



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802618 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 25

- (21) 申请号 200880107655. 1
- (22) 申请日 2008. 07. 11
- (30) 优先权数据
60/949, 820 2007. 07. 13 US
- (85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 03. 15
- (86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/069764 2008. 07. 11
- (87) PCT国际申请的公布数据
W02009/012140 EN 2009. 01. 22
- (73) 专利权人 雀巢产品技术援助有限公司
地址 瑞士沃韦
- (72) 发明人 S·辛格 J·哈维
- (74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 胡晨曦 黄革生
- (51) Int. Cl.
G01N 33/574(2006. 01)
C12N 5/08(2006. 01)
C12Q 1/00(2006. 01)

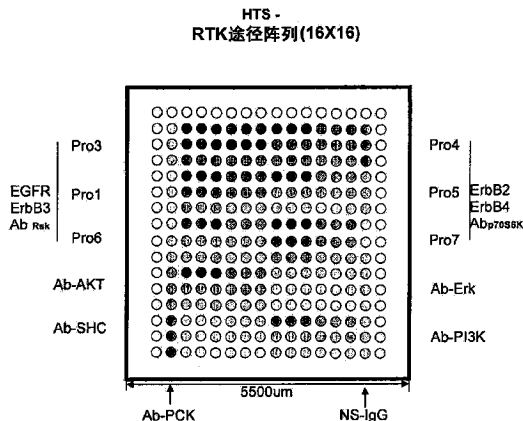
- (56) 对比文件
Merrimack Pharmaceuticals
等. Multiplexed sandwich assays in
microarray format. 《Journal of Immunological
Methods》. Elsevier B. V., 2004, 第 290 卷
107-120.
Ulrik B. Nielsen 等. Profiling receptor
tyrosine kinase activation by using Ab
microarrays. 《PNAS》. 2003, 第 100 卷 (第 16
期), 9330-9335.

审查员 朱晓乐

权利要求书3页 说明书60页 附图5页

(54) 发明名称
利用基于抗体的阵列选择肺癌治疗药物

(57) 摘要
本发明提供检测肿瘤细胞中信号转导途径诸组分的活化状态的组合物和方法。采用本发明获得的给予信号转导途径诸组分的活化状态的信息可用于癌症诊断、预后和设计癌症疗法。



1. 多种信号转导分子的特异性的捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体在制备用于选择治疗肺肿瘤的合适抗癌药物的阵列或试剂盒中的用途,其中各稀释系列中的捕捉抗体局限在固体支持物上,其中所述多种信号转导分子包括 Her3(ErbB3),并且所述的阵列或试剂盒用于以下方法:

(a) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物,所述细胞是在给予某抗癌药物后从肺肿瘤分离的或者在用该抗癌药物温育前从肺肿瘤分离的;

(b) 采用包括捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体的试验检测该细胞提取物中所述多种信号转导分子的活化状态,其中所述的试验包括:

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种稀释系列温育以形成多种被捕捉的信号转导分子;

(ii) 将所述多种被捕捉的信号转导分子与检测抗体温育以形成多种可检测的被捕捉的信号转导分子,所述检测抗体包含多种不依赖活化状态的抗体和多种相应信号转导分子的特异性活化状态依赖性抗体,

其中所述不依赖活化状态的抗体用辅助部分标记,所述活化状态依赖性抗体用信号放大配对的第一成员标记,所述辅助部分产生导向信号放大配对的第一成员并与之反应的氧化剂,

其中所述辅助部分是葡萄糖氧化酶,所述信号放大配对的第一成员是邻近葡萄糖氧化酶的过氧化物酶;

(iii) 将所述多种可检测的被捕捉的信号转导分子与信号放大配对的第二成员温育以产生放大的信号;和

(iv) 检测从所述信号放大配对的第一和第二成员产生的放大的信号;和

(c) 通过比较所述多种信号转导分子测得的活化状态与没有该抗癌药物存在下产生的参比活化概况来测定该抗癌药物是否适于治疗该肺肿瘤。

2. 多种信号转导分子的特异性的捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体在制备用于鉴定肺肿瘤对抗癌药物治疗的反应的阵列或试剂盒中的用途,其中各稀释系列中的捕捉抗体局限在固体支持物上,其中所述多种信号转导分子包括 Her3(ErbB3),并且所述的阵列或试剂盒用于以下方法:

(a) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物,所述细胞是在给予某抗癌药物后从肺肿瘤分离的或者在用该抗癌药物温育前从肺肿瘤分离的;

(b) 采用包含捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体的试验检测细胞提取物中所述多种信号转导分子的活化状态,其中所述的试验包括:

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种稀释系列温育以形成多种被捕捉的信号转导分子;

(ii) 将所述多种被捕捉的信号转导分子与检测抗体温育以形成多种可检测的被捕捉的信号转导分子,所述检测抗体包含多种不依赖活化状态的抗体和多种相应信号转导分子的特异性活化状态依赖性抗体,

其中所述不依赖活化状态的抗体用辅助部分标记,所述活化状态依赖性抗体用信号放大配对的第一成员标记,所述辅助部分产生导向信号放大配对的第一成员并与之反应的氧化剂,

其中所述辅助部分是葡萄糖氧化酶,所述信号放大配对的第一成员是邻近葡萄糖氧化酶的过氧化物酶;

(iii) 将所述多种可检测的被捕捉的信号转导分子与信号放大配对的第二成员温育以产生放大的信号;和

(iv) 检测从所述信号放大配对的第一和第二成员产生的放大的信号;和

(c) 通过比较所述多种信号转导分子测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化概况来鉴定该肺肿瘤是否对该抗癌症药物起反应。

3. 多种信号转导分子的特异性的捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体在制备用于预测具有肺肿瘤的对象对抗癌症药物治疗的反应的阵列或试剂盒中的用途,其中各稀释系列中的捕捉抗体局限在固体支持物上,其中所述多种信号转导分子包括 Her3 (ErbB3), 并且所述的阵列或试剂盒用于以下方法:

(a) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物,所述细胞是在给予某抗癌症药物后从肺肿瘤分离的或者在用该抗癌症药物温育前从肺肿瘤分离的;

(b) 采用包含捕捉抗体的多种稀释系列和检测抗体的试验检测细胞提取物中所述多种信号转导分子的活化状态,其中所述的试验包括:

(i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种稀释系列温育以形成多种被捕捉的信号转导分子;

(ii) 将所述多种被捕捉的信号转导分子与检测抗体温育以形成多种可检测的被捕捉的信号转导分子,所述检测抗体包含多种不依赖活化状态的抗体和多种相应信号转导分子的特异性活化状态依赖性抗体,

其中所述不依赖活化状态的抗体用辅助部分标记,所述活化状态依赖性抗体用信号放大配对的第一成员标记,所述辅助部分产生导向信号放大配对的第一成员并与之反应的氧化剂,

其中所述辅助部分是葡萄糖氧化酶,所述信号放大配对的第一成员是邻近葡萄糖氧化酶的过氧化物酶;

(iii) 将所述多种可检测的被捕捉的信号转导分子与信号放大配对的第二成员温育以产生放大的信号;和

(iv) 检测从所述信号放大配对的第一和第二成员产生的放大的信号;和

(c) 通过比较所述多种信号转导分子测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化概况来预测所述对象对该抗癌症药物治疗起反应的可能性。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述肺肿瘤获自具有非小细胞肺癌 (NSCLC) 的对象。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述细胞提取物包括该肺肿瘤的循环细胞的提取物。

6. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述细胞提取物包括从样品分离的细胞的提取物,所述样品选自:全血、血清、血浆、痰、支气管灌洗液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、唾液、细针抽吸物和它们的组合。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述细胞提取物包括从肿瘤组织分离的细胞的提取物。

8. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述抗癌症药物包括干扰癌细胞中活化的信号转导途径组分功能的药剂。

9. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述多种信号转导分子还包括:EGFR(ErbB1)、Her2(ErbB2)、Her4(ErbB4)、Raf、SRC、Mek、NFkB-IkB、mTor、PI3K、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、Eph-a、Eph-b、Eph-c、Eph-d、cMet、FGFR、PDGFR、cKit、Fit-3、Tie-1、Tie-2、Fit-3、cFMS、PDGFR、Ab1、FTL 3、RET、Kit、HGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、IGF-1R 或它们的组合。

10. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述信号转导分子参与细胞增殖或肿瘤血管生成。

11. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述捕捉抗体包括与 ErbB3 有反应活性的抗体,并且还包含与以下物质有反应活性的抗体所构成的组的一个或多个成员:EGFR、ErbB2、ErbB4、Shc、P13K、Erk、Rsk、Akt、P70S6K、VEGFR1、VEGFR2、Tie 2 和 V-钙粘蛋白-R2 复合物。

12. 根据权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述固体支持物选自:玻璃、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束和它们的组合。

13. 根据权利要求 4 的用途,其中所述的非小细胞肺癌选自:鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌、支气管肺泡癌(BAC)和燕麦细胞癌。

14. 根据权利要求 5 的用途,其中所述的循环细胞选自:循环肿瘤细胞、循环内皮细胞、循环内皮祖细胞、癌症干细胞、扩散性肿瘤细胞和它们的组合。

利用基于抗体的阵列选择肺癌治疗药物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 7 月 13 日提交的美国临时专利申请号 60/949,820 的优先权,其内容出于所有目的通过引用全文纳入本文。

[0003] 对于联邦资助研发作出的发明的声明

[0004] 不适用。

[0005] 对以光盘提交的“序列列表”、表格或计算机程序清单附件的引用不适用

[0006] 发明背景

[0007] 细胞的信号转导过程负责各种生物学功能,包括细胞分裂和死亡、代谢、免疫细胞活化、神经传递和感知觉等等。因此,细胞中正常信号转导的错乱可导致许多疾病状态,例如糖尿病、心脏病、自身免疫和癌症。

[0008] 一种充分表征的信号转导途径是 MAP 激酶途径,其负责将表皮生长因子 (EGF) 的信号转导成促进细胞群的细胞增殖 (参见,图 1)。EGF 结合连接酪氨酸激酶的跨膜受体,即,通过与 EGF 结合而活化的表皮生长因子受体 (EGFR)。EGF 与 EGFR 结合活化受体胞质结构域的酪氨酸激酶活性。该激酶活化的一种结果是 EGFR 在酪氨酸残基上自磷酸化。活化 EGFR 上磷酸化的酪氨酸残基为含有 SH2 结构域的衔接蛋白,例如 GRB2 的结合提供停泊位点。在其作为衔接蛋白的功能中,GRB2 还通过 GRB2 上的 SH3 结构域结合鸟嘌呤核苷酸交换因子, SOS。EGFR-GRB2-SOS 复合物的形成导致 SOS 活化成促进 GDP 从 Ras 中除去的鸟嘌呤核苷酸交换因子。GDP 除去后, Ras 结合 GTP 并被活化。

[0009] 活化后, Ras 结合并活化 RAF 激酶 - 一种丝氨酸 / 苏氨酸 - 特异性蛋白激酶 - 的蛋白质激酶活性。然后活化蛋白激酶级联反应从而导致细胞增殖。概括地说, RAF 激酶随后磷酸化并活化 MEK - 另一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶。活化的 MEK 磷酸化并活化促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK)。由 MAPK 进一步磷酸化的靶标是 40S 核糖体蛋白 S6 激酶 (RSK)。MAPK 磷酸化 RSK 导致 RSK 活化,进而磷酸化核糖体蛋白 S6。MAPK 的另一已知靶标是在各种癌症中突变的原癌基因 c-Myc,其是细胞增殖的至关重要基因。MAPK 还磷酸化和活化另一种蛋白激酶, MNK, 进而磷酸化转录因子, CREB。MAPK 还间接调节 Fos 基因的转录,而该基因还编码参与细胞增殖的另一种转录因子。通过改变这些转录因子的水平和活性, MAPK 将 EGF 的最初胞外信号转换成细胞周期进程至关重要的基因转录的改变。

[0010] 鉴于信号转导途径在细胞生长中起核心作用,信号转导组分的突变和其它改变导致细胞增殖途径异常活化从而产生许多癌症是不奇怪的。例如,EGFR 的过表达或过度活性与许多癌症相关,包括多形性成胶质细胞瘤、结肠癌和肺癌。这促进开发了针对 EGFR 的抗癌剂,包括用于肺癌的吉非替尼 (gefitinib) 和埃洛替尼 (erlotinib),以及用于结肠癌的西妥昔单抗 (cetuximab)。

[0011] 西妥昔单抗是单克隆抗体抑制剂的一种例子,其结合 EGFR 的胞外配体结合结构域,因而防止了活化 EGFR 酪氨酸激酶的配体的结合。相反,吉非替尼和埃洛替尼是抑制胞内定位的 EGFR 酪氨酸激酶的小分子。没有这些激酶活性,EGFR 不能在酪氨酸残基进行自磷酸化,而这是下游衔接蛋白,例如 GRB2 结合的先决条件。通过中断细胞中的信号级联反

应（细胞生长依赖该途径），减少了肿瘤生长和迁移。

[0012] 此外，其它研究显示约 70% 的人黑色素瘤和较低比例的其它肿瘤在 Raf 基因中具有导致 MAPK 途径持久活化的点突变（参见，例如 Davies 等，Nature, 417 :949-954 (2002)）。这些结果提示特定信号转导途径中的突变可能是某些类型肿瘤特征性的，而这种特异性、改变的信号转导途径可能是有希望的化疗干预靶点。

[0013] 鉴于不同的癌症治疗，特别是癌症化疗可能分别通过阻断或活化参与细胞增殖或死亡的细胞信号转导途径而直接或间接起作用，那么特定形式癌症中给定信号转导途径的活性可能用作各种癌症治疗方法效力的良好指标。因此，除了满足这些要求，本发明提供了评估潜在抗癌症治疗对个体患者的效力的方法。因此，本发明提供了协助医师为各患者选择剂量合适和时机合适的合适癌症治疗的方法。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明提供检测肿瘤细胞（例如，肺肿瘤的循环细胞）中信号转导途径诸组分的活化状态的组合物和方法。采用本发明获得的信号转导途径诸组分的活化状态信息可用于癌症诊断、预后和设计癌症治疗。

[0016] 本发明一方面提供选择治疗肺肿瘤的合适抗癌症药物的方法，所述方法包括：

[0017] (a) 先给予某抗癌症药物再分离肺肿瘤的细胞，或者先分离肺肿瘤的细胞再用该抗癌症药物温育；

[0018] (b) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物；

[0019] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个稀释系列的试验检测细胞提取物中所述一种或多种分析物的活化状态，其中所述捕捉抗体局限在固体支持物上；和

[0020] (d) 通过比较所述一种或多种分析物测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化状况来测定该抗癌症药物是否适于治疗该肺肿瘤。

[0021] 在另一方面，本发明提供选择具有肺肿瘤的对象的方法，所述对象是用某抗癌症药物治疗的合适候选对象，所述方法包括：

[0022] (a) 先给予某抗癌症药物再分离肺肿瘤的细胞，或者先分离肺肿瘤的细胞再用该抗癌症药物温育；

[0023] (b) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物；

[0024] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个稀释系列的试验检测细胞提取物中所述一种或多种分析物的活化状态，其中所述捕捉抗体局限在固体支持物上；和

[0025] (d) 通过比较所述一种或多种分析物测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化状况来测定该对象是否适于该肺肿瘤治疗。

[0026] 在另一方面，本发明提供鉴定肺肿瘤对某抗癌症药物治疗的反应的方法，所述方法包括：

[0027] (a) 先给予某抗癌症药物再分离肺肿瘤的细胞，或者先分离肺肿瘤的细胞再用该抗癌症药物温育；

[0028] (b) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物；

[0029] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个稀释系列的试验检测细

胞提取物中所述一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体局限在固体支持物上;和

[0030] (d) 通过比较所述一种或多种分析物测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化状况来鉴定该肺肿瘤是否对该抗癌症药物起反应。

[0031] 在还有另一方面,本发明提供预测具有肺肿瘤的对象对某抗癌症药物治疗的反应的方法,所述方法包括:

[0032] (a) 先给予某抗癌症药物再分离肺肿瘤的细胞,或者先分离肺肿瘤的细胞再用该抗癌症药物温育;

[0033] (b) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物;

[0034] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个稀释系列的试验检测细胞提取物中所述一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体局限在固体支持物上;和

[0035] (d) 通过比较所述一种或多种分析物测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化状况来预测该对象对该抗癌症药物治疗起反应的可能性。

[0036] 在还有另一方面,本发明提供对用抗癌症药物治疗的具有肺肿瘤的对象的结果进行预后的方法,所述方法包括:

[0037] (a) 在给予抗癌症药物后分离肺肿瘤的细胞;

[0038] (b) 裂解分离的细胞以产生细胞提取物;

[0039] (c) 采用包括一种或多种分析物的特异性捕捉抗体的多个稀释系列的试验检测细胞提取物中所述一种或多种分析物的活化状态,其中所述捕捉抗体局限在固体支持物上;和

[0040] (d) 通过比较所述一种或多种分析物测得的活化状态与没有该抗癌症药物存在下产生的参比活化状况对用该抗癌症药物治疗的对象的结果作出预后。

[0041] 在还有一方面,本发明提供具有优秀动态范围的阵列,其包含多个局限于固体支持物上的捕捉抗体的稀释系列,其中各稀释系列中的捕捉抗体对于细胞提取物中信号转导途径组分的一种或多种相应分析物具有特异性。

[0042] 本领域技术人员从以下详述和附图可以明白本发明的其它目的、特征和优点。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1 显示了可用于实施本发明的参与细胞增殖的信号转导途径的例子。描述了细胞用于将丝裂信号转变成细胞增殖的 EGFR/MAPK/ERK 途径的诸组分。

[0045] 图 2 是在癌症治疗期间将本发明的可寻址阵列应用于药物选择的示意图。

[0046] 图 3 显示了包含受体酪氨酸激酶途径诸组分,例如 EGFR/MAPK/ERK 途径诸组分的抗体稀释液的可寻址阵列的示意性例子。

[0047] 图 4 显示了包含在肿瘤血管生成中活化的信号转导途径诸组分的抗体稀释液的可寻址阵列的示意性例子。

[0048] 图 5A-B 显示了在患者 2002(A) 和患者 2015(B) 中采用 Veridex

[0049] CellSearch 系统的 CTC 计数。

[0050] 发明详述

[0051] I. 引言

[0052] 如上所述,参与细胞增殖的信号转导途径的活化和参与细胞死亡的途径的失活是表征许多不同类型癌症的分子特征的非限制性例子。在许多情况中,特定信号转导途径及其诸组分的活性可用作给定类型癌症的分子签名。这些活化的组分还可为治疗干预提供有用靶位。因此,了解治疗之前、期间和之后癌症细胞内的特定信号转导系统的活性水平为医师提供了可用于选择合适治疗进程的高度相关信息。此外,持续监测在癌细胞中有活性的信号转导途径作为治疗进展可为医师提供治疗效力的额外信息,从而提示医师继续特定治疗进程或改用另一治疗方法,例如,当癌细胞通过活化同一或另一信号转导途径的进一步变异而对治疗变得耐受之时。

[0053] 因此,本发明提供在特异性、多重、高通量试验中检测肿瘤组织或肿瘤外细胞,例如实体瘤的稀少循环细胞中多种失调信号转导分子的表达和活化状态的方法和组合物。本发明还提供选择合适的治疗(单一药物或药物组合)来下调或关闭失调信号转导途径的方法和组合物。因此,采用本发明可有利于为癌症患者设计个性化疗法。

[0054] 通过测定单细胞水平的信号转导途径活性来检测和鉴定循环中肿瘤细胞的能力是本发明的重要优点。具有各种癌症早期阶段的患者血液中常见肿瘤细胞,例如“微小转移(弥散性肿瘤细胞)”,在转移癌中也可见到。血液中肿瘤细胞的数量取决于肿瘤的阶段和类型。虽然通常可获得原发性肿瘤的生物活检,但大多数转移瘤未经生物活检,从而极难对这种肿瘤样品进行分子分析。在肿瘤转移期间,大多数侵袭性肿瘤细胞离开原发性肿瘤,通过血液和淋巴系统移动到达远端部位。因此,血液中的循环肿瘤细胞代表了肿瘤细胞中最具侵袭性和均质的群体。然而,血液中转移性肿瘤细胞的数量经常极低,从每毫升血液中1个到数千个细胞不等。在这种稀少细胞中分离和检验信号转导途径和将该信息应用于更有效的癌症治疗的能力是本发明的目的之一。

