



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102016581 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 200980114742. 4

(22) 申请日 2009. 02. 24

(30) 优先权数据

61/031, 319 2008. 02. 25 US

61/106, 404 2008. 10. 17 US

61/108, 384 2008. 10. 24 US

61/117, 908 2008. 11. 25 US

61/140, 558 2008. 12. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 10. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/035013 2009. 02. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/108637 EN 2009. 09. 03

(73) 专利权人 雀巢产品技术援助有限公司

地址 瑞士沃韦

(72) 发明人 S·辛格 J·哈维 P·金 X·刘

L·刘 R·巴罕姆 B·内里

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡晨曦 黄革生

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/153014 A1, 2003. 08. 14, [0009], [0149], [0175], 权 37.

W0 03/087761 A2, 2003. 10. 23, 权利要求 26, 27.

W0 2008/019375 A, 2008. 02. 14, 权利要求 1, 14, 16, 24.

Nielsen Ulrik B., et al.. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. 《PNS》. 2003, 第 100 卷 (第 16 期), 9330-9335, 特别是图 1.

Nielsen Ulrik B., et al.. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. 《PNS》. 2003, 第 100 卷 (第 16 期), 9330-9335, 特别是图 1.

Nielsen Ulrik B., et al.. Multiplexed sandwich assays in microarray format. 《Journal of Immunological Methods》. 2004, 第 290 卷 (第 1-2 期), 107-120.

审查员 王莉

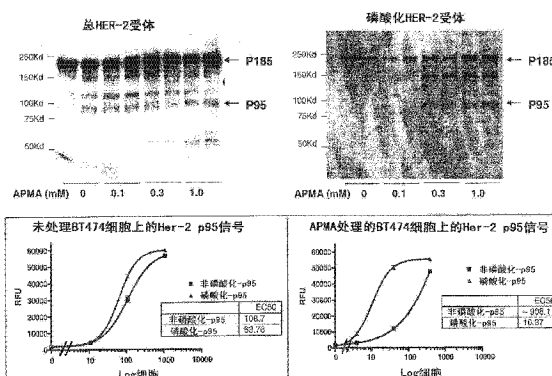
权利要求书4页 说明书119页 附图20页

(54) 发明名称

用抗体阵列选择乳腺癌治疗药物

(57) 摘要

本发明提供检测肿瘤细胞中信号转导途径诸组分活化状态的组合物和方法。利用本发明获得的信号转导途径诸组分活化状态的信息可进行癌症的诊断、预后和设计癌症治疗方法。



1. 检测抗体和捕捉抗体的多个系列稀释液在制备用于实施选择治疗乳腺肿瘤的合适抗癌药物的方法的阵列或试剂盒中的用途,所述方法包括:

(a) 给予抗癌药物后分离乳腺肿瘤细胞或者分离乳腺肿瘤细胞后将其与抗癌药一起培育,随后裂解所述乳腺肿瘤细胞产生细胞提取物;

(b) 采用包括一种或多种分析物特异性捕捉抗体的多个系列稀释液的试验来检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上,其中所述试验包括:

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育,形成多个被捕获的分析物;

(ii) 将多个被捕获分析物与检测抗体一起培育,形成多个可检测的被捕获分析物,所述检测抗体包括相应分析物的特异性多个活化状态依赖性抗体和多个活化状态非依赖性抗体,

其中所述活化状态非依赖性抗体用葡萄糖氧化酶标记,其中所述葡萄糖氧化酶和活化状态非依赖性抗体偶联于巯基活化的葡聚糖分子,其中活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记,并且其中所述葡萄糖氧化酶能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂;

(iii) 将所述多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育,产生放大的信号;和

(iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号;

和

(c) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药物时产生的参比活化状态,确定该抗癌药是否适于治疗该乳腺肿瘤。

2. 检测抗体和捕捉抗体的多个系列稀释液在制备用于实施鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗的反应的方法的阵列或试剂盒中的用途,所述方法包括:

(a) 给予抗癌药物后分离乳腺肿瘤细胞或者分离乳腺肿瘤细胞后将其与抗癌药一起培育,随后裂解所述乳腺肿瘤细胞产生细胞提取物;

(b) 采用包括一种或多种分析物特异性捕捉抗体的多个系列稀释液的试验来检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上,其中所述试验包括:

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育,形成多个被捕获的分析物;

(ii) 将多个被捕获分析物与检测抗体一起培育,形成多个可检测的被捕获分析物,所述检测抗体包括相应分析物的特异性多个活化状态依赖性抗体和多个活化状态非依赖性抗体,

其中所述活化状态非依赖性抗体用葡萄糖氧化酶标记,其中所述葡萄糖氧化酶和活化状态非依赖性抗体偶联于巯基活化的葡聚糖分子,其中活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记,并且其中所述葡萄糖氧化酶能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂;

(iii) 将所述多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育,产生放大

的信号 ;和

(iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号 ;

和

(c) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药物时产生的参比活化状态, 鉴定该乳腺肿瘤是否对该抗癌药有反应。

3. 检测抗体和捕捉抗体的多个系列稀释液在制备用于实施预测乳腺肿瘤对象对抗癌药治疗反应的方法的阵列或试剂盒中的用途, 所述方法包括 :

(a) 给予抗癌药物后分离乳腺肿瘤细胞或者分离乳腺肿瘤细胞后将其与抗癌药一起培育, 随后裂解所述乳腺肿瘤细胞产生细胞提取物 ;

(b) 采用包括一种或多种分析物特异性捕捉抗体的多个系列稀释液的试验来检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态, 其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上, 其中所述试验包括 :

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育, 形成多个被捕获的分析物 ;

(ii) 将多个被捕获分析物与检测抗体一起培育, 形成多个可检测的被捕获分析物, 所述检测抗体包括相应分析物的特异性多个活化状态依赖性抗体和多个活化状态非依赖性抗体,

其中所述活化状态非依赖性抗体用葡萄糖氧化酶标记, 其中所述葡萄糖氧化酶和活化状态非依赖性抗体偶联于巯基活化的葡聚糖分子, 其中活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记, 并且其中所述葡萄糖氧化酶能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂 ;

(iii) 将所述多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育, 产生放大的信号 ;和

(iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号 ;

和

(c) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药物时产生的参比活化状态, 预测该对象对该抗癌药治疗反应的可能性。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途, 其中所述乳腺肿瘤来自患有乳腺导管癌或小叶癌的对象。

5. 如权利要求 4 所述的用途, 其中所述导管癌是浸润性导管癌或原位导管癌。

6. 如权利要求 4 所述的用途, 其中所述小叶癌是浸润性小叶癌或原位小叶癌。

7. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途, 其中所述细胞提取物从选自下述的样品制备 : 肿瘤组织、全血、血清、血浆、导管洗出液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物和它们的组合。

8. 如权利要求 7 所述的用途, 其中所述肿瘤组织是原发性肿瘤或转移性肿瘤组织。

9. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途, 其中所述抗癌药选自 : 单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂、疫苗和它们的组合。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中所述单克隆抗体选自 : 群司珠单抗(赫赛汀®)、阿仑单抗(Campath®)、贝伐单抗(Avastin®)、西妥昔单抗(Erbix®)、吉姆单抗(Mylotarg®)、帕尼

妥莫单抗 (Vectibix™)、利妥昔单抗(Rituxan®)、托西莫单抗(BEXXAR®)和它们的组合。

11. 如权利要求 9 所述的用途,其中所述酪氨酸激酶抑制剂选自:吉非替尼(Iressa®)、苏尼替尼(Sutent®)、埃洛替尼(Tarceva®)、拉帕替尼(Tykerb®)、卡那替尼(CI1033)、塞玛替尼(SU5416)、瓦塔拉尼(PTK787 / ZK222584)、索拉芬尼(BAY43-9006)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec®)、来氟米特(SU101)、凡达它尼(ZACTIMA™;ZD6474);和它们的组合。

12. 如权利要求 9 所述的用途,其中所述化疗剂选自:培美曲塞(ALIMTA®)、吉西他滨(Gemzar®)、西罗莫司(雷帕霉素)、雷帕霉素类似物、铂化合物、碳铂、顺铂、沙铂、紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)、他西络莫司(CCI-779)、依维莫司(RAD001)和它们的组合。

13. 如权利要求 9 所述的用途,其中所述激素治疗剂选自:芳香酶抑制剂、选择性雌激素受体调节剂、类固醇、非那雄胺、促性腺素释放素、其药学上可接受的盐、其立体异构体、其衍生物、其类似物、以及它们的组合。

14. 如权利要求 9 所述的用途,其中所述放疗剂选自:⁴⁷Sc、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Sr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Bi 和它们的组合。

15. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述一种或多种分析物包含多个信号转导分子。

16. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述多个信号转导分子选自:受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶信号转导级联组分、核激素受体、核受体辅激活物、核受体抑制物、和它们的组合。

17. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述多个信号转导分子选自:EGFR(ErbB1)、Her-2(ErbB2)、p95ErbB2、Her-3(ErbB3)、Her-4(ErbB4)、Raf、SRC、Mek、NFkB-IkB、mTor、PI3K、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Eph-a、Eph-b、Eph-c、Eph-d、cMet、FGFR、cKit、Flt-3、Tie-1、Tie-2、Flt-3、cFMS、PDGFRA、PDGFRB、Abl、FTL3、RET、Kit、HGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF-1R、ER、PR、NCOR、AIB1、和它们的组合。

18. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述多个信号转导分子选自:ErbB1、ErbB2、p95ErbB2、ErbB3、ErbB4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ER、PR、和它们的组合。

19. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述活化状态选自:磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态和它们的组合。

20. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述固相支持物选自:玻璃,塑料,芯片,针,滤膜,珠,纸,膜,纤维束,以及它们的组合。

21. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述捕捉抗体束缚于可寻址阵列中的固体支持物上。

22. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中葡萄糖氧化酶能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂。

23. 如权利要求 22 所述的用途,其中阵列或试剂盒还包含信号放大对第二成员。

24. 如权利要求 23 所述的用途,其中放大信号由信号放大对第一和第二成员产生。

25. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员直接标记。

26. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述活化状态依赖性抗体通过偶联于该活化状态依赖性抗体的结合对第一成员与偶联于信号放大对第一成员的结合对第二成员之间的结合,被信号放大对第一成员标记。

27. 如权利要求 26 所述的用途,其中所述结合对第一成员是生物素。

28. 如权利要求 26 所述的用途,其中所述结合对第二成员是链霉抗生物素蛋白。

29. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量为 500kDa。

30. 如权利要求 24 所述的用途,其中所述氧化剂是过氧化氢 (H_2O_2)。

31. 如权利要求 30 所述的用途,其中所述信号放大对第一成员是过氧化物酶。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其中所述过氧化物酶是辣根过氧化物酶 (HRP)。

33. 如权利要求 31 所述的用途,其中所述信号放大对的第二成员是酪酰胺试剂。

34. 如权利要求 33 所述的用途,其中所述酪酰胺试剂是生物素 - 酪酰胺。

35. 如权利要求 34 所述的用途,其中通过过氧化物酶氧化生物素 - 酪酰胺产生活化的酪酰胺而产生放大信号。

36. 如权利要求 35 所述的用途,其中直接检测活化的酪酰胺。

37. 如权利要求 35 所述的用途,其中通过加入信号检测试剂检测活化的酪酰胺。

38. 如权利要求 37 所述的用途,其中所述信号检测试剂是链霉抗生物素蛋白 - 标记的荧光团。

39. 如权利要求 37 所述的用途,其中所述信号检测试剂是链霉抗生物素蛋白 - 标记的过氧化物酶与显色试剂的组合。

40. 如权利要求 39 所述的用途,其中所述显色试剂是 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB)。

用抗体阵列选择乳腺癌治疗药物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请是 2009/2/24 提交的 PCT 申请 PCT/US2009/035013 的后续部分, 该 PCT 申请要求 2008/2/25 提交的美国临时申请序列号 61/031, 319、2008/10/24 提交的美国临时申请序列号 61/106, 404、2008/10/24 提交的美国临时申请序列号 61/108, 384、2008/11/25 提交的美国临时申请序列号 61/117, 908、以及 2008/12/23 提交的美国临时申请序列号 61/140, 558 的优先权, 通过引用将这些申请的内容全文纳入本文用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 细胞的信号转导过程负责各种生物学功能, 包括细胞分裂和死亡、代谢、免疫细胞活化、神经传递和感知觉等等。因此, 细胞正常信号转导的错乱可导致许多疾病状态, 例如糖尿病、心脏病、自身免疫病和癌症。

[0005] 一种经充分特征鉴定的信号转导途径是 MAP 激酶途径, 其负责转导表皮生长因子 (EGF) 的信号从而促进细胞增殖 (参见, 图 1)。EGF 能结合连接酪氨酸激酶的跨膜受体, 即通过 EGF 结合可活化表皮生长因子受体 (EGFR)。EGF 与 EGFR 结合活化了该受体胞质结构域的酪氨酸激酶活性。该激酶活化的一种结果是 EGFR 的酪氨酸残基自身磷酸化。被活化 EGFR 上的磷酸化酪氨酸残基为含有 SH2 结构域的衔接蛋白, 例如 GRB2 的结合提供了停泊位点。作为衔接蛋白, GRB2 的功能还能通过 GRB2 上的 SH3 结构域结合鸟嘌呤核苷酸交换因子 SOS。形成 EGFR-GRB2-SOS 复合物而导致 SOS 活化 (能促进除去 Ras 中的 GDP) 鸟嘌呤核苷酸交换因子。GDP 除去后, Ras 才能结合 GTP 而被活化。

[0006] 活化后, Ras 结合并活化一种丝氨酸 / 苏氨酸特异性蛋白激酶 -RAF 激酶- 的蛋白激酶活性。然后活化蛋白激酶级联反应从而导致细胞增殖。概括地说, RAF 激酶随后磷酸化活化另一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶 MEK。活化的 MEK 磷酸化活化促分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK)。MAPK 进一步磷酸化的靶标是 40S 核糖体蛋白 S6 激酶 (RSK)。MAPK 磷酸化 RSK 可导致 RSK 激活, 进而磷酸化核糖体蛋白 S6。MAPK 的另一已知靶标是各种癌症中对细胞增殖至关重要的基因 - 突变的原癌基因 c-Myc。MAPK 还能磷酸化激活另一种蛋白激酶 MNK, 进而磷酸化转录因子 CREB。MAPK 也能间接调节 Fos 基因的转录, 而该基因还编码参与细胞增殖的另一种转录因子。通过改变这些转录因子的水平和活性, MAPK 将 EGF 的最初胞外信号转换成对细胞周期进程至关重要的基因转录改变。

[0007] 鉴于信号转导途径在细胞生长中所起的核心作用, 信号转导组分的突变和其它改变导致细胞增殖途径异常激活而产生许多癌症并不令人惊奇。例如, EGFR 的过表达或过度活化与许多癌症, 包括多形性成胶质细胞瘤、结肠癌和肺癌相关。这促进开发了针对 EGFR 的抗癌药物, 包括用于肺癌的吉非替尼 (gefitinib) 和埃洛替尼 (erlotinib), 以及用于结肠癌的西妥昔单抗 (cetuximab)。

[0008] 西妥昔单抗是单克隆抗体抑制剂的一个例子, 它能结合 EGFR 的胞外配体结合结构域, 阻止其配体结合活化 EGFR 酪氨酸激酶。相反, 吉非替尼和埃洛替尼是抑制位于胞内的 EGFR 酪氨酸激酶的小分子。没有这些激酶活性, EGFR 的酪氨酸残基不能自身磷酸化, 而这是下游衔接蛋白, 例如 GRB2 结合的先决条件。通过中断细胞中的信号级联反应 (细胞生

长依赖该途径),减少了肿瘤的增殖和迁移。

[0009] 此外,其它研究显示约 70% 的人黑色素瘤和较低比例其它肿瘤的 Raf 基因中含有导致 MAPK 途径持久活化的点突变 (V599E) (参见,例如 Davies 等, Nature, 417: 949-954 (2002))。这些结果提示特定信号转导途径中的突变可能是某些类型肿瘤特征性的,而信号转导途径的这种特异性改变可能是化疗干预有希望的靶点。

[0010] 鉴于不同的癌症治疗,特别是癌症化疗可能分别通过阻断或活化参与细胞增殖或死亡的细胞信号转导途径而直接或间接起作用,那么可将某特定形式癌症中的某给定信号转导途径的活化用作各种癌症治疗方法效力是否良好的指标。因此,除了满足这些要求外,本发明提供了潜在抗癌治疗对个体患者效力的评估方法。因此,本发明提供了协助医师为各患者选择剂量合适和时间合适的癌症治疗的方法。

[0011] 发明简述

[0012] 本发明提供检测肿瘤细胞(例如,乳腺肿瘤的循环细胞)中信号转导途径诸组分活化状态的组合物和方法。可利用实施本发明获得的信号转导途径诸组分活化状态的信息进行癌症的诊断、预后和设计癌症治疗方法。

[0013] 本发明一方面提供选择治疗乳腺肿瘤合适抗癌药物的方法,所述方法包括:

[0014] (a) 给予抗癌药物后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药物一起培育;

[0015] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0016] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;和

[0017] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药物时所产生的参比活化状态,确定该抗癌药物是否适于治疗该乳腺肿瘤。

[0018] 在一个优选实施方式中,选择治疗乳腺肿瘤合适抗癌药物的方法包括:

[0019] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药物一起培育;

[0020] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0021] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;

[0022] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药物时所产生的参比活化状态;和

[0023] (e) 当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态实质性降低时,表明该抗癌药适合治疗乳腺肿瘤。

[0024] 在一些实施方式中,本发明的方法可用于帮助或辅助筛选治疗乳腺肿瘤的合适抗癌药。在其他实施方式中,本发明的方法可用于促进对治疗乳腺肿瘤合适抗癌药的筛选。

[0025] 在另一方面,本发明提供鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗反应的方法,所述方法包括:

[0026] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0027] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0028] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;和

[0029] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态,鉴定该乳腺肿瘤是否对该抗癌药有反应或无反应。

[0030] 在一优选实施方式中,鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗反应的方法包括:

[0031] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0032] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0033] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;

[0034] (d) 比较一种或多种分析物的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态;和

[0035] (e) 当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态实质性降低时,表明该乳腺肿瘤对于用该抗癌药治疗有反应。

[0036] 在一些实施方式中,本发明的方法可用于帮助或辅助鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗的反应。在其他实施方式中,本发明的方法可用于促进对某抗癌药治疗有反应的乳腺肿瘤的鉴定。

[0037] 在还有另一方面,本发明提供预测患乳腺肿瘤对象对抗癌药治疗有无反应的方法,所述方法包括:

[0038] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0039] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0040] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;和

[0041] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态,预测该对象对该抗癌药治疗有反应的可能性。

[0042] 在一优选实施方式中,预测患乳腺肿瘤对象对抗癌药治疗有无反应的方法包括:

[0043] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0044] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0045] (c) 用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚在固体支持物上;

[0046] (d) 比较一种或多种分析物的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态;和

[0047] (e) 当一种或多种分析物的活化状态比参比活化状态实质性降低时,表明该对象对该抗癌药治疗可能有反应。

[0048] 在一些实施方式中,本发明的方法可用于帮助或辅助预测对象对抗癌药治疗有反应的可能性。在其他实施方式中,本发明的方法可用于促进对象可能对抗癌药治疗有反应

的预测。

[0049] 在还有一方面,本发明提供具有优秀动态范围的阵列,其包含多个束缚于固体支持物上的系列稀释捕捉抗体,各系列稀释捕捉抗体是对应于细胞提取物中信号转导途径组分的一种或多种分析物或其他蛋白质(如细胞核激素受体)的特异性抗体。本文所述的可寻址阵列尤其可用于测定涉及乳腺癌信号转导分子和其他蛋白质的表达和/或活化状态。

[0050] 在另一方面,本发明提供了一种检测截短受体存在(或不存在)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0051] (a) 将细胞提取物与多个全长受体胞外域(ECD)结合区的特异珠一起培育;

[0052] (b) 从细胞提取物中除去多个珠,从而除去全长受体形成缺乏全长受体的细胞提取物;

[0053] (c) 将不含全长受体的细胞提取物与多个捕捉抗体一起培育,其中所述多个捕捉抗体是截短受体胞内域(ICD)结合区的特异性抗体,该多个捕捉抗体被束缚在固体支持物上,从而形成多个被捕获的截短受体;

[0054] (d) 将该多个被捕获截短受体与相应截短受体的特异性检测抗体一起培育,形成多个可检测的被捕获截短受体;

[0055] (e) 将多个可检测的被捕获截短受体与信号放大对第一和第二成员一起培育,产生放大的信号;和

[0056] (f) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0057] 在一相关方面,本发明提供了一种检测截短受体存在(或不存在)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0058] (a) 将细胞提取物与多个全长受体胞外域(ECD)结合区特异珠一起培育;

[0059] (b) 从所述细胞提取物中除去多个珠,从而除去全长受体形成缺乏全长受体的细胞提取物;

[0060] (c) 将不含全长受体的细胞提取物与多个捕捉抗体一起培育,其中所述多个捕捉抗体是截短受体胞内域(ICD)结合区的特异性抗体,该多个捕捉抗体被束缚在固体支持物上,从而形成多个被捕获的截短受体;

[0061] (d) 将该多个被捕获截短受体与检测抗体一起培育形成多个可检测的被捕获的截短受体,所述检测抗体包含相应被截短受体的特异性多个活化状态非依赖性抗体和多个活化状态依赖性抗体,

[0062] 其中所述活化状态非依赖性抗体用辅助分子标记,活化状态依赖性抗体用信号放大对的第一成员标记,所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂;

[0063] (e) 将多个可检测的被捕获的截短受体与信号放大对第二成员一起培育,产生放大的信号;和

[0064] (f) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0065] 本领域技术人员从以下详述和附图可以明白本发明的其它目的、特征和优点。

[0066] 附图简要说明

[0067] 图1显示了可用于实施本发明的参与细胞增殖的信号转导途径的例子。描述了细胞用于将丝裂信号转变成细胞增殖的EGFR/MAPK/ERK途径的诸组分。

[0068] 图 2 显示了本发明的一个实施方式,其中,本文所述的邻近试验可检测磷酸化 EGFR(pEGFR) 和磷酸化 HER-2(pHER-2),其灵敏度为一个细胞。

[0069] 图 3 显示了本文所述的邻近试验检测 HER-2 为高特异性试验,可检测一个细胞水平细胞表达的 HER-2。

[0070] 图 4 是用本发明可寻址阵列选择癌症治疗期间药物的示意图。

[0071] 图 5 显示了包含受体酪氨酸激酶途径诸组分,例如 EGFR/MAPK/ERK 途径诸组分稀释抗体的可寻址阵列的示意性例子。四种不同稀释度的抗体一式 3 份被固定在可寻址阵列上。

[0072] 图 6 显示了包含肿瘤血管生成中被活化的信号转导途径诸组分的稀释抗体的可寻址阵列的示意性例子。以四种不同稀释度的抗体一式 3 份被固定在可寻址阵列上。

[0073] 图 7 显示了包含肿瘤血管生成中被活化的信号转导途径诸组分的稀释抗体的另一种可寻址阵列的示意性例子。四种不同稀释度的抗体一式 3 份被固定在可寻址阵列上。

[0074] 图 8 显示了包含肿瘤血管生成中被活化的受体酪氨酸激酶途径和信号转导途径诸组分的稀释抗体的可寻址阵列的示意性例子。四种不同稀释度的抗体以一式 3 份被固定在可寻址阵列上。

[0075] 图 9 显示了包含肿瘤血管生成中被活化的受体酪氨酸激酶途径和信号转导途径诸组分的稀释抗体的另一种可寻址阵列的示意性例子。系列稀释的抗体一式 3 份被固定在可寻址阵列上。

[0076] 图 10 显示了 5 份乳腺癌样品和 6 份正常样品 EGFR 磷酸化的相对水平。数据也显示于表 40。

[0077] 图 11 显示了 5 份乳腺癌样品和 6 份正常样品 HER-2 磷酸化的相对水平。数据也显示于表 41。

[0078] 图 12 显示了 5 名乳腺癌患者的 Veridex CellSearch™ 系统的 CTC 染色图像。对照细胞系是 A431(EGFR 阳性)和 SKBr3(HER-2 阳性)。

[0079] 图 13 显示,可用能与附着于聚苯乙烯珠或多聚葡聚糖的 ErbB2 胞外域结合的抗体来除去患者样品中的全长 HER-2(ErbB2)。

[0080] 图 14 显示了本发明检测截短受体如 p95ErbB2 的一个实施方式。SA = 链霉亲和素;HRP = 辣根过氧化物酶;TSA = 酪氨酸信号扩增。

[0081] 图 15 显示,用抗 ErbB2(HER-2)胞外域(ECD)的抗体包被预处理珠,几乎完全除去了全长 ErbB2 信号而不影响 ErbB2 胞内域(ICD)信号。

[0082] 图 16 显示,APMA((4-氨基苯基)醋酸汞)处理提高了 BT-474 细胞的 p95ErbB2 磷酸化。

[0083] 图 17 显示,异调蛋白(heregulin)提高了 T47D 细胞的 p95ErbB2 磷酸化。

[0084] 图 18 显示了对于选择适合特定患者乳腺癌的治疗方法,可用本发明方法影响临床实践的几个(干预)点。

[0085] 图 19 显示了本发明试验模式的一个实施方式,该试验依赖于连有酶的两种额外检测抗体的共同定位,以随后引导各靶蛋白的结合。

[0086] 图 20 显示了 pHER-1 和 pHER-2 试验的灵敏度为单个细胞。

[0087] 图 21 显示了用 EGF 或 HRG B 处理后各细胞系的 ErbB 表达/活化。

[0088] 图 22 显示了用 EGF 或 HRG β 刺激得到的 T47D ErbB RTK 状态。

[0089] 图 23 显示了 ErbB 途径阵列的一个示范性实施方式。

[0090] 发明详述

[0091] I. 引言

[0092] 如上所述,参与细胞增殖信号转导途径的活化和参与细胞死亡途径的灭活是许多不同类型癌症分子特征的非限制性例子。在许多情况中,特定信号转导途径及其诸组分的活化可作为某给定类型癌症的分子特征。这些活化的组分还可为治疗干预提供有用的靶点。因此,了解治疗之前、期间和之后癌细胞内特定信号转导系统的活化水平可为医师提供用于选择合适治疗进程的高度相关信息。此外,随治疗进展持续监测癌细胞中的信号转导途径活化状态可为医师提供治疗效果的额外信息,例如,当癌细胞通过进一步变异导致同一或另一信号转导途径活化因而对治疗耐受时,可提醒医师是否继续特定治疗或改用另一治疗方法,。

[0093] 因此,本发明提供用特异性的多重高通量试验,检测肿瘤组织或肿瘤外细胞,例如实体瘤的稀少循环细胞中多种失调信号转导分子的表达和活化状态的方法和组合物。本发明还提供选择合适的治疗药物(单一药物或药物组合)以下调或关闭失调信号转导途径的方法和组合物。因此,利用本发明将有利于为癌症患者设计个性化的治疗。

[0094] 通过测定单个细胞水平的信号转导途径是否活化而能检测和鉴定循环肿瘤细胞是本发明的重要优点。“微小转移”的肿瘤细胞(播散的肿瘤细胞)常见于各种癌症早期阶段的患者血液中,也见于转移癌。血液中肿瘤细胞的数量取决于肿瘤的阶段和类型。虽然通常可获得原发性肿瘤的活检样品,但大多数转移瘤无法活检,使得极难对这种肿瘤样品进行分子分析。在肿瘤转移期间,大多数侵袭性肿瘤细胞离开原发性肿瘤,通过血液和淋巴系统转移到达远端部位。因此,血液中的循环肿瘤细胞代表了肿瘤细胞中最具侵袭性的均质细胞群。然而,血液中转移性肿瘤细胞的数量常常极低,从每毫升血液含 1 个到数千个细胞不等。能够分离这种稀少细胞和检验其信号转导途径及利用该信息更有效地治疗癌症是本发明的目的之一。

[0095] 在一些实施方式中,本发明的多重高通量免疫试验能以单个细胞水平检测实体瘤循环细胞中一种或多种信号转导分子的活化状态。事实上,对信号转导分子,如 EGFR 的检测灵敏度可达到约 100 个 10^{-21} 摩尔 (zeptomole),线性动态范围约为 100 个 10^{-21} 摩尔到约 100 毫微微摩尔 (femtomole)。因此,稀少循环细胞中多种信号转导分子活化状态的单细胞检测有助于癌症预后和诊断以及设计个性化的靶向治疗。

[0096] 稀少循环细胞包括实体瘤转移或微小转移的实体瘤循环细胞。循环肿瘤细胞、癌症干细胞和迁移至肿瘤(因趋化作用)的细胞,例如循环内皮祖细胞、循环内皮细胞、循环前血管原髓样细胞和循环树突细胞是与实体瘤相关的循环细胞的一些例子。

[0097] 通常在分离这种循环细胞后不久,优选在约 24、6 或 1 小时内,更优选在约 30、15 或 5 分钟内提取感兴趣的信号转导分子以保留它们的原位活化状态。也可将分离的细胞与通常为纳摩尔到微摩尔浓度的一种或多种生长因子一起培育约 1-30 分钟,以恢复或刺激信号转导分子活化(参见,例如 Irish 等,Cell,118:217-228(2004))。

[0098] 如本文更详细解释的那样,为评估用于某患者个体的可能抗癌治疗,可将其分离的细胞与不同剂量的一种或多种抗癌药一起培育。然后用生长因子刺激数分钟(例如,约

1-5 分钟)或数小时(例如,约 1-6 小时)。用和不用抗癌药来差异激活信号转导途径有助于为各患者个体选择合适剂量的合适癌症治疗方法。也可分离抗癌药治疗期间患者样品的循环细胞用一种或多种生长因子刺激以确定是否应改变治疗。因此,本发明方法有利于帮助临床医生为每位患者提供剂量正确时间正确的正确抗癌药。

[0099] 就乳腺癌而言,目前的检测选项并不令人满意,因为对乳腺癌患者原发和转移性肿瘤的治疗都是根据获自疾病早期活检样品时的诊断。具体说,由于实际上不能获得转移癌患者的活检样品,对乳腺癌早期和转移阶段的治疗性干预都仅仅根据对取自疾病早期活检样品的初步诊断。然而,乳腺肿瘤会随时间和治疗而演变,因此对乳腺肿瘤的时序监测是优化乳腺癌患者治疗方法的关键。例如,受体酪氨酸激酶 ErbB (HER) 家族一个或多个成员活化状态的改变可能会影响对复发的治疗选择。实际上,常见原发与转移癌症之间的 HER-2 状态不一致,因为高达 37% 的乳腺癌患者从 HER-2- 阴性原发性肿瘤转变为 HER-2- 阳性转移癌。此外,由于 HER-1/2 活化,患者可能会重新耐受激素治疗或对激素治疗产生获得性耐受。在一些情况下,由于存在表达 p95HER-2 的肿瘤细胞,患者可能会重新耐受 ErbB- 靶向治疗或对 ErbB- 靶向治疗产生获得性耐受。结果,由于目前的技术缺乏灵敏度和特异性,不能用于监测患者的治疗,不能利用信号转导途径模式来指导对个体治疗的决策,因此临床上迫切需要能帮助医师在适当时间处方给予合适的癌症治疗药物的试验。

[0100] 与目前使用的乳腺癌检测选项相反,本发明方法通过采用例如血液循环肿瘤细胞 (CTC) 和 / 或细针抽吸物 (RNA) 等样品,对实体乳腺肿瘤作“实时活检”而能够监测乳腺癌患者疾病的所有阶段。一个非限制性例子是,本文所述的乳腺癌试验可用于疾病早期患者的乳腺癌初步诊断。采用本文所述的单一检测或邻近 () 双重检测试验,通过对有和没有抗癌药时特定信号传导途径活化状态模式的分析,可以指导选择合适的癌症治疗。由于治疗性干预可根据疾病任何阶段获得的样品用本文所述的单一检测或邻近双重检测试验分析,因此本发明方法也可有利地用于监测疾病的发展或消退。因此,通过实时诊断和对特定信号传导途径分子活化状态的分子分析,可指导对乳腺癌早期或转移阶段合适的癌症治疗药物的选择。

[0101] 本发明的方法可有利地解决癌症治疗中的关键问题并为乳腺癌患者提供更高的护理标准,因为它 : (1) 灵敏度高 (例如,检测所有的和磷酸化的信号转导分子如 EGFR 和 HER-2 时可实现单个细胞检测), (2) 特异性高 (例如,三抗体邻近试验检测磷酸化信号转导分子的特异性高), (3) 可对转导途径的概况进行分析 (例如,可检测患者的 CTC 或 FNA 中特定信号转导分子的活化状态), 和 (4) 减轻了获得患者样品带来的问题 (例如,很少的肿瘤细胞就可试验检测)。尽管任何样品都可用于本文所述的新试验,但 CTC 特别有效,因为它们代表了最具侵袭性的肿瘤细胞,已知每种肿瘤都会排出 CTC,它们可能是残余肿瘤或难以触及转移肿瘤的唯一来源,并且可出现在血液中。因此,本发明的方法能够连续采集乳腺肿瘤组织的样品,得到肿瘤细胞随时间和治疗方法而变的有价值信息,为医师提供快速监测变化的癌症途径特征的方法。

[0102] 总之,本发明方法有利地提供了对癌症患者 (如乳腺癌患者) 的精确选择和监测,采用基于多种抗体的单一检测或邻近试验对容易获得的肿瘤细胞进行转导途径概况的分析,而最可能有益于靶向治疗。

[0103] II. 定义

[0104] 除非另有规定,本文所用的以下术语具有归于它们的含义。

[0105] 术语“癌症”包括特征是异常细胞不受控制生长的疾病类型的任何成员。该术语包括所有已知的癌症和肿瘤病症,无论其特征是恶性、良性、软组织或是实体,以及所有阶段和等级的癌症,包括转移前和后癌症。不同类型癌症的例子包括但不限于:乳腺癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌);消化道和胃肠道癌,例如结肠直肠癌、胃肠道间质瘤、胃肠类癌肿瘤、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胆管癌、小肠癌和胃癌;食道癌;胆囊癌;肝癌;胰腺癌;阑尾癌(appendix cancer);乳腺癌;卵巢癌;肾癌(例如,肾细胞癌);中枢神经系统癌;皮肤癌;淋巴瘤;绒毛膜癌;头颈癌;骨肉瘤;和血癌。本文所用的“肿瘤”包括一种或多种癌细胞。在一个优选实施方式中,所述乳腺肿瘤为对象的侵袭形式或原位形式导管癌或小叶癌。在另一个优选实施方式中,所述乳腺肿瘤为对象的复发或转移乳腺癌。

[0106] 术语“分析物”包括测定其存在、含量和/或身份的任何感兴趣分子,通常是大分子,例如多肽。在某些例子中,分析物是实体瘤循环细胞的一种细胞组分,优选信号转导分子。

[0107] 本文所用的术语“系列稀释液”包括一系列浓度递降的特定样品(例如,细胞裂解液)或试剂(例如,抗体)。一般通过以下过程产生系列稀释液:混合测定量的起始浓度样品或试剂与稀释液(例如,稀释缓冲液)产生较低浓度的样品或试剂,重复该过程足够次数获得所需数量的系列稀释液。可将样品或试剂系列稀释至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、500、或1000-倍而产生包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、或50种浓度递降的样品或试剂的系列稀释液。例如,为制造包含起始浓度为1毫克/毫升的捕捉抗体试剂的2-倍系列稀释液,可将一定量起始浓度的捕捉抗体与等量稀释缓冲液混合,产生浓度为0.5毫克/毫升的捕捉抗体,重复该过程获得浓度为0.25毫克/毫升、0.125毫克/毫升、0.0625毫克/毫升、0.0325毫克/毫升等的捕捉抗体。

[0108] 术语“优秀的动态范围”在本文中指该试验能够检测少至1个细胞或多至数千细胞中的特异性分析物。例如,本文所述免疫试验能用捕捉抗体浓度的系列稀释液有效地检测约1-10,000个细胞(例如,约1、5、10、25、50、75、100、250、500、750、1000、2500、5000、7500或10,000个细胞)中感兴趣的特定信号转导分子,因此具有高的动态范围。

[0109] 术语“信号转导分子”或“信号转导物”包括细胞中胞外信号或刺激转变成反应过程的蛋白质和其它分子,转导过程通常涉及细胞内的生物化学反应有序序列。信号转导分子的例子包括但不限于:受体酪氨酸激酶,例如EGFR(例如,EGFR/HER-1/ErbB1、HER-2/Neu/ErbB2、HER-3/ErbB3、HER-4/ErbB4)、VEGFR-1/FLT-1、VEGFR-2/FLK-1/KDR、VEGFR-3/FLT-4、FLT-3/FLK-2、PDGFR(例如,PDGFRA、PDGFRB)、c-KIT/SCFR、INSR(胰岛素受体)、IGF-IR、IGF-IIR、IRR(胰岛素受体-相关受体)、CSF-1R、FGFR 1-4、HGFR 1-2、CCK4、TRKA-C、MET、RON、EPHA 1-8、EPHB 1-6、AXL、MER、TYRO3、TIE 1-2、TEK、RYK、DDR 1-2、RET、c-ROS、V-钙粘蛋白、LTK(白细胞酪氨酸激酶)、ALK(退行发育性淋巴瘤激酶)、ROR 1-2、MUSK、AATYK 1-3、RTK 106以及受体酪氨酸激酶的截短形式如p95ErbB2;非受体酪氨酸激酶,例如BCR-ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、Zap70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack和LIMK;酪氨酸激酶信号转导级联组分,例如Akt、MAPK/ERK、MEK、RAF、PLA2、MEKK、JNKK、JNK、p38、Shc(p66)、PI3K、Ras(例如,K-Ras、N-Ras、H-Ras)、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p70S6激酶、p53、细胞

周期蛋白 D1、STAT1、STAT3、PIP2、PIP3、PDK、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、PTEN、RSK 1-3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67 和桩蛋白；核激素受体如雌激素受体 (CR)、孕酮受体 (PR)、雄激素受体、糖皮质激素受体、盐皮质激素受体、维生素 A 受体、维生素 D 受体、类视色素受体、甲状腺激素受体和孤儿受体；核受体辅激活物和抑制物，分别例如 AIB1 (在乳腺癌 -1 中扩增) 和核受体辅阻遏物 1 (NCOR)；以及它们的组合。

[0110] 本文所用的术语“循环细胞”包括实体瘤转移或微小转移的肿瘤外细胞 (extratumoral cell)。循环细胞的例子包括但不限于：循环肿瘤细胞、癌症干细胞和 / 或迁移至肿瘤细胞 (例如，循环内皮祖细胞、循环内皮细胞、循环前血管骨髓样细胞、循环树突细胞等)。

[0111] 本文所用的术语“样品”包括获自患者的任何生物学样本。样品包括但不限于：全血、血浆、血清、红细胞、白细胞 (例如，外周血单个核细胞)、导管洗出液、乳头抽吸物、淋巴 (例如淋巴结的弥散性肿瘤细胞)、骨髓抽吸物、唾液、尿液、粪便 (即，排泄物)、痰、支气管灌洗液、眼泪、细针抽吸物 (例如通过随机乳晕缘细针抽吸获得)、任何其它体液、组织样品 (例如，肿瘤组织)，如肿瘤活检 (例如，针吸活检) 或淋巴结活检 (例如前哨淋巴结活检) 样品和它们的细胞提取物。在一些实施方式中，样品是全血或其组分，例如血浆、血清或细胞沉淀。在优选的实施方式中，采用本领域已知的技术分离全血中的实体瘤循环细胞或其细胞组分而获得样品。在其它实施方式中，样品是福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤组织样品，例如获自乳腺的实体瘤。“活检”指取出组织样品以供诊断或预后评估的过程，也指组织样品本身。可将本领域已知的任何活检技术应用于本发明的方法和组合物。所用的活检技术通常取决于待评估的组织类型和肿瘤大小及类型 (即，实体瘤或悬浮细胞 (即，血液或腹水)) 等因素。代表性活检技术包括切除活检、切开式活检、针吸活检 (例如，芯针活检、细针抽吸活检等)、手术活检和骨髓活检。活检技术的描述可参见，例如 Harrison's Principles of Internal Medicine (内科学哈里森原理)，Kasper 等编，第 16 版，2005，第 70 章，以及整个第 V 部分。本领域技术人员将明白，可通过活检技术来鉴定给定组织样品中的癌细胞和 / 或前癌细胞。

[0112] 术语“对象”或“患者”或“个体”通常包括人，但也可包括其它动物，例如其它灵长类、啮齿类、犬、猫、马、绵羊、猪等。

[0113] “阵列”或“微阵列”包括固定或束缚于固相支持物上的分散和 / 或系列稀释捕捉抗体，所述固相支持物例如有玻璃 (例如，玻璃载玻片)、塑料、芯片、针、滤膜、珠 (例如，磁珠，聚苯乙烯珠，等等)、纸、膜 (例如，尼龙、硝酸纤维素，聚偏二氟乙烯 (PVDF) 等膜)、纤维束或任何其他合适的基材。捕捉抗体一般通过共价或非共价相互作用 (例如，离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极 - 偶极键) 而固定或束缚于固体支持物上。某些情况下，捕捉抗体包含能与结合于固相支持物的捕获剂相互作用的捕获尾。本发明试验所用的阵列通常包含偶联于固体支持物表面的不同已知 / 可寻址位置的多个不同捕捉抗体和 / 或不同浓度的捕捉抗体。

[0114] 术语“捕捉抗体”意指包括对样品中一种或多种感兴趣分析物如实体瘤循环细胞的细胞提取物具有特异性 (即，结合、被结合或形成复合体) 的固定抗体。在优选的实施方式中，捕捉抗体束缚于阵列中的固体支持物上。用于将各种信号转导分子固定在固体支持物上的合适捕捉抗体可购自加利福尼亚州泰姆库拉市奥普斯特公司 (Upstate,

Temecula, CA)、加利福尼亚州卡马里奥市生物资源公司 (Biosource, Camarillo, CA)、马萨诸塞州丹弗斯市细胞信号转导技术公司 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA)、明尼苏达州明尼阿波利斯研发系统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、加利福尼亚州弗里蒙特市 LV 公司 (Lab Vision, Fremont, CA)、加利福尼亚州圣克鲁斯市圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、密苏里州圣路易斯市西格玛公司 (Sigma, St. Louis, MO) 和加利福尼亚州圣何塞市 BD 生物科学公司 (BD Biosciences, San Jose, CA)。

[0115] 本文所用的术语“检测抗体”包括含有可检测标记的对样品中感兴趣的一种或多种分析物具有特异性(即,结合、被结合或与之形成复合物)的抗体。该术语还包括对于感兴趣的一种或多种分析物具有特异性的抗体,该抗体可被包含可检测标记的另一种抗体结合。可检测标记的例子包括但不限于:生物素/链霉亲和素标记、核酸(例如,寡核苷酸)标记、化学反应活性标记、荧光标记、酶标记、放射性标记和它们的组合。用于检测各种信号转导分子中任何一种活化状态和/或总量的合适的检测抗体可购自加州特默库拉奥普斯特公司 (Upstate, Temecula, CA)、加州卡玛利奥的生物源公司 (Biosource, Camarillo, CA)、马萨诸塞州丹弗斯的细胞信号传导技术公司 (Cell Signaling Technologies (Danvers, MA)、明尼苏达州明尼阿波利斯的 R&D 系统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、加州弗里蒙特的实验室视觉公司 (Lab Vision, Fremont, CA)、加州桑塔库兹的桑塔库兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、密苏里州圣路易斯的西格玛公司 (Sigma, St. Louis, MO)、以及加州圣何塞的 BD 生物科技公司 (BD Biosciences, San Jose, CA)。一个非限制性的例子是,抗 EGFR、c-KIT、c-Src、FLK-1、PDGFRA、PDGFRB、Akt、MAPK、PTEN、Raf 和 MEK 等信号转导分子各种磷酸化形式的磷酸化特异性抗体可购自桑塔库兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology)。

[0116] 术语“活化状态依赖性抗体”包括对样品中感兴趣的一种或多种分析物的特定活化状态具有特异性(即,结合、被结合或与之形成复合物)的检测抗体。在优选的实施方式中,所述活化状态-依赖性抗体能检测一种或多种分析物,例如一种或多种信号转导分子的磷酸化、遍在蛋白化和/或复合状态。在一些实施方式中,利用活化状态依赖性抗体检测受体酪氨酸激酶 EGFR 家族诸成员的磷酸化和/或 EGFR 家族成员之间形成的异质二聚体复合物。适合用活化状态依赖性抗体检测的活化状态(括号中所列)的非限制性例子包括:EGFR(EGFRvIII、磷酸化(p)-EGFR、EGFR:Shc、遍在蛋白化(u)-EGFR、p-EGFRvIII);ErbB2(p95:截短的(Tr)-ErbB2、p-ErbB2、p95:Tr-p-ErbB2、Her-2:Shc、ErbB2:PI3K、ErbB2:EGFR、ErbB2:ErbB3、ErbB2:ErbB4);ErbB3(p-ErbB3、ErbB3:PI3K、p-ErbB3:PI3K、ErbB3:Shc);ErbB4(p-ErbB4、ErbB4:Shc);ER(p-ER(S118, S167));IGF-1R(p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K);INSR(p-INSR);KIT(p-KIT);FLT3(p-FLT3);HGFRI(p-HGFRI);HGFRI2(p-HGFRI2);RET(p-RET);PDGFRA(p-PDGFRA);PDGFRP(p-PDGFRP);VEGFRI(p-VEGFRI, VEGFRI:PLCg, VEGFRI:Src);VEGFR2(p-VEGFR2, VEGFR2:PLCg, VEGFR2:Src, VEGFR2:硫酸肝素, VEGFR2:VE-钙粘蛋白);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);NFKB和/或IKB(p-IK(S32), p-NFKB(S536), p-P65:IKBa);Akt(p-Akt(T308, S473));PTEN(p-PTEN);

