



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0094792  
(43) 공개일자 2017년08월21일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>G01N 33/50</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>G01N 33/5011</i> (2013.01)<br/><i>G01N 33/5044</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7018267</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년12월14일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년07월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/065584</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/094904<br/>국제공개일자 2016년06월16일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/091,180 2014년12월12일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/><b>셀퀴티 엘엘씨</b><br/>미국 55446 미네소타주 미니애폴리스 씨티식스스<br/>에비뉴 노쓰 스위트 450 16305</p> <p>(72) 발명자<br/><b>설리반, 브라이언, 프란시스</b><br/>미국 55340 미네소타주 메디나 밴틀 팜 로드 2400<br/><b>랭, 란스, 가빈</b><br/>미국 55356 미네소타주 오로노 헌트 팜 로드 994</p> <p>(74) 대리인<br/><b>양영준, 이상남</b></p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **환자를 진단 및 치료하기 위한 신호전달 경로 활성의 측정 방법**

**(57) 요약**

개별 대상체로부터 수득된 이환 세포 샘플 내 세포성 경로의 기능성 상태의 측정 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은, 경로가 정상적으로 기능화하는 경우 특이적 세포성 경로를 교란시킨다고 공지된 교란제 (예를 들면, 활성화제)와, 상기 대상체로부터 수득된 이환 세포 샘플을 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 교란제의 존재 하에서, 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는, 상기 교란제에 의해 표적된 상기 세포성 경로가 상기 개별 대상체에서 기능성이라는 것을 나타낸다. 개별 개상체에 대하여 표적화된 치료제를 선택하는 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

*G01N 2333/71* (2013.01)

*G01N 2800/52* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

암 세포가 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 수용체를 갖는 암을 갖는 것으로 진단된 인간 대상체의 치료 방법으로서,

ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 대상체가 하기 단계를 포함하는 방법을 이용한 치료에 대해 선택되며:

상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 암 세포의 샘플을 제조하고, 기본 배지에서 상기 샘플을 배양하는 단계;

(1) 교란제와, 상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 교란제 및 확인제와, 상기 샘플의 제2 부분의 접촉 단계 (여기서 상기 교란제는 ErbB 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미치고, 상기 확인제는 동일한 ErbB 신호전달 경로상에서 상기 교란제의 효과를 선택적으로 억제시킨다);

상기 샘플의 각 부분에서 상기 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;

상기 샘플의 상기 제1 부분과 상기 샘플의 상기 제2 부분 간 값 차이를 확인하기 위해 상기 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의하여 측정량을 계측하는 단계; 및

ErbB 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 상기 측정량의 비교 단계;

대상체는 상기 측정량이 상기 컷-오프 값 초과인 경우 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택되는, 방법.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 세포 접촉 또는 부착(cell adhesion or attachment)인, 방법.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 상기 샘플을 배양시키기 위해 사용된 상기 기본 배지는 이들이 상기 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 대체되는, 방법.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 세포 대사물질의 수준인, 방법.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 미토콘드리아 기능과 연관된 세포 효소 수준인, 방법.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서, 상기 대상체는, 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 수용체 유방암을 갖는, 방법.

**청구항 7**

제 1 항에 있어서, 상기 교란제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, 암피레굴린, 베타셀룰린, 에피겐, 에피레굴린, 뉴레굴린-1, 뉴레굴린-2, 뉴레굴린-3, 뉴레굴린-4, 및 이들의 조합.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

(1) 뉴레굴린과, 상기 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 상기 샘플의 제1 부분, 및 (2) 뉴레굴린 및 확인제와, 상기 샘플의 제2 부분을 접촉시키고/시키거나 (3) 상피 성장 인자와 상기 샘플의 제3 부분 및 (4) 상피 성장 인자 및 확인제와 상기 샘플의 제4 부분을 접촉시키는 단계; 및

상기 샘플의 상기 제1 부분과 상기 샘플의 상기 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 상기 샘플의 상기 제3 부분과 상기 샘플의 상기 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 상기 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의하여 측정량을 계측하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서, 상기 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: 트라스투주맙, 페르투주맙, 라파티닙, 아파티닙, 네라티닙, ADXS-HER2, TAK-285, MM-302, MM-121, MM-111, REGN 1400, 사파티닙, 다코미티닙, 포지오미티닙, ASLAN001, LIM716, AV-203, 돌리고투주맙, 롬레투주맙, 파니투무맙, REGN955, MM-151, 세톡시맙, 게피티닙, 에를로티닙, 및 이들의 조합.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서, 상기 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합하는, 방법: HER2의 세포외 분절의 도메인 II, HER2의 세포외 분절의 도메인 IV, EGFR 또는 HER2의 세포질 아데노신 삼인산-결합 부위, EGFR 또는 HER2의 아데노신 삼인산 결합 부위에서의 시스템인 잔기, 및 이들의 조합.

**청구항 11**

제 1 항에 있어서, 상기 대상체는 또한 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제로 치료되는, 방법.

**청구항 12**

제 1 항에 있어서, 상기 대상체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB 음성 암을 갖는, 방법: 결장암, 직장암, 자궁내막암, 위 암종, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 교모세포종, 간세포 암종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 전립선 암종, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성적 골수성 백혈병 (CML), 비-호지킨 림프종 및 갑상선 암종 또는 두경부 암.

**청구항 13**

제 1 항에 있어서, 상기 확인제는 2C4 마우스 단클론성 항체인, 방법.

**청구항 14**

비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 유방암을 갖는 것으로 진단된 인간 대상체의 치료 방법으로서,

ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 라파티닙을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 대상체가 하기 단계를 포함하는 방법을 이용한 치료에 대해 선택되며:

상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플을 제조하고, 기본 배지에서 상기 샘플을 배양하는 단계;

상기 샘플이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지와 상기 샘플을 배양시키기 위해 사용된 상기 기본 배지의 대체 단계;

- (1) 교란제로서의 뉴레굴린과 상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 상기 샘플의 제1 부분, 및
- (2) 뉴레굴린 및 확인제와 상기 샘플의 제2 부분을 접촉시키고/시킴거나(여기서 상기 확인제는 뉴레굴린과 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다) (3) 교란제로서의 상피 성장 인자와 상기 샘플의 제3 부분 및
- (4) 상피 성장 인자 및 확인제와 상기 샘플의 제4 부분을 접촉시키는 단계(여기서 상기 확인제는 상피 성장 인자와 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다);

상기 교란제와 접촉된 상기 생존 원발 유방암 세포의 세포 접촉 또는 부착의 연속적 측정 단계;

상기 샘플의 상기 제1 부분과 상기 샘플의 상기 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 상기 샘플의 상기 제3 부분과 상기 샘플의 상기 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 상기 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의하여 측정량을 계측하는 단계; 및

ErbB 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;

대상체는 상기 측정량이 상기 컷-오프 값 초과인 경우 라파티닙을 이용한 치료에 대해 선택되는, 방법.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서, 상기 대상체는, 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 및 비-과발현된, 비-증폭된 EGFR 유방암을 갖는, 방법.

**청구항 16**

제 14 항에 있어서, 상기 대상체는 또한 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제로 치료되는, 방법.

**청구항 17**

비-과발현된, 에스트로겐 수용체 유방암을 갖는 것으로 진단된 인간 대상체의 치료 방법으로서,

에스트로겐-관련된 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화된 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하고,

상기 대상체가 하기 단계를 포함하는 방법을 이용한 치료에 대해 선택되며:

상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플을 제조하고, 기본 배지에서 상기 샘플을 배양하는 단계;

(1) 에스트로겐-관련 신호전달 경로를 상향조절 또는 하향조절한다고 공지된 교란제와, 상기 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 상기 교란제 및 동일한 에스트로겐-관련 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 확인제와, 상기 샘플의 제2 부분을 접촉시키는 단계;

상기 샘플의 각 부분에서 상기 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;

상기 샘플의 상기 제1 부분과 상기 샘플의 상기 제2 부분 간 값 차이를 확인하기 위해 상기 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의하여 측정량을 계측하는 단계; 및

에스트로겐 수용체 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값에 상기 측정량을 비교하는 단계;

상기 측정량이 상기 컷-오프 값 초과인 경우, 대상체는 에스트로겐 관련된 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택되는, 방법.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서, 상기 샘플을 배양시키기 위해 사용된 상기 기본 배지는 이들이 상기 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 대체되는, 방법.

**청구항 19**

제 17 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 세포 접착 또는 부착인, 방법.

**청구항 20**

제 17 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 세포 대사물질의 수준인, 방법.

**청구항 21**

제 17 항에 있어서, 상기 생리적 반응 파라미터는 미토콘드리아 기능과 연관된 세포 효소 수준인, 방법.

**청구항 22**

제 17 항에 있어서, 상기 교란제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법: 에스트라디올, 에스트론, 탈록시펜, 에스트리올, 케니스테인, DHEA, 안드로스테네디온, 안드로스테네디올, 프로게스테론, 하이드록시프로게스테론, 테스토스테론, 이들의 황산화된 형태, 및 이들의 조합.

**청구항 23**

제 17 항에 있어서, 상기 표적화 치료제는 폴베스트란트, 타목시펜, 레트로졸, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 팔보

시클립, 아베마시클립, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 24**

제 17 항에 있어서, 상기 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합하는, 방법: 방향화효소 효소 (CYP19A)의 사이토크롬 P450 서브유닛, 에스트로겐 수용체의 활성화 기능 1 (AFP-1) 도메인, 사이클린-의존적 키나제 4 (사이클린 D1), 사이클린-의존적 키나제 6 (사이클린 D3), 및 이들의 조합.

**청구항 25**

제 17 항에 있어서, 상기 대상체는 또한 에스트로겐 수용체-관련된 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제로 치료되는, 방법.

**청구항 26**

제 25 항에 있어서, 상기 대상체는 또한 화학요법, CDK4/CDK6 억제제, PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA-4 억제제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 요법으로 치료되는, 방법.

**청구항 27**

제 25 항에 있어서, 상기 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제로 치료되는, 방법.

**청구항 28**

제 27 항에 있어서, 상기 대상체는 에스트로겐-관련 표적화 요법을 이전에 받았고 이에 반응하는데 실패하였고, ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료가 에스트로겐-관련 표적화 요법의 기능을 향상시키는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은, 2014년 12월 12일 출원된, 미국 가특허 출원 시리얼 번호 62/091,180에 우선권을 주장하고, 이의 내용은 본원에서 참조로 편입된다.

**배경 기술**

[0003] **발명의 배경**

[0004] 화학물질 및 외인성 단백질이 특이적 세포성 표적에 대해 유효한 인간 치료제일 수 있다는 발견 이후로 이환 개인의 치료는 유의미한 진전을 가졌다. 그러나, 많은 통상 질환 예컨대 암의 치료에서 개선에 대한 유의미한 여지가 여전히 있다. 인간 게놈 프로젝트의 주요 동인 중 하나는, 치료 중재의 발전 및 처방을 진전시키기 위해, 질환의 유전적 원인을 발견하는 것이었다. 보고가 믿어진다면, 전체 인간 유전자는 인간 게놈 프로젝트를 통해 확인되었다. 많은 이들 유전자는 인간 집단에서 질환에 통계적으로 연결된다. 그렇지만 질환의 유전적 연결 또는 유전적 바이오마커의 검출의 지식이 질환 과정 또는 치료적 결과를 항상 효과적으로 예측하지 않는다. 그래서 유전자로부터 유전적 연결 및 심지어 단백질 발현 수준의 정량화도 적절한 치료적 과정의 결정에서 그렇게 매우 제한된다.

[0005] 페타바이트의 유전 정보는 수집되었다. 상당한 통계적인 및 분석적 모델링 컴퓨터처리 능력은 많은 상이한 유형의 질환을 분석하기 위해 수집된 유전 데이터에 적용되었다. 적어도 2개의 중요한 사실이 상기 과정에서 부각되었다. 첫째, 한 개인에서의 유방암이 유전자 구성, 단백질 발현 수준, 및 치료 중재에 대한 반응에서 또 다른 개인에서의 동일한 암과 완전히 상이할 수 있기 때문에 유방암같은 "질환"은 부분적으로 이종성이다. 둘째, 현행 유전 바이오마커의 검출이 대다수의 사례에서 좋지 못한 예측의 값을 갖는다.

[0006] 동시대의 표적된 약물은 특이적 제한된 수의 인간 세포 모델을 염두에 둔 과정을 따라 발견되고 개발된다. 많은 이들 세포주는 특정한 세포성 표적에 대해 원하는 활성을 갖는 것을 선택하기 위해 포텐셜 약물의 큰 라이브러리의 최적화된 스크리닝 환경을 제공하도록 조작된다. 상기 과정의 사용은 각 환자의 질환이 동일한 질환을 가

진 다른 환자와 상이하다는 것을 나타내는 임상 정보의 면에서 포텐셜 약물의 효능에 관하여 오도할 수 있다. 약물 발견 및 발전 과정은 현재까지 임상시험에 앞서 반응성 인간의 확인에서 매우 유효하지 않고 임상 발전 과정 전반에 걸쳐 높은 실패율을 계속해서 겪고 있다. 환자에 손해 감소에 집중하는 조절 임상 발전 과정을 통해 승인되는 많은 약물은 실제의 질환 환자 집단에서 좋지 못한 유효율로 고통받는다.

[0007] 임상 의사에 모든 질환 상태 설명이 동일한 원인에서 발생하지 않는다. 단순 예에서, 골 관절의 염증은 몇 개의 공급원, 일부 내부, 일부 외부, 일부 "유전자 상으로 연결된", 및 일부 아직 미공지된 원인에서 발생할 수 있다. 의학은 외부 병원체가 적절하게 확인될 수 있는 경우 감염성 질환에 대한 환자의 부상자 분류에 상당히 유효하다. 의사는 현재 이용가능한 요법이 내부 원인으로부터 염증의 감소로 이어질 예측을 위하여 가까이 소수의 도구를 갖는다. 의사는 특이적 환자의 세포가 어떻게 기능하고 있는지, 또는 더욱 적절하게 기능부전하는지, 및 이들이 "염증"으로서 임상적으로 나타내는 질환의 치료에 이용가능한 많은 치료제 중 하나에 어떻게 반응할지의 지식이 부족하다. 이들은 비정상적인 유전자가 존재한다는 것을 알지만 그러나 특이적 환자에서 질환 과정에 어떻게 영향을 미치는지는 알지 못한다. 이들은 약물이 특이적으로 어떻게 작용하는지는 알 수 있지만 그러나 특정한 환자가 그 약물 활성화에 무반응성 또는 내성일 수 있는 이유는 모를 수 있다.

[0008] 환자는 그의 특정한 질환 원인의 더 나은 확인 및 유효한 치료적 과정의 의사결정을 필요로 한다. 인간 게놈 서열분석 및 다른 유전적 정량화 도구는 각 환자의 질환이 그 환자에게 어느 정도 고유한지를 의사에게 정보제공하였다. 상기 정보는 개인맞춤형 의약에 관한 전체 사업을 낳았고, 여기에서 각 환자는 그의 질환에 맞춤형된 맞춤형 치료 레지멘을 잠재적으로 받을 수 있다. 약물은 특이적 유전자-관련 질환 징후에 대하여 개발되고 있다. 상기 이상적 접근법은 현행 예후 도구세트의 유의미한 단점에 주로 기인하여 아직 입증되지 않았다. 유전자는 존재할 수 있지만 특정한 개인의 맥락에서 그의 기능은 상관되지 않는다.

[0009] 각 환자가 상이하다는 것 및 여러번 요법이 양성 반응을 효과내는데 실패한다는 것의 인식에 대한 하나의 반응은 동반 진단의 발전이었다. 진단 시험의 상기 유형은 특정한 약물에 더욱 반응할 것 같은 환자를 확인하려고 노력하기 위한 동시대의 바이오마커 검출을 이용하여 설계된다. 시험은 증가된 유전자 수, 유전자 돌연변이, 또는 특정한 유전자의 변경된 발현 수준 찾기를 포함한다. 예를 들어, 많은 암은 요즘 질환과 관련된 특이적 유전적 돌연변이 또는 과-발현된 수용체 단백질의 존재를 계측하기 위한 시험의 도움으로 진단된다. 그러나, 대부분의 바이오마커 시험은 질환 및 그의 근본적인 원인에 대하여 간접적 및 추론적 정보만을 제공한다. 따라서, 유의미한 치료적 반응의 예측에서 대부분의 이들 시험에 대한 성공률은 종종 50% 보다 훨씬 적다.

[0010] 따라서 개인에 대한 치료제의 유효성에 대하여 더 나은 진단 검정 및 더 나은 예후 지표를 제공할 필요성이 남아 있다.

**발명의 내용**

[0011] **발명의 요약**

[0012] 질환의 진단을 위하여 그리고 치료적 의사결정의 기반으로서 바이오마커의 사용은 질환에 관여된 신호전달 경로(들)의 활성이 평가되지 않는다는 사실에 의해 제한된다. 따라서, 본 발명은 질환에 관여된 신호전달 경로(들)이 환자의 이환 세포의 생리적 활성에서 변화에 기반하여 평가되는 진단 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은, 신호전달 경로가 질환 과정에서 연루되는지를 사실상 나타내지 않을 수 있는 바이오마커 (예컨대 세포 표면 수용체)의 발현 보다는, 상기 생리적 활성에 기반하여 치료 레지멘이 선택될 수 있는 정도로 환자의 이환 세포에서 특정한 신호전달 경로가 활성인지의 계측을 허용한다. 특히, 본 발명은 "바이오마커 음성"이고 그렇지만 질환 과정에서 연루된 활성 신호전달 경로를 갖는 환자의 확인 방법을 제공한다. 이는 그의 바이오마커 음성 상태에 기반된 상기 치료에 대하여 이전에 건너뛴 그 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 환자의 선택 및 치료를 허용한다. 예를 들어, 본 발명은 활성 ErbB 신호전달 경로를 아직 갖고 있는 ErbB2 음성 암을 가진 환자의 확인 방법을 제공하여 이로써 그 환자는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택될 수 있고, 반면에 본 발명에 앞서 그 환자는 ErbB 표적화 치료제를 이용한 치료로 간과될 것이다. 이는 ErbB2를 표적하는 약물용 FDA 표지가 과-발현된 또는 증폭된 ErbB2 수용체를 가진 환자에 사용으로만 승인된다는 사실을 반영한다. 마찬가지로, 본 발명은 활성 ER 신호전달 경로를 아직 갖는 에스트로겐 수용체 (ER) 음성 암을 가진 환자의 확인 방법을 제공하여 이로써 그 환자가 ER 신호전달 경로 (예를 들면, 호르몬 요법)에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 선택될 수 있고, 반면에 본 발명에 앞서 그 환자는 ER-관련 요법 (예를 들면, 호르몬 요법)에 간과될 것이다. 따라서, 본 발명은 유의미하게 표적화 치료제를 이용한 치료받음에서 유익할 수 있는 환자 집단을 확대한다.

- [0013] 본 발명의 한 측면은, 하기 단계를 포함하는, 이환 세포에서 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환에 대하여 대상체의 진단 및 치료 방법으로서, 상기 대상체가 질환에 대하여 바이오마커 음성인, 방법을 제공한다:
- [0014] 대상체로부터 수득된 생존 원발 이환 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0015] 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체 단계;
- [0016] 교란제와 접촉되지 않는 세포에 비하여, 생리적 반응 파라미터, 예컨대 세포 접촉 또는 부착에 관한 효과에서 변화에 의해 측정된 바와 같이 신호전달 경로를 상향조절 또는 하향조절하기 위해 질환과 관련된 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미친다고 공지되는 교란제와 이환 세포의 접촉 단계;
- [0017] 교란제와 접촉된 생존 이환 세포의 생리적 반응 파라미터 예컨대 세포 접촉 또는 부착의 연속적 측정 단계; 및
- [0018] 이환 세포에서 발생한 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양을 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계,
- [0019] 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계
- [0020] (여기서 대상체는 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환으로 진단되고 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적된 요법을 이용한 치료에 대해 선택될 수 있다).
- [0021] 변화는, 예를 들어, 적합한 대조군과 비교된 경우 세포 접촉 또는 부착에서 증가 또는 감소일 수 있다.
- [0022] 하나의 구현예에서, 질환은 암, 예컨대 유방암, 폐암, 결장암, 난소암, 식도암, 두경부암, 또는 위암이다. 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환의 다른 유형, 예컨대 자가면역 질환 및 감염성 질환은 또한 포함된다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 질환은 암이고 따라서 이환 세포는 종양 세포의 샘플이고 건강한 세포는 종양 세포와 동일한 세포 유형의 비-종양 세포의 샘플이다. 바람직한 구현예에서, 암은 유방암이다. 유방암 진단을 위한 하나의 구현예에서, 교란제는 PI3K 신호전달 경로, 예컨대 NRG1에 선택적으로 영향을 미친다. 유방암 진단을 위한 하나의 구현예에서, 교란제는 ER $\alpha$  신호전달 경로, 예컨대 에스트라디올에 선택적으로 영향을 미친다. 유방암 진단을 위한 더욱 또 다른 구현예에서, 교란제는 ErbB 신호전달 경로, 예컨대 HER2 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미친다. ErbB 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미치는 제제는 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0024] 다양한 구현예에서, 신호전달 경로는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 신호전달 경로는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: MAPK-PK, RAS/RAF, RHO, FAK1, MEK/MAPK, MAK, MKK, AKT, EGF 수용체, Her2 수용체, Her 3 수용체, Her 4 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 안드로겐 수용체, GPER30, PIK3/PTEN, VEGF 수용체 경로 억제제, 세포 접촉, TGF $\beta$ /SMAD, WNT, 헤지혹/GLI, HIF1 알파, JAK/STAT, 노치, G1/S 전이의 대조군, DNA 손상 대조군, 및 세포자멸사. 추가의 적합한 신호전달 경로는 본원에서 개시된 다른 신호전달 경로를 포함한다. 다양한 구현예에서, 교란제는, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 핵산, 대사물질, 리간드, 시약, 유기 분자, 신호전달 인자, 성장 인자, 생화학물질, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0025] 측정량은 시험에서 측정되도록 의도된 양으로서 일반적으로 정의된다. 본원에서 기재된 본 발명에 대하여, 측정되도록 의도된 양은 교란에 대한 생존 세포의 생리적 반응에서의 변화이다. 본원에서 추가로 기재된 바와 같이, 세포 접촉 또는 부착은 임피던스 바이오센서 또는 광학적 바이오센서로 측정될 수 있는 세포에서 생리적 변화의 예이다. 하나의 구현예에서, 측정량은 교란되는 세포 샘플의 세포 접촉 또는 부착에서의 변화를 나타내고 유클리드 분석을 이용하여 평가된다. 유클리드 분석은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: 다중 시점에서 차이 벡터의 산술적 합산, 일시적 최대치, 일시적 최소치, 최대치 또는 최소치에 도달하는 시간, 경사의 변화, 바이오센서 신호의 절대 저하, 전체 측정의 합계, 및 이들의 조합. 또 다른 구현예에서, 세포 접촉 또는 부착에서의 변화는 일시적 최대치 또는 최소치에서의 변화에 의해 측정된다. 바람직한 구현예에서, 측정량 계산은 아래에서 기재된 바와 같이 알고리즘 적용에 의해 수행된다.
- [0026] 시점 대 임피던스 정보는 다양한 세포 조건 (세포 + 배지, 세포 + 교란 인자 F, 세포 + 확인 시약 + 교란 인자 F)에 대하여 적어도 240 분 동안 각 분 기록된다. 1 초과 교란 인자 F는 질환 이전에 따라 사용될 수 있고; 질환이 다중 관련된 경로를 따라 변식되는 사례에서, 개별적으로 또는 조합으로 각각의 다중 경로를 교란시키는데 유용할 수 있다. 예를 들어, ErbB2 암은 수용체의 ErbB 계열 및 관련된 경로 - MAPK 및 PI3K 경로를 포함한다. 다중 경로가 교란되는 사례에서 측정량은 각 경로에 대하여 계측된 별개의 측정량의 조합일 수 있다. 이들 조건에서 차이에 상응하는 벡터는 아래 상세히 보여진 방정식에 따라 측정량 (NED, 비-선형 유클리드 거리로도 공지

됨)을 제공하도록 합계된다.

[0027] 시간 대 CAS 시험 데이터로부터 유도된 비-선형 유클리드 시점 벡터로부터 측정량을 계산하기 위해 사용된 방정식:

$$\text{측정량} = \left[ \left( \sum_{i=0}^{240} CF1i - Ci \right) - \left( \sum_{i=0}^{240} CCF1i - Ci \right) \right] + \left[ \left( \sum_{i=0}^{240} CF2i - Ci \right) - \left( \sum_{i=0}^{240} CCF2i - Ci \right) \right]$$

[0028]

[0029] 여기에서 변수는 아래와 같이 정의된다:

[0030]  $i$  = CAS가 시험 동안 기록되는 각 분에 대한 단계

[0031] F1 = 교란 인자 1

[0032] F2 = 교란 인자 2 (하나가 사용되면)

[0033]  $C_i$  = 대조군, 시험 세포에 부가된 교란 인자 없음

[0034]  $CF1_i$  = 교란 인자 1 (F1)을 가진 세포

[0035]  $CF2$  = 교란 인자 2 (F2)를 가진 세포 (하나가 사용되면)

[0036]  $CCF1_i$  = HER2 경로 확인제 부가를 가진 세포

[0037]  $CCF2$  = HER2 경로 확인제 부가를 가진 세포 (교란 인자 2가 사용되면)

[0038] 다중 확인 인자는 이들 단계를 수행하기 위해 선택될 수 있다.

[0039] 본 발명은 구현예를 포함하고 이로써 측정량 알고리즘의 간소화된 버전이 유용한 정보를 또한 제공할 수 있다. 예를 들어:

$$\text{측정량} = \left( \sum_{i=0}^{240} CF1i - Ci \right) + \left( \sum_{i=0}^{240} CF2i - Ci \right)$$

또는

$$\text{측정량} = \left( \sum_{i=0}^{240} CF1i - Ci \right)$$

또는

$$\text{측정량} = \left( \sum_{i=0}^{240} CF1i \right)$$

[0040]

[0041] 추가로, 임의의 상기 알고리즘에서 합산의 한계는 분석의 값의 손실 없이 분석을 추가로 향상시키기 위해  $i > 240$  또는  $i < 240$ 까지 확장될 수 있다.

[0042] 또 다른 구현예에서, 이환 세포는 질환과 관련된 신호전달 경로를 표적하는 확인제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에 관한 확인제의 효과는 측정된다. 적합한 확인제는 당해 분야의 숙련자에게 공지된다. 당해 질환 기전에 관련된 경로내 한 지점에서 당해 신호전달 경로를 억제시킨다고 공지되기 때문에 확인제는 선택된다. 상기 구현예는 당해 신호전달 경로와 관련된 교란제와 이환 세포의 접촉에서 비롯된 생리적 반응의 양을 정량화하는 것을 가능하게 한다. 이는 측정된 생리적 반응이 당해 신호전달 경로에 특이적인지 아닌지를 확인할 수 있다.

[0043] 더욱 또 다른 구현예에서, 이환 세포는 질환과 관련된 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에 관한 표적화 치료제의 효과는 측정된다.

[0044] 표적화 치료제의 비-제한 예는 하기를 포함한다: 트라스투주맙, 페르투주맙, 라파티닙, 도세탁셀, 타목시펜, 스플라틴, 아브라산, 파클리탁셀 주사, 브렌투시맙 베도톤, 에버롤리무스, 페메트렉세드, 액세메스탄, 오파투무맙, 베바시주맙, 알렘투주맙, 이리노테칸, 바이칼루타마이드, 옥살리플라틴, 세톡시맙, 비소메테집, 토레미펜 시트레이트, 플베스트란트, 켐시타빈, 이마티닙, 익사베필론, 토페오테칸, 악시티닙, 로미렙신, 카브라지탁셀,

소라페닙, 인플릭시맙, 레날리도마이드, 리톡시맙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 파클리탁셀, 테모졸로마이드, 트리옥사이드, 파니투무맙, 보르테조미드, 아자시티딘, 파조파닙, 크리조티닙, 카페시타빈, 이필리무맙, 베무라페닙, 고세렐린 아세테이트, 아비라테론, BH3 모방체, 나비토클락스, 아나스트로졸, 레트로졸, 방향화효소 억제제, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 메토크세이트, 플루오로우라실, 익사베필론, 카보플라틴, 아플리베르셉트, 템시플리무스, 이르브리투모맙, 아비라테론, 쿠스티르센, 네라티닙, 엔잘루타마이드, 니블루맙, 팔보시클립, 레고라페닙, 엔티노스태트, 아파티닙, ARN-509, ARN-810, BIND-014, 다브라페닙, 다라투무맙, 람브롤리주맙, LDK378, MM-121, sym004, 트라스투주맙-엠탄신, 티보자닙, 트라메티닙, 악시티닙, LY2835219, MPDL320A, 오비누투주맙, Sym004, 토시투모맙, 트라메티닙, 네시투무맙, 라무시투맙, ADXS-HER2, TAK-285, MM-302, MM-121, MM-111, REGN 1400, 사파티닙, 다코미티닙, 포지오티닙, ASLAN001, LIM716, AV-203, 돌리고투주맙, 림레투주맙, 파니투무맙, REGN955, MM-151, 게피티닙, U3-1287(AMG888), TK-A3/TK-A4, AZD9291, 로실레티닙, 및 이들의 조합. 다른 적합한 표적화 치료제는 본원에서 개시된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 방법은 대상체에 표적화 치료제의 투여를 추가로 포함한다.

- [0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 에스트로겐 관련된 신호전달 경로 (예컨대 호르몬 요법)에 영향을 미치는 표적된 요법을 위한 비-과발현된 에스트로겐 수용체 알파 (ER $\alpha$ -음성) 유방암을 가진 대상체의 선택 방법을 제공한다:
- [0046] 비-과발현된 ER $\alpha$  (ER $\alpha$  음성) 유방암을 가진 대상체로부터 획득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0047] 생리적 반응 파라미터 예컨대 세포 접착 또는 부착에 관한 효과에 의해 측정된 바와 같이 신호전달 경로를 상향 조절 또는 하향조절하기 위한 ER $\alpha$  신호전달 경로를 선택적으로 영향을 미친다고 공지되는 교란제와 생존 원발 유방암 세포; 및 (2) 동일한 에스트로겐-관련 신호전달 경로 활성을 억제한다고 공지된 확인제 및 교란제와 샘플의 제2 부분의 접촉 단계;
- [0048] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 유방암 세포의 생리적 반응 파라미터 예컨대 세포 접착 또는 부착의 연속적 측정 단계; 및
- [0049] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측; 및
- [0050] 에스트로겐 수용체 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값에 측정량의 비교 단계;
- [0051] (여기에서 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 대상체는 에스트로겐 관련된 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적된 요법을 이용한 치료에 대해 선택된다).
- [0052] 하나의 구현예에서, 방법은 샘플이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체를 포함한다.
- [0053] 측정량은, 예를 들어, 미교란된 생존 암 세포 샘플에 비교된 경우 교란제와 접촉된 생존 암 세포 샘플의 부분에서 세포 접착 또는 부착의 증가 또는 감소 혹은 교란제 및 확인제와 접촉된 이후 생존 세포 샘플의 부분에서 세포 접착 또는 부착의 증가 또는 감소일 수 있다. ER $\alpha$  신호전달 경로에 영향을 미치는 적합한 교란제는 당해 기술에 공지되어 있고 에스트라디올처럼 본원에서 개시된다. 또 다른 구현예에서, 생존 종양 세포는 ER $\alpha$  신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접착 또는 부착에 관한 표적화 치료제의 효과는 측정된다. ER $\alpha$  신호전달 경로를 표적하는 적합한 표적화 치료제는 당해 기술에 공지되어 있고 풀베스트란트 및 타목시펜처럼 본원에서 개시된다. 방법은 대상체에 표적화 치료제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 더욱 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 요법을 위한 비-과발현된 또는 증폭된 ErbB2 암 (예를 들면, 유방암)을 가진 대상체의 선택 방법을 제공한다:
- [0055] 대상체로부터 획득된 생존 원발 암 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양;
- [0056] (1) 뉴레굴린과 대상체로부터 획득된 생존 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 뉴레굴린 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 뉴레굴린과 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제2 부분의 접촉; 및/

또는 (3) 상피 성장 인자와 샘플의 제3 부분 및 (4) 상피 성장 인자 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 상피 성장 인자와 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제4 부분의 접촉 단계;

- [0057] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;
- [0058] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 샘플의 제3 부분과 샘플의 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계; 및
- [0059] ErbB 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0060] (여기서 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택된다).
- [0061] 하나의 구현예에서, 방법은 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체를 포함한다.
- [0062] 측정량은, 예를 들어, 미교란된 생존 암 세포 샘플과 비교된 경우 교란제와 접촉된 생존 암 세포 샘플의 교란된 부분에서 세포 접촉 또는 부착에서 증가 또는 감소 혹은 교란제 및 확인제와 접촉된 이후 생존 세포 샘플의 부분에서 세포 접촉 또는 부착의 증가 또는 감소일 수 있다.
- [0063] ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 다른 적합한 교란제는 당해 기술에 공지되어 있고 본원에서 개시된다. 또 다른 구현예에서, 종양 세포는 ErbB 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에 관한 표적화 치료제의 효과는 측정된다. ErbB 신호전달 경로를 표적하는 적합한 표적화 치료제는 당해 기술에 공지되어 있고 본원에서 개시된다. 방법은 대상체에 표적화 치료제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.
- [0064] 또 다른 측면에서, 본 발명은 표적화 치료제를 투여함으로써 대상체의 치료 방법을 제공하고, 여기서 상기 대상체는 신호전달 경로가 대상체의 세포에서 활성인지의 계측을 위하여 본 발명의 방법을 이용한 치료에 대해 선택되었다. 따라서, 본 발명은 특이적 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제가 있는 바이오마커 음성 암을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공하고, 여기서 대상체가 바이오마커 음성 암을 가짐에도 불구하고 활성 신호전달 경로를 갖는 것으로 보여졌기 때문에 상기 대상체는 치료에 선택되었다.
- [0065] 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명은 암 세포가 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 수용체를 갖는 암을 가진 (예를 들면, 암으로 진단된) 인간 대상체의 치료 방법을 제공하고, 상기 방법은 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 상기 대상체가 하기 단계를 포함하는 방법을 이용한 치료에 대해 선택된다:
- [0066] 대상체로부터 획득된 생존 원발 암 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0067] (1) 교란제와 대상체로부터 획득된 생존 원발 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 교란제 및 확인제 (여기서 상기 교란제는 ErbB 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미치고 확인제는 동일한 ErbB 신호전달 경로에 관해 교란제의 효과를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제2 부분의 접촉 단계;
- [0068] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;
- [0069] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계; 및
- [0070] ErbB 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0071] (여기서 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택된다).
- [0072] 하나의 구현예에서, 방법은 샘플이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체를 포함한다.
- [0073] 다양한 구현예에서, 교란제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF, 암피레굴린, 베타셀룰린, 에피겐, 에피레굴린, 뉴레굴린-1, 뉴레굴린-2, 뉴레굴린-3, 뉴레굴린-4, 및 이들의 조합. 구현예에서, 방법은 하기를 포함한다:
- [0074] (1) 뉴레굴린과 대상체로부터 획득된 생존 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 뉴레굴린 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 뉴레굴린과 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제2 부분의 접촉; 및/

또는 (3) 상피 성장 인자와 샘플의 제3 부분 및 (4) 상피 성장 인자 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 상피 성장 인자와 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제4 부분의 접촉 단계; 및

- [0075] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 샘플의 제3 부분과 샘플의 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계.
- [0076] 방법은 ErbB 신호전달 경로를 표적하는 교란제 및 표적화 치료제와 생존 원발 암 세포의 접촉 및 생리적 반응 파라미터에 관한 표적화 치료제의 효과의 측정을 추가로 포함할 수 있다.
- [0077] 하나의 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 세포 접착 또는 부착이다. 또 다른 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 세포 대사물질의 수준이다. 또 다른 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 미토콘드리아 기능에 관련된 세포 효소 수준이다.
- [0078] 하나의 구현예에서, 대상체는 비-과발현된, 비-증폭된 HER2 암을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 EGFR 음성 및 HER2 음성 암을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 유방암을 갖는다. 다른 구현예에서, 대상체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB 암을 갖는다: 결장암, 직장암, 자궁내막암, 위 암종, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 교모세포종, 간세포암종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 전립선 암종, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성적 골수성 백혈병 (CML), 비-호지킨의 림프종 및 갑상선 암종.
- [0079] 하나의 구현예에서, 확인제는 2C4 마우스 단클론성 항체이다. 또 다른 구현예에서, 확인제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합한다: HER2의 세포외 분절의 도메인 II; HER2의 세포외 분절의 도메인 IV; EGFR 또는 HER2 또는 HER3 또는 HER4의 세포외 아데노신 삼인산-결합 부위; EGFR 또는 HER2의 아데노신 삼인산 결합 부위에서의 시스테인 잔기; 및 이들의 조합.
- [0080] 하나의 구현예에서, 표적화 치료제는 라파티닙이다. 또 다른 구현예에서, 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군 으로부터 선택된다: 트라스투주맙, 페르투주맙, 아파티닙, 네라티닙, ADXS-HER2, TAK-285, MM-302, MM-121, MM-111, REGN 1400, 사피티닙, 다코미티닙, 포지오티닙, ASLAN001, LIM716, AV-203, 돌리고투주맙, 룸레투주맙, 파니투무맙, REGN955, MM-151, 세톡시맙, 게피티닙, 에를로티닙, 트라스투주맙-엠탄신, 및 이들의 조합. 다른 구현예에서, 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합한다: HER2의 세포 외 분절의 도메인 II; HER2의 세포외 분절의 도메인 IV; EGFR 또는 HER2 또는 HER3 또는 HER4의 세포외 아데노 신 삼인산-결합 부위; EGFR 또는 HER2의 아데노신 삼인산 결합 부위에서의 시스테인 잔기; 및 이들의 조합.
- [0081] 또 다른 구현예에서, 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제, 예컨대 표준 화학요법 제제 또는 ErbB와 상이한 신호전달 경로에 영향을 미치는 상이한 표적화 치료제로 또한 치료된다.
- [0082] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 유방암을 가진 (예를 들면, 상기로 진단된) 인간 대상체의 치료 방법으로서, 라파티닙을 대상체에 투여를 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 대상체는 하기 단계를 포함한 방법을 이용하여 라파티닙을 이용한 치료에 대해 선택되었고;
- [0083] 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0084] 샘플이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체 단계;
- [0085] (1) 교란제로서의 뉴레굴린과 대상체로부터 수득된 생존 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 뉴레굴린 및 확인 제 (여기서 상기 확인제는 뉴레굴린과 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제2 부분 의 접촉; 및/또는 (3) 교란제로서 상피 성장 인자와 샘플의 제3 부분 및 (4) 상피 성장 인자 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 상피 성장 인자와 동일한 ErbB 신호전달 경로를 선택적으로 억제시킨다)와 샘플의 제4 부분의 접 촉 단계;
- [0086] 교란제와 접촉된 생존 원발 유방암 세포의 세포 접착 또는 부착의 연속적 측정 단계;
- [0087] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 샘플의 제3 부분과 샘플의 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계; 및
- [0088] ErbB 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0089] 여기서 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 대상체는 라파티닙을 이용한 치료에 대해 선택된다.

- [0090] 상기 제시된 동일한 방법은 라파티닙 이외의 표적화 치료제에 적용될 수 있다. 따라서, 다른 구현예에서, 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 트라스투주맙, 페르투주맙, 아파티닙, 네라티닙, ADXS-HER2, TAK-285, MM-302, MM-121, MM-111, REGN 1400, 사피티닙, 다코미티닙, 포지오티닙, ASLAN001, LIM716, AV-203, 돌리고투주맙, 룰레투주맙, 파니투무맙, REGN955, MM-151, 세특시맙, 게피티닙, 에를로티닙, 트라스투주맙-엠탄신, 및 이들의 조합. 다른 구현예에서, 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합한다: HER2의 세포외 분절의 도메인 II 또는 또 다른 ErbB 계열 구성원의 동족 도메인; HER2의 세포외 분절의 도메인 IV 또는 또 다른 ErbB 계열 구성원의 동족 도메인; EGFR 또는 HER2 또는 HER3 또는 HER4의 세포외 아테노신 삼인산-결합 부위; EGFR 또는 HER2의 아테노신 삼인산 결합 부위에서의 시스테인 잔기; 및 이들의 조합.
- [0091] 하나의 구현예에서, 대상체는 EGFR 음성 및 HER2 음성 유방암을 갖는다.
- [0092] 하나의 구현예에서, 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제, 예컨대 표준 화학요법 제제 또는 ErbB와 상이한 신호전달 경로에 영향을 미치는 상이한 표적화 치료제로 또한 치료된다.
- [0093] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-과발현된 에스트로겐 수용체 (ER) 유방암을 가진 (예를 들면, 상기로 진단된) 인간 대상체의 치료 방법으로서, ER 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 대상체는 하기 단계를 포함한 방법을 이용하여 치료에 대해 선택되었고;
- [0094] 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0095] (1) 에스트로겐-관련 신호전달 경로를 상향조절 또는 하향조절한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 동일한 에스트로겐-관련 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 교란제 및 확인제와 생존 원발 암 세포의 샘플의 제2 부분의 접촉 단계;
- [0096] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;
- [0097] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계;
- [0098] 에스트로겐 수용체 경로 활성에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0099] 여기서 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 대상체는 에스트로겐 관련된 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택된다.
- [0100] 하나의 구현예에서, 방법은 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체를 포함한다.
- [0101] 방법은 ER 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 원발 유방암 세포의 접촉 및 생리적 반응 파라미터에 관한 표적화 치료제의 효과 측정을 추가로 포함할 수 있다.
- [0102] 하나의 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 세포 접착 또는 부착이다. 또 다른 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 세포 대사물질의 수준이다. 또 다른 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 미토콘드리아 기능에 관련된 세포 효소 수준이다.
- [0103] 하나의 구현예에서, 대상체는 ER $\alpha$  음성 유방암을 갖는다.
- [0104] 하나의 구현예에서, 교란제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 에스트라디올, 에스트론, 락토키펜, 에스트리올, 게니스테인, DHEA, 안드로스테네디온, 안드로스테네디올, 프로그스테론, 하이드록시프로그스테론, 테스토스테론, 이들의 황산화된 형태, 및 이들의 조합.
- [0105] 하나의 구현예에서, 표적화 치료제는 폴베스트란트, 타목시펜, 레트로졸, 팔보시클립, 아베마시클립, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 표적화 치료제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 부위에 결합한다: 방향화효소 효소 (CYP19A)의 사이토크롬 P450 서브유닛, 에스트로겐 수용체의 활성화 기능 1 (AFP-1) 도메인, 사이클린-의존적 키나제 4 (사이클린 D1), 사이클린-의존적 키나제 6 (사이클린 D3), 및 이들의 조합.
- [0106] 하나의 구현예에서, 대상체는 ER 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 치료제, 예컨대 표준 화학요법 제제 또는 ER과 상이한 신호전달 경로에 영향을 미치는 상이한 표적화 치료제로 치료된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 또한 화학요법, CDK4/CDK6 억제제, PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA-4 억제제, 및 이들의 조합으로 이루어진

군으로부터 선택되는 요법으로 치료된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제로 치료된다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 대상체는 에스트로겐-관련 표적된 요법을 이전에 받았고 이에 반응하는데 실패하였고 그 다음 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 표적화 치료제로 치료되었고, 여기서 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는 표적화 치료제를 이용한 치료가 그 다음 에스트로겐-관련 표적된 요법의 기능을 향상시킨다.

[0107] 일부 약물은 특이적 유전자-관련 질환 징후를 표적화되고 있다. 상기 접근법은 주로 현행 예후 도구세트의 유의미한 단점 때문에 아직 광범위하게 이용되지 않았다. 본원에서 기재된 바와 같이 키트 및 방법은 개인의 질환에 대해 효능을 보이는 치료제의 선택 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 치료제는 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)에서 이환 조직으로부터 무 표지 전체의 생세포에 접촉되고 세포의 생리적 파라미터에서 이의 변화 또는 부족은 치료제의 존재하에서 검출된다. 치료제는 기준선 측정과 비교된 경우 질환 세포의 생리적 파라미터에서 변화를 초래하는 대상체를 치료하도록 선택된다.

[0108] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 초기 진단에서 또는 치료 전반에 걸쳐 하나 이상의 치료제의 선택 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 치료제는 개인에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 용도로 상업적으로 승인된다. 방법은 하기를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 치료제의 투여; 치료제 또는 치료제들의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 치료제 또는 치료제들에 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 (여기서 세포성 반응 파라미터에서 상기 변화는 제제 또는 제제들이 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는 것을 나타낸다). 특정 구현예에서, 단리된 질환 세포 샘플은 무 표지 전체의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 단리된 질환 세포에서 세포성 반응 파라미터의 변화는 시간의 연속적으로 규정된 기간 동안 모니터링된다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제의 조합 또는 치료제의 선택 및 건강 관리 제공자에 선택된 제제의 전달을 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제의 조합 또는 치료제의 투여를 포함한다.

[0109] 다른 구현예에서, 개별 대상체용 치료의 선택 방법은 하기를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)에서 개별 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 무 표지 질환 세포 샘플에 제제의 투여를 포함한 개별 대상체에서 질환용 제제의 치료적 효능의 예측 (여기서 상기 질환 세포 샘플은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 암 세포 샘플, 자가면역 질환을 가진 대상체로부터 세포 샘플, 외래 제제로 감염된 조직으로부터 세포 샘플 및 이들의 조합); 치료제의 존재하에 시간의 규정된 기간 동안 세포 샘플의 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터에서의 변화의 연속적 측정; 및 기준선 측정과 비교된 경우 제제에 대한 세포 샘플의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생하는지의 예측 (여기서 생리적 반응에서의 상기 변화는 제제가 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는 것을 나타낸다).

[0110] 다른 구현예에서, 암을 가진 개별 대상체용 치료의 선택 방법은 하기를 포함한다: 하기를 포함하는 개별 대상체에서 암에 대한 제제의 치료적 효능의 예측: 바이오센서에서 개별 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 무 표지 암 세포 샘플에 제제의 투여; 치료제의 존재하에 시간의 규정된 기간 동안 세포 샘플의 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터에서의 변화의 연속적 측정; 및 기준선 측정과 비교된 경우 세포 샘플의 생리적 반응 파라미터에서의 변화를 나타내는 대상체의 치료용 치료제의 선택.

[0111] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 경로가 정상적으로 기능하는 경우 세포성 경로를 작용화 또는 길항화한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 획득된 이환 세포 샘플의 접촉에 의해, 개별 대상체로부터 획득된 이환 세포에서 세포성 경로의 기능성 상태의 예측 방법을 제공한다. 하나 이상의 생리적 반응 파라미터는 샘플내 생존 세포에서 연속적으로 측정될 수 있다. 연속적 측정의 분석은, 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생하는지를 예측하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 기준선 또는 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는, 교란제에 의해 표적된 세포성 경로가 개별 대상체에서 기능성이라는 것을 나타낸다.

[0112] 또 다른 측면에서, 본 발명은 당해 신호전달 경로에 특이적인 신호전달 경로에 영향을 미친다고 공지된 제제에 의해 야기된 경로 교란의 양의 예측 방법을 제공한다. 상기 구현예에서, 이환 세포 샘플은 교란제 및 확인제와 접촉되고, 이 둘 모두는 신호전달 경로에 영향을 미친다고 공지된다. 생리적 반응 파라미터는 측정되고 교란제와 단지 접촉된 세포 샘플에 비하여 변화는 예측된다. 확인제가 억제시키는 신호전달 경로 활성의 양은 당해 신호전달 경로 활성의 양에 상응한다. 교란제가 신호전달 경로에 매우 특이적이지 않다면, 그리고 당해 신호전달

경로에 대하여 다른 세포 신호전달 활성을 개시한다면, 확인제는 교란제에 의해 개시된 그 다른 세포 활성을 억제시킬 수 없을 것이다. 확인제는 따라서 당해 신호전달 경로에 관련된 교란제와 세포 샘플의 접촉에서 비롯된 생리적 반응 파라미터에서의 변화의 양의 계측 방법을 제공한다. 이는 교란제가 당해 신호전달 경로에 관련 없는 활성을 개시하는 사례에서 위 양성 결과의 목적을 제공한다.

[0113] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 경로가 정상적으로 기능하는 경우 세포성 경로를 작용화 또는 길항화한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 수득된 이환 세포 샘플의 접촉, 샘플내 생존 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정, 및 적합한 기준선 또는 대조군에 비하여 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생하는지의 연속적 측정의 분석에 의한 계측에 의해, 개별 대상체용 표적화 치료제의 선택 방법을 제공하고, 여기서 적합한 기준선 또는 대조군에 비하여 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는 대상체가 세포성 경로를 표적하는 표적화 치료제에 반응성일 것을 나타낸다.

[0114] 하나의 구현예에서, 전술한 방법은 또한 대상체에 표적화 치료제의 투여를 포함할 수 있다.

[0115] 특정 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 하기일 수 있다: 세포 접착, 세포 부착, 세포 형태학, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 이들의 조합. 예를 들어, 생리적 반응 파라미터는 세포 접착 또는 부착일 수 있다.

[0116] 하나의 구현예에서, 교란제는 하기를 포함한 하나 이상의 세포성 경로를 표적한다: MAPK-PK, RAS/RAF, RHO, FAK1, MEK/MAPK, MAK, MKK, AKT, EGF 수용체, Her2 수용체, Her 3 수용체, Her 4 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 안드로겐 수용체, GPER30, PIK3/PTEN, VEGF 수용체 경로 억제제, 세포 접착, TGF베타/SMAD, WNT, 헤지혹/GLI, HIF1 알파, JAK/STAT, 노치, G1/S 전이의 대조군, DNA 손상 대조군, 및 세포자멸사. 교란제는, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 핵산, 대사물질, 리간드, 유기 분자, 신호전달 인자, 생화학물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 하나의 구현예에서, 교란제는 CDK4, CDK6, PD-1, 사이클린 A, 사이클린 B, 사이클린 C, 사이클린 D, 사이클린 E, 사이클린 F, 및 G1/S 사이클린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 사이클 조절에 관여된 세포 경로 성분에 표적된다.

[0117] 표적화 치료제는, 특정 구현예에서, 하나 이상의 하기일 수 있다: 트라스투주맙, 페르투주맙, 라파티닙, 도세탁셀, 타목시펜, 시스플라틴, 아브라산, 파클리탁셀 주사, 브렌투시맙 베도톤, 에버롤리무스, 페메트렉세드, 엑세메스탄, 오파투무맙, 베마시주맙, 알렘투주맙, 이리노테칸, 바이칼루타마이드, 옥살리플라틴, 세톡시맙, 비소메데깅, 토레미펜 시트레이트, 폴베스트란트, 켈시타빈, 이마티닙, 익사베필론, 토페오테칸, 악시티닙, 로미렙신, 카브라지탁셀, 소라페닙, 인플릭시맙, 레날리도마이드, 리툭시맙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 파클리탁셀, 테모졸로마이드, 트리옥사이드, 파니투무맙, 보르테조밂, 아자시티닙, 파조파닙, 크리조티닙, 카페시타빈, 이펠리무맙, 베무라페닙, 고세렐린 아세테이트, 아비라테론, BH3 모방체, 나비토클락스, 아나스트로졸, 레트로졸, 방향화효소 억제제, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 메토크세이트, 플루오로우라실, 익사베필론, 카보플라틴, 아플리베르셉트, 템시롤리무스, 이르브리투모맙, 아비라테론, 쿠스티르센, 네라티닙, 엔잘루타마이드, 니볼루맙, 팔보시클립, 레고라페닙, 엔티노스태트, 아파티닙, ARN-509, ARN-810, BIND-014, 다브라페닙, 다라투무맙, 람브롤리주맙, LDK378, MM-121, sym004, 트라스투주맙 엠단신, 티보자닙, 트라메티닙, 악시티닙, LY2835219, MPDL320A, 오비누투주맙, Sym004, 토시투모맙, 트라메티닙, 네시투무맙, 라무시루맙, 및 이들의 조합.

[0118] 하나의 구현예에서, 이환 세포 샘플은 하기이다: 암 세포 샘플, 예를 들면, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 위암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 교모세포종, 간세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 전립선암, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성적 골수성 백혈병 (CML), 비-호지킨의 림프종 및 갑상선암 또는 두경부암.

[0119] 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는, 일부 구현예에서, 비-선형 유클리드 분석을 이용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는 하기를 포함하는 분석적 방법을 이용하여 평가될 수 있다: 다중 시점에서 차이의 산술적 합산, 일시적 최대치, 일시적 최소치, 최대치 또는 최소치를 달성하는 시간, 기울기의 변화, 바이오센서 신호에서의 절대적 저하, 전체 측정의 총계, 또는 이들의 조합. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화는 일시적 최대치 또는 최소치에서의 변화에 의해 측정된다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개별 대상체에서 교란제 및/또는 치료제에 의해 영향받는 세포 경로 성분의 확인

방법을 제공한다. 이들 방법은 하기를 포함한다: 교란제 및/또는 치료제와 대상체로부터 수득된 단리된, 무 표지 세포성 샘플의 접촉, 샘플내 생존 세포에서 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정에 의한 제제의 효과 모니터링, 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생하는지의 연속적 측정의 분석에 의한 예측, 그렇게 함으로써 제제(들)에 대한 샘플의 감수성의 특성화, 및 프로테오믹스, qPCR, 유전체학, RNA 정량화, 탠덤 액체 크로마토그래피-질량 분광법, 및 대사체학으로부터 선택된 방법을 이용하여 제제(들)에 의해 표적된 세포 경로의 성분의 분석, 그렇게 함으로써 세포 경로의 성분이 세포성 샘플에서 교란제 및/또는 치료제의 존재에 의해 변경되는지의 예측. 하나의 구현예에서, 샘플상에서 교란제의 활성은 세포 경로 성분의 분석에 앞서 중단된다.

[0121] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 표적화 치료제에 반응할 것 같은 또는 반응할 것 같지 않은 환자를 확인하는 시험용 컷-오프 값의 예측 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기를 포함할 수 있다: 환자의 그룹의 선택 (각각의 이들은 동일한 질환을 갖고 동일한 치료제가 처방된다); 환자의 그룹 내에서 각 대상체에 대한 시험 값의 유도 (여기서 상기 시험 값은 치료제 및/또는 교란제로 치료 동안 환자 세포 샘플에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 분석에서 비롯된다); 사전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해 시험된 총 환자의 유의미한 백분율로 충분한 일정 기간에 걸쳐 시험된 환자의 그룹의 각 구성원의 건강 상황의 관찰; 이들이 했다면, 사전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해 각각의 환자에 요구된 시간의 길이의 기록; 다른 것에 대한 값에서 등거리인 2 이상의 후보자 컷-오프 값의 확인 (여기서 각 후보자 컷-오프 값은 환자가 반응한다고 또는 반응하지 않는다고 예측되는 값 미만 및 환자가 컷-오프 값 미만에 스코어가 해당했던 것의 반대 방식으로 반응한다고 예상되는 값 초과를 나타낸다); 시험 값이 컷-오프인 또는 미만인 환자에 대하여 임상 종료점 기간과 시험 값이 컷-오프 초과인 환자에 대하여 임상 종료점 기간 사이에서 차이를 분석하기 위한 통계적인 방법의 이용; 및 컷-오프 값 초과 및 미만 환자의 그룹 사이에서 통계적으로 유의차가 있음을 나타내는 후보자 컷-오프 값의 그룹 중에서 요법에 반응하지 않는 것으로 예측되는 환자의 최대 백분율을 초래하는 컷-오프 값의 선택.

[0122] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 동일한 질환을 가지고 동일한 치료제로 시험되었던 개별 대상체의 그룹에 대한 시험 결과 값의 기록, 및 개별 대상체의 시험 값의 백분위 등급의 예측 (여기서 개별 대상체의 시험 값의 상기 백분위 등급은 개별 대상체에서 질환용 치료제의 효능을 예측한다)에 의해, 개별 대상체에서 치료제의 효능의 예측 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 방법은 기록된 시험 결과 값의 목록으로의 열거, 및 각 개별 대상체의 절대적인 수치 시험 값에 기초하여 시험된 개별 대상체의 시험 결과 값에 기초하여 목록의 배치를 포함한다.

[0123] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 키트를 제공하고: 수송 배지를 함유한 개별 대상체로부터 질환 세포 샘플용 용기; 수송 배지를 함유한 개별 대상체로부터 대조군 세포 샘플용 용기; 바이오센서; 및 바이오센서로부터 데이터의 출력으로의 전환용 컴퓨터 실행가능 지침을 가진 비-일시적 컴퓨터 판독가능한 배지, 여기서 상기 출력은 정의된 기간에 걸쳐 세포성 생리적 반응 파라미터의 변화를 보여주고, 여기서 상기 세포성 생리적 반응 파라미터는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: pH, 세포 접촉, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호 전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 세포 사이클, 동화작용, 이화, 소분자 합성 및 생성, 턴오버, 및 호흡, ATP, 칼슘, 마그네슘, 및 다른 충전된 이온, 단백질, 특이적 경로 구성원 분자, 다양한 세포성 구획내 DNA 및 또는 RNA, 유전체학, 및 프로테오믹스, 번역후 변형 및 기전, 생리적 기능을 가진 2차 메신저, cAMP, mRNA, RNAi, 마이크로RNAs 및 다른 RNA의 수준, 및 이들의 조합; 무 반응, 약 반응성, 및 반응성으로 출력의 분류; 및 분류에 따라 보고서 작성.

[0124] 더욱 또 다른 측면, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 개별 대상체에서 교란제 및/또는 치료제에 의해 영향받는 세포 경로 성분의 확인 방법을 제공한다:

[0125] 교란제 및/또는 치료제와 대상체로부터 수득된 단리된, 무 표지 세포성 샘플의 접촉 단계;

[0126] 샘플내 생존 세포에서 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정에 의한 제제의 효과의 모니터링 단계;

[0127] 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생할지의 연속적 측정의 분석의 예측, 그렇게 함으로써 제제(들)에 샘플의 감수성의 특성화 단계;

[0128] 샘플에서 교란제의 활성의 중단 단계; 및

[0129] 프로테오믹스, qPCR, 유전체학, RNA 정량화, 탠덤 액체 크로마토그래피-질량 분광법, 및 대사체학으로부터 선택된 방법을 이용하여 제제(들)에 의해 표적된 세포 경로의 성분의 분석, 그렇게 함으로써 세포 경로의 성분이 세포성 샘플에서 교란제 및/또는 치료제의 존재에 의해 변경되는지의 예측 단계.