[0055] 在一些实施方式中,本发明的多重高通量免疫测定能在单细胞水平检测实体瘤的循环细胞中一种或多种信号转导分子的活化状态。事实上,信号转导分子,例如EGFR的检测灵敏度可以是约 $100 \cdot 10^{-21}$ 摩尔(zzeptomole),线性动态范围是约 $100 \cdot 10^{-21}$ 摩尔到约100毫微微摩尔(femtomole)。因此,稀少循环细胞中多种信号转导物的活化状态的单细胞检测有助于癌症预后和诊断以及设计个性化、靶向疗法。

[0056] 稀少循环细胞包括从实体瘤转移或微小转移的实体瘤循环细胞。循环肿瘤细胞、癌症干细胞和迁移至肿瘤(因趋化作用)的细胞,例如循环内皮祖细胞、循环内皮细胞、循环前血管原性髓样细胞和循环树突细胞是实体瘤相关循环细胞的一些例子。

[0057] 通常在分离循环细胞后不久提取感兴趣的信号转导分子以维持它们的原位活化状态,优选在约24、6或1小时内,更优选在约30、15或5分钟内。还可将分离的细胞与通常为纳摩尔到微摩尔浓度的一种或多种生长因子温育约1-30分钟以恢复或刺激信号转导分子的活化(参见,例如Irish等,Cell,118:217-228(2004))。

[0058] 如本文更详细解释的,为评估用于各患者个体的潜在抗癌疗法,可将分离的细胞与各种剂量的一种或多种抗癌药物温育。然后可进行少许(例如,约1-5分钟)或数小时(例如,约1-6小时)的生长因子刺激。用和不用抗癌药物来差别活化信号转导途径有助于为各患者选择合适剂量的合适癌症疗法。还可在抗癌药物治疗期间从患者样品分离循环细胞并用一种或多种生长因子刺激以确定是否应改变治疗。因此,本发明方法有利于帮助临床医师为各患者个体提供剂量正确、时机正确的正确抗癌药物。

[0059] II. 定义

[0060] 除非另有规定,本文所用的以下术语具有归于它们的意义。

[0061] 术语“癌症”应包括特征在于异常细胞不受控生长的疾病类型的任何成员。该术语包括所有已知癌症和肿瘤病症,无论特征是恶性、良性、软组织还是实体的,以及所有阶段和等级的癌症,包括转移前和后的癌症。不同类型癌症的例子包括但不限于:肺癌(例如,非小细胞肺癌);消化道和胃肠道癌症,例如结肠直肠癌、胃肠道间质瘤、胃肠类癌肿瘤、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胆管癌、小肠癌、和胃癌;食道癌;胆囊癌;肝癌;胰腺癌;阑尾癌(appendixcancer);乳腺癌;卵巢癌;肾癌(例如,肾细胞癌);中枢神经系统癌;皮肤癌;淋巴瘤;绒毛膜癌;头颈癌;骨肉瘤;和血液癌症。本文所用的“肿瘤”包括一种或多种癌细胞。在优选实施方式中,肺肿瘤源自具有非小细胞肺癌,例如鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌、支气管肺泡癌(BAC)或燕麦细胞癌的对象。

[0062] 术语“分析物”包括测定其存在、含量和/或身份的任何感兴趣分子,通常是大分子,例如多肽。在某些例子中,分析物是实体瘤的循环细胞的细胞组分,优选信号转导分子。

[0063] 本文所用的术语“稀释系列”应包括一系列浓度降低的特定样品(例如,细胞裂解物)或试剂(例如,抗体)。一般通过以下过程产生稀释系列:混合测定量的起始浓度样品或试剂与稀释剂(例如,稀释缓冲液)以产生较低浓度的样品或试剂,并重复该过程足够次数以获得所需数量的连续稀释液。样品或试剂可连续稀释至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、500、或1000-倍以产生包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、或50种浓度降低的样品或试剂的稀释系列。例如,可通过混合一定量的起始浓度捕捉抗体与等量稀释缓冲液以产生0.5mg/ml浓度的捕捉抗体,重复该过程以获得0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml、0.0325mg/ml等的捕捉抗体浓度,从而产生包含起始浓度为1mg/ml的捕捉抗体试剂的2-倍连续稀释的稀释系列。

[0064] 术语“优秀的动态范围”指某试验在少至1个细胞或多至数千细胞中检测特异性分析物的能力。例如,本文所述的免疫测定具有优秀的动态范围,因为它们有利于利用捕捉抗体浓度的稀释系列在约1-10,000个细胞中检测感兴趣的特定信号转导分子。

[0065] 术语“信号转导分子”或“信号转导物”包括执行细胞将胞外信号或刺激转换成反应的过程的蛋白质和其它分子,该过程通常涉及细胞内生物化学反应的有序序列。信号转导分子的例子包括但不限于:受体酪氨酸激酶,例如EGFR(例如,EGFR/HER1/ErbB1、HER2/Neu/ErbB2、HER3/ErbB3、HER4/ErbB4)、VEGFR-1/FLT-1、VEGFR-2/FLK-1/KDR、VEGFR-3/FLT-4、FLT-3/FLK-2、PDGFR(例如,PDGFRA、PDGFRB)、c-KIT/SCFR、INSR(胰岛素受体)、IGF-1R、IGF-1IR、IRR(胰岛素受体-相关受体)、CSF-1R、FGFR1-4、HGFR1-2、CCK4、TRKA-C、MET、RON、EPHA1-8、EPHB1-6、AXL、MER、TYRO3、TIE1-2、TEK、RYK、DDR1-2、RET、c-ROS、LTK(白细胞酪氨酸激酶)、ALK(间变性淋巴瘤激酶)、ROR1-2、MUSK、AATYK1-3和RTK106;非受体酪氨酸激酶,例如BCR-ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、Zap70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack和LIMK;酪氨酸激酶信号转导级联组分,例如Akt、MAPK/ERK、MEK、RAF、PLA2、MEKK、JNKK、JNK、p38、Shc(p66)、PI3K、Ras(例如,K-Ras、N-Ras、H-Ras)、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p70S6激酶、p53、细胞周期蛋白D1、STAT1、STAT3、PIP2、PIP3、PDK、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、PTEN、RSK1-3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67和桩蛋白;和它们的

组合。

[0066] 本文所用的术语“循环细胞”包括从实体瘤转移或微小转移的肿瘤外细胞 (extratumoral cell)。循环细胞的例子包括但不限于：循环肿瘤细胞、癌症干细胞和 / 或迁移至肿瘤细胞 (例如, 循环内皮祖细胞、循环内皮细胞、循环前血管原性髓样细胞、循环树突细胞等)。

[0067] 本文所用的术语“样品”包括获自患者的任何生物学样本。样品包括但不限于：全血、血浆、血清、红细胞、白细胞 (例如, 外周血单核的细胞)、唾液、尿液、粪便 (即, 排泄物)、痰、支气管灌洗液、眼泪、乳头抽吸物、淋巴 (例如, 淋巴结的弥散性肿瘤细胞)、细针抽吸物、任何其它体液、组织样品 (例如, 肿瘤组织), 如肿瘤活检 (例如, 针吸活检) 和它们的细胞提取物。在一些实施方式中, 样品是全血或其组分, 例如血浆、血清或细胞沉淀。在优选的实施方式中, 采用本领域已知的任何技术从全血分子实体瘤的循环细胞或其细胞组分而获得样品。在其它实施方式中, 样品是福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤组织样品, 例如来自肺、结肠或直肠的实体瘤。

[0068] “活检”指取出组织样品以供诊断或预后评估的过程, 也指组织样本自身。可将本领域已知的任何活检技术应用于本发明的方法和组合物。所应用的活检技术通常取决于待评估的组织类型和肿瘤大小及类型 (即, 实体或悬浮的 (即, 血液或腹水)) 等因素。代表性活检技术包括切除活检、切开式活检、针吸活检 (例如, 芯针活检、细针抽吸活检等)、手术活检和骨髓活检。活检技术参见, 例如 Harrison' s Principles of Internal Medicine (内科学哈里森原理), Kasper 等编, 第 16 版, 2005, 第 70 章, 以及整个第 V 部分。

[0069] 术语“对象”或“患者”通常包括人, 但不限于其它动物, 例如其它灵长类、啮齿类、犬、猫、马、绵羊、猪等。

[0070] “阵列”或“微阵列”包括固定或局限于固体支持物上的捕捉抗体的不同组和 / 或稀释系列, 所述固体支持物是例如, 玻璃 (例如, 玻璃载玻片)、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜 (例如, 尼龙、硝酸纤维素、聚偏二氟乙烯 (PVDF), 等)、纤维束或任何其它合适的基板。捕捉抗体一般通过共价或非共价相互作用 (例如, 离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极 - 偶极键) 而固定或局限于固体支持物上。本发明试验所用的阵列通常包含偶联于固体支持物表面不同的已知 / 可寻址位置的多个不同的捕捉抗体和 / 或捕捉抗体浓度。

[0071] 术语“捕捉抗体”应包括对于样品中感兴趣的一种或多种分析物具有特异性 (即, 结合、被结合或与之形成复合物) 的固定化抗体。在优选的实施方式中, 捕捉抗体局限于阵列中的固体支持物上。用于将各种信号转导分子固定在固体支持物上的合适捕捉抗体可购自加利福尼亚州泰姆库拉市升态公司 (Upstate, Temecula, CA)、加利福尼亚州卡马里奥市生物资源公司 (Biosource, Camarillo, CA)、马萨诸塞州丹弗斯市细胞信号转导技术公司 (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA)、明尼苏达州明尼阿波利斯研发系统公司 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、加利福尼亚州弗里蒙特市 LV 公司 (Lab Vision, Fremont, CA)、加利福尼亚州圣克鲁斯市圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、密苏里州圣路易斯市西格玛公司 (Sigma, St. Louis, MO) 和加利福尼亚州圣何塞市 BD 生物科学公司 (BD Biosciences, San Jose, CA)。

[0072] 本文所用的术语“检测抗体”包括含有可检测标记并对样品中感兴趣的一种或多种分析物具有特异性 (即, 结合、被结合或与之形成复合物) 的抗体。该术语还包括对于感

兴趣的一种或多种分析物具有特异性的抗体,其中所述抗体可被包含可检测标记的另一种类抗体结合。可检测标记的例子包括但不限于:生物素/链霉亲和素标记、核酸(例如,寡核苷酸)标记、化学反应活性的标记、荧光标记、酶标记、放射性标记和它们的组合。用于检测各种信号转导分子的活化状态的合适检测抗体可购自加利福尼亚州泰姆库拉市升态公司、加利福尼亚州卡马里奥市生物资源公司、马萨诸塞州丹弗斯市细胞信号转导技术公司、明尼苏达州明尼阿波利斯研发系统公司、加利福尼亚州弗里蒙特市LV公司、加利福尼亚州圣克鲁斯市圣克鲁斯生物技术公司、密苏里州圣路易斯市西格玛公司和加利福尼亚州圣何塞市BD生物科学公司。作为非限制性例子,针对各种信号转导分子,例如EGFR、c-KIT、c-Src、FLK-1、PDGFRA、PDGFRB、Akt、MAPK/ERK、PTEN、Raf和MEK的磷酸化形式的磷酸-特异性抗体可购自圣克鲁斯生物技术公司。

[0073] 术语“活化状态依赖性抗体”包括对样品中感兴趣的一种或多种分析物的特定活化状态具有特异性(即,结合、被结合或与之形成复合物)的检测抗体。在优选的实施方式中,所述活化状态-依赖性抗体检测一种或多种分析物,例如一种或多种信号转导分子的磷酸化、遍在蛋白化和/或络合状态。在一些实施方式中,利用活化状态依赖性抗体检测受体酪氨酸激酶的EGFR家族诸成员的磷酸化和/或EGFR家族成员之间异二聚体复合物的形成。适合用活化状态依赖性抗体检测的活化状态(括号中所列)的非限制性例子包括:EGFR(EGFRvIII、磷酸化(p-)EGFR、EGFR:Shc、遍在蛋白化(u-)EGFR、p-EGFRvIII);ErbB2(p85:截短(Tr)-ErbB2、p-ErbB2、p85:Tr-p-ErbB2、Her2:Shc、ErbB2:PI3K、ErbB2:EGFR、ErbB2:ErbB3、ErbB2:ErbB4);ErbB3(p-ErbB3、ErbB3:PI3K、p-ErbB3:PI3K、ErbB3:Shc);ErbB4(p-ErbB4、ErbB4:Shc);IGF-1R(p-IGF-1R、IGF-1R:IRS、IRS:PI3K、p-IRS、IGF-1R:PI3K);INSR(p-INSR);KIT(p-KIT);FLT3(p-FLT3);HGFR1(p-HGFR1);HGFR2(p-HGFR2);RET(p-RET);PDGFRa(p-PDGFRa);PDGFRP(p-PDGFRP);VEGFRI(p-VEGFRI、VEGFRI:PLCg、VEGFR1:Src);VEGFR2(p-VEGFR2、VEGFR2:PLCy、VEGFR2:Src、VEGFR2:硫酸肝素、VEGFR2:VE-钙粘蛋白);VEGFR3(p-VEGFR3);FGFR1(p-FGFR1);FGFR2(p-FGFR2);FGFR3(p-FGFR3);FGFR4(p-FGFR4);Tie1(p-Tie1);Tie2(p-Tie2);EphA(p-EphA);EphB(p-EphB);NFKB和/或IKB(p-IK(S32)、p-NFKB(S536)、p-P65:IKBa);Akt(p-Akt(T308、S473));PTEN(p-PTEN);Bad(p-Bad(S112、S136)、Bad:14-3-3);mTor(p-mTor(S2448));p70S6K(p-p70S6K(T229、T389));Mek(p-Mek(S217、S221));Erk(p-Erk(T202、Y204));Rsk-1(p-Rsk-1(T357、S363));Jnk(p-Jnk(T183、Y185));P38(p-P38(T180、Y182));Stat3(p-Stat-3(Y705、S727));Fak(p-Fak(Y576));Rb(p-Rb(S249、T252、S780));Ki67;p53(p-p53(S392、S20));CREB(p-CREB(S133));c-Jun(p-c-Jun(S63));cSrc(p-cSrc(Y416));和桩蛋白(p-桩蛋白(Y118))。

[0074] 术语“不依赖活化状态的抗体”对样品中感兴趣的一种或多种分析物具有特异性(即,结合、被结合或与之形成复合物),而无论它们的活化状态的检测抗体。例如,不依赖活化状态的抗体可检测一种或多种分析物,例如一种或多种信号转导分子的磷酸化和非磷酸化形式。

[0075] 术语“核酸”或“多核苷酸”包括单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物形式,例如DNA和RNA。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或连接键的核酸,其可以是合成的、天然产生的和非天然产生的,并具有与参比核酸相似的结合

特性。这种类似物的例子包括但不限于：硫代磷酸酯、氨基磷酸酯 (phosphoramidate)、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸 (PNA)。除非另有限定,该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参比核酸相似的结合特性。除非另有表述,特定核酸序列还隐含包括其保守性修饰的变体和互补序列以及明确示出的序列。

[0076] 术语“寡核苷酸”指 RNA、DNA、RNA/DNA 杂交体和 / 或其模拟物的单链共聚物或聚合物。在某些情况中,寡核苷酸由天然产生 (即,未修饰的) 核碱基、糖和核苷间 (主链) 连接键构成。在某些其它例子中,寡核苷酸包含修饰的核碱基、糖和 / 或核苷间连接键。

[0077] 本文所用的术语“错配基序”或“错配区域”指寡核苷酸中与其互补序列不具有 100% 互补性的部分。寡核苷酸可具有至少 1、2、3、4、5、6 个或多个错配区域。错配区域可以是连续的,或可被 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或更多个核苷酸隔开。错配基序或区域可包含一个核苷酸或可包含 2、3、4、5 或更多个核苷酸。

[0078] 短语“严格杂交条件”指寡核苷酸与其互补序列杂交,但不与其它序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,在不同环境中会有差异。较长的序列在较高温度下特异性杂交。核酸杂交的详细指导参见 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes* (生物化学和分子生物学技术—用核酸探针杂交), “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays (杂交原理和核酸试验方案概述)” (1993)。严格条件通常选择比具体序列在规定离子强度 pH 下的热解链温度 (T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是在规定的离子强度、pH 和核酸浓度下,50% 的与靶标互补的探针与靶序列杂交平衡时的温度 (由于存在的靶序列过量, T_m 时,在平衡时有 50% 的探针被占据)。还可进入去稳定剂,例如甲酰胺来获得严格条件。对于选择性或特异性杂交,阳性信号是背景的至少两倍,优选是背景杂交的 10 倍。

[0079] 就两条或更多条核酸而言,术语“实质上相同”或“实质相同性”指在比较窗或指定区域上比较和比对最大对应性时,例如采用序列比较算法或通过手工比对和目测观察,相同或有特定百分比的核苷酸相同 (即,在特定区域上有至少约 60%,优选至少约 65%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 相同性) 的两条或更多条序列或子序列。当文中示出该定义时,其还类似地指某序列的互补序列。优选在至少长约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、或 100 个核苷酸的区域具有实质相同性。

[0080] III. 实施方式描述

[0081] 在一个实施方式中,本发明提供采用特异性、多重、高通量的试验检测衍生自肿瘤组织的肿瘤细胞或实体瘤的循环细胞中多个失调信号转导物的表达和活化状态的方法。本发明还提供选择合适治疗的方法和组合物,以便下调或关闭一种或多种失调的信号转导途径。因此,可根据给定患者肿瘤中活化的信号转导蛋白集合提供的特定分子签名,采用本发明实施方式来帮助设计个性化治疗。

[0082] 实体瘤的循环细胞包括从实体瘤转移或微小转移的细胞,包括癌症干细胞或迁移至肿瘤的细胞 (例如,因趋化作用),例如内皮祖细胞、循环内皮细胞、周细胞、循环前血管原性髓样细胞、树突细胞等等。含有循环细胞的患者样品可获自任何可得的生物学液体 (例如,全血、血清、血浆、痰、支气管灌洗液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、唾液、细针抽吸物等)。在某些情况中,将全血样品分成血浆或血清组分和细胞组分 (即,细胞沉淀)。细胞组分通常含有红细胞、白细胞和 / 或实体瘤的循环细胞,例如循环肿瘤细胞 (CTC)、循环内

皮细胞 (CEC)、循环内皮祖细胞 (CEPC)、癌症干细胞 (CSC)、淋巴结的弥散性肿瘤细胞和它们的组合。血浆或血清组分通常含有实体瘤的循环细胞所释放的核酸 (例如, DNA、RNA) 和蛋白质。

[0083] 通常采用一种或多种分离方法从患者样品分离循环细胞, 所述方法包括, 例如免疫磁性分离 (参见, 例如 Racila 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :4589-4594 (1998) ; Bilkenroth 等, Int. J. Cancer, 92 :577-582 (2001))、宾夕法尼亚州亨廷顿谷的伊缪尼康公司 (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) 的 CellTrack™ 系统、微流体分离 (参见, 例如 Mohamed 等, IEEE Trans. Nanobiosci., 3 :251-256 (2004) ; Lin 等, 第 5147 号摘要, 第 97 届 AACR 年会, 华盛顿, 哥伦比亚特区, (2006))、FACS (参见, 例如 Mancuso 等, Blood, 97 :3658-3661 (2001))、密度梯度离心 (参见, 例如 Baker 等, Clin. Cancer Res., 13 :4865-4871 (2003)) 和消除法 (参见, 例如 Meye 等, Int. J. Oncol., 21 :521-530 (2002))。