Bad(p-Bad(S112, S136), Bad :14-3-3) ;mTor(p-mTor(S2448)) ;p70S6K(p-p70S6K(T229, T389)) ;Mek(p-Mek(S217, S221)) ;Erk(p-Erk(T202, Y204)) ;Rsk-1(p-Rsk-1(T357, S363)) ;Jnk(p-Jnk(T183, Y185)) ;P38(p-P38(T180, Y182)) ;Stat3(p-Stat-3(Y705, S727)) ;Fak(p-Fak(Y576)) ;Rb(p-Rb(S249, T252, S780)) ;Ki67 ;p53(p-p53(S392, S20)) ;CREB(p-CREB(S133)) ;c-Jun(p-c-Jun(S63)) ;cSrc(p-cSrc(Y416)) ;和桩蛋白(p- 桩蛋白(Y118))。

[0117] 术语“活化状态非依赖性抗体”包括对样品中感兴趣的一种或多种分析物具有特异性(即,结合、被结合或与之形成复合物)而无论它们的活化状态的检测抗体。例如,活化状态非依赖性抗体可检测一种或多种分析物,例如一种或多种信号转导分子的磷酸化和非磷酸化形式。

[0118] 术语“核酸”或“多核苷酸”包括单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物,例如 DNA 和 RNA。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或连接键的核酸,可以是合成的、天然产生的和非天然产生的,具有与参比核酸相似的结合特性。这种类似物的例子包括但不限于:硫代磷酸酯、胺基磷酸酯(phosphoramidate)、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非另有限定,该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,具有与参比核酸相似的结合特性。除非另有表述,特定核酸序列还暗示包括其保守性修饰的变体和互补序列以及明确示出的序列。

[0119] 术语“寡核苷酸”指 RNA、DNA、RNA/DNA 杂交的单链寡聚物或聚合物和/或其模拟物。在某些情况中,寡核苷酸由天然产生(即,未修饰)的核碱基、糖和核苷间(主链)连接键构成。在某些其它例子中,寡核苷酸包含修饰的核碱基、糖和/或核苷间连接键。

[0120] 本文所用的术语“错配基序”或“错配区”指寡核苷酸中与其互补序列不 100% 互补的部分。寡核苷酸可含有至少 1、2、3、4、5、6 个或更多个错配区。错配区可以是连续的,或可被 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多个核苷酸隔开。错配基序或区域可包含一个核苷酸或可包含 2、3、4、5 或更多个核苷酸。

[0121] 短语“严格杂交条件”指寡核苷酸与其互补序列杂交,但不与其它序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,在不同环境中会有差异。较长的序列在较高温度下特异性杂交。有关核酸杂交的广泛指南可参见 Tijssen,《生物化学和分子生物学技术-与核酸探针杂交》(Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes) 中的“杂交原理和核酸试验策略综述”Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays(1993)。选择的严格条件通常比具体序列在规定的离子强度和 pH 时的热解链温度(T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是在规定的离子强度、pH 和核酸浓度下,与靶序列互补的 50% 探针与靶序列杂交达到平衡时的温度(由于存在过量的靶序列, T_m 时,平衡时有 50% 的探针被占据)。还可加入去稳定剂例如甲酰胺来获得严格条件。对于选择性或特异性杂交,阳性信号是背景的至少两倍,优选是背景杂交的 10 倍。

[0122] 术语“实质上相同”或“实质性相同”的两条或多条核酸,指例如采用序列比较算法或通过手工比对和目测观察进行比较和比对时,在比较窗口或指定区域具有的最大对应性,含有相同或相同特定百分比的核苷酸(即,在特定区有至少约 60%,优选至少约 65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 相同性)的两条或多条序列或子序列。当文中示出该定

义时,还类似地指某序列的互补序列。优选在至少长约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、或 100 个核苷酸的区域具有实质相同性。

[0123] 所用术语“培育”与“接触”和“暴露”含义相同,不暗指任何具体的时间或温度要求,除非另有说明。

[0124] III. 实施方式描述

[0125] 在一个实施方式中,本发明提供采用特异性的多重高通量试验,检测衍生自肿瘤组织的肿瘤细胞或实体瘤循环细胞中的多种失调信号转导分子表达和活化状态的方法。本发明还提供选择合适治疗药物的方法和组合物,以下调或关闭一种或多种失调的信号转导途径。因此,可根据收集到的某给定患者肿瘤中活化的信号转导蛋白所提供的特定分子特征,采用本发明实施方式来帮助设计个性化治疗。

[0126] 实体瘤循环细胞包括实体瘤转移或微小转移的细胞,包括癌症干细胞或迁移至肿瘤的细胞(例如,因趋化作用),例如内皮祖细胞、循环内皮细胞、周质细胞、循环前血管原髓样细胞、树突细胞等等。含有循环细胞的患者样品可获自任何可得的生物学液体(例如,全血、血清、血浆、痰、支气管灌洗液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、唾液、细针抽吸物等)。在某些情况中,将全血样品分成血浆或血清组分和细胞组分(即,细胞沉淀)。细胞组分通常含有红细胞、白细胞和/或实体瘤循环细胞,例如循环肿瘤细胞(CTC)、循环内皮细胞(CEC)、循环内皮祖细胞(CEPC)、癌症干细胞(CSC)、淋巴结的弥散性肿瘤细胞和它们的组合。血浆或血清组分通常含有实体瘤的循环细胞所释放的核酸(例如,DNA、RNA)和蛋白质。

[0127] 通常采用一种或多种分离方法分离患者样品中的循环细胞,所述方法包括,例如免疫磁性分离(参见,例如 Racila 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4589-4594(1998); Bilkenroth 等, *Int. J. Cancer*, 92:577-582(2001))、宾夕法尼亚州亨廷顿谷的伊缪尼康公司(Immicon, Huntingdon Valley, PA)的 CellTrack™ 系统、微流体分离(参见,例如 Mohamed 等, *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 3:251-256(2004); Lin 等,第 5147 号摘要,第 97 届 AACR 年会,华盛顿,哥伦比亚特区,(2006))、FACS(参见,例如 Mancuso 等, *Blood*, 97:3658-3661(2001))、密度梯度离心(参见,例如 Baker 等, *Clin. Cancer Res.*, 13:4865-4871(2003))和消除法(参见,例如 Meye 等, *Int. J. Oncol.*, 21:521-530(2002))。

[0128] 为保留原位活化状态,宜在分离细胞后不久,优选在 96、92、48、24、6 或 1 小时内,更优选在约 30、15 或 5 分钟内提取信号转导物。还优选将分离的细胞与通常纳摩尔到微摩尔浓度的生长因子一起培育约 1-30 分钟以恢复或刺激信号转导分子活化(参见,例如 Irish 等, *Cell*, 118:217-228(2004))。刺激性生长因子包括表皮生长因子(EGF)、异调蛋白(HRG)、TGF- α 、PIGF、血管生成素(Ang)、NRG1、PGF、TNF- α 、VEGF、PDGF、IGF、FGF、HGF、细胞因子等等。为评估用于患者个体的潜在抗癌治疗药物,将分离的细胞与各种剂量的一种或多种抗癌药一起培育然后用生长因子刺激。生长因子刺激可进行数分钟或数小时(例如,1-5 分钟或 1-6 小时)。用和不用抗癌药的信号转导途径活化差异有助于为各患者个体选择合适剂量的合适癌症治疗药物。在分离、抗癌药物处理和/或生长因子刺激后,可用本领域已知的技术裂解细胞提取信号转导分子。优选在生长因子刺激后约 1-360 分钟之间开始细胞裂解,更优选在两个不同时间间隔:(1) 在生长因子刺激后约 1-5 分钟;和(2) 在生长因子刺激后约 30-180 分钟之间开始细胞裂解。或者,可将裂解液保存于 -80℃ 待用。

[0129] 在一些实施方式中,抗癌药包括能干扰癌细胞中活化信号转导途径组分功能的药

物。这种药物的非限制性例子包括表 1 所列那些。

[0130] 表 1

[0131]

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	HER-4 (ErbB4) 靶标
西妥昔单抗 帕木单抗 马妥珠单抗 尼莫图珠单抗 (Nimotuzumab) ErbB1 疫苗	群司珠单抗 (贺赛汀®) 培妥珠单抗 (DNA) BMS-599626*	抗体 (U3)	
	*异二聚化 Her-1/2; 1 期		
EGFR (ErbB1) (B)	HER-2 (ErbB2) (D)	ErbB1/2 (F)	ErbB1/2/4 (G)
埃洛替尼 吉非替尼 EKB 569* CL-387-785**	CP-724714(辉瑞公司(Pfizer))	拉帕替尼(Tykerb®) HKI-272* HKI-357 (临床前) BIBW 2992**	卡纽替尼* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(惠氏(Wyeth), 不可逆, II CRC)**(惠氏, 不可逆, 临床前)		*惠氏, 不可逆, I/II NSCLC, 乳腺** 伯林格殷格瀚 (Boehringer Ingelheim)公司, 不可逆, I/II 前列腺, 卵巢, 乳腺	*辉瑞, 不可逆, II NSCLC, 乳腺
Raf (H)	SRC (H)	Mek: (I)	NFkB-IkB (I)

[0132]

索拉非尼 PLX4032(普 莱 新 康 (Plexxikon))	AZ	PD-325901 (II: NSCLC) AZD6244 – 阵列/Az XL518 埃 克 丽 西 丝 (Exelisis)/DNA	
mTor (J)	PI3K (J)	VEGFR2 和 VEGFR1 (K)	VEGFR1/2/3:
Rad 001 :依维莫司* Temsirolimus** AP-23573***	PX-866*	阿瓦斯丁(DNA) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171 (NSCLC, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)
* 依 维 莫 司 (诺 华 (Novartis), 与吉非替尼/ 埃洛替尼联用; I/II: NSCLC, 成胶质细胞瘤) ** 他 西 络 莫 司 (Temsirolimus) (惠氏, 与吉非替尼/埃洛替尼 联用; I/II: NSCLC, 成 胶质细胞瘤) ***AP-23573 (阿里亚 德(Ariad)公司, I/II: 子 宫内膜)	*P110 α 特异性抑制; ProIX 法玛公司(Pharma); 临床前 NSCLC	* (PDL) 抗-VEGF α ** 雷根仑(Regeneron)公 司/阿凡提丝(Aventis) 公司(受体模拟物) (2 期)	
VEGFR2 靶标 (L)			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** 完 全 人 源 化 的 IMC1121B CDP-791*** 帕 佐 帕 尼 (Pazopanib)****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 埃塞(Eisai) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, PDGFR)	Bay-579352 (+ PDGFR) ABT-869* BMS-540215 (+FGFR1) KRN-951 BBIW	
* 因 姆 克 隆 (Imclone) (2/3 期?) **嵌合型 IgG1, 针对 VEGFR2 *** 细胞技术公司 (Celltech), 针对 R2 的 PEG 化二-Fab 抗体 **** GSK, 多发性骨髓 瘤, 卵巢, RCC 3 期募 集完成, 肉瘤 II	*OSI, 辉瑞: (+ EGFR + PDGFR) (NSCLC, 卵巢 2 期) ** 辉 瑞 : VEGFR1,2 和 PDGFR β) (RCC II) *** (VEGFR1,2 FGFR3, PDGFR)	*(+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)	
VEGFR 2/ErbB1/2 (ErbB1)/cMet/FGFR	VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKi t/Flt-3 (N)	TIE 1/2	VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit

[0133]

(M)		(O)	
ZD6474* XL647** AEE 788***	索拉非尼*		PTK787 (非 cFMS, FLT-3) 舒尼替尼 XL-999 SU-6668(辉瑞公司 (Pfizer)) GSK AZ (AZD2171) BMS 诺华 (AEE-788) 安姆进(Amgen) 其他
*(凡德他尼) (III 期: 甲状腺, NSCLC) **(埃克丽西丝; 也称 EPHB2): (对埃洛替尼耐受的患者; 亚洲患者) (2 期) *** (诺华, 1/2 期)	*(RCC, HCC, NSCLC(III), 黑色素瘤(III))		
PDGFR 靶标 (P)	Abl 靶标: (Q)	FTL 3	RET
坦度替尼 尼洛替尼	伊马替尼 达萨替尼(Dasatinib) 尼洛替尼 AT-9283 AZD-0530 博苏替尼(Bosutinib)		
Kit 靶标 (R)	HGFR1/2	FGFR1-4	IGF-1R 靶标 (S)
AMG-706 XL-880 XL-999		希龙 (Chiron)	默克 (Merck) 辉瑞 诺华
HSP90 抑制剂:	抗-有丝分裂药物:	其它靶标:	
IPI-504* 17-AAG**	多西他赛* 紫杉醇** 长春碱, 长春新碱, 长春瑞滨***	HDAC 抑制剂 BCL2 化疗剂(分解) 蛋白体抑制剂	
*(无限药业 (Infinity Pharma), 突变型 EGFR, I/II 多发性骨髓瘤, GIST) **(考山(Kosan), I/II 实体瘤)	*(微管稳定剂; 辅助剂和晚期乳腺癌); NSCLC, 不依赖雄激素的前列腺癌) **(微管稳定剂; 辅助剂和晚期乳腺癌; NSCLC, 卵巢癌, AIDS 相关卡波西肉瘤) *** (微管去稳定剂)		

[0134] 在另一实施方式中, 本发明提供具有优秀动态范围的可寻址阵列, 其包含多个束缚于固体支持物上的系列稀释捕捉抗体, 其中各系列稀释捕捉抗体是与信号转导途径组分相应的一种或多种分析物或其他靶蛋白的特异性抗体。在各方面, 该实施方式包括含有特定肿瘤的特征性信号转导途径, 例如乳腺癌细胞中活化的信号转导途径诸组分的阵列。因此, 当用一块阵列或芯片代表的可能引起癌症的感兴趣的每个信号转导分子或其他蛋白的表达或活性缺陷时, 可有利地实施本发明。在各方面, 将特定肿瘤细胞中活化的某给定

信号转导途径诸组分组成线性序列的阵列,对应于通过细胞内信号转导途径传递信息的序列。这种阵列的例子见图 5-9。也可随机点印具体肿瘤细胞内活化的某给定信号转导途径的一个或多个组分的特异性捕捉抗体,尽可能使该制品相关的表面最小。

[0135] 可采用本发明方法查询的信号转导途径的非限制性例子包括表 2 所示那些。

[0136] 表 2

[0137]

途径 1	EGFR	EGFR 磷酸化	EGFR Shc	EGFR 泛素	EGFR-PI3K	PTEN		
途径 2	EGFR	EGFRVIII	EGFR 磷酸化	EGFR Shc	EGFR 泛素化	EGFRVIII 磷酸化	PTEN	
途径 3	ERBB2	ERBB2 磷酸化	Her 2 Shc	ERBB2:PI3K 复合物	ErbB2 泛素化	PTEN		
途径 4	ERBB2	P85 截短的 ERBB2	ERBB2 磷酸化	P85 截短的 ERBB2 磷酸化	Her 2 Shc	ERBB2:PI3K 复合物	ErbB2 泛素化	
途径 5	ERBB3	ERBB3 磷酸化	ERBB3:PI3K 复合物	ERBB3 PI3K 磷酸化	ERBB3:Shc			
途径 6	ERBB4	ERBB4 磷酸化	ERBB4:Shc					
途径 7	IGF-1R	IGF-1R 磷酸化	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	磷酸化 IRS	IGF-1R:PI3K		
途径 8	INSR	INSR 磷酸化						
途径 9	KIT	KIT 磷酸化						
途径 10	FLT3	FLT3 磷酸化						
途径 11	HGFR 1	HGFR 1 磷酸化						
途径 12	HGFR 2	HGFR 2 磷酸化						
途径 13	RET	RET 磷酸化						
途径 14	PDGFR α	PDGFR α 磷酸化						
途径 15	PDGFR β	PDGFR β 磷酸化						
途径 16	VEGFR 1	VEGFR 1 磷酸化	VEGFR 1:PLC γ 复合物	VEGFR 1:Src				

[0138]

途径 17	VEGFR 2	VEGFR 2 磷酸化	VEGFR 2: PLC γ 复合物	VEGFR 2: Src	VEGFR-2/ 硫酸肝素 复合物	VEGFR-2, VE-钙粘 蛋白复合 物		
途径 18	VEGFR 3	VEGFR 3 磷酸化						
途径 19	FGFR 1	FGFR 1 磷酸化						
途径 20	FGFR 2	FGFR 2 磷酸化						
途径 21	FGFR 3	FGFR 3 磷酸						
途径 22	FGFR 4	FGFR 4 磷酸化						
途径 23	TIE 1	TIE 1 磷酸 化						
途径 24	TIE 2	TIE 2 磷酸化						
途径 25	EPHA	EPHA 磷酸化						
途径 26	EPHB	EPHB 磷酸化						
途径 27	NF κ B-I κ B 复合物	磷酸化-I κ B (S32) 总 I κ B	总 NF κ B 磷酸化 NF κ B(S536)	总 P65 I κ Ba 磷酸化 P65 I κ Ba				
途径 28	ER	磷酸化 ER	ER-AIB1	其它 ER 复合 物				
途径 29	PR	磷酸化 Pr		PR 复合物				
途径 30	Hedgehog 途径							
途径 31	Wnt 途径							
途径 32	Notch 途径							
途径 33	总 Mek 磷酸化 Mek (S217/S221)	总 Erk 磷酸化 Erk (T202/Y204)	总 Rsk-1 磷酸化 Rsk-1 (T357/S363)	总 Stat3 磷酸化 tat-3 (Y705) (S727) 总 Stat1 磷酸化 Stat1 (Y701)	磷酸化 Bad (S112) Bad (总)	总 Fak 磷酸化 Fak (Y576)	总 cSrc 磷酸化 cSrc (Y416)	总 Ras 磷酸化 Ras
途径 34	Akt (总) 磷酸化 Akt (T473)	磷酸化 Akt (T308)	磷酸化 Bad (S112) Bad (总)	磷酸化 Bad (S136)	Bad:14-3-3 复合物	总 mTor 磷酸化 mTor (S2448)	总 p70S6K 磷酸化 p70S6K (T229) (T389)	总 GSK3 β (磷酸化 Ser9)
途径 35	总 Jnk 磷酸化 Jnk (T183/Y18 5)	总 P38 磷酸化 P38 (T180/Y182)	总 Rb 磷酸化 Rb (S249/T252) 磷酸化 Rb (S780)	总 p53 磷酸化 p53 (S392) 磷酸化 p53 (S20)	磷酸化 -CREB(S1 33) 总 CREB	总 c-Jun 磷酸化 -c-Jun; (S63)	总 桩蛋白 磷酸化 桩蛋白 (Y118)	
途径 36	Ki67	切割的 胱冬酶 3,8,9 其它						
途径 37	TGF β							

[0139] 在某些实施方式中,所述抗癌药包括抗信号转导剂(即,细胞稳定药物),例如单克隆抗体或酪氨酸激酶抑制剂;抗-增殖剂;化疗剂(即,细胞毒性药物);激素治疗剂;放疗剂;疫苗;和/或能减少或消除异常细胞,例如癌细胞不受控制生长的任何其它化合物。在一些实施方式中,联用抗-信号转导剂、抗增殖剂和/或激素治疗剂中的一种或多种与至

少一种化疗剂处理分离的循环细胞。

[0140] 适用于本发明的抗-信号转导剂的例子包括但不限于:单克隆抗体,例如群司珠单抗(赫赛汀®)、阿仑单抗(Campath®)、贝伐单抗(Avastin®)、西妥昔单抗(Erbix®)、吉姆单抗(Mylotarg®)、帕尼妥莫单抗(Vectibix™)、利妥昔单抗(Rituxan®)、和托西莫单抗(BEXXAR®);酪氨酸激酶抑制剂,例如吉非替尼(Iressa®)、苏尼替尼(Sutent®)、埃洛替尼(Tarceva®)、拉帕替尼(GW-572016)、卡那替尼(CI 1033)、塞玛昔尼(semaxinib)(SU5416)、瓦塔拉尼(vatalanib)(PTK787/ZK222584)、索拉芬尼(BAY 43-9006;Nexavar®)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec®)、来氟米特(SU101)、和凡达它尼(ZACTIMA™;ZD6474);和它们的组合。

[0141] 示范性抗-增殖剂包括mTOR抑制剂,例如西罗莫司(雷帕霉素)、他西络莫司(CCI-779)、和依维莫司(RAD001);Akt抑制剂,例如1L6-羟甲基-手性-肌醇-2-(R)-2-O-甲基-3-O-十八烷基-sn-甘油碳酸酯、9-甲氧基-2-甲基依利醋铵(ellipticinum acetate)、1,3-二氢-1-(1-((4-(6-苯基-1H-咪唑并[4,5-g]喹恶啉,1,4-二氮萘-7-基)苯基)甲基)-4-哌啶基)-2H-苯并咪唑-2-酮、10-(4'-(N-二乙基氨基)丁基)-2-氯吩嗪、3-甲酰基色酮缩氨基硫脲(Cu(II)Cl₂复合物)、衍生自原癌基因TCL1的氨基酸10-24的15-聚肽API-2(Hiromura等, J. Biol. Chem., 279:53407-53418(2004))、KP372-1和Kozikowski等, J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145(2003)及Kau等, Cancer Cell, 4:463-476(2003)所述的化合物;及它们的组合。

[0142] 化疗剂的非限制性例子包括基于铂的药物(例如,奥沙利铂、顺铂、碳铂、顺螺铂、异丙铂、沙铂等);烷化剂(例如,环酞酰胺、异酞酰胺、瘤可宁、白消安、美法仑、氮芥、乌拉莫司汀、塞替派、亚硝(基)脲等);抗代谢药物(例如,5-氟尿嘧啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨嘌呤、亚叶酸、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨(Gemzar®)、培美曲塞(ALIMTA®)、雷替曲塞等);植物生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇(紫杉醇®)、多西他赛(Taxotere®)等);拓扑异构酶抑制剂(例如,依立替康、托泊替康、安吡啶、依托泊苷(VP16)、磷酸依托泊苷、替尼泊苷等);抗肿瘤抗生素(例如,阿霉素、亚德里亚霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博莱霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等);它们的药学上可接受盐;它们的立体异构体;它们的衍生物;它们的类似物和它们的组合。

[0143] 激素治疗剂的例子包括但不限于:芳香酶抑制药(例如,氨鲁米特、阿那曲唑(Arimidex®)、来曲唑(Femara®)、伏氯唑、依西美坦(Aromasin®)、4-雄烯-3,6,17-三酮(6-OXO)、1,4,6-雄三烯-3,17-二酮(ATD)、福美坦(Lentaron®),等等);选择性雌激素受体调节剂(例如,巴多昔芬、氯米芬、氟维司群、拉索昔芬、雷洛昔芬、他莫昔芬、托瑞米芬等等);固醇类(例如,地塞米松);非那雄胺以及促性腺素释放激素激动剂(GnRH)如戈舍瑞林,其药学上可接受的盐;其立体异构体;其衍生物;其类似物以及它们的组合。

[0144] 本发明所用癌症疫苗的非限制性例子包括:活跃生物技术公司(Active Biotech)的ANYARA、西北生物治疗公司(Northwest Biotherapeutics)的DCVax-LB、IDM药业公司(IDM Pharma)的EP-2101、法玛克萨公司(Pharmexa)的GV1001、伊德拉药物公司(Idera Pharmaceuticals)的IO-2055、英特拉金治疗公司(Introgen Therapeutics)的INGN 225

和拜米拉 / 默克公司 (Biomira/Merck) 的 Stimuvax。

[0145] 放疗剂的例子包括但不限于:放射性核素,例如 ^{47}Sc 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{87}Y 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、和 ^{212}Bi , 任选直接偶联于抗肿瘤抗原的抗体。

[0146] 在一些实施方式中,捕捉抗体的各系列稀释液包括一系列浓度递降的捕捉抗体。在某些情况中,连续稀释捕捉抗体至少 2- 倍(例如,2、5、10、20、50、100、500 或 1000- 倍),从而产生包含一组(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 或更多)浓度递降的捕捉抗体系列稀释液,将它们点印在阵列上。优选将各捕捉抗体稀释液至少 2、3、4、5 或 6 个重复点印在阵列上。

[0147] 在其它实施方式中,所述固体支持物包括玻璃(例如,玻璃载玻片)、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜(例如,尼龙、硝酸纤维素、聚偏二氟乙烯(PVDF),等)、纤维束或任何其它合适的基材。在一优选的实施方式中,捕捉抗体束缚(例如,通过共价或非共价相互作用)于包被了硝酸纤维素聚合物的玻璃载玻片上,例如可商品化购自新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司(Whatman Inc., Florham Park, NJ)的FAST[®]载玻片。

[0148] 在一些实施方式中,所述细胞提取物包含实体瘤循环细胞的提取物。通常采用本领域已知的一种或多种分离方法分离患者样品中的循环细胞,所述方法包括,例如免疫磁性分离、CellTrack[™] 系统、微流体分离、FACS、密度梯度离心和消除法。

[0149] 在其它实施方式中,患者样品包括体液样品,如全血、血清、血浆、导管洗出液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液和 / 或细针抽吸物样品。在某些情况中,将全血样品分成血浆或血清组分和细胞组分(即,细胞沉淀)。细胞组分通常含有红细胞、白细胞和 / 或实体瘤循环细胞,例如 CTC、CEC、CEPC、淋巴结的扩散性肿瘤细胞和 / 或 CSC。血浆或血清组分通常含有实体瘤循环细胞所释放的核酸(例如,DNA、RNA)和蛋白质。

[0150] 在一些情况中,在与一种或多种感兴趣的抗癌药一起培育之前、期间或之后可用一种或多种生长因子体外刺激分离的循环细胞。刺激性生长因子如上所述。其他情况下,例如在生长因子刺激和 / 或抗癌药处理之后可用本领域已知的任何技术裂解分离的循环细胞以产生细胞提取物(例如,细胞裂解液)。优选在生长因子刺激后约 1-360 分钟时开始细胞裂解,更优选在以下两种不同的时间间隔开始:优选在生长因子刺激后约 1-360 分钟之间,更优选在两个不同的时间间隔:(1) 在生长因子刺激后约 1-5 分钟;和(2) 在生长因子刺激后约 30-180 分钟之间开始细胞裂解。或者,可将裂解液保存于 -80℃ 待用。

[0151] 在优选的实施方式中,采用下述的单一检测或邻近双重检测试验,检测肿瘤细胞,例如实体瘤循环细胞中多种信号转导分子的表达和 / 或活化状态。

[0152] 因此,本发明一方面提供选择治疗乳腺肿瘤的合适抗癌药的方法,所述方法包括:

[0153] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0154] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0155] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;和

[0156] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏该抗癌药时所产生的参比活化

状态,测定该抗癌药是否适合治疗该乳腺肿瘤。

[0157] 在某些例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。在某些其他例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0158] 在一个优选实施方式中,选择治疗乳腺肿瘤合适抗癌药的方法包括:

[0159] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0160] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0161] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;

[0162] (d) 比较一种或多种分析物的活化状态与缺乏该抗癌药时所产生的参比活化状态;和

[0163] (e) 当所述一种或多种分析物的活化状态比参比活化状态有实质性降低时,表明该抗癌药适合治疗乳腺肿瘤。

[0164] 在某些例子中,优选的实施方式可进一步包括步骤(f),或者包括步骤(e),该步骤是:当一种或多种分析物的活化状态比参比活化状态有实质性降低时,表明该抗癌药适合治疗乳腺肿瘤。

[0165] 在某些其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。在还有的其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0166] 在一些实施方式中,与缺乏抗癌药时相比,分析物如信号转导分子的活化状态比存在抗癌药时降低至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,则认为其活化状态“实质性降低”。在其他实施方式中,(1)当没有抗癌药时分析物由高活化或强活化改变为有抗癌药时的中等、弱、低或非常弱活化,或者(2)当没有抗癌药时分析物由中等活化改变为有抗癌药时的弱、低或非常弱活化,则认为分析物如信号转导分子的活化状态在存在抗癌药时有“实质性降低”。

[0167] 在一些实施方式中,本发明的方法可进一步包括获得乳腺肿瘤患者的样品并分离其中的乳腺肿瘤细胞的步骤。可在抗癌药治疗之前(例如,在与抗癌药培育之前)或者给予抗癌药之后(例如,在癌症治疗过程的任何时刻)获得乳腺癌对象的样品。合适的样品包括但不限于:全血、血清、血浆、导管洗出液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物(FNA)和它们的组合。在一个优选的实施方式中,所述样品是全血或FNA样品。在该实施方式中,可分离全血样品中的乳腺肿瘤循环细胞,或者可分离FNA样品的乳腺癌细胞。如果分离的细胞获自未接受抗癌药治疗的对象,可将该分离的细胞与一种抗癌药或抗癌药混合物一起可在合适条件下体外培育,所述抗癌药能靶向步骤(c)所检测的一种或多种分析物。

[0168] 可用本领域已知的任何技术分离样品中的乳腺肿瘤循环细胞,所述方法例如有,免疫磁性分离、CellTrack™系统、微流体分离、FACS、密度梯度离心和消除法(见实施例1)。

样品中可分离的循环细胞的例子包括但不限于：循环肿瘤细胞、循环内皮细胞、循环内皮祖细胞、癌症干细胞、扩散性肿瘤细胞和它们的组合。可用本领域已知的任何技术裂解分离的细胞如循环细胞，从而将分离的细胞转变为细胞提取物（见实施例 1）。

[0169] 在一个实施方式中，所述乳腺肿瘤来自患导管癌或小叶癌的对象。导管癌的例子包括但不限于浸润性导管癌和原位导管癌。小叶癌的非限制性例子包括浸润性小叶癌或原位小叶癌。

[0170] 在某些例子中，乳腺肿瘤细胞分离自肿瘤组织。所述肿瘤组织可以是，例如，原发性肿瘤组织或转移性肿瘤组织。在一优选的实施方式中，所述细胞是从肿瘤组织分离的细针抽吸（FNA）样品。

[0171] 在一些实施方式中，如本文所述用生长因子体外刺激分离的细胞。在其他实施方式中，所述抗癌药可包括本文所述治疗剂中的一种或多种，包括但不限于：单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂以及疫苗。

[0172] 在优选实施方式中，所述细胞提取物中一种或多种分析物包括多个信号转导分子。信号转导分子的例子包括但不限于：受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶信号转导级联组分、核激素受体、核受体辅激活物、核受体抑制物、和它们的组合。在某些例子中，所述多种信号转导分子选自：EGFR(ErbB 1)、Her-2(ErbB2)、p95ErbB2、Her-3(ErbB3)、Her-4(ErbB4)、Raf、SRC、Mek、NFkB-IkB、mTor、PI3K、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Eph-a、Eph-b、Eph-c、Eph-d、cMet、FGFR、PDGFRA、cKit、Flt-3、Tie-1、Tie-2、Flt-3、cFMS、PDGFR、PDGFRB/Ab1、FTL 3、RET、Kit、HGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF-1R、ER、PR、NCOR、AIB1 和它们的组合。优选所述多种信号转导分子选自：ErbB1、ErbB2、p95ErbB2、ErbB3、ErbB4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ER、PR 和它们的组合。

[0173] 在一些实施方式中，检测细胞提取物中存在的一种或多种分析物的活化状态可以是，例如，磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态或其组合。在其他实施方式中，所述固体支持物可包括，例如：玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。在还有的其他实施方式中，所述捕捉抗体束缚于可寻址阵列的固体支持物上。

[0174] 在某些实施方式中，试验步骤 (c) 包括：

[0175] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育（例如，接触），形成多个被捕获的分析物（例如，以将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物）；

[0176] (ii) 将多个被捕获的分析物与相应分析物活化状态的依赖性特异抗体一起培育（例如，接触），形成多个可检测的被捕获分析物（例如，以将被捕获分析物的复合物转变为包含被捕获分析物的可检测的捕获分析物与活化状态依赖性抗体的复合物）；

[0177] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对的第一和第二成员一起培育（例如，接触），产生放大的信号；和

[0178] (iv) 检测所述信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0179] 在一些例子中，所述活化状态依赖性抗体包含结合对的第一成员（例如，生物素）。在其他例子中，所述信号放大对的第一成员（例如，过氧化物酶，如 HRP）包含结合对的第二成员（例如，链霉亲和素）。在某些例子中，所述信号放大对的第二成员可以是，例如，酪酰胺试剂（例如，生物素 - 酪酰胺）。优选过氧化物酶氧化生物素 - 酪酰胺产生活化

的酪酰胺（例如，将生物素 - 酪酰胺转化成活化的酪酰胺），从而产生放大的信号。可直接检测或间接，例如加入信号检测试剂，检测活化的酪酰胺。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉亲和素蛋白标记的荧光团，以及链霉亲和素标记的过氧化物酶和显色试剂如 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 联用。

[0180] 在某些其他实施方式中，试验步骤 (c) 包括：

[0181] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育（例如，接触），形成多个被捕获分析物（例如，将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物）；

[0182] (ii) 将多个被捕获的分析物与检测抗体一起培育（例如，接触），形成多种可检测的被捕获分析物（例如，将被捕获分析物的复合物转变为包含被捕获分析物的可检测的被捕获分析物与检测抗体的复合物），所述检测抗体包含多种活化状态非依赖性抗体和多种相应分析物的特异性活化状态依赖性抗体，

[0183] 其中所述活化状态非依赖性抗体用辅助分子标记，活化状态依赖性抗体用信号放大对的第一成员标记，所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂；

[0184] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育，产生放大的信号；和

[0185] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0186] 所述活化状态非依赖性抗体可用辅助分子直接标记或用辅助分子间接标记，例如通过偶联于活化状态非依赖性抗体的寡核苷酸与偶联于辅助分子的互补寡核苷酸之间的杂交。类似地，所述活化状态 - 依赖性抗体可用信号放大对第一成员直接标记或用信号放大对第一成员间接标记，例如通过偶联于活化状态 - 依赖性抗体的结合对的第一成员与偶联于信号放大对第一成员的结合对的第二成员之间的结合。在某些例子中，结合对的第一成员是生物素，结合对的第二成员是亲和素，如链霉亲和素或中性亲和素。

[0187] 在一些实施方式中，所述辅助分子可以是，例如，葡萄糖氧化酶。在某些例子中，所述葡萄糖氧化酶以及活化状态非依赖性抗体可偶联于实施例 16 和 17 所述的巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 500kDa（例如约 250、300、350、400、450、500、550、600、650、700 或 750kDa）。在其他实施方式中，所述氧化剂可以是，例如，双氧水 (H_2O_2)。在还有的其他实施方式中，所述信号放大对的第一成员可以是，例如，过氧化物酶例如辣根过氧化物酶 (HRP)。在进一步的实施方式中，所述信号放大对的第二成员可以是，例如，酪酰胺试剂（例如，生物素 - 酪酰胺）。优选过氧化物酶氧化生物素 - 酪酰胺产生活化的酪酰胺（例如，将生物素 - 酪酰胺转化成活化的酪酰胺），产生放大的信号。可直接检测或间接，例如加入信号检测试剂，检测活化的酪酰胺。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉亲和素标记的荧光团，以及链霉亲和素标记的过氧化物酶和显色剂如 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 联用。

[0188] 在某些例子中，所述辣根过氧化物酶以及活化状态依赖性抗体可偶联于巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 70kDa（例如约 40、45、50、55、60、500、70、75、80、85、90、95 或 100kDa）。

[0189] 在一些实施方式中，本发明的方法可用于帮助或辅助筛选用于治疗乳腺肿瘤的合

适抗癌药。在其他实施方式中,本发明的方法可用于促进对治疗乳腺肿瘤合适抗癌药的筛选。

[0190] 在另一方面,本发明提供鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗有无反应的方法,所述方法包括:

[0191] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0192] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0193] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;和

[0194] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态,鉴定该乳腺肿瘤对该抗癌药治疗有无反应。

[0195] 在某些例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。在某些其他例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0196] 在一优选实施方式中,鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗有无反应的方法包括:

[0197] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0198] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0199] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;

[0200] (d) 比较一种或多种分析物的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态;和

[0201] (e) 当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态有实质性降低时,表明该乳腺肿瘤对用该抗癌药治疗有反应。

[0202] 在某些例子中,优选的实施方式可进一步包括步骤(f),或者包括步骤(e),所述步骤是:当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态没有实质性降低时,表明该乳腺肿瘤对用该抗癌药治疗无反应。

[0203] 在某些其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。再在某些其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0204] 如上所述,在存在抗癌药时分析物(例如,信号转导分子)的活化状态可以“实质性降低”。在一些实施方式中,本文所述方法可进一步包括获得乳腺肿瘤对象的样品并分离其中的乳腺肿瘤细胞的步骤。可在抗癌药治疗之前(例如,与抗癌药培育之前)或者给予抗癌药之后(例如,在癌症治疗过程的任何时刻)获得乳腺癌对象的样品。合适的样品包括但不限于:全血、血清、血浆、导管洗出液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物(FNA)和它们的组合。在一个优选的实施方式中,所述样品是全血或FNA样品。在该实施方式中,分离全血样品中的乳腺肿瘤循环细胞,或者分离FNA样品中的乳腺癌

细胞。如果分离的细胞获自未接受抗癌药治疗的对象,可将分离的细胞与一种抗癌药或抗癌药混合物在合适条件下一起体外培育,所述抗癌药物能靶向步骤(c)中检测的一种或多种分析物。

[0205] 可用本领域已知的技术分离样品中的乳腺肿瘤循环细胞,所述方法例如有,免疫磁性分离、CellTrack™ 系统、微流体分离、FACS、密度梯度离心和消除法(见实施例1)。样品中可分离的循环细胞的例子包括但不限于:循环肿瘤细胞、循环内皮细胞、循环内皮祖细胞、癌症干细胞、扩散性肿瘤细胞和它们的组合。可用本领域已知的技术裂解分离的细胞如循环细胞,将分离的细胞转变为细胞提取物(见实施例1)。

[0206] 在一些实施方式中,所述乳腺肿瘤来自患导管癌或小叶癌的对象。导管癌的例子包括但不限于浸润性导管癌和原位导管癌。小叶癌的非限制性例子包括浸润性小叶癌或原位小叶癌。

[0207] 在某些例子中,从肿瘤组织分离乳腺肿瘤细胞。所述肿瘤组织可以是,例如,原发性肿瘤组织或转移性肿瘤组织。在一优选的实施方式中,所述细胞分离自肿瘤组织的细针抽吸(FNA)样品。

[0208] 在一些实施方式中,如本文所述用生长因子体外刺激分离的细胞。在其他实施方式中,所述抗癌药可包括本文所述治疗剂中的一种或多种,包括但不限于:单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂以及疫苗。

[0209] 在优选实施方式中,所述细胞提取物中的一种或多种分析物包括多个信号转导分子。信号转导分子的例子包括但不限于:受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶信号转导级联组分、核激素受体、核受体辅激活物、核受体抑制物、和它们的组合。在某些例子中,所述多种信号转导分子选自:EGFR(ErbB 1)、Her-2(ErbB2)、p95ErbB2、Her-3(ErbB3)、Her-4(ErbB4)、Raf、SRC、Mek、NFkB-IkB、mTor、PI3K、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Eph-a、Eph-b、Eph-c、Eph-d、cMet、FGFR、PDGFRA、cKit、Flt-3、Tie-1、Tie-2、Flt-3、cFMS、PDGFR、PDGFRB/Ab1、FTL3、RET、Kit、HGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF-1R、ER、PR、NCOR、AIB1 和它们的组合。优选所述多种信号转导分子选自:ErbB1、ErbB2、p95ErbB2、ErbB3、ErbB4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ER、PR 和它们的组合。

[0210] 在一些实施方式中,检测细胞提取物中存在的一种或多种分析物的活化状态可以是,例如,磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态或其组合。在其他实施方式中,所述固体支持物可包括,例如:玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。在还有的其他实施方式中,所述捕捉抗体束缚于可寻址阵列的固体支持物上。

[0211] 在某些实施方式中,试验步骤(c)包括:

[0212] (i) 培育(例如,接触)细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液,形成多个被捕获的分析物(例如,以将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物);

[0213] (ii) 培育(例如,接触)多个被捕获的分析物与相应分析物活化状态依赖性特异抗体,形成多个可检测的被捕获的分析物(例如,将被捕获分析物的复合物转变为包含被捕获分析物的可检测的捕获分析物与活化状态依赖性抗体的复合物);

[0214] (iii) 培育(例如,接触)多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第一和第二成员,产生放大的信号;和

[0215] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0216] 在一些例子中,所述活化状态依赖性抗体包含结合对的第一成员(例如,生物素)。在其他例子中,所述信号放大对第一成员(例如,过氧化物酶,如 HRP)包含结合对的第二成员(例如,链霉抗生物素蛋白)。在某些例子中,所述信号放大对第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂(例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺(例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶和显色剂如 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)联用。

[0217] 在某些其他实施方式中,试验步骤(c)包括:

[0218] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育(例如,接触),形成多个被捕获的分析物(例如,将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物);

[0219] (ii) 将多个被捕获的分析物与检测抗体一起培育(例如,接触),形成多个可检测的被捕获分析物(例如,将被捕获分析物的复合物转变为包含被捕获分析物的可检测的捕获分析物与检测抗体的复合物),所述检测抗体包含多种活化状态非依赖性抗体和多种相应分析物的特异性活化状态依赖性抗体,

[0220] 其中所述活化状态非依赖性抗体用辅助分子标记,活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记,所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂;

[0221] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育(例如,接触),产生放大的信号;和

[0222] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0223] 所述活化状态非依赖性抗体可用辅助分子直接标记或用辅助分子间接标记,例如通过偶联于活化状态非依赖性抗体的寡核苷酸与偶联于辅助分子的互补寡核苷酸之间的杂交。类似地,所述活化状态-依赖性抗体可用信号放大对第一成员直接标记或用信号放大对第一成员间接标记,例如通过偶联于活化状态-依赖性抗体结合对第一成员与偶联于信号放大对第一成员结合对的第二成员之间的结合。在某些例子中,结合对的第一成员是生物素,结合对的第二成员是亲和素,如链霉抗生物素蛋白或中性亲和素。

[0224] 在一些实施方式中,所述辅助分子可以是,例如,葡萄糖氧化酶。在某些例子中,所述葡萄糖氧化酶以及活化状态非依赖性抗体偶联于实施例 16 和 17 所述的巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 500kDa(例如约 250、300、350、400、450、500、550、600、650、700 或 750kDa)。在其他实施方式中,所述氧化剂可以是,例如,双氧水(H₂O₂)。在还有的其他实施方式中,所述信号放大对第一成员可以是,例如,过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRP)。在进一步的例子中,所述信号放大对第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂(例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺(例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶体和显色剂如 3,3',5,

5'-四甲基联苯胺(TMB)联用。

[0225] 在某些例子中,所述辣根过氧化物酶以及活化状态依赖性抗体可偶联于巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 70kDa(例如约 40、45、50、55、60、500、70、75、80、85、90、95 或 100kDa)。

[0226] 在一些实施方式中,本发明的方法可用于帮助或辅助鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗有无反应。在其他实施方式中,本发明的方法可用于促进乳腺肿瘤对用抗癌药治疗有无反应的鉴定。

[0227] 在还有另一方面,本发明提供预测乳腺肿瘤对象对抗癌药治疗有无反应的方法,所述方法包括:

[0228] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0229] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0230] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;和

[0231] (d) 比较一种或多种分析物测得的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态,预测该对象对该抗癌药治疗有反应的可能性。

[0232] 在某些例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。在某些其他例子中,本发明的方法可进一步包括将步骤(d)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0233] 在一优选实施方式中,预测乳腺肿瘤对象对抗癌药治疗有无反应的方法包括:

[0234] (a) 给予抗癌药后分离乳腺肿瘤细胞,或者分离肿瘤细胞与抗癌药一起培育;

[0235] (b) 裂解分离的细胞产生细胞提取物;

[0236] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个系列稀释液进行试验,检测细胞提取物中该一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体束缚于固体支持物上;

[0237] (d) 比较一种或多种分析物的活化状态与缺乏抗癌药时所产生的参比活化状态;和

[0238] (e) 当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态有实质性降低时,表明该对象可能对用该抗癌药治疗有反应。

[0239] 在某些例子中,优选的实施方式可进一步包括步骤(f),或者步骤(e),所述步骤是:当一种或多种分析物测得的活化状态比参比活化状态没有实质性降低时,表明该对象对用该抗癌药治疗可能没有反应(例如,不太可能有变化或者有反应的概率低)。

[0240] 在某些其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果发送或报告给临床医生,例如肿瘤科医生或全科医生。在还有的某些其他例子中,优选实施方式可进一步包括将步骤(e)的结果记录或储存在计算机数据库中或者,例如,实验室内的其他合适的信息储存机械或装置中。

[0241] 如上所述,在存在抗癌药时分析物(例如,信号转导分子)的活化状态可以“实质性降低”。在一些实施方式中,本文所述方法可进一步包括获得乳腺肿瘤患者的样品并分离

其中的乳腺肿瘤细胞的步骤。可在抗癌药治疗之前（例如，与抗癌药培育之前）或者给予抗癌药之后（例如，在癌症治疗过程的任何时刻）获得乳腺癌对象的样品。合适的样品包括但不限于：全血、血清、血浆、导管洗出液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物（FNA）和它们的组合。在一个优选的实施方式中，所述样品是全血或FNA样品。在该实施方式中，可从全血样品分离乳腺肿瘤循环细胞，或者可以从FNA样品分离乳腺癌细胞。如果分离的细胞获自未接受抗癌药治疗的对象，可将分离的细胞与一种抗癌药或抗癌药混合物在合适条件下体外一起培育，所述抗癌药能靶向步骤（c）中检测的一种或多种分析物。

[0242] 可用本领域已知的技术分离样品中的乳腺肿瘤循环细胞，所述方法例如有，免疫磁性分离、CellTrack™ 系统、微流体分离、FACS、密度梯度离心和消除法（见实施例1）。样品中可分离的循环细胞的例子包括但不限于：循环肿瘤细胞、循环内皮细胞、循环内皮祖细胞、癌症干细胞、扩散性肿瘤细胞和它们的组合。可用本领域已知的技术裂解分离的细胞如循环细胞，将分离的细胞转变为细胞提取物（见实施例1）。

