(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2012-533738

(P2012-533738A)

(43)公表日　平成24年12月27日(2012.12.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	2G045
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		4B063
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	Z	
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q	1/26		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 138 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-520794 (P2012-520794)
(86)(22)出願日　平成22年7月15日 (2010.7.15)
(85)翻訳文提出日　平成24年3月13日 (2012.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/042182
(87)国際公開番号　WO2011/008990
(87)国際公開日　平成23年1月20日 (2011.1.20)
(31)優先権主張番号　61/225,866
(32)優先日　平成21年7月15日 (2009.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/265,218
(32)優先日　平成21年11月30日 (2009.11.30)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/325,000
(32)優先日　平成22年4月16日 (2010.4.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体ベースのアレイを使用する胃癌療法のための薬物選択

(57)【要約】
本発明は、好適な抗癌療法を選択する方法並びに胃癌の治療についての応答を同定及び予測する方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択すること
を含む方法。
【請求項２】
前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルが、前記１種以上の分析物について作成された標準曲線に対して較正される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
癌細胞が、胃癌を有する対象から抗癌薬の投与後に単離される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
単離された癌細胞が抗癌薬と接触される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
好適な抗癌薬が、前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された前記１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより選択される、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
胃癌が腺癌である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
胃癌が、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
工程（ａ）が、細胞抽出物中の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２又は１３種の分析物の任意の組合せの発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ及びＰＤＧＦＲを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＶＥＧＦＲが、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＰＤＧＦＲが、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
癌細胞が、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である、請求項１に記載の方法。

【請求項１５】
腫瘍が胃腫瘍である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
癌細胞が試料から単離される、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
試料が胃癌を有する対象から得られる、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
試料が、全血、血清、血漿、腫瘍組織、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
腫瘍組織が原発性腫瘍組織又は転移性腫瘍組織である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
単離された細胞が１種以上の成長因子によりインビトロで刺激される、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
抗癌薬が、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、抗増殖剤、化学療法剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
モノクローナル抗体が、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））、パーツズマブ（２Ｃ４）、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（商標））、ＡＭＧ１０２（抗ＨＧＦ抗体）、ＭｅｔＭＡｂ（抗Ｍｅｔ抗体）及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（商標））、ラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、ペリチニブ（ＥＫＢ－５６９）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ（商標））、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名））、ＡＲＱ１９７、ＰＦ－０２３４１０６６、ＳＧＸ５２３、ＸＬ１８４、ＭＧＣＤ２６５、ＸＬ８８０及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
抗増殖剤が、ｍＴＯＲ阻害剤、ＡＫＴ阻害剤、ＰＩ３Ｋ阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２５】
化学療法剤が、白金系薬物、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍抗生物質及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２６】
工程（ｃ）が、前記１種以上の分析物の発現レベル及び活性化レベルの両方を決定することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
細胞抽出物中の１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを更に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
１種以上の追加の分析物が、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チ

ロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上のシグナル伝達分子を含む、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

１種以上の追加の分析物が、ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、ｃＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項２７に記載の方法。

【請求項３０】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物の全レベルを前記１種以上の分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３１】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物のリン酸化レベルを前記１種以上の分析物のリン酸化形態に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、

（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている；

（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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ことであって、ここで第１の活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、第２の活性化状態非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

第１の活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項３２に記載の方法。

【請求項３５】

第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、第２の活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項３２に記載の方法。

【請求項３６】

結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項３２に記載の方法。

【請求項３８】
グルコースオキシダーゼ及び第１の活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、
（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成することであって、ここで活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、活性化状態依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４１】
活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、活性化状態依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４４】
結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４６】
グルコースオキシダーゼ及び活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
固体担体が、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項３２又は４０に記載の方法。
【請求項４９】
捕捉抗体が、アドレス可能なアレイの固体担体上に拘束される、請求項３２又は４０に記載の方法。

【請求項５０】
酸化剤が過酸化水素（H_2O_2）である、請求項３７又は４５に記載の方法。
【請求項５１】
シグナル増幅ペアの第１のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
ペルオキシダーゼがセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
シグナル増幅ペアの第２のメンバーがチラミド試薬である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５４】
チラミド試薬がビオチン－チラミドである、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
増幅されたシグナルが、活性化チラミドを生成するビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化により発生する、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
活性化チラミドが直接的に検出される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
活性化チラミドが、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５８】
シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬の組合せである、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
発色試薬が３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定すること
を含む方法。
【請求項６２】
前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルが、前記１種以上の分析物について作成された標準曲線に対して較正される、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
癌細胞が、胃癌を有する対象から抗癌薬の投与後に単離される、請求項６１に記載の方法。
【請求項６４】
単離された癌細胞が抗癌薬と接触される、請求項６１に記載の方法。
【請求項６５】
前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された前記１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより胃癌の応答が同定される、請求項６３又は６４に記載の方法。

【請求項６６】
胃癌が腺癌である、請求項６１に記載の方法。
【請求項６７】
胃癌が、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している、請求項６１に記載の方法。
【請求項６８】
工程（ａ）が、細胞抽出物中の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２又は１３種の分析物の任意の組合せの発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６９】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項７０】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃを含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項７１】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ及びＰＤＧＦＲを含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項７２】
前記ＶＥＧＦＲが、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項６１に記載の方法。
【請求項７３】
前記ＰＤＧＦＲが、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項６１に記載の方法。
【請求項７４】
癌細胞が、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である、請求項６１に記載の方法。
【請求項７５】
腫瘍が胃腫瘍である、請求項７４に記載の方法。
【請求項７６】
癌細胞が試料から単離される、請求項６１に記載の方法。
【請求項７７】
試料が胃癌を有する対象から得られる、請求項７６に記載の方法。
【請求項７８】
試料が、全血、血清、血漿、腫瘍組織、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項７６に記載の方法。
【請求項７９】
腫瘍組織が原発性腫瘍組織又は転移性腫瘍組織である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
単離された細胞が１種以上の成長因子によりインビトロで刺激される、請求項６１に記載の方法。
【請求項８１】
抗癌薬が、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、抗増殖剤、化学療法剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項６１に記載の方法。
【請求項８２】
モノクローナル抗体が、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））、パーツズマブ（２Ｃ４）、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉ

ｔｕｘａｎ（商標））、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（商標））、ＡＭＧ１０２（抗ＨＧＦ抗体）、ＭｅｔＭＡｂ（抗Ｍｅｔ抗体）及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項８１に記載の方法。

【請求項８３】

チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（商標））、ラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、ペリチニブ（ＥＫＢ－５６９）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ（商標））、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名））、ＡＲＱ１９７、ＰＦ－０２３４１０６６、ＳＧＸ５２３、ＸＬ１８４、ＭＧＣＤ２６５、ＸＬ８８０及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項８１に記載の方法。

【請求項８４】

抗増殖剤が、ｍＴＯＲ阻害剤、ＡＫＴ阻害剤、ＰＩ３Ｋ阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項８１に記載の方法。

【請求項８５】

化学療法剤が、白金系薬物、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍抗生物質及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項８１に記載の方法。

【請求項８６】

工程（ｃ）が、前記１種以上の分析物の発現レベル及び活性化レベルの両方を決定することを含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項８７】

細胞抽出物中の１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを更に含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項８８】

１種以上の追加の分析物が、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上のシグナル伝達分子を含む、請求項８７に記載の方法。

【請求項８９】

１種以上の追加の分析物が、ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、ｃＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項８７に記載の方法。

【請求項９０】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物の全レベルを前記１種以上の分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項９１】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物のリン酸化レベルを前記１種以上の分析物のリン酸化形態に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項９２】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、

（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体

上に拘束されている；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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ことであって、ここで第１の活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、第２の活性化状態非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項９３】
第１の活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項９２に記載の方法。
【請求項９４】
第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項９２に記載の方法。
【請求項９５】
第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、第２の活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項９２に記載の方法。
【請求項９６】
結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項９２に記載の方法。
【請求項９８】
グルコースオキシダーゼ及び第１の活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項９８に記載の方法。
【請求項１００】
工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、
（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成することであって、ここで活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、活性化状態依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項１０１】
活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０３】
活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、活性化状態依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０４】
結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項１０３に記載の方法。
【請求項１０５】
促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０６】
グルコースオキシダーゼ及び活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
固体担体が、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項９２又は１００に記載の方法。
【請求項１０９】
捕捉抗体が、アドレス可能なアレイの固体担体上に拘束される、請求項９２又は１００に記載の方法。
【請求項１１０】
酸化剤が過酸化水素（H_2O_2）である、請求項９７又は１０５に記載の方法。
【請求項１１１】
シグナル増幅ペアの第１のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
ペルオキシダーゼがセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
シグナル増幅ペアの第２のメンバーがチラミド試薬である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１４】
チラミド試薬がビオチン－チラミドである、請求項１１３に記載の方法。
【請求項１１５】
増幅されたシグナルが、活性化チラミドを生成するビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化により発生する、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
活性化チラミドが直接的に検出される、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
活性化チラミドが、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項１１５に記載の方法。

【請求項１１８】
シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１１９】
シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬の組合せである、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２０】
発色試薬が３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測すること
を含む方法。
【請求項１２２】
前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルが、前記１種以上の分析物について作成された標準曲線に対して較正される、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
癌細胞が、胃癌を有する対象から抗癌薬の投与後に単離される、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２４】
単離された癌細胞が抗癌薬と接触される、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２５】
前記１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された前記１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより対象の応答が予測される、請求項１２３又は１２４に記載の方法。
【請求項１２６】
胃癌が腺癌である、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２７】
胃癌が、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２８】
工程（ａ）が、細胞抽出物中の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２又は１３種の分析物の任意の組合せの発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２９】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３を含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１３０】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１３１】
前記１種以上の分析物が、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ及びＰＤＧＦＲを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１３２】

前記ＶＥＧＦＲが、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１３３】

前記ＰＤＧＦＲが、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１３４】

癌細胞が、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１３５】

腫瘍が胃腫瘍である、請求項１３４に記載の方法。

【請求項１３６】

癌細胞が試料から単離される、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１３７】

試料が胃癌を有する対象から得られる、請求項１３６に記載の方法。

【請求項１３８】

試料が、全血、血清、血漿、腫瘍組織、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１３６に記載の方法。

【請求項１３９】

腫瘍組織が原発性腫瘍組織又は転移性腫瘍組織である、請求項１３８に記載の方法。

【請求項１４０】

単離された細胞が１種以上の成長因子によりインビトロで刺激される、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１４１】

抗癌薬が、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、抗増殖剤、化学療法剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１４２】

モノクローナル抗体が、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））、パーツズマブ（２Ｃ４）、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（商標））、ＡＭＧ１０２（抗ＨＧＦ抗体）、ＭｅｔＭＡｂ（抗Ｍｅｔ抗体）及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４３】

チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（商標））、ラパチニブ（Ｔｙｋｅｒｂ（商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、ペリチニブ（ＥＫＢ－５６９）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（Ｎｅｘａｖａｒ（商標））、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名））、ＡＲＱ１９７、ＰＦ－０２３４１０６６、ＳＧＸ５２３、ＸＬ１８４、ＭＧＣＤ２６５、ＸＬ８８０及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４４】

抗増殖剤が、ｍＴＯＲ阻害剤、ＡＫＴ阻害剤、ＰＩ３Ｋ阻害剤、ＭＥＫ阻害剤、ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４５】

化学療法剤が、白金系薬物、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍抗生物質及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１４１に記載の方法。

【請求項１４６】
工程（ｃ）が、前記１種以上の分析物の発現レベル及び活性化レベルの両方を決定することを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１４７】
細胞抽出物中の１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定することを更に含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１４８】
１種以上の追加の分析物が、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上のシグナル伝達分子を含む、請求項１４７に記載の方法。
【請求項１４９】
１種以上の追加の分析物が、ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、Ｅｐｈ－ａ、Ｅｐｈ－ｂ、Ｅｐｈ－ｃ、Ｅｐｈ－ｄ、Ｆｌｔ－３、Ｔｉｅ－１、Ｔｉｅ－２、ｃＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１４７に記載の方法。
【請求項１５０】
工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物の全レベルを前記１種以上の分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１５１】
工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、細胞抽出物中の前記１種以上の分析物のリン酸化レベルを前記１種以上の分析物のリン酸化形態に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１５２】
工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の発現レベルの決定が、
（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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ことであって、ここで第１の活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、第２の活性化状態非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１５３】
第１の活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５５】
第２の活性化状態非依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、第２の

活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項１５２に記載の方法。

【請求項１５６】

結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項１５５に記載の方法。

【請求項１５７】

促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項１５２に記載の方法。

【請求項１５８】

グルコースオキシダーゼ及び第１の活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項１５７に記載の方法。

【請求項１５９】

スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項１５８に記載の方法。

【請求項１６０】

工程（ｃ）における前記１種以上の分析物の活性化レベルの決定が、

（ｉ）細胞抽出物を、前記１種以上の分析物に特異的な捕捉抗体の希釈系列と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ことであって、ここで捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている；

（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、前記１種以上の分析物に特異的な活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成することであって、ここで活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、活性化状態依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる；

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む、請求項１２１に記載の方法。

【請求項１６１】

活性化状態非依存性抗体が、促進部分により直接的に標識される、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６２】

活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６３】

活性化状態依存性抗体が、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、活性化状態依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して標識される、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６４】

結合ペアの第１のメンバーがビオチンであり、及び／又は結合ペアの第２のメンバーがストレプトアビジンである、請求項１６３に記載の方法。

【請求項１６５】

促進部分がグルコースオキシダーゼである、請求項１６０に記載の方法。

【請求項１６６】

グルコースオキシダーゼ及び活性化状態非依存性抗体が、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートされる、請求項１６５に記載の方法。

【請求項１６７】

スルフヒドリル活性化デキストラン分子が、約５００ｋＤａの分子量を有する、請求項１６６に記載の方法。

【請求項１６８】

固体担体が、ガラス、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項１５２又は１６０に記載の方法。

【請求項１６９】

捕捉抗体が、アドレス可能なアレイの固体担体上に拘束される、請求項１５２又は１６０に記載の方法。

【請求項１７０】

酸化剤が過酸化水素（H_2O_2）である、請求項１５７又は１６５に記載の方法。

【請求項１７１】

シグナル増幅ペアの第１のメンバーがペルオキシダーゼである、請求項１７０に記載の方法。

【請求項１７２】

ペルオキシダーゼがセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である、請求項１７１に記載の方法。

【請求項１７３】

シグナル増幅ペアの第２のメンバーがチラミド試薬である、請求項１７１に記載の方法。

【請求項１７４】

チラミド試薬がビオチン－チラミドである、請求項１７３に記載の方法。

【請求項１７５】

増幅されたシグナルが、活性化チラミドを生成するビオチン－チラミドのペルオキシダーゼ酸化により発生する、請求項１７４に記載の方法。

【請求項１７６】

活性化チラミドが直接的に検出される、請求項１７５に記載の方法。

【請求項１７７】

活性化チラミドが、シグナル検出試薬の添加に基づいて検出される、請求項１７５に記載の方法。

【請求項１７８】

シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識フルオロフォアである、請求項１７７に記載の方法。

【請求項１７９】

シグナル検出試薬がストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬の組合せである、請求項１７７に記載の方法。

【請求項１８０】

発色試薬が３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である、請求項１７９に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【０００１】

本出願は、２００９年７月１５日に出願された米国仮出願第６１／２２５，８６６号、２００９年１１月３０日に出願された米国仮出願第６１／２６５，２１８号及び２０１０年４月１６日に出願された米国仮出願第６１／３２５，０００号の優先権を主張し、これらの開示は、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００２】

乳房、肝臓、肺、卵巣、腎臓、胃（ｓｔｏｍａｃｈ）（胃（ｇａｓｔｒｉｃ））及び甲状腺の癌腫を含む広範な種々のヒト悪性腫瘍は、持続するｃ－Ｍｅｔの刺激、過剰発現又

は突然変異を示す。特に、ｃ－Ｍｅｔの活性化突然変異が、乳頭状腎臓癌の特定の遺伝型の患者において明確に同定されており、このことはｃ－Ｍｅｔがヒト腫瘍発生に直接関与していることを示す。ｃ－Ｍｅｔ受容体の調節不全又はこのリガンド、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）の過剰発現に起因するｃ－Ｍｅｔシグナリング経路のアベラントなシグナリングは、悪性表現型と関連している。ｃ－Ｍｅｔシグナリングがいくつかの癌の進行及び拡散に関与する広範な証拠並びに疾患におけるこの役割についての理解の向上は、癌薬物開発における主な標的としてｃ－Ｍｅｔ及びＨＧＦへのかなりの関心を生み出した。

【０００３】

この関心は、潜在的な臨床用途を有する種々のｃ－Ｍｅｔ経路アンタゴニストの開発をもたらした。経路選択的抗癌薬開発のこの３種の主なアプローチは、リガンド／受容体相互作用の拮抗作用、チロシンキナーゼ触媒活性の阻害及び受容体／エフェクター相互作用の遮断を含む。

【０００４】

ｃ－Ｍｅｔは、散乱因子としても公知の肝細胞成長因子（ＨＧＦ）の細胞表面受容体である。ＨＧＦは、プラスミノーゲンセリンプロテアーゼファミリーのメンバーに高度に関連するマルチドメイン糖タンパク質である。ＨＧＦは、間葉細胞により単鎖の不活性ポリペプチドとして分泌され、多数のプロテアーゼによりこの活性ヘテロ二量体に開裂される。

【０００５】

ＨＧＦ結合は、ｃ－Ｍｅｔ受容体のホモ二量体化及び触媒部位内の２個のチロシン残基（Ｙ１２３４及びＹ１２３５）のリン酸化を誘導し、このことによりキナーゼ活性を調節する。カルボキシ末端テイルは、チロシンＹ１３４９及びＹ１３５６を含み、これらはリン酸化されると細胞内アダプタータンパク質についてのドッキング部位として機能し、下流シグナリングをもたらす。ｃ－Ｍｅｔ受容体は、胚形性時及び成人期に、肝臓、膵臓、前立腺、腎臓、筋及び骨髄を含む多くの器官の上皮細胞内で発現される。

【０００６】

対象となる１種のｃ－Ｍｅｔ媒介癌は、胃癌である。胃癌は、世界規模の主な癌による死因であり、発病率は１年当たり１８．９人／１００００００人である。胃癌の発病率は、９３４０００人の症例と推定され、新たな症例の５６％は西アジアにおいて生じている。胃癌は、２００２年のＣｅｎｔｒａｌ　Ｔｕｍｏｒ　Ｒｅｇｉｓｔｒｙデータによれば、韓国において全ての癌の２０．８％を占める。胃切除は胃癌患者における唯一の根治治療であるが、根治手術後４０～６０％に及ぶ高い再発率が依然として不良な全生存率の一因となっている。

【０００７】

いくつかのｃ－Ｍｅｔアンタゴニストの前臨床結果は、目下臨床調査中である。これらの薬剤は、モノクローナル抗体、リガンド／受容体相互作用の撹乱物質及び小分子チロシンキナーゼ阻害剤を含み、有望である。いくつかのマルチ標的療法も臨床において調査中であり、特にチロシンキナーゼ阻害に関して見込みがあると実証されている。種々の癌においてｃ－Ｍｅｔが担う役割に関し、個体のための治療の適切な選択及び方針の必要性が存在する。このことは、特に、ｃ－Ｍｅｔ媒介胃癌に当てはまる。本発明は、これらの及び他の必要性を満たす。

【発明の概要】

【０００８】

本発明は、腫瘍細胞（例えば、胃腫瘍細胞）におけるシグナル伝達経路の構成因子の状態（例えば、発現及び／又は活性化レベル）を検出するための組成物及び方法を提供する。本発明の実施から導き出されるシグナル伝達経路の構成因子（例えば、ＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナル伝達経路構成因子）の発現及び／又は活性化状態についての情報は、胃癌診断、予後診断及び胃癌治療の設計に使用することができる。

【０００９】

一態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、

（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択すること
を含む方法を提供する。

【００１０】

１つの特定の実施態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して抗癌薬が胃癌の治療に好適か不適かを決定すること
を含む方法を提供する。

【００１１】

別の特定の実施態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較すること；並びに
（ｅ）１種以上の分析物について決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、抗癌薬が胃癌の治療に好適であることを示すこと
を含む方法を提供する。

【００１２】

一部の実施態様において、本発明の方法は、胃腫瘍の治療に好適な抗癌薬の選択を補助又は支援するために有用であり得る。他の実施態様において、本発明の方法は、胃腫瘍の治療に好適な抗癌薬の選択を改善するために有用であり得る。

【００１３】

別の態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定すること
を含む方法を提供する。

【００１４】
１つの特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性か非応答性かを同定すること
を含む方法を提供する。
【００１５】
別の特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較すること；並びに
（ｅ）１種以上の分析物について決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性であることを示すこと
を含む方法を提供する。
【００１６】
一部の実施態様において、本発明の方法は、抗癌薬による治療に対する胃腫瘍の応答の同定を補助又は支援するために有用であり得る。他の実施態様において、本発明の方法は、抗癌薬による治療に対する胃腫瘍の応答の同定を改善するために有用であり得る。
【００１７】
更に別の態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測すること
を含む方法を提供する。
【００１８】
１つの特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、Ｉ

ＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性を予測すること
を含む方法を提供する。
【００１９】
別の特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；
（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性を予測すること；並びに
（ｅ）１種以上の分析物について決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性が高いことを示すこと
を含む方法を提供する。
【００２０】
一部の実施態様において、本発明の方法は、抗癌薬による治療に対して応答する胃癌対象の可能性の予測を補助又は支援するために有用であり得る。他の実施態様において、本発明の方法は、抗癌薬による治療に対して応答する胃癌対象の可能性の予測を改善するために有用であり得る。
【００２１】
本発明の他の目的、特性及び利点は、当業者には以下の詳細な説明及び図面から明白になる。
【図面の簡単な説明】
【００２２】
【図１】本発明の実施において使用することができる細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の一例を示す図である。マイトジェンシグナルを細胞増殖に変換させるために細胞により使用されるＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路の構成因子が示されている。
【００２３】
【図２】癌治療の経過を通しての薬物選択のための本発明のアドレス可能なアレイの適用を略図によって示す図である。
【００２４】
【図３】ＨＧＦ処理されたＡ４３１扁平上皮癌細胞におけるｃ－Ｍｅｔ及びＨＥＲ２活性化のレベルを示す図である。
【００２５】
【図４】ＨＧＦ処理されたＨＣＣ８２７肺癌細胞におけるｃ－Ｍｅｔ及びＨＥＲ２活性化のレベルを示す図である。
【００２６】
【図５】結合される各標的タンパク質ごとに後続のチャネリング事象のための酵素と結合している２種の追加の検出抗体の共局在化に依存する本発明の近接アッセイフォーマット

（ＣＯＰＩＡ）の一実施態様を示す図である。
【００２７】
【図６】受容体チロシンキナーゼ経路の構成因子、例えば、ｃ－Ｍｅｔ及びＥＧＦＲ／ＭＡＰＫ／ＥＲＫ経路におけるものに対する抗体の希釈物を含むアドレス可能なアレイの略例を示す図である。非限定的な例として、抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の異なる希釈物中でトリプリケートでプレーティングすることができる。
【００２８】
【図７】胃癌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を含むアドレス可能なアレイの略例を示す図である。非限定的な例として、抗体は、アドレス可能なアレイ上の４種の異なる希釈物中でトリプリケートでプレーティングすることができる。
【００２９】
【図８】生物学的試料における活性化（例えば、リン酸化）及び全分析物レベルの決定において特に有用な本発明の近接アッセイフォーマット（ＣＯＰＩＡ）の別の実施態様を示す。
【００３０】
【図９】ＨＥＲ２定量のために作成された標準滴定曲線を示す図である。
【００３１】
【図１０】図１０Ａは、完全長ＨＥＲ２を除去した又は除去していないＢＴ４７４細胞のディファレンシャルＨＥＲ２プロファイリング（ＨＥＲ２－ＥＣＤ及びＨＥＲ２－ＩＣＤ捕捉を用いる）の比較を示す図である。図１０Ｂは、各ＲＴＫに特異的なリガンドにより処理された既知レベルのＲＴＫ発現を有する細胞系に基づく標的タンパク質発現及びリン酸化の定量を示す図である。
【００３２】
【図１１】ＧＣＡ試料における広範な経路タンパク質発現が観察されたことを示す図である。「Ｔ」＝合計；「Ｐ」＝リン酸化。
【００３３】
【図１２】Ｖｅｒｉｄｅｘ　ＣＴＣ計数システムにより決定された、ＧＣＡ患者からの規定容量の血液において得られたＣＴＣの数を示す図である。
【００３４】
【図１３】ＣＯＰＩＡにより決定された、ＧＣＡ患者から単離されたＣＴＣにおけるＨＥＲ１／ＥＧＦＲ及びＨＥＲ２の発現及び活性化を示す図である。
【００３５】
【図１４】ＧＣＡ腫瘍組織におけるＨＥＲ２発現を検出するための免疫組織化学（ＩＨＣ）とＣＯＰＩＡとの相関度を示す図である。
【００３６】
【図１５】ＧＣＡ試料における広範な経路タンパク質発現が観察されたことを示す図である。ＣＯＰＩＡによりアッセイされた分析物は、以下のシグナル伝達経路タンパク質：ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃを含んだ。Ｎ＝２９１。
【００３７】
【図１６】２種の異なる腫瘍溶解物濃度のＧＣＡ腫瘍組織におけるＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ及びｃＫｉｔの発現レベル並びにＰＩ３Ｋの活性化レベルのＣＯＰＩＡ分析を示す図である。
【００３８】
【図１７】ＣＯＰＩＡを使用するＧＣＡ腫瘍組織試料におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの発現プロファイリングを示す図である。ＩｇＧ及びサイトケラチン（ＣＫ）を対照として使用し、ＨＥＲ１発現レベルは、２種の異なる捕捉抗体（「ＨＥＲ１」及び「ＨＥＲ１－２」と示す）を用いてアッセイした。アッセイされた腫瘍溶解物の量も示す（すなわち、０．２５μｇ、２．５

μｇ、２０μｇ）。
【００３９】
【図１８】ＣＯＰＩＡを使用する追加のＧＣＡ腫瘍組織試料におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの発現プロファイリングを示す図である。ＩｇＧ及びＣＫを対照として使用し、ＨＥＲ１発現レベルは、２種の異なる捕捉抗体（「ＨＥＲ１」及び「ＨＥＲ１－２」と示す）を用いてアッセイした。アッセイされた腫瘍溶解物の量も示す（すなわち、０．２５μｇ、２．５μｇ、２０μｇ）。
【００４０】
【図１９】ＣＯＰＩＡを使用する追加のＧＣＡ腫瘍組織試料におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの発現プロファイリングを示す図である。ＩｇＧ及びＣＫを対照として使用し、ＨＥＲ１発現レベルは、２種の異なる捕捉抗体（「ＨＥＲ１」及び「ＨＥＲ１－２」と示す）を用いてアッセイした。アッセイされた腫瘍溶解物の量も示す（すなわち、０．２５μｇ、２．５μｇ、２０μｇ）。
【００４１】
【図２０】ＨＥＲ２発現についてＩＨＣによりＩＨＣ３＋と決定された試料におけるＣＯＰＩＡ（例えば、本明細書に記載のトランケート化受容体近接アッセイを使用する）により決定されたＧＣＡ腫瘍組織試料におけるｐ９５ＨＥＲ２の発現レベルを示す図である。
【００４２】
【図２１】ＨＥＲ２発現に関してＩＨＣとＣＯＰＩＡとの間に観察された不一致を示す図である。ＣＵ＝標準に対して正規化されたコンピュータ単位
【００４３】
【図２２】ＨＥＲ２発現に関してＩＨＣとＣＯＰＩＡとの間に観察された不一致を説明する追加のＧＣＡ腫瘍組織試料を示す図である。
【００４４】
【図２３】ＨＥＲ２発現についてＩＨＣによっても記録されたＧＣＡ腫瘍試料においてＣＯＰＩＡにより観察されたｐ９５ＨＥＲ２発現レベルを示す図である。
【発明の詳細な説明】
【００４５】
Ｉ．導入
上記のとおり、細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の活性化及び細胞死に関与する経路の不活性化は、多数の異なるタイプの癌を特徴付ける分子的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及びこれらの構成因子の活性は、所与のタイプの癌についての分子シグニチャーとして機能することができる。このような活性化された構成因子は、治療介入に有用な標的を更に提供することができる。従って、治療前、治療中及び治療後の癌細胞内での特定のシグナル伝達系の活性レベルに関する知見は、採用すべき適切な治療経過を選択するために使用することができる高度に関連する情報を医師に提供する。更に、治療が進行するにつれて癌細胞内で活性になるシグナル伝達経路の継続的追跡は、例えば、同一又は別のシグナル伝達経路のいずれかを活性化する更なる異常を通して癌細胞が治療に対して耐性になった場合、医師に特定の治療過程を継続すること又は別の治療ラインに切り替えることを促す、医師に治療の効力に関する追加の情報を提供することができる。
【００４６】
従って、本発明は、特異的マルチプレックスハイスループットアッセイにおいて、腫瘍組織又は腫瘍外細胞、例えば、固形腫瘍の希少循環細胞中での複数の脱調節されたシグナル伝達分子の発現及び活性化状態を検出するための方法及び組成物を提供する。本発明はまた、脱調節されたシグナリング経路を下方調節又は停止させるために適切な治療（単一薬物又は薬物の組合せ）を選択するための方法及び組成物を提供する。従って、本発明は、癌患者にパーソナライズされた治療の設計を促進するために使用することができる。

【００４７】
単細胞のレベルにおけるシグナル伝達経路の活性の決定を介する循環中で腫瘍細胞を検出及び同定する能力は、本発明の重要な利点である。腫瘍細胞は、「微小転移」（播種性腫瘍細胞）としての種々の初期段階の癌を有する患者の血液中に見出されることが多く、転移性癌においても見出される。血液中の腫瘍細胞の数は、腫瘍の病期及びタイプに依存する。生検物は典型的には原発性腫瘍上で得られる一方、ほとんどの転移腫瘍は生検が行われず、このことにより、このような腫瘍試料についての分子分析が極めて困難になる。腫瘍転移時には、多くの進行性腫瘍細胞は原発性腫瘍を離れ、血液系及びリンパ系を通って移動して遠隔部位に達する。従って、血液からの循環腫瘍細胞は、腫瘍細胞の最も悪性で均質な集団を表す。しかしながら、血液中の転移性腫瘍細胞の数は極めて少ないことが多く、血液１ミリリットル当たり１個から数千個の細胞まで変動する。このような希少細胞中でシグナル伝達経路を単離及びアッセイし、この情報をより有効な癌治療に向けて適用する能力は、本発明の１つの目的である。

【００４８】
一部の実施態様において、本発明のマルチプレックスハイスループット免疫アッセイは、固形腫瘍の循環細胞中の１種以上のシグナル伝達分子の活性化状態を単細胞レベルで検出することができる。実際、ＥＧＦＲ及びＨＥＲ２などのシグナル伝達分子は、約１００ゼプトモルの感度及び約１００ゼプトモルから約１００フェムトモルの線形ダイナミックレンジで検出することができる。従って、希少循環細胞中の複数のシグナル伝達物質の活性化状態の単細胞検出は、癌の予後診断及び診断並びにパーソナライズされた標的療法の設計を促進する。

【００４９】
希少循環細胞には、固形腫瘍から転移又は微小転移している固形腫瘍の循環細胞が含まれる。循環腫瘍細胞、癌幹細胞及び腫瘍に遊走している（例えば、化学走化性に起因する）細胞、例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環前血管新生骨髄性細胞及び循環樹状細胞は、固形腫瘍と関連する循環細胞の一部の例である。

【００５０】
対象となるシグナル伝達分子は、典型的にはこれらのインサイチュー活性化状態を保存するために循環細胞が単離された直後に、好ましくは約２４、６又は１時間以内、より好ましくは約３０、１５又は５分以内に抽出される。単離された細胞は、通常はナノモルからマイクロモル濃度の１種以上の成長因子とともに約１～３０分間インキュベートしてシグナル伝達分子の活性化を復活させ、又は刺激することもできる（例えば、Ｉｒｉｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）参照）。

【００５１】
以下により詳細に説明するとおり、個々の患者のために潜在的な抗癌療法を評価するため、単離された細胞を変動する用量の１種以上の抗癌薬とインキュベートすることができる。次いで、成長因子の刺激を数分間（例えば、約１～５分間）又は数時間（例えば、約１～６時間）実施することができる。抗癌薬を用いる及び用いないシグナリング経路のディファレンシャルな活性化は、各個々の患者のために適正用量での好適な癌療法の選択を補助することができる。循環細胞は、抗癌薬治療中の患者試料から単離し、１種以上の成長因子により刺激して治療の変更を実行すべきか否かを決定することもできる。従って、本発明の方法は、有利には、臨床医が全ての患者に適切な時点に適切な用量で適切な抗癌薬を提供することを支援する。

【００５２】
現在利用可能な胃癌試験オプションとは対照的に、本発明の方法は、例えば血液及び／又は細針吸引液（ＦＮＡ）からの循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）などの試料を使用して固形胃腫瘍の「リアルタイム生検」を提供することにより、疾患の全病期を通して胃癌患者を追跡することを可能とする。非限定的な例として、本明細書に記載の胃癌アッセイは、疾患の早期段階に患者における胃癌の初期診断において使用することができる。好適な癌療法の選択は、本明細書に記載のアッセイを使用して、抗癌薬を用いて及び用いずに特異的シグ

ナリング経路の発現及び／又は活性化状態をプロファイリングすることにより導かれる。有利には、本発明の方法は、疾患の任意の段階において採取され、本明細書に記載のアッセイを使用して分析された試料に基づいて治療介入を行うことができるので、疾患の進行又は退縮を追跡するために使用することもできる。従って、胃癌の初期及び転移期のために好適な癌療法の選択は、リアルタイム診断及び特定のシグナリング経路分子の発現及び／又は活性化状態の分析により導かれる。

【００５３】

本発明の方法は、有利には、癌管理における重要な問題に対応し、胃癌患者のためにより高度の標準看護を提供するようにオーダーメードされる。これというのも、この方法が（１）増加した感度を提供し（例えば、全及びリン酸化シグナル伝達分子、例えば、ＥＧＦＲ及びＨＥＲ２を検出するために単細胞検出を達成することができる）、（２）増加した特異性を提供し（例えば、３抗体近接アッセイは全及びリン酸化シグナル伝達分子を検出するための特異性を向上させる）、（３）経路プロファイリングを可能にし（例えば、特定のシグナル伝達分子の発現及び／又は活性化状態は患者からのＣＴＣ及びＦＮＡ中で検出することができる）、（４）患者試料を得ることに伴うあらゆる問題を排除する（例えば、アッセイはほんの少数の腫瘍細胞について実施することができる）からである。本明細書に記載のアッセイにおいてはあらゆる試料を使用することができるが、ＣＴＣは最も悪性の腫瘍細胞を表し、各腫瘍はＣＴＣを遊離させることが公知であり、遺残腫瘍又はアクセス困難な転移性腫瘍の唯一の起源であり得、これらは血液中に見出されるので、特に有用である。従って、本発明の方法は、胃腫瘍組織の連続サンプリングを可能とし、時間及び治療に応じて腫瘍細胞中で発生する変化に関する貴重な情報をもたらし、急速に発達する癌経路シグニチャーを追跡するための手段を臨床医に提供する。

【００５４】

これらをまとめると、本発明の組成物及び方法は、有利には、マルチプレックス化された抗体ベースの近接アッセイを使用して、容易にアクセス可能な腫瘍細胞について経路プロファイリングを実施することにより標的療法から利益を得る可能性が最も高い癌患者（例えば、胃癌患者）の正確な予測、選択及び追跡を提供する。

【００５５】

ＩＩ．定義

本明細書において使用される以下の用語は、他に記載のない限り、これらに与えられた意味を有する。

【００５６】

用語「癌」は、アベラントな細胞の制御されない成長を特徴とする疾患クラスの任意のメンバーを含めるものとする。この用語は、悪性、良性、軟組織もしくは固形並びに転移前及び転移後癌を含む全ての病期及び悪性度の癌のいずれであると特徴付けられようと、全ての公知の癌及び新生物病態を含む。様々な癌のタイプの例には、限定されるものではないが、消化管及び胃腸癌、例えば、胃癌（例えば、胃癌）、結腸直腸癌、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌及び食道癌；乳癌；肺癌（例えば、非小細胞肺癌）；胆嚢癌；肝臓癌；膵臓癌；虫垂癌；前立腺癌、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；神経膠腫；絨毛腫；頭頸部癌；骨原性肉腫；並びに血液癌が含まれる。本明細書において使用される「腫瘍」は、１個以上の癌性細胞を含む。

【００５７】

用語「分析物」には、任意の対象となる分子、典型的にはこの存在、量（発現レベル）、活性化状態及び／又は同一性が決定される高分子、例えば、ポリペプチドが含まれる。ある例において、分析物は、シグナル伝達分子、例えば、ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２）又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の構成因子である。

【００５８】

用語「シグナル伝達分子」又は「シグナル伝達物質」は、細胞が細胞外シグナル又は刺激を応答に変換するプロセスであって、典型的には細胞の内部での順序付けられた生化学

反応の順序を含むプロセスを実施するタンパク質及び他の分子を含む。シグナル伝達分子の例には、限定されるものではないが、受容体チロシンキナーゼ、例えば、ＥＧＦＲ（例えば、ＥＧＦＲ／ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ２／Ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３、ＨＥＲ４／ＥｒｂＢ４）、ＶＥＧＦＲ１／ＦＬＴ１、ＶＥＧＦＲ２／ＦＬＫ１／ＫＤＲ、ＶＥＧＦＲ３／ＦＬＴ４、ＦＬＴ３／ＦＬＫ２、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、ＴＲＫＡ－Ｃ、ｃ－ＭＥＴ、ＲＯＮ、ＥＰＨＡ１－８、ＥＰＨＢ１－６、ＡＸＬ、ＭＥＲ、ＴＹＲＯ３、ＴＩＥ１－２、ＴＥＫ、ＲＹＫ、ＤＤＲ１－２、ＲＥＴ、ｃ－ＲＯＳ、Ｖ－カドヘリン、ＬＴＫ（白血球チロシンキナーゼ）、ＡＬＫ（未分化リンパ腫キナーゼ）、ＲＯＲ１－２、ＭＵＳＫ、ＡＡＴＹＫ１－３及びＲＴＫ１０６；受容体チロシンキナーゼのトランケート化形態、例えば、アミノ末端細胞外ドメインを欠くトランケート化ＨＥＲ２受容体（例えば、ｐ９５ＥｒｂＢ２（ｐ９５ｍ）、ｐ１１０、ｐ９５ｃ、ｐ９５ｎなど）；受容体チロシンキナーゼ二量体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ｐ９５ＨＥＲ２／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ＨＥＲ１／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ＨＥＲ２／ＨＥＲ４など）；非受容体チロシンキナーゼ、例えば、ＢＣＲ－ＡＢＬ、Ｓｒｃ、Ｆｒｋ、Ｂｔｋ、Ｃｓｋ、Ａｂｌ、Ｚａｐ７０、Ｆｅｓ／Ｆｐｓ、Ｆａｋ、Ｊａｋ、Ａｃｋ及びＬＩＭＫ；チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、例えば、Ａｋｔ（例えば、ＡＫＴ１、ＡＫＴ２、ＡＫＴ３）、ＭＥＫ（ＭＡＰ２Ｋ１）、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ（ｐ１１０）、ＰＩＫ３Ｒ１（ｐ８５））、ＰＤＫ１、ＰＤＫ２、ホスファターゼ及びテンシンホモログ（ＰＴＥＮ）、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、Ｐ７０Ｓ６Ｋ（例えば、ｐ７０Ｓ６キナーゼスプライスバリアントアルファＩ）、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、ＰＴＰ１Ｂ、ＰＴＰＮ１３、ＢＤＰ１など）、ＲＡＦ、ＰＬＡ２、ＭＥＫＫ、ＪＮＫＫ、ＪＮＫ、ｐ３８、Ｓｈｃ（ｐ６６）、Ｒａｓ（例えば、Ｋ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ）、Ｒｈｏ、Ｒａｃ１、Ｃｄｃ４２、ＰＬＣ、ＰＫＣ、ｐ５３、サイクリンＤ１、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ３、ホスファチジルイノシノール４，５－二リン酸（ＰＩＰ２）、ホスファチジルイノシノール３，４，５－三リン酸（ＰＩＰ３）、ｍＴＯＲ、ＢＡＤ、ｐ２１、ｐ２７、ＲＯＣＫ、ＩＰ３、ＴＳＰ－１、ＮＯＳ、ＧＳＫ－３β、ＲＳＫ１－３、ＪＮＫ、ｃ－Ｊｕｎ、Ｒｂ、ＣＲＥＢ、Ｋｉ６７及びパキシリン；核ホルモン受容体、例えば、エストロゲン受容体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）、アンドロゲン受容体、グルココルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体、ビタミンＡ受容体、ビタミンＤ受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体及びオーファン受容体；核受容体コアクチベーター及びリプレッサー、例えば、それぞれ乳癌－１（ＡＩＢ１）及び核受容体コリプレッサー１（ＮＣＯＲ）内で増幅するもの；並びにこれらの組合せが含まれる。

【００５９】

用語「ＨＥＲ２シグナリング経路の構成因子」には、ＨＥＲ２の上流リガンド、ＨＥＲ２の結合パートナー及び／又はＨＥＲ２を介してモジュレートされる下流のエフェクター分子の任意の１種以上が含まれる。ＨＥＲ２シグナリング経路の構成因子の例には、限定されるものではないが、ヘレグリン、ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３、ＨＥＲ４／ＥｒｂＢ４、ＡＫＴ（例えば、ＡＫＴ１、ＡＫＴ２、ＡＫＴ３）、ＭＥＫ（ＭＡＰ２Ｋ１）、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ（ｐ１１０）、ＰＩＫ３Ｒ１（ｐ８５））、ＰＤＫ１、ＰＤＫ２、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、Ｐ７０Ｓ６Ｋ（例えば、スプライスバリアントアルファＩ）、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、ＰＴＰ１Ｂ、ＰＴＰＮ１３、ＢＤＰ１など）、ＨＥＲ２二量体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ｐ９５ＨＥＲ２／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ＨＥＲ１／ＨＥＲ２、ＨＥＲ２／ＨＥＲ３、ＨＥＲ２／ＨＥＲ４など）、ＧＳＫ－３β、ＰＩＰ２、ＰＩＰ３、ｐ２７及びこれらの組合せが含まれる。

【００６０】
用語「ｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の構成因子」には、ｃ－Ｍｅｔの上流リガンド、ｃ－Ｍｅｔの結合パートナー及び／又はｃ－Ｍｅｔを介してモジュレートされる下流エフェクター分子の任意の１種以上が含まれる。ｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の構成因子の例には、限定されるものではないが、肝細胞成長因子／散乱因子（ＨＧＦ／ＳＦ）、Ｐｌｅｘｉｎ Ｂ１、ＣＤ４４ｖ６、ＡＫＴ（例えば、ＡＫＴ１、ＡＫＴ２、ＡＫＴ３）、ＭＥＫ（ＭＡＰ２Ｋ１）、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＳＴＡＴ（例えば、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ３）、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ（ｐ１１０）、ＰＩＫ３Ｒ１（ｐ８５））、ＧＲＢ２、Ｓｈｃ（ｐ６６）、Ｒａｓ（例えば、Ｋ－Ｒａｓ、Ｎ－Ｒａｓ、Ｈ－Ｒａｓ）、ＧＡＢ１、ＳＨＰ２、ＳＲＣ、ＧＲＢ２、ＣＲＫＬ、ＰＬＣγ、ＰＫＣ（例えば、ＰＫＣα、ＰＫＣβ、ＰＫＣδ）、パキシリン、ＦＡＫ、アデュシン、ＲＢ、ＲＢ１、ＰＹＫ２及びこれらの組合せが含まれる。
【００６１】
用語「活性化状態」は、特定のシグナル伝達分子、例えば、ＨＥＲ２又はｃ－ＭＥＴシグナリング経路構成因子が活性化されているか否かを指す。同様に、用語「活性化レベル」は、特定のシグナル伝達分子、例えば、ＨＥＲ２又はｃ－ＭＥＴシグナリング経路構成因子がどの程度活性化されているかを指す。活性化状態は、典型的には、１種以上のシグナル伝達分子のリン酸化、ユビキチン化及び／又は複合体化状態に対応する。活性化状態（丸括弧内に列記）の非限定的な例には、ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ（ＥＧＦＲｖＩＩＩ、リン酸化（ｐ－）ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲ：Ｓｈｃ、ユビキチン化（ｕ－）ＥＧＦＲ、ｐ－ＥＧＦＲｖＩＩＩ）；ＥｒｂＢ２（ｐ－ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＨＥＲ２（トランケート化ＥｒｂＢ２）、ｐ－ｐ９５ＨＥＲ２、ＥｒｂＢ２：Ｓｈｃ、ＥｒｂＢ２：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ２：ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ２：ＥｒｂＢ４）；ＥｒｂＢ３（ｐ－ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ｐ－ＥｒｂＢ３：ＰＩ３Ｋ、ＥｒｂＢ３：Ｓｈｃ）；ＥｒｂＢ４（ｐ－ＥｒｂＢ４、ＥｒｂＢ４：Ｓｈｃ）；ｃ－ＭＥＴ（ｐ－ｃ－ＭＥＴ、ｃ－Ｍｅｔ：ＨＧＦ複合体）；ＡＫＴ１（ｐ－ＡＫＴ１）；ＡＫＴ２（ｐ－ＡＫＴ２）；ＡＫＴ３（ｐ－ＡＫＴ３）；ＰＴＥＮ（ｐ－ＰＴＥＮ）；Ｐ７０Ｓ６Ｋ（ｐ－Ｐ７０Ｓ６Ｋ）；ＭＥＫ（ｐ－ＭＥＫ）；ＥＲＫ１（ｐ－ＥＲＫ１）；ＥＲＫ２（ｐ－ＥＲＫ２）；ＰＤＫ１（ｐ－ＰＤＫ１）；ＰＤＫ２（ｐ－ＰＤＫ２）；ＳＧＫ３（ｐ－ＳＧＫ３）；４Ｅ－ＢＰ１（ｐ－４Ｅ－ＢＰ１）；ＰＩＫ３Ｒ１（ｐ－ＰＩＫ３Ｒ１）；ｃ－ＫＩＴ（ｐ－ｃ－ＫＩＴ）；ＥＲ（ｐ－ＥＲ）；ＩＧＦ－１Ｒ（ｐ－ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＧＦ－１Ｒ：ＩＲＳ、ＩＲＳ：ＰＩ３Ｋ、ｐ－ＩＲＳ、ＩＧＦ－１Ｒ：ＰＩ３Ｋ）；ＩＮＳＲ（ｐ－ＩＮＳＲ）；ＦＬＴ３（ｐ－ＦＬＴ３）；ＨＧＦＲ１（ｐ－ＨＧＦＲ１）；ＨＧＦＲ２（ｐ－ＨＧＦＲ２）；ＲＥＴ（ｐ－ＲＥＴ）；ＰＤＧＦＲＡ（ｐ－ＰＤＧＦＲＡ）；ＰＤＧＦＲＢ（ｐ－ＰＤＧＦＲＢ）；ＶＥＧＦＲ１（ｐ－ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ１：ＰＬＣγ、ＶＥＧＦＲ１：Ｓｒｃ）；ＶＥＧＦＲ２（ｐ－ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ２：ＰＬＣγ、ＶＥＧＦＲ２：Ｓｒｃ、ＶＥＧＦＲ２：硫酸ヘパリン、ＶＥＧＦＲ２：ＶＥ－カドヘリン）；ＶＥＧＦＲ３（ｐ－ＶＥＧＦＲ３）；ＦＧＦＲ１（ｐ－ＦＧＦＲ１）；ＦＧＦＲ２（ｐ－ＦＧＦＲ２）；ＦＧＦＲ３（ｐ－ＦＧＦＲ３）；ＦＧＦＲ４（ｐ－ＦＧＦＲ４）；ＴＩＥ１（ｐ－ＴＩＥ１）；ＴＩＥ２（ｐ－ＴＩＥ２）；ＥＰＨＡ（ｐ－ＥＰＨＡ）；ＥＰＨＢ（ｐ－ＥＰＨＢ）；ＧＳＫ－３β（ｐ－ＧＳＫ－３β）；ＮＦＫＢ（ｐ－ＮＦＫＢ）、ＩＫＢ（ｐ－ＩＫＢ、ｐ－Ｐ６５：ＩＫＢ）；ＢＡＤ（ｐ－ＢＡＤ、ＢＡＤ：１４－３－３）；ｍＴＯＲ（ｐ－ｍＴＯＲ）；Ｒｓｋ－１（ｐ－Ｒｓｋ－１）；Ｊｎｋ（ｐ－Ｊｎｋ）；Ｐ３８（ｐ－Ｐ３８）；ＳＴＡＴ１（ｐ－ＳＴＡＴ１）；ＳＴＡＴ３（ｐ－ＳＴＡＴ３）；ＦＡＫ（ｐ－ＦＡＫ）；ＲＢ（ｐ－ＲＢ）；Ｋｉ６７；ｐ５３（ｐ－ｐ５３）；ＣＲＥＢ（ｐ－ＣＲＥＢ）；ｃ－Ｊｕｎ（ｐ－ｃ－Ｊｕｎ）；ｃ－Ｓｒｃ（ｐ－ｃ－Ｓｒｃ）；パキシリン（ｐ－パキシリン）；ＧＲＢ２（ｐ－ＧＲＢ２）、Ｓｈｃ（ｐ－Ｓｈｃ）、Ｒａｓ（ｐ－Ｒａｓ）、ＧＡＢ１（ｐ－ＧＡＢ１）、ＳＨＰ２（ｐ－ＳＨＰ２）、ＧＲＢ２（ｐ－ＧＲＢ２）、ＣＲＫＬ（ｐ－ＣＲＫＬ）、ＰＬＣγ（ｐ－ＰＬＣγ）、ＰＫＣ（例えば、ｐ－ＰＫＣα、ｐ－ＰＫＣβ、ｐ－ＰＫＣδ）、アデュシン（ｐ－アデュシン

）、ＲＢ１（ｐ－ＲＢ１）及びＰＹＫ２（ｐ－ＰＹＫ２）が含まれる。

【００６２】

本明細書において使用される用語「希釈系列」は、特定試料（例えば、細胞溶解物）又は試薬（例えば、抗体）の一連の減少する濃度を含むものとする。希釈系列は、典型的には、測定された量の出発濃度の試料又は試薬を希釈物（例えば、希釈緩衝液）と混合してより低濃度の試料又は試薬を作出するプロセス及び更に所望の数の段階希釈物を得るために十分な回数にわたり前記プロセスを繰り返すプロセスにより生成される。試料又は試薬は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、５００又は１０００倍で段階希釈して少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５又は５０種の減少濃度の試料又は試薬を含む希釈系列を生成することができる。例えば、１ｍｇ／ｍＬの出発濃度で捕捉抗体試薬の２倍の段階希釈物を含む希釈系列は、ある量の出発濃度の捕捉抗体を等量の希釈緩衝液と混合して０．５ｍｇ／ｍＬ濃度の捕捉抗体を作出することと及び前記プロセスを繰り返して０．２５ｍｇ／ｍＬ、０．１２５ｍｇ／ｍＬ、０．０６２５ｍｇ／ｍＬ、０．０３２５ｍｇ／ｍＬなどの捕捉抗体濃度を得ることにより生成することができる。

