癌といった非小細胞肺癌を患う被験者から得られる。

【００２７】

「分析物（ａｎａｌｙｔｅ）」という用語は、対象となるあらゆる分子、概してポリペプチドといった巨大分子を含み、その存在、量、および／または由来が決定される。ある例において、分析物は、固相腫瘍の循環細胞の細胞成分であり、好ましくは、シグナル伝達分子である。

【００２８】

本明細書では、「希釈系列（ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｓｅｒｉｅｓ）」という用語は、特定の試料（例えば、細胞溶解物）または試薬（例えば、抗体）の一連の下降濃度を含むと意図される。希釈系列は、概して、開始濃度の試料または試薬の測定された量を希釈剤（例えば、希釈緩衝液）と混合して、より低い濃度の試料または試薬を作製し、所望の数の一連の希釈を得るのに充分な回数、この工程を繰り返す工程によって生成される。試料または試薬は、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または５０個の下降濃度の試料または試薬からなる希釈系列を作製するために、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、５００または１０００倍で連続的に希釈されうる。例えば、１ｍｇ／ｍｌの開始濃度で補足抗体試薬の２倍の連続的な希釈からなる希釈系列は、０．５ｍｇ／ｍｌの濃度の補足抗体を作製するように、一定量の開始濃度の補足抗体を等量の希釈緩衝液と混合し、０．２５ｍｇ／ｍｌ、０．１２５ｍｇ／ｍｌ、０．０６２５ｍｇ／ｍｌ、０．０３２５ｍｇ／ｍｌなどの補足抗体濃度を得るようにこの工程を繰り返すことによって作製されうる。

【００２９】

「高いダイナミックレンジ（ｓｕｐｅｒｉｏｒ　ｄｙｎａｍｉｃ　ｒａｎｇｅ）」という用語は、わずか一つの細胞において、または数千もの細胞において、特定の分析物を検出するアッセイの能力のことをいう。例えば、本明細書で述べる免疫アッセイは、補足抗体濃度の希釈系列を用いて約１～１００００細胞における対象となる特定のシグナル伝達分子を有利に検出するので、高いダイナミックレンジを有する。

【００３０】

「シグナル伝達分子（ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　ｍｏｌｅｃｕｌｅ）」または「シグナル伝達因子（ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ）」という用語は、

細胞が細胞外シグナルまたは刺激を、概して細胞内での秩序だった連続した生化学的反応を含む応答に変換するプロセスを実行するタンパク質および他の分子を含む。シグナル伝達分子の例は、ＥＧＦＲ（例えば、ＥＧＦＲ／ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ２／Ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３、ＨＥＲ４／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受容体）、ＣＳＦ－１Ｒ、ＦＧＦＲ１－４、ＨＧＦＲ１－２、ＣＣＫ４、ＴＲＫ　Ａ－Ｃ、ＭＥＴ、ＲＯＮ、ＥＰＨＡ　１－８、ＥＰＨＢ　１－６、ＡＸＬ、ＭＥＲ、ＴＹＲＯ３、ＴＩＥ１－２、ＴＥＫ、ＲＹＫ、ＤＤＲ１－２、ＲＥＴ、ｃ－ＲＯＳ、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、およびＲＴＫ１０６といった受容体型チロシンキナーゼ；ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｓｒｃ、Ｆｒｋ、Ｂｔｋ、Ｃｓｋ、Ａｂｌ、Ｚａｐ７０、Ｆｅｓ／Ｆｐｓ、Ｆａｋ、Ｊａｋ、Ａｃｋ、およびＬＩＭＫといった非受容体型チロシンキナーゼ；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、およびパキシリンといったチロシンキナーゼシグナルカスケード構成因子；およびそれらの組み合わせを含むが、これに限定されるものではない。

【００３１】

本明細書では、「循環細胞（ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　ｃｅｌｌ）」という用語は、固形腫瘍から転移または微小転移した外部腫瘍細胞からなる。循環細胞の例は、循環腫瘍細胞、癌肝細胞および／または腫瘍へと移動する細胞（例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環血管新生促進骨髄細胞および循環樹枝状細胞など）を含むがこれに限定されるものではない。

【００３２】

本明細書では、「試料（ｓａｍｐｌｅ）」という用語は、患者から得られるあらゆる生物学的分析物を含む。試料は、全血、血漿、血清、赤血球細胞、白血球細胞（例えば、末梢血単核細胞）、唾液、尿、便（排泄物）、痰、気管支洗浄液、涙、乳頭吸引液、リンパ液（例えば、リンパ節の播種性腫瘍細胞）、細針吸引物、他のあらゆる体液、腫瘍の生検（例えば、針生検）といった組織試料（例えば、腫瘍組織）およびそれらの細胞抽出物を含むがこれに限定されるものではない。ある実施形態において、試料は、全血、または血漿、血清または細胞沈殿物といったその細胞画分である。好ましい実施形態において、試料は、当該分野で公知の技術を用いて、全血からのまたはその細胞画分から固形腫瘍の循環細胞を分離することによって得られる。他の実施形態において、試料は、例えば、肺、結腸または直腸からのホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）腫瘍組織試料である。

【００３３】

「生検（ｂｉｏｐｓｙ）」という用語は、診断または予後評価のための組織資料を取り出すプロセスおよびその組織試料をいう。当該分野において公知のあらゆる生検の技術が本発明の方法および組成物に適用されうる。適応される生検技術は、その他の因子としては、概して、評価される組織の種類、および腫瘍の大きさおよび種類（すなわち、固形または浮遊性（すなわち、血液または腹水）に依る。代表的な生検技術は、切除生検、切開生検、針生検（例えば、コアニードル生検、穿刺吸引細胞診など）、外科生検および骨髄生検を含む。生検技術は、例えば、Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　Ｉｎｔｅｒｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，　Ｋａｓｐｅｒ，　ｅｔ　ａｌ．，　ｅｄｓ．，　１６ｔｈ　ｅｄ．，　２００５，　Ｃｈａｐｔｅｒ　７０、およびパートＶを通して説明される。

【００３４】
「被験者（ｓｕｂｊｅｃｔ）」または「患者（ｐａｔｉｅｎｔ）」という用語は、概して、ヒトを含むが、例えば、他の霊長類、齧歯類、イヌ科の動物、ネコ科の動物、ウマ科の動物、羊、ブタなどといった、他の動物も含みうる。
【００３５】
「アレイ（ａｒｒａｙ）」または「マイクロアレイ（ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ）」という用語は、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、ビーズ、紙、膜（例えば、ナイロン、ニトロセルロース、ポリビニリジンフルオライド（ＰＶＤＦ）など）、繊維束または他のあらゆる適切な基質といった固相担体上に固定または拘束されたキャプチャ抗体の同一のセットおよび／または希釈系列から構成される。キャプチャ抗体は、概して、共有または非共有性相互作用（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－双極子結合）を介して固相担体上に固定または拘束される。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、異なる既知の／アドレス可能な位置において固相担体の表面に連結された複数の異なるキャプチャ抗体および／またはキャプチャ抗体濃度から構成される。
【００３６】
「キャプチャ抗体（ｃａｐｔｕｒｅ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」という用語は、試料中の一つ以上の対象となる分析物に特異的な（すなわち分析物に結合する、分析物によって結合される、または分析物ち複合体を形成する）固定された抗体を含むことを意図される。好ましい実施形態において、キャプチャ抗体は、アレイ中の固相担体上に拘束される。固相担体上のあらゆる様々なシグナル伝達分子を固定するために適したキャプチャ抗体は、Ｕｐｓｔａｔｅ（Ｔｅｍｅｃｕｌａ，ＣＡ）、Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ（Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，ＣＡ）、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）およびＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から入手可能である。
【００３７】
本明細書では、検出抗体（ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」という用語は、試料中の一つまたはそれ以上の対象となる分析物に特異的な（対象物と結合する、対象物によって結合される、または対象物と複合体を形成する）検出可能なラベルを備える抗体を含む。その用語はまた、一つ以上の対象となる分析物に特異的な抗体を包含し、該抗体は、検出可能なラベルを備える他の種類のものによって結合されうる。検出可能なラベルの例は、ビオチン／ストレプトアビジンラベル、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）ラベル、化学反応性等別、蛍光ラベル、酵素ラベル、放射性ラベル、およびそれらの組み合わせを含むが、これに限定されるものではない。あらゆる様々なシグナル伝達分子の活性化状態を検出するための適切な検出抗体は、Ｕｐｓｔａｔｅ（Ｔｅｍｅｃｕｌａ，ＣＡ）、Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ（Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、Ｌａｂ　Ｖｉｓｉｏｎ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，ＣＡ）、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）およびＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から入手可能である。非限定的な例として、ＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－Ｓｒｃ、ＦＬＫ－１、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、Ａｋｔ、ＭＡＰＫ／ＥＲＫ、ＰＴＥＮ、ＲａｆおよびＭＥＫといった様々なシグナル伝達分子のリン酸化型に対するリン酸特異的抗体が、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから入手可能である。
【００３８】
活性化状態依存抗体（ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｓｔａｔｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」という用語は、試料中の対象となる一つ以上の分析物の特定の活性化状態に特異的な（すなわち、結合し、結合され、または複合体を形成する）検出抗体を含む

。好ましい実施形態において、活性化状態依存抗体は、一つ以上のシグナル伝達分子といった一つ以上の分析物のリン酸化、ユビキチン化、および／または複合体状態を検出する。ある実施形態において、受容体型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、活性化状態依存抗体を用いて検出される。活性化状態依存抗体を用いた検出に適した（括弧中に挙げられた）活性化状態の非限定的な例は、ＥＧＦＲ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ、リン酸化（ｐ－）ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲ：Ｓｈｃ、ユビキチン化（ｕ－）ＥＧＦＲ、ｐ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ）；ＥｒｂＢ２（ｐ８５：切断型（Ｔｒ）－ＥｒｂＢ２、ｐ－ＥｒｂＢ２、ｐ８５：Ｔｒ－ｐ－ＥｒｂＢ２、Ｈｅｒ２：Ｓｈｃ、ＥｒｂＢ２：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ２：ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ４）；ＥｒｂＢ３（ｐ－ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ｐ－ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ３：Ｓｈｃ）；ＥｒｂＢ４（ｐ－ＥｒｂＢ４、ＥｒｂＢ４：Ｓｈｃ）；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：ｈ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－Ｍｅｋ（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））を含む。

【００３９】

「活性化状態非依存抗体（ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｓｔａｔｅ－ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」という用語は、その活性化状態に関わりなく、試料中の一つ以上の対象となる分析物に特異的な（すなわち、結合し、結合され、または複合体を形成する）検出抗体を含む。例えば、活性化状態非依存性抗体は、一つ以上のシグナル伝達分子といった一つ以上の分析物のリン酸化型および非リン酸化型の両方を検出しうる。

【００４０】

「核酸（ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）」または「ポリヌクレオチド（ｐｏｌｙｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」という用語は、例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡといった単鎖型または二重鎖型におけ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。核酸は、参照核酸と同様の結合特性を有し、合成され、自然発生し、および自然発生しない既知のヌクレオチドアナログまたは改変された骨格残基または結合を含む核酸を含む。そのようなアナログの例は、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホン酸塩、キラルーメチルホスホン酸塩、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチドおよびペプチド－核酸（ＰＮＡ）を含むが、これに限定されるものではない。特に限定されない限り、その用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する、天然核酸の公知のアナログを含む

核酸を包含する。他に示されない限り、特定の核酸配列がまた、明確に示された配列と同様に、保存的に改変されたその変異体および相補配列を黙示的に包含する。

【００４１】

「オリゴヌクレオチド（ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）」という用語は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド、および／またはそれらの類似物の単鎖オリゴマーまたはポリマーのことをいう。ある例において、オリゴヌクレオチドは、自然発生（即ち、改変していない）の核酸塩基、糖、およびヌクレオシド間（骨格）結合から構成される。ある他の例において、オリゴヌクレオチドは、改変された核酸塩基、糖、および／またはヌクレオシド間結合から構成される。

【００４２】

本明細書では、「ミスマッチモチーフ（ｍｉｓｍａｔｃｈ　ｍｏｔｉｆ）」または「ミスマッチ領域（ｍｉｓｍａｔｃｈ　ｒｅｇｉｏｎ）」という用語は、その相補配列に対し１００％の相補性を有さないオリゴヌクレオチドの部分をいう。オリゴヌクレオチドは、少なくとも、１、２、３、４、５、６、またはそれ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、連続してもよいし、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２またはそれ以上の核酸によって分離されてもよい。ミスマッチモチーフまたは領域は、単一の核酸から構成されてもよく、または２、３、４、５またはそれ以上の核酸から構成されてもよい。

【００４３】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（ｓｔｒｉｎｇｅｎｔ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）」という用語は、オリゴヌクレオチドが、他の配列にはハイブリダイズしないが、その相補配列にハイブリダイズするであろう条件をいう。ストリンジェント条件は、配列に依存しており、異なる環境において異なるだろう。より長い配列は、特により高い温度でハイブリダイズする。核酸のハイブリダイズについての広範囲のガイドは、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ｐｒｏｂｅｓ，”Ｏｖｅｒｖｉｅｗ　ｏｆ　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ｏｆ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｔｈｅ　ｓｔｒａｔｅｇｙ　ｏｆ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ａｓｓａｙｓ”（１９９３）に開示されている。概して、ストリンジェントな条件は、所定のイオン強度ｐＨで、特定の配列に対する熱融点（Ｔｍ）よりも約５～１０℃低いように選択される。Ｔｍは、平衡状態で、（所定のイオン強度、ｐＨ、および核酸濃度で）ターゲット配列に相補的なプローブの５０％がターゲット配列にハイブリダイズする（ターゲット配列が過剰に存在する場合に、Ｔｍで、プローブの５０％が平衡状態で占領される）温度である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドといった不安定化試薬の添加で達成されてもよい。選択されるまたは特定のハイブリダイゼーションのため、ポジティブシグナルは、少なくともバックグラウンドのハイブリダイゼーションの２倍であり、好ましくはバックグラウンドのハイブリダイゼーションの１０倍である。

【００４４】

２つまたはそれ以上の核酸との関連で「実質的に同一の（ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ　ｉｄｅｎｔｉｃａｌ）」「実質同一（ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌ　ｉｄｅｎｔｉｔｙ）」という用語は、配列比較アルゴリズムを用いてまたはマニュアルアライメントおよび外観観察によって測定される際に、比較窓または指定領域にわたって最大限一致するように比較および位置比較されると、特定の割合同一である（すなわち、特定の領域にわたって、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％の同一性を有する）核酸を有するまたは同一である、２つまたはそれ以上の配列またはサブ配列のことをいう。この定義はまた、文脈が示す際には、同様に配列の相補性のこともいう。好ましくは、実質同一は、長さが、少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５または１００個の核酸である領域にわたって存在する。

【００４５】
（ＩＩＩ．実施形態の説明）
一つの実施形態において、本発明は、特異的で、多重の、ハイスループットのアッセイにおいて、腫瘍組織から取り出した腫瘍細胞または固形腫瘍の循環細胞における複数の制御が解除されたシグナル伝達因子の発現および活性化状態を検出する方法を提供する。本発明はまた、一つ以上の制御が解除されたシグナル経路を下方制御または遮断するための適切な治療法の選択のための方法および組成物を提供する。従って、本発明の実施形態は、特定の患者の腫瘍における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の分子署名に基づいて各個人用の治療法の設計を促進するために使用されてもよい。

【００４６】
固形腫瘍の循環細胞は、癌幹細胞、または内皮前駆細胞、循環内皮細胞、周皮細胞、循環血管新生促進骨髄性細胞、樹状細胞などといった腫瘍へと移動する細胞を含む、固形腫瘍から転移または微小転移したいずれかの細胞を含む。循環細胞を含む患者試料は、あらゆる入手しやすい生物液体（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、細針吸引物など）から得られうる循環細胞を含む。ある例において、全血試料は、血漿または血清画分、および細胞画分（すなわち、細胞沈殿物）に分離される。細胞画分は、典型的に、赤血球細胞、白血球細胞、および／または循環腫瘍細胞（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といった循環細胞を含む。血漿または血清画分は通常、とりわけ、固形腫瘍の循環細胞によって放出される核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）およびタンパク質を含む。

【００４７】
循環細胞は、典型的に、例えば、免疫磁気分離法（例えば、Ｒａｃｉｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：４５８９－４５９４（１９９８）；Ｂｉｌｋｅｎｒｏｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９２：５７７－５８２（２００１）を参照）、ｔｈｅ ＣｅｌｌＴｒａｃｋ（登録商標）Ｓｙｓｔｅｍ ｂｙ Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ（Ｈｕｎｔｉｎｇｄｏｎ Ｖａｌｌｅｙ，ＰＡ）、マイクロ流体分離法（例えば、Ｍｏｈａｍｅｄ ｅｔ ａｌ．，ＩＥＥＥ Ｔｒａｎｓ．Ｎａｎｏｂｉｏｓｃｉ．，３：２５１－２５６（２００４）；Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．５１４７，９７ｔｈ ＡＡＣＲ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（２００６）を参照）、ＦＡＣＳ（例えば、Ｍａｎｃｕｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，９７：３６５８－３６６１（２００１）を参照）、密度勾配遠心法（例えば、Ｂａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３）を参照）および減少法（ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ）（例えば、Ｍｅｙｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２）を参照）を含む一つ又は複数の分離方法を用いて、患者から分離される。

【００４８】
ある実施形態において、ｉｎ ｓｉｔｕ活性化状態を維持するために、細胞が分離された後すぐに、好ましくは、９６、７２、４８、２４、６または１時間以内に、より好ましくは、３０、１５または５分以内に、シグナル伝達因子が抽出されるのが有利である。分離された細胞はまた、有利には、シグナル伝達因子の活性を復活させる、または刺激するために、通常、ナノモル濃度～マイクロモル濃度で、約１～３０分間、増殖因子とインキュベートされてもよい（例えば、Ｉｒｉｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）を参照）。促進性の増殖因子は、上皮細胞増殖因子（ＥＧＦ）、ヘレグリン（ＨＲＧ）、ＴＧＦ－α、ＰＩＧＦ、アンギオポイエチン（Ａｎｇ）、ＮＲＧ１、ＰＧＦ、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、サイトカインなどを含む。個々の患者に対する可能な抗癌療法を評価するため、増殖因子の刺激の前に、分離された細胞が、複数の容量の一つ以上の抗癌剤とインキュベートされ得る。増殖因子

の刺激は、数分または数時間（例えば、１～５分から１～６時間）、実施され得る。抗癌剤の有無におけるシグナル伝達経路の活性化差異は、個々の患者それぞれに対する適切な用量での適切な癌治療の選択を助ける。分離、抗癌剤処理および／または増殖因子刺激後、細胞は、当業者に公知の任意の技術を用いてシグナル伝達因子を抽出するために溶解される。好ましくは、細胞溶解は、増殖因子刺激後、約１～３６０分の間に開始され、より好ましくは、２つの異なる時間間隔：（１）増殖因子刺激後約１～５分で；および（２）増殖因子刺激後約３０～１８０分の間で開始される。その代わりに、溶解物は、使用まで－８０℃で保存され得る。

【００４９】

ある実施形態において、抗癌剤は、癌細胞における活性型シグナル伝達経路の分子の機能を阻害する薬剤から構成される。そのような薬剤の非限定的な例は、以下に記載された薬剤を含む。

【表１】

表A

EGFR (A) (ErbB1)
セツキシマブ（Cetuximab）
パニツムマブ（Panitumumab）
マツズマブ（Matuzumab）
ニモツズマブ（Nimotuzumab）
EGFR ワクチン

Her 2 (C) (ErbB2)
トラスツズマブ（Trastuzumab）
（ヘルセプチン(Herceptin)）
ペルツズマブ（Pertuzumab）（DNA）
BMS-599626（ヘテロ2量体化 Her1/2; フェーズ1）

Her 3 (ErbB3)(E)
抗体 (U3)

Her4 (ErbB4) target

EGFR (B) (ErbB1)
エルロチニブ（Erlotinib）
ゲフィチニブ（Gefitinib）
EKB 569 (Wyeth, 不可逆的, II CRC)
CL-387-785 （Wyeth, 不可逆的，前臨床）

Her 2 (D) (ErbB2)
CP-724714 (Pfizer)

ErbB1/2 (F)
ラパチニブ（Lapatinib）
HKI-272 (Wyeth, 不可逆的，I/II NSCLC, 胸)
HKI-357 (前臨床)
BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim, 不可逆的, I/II 前立腺, 卵巣, 胸)

ErbB1/2/4 (G)
カネルチニブ（Canertinib）(Pfizer, 不可逆的, II NSCLC, 胸)
ARRY-334543
JNJ-26483327
JNJ-26483327

Raf (H)
ソラフェニブ（Sorafenib）
PLX4032 (Plexxikon)

SRC
AZ

Mek: (I)
PD-325901 (II: NSCLC)
AZD6244 - Array/Az
XL518 Exelisis/DNA

NFkB-IkB

mTor target (J)
Rad 001 : Everolimus (Novartis, ゲフィチニブ／エルロチニブ（Gefetinib/Erlotinib）の組み合わせ; I/II: NSCLC, グリア芽腫)
テムシロリムス（Temsirolimus）(Wyeth, ゲフィチニブ／エルロチニブ（Gefetinib/Erlotinib）の組み合わせ; I/II: NSCLC, グリア芽腫)
AP-23573 (Ariad, I/II : 子宮内膜)

PI3K:
PX-866 (P110アルファ特異的阻害剤; ProlX Pharma; 前臨床 NSCLC)

VEGF ターゲット (ターゲット VEGFR2, および VEGFR1) (K)
アバスチン（Avastin）(DNA)
HuMV833 (PDL) 抗-VEGFa
VEGF-Trap - Regeneron/Aventis (受容体模倣体) (フェーズ 2)

VEGFR-2 ターゲット (L)
DC101 - Imclone (フェーズ 2/3?)
IMC-IC11 抗VEGFR2 キメラ IgG1
完全ヒト化 IMC1121B
CDP-791 (Celltech, pegalated 抗 R2 di-Fab抗体
Pazopanib (GSK) (多発性骨髄腫, 卵巣,RCC フェーズ3 登録完了, 肉腫 II)
CDP-791 (UCB)
CP-547632 (OSI, PFIZER): (+ EGFR + PDGFR) (NSCLC, 卵巣 フェーズ 2)
AG13736 (Pfizer): VEGFR1,2 および PDGFRベータ) (RCC II)
E-7080 (Eisai)
CHIR-258 (VEGFR1,2 FGFR3,PDGFR)
OSI-930 (+ cKit, PDGFR)
Bay-579352 (+ PDGFR)
ABT-869 (+CSF1R, Erk, Flt-3,PDGFR)
BMS-540215 (+FGFR1)
KRN-951
BBIW

EPH A-D

VEGFR 1/2/3:
AZD 2171 (NSCLC, CRC)
AMG-706 (+ PDGFR)

VEGFR 2/ErbB1/2 (EGFR)/cMet/FGFR (M)
ZD6474 (vandetanib) (フェーズ III: チロイド, NSCLC)
XL647 (Exelixis; また EPHB2): (エルロチニブ耐性患者; アジア人患者) (フェーズ 2)
AEE 788 (Novartis, フェーズ1/2)

【表２】

表A（続き）

VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N)
ソラフェニブ（Sorafenib）(RCC, HCC, NSCLC(III), 黒色腫(III),

TIE 1/2

VEGFR2/1/3,Flt-3,cFMS, PDGFR/cKit/
PTK787 (Not cFMS, FLT-3)
スニチニブ（Sunitinib）
XL-999
SU-6668 (Pfizer)
GSK
AZ (AZD2171)
BMS
Novartis (AEE-788)
Amgen
その他

(O)

PDGFR target (P)
タンヅチニブ（Tandutinib）
ニロチニブ（Nilotinib）

Abl ターゲット: (Q)
イマチニブ（Imatinib）
ダサチニブ（Dasatinib）
ニロチニブ（Nilotinib）
AT-9283
AZD-0530
ボスチニブ（Bosutinib）