[0243] 在一些实施方式中，所述乳腺肿瘤来自患导管癌或小叶癌的对象。导管癌的例子包括但不限于，浸润性导管癌和原位导管癌。小叶癌的非限制性例子包括浸润性小叶癌或原位小叶癌。

[0244] 在某些例子中，从肿瘤组织分离乳腺肿瘤细胞。所述肿瘤组织可以是，例如，原发性肿瘤组织或转移性肿瘤组织。在一优选的实施方式中，从肿瘤组织的细针抽吸（FNA）样品分离细胞。

[0245] 在一些实施方式中，如本文所述用生长因子体外刺激分离的细胞。在其他实施方式中，所述抗癌药可包括本文所述治疗剂中的一种或多种，包括但不限于：单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂以及疫苗。

[0246] 在优选实施方式中，所述细胞提取物中一种或多种分析物包含多个信号转导分子。信号转导分子的例子包括但不限于：受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶、酪氨酸激酶信号转导级联组分、核激素受体、核受体辅激活物、核受体抑制物、和它们的组合。在某些例子中，所述多种信号转导分子选自：EGFR（ErbB1）、Her-2（ErbB2）、p95ErbB2、Her-3（ErbB3）、Her-4（ErbB4）、Raf、SRC、Mek、NFkB-IkB、mTor、PI3K、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Eph-a、Eph-b、Eph-c、Eph-d、cMet、FGFR、PDGFRA、cKit、Flt-3、Tie-1、Tie-2、Flt-3、cFMS、PDGFR、PDGFRB/Ab1、FTL 3、RET、Kit、HGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF-1R、ER、PR、NCOR、AIB1 和它们的组合。优选地所述多种信号转导分子选自：ErbB 1、ErbB2、p95ErbB2、ErbB3、ErbB4、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ER、PR 和它们的组合。

[0247] 在一些实施方式中，检测细胞提取物中存在的一种或多种分析物的活化状态可以是，例如，磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态或其组合。在其他实施方式中，所述固体支持物可包括，例如：玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。在还有的其他实施方式中，所述捕捉抗体束缚于可寻址阵列的固体支持物上。

[0248] 在某些实施方式中，步骤（c）的试验包括：

[0249] （i）将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育（例如，接触），形成多个被捕获的分析物（例如，将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物）；

[0250] (ii) 将多个被捕获的分析物与相应分析物的活化状态依赖性特异性抗体一起培育(例如,接触),形成多个可检测的被捕获的分析物(例如,将被捕获的分析物的复合物转变为包含被捕获分析物的可检测的被捕获分析物与活化状态依赖性抗体的复合物);

[0251] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第一和第二成员一起培育(例如,接触),产生放大的信号;和

[0252] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0253] 在一些例子中,所述活化状态依赖性抗体包含结合对第一成员(例如,生物素)。在其他例子中,所述信号放大对第一成员(例如,过氧化物酶,如 HRP) 包含结合对的第二成员(例如,链霉抗生物素蛋白)。在某些例子中,所述信号放大对的第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂(例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺(例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶体和显色剂如 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 联用。

[0254] 在某些其他实施方式中,步骤(c)的试验包括:

[0255] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多个系列稀释液一起培育(例如,接触),形成多个被捕获的分析物(例如,将细胞提取物中存在的分析物转变为包含分析物的被捕获分析物与捕捉抗体的复合物);

[0256] (ii) 将多个被捕获的分析物与检测抗体一起培育(例如,接触),形成多个可检测的被捕获分析物(例如,将被捕获分析物的复合物转变为包含捕获的分析物的可检测的被捕获分析物与检测抗体的复合物),所述检测抗体包含多种活化状态非依赖性抗体和多种相应分析物活化状态的依赖性特异性抗体,

[0257] 其中所述活化状态依赖性非抗体用辅助分子标记,活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记,所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂;

[0258] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育(例如,接触),产生放大的信号;和

[0259] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0260] 所述活化状态非依赖性抗体可用辅助分子直接标记或用辅助分子间接标记,例如通过偶联于活化状态非依赖性抗体的寡核苷酸与偶联于辅助分子的互补寡核苷酸之间的杂交。类似地,所述活化状态-依赖性抗体可用信号放大对第一成员直接标记或用信号放大对第一成员间接标记,例如通过偶联于活化状态-依赖性抗体结合对的第一成员与偶联于信号放大对第一成员的结合对第二成员之间的结合。在某些例子中,结合对的第一成员是生物素,结合对的第二成员是亲和素,如链霉抗生物素蛋白或中性亲和素。

[0261] 在一些实施方式中,所述辅助分子可以是,例如,葡萄糖氧化酶。在某些例子中,所述葡萄糖氧化酶以及活化状态非依赖性抗体可偶联于实施例 16 和 17 所述的巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 500kDa(例如约 250、300、350、400、450、500、550、600、650、700 或 750kDa)。在其他实施方式中,所述氧化剂可以是,例如,双氧水(H₂O₂)。在还有的其他实施方式中,所述信号放大对的第一成员可以是,例如,过氧化

物酶例如辣根过氧化物酶 (HRP)。在进一步的例子中,所述信号放大对的第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂(例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺(例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),从而产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶体和显色剂如 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)联用。

[0262] 在某些例子中,所述辣根过氧化物酶以及活化状态依赖性抗体可偶联于巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 70kDa(例如约 40、45、50、55、60、500、70、75、80、85、90、95 或 100kDa)。

[0263] 在一些实施方式中,可用本发明的方法帮助或辅助预测对象对用抗癌药治疗有反应的可能性。在其他实施方式中,可用本发明的方法促进对象对用抗癌药治疗有可能反应的预测。

[0264] 在还有一方面,本发明提供具有优秀动态范围的阵列,其包含多个束缚于固体支持物上的系列稀释捕捉抗体,其中各系列稀释捕捉抗体是细胞提取物中信号转导途径组分的一种或多种相应分析物或其他蛋白质(如核激素受体)的特异性抗体。

[0265] 在某些实施方式中,所述信号转导途径可能参与细胞增殖。在这类实施方式中,所述捕捉抗体可包括,例如,选自能与:IGF1R、cMET、ErbB1、ErbB2、p95ErbB2、ErbB3、ErbB4、Shc、PI3K、Erk、Rsk、Akt、p70S6K、ER、PR、NCOR 和 AIB 1 反应的抗体组的一个或多个抗体成员。在某些其他实施方式中,所述信号转导途径可能参与肿瘤血管发生。在该实施方式中,所述捕捉抗体可包括,例如,选自能与:Shc、PI3K、Erk、Rsk、Akt、p70S6K、VEGFR-1、VEGFR-2、Tie 2、V-钙粘蛋白-R2 复合物、PDGFRA、和 PDGFRB 反应的抗体组的一个或多个抗体成员。因此,本文所述的可寻址试验尤其可用于测定涉及乳腺癌的信号转导分子和其他蛋白质的表达和/或活化状态。

[0266] 在另一方面,本发明提供了一种检测截短受体存在(或不存在)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0267] (a) 将细胞提取物与多个包被有全长受体胞外域(ECD)结合区特异性抗体的珠一起培育(例如,接触);

[0268] (b) 从细胞提取物中除去多个珠从而除去全长受体,形成缺乏全长受体的细胞提取物(例如,将细胞提取物转变为不含特定全长受体或全长受体家族的细胞提取物);

[0269] (c) 将该不含述全长受体的细胞提取物与多个捕捉抗体一起培育(例如,接触),该多个捕捉抗体是截短受体胞内(ICD)结合区的特异性抗体且该多个捕捉抗体被束缚于固体支持物上,形成多个被捕获的截短受体(例如,将去除了全长受体的细胞提取物中存在的截短受体转变为截短受体和捕捉抗体的复合物);

[0270] (d) 将多个被捕获的截短受体与相应截短受体的特异性检测抗体一起培育(例如,接触),形成多个可检测的被捕获截短受体(例如,将被捕获截短受体的复合物转变为包含被捕获的截短受体的可检测的被捕获的截短受体与活化状态依赖性抗体的复合物);

[0271] (e) 将多个可检测的被捕获截短受体与信号放大对第一和第二成员一起培育(例如,接触),产生放大的信号;和

[0272] (f) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0273] 截短受体通常是全长受体的片段与全长受体共同含有胞内域 (ICD) 结合区。在某些实施方式中,所述全长受体包含胞外域 (ECD) 结合区、跨膜区和胞内域 (ICD) 结合区。不想受任何具体理论的束缚,可通过全长受体 ECD 的蛋白酶水解获得所述截短受体,或者通过在位于跨膜区之前、之内或之后的甲硫氨酸残基开始翻译,例如产生含有较短 ECD 的截短受体或包含膜结合 ICD 片段或胞质 ICD 片段的截短受体。

[0274] 在某些优选实施方式中,所述截短受体是 p95ErbB2,而相应的全长受体是 ErbB2 (HER-2)。然而,本领域技术人员将明白,本文所述的检测截短蛋白的方法可用于许多不同的蛋白质,其中包括但不限于,EGFRV111 突变体 (涉及胶质母细胞瘤、结肠直肠癌等)、其他截短的受体酪氨酸激酶、胱冬酶等等。实施例 12 提供了本发明采用具有优异动态范围的多重高通量单一检测微阵列 ELISA,检测稀少循环细胞中截短受体如 p95ErbB2 试验方法的一个示范性实施方式。

[0275] 在一些实施方式中,所述多个 ECD 结合区的特异珠包含链霉抗生物素蛋白-生物素对,其中链霉抗生物素蛋白结合于珠,生物素结合于抗体。在某些实施方式中,所述抗体是全长受体 ECD 结合区的特异性抗体。在其他实施方式中,通过裂解实体瘤 (例如乳腺肿瘤) 的循环细胞制得细胞提取物。可用本文所述的技术,例如免疫磁性分离法,分离样品中的循环细胞。合适的样品包括但不限于:全血、血清、血浆、导管洗出液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物和它们的组合。在一优选的实施方式中,所述样品是全血。或者,通过裂解分离自肿瘤组织,例如乳腺肿瘤组织的细胞制得细胞提取物。所述肿瘤组织可以是,例如原发性肿瘤组织或转移性肿瘤组织。在一优选的实施方式中,所述细胞是从肿瘤组织的细针抽吸 (FNA) 样品分离的细胞。

[0276] 在一些实施方式中,如本文所述用生长因子体外刺激分离的细胞。在其他实施方式中,所述分离细胞与抗癌药一起培育后用生长因子刺激。合适的抗癌药包括本文所述治疗剂中的一种或多种,例如,单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂以及疫苗。

[0277] 在某些实施方式中,所述多个可检测的被捕获截短受体的活化状态是可询问的。要询问的活化状态可以是,例如,磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态或其组合。在某些其他实施方式中,所述束缚了多个捕捉抗体的固体支持物可包括,例如:玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。在进一步的实施方式中,所述多个捕捉抗体束缚于可寻址阵列的固体支持物上。

[0278] 在一些例子中,所述检测抗体包含结合对的第一成员 (例如,生物素)。在其他例子中,所述信号放大对的第一成员 (例如,过氧化物酶,如 HRP) 包含结合对的第二成员 (例如,链霉抗生物素蛋白)。在某些例子中,所述信号放大对的第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂 (例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺 (例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶体和显色剂如 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 联用。

[0279] 在一相关方面,本发明提供了一种检测截短受体存在 (或不存在) 的方法,所述方法包括以下步骤:

[0280] (a) 将细胞提取物与多个全长受体胞外域 (ECD) 结合区的特异性珠一起培育 (例如, 接触) ;

[0281] (b) 从细胞提取物中除去多个珠从而除去全长受体, 形成缺乏全长受体的细胞提取物 (例如, 将细胞提取物转变为不含特定全长受体或全长受体家族的细胞提取物) ;

[0282] (c) 将不含全长受体的细胞提取物与多个捕捉抗体一起培育 (例如, 接触), 其中所述多个捕捉抗体是截短受体胞内域 (ICD) 结合区的特异性抗体, 所述多个捕捉抗体被束缚于固体支持物上, 形成多个被捕获的截短受体 (例如, 将去除全长受体的细胞提取物中存在的截短受体转变为截短受体和捕捉抗体的复合物) ;

[0283] (d) 将多个被捕获的截短受体与检测抗体一起培育 (例如, 接触), 形成多个可检测的被捕获的截短受体 (例如, 将被捕获截短受体的复合物转变为包含被捕获截短受体的可检测的被捕获截短受体与检测抗体的复合物), 所述检测抗体包含相应截短受体的多个活化状态非依赖性抗体和多个活化状态依赖性特异性抗体,

[0284] 其中所述活化状态非依赖性抗体用辅助分子标记, 活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记, 所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂 ;

[0285] (e) 将多个可检测的被捕获截短受体与信号放大对第二成员一起培育 (例如, 接触), 产生放大的信号 ; 和

[0286] (f) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0287] 截短受体通常是全长受体的片段与全长受体共同含有胞内域 (ICD) 结合区。在某些实施方式中, 所述全长受体包含胞外域 (ECD) 结合区、跨膜区和胞内域 (ICD) 结合区。不想受任何具体理论的束缚, 可通过全长受体 ECD 的蛋白酶水解获得所述截短受体, 或者通过在位于跨膜区之前、之内或之后的甲硫氨酸残基开始翻译, 例如产生具有较短 ECD 的截短受体或包含膜结合 ICD 片段或胞质 ICD 片段的截短受体。

[0288] 在某些优选实施方式中, 所述截短受体是 p95ErbB2, 而相应的全长受体是 ErbB2 (HER-2)。然而, 本领域技术人员将明白, 本文所述的检测截短蛋白的方法可用于许多不同的蛋白质, 包括但不限于 : EGFR V111 突变体 (涉及胶质母细胞瘤、结肠直肠癌等)、其他截短的受体酪氨酸激酶、胱冬酶等等。实施例 12 提供了本发明采用具有优异动态范围的多重高通量邻近双重检测微阵列 ELISA, 检测稀少循环细胞中截短受体如 p95ErbB2 试验方法的一个示范性实施方式。

[0289] 在一些实施方式中, 所述多个 ECD 结合区的特异性珠包含链霉抗生物素蛋白 - 生物素对, 其中链霉抗生物素蛋白结合于珠, 生物素结合于抗体。在某些实施方式中, 所述抗体是全长受体 ECD 结合区的特异性抗体。在其他实施方式中, 通过裂解实体瘤 (例如乳腺肿瘤) 的循环细胞制得细胞提取物。可用本文所述的技术, 例如免疫磁性分离法, 分离样品中的循环细胞。合适的样品包括但不限于 : 全血、血清、血浆、导管洗出液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、骨髓抽吸物、尿液、唾液、细针抽吸物和它们的组合。在一优选的实施方式中, 所述样品是全血。或者, 通过裂解分离自肿瘤组织, 例如乳腺肿瘤组织的细胞制得细胞提取物。所述肿瘤组织可以是, 例如, 原发性肿瘤组织或转移性肿瘤组织。在一优选的实施方式中, 所述细胞是从肿瘤组织的细针抽吸 (FNA) 样品分离的细胞。

[0290] 在一些实施方式中, 如本文所述用生长因子体外刺激分离的细胞。在其他实施方

式中,所述分离细胞用生长因子刺激后与抗癌药一起培育。合适的抗癌药包括本文所述治疗剂中的一种或多种,例如,单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂以及疫苗。

[0291] 在某些实施方式中,所述多个可检测的被捕获截短受体的活化状态是可询问的。要询问的活化状态可以是,例如,磷酸化状态、遍在蛋白化状态、复合状态或其组合。在某些其他实施方式中,所述束缚了多个捕捉抗体的固体支持物可包括,例如:玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。在进一步的实施方式中,所述多个捕捉抗体束缚于可寻址阵列的固体支持物上。

[0292] 所述活化状态非依赖性抗体可用辅助分子直接标记或用辅助分子间接标记,例如通过偶联于活化状态非依赖性抗体的寡核苷酸与偶联于辅助分子的互补寡核苷酸之间的杂交。类似地,所述活化状态-依赖性抗体可用信号放大对第一成员直接标记或用信号放大对第一成员间接标记,例如通过偶联于活化状态-依赖性抗体结合对第一成员与偶联于信号放大对第一成员结合对的第二成员之间的结合。在某些例子中,结合对的第一成员是生物素,结合对的第二成员是亲和素,如链霉抗生物素蛋白或中性亲和素。

[0293] 在一些实施方式中,所述辅助分子可以是,例如,葡萄糖氧化酶。在某些例子中,所述葡萄糖氧化酶以及活化状态非依赖性抗体偶联于巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 500kDa (例如约 250、300、350、400、450、500、550、600、650、700 或 750kDa)。在其他实施方式中,所述氧化剂可以是,例如,双氧水 (H_2O_2)。在还有的其他实施方式中,所述信号放大对的第一成员可以是,例如,过氧化物酶例如辣根过氧化物酶 (HRP)。在进一步的例子中,所述信号放大对的第二成员可以是,例如,酪酰胺试剂 (例如,生物素-酪酰胺)。优选过氧化物酶氧化生物素-酪酰胺产生活化的酪酰胺 (例如,将生物素-酪酰胺转化成活化的酪酰胺),从而产生放大的信号。活化的酪酰胺可直接检测或间接检测,例如加入信号检测试剂。信号检测试剂的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白标记的荧光团以及链霉抗生物素蛋白标记的过氧化物酶体和显色剂如 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 联用。

[0294] 在某些例子中,所述辣根过氧化物酶以及活化状态依赖性抗体可偶联于巯基活化的葡聚糖分子。所述巯基活化的葡聚糖分子的分子量通常约为 70kDa (例如约 40、45、50、55、60、500、70、75、80、85、90、95 或 100kDa)。

[0295] 在一些实施方式中,可用本发明检测 p95ErbB2 之类截短受体存在 (或者不存在,或水平) 的试验方法来帮助或辅助癌症诊断、预后、或者癌症治疗的设计,例如帮助或辅助:(i) 治疗乳腺肿瘤的合适抗癌药物选择,(ii) 鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗的反应,或(iii) 预测对象对抗癌药治疗有反应的可能性。。

[0296] 在其他实施方式中,可用本发明检测 p95ErbB2 之类截短受体存在 (或者不存在,或水平) 的试验方法来改进癌症诊断、预后、或者癌症治疗的设计,例如,改进:(i) 治疗乳腺肿瘤的合适抗癌药物的选择,(ii) 鉴定乳腺肿瘤对抗癌药治疗的反应,或者(iii) 预测对象对抗癌药治疗有反应的可能性。

[0297] IV. 乳腺癌

[0298] 乳腺癌是全世界第五最常见的癌症死因,仅次于肺癌、胃癌、肝癌和结肠癌。2005 年乳腺癌引起全世界 502,000 人死亡。在全世界妇女中乳腺癌是最常见的癌症死因。

[0299] 在美国,乳腺癌是第三最常见的癌症死因,仅次于肺癌和结肠癌。2007 年乳腺癌引起美国 40,000 人死亡。在美国妇女中乳腺癌是最常见的癌症并且是第二最常见的癌症死因。实际上,在美国,妇女一生中患浸润性乳腺癌的几率为 1/8,乳腺癌死亡几率为 1/33。

[0300] 从 20 世纪 70 年代以来,全世界乳腺癌病例数显著增长,这一现象部分归咎于西方世界的现代生活方式。由于男性和妇女的乳房由相同组织构成,乳腺癌也可发生于男性,虽然不常见。

[0301] 分类

[0302] 可用四种不同的分类方法描述乳腺癌,每种方法基于以下标准:

[0303] 1. 病理学。病理学家可根据每种肿瘤的组织学表现和其他标准来分类。乳腺癌最常见的病理学类型是浸润性导管癌和浸润性小叶癌。

[0304] 2. 肿瘤等级。病理学家可在显微镜下确定组织学等级。分化良好(低级)的肿瘤类似正常组织。分化差(高级)的肿瘤由无序细胞构成,看上去不像正常组织。中等分化(中级)的肿瘤介于两者之间。

[0305] 3. 蛋白质和基因表达状态。可检测乳腺癌中信号转导分子,例如雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)和 Her2/Neu/ErbB2 的表达和/或活化。如本文所述,给定肿瘤的表达模式能帮助预测其预后以及帮助肿瘤科医生选择最合适的治疗。

[0306] 4. 肿瘤阶段。可根据以下 TNM 分类系统划分乳腺癌的阶段:

[0307] a. 肿瘤. 5 个值(Tis、T1、T2、T3 或 T4) 取决于浸润性肿瘤存在与否、浸润性肿瘤的大小、以及是否存在向乳腺外(例如,乳腺皮肤或肌肉或胸廓下)侵袭。

[0308] b. 淋巴结. 4 个值(N0、N1、N2 或 N3) 取决于淋巴结内转移病灶的数量、大小和位置。

[0309] c. 转移. 2 个值(M0 或 M1) 取决于淋巴结之外是否有转移(所谓的远端转移,例如骨、脑、肺转移等)。

[0310] 病理学

[0311] 就病理学而言,世界卫生组织的乳腺肿瘤分类列出了以下组织学类型:

[0312] 1. 浸润性乳腺癌如浸润性导管癌(如基底样癌,混合型癌,多形性癌,含破骨巨细胞的癌,含绒毛膜特征的癌,含黑色素特征的癌),浸润性小叶癌,管状癌,浸润性筛状癌,髓样癌,粘液癌和富含粘蛋白的肿瘤(例如粘液癌,粘液囊性腺癌和柱状细胞粘液癌,印指环细胞癌),神经内分泌瘤(例如实体神经内分泌癌(乳腺的类癌),非典型类癌,小细胞/燕麦细胞癌,大细胞神经内分泌癌),浸润性乳头状癌,浸润性微乳头状癌,顶质分泌癌,化生癌(例如,混合上皮/间质化生上皮化生癌或纯上皮化生癌如鳞状细胞癌,含梭形细胞化生的腺癌,腺鳞状癌和粘液表皮样癌),富含脂质癌,分泌癌,嗜酸细胞癌,腺样囊性癌,腺泡细胞癌,糖原丰富的透明细胞癌,皮脂腺癌,炎性癌,以及双侧向乳腺癌;

[0313] 2. 癌前病变,如小叶肿瘤(例如,原位小叶癌),导管内增殖性病变(如普通型导管增生,扁平上皮增生,非典型性导管增生,原位导管癌),微侵袭性癌,以及导管内乳头状肿瘤(如中央乳头状瘤,周边乳头状瘤,非典型乳头状瘤,导管内乳头状癌,囊内乳头状癌,良性上皮病变);

[0314] 3. 良性上皮病变,如腺病,包括变种(如硬化性腺病,大汗腺腺病,钝导管腺病,小腺腺病,腺肌上皮乳腺病),径向疤痕/复杂硬化性病变和腺瘤(例如,管状腺瘤,泌乳腺瘤,

大汗腺腺瘤,多形性腺瘤,导管腺瘤);

[0315] 4. 肌上皮病变,如肌上皮瘤病,腺肌上皮乳腺病,腺肌上皮瘤和恶性肌上皮瘤;

[0316] 5. 间质肿瘤,如肉瘤,血管瘤,多发性血管瘤,血管外皮细胞瘤,假血管瘤性间质增生,肌纤维母细胞,纤维瘤病(侵袭性),炎性肌纤维母细胞瘤,脂肪瘤(如血管脂肪瘤),颗粒细胞瘤,神经纤维瘤,神经鞘瘤,血管肉瘤,脂肪肉瘤,横纹肌肉瘤,骨肉瘤,平滑肌瘤,和平滑肌肉瘤;

[0317] 6. 纤维上皮肿瘤,如纤维腺瘤,叶状肿瘤(例如良性、边缘性、恶性),低级导管外周间质肉瘤和乳腺错构瘤;

[0318] 7. 乳头肿瘤,如乳头腺瘤,汗腺腺瘤和乳头佩吉特病;

[0319] 8. 恶性淋巴瘤;

[0320] 9. 转移性肿瘤;以及

[0321] 10. 男性乳房肿瘤,如男子乳腺发育以及原位癌或浸润性癌。

[0322] 导管癌是妇女中最常见的乳腺癌类型,指乳房输乳管内产生了癌细胞。可分为两种形式:浸润性导管癌(IDC)是浸润性恶性肿瘤;原位导管癌是非浸润性肿瘤。IDC是浸润性乳腺癌最常见的形式,占有乳腺癌类型的大约80%。在乳房X线照片上,通常表现为边缘有放射状微小突起的肿块。体检时,这种肿块的触感通常比良性乳房病损硬得多。显微镜检查,癌细胞侵入并取代了周围正常组织。DCIS是妇女中非浸润性乳腺癌的最常见形式。由于乳房造影筛查已经越来越普及,DCIS已经成为一种最常诊断的乳房疾病,通常称为“0级”乳腺癌。DCIS通常是通过乳房x光检查发现的非常小的钙化斑,称为微钙化。然而,不是所有的微钙化都表明存在DCIS,必需通过活检证实。DCIS可能有多个病灶,治疗目的是切除所有的异常导管,留下清晰边缘。切除治疗后常包括局部放疗。通过合适的治疗DCIS不太可能发展成侵袭癌。手术切除和放疗降低了DCIS复发的风险或产生浸润性乳腺癌的风险。

[0323] 浸润性小叶癌(ILC)是从小叶开始扩散到周围乳腺组织的一种乳腺癌类型。如果早期未治疗,ILC可能会侵入身体的其他部位,如子宫或卵巢。ILC是第二最常见的浸润性乳腺癌类型,占有乳腺癌病例的约10-15%。ILC的特征通常是乳头上方向手臂的乳房区域增厚。ILC在乳房x光检查时不大可能看见。而看见时,表现为边缘有放射状微小突起的肿块,或者看起来与另一侧乳房不对称。

[0324] 治疗

[0325] 现已证明乳腺癌中关键的信号转导组分有许多改变。这些改变包括:导致活化的EGFR突变;其它受体酪氨酸激酶,例如cMet的活化;EGFR活化以及HER-2和HER-3活化或HER-2扩增;EGFR活化及PI3K突变;EGFR活化及PTEN消除;和EGFR活化及Ras突变。各种形式的化疗已针对信号转导途径不同组分中的各种改变。

[0326] 同时,可以靶向肿瘤的新血管形成(一种称为血管生成的过程)。VEGF是新血管形成必须的内皮细胞存活因子。因此,调节VEGF-介导血管生成的一种方法是利用抗VEGF蛋白质本身或抗VEGFR的抗体。贝伐单抗是针对VEGF的一种重组人源化单克隆抗体,可与化疗剂协同作用,已显示能改善结肠直肠、乳腺和肺癌患者的存活。

[0327] 设计的所有内分泌治疗都是以独特方式阻断雌激素受体(ER)的功能。例如,选择性雌激素受体调节物(SERM)如他莫昔芬能结合ER而部分阻断其活性。卵巢烧蚀、促黄

体素释放素激动剂和芳香酶抑制剂如阿那曲唑(Arimidex[®])、来曲唑(Femara[®])和依西美坦(Aromasin[®])可降低雌激素水平并抑制配体诱导的 ER 活化。理想的 SERM 能在乳房和子宫中应发挥抗雌激素作用,并在骨骼、心血管和中枢神经系统以及胃肠道和阴道中发挥部分雌激素激动剂的作用。

[0328] 甾类抗雌激素如氟维司群能更紧密地结合 ER,因此能完全阻断其功能并诱导受体降解。

[0329] 选择性雌激素受体(ER)调节物他莫昔芬是使用最广泛的治疗 ER- 阳性乳腺癌的药物。他莫昔芬的辅助治疗研究显示,复发率和死亡率降低了 40-50%。他莫昔芬也能使 30-50% 的转移癌疾病患者得到暂时缓解,预防乳腺癌也有效。

[0330] 芳香酶抑制剂已成为治疗绝经后乳腺癌妇女的标准护理药物,而他莫昔芬仍旧是绝经前妇女的标准治疗药物。尽管芳香酶抑制剂的疗效略好于他莫昔芬,但他莫昔芬仍旧是重要的药物,因为证明与这些辅助治疗剂顺次使用有益,因此它在转移癌疾病中将继续发挥作用。

[0331] 耐药性

[0332] 对他莫昔芬的从头开始的耐药性(初次治疗就无反应;原发耐药性)和获得性耐药性(初次治疗显示有反应,此后疾病复发或发展;继发性耐药性)是主要的问题。因此,对肿瘤生物学和耐药性机制的了解方可能提供显著的临床效果。

[0333] ER/PR 生物学:ER 和 PR 是细胞核激素受体,当它们结合配体时在细胞核中发挥转录因子的功能。ER 和 PR 具有类似的结构含有 DNA 结合区、二聚化区、激素结合区和数个转录活化区。注意到与 ER 阳性、PR 阴性肿瘤患者相比,ER 阳性、PR 阳性患者的复发风险显著降低。

[0334] ER 功能:激素与 ER 结合通过磷酸化激活该蛋白质,解离其伴侣蛋白如热激蛋白 90 而改变其构象。激素结合的(“活化的”)ER 然后与另一受体二聚化,该二聚体能结合雌激素反应性基因启动子中的雌激素反应元件(特定 DNA 序列)。结合启动子的 ER 二聚体与辅调节蛋白如 AIB1 或 SRC3(在乳腺癌 1 中扩增的)形成复合物,发挥协同作用影响雌激素反应性基因的转录。通常,当受体与雌激素结合时是辅激活蛋白结合 ER,而当 ER 与他莫昔芬结合时是辅抑制蛋白结合。AIB1 在 65% 的乳腺癌中过表达,其相应基因扩增 5%。高水平 AIB1 能增强雌激素的激动活性从而造成 SERM 耐药性(例如,用芳香酶抑制剂治疗时)。ER 二聚体也能与辅抑制蛋白如 NCOR 形成复合物而下调某些基因(如 HOXB13)的表达。

[0335] 生长因子信号传导网络中的一些激酶在称为不依赖于配体的活化过程中也能激活 ER。在某些条件下,如 ErbB 家族高活化(例如,HER-2 或 HER-1 高活化),ER 能结合他莫昔芬-AIB1 复合物,导致他莫昔芬的雌激素激动活性升高(例如,用氟维司群或芳香酶抑制剂和激酶抑制剂一起治疗时)。

[0336] 这种非细胞核 ER 作用或膜引发的类固醇信号转导(MISS)发生于加入雌激素数分钟内。SERM 如他莫昔芬也激活膜 ER。在骨骼、神经、子宫、脂肪和内皮细胞中都发现了这些受体。雌激素激活膜 ER 功能的机制开始变得清楚起来。已经发现 ER 与各种膜信号转导分子如胰岛素生长因子 1 受体、PI3K 的 p85 调节亚单位、Src 和 Shc(一种可将 ER 直接偶联于各种生长因子酪氨酸激酶受体的蛋白)之间有直接相互作用。雌激素通过激活 Akt 和 MAPK 对这些途径的激活发送了强有力的细胞存活和细胞增殖信号。此外,这些激酶可磷酸化 ER

及其辅调节剂而促进核 ER 信号转导。这些蛋白的磷酸化也提高了他莫昔芬和其他 SERM 的雌激素激动剂样活性。

[0337] 纯的抗雌激素氟维司群不会以这种方式激活膜 ER ;然而, SERM 如他莫昔芬却能以类似于雌激素的方式激活膜 ER。与其细胞核活性一样, ER 的膜效应可以是细胞、受体亚型和配体特异性的,也可能受到生长因子信号传导微环境非常强的影响,例如在过表达 ErbB1 或 HER-2 的乳腺癌中。他莫昔芬和其他 SERM 对 ER 的 MISS 活性的刺激的部分解释可能是,有时观察到 HER-2 过表达的肿瘤对这些药物耐受。

[0338] 除了与细胞核和质膜(膜引发的类固醇信号传导;MISS)相关的 ER 功能外, ER 与其他途径分子的偶联有利于后续的肿瘤发展。这种分子交谈可以用芳香酶抑制剂而非 SERM 很好的处理。

[0339] ER 至少有两种主要功能。它可作为雌激素调节基因的转录因子以及细胞核中其他转录因子的辅激活剂。它在胞质和质膜中也有活化生长因子信号转导的作用。在一些乳腺肿瘤中,尤其是具有高活性生长因子信号转导途径如 HER-2 扩增的肿瘤中,雌激素活化生长因子信号转导,然后生长因子信号转导途径进一步活化 ER 而产生恶性循环。预计这类肿瘤中的雌激素通过激活肿瘤发展中重要的多种途径而成为优势因子。这种分子交谈对于乳腺癌治疗意义重大。例如,在 HER-2 扩增的肿瘤中,雌激素剥夺芳香酶的治疗效果应比 SERM 更加有效,因为能同时切断细胞核引发的类固醇信号转导和 ER 的 MISS 活性。

[0340] 转移癌疾病

[0341] 2/3 或更多的乳腺肿瘤生长依赖于雌激素。可用许多雌激素阻断剂治疗转移性乳腺癌。对这些药物的治疗反应不可预测,然而大约 1/3 具有雌激素或孕酮受体的转移性乳腺癌患者无法从激素治疗中获益。尽管仍旧存在激素受体,但几乎所有的转移性乳腺癌患者最终将对激素治疗产生耐受。

[0342] 治疗方法的选择根据信号转导途径的活化或对肿瘤生物学的更深了解而定。本发明有利地提供了一种试验方法和诊断/预后芯片,可帮助肿瘤科医生确定各患者个体的最佳治疗。

[0343] V. 抗体阵列的构建

[0344] 在某些方面,采用束缚于固体支持物上的系列稀释捕捉抗体的抗体阵列检测肿瘤细胞,例如实体瘤循环细胞的细胞提取物中多种信号转导分子的活化状态。所述阵列通常包含不同浓度范围的偶连于固体支持物表面不同可寻址位置的多种不同捕捉抗体。

[0345] 所述固体支持物可包含任何适合固定蛋白质的基材。固体支持物的例子包括但不限于:玻璃(例如,玻璃载玻片)、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束、凝胶、金属、陶瓷等。所述膜,例如有尼龙(Biotrans™,加利福尼亚州科斯拉梅萨市 ICN 生物学公司(ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA);Zeta-Probe®,加利福尼亚州赫拉克勒斯市的拜尔莱德公司(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA))、硝酸纤维素(Protran®,新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司)和 PVDF(Immobilon™,马萨诸塞州比尔里卡市米丽波尔公司(Millipore Corp., Billerica, MA))膜适合用作本发明阵列中的固体支持物。捕捉抗体优选束缚于包被了硝酸纤维素聚合物的玻璃载玻片上,例如可商品化购自新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司的FAST®载玻片。

[0346] 固体支持物的理想性能的特定方面包括能否结合大量捕捉抗体和能否使结合的

捕捉抗体变性最小。另一方面合适的性能是当含有捕捉抗体的抗体溶液施加于支持物时,该固体支持物显示最少的“灯芯作用”。灯芯作用最少的固体支持物在将一小份等量捕捉抗体溶液施加于该支持物,能产生小而大小明确的固定捕捉抗体斑点。

[0347] 一般通过共价或非共价相互作用(例如,离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极-偶极键)将捕捉抗体直接或间接(例如,通过捕捉尾)束缚于固体支持物上。在一些实施方式中,采用标准的交联方法和条件,利用同质双功能或异质双功能交联剂将捕捉抗体共价连接于固体支持物。合适的交联剂可商品化购自零售商,例如伊利诺斯州洛克福特市皮尔斯生物技术公司(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)。

[0348] 产生适用于本发明的阵列的方法包括但不限于:用于构建蛋白质或核酸阵列的任何技术。在一些实施方式中,用微量点样器将捕捉抗体点印在阵列上,所述点样器通常是配有裂缝针、钝针或喷墨打印头的机器人打印机。打印本文所述抗体阵列的合适机器人系统包括加利福尼亚州爱尔文市笛卡尔技术公司(Cartesian Technologies; Irvine, CA)的PixSys 5000 机器人,其装配有加利福尼亚州桑尼维尔市 TC 国际公司(TeleChem International; Sunnyvale, CA)的ChipMaker2 裂缝针,以及可购自马萨诸塞州沃本市生物机器人公司(BioRobotics, Woburn, MA)和康涅狄格州梅里登市帕卡德仪器公司(Packard Instrument Co., Meriden, CT)的其它机器人打印机。优选将各捕捉抗体稀释液以至少 2、3、4、5 或 6 个重复点印在阵列上。

[0349] 产生适用于本发明阵列的另一方法包括在体积确定的抗体液能有效吸附在支持物上的条件下,使毛细管分配器接触固体支持物将已知体积的捕捉抗体稀释液分散点印在各阵列所选位置,其中用所选择的捕捉抗体稀释液在各阵列所选位置重复该过程从而产生整个阵列。可实施该方法形成多个这样的阵列,其中在每轮重复点印中,溶液沉积步骤应用于多个固体支持物每一个所选位置。这种方法的进一步描述可见,例如,美国专利号 5,807,522。

[0350] 在某些情况中,可利用纸打印装置产生抗体阵列。例如,可将所需的捕捉抗体稀释液加入桌面喷墨打印机的打印头中,打印在合适的固体支持物上(参见,例如 Silzel 等, Clin. Chem., 44:2036-2043(1998))。

[0351] 在一些实施方式中,固体支持物上产生阵列的密度为至少约为 5 个斑点/cm²,优选至少约 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 或 9000、或 10,000 个斑点/cm²。

[0352] 在某些情况中,固体支持物上的斑点各自代表不同的捕捉抗体。在某些其它情况中,固体支持物上的多个斑点代表相同的捕捉抗体,例如含有一系列浓度递降的系列稀释捕捉抗体。

[0353] 制备和构建固相支持物抗体阵列的方法的其它实施例描述参见美国专利号 6,197,599、6,777,239、6,780,582、6,897,073、7,179,638 和 7,192,720;美国专利公布号 20060115810、20060263837、20060292680 和 20070054326;和 Varnum 等, Methods Mol. Biol., 264:161-172(2004)。

[0354] 扫描抗体阵列的方法是本领域已知的,包括但不限于扫描蛋白质或核酸阵列的

任何技术。适用于本发明的微阵列扫描仪可购自马萨诸塞州波士顿的帕金埃尔默公司 (PerkinElmer)、加利福尼亚州帕洛阿尔托市安捷伦技术公司 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)、华盛顿州伊萨夸的应用精确公司 (Applied Precision, Issaquah, WA)、马萨诸塞州比尔里卡市的 GSIL 公司 (GSI Lumonics Inc., Billerica, MA) 和加利福尼亚州联盟城的阿克桑仪器公司 (Axon Instruments, Union City, CA)。用于荧光检测的 GSI 扫描阵列 3000 是非限制性例子,其可与 ImaGene 软件一起用于定量测定。

[0355] VI. V. 单一检测试验

[0356] 在一些实施方式中,检测肿瘤细胞,例如实体瘤循环细胞的细胞提取物中感兴趣特定分析物(例如,信号转导分子)活化状态的试验,是具有优秀动态范围的多重高通量双抗体试验。作为非限制性例子,用于所述试验的两种抗体可包括:(1)分析物的特异性捕捉抗体;和(2)分析物活化形式的特异性检测抗体(即,活化状态依赖性抗体)。活化状态依赖性抗体能检测,例如分析物的磷酸化、遍在蛋白化和/或复合状态。或者,检测抗体包括活化状态非依赖抗体,能检测细胞提取物中分析物的总量。活化状态非依赖抗体通常能检测分析物的活化和未活化状态。

[0357] 在一优选的实施方式中,所述双-抗体试验包括:

[0358] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种系列稀释液一起培育,形成多种被捕捉分析物;

[0359] (ii) 将多个被捕获的分析物与相应分析物的活化状态依赖性特异性抗体一起培育,形成多种可检测的被捕获分析物;

[0360] (iii) 将多种可检测的被捕获分析物与信号放大对第一和第二成员一起培育,产生放大的信号;和

[0361] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0362] 本文所述双-抗体试验通常是包含不同浓度范围的多个捕捉抗体的抗体阵列,捕捉抗体偶联于固体支持物表面的不同可寻址位置上。本发明所用的合适固体支持物的例子如上所述。

[0363] 就分析物结合而言,捕捉抗体和检测抗体的选择宜尽量减少它们之间的竞争(即,捕捉和检测抗体二者同时结合它们相应的信号转导分子)。

[0364] 在一个实施方式中,检测抗体包括结合对的第一成员(例如,生物素),而信号放大对的第一成员包括该结合对的第二成员(例如,链霉亲和素)。可用本领域熟知的方法将结合对成员直接或间接偶联于检测抗体或信号放大对的第一成员。在某些情况中,信号放大对第一成员是过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶、氯过氧化物酶、细胞色素 c 过氧化物酶、嗜曙红细胞过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、乳过氧化物酶、髓过氧化物酶、甲状腺过氧化物酶、脱碘酶等),而信号放大对第二成员是酪酰胺(tyramide)试剂(例如,生物素-酪酰胺)。在这些例子中,过氧化物酶在过氧化氢(H₂O₂)存在下氧化酪酰胺试剂产生活化的酪酰胺,从而产生放大的信号。

[0365] 可直接检测活化的酪酰胺,或加入信号检测试剂,例如链霉亲和素-标记的荧光团或链霉亲和素-标记的过氧化物酶和显色试剂的组合后检测。适用于本发明的荧光团的例子包括但不限于:Alexa Fluor[®]染料(例如,Alexa Fluor[®] 555)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green[™];罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明(TRITC)、CyDye[™] 荧光素

(例如, Cy2、Cy3、Cy5) 等。可用本领域熟知的方法将链霉亲和素标记直接或间接偶联于荧光团或过氧化物酶。适用于本发明的显色试剂的非限制性例子包括 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB)、3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB)、2,2' - 连氨基 - 二 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸) (ABTS)、4- 氯 -1- 萘酚 (4CN) 和 / 或卟啉原。

[0366] 实施本文所述双 - 抗体试验的示范性方案见实施例 3。

[0367] 在另一实施方式中, 本发明提供实施上述双 - 抗体试验的试剂盒, 其包含: (a) 束缚于固体支持物上的多种系列稀释捕捉抗体; 和 (b) 多种检测抗体 (例如, 活化状态非依赖抗体和 / 或活化状态依赖性抗体)。在一些例子中, 试剂盒也可装有利用所述试剂盒检测实体瘤循环细胞的多种信号转导分子活化状态的使用说明书。就实施本发明的特定方法而言, 试剂盒还可装有上述任何额外试剂, 例如信号放大对的第一和第二成员、酪酰胺信号放大试剂、洗涤缓冲液等。

[0368] 在双抗体方法的另一个实施方式中, 本发明提供了一种检测截短受体存在的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0369] (a) 将细胞提取物与多个胞外域 (ECD) 结合区特异珠一起培育, 其中所述 ECD 结合区是全长受体的特异区;

[0370] (b) 从细胞提取物中除去多个珠从而除去全长受体, 形成缺乏全长受体的细胞提取物;

[0371] (c) 将不含全长受体的细胞提取物与多个捕捉抗体一起培育, 其中多个捕捉抗体是截短受体胞外域 (ICD) 结合区的特异性抗体, 该多个捕捉抗体被束缚于固体支持物上, 形成多个被捕获的截短受体;

[0372] (d) 将多个被捕获截短受体与相应截短受体的特异性检测抗体一起培育, 形成多个可检测的被捕获截短受体;

[0373] (e) 将多个可检测的被捕获截短受体与信号放大对第一和第二成员一起培育, 产生放大的信号; 和

[0374] (f) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0375] 在某些实施方式中, 所述截短受体是 p95ErbB2, 而相应的全长受体是 ErbB2 (HER-2)。在某些其他方面, 所述多个胞外域 (ECD) 结合区特异性珠包含链霉抗生物素蛋白 - 生物素对, 其中生物素附着于珠, 生物素附着于抗体 (例如, 全长受体 ECD 结合区的特异性抗体)。

[0376] 图 14A 显示, 用抗感兴趣受体胞外域 (ECD) 的抗体包被的珠结合全长受体 (例如 ErbB2), 但不结合截短受体 (例如 p95), 从而通过该试验可除去任何全长受体。图 14B 显示, 截短受体 (例如 p95) 一旦与捕捉抗体结合然后就可利用全长受体 (例如 ErbB2) 胞内域 (ICD) 的特异性检测抗体检测。可所述检测抗体直接偶联于辣根过氧化物酶 (HRP)。然后进行酪酰胺信号放大 (TSA), 而产生检测信号。可以询问的 p95 活化状态有, 例如, 其磷酸化状态、遍在蛋白化状态和 / 或复合状态。

[0377] VII. 邻近双重检测试验

[0378] 在一些实施方式中, 检测肿瘤细胞, 例如实体瘤循环细胞的细胞提取物中感兴趣特定分析物 (例如, 信号转导分子) 活化状态的试验, 是具有优秀动态范围的多重高通量邻近 (即, 三 - 抗体) 试验。作为非限制性例子, 用于邻近试验的三种抗体可包括: (1) 分析

物的特异性捕捉抗体；(2) 分析物活化形式的特异性检测抗体（即，活化状态依赖性抗体）；和(3) 检测分析物总量的检测抗体（即，活化状态非依赖抗体）。活化状态依赖性抗体能检测，例如分析物的磷酸化、遍在蛋白化和 / 或复合状态。活化状态非依赖性抗体通常能检测活化和未活化形式的分析物。

[0379] 在一优选的实施方式中，所述邻近试验包括：

[0380] (i) 将细胞提取物与多个系列稀释捕捉抗体一起培育，形成多个被捕捉分析物；

[0381] (ii) 将多个被捕捉的分析物与检测抗体一起培育，形成多种可检测的被捕捉分析物，所述检测抗体包含相应分析物的特异性多种活化状态非依赖抗体和多种活化状态依赖性抗体，

[0382] 其中所述活化状态非依赖性抗体用辅助分子标记，活化状态依赖性抗体用信号放大对第一成员标记，所述辅助分子能产生传送给信号放大对第一成员并与之反应的氧化剂；