【００６３】

本明細書において使用される用語「優れたダイナミックレンジ」は、１個という少ない細胞中又は数千個という多数の細胞中で特定の分析物を検出するアッセイの能力を意味する。例えば、本明細書に記載の免疫アッセイは、有利には、捕捉抗体濃度の希釈系列を使用して約１～１００００個の細胞（例えば、約１、５、１０、２５、５０、７５、１００、２５０、５００、７５０、１０００、２５００、５０００、７５００又は１００００個の細胞）中で対象となる特定のシグナル伝達分子を検出するので、優れたダイナミックレンジを有する。

【００６４】

本明細書において使用される用語「循環細胞」は、固形腫瘍から転移した、又は微小転移した腫瘍外細胞を含む。循環細胞の例には、限定されるものではないが、循環腫瘍細胞、癌幹細胞及び／又は腫瘍に遊走している細胞（例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環前血管新生骨髄性細胞、循環樹状細胞など）が含まれる。循環細胞を含有する患者試料は、任意のアクセス可能な生体液（例えば、全血、血清、血漿、痰、気管支洗浄液、尿、乳頭吸引液、リンパ液、唾液、細針吸引液など）から得ることができる。ある例において、全血試料は、血漿又は血清分画及び細胞分画（すなわち、細胞ペレット）に分離される。細胞分画は、典型的には、赤血球、白血球及び／又は固形腫瘍の循環細胞、例えば、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及びこれらの組合せを含有する。血漿又は血清分画は、通常、とりわけ、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）及び固形腫瘍の循環細胞により放出されるタンパク質を含有する。

【００６５】

循環細胞は、典型的には、１種以上の分離方法を使用して患者試料から単離され、この方法は、例えば、免疫磁気分離（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））、Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ（Ｈｕｎｔｉｎｇｄｏｎ Ｖａｌｌｅｙ，ＰＡ）によるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）Ｓｙｓｔｅｍ、マイクロ流体分離（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）参照）、密度勾配遠心（例えば、Ｂａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３）参照）及び枯渇

法（例えば、Ｍｅｙｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２）参照）を含む。

【００６６】

本明細書において使用される用語「試料」は、患者から得られた任意の生物学的標本を含む。試料には、限定されるものではないが、全血、血漿、血清、赤血球、白血球（例えば、末梢血単核球細胞）、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液（例えば、リンパ節の播種性腫瘍細胞）、骨髄吸引液、唾液、尿、糞便（すなわち大便）、痰、気管支洗浄液、涙液、細針吸引液（例えば、ランダム乳頭周囲細針吸引により採取される）、任意の他の体液、例えば腫瘍の生検（例えば、針生検）又はリンパ節（例えば、センチネルリンパ節生検）の生検などの組織試料（例えば、腫瘍組織）、腫瘍の外科的切除物などの組織試料（例えば、腫瘍組織）及びこれらの細胞抽出物が含まれる。一部の実施態様において、試料は、全血又はこれらの分画構成成分、例えば血漿、血清もしくは細胞ペレットである。好ましい実施態様において、試料は、当分野において公知である任意の技術を使用して全血又はこの細胞分画から固形腫瘍の循環細胞を単離することにより得られる。他の実施態様において、試料は、例えば胃又は胃腸管の他の部分の固形腫瘍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。

【００６７】

「生検」は、診断的又は予後診断的評価のために組織試料を切除するプロセス及び組織標本自体を指す。当分野において公知の任意の生検技術を、本発明の方法及び組成物に適用することができる。適用される生検技術は、一般に、他の因子の中でも特に、評価すべき組織タイプ並びに腫瘍のサイズ及びタイプ（すなわち、固形又は浮遊型（すなわち、血液又は腹水））に依存する。代表的な生検技術には、切除生検、切開生検、針生検（例えば、コア針生検、細針吸引生検など）、外科生検及び骨髄生検が含まれる。生検技術については、例えば、Ｈａｒｒｉｓｏｎ’ｓ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｋａｓｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１６ｔｈ ｅｔ．，２００５，Ｃｈａｐｔｅｒ ７０及びＰａｒｔ Ｖ全体において考察されている。当業者は、所与の組織試料における癌性及び／又は前癌性細胞を同定するために生検技術を実施することができることを理解する。

【００６８】

用語「対象」又は「患者」又は「個体」は、典型的にはヒトを含むが、他の動物、例えば他の霊長類、齧歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなども含むことができる。

【００６９】

「アレイ」又は「マイクロアレイ」は、固体担体、例えば、ガラス（例えば、ガラススライド）、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ（例えば、磁気ビーズ、ポリスチレンビーズなど）、紙、膜（例えば、ナイロン、ニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）など）、繊維束など又は任意の他の好適な基体上に固定化又は拘束された捕捉抗体の個別セット及び／又は希釈系列を含む。捕捉抗体は、一般に、共有結合又は非共有結合相互作用（例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子間結合）を介して固体担体上に固定化又は拘束される。ある例において、捕捉抗体は、固体担体に結合している捕捉剤と相互作用する捕捉タグを含む。本明細書に記載のアッセイにおいて使用されるアレイは、典型的には、複数の異なる捕捉抗体及び／又は異なる既知／アドレス可能な位置において固体担体の表面に結合している捕捉抗体濃度を含む。

【００７０】

用語「捕捉抗体」は、試料、例えば、細胞抽出物中の１種以上の対象となる分析物に特異的である（すなわち、結合する、これにより結合される又は複合体をともに形成する）固定化された抗体を含むものとする。好ましい実施態様において、捕捉抗体は、アレイ内の固体担体上に拘束される。固体担体上に種々のシグナル伝達分子のいずれかを固定化するのに好適な捕捉抗体は、Ｕｐｓｔａｔｅ（Ｔｅｍｅｃｕｌａ，ＣＡ），Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ（Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｉｅｓ（Ｄａｎｖｅｒｓ，ＭＡ）、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、Ｌａｂ Ｖｉｓｉｏｎ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ，ＣＡ）、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）及びＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から入手可能である。

【００７１】

本明細書において使用される用語「検出抗体」は、試料中の対象となる１種以上の分析物に特異的である（すなわち、結合する、これにより結合される又は複合体をともに形成する）検出可能な標識を含む抗体を含む。この用語は、対象となる１種以上の分析物に特異的である抗体も包含し、この抗体は検出可能な標識を含む別の種により結合され得る。検出可能な標識の例には、限定されるものではないが、ビオチン／ストレプトアビジン標識、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）標識、化学的に反応性の標識、蛍光標識、酵素標識、放射活性標識及びこれらの組合せが含まれる。種々のシグナル伝達分子のいずれかの活性化状態及び／又は全量を検出するのに好適な検出抗体は、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）及びＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から入手可能である。非限定的な例として、種々のシグナル伝達分子、例えば、ＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－Ｓｒｃ、ＦＬＫ－１、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ、ＡＫＴ、ＭＡＰＫ、ＰＴＥＮ、Ｒａｆ及びＭＥＫのリン酸化形態に対するホスホ特異的抗体が、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから入手可能である。

【００７２】

「活性化状態依存性抗体」という用語は、試料中の対象となる１種以上の分析物の特定の活性化状態に特異的な（すなわち、結合する、これにより結合される又は複合体をともに形成する）検出抗体を含む。好ましい実施態様において、活性化状態依存性抗体は、１種以上の分析物、例えば、１種以上のシグナル伝達分子のリン酸化、ユビキチン化及び／又は複合体状態を検出する。一部の実施態様において、受容体チロシンキナーゼのＥＧＦＲファミリーのメンバーのリン酸化及び／又はＥＧＦＲファミリーメンバー間のヘテロ二量体複合体の形成は、活性化状態依存性抗体を使用して検出される。特定の実施態様において、活性化状態依存性抗体は、以下のシグナル伝達分子（リン酸化部位は、ヒトタンパク質配列におけるアミノ酸の位置に対応する）の１種以上のリン酸化の１つ以上の部位を検出するために有用である：ＥＧＦＲ／ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１（例えば、チロシン（Ｙ）１０６８）；ＥｒｂＢ２／ＨＥＲ２（例えば、Ｙ１２４８）；ＥｒｂＢ３／ＨＥＲ３（例えば、Ｙ１２８９）；ＥｒｂＢ４／ＨＥＲ４（例えば、Ｙ１２８４）；ｃ－Ｍｅｔ（例えば、Ｙ１００３、Ｙ１２３０、Ｙ１２３４、Ｙ１２３５及び／又はＹ１３４９）；ＳＧＫ３（例えば、スレオニン（Ｔ）２５６及び／又はセリン（Ｓ）４２２）；４Ｅ－ＢＰ１（例えば、Ｔ７０）；ＥＲＫ１（例えば、Ｔ１８５、Ｙ１８７、Ｔ２０２及び／又はＹ２０４）；ＥＲＫ２（例えば、Ｔ１８５、Ｙ１８７、Ｔ２０２及び／又はＹ２０４）；ＭＥＫ（例えば、Ｓ２１７及び／又はＳ２２１）；ＰＩＫ３Ｒ１（例えば、Ｙ６８８）；ＰＤＫ１（例えば、Ｓ２４１）；Ｐ７０Ｓ６Ｋ（例えば、Ｔ２２９、Ｔ３８９及び／又はＳ４２１）；ＰＴＥＮ（例えば、Ｓ３８０）；ＡＫＴ１（例えば、Ｓ４７３及び／又はＴ３０８）；ＡＫＴ２（例えば、Ｓ４７４及び／又はＴ３０９）；ＡＫＴ３（例えば、Ｓ４７２及び／又はＴ３０５）；ＧＳＫ－３β（例えば、Ｓ９）；ＮＦＫＢ（例えば、Ｓ５３６）；ＩＫＢ（例えば、Ｓ３２）；ＢＡＤ（例えば、Ｓ１１２及び／又はＳ１３６）；ｍＴＯＲ（例えば、Ｓ２４４８）；Ｒｓｋ－１（例えば、Ｔ３５７及び／又はＳ３６３）；Ｊｎｋ（例えば、Ｔ１８３及び／又はＹ１８５）；Ｐ３８（例えば、Ｔ１８０及び／又はＹ１８２）；ＳＴＡＴ３（例えば、Ｙ７０５及び／又はＳ７２７）；ＦＡＫ（例えば、Ｙ３９７

、Ｙ５７６、Ｓ７２２、Ｙ８６１及び／又はＳ９１０）；ＲＢ（例えば、Ｓ２４９、Ｔ２５２、Ｓ６１２及び／又はＳ７８０）；ＲＢ１（例えば、Ｓ７８０）；アデュシン（例えば、Ｓ６６２及び／又はＳ７２４）；ＰＹＫ２（例えば、Ｙ４０２及び／又はＹ８８１）；ＰＫＣα（例えば、Ｓ６５７）；ＰＫＣα／β（例えば、Ｔ３６８及び／又はＴ６４１）；ＰＫＣδ（例えば、Ｔ５０５）；ｐ５３（例えば、Ｓ３９２及び／又はＳ２０）；ＣＲＥＢ（例えば、Ｓ１３３）；ｃ－Ｊｕｎ（例えば、Ｓ６３）；ｃ－Ｓｒｃ（例えば、Ｙ４１６）；及びパキシリン（例えば、Ｙ３１及び／又はＹ１１８）。

【００７３】

用語「活性化状態非依存性抗体」は、分析物の活性化状態に関わりなく、試料中の１種以上の対象となる分析物に特異的な（すなわち、結合する、これにより結合される又は複合体をともに形成する）検出抗体を含む。例えば、活性化状態非依存性抗体は、１種以上の分析物、例えば、１種以上のシグナル伝達分子のリン酸化形態及び非リン酸化形態の両方を検出することができる。

【００７４】

用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかであるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及びこれらのポリマー、例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。核酸には、合成、天然型及び非天然型であり、参照核酸と同様の結合特性を有する公知のヌクレオチドアナログ又は修飾骨格残基もしくは連結部を含有する核酸が含まれる。このようなアナログの例には、限定されることなく、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラル－メチルホスホネート、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド及びペプチド－核酸（ＰＮＡ）が含まれる。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの公知のアナログを含有する核酸を包含する。特に記載のない限り、特定の核酸配列は、保存的に改変されたこれらの突然変異体及び相補的配列並びに明示的に示された配列も黙示的に含む。

【００７５】

用語「オリゴヌクレオチド」は、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド及び／又はこれらの模倣物の一本鎖オリゴマー又はポリマーを含む。ある例において、オリゴヌクレオチドは、天然型（すなわち、未改変）核酸塩基、糖及びインターヌクレオシド（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、糖及び／又はインターヌクレオシド結合を含む。

【００７６】

本明細書において使用される用語「ミスマッチモチーフ」又は「ミスマッチ領域」は、この相補的配列に対して１００％相補性を有しないオリゴヌクレオチドの一部を指す。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１、２、３、４、５、６個以上のミスマッチ領域を有してよい。ミスマッチ領域は連続していてよく、又は１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２個以上のヌクレオチドにより分離されていてよい。ミスマッチモチーフ又は領域は、単一ヌクレオチドを含んでよく、又は２、３、４、５個以上のヌクレオチドを含んでよい。

【００７７】

語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、オリゴヌクレオチドがこの相補性配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況では異なる。長い配列は、特に高温においてハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広汎な指針は、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ－－Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ｐｒｏｂｅｓ，「Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ａｓｓａｙｓ」（１９９３）に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度ｐＨにおいて特異的配列について熱融点（T_m）よりも約５～１０℃低いように選択される。T_mは、標的に相補的であるプローブの５０％が平衡状

態（標的配列が過剰に存在するので、T_mにおいては、プローブの５０％は平衡状態で占められる）で標的配列にハイブリダイズする温度（規定のイオン強度、ｐＨ及び核濃度下で）である。ストリンジェントな条件は、脱安定剤、例えば、ホルムアミドを添加して達成することもできる。選択的又は特異的ハイブリダイゼーションのため、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも２倍、好ましくはバックグラウンドハイブリダイゼーションの１０倍である。

【００７８】

用語「実質的に同一」又は「実質的同一性」は、２種以上の核酸に関し、配列比較アルゴリズムを使用し、又は手動アラインメント及び目視検査により測定された比較窓もしくは指定領域にわたり最大一致性について比較及びアライメントした場合、同一であり、又は同一である規定パーセンテージのヌクレオチド（すなわち、規定領域にわたり少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％同一性）を有する２種以上の配列又は下位配列を指す。この定義は、状況が示す場合、配列の相補体を同様に意味する。好ましくは、実質的同一性は、長さが少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５又は１００ヌクレオチドである領域にわたって存在する。

【００７９】

用語「インキュベートすること」は、「接触させること」及び「曝露させること」と同義的に使用され、特に記載のない限り任意の特定の時間又は温度要件を意味しない。

【００８０】

「受容体チロシンキナーゼ」又は「ＲＴＫ」は、膜貫通ドメイン及びチロシンキナーゼモチーフを特徴とする５６種のタンパク質のファミリーを含む。ＲＴＫは、細胞シグナリングにおいて機能し、成長、分化、接着、遊走及びアポトーシスを調節するシグナルを伝達する。受容体チロシンキナーゼの突然変異活性化及び／又は過剰発現は、細胞を変形させ、癌の発達において重要な役割を担うことが多い。ＲＴＫは、種々の分子標的剤、例えば、トラスツズマブ、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、スニチニブ、イマチニブ、ニロチニブなどの標的になっている。１種の十分に特徴付けられたシグナル伝達経路は、ＭＡＰキナーゼ経路であり、この経路は、細胞における細胞増殖の促進に対する上皮成長因子（ＥＧＦ）からのシグナルの伝達を担う（図１参照）。

【００８１】

ＩＩＩ．実施態様の説明

本発明は、アッセイ、例えば、本明細書に記載の特異的マルチプレックスハイスループット近接アッセイにより固形腫瘍の腫瘍組織に由来する腫瘍細胞又は循環細胞におけるシグナル伝達経路の構成因子の状態（例えば、発現及び／又は活性化レベル）を検出するための組成物及び方法を提供する。本発明はまた、１種以上の脱調節されたシグナル伝達経路を下方調節又は活動停止させるために適切な治療を選択するための組成物及び方法を提供する。従って、本発明のある実施態様は、所与の患者の腫瘍（例えば、胃腫瘍）における全及び活性化シグナル伝達タンパク質の回収により提供される特定の分子シグニチャーに基づいてパーソナライズされた治療の設計を促進するために使用することができる。

【００８２】

特定の態様において、本発明は、特定の癌が、抗癌薬、例えば、ＨＥＲ２－モジュレーティング化合物（例えば、ＨＥＲ２阻害剤）及び／又はｃ－Ｍｅｔ－モジュレーティング化合物（例えば、ｃ－Ｍｅｔ阻害剤）などに応答し得るか否か又は好ましく応答する可能性が高いか否かの決定又は予測を可能にする分子マーカー（バイオマーカー）を提供する。特定の実施態様において、ＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の１種以上の構成因子（例えば、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ及び／又はＰＤＧＦＲ）の発現及び／又は活性化のレベルの測定は、好適な抗癌薬の選択及び／又は細胞、例えば胃癌細胞（例えば、単離された循環腫瘍細胞、細針吸引液（ＦＮＡ）細胞など）におけるこれに対する応答の同定もしくは予測に特に有用である。

【００８３】
一態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択すること
を含む方法を提供する。

【００８４】
一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、例えば、近接アッセイ、例えば、本明細書に記載の共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）を使用して決定される、対象となる特定の分析物についてのシグナル強度に対応する相対蛍光単位（ＲＦＵ）値として表現される。他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現され、これらは、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される、対象となる特定の分析物についての増加するシグナル強度に対応する。一部の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、検出不能又はわずかに検出可能なレベルの発現又は活性化は「－」又は「±」として表現することができる。他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、低レベルの発現又は活性化は「＋」として表現することができる。更に他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、中程度のレベルの発現又は活性化は「＋＋」として表現することができる。更にいっそう他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋」として表現することができる。更なる例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、非常に高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋＋」として表現することができる。

【００８５】
更に他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定されるＲＦＵ値を、対象となる特定の分析物について作成された標準曲線に対して較正又は正規化することにより定量される。ある例において、計算単位（ＣＵ）値を標準曲線に基づき計算することができる。他の例において、ＣＵ値は、シグナル強度について上記説明に従って、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現することができる。実施例１３は、胃癌細胞中のシグナル伝達経路タンパク質（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の定量についてのデータ分析の非限定的な例を提供する。

【００８６】
ある実施態様において、対象となる特定の分析物の発現又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現される場合、例えば、陰性対照、例えば、ＩｇＧ対照と比較した場合、対象となる分析物について作成された標準曲線と比較した場合、陽性対照、例えば、ｐａｎ－ＣＫ対照と比較した場合、抗癌薬の存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合及び／又は抗癌薬の非存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合、参照発現レベル又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い又は低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、

４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い又は低い）発現又は活性化のレベルに対応し得る。一部の例において、相関は分析物特異的である。非限定的な例として、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定された発現又は活性化の「＋」レベルは、参照発現又は活性化レベルと比較した場合、ある分析物については発現又は活性化の２倍増加に、別の分析物については５倍増加に対応し得る。

【００８７】

一部の実施態様において、癌細胞は、対象への抗癌薬の投与後に胃癌を有する対象から単離される。他の実施態様において、単離された癌細胞は、抗癌薬と接触される。これらの実施態様のいずれにおいても、好適な抗癌薬は、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより選択することができる。

【００８８】

ある実施態様において、工程（ｂ）は、工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを適用して胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択することを含む。

【００８９】

１つの特定の実施態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して抗癌薬が胃癌の治療に好適か不適かを決定すること

を含む方法を提供する。

【００９０】

別の特定の実施態様において、本発明は、胃癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、

（ａ）胃癌の試料から得られた癌細胞を抗癌薬と接触させること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較すること；並びに

（ｅ）１種以上の分析物について工程（ｃ）において決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、抗癌薬が胃癌の治療に好適であること（例えば、胃腫瘍は、抗癌薬に対する応答の可能性の増加を有する）を示すこと

を含む方法を提供する。

【００９１】

ある例において、胃癌は腺癌である。ある他の例において、胃癌は、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している。

【００９２】

一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％多く又は少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「変化した」とみなされる。他の実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。更なる実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、（１）抗癌薬を用いない分析物の高いもしくは強い発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の中程度、弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、又は（２）抗癌薬を用いない分析物の中程度の発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。

【００９３】

インサイチュー活性化状態を保存するため、シグナル伝達タンパク質は、典型的には、細胞が単離された直後に、好ましくは９６、７２、４８、２４、６又は１時間以内に、より好ましくは３０、１５又は５分以内に抽出される。単離された細胞は、通常はナノモルからマイクロモル濃度の成長因子とともに約１～３０分間インキュベートしてシグナル伝達物質の活性化を復活させ、又は刺激することもできる（例えば、Ｉｒｉｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）参照）。刺激成長因子には、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ヘレグリン（ＨＲＧ）、ＴＧＦ－α、ＰＩＧＦ、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、ＮＲＧ１、ＰＧＦ、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、サイトカインなどが含まれる。個々の患者のための潜在的抗癌療法を評価するため、成長因子の刺激前、刺激中及び／又は刺激後、単離された細胞を変動する用量の１種以上の抗癌薬とインキュベートすることができる。成長因子の刺激は、数分間又は数時間（例えば、約１～５分間から約１～６時間）実施することができる。単離、抗癌薬による治療及び／又は成長因子刺激後、細胞は当分野において公知の任意の技術を使用して溶解されてシグナル伝達タンパク質が抽出される。好ましくは、細胞溶解は、成長因子刺激の約１～３６０分後に、より好ましくは２つの異なる時間間隔で：（１）成長因子刺激の約１～５分後；及び（２）成長因子刺激の約３０～１８０分後に開始される。あるいは、溶解物は、使用時まで－８０℃で貯蔵することができる。

【００９４】

一部の実施態様において、抗癌薬は、癌細胞中の活性化シグナル伝達経路構成因子の機能を妨害する物質を含む。このような作用物質の非限定的な例には、以下の表１に列挙した作用物質が含まれる。

【表１】

EGFR(ErbB1)(A)	HER-2(ErbB2)(C)	HER-3(ErbB3)(E)	HER-4(ErbB4)標的
セツキシマブ パニツムマブ マツズマブ ニモツズマブ ErbB1ワクチン	トラスツズマブ (Herceptin(商標)) パーツズマブ(2C4) BMS-599626*	抗体(U3)	
	*ヘテロ二量体化HER-1/2;第１相		
EGFR(ErbB1)(B)	HER-2(ErbB2)(D)	ErbB1/2(F)	ErbB1/2/4(G)
エルロチニブ ゲフィチニブ EKB569* CL-387-785**	CP-724714(Pfizer)	ラパチニブ(Tykerb(商標)) HKI-272* HKI-357(前臨床試験) BIBW2992**	カネルチニブ* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth、不可逆性、II CRC) **(Wyeth、不可逆性、前臨床試験)		*Wyeth、不可逆性、I/II NSCLC、乳癌 **Boehringer Ingelheim、不可逆性、I/II前立腺癌、卵巣癌、乳癌	*Pfizer、不可逆性、II NSCLC、乳癌
Raf(H)	SRC(H)	Mek:(I)	NFkB-IkB(I)
ソラフェニブ PLX4032(Plexxikon)	AZ	PD-325901(II:NSCLC) AZD6244-Array/Az XL518 Exelisis/DNA	
mTor(J)	PI3K(J)	VEGFR2及びVEGFR1(K)	VEGFR1/2/3:
Rad001:エベロリムス* テムシロリムス** AP-23573***	PX-866*	Avastin(DNA) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171(NSCLC、CRC) AMG-706(+PDGFR)
*エベロリムス(Novartis、ゲフェチニブ/エルロチニブとの組合せ;I/II:NSCLC、膠芽細胞腫) **テムシロリムス(Wyeth、ゲフェチニブ/エルロチニブとの組合せ;I/II:NSCLC、膠芽細胞腫) ***AP-23573(Ariad、I/II:子宮内膜癌)	*P110アルファ特異的阻害;ProlX Pharma;前臨床試験NSCLC	*(PDL)抗VEGFa **Regeneron/Aventis(受容体模倣薬)(第２相)	
VEGFR2標的(L)			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** 完全ヒト化IMC1121B CDP-791*** パゾパニブ****	CDP-791(UCB) CP-547632* AG13736** E-7080(Eisai) CHIR-258*** OSI-930(+cKit、PDGFR)	Bay-579352(+PDGFR) ABT-869* BMS-540215(+FGFR1) KRN-951 BBIW	
*Imclone(第2/3相?)**VEGFR2に対するキメラIgG1 ***Celltech、R2に対するペグ化ジ-Fab抗体 ****GSK、多発性骨髄腫、卵巣癌、RCC第３相登録完了、II肉腫)	*OSI、PFIZER:(+ErbB1+PDGFR)(NSCLC、卵巣癌第２相) **Pfizer:VEGFR1、２及びPDGFRベータ)(RCC II) ***(VEGFR1、2 FGFR3、PDGFR)	*(+CSF1R、Erk、Flt-3、PDGFR)	

VEGFR2/ErbB1/2(ErbB1)/cMet/FGFR(M)	VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3(N)	TIE1/2	VEGFR2/1/3、Flt-3、cFMS、PDGFR/cKit(O)
ZD6474* XL647** AEE788***	ソラフェニブ*		PTK787(Not cFMS、FLT-3) スニチニブ XL-999 SU-6668(Pfizer) GSK AZ(AZD2171) BMS Novartis(AEE-788) Amgen その他
*(バンデタニブ)(第III相:甲状腺癌、NSCLC) **(Exelixis;更にEPHB2):(エルロチニブに耐性の患者;アジア人の患者)(第2相) ***(Novartis、第1/2相)	*(RCC、HCC、NSCLC(III)、黒色腫(III))		

PDGFR標的(P)	Abl標的:(Q)	FTL3	RET
タンヅチニブ ニロチニブ	イマチニブ ダサチニブ ニロチニブ AT-9283 AZD-0530 ボスチニブ		

Kit標的(R)	HGFR1/2	FGFR1-4	IGF-1R標的(S)
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron	Merck Pfizer Novartis

HSP90阻害剤:	抗有糸分裂薬:	その他の標的:	
IPI-504* 17-AAG**	ドセタキセル* パクリタキセル** ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン***	HDAC阻害剤 BCL2 化学療法薬(破壊) プロテオソーム阻害剤	
*(Infinity Pharma、突然変異ErbB1、I/II多発性骨髄腫、GIST) **(Kosan、I/II固形腫瘍)	*(微小管安定剤;アジュバント及び進行性乳癌;NSCLC、アンドロゲン非依存性前立腺癌) **(微小管安定剤;アジュバント及び進行性乳癌;NSCLC、卵巣癌、AIDS関連カポジ肉腫) ***(微小管脱安定剤)		

【００９５】

ある実施態様において、抗癌薬は、抗シグナリング剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）、例えばモノクローナル抗体又はチロシンキナーゼ阻害剤；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又はアベラントな細胞、例えば、癌性細胞の脱制御された成長を低減又は無効にさせる能力を備える任意の他の化合物を含む。一部の実施態様において、単離された細胞は、少なくとも１種の化学療法剤と組み合わせて１種以上の抗シグナリング剤、抗増殖剤及び／又はホルモン療法剤により治療される。

【００９６】

本発明における使用に好適な抗シグナリング剤の例には、制限されることなく、モノク

ローナル抗体、例えばトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））、パーツズマブ（２Ｃ４）、アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（商標））、セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（商品名））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（商標））及びトシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ（商標））；チロシンキナーゼ阻害剤、例えばゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（商標））、スニチニブ（Ｓｕｔｅｎｔ（商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（商標））、ラパチニブ（ＧＷ－５７２０１６；Ｔｙｋｅｒｂ（商標））、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、セマキシニブ（ＳＵ５４１６）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４）、ソラフェニブ（ＢＡＹ４３－９００６；Ｎｅｘａｖａｒ（商標））、イマチニブメシレート（Ｇｌｅｅｖｅｃ（商標））、レフルノミド（ＳＵ１０１）、バンデタニブ（ＺＡＣＴＩＭＡ（商品名）；ＺＤ６４７４）、ペリチニブ、ＣＰ－６５４５７７、ＣＰ－７２４７１４、ＨＫＩ－２７２、ＰＫＩ－１６６、ＡＥＥ７８８、ＢＭＳ－５９９６２６、ＨＫＩ－３５７、ＢＩＢＷ２９９２、ＡＲＲＹ－３３４５４３、ＪＮＪ－２６４８３３２７及びＪＮＪ－２６４８３３２７；並びにこれらの組合せが含まれる。

【００９７】

典型的な抗増殖剤には、ｍＴＯＲ阻害剤、例えばシロリムス（ラパマイシン）、テムシロリムス（ＣＣＩ－７７９）、エベロリムス（ＲＡＤ００１）、ＢＥＺ２３５及びＸＬ７６５；Ａｋｔ阻害剤、例えば１Ｌ６－ヒドロキシメチル－カイロ－イノシトール－２－（Ｒ）－２－Ｏ－メチル－３－Ｏ－オクタデシル－ｓｎ－グリセロカーボネート、９－メトキシ－２－メチルエリプチシニウムアセテート、１，３－ジヒドロ－１－（１－（（４－（６－フェニル－１Ｈ－イミダゾ［４，５－ｇ］キノキサリン－７－イル）フェニル）メチル）－４－ピペリジニル）－２Ｈ－ベンゾイミダゾール－２－オン、１０－（４’－（Ｎ－ジエチルアミノ）ブチル）－２－クロロフェノキサジン、３－ホルミルクロモンチオセミカルバゾン（Ｃｕ（ＩＩ）Ｃｌ$_2$錯体）、癌原遺伝子ＴＣＬ１のアミノ酸１０－２４に由来する１５量体ペプチドであるＡＰＩ－２（Ｈｉｒｏｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７９：５３４０７－５３４１８（２００４）、ＫＰ３７２－１及びＫｏｚｉｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２５：１１４４－１１４５（２００３）及びＫａｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ，４：４６３－４７６（２００３）に記載の化合物；ＰＩ３Ｋ阻害剤、例えばＰＸ－８６６、ワートマニン、ＬＹ２９４００２、クエルセチン、テトロドトキシンシトレート、チオペラミドマレエート、ＧＤＣ－０９４１（９５７０５４－３０－７）、ＩＣ８７１１４、ＰＩ－１０３、ＰＩＫ９３、ＢＥＺ２３５（ＮＶＰ－ＢＥＺ２３５）、ＴＧＸ－１１５、ＺＳＴＫ４７４、（－）－デグエリン、ＮＵ７０２６、ミリセチン、タンゾチニブ、ＧＤＣ－０９４１ビスメシレート、ＧＳＫ６９０６９３、ＫＵ－５５９３３、ＭＫ－２２０６、ＯＳＵ－０３０１２、ペリホシン、トリシリビン、ＸＬ－１４７、ＰＩＫ７５、ＴＧＸ－２２１、ＮＵ７４４１、ＰＩ８２８、ＸＬ－７６５及びＷＨＩ－Ｐ１５４；ＭＥＫ阻害剤、例えばＰＤ９８０５９、ＡＲＲＹ－１６２、ＲＤＥＡ１１９、Ｕ０１２６、ＧＤＣ－０９７３、ＰＤ１８４１６１、ＡＺＤ６２４４、ＡＺＤ８３３０、ＰＤ０３２５９０１及びＡＲＲＹ－１４２８８６；並びにこれらの組合せが含まれる。

【００９８】

ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤の非限定的な例には、ＰＦ－００２９９８０４、ネラチニブ（ＨＫＩ－２７２）、ＡＣ４８０（ＢＭＳ－５９９６２６）、ＢＭＳ－６９０１５４、ＰＦ－０２３４１０６６、ＨＭ７８１－３６Ｂ、ＣＩ－１０３３、ＢＩＢＷ－２９９２及びこれらの組合せが含まれる。

【００９９】

化学療法剤の非限定的な例には、白金系薬物（例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロプラチン、イプロプラチン、サトラプラチンなど）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、チオテパ、ニトロソウレアなど）、代

謝拮抗薬（例えば、５－フルオロウラシル、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、メトトレキセート、ロイコボリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン（Ｇｅｍｚａｒ（商標））、ペメトレキセド（ＡＬＩＭＴＡ（商標））、ラルチトレキセドなど）、植物アルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタキセル（Ｔａｘｏｌ（商標））、ドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ（商標））など）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド（ＶＰ１６）、リン酸エトポシド、テニポシドなど）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシンなど）、薬学的に許容されるこれらの塩、これらの立体異性体、これらの誘導体、これらのアナログ並びにこれらの組合せが含まれる。

【０１００】

ホルモン療法剤の例には、制限されることなく、アロマターゼ阻害剤（例えば、アミノグルテチミド、アナストロゾール（Ａｒｉｍｉｄｅｘ（商標））、レトロゾール（Ｆｅｍａｒａ（商標））、ボロゾール、エキセメスタン（Ａｒｏｍａｓｉｎ（商標））、４－アンドロステン－３，６，１７－トリオン（６－ＯＸＯ）、１，４，６－アンドロスタトリエン－３，１７－ジオン（ＡＴＤ）、フォルメスタン（Ｌｅｎｔａｒｏｎ（商標））など）、選択的エストロゲン受容体モジュレーター（例えば、バゼドキシフェン、クロミフェン、フルベストラント、ラソフォキシフェン、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェンなど）、ステロイド剤（例えば、デキサメタゾン）、フィナステリド及びゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト（ＧｎＲＨ）、例えば、ゴセレリン、薬学的に許容されるこれらの塩、これらの立体異性体、これらの誘導体、これらのアナログ並びにこれらの組合せが含まれる。

【０１０１】

本発明において有用な癌ワクチンの非限定的な例には、Ａｃｔｉｖｅ ＢｉｏｔｅｃｈからのＡＮＹＡＲＡ、Ｎｏｒｔｈｗｅｓｔ ＢｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓからのＤＣＶａｘ－ＬＢ、ＩＤＭ ＰｈａｒｍａからのＥＰ－２１０１、ＰｈａｒｍｅｘａからのＧＶ１００１、Ｉｄｅｒａ ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓからのＩＯ－２０５５、Ｉｎｔｒｏｇｅｎ ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓからのＩＮＧＮ２２５及びＢｉｏｍｉｒａ／ＭｅｒｃｋからのＳｔｉｍｕｖａｘが含まれる。

【０１０２】

放射線療法剤の例には、制限されることなく、腫瘍抗原に向けられた抗体に場合によりコンジュゲートされた放射性核種、例えば^{47}Ｓｃ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ、^{89}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{87}Ｙ、^{90}Ｙ、^{105}Ｒｈ、^{111}Ａｇ、^{111}Ｉｎ、^{117m}Ｓｎ、^{149}Ｐｍ、^{153}Ｓｍ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{211}Ａｔ及び^{212}Ｂｉが含まれる。

【０１０３】

ＨＥＲ２活性をモジュレートする化合物の非限定的な例は本明細書に記載されており、この例には、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼ阻害剤及びこれらの組合せが含まれる。好ましい実施態様において、ＨＥＲ２－モジュレーティング化合物は、ＨＥＲ２活性を阻害し、及び／又はＨＥＲ２シグナリングを遮断し、例えば、ＨＥＲ２阻害剤である。ＨＥＲ２阻害剤の例には、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、例えばトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標））及びパーツズマブ（２Ｃ４）；小分子チロシンキナーゼ阻害剤、例えばゲフィチニブ（Ｉｒｅｓｓａ（商標））、エルロチニブ（Ｔａｒｃｅｖａ（商標））、ペリチニブ、ＣＰ－６５４５７７、ＣＰ－７２４７１４、カネルチニブ（ＣＩ１０３３）、ＨＫＩ－２７２、ラパチニブ（ＧＷ－５７２０１６；Ｔｙｋｅｒｂ（商標））、ＰＫＩ－１６６、ＡＥＥ７８８、ＢＭＳ－５９９６２６、ＨＫＩ－３５７、ＢＩＢＷ２９９２、ＡＲＲＹ－３３４５４３、ＪＮＪ－２６４８３３２７及びＪＮＪ－２６４８３３２７；並びにこれらの組合せが含まれる。他の実施態様において、ＨＥＲ

２モジュレーティング化合物は、ＨＥＲ２経路を活性化させ、例えば、ＨＥＲ２活性化剤である。

【０１０４】

ｃ－Ｍｅｔ活性をモジュレートする化合物の非限定的な例は、本明細書に記載されており、この例には、モノクローナル抗体、小分子阻害剤及びこれらの組合せが含まれる。好ましい実施態様において、ｃ－Ｍｅｔモジュレーティング化合物は、ｃ－Ｍｅｔ活性を阻害し、及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリングを遮断し、例えば、ｃ－Ｍｅｔ阻害剤である。ｃ－Ｍｅｔ阻害剤の例には、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、例えばＡＭＧ１０２及びＭｅｔＭＡｂ；ｃ－Ｍｅｔの小分子阻害剤、例えばＡＲＱ１９７、ＪＮＪ－３８８７７６０５、ＰＦ－０４２１７９０３、ＳＧＸ５２３、ＧＳＫ１３６３０８９／ＸＬ８８０、ＸＬ１８４、ＭＧＣＤ２６５及びＭＫ－２４６１；並びにこれらの組合せが含まれる。他の実施態様において、ｃ－Ｍｅｔモジュレーティング化合物は、ｃ－Ｍｅｔ経路を活性化させ、例えば、ｃ－Ｍｅｔ活性化剤である。

【０１０５】

ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、正常細胞、例えば、癌、例えば、胃癌を有しない健常個体からの非癌性細胞から得られる。ある他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、癌、例えば、胃癌を有する患者からの試料からの腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞から得られる。

【０１０６】

一部の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、腫瘍細胞、例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）から得られる。特定の実施態様において、抗癌薬により処理されていない細胞は、細胞抽出物を生成するために使用される単離された細胞（例えば、調査すべき試験細胞）が得られる同一試料から得られる。ある例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の低いレベルの発現又は活性化の存在は、抗癌薬が胃癌の治療に好適であること（例えば、胃腫瘍が抗癌薬に対して応答する可能性が増加すること）を示す。ある他の例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、抗癌薬が胃癌の治療に不適であること（例えば、胃腫瘍が抗癌薬に対して応答する可能性が減少すること）を示す。

【０１０７】

代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に感受性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似又は低いレベルの発現又は活性化の存在は、抗癌薬が胃癌の治療に好適であること（例えば、胃腫瘍が抗癌薬に対して応答する可能性が増加すること）を示す。ある他の代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に耐性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、抗癌薬が胃癌の治療に不適であること（例えば、胃腫瘍が抗癌薬に対して応答する可能性が減少すること）を示す。

【０１０８】
ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより高い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。
【０１０９】
他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより低い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍低い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。
【０１１０】
本発明を使用して調査することができるシグナル伝達分子及び経路の非限定的な例には、表２に示したものが含まれる。

【表２】

経路１	ErbB1	ErbB1 ホスホ	ErbB1 Shc	ErbB1 ユビキチン	ErbB1-PI3K	PTEN		
経路２	ErbB1	ErbB1VIII	ErbB1VIII ホスホ	ErbB1VIII Shc	ErbB1VIII ユビキチン	ErbB1VIII PI3K	PTEN	
経路３	ErbB2	ErbB2 ホスホ	HER-2 Shc	ErbB2:PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン	PTEN		
経路４	ErbB2	P95 トランケート化 ErbB2	ErbB2 ホスホ	P95 トランケート化 ERBB2 ホスホ	HER-2 Shc	ERBB2:PI3K 複合体	ErbB2 ユビキチン	P95ErbB2:PI3K
経路５	ErbB3	ErbB3 ホスホ	ErbB3:PI3K 複合体	ErbB3 PI3K ホスホ	ErbB3:Shc			
経路６	ErbB4	ErbB4 ホスホ	ErbB4:Shc					
経路７	IGF-1R	IGF-1R ホスホ	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	ホスホ IRS	IGF-1R :PI3K		
経路８	INSR	INSR ホスホ						
経路９	KIT	KIT ホスホ						
経路 10	FLT3	FLT3 ホスホ						
経路 11	HGFR1	HGFR1 ホスホ						
経路 12	HGFR2	HGFR2 ホスホ						
経路 13	RET	RET ホスホ						
経路 14	PDGFR アルファ	PDGFR アルファホスホ						
経路 15	PDGFR ベータ	PDGFR ベータホスホ						
経路 16	VEGFR1	VEGFR1 ホスホ	VEGFR1:PLCγ 複合体	VEGFR1:Src				
経路 17	VEGFR2	VEGFR2 ホスホ	VEGFR2:PLCγ 複合体	VEGFR2:Src	VEGFR-2/硫酸ヘパリン複合体	VEGFR-2、VE-カドヘリン複合体		
経路 18	VEGFR3	VEGFR3 ホスホ						
経路 19	FGFR1	FGFR1 ホスホ						
経路 20	FGFR2	FGFR2 ホスホ						
経路 21	FGFR3	FGFR3 ホスホ						
経路 22	FGFR4	FGFR4 ホスホ						
経路 23	TIE1	TIE1 ホスホ						
経路 24	TIE2	TIE2 ホスホ						
経路 25	EPHA	EPHA ホスホ						
経路 26	EPHB	EPHB ホスホ						
経路 27	NFkB-IkB 複合体	ホスホ-IκB(S32)全 IkB	全 NFκB ホスホ NFκB(S536)	全 P65IkBa ホスホ P65IkBa				

経路 28	ER	ホスホ ER	ER-AIB1	その他の ER 複合体				
経路 29	PR	ホスホ Pr		PR 複合体				
経路 30	ヘッジホッグ経路							
経路 31	Wnt 経路							
経路 32	ノッチ経路							
経路 33	全 Mek ホスホ Mek(S217/S221)	全 Erk ホスホ Erk(T202/Y204)	全 Rsk-1 ホスホ Rsk-1(T357/S363)	全 Stat3 ホスホ Stat-3(Y705)(S727) 全 Stat1 ホスホ Stat1(Y701)	ホスホ Bad(S112) Bad(全)	全 Fak ホスホ Fak(Y576)	全 cSrcP ホスホ cSrc(Y416)	全 Ras ホスホ Ras
経路 34	Akt(全) ホスホ Akt(T473)	ホスホ Akt(T308)	ホスホ Bad(S112)Bad(全)	ホスホ Bad(S136)	Bad:14-3-3 複合体	全 mTor ホスホ mTor(S2448)	全 p70S6K ホスホ p70S6K(T229)(T389)	GSK3 ベータ全(ホスホ Ser9)
経路 35	全 Jnk ホスホ Jnk(T183/Y185)	全 P38 ホスホ P38(T180/Y182)	全 Rb ホスホ Rb(S249/T252)ホスホ Rb(S780)	全 p53 ホスホ p53(S392)ホスホ p53(S20)	ホスホ -CREB(S133)全 CREB	全 c-Jun ホスホ -c-Jun;(S63)	全パキシリン ホスホパキシリン(Y118)	
経路 36	Ki67	開裂カスパーゼ 3、8、9 他	TOPO2					
経路 37	TGF ベータ							

【０１１１】

細胞抽出物における発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルについて調査することができる分析物、例えば、シグナル伝達分子の非限定的な例には、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せが含まれる。

【０１１２】

一実施態様において、本発明の方法は、細胞抽出物中の以下の分析物の１種の発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：（１）ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ／ＥｒｂＢ１；（２）ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２；（３）ｐ９５ＨＥＲ２；（４）ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３；（５）ｃ－Ｍｅｔ；（６）ＩＧＦ１Ｒ；（７）ｃＫｉｔ；（８）ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）；（９）Ｓｈｃ；（１０）Ａｋｔ；（１１）ｐ７０Ｓ６Ｋ；（１２）ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２及び／又はＶＥＧＦＲ３）；及び（１３）ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＰＤＧＦＲＢ）。

【０１１３】

別の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の２種の分析物のペアの１種の発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含み、「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）：１、２；１、３；１、４；１、５；１、６；１、７；１、８；１、９；１、１０；１、１１；１、１２；１、１３；２、３；２、４；２、５；２、６；２、７；２、８；２、９；２、１０；

２、１１；２、１２；２、１３；３、４；３、５；３、６；３、７；３、８；３、９；３、１０；３、１１；３、１２；３、１３；４、５；４、６；４、７；４、８；４、９；４、１０；４、１１；４、１２；４、１３；５、６；５、７；５、８；５、９；５、１０；５、１１；５、１２；５、１３；６、７；６、８；６、９；６、１０；６、１１；６、１２；６、１３；７、８；７、９；７、１０；７、１１；７、１２；７、１３；８、９；８、１０；８、１１；８、１２；８、１３；９、１０；９、１１；９、１２；９、１３；１０、１１；１０、１２；１０、１３；１１、１２；１１、１３；及び１２、１３である。

【０１１４】

更に別の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の３種の分析物の組の１種の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含み、「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）：１、２、３；１、２、４；１、２、５；１、２、６；１、２、７；１、２、８；１、２、９；１、２、１０；１、２、１１；１、２、１２；１、２、１３；１、３、４；１、３、５；１、３、６；１、３、７；１、３、８；１、３、９；１、３、１０；１、３、１１；１、３、１２；１、３、１３；１、４、５；１、４、６；１、４、７；１、４、８；１、４、９；１、４、１０；１、４、１１；１、４、１２；１、４、１３；１、５、６；１、５、７；１、５、８；１、５、９；１、５、１０；１、５、１１；１、５、１２；１、５、１３；１、６、７；１、６、８；１、６、９；１、６、１０；１、６、１１；１、６、１２；１、６、１３；１、７、８；１、７、９；１、７、１０；１、７、１１；１、７、１２；１、７、１３；１、８、９；１、８、１０；１、８、１１；１、８、１２；１、８、１３；１、９、１０；１、９、１１；１、９、１２；１、９、１３；１、１０、１１；１、１０、１２；１、１０、１３；１、１１、１２；１、１１、１３；１、１２、１３、２、３、４；２、３、５；２、３、６；２、３、７；２、３、８；２、３、９；２、３、１０；２、３、１１；２、３、１２；２、３、１３；２、４、５；２、４、６；２、４、７；２、４、８；２、４、９；２、４、１０；２、４、１１；２、４、１２；２、４、１３；２、５、６；２、５、７；２、５、８；２、５、９；２、５、１０；２、５、１１；２、５、１２；２、５、１３；２、６、７；２、６、８；２、６、９；２、６、１０；２、６、１１；２、６、１２；２、６、１３；２、７、８；２、７、９；２、７、１０；２、７、１１；２、７、１２；２、７、１３；２、８、９；２、８、１０；２、８、１１；２、８、１２；２、８、１３；２、９、１０；２、９、１１；２、９、１２；２、９、１３；２、１０、１１；２、１０、１２；２、１０、１３；２、１１、１２；２、１１、１３；２、１２、１３；３、４、５；３、４、６；３、４、７；３、４、８；３、４、９；３、４、１０；３、４、１１；３、４、１２；３、４、１３；３、５、６；３、５、７；３、５、８；３、５、９；３、５、１０；３、５、１１；３、５、１２；３、５、１３；３、６、７；３、６、８；３、６、９；３、６、１０；３、６、１１；３、６、１２；３、６、１３；３、７、８；３、７、９；３、７、１０；３、７、１１；３、７、１２；３、７、１３；３、８、９；３、８、１０；３、８、１１；３、８、１２；３、８、１３；３、９、１０；３、９、１１；３、９、１２；３、９、１３；３、１０、１１；３、１０、１２；３、１０、１３；３、１１、１２；３、１１、１３；３、１２、１３；４、５、６；４、５、７；４、５、８；４、５、９；４、５、１０；４、５、１１；４、５、１２；４、５、１３；４、６、７；４、６、８；４、６、９；４、６、１０；４、６、１１；４、６、１２；４、６、１３；４、７、８；４、７、９；４、７、１０；４、７、１１；４、７、１２；４、７、１３；４、８、９；４、８、１０；４、８、１１；４、８、１２；４、８、１３；４、９、１０；４、９、１１；４、９、１２；４、９、１３；４、１０、１１；４、１０、１２；４、１０、１３；４、１１、１２；４、１１、１３；４、１２、１３；５、６、７；５、６、８；５、６、９；５、６、１０；５、６、１１；５、６、１２；５、

６、１３；５、７、８；５、７、９；５、７、１０；５、７、１１；５、７、１２；５、７、１３；５、８、９；５、８、１０；５、８、１１；５、８、１２；５、８、１３；５、９、１０；５、９、１１；５、９、１２；５、９、１３；５、１０、１１；５、１０、１２；５、１０、１３；５、１１、１２；５、１１、１３；５、１２、１３、６、７、８；６、７、９；６、７、１０；６、７、１１；６、７、１２；６、７、１３；６、８、９；６、８、１０；６、８、１１；６、８、１２；６、８、１３；６、９、１０；６、９、１１；６、９、１２；６、９、１３；６、１０、１１；６、１０、１２；６、１０、１３；６、１１、１２；６、１１、１３；６、１２、１３；７、８、９；７、８、１０；７、８、１１；７、８、１２；７、８、１３；７、９、１０；７、９、１１；７、９、１２；７、９、１３；７、１０、１１；７、１０、１２；７、１０、１３；７、１１、１２；７、１１、１３；７、１２、１３；８、９、１０；８、９、１１；８、９、１２；８、９、１３；８、１０、１１；８、１０、１２；８、１０、１３；８、１１、１２；８、１１、１３；８、１２、１３；９、１０、１１；９、１０、１２；９、１０、１３；９、１１、１２；９、１１、１３；９、１２、１３；１０、１１、１２；１０、１１、１３；１０、１２、１３；及び１１、１２、１３である。

【０１１５】

いっそう更に別の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の４種の分析物の組の１種の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含み、「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）：１、２、３、４；１、２、３、５；１、２、３、６；１、２、３、７；１、２、３、８；１、２、３、９；１、２、３、１０；１、２、３、１１；１、２、３、１２；１、２、３、１３；１、３、４、５；１、３、４、６；１、３、４、７；１、３、４、８；１、３、４、９；１、３、４、１０；１、３、４、１１；１、３、４、１２；１、３、４、１３；１、４、５、６；１、４、５、７；１、４、５、８；１、４、５、９；１、４、５、１０；１、４、５、１１；１、４、５、１２；１、４、５、１３；１、５、６、７；１、５、６、８；１、５、６、９；１、５、６、１０；１、５、６、１１；１、５、６、１２；１、５、６、１３；１、６、７、８；１、６、７、９；１、６、７、１０；１、６、７、１１；１、６、７、１２；１、６、７、１３；１、７、８、９；１、７、８、１０；１、７、８、１１；１、７、８、１２；１、７、８、１３；１、８、９、１０；１、８、９、１１；１、８、９、１２；１、８、９、１３；１、９、１０、１１；１、９、１０、１２；１、９、１０、１３；１、１０、１１、１２；１、１０、１１、１３；１、１１、１２、１３；２、３、４、５；２、３、４、６；２、３、４、７；２、３、４、８；２、３、４、９；２、３、４、１０；２、３、４、１１；２、３、４、１２；２、３、４、１３；２、４、５、６；２、４、５、７；２、４、５、８；２、４、５、９；２、４、５、１０；２、４、５、１１；２、４、５、１２；２、４、５、１３；２、５、６、７；２、５、６、８；２、５、６、９；２、５、６、１０；２、５、６、１１；２、５、６、１２；２、５、６、１３；２、６、７、８；２、６、７、９；２、６、７、１０；２、６、７、１１；２、６、７、１２；２、６、７、１３；２、７、８、９；２、７、８、１０；２、７、８、１１；２、７、８、１２；２、７、８、１３；２、８、９、１０；２、８、９、１１；２、８、９、１２；２、８、９、１３；２、９、１０、１１；２、９、１０、１２；２、９、１０、１３；２、１０、１１、１２；２、１０、１１、１３；２、１１、１２、１３；３、４、５、６；３、４、５、７；３、４、５、８；３、４、５、９；３、４、５、１０；３、４、５、１１；３、４、５、１２；３、４、５、１３；３、５、６、７；３、５、６、８；３、５、６、９；３、５、６、１０；３、５、６、１１；３、５、６、１２；３、５、６、１３；３、６、７、８；３、６、７、９；３、６、７、１０；３、６、７、１１；３、６、７、１２；３、６、７、１３；３、７、８、９；３、７、８、１０；３、