FTL 3

RET

Kit ターゲット (R)
AMG-706
XL-880
XL-999

HGFR1/2

FGFR1-4
Chiron

IGF-1R ターゲット(S)
Merck
Pfizer
Novartis

HSP90 阻害剤:
IPI-504 (Infinity Pharma, 変異 EGFR, I/II 多発性骨髄腫, GIST)
17-AAG (Kosan, I/II 固形腫瘍)

細胞分裂抑制薬:
ドセタキセル（微小管安定化剤; アジュバントおよび進行性乳癌; NSCLC,アンドローゲン非依存性前立腺癌）
パクリタキセル（Paclitaxel）（微小管安定化剤;; アジュバントおよび進行性乳癌r, NSCLC, 卵巣癌, カポジ肉腫関連AIDS）
ビンブラスチン（Vinblastine),ビンクリスチン（Vincristine),ビノレルビン（Vinorelbine）（微小管 De−安定化剤）

その他 ターゲット:
HDAC阻害剤
BCL2
化学療法 (breakdown)
プロテオソーム阻害剤

【００５０】

他の実施形態において、本発明は、固相担体上に拘束された、複数のキャプチャ抗体の希釈系列から構成される、高いダイナミックレンジを有するアレイを提供し、各希釈系列中のキャプチャ抗体は、シグナル伝達経路の構成因子に対応した、一つ以上の分析物に特異的である。様々な観点において、この実施形態は、特定の腫瘍の特徴的なシグナル伝達経路、例えば、肺癌細胞において活性化されているシグナル伝達経路、の構成因子から構成されるアレイを含む。従って、本発明は、有利には、各種類の癌が単一のアレイまたはチップ上に提示されるように実施され得る。いくつかの観点において、特定の腫瘍細胞において活性化している所定のシグナル伝達経路の構成因子は、細胞内においてシグナル伝達経路を介して情報が伝達される順番に、対応する直線状配列に配置される。そのようなアレイの例は、図３および図４に示される。

【００５１】

本発明を使用して調べられ得るシグナル伝達経路の非限定的な例は、表１に示される経路を含む。

【表３】

表1

経路 1	EGFR	EGFR リン酸化	EGFR Shc	EGFR ユビキチン化	EGFR-PI3K	PTEN		
経路 2	EGFR	EGFRVIII	EGFR リン酸化	EGFR Shc	EGFR ユビキチン化	EGFRVIII リン酸化	PTEN	
経路 3	ERBB2	ERBB2 リン酸化	Her 2 Shc	ERBB2: PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン化	PTEN		
経路 4	ERBB2	P85切断型 ERBB2	ERBB2 リン酸化	P85Truncated ERBB2 リン酸化	Her 2 Shc	ERBB2: PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン化	
経路 5	ERBB3	ERBB3リン酸化	ERBB3:PI3K 複合体	ERBB3 PI3K リン酸化	ERBB3:Shc			
経路 6	ERBB4	ERBB4リン酸化	ERBB4:Shc					
経路 7	IGF-1R	IGF-1Rリン酸化	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	リン酸化 IRS	IGF-1R :PI3K		
経路 8	INSR	INSRリン酸化						
経路 9	KIT	KITリン酸化						
経路 10	FLT3	FLT3リン酸化						
経路 11	HGFR 1	HGFR 1 リン酸化						
経路 12	HGFR 2	HGFR 2 リン酸化						
経路 13	RET	RETリン酸化						
経路 14	PDGFRアルファ	PDGFRアルファ リン酸化						
経路 15	PDGFRベータ	PDGFRベータ リン酸化						
経路 16	VEGFR 1	VEGFR 1 リン酸化	VEGFR 1: PLC γ 複合体	VEGFR 1: Src				
経路 17	VEGFR 2	VEGFR 2 リン酸化	VEGFR 2: PLC γ 複合体	VEGFR 2: 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	VEGFR 3	VEGFR 3 リン酸化						
経路 19	FGFR 1	FGFR 1 リン酸化						
経路 20	FGFR 2	FGFR 2 リン酸化						
経路 21	FGFR 3	FGFR 3 リン酸化						
経路 22	FGFR 4	FGFR 4 リン酸化						
経路 23	TIE 1	TIE 1 リン酸化						
経路 24	TIE 2	TIE 2 リン酸化						
経路 25	EPHA	EPHA リン酸化						
経路 26	EPHB	EPHB リン酸化						
経路 27	NFkB-IkB 複合体	リン酸化-IkB (S32) 総 IkB	総 NF κ B リン酸化 NF κ B(S536)	総 P65 IkBa リン酸化 P65 IkBa				
経路 28	ER	リン酸化 ER	ER-AIB1	Other ER 複合体es				
経路 29	PR	リン酸化Pr		PR 複合体es				
経路 30	Hedgehog 経路							
経路 31	Wnt 経路							
経路 32	Notch 経路							
経路 33	総 Mek リン酸化 Mek (S217/S221)	総 Erk リン酸化Erk (T202/Y204)	総 Rsk-1 リン酸化Rsk-1 (T357/S363)	総 Stat3 リン酸化 Stat-3 (Y705) (S727) 総 Stat 1 リン酸化 Stat1 (Y 701)	リン酸化Bad (S112) Bad (総量)	総 Fak リン酸化Fak (Y576)	総 cSrc リン酸化 cSrc(Y416)	総 Ras リン酸化 Ras
経路 34	Akt (総量) リン酸化 Akt (T473)	リン酸化 Akt (T308)	リン酸化 Bad (S112) Bad (総量)	リン酸化 Bad (S136)	Bad:14-3-3 複合体	総 mTor リン酸化 mTor (S2448)	総 p70S6K リン酸化 p70S6K (T229) (T389)	GSK3ベータ 総量 (リン酸化Ser 9)
経路 35	総 Jnk リン酸化 Jnk (T183/Y185)	総 P38 リン酸化 P38 (T180/Y182)	総 Rb リン酸化Rb (S249/T252) リン酸化Rb (S780)	総 p53 リン酸化 p53 (S392) リン酸化 p53 (S20)	リン酸化-CREB(S133) 総量 CREB	総 c-Jun リン酸化-c-Jun; (S63)	総量 パキシリン (Paxillin) リン酸化 パキシリン (Paxillin) (Y118)	
経路 36	Ki67	切断された カスパーゼ 3,8,9 その他						
経路 37	TGFベータ							

【００５２】

ある実施形態において、抗癌剤は、モノクローナル抗体またはチロシンキナーゼ阻害剤抗シグナル伝達剤（即ち、細胞増殖抑制剤）、抗増殖剤、化学療法剤（即ち、細胞毒性薬）、放射線治療薬、ワクチン、および／または癌性細胞といった異常細胞の非制御性増殖

を低減または無効にする能力を有する任意の他の構成因子から構成される。いくつかの実施形態において、分離された循環細胞は、一つ以上の化学療法剤と組み合わせて、抗シグナル伝達剤および／または抗増殖剤と一緒に処理される。

【００５３】

本発明における使用に適した抗シグナル伝達剤の例は、トラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、アレムツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（Ｃａｍｐａｔｈ（登録商標））、ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、セツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））、ゲムツズマブ（ｇｅｍｔｕｚｕｍａｂ）（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、パニツムマブ（ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、リツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））およびトシツモマブ（ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）（ＢＥＸＸＡＲ（登録商標））といったモノクローナル抗体；ゲフィチニブ（ｇｅｆｉｔｉｎｉｂ）（Ｉｒｅｓｓａ（登録商標））、スニチニブ（ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ）（Ｓｕｔｅｎｔ（登録商標））、エルロチニブ（ｅｒｌｏｔｉｎｉｂ）（Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標））、ラパチニブ（ｌａｐａｔｉｎｉｂ）（ＧＷ－５７２０１６）、カネルチニブ（ｃａｎｅｒｔｉｎｉｂ）（ＣＩ　１０３３）、セマキシニブ（ｓｅｍａｘｉｎｉｂ）（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ｖａｔａｌａｎｉｂ）（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ｓｏｒａｆｅｎｉｂ）（ＢＡＹ　４３－９００６；Ｎｅｘａｖａｒ（登録商標））、イマチニブメシレート（ｉｍａｔｉｎｉｂ　ｍｅｓｙｌａｔｅ）（Ｇｌｅｅｖｅｃ（登録商標））、レフルノミド（ｌｅｆｌｕｎｏｍｉｄｅ）（ＳＵ１０１）およびバンデタニブ（ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ）（ＺＡＣＴＩＭ（登録商標）；ＺＤ６４７４）といったチロシンキナーゼ阻害剤およびこれらの組み合わせを含むがこれに限定されるものではない。

【００５４】

具体的な抗増殖剤は、シロリムス（ｓｉｒｏｌｉｍｕｓ）（ｒａｐａｍｙｃｉｎ）、テムシロリムス（ｔｅｍｓｉｒｏｌｉｍｕｓ）（ＣＣＩ－７７９）、およびエベロリムス（ｅｖｅｒｏｌｉｍｕｓ）（ＲＡＤ００１）といったｍＴＯＲ阻害剤、１Ｌ６－ヒドロキシメチル－チロ－イノシトール－２－（Ｒ）－２－Ｏ－メチル－３－Ｏ－オクタデシル－ｓｎ－グリセロカルボネート、９－メトキシ－２－メチルエリプチシニウムアセテート（９－ｍｅｔｈｏｘｙ－２－ｍｅｔｈｙｌｅｌｌｉｐｔｉｃｉｎｉｕｍ　ａｃｅｔａｔｅ）、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－フォルミルクロモンチオセミカルバゾン（３－ｆｏｒｍｙｌｃｈｒｏｍｏｎｅ　ｔｈｉｏｓｅｍｉｃａｒｂａｚｏｎｅ）（Ｃｕ（ＩＩ）Cl_2複合体）、ＡＰＩ－２、癌原遺伝子ＴＣＬ１の１０～２４アミノ酸由来の１５－ｍｅｒペプチド（Ｈｉｒｏｍｕｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７９：５３４０７－５３４１８（２００４））、ＫＰ３７２－１、およびＫｏｚｉｋｏｗｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２５：１１４４－１１４５（２００３）およびＫａｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ，４：４６３－４７６（２００３）に記載された組成物といったＡｋｔ阻害剤、およびそれらの組み合わせを含む。

【００５５】

化学療法剤の非限定的な例は、白金に基づく薬剤（例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロノプラチン、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（ｉｆｏｓｆａｍｉｄｅ）、クロランブシル（ｃｈｌｏｒａｍｂｕｃｉｌ）、ブスルファン（ｂｕｓｕｌｆａｎ）、メルファラン（ｍｅｌｐｈａｌａｎ）、メクロレサミン（ｍｅｃｈｌｏｒｅｔｈａｍｉｎｅ）、ウラムスチン（ｕｒａｍｕｓｔｉｎｅ）、チオテパ（ｔｈｉｏｔｅｐａ）、ニトロソウレア（ｎｉｔｒｏｓｏｕｒｅａ）など）、抗－代謝産物（例えば、５－フルオロウ

ラシル（５－ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｌ）、アザチオプリン（ａｚａｔｈｉｏｐｒｉｎｅ）、６－メルカプトプリン（６－ｍｅｒｃａｐｔｏｐｕｒｉｎｅ）、メトトレキサン（ｍｅｔｈｏｔｒｅｘａｔｅ）、ロイコボリン（ｌｅｕｃｏｖｏｒｉｎ）、カペシタビン（ｃａｐｅｃｉｔａｂｉｎｅ）、シタラビン（ｃｙｔａｒａｂｉｎｅ）、フロクスウリジン（ｆｌｏｘｕｒｉｄｉｎｅ）、フルダラビン（ｆｌｕｄａｒａｂｉｎｅ）、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ）（Ｇｅｍｚａｒ（登録商標））、ペメトレキセド（ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ）（ＡＬＩＭＴＡ（登録商標））、ラルチトレキセド（ｒａｌｔｉｔｒｅｘｅｄ）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（ｖｉｎｏｒｅｌｂｉｎｅ）、ビンデスチン（ｖｉｎｄｅｓｉｎｅ）、ポドフィルトキシン（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、パクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）（Ｔａｘｏｌ（登録商標））、ドセタキセル（ｄｏｃｅｔａｘｅｌ）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（ａｍｓａｃｒｉｎｅ）、エトポシド（ｅｔｏｐｏｓｉｄｅ）（ＶＰ１６）、エトポシドホスフェート、テニポシド（ｔｅｎｉｐｏｓｉｄｅ）など）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン（ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ）、アドリアマイシン（ａｄｒｉａｍｙｃｉｎ）、ダウロルビシン（ｄａｕｎｏｒｕｂｉｃｉｎ）、エピルビシン（ｅｐｉｒｕｂｉｃｉｎ）、アクチノマイシン、ブレオマイシン（ｂｌｅｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシン、ミトキサントロン（ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎｅ）、プリカマイシン（ｐｌｉｃａｍｙｃｉｎ）など）、それらの製剤的に許容できる塩、、それらの立体異性体、それらの誘導体、それらの類似体、およびそれらの組み合わせを含む。

【００５６】

本発明において有用な癌ワクチンの非限定的な例は、アクティブバイオテック（Ａｃｔｉｖｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）からのＡＮＹＡＲＡ、ノースウエストバイオセラピューティクス（Ｎｏｒｔｈｗｅｓｔ　Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）からのＤＣＶａｘ－ＬＢ、ＩＤＭファーマからのＥＰ－２１０１、ファルメクサ（Ｐｈａｒｍｅｘａ）からのＧＶ１００１、イデラファーマシューティカル（Ｉｄｅｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）からのＩＯ－２０５５、イントロジェンセラピューチクス（Ｉｎｔｒｏｇｅｎ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）からのＩＮＧＮ　２２５およびバイオミラ／メルク（Ｂｉｏｍｉｒａ／Ｍｅｒｃｋ）からのスチムバックス（Ｓｔｉｍｕｖａｘ）を含むが、これに限定されるものではない。

【００５７】

放射線治療薬の例は、任意に腫瘍抗原に対する抗体に結合された^{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といった放射性核種を含むが、これに限定されるものではない。

【００５８】

いくつかの実施形態において、キャプチャ抗体の各希釈系列は、一連の下降するキャプチャ抗体濃度から構成される。ある例において、キャプチャ抗体は、少なくとも２倍（例えば、２，５，１０，２０，５０，１００，５００または１０００倍）で連続的に希釈されて、アレイ上にスポットされる、規定数（例えば、２，３，４，５，６，７，８，９，１０，１５，２０，２５またはそれ以上）の下降キャプチャ抗体濃度から構成される希釈系列を作成する。各キャプチャ抗体の希釈の少なくとも２，３，４，５または６の反復がアレイ上にスポットされることが好ましい。

【００５９】

他の実施形態において、固相担体は、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、ポリビニリデンフルオライド（ＰＶＤＦ）など）、繊維束、または他の適切な基質から構成される。好ましい実施形態において、キャプチャ抗体は、例えば、Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）から商業的に入手可能なＦＡＳＴ（登録商

標）スライドといった、ニトロセルロースポリマーを塗布されたガラススライド上に（例えば、共有または非共有結合を介して）固定される。

【００６０】

いくつかの実施形態において、細胞抽出物は、固形腫瘍の循環細胞の抽出物から構成される。循環細胞は、典型的には、例えば、免疫磁気分離法、ＣｅｌｌＴｒａｃｋ（登録商標）システム、マイクロ流体分離法、ＦＡＣＳ、密度勾配遠心法、および減少法を含む当業者に公知の一つ以上の分離方法を使用して、患者試料から分離される。

【００６１】

他の実施形態において、患者試料は、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、および／または細針吸引試料から構成される。ある例において、全血試料は、血漿または血清画分および細胞画分（即ち、細胞沈殿物）に分離される。細胞画分は、典型的には、赤血球細胞、白血球細胞および／またはＣＴＣ，ＣＥＣ，ＣＥＰＣ，リンパ節の播種性腫瘍細胞、および／またはＣＳＣといった固形腫瘍の循環細胞を包含する。血漿または血清画分は、通常、とりわけ、固形腫瘍の循環細胞によって放出される核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）およびタンパク質を含む。

【００６２】

いくつかの例において、分離された循環細胞は、一つ以上の目的の抗癌剤とのインキュベーション前、その間、および／またはその後に、インビトロで一つ以上の増殖因子で刺激され得る。刺激性の増殖因子は、上述される。他の例において、分離された循環細胞は、当業者に公知の任意の技術を使用して細胞抽出物（例えば、細胞溶解物）を作製するために、例えば、増殖因子の刺激および／または抗癌剤処理に続いて溶解され得る。細胞溶解は、増殖因子刺激後約１～３６０分の間に開始されることが好ましく、２つの異なる時間間隔：（１）増殖因子刺激後約１～５分；（２）増殖因子刺激後約３０～１８０分の間、で開始されることがより好ましい。代わりに、細胞溶解物は、使用まで－８０℃で保存され得る。

【００６３】

好ましい実施形態において、固形腫瘍の循環細胞といった腫瘍細胞中における多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、以下に述べるような単一の検出アッセイまたは近接二重検出アッセイを使用して検出される。

【００６４】

（ＩＶ．抗体アレイの構築）

ある形態において、固形腫瘍の循環細胞といった腫瘍細胞の細胞抽出物における多数のシグナル伝達分子の活性化状態は、固相担体上に固定されたキャプチャ抗体の希釈系列から構成される抗体に基づくアレイを使用して検出される。アレイは、典型的に、異なるアドレス可能な位置において固相担体の表面に連結された、ある範囲のキャプチャ抗体濃度での複数の異なるキャプチャ抗体から構成される。

【００６５】

固相担体は、タンパク質を固定するための、任意の適切な基質から構成され得る。固相担体の例は、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、セラミクス、などを含むが、これに限定されるものではない。ナイロン（Ｂｉｏｔｒａｎｓ（登録商標）），ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．（Ｃｏｓｔａ Ｍｅｓａ，ＣＡ）；Ｚｅｔａ－Ｐｒｏｂｅ（登録商標），Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）；ニトロセルロース（Ｐｒｏｔｒａｎ（登録商標），Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ Ｐａｒｋ，ＮＪ））および ＰＶＤＦ（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎａ，Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐ．（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ））といった膜が、本発明のアレイにおける固形支持体としての使用に適している。キャプチャ抗体は、Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ Ｐａｒｋ，ＮＪ）から商業的に入手可能なニトロセルロースポリマー、例えば、ＦＡＳＴ（登録商標）スライドを塗布されたガラス上に固定されることが好ましい。

【００６６】
望ましい固形支持体の特定の特徴は、多数のキャプチャ抗体への結合能および最小限の変性でのキャプチャ抗体との結合能を含む。他の適切な特徴は、キャプチャ抗体を含む抗体溶液が、固形支持体上に塗布される際、固形支持体が最小限の「ウィッキング（ｗｉｃｋｉｎｇ）」を示すことである。最小限のウィッキングを有する固形支持体は、支持体に塗布されるキャプチャ抗体溶液の少量一定分量を許容し、結果として固定されたキャプチャ抗体の小さく明確なスポットをもたらす。
【００６７】
キャプチャ抗体は、典型的に、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力、双極子－双極子結合）を介して固相担体上に直接または間接的に（例えばキャプチャ抗体を介して）固定される。いくつかの実施形態において、キャプチャ抗体は、標準的な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の架橋剤を用いて固相担体に共有結合される。適切な架橋剤は、例えばＰｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）といった業者から商業的に入手可能である。
【００６８】
本発明における使用に適したアレイを製造する方法は、タンパク質または核酸アレイを製造するために使用される任意の技術を含むが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、キャプチャ抗体は、典型的には、スプリットピンまたはインクジェットプリンタを備えるロボットのプリンタであるマイクロスポッタを使用して、アレイ上にスポットされる。ここで述べる抗体アレイを印刷するために適したロボットシステムは、ＣｈｉｐＭａｋｅｒ２スプリットピン（ＴｅｌｅＣｈｅｍ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ；Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）を有するＰｉｘＳｙｓ ５０００ロボット（Ｃａｒｔｅｓｉａｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ）に加えてＢｉｏＲｏｂｉｃｓ（Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）およびＰａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏ．（Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）から入手可能な他のロボットのプリンタを含む。各キャプチャ抗体希釈の少なくとも２，３，４，５または６の反復がアレイ上にスポットされることが好ましい。
【００６９】
本発明における使用に適したアレイを製造するための他の方法は、支持体上に規定量の液体を取り出すのに効果的な条件下で固相担体上にキャピラリー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に既知の量のキャプチャ抗体を分注することから構成され、この工程は、完全なアレイを作製するために各選択されたアレイ位置で選択されたキャプチャ抗体の希釈を使用して繰り返される。その方法は、複数のそのようなアレイを形成する際に実施されてもよく、その液体分注工程が、各繰り返しサイクルで複数の固相支持体のそれぞれの上の選択された位置に適用される。そのような方法の更なる説明は、例えば米国特許第５，８０７，５２２号明細書に開示されている。
【００７０】
ある例において、紙上に印刷するための装置は、抗体アレイを製造するために使用され得る。例えば、所定のキャプチャ抗体希釈が、デスクトップジェットプリンタのプリントヘッドへと積み込まれ得、適切な固相担体上に印刷され得る（例えば、Ｓｉｌｚｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，４４：２０３６－２０４３（１９９８）を参照）。
【００７１】
いくつかの実施形態において、固相担体上に作製されたアレイは、少なくとも約５スポット／cm^2の密度を有し、好ましくは少なくとも約１０，２０，３０，４０，５０，６０，７０，８０，９０，１００，１１０，１２０，１３０，１４０，１５０，１６０，１７０，１８０，１９０，２００，２１０，２２０，２３０，２５０，２７５，３００，３２５，３５０，３７５，４００，４２５，４５０，４７５，５００，５５０，６００，６５０，７００，７５０，８００，８５０，９００，９５０，１０００，２０００，３０００，４０００，５０００，６０００，７０００，８０００，９０００または１００００ス

ポット／ｃｍ^{2}を有する。

【００７２】

ある例において、固相担体上のスポットは、異なるキャプチャ抗体を示す。ある他の例において、固相担体上の多数のスポットは、例えば、一連の下降キャプチャ抗体濃度から構成される希釈系列のような、同一のキャプチャ抗体を提示する。

【００７３】

固相担体上に抗体アレイを作製、構築する方法の追加の例は、米国特許第６，１９７，５９９号，第６，７７７，２３９号、第６，７８０，５８２号、第６，８９７，０７３号、第７，１７９，６３８号、第７，１９２，７２０号、米国特許出願公報第２００６０１１５８１０号明細書、第２００６０２６３８３７号明細書、第２００６０２９２６８０号明細書、第２００７００５４３２６号明細書；およびＶａｒｎｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　２６４：１６１－１７２　（２００４）に記載されている。

【００７４】

抗体アレイをスキャンする方法は、当業者に公知であり、タンパク質または核酸アレイをスキャンするために使用される任意の技術を含むが、これに限定されるものではない。本発明の使用に適したマイクロアレイスキャナは、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ（Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ），Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ），Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ（Ｉｓｓａｑｕａｈ，ＷＡ），ＧＳＩ　Ｌｕｍｏｎｉｃｓ　Ｉｎｃ．（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）およびＡｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｕｎｉｏｎ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）から入手可能である。非限定的な例として、蛍光検出のためのＧＳＩ　ＳｃａｎＡｒｒａｙ３０００　は、定量のためのＩｍａＧｅｎｅソフトウエアと共に使用され得る。