[0383] (iii) 将多个可检测的被捕获分析物与信号放大对第二成员一起培育，产生放大的信号；和

[0384] (iv) 检测信号放大对第一和第二成员产生的放大信号。

[0385] 或者，可用辅助分子标记活化状态依赖性抗体，用信号放大对第一成员标记活化状态非依赖抗体。

[0386] 本文所述的邻近试验通常是包含不同浓度范围的多种不同捕捉抗体的抗体阵列，捕捉抗体偶联于固体支持物表面的不同可寻址位置。本发明所用合适固体支持物的例子如上所述。

[0387] 就分析物结合而言，捕捉抗体、活化状态非依赖抗体和活化状态依赖性抗体的选择最好能尽量减少它们之间的竞争（即，所有抗体可同时结合它们相应的信号转导分子）。

[0388] 在一些实施方式中，活化状态非依赖抗体还包含可检测部分。在这种例子中，可检测部分的含量与细胞提取物中一种或多种分析物的含量相关。可检测部分的例子包括但不限于：荧光标记、化学反应活性标记、酶标记、放射性标记等。可检测标记优选荧光团，例如 Alexa Fluor[®]染料（例如，Alexa Fluor[®] 647）、荧光素、异硫氰酸荧光素（FITC）、Oregon Green[™]；罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明（TRITC）、CyDye[™] 荧光素（例如，Cy2、Cy3、Cy5）等。可用本领域熟知的方法将可检测部分直接或间接偶联于活化状态非依赖抗体。

[0389] 在某些例子中，用辅助分子直接标记活化状态非依赖抗体。可用本领域熟知的方法将辅助分子偶联于活化状态非依赖抗体。本发明所用的合适辅助分子包括能产生传送给（即，引向）辅助分子附近（即，空间上接近或邻近）的另一分子并与之反应（即，结合、被结合或与之形成复合物）的氧化剂的任何分子。辅助分子的例子包括但不限于：酶，例如葡萄糖氧化酶或能催化参与生成分子氧（O₂）作为电子接受体的氧化 / 还原反应的任何其它酶，和光敏剂，例如亚甲蓝、玫瑰红、卟啉类、四方酸（squarate）染料、酞菁类等。氧化剂的非限制性例子包括过氧化氢（H₂O₂）、单态氧和在氧化 / 还原反应中传递氧原子或获得电子的任何其它化合物。优选当两个部分彼此接近时，辅助分子（例如，葡萄糖氧化酶、光敏剂等）在合适底物（例如，葡萄糖、光）存在下产生传送给信号放大对第一成员（例如，辣根过氧化物酶（HRP）、受保护基团保护的半抗原、通过硫醚与酶抑制剂连接而灭活的酶）并与之反应的氧化剂（例如，过氧化氢（H₂O₂）、单态氧等）。

[0390] 在某些其它例子中,活化状态非依赖抗体通过偶联于活化状态非依赖抗体的寡核苷酸接头与偶联于辅助分子的互补寡核苷酸接头之间的杂交而被辅助分子间接标记。可用本领域熟知的方法将寡核苷酸接头偶联于辅助分子或活化状态非依赖抗体。在一些实施方式中,偶联于辅助分子的寡核苷酸接头与偶联于活化状态非依赖抗体的寡核苷酸接头100%互补。在其它实施方式中,例如在严格杂交条件下杂交时,该对寡核苷酸接头可包含至少1、2、3、4、5、6个或更多个错配区。本领域技术人员应知道可将不同分析物的活化状态非依赖特异性抗体偶联于同一寡核苷酸接头或不同寡核苷酸接头。

[0391] 偶联于辅助分子或活化状态非依赖抗体的寡核苷酸接头的长度可以不同。接头序列通常至少长约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、或100个核苷酸。通常产生随机核酸序列以供偶连。作为非限制性例子,可将寡核苷酸接头文库设计成含有三个不同的毗连结构域:间隔结构域、特征结构域和偶联结构域。优选将寡核苷酸接头设计成能有效偶连但不会破坏与之偶联的辅助分子或活化状态非依赖抗体的功能。

[0392] 可将寡核苷酸接头序列设计成能防止或尽量减少在各种试验条件下形成任何二级结构。通常小心监测接头内各区段的解链温度以使它们得以参与整个试验过程。接头序列区段的解链温度范围通常介于1-10°C之间。可用能测定在确定离子浓度下的解链温度、二级结构和发夹结构的计算机算法(例如,OLIGO6.0)来分析各接头内的三种不同结构域。也可分析总的组合序列的结构特征和它们与其它偶联寡核苷酸接头序列的相容性,例如,它们是否会在严格杂交条件下与互补寡核苷酸接头杂交。

[0393] 寡核苷酸接头的间隔区充分隔开了偶联结构域与寡核苷酸交联位点。偶联结构域的功能是,通过核酸杂交将用互补寡核苷酸接头序列标记的分子连接于偶联结构域。可在抗体-分析物(即,抗原)复合物形成前或后进行核酸介导的杂交,从而提供更灵活的试验形式。与许多直接抗体偶联方法不同,较小寡核苷酸连接于抗体或其它分子时,对抗体与其靶分析物的特异性亲和力,或偶联分子的功能影响最低。

[0394] 在一些实施方式中,复杂的多重蛋白质试验可采用寡核苷酸接头的特征序列结构域。可将多种抗体偶联于含不同特征序列的寡核苷酸接头。在多重免疫试验中,可采用合适探针标记的报道寡核苷酸序列来检测多重试验形式中抗体与其抗原之间的交叉反应性。

[0395] 可用几种不同的方法将寡核苷酸接头偶联于抗体或其它分子。例如,可以合成在5'或3'端含巯基的寡核苷酸接头。可用还原剂(例如,TCEP-HCl)使巯基脱保护,用脱盐自旋柱(desalting spin column)纯化得到的接头。可用异质双功能交联接头,例如SMCC将得到的脱保护寡核苷酸接头偶联于抗体或其它类型蛋白质的伯胺。或者,可用水溶性碳二亚胺EDC处理寡核苷酸上的5'-磷酸基团形成磷酸酯,随后偶联于含胺基的分子。在某些例子中,可将3'-核糖残基上的二醇氧化成醛基,然后还原胺化偶联于抗体或其它类型蛋白质的胺基。在某些其它例子中,可合成3'或5'端含有生物素修饰的寡核苷酸接头,而偶联链霉亲和素标记的分子。

[0396] 可用本领域已知的各种技术,例如Usman等,J. Am. Chem. Soc.,109:7845(1987); Scaringe等,Nucl. Acids Res.,18:5433(1990); Wincott等,Nucl. Acids Res.,23:2677-2684(1995);和Wincott等,Methods Mol. Bio.,74:59(1997)所述的那些技术合成寡核苷酸接头。寡核苷酸的合成通常采用核酸保护和偶连基团,例如5'-端的二甲氧基三苯甲基和3'-端的亚磷酰胺基。该领域技术人员知道寡核苷酸合成的合适试剂、核酸脱

保护方法和核酸纯化方法。

[0397] 在某些例子中,用信号放大对的第一成员直接标记活化状态-依赖性抗体。可用本领域熟知的方法将信号放大对成员偶联于活化状态依赖性抗体。在某些其它例子中,可通过偶联于活化状态-依赖性抗体结合对的第一成员与偶联于信号放大对第一成员结合对的第二成员之间的结合,用信号放大对第一成员间接标记活化状态-依赖性抗体。可用本领域熟知的方法将结合对成员(例如,生物素/链霉亲和素)偶联于信号放大对成员或活化状态-依赖性抗体。信号放大对成员的例子包括但不限于:过氧化物酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶、氯过氧化物酶、细胞色素 c 过氧化物酶、嗜曙红细胞过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、乳过氧化物酶、髓过氧化物酶、甲状腺过氧化物酶、脱碘酶等。信号放大对成员的其它例子包括受保护基团保护的半抗原和能通过硫醚与酶抑制剂连接而灭活的酶。

[0398] 在邻近传送(proximity channeling)的一个例子中,辅助分子是葡萄糖氧化酶(GO),信号放大对第一成员是辣根过氧化物酶(HRP)。当GO与底物,例如葡萄糖接触时,可产生氧化剂(即,过氧化氢(H_2O_2))。如果HRP位于GO附近,GO产生的 H_2O_2 传送给HRP与之形成HRP- H_2O_2 复合物,在信号放大对第二成员(例如,化学发光底物,如氨基苯二酰肼或异氨基苯二酰肼;或荧光底物,如酪酰胺(例如,生物素-酪酰胺)、高香草酸或4-羟苯基乙酸)存在下,可产生放大的信号。在邻近试验中利用GO和HRP的方法描述参见,例如Langry等,美国能源部第UCRL-ID-136797号报道(1999)。当生物素-酪酰胺用作信号放大对的第二成员时,HRP- H_2O_2 复合物可氧化酪酰胺产生能共价结合附近亲核残基的反应活性酪酰胺基团。活化的酪酰胺可直接检测或在加入信号检测试剂,例如链霉亲和素-标记的荧光团或链霉亲和素-标记的过氧化物酶和显色试剂的组合后检测。适用于本发明的荧光团的例子包括但不限于:Alexa Fluor[®]染料(例如,Alexa Fluor[®] 555)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green[™];罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明(TRITC)、CyDye[™] 荧光素(例如,Cy2、Cy3、Cy5)等。可用本领域熟知的方法将链霉亲和素标记直接或间接偶联于荧光团或过氧化物酶。适用于本发明的显色试剂的非限制性例子包括3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、2,2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、4-氯-1-萘酚(4CN)和/或卟啉原。

[0399] 在邻近传送的另一例子中,辅助分子是光敏剂,信号放大对第一成员是用多种半抗原标记的大分子,这些半抗原用保护基团保护以防止半抗原与特异性结合伴侣(例如,配体、抗体等)结合。例如,信号放大对成员可以用受保护的生物素、香豆素和/或荧光分子标记的葡聚糖。合适的保护基团包括但不限于:苯氧基-、analino-、烯烃-、硫醚-和烯醚-保护基团。适用于本发明邻近试验的其它光敏剂和受保护的半抗原分子的描述可见美国专利号5,807,675。当用光激发光敏剂时,可产生氧化剂(即,单态氧)。如果半抗原分子位于光敏剂附近,光敏剂产生的单态氧传送给半抗原保护基团的硫醚并与之反应从而产生羰基(酮或醛)和亚磺酸,释放半抗原的保护基团。然后,无保护的半抗原可特异性结合信号放大对第二成员(例如,能产生可检测信号的特异性结合伴侣)。例如,当半抗原是生物素时,其特异性结合伴侣可以是酶标记的链霉亲和素。示范性酶包括:碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、HRP等。洗涤除去未结合的试剂后,通过加入酶的可检测(例如,荧光、化学发光、显色等)底物产生可检测信号,用本领域已知的合适方法及仪器进行检测。或者,

可采用酪酰胺信号放大法放大可检测信号,可直接检测活化的酪酰胺或在加入上述信号检测试剂后检测。

[0400] 在邻近传送的还有另一例子中,辅助分子是光敏剂,信号放大对第一成员是酶-抑制剂复合物。酶和抑制剂(例如,磷酸标记的葡聚糖)通过可切割接头(例如,硫醚)相连。当用光激发光敏剂时,可产生氧化剂(即,单态氧)。如果酶-抑制剂复合物位于光敏剂附近,光敏剂产生的单态氧传送给可切割接头并与之反应,释放出酶的抑制剂从而活化酶。加入酶底物产生可检测信号,或者加入放大试剂产生放大的信号。

[0401] 在邻近传送的进一步例子中,辅助分子是 HRP,信号放大对第一成员是上述受保护的半抗原或酶-抑制剂复合物,保护基团包括对-烷氧基苯酚。加入苯二胺和 H_2O_2 产生的反应活性苯二胺传送给受保护的半抗原或酶-抑制剂复合物,与对-烷氧基苯酚保护基团反应产生暴露的半抗原或反应活性酶。如上所述产生放大的信号并检测(参见例如美国专利号 5,532,138 和 5,445,944)。

[0402] 进行本文所述邻近试验的示范性方案见实施例 4。

[0403] 在另一实施方式中,本发明提供实施上述邻近试验的试剂盒,其装有:(a) 束缚于固体支持物上的多种系列稀释捕捉抗体;和(b) 多种检测抗体(例如,活化状态非依赖抗体和活化状态依赖性抗体)。在一些例子中,试剂盒也可装有用该试剂盒检测实体瘤循环细胞的多种信号转导分子活化状态的使用说明书。试剂盒还可装有实施本发明具体方法的任何上述额外试剂,例如信号放大对的第一和第二成员、酪酰胺信号放大试剂、辅助分子的底物、洗涤缓冲液等。

[0404] VIII. 抗体的产生

[0405] 可采用几种方法产生和选择尚未能商品化购得的抗体,以根据本发明分析肿瘤细胞,例如稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态。例如,一种方法是用本领域已知的蛋白质表达和纯化方法来表达和/或纯化感兴趣的多肽(即,抗原),而另一种方法是用本领域已知的固相肽合成方法来合成感兴趣的多肽。参见,例如,《蛋白质纯化指南》(Guide to Protein Purification),Murray P. Deutcher 编,Meth. Enzymol.,第 182 卷(1990);《固相肽合成》(Solid Peptide Synthesis),Greg B. Fields 编,Meth. Enzymol.,第 289 卷(1997);Kiso 等,Chem. Pharm. Bull.,38:1192-99(1990);Mostafavi 等,Biomed. Pept. 《蛋白质核酸》(Proteins Nucleic Acids),1:255-60,(1995);和 Fujiwara 等,Chem. Pharm. Bull.,44:1326-31(1996)。然后将纯化或合成的多肽注射入例如小鼠或家兔中,产生多克隆或单克隆抗体。本领域技术人员应知道有许多方法可制备抗体,例如 Antibodies, A Laboratory Manual(抗体,实验室手册),Harlow 和 Lane 编,冷泉港实验室,冷泉港,纽约,(1988) 所述。本领域技术人员还应知道也可通过各种方法从遗传信息制备模拟(例如,保留功能性结合区)抗体的结合片段或 Fab 片段。参见,例如 Antibody Engineering: A Practical Approach(抗体工程改造:实用方法),Borrebaeck 编,牛津大学出版社,牛津(1995);和 Huse 等,J. Immunol.,149:3914-3920(1992)。

[0406] 此外,许多出版物报道了利用噬菌体展示技术产生和筛选文库中能结合所选靶抗原的多肽(参见,例如 Cwirla 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,87:6378-6382(1990);Devlin 等,Science,249:404-406(1990);Scott 等,Science,249:386-388(1990);和 Ladner 等,美国专利号 5,571,698)。噬菌体展示方法的基本概念是在噬菌体 DNA 编码的多肽与靶抗原

之间建立物理关联。这种物理关联由噬菌体颗粒提供,其展示的多肽为衣壳的一部分,该衣壳将编码该多肽的噬菌体基因组包裹在内。利用多肽与它们的遗传材料之间建立的这种物理关联得以同时大规模筛选携带不同多肽的非常大量的噬菌体。展示对靶抗原具有亲和力多肽的噬菌体能结合该靶抗原,通过对靶抗原的亲和力筛选富集这些噬菌体。可检测这些噬菌体各自的基因组从而鉴定它们所展示的多肽。用这些方法,可常规大量合成经鉴定对所需靶抗原具有结合亲和力的多肽(参见,例如美国专利号 6,057,098)。

[0407] 然后选择这些方法产生的抗体,首先用纯化的感兴趣多肽抗原筛选抗体的亲和力和特异性,如果需要,比较抗体与不需要结合的其它多肽抗原的亲和力和特异性。筛选方法可包括将纯化的多肽抗原固定在微量滴定板的不同孔中。然后用含有潜在抗体或抗体组的溶液替换各自的微量滴定板孔,培育约 30 分钟到 2 小时。然后洗涤微量滴定板孔,将标记的二抗(例如,偶联碱性磷酸酶的抗-小鼠抗体,如果产生的抗体是小鼠抗体的话)加入各孔培育约 30 分钟,然后洗涤。各孔加入底物后,抗体结合固定多肽抗原的孔显示颜色反应。

[0408] 然后进一步分析如此鉴定的抗体的亲和力和特异性。在开发靶蛋白质的免疫试验中,将纯化的靶蛋白用作标准品,判断用所选抗体的免疫试验的灵敏度和特异性。由于各种抗体的结合亲和力可能不同,例如某些抗体组合可能在空间上彼此干扰,抗体的试验性能可能是比该抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0409] 本领域技术人员应知道可采用许多方法制备抗体或其结合片段,和筛选选择它们对各种感兴趣多肽的亲和力和特异性,但这些方法不改变本发明的范围。

[0410] A. 多克隆抗体

[0411] 优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射感兴趣的多肽和佐剂在动物中产生多克隆抗体。利用双功能或衍生试剂将感兴趣的(小)多肽与在免疫接种动物中具有免疫原性的载体蛋白,例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂偶联方能有效。双功能或衍生试剂的非限制性例子包括马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羧基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基偶联)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 和 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R_1 是不同的烷基。

[0412] 如下混合,例如 $100\text{ }\mu\text{g}$ (对于家兔)或 $5\text{ }\mu\text{g}$ (对于小鼠)抗原或偶联抗原与 3 倍体积的完全弗氏佐剂,将混合液皮下多点注射,用感兴趣多肽或其免疫原性偶联物或衍生物免疫动物。一个月后,用不完全弗氏佐剂配制的含约 1/5 到 1/10 初始量的多肽或其偶联物皮下多点注射加强免疫动物。7-14 天后,动物采血,检验血清的抗体滴度。通常加强免疫动物直至滴度升高至平台。优选用同一多肽的偶联物加强免疫动物,但也可采用与不同免疫原性蛋白质的偶联物和/或通过不同交联剂的偶联物。还可用重组细胞培养制备的融合蛋白偶联物。在某些例子中,可用凝聚剂,例如明矾增强免疫应答。

[0413] B. 单克隆抗体

[0414] 获得的单克隆抗体通常是基本均质的抗体群,即除了可能存在极少量的可能天然发生的突变外,构成该群体的各抗体相同。因此,修饰语“单克隆”指该抗体的性质不是互不相关抗体的混合物。例如,可用 Kohler 等(Nature, 256:495(1975))所述的杂交瘤方法或本领域已知的任何重组 DNA 方法(参见,例如美国专利号 4,816,567)制备单克隆抗体。

[0415] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物(例如,仓鼠)以诱生

或产生能特异性结合免疫所用感兴趣多肽的抗体的淋巴细胞。或者,体外免疫淋巴细胞。然后用合适的融合剂,例如聚乙二醇使免疫的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤细胞(参见,例如 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (单克隆抗体:原理和实施), 学术出版社 (Academic Press), 第 59-103 页 (1986))。59-103 (1986)。将如此制备的杂交瘤细胞接种合适的培养基并培养,所述培养基优选含有能抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT), 杂交瘤细胞的培养基通常含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基) 以防止 HGPRT⁻ 缺陷细胞生长。

[0416] 优选的骨髓瘤细胞是能有效融合、支持选择的抗体产生细胞稳定高水平产生抗体和 / 或对例如 HAT 培养基敏感的那些细胞。用于产生人单克隆抗体的这种优选的骨髓瘤细胞系的例子包括但不限于: 小鼠骨髓瘤细胞系如衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的细胞系 (获自美国加州圣地亚哥的索尔克细胞销售中心 (Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞 (获自美国马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection; Rockville, MD), 以及人骨髓瘤或小鼠-人杂骨髓瘤细胞系 (参见, 例如, Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); 和 Brodeur 等, 《单克隆抗体制造技术和应用》(*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*), MD 公司 (Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 第 51-63 页 (1987))。

[0417] 检验培养杂交瘤细胞的培养基中产生的针对感兴趣多肽的单克隆抗体。优选免疫沉淀或体外结合试验, 例如放射免疫试验 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。可采用, 例如 Munson 等 (*Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)) 的 Scatchard 分析测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0418] 鉴定杂交瘤细胞产生的抗体是否具有所需特异性、亲和力和 / 或活性后, 可用有限稀释法亚克隆杂交瘤细胞, 再用标准方法培养 (参见, 例如 Goding, 单克隆抗体: 原理和实践, 学术出版社, 第 59-103 页 (1986))。用于该目的合适培养基包括, 例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 杂交瘤细胞可在动物体内生长成腹水瘤。可用常规抗体纯化方法, 例如 A 蛋白-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 分离培养基、腹水或血清中亚克隆细胞分泌的单克隆抗体。

[0419] 用常规方法 (例如, 利用能特异性结合编码鼠抗体重链和轻链基因的寡核苷酸探针) 不难分离和测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞可用作这种 DNA 的优选来源。一旦分离, 可将 DNA 置于表达载体中, 然后转染入不会产生抗体的宿主细胞, 例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞, 诱导重组宿主细胞合成单克隆抗体。参见, 例如 Skerra 等, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); 和 Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992)。也可, 例如用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列 (参见, 例如美国专利号 4,816,567; 和 Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), 或通过非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列共价连接于免疫球蛋白编码序列来修饰编码单克隆抗体的 DNA。

[0420] 在进一步的实施方式中, 可从采用, 例如 McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554 (1990); Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991); 和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 描述的技术产生的抗体噬菌体文库, 分离单克隆抗体或抗体片段。通

过链改组产生高亲和力 (nM 范围) 人单克隆抗体的描述见 Marks 等, *BioTechnology*, 10:779-783(1992)。可用组合感染和体内重组作为构建极大噬菌体文库的策略描述见 Waterhouse 等, *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266(1993)。因此, 这些技术是产生单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤方法的可行备选方法。

[0421] C. 人源化抗体

[0422] 人源化非人抗体的方法是本领域已知的。人源化抗体优选引入了非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为“输入”残基, 它们通常取自“输入的”可变区。通过用非人抗体的超变区序列基本取代人抗体的相应序列进行人源化。参见, 例如 Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-327(1988); 和 Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988)。因此, 这种“人源化”抗体是嵌合型抗体 (参见, 例如美国专利号 4,816,567), 其中短于完整的人可变区基本上被非人动物的相应序列取代。实际上, 人源化抗体通常是其中一些超变区残基和可能一些框架区 (FR) 残基被啮齿类抗体的类似部位残基取代的人抗体。

[0423] 降低抗原性重点考虑的问题是如何选择用于制备本文所述人源化抗体的人轻链和重链可变区。可按照所谓的“最佳拟合”方法, 用啮齿动物抗体可变区的序列筛选已知人可变区序列的整个文库。然后, 将最接近啮齿类序列的人序列接受为人源化抗体的人 FR 区 (参见, 例如 Sims 等, *J. Immunol.*, 151:2296(1993); 和 Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一方法采用衍生自所有人抗体轻链或重链特定亚组共有序列的特定 FR。这种相同的 FR 可用于几种不同的人源化抗体 (参见, 例如 Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); 和 Presta 等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

[0424] 人源化抗体保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性也至关重要。为实现此目的, 可利用亲代和人源化序列的三维模型, 通过分析亲代序列和各种概念人源化产物的方法制备人源化抗体。通常可利用现有的免疫球蛋白三维模型, 这是本领域技术人员熟悉的。可利用现有的用于阐明和展示所选择候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些展示以分析在候选免疫球蛋白序列功能中可能发挥作用的残基, 即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的残基。以此方式, 可选择要组合的受者序列和输入的 FR 序列残基, 获得具有所需特征, 例如对靶抗原的亲和力增加的抗体。超变区残基通常直接或特异性地影响抗原结合。

[0425] 本发明考虑了各种形式的人源化抗体。例如, 人源化抗体可以是抗体片段, 例如 Fab 片段。或者, 人源化抗体可以是完整的抗体, 例如完整的 IgA、IgG 或 IgM 抗体。

[0426] D. 人抗体

[0427] 作为人源化的备选方案, 可产生人抗体。在一些实施方式中, 可产生转基因动物 (例如, 小鼠), 免疫后其能产生完全的人抗体库但不产生内源性免疫球蛋白。例如, 已有报道说嵌合型和种系突变型小鼠因抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合缺失导致完全抑制了内源性抗体的产生。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移入这种种系突变型小鼠将导致在抗原刺激后产生人抗体。参见, 例如 Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggermann 等, *Year in Immun.*, 7:33(1993); 和美国专利号 5,591,669、5,589,369 和 5,545,807。

[0428] 或者, 可采用噬菌体展示技术 (参见, 例如 McCafferty 等, *Nature*, 348:

552-553(1990)),用未免疫供者的免疫球蛋白可变(V)区基因库在体外产生人抗体和抗体片段。按照该技术,将抗体V结构域基因框内克隆入丝状噬菌体,例如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因中,在噬菌体颗粒表面上展示为功能抗体片段。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,根据抗体的功能特性进行选择还可选择编码显示那些特性的抗体的基因。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些特性。可以各种形式进行噬菌体展示,如Johnson等(Curr. Opin. Struct. Biol., 3:564-571(1993))所述。一些来源的V-基因区段可用于噬菌体展示。参见,例如Clackson等,Nature, 352:624-628(1991)。可构建未免疫人供者的V基因库,基本上可按照Marks等,J. Mol. Biol., 222:581-597(1991);Griffith等,EMBO J., 12:725-734(1993);和美国专利号5,565,332和5,573,905所述技术,分离针对不同抗原阵列(包括自身抗原)的抗体:

[0429] 在某些例子中,可如美国专利号5,567,610和5,229,275所述通过体外活化B细胞产生人抗体。

[0430] E. 抗体片段

[0431] 业已开发了产生抗体片段的各种技术。通常用蛋白酶解消化完整的抗体获得这些片段(参见,例如Morimoto等,J. Biochem. Biophys. Meth., 24:107-117(1992);和Brennan等,Science, 229:81(1985))。然而,目前已用重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,从上述抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者,可从大肠杆菌细胞直接回收Fab'-SH片段将其化学偶联形成F(ab')₂片段(参见,例如Carter等,BioTechnology, 10:163-167(1992))。按照另一方法,直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。本领域技术人员知道产生抗体片段的其它技术。在其它实施方式中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见,例如PCT公布号W0 93/16185;和美国专利号5,571,894及5,587,458。抗体片段还可以是如美国专利号5,641,870所述的线形抗体。这种线形抗体片段可以是单特异性或双特异性。

[0432] F. 双特异性抗体

[0433] 双特异性抗体是对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。示范性双特异性抗体可结合同一感兴趣多肽的两个不同表位。其它双特异性抗体可同时含有感兴趣多肽的结合位点与一种或多种其它抗原的结合位点。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(例如,F(ab')₂双特异性抗体)。

[0434] 本领域知道制备双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的传统制备方法基于共同表达具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链(参见,例如Millstein等,Nature, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四重杂交瘤)可能产生10种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常须用亲和层析纯化该正确的分子。PCT公布号W0 93/08829和Traunecker等,EMBO J., 10:3655-3659(1991)中描述了类似的方法。

[0435] 按照不同的方法,将含有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定区序列融合,优选与免疫球蛋白重链恒定区融合,从而包含CH2和CH3区、绞链区的至少一部分。优选在至少一种融合抗体中存在含有轻链结合所必须的重链第一恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合和免疫球蛋白轻链(如果需要)的DNA插入不同表达载体中,共同转染入合适的宿主生物。在采用比例不相等的这三种多肽链进行构建以提供最佳产量的实施方式中,如此操作为调节这三种多肽片段的相互比例提供了很大

的灵活性。然而,当等比例的至少两种多肽链的表达可导致高产或当这种比例不特别重要时,可将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0436] 在该方法的优选实施方式中,构成双特异性抗体的一条臂为具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白的重链,另一臂为杂交免疫球蛋白的重链-轻链对(提供第二结合特异性)。这种不对称结构有助于分隔所需双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链缔合,因为只在双特异性分子一半中存在免疫球蛋白轻链从而提供了方便的分离方法。参见,例如 PCT 公布号 WO 94/04690 和 Suresh 等, *Meth. Enzymol.*, 121 :210 (1986)。

[0437] 按照美国专利号 5, 731, 168 所述的另一方法,可工程改造一对抗体分子之间的界面以最大程度提高从重组细胞培养物中回收的异源二聚体百分比。优选的界面包括抗体恒定区的 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中,第一抗体分子界面的一个或多个小侧链氨基酸被较大侧链氨基酸(例如,酪氨酸或色氨酸)替代。通过用侧链较小的氨基酸(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代第二抗体分子界面上的大侧链氨基酸,可产生与该大侧链相同或相似大小的补偿性“空穴”。这为提高异质二聚体的产量超过其它不良终末产物,例如同质二聚体提供了机制。

[0438] 双特异性抗体包括交联的或“异质偶联”的抗体。例如,异质偶联抗体之一可偶联亲和素,另一偶联生物素。可采用方便的交联方法制备异质偶联抗体。合适的交联剂和技术是本领域熟知的,其描述可参见例如美国专利号 4, 676, 980。

[0439] 本领域还知道从抗体片段产生双特异性抗体的合适技术。例如,可利用化学连接制备双特异性抗体。在某些例子中,可蛋白水解切割完整抗体产生 $F(ab')_2$ 片段来产生双特异性抗体(参见,例如 Brennan 等, *Science*, 229 :81 (1985))。在二硫醇复合剂亚砷酸钠存在下还原这些片段可稳定邻近的二硫醇阻止分子间二硫键形成。再将产生的 Fab' 片段转变成巯基硝基苯甲酸酯(thionitrobenzoate, TNB) 衍生物。然后用巯基乙胺还原将 Fab' -TNB 衍生物之一再转变成 Fab' -硫醇,与等摩尔量的另一 Fab' -TNB 衍生物混合从而形成双特异性抗体。

[0440] 在一些实施方式中,可从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段,将其化学偶联以形成双特异性抗体。例如,可用 Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992) 所述的方法制备完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。217-225 (1992)。各 Fab' 片段分别从大肠杆菌细胞分泌,对其进行体外定向化学偶连而形成双特异性抗体。

[0441] 从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已有描述。例如,利用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。参见,例如 Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148 : 1547-1553 (1992)。Fos 和 Jun 蛋白质的亮氨酸拉链肽通过基因融合连接于两种不同抗体的 Fab' 部分。在绞链区还原该同质二聚体抗体形成单体,然后再氧化产生异质二聚体抗体。也可用该方法产生同质二聚体抗体。Hollinger 等 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 6444-6448 (1993)) 所述的“二抗体(diabody)”技术为制备双特异性抗体片段提供了另一种机制。这些片段包含通过接头与轻链可变区(VL)相连的重链可变区(VH),所述接头太短不允许同一链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的 VH 和 VL 结构域被迫与另一片段的互补 VL 和 VH 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。利用单链 Fv(sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略描述参见 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152 :5368 (1994)。

[0442] 还考虑了两价以上的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。参见,例如 Tutt 等,

J. Immunol., 147 :60 (1991)。

[0443] G. 抗体纯化

[0444] 当采用重组技术时,可在分离的宿主细胞内、宿主细胞的周质间隙中产生抗体,或从宿主细胞直接分泌到培养基中。如果胞内产生抗体,应先通过,例如离心或超滤除去颗粒和碎片。Carter 等 (BioTech., 10 :163-167 (1992)) 描述了分泌入大肠杆菌周质间隙中的抗体的分离方法。简言之,在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 存在下,融化细胞沉淀糊 (cell paste) 约 30 分钟,离心除去细胞碎片。当抗体分泌入培养基中时,通常用可商品化购得的蛋白质浓缩过滤器,例如阿米康 (Amicon) 或 MP 超滤单元 (Millipore Pellicon ultrafiltration unit) 浓缩这种表达系统的上清液。前述任一步骤中可加入蛋白酶抑制剂,例如 PMSF 来抑制蛋白水解,也可加入抗生素来防止外来污染物的生长。

[0445] 可采用,例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析纯化用细胞制备的抗体组合物。A 蛋白作为亲和配体是否合适取决于抗体免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。可用 A 蛋白纯化含人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (参见,例如 Lindmark 等, J. Immunol. Meth., 62 :1-13 (1983))。对于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$,推荐 G 蛋白 (参见,例如 Guss 等, EMBO J., 5 :1567-1575 (1986))。连接亲和配体的基质多为琼脂糖,但也可用其它基质。与琼脂糖相比,机械上稳定的基质,例如可控孔玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯基) 苯的流速较快和加工时间较短。如果抗体包含 CH3 结构域,可用新泽西州费利浦斯勃格市 JTB 公司 (J. T. Baker ;Phillipsburg, N. J.) 的 Bakerbond ABX™ 树脂纯化。根据待回收的抗体,还可采用蛋白质纯化的其它技术,例如用离子交换柱分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、二氧化硅层析、肝素 SEPHAROSE™ 层析、阴离子或阳离子交换树脂 (例如,聚天冬氨酸柱) 层析、色谱聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0446] 初步纯化步骤后,可对含感兴趣抗体和污染物的混合液进行低 pH 疏水相互作用层析,所用洗脱缓冲液的 pH 为 2.5-4.5,优选在低盐浓度下 (例如,约 0-0.25M 盐) 进行。

[0447] 本领域技术人员应知道功能与抗体相似的任何结合分子,例如样品中一种或多种感兴趣分析物的特异性结合分子或结合伴侣也可用于本发明方法和组合物中。合适的抗体-样分子的例子包括但不限于:结构域抗体 (domain antibody)、单片式抗体 (unibody)、纳米抗体 (nanobody)、鲨抗原反应活性蛋白质 (shark antigen reactive protein)、阿微莫 (avimers)、阿德耐汀 (adnectins)、安替卡莫斯 (anticalms)、亲和配体、菲乐莫斯 (phylomers)、适体、埃飞体 (affibodies)、特里耐汀 (trinectins) 等。

[0448] IX. 给药方法

[0449] 按照本发明,可用本领域已知的任何便利方法将本文所述的抗癌药给予对象。可用本发明方法选择合适的抗癌药或抗癌药组合治疗对象的肿瘤 (例如,乳腺肿瘤)。还可用于本发明方法鉴定对象肿瘤 (例如,乳腺肿瘤) 对抗癌药或抗癌药组合治疗的反应。此外,可用本发明方法预测患肿瘤 (例如,乳腺肿瘤) 对象对抗癌药或抗癌药组合治疗的反应。本领域技术人员应知道可单独给予本文所述的抗癌药或作为组合治疗方法的一部分与常规化疗、放疗、激素治疗、免疫治疗和 / 或外科手术一起给予。

[0450] 在某些实施方式中,抗癌药包括抗信号转导药物 (即,细胞稳定药),例如单克隆抗体或酪氨酸激酶抑制剂;抗-增殖剂;化疗剂 (即,细胞毒性药物);激素治疗剂;放疗剂;疫苗;和 / 或能减少或消除异常细胞,例如癌细胞不受控制生长的任何其它化合物。在一些

实施方式中,联用抗-信号转导药物、抗增殖剂和/或激素治疗剂中的一种或多种与至少一种化疗剂治疗对象。示范性的单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、抗-增殖剂、化疗剂、激素治疗剂、放疗剂和疫苗如上所述。

[0451] 在一些实施方式中,也可共同给予本文所述的抗癌药与常规免疫治疗剂,所述免疫治疗剂包括但不限于:免疫刺激剂(例如,卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白介素-2、 α -干扰素等)、免疫毒素(例如,抗-CD33 单克隆抗体-刺孢霉素偶联物、抗-CD22 单克隆抗体-假单胞菌外毒素偶联物等)、和放射性免疫治疗剂(例如,与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 偶联的抗-CD20 单克隆抗体等)。

[0452] 视需要一起给予的抗癌药与合适的药物赋形剂,可通过任何可接受的给药方式进行。因此,给药可以是,例如口服、口腔含化、舌下、经牙龈、经上颚、静脉内、局部、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、胃肠外、小动脉内、真皮内、心室内、颅内、腹膜内、膀胱内、鞘内、病损内、鼻内、经直肠、经阴道、或吸入。“共同-给予”表示在给予第二药物(例如,另一种抗癌药、用于减轻抗癌药副作用的药物、放疗剂、激素治疗剂、免疫治疗剂等)的同时,之前或之后给予抗癌药。

[0453] 可反复多次,例如至少 2、3、4、5、6、7、8 或更多次给予治疗有效量的抗癌物,或者可通过连续输注给予该剂量。剂型可采取固体、半固体、冻干粉末或液体剂型,例如片剂、丸剂、小药丸、胶囊、粉末、溶液、混悬液、乳液、栓剂、驻留灌肠剂(retention enemas)、乳膏、软膏、洗剂、凝胶、气溶胶、泡沫等,优选一次给予含精确剂量的单位剂型。

[0454] 本文所用的术语“单位剂型”指适合用作人对象和其它哺乳动物的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有经计算能产生所需效果、耐受性和/或疗效的预定量抗癌药和合适的药物赋形剂(例如,安瓿)。此外,可制备浓缩剂型,然后用其制备稀释的单位剂型。因此,浓缩剂型可含有基本上多于,例如至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多倍的抗癌药含量。

[0455] 本领域技术人员知道制备这类剂型的方法(参见,例如雷明顿药物科学,第 18 版,马克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿(Easton),宾夕法尼州(1990))。各剂型通常包含常规药物运载体或赋形剂,也可包含其它医学制剂、运载体、辅佐剂、稀释剂、组织渗透增强剂、增溶剂等。可用本领域熟知的方法为某给药途径的特定剂型,定制合适的赋形剂(参见,例如雷明顿药物科学,同上)。

[0456] 合适赋形剂的例子包括但不限于:乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、和聚丙烯酸,例如卡巴浦尔(Carbopol,聚羧乙烯),如卡巴浦尔 941、卡巴浦尔 980、卡巴浦尔 981 等。这些剂型也可包含润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂;助悬剂;防腐剂,例如羟基苯甲酸甲酯、乙酯和丙酯(即,对羟基苯甲酸酯类);pH 调节剂,例如无机和有机酸和碱;甜味剂;和调味剂。这些剂型也可包括生物可降解的聚合物珠、葡聚糖和环糊精包埋复合物。

[0457] 对于口服给药,治疗有效剂量的剂型可以是片剂、胶囊、乳剂、混悬液、溶液、糖浆、喷雾剂、锭剂、粉末和缓释剂型。用于口服给药的合适赋形剂包括药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠(sodium saccharine)、滑石粉、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0458] 在一些实施方式中,治疗有效剂量采取丸剂、片剂或胶囊剂型,因此,该剂型可含有抗癌药和以下任何一种:稀释剂,例如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等;崩解剂,例如淀粉或其衍生物;润滑剂,例如硬脂酸镁等;和粘合剂,例如淀粉、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素及其衍生物。也可例如用聚乙二醇(PEG)运载体将抗癌药配制成栓剂。

[0459] 可将抗癌药和任选的一种或多种药学上可接受的辅佐剂溶解或分散于运载体,例如盐水(例如,0.9% w/v 氯化钠)、水性右旋糖、甘油、乙醇等中,制备成液体剂型,形成用于例如口服、局部或静脉内给药的溶液或混悬液。也可将抗癌药配制成驻留灌肠剂。

[0460] 对于局部给药,治疗有效量的剂型可以是乳剂、洗剂、凝胶、泡沫、乳膏、凝胶剂、溶液、混悬液、软膏和经皮贴剂。对于吸入给药,可将抗癌药的干粉或液体通过喷雾器递送。对于胃肠外给药,治疗有效剂量的药物可采取无菌可注射溶液和无菌包装粉末剂型。优选配制成 pH 约 4.5-7.5 的可注射溶液。

[0461] 也可用冻干剂型提供治疗有效剂量。这种剂型可包含缓冲剂,例如碳酸氢盐,可在给药前重建,或者可在冻干剂型中包含缓冲剂以使用(例如)水重建。冻干剂型中也可包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。可用注射器提供冻干剂型,任选与用于重建的缓冲液一起包装,从而可将重建的剂型立即给予对象。

[0462] 也可以间隔一定的时间监测对象评估某些治疗方案的效果。例如,某些信号转导分子的活化状态可能因用本文所述一种或多种抗癌药治疗的效果而改变。可监测对象,评估治疗反应和了解某些药物或治疗在个体化方法中的效果。此外,最初对特定抗癌药或抗癌药组合有反应的对象也可能变得对该药物或药物组合难治,提示这些对象产生了获得性耐药。可停止这些对象的当前治疗,并按照本发明方法处方进行另一种治疗。

[0463] 在某些方面,本文所述方法可与多个基因表达标记面板联用,来预测各类妇女人群(例如淋巴结转移阴性)的乳腺癌预后和/或复发概率。可利用这些基因面板鉴定那些不可能复发,因此不可能从辅助化疗获益的妇女。可利用这些基因表达面板来鉴定哪些妇女可以安全地避免辅助化疗,而对无病妇女以及总体存活结果不会有不良影响。合适的系统包括但不限于:Oncotype DX™(GH 公司(Genomic Health, Inc.)制造的 21 种基因面板); **MammaPrint®** (Agendia 公司制造的 70 种基因面板;以及 Veridex 的 76 种基因面板)。

[0464] 此外,在某些其他方面,本文所述方法可与能鉴定未知原发性癌症(CUP)原始肿瘤的基因表达标记面板联用。这些基因面板可用来鉴定可能从治疗中获益的转移癌妇女,所述治疗与给予最初被诊断为乳腺癌的妇女的治疗相同。合适的系统包括但不限于 Avicara CancerTYPE ID 试验,这是一种基于 RT-PCR 的表达试验,能测量 92 种基因从而鉴定 39 种类型的肿瘤原发部位;以及 **Pathwork®** 起源组织试验(Tissue of Origin Test),它用微阵列能检测超过 1600 种基因的表达,并将肿瘤基因表达的“特征”与 15 种已知组织类型的表达进行比较。

[0465] X. 实施例

[0466] 提供以下实施例是为了说明而非限制本发明。

[0467] 实施例 1. 循环细胞的分离、刺激和裂解

[0468] 实体瘤循环细胞包括从实体瘤转移或微小转移的细胞,包括循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)和/或迁移至肿瘤的细胞(例如,循环内皮祖细胞(CEPC)、循环内皮细胞(CEC)、循环性前-血管骨髓细胞、循环树突细胞等)。含有循环细胞的患者样品可获自

任何可得的生物学液体（例如，全血、血清、血浆、导管灌洗液、乳头抽吸物、淋巴、尿液、唾液、细针抽吸物等）。可采用一种或多种分离方法，例如免疫磁性分离（参见，例如 Racila 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :4589-4594(1998) ;Bilkenroth 等，Int. J. Cancer, 92 :577-582(2001)）、宾夕法尼亚州亨廷顿谷伊穆尼康 (Immunicon) 公司的 CellTrack™ 系统、微流体分离（参见，例如 Mohamed 等，IEEE Trans. Nanobiosci., 3 :251-256(2004) ;Lin 等，第 5147 号摘要，第 97 届 AACR 年会，华盛顿，哥伦比亚特区，(2006)）、FACS（参见，例如 Mancuso 等，Blood, 97 :3658-3661(2001)）、密度梯度离心（参见，例如 Baker 等，Clin. Cancer Res., 13 :4865-4871(2003)）和消除法（参见，例如 Meye 等，Int. J. Oncol., 21 :521-530(2002)）分离患者样品的循环细胞。

[0469] 手工分离 CTC：

[0470] CTC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行以下活化试验：

[0471] 1) 采用预先偶联了抗 -EpCAM 单克隆抗体（科地亚生命科学公司 (Kordia Life Sciences) ;莱顿 (Leiden), 荷兰) 的磁珠 (Dyna1 M450 ;戴纳公司 (Dyna1AS) ;奥斯陆, 挪威)。或者可采用多克隆抗体或混合的单克隆抗体偶联的这种珠。

[0472] 2) 恰在使用前，用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0473] 3) 将 25 μ l 预包被的 Dyna 珠加入 1ml 样品中。

[0474] 4) 2-8℃ 培育混合物 20 分钟，同时轻柔翻转和转动。

[0475] 5) 将试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中 2 分钟。

[0476] 6) 吸弃上清液，重悬于含 0.01% BSA 的 PBS，洗涤结合珠的细胞三次，然后进行磁性分离。

[0477] 7) 将样品重悬于 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0478] 样品制备：

[0479] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免污染被刺破静脉释放的上皮细胞。

[0480] 2) 用前以 0.9% NaCl 稀释 1ml 全血 3 倍。

[0481] 对照品制备：

[0482] 1) 将人癌细胞系加入 HL-60 细胞，制备对照细胞系。

[0483] 2) 将人癌细胞系加入健康献血员的全血，制备对照细胞系。

[0484] 手工分离 CEC 和 CEPC：

[0485] 作为非限制性例子，可采用 Beerepoot 等 (Ann. Oncology, 15 :139-145(2004)) 所述的免疫磁性分离 / 富集技术分离活的 CEC 和 CEPC。简言之，将外周血与预先偶联了抗 -CD146 单克隆抗体（科地亚生命科学公司）的磁珠 (Dyna1 M450IgG₁) 一起培育。该抗体识别外周血中所有谱系的内皮细胞，但不识别造血或上皮细胞 (George 等，J. Immunol. Meth., 139 :65-75(1991))。可先进行造血和上皮细胞的负选择，再用偶联了合适抗体的磁珠（例如，用于去除白细胞的 Dyna1-CD45 珠，用于去除单核细胞的 Dyna1-CD14 珠，用于去除上皮细胞的 Dyna1-EpCAM(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司 (Invitrogen, Carlsbad, CA)) 进行正选择。在该实施例中，只采用正选择。

[0486] CEC 和 CEPC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行以下活化试验：

[0487] 1) 采用预先偶联了抗 -CD146 单克隆抗体（科地亚生命科学公司）的磁珠 (Dyna1

M450)。

[0488] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0489] 3) 在 1ml 样品中加入 25 微升预包被 Dyna 珠。

[0490] 4) 2-8℃ 培育混合物 20 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0491] 5) 将试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中 2 分钟。

[0492] 6) 吸弃上清液,重悬于含 0.01% BSA 的 PBS 中,洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0493] 7) 将样品重悬于 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0494] 样品制备:

[0495] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免污染被刺破静脉所释放的内皮细胞。

[0496] 2) 用前以 0.9% NaCl 稀释 1ml 全血 3 倍。

[0497] 对照品制备:

[0498] 1) 将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 加入 HL-60 细胞,制备对照细胞系。

[0499] 2) 将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 加入健康个体捐献的全血,制备对照细胞系。

[0500] 手工分离 CEPC (无:CEC):