７、８、１１；３、７、８、１２；３、７、８、１３；３、８、９、１０；３、８、９、１１；３、８、９、１２；３、８、９、１３；３、９、１０、１１；３、９、１０、１２；３、９、１０、１３；３、１０、１１、１２；３、１０、１１、１３；３、１１、１２、１３；４、５、６、７；４、５、６、８；４、５、６、９；４、５、６、１０；４、５、６、１１；４、５、６、１２；４、５、６、１３；４、６、７、８；４、６、７、９；４、６、７、１０；４、６、７、１１；４、６、７、１２；４、６、７、１３；４、７、８、９；４、７、８、１０；４、７、８、１１；４、７、８、１２；４、７、８、１３；４、８、９、１０；４、８、９、１１；４、８、９、１２；４、８、９、１３；４、９、１０、１１；４、９、１０、１２；４、９、１０、１３；４、１０、１１、１２；４、１０、１１、１３；４、１１、１２、１３；５、６、７、８；５、６、７、９；５、６、７、１０；５、６、７、１１；５、６、７、１２；５、６、７、１３；５、７、８、９；５、７、８、１０；５、７、８、１１；５、７、８、１２；５、７、８、１３；５、８、９、１０；５、８、９、１１；５、８、９、１２；５、８、９、１３；５、９、１０、１１；５、９、１０、１２；５、９、１０、１３；５、１０、１１、１２；５、１０、１１、１３；５、１１、１２、１３；６、７、８、９；６、７、８、１０；６、７、８、１１；６、７、８、１２；６、７、８、１３；６、８、９、１０；６、８、９、１１；６、８、９、１２；６、８、９、１３；６、９、１０、１１；６、９、１０、１２；６、９、１０、１３；６、１０、１１、１２；６、１０、１１、１３；６、１１、１２、１３；７、８、９、１０；７、８、９、１１；７、８、９、１２；７、８、９、１３；７、９、１０、１１；７、９、１０、１２；７、９、１０、１３；７、１０、１１、１２；７、１０、１１、１３；７、１１、１２、１３；８、９、１０、１１；８、９、１０、１２、８、９、１０、１３；８、１０、１１、１２；８、１０、１１、１３；８、１１、１２、１３；９、１０、１１、１２；９、１０、１１、１３；９、１１、１２、１３；及び１０、１１、１２、１３である。

【０１１６】

別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の５種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）、及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、５種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５；２、３、４、５、６；３、４、５、６、７；４、５、６、７、８；５、６、７、８、９；６、７、８、９、１０；７、８、９、１０、１１；８、９、１０、１１、１２；又は９、１０、１１、１２、１３。

【０１１７】

更に別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の６種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）、及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、６種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６；２、３、４、５、６、７；３、４、５、６、７、８；４、５、６、７、８、９；５、６、７、８、９、１０；６、７、８、９、１０、１１；７、８、９、１０、１１、１２；又は８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１１８】

更に別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の７種の任意の考えられる組合せ

の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、７種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７；２、３、４、５、６、７、８；３、４、５、６、７、８、９；４、５、６、７、８、９、１０；５、６、７、８、９、１０、１１；６、７、８、９、１０、１１、１２；又は７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１１９】

別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の８種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、８種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７、８；２、３、４、５、６、７、８、９；３、４、５、６、７、８、９、１０；４、５、６、７、８、９、１０、１１；５、６、７、８、９、１０、１１、１２；又は６、７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１２０】

更に別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の９種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、９種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７、８、９；２、３、４、５、６、７、８、９、１０；３、４、５、６、７、８、９、１０、１１；４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２；又は５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１２１】

更にいっそう別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の１０種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、１０種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０；２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１；３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２；又は４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１２２】

別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の１１種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ

３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、１１種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１；２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２；又は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１２３】

更に別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の１２種の任意の考えられる組合せの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。非限定的な例として、１２種の分析物の組合せは、以下のものの１種を含むことができる：１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２；又は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３。

【０１２４】

いっそう更に別の実施態様において、本発明は、以下の分析物の１３種全ての発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：「１」＝ＨＥＲ１、「２」＝ＨＥＲ２、「３」＝ｐ９５ＨＥＲ２、「４」＝ＨＥＲ３、「５」＝ｃ－Ｍｅｔ、「６」＝ＩＧＦ１Ｒ、「７」＝ｃＫｉｔ、「８」＝ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、「９」＝Ｓｈｃ、「１０」＝Ａｋｔ、「１１」＝ｐ７０Ｓ６Ｋ、「１２」＝ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及び「１３」＝ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）。

【０１２５】

１つの特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）及びＳｈｃの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。更に別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及びＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。

【０１２６】

ある実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）の追加の分析物の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む。一部の実施態様において、１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）の追加の分析物は、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上のシグナル伝達分子を含む。

【０１２７】
特定の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の追加の分析物の２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上の１種又は任意の組合せの発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む：ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１、ＰＤＫ２、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、ＥＰＨ－Ａ、ＥＰＨ－Ｂ、ＥＰＨ－Ｃ、ＥＰＨ－Ｄ、ＦＬＴ－３、ＴＩＥ－１、ＴＩＥ－２、ｃ－ＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ、ＰＩＰ２、ＰＩＰ３、ｐ２７、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、ＰＴＰ１Ｂ、ＰＴＰＮ１３、ＢＤＰ１など）、受容体二量体、他のＨＥＲ２シグナリング経路構成因子、他のｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子及びこれらの組合せ。

【０１２８】
一部の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞である。ある例において、腫瘍細胞は、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である。他の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、例えば、胃癌患者から得られた試料から単離される。試料の非限定的な例には、体液試料、例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及び／又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料などが含まれる。特定の実施態様において、試料は、全血、血清、血漿及び／又は腫瘍組織試料、例えば、胃腫瘍組織を含む。

【０１２９】
ある例において、本発明の方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を読取可能なフォーマットでユーザ（例えば、臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医）に提供する工程を更に含む。一部の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医に送付又は報告することを更に含むことができる。他の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果をコンピュータデータベース又は例えば実験室において情報を保存するための他の好適な機械もしくはデバイスに記録又は保存することを更に含むことができる。

【０１３０】
一部の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物の全量を、対応する分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む。特定の実施態様において、抗体は、検出すべき分析物の活性化状態にかかわらず分析物に結合し、すなわち、抗体は、分析物の非活性化及び活性化形態の両方を検出する。

【０１３１】
全発現レベル及び／又は状態は、種々の技術のいずれかを使用して決定することができる。ある実施態様において、試料中の１種以上の分析物、例えば、シグナル伝達分子の発現レベル及び／又は状態は、免疫アッセイ、例えば単一検出アッセイ又は本明細書に記載の近接二重検出アッセイ（例えば、共同近接免疫アッセイ（ＣＯｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｐｒｏｘｉｍｉｔｙ　ＩｍｍｕｎｏＡｓｓａｙ）（ＣＯＰＩＡ））により検出される。

【０１３２】
ある実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現（例えば、全）レベルの決定は、
（ｉ）細胞抽出物を捕捉抗体（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子に特異的な捕捉抗体）の１種又は複数の希釈系列とインキュベートし

て（例えば、接触させて）複数の捕捉された分析物を形成すること（捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている）（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、分析物及び捕捉抗体を含む捕捉された分析物の複合体に転換すること）；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な１種又は複数の第１及び第２の活性化状態非依存性抗体（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子に特異的な第１及び第２の活性化状態非依存性抗体）を含む検出抗体とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の検出可能な捕捉された分析物を形成すること（例えば、捕捉された分析物の複合体を、捕捉された分析物及び検出抗体を含む検出可能な捕捉された分析物の複合体に転換すること）；
（第１の活性化状態非依存性抗体は、促進部分により標識されており、第２の活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進部分は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして（例えば、接触させて）増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０１３３】

ある他の実施態様において、トランケート化受容体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２）である工程（ｃ）における１種以上の分析物の発現（例えば、全）レベルの決定は、
（ｉ）細胞抽出物を完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートする（例えば、接触させる）こと；
（ｉｉ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、これにより完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を除去して完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を欠く細胞抽出物を形成すること（例えば、細胞抽出物を、特定の完全長受容体又は完全長受容体のファミリーを欠く細胞抽出物に転換すること）；
（ｉｉｉ）完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を欠く細胞抽出物を、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に特異的な１種又は複数の捕捉抗体とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の捕捉されたトランケート化受容体を形成すること（捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている）（例えば、完全長受容体枯渇細胞抽出物中に存在するトランケート化受容体を、トランケート化受容体及び捕捉抗体の複合体に転換すること）；
（ｉｖ）複数の捕捉されたトランケート化受容体を、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）のＩＣＤ結合領域に特異的な１種又は複数の第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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トランケート化受容体を形成すること（例えば、捕捉されたトランケート化受容体の複合体を、捕捉されたトランケート化受容体及び検出抗体を含む検出可能な捕捉されたトランケート化受容体の複合体に転換すること）、
（第１の活性化状態非依存性抗体は、促進部分により標識されており、第２の活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進部分は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｖ）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体を、シグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして（例えば、接触させて）増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｖｉ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０１３４】
第１の活性化状態非依存性抗体は、促進部分により直接的に標識することができ、又は促進成分により、例えば第１の活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドと促進成分にコンジュゲートされた相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより間接的に標識することができる。同様に、第２の活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識することができ、又はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、例えば第２の活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合により間接的に標識することができる。ある例において、結合ペアの第１のメンバーはビオチンであり、結合ペアの第２のメンバーはアビジン、例えばストレプトアビジン又はニュートラビジンである。
【０１３５】
一部の実施態様において、促進部分は、例えば、グルコースオキシダーゼであり得る。ある例において、グルコースオキシダーゼ及び活性化状態非依存性抗体は、例えば、開示が全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例１６～１７に記載のとおりスルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートさせることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００又は７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施態様において、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であり得る。更に他の実施態様において、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは、例えば、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）であり得る。更なる実施態様において、シグナル増幅ペアの第２のメンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であり得る。好ましくは、増幅されたシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに転換する）ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼの酸化により発生する。活性化チラミドは、直接的に検出することができ、又は例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出することができる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア並びにストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬、例えば、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの組合せが含まれる。
【０１３６】
ある例において、セイヨウワサビペルオキシダーゼ及び第２の活性化状態非依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートさせることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５又は１００ｋＤａ）の分子量を有する。
【０１３７】
トランケート化受容体は、典型的には完全長受容体のフラグメントであり、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を完全長受容体と共有する。ある実施態様において、完全長受容体は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を含む。任意の特定の理論により拘束されるものではないが、トランケート化受容体は、完全長受容体のＥＣＤのタンパク質分解プロセシングを介し、又は例えば短縮ＥＣＤを有するトランケート化受容体又は膜関連もしくは細胞質ＩＣＤフラグメントを含むトランケート化受容体を作出するために、膜貫通ドメイン前、内又は後に局在するメチオニン残基からの翻訳の選択的開始により生じ得る。
【０１３８】
ある好ましい実施態様において、トランケート化受容体はｐ９５ＨＥＲ２であり、対応する完全長受容体はＨＥＲ２である。しかしながら、当業者であれば、トランケート化タンパク質を検出するための本明細書に記載の方法は、限定されるものではないが、ＥＧＦＲ　ＶＩＩＩ突然変異体（膠芽細胞腫、結腸直腸癌などに関与する）又は他のトランケー

ト化受容体チロシンキナーゼ、カスパーゼなどを含む多数の様々なタンパク質に適用することができることを認識する。開示が全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例１２は、優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックスハイスループット近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを使用して細胞中のトランケート化受容体、例えばｐ９５ＨＥＲ２を検出するための本発明のアッセイ方法の例示的な実施態様を提供している。

【０１３９】

一部の実施態様において、ＥＣＤ結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチンペアを含み、ストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している。ある例において、抗体は、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）のＥＣＤ結合領域に特異的である。

【０１４０】

一部の実施態様において、捕捉抗体の各希釈系列は、一連の減少する捕捉抗体濃度を含む。ある例において、捕捉抗体は、少なくとも２倍（例えば、２、５、１０、２０、５０、１００、５００又は１０００倍）で段階希釈されてアレイ上にスポットされるセット数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５以上）の減少する捕捉抗体濃度を含む希釈系列が生成される。好ましくは、各捕捉抗体希釈物の少なくとも２、３、４、５又は６個のレプリケートがアレイ上にスポットされる。

【０１４１】

他の実施態様において、固体担体は、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、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）など）、繊維束又は任意の他の好適な基体を含む。好ましい実施態様において、捕捉抗体は、ニトロセルロースポリマーによりコーティングされたガラススライド、例えば、Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）から市販されているＦＡＳＴ（商標）スライドなどの上に（例えば、共有結合又は非共有結合相互作用により）拘束される。

【０１４２】

更なる実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の活性化レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物のリン酸化レベルを検出すべき分析物のそれぞれのリン酸化形態に特異的な抗体により検出することを含む。

【０１４３】

リン酸化レベル及び／又は状態は、種々の技術のいずれかを使用して決定することができる。例えば、リン酸化タンパク質は、タンパク質のリン酸化形態を特異的に認識する抗体を使用する免疫アッセイにより検出することができることが当分野において周知である（例えば、Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９３：１３７２－１３８１（２００５））。免疫アッセイには、一般に、免疫ブロッティング（例えば、ウエスタンブロッティング）、ＲＩＡ及びＥＬＩＳＡが含まれる。免疫アッセイのより具体的なタイプには、抗原捕捉／抗原競合、抗体捕捉／抗原競合、二抗体サンドイッチ、抗体捕捉／抗体過剰及び抗体捕捉／抗原過剰が含まれる。抗体を作製する方法は、本明細書及びＨａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅ，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，１９８８，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ＵＳＡに記載されている。ホスホ特異的抗体は、デノボで作製することができ、又は市販もしくは非市販源から得ることができる。リン酸化レベル及び／又は状態は、細胞を［γ－^{32}Ｐ］ＡＴＰ又は［γ－^{33}Ｐ］ＡＴＰの形態の放射性リン酸で代謝標識することによっても決定することができる。リン酸化されたタンパク質は放射性になり、従ってシンチレーションカウンティング、ラジオグラフィーなどを介して追跡可能及び定量可能となる（例えば、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５３：７６０５－７６０８（１９７８）参照）。例えば、代謝標識されたタンパク質は、細胞から抽出し、ゲル電気泳動により分離し、

膜に転移させ、特定のＨＥＲ２シグナリング経路構成因子に特異的な抗体によりプロービングし、オートラジオグラフィーに供して^{32}Ｐ又は^{33}Ｐを検出することができる。あるいは、ゲルをオートラジオグラフィーに供してから膜転移及び抗体プロービングを行うことができる。

【０１４４】

特定の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の活性化（例えば、リン酸化）レベル及び／又は状態は、免疫アッセイ、例えば、単一検出アッセイ又は本明細書に記載の近接二重検出アッセイ（例えば、共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ））により検出される。

【０１４５】

ある実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の構成因子）の活性化（例えば、リン酸化）レベルの決定は、

（ｉ）細胞抽出物を捕捉抗体（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子に特異的な捕捉抗体）の希釈系列とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の捕捉された分析物を形成すること（捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている）（例えば、細胞抽出物中に存在する分析物を、分析物及び捕捉抗体を含む捕捉された分析物の複合体に転換すること）；

（ｉｉ）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非依存性抗体（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子に特異的な活性化状態非依存性抗体）及び対応する分析物に特異的な活性化状態依存性抗体（例えば、例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子に特異的な活性化状態依存性抗体）を含む検出抗体とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の検出可能な捕捉された分析物を形成すること（例えば、捕捉された分析物の複合体を、捕捉された分析物及び検出抗体を含む検出可能な捕捉された分析物の複合体に変換させること）；

（活性化状態非依存性抗体は、促進部分により標識されており、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進部分は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして（例えば、接触させて）増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む。

【０１４６】

ある他の実施態様において、トランケート化受容体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２）である工程（ｃ）における１種以上の分析物の活性化（例えば、リン酸化）レベルの決定は、

（ｉ）細胞抽出物を完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートする（例えば、接触させる）こと；

（ｉｉ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、これにより完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を除去して完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を欠く細胞抽出物を形成すること（例えば、細胞抽出物を、特定の完全長受容体又は完全長受容体のファミリーを欠く細胞抽出物に転換すること）；

（ｉｉｉ）完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）を欠く細胞抽出物を、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に特異的な複数の捕捉抗体とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の捕捉されたトランケート化受容体を形成すること（捕捉抗体は、固体担体上に拘束されている）（例えば、完全長受容体枯渇細胞抽出物中に存在するトランケート化受容体を、トランケート化受容体及び捕捉抗

体の複合体に転換すること）；
（ｉｖ）複数の捕捉されたトランケート化受容体を、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）のＩＣＤ結合領域に特異的な活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして（例えば、接触させて）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体を形成すること（例えば、捕捉されたトランケート化受容体の複合体を、捕捉されたトランケート化受容体及び検出抗体を含む検出可能な捕捉されたトランケート化受容体の複合体に転換すること）
（活性化状態非依存性抗体は、促進部分により標識されており、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進部分は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｖ）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体を、シグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして（例えば、接触させて）増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｖｉ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０１４７】

活性化状態非依存性抗体は、促進部分により直接的に標識でき、又は促進成分により、例えば活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドと促進成分にコンジュゲートされた相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより間接的に標識することができる。同様に、活性化状態依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識することができ、又はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、例えば活性化状態依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合により間接的に標識することができる。ある例において、結合ペアの第１のメンバーはビオチンであり、結合ペアの第２のメンバーはアビジン、例えばストレプトアビジン又はニュートラビジンである。

【０１４８】

一部の実施態様において、促進部分は、例えば、グルコースオキシダーゼであり得る。ある例において、グルコースオキシダーゼ及び活性化状態非依存性抗体は、例えば、開示が全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例１６～１７に記載のとおりスルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートさせることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約５００ｋＤａ（例えば、約２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００又は７５０ｋＤａ）の分子量を有する。他の実施態様において、酸化剤は、例えば過酸化水素（H_2O_2）であり得る。更に他の実施態様において、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは、例えば、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）であり得る。更なる実施態様において、シグナル増幅ペアの第２のメンバーは、例えば、チラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）であり得る。好ましくは、増幅されたシグナルは、活性化チラミドを生成する（例えば、ビオチン－チラミドを活性化チラミドに転換する）ビオチン－チラミドのペルオキシダーゼの酸化により発生する。活性化チラミドは、直接的に検出することができ、又は例えばシグナル検出試薬の添加に基づいて間接的に検出することができる。シグナル検出試薬の非限定的な例には、ストレプトアビジン標識フルオロフォア並びにストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬、例えば、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）などの組合せが含まれる。

【０１４９】

ある例において、セイヨウワサビペルオキシダーゼ及び活性化状態依存性抗体は、スルフヒドリル活性化デキストラン分子にコンジュゲートさせることができる。スルフヒドリル活性化デキストラン分子は、典型的には、約７０ｋＤａ（例えば、約４０、４５、５０

、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５又は１００ｋＤａ）の分子量を有する。

【０１５０】

トランケート化受容体は、典型的には完全長受容体のフラグメントであり、細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を完全長受容体と共有する。ある実施態様において、完全長受容体は、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域を含む。任意の特定の理論により拘束されるものではないが、トランケート化受容体は、完全長受容体のＥＣＤのタンパク質分解プロセシングを介し、又は例えば短縮ＥＣＤを有するトランケート化受容体又は膜関連もしくは細胞質ＩＣＤフラグメントを含むトランケート化受容体を作出するために、膜貫通ドメイン前、内又は後に局在するメチオニン残基からの翻訳の選択的開始により生じ得る。

【０１５１】

ある好ましい実施態様において、トランケート化受容体はｐ９５ＨＥＲ２であり、対応する完全長受容体はＨＥＲ２である。しかしながら、当業者であれば、トランケート化タンパク質を検出するための本明細書に記載の方法は、限定されるものではないが、ＥＧＦＲ　ＶＩＩＩ突然変異体（膠芽細胞腫、結腸直腸癌などに関与する）又は他のトランケート化受容体チロシンキナーゼ、カスパーゼなどを含む多数の様々なタンパク質に適用することができることを認識する。開示が全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例１２は、優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックスハイスループット近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡを使用して細胞中のトランケート化受容体、例えばｐ９５ＨＥＲ２を検出するための本発明のアッセイ方法の例示的な実施態様を提供している。

【０１５２】

一部の実施態様において、ＥＣＤ結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチンペアを含み、ストレプトアビジンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している。ある例において、抗体は、完全長受容体（例えば、完全長ＨＥＲ２）のＥＣＤ結合領域に特異的である。

【０１５３】

一部の実施態様において、捕捉抗体の各希釈系列は、一連の減少する捕捉抗体濃度を含む。ある例において、捕捉抗体は、少なくとも２倍（例えば、２、５、１０、２０、５０、１００、５００又は１０００倍）で段階希釈されてアレイ上にスポットされるセット数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５以上）の減少する捕捉抗体濃度を含む希釈系列が生成される。好ましくは、各捕捉抗体希釈物の少なくとも２、３、４、５又は６個のレプリケートがアレイ上にスポットされる。

【０１５４】

他の実施態様において、固体担体は、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、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）など）、繊維束又は任意の他の好適な基体を含む。好ましい実施態様において、捕捉抗体は、ニトロセルロースポリマーによりコーティングされたガラススライド、例えば、Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）から市販されているＦＡＳＴ（商標）スライドなどの上に（例えば、共有結合又は非共有結合相互作用により）拘束される。

【０１５５】

別の態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、

（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レ

ベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定すること
を含む方法を提供する。

【０１５６】

一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、例えば、近接アッセイ、例えば、本明細書に記載の共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）を使用して決定される、対象となる特定の分析物についてのシグナル強度に対応する相対蛍光単位（ＲＦＵ）値として表現される。他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現され、これらは、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される、対象となる特定の分析物についての増加するシグナル強度に対応する。一部の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、検出不能又はわずかに検出可能なレベルの発現又は活性化は「－」又は「±」として表現することができる。他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、低レベルの発現又は活性化は「＋」として表現することができる。更に他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、中程度のレベルの発現又は活性化は「＋＋」として表現することができる。更にいっそう他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋」として表現することができる。更なる例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、非常に高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋＋」として表現することができる。

【０１５７】

更に他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定されるＲＦＵ値を、対象となる特性の分析物について作成された標準曲線に対して較正又は正規化することにより定量される。ある例において、計算単位（ＣＵ）値を標準曲線に基づき計算することができる。他の例において、ＣＵ値は、シグナル強度について上記説明に従って、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現することができる。実施例１３は、胃癌細胞中のシグナル伝達経路タンパク質（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の定量についてのデータ分析の非限定的な例を提供する。

【０１５８】

ある実施態様において、対象となる特定の分析物の発現又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現される場合、例えば、陰性対照、例えば、ＩｇＧ対照と比較した場合、対象となる分析物について作成された標準曲線と比較した場合、陽性対照、例えば、ｐａｎ－ＣＫ対照と比較した場合、抗癌薬の存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合及び／又は抗癌薬の非存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合、参照発現レベル又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い又は低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い又は低い）発現又は活性化のレベルに対応し得る。一部の例において、相関は分析物特異的である。非限定的な例として、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定された発現又は活性化の「＋」レベルは、参照発現又は活性化レベルと比較した場合、ある分析物については発現又は活性化の２倍増加に、別の分析物については５倍増加に対応し得る。

【０１５９】

一部の実施態様において、癌細胞は、胃癌を有する対象から、対象への抗癌薬の投与後に単離される。他の実施態様において、単離された癌細胞は、抗癌薬と接触される。これらの実施態様のいずれにおいても、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答は、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより同定することができる。

【０１６０】

ある実施態様において、工程（ｂ）は、工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを適用して抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定することを含む。

【０１６１】

１つの特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性か非応答性かを同定すること

を含む方法を提供する。

【０１６２】

別の特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌の応答を同定する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較すること；並びに

（ｅ）１種以上の分析物について決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性である（例えば、胃腫瘍が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示すこと

を含む方法を提供する。

【０１６３】

ある例において、胃癌は腺癌である。ある他の例において、胃癌は、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している。

【０１６４】

一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％多く又は少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「変化した」とみなされる。他の実施態様において、１

種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。更なる実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、（１）抗癌薬を用いない分析物の高いもしくは強い発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の中程度、弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、又は（２）抗癌薬を用いない分析物の中程度の発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。

【０１６５】

インサイチュー活性化状態を保存するため、シグナル伝達タンパク質は、典型的には、細胞が単離された直後に、好ましくは９６、７２、４８、２４、６又は１時間以内に、より好ましくは３０、１５又は５分以内に抽出される。単離された細胞は、通常はナノモルからマイクロモル濃度の成長因子とともに約１～３０分間インキュベートしてシグナル伝達物質の活性化を復活させ、又は刺激することもできる（例えば、Ｉｒｉｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）参照）。刺激性成長因子には、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ヘレグリン（ＨＲＧ）、ＴＧＦ－α、ＰＩＧＦ、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、ＮＲＧ１、ＰＧＦ、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、サイトカインなどが含まれる。個々の患者のための潜在的抗癌療法を評価するため、成長因子の刺激前、刺激中及び／又は刺激後に、単離された細胞を変動する用量の１種以上の抗癌薬とインキュベートすることができる。成長因子の刺激は、数分間又は数時間（例えば、約１～５分間から約１～６時間）実施することができる。単離、抗癌薬による治療及び／又は成長因子刺激後、細胞は当分野において公知の任意の技術を使用して溶解されてシグナル伝達タンパク質が抽出される。好ましくは、細胞溶解は、成長因子刺激の約１～３６０分間後に、より好ましくは２つの異なる時間間隔で：（１）成長因子刺激の約１～５分間後；及び（２）成長因子刺激の約３０～１８０分後に開始される。あるいは、溶解物は、使用時まで－８０℃で貯蔵することができる。

【０１６６】

一部の実施態様において、抗癌薬は、癌細胞中の活性化シグナル伝達経路構成因子の機能を妨害する作用物質を含む。このような作用物質の非限定的な例には、上の表１に列挙した作用物質が含まれる。

【０１６７】

他の実施態様において、抗癌薬は、抗シグナリング剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）、例えば、モノクローナル抗体もしくはチロシンキナーゼ阻害剤；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又はアベラントな細胞、例えば、癌性細胞の脱制御された成長を低減又は無効にさせる能力を有する任意の他の化合物、例えば上記の抗癌剤を含む。更なる実施態様において、単離された細胞は、少なくとも１種の化学療法剤、例えば上記の抗癌剤と組み合わせて１種以上の抗シグナリング剤、抗増殖剤及び／又はホルモン療法剤により処理される。

【０１６８】

ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、正常細胞、例えば、癌、例えば、胃癌を有しない健常個体からの非癌性細胞から得られる。ある他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、癌、例えば、胃癌を有する患者からの試料からの腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞から得られる。

【０１６９】

一部の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば

、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、腫瘍細胞、例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）から得られる。特定の実施態様において、抗癌薬により処理されていない細胞は、細胞抽出物を生成するために使用される単離された細胞（例えば、調査すべき試験細胞）が得られる同一試料から得られる。ある例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の低いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性である（例えば、胃腫瘍が抗癌薬に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示す。ある他の例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性でない（例えば、胃腫瘍が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が減少する）ことを示す。

【０１７０】

代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に感受性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは低いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性である（例えば、胃腫瘍が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示す。ある他の代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に耐性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性でない（例えば、胃腫瘍が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が減少する）ことを示す。

【０１７１】

ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより高い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。

【０１７２】

他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより低い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２

～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍低い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。

【０１７３】

細胞抽出物における発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルについて調査することができる分析物、例えば、シグナル伝達分子の非限定的な例には、上記表２に示す分析物、例えば、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せなどが含まれる。

【０１７４】

一実施態様において、本発明の方法は、上記組合せに従う細胞抽出物中の以下の分析物の１種又は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２種の任意の組合せ又は１３種全ての発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：（１）ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ／ＥｒｂＢ１；（２）ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２；（３）ｐ９５ＨＥＲ２；（４）ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３；（５）ｃ－Ｍｅｔ；（６）ＩＧＦ１Ｒ；（７）ｃＫｉｔ；（８）ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）；（９）Ｓｈｃ；（１０）Ａｋｔ；（１１）ｐ７０Ｓ６Ｋ；（１２）ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２及び／又はＶＥＧＦＲ３）；及び（１３）ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＰＤＧＦＲＢ）。

【０１７５】

１つの特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）及びＳｈｃの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。更に別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及びＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。

【０１７６】

ある実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）の追加の分析物の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む。一部の実施態様において、１種以上の追加の分析物は、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）のシグナル伝達分子を含む。

【０１７７】

特定の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の追加の分析物の１種又は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上の任意の組合せの発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む：ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１

、ＰＤＫ２、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、ＥＰＨ－Ａ、ＥＰＨ－Ｂ、ＥＰＨ－Ｃ、ＥＰＨ－Ｄ、ＦＬＴ－３、ＴＩＥ－１、ＴＩＥ－２、ｃ－ＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ、ＰＩＰ２、ＰＩＰ３、ｐ２７、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、ＰＴＰ１Ｂ、ＰＴＰＮ１３、ＢＤＰ１など）、受容体二量体、他のＨＥＲ２シグナリング経路構成因子、他のｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子及びこれらの組合せ。

【０１７８】

一部の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞である。ある例において、腫瘍細胞は、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である。他の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、例えば、胃癌患者から得られた試料から単離される。試料の非限定的な例には、体液試料、例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及び／又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料などが含まれる。特定の実施態様において、試料は、全血、血清、血漿及び／又は腫瘍組織試料、例えば、胃腫瘍組織を含む。

【０１７９】

ある例において、本発明の方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を読取可能なフォーマットでユーザ（例えば、臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医）に提供する工程を更に含む。一部の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医に送付又は報告することを更に含むことができる。他の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果をコンピュータデータベース又は例えば実験室において情報を保存するための他の好適な機械もしくは装置に記録又は保存することを更に含むことができる。

【０１８０】

一部の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物の全量を、対応する分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む。特定の実施態様において、抗体は、検出すべき分析物の活性化状態にかかわらず分析物に結合し、すなわち、抗体は、分析物の非活性化及び活性化形態の両方を検出する。

【０１８１】

他の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の活性化レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物のリン酸化レベルを検出すべき分析物のそれぞれのリン酸化形態に特異的な抗体により検出することを含む。

【０１８２】

発現（例えば、全）レベルもしくは状態及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルもしくは状態は、種々の技術のいずれかを使用して決定することができる。特定の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現（例えば、全）及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベル又は状態は、免疫アッセイ、例えば、単一検出アッセイ又は本明細書に記載の近接二重検出アッセイ（例えば、共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ））により検出される。

【０１８３】

更に別の態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、

（ａ）単離癌細胞から生成される細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分

析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測すること
を含む方法を提供する。

【０１８４】

一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、例えば、近接アッセイ、例えば、本明細書に記載の共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）を使用して決定される、対象となる特定の分析物についてのシグナル強度に対応する相対蛍光単位（ＲＦＵ）値として表現される。他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現され、これらは、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される、対象となる特定の分析物についての増加するシグナル強度に対応する。一部の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、検出不能又はわずかに検出可能なレベルの発現又は活性化は「－」又は「±」として表現することができる。他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、低レベルの発現又は活性化は「＋」として表現することができる。更に他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、中程度のレベルの発現又は活性化は「＋＋」として表現することができる。更にいっそう他の例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋」として表現することができる。更なる例において、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定される対象となる特定の分析物の、非常に高レベルの発現又は活性化は「＋＋＋＋」として表現することができる。

【０１８５】

更に他の実施態様において、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルは、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定されるＲＦＵ値を、対象となる特性の分析物について作成された標準曲線に対して較正又は正規化することにより定量される。ある例において、計算単位（ＣＵ）値を標準曲線に基づき計算することができる。他の例において、ＣＵ値は、シグナル強度について上記説明に従って、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現することができる。実施例１３は、胃癌細胞中のシグナル伝達経路タンパク質（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の定量についてのデータ分析の非限定的な例を提供する。

【０１８６】

ある実施態様において、対象となる特定の分析物の発現又は活性化レベルは、「－」、「±」、「＋」、「＋＋」、「＋＋＋」又は「＋＋＋＋」として表現される場合、例えば、陰性対照、例えば、ＩｇＧ対照と比較した場合、対象となる分析物について作成された標準曲線と比較した場合、陽性対照、例えば、ｐａｎ－ＣＫ対照と比較した場合、抗癌薬の存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合及び／又は抗癌薬の非存在下で決定された発現もしくは活性化レベルと比較した場合、参照発現レベル又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い又は低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い又は低い）発現又は活性化のレベルに対応し得る。一部の例において、相関は分析物特異的である。非限定的な例として、例えば、近接アッセイ、例えば、ＣＯＰＩＡを使用して決定された発現又は活性化の「＋」レベルは、参照発現又は活性化レベルと比較した場合、ある分析物については発現又は活性化の２倍増加に、別の分析物については５倍増

加に対応し得る。

【０１８７】

一部の実施態様において、癌細胞は、対象への抗癌薬の投与後に胃癌を有する対象から単離される。他の実施態様において、単離された癌細胞は、抗癌薬と接触される。これらの実施態様のいずれにおいても、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答は、１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較することにより予測することができる。

【０１８８】

ある実施態様において、工程（ｂ）は、工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを適用して抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測することを含む。

【０１８９】

１つの特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性を予測すること

を含む方法を提供する。

【０１９０】

別の特定の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対する胃癌を有する対象の応答を予測する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；

（ｄ）工程（ｃ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成された１種以上の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性を予測すること；並びに

（ｅ）１種以上の分析物について決定された発現レベル及び／又は活性化レベルが参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して変化（例えば、実質的に減少）した場合、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性が高い（例えば、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示すことを含む方法を提供する。

【０１９１】

ある例において、胃癌は腺癌である。ある他の例において、胃癌は、食道、小腸、リンパ節、器官、骨又はこれらの組合せに転移している。

【０１９２】

一部の実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５％、１

０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％多く又は少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「変化した」とみなされる。他の実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、これが抗癌薬の非存在下よりも少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％少なく活性化された場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。更なる実施態様において、１種以上の分析物の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、（１）抗癌薬を用いない分析物の高いもしくは強い発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の中程度、弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、又は（２）抗癌薬を用いない分析物の中程度の発現及び／又は活性化からの、抗癌薬を用いる分析物の弱い、低いもしくは極めて弱い発現及び／又は活性化への変化が存在する場合、抗癌薬の存在下で「実質的に減少した」とみなされる。

【０１９３】

インサイチュー活性化状態を保存するため、シグナル伝達タンパク質は、典型的には、細胞が単離された直後に、好ましくは９６、７２、４８、２４、６又は１時間以内に、より好ましくは３０、１５又は５分以内に抽出される。単離された細胞は、通常はナノモルからマイクロモル濃度の成長因子とともに約１～３０分間インキュベートしてシグナル伝達物質の活性化を復活させ、又は刺激することもできる（例えば、Ｉｒｉｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１１８：２１７－２２８（２００４）参照）。刺激性成長因子には、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ヘレグリン（ＨＲＧ）、ＴＧＦ－α、ＰＩＧＦ、アンジオポエチン（Ａｎｇ）、ＮＲＧ１、ＰＧＦ、ＴＮＦ－α、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ、ＩＧＦ、ＦＧＦ、ＨＧＦ、サイトカインなどが含まれる。個々の患者のための潜在的抗癌療法を評価するため、成長因子の刺激前、刺激中及び／又は刺激後に、単離された細胞を変動する用量の１種以上の抗癌薬とインキュベートすることができる。成長因子の刺激は、数分間又は数時間（例えば、約１～５分間から約１～６時間）実施することができる。単離、抗癌薬による治療及び／又は成長因子刺激後、細胞は当分野において公知の任意の技術を使用して溶解されてシグナル伝達タンパク質が抽出される。好ましくは、細胞溶解は、成長因子刺激の約１～３６０分間後に、より好ましくは２つの異なる時間間隔で：（１）成長因子刺激の約１～５分間後；及び（２）成長因子刺激の約３０～１８０分後に開始される。あるいは、溶解物は、使用時まで－８０℃で貯蔵することができる。

【０１９４】

一部の実施態様において、抗癌薬は、癌細胞中の活性化シグナル伝達経路構成因子の機能を妨害する作用物質を含む。このような作用物質の非限定的な例には、上の表１に列挙した作用物質が含まれる。

【０１９５】

他の実施態様において、抗癌薬は、抗シグナリング剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）、例えばモノクローナル抗体もしくはチロシンキナーゼ阻害剤；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又はアベラントな細胞、例えば、癌性細胞の脱制御された成長を低減又は無効にさせる能力を有する任意の他の化合物、例えば、上記の抗癌剤を含む。更なる実施態様において、単離された細胞は、少なくとも１種の化学療法薬、例えば上記の抗癌剤と組み合わせて１種以上の抗シグナリング剤、抗増殖剤及び／又はホルモン療法剤により処理される。

【０１９６】

ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、正常細胞、例えば、癌、例えば、胃癌を有しない健常個体からの非癌性細胞から得られる。ある他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、癌、例えば、胃癌を有する患者からの試料からの腫瘍

細胞、例えば、胃癌細胞から得られる。

【０１９７】

一部の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、腫瘍細胞、例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）から得られる。特定の実施態様において、抗癌薬により処理されていない細胞は、細胞抽出物を生成するために使用される単離された細胞（例えば、調査すべき試験細胞）が得られる同一試料から得られる。ある例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の低いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性が高い（例えば、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示す。ある他の例において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性が低い（例えば、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が減少する）ことを示す。

【０１９８】

代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に感受性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは低いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に応答する可能性が高い（例えば、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が増加する）ことを示す。ある他の代替的実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の参照発現又は活性化レベルは、抗癌薬により処理された、抗癌薬に耐性の細胞から得られる。このような実施態様において、参照発現又は活性化レベルと比較して１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の同一、類似もしくは高いレベルの発現又は活性化の存在は、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性が低い（例えば、胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性又は確率が減少する）ことを示す。

【０１９９】

ある実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより高い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例えば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍高い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍高い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。

【０２００】

他の実施態様において、工程（ｃ）において決定される、１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）のより低い発現又は活性化レベルは、発現又は活性化レベルが、抗癌薬により処理されていない細胞（例え

ば、患者試料から得られた胃癌細胞）中の、抗癌薬により処理された抗癌薬感受性細胞中の、又は抗癌薬により処理された抗癌薬耐性細胞中の対応する分析物の参照発現又は活性化レベルよりも少なくとも約１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又は１００倍低い（例えば、約１．５～３、２～３、２～４、２～５、２～１０、２～２０、２～５０、３～５、３～１０、３～２０、３～５０、４～５、４～１０、４～２０、４～５０、５～１０、５～１５、５～２０又は５～５０倍低い）場合に細胞抽出物に存在するとみなされる。

【０２０１】

細胞抽出物における発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルについて調査することができる分析物、例えば、シグナル伝達分子の非限定的な例には、上記表２に示す分析物、例えば、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せなどが含まれる。

【０２０２】

一実施態様において、本発明の方法は、上記組合せに従う細胞抽出物中の以下の分析物の１種又は２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２種の任意の組合せ又は１３種全ての発現（例えば、全量）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む：（１）ＨＥＲ１／ＥＧＦＲ／ＥｒｂＢ１；（２）ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２；（３）ｐ９５ＨＥＲ２；（４）ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３；（５）ｃ－Ｍｅｔ；（６）ＩＧＦ１Ｒ；（７）ｃＫｉｔ；（８）ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）；（９）Ｓｈｃ；（１０）Ａｋｔ；（１１）ｐ７０Ｓ６Ｋ；（１２）ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２及び／又はＶＥＧＦＲ３）；及び（１３）ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＰＤＧＦＲＢ）。

【０２０３】

１つの特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）及びＳｈｃの発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。更に別の特定の実施態様において、本発明は、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ及び／又はＰＩＫ３Ｒ１）、Ｓｈｃ、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、２及び／又は３）及びＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ及び／又はＢ）の発現（例えば全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを含む。

【０２０４】

ある実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）の追加の分析物の発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む。一部の実施態様において、１種以上の追加の分析物は、受容体チロシンキナーゼ、非受容体チロシンキナーゼ、チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成因子、核ホルモン受容体、核受容体コアクチベーター、核受容体リプレッサー及びこれらの組合せからなる群から選択される１種以上（例えば、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上）のシグナル伝達分子を含む。

【０２０５】

特定の実施態様において、本発明は、細胞抽出物中の以下の追加の分析物の１種又は２

、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０種以上の任意の組合せの発現（例えば、全）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルを決定することを更に含む：ＨＥＲ４、ＭＥＫ、ＰＴＥＮ、ＳＧＫ３、４Ｅ－ＢＰ１、ＥＲＫ２（ＭＡＰＫ１）、ＥＲＫ１（ＭＡＰＫ３）、ＰＤＫ１、ＰＤＫ２、ＧＳＫ－３β、Ｒａｆ、ＳＲＣ、ＮＦｋＢ－ＩｋＢ、ｍＴＯＲ、ＥＰＨ－Ａ、ＥＰＨ－Ｂ、ＥＰＨ－Ｃ、ＥＰＨ－Ｄ、ＦＬＴ－３、ＴＩＥ－１、ＴＩＥ－２、ｃ－ＦＭＳ、Ａｂｌ、ＦＴＬ３、ＲＥＴ、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＧＦＲ４、ＥＲ、ＰＲ、ＮＣＯＲ、ＡＩＢ１、ＲＯＮ、ＰＩＰ２、ＰＩＰ３、ｐ２７、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、ＰＴＰ１Ｂ、ＰＴＰＮ１３、ＢＤＰ１など）、受容体二量体、他のＨＥＲ２シグナリング経路構成因子、他のｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子及びこれらの組合せ。

【０２０６】

一部の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞である。ある例において、腫瘍細胞は、腫瘍から得られた循環腫瘍細胞又は細針吸引液（ＦＮＡ）細胞である。他の実施態様において、細胞（例えば、細胞抽出物が生成される試験細胞）は、例えば、胃癌患者から得られた試料から単離される。試料の非限定的な例には、体液試料、例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、骨髄吸引液、尿、唾液及び／又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料などが含まれる。特定の実施態様において、試料は、全血、血清、血漿及び／又は腫瘍組織試料、例えば、胃腫瘍組織を含む。

【０２０７】

ある例において、本発明の方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を読取可能なフォーマットでユーザ（例えば、臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医）に提供する工程を更に含む。一部の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果を臨床医、例えば、癌専門医又は一般診療医に送付又は報告することを更に含むことができる。他の例において、本方法は、工程（ｄ）において得られた比較の結果をコンピュータデータベース又は例えば実験室において情報を保存するための他の好適な機械又はデバイスに記録又は保存することを更に含むことができる。

【０２０８】

一部の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物の全量を、対応する分析物に特異的な１種以上の抗体により検出することを含む。特定の実施態様において、抗体は、検出すべき分析物の活性化状態にかかわらず分析物に結合し、すなわち、抗体は、分析物の非活性化及び活性化形態の両方を検出する。

【０２０９】

他の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の活性化レベルの決定は、細胞抽出物中の１種以上の分析物のリン酸化レベルを検出すべき分析物のそれぞれのリン酸化形態に特異的な抗体により検出することを含む。

【０２１０】

発現（例えば、全）レベルもしくは状態及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルもしくは状態は、種々の技術のいずれかを使用して決定することができる。特定の実施態様において、工程（ｃ）における１種以上の分析物（例えば、１種以上のＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路構成因子）の発現（例えば、全）及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベル又は状態は、免疫アッセイ、例えば、単一検出アッセイ又は本明細書に記載の近接二重検出アッセイ（例えば、共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ））により検出される。

【０２１１】

ＩＶ．ｃ－Ｍｅｔ媒介癌

ｃ－Ｍｅｔは、多くの悪性腫瘍において過剰発現され得る。ｃ－Ｍｅｔ媒介癌において、チロシンキナーゼドメイン、膜近傍ドメイン又はセマホリン内の増幅及び／又は活性化突然変異が同定されている。ｃ－Ｍｅｔ媒介癌の治療に好適な抗癌薬の選択は、治療の存在下でのｃ－Ｍｅｔの発現及び／又は活性化状態のレベルを査定することにより可能である。ｃ－Ｍｅｔの活性化は、細胞成長、浸潤、血管新生及び転移をもたらす。ある実施態様において、本発明は、適切な治療方針を選択してｃ－Ｍｅｔ活性化及び／又は過剰発現を阻害する方法を提供する。

【０２１２】

一実施態様において、本発明は、ｃ－Ｍｅｔ媒介癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、

（ａ）単離癌細胞から生成された細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づきｃ－Ｍｅｔ媒介癌の治療に好適な抗癌薬を選択すること

を含む方法を提供する。

【０２１３】

一部の例において、本発明は、ｃ－Ｍｅｔ媒介癌の治療に好適な抗癌薬を選択する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｄ）工程（ｃ）において決定されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して抗癌薬がｃ－Ｍｅｔ媒介癌の治療に好適か不適かを決定すること

を含む方法を提供する。

【０２１４】

別の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌の応答を同定する方法であって、

（ａ）単離癌細胞から生成された細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌の応答を同定すること

を含む方法を提供する。

【０２１５】

一部の例において、本発明は、抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌の応答を同定する方法であって、

（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；

（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；

（ｃ）細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに

（ｄ）工程（ｃ）において決定されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌が抗癌薬による治療に対して応答性か非応答性かを同定すること

を含む方法を提供する。

【０２１６】

更に別の実施態様において、本発明は、抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌を

有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）単離癌細胞から生成された細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｂ）工程（ａ）において決定された１種以上の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルに基づき抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌を有する対象の応答を予測すること
を含む方法を提供する。
【０２１７】
一部の例において、本発明は、抗癌薬による治療に対するｃ－Ｍｅｔ媒介癌を有する対象の応答を予測する方法であって、
（ａ）抗癌薬の投与後又は抗癌薬とのインキュベーション前に癌細胞を単離すること；
（ｂ）単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成すること；
（ｃ）細胞抽出物中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを決定すること；並びに
（ｄ）工程（ｃ）において決定されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の発現レベル及び／又は活性化レベルを、抗癌薬の非存在下で作成されたｃ－Ｍｅｔ及び場合により１種以上の追加の分析物の参照発現及び／又は活性化プロファイルと比較して胃癌を有する対象が抗癌薬による治療に対して応答する可能性を予測すること
を含む方法を提供する。
【０２１８】
ある態様において、本発明は、患者試料、例えば、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）又は細針吸引液（ＦＮＡ）におけるｃ－Ｍｅｔ媒介癌経路を評価する方法を提供する。本明細書の方法は、患者に最適な治療方針を提供する。一態様において、以下の追加の分析物の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９種以上をスクリーニング又は調査してｃ－Ｍｅｔ媒介癌療法（例えば、ｃ－Ｍｅｔ阻害剤）に対する応答を決定することができる：ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ（例えば、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＩＫ３Ｒ１）、Ｓｈｃ、Ａｋｔ（例えば、Ａｋｔ１、Ａｋｔ２、Ａｋｔ３）、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ（例えば、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３）、ＰＤＧＦＲ（例えば、ＰＤＧＦＲＡ、ＰＤＧＦＲＢ）、ＲＯＮ及びこれらの組合せ。例えば、ＸＬ－８８０に対する応答者は、活性化ｃ－Ｍｅｔ及びＶＥＧＦＲ２を有する一方、非応答者は、活性化ＲＴＫの組合せを有する。
【０２１９】
ある他の例において、本明細書に提供される方法は、胃癌の治療のための組合せ療法の選択において有用である。例えば、活性化ｃ－ＭＥＴ、ＶＥＧＦＲ２及びＥＧＦＲを有する胃癌患者は、Ｉｒｅｓｓａ（商標）及びＸＬ８８０の組合せにより連続的に治療することができる一方、活性化ｃ－ＭＥＴ、ＶＥＧＦＲ２、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３を有する胃癌患者は、Ｔｙｋｅｒｂ（商標）＋ＸＬ８８０により治療することができる。
【０２２０】
腫瘍細胞において、ｃ－Ｍｅｔ活性化は、細胞成長、増殖、浸潤及びアポトーシスからの保護をもたらす多様な系列のシグナリングカスケードの誘引を引き起こすと考えられている。細胞及び動物腫瘍モデルからのデータは、ｃ－Ｍｅｔ媒介癌の腫瘍発生についての根底となる生物学的機序は、典型的には、３つの異なる様式において達成されることを示唆している：（１）ＨＧＦ／ｃ－Ｍｅｔ自己分泌ループの確立によるもの；（２）ｃ－Ｍｅｔ又はＨＧＦ過剰発現を介するもの；及び（３）ｃ－Ｍｅｔ受容体コード配列におけるキナーゼ活性化突然変異の存在下におけるもの。ＨＧＦ及びｃ－Ｍｅｔの過剰発現は、腫瘍の悪性度増加及び癌患者の不良な予後兆候の指標である。ＨＧＦ／ｃ－Ｍｅｔシグナリングは、内皮細胞における増殖及び遊走を誘導することにより、重要なプロ血管新生因子である血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）の発現を誘導することにより、並びに血管新生の負の調節因子であるトロンボスポンジン１（ＴＳＰ－１）を顕著に下方調節することにより

、腫瘍血管新生を誘導する。ＨＧＦ及びｃ－Ｍｅｔ発現は、ほとんどの固形腫瘍の腫瘍生検において観察されており、ｃ－Ｍｅｔシグナリングは、広範なヒト悪性腫瘍、例えば、胃癌（胃癌）、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、胃癌、頭頸部癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌及び甲状腺癌並びに種々の肉腫、造血悪性腫瘍及び黒色腫において確認されている。中でも注目すべきは、ｃ－Ｍｅｔのチロシンキナーゼドメインの活性化突然変異は、乳頭状腎臓癌の遺伝型を有する患者において明確に同定されており、ｃ－Ｍｅｔがヒト腫瘍発生に直接関与していることを示す。

【０２２１】

ある実施態様において、本発明は、特異的マルチプレックスハイスループットアッセイにおいて、腫瘍組織に由来する腫瘍細胞又は固形腫瘍の循環細胞中のｃ－Ｍｅｔ及び場合により複数の脱調節されたシグナル伝達物質の発現及び活性化状態を検出する方法を提供する。本発明はまた、適切な治療を選択して１種以上の脱調節されたシグナリング経路を下方調節し、又は停止させるための方法及び組成物を提供する。従って、本発明の実施態様は、所与の患者腫瘍、例えば胃腫瘍中の活性化シグナル伝達タンパクの回収により提供される特定の分子シグネチャーに基づきパーソナライズされた治療の設計を促進するために使用することができる。

【０２２２】

一部の実施態様において、抗癌薬（例えば、ｃ－Ｍｅｔ媒介癌、例えば胃癌の治療に好適な１種以上の抗癌薬）は、抗シグナリング剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）、例えばモノクローナル抗体又はチロシンキナーゼ阻害剤；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又はアベラントな細胞、例えば、癌性細胞の脱制御された成長を低減又は無効にさせる能力を有する任意の他の化合物を含む。一部の実施態様において、単離された細胞は、少なくとも１種の化学療法剤と組み合わせて１種以上の抗シグナリング剤、抗増殖剤及び／又はホルモン療法剤により処理される。