- [0130] 더욱 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 기능성 수준에서 그의 질환을 한정할 목적으로 개별 대상체로부터 취득된 이환 세포에서 세포성 경로의 기능성 상태의 측정 방법을 제공하고:
- [0131] 경로가 정상적으로 기능하는 경우 세포성 경로를 작용화 또는 길항화한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 취득된 이환 세포 샘플의 접촉 단계;
- [0132] 샘플내 생존 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 측정 단계; 및
- [0133] 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 적합한 기준선 또는 대조군에 비하여 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플에서 발생하는지의 측정의 분석에 의한 측정 단계;
- [0134] 여기서 적합한 기준선 또는 대조군에 비하여 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 변화는 교란제에 의해 표적된 세포성 경로가 개별 대상체에서 비정상 또는 정상을 나타낸다.
- [0135] 측정 단계는, 예를 들어, 샘플내 생존 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 또는 간헐적 측정일 수 있다
- [0136] 더욱 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 표적화 치료제가 대상체의 암 세포에서 기능성인지를 측정하기 위해 표적화 치료제인 제1 제제가 대상체로부터 취득된 생존 암 세포의 샘플에서 다루도록 의도되는 신호전달 경로에서 효과를 갖는지의 평가 방법을 제공하고;
- [0137] 대상체로부터 취득된 생존 원발 암 세포의 샘플 제조 및 기본 배지에서 이들의 배양 단계;
- [0138] 이들이 제제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 샘플을 배양하기 위해 사용된 기본 배지의 대체 단계;
- [0139] 세포 접촉 또는 부착에 관한 효과에 의해 측정된 바와 같이 신호전달 경로를 상향조절 또는 하향조절하기 위해, 제1 제제가 다루도록 의도되는 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미친다고 공지되는 제2 제제와 그리고 제1 제제와 샘플의 접촉 단계;
- [0140] 샘플이 제1 제제 또는 제2 제제와 단독으로 접촉되는 대상체로부터 취득된 생존 암 세포의 샘플에 비하여, 제1 제제 및 제2 제제 모두와 접촉된 샘플에서 생존 세포의 세포 접촉 또는 부착의 연속적 측정 단계; 및
- [0141] 제1 제제 또는 제2 제제와 단독으로 접촉된 샘플과 비교된 경우, 제1 제제 및 제2 제제 모두와 접촉된 샘플에서 세포 접촉 또는 부착에서의 변화가 발생했는지의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정 단계; 및
- [0142] 세포 신호전달 경로에서 변화를 나타내는, 제1 또는 제2 제제 단독과 비교된 경우, 제2 제제와 조합으로 세포 접촉 또는 부착에서의 변화를 일으키는 및 따라서 표적화 치료제가 대상체의 암 세포에서 기능성인 것으로 예상되는 제1 제제의, 대상체에서 치료 용도를 위한 선택 단계.

**도면의 간단한 설명**

[0143] 도 1a, 1b, 및 1c는 HER2 과발현 유방암, 및 인간 상피 성장 인자 (EGF)에 대하여 나타낸 2개 HER2 과발현 유방암 환자 (환자 B1 및 B4), 2개 표적된 경로 약물 (라파티닙 및 트라스투주맙)으로부터 세포로 수행된 "CELx" 시험의 결과를 보여준다. 시험 동안 B1 및 B4 세포의 생리적 변화는 도에서 기록되는 CReMS로부터 출력 및 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)으로 측정되었다. 하나의 샘플 각각의 B1 및 B4 세포는 라파티닙으로 전처리되었고 또 다른 샘플 각각의 B1 및 B4 세포는 트라스투주맙으로 전처리되었고 후속의 EGF 교란에 대한 각 세트의 세포의 생리적 반응은 시험 전반에 걸쳐 연속적 기준으로 기록된다. 도 1a에서 보이는 CELx 경로 폐쇄 시험은 환자 B1이 트라스투주맙에 반응하지 않지만 라파티닙에 반응할 것을 예측한다. 도 1b에서 보이는 결과는 또한 환자 B4가 트라스투주맙 및 라파티닙 모두에 반응할 것을 예측한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 1c에서 보여지고; CELx 시험이 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 정확하게 예측한 것을 보여주고, 여기에서 환자 B1은 트라스투주맙에 미반응성 및 라파티닙에 반응성인 것이 밝혀졌고 환자 B4는 모두에 반응성인 것이 밝혀졌다.

도 2a, 2b, 및 2c는 2 유방암 환자 (환자 B1 및 B2) 및 항-증식성 약물 파클리탁셀로부터 세포로 수행된 CELx 시험의 결과를 보여준다. 시험 동안 B1 및 B2 세포의 생리적 변화는 도에서 기록되는 CReMS로부터 출력 및 CReMS로 측정되었다. 하나의 세트 각각의 B1 및 B2 세포는 파클리탁셀로 처리되었고 또 다른 대조군 세트의 B1 및 B2 세포는 약물을 받지 않았고; 각 세트의 세포의 생리적 반응은 48 시간 동안 연속적으로 기록되었다. B2 시험 세포는, B2 대조군 세포와 비교된 CReM 출력에서의 유의미한 감소에서 반영된 경우, 파클리탁셀에 초기 반

응성을 보여주었지만, 그러나 거의 24 시간 이후, CREM 출력은 반대가 되어, 시험 세포가 증식하기 시작하고 약물에 더이상 반응성이 없음을 나타낸다. B1 시험 세포는, 시험 기간 전반에 걸쳐 B1 대조군 세포와 비교된 CREM 출력에서의 감소에서 반영된 경우, 파클리탁셀에 즉각적 및 연속적 반응성을 보여준다. 도 2a 및 2b에서 나타난 CELx 시험 결과는 모든 환자 B1 및 B2가 파클리탁셀에 반응할 것을 예측한다. 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과 및 CELx 시험 예측의 비교는 도 2c에서 보여지고; 환자 B1 및 B2가 파클리탁셀에 반응성인 것으로 모두 밝혀지는 경우, CELx 시험이 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 정확하게 예측하였음을 보여준다.

도 3a, 3b, 및 3c는 2명 결장암 환자 (환자 C1 및 C2)로부터 세포, EGF, 및 결장 암에 대하여 나타난 2개의 약물, 세톡시맵 및 이리노테칸의 조합으로 수행된 CELx 시험의 실험의 전체 시간 경과에 걸친 결과를 보여준다. 시험 동안 C1 및 C2 세포의 생리적 변화는 도에서 기록되는 것인 CREMS로부터 출력 및 CREMS로 측정되었다. 하나의 세트 각각의 C1 및 C2 시험 세포는 세톡시맵 및 이리노테칸으로 처리되었고 또 다른 세트의 대조군 C1 및 C2 세포는 약물을 받지 않았고; 각 세트의 세포의 생리적 반응은 연속적으로 기록되었다. 모든 C1 및 C2 시험 세포는 그의 각각의 대조군 세포에 비교된 시험 세포에 대하여 감소된 CREMS 출력에서 반영된 경우 약물 조합에 대한 반응성을 보여주었다. 이들 결과는 모든 환자 C1 및 C2가 세톡시맵 및 이리노테칸의 조합에 반응할 것을 예측한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 3c에서 보여지고; 환자 C1 및 C2가 세톡시맵 및 이리노테칸 조합에 모두 반응성인 것으로 밝혀진 경우, CELx 시험이 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 정확하게 예상하였음을 보여준다.

도 4는 11 상이한 환자 세포 (환자 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7로부터 유방암 세포, 환자 C1 및 C2로부터 결장암 세포, 및 환자 L1 및 L2로부터 폐암 세포) 및 15 상이한 약물 (카페시타빈, 세톡시맵, 도세탁셀, 플루오로우라실, 게피티닙, GSK1059615, GSK1120212, 라파티닙, 파클리탁셀, 파조파닙, 트라스투주맵, 토포테칸, 시스플라틴, 에를로티닙, 및 옥실리플라틴)의 선택으로부터 조합 가능한 세포 및 약물의 일부를 이용하여 수행된 57 CELx 시험의 요약 결과를 보여준다. 도 4는 또한 환자 L1 및 L2 세포상에서 파클리탁셀 및 시스플라틴의 약물 조합을 이용하여 수행된 2개의 CELx 조합 시험 및 환자 B1, B2, B3, 및 B4 세포상에서 트라스투주맵 및 라파티닙의 약물 조합을 이용한 4개의 CELx 시험으로부터의 결과를 보여준다. 11개의 상이한 세포성 경로를 표적하는 총 18개의 상이한 약물은 실험의 상기 세트에서 세포 샘플에 도입되었다. 각 실험에 대하여, 그의 대조군 세포와 비교된 시험 세포의 생리적 반응의 변화는 계산되었다. 도 4에서 각 박스는 50% 초과 (고체 박스), 5% - 50% 사이 (수직 그늘진 박스), 5% 미만 (수평 그늘진 박스), 또는 시험되지 않는 것 (개방형 박스) 으로서 각 실험에서 측정된 생리적 반응에서의 변화를 분류한다. 상기 도에서 나타난 실험의 시리즈는 이들이 광범위의 약물 노출된 이후 다양한 암 세포 유형에서 발생하는 생리적 변화를 측정하기 위한 CELx 시험의 능력을 예시한다.

도 5는 약물 세톡시맵 및 EGF를 가진 4명의 유방암 환자 (B1, B2, B3, 및 B4)로부터 세포상에서 분리하여 수행된 8개 CELx 시험의 요약 결과를 보여준다. 세포 B1, B2, B3, 및 B4상에서 시험의 하나의 세트는 "광학적" 바이오센서 CREMS를 이용하여 수행되었고 동일한 세포에 관한 시험의 또 다른 세트는 "임피던스" 바이오센서 CREMS를 이용하여 수행되었다. 결과는 CREMS에 의해 기록된 출력에서 백분율 변화의 범위를 보여주는 요약 방식으로 나타난다. 시험된 각 환자 세포에 대하여, 각 CREMS에 의해 기록된 생리적 변화의 양은 동일하였다. 이들 결과는 CELx 시험 방법이 세포에서 상이한 생리적 변화를 측정하는 CREMS의 상이한 유형을 이용할 수 있다는 것을 예시한다.

도 6은 실시예 1-4에서 기재된 65 시험의 요약 결과를 제공한다. 11개의 상이한 세포성 경로를 표적하는 총 16개의 상이한 약물은 암의 3개 상이한 유형을 가진 11명의 환자로부터 세포 샘플에 대한 상기 세트의 실험에 도입되었다. 각 실험에 대하여, 그의 기준선, 또는 대조군 세포에 비교된 시험 세포의 생리적 반응의 변화는 계산되었다. 도 6에서 각 박스는 50% 초과, 5% - 50%, 또는 5% 미만인 것으로서 각 실험에서 측정된 생리적 반응에서의 변화를 분류한다. CELx 시험은 생리적 반응에서의 변화가 5%-50% 또는 50% 초과인 경우 요법에 대해 양성 환자 반응을 예측하고 생리적 반응에서의 변화가 5% 미만인 경우 요법에 대해 무 환자 반응을 예측한다. 반응은 아래와 같이 보여진다: 50% 초과 (고체 박스), 5% - 50%, (수직 그늘진 박스), 5% 미만 (수평 그늘진 박스), 또는 시험되지 않음 (개방형 박스). 상기 도에서 나타난 실험의 시리즈는 이들이 광범위한 세포성 경로에 영향을 미치는 광범위의 약물 노출된 이후 다양한 암 세포 유형에서 발생하는 생리적 변화를 측정하는 CELx 시험의 능력을 예시한다.

도 7은 도 6 (개별 약물에 대한 시험 세포 반응)에서 기재된 CELx 시험 예측 사이에서 상관관계 (0% 또는 100%) 및 약물에 대한 환자의 반응성을 기록한 제삼자로부터 결과를 기록한다. 고체 박스는 치료제에 대한 반응 또는 비반응 세포 샘플에 관한 시험 결과와 세포 샘플의 공지된 상태 사이에서 100% 일치율을 나타내고, 블랭크 박스는 시험되지 않고, 회색 그늘진 박스는 치료제에 대한 반응 또는 비 반응 공지된 세포 샘플 상태와 무 일치율을

나타낸다. 시험된 사례에서, CELx 시험 및 제삼자는, 광범위한 세포성 경로를 표적하는 16개의 상이한 약물에 유방, 폐, 및 결장 환자 반응을 예측하기 위한 CELx 시험의 힘을 예시하는, 하나의 사례에서 제외하고 동일한 결과를 생성하였다.

도 8a, 8b, 8c 및 8d는 약물에 대한 환자의 반응성의 기록한 제삼자로부터 결과 대 상이한 환자 암 세포 및 약물에 대하여 CELx 시험 결과를 기록한다. 도 8a는 시험된 전체 12개의 암 환자 세포 및 16개의 상이한 약물에 대하여 결과의 비교를 기록한다. 도 8b는 단독으로 및 13개의 상이한 약물과 조합으로 시험된 8개의 유방암 환자 세포에 대하여 결과의 비교를 기록한다. 도 8c는 단독으로 및 3개의 상이한 약물과 조합으로 시험된 2개의 상이한 결장 암 환자 세포에 대하여 결과의 비교를 기록한다. 도 8d는 단독으로 및 3개의 상이한 약물과 조합으로 시험된 2개의 상이한 폐암 환자 세포에 대하여 결과의 비교를 기록한다. 각 도에서, CELx 시험은 환자가 하나의 사례에서 제외하고 특정한 약물 또는 약물의 조합에 반응할지 또는 반응하지 않을지를 정확하게 예측하는 것으로 보여진다.

도 9는 시험된 전체 환자 세포 및 약물에 대하여 뿐만 아니라 시험된 환자, 약물, 경로, 및 CReMS 유형의 하위-그룹에 대하여 CELx 시험의 감수성 및 특이성을 기록한다. 연구된 전체 및 각각의 하위-그룹 내에서, CELx 시험은 고감수성 (98%+) 및 특이성 (99.9%+)을 생성하였다. 이들 결과는 상이한 암 세포 유형, 약물 유형, CReMS 유형, 및 표적된 경로를 거친 시험의 예측의 능력을 예시한다.

도 10a-c는 PI3K 경로 인자 (NRG1) 단독의 존재하에 또는 PI3K 경로 억제제 (라파티닙)와 함께 유방암 세포주 및 원발 종양 세포에서 세포 부착 신호전달 (CAS)에 의해 측정된 바와 같이, 특이적 PI3K 경로 활성화의 측정을 기록한다. 도 10a 및 10b는 NRG1이 BT474 세포 (도 10a) 및 환자 54 종양 세포 (도 10b)에서 CAS를 증가시키는 것 및 라파티닙이 CAS를 감소시키는 것을 보여주어, 단지 NRG1로 측정된 CAS가 PI3K 경로를 따라 활성화에 특이적이었음을 확인한다. 도 10c는 원발 유방암 세포 (환자 54 세포)와 건강한 유방암 세포 (H62 세포) 사이에서 NRG1에 대한 차별적인 반응을 보여주어, 질환 활성화의 표현형 바이오마커로서 신호전달 경로 활성화 이용의 유효성을 증명한다.

도 11a-c는 ER $\alpha$  경로 인자 (에스트라디올) 단독의 존재하에 또는 ER $\alpha$  경로 억제제 (플베스트란트)와 함께 유방암 세포주 및 원발 종양 세포에서 세포 부착 신호전달 (CAS)에 의해 측정된 바와 같이, 특이적 ER $\alpha$  경로 활성화의 측정을 기록한다. 도 11a 및 11b는 에스트라디올이 BT474 세포 (도 11a) 및 환자 54 종양 세포 (도 11b)에서 CAS를 증가시키는 것 및 플베스트란트가 CAS를 감소시켰음을 보여주어, 단지 에스트라디올로 측정된 CAS가 ER $\alpha$  경로를 따라 활성화에 특이적이었음을 확인한다. 도 11c는 원발 유방암 세포 (환자 54 세포)와 건강한 유방암 세포 (H62 세포) 사이에서 에스트라디올에 차별적인 반응을 보여주어, 질환 활성화의 표현형 바이오마커로서 신호전달 경로 활성화 이용의 유효성을 증명한다.

도 12는 실시예 7에서 시험된 상이한 환자 물질에 관한 HER2의 발현에 대하여 FACS 데이터를 보여주는 막대 그래프이다.

도 13은 상이한 생존가능성의 세포에 대하여 세포 부착 (임피던스) CAS 결과를 보여주는 그래프이다.

도 14는 HER2 유도된 질환을 가진 HER2-낮은 환자의 EGF 및 NRG1 교란에 대하여 확인제를 이용한 CAS 결과를 보여주는 그래프이다.

도 15a-d는 상이한 세포주 및 환자 샘플에 대하여 확인제 있거나 없이 NRG1 교란에 대하여 CAS 결과의 비교를 보여주는 막대 그래프이다. 도 15a는 과발현된 HER2 세포주 (SKBR3)에 대한 결과를 보여주었고, 도 15b는 HER2-유도된 질환 (R39)을 가진 비-과발현된 HER2 환자에 대한 결과를 보여주었고, 도 15c는 HER2-유도된 질환 (R49)이 없는 비-과발현된 HER2 환자에 대한 결과를 보여주었고 도 15d는 건강한 환자 (R62)에 대한 결과를 보여준다.

도 16은 HER2 경로 컴파일링된 샘플 데이터의 NRG1 교란에 대하여 CAS 결과를 보여주는 그래프이다.

도 17은 HER2 경로 컴파일링된 샘플 데이터의 EGF 교란에 대하여 CAS 결과를 보여주는 그래프이다.

도 18은 신호전달 경로 활성화의 측정에 관한 기본 배지의 수명의 효과를 보여주는 그래프이다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

본 발명이 더욱 쉽게 이해될 수 있기 위해, 특정 용어들이 먼저 정의된다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 설정된다.

[0144]

[0145] A. 정의

[0146] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 전체 기술 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같이 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 지칭된 전체 특허, 출원, 공개 출원 및 다른 공개는 그 전체가 참고로 편입된다. 본 섹션에서 제시된 정의가 본원에서 참고로 편입되는 특허, 출원, 공개 출원 및 다른 공개에서 제시된 정의와 상반되거나 또는 달리 불일치되면, 본 섹션에서 제시된 정의는 본원에서 참조로 편입되는 정의에 우선권을 차지한다. 하기 용어들은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 하기 정의를 갖도록 의도된다.

[0147] 용어 "약"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 거의, 또는 주변의 영역에서 대략을 의미한다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용되는 경우, 제시된 수치 값 초과 및 미만에서 경계를 확대함으로써 그 범위를 변경한다. 일반적으로, 용어 "약"은 10%의 변동에 의해 언급된 값 초과 및 미만에서 수치 값을 변경하기 위해 본원에서 사용된다. 하나의 측면에서, 용어 "약"은 사용되는 수의 수치 값의 플러스 또는 마이너스 20%를 의미한다. 따라서, 약 50%는 45%-55%의 범위에서 의미한다. 종료점에 의해 본원에서 인용된 수치 범위는 전체 수 및 그 범위내에 포함된 분수를 포함한다 (예를 들면 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.90, 4, 및 5를 포함한다).

[0148] 세포와 관련하여 함께 사용된 경우 용어들 "활성제", "활성화하다", "교란제", "교란하다", 및 "교란"은 당해 기술에서 실시된 것으로 잘 알려진 세포에 관한 효과를 갖는 시약, 승인된 약물, 개발 중인분자 및 실험적인 약물 같은 실험적인 화합물 및 약물, 유기 분자, 성장 인자, 신호전달 인자, 생화학물질, 핵산, 사이토카인, 케모카인, 또는 단백질을 이용한 세포의 생리적 조작의 특이적 대상체 또는 활성을 지칭한다. 조작은 세포성 생리적 활성의 임의의 조절을 지칭하고 비제한적으로 상향 또는 하향 조절을 포함할 수 있다. 활성제 제제 또는 교란제는 비제한적으로 임의의 하기 단일 제제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다: 하기 목록으로부터 이들 구성원 또는 구성원의 조합에 제한되지 않고 구성원 및 구성원의 조합을 포함하는 특이적 성장 인자: 혈관 내피 성장 인자, 포스포티달 이노시톨, 상피 성장 인자 및 EGF 펩타이드 서열을 가진 인자, 간세포 성장 인자, m-CSF, RANK 리간드, 종양 괴사 인자 (TNF- $\alpha$ ), 인슐린 성장 인자, 형질전환 성장 인자, 간세포 성장 인자, 뉴레굴린 또는 신경 레굴린, 헤레굴린 및 수용체의 ErbB 계열과 관련된 인자, 에스트로겐 및 그의 호르몬 전구체 및 분해 생성물 (Ex. DHEA, 에스트론, 안드로스테네디온), 프로게스테론, 테스토스테론, 폴레이트, 아데노신 삼인산, AMP, 사이클릭 AMP, 및 FAS 리간드, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), 또는 세포성 경로 또는 신호전달 교란의 다른 제제 예컨대 환자 세포 (특히 섬유아세포 및 상피)로부터 유도된 대상체의 플라스마 또는 혈청 또는 상청액 분획, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, 글루코오스, 글루타민, 히스티딘, 만니톨, 및 트립토판, 항생제 (라파마이신), 필수 및 비-필수 아미노산, 비타민, 다른 유기 화합물, 미량 미네랄 및 무기 염, 나트륨 셀레나이트, 혈청, 세포 추출물, 분획화된 세포 추출물 또는 분획화된 혈청, 세포의 신호전달 인자, 세포내 신호전달 인자, 인슐린, 트랜스페린, 하이드로코르티손, 에탄올아민, 포스포포리에탄올로아민, 트리이도티로닌, 나트륨 피루베이트, 미토겐, 옥시토신, 이소프로테레놀, L-글루타민.

[0149] 용어 "접착"은 직접적으로, 간접적으로, 및 경로 소통에 의해 간접적으로 ECM 또는 다른 세포에 세포의 연결을 책임지는 임의의 수의 분자를 포함한 공정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인테그린은 세포골격 조직화, 세포성 운동성, 세포 사이클의 조절, 인테그린 친화도의 세포성의 조절, 바이러스에 세포의 부착, 다른 세포 또는 ECM에 세포의 부착을 책임진다. 인테그린은 또한 신호 전달, 이로써 세포가 한 종류의 신호 또는 자극을 또 다른-세포내- 및 세포간 중 하나를 변환하는 공정을 책임진다. 인테그린은 ECM부터 세포까지의 정보 및 세포부터 (예를 들면, 다른 세포상의 인테그린을 통해) 다른 세포 또는 ECM까지의 정보를 전달할 수 있다.  $\alpha$ - 및  $\beta$ -서브유닛의 조합은 인테그린의 리간드 특이성을 계측한다. 많은 인테그린은 동일한 리간드에 대하여 결합 특이성을 갖고 생체내 상호작용을 구체화하는 리간드의 이용가능성과 인테그린 발현/활성화 패턴의 조합이다. 접착은 세포 영역 또는 세포의 집단의 영역 내에 밀도에서 변화할 수 있다. 접착은 세포 또는 세포의 집단 내에 양에서 변화할 수 있다. 접착은 접착 공정에서 관여된 특이성 또는 단백질 유형에 의해 품질에서 변화할 수 있다. 접착은 극성에서 변화할 수 있다.

[0150] 용어 "검정" 또는 "검정하는"은, 예를 들어, 표적의 존재, 부재, 양, 정도, 동력학, 동력학, 또는 유형, 예컨대 외인성 자극 (예를 들면, 치료제 또는 리간드)으로 교란시 세포의 광학적 또는 생체임피던스 반응을 계측하기 위한 분석을 지칭한다.

[0151] 용어들 "부착한다", 또는 "부착"은, 표면에, 예컨대 물리적 흡수, 화학 결합, 화학 인력, 및 유사 공정, 또는 이들의 조합에 의해 연결된, 예를 들어, 표면 조절제 물질, 세포, 리간드 후보자 화합물, 및 개시내용의 유사 독립체를 지칭한다. 특히, "세포 부착", "세포 접착", 또는 "세포 샘플 부착"은 표면에, 예컨대 배양에 의해 함

계 또는 상호작용하는, 또는 세포 고착 물질, 등등과 상호작용하는 세포의 결합을 지칭한다.

- [0152] 용어 "부착 패턴"은 표면에 세포 또는 세포 샘플의 연결의 관측가능한 특성 또는 특징을 지칭한다. 부착 패턴은 정량적, 예를 들면, 부착 부위의 수일 수 있다. 부착 패턴은 또한 정성적, 예를 들면, 세포의 기질에 부착의 바람직한 분자 부위일 수 있다.
- [0153] 용어 "세포 부착 신호 (CAS)"는 마이크로플레이트의 웰에 배치된 경우 세포에 의해 생성된 및 임피던스 바이오센서로 분석된 세포 부착의 정량적 측정을 지칭한다. 전형적으로, 임의의 제제의 부재하에 세포의 CAS는 특정한 신호전달 경로에 영향을 미치는 교란제 단독의 존재하에 세포의 CAS와 및/또는 그 특정한 신호전달 경로의 특이적 억제제와 조합으로 특정한 신호전달 경로에 영향을 미치는 교란제의 존재하에 세포의 CAS와 비교될 수 있다. 전형적으로, 세포의 CAS는 음으로 측정된다.
- [0154] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고 특이적으로 단클론성 항체 (전장 단클론성 항체 포함), 인간화된 항체, 키메라성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성 또는 기능을 나타내는 항체 단편을 포함한다.
- [0155] 항체는 키메라성, 인간화된, 또는 인간일 수 있고, 예를 들어, 이들의 항원-결합 단편일 수 있다. "항체 단편"은 전장 항체, 일반적으로 이의 항원 결합 또는 가변 영역의 부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 하기를 포함한다: Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자; 및, 예를 들어 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 예컨대 이중특이적 항체. "기능성 단편"은 실질적으로 전장 항체의 항원에 결합을 보유하고, 생물학적 활성을 보유한다. 항체는 개별 약물 분자가 분리하여 성취할 수 있는 것보다 더 큰 효력, 특이성, 및 효능을 성취하기 위해 공유 또는 다른 부착을 통해 하나 이상의 다른 약물과 조합시킴으로써 "아암된" 또는 "접합된" 것일 수 있다.
- [0156] 용어 "확인제"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 본원에서 기재된 시험에서 이용되는 당해 경로 활성을 방해 또는 영향을 미친다고 공지된, 소분자, 공지된 기능의 특이적 리간드, 또는 항체 또는 친화도/특이성 시약을 지칭한다. 교란제가 당해 경로 활성과 직접적으로 관련된 활성을 특이적으로 개시하는 세포 샘플에 도입되는 경우 생성된 특이적 작용 기전과 관련된 경로 활성의 양을 확인 및 정량화하기 위해 시험에서 사용된다. 예를 들어, 교란제가 세포 표면 수용체용 공지된 리간드이면, 확인제의 도입 이후 변화되는 본원에서 기재된 방법에서 측정된 활성은 방법이 분석할 의도인 경로와 관련된 활성의 양을 나타낼 것이다. 추가 예에서, 리간드 결합 영역, 수용체 이량체화 영역, 및 수용체 티로신 키나제 영역으로 구성된 수용체의 사례일 수 있는 바와 같이, 교란제는 수용체 리간드 결합 부위에 결합하는 리간드일 수 있다. 확인 시약은 그 다음 리간드 결합 이전 또는 리간드 결합 이후 사례(들) 즉 수용체 이량체화 또는 수용체 이량체화 이후 수용체 티로신 키나제 활성을 예방한 제제일 수 있다. 더욱이, 확인 시약은 당해 환자에 활성화된 또는 기능이상성 다운스트림 신호전달 경로의 특정한 부분을 한정하는 제제일 수 있다.
- [0157] 용어 "단클론성 항체"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉, 집단의 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단클론성 항체는, 단일 항원성 부위에 관련되는, 매우 특이적이다. 더욱이, 상이한 계측인자 (에피토프)에 관련된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 종래의 (다클론성) 항체 제제와 대조로, 각 단클론성 항체는 항원에 관해 단일 계측인자에 관련된다. 조절제 "단클론성"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득된 것으로서 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의해 항체의 생산을 요구하는 것으로서 해석되지 않는다.
- [0158] 용어 "면역포착 시약"은 임의의 유형의 항체를 지칭하고 RNA, DNA, 및 염기의 합성 변이체를 함유한 폴리머로 구성된 압타머, 또는 압타머 또는 시약이 작제되고 또 다른 분자 및 신호 그의 존재, 양, 및 또는 품질을 특이적으로 인식 및 결합하도록 선택된 임의의 합성 분자를 추가로 포함한다.
- [0159] 용어 "배양"은 본 발명을 수행하기 위한 세포의 준비를 지칭한다. 준비는 본 발명의 실시에서 상이한 시간에, 다양한 배지, 배지 보충물, 온도, 습도, CO<sub>2</sub>%, 종자 밀도, 세포 유형 순도 또는 혼합물의 다양한 조건 및 세포 배양의 당해 기술에서 실시된 것에 공지된 다른 조건을 포함할 수 있다. 준비는 세포를 증식, 정지, 노쇠하게 하고, 그리고 세포 사이클의 다양한 단계에서 진입, 통과 또는 체크되는 조건을 포함할 수 있다. 배양은, 본 발명의 이상적 실시를 허용 및 또는 최적화하는, 당해 기술에서 실시된 것에 공지된 임의의 수의 배지 또는 보충물 예컨대 비제한적으로 비타민, 사이토카인, 성장 인자, 혈청 (Ex. 공급원 동물은 소, 태아 소, 인간, 말 또는 다른 포유동물이다), 대사물질, 아미노산, 미량 미네랄, 이온, pH 버퍼, 및 또는 글루코오스를 포함할 수 있다. 세포의 배양은 본 발명에 의한 교란 이전 또는 이후 무혈청 및 또는 무 교란제 배지로 실시될 수 있다. 배양은

환자의 중앙 미세환경을 모방하도록 설계된 조건을 이상적으로 포함할 수 있다. 배양 준비는 경로 활성의 작용 또는 길항작용의 측정을 허용하기 위해 기저 또는 고조된 수준에 특정한 경로를 배치하도록 설계되는 조건을 이상적으로 포함할 수 있다.

[0160] 용어 "기본 배지"는, 양호하게 정의된 양으로, 무기 염, 필수 아미노산, 글루코오스, 비타민, 및 pH 버퍼를 함유하지만 방법이 분석하도록 의도되는 신호전달 경로를 자극시키는 제제를 함유하지 않는 배양 배지의 유형을 지칭한다. 많은 기본 배지는 당해 기술에서 실시된 것으로 공지되고 예를 들어 DMEM, F12, MEM, MEGM, RPMI-1640 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, ErbB 신호전달 경로가 분석되는 경우, 기본 배지는 ErbB 경로를 교란시킨다고 공지된 시약을 함유하지 않는다. 기본 배지는 세포 배양을 유지하기 위해 사용되어 이로써 세포 집단이 생존하고 개별 세포 유형의 그의 이중성 및 세포 사이클의 상이한 단계를 나타내는 세포의 정상 분포를 보유한다. 질환 세포의 샘플이 교란제와 접촉되는 방법에서 단계 직전에 본원에서 기재된 방법에서 대상체로부터 수득된 이환 세포의 샘플을 배양시키기 위해 사용된다.

[0161] 물질에 적용된 경우 용어 "신선한"은 아직 사용되지 않은 물질을 지칭한다. 신선한 기본 배지는 따라서 아직 사용되지 않은 기본 배지이다. 신선한 기본 배지는 세포 배양액을 함유한 용기에서 기본 배지의 용적을 증가시키기 위해 기본 배지에서 이미 배양되는 질환 세포의 샘플을 함유한 용기에 부가될 수 있다. 대안적으로, 용기에서 이환 세포의 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 부분은 세포 배양 용기로부터 제거될 수 있고 신선한 기본 배지로 대체될 수 있다. 어느 경우이나, 세포 배양 용기에서 총 기본 배지 용적의 50% 초과가 신선한 기본 배지인 경우, 세포 배양 용기는 신선한 기본 배지를 함유하는 것으로 간주된다. 확장된 기간의 시간 (예를 들면 72 시간 초과) 동안 동일한 기본 배지에서 배양된 세포는 개별 세포 유형의 이중성을 잃을 것이고 대다수의 세포는 신호전달 경로 활성의 측정을 방해할 수 있는 G0/G1 세포 사이클 단계에 진입할 수 있다. 신선한 배지에 배치된 세포 샘플은 신규 배지로 조정하기 위해 일정 기간 (예를 들면 적어도 12 시간)을 필요로 하여 이로써 세포 샘플은 최초 세포 샘플에서 발견된 개별 세포 유형의 이중성 및 세포 사이클의 상이한 단계를 나타내는 세포의 정상 분포를 반영한다.

[0162] 용어 "버퍼 배지"는 pH 버퍼 및 등장의 용액을 함유하는 용액을 지칭한다. 버퍼 배지는 세포의 샘플을 아사 또는 세포를 휴지기 또는 노화로 유도하기 위해 전형적으로 사용되고 예컨대 세포가 쉬는 경우 찾은 것은 세포-사이클  $G_0/G_1$ 이다.

[0163] "키메라성" 항체 (면역글로불린)은, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855), 특정한 종으로부터 유도된 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일한 또는 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄의 부분을 함유하고, 반면에 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유도된 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체, 뿐만 아니라 상기 항체의 단편에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다.

[0164] 용어 "인간화된 항체"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 비인간 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수령체 항체의 가변 도메인 추가변 영역 잔기가 비인간 종 (공여체 항체), 예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 또는 원하는 특이성, 친화도, 및 수용력을 갖는 비인간 영장류로부터 추가변 영역 잔기에 의해 대체되는 인간 면역글로불린 (수령체 또는 수용체 항체)이다. 추가변 영역은 서열에 의해 정의된 상보성-계측 영역 (CDRs) (참고 예를 들어 카밧 1991, 1987, 1983), 또는 구조에 의해 정의된 추가변 루프 (HVLs) (참고 예를 들어, 초티아 1987), 또는 모두일 수 있다.

[0165] "생체분자 코팅물"은 천연 발생 생체분자 또는 생화학물질, 또는 하나 이상의 천연 발생 생체분자 또는 생화학물질로부터 유도된 또는 상기에 기반된 생화학물질인 분자를 포함하는 표면상의 코팅물이다. 예를 들어, 생체분자 코팅물은 세포의 기질 성분 (예를 들면, 파이브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 다른 당단백질, 펩타이드, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸, 빈트로넥틴, 세포간CAMs, 혈관CAMs, MAdCAMs), 또는 그들의 유도체를 포함할 수 있거나, 또는 천연 발생 생화학물질 라이신 및 오르니틴에 기반된 폴리머성 분자인, 생화학물질 예컨대 폴리라이신 또는 폴리오르니틴을 포함할 수 있다. 천연 발생 생화학물질 예컨대 아미노산에 기반된 폴리머성 분자는 천연 발생 생화학물질의 이성질체 또는 거울상이성질체를 이용할 수 있다. 코팅물은 또한 세포 표면 수용체 또는 세포 표면 동족 결합 단백질 또는 상기 세포 표면 단백질에 대하여 친화도를 가진 단백질을 포함할 수 있다.

[0166] 용어 "기준선 측정"은 시험되는 세포의 세트에 대하여 생리적 시작점을 지칭하고 약물이 부가되기 이전 일정 기간에 걸쳐 측정의 평가에 기반된다. 이는 외인성 교란에 앞서 기저 세포성 대사 측정 또는 CREMS 판독을 포함할 수 있다. 이는 외인성 교란 있거나 없이 정상 건강한 세포 대사성 기능의 CREMS 측정을 포함하는 것에 제한되지

않고 대안적으로 포함할 수 있다.

- [0167] 용어 "측정량"은 임상 시험에서 측정되도록 의도된 양으로서 정의된다. 본원에서 기재된 본 발명에 대하여, 측정되도록 의도된 양은 교란에 대한 세포의 생리적 반응에서의 변화이다. 교란에 대한 세포의 생리적 반응의 측정에서의 변화는 다양한 유클리드 수학적 분석을 이용하여 수학적으로 계측될 수 있고 정량적 시험의 사례에서 수치로 보고 또는 정성적 시험의 사례에서 양성 또는 음성 결과로서 보고될 수 있다. 정량적 및 정성적 시험 모두에서, 측정량 (예를 들면 시험 결과)는 상이한 임상 계측 또는 해석이 실시되는 초과 및 미만 컷-오프 값과 비교된다.
- [0168] 용어 "기저 형태학"은 제제, 교란제, 또는 자극의 도입에 앞서 세포 또는 세포 샘플의 형태 및 구조를 지칭한다.
- [0169] 용어 "세포 접촉"은 또 다른 세포, 세포외 기질 성분, 또는 표면 (예를 들면, 미세적정 플레이트)에 세포의 결합을 지칭한다.
- [0170] 용어 "세포성 반응 측정 시스템" 또는 "CReMS"는 세포에서, 세포에서 그리고 세포 사이에서, 및 세포와 기기장치 디바이스 사이에서 생리적 또는 세포성 반응 파라미터에서의 변화를 정량적으로 계측할 수 있는 디바이스를 지칭한다. 구현예에서 세포는 전체의 무 표지 세포이다. 생리적 또는 세포성 반응 파라미터에서의 변화는 분석물 예컨대 글루코오스, 산소, 이산화탄소, 아민 함유 물질 예컨대 단백질, 아미노산, 또는 세포외 기질에서의, 또는 세포 신호전달 분자, 또는 세포 증식, 세포 형태학, 또는 세포골격 재배열의 변화 계측에 의해 측정된다. CReMS의 예는 바이오센서이다.
- [0171] 용어 "CReMS 신호"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 그 세포가 화학-전기 CReMS에 의해 분석되는 경우 세포의 세포성 생리적 변화의 측정으로서 정의된다. CReMS 신호 및 CReMS 신호에서의 변화는 생리적 변화를 측정하는 특정한 화학-전기 변환기에 관련된 경우 다양한 단위를 가질 수 있다. 예를 들어, CReMS 신호는 비제한적으로 세포 지수, 임피던스, 파장 단위, pH 단위, 전압, 전류의 단위를 가질 수 있거나, 또는 단위의 비를 이용함으로써 무차원이 될 수 있다. 임의의 이들 단위는 시간 성분을 가질 수 있다. CReMS 신호는, 예를 들어 정규화, 기준선설정, 곡선 소거법, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한, 생물학, 생화학 및 생물물리학의 당해 기술에서 실시된 것에 의해 빈번하게 실시되는 바와 같이 해석을 명백하게 하기 위해 수학적으로 변형될 수 있다. CReMS 신호는 단일 시점에서, 또는, 더 바람직하게는, 세포성 생리적 반응의 완벽한 패턴을 나타내는 연속적 시리즈의 시점에 걸쳐 측정될 수 있다.
- [0172] 용어 CReM "광학적 신호"는 세포가 쉬고 있는 광자 계측 생물감지 CReMS로부터 광이 반사되는 경우 측정된 파장 값 또는 파장 값의 변화로서 정의된다. 단위는 변화의 비가 보고되면 또한 무차원이 될 수 있어도 전형적으로 피코미터 또는 나노미터이다. "광학적 신호"는 시간과 조합된 상기 단위에서 발현될 수 있다. 광의 반사된 파장에서 시프트는 광자 계측 표면상의 질량에 비례한다. 따라서 "광학적 신호"는 CReMS상에서 세포의 수의 정량적 측정이다. 더욱이, 예를 들어 세포 형태학, 세포 접촉, 세포 생존력, 세포의 구조적 재배열에서의 변화가 파장 시프트로서 검출되는 센서에서 질량의 양에서 차이로 이어지는 경우 "광학적 신호"는 세포 생리적 상태의 측정이다.
- [0173] 용어 "세포 지수"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 임피던스의 측정으로서 정의되고, 예를 들어, 10 kHz의 고정된 전기 주파수 및 고정된 전압에서 측정에 의해 본 발명의 한 사례에 적용될 수 있다.
- [0174] 그리고 방정식 세포 지수<sub>i</sub> = (R<sub>tm</sub> - R<sub>t0</sub>)/F로 계산된다
- [0175] 식 중:
- [0176] i = 1, 2, 또는 3 시점
- [0177] F = 기기가 10kHz 주파수에서 작동되는 경우 하나의 예에서 15옴
- [0178] R<sub>t0</sub>는 시점 T<sub>0</sub>에서 측정된 배경 저항성이다.
- [0179] R<sub>tm</sub>은 세포 부가, 세포 생리적 변화, 또는 세포 교란 이후 시점 T<sub>n</sub>에서 측정된 저항성이다.
- [0180] 세포 지수는 세포 상태를 나타내기 위해 측정된 전기적 임피던스에서의 상대적 변화로서 유도된 무차원 파라미터이다. 세포가 존재하지 않거나 또는 전극상에서 양호하게-부착되지 않는 경우, CI는 0 이다. 동일한 생리적 조건하에서, 더 많은 세포가 전극상에 부착되는 경우, CI 값은 더 크다. CI는 따라서 웰에 존재한 세포 수의 정

량적 측정이다. 추가로, 세포 생리적 상태, 예를 들어 세포 형태학, 세포 접착, 또는 세포 생존력에서의 변화는 CI에서의 변화로 이어질 것이다.

[0181] 용어 "바이오마커"는, 가장 일반적인 의미로, 세포의 상태 또는 환자 건강 또는 질환 상태의 생물학적 측정기준을 지칭한다. 일반적인 바이오마커의 비-제한 열거는 하기를 포함한다: 포유동물에서 발견된 생물학적으로 유도된 분자, 포유동물 세포 또는 조직의 생물학적 활성, 유전자 복제수, 유전자 돌연변이, 단일 뉴클레오타이드 다형성, 유전자 발현 수준, mRNA 수준, 스플라이스 변이체, 전사 변형, 후-전사 변형, 에피-유전적 변형, 세포 표면 마커, (전체 형태의 작용성 RNA 포함한) 단백질 또는 핵산의 차별적인 발현, 핵산의 증폭, 세포 형태학, 번역후 변형, 단백질 절단, 인산화, 탈인산화, 유비퀴틴화, 탈-유비퀴틴화, 대사물질, 생합성의 임의의 단계에서의 호르몬, 사이토카인, 케모카인, 및 이들의 조합. 바이오마커의 서브셋은 질환을 진단하는 병리학자를 돕기 위해 및 요법을 처방하는 의사를 돕기 위해 진단적 및 치료적 선택 목적으로 사용된다. 바이오마커는 전형적으로, 고정된, 실장된 조직에서, 유전자 복제수, 유전적 돌연변이, 또는 단백질의 상태 또는 활성의 구체화 없이 단백질의 수준을 측정한다. 본 발명은, 살아있는 환자 세포 샘플로부터 활성 또는 동적 결과인 생리적 반응 파라미터인, 신규 유형의 바이오마커를 포함한다.

[0182] 용어 "바이오마커 상태"는 환자, 또는 환자의 세포에서 바이오마커(들)의 평가를 지칭하고, 전형적으로 바이오마커가 존재하는 경우 "바이오마커 양성" 또는 바이오마커가 부재인 경우 "바이오마커 음성"으로서 보고된다. 단백질 수용체가 바이오마커 (예를 들면 HER2/ErbB2 또는 ER)로서 사용되는 경우, 바이오마커 양성 결과는 또한 과-발현된 또는 증폭된 수용체로 지칭되고 바이오마커 음성 결과는 정상적으로 발현된 또는 비-증폭된 수용체로 지칭된다. 바이오마커 또는 바이오마커 시그니처가 질환 진행의 예후 지표이거나 또는 치료적 효능을 예측하는 질환에 대하여, 현행 임상 실시는 바이오마커 음성 또는 양성으로서 환자를 분류함으로써 환자의 진단을 한정하기 위해 바이오마커 또는 그의 관련된 돌연변이의 양의 측정에 의존한다. 바이오마커 상태의 계측은 환자를 치료하기 위해 약물 치료제의 선택을 안내하는데 종종 사용된다. 바이오마커 양성 및 바이오마커 음성 환자를 확인하기 위해 사용되는 바이오마커 측정의 컷-오프 값은 바이오마커부터 바이오마커까지 다양하다. 바이오마커가 약물 표적인 경우, 컷-오프 값은 환자가 바이오마커를 표적하는 치료제를 받을 조건 초과 및 환자가 바이오마커를 표적하는 치료제를 받지 않을 조건 미만이다. 임상시험은 바이오마커의 임상 관련성을 확인하기 위해 전형적으로 요구된다.

[0183] 용어 "HER2/ErbB2 상태"는 바이오마커로서 환자, 또는 환자의 세포 (예를 들면, 암 세포)에서 HER2/ErbB2의 발현의 평가를 지칭하고, 상태는 전형적으로 바이오마커가 정상 건강한 비-암 유방 조직 샘플과 비교시 과잉으로 존재한 경우 "HER2/ErbB2 양성" 또는 바이오마커가 고정된 조직 샘플의 IHC 염색 시험에 의해 계측된 바와 같이 정상 건강한 비-암 유방 조직 샘플 이하의 수준에서 존재한 경우 "HER2/ErbB2 음성"으로서 보고된다. 다양한 방법은 HER2/ErbB2 상태의 평가, 전형적으로 환자의 세포에 의해 발현되어 그렇게 함으로써 환자를 HER2/ErbB 양성 (이 수용체가 환자의 세포에서 과발현된 또는 증폭된 경우) 또는 HER2/ErbB 음성 (이 수용체가 환자의 세포 상에서 과발현되지 않거나 또는 증폭되지 않는 경우)으로서 진단하는, 수용체 (IHC)의 양, 또는 mRNA 수준 (qPCR), 또는 유전자 복제수 (FISH)에 집중에 대하여 당해 기술에 공지되어 있다. 과발현 및 증폭은 정상 무병 개인으로부터 유사한 조직에서 발견된 것 초과로 상승된 수준을 기재하는 기술분야의 용어들이다. DAKO IHC 시험에 대하여, HER2 음성 결과는 보고된 스코어가 2+ 미만인 환자에 대하여 전형적으로 보고된다. DAKO HER2 IHC 시험 염색 해석 지침은 표 1에서 아래 보여진다:

[0184] 표 1: DAKO HER2 IHC 시험 염색 해석 가이드라인

보고된 스코어	HER2 단백질 과발현 평가	염색
0	음성	<10%의 종양 세포에서 염색 또는 막 염색이 관찰되지 않음
1+	음성	>10%의 종양 세포에서 희미한/경우 인지가능한 막 염색이 검출됨. 세포는 불안전 막 염색을 나타냄.
2+	모호함 (강하지 않게 양성)	>10%의 종양 세포에서 약 내지 중간 정도의 완전 막 염색이 관찰됨.
3+	강하게 양성	>10%의 종양 세포에서 강한 완전 막 염색이 관찰됨.

[0185] [0186] HER2 FISH 시험은 정상 세포 각각이 염색체 17상에서 HER2 유전자의 2개의 카피 - 모진에서 물려받은 하나 및

부친에서 물려받은 하나를 갖는 것을 고려한다. HER2-양성 암 세포에서, 유전자는 증폭될 수 있고 - 각 세포는 2 초과 카피를 갖는다. 암 세포는 또한 이수성 염색체를 가질 수 있고, 그의 HER2 유전자를 포함한, 모든 그 DNA가 증폭되는 것을 의미한다. HER2 FISH 시험은, 염색체 17 (CEP17)에서, 동원체로 불리는, 상이한 영역에 결합하는 녹색 형광 태그와 혼재 변수에 대하여 대조한다. HER2-양성 세포는 이들이 동원체 신호를 하는 것보다 더 많은 HER2 신호를 항상 가질 것이다. ASCO-CAP HER2 시험 지침 권고 2013에 의해, HER2 양성 환자는 내부 대조군 프로브 없이 그 시험 시스템에 대하여 > 2.2의 HER2 대 CEP17의 FISH 증폭된 (비 또는 평균 HER2 유전자 복제수 > 6 신호/ 핵을 갖고 HER2 음성 환자는 내부 대조군 프로브 없이 시험 시스템에 대하여 < 1.8의 FISH HER2/CEP17 비 또는 < 4 신호/핵의 평균 HER2 유전자 복제수를 갖는다. 시험은 인증된 기술자 및 병리학자에 의해 수행되고 등급화되어야 한다.

- [0187] HER2 유도된 암의 계측에 대하여 HER2 mRNA 존재의 양의 해석을 위한 표준은 설정되지 않았다.
- [0188] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "HER2 음성 암", "ErbB2 음성 암", "비-과발현된, 비-증폭된 HER2 암" 및 "비-과발현된, 비-증폭된 ErbB2 암"은 대상체의 암 세포 (예를 들면, 유방암 세포)의 HER2/ErbB2 상태에 대해 상호교환적으로 사용된다.
- [0189] 용어들 "에스트로겐 수용체 상태" 또는 "ER 상태"는 바이오마커로서 환자, 또는 환자의 세포 (예를 들면, 암 세포)에서 ER의 발현의 평가를 지칭하고, 상태는 전형적으로 바이오마커가 염색된 고정된 시료의 핵에서 과발현되는 경우 "ER 양성" 또는 바이오마커가 정상적으로 발현되거나 또는 염색된 고정된 시료의 핵에서 부재인 경우 "ER 음성"으로서 보고된다. 다양한 방법은 ER 상태의 평가, 전형적으로 환자의 세포에 의해 발현되어 그렇게 함으로써 환자를 ER 양성 (이 수용체가 환자의 세포에서 과발현된 또는 증폭된 경우) 또는 ER 음성 (이 수용체가 환자의 세포상에서 발현되지 않는 경우)으로서 진단하는, 수용체 (IHC)의 양, 또는 mRNA 수준 (qPCR)에 집중에 대하여 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0190] ER 상태에 관한 ASCO CAP 2010 승인된 지침은 ER 검정이 내부 (정상 상피 요소) 및 외부 대조군의 예상된 반응성의 존재하에 시험시 샘플에서 적어도 1% 양성 종양 핵이 있다면 양성으로 고려되어야 한다는 것이다. ER 염색 시험 결과는 샘플이 ER 또는 PgR을 발현시킬 수 있다는 (양성 고유 대조군이 보여진다는) 증거의 존재하에 종양 세포 핵의 < 1%의 발견이 면역반응성이면 ER에 대하여 음성이다. ER 염색 시험 결과는 무 종양 핵이 면역반응성이고 샘플에서 존재한 또는 동일한 샘플로부터 분리하여 추출된 내부 상피 요소가 임의의 핵 염색이 부족한 것이 발견되면 ER에 대하여 해석불가능하다. 시험은 인증된 기술자 및 병리학자에 의해 수행되고 등급화되어야 한다.
- [0191] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "ER 음성 암" 및 "비-과발현된 ER 암"은 대상체의 암 세포 (예를 들면, 유방암 세포)의 ER 상태에 대해 상호교환적으로 사용된다.
- [0192] 용어 "바이오센서"는 분석물 또는 세포의 생리적 조건 또는 분석물에서의 변화를 측정하는 디바이스를 지칭한다. 구현예에서, 바이오센서는 전형적으로 하기 3개의 부품을 함유한다: (비-제한 예 예컨대 세포의 기질, 세포 신호전달 분자, 또는 세포 증식, 조직, 세포, 대사물질, 이화대사물, 생체분자, 이온, 산소, 이산화탄소, 탄수화물, 단백질 등을 포함한) 분석물을 결합 또는 인식하는 생물학적 성분 또는 요소, (물리화학 방식 예컨대 광학, 압전, 전기화학적, 온도측정, 또는 자기에서 작동한) 검출기 요소, 및 모든 성분과 관련된 변환기.
- [0193] 용어 "광학적 바이오센서"는 형광, 흡수, 투과율, 밀도, 굴절률, 및 광의 반사를 측정하는 디바이스를 지칭한다. 구현예에서, 광학적 바이오센서는 생세포, 병원체, 또는 이들의 조합에서 분자 인식 또는 분자 교란 사례를 정량화가능 신호로 전환하기 위한 광학적 변환기를 포함할 수 있다. 추가로, 구현예는 광자 계측 디바이스, 광학적 도파관 디바이스, 및 표면 플라즈몬 공명 디바이스를 포함할 수 있다.
- [0194] 용어 "임피던스 바이오센서"는 임피던스 (Z)가 옴 법칙 ( $Z = V/I$ )에 의해 기재된 바와 같이 전압 대 전류의 비에 관련되는 살아있는 환자 세포의 복합 임피던스 변화 (델타 Z, 또는 dZ)를 측정하는 디바이스를 지칭한다. 세포가 있는 전극 계면에서 국부 이온성 환경에 감수성이고 전압 및 전류 변동의 기능으로서 이들 변화를 검출한다. 정상 기능의 결과로서 세포의 생리적 변화 또는 이들의 교란은 전극 주변의 전류의 흐름에 정량화가능 변화를 초래하고 측정된 신호의 규모 및 특징에 영향을 미친다. 구현예에서, 임피던스 바이오센서는 생세포, 병원체, 또는 이들의 조합에서 분자 인식 또는 분자 교란 사례를 정량화가능 신호로 전환시키기 위한 전극 또는 전기 회로를 포함할 수 있다. 구현예에서, ISFET 바이오센서는 생세포, 병원체, 또는 이들의 조합에서 분석물 인식 또는 세포성 교란 사례를 정량화가능 신호로 전환시키기 위한 이온 선택적 전계 효과 전기 변환기를 포함

할 수 있다. ISFET 바이오센서에서 분석물 농도가 변화하는 경우, 트랜지스터에서 전류는 변화하고, 이는 정량화 신호를 창출한다.

[0195] 용어 "세포 신호전달"은 정보의 세포내 또는 세포간 전달을 지칭한다. 세포 신호전달은 세포 사이에서 직접 접촉에 의해 또는 또 다른 세포에 의해 취해지는 한 세포로부터 물질의 방출에 의해 달성될 수 있다. 세포간 신호전달은 2개의 분자 (예를 들면, 리간드 및 수용체) 사이에서 상호작용을 통해 발생할 수 있다. 수용체 결합은 세포내 신호전달의 캐스케이드 (예를 들면, 세포 내에서 생화학물질 변화 또는 막 전위의 변형의 개시)를 유발시킬 수 있다.

[0196] 용어 "HER 계열-관련 신호전달 경로"는 HER 계열 수용체 (HER1/ErbB1/EGFR, HER2/ErbB2, HER2/ErbB3 및 HER4/ErbB4)를 통해 신호전달과 관련된 세포내 신호전달 경로를 지칭한다. 각 수용체에 결합한다고 공지된 HER 계열 수용체 및 상응하는 리간드는 표 2에서 아래 요약된다:

[0197] 표 2:

리간드	수용체			
	ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4
EGF	+	-	-	-
TGF- $\alpha$	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
암피레굴린	+	-	-	-
베타셀룰린	+	-	-	+
에피겐	+	-	-	-
에피레굴린	+	-	-	+
뉴레굴린 1	-	-	+	+
뉴레굴린 2	-	-	+	+
뉴레굴린 3	-	-	-	+
뉴레굴린 4	-	-	-	+

[0198] 용어 "ER-관련 신호전달 경로"는, ER $\alpha$  및 ER $\beta$ 를 포함한, 에스트로겐 수용체 (ER)를 통한 신호전달과 관련된 세포내 신호전달 경로를 지칭한다. (ER의 알파 또는 베타 동형체에 대하여 그의 친화도가 상이할 수 있는) ER용 공지된 리간드는 에스트라디올, 에스트론, 탈록시펜, 에스트리올 및 게니스테인을 포함한다.

[0200] 용어 "세포골격 조직화"는 세포의 내부 스캐폴드의 배열을 지칭한다. 세포의 세포골격은 세포질 또는 막 요소 및/또는 세포내 세포소기관을 지지하는 작용을 하는 필라멘트를 포함한다. 세포골격은 또한 세포의 형상을 유지하는데 도움을 준다.

[0201] 용어 "세포 증식"은 세포 성장 및 세포 분할의 결과로서 세포의 수에서의 증가를 지칭한다.

[0202] 용어 "세포 생존"은 특정 기능 예컨대 대사, 성장, 운동, 재생산, 반응성의 일부 형태, 및 순응성을 수행하기 위한 수용력에 의해 특성화된 세포의 생존력을 지칭한다.

[0203] 용어 "효능"은 특이적 개입이 유익한 결과를 생산하는 정도를 지칭한다. 구현예에서, 개입은 치료제, 예컨대 소분자 또는 항체일 수 있다. 유익한 결과는 비제한적으로 증상의 억제, 세포 성장의 감소, 세포 사멸의 증가, 염증의 감소, 및 면역 반응성의 증가를 포함한다.

[0204] "세포외 기질 성분"은 동물의 세포외 기질에서 발생하는 분자이다. 임의의 중으로부터 및 임의의 조직 유형으로부터 세포외 기질의 성분일 수 있다. 세포외 기질 성분의 비-제한 예는 라미닌, 콜라겐, 파이프록틴, 다른 당단백질, 펩타이드, 글리코사미노글리칸, 프로테오글리칸, 등을 포함한다. 세포외 기질 성분은 또한 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0205] 용어 "전면적인 표현형"은 전체적으로 세포 또는 세포 샘플의 관측가능한 특성의 복수 또는 복합체를 지칭하고 발달, 생화학물질 또는 생리적 특성, 생물계절학, 행동, 및 행동의 산물을 반영한다. 전면적인 표현형은 비제한적으로 하기를 포함할 수 있다: 세포 크기, 세포 형상, 고유 돌출부, 결과물, 확산, 부착 병소 밀도, 세포골격 배열, 세포 증식 패턴, 수용체 식균작용, 또는 부착 병소 수, pH의 변화, 대사물질, 신호전달 단백질 및 성장 인자, 산소, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, ATP, 및 이온 예컨대 마그네슘, 칼슘, 칼륨의 흡수 또는 유출.

[0206] 용어 "사례 특이성"은 세포의 특이적 특성의 물리적 관찰을 지칭한다. 그와 같은 특이적 특성은 특정한 활성제

또는 치료제에 대한 세포의 의도된 및/ 또는 예상된 생리적 반응의 일부로서 특이적 세포성 기능, 외인성 교란, 또는 경로 작용/길항작용에 관련한다. 활성제 및 치료제는 세포 기능의 특정 측면 예컨대 세포골격 구조, 또는 세포성 경로에 영향을 미치기 위해 표적된다고 공지될 수 있다. 물리적으로 관측가능한 사례는 활성제 또는 치료제의 존재하에 세포에서 물리적으로 관측가능한 사례가 세포에서 활성제 또는 치료제의 의도된 및/또는 예상된 효과의 반영이기 때문에 사례 특이성이라 불린다. 예를 들어, CREMS의 부착 바이오센서 유형에서 대부분의 세포 샘플에 빈블라스틴의 부가는 신호에서 심오한 감소를 생산한다. 빈블라스틴은 장애물질을 스캐폴딩한 세포성 세포골격이다. 신호의 감소는 미세소관 분자에서 약물 작용에 의해 야기된 세포 형상 및 부착의 손실에 특이적으로 연결된 세포의 물리적으로 관측가능한 사례이다.

[0207] 용어 "임피던스"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 하기 방정식에 의해 전압 및 전류에 관한 물리적 법칙에 의해 정의된다: 임피던스 (옴) = 전압 (볼트) / 전류 (암페어) 또는  $Z = V/I$ .

[0208] 치료 또는 요법의 목적을 위하여 "포유동물"은, 인간, 가정용 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 등등을 포함한, 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0209] 용어 "미세 캔틸레버 디바이스", "미세 캔틸레버 어레이", 또는 미세 캔틸레버 장치"는, 그의 적용에 의존하여, 적어도 하나의 캔틸레버, 막대-형상화, V-형상화될 수 있는, 또는 다른 형상을 가질 수 있는 가요성 빔을 포함한 CREMS 기기의 유형을 지칭한다. 미세 캔틸레버의 한 말단은 지지 기부에 고정되고, 또 다른 말단은 자유롭게 서있다. 미세 캔틸레버는 천연 공명 주파수 (미국 특허 번호 6,041,642에 기재된, 2000년 3월 28일 발행된, 이로써 참고로 편입된 바와 같은 예)와 매칭될 수 있는 위상차 신호를 검출하기 위한 전기적 방법을 이용한 농도를 측정할 수 있다 공지된 분자, 예를 들어, 거대분자 생체분자 예컨대 DNA, RNA, 또는 단백질이 배치되는 미세 캔틸레버의 공명 특성에서의 변화를 이용한 표적 종의 농도 측정. 편향은 광학적 및 압전 방법을 이용하여 측정된다.

[0210] 용어 "정상 기능성"은 신호전달의 비천연 수준, 복제, 접착 역제의 손실, 및 비정상적인 유전자 복사 및 증폭으로부터 기능이상에서 세포를 예방하는 체크 및 균형의 정의된 시스템을 갖는 세포에서 경로를 지칭한다. 많은 사례에서, 일부 정지 또는 정체 기초 상태에서 시작하는 경로로, 경로 구성원의 EC50 농도에서 교란제의 소량의 부가는 세포 시스템이 교란제를 인식하고, 경로 활성을 개시하고, 그 다음 다른 세포성 기능과 균형을 유지하기 위해 교란제 효과를 하향 조절함에 따라 단지 작은 일시적 효과를 가질 것이다. 이환 기능은 종종 교란제와 과반응, 경로를 따른 고/저 활성, 교란제 효과를 측정하기 위한 부적절한 경로간 활성, 및 최소 교란제 효과를 하향조절하는데 실패로서 인식가능하다. 추가로, 일부 이환 상태로, 일부 경로 구성원의 기초 상태는 경로로 도달될 수 없다. 이들 시스템은 구성적으로 활성화될 때 기재된다.