【００７５】

（Ｖ．単一検出アッセイ）

いくつかの実施形態において、固形腫瘍の循環細胞といった腫瘍細胞の細胞抽出物中の目的の特定の分析物（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、高いダイナミックレンジを有する、多重でハイスループットの２抗体アッセイである。非限定的な例として、アッセイにおいて使用される２つの抗体は、（１）分析物に特異的なキャプチャ抗体、および（２）分析物の活性型に特異的な検出抗体（即ち、活性化状態依存性抗体）から構成され得る。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／または複合体形成の状態を検出することができる。その代わりに、検出抗体は、細胞抽出物中の分析物の総量を検出する、活性化状態非依存性抗体から構成される。活性化状態非依存性抗体は、概して、分析物の活性型および不活性型の両方を検出することができる。

【００７６】

好ましい実施形態において、２抗体アッセイは、

（ｉ）複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに細胞抽出物をインキュベートして、複数の捕捉された分析物を形成する工程と、

（ｉｉ）対応する分析物に特異的な活性化状態依存性抗体とともに複数の捕捉された分析物をインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成する工程と、

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅対の第１および第２の要素とインキュベートして、増幅されたシグナルを生成する工程と、

（ｉＶ）シグナル増幅対の第１および第２の要素から生成された増幅されたシグナルを検出する工程と、

から構成される。

【００７７】

本明細書で述べる２抗体アッセイは、典型的には、異なるアドレス可能な位置において、固相担体の表面に連結される、一定の範囲のキャプチャ抗体濃度の、複数の異なるキャプチャ抗体から構成される抗体に基づくアレイである。本発明の使用に適した固相担体の

例は上述される。

【００７８】

キャプチャ抗体および検出抗体は、結合する分析物に対する、それらの間の競合を最小限にするように選択されることが好ましい（即ち、キャプチャ抗体および検出抗体は、それらの対応するシグナル伝達分子と同時に結合し得る）。

【００７９】

一つの実施形態において、検出抗体は、結合対の第１の要素（例えば、ビオチン）から構成され、シグナル増幅対の第１の要素は、結合対（例えば、ストレプトアビジン）の第２の要素から構成される。結合対の要素は、当業者に広く知られた方法を使用して、検出抗体とまたはシグナル増幅対の第１の要素と、直接的または間接的に連結され得る。ある例において、シグナル増幅対の第１の要素は、ペルオキシダーゼ（例えば、セイヨウ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、シトクロームｃペルオキシダーゼ、エノシノフィルペルオキシダーゼ、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、チロイドペルオキシダーゼ、デヨードナーゼ、等）であり、シグナル増幅対の第２の要素は、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）である。これらの例において、増幅されたシグナルは、過酸化水素（H_2O_2）の存在下において、活性型チラミドを生み出すために、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。

【００８０】

活性型チラミドは、直接検出されるか、或いは、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フルオロフォアと発色試薬との組み合わせといったシグナル検出試薬の添加によって検出されるかのいずれかである。本発明の使用に適したフルオロフォアの例は、アレクサフルオール（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標））染色剤（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）、オレゴングリーン（Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（登録商標）；　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（登録商標）フルオール（例えば、Ｃｙ２，Ｃｙ３，Ｃｙ５）等を含むが、これに限定されるものではない。ストレプトアビジン標識フルオロフォア標識は、当業者に広く知られた方法を用いて、フルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接又は間接的に連結され得る。本発明の使用に適した発色試薬の非限定的な例は、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チン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）、４－クロロ－１－ナフトール（４ＣＮ）および／又はポルフィリノーゲンを含む。

【００８１】

本明細書において述べる２抗体アッセイを実施するための具体的なプロトコルは、実施例３において提供される。

【００８２】

その他の実施形態において、本発明は、上述した２抗体アッセイを実施するためのキットを提供し、このキットは、（ａ）固相担体上に固定された複数のキャプチャ抗体の希釈系列と、（ｂ）複数の検出抗体（例えば、活性化状態依存性抗体および／または活性化状態非依存性抗体）と、から構成される。いくつかの例において、このキットは更に、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のキットを用いる方法のための取扱説明書を含み得る。このキットはまた、例えば、シグナル増幅対の第１および第２の要素、チラミドシグナル増幅試薬、洗浄用緩衝液、などといった本発明の特定の方法を実施することに関して上述された任意の追加の試薬を含んでもよい。

【００８３】

（ＶＩ．近接２重検出アッセイ）

いくつかの実施形態において、固形腫瘍の循環細胞といった腫瘍細胞の細胞抽出物中における目的の特定の分析物の活性化状態を検出するためのアッセイは、高いダイナミック

レンジを有する、多重で、ハイスループットの近接（即ち、３抗体）アッセイである。非限定的な例として、この近接アッセイにおいて使用される２つの抗体は、（１）分析物に特異的なキャプチャ抗体と、（２）分析物の活性型に特異的な検出抗体（即ち、活性化状態依存性抗体）と、（３）分析物の総量を検出する検出抗体（即ち、活性化状態非依存性抗体）と、から構成され得る。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、概して、分析物の活性型および非活性型の両方を検出することができる。

【００８４】

好ましい実施形態において、近接アッセイは、

（ｉ）複数の捕捉された分析物を形成するための複数のキャプチャ抗体の希釈系列とともに細胞抽出物をインキュベートする工程と、

（ｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物を形成するための対応する分析物に特異的な複数の活性化状態非依存性抗体と活性化状態依存性抗体とから構成される検出抗体とともに複数の捕捉された分析物をインキュベートする工程であって、この活性化状態非依存性抗体は、促進部位で標識され、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の要素で標識され、この促進部位は、シグナル増幅対の第１の要素に向けられて反応する酸化剤を生成する、工程と、

（ｉｉｉ）増幅されたシグナルを生成するために、シグナル増幅対の第２の要素とともに複数の検出可能な捕捉された分析物をインキュベートする工程と、

（ｉｖ）シグナル増幅対の第１および第２の要素から生成された増幅シグナルを検出する工程と、から構成される。

【００８５】

その代わりに、活性化状態依存性抗体は、促進部位で標識され得、活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の要素で標識され得る。

【００８６】

本明細書において述べる近接アッセイは、典型的には、異なるアドレス可能な位置における固相担体の表面に連結された、一定の範囲のキャプチャ抗体濃度の、複数の異なるキャプチャ抗体から構成される抗体に基づくアッセイである。本発明における使用に適した固相担体の例は、上述される。

【００８７】

キャプチャ抗体、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、分析物の結合に関して、それらの間の競合を最小限にするように選択される（即ち、全ての抗体が、同時に、それらの対応するシグナル伝達分子に結合し得る）ことが好ましい。

【００８８】

いくつかの実施形態において、活性化状態非依存性抗体は更に、検出可能部位から構成される。そのような例において、検出可能部位の量は、細胞抽出物における一つ又は複数の分析物の量に相関する。検出可能部位の例は、蛍光標識、化学反応性標識、酵素標識等を含むが、これに限定されるものではない。検出部位は、アレクサフルオール（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標））染色剤　（例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）６４７）、フルオレセイン（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ）、フルオレセインイソチオシアネート（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ　ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ）（ＦＩＴＣ）、オレゴングリーン（Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（登録商標））；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（登録商標）フルオール　（例えば、Ｃｙ２，Ｃｙ３，Ｃｙ５）等であることが好ましい。検出可能部位は、当業者に広く知られた方法を用いて、活性化状態非依存性抗体に直接または間接的に連結され得る。

【００８９】

ある例において、活性化状態非依存性抗体は、促進部位で直接、標識される。促進部位は、当業者に公知の方法を用いて活性化状態非依存性抗体に連結され得る。本発明における使用に適した促進部位は、促進部位に近接する（即ち、空間的に隣接または接近する）

他の分子に向けられ（即ち、方向付けられ）、この分子と反応する（即ち、それと結合する、それによって結合される、又はそれと複合体を形成する）酸化剤を生成することができる任意の分子を含む。促進部位の例は、グルコースオキシダーゼまたは電子受容体として酸素分子（O_2）を含む酸化／還元反応を触媒する他の酵素といった酵素、メチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン、スクアル酸染色剤、フタロシアニン等といった光感受性物質と、を含むが、これに限定されるものではない。酸化剤の非限定的な例は、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又は電子を得る任意の化合物を含む。適切な基質（例えば、グルコース、光など）の存在下において、促進部位（例えば、グルコースオキシダーゼ、光感受性物質等）は、シグナル増幅対の第１の要素（例えば、セイヨウ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等）に向けられ、２つの部位が互いに近接する場合に、それと反応する酸化剤（例えば、過酸化水素、一重項酸素等）を生成する。

【００９０】

ある他の例において、活性化状態非依存性抗体は、活性化状態非依存性抗体に共役されたオリゴヌクレオチドリンガーと促進部位に共役された相補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を介して促進部位で間接的に標識される。オリゴヌクレオチドリンカーは、当業者に公知の方法を用いて促進部位または活性化状態非依存性抗体に連結され得る。いくつかの実施形態において、促進部位に連結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連結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。他の実施形態において、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ズする、少なくとも１，２，３，４，５，６またはそれより多いミスマッチ領域を備える。当業者は、異なる分析物に特異的な活性化状態非依存性抗体が、同一のオリゴヌクレオチドリンカーに連結されてもよく、または異なるオリゴヌクレオチドリンカーに連結されてもよいことを理解するだろう。

【００９１】

促進部位または活性化状態非依存性抗体に連結されるオリゴヌクレオチドリンカーの長さは、様々であり得る。概して、リンカー配列は、少なくとも約５，１０，１５，２０，２５，３０，３５，４０，４５，５０，７５または１００ヌクレオチドの長さである。典型的には、ランダムな核酸配列が共役のために生成させる。非限定的な例として、オリゴヌクレオチドリンカーのライブラリは、３つの明確な隣接ドメインと、スペーサドメインと；シグナチュアドメインと；共役ドメインと、を有するように設計され得る。オリゴヌクレオチドリンカーは、それらが共役される促進部位又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果的に共役するように設計される。

【００９２】

オリゴヌクレオチドリンカー配列は、多様なアッセイ条件下で、あらゆる２次構造形成を阻害又は最小化するように設計され得る。溶解温度は、典型的には、リンカー内の各断片について注意深く監視され、アッセイ手順全体において、それらの関与を認めるようにする。概して、リンカー配列の断片の溶解温度の範囲は、１～１０℃の間である。所定のイオン濃度下における溶解温度、２次構造およびヘアピ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、ＯＬＩＧＯ６．０）は、各リンカー内の３つの異なるドメインそれぞれを分析するために使用され得る。全体を組み合わせた配列も、それらの構造特徴および共役されたオリゴヌクレオチドリンカー配列との比較可能性、例えば、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、相補オリゴヌクレオチドリンカーとハイブリダイズするかどうかについて分析され得る。

【００９３】

オリゴヌクレオチドリンカーのスペーサ領域は、オリゴヌクレオチド架橋部位から共役ドメインを充分に分離する。共役ドメインは、相補的な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を介して共役ドメインに連結する働きを

する。核酸を介したハイブリダイゼーションは、抗体－分析物（即ち、抗原）複合体形成の前または後のいずれかにおいて実施され得、より柔軟なアッセイ形式を与える。多くの直接抗体共役法と異なり、抗体又は他の分子への比較的小さいヌクレオチドの連結は、それらの標的分析物に対する抗体の特異的な親和性又は共役された分子の機能に対して最小限の影響を有する。

【００９４】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドリンカーのシグナチュア配列ドメインは、複合多重タンパク質アッセイにおいて利用され得る。多数の抗体が、異なるシグナチュア配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーと共役され得る。多重免疫アッセイにおいて、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は、多重アッセイ形式において、抗体とそれらの抗原との間の交差反応性を検出するために使用され得る。

【００９５】

オリゴヌクレオチドリンカーは、様々な異なる方法を用いて抗体または他の分子に連結され得る。例えば、オリゴヌクレオチドリンカーは、５’または３’末端のいずれかにチオール基を付加して合成され得る。チオール基は、還元剤（例えば、ＴＣＥＰ－ＨＣｌ）を用いて脱保護され得、その結果として得られるリンカーは脱塩スピンカラムを用いることによって精製され得る。その結果として脱保護されるオリゴヌクレオチドリンカーは、ＳＭＣＣといったヘテロ二官能性クロスリンカーを用いて抗体または他の種類のタンパク質の１級アミンに連結され得る。その代わりに、オリゴヌクレオチドの５’－リン酸基は、リン酸エステルを生成するために、水溶性カルボジイミン・ＥＤＣで処理され得、同時にアミン含有分子と共役され得る。ある例において、３’リボース残基上のジオールは、アルデヒド基へと酸化され、その後、還元アミン化を用いて、抗体または他の種類のタンパク質のアミン基と共役され得る。ある例において、オリゴヌクレオチドリンカーは、３’または５’末端のいずれかにおいてビオチン化されて合成され得、ストレプトアビジン標識分子と共役され得る。

【００９６】

オリゴヌクレオチドリンカーは、Ｕｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０９：７８４５（１９８７）；Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１８：５４３３（１９９０）；Ｗｉｎｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２３：２６７７－２６８４（１９９５）；およびＷｉｎｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，７４：５９（１９９７）に記載された方法などの、当業者に公地の様々な任意の技術を用いて合成され得る。概して、オリゴヌクレオチドの合成は、５’末端ではジメトキシトリチル、３’末端ではホスホールアミダイト、などの一般的な核酸保護カップリング基を使用する。オリゴヌクレオチド合成のための適切な試薬、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、当業者にとって公知である。

【００９７】

ある例において、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅対の第１の因子で標識される。そのシグナル増幅対の因子は、当業者に公知の方法を用いて、直接、活性化状態依存性抗体に共役され得る。ある他の例において、活性化状態依存性抗体は、活性化状態依存性抗体に共役された結合対の第１の因子と、シグナル増幅対の第１の因子に共役された結合対の第２の因子との間の結合を介して、シグナル増幅対の第１の因子で、間接的に標識される。結合対の因子（例えば、ビオチン／ストレプトアビジン）は、当業者に公知の方法を用いてシグナル増幅対の因子または活性化状態依存性抗体に連結され得る。シグナル増幅対因子の例は、セイヨウ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、シトクロームｃ　ペルオキシダーゼ、エノシノフィルペルオキシダーゼ、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、チロイドペルオキシダーゼ、デイオダイナーゼ、などといったペルオキシダーゼを含むが、これに限定されるものではない。シグナル増幅対因子の他の例は、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を含む

。

【００９８】

近接チャネリングの一つの例は、促進部位が、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の因子が、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である。ＧＯが、グルコースといった基質と接触されると、それは、酸化剤（すなわち、過酸化水素（H_2O_2））を生成する。ＨＲＰがＧＯへとチャネリング近接内にある場合、ＧＯによって生成された過酸化水素は、ＨＲＰに向けられ、複合体を形成して、シグナル増幅対の第２の因子（例えば、ルミノールまたはイソルミノールといった化学発光性基質、あるいはチラミド（例えば、ビオチン－チラミド）、ホモバニリン酸またはヒドロキシフェニル酢酸といった蛍光生成基質）の存在下で、増幅されたシグナルを生成する、ＨＲＰ－H_2O_2複合体を形成する。近接アッセイにおいてＧＯおよびＨＲＰを用いる方法は、例えば、Ｌａｎｇｒｙ ｅｔ ａｌ．，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の因子として使用される場合、ＨＲＰ－H_2O_2複合体は、チラミドを酸化して、隣接するヌクレオフィル残基に共有結合する還元性チラミドラジカルを生成する。活性型チラミドは、直接検出されるか、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と発色試薬との組み合わせといったシグナル検出試薬の添加によって検出されるか、のいずれかである。本発明における使用に適したフルオロフォアの例は、アレクサフルオール（Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（登録商標））染色剤（たとえば、アレクサフルオール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）、オレゴングリーン（登録商標）、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（登録商標）フルオール（例えば、Ｃｙ２，Ｃｙ３，Ｃｙ５）などを含むが、これに限定されるものではない。ストレプトアビジン標識は、当業者に公知の方法を用いて、直接または間接的にフルオロフォアまたはペルオキシダーゼに連結され得る。本発明の使用に適したクロモジェニック試薬の非限定的な例は、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を含む。

【００９９】

近接チャネリングの他の例において、促進部位は、光増感剤であり、シグナル増幅対の第１の因子は、特異的な結合相手（例えば、リガンド、抗体など）へのハプテンの結合を避ける保護基で保護された多重ハプテンで標識された巨大分子である。例えば、シグナル増幅対因子は、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り得る。適切な保護基の例は、フェニル－、アナリノ－（ａｎａｌｉｎｏ－）、オレフィン－、チオエーテル、およびセレノエーテル－保護基を含むが、これに限定されるものではない。本発明の近接アッセイにおける使用に適した追加の光発生剤および保護されたハプテン分子は、米国特許第５，８０７，６７５号に記載されている。光発生剤は、光で励起されると、それは酸化剤（すなわち一重項酸素）を生成する。ハプテン分子が、光発生剤とチャネリング近接内にある場合、光発生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に向けられ、チオエーテルと反応して、カルボニル基（ケトンまたはアルデヒド）およびスルフィン酸を生成し、ハプテンから保護基を放出する。保護されていないハプテンは、その後、シグナル増幅対の第２の因子（例えば、検出可能なシグナルを生成し得る特異的な結合相手）と特異的に結合するのに利用され得る。例えば、ハプテンがビオチンであると、特異的な結合相手は、酵素標識ストレプトアビジンであり得る。具体的な酵素は、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、ＨＲＰなどを含む。洗浄して非結合試薬を除去した後、検出可能なシグナルは、その酵素の検出可能な（例えば、蛍光、化学発光、ケモジェニックなどの）基質を添加することによって生成され、当業者に公知の適切な方法および装置を用いて検出され得る。その代わりに、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

れ得、活性化されたチラミドは、直接的に検出され、または上述したようなシグナル検出試薬の添加によって検出され得る。

【０１００】

近接チャネリングのさらに他の例において、促進部位は、光発生剤であり、シグナル増幅対の第１の因子は、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、切断可能なリンカー（例えば、チオエーテル）によって一緒に連結される。光発生剤が、光で励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）を生成する。酵素－阻害剤複合体が光発生剤とチャネリング近接内にある場合、光発生剤によって生成された一重項酸素は、切断可能なリンカーに向けられ、このリンカーと反応し、酵素から阻害剤を放出して、それによって酵素を活性化する。酵素基質が、検出可能なシグナルを生成するために添加され、または、増幅剤が、増幅したシグナルを生成するために添加される。

【０１０１】

近接チャネリングのさらなる例は、促進部位がＨＲＰであり、シグナル増幅対の第１の要素が保護されたハプテンまたは上述したような酵素－阻害剤複合体であり、保護基はｐ－アルコキシフェノールから構成される。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または酵素－阻害剤複合体に向けられる反応性フェニレンジイミンを生成し、ｐ－アルコキシフェノール保護基と反応して、露出したハプテンまたは反応し酵素を生成する。増幅されたシグナルが生成され、上述のように検出される（例えば、米国特許第５５３２１３８号明細書および第５，４４５，９４４号明細書を参照）。

【０１０２】

本明細書において述べる近接アッセイを実施するための具体的なプロトコルは、実施例４に提供される。

【０１０３】

他の実施形態において、本発明は、（ａ）固相担体上に固定された複数のキャプチャ抗体の希釈系列と；（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活性化状態依存性抗体）と、から構成される、上述した近接アッセイを実施するためのキットを提供する。いくつかの例において、そのキットはさらに、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そのキットを使用する方法に関する使用説明書を含み得る。そのキットは、たとえば、シグナル増幅対の第１および第２の要素、チラミドシグナル増幅試薬、促進部位に対する基質、洗浄用緩衝液など、といった本発明の特定の方法を実施するという観点で上述した任意の追加の試薬を含んでもよい。

【０１０４】

（ＶＩＩ．抗体の作製）

本発明に係る希少循環細胞といった腫瘍細胞におけるシグナル伝達分子の活性化状態を分析するために、依然として商業的に入手可能ではない抗体の作製および選択は、様々な方法で成し遂げられ得る。例えば、一つの方法は、当業者に公知のタンパク質発現および精製方法を使用して、目的のポリペプチド（すなわち、抗原）を発現および／または精製することであり、一方、他の方法は、当業者に公知の固相ペプチド合成法を使用して目的のポリペプチドを合成することである。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 ｅｔ ａｌ., Ｃｈｅｍ. Ｐｈａｒｍ. Ｂｕｌｌ., ３８：１１９２－９９ （１９９０）；Ｍｏｓｔａｆａｖｉ ｅｔ ａｌ., Ｂｉｏｍｅｄ. Ｐｅｐｔ. Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ, １：２５５－６０, （１９９５）；ａｎｄ Ｆｕｊｉｗａｒａ ｅｔ ａｌ., Ｃｈｅｍ. Ｐｈａｒｍ. Ｂｕｌｌ., ４４：１３２６－３１ （１９９６）を参照する。精製され、または合成されたポリペプチドは、その後、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製するために、例

えば、マウスまたはウサギに注射され得る。当業者は、例えば、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８８）に記載されるような、多くの手法が抗体の製造のために利用可能であることを認識しているだろう。当業者はまた、結合断片または抗体を真似た（例えば、その機能性結合領域を保有する）Ｆａｂ断片も様々な手法によって遺伝子情報から用意され得ることも理解しているだろう。例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ，Ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９９５）；ａｎｄ Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４９：３９１４－３９２０（１９９２）を参照する。

【０１０５】

加えて、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を作製しスクリーニングするためのファージディスプレイ技術の使用を報告している（例えば、Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：６３７８－６３８２（１９９０）；Ｄｅｖｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：４０４－４０６（１９９０）；Ｓｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４９：３８６－３８８（１９９０）；ａｎｄ Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．５，５７１，６９８）を参照）。ファージディスプレイ法の基本的な概念は、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な結合の形成である。この物理的な結合は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを包囲するカプシドの部分としてポリペプチドを提示する、ファージ粒子によって与えられる。ポリペプチドとそれらの遺伝物質との間の物理的な結合の形成は、異なるポリペプチドを有する非常に多数のファージの同時マススクリーニングを許容する。標的抗原への親和性を有す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るポリペプチドの同一性は、それらのそれぞれのゲノムから決定され得る。これらの方法を用いて、所定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、その後、従来の方法によって大量に合成され得る（例えば、米国特許第６，０５７，０９８号を参照）。

【０１０６】

これらの方法によって作製された抗体は、その後、目的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関する第１のスクリーニングによって選択され得、必要に応じて、結合から除外されると望まれる他のポリペプチド抗原との抗体の親和性および特異性と、その結果を比較する。スクリーニング手法は、マイクロタイタープレートの個々のウェルにおける、精製されたポリペプチド抗原の固定化を含み得る。潜在的な抗体または抗体の集団を含む溶液は、その後、各マイクロタイターウェルへと入れられ、約３０分から約２時間インキュベートされる。マイクロタイターウェルは、その後洗浄され、標識された第２の抗体（例えば、上昇させられた抗体がマウス抗体である場合、アルカリホスファターゼを共役された抗－マウス抗体）がウェルに添加されて、約３０分間インキュベートされ、その後洗浄される。基質がウェルに添加され、固定されたポリペプチド抗原に対する抗体が存在すると、色反応が現れるだろう。

【０１０７】

そのように同定された抗体は、その後、さらに親和性および特異性に関して分析され得る。標的タンパク質に対する免疫アッセイの開発において、精製された標的タンパク質が、選択されている抗体を用いた免疫アッセイの感度と特異性を判断するための標準物質として働く。様々な抗体の結合親和性は異なり得、例えば、ある抗体の組み合わせは、互いに立体的に阻害し得るので、抗体のアッセイ性能は、抗体の絶対的な親和性および特異性よりも重要な基準であり得る。

【０１０８】

当業者は、抗体または結合断片を作製し、目的の様々なポリペプチドに対する親和性および特異性に関してスクリーニングし、および選択するのに、多くのアプローチが採られ得、これらのアプローチが本発明の範囲を変更するものではないことを認識するだろう。