[0501] CEPC 是能对各种血管原性生长因子反应,分化成为成熟内皮细胞的骨髓衍生祖细胞的循环亚型。可用能识别表面标记 CD34 的抗体进行选择来分离 CEPC。CD133 是区别不成熟的内皮祖细胞 (EPC) 或原始造血干细胞 (HSC) 与 CEPC 的表面标记。利用贴壁培养或磁性微珠分离不同来源 CEPC 的各种方法已见描述。在该实施例中,采用 Asahara 等 (Science, 275 :964-967 (1997)) 描述的改进方案。

[0502] CEPC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行活化试验:

[0503] 1) 采用磁珠 (Dyna1 M450CD34)。用 CD34 表面抗原的特异性单克隆抗体包被这些珠。

[0504] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0505] 3) 在 1ml 样品中加入 25 微升预包被的 Dyna 珠。

[0506] 4) 2-8℃ 培育混合物 20 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0507] 5) 将试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中 2 分钟。

[0508] 6) 吸弃上清液,重悬于含 0.01% BSA 的 PBS 中,洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0509] 7) 将样品重悬于 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0510] 样品制备:

[0511] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免污染被刺破静脉释放的内皮细胞。

[0512] 2) 用平衡盐溶液 1 : 1 稀释 10ml 血液。

[0513] 3) 将 4ml 稀释的血液叠加在 10ml 试管中的 3ml Ficoll-Paque 上。

[0514] 4) 18-20℃, 400x g 离心试管 30-40 分钟。

[0515] 5) 用无菌巴斯德移液管吸取含血浆和血小板的上层,不扰乱界面的单个核细胞层。

[0516] 6) 用无菌移液管将单个核细胞转移至无菌离心管中。

[0517] 7) 加入 6ml 平衡盐溶液,小心地重悬细胞。

[0518] 8) 18-20℃, 60-100x g 离心混合液 10 分钟。

[0519] 9) 吸弃上清液,将各试管的单个核细胞重悬于 1ml PBS 中。

[0520] 用维里德克丝系统分离 CTC、CEC 和 CEPC:

[0521] 新泽西州沃伦市维里德克丝公司 (Veridex, LLC, Warren, NJ) 出售的 CellSearch 系统,由**CellTracks® AutoPrep®**系统、CellSearch™ 上皮细胞试剂盒和**CellTracks®**分析仪构成。**CellTracks® AutoPrep®**系统是半自动化样品制备系统 (Kagan 等, J. Clin. Ligand Assay, 25 :104-110 (2002))。CellSearch™ 上皮细胞试剂盒的构成有:包被了上皮细胞抗 -EpCAM 特异性抗体的铁磁流体;藻红蛋白-偶联的细胞角蛋白 8、18 和 19 抗体;偶联于别藻蓝蛋白的抗 -CD45 抗体;DAPI 染料;和用于洗涤、渗透和重悬细胞的缓冲液。该实施例所用方案的描述见 Allard 等, Clin. Cancer Res., 10 :6897-6904 (2004)。完整的维里德克丝系统可用于 CTC 计数,或者用**CellTracks® AutoPrep®**系统分离后手工取出样品,完整的维里德克丝系统可提供分离方法,然后分析途径的活化状态。CTC 的数量可为算法开发提供信息。

[0522] 维里德克丝系统 -CTC 富集后进行计数:

[0523] 1) 将 7.5ml 血液与 6ml 缓冲液混合,800x g 离心 10 分钟,然后置于 **CellTracks® AutoPrep®**系统上。

[0524] 2) 仪器吸弃上清液后,仪器加入铁磁流体。

[0525] 3) 仪器进行培育和随后的磁性分离步骤。

[0526] 4) 吸弃未结合的细胞和残留血浆。

[0527] 5) 加入染色试剂和渗透缓冲液,以便荧光染色。

[0528] 6) 培育该体系后,再次磁性分离细胞,重悬于**MagNest®**细胞提呈装置。

[0529] 7) 然后将**MagNest®**细胞提呈装置置于**CellTracks®**分析仪(一种 4-色半自动化荧光显微镜)中。

[0530] 8) 获取符合维里德克丝规定标准的图像,通过网络浏览器显示以供最终的手工选择。

[0531] 9) 细胞计数的结果表示为每 7.5ml 血液的细胞含量。维里德克丝系统 -CTC 富集后进行活化试验:

[0532] 1) 将 7.5ml 血液与 6ml 缓冲液混合,800x g 离心 10 分钟,然后置于 **CellTracks® AutoPrep®**系统上。

[0533] 2) 仪器吸弃上清液后,仪器加入铁磁流体。

[0534] 3) 仪器进行培育和随后的磁性分离步骤。

[0535] 4) 吸弃未结合的细胞和残留血浆。

[0536] 5) 将样品重悬于 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0537] 维里德克丝系统 -CEC 和 CEPC 富集后进行活化试验:

[0538] 1) 1) 维里德克丝公司提供利用抗 -CD146 抗体捕捉的 CellSearch™ 内皮细胞试剂盒 (CellSearch™ Endothelial Cell Kit)。CellSearch™ 内皮细胞试剂盒与

CellTracks® AutoPrep®系统联用来制备血液样品,与**CellTracks®**分析仪联用,计数和特征分析全血中的 CEC 和 CEPC。该方案与 CellSearch™ 上皮细胞试剂盒的相同。

[0539] 样品制备:

[0540] 1) 举例:1) 按照生产商使用说明书将人对象的外周血抽入 CellSave 保存试管。弃去最初的 3-5ml 以免污染被刺破静脉释放的上皮或内皮细胞。

[0541] 2) 途径分析:将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免污染被刺破静脉释放的上皮或内皮细胞。

[0542] 手工分离 CSC:

[0543] 有证据显示肿瘤含有一小群具有独特自我更新和存活机制的假定癌症干细胞(参见,例如 Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28(2004);Reya 等, Nature, 414:105-111(2001);Dontu 等, Trends Endocrinol. Metab., 15:193-197(2004);和 Dick, Nature, 423:231-233(2003))。癌症干细胞(CSC)可以休眠状态长期存在,使得它们耐受靶向分裂细胞的化疗药物。这种癌症启动细胞群的特征是自我更新和存活途径活化,从而可用靶向治疗选择性除去它们。已描述了利用贴壁培养或磁性微珠分离 CSC 的方法。在本实施例中,采用由 Cote 等(Clin. Can. Res., 12:5615(2006))所述改进的方案。

[0544] 免疫磁性 CSC 分离-手工分离后进行活化试验:

[0545] 1) 采用磁珠(戴纳公司,奥斯陆,挪威)。用 CD34 或 CD133 表面抗原的特异性单克隆抗体包被这些珠。

[0546] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0547] 3) 将 $1-10^7$ 个预包被的 Dyna 珠加入 3ml 样品中。

[0548] 4) 2-8°C 培育混合物 60 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0549] 5) 将混合物分成 1ml 等份,将各试管置于磁性分离器(MPL-1 磁体)中至少 6 分钟。

[0550] 6) 吸弃上清液,重悬于含 0.01% BSA 的 PBS 中,洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0551] 7) 将样品重悬于 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0552] 样品制备:

[0553] 1) 患者知情同意后获得早期乳腺癌患者的骨髓标本。

[0554] 2) 如 Bauer 等, Clin. Can. Res., 6:3552-3559(2000)) 所述加工骨髓抽吸物。采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心,用 Beckman GS-6 离心机以 4000x g 离心 35 分钟,用 PBS 洗涤两次,富集含播散肿瘤细胞的单个核细胞组分。

[0555] 分离的 CTC 的细胞刺激和裂解:

[0556] 细胞刺激:

[0557] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞,37°C 培育 5 分钟。

[0558] 用药物处理刺激细胞:

[0559] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0560] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞,37°C

培育 5 分钟。

[0561] 用药物处理刺激细胞（反馈环）：

[0562] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0563] 2) 后后加入 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞, 37℃ 培育 120 分钟。

[0564] 采用以下方案裂解经刺激的 CTC：

[0565] 1) 混合表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0566] 2) 最后一次洗涤细胞后, 在冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液中。

[0567] 3) 冰上培育 30 分钟。

[0568] 4) 用微型离心机以最大转速离心混合物 10 分钟, 分离珠和裂解液。

[0569] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80℃ 保存。

[0570] 表 3

[0571] 裂解缓冲液配方 (10ml)

	试剂	贮藏液浓度	终浓度	体积
[0572]	10%曲通 X-100	10	1	1.00
	1M Tris, pH 7.5	1	0.05	0.05
	1M NaF	1	0.05	0.05
	5M NaCl	5	0.1	0.20
	2M B-甘油磷酸酯	1	0.05	0.50
	0.1M Na ₃ VO ₄	0.1	0.001	0.10
	1 mg/ml 抑胃肽酶	1	0.10	
	完全的迷你蛋白酶			1 片
	0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
			总计 (ml)	3.00
			水 (ml)	7.00

[0573] 分离的 CEC 和 / 或 CEPC 的细胞刺激和裂解：

[0574] 据认为 VEGF 能通过活化 CEPC(Larrivee 等, J. Biol. Chem., 278 : 22006-22013(2003)) 和血管壁脱落的成熟 CEC(Solovey 等, Blood, 93 : 3824-3830(1999)) 的抗凋亡途径而促进存活。VEGF 也能刺激 CEPC 或成熟 CEC 的增殖, 虽然与 CEPC 相比, 成熟 CEC 看来只有有限的增殖能力 (Lin 等, J. Clin. Invest., 105 : 71-77(2000))。由于这三个原因, 将细胞与 VEGF 家族生长因子一起培育, 活化 CEC 和 / 或 CEPC, 然后裂解细胞。

[0575] 细胞刺激：

[0576] 1) 将各 100nM 的生长因子 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 加入细胞, 37℃ 培育 5 分钟。

[0577] 用药物处理刺激细胞：

[0578] 1) 将样品与治疗有效浓度的贝伐单抗、索拉芬尼、苏尼替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0579] 2) 然后通过加入各 100nM 的因子 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 刺激细胞, 37℃

培育 5 分钟。

[0580] 用药物处理刺激细胞（反馈环）：

[0581] 1) 将样品与治疗有效浓度的贝伐单抗、索拉芬尼、苏尼替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0582] 2) 然后加入各 100nM 的 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 刺激细胞, 37℃ 培育 120 分钟。

[0583] 采用以下方案裂解分离的 CEC 和 / 或 CEPC 细胞：

[0584] 1) 混合表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0585] 2) 最后一次洗涤细胞后, 置冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液。

[0586] 3) 在冰上培育 30 分钟。

[0587] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟, 分离珠和裂解液。

[0588] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80℃ 保存。

[0589] 分离的 CSC 的细胞刺激和裂解：

[0590] 刺激细胞：

[0591] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 加入细胞 37℃ 培育 5 分钟。

[0592] 用药物处理刺激细胞：

[0593] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0594] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 刺激细胞, 37℃ 培育 5 分钟。

[0595] 用药物处理刺激细胞（反馈环）：

[0596] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0597] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 刺激细胞, 37℃ 培育 120 分钟。

[0598] 采用以下方案裂解分离的 CSC 细胞：

[0599] 1) 混合表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0600] 2) 最后一次洗涤细胞后, 置冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液。

[0601] 3) 在冰上培育 30 分钟。

[0602] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟, 分离珠和裂解液。

[0603] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80℃ 保存。

[0604] 实施例 2 制备组织、活检样品或原代培养物的肿瘤细胞提取物

[0605] 本实施例说明了分离、刺激和裂解肿瘤组织或活检标本中的细胞的方法。本实施例还说明了启动、刺激和裂解分离自组织、活检样品或全血的肿瘤细胞原代培养物的方法。分离和培养生物学标本中的肿瘤细胞以供筛选化疗剂的其它方法描述可参见, 例如美国专利号 5, 728, 541 ; 6, 416, 967 ; 6, 887, 680 ; 6, 900, 027 ; 6, 933, 129 ; 和 7, 112, 415 ; 和美国专利公布号 20040023375 及 20050202411。按照本实施例制备的细胞提取物可用于本文所述的单一检测或邻近试验。

[0606] 分离原代或转移组织的肿瘤细胞：

[0607] 细胞分离和培养：

[0608] 1) 手术收集约 5-100mg 无坏死、无污染的肿瘤组织，置于含有无菌细胞培养基（例如，含 10% FBS 和抗生素的 RPMI-1640）的 100ml 瓶中。

[0609] 2) 室温下，样品须在提取后 72 小时内保存或运输。

[0610] 3) 用细胞培养基清洗样品三次。

[0611] 4) 用手术刀将组织切成小片，然后使其通过细孔筛网分解成细胞悬液。

[0612] 5) 或者，用含抗生素的无血清细胞培养基稀释的含 0.25% 胶原酶 II 和 0.001% DNA 酶的混合液处理切碎的组织，轻柔搅拌培育 15-20 分钟。用细胞培养基洗涤 3 次除去酶。

[0613] 6) 将细胞浓度调节至 10^6 个 /ml，将细胞接种 6-孔板静置过夜。第二天，用胰蛋白酶处理细胞后再次接种微量滴定板，以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0614] 分离的肿瘤细胞的细胞刺激和裂解：

[0615] 细胞刺激：

[0616] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 加入细胞 37°C 培育 5 分钟。

[0617] 用药物处理刺激细胞：

[0618] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0619] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 刺激细胞，37°C 培育 5 分钟。

[0620] 用药物处理刺激细胞（反馈环）：

[0621] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0622] 2) 然后用 TGF- α (100nM)、Hrg (100nM) 和 / 或 IGF (100nM) 刺激细胞，37°C 培育 120 分钟。

[0623] 采用以下方案裂解经刺激的细胞：

[0624] 1) 混合上表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0625] 2) 最后一次洗涤细胞后，置冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液。

[0626] 3) 在冰上培育 30 分钟。

[0627] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟，分离珠和裂解液。

[0628] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80°C 保存。

[0629] 分离活检标本的肿瘤细胞：

[0630] 细胞分离和培养：

[0631] 1) 进行针芯活检手术抽取组织 (core biopsies) (14 号针头 2 个针芯, 16 号针头 3 个针芯, 18 号针头 4 个针芯, 其中 1-2 次活检为真空辅助的活检 (vacuum-assisted biopsies)), 将其置入含有细胞培养基的 10ml 无菌小瓶中作为肿瘤标本。

[0632] 2) 室温下，样品须在提取后 72 小时内保存或运输。

[0633] 3) 使针芯活检取得的组织通过细孔筛网将细胞材料分离成细胞悬液。

[0634] 4) 或者,用含抗生素的细胞培养基稀释的含 0.25% 胶原酶 II 和 0.001% DNA 酶的混合液处理活检组织,轻柔搅拌培育 15-20 分钟。用细胞培养基洗涤 3 次除去酶。

[0635] 5) 将细胞浓度调节至 10^6 个 /ml,将细胞接种 6-孔板静置过夜。第二天,用胰蛋白酶处理细胞后再次接种微量滴定板,以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0636] 活检组织细胞的细胞刺激和裂解

[0637] 细胞刺激:

[0638] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞 37°C 培育 5 分钟。

[0639] 用药物处理刺激细胞:

[0640] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0641] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞,37°C 培育 5 分钟。

[0642] 用药物处理刺激细胞(反馈环):

[0643] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0644] 2) 然后加入 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞,37°C 培育 120 分钟。

[0645] 采用以下方案裂解经刺激的细胞:

[0646] 1) 混合上表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0647] 2) 将最后一次洗涤后的细胞置冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液。

[0648] 3) 在冰上培育 30 分钟。

[0649] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟,分离珠和裂解液。

[0650] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80°C 保存。

[0651] 启动分离自组织、活检组织或全血的肿瘤细胞的原代培养

[0652] 细胞培养:

[0653] 1) 根据所分离肿瘤细胞的数量,将上述组织、活检组织或全血分离的肿瘤细胞在无菌小瓶(例如,T-25)、培养皿(例如,10mm)或平板(例如,24-孔平板)中培养。

[0654] 2) 37°C,在补充了 5% CO₂ 的潮湿气氛中,用细胞培养基(例如,含 2% FBS 和抗生素的 RMPI-1640) 培育细胞。随着时间推移,容器底部的细胞形成单层并开始分裂。当细胞长至汇合时,用胰蛋白酶处理后再次接种微量滴定板以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0655] 从组织、活检组织或全血分离的原代培养肿瘤细胞的细胞刺激和裂解

[0656] 细胞刺激:

[0657] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞,37°C 培育 5 分钟。

[0658] 用药物处理刺激细胞:

[0659] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37°C 培育 30 分钟。

[0660] 2) 然后加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞, 37℃ 培育 5 分钟。

[0661] 用药物处理刺激细胞 (反馈环):

[0662] 1) 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物 37℃ 培育 30 分钟。

[0663] 2) 然后加入 GF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞, 37℃ 培育 120 分钟。

[0664] 采用以下方案裂解经刺激的细胞:

[0665] 1) 混合上表 3 所列试剂新鲜配制新鲜的裂解缓冲液。

[0666] 2) 最后一次洗涤细胞后, 置冰上将细胞重悬于 100 微升冷却的缓冲液。

[0667] 3) 在冰上培育 30 分钟。

[0668] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟, 分离珠和裂解液。

[0669] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或 -80℃ 保存。

[0670] 实施例 3. 采用酪酰胺信号放大的单一检测微阵列 ELISA

[0671] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重高通量单一检测微阵列 ELISA, 适合分析稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态:

[0672] 1) 将捕捉抗体的 2- 倍系列稀释液点印在新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司的 16- 圈孔 FAST 载玻片上。

[0673] 2) 干燥过夜, 用获特满封闭缓冲液封闭载玻片。

[0674] 3) 各圈孔中加入 80 微升 10 倍系列稀释的细胞裂解液, 室温培育载玻片 2 小时。

[0675] 4) 用 TBS- 吐温洗涤 6 次后, 加入 80 μ l 生物素标记的检测抗体 (例如, 识别 p-EGFR 的单克隆抗体或识别 EGFR 的单克隆抗体, 而不论 EGFR 二者的活化状态) 室温培育 2 小时。

[0676] 5) 洗涤 6 次后, 加入链霉亲和素 - 标记的辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 培育 1 小时, 使 SA-HRP 结合生物素 - 标记的检测抗体。

[0677] 6) 为放大信号, 加入 80 微升 5 μ g/ml 的生物素 - 酪酰胺反应 15 分钟。用 TBS- 吐温洗涤载玻片六次, 用 20% DMSO/TBS- 吐温洗涤两次, 用 TBS 洗涤一次。

[0678] 7) 加入 80 微升 SA-Alexa 555 培育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次, 干燥 5 分钟, 用马萨诸塞州沃尔瑟姆市帕金埃尔默公司 (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA) 的微阵列扫描仪扫描。

[0679] 实施例 4 采用酪酰胺信号放大的邻近双重检测微阵列 ELISA

[0680] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重高通量邻近双重检测微阵列 ELISA, 适合分析稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态:

[0681] 1) 将捕捉抗体的 1mg/ml-0.004mg/ml 系列稀释液点印在获特满公司的 16- 圈孔 FAST 载玻片上。

[0682] 2) 干燥过夜, 用获特满封闭缓冲液封闭载玻片。

[0683] 3) 各圈孔中加入 80 微升 10 倍系列稀释的 A431 细胞裂解液, 室温培育载玻片 2 小时。

[0684] 4) 用 TBS-Tween 洗涤 6 次后在载玻片上加入 80 μ l 用 TBS-Tween/2% BSA/1% FBS

稀释的用于邻近试验的检测抗体。所用的检测抗体是：(1) 直接偶连于葡萄糖氧化酶 (GO) 的抗-EGFR 单克隆抗体；和 (2) 直接偶连于辣根过氧化物酶 (HRP) 的识别磷酸化 EGFR 的单克隆抗体。室温培育 2 小时。

[0685] 5) 或者，检测步骤采用识别磷酸化 EGFR 的偶联生物素的单克隆抗体。在这些情况中，洗涤 6 次后，包括与链霉亲和素-HRP 一起培育 1 小时的额外后续步骤。

[0686] 6) 或者，检测步骤采用寡核苷酸介导的葡萄糖氧化酶 (GO) 与抗-EGFR 抗体的偶连物。可用 HRP 与磷酸化 EGFR 抗体的直接偶连物或者生物素-链霉亲和素 (SA) 连接的偶连物。

[0687] 7) 为放大信号，加入 80 微升 5 μ g/ml 生物素-酪酰胺反应 15 分钟。用 TBS-吐温洗涤载玻片六次，用 20% DMSO/TBS-吐温洗涤两次，用 TBS 洗涤一次。

[0688] 8) 加入 80 微升 SA-Alexa 555 培育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次，干燥 5 分钟，用帕金埃尔默公司的微阵列扫描仪扫描。

[0689] 图 2 说明本发明的一个实施方式，其中，本文所述的邻近试验检测磷酸化 EGFR (pEGFR) 和磷酸化 HER-2 (pHER-2) 的灵敏度可达到单个细胞水平。图 3 显示了本文所述邻近试验的结果，它是一种高特异性试验，检测表达 HER-2 的细胞所表达的 HER-2 可达到单个细胞水平。

[0690] 实施例 5 产生活化状态以供药物选择

[0691] 可利用本发明方法和组合物选择癌症治疗药物。典型方案需要产生两种状况，参比活化状态和测试活化状态，然后比较两种状况以确定特定药物治疗方案的效果（参见，图 4）。

[0692] 参比活化状态

[0693] 为产生参比活化状态，需获得特定类型癌症（例如，乳腺肿瘤）患者抗癌药物治疗之前的血液样品。可用（例如）本文详述的免疫磁性分离技术分离血液样品中癌细胞衍生的稀少循环细胞，用一种或多种生长因子体外刺激该分离的循环细胞。然后裂解经过刺激的细胞产生细胞提取物。将细胞提取物加入含有一组系列稀释的捕捉抗体的可寻址阵列，所述捕捉抗体是患者癌症类型中活化状态可能改变的信号转导分子的特异性抗体。用合适的检测抗体（例如，活化状态非依赖抗体和 / 或活化状态依赖性抗体）进行单一检测或邻近试验，测定感兴趣的各信号转导分子的活化状态。表 2 所示的“途径选择”表专门用于根据患者的癌症类型选择检测哪种活化状态。例如，一位患者可能患表 2 “途径 1”所示 EGFR 途径活化类型的癌症。或者，另一位患者可能患表 2 “途径 2”所示 EGFR 途径活化的另一类型癌症。因此，产生的参比活化状态可提供没有抗癌药时患者癌症中信号转导分子的活化状态。

[0694] 测定活化状态

[0695] 为测定活化状态，需获得抗癌药治疗之前或在给予抗癌药后（例如，在癌症治疗期间的任何时间）特定类型癌症（例如，肺肿瘤）患者的第二份血液样品。分离该血液样品癌细胞衍生的稀少循环细胞。如果分离的细胞获自未接受抗癌药治疗的患者，则将分离的细胞与靶向上述参比活化状态测定的一种或多种活化的信号转导分子的抗癌药一起培育。“药物选择”表（表 1）专门用于选择得到批准的或处于临床试验的能特异性抑制活化靶信号转导分子的合适抗癌药。例如，如果与参比活化状态相比测得 EGFR 被活化，则将细

胞与表 1 的“A”或“B”行所示的一种或多种药物一起培育。然后用一种或多种生长因子体外刺激该分离的细胞。继而裂解分离的细胞产生细胞提取物。将细胞提取物加入于可寻址阵列,进行邻近试验以测定感兴趣的各信号转导分子的活化状态。如此产生的患者的测试活化状态可提供在特定抗癌药存在时,患者癌症中信号转导分子的活化状态。

[0696] 药物选择

[0697] 通过比较测试活化状态与参比活化状态来测定某抗癌药是否适合治疗患者的癌症。例如,如果该药物治疗导致大多数或所有信号转导分子的活化比没有药物时实质性降低,例如从没有药物时的强活化改变为有药物时的弱或极弱活化,则可确定该治疗药物适合于该患者的癌症。在这种情况下,未接受药物治疗的患者可用合适的抗癌药开始治疗,或者已接受药物的患者后续治疗可采用合适的抗癌药。然而,如果认为该药物治疗不适合治疗患者的癌症,可选择用不同的药物来产生新的测试活化状态,然后将其与参比活化状态相比较。在这种情况下,未接受药物治疗的患者可用合适的抗癌药开始治疗,或者正接受不合适药物治疗的患者的后续治疗改用合适的抗癌药。

[0698] 实施例 6. 分析受体酪氨酸激酶活化状态的可寻址阵列

[0699] 图 5 描述了本发明一种示范性的可寻址的受体酪氨酸激酶阵列。本文所述的受体酪氨酸激酶是参与细胞增殖多种信号转导途径的关键组分。例如,受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族具有 4 个家族成员,它们在细胞增殖、分化和存活等基础细胞过程中起着至关重要的作用。据报道,该受体酪氨酸激酶家族在许多不同癌症中过表达与临床结局不佳相关。ErbB1/EGFR、ErbB3/HER3、和 ErbB4/HER-4 与生长因子结合后,发生同质和异质 - 二聚化可激活许多不同的信号转导途径。ErbB2/HER-2 不结合生长因子,是所有 3 种家族成员中最佳的异质 - 二聚化伴侣。ErbB2 过表达时也可发生同质 - 二聚化激活信号转导途径。ErbB 家族的同质 - 或异质 - 二聚化可导致转磷酸化。自身磷酸化或转磷酸化削弱了受体酪氨酸激酶的抑制性构象,致使该激酶完全活化,同时产生许多含 SH2 的信号转导分子,例如 Src、Shc SHP-1、SHEP-1 和 PI3K 的结合位点。衔接蛋白或信号转导蛋白,如 Shc、Grb2 或 PI3K 被募集至这类磷酸化的受体。衔接蛋白的磷酸化导致 MAPK 和 Akt 途径活化。可通过测定 Erk 和 Rsk 的磷酸化状态来评估 MAPK 途径的活化,可通过测定 Akt 和 p70S6K 的磷酸化状态来评估 PI3K 途径的活化。

[0700] 因此,图 5 所示可寻址阵列不仅能测定受体酪氨酸激酶 ErbB 家族的表达,还能测定它们的活化状态。也可用可寻址芯片研究 MAPK 和 PI3K/Akt 途径的活化。此外,可用该可寻址芯片研究核激素受体如 ER(雌激素受体)和 PR(孕酮受体)以及其他蛋白质如 NCOR(细胞核受体辅抑制物)、AIB1(在乳腺癌 -1 中扩增)、IGF-IR、cMET、Ki67 和 TOPO II 的表达和 / 或活化状态。该芯片的另一个特征是存在测定肿瘤或肿瘤相关细胞(CEC、CEP、周细胞等)含量的内部对照和测定任何非特异性结合的非特异性 IgG。

[0701] 实施例 7. 分析血管生成信号转导途径的可寻址阵列

[0702] 图 6 和 7 说明了用于测定参与血管生成信号转导组分活化状态的可寻址阵列的构成。本文所述的肿瘤血管生成对于许多实体瘤的生长至关重要。可检验的关键性信号转导分子包括受体酪氨酸激酶 VEGFR、FGFR 和 TIE 家族的成员,它们主要在内皮细胞上表达。PDGFR 通常表达在周细胞上。这些受体的表达和活化状态对于测定个体肿瘤标本中血管生成的主要机制至关重要。生长因子,如 VEGF 和 PlGF 可结合 VEGFR-1 和 VEGFR-2,启动同

质-和异质-二聚化。二聚化使这些受体磷酸化,进而活化 MAPK 和 PI3K/Akt 信号转导途径。FGFR、TIE 与 PDGFR 受体的活化方式相似。自身磷酸化或转磷酸化削弱了受体酪氨酸激酶的抑制性构象,致使该激酶完全活化,同时产生许多含 SH2 的信号转导分子,例如 Src、Shc SHP-1、V-钙粘蛋白、SHP-1 和 PI3K 的结合位点。衔接蛋白或信号转导蛋白,例如 Shc、Grb2 或 PI3K 被募集至这类磷酸化的受体。衔接蛋白的磷酸化导致 MAPK 和 Akt 途径活化。可通过测定 Erk 和 Rsk 的磷酸化状态来评估 MAPK 途径活化,而 PI3K 途径活化可通过测定 Akt 和 p70S6K 的磷酸化状态来评估。

[0703] 因此,可寻址的血管生成芯片,例如图 6 和 7 所示那些不仅能测定患者样品中所有涉及血管生成信号转导组分的表达,还能测定它们的活化状态。也可用该可寻址芯片研究 MAPK 和 PI3K/Akt 途径的活化。该芯片具有测定肿瘤或肿瘤相关细胞(CEC、CEP、周细胞等)含量的内部对照和测定任何非特异性结合的非特异性 IgG。

[0704] 图 8 和 9 显示了本发明的组合可寻址测定,可用来测定涉及血管生成的受体酪氨酸激酶 ErbB 家族以及信号转导组分的表达和 / 或活化状态。此外可用该可寻址芯片研究核激素受体如 ER(雌激素受体)和 PR(孕酮受体)以及其他蛋白质如 NCOR(细胞核受体辅抑制物)、AIB1(在乳腺癌-1 中扩增)、IGF-IR、cMET、Ki67 和 TOPO II 的表达和 / 或活化状态。这些芯片的另一个特征是存在测定肿瘤或肿瘤相关细胞(CEC、CEP、周细胞等)含量的内部对照和测定任何非特异性结合的非特异性 IgG。

[0705] 实施例 8. 选择患者进行乳腺癌治疗。

[0706] 癌症治疗的主要困难是为给定患者选择效力最大毒性最小的治疗方案。相关困难在于需尝试提供精确的诊断、预后和预测信息。

[0707] 目前,通常采用肿瘤-淋巴结-转移(TNM)体系分类肿瘤。根据 AJCC 癌症分期手册(AJCC Cancer Staging Manual, Lippincott, 第 5 版, 171-180 页(1997))中公布的指南,该体系采用肿瘤大小、局部淋巴结中有无肿瘤细胞、以及有无远端转移来确定肿瘤阶段。确定阶段后可用作选择合适治疗和预后的基础。除了 TNM 参数外,可利用形态学表现进一步划分肿瘤类型,帮助选择合适的治疗。然而,该方法有严重的缺陷。例如,一些肿瘤的组织病理学表现虽相似,但临床过程和对治疗的反应可能显著不同。此外,一些肿瘤发展迅速,而其他一些则不。再者,对激素治疗或化疗一些肿瘤有反应,而其他肿瘤则耐受。

[0708] 采用例如免疫组织化学测定细胞表面标记可为某些类型肿瘤的亚类划分提供方法。例如,在乳腺癌的预后和治疗决策中需要考虑的一个因素是肿瘤样品中是否存在雌激素受体(ER)。ER 阳性乳腺癌对他莫昔芬(在乳腺癌组织中作为抗雌激素)等激素治疗的反应通常比 ER 阴性肿瘤快得多。虽然有用,但这些分析只能部分预测乳腺肿瘤的临床行为。目前的诊断工具不能检测癌症的表型多样性。结果,关于给予患者何种类型的治疗以获得最佳结果仍旧存在很大争议(例如,对于乳腺癌,参见“NIH 总结性报告:乳腺癌的辅助治疗(NIH Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer), 2000/11/1-3”, J. Nat. Cancer Inst. Monographs, 30 :5-15(2001); 以及 Di Leo 等, Int. J. Clin. Oncol., 7 :245-253(2002))。

[0709] 本发明认识到,可利用信号传导深入了解癌症和疾病发展的生物病因。本发明还提供采用个性化治疗方案,利用各种激活的信号传导途径来治疗癌症的方法。

[0710] 目前采用三种不同的分子标记来定义具有重要治疗意义的乳腺癌的四种不同亚

类。这三种标记是 ER、PR 和 HER-2/ErbB2。所述四种主要亚类如下：

[0711] 1. ER+/PR+/ErbB2-

[0712] 2. ER+/ErbB2+

[0713] 3. ER-/ErbB2+

[0714] 4. ER-/PR-/ErbB2-

[0715] 目前的一种理论将乳腺癌分成 5 种分子亚类：鲁米那 (Luminal)A；鲁米那 B；基底样；HER-2/neu- 阳性；以及正常乳腺样（参见，例如，Carey 等，JAMA，295：2492-2502(2006)；Fan 等，N. Engl. J. Med.，355：560-569(2006)；Hannemann 等，British J Cancer，95：1334-1341(2006)；Potemski 等，Oncology，69：478-485(2005)）。迄今为止所了解的这些亚类多数与已经熟知的特征直接相关，如激素受体和 HER-2/neu 状态。

[0716] 雌激素在乳腺癌发病机制中起着重要作用，选择性干扰雌激素 /ER 介导的信号传导级联反应是治疗 ER 阳性乳腺癌患者的最有效方法。ER 能调节正常和恶性乳腺细胞的生长和分化。功能性 ER 和 / 或孕酮受体 (PR) 的表达是肿瘤对抗激素治疗（“激素反应”）反应良好所必须，许多研究已证明，ER 的表达强烈预示对抗激素治疗反应良好，尽管其表达只有很弱的预后性。ER 单独不刺激肿瘤生长，而是一个复杂的相互作用网络确保了癌细胞的活力。了解该网络便能科学地合理选择靶向治疗。

[0717] 示范性的患者状况见下表 4-22，说明了如何利用对针吸组织活检获得的血液循环肿瘤细胞 (CTC) 或癌细胞的活化途径分析来帮助医师决定乳腺肿瘤的有效疗程，例如，重新调整手术前的肿瘤治疗药物以减小乳腺肿瘤的大小，或治疗局部复发或转移性乳腺癌患者。简言之，可测定在有或没有不同组合的测试治疗剂时，CTC 或活检得到的癌细胞中 ErbB 和核激素受体途径不同组分的活化水平。

[0718] 表 4

[0719] 患者 4001：(ER+/PR+/ErbB2-)

[0720]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用他莫昔芬治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	高
黄体酮 受体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	中	中	中
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	中		弱
TOPO II	中		中

[0721] 对患者（绝经前妇女，淋巴结阴性）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER/PR 高度表达和活化。该患者用他莫昔芬治疗。该患者反应良好，再次活检仍显示该蛋白质（ER/PR）为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对他莫昔芬反应良好。认为当存在拮抗剂如他莫昔芬时 ER 会募集补充辅抑制蛋白 NCOR，并认为这种募集补充是全面拮抗活性所必需。

[0722] 表 5

[0723] 患者 4002 : (ER+/PR-/ErbB2-)

[0724]

12	表达	活化 (磷酸化水平)	用他莫昔芬+化疗治 疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR		弱	高
复合物			
黄体酮	低		弱
受体			
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO II	高		高

[0725] 对患者（绝经前妇女，淋巴结阴性）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化以及 Ki67 高表达。该患者用他莫昔芬 + 化疗治疗。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对他莫昔芬 + 化疗反应良好。良好当存在拮抗剂如他莫昔芬时 ER 会募集补充抑制蛋白 NCOR，并认为这种募集补充是全面拮抗活性所必需。

[0726] 表 6

[0727] 患者 4003 : (ER+/PR+/ErbB2-)

[0728]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用他莫昔芬+化疗治 疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			

[0729]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用他莫昔芬+化疗治 疗
ER:N-CoR 复合物		弱	高
黄体酮 受体	高		弱
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO II	高		高

[0730] 对患者（绝经前妇女，淋巴结阳性）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER/PR 高度表达和活化。该患者用他莫昔芬 + 化疗治疗。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对他莫昔芬 + 化疗反应良好。认为当存在拮抗剂如他莫昔芬时 ER 会募集补充抑制蛋白 NCOR，并认为这种募集补充是全面拮抗活性所必需。

[0731] 表 7

[0732] 患者 4004 : (ER+/PR+/ErbB2-)

[0733]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱

[0734]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂治疗
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	中		弱
TOPO II	低		

[0735] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。肿瘤细胞分析揭示 ER/PR 高度表达和活化, 伴有一些通过 MISS 而活化的 ErbB1 (胞质 ER 活化导致交谈活化 ErbB1)。该患者用芳香酶抑制剂治疗以关闭所有 ER- 相关活性。该患者反应良好, 再次活检仍显示上述蛋白为高度活化状态。因此, 具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂反应良好。

[0736] 表 8

[0737] 患者 4005 : (ER+/PR+/ErbB2-)

[0738]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂+化 疗治疗
ER	高	中	
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	高		中
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱

[0739]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂+化 疗治疗
Ki67	高		弱
TOPO II	高		

[0740] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。肿瘤细胞分析揭示 ER/PR 高度表达和活化，伴有一些通过 MISS 而活化的 ErbB1（胞质 ER 活化导致交谈活化 ErbB1）。该患者用芳香酶抑制剂 + 化疗治疗以关闭所有 ER- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 化疗反应良好。

[0741] 表 9

[0742] 患者 4006 : (ER+/PR-/ErbB2-)

[0743]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂或他 莫昔芬+化疗治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0744] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。肿瘤细胞分析揭示 ER(PR 阴性肿瘤) 高度表达和活化，伴有一些通过 MISS 而活化的 ErbB1（胞质 ER 活化导致交谈活化 ErbB1）。该患者用芳香酶抑制剂 + 化疗治疗以关闭所有 ER- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 化疗反应良好。

[0745] 表 10 提供了一名局部复发或转移性乳腺癌患者的例子，该患者在内分泌治疗和 / 或化疗后复发。患者接受辅助化疗和激素治疗治疗局部复发或转移性乳腺癌至少 3 周。

[0746] 表 10

[0747] 患者 4007 : (ER+/PR+/ErbB2-)

[0748]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用他莫昔芬或芳香酶 抑制剂+紫杉烷 +Avastin®治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR		弱	中
复合物			
黄体酮	高		中
受体			
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0749] 内皮细胞 :

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin®
[0750] VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2	无	中	弱
复合物			
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0751] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的

CTC。肿瘤细胞和内皮细胞分析揭示 ER/PR 高度表达和活化,伴有一些通过 MISS 而活化的 ErbB1 (胞质 ER 活化导致交谈活化 ErbB1) 以及 VEGFR2 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 化疗 + **Avastin**[®] 治疗以关闭所有 ER- 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好,再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此,具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 化疗 + **Avastin**[®] 组合治疗反应良好。

[0752] 表 11

[0753] 患者 4008 : (高 AIB1 ;ER+/PR+/ErbB2-)

[0754]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用氟维司群治疗
ER	高		低
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		V.高	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	弱
黄体酮 受体	高		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0755] 对患者 (绝经前或绝经后妇女) 进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER/PR 高度表达和活化以及非常高的 ER :AIB1 复合物表达。该患者用氟维司群(**Faslodex**[®]) 治疗以降解 ER。该患者反应良好,再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此,具有上述蛋白质状态的患者对氟维司群反应良好。

[0756] 表 12

[0757] 患者 4009 : (ER+/PR-/ErbB2-)

[0758]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	用芳香酶抑制剂+化 疗治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR	低	弱	中
复合物			
黄体酮			低
受体			
IGF-1R		弱	弱
ErbB1	低	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		弱	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K	高	中	弱
Ki67			弱

[0759] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化。PR 表达水平非常低。该患者用芳香酶抑制剂 + 化疗治疗以关闭所有 ER- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 化疗反应良好。

[0760] 表 13

[0761] 患者 4010 : (ER+/PR-/ErbB1+)

[0762]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼或 Erbbitux®治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR		弱	中
复合物			
黄体酮	低		低
受体			
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		弱	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		弱	弱
P70S6K		弱	弱
Ki67	高		弱

[0763] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化。PR 表达水平非常低。ErbB1 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼或Erbbitux®治疗以关闭所有 ER/ErbB1- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼或Erbbitux®组合治疗反应良好。

[0764] 表 14

[0765] 患者 4011 : (ER+/PR-/ErbB1+)

[0766]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼或 Erbbitux®治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱

[0767]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼或 Erbitux®治疗
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	高	高	弱
ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		高	弱
PI3K		弱	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		弱	弱
P70S6K		弱	弱
Ki67	高		弱

[0768] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化。PR 表达水平非常低。ErbB1 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼或Erbitux®治疗以关闭所有 ER/ErbB1- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼或Erbitux®组合治疗反应良好。

[0769] 表 15

[0770] 患者 4012 : (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+)

[0771]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼治 疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低

[0772]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼治 疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0773] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化。PR 表达水平非常低。ErbB1 和 ErbB2 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼治疗以关闭所有 ER/ErbB1/ErbB2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼反应良好。

[0774] 表 16

[0775] 患者 4013 : (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)

[0776]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼治 疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR		弱	中
复合物			
黄体酮	低		低
受体			
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱

[0777]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼治 疗
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0778] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞分析显示 ER 高度表达和活化。PR 表达水平非常低。ErbB1、ErbB2 和 ErbB3 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼治疗以关闭所有 ER/ErbB1/ErbB2/

[0779] ErbB3- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼治疗反应良好。

[0780] 表 17 提供了一名局部复发或转移性乳腺癌患者的例子，该患者在抗血管生成治疗后复发。患者接受辅助化疗和激素治疗治疗局部复发或转移性乳腺癌至少 3 周。

[0781] 表 17

[0782] 患者 4014 : (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)

[0783]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼 +Avastin® 治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0784] 内皮细胞：

[0785]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin®
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2 复合物	无	中	弱
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0786] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。PR 表达水平非常低。ErbB1、ErbB2 和 ErbB3 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼+Avastin®治疗以关闭所有 ER+ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼+Avastin®组合治疗反应良好。

[0787] 表 18

[0788] 患者 4015 : (ER+/PR-/ErbB2-/IGF-1R+)

[0789]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 抗-IGF-1R Ab 治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低
IGF-1R	高/中	高	弱
ErbB1	低	低	弱

[0790]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 抗-IGF-1R Ab 治疗
ErbB2	低	低	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0791] 对患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的CTC。其肿瘤细胞分析显示ER高度表达和活化。PR表达水平非常低。IGF-1R活化。该患者用芳香酶抑制剂+抗-IGF-1R抗体治疗以关闭所有ER/IGF-1R-相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂+抗IGF-1R抗体治疗反应良好。

[0792] 表 19

[0793] 患者 4016 : (ER+/PR+/ErbB2+)

[0794]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + Herceptin [®] +Avastin [®] 治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	高		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	低	低
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱

[0795]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + Herceptin®+Avastin® 治疗
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0796] 内皮细胞：

[0797]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin®
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2 复合物	无	中	弱
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0798] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER、PR 和 ErbB2 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用芳香酶抑制剂+Herceptin®+Avastin®治疗以关闭所有 ER、ErbB2 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂+Herceptin®+Avastin®组合治疗反应良好。

[0799] 表 20

[0800] 患者 4017 : (ER+/PR+/ErbB2+)

[0801]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼 +Avastin®治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	高		低
IGF-1R	低	弱	弱

[0802]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼 +Avastin® 治疗
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		高	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		高	弱
P70S6K		高	弱
Ki67	高		弱

[0803] 内皮细胞：

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin®
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2	无	中	弱
[0804] 复合物			
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0805] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER、ErbB2 和 p95ErbB2 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼 + Avastin® 治疗以关闭所有 ER、ErbB1、ErbB2、ErbB3、p95ErbB2 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼 + Avastin® 组合治疗反应。

[0806] 表 21

[0807] 患者 4018 : (ER+/PR-/ErbB2+)

[0808]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + Herceptin® + 紫杉烷 + Avastin® 治疗
ER	高		中

[0809]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + Herceptin [®] + 紫杉烷+Avastin [®] 治疗
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1 复合物		中	弱
ER:N-CoR 复合物		弱	中
黄体酮 受体	低		低
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	低	低
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱

[0810] 内皮细胞：

[0811]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin [®]
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2 复合物	无	中	弱
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0812] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER 和 ErbB2 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。PR 水平低。该患者用芳香酶抑制剂+Herceptin[®]+紫杉烷+Avastin[®]治疗以关闭所有 ER、ErbB2 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂+Herceptin[®]+Avastin[®]+化疗组合治疗反应良好。

[0813] 表 22

[0814] 患者 4019 : (ER+/PR-/ErbB2+)

[0815]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 AI + 拉帕替尼 +Avastin [®] +化疗治疗
ER	高		中
ER (Ser 118)		高	弱
ER (Ser 167)		高	弱
ER:AIB1		中	弱
复合物			
ER:N-CoR		弱	中
复合物			
黄体酮	低		低
受体			
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		高	弱
Erk		高	弱
Rsk		高	弱
Akt		高	弱
P70S6K		高	弱
Ki67	高		弱

[0816] 内皮细胞 :

[0817]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	活化 采用 Avastin [®]
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白-R2	无	中	弱
复合物			
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱

[0818]

受体	表达	活化 (磷酸化水平) 强	活化 采用 Avastin® 弱
P70S6K			
[0819] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER、ErbB2 和 p95ErbB2 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。PR 水平低。该患者用芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼 + Avastin® + 化疗以关闭所有 ER、ErbB1、ErbB2、ErbB3、p95ErbB2 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对芳香酶抑制剂 + 拉帕替尼 + Avastin® + 化疗组合治疗反应良好。 [0820] 因此，在某些方面，本发明可以理性选择能最佳预测存活的活化标记。不同药物之间的最合适活化标记可能不同，可用于指导在抗癌药物单一治疗与用抗癌药混合物联合治疗之间作出选择，从而提供个性化的靶向治疗。 [0821] 实施例 9. 选择 Her2- 阳性乳腺癌患者进行乳腺癌治疗。 [0822] 在美国，每年有大约 200,000 例乳腺癌病例。发现 18-20 % 乳腺癌的 HER-2/ ErbB2 (一种 185kDa 的膜受体酪氨酸激酶) 活化与复发和死亡率升高有关。目前已知 ErbB2 是预测治疗剂如群司曲珠单抗(Herceptin®)效果的一种标记。 [0823] 最近 10 年治疗 ErbB2+ 乳腺癌已获得重要进展。Herceptin® 改变了转移性乳腺癌治疗和辅助治疗的历史。拉帕替尼，目前的商品名为 Tykerb® (葛兰素史克公司 (GlaxoSmithKline))，是一种重要的补充药物，是 Herceptin® 后续治疗可购得的许多药物中的第一选择。 [0824] 不幸的是，许多病例以及几乎所有转移性病例对 Herceptin® 产生了耐药性。还发现从一开始就对 Herceptin® 耐药和获得性耐药的病例。 [0825] 对 Herceptin® 耐药的可能方式有： [0826] • 靶点表达改变 (ErbB2 状态变化) [0827] • 通过替代途径 (IGF-1R) 传导信号 [0828] • 优先与其他受体 (ErbB1 或 ErbB3) 二聚化 [0829] • 亚适药物递送所致 (ErbB2+ 乳腺癌妇女的 CNS 转移似乎特别常见。ErbB2+ 转移性乳腺癌患者的 CNS 转移发病率可能与 1/3 的 ErbB2+ 转移癌患者一样高)。 [0830] • PTEN 改变 [0831] • PI3K 突变 [0832] • P95ErbB2 表达或 ErbB2 截短 [0833] • cMET 过表达或扩增 [0834] 治疗药物选择 / 效果的标记： [0835] • 5-FU/ 凯西替滨 (capecitabine) : 胸苷酸合成酶 (TS) 表达 [0836] • 双氢嘧啶脱氢酶 (DPD) 表达 [0837] • TS 表达中 HDAC 降低 [0838] • 紫杉烷 : ErbB2 [0839] • 蒽环类抗生素 : TOP2 过表达			