[0084] 在一个实施方式中, 为保持原位活化状态, 优选在分离细胞后不久提取信号转导物, 优选在 96、92、48、24、6 或 1 小时内, 更优选在约 30、15 或 5 分钟内。还优选可将分离的细胞与通常为纳摩尔到微摩尔浓度的生长因子温育约 1-30 分钟以恢复或刺激信号转导物活化 (参见, 例如 Irish 等, Cell, 118 :217-228 (2004))。刺激性生长因子包括表皮生长因子 (EGF)、调蛋白 (HRG)、TGF- α 、PIGF、血管生成素 (Ang)、NRG1、PGF、TNF- α 、VEGF、PDGF、IGF、FGF、HGF、细胞因子, 等等。为评估用于各患者的潜在抗癌治疗, 在生长因子刺激前将分离的细胞与各种剂量的一种或多种抗癌药物温育。生长因子刺激可进行数分钟或数小时 (例如, 1-5 分钟或 1-6 小时)。用和不用抗癌药物差别活化的信号转导途径有助于为各患者选择合适剂量的合适癌症疗法。分离、抗癌药物剂治疗 and / 或生长因子刺激后, 采用本领域已知的任何技术裂解细胞以提取信号转导物。优选在生长因子刺激后约 1-360 分钟之间, 更优选在两个不同的时间间隔开始细胞裂解: (1) 在生长因子刺激后约 1-5 分钟; 和 (2) 在生长因子刺激后约 30-180 分钟之间。或者, 可将裂解物保存于 -80°C 待用。

[0085] 在一些实施方式中, 抗癌药物包括干扰癌细胞中活化信号转导途径组分功能的药剂。这种药剂的非限制性例子包括下文所列那些:

[0086] 表 A

[0087]	EGFR(A) (ErbB1)	Her 2(C) (ErbB2)	Her 3(ErbB3) (E)	Her4(ErbB4) 靶标
--------	-----------------	------------------	------------------	----------------

[0088]	西妥昔单抗	群司珠单	抗抗体 (U3)
--------	-------	------	----------

[0089]	帕尼妥莫单抗	(赫赛汀)
--------	--------	-------

[0090]	(Panitumumab)
--------	---------------

[0091]	玛妥珠单抗	彭图珠单抗
--------	-------	-------

[0092]	(Matuzumab)	(Pertuzumab) (DNA)
--------	-------------	--------------------

[0093]	尼莫图珠单抗	BMS-599626 (异二聚化 Her1/2 ; 1 期)
--------	--------	--------------------------------

[0094]	(Nimotuzumab)
--------	---------------

[0095]	EGFR 疫苗
--------	---------

[0096]	EGFR(B) (ErbB1)	Her 2(D) (ErbB2)
--------	-----------------	------------------

[0097]	埃洛替尼	CP-724714
--------	------	-----------

[0098]		(辉瑞公司 (Pfizer))
--------	--	-----------------

- [0099] 吉非替尼
- [0100] EKB 569(惠氏(Wyeth),不可逆,II CRC)
- [0101] CL-387-785(惠氏,不可逆,临床前)
- [0102] ErbB1/2(F)
- [0103] 拉帕替尼(Lapatinib)
- [0104] HKI-272(惠氏,不可逆,I/II NSCLC,乳腺)
- [0105] HKI-357(临床前)
- [0106] BIBW 2992(伯林格殷格瀚(Boehringer Ingelheim),不可逆,I/II 前列腺,卵巢,乳腺)
- [0107] ErbB1/2/4(G)
- [0108] 卡那替尼(Canertinib)(辉瑞,不可逆,II NSCLC,乳腺)
- [0109] ARRY-334543
- [0110] JNJ-26483327
- [0111] JNJ-26483327
- [0112] Raf(H) SRC
- [0113] 索拉芬尼(Sorafenib) AZ
- [0114] PLX4032
- [0115] (普莱新康(Plexxikon))
- [0116] Mek:(I) NFkB-IkB
- [0117] PD-325901(II:NSCLC)
- [0118] AZD6244-阵列/Az
- [0119] XL518 埃克丽西丝
- [0120] (Exelisis)/DNA
- [0121] mTor 靶标(J)
- [0122] Rad 001:依维莫司(诺华(Novartis),与吉非替尼/埃洛替尼组合;I/II:NSCLC,成胶质细胞瘤)
- [0123] 他西络莫司(Temsirolimus)(惠氏,与吉非替尼/埃洛替尼组合;I/II:NSCLC,成胶质细胞瘤)
- [0124] AP-23573(阿里亚德(Ariad),I/II:子宫内膜)
- [0125] PI3K:
- [0126] PX-866(P110 α 特异性抑制;ProIX 法玛(Pharma);临床前 NSCLC)
- [0127] VEGF 靶标(靶标 VEGFR2,和 VEGFR1)(K)
- [0128] 阿伐司汀
- [0129] (Avastin)(DNA)
- [0130] HuMV833(PDL) 抗-VEGF α
- [0131] VEGF-Trap- 雷根仑(Regeneron)/阿凡提丝(Aventis)(受体模拟物)(2期)
- [0132] VEGFR-2 靶标(L) EPH A-D
- [0133] DC101- 因克隆(Imclone)(2/3期?)
- [0134] IMC-IC11 嵌合型 IgG1,针对 VEGFR2

- [0135] IMC1121B 完全人源化
- [0136] CDP-791 (细胞技术 (Celltech), 针对 R2 的 PEG 化的二 -Fab 抗体
- [0137] 帕佐帕尼 (Pazopanib) (GSK) (多发性骨髓瘤, 卵巢, RCC 3 期募集完成, 肉瘤 II)
- [0138] CDP-791 (UCB)
- [0139] CP-547632 (OSI, 辉瑞) : (+EGFR+PDGFR) (NSCLC, 卵巢 2 期)
- [0140] AG 13736 (辉瑞) : VEGFR1, 2 和 PDGFR β) (RCC II)
- [0141] E-7080 (埃塞 (Eisai))
- [0142] CHIR-258 (VEGFR1, 2FGFR3, PDGFR)
- [0143] OSI-930 (+cKit, PDGFR)
- [0144] Bay-579352 (+PDGFR)
- [0145] ABT-869 (+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)
- [0146] BMS-540215 (+FGFR1)
- [0147] KRN-951
- [0148] BBIW
- [0149] VEGFR 1/2/3 :
- [0150] AZD 2171 (NSCLC, CRC)
- [0151] AMG-706 (+PDGFR)
- [0152] VEGFR 2/ErbB1/2 (EGFR) /cMet/FGFR (M)
- [0153] ZD6474 (凡达它尼 (vandetanib)) (III 期 : 甲状腺, NSCLC)
- [0154] XL647 (埃克丽西丝 ; 也是 EPHB2) : (对埃洛替尼耐受的患者 ; 亚洲患者) (2 期)
- [0155] AEE 788 (诺华, 1/2 期)
- [0156] VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N) TIE 1/2
- [0157] 索拉芬尼 (RCC, HCC, NSCLC (III), 黑色素瘤 (III),
- [0158] VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit/(O) PDGFR 靶标 (P)
- [0159] PTK787 (Not cFMS, FLT-3) 坦度替尼
- [0160] (Tandutinib)
- [0161] 苏尼替尼 (Sunitinib) 尼洛替尼
- [0162] (Nilotinib)
- [0163] XL-999
- [0164] SU-6668 (辉瑞)
- [0165] GSK
- [0166] AZ (AZD2171)
- [0167] BMS
- [0168] 诺华 (AEE-788)
- [0169] 安进 (Amgen)
- [0170] 其它
- [0171] Ab1 靶标 : (Q) FTL3 RET
- [0172] 伊马替尼
- [0173] 达萨替尼 (Dasatinib)

途径 1	EGFR	EGFR 磷酸	EGFR Shc	EGFR 泛素	EGFR-PI3 K	PTEN		
途径 2	EGFR	EGFRVIII	EGFR 磷酸	EGFR Shc	EGFR 泛素	EGFRVI II 磷酸	PTEN	
途径 3	ERBB2	ERBB2 磷酸	Her 2Shc	ERBB2: PI3K 复合物	ErbB2 泛素	PTEN		
途径 4	ERBB2	P85 截短的 ERBB2	ERBB2 磷酸	P85 截短的 ERBB2 磷 酸	Her2Shc	ERBB2: PI3K 复合物	ErbB2 泛素	
途径 5	ERBB3	ERBB3 磷 酸	ERBB3:PI3 K 复合物	ERBB3 PI3K 磷酸	ERBB3:Sh c			
途径 6	ERBB4	ERBB4 磷 酸	ERBB4:Sh c					
途径 7	IGF-1R	IGF-1R 磷 酸	IGF-1R:IR S	IRS:PI3K	磷酸 IRS	IGF-1R :PI3K		
途径 8	INSR	INSR 磷酸						
途径 9	KIT	KIT 磷酸						
途径 10	FLT3	FLT3 磷酸						
途径 11	HGFR 1	HGFR 1 磷酸						
途径 12	HGFR2	HGFR 2 磷酸						
途径 13	RET	RET 磷酸						
途径 14	PDGFR α	PDGFR α 磷酸						
途径 15	PDGFR β	PDGFR β 磷酸						

[0201]

途径 16	VEGFR 1	VEGFR 1 磷酸	VEGFR 1: PLC γ 复合物	VEGFR 1: Src				
途径 17	VEGFR2	VEGFR2 磷酸	VEGFR 2: PLC γ 复合物	VEGFR 2: Src	VEGFR-2/ 硫酸肝素 复合物	VEGFR- 2, VE- 钙 粘蛋白 复合物		
途径 18	VEGFR 3	VEGFR 3 磷酸						
途径 19	FGFR 1	FGFR 1 磷酸						
途径 20	FGFR 2	FGFR 2 磷酸						
途径 21	FGFR 3	FGFR 3 磷酸						
途径 22	FGFR 4	FGFR4 磷酸						
途径 23	TIE 1	TIE 1 磷 酸						
途径 24	TIE 2	TIE 2 磷酸						
途径 25	EPHA	EPHA 磷酸						
途径 26	EPHB	EPHB 磷酸						
途径 27	NF κ B-I κ B 复合物	磷酸-I B (S32) 总 I κ B	总 NF κ B 磷酸 NF κ B (S53 6)	总 P65 I κ Ba 磷酸 P65I κ Ba				

途径 28	ER	磷酸 ER	ER-AIB1	其它 ER 复合物				
途径 29	PR	磷酸 Pr		PR 复合物				
途径 30	Hedgehog 途径							
途径 31	Wnt 途径							
途径 32	Notch 途径							
途径 33	总 Mek 磷酸 Mek (S217/ S221)	总 Erk 磷酸 Erk (T202/Y204)	总 Rsk-1 磷酸 Rsk-1 (T357/S363)	总 Stat3 磷酸 Stat-3 (Y705) (S727) 总 Stat1 磷酸 Stat1 (Y701)	磷酸 Bad (S112) Bad(总)	总 Fak 磷酸 Fak (Y576)	总 cSrc 磷酸 cSrc(Y416)	总 Ras 磷酸 Ras
途径 34	Akt(总)	磷酸 Akt	磷酸 Bad	磷酸 Bad	Bad:14-3-3	总 mTor	总	GSK3
	磷酸 Akt (T473)	(T308)	(S112) Bad(总)	(S136)	复合物	磷酸 mTor (S2448)	p70S6 K 磷酸 p70S6 K (T229) (T389)	β 总 (磷酸 Ser9)
途径 35	总 Jnk 磷酸 Jnk (T183/Y185)	总 P38 磷酸 P38 (T180/Y182)	总 Rb 磷酸 Rb (S249/T252) 磷酸 Rb (S780)	总 p53 磷酸 p53 (S392) 磷酸 p53 (S20)	磷酸 -CREB(S133) 总 CREB	总 c-Jun 磷酸 -c-Jun; (S63)	总 桩蛋白 磷酸 桩蛋白 (Y118)	
途径 36	Ki67	切割的 胱冬酶 3,8,9 其它						
途径 37	TGF β							

[0202] 在某些实施方式中,抗癌剂药物包括抗-信号转导剂(即,细胞稳定药),例如单克隆抗体或酪氨酸激酶抑制剂;抗-增殖剂;化疗剂(即,细胞毒性药物);放疗剂;疫苗;和/或能减少或消除异常细胞,例如癌性细胞的不受控生长的任何其它化合物。在一些实施方式中,联用抗-信号转导剂和/或抗-增殖剂与一种或多种化疗剂处理分离的循环细胞。

[0203] 适用于本发明的抗-信号转导剂的例子包括但不限于:单克隆抗体,例如群司珠

单抗(赫赛汀[®])、阿仑单抗(Campath[®])、贝伐单抗(Avastin[®])、西妥昔单抗(Erbitux[®])、吉姆单抗(Mylotarg[®])、帕尼妥莫单抗(Vectibix[™])、利妥昔单抗(Rituxan[®])、和托西莫单抗(BEXXAR[®]);酪氨酸激酶抑制剂,例如吉非替尼(Iressa[®])、苏尼替尼(Sutent[®])、埃洛替尼(Tarceva[®])、拉帕替尼(GW-572016)、卡那替尼(CI 1033)、塞玛昔尼(semaxinib)(SU5416)、瓦塔拉尼(vatalanib)(PTK787/ZK222584)、索拉芬尼(BAY 43-9006;Nexavar[®])、甲磺酸伊马替尼(Gleevec[®])、来氟米特(SU101)、和凡达它尼(ZACTIMA[™];ZD6474);和它们的组合。

[0204] 示范性抗-增殖剂包括mTOR抑制剂,例如西罗莫司(雷帕霉素)、他西络莫司(CCI-779)、和依维莫司(RAD001);Akt抑制剂,例如1L6-羟甲基-手-肌醇-2-(R)-2-O-甲基-3-O-十八烷基-sn-甘油碳酸酯、9-甲氧基-2-甲基依利醋铵(ellipticinium acetate)、1,3-二氢-1-(1-((4-(6-苯基-1H-咪唑并[4,5-g]喹噁啉-7-基)苯基)甲基)-4-哌啶基)-2H-苯并咪唑-2-酮、10-(4'-(N-二乙基氨基)丁基)-2-氯吩噻嗪、3-甲酰基色酮缩氨基硫脲(Cu(II)Cl₂复合物)、API-2,一种衍生自原癌基因TCL1的氨基酸10-24的15-聚体肽(Hiromura等,J. Biol. Chem., 279:53407-53418(2004))、KP372-1、和Kozikowski等,J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145(2003)及Kau等,Cancer Cell, 4:463-476(2003)所述的化合物;和它们的组合。

[0205] 化疗剂的非限制性例子包括基于铂的药物(例如,奥沙利铂、顺铂、碳铂、顺螺铂、异丙铂、沙铂等)、烷化剂(例如,环磷酰胺、异磷酰胺、瘤可宁、白消安、美法仑、氮芥、乌拉莫司汀、塞替派、亚硝(基)脲等)、抗代谢物(例如,5-氟尿嘧啶、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨喋呤、亚叶酸、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨(Gemzar[®])、培美曲塞(ALIMTA[®])、雷替曲塞等)、植物生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇(紫杉醇[®])、多西他赛等)、拓扑异构酶抑制剂(例如,依立替康、托泊替康、安吡啶、依托泊苷(VP16)、磷酸依托泊苷、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素(例如,阿霉素、亚德里亚霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等)、它们在药学上可接受的盐、它们的立体异构体、它们的衍生物、它们的类似物和它们的组合。

[0206] 本发明所用癌症疫苗的非限制性例子包括但不限于:活跃生物技术公司(Active Biotech)的ANYARA、西北生物治疗公司(NorthwestBiotherapeutics)的DCVax-LB、IDM药业公司(IDM Pharma)的EP-2101、法玛克萨公司(Pharmexa)的GV1001、伊德拉药物公司(Idera Pharmaceuticals)的I0-2055、英特拉金治疗公司(Introgen Therapeutics)的INGN 225和拜米拉/默克公司(Biomira/Merck)的Stimuvax。

[0207] 放疗剂的例子包括但不限于:放射性核素,例如⁴⁷Sc、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁸⁹Sr、⁸⁶Y、⁸⁷Y、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、^{117m}Sn、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、和²¹²Bi,任选结合于直接针对肿瘤抗原的抗体。

[0208] 在一些实施方式中,捕捉抗体的各稀释系列包括捕捉抗体浓度降低的系列。在某些情况中,捕捉抗体连续稀释至少2-倍(例如,2、5、10、20、50、100、500或1000-倍),从而产生包含一组(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或更多)浓度降低的捕捉抗体稀释系列,将这些系列点样在阵列上。优选将各捕捉抗体稀释液的至少2、3、4、5或6个重复品点

样在阵列上。

[0209] 在其它实施方式中,固体支持物包括玻璃(例如,玻璃载玻片)、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜(例如,尼龙、硝酸纤维素、聚偏二氟乙烯(PVDF),等)、纤维束或任何其它合适的基板。在优选的实施方式中,捕捉抗体局限(例如,通过共价或非共价相互作用)于包被了硝酸纤维素聚合物的玻璃载玻片上,例如可商品化购自新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司(Whatman Inc., Florham Park, NJ)的**FAST**[®]载玻片。

[0210] 在一些实施方式中,细胞提取物包含实体瘤的循环细胞的提取物。通常采用本领域已知的一种或多种分离方法从患者样品分离循环细胞,所述方法包括,例如免疫磁性分离、CellTrack[™]系统、微流体分离、FACS、密度梯度离心和消除法。

[0211] 在其它实施方式中,患者样品包括全血、血清、血浆、痰、支气管灌洗液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、唾液和/或细针抽吸物样品。在某些情况中,将全血样品分成血浆或血清组分和细胞组分(即,细胞沉淀)。细胞组分通常含有红细胞、白细胞和/或实体瘤的循环细胞,例如CTC、CEC、CEPC、淋巴结的扩散性肿瘤细胞和/或CSC和它们的组合。血浆或血清组分通常含有实体瘤的循环细胞所释放的核酸(例如,DNA、RNA)和蛋白质。

[0212] 在一些情况中,可在与一种或多种感兴趣的抗癌症药物温育之前、期间或之后用一种或多种生长因子体外刺激分离的循环细胞。刺激性生长因子如上所述。在其它情况中,可以采用本领域已知的任何技术,例如在生长因子刺激和/或抗癌症药物处理后裂解分离的循环细胞,从而产生细胞提取物(例如,细胞裂解物)。优选在生长因子刺激后约1-360分钟之间,更优选在两个不同的时间间隔开始细胞裂解:(1)在生长因子刺激后约1-5分钟;和(2)在生长因子刺激后约30-180分钟之间。或者,可将裂解物保存于-80℃待用。

[0213] 在优选的实施方式中,采用下述的单个检测或邻近双重检测试验检测肿瘤细胞,例如实体瘤的循环细胞中多种信号转导分子的表达和/或活化状态。

[0214] IV. 抗体阵列的构建

[0215] 在某些方面,采用局限在固体支持物上的捕捉抗体稀释系列的抗体阵列检测肿瘤细胞,例如实体瘤的循环细胞的细胞提取物中多种信号转导分子的活化状态。所述阵列通常包含具有一定浓度范围的偶连于固体支持物上不同可寻址位置的多种不同捕捉抗体。

[0216] 所述固体支持物可包含任何适合固定蛋白质的基板。固体支持物的例子包括但不限于:玻璃(例如,玻璃载玻片)、塑料、芯片、钉、滤膜、珠、纸、膜、纤维束、凝胶、金属、陶瓷等。膜,例如(Biotrans[™],加利福尼亚州科斯拉梅萨市ICN生物医学公司(ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA);Zeta-**Probe**[®],加利福尼亚州赫拉克勒斯市的拜尔莱德公司(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA))、硝酸纤维素(**Protran**[®],新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司)和PVDF(Immobilon[™],马萨诸塞州比尔里卡市米丽波尔公司(Millipore Corp., Billerica, MA))适合在本发明阵列中用作固体支持物。捕捉抗体优选局限于包被了硝酸纤维素聚合物的玻璃载玻片上,例如可商品化购自新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司的**FAST**[®]载玻片。