【０１０９】

（Ａ．ポリクローナル抗体）

ポリクローナル抗体は、目的のポリペプチドおよびアジュバントの、多数の皮下（ｓｃ）または腹腔内（ｉｐ）注射によって動物内で増加されることが好ましい。二官能性物質または誘導体化剤を使用して、目的のポリペプチドを、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシ－サイログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤といった、その種において免疫性を付与する免疫原性のタンパク質キャリアに共役することは有用であり得る。二官能性物質または誘導体化剤の非限定的な例は、マレイミドベンゾイルスルホスクシニミドエステル（システイン残基を介する共役）、Ｎ－ヒドロキシスクシニミド（リジン残基を介して共役）、グルタルアルデヒド、スクシニックアンヒドリド、$SOCl_2$および$R_1N=C=NR$（ＲおよびＲ$_1$は異なるアルキル基である）を含む。

【０１１０】

動物は、目的のポリペプチドまたは免疫原性共役物またはそれらの誘導体に対して、例えば、１００μｇ（対ウサギ）または５μｇ（対マウス）の抗原または３倍量のフロイド完全アジュバントとの共役物を混合して、多数部位でその溶液を皮内に注射されることによって免疫性を付与される。一ヵ月後、その動物は、多数部位での皮下注射によって、元々の量の約１／５～１／１０の量のポリペプチドまたはフロイド非感染アジュバントでブーストされる。７～１４日後、その動物は、血を採られ、その血清が、抗体力価に関して分析される。動物は、典型的に、力価が安定するまでブーストされる。動物は、同一のポリペプチドの共役物でブーストされることが好ましいが、異なる免疫原性たんぱく質への共役および／または異なる架橋試薬が使用されてもよい。共役はまた、融合たんぱく質として、組み換え細胞培養において成され得る。ある例において、硫酸アルミニウムといった凝集剤が免疫反応を高めるために使用されうる。

【０１１１】

（Ｂ．モノクローナル抗体）

モノクローナル抗体は、概して、実質的に相同な抗体の集団から得られ、すなわち、その集団から構成される個々の抗体は、少量存在していてもよい生じうる自然発生変異を除いて同一である。したがって、修飾語句「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物ではないとする抗体の特徴を示す。例えば、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって開示されたハイブリドーマ法を用いて、または当業者に公知の任意の組み換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照）によって作製されうる。

【０１１２】

ハイブリドーマ法において、マウスまたは他の適切なホスト動物（例えば、ハムスター）が、上述したように免疫を付与され、免疫付与に使用された目的のポリペプチドに特異的に結合する抗体を作製し、または作製することができるリンパ球を誘発させる。）その代わりに、リンパ球が、インビトロで免疫される。免疫されたリンパ球は、その後、ポリエチレングリコールといった適切な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．５９－１０３（１９８６）を参照）。そのように調整されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合されていない親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する一つ以上の基質を含む適切な培地中に植えられて増殖する。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポチ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）を欠損している場合、ハイブリドーマ細胞のための培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の成長を阻害する、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（ＨＡＴ培地）を含むだ

ろう。

【０１１３】

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体細胞による安定で高レベルな抗体の生産を支持し、および／またはＨＡＴ培地といった培地に感受性である細胞である。ヒトモノクローナル抗体の作製に関して、そのような好ましい骨髄腫細胞系統は、（Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡから入手可能な）ＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍に由来するもの、（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから入手可能な）ＳＰ－２またはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞といった、齧歯類骨髄腫系統、およびヒト骨髄腫またはマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞系統を含むが、これに限定されるものではない（例えば、Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；およびＢｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．５１－６３（１９８７）を参照）。

【０１１４】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、目的のポリペプチドに対するモノクローナル抗体の産生に関して分析され得る。ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または　酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）といった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、Ｍｕｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のスキャッチャード解析を使用して決定され得る。

【０１１５】

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性、および／または活性の抗体を産生することが確認された後、そのクローンは、限界希釈手法によってサブクローン化されてよく、標準的な方法で、増殖されてよい（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．５９－１０３（１９８６）を参照）。この目的のために適した培地は、例えば、Ｄ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地を含む。また、ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖されてもよい。サブクローンから分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質Ａ－セファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーといった、従来の抗体精製手法によって、培地、腹水または血清から分離され得る。

【０１１６】

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、容易に分離されて従来の手法を使用して（例えば、齧歯類抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）配列決定され得る。ハイブリドーマ細胞は、そのようなＤＮＡの好ましい源として役立つ。一旦、分離されると、ＤＮＡは、発現ベクターに挿入されてよく、その後、そうでなければ抗体を産生しない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に導入されて、組み換えホスト細胞中においてモノクローナル抗体の合成を誘導する。例えば、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６－２６２（１９９３）；およびＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．，１３０：１５１－１８８（１９９２）を参照する。ＤＮＡはまた、例えば、相同な齧歯類配列をヒト重鎖および軽鎖不変ドメインをコードする配列に置換することによって（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号；およびＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１（１９８４）を参照）または非イムノグロブリンポリペプチドをコードする配列のすべ

てまたは一部をイムノグロブリンをコードする配列に共有結合することによって改変され得る。

【０１１７】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体または抗体断片は、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ, ３４８：５５２－５５４ （１９９０）；Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ, ３５２：６２４－６２８ （１９９１）； およびＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．, ２２２：５８１－５９７ （１９９１）に記載された技術を使用して作製される抗体ファージライブラリーから分離され得る。鎖シャッフリングによる高い親和性（ｎＭレンジ）のヒトモノクローナル抗体の製造は、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．, ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ, １０：７７９－７８３ （１９９２）に記載されている。非常に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コンビナトリアル感染およびｉｎ ｖｉｖｏ組み換えの使用は、Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．, Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．, ２１：２２６５－２２６６ （１９９３）に記載されている。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体の製造のために伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な代替案である。

【０１１８】

（Ｃ．ヒト化抗体）

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当業者に公知である。ヒト化抗体は、非ヒトであるソースからそれに導入された一つ以上のアミノ酸残基を有することが好ましい。これらの非ヒトのアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、典型的には、「インポート」可変ドメインから採られる。ヒト化は、本質的に、非ヒト抗体の超可変領域の配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって実施され得る。例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ, ３２１：５２２－５２５ （１９８６）； Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ, ３３２：３２３－３２７ （１９８８）； ａｎｄ Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．, Ｓｃｉｅｎｃｅ, ２３９：１５３４－１５３６ （１９８８）を参照する。従って、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号参照）であり、完全なヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列によって置換されることは実質的にほとんどない。実際に、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域の残基および可能ないくつかのフレームワーク領域（ＦＲ）の残基が齧歯類抗体のアナログ部位からの残基によって置換されるヒト抗体である。

【０１１９】

本明細書において述べられるヒト化抗体を作製するのに使用されるヒト可変ドメイン、軽鎖および重鎖の両方、の選択は、抗原性を低下するために重要な検討事項である。いわゆる「最適な」方法によると、齧歯類抗体の可変領域が、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た。齧歯類の配列にもっとも近いヒトの配列は、その後、ヒト化抗体のためのヒトＦＲとして受け入れられる（例えば、Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．, １５１：２２９６ （１９９３）；およびＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．, １９６：９０１ （１９８７）を参照）。他の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブ集団のすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のＦＲを用いる。同じＦＲは、様々な異なるヒト化抗体のために使用されてもよい（例えば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．, Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ, ８９：４２８５ （１９９２）； およびＰｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．, Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．, １５１：２６２３ （１９９３）を参照）。

【０１２０】

抗体は、抗原に対する高い親和性の保持、または他の有利な生物学的特性を有してヒト化されることも重要である。この目的を達成するため、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た親配列と様々な概念上のヒト化された産物との分析プロセスに

よって用意され得る。三次元イムノグロブリンモデルは、共通して利用され得、当業者にはよく知られている。選択された候補イムノグロブリン配列の予想される三次元コンフォメーション構造を図示し、表示するコンピュータプログラムが利用できる。これらの調査表示は、候補イムノグロブリン配列の機能性における残基の好ましい役割の分析、即ち、候補イムノグロブリンのその抗原への結合能に影響する残基の分析を可能にする。この方法において、ＦＲ残基は、受容およびインポート配列から選択されて組み合わせられ得るので、標的抗原に対する増加した親和性といった所望の抗体の特徴が得られる。概して、超可変領域残基は、直接的かつ特異的に抗原結合に影響する。

【０１２１】

様々な形状のヒト化抗体が本発明に関して意図される。例えば、ヒト化抗体は、Ｆａｂ断片といった抗体断片であり得る。代わりに、ヒト化抗体は、完全なＩｇＡ、ＩｇＧまたはＩｇＭ抗体といった完全な抗体であり得る。

【０１２２】

（Ｄ．ヒト抗体）

ヒト化の代替案として、ヒト抗体が生成され得る。いくつかの実施形態において、トランスジェニック動物（例えば、マウス）は、免疫付与において、内因性イムノグロブリンの産生のない状態で、ヒト抗体の完全なレパートリを産生することができる。例えば、キメラ生殖系突然変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（ＪＨ）のホモ接合体欠失は、内因性抗体の産生の完全な阻害という結果をもたらす。そのような生殖系突然変異マウスにおけるヒト生殖系イムノグロブリン遺伝子アレイのトランスファーは、抗原チャレンジにおけるヒト抗体の産生という結果をもたらすだろう。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎ．，７：３３（１９９３）；および米国特許第５，５９１，６６９号，第５，５８９，３６９号，および第５，５４５，８０７号を参照する。

【０１２３】

代わりに、ファージディスプレイ技術（例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５３（１９９０）を参照）が、免疫されていないドナーからのイムノグロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーを用いて、ヒト抗体および抗体断片をインビトロで産生するのに使用され得る。この技術によると、抗体Ｖドメイン遺伝子は、Ｍ１３またはｆｄといったフィラメントバクテリオファージのメジャーまたはマイナーのいずれかのコートタンパク質遺伝子へとインフレームでクローン化され、ファージ粒子の表面上で機能性抗体断片として提示される。フィラメント粒子は、ファージゲノムの単鎖ＤＮＡコピーを包含するので、抗体の機能特性に基づく選択はまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択という結果になる。従って、ファージは、Ｂ細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，３：５６４－５７１（１９９３）に記載されるように、様々な形式で実施され得る。Ｖ遺伝子セグメントの様々なソースは、ファージディスプレイのために使用され得る。例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照する。免疫されていないヒトドナーからのＶ遺伝子レパートリーが構築され得、（自己抗原を含む）抗原の多様なアレイへの抗体が、本質的に、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）；Ｇｒｉｆｆｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１２：７２５－７３４（１９９３）；および米国特許第５，５６５，３３２号および第５，５７３，９０５号に記載された技術に従って分離され得る。

【０１２４】

ある例において、ヒト抗体は、米国特許第５，５６７，６１０号および第５，２２９，２７５号に記載されるようにインビトロで活性化されたＢ細胞によって産生され得る。

【０１２５】
（Ｅ．抗体断片）
様々な技術が、抗体断片の製造のために開発されてきている。伝統的に、これらの断片は、完全な抗体のタンパク質分解を介して得られた（例えばＭｏｒｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈ．，２４：１０７－１１７（１９９２）；およびＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照）。しかしながら、これらの断片は、現在は、組み換えホスト細胞を用いて、直接的に作製され得る。例えば、抗体断片は、上述した抗体ファージライブラリから分離され得る。代わりに、Ｆａｂ’－ＳＨ断片は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞から直接、回収され、化学的に共役されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を形成することができる（例えば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３－１６７（１９９２）を参照）。他のアプローチによると、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、組み換えホスト細胞培養から直接、分離され得る。抗体断片の他の製造技術は、当業者にとって明らかであるだろう。他の実施形態において、選択される抗体は、単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。例えば、国際公開９３／１６１８５号；および米国特許第５，５７１，８９４号および第５，５８７，４５８号を参照する。抗体断片はまた、例えば、米国特許第５，６４１，８７０号に記載されるように直線抗体であってもよい。そのような直線抗体断片は、単一特異的であってよく、または二重特異的であってもよい。
【０１２６】
（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して結合特異性を有する抗体である。具体的な二重特異性抗体は、目的の同じポリペプチドの２つの異なるエピトープに結合してもよい。他の二重特異性抗体は、目的のポリペプチドに対する結合部位と一つ以上の追加の抗原に対する結合部位とを兼ね備えてもよい。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調整され得る。
【０１２７】
二重特異性抗体の作製方法は当業者に公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な製造は、２つの鎖が異なる特異性を有する、２つのイムノグロブリン重鎖－軽鎖対の共発現に基づく（例えば、Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３）を参照）。イムノグロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を酸性紙、そのうちの一つのみ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、アフィニティクロマトグラフィによって実施される。同様の手法が、国際公開第９３／０８８２９号およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５－３６５９（１９９１）に開示される。
【０１２８】
異なるアプローチによると、所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、イムノグロブリンの共通ドメイン配列に融合される、融合体は、少なくともヒンジの一部、ＣＨ２およびＣＨ３領域から構成されるイムノグロブリン重鎖共通ドメインを有することが好ましい。少なくとも融合体の一つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第１の重鎖共通領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。イムノグロブリン重鎖融合体および必要であればイムノグロブリン軽鎖をコードするＤＮＡは、個々の発現ベクターに挿入され、適切なホスト生物に共導入される。これにより、構築に使用される３つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす場合、実施形態における３つのポリペプチド断片の相互の比率を非常に柔軟に調整することができるようになる。しかしながら、少なくとも２つのポリペプチド鎖が等しい割合で高い収率をもたらす場合、または比率が特に重要ではない場合、２つまたは３つ全てのポリペプチド鎖をコードする配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。
【０１２９】
このアプローチの好ましい実施形態において、二重特異性抗体は、一つの手腕に第１の

結合特異性を有するハイブリッドイムノグロブリン重鎖を、他方の手腕に（第２の結合特異性を与える）ハイブリッドイムノグロブリン重鎖－軽鎖対を備える。イムノグロブリン軽鎖が二重特異性分子の一方のみに存在することは、分離を容易にするので、この非対称な構造は、望まないイムノグロブリン鎖の組み合わせ物から所望の二重特異性組成物の分離を促進する。例えば、国際公開第９４／０４６９０号およびＳｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１２１：２１０（１９８６）を参照する。

【０１３０】

米国特許第５，７３１，１６８号に記載される他のアプローチによると、抗体分子の対の接合部は、組み換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーの割合を最大化するように改変され得る。好ましい接合部は、抗体共通ドメインのＣＨ３ドメインの少なくとも一部から構成される。この方法において、第１の抗体分子の接合部からの一つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換される。大きな側鎖と同一または類似の寸法の補償「空洞（ｃａｖｉｔｙ）」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなもので置換することによって、第２の抗体分子の接合部上に形成される。これは、ホモダイマーといった他の望まない最終産物に対するヘテロダイマーの収率を増加させるための機構を与える。

【０１３１】

二重特異性抗体は、架橋された、または「ヘテロ複合体」抗体を含む。例えば、ヘテロ複合体における抗体の一方はアビジンと連結され、他方はビオチンと連結される。ヘテロ複合体抗体は、任意の使い易い架橋方法を用いて作製され得る。適切な架橋剤および技術は、当業者に公知であり、例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示される。

【０１３２】

抗体断片から二重特異性抗体を作製するために適した技術も当業者に公知である。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて用意され得る。ある例において、二重特異性抗体は、完全な抗体がタンパク質分解によって切断されて、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片を作製する手法によって作製され得る（例えば、Ｂｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照）。これらの断片は、近接するジチオールを安定化するためにチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元され、分子内ジスルフィドの形成を回避される。作製されたＦａｂ’断片は、その後、チオニトロベンゼゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換される。Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の一つは、その後、メルカプトエチルアミンを用いて還元されることによってＦａｂ’－チオールに再変換され、等モルの他のＦａｂ’－ＴＮＢと混合されて二重特異性抗体が形成される。

【０１３３】

いくつかの実施形態において、Ｆａｂ’－ＳＨ断片は、Ｅ．ｃｏｌｉから直接回収され得、化学的に共役されて二重特異性抗体を形成することができる。例えば、完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子は、Ｓｈａｌａｂｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）に記載された方法によって製造され得る。各Ｆａｂ’断片は、Ｅ．ｃｏｌｉから別々に分泌され、インビトロで直接化学的結合にさらされて二重特異性抗体が形成される。

【０１３４】

組み換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し分離するための様々な方法も述べられてきた。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて製造される。例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照する。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合による２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に連結される。抗体ホモダイマーが、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、その後、再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法は、抗体ホモダイマーの製造のためにも利用され得る。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって開示された「ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代わり

の機構を提供している。断片は、小さすぎて同一鎖上の２つのドメイン間での対形成を許容しないリンカーによって軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）から構成される。従って、一つの断片のＶＨおよびＶＬドメインは、他の断片の相補的なＶＬ及びＶＨドメインと対を形成せざるを得ず、それによって２つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーの使用による二重特異性抗体断片を形成するための他の戦略は、Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）に開示されている。

【０１３５】

２以上の価数を有する抗体はまた、検討される。例えば、三重特異性抗体が調整され得る。例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：６０（１９９１）を参照する。

【０１３６】

（Ｇ．抗体精製）

組み換え技術を用いると、抗体は、ホスト細胞のペリプラズム空間において、分離された細胞内で製造され得、またはホスト細胞から培地中に直接分泌される。抗体が、細胞内で製造される場合、例えば、遠心分離または限外ろ過によって特定の残骸がまず除去される。Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈ．，１０：１６３－１６７（１９９２）は、Ｅ．ｃｏｌｉのペリプラズム空間へと分泌された抗体を分離する手法を説明する。簡単に言うと、細胞ペーストが、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ルオライド（ＰＭＳＦ）の存在化で、約３０分間溶解される。細胞の残骸は遠心分離によって除去され得る。抗体が培地中に分泌されると、そのような発現系からの上清は、概して、市販で購入可能なタンパク質濃縮フィルタ、例えば、アミコンまたはミリポアペリコン限外ろ過ユニットを用いて濃縮される。ＰＭＳＦといった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、任意の前工程において包含されてよく、抗生物質が、外来の混入物の正常を抑制するために包含されてもよい。

【０１３７】

細胞から用意される抗体組成物は、例えば、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、透析、及びアフィニティクロマトグラフィを用いて精製され得る。親和性リガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する任意のイムノグロブリンＦｃドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγｌ，γ２，またはγ４重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る（例えば、Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，６２：１－１３（１９８３）を参照）。プロテインＧは、全てのマウスアイソタイプおよびヒトγ３に推奨される（例えば、Ｇｕｓｓ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，５：１５６７－１５７５（１９８６）を参照）。親和性リガンドを付着される基質は、ほとんどの場合、アガロースであるが、他の基質も利用可能である。制御孔ガラス（ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ ｐｏｒｅ ｇｌａｓｓ）またはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンといった機械的な安定な基質が、アガロースで達成され得るよりも速い流速および短い処理時間を許容する。抗体が、ＣＨ３ドメインを備える場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ ＡＢＸ（登録商標）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ；Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，Ｎ．Ｊ．）が精製に有用である。（ポリアスパラギン酸カラムといった）イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆送ＨＰＬＣ、シリカ上のクロマトグラフィ、ヘパリンセファロース（登録商標）上のクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿といったタンパク質精製のための他の技術も回収された抗体に応じて利用可能である。

【０１３８】

任意の予備的な精製工程に続いて、目的の抗体と共雑物から構成される混合物は、好ましくは低塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍ塩）で実施される、約２．５～４．５の間のｐＨの溶出緩衝液を用いた低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに供されてもよい。

【０１３９】

当業者は、抗体と同様の機能を有する任意の結合分子、例えば、試料中の目的の一つ以

上の分析物に特異的な結合分子または結合相手はまた、本発明の方法および組成物に使用され得る。適切な抗体様分子の例は、ドメイン抗体、ユニボディ（ｕｎｉｂｏｄｙ）、ナノボディ（ｎａｎｏｂｏｄｙ）、サメ抗原感受性タンパク質、アビマー（avimer）、アドネクチン（adnectin）、アンチカーム（anticalm）、親和性リガンド、フィロマー（phylomer）、アプタマー（aptamer）、アフィボディ（ａｆｆｉｂｏｄｙ）、トリネクチン（ｔｒｉｎｅｃｔｉｎ）などを含むが、これに限定されるものではない。

【０１４０】

（ＶＩＩＩ．投与方法）

本発明の方法によると、本明細書において述べられる抗癌剤は、当業者に公知の任意の使用しやすい手段によって被検者に投与される。本発明の方法は、被検者における腫瘍（例えば、肺腫瘍）の治療のために適した抗癌剤または抗癌剤の組み合わせを選択するのに使用され得る。加えて、本発明の方法は、抗癌剤または抗癌剤の組み合わせでの治療に適した候補者である腫瘍（例えば、肺腫瘍）を患う被検者を選択するために使用され得る。本発明の方法はまた、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検者における腫瘍の応答を同定するために使用され得る。加えて、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、肺腫瘍）を患う被検者の応答を予測するために使用され得る。当業者は、本明細書で述べられる抗癌剤は、それのみで投与され得、または従来の化学療法、放射線療法、ホルモン治療、免疫療法、および／または手術と組み合わせ治療アプローチの一部として投与され得る。

【０１４１】

ある実施形態おいて、抗癌剤は、モノクローナル抗体またはチロシンキナーゼ阻害剤といった抗シグナル伝達剤（即ち、細胞増殖抑制剤）；抗増殖剤；化学療法剤（即ち、細胞毒性薬）；放射線療法剤；ワクチン；および／または癌性細胞といった異常細胞の制御されていない増殖を減らしまたは無効にする能力を有する任意の他の組成物から構成される。いくつかの実施形態において、被験者は、一つ以上の化学療法剤と組み合わせて、抗シグナル伝達剤および／または抗増殖剤で治療される。具体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、化学療法剤、放射線療法剤、およびワクチンが上述される。

【０１４２】

本明細書において述べられる抗癌剤はまた、これに限定されないが、ステロイド（例えば、デキサメタゾン）、フィナステライド、アロマターゼ、タモキシフェン、およびゴセレリンといったゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（ＧｎＲＨ）を含む従来のホルモン療法剤と共投与され得る。

【０１４３】

加えて、本明細書において述べられる抗癌剤は、これに限定されないが、免疫促進剤（例えば、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）、レバミゾール、インターロイキン－２、アルファ－インターフェロン、など）、抗毒素（例えば、抗－ＣＤ３３モノクローナル抗体－カリケアマイシン共役体、など）、および放射線療法剤（例えば、^{111}Ｉｎ，^{90}Ｙ，または ^{131}Ｉなどに共役した抗－ＣＤ２０モノクローナル抗体）を含む従来の免疫療法剤と共投与され得る。

【０１４４】

抗癌剤は、必要であれば、適切な医薬品賦形剤とともに投与され得、許容される投与形態のいずれを介して実行されてもよい。従って、投与は、例えば、経口，口腔，舌下，歯肉，口蓋，静脈，局所，皮下，経皮（ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ），経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ），筋肉内，関節内，非経口，細動脈内，皮内，脳室内，頭蓋内、腹腔内，膀胱内，髄腔内，病巣内，鼻腔内，直腸，膣内であり得、または吸入によってもよい。「共投与」によって、抗癌剤は、第２の薬剤（例えば、他の抗癌剤、抗癌剤治療剤、放射線治療剤、ホルモン治療、免疫療法剤など）の投与と同時に、直前に、または直後に投与されることを意味する。

【０１４５】

抗癌剤の治療に効果的な量は、例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上の回数、繰り返し投与されてもよく、またはその用量（ｄｏｓｅ）が、例えば、タブレット、ピル、ペレット、カプセル、粉末、溶液、懸濁液、乳濁液、坐薬、停留浣腸、クリーム、軟膏、液体、ゲル、エアロゾル、泡などといった固形、半固形、凍結乾燥粉末または液体の投薬形態の形状をとってもよい。