[0840] • ErbB2 阳性 : (5-FU 或紫杉烷或蒽环类抗生素)

[0841] 已试验过多种化疗方案与**Herceptin®**联用。优选联用紫杉酚、多西他赛、紫杉烷 + 铂盐治疗转移癌。也可联用所有的靶向治疗药物。

[0842] 示范性的患者状况见下表 23-25, 说明如何利用血液循环肿瘤细胞 (CTC) 或活检获得的癌细胞中的活化途径分析来帮助医师选择对群司珠单抗(**Herceptin®**)治疗反应良好可从这种乳腺癌治疗方法受益的患者。示范性的患者状况见下表 26-31, 说明如何利用血液 CTC 或活检获得的癌细胞中的活化途径分析, 来帮助医师为一开头就耐药的患者和**Herceptin®**治疗后复发的获得性耐药患者选择适合的治疗药物。简言之, 测定在有或没有不同组合测试治疗药物时, CTC 或活检得到的癌细胞中信号转导途径 (如 ErbB 受体途径) 不同组分的活化水平。

[0843] 表 23

[0844] 患者 5001 : (ErbB2+)

[0845]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin® + Avastin® + 紫杉烷(任选) 治疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0846] 内皮细胞 :

[0847]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	中	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白			
-R2 复合物	无	中	弱
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0848] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB2 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 Herceptin®+紫杉烷+Avastin®治疗以关闭所有 ErbB2 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对 Herceptin® + Avastin®+化疗反应良好。

[0849] 表 24

[0850] 患者 5002 : (ErbB2+)

[0851]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin® + Avastin®+ FEC: [氟尿嘧啶，表柔比星(蒽环类抗 生素)和环磷酰胺]治疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	高		高

[0852] 内皮细胞：

[0853]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱
VEGFR1	中	强	弱
Tie 2	低	弱	弱
V-钙粘蛋白			
-R2 复合物	无	中	弱
Shc		强	弱
PI3K		强	弱
Erk		强	弱
Rsk		强	弱
Akt		强	弱
P70S6K		强	弱

[0854] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB2 和 TOP02 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 Herceptin®+蒽环类抗生素+化疗+Avastin®治疗以关闭所有 ErbB2、VEGFR2 和 TOP02- 相关活性。该患者反应良好,再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此,具有上述蛋白质状态的患者对 Herceptin®+蒽环类抗生素+化疗+Avastin®组合治疗反应良好。

[0855] 表 25

[0856] 患者 5003 : (ErbB2+)

[0857]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin® + Herceptin® + 索拉非尼 或舒尼替尼或 AZD2171 + 紫杉烷(任选)治疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	弱	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0858] 内皮细胞和周细胞 :

[0859]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0860] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 **Herceptin®** + 索拉非尼 (sorafenib) + **Avastin®** 治疗以关闭所有 ErbB2、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 PDGFR 在 **Avastin®**-耐受性患者中过表达和活化，上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对 **Herceptin®** + 索拉非尼 + 化疗反应良好。

[0861] 表 26

[0862] 患者 5004 : (ErbB2+)

[0863]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用拉帕替尼+紫杉烷+索拉非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	高	高	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	中	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0864] 内皮细胞和周细胞：

[0865]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0866] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB1、ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用拉帕替尼 + 索拉非尼治疗以关闭所有 ErbB1、ErbB2、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 ErbB1 和 PDGFR 在 Avastin®-和 Avastin®-耐受患者中过表达和活化，上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。由于拉帕替尼能抑制 ErbB1 和 ErbB2，因此用拉帕替尼代替 Herceptin®。该患者反应良好，再次活

检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此,具有上述蛋白质状态的患者对拉帕替尼 + 索拉非尼 + 化疗反应良好。

[0867] 表 27

[0868] 患者 5005 : (ErbB2+)

[0869]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin®+紫杉烷+索拉非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗
IGF-1R	高	高	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0870] 内皮细胞和周细胞 :

[0871]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0872] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 IGF-1R、ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 **Herceptin**®+索拉非尼 (sorafenib) +**Avastin**®+IGF-1R 抗体 (Ab) 治疗以关闭所有 IGF-1R、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 IGF-1R 和 PDGFR 在 **Avastin**®-和 **Avastin**®- 耐受患者中过表达和活化, 上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。用 IGF-1R Ab 和 **Herceptin**®代替单用 **Herceptin**®以抑制 IGF-1R 和 ErbB2。该患者反应良好, 再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此, 具有上述蛋白质状态的患者对 **Herceptin**® + IGF-1RAb+ 索拉非尼 + 化疗反应。

[0873] 表 28

[0874] 患者 5006 : (ErbB2+/PTEN 缺失)

[0875]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用拉帕替尼+紫杉烷+索拉 非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗
IGF-1R	低	低	弱
ErbB1	中	中	中
ErbB2	高	高	弱

[0876]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用拉帕替尼+紫杉烷+索拉非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗
P95 ErbB2	中	高	弱
ErbB3	低	中	中
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	低	低	低
Shc		中	弱
PI3K		中	中
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	高
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0877] 内皮细胞和周细胞：

[0878]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0879] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 p95ErbB2、ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者也缺失 PTEN。该患者用拉帕替尼 + 索拉非尼治疗以关闭所有 ErbB2、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 p95ErbB2 和 PDGFR 在 Avastin®-和 Avastin®-耐受患者中过表达和活化，上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。用拉帕替尼代替 Herceptin® 以抑制 ErbB2 和 ErbB2，并用 mTor 抑制剂来切断下游信号传导活性。该患者反应良好，再次活检显示出上述蛋白质概况。因此，具有上述蛋白质状态的患者对拉帕替尼 + 索拉非尼 + 雷帕霉素 + 化疗反应良好。

[0880] 表 29

[0881] 患者 5007 : (ErbB2+/p95ErbB2+)

[0882]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用拉帕替尼+紫杉烷+索拉 非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗
IGF-1R	低	低	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	高	高	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		高	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0883] 内皮细胞和周细胞 :

[0884]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱

[0885]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
Akt P70S6K		强 强	弱 弱	弱 弱
[0886] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 p95ErbB2、ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用拉帕替尼 + 索拉非尼治疗以关闭所有 ErbB2、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 p95ErbB2 和 PDGFR 在Avastin®-和Avastin®-耐受患者中过表达和活化, 上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。用拉帕替尼代替以抑制和ErbB2。该患者反应良好, 再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此, 具有上述蛋白质状态的患者对拉帕替尼 + 索拉非尼 + 化疗组合治疗反应良好。				
[0887] 表 30				
[0888] 患者 5008 : (ErbB2+)				
受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用拉帕替尼+紫杉烷+索拉 非尼或舒尼替尼或 AZD2171 治疗	
IGF-1R	低	低	弱	
ErbB1	中	中	弱	
ErbB2	高	高	弱	
P95 ErbB2	低	弱	弱	
ErbB3	低	中	弱	
[0889] ErbB4	低	弱	弱	
Shc		中	弱	
PI3K		中	弱	
Erk		中	弱	
Rsk		中	弱	
Akt		中	弱	
P70S6K		中	弱	
Ki67	高		弱	
TOPO2	低		弱	
[0890] 内皮细胞和周细胞 :				
[0891]				

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	中
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	高	弱	高
PDGFRb	中	高	弱	高
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0892] 对转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB2 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者有脑转移。该患者用拉帕替尼 + 索拉非尼治疗以关闭所有 ErbB2、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 PDGFR 在 Avastin®-耐受患者中过表达和活化，上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。由于患者有脑转移，因此用拉帕替尼代替 Herceptin®。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对拉帕替尼 + 索拉非尼 + 化疗反应良好。

[0893] 表 31

[0894] 患者 5009 : (ErbB2+)

[0895]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin®+紫杉烷 +Avastin®+拉帕替尼治疗
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	高	高	弱
P95 ErbB2	中	中	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱

[0896]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Herceptin®+紫杉烷 +Avastin®+拉帕替尼治疗
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0897] 内皮细胞和周细胞：

[0898]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0899] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 PDGFR 高度表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 Herceptin®+拉帕替尼+索拉非尼治疗以关闭所有 ErbB 1、ErbB2、ErbB3、PDGFR 和 VEGFR2- 相关活性。因为 ErbB1 和 PDGFR 在 Avastin®-和 Avastin®-耐受患者中过表达和活化，上述信息表明抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 或索拉非尼可能是治疗这种肿瘤可选用的药物。一起使用拉帕替尼和 Herceptin®以抑制 ErbB1、ErbB2 和 ErbB3。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质为高度活化状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对拉帕替尼+ Herceptin®+索拉非尼+化疗组合治疗反应。

[0900] 实施例 10 选择 ER-、PR- 和 ErbB2- 阴性乳腺癌患者的治疗。

[0901] 大约 15-20% 的乳腺癌妇女是三阴性癌症。“三受体阴性乳腺癌”患者完全缺失激素受体 ER、PR 和 HER-2/ErbB2，具有侵袭性临床过程，且治疗选择少。唯一的治疗方法是化疗，在这方面，可供选择的细胞生长抑制剂有限。三阴性乳腺癌的标准治疗通常是化疗、手术和 / 或放疗联合治疗。当用标准方法治疗时，与非三阴性乳腺癌妇女相比，三阴性乳腺癌

妇女的长期结果较差。三阴性乳腺癌的细胞表面通常表达 ErbB1。ErbB1 阳性乳腺癌妇女的长期结果不及肿瘤不表达 ErbB1 的妇女。因此,本领域需要为三阴性乳腺癌患者的上述状态、选择和预测治疗选项提供方法。

[0902] 表 32

[0903] 患者 6001 : (低 ErbB1 三阴性)

[0904]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用紫杉烷+Avastin®治疗
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	低	弱	弱
ErbB2	低	弱	弱
P95 ErbB2	低	弱	弱
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0905] 内皮细胞和周细胞 :

[0906]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V- 钙粘蛋	无	中	弱	弱

[0907]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
白-R2 复合 物				
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0908] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ER、ErbB2 和 p95ErbB2 低表达不活化，只 VEGFR2 活化。该患者用紫杉烷+Avastin®治疗以关闭 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对Avastin®+化疗反应良好。

[0909] 表 33

[0910] 患者 6002 : (三阴性)

[0911]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Tarceva®+紫杉烷 +Avastin®治疗
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	弱	弱
P95	低	弱	弱
ErbB2			
ErbB3	低	弱	弱
ErbB4	低	弱	弱
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0912] 内皮细胞和周细胞：

[0913]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0914] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB1 中等表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 Tarceva®+Avastin®治疗以关闭所有 ErbB1 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对 Tarceva® + Avastin® + 化疗反应良好。

[0915] 表 34

[0916] 患者 6003 : (三阴性)

[0917]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Pan Her 抑制剂+紫杉烷 +Avastin®治疗
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	中	弱
P95 ErbB2	无	弱	弱
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	中		
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱

[0918]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Pan Her 抑制剂+紫杉烷 +Avastin®治疗
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0919] 内皮细胞和周细胞：

[0920]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin® 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋白				
-R2 复合物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0921] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB1、ErbB2 和 ErbB3 中等表达和活化同时 VEGFR2 活化。该患者用 Pan Her 抑制剂+Avastin®治疗以关闭所有 ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对 Pan Her 抑制剂+Avastin®+化疗组合治疗反应。Pan Her 抑制剂的例子包括但不限于 BMS-599626 和 CI-1033。

[0922] 表 35

[0923] 患者 6004 : (三阴性)

[0924]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Pan Her 抑制剂+紫杉烷 +Avastin®+雷帕霉素治疗
ER	低		
PR	低		
IGF-1R	低	弱	弱

[0925]

受体	表达	活化 (+/-GF) (磷酸化水平)	用 Pan Her 抑制剂+紫杉烷 +Avastin [®] +雷帕霉素治疗
ErbB1	中	中	弱
ErbB2	低	中	弱
P95 ErbB2	无	无	无
ErbB3	低	中	弱
ErbB4	低	弱	弱
PTEN	无		
Shc		中	弱
PI3K		中	弱
Erk		中	弱
Rsk		中	弱
Akt		中	弱
P70S6K		中	弱
Ki67	高		弱
TOPO2	低		弱

[0926] 内皮细胞和周细胞：

[0927]

受体	表达	活化 (磷酸化水平)	采用 AZD2171 或索拉非尼或 舒尼替尼的活 化	采用 Avastin [®] 的活化
VEGFR2	中	强	弱	弱
VEGFR1	中	强	弱	弱
Tie 2	低	弱	弱	弱
V-钙粘蛋 白-R2 复合 物	无	中	弱	弱
PDGFRa	中	低	弱	弱
PDGFRb	中	低	弱	弱
Shc		强	弱	弱
PI3K		强	弱	弱
Erk		强	弱	弱
Rsk		强	弱	弱
Akt		强	弱	弱
P70S6K		强	弱	弱

[0928] 对局部复发或转移性乳腺癌患者（绝经前或绝经后妇女）进行活检或分离血液的 CTC。其肿瘤细胞和内皮细胞分析显示 ErbB1、ErbB2 和 ErbB3 中等表达和活化同时 VEGFR2 活化。PTEN 缺失。该患者用 Pan Her 抑制剂+Avastin[®]+mTOR 抑制剂治疗以关闭所有 ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 VEGFR2- 相关活性。该患者反应良好，再次活检仍显示上述蛋白质状态。因此，具有上述蛋白质状态的患者对 Pan Her 抑制剂+Avastin[®]+雷帕霉素 + 化疗组合治疗反应良好。

[0929] 实施例 11. 监测乳腺癌患者的 EGFR 和 / 或 HER-2 活化来指导治疗选择

[0930] 检测 5 位治疗中的乳腺癌患者的循环肿瘤细胞 (CTC) 数、通过染色检测 CTC 的 EGFR 表达,并用本文所述的邻近试验检测 EGFR 和 HER-2 磷酸化。患者人口统计学、癌症病史和目前的医疗分别见表 36、37 和 38。原发性肿瘤的雌激素受体 (ER)、孕酮受体 (PR) 和 HER-2 检测结果提供在表 39 中。表 40 和 41 显示各样品检测的 CTC 数和 EGFR 及 HER-2 的相对磷酸化水平。用 4 种缓冲液对照的平均值计算相对磷酸化水平。绘制的磷酸化信息图见图 10 和 11 中。图 12 显示用 DAPI 染色 CTC 的 EGFR、细胞角蛋白 (CK) 和细胞角蛋白的图像。对照细胞系分别是 HER-2 和 EGFR 表达阳性的 SKBr3 和 A431。用相同方法处理 6 名正常个体的全血作为对照。正常样品显示 EGFR 或 HER-2 磷酸化不超过背景。

[0931] 表 36

[0932] 所研究的 5 名乳腺癌患者的人口统计数据

[0933]

患者编号	出生日期	性别	人种/种族
01-003	01/APR/1951	妇女	西班牙人/拉丁美洲人
01-006	15/OCT/1929	妇女	亚洲人
01-014	29/SEP/1966	妇女	西班牙人/拉丁美洲人
01-019	08/JUN/1954	妇女	亚洲人
02-017	03/OCT/1954	妇女	高加索人

[0934] 表 37

[0935] 所研究的 5 名乳腺癌患者的癌症病史

[0936]

患者编号	癌症类型	阶段	转移部位	诊断日期	治疗类型
01-003	乳腺癌	3 C	淋巴结 左胸壁	检测	化疗
01-006	乳腺癌	4	淋巴结 和肝脏	检测	化疗
01-014	乳腺癌	4	淋巴结	检测	化疗
01-019	乳腺癌	4	骨骼 肝脏	检测	化疗
02-017	乳腺癌	3	淋巴结	未检测	放疗 化疗

[0937] 表 38

[0938] 所研究的 5 名乳腺癌患者的当前药物

[0939]

患者编号	药物名称	与治疗相关的诊断	剂量
01-003	苯海拉明	化疗前药物	25 MG Q 28 天
01-003	地卡特隆	化疗前药物	20 MG Q 28 天
01-003	贺赛汀	乳腺癌化疗	8 MG Q 28 天
01-003	泰为美	乳腺癌化疗前药物	300 MG Q 28 天
01-003	泰索帝	乳腺癌化疗	40 MG Q 28 天
01-003	泰诺林	疼痛	1 GR Q 28 天
01-003	枢复宁	乳腺癌化疗前药物	32 MG Q 28 天
01-006	地卡特隆	化疗前药物	20 MG Q 2 周
01-006	健择	乳腺癌化疗	1000 MG Q 2 周
01-006	贺赛汀	乳腺癌化疗	100 MG Q 周
01-006	凯特瑞	化疗前药物	1 MG Q 2 周
01-006	泰诺林	前期药物	1 GRAM Q 2 周
01-014	卡铂	乳腺癌化疗	650 MG Q 21 天
01-014	地卡特隆	化疗前药物	20 MG Q 21 天
01-014	贺赛汀	乳腺癌化疗	270 MG Q 21 天
01-014	罗氏芬	治疗发热的抗生素	1000 MG PRN
01-014	泰索帝	乳腺癌化疗	100 MG Q 21 天
01-014	枢复宁	化疗前药物	32 MG Q 21 天
01-019	阿可达	乳腺癌化疗	90 MG Q 21 天
01-019	苯海拉明	化疗前药物	25 MG Q 21 天
01-019	卡铂	乳腺癌化疗	580 MG Q 21 天
01-019	地卡特隆	化疗前药物	20 MG Q 21 天
01-019	凯特瑞	化疗前药物	1 MG Q 21 天
01-019	硫酸吗啡	化疗前药物	2 MG PRN
01-019	泰为美	化疗前药物	300 MG Q 21 天
01-019	泰索帝	乳腺癌化疗	110 MG Q 21 天
01-019	舒降之	高胆固醇血症	10 MG 1 QD
02-017	多柔比星	乳腺癌	79 MG QD 21 天
02-017	苯海拉明	搔痒	25 MG Q 21 天
02-017	氰脱灵	乳腺癌	790 MG Q 21 天
02-017	地卡特隆	恶心	20 MG Q 21 天
02-017	维 克 丁 (VICODIN)	癌症疼痛	325 MG TID PRN
02-017	枢复宁	恶心和呕吐	32 MG Q 21 天

[0940] 表 39

[0941] 所研究的 5 名乳腺癌患者的 ER、PR 和 HER-2 诊断试验结果

[0942]

患者编号	该对象是否为 ER 阳性?	该对象是否为 PR 阳性?	该对象是否为 HER2 阳性?
01-003	否	否	是
01-006	否	否	未知
01-014	否	否	是
01-019	是	否	否
02-017	否	否	否

[0943] 表 40

[0944] 5 名乳腺癌患者和 6 名正常人样品的 CTC 数 (每 7.5ml) 和 EGFR 相对磷酸化水平

[0945]

编号	乳腺癌			正常		
	患者编号	CTC	EGFR 相对水平	患者编号	CTC	EGFR 相对水平
1	01-014	2	0.7	02-007	0	1.14
2	02-014	2	0.69	01-013	0	1.31
3	01-003	1	1.26	01-011	0	1.2
4	01-019	4	0.88	01-015	1	0.68
5	01-006	1	3.27	02-012	0	1.32
6				02-013	0	0.68

[0946] 表 41

[0947] 5 名乳腺癌患者和 6 名正常人样品的 CTC 数 (每 7.5ml) 和相对 HER-2 磷酸化水平

[0948]

编号	乳腺癌			正常		
	患者编号	CTC	HER-2 相对水平	患者编号	CTC	HER-2 相对水平
1	01-014	3	0.66	02-007	0	1.13
2	01-003	1	1	01-013	0	1.15
3	01-019	4	0.94	01-011	0	1.31
4	01-006	1	2.52	01-015	1	0.76
5	02-017	3	2.14	02-012	0	1.07
6				02-013	0	0.59

[0949] 测得患者 01-019 为 ER 阳性、PR 阴性,其原发性肿瘤过表达 HER-2。抽血时该患者未给予 Herceptin[®] 而用 Taxotere[®]+卡铂治疗。鉴定有 4 种 CTC。用 CellSearch[™] 系统检测这些细胞中没有 EGFR 表达染色阳性细胞。用配体刺激分离的 CTC 后,邻近试验没有检测到 EGFR 或 HER-2 磷酸化。这些数据告诉医师,患者的肿瘤细胞未受 EGFR/HER-2 途径驱动,因此没有理由改变目前的治疗。

[0950] 患者 01-006 无 HER-2 检测报告,但由于她被给予 Herceptin[®] 治疗推测她是 HER-2 阳性。该患者 ER 和 PR 双阴性。患者 01-006 有 1 个 CTC 的 EGFR 表达染色阳性。测得 EGFR 和 HER-2 显著活化。尽管治疗包括 Herceptin[®],但 EGFR 和 HER-2 途径均未被关闭。EGFR 和 HER-2 之间形成异质二聚体可导致活化而躲避 Herceptin[®] 的抑制作用。这些数据告诉医师需要改变治疗。表明治疗应包括同时靶向 EGFR 和 HER-2 的药物,如拉帕替尼、Herceptin[®] + ZACTIMA[™]、Herceptin[®] + Erbitux[®]、Herceptin[®] + Iressa[®] 或 Herceptin[®] +

[0951]

Tarceva[®]。

[0952] 测得患者 02-017 为 ER、PR 阳性,其原发性肿瘤过表达 HER-2。患者曾经用阿霉素 + 环磷酰胺治疗过,但在采血时未接受癌症治疗。样品含有 3 个 CTC,全都 EGFR 表达染色阳性。在邻近试验中测得 EGFR 和 HER-2 显著活化。尽管该患者的原发性肿瘤为 HER-2 过表达阴性,但 EGFR/HER-2 途径活化。单用 Herceptin[®] 或与化疗联用,或单用化疗均不足以治疗该患者。这些数据告诉医师,治疗应包括同时靶向 EGFR 和 HER-2 的药物,如拉帕替尼、Herceptin[®] + ZACTIMA[™]、Herceptin[®] + Erbitux[®]、Herceptin[®] + Iressa[®] 或 Herceptin[®] + Tarceva[®]。

[0953] 患者 01-003 和 01-014 的病史报告,患者的原发性肿瘤为 HER-2 过表达阳性。两名患者 ER 和 PR 均阴性。患者 01-003 用 Herceptin[®] 和 Taxotere[®] 治疗,患者 01-014 用 Herceptin[®]、卡铂和 Taxotere[®] 治疗。患者 01-003 有 1 个 CTC 为 EGFR 表达染色阴性。测得 EGFR 或 HER-2 未磷酸化。这些数据告诉医师起初原发性肿瘤中检测到的 HER-2 驱动途径不再活化。鉴于阳性评分其原发性肿瘤中实际 HER-2 抗体染色(阳性)细胞百分比约为 10%,与复发相关的 CTC 不过表达 HER-2 并非出乎意料。EGFR 途径未活化。没有理由用针对 EGFR 或 HER-2 的靶向治疗治疗该患者。患者 01-014 有 3 个 CTC 全都 EGFR 表达染色阳性。测得该患者的 EGFR 或 HER-2 未磷酸化。尽管 CTC 显示 EGFR 表达,但 EGFR 途径未活化。不存在 HER-2 时 EGFR 水平较低不足以激活癌细胞。同样,没有理由用针对 EGFR 或 HER-2 的靶向治疗治疗该患者。

[0954] 表 42 总结了各名患者的诊断信息和推荐的治疗。

[0955] 表 42

[0956] 所研究的 5 名乳腺癌患者的诊断信息以及推荐的治疗总结

[0957]

患者 编号	ER 状态	PR 状态	HER-2 状态	CTC 数目	CTC EGFR	pEGFR	pHER-2	推荐治疗 (可在组合中加入化疗)
01-019	阳性	阴性	阴性	4	阴性	阴性	阴性	激素治疗
01-006	阴性	阴性	未知	1	阳性	阳性	阳性	拉帕替尼, Herceptin [®] + ZACTIMA [™] , Herceptin [®] + Erbitux [®] , Herceptin [®] + Iressa [®] , Herceptin [®] + Tarceva [®]
02-017	阴性	阴性	阴性	3	阳性	阳性	阳性	拉帕替尼, Herceptin [®] + ZACTIMA [™] , Herceptin [®] + Erbitux [®] , Herceptin [®] + Iressa [®] , Herceptin [®] + Tarceva [®]
01-003	阴性	阴性	阳性	1	阴性	阴性	阴性	(无 EGFR +/- 或 HER-2 抑制剂)
01-014	阴性	阴性	阳性	3	阳性	阴性	阴性	(无 EGFR +/- 或 HER-2 抑制剂)

[0958] 实施例 12. 定量检测临床样品 p95ErbB2 和其他截短的受体酪氨酸激酶或蛋白质的新试验

[0959] HER-2 也称为 ErbB2,是表皮生长因子受体或 HER 家族的四个成员(HER-1、HER-2、HER-3 和 HER-4)之一。所有 HER 受体具有类似结构:胞外配体结合域;短的疏水跨膜区和胞

质酪氨酸激酶结构域。配体结合或受体过表达诱导的 HER 受体异质二聚化或同质二聚化, 导致该受体激酶活化和几个酪氨酸残基随后磷酸化。这些位于受体羧基末端的磷酸化的酪氨酸残基募集补充介质分子而激活导致修饰细胞生长、分化和存活的信号传导途径。ErbB2 在大约 15-25% 的人乳腺癌中过表达 / 扩增, 其过表达 / 扩增与侵袭性表型有关。

[0960] 群司珠单抗 (**Herceptin[®]**, 一种能高亲和力结合 ErbB2 胞外域的重组人源化单克隆抗体) 与化疗联用, 为 ErbB2 过表达或 ErbB2 基因扩增的晚期乳腺癌患者提供了重要的临床效益, 提高了存活率。此外, 近年证明 **Herceptin[®]** 提高了 ErbB2 过表达早期乳腺癌患者的无复发存活率和总体存活率。

[0961] 然而, 由于原发性或获得性耐药, 70-80% 的 ErbB2 过表达性乳腺癌患者对单独给予 **Herceptin[®]** 治疗无反应。 **Herceptin[®]** 耐药性的几种可能机制包括: 磷酸酶和染色体 10 上检测到的张力蛋白类似物 (PTEN) 失活或缺失; 包括胰岛素样生长因子受体 (IGF-1R) 在内的其他酪氨酸激酶受体活化; 以及缺乏氨基末端胞外 **Herceptin[®]**-结合域的 ErbB2 截短受体累积。

[0962] 仅含胞质羧基末端片段 (统称为 p95ErbB2 或 C-末端片段) 的 ErbB2 截短多肽常见于表达 ErbB2 的乳腺癌细胞系和肿瘤。实际上, 这些片段是某些肿瘤的主要 ErbB2 形式。这些片段是全长 ErbB2 的胞外域通过蛋白酶解加工, 或者从分别位于跨膜区前和后的两个甲硫氨酸残基 (氨基酸 611 或 687) 交替开始翻译而产生的。

[0963] 对 p95ErbB2 的生物学功能还没完全了解, 但已证明 p95ErbB2 过表达会导致肿瘤异种移植物在裸鼠中生长。p95ErbB2 蛋白具有激酶活性, 这种活性为肿瘤生长所必需。不存在 **Herceptin[®]**-结合胞外域的截短受体 p95ErbB2 具有激酶活性的事实提示, 表达 p95ErbB2 的肿瘤对 **Herceptin[®]** 耐药, 但对泛-HER 抑制剂如拉帕替尼 (一种 ErbB2 的低分子量酪氨酸激酶抑制剂, 在患有 **Herceptin[®]** 耐药表达 ErbB2 的肿瘤的患者中有活性) 的抑制作用敏感。早期临床数据表明, 表达 p95ErbB2 的 8/9 患者对 **Herceptin[®]** 耐药。近年还证明, 发生对泛-HER 酪氨酸激酶抑制剂和 **Herceptin[®]** 的获得性耐药, 是通过导致 ErbB3 过表达的反馈机制, 或者通过 ErbB2 截短而导致 p95ErbB2 形成所致。

[0964] 由于 **Herceptin[®]** 能抑制 ErbB2 截短, 因此联用 **Herceptin[®]** 和泛-HER 酪氨酸激酶抑制剂治疗 **Herceptin[®]** 和 / 或 pan-HER 酪氨酸激酶抑制剂获得性耐药患者可能是理想的。

[0965] 就目前检测 p95ErbB2 的方法而言, 可用 Western 印迹分析检测人乳腺肿瘤中是否存在 p95ErbB2。然而, 这项技术需要大量新鲜冷冻的肿瘤组织, 由于很难从临床样品中获得这种组织, 因此限制多多。可用获自临床样品的常规福尔马林固定石蜡包埋组织切片进行免疫荧光 p95ErbB2 检测试验。该技术的建立是由于发现位于胞质和细胞膜上的是 p95ErbB2, 而不是全长 ErbB2。该方法采用抗-HER 抗体, 它能靶向胞内域依赖于胞质染色质的差异。然而, 免疫荧光方法的敏感性有限 (每个细胞约 10,000 个受体), 因此无法检测低水平的驱动肿瘤增殖的 p95ErbB2。此外, 功能性 p95ErbB2 多肽位于细胞膜上而非胞质中。此外, 很难区分胞质中的内化 ErbB2 和胞质中的 p95ErbB2。

[0966] 本文所述的新的超灵敏高特异性试验方法克服了检测 p95ErbB2 现有方法的局限性, 能够广泛用于各种临床样品, 如细针抽吸物、中心活检组织以及获自血液的循环肿瘤细

胞 (CTC)。除了测量 ErbB2 外,本发明的方法能够检测极少量生物材料中 ErbB 家族所有四种成员以及 PTEN 和 IGF-1R 的活化状态。

[0967] 示范性方法

[0968] 图 13 显示,可利用附着于聚苯乙烯珠或多聚葡聚糖的 ErbB2 胞外域结合抗体,除去临床样品中的全长 ErbB2。该试验的优点在于,能快速解析结合动力学,通过结合于珠的受体抗体选择性提取全长蛋白,以及使珠结合的蛋白质不能结合平面阵列。或者,可用荷磁珠将全长 ErbB2 留在后面,只将截短的 p95ErbB2 施加于微阵列。

[0969] 下面的试验方法“A”说明了用高灵敏度和特异性的邻近试验检测 p95ErbB2。下面的试验方法“B”说明了用单一抗体检测 p95ErbB2。这些检测截短蛋白的方法可用于许多不同的蛋白质,包括但不限于:p95ErbB2,EGFR V111 突变蛋白(涉及胶质母细胞瘤、结肠直肠癌等)、其他截短受体酪氨酸激酶、胱冬酶等等。

[0970] A. 利用酪酰胺信号放大的微阵列 ELISA 进行邻近双重试验检测截短受体

[0971] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重高通量邻近双重检测微阵列 ELISA,它适合检测稀少循环细胞中的截短受体,如 p95ErbB2:

[0972] 1) 将捕捉抗体的 1mg/ml-0.004mg/ml 系列稀释液印刷在获特满公司的 16-圈孔 FAST 载玻片上。

[0973] 2) 干燥过夜,用获特满封闭缓冲液封闭载玻片。

[0974] 3) 各圈孔中加入 80 微升 BT474 细胞裂解液的 10 倍系列稀释液,和或不和用抗 -ErbB2(胞外)抗体包被的珠。室温培育载玻片 2 小时。

[0975] 4) 用 TBS-Tween 洗涤 6 次后,载玻片上加入 80 μ l 用 TBS-Tween/2% BSA/1% FBS 稀释的邻近试验检测抗体。所用的检测抗体是:(1) 直接偶连于葡萄糖氧化酶 (GO) 的 ErbB2 胞内域特异性抗 -ErbB2 抗体;和 (2) 直接偶连于辣根过氧化物酶 (HRP) 的识别磷酸化 ErbB2 的单克隆抗体。室温培育 2 小时。

[0976] 5) 为放大信号,加入 80 微升 5 μ g/ml 的生物素-酪酰胺只与 50mM 葡萄糖反应 15 分钟。用 TBS-吐温洗涤载玻片六次,用 20% DMSO/TBS-吐温洗涤两次,用 TBS 洗涤一次。加入 80 微升 SA-Alexa 555 培育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次,干燥 5 分钟,用帕金埃尔默公司的微阵列扫描仪扫描。

[0977] 6) 一个非限制性例子是,载玻片 1 可报告总体 ErbB2 活化,而载玻片 2 能报告截短的 ErbB2 活化。根据样品中活化 ErbB2 的含量或者截短 ErbB2 的总量选择合适的治疗。

[0978] B. 利用酪酰胺信号放大微阵列 ELISA 检测截短受体。

[0979] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重高通量单一检测微阵列 ELISA 适合检测稀少循环细胞中的截短受体,如 p95ErbB2:

[0980] 1) 将捕捉抗体的 1mg/ml-0.004mg/ml 系列稀释液印制在获特满公司的 16-圈孔 FAST 载玻片上。

[0981] 2) 干燥过夜,用获特满封闭缓冲液封闭载玻片。

[0982] 3) 以在各圈孔中加入 80 微升 BT474 细胞裂解液的 10 倍系列稀释液,和或不和用抗 -ErbB2(胞外)抗体包被的珠。室温培育载玻片 2 小时。

[0983] 4) 用 TBS-Tween 洗涤 6 次后,载玻片上加入 80 μ l 用 TBS-Tween/2% BSA/1% FBS 稀释的检测抗体。所用的检测抗体是直接偶联于 HRP 的 ErbB2 胞内域特异性抗 -ErbB2 抗

体。室温培育 2 小时。

[0984] 5) 为放大信号,加入 80 微升 $5\mu\text{g/ml}$ 的生物素-酪酰胺与 1mM 过氧化氢反应 15 分钟。用 TBS-吐温洗涤载玻片六次,用 20% DMSO/TBS-吐温洗涤两次,用 TBS 洗涤一次。

[0985] 6) 加入 80 微升 SA-Alexa 555 培育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次,干燥 5 分钟,用帕金埃尔默公司的微阵列扫描仪扫描。

[0986] 7) 一个非限制性的例子是,载玻片 1 可报告总体 ErbB2 活化,而载玻片 2 能报告截短的 ErbB2 活化。根据样品中活化 ErbB2 的含量或者截短 ErbB2 的总量选择合适的治疗。

[0987] 图 14 显示了检测截短受体如 p95ErbB2 的本发明的一个实施方式。图 14A 显示,用抗感兴趣受体胞外域 (ECD) 的抗体包被的珠能结合全长受体但不结合截短受体,除去该试验的所有全长受体。图 14B 显示,截短受体一旦与捕捉抗体结合,就可用全长受体胞内域 (ICD) 的特异性检测抗体检测。所述检测抗体可以直接偶联于辣根过氧化物酶 (HRP)。然后进行酪酰胺信号放大 (TSA),产生可被检测的信号。

[0988] 就 p95ErbB2 而言,图 15 显示,用抗 ErbB2 (HER-2) 胞外域 (ECD) 的抗体包被的珠预处理,能几乎完全除去全长 ErbB2 的信号且不会影响 ErbB2 胞内域 (ICD) 的信号。全长 ErbB2 信号的降低取决于试验所用的 HER-2ECD 抗体偶联珠的浓度,抗体偶联珠用量从 $4\mu\text{g/ml}$ 升至 $12\mu\text{g/ml}$ 时,全长 ErbB2 信号从 9.59% 降至 2.84%。

[0989] 图 16 和 17 证实,用上述试验方法可特异性检测 p95ErbB2。如图 16 所示,APMA ((4-氨基苯基)醋酸汞) 处理提高了 BT-474 细胞的 p95ErbB2 磷酸化水平。图 17 显示,异调蛋白提高了 T47D 细胞中的 p95ErbB2 磷酸化水平。

[0990] 因此,上述检测患者样品中截短蛋白如 p95ErbB2 的方法至少有以下几点优于目前方法:

[0991] 1) 灵敏度较高,能够检测一个细胞中的截短受体。

[0992] 2) 特异性较高。

[0993] 3) 用多重微阵列能够报告整个途径诸蛋白的状态而非单个蛋白状态。

[0994] 4) 可扩大规模。

[0995] 实施例 13. 通过基因表达面板鉴定复发风险,为 I 期或 II 期淋巴-结-阴性浸润性乳腺癌患者选择治疗药物。

[0996] 已用开发的基因表达标记面板预测各类妇女群体 (例如淋巴结阴性癌患者) 的乳腺癌预后和 / 或复发可能性。可用这些基因试剂盒鉴定哪些妇女不可能复发,因此不可能从辅助化疗受益。可用这种表达面板鉴定哪些妇女可以安全地避免辅助化疗,不会对无病和总体存活结果有不良影响。合适的系统包括但不限于: Oncotype DX™ (GH 公司 (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA) 制造的 21 个基因面板); MammaPrint® (Agendia 公司 (阿姆斯特丹, 荷兰) 制造的 70 个基因面板); 以及 Veridex 公司 (Warren, NJ) 的 76 个基因面板。这些面板可与途径活化分析联用,以确定用上面实施例所述方法选择的合适靶向治疗中是否需要包括化疗。

[0997] 以下方案提供了本发明的一个示范性实施方式,其中联用了基因表达概况分析与活化状态概况分析,以选择用于治疗乳腺癌的合适靶向治疗或组合靶向治疗:

[0998] 1) 用活检穿刺针收集最小厚度 3mm 最大厚度 5mm 的肿瘤样品。将活检样品直接置于含有 RNARetain™ 防腐剂的样品管中。将试管直接运送到 Agendia 用 MammaPrint® 试验

检测。

[0999] 2) Agendia 的检测报告将患者分为“好”/ 低风险组或“差”/ 高风险组。如果患者在低风险组中,则可以安全地避免辅助化疗,不会对无病以及总体存活率有不良影响。

[1000] 3) **MammaPrint[®]** 试验适合于 ER 阳性或 ER 阴性患者。一旦确定 ER 或 ErbB2 状态,便可将患者分配到实施例 8 所述的乳腺癌亚类之一。这四种主要亚类如下:

[1001] 1. ER+/PR+/ErbB2-

[1002] 2. ER+/ErbB2+

[1003] 3. ER-/ErbB2+

[1004] 4. ER-/PR-/ErbB2

[1005] 4) 如实施例 1 所述分离血液的肿瘤细胞(如 CTC)作好分析准备。或者如实施例 2 所述用部分活检样品制备肿瘤细胞提取物。如实施例 3 或实施例 4 所述制备和检测细胞。用与实施例 8(表 4-22)、实施例 9(表 23-31) 和实施例 10(表 32-35) 所述类似的方法评价活化概况。选择合适的靶向治疗或组合靶向治疗。如果患者在低风险组,无需加入化疗。如果患者在高风险组,由医师根据临床信息在靶向治疗中加入选择的化疗。

[1006] 实施例 14 用基因表达面板确定癌的主要来源组织后为患者选择治疗方法。

[1007] 所有转移性肿瘤大约 3-5% 归类为未知原发部位的癌症(CUP)。由于目前的治疗方法主要根据肿瘤的解剖学位置,因此正确诊断来源组织对于治疗决策至关重要。可用基因表达面板鉴定哪些患转移癌的妇女能从给予的治疗中获益,所述妇女是开始就诊断为乳腺癌的妇女。合适的系统包括但不限于:Rosetta Genomics CUP 试验,该试验通过分析微小 RNA 的表达模式给癌症和来源组织分类(参见,例如,PCT 公布号 WO 08/117278);Aviara DX(Carlsbad, CA) 的 CancerTYPE ID[™] 试验,这是一种基于 RT-PCR 的表达试验,能测量 92 种基而鉴定 39 种肿瘤的起源位置;以及 Pathwork[™] 起源组织试验(Sunnyvale, CA),该试验用微阵列能检测 1600 种以上基因的表达,并将肿瘤基因表达“特征”与 15 种已知组织类型的表达特征进行比较。一旦鉴定患者的原发癌组织是乳腺,可利用途径活化状态在治疗方案中选择包括合适的靶向治疗。

[1008] 以下方案提供了本发明的一个示范性实施方式,其中联用基因表达概况分析与活化状态概况分析,来选择用于治疗乳腺癌的合适的靶向治疗或组合靶向治疗:

[1009] 1) 通过手术或细针活检获得患者转移肿瘤组织 7 μ m 切片的一个或多个玻璃载玻片。用福尔马林固定石蜡包埋这些细胞(FFPE)。用 H&E 染色同一肿瘤的另一个 H&E 染色载玻片。

[1010] 2) 病理学家检查 H&E 载玻片并标出 CancerTYPE ID[™] 试验要收集区域。将载玻片送到 Aviara DX 进行分析。

[1011] 3) Aviara DX 的检测报告指出通过 k-最近邻分析确定的 5 个最可能的起源部位并作出预测。如果预测患者乳腺肿瘤的来源未知,则评价该患者肿瘤细胞的途径活化状况。

[1012] 4) 如实施例 1 所述分离血液的肿瘤细胞(如 CTC)作好分析准备。或者如实施例 2 所述用细针活检样品制备肿瘤细胞提取物。如实施例 3 或实施例 4 所述制备和测定细胞。用与实施例 8(表 4-22)、实施例 9(表 23-31) 和实施例 10(表 32-35) 所述类似的方法评价活化概况。选择合适的靶向治疗或组合靶向治疗。

[1013] 实施例 15. 用邻近试验检测乳腺癌的新设置。

[1014] 背景：

[1015] 2008 年，估计美国妇女中将鉴定有 182,460 例浸润性乳腺癌新病例。大约 20% 的乳腺癌妇女在诊断时有 HER-2 过表达。过表达 HER-2 (HER-2 阳性) 乳腺癌与更具侵袭形式的癌症有关，因此导致存活率较差和复发率较高。HER-2 阳性患者常用单克隆抗体药物群司珠单抗(Herceptin®)治疗。然而，Herceptin®是一种昂贵的可能有心脏毒性的治疗药物；因此必需准确鉴定候选人以使临床结果最佳。Herceptin®通过阻断 HER-2 而减缓肿瘤细胞生长发挥作用。拉帕替尼(Tykerb®)是一种小分子量的激酶抑制剂，常用于Herceptin®治疗失败患者。

[1016] 现有的 HER-2 检测选项：

[1017] 通常通过以下一项或两项来评估 HER-2 状态：(1) 用免疫组织化学试验 (IHC) 检测该受体蛋白质；或 (2) 用原位杂交荧光 (FISH) 检测技术检测基因扩增。然而，广泛认为目前的检测方法缺乏准确度，各个实验室之间差别很大，随样品被实验室接受之前的处理方法不同而不同。事实上，已有的证据提示，现有 HER-2 检测约 20% 不准确（有关乳腺癌 HER-2 检测的 ASCO/CAP 指南 (ASCO/CAP Guidelines for HER-2 Testing in Breast Cancer), J. Clin. Oncology (2007)）。

[1018] 基于邻近试验的乳腺癌检测：

[1019] 该实施例所述的乳腺癌检测的新设置利用了本文所述的多重高通量邻近（即，三抗体）试验。这种诊断试验在确定从乳腺癌患者收集的循环肿瘤细胞 (CTC) 或细针抽吸物 (FNA) 的 HER-2 表达和活化特别有效，有助于为乳腺癌患者选择治疗方案。

[1020] 以下方案描述了用于该实施例中列出的所有试验的标准模式：

[1021] 1. 收集血样：

[1022] a. 收集 2 管血液，每管 7.5mL。

[1023] b. 用带有上皮细胞特异性结合蛋白的 Veridex 上皮细胞附着模块 (EpCAM, Veridex Epithelial Cell Adhesion Molecule) 磁珠分离循环肿瘤细胞 (CTC) 与其他血液组分。

[1024] c. 洗涤样品。

[1025] 2. 活化一份样品（仅活化活细胞）并裂解那些活化细胞。

[1026] 3. 裂解其他样品细胞。

[1027] 4.（该步骤在各试验之间不同）用邻近微阵列试验检测活化样品中的两种蛋白质（例如，信号转导蛋白）和细胞角蛋白，定量总的活化蛋白和细胞角蛋白：

[1028] a. 将两种蛋白质和细胞角蛋白 (CK) 的三种特异性单克隆抗体固定于微阵列。

[1029] b. 将样品倒入微阵列芯片上，使分析物结合它们的特异性单克隆抗体。

[1030] c. 在微阵列芯片上倒入 6 种额外单克隆抗体的混合物（每种分析物两种单克隆抗体）。为了使分析物位点发生荧光，所有三种特异性单克隆抗体（一种固定抗体和两种倒入的抗体）必需与分析物结合。