[0217] 固体支持物的理想特定方面包括结合大量捕捉抗体的能力和以最低变性结合捕捉抗体的能力。另一合适的方面是当含有捕捉抗体的抗体溶液施加于支持物时,所述固体支持物显示最低的“灯芯作用”。灯芯作用最低的固体支持物能将少量捕捉抗体溶液施加于该支持物,从而获得固定捕捉抗体的小而确定的斑点。

[0218] 捕捉抗体一般通过共价或非共价相互作用（例如，离子键、疏水相互作用、氢键、范德华力、偶极-偶极键）而直接或间接（例如，通过捕捉标签）局限于固体支持物上。在一些实施方式中，采用标准交联方法和条件，利用同双功能或异双功能交联剂将捕捉抗体共价连接于固体支持物。合适的交联剂可商品化购自零售商，例如伊利诺斯州洛克福特市皮尔斯生物技术公司 (PierceBiotechnology, Rockford, IL)。

[0219] 产生适用于本发明的阵列的方法包括但不限于：用于构建蛋白质或核酸阵列的任何技术。在一些实施方式中，利用微点样器将捕捉抗体点样于阵列上，所述点样器通常是装配有裂缝针、钝针或喷墨打印头的机器人打印机。打印本文所述抗体阵列的合适机器人系统包括加利福尼亚州爱尔文市笛卡尔技术公司 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) 的 PixSys 5000 机器人，其装配有加利福尼亚州桑尼维尔市 TC 国际公司 (TeleChem International; Sunnyvale, CA) 的 ChipMaker2 裂缝针，以及可购自马萨诸塞州沃本市生物机器人公司 (BioRobics, Woburn, MA) 和康涅狄格州梅里登市帕卡德仪器公司 (PackardInstrument Co., Meriden, CT) 的其它机器人打印机。优选将各捕捉抗体稀释液的至少 2、3、4、5 或 6 个重复品点样在阵列上。

[0220] 产生适用于本发明的阵列的另一方法包括在将体积确定的液体有效吸在支持物上的条件下，通过使毛细管分配器接触固体支持物而将已知体积的捕捉抗体稀释液分散在选择的各阵列位置，其中利用选择的捕捉抗体稀释液在选择的各阵列位置重复该过程从而产生完整的阵列。可实施该方法从而形成多个这样的阵列，其中在每个重复轮次中，溶液沉积步骤应用于多个固体支持物中每一个的选择位置。这种方法的进一步描述可见。例如美国专利号 5,807,522。

[0221] 在某些情况中，可利用在纸上打印的装置产生抗体阵列。例如，可将所需的捕捉抗体稀释液加载入桌面喷墨打印机的打印头中，并打印在合适的固体支持物上（参见，例如 Silzel 等, Clin. Chem., 44:2036-2043(1998)）。

[0222] 在一些实施方式中，在固体支持物上产生的阵列的密度为至少约 5 个斑点/cm²，优选至少约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000 或 9000、或 10,000 个斑点/cm²。

[0223] 在某些情况中，固体支持物上的斑点各自代表不同的捕捉抗体。在某些其它情况中，固体支持物上的多个斑点代表相同的捕捉抗体，例如含有一系列浓度降低的捕捉抗体的稀释系列。

[0224] 在固相支持物上制备和构建抗体阵列的方法的其它实例描述于美国专利号 6,197,599、6,777,239、6,780,582、6,897,073、7,179,638 和 7,192,720；美国专利公布号 20060115810、20060263837、20060292680 和 20070054326；和 Varnum 等, Methods Mol. Biol., 264:161-172(2004)。

[0225] 扫描抗体阵列的方法是本领域已知的，包括但不限于用于扫描蛋白质或核酸阵列的任何技术。适用于本发明的微阵列扫描仪可购自马萨诸塞州波士顿的帕金埃尔默公司 (PerkinElmer)、加利福尼亚州帕洛阿尔托市安捷伦技术公司 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)、华盛顿州伊萨夸的应用精确公司 (Applied Precision, Issaquah, WA)、马

萨诸塞州比尔里卡市的 GSIL 公司 (GSILumonics Inc., Billerica, MA) 和加利福尼亚州联盟城的阿克桑仪器公司 (Axon Instruments, Union City, CA)。用于荧光检测的 GSI 扫描阵列 3000 是非限制性例子,其可与 ImaGene 软件一起用于定量测定。

[0226] V. 单次检测试验

[0227] 在一些实施方式中,检测肿瘤细胞,例如实体瘤的循环细胞的细胞提取物中感兴趣特定分析物(例如,信号转导分子)的活化状态的试验是具有优秀动态范围的多重、高通量的双抗体试验。作为非限制性例子,用于所述试验的两种抗体可包括:(1)分析物的特异性捕捉抗体;和(2)分析物的活化形式的特异性检测抗体(即,活化状态依赖性抗体)。活化状态依赖性抗体能检测,例如分析物的磷酸化、遍在蛋白化和/或络合状态。或者,检测抗体包括不依赖于活化状态的抗体,其检测细胞提取物中分析物的总量。不依赖于活化状态的抗体通常能检测分析物的活化和未活化状态。

[0228] 在优选的实施方式中,所述双-抗体试验包括:

[0229] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种稀释系列温育以形成多种被捕捉的分析物;

[0230] (ii) 将所述多种被捕捉的分析物与相应分析物的特异性活化状态依赖性抗体温育以形成多种可检测的被捕捉分析物;

[0231] (iii) 将所述多种可检测的被捕捉分析物与信号放大配对的第一和第二成员温育以产生放大的信号;和

[0232] (iv) 检测从所述信号放大配对的第一和第二成员产生的放大的信号。

[0233] 本文所述双-抗体试验通常是包含具有一定浓度范围的多个不同捕捉抗体的抗体阵列,所述抗体偶联于固体支持物表面的不同可寻址位置。本发明所用合适固体支持物的例子如上所述。

[0234] 就分析物结合而言,捕捉抗体和检测抗体的选择最好能尽量减少它们之间的竞争(即,捕捉和检测抗体可同时结合它们相应的信号转导分子)。

[0235] 在一个实施方式中,检测抗体包括结合配对的第一成员(例如,生物素),而信号放大配对的第一成员包括该结合配对的第二成员(例如,链霉亲和素)。可采用本领域熟知的方法将结合配对成员直接或间接偶联于检测抗体或信号放大配对非第一成员。在某些情况中,信号放大配对的第一成员是过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶、氯过氧化物酶、细胞色素 c 过氧化物酶、嗜曙红细胞过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、乳过氧化物酶、髓过氧化物酶、甲状腺过氧化物酶、脱碘酶等),而信号放大配对的第二成员是酪酰胺(tyramide)试剂(例如,生物素-酪酰胺)。在这些例子中,过氧化物酶在有过氧化氢(H_2O_2)存在下氧化酪酰胺试剂产生活化的酪酰胺,从而产生放大的信号。

[0236] 活化的酪酰胺可直接检测或在加入信号检测试剂,例如链霉亲和素标记的过氧化物酶和产色试剂后检测。适用于本发明的荧光团的例子包括但不限于:Alexa Fluor[®]染料(例如,Alexa Fluor[®] 555)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green[™];罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明(tetrarhodamine isothiocyanate)(TRITC)、CyDye[™]荧光素(例如,Cy2、Cy3、Cy5)等。可采用本领域熟知的方法将链霉亲和素标记直接或间接偶联于荧光团或过氧化物酶。适用于本发明的产色试剂的非限制性例子包括 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺(TMB)、3,3' - 二氨基联苯胺(DAB)、2,2' - 连氨基 - 二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、4-氯-1-萘酚(naphthol)(4CN)和/或卟啉原。

[0237] 实施本文所述双-抗体试验的示范性方案见实施例 3。

[0238] 在另一实施方式中,本发明提供实施上述双-抗体试验的试剂盒,其包含:(a)局限在固体支持物上的多种捕捉抗体的稀释系列;和(b)多种检测抗体(例如,不依赖活化状态的抗体和/或活化状态依赖性抗体)。在一些实例中,所述试剂盒还可含有利用该试剂盒检测实体瘤的循环细胞的多个信号转导分子的活化状态的使用说明书。就实施本发明的特定方法而言,所述试剂盒还可含有上述任何额外试剂,例如信号放大配对的第一和第二成员、酪酰胺信号放大试剂、洗涤缓冲液等。

[0239] VI. 邻近双重检测试验

[0240] 在一些实施方式中,检测肿瘤细胞,例如实体瘤的循环细胞的细胞提取物中感兴趣特定分析物(例如,信号转导分子)的活化状态的试验是具有优秀动态范围的多重高通量邻近(即,三-抗体)试验。作为非限制性例子,用于邻近试验的三种抗体可包括:(1)分析物的特异性捕捉抗体;(2)分析物的活化形式的特异性检测抗体(即,活化状态依赖性抗体);和(3)检测分析物总量的检测抗体(即,不依赖活化状态的抗体)。活化状态依赖性抗体能检测,例如分析物的磷酸化、遍在蛋白化和/或络合状态。活化状态依赖性抗体通常能检测活化和未活化形式的分析物。

[0241] 在优选的实施方式中,所述邻近试验包括:

[0242] (i) 将细胞提取物与捕捉抗体的多种稀释系列温育以形成多种被捕捉分析物;

[0243] (ii) 将所述多种被捕捉分析物与检测抗体温育以形成多种可检测的被捕捉分析物,所述检测抗体包含多种不依赖活化状态的抗体和多种相应分析物的特异性活化状态依赖性抗体,

[0244] 其中所述不依赖活化状态的抗体用辅助部分标记,活化状态依赖性抗体用信号放大配对的第一成员标记,所述辅助部分产生导向信号放大配对的第一成员并与之反应的氧化剂;

[0245] (iii) 将所述多种可检测的被捕捉分析物与信号放大配对的第二成员温育以产生放大的信号;和

[0246] (iv) 检测从所述信号放大配对的第一和第二成员产生的放大的信号。

[0247] 或者,可用辅助部分标记活化状态依赖性抗体,而用信号放大配对的第一成员标记不依赖活化状态的抗体。

[0248] 本文所述的邻近试验通常是包含具有一定浓度范围的多种不同捕捉抗体的抗体阵列,所述抗体偶联于固体支持物表面的不同可寻址位置。本发明所用合适固体支持物的例子如上所述。

[0249] 就分析物结合而言,捕捉抗体、不依赖活化状态的抗体和活化状态依赖性抗体的选择最好能尽量减少它们之间的竞争(即,所有抗体可同时结合它们相应的信号转导分子)。

[0250] 在一些实施方式中,不依赖活化状态的抗体还包含可检测部分。在这种例子中,可检测部分的用量与细胞提取物中一种或多种分析物的含量相关。可检测部分的例子包括但不限于:荧光标记、化学反应活性标记、酶标记、放射性标记等。可检测标记优选是荧光团,例如 Alexa Fluor[®]染料(例如, Alexa Fluor[®] 647)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green[™];罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明(TRITC)、CyDye[™] 荧光素(例如, Cy2、Cy3、

Cy5) 等。可采用本领域熟知的方法将可检测部分直接或间接偶联于不依赖活化状态的抗体。

[0251] 在某些例子中,用辅助部分直接标记不依赖活化状态的抗体。可采用本领域熟知的方法将辅助部分偶联于不依赖活化状态的抗体。本发明所用的合适辅助部分包括能产生导向(即,引向)辅助部分附近(即,空间上接近或邻近)的另一分子并与之反应(即,结合、被结合或与之形成复合物)的氧化剂的任何分子。辅助部分的例子包括但不限于:酶,例如葡萄糖氧化酶或催化涉及分子氧(O_2)作为电子接受体的氧化/还原反应的任何其它酶,和光敏剂,例如亚甲蓝、玫瑰红、卟啉类、四方酸(squarate)染料、酞菁类等。氧化剂的非限制性例子包括过氧化氢(H_2O_2)、单态氧和在氧化/还原反应中传递氧原子或获得电子的任何其它化合物。优选地,当两个部分彼此接近时,辅助部分(例如,葡萄糖氧化酶、光敏剂等)在有合适底物(例如,葡萄糖、光)存在下产生导向信号放大配对的第一成员(例如,辣根过氧化物酶(HRP)、由保护基团保护的半抗原、通过硫醚与酶抑制剂连接而灭活的酶)并与之反应的氧化剂(例如,过氧化氢(H_2O_2)、单态氧等)。

[0252] 在某些其它例子中,不依赖活化状态的抗体通过结合于不依赖活化状态的抗体的寡核苷酸接头与结合于辅助部分的互补寡核苷酸接头之间的杂交而用辅助部分作间接标记。可采用本领域熟知的方法将寡核苷酸接头偶联于辅助部分或不依赖活化状态的抗体。在一些实施方式中,结合于辅助部分的寡核苷酸接头与结合于不依赖活化状态的抗体的寡核苷酸接头100%互补。在其它实施方式中,例如在严格杂交条件下杂交后,寡核苷酸接头配对包含至少1、2、3、4、5、6或更多个错配区域。本领域技术人员应知道可将不同分析物的特异性不依赖活化状态的抗体结合于同一寡核苷酸接头或不同寡核苷酸接头。

[0253] 结合于辅助部分或不依赖活化状态的抗体的寡核苷酸接头的长度可以不同。接头序列通常至少长约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、或100个核苷酸。通常产生随机核酸序列以供偶连。作为非限制性例子,可将寡核苷酸接头文库设计成具有三个不同的毗连结构域:间隔结构域;签名结构域;和结合结构域。优选将寡核苷酸接头设计成能有效偶连而不破坏要与之结合的辅助部分或不依赖活化状态的抗体的功能。

[0254] 可将寡核苷酸接头序列设计成能防止或尽量降低在各种试验条件下的任何二级结构形成。通常小心监测接头内各区段的解链温度以使得它们参与整个试验过程。接头序列区段的解链温度范围通常介于1-10°C之间。测定确定离子浓度下的解链温度、二级结构和发夹结构的计算机算法(例如,OLIGO 6.0)可用于分析各接头内各三种不同结构域。还可分析总的组合序列的结构特征和它们与其它结合的寡核苷酸接头序列的相容性,例如,它们是否会在严格杂交条件下与互补寡核苷酸接头杂交。

[0255] 寡核苷酸接头的间隔区域充分隔开结合结构域与寡核苷酸交联位点。结合结构域起到通过核酸杂交将互补寡核苷酸接头序列标记的分子连接于结合结构域的作用。可在抗体-分析物(即,抗原)复合物形成前或后进行核酸介导的杂交,从而提供更灵活的试验形式。与许多直接抗体结合方法不同,将较小寡核苷酸连接于抗体或其它分子对抗体与其靶分析物的特异性亲和力,或结合分子的功能的影响最低。

[0256] 在一些实施方式中,寡核苷酸接头的签名序列(signature sequence)结构域可用于复杂的多重蛋白质试验中。可将多种抗体结合与含不同签名序列的寡核苷酸接头。在多重免疫测定中,用合适探针标记的报道寡核苷酸序列可用于检测多重试验形式中抗体与其

抗原之间的交叉反应性。

[0257] 可采用几种不同的方法将寡核苷酸接头结合于抗体或其它分子。例如,可以合成在 5' 或 3' 端含巯基的寡核苷酸接头。可利用还原剂(例如,TCEP-HCl)使巯基脱保护,可利用脱盐自旋柱(desalting spin column)纯化得到的接头。可利用异双功能交联接头,例如 SMCC 将得到的脱保护寡核苷酸接头结合于抗体或其它类型蛋白质的伯胺。或者,可用水溶性碳二亚胺 EDC 处理寡核苷酸上的 5' - 磷酸基团以形成磷酸酯,随后将其偶联于含胺的分子。在某些例子,可将 3' - 核糖残基上的二醇氧化成醛基,然后采用还原胺化将其结合于抗体或其它类型蛋白质上的胺基。在某些其它实施方式中,可将寡核苷酸接头合成为在 3' 或 5' 端具有生物素修饰,并结合于链霉亲和素标记的分子。

[0258] 可采用本领域已知,例如以下所述的那些技术合成寡核苷酸接头:Usman 等, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 :7845(1987); Scaringe 等, *Nucl. Acids Res.*, 18 :5433(1990); Wincott 等, *Nucl. Acids Res.*, 23 :2677-2684(1995); 和 Wincott 等, *Methods Mol. Bio.*, 74 :59(1997)。寡核苷酸的合成通常利用常规核酸保护和偶连基团,例如 5' - 端的二甲氧基三苯甲基和 3' - 端的亚磷酰胺。本领域技术人员已知寡核苷酸合成的合适试剂、核酸脱保护的方法和核酸纯化的方法。

[0259] 在某些例子中,用信号放大配对的第一成员直接标记活化状态 - 依赖性抗体。可采用本领域熟知的方法将信号放大配对成员偶联于活化状态依赖性抗体。在某些其它例子中,可通过结合于活化状态 - 依赖性抗体的结合配对的第一成员与结合于信号放大配对第一成员的结合配对的第二成员之间的结合作用,用信号放大配对的第一成员间接标记活化状态 - 依赖性抗体。可采用本领域熟知的方法将结合配对成员(例如,生物素 / 链霉亲和素)偶联于信号放大配对成员或活化状态 - 依赖性抗体。信号放大配对成员的例子包括但不限于:过氧化物酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶、氯过氧化物酶、细胞色素 c 过氧化物酶、嗜曙红细胞过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、乳过氧化物酶、髓过氧化物酶、甲状腺过氧化物酶、脱碘酶,等。信号放大配对成员的其它例子包括受保护基团保护的半抗原和通过硫醚与酶抑制剂连接而灭活的酶。

[0260] 在邻近传送(proximity channeling)的一个例子中,辅助部分是葡萄糖氧化酶(GO),信号放大配对的第一成员是辣根过氧化物酶(HRP)。当 GO 与底物,例如葡萄糖接触时,其产生氧化剂(即,过氧化氢(H_2O_2))。如果 HRP 的位置在 GO 附近,GO 产生的 H_2O_2 传送给 HRP 与之形成 HRP- H_2O_2 复合物,在有信号放大配对的第二成员(例如,化学发光底物,如氨基苯二酰肼或异氨基苯二酰肼或荧光底物,如酪酰胺(例如,生物素 - 酪酰胺)、高香草酸或 4- 羟苯基乙酸)存在下,其产生放大的信号。在邻近试验中利用 GO 和 HRP 的方法描述于,例如 Langry 等,美国能源部第 UCRL-ID-136797 号报道(1999)。当生物素 - 酪酰胺用作信号放大配对的第二成员时,HRP- H_2O_2 复合物氧化酪酰胺以产生共价结合附近的亲核残基的反应活性酪酰胺基团。活化的酪酰胺可直接检测或在加入信号检测试剂,例如链霉亲和素 - 标记的荧光团或链霉亲和素 - 标记的过氧化物酶和产色试剂的组合后检测。适用于本发明的荧光团的例子包括但不限于:Alexa Fluor[®]染料(例如,Alexa Fluor[®] 555)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、Oregon Green[™];罗丹明、德克萨斯红、异硫氰酸四罗丹明(TRITC)、CyDye[™] 荧光素(例如,Cy2、Cy3、Cy5)等。可采用本领域熟知的方法将链霉亲和素标记直接或间接偶联于荧光团或过氧化物酶。适用于本发明的产色试剂的非限制性例子

包括 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB)、3,3' - 二氨基联苯胺 (DAB)、2,2' - 连氨基 - 二(3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸) (ABTS)、4- 氯 -1- 萘酚 (4CN) 和 / 或卟啉原。

[0261] 在邻近传送的另一例子中,辅助部分是光敏剂,信号放大配对的第一成员是用多种半抗原标记的大分子,这些半抗原用保护基团保护以防止半抗原与特异性结合伴侣(例如,配体、抗体等)结合。例如,信号放大配对成员可以用受保护的生物素、香豆素和 / 或荧光分子标记的葡聚糖。合适的保护基团包括但不限于:苯氧基 -、analino-、烯炔 -、硫醚 - 和烯醚 - 保护基团。适用于本发明邻近试验的其它光敏剂和受保护的半抗原分子描述于美国专利号 5,807,675。当用光激发光敏剂时,其产生氧化剂(即,单态氧)。如果半抗原分子的位置在光敏剂附近,光敏剂产生的单态氧传送给半抗原保护基团上的硫醚并与之反应从而产生羰基(酮或醛)和亚磺酸,释放半抗原的保护基团。然后,未保护的半抗原可特异性结合信号放大配对的第二成员(例如,能产生可检测信号的特异性结合伴侣)。例如,当半抗原是生物素时,特异性结合伴侣可以是酶标记的链霉亲和素。示范性酶包括碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、HRP 等。洗涤除去未结合的试剂后,可通过加入酶的可检测(例如,荧光、化学发光、产色等)底物来产生可检测信号并采用合适方法及本领域已知的仪器进行检测。或者,可采用酪酰胺信号放大方法放大可检测信号,活化的酪酰胺可直接检测或在加入上述信号检测试剂后检测。