【０１４６】

本明細書において使用されるように、「ユニット剤形（ｕｎｉｔ　ｄｏｓａｇｅ　ｆｏｒｍ）」という用語は、ヒト被験者および他のほ乳類に対して単位投与量として適した物理的に不連続な単位を含み、それぞれのユニットは、適切な医薬品賦形剤（例えば、アンプル）と関連して、所望の発現、許容性、および／または治療効果を生じるように計算された所定量の抗癌剤を含む。加えて、より濃縮された剤形が調整されてもよく、そこからより希釈されたユニット剤形が、その後、作製される。従って、より濃縮された剤形は、同時に、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０倍またはそれ以上の量の抗癌剤を同時に包含するだろう。

【０１４７】

そのような剤形を調整する方法は、当業者に公知である（例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ，　１８ＴＨ　ＥＤ．，　Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，　Ｅａｓｔｏｎ，　ＰＡを参照。）剤形は、典型的に、従来の医薬品キャリアまたは賦形剤を含み、加えて、他の薬剤、キャリア、アジュバント、希釈剤、組織浸透促進剤、可溶化剤などを含んでもよい。適切な賦形剤は、当業者に公知の方法によって特定の剤形および投与経路に合わせられ得る（例えば、上記ＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳを参照）。

【０１４８】

適切な賦形剤の例は、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、スターチ、アカシア・ゴム、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、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、食塩水、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、および、例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９４１，　Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８０，　Ｃａｒｂｏｐｏｌ　９８１などのカルボポール（Ｃａｒｂｏｐｏｌ）といったポリアクリル酸を含むが、これに限定されるものではない。剤形は、加えて、ｔａｌｃ、マグネシウムステアレート、およびミネラルオイルといった平滑剤；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；メチル－、エチル－、およびプロピル－ヒドロキシ－ベンゾエート（即ち、パラベン）といった保存剤；無機および有機酸および塩基といったｐＨ調整剤；甘味剤；および香料添加剤を伝統的に含む。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包含錯体から構成されてもよい。

【０１４９】

経口投与のため、治療に効果的な用量は、タブレット、カプセル、乳化液、懸濁液、溶液、シロップ、スプレー、トローチ、粉末、および徐放性製剤の形状であり得る。経口投与に適した賦形剤は、医薬品品質のマンニトール、ラクトース、スターチ、マグネシウムステアレート、サッカリン・ナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ゲラチン、スクロース、炭酸マグネシウム等を含む。

【０１５０】

いくつかの実施形態において、治療に効果的な用量は、ピル、タブレット、またはカプセルの形態をとり、従って、剤形は、抗癌剤とともに、任意の以下のもの：ラクトース、スクロース、第二リン酸カルシウム等；スターチまたはその誘導体といった崩壊剤；マグネシウムステアレートなどといった潤滑剤；およびスターチ、アカシア・ガム、ポリビニルピロリドン、ゲラチン、セルロースおよびそれらの誘導体といった結合剤、を含み得る。抗癌剤はまた、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）キャリアに配置された坐薬へと成形され得る。

【０１５１】

液体剤形は、例えば、食塩水（例えば、０．９重量％塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリコール、エタノールなどといったキャリアにおいて、抗癌剤と任意の一つ以上の医薬上に許容されるアジュバントとを溶解または分散させて、例えば、経口、局所、静脈内投与などのための溶液または懸濁液を作製することによって用意され得る。抗癌剤はまた、停留かん腸剤に構築され得る。

【０１５２】

局所投与のため、治療に効果的な用量は、乳化剤、ローション、ゲル、泡、クリーム、ゼリー、溶液、懸濁液、軟膏、および経皮パッチの形態であり得る。吸入剤による投与のため、抗癌剤は、乾燥粉末として、または噴霧器を介した液体形状で投与され得る。非経口による投与のため、治療に効果的な用量は、無菌的な注射可能な溶液および無菌的に封入された粉末の形態であり得る。注射可能な溶液が約４．５～約７．５のｐＨで作製されることが好ましい。

【０１５３】

治療に効果的な用量はまた、凍結乾燥製剤として提供され得る。そのような剤形は、投与前の再構成のために、例えばジカルボン酸といった緩衝液を含んでよく、またはその緩衝液は、例えば、水での再構築のために、凍結乾燥製剤に含まれてよい。凍結乾燥剤形は、さらに、適切な血管収縮剤、例えば、エピネフリンを包含してもよい。凍結乾燥剤形は、再構成された剤形が、すぐに被験者に投与され得るように、再構成のための緩衝液と組み合わせて任意に包装された、シリンジとして提供され得る。

【０１５４】

被験者はまた、ある治療レジメの有効性を評価するために、周期的な時間間隔でモニターされ得る。例えば、あるシグナル伝達分子の活性化状態が、本明細書において述べる一つ以上の抗癌剤での処置の治療効果に基づいて、変化し得る。被検者は、反応を評価するためにモニターされ得、個別のアプローチにおけるある薬剤または処置の効果を理解し得る。加えて、まず特定の抗癌剤または抗癌剤の組み合わせに反応する被検者は、その抗癌剤または抗癌剤の組み合わせに対して難治性をしめすようになり得、これらの患者は、薬剤耐性獲得していることを示す。これらの被検者は、その現在の治療を中止され得、本発明の方法に従って代わりの治療法が示され得る。

【０１５５】

ある他の例において、多重ハイスループット免疫アッセイおよびタンパク質アッセイを実施する方法は、本明細書において参照によって援用される国際公開第２００８／０３６８０２号に開示される。出願人は、とりわけ、希少循環細胞における複数のシグナル伝達分子の活性化状態および／または総量を検出するための抗体に基づくアレイ、および、癌の予後および診断、および個々人に標的化された治療法の設計を促進するためのアレイの使用方法を開示する。出願人はさらに、「アドレス可能な」または「ジップコード」アレイにこれいされた複数のキャプチャ分子を備える基質表面を開示する。そのアレイの明確な領域のそれぞれは、活性化状態非依存性検出抗体または活性化状態依存性抗体上に存在するキャプチャタグに特異的に結合する特異的なキャプチャ剤を包含し、それによって、アレイ中にタグ化検出抗体を固定して体系化する。好ましい実施形態において、キャプチャ剤およびキャプチャタグは、互いに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。

【０１５６】

（ＩＸ．実施例）

以下の実施例は、要求される発明を説明するために述べられるが、これに限定されるものではない。

【０１５７】

（実施例１．循環細胞の分離、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細胞から構成され、循環性腫瘍細胞（ＣＴＣ）、癌幹細胞（ＣＳＣ）、および／または腫瘍へと移動する細胞（例えば、循環内皮前駆細胞（ＣＥＰＣ）、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、循環血管新生促進骨髄

性細胞、循環樹状細胞など）を含む。循環細胞を含む患者試料は、任意の採取可能な体液（例えば、血液、尿、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液など）から獲得され得る。循環細胞は、例えば、免疫磁気分離法（例えば、Ｒａｃｉｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５：４５８９－４５９４（１９９８）；Ｂｉｌｋｅｎｒｏｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９２：５７７－５８２（２００１）を参照）、イムニコン（Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ）によるＣｅｌｌＴｒａｃｋ（登録商標）システム（Ｈｕｎｔｉｎｇｄｏｎ Ｖａｌｌｅｙ，ＰＡ）、微小流体分離法（例えば、Ｍｏｈａｍｅｄ ｅｔ ａｌ．，ＩＥＥＥ Ｔｒａｎｓ．Ｎａｎｏｂｉｏｓｃｉ．，３：２５１－２５６（２００４）；Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．５１４７，９７ｔｈ ＡＡＣＲ Ａｎｎｕａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．（２００６））、ＦＡＣＳ（例えば、Ｍａｎｃｕｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，９７：３６５８－３６６１（２００１））、密度勾配遠心分離法（例えば、Ｂａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３））および減少法（例えば、Ｍｅｙｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２））といった一つ以上の方法を用いて、患者試料から分離され得る。

【０１５８】

ＣＴＣの手動分離：

ＣＴＣの免疫磁気分離法－活性化アッセイによって後続される手動分離：

１）前もって、抗－ＥｐＣＡＭモノクローナル抗体、（Ｋｏｒｄｉａ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｌｅｉｄｅｎ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）に共役された磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ Ｍ４５０；Ｄｙｎａｌ ＡＳ；Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）が使用される。

２）使用の直前に、プレコートされたダイナビーズが０．０１％でＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で一度洗浄される。

３）２５μｌのプレコートされたダイナビーズが試料１ｍｌに添加される。

４）混合物が、緩やかな角度と回転で、２－８℃で２０分間インキュベートされる。

５）そのチューブは、磁性分離器（ＭＰＬ－１ ｍａｇｎｅｔ）に、２分間載置される。

６）上清が廃棄され、ビーズに結合した細胞が、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に懸濁し、磁性分離が続くことによって、３回洗浄される。

７）試料は、１００μｌの促進緩衝液中に懸濁される。

【０１５９】

試料調整：

１）ヒト被検者からの末梢血が、１ｍｇ／ｍｌのＥＤＴＡを含むシリコン処理したチューブに引き抜かれる。最初の３～５ｍｌは、刺された静脈から放出される内皮細胞での汚染を回避するために廃棄される。

２）全血の１ｍｌが、使用前に０．９％のＮａＣｌを用いて１：３に希釈される。

【０１６０】

コントロールの調整：

１）細胞系統のコントロールは、ＨＬ－６０細胞にヒト癌細胞系統をスパイクすることによって作製される。

２）細胞系統のコントロールは、２．５×10^6細胞／ｍｌの濃度で使用される。

【０１６１】

ＣＥＣおよびＣＥＰＣの手動分離：

非限定的な例として、生存ＣＥＣおよびＣＥＰＣは、Ｂｅｅｒｅｐｏｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１５：１３９－１４５（２００４）に述べられた免疫磁気分離／濃縮技術を使用して分離され得る。簡単に言えば、末梢血が、前もって抗－ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）と共

役された磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＩｇＧ$_1$）とインキュベートされる。この抗体は、末梢血における、造血細胞または上皮細胞ではなく、内皮細胞の全ての系統を認識する（Ｇｅｏｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈ．，　１３９：６５－７５　（１９９１））。造血細胞および上皮細胞のネガティブ選択は、適切な抗体（例えば、白血球を除くためのＤｙｎａｌ－ＣＤ４５ビーズ、単球を除くためのＤｙｎａｌ－ＣＤ１４ビーズ、上皮細胞を除くためのＤｙｎａｌ－ＥｐＣＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；　Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））に共役された磁性ビーズとともにポジティブ選択に先んじて使用され得る。この実施例において、ポジティブ選択のみが使用される。

【０１６２】

ＣＥＣおよびＣＥＰＣの免疫磁気分離法－活性化アッセイに後続される手動分離：

１）前もって、抗－ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に共役された磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０）が使用される。

２）使用の直前に、プレコートされたダイナビーズが０．０１％でＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で一度洗浄される。

３）２５μｌのプレコートされたダイナビーズが試料１ｍｌに添加される。

４）混合物が、緩やかな角度と回転で、２－８℃で２０分間インキュベートされる。

５）そのチューブは、磁性分離器（ＭＰＬ－１　ｍａｇｎｅｔ）に、２分間載置される。

６）上清が廃棄され、ビーズに結合した細胞が、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に懸濁され、磁性分離が続くことによって、３回洗浄される。

７）試料は、１００μｌの促進緩衝液中に再懸濁される。

【０１６３】

試料調整：

１）ヒト被検者からの末梢血が、１ｍｇ／ｍｌのＥＤＴＡを含むシリコン処理したチューブに引き抜かれる。最初の３～５ｍｌは、刺された静脈から放出される内皮細胞での汚染を回避するために廃棄される。

２）全血の１ｍｌが、使用前に０．９％のＮａＣｌを用いて１：３に希釈される。

【０１６４】

コントロールの準備：

１）細胞系統のコントロールは、ＨＬ－６０細胞へとヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）　をスパイクすることによって作製される。

２）細胞系統のコントロールは、２．５×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度で使用される。

【０１６５】

ＣＥＰＣ（ＣＥＣを除く）の手動分離：

ＣＥＰＣは、様々な造血因子に応答して成熟型内皮細胞へと分化する能力を有するの骨髄由来前駆細胞の循環性サブタイプである。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分離される。ＣＤ１３３は、ＣＥＰＣから、未熟型内皮前駆細胞（ＥＰＣ）または原造血幹細胞（ＨＳＣ）を区別する表面マーカーである。異なる源からのＣＥＰＣの様々な分離手法は、付着培養または磁性マイクロビーズを用いて説明されている。この実施例において、Ａｓａｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２７５：９６４－９６７　（１９９７）　に記載されたものから改変されたプロトコールが使用される。

【０１６６】

ＣＥＰＣの免疫磁気分離－活性化アッセイによって後続される手動分離：

１）磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＣＤ３４）が使用される。これらのビーズは、ＣＤ３４抗原に特異的なモノクローナル抗体で覆われている。

２）使用の直前に、プレコートされたダイナビーズが０．０１％でＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で一度洗浄される。

３）２５μｌのプレコートされたダイナビーズが試料１ｍｌに添加される。

４）混合物が、緩やかな角度と回転で、２～８℃で２０分間インキュベートされる。

５）そのチューブは、磁性分離器（ＭＰＬ－１　ｍａｇｎｅｔ）に、２分間載置される。

６）上清が廃棄され、ビーズに結合した細胞が、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁され、磁性分離が続くことによって、３回洗浄される。

７）試料は、１００μｌの促進緩衝液中に再懸濁される。

【０１６７】

試料調整：

１）ヒト被検者からの末梢血が、１ｍｇ／ｍｌのＥＤＴＡを含むシリコン処理したチューブに引き抜かれる。最初の３～５ｍｌは、刺された静脈から放出される内皮細胞での汚染を回避するために廃棄される。

２）全血の１０ｍｌが、平衡塩類溶液で１：１に希釈される。

３）４ｍｌの希釈血液は、１０ｍｌチューブ中で、３ｍｌのフィコール－プラーク（Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ）上に層状に置かれる。

４）チューブは、１８～２０℃で３０～４０分間、４００×ｇで回転される。

５）血漿および血小板を含む上側の層は、無菌的なパスツールピペットを用いて引き抜かれて捨てられ、接触面で乱れていない単核細胞の層が残る。

６）単核細胞は、無菌的なピペットを用いて、無菌的な遠心分離用チューブに移される。

７）６ｍｌの平衡塩類溶液が添加され、細胞はゆっくりと再懸濁される。

８）混合物は、１８～２０℃で１０分間、６０～１００×ｇで遠心分離される。

９）上清は、除去されて、各チューブからの単核細胞が、１ｍｌのＰＢＳ中に再懸濁される。

【０１６８】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステムを用いたＣＴＣ、ＣＥＣおよびＣＥＰＣの細胞分離：

Ｖｅｒｉｄｅｘ（Ｗａｒｒｅｎ，ＮＪ）は、ＣｅｌｌＰｒｅｐシステム、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ上皮細胞キット、およびＣｅｌｌＳｐｏｔｔｅｒ　ＡｎａｌｙｚｅｒＣｅｌｌＳｅａｒｃｈシステムを販売する。ＣｅｌｌＰｒｅｐシステムは、半自動化された試料準備システムである（Ｋａｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｌｉｇａｎｄ　Ａｓｓａｙ，２５：１０４－１１０（２００２））。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ上皮細胞キットは：上皮細胞特異的な抗－ＥｐＣＡＭ抗体でコートされた磁性流体；サイトケラチン８，１８，および１９に対するフィコエリスリン－共役抗体；アロフィコシアニンに共役された抗－ＣＤ４５抗体；ＤＡＰＩ染色剤；および細胞を洗浄、透過、および再懸濁するための緩衝液、からなる。この実施例において使用されるプロトコールはまた、Ａｌｌａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１０：６８９７－６９０４（２００４）に記載される。全Ｖｅｒｉｄｅｘシステムが、ＣＴＣの計数のために使用され得、または、ＣｅｌｌＰｒｅｐシステムを用いた分離の後に手動で試料を除去することによって、経路活性化状態のための分析に先んずる分離方法を提供し得る。ＣＴＣの数は、アルゴリズム開発のために情報を提供し得る。

【０１６９】

Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－計数に後続されるＣＴＣ濃縮：

１）７．５ｍｌの血液が６ｍｌの緩衝液と混合され、１０分間８００×ｇで遠心分離され、ＣｅｌｌＰｒｅｐシステム上に載置される。

２）装置が上清を吸引した後、その装置は、磁性流体を添加する。

３）その装置は、インキュベーションおよび後続する磁性分離工程を実施する。

４）非結合細胞および残存する血漿が吸引される。

５）染色試薬が、蛍光染色のための浸透緩衝液とともに添加される。

６）システムによるインキュベートの後、細胞は、磁性的に再度分離され、ＣｅｌｌＳｐｏｔｔｅｒ　Ａｎａｌｙｚｅｒを用いた分析のため、ＭａｇＮｅｓｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ装置において、再懸濁される。

７）その装置は、ＣｅｌｌＳｐｏｔｔｅｒ　Ａｎａｌｙｚｅｒ、４色の半自動化された

蛍光顕微鏡上に載置される。
８）画像は、Ｖｅｒｉｄｅｘが定義した基準に合うように取得され、最終的な手動選択のために、ウェブに基づくブラウザを介して示される。
９）細胞計数の結果が、７．５ｍｌの血液あたりの細胞数として表示される。
【０１７０】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－活性化アッセイに後続されるＣＴＣ濃縮：
１）７．５ｍｌの血液が６ｍｌの緩衝液と混合され、１０分間８００×ｇで遠心分離され、その後、ＣｅｌｌＰｒｅｐシステム上に載置される。
２）装置が上清を吸引した後、その装置は、磁性流体を添加する。
３）その装置は、インキュベーションおよび後続する磁性分離工程を実施する。
４）非結合細胞および残存する血漿が吸引される。
５）試料は、１００μｌの促進緩衝液中に再懸濁される。
【０１７１】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－活性化アッセイに後続されるＣＥＣおよびＣＥＰＣ濃縮：
１）Ｖｅｒｉｄｅｘは、抗－ＣＤ１４６抗体を有するキャプチャを利用するＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ内皮細胞キットを用意する。ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ内皮細胞キットは、血液試料調整のためのＶｅｒｉｄｅｘのＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ　ＡｕｔｏＰｒｅｐシステムおよび全血からのＣＥＣおよびＣＥＰＣを計測し、特徴づけるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　ＩＩとともに使用される。
【０１７２】
試料調整：
１）ヒト被検者からの末梢血は、ＣｅｌｌＳａｖｅ　Ｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｖｅチューブ中に、製造業者の取り扱い説明書に従って、引き抜かれる。最初の３～５ｍｌは、刺された静脈から放出される上皮細胞または内皮細胞での汚染を回避するために廃棄される。
【０１７３】
ＣＳＣの手動分離：
腫瘍が、特徴的な自己再生および生存機構を有する、少数の推定癌幹細胞を含むこと証拠が築かれる（例えば、Ｓｅｌｌｓ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｎｃｏｌ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，５１：１－２８（２００４）；Ｒｅｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４１４：１０５－１１１（２００１）；Ｄｏｎｔｕ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｌ．，１５：１９３－１９７（２００４）；ａｎｄ Ｄｉｃｋ，Ｎａｔｕｒｅ，４２３：２３１－２３３（２００３）を参照）。癌幹細胞（ＣＳＣ）は、長期間、休止状態にあり得、それによって、それらの細胞は、分裂細胞を標的とする化学療法剤に対し耐性になる。この癌を発症している集団は、選択的な除去のために標的化された治療にさらされる自己再生および生存経路の活性化に特徴づけられ得る。ＣＳＣの分離手法は、付着培養または磁性マイクロビーズを用いて述べられる。この実施例において、Ｃｏｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎ．Ｒｅｓ．，１２：５６１５（２００６）に記載されたものを改変したプロトコールが使用される。
【０１７４】
免疫磁性ＣＳＣ分離－活性化アッセイに後続される手動分離：
１）磁性ビーズ（Ｄｙｎａｌ　ＡＳ；Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）が使用される。これらのビーズは、ＣＤ３４またはＣＤ１３３表面抗原に特異的なモノクローナル抗体で覆われている。
２）使用の直前に、プレコートされたダイナビーズが０．０１％でＢＳＡを含む等量のＰＢＳ中で一度洗浄される。
３）１～10^7個のプレコートされたダイナビーズが試料３ｍｌに添加される。
４）混合物が、緩やかな角度と回転で、２～８℃で６０分間インキュベートされる。
５）その混合物は、１ｍｌずつに分注され、各チューブは、磁性分離器（ＭＰＬ－１ｍａｇｎｅｔ）に、少なくとも６分間載置される。

６）上清が廃棄され、ビーズに結合した細胞が、０．０１％でＢＳＡを含むＰＢＳ中に再懸濁され、磁性分離が続くことによって、３回洗浄される。

７）試料は、１００μｌの促進緩衝液中に再懸濁される。

【０１７５】

試料調整：

１）骨髄検体が、患者へのインフォームドコンセントに従い、早期乳癌患者から採取される。

２）骨髄吸引物の処理が、Ｂａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｌｉｎ．　Ｃａｎ．　Ｒｅｓ．，　６：３５５２－３５５９　（２０００）に記載されるように実施される。任意の播種性腫瘍細胞を含む単核細胞画分は、フィコール－ハイパーク（Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ）において、Ｂｅｃｋｍａｎ　ＧＳ－６遠心分離機を用いた４０００×ｇ、３５分間の密度勾配遠心分離によって濃縮され、ＰＢＳで２回洗浄される。

【０１７６】

分離されたＣＴＣの細胞刺激および溶解：

細胞刺激：

１）増殖因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）が、細胞に添加され、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１７７】

薬剤処理での細胞刺激：

１）試料は、治療に効果的な濃度で、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバおよび／またはラパマイシン類似物と３７℃、３０分間インキュベートされる。

２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加し、３７℃で５分間インキュベートされることによって刺激される。

【０１７８】

薬剤処理を伴う細胞刺激（フィードバックループ）：

１）試料は、ハーセプチン（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）、ラパチニブ（Ｌａｐａｔａｎｉｂ）、タルセバ（Ｔａｒｃｅｖａ）、および／またはラパマイシン（Ｒａｐａｍｙｃｉｎ）類似体と、治療に効果的な濃度で、３７℃、３０分間インキュベートされる。

２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）によって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。

【０１７９】

刺激されたＣＴＣは、以下のプロトコールを用いて溶解される：

１）新鮮な溶解緩衝液が、表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。

２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。

４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。

５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。

【表４】

表2

溶解緩衝液レシピ（10 ml）			
試薬	ストック濃度	最終濃度	容量
10% Triton X-100	10	1	1
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-グリセロールリン酸	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	0.1	
コンプリートミニプロテアーゼ			1 錠
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		総量(ml)	3.00
		水 (ml)	7.00

【０１８０】

分離されたＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣの細胞刺激および溶解：

ＶＥＧＦは、ＣＥＰＣ（Ｌａｒｒｉｖｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７８：２２００６－２２０１３（２００３））および血管壁からはがれ落ちた成熟型ＣＥＣ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る。成熟型ＣＥＣは、ＣＥＰＣと比較して限定された増殖能しか有していないであろうが、ＶＥＧＦはまた、ＣＥＰＣまたは成熟型ＣＥＣの増殖を促進し得る（Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０５：７１－７７（２０００）を参照）。これらの理由のため、ＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣは、溶解前に、ＶＥＧＦファミリー増殖因子とのインキュベーションによって活性化される。

【０１８１】

細胞刺激：

１）増殖因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦおよび／またはＡｎｇは、各１００ｎｍで、細胞に添加され、３７℃、５分間インキュベートされる。