[1031] 5. 对灭活样品中的两种蛋白质进行蛋白质微阵列分析，定量总蛋白。

[1032] 6. 用灭活样品校准各活化蛋白的结果。将产生的三种分析物的蛋白质定量结果用“+”或“-”表示。

[1033] 产品 A [**Herceptin**[®]]:该试验是基线 ErbB 活化测试,用来检测 HER-2 活化 / 磷酸化状态。该试验也是增强的 ErbB 活化试验,用于 III 和 IV 期患者,测定 HER-2 的不一致。进行邻近微阵列试验,检测活化样品中的 ErbB1/HER-1、ErbB2/HER-2 以及细胞角蛋白,定量总的活化蛋白和细胞角蛋白。采用抗 ErbB1/HER-1 和 ErbB2/HER-2 单克隆抗体,而对上皮细胞检测采用泛细胞角蛋白 (pancytokeratin) 抗体。定量的信号描述了 HER-2 和 HER-1 蛋白活化和表达的水平。从磷酸化与表达的比例得到相对活化评分。该试验可定量检测: HER-2 活化 (磷酸化);HER-2 表达;HER-1 活化 (磷酸化);HER-1 表达;以及泛细胞角蛋白 (供细胞数目标标准化)。由于可检测一个循环肿瘤细胞的 HER-2 活化,此试验灵敏度很高。测得与其他标记物的交叉反应低于 1%,此试验的特异性 $\geq 99\%$ 。再现性 (院内试验): CV = 5-15%。再现性 (院间试验): CV = 10-20%。试验报告可提供以下信息: (1) HER-2 和 HER-1 磷酸化,报告为测定的含量,用阳性或阴性表示; (2) HER-2 和 HER-1 表达,报告为测定的含量,用阳性或阴性表示;以及 (3) 细胞角蛋白定量。如果 HER-1 或 HER-2 水平正常但细胞角蛋白水平高,则可诊断是乳腺癌,但不能用 HER-1 或 HER-2 靶向治疗。

[1034] 产品 B [**Tykerb**[®] Rule 试验]:该试验是增强的 ErbB 活化试验,包括检测 p95HER-2 和 EGFR。具体说,这是对用**Herceptin**[®]治疗失败的 HER-2 阳性患者改用拉帕替尼(**Tykerb**[®])治疗的常规试验。该试验能帮助选择和监测**Herceptin**[®]患者,以及帮助患者从**Herceptin**[®]治疗转变成**Tykerb**[®]治疗。进行邻近微阵列试验以检测活化样品中的 ErbB1/HER-1、p95HER-2 以及细胞角蛋白,从而定量总的活化蛋白和细胞角蛋白。采用抗 ErbB1/HER-1 和 p95HER-2 单克隆抗体,而对上皮细胞检测采用泛细胞角蛋白 (pancytokeratin) 抗体。该试验可定量:p95-HER-2 活化 (磷酸化);p95-HER-2 表达;HER-1 活化 (磷酸化);HER-1 表达;以及泛细胞角蛋白 (供细胞数目标标准化)。临床试验中可用该试验方法验证根据 IHC 或 FISH 曾经被诊断为 HER-2 阳性用**Herceptin**[®]治疗失败的 p95-HER-2 转移性癌患者。根据邻近试验证明为 p95-HER-2 和 HER-1 活化的患者可用**Tykerb**[®]治疗。该试验对于用**Tykerb**[®]治疗的 p95-HER-2 阳性患者的总体存活率有益。由于 p95HER-2 缺乏 HER-2 的**Herceptin**[®]-结合胞外域,p95HER-2 水平高表明可不用**Herceptin**[®]而用**Tykerb**[®]替代。然而,如果 HER-1 或 HER-2 水平正常但细胞角蛋白水平高,则可诊断是乳腺癌,但不能用 HER-1 或 HER-2 靶向治疗。

[1035] 图 18 显示了可用本发明方法影响临床实践为特定患者选择合适乳腺癌治疗方法的多个步骤。

[1036] 实施例 16. 制备巯基活化的葡聚糖

[1037] 该实施例描述了将游离巯基掺入葡聚糖分子的过程。如实施例 17 所述,可用巯基修饰的葡聚糖分子来制备抗体和葡糖氧化酶 (GO) 偶联物,用于本文所述的单一检测和邻近试验。在一些实施方式中,巯基活化的 500kDa 葡聚糖分子可与抗体和 GO 偶联,抗体: GO: 葡聚糖的比例为 2: 12: 1。巯基活化的 500kDa 葡聚糖分子与抗体和 GO 偶联有利地提高了该试验的灵敏度约 10 倍。在其他实施方式中,巯基活化的 500kDa 葡聚糖分子可与抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联。

[1038] 定义和缩写:

- [1039] 1. 葡聚糖 = 葡萄糖聚合物
- [1040] 2. 盐酸 = HCl
- [1041] 3. N-(3- 二甲基氨基丙基)-N' - 乙基碳二亚胺盐酸盐 = EDC
- [1042] 4. 磷酸缓冲盐水 = PBS
- [1043] 5. 氢氧化钠 = NaOH
- [1044] 6. 2- 吗啉代乙磺酸 = MES
- [1045] 7. 乙二胺四乙酸 = EDTA
- [1046] 仪器和设备 :
- [1047] 1. 水浴 (Fisher, Isotemp 210)
- [1048] 2. ELISA 平板读数器 (Molecular Devices, SpectraMAX 1900)
- [1049] 3. ELISA 平板洗涤器 (Nunc, Nunc-Immuno Wash 8)
- [1050] 4. 涡漩混合器 (Fisher, Vortex Mixer)
- [1051] 5. 冻干机 (Virtis, Freezemobile 12)
- [1052] 6. 离心机 (Beckman, GS-6R)
- [1053] 7. 磁力搅拌器 (Corning, PC-410D)
- [1054] 8. 纳米纯 (NANOpure) 水生成设备 (Barnstead, NANOpure Dlamond)
- [1055] 9. 透析盒 (Pierce, 66380)
- [1056] 试剂、化学品和供应商 :
- [1057] 1. 500kDa 葡聚糖 (Fisher, BP1580-100)
- [1058] 2. 溴乙酸 (Sigma, 259357)
- [1059] 3. 氢氧化钠 (Fisher, S318-500)
- [1060] 4. 异丙醇 (Fisher, A451-4)
- [1061] 5. 12N 盐酸 (Fisher, A144-500)
- [1062] 6. 半胱胺 (Sigma, M9768)
- [1063] 7. N-(3- 二甲基氨基丙基)-N' - 乙基碳二亚胺盐酸盐 (Pierce, 22980)
- [1064] 8. 磷酸缓冲盐水 (Cellgro, 21-040-CV)
- [1065] 9. 0.5M 乙二胺四乙酸溶液 (GIBCO, 15575-038)
- [1066] 10. 2- 吗啉代乙磺酸 (Fluka, 69892)
- [1067] 11. 10X 磷酸缓冲盐水 (Fisher, BP399-500)
- [1068] 缓冲液和溶液
- [1069] 1. 2.9M NaOH : 将 5.8g 氢氧化钠溶于 50mL 纳米纯水。
- [1070] 2. 50mM MES 缓冲液 : 将 5.33g 2- 吗啉代乙磺酸溶于 500mL 纳米纯水并用 12N HCL 将 pH 调至 4.5。
- [1071] 3. 透析缓冲液 : 在 890mL 纳米纯水中加入 10mL 0.5M EDTA 溶液和 100mL 10X PBS 使终浓度为 5mM EDTA/PBS。
- [1072] 步骤 :
- [1073] 在葡聚糖中掺入羧基 :
- [1074] 1. 将 1g 500kDa 葡聚糖 (2 μ mol) 溶于 50mL 聚丙烯螺口试管中的 8.5mL 2.9M NaOH, 加入 850mg 溴乙酸。涡漩振荡充分混合后, 将试管 50℃ 水浴培育过夜。

[1075] 2. 培育后反应混合物中加入异丙醇至终浓度 70% (体积 / 体积) 沉淀羧化的葡聚糖。涡漩混合器混合后, 用 Beckman 离心机室温 3000rpm 离心溶液 15 分钟, 弃去上清液。

[1076] 3. 沉淀重溶于 10mL 纳米纯水, 用异丙醇反复沉淀 2-3 次直到加入异丙醇不再有沉淀出现。然后用 12N HCl 将澄清的 70% 异丙醇溶液调至 pH 4, 涡漩混合再产生沉淀, 用 Beckman 离心机 3000rpm 离心混合物 15 分钟再沉淀羧化葡聚糖, 弃去上清液。

[1077] 4. 为除去残留的溴乙酸, 将沉淀重溶于 10mL 纳米纯水用 HCl 调节溶液的 pH 至 4。然后加入异丙醇至 70 体积% 沉淀羧化葡聚糖。涡漩混合器混合后用 Beckman 离心机 3000rpm 离心溶液 15 分钟, 弃去上清液。重复此洗涤过程共三次。

[1078] 5. 最后一次洗涤后, 沉淀再溶于 10mL 纳米纯水, 用冻干机冻干溶液除去 HCl。

[1079] 6. -70℃ 储存冻干的羧化葡聚糖。

[1080] 将羧化葡聚糖的羧基转变成巯基:

[1081] 1. 将 10mg 冻干羧化葡聚糖溶于 2mL 棕色玻璃试管中的 0.5mL 50mM MES 缓冲液。

[1082] 2. 在上述羧化葡聚糖溶液中加入 1.42mg EDC, 40℃ 搅拌 30 分钟。

[1083] 3. 然后在混合物中加入 10 毫克半胱胺, 4℃ 搅拌所得溶液 1 小时。

[1084] 4. 搅拌后将混合液转移到分子量截断值为 10,000 的 0.5-3.0mL 透析盒中, 4℃ 用 500mL PBS, pH 7.4 透析过夜。

[1085] 5. 然后将透析缓冲液更换成 5mM EDTA/PBS, 再透析 2 小时。再重复透析过程一次。

[1086] 6. 每 500kDa 葡聚糖分子中掺入的巯基的总数用 Ellman 试验确定。

[1087] 7. 在 1mL 塑料离心管中制备掺入巯基的葡聚糖溶液 50 微升等份, 冻干诸等份。-70℃ 储存冻干等份。

[1088] 实施例 17, 制备 HER-2 抗体 - 葡糖氧化酶 - 葡聚糖偶联物。

[1089] 该实施例描述了将抗 HER-2 胞外域的抗体与葡糖氧化酶 (GO) 偶联于巯基活化的 500kDa 葡聚糖分子的过程。所述 HER-2 抗体 -GO- 葡聚糖偶联物可用于本文所述单一检测和邻近试验。

[1090] 定义和缩写:

[1091] 1. 琥珀酰亚胺基 -4-(N- 马来酰亚胺甲基) 环己烷 -1- 羧基 -(6- 氨基乙酸酯) = LC-SMCC

[1092] 2. 二甲亚砜 = DMSO

[1093] 3. 氢氧化钠 = NaOH

[1094] 4. 浓盐酸 = HCl

[1095] 5. 磷酸缓冲盐水 = PBS

[1096] 6. 乙二胺四乙酸 = EDTA

[1097] 7. 2-(乙基汞巯基) 苯甲酸钠盐 = 硫柳汞

[1098] 8. HPLC = 高效液相层析

[1099] 仪器和设备:

[1100] 1. HPLC 系统 (安捷伦技术公司 (Agilent Technologies) ;1100 系列)

[1101] 2. 分子大小排阻色谱柱 (诺麦克斯公司 (Phenomenex) ;BioSep-SEC-S 3000)

[1102] 3. 分光光度计 (日立 (Hitachi) ;U-200)

[1103] 4. 离心机 (贝克曼 (Beckman) ;GS-6R)

- [1104] 5. 磁力搅拌器 (康宁 (Corning) ;PC-410D)
- [1105] 6. ELISA 平板读数器 (分子仪器 (Molecular Devices) ;SpectraMAX1900)
- [1106] 7. 涡漩混合器 (菲希尔科技 (Fisher Scientific) ;02-215-365)
- [1107] 8. 脱盐柱 (皮尔斯 (Pierce), 43230)
- [1108] 9. Centricon YM-10 装置 (密理博 (Millipore), 4205)
- [1109] 10. 1mL 移液管 (雷宁 (Rainin), L-1000)
- [1110] 11. 200 μ L 移液管 (雷宁 (Rainin), L-200)
- [1111] 12. 20 μ L 移液管 (雷宁 (Rainin), L-20)
- [1112] 13. 2 μ L 移液管 (雷宁 (Rainin), L-2)
- [1113] 14. 多通道移液器 (雷宁 (Rainin), L8-200)
- [1114] 试剂、化学品和供应商:
- [1115] 1. 小鼠抗人 HER-2 单克隆抗体, 1mg/mL 的 PBS 溶液 (LV 公司 (Lab Vision) ; MS-301-PABX)
- [1116] 2. 经透析的葡萄糖氧化酶 (普罗米修斯公司 (Prometheus))
- [1117] 3. 巯基-活化的葡聚糖 (普罗米修斯公司)
- [1118] 4. LC-SMCC = 琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧基-(6-氨基乙酸酯) (菲希尔公司 (Fisher) ;22362)
- [1119] 5. DMSO = 二甲亚砜 (西格玛 (Sigma) ;D2650)
- [1120] 6. 牛血清白蛋白 (西格玛 ;A3294)
- [1121] 7. 氢氧化钠 (菲希尔公司 ;S318)
- [1122] 8. 浓盐酸 (菲希尔公司 ;A144-500)
- [1123] 9. PBS = 磷酸缓冲盐水 (赛格露 (Cellgro), 21-040-CV)
- [1124] 10. 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (英杰公司 (Invitrogen) ;1758)
- [1125] 11. 硫柳汞 (西格玛, T8784)
- [1126] 缓冲液和溶液
- [1127] 1. 脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液, pH 7.2: 将 2mL 0.5M EDTA 溶液加入 200mL PBS 中, 然后在所得溶液中鼓入氩气泡 5 分钟除去溶液中的所有其他气体。
- [1128] 2. 10% BSA/PBS 溶液: 将 100mg BSA 溶于 10mL PBS, 通过 0.2 μ m 滤器过滤该溶液。-20℃ 冰箱保存溶液。
- [1129] 3. 10% 硫柳汞 /PBS 溶液: 将 100mg 硫柳汞溶于 10mL PBS, 通过 0.2 μ m 滤器过滤该溶液。-20℃ 冰箱保存溶液。
- [1130] 4. 0.1M PB (磷酸盐缓冲液), pH 6.8。
- [1131] 步骤:
- [1132] 制备 LC-SMCC 溶液立即用于活化反应:
- [1133] 1. 从 -20℃ 的冰箱中取出一瓶 LC-SMCC 使其恢复至室温。
- [1134] 2. 称取 1-2mg LC-SMCC 置于 1.5mL 离心管中加入适量 DMSO, 制成 4.5mg/mL (10mM LC-SMCC) 溶液。剩余的 LC-SMCC 返回冰箱保存。
- [1135] LC-SMCC 活化 HER-2 抗体:
- [1136] 1. 在含 500 μ g 抗体的 0.5mL HER-2 抗体溶液中加入 2.3 μ L 10mM LC-SMCC 溶液,

立即涡漩振荡开始反应。涡漩振荡后室温保持混合液继续反应 30 分钟。

[1137] 2. 同时用 50mL 脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液洗涤脱盐柱进行预平衡。

[1138] 3. 用 LC-SMCC 活化 HER-2 抗体之后将活化混合液加载到脱盐柱上, 室温用脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液洗脱。收集洗脱液, 每份 0.5mL, 用分光光度计监测 280nm 的 UV 吸光度。

[1139] 4. 根据 UV 吸光度合并含活化抗体的组分, 冰上保存用于随后的反应。

[1140] LC-SMCC 活化葡糖氧化酶:

[1141] 1. 取 0.16mL 透析的葡糖氧化酶, 其中含 4mg 酶, 用脱气的 5mMEDTA/PBS 缓冲液将其体积调至 0.5mL。

[1142] 2. 在 0.5mL 葡糖氧化酶溶液中加入 12.4 μ L 10mM LC-SMCC 溶液, 立即涡漩振荡开始反应。涡漩振荡后将混合物保持在室温继续反应 30 分钟。

[1143] 3. 同时用 50mL 脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液洗涤脱盐柱进行预平衡。

[1144] 4. 用 LC-SMCC 活化葡糖氧化酶后, 将活化混合物加载到脱盐柱上, 室温用脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液洗脱。收集洗脱液, 每份 0.5mL, 用分光光度计监测 280nm 的 UV 吸光度。

[1145] 5. 根据 UV 吸光度合并含活化葡糖氧化酶的组分在冰上保存用于随后的反应。

[1146] 将活化的 HER-2 抗体和活化的葡糖氧化酶偶联于巯基活化的葡聚糖:

[1147] 1 在每份 1mg 冻干巯基-活化葡聚糖中加入 50 μ L 纳米纯水得到 20mg/mL 巯基活化葡聚糖溶液。

[1148] 2 在合并的活化抗体液中加入一定体积的相当于 3mg 葡糖氧化酶的合并的活化葡糖氧化酶溶液, 然后加入 34.3 μ L 巯基修饰葡聚糖溶液, 使抗体: 葡糖氧化酶: 葡聚糖的摩尔比约为 2 : 12 : 1。涡漩混合后混合物置 4℃过夜。

[1149] 3 加入 56.4 μ L 用脱气的 0.5mM EDTA/PBS 缓冲液配制的 1mg/mL N-乙基马来酰亚胺, 4℃封闭反应 3 小时, 封闭修饰葡聚糖上残留的过量巯基。

[1150] 纯化 HER-2 抗体-葡糖氧化酶-葡聚糖偶联物:

[1151] 1. 封闭反应后, 用装有 10,000 分子量截断值的 YM-10 膜的 Centricon 装置将 HER-2 抗体-葡糖氧化酶-葡聚糖偶联物浓缩至约 300 μ L。

[1152] 2. 将浓缩液转移到 1.5mL 离心管内, 16,000g 旋转离心管 3 分钟除去小量沉淀。

[1153] 3. 上清液转移到 HPLC 样品管内, 用脱气的 5mM EDTA/PBS 缓冲液调节溶液体积至 320 μ L 以使用 HPLC 纯化。

[1154] 4. 将 100 微升偶联液注入安捷伦 HPLC 系统的 BioSep-SE-S 300 分子大小排阻色谱柱, 用 0.1M PB, pH 6.8 洗脱液以 0.5 毫升/分钟流速分离偶联蛋白 40 分钟, 通过 280nmUV 吸光度监测洗脱液。

[1155] 5. 合并第一个 UV 吸收峰的洗脱组分, 保持在冰上。

[1156] 6. 剩余的 200 μ L 偶联液也同样纯化, 合并三次 HPLC 得到的第一 UV 吸收峰。用 10% BSA/PBS 溶液将合并偶联液调至 0.1% BSA, 再用 10% 硫柳汞 /PBS 溶液调至 0.02% 硫柳汞, -70℃长期储存。

[1157] 7. HER-2 抗体-葡糖氧化酶-葡聚糖偶联物的葡糖氧化酶活性用葡糖氧化酶功能试验测定。

[1158] 8. HER-2 抗体-葡萄糖氧化酶-葡聚糖偶联物的抗体活性用竞争性 ELISA 试验测定。

[1159] 实施例 18. 检测循环肿瘤细胞 ErbB 家族受体酪氨酸激酶活化的新型多重试验。

[1160] 简述：

[1161] 对连续取样的肿瘤组织中激酶和其他信号转导途径分子表达 / 活化的概况分析，可为肿瘤细胞随时间和治疗而发生的改变提供有价值的信息。这种肿瘤发展的时间空间概况分析使临床医生能够监测每位患者的癌症快速演变特征。该实施例阐述了一种检测受体酪氨酸激酶 (RTK) ErbB 家族表达水平和磷酸化程度的新型强效试验，证明采用这种可指导治疗的具有单个细胞水平灵敏度的诊断系统的优点。该试验通常依赖于细针抽吸物 (FNA) 和血液等样品，对检测有限量的获自此类样品的癌细胞具有高灵敏度和特异性。

[1162] 引言：

[1163] 癌症的发作和发展可能与信号转导途径受体和其他组分表达和活化调节异常有关。已将 HER-1 和 HER-2 的异常活化与各种类型癌症的发展相关联。分析 HER-1 和 HER-2 磷酸化状态概况的方法可为疾病的整体发病机制提供有价值的见解，因此通过鉴定这类致病相关分子可导致更好的治疗选择。本文所述试验基于：(1) 多重蛋白质微阵列平台和 (2) 三-抗体-酶传送信号放大方法。这种微阵列平台可满足容纳多重标记所需的扩展以及商品化应用所需的规模。本文所述试验的独特新型设计由三-抗体-酶方法所提供，该方法提供了超高灵敏度同时保留了特异性。在用该试验检测和定量因磷酸化而活化的那些靶标的实施方式中，所述试验可如下进行：

[1164] 1. 将靶特异性抗体的系列稀释液印刷在微阵列表面，用其捕捉选定的靶分子。图 19 描述了本发明试验的一个实施方式，该试验依赖于共同定位与酶相连的两种额外检测抗体，以便随后与（两种抗体）各自结合的靶蛋白沟通。

[1165] 2. 在图 19 所示的实施方式中，捕捉抗体先结合靶分子再与识别捕获靶分子上另一表位的偶联葡萄糖氧化酶 (GO) 的抗体结合，所形成的免疫复合物在 GO 底物如葡萄糖存在时产生 H_2O_2 。GO 是作用最快的一种酶，已知其（底物）转化速率 (TON) 为 10^5 /分。

[1166] 3. 在图 19 所示的实施方式中，偶联辣根过氧化物酶 (HRP, TON 为 10^4 /分) 的磷酸化肽-特异性抗体与被捕获靶分子上的磷酸化位点结合后，利用 H_2O_2 的靶特异性局部流入，而放大靶特异性信号。鉴于要求同时结合三种不同类型抗体，通过这种协同免疫检测和放大方法极大提高了对磷酸化靶分子的检测特异性。

[1167] 用本文所述试验通常可检测和定量低至 $2-3 \times 10^4$ 的磷酸化蛋白，检测可达到单个细胞水平。这种协同免疫试验构型可进一步用于研究蛋白质相互作用和活化状态。

[1168] 方法：

[1169] 组织培养：SKBR3、MDA-MB-468、T47D 和 BT474 细胞系获自 ATCC。用以下生长培养基：SKBR3-MacCoy's 5A 培养基含 10% FBS；MDA-MB-468-DMEM, 10% FBS；BT474-DMEM, 10% FBS；T47D-RPMI 1640, 10% FBS, 0.2U/ml 牛胰岛素，在 100mm 组织培养平板中 37°C 、5% CO_2 培养细胞。。生长至 70-80% 汇合时用温和分离方法（胰蛋白酶处理 + 随后灭活）收获细胞，用 1X PBS 洗涤后进行计数。在无血清生长培养基中加入 $100 \mu\text{M}$ EGF 或 $20 \mu\text{M}$ 异调蛋白 β 或二者刺激细胞 5 分钟。随后用 1X PBS 洗涤刺激过的细胞，然后置冰上裂解 0 分钟。

[1170] 载玻片点印：用含洗涤剂的 1x PBS 稀释捕捉抗体。利用接触式微阵列印刷机 (Genetix) 点印 16 圈孔硝酸纤维素 FAST 载玻片 (Whatman)。斑点直径约 $175 \mu\text{m}$ ，点印后的

载玻片置干燥室内 4℃保存。

[1171] 多重邻近试验:载玻片与封闭缓冲液一起培育 1 小时,然后用 TBST 缓冲液洗涤三次。然后在每个圈孔中加入细胞裂解液,室温 (RT) 培育过夜。完成初步结合后吸弃裂解液,然后用 TBST 洗涤每个圈孔数次。然后每个圈孔加入第二检测抗体 (与 GO 或 HRP 偶联) 室温培育 2 小时。用 TBST 洗涤除去未结合的第二检测抗体,每个圈孔加入含有葡萄糖和生物素化酪酰胺的信号放大缓冲液,培育 15 分钟。除去过量生物素化酪酰胺后加入 Alexa-647 偶联的链霉抗生物素蛋白,检测信号。

[1172] 数据分析:用 Perkin Elmer ScanArray Express 软件定量分析,按局部和整体背景强度校正数据。用 GenePixArray List (GAL) 文件提供描述名和标识符信息,将其加入图像分析输出文件中。取三复份斑点信号的平均值,标准化数据以纠正板间差异。用非线性回归模式定量细胞当量,得到相应的相对荧光单位 (RFU) 数值。将该数据与 5 参数希尔 (Hill) 方程拟合产生标准曲线。用已知对照验证每条曲线。预计适当稀释液的已知细胞数与未知样品强度曲线的最高斜率相对应。

[1173] Western 印迹:获得大致相等数目的每种细胞系的细胞裂解物后,将它们分成等份装入一次用小瓶中。用双金鸡纳酸 (BCA) 蛋白试验测定蛋白质浓度。用含 β -巯基乙醇的样品缓冲液制备样品,煮沸 5 分钟然后冷却至室温,将样品加载到 NuPage 4-12% 蛋白质梯度凝胶上。电泳后将凝胶分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。洗涤膜、用 5% 脱脂奶液封闭,先与第一抗体培育,然后与第二抗体培育,之后用 NBT/BCIP 检测。

[1174] 结果:

[1175] 灵敏度:检测多个细胞系 (MDA-MB-468, A431, BT-474 和 SKBr-3 细胞系) HER-1 和 HER-2 的活化和表达,灵敏度达到一个细胞水平。这些细胞系每个细胞的细胞膜上大约表达 1×10^6 个总 RTK 分子,虽然总 RTK 中只有几个亚组被磷酸化,这种磷酸化是信号转导途径活化所必需。SKBR-3 细胞由于扩增而 HER-2 自发活化,因此它们提供了阳性对照参比。MDA-MB-468 细胞需要用 EGF (TGF- α) 刺激诱导 HER-1 磷酸化,它们的刺激前和刺激后特征可用作阴性和阳性对照。MDA-MB-468 在刺激前有边缘 HER-1 活化,而这两种细胞系的活化 RTK 分子峰值约占 2-5% (每个细胞约 $0.5-1 \times 10^5$ 磷酸化分子)。图 20 显示,本文所述的试验方法能够以单个细胞灵敏度检测 10^5 个以下的活化分子。

[1176] 特异性:根据对 RTK 水平不同的多种细胞系比较研究,本文所述协同免疫试验方法的分析特异性 > 99.99%。所用的细胞系、它们的主要 ErbB 表达以及 EGF 或 HRG β 刺激后 RTK 活化的 Western 印迹图见图 21。T47D 细胞的 RTK 活化概况见图 22,该细胞表达了一定水平的 ErbB2 和 ErbB3,但 ErbB1 表达量极低。利用检测 EC20 (12000RFU) pHER-1 或 pHER-2 所需的细胞数目计算出每个细胞的 RTK 活化数 (RFU/细胞),见表 43 所示。当采用表达极低量 HER-2 的 MB468 细胞时,每个反应圈孔约 1000 个细胞不足以检测 EC20,在表 43 中表达低的或不可检测信号的其他细胞系以“ND”表示。当用 EGF 刺激时 MDAMB 468 细胞表达的 pHER-1 水平约为 4000RFU/细胞,但显示无任何可检测的 pHER-2。这种协同免疫试验方法确保了超特异性,同时试验的灵敏度为一个以下细胞水平 (10^4-10^5 个分子)。

[1177] 表 43

[1178]

	ErbB 相对表达水平			每个细胞的活化 RTK 分子 (RFU/细胞)			
	ErbB1	ErbB2	ErbB3	EGF		HRG	
				pHER1	pHER2	pHER1	pHER2
MDA MB 468	10	--	2	4000	ND	4000	ND
BT 474	--	10	3	96	1200	ND	1200
T47D	--	2	4	60	80	ND	165
SKBR3	3	10	2	360	1334	105	353

[1179] 结论：

[1180] 该实施例阐述了能够特异性检测 ErbB 家族受体成员磷酸化状态的一种新试验，其灵敏度能够检测稀少循环肿瘤细胞系 (CTC)。通过鉴定 CTC 的 HER-1 和 HER-2 活化，该试验平台不仅为初步筛选靶向治疗药物，而且为随后监测治疗进程提供了指南。连续取样的 CTC 中激酶和其他信号转导途径分子的表达 / 活化概况分析 (见图 23) 将为肿瘤细胞随时间和治疗而发生的变化提供有价值的信息。这种可指导治疗的诊断方法可用于疾病控制的各种阶段，如图 18 所示。本文所述试验方法提供的这种肿瘤发展的时间空间概况分析使得临床医生能够监测每位患者癌症特征的快速演变。由于灵敏度和特异性不相平行，可用该实施例所述的试验方法来检测稀少 CTC 中 ErbB 家族受体成员的磷酸化状态。因此，该方法不仅为初步筛选靶向治疗药物，而且为随后监测治疗进程提供了指南。

[1181] 总之，本文所述的多重邻近协同免疫试验平台对有限样品可提供有价值的临床信息，其超高灵敏度和特异性能够帮助肿瘤科医生根据“个性化”癌症特征的变化，对每名患者或维持或调整他们的疾病治疗方法选择。

[1182] 实施例 19. 检测 ErbB 家族受体酪氨酸激酶活性的方法

[1183] 本申请提供的技术能够以单个细胞水平灵敏度特异性检测 ErbB 家族受体酪氨酸激酶 (RTK) 的磷酸化状态。在某些方面，这种多重蛋白质微阵列平台采用了独特的“三-抗体-酶-传送”免疫复合物形式。在一个实施方式中，靶蛋白与捕捉抗体结合，这种复合物使得与相应传送酶偶联的两种检测抗体共定位。邻近的两种检测酶，葡萄糖氧化酶 (GO, 偶联于抗-RTK 抗体) 和辣根过氧化物酶 (HRP, 偶联于 RTK 中的抗-磷酸化位点) 之间的传送使得能够以极高灵敏度分析 RTK 的所述状态。该原理可应用于靶细胞数目有限的两种乳腺癌模型系统：患者全血中的癌细胞 (循环肿瘤细胞系, CTC) 和细针抽吸 (FNA) 样品中的癌细胞。

[1184] 这里我们报告了以单个细胞灵敏度水平成功检测 CTC 模型系统 MDA-MB468 和 SKBr-3 细胞系中的 HER1 和 HER2 活化 (磷酸化) (pHER1 和 pHER2)。根据对含不同水平 RTK 的多种细胞系进行的比较研究，这种“邻近免疫试验”方法的分析特异性 > 99.99%。此外，本文还提供了不同类型乳腺癌的异种移植物模型，采用 ErbB-RTK 表达程度不同的细胞系 (MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 MDA-MB-435)，证明该方法对 FNA (和转移性 FNA) 样品具有潜在应用价值。虽然能检测出 MD-MB-231 异种移植物 -FNA 中的中等水平 pHER2 和 pHER1，以及获自 MDA-MB-468 异种移植物 FNA 中显著水平的 pHER1，但不能检测出获自 MDA-MB-435 异种移植物 FNA 中的 HER1 或 HER2 活化。异种移植物 -FNA 模型系统中的这些发现与驱动细胞系的特征相一致，证明该方法可用来检测用最小侵袭方法获得的任何类型样品 (例如，从 CTC 到 FNA) 中活化的 ErbB 受体。

[1185] 该试验能够监测有限量样品的靶 RTK 活化状态,因此当靶向治疗的成功与否依赖于药物能否关闭(或去磷酸化)靶 RTK 时极其有用。此外,可用该原理研究其他信号转导途径分子,以便在现有的乳腺癌治疗选项中选择更好的治疗方法和更有效地监测疾病。由于乳腺癌复发时疾病的特征常会改变,因此可用这种独特的试验方法为获自“正在演变的疾病”的有限样品提供有价值的临床信息,帮助肿瘤科医生根据“个性化”癌症特征的变化,对每名患者或维持或调节他们的疾病治疗方法选择。

[1186] 实施例 20. 用邻近介导的微阵列免疫试验检测循环肿瘤细胞中受体酪氨酸激酶活化的方法。

[1187] 背景:曾报道 HER1 和 HER2 的异常活化与各种类型癌症的发展有关,和发生原发性肿瘤与循环肿瘤细胞(CTC)之间表达状态变化的频率显著。检测连续收集的 CTC 中 HER1 和 HER2 磷酸化的方法可为整个疾病状态的改变提供了有价值的见解,因此可导致更好的治疗选择/调整。

[1188] 方法:可用已开发的用三-抗体-酶-传送多重蛋白微阵列平台来检测靶分子的磷酸化。这种多重蛋白质微阵列平台利用靶蛋白被捕获在该微阵列表面时通过两种检测酶偶联抗体的共定位形成的独特免疫复合物。邻近的这两种检测酶之间的传送使对受体酪氨酸激酶(RTK)概况的分析灵敏度达到单个细胞水平。鉴于需要同时结合三种抗体,对磷酸化靶点的检测特异性大大提高。为用临床样品验证该方法,检测了 75 名接受不同治疗方案癌症患者 CTC 的活化状况。

[1189] 结果:我们鉴定到 6 名患者(8%)有 HER1 活化,6 名患者(8%)有 HER2 活化,14 名患者(18.5%)的 CTC 有双重 RTK 活化。25 份正常样品显示没检测到 HER1/HER2 活化。我们还观察到乳腺癌患者之间 CTC 的 HER2 活化状态与它们相应原发癌的 HER2-IHC 状态有区别。发现 HER2 阴性原发性乳腺癌患者 6/16 名(38%)的 CTC 有 HER2 活化。此外,HER2-阳性患者 2/5(40%)的 CTC 没有 HER2 活化。

[1190] 结论:这种多重邻近介导的平台优点是,检测有限量样品中的活化 RTK 的灵敏度达到单个细胞水平。因此可用于分析转移癌的 CTC 所述概况,提供影响临床实践的有价值信息。

[1191] 实施例 21. 用邻近介导的微阵列免疫试验检测转移肿瘤细胞受体酪氨酸激酶活化的方法。

[1192] 背景:已知原发部位肿瘤与转移肿瘤它们的肿瘤细胞受体表达状态变化频率显著(约 15-20%)。因此,分析转移性肿瘤中受体酪氨酸激酶(RTK)活化概况的方法可为疾病发病机制的变化提供有价值的见解。

[1193] 方法:已经开发了能够特异性检测 ErbB 家族 RTK 磷酸化状态的新技术。这种多重蛋白质微阵列平台利用了靶蛋白被捕获在该微阵列表面时通过两种检测酶偶联抗体共定位形成独特的免疫复合物。邻近的这两种检测酶(例如葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶)之间的传送使对 RTK 活化状态的分析达到极高灵敏度。事实上,鉴于需要同时结合三种不同抗体,这种分析的特异性将大大提高。我们采用了 29 种冷冻的乳腺癌组织(II-IV 期)作为分析转移癌细针抽吸物(mFNA)RTK 活化状态的模型系统。

[1194] 结果:用 100 μ l 裂解缓冲液裂解用 G23 号针头收集的肿瘤组织样品,分析该可溶性样品(含有约 100-200 μ g 蛋白质)的 RTK 活化状态。8/29(27%)份 FNA 样品显示 HER2

高度活化, 2/29 (6%) 样品显示中等水平的 HER2 活化。一份 HER2 中等活化的样品也显示中等水平的 HER1 活化。2/8 的 HER2 活化样品也显示显著水平的 HER1 活化。3/19 的 HER2 活化阴性样品显示中等水平的 HER1 活化。

[1195] 结论 : 这种多重邻近介导的平台优点是, 在检测有限量 mFNA 组织样品中的 RTK 活化时, 对靶分子磷酸化的检测灵敏度可达到单个细胞水平。由于能够分析不同转移部位肿瘤细胞的这种状态, 因此可提供它们有可能性转移的有价值信息。因此, 可随此种疾病所述状态的变化, 利用对侵袭性最小的一次针刺获得的 mFNA 样品的检测, 选择治疗方法。

[1196] 如同各出版物或专利申请专门而单独表明通过引用纳入本文一样, 本说明书引用的所有出版物和专利申请通过引用纳入本文。虽然为了明确理解, 通过说明和实施例详细描述了上述发明, 但本领域普通技术人员不难明白, 根据本发明的指导可作出明显改变和改进但不脱离随附权利要求书的构思或范围。

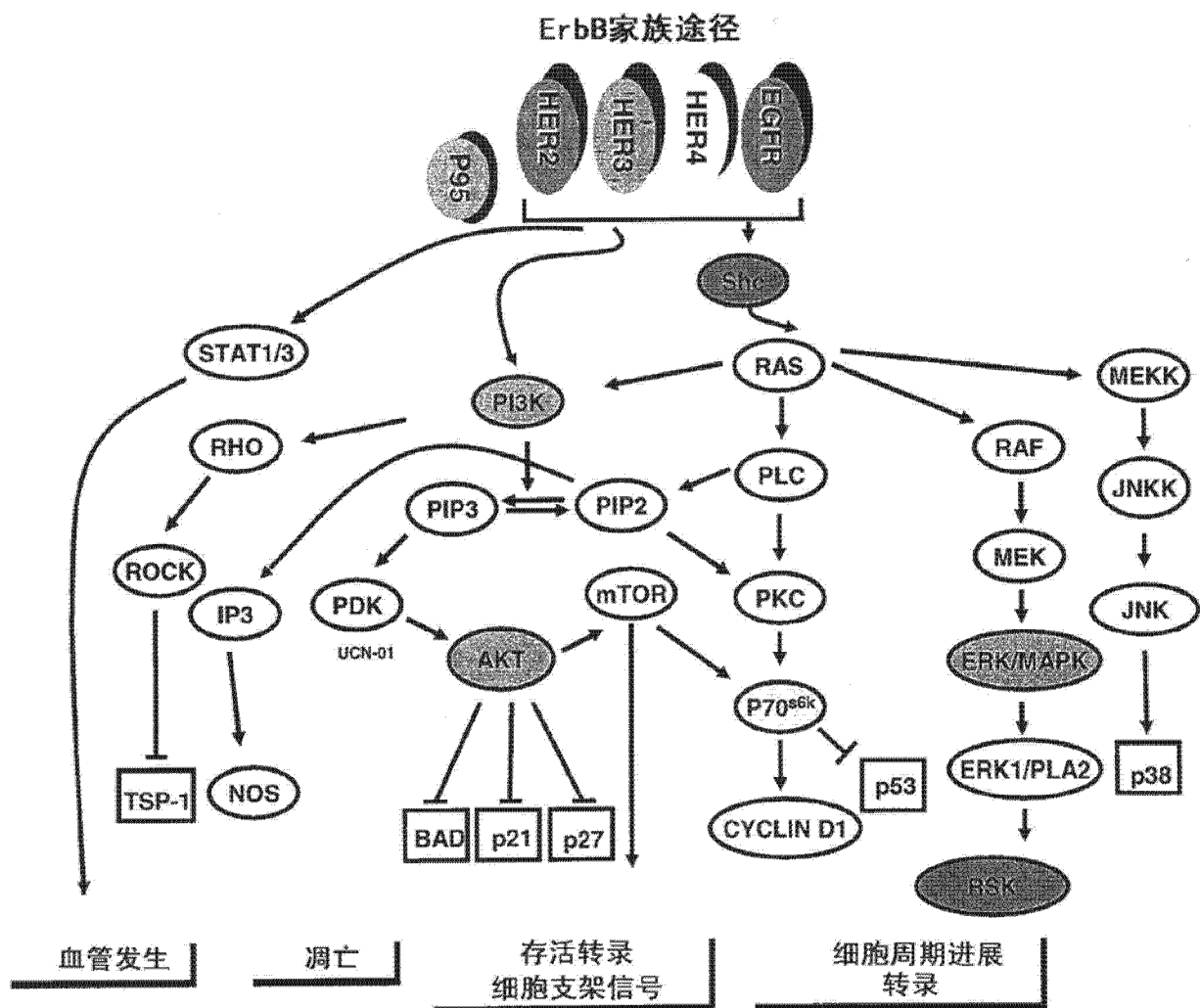


图 1

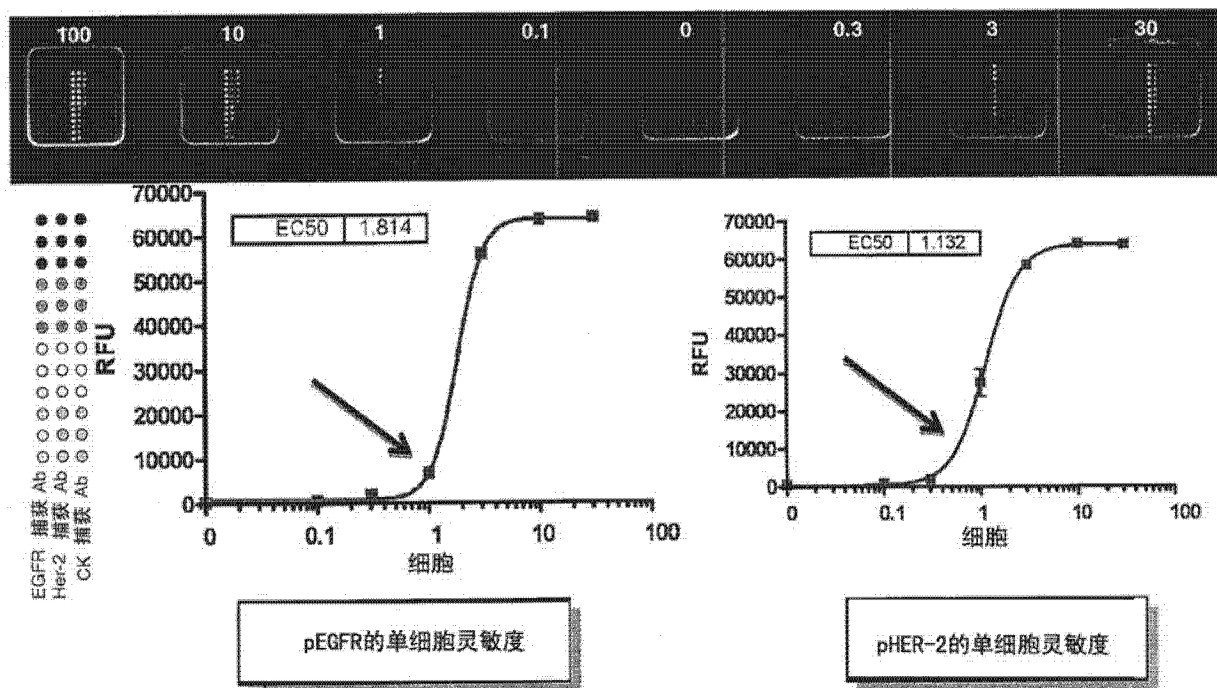
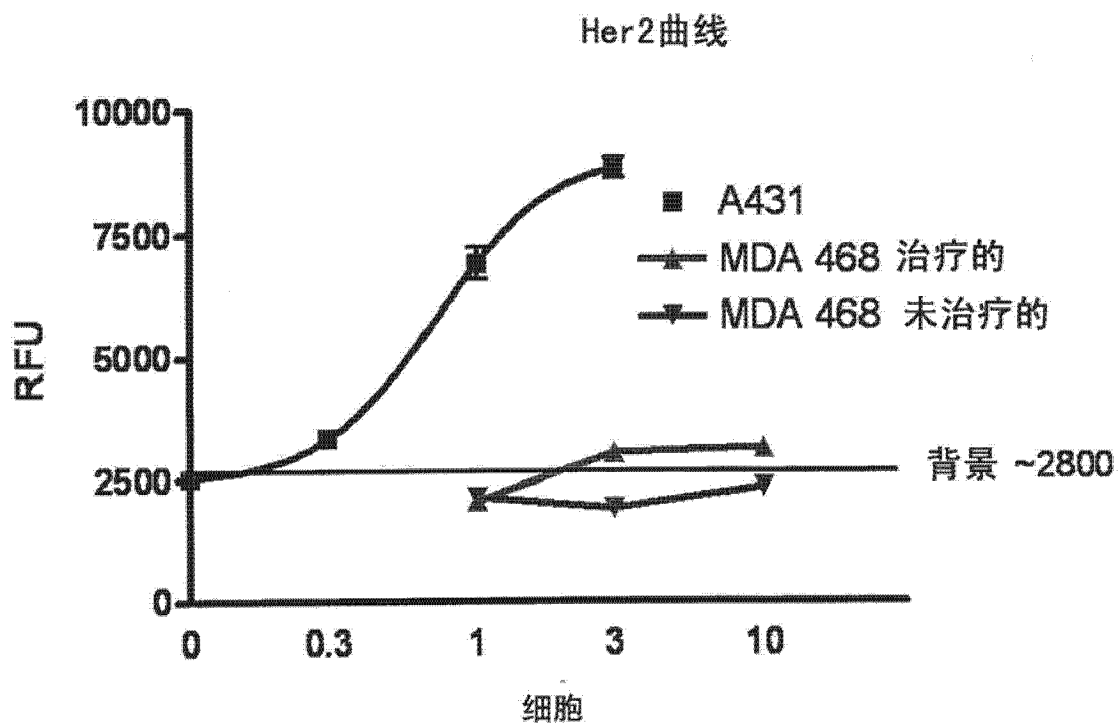