[0262] 在邻近传送的还有另一例子中,辅助部分是光敏剂,信号放大配对的第一成员是酶 - 抑制剂复合物。酶和抑制剂(例如,磷酸标记的葡聚糖)通过可切割接头(例如,硫醚)相连。当用光激发光敏剂时,其产生氧化剂(即,单态氧)。如果酶 - 抑制剂复合物的位置在光敏剂附近,光敏剂产生的单态氧与可切割接头沟通并与之反应从而释放酶的抑制剂,进而活化该酶。加入酶底物以产生可检测信号,或者加入放大试剂以产生放大信号。

[0263] 在邻近传送的进一步例子中,辅助部分是 HRP,信号放大配对的第一成员是上述受保护的半抗原或酶 - 抑制剂复合物,保护基团包括对 - 烷氧基苯酚。加入苯二胺和 H_2O_2 产生的反应活性苯二胺传送给受保护的半抗原或酶 - 抑制剂复合物并与对 - 烷氧基苯酚保护基团反应产生暴露的半抗原或反应活性酶。如上所述产生并检测放大的信号(参见,例如美国专利号 5,532,138 和 5,445,944)。

[0264] 进行本文所述邻近试验的示范性方案见实施例 4。

[0265] 在另一实施方式中,本发明提供进行上述邻近试验的试剂盒,其装有:(a) 局限于固体支持物上的多种捕捉抗体的稀释系列;和(b) 多种检测抗体(例如,不依赖活化状态的抗体和活化状态依赖性抗体)。在一些例子中,所述试剂盒还可装有利用所述试剂盒检测实体瘤的循环细胞的多种信号转导分子的活化状态的使用说明书。所述试剂盒还可装有实施本发明具体方法的任何上述额外试剂,例如信号放大配对的第一和第二成员、酪酰胺信号放大试剂、辅助部分的底物、洗涤缓冲液,等。

[0266] VII. 抗体的产生

[0267] 可采用几种方法产生和选择尚未能商品化购得的抗体以供根据本发明分析肿瘤细胞,例如稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态。例如,一种方法是采用本领域已知的表达和纯化方法来表达和 / 或纯化感兴趣多肽(即,抗原),而另一种方法是采用本领域已知的固相肽合成方法来合成感兴趣的多肽。参见,例如 Guide to Protein Purification(蛋白质纯化指南),Murray P. Deucher 编, Meth. Enzymol., 第 182 卷(1990);

Solid Phase Peptide Synthesis(固相肽合成), Greg B. Fields 编, Meth. Enzymol., 第 289 卷 (1997); Kiso 等, Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99(1990); Mostafavi 等, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); 和 Fujiwara 等, Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31(1996)。然后可将纯化或合成的多肽注射入, 例如小鼠或家兔中, 从而产生多克隆或单克隆抗体。本领域技术人员应知道可用许多方法制备抗体, 例如 Antibodies, A Laboratory Manual(抗体, 实验室手册), Harlow 和 Lane 编, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, (1988) 所述的。本领域技术人员还应知道还可通过各种方法从遗传信息制备模拟(例如, 保留功能性结合区)抗体的结合片段或 Fab 片段。参见, 例如 Antibody Engineering: A Practical Approach(抗体工程改造: 实用性方法), Borrebaeck 编, 牛津大学出版社, 牛津 (1995); 和 Huse 等, J. Immunol., 149:3914-3920(1992)。

[0268] 此外, 许多出版物报道了利用噬菌体展示技术产生和筛选结合所选靶抗原的多肽文库(参见, 例如 Cwirla 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382(1990); Devlin 等, Science, 249:404-406(1990); Scott 等, Science, 249:386-388(1990); 和 Ladner 等, 美国专利号 5,571,698)。噬菌体展示方法的基本概念是在噬菌体 DNA 编码的多肽和靶抗原之间建立物理关联。这种物理关联由噬菌体颗粒提供, 其展示作为衣壳一部分的多肽, 而该衣壳将编码该多肽的噬菌体基因组包裹在内。在多肽和它们的遗传材料之间建立物理关联能同时大规模筛选携带不同多肽的非常大量的噬菌体。展示对靶抗原具有亲和力的多肽的噬菌体结合该靶抗原, 通过对靶抗原的亲和力筛选富集这些噬菌体。可从这些噬菌体各自的基因组测定它们所展示多肽的身份。采用这些方法, 随后可通过常规方式大量合成经鉴定对所需靶抗原具有结合亲和力的多肽(参见, 例如美国专利号 6,057,098)。

[0269] 然后可通过针对感兴趣的纯化多肽抗原的亲和力和特异性的第一筛选以及比较(如果需要)抗体与不需要结合的其他多肽抗原的亲和力和特异性来选择这些方法产生的抗体。筛选方法可涉及将纯化的多肽抗原固定在微量滴定板不同的孔中。然后将含有潜在抗体或抗体组的溶液替换入各自的微量滴定板孔中, 并温育约 30 分钟到 2 小时。然后洗涤微量滴定板孔, 将标记的二抗(例如, 结合于碱性磷酸酶的抗-小鼠抗体, 如果产生的抗体是小鼠抗体的话)加入各孔并温育约 30 分钟, 然后洗涤。将底物加入各孔, 固定的多肽抗原的抗体存在之处显示颜色反应。

[0270] 然后进一步分析如此鉴定的抗体的亲和力和特异性。在靶蛋白质免疫测定的开发中, 纯化的靶蛋白质用作标准品, 用其判断利用所选择的抗体的免疫测定的灵敏度和特异性。由于各种抗体的结合亲和力可能不同, 例如某些抗体组合可能在空间上彼此干扰, 抗体的试验性能可能是比该抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0271] 本领域技术人员应知道可采用许多方法制备抗体或结合片段, 并筛选和选择其于各种感兴趣多肽的亲和力和特异性, 但这些方法不改变本发明的范围。

[0272] A. 多克隆抗体

[0273] 优选通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射感兴趣的多肽和佐剂在动物中产生多克隆抗体。利用双功能或衍生试剂将感兴趣的多肽与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质运载体, 例如匙孔蛾血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂结合可能是有用的。双功能或衍生试剂的非限制性例子包括马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀

珀酰亚胺（通过赖氨酸残基结合）、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 和 $\text{R}_1\text{N} = \text{C} = \text{NR}$ ，其中 R 和 R_1 是不同的烷基。

[0274] 通过混合，例如 $100 \mu\text{g}$ （对于家兔）或 $5 \mu\text{g}$ （对于小鼠）抗原或偶联抗原与 3 体积完全弗氏佐剂并将该溶液在多个部位真皮下注射，从而用感兴趣多肽或其免疫原性偶联物或衍生物免疫动物。一个月后，通过在多个部位用约 1/5 到 1/10 原始体积的不完全弗氏佐剂配制的多肽或偶联物进行皮下注射来加强动物。7-14 天后，对动物采血，检验血清的抗体滴度。通常加强动物直至滴度升高至平台。优选相同多肽的偶联物加强动物，但也可采用与不同免疫原性蛋白质缀合和 / 或通过不同的交联剂偶联。还可在重组细胞培养物中将偶联物制备成融合蛋白。在某些例子中，凝聚剂，例如明矾可用于增强免疫应答。

[0275] B. 单克隆抗体

[0276] 通常从基本上均质的抗体群体获得单克隆抗体，即，除了可能存在极少量的可能天然产生的突变外，构成该群体的各抗体是相同的。因此，修饰语“单克隆”表明该抗体的性质不是不同抗体的混合物。例如，可采用 Kohler 等 (Nature, 256 :495 (1975)) 所述的杂交瘤方法或本领域已知的任何重组 DNA 方法（参见，例如美国专利号 4, 816, 567）制备单克隆抗体。

[0277] 在杂交瘤方法中，如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物（例如，仓鼠）以激发产生或能产生特异性结合免疫所用感兴趣多肽的抗体的淋巴细胞。或者，体外免疫淋巴细胞。然后利用合适的融合剂，例如聚乙二醇将免疫的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞（参见，例如 Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice (单克隆抗体 :原理和实施)，学术出版社 (Academic Press)，第 59-103 页 (1986))。将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种并培养，所述培养基优选含有抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT)，杂交瘤细胞的培养基通常含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基) 以防止 HGPRT- 缺陷型细胞生长。

[0278] 优选的骨髓瘤细胞是有效融合、支持选择的抗体产生细胞稳定而高水平地产生抗体和 / 或对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的那些细胞。产生人单克隆抗体的这种优选骨髓瘤细胞系的例子包括但不限于：小鼠骨髓瘤谱系，例如衍生自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些（得自加利福尼亚州圣迭戈索尔克研究院细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center ;San Diego, CA))、SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞（得自马里兰州洛克维尔的美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection ;Rockville, MD))、和人骨髓瘤或小鼠 - 人异质骨髓瘤 (heteromyeloma) 细胞系（参见，例如 Kozbor, J. Immunol. , 133 :3001 (1984) ; 和 Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (单克隆抗体制备技术和应用)，MD 公司 (Marcel Dekker, Inc.)，纽约，第 51-63 页 (1987))。

[0279] 检验培养杂交瘤细胞的培养基中产生的针对感兴趣多肽的单克隆抗体。优选通过免疫沉淀或体外结合试验，例如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。可采用，例如 Munson 等 (Anal. Biochem. , 107 : 220 (1980)) 的 Scatchard 分析测定单克隆抗体的结合亲和力。

[0280] 杂交瘤细胞鉴定为产生具有所需特异性、亲和力和 / 或活性的抗体后，可通过有

限稀释方法亚克隆诸克隆并通过标准方法培养（参见，例如 Goding, 单克隆抗体：原理和实践，学术出版社，第 59-103 页（1986））。用于该目的合适培养基包括，例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外，杂交瘤细胞可在动物中体内生长成腹水肿瘤。可通过常规抗体纯化方法，例如 A 蛋白-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水或血清中分离亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0281] 不难采用常规方法（例如，利用能特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）分离和测序编码单克隆抗体的 DNA。杂交瘤细胞用作这种 DNA 的优选来源。一旦分离，可将 DNA 置于表达载体中，然后转染入不会产抗体的宿主细胞，例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞或骨髓瘤细胞，从而诱导重组宿主细胞合成单克隆抗体。参见，例如 Skerra 等，*Curr. Opin. Immunol.*, 5 :256-262(1993)；和 Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130 :151-188(1992)。还可通过，例如用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列（参见，例如美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :6851(1984)），或通过非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列共价连接于免疫球蛋白编码序列来修饰 DNA。

[0282] 在进一步的实施方式中，可从采用以下文献描述的技术产生的抗体噬菌体文库分离单克隆抗体或抗体片段，例如 McCafferty 等，*Nature*, 348 :552-554(1990)；Clackson 等，*Nature*, 352 :624-628(1991)；和 Marks 等，*J. Mol. Biol.*, 222 :581-597(1991)。通过链改组产生高亲和力（nM 范围）人单克隆抗体描述于 Marks 等，*BioTechnology*, 10 :779-783(1992)。采用组合感染和体内重组作为构建极大噬菌体文库的方案描述于 Waterhouse 等，*Nuc. Acids Res.*, 21 :2265-2266(1993)。因此，这些技术是产生单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤方法的可行备选方案。

[0283] C. 人源化抗体

[0284] 人源化非人抗体的方法是本领域已知的。人源化抗体优选引入了非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称为“输入”残基，它们通常取自“输入”可变区。基本上通过用非人抗体的超变区序列取代人抗体的相应序列进行人源化。参见，例如 Jones 等，*Nature*, 321 :522-525(1986)；Riechmann 等，*Nature*, 332 :323-327(1988)；和 Verhoeyen 等，*Science*, 239 :1534-1536(1988)。因此，这种“人源化”抗体是嵌合型抗体（参见，例如美国专利号 4,816,567），其中基本上短于完整的人可变区被非人种类的相应序列取代。实际上，人源化抗体通常是其中一些超变区残基和可能的一些框架区（FR）残基被啮齿类抗体的类似部位残基取代的人抗体。

[0285] 选择用于制备本文所述人源化抗体的人轻链和重链可变区是降低抗原性重点考虑的问题。根据所谓的“最佳-拟合”方法，对已知人可变区序列的整个文库筛选啮齿类抗体的可变区序列。然后，认可最接近啮齿类序列的人序列为人源化抗体的人 FR（参见，例如 Sims 等，*J. Immunol.*, 151 :2296(1993)；和 Chothia 等，*J. Mol. Biol.*, 196 :901(1987)）。另一方法利用衍生自轻链或重链特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定 FR。相同的 FR 可用于几种不同的人源化抗体（参见，例如 Carter 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 :4285(1992)；和 Presta 等，*J. Immunol.*, 151 :2623(1993)）。

[0286] 人源化的抗体保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性也是重要的。为实现此目的，可利用亲代和人源化序列的三维模型，通过分析亲代序列和各种概念人源化产

物的方法制备人源化抗体。通常可获得三维免疫球蛋白模型,这些模型是本领域技术人员熟悉的。可获得阐明和显示所选择候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示结果能分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中可能的作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的残基。以此方式,可从受者和输入序列选择 FR 残基,并组合,从而实现所需的抗体性质,例如对靶抗原的亲合力增加。超变区残基通常直接或特异性地影响抗原结合。

[0287] 本发明考虑了各种形式的人源化抗体。例如,人源化抗体可以是抗体片段,例如 Fab 片段。或者,人源化抗体可以是完整的抗体,例如完整的 IgA、IgG 或 IgM 抗体。

[0288] D. 人抗体

[0289] 作为人源化的备选方案,可产生人抗体。在一些实施方式中,可产生转基因动物(例如,小鼠),免疫后其能在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生完全的人抗体库。例如,已有报道说嵌合型和种系突变型小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失完全抑制了内源性抗体产生。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移入这种种系突变型小鼠将导致在抗原刺激后产生人抗体。参见,例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993); Jakobovits 等, Nature, 362 :255-258(1993); Bruggermann 等, Year in Immun., 7 :33(1993); 和美国专利号 5,591,669、5,589,369 和 5,545,807。

[0290] 或者,可采用噬菌体展示技术(参见,例如 McCafferty 等, Nature, 348 :552-553(1990)),利用未免疫供者的免疫球蛋白可变(V)区基因库在体外产生人抗体和抗体片段。按照该技术,将抗体 V 结构域基因框内克隆入丝状噬菌体,例如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因,并在噬菌体颗粒的表面上展示为功能抗体片段。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,根据抗体的功能特性进行选择还可选择编码显示那些特性的抗体的基因。因此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。可以各种形式进行噬菌体展示,如 Johnson 等(Curr. Opin. Struct. Biol., 3 :564-571(1993))所述。一些来源的 V-基因区段可用于噬菌体展示。参见,例如 Clackson 等, Nature, 352 :624-628(1991)。可构建未免疫人供者的 V 基因库,基本上可按照下述技术分离针对不同抗原阵列(包括自体抗原)的抗体: Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991); Griffith 等, EMBO J., 12 :725-734(1993); 和美国专利号 5,565,332 和 5,573,905。

[0291] 在某些例子中,可如美国专利号 5,567,610 和 5,229,275 所述通过体外活化的 B 细胞产生人抗体。

[0292] E. 抗体片段

[0293] 现已开发了各种技术产生抗体片段。这些片段通常由蛋白水解消化完整的抗体而获得(参见,例如 Morimoto 等, J. Biochem. Biophys. Meth., 24 :107-117(1992); 和 Brennan 等, Science, 229 :81(1985))。然而,目前可利用重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可从上述抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者,可从大肠杆菌细胞直接回收 Fab' -SH 片段并将其化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段(参见,例如 Carter 等, BioTechnology, 10 :163-167(1992))。按照另一方法,可从重组宿主细胞培养物直接分离 F(ab')₂ 片段。本领域技术人员知道产生抗体片段的其它技术。在其它实施方式中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见,例如 PCT 公布号 W0 93/16185; 和美国专利号 5,571,894 及 5,587,458。抗体片段还可以是如美国专利号 5,641,870 所述的线形抗体。这种线形抗体片段可以是单特

异性或双特异性的。

[0294] F. 双特异性抗体

[0295] 双特异性抗体是对至少两种不同的表位具有结合特异性的抗体。示范性双特异性抗体可结合同一感兴趣多肽的两个不同表位。其它双特异性抗体可组合了感兴趣多肽的结合位点与一种或多种其它抗原的结合位点。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段（例如， $F(ab')_2$ 双特异性抗体）。

[0296] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的传统制备方法基于共同表达两个免疫球蛋白重链-轻链配对，其中该两条链具有不同特异性（参见，例如 Millstein 等，*Nature*, 305 :537-539 (1983)）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤）可能产生 10 种不同抗体分子的混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常采用亲和层析纯化正确的分子。PCT 公布号 WO 93/08829 和 Traunecker 等，*EMBO J.*, 10 :3655-3659 (1991) 中描述了类似的方法。

[0297] 按照不同的方法，具有所需结合特异性的抗体可变区（抗体-抗原结合位点）融合于免疫球蛋白恒定区序列。优选与免疫球蛋白重链恒定区进行融合，从而包含 CH2 和 CH3 区、绞链区的至少一部分。优选在至少一种融合物中存在含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区（CH1）。将编码免疫球蛋白重链融合物和免疫球蛋白轻链（如果需要）的 DNA 插入不同表达载体，共同转染入合适的宿主生物。在利用不同比例的这三种多肽链进行构建以提供最佳产量的实施方式中，如此操作为调节这三种多肽链的相互比例提供了很大的灵活性。然而，当相同比例的至少两种多肽链的表达导致高产量或当这些比例没有特别意义时，可能将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0298] 在该方法的优选实施方式中，构成双特异性抗体的一条臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链，另一臂为杂交免疫球蛋白重链-轻链配对（提供第二结合特异性）。这种不对称的结构有助于分开所需双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合，因为只在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了方便的分离方法。参见，例如 PCT 公布号 WO 94/04690 和 Suresh 等，*Meth. Enzymol.*, 121 :210 (1986)。

[0299] 按照美国专利号 5, 731, 168 所述的另一方法，可工程改造一对抗体分子之间的界面以尽可能提高从重组细胞培养物中回收的异源二聚体百分比。优选的界面包括抗体恒定区的 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中，第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大侧链（例如，酪氨酸或色氨酸）替代。通过用较小的氨基酸侧链（例如，丙氨酸或苏氨酸）替代大的在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这为提高异质二聚体的产量超过其它不良终产物，例如同质二聚体提供了机制。

[0300] 双特异性抗体包括交联的或“异质偶联”抗体。例如，异质偶联物中的抗体之一可偶联于亲和素，另一种看偶联于生物素。可采用方便的交联方法制备异质偶联物抗体。合适的交联剂和技术是本领域熟知的，其描述于，例如美国专利号 4, 676, 980。

[0301] 本领域还知道从抗体片段产生双特异性抗体的合适技术。例如，可采用化学连接制备双特异性抗体。在某些例子中，可通过将完整抗体蛋白水解切割以产生 $F(ab')_2$ 片段的方法产生双特异性抗体（参见，例如 Brennan 等，*Science*, 229 :81 (1985)）。在有二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下还原这些片段以稳定邻近的二硫醇并阻止分子间二硫键形成。然后将产生的 Fab' 片段转变成巯基硝基苯甲酸酯（thionitrobenzoate）(TNB) 衍生物。然

后通过巯基乙胺还原将 Fab' -TNB 衍生物之一再转变成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一 Fab' -TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。