[0211] 용어 "정상 참조 구간"은, 건강한 대상체 (예를 들면 당해 질환이 없는 대상체)의 집단으로부터 수득된 값의 지정된 백분율을 포함하도록 추정되는, 2개 숫자, 상한치 및 하한치 사이 및 이를 포함한 범위로서 본원에서 정의된다. 대부분의 분석물에 대하여, 하한치 및 상한치는 참조 집단, 각각에 대하여 시험 결과의 분포의 2.5번째 및 97.5번째 백분위로서 추정된다. 일부 경우에서, 단 하나의 한계치는 의료적 중요성이고, 보통 상한이고, 97.5번째 백분위를 말한다. 참조 구간의 한계의 추정치에 대한 신뢰 구간은 참조 집단 - 일반적으로 약 120 참조 대상체의 랜덤 샘플링을 가정하면 작성될 수 있다. 각 신뢰 구간의 폭은 참조 대상체의 수, 뿐만 아니라 관측된 참조 값의 분포에 좌우된다.

[0212] 정상 참조 구간 컷오프는 참조 개인의 선택의 과정, 그들 참조 개인에 적용된 분석 방법에 의해 측정 및 설정되고, 내용이 본원에서 그 전체가 참고로 편입되는 간행물 임상 실험실 표준 협회 승인된 지침 EP28-A3C "Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory"에 의해 정의된 바와 같이 데이터 수집 및 분석으로 결론낸다.

[0213] 하나의 구현예에서, 참조 개인은 질환, 특히 모든 형태의 암이 없는 개인일 것이다. 정상 참조 구간은 본원에서 기재된 방법을 이용하여 정상 참조 개인의 시험에 의해 측정될 것이다. 정상 참조 구간의 상한은 정상 경로 활성의 상한을 나타낼 것이다. 하나의 구현예에서, 양성 및 음성 시험 결과 사이에서 확인하는 컷-오프 값은 정상 참조 구간의 상한과 비등할 것이다. 다른 구현예에서, 컷-오프 값은 정상 참조 구간의 상한 플러스 하나의, 조합, 또는 모든 하기 값의 임의의, 조합, 전체, 또는 배수와 비등할 것이다: 검출의 한계, 블랭크의 한계, 정량화의 한계, 측정량의 표준 편차.

[0214] 질환이 없는 참조 개인의 그룹은 당해 질환을 넘어서 다양한 특징에 의해 추가로 정의될 수 있다. 예를 들어,

유방암에 대한 본 발명의 적용에서, 질환이 없는 참조 여성의 그룹은 임의의, 조합, 또는 모든 하기 특징을 갖는 것으로 추가로 정의될 수 있다: 폐경전 또는 폐경후, 수유 또는 비-수유, 출산 경험, BRCA 유전자 돌연변이 보유, 당뇨병의 존재, BMI (체질량 지수)로 측정된 대로 비만. 약리학적 제제 예컨대 호르몬 또는 다른 약물 중독으로부터 금단, 식이 물질 예컨대 알코올로부터 금단 및 또는 암의 가족력.

[0215] 용어들 "비정상 신호전달 경로" 또는 "기능이상 신호전달 경로"는 상호교환적으로 사용되고 그의 정상 기능을 수행하기 위해 세포의 능력을 손상시키는 그와 같은 방식으로 파괴되는 세포 신호전달 경로를 지칭한다. 세포 신호전달 파괴 및 수득한 기능이상의 원인은 전형적으로 신호전달 경로의 정상 기능을 방해하는 게놈에 대한 손상의 결과이다. 상기 손상은 내인성 과정의 결과 예컨대 DNA의 복제에서의 오류, 특정 DNA 염기의 고유 화학 불안정 또는 대사 동안 생성된 유리 라디칼에 의한 공격으로부터일 수 있다. 일부 불활성화 돌연변이는 추가의 돌연변이의 취득을 용이하게 하는 게놈 완전성을 책임지는 유전자에서 발생한다. 세포성 대조군의 게놈 수준에 영향을 미치는 추가의 기전은 후성유전적 기전을 포함하여 이로써 특이적 유전자의 발현이 히스톤 단백질의 기능에 대한 변화에 의해 변경되었다. 에피게놈 기능은 질환 병인 및 번식에 참여하는 조건을 포함한 많은 상이한 환경적 조건에 고 적응성 또는 반응성인 것으로 입증되었다. 경로 기능이상의 다양한 RNA-기반 기전은 전사, 전사후, 번역, 및 번역후 수준에서 기재되었다.

[0216] 추가로, 단백질 수준에서 경로 기능이상의 많은 작용이 세포성 분자 생물학의 당해 분야의 숙련가에 공지된다. 경로 기능이상은 경로 구성원 또는 구성원들 또는 보조-인자(들)의 과발현 또는 저발현, 비천연 세포 유형 또는 세포성 위치에 존재한 단백질 활성화, 경로 교차-반응성으로도 공지된 비천연 경로 구성원과의 단백질 상호작용, 기능이상 피드백 루프의 결과일 수 있다. 경로 기능이상은 추가로 단백질체, 프로테아솜, 키놈, 대사체, 핵 단백질 및 인자, 세포질 단백질 및 인자, 및 또는 미토콘드리아 단백질 및 인자의 활성화의 결과일 수 있다.

[0217] 기능이상 경로를 가진 세포가 복제하는 경우, 이들은 그의 자손에 비정상적으로 통과할 수 있고, 이는 세포가 이환되는 가능성을 증가시킨다. 살아있는 세포에서 세포 신호전달 경로의 활성을 분석함으로써, 세포의 신호전달 경로가 정상적으로 또는 비정상적으로 기능하는지를 계속하는 것이 가능하다.

[0218] "폴리뉴클레오타이드", 또는 "핵산"은, 본원에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라체에 의해, 또는 합성 반응에 의해 폴리머에 편입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머의 어셈블리 이전 또는 이후 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 방해될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성 이후, 예컨대 표지를 이용한 콘주게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다. 변형의 다른 유형은, 예를 들어, 하기를 포함한다: "캡스", 천연 발생 뉴클레오타이드의 하나 이상의 유사체로의 치환, 뉴클레오타이드간 변형 예컨대, 예를 들어, 미하전된 연결기 (예를 들면, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트, 등) 및 하전된 연결기 (예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 등)을 갖는 것, 현수 모이어티, 예컨대, 예를 들어, 단백질 (예를 들면, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩타이드, pLy-L-라이신, 등)을 함유한 것, 삼입체 (예를 들면, 아크리딘, 소랄렌, 등)을 가진 것, 킬레이터 (예를 들면, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화적 금속, 등)을 함유한 것, 알킬화제를 함유한 것, 변형된 연결기 (예를 들면, 알파 아노머성 핵산, 등)을 가진 것, 뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드(들)의 비변형된 형태. 추가로, 당류에서 통상적으로 존재한 임의의 하이드록실기는, 예를 들어, 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 대체될 수 있거나, 표준 보호기에 의해 보호될 수 있거나, 또는 추가의 뉴클레오타이드에 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 또는 고히 또는 반-고형 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 1 내지 20개의 탄소 원자의 아민 또는 유기 캡핑 기 모이어티로 인산화 또는 치환될 수 있다. 다른 하이드록실은 또한 표준 보호기에 유도될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한, 예를 들어, 하기를 포함한, 당해 기술에서 일반적으로 공지되는 비슷한 형태의 리보오스 또는 데옥시리보오스 당류를 함유할 수 있다: 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴-, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보오스, 카보사이클릭 당 유사체, 알파-아노머성 당, 에피머 당류 예컨대 아라비노오스, 자일로오스 또는 리소오스, 피라노오스 당, 푸라노오스 당, 세도헥스로오스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오사이드 유사체 예컨대 메틸 리보사이드. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대안적인 연결기에 의해 대체될 수 있다. 이들 대안적인 연결기는, 비제한적으로, 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), "(O)NR.sub.2 ("아미데이트"), P(O)R', P(O)또는', CO 또는 CH.sub.2 ("포름아세탈") (여기에서 각 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 에테르 (--O--) 연결, 알릴, 알케닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 또는 아랄딜을 선택적으로 함유한 치환된 또는 비치환된 알킬 (1-20 C)이다)에 의해 대체되는 구현

예를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드에서 전체 연결기가 동일할 필요는 없다. 이전의 설명은, RNA 및 DNA를 포함, 본원에서 참조된 전체 폴리뉴클레오타이드에 적용한다.

- [0219] "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2 이상의 아미노산을 함유한 펩타이드 또는 단백질을 지칭하고, 펩타이드, 올리고머, 단백질, 등등을 포함한다. 폴리펩타이드는 천연, 변형된, 또는 합성 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 자연적으로, 예컨대 번역후 가공에 의해, 또는 화학적으로, 예컨대 아미드화, 아실화, 가교결합, 등등으로 변형될 수 있다.
- [0220] 용어 "석영 계측 공명체/미량천칭"은 작은 질량 예컨대 바이러스 또는 측정되도록 의도된 임의의 다른 미소물의 부가에 의해 방해되는 경우 압전 석영 계측의 빈도의 변화를 측정함으로써 질량을 측정하는 CREMS 디바이스의 유형을 지칭한다. 빈도 측정은 높은 정확성으로 쉽게 실시되고, 그러므로, 작은 질량을 측정하는데 용이하다.
- [0221] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "샘플"은 본 개시내용에서 장치, 마이크로플레이트 또는 방법을 이용하여 단리된, 조작된, 측정된, 정량화된, 검출된 또는 분석된 모이어티를 함유할 수 있는 임의의 것을 지칭한다. 샘플은 생물학적 샘플, 예컨대 생체액 또는 생물학적 조직일 수 있다. 생체액의 예는 배지 예컨대 세포 배양 배지내 세포의 현탁액, 소변, 혈액, 플라즈마, 혈청, 타액, 정액, 대변, 가래, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등등을 포함한다. 생물학적 조직은, 연결, 상피, 근육 및 신경 조직을 포함한, 인간, 동물, 식물, 박테리아, 진균 또는 바이러스 구조의 구조적 물질 중 하나를 형성하는 그의 세포간 물질과 함께 세포의, 보통 특정한 종류의 응집물이다. 생물학적 조직의 예는 또한 기관, 종양, 림프절, 동맥 및 개별 세포(들)을 포함한다. 생물학적 샘플은 추가로 세포 현탁액, 생물학적 분자 (예를 들면 단백질, 효소, 핵산, 탄수화물, 생물학적 분자에 결합하는 화학 분자)를 함유한 용액을 포함할 수 있다.
- [0222] 용어 "세포 샘플"은 특정한 대상체로부터 단리된 세포를 지칭하고, 여기에서 세포는 대상체의 생체액, 배설물, 또는 조직으로부터 단리된다. 조직으로부터 단리된 세포는 종양 세포를 포함할 수 있다. 조직으로부터 단리된 세포는 균질화된 조직, 및 세포성 추출물, 및 이들의 조합을 포함한다. 세포 샘플은, 비제한적으로, 혈액, 혈액 혈청, 혈당, 소변, 정액, 정액, 정액 장액, 전립선 유체, 사정전 유체 (쿠퍼액), 배설물, 눈물, 타액, 땀, 생검, 복수, 뇌척수액, 림프, 골수, 또는 모발로부터 단리물을 포함한다.
- [0223] 용어 "CELx" 시험은 일반적으로 본원에서 기재된 방법의 다양한 구현예를 지칭한다.
- [0224] 용어 "질환 세포 샘플"은 질환의 특징을 갖는 세포 또는 질환의 부위로부터 복수의 세포를 지칭한다.
- [0225] 용어 "건강한 세포 샘플"은 세포가 시험되는 질환을 갖지 않는 조직으로부터 추출되거나 상기 조직을 갖지 않는 세포 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 특정한 대상체가 대상체의 유방암에 대해 치료제의 효과에 대하여 시험되는 경우, 비-암성 세포 또는 비-유방 조직으로부터 세포는 "건강한" 것으로 고려된다. 용어 "건강한 세포 샘플"은 대상체의 전체의 건강 상황에서 계측 또는 반영은 아니다. 정상 참조 구간의 유도 목적으로, 종종 사용된 건강한 세포 샘플이 시험되는 질환을 갖지 않는 대상체로부터 획득되는 사례가 있다.
- [0226] 용어 분석적 "감수성"은 시험 또는 검출 한계를 지칭하고, 0 부터 분화된 최저 양으로서 정의된다. (예를 들면 제로 대조군의 평균 초과 95% 신뢰 구간 또는 2 표준 편차 (SD)는 통상적으로 사용된다).
- [0227] 용어 임상 "감수성"은 시험이 양성인 표적 조건을 가진 대상체의 분율 또는 당해 조건이 존재한 경우 얼마나 자주 시험이 양성인지를 지칭한다. 시험의 임상 "감수성"은 하기 계산에 의해 제공된 정확도의 추정치로서 정의된다:  $100\% \times TP / (TP + FN)$  (여기에서 TP는 시험된 결과에 대하여 진 양성 사례의 수이고 FN은 위 음성 사례, 음성으로서 부정확하게 계측된 사례의 수이다).
- [0228] 임상 "특이성"은 시험이 음성인 표적 조건 없이 대상체의 분율 또는 당해 조건이 부재인 경우 얼마나 자주 시험이 음성인지를 지칭한다. 임상 특이성은 하기 계산에 의해 추정된다:  $100\% \times TN / (FP + TN)$  (여기에서 TN은 시험된 결과에 대하여 진 음성 사례의 수이고 FP는 위 양성, 양성으로서 부정확하게 계측된 사례의 수이다).
- [0229] 용어 "표면 플라즈몬 공명 디바이스"는 국부 굴절률에서의 변화를 검출함으로써 금속 표면에서 생체분자의 결합 사례를 측정하는 CREMS의 광학적 바이오센서 유형을 지칭한다.
- [0230] 용어 "치료제"는, 유기체 (인간 또는 비인간 동물)에 투여된 경우, 국부 및/또는 전신 작용에 의해 원하는 약리학, 면역원성, 및/또는 생리적 효과를 유도하는 물질의 임의의 합성 또는 천연 발생 생물학적 활성 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 용어는 분자 예컨대 단백질, 펩타이드, 호르몬, 핵산, 유전자 작제물 등등을 포함한 약물, 백신, 및 생물의약품으로서 전통적으로 여겨지는 화합물 또는 화합물질을 포함한다. 제제는 수의과, 응용을 포함한, 의료에서 그리고 예컨대 식물을 이용한 농업에서, 뿐만 아니라 다른 영역에서 사용된 생물학적 활성 제

제일 수 있다. 용어 치료제는 또한 비제한적으로, 하기를 포함한다: 약제; 비타민; 미네랄 보충물; 질환 또는 병의 치료, 예방, 진단, 치유 또는 완화에 사용된 물질; 또는 신체의 구조 또는 기능에 영향을 미치는 물질; 또는 이들이 생물학적 활성이 되거나 또는 예정된 생리적 환경에서 배치된 이후 더욱 활성이 되는, 전구-약물. 치료제는, 비제한적으로, 항암 치료제, 항정신병약, 항-염증제, 및 항생제를 포함한다.

[0231] 용어들 "세포독성 요법" 및 "화학요법"은 하나 이상의 치료제를 이용한 치료를 지칭하고, 여기서 상기 제제(들)은 이환 세포 (뿐만 아니라, 가능하게는, 비-이환 세포)에 대해 비-특이적 또는 비-표적된 세포독성을 나타낸다.

[0232] 용어 "표적된 경로 약물", "경로 약물", 또는 "표적된 약물"은, 질환 과정에 관여된, 그렇게 함으로써 그의 활성을 조절하는 특이적 생체분자 (예를 들면 단백질)에 결합하도록 설계된 치료적 수용력을 가진 임의의 분자 또는 항체를 지칭한다.

[0233] 용어들 "HER2 요법" 또는 "HER2-표적된 요법"은, 비제한적으로, 예를 들어 HER2 분자 및/또는 신호전달 경로(들)을 표적하는 항체 및 소분자를 포함한, HER2 분자 및/또는 신호전달 경로(들)을 특이적으로 표적하도록 설계되는 하나 이상의 치료제를 이용한 치료를 지칭한다. 상기 HER2 요법은 또한 HER 계열의 다른 구성원, 예를 들어 모든 HER1 및 HER2, HER1, HER2, 및 HER4, 또는 HER3 단백을 표적하는 요법을 표적할 수 있다.

[0234] 용어들 "ER 요법", "ER-표적된 요법" 또는 "호르몬 요법"은, 비제한적으로 방향화효소 억제제, 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질 및 선택적 에스트로겐 수용체 하향조절물질을 포함한, ER 분자 및/또는 신호전달 경로(들)을 특이적으로 표적하도록 설계되는 하나 이상의 치료제를 이용한 치료, 뿐만 아니라 상기 요법과 사이클린-의존적 키나제 CDK4 및 CDK6을 억제시키는 요법의 조합을 지칭한다.

[0235] 용어 "항-증식성 약물", "항-증식성 제제", 또는 "세포자멸사 유도 약물"은, 세포 분할을 감소시키는, 세포 성장을 감소시키는, 또는 세포를 사멸시키는 기능을 하는 치료적 수용력을 가진 임의의 분자 또는 항체를 지칭한다. 많은 사례에서, 이들 약물의 활성은 정상 세포성 공정에 관여된 생체분자의 넓은 클래스 (예를 들면 DNA 삽입)에 관련하고 따라서 약물은 세포 질환 상태에 대하여 덜 변별적일 수 있다.

[0236] 폴리펩타이드의 "변이체"는 참조 서열과 상이한 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 참조 서열은 전장 원상태 폴리펩타이드 서열 또는 전장 폴리펩타이드 서열의 임의의 다른 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 서열은 가변 도메인 중쇄 또는 가변 도메인 경쇄 공통 서열이다. 폴리펩타이드 변이체는 일반적으로 참조 서열과 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0237] **B. 신호전달 경로 활성 측정의 진단 검정 및 방법**

[0238] 오늘날 많은 암은 질환과 관련된 특이적 유전적 돌연변이 또는 과-발현된 수용체 단백질의 존재를 계측하는 시험의 도움으로 진단된다. 예를 들어, 유방암의 경우, 에스트로겐 수용체 (ER) 또는 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (HER2)가 암 세포에서 과발현 또는 증폭되는지를 계측하기 위해 시험이 수행된다. 이들 시험의 결과는 질환을 치료하는데 가장 알맞은 요법을 계측하는데 사용된다.

[0239] 대부분의 표적된 요법의 실제 표적이 신호전달 경로의 요소인 반면, 대부분의 바이오마커 시험은 단지 신호전달 경로 활성 자체에 대한 간접적 및 추정적 정보를 제공한다. 이들 시험은 전형적으로 활성화된 신호 전달 단백질을 인코딩한 유전자에서 돌연변이에 대한 DNA 분석 또는 고정된 조직에서 과-발현된 수용체 단백질의 면역조직화학으로 이루어진다. 실제로는, 질환은 개별 단백질에 의해 유도되지 않지만, 중앙 세포 생존 및 증식으로 이어지는 신호전달 경로 네트워크의 동적, 복합 회로에 의해 유도된다. 상기 네트워크는 단순한, 선형 경로는 아니지만, 그러나 다소 유전적 분석을 이용하여 평가하기가 불가능한 복합 바이패스 기전 및 피드백 루프를 포함한다.

[0240] 현행 바이오마커 시험의 제한 때문에 오진에 대하여 포텐셜의 예는 현행 유방암 바이오마커 시험으로 알아낼 수 있다. 대략 300,000 여성은 연간 침습성 또는 비-침습성 유방암으로 진단된다. 임상 결과는 에스트로겐 수용체 알파 (ER $\alpha$ ) 양성 유방암으로 진단된 여성의 70%에 대하여 극적으로 개선하였다. 이들 개선된 결과는 주로 ER $\alpha$ 에 결합과 관련된 에스트라디올 또는 그의 활성의 생산을 파괴하는 표적된 요법의 이용가능성의 결과이다. 암이 ER $\alpha$ -음성인, 여성의 잔여 30%, 거의 90,000명은 훨씬 더 나쁜 예측을 직면한다.

[0241] 기능이상 에스트로겐 신호전달 네트워크 (ESN)가 유방암에서 실시하는 널리 기술적으로 인식된 역할에도 불구하고, 단일 반응물, ER $\alpha$ 를 측정할 유일한 시험은 병상에서 수행되고; 환자의 중앙 상피 세포 내에서 ESN 활성을 측정하는 진단 시험은 오늘날 이용불가능하다. 그러나, 단지 ER $\alpha$  발현이 측정된 경우, ER $\alpha$ -음성으로서 분류된

그러나 종양 세포에서 비정상 ESN 활성을 갖는 환자는, 사실상, 이들이 하는 경우, 에스트로젠-유도된 유방암을 갖지 않는 것으로 진단된다. ER $\alpha$ -음성 유방암이 ER $\alpha$ -양성 유방암에 대하여 처방된 것보다 훨씬 덜 유효한 약물로 치료되기 때문에 상기 오진은 상기 환자에 대하여 유의미한 음성 결과를 갖는다. ER $\alpha$ -양성 대 ER $\alpha$ -음성 환자 사이에서 결과의 차이는 극명하다.

- [0242] 임상시험으로부터 발견은 일부 ER $\alpha$ -음성 환자가 내분비 요법의 덕을 본다는 것을 나타낸다. 이는 이들이 확인될 수 있다면 그의 생존 결과를 개선하는 것이 가능할 것이라는 것을 시사한다. 이는 ER $\alpha$ -음성 환자에 대하여 내분비 요법의 추천된 시도로 NCCN 유방암 패널을 이끌었다.
- [0243] 병상에서 사용된 현행 방법이 질환 활성을 구동한다고 공지된 특이적 기능성 활성을 측정하지 않는 또 다른 예는 과발현된 HER2 유방암 (HER2 양성)이다. HER2의 과발현된 수준의 존재가 필연적으로 암 세포 증식을 구동하는 HER2-관련 경로의 활성화에 상관하지 않기 때문에 HER2 단백질을 표적한 약물은 종종 효과적이다. 이 경우에, HER2-관련 경로가 활성이었는지를 예측하는 것이 바람직할 것이다.
- [0244] 따라서, 원발 이환 세포에서 신호전달 경로 활성을 측정하는 방법은 질환이 고정된 유전적 또는 단백질 분석의 도움으로 먼저 특성화되는 더욱 정확하게 진단 환자에 대한 시험으로서 유의미한 상업적 적용을 갖는다. 상기 접근법은 과학적 총의의 오래된 영역을 넘어뜨리고, 유전자 또는 단백질의 상태 그대로가 아니라, 생존 원발 이환 세포에서 신호전달 경로 활성의 측정이 환자의 질환의 정확한 진단에 필수적인 것을 보여준다.
- [0245] 유전적 또는 단백질 분석에 관한 집중은 환자의 바이오마커 상태가 그의 암을 진단하는데 충분하다는 널리-퍼진 견해를 반영한다. 그러나 유전적 또는 단백질 발현 수준의 평가는 이환 신호전달 경로 자체의 활성화에 대해 간접적 및 추정적 정보만을 제공한다. 현행 연구는 질환이 신호전달 경로 네트워크의 동적, 복합 회로에 의해 전형적으로 유도된다는 것을 확립하였다. 상기 네트워크는 단순한, 선형 경로가 아니지만, 다소 고정된 세포의 고정된 유전적 및 번역조직화학 분석을 이용하여 사정하는 것이 불가능한 복합 바이패스 기전 및 피드백 루프를 포함한다. 신호전달 경로 활성의 분석은 경시적으로 이들 살아있는 세포에서 동적 세포성 변화를 측정할 수 있는 방법의 개발 및 살아있는, 고정되지 않은, 세포의 사용을 필요로 한다. 고정된 유전적 또는 단백질 분석에 관한 상기 신뢰는, 부분적으로, 통상적으로 사용된 시험 방법에 의해 유도된다. 이들은 먼저 많은 세포 고착 기술 중 하나를 이용하여 종양 조직의 제조, 및 그 다음 다양한 기술, 예컨대 면역조직화학 또는 형광 제자리 하이브리드화 (FISH)를 이용하여 고정된 세포의 분석을 포함한다. 이들 방법은 종양 시료의 유전적 또는 단백질 조성물을 검출할 수 있지만, 그러나 이들은 동적 세포성 경로 활성을 측정할 수 없다.
- [0246] 신호전달 경로 활성의 측정은 질환과 일치된 비정상의 존재를 검출할 수 있다. 이를 성취하기 위해, 세포성 신호전달 경로 작동과 세포 접착 공정 사이에서 밀접한 연결을 활용하는 플랫폼은 개발되었다. 세포의 기질에서 또는 다른 세포상에서 그의 동족 결합 부위와, 막통과 세포 접착 수용체, 예컨대 인테그린, 카드헤린, Ig CAMs, 및 셀렉틴의 상호작용은 다중 세포성 신호전달 공정에 연결을 입증하였다. 접착 연결은 세포내 신호전달 캐스케이드에 직접적으로 연결되는 조직화된 막-근위 세포골격 구조를 통해 전달한다. 이는 경로 교란제의 적용시 특이적 세포성 경로를 통해 특이적 접착 분자에 영향을 미치는 것을 가능하게 한다.
- [0247] 세포성 경로의 교란이 세포 접착에 얼마나 효과를 보이는지를 측정하기 위해, 미소전극을 코팅한 특이적 세포의 기질 (ECM) 물질에 부착된 생존 환자 세포의 복합 임피던스 변화를 측정하는 디바이스는 사용된다. 세포성 임피던스 바이오센서로서 공지되면, 이들 디바이스는 각 웰의 최하부를 커버하는 박형 금 전극을 가진 표준 마이크로플레이트로 구성된다. 선택적 세포의 기질과 함께 이용된 웰들은 특이적 방식으로 마이크로플레이트 웰 전극에 생존 세포를 부착시킨다. 웰 전극의 최상부상에서 생존 세포의 존재는 전극/세포 인터페이스에서 국부 이온성 환경에 영향을 미쳐, 전극 임피던스에서의 증가로 이어진다. 세포가 교란 또는 자극되어 그의 기능을 변화시키는 경우, 세포 접착에서 수반한 변화는 따라서 임피던스를 변경시킨다. 접착 반응의 특이성은 경로내 다양한 지점에서 작용한다고 공지된 특이적 ECM 또는 도구 화합물 또는 약물의 적용에 의해 예측될 수 있다. 임피던스 결과는 임피던스 일시적 패턴에 의해 나타낸 시점에서 특이적 단백질 변화의 면역검출에 의해 추가로 지지된다. 시스템은 서브-나노미터 내지 마이크로미터 범위로 접착 변화를 검출할 수 있고 살아있는 세포상에서 다양한 경로 약리학의 카테고리화를 위한 데이터를 생성한다. 옴으로 발현된, 세포 부착 신호 (CAS)로 지칭된, 측정된 임피던스의 양은 세포 생존력, 접착, 및 신호전달 경로 교란을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 생성된 데이터는 임피던스 대 시간이다.
- [0248] 따라서, 본 발명의 진단 시험에서, 분석물은, 마이크로플레이트의 웰에 배치된 및 바이오센서 예컨대 임피던스 바이오센서로 분석된 경우, 생존 환자 세포가 단독으로 또는 세포 교란제의 존재하에 발생하는 세포 부착 신호 (CAS)이다. 모든 시험에 대하여, CAS는 환자 세포 샘플의 2개 그룹에 대하여 측정 및 분석된다.

- [0249] 1) 환자 세포 단독 (C)
- [0250] 2) 환자 세포 + 교란 경로 인자(들) (CF)
- [0251] 3) 환자 세포 + 교란 경로 인자(들) + 확인제 (CCF)

[0252] 신호전달 경로가 정상적으로 또는 비정상적으로 기능하는지를 검출하기 위해, 환자의 이환 세포에서 신호전달 경로는 하나 이상의 경로 인자 및 확인제로 교란되고 수득한 활성은 교란제 및/또는 확인제가 컷-오프 값에서 갖는 효과와 비교된다. 컷-오프 값은 암을 갖지 않는 대상체로부터 수득된 건강한 세포의 샘플 세트의 신호전달 경로 활성의 분석을 포함한 연구로부터 유도될 수 있다. 검정 측정량은 환자의 이환 세포내 CF와 C 세포 사이 CAS에서의 변화 및 CF와 CCF 이환 세포 사이 CAS에서의 변화를 반영한다. 신호전달 경로가 비정상이면, CF와 C 이환 세포 사이 CAS 변화 및/또는 CF와 CCF 이환 세포 사이 CAS 변화는 컷-오프 값 초과일 것이다. 컷-오프 값은 당해 경로 활성화에 대하여 전형적으로 정상 참조 구간의 상한 초과이다. 간소화된 구현예에서, 경로 인자 또는 확인제로 교란 직전 시점에서 CAS에 비교된 교란의 지점 이후 CF 및 CDF 샘플의 CAS의 측정은 또한 유용한 측정량일 수 있다. 상기 분석의 예는, 실시예 6에서 추가로 기재된, 도 10c 및 11c에서 보여진다. 이들 실험에서, 건강한 유방암 세포 (H62 세포) 및 유방암 환자 세포 (환자 54 원발 종양 세포)는 PI3K 경로 (NRG1, 도 10c) 또는 에스트로겐 수용체 알파 (ER α) 경로 (에스트라디올, 도 11c)를 특이적으로 활성화하는 교란제로 치료되었고 CAS는 세포에서 측정되었다. 결과는 PI3K 경로의 신호전달 활성화는 이환 세포 대 건강한 세포 (도 10c)에서 상승되는 것을 입증한다. 마찬가지로, ER α 경로에서 신호전달 활성화는 이환 세포 대 건강한 세포 (도 11c)에서 상승된다.

[0253] 신호전달 경로에 관한 특이적 표적된 치료적 억제제의 효과는 또한 CAS를 이용하여 평가될 수 있다. 도 10a-b 및 11a-b에서 나타낸 바와 같이, PI3K 경로 또는 ER α 경로의 특이적 억제제는 유방암 세포주 (도 10a, 11a) 및 원발 유방암 세포 (도 10b, 11b)에서 감소된 신호전달 경로 활성화로 보여주었다.

[0254] 본 발명의 진단 검정은 본질적으로 임의의 임상 상황, 특히 현재 유전적 또는 단백질 바이오마커가 질환의 지표로서 및 따라서 치료적 의사결정용 지표로서 사용되는 것에서 사용될 수 있다. 아래 표 3은 다양한 질환 상태의 치료에서 그의 용도와 관련된 바이오마커와 함께 FDA 승인된 치료제의 목록을 보여준다. 본 발명의 방법에 있어서, 본원에서 기재된 접근법은 치료제에 의해 영향을 받는 관여된 신호전달 경로의 활성을 조사하여 그렇게 함으로써, 이들이 표준 바이오마커 검정을 이용한 양성 결과를 나타내는지와 무관하게, 치료제를 이용한 치료가 환자에 처방되어야 하는지를 예측하기 위해 사용될 수 있다.

[0255] 표 3. 약물 표지 내 약물유전체학적 바이오마커

HUGO 부호	참조 하위그룹	치료 영역	약물
ALK	ALK 유전자 재배열 양성	종양학	크리조티닙
BCR -ABL T315I	BCR -ABL T315I 돌연변이	종양학	포나티닙
BCR/ABL1	필라델피아 염색체 (t(9;22)) 양성	종양학	보수티닙
BCR/ABL1	필라델피아 염색체 (t(9;22)) 양성; T315I 돌연변이-양성	종양학	다사티닙
BCR/ABL1	필라델피아 염색체 (t(9;22)) 양성	종양학	이마티닙
BCR/ABL1	필라델피아 염색체 (t(9;22)) 양성	종양학	닐로티닙
BCR/ABL1	BCR-ABL T315I	종양학	오마세탁신
BRAF	BRAF V600E 돌연변이 양성	종양학	다브라페닙
BRAF	BRAF V600E/K 돌연변이 양성	종양학	트라메티닙
BRAF	BRAF V600E 돌연변이 양성	종양학	베무라페닙
CCR5	CCR5 양성	감염성 질환	마라비록
CFTR	CFTR G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S540N, 또는 S549R 돌연변이 담체	폐	이바카프토르
CYB5R1-4	NADH 사이토크롬 b5 환원효소 결여	소화기내과학	메토클로프라마이드
CYP1A2	CYP1A2 유전자형	소화기내과학	텍스란소프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	튜머티스학	카리소프로돌
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	정신건강의학	시탈로프람
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	신경학	클로바잠
CYP2C19	CYP2C19 중간체 또는 불량 대사자	순환기내과학	클로피도그렐
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	텍스란소프라졸

[0256]

CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	정신건강의학	디아제팜
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	신경학	드로스피레논 및 에티닐 에스트라디올
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	에소메프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	란소프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	오메프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	판토프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	순환기내과학	프라수그렐
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	소화기내과학	라베프라졸
CYP2C19	CYP2C19 불량 대사자	순환기내과학	티카그렐로르
CYP2C19	CYP219 중간체 또는 불량 대사자	감염성 질환	보리코나졸
CYP2C9	CYP2C9 불량 대사자	류머티스학	세레콕시브
CYP2C9	CYP2C9 불량 대사자	류머티스학	플루르비프로펜
CYP2C9	CYP2C9 중간체 또는 불량 대사자	순환기내과학 또는 혈액학	와파린
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	아미트립틸린
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	아리피프라졸
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	아토목세틴
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	순환기내과학	카르베디롤
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	치의과	세비멜린
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	시달로프람
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	클로미프라민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	클로자핀

[0257]

CYP2D6	CYP2D6 ultra-rapid 대사자	마취통증의학	코데인
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	데시프라민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	신경학	텍스트로메토르판 및 퀴니딘
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	독세핀
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	플루옥세틴
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	플루복사민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	신경학	갈란타민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	일로페리돈
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	이미프라민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	순환기내과학	메토프로롤
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	모다피닐
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	네파조돈
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	노프트립틸린
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	파록세틴
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	페르페나진
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	피모지드
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	순환기내과학	프로파페논
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	순환기내과학	프로프라놀롤
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	프로트립틸린
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	순환기내과학	퀴니딘
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	리스페리돈
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	감염성 질환	테르비나핀
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	신경학	테트라베나진

[0258]

CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	티오리다진
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	비교생식	톨테로딘
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	진통제	트라마돌
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	트리미프라민
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	정신건강의학	벤라팍신
CYP2D6	CYP2D6 불량 대사자	신경학	보르티옥세틴
de1 (5q)	염색체 5q 결실	혈액학	레날리도미드
DPYD	DPD 결여	종양학	카페시타빈
DPYD	DPD 결여	피부과학	플루오로우라실
DPYD	DPD 결여	종양학	플루오로우라실
EGFR	EGFR 엑손 19 결실 또는 엑손 21 치환 (L858R) 돌연변이 양성	종양학	아파티닙5
EGFR	EGFR 단백질 발현 양성	종양학	세록시맙
EGFR	EGFR 단백질 발현 양성	종양학	에를로티닙
EGFR	EGFR 엑손 19 결실 또는 엑손 21 치환 (L858R) 양성	종양학	에를로티닙
EGFR	EGFR 단백질 발현 양성	종양학	파니투무맙
ERBB2	HER2 단백질 과발현 또는 유전자 증폭 양성	종양학	아도-트라스투주맙 엠탄신
ERBB2	HER2 단백질 과발현 음성	종양학	에베롤리무스
ERBB2	HER2 단백질 과발현 양성	종양학	라파티닙
ERBB2	HER2 단백질 과발현 양성	종양학	퍼투주맙
ERBB2	HER2 단백질 과발현 양성	종양학	트라스투주맙
ESR1	에스트로겐 수용체 양성	종양학	에베롤리무스
ESR1	에스트로겐 수용체 양성	종양학	엑세메스탄
ESR1	에스트로겐 수용체 양성	종양학	플베스트란트

[0259]

ESR1, PGR	호르몬 수용체 양성	종양학	아나스트로졸
ESR1, PGR	호르몬 수용체 양성	종양학	레트로졸
ESR1, PGR	호르몬 수용체 양성	종양학	타목시펜
F2	프로트롬빈 돌연변이 G20210A 양성	종양학	타목시펜
F5	인자 V 레이덴(Leiden) 담체	혈액학	엘트롬보패그
F5	인자 V 레이덴(Leiden) 담체	종양학	타목시펜
FIP1L1/PDGFRΑ	FIP1L1/PDGFRα 융합 키나아제 (또는 CHIC2 결실) 양성	종양학	이마티닙
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	클로로퀸
G6PD	G6PD 결여	내분비내과학	클로로프로파미드
G6PD	G6PD 결여	종양학	다브라페닙
G6PD	G6PD 결여	피부과학	답손
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	답손
G6PD	G6PD 결여	내분비내과학	클리메피리드
G6PD	G6PD 결여	내분비내과학	클리피지드
G6PD	G6PD 결여	내분비내과학	클리부라이드
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	마페니드
G6PD	G6PD 결여	혈액학	메틸렌 블루
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	날리덱스 산
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	니트로푸란토인
G6PD	G6PD 결여	소화기내과학	PEG-3350, 황산나트륨,

[0260]

			염화나트륨, 칼륨 클로라이드, 나트륨 아스코르베이트, 및 아스코브산 산
G6PD	G6PD 결여	류머티스학	페글로티카제
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	프리마퀸
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	퀴닌 술페이트
G6PD	G6PD 결여	종양학	라스부리카제
G6PD	G6PD 결여	해독 요법	나트륨 니트라이트
G6PD	G6PD 결여	혈액학	숙심
G6PD	G6PD 결여	감염성 질환	솔파메톡사졸 및 트리메토프림
HLA-A	HLA-A*3101 대립유전자 담체	신경학	카르바마제핀
HLA-B	HLA-B*5701 대립유전자 담체	감염성 질환	아바카비
HLA-B	HLA-B*1502 대립유전자 담체	신경학	카르바마제핀
HLA-B	HLA-B*1502 대립유전자 담체	신경학	페니토인
HPRT1	HGPRT 결여	이식	마이코페놀산
IFNL3	IL28B rs12979860 T 대립유전자 담체	감염성 질환	보세프리비르
IFNL3	IL28B rs12979860 T 대립유전자 담체	감염성 질환	페긴테페론 알파-2b
IFNL3	IL28B rs12979860 T 대립유전자 담체	감염성 질환	시메프리비르
IFNL3	IL28B rs12979860 T 대립유전자 담체	감염성 질환	소포스부비르
IFNL3	IL28B rs12979860 T 대립유전자 담체	감염성 질환	테라프레비르

[0261]

IL2RA	CD25 항원 양성	종양학	데니류킨 디프티톡스
키트	c-키트 D816V 돌연변이 음성	종양학	이마티닙
KRAS	KRAS 코돈 12 및 13 돌연변이 음성	종양학	세특시맙
KRAS	KRAS 코돈 12 및 13 돌연변이 음성	종양학	파니투무맙
LDLR	동종접합성 가족성 고콜레스테롤혈증	내분비내과학	아토르바스타틴
LDLR	동종접합성 가족성 고콜레스테롤혈증	내분비내과학	로미타피드
LDLR	동종접합성 가족성 고콜레스테롤혈증	내분비내과학	미포메르센
LDLR	동종접합성 가족성 고콜레스테롤혈증	내분비내과학	프라바스타틴
LDLR	동종접합성 가족성 고콜레스테롤혈증	내분비내과학	로수바스타티
MS4A1	CD20 양성	종양학	이브리투모맙 티옥세탄
MS4A1	CD20 양성	종양학	오비누투주맙
MS4A1	CD20 양성	종양학	오파투무맙
MS4A1	CD20 양성	종양학	리특시맙
MS4A1	CD20 항원 양성	종양학	토시투모맙

[0262]

NAGS	N-아세틸글루타메이트 신타제 결여	대사 장애	카르글루민 산
NAGS, CPS1, ASS1, OTC, ASL, ABL2	요소 주기 효소 결여	신경학	발프로산
NAT1-2	서행 아세틸화자	순환기내과학	이소소르바이드 및 하이드라라진
NAT1-2	서행 불활성화자	감염성 질환	리팜핀, 이소니아지드, 및 피라진아미드
PDGFRB	PDGFR 유전자 재배열 양성	종양학	이마티닙
Ph 염색체	Ph 염색체 음성	종양학	부술판
PML/RARA	PML/RAR $\alpha$ (t(15;17)) 유전자 발현 양성	종양학	삼산화비소
PML/RARA	PML/RAR $\alpha$ (t(15;17)) 유전자 발현 양성	종양학	트레티노인
POLG	POLG 돌연변이 양성	신경학	발프로산
PROC	단백질 C 결여	순환기내과학 또는 혈액학	와파린
SERPINC1	항트롬빈 III 결여	혈액학	엘트롬보패그
TNFRSF8	CD30 양성	종양학	브렌톡시맙 베도틴
TPMT	TPMT 중간체 또는 불량 대사자	류머티스학	아자티오프린
TPMT	TPMT 중간체 또는 불량 대사자	종양학	시스플라틴
TPMT	TPMT 중간체 또는 불량 대사자	종양학	머캅토프린
TPMT	TPMT 불량 대사자	종양학	티오구아닌
UGT1A1	UGT1A1*28 대립유전자 동형접합체	폐	인다가테를
UGT1A1	UGT1A1*28 대립유전자 담체	종양학	이리노테칸
UGT1A1	UGT1A1*28 대립유전자 동형접합체	종양학	닐로티닙
UGT1A1	(TA)7/(TA)7 유전자형 (UGT1A1*28/*28)	종양학	파조파닙
VKORC1	VKORC1 rs9923231 A 대립유전자 담체	순환기내과학 또는 혈액학	와파린

[0263]

[0264]

따라서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 이환 세포에서 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환에 대하여 대상체의 진단 방법으로서, 상기 대상체가 바이오마커 음성인, 방법을 제공하고;

[0265]

대상체로부터 획득된 생존 원발 이환 세포의 샘플의 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;

[0266]

(1) 교란제와 대상체로부터 획득된 생존 원발 이환 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 교란제 및 확인제와 샘플의 제2 부분의 접촉 단계 (여기서 상기 교란제는 선택적으로 질환-관련된 신호전달 경로에 영향을 미치고 확인제는 동일한 질환-관련된 신호전달 경로에 관한 교란제의 효과를 선택적으로 억제시킨다);

[0267]

샘플의 각 부분에서 생존 원발 이환 세포의 세포 접촉 또는 부착의 연속적 측정 단계; 및

[0268]

샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계;

[0269]

ErbB 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;

[0270]

여기서 상기 대상체는 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 이환 세포에서 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환에 대하여 진단된다.

[0271]

추가 구현예에서, 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지는 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 대체된다.

[0272]

또 다른 구현예에서, 본원에서 기재된 방법을 이용하는 비정상 신호전달 경로 활성으로 진단된 대상체는 대상체가 진단되는 비정상 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 요법으로 선택된다. 추가 구현예에서, 대상체는 본원에서 기재된 방법을 이용하여 선택된 요법이 투여된다.

[0273]

하나의 구현예에서, 질환은 하기이다: 암, 예컨대 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 위 암종, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양, 교모세포종, 간세포 암종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 췌장암, 전립선 암종, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성적 골수성 백혈병 (CML), 비-호지킨 림프종 및 갑상선 암종 또는 두경부암. 비정상 신호전달 경로와 관련된 질환의 다른 유형, 예컨대 자가면역 질환

및 감염성 질환은 또한 포함된다.

- [0274] 하나의 구현예에서, 질환은 암이고 따라서 이환 세포는 종양 세포의 샘플이다. 또 다른 구현예에서, 질환에 관여된 조직 유형으로부터 수득된 이환 환자의 건강한 세포는 대조군으로서 사용된다. 바람직한 구현예에서, 암은 유방암이다. 유방암 진단을 위한 하나의 구현예에서, 교란제는 PI3K 신호전달 경로, 예컨대 NRG1에 선택적으로 영향을 미친다. 또 다른 구현예에서, 교란제는 MAPK 신호전달 경로, 예컨대 상피 성장 인자를 선택적으로 영향을 미친다. 유방암 진단을 위한 하나의 구현예에서, 교란제는 ER $\alpha$  신호전달 경로, 예컨대 에스트라디올을 선택적으로 영향을 미친다. 유방암 진단을 위한 더욱 또 다른 구현예에서, 교란제는 ErbB 신호전달 경로, 예컨대 HER2 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미친다. ErbB 신호전달 경로에 선택적으로 영향을 미치는 제제는 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0275] 다양한 구현예에서, 신호전달 경로는 MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, MAK, MKK, 및 MEK로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 적합한 신호전달 경로는 본원에서 개시된 다른 신호전달 경로를 포함한다. 다양한 구현예에서, 교란제는, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 핵산, 대사물질, 리간드, 시약, 유기 분자, 신호전달 인자, 성장 인자, 생화학물질, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0276] 본원에서 추가로 기재된 바와 같이, 세포 접촉 또는 부착은 임피던스 바이오센서 또는 광학적 바이오센서를 이용하여 측정될 수 있다. 하나의 구현예에서, 세포 접촉 또는 부착에서의 변화는 유클리드 분석을 이용하여 평가된다. 예를 들어, 유클리드 분석은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: 다중 시점에서 차이의 산술적 합산, 일시적 최대치, 일시적 최소치, 최대치 또는 최소치를 달성하는 시간, 기울기의 변화, 바이오센서 신호에서의 절대적 저하, 전체 측정의 총계, 또는 이들의 조합. 또 다른 구현예에서, 세포 접촉 또는 부착에서의 변화는 일시적 최대치 또는 최소치에서의 변화에 의해 측정된다.
- [0277] 다양한 구현예에서, 생존 원발 이환 세포는 질환과 관련된 신호전달 경로를 표적하는 확인제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에서 확인제의 효과는 측정된다. 또 다른 구현예에서, 확인제는 에스트로겐 관련된 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 선택적 에스트로겐 수용체 하향 조절물질 (SERD), 또는 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질 (SERM)이다.
- [0278] 더욱 또 다른 구현예에서, 이환 세포는 질환과 관련된 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에서 표적화 치료제의 효과는 측정된다. 표적화 치료제의 비-제한 예는 하기를 포함한다: 세톡시맵, 도세탁셀, 에플로티닙, 게피티닙, 이리노테칸, 라파티닙, 파클리탁셀, 파조파닙, 토포테칸, 트라스투주맙, 폴베스트란트, 타목시펜, 레트로졸, 아나스트로졸, 엑세메스탄, 에버롤리무스, 아비라테론, 바이칼루타마이드, 보르테오미드, 베부라페닙, 이필리무맙 및 이들의 조합. 다른 적합한 표적화 치료제는 본원에서 개시된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 표적화 치료제의 투여를 포함한다.
- [0279] 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 호르몬 요법을 위하여 에스트로겐 수용체 알파 (ER $\alpha$ ) 음성 유방암을 가진 대상체의 선택 방법을 제공하고;
- [0280] 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0281] (1) 에스트로겐-관련 신호전달 경로를 상향조절 또는 하향조절한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 동일한 에스트로겐-관련 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 교란제 및 확인제와 샘플의 제2 부분의 접촉 단계;
- [0282] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 유방암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;
- [0283] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계; 및
- [0284] 에스트로겐 수용체 경로 활성에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0285] 여기서 대상체는 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 호르몬 요법으로 선택된다.
- [0286] 추가 구현예, 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지는 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지와 대체된다.
- [0287] ER $\alpha$  신호전달 경로에 영향을 미치는 적합한 교란제는 당해 기술에 공지되어 있고 에스트라디올과 같이 본원에서 개시된다. 또 다른 구현예에서, 생존 원발 암 세포는 에스트로겐 관련된 신호전달 경로 활성을 억제시키는 확인제, 예컨대 선택적 에스트로겐 수용체 하향 조절물질과 추가로 접촉된다. 또 다른 구현예에서, 종양 세포는

ER $\alpha$  신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에 관한 표적화 치료제의 효과는 측정된다. ER $\alpha$  신호전달 경로를 표적하는 적합한 표적화 치료제는 당해 기술에 공지되어 있고 폴베스트란트 및 타목시펜과 같이 본원에서 개시된다. 방법은 대상체에 표적화 치료제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

- [0288] 더욱 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 요법을 위하여 비-과발현, 비-증폭된 ErbB2 암을 가진 대상체의 선택 방법을 제공하고;
- [0289] 대상체로부터 수득된 생존 원발 암 세포의 샘플의 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0290] (1) 교란제와 대상체로부터 수득된 생존 원발 암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 교란제 및 확인제와 샘플의 제2 부분의 접촉 단계 (여기서 상기 교란제는 선택적으로 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치고 확인제는 선택적으로 동일한 ErbB 신호전달 경로상에서 교란제의 효과를 억제시킨다);
- [0291] 샘플의 각 부분에서 생존 원발 암 세포의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계;
- [0292] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계;
- [0293] ErbB 신호전달 경로 활성의 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0294] 여기서 대상체는 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택된다.
- [0295] 추가 구현예에서, 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지는 이들이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지로 대체된다.
- [0296] ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는 적합한 교란제는 당해 기술에 공지되어 있고 본원에서 개시된다. 하나의 구현예에서, 생존 원발 암 세포는 ErbB 관련된 신호전달 경로 신호전달을 억제시킨다고 공지된 확인제, 예컨대 2C4 마우스 단클론성 항체 또는 티로신 키나제 억제제와 접촉된다. 또 다른 구현예에서, 생존 원발 종양 세포는 ErbB 신호전달 경로를 표적하는 표적화 치료제와 추가로 접촉되고 세포 접촉 또는 부착에서 표적화 치료제의 효과는 측정된다. ErbB 신호전달 경로를 표적하는 적합한 표적화 치료제는 당해 기술에 공지되어 있고 본원에서 개시된다. 방법은 대상체에 표적화 치료제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.
- [0297] 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 라파티닙을 이용한 요법을 위하여 비-과발현, 비-증폭된 ErbB2 유방암을 가진 대상체의 선택 방법을 제공한다:
- [0298] 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제조 및 기본 배지에서 샘플의 배양 단계;
- [0299] 샘플이 교란제와 접촉되기 최소 12 시간 내지 최대 72 시간 이전에 신선한 기본 배지와 샘플을 배양시키기 위해 사용된 기본 배지의 대체 단계;
- [0300] (1) 교란제로서의 뉴레굴린과 대상체로부터 수득된 생존 원발 유방암 세포의 샘플의 제1 부분, 및 (2) 뉴레굴린 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 선택적으로 뉴레굴린과 동일한 ErbB 신호전달 경로를 억제시킨다)와 샘플의 제2 부분의 접촉; 및/또는 (3) 교란제로서 상피 성장 인자와 샘플의 제3 부분 및 (4) 상피 성장 인자 및 확인제 (여기서 상기 확인제는 선택적으로 상피 성장 인자와 동일한 ErbB 신호전달 경로를 억제시킨다)와 샘플의 제4 부분의 접촉 단계;
- [0301] 교란제와 접촉된 생존 원발 유방암 세포의 세포 접촉 또는 부착의 연속적 측정 단계;
- [0302] 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이 및/또는 샘플의 제3 부분과 샘플의 제4 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 계측 단계; 및
- [0303] ErbB 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계;
- [0304] (여기서 대상체는 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 라파티닙을 이용한 치료에 대해 선택된다).
- [0305] 대안적으로, 상기 설정된 동일한 방법은, ErbB 신호전달 경로에 영향을 미치는, 라파티닙 이외의, 다른 표적화 치료제로 적용될 수 있다. 아래 표 (표 4)는 ErbB 신호전달 경로 암을 치료하도록 의도된 경로, 약물 표적, 및 표적된 요법을 요약한다.

[0306] 표 4:

경로	약물 표적	약물
MAPK; PI3K/Akt	HER2	트라스투주맵 페투주맵
	HER3	MM-121 LJM716 U3-1287 (AMG 888) TK-A3/TK-A4 롬레투주맵 REGN1400 AV-203
	HER1 & HER2	라파티닙 네라티닙 아파티닙
	HER1 & HER3	두리고투주맵
	HER2 & HER3	MM-111
	HER1, HER2, HER3	다코미티닙 사피티닙 포지오티닙
	HER1, HER2, HER4	ASLAN001
MAPK	HER1 (동종이량체)	제피티닙 에를로티닙 세특시맵
		파니투무맵 REGN955 MM-151
	HER1 (T790m +)	AZD9291 로실레티닙

[0307]

[0308]

표적화 치료제를 이용한 치료를 위하여 대상체의 상기-기재된 선택 방법에 더하여, 본 발명은 또한 대상체에 표적화 치료제의 투여를 포함하는, 표적화 치료제를 이용한 대상체의 치료 방법을 포함하고, 여기서 상기 대상체는, 대상체로부터 생존 원발 세포의 샘플을 이용하여, 치료용 대상체의 상기-기재된 선택 방법 중 하나의 적용에 의해 표적화 치료제를 이용한 치료에 대해 선택되었다.

[0309]

**C. 치료제의 효능의 선택 또는 모니터링 방법**

[0310]

한 개인내 한 부위로부터 암이 유전자 구성, 단백질 발현 수준, 및 치료 중재에 대한 반응에서 또 다른 개인내 동일한 부위의 암과 완전히 상이할 수 있기 때문에 암 같은 질환은 부분적으로 이종성이다. 이환 조직은 유전자 발현 또는 유전자 변경에서 서로 상당히 다양할 수 있다. 예를 들어, 전이성 종양은 원발 종양과 상이할 수 있다. 인간 게놈 서열분석 및 다른 유전적 정량화 도구는 각 환자의 질환이 그 환자에 어느 정도 고유한지를 의사에서 정보제공하였다. 상기 정보는 개인맞춤형 의약에 맞춰 전체 사업을 낳았고, 여기에서 각 환자는 그의 질환에 대하여 맞춤형 치료 레지멘을 잠재적으로 받을 수 있다.

[0311]

일부 약물은 특이적 유전자-관련 질환 징후로 표적되고 있다. 상기 접근법은 현행 예후 도구세트의 유의미한 단점에 주로 기인하여 아직 광범위하게 이용되지 않는다. 본원에서 기재된 바와 같은 방법은 개인의 질환에 대해 효능을 보여주는 치료제의 선택 방법을 제공한다. 구현예에서, 치료제는 CREMS에서 이환 조직으로부터 단리된 무 표지 살아있는 전체의 세포에 접촉되고 세포의 생리적 파라미터에서 이의 변화 또는 부족은 치료제의 존재하에 검출된다. 치료제는 기준선 측정과 비교된 경우 질환 세포의 생리적 파라미터에서의 변화를 초래하는 대상체를 치료하기 위해 선택된다.

[0312]

개시내용의 하나의 측면은, 초기 진단에서 또는 대상체의 치료 전반에 걸쳐, 질환 또는 장애를 치료하기 위한 용도로 상업적으로 승인되는 약물을 포함한, 하나 이상의 치료제의 선택 방법을 포함한다. 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 치료제의 투여 단계; 치료제 또는 치료제들의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 치료제 또는 치료제들의 반응에서 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 계

측 단계 (여기서 세포성 반응 파라미터에서의 상기 변화는 제제 또는 제제들이 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는다는 것을 나타낸다). 특정 구현예에서, 단리된 질환 세포 샘플은 무 표지 전체의 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 단리된 질환 세포에서 세포성 반응 파라미터의 변화는 시간의 규정된 기간 동안 연속적으로 모니터링된다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 선택 단계 및 건강 관리 제공자에 선택된 제제의 제공 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 투여 단계를 포함한다.

[0313] 또 다른 구현예에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 개별 대상체에서 질환에 대하여 제제의 치료적 효능을 예측함으로써 개별 대상체용 치료의 선택 방법을 제공한다: 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)에서 개별 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 무 표지 질환 세포 샘플에 제제의 투여 단계 (여기서 상기 질환 세포 샘플은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 암 세포 샘플, 자가면역 질환을 가진 대상체로부터의 세포 샘플, 외래 제제로 감염된 조직으로부터의 세포 샘플 및 이들의 조합); 치료제의 존재 및/또는 부재하에 시간의 규정된 기간 동안 세포 샘플의 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터에서의 변화의 연속적 측정 단계; 및 제제에 대한 세포 샘플의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 기준선 측정과 비교된 경우 발생하는지의 예측 단계 (여기서 생리적 반응에서의 상기 변화는 제제가 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는다). 구현예에서, 질환 세포는 암 세포이다.

[0314] 다른 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 특정한 대상체에 대하여 치료제의 효능의 비교 방법을 제공한다: 세포의 적어도 하나의 생리적 파라미터를 측정하는 디바이스에서 동일한 대상체로부터 별개의 질환 세포 샘플에 적어도 2개의 상이한 치료제의 투여 단계; 기준선 측정에 비교된 각각의 치료제에 대한 각 세포 샘플의 생리적 반응의 예측 단계 (여기서 상기 생리적 반응은 각 치료제의 효능을 나타낸다). 특정 구현예에서, 단리된 질환 세포 샘플은 무 표지 전체의 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 단리된 질환 세포에서 세포성 반응 파라미터의 변화는 시간의 규정된 기간 동안 연속적으로 모니터링된다. 구현예에서, 방법은 추가로 더 나은 효능을 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 선택 단계; 및 건강 관리 제공자에 선택된 제제의 제공 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 더 나은 효능을 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 투여 단계를 포함한다.

[0315] 개시내용의 또 다른 측면은 종양 세포의 성장 속도의 예측 방법을 제공한다. 종양의 성장 속도를 측정함으로써, 치료는 종양 세포가 얼마나 빨리 성장할 수 있는지에 의존하여 선택될 수 있다. 종양 세포가 고속 성장 종양이면, 건강 관리 작업자는 저속 성장 종양에 대한 치료의 것과 비교된 경우 더욱 공격성 치료를 선택할 것이다. 특정 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템에서 단리된 종양 세포 샘플의 제공 단계, 정의된 기간에 걸쳐 연속적으로 종양 세포 샘플의 성장 속도의 모니터링 단계, 및 고속 성장 속도를 나타내는 그 종양 세포를 위하여 더욱 공격성 치료의 선택 단계 및/또는 건강 관리 제공자에 선택된 치료의 제공 단계. 다른 구현예에서, 단리된 질환 세포 샘플은 무 표지 전체의 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 선택된 치료의 투여 단계를 포함한다. 구현예에서, 고속 성장 종양은 약 100 시간 미만, 바람직하게는 20 시간 미만의 세포 배가 속도를 갖고, 반면에 저속 성장 종양은 100 시간 이상인 세포 배가 속도를 갖고, 여기에서 세포 배가 속도는 하나의 세포가 2개 세포로 분할하기 위한 시간이다.