【０２２３】

ある実施態様において、抗体、例えばＨＧＦ－又はｃ－Ｍｅｔ特異的抗体は、リガンド／受容体結合を妨げ、増殖を阻害し、アポトーシスを向上させることにより成長阻害及び腫瘍退縮をもたらす。一部の例において、モノクローナル抗体の組合せを使用することもできる。モノクローナル抗体を使用する方針により、ＨＧＦ／ｃ－Ｍｅｔに対する排他的な特異性、小分子キナーゼ阻害剤と比較して比較的長い半減期及び腫瘍細胞に対して宿主免疫応答を誘発する潜在性が許容される。ＡＭＧ１０２は、ＨＧＦに選択的に結合し、これを中和し、これによりｃ－Ｍｅｔに対するこの結合及び後続の活性化を妨げる完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体である。ＡＭＧ１０２は、種々の標準化学療法剤、例えば、テモゾロミド及びドセタキセルの効果を、組み合わせた場合にインビトロ及びゼノグラフトにおいて向上させることが示されている。ＭｅｔＭＡｂは、アゴニストモノクローナル抗体５Ｄ５に由来するヒト化一価アンタゴニスト抗ｃ－Ｍｅｔ抗体である。ＭｅｔＭＡｂは、ｃ－Ｍｅｔに高い親和性で結合し、ｃ－Ｍｅｔとともに細胞表面上に残留し、ＨＧＦ結合及び後続のｃ－Ｍｅｔリン酸化並びに下流シグナリング活性及び細胞応答を妨げる。近年の前臨床試験は、ＭｅｔＭＡｂが、ヒト癌における治療抗体として、特にＥＧＦＲ及び／又はＶＥＧＦ阻害剤との組合せにおいて有望な強力な抗ｃ－Ｍｅｔ阻害剤であることを示している。

【０２２４】

ｃ－Ｍｅｔの小分子阻害剤には、限定されるものではないが、ｃ－Ｍｅｔ受容体に高度に選択的な非ＡＴＰ競合剤であるＡＲＱ１９７（ＡｒＱｕｌｅ）が含まれる。他の選択的ｃ－Ｍｅｔ阻害剤が初期臨床評価に近年登録されており、以下のものを含む：ｃ－Ｍｅｔの触媒活性の小分子ＡＴＰ競合阻害剤であるＪＮＪ－３８８７７６０５（Ｊｏｈｎｓｏｎ　＆　Ｊｏｈｎｓｏｎ）；＞１５０種のタンパク質キナーゼのスクリーニングパネルと比較してｃ－Ｍｅｔについて＞１０００倍の選択率の経口利用可能なｃ－ＭｅｔのＡＴＰ競合小分子阻害剤であるＰＦ－０４２１７９０３（Ｐｆｉｚｅｒ）；２１３種のタンパク質

キナーゼのスクリーニングパネルにおける全ての他のキナーゼと比べてｃ－Ｍｅｔについて＞１０００倍の選択率及びヒトゼノグラフトモデルにおいて経口投与された場合に明らかな毒性を示さずに強力な抗腫瘍活性を有するｃ－Ｍｅｔの別の高度に選択的なＡＴＰ競合阻害剤であるＳＧＸ５２３（ＳＧＸ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）。

【０２２５】

ＧＳＫ１３６３０８９／ＸＬ８８０（Ｅｘｅｌｉｘｉｓ）は、０．４ｎＭのＩＣ５０においてｃ－Ｍｅｔを標的とするｃ－Ｍｅｔの小分子阻害剤の別の例である。ｃ－Ｍｅｔ及びＶＥＧＦＲ２の両方に対する結合親和性は高く、キナーゼにおける立体構造変化を引き起してＸＬ８８０をＡＴＰ結合ポケットにより深く移動させる。標的時間は、両方の受容体について＞２４時間である。ＸＬ８８０は、良好な経口バイオアベイラビリティを有し、これはＣＹＰ４５０基質であるが、阻害剤又は誘導因子ではない。２種の第１相臨床試験は、ＸＬ８８０の異なる投与スケジュールを試験し、５日投与／９日非投与のスケジュール（試験１）又は固定１日用量（試験２）としてのいずれかである。ＸＬ８８０は、異なる時点において増殖及び生存のための２種の協力経路に作用し、腫瘍血管新生への初期攻撃に対する腫瘍応答のための治療解決策を既に提供する。第２相試験は、乳頭状腎臓癌、胃癌及び頭頸部癌を含む複数の腫瘍タイプにおいて出発した。

【０２２６】

ＸＬ１８４（Ｅｘｅｌｉｘｉｓ）は、ｃ－Ｍｅｔ及びＶＥＧＦＲ２の強力な阻害が前臨床モデルにおいて実証されている新規の経口投与される小分子抗癌化合物である。ＭＰ４７０（ＳｕｐｅｒＧｅｎ）は、ｃ－Ｍｅｔ並びにｃ－Ｋｉｔの突然変異形態、突然変異ＰＤＧＦＲａ及び突然変異Ｆｌｔ－３を含むいくつかの他のタンパク質チロシンキナーゼ標的に対して阻害活性を有する新規の経口投与可能な小分子である。ＭＧＣＤ２６５（Ｍｅｔｈｙｌｇｅｎｅ）は、ｃ－Ｍｅｔ、Ｒｏｎ、ＶＥＧＦＲ及びＴｉｅ－２酵素活性をインビトロで強力に阻害し、ＨＧＦ依存性細胞エンドポイント、例えば、細胞散乱及び創傷治癒並びにＶＥＧＦ依存性応答、例えばインビトロ血管新生及びインビボ血管浸透性を無効にすることが報告されている。ＭＫ－２４６１（Ｍｅｒｃｋ）は、ｃ－Ｍｅｔが構成的にリン酸化されるＭＥＴ遺伝子が増幅された前臨床モデルにおいて特に活性であるｃ－Ｍｅｔ、ＫＤＲ、ＦＧＦＲ１／２／３及びＦｌｔ１／３／４の強力な阻害剤である。ＭＫ－２４６１は、前期第１相評価において十分に忍容されている。

【０２２７】

ある例において、ｃ－Ｍｅｔ受容体に対するＨＧＦリガンドの結合は、デコイ又はアンタゴニストとして作用することができるＨＧＦ又はｃ－Ｍｅｔの下位領域により阻害することができる。これらのデコイ及びアンタゴニストは、ｃ－Ｍｅｔ活性化をもたらすことなくリガンド又は受容体と化学量論的に競合し、これにより下流経路の活性化及び生物学的アウトカムを妨げる。いくつかのＨＧＦ及びｃ－Ｍｅｔ変種は、インビトロ及びインビボの両方でアンタゴニストとして実験的に立証されており、リガンド結合を遮断し、又はｃ－Ｍｅｔ二量体化を妨げることにより機能する。更に、ｃ－Ｍｅｔ結合についてＨＧＦと競合することが示されているＨＧＦに対する分子アナログが開発されている。

【０２２８】

Ｖ．抗体アレイの構築

ある態様において、腫瘍細胞、例えば、胃癌細胞の細胞抽出物中の分析物（例えば、シグナル伝達分子）の１種以上（例えば、複数）の発現レベル及び／又は活性化状態は、固体担体上に拘束された捕捉抗体の希釈系列を含む抗体ベースのアレイを使用して検出される。これらのアレイは、典型的には、異なるアドレス可能な位置における固体担体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度で複数の異なる捕捉抗体を含む。

【０２２９】

１つの特定の実施態様において、本発明は、固体担体上に拘束された捕捉抗体の複数の希釈系列を含む優れたダイナミックレンジを有するアドレス可能なアレイであって、各希釈系列における捕捉抗体は、シグナル伝達経路の構成因子及び他の標的タンパク質に対応する１種以上の分析物に特異的であるアレイを提供する。種々の態様において、この実施

態様には、特定の腫瘍に特徴的なシグナル伝達経路、例えば、胃癌細胞において活性であるシグナル伝達経路（例えば、ＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔ経路）の構成因子を含むアレイが含まれる。従って、本発明は、有利には、胃癌をもたらす潜在的な発現又は活性化の欠陥を有する対象となる各シグナル伝達分子又は他のタンパク質が単一のアレイ又はチップ上で提示されて実施することができる。一部の態様において、特定の腫瘍細胞中で活性である所与のシグナル伝達経路の構成因子は、細胞内のシグナル伝達経路を通って情報が伝えられる配列に対応する直鎖状配列でアレイ化されている。このようなアレイの例は、本明細書に記載されており、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の図５～９にも示されている。特定の腫瘍細胞中で活性である所与のシグナル伝達経路の１種以上の構成因子に特異的な捕捉抗体は、無作為式でプリントしてあらゆる表面関連アーチファクトを最小化することもできる。

【０２３０】

固体担体は、タンパク質を固定化するために任意の好適な基体を含むことができる。固体担体の例には、限定されるものではないが、ガラス（例えば、ガラススライド）、プラスチック、チップ、ピン、フィルター、ビーズ、紙、膜、繊維束、ゲル、金属、セラミックなどが含まれる。膜、例えば、ナイロン（Ｂｉｏｔｒａｎｓ（商品名）、ＩＣＮ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ Ｉｎｃ．（Ｃｏｓｔａ Ｍｅｓａ，ＣＡ；Ｚｅｔａ－Ｐｒｏｂｅ（商標）、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ））、ニトロセルロース（Ｐｒｏｔｒａｎ（商標）、Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ Ｐａｒｋ，ＮＪ））及びＰＶＤＦ（Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ（商品名）、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐ．（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ））は、本発明のアレイにおける固体担体として使用するのに好適である。好ましくは、捕捉抗体は、ニトロセルロースポリマーによりコーティングされたガラススライド、例えば、Ｗｈａｔｍａｎ Ｉｎｃ．（Ｆｌｏｒｈａｍ Ｐａｒｋ，ＮＪ）から市販されているＦＡＳＴ（商標）スライド上で拘束される。

【０２３１】

望ましい固体担体の特定の態様には、大量の捕捉抗体に結合する能力及び最小の変性で捕捉抗体に結合する能力が含まれる。別の好適な態様は、固体担体が、捕捉抗体を含有する抗体溶液が担体に適用される場合に最小の「ウィッキング」を示すことである。最小のウィッキングを有する固体担体は、担体に適用された捕捉抗体溶液の小量のアリコートが固定化された捕捉抗体の小さい規定スポットをもたらすことを可能にする。

【０２３２】

捕捉抗体は、典型的には、共有結合又は非共有結合相互作用（例えば、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、双極子間結合）を介して固体担体上に直接的又は間接的に（例えば、捕捉タグにより）拘束される。一部の実施態様において、捕捉抗体は、標準架橋方法及び条件を使用してホモ二官能性又はヘテロ二官能性架橋剤を使用して固体担体に共有結合される。好適な架橋剤は、例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）などの製造供給元から市販されている。

【０２３３】

本発明における使用に好適なアレイを作製するための方法には、限定されるものではないが、タンパク質又は核酸アレイを構築するために使用される任意の技術が含まれる。一部の実施態様において、捕捉抗体は、典型的にはスプリットピン、ブラントピン又はインクジェット印刷を備えたロボット型プリンタである、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。本明細書に記載の抗体アレイをプリントするのに好適なロボットシステムには、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）並びにＢｉｏＲｏｂｉｃｓ（Ｗｏｂｕｒｎ，ＭＡ）及びＰａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏ（Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）から入手可能な他のロボット型プリンタが含まれる。好ましくは、各捕捉抗体希釈物の少なくとも２、３、４、５又は６個のレプリケートがアレイ上にス

ポットされる。

【０２３４】

本発明における使用に好適なアレイを作製する別の方法は、担体上に規定容量の液体を引き出すために有効な条件下で固体担体上に毛細管ディスペンサを接触させることにより、それぞれの選択されたアレイ位置において既知容量の捕捉抗体希釈物を分注する工程を含み、このプロセスは完全アレイを作出するためにそれぞれの選択されたアレイ位置において選択された捕捉抗体希釈物を使用して繰り返される。本方法は、複数のこのようなアレイの形成において実施することができ、溶液堆積工程は各反復サイクルにおいて複数の固体担体それぞれの上の選択された位置に適用される。このような方法の更なる説明は、例えば、米国特許第５，８０７，５２２号に見出すことができる。

【０２３５】

ある例において、紙上に印刷するための装置を使用して抗体アレイを作製することができる。例えば、望ましい捕捉抗体希釈物は、デスクトップ型ジェットプリンタのプリントヘッド内に装填し、好適な固体担体上にプリントすることができる（例えば、Ｓｉｌｚｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，４４：２０３６－２０４３（１９９８）参照）。

【０２３６】

一部の実施態様において、固体担体上で作製されたアレイは、少なくとも約５スポット／ｃｍ^2、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もしくは９０００又は１００００スポット／ｃｍ^{2}の密度を有する。

【０２３７】

ある例において、固体担体上のスポットはそれぞれ、異なる捕捉抗体を表す。ある他の例において、固体担体上の複数のスポットは、例えば、一連の減少する捕捉抗体濃度を含む希釈系列と同一の捕捉抗体を表す。

【０２３８】

固体担体上で抗体アレイを調製及び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号及び第７，１９２，７２０号；米国特許出願公開第２００６０１１５８１０号、第２００６０２６３８３７号、第２００６０２９２６８０号及び第２００７００５４３２６号；並びにＶａｒｎｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６４：１６１－１７２（２００４）に記載されている。

【０２３９】

抗体アレイをスキャンする方法は当分野において公知であり、この方法には、制限されることなく、タンパク質又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が含まれる。本発明における使用に好適な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）及び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を定量のためにＩｍａＧｅｎｅソフトウエアとともに使用できる。

【０２４０】

ＶＩ．単一検出アッセイ

一部の実施態様において、細胞、例えば腫瘍細胞の細胞抽出物中の対象となる１種以上の分析物（例えば、１種以上のシグナル伝達分子、例えば、ＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅ

ｔシグナリング経路の１種以上の構成因子）の発現及び／又は活性化レベルを検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックスハイスループット２抗体アッセイである。非限定的例として、本アッセイにおいて使用される２種の抗体は：（１）対象となる特定の分析物に特異的な捕捉抗体；及び（２）分析物の活性化形態に特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態依存性抗体）を含むことができる。活性化状態依存性抗体は、例えば、分析物のリン酸化、ユビキチン化及び／又は複合体化状態を検出することができる。あるいは、検出抗体は、細胞抽出物中の分析物の全量を検出する、活性化状態非依存性抗体を含む。活性化状態非依存性抗体は、一般に、分析物の活性化及び非活性化形態の両方を検出することができる。

【０２４１】

１つの特定の実施態様において、対象となる分析物の発現又は活性化レベルを検出するための２抗体アッセイは：

（ｉ）細胞抽出物を捕捉抗体の１種又は複数の希釈系列と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こと；

（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な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こと（検出抗体は、分析物の活性化（例えば、リン酸化）レベルを検出するための活性化状態依存性抗体又は分析物の発現レベル（例えば、全量）を検出するための活性化状態非依存性抗体を含む）；

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物を、シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む。

【０２４２】

本明細書に記載の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ける固体担体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度において複数の異なる捕捉抗体を含む抗体ベースのアレイである。本発明における使用に好適な固体担体の例は、上述されている。

【０２４３】

捕捉抗体及び検出抗体は、好ましくは、分析物結合に関するこれらの間の競合を最小化するように選択される（すなわち、捕捉及び検出抗体の両方は、これらの対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる）。

【０２４４】

一実施態様において、検出抗体は結合ペアの第１のメンバー（例えば、ビオチン）を含み、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは結合ペアの第２のメンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。結合ペアメンバーは、当分野において周知の方法を使用して、検出抗体に、又はシグナル増幅ペアの第１のメンバーに直接的又は間接的に結合させることができる。ある例において、シグナル増幅ペアの第１のメンバー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、チトクロームｃペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、デヨージナーゼなど）であり、シグナル増幅ペアの第２のメンバーはチラミド試薬（例えば、ビオチン－チラミド）である。これらの例において、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化チラミドを生成するためのチラミド試薬のペルオキシダーゼ酸化により発生する。

【０２４５】

活性化チラミドは、直接的に検出され、又はシグナル検出試薬、例えば、ストレプトアビジン標識フルオロフォア又はストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬の組合せなどの添加に基づいて検出される。本発明における使用に好適なフルオロフォアの例には、限定されるものではないが、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）色素（例えば、Ａ

ｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）５５５）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオル（ｆｌｕｏｒ）（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などが含まれる。ストレプトアビジン標識は、当分野において周知の方法を使用してフルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接的又は間接的に結合させることができる。本発明における使用に好適な発色試薬の非限定的な例には、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）、２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）、４－クロロ－１－ナフトール（４ＣＮ）及び／又はポルフィリノーゲンが含まれる。

【０２４６】

本明細書に記載の２抗体アッセイを実施するための例示的なプロトコールは、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例３に提供されている。

【０２４７】

２抗体アプローチの別の実施態様において、本発明は、トランケート化受容体の発現又は活性化レベルを検出する方法であって：

（ｉ）細胞抽出物を完全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートすること；

（ｉｉ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、これにより完全長受容体を除去して完全長受容体を欠く細胞抽出物を形成すること；

（ｉｉｉ）完全長受容体を欠く細胞抽出物を、完全長受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に特異的な１種又は複数の捕捉抗体の希釈系列とインキュベートして複数の捕捉されたトランケート化受容体を形成すること；

（ｉｖ）複数の捕捉されたトランケート化受容体を、完全長受容体のＩＣＤ結合領域に特異的な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トランケート化受容体を形成すること（検出抗体は、トランケート化受容体の活性化（例えば、リン酸化）レベルを検出するための活性化状態依存性抗体又はトランケート化受容体の発現レベル（例えば、全量）を検出するための活性化状態非依存性抗体を含む）；

（ｖ）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体を、シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｖｉ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む方法を提供する。

【０２４８】

ある実施態様において、トランケート化受容体はｐ９５ＨＥＲ２であり、完全長受容体はＨＥＲ２である。ある他の実施態様において、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチンペアを含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している（例えば、抗体は、完全長受容体のＥＣＤ結合領域に特異的である）。

【０２４９】

全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の図１４Ａは、対象となる受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に向けられた抗体によりコーティングされたビーズが全長受容体（例えば、ＨＥＲ２）には結合するが、トランケート化受容体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２）には結合せずにあらゆる全長受容体を本アッセイから除去することを示している。ＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の図１４Ｂは、トランケート化受容体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２）が捕捉抗体に結合すると、次いで完全長受容体（例えば、ＨＥＲ２）の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）に特異的な検出抗体により検出することができることを示している。検出抗体は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に直接的にコンジュゲートさせることができる。次

いで、チラミドシグナル増幅（ＴＳＡ）を実施して検出すべきシグナルを発生させることができる。トランケート化受容体（例えば、ｐ９５ＨＥＲ２）の発現レベル又は活性化状態は、例えば、この全濃度又はこのリン酸化状態、ユビキチン化状態及び／もしくは複合体化状態を決定するために調査することができる。

【０２５０】

別の実施態様において、本発明は、本明細書に記載の２抗体アッセイを実施するためのキットであって：（ａ）固体担体上に拘束された１種又は複数の捕捉抗体の希釈系列；並びに（ｂ）１種又は複数の検出抗体（例えば、活性化状態非依存性抗体及び／又は活性化状態依存性抗体）を含むキットを提供する。一部の例において、本キットは、細胞、例えば、腫瘍細胞の１種又は複数のシグナル伝達分子の発現レベル及び／又は活性化状態を検出するために本キットを使用する方法についての取扱説明書を更に含有することができる。本キットは、本発明の特定方法を実施することに関連して上述した追加の試薬のいずれか、例えば、シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバー、チラミドシグナル増幅試薬、洗浄緩衝液などを含有することもできる。

【０２５１】

ＶＩＩ．近接二重検出アッセイ

一部の実施態様において、細胞、例えば、腫瘍細胞の細胞抽出物中の対象となる１種以上の分析物（例えば、１種以上のシグナル伝達分子、例えば、ＨＥＲ２及び／又はｃ－Ｍｅｔシグナリング経路の１種以上の構成因子）の発現及び／又は活性化レベルを検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックスハイスループット近接（すなわち、３抗体）アッセイである。非限定的な例として、本近接アッセイにおいて使用される３種の抗体は：（１）対象となる特定の分析物に特異的な捕捉抗体；（２）分析物の活性化形態に特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態依存性抗体）；及び（３）分析物の全量を検出する検出抗体（すなわち、活性化状態非依存性抗体）を含むことができる。活性化状態依存性抗体は、例えば、分析物のリン酸化、ユビキチン化及び／又は複合体形成状態を検出することができる一方、活性化状態非依存性抗体は、分析物の全量（すなわち、活性化及び非活性化形態の両方）を検出することができる。

【０２５２】

１つの特定の実施態様において、対象となる分析物の活性化レベル又は状態を検出するための近接アッセイは、

（ｉ）細胞抽出物を捕捉抗体の１種又は複数の希釈系列と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こと；

（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な１種又は複数の活性化状態非依存性抗体及び１種又は複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉された分析物を形成すること、

（活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、活性化状態依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；

（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに

（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること

を含む。

【０２５３】

別の特定の実施態様において、トランケート化受容体である対象となる分析物の活性化レベル又は状態を検出するための近接アッセイは、

（ｉ）細胞抽出物を完全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートすること；

（ｉｉ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、これにより完全長受容体を除去して完全長受容体を欠く細胞抽出物を形成すること；

（ｉｉｉ）完全長受容体を欠く細胞抽出物を、複数の捕捉された完全長受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に特異的な１種又は複数の捕捉抗体とインキュベートして複数の捕捉されたトランケート化受容体を形成すること；
（ｉｖ）複数の捕捉されたトランケート化受容体を、完全長受容体のＩＣＤ結合領域に特異的な１種又は複数の活性化状態非依存性抗体及び１種又は複数の活性化状態依存性抗体を含む検出抗体とインキュベートして複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体を形成すること
（活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、活性化状態依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｖ）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｖｉ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０２５４】

ある実施態様において、トランケート化受容体はｐ９５ＨＥＲ２であり、完全長受容体はＨＥＲ２である。ある他の実施態様において、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチンペアを含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している（例えば、抗体は、完全長受容体のＥＣＤ結合領域に特異的である）。

【０２５５】

代替的な実施態様において、活性化状態依存性抗体は促進部分により標識することができ、活性化非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識することができる。

【０２５６】

別の非限定的な例として、本近接アッセイにおいて使用される３種の抗体は：（１）対象となる特定の分析物に特異的な捕捉抗体；（２）分析物の全量を検出する第１の検出抗体（すなわち、第１の活性化状態非依存性抗体）；及び（３）分析物の全量を検出する第２の検出抗体（すなわち、第２の活性化状態非依存性抗体）を含むことができる。好ましい実施態様において、第１及び第２の活性化非依存性抗体は、分析物上の異なる（例えば、別々の）エピトープを認識する。

【０２５７】

１つの特定の実施態様において、対象となる分析物の発現レベルを検出するための近接アッセイは、
（ｉ）細胞抽出物を捕捉抗体の１種又は複数の希釈系列と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こと；
（ｉｉ）複数の捕捉された分析物を、対応する分析物に特異的な１種又は複数の第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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こと
（第１の活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、第２の活性化非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｉｉｉ）複数の検出可能な捕捉された分析物をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｉｖ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０２５８】

別の特定の実施態様において、トランケート化受容体である対象となる分析物の発現レ

ベルを検出するための近接アッセイは、
（ｉ）細胞抽出物を完全長受容体の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートすること；
（ｉｉ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、これにより完全長受容体を除去して完全長受容体を欠く細胞抽出物を形成すること；
（ｉｉｉ）完全長受容体を欠く細胞抽出物を、複数の捕捉された完全長受容体の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）結合領域に特異的な１種又は複数の捕捉抗体とインキュベートして複数の捕捉されたトランケート化受容体を形成すること；
（ｉｖ）複数の捕捉されたトランケート化受容体を、完全長受容体のＩＣＤ結合領域に特異的な１種又は複数の第１及び第２の活性化状態非依存性抗体を含む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トランケート化受容体を形成すること
（第１の活性化状態非依存性抗体は促進成分により標識されており、第２の活性化非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識されており、促進成分はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにチャネリングし、これと反応する酸化剤を発生させる）；
（ｖ）複数の検出可能な捕捉されたトランケート化受容体をシグナル増幅ペアの第２のメンバーとインキュベートして増幅されたシグナルを発生させること；並びに
（ｖｉ）シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバーから発生した増幅されたシグナルを検出すること
を含む。

【０２５９】
ある実施態様において、トランケート化受容体はｐ９５ＨＥＲ２であり、完全長受容体はＨＥＲ２である。ある他の実施態様において、細胞外ドメイン（ＥＣＤ）結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン－ビオチンペアを含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している（例えば、抗体は、完全長受容体のＥＣＤ結合領域に特異的である）。

【０２６０】
代替的な実施態様において、第１の活性化状態非依存性抗体はシグナル増幅ペアの第１のメンバーにより標識することができ、第２の活性化状態非依存性抗体は促進部分により標識することができる。

【０２６１】
本明細書に記載の近接アッセイは、典型的には、異なるアドレス可能な位置において固体担体の表面に結合しているある範囲の捕捉抗体濃度で１種又は複数の異なる捕捉抗体を含む抗体ベースのアレイである。本発明における使用に好適な固体担体の例は、上述されている。

【０２６２】
捕捉抗体、活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体は、好ましくは、分析物結合に関するこれらの間の競合を最小化するように選択される（すなわち、全ての抗体は、これらの対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる）。

【０２６３】
一部の実施態様において、分析物の１種以上の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存性抗体又は分析物の１種以上の発現レベルを検出するための第１の活性化状態非依存性抗体は、検出可能部分を更に含む。このような例において、検出可能部分の量は、細胞抽出物中の分析物の１種以上の量と相関する。検出可能部分の例には、限定されるものではないが、蛍光標識、化学反応性標識、酵素標識、放射活性標識などが含まれる。好ましくは、検出可能部分は、フルオロフォア、例えばＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）色素（例えば、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商標）６４７）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオル（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などである。検出可能部分は、当分野において周知の方法を使用して活性化状態非依存性抗体に直接的又は間接的に結合さ

せることができる。

【０２６４】

ある例において、分析物の１種以上の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存性抗体又は分析物の１種以上の発現レベルを検出するための第１の活性化状態非依存性抗体は、促進成分により直接的に標識される。促進成分は、当分野において周知の方法を使用して活性化状態非依存性抗体に結合させることができる。本発明における使用に好適な促進成分には、促進成分に近接する（すなわち、空間的に近い、又は近接する）また別の分子にチャネリングし（すなわち、これに方向付けられ）、これと反応する（すなわち、結合する、これにより結合される、又は複合体をともに形成する）酸化剤を発生させることができる任意の分子が含まれる。促進成分の例には、制限されることなく、酵素、例えばグルコースオキシダーゼ又は電子受容体として分子酸素（O_2）を含む酸化／還元反応を触媒する任意の他の酵素及び光感作剤、例えばメチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン、スクアレート色素、フタロシアニンなどが含まれる。酸化剤の非限定的な例には、過酸化水素（H_2O_2）、一重項酸素及び酸化／還元反応において酸素原子を移動させ、又は電子を獲得する任意の他の化合物が含まれる。好ましくは、好適な基質（例えば、グルコース、光など）の存在下で、促進成分（例えば、グルコースオキシダーゼ、光感作剤など）は、２種の部分が相互に近接している場合、シグナル増幅ペアの第１のメンバー（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、保護基により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り不活性化された酵素など）にチャネリングし、これと反応する酸化剤（例えば、過酸化水素（H_2O_2）、一重項酸素など）を発生させる。

【０２６５】

ある他の例において、分析物の１種以上の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存性抗体又は分析物の１種以上の発現レベルを検出するための第１の活性化状態非依存性抗体は、活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドリンカーと促進成分にコンジュゲートされた相補的オリゴヌクレオチドリンカーとのハイブリダイゼーションにより促進成分により間接的に標識される。オリゴヌクレオチドリンカーは、当分野において周知の方法を使用して促進成分又は活性化状態非依存性抗体に結合させることができる。一部の実施態様において、促進成分にコンジュゲート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コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドリンカーに対して１００％の相補性を有する。他の実施態様において、オリゴヌクレオチドリンカーペアは、例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイゼーションすると、少なくとも１、２、３、４、５、６個以上のミスマッチ領域を含む。当業者であれば、異なる分析物に特異的な活性化状態非依存性抗体は、同一オリゴヌクレオチドリンカーに、又は異なるオリゴヌクレオチドリンカーのいずれかにコンジュゲートさせることができることを認識する。

【０２６６】

促進成分又は活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドリンカーの長さは、変動し得る。一般に、リンカー配列は、長さが少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５又は１００ヌクレオチドであり得る。典型的には、結合のためにランダム核酸配列を発生させる。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ーは、３種の別々の隣接ドメイン：スペーサードメイン；シグニチャードメイン；及びコンジュゲーションドメインを有するように設計することができる。好ましくは、オリゴヌクレオチドリンカーは、これらがコンジュゲートされる促進成分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率的に結合するために設計される。

【０２６７】

オリゴヌクレオチドリンカー配列は、種々のアッセイ条件下で任意の二次構造形成を妨害又は最小化するように設計することができる。典型的には、リンカー内の各セグメントについて、アッセイ手順全体においてこれらの関与を可能とするように融解温度が慎重に

追跡される。一般に、リンカー配列のセグメントの融解温度の範囲は、１～１０℃である。規定イオン濃度下での融解温度、二次構造及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）を使用して各リンカー内の３種の異なるドメインのそれぞれについて分析することができる。組合せ配列全体は、これらの構造的特徴及び他のコンジュゲートされるオリゴヌクレオチドリンカー配列とのこれらの比較可能性について、例えば、これらがストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で相補的オリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするか否かについてのように分析することもできる。

【０２６８】

オリゴヌクレオチドリンカーのスペーサー領域は、コンジュゲーションドメインのオリゴヌクレオチド架橋部位からの適切な分離を提供する。コンジュゲーションドメインは、相補的オリゴヌクレオチドリンカー配列により標識された分子を核酸ハイブリダイゼーションによりコンジュゲーションドメインに結合させるように機能する。核酸媒介性ハイブリダイゼーションは、抗体－分析物（すなわち、抗原）複合体形成の前又は後のいずれかに実施することができ、よりフレキシブルなアッセイフォーマットを提供する。多数の直接抗体コンジュゲーション法とは相違して、比較的小さいオリゴヌクレオチドを抗体又は他の分子に結合させることは、標的分析物に向かう抗体の特異的親和性又はコンジュゲートされる分子の機能にわずかに影響を及ぼすにすぎない。

【０２６９】

一部の実施態様において、オリゴヌクレオチドリンカーのシグニチャー配列ドメインは、複合体マルチプレックス化タンパク質アッセイにおいて使用できる。様々なシグニチャー配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーと複数の抗体をコンジュゲートさせることができる。マルチプレックス免疫アッセイにおいて、適切なプローブにより標識されたレポーターオリゴヌクレオチド配列を使用してマルチプレックスアッセイフォーマットにおいて抗体とこれらの抗原との交差反応性を検出することができる。

【０２７０】

オリゴヌクレオチドリンカーは、いくつかの異なる方法を使用して抗体又は他の分子にコンジュゲートさせることができる。例えば、オリゴヌクレオチドリンカーは、５’又は３’末端上のいずれかでチオール基と合成することができる。チオール基は、還元剤（例えば、ＴＣＥＰ－ＨＣｌ）を使用して脱保護することができ、得られたリンカーは、脱塩スピンカラムを使用することにより精製することができる。得られた脱保護オリゴヌクレオチドリンカーは、ヘテロ二官能性架橋剤、例えば、ＳＭＣＣを使用して抗体又は他のタイプのタンパク質の第１級アミンにコンジュゲートさせることができる。あるいは、オリゴヌクレオチド上の５’－リン酸基を水溶性カルボジイミドＥＤＣにより処理してリン酸エステルを形成し、続いてアミン含有分子に結合させることができる。ある例において、３’－リボース残基上のジオールは、アルデヒド基に酸化させ、次いで還元アミノ化を使用して抗体又は他のタイプのタンパク質のアミン基にコンジュゲートさせることができる。ある他の例において、オリゴヌクレオチドリンカーは、３’又は５’末端上のいずれかでビオチン修飾により合成し、ストレプトアビジン標識分子にコンジュゲートさせることができる。

【０２７１】

オリゴヌクレオチドリンカーは、当分野において公知である種々の技術のいずれか、例えば、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）；及びＷｉｎｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，７４：５９（１９９７）に記載の技術を使用して合成することができる。一般に、オリゴヌクレオチドの合成は、一般的な核酸保護基及び結合基、例えば、５’末端のジメトキシトリチル及び３’末端のホスホラミダイトを使用する。オリゴヌクレオチド合成に好適な試薬、核酸脱保護のための方法及び核酸精製のための

方法は、当業者には公知である。

【０２７２】

ある例において、分析物の１種以上の活性化レベルを検出するための活性化状態依存性抗体又は分析物の１種以上の発現レベルを検出するための第２の活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより直接的に標識される。シグナル増幅ペアのメンバーは、当分野において周知の方法を使用して活性化レベルを検出するために活性化状態依存性抗体に、又は発現レベルを検出するために第２の活性化状態非依存性抗体に結合させることができる。ある他の例において、活性化状態依存性抗体又は第２の活性化状態非依存性抗体は、シグナル増幅ペアの第１のメンバーにより、活性化状態依存性抗体又は第２の活性化状態非依存性抗体にコンジュゲートされた結合ペアの第１のメンバーとシグナル増幅ペアの第１のメンバーにコンジュゲートされた結合ペアの第２のメンバーとの結合を介して間接的に標識される。結合ペアメンバー（例えば、ビオチン／ストレプトアビジン）は、当分野において周知の方法を使用してシグナル増幅ペアのメンバー又は活性化状態依存性抗体もしくは第２の活性化状態非依存性抗体に結合させることができる。シグナル増幅ペアのメンバーの例には、限定されるものではないが、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、チトクロームｃペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、デヨージナーゼなどが含まれる。シグナル増幅ペアのメンバーの他の例には、保護基により保護されたハプテン及び酵素阻害剤へのチオエーテル結合により不活性化された酵素が含まれる。

【０２７３】

近接チャネリングの一例において、促進成分はグルコースオキシダーゼ（ＧＯ）であり、シグナル増幅ペアの第１のメンバーはセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）である。ＧＯがグルコースなどの基質と接触されると、ＧＯは酸化剤（すなわち、過酸化水素（H_2O_2））を発生させる。ＨＲＰがＧＯにチャネリングする近接内にあると、ＧＯにより発生されたH_2O_2はＨＲＰにチャネリングされ、これと複合体を形成してＨＲＰ－H_2O_2複合体を形成し、これはシグナル増幅ペアの第２のメンバー（例えば、化学発光基質、例えばルミノールもしくはイソルミノール又は蛍光発生基質、例えば、チラミド（例えば、ビオチン－チラミド）、ホモバリン酸又は４－ヒドロキシフェニル酢酸）の存在下で増幅されたシグナルを発生させる。近接アッセイにおいてＧＯ及びＨＲＰを使用する方法は、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ペアの第２のメンバー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求核残基の近くで共有結合する反応性チラミドラジカルを発生させる。活性化チラミドは、直接的に検出される、又はシグナル検出試薬、例えばストレプトアビジン標識フルオロフォア又はストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ及び発色試薬の組合せなどの添加に基づいて検出される。本発明における使用に好適なフルオロフォアの例には、限定されるものではないが、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）色素（例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ（商標）５５５）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ（商品名）；ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）、ＣｙＤｙｅ（商品名）フルオル（例えば、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ５）などが含まれる。ストレプトアビジン標識は、当分野において周知の方法を使用してフルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接的又は間接的に結合させることができる。本発明における使用に好適な発色試薬の非限定的例には、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）、２，２’－アジノ－ビス（３－エチルベンゾチアゾリン－６－スルホン酸）（ＡＢＴＳ）、４－クロロ－１－ナフトール（４ＣＮ）及び／又はポルフィリノーゲンが含まれる。

【０２７４】

近接チャネリングの別の実施例において、促進成分は光感作剤であり、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは特異的結合パートナー（例えば、リガンド、抗体など）へのハプテンの結合を妨げる保護基により保護された複数のハプテンにより標識された巨大分子である。例えば、シグナル増幅ペアのメンバーは、保護されたビオチン、クマリン及び／又はフルオレセイン分子により標識されたデキストラン分子であり得る。好適な保護基には、限定されるものではないが、フェノキシー、アナリノー、オレフィンー、チオエーテルー、及びセレノエーテルー保護基が含まれる。本発明の近接アッセイにおける使用に好適な追加の光感作剤及び保護ハプテン分子は、米国特許第５，８０７，６７５号に記載されている。光感作剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）を発生させる。ハプテン分子が光感作剤にチャネリングする近接内にある場合、光感作剤により発生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チャネリングされ、これと反応してカルボニル基（ケトン又はアルデヒド）及びスルフィン酸を生じさせ、ハプテンから保護基を遊離させる。次いで、未保護ハプテンは、シグナル増幅ペアの第２のメンバー（例えば、検出可能なシグナルを発生させることができる特異的結合パートナー）に特異的に結合するために利用可能である。例えば、ハプテンがビオチンである場合、特異的結合パートナーは酵素標識ストレプトアビジンであり得る。例示的な酵素には、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、ＨＲＰなどが含まれる。洗浄して未結合試薬を除去した後、検出可能なシグナルは、酵素の検出可能な（例えば、蛍光、化学発光、発色性などの）基質を添加することにより発生させ、当分野において公知の好適な方法及び機器を使用して検出することができる。あるいは、検出可能なシグナルは、チラミドシグナル増幅を使用して増幅させることができ、活性化チラミドは、直接的に検出でき、又は上記のとおりシグナル検出試薬の添加に基づいて検出することができる。

【０２７５】

近接チャネリングの更に別の例において、促進成分は光感作剤であり、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは酵素－阻害剤複合体である。酵素及び阻害剤（例えば、ホスホン酸標識デキストラン）は、開裂可能なリンカー（例えば、チオエーテル）により一緒に結合される。光感作剤が光により励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）を発生させる。酵素－阻害剤複合体が光感作剤にチャネリングする近接内にある場合は、光感作剤により発生された一重項酸素は、開裂可能なリンカーにチャネリングされ、これと反応し、酵素から阻害剤を遊離させ、これにより酵素を活性化する。検出可能なシグナルを発生させるために酵素基質が添加され、又は増幅シグナルを発生させるために増幅試薬が添加される。

【０２７６】

近接チャネリングの更なる例において、促進成分はＨＲＰであり、シグナル増幅ペアの第１のメンバーは上記の通り保護されたハプテン又は酵素－阻害剤複合体であり、保護基はｐ－アルコキシフェノールを含む。フェニレンジアミン及びH_2O_2の添加は、保護されたハプテン又は酵素－阻害剤複合体にチャネリングし、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又は反応性酵素を生じさせる、反応性フェニレンジイミンを発生させる。増幅されたシグナルは、上記のとおり発生し、検出される（例えば、米国特許第５，５３２，１３８号及び第５，４４５，９４４号参照）。

【０２７７】

本明細書に記載の近接アッセイを実施するための例示的なプロトコールは、開示が全ての目的のために参照により本明細書に全体として組み込まれるＰＣＴ国際公開第２００９／１０８６３７号の実施例４に提供されている。

【０２７８】

別の実施態様において、本発明は、上記の近接アッセイを実施するためのキットであって：（ａ）固体担体上に拘束された１種又は複数の捕捉抗体の希釈系列；並びに（ｂ）１種又は複数の検出抗体（例えば、活性化レベルを検出するための活性化状態非依存性抗体及び活性化状態依存性抗体の組合せ並びに／又は発現レベルを検出するための第１及び第２の活性化状態非依存性抗体の組合せ）を含むキットを提供する。一部の例において、本

キットは、細胞、例えば腫瘍細胞の１種又は複数のシグナル伝達分子の発現及び／又は活性化状態を検出するために本キットを使用する方法についての取扱説明書を更に含有することができる。本キットは、本発明の特定方法を実施することに関連して上述した追加の試薬のいずれか、例えば、シグナル増幅ペアの第１及び第２のメンバー、チラミドシグナル増幅試薬、促進成分のための基質、洗浄緩衝液などを更に含有することができる。

【０２７９】

ＶＩＩＩ．抗体の生成

本発明による細胞、例えば胃癌細胞中のシグナル伝達分子（例えば、ＨＥＲ２及び／又はｃ－ＭＥＴシグナリング経路化合物）の発現及び／又は活性化レベルを分析するために未だ市販されていない抗体の作製及び選択は、いくつかの手法により実施することができる。例えば、１つの手法は、当分野において公知のタンパク質発現及び精製方法を使用して対象となるポリペプチド（すなわち、抗原）を発現させ、及び／又は精製する方法である一方、別の手法は当分野において公知の固相ペプチド合成法を使用して対象となるポリペプチドを合成する方法である。例えば、Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｍｕｒｒａｙ Ｐ．Ｄｅｕｔｃｈｅｒ，ｅｄ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，Ｖｏｌ．１８２（１９９０）；Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｇｒｅｇ Ｂ．Ｆｉｅｌｄｓ，ｅｄ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，Ｖｏｌ．２８９（１９９７）；Ｋｉｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，３８：１１９２－９９（１９９０）；Ｍｏｓｔａｆａｖｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍｅｄ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，１：２５５－６０，（１９９５）；及びＦｕｊｉｗａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．，４４：１３２６－３１（１９９６）参照。次いで、精製又は合成されたポリペプチドは、例えば、マウス又はウサギに注射してポリクローナル又はモノクローナル抗体を発生させることができる。当業者であれば、例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄｓ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８８）に記載のとおり、抗体を生成するための多数の手順を利用可能であることを認識する。当業者であれば、結合フラグメント又は抗体を模倣する（例えば、抗体の機能的結合領域を保持する）Ｆａｂフラグメントも種々の手順により遺伝子情報から調製することができることも認識する。例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋ，Ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ（１９９５）；及びＨｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４９：３９１４－３９２０（１９９２）参照。

【０２８０】

更に、多数の刊行物は、選択された標的抗原への結合のためのポリペプチドのライブラリーを生成及び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）；及びＬａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５７１，６９８号参照）。ファージディスプレイ法の基本的概念は、ファージＤＮＡによりコードされるポリペプチドと標的抗原との間の物理的会合の確立である。この物理的会合は、ポリペプチドをコードするファージゲノムを取り囲んでいるキャプシドの一部としてポリペプチドを提示するファージ粒子により提供される。ポリペプチドとこれらの遺伝物質との間の物理的会合の確立は、様々なポリペプチドを担持する極めて多数のファージの同時マススクリーニングを可能にする。標的抗原との親和性を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に対する親和性スクリーニングにより濃縮される。これらのファージから提示されたポリペプチドの同一性は、これらの各ゲノムから決定することができる。これらの方法を使用すると、所望

の標的抗原について結合親和性を有すると同定されたポリペプチドは、次いで慣用の手段により大量に合成することができる（例えば、米国特許第６，０５７，０９８号参照）。

【０２８１】

これらの方法により発生した抗体は、次いで対象となる精製されたポリペプチド抗原との親和性及び特異性についての第１のスクリーニングにより及び必要であれば、この結果を、結合から排除されることが望ましい他のポリペプチド抗原を有する抗体の親和性及び特異性と比較することにより選択することができる。スクリーニング手順は、マイクロタイタープレートの別個のウエル内への精製ポリペプチド抗原の固定化を含むことができる。次いで、潜在的抗体又は抗体群を含有する溶液は、各マイクロタイターウエル内に配置され、約３０分から２時間インキュベートされる。次いで、マイクロタイターウエルは洗浄され、標識された二次抗体（例えば、作製された抗体がマウス抗体の場合、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗マウス抗体）がウエルに添加され、約３０分間インキュベートされ、次いで洗浄される。基質がウエルに添加され、固定化されたポリペプチド抗原に対する抗体が存在する場合に呈色反応が現れる。

【０２８２】

次いで、このように同定された抗体は、親和性及び特異性について更に分析することができる。標的タンパク質のための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は、選択された抗体を使用して免疫アッセイの感度及び特異性を判断する標準として作用する。種々の抗体の結合親和性は異なり得、例えばある抗体の組合せが相互に立体的に干渉し得るので、抗体のアッセイ性能は、この抗体の絶対親和性及び特異性よりも重要な尺度となり得る。

【０２８３】

当業者であれば、抗体もしくは結合フラグメントを生成する際に、対象となる種々のポリペプチドに親和性及び特異性についてスクリーニング及び選択する際に多数のアプローチを実施できるが、これらのアプローチは本発明の範囲を変化させないことを認識する。

【０２８４】

Ａ．ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは対象となるポリペプチド及びアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）又は腹腔内（ｉｐ）注射により動物において作製される。対象となるポリペプチドを、二官能剤又は誘導体化剤を使用して、免疫すべき種内で免疫原性であるタンパク質担体、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、ウシチログロブリン又はダイズトリプシン阻害剤などにコンジュゲートさせることが有用であり得る。二官能剤又は誘導体化剤の非限定的例には、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介するコンジュゲーション）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介するコンジュゲーション）、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、$SOCl_2$及び$R_1N=C=NR$（式中、Ｒ及びR_1は異なるアルキル基である）が含まれる。

【０２８５】

動物は、例えば１００μｇ（ウサギについて）又は５μｇ（マウスについて）の抗原又はコンジュゲートを３容量のフロイント完全アジュバントと合わせ、複数の部位で溶液を皮内に注射することにより、対象となるポリペプチド又はこれらの免疫原性コンジュゲートもしくは誘導体に対して免疫される。１カ月後、動物は、複数部位での皮下注射によるフロイント不完全アジュバント内のポリペプチドもしくはコンジュゲートの元の量の約１／５から１／１０により追加免疫される。７から１４日後に、動物から採血され、血清が抗体力価についてアッセイされる。動物は、典型的には力価が安定状態に達するまで追加免疫される。好ましくは、動物は同一ポリペプチドのコンジュゲートにより追加免疫されるが、異なる免疫原性タンパク質への、及び／又は異なる架橋試薬を介するコンジュゲーションを使用することができる。コンジュゲートは、融合タンパク質としての組換え細胞培養物中で作製することもできる。ある例において、凝集剤、例えばミョウバンを免疫応答を向上させるために使用することができる。

【０２８６】
Ｂ．モノクローナル抗体
モノクローナル抗体は、一般に、実質的に均質な抗体の集団から入手される、すなわち、この集団を含む個々の抗体は小量で存在し得る考えられる天然型突然変異を除いて同一である。従って、修飾語句「モノクローナル」は、抗体の特徴が別々の抗体の混合物ではないことを示す。例えば、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）により記載されたハイブリドーマ法又は当分野において公知の任意の組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号参照）を使用して作製することができる。
【０２８７】
ハイブリドーマ法において、マウス又は他の適切な宿主動物（例えば、ハムスター）は、免疫のために使用される対象となるポリペプチドに特異的に結合する抗体を生成する、又は生成することのできるリンパ球を誘引するために、上記のとおり免疫される。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫される。次いで、免疫されたリンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成するために、好適な融合剤、例えばポリエチレングリコールを使用して骨髄腫細胞と融合される（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．５９－１０３（１９８６）参照）。こうして調製されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは融合していない親骨髄腫細胞の成長もしくは生存を阻害する１種以上の物質を含有する好適な培養培地中で播種され、成長する。例えば、親骨髄腫細胞が酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマ細胞のための培養培地は、典型的には、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の成長を妨げるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン（ＨＡＴ培地）を含む。
【０２８８】
好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定性高レベル産生を支持し、及び／又は例えばＨＡＴ培地などの培地に感受性である骨髄腫細胞である。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのこのような好ましい骨髄腫細胞系の例には、限定されるものではないが、マウス骨髄腫細胞系、例えばＭＯＰＣ－２１及びＭＰＣ－１１マウス腫瘍（Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡから入手可能）、ＳＰ－２又はＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ；Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤから入手可能）に由来する骨髄腫細胞及びヒト骨髄腫もしくはマウス－ヒト異種骨髄腫細胞系（例えば、Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；及びＢｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．５１－６３（１９８７）参照）が含まれる。
【０２８９】
ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地は、対象となるポリペプチドに対して向けられたモノクローナル抗体を産生するためにアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法により、又はインビトロ結合アッセイ、例えば放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）により決定される。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分析を使用して決定することができる。
【０２９０】
所望の特異性、親和性及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限定希釈手順によりサブクローニングし、標準方法により成長させることができる（例えば、Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ

．５９－１０３（１９８６）参照）。この目的に好適な培養培地には、例えば、Ｄ－ＭＥＭ又はＲＰＭＩ－１６４０培地が含まれる。更に、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで成長させることができる。サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、慣用の抗体精製手順、例えば、プロテインＡ－セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動法、透析又は親和性クロマトグラフィーなどにより、培養培地、腹水又は血清から分離することができる。

【０２９１】

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、慣用の手順を使用して容易に単離して（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）シーケンシングすることができる。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい源として機能する。ＤＮＡは、単離されると、他の点で抗体を産生しない宿主細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞又は骨髄腫細胞中に後にトランスフェクトされる発現ベクター内に配置して組換え宿主細胞中でのモノクローナル抗体の合成を誘導することができる。例えば、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６－２６２（１９９３）；及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．，１３０：１５１－１８８（１９９２）参照。ＤＮＡは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのためのコーディング配列をホモロガスなマウス配列に代えて置換する工程により（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号；及びＭｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１（１９８４）参照）又は非免疫グロブリンポリペプチドについてのコーディング配列の全部又は一部を免疫グロブリンコーディング配列に共有結合させることにより改変することができる。

【０２９２】

更なる実施態様において、モノクローナル抗体又は抗体フラグメントは、例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４（１９９０）；Ｃｌａｃｋｓｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）；及びＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載の技術を使用して発生された抗体ファージライブラリーから単離することができる。鎖シャフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）ヒトモノクローナル抗体の産生は、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されている。極めて大きいファージライブラリーを構築するための方針としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組換えの使用については、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を発生させるための慣習的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に重要な代替法である。

【０２９３】

Ｃ．ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当分野において公知である。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである起源からこの中に導入された１個以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、典型的には「インポート」可変ドメインから採取される、「インポート」残基と称されることが多い。ヒト化は、本質的には非ヒト抗体の超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列と置換することにより実施することができる。例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；及びＶｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８）参照。従って、このような「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、実質的にインタクト未満のヒト可変領域は、非ヒト種からの対応する配列により置換されている。実際、ヒト化抗体は、典型的には一部の超可変領域残基及びおそらくは一部のフレームワーク領域（ＦＲ）残基が齧歯類抗体の類似

部位からの残基により置換されているヒト抗体である。

【０２９４】

本明細書に記載のヒト化抗体の作製において使用すべき軽鎖及び重鎖両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減させるために重要な検討事項である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためのヒトＦＲとして容認される（例えば、Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２２９６（１９９３）；及びＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１（１９８７）参照）。別の方法は、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のＦＲを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体については、同一のＦＲを使用することができる（例えば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；及びＰｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３（１９９３）参照）。

【０２９５】

抗原についての高親和性及び他の好ましい生物学的特性が保持された抗体をヒト化することも重要である。この目標を達成するため、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して親配列及び種々の概念的ヒト化生成物を分析するプロセスにより調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者であれば精通している。選択された候補免疫グロブリン配列の考えられる三次元立体配座構造を説明及び提示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらの提示の検査は、候補免疫グロブリン配列の機能において残基が果たす可能性がある役割についての分析、すなわち候補免疫グロブリンがこの抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析を許容する。この手法において、ＦＲ残基をレシピエント及びインポート配列から選択して組み合わせることができるので、所望の抗体特性、例えば（１種以上の）標的抗原についての親和性の増加が達成される。一般に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的及び特異的に関係している。