【０１８２】

薬剤を用いた細胞刺激：

１）試料は、アバスチン、ネクサバール（Ｎｅｘａｖａｒ）、スーテント（Ｓｕｔｅｎｔ）、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。

２）細胞は、その後、増殖因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦおよび／またはＡｎｇを各１００ｎｍで添加することによって刺激され、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１８３】

薬剤を用いた細胞刺激（フィードバックループ）：

１）試料は、アバスチン、ネクサバール、スーテント、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃で、インキュベートされる。

２）細胞は、その後、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦおよび／またはＡｎｇを各１００ｎｍで添加することによって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。

【０１８４】

刺激されたＣＥＣおよび／またはＣＥＰＣ細胞は、以下のプロトコールを用いて溶解される：

１）新鮮な溶解緩衝液が、表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。
２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。
３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。
４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。
５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。

【０１８５】
分離されたＣＳＣの細胞刺激および溶解：
１）増殖因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）が細胞に添加されて、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１８６】
薬剤を用いた細胞刺激：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃で、インキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１０ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１８７】
薬剤を用いた細胞刺激（フィードバックループ）：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１０ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。

【０１８８】
分離されたＣＳＣ細胞は、以下のプロトコールを用いて溶解される：
１）新鮮な溶解緩衝液が、表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。
２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。
３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。
４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。
５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。

【０１８９】
（実施例２．組織、生検またはプライマリ培養からの腫瘍細胞抽出物の調整）
この実施例は、腫瘍組織または生検試料から細胞を分離し、刺激し、および溶解する方法を示す。この実施例はまた、組織、生検、または全血から分離された腫瘍細胞のプライマリ培養を開始し、刺激し、および溶解する方法を示す。化学療法剤をスクリーニングするために、生物試料からの腫瘍細胞を分離し、培養する追加の方法は、米国特許第５，７２８，５４１号；第６，４１６，９６７号；第６，８８７，６８０号；第６，９００，０２７号；第６，９３３，１２９号；および第７，１１２，４１５号；および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る。この実施例に従って調整される細胞抽出物は、本明細書において述べられる単一検出または近接アッセイにおいて使用され得る。

【０１９０】
原発性および転移性組織からの腫瘍細胞の分離：
細胞の分離と培養：
１）約５～１００ｍｇの非壊死性、非汚染腫瘍組織が、外科的に摘出され、無菌性細胞培地（例えば、１０％ＦＢＳおよび抗体を有するＲＭＰＩ－１６４０）を含む１００ｍｌ

ボトルへと入れられる。
２）試料は、抽出の７２時間内は、室温で保存され得、または輸送され得る。
３）試料は、細胞培地において３回洗浄される。
４）組織は、外科用メスで小片へと細分化され、その後、微細な金網を通過させることによって細胞懸濁液へと分散される。
５）代わりに、細分化された組織は、抗体を含む無血清細胞培地にて希釈された０．２５％コラゲナーゼＩＩおよび０．００１％ＤＮａｓｅを含むカクテルで処理される。インキュベーションは、１５～２０分間、緩やかな撹拌を伴う。酵素は、細胞培地で３回洗浄することによって処理された後、除去される。
６）細胞濃度は、10^6細胞／ｍｌに調整され、細胞は６ウェルプレートへと植え付けられ、一晩安定させられる。次の日、細胞は、トリプシン処理され、リガンドでの刺激および／または標的薬剤での阻害のために、マイクロタイタープレートに再度植え付けられる。

【０１９１】
分散された腫瘍からの細胞刺激および細胞の溶解：
細胞刺激：
１）増殖因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）が細胞に添加されて、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１９２】
薬剤処理での細胞刺激：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１０ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１９３】
薬剤処理での細胞刺激（フィードバックループ）：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１０ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。

【０１９４】
刺激された細胞は、以下のプロトコールを用いて溶解される：
１）新鮮な溶解緩衝液が、上記表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。
２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。
３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。
４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。
５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。

【０１９５】
生検試料からの腫瘍細胞の分離：
細胞の分離および培養：
１）コア生検が外科的に摘出され（引圧吸引生検のための１～２生検で、１４ゲージの針に対して２コア、１６ゲージの針に対して３コア、および１８ゲージの針に対して４コア）、腫瘍生検に関しては、細胞培地を含む１００ｍｌバイアルへと入れられる。
２）試料は、抽出の７２時間以内は、室温で保存され得、または輸送され得る。
３）コア生検からの細胞物質は、微細な金網を通過させることによって細胞懸濁液へと分散される。

４）代わりに、生検は、抗体を含む細胞培地にて希釈された０．２５％コラゲナーゼＩＩおよび０．００１％ＤＮａｓｅを含むカクテルで処理され得る。インキュベーションは、１５～２０分間、緩やかな撹拌を伴う。酵素は、細胞培地で３回洗浄することによって処理された後、除去される。

５）細胞濃度は、10^6細胞／ｍｌに調整され、細胞は６ウェルプレートへと植え付けられ、一晩安定させられる。次の日、細胞は、トリプシン処理され、リガンドでの刺激および／または標的薬剤での阻害のために、マイクロタイタープレートに再度植え付けられる。

【０１９６】

生検からの細胞刺激および細胞の溶解：

細胞刺激：

１）増殖因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）が細胞に添加されて、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１９７】

薬剤処理での細胞刺激：

１）試料は、ハーセプチン）、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。

２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１０ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で５分間インキュベートされる。

【０１９８】

薬剤処理での細胞刺激（フィードバックループ）：

１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃で、インキュベートされる。

２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。

【０１９９】

刺激された細胞は、以下のプロトコールを用いて溶解される：

１）新鮮な溶解緩衝液が、上記表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。

２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。

３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。

４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。

５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。

【０２００】

組織、生検または全血から分離された腫瘍細胞由来のプライマリー培養の開始：

細胞培養：

１）上述のとおり組織、生検または全血から分離された腫瘍細胞は、分離された腫瘍細胞の数に応じて、小さな無菌性フラスコ（例えば、Ｔ－２５）、ペトリ皿（例えば、１０ｍｍ）またはプレート（例えば、２４ウェルプレート）において培養される。

２）インキュベーションは、５％CO_2で充満された加湿された３７℃のインキュベーションにおいて、細胞培地（例えば、２％のＦＢＳと抗体とを有するＲＭＰＩ－１６４０）中でなされる。徐々に、細胞は、ベッセルの底部上に単層を形成し、分裂し始める。細胞が、ほぼ重なり合うようになると、それらは、トリプシン処理され、リガンドでの刺激および／または標的薬剤での阻害のためにマイクロタイタープレートへと再度植え付けられる。

【０２０１】

組織、生検、または全血から分離された腫瘍細胞由来の細胞刺激およびプライマリー培養

の溶解：
細胞刺激：
１）増殖因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）が細胞に添加されて、３７℃で５分間インキュベートされる。
【０２０２】
薬剤処理での細胞刺激：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で５分間インキュベートされる。
【０２０３】
薬剤処理での細胞刺激（フィードバックループ）：
１）試料は、ハーセプチン、ラパチニブ、タルセバ、および／またはラパマイシン類似体と、治療に効果的な濃度で、３０分間、３７℃でインキュベートされる。
２）細胞は、その後、ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）、および／またはＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することによって刺激され、３７℃で１２０分間インキュベートされる。
【０２０４】
刺激された細胞は、以下のプロトコールを用いて溶解される：
１）新鮮な溶解緩衝液が、上記表２に示す試薬を混合することによって、新鮮に調整され得る。
２）最後の洗浄の後、細胞は、１００μｌの冷緩衝液中に、氷上で、再懸濁される。
３）インキュベーションは、氷上で３０分間実施される。
４）混合物は、１０分間、最高速度で、微量遠心管中において回転され、溶解物からビーズが分離される。
５）溶解物は、アッセイまたは－８０℃での保存のために新しいチューブに移される。
【０２０５】
実施例３．チラミドシグナル増幅を伴う単一検出マイクロアレイ
この実施例は、希少循環細胞におけるシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに適した高いダイナミックレンジを有する、多重、ハイスループット、単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを説明する：
１）キャプチャ抗体が、２倍の連続希釈で、１６－パッドＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．；Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）上に印刷された。
２）一晩乾燥後、スライドは、Ｗｈａｔｍａｎブロッキング緩衝液でブロックされた。
３）８０μｌの細胞溶解物が各パッドに１０倍の連続希釈で添加された。スライドは、室温で２時間インキュベートされた。
４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで６回洗浄後、８０μｌのビオチン標識検出抗体（例えば、ｐＥＧＦＲ　認識モノクローナル抗体または活性化状態に関係なくＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体）が室温で２時間インキュベートされた。
５）６回洗浄後、ストレプトアビジン標識セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＳＡ－ＨＲＰ）が添加され、ＳＡ－ＨＲＰがビオチン標識検出抗体に結合するように１時間インキュベートされた。
６）シグナル増幅のため、５μｇ／ｍｌのビオチン－チラミド８０μｌが添加されて１５分間反応させられた。素来ふぉは、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで２回、ＴＢＳで１回洗浄された。
７）８０μｌのＳＡ－Ａｌｅｘａ　５５５が添加され、３０分間インキュベートされた。スライドは、その後、２回洗浄され、５分間乾燥され、そしてマイクロアレイスキャナ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．；Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）上でスキャンされた。
【０２０６】

実施例４．チラミドシグナル増幅を伴う近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡ
この実施例は、希少循環細胞におけるシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに適した高いダイナミックレンジを有する、多重、ハイスループット、近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを説明する：
１）キャプチャ抗体が、１ｍｇ／ｍｌ～０．００４ｍｇ／ｍｌの希釈系列で１６－パッドＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．；Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）上に印刷された。
２）一晩乾燥後、スライドは、Ｗｈａｔｍａｎ　ブロッキング緩衝液でブロックされた。
３）８０μｌのＡ４３１細胞溶解物が各パッドに１０倍の連続希釈で添加された。スライドは、室温で２時間インキュベートされた。
４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで６回洗浄後、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ／２％　ＢＳＡ／１％　ＦＢＳに希釈された近接アッセイのための検出抗体８０μｌがスライドに添加された。使用された検出抗体は：（１）グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）に直接共役された－ＥＧＦＲモノクローナル抗体；および（２）セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に直接共役されたリン酸化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、２時間、室温であった。
５）代わりに、検出工程は、リン酸化ＥＧＦＲを認識するモノクローナル抗体のビオチン共役体を利用した。これらの例において、６回洗浄後、ストレプトアビジン－ＨＲＰとの１時間のインキュベーションという追加の連続工程が含まれた。
６）代わりに、検出工程は、抗－ＥＧＦＲ抗体のオリゴヌクレオチドを介したグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）を利用した。リン酸化ＥＧＦＲ抗体に対する、直接共役されたＨＲＰ共役体またはビオチン－ストレプトアビジン（ＳＡ）で接続されたＨＲＰ共役体のいづれかが使用された。
６）シグナル増幅のため、５μｇ／ｍｌのビオチン－チラミド８０μｌが添加され、１５分間反応させられた。スライドは、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで６回、２０％　ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで２回、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎで６回洗浄後で１回洗浄された。
７）８０μｌのＳＡ－Ａｌｅｘａ　５５５が添加され、３０分間インキュベートされた。スライドは、その後、２回洗浄され、５分間乾燥され、そしてマイクロアレイスキャナ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．）上でスキャンされた。

【０２０７】
実施例５．薬剤選択のための活性プロファイルの生成
本発明の方法および組成物は、癌治療のための薬剤選択に適用され得る、典型的なプロトコールは、２つのプロファイル、一つの参照活性プロファイルおよび一つのテスト活性プロファイルの生成を必要とし、その後、これらは、特定の薬剤治療レジメの有効性を決定するために比較される（図２を参照）。

【０２０８】
参照活性プロファイル
参照活性プロファイルを導出するため、血液試料が、抗癌剤治療の前に、特定の種類の癌（例えば、肺腫瘍）を患う患者から取得される。癌性腫瘍由来の希少循環細胞が、例えば、本明細書において非常に詳細に述べたように、免疫磁気分離技術を用いて、血液試料から分離される。分離された循環細胞は、インビトロで一つ以上の増殖因子で刺激され得る。刺激された細胞は、その後、溶解されて、細胞抽出物を生成する。細胞抽出物は、活性化状態が患者の癌のタイプで変化され得るシグナル伝達分子に特異的なキャプチャ抗体のパネルの希釈系列を含む、アドレス可能なアレイに加えられる。単一検出または近接アッセイが、目的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）を用いて実施される。表１に示される「経路選択」テーブルが、患者の癌のタイプに基づいて活性化状態を検出するものを選択するために特に有用である。例えば、ある患者が、表１の「経路１」に示されるＥＧＦＲ経路の活性化状態を示す癌タイプを患っていてもよい。代わりに、

他の患者が、表１の「経路２」に示されるＥＧＦＲ経路の活性化状態を示す他の癌タイプであってもよい。従って、参照活性プロファイルが作成されて、任意の抗癌剤のない状態での患者の癌中のシグナル伝達分子の活性化状態を提供する。

【０２０９】

テスト活性プロファイル：

テスト活性プロファイルを得るため、第２の血液試料が、抗癌剤治療前または抗癌剤の投与後のいずれか（例えば、癌治療の過程を通して任意の時）に、特定の癌タイプ（例えば、肺腫瘍）を患う患者から取得される。癌性腫瘍由来の希少循環細胞は、血液試料から分離される。分離された細胞が、抗癌剤治療を受けていない患者から得られた場合、分離された細胞は、上述した参照活性プロファイルから決定された活性型シグナル伝達分子の一つまたは複数を標的化した抗癌剤とインキュベートされる。「薬剤選択」テーブル（表Ａ）は、特定の活性化された標的シグナル伝達分子を阻害する、認可されたまたは臨床試験のいずれかである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参照活性プロファイルから決定されると、その後、細胞は、表Ａのカラム「Ａ」または「Ｂ」にリスト化された薬剤の一つまたは複数とインキュベートされ得る。分離された細胞は、その後、インビトロで、一つ以上の増殖因子で刺激され得る。分離された細胞は、その後、溶解されて細胞抽出物を生成する。細胞抽出物は、アドレス可能なアレイに適用され、近接アッセイが、目的の各シグナル伝達分子の活性化状態を決定するために実施される。従って、患者のためのテスト活性プロファイルが作成されて、特定の抗癌剤の存在下で、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。

【０２１０】

薬剤選択：

抗癌剤は、テスト活性プロファイルを参照活性プロファイルと比較することによって患者の癌の治療に適した、または適さないことが決定される。例えば、薬剤治療が、ほとんどまたは全てのシグナル伝達分子を、薬剤のない状態よりも実質的に活性化されないようにする場合、例えば、薬剤がないときの強い活性から、薬剤があるときの弱いまたは非常に弱い活性へと変化する場合、その後、その治療は、その患者の癌に適していると決定される。そのような例において、治療は、薬剤治療を受けていない患者に適した抗癌剤で開始する、または、すでに薬剤を投与されている患者に適した抗癌剤で次の治療が継続される。しかしながら、薬剤治療が、患者の癌の治療に適していないと見なされる場合、異なる薬剤が、選択され、新しいテスト活性プロファイルを作成するために使用され、その後、参照活性プロファイルと比較される。そのような例において、治療は、薬剤療法を受けていない患者に適した抗癌剤で開始され、または次の治療が、不適切な薬剤を現在投与されている患者に適した抗癌剤へと変えられる。

【０２１１】

実施例６．活性型受容体チロシンキナーゼの分析のためのアドレス可能なアレイ：

図３は、本発明のアドレス可能な受容体チロシンキナーゼアレイを示す。本明細書において述べられるように、受容体チロシンキナーゼは、細胞増殖に含まれる多くのシグナル伝達経路の鍵となる構成因子である。例えば、受容体チロシンキナーゼのＥｒｂＢファミリーは、４つのファミリー要素を有し、細胞増殖、分化、および生存といった基本的な細胞プロセスにおいて重要な役割を果たす。このファミリーの受容体チロシンキナーゼは、多くの異なる癌において過剰発現されることが報告されており、悪い臨床転帰と相関する。増殖因子の結合において、ＥｒｂＢ１またはＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ３またはＨＥＲ３、およびＥｒｂＢ４またはＨＥＲ４がホモ－およびヘテロ－２量体化して、多数の異なるシグナル伝達経路を活性化する。ＥｒｂＢ２またはＨＥＲ２は、増殖因子と結合せず、全ての３つのファミリー要素にとって好ましいヘテロ２量体化の相手である。ＥｒｂＢ２はまた、過剰発現されるとホモ２量体化され得、シグナル伝達経路を活性化し得る。ＥｒｂＢファミリーのホモ－またはヘテロ－２量体化は、結果としてトランスリン酸化をもたらす。自己リン酸化またはトランスリン酸化は、受容体チロシンキナーゼの阻害型立体構造を緩

和し、完全なキナーゼ活性を可能にし、同時に、Ｓｒｃ、Ｓｈｃ、ＳＨＰ－１、ＳＨＥＰ－１およびＰＩ（３）Ｋといった様々なＳＨ２含有シグナル伝達分子のための結合部位を形成する。Ｓｈｃ、Ｇｒｂ２またはＰＩ３Ｋのようなアダプタータンパク質またはシグナル伝達タンパク質は、リン酸化された受容体に取り込まれる。アダプタータンパク質のリン酸化は、ＭＡＰＫおよびＡＫＴ経路の活性化をもたらす。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され得、一方、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され得る。

【０２１２】

従って、図３に示されたアドレス可能なＥｒｂＢファミリーチップは、４つの受容体チロシンキナーゼの発現を決定するだけでなく、それらの活性化状態を決定することも可能にする。ＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ経路両方の活性化はまた、アドレス可能なチップ上で試験され得る。チップの他の特徴は、腫瘍の量を決定するための内部標準およびあらゆる非特異的結合を決定するための非特異的ＩｇＧが存在していることである。

【０２１３】

実施例７．血管新生におけるシグナル伝達経路の分析のためのアドレス可能なアレイ

図４は、血管新生に含まれるシグナル伝達構成因子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成を示す。本明細書において述べるように、腫瘍の血管新生は、多くの固形腫瘍の増殖にとって重要である。内皮細胞上に顕著に発現され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を含む。ＰＤＧＦＲは、典型的には、周皮細胞上に発現される。これらの受容体の発現および活性化状態は、個々の腫瘍検体における血管新生の主要な機構を決定するのに重要である。ＶＥＧＦおよびＰＩＧＦのような増殖因子は、ＶＥＧＦＲ－１およびＶＥＧＦＲ－２に結合し、ホモ－およびヘテロ－２量体化を開始する。２量体化は、これらの受容体のリン酸化によって後続され、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受容体はまた、同様に活性化される。自己リン酸化またはトランスリン酸化は、受容体チロシンキナーゼの阻害型立体構造をを緩和し、完全なキナーゼ活性を可能にし、同時に、Ｓｒｃ、Ｓｈｃ、ＳＨＰ－１、Ｖ－カドヘリン、ＳＨＥＰ－１およびＰＩ３Ｋといった様々なＳＨ２含有シグナル伝達分子のための結合部位を形成する。Ｓｈｃ、Ｇｒｂ２またはＰＩ３Ｋのようなアダプタータンパク質またはシグナル伝達タンパク質は、リン酸化された受容体に取り込まれる。アダプタータンパク質のリン酸化は、ＭＡＰＫおよびＡＫＴ経路の活性化をもたらす。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され得、一方、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され得る。

【０２１４】

従って、図４に示されるもののような、アドレス可能な血管新生チップは、患者試料における全ての受容体チロシンキナーゼの発現を決定するだけでなく、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経路の活性化はまた、アドレス可能なチップ上で試験され得る。そのチップは、腫瘍または腫瘍関連細胞（ＣＥＣ、ＣＥＰ、周皮細胞など）の量を決定するための内部標準およびあらゆる非特異的結合を決定する非特異的ＩｇＧを有する。

【０２１５】

実施例８．非小細胞肺癌治療のための患者の選択

非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の現在の治療は、化学療法および抗血管新生治療の両方の使用を必要とする。第１のラインの治療として、医師は、典型的には、非扁平上皮細胞の患者に対して、カルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）（Ｃ）またはタキソール（Ｔａｘｏｌ）（登録商標）（Ｔ）およびアバスタチン（Ａｖａｓｔｉｎ）（登録商標）を採用する。第２のラインの薬剤は、（登録商標）（非喫煙者、女性、およびアジア人に対して）タキソール、ＡＬＩＭＴＡ（登録商標）およびタルセバを含む。進行中の臨床試験

は、様々な薬剤の以下のものを含む組み合わせの有効性を試験する：非扁平上皮細胞の患者においてアバスタチン＋タルセバ；扁平上皮細胞癌を含む全てのＮＳＣＬＣにおいてソラフェニブ（ｓｏｒａｆｅｎｉｂ）＋カルボプラチン＋タキソール；扁平上皮細胞癌を含む全てのＮＳＣＬＣにおいてＺＤ６４７４（ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標））＋カルボプラチン＋タキソール）。

【０２１６】

鍵となるシグナル伝達の構成因子における多数の変化がＮＳＣＬＣにおいて示されている。これらは：活性化をもたらすＥＧＦＲ変異；ｃ－ｍｅｔといった他の受容体チロシンキナーゼの活性化；ＨＥＲ２および３活性化またはＨＥＲ２の増幅を伴うＥＧＦＲ活性化；ＰＩ３Ｋ変異を伴うＥＧＦＲ活性化；ＰＴＥＮ欠損を伴うＥＧＦＲを新式活性化；およびＲａｓ変異を伴うＥＧＦＲ活性化、を含む。シグナル伝達経路の異なる構成因子における様々な変化が、様々な形態の化学療法によって標的化されている。

【０２１７】

同時に、腫瘍細胞への新しい血管の形成、血管新生と呼ばれるプロセス、が標的化され得る。ＶＥＧＦは、新しい血管の形成に必要不可欠である内皮細胞生存因子である。従って、ＶＥＧＦを介した血管新生の調整への一つのアプローチは、ＶＥＧＦタンパク質自身またはＶＥＧＦＲに対する抗体を使用することである。ベバシズナブ（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）、ＶＥＧＦへの組み換えヒト化モノクローナル抗体、は、化学療法と相乗的に働き、結腸癌、乳癌、および肺癌を患う患者における生存を改善することが示されている。

【０２１８】

表３に以下示される例は、内皮細胞またはＥＣＰにおいて活性な経路の分析が、医師が有効な治療過程を決定するのを助けるためにどのように使用され得るかを示す。簡単に言えば、内皮細胞またはＥＣＰにおけるＶＥＧＦ経路の異なる構成因子の活性レベルは、試験治療剤の異なる組み合わせの存在または非存在化において決定され得る。

【表５】

表3

受容体	発現	活性 (リン酸化レベル)	活性化 プラス アバスタチン(Avastin)	活性化 プラス Ｃ＋Ｔ +アバスタチン(Avastin)
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	弱	中	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

【０２１９】

表３に示される情報は、強いリン酸化レベルによって示されるような強い活性を示すシグナル伝達構成因子が、アバスタチンまたはＣ＋Ｔ＋アバスタチンを用いた治療によって、弱いレベルに減少される。従って、活性型ＶＥＧＦＲ－２およびＶＥＧＦＲ－１経路を有する患者は、アバスタチンまたはＣ＋Ｔ＋アバスタチンで処理されるべきである。