[0316] 또 다른 측면에서, 본 발명은 특정한 경로가 개별 대상체로부터 생존 원발 질환 세포 샘플에서 비정상인지, 및/또는 특정한 경로가 질환 세포 샘플에서 경로의 기능 이상을 확인하기 위해 확인제에 감수성인지의 예측 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 개인의 질환 세포 샘플에서 기능한 세포성 경로의 프로파일은 치료가 계속함에 따라 경시적으로 수득 및 모니터링될 수 있다. 특정 구현예에서, 방법은 하기 단계를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 생존 원발 질환 세포 샘플에 하나 이상의 교란제 및/또는 확인제를 투여함으로써 비정상 경로 기능의 존재로 질환 세포 샘플의 특성화 단계; 교란제 및/또는 확인제의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 교란제 및/또는 확인제에 대한 반응에서 생존 원발 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 단계 (여기서 세포성 반응 파라미터에서의 상기 변화는 교란제에 의해 활성화된 또는 확인제에 의해 억제된 세포성 경로가 개별 대상체로부터 단리된 생존 원발 질환 세포 샘플에서 비정상인 것을 나타낼 수 있다). 특정 구현예에서, 교란제는 하기를 포함한다: 성장 인자, 그 다음 세포성 경로를 활성화시키는 수용체 및 세포 표면 단백질 예컨대 헤레굴린에 결합하는 단백질 또는 다른 리간드, 질환 세포 샘플에서 경로를 활성화시키는 세포 표면 수용체를 갖는 형질전환된 세포를 포함한 세포, 또는 작은 유기 분자 (10,000 달톤 이하), 펩타이드, 원하는 방식으로 세포성 생리적 기능을 세포내로 교란시키는 핵산 (예를 들면 간섭하는 RNA). 다른 구현예에서, 확인제는 비-제한 목록으로부터 성장 인자 수용체

예컨대 EGFR, Her2, PDGFR, TGFR, FGFR, TNFR, HGF, FGF, IGF, TNF  $\alpha$ , TGF  $\beta$ , 또는 VEGF 수용체, 토포이소머라제 활성화, 키나제, G-단백질 커플링된 수용체, 수용체 티로신 키나제, 미세소관 중합, 세포골격 조직화, 세포 기능 및 세포 접착을 억제시키는 것을 포함한다.

- [0317] 예를 들어, 하나의 구현예에서, 세포성 경로를 작용화 또는 길항화한다고 공지된 교란제 (예를 들면, 활성화제 제제)와 대상체로부터 획득된 이환 세포 샘플의 접촉, 샘플에서 생존 원발 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정, 및 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 생존 원발 이환 세포 샘플내 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양의 연속적 측정에 의해, 개별 대상체로부터 획득된 이환 세포에서 세포성 경로의 기능성 상태의 예측 방법이 제공되고, 여기서, 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양은 교란제에 의해 표적된 세포성 경로가 개별 대상체에서 비정상인 것을 나타낸다.
- [0318] 개별 대상체에서 세포성 경로의 상태의 지식은, 하나의 구현예에서, 신호전달 경로 유도된 질환의 존재를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 추가 구현예에서, 본원에서 기재된 방법으로 진단된 대상체는 신호전달 경로 질환을 표적하는 치료제에 반응성인 것으로 예상된다. 예를 들어, 대상체로부터 이환 세포가, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 분석에 의해 예측된 바와 같이, 교란제 (예를 들면, 활성화제 제제)에 비정상적으로 반응성이면, 대상체는 교란제와 동일한 세포성 경로에 표적화 치료제에 유사하게 반응성일 것이다. 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플의 생존 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 발생하면 대상체로부터 이환 세포는 교란제에 비정상적으로 반응성이다.
- [0319] 또 다른 예에서, 대상체로부터 이환 세포가, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 분석에 의해 예측된 바와 같이, 교란제 (예를 들면, 활성화제 제제)에 비정상적으로 반응성이 없으면, 대상체는 교란제와 동일한 세포성 경로에 표적화 치료제의 투여의 도움을 받는데 유사하게 실패할 것이다. 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플의 생존 세포내 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서의 변화가 적합한 대조군 미만이면 대상체로부터 이환 세포는 교란제에 정상적으로 반응성이다.
- [0320] 따라서, 또 다른 측면에서, 세포성 경로를 작용화 또는 길항화한다고 공지된 교란제와 대상체로부터 획득된 이환 세포 샘플의 접촉 단계, 샘플내 생존 세포에서 하나 이상의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정 단계, 및 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 이환 세포 샘플에서 발생하는 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 예측 단계에 의해, 개별 대상체에 대하여 표적화 치료제의 선택 방법이 제공되고, 여기서 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양은 대상체가 세포성 경로를 표적하는 표적화 치료제에 반응성일 것을 나타낸다.
- [0321] 특정 구현예에서, 대상체로부터 획득된 세포 샘플의 제1 부분은 교란제와 접촉되고 세포 샘플의 제2 부분은 교란제 및 확인제와 접촉된다. 방법은 그 다음 추가로 샘플의 각각의 부분에서 생리적 반응 파라미터 (예를 들면, 세포 접착 또는 부착)의 연속적 측정 단계, 그 다음 샘플의 제1 부분과 샘플의 제2 부분 간 값의 차이를 확인하기 위해 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정량의 예측 단계; 그 다음 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값과 측정량의 비교 단계를 포함한다. 표적화 치료제는 측정량이 컷-오프 값 초과인 경우 선택된다.
- [0322] 특정 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 (즉, 대상체가 제제에 반응성인 것으로 예측되면) 표적화 치료제의 투여를 포함한다.
- [0323] 다른 구현예에서, 방법은 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 활성화제 제제의 투여 단계; 교란제의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 정의된 기간에 걸쳐 교란제와 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 단계, 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 확인제의 투여 단계 및 교란제의 투여 이후 또는 이후 세포성 반응 파라미터에 비교된 경우 정의된 기간에 걸쳐 확인제와 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 단계를 포함하고, 여기서 적합한 대조군에 비하여 세포성 반응 파라미터에서 변화의 상기 양은 교란제에 의해 활성화된 및 확인제에 의해 억제된 세포성 경로가 개별 대상체로부터 단리된 질환 세포 샘플에서 비정상적으로 기능하고 있다는 것을 나타낸다.
- [0324] 추가의 구현예는 치료, 임상시험, 및/또는 후보자 치료제에 대한 환자의 반응성 평가용 대상체의 선택 방법을 포함한다. 구현예에서, 대상체는 후보자 치료제에 아마도 반응하는 그 환자만을 선택하기 위해 그 후보자 치료제의 임상시험에 앞서 선택되고; 상기 접근법은, 특히 그 질환으로 진단되는 전체 집단의 부분에 대하여 유효한

결과를 제공할 수 있을 뿐인 치료제로, 후보자 치료제가 조절 승인을 보증하기에 충분한 선택된 환자 집단 내에서 효능을 입증할 수 있다는 가능성을 증가시킬 것이다. 상기 접근법으로 미승인된 치료제의 임상시험으로 고려된 환자는 미승인된 약물에 대한 그의 반응성을 예측하기 위해 비정상 신호전달 경로 활성의 존재를 계속하도록 평가된 그의 이환 세포를 가질 것이다. 비정상 신호전달 경로 활성의 존재를 입증하는 것만이 실험에 선택될 것이다. 다른 구현예에서, 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 치료제의 투여 단계; 치료제 또는 치료제들의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정에 비교된 경우 치료제 또는 치료제들에 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 측정 단계를 포함하는 방법에 의해 대상체의 세포의 샘플이 반응군으로서 확인된 경우 대상체는 치료에 선택되고, 여기서 세포성 반응 파라미터에서 상기 변화는 제제 또는 제제들이 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는 것을 나타낸다. 특정 구현예에서, 방법은 추가로 세포가 치료용 또는 임상시험용 치료제 또는 치료제들에 반응으로 세포성 반응 파라미터에서 변화를 나타내는 대상체의 선택 단계를 포함한다.

[0325] 추가 측면에서, 본 발명은 치료제에 반응성 또는 비-반응성을 입증하는 대상체로부터 질환 샘플의 바이오마커의 확인 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 방법은 세포성 반응 측정 시스템에서 치료제와 대상체로부터 단리된 질환 세포 샘플의 접촉 단계; 치료제 또는 치료제들의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 치료제 또는 치료제들과 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 측정 단계를 포함하고, 여기서 세포성 반응 파라미터에서 상기 변화는 제제 또는 제제들이 개별 대상체 (반응군)에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는 것을 나타내고 변화의 부족은 치료제가 그 대상체의 질환 (비반응군)에 대하여 효능을 갖지 않는 것을 나타낸다. 구현예에서, 방법은 추가로 다른 바이오마커용 치료제에 반응성인 대상체로부터 세포의 추가 특성화 단계 및/또는 다른 바이오마커용 치료제에 반응성이 아닌 대상체로부터 세포의 추가 특성화 단계를 포함한다. 바이오마커는 하기를 포함한다: 유전자 돌연변이, 단일 뉴클레오타이드 다형성, 유전자 발현 수준, 단백질, 단백질 돌연변이, 번역후 단백질 변형, 스플라이스 변이체, 세포 표면 마커, 단백질 또는 핵산의 과발현, 핵산의 증폭 (비-제한 예는 mRNA, miRNA 또는 다른 RNA를 포함한다), 세포 형태학, 및 이들의 조합.

[0326] 표적화 치료제의 효능은 표적된 요법이 영향받도록 의도되는 (예를 들면 비정상 신호전달 경로 활성) 질환을 환자가 갖는지의 여부, 그의 표적에 결합하는지의 여부 및 비정상 신호전달 활성에서 우연한 변화를 일으키는지 여부에 좌우된다. 본원에서 기재된 방법은 세포 샘플에서 제제(들)에 생리적 반응을 측정함으로써 제제가 효과에 의도되는 경로상에서 교란제, 및/또는 확인제, 및/또는 치료제가 갖는 효과를 측정한다. 게놈 및 단백질 도구는 치료제 및/또는 교란제 (예를 들면, 활성화제)에 의해 영향받는 세포 경로 성분에서 변경을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서, 교란제, 및/또는 확인제, 및/또는 치료제와 대상체로부터 수득된 단리된, 무 표지 세포성 샘플의 접촉 단계, 샘플내 생존 세포에서 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터의 연속적 측정에 의한 제제의 효과의 모니터링 단계, 생리적 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 연속적 측정의 수학적 분석에 의한 측정 단계, 그렇게 함으로써 제제(들)에 대한 샘플의 감수성의 특성화 단계, 샘플상에서 교란제의 활성의 중단 단계, 및 세포 경로의 성분이 세포성 샘플에서 제제(들)에 의해 변경되는지를 측정하기 위해, 프로테오믹스, qPCR, 유전체학, RNA 정량화, 탠덤 액체 크로마토그래피-질량 분광법, 및 대사체학으로부터 선택된 방법을 이용하여 제제(들)에 의해 표적된 세포 경로의 성분 또는 바이오마커의 분석 단계에 의해, 개별 대상체에서 교란제, 및/또는 확인제, 및/또는 치료제에 의해 영향받는 세포 경로 성분의 확인 방법이 제공된다. 상기 방법은, 예를 들어, 환자 세포에서 경로의 교란시 세포 경로 성분이 발현 또는 활성화 (예를 들면, 인산화)를 변화시키는 것을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0327] 이들 방법은 또한 동일한 개별 대상체로부터 상이한 조직에서 2개 세포 샘플의 경로 활성을 비교하기 위해 사용될 수 있다.

[0328] 특정 구현예에서, 교란제는 약물, 교란제의 조합, 경로의 활성화제 및 억제제를 포함하는 교란제의 조합, 경로의 상이한 구성원의 작용제 및 길항제를 포함하는 교란제의 조합, 또는 치료제를 포함하는 교란제의 조합일 수 있다.

[0329] 이들 방법은 또한 약물 후보자인 소분자 또는 항체가 이들이 표적하는 경로에서 효과를 갖는지를 평가함으로써 약물 발견 공정을 향상시키기 위해 사용될 수 있다.

[0330] 더욱 다른 구현예에서, 본 발명은 세포의 적어도 하나의 생리적 파라미터를 측정하는 디바이스에서 동일한 대상체로부터 질환 세포 샘플을 분리시키기 위해 복수의 치료제 조합의 투여 단계 (여기서 각 치료제 조합은 동일한 대상체로부터 질환 세포 샘플을 분리시키기 위해 투여된다); 및 기준선 측정과 비교된 각 치료제 조합에 대한

각 세포 샘플의 생리적 반응의 예측 단계 (여기서 상기 생리적 반응은 포텐셜 치료제 조합의 가장 유효한 치료제 조합을 나타낸다)에 의해 특정한 대상체용 약물의 조합 또는 최적의 치료적 체제의 예측 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 방법은 추가로 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 선택 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제 또는 치료제의 조합의 투여 단계를 포함한다.

[0331] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 단계에 의해 질환에 대하여 환자의 치료를 포함하는 방법을 제공한다: 세포성 반응 측정 시스템에서 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 하나 이상의 치료제의 투여를 포함하는 질환 치료용 치료제의 선택 단계; 치료제 또는 치료제들의 투여 이전 세포성 반응 파라미터의 기준선 측정과 비교된 경우 치료제 또는 치료제들과 반응으로 질환 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 단계, 세포성 반응 파라미터에서 변화를 야기하는 치료제의 선택 단계; 대상체에 적어도 하나의 세포성 반응 또는 생리적 파라미터의 변화를 초래하는 치료제의 투여 단계. 치료제는 특이적 생물학적 경로에 표적되는 것, 세포 증식을 억제시키는 것, 세포 사멸을 향상시키는 것, 염증을 억제시키는 것, 미생물을 사멸시키는 것 및/또는 면역 반응을 향상시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 치료제가 특이적 생물학적 경로에 표적되는 경우, 세포 표면 수용체와 상호작용할 수 있고 수용체용 리간드의 작용을 억제시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 구현예에서 생리적 반응 파라미터 또는 바이오마커는 환자 살아있는 세포 또는 조직 샘플로부터 상청액 분획을 시험함으로써 측정된다. 예를 들어, 일부 유방암 세포는 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)에 대하여 양성이고 상피 성장 인자 (EGF)에 반응한다. 개별 대상체의 세포용 EGF의 상호작용을 억제시키는 치료제의 효능은 리간드의 존재 및 부재하에 예측될 수 있다.

[0332] 다른 구현예에서, 치료제는 세포 증식 및/또는 세포 사멸을 억제시킨다. 이 경우에, 세포성 반응 또는 생리적 파라미터에서 변화의 속도는 샘플상에서 측정될 수 있고 세포 사멸의 유발 또는 세포 증식의 억제를 위하여 치료제의 효능을 나타낸다. 구현예에서, 세포성 반응의 변화의 속도는 증식을 향상시키고/향상시키거나 세포 사멸을 억제시키는 공지된 제제 및 치료제의 존재 및/또는 부재하에 예측된다.

[0333] 본 발명의 다른 측면에서, 키트가 제공된다. 하나의 구현예에서, 키트는 하기를 포함한다: 수송 배지를 함유한 개별 대상체로부터 질환 세포 샘플용 용기; 수송 배지를 함유한 대조군 세포 샘플용 용기; 바이오센서; 및 바이오센서로부터 출력까지 데이터 전송 (여기서 상기 출력은 정의된 기간에 걸쳐 세포성 생리적 반응 파라미터에서 변화를 보여주고, 여기서 상기 세포성 생리적 반응 파라미터는 pH, 세포 접착, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다); 무 반응, 약 반응성, 및 반응성으로서 출력의 분류; 및 분류를 이용한 리포트의 발생용 컴퓨터 실행가능 지침을 갖는 비 일시적 컴퓨터 판독가능한 배지.

[0334] **D. 세포 샘플**

[0335] 본 발명의 구현예는 치료제의 유효성을 예측하기 위한, 유효성을 모니터링하기 위한, 또는 대상체의 이환 세포에 투여된 경우 치료제의 용량을 확인하기 위한 시스템, 키트, 및 방법을 포함한다.

[0336] 전통적으로, 질환은 질환이 영향을 미치는 조직 또는 장기에 의해 분류되었다. 기저 기전 (예를 들면, 유전적, 자가면역 반응, 등)의 더 나은 지식 때문에, 동일한 조직/장기에 영향을 미치는, 또는 동일한 증상을 생산하는 질환이 상이한 원인론을 가질 수 있고 이종 유전자 발현 프로파일을 가질 수 있음이 이제 이해된다. 또한, 치료제에 반응군 및 비-반응군이 있는 많은 질환에서 나타났다. 구현예에서, 반응군 및 비-반응군이 확인된 경우, 임의의 질환 유형은 약물의 특정한 치료적 약물 조합이 특정한 개인에 유효할지를 예측 또는 예지하기 위해 본원에서 방법, 예를 들면 개인이 반응군 또는 비-반응군인지의 예측에서 이용될 수 있다.

[0337] 자연에서 이종이라고 공지된 그리고 반응군 및 많은 비-반응군을 갖는다고 공지된 질환 유형의 한 예는 암이다. 암은 조직 유형에 따라 전형적으로 분류된다. 그러나, 암의 이종성의 더욱 정확한 설명은 상이한 암의 상이한 돌연변이에서 반영된다. 암의 이종성의 더욱더 정확한 설명은 특정한 환자의 세포에서 돌연변이의 실제 기능성, 생리적 결과이다. 예를 들어, 유방암은 상기 장기의 암을 유발시키는 상이한 유형 및 상이한 돌연변이를 갖는다. 결과 및 치료는 암을 유발하는 돌연변이가 기능의 이득 (예를 들면, 단백질 생산 증가를 유발한 원종양 유전자) 또는 기능 돌연변이의 손실 (예를 들면, 종양 억제제) 및 그 유전자인지에 기반하여 상이할 수 있다. 특정한 암의 이종성 때문에, 특정한 치료제에 이종 반응이 있을 것이 예상될 것이다. 본 발명의 구현예는 대상체에 대하여 치료를 선택하기 위해 특정한 대상체의 암을 위한 특이적 치료제 또는 가장 유효한 치료제의 효능을 예측하기 위해 치료제 또는 치료제의 패널에 특정한 대상체의 암 세포의 시험을 허용한다.

- [0338] 본 발명의 구현에는 개별 대상체로부터 암 세포의 질환 세포 샘플을 포함한다. 그와 같은 암 세포는, 비제한적으로, 하기로부터 유도될 수 있다: 급성 림프아구성 백혈병 (ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 부신피질 암종, 항문암, 충수암, 별아교세포종, 기저 세포 암종, 간의 담관암, 방광암, 골암, 골육종, 악성 섬유질 조직구종, 뇌줄기 신경아교종, 중심 신경 시스템 비정형 기형/형근균양 종양, 중심 신경 시스템 배아 종양, 중심 신경 시스템 세균 세포 종양, 두개인두종, 상의모세포종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 수질상피종, 유방암, 중간체 분화의 송과체 실질 종양, 천막상 원시 신경외배엽성 종양, 송과체아세포종, 기관지 종양, 카르시노이드 종양, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 골수증식성 장애, 결장암, 대장암, 피부 T-세포 림프종, 유관상피내암 (DCIS), 자궁내막암, 식도암, 비강신경교세포종, 유잉 육종, 고환외 세균 세포 종양, 안구내 흑색종, 망막모세포종, 섬유질 조직구종, 담낭암, 위암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 기질 종양 (GIST), 임신성 용모성 종양, 신경아교종, 모발 세포 백혈병, 심장암, 간세포암, 랑게르한스 세포 조직구종, 호지킨 림프종, 하인두암, 소도 세포 종양, 카포시 육종, 신장 세포 암, 후두암, 구순암, 간암, 소엽상피내암 (LCIS), 폐암, 메르켈 세포 암종, 흑색종, 중피종, 구강암, 다발성 골수종, 비강 및 부비동 암, 비인두암, 신경교세포종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 구강 암, 구강인두암, 난소암, 췌장암, 유두종증, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체 실질, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 전립선암, 직장암, 형근근육종, 타액샘 암, 편평상피 세포 암종, 소장암, 고환암, 목암, 갑상선암, 요관암, 요도암, 자궁암, 질암, 외음부암, 및 빌름스 종양.
- [0339] 자가면역 질환은 자기 항원에 대해 면역 시스템 활성화로 인한 증가된 염증에 의해 특성화된다. 현행 요법은 면역 시스템 세포 예컨대 B 세포 및 염증성 분자 예컨대 항 TNF  $\alpha$ 를 표적한다. 요법은 면역조절제 또는 면역억제제로서 광범위하게 특성화될 수 있다. 약물은 특정한 분자 예컨대 TNF 알파, 인테그린, 스펅고신 수용체, 및 인터류킨에 표적화될 수 있다. 다른 약물은 항-염증제 예컨대 코르티코스테로이드로서 작용한다. 더욱 다른 사례에서, 약물은 면역억제제 예컨대 머캅토피린 및 사이클로포스파마이드이다. 자가면역 조건에 대하여, 말초 혈액 세포는 특정 치료제에 대한 반응으로 검사될 수 있다. 다른 구현예에서, 염증의 부위의 조직 샘플, 예를 들어, 류마티스성 관절염에서의 활막 조직 또는 궤양성 대장염용 결장 조직.
- [0340] 예를 들어, 류마티스성 관절염을 가진 일부 환자는 항-TNF  $\alpha$  항체에 비-반응군이라고 공지된다. 하나의 구현예에서, 말초 혈액 세포는 RA를 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 취득될 수 있고 환자의 TNF 수용체의 세포 신호 전달 능력 및 관련된 MAPK 경로에서의 감소는 환자가 면역조절 또는 면역억제 화합물에 반응군 또는 비-반응군이 될 것 같은지를 예측하기 위해 사용될 수 있다. 마찬가지로 다른 치료제 예컨대 IL-6, 인터페론 알파, 인터페론 감마, 등등을 표적하는 것은 동일한 방식으로 시험될 수 있다. 다른 구현예에서, 다발성 경화증을 갖는 환자가 인터페론 베타에 비반응군인 것이 공지된다. 대상체로부터 세포 샘플은 세포성 생리적 파라미터에서 변화를 유도함으로써 특정한 대상체에 임의의 약물이 유효한지를 보기 위해 약물의 패널에 대해 시험될 수 있다. 유리한 결과의 예는 미국 류머티스학회 (ACR) 기준에 의해 예측된 바와 같이 세포성 염증 파라미터에서의 감소 또는 혈액-뇌 장벽 기능의 강화를 위하여 세포 접착의 증가일 것이다.
- [0341] 다른 구현예에서, 환자는 미생물, 이물질, 또는 외래 체제에 의한 세포의 감염에 의해 야기된 질환을 가질 수 있다. 미생물로 감염된 혈액 세포 또는 조직 샘플은 다양한 항생제, 항바이러스제, 또는 다른 치료적 후보자에 대한 반응성으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 기능을 감소시키는 C형 간염 감염에 대하여 수많은 상이한 치료제가 있고, 감염된 조직 샘플은 하나 이상의 치료제로 접촉될 수 있고 세포성 생리적 파라미터에서의 변화는 검출된다. 감염된 조직의 세포성 생리적 파라미터에서 변화를 제공하는 치료제, 및/또는 최저 용량으로 세포성 생리적 파라미터에서 변화를 제공하는 치료제는 선택된다. 결과 예컨대 세포 생존에서의 증가 또는 세포 성장에서의 증가는 유리한 것으로 고려될 것이다. 특이적 수용체 유형을 통해 바이러스 진입의 차단 또는 세포성 경로의 교란 차단처럼 직접적으로 인간 세포를 초래하도록 치료제가 설계되는 다른 구현예에서, 환자 세포는 본원에서 다른 구현예에 기재된 바와 같이 상기 치료제에 의한 경로 교란 또는 수용체 결합에 대하여 시험될 수 있다.
- [0342] 구현예에서, 세포 샘플은 요법이 개시되기 이전, 요법 동안, 요법 이후, 차도 동안, 및 재발시 취득될 수 있다. 본원에서 기재된 바와 같은 방법은 치료에 앞서, 치료 동안, 환자가 저항성을 발전시키는 경우, 및 재발시 치료적 효능을 예측하는데 유용하다. 개시내용의 방법은 치료제 또는 체제의 조합에 반응군 또는 비-반응군을 예측하는 것으로 또한 유용하다.
- [0343] 특정 구현예에서, 세포는 임의의 종류의 고정제와 접촉되지 않거나 또는 상기로 처리되지 않거나, 또는 파라핀 또는 다른 물질, 또는 임의의 검출가능한 표지에 포매된다. 다른 구현예에서, 바람직하게는, 세포는 전체의, 생존 및/또는 무 표지로 남아있다. 따라서, 생존 원발 세포는 세포 샘플로서 사용될 수 있다. 일부 다른 구현예에

서, 세포 샘플은 모든 이환 조직 및 건강한 조직에 제공된다. 일부 구현예에서, 세포 샘플은 모든 생존 및 고정된 형태로 제공된다. 고정된 형태로 제공된 세포 샘플은 추가의 바이오마커의 특히 개선된 확인 및 상관관계에 대하여 본원에서 기재된 바와 같은 방법에 따라 분석되는 생존 세포와 비교를 위하여 대조군으로서 작용할 수 있다.

[0344] 본 발명의 다른 구현예에서, 개별 대상체로부터 세포는 치료적 유효성을 측정하기 위해 사용된다. 세포는 공지된 방법 (즉, 면봉, 생검, 등)에 의해 수집 및 단리될 수 있다. 모든 이환 및 비-이환 세포는 사용될 수 있다. 비-이환 세포는 음성 대조군, 기준선 측정, 경시적으로 측정용 비교, 등으로서 사용될 수 있다. 구현예에서, 동일한 대상체로부터 조직 세포의 대조군 샘플이 또한 획득될 수 있다. 이환 조직 샘플 또는 더 바람직하게는 건강한 조직이 질환 없이 개인으로부터 얻어짐에 따라 대조군 샘플은 대상체내 또 다른 건강한 조직 또는 동일한 장기에서 건강한 조직으로부터 얻을 수 있다. 이환 세포는 활성 질환을 가진 조직으로부터 추출된 세포이다. 하나의 구현예에서, 이환 세포는 종양 세포, 예컨대 유방암 세포일 수 있다. 암성 세포는 필연적으로 종양으로부터 추출되지 않아야 한다. 예를 들어, 백혈병성 세포는 백혈병을 가진 환자의 혈액으로부터 수집될 수 있다. 세포는 상이한 조직 부위 예컨대 전이의 부위, 순환 종양 세포, 원발 종양 부위, 및 반복되는 종양 부위, 및 서로 비교된 세포성 반응성으로부터 수집될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이환 세포는 자가면역 질환, 예컨대 류마티스성 관절염의 부위로부터 추출될 수 있다. 특정 구현예에서, 각 조직 샘플내 세포의 수는 바람직하게는 적어도 약 5000 세포이다. 다른 구현예에서, 조직 샘플내 세포 수는 약 5000 내지 1 백만 세포 이상 범위일 수 있다. 세포 샘플은, 비제한적으로, 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 정액, 정액 유체, 정액 장액, 전립선 유체, 사정전 유체 (쿠퍼액), 배설물, 눈물, 타액, 땀, 생검, 복수, 뇌척수액, 림프, 골수, 또는 모발로부터 단리물을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 세포 샘플은 환자 혈청, 이의 분획, 오가노이드, 섬유아세포, 기질 세포, 간엽 세포, 상피 세포, 백색 혈액 세포, 적색 혈액 세포, B 세포, T 세포, 면역 세포, 줄기 세포, 또는 이들의 조합을 함유할 수 있거나 또는 상기로부터 유도될 수 있다.

[0345] 하나의 구현예에서, 대상체로부터 세포의 추출은 CReMS (예를 들면, 실험실, 병원)과 동일한 위치이다. 이와 같이, 세포는 바이오센서에 대상체로부터 시간을 가교시키기 위해 공지된 수송 배지에서 현탁 또는 보존될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 대상체로부터 세포의 추출은 CReMS로부터 상이한 위치이다. 일단 획득되면 세포 샘플은 세포 생존력을 보유하는 배지에서 유지된다. 분석의 부위에 수송용 시간의 길이에 의존하여, 상이한 배지는 이용될 수 있다. 구현예에서, 조직 샘플의 수송이 최대 10 시간 필요할 수 있는 경우, 배지는 400 mosm/L 미만의 오스몰농도를 갖고 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, 글루코오스, 글루타민, 히스티딘, 만니톨, 및 트립토판, 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하고, 필수 아미노산을 함유하고 그리고 추가로, 인간 원발 세포의 증식 및 플레이팅 효율을 지지하기 위해, 비-필수 아미노산, 비타민, 다른 유기 화합물, 미량 미네랄 및 무기 염, 혈청, 세포 추출물, 또는 성장 인자, 인슐린, 트랜스페린, 나트륨 셀레나이트, 하이드로코르티손, 에탄올아민, 포스포포릴 에탄올로아민, 트리아이오도티로닌, 나트륨 피루베이트, L-글루타민을 함유할 수 있다. 그와 같은 배지의 예는 원발 세포 치유의 실시를 위하여 셀시오 배지, 로즈웰 파크 메모리얼 연구소 배지 (RPMI), 항크스 버퍼링된 염수, 및 McCoy's 5A, 이글스 필수 최소 배지 (EMEM), 돌베코 변형된 이글스 배지 (DMEM), Leibovitz L-15, 또는 이들의 변형을 포함한다. 구현예에서, 배지 및 용기는 무 내독소, 비발열성 및 DNase- 및 RNase-프리이다.

[0346] 다른 구현예에서, 개별 대상체의 조직 시료로부터 획득된 이환 세포는 조직 시료의 다짐 및 효소 소화, 세포 유형에 의한 추출된 세포의 분리, 및/또는 추출된 세포의 배양을 포함하는 단계를 이용하여 추출된다. 배양 시약은 다양한 보충물, 예를 들어, 환자 혈청 또는 환자 유도된 인자를 포함할 수 있다.

[0347] 추가 측면은, 이후에 개별 대상체에서 치료제의 효능을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 조직 시료로부터 오가노이드의 추출 방법을 포함한다. 그와 같은 방법은 다짐 및 효소 소화 단계를 포함한다. 추가 측면은, 이후에 개별 대상체에서 치료제의 효능을 측정하기 위해 사용될 수 있는, 조직 시료로부터 오가노이드의 배양 방법을 포함한다. 그와 같은 방법은 다짐, 효소 소화, 세포 유형에 의한 분리, 및 배양 단계를 포함한다. 추가 측면은 본원에서 기재된 방법을 수행하기 위해 상당히 분리된 세포의 특이적 재조합을 포함할 수 있다.

[0348] 특정 구현예에서, 대상체로부터 생존 세포의 샘플에서 신호전달 경로 활성의 평가에 앞서, 세포는 평가되는 신호전달 경로 (즉, 대상체의 세포에서 유효성에 대하여 평가되는 표적화 치료제에 의해 다루어진 신호전달 경로)를 교란시킬 수 있는 임의의 제제 및 혈청이 없는 배지에서 먼저 배양되어 이로써 세포는 생리적 상태 및 경로 교란에 관해 동조화된다. 특정 구현예에서, 세포 샘플은 혈청 및 성장 인자가 없는 배지에서 배양된다. 다른 구현예에서, 세포는 인간 원발 세포의 증식 및 플레이팅 효율을 지지하기 위해 기능성 세포성 사이클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP), 기능성 갑상선 수용체 및/또는 기능성 G-단백질-커플링된 수용체 (또는 상기 언급된

특성의 2개 또는 3개의 임의의 조합)을 유지하는 배지에서 배양된다.

[0349] **E. 세포성 반응 측정 시스템 ("CReMS")**

[0350] 본 발명의 시스템 및 방법은 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)을 이용한다. CReMS는 세포내, 세포내 및 사이, 및 세포와 기기장치 디바이스 사이 생리적 파라미터에서 변화를 정량적으로 측정할 수 있는 디바이스를 지칭한다. 생리적 파라미터에서 변화는 (비-제한 예 예컨대 세포외 기질, 세포 신호전달 분자, 또는 세포 증식, 조직, 세포, 대사물질, 이화대사물, 생체분자, 이온, 산소, 이산화탄소, 탄수화물, 단백질 등을 포함한) 분석물에서 변화를 측정함으로써 측정된다. 구현예에서, 바이오센서는 단리된 전체의 무 표지 생존 세포내 생리적 파라미터에서 변화의 측정이다. 구현예에서, 치료제 및/또는 활성제 제제의 유형 때문에 예상된 변화를 측정할 수 있는 바이오센서가 선택된다.

[0351] CReMS의 예는 바이오센서이다. 바이오센서의 예는 전기화학적 바이오센서, 전기적 바이오센서, 광학적 바이오센서, 질량 감수성 바이오센서, 열적 바이오센서, 및 ISFET 바이오센서이다. 전기화학적 바이오센서는 전위차, 전류 측정 및/또는 전압전류 특성을 측정한다. 전기적 바이오센서는 표면 전도도, 임피던스, 저항성 또는 전해질 전도도를 측정한다. 광학적 바이오센서는 형광, 흡수, 투과율, 밀도, 굴절률, 및 반사를 측정한다. 질량 감수성 바이오센서는 압전계측의 공명 주파수를 측정한다. 열적 바이오센서는 반응 및 흡착의 열을 측정한다. ISFET 바이오센서는 이온, 요소, 및 산소같은 단순 분자, 이산화탄소, 글루코오스, 및 생활과학에서 당해 다른 대사물질을 측정한다. 구현예에서, 바이오센서는 임피던스 디바이스, 광자 계측 디바이스, 광학적 도파관 디바이스, 표면 플라즈몬 공명 디바이스, 석영 계측 공명체/미량천칭, 및 미세 캔틸레버 디바이스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 광학적 바이오센서는 생세포, 병원체, 또는 이들의 조합에서 분자 인식 또는 분자 교란 사례 전환용 광학적 변환기를 포함할 수 있다. 특이적 구현예에서, 디바이스는 임피던스 디바이스이다.

[0352] 단백질 또는 다른 시험관내 생체분자 상호작용을 측정하기 위해 사용된 바이오센서의 예에서, 특이적 단백질 질량의 포착은 유의미한 생화학물질 및 생체물리학적 값으로 번역된다. 포착된 특이적 단백질의 분자량을 포함한 포착된 질량을 이용한 단순 계산의 적용으로, 몰수가 평가되어, 당해 기술에서 경험된 것으로 공지된 평형 결합 상수 및 다른 상호작용 서술적인 값으로 이어진다. 세포 검정에 사용된 바이오센서의 예에서, 세포 표면상에서 특이적 결합 분자는 특이적 세포성 경로를 통해 외부 화학 또는 다른 자극의 적용시 센서 및 다른 근접 세포의 표면에 인접한 그의 부착 및 형태학을 조절한다.

[0353] 바이오센서는 자극에 반응하기 위해 이용된 세포 내에서 자극 및 경로에 고유하도록 그와 같은 방식으로 선택될 수 있는 이들 조절을 검출할 수 있다. 적절하게 설계된 경우, 상기 세포 검정용 바이오센서 결과는 분자 및 기능성 용어들에서 최상으로 정량적일 수 있다. 상기 바이오센서 결과는 추가 고유성에 대하여 반응의 일시적 패턴일 수 있다. 세포 내에서 특이적 경로의 턴 온 및 턴 오프로 공지된 생체분자 활성제 또는 교란제는 CReMS 바이오센서 신호의 특이성 계측용 대조군으로서 사용될 수 있다. 바이오센서 결과의 일시적 반응의 곡선 디콘볼루션의 방법 (예를 들면 대조군 반응을 이용한 비-선형 유클리드 비교)는 추가로 더욱 미세하게 상세한 특이적 세포성 반응에 적용될 수 있다. 세포성 바이오센서 검정에서 적정 외부 자극의 사용은 또한 추가로 생화학물질 및 생체물리학적 파라미터 설명을 제공할 수 있다.

[0354] 무 표지 센서의 하나의 예는 고주파수 석영 공명체 또는 석영 계측 미량천칭 (QCM) 또는 공명 캔틸레버이다. 공명체는 그의 표면상에 패터닝된 금속 전극을 가진 석영 계측을 포함한다. 석영 물질은 전압이 인가된 경우 확립된 공명 특성을 갖는다. 특정 주파수로 전극에 교대 전압을 인가함으로써, 계측은 특징적인 주파수로 진동할 것이다. 진동 주파수는 질량이 센서 표면에서 포착된 경우 정량적 방식으로 조절되고; 부가 질량은 더 낮은 공명체 주파수를 초래한다. 따라서, 석영 진동자의 공명 주파수에서 작은 변화를 측정함으로써, 침착된 질량에서 매우 작은 변화는 연구중 생체분자 또는 세포에 표지 부착 없이 측정될 수 있다.

[0355] 이온 선택적 전계 효과 트랜지스터 (ISFET) 디바이스는 선택된 이온, 요소, 및 산소 같은 단순 분자, 이산화탄소, 글루코오스, 및 생활과학에서 당해 다른 대사물질을 측정할 수 있는 소형화된, 나노규모, 디바이스이다. 이들은 전기기계적 작동의 수준 뿐만 아니라 생물적용 수준에서 광범위하게 기재되었다. 현재까지 이들은 질환 과정에서 제안된 치료 중재에 이들의 반응 또는 저항성 또는 일시적 패턴을 확인하기 위해 특이적 환자의 세포를 가진 용도로 기재되지 않았다.

[0356] 광학적 바이오센서는 센서 표면에 커플링되는 광의 일부 특징에서 측정가능한 변화를 산출하도록 설계된다. 상기 접근법의 이점은 여기 공급원 (센서의 조명의 공급원), 검출 변환기 (반사광 또는 투과광을 수집하는 디바이스), 및 변환기 표면 자체 사이 직접적인 물리적 연결이 요구되지 않는다는 것이다. 환언하면, 대부분의 생물학

적 시스템의 안정화 및 연구에 요구된 유체와 센서의 결부 간소화 방법인, 광학적 바이오센서에 전기적 연결 필요성은 없다. 직접적으로 질량 검출 보다는, 전체 광학적 바이오센서는 측정가능한 신호를 생산하기 위한 검출된 물질의 유전체 유전율에 의존한다. 유전체 유전율에서 변화는 자유 공간에서 광의 속도 대 배지에서 빛의 비에서 차이와 관련된다. 상기 변화는 본질적으로 배지의 굴절률을 나타낸다. 굴절률은 배지의 유전 상수의 제곱근으로서 공식적으로 정의된다 (참고 상기 관계의 더욱 명백한 처리를 위하여 맥스웰 방정식). 광학적 바이오센서는 전체 생물학적 물질, 예컨대 단백질, 세포, 및 DNA가 자유 공간의 것보다 더 높은 유전 상수를 갖는다는 사실에 의존한다. 따라서, 이들 물질은 모두 이들을 통과시킨 광의 속도를 저속화하기 위한 고유 능력을 보유한다. 광학적 바이오센서는 센서 표면상에서 포착되는 생물학적 물질의 양에 비례하는 정량화가능 신호로, 생물학적 물질을 함유하는 배지를 통해 광의 전파 속도에서 변화를 번역하도록 설계된다.

[0357] 광학적 바이오센서의 상이한 유형은 비제한적으로 하기를 포함한다: 엘립소미터, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 디바이스, 화상형성 SPR 디바이스, 격자 커플링된 화상형성 SPR 디바이스, 홀로그램 바이오센서, 간섭 바이오센서, 반사형 간섭 분광법 (RIFS), 비색 간섭 바이오센서, 차이 간섭계, 하트만 간섭계, 이중 국소 분극화 간섭계 (DPI), 도파관 센서 칩, 통합된 입력 격자 커플러 디바이스, 처핑된 도파관 격자 디바이스, 광자 계측 디바이스, 우드의 이상에 기반된 유도된 방식 공명 필터 디바이스, 삼각형 은 입자 배열. 그리고 추가로 비제한적으로 가시선, 자외선, 근적외선, 및 적외선을 포함한 전자기 스펙트럼의 다양한 파장을 측정하는 디바이스를 포함한다. 작동 방식은 비제한적으로 산란, 비탄성 산란, 반사, 흡광도, 라만, 투과율, 횡행 전파, 및 횡행 자파를 포함한다.

[0358] 표면 플라즈몬 공명 디바이스는 국부 굴절률에서 변화 검출에 의해 금속 표면에서 생체분자의 결합 사례를 측정하는 광학적 바이오센서이다. 일반적으로, 고-처리량 SPR 기기는 오토-샘플링 로보트, 고해상도 CCD (전하-커플링된 디바이스) 카메라, 및 플라스틱 지지체 플랫폼에서 포매된 4 초과 배열 세포를 각각 가진 금 또는 은-코팅된 유리 슬라이드 칩으로 이루어진다. SPR 기술은 특정 금속 인터페이스, 가장 현저히 은 및 금에서 여기될 수 있는 표면 플라즈몬 (특별한 전자기파)를 활용한다. 입사광이 임계각 초과와 각에서 금속 인터페이스와 커플링되는 경우, 반사광은 입사광부터 표면 플라즈몬까지 에너지의 공명 전달 때문에 반사율에서의 급격한 감소 (SPR 최소)를 나타낸다. 표면에서 생체분자의 결합은 국부 굴절률을 변화시키고 SPR 최소의 변화를 초래한다. SPR 신호에서 변화의 모니터링에 의해, 실시간으로 표면에서 결합 활성을 측정하는 것이 가능하다.

[0359] SPR 측정이 굴절률 변화에 기반하기 때문에, 분석물의 검출은 무 표지이고 직접적이다. 분석물은 임의의 특별한 특징 또는 표지 (방사성 또는 형광성)를 요구하지 않고 단단계 검출 프로토콜에 대한 필요성 없이 직접적으로 검출될 수 있다. 측정은 실시간으로 수행될 수 있어서, 동력학 데이터 및 열역학적 데이터의 수집을 허용한다. 마지막으로, SPR은 광범위한 분자량에 대한 다수의 분석물 및 결합 친화도를 검출할 수 있다. 따라서, SPR 기술은 세포성 반응 측정 시스템으로서 상당히 유용하다.

[0360] 살아있는 환자 세포의 복합 임피던스 변화 (델타 Z, 또는 dZ)의 측정용 CReMS는 임피던스 (Z)가 옴의 법칙 ( $Z = V/I$ )에 의해 기재된 바와 같이 전압 대 전류의 비와 관련되는 본 구현예에서 기재된다. 예를 들어 일정한 전압은 환자 세포가 부착되는 전극에 인가되어, 차별적인 주파수로 세포 주변, 세포 사이 및 세포를 통해 흐르는 전류를 생산한다. 상기 CReMS는 세포와 전극 계면에서 국부 이온성 환경에 감수성이고 전압 및 전류 변동의 기능으로서 이들 변화를 검출한다. 이들의 정상 기능 또는 교란의 결과로서 세포의 생리적 변화는 전극 주위 전류의 흐름에 대한 정량화가능 변화를 초래하고 그와 같은 CReMS에서 측정된 신호의 규모 및 특징에 영향을 미친다.

[0361] 특정 구현예에서, 바이오센서는 사례 특이성을 가진 전면적인 표현형에서의 변화를 검출한다. 전면적인 표현형은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포성 반응 파라미터를 포함한다: pH, 세포 접착, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 세포 사이클, 동화작용, 이화, 소분자 합성 및 생성, 턴오버, 및 호흡, ATP, 칼슘, 마그네슘, 및 다른 충전된 이온, 단백질, 특이적 경로 구성원 분자, 다양한 세포성 구획, 유전체학, 및 프로테오믹스내 DNA 및 또는 RNA, 번역후 변형 및 기전, 2차 메신저의 수준, 생리적 기능을 가진 cAMP, mRNA, RNAi, 마이크로RNAs 및 다른 RNA, 및 이들의 조합. 사례 특이성에 관해, 치료제 및/또는 활성제 제제의 그 유형에 대하여 예상된 변화인 세포 샘플에서 변화를 반영하는 세포성 파라미터는 선택된다. 예를 들어, 치료제가 세포골격 요소를 표적하도록 공지되면, 그와 같은 제제와 접촉된 세포는 제제의 존재하에 세포 접착에서 변화를 보여준다고 예상될 것이다.

[0362] 다른 구현예에서, 부착 패턴에서 변화는 세포 접착에서 변화이다. 일부 경우에서, 세포 접착에서 변화는 굴절률에서 변화 또는 임피던스에서 변화에 의해 나타낸다. 더욱 다른 구현예에서, 부착 패턴에서 변화는 기저 형태학에서 변화, 세포 밀도에서 변화, 또는 세포 크기 또는 세포 형상에서 변화이다. 특이적 구현예에서, 기저 형태

학에서 변화는 세포 극성에서 변화이다. 구현예에서, 세포 신호전달에서 감소는 세포골격 조직화에서 변화를 나타낸다.

- [0363] 다른 구현예에서, 개시내용의 방법은 무 표지이고 실시간으로 측정될 수 있는 세포 샘플의 분석을 제공한다. 하나의 구현예에서, 분석된 세포 샘플은 무 표지이고, 생존성이고, 그리고 세포를 고정시키기 위해 임의의 처리되지 않는다. 또 다른 구현예에서, 개시내용의 방법 및 키트에서 사용된 치료제 및/또는 활성제 제제는 또한 무 표지이다. 현재까지 무 표지 방법은 유효한 방식으로 치료적 효능의 측정에 적용되지 않았다.
- [0364] 무 표지 검정은 시간의 감소 및 표지 검정의 합병증의 오도에 의해 스크리닝 캠페인의 시간 및 비용을 감소시킬 수 있다. 유전자 발현, 유전자 돌연변이, 및 단백질 기능을 확인 및 정량화할 수 있는 검정은 대규모 평행관계를 가능하게 하는 포맷으로 수행된다. 단백질-단백질 또는 DNA-DNA 상호작용의 수만 내지 백만은 무 표지 검정으로 동시에 더욱 경제적으로 수행될 수 있다.
- [0365] 매우 다양한 표지된 방법과 대조로, 분자 상호작용의 검출을 허용하는 상대적으로 소수의 방법이 있고 표지 없이 세포성 기능에 대하여 여전히 심지어 더욱 적다. 무 표지 검출은 치료제 및 활성제 제제의 분자 폴딩에서 표지의 효과에 의해 창출된 실험적인 불확실성, 세포에서 활성 부위의 차단, 또는 세포 내에서 효과적으로 배치될 수 있는 실험에서 전체 분자에 대하여 동등하게 기능하는 적절한 표지를 찾기 위한 무능을 제거한다. 무 표지 검출 방법은 검정 발전에 요구된 시간 및 노력을 크게 간소화시키고, 반면에 쉐칭, 유통 기한, 및 배경 간섭으로부터 실험적인 인공물을 제거한다.
- [0366] 표지는 생화학물질 및 세포-기반 검정의 버팀목이다. 표지는 대다수의 전체 검정 방법을 포함하고 몇 개의 문제를, 특히 살아있는 인간 세포에서 복합 동적 활성의 연구의 맥락에서 극복해야 한다. 방사성 표지의 사용은 오염된 물질의 큰 양을 창출하고 이들을 사용하는 것에 (세포성 수준으로) 해를 예방하기 위해 조절 방법을 가진 특화된 설비에서 사용되어야 한다. 형광단의 여기/방출 효율은 시간 및 광에 노출에 의해 떨어지고, 정확하고 정밀하게 되기 위해 표지의 능력을 감소시키고, 일시적 정보가 수득될 수 없는 종료점 방식으로만 검정이 일단 관독되도록 요구한다. 전체 표지-기반 검정은, 표지가 선형으로 정량적일지를 측정하는, 균질한 및 균일한 방식으로 표지의 부착 공정을 개발하기 위한 시간의 유의미한 양을 요구하고, 측정되는 상호작용 또는 공정을 방해 또는 영향을 미치지 않을 것이다. 복합 혼합물에서 표지의 균일한 적용은 자연적으로 진행되는 공정에 필요한 전체 분자의 존재에 의해 복잡해진다. 표지의 부가는 그 분자 기능의 가시화를 간접적으로만 허용하고, 직접적으로 전체 시스템 기능은 아니다 (즉 일부 확장된 가정은 필요할 수 있다). 세포성 활성은 정확하게 표지로 측정하기 더욱더 어렵다. 유용한 시험은 표지가 세포에 관해 올바른 분자, 올바른 방식, 올바른 위치에서 얻을 방법을 해결해야 하고, 표지가 정상 세포성 공정을 방해하지 않는 것이 특정되어야 한다.
- [0367] 무 표지 검출은 일반적으로 생물학적 화합물 또는 생물독립체 예컨대 DNA 분자, 펩타이드, 단백질, 또는 세포의 일부 물리적 특성을 직접적으로 측정할 수 있는 변환기의 사용을 포함한다. 전체 생화학물질 분자 및 세포는 그의 존재 또는 부재, 증가 또는 감소, 및 센서의 유형을 이용한 변형을 나타내기 위해 사용될 수 있는 용적, 질량, 점탄성, 유전체 유전율, 열용량 및 전도도에 대하여 유한한 물리적 값을 갖는다. 추가 생 시스템은 에너지를 제공하기 위해 및 그의 생활 과정, 예컨대 유한한 기간을 넘어 그의 환경에서 pH 같은 측정가능한 변화를 야기하는 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 소비/생성, 글루코오스 생산/ 소비, ATP 생산/소비를 실시하기 위해 분자를 이용한다. 센서는 이들 물리적 특성 중 하나를 정량화가능 신호 예컨대 측정될 수 있는 전류 또는 전압으로 전환시킬 수 있는 변환기로서 기능한다.
- [0368] 일부 경우에서, 바이오센서로서 변환기를 사용하기 위해, 변환기의 표면은 특이적 물질 예컨대 단백질 또는 특이적 세포 유형을 선택적으로 포착하고, 반면에 원하지 않는 물질을 부착시키지 않는 능력을 가져야 한다. 선택적 검출 능력은 변환기의 표면에 화학 분자의 특이적 코팅층의 결합에 의해 제공된다. 센서 표면에 부착되는 물질은 센서 코팅물로 지칭되고 반면에 검출된 물질은 분석물로 불린다. 따라서, 일부 경우에서, 바이오센서는 변환기에 부착하는 물질로부터 측정가능한 신호를 생성할 수 있는 변환기, 및 시험 샘플로부터 표적된 분석물을 결합시킬 수 있는 수용체 리간드를 함유한 특이적 인식 표면 코팅물의 조합이다.
- [0369] 특정 구현예에서, 코팅물은 특정한 세포성 성분 또는 경로와 관련되는 바이오센서에 대하여 선택된다. 예를 들어, 이 경우에, 세포성 생리적 파라미터는 세포 접촉에서 변화이고, 바이오센서 표면에 세포 샘플내 세포의 접촉을 제공하는 코팅물이 선택된다. 구현예에서, 바이오센서에 세포의 접촉을 향상시키는 코팅물은 세포의 기질, 파이브로넥틴, 인테그린 등등을 포함한다. 다른 구현예에서, 세포 표면 마커에 기반된 특정한 세포 유형에 결합하는 코팅물이 선택된다. 구현예에서, 상기 세포 표면 마커는 CD20, CD30, EGFR, EGFR-TK, PI3K, MEK1, MEK2,

HER2 수용체, Her3 수용체, Her4 수용체, VEGFR, 및 다른 세포 표면 암 바이오마커를 포함한다.

[0370] 다른 구현예에서, 바이오센서는 생체분자 코팅물로 코팅된다. 세포를 접촉하는 CREMS 표면은 세포의 부가에 앞서, 세포의 부가 동안, 또는 세포의 부가 이후 생체 분자 코팅물을 함유할 수 있다. 코팅 물질은 합성, 천연, 동물 유도된, 포유동물일 수 있거나, 또는 센서상에 배치된 세포에 의해 창출될 수 있다. 예를 들어, 생체분자 코팅물은 인테그린, 어드헤린, 카드헤린 및 다른 세포성 접착 분자 및 세포 표면 단백질 (예를 들면, 피브로넥틴, 라미닌, 빈트로넥틴, 콜라겐, 세포간CAMs, 혈관CAMs, MAdCAMs)에 관여한다고 공지된 세포의 기질 성분을 포함할 수 있거나, 또는 천연 발생 생화학물질 라이신 및 오르니틴에 기반된 폴리머성 분자인, 생화학물질 예컨대 폴리라이신 또는 폴리오르니틴을 포함할 수 있고, 천연 발생 생화학물질 예컨대 아미노산에 기반된 폴리머성 분자는, 바이오센서에 특이적 세포 표면 단백질을 부착시키도록 설계된, 천연 발생 생화학물질, 항체, 항체의 단편 또는 펩타이드 유도체, 보체 계측 영역 (CDR)의 이성질체를 또는 거울상이성질체를 이용할 수 있다.

[0371] 마이크로플레이트에 생존 세포의 부착 방법은, 예를 들어, 바이오센서의 표면과 상호작용하도록 설계된 하나의 말단, 및 펩타이드상에서 작용기와 반응하도록 설계된 또 다른 말단을 갖는 반응성 분자로 센서 마이크로플레이트 표면의 코팅을 포함할 수 있다. 예를 들어, 금-코팅된 바이오센서를 이용하는 경우, 반응성 분자는 바이오센서 표면과 화학적으로 상호작용하도록 설계된 황 원자 또는 다른 화학 모이어티를 포함할 수 있다. 분자의 다른 말단은, 예를 들어, 펩타이드상에서 아미드 또는 카복시기와 특이적으로 반응할 수 있다.

[0372] 또 다른 예에서, 바이오센서 표면은 반데르발스력, 수소 결합, 정전기 인력, 소수성 상호작용, 또는 이들의 임의의 조합을 통해 부착할 수 있는 분자로 코팅될 수 있고 예컨대 당해 기술에서 실시된 것이 단백질을 적용하기 위해 사용한다. 세포의 기질 (ECM) 분자는 또한 제1 표면 분자 코팅물에 부가될 수 있다. Gcience. Journal of Cell Science 119 (19) p3901-03에서 Humphries 2006 인테그린 리간드는 본 발명에서 유용한 접착 분자를 기재한다. 특이적 세포 접착 분자에 사용될 수 있는 추가의 ECM 분자는 Takada *et al.*, Genome Biology 8:215 (2007)의 표 1에 기재된 것을 포함한다. 상기 예는 세포-ECM 및 세포-세포 접촉에서 관여된 인테그린용이다. 많은 다른 접착 분자는 생리적 대조군 및 반응에 관련된 특성으로 기재되었다. (참고 표 5 아래).

[0373] 표 5:

인간 인테그린의 리간드-결합 특이성	
인테그린	ECM 및 세포-세포 리간드
$\alpha 1\beta 1$	라미닌, 콜라겐
$\alpha 2\beta 1$	라미닌, 콜라겐, 트롬보스폰딘, E-카드헤린, 테나신
$\alpha 3\beta 1$	라미닌, 트롬보스폰딘, uPAR
$\alpha 4\beta 1$	트롬보스폰딘, MAdCAM-1, VCAM-1, 피브로넥틴, 오스테오펀틴, ADAM, ICAM-4
$\alpha 5\beta 1$	피브로넥틴, 오스테오펀틴, 피브릴린, 트롬보스폰딘, ADAM, COMP, L1
$\alpha 6\beta 1$	라미닌, 트롬보스폰딘, ADAM, Cyr61
$\alpha 7\beta 1$	라미닌
$\alpha 8\beta 1$	테나신, 피브로넥틴, 오스테오펀틴, 빈트로넥틴, LAP-TGF- $\beta$ , 네프로넥틴,
$\alpha 9\beta 1$	테나신, VCAM-1, 오스테오펀틴, uPAR, 플라스민, 안지오스타틴, ADAM [25], VEGF-C, VEGF-D[26]
$\alpha 10\beta 1$	라미닌, 콜라겐
$\alpha 11\beta 1$	콜라겐
$\alpha V\beta 1$	LAP-TGF- $\beta$ , 피브로넥틴, 오스테오펀틴, L1

[0374]

$\alpha$ L $\beta$ 2	ICAM, ICAM-4
$\alpha$ M $\beta$ 2	ICAM, iC3b, 인자 X, 피브리노겐, ICAM-4, 헤파린
$\alpha$ X $\beta$ 2	ICAM, iC3b, 피브리노겐, ICAM-4, 헤파린, 콜라겐 [27]
$\alpha$ D $\beta$ 2	ICAM, VCAM-1, 피브리노겐, 피브로넥틴, 비트로넥틴, Cyr61, 플라스미노겐
$\alpha$ IIb $\beta$ 3	피브리노겐, 트롬보스폰딘, 피브로넥틴, 비트로넥틴, vWF, Cyr61, ICAM-4, L1, CD40 리간드 [28]
$\alpha$ V $\beta$ 3	피브리노겐, 비트로넥틴, vWF, 트롬보스폰딘, 피브릴린, 테나신, PECAM-1, 피브로넥틴, 오스테오펀틴, BSP, MFG-E8, ADAM-15, COMP, Cyr61, ICAM-4, MMP, FGF-2 [29], uPA [30], uPAR [31], L1, 안지오테닌 [32], 플라스틴 [33], 심장독소 [34], LAP-TGF- $\beta$ , De1-1
$\alpha$ 6 $\beta$ 4	라미닌
$\alpha$ V $\beta$ 5	오스테오펀틴, BSP, 비트로넥틴, CCN3 [35], LAP-TGF- $\beta$
$\alpha$ V $\beta$ 6	LAP-TGF- $\beta$ , 피브로넥틴, 오스테오펀틴, ADAM
$\alpha$ 4 $\beta$ 7	MadCAM-1, VCAM-1, 피브로넥틴, 오스테오펀틴
$\alpha$ E $\beta$ 7	E-카드헤린
$\alpha$ V $\beta$ 8	LAP-TGF- $\beta$

[0375]

[0376]

추가적 코팅물은 본원에서 기재된 방법의 수행 목적으로 바이오센서에 환자 세포를 매우 근접시키기 위해 환자 세포 표면 단백질에 대하여 친화도를 갖는다고 공지된 항체 또는 다른 단백질을 포함할 수 있다. 환자 세포가 마이크로플레이트에 원하는 방식으로 부착되는 것을 확인하는 것이 또한 유익할 수 있다. 특이적 바이오센서 코팅물은 특이적 환자 세포 유형으로부터 특이적 세포 신호 및 특이적 세포성 경로에 센서 코팅물의 연결에 의한 교란 및 치료제에 대한 세포 신호전달 반응을 향상, 개선, 명확화, 격리, 또는 검출하기 위해 추가로 사용될 수 있다 (참고, 예를 들면, Hynes, *Integrins*, Cell, 110:673-687 (2002)). 바이오센서는 종자 세포에 대한 영역을 포함한다. 예를 들어, 바이오센서는 종자 세포에 대한 웰들을 함유한 미세적정 플레이트를 포함할 수 있다. 하나 이상의 세포 샘플은 상이한 위치에서 표면에 물리적 흡착에 의해 바이오센서상에 썬딩될 수 있다. 바이오센서는 1, 10, 24, 48, 96, 384, 또는 초과 상이한 위치를 포함할 수 있다. 세포 샘플은 중간에 약 100 내지 약 100,000 개별 세포 또는 임의의 세포 수를 포함할 수 있다. 최적의 세포 샘플은 바이오센서상에서 상이한 위치의 크기 및 성질에 의존한다. 세포 샘플은 약 5000 세포 이하; 약 10,000 세포 이하; 약 15,000 세포 이하; 약 20,000 세포 이하; 약 25,000 세포 이하; 또는 약 50,000 세포 이하를 포함할 수 있다. 세포 샘플은 약 1000 내지 약 2500 세포; 약 1000 내지 약 5000 세포; 5000 내지 약 10,000 세포; 약 5000 내지 약 15,000 세포; 약 5000 내지 약 25,000 세포; 약 1000 내지 약 10,000 세포; 약 1000 내지 약 50,000 세포; 및 약 5000 내지 약 50,000 세포를 포함할 수 있다.

[0377]

특정 구현예에서, 세포성 반응 또는 생리적 파라미터에서 변화는 정의된 기간 동안 측정된다. 다른 구현예에서, 정의된 기간은 생리적 파라미터의 출력에서 변화가 20% 이하만큼 변하는 정상 상태를 대조군 세포가 달성하는데 걸리는 시간의 양이다. 다른 구현예에서, 변화는 1 시간 이하로 세포에서 관측된다. 다른 구현예에서, 변화는 적어도 1 분 내지 약 60 분 동안 및 중간에 매 분 세포에서 관측된다. 다른 구현예에서, 세포 반응에서 변화는 약 10 분 내지 약 1 주 또는 200 시간 측정된다. 다른 구현예에서, 치료제가 세포성 경로에 표적되는 경우, 세포성 반응은 약 10 분 내지 약 5 시간, 약 10 분 내지 약 4 시간, 약 10 분 내지 약 3 시간, 약 10 분 내지 약 2 시간, 약 10 분 내지 약 1 시간, 또는 약 10 분 내지 약 30 분 또는 중간에 임의의 시점에서 측정된다. 다른 구현예에서, 치료제가 세포 증식 또는 세포 사멸 또는 세포성 저항성에 영향을 미치는 경우, 세포성 반응은 약 1 시간 내지 약 200 시간 측정된다. 더욱 다른 구현예에서, 1 분과 200 시간 사이 (달리 완전 일시적 패턴으로서 기재된) 반응의 조합은 세포상에서 화합물의 치료 효과 및 저항성을 개발하기 위한 세포 능력을 측정하기 위해 사용된다. 상기 기간은 환자에서 정황적 반응 및 이의 유지 평가에 중요한 단기 경로 신호전달, 동적 재프로 그래밍 및 더 긴 기간 세포성 반응의 중요한 공정을 포함한다.