[0302] 在一些实施方式中,可从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段,将其化学偶联以形成双特异性抗体。例如,可通过 Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992) 所述的方法制备完全人源化双特异性抗体 F(ab')₂ 分子。各 Fab' 片段分别从大肠杆菌细胞分泌,对其进行体外化学偶联以形成双特异性抗体。

[0303] 从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已描述。例如,现已利用亮氨酸拉链制备了双特异性抗体。参见,例如 Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148 :1547-1553 (1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白质的亮氨酸拉链肽通过基因融合连接于两种不同抗体的 Fab' 部分。在绞链区还原该抗体同质二聚体从而形成单体,然后将之再氧化以形成抗体异质二聚体。该方法还可用于产生抗体二聚体。Hollinger 等 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :6444-6448 (1993)) 所述的“二抗体 (diabody)”技术为制备双特异性抗体片段提供了其它机制。这些片段包含通过接头与轻链可变区相连的重链可变区 (VH),所述接头太短从而不能在同一链的两个结构域之间形成配对。因此,一个片段的 VH 和 VL 结构域被迫与另一片段的互补 VL 和 VH 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。利用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一方案描述于 Gruber 等, *J. Immunol.*, 152 :5368 (1994)。

[0304] 还考虑了两价以上的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。参见,例如 Tutt 等, *J. Immunol.*, 147 :60 (1991)。

[0305] G. 抗体纯化

[0306] 当采用重组技术时,抗体可在分离的宿主细胞内、宿主细胞的周质空间中产生,或从宿主细胞直接分泌到培养基中。如果抗体在胞内产生,首先通过,例如离心或超滤除去颗粒物碎片。Carter 等 (*BioTech.*, 10 :163-167 (1992)) 描述了分泌入大肠杆菌周质空间中的抗体的分离方法。简言之,在有乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 存在下,将细胞糊 (cell paste) 融化约 30 分钟。可通过离心除去细胞碎片。当抗体分泌入培养基时,通常利用可商品化购得的蛋白质浓缩过滤器,例如阿米康 (Amicon) 或 MP 超滤单元 (Millipore Pellicon ultrafiltration unit) 浓缩这种表达系统的上清液。前述任一步骤中可包含蛋白酶抑制剂,例如 PMSF 来抑制蛋白水解,还可包含抗生素来防止外来污染物的生长。

[0307] 可采用,例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析纯化从细胞制备的抗体组合物。A 蛋白作为亲和配体是否合适取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。可利用 A 蛋白纯化基于人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链的抗体 (参见,例如 Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.*, 62 :1-13 (1983))。对于所有小鼠同种型和人 γ 3,推荐 G 蛋白 (参见,例如 Guss 等, *EMBO J.*, 5 :1567-1575 (1986))。连接亲和配体的基质多为琼脂糖,但其它基质也可用。与琼脂糖相比,机械上稳定的基质,例如可控多孔玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯基) 苯的流速较快和加工时间较短。如果抗体包含 CH3 结构域,新泽西州菲利普斯勃格市 JTB 公司 (J. T. Baker ;Phillipsburg, N. J.) 的 Bakerbond ABX™ 树脂可用于纯化。根据待回收的抗体,还可采用蛋白质纯化的其它技术,例如用离子交换柱分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、二氧化硅层析、肝素 SEPHAROSE™ 层析、阴离子或阳离子交换树脂 (例如,聚天冬氨酸柱) 层析、色谱聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0308] 任何初步纯化步骤后,可利用 pH 介于约 2.5-4.5 之间的洗脱缓冲液对包含感兴趣抗体和污染物的混合物施以低 pH 疏水相互作用层析,优选在低盐浓度下(例如,约 0-0.25M 盐)进行。

[0309] 本领域技术人员应知道具有与抗体相似功能的任何结合分子,例如样品中一种或多种感兴趣分析物的特异性结合分子或结合伴侣也可用于本发明方法和组合物中。合适的抗体-样分子的例子包括但不限于:结构域抗体(domain antibody)、单片式抗体(unibody)、纳米抗体(nanobody)、鲨抗原反应活性蛋白质(shark antigen reactive protein)、埃微末(avimers)、阿德耐汀(adnectins)、抗静(anticalms)、亲和配体、菲勒末(phyloimers)、适体、埃飞体(affibodies)、特里耐汀(trinectins)等。

[0310] VIII. 给药方法

[0311] 按照本发明方法,通过本领域已知的任何便利方法将本文所述的抗癌症药物给予对象。可采用本发明方法为治疗对象的肿瘤(例如,肺肿瘤)选择合适抗癌症药物或抗癌症药物组合。此外,本发明方法可用于选择具有肿瘤(例如,肺肿瘤)的对象,该对象是用抗癌症药物或抗癌症药物组合治疗的合适候选对象。本发明方法还可用于鉴定对象中肿瘤(例如,肺肿瘤)对抗癌症药物或抗癌症药物组合治疗的反应。此外,可采用本发明方法预测具有肿瘤(例如,肺肿瘤)的对象对抗癌症药物或抗癌症药物组合治疗的反应。本领域技术人员应知道本文所述的抗癌症药物可单独给予或作为组合治疗方法的一部分与常规化疗、放疗、激素治疗、免疫治疗和/或外科手术一起给予。

[0312] 在某些实施方式中,抗癌症药物包括抗信号转导剂(即,细胞稳定药),例如单克隆抗体或酪氨酸激酶抑制剂;抗-增殖剂;化疗剂(即,细胞毒性药物);放疗剂;疫苗;和/或能减少或消除异常细胞,例如癌性细胞的不受控生长的任何其它化合物。在一些实施方式中,联用抗-信号转导剂和/或抗-增殖剂与一种或多种化疗剂治疗对象。示范性单克隆抗体、酪氨酸激酶抑制剂、抗-增殖剂、化疗剂、放疗剂和疫苗如上所述。

[0313] 本文所述抗癌症药物还可与常规激素剂,包括但不限于类固醇(例如,地塞米松)、非那司提、芳香酶抑制剂、他莫昔芬和促性腺激素释放激素激动剂(GnRH),例如戈舍瑞林共同给予。

[0314] 此外,本文所述抗癌症药物还可与常规免疫治疗剂共同给予,所述免疫治疗剂包括但不限于:免疫兴奋剂(例如,卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白介素-2、 α -干扰素等)、免疫毒素(例如,抗-CD33 单克隆抗体-刺孢霉素偶联物、抗-CD22 单克隆抗体-假单胞菌外毒素偶联物等)、和放射性免疫治疗剂(例如,与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 偶联的抗-CD20 单克隆抗体等)。

[0315] 抗癌症药物可视需要与合适的药物赋形剂一起给予,可通过任何接受的给药方式进行。因此,给药可以是,例如口服、口腔含化、舌下、经牙龈、经上颚、静脉内、局部、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、胃肠外、小动脉内、真皮内、心室内、颅内、腹膜内、膀胱内、鞘内、病损内、鼻内、经直肠、经阴道、或通过吸入。“共同-给予”表示在给予第二药物(例如,另一种抗癌症药物、用于减轻抗癌症药物副作用的药物、放疗剂、激素治疗剂、免疫治疗剂等)的同时,或恰在之前或恰在之后给予抗癌症药物。

[0316] 可反复给予治疗有效量的抗癌症药物,例如至少 2、3、4、5、6、7、8 或更多次,或者可通过连续输注给予该剂量。剂型可采取固体、半固体、冻干粉末或液体剂型,例如片剂、丸

剂、小药丸、胶囊、粉末、溶液、混悬液、乳液、栓剂、驻留灌肠剂 (retention enemas)、乳膏、软膏、洗剂、凝胶、气溶胶、泡沫等, 优选适于单次给予精确剂量的单位剂型。

[0317] 本文所用的术语“单位剂型”包括适合用作人对象和其它哺乳动物的单位剂量的物理上离散的单位, 各单位含有经计算能产生所需起效、耐受性和 / 或疗效的预定量抗癌症药物, 连同合适的药物赋形剂 (例如, 安瓿)。此外, 可制备更浓缩的剂型, 然后可从中制备更稀释的单位剂型。因此, 更浓缩的剂型可含有基本上多于, 例如至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多倍的抗癌症药物用量。

[0318] 本领域技术人员已知制备这种剂型的方法 (参见, 例如 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES (雷明顿药物科学), 第 18 版, 马克出版公司 (Mack Publishing Co.), 伊斯顿 (Easton), 宾夕法尼州 (1990))。剂型通常包含常规药物运载体或赋形剂, 还可包含其它医学制剂、运载体、佐剂、稀释剂、组织渗透增强剂、增溶剂等。可通过本领域熟知的方法改进合适的赋形剂以适合聚体剂型和给药途径 (参见, 例如雷明顿药物科学, 同上)。

[0319] 合适赋形剂的例子包括但不限于: 乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄耆胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、和聚丙烯酸, 例如卡巴浦尔 (Carbopol), 如卡巴浦尔 941、卡巴浦尔 980、卡巴浦尔 981 等。这些剂型还可包含润滑剂, 例如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油; 润湿剂; 乳化剂; 助悬剂; 防腐剂, 例如羟基苯甲酸甲酯、乙酯和丙酯 (即, 对羟基苯甲酸酯类); pH 调节剂, 例如无机和有机酸和碱; 甜味剂; 和调味剂。这些剂型还可包含生物可降解的聚合物珠、葡聚糖和环糊精包埋复合物。

[0320] 对于口服给药, 治疗有效剂量可以是片剂、胶囊、乳剂、混悬液、溶液、糖浆、喷雾剂、锭剂、粉末和缓释剂型的形式。用于口服给药的合适赋形剂包括药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠 (sodium saccharine)、滑石粉、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0321] 在一些实施方式中, 治疗有效剂量采取丸剂、片剂或胶囊的形式, 因此, 该剂型可含有以下任何试剂以及抗癌症药物: 稀释剂, 例如乳糖、蔗糖、磷酸二钙等; 崩解剂, 例如淀粉或其衍生物; 润滑剂, 例如硬脂酸镁等; 和粘合剂, 例如淀粉、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、纤维素及其衍生物。还可将抗癌症药物配制成置于, 例如聚乙二醇 (PEG) 运载体中的栓剂。

[0322] 可将抗癌症药物和任选的一种或多种药学上可接受的佐剂分散或溶解于运载体, 例如盐水 (例如, 0.9% w/v 氯化钠)、水性右旋糖、甘油、乙醇等中来制备液体剂型, 从而形成用于, 例如口服、局部或静脉内给药的溶液或混悬液。还可将抗癌症药物配制成驻留灌肠剂。

[0323] 对于局部给药, 治疗有效剂量可采取乳剂、洗剂、凝胶、泡沫、乳膏、凝胶剂、溶液、混悬液、软膏和经皮贴剂的形式。对于通过吸入给药, 可将抗癌症药物作为干粉或以液体形式经喷雾剂递送。对于胃肠外给药, 治疗有效剂量可采取无菌可注射溶液和无菌包装粉末的形式。优选配制成 pH 约 4.5- 约 7.5 的可注射溶液。

[0324] 还可采用冻干形式提供治疗有效剂量。这种剂型可包含缓冲液, 例如碳酸氢盐, 以便在给予前重建, 或者可以在冻干剂型中包含所述缓冲液以使用, 例如水重建。冻干剂型还

可包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。可在注射器中提供冻干剂型,任选与用于重建的缓冲液一起包装,从而可将重建的剂型立即给予对象。

[0325] 还可以定期的时间间隔监测对象以评估某些治疗方案的效力。例如,某些信号转导分子的活化状态可根据用本文所述一种或多种抗癌症药物治疗的疗效而改变。可监测对象以评估反应和了解某些药物或治疗在个体化方法中的作用。此外,最初对特定抗癌症药物或抗癌症药物组合有反应的对象可变得对该药物或药物组合难治,提示这些对象产生了获得性耐药。可停止这些对象的当前治疗,并按照本发明方法开出备选治疗的处方。

[0326] 在某些其它例子中,通过引用纳入本文的 WO 2008/036802 公开了实施多重高通量免疫测定的方法和蛋白质阵列。该申请公开了用于检测稀少循环细胞中多种信号转导分子的活化状态和 / 或总量的抗体阵列和利用这种阵列帮助癌症预后和诊断以及个性化靶向治疗设计的方法。该申请还公开了包含局限于“可寻址”或“邮政编码”阵列中的多种捕捉分子的支持物表面。该阵列的各不同区域包含特异性结合存在于不依赖活化状态的检测抗体或活化状态依赖性抗体上的捕捉标签的独特捕捉试剂,从而将有标签的检测抗体局限和布置在阵列中。在优选的实施方式中,捕捉制剂和捕捉标签是彼此特异性杂交的寡核苷酸。

[0327] IX. 实施例

[0328] 提供以下实施例是为了说明,而非限制本发明。

[0329] 实施例 1. 循环细胞的分离、刺激和裂解

[0330] 实体瘤的循环细胞包括从实体瘤转移或微小转移的细胞,包括循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞(CSC)和 / 或迁移至肿瘤的细胞(例如,循环内皮祖细胞(CEPC)、循环内皮细胞(CEC)、循环前-血管原性髓细胞、循环树突细胞等)。可从任何可获得的生物液体(例如,血液、尿液、乳头抽吸物、淋巴、唾液、细针抽吸物等)获得含循环细胞的患者样品。可采用一种或多种分离方法,例如免疫磁性分离(参见,例如 Racila 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :4589-4594(1998); Bilkenroth 等, Int. J. Cancer, 92 :577-582(2001))、宾夕法尼亚州亨廷顿谷的伊缪尼康公司的 CellTrack™ 系统、微流体分离(参见,例如 Mohamed 等, IEEE Trans. Nanobiosci., 3 :251-256(2004); Lin 等, 第 5147 号摘要, 第 97 届 AACR 年会, 华盛顿, 哥伦比亚特区, (2006))、FACS(参见,例如 Mancuso 等, Blood, 97 :3658-3661(2001))、密度梯度离心(参见,例如 Baker 等, Clin. Cancer Res., 13 :4865-4871(2003))和消除法(参见,例如 Meye 等, Int. J. Oncol., 21 :521-530(2002))分离患者样品的循环细胞。

[0331] 手工分离 CTC:

[0332] CTC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行以下活化试验:

[0333] 1) 利用已结合于抗 -EpCAM 单克隆抗体(科地亚生命科学公司(KordiaLife Sciences); 莱顿(Leiden), 荷兰)的磁珠(Dyna1 M450; 戴纳公司(Dyna1AS); 奥斯陆, 挪威)。

[0334] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0335] 3) 将 25 μ l 预-包被的 Dyna 珠加入 1ml 样品中。

[0336] 4) 将混合物在 2-8°C 温育 20 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0337] 5) 将试管置于磁性分离器(MPL-1 磁体)中 2 分钟。

[0338] 6) 弃去上清液,通过悬浮在含 0.01% BSA 的 PBS 中洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0339] 7) 将样品重悬在 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0340] 样品制备：

[0341] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免被刺穿的静脉所释放的上皮细胞污染。

[0342] 2) 在使用前用 0.9% NaCl 将 1ml 全血作 1 : 3 稀释。

[0343] 对照品制备：

[0344] 1) 通过将人癌细胞系掺加入 HL-60 细胞来制备细胞系对照。

[0345] 2) 细胞系对照的使用浓度为 2.5×10^6 个细胞 / 毫升。

[0346] 手工分离 CEC 和 CEPC：

[0347] 作为非限制性例子,可采用 Beerepoot 等 (Ann. Oncology, 15 :139-145 (2004)) 所述的免疫磁性分离 / 富集技术分离存活的 CEC 和 CEPC。简言之将外周血与已结合了抗 -CD146 单克隆抗体 (科地亚生命科学公司) 的磁珠 (Dyna1 M450Ig_G₁) 温育。该抗体识别外周血中内皮细胞的所有谱系,但不识别造血或上皮细胞 (George 等, J. Immunol. Meth., 139 :65-75 (1991))。可先进行造血和上皮细胞的负选择,再用结合有合适抗体的磁珠 (例如,用于消除白细胞的 Dyna1-CD45 珠,用于消除单核细胞的 Dyna1-CD14 珠,用于消除上皮细胞的 Dyna1-EpCAM (加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司 (Invitrogen, Carlsbad, CA)) 进行正选择。在该实施例中,只采用正选择。

[0348] CEC 和 CEPC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行以下活化试验：

[0349] 1) 利用已结合于抗 -CD146 单克隆抗体 (科地亚生命科学公司) 的磁珠 (Dyna1 M450)。

[0350] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包装的 Dyna 珠一次。

[0351] 3) 将 25 μ l 预 - 包装的 Dyna 珠加入 1ml 样品中。

[0352] 4) 将混合物在 2-8°C 温育 20 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0353] 5) 将试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中 2 分钟。

[0354] 6) 弃去上清液,通过悬浮在含 0.01% BSA 的 PBS 中洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0355] 7) 将样品重悬在 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0356] 样品制备：

[0357] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免被刺穿的静脉所释放的内皮细胞污染。

[0358] 2) 在使用前用 0.9% NaCl 将 1ml 全血作 1 : 3 稀释。

[0359] 对照品制备：

[0360] 1) 通过将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 掺加入 HL-60 细胞来制备细胞系对照。

[0361] 2) 细胞系对照的使用浓度为 2.5×10^6 个细胞 / 毫升。

[0362] 手工分离 CEPC (无 CEC)：

[0363] CEPC 是能对各种血管原性生长因子起反应而分化成成熟内皮细胞的骨髓衍生祖细胞的循环亚型。可利用识别表面标记 CD34 的抗体进行选择来分离 CEPC。CD133 是区别不成熟的内皮祖细胞 (EPC) 或原始造血干细胞 (HSC) 与 CEPC 的表面标记。利用贴壁培养或磁珠分离不同来源 CEPC 的各种方法已见描述。在该实施例,采用 Asahara 等 (Science,

275 :964-967(1997)) 描述的改进方案。

[0364] CEPC 的免疫磁性分离 - 手工分离后进行活化试验 :

[0365] 1) 利用磁珠 (Dyna1 M450CD34)。用 CD34 表面抗原的特异性单克隆抗体包被这些珠。

[0366] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0367] 3) 将 25 μ l 预 - 包被的 Dyna 珠加入 1ml 样品中。

[0368] 4) 将混合物在 2-8 $^{\circ}$ C 温育 20 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0369] 5) 将试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中 2 分钟。

[0370] 6) 弃去上清液,通过悬浮在含 0.01% BSA 的 PBS 中洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0371] 7) 将样品重悬在 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0372] 样品制备 :

[0373] 1) 将人对象的外周血抽入含 1mg/ml EDTA 的硅化试管中。弃去最初的 3-5ml 以免被刺穿的静脉所释放的内皮细胞污染。

[0374] 2) 在使用前用平衡盐溶液将 10ml 血液作 1 : 1 稀释。

[0375] 3) 将 4ml 稀释的血液叠加在 10ml 试管中的 3ml Ficoll-Paque 上。

[0376] 4) 18-20 $^{\circ}$ C,以 400xg 离心试管 30-40 分钟。

[0377] 5) 利用无菌的巴斯德移液管取出含血浆和血小板的上层,不打散界面处的单核的细胞层。

[0378] 6) 利用无菌移液管将单核的细胞转移至无菌离心管。

[0379] 7) 加入 6ml 平衡盐溶液,小心地重悬细胞。

[0380] 8) 18-20 $^{\circ}$ C,以 60-100x g 离心混合物 10 分钟。

[0381] 9) 取出上清液,将各试管的单核的细胞重悬在 1ml PBS。

[0382] 利用维里德克丝系统分离 CTC、CEC 和 CEPC :