【０２９６】

種々の形態のヒト化抗体が、本発明により企図される。例えば、ヒト化抗体は、抗体フラグメント、例えば、Ｆａｂフラグメントであり得る。あるいは、ヒト化抗体は、インタクト抗体、例えば、インタクトＩｇＡ、ＩｇＧ又はＩｇＭ抗体であり得る。

【０２９７】

Ｄ．ヒト抗体

ヒト化の代替法として、ヒト抗体を発生させることができる。一部の実施態様において、免疫すると、内因性免疫グロブリン産生の非存在下で全レパートリーのヒト抗体を産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生成することができる。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（ＪＨ）遺伝子のホモ接合体欠失は内因性抗体産生の完全阻害をもたらすと記載されている。このような生殖細胞系突然変異マウスへのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの移動は、抗原チャレンジ後にヒト抗体の産生をもたらす。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）；並びに米国特許第５，５９１，６６９号、第５，５８９，３６９号及び第５，５４５，８０７号参照。

【０２９８】

あるいは、ファージディスプレイ技術（例えば、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５３（１９９０）参照）を使用して未免疫ドナーからの免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーを使用してインビトロでヒト抗体及び抗体フラグメントを生成することができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン

遺伝子は、線維状バクテリオファージ、例えばＭ１３又はｆｄのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかの中に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的抗体フラグメントとして提示される。線維状粒子はファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選択は、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択ももたらす。従って、ファージはＢ細胞の特性の一部を模倣する。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）に記載の種々のフォーマットで実施することができる。ファージディスプレイのために、Ｖ遺伝子セグメントのいくつかの起源を使用できる。例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）参照。未免疫ヒトドナーからのＶ遺伝子のレパートリーを構築することができ、多様な抗原アレイに対する抗体（自己抗原を含む）は、Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）；Ｇｒｉｆｆｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１２：７２５－７３４（１９９３）；並びに米国特許第５，５６５，３３２号及び第５，５７３，９０５号に記載の技術に本質的に従って単離することができる。

【０２９９】

ある例において、ヒト抗体は、例えば米国特許第５，５６７，６１０号及び第５，２２９，２７５号に記載のとおりインビトロ活性化Ｂ細胞により発生させることができる。

【０３００】

Ｅ．抗体フラグメント

抗体フラグメントを生成するために、種々の技術が開発されてきた。慣習的には、これらのフラグメントはインタクト抗体のタンパク質分解消化により導き出された（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈ．，２４：１０７－１１７（１９９２）；及びＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）参照）。しかしながら、これらのフラグメントは、現在では組換え宿主細胞を使用して直接的に生成することができる。例えば、抗体フラグメントは、上記で考察した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントを大腸菌細胞から直接的に回収し、化学的に結合させてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成することができる（例えば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３－１６７（１９９２）参照）。別のアプローチによれば、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接的に単離することができる。抗体フラグメントを産生するための他の技術は、当業者には明白である。他の実施態様では、最適な抗体は、一本鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）である。例えば、ＰＣＴ国際公開第９３／１６１８５号；並びに米国特許第５，５７１，８９４号及び第５，５８７，４５８号参照。抗体フラグメントは、例えば米国特許第５，６４１，８７０号に記載の直鎖抗体であり得る。このような直鎖抗体フラグメントは、単一特異的又は二重特異的であり得る。

【０３０１】

Ｆ．二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２種の異なるエピトープについての結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、対象となる同一ポリペプチドの２種の異なるエピトープに結合することができる。他の二重特異性抗体は、対象となるポリペプチドについての結合部位を、１種以上の追加の抗原についての（１種以上の）結合部位と組み合わせることができる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメント（例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体）として調製することができる。

【０３０２】

二重特異性抗体を作製する方法は、当分野において公知である。完全長二重特異性抗体の慣習的な生成は、２種の免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアの共発現に基づいており、この２種の鎖は異なる特異性を有する（例えば、Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３）参照）。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のラ

ンダム選別のため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ（ｑｕａｄｒｏｍａ））は１０種の異なる抗体分子の潜在的混合物を産生し、このうち１種のみが適正な二重特異性構造を有する。適正な分子の精製は、通常は親和性クロマトグラフィーにより実施される。同様の手順が、ＰＣＴ国際公開第９３／０８８２９号及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，１０：３６５５－３６５９（１９９１）に開示されている。

【０３０３】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合体は、好ましくは、ヒンジ、ＣＨ２及びＣＨ３領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有する。融合体の少なくとも１種に存在する軽鎖結合のために必要な部位を含有する第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするＤＮＡ及び所望であれば免疫グロブリン軽鎖は、別個の発現ベクター内に挿入され、好適な宿主生物内にコトランスフェクトされる。このことは、構築において使用される３本のポリペプチド鎖の不等比が最適収率を提供する場合、実施態様において３本のポリペプチドフラグメントの相互比率を調整する際の大きい柔軟性を提供する。しかしながら、同等比の少なくとも２本のポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、又は比が特に有意ではない場合、２本又は全３本のポリペプチド鎖についてのコーディング配列を１個の発現ベクター内に挿入することが可能である。

【０３０４】

このアプローチの好ましい実施態様において、二重特異性抗体は、一方のアームにおいて第１の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖及び他方のアームにおいて（第２の結合特異性を提供する）ハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアから構成される。この非対称性構造は、二重特異性分子の２分の１のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が容易な分離手法を提供するので、不所望の免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進する。例えば、ＰＣＴ国際公開第９４／０４６９０号及びＳｕｒｅｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１２１：２１０（１９８６）参照。

【０３０５】

米国特許第５，７３１，１６８号に記載の別のアプローチによれば、一対の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大化するために遺伝子操作することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのＣＨ３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第１の抗体分子の界面からの１個以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きい側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）により置き換えられる。（１個以上の）大きい側鎖と同一又は類似のサイズの代償性「キャビティ」は、大きいアミノ酸側鎖を小さいアミノ酸側鎖（例えば、アラニン又はトレオニン）により置き換えることにより第２の抗体分子の界面上で作出される。このことは、他の不所望の最終生成物、例えばホモ二量体と比べてヘテロ二量体の収率を増加させる機序を提供する。

【０３０６】

二重特異性抗体には、架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート内の抗体の一方はアビジンに、他方はビオチンに結合させることができる。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の便宜的な架橋法を使用して作製することができる。好適な架橋剤及び架橋技術は、当分野において周知であり、例えば、米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０３０７】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を発生させるのに好適な技術も当分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製することができる。ある例において、二重特異性抗体は、インタクト抗体をタンパク質分解により開裂させてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを発生させる手順により発生させることができる（例えば、Ｂｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）参照）。これら

のフラグメントは、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて隣接ジチオールが安定化され、分子間ジスルフィド形成が妨げられる。次いで、発生したＦａｂ’フラグメントは、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換される。次いで、Ｆａｂ’－ＴＮＢ誘導体の１種はメルカプトエチルアミンによる還元によりＦａｂ’－チオールへ再変換され、等モル量の他のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合されて二重特異性抗体が形成される。

【０３０８】

一部の実施態様において、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントは、大腸菌から直接的に回収し、化学的に結合させて二重特異性抗体を形成することができる。例えば、完全ヒト化二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子は、Ｓｈａｌａｂｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）に記載の方法により生成することができる。各Ｆａｂ’フラグメントは大腸菌から別個に分泌させ、インビトロで指向化学的結合に供して二重特異性抗体を形成した。

【０３０９】

組換え細胞培養物から直接的に二重特異性抗体フラグメントを作製及び単離するための種々の技術についても記載されてきた。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して生成されてきた。例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：１５４７－１５５３（１９９２）参照。Ｆｏｓ及びＪｕｎタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合により２種の異なる抗体のＦａｂ’部分に連結させた。抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域で還元させてモノマーを形成し、次いで再酸化させて抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体を生成するためにも利用できる。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）により記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替機序を提供した。これらのフラグメントは、同一鎖上の２種のドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。従って、１本のフラグメントのＶＨ及びＶＬドメインは、別のフラグメントの相補的ＶＬ及びＶＨドメインと対合させられ、これにより２種の抗原結合部位が形成される。一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用により二重特異性抗体フラグメントを作製するための別の方針は、Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）に記載されている。

【０３１０】

２超の価数を有する抗体も企図されている。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：６０（１９９１）参照。

【０３１１】

Ｇ．抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体は単離された宿主細胞の内側で、宿主細胞のペリプラスム間隙内において産生することができ、又は宿主細胞から培地中に直接的に分泌させることができる。抗体が細胞内で産生される場合、最初に微粒子片が例えば遠心分離又は限外濾過により除去される。Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈ．，１０：１６３－１６７（１９９２）は、大腸菌のペリプラスム間隙内に分泌される抗体を単離する手順について記載している。手短に述べると、細胞ペーストは酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ及びフェニルメチルスルホニルフルオライド（ＰＭＳＦ）の存在下で約３０分間解凍される。細胞片は、遠心分離により除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、このような発現系からの上清は一般に、例えば、Ａｍｉｃｏｎ又はＭｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｐｅｌｌｉｃｏｎ製の限外濾過装置である市販されているタンパク質濃縮フィルターを使用して濃縮される。プロテアーゼ阻害剤、例えばＰＭＳＦを上記の工程のいずれかに含めてタンパク質分解を阻害することができ、抗生物質を含めて外来汚染物質の成長を妨げることができる。

【０３１２】
細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動法、透析及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができる。親和性リガンドとしてのプロテインＡの好適性は、抗体内に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトγ１、γ２、又はγ４重鎖をベースとする抗体を精製するために使用することができる（例えば、Ｌｉｎｄｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，６２：１－１３（１９８３）参照）。プロテインＧは、全マウスアイソタイプ及びヒトγ３について推奨されている（例えば、Ｇｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，５：１５６７－１５７５（１９８６）参照）。親和性リガンドが付着されるマトリックスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリックスも利用可能である。機械的に安定性のマトリックス、例えば、制御細孔ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンは、アガロースを用いた場合よりも高速の流速及び短いプロセッシング時間を達成できる。抗体がＣＨ３ドメインを含む場合、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ　ＡＢＸ（商品名）樹脂（Ｊ．Ｔ．Ｂａｋｅｒ；Ｐｈｉｌｌｉｐｓｂｕｒｇ，Ｎ．Ｊ．）が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラム上での分別、エタノール沈殿、シリカ上での逆相ＨＰＬＣクロマトグラフィー、ヘパリンＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（商品名）上でのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上のクロマトグラフィー、クロマト分画、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収すべき抗体に応じて利用可能である。

【０３１３】
（１つ以上の）予備精製工程後、対象となる抗体及び汚染物質を含む混合物は、好ましくは低い塩濃度（例えば、約０～０．２５Ｍの塩）で実施される、約２．５～４．５のｐＨにある溶出緩衝液を使用して低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに供することができる。

【０３１４】
当業者であれば、抗体に類似する機能を有する任意の結合分子、例えば試料中の１種以上の対象となる分析物に特異的な結合分子又は結合パートナーも本発明の方法及び組成物において使用することができることを認識する。好適な抗体様分子の例には、限定されるものではないが、ドメイン抗体、ユニボディ、ナノボディ、サメ抗原反応性タンパク質、アビマー、アドネクチン、アンチカルム（ａｎｔｉｃａｌｍ）、親和性リガンド、フィロマー（ｐｈｙｌｏｍｅｒ）、アプタマー、アフィボディ、トリネクチンなどが含まれる。

【０３１５】
ＩＸ．投与方法
本発明の方法によれば、本明細書に記載の抗癌薬は、当分野において公知の任意の便宜的手段により対象に投与される。本発明の方法は、対象における腫瘍、例えば、胃（胃）腫瘍を治療するのに好適な抗癌薬又は抗癌薬の組合せを選択するために使用することができる。本発明の方法は、抗癌薬又は抗癌薬の組合せによる治療に対する対象における腫瘍、例えば、胃（胃）腫瘍の応答を同定するために使用することもできる。更に、本発明の方法は、抗癌薬又は抗癌薬の組合せによる治療に対する腫瘍、例えば、胃（胃）腫瘍を有する対象の応答を予測するために使用することができる。当業者であれば、本明細書に記載の抗癌薬を単独で、又は慣用の化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法及び／もしくは手術との組合せ治療アプローチの一部として投与することができることを認識する。

【０３１６】
ある実施態様において、抗癌薬は、抗シグナリング剤（すなわち、細胞増殖抑制薬）、例えばモノクローナル抗体又はチロシンキナーゼ阻害剤；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又はアベラントな細胞、例えば癌性細胞の脱制御された成長を低減又は無効にさせる能力を有する任意の他の化合物を含む。一部の実施態様において、対象は、少なくとも１種の化学療法剤と組み

合わせて１種以上の抗シグナリング剤、抗増殖剤及び／又はホルモン療法剤により治療される。例示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、ホルモン療法剤、放射線療法剤及びワクチンは上述されている。

【０３１７】

一部の実施態様において、本明細書に記載の抗癌薬は、限定されるものではないが、免疫賦活剤（例えば、カルメット・ゲラン桿菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ：ＢＣＧ）、レバミゾール、インターロイキン－２、α－インターフェロンなど）、免疫毒素（例えば、抗ＣＤ３３モノクローナル抗体－カリケアマイシンコンジュゲート、抗ＣＤ２２モノクローナル抗体－シュードモナス外毒素コンジュゲートなど）及び放射免疫療法（例えば、^{111}Ｉｎ、^{90}Ｙ又は^{131}Ｉなどにコンジュゲートされた抗ＣＤ２０モノクローナル抗体）を含む慣用の免疫療法剤と共投与することができる。

【０３１８】

抗癌薬は、必要に応じて好適な医薬賦形剤とともに投与することができ、許容された投与様式のいずれかにより実施することができる。従って、投与は、例えば、経口、バッカル、舌下、経歯肉、経口蓋、静脈内、局所、皮下、経皮的、経皮性、筋肉内、関節内、非経口、動脈内、皮内、心室内、頭蓋内、腹腔内、膀胱内、髄腔内、病巣内、鼻腔内、直腸内、膣内又は吸入によるものであり得る。「共投与する」は、抗癌薬が第２薬（例えば、別の抗癌薬、抗癌薬療法と関連する副作用を低減させるために有用な薬物、放射線療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤など）の投与と同時に、投与直前に、又は投与直後に投与されることを意味する。

【０３１９】

治療有効量の抗癌薬は、繰り返して、例えば少なくとも２、３、４、５、６、７、８回以上繰り返し投与することができ、又は用量は連続注入により投与することができる。用量は、好ましくは正確な用量を簡単に投与するのに好適な単位剤形である、固体、半固体、凍結乾燥粉末又は液体剤形、例えば、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤、エマルジョン、坐剤、停留浣腸剤、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、エアロゾル剤、フォーム剤などの形態を取ることができる。

【０３２０】

本明細書において使用される用語「単位剤形」は、ヒト対象及び他の哺乳動物のための単一投与量として好適な物理的不連続単位を指し、各単位は適切な医薬賦形剤（例えば、アンプル）と関連して、所望の発現、忍容性及び／又は治療効果を生成するように計算された所定量の抗癌薬を含有する。更に、より濃縮された剤形を調製することができ、次いでこの剤形からより希釈された単位剤形を生成することができる。従って、より濃縮された剤形は、抗癌薬の量より実質的に多い、例えば少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０倍以上の量を含有する。

【０３２１】

このような剤形を調製する方法は、当業者には公知である（例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ ＳＣＩＥＮＣＥＳ，１８ＴＨ ＥＤ．Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ（１９９０）参照）。剤形は、典型的には、慣用の医薬担体又は賦形剤を含み、更に他の医薬剤、担体、アジュバント、希釈剤、組織透過強化剤、可溶化剤などを含むことができる。適切な賦形剤は、当分野において周知の方法によって、特定の剤形及び投与経路に合わせることができる（例えば、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ ＳＣＩＥＮＣＥＳ参照、前掲）。

【０３２２】

好適な賦形剤の例には、限定されるものではないが、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、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、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水、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並びにポリアクリル酸、例えば、Ｃａｒ

ｂｏｐｏｌ、例えば、Ｃａｒｂｏｐｏｌ９４１、Ｃａｒｂｏｐｏｌ９８０、Ｃａｒｂｏｐｏｌ９８１などが含まれる。これらの剤形は、滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び鉱油；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；保存剤、例えばメチルー、エチルー、及びプロピルーヒドロキシーベンゾエート（すなわち、パラベン）；ｐＨ調整剤、例えば、無機及び有機の酸及び塩基；甘味剤；並びに付香剤を更に含むことができる。剤形は、生分解性ポリマービーズ、デキストラン及びシクロデキストリン包接錯体を含むこともできる。

【０３２３】

経口投与のため、治療有効用量は、錠剤、カプセル剤、エマルジョン、懸濁剤、液剤、シロップ剤、噴霧剤、トローチ剤、散剤及び徐放性配合物の形態であり得る。経口投与に好適な賦形剤には、医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石粉、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどが含まれる。

【０３２４】

一部の実施態様において、治療有効用量は、丸剤、錠剤又はカプセル剤の形態を取り、従って、剤形は、抗癌薬と一緒に、下記のいずれか：希釈剤、例えば、ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムなど；崩壊剤、例えば、デンプン又はこの誘導体；滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなど；並びに結合剤、例えば、デンプン、アカシアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース及びこれらの誘導体を含有することができる。抗癌薬は、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）担体内に配置された坐剤内に配合することもできる。

【０３２５】

液体剤形は、例えば、経口、局所又は静脈内投与のための液剤又は懸濁剤を形成するために、担体、例えば、生理食塩水（例えば、０．９（重量／容量）％塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの中に抗癌剤及び場合により１種以上の薬学的に許容されるアジュバントを溶解又は分散させることにより調製することができる。抗癌薬は、停留浣腸剤に配合することもできる。

【０３２６】

局所投与のため、治療有効用量は、エマルジョン、ローション剤、ゲル剤、フォーム剤、クリーム剤、ゼリー剤、液剤、懸濁剤、軟膏剤及び経皮貼付剤の形態であり得る。吸入による投与のため、抗癌薬は、乾燥粉末として、又はネブライザーによる液体形態で送達することができる。非経口投与のため、治療有効用量は、無菌注射液及び無菌包装粉末の形態であり得る。好ましくは、注射液は、約４．５から約７．５のｐＨにおいて配合される。

【０３２７】

治療有効用量は、凍結乾燥形態で提供することもできる。このような剤形は、投与前の再構成のために、緩衝液、例えば、重炭酸塩を含むことができ、又は緩衝液は例えば水による再構成のための凍結乾燥剤形態で含めることができる。凍結乾燥剤形は、好適な血管収縮剤、例えばエピネフリンを更に含むことができる。凍結乾燥剤形は、再構成された剤形を対象に直ちに投与することができるように、再構成のための緩衝液と組み合わせて場合により包装されてシリンジで提供することができる。

【０３２８】

対象は、ある治療レジメンの効力を査定するために定期的時間間隔で追跡することもできる。例えば、あるシグナル伝達分子の活性化状態は、本明細書に記載の抗癌薬の１種以上による治療の治療効果に基づいて変化し得る。対象を追跡して個別化されたアプローチにおけるある薬物又は治療の応答を査定し、これらの効果を理解することができる。更に、特定の抗癌薬又は抗癌薬の組合せに最初に応答する対象は、薬物又は薬物の組合せに対して治療抵抗性になり得、このことは、これらの対象に獲得薬物耐性が生じたことを示している。これらの対象は、対象の現行治療を中止し、代替療法を本発明の方法に従って処方することができる。

【０３２９】
ある態様において、本発明に記載の方法は、種々の集団における胃癌の予後診断及び／又は再発の可能性を予測する遺伝子発現マーカーのパネルと結び付けて使用することができる。これらの遺伝子パネルは、再発を経験する可能性が低い、従ってアジュバント化学療法からの利益が得られる可能性が低い個体を同定するために有用であり得る。これらの発現パネルを使用して疾患不含の全生存アウトカムに悪影響を及ぼさずにアジュバント化学療法を安全に回避することができる個体を同定することができる。好適なシステムには、限定されるものではないが、Ｇｅｎｏｍｉｃ Ｈｅａｌｔｈ，Ｉｎｃ．からの２１遺伝子パネルであるＯｎｃｏｔｙｐｅ ＤＸ（商品名）；Ａｇｅｎｄｉａからの７０遺伝子パネルであるＭａｍｍａＰｒｉｎｔ（商標）；及びＶｅｒｉｄｅｘからの７６遺伝子パネルが含まれる。
【０３３０】
更に、ある他の態様において、本明細書に記載の方法は、原発不明癌（ＣＵＰ）についての原発腫瘍を同定する遺伝子発現マーカーのパネルと結び付けて使用することができる。これらの遺伝子パネルは、最初に胃癌を有すると診断された患者に与えられる治療と一致する治療から利益が得られるであろう転移性癌を有する患者を同定する際に有用であり得る。好適なシステムには、限定されるものではないが、９２種の遺伝子を測定して３９種の腫瘍タイプについての原発出現部位を同定するＲＴ－ＰＣＲベースの発現アッセイであるＡｖｉａｒａ ＣａｎｃｅｒＴＹＰＥ ＩＤアッセイ；及びマイクロアレイ上で１６００種超の遺伝子の発現を測定し、１５種の既知の組織タイプに対して腫瘍の遺伝子発現「シグニチャー」を比較するＰａｔｈｗｏｒｋ（商標）Ｔｉｓｓｕｅ ｏｆ Ｏｒｉｇｉｎ Ｔｅｓｔが含まれる。
【０３３１】
Ｘ．実施例
以下の実施例は、本発明を限定するためではなく例示するために提供する。
【０３３２】
（実施例１）循環細胞の単離、刺激及び溶解
固形腫瘍の循環細胞は固形腫瘍から転移又は微小転移した細胞を含み、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、癌幹細胞（ＣＳＣ）及び／又は腫瘍へ移動中である細胞（例えば、循環内皮前駆細胞（ＣＥＰＣ）、循環内皮細胞（ＣＥＣ）、循環プロ血管新生骨髄性細胞、循環樹状細胞など）を含む。循環細胞を含有する患者試料は、任意のアクセス可能な生体液（例えば、全血、血清、血漿、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液、尿、唾液、細針吸引液など）から得ることができる。循環細胞は、例えば、免疫磁気分離（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）参照）、Ｉｍｍｕｎｉｃｏｎ（Ｈｕｎｔｉｎｇｄｏｎ Ｖａｌｌｅｙ，ＰＡ）によるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商品名）システム、マイクロ流体分離（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（例えば、Ｂａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１３：４８６５－４８７１（２００３））及び枯渇法（例えば、Ｍｅｙｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，２１：５２１－５３０（２００２）参照）を含む１種以上の分離方法を使用して患者試料から単離することができる。
【０３３３】
ＣＴＣの手動単離：
ＣＴＣの免疫磁気分離－手動単離に続く活性化アッセイ：
１）抗ＥｐＣＡＭモノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｌ

ｅｉｄｅｎ，Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）に既にコンジュゲートされた磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０；Ｄｙｎａｌ　ＡＳ、Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）を使用する。あるいは、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の混合物を使用することができる。
２）使用直前、プレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを有する等容量のＰＢＳ中で１回洗浄する。
３）２５μＬのプレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬの試料に添加する。
４）混合物を穏やかに傾斜及び回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。
６）上清を廃棄し、０．０１％のＢＳＡを有するＰＢＳ中に再懸濁させることによりビーズ結合細胞を３回洗浄し、次いで磁気分離する。
７）この試料を１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３３４】

試料の調製：
１）ヒト対象からの末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に抜き出す。穿刺した静脈から遊離される上皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
２）使用前に、０．９％のＮａＣｌにより１ｍＬの全血を１：３に希釈する。

【０３３５】

対照の調製：
１）細胞系対照は、ヒト癌細胞系をＨＬ－６０細胞中にスパイクすることにより作製する。
２）細胞系対照は、ヒト癌細胞系を健常ドナーからの全血中にスパイクすることにより作製する。

【０３３６】

ＣＥＣ及びＣＥＰＣの手動単離：
非限定的な例として、生存可能なＣＥＣ及びＣＥＰＣは、Ｂｅｅｒｅｐｏｏｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１５：１３９－１４５（２００４）に記載の免疫磁気分離／濃縮技術を使用して単離することができる。手短に述べると、末梢血を抗ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に既にコンジュゲートされた磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＩｇＧ$_1$）とともにインキュベートする。この抗体は、末梢血中で造血細胞又は上皮細胞以外の全系統の内皮細胞を認識する（Ｇｅｏｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，１３９：６５－７５（１９９１））。造血細胞及び上皮細胞の陰性選択は、適切な抗体（例えば、白血球を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＣＤ４５ビーズ、単球を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＣＤ１４ビーズ、上皮細胞を枯渇させるためにはＤｙｎａｌ－ＥｐＣＡＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））に結合した磁気ビーズを用いる陽性選択の前に使用することができる。本実施例においては陽性選択のみを使用する。

【０３３７】

ＣＥＣ及びＣＥＰＣの免疫磁気分離－手動単離に続く活性化アッセイ：
１）抗ＣＤ１４６モノクローナル抗体（Ｋｏｒｄｉａ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に既にコンジュゲートされた磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０）を使用する。
２）使用直前、プレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを有する等容量のＰＢＳ中で１回洗浄する。
３）２５μＬのプレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬの試料に添加する。
４）混合物を穏やかに傾斜及び回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。
６）上清を廃棄し、０．０１％のＢＳＡを有するＰＢＳ中に再懸濁させることによりビーズ結合細胞を３回洗浄し、次いで磁気分離する。

７）この試料を１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。
【０３３８】
試料の調製：
１）ヒト対象からの末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に抜き出す。穿刺した静脈から遊離される内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
２）使用前に、０．９％のＮａＣｌにより１ｍＬの全血を１：３に希釈する。
【０３３９】
対照の調製：
１）細胞系対照は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）をＨＬ－６０細胞中にスパイクすることにより作製する。
２）細胞系対照は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を健常個体から提供された全血中にスパイクすることにより作製する。
【０３４０】
ＣＥＰＣ（ＣＥＣ不含）の手動単離：
ＣＥＰＣは、種々の血管新生成長因子に応答して成熟内皮細胞に分化する能力を有する骨髄由来前駆細胞の循環サブタイプである。ＣＥＰＣは、表面マーカーＣＤ３４を認識する抗体による選択により単離することができる。ＣＤ１３３は、ＣＥＰＣから未成熟内皮前駆細胞（ＥＰＣ）又は原子造血幹細胞（ＨＳＣ）を分化させる表面マーカーである。様々な起源からのＣＥＰＣの種々の単離手順は、接着培養又は磁気マイクロビーズを使用して記載されている。本実施例において、Ａｓａｈａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７５：９６４－９６７（１９９７）に記載のプロトコールから修正されたプロトコールを使用する。
【０３４１】
ＣＥＰＣの免疫磁気分離－手動単離に続く活性化アッセイ：
１）磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ　Ｍ４５０　ＣＤ３４）を使用する。これらのビーズは、ＣＤ３４表面抗原に特異的なモノクローナル抗体によりコーティングする。
２）使用直前、プレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを有する等容量のＰＢＳ中で１回洗浄する。
３）２５μＬのプレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを１ｍＬの試料に添加する。
４）混合物を穏やかに傾斜及び回転させながら、２～８℃で２０分間インキュベートする。
５）試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に２分間配置する。
６）上清を廃棄し、０．０１％のＢＳＡを有するＰＢＳ中に再懸濁させることによりビーズ結合細胞を３回洗浄し、次いで磁気分離する。
７）この試料を１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。
【０３４２】
試料の調製：
１）ヒト対象からの末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に抜き出す。穿刺した静脈から遊離される内皮細胞による汚染を回避するために、最初の３～５ｍＬは廃棄する。
２）平衡塩類溶液により１０ｍＬの全血を１：１に希釈する。
３）４ｍＬの希釈血液を１０ｍＬの試験管中の３ｍＬのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ上へ層状に重ねる。
４）試験管を１８～２０℃において３０～４０分間４００×ｇにおいて回転させる。
５）無菌パスツールピペットを使用して血漿及び血小板を含有する上層を取り出し、界面で平静である単核球の層を残す。
６）単核球は、無菌ピペットを使用して無菌遠心分離管に移す。
７）６ｍＬの平衡塩類溶液を添加し、細胞を穏やかに再懸濁させる。
８）混合物を１８～２０℃において１０分間６０～１００×ｇにおいて遠心分離する。

９）上清を除去し、各試験管からの単核球を１ｍＬのＰＢＳ中に再懸濁させる。
【０３４３】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステムを使用するＣＴＣ、ＣＥＣ及びＣＥＰＣの細胞単離：
Ｖｅｒｉｄｅｘ，ＬＬＣ（Ｗａｒｒｅｎ，ＮＪ）は、ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システム、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キット及びＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）アナライザーから構成されるＣｅｌｌＳｅａｒｃｈシステムを市販している。ＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システムは、半自動化試料調製システムである（Ｋａｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ，２５：１０４－１１０（２００２））。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キットは：上皮細胞に特異的な抗ＥｐＣＡＭ抗体によりコーティングされた強磁性流体；サイトケラチン８、１８及び１９に対するフィコエリトリンにコンジュゲートされた抗体；アロフィコシアニンにコンジュゲートされた抗ＣＤ４５抗体；ＤＡＰＩ色素；並びに細胞を洗浄し、透過させ、再懸濁化させるための緩衝液からなる。本実施例において使用するプロトコールは、Ａｌｌａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１０：６８９７－６９０４（２００４）にも記載されている。全ＶｅｒｉｄｅｘシステムはＣＴＣ計数のために使用することができ、又はＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システムを用いた単離後に試料を手動で除去することにより、分析前に経路活性化のための単離方法を提供することができる。ＣＴＣの数は、アルゴリズム開発のために情報を提供することができる。
【０３４４】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－ＣＴＣ濃縮に続く計数：
１）７．５ｍＬの血液を６ｍＬの緩衝液と混合し、１０分間８００×ｇにおいて遠心分離し、次いでＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システム上に配置する。
２）機器が上清を吸引した後、機器は強磁性流体を添加する。
３）機器はインキュベーション及び後続の磁気分離工程を実施する。
４）未結合細胞及び残留血漿を吸引する。
５）蛍光染色のために透過緩衝液を結び付けて染色試薬を添加する。
６）システムによるインキュベーション後、細胞を再び磁気的に分離し、ＭａｇＮｅｓｔ（商標）細胞提示装置に再懸濁させる。
７）次いで、ＭａｇＮｅｓｔ（商標）細胞提示装置を４色半自動化蛍光顕微鏡であるＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）アナライザー上に配置する。
８）Ｖｅｒｉｄｅｘ規定基準を満たす画像を捕捉し、最終手動選択のためにウエブベースのブラウザにより示す。
９）細胞計数の結果は、血液７．５ｍＬ当たりの細胞数として表現する。
【０３４５】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－ＣＴＣ濃縮に続く活性化アッセイ：
１）７．５ｍＬの血液を６ｍＬの緩衝液と混合し、１０分間８００×ｇにおいて遠心分離し、次いでＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システム上に配置する。
２）機器が上清を吸引した後、機器は強磁性流体を添加する。
３）機器はインキュベーション及び後続の磁気分離工程を実施する。
４）未結合細胞及び残留血漿を吸引する。
５）試料を１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。
【０３４６】
Ｖｅｒｉｄｅｘシステム－ＣＥＣ及びＣＥＰＣ濃縮に続く活性化アッセイ：
１）Ｖｅｒｉｄｅｘは、抗ＣＤ１４６抗体による捕捉を利用するＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）内皮細胞キットを供給する。ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）内皮細胞キットは、血液試料調製のためにはＣｅｌｌＴｒａｃｋｓ（商標）ＡｕｔｏＰｒｅｐ（商標）システムと、及び全血からのＣＥＣ及びＣＥＰＣを計数及び特性決定するためにはＣｅｌｌＴ

ｒａｃｋｓ（商標）アナライザーと結び付けて使用される。プロトコールは、ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（商品名）上皮細胞キットについてのプロトコールと同一である。

【０３４７】

試料の調製：

１）計数：ヒト対象からの末梢血を、製造業者の取扱説明書に従ってＣｅｌｌＳａｖｅ保存用試験管内に採血する。穿刺した静脈から遊離される上皮又は内皮細胞による汚染を回避するため、最初の３～５ｍＬは廃棄する。

２）経路分析：ヒト対象からの末梢血を、１ｍｇ／ｍＬのＥＤＴＡを含有するシリコン被覆試験管内に抜き出す。穿刺した静脈から遊離される上皮又は内皮細胞による汚染を回避するため、最初の３～５ｍＬは廃棄する。

【０３４８】

ＣＳＣの手動単離：

腫瘍が固有の自己再生及び生存機序を有する小集団の推定癌幹細胞を含有するという証拠が確立されつつある（例えば、Ｓｅｌｌｓ，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｎｃｏｌ．Ｈｅｍａｔｏｌ．，５１：１－２８（２００４）；Ｒｅｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，４１４：１０５－１１１（２００１）；Ｄｏｎｔｕ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｌ．，１５：１９３－１９７（２００４）；及びＤｉｃｋ，Ｎａｔｕｒｅ，４２３：２３１－２３３（２００３）参照）。癌幹細胞（ＣＳＣ）は長時間静穏状態で存在し得、このことによりこの細胞が分裂細胞を標的とする化学療法薬に耐性となる。この癌開始集団は、選択的除去のための標的療法を受ける自己再生及び生存経路の活性化について特徴付けることができる。ＣＳＣの単離手順は、接着培養又は磁気マイクロビーズを使用して記載されている。本実施例においては、Ｃｏｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎ．Ｒｅｓ．，１２：５６１５（２００６）に記載のプロトコールから修正されたプロトコールを使用する。

【０３４９】

免疫磁気ＣＳＣ単離－手動単離に続く活性化アッセイ：

１）磁気ビーズ（Ｄｙｎａｌ ＡＳ；Ｏｓｌｏ，Ｎｏｒｗａｙ）を使用する。これらのビーズは、ＣＤ３４又はＣＤ１３３表面抗原のいずれかに特異的なモノクローナル抗体によりコーティングする。

２）使用直前、プレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを０．０１％のＢＳＡを有する等容量のＰＢＳ中で１回洗浄する。

３）１～10^7個のプレコーティングされたＤｙｎａｂｅａｄｓを３ｍＬの試料に添加する。

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

５）混合物を１ｍＬ部分に分割し、各試験管を磁気分離装置（ＭＰＬ－１マグネット）内に少なくとも６分間配置する。

６）上清を廃棄し、０．０１％のＢＳＡを有するＰＢＳ中に再懸濁させることによりビーズ結合細胞を３回洗浄し、次いで磁気分離する。

７）この試料を１００μＬの刺激緩衝液中に再懸濁させる。

【０３５０】

試料の調製：

１）骨髄標本を、癌患者からインフォームドコンセントを得た後に得る。

２）骨髄吸引液を処理する工程は、Ｂａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎ．Ｒｅｓ．，６：３５５２－３５５９（２０００））に記載のとおり実施する。任意の播種性腫瘍細胞を含有する単核球分画は、３５分間にわたり４０００×ｇでＢｅｃｋｍａｎ ＧＳ－６遠心分離装置を使用してＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ密度勾配遠心分離により濃縮し、ＰＢＳにより２回洗浄する。

【０３５１】

単離されたＣＴＣの細胞刺激及び溶解：

細胞の刺激：
１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３５２】
薬物処理による細胞の刺激：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３５３】
薬物処理による細胞の刺激（フィードバックループ）：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで細胞をＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）により刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。
【０３５４】
下記のプロトコールを使用して刺激されたＣＴＣを溶解させる：
１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。
２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。
３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。
４）混合物を最高速度でマイクロフュージ（ｍｉｃｒｏｆｕｇｅ）内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。
５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。
【表３】

溶解緩衝液レシピ(10mL)			
試薬	原液濃度	最終濃度	容量
10% Triton X-100	10	1	1.00
1M Tris、pH7.5	1	0.05	0.05
1M NaF	1	0.05	0.05
5M NaCl	5	0.1	0.20
2M B-グリセロールホスフェート	1	0.05	0.50
0.1M Na_3VO_4	0.1	0.001	0.10
1mg/mL ペプスタチン	1	0.10	
完全ミニプロテアーゼ			1錠
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		合計(mL)	3.00
		水(mL)	7.00

【０３５５】
単離されたＣＥＣ及び／又はＣＥＰＣの細胞刺激及び溶解：
ＶＥＧＦは、ＣＥＰＣ（Ｌａｒｒｉｖｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７８：２２００６－２２０１３（２００３））及び血管壁から剥がれた成熟ＣＥＣ（Ｓｏｌｏｖｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ，９３：３８２４－３８３０（１９９９））の両方において抗アポトーシス経路を活性化することにより生存を促進すると考えられている。ＶＥＧＦは、ＣＥＰＣ又は成熟ＣＥＣの増殖を刺激することもできるが、成熟ＣＥＣはＣＥＰＣに比較して限定された増殖能力しか有しないと思われる（Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０５：７１－７７（２０００））。これらの理由から、ＣＥＣ及び／又はＣＥＰＣは、溶解前にＶＥＧＦファミリー成長因子とのインキュベーションにより活性化される。
【０３５６】
細胞の刺激：
１）成長因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ及び／又はＡｎｇをそれぞれ１００

ｎＭで細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３５７】
薬物処理による細胞の刺激：
１）試料を、治療有効濃度のＡｖａｓｔｉｎ、Ｎｅｘａｖａｒ、Ｓｕｔｅｎｔ及び／又はラパマイシンアナログと、３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、因子ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ及び／又はＡｎｇをそれぞれ１００ｎＭで添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３５８】
薬物処理による細胞の刺激（フィードバックループ）：
１）試料を、治療有効濃度のＡｖａｓｔｉｎ、Ｎｅｘａｖａｒ、Ｓｕｔｅｎｔ及び／又はラパマイシンアナログと、３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ、ＰＩＧＦ及び／又はＡｎｇをそれぞれ１００ｎＭで添加することにより細胞を刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。
【０３５９】
単離されたＣＥＣ及び／又はＣＥＰＣ細胞を、下記のプロトコールを使用して溶解させる：
１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。
２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。
３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。
４）混合物を最高速度でマイクロフュージ内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。
５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。
【０３６０】
単離されたＣＳＣの細胞刺激及び溶解：
刺激された細胞：
１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３６１】
薬物処理により刺激された細胞：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３６２】
薬物処理により刺激された細胞（フィードバックループ）：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。
【０３６３】
単離されたＣＳＣ細胞を、下記のプロトコールを使用して溶解させる：
１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。
２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。
３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。
４）混合物を最高速度でマイクロフュージ内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。
５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。
【０３６４】
（実施例２）組織、生検物又は一次培養物からの腫瘍細胞抽出物の調製

本実施例は、腫瘍組織又は生検標本から細胞を単離し、刺激し、及び溶解させる方法を説明する。本実施例は、組織、生検物又は全血から単離された腫瘍細胞の一次培養を開始し、刺激し、及び溶解させる方法も説明する。化学療法剤をスクリーニングするための生物学的標本から腫瘍細胞を単離及び培養する追加の方法は、例えば、米国特許第第５，７２８，５４１号；第６，４１６，９６７号；第６，８８７，６８０号；第６，９００，０２７号；第６，９３３，１２９号；第７，１１２，４１５号並びに米国特許出願公開第２００４００２３３７５号及び第２００５０２０２４１１号に記載されている。本実施例に従って調製された細胞抽出物は、単一検出又は本明細書に記載の近接アッセイにおいて使用することができる。

【０３６５】

原発性又は転移性組織からの腫瘍細胞の単離：

細胞の単離及び培養：

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

２）試料は、抽出後７２時間以内に室温で貯蔵又は輸送することができる。

３）試料を細胞培養培地中で３回すすぎ洗う。

４）組織は外科用メスにより小片に細分化し、次いで微細なワイヤーメッシュに導通させることにより細胞懸濁液に分解させる。

５）あるいは、細分化された組織を、抗生物質を含有する血清不含細胞培養培地中に希釈された０．２５％コラゲナーゼＩＩ及び０．００１％ＤＮアーゼを含有するカクテルにより処理する。インキュベーションは、穏やかに撹拌しながら１５～２０分間行う。細胞培養培地により３回洗浄することによる処理後に酵素を除去する。

６）細胞濃度を10^6／ｍＬに調整し、細胞を６ウエルプレート内に播種し、一晩沈降させる。翌日、細胞をトリプシン処理し、リガンドによる刺激及び／又は標的薬による阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種する。

【０３６６】

解離された腫瘍からの細胞の細胞刺激及び溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。

【０３６７】

薬物処理による細胞の刺激：

１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。

２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。

【０３６８】

薬物処理による細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。

２）次いで細胞をＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）により刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。

【０３６９】

刺激された細胞は、下記のプロトコールを使用して溶解させる：

１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。

２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。

４）混合物を最高速度でマイクロフュージ内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。

５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。
【０３７０】
生検標本からの腫瘍細胞の単離：
細胞の単離及び培養：
１）コア生検物を外科的に抽出し（真空支援生検のための１～２片の生検物とともに、１４ゲージ針については２つのコア、１６ゲージ針については３つのコア及び１８ゲージ針については４つのコア）、腫瘍標本のための細胞培養培地を含有する１０ｍＬの無菌バイアル内に配置する。
２）試料は、抽出後７２時間以内に室温で貯蔵又は輸送することができる。
３）コア生検物からの細胞材料を、微細なワイヤーメッシュに導通させることにより細胞懸濁液に分解させる。
４）あるいは、生検物を、抗生物質を含有する細胞培養培地中に希釈された０．２５％コラゲナーゼＩＩ及び０．００１％ＤＮアーゼを含有するカクテルにより処理することができる。インキュベーションは、穏やかに撹拌しながら１５～２０分間行う。細胞培養培地により３回洗浄することによる処理後に酵素を除去する。
５）細胞濃度を10^6／ｍＬに調整し、細胞を６ウエルプレート内に播種し、一晩沈降させる。翌日、細胞をトリプシン処理し、リガンドによる刺激及び／又は標的薬による阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種する。
【０３７１】
生検物からの細胞の細胞刺激及び溶解：
細胞の刺激：
１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３７２】
薬物処理による細胞の刺激：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。
【０３７３】
薬物処理による細胞の刺激（フィードバックループ）：
１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。
２）次いで細胞をＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）により刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。
【０３７４】
刺激された細胞は、下記のプロトコールを使用して溶解させる：
１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。
２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。
３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。
４）混合物を最高速度でマイクロフュージ内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。
５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。
【０３７５】
組織、生検物又は全血から単離された腫瘍細胞からの一次培養の開始：
細胞の培養：
１）上記の組織、生検物又は全血から単離された腫瘍細胞を、単離された腫瘍細胞の数に応じて小さい無菌フラスコ（例えば、Ｔ－２５）、ペトリ皿（例えば、１０ｍｍ）又はプレート（例えば、２４ウェルプレート）内で培養する。
２）インキュベーションは、５％CO_2が補給された加湿３７℃インキュベーション内の

細胞培養培地（例えば、２％ＦＢＳ及び抗生物質を有するＲＭＰＩ－１６４０）中で行う。経時的に細胞は容器底部上で単層を形成し、分裂し始める。細胞がコンフルエンスに近付くと、細胞をトリプシン処理し、リガンドによる刺激及び／又は標的薬による阻害のためにマイクロタイタープレート内に再播種する。

【０３７６】

組織、生検物又は全血から単離された腫瘍細胞からの一次培養物の細胞刺激及び溶解：

細胞の刺激：

１）成長因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を細胞に添加し、３７℃で５分間インキュベートする。

【０３７７】

薬物処理による細胞の刺激：

１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。

２）次いで、因子ＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）を添加することにより細胞を刺激し、３７℃で５分間インキュベートする。

【０３７８】

薬物処理による細胞の刺激（フィードバックループ）：

１）試料を治療有効濃度のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ、ラパチニブ、Ｔａｒｃｅｖａ及び／又はラパマイシンアナログと３７℃で３０分間インキュベートする。

２）次いで細胞をＴＧＦ－α（１００ｎＭ）、Ｈｒｇ（１００ｎＭ）及び／又はＩＧＦ（１００ｎＭ）により刺激し、３７℃で１２０分間インキュベートする。

【０３７９】

刺激された細胞は、下記のプロトコールを使用して溶解させる：

１）新たな溶解緩衝液を、表３に記載の試薬を混合することにより新たに調製する。

２）最終洗浄後、細胞を氷上で１００μＬの冷蔵緩衝液中に再懸濁させる。

３）インキュベーションを氷上で３０分間実施する。

４）混合物を最高速度でマイクロフュージ内で１０分間回転させて溶解物からビーズを分離する。

５）溶解物をアッセイのために新しい試験管に移し、又は８０℃で貯蔵する。

【０３８０】

（実施例３）チラミドシグナル増幅による単一検出マイクロアレイＥＬＩＳＡ

本実施例は、希少循環細胞中のシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに好適な優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックス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）捕捉抗体を、２倍の段階希釈物により１６パッドのＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．；Ｆｌｏｒｈａｍ　Ｐａｒｋ，ＮＪ）上にプリントした。

２）一晩乾燥させた後、スライドをＷｈａｔｍａｎブロッキング緩衝液によりブロッキングした。

３）８０μＬの細胞溶解物を、１０倍の段階希釈物を含む各パッド上に添加した。スライドを、室温で２時間インキュベートした。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより６回洗浄した後、８０μＬのビオチン標識検出抗体（例えば、リン酸化ｃ－Ｍｅｔを認識するモノクローナル抗体又は活性化状態とは無関係にｃ－Ｍｅｔを認識するモノクローナル抗体）を室温で２時間インキュベートした。

５）６回洗浄した後、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）を添加し、１時間インキュベートしてＳＡ－ＨＲＰをビオチン標識検出抗体に結合させた。

６）シグナル増幅のため、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを添加し、１５分間反応させた。スライドをＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより６回、２０％ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより２回及びＴＢＳにより１回洗浄した。

７）８０μＬのＳＡ－Ａｌｅｘａ　５５５を添加し、３０分間インキュベートした。次い

でスライドを２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．；Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）上でスキャンした。

【０３８１】

（実施例４）チラミドシグナル増幅による近接二重検出マイクロアレイＥＬＩＳＡ

本実施例は、希少循環細胞中のシグナル伝達分子の活性化状態を分析するのに好適な優れたダイナミックレンジを有するマルチプレックス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）捕捉抗体を、１ｍｇ／ｍＬから０．００４ｍｇ／ｍＬの範囲内の連続希釈物を含む１６パッドのＦＡＳＴスライド（Ｗｈａｔｍａｎ　Ｉｎｃ．）上でプリントした。

２）一晩乾燥させた後、スライドをＷｈａｔｍａｎブロッキング緩衝液によりブロッキングした。

３）８０μＬのＡ４３１細胞溶解物を、１０倍の連続希釈物を有する各パッド上に添加した。スライドを室温で２時間インキュベートした。

４）ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより６回洗浄した後、ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎ／２％ＢＳＡ／１％ＦＢＳ中に希釈された近接アッセイのための８０μＬの検出抗体をスライドに添加した。インキュベーションを室温で２時間行った。

ａ）非限定的な例として、検出抗体は以下のものを含むことができる：（ｉ）グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）に直接コンジュゲートされた抗ｃ－Ｍｅｔモノクローナル抗体；及び（ｉｉ）セイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に直接コンジュゲートされたリン酸化ｃ－Ｍｅｔを認識するモノクローナル抗体。

ｂ）あるいは、検出工程は、リン酸化ｃ－Ｍｅｔを認識するモノクローナル抗体のビオチン－コンジュゲートを利用することができる。これらの例において、６回洗浄した後、ストレプトアビジン－ＨＲＰによる１時間のインキュベーションの追加の連続工程を含める。

ｃ）あるいは、検出工程は、抗ｃ－Ｍｅｔ抗体のオリゴヌクレオチド媒介グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）コンジュゲートを利用することができる。リン酸化ｃ－Ｍｅｔ抗体に直接コンジュゲートされた、又はＨＲＰのビオチン－ストレプトアビジン（ＳＡ）結合コンジュゲートのいずれかを使用することができる。

５）シグナル増幅のため、５μｇ／ｍＬの８０μＬのビオチン－チラミドを添加し、１５分間反応させた。スライドをＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより６回、２０％ＤＭＳＯ／ＴＢＳ－Ｔｗｅｅｎにより２回及びＴＢＳにより１回洗浄した。

６）８０μＬのＳＡ－Ａｌｅｘａ５５５を添加し、３０分間インキュベートした。次いでスライドを２回洗浄し、５分間乾燥させ、マイクロアレイスキャナ（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｉｎｃ．）上でスキャンした。

【０３８２】

（実施例５）薬物選択のための活性化プロファイルの作成

本発明の方法及び組成物は、癌治療のための薬物選択に適用することができる。典型的なプロトコールは、２種のプロファイル、すなわち参照活性化プロファイル及び試験活性化プロファイルを作成し、次いでこれらを比較して特定の薬物治療レジメンの効力を決定することを必要とする（図２参照）。

【０３８３】

参照活性化プロファイル

参照活性化プロファイルを導出するため、血液又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料は、抗癌薬治療前に特定のタイプの癌（例えば、胃癌）を有する患者から得る。癌性腫瘍に由来する希少循環細胞は、血液試料から単離し、又は腫瘍細胞は、例えば、本明細書により詳細に記載された免疫磁気分離技術を使用してＦＮＡ試料から単離する。単離された細胞は、１種以上の成長因子を用いてインビトロで刺激することができる。次いで、刺激された細胞を溶解させ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において変化され得るシグナル伝達分子に特異的な捕捉抗体のパネルの希釈系列を含有するアドレス可能なアレイに適用する。単一検出又は近接アッセイは、適切な検出抗体（例え

ば、活性化状態非依存性抗体及び／又は活性化状態依存性抗体）を使用して実施して対象となる各シグナル伝達分子の活性化状態を決定する。表２に示した「経路選択」表は、患者の癌のタイプに基づいてどの活性化状態を検出すべきかを選択するために特に有用である。例えば、ある患者は、表２の「経路１」に記載のＥＧＦＲ経路の活性化状態を提示する癌のタイプを有し得る。あるいは、別の患者は、表２の「経路２」に記載のＥＧＦＲ経路の活性化状態を提示する別の癌のタイプを有し得る。従って、参照活性化プロファイルは、任意の抗癌薬の非存在下で患者の癌におけるシグナル伝達分子の活性化状態を提供するように作成する。

【０３８４】

試験活性化プロファイル

試験活性化プロファイルを得るため、第２の血液又はＦＮＡ試料を、抗癌薬治療前又は抗癌薬の投与後のいずれかに（例えば、癌治療の過程を通して任意の時点に）特定タイプの癌（例えば、胃癌）を有する患者から得る。癌性腫瘍に由来する希少循環細胞を血液試料から単離し、又は腫瘍細胞をＦＮＡ試料から単離する。単離された細胞を抗癌薬による治療を受けていない対象から得る場合、単離された細胞を、上記の参照活性化プロファイルから決定された活性化シグナル伝達分子の１種以上を標的とする抗癌薬とインキュベートする。「薬物選択」表（表１）は、特異的活性化標的シグナル伝達分子を阻害する、承認されている又は臨床試験下の適切な抗癌薬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化プロファイルから決定された場合、細胞を表１の欄「Ａ」又は「Ｂ」に列挙した薬物の１種以上とインキュベートすることができる。次いで、単離された細胞を１種以上の成長因子によりインビトロで刺激することができる。次いで、単離された細胞を溶解させて細胞抽出物を生成する。細胞抽出物をアドレス可能なアレイに適用し、近接アッセイを実施して対象となる各シグナル伝達分子の活性化状態を決定する。従って、患者のための試験活性化プロファイルを、特定の抗癌薬の存在下での患者の癌におけるシグナル伝達分子の活性化状態を提供するように作成する。