[0378]

일단 특정한 대상체의 세포가 바이오센서상에 썬딩되면, 기준선 측정은 측정될 수 있다. 기준선 측정은 동일한 세포 샘플, 또는 대조군 세포 샘플상에서 실시될 수 있다. 대조군 샘플은 동일한 환자 및/또는 동일한 조직으로부터 건강한 세포 또는 이환 세포를 포함할 수 있다. 대조군 샘플은 교란제 또는 제제를 받지 않는 이환 세포를 포함할 수 있다. 대조군 샘플은 제제에 반응한다고 공지된 질환 세포를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 대조군 샘플은 제제에 반응하지 않는다고 공지된 질환 세포를 포함한다. 대조군 샘플은, 세포 건강, 세포 대사, 또

는 세포 경로 활성화에 관련한 표준화된 반응을 유도하도록 설계된, 특정한 환자의 건강한 또는 이환 세포에 활성화 제제의 적용을 포함할 수 있다.

- [0379] 대조군은 각 질환 및/또는 약물 유형에 대하여 예측될 것이다. 하나의 구현예에서, 이는 동일한 환자로부터 건강한 세포 대조군에 대한 비교 또는 비-이환 환자 (예를 들면 정상 참조 구간)의 풀에 대하여 결과에 대한 비교를 포함한다. 예를 들어, 세포 사멸 약물의 경우, 방법은 유의미한 치료적 지수를 달성하기 위해 건강한 세포에 대해 질환 세포의 사멸의 이점을 보여줄 것이다. 다른 구현예는 약물에 의해 경로 기능 및 대조군을 계속하기 위한 경로 도구의 사용을 포함한다. 표적화 치료제에 대하여, 도구는 교란을 방해하는 표적된 약물의 능력을 계속 및 경로를 교란하기 위한 대조군으로서 사용되는 교란제 (예를 들면, 활성화제 제제), 생체시약 또는 소분자일 수 있다. 더욱 다른 구현예에서, 세포상에서 약물의 생리적 효과는, 예를 들어, 산소 소비의 일시적 패턴 또는 속도, 산성화의 속도 또는 일시적 패턴, 이온 유동, 또는 대사물질 턴오버를 언급한 활성화제 제제의 외인성 교란 없이 측정된다.
- [0380] 특정한 구현예에서, 바이오센서 신호는 계속되는 시간 경과 동안 측정된다. 약물 치료에 대한 환자 세포 반응을 나타내는 시간 대 바이오센서 신호 플롯상에서 고유 패턴이 있다. 이들 패턴의 평가는 유효한 사례의 존재를 확인하는데 유용하다. 살아있는 및 완전히 기능성 세포의 시간 경과 또는 일정하게 변화 측정은 시점을 단지 나타내는 전형적인 전체의 세포 검정에서 사용된 현행 실시보다 더욱 유의하다. 본원에서 기재된 방법은 이들이 환자에서 발생하고 환자 반응 예측의 가장 정확한 수단을 나타냄에 따라 동적 시스템을 측정한다. 경로 반응의 경우에서, 완벽한 시간 경과 또는 일시적 패턴의 기록은 더욱 복잡한 분석을 지지하기 위한 및 단일 측정에 대하여 최적의 시점 선택을 방지하기 위한 능력이 우수하다.
- [0381] 대조군에 대한 비교는 일시적 최대치, 최소치에서, 또는 최대 신호-최소 신호 사이 차이로서, 또는 시간 경과 플롯에 대하여 통합된 곡선하 면적 (AUC)의 비교 또는 양성 또는 음성 대조군 웰들에 대해 시험 웰의 다른 비-선형 비교 (예를 들면 차이 벡터의 합산) 또는 동일한 환자 생존 이환 세포에 대하여 교란된 및 미혼란된 웰들의 비교에 의해 발생할 수 있다. 바이오센서를 이용한 측정으로만 지지된 추가의 분석은 최대치/최소치, 및 일시적 시간 경과와 다른 유도체를 달성하기 위한 시간이다. 더 긴 기간 반응의 경우에서, 비교의 시간은 약물의 치료 또는 다중 적용의 며칠 또는 1 주 이후 특이적 시점일 수 있다. 더 긴 시간 경과와 또한 기울기에서 변화를 비교할 수 있거나 또는 약물 치료의 1 주의 시작, 중간 또는 말기에서 시간 대 바이오센서 신호 플롯의 제2 유도체를 포함할 수 있다. 대조군에 비교된 유의미한 변화는 세포성 대사의 단축에 관련된 바이오센서 신호에서 절대적 하락을 포함할 수 있다. 대안적으로, 하락은 그 다음 검정 동안 약물에 대한 저항성의 발달을 나타낼 수 있는 증가일 수 있다. 추가로, 비-선형 유클리드 분석은 완벽한 시간 경과 동안 대조군과 환자 샘플 사이 총 차이의 측정을 만들어내는데 사용될 수 있다. 이는 또한 환자에 대하여 결과 예측에 관해 유의미할 것이다.
- [0382] 특정 구현예에서, 정의된 기간 동안 바이오센서의 출력은 세포 지수로서 나타난다. 세포 지수는 시험 개시점으로부터 임피던스에서의 변화이다. 세포 지수는 임피던스의 측정으로서 정의되고, 예를 들어, 10 kHz의 고정된 전기 주파수 및 고정된 전압에서 측정함으로써 본 발명의 일 사례에서 적용될 수 있다.
- [0383] 그리고 하기 방정식에 의해 계산된다: 세포 지수<sub>i</sub> = (R<sub>in</sub> - R<sub>t0</sub>)/F
- [0384] 식 중:
- [0385] i = 1, 2, 또는 3 시점
- [0386] F = 기기가 10kHz 주파수에서 작동되는 경우 하나의 예에서 15옴
- [0387] R<sub>t0</sub>는 시점 T<sub>0</sub>에서 측정된 배경 저항성이다.
- [0388] R<sub>in</sub>은 세포 부가, 세포 생리적 변화, 또는 세포 교란 이후 시점 T<sub>n</sub>에서 측정된 저항성이다.
- [0389] 세포 지수는 세포 상태를 나타내기 위해 측정된 전기적 임피던스에서 상대적 변화로서 유도된 무차원 파라미터이다. 세포가 존재하지 않거나 또는 전극에 잘-부착되지 않는 경우, CI는 0이다. 동일한 생리적 조건하에서, 더 많은 세포가 전극상에 부착되는 경우, CI 값이 더 크다. CI는 따라서 웰에 존재한 세포 수의 정량적 측정이다. 추가로, 세포 형태학을 포함한, 세포 생리적 상태에서 변화, 기저, 안정한, 또는 정지 상태에서 변화, 세포 접착, 또는 세포 생존력은 CI에서 변화로 이어질 것이다.
- [0390] 세포 지수는 개시점 또는 기준선 임피던스 측정에 기반된 이의 존재, 밀도, 부착 또는 변화의 정량적 측정이다. 기준선 개시점 임피던스는 약물 또는 다른 교란제를 이용한 임의의 치료에 앞서 세포의 건강, 생존력, 및 생리

적 상태의 적응증 및 물리적 관측가능한 특징이다. 기준선 개시점은 CELx 시험에 대하여 정성적 대조군으로서 사용될 수 있다. 약물 또는 교란제의 부가는 세포에 의해 경험된 세포성 생리적 변화의 특이성의 일시적 패턴 반사에서 변화에 임피던스를 발생시킨다. 세포 생리적 상태, 예를 들어 세포 형태학, 세포 수, 세포 밀도, 세포 접착, 또는 세포 생존력에서 변화는 세포 지수에서 변화로 이어질 것이다.

[0391] 생리적 반응 파라미터는 추가로 세포 사이클 분석을 포함할 수 있고 기능성 및 기능이상 경로와 관련된 환자 세포에서 다른 비색 변화 또는 임의의 수의 화학 바이오센서 예컨대 접합된 또는 비접합된 형광 염료를 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들어 비접합된 염료를 이용한 세포의 집단에 대하여 세포 사이클에서 변화는 DNA에 삽입한다고 공지된 프로피듐 아이오다이드 또는 유사한 염료로 정량화될 수 있고 DNA의 양에서 변화를 평가함으로써 성장 및 복제의 G0, G1, S, G2, Gm 시기를 통해 세포 사이클링과 상관할 수 있다. 하나의 염료 유형, 프로피듐 아이오다이드의 경우, G2/M 시기에서 세포의 형광은 G0/G1 시기에서 세포의 것보다 2배만큼 높을 것이다. 프로피듐 아이오다이드는 또한 RNA에 삽입할 수 있고 종종 리보뉴클레아제는 RNA에 비교된 DNA로부터 형광 신호를 구별하기 위해 사용된다. 예는 또한 세포 사이클 체크 포인트에 연결된 특정한 단백질에 특이적인 염료를 포함하고 추가의 세포 사이클 상태 측정을 제공한다. 이들 측정 실시예 유용한 통상 기기 비제한적으로 본원에서 열거된 것은 형광 현미경검사, 공초점 레이저 스캐닝 현미경검사, 유세포측정, 형광분석법, 형광 국소 분극화, 균질한 시간 분해 형광, 및 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)이다.

[0392] 비접합된 염료는 세포의 생리적 상태 또는 경로의 화학 바이오센서로서 본 발명과 함께 이용될 수 있으면서 대사성 파라미터 예컨대 동화작용, 이화, 소분자 합성 및 생성, 턴오버, 및 호흡을 측정한다. 와버그 효과로 명명된, 공지된 세포 생리적 반응은 종양 및 다른 이환 세포, 및 주요 신호전달 경로에서 에너지 생성을 위하여 산화적 인산화부터 락테이트 생산까지 시프트를 기재하고, 종양유전자 및 종양 억제제 (예를 들어 비제한적으로 Akt, mTor, c-myc, p53)는 본원에서 기재된 임의의 화학 바이오센서 방법에 의해 또는 광-전자 바이오센서에 의해 측정될 수 있다. 세포성 반응에서 세포성 산소 소비 또는 호흡 및 당분해는 양성자를 생산하고 용해된 산소 및 자유 양성자의 농도 또는 산도에 급속, 쉽게 측정가능한 변화를 발생시킨다.

[0393] 화학 바이오센서를 이용한 생리적 반응 파라미터의 추가의 그러나 비제한 예는, 대사작용으로 활성 및 불활성 세포성 기능의 지표인, 존재한 ATP의 정량화 (Ex. CellTiterGlo 및 유사한 루시페라아제 유도된 검정)에 기반된 배양액에서 세포에 의해 이용되는 ATP의 양이다.

[0394] 생체분자 폴딩 및 기능에 중요한 칼슘, 마그네슘, 및 다른 충전된 이온은 생리적 반응 때문에 유입된다. 이들은 또한 화학 바이오센서 예컨대 Cal-520, 오레곤 그린 BAPTA-1, 후라-2, 인도-1, 플루오-3, 플루오-4, 칼슘 녹색-1, 및 특이적 이온 착화 및 측정용 다른 EGTA 또는 EDTA-유사 화학에 의해 측정될 수 있다. 이들 생리적 반응 파라미터는 많은 유형의 비접합된 반응성 또는 결합 염료 또는 다른 전자 또는 분광 수단을 이용하여 측정될 수 있다. 많은 이들 방법은 동일한 세포 집단의 생리적 기능을 경시적으로 반복적으로 연속적으로 측정되도록 하는 세포에 비-파괴적이기 위해 배열될 수 있다.

[0395] 접합된 염료 예컨대 천연 세포 단백질 결합 리간드에 부착된 또는 면역입자 (항체 또는 항체의 단편 또는 높은 특이성 높은 친화도 합성 분자 예컨대 압타머)에 부착된 것, 또는 핵산 폴리머 하이브리드화 프로브는 다양한 세포성 구획, 유전체학, 및 프로테오믹스에서 단백질, 특이적 경로 구성원 분자, DNA 및 또는 RNA에 관련된 생리적 반응 파라미터를 측정하기 위해 사용될 수 있고, 특이적 번역후 변형 및 기전을 측정할 수 있다. 세포성 대조군의 번역후 변형 및 후성유전적 수단은 비제한적으로 리보자임, 키나제, 포스파타제, 유비퀴티나제, 데유 비퀴티나제, 메틸효소, 탈메틸효소, 및 프로테아제를 포함하는 경로 기능을 수행하는 다수의 효소에 의한 조절을 포함할 수 있다. 죽은 세포의 포르말린 고정 파라핀 실장된 샘플의 염색에 사용된 이들 분자의 예는 아래에서 찾아질 수 있다: DAKO Immunohistochemical Staining Methods Education Guide - Sixth Edition or at Cell Signaling Technology tutorials and application guides <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=tutorials-and-application-guides>. 이들 2개의 예는 살아있는 세포 반응의 측정을 위하여 본 발명과 함께 더욱더 유용할 것이다. 비제한적으로 이들 방법의 상기 측정 수행에 유용한 통상 기기는 형광 현미경검사, 공초점 레이저 스캐닝 현미경검사, 유세포측정, 형광분석법, 균질한 시간 분해 형광, 형광 국소 분극화, 및 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)이다.

[0396] 접합된 및 비-접합된 염료의 조합은 또한 세포의 생리적 반응을 측정하기 위해 본 발명에 의해 이용될 수 있다. 활성화 이후, 생리적 반응 제어를 책임지는 수용체의 한 유형은 GPCRs이다. 이들은 2개의 신호전달 경로: 2차 메신저 이노시톨 (1,4,5) 삼인산 (IP3)에 의해 해방되는, 2차 메신저 cAMP의 수준에서 변화, 또는 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 수준에서 변화를 통해 정보 및 대조군 세포를 전달한다. cAMP 검출은 예를 들어 크립테이트-표지된 항-cAMP

항체 (또는 다른 면역포착 분자) 및 GPCR 반응 및 후속의 항체 결합에 대하여 세포성 cAMP와 경쟁하는 d2-표지된 cAMP를 이용하여 경쟁적 면역검정상에서 기반될 수 있다. 특이적 신호 (즉 에너지 전달)은 표준 또는 샘플에서 cAMP의 농도에 반비례한다.

- [0397] 생리적 기능을 가진 mRNA, RNAi, 마이크로RNAs 및 다른 RNA의 정량화에 의한 생리적 반응의 측정은 전사 수준에서 세포성 변화의 교란 계측을 위하여 본 발명의 실시와 함께 이용된 매우 감수성 방법일 수 있다. 모두 화학 센서를 사용하는 rtPCR, qPCR, 선택적 서열 탐침검사, 선택적 서열 포착, 및 서열 하이브리드화 방법을 이용함으로써 RNA 예를 들어 비제한적으로 본원에서 열거된 것은 정량화될 수 있다.
- [0398] 면역-포착 및 하이브리드화 방법은, 비드 기반 방법 예컨대 루미넥스 또는 섬유 옵틱 팁 기술 예컨대 일루미나 또는 단백질, DNA, RNA, 또는 세포로부터 생리적 반응 분자(들)을 꺼내기 위해, 단리하기 위해, 및 정확하게 측정하기 위해 사용되는 고체 표면에 특이적 포착 시약이 고정되는 다른 하이브리드화 마이크로어레이 기술을 이용한 것을 포함한다. 이들 방법은 단일 실험에서 다수의 반응 파라미터의 측정의 이점을 제공한다.
- [0399] 세포성 반응 또는 생리적 파라미터에서 변화는 기준선 측정과 비교에 의해 계측된다. 세포성 파라미터 또는 생리적 반응에서 변화는 CREMS의 유형에 좌우된다. 예를 들어, 세포성 반응에서 변화가 광학적으로 계측되면, 물리적으로 관측가능한 변화는 예를 들어 화학 흡광도 또는 투과율용 스펙트럼 파장에서 광학 밀도의 기능, 표면 플라즈몬 측정 디바이스에서 변화, 또는 광자 계측 디바이스에 의해 검출된 변화로서 측정될 수 있다. 세포성 파라미터 또는 생리적 반응에서 변화가 전기적으로 계측되면, 물리적으로 관측가능한 변화는 예를 들어 전극에 부착된 세포의 밀리 또는 마이크로 임피던스 변화를 이용하여 측정될 수 있다. pH, 글루코오스, 이산화탄소, 또는 이온에서 변화는 이온 선택적 전계 효과 트랜지스터 (ISFET)를 이용하여 전자적으로 측정될 수 있다.
- [0400] 다른 구현예에서, 변화의 속도는 치료제에 대한 세포성 생리적 반응에서 차이를 계측하도록 요구된 일정한 기간 동안 CREMS 반응을 측정하는 방법에 의해 계측된다. 변화의 속도는 시간 경과 데이터의 다양한 해석에 의해 기재되고 속도로서 또는 추가로 속도의 가속을 포함한 속도의 유도 기능으로서 발현될 수 있다.
- [0401] 환자의 생리적 조건을 측정하는 시험은 환자가 상이한 임상 결과를 경험하는 것으로 예상되는 것 초과 및 미만으로 하나 이상의 컷오프 값을 유도할 수 있다. 구현예에서, 세포성 반응에서 변화 계측용 하나 이상의 컷오프 값은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 계측된다: 표준 편차, 신호 대 잡음 비, 표준 오차, 변동의 분석, 또는 공지된 비반응 환자로부터 샘플의 세트로부터 및 공지된 반응 세포 샘플로부터 샘플의 세트의 통계적 유의도로 적절한 신뢰 구간의 계측을 위하여 당해 기술에서 실시된 것에 의해 공지된 다른 통계적인 시험 값의 계측 단계; 및 둘 사이에서 차이의 계측 및 모든 그룹에 대하여 신뢰 구간 사이에서 컷오프 값의 셋팅 단계. 추가의 구현예는 이환되지 않은 공지된 환자로부터 CREMS 반응에 의해 정의된 정상 참조 범위로부터 계측된 컷오프를 이용한다. 상기 구현예에서, 단일 환자 질환 물질 시험 결과는 정상 (건강한) 참조 범위 구간으로 본 발명내 추가로 다른 곳에 기재된 바와 같이 교란된 및 미혼란된 생존 암 세포 결과의 비교에 의해 보고된다.
- [0402] 정상 (건강한) 참조 범위 시험 결과는 "정상" 경로 활성이 건강한 대상체로부터 정상 조직을 이용한 연구의 수행이다. 시험 결과는 그 다음 이환 경로를 갖는다고 예상되지 않는 임의의 환자 (예를 들면 바이오마커 음성 환자)가 사실상 정상 참조 구간 연구로부터 유도된 값과 비교된 경우 비정상 경로 활성을 갖는지를 평가한다. 본 발명의 결과는 또한 바이오마커 음성인 환자가 모두 비정상이고 바이오마커 양성 환자의 경로 활성에 비교할만한 경로 활성을 갖는지를 보기 위해 질환으로 현재 진단되는 대상체 (바이오마커 양성 환자)로부터 실시된 측정에 대하여 바이오마커-음성 환자로부터 관측된 비정상 측정에 대하여 비교된다. 경로 활성을 방해하기 위해 의도된 요법을 현재 받고 덕을 보는 환자의 경로 활성에 비교할만한 비정상 경로 활성을 갖는 환자는 따라서 경로 질환을 갖는 것으로서 진단될 것이고 따라서 경로 활성을 방해하기 위해 바이오마커를 표적하는 약물로 치료되어야 한다.
- [0403] 본 발명은 따라서 이환 경로의 기능성 활성에 기반된 질환 진단의 더욱 정확한 수단을 의사가 창출하게 한다. 이는 상관적인, 원인이 되지 않는 모델에 의존하는 단일 바이오마커가 측정되는 경우 실시된 접근법과 대조된다. 현행 바이오마커 접근법은 위 음성 및 위 양성 결과의 높은 백분율을 초래할 수 있다. 본 발명은 위 결과의 백분율을 감소시킬 것이다.
- [0404] 바람직한 구현예는 80-90% 신뢰 구간을 포함하고, 더 바람직한 구현예는 >90% 신뢰 구간을 포함하고 가장 바람직한 구현예는 >95% 또는 >99% 신뢰 구간을 포함한다.
- [0405] 구현예에서, 컷오프 값은 컷오프 값을 이용하여 반응군 또는 비반응군으로서 맹검 공지된 샘플의 상태의 계측 및 샘플의 비맹검 및 샘플의 상태 예측의 정확도의 계측에 의해 입증된다. 단일 컷오프 값의 경우에서, 컷오프

값 미만에 해당하거나 또는 공지된 반응군에 대한 값에 더 근접한 값은 환자 샘플이 치료제에 반응성을 나타내고 있음을 가리킨다. 값이 컷오프 값이거나 또는 초과이거나 또는 공지된 비 반응군 값에 대한 값에 더 근접하면, 세포 샘플은 치료제에 비 반응군으로서 확인된다. 일부 구현예에서 정의된 기간에서 바이오센서의 출력은 무 반응, 약 반응성 또는 반응성으로서 분류된다.

[0406] 바람직한 구현예에서, 컷오프 값은 컷오프 값을 이용하여 질환 경로 반응 (예를 들면 암 환자)를 갖는 또는 질환 경로 반응 (예를 들면 건강한 무병 환자)를 갖지 않는 것으로서 맹검 공지된 샘플의 상태 예측 및 샘플의 비 맹검 및 샘플의 상태 예측의 정확도의 예측에 의해 입증된다. 단일 컷오프 값의 경우에서, 컷오프 값 미만에 해당하거나 또는 공지된 반응군에 대한 값에 더 근접한 값은 환자 샘플이 치료제에 반응성을 나타내고 있음을 가리킨다. 컷오프 값이거나 또는 초과이거나 또는 질환 경로 반응을 갖지 않는 샘플의 값에 더 근접한 값은 환자 샘플이 무 경로 질환을 나타내는 것을 가리킨다. 값이 컷오프 값이거나 또는 초과이거나 또는 공지된 이환 경로 샘플 값에 대한 값에 더 근접하면, 세포 샘플은 존재한 이환 경로로서 확인된다. 일부 구현예에서 정의된 기간에서 바이오센서의 출력은 존재하지 않는 경로 질환, 비확정적인 경로 질환, 또는 존재한 경로 질환으로서 분류된다.

[0407] 정의된 기간에서 출력은 카테고리에 출력을 분류하기 위해 선택된다. 다른 구현예에서, 정의된 기간은 세포가 바이오센서에서 연속적으로 모니터링되었던 기간의 종료점이다. 다른 구현예에서, 기간은 적어도 60 분, 240 분, 300 분, 10 시간, 24 시간, 60 시간, 또는 120 시간이다. 바람직한 구현예에서 정의된 기간에서 출력은 30 분 및 10 시간이다. 더 바람직한 구현예에서, 정의된 기간에서 출력은 180 분 내지 600 분 또는 240 분이다.

[0408] 구현예에서, 무 반응으로서 분류된 출력은 치료제의 투여에 앞서 기준선 또는 적어도 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 또는 5% 이하 치료제로 치료되지 않은 대조군 세포의 출력 값과 상이한 출력 값으로 나타낸다.

[0409] 다른 구현예에서, 약 반응성으로서 분류된 출력은 치료제의 투여에 앞서 기준선 또는 적어도 50% 이하 및 5% 초과 치료제로 치료되지 않은 대조군 세포의 출력 값과 상이한 출력 값으로 나타낸다. 다른 구현예에서, 반응성으로서 분류된 출력은 치료제의 투여에 앞서 기준선 또는 적어도 50% 초과 치료제로 치료되지 않은 대조군 세포와 상이한 출력 값으로 나타낸다. 구현예에서, 대조군 샘플은 동일한 대상체로부터 및 치료제로 치료되지 않은 질환 세포의 샘플이다.

[0410] 본원에서 기재된 방법의 추가 측면은 개별 대상체에서 치료제의 효능을 예측하기 위해 사용될 수 있는 알고리즘의 개발을 포함한다. 알고리즘은, 개별 대상체의 건강의 측면을 한정하는 하나 이상의 환자 특징에 배정된 값과 조합으로, 본원에서 기재된 방법을 이용하여 유도된 값을 편입시킨다. 환자 특징은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 전이의 존재, 전이의 위치, 결절 상태, 암의 초기 진단부터 전이의 진단까지 무병 구간, 아췌판트 화학요법의 수령, 다른 약물 요법의 수령, 방사선 요법의 수령, 질환의 우세한 부위, 종양 질량 크기, 바디-질량 지수, 연한 관절의 수, 팽윤된 관절의 수, 통증, 장애 지수, 의사 전면적인 평가, 환자 전면적인 평가, 배쓰 강직 척추염 작용성 지수, 배쓰 강직 척추염 질환 활성 지수, 배쓰 강직 척추염 도량형 지수, C-반응성 단백질, 총 요통, 염증, 유전적 상태, 다른 병의 이력, 다른 생명 유지 관련 건강 통계 상태, 및 임의의 이들의 조합. 이들 값을 편입시키는 알고리즘은 치료제가 표적하기 위해 의도되는 질환을 가진 환자의 집단에서 질환 진행과 그의 상관관계에 따라 이들 값을 가감할 것이다. 차별적인 반응과 임의의 상관관계를 입증하지 않았던 질환 특징은 알고리즘에 포함되지 않을 것이다.

[0411] 하나의 구현예에서, 환자 특징상에 배치된 값은 시험 결과의 퇴행 분석 (즉, 본원에서 기재된 바와 같이 치료제, 교란제, 활성제 제제, 등에 대한 반응성의 예측 방법으로부터 유도된 값), 환자 특징, 및 연구된 환자의 그룹의 임상 결과로부터 유도될 수 있다. 상기 분석으로부터, 알고리즘 값은 유도될 수 있다. 하나의 예에서, 환자 특징 데이터에 기반된 변수와 조합으로 시험을 이용한 알고리즘의 최적화는 0.10으로 시작하여 폭 0.10의 9 동등하게 이격된 컷-포인트에 기반하여 10 구간으로 시험 값을 분할함으로써 수행될 수 있다. 각 컷-포인트에 대하여, 폭스 퇴행은 대상체가 컷-포인트 미만 또는 동등인 알고리즘 값을 가지면 값 "1" 및 달리 "0"으로 표시하는 지표 변수를 이용하여 실시될 수 있다. 컷-오프에서 또는 그 미만에서의 컷 대 컷-오프 초과와 비교인, 위험 비율은 각 컷-포인트에 대하여 예측될 것이다. 추정된 위험 비율을 최소화하는 컷-포인트의 값은 그 다음 선택된다.

[0412] 예를 들어, 환자의 총 종양 질량이 특정 값 초과인 경우, 본원에서 기재된 방법에 의해 예측된 바와 같이, 약물에 대한 그의 반응성이 약물에 대한 비 반응성인 환자에 대하여 발견된 중앙 결과를 넘어서 환자의 포텐셜 무진행 기간을 연장시키기에 충분하지 않을 것이 발견될 수 있다. 시험 결과가 약물이 환자에서 기능성이라는 것, 및 이들이 달리 이의 덕분으로 예상될 것이라는 것을 나타내는 경우에서, 환자 특징 변수를 포함하는 알고리즘

은 중앙 질량 변수가 시험 결과 값을 상쇄시키기 때문에 결과가 불확정임을 보고할 것이다.

[0413] 본원에서 기재된 방법의 또 다른 측면은 표적화 치료제에 반응할 것 같은 또는 반응하지 않을 것 같은 환자를 확인하는 시험용 컷-오프 값의 예측 방법을 제공한다. 상기 방법은 하기를 포함한다: a) 각각의 이들이 동일한 질환을 갖고 동일한 치료제로 처방되는, 환자의 그룹의 선택, b) 환자의 그룹 내에서 각 대상체에 대하여 시험 값을 유도하기 위해 본원에서 기재된 방법의 이용, c) 사전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해 시험된 총 환자의 유의미한 백분율로 충분한 일정 기간에 걸쳐 시험된 환자의 그룹의 각 구성원의 건강 상황 및, 이들이 했다 면, 사전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해, 각각의 환자에 대하여 요구된 시간의 길이의 기록의 관찰, d) 다른 것에 값에서 등거리인 2 이상의 후보자 컷-오프 값의 확인 (여기서 각 후보자 컷-오프 값은 환자가 반응할 또는 반응하지 않을 것으로 예상되는 것 미만 및 스코어가 컷-오프 값 미만에 해당한 것의 반대편 방식으로 환자가 반응한다고 예상되는 것 초과 값을 나타낸다), e) 시험 값이 컷-오프 또는 미만인 환자에 대하여 임상 종료점 기간과 시험 값이 컷-오프 초과인 환자에 대하여 임상 종료점 기간 사이의 차이를 분석하기 위한 통계적 인 방법의 이용, 및 f) 컷-오프 값 초과 및 미만의 환자의 그룹 사이에서 통계적으로 유의차가 있는 것을 나타 내는 후보자 컷-오프 값의 그룹 중에서 요법에 반응하지 않는다고 예상되는 환자의 최대 백분율을 초래하는 컷- 오프 값의 선택.

[0414] 본원에서 기재된 방법을 이용하여, 세포가 동일한 치료제로 시험된 동일한 질환을 가진 다른 개인으로부터 유도 된 시험 값에 비교될 수 있는 개별 대상체에 대하여 숫자적 시험 결과 값을 유도하는 것이 가능하다. 이는 하기 에 의해 개별 대상체에 치료제의 효능을 감소시킬 수 있다: a) 동일한 질환을 갖는 및 동일한 치료제로 시험 된 그룹 개별 대상체에 대하여 시험 결과 값의 기록, b) 상기 값의 목록으로의 열거, c) 각 개별 대상체의 절대 적인 숫자적 시험 값을 기준으로 시험된 개별 대상체에 대하여 시험 결과 값을 기준으로 목록의 배치, 및 d) 개 별 대상체의 시험 값의 백분위 순위의 예측 (여기서 개별 대상체의 시험 값의 상기 백분위 순위는 개별 대상체 에서 질환에 대하여 치료제의 효능을 예측한다).

[0415] 또 다른 구현에는 특정한 결과의 백분위 순위화를 추정하기 위해 동일한 요법의 효능을 시험하는 임상시험으로 부터 수득된 결과의 분석 및 그 다음 개별 대상체의 시험 값에 대하여 백분위 순위의 확인, 및 동일한 백분위 순위화에 상응하는 임상시험 종료점 결과의 확인을 포함하고, 여기서 개별 대상체의 시험 값과 동일한 백분위 순위화에서 상기 임상시험 종료점 결과는 개별 대상체가 질환용 치료제로부터 수득할 수 있을 것 같은 임상 결 과를 예측한다. 임상시험 종료점은, 예를 들어, 하기를 포함할 수 있다: 시간-대-진행 기간, 무진행 생존 기간, 전체 생존율 기간, 객관적 반응 기간, ACR 반응, 토탈 샤프 스코어 (Total Sharp Score)에서 변화, 침식 스코어, 및 관절 공간 협소화(Joint Space Narrowing), 임상 반응, 통증, 장애 지수, 임상 차도, 체표면적 관여, 의사 전면적인 평가, 및 건선 면적 및 중증도 지수.

[0416] 또 다른 구현에는 본원에서 기재된 방법으로부터 유도된 시험 결과 값과 시험된 치료제를 받은 개인에 대한 임상 결과 사이에서 통계적인 상관관계의 예측 방법을 포함한다. 상기 방법은 하기를 포함한다: a) 각각 동일한 질환을 갖고 동일한 치료제 처방되는, 환자의 그룹의 선택, b) 개인에 대하여 시험 결과 값을 유도하기 위해 본 원에서 기재된 방법의 이용, c) 동일한 질환을 갖고 동일한 치료제로 시험된 환자의 그룹 내에서 각 대상체에 대하여 시험 결과 값의 목록의 열거, d) 사전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해 시험된 총 환자의 유의미한 백분율로 충분한 일정 기간에 걸쳐 시험된 환자의 그룹의 각 구성원의 건강 상황의 관찰, e) 이들이 했다면, 사 전규정된 임상 종료점을 달성하기 위해 각각의 환자에게 요구된 시간의 길이의 기록, f) 종료점 결과와 시험 값 사이에서 통계적인 관계가 예측되는 그와 같은 방식으로 종료점 데이터 (예를 들면 시간-대-진행 기간, 무진행 생존, ACR 반응)의 분석.

[0417] 예의 방식으로, 일단 임상시험로부터 결과가 이용가능하면, 컷-오프 값 - "C\*" -의 추정치의 예측은 아래와 같 이 진행된다. 시험 값이 환자 결과, 예컨대 시간-대-진행 (TTP)을 예측하는 것을 콕스 퇴행 시험이 나타낸다는 가정하에, 시험 값은 0.10으로 시작하는 폭 0.10의 9 동등하게 이격된 컷-포인트에 기반하여 10 구간으로 분할 될 것이다. 각 컷-오프에 대하여, 콕스 퇴행은 대상체가 컷-포인트 미만 또는 동등인 검정 값을 가지면 값 "1" 및 달리 "0"으로 표시하는 지표 변수를 이용하여 실시될 것이다. 컷-오프에서 또는 그 미만에서의 것 대 컷-오프 초과와 비교인, 위험 비율은 각 컷-포인트에 대하여 예측될 것이다. 추정된 위험 비율을 최대화하는 컷 -포인트의 값은 연구의 후속 중추적 시기에서 사용을 위하여 선택될 것이다. 최종 분석을 위하여, 콕스 비례 위 험 퇴행은 지표 변수 (컷-포인트 미만 대 컷-포인트 초과)로 실시될 수 있다. 최종 분석은 또한 TTP의 다른 추 정 예측의 환자 특징적인 변수를 포함할 수 있다.

[0418] **F. 치료제 및 활성제 제제**

- [0419] 종종 환자가 특정한 질환 또는 병태로 진단된 경우, 다양한 치료 옵션이 있다. 일부 경우에서, 치료는 매우 고가일 수 있거나 또는 환자가 치료에 반응군 또는 비-반응군이 될 것 같은지를 알기에 유용하도록 치료와 관련된 부작용이 중증일 수 있다. 또한, 환자가 내성이 있는 경우, 환자의 이환 세포가 내성이 있는 다른 치료가 현재 유효할지를 아는 것이 유용할 것이다.
- [0420] 특정 구현예에서, 일부 환자가 반응하고 다른 환자가 반응하지 않는 병태의 치료에서 사용되는 임의의 치료제 또는 치료제들은 본원에서 기재된 방법에서 분석될 수 있다. 예를 들어, 암에 대하여, 수많은 상이한 키메라성 및 인간화된 항체를 포함한 수많은 표적된 면역요법이 이용가능하다. 자가면역 병태에 대하여, 분자 예컨대 염증성 사이토카인 또는 그의 수용체에 표적된 것은 분석될 수 있다. 염증성 사이토카인에 표적된 제제의 예는 항-TNF  $\alpha$  제제, 인터페론 알파를 표적한 제제, 인터류킨, 등등이다. 면역억제성 제제 예컨대 코르티코스테로이드, 타크롤리무스 (FK-506 또는 TACR) (T-세포 대사 및 증식을 억제시킨다), 시롤리무스 (SIRO/81768), 미오코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF), 칼시뉴린 억제제 (CI), 사이클로스포린 (CsA), 및 라파마이신 (mTOR 억제제).
- [0421] 다른 구현예에서, 방법은, 개별 대상체로부터 이환 세포의 생리적 파라미터에서 변화를 일으키는 능력에 대하여, 하나 이상의 치료제, 교란제 (예를 들면, 활성제 제제), 확인제, 또는 이들의 조합의 시험을 포함한다. 구현예에서, 치료제는 또한 무 표지이다. 일부 구현예에서, 2 이상의 치료제는 분리하여 또는 동일한 환자로부터 이환 세포의 별도 샘플에서 조합으로 시험될 수 있다. 다른 치료제보다 더 적은 용량에서 세포성 반응 또는 생리적 특징에서 최대 변화를 일으키는 치료제가 선택된다. 최대 치료 효과를 제공하는 화합물의 조합이 예측될 수 있다. 구현예에서, 치료적 지수 및 다른 개인 안전성 및 내성 효과를 측정하기 위해 환자의 건강한 세포 또는 비-이환 환자의 건강한 세포 또는 비-이환 환자 결과의 풀과 비교된 경우 예측이 될 수 있다.
- [0422] 일부 구현예에서, 치료제가 세포성 경로에 영향을 미치는 표적화 치료제인 경우, 세포성 반응성에서 변화는 경로의 활성제 제제 또는 교란제 (즉, 교란 제제)의 부재 또는 존재하에 측정된다. 기준선 측정 또는 컷-오프 값과 비교된 경우 및 선택적으로, 다른 치료제와 비교된 경우 경로의 교란제에 세포성 반응성을 억제시키는 치료제가 선택된다.
- [0423] 다른 구현예에서, 치료제가 세포 표면 수용체에 결합하는 표적화 치료제인 경우, 세포성 반응성에서 변화는 수용체에 결합하는 활성제 제제 또는 교란제의 부재 또는 존재하에 측정된다. 구현예에서, 치료제는 활성제 또는 교란제 이전 또는 이후 세포 샘플에 투여된다. 구현예에서, 활성제 제제 또는 교란제는 무 표지이다. 세포 표면 수용체의 밀도와 무관하게, 기준선 측정과 비교된 경우 및 선택적으로, 다른 치료제와 비교된 경우 활성제 제제 또는 교란제에 세포성 반응성을 억제시키는 치료제가 선택된다. 일부 구현예에서, 세포 수용체의 밀도에 독립적인 활성제 제제 또는 교란제의 작용을 억제시키는 치료제가 선택된다.
- [0424] 생리적 파라미터에서 변화는 기준선 또는 건강한 또는 미교란된 세포 대조군과 비교된 경우 파라미터에서 증가 또는 감소일 수 있다. 변화는 하기를 나타낼 수 있다: 전체 작용, 초작용, 비가역적 작용, 선택적 작용, 공동-작용, 역 작용, 또는 부분 제한 작용, 가역적 및 비가역적 길항작용, 경쟁적 길항작용, 비-경쟁적 길항작용, 비-경쟁적 길항작용. 변화는 적절한 대조군과 비교된 경우 더 먼저, 더 후에 또는 전혀 발생할 수 있다. 변화는 더 긴 또는 더 짧은 기간 동안 발생시키기 위해 선택될 수 있다. 가역적 또는 비가역적인 변화가 선택될 수 있다.
- [0425] 예를 들어, 세포 신호전달에서 감소를 초래하는 치료제는 자가면역 병태의 치료를 위하여 선택될 것이다. 사이토카인의 작용을 억제시키는 제제에 반응하는 말초 혈액 세포는 세포 신호전달에서 감소를 보여준다. 또 다른 예에서, 항암제, 예컨대 Her2 같은 수용체에 표적된 인간화된 항체에 반응성인 질환 세포에 대하여, 질환 세포는 EGF 계열 경로 신호전달에서 유의미한 감소를 보여줄 것이다. 다른 사례에서, 항-혈관형성제에 반응성인 질환 세포에 대하여, 질환 세포는 VEGF 경로 신호전달에서 감소 또는 증식성 능력에서 감소를 보여줄 것이다. 제제의 각 유형에 대하여 측정된 CREMS 반응 또는 물리적으로 관측가능한 특징은 약물이 불법으로 설계되었고 필요에 따라 특이적 또는 일반적인 수 있는 의도된 생리적 반응에 의존한다. 비결은 약물이 변경하도록 의도된 반응을 시험하기 위해 일정한 기간 동안 살아있는 세포의 생리적 측정에 대하여 CREMS의 용도이다.
- [0426] 특정한 치료제 또는 치료제들은 특정한 치료제 또는 치료제들의 유효성을 측정하기 위해 이환 세포, 및 선택적으로, 건강한 세포에 투여될 수 있다. 이환 세포 및/또는 건강한 세포는 또한 치료된 및 미치료된 이환 및/또는 건강한 세포에서 치료제 또는 치료제들의 효과를 비교하기 위해 미치료될 수 있다. 단일 치료제는 대상체가 치료적 치료에 얼마나 반응할지를 측정하기 위해 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상이한 치료제의 패널은

특정한 대상체의 세포에 투여될 수 있다.

- [0427] 특정 구현예에서, 세포성 경로의 활성화를 억제시키기 위해 치료제의 효능에 대하여 컷오프 값은 약물의 부가 및 생리적 반응의 측정예에 의해 하나의 구현예에서 예측된다. 또 다른 구현예에서, 경로는 약물 사전-치료 있거나 없이 교란된다. 생리적 기준선 신호에 대한 변화 또는 85% 신뢰 구간에서 또는 이상적으로 90% 신뢰 구간 초과에서 또는 더욱 이상적으로 95% 또는 99% 신뢰 구간 초과에서 약물에 의한 교란 신호의 감소는 유효한 것으로 간주된다. 구현예에서, 세포 증식을 억제시키는 또는 세포 사멸을 향상시키는 치료제의 효능에 대하여 컷오프 값은 경시적으로 생리적 반응의 기록에 의해 예측된다. 85% 신뢰 구간 또는 이상적으로 90% 신뢰 구간 초과 또는 더욱 이상적으로 95% 또는 99% 신뢰 구간 초과에서 약물에 의해 비-치료된 또는 건강한 세포 또는 이의 조합에 비교된 경우 일시적 패턴으로부터 생리적 기준선 신호 또는 편차에 대한 감소는 유효한 것으로 간주된다.
- [0428] 개별 대상체의 질환 치료용 치료제의 감수성 및 특이성은 약물이 특이적 표적상에서 설계된 대로 작동하는 것을 예측하기 위해 CReMS에 의해 측정된 바와 같이 세포성 생리적 경로 반응의 비교 및 효능에 대하여 컷오프 값이 획득되었는지 예측에 의해 예측된다.
- [0429] 일부 구현예에서, 활성제 제제 및/또는 치료제는 한쪽 제제에 대하여 힐 슬로프 (Hill Slope), EC<sub>50</sub> 또는 IC<sub>50</sub> 값을 획득하기 위해 적정된다. 활성화제 적정 및/또는 치료제 적정으로부터 획득된 데이터는 한쪽 제제의 효력 (농도가 절반 최대 효과를 달성하는 것) 및 또는 효능 (최대 달성가능한 효과)를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 추가 측면은, IC<sub>50</sub> 값을 개발하기 위해 활성제 제제 또는 치료제를 적정함으로써, 대상체로부터 획득된 이환 세포를 이용한 개별 대상체에서 치료제의 효능의 예측 방법을 포함하고, 여기서 활성화제는 세포성 경로 활성을 감소시키고 치료제는 세포성 경로 활성을 작용화한다.
- [0430] 치료제는 비제한적으로 세포 증식을 억제시키는 또는 세포 사멸을 일으키는 특정한 세포성 경로 및/또는 제제에 표적되는 제제를 포함할 수 있다. 치료제가 표적하는 경로의 예는 하기를 포함한다: MAPK-PK, RAS/RAF, RHO, FAK1, MEK/MAPK, MAK, MKK, AKT, EGF 수용체, Her2 수용체, Her 3 수용체, Her 4 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 안드로겐 수용체, GPER30, PIK3/PTEN, VEGF 수용체 경로 억제제, 세포 접착, TGF베타/SMAD, WNT, 헤지혹/GLI, HIF1 알파, JAK/STAT, 노치, G1/S 전이의 대조군, DNA 손상 대조군, 및 세포사멸사. 일부 구현예에서, 치료제는 세포 사이클 조절에 관여된 세포성 경로를 표적한다. 세포 사이클 조절에 영향을 미치는 예시적인 표적화 치료제는 CDK4, CDK6, PD-1, 및 사이클린 (예를 들면, 사이클린 A, B, C, D, E, 또는 F, 및 G1/S 사이클린)에 표적된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 치료제는 방향화효소 효소를 표적한다.
- [0431] 다른 구현예에서, 치료제는 하기로부터 선택된다: 수많은 소분자 및 항체 약물 예컨대 트라스투주맙, 페르투주맙, 라파티닙, 도세탁셀, 타목시펜, 시스플라틴, 아브라칸, 파클리탁셀 주사, 브렌톡시맙 베도톤, 에버롤리무스, 페메트렉세드, 엑세메스탄, 오파투무맙, 베바시주맙, 알렘투주맙, 이리노테칸, 바이칼루타마이드, 옥살리플라틴, 세톡시맙, 비소메데깁, 토레미펜 시트레이트, 폴베스트란트, 켐시타빈, 이마티닙, 익사베필론, 토페오테칸, 악시티닙, 로미렙신, 카브라지탁셀, 소라페닙, 인플릭시맙, 레날리도마이드, 리톡시맙, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 파클리탁셀, 테모졸로마이드, 트리옥사이드, 파니투무맙, 보르테조미, 아자시티딘, 파조파닙, 크리조티닙, 카페시타빈, 이필리무맙, 베무라페닙, 고세렐린 아세테이트, 아비라테론, BH3 모방체, 나비토클락스, 아나스트로졸, 레트로졸, 방향화효소 억제제, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 메토트렉세이트, 플루오로우라실, 익사베필론, 카보플라틴, 아플리베르셉트, 템시롤리무스, 이르브리투모맙, 아비라테론, 쿠스티르센, 네라티닙, 엔잘루타마이드, 니볼루맙, 팔보시클립, 레고라페닙, 엔티노스태트, 아파티닙, ARN-509, ARN-810, BIND-014, 다브라페닙, 다라투무맙, 람브롤리주맙, LDK378, MM-121, sym004, 트라스투주맙 엠탄신, 티보자닙, 트라메티닙, 악시티닙, LY2835219, MPDL320A, 오비누투주맙, Sym004, 토시투모맙, 트라메티닙, 네시투무맙, 라무시루맙, 및 이들의 조합. 이들 치료제의 표적은 공지되어 있다. 치료제의 추가의 조합은 Chou and Talalay 방법 (Chou, Cancer Res., 70(2):440-446 (2010))을 이용하여 선택될 수 있다.
- [0432] 하나의 구현예에서, 개별 대상체에서 질환용 제제의 치료적 효능의 예측 방법은 하기를 포함한다: 세포성 반응 측정 시스템 (CReMS)에서 개별 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 제제의 투여; 및 기준선 측정과 비교된 경우 제제에 대한 세포 샘플의 세포성 반응 파라미터에서 변화가 발생하는지의 예측 (여기서 세포성 반응에서 상기 변화는 제제가 개별 대상체에서 질환에 대하여 치료적 효능을 갖는 것을 나타낸다). 구현예에서, 방법은 추가로 세포성 반응 측정 시스템에서 개별 대상체로부터 적어도 하나의 단리된 질환 세포 샘플에 치료제의 투여 이전 또는 이후 세포성 반응 경로를 교란시키는 교란제 또는 활성제 제제의 투여를 포함한다.
- [0433] 일부 구현예에서, 치료제는 세포성 경로의 구성원인 세포 표면 수용체에 표적된다. 이들 샘플은 샘플이 경로의 활성제 제제 또는 교란제로 활성화되기 이전 치료제와 접촉될 수 있다. 다른 구현예에서, 활성제 제제 또는 교

란제는 하기를 포함한다: 특이적 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, 포스포티딜 이노시톨, 상피 성장 인자, 간세포 성장 인자, m-CSF, RANK 리간드, 중앙 피사 인자 (TNF- $\alpha$ ), 뉴레굴린, 에스트로겐, 프로게스테론, 플레이트, 아데노신 삼인산, 및 FAS 리간드, 혈소판 유도된 성장 인자 (PDGF), 또는 세포성 경로 또는 신호전달 교란의 다른 제제 예컨대 대상체의 플라즈마 또는 혈청, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, 글루코오스, 글루타민, 히스티딘, 만니톨, 및 트립토판, 항생제 (라파마이신), 필수 및 비-필수 아미노산, 비타민, 다른 유기 화합물, 미량 미네랄 및 무기 염, 혈청, 세포 추출물, 분획화된 세포 추출물 또는 분획화된 혈청, 세포의 신호전달 인자, 세포내 신호전달 인자, 인슐린, 트랜스페린, 나트륨 셀레나이트, 하이드로코르티손, 에탄올아민, 포스포포리에탄올로아민, 트라이도티로닌, 나트륨 피루베이트, L-글루타민. 다른 구현예에서, 치료제는 세포 증식 억제제, 세포 사멸 향상, 및 이환 상태로 이어지는 신호에 세포의 미반응성 또는 덜 반응성화에 의해 이환 세포에 영향을 미치는 것이다. 상기 치료제의 예는 하기를 포함한다: 사이클로포스파마이드, 5-FU, 카페시타빈, 및 다른 피리미딘 약물, 다른 것 SN-38 대사물질 유사체 (Ex. 이리노테칸), 탁솔, 및 백금 함유 약물 (Ex. 시스플라틴).

[0434] 일부 구현예에서, 하나 이상의 이들 제제들에 샘플의 반응은 또한 세포 증식을 교란시키는 성장 인자 또는 항-세포자멸적 제제의 존재 또는 부재하에 측정될 수 있다. 세포 증식을 교란시키는 성장 인자는 하기를 포함한다: 성장 호르몬, 상피 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, 혈소판 유도된 성장 인자, 간세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 신경 성장 인자, 및 당해 기술에 실시된 것에 공지된 다른 것. 항-세포자멸적 제제는 항-세포자멸적 단백질 또는 경로를 조절하는 화합물 (예를 들면, 항-세포자멸적 Ras 신호전달 캐스케이드의 대조군용 게피티닙 및 Bcl-2 단백질 활성에 관한 탁솔)을 포함한다.

[0435] 예를 들어, 유방암으로 진단된 및 과발현된 또는 증폭된 HER2 수용체를 갖도록 예측된 특정한 대상체에 대하여, 그 대상체로부터 단리된 세포는 특정한 항-암 치료제, 특히 항-HER2 치료제에 대한 반응성으로 시험될 수 있다. 예를 들어, 과발현된 HER2 대상체로부터 세포는 상피 성장 인자 (EGF) 및/또는 상동성 구조화된 펩타이드, 뉴레굴린, 또는 헤레굴린의 존재 또는 부재하에 트라스투주맙 또는 라파티닙에 대한 반응성으로 시험될 수 있다. 하나의 구현예에서, 대상체로부터 세포는 바이오센서상에서 씨딩될 수 있다. 구현예에서, 세포는 무 표지 전체의 세포이다. 상기 세포 둘 모두는 유방암 중앙 및 건강한 유방 조직으로부터 세포일 수 있다. 트라스투주맙 또는 라파티닙은 이환 세포의 샘플 및, 선택적으로, 건강한 세포의 샘플에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 트라스투주맙으로 치료된 세포 샘플은 그 다음 Her 수용체 활성화제 예컨대 뉴레굴린과 접촉된다. 모든 이환 및 건강한 세포의 샘플은 미치료된 채 남아있을 수 있다. 세포성 반응은 세포성 반응 측정 시스템 (CREMS)을 이용하여 측정된다. 구현예에서, 세포성 반응은 1 시간 이하 이후 측정된다. 특정한 대상체의 세포를 표적하는 트라스투주맙의 유효성은 그 다음 경로의 교란의 존재 또는 부재하에 측정될 수 있다.

[0436] 특정 구현예에서, 세포성 경로의 활성화제, 세포 증식의 활성화제, 또는 세포자멸사의 억제제에 개별 대상체의 세포 샘플의 세포성 반응을 억제시키는 제제가 선택된다. 동일한 또는 상이한 경로를 활성화시키는 수많은 상이한 치료제가 개시내용의 방법에서 평가되는 경우, 다른 것보다 더 낮은 농도에서 활성화제 또는 억제제 반응을 억제시킬 수 있는 제제가 바람직하게는 선택된다.

[0437] 유사한 구현예에서, 치료제는 감소된 활성이 이환 상태로 이어진 세포성 활성의 작용화 또는 부분적으로 작용화에 의해 이환 세포에 영향을 미치는 것이다.

[0438] 시험은 일반적으로 20% 미만 표준 편차 및 최적으로 5% 미만 표준 편차를 이용하여 1nM 미만 내지 100uM 초과 농도의 범위에서 약물의 유효성을 측정할 수 있다. 화합물 시험 범위는 최대 내성 용량으로서 공지된 약물 패키징 표지상에 정의된 바와 같이 투약 수준에 상응할 것이다. 시험내 세포의 실제 세트에서 살아있는 세포의 수를 확인할 수 없는 대부분의 시험과 달리, 상기 시험은 시험의 시작에서 품질 대조군 및 기준선 생리적 측정 단계에서 측정된 바와 같이 살아있는 세포와 함께 단지 작용한다. 상기 특성의 결과는 시험 결과의 변동을 감소시킨다. 시험은 온도, 산소, 습도, 및 당해 기술에서 실시된 것에 통상적으로 공지된 세포 생존력으로 일반적으로 허용가능한 이산화탄소 범위를 이용하여 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 바람직한 온도 범위는 25°C-40°C이다. 다른 사례에서 온도는 특이적 작은 변화를 위하여 상기 범위 내에서 추가로  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 까지 최적화될 수 있고 표준 온도 제어된 인큐베이터 캐비닛을 이용하여 유지될 수 있다.

[0439] 또 다른 구현예에서, 개인으로부터 이환 세포의 샘플은 항암 치료제의 패널에 대한 반응성에 대하여 시험될 수 있다. 암에 대하여, 수많은 소분자 및 항체 약물은 이용가능하다. 상기 치료제의 예는 하기를 포함한다: 트라스투주맙, 페르투주맙, 라파티닙, 도세탁셀, 타목시펜, 시스플라틴, 아브락산, 파클리탁셀 주사, 브렌독시맙 베도톤, 에버롤리무스, 페메트렉세드, 엑세메스탄, 오파투무맙, 베바시주맙, 알렘투주맙, 이리노테칸, 바이칼루타마

이드, 옥살리플라틴, 세특시맵, 비소메데깁, 토레미펜 시트레이트, 플베스트란트, 켈시타빈, 이마티닙, 토페오데칸, 약시티닙, 로미덱신, 카브라지탁셀, 소라페닙, 인플릭시맵, 레날리도마이드, 리톡시맵, 다사티닙, 수니티닙, 에를로티닙, 닐로티닙, 파클리탁셀, 테모졸로마이드, 트리옥사이드, 파니투무맵, 보르테조미, 아자시티딘, 파조파닙, 크리조티닙, 카페시타빈, 이필리무맵, 베루라페닙, 고세렐린 아세테이트, 아비라테론, BH3 모방체, 나비토클라스, 아나스트로졸, 레트로졸, 방향화효소 억제제, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 메토틱세이트, 플루오로우라실, 및 이들의 조합.

[0440] 예를 들어, 과발현된 HER2 대상체로부터 수집된 세포의 샘플은, 항-HER2 치료제를 포함한, 항-유방암 치료제의 패널에 대해 시험될 수 있다. 하나의 구현예에서, 대상체로부터 세포의 각 샘플은 항-유방암 치료제 중 하나가 투여될 수 있다. 항-유방암 치료제의 패널은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 트라스투주맵, 페르투주맵, 라파티닙, 도세탁셀, 타목시펜, 시스플라틴, BH3 모방체, 방향화효소 억제제, 사이클로포스파마이드, 독소루비신, 메토틱세이트, 플루오로우라실, NeuVax™(아주반트 사르그라모스팀 (rGM-CSF)으로 투여된 E75 펩타이드), 및 이들의 조합. 방향화효소 억제제는 방향화효소 억제제의 적어도 하나일 수 있다 아나스트로졸, 레트로졸, 또는 엑세메스탄이다. BH3 모방체는 나비토클라스일 수 있다.

[0441] 하나의 구현예에서, 항-유방암 치료제는 하기일 수 있다: Her/Neu 수용체 계열 활성 조절물질 (예를 들면, 페르투주맵), 세포성 성장 인자 수용체 조절물질 (예를 들면, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체의 조절물질), 미토겐 활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 경로 조절물질, (PI3K) 경로 조절물질, BH3 모방체, 방향화효소 억제제, 또는 이들의 조합.

[0442] 본 발명의 방법은 안전성을 측정하기 위해 및 치료적 유효성을 측정하기 위해 대상체의 세포에 후보자 치료제의 투여를 포함한다. 추가로, 대상체의 이환 세포에 후보자 치료제의 투여는 II 또는 III 기 임상시험에 대하여 적절한 환자 집단의 선택 방법으로서 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 공지된 치료적 조합에 대해 이환 세포의 시험을 포함한다. 추가로, 본 발명의 방법은 공지된 및 후보자 치료제의 시험을 포함한다.

[0443] 본 발명의 방법은 또한 제제의 특정한 조합이 더 효과적인 결과 (즉, 질환 증상의 완화 또는 치유)를 생산하는지를 측정하기 위해 치료제의 조합의 투여를 포함한다. 치료제의 조합은 동일한 세포 샘플에 투여된 2 이상의 치료제이다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 치료제의 조합은 동반하여 세포 샘플에 투여된다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 치료제는 조합의 다른 적어도 하나의 치료제의 투여보다 상이한 한번에 세포 샘플에 투여된다.

[0444] 세포 샘플에 치료제의 투여 이후, 실시간 데이터는 세포 샘플의 다중 측면상에서 수집될 수 있다. 예를 들어, pH 및 온도는 측정될 수 있다. 추가로, 다른 인자, 예컨대 "세포 사멸 인자"는 측정될 수 있다. CReMS에 의해 측정된 바와 같이 세포 사멸 인자는 CReMS에 의해 측정된 바와 같이 물리화학 특성에서 변화될 수 있다. 예를 들어, 암 세포는 표면에 부착할 것이고 굴절률용 기준선 판독을 제공할 것이다. 암 세포 사멸을 촉진시키는 치료제의 투여는 샘플내 암 세포가 모이지고 표면으로부터 탈착하기 때문에 굴절률에서 변화를 야기할 것이다. 이는 연속적 실시간 방식으로 표면 플라즈몬 공명을 이용한 광학적 바이오센서에 의해 측정될 수 있다.

[0445] 하나의 구현예에서, 본 발명은 CReMS에서 대상체로부터 질환 세포 샘플에 제제의 투여 및 기준선 측정에 비교된 제제에 세포 샘플의 생리적 반응의 측정에 의해 특정한 대상체용 제제의 치료적 효능의 측정 방법을 제공하고, 여기서 상기 생리적 반응은 제제의 치료적 효능을 나타낸다. 질환 세포 샘플에 투여된 제제는 단일 제제 또는 2 이상의 제제일 수 있다. 제제가 2 이상의 제제인 경우, 2 이상의 제제는 동반하여 또는 상이한 시간에 투여될 수 있다. 예를 들어, 하나의 제제가 세포 샘플에 투여될 수 있고 제2 제제가 이후의 시간 (예를 들면, 10 분 이후)에 투여될 수 있다. 방법은 또한 이환 세포 샘플에 위약의 투여를 포함할 수 있다. 방법은 또한 건강한 세포 샘플상에 시험되도록 제제(들)의 투여를 포함할 수 있다.

[0446] 특정 구현예에서, 방법은 특정한 치료제에 대하여 최적의 용량 범위의 측정을 포함한다. 용량 범위의 측정은 임상시험의 적절한 설계를 허용하고/하거나 의사가 해로운 부작용과 효능에 균형을 이루게 한다. 구현예에서, 방법은 동일한 환자로부터 이환 세포의 샘플을 분리시키기 위해 치료제의 다양한 용량의 투여, 및 기준선 및/또는 건강한 대조군 세포에 비교된 경우 본원에서 기재된 바와 같이 세포의 생리적 파라미터에서 변화를 초래하는 용량 범위의 측정을 포함한다.