[0383] 新泽西州沃伦市维里德克丝公司 (Veridex, Warren, NJ) 出售 CellSearch 系统,其由 CellPrep 系统、CellSearch 上皮细胞试剂盒和 CellSpotter 分析仪构成。CellPrep 系统是半自动样品制备系统 (Kagan 等, J. Clin. Ligand Assay, 25 :104-110(2002))。CellSearch 上皮细胞试剂盒由以下部分构成 :包被上皮细胞特异性的抗 -EpCAM 抗体的铁磁流体 ;针对细胞角蛋白 8、18 和 19 的藻红蛋白 - 偶联抗体 ;偶联别藻蓝蛋白的抗 -CD45 抗体 ;DAPI 染料 ;和用于洗涤、透化和重悬细胞的缓冲液。该实施例所用方案还描述于 Allard 等, Clin. Cancer Res. , 10 :6897-6904(2004)。完整的维里德克丝系统可用于 CTC 计数,或者通过在 CellPrep 系统分离后手工除去样品,完整的维里德克丝系统可提供分离方法,然后分析途径的活化状况。CTC 的数量可为算法开发提供信息。

[0384] 维里德克丝系统 -CTC 富集后进行计数 :

[0385] 1) 将 7.5ml 血液与 6ml 缓冲液混合,800xg 离心 10 分钟,并置于 CellPrep 系统上。

[0386] 2) 仪器抽出上清液后,仪器加入铁磁流体。

[0387] 3) 该仪器进行温育和随后的磁性分离步骤。

[0388] 4) 吸出未结合的细胞和其余血浆。

[0389] 5) 加入染色试剂连同透化缓冲液以便进行荧光染色。

[0390] 6) 该体系温育后,再次磁性分离细胞并重悬在 MagNest 细胞沉淀装置 (MagNest Cell Presentation Device) 中以便利用 CellSpotter 分析仪作分析。

[0391] 7) 将该装置置于 CellSpotter 分析仪 (一种 4-色半自动荧光显微镜) 中。

[0392] 8) 获取符合维里德克丝规定标准的图像,通过网络浏览器显示以供最终的手工选择。

[0393] 9) 细胞计数的结果表示为每 7.5ml 血液的细胞数量。

[0394] 维里德克丝系统 -CTC 富集后进行活化试验:

[0395] 1) 将 7.5ml 血液与 6ml 缓冲液混合,800xg 离心 10 分钟,并置于 CellPrep 系统上。

[0396] 2) 仪器抽出上清液后,仪器加入铁磁流体。

[0397] 3) 该仪器进行温育和随后的磁性分离步骤。

[0398] 4) 吸出未结合的细胞和其余血浆。

[0399] 5) 将样品重悬在 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0400] 维里德克丝系统 -CEC 和 CEPC 富集后进行活化试验:

[0401] 1) 维里德克丝公司提供利用抗 -CD146 抗体进行捕捉的 CellTracks 内皮细胞试剂盒 (CellTracks Endothelial Cell Kit)。CellTracks 内皮细胞试剂盒与维里德克丝公司的 CellTracks AutoPrep 系统联用来制备血液样品,与 CellTracks 分析仪 II 联用以计数和表征全血中的 CEC 和 CEPC。该方案与 CellSearch 上皮细胞试剂盒的相同。

[0402] 样品制备:

[0403] 1) 按照生产商的使用说明书将人对象的外周血抽入 CellSave 保存试管。弃去最初的 3-5ml 以免被刺穿的静脉所释放的上皮或内皮细胞污染。

[0404] 手工分离 CSC:

[0405] 有证据显示肿瘤含有小群体的具有独特自我更新和存活机理的假定癌症干细胞 (参见,例如 Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51 :1-28 (2004);Reya 等, Nature, 414 : 105-111 (2001);Dontu 等, Trends Endocrinol. Metal., 15 :193-197 (2004); 和 Dick, Nature, 423 :231-233 (2003))。癌症干细胞 (CSC) 可在休眠状态长期存在,从而使得它们耐受靶向分裂细胞的化疗药物。这种癌症启动群体的特征在于自我更新和存活途径的活化,从而能进行选择性的靶向治疗。利用贴壁培养或磁性微珠描述了 CSC 的分离方法。在本实施例中,采用由 Cote 等 (Clin. Can. Res., 12 :5615 (2006)) 所述改进的方案。

[0406] 免疫磁性 CSC 分离 - 手工分离后进行活化试验:

[0407] 1) 利用磁珠 (戴纳公司,奥斯陆,挪威)。用 CD34 或 CD133 表面抗原的特异性单克隆抗体包被这些珠。

[0408] 2) 恰在使用前,用含 0.01% BSA 的等体积 PBS 洗涤预包被的 Dyna 珠一次。

[0409] 3) 将 $1-10^7$ 个预-包被的 Dyna 珠加入 3ml 样品中。

[0410] 4) 将混合物在 2-8°C 温育 60 分钟,同时轻柔翻转和转动。

[0411] 5) 将混合物分成 1ml 的部分,将各试管置于磁性分离器 (MPL-1 磁体) 中至少 6 分钟。

[0412] 6) 弃去上清液,通过悬浮在含 0.01% BSA 的 PBS 中洗涤结合珠的细胞三次,然后进行磁性分离。

[0413] 7) 将样品重悬在 100 μ l 刺激缓冲液中。

[0414] 样品制备：

[0415] 1) 患者知情同意后获得早期乳腺癌患者的骨髓样本。

[0416] 2) 如 Bauer 等, Clin. Can. Res., 6 :3552-3559 (2000) 所述加工骨髓抽吸物。采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心, 利用 Beckman GS-6 离心机以 4000xg 离心 35 分钟并用 PBS 洗涤两次从而富集含有任何扩散性肿瘤细胞的单核的细胞组分。

[0417] 分离的 CTC 的细胞刺激和裂解：

[0418] 细胞刺激：

[0419] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞并在 37°C 温育 5 分钟。

[0420] 用药物处理刺激细胞：

[0421] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0422] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 5 分钟。

[0423] 用药物处理刺激细胞 (反馈环)：

[0424] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0425] 2) 然后用 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 120 分钟。

[0426] 采用以下方案裂解经刺激的 CTC：

[0427] 1) 通过混合表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0428] 2) 最终洗涤后, 将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷却缓冲液中。

[0429] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0430] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0431] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0432] 表 2

裂解缓冲液配方 (10 ml)			
试剂	母液浓度	终浓度	体积
10% Triton X-100	10	1	1.00
1M Tris, pH 7.5	1	0.05	0.05
1M NaF	1	0.05	0.05
5M NaCl	5	0.1	0.20
[0433] 2M B-甘油磷酸酯	1	0.05	0.50
0.1M Na ₃ VO ₄	0.1	0.001	0.10
1 mg/ml 胃蛋白酶抑制剂	1	0.10	
完全的迷你蛋白酶			1 片
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		总计 (ml)	3.00
		水 (ml)	7.00

[0434] 分离的 CEC 和 / 或 CEPC 的细胞刺激和裂解：

[0435] 据信 VEGF 能通过活化 CEPC(Larrivee 等, J. Biol. Chem., 278 : 22006-22013(2003)) 和从血管壁脱落的成熟 CEC(Solovey 等, Blood, 93 : 3824-3830(1999)) 的抗凋亡途径而促进存活。VEGF 还可刺激 CEPC 或成熟 CEC 的增殖, 虽然与 CEPC 相比, 成熟 CEC 看来只有有限的增殖能力 (Lin 等, J. Clin. Invest., 105 : 71-77(2000))。出于这三个原因, 裂解前与 VEGF 家族生长因子温育活化了 CEC 和 / 或 CEPC。

[0436] 细胞刺激：

[0437] 1) 将各 100nM 的生长因子 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 加入细胞, 并在 37°C 温育 5 分钟。

[0438] 用药物处理刺激细胞：

[0439] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的贝伐单抗、索拉芬尼、苏尼替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0440] 2) 然后通过加入各 100nM 的因子 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 5 分钟。

[0441] 用药物处理刺激细胞 (反馈环)：

[0442] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的贝伐单抗、索拉芬尼、苏尼替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0443] 2) 然后通过加入各 100nM 的 VEGF、FGF、PDGF、PIGF 和 / 或 Ang 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 120 分钟。

[0444] 采用以下方案裂解分离的 CEC 和 / 或 CEPC 细胞：

[0445] 1) 通过混合表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0446] 2) 最终洗涤后, 将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷却缓冲液中。

[0447] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0448] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0449] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0450] 分离的 CSC 的细胞刺激和裂解：

[0451] 刺激细胞：

[0452] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞并在 37°C 温育 5 分钟。

[0453] 用药物处理刺激细胞：

[0454] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0455] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 5 分钟。

[0456] 用药物处理刺激细胞 (反馈环)：

[0457] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0458] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 120 分钟。

[0459] 采用以下方案裂解分离的 CSC 细胞：

[0460] 1) 通过混合表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0461] 2) 最终洗涤后, 将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷却缓冲液中。

[0462] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0463] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0464] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0465] 实施例 2. 从组织、活检样品或原代培养物制备肿瘤细胞提取物

[0466] 本实施例说明了分离、刺激和裂解肿瘤组织或活检样本的细胞的方法。本实施例还说明了启动、刺激和裂解分离自组织、活检样品或全血的肿瘤细胞原代培养物的方法。分离和培养生物学样本的肿瘤细胞以供筛选化疗剂的其它方法描述于, 例如美国专利号 5, 728, 541 ; 6, 416, 967 ; 6, 887, 680 ; 6, 900, 027 ; 6, 933, 129 ; 和 7, 112, 415 ; 和美国专利公布号 20040023375 及 20050202411。按照本实施例制备的细胞提取物可用于本文所述的单次检测或邻近试验。

[0467] 分离原代或转移组织的肿瘤细胞：

[0468] 细胞分离和培养：

[0469] 1) 通过手术收集约 5-100mg 无坏死、无污染的肿瘤组织, 置于含有无菌细胞培养基 (例如, 含 10% FBS 和抗生素的 RPMI-1640) 的 100ml 瓶中。

[0470] 2) 室温下, 样品须在提取后 72 小时内保存或运输。

[0471] 3) 用细胞培养基清洗样品三次。

[0472] 4) 用手术刀将组织切成小片, 然后使其通过细孔筛网分解成细胞悬液。

[0473] 5) 或者, 用含抗生素的无血清细胞培养基稀释的含 0.25% 胶原酶 II 和 0.001% DNA 酶的混合物处理切碎的组织。温育 15-20 分钟, 轻柔搅拌。通过细胞培养基洗涤 3 次处理以除去酶。

[0474] 6) 将细胞浓度调节至 10^6 /ml, 将细胞接种入 6-孔板并静置过夜。第二天, 用胰蛋白酶处理细胞并再次接种入微量滴定板以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0475] 分解肿瘤细胞的细胞刺激和裂解：

[0476] 细胞刺激：

[0477] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞并在 37°C 温育 5 分钟。

[0478] 用药物处理刺激细胞：

[0479] 1) 37°C, 将样品与治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物温育 30 分钟。

[0480] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞, 并在 37°C 温育 5 分钟。

[0481] 用药物处理刺激细胞 (反馈环)：

[0482] 1) 37°C, 用治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物处理样品 30 分钟。

[0483] 2) 然后通过 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞, 并在 37°C 温育 120 分钟。

[0484] 采用以下方案裂解经刺激的细胞：

[0485] 1) 通过混合上表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0486] 2) 最终洗涤后, 将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷焯缓冲液中。

[0487] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0488] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0489] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0490] 从活检样本分离肿瘤细胞：

[0491] 细胞分离和培养：

[0492] 1) 通过手术提取针芯活组织 (core biopsies) (14 号针头 2 个针芯, 16 号针头 3 个针芯, 18 号针头 4 个针芯, 其中 1-2 次活检为真空辅助的活检 (vacuum-assisted biopsies)), 并置于含有细胞培养基的 10ml 无菌小瓶中作为肿瘤样本。

[0493] 2) 室温下, 样品须在提取后 72 小时内保存或运输。

[0494] 3) 通过细孔筛网将针芯活组织的细胞材料分解成细胞悬液。

[0495] 4) 或者, 用含抗生素的细胞培养基稀释的含 0.25% 胶原酶 II 和 0.001% DNA 酶的混合物处理活检组织。温育 15-20 分钟, 轻柔搅拌。通过细胞培养基洗涤 3 次处理以除去酶。

[0496] 5) 将细胞浓度调节至 10^6 /ml, 将细胞接种入 6-孔板并静置过夜。第二天, 用胰蛋白酶处理细胞并再次接种入微量滴定板以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0497] 活检组织的细胞的细胞刺激和裂解

[0498] 细胞刺激：

[0499] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞并在 37°C 温育 5 分钟。

[0500] 用药物处理刺激细胞：

[0501] 1) 37°C, 用治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物处理样品 30 分钟。

[0502] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细

胞,并在 37°C 温育 5 分钟。

[0503] 用药物处理刺激细胞(反馈环):

[0504] 1) 37°C,用治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物处理样品 30 分钟。

[0505] 2) 然后通过 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞,并在 37°C 温育 120 分钟。

[0506] 采用以下方案裂解经刺激的细胞:

[0507] 1) 通过混合上表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0508] 2) 最终洗涤后,将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷却缓冲液中。

[0509] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0510] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0511] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0512] 启动从组织、活检组织或全血分离的肿瘤细胞的原代培养

[0513] 细胞培养:

[0514] 1) 根据所分离肿瘤细胞的数量,将从上述组织、活检组织或全血分离的肿瘤细胞培养在无菌小瓶(例如, T-25)、培养皿(例如, 10mm) 或平板(例如, 24-孔平板)中。

[0515] 2) 37°C,在补充了 5% CO₂ 的加湿气氛中,用细胞培养基(例如,含 2% FBS 和抗生素的 RPMI-1640) 进行温育。随着时间推移,细胞在容器底部形成单层并开始分裂。当细胞接近汇合时,用胰蛋白酶处理它们并再次接种入微量滴定板以使用配体刺激和 / 或用靶向药物抑制。

[0516] 从组织、活检组织或全血分离的肿瘤细胞的原代培养的细胞刺激和裂解

[0517] 细胞刺激:

[0518] 1) 将生长因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 加入细胞并在 37°C 温育 5 分钟。

[0519] 用药物处理刺激细胞:

[0520] 1) 37°C,用治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物处理样品 30 分钟。

[0521] 2) 然后通过加入因子 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 来刺激细胞,并在 37°C 温育 5 分钟。

[0522] 用药物处理刺激细胞(反馈环):

[0523] 1) 37°C,用治疗有效浓度的赫赛汀、拉帕替尼、埃洛替尼和 / 或雷帕霉素类似物处理样品 30 分钟。

[0524] 2) 然后通过 TGF- α (100nM)、Hrg(100nM) 和 / 或 IGF(100nM) 刺激细胞,并在 37°C 温育 120 分钟。

[0525] 采用以下方案裂解经刺激的细胞:

[0526] 1) 通过混合上表 2 所列试剂新鲜制备新鲜的裂解缓冲液。

[0527] 2) 最终洗涤后,将细胞重悬在置于冰上的 100 μ l 冷却缓冲液中。

[0528] 3) 在冰上温育 30 分钟。

[0529] 4) 用微型离心机以最大转速离心该混合物 10 分钟以分离珠和裂解液。

[0530] 5) 将裂解液转移至新试管以供检验或在 -80°C 保存。

[0531] 实施例 3. 利用酪酰胺信号放大的单次检测微阵列 ELISA

[0532] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重、高通量、单次检测微阵列 ELISA, 其适于分析稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态:

[0533] 1) 将捕捉抗体以 2- 倍连续稀释印刷在新泽西州弗洛哈姆帕克市获特满公司的 16- 垫 FAST 载玻片上。

[0534] 2) 干燥过夜后, 用获特满封闭缓冲液封闭该载玻片。

[0535] 3) 将 $80\ \mu\text{l}$ 细胞裂解液以 10- 倍连续稀释加入各垫。该载玻片在室温温育 2 小时。

[0536] 4) 用 TBS- 吐温洗涤 6 次后, 室温下将 $80\ \mu\text{l}$ 生物素标记的检测抗体 (例如, 识别 pEGFR 的单克隆抗体或识别 EGFR 的单克隆抗体, 而无论活化状态) 温育 2 小时。

[0537] 5) 洗涤 6 次后, 加入链霉亲和素 - 标记的辣根过氧化物酶 (SA-HRP) 并温育 1 小时以使 SA-HRP 结合生物素 - 标记的检测抗体。

[0538] 6) 为放大信号, 加入 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的 $80\ \mu\text{l}$ 生物素 - 酪酰胺并反应 15 分钟。用 TBS- 吐温洗涤载玻片六次, 用 20% DMSO/TBS- 吐温洗涤两次, 用 TBS 洗涤一次。

[0539] 7) 加入 $80\ \mu\text{l}$ SA-Alexa 555 并温育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次, 干燥 5 分钟, 并用马萨诸塞州沃尔瑟姆市帕金埃尔默公司 (Perkin-Elmer, Inc. ; Waltham, MA) 的微阵列扫描仪扫描。

[0540] 实施例 4. 采用酪酰胺信号放大的邻近双重检测微阵列 ELISA

[0541] 本实施例描述了具有优秀动态范围的多重、高通量、邻近双重检测微阵列 ELISA, 其适于分析稀少循环细胞中信号转导分子的活化状态:

[0542] 1) 将捕捉抗体以 1mg/ml - 0.004mg/ml 的连续稀释印刷在获特满公司的 16- 垫 FAST 载玻片上。

[0543] 2) 干燥过夜后, 用获特满封闭缓冲液封闭该载玻片。

[0544] 3) 将 $80\ \mu\text{l}$ A431 细胞裂解液以 10- 倍连续稀释加入各垫。该载玻片在室温温育 2 小时。

[0545] 4) 用 TBS- 吐温洗涤 6 次后, 将 TBS- 吐温 /2% BSA/1% FBS 稀释的用于邻近试验的 $80\ \mu\text{l}$ 检测抗体加入载玻片。所用的检测抗体是: (1) 直接偶连于葡萄糖氧合酶 (GO) 的抗 -EGFR 单克隆抗体; 和 (2) 直接偶连于辣根过氧化物酶 (HRP) 的识别磷酸化 EGFR 的单克隆抗体。室温下温育 2 小时。

[0546] 5) 或者, 检测步骤利用识别磷酸化 EGFR 的单克隆抗体的生物素 - 偶连物。在这些情况中, 洗涤 6 次后, 包括与链霉亲和素 -HRP 温育 1 小时的额外后续步骤。

[0547] 6) 或者, 检测步骤利用抗 -EGFR 抗体的寡核苷酸介导的葡萄糖氧合酶 (GO) 偶连物。可利用 HRP 与磷酸化 EGFR 抗体的直接偶连物或者生物素 - 链霉亲和素 (SA) 连接的偶连物。

[0548] 7) 为放大信号, 加入 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的 $80\ \mu\text{l}$ 生物素 - 酪酰胺并反应 15 分钟。用 TBS- 吐温洗涤载玻片六次, 用 20% DMSO/TBS- 吐温洗涤两次, 用 TBS 洗涤一次。

[0549] 8) 加入 $80\ \mu\text{l}$ SA-Alexa 555 并温育 30 分钟。然后洗涤载玻片两次, 干燥 5 分钟, 并用帕金埃尔默公司的微阵列扫描仪扫描。

[0550] 实施例 5. 产生活化状况以供药物选择

[0551] 本发明方法和组合物可应用于癌症治疗的药物选择。典型方案需要产生两种状况, 参比活化状况和测试活化状况, 然后比较两种状况以测定特定药物治疗方案的效力 (参见, 图 2)。

[0552] 参比活化状况

[0553] 为获得参比活化状况, 在抗癌症药物治疗之前获得具有特定类型癌症 (例如, 肺肿瘤) 的患者的血液样品。采用, 例如本文详述的免疫磁性分离技术从该血液样品分离衍生自癌细胞的稀少循环细胞。可用一种或多种生长因子体外刺激分离的循环细胞。然后裂解经刺激的细胞以产生细胞提取物。将细胞提取物施加于含有一组捕捉抗体的稀释系列的可寻址阵列, 所述捕捉抗体是活化状态在患者的癌症类型中可能改变的信号转导分子的特异性抗体。利用合适的检测抗体 (例如, 不依赖活化状态的抗体和 / 或活化状态依赖性抗体) 进行单次检测或邻近试验以测定感兴趣的各信号转导分子的活化状态。表 1 所示“途径选择”表尤其可用于根据患者的癌症类型选择检测哪种活化状态。例如, 一位患者可能具有显示表 1 “途径 1” 中所示 EGFR 途径活化状态的癌症类型。或者, 另一位患者可能具有显示表 1 “途径 2” 中所示 EGFR 途径活化状态的另一癌症类型。因此, 产生的参比活化状况提供了没有任何抗癌症药物存在下, 患者癌症中信号转导分子的活化状态。