【０３８５】

薬物の選択

抗癌薬は、試験活性化プロファイルを対照活性化プロファイルと比較することにより、患者の癌の治療に好適か不適かを決定する。例えば、薬物治療により、ほとんど又は全部のシグナル伝達分子が薬物の非存在下よりも実質的に低く活性化される場合、例えば、薬物を用いない強い活性化から薬物を用いた弱い又は極めて弱い活性化への変化が引き起こされる場合、治療は患者の癌に好適であると決定する。このような例において、治療は薬物療法を受けていない患者においては好適な抗癌薬を用いて開始し、又は薬物を既に摂取している患者においては好適な抗癌薬による後続の治療を継続する。しかしながら、薬物治療が患者の癌の治療に不適とみなした場合、異なる薬物を選択及び使用して新規な試験活性化プロファイルを作成し、次いでこのプロファイルを参照活性化プロファイルと比較する。このような例において、治療は薬物療法を受けていない患者においては好適な抗癌薬により開始し、又は不適な薬物を現在摂取している患者においては後続の治療を好適な抗癌薬に変更する。

【０３８６】

（実施例６）抗癌薬療法選択のためにｃ－Ｍｅｔ活性化を検出する方法

本実施例は、抗ｃ－Ｍｅｔ阻害剤に対して応答する患者を同定するための、及び抗ｃ－Ｍｅｔ阻害剤と他の標的剤との組合せから利益を受ける患者を同定するための、本明細書に記載のマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームの使用を説明する。

【０３８７】

乳癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、腎臓癌及び甲状腺癌を含む広範なヒト悪性腫瘍は、ｃ－Ｍｅｔ刺激の持続、過剰発現又は突然変異を示す。特に、ｃ－Ｍｅｔの活性化突然変異は、乳頭状腎臓癌の特定の遺伝型を有する患者において明確に同定されており、このことは、ｃ－Ｍｅｔがヒト腫瘍発生に直接関与していることを示している。ｃ－Ｍｅｔ受容体の

調節不全又はこのリガンドの肝細胞成長因子（ＨＧＦ）の過剰発現に起因するｃ－Ｍｅｔシグナリング経路のアベラントなシグナリングは、悪性表現型と関連している。

【０３８８】

ｃ－Ｍｅｔシグナリングがいくつかの癌の進行及び拡散に関与する広範な証拠並びに疾患におけるこの役割についての理解の向上は、癌薬物開発における主な標的としてｃ－Ｍｅｔ及びＨＧＦへのかなりの関心を生み出した。この関心は、潜在的な臨床用途を有する種々のｃ－Ｍｅｔ経路アンタゴニストの開発をもたらした。経路選択的抗癌薬開発のこの３種の主なアプローチは、リガンド／受容体相互作用の拮抗作用、チロシンキナーゼ触媒活性の阻害及び受容体／エフェクター相互作用の遮断を含む。

【０３８９】

いくつかのｃ－Ｍｅｔアンタゴニストが、目下臨床調査中である。モノクローナル抗体及び小分子チロシンキナーゼ阻害剤の両方を含むこれらの薬剤のいくつかの前臨床結果は、有望である。興味深いことに、ｃ－Ｍｅｔ増幅を有する患者は、チロシンキナーゼ阻害剤に対して応答しない。いくつかの多標的療法も臨床において調査中であり、特にチロシンキナーゼ阻害に関して見込みがあると実証されている。

【０３９０】

ｃ－Ｍｅｔ受容体チロシンキナーゼは、多くの悪性腫瘍において過剰発現され得、生物学的及び生化学的機能において重要である。ｃ－Ｍｅｔ受容体の活性化は、細胞成長、浸潤、血管新生及び転移の増加をもたらし得る。チロシンキナーゼドメイン、膜近傍ドメイン又はセマホリンドメイン内の増幅及び／又は活性化突然変異が、ｃ－Ｍｅｔについて同定されている。多数の治療方針がｃ－Ｍｅｔを阻害するために用いられている。いくつかの臨床試験は、種々の悪性腫瘍についてｃ－Ｍｅｔ及びこのリガンドの肝細胞成長因子（ＨＧＦ）を調査している。従って、患者全血又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料中に見出される限定数の癌細胞においてｃ－Ｍｅｔリン酸化をプロファイリングする方法は、疾患病因全体への貴重な見識を提供し、従ってより良好な抗癌療法選択をもたらす。

【０３９１】

図３は、Ａ４３１扁平上皮癌細胞においてｃ－ＭｅｔリガンドＨＧＦがｃ－Ｍｅｔリン酸化を刺激したが、ＨＥＲ２リン酸化は刺激しなかったことを示す。ＨＥＲ２リン酸化は、ＨＧＦ処理によりわずかに減少した。

【０３９２】

図４は、ＨＣＣ８２７肺癌細胞においてｃ－Ｍｅｔが高度にリン酸化されたことを示す。ＨＧＦ処理により、これらのＨＣＣ８２７細胞においてｃ－Ｍｅｔリン酸化が約４倍だけ増加した。ＨＥＲ２リン酸化は、ＨＧＦ処理により影響を受けなかった。

【０３９３】

本明細書に記載のマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、標的タンパク質がマイクロアレイ表面上で捕捉されると、２種の検出酵素にコンジュゲートされた抗体の共局在化を要する固有の免疫複合体の形成を利用する。近接している２種の検出酵素（例えば、グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）及びセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ））間のチャネリング事象により、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、例えばｃ－Ｍｅｔのプロファイリングが極限感度で可能となる。分析特異性は、３種の異なる抗体の同時結合についての要件を前提として大きく向上する。特に、マルチプレックス化近接アッセイは、（１）マルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームを（２）三重抗体酵素チャネリングシグナル増幅プロセスと組み合わせてベースとする。固有及び新規な設計は、特異性を保存しつつ超高感度を付与する三重抗体酵素アプローチにより提供される：

（１）選択された標的は、マイクロアレイ表面上に段階希釈物でプリントされた標的特異性抗体により捕捉される。このフォーマットは、結合した各標的タンパク質ごとに後続のチャネリング事象のために酵素と結合している２種の追加の検出抗体の共局在化を要する（図５）。

（２）捕捉抗体による最初の標的結合及び捕捉された標的分子上の択一的エピトープを認

識するＧＯ（１０^{5}／分のＴＯＮ）にコンジュゲートされた抗体の二次結合により形成された免疫複合体は、ＧＯ基質グルコースの存在下でH_2O_2を生成することができる。
（３）次いで、H_2O_2の標的特異的局所流入は、捕捉された標的上のリン酸化ペプチドに結合するＨＲＰ（１０^{4}／分のＴＯＮ）にコンジュゲートされたホスホペプチド特異的抗体により利用され、従って標的特異的シグナルが増幅される。リン酸化標的を検出するための特異性は、３種の異なるタイプの抗体の同時結合のための要件を前提にすると、共同免疫検出及び増幅プロセスを介して大きく増加される。約２～３×１０^{4}回という少ないリン酸化事象の検出及び定量は、この検出を「単」細胞レベルにする本方法により定型的に達成される。ある例において、この共同免疫アッセイの構成は、タンパク質相互作用及び活性化状態を調査するために更に適用することができる。

【０３９４】

表４は、ｃ－Ｍｅｔ発現、突然変異又は活性化を有する原発性腫瘍を有する患者のパーセンテージを説明する。興味深いことに、胃癌においてＭＥＴ増幅を有する患者は、ｃ－Ｍｅｔ阻害剤に対して応答しない。

【表４】

腫瘍タイプ	MET 発現 （患者%）	MET 突然変異 （患者%）	MET 増幅 （患者%）
脳腫瘍	54-88	0-9	9-20
頭頸部腫瘍	52-68	11-27	n/a
中皮腫	74-100	0	n/a
肺腫瘍	41-72	8-13	0
甲状腺腫瘍	40-91	6-10	n/a
乳房腫瘍	25-60	0	n/a
腎細胞腫瘍	54-87	13-100	トリソミー7
肝臓腫瘍	68	0-30	n/a
結腸腫瘍	55-78	0	4-89
卵巣腫瘍	64	0-4	0
胃腫瘍	75-90	n/a	10-20
黒色腫	17-30	0	n/a

【０３９５】

ｃ－Ｍｅｔは、キナーゼ、例えば、ＲＯＮ、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＰＩ３Ｋ及びＳＨＣと相互作用し、これらをリン酸化することが実証されている。ｃ－Ｍｅｔは、他のキナーゼ、例えば、ｐ９５ＨＥＲ２、ＩＧＦ－１Ｒ、ｃ－ＫＩＴなどとも相互作用し得る。本明細書に記載のマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイは、患者全血（例えば、循環腫瘍細胞）又はＦＮＡ試料中に見出される限定数の癌細胞を使用してこれらのキナーゼ及びこれらの経路の１種以上を状態を調査するために実施することができる。アッセイの結果は、各個々の患者について適正な抗癌療法の決定を可能とする。

【０３９６】

図６は、以下のマーカーの発現及び／又は活性化状態を決定するための本発明の例示的なアドレス可能なアレイを説明する：ｃ－ＭＥＴ、ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２、ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３、ＩＧＦ－１Ｒ、ＲＯＮ、ｃ－ＫＩＴ、ＰＩ３Ｋ、ＳＨＣ、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２及びＶＥＧＦＲ３。近接アッセイマイクロアレイフォーマットを使用するこれらの受容体チロシンキナーゼ及びこれらの経路の調査により、有利には、特定のｃ－Ｍｅｔ阻害剤療法に対する患者の応答の予測が可能となる。非限定的な例として、ＸＬ－８８０に対して応答する患者は、活性化されたｃ－ＭＥＴ及びＶＥＧＦＲ２を有する一方、非応答者は活性化されたＲＴＫの組合せを有する。重要なことに、近接アッセイマイクロアレイプラットフォームは、適切な組合せ療法を選択するために使用することもできる。例えば、活性化されたｃ－ＭＥＴ、ＶＥＧＦＲ２及びＥＧＦＲを有する患者は、Ｉｒｅｓｓａ＋ＸＬ８８０の組合せにより治療すべきである一方、活性化されたｃ－ＭＥＴ、ＶＥＧＦＲ２、ＥｒｂＢ１、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３及びｐ９５ＥｒｂＢ２を有する患者はＴｙｋｅｒｂ＋ＸＬ８８０により治療すべきである。

【０３９７】

マルチプレックス化近接媒介プラットフォームは、有利には、限定量の試料においてＲＴＫ、例えば、ｃ－Ｍｅｔの活性化を検出するための単細胞レベルの感度を提供する。従って、転移性癌を有する患者から得られた循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）及び／又はｍＦＮＡ試料をプロファイリングしてオーダーメード療法及びインパクトのある臨床診療のための貴重な情報を提供することができる。

【０３９８】

（実施例７）抗癌薬療法選択のための近接アッセイを使用する胃癌のプロファイリング

腫瘍組織の逐次サンプリングに基づくキナーゼ及び他のシグナル伝達経路分子の発現／活性化プロファイリングは、時間及び治療に応じて腫瘍細胞において生じる変化に基づく貴重な情報を提供する。腫瘍進行のこの一時的なプロファイリングにより、臨床医が各患者において急速に発達する癌シグネチャーを追跡することが可能となる。本実施例は、胃癌に関与する受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）経路の発現のレベル及びリン酸化の程度を検出するための新規で堅牢なアッセイを説明し、単細胞レベルの感度を有するこのような治療ガイド診断システムを使用する利点を実証する。本アッセイは、一般に、試料、例えば、細針吸引液（ＦＮＡ）及び血液に依存し、このような試料から得られた限定量の癌細胞の調査のための高い感度及び特異性を達成する。

【０３９９】

本実施例は更に、（１）胃癌における９５Ｈｅｒ２の頻度を検査することにより；（２）臨床病理学的可変要素と胃癌におけるｐ９５Ｈｅｒ２との相関を分析することにより；（３）Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ耐性ｐ９５Ｈｅｒ２（＋）胃癌からのインビトロでの前臨床データと相関付けることにより；及び（４）ｐ９５Ｈｅｒ２（＋）胃癌患者においてラパチニブベースの治療について臨床試験を実行することにより、ｐ９５Ｈｅｒ２（＋）胃癌の発生率及び臨床的特徴を評価することを目的とする。

【０４００】

胃癌は、世界規模で主な癌による死因であり、発病率は１年当たり１８．９人／１０００００人である。胃癌の発病率は、９３４０００人の症例と推定され、新たな症例の５６％は西アジアにおいて生じている。胃癌は、２００２年のＣｅｎｔｒａｌ　Ｔｕｍｏｒ　Ｒｅｇｉｓｔｒｙデータによれば、韓国において全ての癌の２０．８％を占めている。胃切除は胃癌患者における唯一の根治治療であるが、根治手術後４０～６０％に及ぶ高い再発率が依然として不良な全生存率の一因となっている。アジュバント試験における指標となる研究の１つは、Ｕ．Ｓ．Ｉｎｔｅｒｇｒｏｕｐの研究ＩＮＴ－０１１６であり、この研究は、ほとんどのＤ０－Ｄ１結節切除胃癌患者における５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）／ロイコボリン及び^{45}Ｇｙ放射線による化学放射線療法からの顕著により良好な生存率を報告している。更に、アジュバント化学放射線療法（ＩＮＴ－０１１６）からの潜在的な生存利益が、Ｄ２切除患者において近年実証された。

【０４０１】

生存率を更に改善するため、患者オーダーメード治療方針の開発に進展する、アジュバント化学放射線療法後の生存率又は再発率についての信頼性のある分子診断マーカーを同定する緊急の必要性が存在する。更に、胃癌療法の改善は、最終的には、新規治療アプローチに依存する。

【０４０２】

ＲＴＫは、膜貫通ドメイン及びチロシンキナーゼモチーフを特徴とする５６種のタンパク質のファミリーである。これらは、細胞シグナリングにおいて機能し、成長、分化、接着、遊走及びアポトーシスを調節するシグナルを伝達する。ＲＴＫの突然変異活性化及び／又は過剰発現は、細胞を変形させ、癌の発達において重要な役割を担うことが多い。このような理由のため、ＲＴＫは、種々の分子標的剤、例えば、トラスツズマブ、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、スニチニブ、イマチニブ、ニロチニブなどの標的となっている。胃癌における５６種の既知のＲＴＫの相対遺伝子発現レベルの中央値は、ＥＧＦＲ、ＦＧＦＲ及びＶＥＧＦＲサブタイプを含むいくつかのＲＴＫが胃癌に存在することを示す。

【０４０３】
近年、ＨＥＲ２（＋）胃癌においてカペシタビン＋シスプラチン（ＸＰ）とＸＰ＋トラスツズマブを比較したＴｏＧＡ臨床試験の中間分析は、トラスツズマブ群において自由生存率の進行の顕著な延長を実証した。興味深いことに、トラスズマブ耐性の機序の１つは、細胞外トラスツズマブ結合ドメインを欠損するＨＥＲ２受容体のトランケート化形態ｐ９５ＨＥＲ２の蓄積である。近年の研究は、ｐ９５ＨＥＲ２を発現する乳房腫瘍がトラスツズマブに耐性であり、代替的又は追加的な抗ＨＥＲ２標的化方針、例えば、トラスツズマブ及びラパチニブによる組合せ療法を要し得ることを実証した。従って、ｐ９５ＨＥＲ２発現の頻度を確立して胃癌におけるＨＥＲ２標的剤を取り込む将来的な臨床試験の基礎を作ることが重要である。

【０４０４】
本明細書に記載のマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームは、胃癌と関連するキナーゼ及び他のシグナル伝達経路分子の発現／活性化を調査するために使用することができる。従って、患者全血又は細針吸引液（ＦＮＡ）試料に見出される限定数の癌細胞中の胃癌マーカーをプロファイリングする方法は，全疾患病因への貴重な見識を提供し、従ってより良好な抗癌療法選択をもたらす。

【０４０５】
全血又はＦＮＡ試料は、本明細書に記載の近接アッセイを使用するＲＴＫ経路調査のために胃癌を有する患者から得ることができる。あるいは、経路分析のための試料は、冷凍組織から、切片化又は冷凍ＦＮＡ手順の実施により得ることができる。ある例において、組織切片化は、後続のプロファイル分析のための冷凍標本について好ましい方法である一方、比較的非侵襲的なＦＮＡ手順は、臨床環境において患者（及びゼノグラフト）から試料を得るのに好ましい方法である。

【０４０６】
冷凍組織試料は、以下の方法により回収することができる：
オプション番号１組織切片回収：
１．プラスチック秤量ボートをドライアイス上で保持し、このボート内で試料切断を行う。
ａ．材料を冷蔵するため、かみそり刃又はミクロトームブレード、微細鉗子及び予備標識試料回収バイアルをドライアイス上で保持する。
２．冷凍ヒト癌組織を－８０℃フリーザーから取り出し、試料を直ちにドライアイス上に移す。
３．冷凍組織をドライアイス上の秤量ボートに移し、かみそり刃又はミクロトームブレードを使用して冷凍組織を小片（１０μｍ切片×３）に切断し、予備冷蔵鉗子を使用して組織を予備冷蔵及び予備標識された試料回収バイアルに移す。
４．キャップを閉じ、これをドライアイス上で保持する。
５．回収された標本を、最初に二重プラスチックバッグ中に配置し、次いでＳｔｙｒｏｆｏａｍ容器（一次容器）中に適切量のドライアイスとともに配置する。
ａ．少なくとも６～８ポンドのドライアイスを使用する。夏季においてはより多くのドライアイスを使用する。
注：正確な量のドライアイスは、輸送会社との協議後に決定する。
ｂ．必要な許可及びドキュメンテーションについて国際的な輸送プロセスのために輸送会社と協議する。
ｃ．湿った氷又は冷却剤（すなわち、クールパック）は使用しない。
６．必要条件を確認し、試料リストをボックス中に配置するが、二重バッグの外側に配置する。
７．容器を安全に密封し、「冷凍組織－解凍不可」のラベルを貼る。
オプション番号２冷凍組織からのＦＮＡ調製：
１．冷凍ヒト癌組織を－８０℃フリーザーから取り出し、試料バイアルを直ちにドライアイス上に移す。

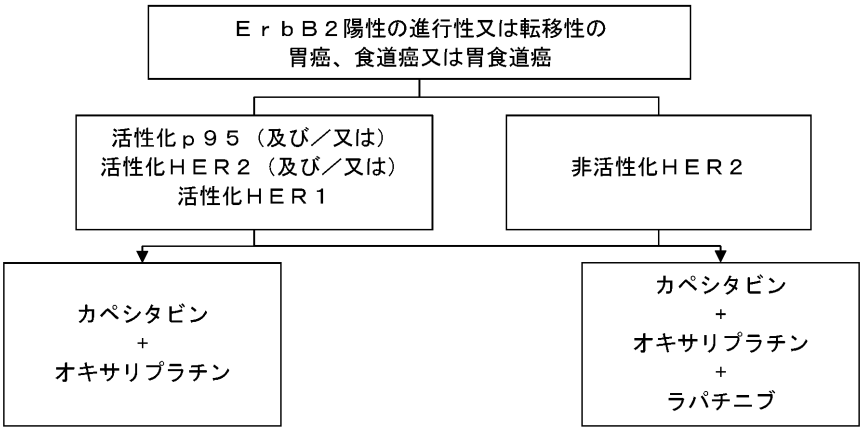
２．ＦＮＡ手順について準備された試料を湿った氷の上に１０分間配置して組織を軟化させるべきである。
３．ＦＮＡ試料回収は、２３又は２５ゲージ針を軟化した冷凍組織に５から１０回通すことにより実施すべきである。残りの試料バイアルをドライアイスに戻す。
４．ＦＮＡ試料回収バイアルの蓋をアルコールにより拭く。
５．冷凍ＦＮＡ試料は、１００μＬの「タンパク質後溶液」（Ｐｒｏｍｅｔｈｅｕｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を含有する回収バイアル中への直接注射により回収すべきである。回収された組織材料を、内容物を穏やかに混合することにより分注する。
６．ＦＮＡ回収バイアルを片手によりしっかり固定し、急速な指によるタッピング（約１５×）を実施して完全な細胞溶解を確保する（可能な場合、１０秒間ボルテックスにかける）。
７．回収された標本を、最初に二重プラスチックバッグ中に配置し、次いでＳｔｙｒｏｆｏａｍ容器（一次容器）中にクールパックとともに配置する。
ａ．必要な許可及びドキュメンテーションについて国際的な輸送プロセスのために輸送会社と協議する。
８．必要条件を確認し、試料リストをボックス中に配置するが、二重バッグの外側に配置する。
９．容器を安全に密封し、「生物学的標本」のラベルを貼る。

【０４０７】

図７は、以下のマーカーの発現及び／又は活性化状態に基づき、胃癌において活性化されるシグナル伝達経路をプロファイリングするための本発明の例示的なアドレス可能なアレイを説明する：ＨＥＲ１／ＥｒｂＢ１、ＨＥＲ２／ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ３、ｐ９５ＨＥＲ２／ｐ９５ＥｒｂＢ２、ＩＧＦ－１Ｒ、ｃ－ＭＥＴ、ＰＩ３Ｋ、ＳＨＣ、Ａｋｔ及びＥｒｋ。この活性化プロファイルは、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｃ－Ｍｅｔ、ＰＩ３Ｋ、Ａｋｔ及びＦＧＦＲ２を含むいくつかの分子標的（発現）について現在プロファイリングされている５００個の胃癌標本のコホートからの結果と比較することができる。近接アッセイマイクロアレイフォーマットを使用するこれらのＲＴＫ及びこれらの経路の調査により、有利には、胃癌の治療のための特定の治療レジメンに対する患者の応答の予測が可能となる。更に、近接アッセイマイクロアレイ技術に基づくＲＴＫ発現／活性化プロファイルは、ＲＴＫ標的療法に基づく臨床試験を支援することができる。現在、ラパチニブは、ＬＯＧｉＣ試験において臨床調査中であり、この試験において、カペシタビン＋オキサリプラチン（ＣａｐｅＯｘ）の化学療法レジメンへのラパニチブの添加が、進行する時間の延長及びＥｒｂＢ２遺伝子の増幅を有する局所的に進行性、切除不可能な、又は転移性の胃癌、食道癌又は胃食道接合部癌を有する患者の全生存率におけるこの影響について評価されている。従って、ＨＥＲ２の発現に加え、活性化された９５ＥｒｂＢ２、ＨＥＲ２及びＨＥＲ１について各疾患をプロファイリングすることは、ＨＥＲ２標的療法について適切な患者を選択するための臨床的に関連する情報を提供する。

【０４０８】

非限定的な例として、本明細書に記載の近接アッセイにより決定された、活性化ｐ９５ＥｒｂＢ２及び／又は活性化ＨＥＲ２及び／又は活性化ＨＥＲ１を有するＥｒｂＢ２陽性の進行性又は転移性の胃癌、食道癌又は胃食道癌を有する患者は、カペシタビン＋オキサリプラチンの組合せにより治療すべきである一方、非活性化ＨＥＲ２を有する患者は、カペシタビン、オキサリプラチン及びラパチニブの組合せにより治療すべきである：



【０４０９】

マルチプレックス化近接媒介プラットフォームは、有利には、限定量の試料においてＲＴＫ及びこれらの経路の活性化を検出するための単細胞レベルの感度を提供する。従って、胃癌を有する患者から得られたＣＴＣ及び／又はｍＦＮＡ試料をプロファイリングしてオーダーメード療法及びインパクトのある臨床診療のための貴重な情報を提供することができる。

【０４１０】

（実施例８）遺伝子発現パネルによる一次起源組織決定後の治療のための患者の選択

全転移性腫瘍の約３％～５％は、原発不明癌（ＣＵＰ）のカテゴリーに分類される。起源組織の正確な診断は、現行療法が多分に解剖学的部位に基づいているので、治療の決定において重要である。遺伝子発現パネルは、最初に胃癌を有すると診断された患者に与えられる治療と一致する治療から利益が得られるであろう転移性胃癌を有する患者の同定において有用であり得る。好適なシステムには、限定されるものではないが、マイクロＲＮＡの発現パターンの分析を通して癌及び起源組織を分類するＲｏｓｅｔｔａ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　ＣＵＰアッセイ（例えば、ＰＣＴ国際公開第０８／１１７２７８号参照）；９２種の遺伝子を測定して３９種の腫瘍タイプについて原発起源部位を同定するＲＴ－ＰＣＲベースの発現アッセイであるＡｖｉａｒａ　ＤＸ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）ＣａｎｃｅｒＴＹＰＥ　ＩＤ（商品名）アッセイ；及びマイクロアレイ上で１６００種超の遺伝子の発現を測定し、１５種の既知の組織タイプに対して腫瘍の遺伝子発現「シグニチャー」を比較する、Ｐａｔｈｗｏｒｋ（商品名）起源組織検査（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）が含まれる。患者の原発性癌の組織が食道及び／又は胃であると同定されると、経路活性化プロファイルを使用して適切な標的療法を選択して治療スケジュールに含めることができる。

【０４１１】

以下のプロトコールは、胃癌、食道癌又は胃食道癌を治療するのに適切な標的療法又は標的療法の組合せを選択するために活性化状態プロファイリングと結び付けて遺伝子発現プロファイリングが使用される、本発明の例示的な実施態様を提供する：

１）転移性腫瘍から外科的又は細針生検のいずれかにより切除された厚さ７μｍの組織切片を載せた２枚以上のガラススライドを患者から得る。これらの細胞をホルマリン中で固定し、パラフィン（ＦＦＰＥ）内に包埋する。１枚の追加の同一腫瘍のスライドをＨ＆Ｅにより染色する。

２）病理学者は、Ｈ＆Ｅスライドを精査し、ＣａｎｃｅｒＴＹＰＥ　ＩＤ（商品名）アッセイのために回収すべき領域を示す。スライドを分析のためにＡｖｉａｒａ　ＤＸに送付する。

３）Ａｖｉａｒａ　ＤＸからの試験報告書は、ｋ近傍分析から決定された上位５つの最も可能性が高い起源部位を示し、予測が導出される。患者のための予測が原発不明腫瘍として食道及び／又は胃を示す場合、患者の腫瘍細胞を経路活性化について査定することができる。

４）腫瘍細胞（例えば、ＣＴＣ）を、実施例１に記載のとおり血液から単離し、分析のために調製する。あるいは、細針生検物を使用して実施例２に記載のとおり腫瘍細胞抽出物を調製することができる。細胞調製物は、実施例３又は実施例４に記載のとおりアッセイする。活性化プロファイルは、実施例６又は実施例７に記載のものと類似の様式において評価する。適切な標的療法又は標的療法の組合せを選択する。

【０４１２】

（実施例９）胃癌患者におけるシグナル伝達経路タンパク質の機能的プロファイリング

胃切除は胃癌（ＧＣＡ）患者における唯一の根治治療であるが、根治手術後の４０～６０％に及ぶ高い再発率が依然として不良な全生存率の一因となっている。生存率を更に改善するため、患者オーダーメード治療方針の開発に進展する、アジュバント化学放射線療法後の生存率又は再発率についての信頼性のある分子診断マーカーを同定する緊急の必要性が存在する。胃癌療法の改善は、最終的には、癌増殖に重要な分子を標的とする新規治療アプローチに依存する。伝達経路タンパク質は細胞シグナリングにおいて機能し、成長、分化、接着、遊走及びアポトーシスを調節するシグナルを伝達するので、これらは種々の治療剤の標的となっている。本明細書に記載のマルチプレックス化免疫アッセイプラットフォームは、これらの伝達経路タンパク質の機能的プロファイリングに利用することができる。

【０４１３】

共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）は、２種の検出抗体の共局在化を要する固有の免疫複合体の形成を利用するマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームである。検出抗体は、対応するチャネリング酵素グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）及びセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）にコンジュゲートされている。標的タンパク質が捕捉抗体により結合されると、近接しているＧＯとＨＲＰとのチャネリング事象により、標的タンパク質のプロファイリングが極限感度で可能となる。ＣＯＰＩＡは、極度に高い分析特異性を達成する。それというのも、これがシグナル発生／増幅のための標的特異的近接内で複数の実体を要するからである。ＣＯＰＩＡは、各特異的標的タンパク質について、トランケート化標的（すなわち、ｐ９５ＨＥＲ２）の、これらの正常な対応物（すなわち、ＨＥＲ２）からのディファレンシャルな検出が可能となるように構成することもできる。ＣＯＰＩＡを適用してＧＣＡ患者から回収された冷凍組織におけるシグナリングタンパク質の発現及び活性化のレベルを調査した。

【０４１４】

本実施例は、ＧＣＡ患者におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＩＧＦ１－Ｒ、ｃ－ＭＥＴ、ＰＩ３Ｋ、Ｓｈｃ、ＶＥＧＦＲ、ｐａｎＣＫ及び他のシグナル伝達経路タンパク質の発現の有病率並びにこれらの活性化のレベルを実証する。胃癌療法の改善は、最終的には、機能的プロファイリングにより同定される特異マーカーを標的とする新規治療アプローチに依存する。疾患プロファイルは再発性癌において、及び異なる治療圧力下でシフトすることが多いので、「発達／異種疾患」から得られた試料（入手可能性が限定されることが多い）を分析することにより得られた臨床情報は、臨床医がこれらの疾患治療オプションを「個人の」癌プロファイルーシフトに従って各患者に調整するのを補助することができる。

【０４１５】

（実施例１０）胃癌患者における複数のシグナル経路タンパク質の機能的プロファイリング

要旨

胃切除は胃癌（ＧＣＡ）患者における唯一の根治治療であるが、根治手術後の４０～６０％に及ぶ高い再発率が依然として不良な全生存率の一因となっている。生存率を更に改善するため、患者オーダーメード治療方針の開発に進展する、アジュバント化学放射線療法後の生存率又は再発率についての信頼性のある分子診断マーカーを同定する緊急の必要性が存在する。従って、本発明者らは、マルチプレックス化免疫マイクロアレイプラットフォームを使用するシグナル伝達経路タンパク質の機能的プロファイリングのためのマル

チプレックス化免疫アッセイプラットフォームを開発した。本実施例は、ＧＣＡにおけるＨＥＲ２、ＨＥＲ１、ＨＥＲ３、ＰＩ３Ｋ、ｃＭＥＴ及びＩＧＦ１Ｒの機能的プロファイリングを実証する。

【０４１６】

導入

胃癌は、世界規模で主な癌による死因であり、発病率は１年当たり１８．９人／１０００００人であり、致死率は１年当たり１４．７人／１０００００人である。転移性胃癌は、不良な予後に起因して腫瘍内科医にとって治療的な困難性が残存している。胃癌のための新規治療標的を追求して、ＨＥＲ２過剰発現が試験されており、胃腫瘍及び胃食道腫瘍の６～３５％で報告された。ＨＥＲ２を選択的に標的とするヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブは、ＨＥＲ２（＋）転移性乳癌を有する患者において生存利益を示している。注目すべきは、ＨＥＲ２過剰発現する乳癌患者の７０～８０％は、初回又は獲得耐性のいずれかに起因してトラスツズマブに対して応答しない。トラスツズマブ耐性についての重要な機序の１つは、細胞外トラスツズマブ結合ドメインを欠損するＨＥＲ２トランケート化形態（ｐ９５－ＨＥＲ２）の蓄積である。本明細書において本発明者らは、胃癌におけるＨＥＲ２標的剤を取り込む将来的な臨床試験のための基礎を作るため、ＨＥＲ２、ｐ９５－ＨＥＲ２及びＨＥＲ２活性化についてトランス活性化潜在性を有する他の経路タンパク質の発現／活性化プロファイリングを報告する。

【０４１７】

方法

共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）：組織溶解物中に存在する標的タンパク質をニトロセルロース表面上にプリントされた特異的捕捉抗体に結合させ、未結合の非標的タンパク質をスライドから除去する。グルコースオキシダーゼ（ＧＯ）にコンジュゲートされた、捕捉された標的タンパク質上の択一的エピトープに対する一方の検出抗体と、ＨＲＰにコンジュゲートされた、標的タンパク質上のリン酸化部位又は別の重複しないエピトープに特異的な他方の検出抗体との酵素的相互作用は、シグナル発生及び後続のチラミド媒介シグナル増幅をもたらす（図８）。

【０４１８】

スライドプリンティング：各特異的標的タンパク質についての捕捉抗体を、段階希釈物でトリプリケートでプリントする。各スライドは、各スライド実行時の試料の正確な定量のための標準曲線作成のための細胞系対照を含有する。内部品質対照試料を各スライド上で実行して各アレイスライドから作成されたデータの品質を確保する。

【０４１９】

臨床試料：急速冷凍された乳癌組織は、局在化し、組織学的に確認されたＧＣＡを有する患者からのものであった（Ｓａｍｓｕｎｇ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ）。急速冷凍された組織試料を１００μＬの溶解緩衝液中で溶解させ、得られた溶解物を－８０℃で貯蔵してから後続の分析を行った。

【０４２０】

ｐ９５ＨＥＲ２濃縮：ＨＥＲ２の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）に特異的な磁気標識抗体を使用して完全長ＨＥＲ２受容体を細胞溶解物から除去した。

【０４２１】

結果

ＨＥＲ２標準滴定曲線を、ＢＴ４７４細胞を使用して作成し、図９に示すとおり単細胞レベルの感度が達成された。これらの値をスタンダードとして使用して臨床試料についての定量値を作成した。完全長ＨＥＲ２を除去し、及び除去しないＢＴ４７４細胞のディファレンシャルなＨＥＲ２プロファイリング（ＨＥＲ２－ＥＣＤ及びＨＥＲ２－ＩＣＤ捕捉による）の比較は、ＨＥＲ２増幅参照細胞系ＢＴ４７４において約４．４％のｐ９５ＨＥＲ２が存在することを示した（図１０Ａ）。標的タンパク質発現及びリン酸化の定量は、各ＲＴＫに特異的なリガンドにより処理した既知レベルのＲＴＫ発現を有する細胞系（例えば、ＢＴ４７４、Ｔ４７Ｄ、ＨＣＣ８２７）に基づくものであった（図１０Ｂ）。

【０４２２】
図１１に示したとおり、ＧＣＡ試料における広範な経路タンパク質発現が観察された。各マーカーについて最大シグナルを有する試料を、最も黒い色により示す。ＣＯＰＩＡ－ＨＥＲ２は、ＩＨＣ－ＨＥＲ２状態との高い相関を示した。ＨＥＲ１のより高いレベルが、より低いＨＥＲ２発現を有する試料において見出された。ＨＥＲ３－Ｐレベルは、ＨＥＲ３－Ｔ及びＰＩ３Ｋ活性化との高程度の相関を示した。ｃＭＥＴプロファイルも、ＰＩ３Ｋ活性化との強い相関を示した。このコホートにおけるＩＧＦ１Ｒの発現は、ほとんどの試料において相対的に低かった。ｐ９５ＨＥＲ２レベルは、より高いＨＥＲ２発現を有する試料において顕著であったが；ｐ９５ＨＥＲ２活性化の証拠は、より広い分布を有した。表５に、９５個のＧＣＡ試料におけるＲＴＫ発現をまとめる。
【表５】

	HER2	HER1	HER3	cMET	IGF1R
H	13 (14%)	13 (14%)	24 (25%)	5 (5%)	0
M	67 (70%)	64 (67%)	45 (47%)	51 (54%)	0
L	15 (16%)	18 (19%)	26 (28%)	39 (41%)	95 (100)

「Ｈ」＝高；「Ｍ」＝中；「Ｌ」＝低。

【０４２３】
結論
ＨＥＲ２及びこの変種形態並びに他のＲＴＫの状態に基づく本実施例に記載の知見は、初回又は獲得耐性のいずれかに起因してトラスツズマブに応答しないＨＥＲ２陽性ＧＣＡ患者についての潜在的な機序についての重要な情報を提供する。本発明のＣＯＰＩＡフォーマット及び分析は、有利には、有効な標的療法を選択するため、ＧＣＡ患者を、これらのシグナル伝達タンパク質についてプロファイリングするために利用することができる。
【０４２４】
（実施例１１）胃癌患者から単離されたＣＴＣにおけるシグナル伝達経路タンパク質の機能的プロファイリング
本実施例は、本明細書に記載の共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）マルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームを使用して胃癌（ＧＣＡ）患者の血液から得られた循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）におけるシグナル伝達経路タンパク質、例えば、ＨＥＲ１及びＨＥＲ２の機能的プロファイリングを実証する。従って、本実施例に記載の実験の１つの特定の目的は、ＧＣＡにおけるＨＥＲ２陽性ＣＴＣの頻度を検査することであった。
【０４２５】
患者及び試験試料：ステージＩＩＩ又はＩＶの胃癌患者（Ｎ＝１００）を試験に登録し、単一血液試料回収を実施した。いくつかの例において、腹水試料を得た。
【０４２６】
アウトカム測定：ＧＣＡ患者の血液試料から単離されたＣＴＣにおけるＨＥＲ１及びＨＥＲ２の発現及び活性化
【０４２７】
登録及び状態：

試料タイプ	期待数	登録
血液	１００	８３（８０）
腹水	規定せず	３

３人のＧＣＡ患者は、ＣＯＰＩＡ分析に不十分な血液容量を有した。

【０４２８】
図１２は、Ｖａｒｉｄｅｘ　ＣＴＣ計数システムにより決定された８２個のＧＣＡ患者

試料の７．５ｍＬの血液から得られたＣＴＣの数を示す。特に、８２個のＧＣＡ血液試料のうち３９個（４８％）はＣＴＣ陽性であった一方、８２個のＧＣＡ血液試料のうち１２個（１４．６％）はＨＥＲ２陽性であった。

【０４２９】

図１３は、ＣＯＰＩＡにより決定された、ＧＣＡ患者から単離されたＣＴＣにおけるＨＥＲ１／ＥＧＦＲ及びＨＥＲ２の発現及び活性化を示す。Ｖｅｒｉｄｅｘシステムにより同定されたＣＴＣを有する試料は、顕著なＨＥＲ１及びＨＥＲ２の発現を示し、ＨＥＲ１及びＨＥＲ２の活性化（すなわち、リン酸化）はより低レベルであった。

【０４３０】

本発明のＣＯＰＩＡフォーマット及び分析は、有利には、有効な標的療法を選択するため、ＧＣＡ患者を、これらのシグナル伝達タンパク質についてプロファイリングするために利用することができる。例えば、ＧＣＡ患者におけるＨＥＲ１及びＨＥＲ２の発現及び活性化の決定は、これらのＲＴＫの一方又は両方を標的とする治療が有効か否かについての見識を提供する。

【０４３１】

（実施例１２）胃癌患者から単離された腫瘍組織におけるシグナル伝達経路タンパク質の機能的プロファイリング

本実施例は、本明細書に記載の共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）マルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームを使用して胃癌（ＧＣＡ）腫瘍組織試料におけるシグナル伝達経路タンパク質、例えば、ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの機能的プロファイリングを実証する。本実施例は、ＣＯＰＩＡを使用するＧＣＡ腫瘍組織試料におけるｐ９５ＨＥＲ２の機能的プロファイリングも実証する。従って、本実施例に記載の実験の１つの特定の目的は、（１）ＧＣＡ腫瘍組織におけるｐ９５ＨＥＲ２の頻度を検査すること、（２）臨床病理可変要素とｐ９５ＨＥＲ２との相関を分析すること及び（３）トラスツズマブ耐性ｐ９５ＨＥＲ２（＋）胃癌からのインビトロでの前臨床データと相関付けることであった。

【０４３２】

患者及び試験試料：外科的切除から得られた４４７個の冷凍ＧＣＡ腫瘍組織標本を本試験において使用した。

【０４３３】

アウトカム測定：ＧＣＡにおけるｐ９５ＨＥＲ２を含むシグナル伝達経路タンパク質の発現及び活性化

【０４３４】

登録：４４７個の冷凍ＧＣＡ組織試料を回収し、１０種のマーカーを試験した。

【０４３５】

図１４は、ＧＣＡ腫瘍組織におけるＨＥＲ２発現を検出するための免疫組織化学（ＩＨＣ）とＣＯＰＩＡとの相関の程度を示す。特に、図１４は、ＩＨＣにより決定された最大レベルのＨＥＲ２発現を有するＧＣＡ組織試料に対応する「ＩＨＣ３」カテゴリーにおけるＩＨＣとＣＯＰＩＡとの高程度の相関が存在したことを示す。しかしながら、（ＩＨＣにより検出不可能なＨＥＲ２発現に対応する）「ＩＨＣ０」と同定された顕著な数のＧＣＡ組織試料は、実際には、ＣＯＰＩＡにより決定された中程度から高レベルのＨＥＲ２発現を有した。従って、図１４は、ＨＥＲ２発現の標準ＩＨＣ分析と比較した場合にＣＯＰＩＡを使用して著しく増加した達成感度を説明する。

【０４３６】

図１５に示すとおり、ＧＣＡ試料における広範な経路タンパク質の発現が観察された。各マーカーについて最大シグナルを有する試料を、最も黒い色により示す。ＣＯＰＩＡによりアッセイされる分析物は、以下のシグナル伝達経路タンパク質を含んだ：ＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃ。これらの分析物は、ＣＯＰＩＡを使用して発現レベル及び活性化（例えば、リン酸化）レベルの両方について分析することができる。ある実施態様において、限定されるものではないが

、ｐ９５ＨＥＲ２、Ａｋｔ、ｐ７０Ｓ６Ｋ、ＶＥＧＦＲ及び／又はＰＤＧＦＲを含む少なくとも１、２、３、４、５種以上の追加の分析物の発現及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルは、ＣＯＰＩＡを使用してＧＣＡ組織試料において分析することができる。

【０４３７】

図１６は、２種の異なる腫瘍溶解物濃度におけるＧＣＡ腫瘍組織におけるＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ及びｃＫｉｔの発現レベル並びにＰＩ３Ｋの活性化レベルのＣＯＰＩＡ分析を示す。特に、ＣＯＰＩＡは、両方の腫瘍溶解物濃度においてそれぞれの調査された分析物の発現又は活性化レベルを検出することができた。

【０４３８】

図１７は、本明細書に記載のＣＯＰＩＡマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームを使用するＧＣＡ腫瘍組織試料におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの発現プロファイリングを示す。ＩｇＧ及びサイトケラチン（ＣＫ）を対照として使用し、ＨＥＲ１発現レベルを２種の異なる捕捉抗体（「ＨＥＲ１」及び「ＨＥＲ１－２」と称する）によりアッセイした。図１７において分析されたＧＣＡ組織試料は全て、ＩＨＣにより決定された最大レベルのＨＥＲ２発現（「ＩＨＣ３＋」と称する）を有した。特に、図１７は、ＩＨＣにより決定された高いＨＥＲ２発現（すなわち、ＩＨＣ３＋）が、ＣＯＰＩＡにより測定されたＨＥＲ２発現レベルと常に相関するとは限らないことを示す。任意の特定の理論に拘束されるものではないが、ＩＨＣとＣＯＰＩＡとの間で観察される不一致は、本明細書に記載のＣＯＰＩＡマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームにより達成される増加した感度及び特異性並びに優れたダイナミックレンジに起因する。図１７は、シグナル伝達経路、例えばＨＥＲ２及び／又はｃ－ＭＥＴ経路の複数の構成因子の機能的プロファイリングが、胃癌の治療に好適な１種以上の抗癌薬の選択への貴重な見識を提供することも説明する。

【０４３９】

例えば、図１７は、患者１４７４２２１２が高レベルのｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３に起因してＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に応答しない可能性が高いことを説明する。ペルツズマブも、高レベルのｐ９５ＨＥＲ２に起因して二量体化の妨害において有効でない。他の好適な抗癌療法は、１種以上の小分子ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ＰＦ－００２９９８０４の使用である。別の好適な抗癌療法は、１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤を１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ネラチニブと組み合わせた使用である。図１７は更に、高レベルのＨＥＲ１、ＨＥＲ３及びＩＧＦ１Ｒ発現を有する患者１２６１９７８５が、１種以上の小分子ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ＰＦ－００２９９８０４又は１種以上のＩＧＦ１Ｒ阻害剤を１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ネラチニブと組み合わせて投与されるべきであることを説明する。図１７は、患者１４６０９７４４が、高レベルのＨＥＲ３に起因してＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に応答しない可能性が高いことも説明する。しかしながら、この患者は低レベルのｐ９５ＨＥＲ２を有する。従って、好適な抗癌療法の一例は、ペルツズマブ又は他のＨＥＲ２二量体化阻害剤の使用である。ある例において、ペルツズマブは、１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤、ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及び／又はＰＩ３Ｋ阻害剤と組み合わせることができる。ある他の例において、ＰＩ３Ｋ阻害剤は、ｍＴＯＲ及び／又はＭＥＫ阻害剤と組み合わせて使用される。好適な抗癌療法の別の例は、１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤を１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤と組み合わせた使用である。更に、図１７は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）が患者１５５３０４６１及び１３３１３９７８における他のＲＴＫの共発現に起因して有効な治療でない可能性が高いことを示す。ペルツズマブは、ｐ９５ＨＥＲ２レベルが高い場合には有効でない可能性が高い。他の好適な抗癌療法は、１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤を１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤と組み合わせた使用である。

【０４４０】

図１８及び１９は、ＣＯＰＩＡを使用する、追加のＧＣＡ腫瘍組織試料におけるＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ｃ－Ｍｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、ｃＫｉｔ、ＰＩ３Ｋ及びＳｈｃの発

現プロファイリングを示す。ＩｇＧ及びサイトケラチン（ＣＫ）を対照として使用し、ＨＥＲ１発現レベルを２種の異なる捕捉抗体（「ＨＥＲ１」及び「ＨＥＲ１－２」と称する）によりアッセイした。図１８及び１９において分析されるＧＣＡ組織試料は、ＩＨＣにより決定された変動レベルのＨＥＲ２発現を有した。特に、これらの図は、ＩＨＣにより決定されたＨＥＲ２発現のレベルがＣＯＰＩＡにより測定されたＨＥＲ２発現のレベルと常に相関するとは限らないことを示す。任意の特定の理論に拘束されるものではないが、ＩＨＣとＣＯＰＩＡとの間で観察される不一致は、本明細書に記載のＣＯＰＩＡマルチプレックス化タンパク質マイクロアレイプラットフォームにより達成される増加した感度及び特異性並びに優れたダイナミックレンジに起因する。更に、これらの図は、シグナル伝達経路、例えばＨＥＲ２及び／又はｃ－ＭＥＴ経路の複数の構成因子の機能的プロファイリングが、胃癌の治療に好適な１種以上の抗癌薬の選択への貴重な見識を提供することを説明する。

【０４４１】

例えば、図１８は、ｐ９５ＨＥＲ２レベルが低いのでＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）が患者１５１９９０３７において有効であり得ることを示す。しかしながら、この患者は、ＨＥＲ３及びｃ－ＭＥＴの発現に起因してＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に対する耐性を発症し得る可能性が存在する。従って、好適な抗癌療法の一例は、１種以上の小分子ｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ＰＦ－００２９９８０４及び／又はペルツズマブを１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤と組み合わせて使用し、又はこれに切り替えることである。図１８は、患者１５２８６９８２が低レベルのＨＥＲ２を有するが、高レベルのＨＥＲ３を有することも説明する。この患者は、１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤及び１種以上の化学療法剤と組み合わせた場合、１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及び／又はペルツズマブの投与から利益を受け得る。図１８は更に、検出不可能なＨＥＲ２発現を有する患者１３７７７５０７に、１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤を１種以上の化学療法剤と組み合わせて投与することができることを説明する。

【０４４２】

図１９は、低レベルのＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３及びｃ－ＭＥＴ及び検出不能レベルのｐ９５ＨＥＲ２に起因して１種以上の化学療法剤を患者１３７５８９４４について選択すべきであることを示す。図１９は、患者１３７２５７９５が１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤及び１種以上の化学療法剤と組み合わせた１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及び／又はペルツズマブによる治療から利益を受け得ることも示す。更に、図１９は、ＣＯＰＩＡにより決定された高レベルのＨＥＲ１、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３及びＩＧＦ１Ｒを有する患者１３６９０６２４に、１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤及び／又はペルツズマブを１種以上のＩＧＦ１Ｒ阻害剤とともに投与することができることを説明する。図１９は、検出不能レベルのＨＥＲ２、ｐ９５ＨＥＲ２及びＨＥＲ３並びにｃ－ＭＥＴ発現の存在に起因して１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤を患者１４６２２９１２について選択すべきであることも示す。図１９は更に、ペルツズマブ及び／又は１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤、例えば、ＰＦ－００２９９８０４を１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤と組み合わせて患者０４０２１２０８について適切な治療として選択することができることを示す。更に、図１９は、ｃ－ＭＥＴ及びＩＧＦ１Ｒ発現並びにＨＥＲ発現を有する患者１４６９１６２８が、１種以上のｐａｎ－ＨＥＲ阻害剤を１種以上のｃ－ＭＥＴ阻害剤及び１種以上のＩＧＦ１Ｒ阻害剤と組み合わせた使用から利益を受け得ることを示す。

【０４４３】

図２０は、ＩＨＣによりＨＥＲ２発現についてＩＨＣ３＋と決定された試料におけるＣＯＰＩＡ（例えば、本明細書に記載のトランケート化受容体近接アッセイを使用する）により決定されたＧＣＡ腫瘍組織試料におけるｐ９５ＨＥＲ２の発現レベルを示す。高い又はより高いｐ９５ＨＥＲ２発現レベルを有するＧＣＡ患者は、ＨＥＲ２標的療法、例えば、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に対して応答しないより高い確率を有する（例えば、図２０のグラフの左側に示されるＧＣＡ患者）一方、低い又はより低いｐ９５ＨＥＲ２発現レベルを有するＧＣＡ患者は、ＨＥＲ２標的療法、例えば、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に

対して応答するより高い確率を有する（例えば、図２０のグラフの右側に示されるＧＣＡ患者）。

【０４４４】

図２１及び２２は、ＨＥＲ２発現に関してＩＨＣとＣＯＰＩＡとの間に観察された不一致を示す。特に、実際に高レベルのＨＥＲ２を有するＧＣＡ腫瘍組織試料は、ＩＨＣにより低い検出不可能なＨＥＲ２を有するとして記録された。これらの図は、ＨＥＲ２不一致ＧＣＡ試料におけるｐ９５ＨＥＲ２の発現レベルも示す（矢印）。更に、図２３は、ＧＣＡ腫瘍試料においてＣＯＰＩＡにより観察された広範なｐ９５ＨＥＲ２発現レベルが、ＩＨＣにより最大レベルのＨＥＲ２発現を有する（すなわち、ＩＨＣ３＋）として記録されたことを説明する。

【０４４５】

（実施例１３）胃癌細胞におけるシグナル伝達経路タンパク質の定量のためのデータ分析

本実施例は、対象となる特定の分析物について作成された標準曲線に対する生物学的試料（例えば、血液又は腫瘍組織）中の１種以上の分析物、例えば、１種以上のシグナル伝達タンパク質の発現及び／又は活性化レベルの定量を説明する。

【０４４６】

一部の実施態様において、各ＣＯＰＩＡスライドを３つの光電子倍増管（ＰＭＴ）ゲイン設定においてスキャンして感度を改善し、サチュレーションの影響を低減させる。Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ ＳｃａｎＡｒｒａｙ Ｅｘｐｒｅｓｓソフトウエアを、スポット探索及びシグナル定量に使用する。各スポットについての同定物は、ＧｅｎｅＰｉｘ Ａｒｒａｙ Ｌｉｓｔ（.ｇａｌ）ファイルからインポートする。スライド上の各臨床試料についての脱同定試験特定数を、得られたデータセットに取り込む。