【０２２０】

血管新生シグナル伝達経路を標的化し、テスト活性プロファイルを作成するのに使用され得る他の治療剤の例は、以下、表４に示される。

【表６】

表4

NSCLCにおけるVEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の安全性および有効性

阻害剤	標的	共通の毒性	NSCLCにおける臨床活性
バタラニブ（Vatalanib）	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	疲労, 吐き気, 嘔吐, 肝酵素の上昇, 高血圧	報告例なし
AZD2171	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR	疲労, 下痢, 高血圧, 食欲不振, 呼吸困難	SD
スニチニブマレート（Sunitinib Malate）	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	疲労, 発疹, 毛髪脱色素, 毛髪変色, 高血圧	PR
AG013736	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	高血圧, 喀血, 口内炎, 吐き気, 下痢	腫瘍キャビテーション
ソラフェニブ（Sorafenib）	VEGFR-2, -3, PDGFR, c-Kit, Raf	下痢, 肝酵素の上昇, 高血圧, 疲労	SD
GW786034	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	高血圧, 肺塞栓, 吐き気, 疲労, 毛髪脱色素	SD
ZD6474	VEGFR-1, -2, -3,	下痢, 発疹, 高血圧	PR
CP-547632	VEGFR-2	発疹および口渇	PR

【０２２１】

上記の表４は、新規抗血管新生剤のための標的を列挙する。本発明は、最もよく生存を予測するであろう活性マーカーの知的な選択を可能にする。最も適切な活性マーカーは、異なる薬剤間で変わってよく、抗血管新生単一療法、対、組み合わせ療法の間の選択のためのガイドとして使用され得る。

【０２２２】

実施例９．他の抗血管新生剤での治療のための患者の選択

本発明によって開示される経路分析の表４に示される様々な薬剤の適正の決定に対する適用の追加の例は、以下に示される。

【０２２３】

ＺＤ６４７４

ＺＤ６４７４（ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標））は、現在、ＥＧＦＲに対する治療が失敗している患者の治療のため、フェーズＩＩＩ臨床試験の段階にある。特に、この試験は、最良の支持治療（ＢＳＣ）にＺＤ６４７４を加えることが、以前の化学療法およびＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤（ＴＫＩ）の後に病気が再発した非小細胞肺癌を患う患者の治療のために、最良の支持治療単独よりも有効であるかを評価するために実施されている。ＺＤ６４７４　は、腫瘍への新しい血管の成長を標的化し、それによって腫瘍の増殖速度を減少してもよい。前試験は、ＺＤ６４７４が、腫瘍がさらなる段階へと進行し得る時期に対してポジティブな効果を有することを示す。第３のラインの治療のため、ＺＤ６４７４が化学療法およびＥＧＦＲ　ＴＫＩにおいて再発した患者に与えられる。ＺＤ６４７４の構造は、タルセバ／イレッサ（Ｉｒｅｓｓａ）（登録商標）とは異なり、従って、それは、ＥＧＦＲおよび抗血管新生経路（例えば、ＶＥＧＦＲ－１，－２および－３）を未だに阻害するであろう期待がある。

【０２２４】

従って、以下の試験が行われている：

・ペメトレキセド（ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ）と組み合わせたＺＤ６４７４と、ペメトレキセドｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ単独とを比較する効果試験；

・非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）におけるドセタキセル（ｄｏｃｅｔａｘｅｌ）を組み合わせたＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標）とドセタキセル（ｄｏｃｅｔａｘｅｌ）単独との比較試験；

・手術によって除去され得るステージＩ、ステージＩＩ、またはステージＩＩＩのＮＳＣＬＣを患う患者の治療におけるバンデタニブ（Ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ）、カルボプラチン

（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）、およびパクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）；および・少なくとも一つの先の化学療法の失敗後のＮＳＣＬＣにおいてＺＤ６４７４とエルロチニブを比較する効果試験。

【０２２５】

本発明の方法および組成物を用いてＺＤ６４７４を含む薬剤の組み合わせに応答する患者の選択は、以下、表５に示されるように、フェーズＩＩＩ臨床試験における患者の数を減らすだけでなく、より良好な患者の治療をもたらすだろう。

【表７】

表５

腫瘍細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス ZD 6474	活性化 プラス アバスタチン(Avastin)
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	強
ErbB2:	中	強	微弱(V. Weak)	強
ErbB3	低	中	微弱(V. Weak)	中
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	弱
Shc		強	微弱(V. Weak)	強
PI3K		強	微弱(V. Weak)	強
Erk		強	微弱(V. Weak)	強
Rsk		強	微弱(V. Weak)	強
Akt		強	微弱(V. Weak)	強
P70S6K		強	微弱(V. Weak)	強

【表８】

表６

内皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス ZD 6474	活性化 プラス アバスタチン(Avastin)
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	無し	中	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

【０２２６】

表５および表６における情報は、ＺＤ６４７４が、内皮細胞と腫瘍細胞との両方において経路を下方制御することを示す。

【０２２７】

ＡＺＤ２１７１

ＰＤＧＦＲおよびＶＥＧＦＲを阻害する薬剤、ＡＺＤ２１７１での多数の臨床試験が、行われている。例えば、ＡＺＤ２１７１とペメトレキセド（ｐｅｍｅｔｒｅｘｅｄ）二ナトリウムの組み合わせが、再発した非小細胞肺癌を患う患者の治療のために試験されている。この組み合わせの根本的理由は、ペメトレキセド二ナトリウムが、細胞分裂に必要な酵素を阻害することによって腫瘍細胞の増殖を停止し得ることである。ＡＺＤ２１７１は、腫瘍へと流れる血液を遮断することによる腫瘍細胞の増殖を停止するという追加の寄与を提供する。従って、ＡＺＤ２１７１をペメトレキセド二ナトリウムと共に投与することは、より多くの腫瘍細胞を殺すことにおける相乗効果を有し得る。

【０２２８】

他の臨床試験は、転移性または切除不能な固形腫瘍またはリンパ腫を患う患者を処置するためにベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）（アバスチン（Ａｖａｓｔｉｎ）（登録商標））およびＡＺＤ２１７１を対としている。この組み合わせの根本的理由は、ベバシズマブといったモノクローナル抗体が、多様な方法で、癌の増殖を遮断し得る。いくつかは、腫瘍細胞が増殖し、広がる能力を遮断する。その他は、癌細胞を見つけ、それらを殺すのを、またはそれらに癌を殺す基質を運ぶのを助ける。ベバシズマブおよびＡＺＤ２１７１はまた、癌への血流を遮断することによって、癌細胞の増殖を停止し得る。従って、ＡＺＤ２１７１と共にベバシズマブを投与することは、より多くの癌細胞を相乗効果で殺し得る。

【０２２９】

他の臨床試験は、ステージＩＩＩＢまたはステージＩＶの非小細胞肺癌を患う患者を処置する際の第１ラインの治療として、ＡＺＤ２１７１の存在または非存在下での、ゲムシタビン（ｇｅｍｃｉｔａｂｉｎｅ）およびカルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）の組み合わせを評価し、ステージＩＩＩまたはステージＩＶの非小細胞肺癌を患う患者を処置する際のＡＺＤ２１７１の存在または非存在下でのパクリタキセル（ｐａｃｌｉｔａｘｅｌ）およびカルボプラチン（ｃａｒｂｏｐｌａｔｉｎ）の組み合わせを評価している。

【０２３０】

本発明の方法および組成物を用いてＡＺＤ２１７１を含む薬剤の組み合わせに応答する患者の選択は、以下表７に示される。

【表９】

表7

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス AZD 2171	活性化 プラス アバスタチン(Avastin)
VEGFR2:	中	強	弱	弱
VEGFR1:	中	強	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-Cadherin--R2 complex	無し	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

【０２３１】

ＰＤＧＦが、アバスタチン耐性の患者において過剰発現しているので、表７に示されるような情報は、ＰＤＧＦＲおよびＶＥＧＦＲを阻害するＡＺＤ２１７１が、そのような腫瘍を処置する選択がされる薬剤であり得る。

【０２３２】

ソラフェニブ

ソラフェニブ（ＢＡＹ　４３－９００６）を用いた多数の臨床試験も、進行中である。例えば、以下の試験がなされている：（１）小細胞肺癌を患う患者における、カルボプラチンおよびパクリタキセル、プラスまたはマイナスソラフェニブの比較；（２）ステージＩＩＩ～ＩＶの非小細胞肺癌を患う、化学物質に過敏な患者における、カルボプラチンおよびパクリタキセル、プラスまたはマイナスソラフェニブの安全性と有効性ランダムに制御された試験；（３）耐性、転移性、または切除不能な固形腫瘍を患う患者のソラフェニブおよびベバシズマブ治療。

【０２３３】

本発明の方法および組成物を用いたソラフェニブを含む薬剤の組み合わせに応答する患者の選択は、以下表８に示される。

【表１０】

表8

内皮細胞および周皮細胞:

受容体	発現	活性化	活性化 プラス	活性化 プラス
		(リン酸化レベル)	ソラフィニブ(Sorafinib	アバスタチン(Avastin)
VEGFR2:	中	高	弱	弱
VEGFR1:	中	弱	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-カドヘリン- -R2複合体				
	無し	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

【０２３４】

アバスタチン耐性の患者において、ＶＥＧＦおよびＰＤＧＦの両方が過剰発現しているの、アバスタチンおよびソラフェニブの組み合わせが、両経路を遮断するのに有効であり得る。加えて、ソラフェニブはＲａｆを阻害し、従って、全ての細胞タイプにおいてＭＡＰＫ経路を阻害し得る。

【０２３５】

実施例１０．他の抗血管新生および抗シグナル伝達療法の組み合わせ

血管内皮増殖因子および上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）の両方は、腫瘍組織における血管新生に貢献し得、下流のシグナル伝達経路を共有する。それゆえ、両経路を標的化することは、原理上、追加のまたは相乗的な抗腫瘍効果をもたらす。最近のフェーズＩ／ＩＩ試験は、非扁平上皮の難治性進行性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を患う患者における、ベバシズマブと、ＥＧＦＲ小分子チロシンキナーゼ阻害剤（ＴＫＩ）エルロチニブとの組み合わせを評価した。フェーズＩＩ試験において、エルロチニブと組み合わせたベバシズマブは、ＥＧＦＲチロシンキナーゼの変異状態に依存せずに利益を与えることが分かった（例えば、Ｈｅｒｂｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２３：２５４４－２５５５ （２００５）を参照）。従って、ＥＧＦＲおよびＶＥＧＦＲ－２の両方を明確に遮断することが患者に有益であることが分かる。

【０２３６】

この領域における進行中の臨床試験の間では：（１）非小細胞肺癌（ＡＴＬＡＳ）の第１のラインの治療のための、エルロチニブを併用する、または併用しないベバシズマブの治療を比較する試験；局所的に進行した、または転移性ＮＳＣＬＣを患う被検者における、ベバシズマブ＋エルロチニブ対ベバシズマブ＋エルロチニブプラセボが後続する、化学療法＋ベバシズマブの安全性と有効性を評価するための、フェーズＩＩＩｂの、複数のセンターでの、ランダム化された、プラゼボ制御された試験；（２）進行した非小脂肪肺癌のためのタルセバと組み合わせたベバシズマブの有効性を評価する試験；第２のラインのフェーズＩＩＩの、多数のセンターでの、プラセボ制御された、二重ブラインドの、ランダム化された試験、である。約６５０人の患者が、２つの治療群の一つに１：１の割合でランダムにされるだろう：群１：タルセバ＋プラセボ；群２：タルセバ＋ベバシズマブ；（３）ステージＩＩＩＢまたはステージＩＶの原発性非小細胞肺癌を患い、一度も喫煙していない患者を治療するエルロチニブおよびベバシズマブ；（４）新に診断されたまたは再発したステージＩＩＩＢまたはステージＩＶの非小細胞肺癌を患う患者を治療する、シ

スプラチンまたはカルボプラチンおよびゲムシタビンによって後続される、ベバシズマブおよびエルロチニブ；（５）これまでに全身療法を受けていない非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）患者におけるＲＡＤ００１のカルボプラチン、パクリタキセルおよびベバシズマブとの組み合わせ；（６）進行性非小細胞肺癌を患う患者を治療する、セツキシマブ、パクリタキセル、カルボプラチンおよびベバシズマブ；（７）パゾパニブ（ｐａｚｏｐａｎｉｂ）＋ラパタニブ（ｌａｐａｔａｎｉｂ）；（８）第１のラインの化学療法後のイマチニブ（ｉｍａｔｉｎｉｂ）メシラートおよびベバシズマブ、およびステージＩＩＩＢまたはステージＩＶの非小細胞肺癌を患う患者を治療する、ベバシズマブ；および（９）進行性ＮＳＣＬＣに対する、化学療法と組み合わせたＡＭＧ７０６またはベバシズマブのフェーズＩＩ試験。

【０２３７】

以下に、本発明の方法および組成物を用いた様々な薬剤の組み合わせでの治療のための患者選択の例を示す。

【表１１】

表9

腫瘍細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス アバスタチン (Avastin)+タルセバ (Tarceva)	活性化 プラス アバスタチン (Avastin)
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	強
ErbB2:	中	強	微弱(V. Weak)	強
ErbB3	低	中	微弱(V. Weak)	中
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	弱
Shc		強	微弱(V. Weak)	強
PI3K		強	微弱(V. Weak)	強
Erk		強	微弱(V. Weak)	強
Rsk		強	微弱(V. Weak)	強
Akt		強	微弱(V. Weak)	強
P70S6K		強	微弱(V. Weak)	強

【表１２】

表10

内皮細胞:

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス アバスタチン (Avastin)+タルセバ (Tarceva)	活性化 プラス アバスタチン (Avastin)
VEGFR2:	中	強	弱	弱
VEGFR1:	中	強	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-Cadherin--R2 complex	無し	中	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

【０２３８】

表９および１０における情報は、アバスタチンおよびタルセバの組み合わせが内皮細胞と腫瘍細胞の両方において経路を下方制御することを示す。

【表１３】

表11

患者5001: (EGFR 変異)

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス エルビタックス(Erbitux)
EGFR:	高	強	微弱(V. Weak)	弱
ErbB2:	中	強	微弱(V. Weak)	弱
ErbB3	低	中	微弱(V. Weak)	中
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	弱
Shc		強	微弱(V. Weak)	弱
PI3K		強	微弱(V. Weak)	中
Erk		強	微弱(V. Weak)	中
Rsk		強	微弱(V. Weak)	中
Akt		強	微弱(V. Weak)	中
P70S6K		強	微弱(V. Weak)	中

【０２３９】

表１１における情報は、患者５００１が、受容体リン酸化の完全な阻害剤としてタルセバで治療されるべきであり、下流のエフェクタが、タルセバ添加に基づき観察された。エルビタックス（Ｅｒｂｉｔｕｘ）（登録商標）は、同様のレベルの阻害は誘導しなかった。タルセバで治療することの決定は、以下に基づき得る：

・腫瘍細胞において活性化された経路（アドレス可能なチップ上に基づく活性プロファイル）；

・刺激に基づき活性化された経路；または

・タルセバでの経路の阻害。

【表１４】

表12

患者5002: (タルセバ耐性EGFR変異)

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス EKB 569
EGFR:	高	強	強	弱
ErbB2:	中	強	強	弱
ErbB3	低	中	中	弱
ErbB4	低	弱	弱	弱
Shc		強	強	弱
PI3K		強	強	弱
Erk		強	強	弱
Rsk		強	強	弱
Akt		強	強	弱
P70S6K		強	強	弱

【０２４０】

表１２における情報から、この患者は、阻害プロファイルに基づき、ＥＫＢ５６９で処理されるだろう。変わりに、患者は、まずタルセバで治療され、再発時に、患者は、ＥＫＢ５６９で治療され得る。

【表１５】

表13

患者5003: (cMet増幅, タルセバ(Tarceva)で再発)

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス PHB + タルセバ(Tarceva)
EGFR:	高	強	強	弱
ErbB2:	中	強	強	弱
ErbB3	低	中	中	弱
ErbB4	低	弱	弱	弱
cMet	高	強	強	弱
Shc		強	強	弱
PI3K		強	強	弱
Erk		強	強	弱
Rsk		強	強	弱
Akt		強	強	弱
P70S6K		強	強	弱

【０２４１】

この患者の活性プロファイルは、ｃＭｅｔの高い発現とリン酸化を示す。従って、患者は、ｃＭｅｔおよびＥＧＦＲ阻害剤の組み合わせで治療されるべきである。

【表１６】

表14

患者5004: (Her 2および3活性化を伴うEGFR活性化 (2/3二量体) またはHer2増幅):

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス ラパタニブ(Lapatanib)
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
ErbB2:	高または中	強	強	弱
ErbB3	低	強	強	弱
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
Shc		強	強	微弱(V. Weak)
PI3K		強	強	微弱(V. Weak)
Erk		強	中	微弱(V. Weak)
Rsk		強	中	微弱(V. Weak)
Akt		強	強	微弱(V. Weak)
P70S6K		強	強	微弱(V. Weak)

【０２４２】

Ｈｅｒ３リン酸化に基づく表１４における経路プロファイルは、ｐａｎ－Ｈｅｒ阻害剤を用いることを提案する。ラパタニブで観察された強い阻害は、この薬剤が、選択されるべき治療であるべきことを強く示す。

【表１７】

表15

患者5005: (EGFR活性化＋PI3K変異またはPTEN欠損):

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)+Mek ＋mTor阻害剤
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
ErbB2:	中	中	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱	弱
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
Shc		強	弱	微弱(V. Weak)
PI3K		強	強	微弱(V. Weak)
Erk		強	中	微弱(V. Weak)
Rsk		強	中	微弱(V. Weak)
Akt		強	強	微弱(V. Weak)
P70S6K		強	強	微弱(V. Weak)

【表１８】

表16

患者5006: (EGFR活性化プラスRas変異):

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)+Mek ＋mTor阻害剤
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
ErbB2:	中	中	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱	弱
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
Shc		強	弱	微弱(V. Weak)
PI3K		強	強	微弱(V. Weak)
Erk		強	中	微弱(V. Weak)
Rsk		強	中	微弱(V. Weak)
Akt		強	強	微弱(V. Weak)
P70S6K		強	強	微弱(V. Weak)

【０２４３】

表１５および１６に示されるプロファイルを有する腫瘍タイプの増殖は、ＥｒｂＢファミリーによって促進されるだけでなく、下流の出来事の活性化によっても（典型的には、ＲａｓまたはＲａｓ変異により）促進される。従って、プロファイルされた情報は、そのような患者は、ＭＡＰＫおよびＰＩ３Ｋ経路といった下流の経路を阻害する薬剤とともにＥＧＦＲ阻害剤で治療すべきことを示す。

【表１９】

表17

患者5007: 遅い内在化(トラフィックの問題)によるタルセバ(Tarceva)およびエルビタックスErbitux)の組み合わせ使用

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva＋エルビタックスErbitux)
EGFR:	中	強	中	微弱(V. Weak)
ErbB2:	中	強	中	弱
ErbB3	低	強	中	弱
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
Shc		強	弱	微弱(V. Weak)
PI3K		強	強	微弱(V. Weak)
Erk		強	中	微弱(V. Weak)
Rsk		強	中	微弱(V. Weak)
Akt		強	強	微弱(V. Weak)
P70S6K		強	強	微弱(V. Weak)

【０２４４】

上の表１７に示す情報は、この患者が、タルセバおよびエルビタックスの組み合わせで治療されるべきことを示す。

【表２０】

表18

患者5008: TKIIに応答するが化学療法には応答しない患者の選択

受容体	発現	活性化 (リン酸化レベル)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)	活性化 プラス タルセバ(Tarceva)+Mek ＋mTor阻害剤
EGFR:	中	強	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
ErbB2:	中	中	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱	弱
ErbB4	低	弱	微弱(V. Weak)	微弱(V. Weak)
Shc		強	弱	微弱(V. Weak)
PI3K		強	強	微弱(V. Weak)
Erk		強	中	微弱(V. Weak)
Rsk		強	中	微弱(V. Weak)
Akt		強	強	微弱(V. Weak)
P70S6K		強	強	微弱(V. Weak)

【０２４５】

上の表１８に示される情報は、Ｒａｓ変異を有する患者は、化学療法に応答しにくいことを示す。従って、そのようなプロファイルを有する患者は、ＴＫＩの組み合わせでの治療のための候補であり得る。

【０２４６】

実施例１１．治療選択を導くためのＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ－２活性化のための肺癌患者のモニタリング

治療中の９人の肺癌患者がＶｅｒｉｄｅｘ　ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムによってＣＴＣの数が評価され、本明細書における近接アッセイを用いてＥＧＦＲ阻害剤で治療及びＨＥＲ－２のリン酸化が評価された。これらの患者の５人がまた、Ｖｅｒｉｄｅｘ　ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）腫瘍フェノタイピング試薬ＥＧＦＲを用いた染色によってＣＴＣ上でのＥＧＦＲの発現のために試験された。患者人口統計、癌病歴、及び最近の投薬が、表１９，２０および２１にそれぞれ与えられる。表２２は、各試料において検出されたＣＴＣ上でのＥＧＦＲ阻害剤の数およびにＥＧＦＲ及びＨＥＲ－２に関する相対的なリン酸化レベルを示す。相対的なリン酸化レベルは、マイクロアレイ上での正常標準の値を差し引くことによって計算された。図５（ＡおよびＢ）は、選択された患者に関する、ＥＧＦＲ、サイトケラチン（ＣＫ）及びＤＡＰＩを伴うサイトケラチンのためのＣＴＣ染色の画像を示す。細胞系統のコントロールは、ＥＧＦＲ及びＨＥＲ－２の発現に関して、それぞれ陽性である、ＳＫＢｒ３及びＡ４３１である。

【０２４７】

患者２００２は、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムにおいて試験された７．５ｍｌの血液中に２つのＣＴＣが検出された。両方の細胞では、ＥＧＦＲ阻害剤で治療及びＨＥＲ－２の発現が検出された。この患者は、アバスタチンで治療されていた。アバスタチン単独または化学療法との組み合わせのいずれか、または化学療法単独での治療は、この患者にとって適切な治療ではなかったであろう。これらのデータは、例えば、ラパチニブ、ヘルセプチン＋ザクチマ（ｚａｃｔｉｍａ）、ヘルセプチン＋エルビタックス、ヘルセプチン＋イレッサ、またはヘルセプチン＋タルセバといった、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２の両方を標的化する薬剤を含む治療が示されることを医師に教える。

【０２４８】

患者２０１５は、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムを用いた分析において１１のＣＴＣが検出された。これらの細胞の多くはまた、Ｖｅｒｉｄｅｘキットを用いてＥＧＦＲの発現に関して陽性に試験された。ＥＧＦＲ及びＨＥＲ－２の商法が非常に活性化されていた。この患者は、アバスタチン、ゲムザール（ｇｅｍｚａｒ）、タキソテール（ｔａｘｏｔｅｒｅ）で治療されていた。アバスタチン単独、または化学療法との組み合わせ、または化学療法単独での治療は、この患者にとって適切な治療ではなかったであろう。これらのデータは、例えば、ラパチニブ、ヘルセプチン＋ザクチマ（ｚａｃｔｉｍａ）、ヘルセプチン＋エルビタックス、ヘルセプチン＋イレッサ、またはヘルセプチン＋タルセバといった、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ－２の両方を標的化する薬剤を含む治療が示されることを医師に教える。

【０２４９】

患者１０２３，２０４０，１０３７及び１０３５は、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムにおいて試験された７．５ｍｌの血液中にＣＴＣがなかった。それらはまた、予想通り、近接アッセイを用いたＥＧＦＲ阻害剤で治療及びＨＥＲ－２のリン酸化に関しては、陰性に試験された。これらの患者に対する現在の治療が以下の通りである：患者１０２３はカルボプラチン；患者２０４０はアバスタチン；患者１０３７はアバスタチン、カルボプラチン、タキソール；患者１０３５はアバスタチン、カルボプラチン、ゲムザール。これらの患者の血液中にＣＴＣが検出されないことは、現在の治療を継続することを示す。

【０２５０】

患者２０１６および１０２５はそれぞれ、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムにおいて試験された７．５ｍｌの血液中に３つのＣＴＣが検出された。両方の場合におい