[0447] 일단 본원에서 기재된 임의의 방법이 개별 대상체의 질환 세포가 하나 이상의 치료제에 반응하는지를 측정하기 위해 사용되면, 결과는 대상체의 치료용 치료제의 선택을 허용하도록 건강 관리 작업자에 보고된다. 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 선택된 치료제의 투여를 포함한다.

[0448] **G. 개별 대상체에서 세포성 경로의 상태 계측**

[0449] 많은 질환은, 상기 기재된 바와 같이, 기능이상 세포성 경로에 의해 야기된다. 많은 사례에서, 특정한 유전적 돌연변이는 종종 이들 기능이상 경로와 관련되어, 예를 들어, 과- 또는 저-발현되는 단백질 수용체로 이어진다. 다양한 치료제는 주어진 장애의 특징이 된다고 생각되는 바이오마커를 특이적으로 표적하도록 설계되었다. 불행하게도, 표적화 치료제가 이들을 받는 환자의 절반 미만에서 종종 단지 유효한 것은, 적어도 부분적으로 환자의 질환의 성질이 단순하지 않게 특이적 유전적 바이오마커의 존재의 기능이기 때문이다. 따라서, 질환 바이오마커 또는 유전자 시그니처의 확인은 약물 효능을 정확하게 예측하기에 불충분하다. 질환 과정에 관여된 세포성 경로의 활성화는 유전적 조건의 정적 정량화로 포착되기에는 너무 복잡하다. 상기 기재된 바와 같이, 개별 대상체에서 치료제의 효능은, 단독으로 또는 교란제와 조합으로, 치료제에 대상체로부터 이환 세포 샘플의 노출, 및 치료된 세포상에 제제의 생리적 효과의 측정에 의해 계측될 수 있다.

[0450] 또 다른 구현예에서, 대상체로부터 수득된 세포 샘플에서 제제에 의해 표적된 세포성 경로의 상태를 계측함으로써 표적화 치료제에 개별 대상체의 반응성을 계측하는 것이 또한 가능하다. 세포성 경로가 정상적으로 기능하는 경우, 질환-유발 경로의 활성화는 특이적 세포성 경로를 교란시킨다고 공지된 제제를 이용하여 측정될 수 있다. 상기 구현예는 생존 이환 세포의 맥락에서 세포성 경로의 기능화가 질환 활성화의 으뜸이라는 관찰을 반영하고, 이는 단순히 그 경로 내에서 잔류하는 단백질의 과-발현의 정도 때문이 아니다.

[0451] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은, 경로가 정상적으로 기능화하는 경우 특이적 세포성 경로를 교란시킨다고 공지된 교란제 (예를 들면, 활성화제)와 대상체로부터 수득된 이환 세포 샘플의 접촉에 의해, 개별 대상체로부터 수득된 이환 세포에서 세포성 경로의 기능성 상태의 계측 방법을 제공한다. 하나 이상의 생리적 반응 파라미터는 샘플내 생존 세포에서 (예를 들면, 세포성 반응 측정 시스템 (CREMS)에서) 측정될 수 있고, 연속적 측정의 수학적 분석은 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양이 교란제 및/또는 확인제의 존재하에 발생하는지를 계측하기 위해 사용될 수 있고, 적합한 대조군 (예를 들면 정상 참조 구간) 초과이다. 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화의 양은 교란제에 의해 표적된 세포성 경로가 개별 대상체에서 비정상 또는 정상인지를 나타낸다.

[0452] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 경로가 비정상적으로 기능화하는 경우 특이적 세포성 경로를 교란시킨다고 공지된 교란제와 대상체로부터 수득된 이환 세포 샘플의 접촉에 의해, 개별 대상체용 표적화 치료제의 선택 방법을 제공한다. 하나 이상의 생리적 반응 파라미터는 샘플내 생존 세포에서 (예를 들면, 세포성 반응 측정 시스템 (CREMS)에서) 측정될 수 있고, 연속적 측정의 수학적 분석은 생리적 반응 파라미터에서 변화가 교란제의 존재하에 발생하는지를 계측하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 대조군에 비하여, 교란제의 존재하에 하나 이상의 생리적 반응 파라미터에서 변화는 교란제에 의해 표적된 세포성 경로가 개별 대상체에서 기능이상 (예를 들면 비정상)이라는 것, 및, 따라서, 대상체가 동일한 세포성 경로를 표적하는 표적화 치료제에 반응성일 것을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 추가로 대상체에 표적화 치료제의 투여를 포함한다. 상기 구현예는, 치료제가 영향을 미치는 세포성 경로가 정상적으로 또는 비정상적으로 기능화하는지의 계측에 의해, 표적화 치료제에 개별 대상체의 반응성이 계측되도록 한다.

[0453] 특정한 구현예에서, 개별 대상체에서 세포성 경로의 기능성 상태는 본원에서 기재된 방법의 적용에 앞서 미공지된다. 또 다른 특정한 구현예에서, 대상체로부터 수득된 세포성 샘플은 이환 세포를 함유하고/하거나, 무 표지일 수 있다.

[0454] 교란제의 효과는, 교란제 및/또는 확인제의 존재하에, 샘플내 생존 세포에서 상기 파라미터에서의 변화를 검출하는데 충분한 시간의 규정된 기간 동안 세포 샘플의 적어도 하나의 생리적 반응 파라미터의 모니터링에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 본질적으로 생존 세포로 이루어진다.

[0455] 교란제는 본원에서 기재된 교란제 (예를 들면, 활성화제)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 교란제는 하기일 수 있다: 단백질, 펩타이드, 핵산, 대사물질, 리간드, 유기 분자, 신호전달 인자, 생화학물질, 또는 이들의 조합. 특정 교란제는 비제한적으로 하기를 포함한다: 작용제 또는 길항제, 성장 인자, 사이토카인, 호르몬, 특이적 세포성 활성을 작용화 또는 길항화하도록 설계된 소분자, 효소, 임의의 상기의 펩타이드 및 펩타이드 분획, 항체 또는 항체의 단편.

[0456] 확인제는 본원에서 교란제가 기재된 바와 같이 개시할 수 있는 신호전달 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 제제들을 포함할 수 있다. 교란제 및 확인제에 의해 표적된 경로의 예는 하기를 포함한다: MAPK-PK, RAS/RAF, RHO, FAK1, MEK/MAPK, MAK, MKK, AKT, EGF 수용체, Her2 수용체, Her 3 수용체, Her 4 수용체, PIK3/PDEN, VEGF 수

용체 경로 억제제, 세포 접착, TGF베타/SMAD, WNT, 헤지혹/GLI, HIF1 알파, JAK/STAT, 노치, G1/S 전이의 대조군, DNA 손상 대조군, 및 세포자멸사. 일부 구현예에서, 제제는 세포 사이클 조절에 관여된 세포성 경로를 표적한다. 세포 사이클 조절에 영향을 미치는 예시적인 제제는 CDK4, CDK6, PD-1, 및 사이클린 (예를 들면, 사이클린 A, B, C, D, E, 또는 F, 및 G1/S 사이클린)에 표적된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 방향화효소 효소를 표적한다.

[0457] 예시적인 구현예에서, 교란제 및 확인 치료제는 하기 세포성 과정의 적어도 하나에 관여된 세포성 경로상에서 작용한다: MAP 키나제 신호전달, 세포자멸사, PI3K/Akt/mTOR 신호전달, 염색질/후성유전적 조절, 세포성 대사, 세포 사이클 대조군, 면역학 및 염증, 발달 및 분화, 및/또는 세포골격 조절 및 접착. 예시적인 교란제, 및 이들이 표적하는 경로는 아래 표 6-14에서 제공된다.

[0458] **표 6. 세포 처리 - MAP 키나아제 신호전달**

[0459] 경로

[0460] 미토겐-활성화 단백질 키나아제 캐스케이드

[0461] 성장 및 분화에서의 MAPK/Erk

[0462] MAPK/Erk으로의 G-단백질-커플링된 수용체 신호전달

[0463] SAPK/JNK 신호전달 캐스케이드

[0464] 신호전달 경로 활성화 p38 MAPK

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
미토겐	Ras, Raf, Mos, MEK, Erk, MAPK	<i>Cell. Mol. Life Sci.</i> 64(21), 2771-89 (2007) Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling.
성장 인자 -EGF, FGF, PDGF	MLK3, TAK, DLK, MKK, P38, MAPK, MEK, Erk	<i>FASEB J.</i> 22(4), 954-65 (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival
전- & 항-염증 시토카인 - IL-1, IL-6, IL-10, TNF알파	MEKK, MLK, ASK, MKK, SAPK, JNK, MAPK	<i>Expert Opin Ther Targets.</i> 2008 Feb;12(2):171-83. doi: 10.1517/14728222.12.2.171 - Pro-inflammatory cytokine-induced SAPK/MAPK and JAK/STAT in rheumatoid arthritis and the new anti-depression drugs
산소 또는 CO2의 용력 - 온도, 열 충격, 삼투 압력, 압력, 분압	MEKK, MEK, Erk, BMK, SAPK, p38, MAPK	<i>Biochem&amp;Biophys Res Comm</i> Volume 239, Issue 3, 29 October 1997, Pages 840-844 Hypoxia and Hypoxia/Reoxygenation Activate p65PAK, p38Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), and Stress-Activated Protein Kinase (SAPK)
GPCR 리간드 -도파민, 5-HT, 히스타민, 아세틸콜린, 아미노산 및 이온 (글루탐산염, 칼슘, GABA), 뉴클레오티드, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 케모카인, 트롬빈, 안지오텐신	Erk, JNK, p38, MAPK	<i>Oncogene</i> 26(22), 3122-42 (2007) G protein regulation of MAPK networks

[0465]

[0466] **표 7. 세포 처리 - 세포사멸 경로**

[0467] 세포사멸 (Overview)

[0468] 세포사멸 억제

[0469] 사멸 수용체 신호전달

[0470] 세포사멸의 미토콘드리아 대조군

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
영양성 인자 -Ex. NGF, 뉴트로핀, BDNF	PKC & PI3K/AKT & Bad, Bcl, Bak, Bax, BID 또는 Bim, Noxa, Puma, 카스파제	Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 378-390 (May 2008)   doi:10.1038/nrm2393-Expansion and evolution of cell death programmes
TNF, TRAIL	ASK, JNK, P53 & NIK, NF-κB, 카스파제, ROCK	Biochim Biophys Acta. 2011 Jun;1807(6):735-45. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.03.010. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells
FasL	카스파제, BH3, Bid, XIAP, Bcl-2-조절 세포사멸 경로, Bax/Bak, MOMP	Cell Death Differ. 2012 Jan;19(1):42-50. doi: 10.1038/cdd.2011.121. Fas death receptor signaling: roles of Bid and XIAP

[0471]

[0472] 표 8. 세포 처리 - PI3 키나아제/Akt /mTOR 신호전달

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
인테그린 결합 ECM/RGD 펩티드	PI3K, FAK, ILK, PDK, Akt	Integrin signalling during tumour progression Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 816-826 (October 2004) doi:10.1038/nrm1490
인슐린	IR, IGFr, PI3K, Akt, mTOR, Bcl	Diabetes February 2003 vol. 52 no. 2 227-231 doi: 10.2337/diabetes.52.2.227 Insulin Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase
NRG, HRG, IGF	PI3K, PDK, Akt, mTOR	Curr Cancer Drug Targets 8(3), 187-98 (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications.
시토카인 - GM-CSF, IL-3	JAK, Ras, PI3K, PDK, Akt	The EMBO Journal (2006) 25, 479 - 489 doi:10.1038/sj.emboj.7600948,

[0473]

		& Protein Kinase Activity of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cytokine-Dependent Cell Survival PLOS Biology Published: March 19, 2013 DOI: 10.1371/journal.pbio.1001515
라파마이신	PIKK, PI3K, Akt, 4E-BP1, 랩터(Raptor), PDK	The tor pathway: a target for cancer therapy. Nature Reviews Cancer 4, 335-348 (1 May 2004)   doi:10.1038/nrc1362
파단점 클러스터 영역 단백질 (BCR)	PI3K, PDK, Akt, mTOR, PKC	Leukemia, 2004 Feb;18(2):189-218 JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis

[0474]

[0475] 2개의 TORC 및 Akt. Dev. Cell 12(4), 487-502 (2007)

[0476] 표 9. 세포 처리 - 염색질 / 후성적 조절

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
참고: 핵 수용체의 스테로이드/호르몬 리간드, 참고: Wnt 경로의 리간드, 참고: MAPK 경로 리간드, 참고: PI3K 경로 리간드	KMT, MLL, KDM, UTX, DOT1L, BRD, TET, SirT1, Hat, SNF, DNMT, EZH	<i>Epigenetics &amp; Chromatin</i> 2013, 6:28 doi:10.1186/1756-8935-6-28 Epigenetic coordination of signaling pathways during the epithelial-mesenchymal transition & <i>Cancer Res.</i> 2011 March 1; 71(5): 1752-1762. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3573 Epigenetic Silencing Mediated Through Activated PI3K/AKT Signaling in Breast Cancer

[0477]

[0478] 표 10. 세포 처리 - 세포성 대사

- [0479] 경로
- [0480] 인슐린 수용체 신호전달
- [0481] AMPK 신호전달
- [0482] 와르버그(Warburg) 효과

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
응력, 낮은 글루코오스, 열 충격, 트롬빈, 히스타민, 아드레날린 수용체 리간드	AMPK, PLC, CaMKK	(2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. <i>Nat. Chem. Biol.</i> 7(8), 512-8.
인슐린	AMPK, PI3K, Akt, Ras, RaF, Erk,	(2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. <i>Cell. Mol. Life Sci.</i> 67(20), 3407-23
글루코오스, 락테이트, 시트레이트	글루코오스 수송체 & 대사, Ras, PFK, FAS, Krebs 주기, AKT, Bim/Bad/Bcl	(2010) The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. <i>Mol. Aspects Med.</i> 31(1), 60-74 & (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. <i>Annu. Rev. Cell Dev. Biol.</i> 27, 441-64
인슐린 & 성장 인자	PI3K, Akt, mTOR, 해당작용	(2011) Regulation of cancer cell metabolism. <i>Nat. Rev. Cancer</i> 11(2), 85-95

[0483]

[0484] 표 11. 세포 처리 - 세포 주기 / DNA 손상

- [0485] 경로
- [0486] 세포 주기 대조군: G1/S 관문
- [0487] 세포 주기 대조군: G2/M DNA 손상 관문

[0488] 표 12. 세포 처리 - 면역학 및 염증

- [0489] 경로
- [0490] JaK/Stat 신호전달: IL-6 수용체 패밀리
- [0491] NF-κB 신호전달
- [0492] TLR 경로

[0493] B 세포 수용체 신호전달

[0494] T 세포 수용체 신호전달

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
TNF	TNFR, NFkB, TRAD, TRAF, TAK, TAB, NEMO, NIK, IKK, MEKK, RelA, RelB, kB,	(2011) Regulation of TNF-induced NF-kB activation by different cytoplasmic ubiquitination events. <i>Cytokine Growth Factor Rev.</i> 22(5-6), 277-86
IL-1	IL1R, IRAK, MydBB, TRAF, TAB, TAK, NEMO, NFkB, RelA, RelB	(2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. <i>Cell</i> 132(3), 344-62
Fas/DR 리간드	ASK, TRADD, FADD, MKK, JNK, 카스파제, FLIPs, Bid, ICAD, CAD, PARP, 라민	(2011) Non-canonical NF-kB signaling activation and regulation: principles and perspectives. <i>Immunol. Rev.</i> 244(1), 44-54
미토겐, 성장 인자 및 호르몬		See individual references
폴 모르포겐 단백질 2	NFkB	Mohan et al, 1998
폴 모르포겐 단백질 4	NFkB	Mohan et al, 1998
결합성 조직 성장 인자 Ccn2	NFkB	Gao et al, 2005
코르티코스테로이드-방출 호르몬	NFkB	Zbytek et al, 2004
엔도텔린-1	NFkB	Gerstung et al, 2007
표피 성장 인자	NFkB	Biswas et al, 2000; Sethi et al, 2007
에스트로겐/베타-에스트라디올	NFkB	Hirano et al, 2006
난포 자극 호르몬	NFkB	Delfino & Walker, 1998
가스트린	NFkB	Ogasa et al, 2003

[0495]

GM-CSF	NFkB	Ebner et al, 2003
간세포 성장 인자	NFkB	Yao et al, 2004; Kaibori et al, 2004; Shen et al, 1997
인슐린	NFkB	Bertrand et al, 1995; Madonna et al, 2007
인슐린-유사 성장 인자 1	NFkB	Liu et al, 2001
리소포스파티드 산	NFkB	Raj et al, 2004; Hwang et al, 2006; Chen et al, 2008
M-CSF	NFkB	Brach et al, 1991
플래리안 억제 물질	NFkB	Hoshiya et al, 2003
신경 성장 인자	NFkB	Wood, 1995; Carter et al, 1996
뉴로키닌 A	NFkB	Sun et al, 2008
안료 상피-유도 인자 (PEDF)	NFkB	Yabe et al, 2001
혈소판 활성화 인자 (PAF)	NFkB	Fernandes et al, 2003; Seo et al, 2006
혈소판-유도 성장 인자	NFkB	Olashaw et al, 1992
식물 스테로이드 (디옥스게닌, 헤코게닌, 티코게닌)	NFkB	Corbiere et al, 2003
프로가스트린	NFkB	Rengifo-Cam et al, 2007; Umar et al, 2008
프로스트라틴	NFkB	Williams et al, 2004
레락신	NFkB	Ho et al, 2007
레지스탄	NFkB	Silswal et al, 2005
전체-트랜스 레티노산	NFkB	Farina et al, 2002; Mathieu et al, 2005
RET/PTC3 융합 종양 단백질	NFkB	Russell et al, 2003
S100B	NFkB	Adami et al, 2004
혈청	NFkB	Baldwin et al, 1991
술폰아미드 (L-셀렉틴 가교결합제)	NFkB	Turutin et al, 2003
TGF-알파	NFkB	Lee et al, 1995
TGF-베타2	NFkB	Lu et al, 2004
트롬복산	NFkB	Wei et al, 2007

[0496]

[0497] 표 13. 세포 처리 - 진행, 및 분화

[0498] 경로

- [0499] 히포(Hippo) 신호전달
- [0500] TGF-β 신호전달
- [0501] 헤지호그(Hedgehog) 신호전달
- [0502] 노치(Notch) 신호전달
- [0503] Wnt/β-카테닌 신호전달
- [0504] 혈관형성
- [0505] 핵 수용체 신호전달
- [0506] ErbB/HER 신호전달
- [0507] Ras 신호전달

리간드/페르투르빙 제제	구성원의 경로 & 예시	참조
FGF, IGF, VEGF, SLIT, PDGF	PI3K/Akt	Angiogenesis - pathway map
에스트라디올, 안드로겐, 테스토스테론	호르몬/스테로이드 및 비-스테로이드 활성화 신호전달	Nuclear Receptor Signaling - pathway map
표피 성장 인자, 뉴레굴린, 또는 헤레굴린.	PI3K & MAPK	ErbB/HER Signaling - pathway map
R-스폰딘, Wnt	ZNRF, 프리즐드(Frizzled), WntR, PAR, GSK,Dsh, LGR, 카테닌, WTX, APC	(2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. <i>Dev. Cell</i> 17(1), 9-26. & (2009) PARsing the phrase "all in for Axin"- Wnt pathway targets in cancer. <i>Cancer Cell</i> 16(5), 366-8 &
E-카드헤린 결합 ECM 펩티드 서열, 카테닌	Src, 카테닌, CBP, GSK	Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia October 2003, Volume 8, Issue 4, pp 435-447 Wnt-Cadherin Connections in Normal and Neoplastic Mammary Epithelium

[0508]

TACE, ADAM, 엡신(Epsin), Neur, Mib, 적스타크린(juxtacrin) 인자, DLL, JAG	NOTCH, 프린지(Fringe), 퓨린, 델타 재기드, NIC, 프레세닐린	(2011) Notch signaling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. <i>Nat. Rev. Cancer</i> 11(5), 338-51 & (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. <i>Development</i> 138(17), 3593-612. & (2011) Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. <i>J. Pathol.</i> 223(2), 262-73
Hh, Shh, Dhh	CDO, BOC, Ptch, Smo, Gli,KIF, myc, 사이클린 D,E	(2010) Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. <i>Genes Dev.</i> 24(18), 2001-12 & (2009) Paracrine Hedgehog signaling in cancer. <i>Cancer Res.</i> 69(15), 6007-10 & (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. <i>Nat. Rev. Cancer</i> 11(7), 493-501.

[0509]

TGF	SARA, Smad, Smurf, Ras, ERK, TAK, TAB, NLK, MKK, p28, JNK, Myc, Max, Fos, Jun	(2010) TGF베타 signalling: a complex web in cancer progression. <i>Nat. Rev. Cancer</i> 10(6), 415-24.
BMP, Mis	Smad, Smurf, LIMK, MKK, Erk, p38, 코필린(Cofilin)	(2007) Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. <i>FEBS J.</i> 274(12), 2977-85
GPCR 리간드	CD44, FAT, KIBRA, FRMD, Mst, YAP, LATS, MOB, SAV, TEAD, Smad	(2010) The hippo signaling pathway in development and cancer. <i>Dev. Cell</i> 19(4), 491-505.
Dachsous (Ds), Ex	Mer, KIBRA, Mst, SAB, LATS, MOB, YAP, TAZ, Smad, TEAD	(2011) SnapShot: The hippo signaling pathway. <i>Cell</i> 145(3), 484-484.e1
GTP 및 또한 MAPK, PI3K 리간드 참고	Rho, Rac, RAF, PAK, MEK, Erk, Myc/Max, JNK, HIF, CREB, PI3K	"The Ras superfamily at a glance". <i>J. Cell. Sci.</i> 118 (Pt 5): 843-6. doi:10.1242/jcs.01660.

[0510]

[0511]

**표 14. 세포 공정- 세포골격 조절 및 접착**

[0512]

· 액틴 동력학의 조절 - 많은 경로에 관련됨, 참고 예를 들어 인테그린 수용체는 ECM 리간드, GPCR 리간드, 성장 인자 결합 수용체 (수용체 티로신 키나제)를 결합시킨다

[0513]

· 미세소관 동력학의 조절 - 상기 많은 경로에 관련됨, 참고 예를 들어 Wnt 신호전달, 뉴트로핀/트로핀

[0514]

· 애드헤렌 접합 동력학 - 상기 많은 경로에 관련됨, 참고 예를 들어 PI3K, MAPK

[0515]

생리적 반응 파라미터는 본원에서 기재된 것, 예를 들면, 세포 접착, 세포 부착, 세포 형태학, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 이들의 조합을 포함한다. 예시적인 구현예에서, 생리적 반응 파라미터는 세포 접착 또는 부착에서 변화이다.

[0516]

생리적 반응 파라미터에서 변화가 세포성 샘플에서 발생하는지를 계측하기 위해 연속적 측정의 분석 방법은 본원에서 기재된다 (예를 들면, 반응의 규모 (양성 또는 음성), 최대 또는 최소까지 시간, 반응 연대표의 임의의 시점에서 규모, 등). 비-선형 분석의 이들 및 다른 방법은 생리적 반응 파라미터에서 변화가 교란제의 존재하에 발생하는지를 계측하기 위해 사용될 수 있다.

[0517]

기준선 및 대조군은 세포성 경로의 상태를 판단하기 위해 사용될 수 있다. 적합한 기준선은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 교란제 없는 샘플, 교란제의 무한한 희석의 샘플, 교란제의 부가 이후 충분히 오랜 시간 이후 또는 이전 동일한 샘플, 및 세포 기반 검정의 당해 분야의 숙련가에 공지된 다른 상기 베이스라이닝 활성화.

[0518]

적합한 대조군은, 비제한적으로, 하기를 포함할 수 있다: 동일한 환자로부터 건강한 물질의 샘플, 정상 참조 구간을 유도하기 위해 당해 질환이 부족한 충분한 수의 환자로부터 건강한 물질의 샘플의 세트, 유사한 그러나 상이한 활성화제를 가진 샘플, 공지된 양성 또는 음성 반응의 세포주, 활성화제의 역 활성화로 처리된 샘플, 하나 이상의 환자로부터 이환 물질의 샘플, 및 세포 기반 검정의 당해 기술에서 실시된 것으로 공지된 다른 상기 양성 및 음성 대조군.

[0519]

일부 구현예에서, 교란제의 양의 적정으로부터 수득된 데이터는 개별 대상체에서 표적화 치료제의 효능을 계측하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이환 세포 샘플이 교란제의 증가하는 농도에 노출되면, 세포 샘플에서 생존 세포에 관한 교란제의 EC50 값은 생성될 수 있고, 여기서 세포성 경로가 정상적으로 기능하는 경우, 그 세포 샘플에 대한 상기 EC50 값은 교란제에 의해 영향받은 세포성 경로를 방해한다고 공지된 표적화 치료제의 효능을 예측한다. EC50 값의 예측에 의해, 교란제에 대한 환자 세포 샘플의 감수성은 획득되고 따라서 관련된 세포성 경로가 그 환자에서 기능성 또는 기능이상인 정도를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0520]

하나의 예에서, EC50은 매우 작은 수이어서, 환자가 최소량의 교란제에 매우 감수성인 것을 나타낸다. 교란제가 정상 인간 유체에서 발견된 천연 제제이면, 상기 제제를 감소시키기 위해 설계된 치료는 낮은 EC50 미만의 상기 제제 수준의 약화에서 효과없을 수 있다. 또 다른 예에서, 경로의 구성원은 구성적이고 교란제에 대해 경로를 미반응성 또는 약 반응성으로 만들 수 있어서, 세포성 경로가 기능이상인 것을 나타낸다. 상기 실시예에서, EC50은 매우 큰 수이다. 또 다른 예에서, 경로 구성원은 과발현될 수 있어서, 교란제의 부가시 경로의 지나친 생리적 반응을 초래하고, 기능이상 경로 상태에 기여한다. 더욱 또 다른 실시예에서, 경로 구성원은, 예를 들어, 불활성 상태에서 잠겨진, 발현하에, 돌연변이, 또는 격리를 통해 저활동성일 수 있어서, 기능이상 상태에

기여한다. 또 다른 구현예에서, 경로 구성원은 다른 세포성 기능에 부적절하게 연결될 수 있어서, 정상 경로 반응의 생리적 반응 미특징을 생성하고, 기능이상 상태에 기여한다.

[0521] 교란제의 적정으로부터 수득된 데이터는 또한 교란제의 효력 (즉, 농도가 절반최대 효과를 달성한 것) 및/또는 효능 (즉, 최대 달성가능한 효과)를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0522] 한 개별 대상체로부터 단리된 무 표지 질환 세포 샘플에 대하여 EC50 결과는 본질적으로 동일한 세포 유형을 함유한 다른 개별 대상체로부터 단리된 무 표지 세포 샘플에 대하여 EC50 결과와 비교될 수 있고 동일한 교란제로 시험될 수 있다. 통계적인 분석은 수행될 수 있고, 여기에서 통계적인 분석은 세포성 경로의 기능성 상태를 예측한다. 개별 대상체에서 세포성 경로의 기능성 상태는 그 경로에 표적화 치료제에 대한 대상체의 반응성을 나타낸다.

[0523] **H. 약물 효능을 측정하기 위한 세포 사이클 상태의 분석 방법**

[0524] 사이클린-의존적 키나제 (CDKs)는 세포 사이클의 주요 조절물질로서 작용한다. 다양한 유형의 암을 치료하기 위해 개발된 수많은 표적화 치료제는 CDKs를 표적화한다. 본원에서 기재된 방법의 하나의 구현예에서, CDK 경로의 활성화는 세포 사이클의 상태를 측정하기 위해 단리되고, 상기 측정은 약물 효능과 상관될 수 있다.

[0525] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 방법은 교란제, 및/또는 확인제, 및/또는 특정한 세포 사이클 상태로 세포의 이동에 관여된 세포성 경로를 교란시키는 표적화 치료제를 이용할 수 있다. 예를 들어, 약물 트라스투주마비 의도된 바와 같이 작용하는 경우, G1/S 시기에서 정적이도록 세포 사이클을 명확히 유발시켜, 세포가 추가로 번식할 수 없게 만들고 암성 상태를 방해한다. 본원에서 기재된 방법은 G1/S 시기에서 세포의 기능성 상태의 측정, 예를 들면, G1/S 상태와 관련된 경로의 상태의 시험에 의해 환자 샘플에서 트라스투주마비의 효능을 확인할 것이다. 상기 경로는 당해 기술에 공지되어 있다. 다른 실시예에서, G0 시기에서 세포를 중단시키는 교란제가 선택될 수 있고, 본원에서 기재된 방법은 상기 시험 또는 정지 세포 시기와 관련된 경로 기능을 시험하기 위해 사용될 수 있다. 더욱 다른 실시예에서, 세포가 세포자멸사에 진입 또는 진입하기 시작하도록 하는 제제가 선택될 수 있고, 본원에서 기재된 방법은 세포 사멸 사이클에서 진입과 관련된 경로 기능을 시험할 수 있다.

[0526] **I. 시험 결과의 분석 및 해석**

[0527] 본원에서 기재된 방법을 이용하여 수득된 시험 결과는 임상 및/또는 환자에 정보를 제공하기 위해 다양한 방식으로 분석 및 해석될 수 있다. 특정 구현예는 아래와 같이 설정된다.

[0528] (i) 이환 경로 분석. 상기 분석은 이환 경로 활성화가 생체외 환자에서 발견되는지를 확인한다. 분석은 의사에게, 처음으로, 질환 과정이 환자의 이환 세포에서 존재하는지의 동적 평가를 제공할 것이다. 상기 구현예에서, 시험된 경로는 4개의 그룹 카테고리 중 하나로 분류될 수 있다: 구성적으로 활성화, 과반응, 전체에서 활성화 없음 (저-활성), 또는 정상적으로 활성화. 경로가 이환되는지 및 따라서 당해 경로 활성을 억제시킨다고 공지된 표적된 요법을 이용한 치료에 적합한지를 예측하기 위해, 질환을 갖는 것으로 의심되는 환자에 대하여 본원에서 기재된 방법에 의해 예측된 바와 같이 경로 활성화는 그 경로 활성화에 대하여 정상 참조 구간으로부터 유도된 컷-오프 값에 비교된다. 비정상인 경로 활성화 (예를 들면 비정상 및 정상 경로 활성을 기술하는 컷-오프 초과)를 갖기 위해 밝혀진 경로를 표적하는 약물은 그 활성을 방해하는 것이 예상될 것이고, 그렇게 함으로써 환자에서 의도된 효과를 생산한다.

[0529] (ii) 약물 작용기 분석. 상기 분석은 생체외 약물의 작용기의 2개 평가를 제공한다.

[0530] 1) 반응 스코어 (RS): 반응 스코어는 시험된 약물이 표적된 경로상에서 가졌던 기능성 효과를 특성화한다. 0 - 1 범위 상에서 보고될 수 있고, 여기서 더 높은 스코어는 더 큰 약물 작용기를 나타낸다.

[0531] 2) 반응 스코어 백분위 등급화 (RSPR): RSPR은 환자의 반응 스코어가 동일한 제제로 시험된 다른 환자에 의해 받은 스코어에 비하여 등급하는 방법을 특성화한다. 각 환자에 대하여, 총 그룹 내에서 그의 반응 스코어의 백분위는 예측된다. 일단 백분위 등급화가 배정되면, 환자는 그 다음 3개의 그룹: a) 중앙 미만, b) 중앙 근처, 또는 c) 중앙 초과로 분류될 수 있다. 특정 약물에 대하여, 임상 종료점에 의해 측정된 바와 같이 환자 약물 반응 예컨대 진행까지의 시간 (TTP)에서 광범위 변화는 반응 스코어에서의 변화를 비취질 것이다. 임상시험에서 75번째 백분위 환자의 TTP 기간이 25번째 백분위 환자의 TTP 기간의 5-10 배 초과인 것이 종종 사실이기 때문에, 의사에게 그의 환자의 반응 스코어의 상대적 등급의 제공은 이들에게 중요한 해석적 맥락을 제공한다. 예를 들어, 이들은 개별 환자의 반응 스코어 백분위에 상응하는 백분위 범위에서 임상시험내 환자의 TTP 기간에

기반된 개별 환자에 대하여 TTP 기간을 추정할 수 있다.

[0532] (iii) 유사하게 임상 결과의 예측. 상기 분석은 반응 스코어와 문제의 제제의 수용 이후 시험된 및 관측된 환자에 대한 임상 종료점 사이 임상시험에서 찾아진 상관관계를 반영한다. 상기 상관관계의 경우, 임상시험에서 특정 반응 스코어를 받은 환자와 일치하는 임상 결과를 확인하는 것이 가능하다. 예를 들어, TTP가 측정된 임상 결과였으면, 환자의 결과는 하기 3개의 카테고리 중 하나로 분류될 수 있다.

[0533] 1) 유사한 TTP 기간 - 최저: 본 하위-집단에 해당하는 환자는 환자의 전체 집단이 경험할 중앙 TTP 기간 미만에서 양호한 TTP 기간을 경험할 것 같다.

[0534] 2) 유사한 TTP 기간 - 불확정: 본 카테고리에 해당하는 반응 스코어를 받은 환자에 대하여 평가는 제공되지 않는다.

[0535] 3) 유사한 TTP 기간 - 최고: 본 하위-집단에 해당하는 환자는 환자의 전체 그룹의 중앙 TTP 기간 초과에서 양호한 TTP 기간을 경험할 것 같다.

[0536] 임상의는 이들이 선택하는 약물 요법을 계측함에 따라 안내로서 CELx 프로파일 시험의 결과를 이용할 것이다. 환자의 세포가 다중 약물로 시험된 경우, 각 약물의 유사한 임상 결과는 의사가 최대 유사하게 임상 결과를 상관하는 시험 결과를 가진 약물을 선택할 수 있을 정도로 비교될 수 있다.

[0537] J. 키트

[0538] 본 발명의 또 다른 측면에서, 키트가 제공된다. 특정 구현예에서, 키트는 하기를 포함하고: 수송 배지를 함유한 개별 대상체로부터 질환 세포 샘플용 용기; 수송 배지를 함유한 개별 대상체로부터 대조군 세포 샘플용 용기; 바이오센서; 바이오센서로부터 출력으로 데이터 전환용 컴퓨터 실행가능 지침을 갖는 비-일시적 컴퓨터 판독가능한 배지, 여기서 상기 출력은 정의된 기간 동안 세포성 생리적 반응 파라미터에서 변화를 보여주고, 여기서 상기 세포성 생리적 반응 파라미터는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: pH, 세포 접착, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 세포 사이클, 동화작용, 이화, 소분자 합성 및 생성, 턴오버, 및 호흡, ATP, 칼슘, 마그네슘, 및 다른 충전된 이온, 단백질, 특이적 경로 구성원 분자, 다양한 세포성 구획에서 DNA 및 또는 RNA, 유전체학, 및 프로테오믹스, 번역 후 변형 및 기전, 2차 메신저의 수준, cAMP, mRNA, RNAi, 마이크로RNAs 및 생리적 기능을 가진 다른 RNA, 및 이들의 조합; 반응군 또는 비반응군으로서의 상태를 나타내는 컷오프 값 초과 또는 미만으로서 출력의 분류 및/또는 무 반응, 약 반응성, 및 반응성을 갖는 것으로서 샘플의 분류; 및 분류를 이용한 보고서 작성.

[0539] 질환 세포 샘플의 유형 및 양은 본원에서 기재된다. 특정 구현예에서, 질환 세포 샘플은 적어도 5,000 세포를 갖는 전체의 세포 무 표지 생존 세포 샘플이다. 구현예에서, 대조군 세포 샘플은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 동일한 대상체로부터 질환 세포 샘플, 동일한 대상체로부터 건강한 세포 샘플, 질환이 없다고 공지된 대상체로부터 건강한 세포 샘플, 정상 참조 구간을 유도하기 위해 당해 질환이 부족한 환자의 충분한 수로부터 건강한 물질의 샘플의 세트, 치료제에 반응한다고 공지된 세포 샘플, 치료제에 반응하지 않는다고 공지된 세포 샘플, 및 이들의 조합.

[0540] 용기 및 수송 배지는 세포 생존력을 유지하기 위해 및 세포 활성화를 최소화하기 위해 설계된다. 구현예에서, 배지 및 용기는 무 내독소, 비발열성 및 DNase- 및 RNase-프리이다. 일단 수득되면 세포 샘플은 세포 생존력을 보유하는 수송 배지에서 유지된다. 분석의 부위에 대한 수송용 시간의 길이에 의존하여, 상이한 배지가 이용될 수 있다. 구현예에서, 조직 샘플의 수송이 최대 10 시간을 필요로 하는 경우, 배지는 400 mosm/L 미만의 오스몰 농도를 갖고 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, 글루코오스, 글루타민, 히스티딘, 만니톨, 및 트립토판, 페니실린, 스트렙토마이신을 포함하고, 필수 아미노산을 함유하고 그리고 인간 원발 세포의 증식 및 플레이트링 효율을 지지하기 위해, 추가로 하기를 함유할 수 있다: 비-필수 아미노산, 비타민, 다른 유기 화합물, 미량 미네랄 및 무기 염, 혈청, 세포 추출물, 또는 성장 인자, 인슐린, 트랜스페린, 나트륨 셀레나이트, 하이드로코르티손, 에탄올아민, 포스포포틸에탄올아민, 트리도티론, 나트륨 피루베이트, L-글루타민. 그와 같은 배지의 예는 하기를 포함한다: 셀시오 배지, 로즈웰 파크 메모리얼 연구소 배지 (RPMI), 항크스 버퍼링된 염수, 및 McCoy's 5A, 이글스 필수 최소 배지 (EMEM), 둘베코 변형된 이글스 배지 (DMEM), Leibovitz L-15, 또는 이들의 변형.

[0541] 바이오센서는 본원에서 기재된다. 특정 구현예에서 바이오센서는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 세포성 파라미터를 검출하는 바이오센서로 이루어진 군으로부터 선택된다: 세포 접착, 세포 부착, 세포 형태학, 세포 표현형, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 밀도, 세포 극성, pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 이들의 조합. 구현예에서,

디바이스는 임피던스 또는 광학적 디바이스이다. 바이오센서는 본원에서 기재된 바와 같이 선택적으로 코팅될 수 있다. 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 치료적 및/또는 활성제 제제의 유형과 관련된 생리적 파라미터에서 변화를 측정하는 바이오센서가 선택된다.

- [0542] 다른 구현예에서, 키트는 바이오센서로부터 출력으로 데이터 전환용 컴퓨터 실행가능 지침을 갖는 비-일시적 컴퓨터 판독가능한 배지를 포함하고, 여기서 상기 출력은 정의된 기간 동안 세포성 생리적 반응 파라미터에서 변화를 보여주고, 여기서 상기 세포성 생리적 반응 파라미터는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: pH, 세포 접착, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 이들의 조합; 반응군 또는 비반응군 및/또는 무 반응, 약 반응성, 및 반응성으로서 출력의 분류; 및 분류를 이용한 보고서 작성.
- [0543] 다른 구현예에서, 본 발명은 개시내용의 방법을 이행하기 위한 지침으로 컴퓨터처리 디바이스 또는 컴퓨터 판독가능한 배지를 제공한다. 컴퓨터 판독가능한 배지는 비-일시적 CD, DVD, 플래시 드라이브, 외부 하드 드라이브, 및 모바일 디바이스를 포함한다.
- [0544] 본원에서 기재된 키트 및 방법은 프로세서/컴퓨터 시스템의 용도를 사용할 수 있다. 예를 들어, 방법을 이행하기 위해 컴퓨터 프로그램 코드를 분류하는 프로그램 메모리, 작업 메모리, 및 인터페이스 예컨대 종래의 컴퓨터 스크린, 키보드, 마우스, 및 프린터, 뿐만 아니라 다른 인터페이스, 예컨대 네트워크 인터페이스, 및 데이터베이스 인터페이스를 포함한 소프트웨어 인터페이스에 결합된 프로세서를 포함한 다목적 컴퓨터 시스템은 본원에서 기재된 하나의 구현예의 용도를 찾는다.
- [0545] 컴퓨터 시스템은 데이터 입력 디바이스, 예컨대 키보드, 입력 데이터 파일, 또는 네트워크 인터페이스, 또는 또 다른 시스템, 예컨대, 예를 들어, 정의된 기간 동안 바이오센서에 의해 생성된 데이터를 해석한 시스템으로부터 사용자 입력을 허용하고, 출력 디바이스 예컨대 프린터, 디스플레이, 네트워크 인터페이스, 또는 데이터 저장 디바이스에 출력을 제공한다. 입력 디바이스, 예를 들어 네트워크 인터페이스는 본원에서 기재된 바와 같이 세포성 생리적 파라미터에서 변화 및/또는 이들 변화의 정량화를 포함한 입력을 받는다. 출력 디바이스는, 세포성 파라미터에서 변화의 검출 및/또는 정량화를 도시하는 하나 이상의 수 및/또는 그래프를 포함한, 출력 예컨대 디스플레이를 제공한다.
- [0546] 컴퓨터 시스템은 본원에서 기재된 방법에 의해 생성된 데이터를 저장하는 데이터 스토어에 결합될 수 있다. 상기 데이터는 각 측정 및/또는 각 대상체에 대하여 저장되고; 각각의 이들 데이터 유형의 선택적으로 복수의 세트는 각 대상체에 상응하여 저장된다. 하나 이상의 컴퓨터/프로세서는, 예를 들어, 네트워크를 거쳐 컴퓨터 시스템에 연결된, 예를 들어, 별도의 기계로서 사용될 수 있거나, 또는 컴퓨터 시스템상에서 실시하는 별도 또는 통합된 프로그램을 포함할 수 있다. 어느 방법이 이용되든 이들 시스템은 데이터를 받고 대신 검출/진단에 관한 데이터를 제공한다.
- [0547] 일부 구현예에서, 컴퓨터처리 디바이스는 단일 컴퓨터처리 디바이스, 예컨대 서버 컴퓨터를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 컴퓨터처리 디바이스는 네트워크 (도시되지 않음)를 거쳐 서로 통신하기 위해 구성된 다중 컴퓨터처리 디바이스를 포함할 수 있다. 컴퓨터처리 디바이스는 메모리 내에서 다중 데이터베이스를 저장할 수 있다. 컴퓨터처리 디바이스상에서 저장된 데이터베이스는 임상, 실시 임상, 프로그래머 확인 코드, 또는 임의의 다른 원하는 카테고리에 의해 조직화될 수 있다.
- [0548] 바이오센서로부터 데이터는 원격 컴퓨터처리 시스템 또는 또 다른 데이터 저장 디바이스에 보내질 수 있다. 통신 과정은 출발 모듈에서 개시 및 시작하고 연결 작업으로 진행한다. 연결 작업은 건강 관리 제공자의 저장된 정보를 원격 컴퓨터처리 시스템에, 예를 들어, 케이블 연결, 무선 랜 (WLAN 또는 Wi-Fi) 연결, 세포성 네트워크, 무선 개인 통신망 (WPAN) 연결, 예를 들면, BLUETOOTH®, 또는 임의의 원하는 통신 회선을 통해 통신적으로 연결한다.
- [0549] 수송 작업은 데이터를 바이오센서로부터 컴퓨터처리 디바이스에 수송한다. 하나의 구현예에서, 수송 작업은 디바이스 사이에서 데이터 전송 이전 데이터를 암호화시킨다. 통신 과정은 완료할 수 있고 중지 모듈에서 종료할 수 있다. 일단 바이오센서 데이터가 원격 컴퓨터처리 디바이스에 이동되면, 데이터는 출력, 예컨대 경시적으로 세포 지수 측정으로 전환된다. 특정 구현예에서, 정의된 종료점은 선택되고 본원에서 기재된 바와 같이 무 반응, 약 반응성 또는 반응성으로서 세포 샘플을 분류하는데 사용된다. 구현예에서, 반응군 또는 비 반응군으로서 샘플의 분석의 상태는 케이블 연결, 무선 랜 (WLAN 또는 Wi-Fi) 연결, 세포성 네트워크, 무선 개인 통신망 (WPAN) 연결, 예를 들면, BLUETOOTH®, 또는 임의의 원하는 통신 회선을 거쳐 유사한 과정을 이용하여 건강 관

리 제공자에 역으로 통신된다.

[0550] 특정 구현예에서, 컴퓨터 판독가능한 저장 배지는, 컴퓨터처리 디바이스에 의해 실행된 경우, 컴퓨터처리 디바이스가 하기를 포함하는 단계를 수행하도록 하는 컴퓨터-실행가능 지침을 갖는다: 데이터를 바이오센서로부터 출력으로의 전환 단계 (여기서 상기 출력은 정의된 기간에 걸쳐 세포성 생리적 반응 파라미터에서 변화를 보여 주고, 여기서 상기 세포성 생리적 반응 파라미터는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: pH, 세포 접촉, 세포 부착 패턴, 세포 증식, 세포 신호전달, 세포 생존, 세포 밀도, 세포 크기, 세포 형상, 세포 극성, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 글루코오스, 및 치료제의 존재 및/또는 부재 하에 이들의 조합); 치료제의 존재하에 세포 샘플에서 바이오센서로부터 출력과 치료제의 부재 하에 세포 샘플에서 바이오센서로부터 출력의 비교에 의해 정의된 종료점에서 무반응, 및 반응성으로서 출력의 분류 단계; 및 분류를 이용한 보고서 작성 단계. 구현예에서, 컴퓨터 실행가능 지침은 건강 관리 제공자에 분류 통신용 지침을 포함한다.

[0551] 다른 구현예에서, 컴퓨터 판독가능한 저장 배지는 경로가 대상체의 질환 세포 샘플에서 작동가능한지 확인용 지침을 포함할 수 있다. 컴퓨터처리 디바이스에 의해 실행된 경우 지침은 제1 활성제 또는 교란제 제제에 대한 경로 반응성이 질환 세포 샘플에서 활성인지를 측정하기 위해 서로 제1 활성화제 또는 교란제로 치료된 대상체에서 질환 세포 샘플로부터 바이오센서 데이터의 출력과 제1 활성화제 또는 교란제로 치료되지 않은 동일한 대상체에서 제2 질환 세포 샘플로부터 바이오센서 데이터의 출력 사이에서 차이가 있는지의 측정; 경로의 활성의 적응증으로서 출력에서 차이의 존재 확인, 및 건강 관리 제공자에 경로의 활성 전달을 포함한다. 활성제 또는 교란제 제제 및 그의 경로는 본원에서 기재된다.

[0552] 적어도 5개 유형의 CELx 시험은 본원에서 기재된 방법을 이용하여 구상된다.

[0553] 1) 표적된 경로 약물의 효능을 측정하는 경로 폐쇄 시험. 본 시험에서, 그의 세포성 표적에 표적된 경로 약물의 결합에 의해 야기된 시험 세포의 생리적 변화는 측정되고 기준선 측정과 비교된다.

[0554] 2) 항-증식 약물의 효능을 측정하는 항-증식 시험. 본 시험에서, 그의 증식성 수용력의 저해에 의해 야기된 시험 세포의 생리적 변화는 측정되고 기준선 측정과 비교된다.

[0555] 3) 조합으로 이용된 2 이상의 약물의 효능을 측정하는 조합 시험. 본 시험에서, 약물에 의해 야기된 시험 세포의 생리적 변화는 측정되고 기준선 측정과 비교된다. 조합 시험은 2 이상의 표적된 경로 약물, 2 이상의 항-증식 약물, 또는 하나 이상의 각 유형의 약물을 포함할 수 있다.

[0556] 4) 특이적 환자에서 경로의 기능을 입증하는 기능성 경로 시험. 본 시험에서, 교란제 및/또는 확인제의 부가에 의해 야기된 시험 세포의 생리적 변화는 환자에서 신호전달 경로의 기능성 상태를 나타낸다. 상기 결과는 경로 기능이 비정상 (예를 들면 질환-관련) 또는 정상인지를 측정하기 위해 분리하여 측정된 컷-오프 값과 비교된다.

[0557] 5) 리간드 및 또는 표적이 조합된 리간드 및 또는 표적의 존재하에 측정함으로써 존재하는지를 측정하기 위한 리간드/표적 시험.

[0558] **실시예**

[0559] **실시예 1-5에 대한 실험 디자인의 논의**

[0560] 방법은 세포 또는 세포 경로 내에서 단백질 결합이 발생한 이후 세포 또는 세포 경로의 생리적 변화를 측정하기 위해 CReMS를 이용한다. 결합되지 않는 한 약물이 작업할 수 없는 것, 그리고 거의 모든 질환 유전자가 코어 신호전달 경로에 해당하는 것이 통상적으로 이해된다. 상기 및 단백질 결합의 생화학물질 원리가 세포 유형을 거쳐 보편적이라는 사실의 관점에서, 본원에서 기재된 방법은 따라서 단백질 및 다른 생체분자 결합이 발생할 수 있는 전체 세포 및 세포 경로에 광범위하게 적용가능하다.

[0561] 종래 기술의 유전적 시험의 현황은 약물 또는 경로가 결합되는지를 직접적으로 나타낼 수 없고, 따라서 이들은 약물 반응을 신뢰성있게 예측할 수 없다. 약물이 도입된 이후 세포 내에서 발생하는 생리적 변화의 확인에 의해, CELx 시험은 약물에 대한 대상체의 세포의 반응을 신뢰성있게 예측할 수 있다.

[0562] 방법이 이용하는 시험의 유형의 구현예의 일부를 입증하기 위해, 3개의 상이한 유형의 암을 가진 11명의 상이한 환자로부터 세포에 관한 65 실험은 수행되었다. 11 상이한 세포 경로에 영향을 미치는 16개의 상이한 약물은 시험되었고 2개의 상이한 CReMS 유형은 이용되었다. 결과가 본 출원의 실시예에서 보고되는 시험의 목록은 아래 표 15에서 제공된다:

[0563] 표 15. 시험 수행 목록

예시	약물	표적	경로	환자 세포
Ex. 1	라파티닙	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B1, B4
Ex. 1	트라스투주맙	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B1, B4
Ex. 2	파클리탁셀	TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포성 부착	B1, B2
Ex. 3	세록시맙 및 이리노테칸	EGFR 토포이소머라제 I	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포사멸 경로, 세포성 부착	C1, C3
Ex. 4	카페시타빈	티미딜레이트 신타제	세포사멸 경로, 세포성 부착	B2
Ex. 4	세록시맙	EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B3, B5, C1, C2, C1, C2

[0564]

Ex. 4	시스플라틴	DNA	세포사멸 경로, 세포성 부착	L1, L2
Ex. 4	도세탁셀	TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포성 부착	B1, B2, B3, B4
Ex. 4	에를로티닙	EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	L1, L2
Ex. 4	플루오로우라실	티미딜레이트 신타제	세포사멸 경로, 세포성 부착	B1, B3
Ex. 4	제피티닙	EGFR-TK	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B1, B2, B3
Ex. 4	GSK1059615	PI3K	PI3K/PTEN, 세포성 부착	B1, B2, B3, B4, B5, B7
Ex. 4	GSK1120212	MEK1 및 MEK 2	MEK, 세포성 부착	B1, B2, B3,

[0565]

				B5, B7, B8
Ex. 4	이리노테칸	토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포성 부착	C1, C2
Ex. 4	라파티닙	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B2, B3, B5, B6, B7
Ex. 4	옥실리플라틴	GG, AG, GNG	세포사멸 경로, 세포성 부착	C1, C2
Ex. 4	파클리탁셀	TUBB1, BCL3	세포사멸 경로, 세포성 부착	B3, B4
Ex. 4	파클리탁셀 및 시스플라틴	TUBB1, BCL2, DNA	세포사멸 경로, 세포성 부착	L1, L2
Ex. 4	파조파닙	VEGF 수용체	PI3K/PTEN, RAS/RAF, MAK, MKK, 세포성 부착	B1, B2, B3, B5, B7, B8
Ex. 4	트라스투주맙 및 라파티닙	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B1, B2, B3, B4
Ex. 4	토포테칸	토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포성 부착	B3
Ex. 4	트라스투주맙	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B2, B3
Ex. 5	세독시맙 (광학, 임피던스)	EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/PTEN, 세포성 부착	B1, B2, B3, B4

[0566]

실험 디자인에 대한 근거

[0567]

**조직:**

[0568]

최고 발생률을 가진 3개의 암으로부터 조직이 선택되었다.

[0569]

유방암. 유방암 모델이 진행, 다양한 세포성 형태학, 가변 대사율, 및 생존에 관하여 많은 다른 암을 대표하고 많은 다른 조직에서 발견된 암에 공통인 비정상적인 분자 및 경로를 갖기 때문에 유방암 세포는 시험의 64%로 이용되었다.

[0570]

대장암 및 폐암. 대장암 및 폐암 세포는 다른 유의미한 암 유형으로 개시내용의 시스템 및 방법의 적용가능성을 입증하기 위해 이용되었다.

[0571]

**세포:**

[0572]

유방암에 대하여 상피 세포 유형의 공통 임상 체시를 가진 8명 환자로부터 세포는 시험용으로 선택되었다. 환자로부터 세포는 조직 수집의 당해 기술에서 실시된 것에 의해 규칙적으로 사용된 세포 샘플 수집 기술을 이용하여 획득되었다.

[0573]

환자 B1: 세포는 61세 여성의 유방의 TNM IIA 기, 등급 3 원발 침습성 관상 암종에서 유도된다. 세포는 대략 31 시간의 배가 시간을 갖고, 가끔의 비정질-형상화된 상피 세포 형태학으로 확장된 바와 같이 나타나고, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 매우 높은 발현 수준을 갖는다. 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR) 및 종양유전자 TP53 상태는 모두 3개 음성이다.

[0574]

환자 B2: 세포는 51-세 코카서스 여성의 유방의 선암종의 늑막 삼출에서 유도된다. 세포는 대략 28 시간의 배가 시간을 갖고, 침습성, ee1-유사 형태학으로 보여지고 정상 ERB B2 수용체 수준 초과 약간 상승된 및 ERB B1의 높은 발현 수준을 갖고, 에스트로겐 수용체 (ER) 음성, 프로게스테론 수용체 (PR) 음성이고 높은 종양유전자 TP53 상태를 갖는다.

[0575]

환자 B3: 세포는 43-세 백인 여성의 유방의 선암종의 늑막 삼출에서 유도되고; 대략 20 시간 배가 시간, 자갈 상피 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 매우 높은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 음성, 프로게스테론 수용체 (PR) 음성, 및 종양유전자 TP53 양성 상태.

[0576]

- [0577] 환자 B4: 세포는 47-세 흑인 여성의 유방의 침습성 관상 암종의 복수 유체에서 유도되고; 110 시간의 배가 시간, 원형, 포도-유사 클러스터 형태학을 갖고, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 매우 높은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 양성, 프로게스테론 수용체 (PR) 음성, 및 종양유전자 TP53 야생형-낮은 상태를 갖는다.
- [0578] 환자 B5: 세포는 60-세 백인 여성의 원발 유방 침습성 관상 암종에서 유도되고; 28 시간 배가 시간, 비정질 확대의 혼합물 및 침습성 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 매우 높은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 양성, 프로게스테론 수용체 (PR) 양성, 및 종양유전자 TP53 양성 상태.
- [0579] 환자 B6: 세포는 70-세 흑인 여성의 원발 유방 화생 암종 TNM IV 기 등급 3에서 유도되고; 대략 30 시간 배가 시간, 거칠어진 확대 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 매우 높은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 음성, 프로게스테론 수용체 (PR) 음성, 및 종양유전자 TP53 돌연변이된 낮은 상태.
- [0580] 환자 B7: 세포는 69-세 백인 여성의 유방의 침습성 관상 암종의 늑막 삼출에서 유도되고; 30 시간 배가 시간, 작은 모자이크 상피 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 낮은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 양성, 프로게스테론 수용체 (PR) 양성, 및 종양유전자 TP53 야생형 상태.
- [0581] 환자 B8: 세포는 48-세 백인 여성의 유방의 선암종의 늑막 삼출에서 유도되고; 24 시간 배가 시간, 매우 작은 포도-유사 클러스터 형태학, ERB B1 수용체의 매우 낮은 발현 수준, ERB B2 수용체의 높은 발현 수준, 및 에스트로겐 수용체 (ER) 음성, 프로게스테론 수용체 (PR) 음성, 및 종양유전자 TP53 야생형 낮은 상태.
- [0582] 대장암에 대한 상피 세포 유형의 공통 임상 체시를 가진 2명의 환자로부터 세포가 시험용으로 선택되었다:
- [0583] 환자 C1: 세포는 남성 결장직장 암종에서 유도된다. 세포는 14 시간의 회전타원체 용적 배가 시간, ERB B1의 높은 수준, 돌연변이체 K-Ras, 돌연변이체 PIK3CA 및 종양유전자TP53 양성 상태를 갖는다.
- [0584] 환자 C2: 세포는 44 세 백인 여성의 원발 결장 선암종, 등급 2에서 유도된다. 세포는 46 시간의 회전타원체 용적 배가 시간, ERB B1의 높은 수준, 돌연변이체 BRAF, 및 종양유전자 TP53 음성 상태를 갖는다.
- [0585] 비-소세포 폐암에 대하여 상피 세포 유형의 공통 임상 체시를 갖는 2명의 환자로부터 세포는 시험용으로 선택되었다:
- [0586] 환자 L1: 세포는 25-세 남성의 비-소세포 폐 암종의 늑막 삼출에서 유도되고; 48 시간 배가 시간, 상피 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 상승된 발현 수준, PIK3CA 양성, 및 KRAS, BRAF 모두 음성 상태.
- [0587] 환자 L2: 세포는 52-세 백인 남성의 세기관지폐포 선암종에서 유도되고; 대략 30 시간 배가 시간, 상피 형태학, ERB B1 및 ERB B2 수용체의 정상 발현 수준, 및 BRAF, HRAS, PIK3CA, 및 KRAS 모두 음성 상태.
- [0588] **세포 경로 표적:**
- [0589] 이들 실험에 대하여 선택된 약물은, 이들이 광범위하게 상호연결되고, 결합을 통해 조절되고, 효소 활성 예컨대 인산화 및 탈-인산화를 포함하고, 임계적 세포성 기능을 대조하는 방법에서 대부분의 세포성 조절 경로를 대표하는 11개의 세포성 경로에 영향을 미친다.
- [0590] MAPK. (EGFR, EGFR-TK, HER1, HER 2). 미토겐-활성화된 단백질 (MAP) 키나제는 전체 세포 유형에서 발견되고 그리고 세포의 자극 (미토겐, 삼투 스트레스, 열충격 및 전-염증 사이토카인)에 반응하는 및 다양한 세포성 활성, 예컨대 유전자 발현, 유사분열, 분화, 증식, 및 세포 생존/세포자멸사를 조절하는 필수 세린/트레오닌-특이적 단백질 키나제이다. 그의 단단한 조절은 세포성 생존력의 유지에 중요하다. 상피 성장 인자 수용체 (인간에서 EGFR; ErbB-1; HER1)은 세포의 단백질 리간드의 상피 성장 인자 계열 (EGF-계열)의 구성원에 대한 세포-표면 수용체이다. (상향조절로서 공지된) EGFR 과발현 또는 과-활성으로 이어지는 돌연변이는, 폐암, 항문암 및 교모 세포종 다형성을 포함한, 수많은 암과 관련되었다. 돌연변이, 증폭 또는 EGFR 또는 계열 구성원의 오-조절은 전체 상피암의 약 30%에서 연루되고, 항암 요법의 확장 클래스의 표적이다.
- [0591] PI3K/PTEN (Her2, 3, 4, VEGF). 거의 전체 세포 유형에서 발견된 포스포타이딜이노시톨 3-키나제 (PI3K) 경로는 세포 생존 및 세포 성장에 임계적이고, 세포 표면 수용체에 성장 인자 결합에 의해 활성화될 수 있다. 암에서 가장 빈번하게 활성화된 경로중에 있는 복잡한 신호전달 캐스케이드이다. 인간 암에서 임의의 다른 경로보다 더 자주 돌연변이, 증폭 및 재배열을 포함한 게놈 변이에 의해 표적된다. VEGF 수용체는 광범위한 인간 종양 및 세포주를 거쳐 발현된다. VEGF의 발현은 종양 성장 및 전이를 촉진시키는 혈관 네트워크의 개발 및 유지로 이어지기 위해 나타났다. VEGF는 대다수의 비-소세포 폐암 (NSCLC), 결장직장, 및 다른 종양에서 발현된다. VEGF는 폐암이 진행함에 따라 더 높은 수준에서 발현된다. 또한, 거대하고 확실해지는 증거는 VEGF 유전자 발현이 좋지

못한 예측과 밀접하게 관련되는 것을 나타낸다.