【０４４７】

他の実施態様において、バックグラウンド補正されたシグナル強度を、トリプリケートでプリントされたレプリケートスポットについて平均化する。それぞれの試薬ブランクの相対蛍光値を、各試料から差し引いた。スポットフットプリント上の限度、スポットレプリケートについての変動係数、全パッドバックグラウンド及び試薬ブランクの強度を含む更なる分析からのデータをフィルタリングするため、いくつかの品質基準を使用する。

【０４４８】

各アッセイのため、細胞系、例えば、ＭＤ－４６８（ＨＥＲ１陽性）、ＳＫＢｒ３（ＨＥＲ２陽性）、ＢＴ４７４（ＨＥＲ２及びｐ９５ＨＥＲ２陽性）、ＨＣＣ８２７（ｃ－ＭＥＴ及びＨＥＲ１陽性）、ＩＧＦにより刺激されたＴ４７Ｄ（ＩＧＦ１Ｒ陽性）及び／又はＨＲＧにより刺激されたＴ４７Ｄ（ＨＥＲ３陽性）から調製された複数（例えば、２、３、４、５、６、７種など）の濃度の段階希釈された細胞溶解物からシグモイド標準曲線を作成することができる。各曲線は、ｌｏｇ濃度誘導単位ＣＵ（計算単位）に対するシグナル強度の関数としてプロットすることができる。データは、非線形回帰（Ｒｉｔｚ，Ｃ．ａｎｄ Ｓｔｒｅｉｂｉｇ，Ｊ．Ｃ．，Ｊ．Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，１２，１－２２（２００５））により５パラメーター方程式（５ＰＬ）にフィッティングすることができ、捕捉抗体の３種全ての希釈物を同時にフィッティングする。フィッティングは、Ｒ、オープンソース統計ソフトウエアパッケージ（Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｃｏｒｅ Ｔｅａｍ，Ｒ：Ａ ｌａｎｇｕａｇｅ ａｎｄ ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ ｆｏｒ ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ．Ｒ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ ｆｏｒ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ，Ｖｉｅｎｎａ，Ａｕｓｔｒｉａ．ＩＳＢＮ ３－９０００５１－０７－０，ＵＲＬ ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．Ｒ－ｐｒｏｊｅｃｔ．ｏｒｇ．Ｒ（２００８））を使用して実施する。数学モデルのオーバーパラメーター化を回避し、これにより精度を改善するため、４種のパラメーターを律則させることができる一方、各希釈物を個々の変曲点について解くことができる。このプロセスを４５、５０及び６０の各ＰＭＴゲイン設定について繰り返すことができる。このことは、捕捉抗体の３種の希釈物及び３つのＰＭＴスキャンからアッセイごとに作成される９種の標準曲線をもたらす。アッセイにおけるビルトイン冗長により、標準曲線のフィットが０．９

５未満のＲ^{2}を有する場合、希釈物／スキャン組合せの１種以上が排除されることが可能となり、こうして後続の予測が改善される。

【０４４９】

ＣＵ計算（標準曲線に基づく）

－標準曲線のそれぞれ（例えば、３種の捕捉抗体希釈物及び３つのＰＭＴゲイン設定スキャニング）からの個々の予測は、単一の最終予測に組み合わせることができる。各予測のため、標準曲線上の点の傾きを計算する。この傾きは、ｘ軸上でｌｏｇ単位を取り、すなわち、傾きの分母における単位はｌｏｇ計算単位（ＣＵ）である。第２に、予測の加重平均を計算し、この重みは傾きから決定する。特に、重みを合算し、各点に全傾きにより割った傾きに等しい重みを与える。各アッセイは、既知対照についての予測に対して検証することができる。

【０４５０】

（実施例１４）共同近接免疫アッセイ（ＣＯＰＩＡ）を使用する胃癌のための治療の選択ＨＥＲ２陽性進行性胃癌

この提案される進行性胃癌の臨床試験において、ＨＥＲ－２標的剤、例えば、トラスツズマブをＨＥＲ－１及びＨＥＲ－２二重阻害剤、例えば、ラパチニブと組み合わせた組合せの治療効力を、これらの一方又は他方の単一治療が不適合であった患者において評価する。資格要件は、個体が少なくとも１種の化学療法レジメン、すなわち、トラスツズマブ又はラパチニブにおいて既に不適合であったことである。個体は、根治療法がなじまない局所進行性又は再発性及び／又は転移性疾患を有する手術不能な、組織学的に確認された胃又は胃食道接合部の腺癌を有する。

【０４５１】

個体は、ＨＥＲ２陽性腫瘍（ＩＨＣに基づきｉ）３＋及び／又はｉｉ）ＦＩＳＨ（＋）と定義された原発性腫瘍又は転移を有する。ＨＥＲ２陽性腫瘍は、ＣＯＰＩＡを使用して確認する。調査者は、少なくとも１種の化学療法レジメンの不適合後にＣＯＰＩＡにより確認されたＨＥＲ－２陽性進行性胃癌を有する患者におけるこの第ＩＩ相二重療法試験を計画する。

【０４５２】

胃癌におけるファーストライン治療の有効性

この提案される無作為化第ＩＩ相試験は、胃癌を有する患者の治療におけるファーストライン療法としてラパチニブジトシレートを用いて一緒に又は用いないで与える場合、エピルビシン塩酸塩又は５－フルオロウラシルがいかに十分であるかを決定する。

【０４５３】

目的は、ＨＥＲ２及びＥＧＦＲ状態に従って転移性の又は根治手術がなじまない胃又は食道胃接合部の腺癌を有する患者におけるエピルビシン塩酸塩又は５－フルオロウラシルを、ラパチニブジトシレートを用いて又は用いずに含むファーストライン治療の活性を決定することである。更なる目的は、ＩＨＣ（０及び１＋）によるＨＥＲ２陰性及びＣＯＰＩＡ－又は±によるＨＥＲ－２陰性である患者並びにＩＨＣ（２＋及び３＋）によるＨＥＲ２陽性及びＣＯＰＩＡ＋＋＋又は＋＋＋＋による陽性である患者におけるこのレジメンの活性を探索することである。ＩＨＣ及びＣＯＰＩＡによるＨＥＲ２決定の一致性を査定することが目的である。更に、ＥＧＦＲ状態もＩＨＣ及びＣＯＰＩＡにより査定する。

【０４５４】

この提案される試験において、患者を、慣例及び免疫組織化学（ＩＨＣ）及びＣＯＰＩＡアッセイにより決定されたＨＥＲ２／ＥＧＦＲ状態の組合せに従って階層化する（ＩＨＣ２／３＋によるＨＥＲ２陽性及びＣＯＰＩＡ３／４＋による陽性並びにＩＨＣによるＥＧＦＲ陽性及びＣＯＰＩＡによる陽性と、ＩＨＣによるＨＥＲ２陰性及びＣＯＰＩＡによる陰性、ＩＨＣによりＥＧＦＲ陽性であるがＣＯＰＩＡにより陰性）。患者を２種の治療群の１種に無作為化する。

【０４５５】

試験治療の完了後、患者を８週間、２年にわたり３ヵ月ごと、次いでそれ以降６ヵ月ご

とに追跡する。

【０４５６】

ＨＥＲ２過剰発現胃癌における治療におけるラパチニブとラパチニブ＋カペシタビン

転移性胃癌を有する患者の大多数は、化学療法（例えば、白金誘導体及びフルオロピリミジン、タキサンと組み合わせることもある）と組み合わせたファーストラインを受けるが、セカンドライン化学療法の役割は依然として十分に規定されていない。従って、ファーストライン化学療法の間又は直後の進行は、標準的な医学的アプローチが存在しない医学的病態である。胃癌及び胃食道癌におけるＥＧＦＲ及びＨＥＲ２の過剰発現により、これらの適応症が二重Ｅｒｂ Ｂ１／２チロシンキナーゼ阻害剤（ＴＫＩ）、例えば、ラパチニブによる治療についての最有力候補となる。

【０４５７】

この提案される試験において、ＨＥＲ２過剰発現は、ＣＯＰＩＡ及びＦＩＳＨにより測定する（増幅及び増加した遺伝子コピー数）。ＥＧＦＲ活性化及び発現は、ＣＯＰＩＡにより測定する。一方の群において患者にラパチニブを与え、他方の群において患者にラパチニブをカペシタビンとともに与える。患者を２種の治療群の１種に無作為化する。

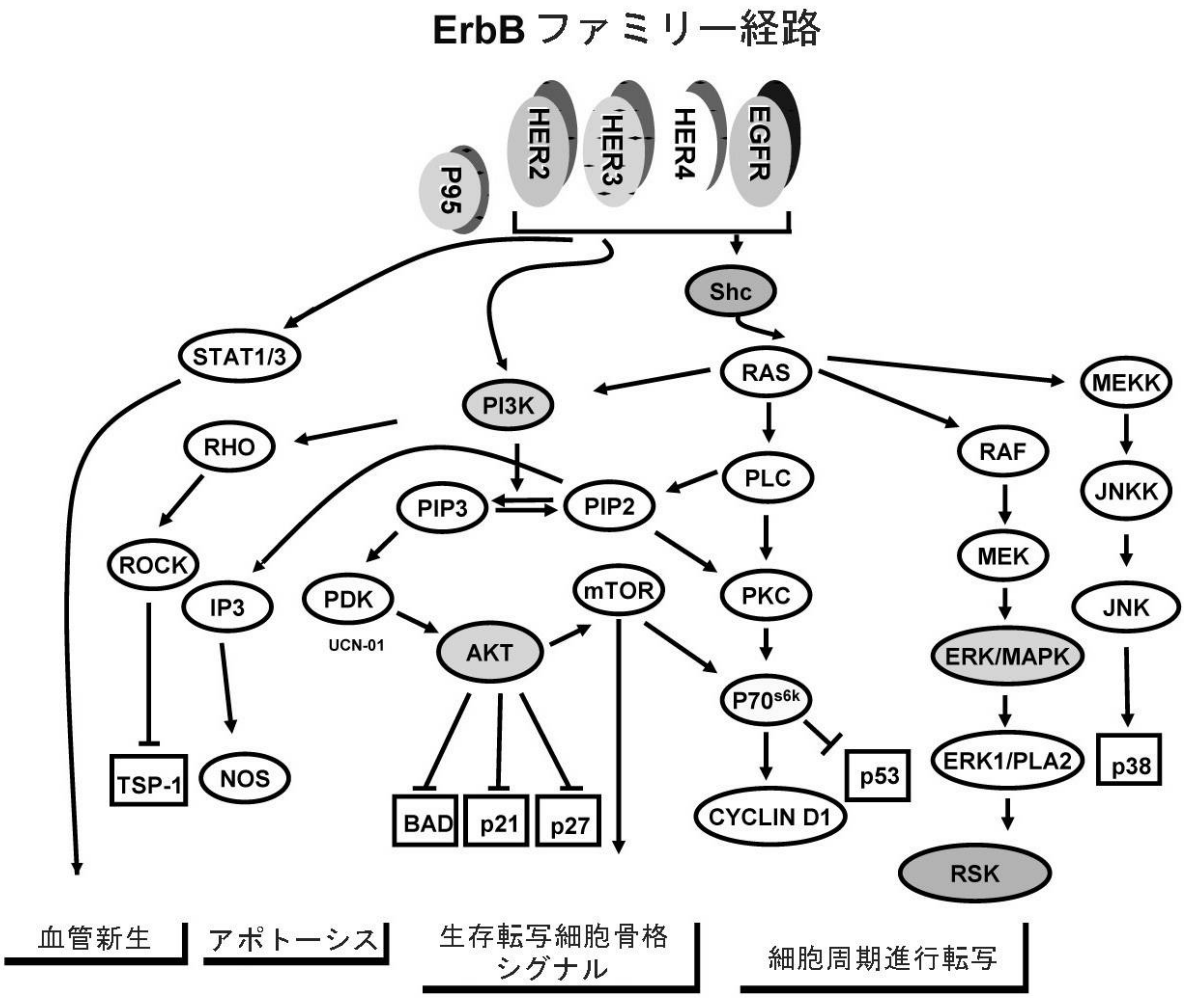
【０４５８】

試験治療の完了後、患者を８週間、２年にわたり３ヵ月ごと、次いでそれ以降６ヵ月ごとに追跡する。

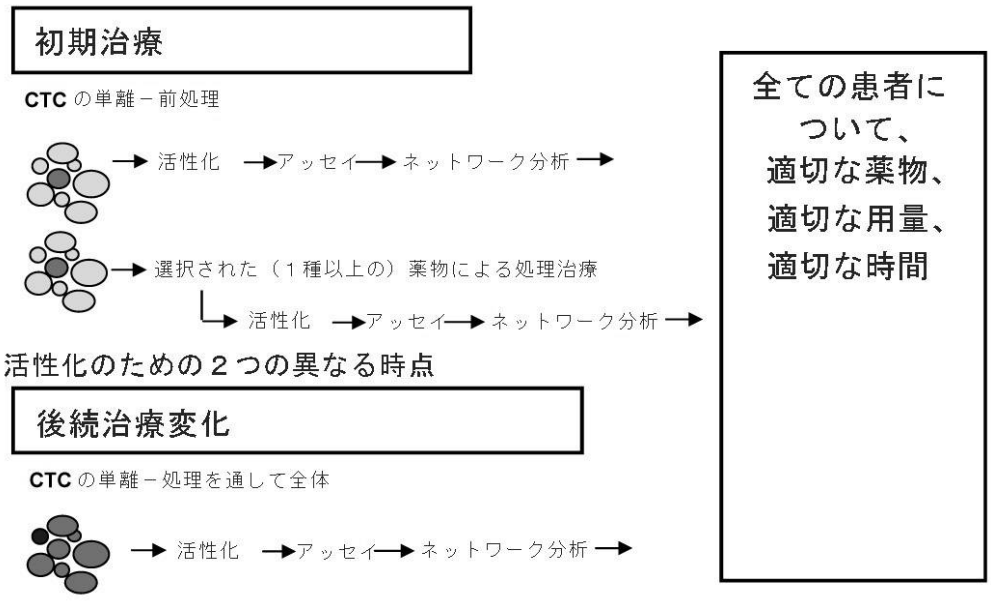
【０４５９】

本明細書に言及した全刊行物及び特許出願は、各個別刊行物又は特許出願が具体的及び個別に参照により本明細書に組み込まれると指示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。上記の本発明を明確に理解することができるように説明及び実施例によりある程度詳細に記載してきたが、当業者には、本発明の教示に照らせば、添付の特許請求の範囲の趣旨又は範囲から逸脱することなくある種の変更及び改変をなすことができることは容易に明白になる。

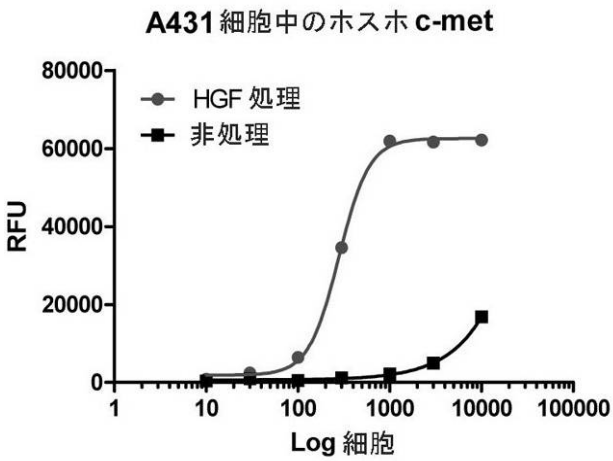
【図１】

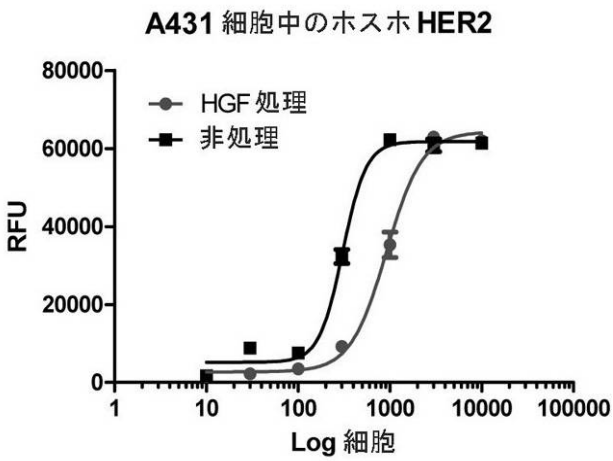

ErbBファミリー経路
HER2
HER3
HER4
EGFR
P95
Shc
STAT1/3
RAS
MEKK
PI3K
RHO
RAF
PLC
JNKK
PIP3
PIP2
MEK
ROCK
IP3
PDK
UCN-01
mTOR
PKC
JNK
AKT
ERK/MAPK
P70s6k
TSP-1
NOS
BAD
p21
p27
p53
CYCLIN D1
ERK1/PLA2
p38
RSK
血管新生
アポトーシス
生存転写細胞骨格シグナル
細胞周期進行転写

【図２】


初期治療
CTC の単離－前処理
活性化
アッセイ
ネットワーク分析
選択された（１種以上の）薬物による処理治療
活性化
アッセイ
ネットワーク分析
活性化のための２つの異なる時点
後続治療変化
CTC の単離－処理を通して全体
活性化
アッセイ
ネットワーク分析
全ての患者について、適切な薬物、適切な用量、適切な時間

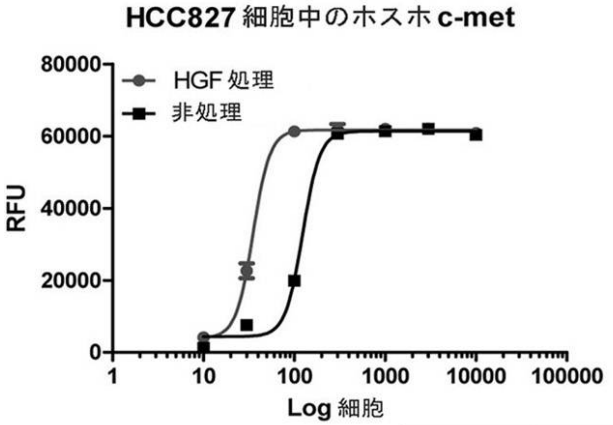
【図３】

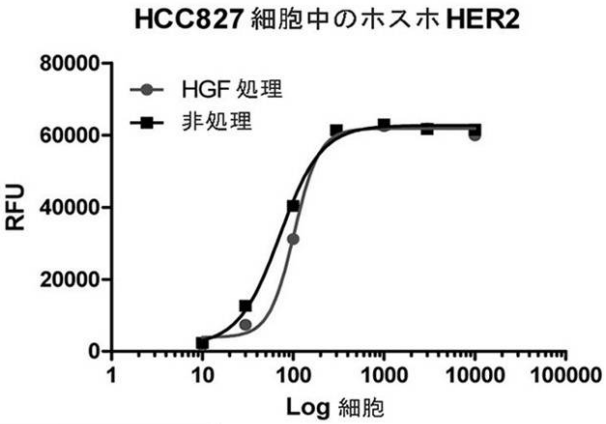




細胞	受容体 (HGF処理)	S/B
A431	ホスホc-met	3.2 (10個の細胞)
	ホスホHER2	2.9 (100個の細胞)

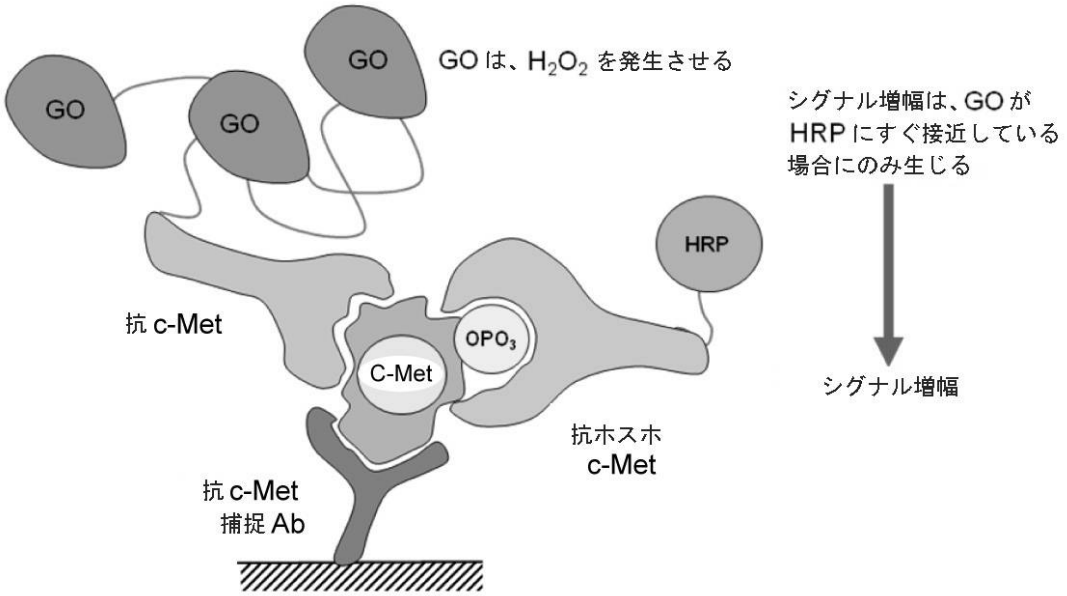
【図４】



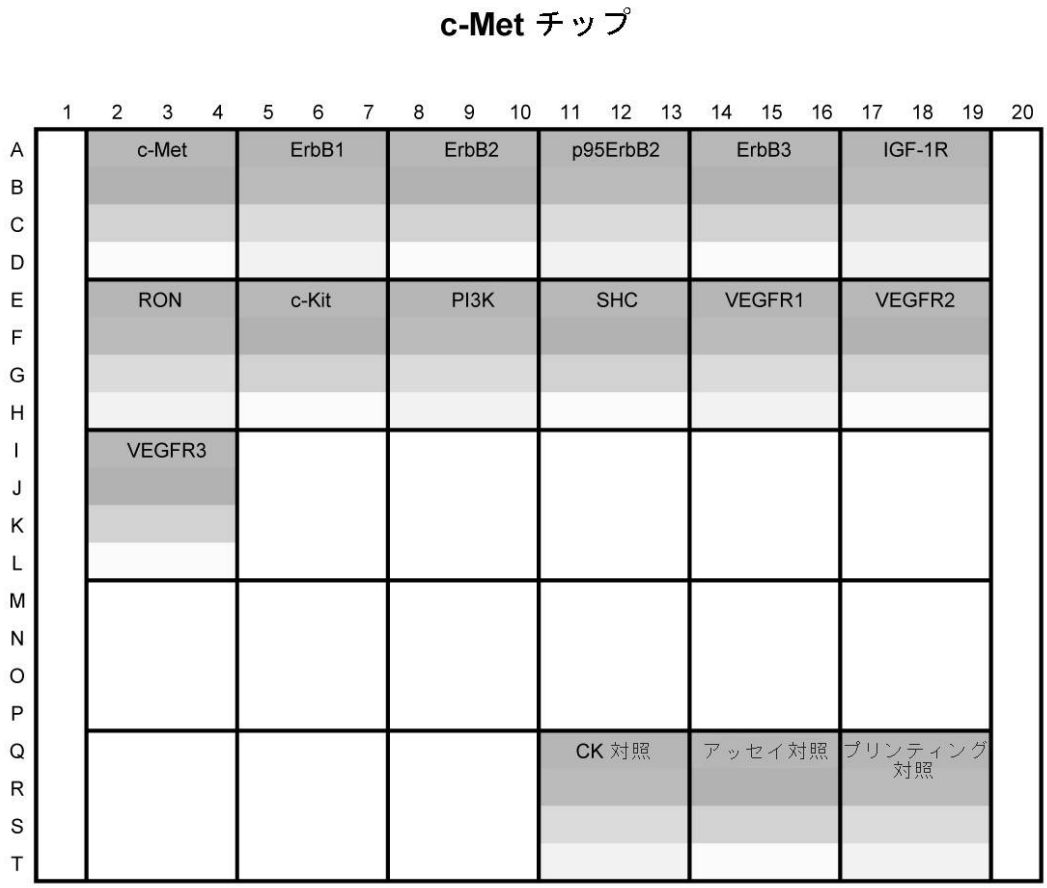


細胞	受容体 (HGF処理)	S/B
HCC827	ホスホc-met	60 (10個の細胞)
	ホスホHER2	3.4 (10個の細胞)

【図５】

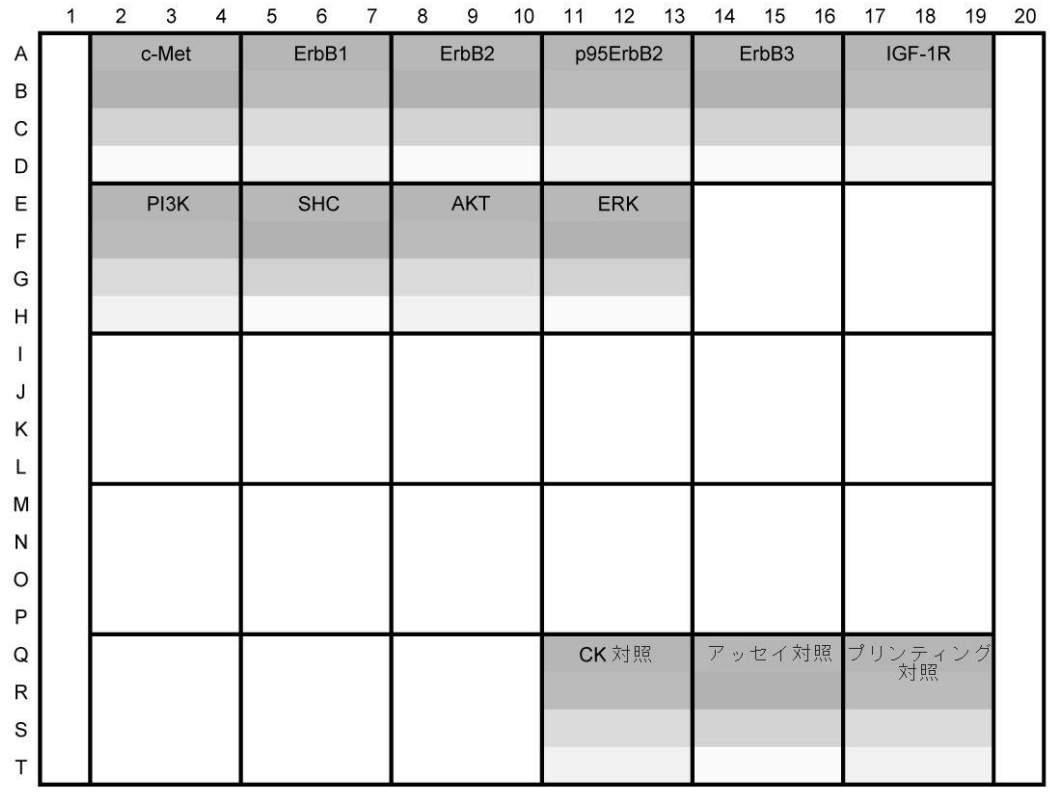

GO
GO
GO
GO は、H_2O_2 を発生させる
シグナル増幅は、GO が HRP にすぐ接近している場合にのみ生じる
HRP
抗 c-Met
OPO_3
C-Met
抗ホスホ c-Met
抗 c-Met 捕捉 Ab
シグナル増幅

【図６】

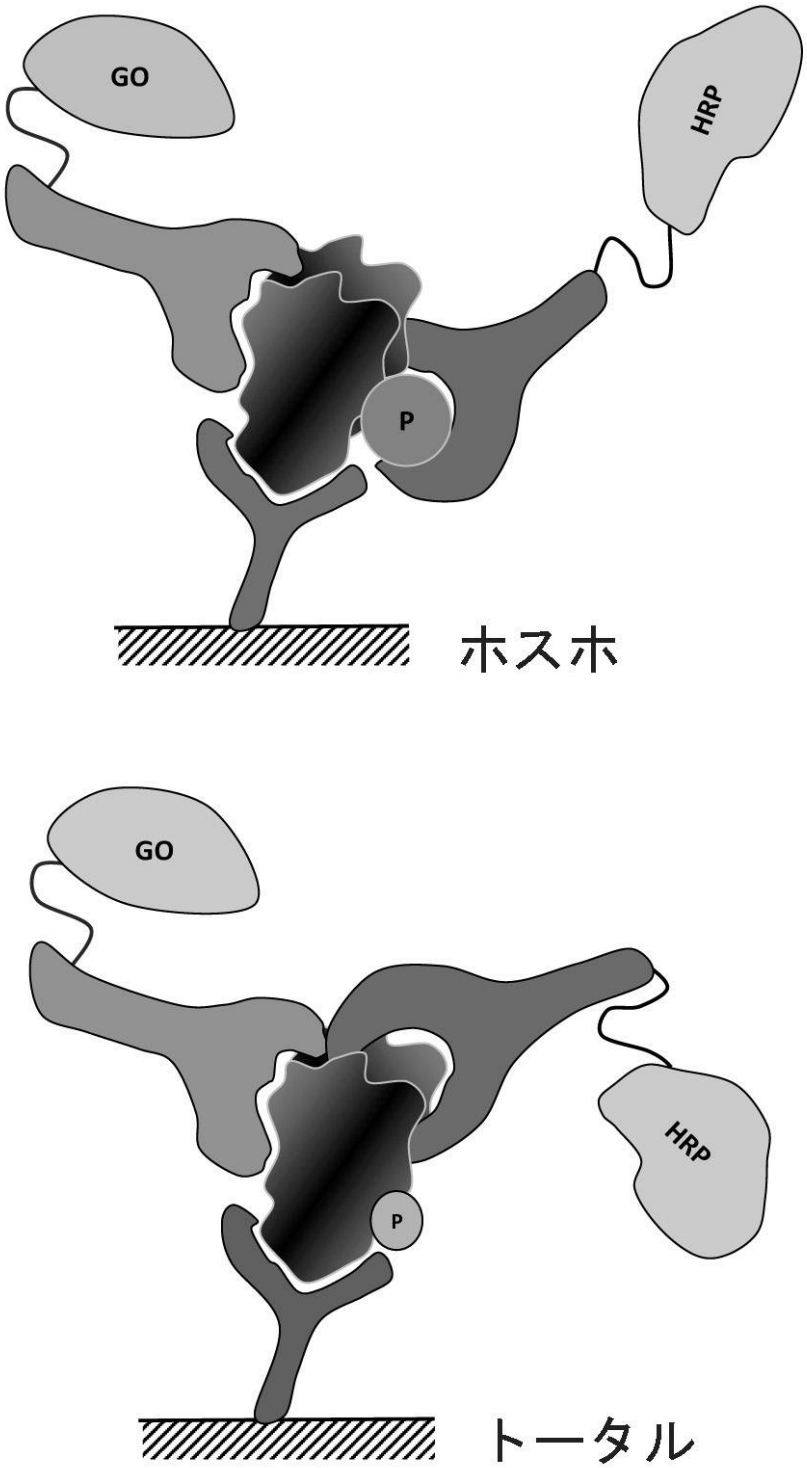

c-Met チップ
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
c-Met
ErbB1
ErbB2
p95ErbB2
ErbB3
IGF-1R
RON
c-Kit
PI3K
SHC
VEGFR1
VEGFR2
VEGFR3
CK 対照
アッセイ対照
プリンティング対照

【図７】

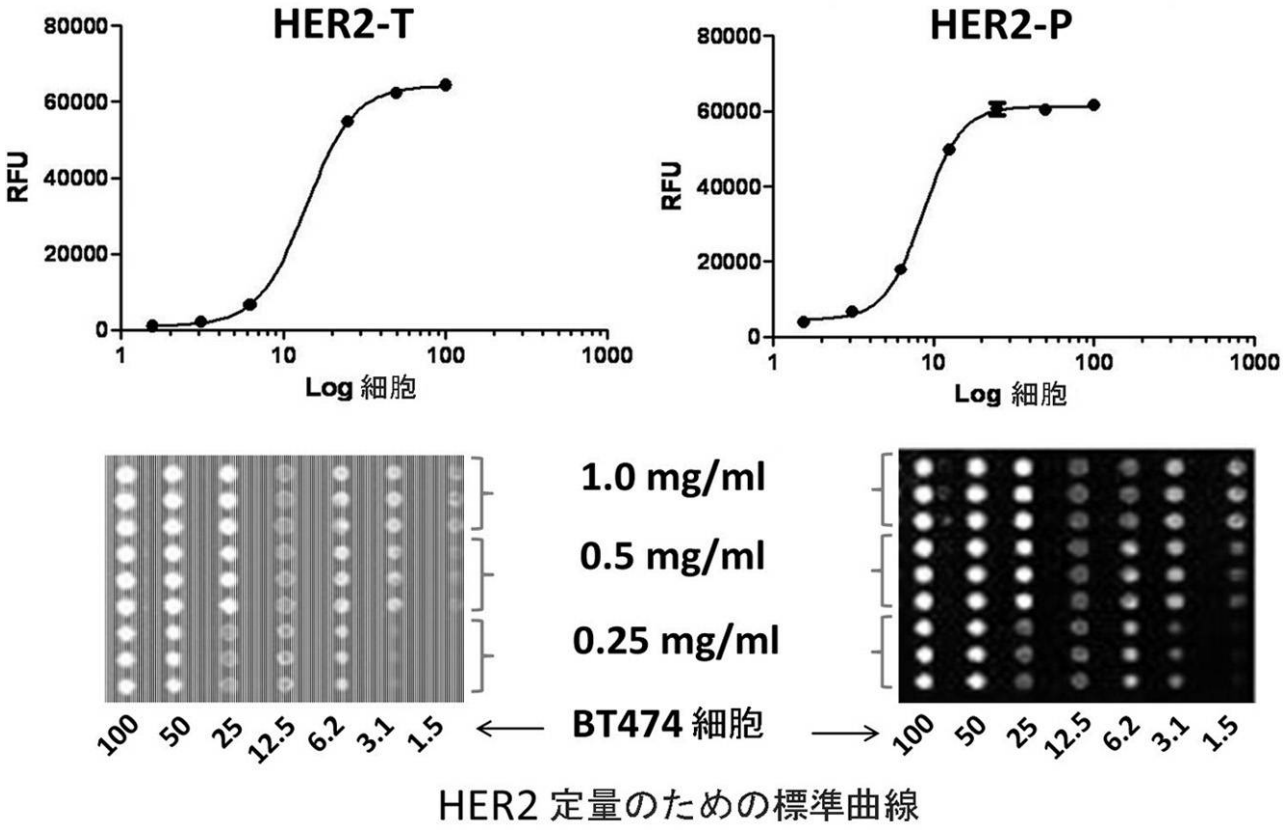
胃癌チップ


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
c-Met
ErbB1
ErbB2
p95ErbB2
ErbB3
IGF-1R
PI3K
SHC
AKT
ERK
CK 対照
アッセイ対照
プリンティング対照

【図８】

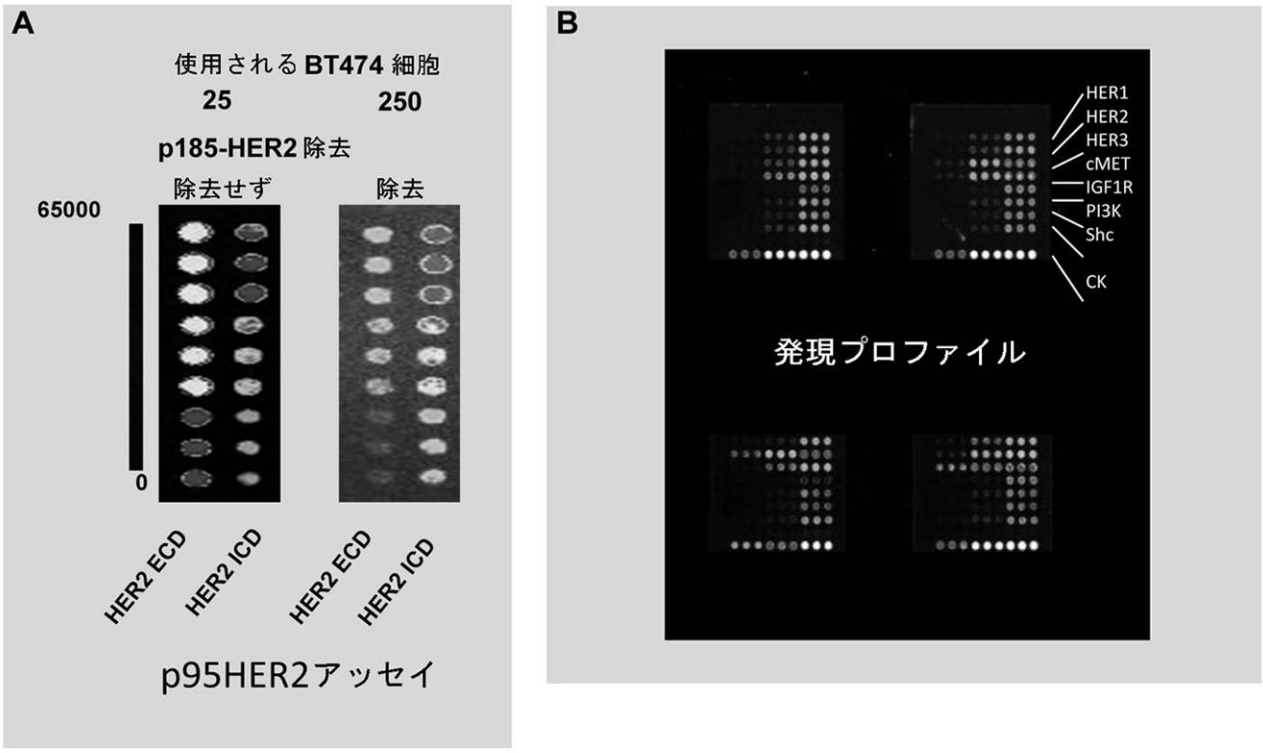


【図９】



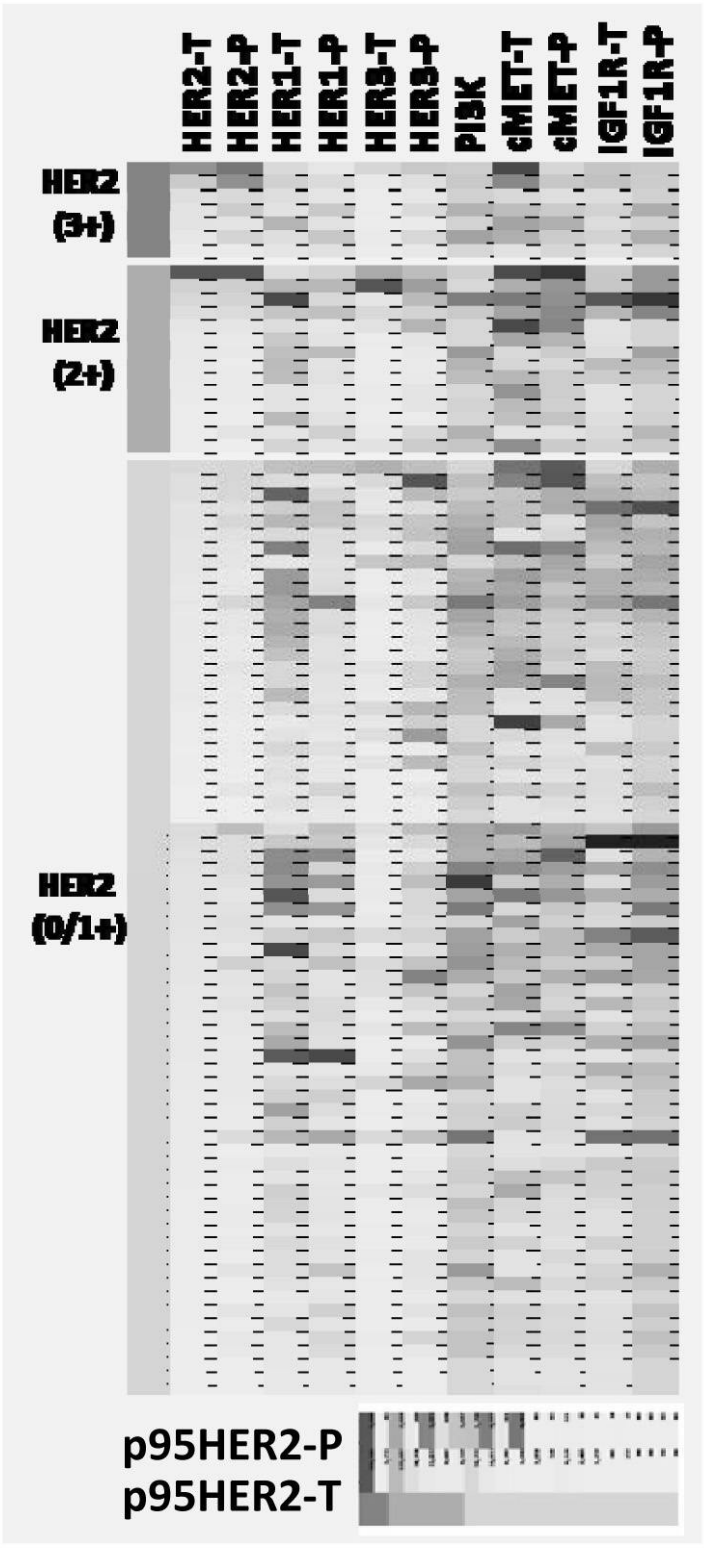
HER2 定量のための標準曲線

【図１０】

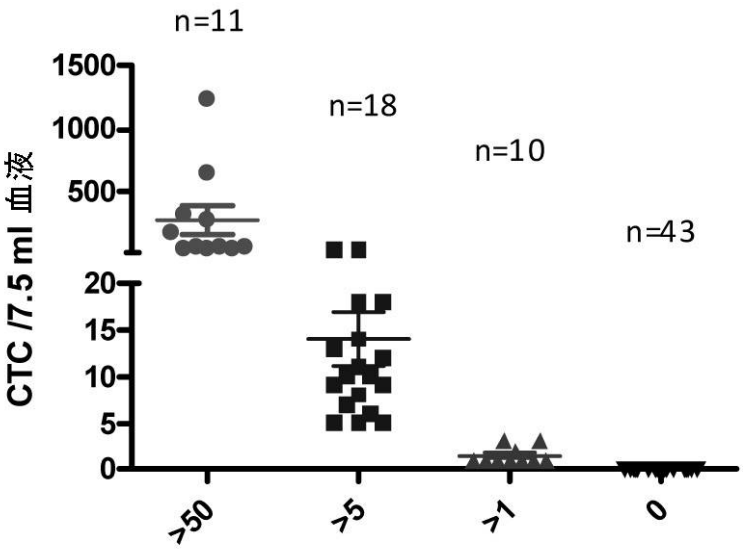


p95HER2アッセイ

【図１１】


HER2-T
HER2-P
HER1-T
HER1-P
HER3-T
HER3-P
PI3K
cMET-T
cMET-P
IGF1R-T
IGF1R-P
HER2 (3+)
HER2 (2+)
HER2 (0/1+)
p95HER2-P
p95HER2-T

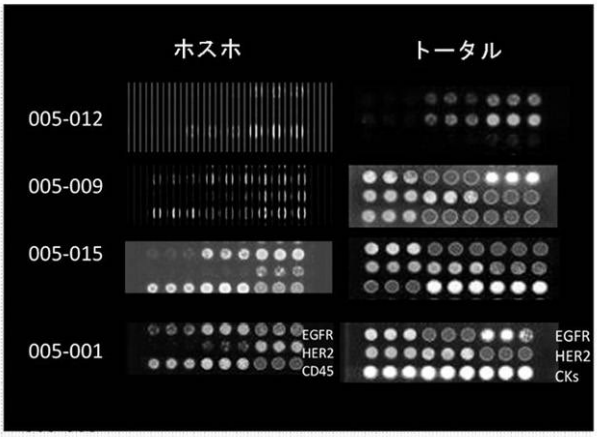
【図１２】

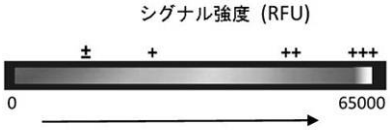


	CTC	HER2+
陽性	39	12
%	48%	14.6%
レンジ	1~6000*	1(75) ~ 3(8)
中央値	10	
合計	82	

＊ 推定

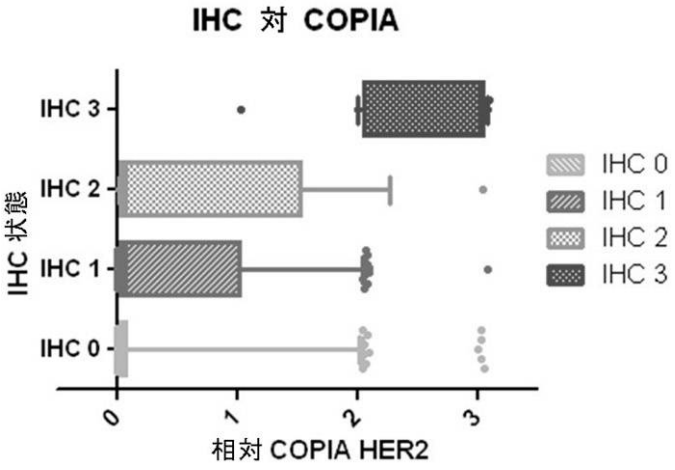
【図１３】





患者 ID	CTC	pEGFR	pHER2	EGFR	HER2	CKs
005-012	0	-	-	-	-	-
005-009	3	++	+	+++	++	++
005-015	58	+	±	++	++	+++
005-001	193	+	+	++	+ +	++++

【図１４】



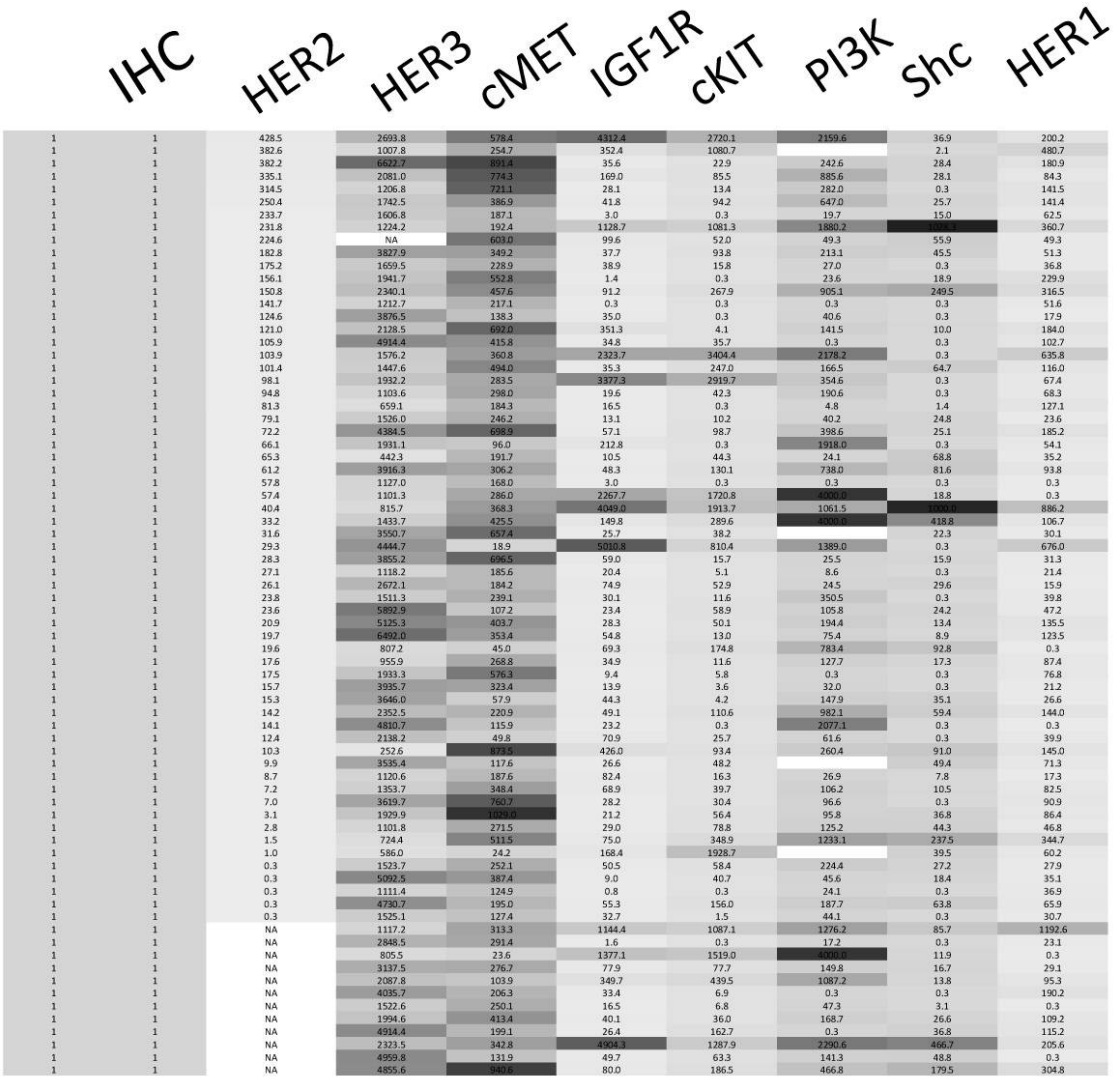
IHC 3+	
Q3	2684
Q2	1926
Q1	1143
IHC 2+	
Q3	640
Q2	129
Q1	14.1
IHC 1+	
Q3	806
Q2	103
Q1	23.7
IHC 0	
Q3	697
Q2	74
Q1	9.3