て、Ｖｅｒｉｄｅｘ　ＥＧＦＲ染色によって示されるように全ての細胞上にＥＧＦＲの発現があった。しかしながら、試験されたこれらの患者の試料はいずれもＥＧＦＲまたはＨＥＲ２リン酸化に対して陽性ではなかった。全身療法は、これらの患者に対して未だ始められていない。これらのデータは、腫瘍細胞上でＥＧＦＲの発現はあるにも関わらず、患者の腫瘍細胞は、ＥＧＦＲ／ＨＥＲ－２経路によって促進されていないことを医師に教える。

【０２５１】

患者１０１２は、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（登録商標）システムにおいて分析されて、血液中に３つのＣＴＣを有した。Ｖｅｒｉｄｅｘ　キットを用いた染色されるＥＧＦＲはなかった。近接アッセイ分析によって示されるＥＧＦＲまたはＨＥＲ２のリン酸化もなかった。この患者は、アバスタチン、カルボプラチンおよびタキソールで治療されている。ＥＧＦＲまたはＨＥＲ－２のいずれかに向けられた標的化された治療でこの患者を治療しないことが示唆されるだろう。

【０２５２】

表２２は、各患者に関する診断情報と、ＣＴＣ数、およびＥＧＦＲおよびＨＥＲ２リン酸化に関するデータに基づく治療のための提案のまとめを示す。

【表２１】

表19．9人の肺癌患者のデモグラフィック

患者番号	生年月日	性別	人種/民族
02-002	1945年4月19日	男性	白人
01-012	1943年6月20日	男性	白人
02-015	1950年12月9日	男性	白人
02-016	1938年3月5日	女性	白人
01-025	1942年12月4日	男性	ヒスパニック/ラテン
01-023	1951年12月2日	男性	ヒスパニック/ラテン
01-040	1963年9月16日	男性	アジア人
01-037	1955年4月5日	男性	アジア人
01-035	1947年9月15日	男性	アジア人

【表２２】

表20．9人の肺癌患者の癌病歴

患者番号	癌タイプ	ステージ	転移部位	診断日	治療のタイプ
02-002	肺	4	副腎	2005年7月1日	化学療法
01-012	肺	4	大脳	2007年10月9日	放射線化学療法
02-015	肺	4	骨、大脳	2007年10月24日	化学療法
02-016	肺	4	肝臓	2007年8月18日	化学療法
01-025	肺	4	肝臓	2007年4月18日	化学療法
01-023	肺	4	リンパ節、骨	2007年8月29日	化学療法
02-040	肺	4	骨、副腎、小脳	2006年12月6日	化学放射線療法
01-037	肺	4	肝臓の右葉	2007年10月25日	化学療法
01-035	肺	4	他方の肺	2006年12月22日	化学療法

【表２３】

表21．9人の肺癌患者の現在の投薬

患者番号	薬剤名	治療と関連づけられた診断	投与形態
02-002	アバスチン(AVASTIN)	癌	1400 MG QD
01-012	アバスチン(AVASTIN)	肺癌のための化学療法	1000 MG Q 2 WEEK
01-012	ベナドリル(ベナドリル(BENADRYL))	プレ化学療法	25 MG Q 2 WEEKS
01-012	ベナゼプリル(BBENAZEPRIL)	高血圧	20 MG ONE Q D
01-012	ベナゼプリル(BBENAZEPRIL)塩酸塩	高血圧	10 MG ONCE Q D
01-012	カルボプラチン(CARBOPLATIN)	肺癌のための化学療法	775 MG Q 2 WEEKS
01-012	デカドロン(DECADRON)	プレ化学療法	20 MG Q 2 WEEKS
01-012	デキサメタゾン(DEXAMETHASONE)	癌化学療法のためのプレ薬剤	4 MG ONE TID
01-012	タガメット(TAGAMET)	プレ化学療法	300 MG Q 2 WEEKS
01-012	タキソール(TAXOL)	肺癌のための化学療法	315 MG Q 2 WEEKS
01-012	ゾフラン(ZOFRAN)	プレ化学療法	32 MG Q 2 WEEKS
01-012	ゾルピデン(ZOLPIDEM)	睡眠補助薬	10 MG ONE Q D
02-015	アクトス(ACTOS)	2型真性糖尿病	30 MG QD
02-015	アバスチン(AVASTIN)	肺癌	1400 MG Q 28 D
02-015	ベナドリル(BENADRYL)	発疹	25 MG Q 28 D
02-015	コンパジン(COMPAZINE)	吐き気	10 MG Q 6-8 HR P
02-015	デカドロン(DECADRON)	吐き気	32 MG EVERY 3 HR
02-015	デカドロン(DECADRON)	吐き気	20 MG Q 28 D
02-015	ディランチン(DILANTIN)	けいれん	800 MG EVERY 3 H
02-015	ディオバン(DIOVAN)	高血圧	120 MG BID
02-015	エナラプリル(ENALAPRIL)	高血圧	80 MG 4XD
02-015	フロマックス(FLOMAX)	前立腺肥大	8 MG BID
02-015	ゲムザール(GEMZAR)	肺癌	2200 MG Q 28 D
02-015	リピトール(LIPITOR)	高コレステロール血症	20 MG BID
02-015	MAG-OX	健康補助食品	BID 800 MG
02-015	モルヒネ(MORPHINE)	癌の痛み	Q 12 HR 15 MG
02-015	ニューロンチン(NEURONTIN)	神経障害	2400 MG TID
02-015	タガメット(TAGAMET)	胃食道逆流症	300 MG Q 28 D
02-015	タキソテレ(TAXOTERE)	肺癌	130 MG Q 28 D
02-015	ビコディン(VICODIN) ES	痛み	750 MG Q 4 HR PR
02-015	ザナクス(XANAX)	不安神経症	BID 1 MG PRN
02-015	ゾフラン(ZOFRAN)	吐き気	32 MG Q 28 D
02-015	ゾフラン(ZOFRAN)	吐き気	8 MG Q HR HR
02-015	ゾメタ(ZOMETA)	肺癌	4 MG Q 28 D
02-016	アドバイアディスカス(ADVAIR DISKUS)	気腫	500 MG QD
02-016	フロナセ(FLONASE)	季節性アレルギー	100 MCG BID
02-016	ラシックス(LASIX)	高血圧	40 MG QD
02-016	レバキン(LEVAQUIN)	気管支炎	500 MG QD
02-016	レボキシル(LEVOXYL)	甲状腺機能	0.15 MG QD
02-016	リピトール(LIPITOR)	高コレステロール血症	20 MG QD
02-016	リソノプリル(LISINOPRIL)	高血圧	10 MG QD
02-016	ロラゼパム(LORAZEPAM)	不眠症	3 MG TID
02-016	ニトロスタット(NITRO STAT)	狭心症	0.4 MG PRN
02-016	ニトログリセリン(NITROGLYCERIN)	狭心症	5 MG BID
02-016	プロクリット(PROCRIT)	貧血	40,000 UNITS SQ
02-016	ビコディン(VICODIN) ES	癌の痛み	10 - 325 MG Q -
02-016	ザンタック(ZANTAC)	胃食道逆流症	300 MG BID
01-025	アロプリノール(ALLOPURINOL)	胃食道逆流症	300 MG ONE QD
01-025	ビアキシン(BIAXIN)	予防	500 MG ONE PRN
01-025	ヒドロクロロチアジン(HYDROCHLOROTHIAZIDE)	高血圧	50 MG ONE QD
01-025	イブプロフェン(IBUPROFEN)	痛み	800 MG ONE PRN
01-025	LEVOTHYROXINE	甲状腺機能低下	0.175 MG ONE QD
01-025	リソノプリル(LISINOPRIL)	高血圧	40 MG ONE QD
01-025	ロバスタチン(LOVASTATIN)	高コレステロール血症	40 MG ONE QD
01-025	パキシル(PAXIL)	鬱病	20 MG ONE QD
01-025	プロトニクス(PROTONIX)	胃食道逆流症	40 MG ONE QD
01-025	スピリバ(SPIRIVA)	慢性閉塞性肺疾患	18 MCG ONE QHS
01-025	ベラパミル(ERAPAMIL)	高血圧	240 MG ONE BID
01-023	ベナドリル(BENADRYL)	プレ化学療法薬剤	50 MG Q 3 WEEKS
01-023	カルボプラチン(CARBOPLATIN)	化学療法薬剤	500 MG Q 3 WEEKS
01-023	デカドロン(DECADRON)	プレ化学療法薬剤	20 MG Q 3 WEEKS
01-023	キトリル(KYTRIL)	プレ化学療法薬剤	1 MG Q 3 WEEKS
01-023	標準生理食塩水	水分補給	250 ML PRN
01-023	タガメット(TAGAMET)	プレ化学療法薬剤	300 MG Q 3 WEEKS

【表２４】

表21（続き）

02-040	アバスチン（AVASTIN）	肺癌	700 MG Q 3 WKS
02-040	ドゥルコロックス（DULCOLOX）	便秘	10 MG 1 TAB QD
02-040	ペプシド（PEPCID）	胃食道逆流症	10 MG PRN
02-040	キナプリル（QUINAPRIL）	高血圧	10 MG QD
02-040	ゾメタ（ZOMETA）	肺癌	4 MG Q 3 WKS
01-037	アバスチン（AVASTIN）	肺癌のための化学療法	1200 MG Q 21 DAY
01-037	ベナドリル（BENADRYL）	プレ化学療法	50 MG Q 21 - DAY
01-037	ビソプロロール（BISOPROLOL）	高血圧	5 MG ONE QD
01-037	カルボプラチン（CARBOPLATIN）	肺癌のための化学療法	700 MG Q 21 - DA
01-037	デカドロン（DECADRON）	プレ化学療法	20 MG Q 21- DAYS
01-037	フルコナゾール（FLUCONAZOLE）	真菌	200 MG TWO QD
01-037	グリブリド（GLYBURIDE）	糖尿病	2.5 MG ONE QD
01-037	プロトニクス（PROTONIX）	酸の逆流	40 MG ONE QD
01-037	タガメット（TAGAMET）	プレ化学療法	300 MG Q 21 - DA
01-037	タキソール（TAXOL）	肺癌のための化学療法	340 MG Q 21 - DA
01-037	ゾフラン（ZOFRAN）	プレ化学療法	32 MG Q 21 - DAY
01-035	アバスチン（AVASTIN）	肺癌のための化学療法	1,000 MG Q 21 DA
01-035	カルボプラチン（CARBOPLATIN）	肺癌のための化学療法	700 MG Q 21 DAY
01-035	デカドロン（DECADRON）	化学療法のためのプレ薬剤	20 MG Q 21 DAY
01-035	ゲムザール（GEMZAR）	肺癌のための化学療法	1,800 MG Q 21 DA
01-035	メガセ（MEGACE）	食欲増進	20 ML QD
01-035	ゾフラン（ZOFRAN）	化学療法のためのプレ薬剤	32 MG Q 21 - DAY

【表２５】

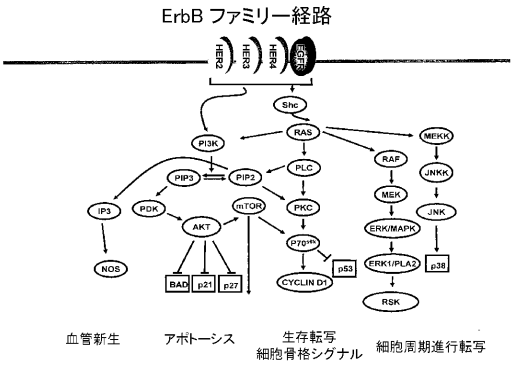
表22．9個の肺癌試料に関するCTCの数（7.5 mlあたり）、Veridex EGFR染色、および相対的なEGFRおよびHER2リン酸化レベル、治療の指針がデータから導出される

患者ID	CTC数	Veridex EGFR染色	相対pEGFR	相対pHER2	治療指針
2002	2	+	1.62	1.89	EGFR/HER2阻害剤推奨された
1012	3	-	0.83	0.8	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
2015	11	+	1.74	1.72	EGFR/HER2阻害剤推奨された
2016	3	+	0.61	0.65	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
1025	3	+	0.94	0.69	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
1023	0	nd	0.66	0.72	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
2040	0	nd	1	1	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
1037	0	nd	0.93	0.64	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない
1035	0	nd	0.01	0.05	EGFR/HER2阻害剤は示唆されない

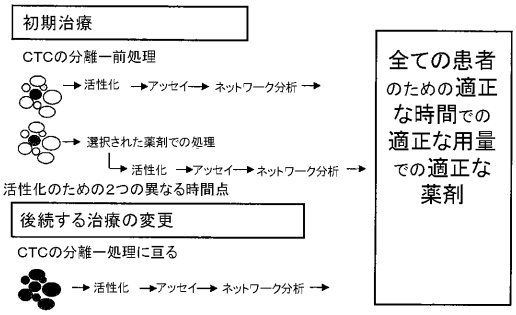
【０２５３】

この明細書において引用する全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願それぞれが、明確におよび個々に参照によって援用されることが示されたように、参照によって本明細書に援用される。前述の発明は、理解の明確化の目的のため、図および実施例によってある程度詳細に説明されたが、この発明の教示を考慮すると、添付の請求項の精神と範囲から逸脱することなく、ある程度の変化および改変が本発明になされ得ることは当業者には容易に理解されるだろう。

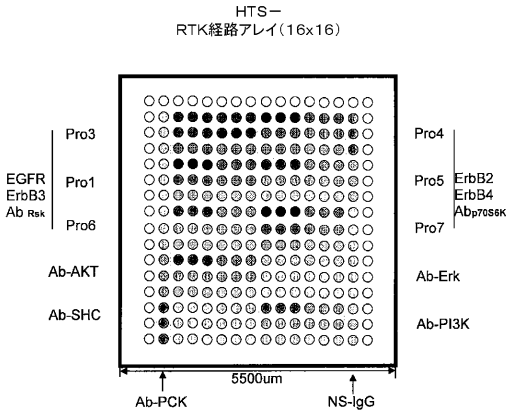
【図１】


ErbB ファミリー経路
HER2
HER3
HER4
EGF/HRG
Shc
RAS
PI3K
MEKK
RAF
PLC
JNKK
PIP3
PIP2
MEK
IP3
PDK
PKC
JNK
AKT
mTOR
ERK/MAPK
P70S6K
NOS
p53
ERK1/PLA2
p38
BAD
p21
p27
CYCLIN D1
RSK
血管新生
アポトーシス
生存転写
細胞骨格シグナル
細胞周期進行転写

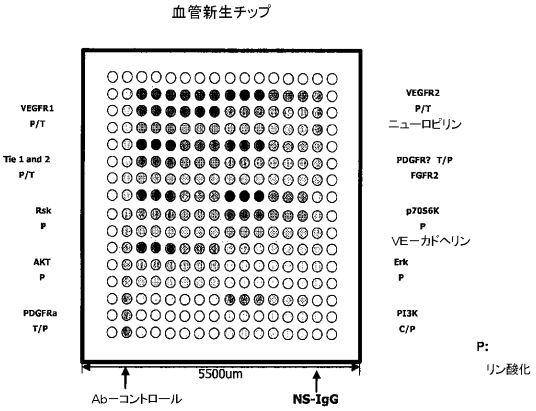
【図２】


初期治療
CTCの分離ー前処理
活性化
アッセイ
ネットワーク分析
選択された薬剤での処理
活性化のための2つの異なる時間点
後続する治療の変更
CTCの分離ー処理に亘る
全ての患者のための適正な時間での適正な用量での適正な薬剤

【図３】

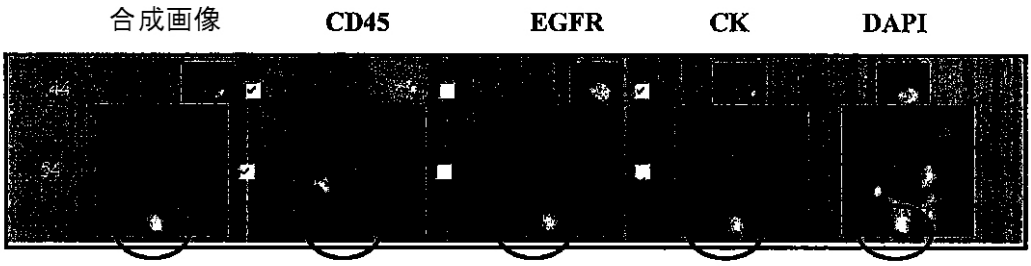

HTSー
RTK経路アレイ(16x16)
Pro3
EGFR
ErbB3
Ab Rsk
Pro1
Pro6
Ab-AKT
Ab-SHC
Pro4
Pro5
ErbB2
ErbB4
Ab p70S6K
Pro7
Ab-Erk
Ab-PI3K
5500um
Ab-PCK
NS-IgG

【図４】

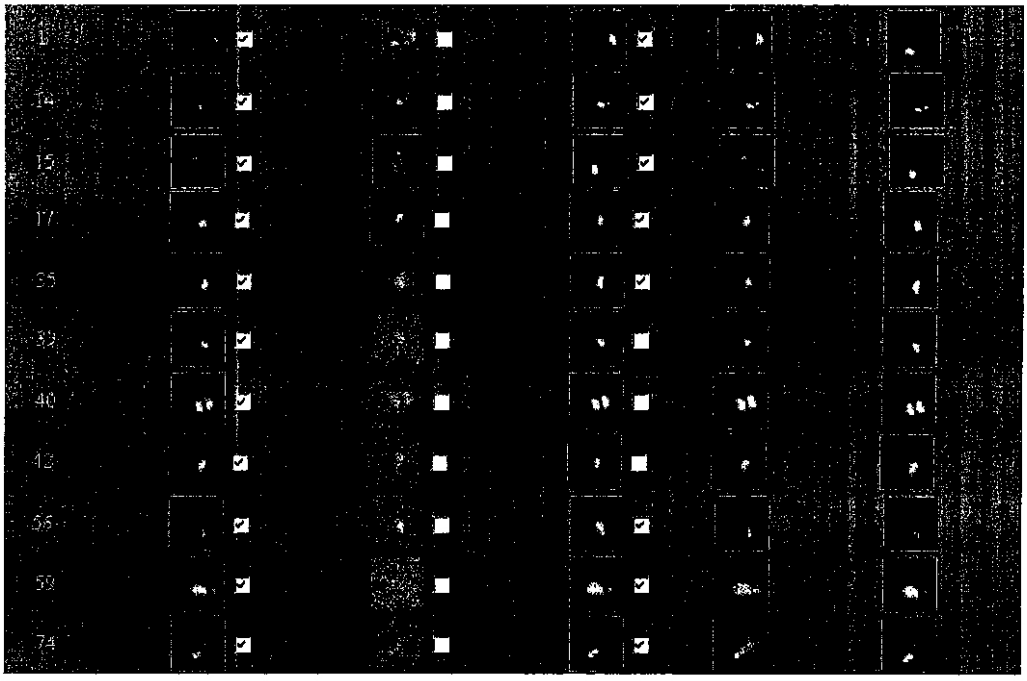

血管新生チップ
VEGFR1
P/T
Tie 1 and 2
P/T
Rsk
P
AKT
P
PDGFRa
T/P
VEGFR2
P/T
ニューロピリン
PDGFR? T/P
FGFR2
p70S6K
P
VEーカドヘリン
Erk
P
PI3K
C/P
P:
リン酸化
5500um
Abーコントロール
NS-IgG

【図５】

A. 2個のCTCを有する患者2002



B. 11個のCTCを有する患者2015



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/069764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i, C12N 5/08(2006.01)i, C12Q 1/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 8: G01N 33/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKIPASS, WPI, USPTO, PAJ "antibody microarray, cancer, lung tumor, signal transduction, EGFR, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DMITRY S. GEMBITSKY et al. 'A prototype antibody microarray platform to monitor changes in protein tyrosine phosphorylation', In: Molecular & Cellular Proteomics. September 2004, Vol.3(11), pp.1102-1118. See pages 1106-1117.	102-106
X	ELIEZER KOPF and DORIT ZHARHARY, 'Antibody arrays-an emerging tool in cancer proteomics', In: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Available online 13 May 2007, Vol.39(7-8), pp.1305-1317. See the whole documents.	102-106
X	BRIAN B. HAAB, 'Antibody arrays in cancer research', In: Molecular & Cellular Proteomics. January 2005, Vol.4(4), pp.377-383. See the whole documents.	102-106
X	BRIAN B. HAAB, 'Applications of antibody array platforms', In: Current Opinion in Biotechnology. August 2006, Vol.17(4), pp.415-421. See the whole documents.	102-106

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 JANUARY 2009 (21.01.2009)	**21 JANUARY 2009 (21.01.2009)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Heo, Joo-Hyung Telephone No. 82-42-481-8150

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/069764

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-101
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-101 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/069764

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BABETT BARTLING et al. 'Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma', In: Lung Cancer. August 2005, Vol.49(2), pp.145-154. See the whole documents.	102-106
A	WO 2001-27611 A2 (INCYTE GENOMICS, INC., US) 19 Apr. 2001 See the whole documents.	102-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2008/069764

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2001-27611 A2	19.04.2001	US 2003-0211550 A1	13.11.2003
		JP 2003-511696 T2	25.03.2003
		EP 1222468 A2	17.07.2002
		DE 60009533 C0	06.05.2004
		CA 2385614 AA	19.04.2001
		AU 2000-80264 A5	23.04.2001
		AT 0263375 E	15.04.2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	U	
G01N	*33/552*	*(2006.01)*	G01N	33/552		
G01N	*33/543*	*(2006.01)*	G01N	33/543	575	
C12N	*1/02*	*(2006.01)*	G01N	33/543	545D	
			C12N	1/02		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 サイ、シャラット
アメリカ合衆国、９４０２２ カリフォルニア州、ロス アルトス ヒルズ、ジュリエッタ レーン ２７３５９
(72)発明者 ハーヴェイ、ジーン
アメリカ合衆国、９４５５０ カリフォルニア州、ライバーモア、アロイオ ロード １５５４

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BB01 BB50 CA25 CA26 CB02 CB03 CB07 CB08 FA11
FB01 FB12 GC15
4B063 QA01 QA05 QQ08 QR48 QR51 QS33
4B065 AA90X AC20 BD14 CA46

专利名称(译)	抗体阵列治疗肺癌的药物选择		
公开(公告)号	JP2010533842A	公开(公告)日	2010-10-28
申请号	JP2010516264	申请日	2008-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	普罗米修斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	普罗米修斯实验室公司		
[标]发明人	サイシャラット ハーヴェイジーン		
发明人	サイ、シャラット ハーヴェイ、ジーン		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/574 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/552 G01N33/543 C12N1/02		
CPC分类号	G01N33/5041 G01N33/5044 G01N33/5082 G01N33/57423 G01N2500/10 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/50.Z C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/574.D G01N37/00.102 G01N33/53.U G01N33/552 G01N33/543.575 G01N33/543.545.D C12N1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB01 2G045/BB50 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS33 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BD14 4B065/CA46		
代理人(译)	木村充		
优先权	60/949820 2007-07-13 US		
其他公开文献	JP5352585B2 JP2010533842A5		
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。

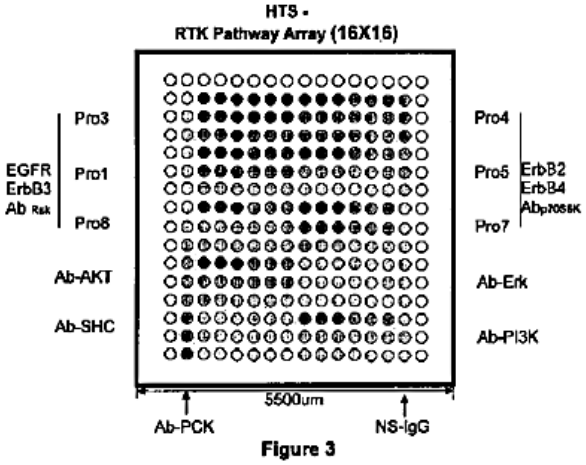


Figure 3