- [0592] 세포 접촉. 세포 접촉 경로는 거의 전체 주요 생리적 기능을 교차한다. 경로는 세포 접촉 분자 예컨대 셀렉틴, 인테그린, 및 카드헤린을 이용하여 표면, 세포의 기질 또는 또 다른 세포에 세포의 결합을 포함한다. 정확한 세포성 접촉은 다중세포 구조의 유지에 필수적이다. 세포성 접촉은 세포의 세포질을 연결할 수 있고 신호 전달에 관여될 수 있다. 전체 접촉은, 직접적으로 원형질막의 통합 성분을 포함한, 또는 간접적으로 세포의 외부상에서 배출된 및 침착된 물질을 통해, 세포 표면에 의해 매개된다.
- [0593] MEK. MEK는, 암 세포 증식 및 생존에 대하여 신호전달하는, RAS/RAF/MEK/ERK 경로에서 주요 단백질 키나제이다. MEK는 암, 특히 RAS 및 RAF 종양유전자에서 돌연변이를 갖는 종양에서 빈번하게 활성화된다. MEK는 또한, 암에서 성장 및 생존 인자로서 작용할 수 있는, 염증성 사이토카인 TNF, IL-6 및 IL-1의 생합성을 조절한다. MEK 경로는 흑색종, 비-소세포 폐암, 두경부암 및 췌장암을 포함한 상이한 종양의 증식에서 중심 축으로서 작용한다. 그리고 단독 또는 다른 제제와 조합으로 MEK 저해는 암 치료에서 중요한 치료적 전략이다.
- [0594] RHO. Rho 단백질은 다양한 세포성 기능 예컨대 세포 극성, 소포성 추적, 세포 사이클 및 전사체 동력학에서 관여된다. Rho 활성화는 암성 세포에서 수많은 상이한 효과를 가질 수 있다. 종양의 개시에서, Rho 활성화의 변형은 세포자멸사를 억제시킬 수 있고 따라서 인공 세포 장수에 기여할 수 있다. 천연 세포자멸사가 억제된 이후, 비정상 종양 성장은 Rho 단백질이 통합적 역할을 하는 극성의 손실을 통해 관측될 수 있다. 다음으로, 성장하는 덩어리는 Rho 단백질에 의해 잠재적으로 야기된 접촉 단백질의 변경을 통해 그의 정상 경계를 거쳐 침범할 수 있다.
- [0595] AKT. AKT는 세린/트레오닌 키나제이고, 수용체 티로신 키나제 예컨대 IGF-1R, HER2/Neu, VEGF-R, PDGF-R의 자극, 및 수용체-PI-3K의 막-국재화된 복합체의 어셈블리 및 2차 메신저 PIP를 통한 Akt의 활성화를 포함하는, 수렴성 업스트림 신호전달 경로의 무리에 대하여 중요한 결절 포인트로서 세포내로 기능한다. AKT 및 그의 업스트림 조절물질이 광범위한 고체 종양 및 혈액성 악성종양에서 탈조절되고, 상기 경로의 상기 언급된 생물학적 후유증의 면에서, AKT 경로는 이들 종양의 생물학적 공격성의 주요 계측인자, 및 신규 항-암 요법용 주요 잠재 표적으로 간주된다.
- [0596] FAK1. 초점 접촉 키나제 1 (FAK1)-매개된 신호 전달의 생물학적 중요성은 상기 티로신 키나제가 배아 발생에서, 세포 이동, 세포 사이클 진행의 대조에서, 및 세포자멸사에서 근본적인 역할을 한다는 사실에 의해 밀접 표시된다. 정착-의존적 세포의 생존에서 중추적 역할을 하고 악성종양의 개발에서 중요한 역할을 하는 인테그린-연결된 세포 이동-과정에 필수적이다. FAK는 다양한 인간 상피암에서 상향조절되고, 발현은 침습성 포텐셜에 밀접하게 상관된다. 최근에, FAK 발현은 종양 세포의 악성종양으로의 진행 또는 암의 발병에 연루되었다. FAK1은 유방암 항-에스트로겐 저항성 조절에서 주요 역할을 한다.
- [0597] RAS/RAF. RAS 경로는 암에서 가장 빈번하게 탈조절된 경로 중 하나이다. RAS는, RAF/미토겐-활성화된 단백질 키나제 (MAPK)/세포의 신호-조절된 키나제 (ERK) 키나제 (MEK)/ERK MAPK 및 포스파티딜이노시톨 3-키나제 (PI3K)-AKT 신호전달 캐스케이드를 포함한, 다중 효과기 경로를 통해 신호전달한다. 이들 효과기 경로의 종양발생 포텐셜은 BRAF 및 PIK3CA에서 활성화 돌연변이의 빈번한 발생 뿐만 아니라 종양 억제제 PTEN, PI3K의 음성 조절물질에서 기능 상실 돌연변이에 의해 예시된다. 종양형성에서 Ras의 상기 중요한 역할 때문에, Ras-신호전달 경로는 항암 요법용 표적으로서 상당한 주의력을 유인하였다.
- [0598] MAK 경로. 전이-관련된 키나제 (MAK)는 세포 성장에 요구된 전사 인자의 신규 조절물질이다. 상기 경로의 저해는 세포 사이클 저지 활성으로 이어진다.
- [0599] MKK. 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제 (MKK) 신호전달 경로는 세포 분화, 증식, 운동성 및 생존을 포함한 생명 유지 관련 세포성 과정의 전사 및 번역후 조절 모두에 실시되었다. MKK 신호전달 경로가 VEGF의 방출, 및 VEGF에 대한 반응 조절에서 필수적 역할을 하기 때문에, MKK가 종양 혈관형성 촉진에서 중요한 역할을 한다고 믿어진다.
- [0600] 세포자멸적 경로. 세포자멸사 경로의 활성화는세포독성 약물이 종양 세포를 사멸시키는 주요 기전이다. 세포자멸사는 2개의 주요 경로를 통해 발생한다. 외적인 또는 세포질 경로로 언급된, 제1은 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 슈퍼패밀리의 구성원인, Fas 사멸 수용체를 통해 유발된다. 제2 경로는 교란된 경우 미토콘드리아로부터 사이토크롬-c의 방출 및 사멸 신호의 활성화로 이어지는 고유 또는 미토콘드리아 경로이다. 모든 경로는, 세포의 사멸이 되는, 조절 및 구조 분자를 절개하는 카스파제로 불리는 프로테아제의 캐스케이드의 활성화를 포함한 최종 공통 경로로 수렴한다. 세포자멸사 신호전달에서 결합은 종양의 저항성에 기여한다.

- [0601] **치료제:**
- [0602] 선택된 치료제는 소분자 약물을 대표하는 것 및 항체로부터 유도된 것을 포함한다. 시험된 치료제는 세포 내에서 기능성인 특이적 경로를 폐쇄하기 위해 설계된 작용 기전을 가진 일부 및 세포 세포자멸사를 유발시키기 위해 설계된 다른 것을 포함한다.
- [0603] **세특시맙.** 세특시맙 (Erbix)은 전이성 결장직장암 및 두경부암의 치료를 위하여 정맥내 주입에 의해 주어진, 키메라성 (마우스/인간) 단클론성 항체, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제이다. 성장 인자가 세포의 표면상에서 그의 수용체에 결합하는 경우, 수용체는 세포를 분할시키는 신호를 제공한다. 일부 암은 심지어 성장 인자 없이 분할하기 위해 신호를 제공하는 돌연변이된 수용체에 의해 야기된다. 그것이 세포를 통제불가능하게 분할시킨다. 세특시맙은 그와 같은 수용체에 결합하고 그 신호를 턴오프한다.
- [0604] **에를로티닙.** 에를로티닙 하이드로클로라이드 (Tarceva)는 비-소세포 폐암, 췌장암 및 몇 개의 다른 유형의 암을 치료하기 위해 사용된 약물이다. 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)상에서 작용하는, 가역적 티로신 키나제 억제제이다. 에를로티닙은, 다양한 형태의 암에서 크게 발현되고 가끔 돌연변이되는, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 티로신 키나제를 특이적으로 표적한다. 수용체의 아데노신 삼인산 (ATP) 결합 부위에 가역적 방식으로 결합한다.
- [0605] **라파티닙.** 라파티닙 (Tykerb/Tyverb)은 유방암 및 다른 고체 종양용 경구 활성 약물이다. HER2 성장 수용체 경로를 방해하는 이중 티로신 키나제 억제제이다. HER2-양성 유방암을 위하여 조합 요법으로 사용된다. 라파티닙은 2개의 종양유전자, EGFR (상피 성장 인자 수용체) 및 HER2/neu (인간 EGFR 유형 2)와 관련된 티로신 키나제 활성을 억제시킨다. HER2/neu의 과 발현은 여성에서 고위험 유방암의 특정 유형을 책임진다.
- [0606] **트라스투주맙.** 트라스투주맙 (Herceptin)은 HER2/neu 수용체를 방해하는 단클론성 항체이다. 그의 주요 용도는 특정 유방암을 치료하는 것이다. 불량성 HER2 단백질에 결합하는 경우, HER2 단백질은 더 이상 유방내 세포를 통제불가능하게 재생시키지 않는다.
- [0607] **도세탁셀.** 도세탁셀 (Taxotere)은 임상적으로 정착된 항-유사분열 화학요법 약물이다 (즉, 세포 분할을 방해한다). 유방, 난소, 전립선, 및 비-소세포 폐 암의 치료에 주로 사용된다. 도세탁셀은 화학요법 약물 부류; 탁산이고, 파클리탁셀 (탁솔)의 반-합성 유사체이다.
- [0608] **GSK1059615.** 포스포이노시티드 3-키나제 억제제 (PI3K 억제제)는, 암에서 주요 역할을 하는, PI3K/AKT/mTOR 경로의 일부인 포스포이노시티드 3-키나제 효소의 억제에 의해 기능하는 포텐셜 의료 약물이다. 상기 경로의 억제는 종종 종양 성장을 억압시킨다.
- [0609] **GSK1120212.** GSK1120212는 유망한 항종양 활성을 가진 MEK1 및 MEK2 (MEK1/2) 효소의 강력한 및 선택적 알로스테릭 억제제이다.
- [0610] **파조파닙.** 파조파닙 (Votrient)은 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\alpha/\beta$ 의 강력한 및 선택적 다중-표적된 수용체 티로신 키나제 억제제, 및 종양 성장을 차단하고 혈관신생을 억제시키는 c-키트이다.
- [0611] **파클리탁셀.** 파클리탁셀은 폐, 난소, 유방, 두경부암, 및 진전된 형태의 카포시 육종을 가진 환자를 치료하기 위해 사용된 유사분열 억제제이다. 파클리탁셀은 미세소관을 안정화시키고 결과적으로, 세포 분할 동안 미세소관의 정상 파손을 방해한다. 도세탁셀과 함께, 탁산의 약물 카테고리를 형성한다.
- [0612] **플루오로우라실.** 플루오로우라실 (5-FU 또는 f5U) (Acrucil, Carac, Efudix, Efudex 및 Fluoroplex)은 암의 치료에서 사용되는 피리미딘 유사체인 약물이다. 타이미딜레이트 합성효소의 비가역적 저해를 통해 작용하고 자살 억제제이다. 항대사물질로 불리는 약물의 계열에 속한다.
- [0613] **카페시타빈.** 카페시타빈 (Xeloda)은 전이성 유방암 및 결장직장암의 치료에서 사용된 경구로-투여된 화학치료제이다. 카페시타빈은, DNA 합성을 억제시키고 종양 조직의 성장을 느리게 하는, 종양에서 5-플루오로우라실까지 효소적으로 전환되는, 프로드러그이다.
- [0614] **토포테칸.** 토포테칸 (Hycamtin)은 토포이소머라제 억제제인 화학치료제이다. 난소 암 및 폐암, 뿐만 아니라 다른 암 유형을 치료하기 위해 사용된다. 토포이소머라제-I은 DNA 복제를 방해하는, 및 궁극적으로 세포 사멸로 이어지는 핵 효소이다. 상기 과정은 세포자멸사를 초래하는 DNA 가닥의 파괴로 이어진다.
- [0615] **이리노테칸.** 이리노테칸 (Camptosar)는 결장암의 치료에 사용된 약물이다. 이리노테칸은 토포이소머라제 I의 억제제인, SN-38에 가수분해에 의해 활성화된다. 활성 대사물질 SN-38에 의한 토포이소머라제 I의 억제는 결국

DNA 복제 및 전사 모두의 억제로 이어진다.

[0616] 옥살리플라틴. 옥살리플라틴은 암 화학요법에서 사용되는 배위 착물이다. 이들 백금-기반 약물은 보통 알킬화제 로서 분류된다. 옥살리플라틴은 DNA에서 모든 가닥간 및 가닥내 가교 형성에 의해 기능하는 알킬화제이다. DNA 에서 가교는 DNA 복제 및 전사를 예방하여, 세포 사멸을 초래한다.

[0617] 시스플라틴. 시스플라틴 (Platin)은, 육종, 일부 암종 (예를 들면 소세포 폐암, 및 난소암), 림프종, 및 세균 세포 종양을 포함한, 다양한 유형의 암을 치료하기 위해 사용된다. 이제 또한 카보플라틴 및 옥살리플라틴을 포함하는, 백금-함유 항-암 약물의 클래스의 제1 구성원이었다. 이들 백금 착물은 생체내 반응하여, DNA에 결합하고 이의 가교결합을 일으켜, 궁극적으로 세포사멸사를 유발시킨다.

[0618] **CReMS 유형**

[0619] 2개 유형의 CReMS, 광학적 바이오센서 및 임피던스 바이오센서는 시험 동안 세포의 생리적 반응을 측정하기 위해 및 발생하는 생리적 변화의 양이 상이한 유형의 CReMS상에서 측정될 수 있는 방법을 입증하기 위해 이용되었다.

[0620] **예측 기준**

[0621] 질환 진단:

[0622] 본원에서 기재된 방법으로부터 유도된 시험 결과는 컷-오프 값과 비교되고; 여기서 컷-오프 초과인 시험 결과는 시험 양성으로서 기록되고 컷-오프 값 미만은 시험 음성으로서 기록된다. 환자의 신호전달 경로 활성의 측정량이 그 특정한 신호전달 경로에 대하여 유도된 컷-오프 값 초과인 것으로 발견되는 경우, 환자는 비정상 신호전달 경로 활성으로 간주되고 따라서 그 비정상 신호전달 경로 활성과 관련된 질환을 갖는 것으로 진단된다. 반대로, 환자의 신호전달 경로 활성이 그 특정한 신호전달 경로에 대하여 유도된 컷-오프 값 미만인 것으로 발견되는 경우, 환자는 정상 신호전달 경로 활성을 갖는 것으로 간주되고 따라서 비정상 신호전달 경로 활성과 관련된 질환을 갖지 않는 것으로 진단된다.

[0623] 사례에서, 환자가 신호전달 경로와 관련된 바이오마커로 먼저 진단되는 경우, 본원에서 기재된 방법은 바이오마커-기반 진단을 보정할 수 있다.

[0624] 약물 효능:

[0625] 표적된 경로 또는 세포사멸적 경로의 억제에 의해 CELx 시험 동안 야기된 생리적 변화의 양은 3개 카테고리 중 하나로 기록되었다:

[0626] 1) 비-반응군: 미치료된 대조군 세포에 비교된 경우 2개 약물의 최고 생리적으로 관련된 농도에 의해 세포 지수의 <25% 감소. 상기 결과는 환자가 시험된 약물 조합에 반응하지 않을 것임을 나타낼 것이다;

[0627] 2) 반응군 (약): 임의의 수준의 농도에서 약물에 의한 세포 지수의 25-50% 감소. 이는 환자가 어느 정도까지 시험 약물의 조합에 반응할 것임을 나타낼 것이다.

[0628] 3) 반응군 (강): 임의의 수준의 농도에서 약물에 의한 세포 지수의 >50% 감소. 이는 환자가 시험 약물에 반응할 것임을 나타낼 것이다.

[0629] 임피던스 또는 광학적 바이오센서를 이용한 세포 지수는 임피던스 측정 또는 굴절률 측정의 기준선 개시점을 이용하여 계산된다. 기준선 개시점 임피던스 또는 굴절률은 물리적 관측가능하고 약물 또는 다른 교란제를 이용한 임의의 치료에 앞서 세포의 건강, 생존력, 및 생리적 상태의 암시이다. 약물 또는 교란제의 부가는 세포에 의해 경험된 세포성 생리적 변화의 특이성의 일시적 패턴 반사에서 변화에 대한 임피던스 또는 굴절률의 기준선 관독을 야기한다.

[0630] **실시예 1**

[0631] 2개 약물에 대한 2명 환자의 분화된 반응을 보여주는 경로 폐쇄 시험

[0632] CELx 경로 폐쇄 시험은 2명의 HER2 과발현 유방암 환자 (환자 B1 및 B4)로부터 세포, HER2 양성 유방암, 및 인간 상피 성장 인자 (EGF)로 나타내는 2개의 약물 (라파티닙 및 트라스투주맵)을 이용하여 수행되었다. 시험 동안 B1 및 B4 세포의 생리적 변화는 임피던스 바이오센서 CReMS로 측정되었고 CReMS로부터 출력은 도 1a 및 1b에서 기록된다. CELx 시험 결과와 제삼자 임상 참조의 비교는 도 1c에서 기록된다. 본 실시예는 환자가 수 시간의 기간에 걸쳐 연속적으로 환자의 세포에서 생리적 변화를 측정하는 CReMS의 이용에 의해 상이한 표적된 경로 약

물에 CELx 시험이 가질 반응성을 예측할 수 있는 방법을 제시한다. 본 실시예는 또한 유전적 바이오마커, 이 경우에 과발현 HER2 수용체의 존재가, 약물의 효능을 예측하는데 충분한 조건이 아닌 방법을 제시한다.

- [0633] **물질 및 방법**
- [0634] CREM 및 마이크로플레이트: 4"x 6", 96-웰 임피던스 마이크로플레이트는 모든 웰의 임피던스를 동시에 측정하면서 일정한 전압을 유지하도록 설계된 Roche Applied Science (Indianapolis, IN) xCELLigence SP 임피던스 바이오센서에 배치되었다. 특정한 웰에 대하여 임피던스의 변화는 임피던스 마이크로플레이트를 이용하여 세포의 수 및 세포가 갖는 부착의 유형에 비례한다. 임피던스의 변화는 이들 작은 세포 집단의 교란에 대한 반응을 나타낸다.
- [0635] 세포: 환자 B1 및 B4로부터 세포는 이용되었다. 세포는 -80°C에서 받아졌고, 전형적으로 37°C, 5% CO2에서 혈청과 버퍼링된 배지를 함유한 T75 배양 플라스크에서, 표준 인간 상피 세포 취급 절차에 따라 해동 및 배양되었다. 임피던스 마이크로플레이트에 부가에 앞서, 세포는 베르센을 가진 그의 성장 용기로부터 제거되었고, 카운트되었고, 혈청 또는 다른 성장 인자 없이 배지에서 재현탁되었다.
- [0636] 버퍼 및 시약: 표준 배지, 혈청, 항생제 (예를 들면 페니실린, 스트렙토마이신), 및 다른 버퍼는 ATCC (Manassas, VA, USA) 또는 Life Technologies (Grand Island, NY)로부터 전달된 대로 사용되었고 구매되었다. 추가의 성장 인자 (성숙한 인간 EGF ca6KDa)는 R&D Systems (Minneapolis, MN)로부터 구매되었고 성장 인자 또는 혈청 없이 버퍼링된 세포 배지에서 제조되었다. 치료제 라파티닙, 소분자 약물은 Selleck Chemicals (TX, USA)로부터 구매되었고; 트라스투주맙, 항체 약물은 임상 조제실로부터 수득되었다.
- [0637] 절차: 각 웰에서 6,000-12,000 세포는 혈청과 120uL 표준 배지를 함유한 임피던스 마이크로플레이트상에서 씨딩되었다. 용액은 생리적 상태 및 경로 교란에 대하여 세포를 동조화하기 위해 무 혈청 함유 배지로 대체되었다. 20 마이크로리터의 약물은 경로 교란보다 2 시간 앞에 무-혈청 배지에 부가되었다. 경로 교란은 EC80 용량의 수용체 리간드 (전형적으로 20uL내 6nM)를 이용하여 개시되었다. 생리적 변화의 CREMS 기록은 완벽한 세포성 반응을 통해 경로 교란에 버퍼 교환으로부터 수 시간 동안 연속적으로 유지되었다. 경로 시험은 37°C, 5% CO2 및 상대 습도 75%에서 수행되었다.
- [0638] CREMS는 시험 전반에 걸쳐 연속 기준으로 데이터를 기록하였고, 여기서 데이터는 B1 및 B4 세포상에서 2개 치료제의 효과를 나타냈다.
- [0639] 결과: 도 1a 및 1B는 항체 약물 트라스투주맙 및 소분자 약물 라파티닙을 각각 갖는 B1 및 B4 세포상에서 CELx 시험 동안 수집된 데이터를 나타낸다. 임피던스 CREMS에 의해 수집된 데이터는 X-축에서 분 및 Y-축에서 세포 지수로 경시적으로 각 도에서 나타난다. 세포 지수는 시험 동안 B1 및 B4 세포의 생리적 변화를 나타낸다.
- [0640] 결과는 부가된 약물 없이 리간드 수용체를 가진 전체 경로의 교란이 최고 세포 지수를 생성하였음을 나타낸다. 약물 트라스투주맙이 교란된 B1 세포에 부가된 이후, 시험 세포의 세포 지수는 5% 미만 변화하였고, B1 시험 세포가 트라스투주맙의 부가에 의해 영향받지 않는다는 것을 나타낸다. 반대로, 약물 라파티닙이 B1 세포에 부가된 이후, 시험 세포에 대한 세포 지수는 50% 초과만큼 감소하였고, 표적된 경로 내에서 활성이 유의미하게 감소되는 것을 나타낸다. 약물, 라파티닙 및 트라스투주맙 각각이 B4 세포의 샘플을 분리시키기 위해 부가된 이후, 각 시험 세포 샘플의 세포 지수는 50% 초과만큼 감소하였다. 이는 각 시험 세포 샘플의 표적된 경로 내에서 활성이 유의미하게 감소되었음을 나타냈다.
- [0641] 이들 결과에 기반하여, 도 1a에서 보여진 CELx 경로 폐쇄 시험은 환자 B1이 트라스투주맙에 반응하지 않지만 라파티닙에 반응할 것을 예측한다. 도 1b에서 보여준 결과는 또한 환자 B4가 트라스투주맙 및 라파티닙 모두에 반응할 것을 예측한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 1c에서 보여지고; CELx 시험이 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 정확하게 예상하였음을 보여주고, 여기서 환자 B1은 트라스투주맙에 미반응성 및 라파티닙에 반응성임을 알아냈고 환자 B4는 모두에 반응성임을 알아냈다.
- [0642] 논의: 본 발명의 본 실시예에서, CELx 시험은, 세포 환자 B1 및 B4를 이용하여, 2개 약물, 트라스투주맙 및 라파티닙의 효능을 정확하게 예측하였다. B1 및 B4 세포는 수용체 리간드를 이용하여 HER2 경로의 교란에 반응하였고, 환자가 그 경로 내에서 활성을 폐쇄할 수 있는 약물에 반응할 수 있음을 나타낸다. 본 실시예에서, B1 세포는, 유사한 작용 기전을 가진 약물에도 불구하고, 2개 약물에 분화된 반응을 입증한다. 환자 B1은 라파티닙에 반응성 및 트라스투주맙에 비-반응성인 것을 알아내었다.
- [0643] 본 실시예는, 트라스투주맙, 항체 약물의 경우에서와 같이, 세포 표면에서 작업하는 것, 또는 키나제 억제제 약

물, 라파티닙의 경우에서와 같이, 세포질에서 작용하는 것을 포함한, 상이한 유형의 치료제에 CELx 시험이 적용될 수 있는 방법을 예시한다. 개시내용의 시스템 및 방법이 MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3 및 세포 접착 경로를 표적하는 약물에 반응으로 변화를 검출하는데 유효한 방법을 또한 예시한다. 본 실시예에는 또한 관련된 유전적 바이오마커, 이 경우에 과발현 HER2 유전자의 존재의 지식이 그의 의도된 작용 기전에 따라 약물이 기능할지를 예측하기 위한 충분한 조건이 아님을 예시한다. 본 실시예에서, 약물 트라스투주맙은, 의도되는 바와 같이, 모든 Her2 양성 암 세포 유형에서 HER2 성장 인자 신호전달 경로를 항상 폐쇄시키지 않는다. 유사한 유전적 프로파일에도 불구하고, 환자 B1 및 B4는 CELx 시험에 의해 확인된 바와 같이 트라스투주맙에 상이하게 반응한다. 반대로, 본 발명의 방법의 구현에는, HER2 부위에서 작용하는, 또 다른 약물, 라파티닙이 모든 환자에 대하여 설계된 바와 같이 경로를 폐쇄할 수 있다는 것을 정확하게 예측한다. 본 실시예의 결과는 제삼자에 의해 보고된 반응, 치료제가 의도된 효능을 제공할지를 예측하기 위해 환자의 이환 세포에서 생리적 변화의 측정을 사용하는 능력의 확인과 상관한다. 본 발명의 경우에, 의사는 약물에 대한 종양 세포의 실제 반응성에 기반하여 유방암 환자용 치료를 선택한다.

[0644] **실시예 2**

[0645] 하나의 약물에 대한 2명 환자의 분화된 반응을 보여주는 항-증식성 시험

[0646] CELx 항-증식성 시험은 2명 유방암 환자 (환자 B1 및 B2)로부터 세포 및 약물 파클리탁셀을 이용하여 수행되었다. 시험 동안 B1 및 B2 세포의 생리적 변화는 임피던스 바이오센서 CReMS로 측정되었고 CReMS로부터 출력은 도 2a 및 2b에 기록된다. CELx 시험 결과와 제삼자 임상 참조의 비교는 도 2c에 기록된다. 본 실시예에는 항-증식성 약물이 도입된 이후 환자의 암 세포에서 며칠 동안 생리적 변화의 측정에 의해 치료제의 효능 예측에 대한 CELx 시험의 능력을 입증한다. 본 실시예에는 또한 결과의 측정에서 기준선, 이 경우에, 미치료된 환자 세포의 역할을 입증한다. 또한, 환자 B2에 대하여 기록된 결과는 약물에 대한 세포의 반응성에서 경시적으로 발생할 수 있는 변화 때문에 며칠 동안 연속적 기준선에서 세포의 생리적 반응의 모니터링의 중요성을 입증한다.

[0647] **물질 및 방법**

[0648] CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼: 실시예 1에서 사용된 CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼는, 시험된 치료제를 제외하고, 실시예 2에서 이용된 것과 동일하다. 실시예 2에서, 치료제, 파클리탁셀은 시험되었다. 파클리탁셀은 Selleck Chemicals (TX, USA)로부터 구매되었다.

[0649] 세포: 환자 B1 및 B2로부터 유방암 세포는 실시예 1에서 기재된 바와 동일한 방식으로 이용되었고 다루어졌다.

[0650] 절차: 각 웰에서 6,000 - 12,000 세포는 혈청과 120uL 침강 배지를 함유한 임피던스 마이크로플레이트상에 씨딩되었다. 약물 파클리탁셀의 40 마이크로리터는 B1 및 B2 세포 각각의 한 세트에 부가되었고; B1 및 B2 세포의 또 다른 대조군 세트는 약물을 받지 않았다. 세포가 48-72 시간인 완벽한 세포성 반응을 통해 마이크로플레이트 상에서 먼저 씨딩된 경우 생리적 변화의 CReMS 기록은 연속적으로 유지되었다. 시험은 37°C, 5% CO2 및 75% 상대 습도에서 수행되었다.

[0651] 결과: 도 2a 및 2b는 약물 파클리탁셀을 이용하여 B1 및 B2 세포에 관한 CELx 시험 동안 수집된 데이터를 나타낸다. 임피던스 CReMS에 의해 수집된 데이터는 X-축에서 시간 및 Y-축에서 세포 지수로 경시적으로 도에서 나타낸다. 세포 지수는 시험 동안 B1 및 B2 세포의 생리적 변화를 나타낸다. 세포 지수에서 증가는 일반적으로 세포 증식에서 증가의 암시이다. 반면에 장기간 세포 지수에서 감소는 일반적으로 세포 생존력 또는 살아있는 세포수 감소의 손실을 암시한다. B2 시험 세포는, B2 대조군 세포에 비교된 CReM 출력에서의 유의미한 감소에서 반영된 바와 같이, 파클리탁셀에 대한 초기 반응성을 보여주었지만, 그러나 거의 24 시간 이후, CReM 출력은 반전시켜, 시험 세포가 증식하기 시작하고 더 이상 약물에 반응성이 없음을 나타낸다. B1 시험 세포는, 시험 기간 전반에 걸쳐 B1 대조군 세포에 비교된 CReM 출력에서의 감소에서 반영된 바와 같이, 파클리탁셀에 대한 즉각적 및 연속적 반응성을 보여준다. 도 2a 및 2b에서 나타낸 CELx 시험 결과는 환자 B1 및 B2 모두가 파클리탁셀에 반응할 것을 예측한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 2c에서 보여지고; 환자 B1 및 B2가 모두 파클리탁셀에 반응성인 것으로 발견되는, 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 CELx 시험이 정확하게 예측하였음을 보여준다.

[0652] 논의: 본 실시예에서, CELx 시험은 2명 유방암 환자, B1 및 B2의 경우 항-증식성 약물, 파클리탁셀의 효능을 정확하게 예측하였다. 추가로, 환자 B2에 대한 CELx 시험 결과는 파클리탁셀에 대한 저항성이 단기에서 발달하는 것을 나타내어, 장시간에 걸쳐 연속적 기준으로 세포의 생리적 반응의 모니터링의 중요성을 예시하였다. 약물 요법을 이용한 주요 사안 중 하나가 약물에 대한 저항성의 급속 개발이기 때문에 상기 결과는 중요하다. 환자가

효과없는 요법으로 처방된 경우 시간은 허비된다. 화학독성의 위험 증가 및 화학요법의 통상 부작용 발생 이외에, 많은 사례에서, 하나의 약물을 이용한 치료는 더 효과적일 수 있는 또 다른 약물을 이용한 치료의 가능성을 제거한다.

[0653] **실시예 3**

[0654] 함께 합쳐져서 2개 약물에 대한 2명 환자의 반응을 보여주는 조합 시험

[0655] CELx 조합 시험은 2명의 결장암 환자 (환자 C1 및 C2)로부터 세포, EGF, 및 결장암에 대하여 나타낸 2개 약물, 세특시맵 및 이리노테칸의 조합을 이용하여 수행되었다. 시험 동안 C1 및 C2 세포의 생리적 변화는 임피던스 바이오센서 CReMS로 측정되었고 CReMS로부터 출력은 도 3a 및 3b에서 기록된다. CELx 시험 결과와 제삼자 임상 참조의 비교는 도 3c에서 기록된다. 본 실시예는 개별 환자가 유전 검사 또는 발현 프로파일링을 이용하여 실시될 수 없는 방식으로 2 이상의 약물의 조합을 가질 반응성을 CELx 시험이 예측할 수 있는 방법을 입증한다. 시험은 또한 CELx 시험이, 유방암 세포에 더하여, 결장암 세포를 이용하여 작동하는 방법을 예시한다.

[0656] **물질 및 방법**

[0657] CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼: 실시예 1 및 2에서 사용된 CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼는, 사용된 치료제를 제외하고, 실시예 3에서 이용된 것과 동일하다. 실시예 3에서, 2개 치료제, 세특시맵 및 이리노테칸은 시험되었다. 이리노테칸은 Selleck Chemicals (TX, USA)로부터 구매되었고 세특시맵은 임상 조제실로부터 수득되었다.

[0658] 세포: 환자 C1 및 C2로부터 결장암 세포는 실시예 1에서 기재된 바와 동일한 방식으로 이용되었고 다루어졌다.

[0659] 절차: 각 웰에서 6,000 - 12,000 세포는 혈청과 120uL 침강 배지를 함유한 임피던스 마이크로플레이트에 씨딩되었다. 용액은 생리적 상태에 대해 세포를 동조화하기 위해 혈청을 함유하지 않은 배지로 대체되었다. 이리노테칸 및 세특시맵의 20 마이크로리터 각각은 C1 및 C2 세포 각각의 한 세트에 부가되었고; C1 및 C2 세포의 또 다른 대조군 세트는 약물을 받지 않았다. 세포가 48-72 시간인 완벽한 세포성 반응을 통해 마이크로플레이트상에서 먼저 씨딩된 경우 생리적 변화의 CReMS 기록은 연속적으로 유지되었다. 시험은 37°C, 5% CO2 및 75% 상대 습도에서 수행되었다.

[0660] 결과: 도 3a 및 3b는 C1 및 C2 세포 및 항체 약물 세특시맵 및 소분자 약물 이리노테칸의 조합에 관한 CELx 시험 동안 수집된 데이터를 나타낸다. 임피던스 CReMS에 의해 수집된 데이터는 X-축에서 시간 및 Y-축에서 세포 지수로 경시적으로 도에서 나타난다. 세포 지수는 시험 동안 C1 및 C2 세포의 생리적 변화를 나타낸다. 결과는 미치료된 대조군 C1 및 C2 세포가 최고 세포 지수를 생성하였음을 보여준다. 2개 약물이 C1 및 C2 시험 세포에 부가된 이후 결과는 50% 초과 각 세포 샘플에 대한 세포 지수의 감소를 보여준다. 이들 결과는 환자 C1 및 C2 모두가 세특시맵 및 이리노테칸의 조합에 반응할 것을 예측한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 3c에서 보여지고; CELx 시험이, 환자 C1 및 C2가 세특시맵 및 이리노테칸 조합에 반응성인 것으로 발견된, 임상 참조 표준에 의해 기록된 결과를 정확하게 예측하였음을 보여준다.

[0661] 논의: 본 실시예에서, CELx 시험은 2명의 결장암 환자, C1 및 C2의 경우 2개 약물, 세특시맵 및 이리노테칸의 효능을 정확하게 예측하였다.

[0662] 그러나, 2개 약물을 이용하여 환자 C1에 대한 전체 결과가 세포 지수에서 50% 초과 감소를 보여주었어도, CELx 시험 결과는 약물 중 하나, 세특시맵이 환자 C1의 세포에서 생리적 변화를 야기하지 않는 것을 나타냈다. 이는 환자 C1에서 약물 조합의 전체 치료적 이점이 유사하게 이리노테칸 때문이었음을 시사할 것이다. 의사가 조합 요법 내에서 단 하나의 약물, 이 경우에 이리노테칸이 유효하였다는 것을 안다면, 이들은 그 다음 유효한 약물을 단지 처방할 것이다. CELx 시험 결과는 환자 2가 각 개별 약물에 반응성이었음을 나타내어, 약물의 조합이 단지 단일 약물의 사용보다 더욱 유효할 것임을 시사한다.

[0663] 결과는 CELx 시험이 2 이상의 치료제의 조합에 대한 개별 환자의 반응성을 예측할 수 있는 방법을 예시한다. 시험은 CELx 시험이 결장암 세포로 작동하는 방법을 예시한다. 세포 표면에 결합에 의해 작동하는 약물, 이 경우에, 항체 약물 세특시맵, 및 세포 핵에 결합에 의해 작동하는 세포자멸적 경로 억제제, 이 경우에 이리노테칸의 상이한 유형에 대한 암 세포의 생리적 반응성을 추가로 예시한다. 그리고 MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3, 및 세포 접착 경로 및 세포자멸적 경로를 표적하는 약물에 대한 암 세포의 생리적 반응성을 또한 예시한다. 결과는 의사가 결장암 환자에 대하여 더욱 유효한 치료를 선택하게 할 것이다

- [0664] **실시예 4**
- [0665] 상이한 약물을 이용한 추가의 CELx 시험
- [0666] 51 CELx 경로 폐쇄 및 항-증식성 단일 약물 시험은 11 상이한 환자 세포 (환자 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7로부터 유방암 세포), 환자 C1 및 C2로부터 결장암 세포, 및 환자 L1 및 L2로부터 폐암 세포) 및 15 상이한 약물 (카페시타빈, 세톡시맵, 도세탁셀, 플루오로우라실, 게피티닙, GSK1059615, GSK1120212, 라파티닙, 파클리탁셀, 파조파닙, 트라스투주맵, 토포데칸, 시스플라틴, 에블로티닙, 및 옥실리플라틴)의 선택으로부터 가능한 세포 및 약물 조합의 일부를 이용하여 수행되었다. 6 CELx 조합 시험은 수행되었고, 2개는 파클리탁셀 및 시스플라틴 및 환자 L1 및 L2 세포의 약물 조합이었고, 4개는 트라스투주맵 및 라파티닙 및 환자 B1, B2, B3, 및 B4 세포의 약물 조합이었다. 시험된 세포 및 약물의 생리적 변화는 임피던스 바이오센서 CReMS로 측정되었고 CReMS로부터 요약 출력은 도 4에서 기록된다. 이들 CELx 시험 결과와 제삼자 임상 참조 사이 상관관계는 도 7에 기록된다.
- [0667] **물질 및 방법**
- [0668] CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼: 도 4에 열거된 각각의 57 시험은 실시예 1-3에 기재된 것과 동일한 CReMS, 마이크로플레이트, 시약, 및 버퍼에 의존한다.
- [0669] 세포: 환자 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, C1, C2, L1, 및 L2로부터 세포는 실시예 1에서 기재된 바와 동일한 방식으로 이용되었고 다루어졌다.
- [0670] 절차: 표적된 경로 약물 (세톡시맵, 게피티닙, GSK1059615, GSK1120212, 라파티닙, 파조파닙, 트라스투주맵, 및 에블로티닙)을 포함한 실험에서 실시예 1에 기재된 절차는 이용되었다. 항-증식성 약물 (카페시타빈, 도세탁셀, 플루오로우라실, 파클리탁셀, 토포데칸, 시스플라틴, 및 옥실리플라틴)을 포함한 실험에서, 실시예 2에 기재된 절차는 이용되었다. 약물의 조합을 포함한 실험에서, 실시예 3에 기재된 절차는 이용되었다. 환자 세포 및 세포로 시험된 약물의 목록은 도 4에서 특성화된다.
- [0671] 결과: 열거된 세포 및 약물의 다양한 조합상에서 수행된 57 CELx 시험의 요약 결과는 도 4에서 보여진다. 각 실험에 대하여, 그의 대조군 세포에 비교된 시험 세포의 생리적 반응의 변화는 계산되었다. 도 4에서 각 박스는 50% 초과, 5% - 50%, 또는 5% 미만으로서 각 실험에서 측정된 생리적 반응에서 변화를 분류한다. 도 4에서 나타난 시험의 시리즈는 광범위한 세포성 경로를 표적하는 광범위한 약물에 이들이 노출된 이후 다양한 통상 암 세포 유형에서 발생하는 생리적 변화를 측정하기 위한 CELx 시험의 능력을 예시한다. CELx 시험 예측과 제삼자 임상 참조에 의해 기록된 결과의 비교는 도 7에서 보여지고; CELx 시험 결과가 환자 및 약물 조합에 대하여 보고된 제삼자 임상 참조와 상관하였음을 보여준다.
- [0672] 논의: 본 실시예에 기재된 57 시험에서 본원에서 기재된 본 발명은 하기를 이용한 효능을 입증하였다:
- [0673] 결장, 유방, 및 폐 암 세포;
- [0674] EGFR, EGFR-TK, PI3K, MEK1, MEK2, HER2 수용체, 및 VEGFR를 포함하는 표적을 통해 MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K, MAK, MKK, MEK 및 세포 접착 경로를 억제시키는 표적된 경로 약물; 및
- [0675] 토포이소머라제 I, TUBB1, BCL2, DNA, 퓨린 가교결합 (GG, AG, GNG), 및 타이미딜레이트 합성효소를 포함하는 표적을 통해 세포자멸적 경로를 표적하는 항-증식성 약물.
- [0676] 하나를 제외한 각각의 CELx 시험 결과는 상기 환자 세포 및 약물 조합에 대한 결과와 상관하였다.
- [0677] **실시예 5**
- [0678] 상이한 CReMS로부터 생산된 결과 사이에서 조화 시험
- [0679] CELx 경로 폐쇄 시험은 과발현 상피 성장 인자 (EGF) 수용체, 1 약물 세톡시맵, 및 인간 상피 성장 인자 (EGF)를 가진 4명의 유방암 환자 (환자 B1, B2, B3, B4)로부터 세포를 이용하여 수행되었다. 시험 동안 4명 환자의 세포의 생리적 변화는 2개의 상이한 CReMS로부터 생산된 결과의 상관관계를 입증하기 위해 임피던스 바이오센서 CReMS 및 광학적 바이오센서 CReMS로 측정되었다. CReMS로부터 출력은 도 5에 기록된다. 본 실시예는 CELx 시험이 환자의 세포에서 생리적 변화의 동일한 측정을 수득하기 위해 2개의 상이한 CReMS를 이용할 수 있는 방법을 예시한다.
- [0680] **물질 및 방법**

- [0681] CReMS 및 마이크로플레이트: 2개의 상이한 CReMS는 본 실시예에서 사용되었다. 시험의 한 시리즈에서, 4"x 6", 96-웰 임피던스 마이크로플레이트는 모든 웰의 임피던스를 동시에 측정하면서 일정한 전압을 유지하기 위해 설계된 Roche Applied Science (Indianapolis, IN) xCELLigence SP 임피던스 바이오센서에 배치되었다. 특정한 웰에 대하여 임피던스에서의 변화는 세포의 수 및 세포가 임피던스 마이크로플레이트와 함께 갖는 부착의 유형에 비례한다. 임피던스에서의 변화는 이들 작은 세포 집단의 교란에 대한 반응을 나타낸다. 시험의 다른 시리즈에서, 4"x 6", 384-웰 광학적 마이크로플레이트는 각 웰에서 850 나노미터 근적외선 반사광을 스캔하기 위해 설계된 PerkinElmer Instruments (Waltham, MA) EnSpire Multimode 광학적 바이오센서에 배치되었다. 특정한 웰에 대하여 반사된 파장에서의 변화는 세포의 수 및 세포가 광학적 마이크로플레이트와 함께 갖는 부착의 유형에 비례한다. 반사된 파장에서의 변화는 웰에서 소세포 집단의 교란에 대한 반응을 나타낸다.
- [0682] 시약 및 버퍼: 실시예 1에서 사용된 시약 및 버퍼는, 이용된 치료제를 제외하고, 실시예 5에서 이용된 것과 동일하다. 실시예 5에서, 치료제 세톡시맵이 시험되었다. 세톡시맵은 의료 조제실로부터 획득되었다.
- [0683] 세포: 환자 B1, B2, B3 및 B4로부터 유방암 세포는 시험의 모든 세트에서 이용되었고 실시예 1에 기재된 바와 동일한 방식으로 다루어졌다.
- [0684] 절차: 임피던스 바이오센서 CReMS를 이용하여 수행된 시험의 세트에서, 각 웰내 6,000 - 12,000 세포는 혈청과 120uL 침강 배지를 함유한 임피던스 마이크로플레이트에 씨딩되었다. 약물 세톡시맵의 40 마이크로리터는 경로 교란에 2 시간 앞서 B1, B2, B3, 및 B4 환자 세포 각각의 한 세트를 함유한 무-혈청 배지에 부가되었고; B1, B2, B3 및 B4 세포의 또 다른 대조군 세트는 약물을 받지 않았다. 경로 교란은 수용체 리간드 (20uL내 6nM)의 EC80 용량을 이용하여 개시되었다. 세포가 20-48 시간 범위인 완벽한 세포성 반응을 통해 마이크로플레이트상에서 먼저 씨딩된 경우 생리적 변화의 CReMS 기록은 연속적으로 유지되었다. 시험은 37°C, 5% CO2 및 75% 상대 습도에서 수행되었다.
- [0685] 광학적 바이오센서 CReMS를 이용하여 수행된 시험의 세트에서, 각 웰내 6,000 - 12,000 세포는 혈청과 60uL 침강 배지를 함유한 광학적 마이크로플레이트에 씨딩되었다. 약물 세톡시맵의 20 마이크로리터는 경로 교란에 2 시간 앞서 B1, B2, B3, 및 B4 환자 세포 각각의 한 세트를 함유한 무-혈청 배지에 부가되었고; B1, B2, B3 및 B4 세포의 또 다른 대조군 세트는 약물을 받지 않았다. 경로 교란은 수용체 리간드 (20uL내 6nM)의 EC80 용량을 이용하여 개시되었다. 세포가 20-48 시간 범위인 완벽한 세포성 반응을 통해 마이크로플레이트상에서 먼저 씨딩된 경우 생리적 변화의 광학적 CReMS 기록은 연속적으로 유지되었다. 시험은 25°C-30°C, <5% CO2 및 30% 상대 습도에서 수행되었다.
- [0686] 결과: 도 5는 약물 세톡시맵 및 EGF를 가진 4명 유방암 환자 (B1, B2, B3, 및 B4)로부터 세포에 관해 분리하여 수행된 8 CELx 시험의 요약 결과를 보여준다. 세포 B1, B2, B3, 및 B4에 관한 시험의 1 세트는 광학적 바이오센서 CReMS를 이용하여 수행되었고 동일한 세포에 관한 시험의 또 다른 세트는 임피던스 바이오센서 CReMS를 이용하여 수행되었다. 결과는 CReMS에 의해 기록된 출력에서 백분율 변화의 범위를 보여주는 요약 방식으로 나타난다. 시험된 각 환자 세포에 대하여, 각 CReMS에 의해 기록된 생리적 변화의 양은 동일하였다. 이들 결과는 CELx 시험 방법이 세포에서 상이한 생리적 변화를 측정하는 CReMSs의 상이한 유형을 이용할 수 있음을 예시한다.
- [0687] 논의: 본 실시예에서, CELx 시험은 세포성 생리적 변화를 측정하기 위해 상이한 변환기 인터페이스를 갖는 2개의 상이한 CReMS상에서 수행되었다. 치료에 대한 생리적 반응의 획득에 이용된 디바이스에서 유의차에도 불구하고, 광학적 바이오센서 CReMS 및 임피던스 바이오센서 CReMS는 각각의 환자 샘플에 동일한 결과를 제공하였다. 상기 결과는 약물에 대한 치료적 반응을 예측하기 위해 개별 환자의 세포성 생리적 변화의 이용의 본 발명의 보편성의 실례 및 많은 CReMS 유형까지 본 발명의 확대에 중요하다.
- [0688] 실시예 1-5로부터 CELx 시험 결과 및 임상 예측의 요약
- [0689] 실시예 1-4에서 기재된 전체 65 총 CELx 시험의 요약 결과는 도 6에 나타낸다. 도 6에 기재된 CELx 시험 결과와 단일 약물 또는 약물 조합에 대한 환자의 반응성을 기록한 제삼자 임상 참조로부터의 결과 사이에서 상관관계 (0% 또는 100%)는 도 7에 보여진다. 하나를 제외한 전체 65 시험에서, CELx 시험 예측 및 제삼자 측정은 동일한 결과를 생성하여, 광범위한 세포성 경로를 표적하는 16 상이한 약물에 대한 유방, 폐, 및 결장 환자 반응을 예측하기 위한 CELx 시험의 능력을 예시하였다.
- [0690] 실시예 1-4에서 시험된 다양한 환자 암 세포에 대한 CELx 시험 예측 대 제삼자 기록은 도 8a, 8b, 8c 및 8d에서 제공된다. 환자가 약물 또는 약물 조합에 반응할 것을 정확하게 예측하는 CELx 시험 결과는 진 양성 (TP) 결과로서 표시된다. 환자가 약물 또는 약물 조합에 반응하지 않을 정확한 예측은 진 음성 (TN) 결과로서 표시된다.

환자가 약물 또는 약물 조합에 반응할 부정확한 예측은 위 양성 (FP)으로 표시되고 환자가 약물에 반응하지 않을 부정확한 예측은 위 음성 (FN)으로 표시된다.

[0691] 도 8a는 단독으로 또는 16 상이한 약물과 조합으로 시험된 12 암 환자 세포로 실시예 1-4에서 수행된 전체 시험에 대한 결과 대 제삼자 기록의 비교를 기록한다. 도 8b는 단독으로 및 13 상이한 약물과 조합으로 시험된 8명 유방암 환자 세포에 대한 결과 대 제삼자 기록의 비교를 기록한다. 도 8c는 단독으로 및 3 상이한 약물과 조합으로 시험된 2 상이한 결장암 환자 세포에 대한 결과의 비교를 기록한다. 도 8d는 단독으로 및 3 상이한 약물과 조합으로 시험된 2 상이한 폐암 환자 세포에 대한 결과의 비교를 기록한다. 각 도에서, CELx 시험은 한 경우에서 제외하고 환자가 특정한 약물 또는 약물의 조합에 반응할지 또는 반응하지 않을지를 정확하게 예측한다고 보여진다. 도 8b에서, 게피티닙에 대한 반응군인 것으로 예상된 1 환자 유방암 세포 샘플이 CReMS 시험에서 반응을 보여주지 않았음을 볼 수 있다.

[0692] 실시예 1-4에서 시험된 환자 세포 및 약물 뿐만 아니라 시험된 환자, 약물, 경로, 및 CReMS 유형의 하위-그룹에 대한 CELx 시험의 감수성 및 특이성은 도 9에서 제공된다. 연구된 전체 및 각각의 하위-그룹 내에서, CELx 시험은 고 감수성 (98%+) 및 특이성 (99.9%+)을 생성하였다. 이들 결과는 실시예 1-5에 기재된 시험에서 표적된 상이한 암 세포 유형, 약물 유형, CReMS 유형, 및 경로를 거쳐 시험의 예측의 능력을 예시한다.

[0693] **실시예 6**

[0694] 세포 부착 신호 (CAS)를 이용한 진단 검정 시스템

[0695] 본원에서 사용된 진단 시험의 분석물은, 마이크로플레이트의 웰에 배치되고 임피던스 바이오센서로 분석된 경우, 단독 또는 세포 길항제의 존재하에, 생존 환자 세포가 생성하는 세포 부착 신호 (CAS)이다. 전체 시험에 대하여, CAS는 환자 세포 샘플의 2개 그룹에 대하여 측정 및 분석된다.

[0696] 1) 환자 세포 단독 (C)

[0697] 2) 환자 세포 + 경로 인자(들) (CF)

[0698] 3) 환자 세포 + 경로 인자(들) + 확인제 (CCF)

[0699] 신호전달 경로가 정상적으로 기능하고 있는지를 검출하기 위해, 환자의 이환 세포에서 신호전달 경로는 교란되고 수득한 활성은 그의 건강한 세포의 신호전달 경로 활성에 관해 교란제가 갖는 효과 또는 질환이 없다고 공지된 환자 또는 환자들로부터 건강한 세포의 신호전달 경로 활성에 관해 교란제의 효과에 비교된다. 검정은 이환 세포내 CF와 C 세포 사이 CAS에서의 변화에 비하여 환자의 건강한 세포내 CF와 C 세포 사이 CAS에서의 변화를 측정한다. 대안적으로, 검정은 질환이 없다고 공지된 환자 또는 환자의 풀로부터 공지된 결과에 비교될 수 있는 환자의 이환 세포내 CF와 C 세포 사이 CAS에서의 변화를 측정할 수 있다. 본질적으로, 신호전달 경로가 비정상 이면, 건강한 세포와 이환 세포 사이 CAS 변화는 상이할 것이다. 대상체로부터 CF와 CCF 이환 세포 사이 CAS에서의 변화의 측정은 CF CAS가 당해 신호전달 경로의 활성을 나타내는 확인을 제공한다. CCF가 CF에 비하여 변화되지 않는 경우에서, 이는 CF에서 신호전달 경로 활성이 당해 조건에 관련되지 않은 일부 다른 신호전달 경로 활성을 나타내는 것을 암시할 것이다. 이들 경우에, 환자는 분석된 질환을 갖는 것으로 고려되지 않을 것이다.

[0700] 원발 비-전환된 악성 및 건강한 상피 세포 뿐만 아니라 세포주에서 특이적 경로 활성을 측정하기 위한 상기 세포 분석 방법의 능력을 확인하는 연구가 수행되었다. 이들 연구로부터 대표적인 데이터는 유방암, PI3K 및 ER $\alpha$ 에 관여된 2개의 임계적 경로에 대하여 도 10 및 11에서 보여진다.

[0701] 도 10a 및 10b는 NRG1, PI3K 신호전달 경로 인자 (즉, PI3K 신호전달 경로를 교란시키는 제제)가 예상대로 시험된 세포 (도 10a에서 BT474 유방암 세포주 세포 및 도 10b에서 환자 54 원발 유방암 세포)에서 세포 부착 신호 (CAS)를 증가시켰다는 것 및 확인제, 라파티닙, 이중 PI3K 및 MAPK 억제제가 CAS를 감소시켜, NRG1으로만 측정된 CAS가 PI3K 경로를 따라 활성에 특이적이었음을 확인하는 것을 보여준다. 도 10c는 원발 유방암 세포 (환자 54 세포)와 건강한 유방암 세포 (H62 세포) 사이 NRG1에 대한 차별적인 반응을 보여주어, 질환 활성의 표현형 바이오마커로서 신호전달 경로 활성 이용의 유효성을 입증한다.

[0702] 도 11a 및 11b는 에스트라디올, ER $\alpha$  경로 인자가 예상대로 시험된 세포 (도 11a에서 BT474 유방암 세포주 세포 및 도 11b에서 환자 54 원발 유방암 세포)에서 CAS를 변화시켰다는 것 및 확인제, 폴베스트란트, ER $\alpha$  억제제가 CAS를 역전시켜, 에스트라디올로만 측정된 CAS가 ER $\alpha$  경로를 따라 활성에 특이적이었음을 확인하는 것을 보여준다. 도 11c는 원발 유방암 세포 (환자 54 세포)와 건강한 유방암 세포 (H62 세포) 사이 에스트라디올에 대한

차별적인 반응을 보여주어, 질환 활성의 표현형 바이오마커로서 경로 활성 이용의 유효성을 입증한다.

[0703] 실시예 7

[0704] 그의 이환 세포에서 비-과발현된 HER2 수용체 및 비정상 HER2 신호전달 경로 활성을 갖는 유방암 환자를 확인하기 위한 신호전달 경로 활성의 측정

[0705] 본 발명의 가치 및 유용성 그리고 본 발명이 임상 시험으로서 유용해지는데 충분히 정밀한 및 정확한 것을 입증하기 위해, 유의미한 수의 건강한 및 이환 환자로부터 세포는 본 발명으로 분석되었다. 특히적으로, 본 실시예는 본 발명이 암 세포가 HER2 수용체의 비-과발현 또는 비-증폭된 수준을 갖고 또한 현행 IHC 또는 FISH 진단에 기반된 HER2-표적된 요법을 정성화하는 환자의 경로 활성만큼 적어도 기능이상인 기능이상 HER2-관련 경로 활성을 갖는 환자의 하위-그룹을 확인하는 방법을 입증한다. 이는 예기치 못한 및 임상적으로 중요한 결과이다.

[0706] HER2-유도된 암: HER2 유도된 유방암은 그의 유방 상피 세포상에서 (IHC 또는 FISH에 의해) 과발현된 또는 증폭된 HER2 수용체를 갖는 환자에서 단지 발생하는 것으로서 현재 진단된다.

[0707] 암 세포가 비-과발현된 또는 비-증폭된 HER2 수용체 수준을 갖고 또한 HER2-유도된 암을 갖는 환자를 확인할 수 있는 공지된 현행 방법은 없다. 본 발명의 본 실시예는 본원에서 기재된 방법이 HER2 수용체 수준이 비-과발현된 또는 비-증폭되고 또한 HER2-유도된 암을 갖는 환자를 확인하기 위해 유효한 시험을 제공한다는 것을 입증한다.

[0708] HER2 수용체는 계열의 임의의 다른 구성원과 짝짓기를 할 수 있다는 점에서 ErbB 수용체 계열 (HER1, HER2, HER3, 및 -HER4)의 도처에 존재하는 구성원이다. ErbB 수용체 계열의 구성원은 그의 세포 신호전달 기능을 실시하기 위해 짝짓기 또는 이량체화한다. ErbB 수용체 계열의 구성원은, 혼합된 계열 구성원 짝짓기 (Ex. HER1-HER2 또는 HER2-HER3)와 함께하는, 동형이량체 (Ex. HER2-HER2) 또는 이종이량체로서 자체로 짝짓기할 수 있다. HER2는 수용체의 상기 계열과 짝짓기를 통해 상기 경로에서 신호전달 개시에서 임계적 성분인, 수용체 티로신 키나제 효소 활성을 강력하게 공급할 수 있다. HER2 수용체의 도처에 존재하는 성질은 세포 집단 내에서 그의 작용성 활성의 정량화를 어렵게 할 수 있다. HER2가 ErbB 계열의 상이한 구성원과 짝짓기하는 경우, 상이한 경로 신호는 생성될 수 있다. HER2-유도된 암은 HER1 수용체와 HER2 수용체 짝짓기를 통해 및 HER3 수용체와 HER2 짝짓기를 통해 주로 발생한다고 생각된다. HER2 수용체는 공지된 직접적으로 교란 리간드를 갖지 않고 따라서 HER2-HER2 짝짓기 교란은 발생한다고 공지되지 않는다. HER1-HER2 수용체 짝짓기는 상피 성장 인자 (EGF)의 부가에 의해 생존 세포상에서 교란될 수 있다. HER2-HER3 수용체 짝짓기는 뉴레굴린 1 (NRG1)의 부가에 의해 생존 세포상에서 교란될 수 있다. 본 발명의 한 구현예는, 본 실시예에서 입증된 바와 같이, HER2 수용체가 짝짓기되는 ErbB 계열 구성원과 무관하게 경로 신호전달 활성에 HER2 수용체의 특이적 기여를 계측하기 위해 2 교란제를 사용한다. 교란제는 ErbB 경로 수용체에 특이적인 것이고 확인제는 교란제 기능에서 HER2 수용체의 역할 방해에 특이적인 것이다.

[0709] 분석물 및 측정량: 본원에서 사용된 진단 시험의 분석물은, 단독 또는 특이적 세포 신호전달 경로 교란제의 존재하에, 임피던스 바이오센서 마이크로플레이트의 웰에 배치되고 전기적 임피던스로 연속적으로 측정된 경우, 생존 환자 세포가 생성하는 세포 부착 신호 (CAS)이다. 전체 시험에 대하여, CAS는 동일한 환자로부터 환자 세포 샘플의 최대 4 부분에 대하여 측정량 알고리즘에서 연속적으로 측정되고 사용된다.