N = 21
N = 33
N = 91
N = 146
291

【図１５－１】

IHC	HER2	HER3	cMET	IGF1R	cKIT	PI3K	Shc	HER1
3	9957.6	NA	520.6	25.7	0.3	0.3	0.3	116.9
3	5760.5	6791.8	945.3	28.5	14.8	172.9	12.0	346.5
3	3437.6	1750.0	518.6	1978.7	2033.9	349.6	101.5	355.9
3	3437.6	3211.6	194.5	1.6	0.3	0.3	0.3	36.3
3	3011.8	108.9	540.3	104.5	243.5	2598.1	146.0	214.3
3	2355.3	1257.0	269.1	1378.7	1475.8	1753.4	0.3	202.1
3	2342.6	4850.0	73.9	290.1	256.4	1531.2	5.7	121.9
3	2100.2	973.3	168.3	481.2	532.2	914.1	0.3	270.6
3	2100.2	2648.1	142.9	203.4	116.0	864.9	0.3	140.0
3	1926.1	1277.8	953.2	506.5	6176.4	1106.0	224.3	189.8
3	1918.3	3321.7	267.8	374.5	322.6	2636.0	146.9	163.0
3	1677.7	4917.7	256.5	110.2	82.7	869.3	0.3	77.1
3	1413.7	2098.6	269.9	3732.9	1475.8	1753.4	114.4	314.2
3	1202.4	3395.9	231.9	778.9	5000.0	1297.7	17.5	144.7
3	1084.0	3339.1	275.6	78.9	293.4	478.9	131.0	104.0
3	998.8	3953.9	773.4	79.7	54.2	177.3	68.5	398.1
3	952.8	1932.5	654.8	221.6	66.7	769.6	43.7	169.9
3	943.7	1764.7	368.6	214.7	2675.5	NA	51.4	130.0
3	939.8	6497.6	714.7	175.1	513.2	1386.4	6.2	151.4
3	NA	2420.5	342.9	1464.7	2035.3	947.6	209.4	272.4
2	143.2	3438.5	763.1	1113.5	2175.1	3436.8	91.7	3334.0
2	11.4	636.9		704.1	4918.3	2272.3	309.6	3000.0
2	3241.4	967.2	119.5	68.6	107.0		126.1	78.3
2	1240.7	1944.6	179.9	43.6	22.4	172.5	27.3	63.6
2	1095.8	4912.7	1000.0	61.4	391.2	276.4	154.3	74.3
2	853.8	3444.4	947.3	92.8	64.4	187.6	17.9	416.8
2	568.9	3094.8	360.3	581.6	1682.4	1427.3	0.3	91.5
2	202.0	2331.9	141.3	0.3	0.3	0.3	0.3	63.6
2	160.4	5057.1	1000.0	53.9	0.3	7.9	0.3	112.7
2	115.0	1928.6	211.2	25.5	12.2	55.1	1.0	0.3
2	71.0	4418.9	970.9	107.7	123.4	273.6	145.1	198.8
2	39.2	1748.4	1115.6	50.4	67.0	46.3	49.9	128.2
2	14.5	2786.2	371.7	0.3	0.3	23.8	0.3	163.5
2	13.0	3087.8	159.0	1513.4	4297.8	2563.8	0.3	176.4
2	7.4	2347.1	154.5	18.4	0.3	8.9	0.3	28.9
2	0.3	1873.0	152.3	0.3	0.3	0.3	0.3	20.2
1	2708.1	2352.5	507.0	58.3	54.1	144.0	32.5	113.4
1	1411.6	3403.2	386.7	17.1	73.4	271.9	26.7	190.8
1	968.4	365.2	98.3	464.7	422.3	3848.2	0.3	60.5
1	834.2	6.6	18.8	0.3	0.3	0.3	1.4	4.2
1	812.2	2852.6	566.7	52.1	17.7	122.8	14.2	151.1
1	548.8	1935.9	391.4	1781.5	1501.9	1243.2	29.0	512.7
1	140.1	4911.5	935.9	50.3	40.0	103.9	15.0	25.2
1	109.4	1289.0	133.9	2.0	0.3	8.3	0.3	83.0
1	66.4	2223.3	351.6	49.1	77.3	58.5	21.4	71.0
1	59.8	2347.1	198.3	5000.0	239.9	2012.6	0.3	219.2
1	49.7	1968.1	309.6	371.0	812.6	1086.5	0.3	348.5
1	47.0	1412.9	731.7	0.4	0.3	0.3	0.3	46.0
1	47.0	1530.0	450.1	403.8	4066.7	1573.1	5000.0	
1	45.5	1115.0	1011.3	88.0	38.4	141.2	0.3	0.3
1	41.6	NA	63.4	7.7	52.1	70.7	107.0	6.1
1	38.8	3817.4	805.8	3586.5	2266.4	2331.8	0.3	293.9
1	8.5	1113.5	223.7	28.8	34.7	78.1	0.8	52.6
1	4.1	3973.6	50.9	3695.7	1746.5	1896.3	54.2	899.6
1	0.3	1527.2	421.7	207.2	311.6	638.3	451.5	56.8
1	3857.0	1780.5	462.6	36.1	7.5	8.4	0.3	24.5
1	2768.4	1525.1	64.9	1530.2	1561.7	1738.1	26.2	455.4
1	2439.5	1929.9	648.4	5360.3	1286.2	1224.1	0.3	341.4
1	2127.6	1115.0	445.3	248.7	646.8	1562.2	214.5	0.3
1	2008.2	4514.0	400.6	4.1	0.3	1.3	2.3	11.8
1	1842.9	7461.8	1081.5	450.3	4604.0	3448.5	127.7	774.5
1	1618.9	1929.0	78.4	4209.1	3219.0	1470.6	0.3	416.6
1	1412.2	1582.2	131.0	2639.0	938.9	1768.6	44.2	163.6
1	1313.0	1224.2	181.7	1750.2	1733.8	1880.2	5000.0	574.2
1	1124.1	1928.6	134.2	14.0	17.2	47.1	6.9	2.7
1	1111.1	1491.1	262.8	9.3	9.7	17.5	15.7	40.7
1	843.7	1527.2	215.2	48.7	21.5	89.1	0.3	36.1
1	835.0	1941.7	99.3	838.6	447.7	1830.8	0.3	96.8
1	788.4	1576.2	51.2	196.5	92.5	1792.9	0.3	0.3
1	624.2	3722.9	73.5	151.1	110.1	461.6	150.9	196.2
1	593.0	1556.3	285.6	16.5	0.3	0.3	0.3	74.7
1	490.6	1524.9	46.1	1446.6	562.5	4000.0	0.3	335.7
1	457.4	6385.3	384.5	20.8	25.5	638.0	7.1	105.5
1	445.3	1143.1	497.9	1120.8	2271.8	2280.5	130.0	2580.5

【図１５－２】



IHC		HER2	HER3	cMET	IGF1R	cKIT	PI3K	Shc	HER1
1	1	428.5	2693.8	578.4	4312.4	2720.1	2159.6	36.9	200.2
1	1	382.6	1007.8	254.7	352.4	1080.7		2.1	480.7
1	1	382.2	6621.7	893.4	35.6	22.9	242.6	28.4	180.9
1	1	335.1	2081.0	774.3	169.0	85.5	885.6	28.1	84.3
1	1	314.5	1206.8	721.1	28.1	13.4	282.0	0.3	141.5
1	1	250.4	1742.5	386.9	41.8	94.2	647.0	25.7	141.4
1	1	233.7	1606.8	187.1	3.0	0.3	19.7	15.0	62.5
1	1	231.8	1224.2	192.4	1128.7	1081.3	1880.2	1074.1	360.7
1	1	224.6	NA	603.0	99.6	52.0	49.3	55.9	49.3
1	1	182.8	3827.9	349.2	37.7	93.8	213.1	45.5	51.3
1	1	175.2	1659.5	228.9	38.9	15.8	27.0	0.3	36.8
1	1	156.1	1941.7	557.8	1.4	0.3	23.6	18.9	229.9
1	1	150.8	2340.1	457.6	91.2	267.9	905.1	249.5	316.5
1	1	141.7	1212.7	217.1	0.3	0.3	0.3	0.3	51.6
1	1	124.6	3876.5	138.3	35.0	0.3	40.6	0.3	17.9
1	1	121.0	2128.5	692.0	351.3	4.1	141.5	10.0	184.0
1	1	105.9	4914.4	415.8	34.8	35.7	0.3	0.3	102.7
1	1	103.9	1576.2	360.8	2323.7	3404.4	2178.2	0.3	635.8
1	1	101.4	1447.6	494.0	35.3	247.0	166.5	64.7	116.0
1	1	98.1	1932.2	283.5	3377.3	2919.7	354.6	0.3	67.4
1	1	94.8	1103.6	298.0	19.6	42.3	190.6	0.3	68.3
1	1	81.3	659.1	184.3	16.5	0.3	4.8	1.4	127.1
1	1	79.1	1526.0	246.2	13.1	10.2	40.2	24.8	23.6
1	1	72.2	4384.5	698.9	57.1	98.7	398.6	25.1	185.2
1	1	66.1	1931.1	96.0	212.8	0.3	1918.0	0.3	54.1
1	1	65.3	442.3	191.7	10.5	44.3	24.1	68.8	35.2
1	1	61.2	3916.3	306.2	48.3	130.1	738.0	81.6	93.8
1	1	57.8	1127.0	168.0	3.0	0.3	0.3	0.3	0.3
1	1	57.4	1101.3	286.0	2267.7	1720.8	4000.0	18.8	0.3
1	1	40.4	815.7	368.3	4049.0	1913.7	1061.5	1000.0	886.2
1	1	33.2	1433.7	425.5	149.8	289.6	4000.0	418.8	106.7
1	1	31.6	3550.7	657.4	25.7	38.2		22.3	30.1
1	1	29.3	4444.7	18.9	5010.8	810.4	1389.0	0.3	676.0
1	1	28.3	3855.2	696.5	59.0	15.7	25.5	15.9	31.3
1	1	27.1	1118.2	185.6	20.4	5.1	8.6	0.3	21.4
1	1	26.1	2672.1	184.2	74.9	52.9	24.5	29.6	15.9
1	1	23.8	1511.3	239.1	30.1	11.6	350.5	0.3	39.8
1	1	23.6	5892.9	107.2	23.4	58.9	105.8	24.2	47.2
1	1	20.9	5125.3	403.7	28.3	50.1	194.4	13.4	135.5
1	1	19.7	6492.0	353.4	54.8	13.0	75.4	8.9	123.5
1	1	19.6	807.2	45.0	69.3	174.8	783.4	92.8	0.3
1	1	17.6	955.9	268.8	34.9	11.6	127.7	17.3	87.4
1	1	17.5	1933.3	576.3	9.4	5.8	0.3	0.3	76.8
1	1	15.7	3935.7	323.4	13.9	3.6	32.0	0.3	21.2
1	1	15.3	3646.0	57.9	44.3	4.2	147.9	35.1	26.6
1	1	14.2	2352.5	220.9	49.1	110.6	982.1	59.4	144.0
1	1	14.1	4810.7	115.9	23.2	0.3	2077.1	0.3	0.3
1	1	12.4	2138.2	49.8	70.9	25.7	61.6	0.3	39.9
1	1	10.3	252.6	873.5	426.0	93.4	260.4	91.0	145.0
1	1	9.9	3535.4	117.6	26.6	48.2		49.4	71.3
1	1	8.7	1120.6	187.6	82.4	16.3	26.9	7.8	17.3
1	1	7.2	1353.7	348.4	68.9	39.7	106.2	10.5	82.5
1	1	7.0	3619.7	760.7	28.2	30.4	96.6	0.3	90.9
1	1	3.1	1929.9	1023.0	21.2	56.4	95.8	36.8	86.4
1	1	2.8	1101.8	271.5	29.0	78.8	125.2	44.3	46.8
1	1	1.5	724.4	511.5	75.0	348.9	1233.1	237.5	344.7
1	1	1.0	586.0	24.2	168.4	1928.7		39.5	60.2
1	1	0.3	1523.7	252.1	50.5	58.4	224.4	27.2	27.9
1	1	0.3	5092.5	387.4	9.0	40.7	45.6	18.4	35.1
1	1	0.3	1111.4	124.9	0.8	0.3	24.1	0.3	36.9
1	1	0.3	4730.7	195.0	55.3	156.0	187.7	63.8	65.9
1	1	0.3	1525.1	127.4	32.7	1.5	44.1	0.3	30.7
1	1	NA	1117.2	313.3	1144.4	1087.1	1276.2	85.7	1192.6
1	1	NA	2848.5	291.4	1.6	0.3	17.2	0.3	23.1
1	1	NA	805.5	23.6	1377.1	1519.0	4000.0	11.9	0.3
1	1	NA	3137.5	276.7	77.9	77.7	149.8	16.7	29.1
1	1	NA	2087.8	103.9	349.7	439.5	1087.2	13.8	95.3
1	1	NA	4035.7	206.3	33.4	6.9	0.3	0.3	190.2
1	1	NA	1522.6	250.1	16.5	6.8	47.3	3.1	0.3
1	1	NA	1994.6	413.4	40.1	36.0	168.7	26.6	109.2
1	1	NA	4914.4	199.1	26.4	162.7	0.3	36.8	115.2
1	1	NA	2323.5	342.8	4904.3	1287.9	2290.6	466.7	205.6
1	1	NA	4959.8	131.9	49.7	63.3	141.3	48.8	0.3
1	1	NA	4855.6	940.6	80.0	186.5	466.8	179.5	304.8

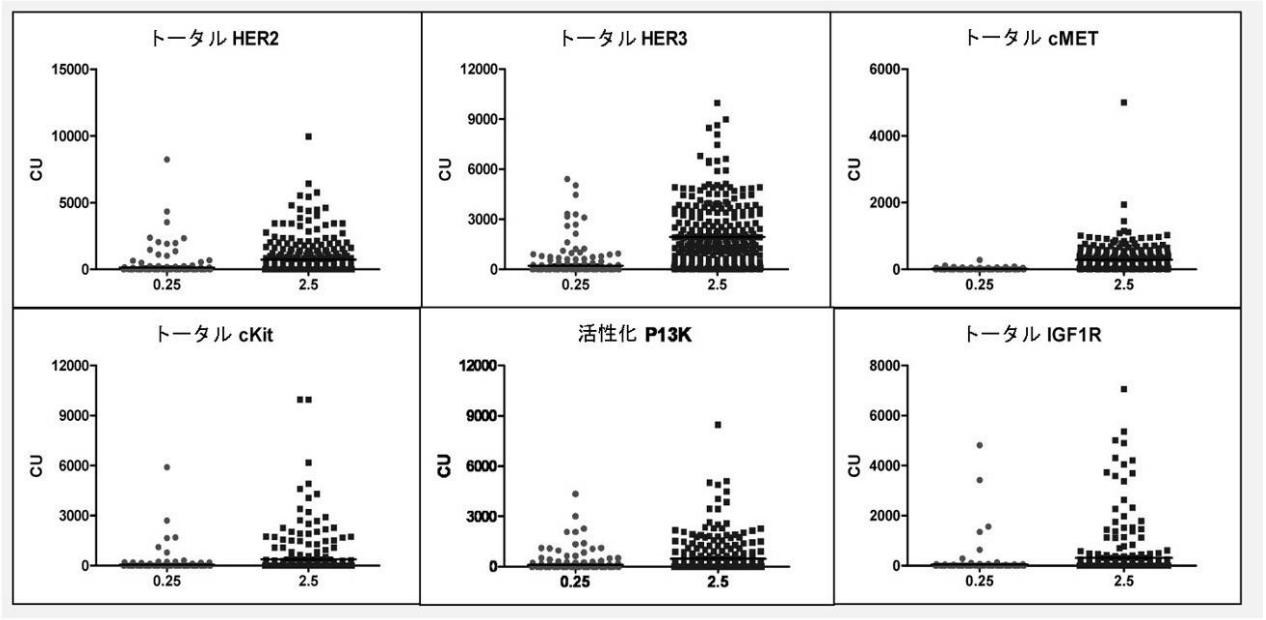
【図１５－３】

IHC		HER2	HER3	cMET	IGF1R	cKIT	PI3K	Shc	HER1
0	0	4610.0	3444.4	225.9	12.0	0.3	15.2	0.3	53.5
0	0	4502.7	112.4	200.1	19.9	54.3	104.9	32.2	0.3
0	0	3448.6	2886.0	575.7	18.9	19.0	1.4	14.3	50.0
0	0	3435.1	4464.6	315.6	25.1	40.5	234.6	25.0	86.0
0	0	2848.1	211.7	382.8	30.2	98.8	261.4	128.3	37.7
0	0	1847.4	NA	25.0	14.2	15.6	47.0	0.3	0.3
0	0	1799.6	370.5	79.9	89.4	22.9	24.6	0.3	88.4
0	0	1738.4	4255.6	185.7	23.1	0.3	29.9	0.5	56.3
0	0	1528.8	2539.9	544.7	0.3	0.3	0.3	0.3	42.5
0	0	1516.5	331.0	79.8	23.1	124.5	300.0	30.3	53.2
0	0	1511.0	4508.6	197.7	9.0	0.3	0.3	0.3	30.6
0	0	1430.7	721.1	13.1	198.7	30.5		18.9	46.7
0	0	1365.8	4529.1	64.6	37.5	14.3	52.4	14.5	61.7
0	0	1364.2	469.3	128.8	27.3	55.6	165.5	68.9	31.4
0	0	1355.5	59.9	24.8	5.0	0.3	465.9	0.3	30.7
0	0	1299.0	23.4	122.2	21.1	65.3	267.4	32.5	31.6
0	0	1211.6	2764.6	238.0	258.0	69.7	89.0	99.2	57.1
0	0	1193.8	1530.0	252.8	2.5	0.3	22.9	0.3	0.3
0	0	1116.0	172.6	61.0	29.0	17.2	72.9	0.3	36.1
0	0	1075.7	2504.8	213.0	21.7	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	1068.3	1520.2	153.8	286.8	0.3	0.3	0.3	6.3
0	0	1020.3	1936.8	51.9	27.4	0.3	5.9	4.7	12.9
0	0	938.8	5022.8	369.2	28.7	17.4	109.7	2.2	361.5
0	0	883.7	84.0	23.7	17.4	45.1	54.8	43.9	96.4
0	0	837.2	79.7	20.0	15.9	13.7	103.9	62.9	21.2
0	0	808.6	4145.4	189.3	9.9	0.3	24.9	0.3	15.9
0	0	790.8	3492.4	359.1	19.0	3.7	141.9	19.3	58.2
0	0	754.5	1051.2	77.2	54.6	27.1	0.3	0.3	29.4
0	0	733.1	67.7	18.7	20.7	17.3	19.6	6.1	26.5
0	0	698.4	3663.3	572.0	27.8	25.3	130.6	21.8	29.4
0	0	691.4	451.1	141.9	24.3	3.9	20.8	1.3	35.6
0	0	630.4	1535.7	9.1	5.1	0.3	59.7	32.4	63.5
0	0	619.7	267.3	335.3	46.2	125.6	422.7	92.4	77.9
0	0	619.0	1155.2	269.1	0.5	0.3	0.3	0.3	70.0
0	0	532.5	73.7	386.0	63.5	129.9	273.5	31.8	31.2
0	0	508.3	NA	201.5	12.2	13.1	19.0	5.0	2.3
0	0	388.7	1007.1	676.9	9.1	0.3	27.6	0.3	137.7
0	0	340.1	274.3	255.6	612.6	0.3	179.1	6.0	125.7
0	0	326.7	4705.5	284.4	0.3	0.3	0.3	0.3	12.8
0	0	287.3	3623.5	273.5	31.1	215.5	428.2	86.6	0.3
0	0	250.3	2582.5	290.5	25.1	0.3	12.9	7.5	58.9
0	0	225.5	33.0	666.1	17.2	71.0	206.6	28.1	101.3
0	0	221.8	34.4	60.8	25.2	77.3	192.2	57.7	42.7
0	0	212.4	48.8	221.4	20.3	74.6	140.5	40.0	0.3
0	0	205.0	1005.8	105.7	7.9	0.3	0.3	0.3	39.0
0	0	189.5	3799.7	156.9	11.9	0.3	0.3	0.3	41.8
0	0	172.1	1113.1	267.5	4.9	1.7	20.7	2.6	26.3
0	0	167.5	1761.4	94.4	14.9	45.1	85.1	11.9	0.3
0	0	165.7	1043.2	649.0	8.6	2.4		15.6	138.3
0	0	162.6	16.7	182.7	2.2	0.3	560.8	43.5	32.7
0	0	144.8	56.0	10.2	5.1	4.2	5.3	4.0	41.6
0	0	143.1	1044.3	74.0	7.2	4.6	4.3	35.3	20.1
0	0	134.8	3888.9	75.4	18.0	35.5	87.4	0.3	78.1
0	0	132.1	533.4	164.0	23.4	149.8	12.1	36.7	46.7
0	0	126.4	705.5	263.0	21.3	0.3	164.1	52.3	68.6
0	0	121.5	1084.5	274.0	24.4	0.3	10.0	0.3	34.8
0	0	113.0	1701.1	287.3	0.3	0.3	0.3	0.3	60.8
0	0	104.2	1320.8	229.1	3.5	0.3	0.3	0.3	42.8
0	0	100.9	43.0	305.4	9.7	29.3	138.6	38.0	82.9
0	0	93.6	166.4	14.2	27.5	31.5	21.4	11.6	30.1
0	0	93.1	1345.2	344.0	10.8	22.9	30.5	0.3	0.3
0	0	89.8	98.9	12.8	6.2	0.3	9.1	0.3	11.4
0	0	76.7	1000.9	124.2	9.7	0.3	0.3	0.3	23.2
0	0	76.1	712.0	29.6	19.4	8.7	188.5	0.3	0.3
0	0	74.6	2761.0	46.1	1.0	0.3	0.3	4.8	75.7
0	0	74.2	3435.3	166.9	10.4	1.6	8.7	5.3	66.3
0	0	73.4	1853.0	414.1	11.6	0.3	13.5	0.6	64.2
0	0	68.3	3676.0	115.9	1.2	0.3	0.3	0.3	71.3
0	0	64.9	17.5	1148.3	7.7	8.0	42.0	15.0	47.8
0	0	62.6	121.3	90.3	15.4	8.4	31.3	0.8	141.9
0	0	62.2	454.1	71.7	17.3	1.3	13.9	9.7	15.5
0	0	56.5	489.0	77.6	5.1	14.1	23.6	13.1	29.8
0	0	54.6	2600.3	89.0	10.0	0.3	23.0	0.3	38.0

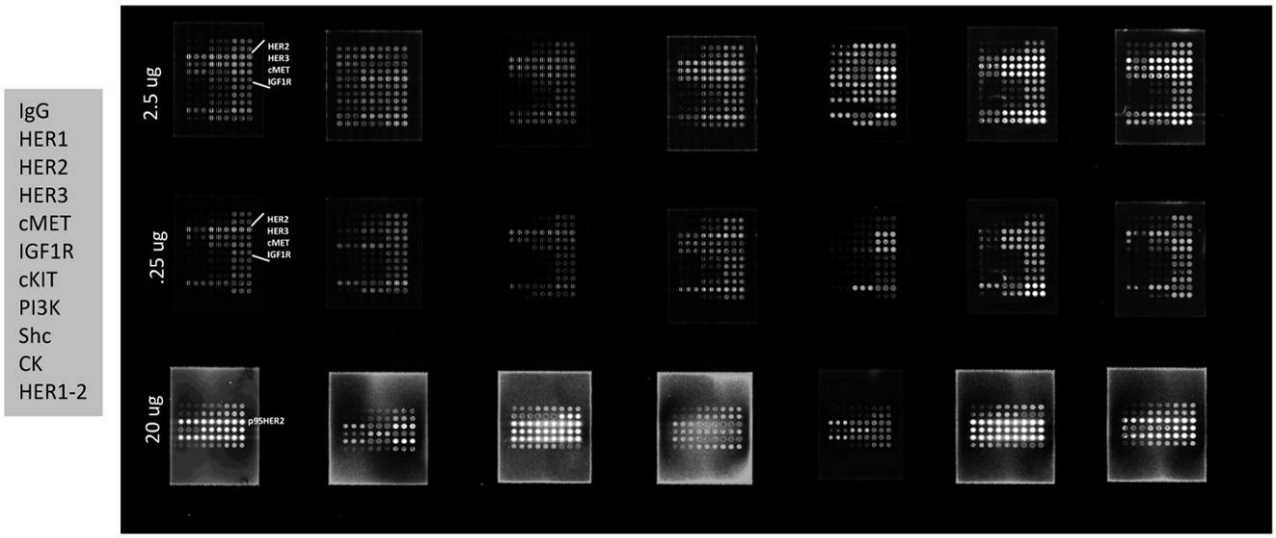
【図１５－４】

IHC		HER2	HER3	cMET	IGF1R	cKIT	PI3K	Shc	HER1
0	0	49.8	13.0	69.9	1.5	0.3	3.9	1.5	33.3
0	0	48.6	135.1	5.0	1.8	0.3	0.3	2.8	74.6
0	0	46.7	332.8	24.7	6.1	0.7	0.3	0.3	11.4
0	0	46.2	1118.2	170.5	16.4	3.2	1.0	0.3	29.8
0	0	45.9	247.1	22.1	0.3	0.3		0.3	17.2
0	0	45.3	2680.3	407.2	3.7	0.3	5.9	0.3	23.3
0	0	41.7	230.7	110.9	0.3	0.3	0.3	0.3	12.0
0	0	41.6	1917.6	354.5	8.9	0.3	0.3	0.3	11.2
0	0	38.5	101.5	29.5	25.5	46.7	218.5	21.8	14.0
0	0	37.6	22.4	332.2	8.9	10.1	82.1	22.2	76.5
0	0	35.6	29.7	29.5	2.4	0.3		0.3	8.5
0	0	34.2	14.9	156.6	14.3	26.2	133.4	4.6	0.3
0	0	33.2	14.4	99.9	4.8	0.3	63.6	0.3	39.1
0	0	32.8	4844.6	73.0	6.3	1.7	11.9	3.2	25.6
0	0	29.1	15.6	13.8	17.9	12.2	86.8	0.3	6.3
0	0	28.5	3816.5	308.6	41.4	0.3	0.3	0.3	32.7
0	0	27.8	528.4	97.6	128.9	0.3	0.3	0.3	18.0
0	0	27.7	215.5	80.7	0.3	0.3	43.5	0.3	30.0
0	0	27.6	2298.8	228.8	1.5	0.6	0.3	0.3	33.2
0	0	27.6	1423.0	37.2	7.8	0.3	0.3	1.3	19.0
0	0	20.4	25.1	98.3	1.7	0.3	0.3	0.3	10.0
0	0	20.3	3214.7	65.1	0.3	0.3	0.4	0.3	27.2
0	0	19.7	1151.6	54.5	18.1	8.1	52.0	1.4	40.8
0	0	19.3	1171.3	137.7	4.1	0.3	0.3	5.1	47.4
0	0	18.8	279.7	57.2	2.1	0.3	0.3	7.6	54.7
0	0	16.1	449.2	13.6	0.3	0.3	0.3	0.3	2.1
0	0	14.4	240.3	45.3	8.3	21.4	49.3	10.2	1.5
0	0	12.2	2.9	111.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	11.2	434.0	53.9	7.8	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	8.6	194.0	76.9	6.1	11.2	33.0	0.3	9.8
0	0	8.5	340.3	134.2	0.3	0.3	0.3	0.3	27.1
0	0	7.2	122.5	13.6	3.1	0.3	0.3	0.3	36.6
0	0	6.5	3251.5	40.8	1.5	0.3	0.3	0.3	73.5
0	0	6.3	1.8	213.2	0.3	0.3	0.3	0.3	8.3
0	0	5.0	48.9	28.0	15.2	45.3	75.7	33.5	29.4
0	0	4.0	0.3	35.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	2.6	8.3	1.3	0.3	0.3	0.3	0.3	25.1
0	0	1.9	176.3	118.3	0.3	0.3	9.5	0.3	27.0
0	0	1.8	30.3	8.1	0.3	0.3	0.3	0.3	5.8
0	0	0.3	131.6	14.0	14.4	0.3	90.3	0.3	10.2
0	0	0.3	0.3	5.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	5.7	2.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	0.3	3.4	0.3	0.3	0.3	0.3	2.9
0	0	0.3	53.1	162.4	15.6	32.0	25.8	0.3	8.4
0	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	0.3	4.5	0.3	0.3	4.1	0.3	2.5
0	0	0.3	26.2	9.8	0.3	0.3	0.3	0.3	11.1
0	0	0.3	142.7	29.6	2.2	0.3	12.8	0.3	9.8
0	0	0.3	0.3	0.3	0.3		0.3		0.3
0	0	0.3	0.3	4.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	854.7	37.5	25.1	13.9	15.3	0.3	26.8
0	0	0.3	15.8	912.4	0.3	2.2	1.1	0.3	9.3
0	0	0.3	252.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	9.1
0	0	0.3	45.8	68.2	0.3	0.3	0.3	0.3	19.5
0	0	0.3	996.3	46.8	5.3	0.3	0.3	0.3	23.4
0	0	0.3	483.6	7.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	9.1	11.0	1.3	0.3	14.1	6.9	6.5
0	0	0.3	70.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
0	0	0.3	112.0	3.5	0.3	0.3	0.3	0.3	4.4
0	0	0.3	3850.0	48.7	0.3	0.3	0.3	0.3	11.2
0	0	0.3	5.6	26.3	5.6	0.9	24.5	0.3	9.9
0	0	0.3	0.3	11.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9
0	0	0.3	949.3	44.6	0.3	0.3	0.3	0.3	4.6
0	0	0.3	0.3	0.3	0.3				0.3
0	0	0.3		347.1		9965.7		261.2	3000.0
0	0	0.3							
0	0	NA	1324.5	143.4	5.1	0.3	19.6	0.3	55.9
0	0	NA	2362.3	144.1	27.5	22.3	4.5	10.4	82.8
0	0	NA	91.9	31.8	71.2	173.4	4033.9	85.6	14.4
0	0	NA	431.3	522.8	8.9	15.7	58.5	0.3	56.1
0	0	NA	840.8	15.2	14.0	5.8	16.9	4.1	57.8
0	0	NA	1217.3	631.6	11.6	23.6		23.9	72.6
0	0	NA	1939.9	467.1	22.7	48.2	62.7	36.1	25.5
0	0	NA		482.0	476.9	2501.8	1496.3	0.3	80.8

【図１６】



【図１７】



14742212 IHC 3+	
HER2	++++
HER3	++
cMET	+
HER1	+
p95	++++

12619785 IHC 3+	
HER2	+
HER3	++
cMET	+
IGF1R	+++
HER1	++
p95	+

14594046 IHC 3+	
HER2	++++
HER3	++
cMET	++
HER1	+
p95	++++

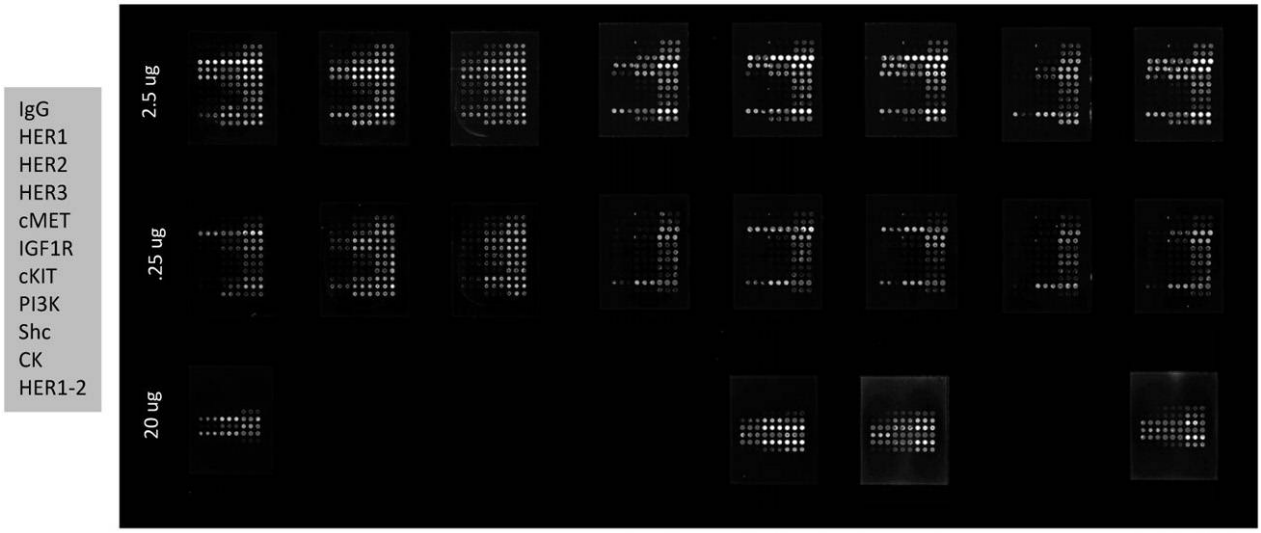
14609744 IHC 3+	
HER2	++++
HER3	++
cMET	++
HER1	+
p95	+

00897991 IHC 3+	
HER2	++
HER3	++
cMET	++
HER1	+
p95	+

15530461 IHC 3+	
HER2	+++
HER3	+++
cMET	+++
HER1	+++
p95	++++

13313978 IHC 3+	
HER2	+++
HER3	+++
cMET	+++
HER1	++
p95	++++

【図１８】



15199037 IHC 3+	
HER2	+++
HER3	+
cMET	+
HER1	+
p95	+

15193905 IHC 2+	
HER2	low
HER3	++
cMET	++
HER1	+
p95	-

15286982 IHC 2+ (1+B)	
HER2	low
HER3	++
cMET	+
p95	-

13793011 IHC 1+	
HER2	low
HER3	++
cMET	+
HER1	+
p95	-

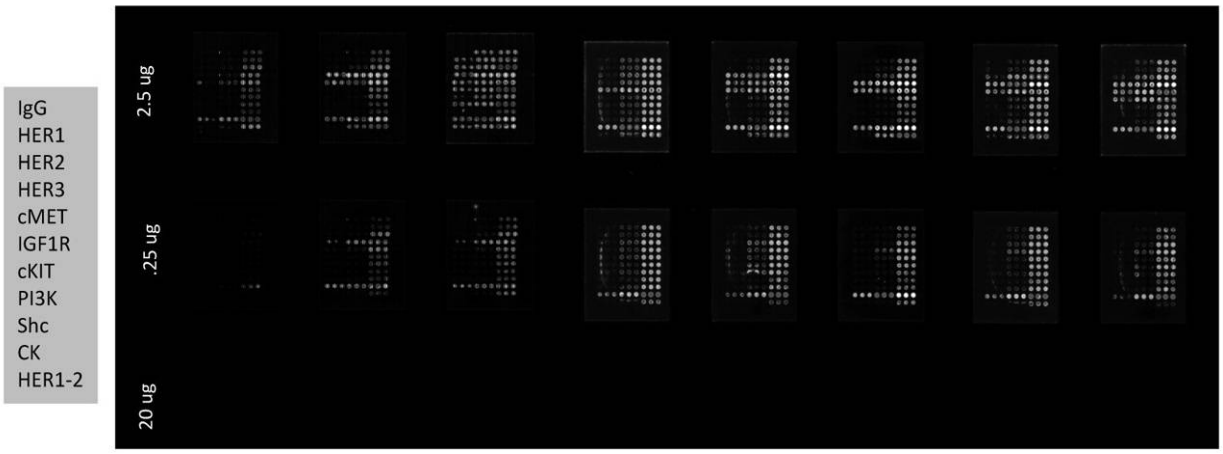
13820467 IHC 3+	
HER2	++++
HER3	++
cMET	+
HER1	+
p95	+++

13755484 IHC 3+	
HER2	+++
HER3	++
cMET	++
HER1	+
p95	++

13777507 IHC 0	
HER2	low
HER3	+++
cMET	+++
HER1	++
p95	+++

07266206 IHC 3+	
HER2	++
HER3	++
cMET	+
HER1	++
p95	++

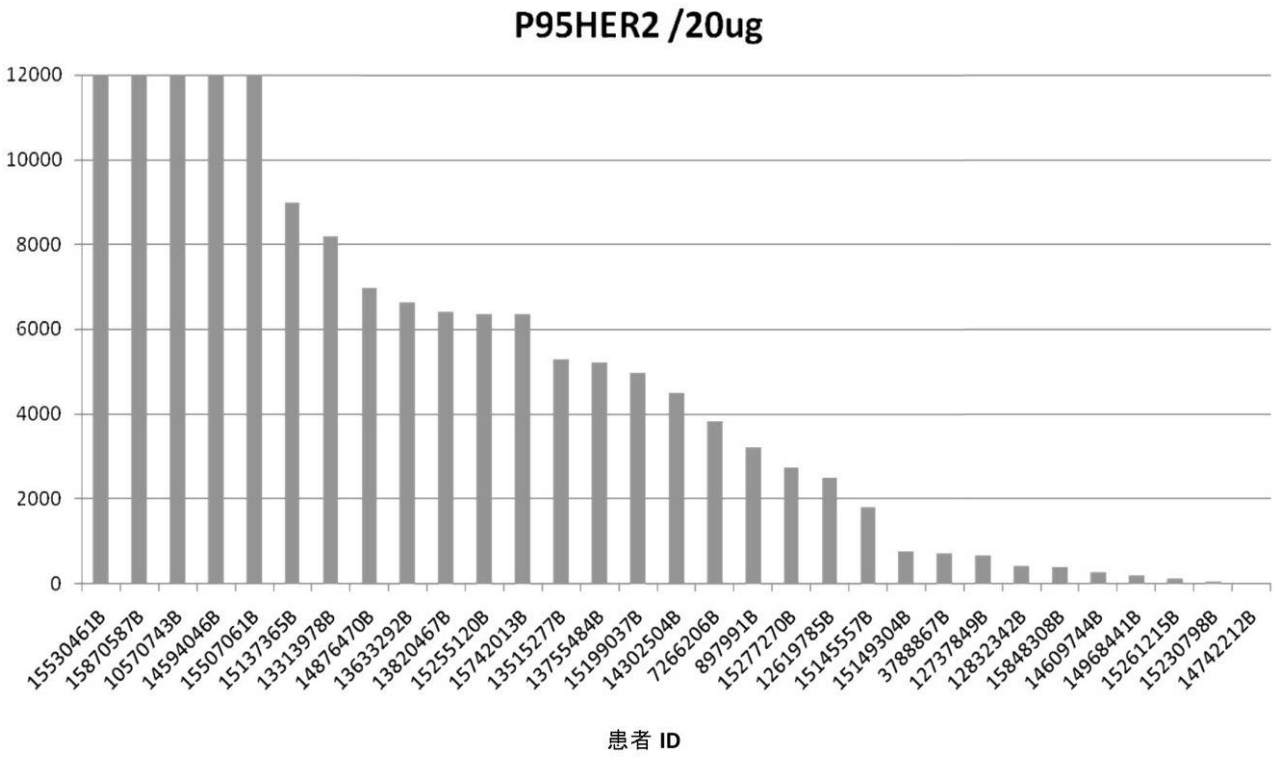
【図１９】



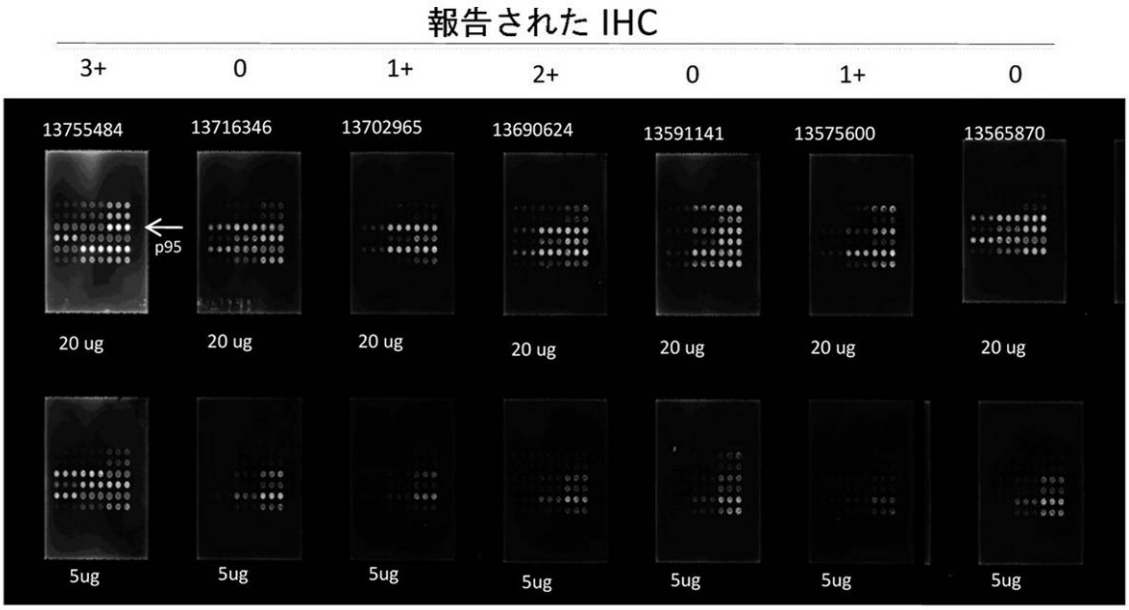
13758944 IHC 2+		13725795 IHC 0		13690624 IHC 2+		14622912 IHC 1+		04021208 IHC 2+		14627337 IHC 1+		11795208 IHC 0		14691628 IHC 1+	
HER2	low	HER2	low	HER2	++	HER2	-	HER2	++	HER2		HER2	+	HER2	low
HER3	low	HER3	+++	HER3	+++	HER3	+	HER3	++	HER3	+++	HER3	++	HER3	++
cMET	low	cMET		cMET	+	cMET		cMET	++	cMET	++	cMET	++	cMET	+
HER1	low	HER1	+	IGF1R	++	HER1		HER1	+	HER1	+	HER1	++	IGF1R	+
p95	-	p95	-	cKIT	low	p95	-	p95		p95	-	p95	-	p95	++
				PI3K	++										
				HER1	++										
				p95											

* low CK

【図２０】

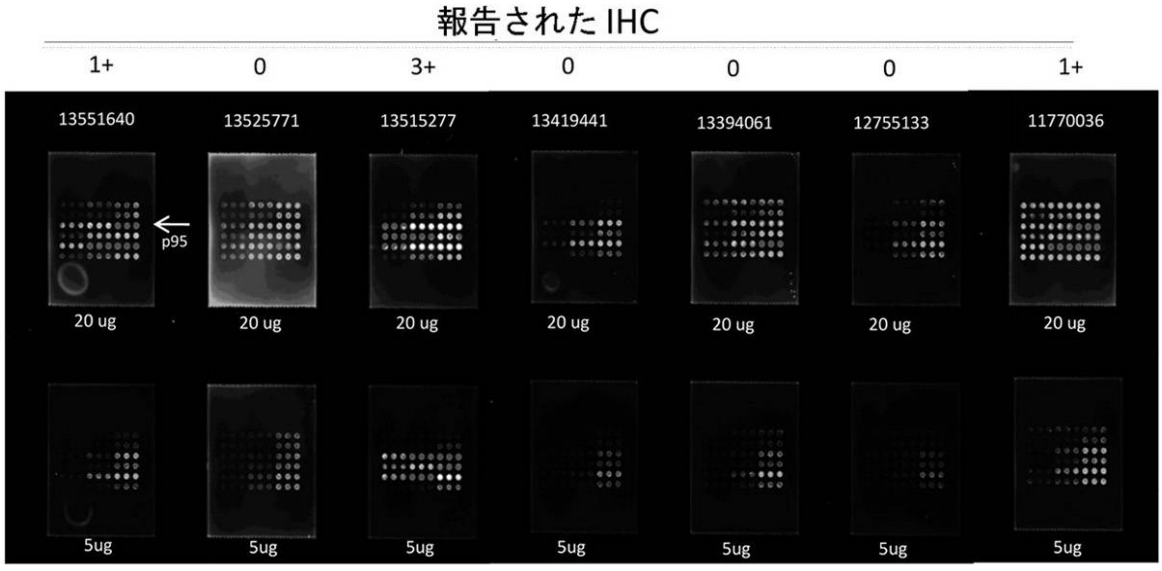


【図２１】



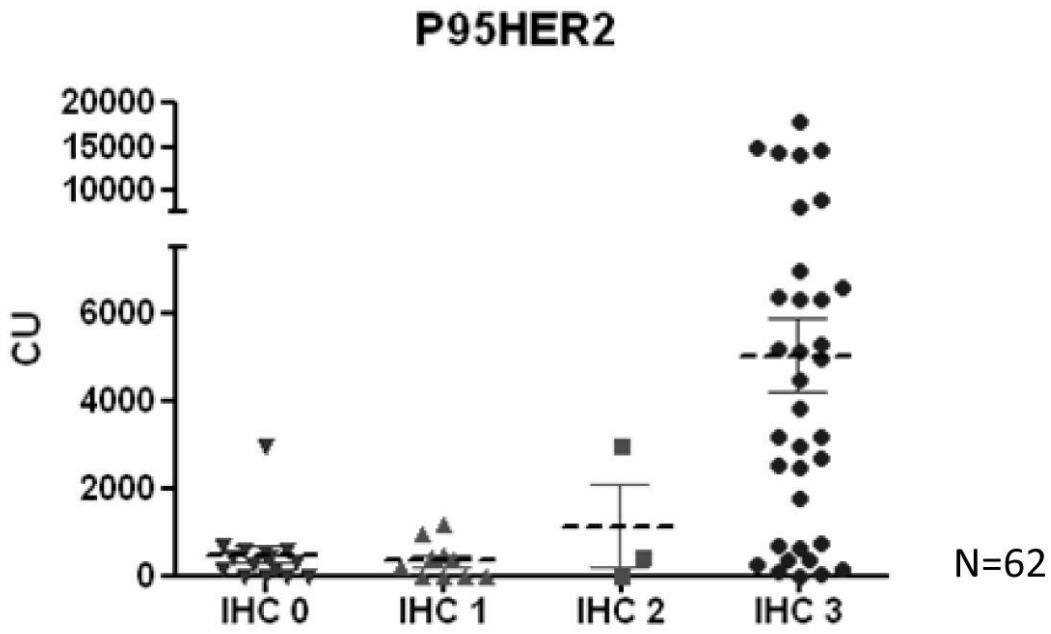
HER2 (CU)	199	169	70	170	105	62	134

【図２２】



HER2 (CU)	133	111	202	106	178	28	72

【図２３】


P95HER2
20000
15000
10000
6000
4000
2000
0
CU
IHC 0
IHC 1
IHC 2
IHC 3
N=62

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/42182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - G01N 33/574 (2010.01)
USPC - 435/7.23
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)
USPC- 435/7.23

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 435/330, 344; 424/138.1, 155.1, 174.1, 181.1, 277.1, 573

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST: sulfhydryl-activated dextran, glucose oxidase, her1, her2, p95her2, her3, c-met, igfir, ckit, pi3k, she, akt, p7026k, begfr, pdgfr, cancer, melanoma, tumor, select, prognosis, predict, identify, drug, treatment, pharmaceutical, active, compound, upregulate, gastric,
Google Scholar: sulfhydryl-activated dextran, glucose oxidase, gastric

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2008/0176229 A1 (Agus et al.) 24 July 2008 (24.07.2008) para [0011]-[0012], [0017]-[0018], [0023], [0043], [0045], [0055], [0061], [0065], [0072]-[0073], [0077], [0079], [0084], [0086], [0088]	1-5, 8,13-19, 21-23, 27-30 --- 6-7, 9-12, 20, 24-26, 31-37, 40-45, 48-60
Y	Yonemura et al. Role of Vascular Endothelial Growth Factor C Expression in the Development of Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer'.Clinical Cancer Research, 1999, Vol 5, pp 1823-1829; pg 1827, col 2, para 4-5; pg 1828, col 1, para 2-3, Fig 8	6-7
Y	US 2008/0261829 A1 (Harvey et al.) 23 October 2008 (23.10.2008) abstract; para [0013]-[0020], [0042], [0051], [0055], [0058], [0071], [0074]-[0075], [0078], [0082], [0090], [0104]-[0111], [0126], [0134], [0136], [0408]	9-12, 20, 24-26, 31-37, 40-45, 48-60
Y	Scaltriti et al. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. JNCI, 2007, Vol 99, Iss 8, pp 628-638; abstract	9, 11
P/A	US 2010/0167945 A1 (Singh et al.) 01 July 2010 (01.07.2010) para [0173], [0212], [0249], [0280], [0805]; claim 49	38-39, 46-47

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 another 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
13 Nov. 2010 (13.11.2010)	23 NOV 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/42182

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-60, drawn to methods for selecting a suitable anticancer drug for the treatment of a gastric cancer, the method comprising:
(a) determining the expression level and/or activation level of one or more analytes selected from the group consisting of HERI. HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, She, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR, and combinations thereof in a cellular extract produced from an isolated cancer cell; and
(b) selecting a suitable anticancer drug for the treatment of the gastric cancer based upon the expression level and/or activation level of said one or more analytes determined in step (a), etc.

----Continued in Extra Sheet----

1. ☐ As all required additional 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:
1-60

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/US 10/42182

Continued from Box III

Group II: claims 61-120, drawn to methods for identifying the response of a gastric cancer to treatment with an anticancer drug, the method comprising:
(a) determining the expression level and/or activation level of one or more analytes selected from the group consisting of HER 1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGFIR, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR, and combinations thereof in a cellular extract produced from an isolated cancer cell; and
(b) identifying the response of the gastric cancer to treatment with an anticancer drug based upon the expression level and/or activation level of said one or more analytes determined in step (a), etc.

Group III: claims 121-180, drawn to methods for predicting the response of a subject having a gastric cancer to treatment with an anticancer drug, the method comprising:
(a) determining the expression level and/or activation level of one or more analytes selected from the group consisting of HER), HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGFIR, cKit, PI3K, She, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR, and combinations thereof in a cellular extract produced from an isolated cancer cell; and
(b) predicting the response of the subject having the gastric cancer to treatment with an anticancer drug based upon the expression level and/or activation level of said one or more analytes determined in step (a), etc.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The claims of the various groups I-III as defined above do not share any special technical feature that is an advance over the prior art. US 2008/0176229 A1 to Agus et al. (hereinafter 'Agus') teaches a method for selecting a suitable anticancer drug for the treatment of a gastric cancer (para [0084], [0043]--'gastric cancer'), the method comprising:
(a) determining the expression level and/or activation level of one or more analytes selected from the group consisting of HER1. HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, She, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR, and combinations thereof in a cellular extract produced from an isolated cancer cell (para [0017]-[0018]--IGF1R; [0065]-[0073]); and
(b) selecting a suitable anticancer drug for the treatment of the gastric cancer based upon the expression level and/or activation level of said one or more analytes determined in step (a) (para [0084]--"the data are analyzed to identify the best treatment option available to the patient on the basis of the characteristic gene expression pattern identified in the tumor sample examined").

Thus, the inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical feature. According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by all claimed inventions.

In this case the first named invention that will be searched without additional fees is Group I represented by claims 1-60.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
G01N 33/15	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z
G01N 33/574	*(2006.01)*	G01N	33/574	A
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	U

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,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,CL,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シン シャラット
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 ９２１２７, ランチョ サンタ フェ, トップ オブ ザ モーニング ウェイ ８１７１
(72)発明者 キム フィリップ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 ９２６１２, アーバイン, エクセター ２８
(72)発明者 リュウ シンジュン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 ９２１３０, サン ディエゴ, カミニート ディエゴ １２８９０
(72)発明者 イバルロンド ベレン
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 ９２１０７, サン ディエゴ, オーチャード アベニュー ４５７０

Fターム(参考) 2G045 AA26
4B063 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QX01

专利名称(译)	使用基于抗体的阵列进行胃癌治疗的药物选择		
公开(公告)号	JP2012533738A	公开(公告)日	2012-12-27
申请号	JP2012520794	申请日	2010-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	Nesuteku兴业ANONYME		
[标]发明人	シンシャラット キムフィリップ リュウシンジュン イバルロンドベレン		
发明人	シン シャラット キム フィリップ リュウ シンジュン イバルロンド ベレン		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/04 C12Q1/68 C12Q1/48 C12Q1/26 G01N33/15 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/5041		
FI分类号	G01N33/50.Z C12Q1/04 C12Q1/68.A C12Q1/48.Z C12Q1/26 G01N33/15.Z G01N33/574.A G01N33/53.U		
F-TERM分类号	2G045/AA26 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	长谷川良树 黑川智也 清水义 池田 成人		
优先权	61/225866 2009-07-15 US 61/265218 2009-11-30 US 61/325000 2010-04-16 US		
其他公开文献	JP2012533738A5 JP5795311B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于选择合适的抗癌疗法，以及用于鉴定和预测胃癌治疗反应的方法。

(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2012-53
(P2012-533
(43)公表日　平成24年12月27日(2012.1

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/50	***(2006.01)***	G01N	33/50	Z	2G045
C12Q 1/04	***(2006.01)***	C12Q	1/04		4B063
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	
C12Q 1/48	***(2006.01)***	C12Q	1/48	Z	
C12Q 1/26	***(2006.01)***	C12Q	1/26		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 138 頁）　最終頁に

(21)出願番号　特願2012-520794 (P2012-520794)
(86)(22)出願日　平成22年7月15日 (2010.7.15)
(85)翻訳文提出日　平成24年3月13日 (2012.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/042182
(87)国際公開番号　WO2011/008990
(87)国際公開日　平成23年1月20日 (2011.1.20)
(31)優先権主張番号　61/225,866
(32)優先日　平成21年7月15日 (2009.7.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/265,218
(32)優先日　平成21年11月30日 (2009.11.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/325,000
(32)優先日　平成22年4月16日 (2010.4.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

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

最終頁に続