图 2



A431: HER-1 & HER-2-阳性; MD-MBA 468: 仅 HER-1-阳性

图 3

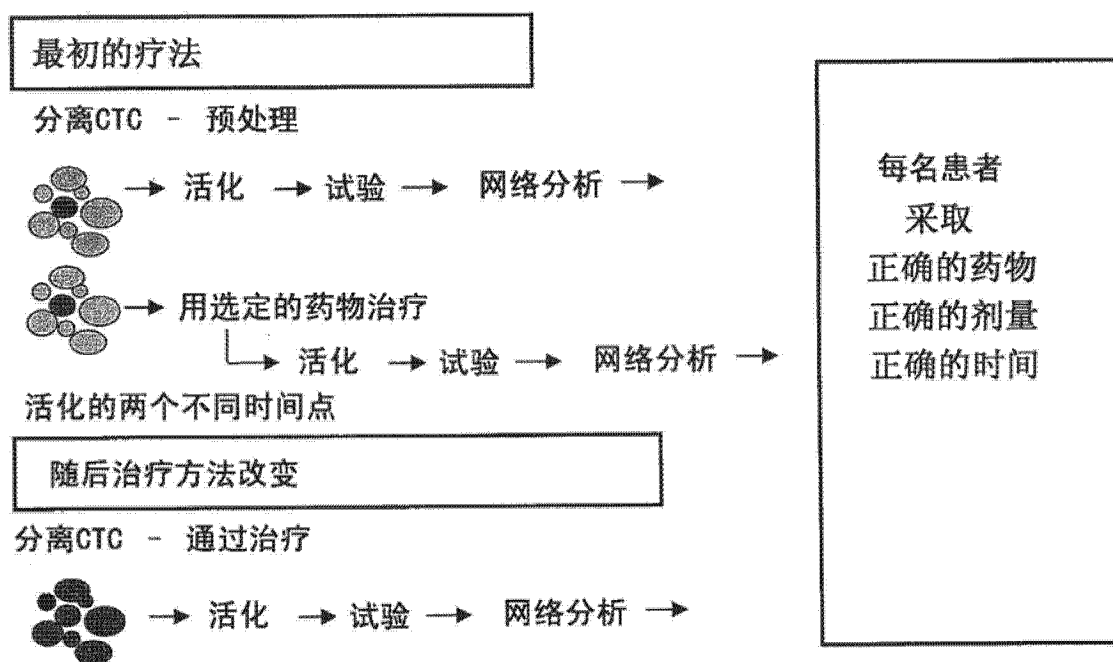


图 4

RTK途径芯片

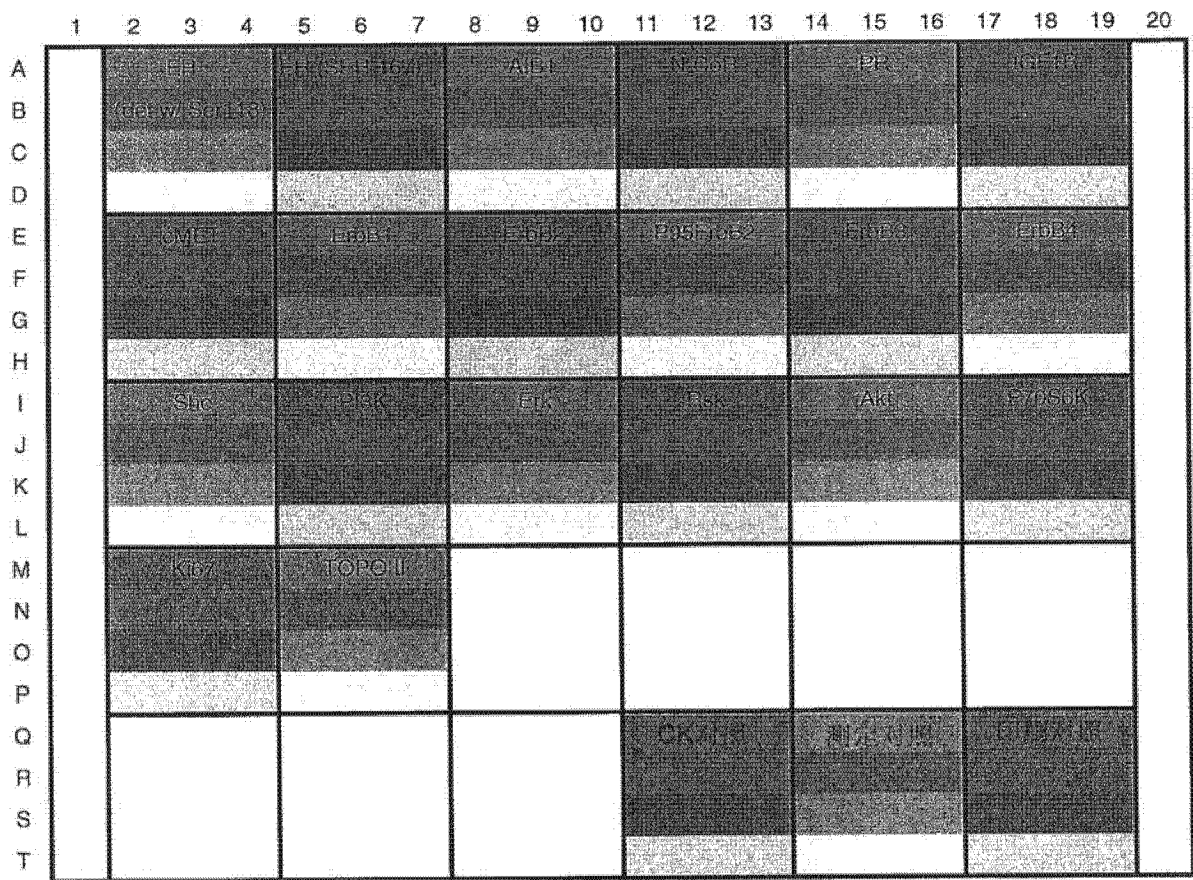


图 5

血管发生芯片

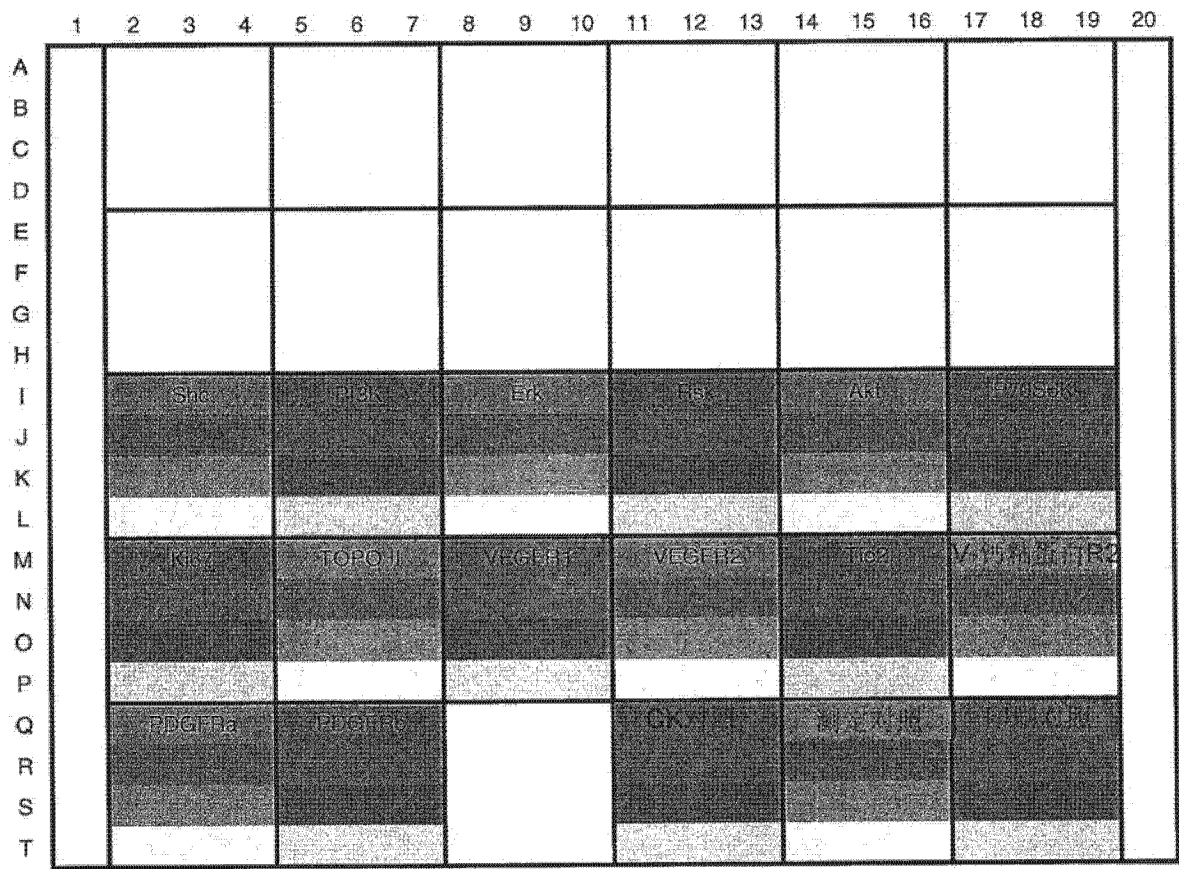


图 6

另一种血管发生芯片

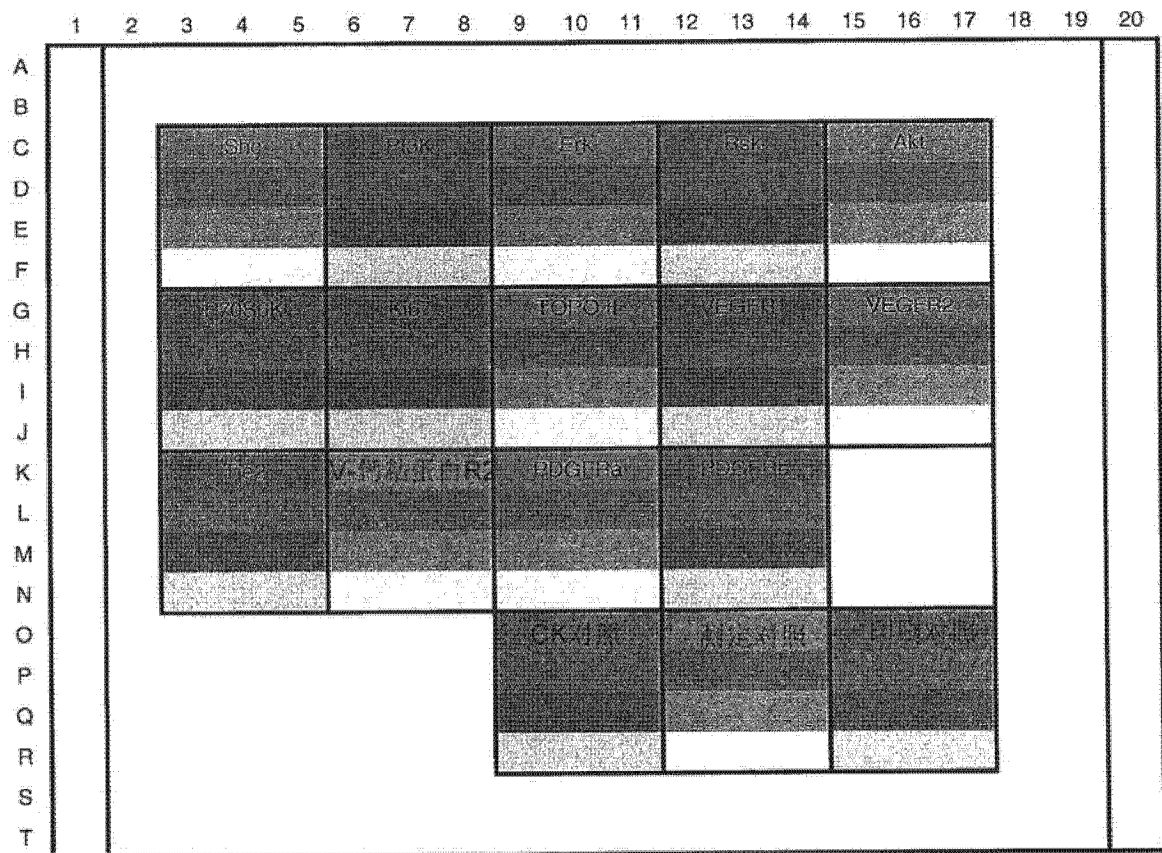


图 7

组合芯片

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A		ER		ER (Ser18)				AIB			N-CoR			PR			ICG1R			
B		(del w/ Ser18)																		
C																				
D																				
E		W		Erbb1		Erbb2					P95Erbb2			Erbb3			Erbb4			
F																				
G																				
H																				
I		Shc		GrbK		Erk					Erk			Akt			P70S6K			
J																				
K																				
L																				
M		IKK7		TOPO11		VEGFR1					VEGFR2			IGF2			VEGFR1/IR2			
N																				
O																				
P																				
Q		PDGFRa		PDGFRb							CK1A			IKK1/IKK2			IKK1/IKK2			
R																				
S																				
T																				

图 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A			ER		ER (SER 118)			ER (SER 167)			ER-AIB1			ER-N-CoR			EGFR			
B																				
C																				
D																				
E			PR		IGF1R		Shc		PI3K		Erk		ErbB2							
F																				
G																				
H																				
I			Rsk		Akt		P70S6K		Ki67		TOPO II		P95ErbB2							
J																				
K																				
L																				
M			VEGFR1		VEGFR2		Tie2		V-钙粘蛋白R2		PDGFRa		ErbB3							
N																				
O																				
P																				
Q			PDGFRb		CK对照		测定对照						印刷对照		ErbB4					
R																				
S																				
T																				

图 9

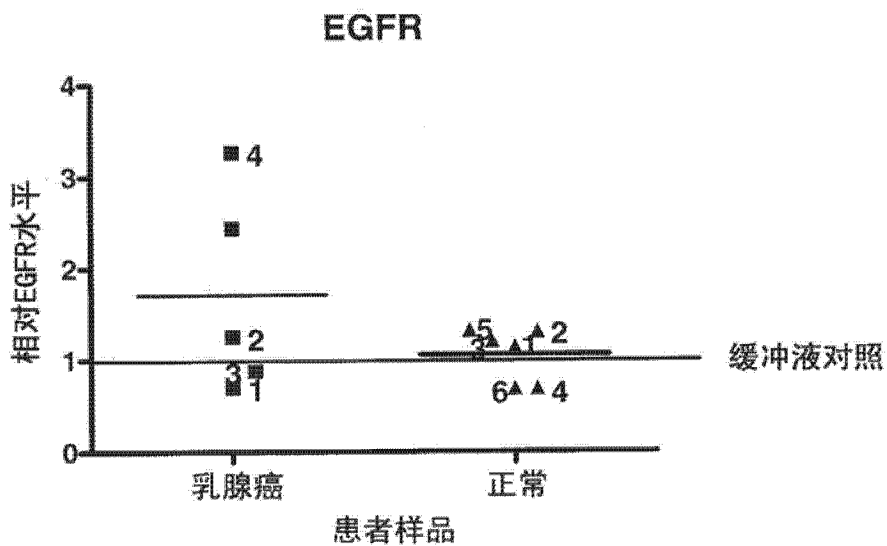


图 10

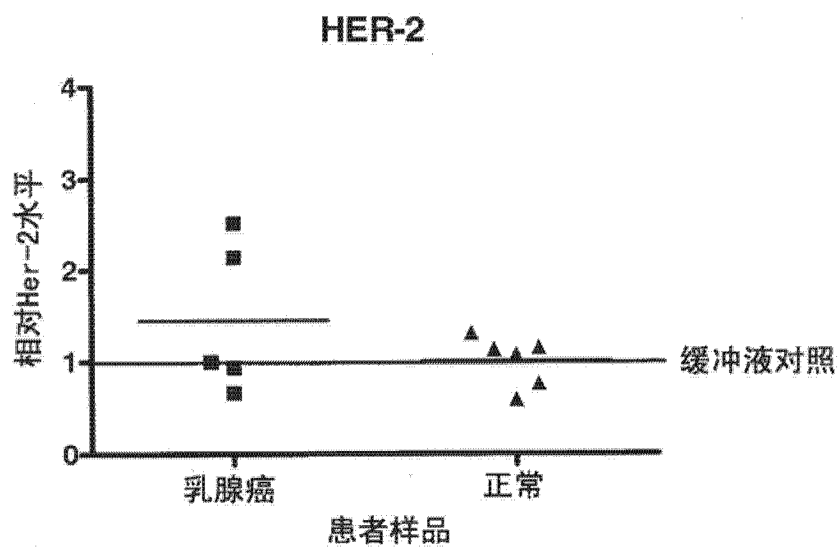


图 11

	A431	SKBR3	01-003 BCA	01-006 BCA	01-019 BCA	01-014 BCA	02-017 BCA
EGFR			0 -	1 +	0 -	3 +	3 +
CK			1	1	4	3	3
CK + DAPI			1	1	4	3	3

图 12

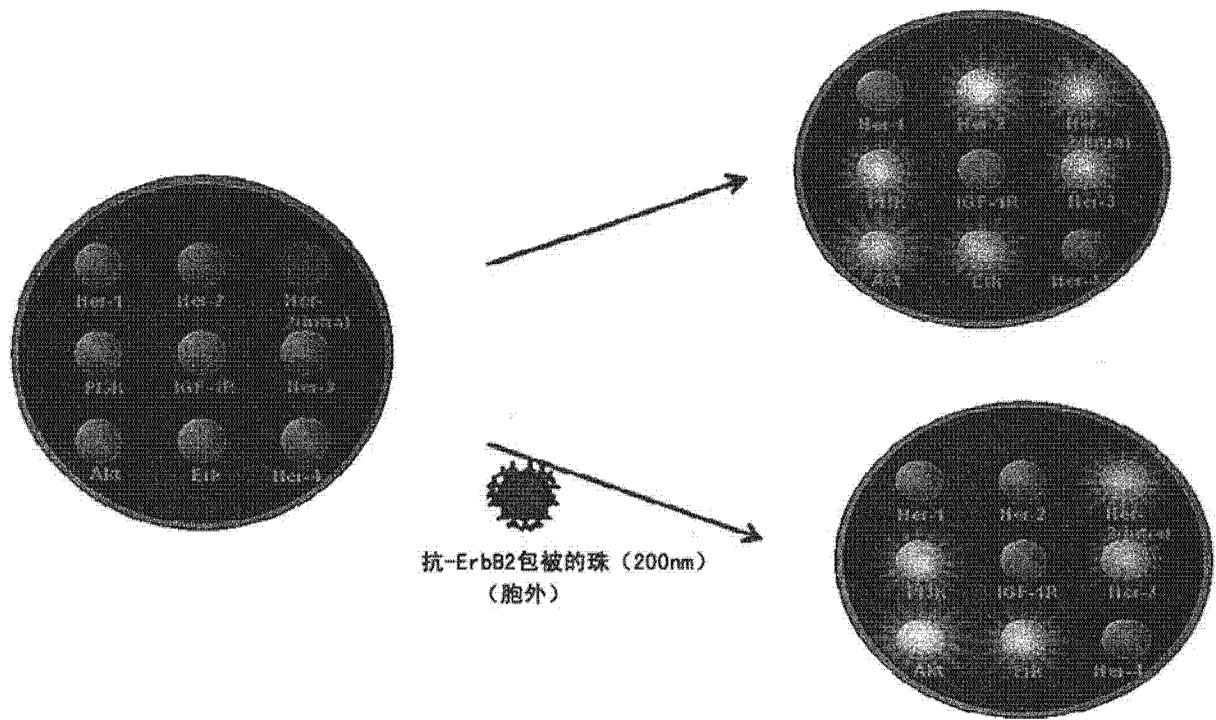


图 13

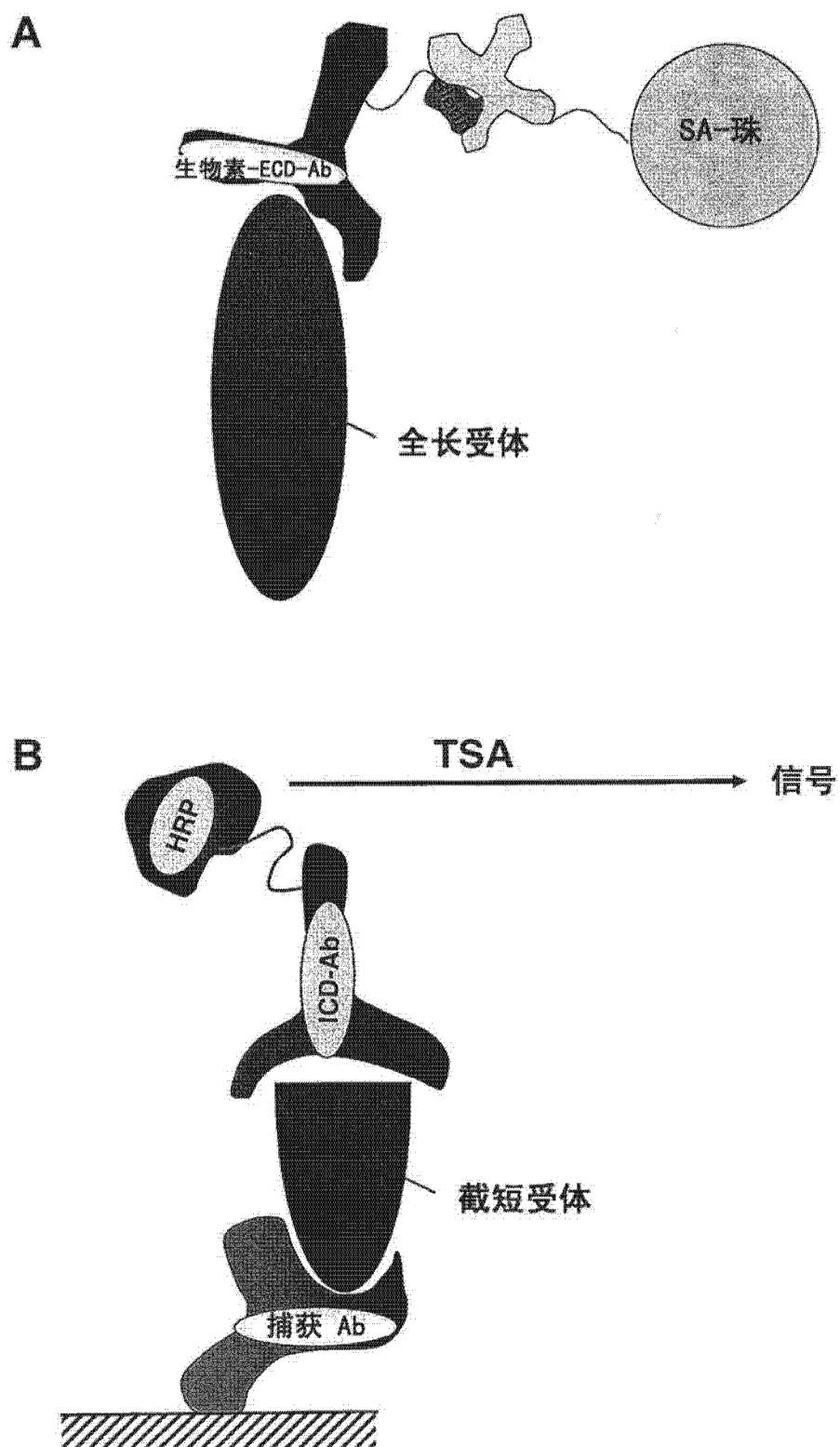


图 14

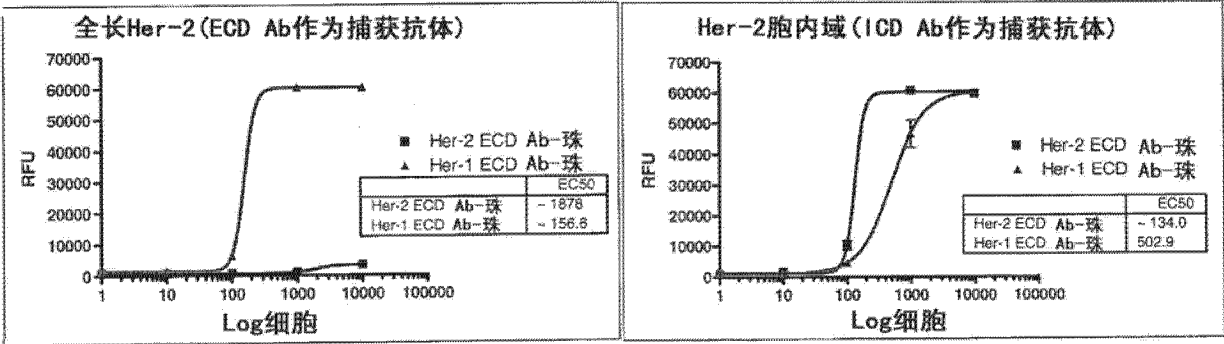


图 15

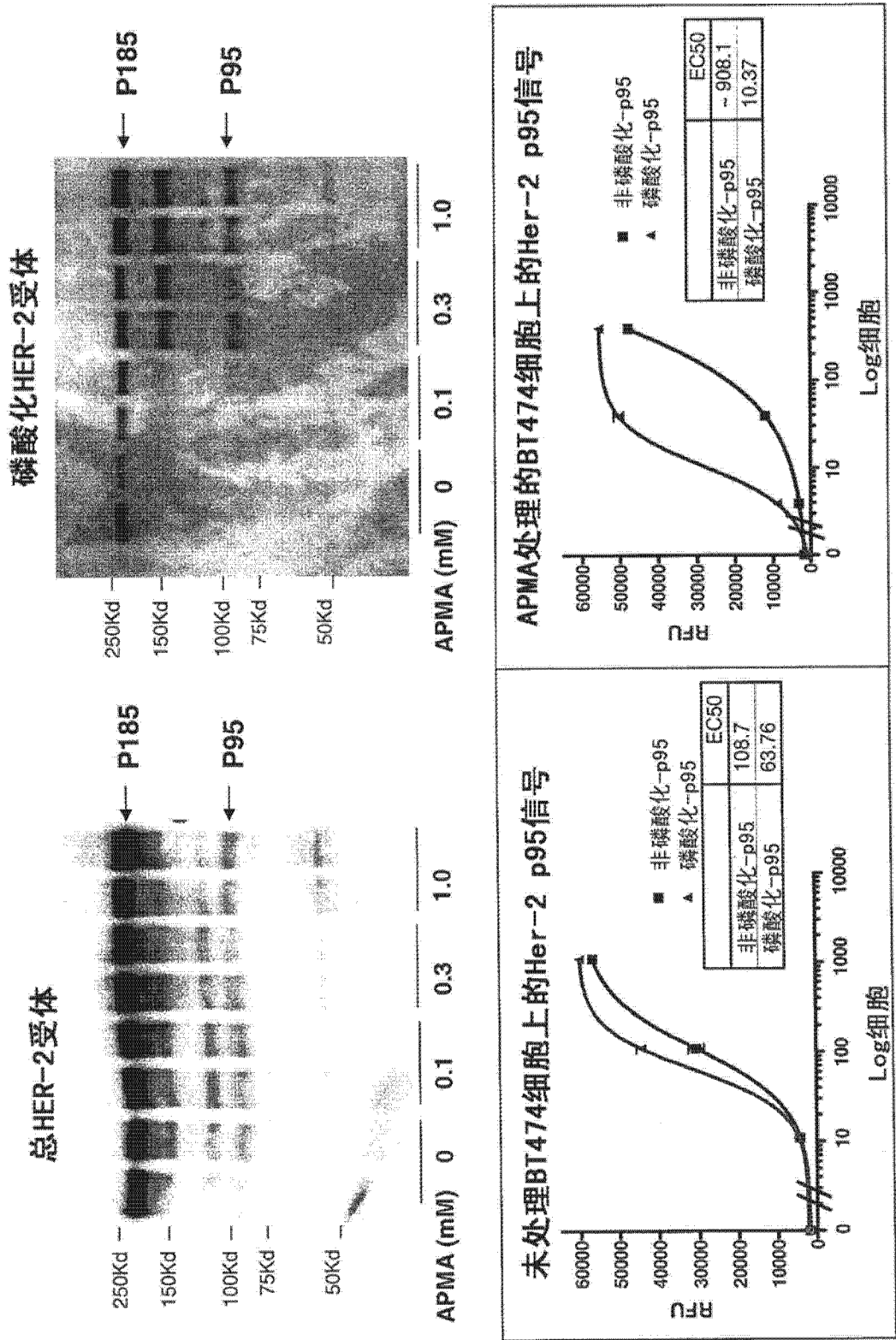


图 16

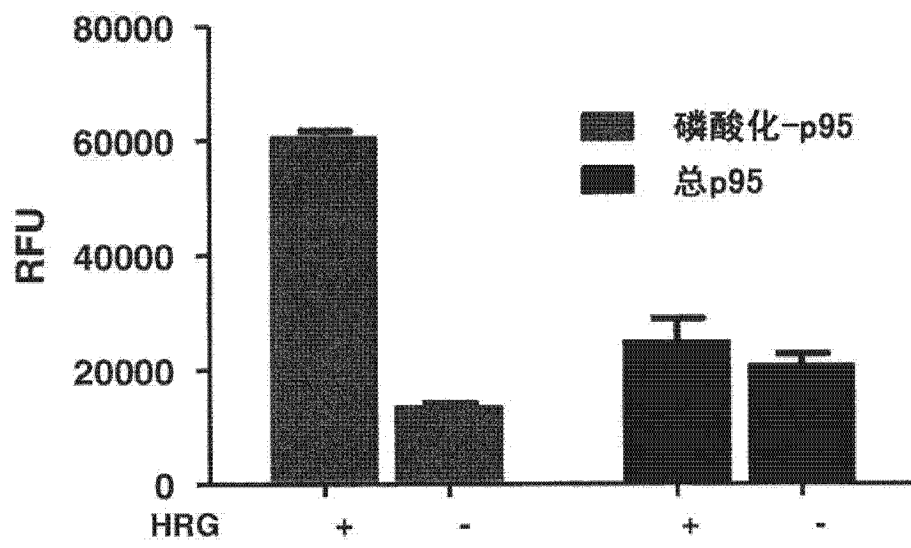


图 17

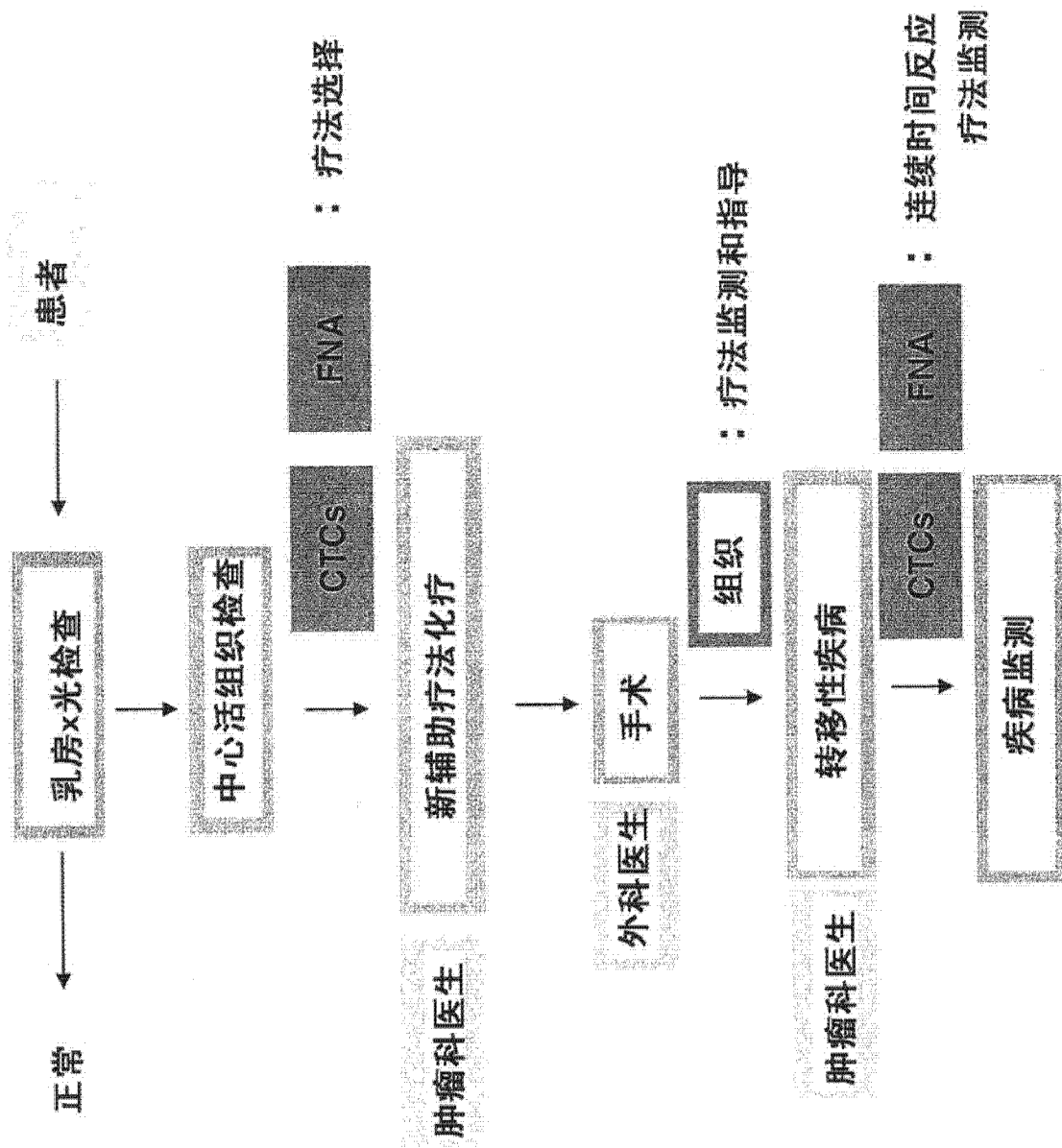


图 18

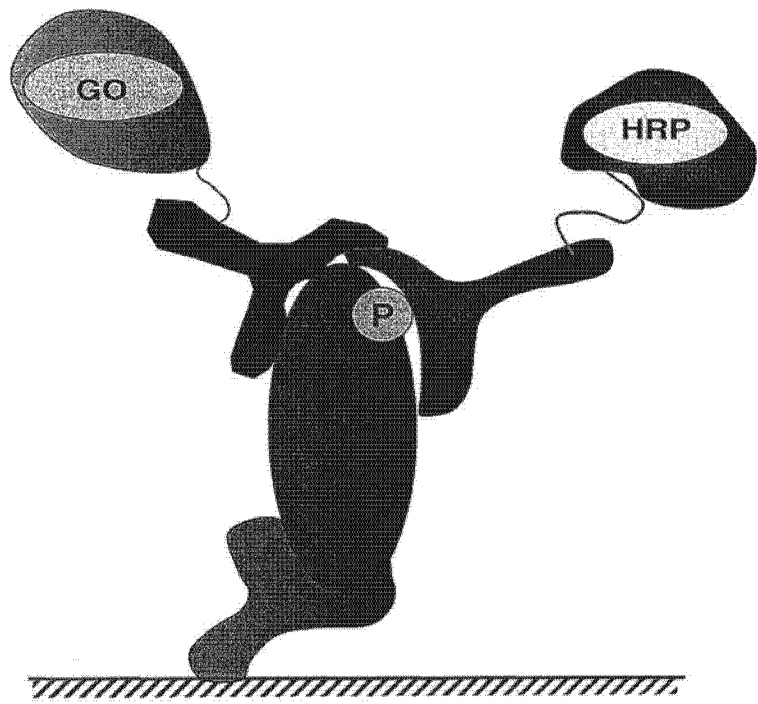


图 19

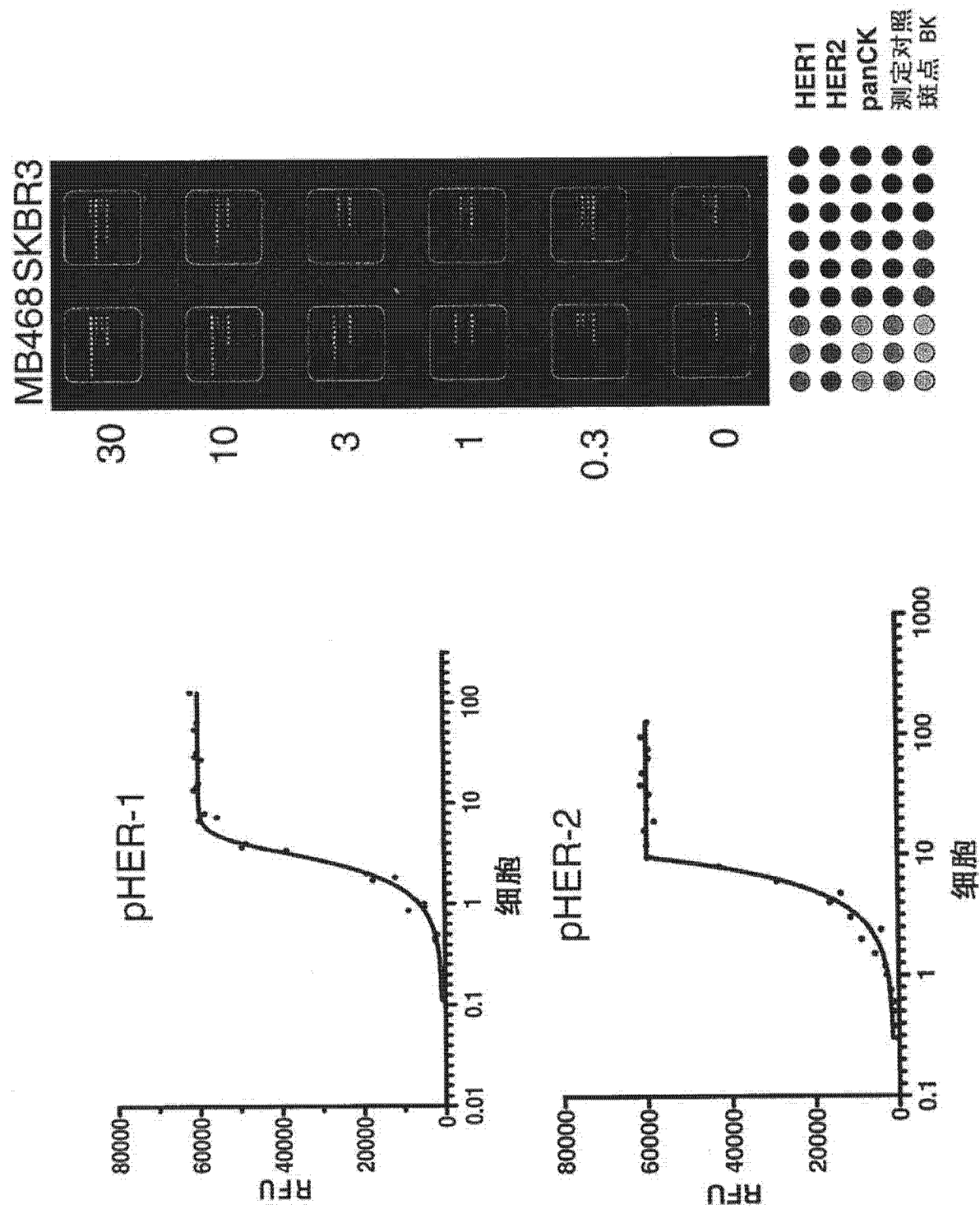


图 20

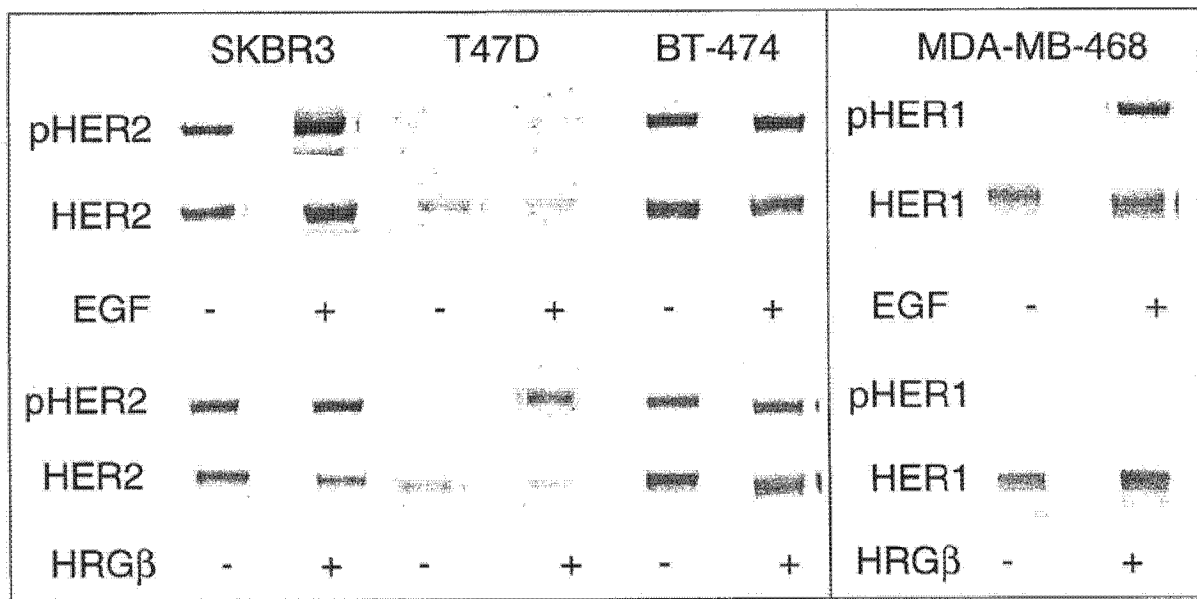


图 21

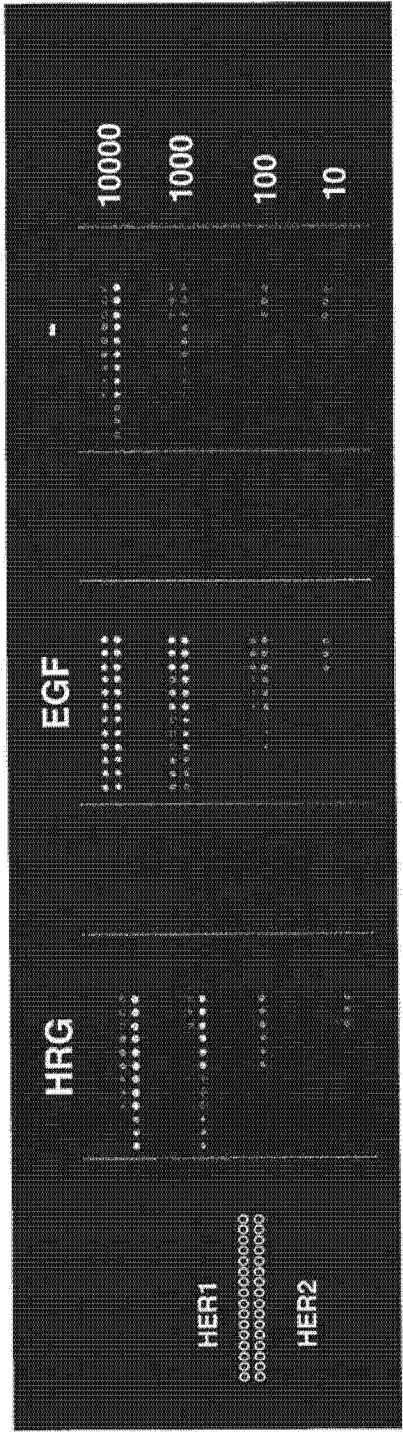


图 22

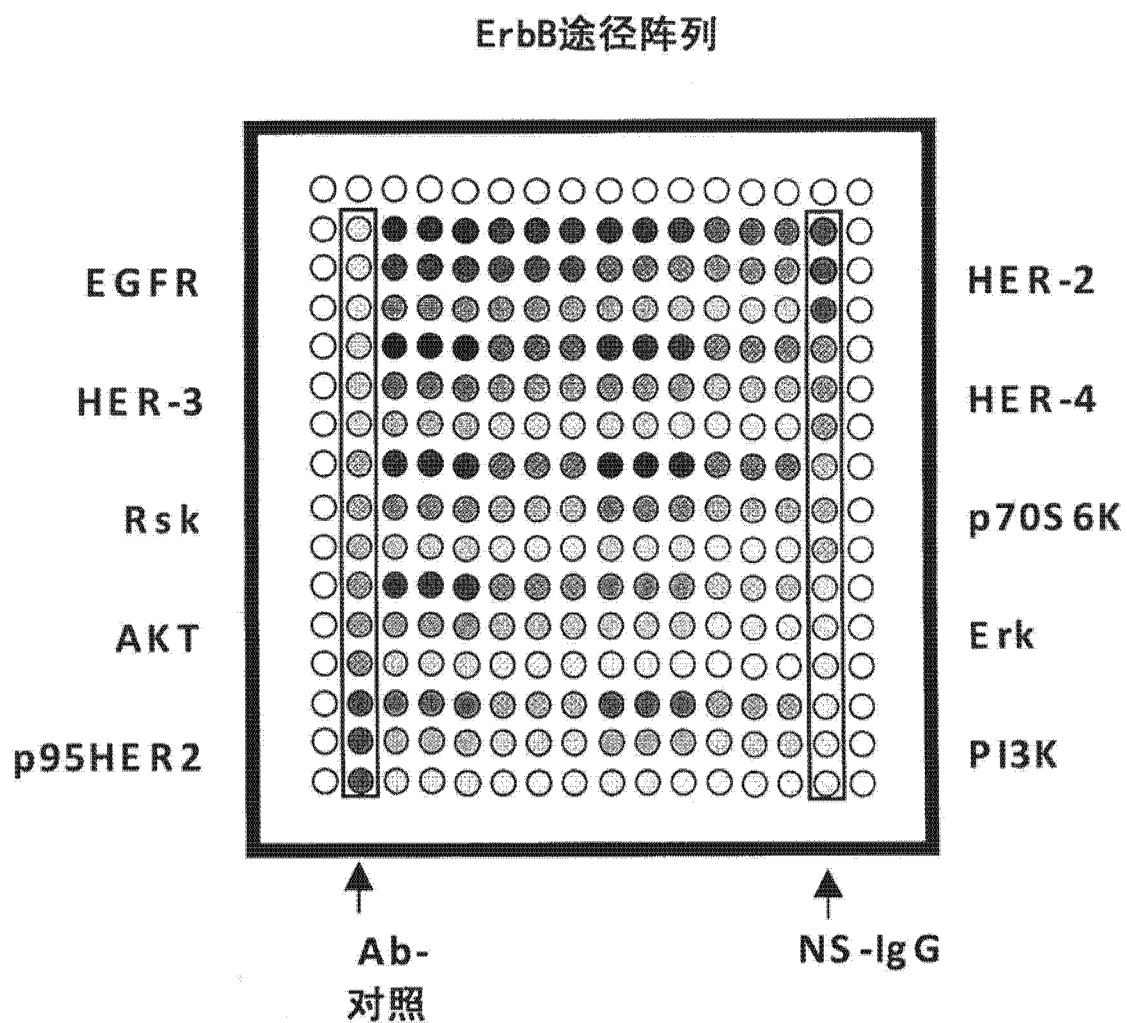


图 23