[0710] 1. 환자 세포 단독 (C)

[0711] 2. 환자 세포 + 교란 경로 인자 1 (CF1)

[0712] 3. 환자 세포 + 교란 경로 인자 2 (CF2) (필요하면)

[0713] 4. 환자 세포 + 교란 경로 인자(들) + 확인제 (CCF)

[0714] CAS는 시험된 환자 샘플의 최대 4 부분 (C, CF1, CF2, CCF)의 각각에 대하여 정량화된다. 환자의 이환 세포의 신호전달 경로 활성을 정량화하기 위해, CF1 및/또는 CF2 부분에서 측정된 CAS는 C 부분에서 측정된 CAS에 비교된다. 이는 CF와 C 사이 얼마나 많은 변화가 당해 신호전달 경로에 관련되는지를 확인하기 위해 CCF와 CF 샘플 부분 사이 CAS에서의 변화에 비하여 CF와 C 샘플 부분 사이 CAS에서의 변화를 계측할 수 있다.

[0715] 본 실시예에서 사용된 확인제, 항체 약물은 작용 기전을 갖고 이로써 HER2 수용체의 이량체화 아암은 다른 HER2 수용체, HER1 수용체, HER3 수용체, 또는 HER4 수용체와 짝짓기로부터 입체적으로 차단된다. 상기 확인제의 사용에서, CF1 및/또는 CF2와 C의 CAS 사이 차이는 HER2 참여에 정확하게 배분될 수 있다. 상기 확인제가 교란제 전에 세포 샘플에 적용되는 경우, 교란제는 HER2-수용체-관련 활성으로부터 차단되고 그렇게 함으로써 C에 비하

여 CF1 및/또는 CF2 변화에서 HER2 수용체의 참여에 비례하는 양에 의해 CF1 및/CF2 CAS 값 미만인 CCF에 대한 CAS 값을 생성한다.

[0716] 상이한 확인제, 예컨대 소분자가 사용될 수 있다. 이들은 작용 기전을 갖고 이로서 이들은 ErbB 계열에서 수용체 티로신 키나제의 ATP 결합 부위에 결합한다. 이들 확인제는 HER2 수용체, HER1 수용체, HER3 수용체, 또는 HER4 수용체의 신호전달 효소 기능의 개시를 입체적으로 차단한다. 이들 소분자 확인제는 교란제의 부가시 그 CAS 신호 변화에서 수용체 티로신 키나제 효소 참여에 교란제 신호를 정확하게 분배되게 할 수 있다. 이들 확인제가 교란제 전에 세포 샘플에 개별적으로 적용된 경우, 교란제는 수용체-관련 효소 활성화로부터 차단되고 그렇게 함으로써 수용체 효소 기능의 참여에 비례하는 양에 의해 CF1 및/또는 CF2 CAS 값 미만인 CCF CAS 값을 생성한다.

[0717] 시간으로부터 유도된 비-선형 유클리드 시점 벡터로부터 측정량 대 CAS 시험 데이터를 계산하기 위해 사용된 방정식:

$$\begin{aligned} \text{측정량} = & \left[ \left( \sum_{i=0}^{240} CF1_i - C_i \right) - \left( \sum_{i=0}^{240} CCF1_i - C_i \right) \right] + \left[ \left( \sum_{i=0}^{240} CF2_i - C_i \right) \right. \\ & \left. - \left( \sum_{i=0}^{240} CCF2_i - C_i \right) \right] \end{aligned}$$

[0718]

[0719] 여기서 변수는 아래와 같이 정의된다:

[0720]  $i$  = CAS가 시험 동안 기록된 각 분용 단계

[0721] F1 = NRG1 교란 인자

[0722] F2 = EGF 교란 인자

[0723]  $C_i$  = 대조군, 시험 세포에 부가된 교란 인자 없음

[0724]  $CF1_i$  = 교란 인자 (F1)를 가진 세포

[0725]  $CF2_i$  = 교란 인자 (F2)를 가진 세포

[0726]  $CCF1_i$  = F1 및 HER2 경로 확인 (C) 체제를 가진 세포

[0727]  $CCF2_i$  = F2 및 HER2 경로 확인 (C) 체제를 가진 세포

[0728] 개별 교란 인자 기여에 대하여 측정량 계산용 알고리즘이 상기 보여진 완벽한 알고리즘에서 부가 오퍼레이터 (+)의 한쪽에서 발견되는 것을 주목.

[0729] 시약 및 버퍼: 혈청 없이, 항생제 (예를 들면 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신), 및 HEPES 버퍼를 가진 DMEM/F12에 기반된 표준 배지는 VWR (Radnor, PA) 또는 Life Technologies (Grand Island, NY)로부터 전달된 바와 같이 사용되었고 구매되었다. 추가의 성장 인자/교란제 (인간 EGF ca6kDa, NRG1 ca8kDa)는 R&D Systems (Minneapolis, MN)로부터 구매되었고 성장 인자 또는 혈청 없이 버퍼링된 세포 배지에서 제조되었다. 사용된 소분자 확인제는 (라파티닙, 아파티닙, 네라티닙)이었고 성장 인자 또는 혈청 없이 버퍼링된 세포 배지에서 제조되었고 Selleck Chemicals (TX, USA)로부터 구매되었고; 사용된 항체 확인제는 페르투주맙, 인간화된 단클론성 항체이었고 임상 조제실로부터 획득되었다.

[0730] 세포 샘플: 상업적 공급원 (Ex. DSMZ, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, GERMANY)으로부터 표준 장수하는 유방암 상피 세포주, 산부인과 수술을 경험한 건강한 여성으로부터 유방 상피 세포, 및 환자로부터 유방암 세포가 이용되었다.

[0731] 세포 샘플 목록

[0732] · 서른다섯 (35) HER2 음성 환자

[0733] · 여섯 (6) 무병 건강한 환자

[0734] · 열 (10) 과발현된 HER2 양성 세포주

[0735] · 아홉 (9) 비-과발현된 HER2 음성 세포주

[0736] 상업적-공급원 세포주는 드라이아이스상에서 수령되었고 상업적 제공자의 권고에 따라 배양되었다. 생존 원발 환자 물질은, 전형적으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 85% 습도에서 혈청 없이, 항생제와 함께 버퍼링된 유선 상피 성장 배지를 함유한 플라스틱 세포 배양-준비 플라스크에서 표준 인간 상피 세포 취급 절차에 따라 이들이 배양된 병원으로부터 직접적으로 받았다. 임피던스 마이크로플레이트의 부가에 앞서, 세포는 트립신/EDTA 용액으로 그의 성장 용기로부터 제거되었고, 카운트되었고, 혈청, 또는 다른 성장 인자 없이 항생제를 가진 배지에서 재현탁되었다.

[0737] 절차: 사용된 시험 절차 (이하에서 CELx로 칭함)는, 모두 5%CO<sub>2</sub>, 85% 습도, 37°C에서 수행된, 하기 단계를 포함하였다:

[0738] 1. 세포 씨딩: 혈청, 또는 다른 성장 인자 없이 항생제를 가진 유선 상피 성장 배지에서 각 환자로부터 15,000 생존 상피 세포 또는 세포주를 함유한 180 uL 분취액은 임피던스 마이크로플레이트의 각 지정된 웰 (C, CCF, CF1, CF2)에 분포되었다. 임피던스는 아래 기재된 단계 2-4 전반에 걸쳐 연속적으로 측정되었다.

[0739] 2. 확인제 (20 uL)는 각 세포 샘플에 대하여 사전-지정된 CCF 웰들에 씨딩 이후 6 시간 부가되었다. 확인제를 받지 않은 웰들은 대조군으로서 배지를 수령했다.

[0740] 3. 교란 인자는 각 샘플에 대하여 사전-지정된 CF 웰들에 씨딩 이후 18 시간 부가되었다 (20uL). 교란 인자를 받지 않은 웰들은 대조군으로서 배지를 수령했다.

[0741] 4. 연속적 임피던스 기록은 교란제가 부가된 이후 적어도 15 시간 동안 전형적으로 각 환자에 대하여 각 시험 웰에 대하여 작성되었다.

[0742] 결과 및 도 설명:

[0743] 임피던스 CReMS에 의해 수집된 데이터는 X-축에서 분으로 및 Y-축에서 세포 지수로 경시적으로 각 도에서 표시된다. 세포 지수는 시험 동안 부가된 상이한 제제에 대해 시험 동안 상이한 세포의 생리적 변화를 표시한다.

[0744] 형광성 활성화된 세포 분류 (FACS)는 본 실시예에 사용된 상이한 환자 세포의 수용체 수준을 측정하기 위해 사용되었다. 환자 생존 세포는 HER2 수용체의 세포의 부분에 결합하기 위해 관련된 형광성 항체로 태그되었다. 도 12는 본 실시예에서 시험된 상이한 환자 물질에 대하여 HER2 수용체 수준용 FACS 데이터를 보여준다. 상기 FACS 데이터는 본 실시예에 대하여 시험된 세포의 상이한 클래스가 HER2 수용체의 상이한 수준을 갖는다는 것을 확인한다. 데이터는 비-발현된 HER2 암 환자가 건강한 환자와 유사한 HER2 수용체 단백질 수준 및 비-발현된 HER2 세포주를 가졌고 이들이 과발현 HER2 세포주의 수용체 수준의 훨씬 아래인 것을 나타낸다.

[0745] 도 13은 생존 세포 대 덜 생존 (시험불가능한 세포)에 대한 세포 부착 CAS를 보여준다. 본 발명은 실시간으로 연속적으로 단지 생존 세포를 시험하기 위해 의도된다. 각 시험은 단지 생존 세포가 시험되는 것을 보장한다.

[0746] 도 14는 1명의 암 환자 (R112)에 대하여 CELx 시험 동안 수집된 데이터를 나타낸다. EGF 및 NRG 교란 인자를 이용한 암 환자 R112 예 시간 경과 (X-축) 대 임피던스 (Y-축)가 보여진다. 각 교란 인자 부가는 또한 HER2 참여 확인 인자 부가와 함께 도에서 보여진다.

[0747] C에 대하여 환자 R112, NRG에 대하여 CF, EGF에 대하여 CF, 및 각 교란 인자에 대하여 CCF용 계산된 측정량 값의 표는 아래에서 발견될 수 있다: 표 16 아래.

[0748] 표 16

수용체 쌍 (환자 R112)	교란 리간드	CAS (C, CF, CCF)	총 리간드 신호 (CF-C)	측정량 (HER2 신호)	% HER2 참여
HER1-HER2	EGF	42, 440, 337	398	103	25
HER3-HER2	NRG	42, 553, 91	511	462	90

[0749] [0750] 주석: C = 배지 단독 부가 대조군 샘플, CF = 교란 인자 단독 부가 샘플, CCF = 확인 인자 + 교란 인자 부가 샘플. (CF-C)는 교란제가 개시한 신호의 총량이다. 리간드 측정량은 ~ (CF-C) - (CCF-C)이다. % HER2 참여는 ((CF-C)-(CCF-C))/(CF-C)\*100에 의해 계산된다. 여기서 CF 및 CCF에 대한 값은 상기 제공된 비-선형 벡터 알고리즘의 합산에 의해 계산된다.

[0751] 이들 결과는 확인 인자 부가 없이 수용체 리간드를 가진 전체 경로의 교란이 상기 비-과발현 HER2 환자 (CF-C)에 대하여 최고 세포 지수를 생성하였음을 나타낸다. 2개의 상이한 수용체 교란제 샘플에 확인 인자의 부가는 HER2-HER3 수용체 연결된 경로 신호전달 또는 HER2-HER4 수용체 연결된 경로 신호전달의 NRG1 교란이 90%이었고 반면에 HER1-HER2 수용체 연결된 경로 신호전달 교란이 상기 환자에 대하여 유의미하게 더 낮은 HER2 수용체 참여를 가졌음을 입증한다. 각 환자는 각각의 2개 작은 변화에서 HER2 참여의 상이한 수준을 갖고, 추가로 각 환자에서 HER2-유도된 경로 신호전달의 모든 측면의 개별화된 시험의 중요성을 입증한다.

[0752] 도 15a-d는 하나의 과발현된 HER2 세포주 (SKBr3; 도 15a), HER2-유도된 질환 (R39; 도 15b)을 가진 하나의 비-과발현된 HER2 환자, HER2-유도된 질환 (R49; 도 15c)이 없는 하나의 비-과발현된 HER2 환자, 및 하나의 건강한 환자 (R62; 도 15d)의 NRG1 교란 데이터 비교에 대한 막대 그래프 측정량을 나타낸다. 과발현된 HER2 세포주 (도 15a, SKBR3) 및 비-과발현된 HER2 환자 샘플 (도 15b, R39)은 비교할만한 NRG1 유도된 활성을 보여준다. HER2 이량체 차단제 (페르투주맵) 확인제 저해 결과는 측정된 PI3K 활성의 벌크가 이들 환자에 대하여 HER2 수용체를 포함하는 것을 확인한다. 페르투주맵 저해의 양이 비-과발현된 HER2 환자 샘플 (R39)보다 더 크다는 것을 주목한다. HER2-유도된 질환이 없는 비-과발현된 HER2 암 환자 샘플에 대한 경로 신호전달 활성의 NRG1 교란 (도 15c, R49)은 본 실시예에서 시험된 비-과발현된 HER2 환자 샘플의 80%를 대표하고 대표적인 건강한 환자 샘플 (도 15d, R62)에 비교할만하다. 모든 중앙 (도 15d; R49) 및 건강한 (도 15d, R62) 샘플에 대하여 측정된 NRG1 활성의 수준이 좌측에서 SKBR3 및 R39 샘플에 대하여 측정된 활성의 25% 미만임을 주목한다.

[0753] 연구는 비-과발현된 HER2 암 환자가 CELx 시험을 이용한 건강한 비-이환 환자로부터 통계적으로 불가분인 귀무 가설을 시험하기 위해 수행되었다. 도 16은 본 실시예에서 시험된 상이한 환자 집단의 사분위를 한정하는 위스커-박스 플롯을 나타낸다. CELx 시험은 HER2/HER3 수용체상에서 경로 신호전달 반응의 NRG1 교란을 측정한다. 세포주 및 원발 샘플 결과는 일치한다. 데이터는 비정상 HER2 경로가 비-과발현 HER2 환자에서 존재하였음을 보여준다. 과발현 HER2 세포주 및 비-과발현 HER2 환자의 최상부 20번째 백분위에서 HER2 경로 신호전달 활성의 NRG1 교란은 더 낮은 CAS를 갖는 건강한 집단으로부터 고유하다.

[0754] 비-과발현된 HER2 암 환자의 대략 20%는 과발현 HER2 환자의 최상부 50번째 백분위 (점선 초과)와 일치된 HER2 경로 신호전달 활성의 NRG1 교란을 갖는다. 이들 결과는 귀무 가설이 건강한 및 비-과발현된 HER2 집단 사이에서 차이로 거부되고 과발현된 HER2 그룹 활성과 비-과발현된 HER2 그룹 신호전달 경로 활성 사이에서 중첩을 확인하는 것을 보여준다.

[0755] 도 17은 HER2/HER1 수용체 이량체에 의해 CELx EGF 교란된 경로 신호전달 활성용 데이터를 나타낸다. HER2/HER1 이 HER2-유도된 질환에 참여한다고 공지되기 때문에 제공된다. 데이터는 EGF 교란된 경로 신호전달 활성이 과발현된 HER2 및 비-과발현된 HER2 샘플에서 유사하다는 것을 보여준다. 데이터는 NRG1 교란된 경로 신호전달 활성에서 발견된 바와 같이 최상부 사분위 비-과발현된 HER2 및 과발현된 HER2 샘플의 CELx EGF 교란된 경로 신호전달 활성에서 유사한 상승을 보여준다. 데이터는 또한 비-과발현된 HER2 CELx EGF 교란된 경로 신호전달 활성이 건강한 집단에 비교된 경우 상승되는 것을 보여준다.

[0756] 아래 표 17은 HER2-유도된 질환을 가진 비-과발현 HER2 암 환자에 대하여 대표적인 NRG1 확인제 데이터를 나타내고, 반면에 확인제는 CELx 시험에 따라 HER2-유도된 질환을 갖도록 계측된 5명 환자에 대하여 치료적 약물이다.

[0757] 표 17

환자 #	라파티닙	네라티닙	아파티닙	퍼투주맵
R39	65%	107%	90%	75%
R20	72%	104%	91%	76%
R160	76%	118%	97%	95%
R82	68%	105%	92%	81%
R71	68%	100%	ND	68%

[0758] \*NRG1 신호의 감쇠%

[0760] 표 17에서 데이터는 HER2 경로 신호전달 치료적 억제제 반응을 보여준다. 각 억제제는 각 환자에 대하여 약물 반응을 입증하기 위해 임상적으로 관련된 단일 농도에서 사용되었다. 공유 수용체 티로신 키나제 억제제 약물 (RTKi) 네라티닙 및 아파티닙은 이들 환자에 대하여 NRG1 및 EGF 유도된 활성 (단지 NRG1 데이터 보여짐)의 최

고 백분율 감쇠를 생산하였다. 비-공유 RTKi, 라파티닙, 및 단클론성 항체 (페르투주맵)은 경로 신호전달의 그러나 공유 RTKi 미만의 유의미한 감쇠를 생산하였다. 예상외로, HER2 약물은 과발현 HER2 세포주보다 비-과발현 HER2 환자에서 HER2-유도된 경로 신호전달 활성의 더 높은 백분율을 억제시킨다.

[0761] 실시예 7에 대한 결과의 논의

[0762] 본 실시예에 기재된 결과는 본 발명의 주요 측면 및 본원에서 기재된 방법을 입증하고 예기치 못한 결과를 제공한다. 비-과발현된 HER2 암 세포 샘플은 건강한 유방 세포에서 발견된 것만큼 낮은 HER2 수용체 수준을 갖는 것으로 그리고 유의미하게 과발현된 HER2 암 환자의 HER2 수용체 수준보다 더 낮은 것으로 확인되었다. 따라서, 비-과발현된 HER2 암 세포에서 측정된 경로 신호전달 활성은 대상체의 이들 그룹 사이의 HER2 수용체 수준에서 차이에 기인될 수 없다. 본 실시예는 또한 방법이 특이적 HER2/HER3 및 HER2/HER1 경로 활성을 단리 및 정량화할 수 있다는 것을 확인하였다. 추가로, 실시예는 비정상 HER2 신호전달 활성이 비-과발현 HER2 암 환자에 존재하고 비-과발현 HER2 암 환자의 하위-그룹 (15%)이 과발현된 HER2 암 환자에 유사한 HER2 경로 신호전달 활성을 갖는다는 가설을 확인하였다. 이 예기치 못한 결과는 이들 방법의 가치를 입증한다. 또 다른 예기치 못한 결과는 과발현된 HER2 암 환자보다 비-과발현된 HER2 암 환자에서 HER2 신호전달 경로 활성의 더 높은 백분율을 억제시키기 위한 HER2 표적된 약물의 능력이었다. 집합적으로, 본 실시예에 기재된 결과는 방법이 활성 HER2-신호전달 네트워크를 갖는 비-과발현된 HER2 환자를 확인, 진단 및 치료할 수 있다는 것을 확인한다. 전체 비-과발현된 HER2 유방암 환자의 대략 15%가 미진단된 및 미치료된 HER2-유도된 유방암을 갖는다는 것을 실시예가 시사하기 때문에 이는 유의미한 결과이다. 본 발명은 상기 환자 집단의 확인을 허용하고 이로써 이들은 ErbB 신호전달 경로를 표적하는 치료제를 이용한 치료에 선택될 수 있다.

[0763] **실시예 8**

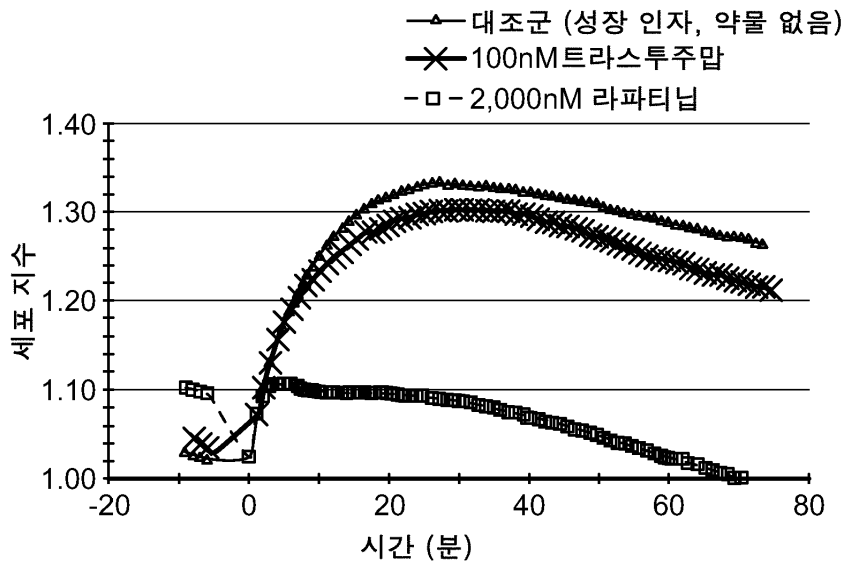
[0764] 신호전달 경로 활성의 측정에 관한 신선한 기본 배지의 효과

[0765] 많은 세포 선별 검정은 세포가 이들이 시험되는 단시간 동안 및 그 이전에 배치되는 간소화된 배지-버퍼를 처방한다. 생존 원발 환자 세포를 이용한 본 발명은 생존 원발 세포 샘플을 유지하기 위해 사용된 기본 배지로 수행되어 이로써 세포 집단은 생존하고 연속적 측정의 완벽한 시험 시간 동안 세포 사이클의 상이한 시기를 나타내는 세포의 정상 분포 및 개별 세포 유형의 그의 이종성을 보유한다. 기본 배지는 당해 신호전달 경로를 교란시킨다고 공지된 시약을 함유하지 않는다. 방법의 추가 측면은 교란제 또는 확인제와 접촉 개시의 72 시간 이내에 신선한 기본 배지로 기본 배지의 대체를 포함한다.

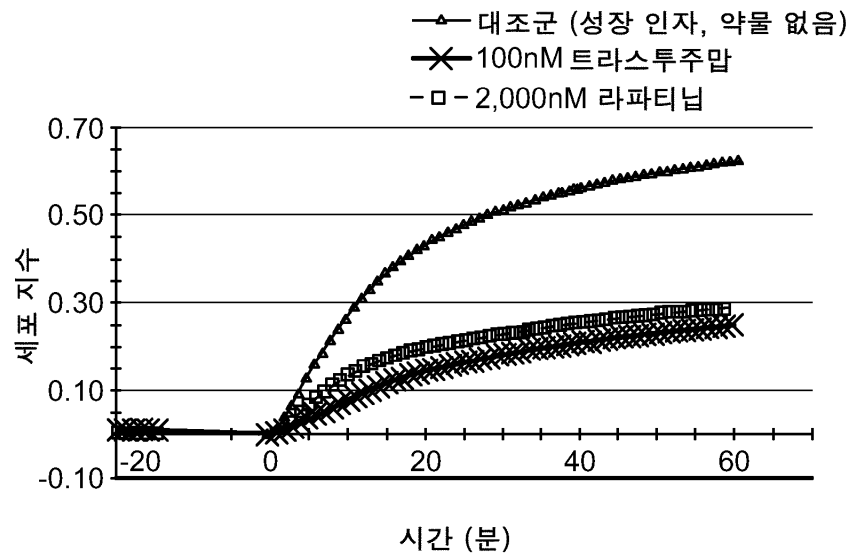
[0766] 도 18은 세포 샘플의 MAPK 신호전달 경로 활성에 관해 비-신선한 기본 배지 이용의 효과를 입증하는 데이터를 나타낸다. 세포 샘플 C54가 비-신선한 기본 배지에서 교란에 앞서 배양된 이후 EGF로 교란된 경우, CAS는 C54가 EGF로 교란되지 않은 경우 미만이다. 사실상, 신호전달 경로 활성은 측정되지 않는다. 이는 세포 샘플 C54가 EGF와 접촉에 앞서 신선한 기본 배지에서 배양된 경우 측정된 CAS에 유의미한 대조이다. 신선한 기본 배지 예에서, 측정된 CAS는 C54 샘플에서 유의미한 MAPK 신호전달 경로 활성이 있음을 시사한다. 데이터는 세포 샘플이 교란제 또는 확인제와 접촉되기 전에 신선한 기본 배지에서 세포 배양의 중요성을 강조한다.

도면

도면1a



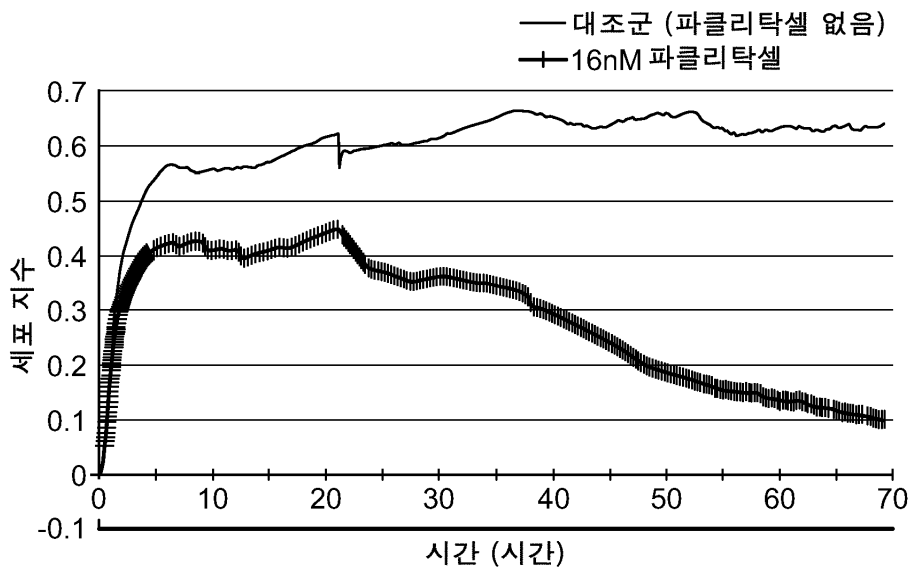
도면1b



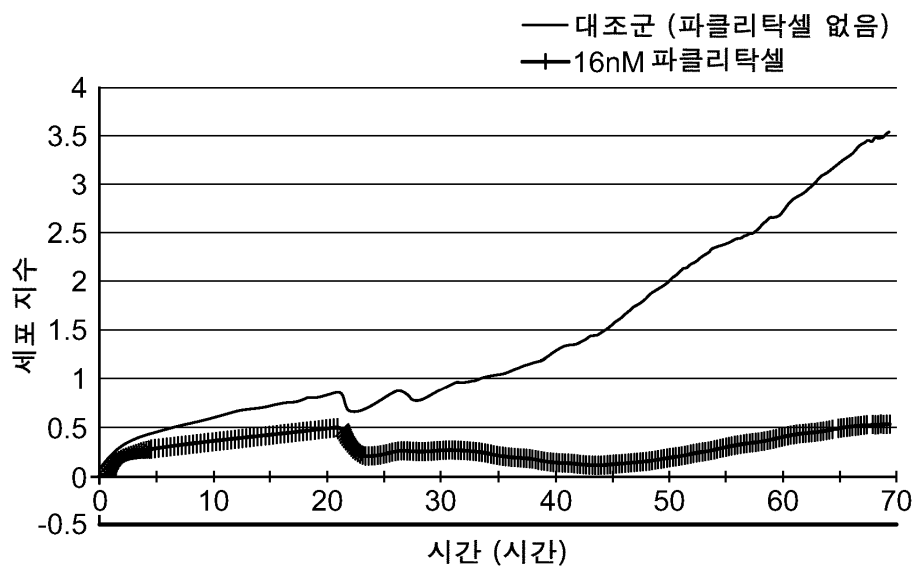
도면1c

참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	1	1
반응	3	0	3
합계	3	1	4

도면2a



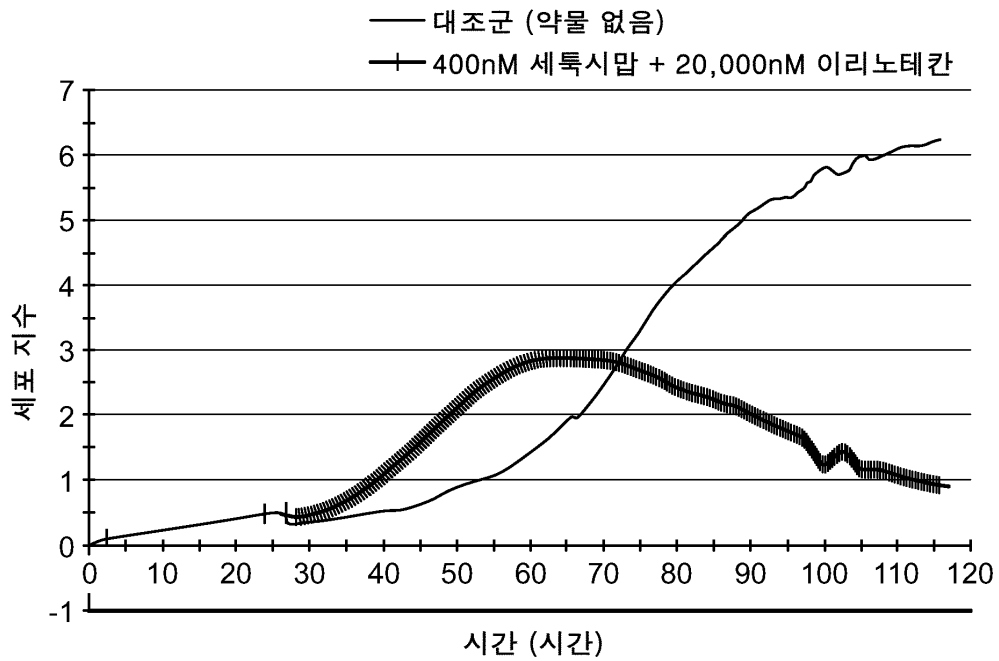
도면2b



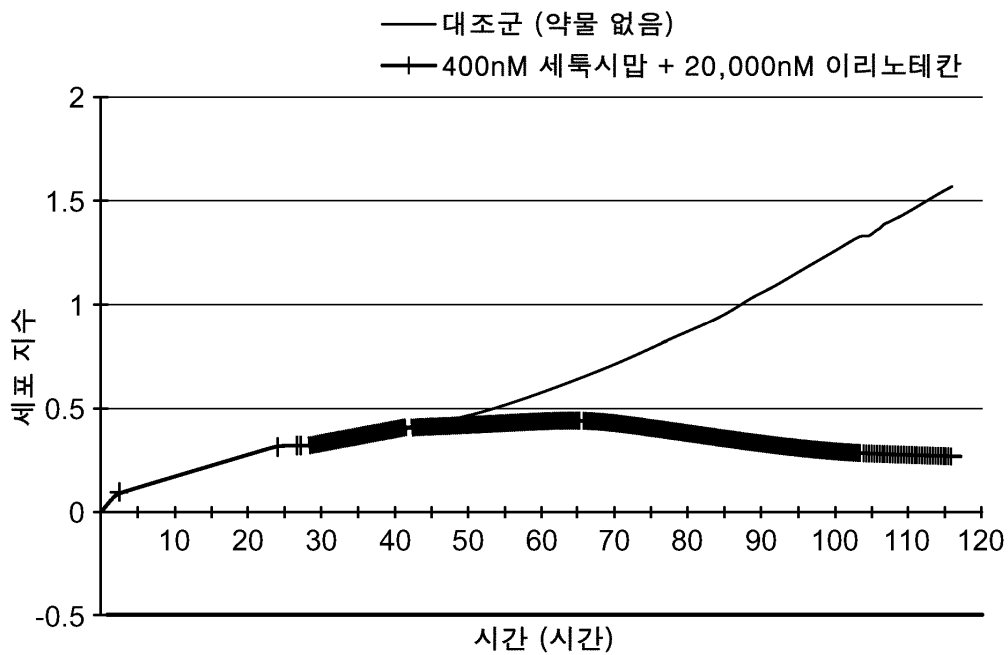
도면2c

참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	0	0
반응	2	0	2
합계	2	0	2

도면3a



도면3b



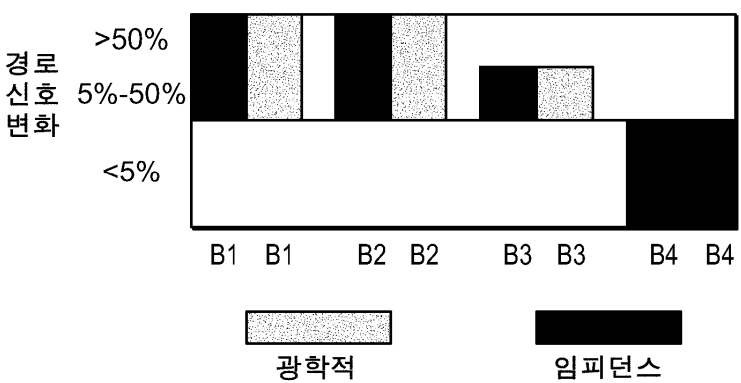
도면3c

참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	0	0
반응	2	0	2
합계	2	0	2

도면4

약물 (시험 유형)	세포												표적	경로
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	C1	C2	L1	L2		
카페시타빈 (AP)	■	■											티미딜레이트 합성효소	세포사멸 경로, 세포 접착
세특시암 (PS)									▨	▨	▨	▨	EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착
시스플라틴 (AP)													DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
도세탁셀 (AP)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
에블러티닙 (PS)													EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착
플루오우로우라실 (AP)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	티미딜레이트 합성효소	세포사멸 경로, 세포 접착
게피티닙 (PS)													EGFR-TK	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착
GSK1059615 (PS)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	PI3K	PI3K/P1TEN
GSK1120212 (PS)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	MEK1 및 MEK2	MEK/MAK
이리노테칸 (AP)													토포이소머라제	세포사멸 경로, 세포 접착
라파티닙 (PS)													Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착
옥실리플라틴 (AP)													GG, AG, GNG	세포사멸 경로, 세포 접착
파클리탁셀 (AP)													TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
파조파닙 (PS)													VEGF 수용체	PI3K/P1TEN, RAS/RAF, MAK, MKK, 세포 접착
토포테칸 (AP)													토포이소머라제	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 (PS)													Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착
파클리탁셀 + 시스플라틴 (C)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	TUBB1, BCL2, DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 + 라파티닙 (C)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3/P1TEN, 세포 접착

도면5



도면6

약물 (시험 유형)	세포												표적	경로
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	C1	C2	L1	L2		
카페시타빈 (AP)													티미딜레이트 합성효소	세포사멸 경로, 세포 접착
세록시암 (PS)													EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착
시스플라틴 (AP)													DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
도세탁셀 (AP)													TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
에블로티닙 (PS)													EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착
플루오우로우라실 (AP)													티미딜레이트 합성효소	세포사멸 경로, 세포 접착
게피티닙 (PS)													EGFR-TK	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착
GSK1059615 (PS)													PI3K	PI3K/PTEN
GSK1120212 (PS)													MEK1 및 MEK2	MEK/MAK
이리노테칸 (AP)													토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포 접착
라파티닙 (PS)													Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착
옥실리플라틴 (AP)													GG, AG, GNG	세포사멸 경로, 세포 접착
파클리탁셀 (AP)													TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
파조파닙 (PS)													VEGF 수용체	PI3K/PTEN, RAS/RAF, MAK, MKK, 세포 접착
토포테칸 (AP)													토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 (PS)													Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착
세록시암 + 이리노테칸 (C)													EGFR, 토포이소머라제 I	PI3K/PTEN, 세포사멸 경로, 세포 접착
파클리탁셀 + 시스플라틴 (C)													TUBB1, BCL2, DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 + 라파티닙 (C)													Her2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PI3K/PTEN, 세포 접착

시험되지 않음  
 <5%  
 5%-50%  
 >50%

측정된 경로 신호 변화의 양  
 PS = 경로 폐쇄 시험  
 AP = 항-증식성 시험  
 C = 조합 시험

도면7

약물 (시험 유형)	세포												표적	경로	
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	C1	C2	L1	L2			
카펠시타빈 (AP)	■													티미롤레이트 항생효소	세포사멸 경로, 세포 접착
세특시암 (PS)														EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착
시스플라틴 (AP)														DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
도세탁셀 (AP)														TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
에플로티닙 (PS)														EGFR	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착
블루오우로우라실 (AP)														티미롤레이트 항생효소	세포사멸 경로, 세포 접착
게피티닙 (PS)														EGFR-TK	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착
GSK1059615 (PS)														PI3K	PI3K/PTEN
GSK1120212 (PS)														MEK1 및 MEK2	MEK/IMAPK
이리노테칸 (AP)														토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포 접착
라파티닙 (PS)														He2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착
우실러플라틴 (AP)														GG, AG, GNG	세포사멸 경로, 세포 접착
파클리탁셀 (AP)														TUBB1, BCL2	세포사멸 경로, 세포 접착
파조파닙 (PS)														VEGF 수용체	PI3K/PTEN, RAS/RAF, MAK, MKK, 세포 접착
토포테칸 (AP)														토포이소머라제 I	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 (PS)														He2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착
세특시암 + 이리노테칸 (C)														EGFR 토포이소머라제 I	PI3K/PTEN, 세포사멸 경로, 세포 접착
파클리탁셀 + 시스플라틴 (C)														TUBB1, BCL2, DNA	세포사멸 경로, 세포 접착
트라스투주맙 + 라파티닙 (C)														He2 수용체	MAPK, RHO, AKT, FAK1, RAS/RAF, PIK3PTEN, 세포 접착

시험되지 않음  
 0%  
 100%

셀류이티 시험 예측과 임상 참조 결과 사이의 상관관계

PS = 경과 폐쇄 시험  
 AP = 항-중식성 시험  
 C = 조합 시험

도면8a

참조 표준 (임상 반응)	셀류이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	4	4
반응	60	1	61
합계	60	5	65

도면8b

카페시타빈, 세특시맙, 시스플라틴, 도세탁셀, 플루오우로우라실, 게피티닙, GSK 1059615, GSK 1120212, 라파티닙, 파클리탁셀, 파조파닙, 트라스투주맙, 토포테칸, 및 트라스투주맙/라파티닙으로 시험된 유방암 세포			
참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	3	3
반응	47	1	48
합계	47	4	51

도면8c

세특시맙, 이리노테칸, 옥실리플라틴, 및 세특시맙/이리노테칸으로 시험된 결장암 세포			
참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	1	1
반응	7	0	7
합계	7	1	8

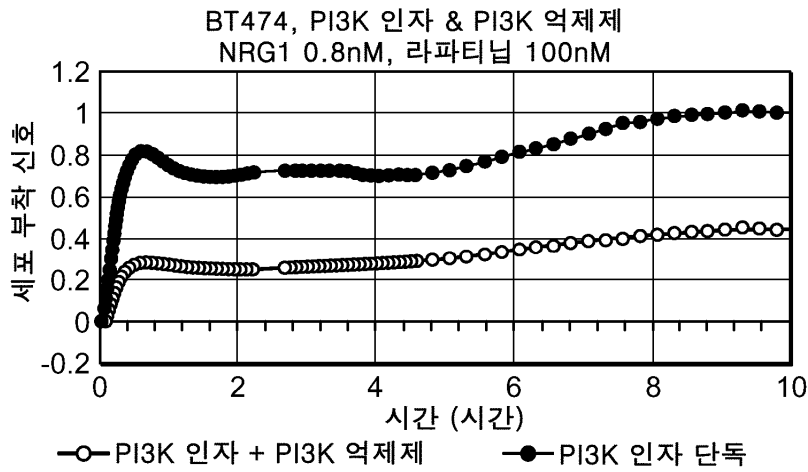
도면8d

시스플라틴, 에를로티닙, 파클리탁셀/시스플라틴으로 시험된 폐암 세포			
참조 표준 (임상 반응)	셀큐이티 시험		합계
	반응	비-반응	
비-반응	0	0	0
반응	6	0	6
합계	6	0	6

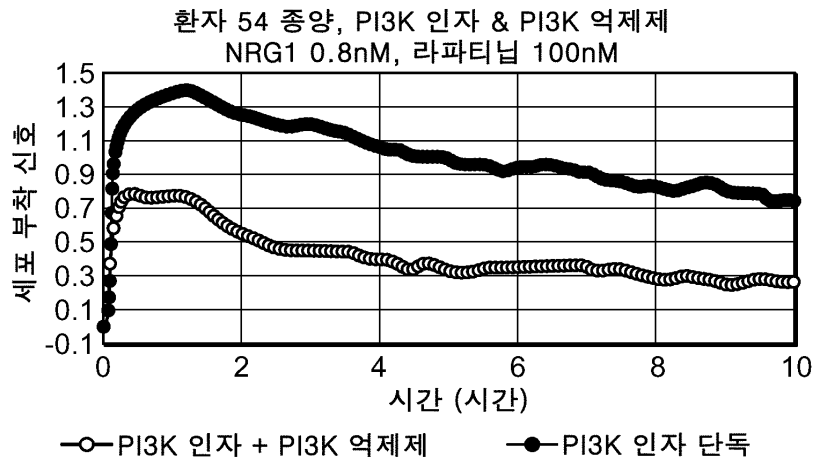
도면9

	감수성	특이성	번호
합계	98%	100%	65
질병			
유방	98%	100%	51
폐	100%	100%	6
결장	100%	100%	8
약물 유형			
경로	97%	100%	34
항-증식성	100%	100%	23
조합	100%	100%	8
약물			
카페시타빈	100%	100%	1
세톡시맙	100%	100%	2
시스플라틴	100%	100%	2
도세탁셀	100%	100%	6
에를로티닙	100%	100%	2
플루오우로우라실	100%	100%	5
게피티닙	50%	100%	3
GSK1059615	100%	100%	4
GSK1120212	100%	100%	6
이리노테칸	100%	100%	2
라파티닙	100%	100%	7
옥실리플라틴	100%	100%	2
파클리탁셀	100%	100%	4
파조파닙	100%	100%	6
토포테칸	100%	100%	1
트라스투주맙	100%	100%	4
세톡시맙/이리노테칸	100%	100%	2
파클리탁셀/시스플라틴	100%	100%	2
트라스투주맙/라파티닙	100%	100%	4
경로			
AKT	95%	100%	20
세포사멸 경로	100%	100%	23
세포 접착	97%	100%	65
FAK1	95%	100%	20
MAK	100%	100%	6
MAPK	95%	100%	20
MEK/MAPK	100%	100%	6
MKK	100%	100%	6
PI3K/PTEN	96%	100%	26
PAS/RAF	96%	100%	26
RHO	95%	100%	20

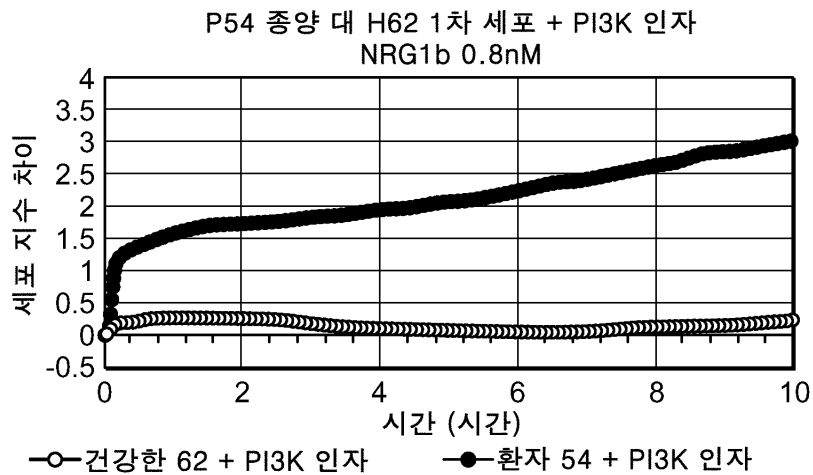
도면10a



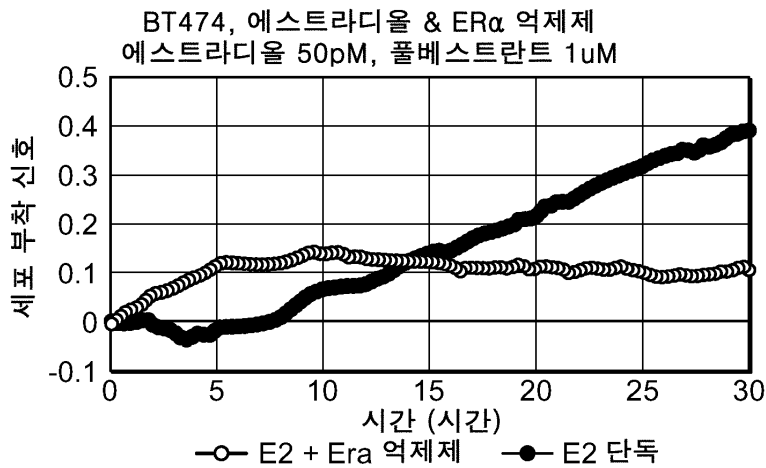
도면10b



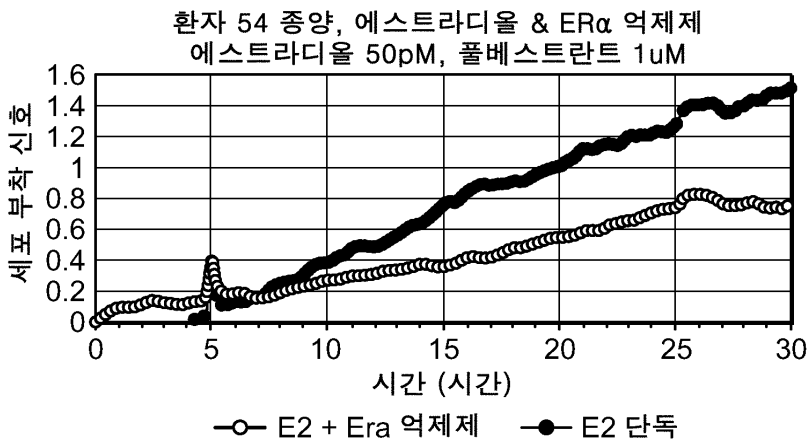
도면10c



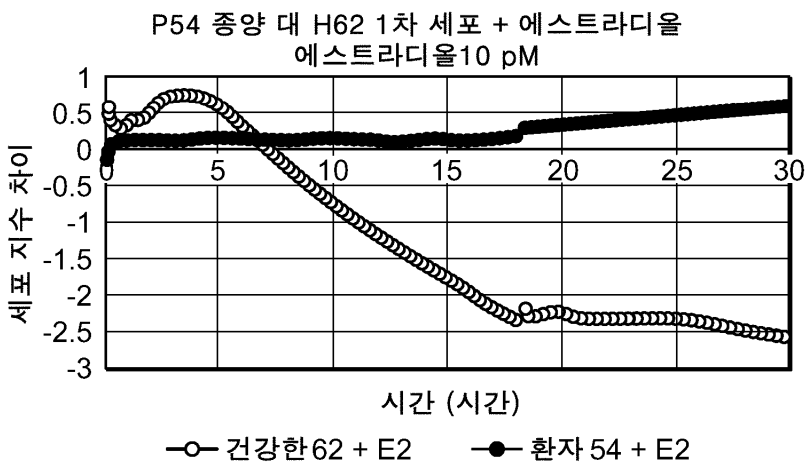
도면11a



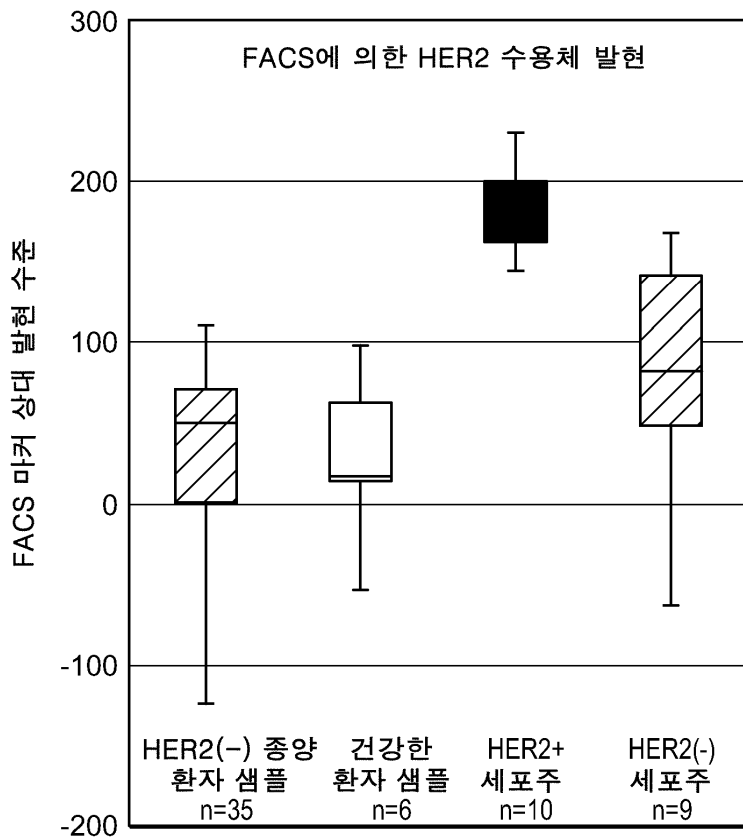
도면11b



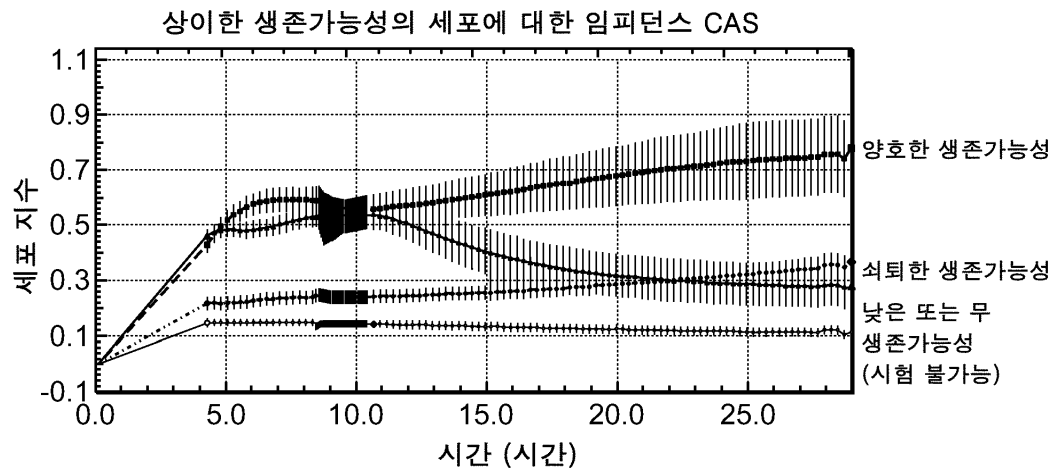
도면11c



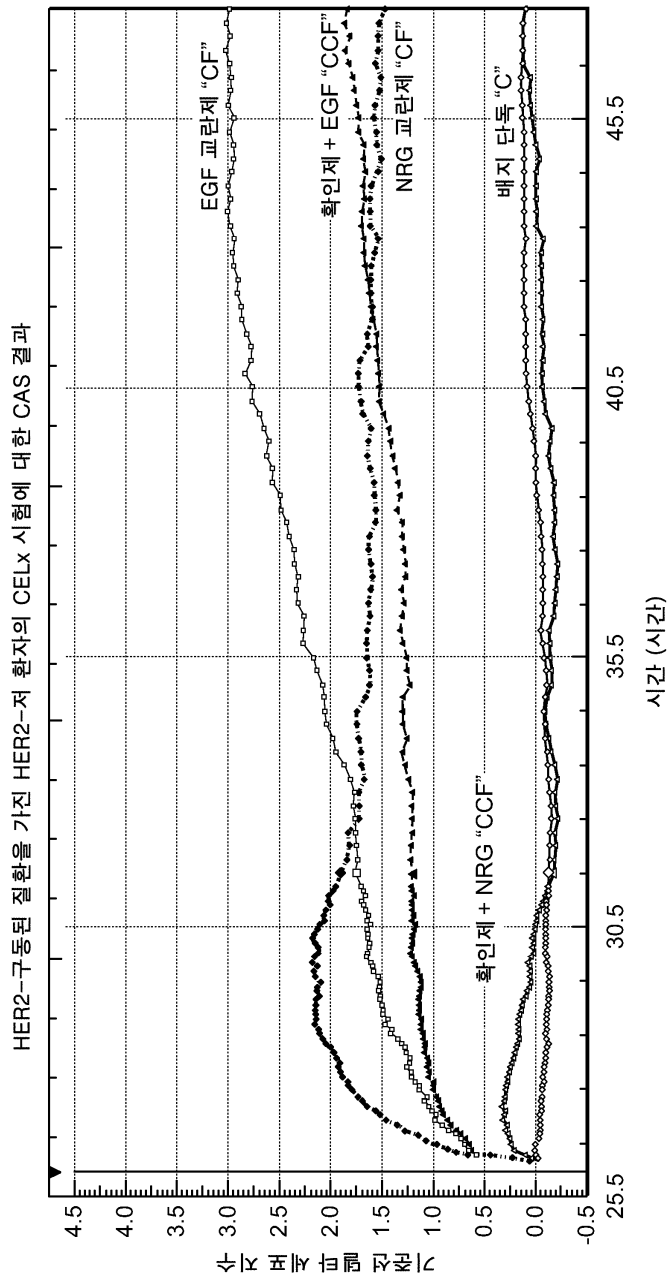
도면12



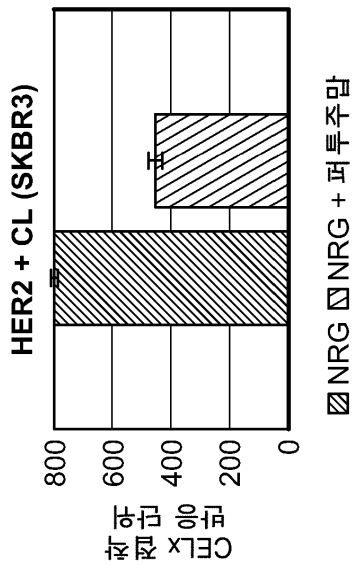
도면13



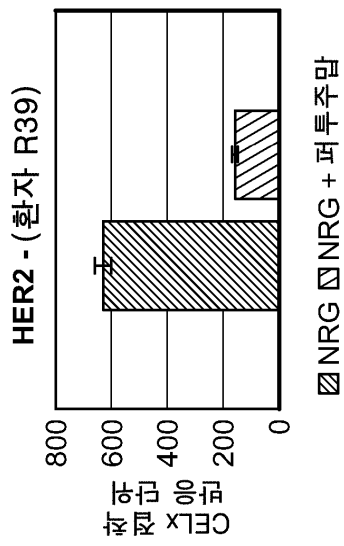
도면14



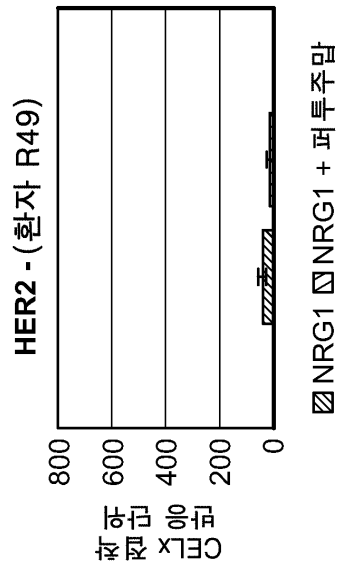
도면15a



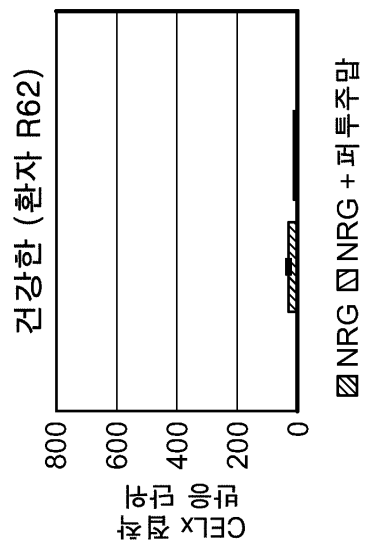
도면15b



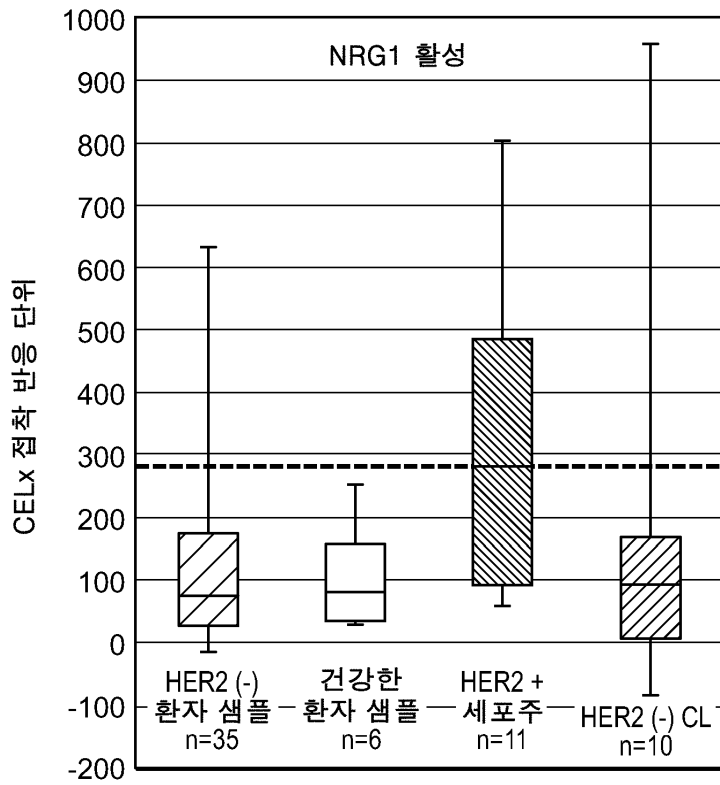
도면15c



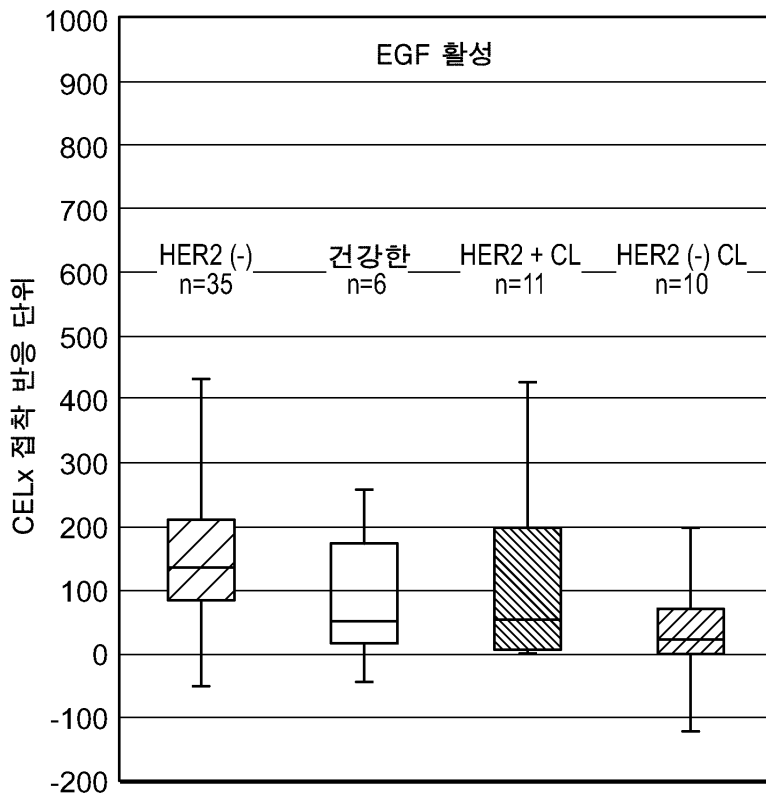
도면15d



도면16



도면17



도면18