[0554] 测试活化状况

[0555] 为获得测试活化状况, 在抗癌症药物治疗之前或在给予抗癌症药物后 (例如, 在癌症治疗期间的任何时间) 获得具有特定类型癌症 (例如, 肺肿瘤) 的患者的第二份血液样品。从该血液样品分离衍生自癌细胞的稀少循环细胞。如果分离的细胞获自未接受抗癌症药物治疗的患者, 则将分离的细胞与靶向上述参比活化状况测定的一种或多种活化的信号转导分子的抗癌症药物温育。“药物选择”表 (表 A) 尤其可用于选择批准的或处于临床试验的抑制特定活化靶信号转导分子的合适抗癌症药物。例如, 如果从参比活化状况中测定到 EGFR 被活化, 则可将细胞与表 A 的“A”或“B”行所示的一种或多种药物温育。然后可用一种或多种生长因子体外刺激分离的细胞。然后裂解分离的细胞以产生细胞提取物。将细胞提取物施加于可寻址阵列, 进行邻近试验以测定感兴趣的各信号转导分子的活化状态。因此, 产生的患者的测试活化状况提供了有特定抗癌症药物存在下, 患者癌症中信号转导分子的活化状态。

[0556] 药物选择

[0557] 通过比较测试活化状况与参比活化状况来测定抗癌症药物是否适于治疗患者的癌症。例如, 如果与没有药物存在下相比, 药物治疗导致大多数或所有信号转导分子的活化实质性降低, 例如从没有药物时的强活化改变成有药物时的弱或极弱活化, 则确定该治疗适合于患者的癌症。在这种情况下, 可在未接受药物治疗的患者中用该合适的抗癌症药物开始治疗, 或者在已接受药物的患者中用该合适的抗癌症药物继续后续治疗。然而, 如果药物治疗视作不适于治疗患者的癌症, 则选择不同的药物并用于产生新的测试活化状况, 然后将其与参比活化状况相比较。在这种情况下, 可在未接受药物治疗的患者中用合适的抗癌症药物开始治疗, 或者将正接受该不合适药物的患者的后续治疗改成合适的抗癌症药物。

[0558] 实施例 6. 分析活化的受体酪氨酸激酶的可寻址阵列

[0559] 图 3 描述了本发明的可寻址受体酪氨酸激酶阵列。本文所述的受体酪氨酸激酶是参与细胞增殖的许多信号转导途径的关键组分。例如,受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族具有 4 个家族成员,并在诸如细胞增殖、分化和存活等基础细胞过程中起着至关重要的作用。据报道,该受体酪氨酸激酶家族在许多不同癌症中过表达并与更差的临床结果有关。与生长因子结合后, ErbB1 或 EGFR、ErbB3 或 HER3、和 ErbB4 或 HER4 同型和异型 - 二聚化以活化许多不同的信号转导途径。ErbB2 或 HER2 不结合生长因子,其是所有 3 种家族成员的最佳异型 - 二聚化伴侣。过表达时, ErbB2 也可同型 - 二聚化并活化信号转导途径。ErbB 家族的同型 - 或异型 - 二聚化导致转磷酸化。自磷酸化或转磷酸化减弱了受体酪氨酸激酶的抑制性构象,使得激酶完全活化,同时产生许多含 SH2 的信号转导分子,例如 Src、Shc SHP-1、SHEP-1 和 PI(3)K 的结合位点。衔接蛋白或信号转导蛋白,例如 Shc、Grb2 或 PI3K 募集至磷酸化的受体。衔接蛋白的磷酸化导致 MAPK 和 AKT 途径活化。可通过测定 Erk 和 Rsk 的磷酸化状态来评估 MAPK 途径的活化,而 PI3K 途径活化可通过测定 Akt 和 p70S6K 的磷酸化状态来评估。

[0560] 因此,图 3 所示可寻址 ErbB 家族芯片不仅能测定 4 种受体酪氨酸激酶的表达,还能测定它们的活化状态。还可利用可寻址芯片研究 MAPK 和 PI3K/Akt 途径的活化。该芯片的另一特征是存在测定肿瘤含量的内标和测定任何非特异性结合的非特异性 IgG。

[0561] 实施例 7. 分析血管生成中的信号转导途径的可寻址阵列

[0562] 图 4 说明了测定参与血管生成的信号转导组分的活化状态的可寻址阵列构成。本文所述的肿瘤血管生成对于许多实体瘤的生长至关重要。检验的关键性信号转导分子包括受体酪氨酸激酶的 VEGFR、FGFR 和 TIE 家族的成员,它们主要在内皮细胞上表达。PDGFR 通常表达在周细胞上。这些受体的表达和活化状态对于测定各种肿瘤样本中血管生成的主要机制至关重要。生长因子,例如 VEGF 和 PlGF 结合 VEGFR-1 和 VEGFR-2,并启动同型 - 和异型 - 二聚化。二聚化后,这些受体磷酸化,进而活化 MAPK 和 PI3K/Akt 信号转导途径。FGFR、TIE 和 PDGFR 受体也以相似方式活化。自磷酸化或转磷酸化减弱了受体酪氨酸激酶的抑制性构象,使得激酶完全活化,同时产生许多含 SH2 的信号转导分子,例如 Src、Shc SHP-1、V-钙粘蛋白、SHEP-1 和 PI3K 的结合位点。衔接蛋白或信号转导蛋白,例如 Shc、Grb2 或 PI3K 募集至磷酸化的受体。衔接蛋白的磷酸化导致 MAPK 和 AKT 途径活化。可通过测定 Erk 和 Rsk 的磷酸化状态来评估 MAPK 途径活化,而 PI3K 途径活化可通过测定 Akt 和 p70S6K 的磷酸化状态来评估。

[0563] 因此,可寻址血管生成芯片,例如图 4 所示那些不仅能测定患者样品中所有受体酪氨酸激酶的表达,还能测定它们的活化状态。还可利用可寻址芯片研究 MAPK 和 PI3K/Akt 途径的活化。该芯片具有测定肿瘤或肿瘤相关细胞(CEC、CEP、周细胞等)含量的内标和测定任何非特异性结合的非特异性 IgG。

[0564] 实施例 8. 选择用于治疗非小细胞肺癌的患者

[0565] 目前对非小细胞肺癌(NSCLC)的治疗需要同时利用化疗和抗血管生成治疗。作为第一线治疗,医师对非鳞状细胞癌患者通常利用碳铂(C)或联用碳铂与紫杉醇[®](T)和 Avastin[®]。第二线药物包括紫杉醇[®]、ALIMTA[®]和 Tarceva[®](对于非吸烟者、妇女和亚洲人)。正在进行的临床试验测试了各种药物组合的效力:在非鳞状细胞癌患者中用

Avastin[®] + Tarceva[®];包括鳞状细胞癌症在内的所有 NSCLC 中用索拉芬尼 + 碳铂 + 紫杉醇[®];和包括鳞状细胞癌症在内的所有 NSCLC 中用 ZD6474 (ZACTIMA[™]) + 碳铂 + 紫杉醇[®]。

[0566] 现已证明在 NSCLC 中,关键信号转导组分中有许多改变。这些包括:导致活化的 EGFR 突变;其它受体酪氨酸激酶,例如 c-met 的活化;EGFR 活化以及 HER2 和 3 活化或 HER2 扩增;EGFR 活化及 PI3K 突变;EGFR 活化及 PTEN 消除;和 EGFR 活化及 Ras 突变。各种形式的化疗已针对信号转导途径不同组分中的各种改变。

[0567] 同时,可以靶向肿瘤的新血管形成,一种称为血管生成的过程。VEGF 是对于新血管形成必不可少的内皮细胞存活因子。因此,调节 VEGF-介导血管生成的一种方法是利用针对 VEGF 蛋白质本身或 VEGFR 的抗体。贝伐单抗是针对 VEGF 的一种重组人源化单克隆抗体,其与化疗剂协同作用,已显示能改善结肠直肠、乳腺和肺癌患者的存活。

[0568] 下表 3 所示的例子说明了分析内皮细胞或 ECP 中有活性的途径是如何帮助医师决定有效治疗过程。简言之,可在有或没有测试治疗剂的不同组合存在下,测定内皮细胞或 ECP 中 VEGF 途径的不同组分的活化水平。

[0569] 表 3

[0570] 受体	表达	活化	活化 + 贝伐单抗	活化 + C+T+ 贝伐单抗
[0571]				
[0572]	(磷酸化水平)			
[0573] VEGFR2 :	中等	强	弱	弱
[0574] VEGFR1 :	中等	强	弱	弱
[0575] Tie 2	低	弱	弱	弱
[0576] V-钙粘蛋白 -R2 复合物	弱	中等	弱	弱
[0577] Shc		强	弱	弱
[0578] PI3K		强	弱	弱
[0579] Erk		强	弱	弱
[0580] Rsk		强	弱	弱
[0581] Akt		强	弱	弱
[0582] P70S6K		强	弱	弱

[0583] 表 3 所示信息表明用贝伐单抗或 C+Y+ 贝伐单抗处理将显示强活化(强磷酸化水平所示)的信号转导组分减弱至弱水平。因此,具有活化的 VEGFR-2 和 VEGFR-1 途径的患者应用贝伐单抗或 C+T+ 贝伐单抗治疗。

[0584] 靶向血管生成信号转导途径并且可用于产生测试活化状况的其它治疗剂的例子见下表 4。

[0585] 表 4

[0586] VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂在 NSCLC 中的安全性和效力

[0587]

抑制剂	靶标	常规毒性	在 NSCLC 中的临床活性
瓦塔拉尼	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	疲倦, 恶心, 呕吐, 肝脏酶升高, 高血压	未报道
AZD2171	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR	疲倦, 腹泻, 高血压, 食欲不振, 呼吸困难	SD[?]
苹果酸苏尼替尼	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	疲倦, 皮疹, 毛发 色素缺失, 毛发褪 色, 高血压	PR[?]
AG013736	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	高血压, 咳血, 口 炎, 恶心, 腹泻	肿瘤空穴化
索拉芬尼	VEGFR-2, -3, PDGFR, c-Kit, Raf	腹泻, 肝脏酶升高, 高血压, 疲倦	SD[?]
GW786034	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	高血压, 肺栓塞, 恶心, 疲倦, 毛发 色素缺失	SD[?]
ZD6474	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	腹泻, 皮疹, 高血压	PR[?]
CP-547632	VEGFR-2	皮疹和口干	PR[?]

[0588] 上表 4 列出了新抗血管生成药物的靶标。本发明能理性选择最佳预测存活的活化标记。不同药物之间的最合适活化标记可能不同, 这些标记可用作在抗血管生成单一治疗与组合治疗之间作出选择的指导。

[0589] 实施例 9. 选择用其它抗血管生成药物治疗的患者

[0590] 应用本发明公开的途径分析来测定表 4 所示各种药物的适合性的其它例子如下所述。

[0591] ZD6474

[0592] ZD6474 (ZACTIMA™) 目前处于治疗 EGFR 指向治疗失败的患者的 III 期临床试验。具体地说, 进行本项研究来评估对于治疗非小细胞肺癌患者, 将 ZD6474 加入最佳支持疗法 (BSC) 是否比单用最佳支持疗法更有效, 所述患者的疾病在以前的化疗和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 治疗后复发。ZD6474 是靶向肿瘤的新血管生长的抗癌症药物, 从而其可能减缓肿瘤的生长速度。早期研究表明 ZD6474 对肿瘤发展至下一阶段的时间可能有正面作用。对于第三线治疗, 将 ZD6474 给予化疗和 EGFR TKI 治疗后复发的患者。ZD6474 的结构不同于

Tarceva®/Iressa®,因此,预计它仍会抑制EGFR和抗血管生成途径(例如,VEGFR-1、-2和-3)。

[0593] 因此,进行了以下试验:

[0594] • 比较联用 ZD6474 与培美曲塞以及单用培美曲塞的效力研究;

[0595] • 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中联用 ZACTIMA™ 与多西他赛和单用多西他赛的比较性试验;

[0596] • 凡达它尼、碳铂和紫杉醇治疗具有可通过手术除去 I、II 或 III 期 NSCLC 的患者;和

[0597] • 比较至少一种先前化疗失败后 ZD6474 与埃洛替尼在 NSCLC 中的效力试验。

[0598] 采用本发明方法和组合物选择对包含 ZD6474 的药物组合起反应的患者(如下表 5 所示)不仅减少 III 期临床试验的患者数量,还导致更好的患者护理。

[0599] 表 5

[0600] 肿瘤细胞

[0601]	受体	表达	活化	活化 + ZD6474	活化 + 贝伐单抗
[0602]					
[0603]		(磷酸化水平)			
[0604]	EGFR :	中等	强	极弱	强
[0605]	ErbB2 :	中等	强	极弱	强
[0606]	ErbB3	低	中等	极弱	中等
[0607]	ErbB4	低	弱	极弱	弱
[0608]	Shc		强	极	弱强
[0609]	PI3K		强	极	弱强
[0610]	Erk		强	极弱	强
[0611]	Rsk		强	极	弱强
[0612]	Akt		强	极	弱强
[0613]	P70S6K		强	极弱	强

[0614] 表 6

[0615] 内皮细胞

[0616]	受体	表达	活化	活化 + ZD6474	活化 + 贝伐单抗
[0617]					
[0618]		(磷酸化水平)			
[0619]	VEGFR2 :	中等	强	弱	弱
[0620]	VEGFR1 :	中等	强	弱	弱
[0621]	Tie 2	低	弱	弱	弱
[0622]	V-钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中等	弱	弱
[0623]	Shc		强	弱	弱
[0624]	PI3K		强	弱	弱
[0625]	Erk		强	弱	弱
[0626]	Rsk		强	弱	弱
[0627]	Akt		强	弱	弱

[0628] P70S6K 强 弱 弱

[0629] 表 5 和 6 中的信息表明 ZD6474 同时下调内皮细胞以及肿瘤细胞中的途径。

[0630] AZD2171

[0631] 利用 AZD2171 (一种抑制 PDGFR 和 VEGFR 的药剂) 的许多临床试验正在进行。例如, 正在测试 AZD2171 与培美曲塞二钠的组合能否治疗非小细胞肺癌复发的患者。该组合的基本原理是培美曲塞二钠可能通过抑制细胞分裂所需的酶而终止肿瘤细胞生长。AZD2171 通过阻断流向肿瘤的血流而进一步导致肿瘤细胞生长停止。因此, 给予 AZD2171 与培美曲塞二钠可能在杀伤更多肿瘤细胞中具有协同作用。

[0632] 另一临床试验将贝伐单抗(**Avastin**[®])与 AZD2171 组合来治疗具有转移性或不可切除的实体瘤或淋巴瘤的患者。该组合的基本原理是单克隆抗体, 例如贝伐单抗能以多种方式阻断癌症生长。一些阻断了癌细胞生长和扩散的能力。其它能发现癌细胞并协助杀伤它们或将癌症杀伤性物质携带到癌细胞。贝伐单抗和 AZD2171 还可通过阻断流向癌症的血流而终止癌细胞的生长。因此, 给予贝伐单抗和 AZD2171 可能在协同杀伤更多肿瘤细胞。

[0633] 其它临床试验检验了含或不含 AZD2171 的吉西他滨和碳铂组合作为第一线疗剂在 IIIB 期或 IV 期非小细胞肺癌患者中的治疗情况, 以及含或不含 AZD2171 的紫杉醇和碳铂组合在 III 期或 IV 期非小细胞肺癌患者中的治疗情况。

[0634] 采用本发明方法和组合物选择的对包含 AZD2171 的药物组合起反应的患者示于下表 7。

[0635] 表 7

[0636] 内皮细胞和周细胞

[0637] 受体	表达	活化	活化 + AZD2171	活化 + 贝伐单抗
[0639]	(磷酸化水平)			
[0640] VEGFR2 :	中等	强	弱	弱
[0641] VEGFR1 :	中等	强	弱	弱
[0642] Tie 2	低	弱	弱	弱
[0643] V- 钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中等	弱	弱
[0644] PDGFRa	中等	高	弱	高
[0645] PDGFRb	中等	高	弱	高
[0646] Shc		强	弱	弱
[0647] PI3K		强	弱	弱
[0648] Erk		强	弱	弱
[0649] Rsk		强	弱	弱
[0650] Akt		强	弱	弱
[0651] P70S6K		强	弱	弱

[0652] 因为 PDGF 在 **Avastin**[®] - 耐受性患者中过表达, 例如表 7 所示的信息将提示抑制 PDGFR 以及 VEGFR 的 AZD2171 可能是治疗这种肿瘤的选用药剂。

[0653] 索拉芬尼

[0654] 利用索拉芬尼 (BAY 43-9006) 的许多临床试验正在进行。例如,进行了以下研究:(1) 在具有非小细胞肺癌的化疗原初患者中比较碳铂与紫杉醇(含或不含索拉芬尼);(2) 在具有 III-IV 期非小细胞肺癌的化疗原初患者中比较碳铂和紫杉醇(含或不含索拉芬尼);和(3) 索拉芬尼和贝伐单抗治疗具有难治、转移性或不可切除实体瘤的患者。

[0655] 采用本发明方法和组合物选择的对包含索拉芬尼的药物组合起反应的患者示于下表 8。

[0656] 表 8

[0657] 内皮细胞和周细胞

[0658] 受体	表达	活化	活化 + 索拉芬尼	活化 + 贝伐单抗
[0659]	(磷酸化水平)			
[0661] VEGFR2 :	中等	强	弱	弱
[0662] VEGFR1 :	中等	弱	弱	弱
[0663] Tie 2	低	弱	弱	弱
[0664] V- 钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中等	弱	弱
[0665] PDGFRa	中等	高	弱	高
[0666] PDGFRb	中等	高	弱	高
[0667] Shc		强	弱	弱
[0668] PI3K		强	弱	弱
[0669] Erk		强	弱	弱
[0670] Rsk		强	弱	弱
[0671] Akt		强	弱	弱
[0672] P70S6K		强	弱	弱

[0673] 因为 VEGF 和 PDGF 均在 **Avastin**[®]- 耐受性患者中过表达, **Avastin**[®]和索拉芬尼的组合可能有效关闭该二途径。此外,索拉芬尼抑制 Raf, 因此能抑制所有细胞类型中的 MAPK 途径。

[0674] 实施例 10. 其它抗 - 血管生成和抗 - 信号转导治疗组合

[0675] 血管内皮生长因子和表皮生长因子受体 (EGFR) 可在肿瘤组织中导致血管生成, 它们的下游信号转导途径相同。因此, 靶向两种途径可能原则上导致加和的或协同的抗肿瘤作用。最近的 I/II 期研究在难治的晚期非鳞状细胞非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者中评估了贝伐单抗与 EGFR 小分子酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 埃洛替尼的组合。在 II 期研究中, 业已证明贝伐单抗与埃洛替尼组合看来能不依赖于 EGFR 酪氨酸激酶突变状态而提供益处 (参见, 例如 Herbst 等, J. Clin. Oncol., 23 :2544-2555 (2005))。因此, 明显关闭 EGFR 和 VEGFR-2 看来有利于患者。

[0676] 该领域中正在进行的临床试验有:(1) 对于非小细胞肺癌 (ATLAS) 的第一线治疗, 比较含或不含埃洛替尼的贝伐单抗治疗的研究; 一种在具有局部晚期或转移性 NSCLC 的对象中评估化疗 + 贝伐单抗, 随后进行贝伐单抗 + 埃洛替尼与贝伐单抗 + 埃洛替尼安慰剂的安全性和效力的 IIIb 期、多中心、随机化、安慰剂 - 对照试验;(2) 评估贝伐单抗与 **Tarceva**[®]组合对于晚期非小细胞肺癌的效力的研究; 一种第二线的 III 期、多中心、安慰剂

对照、双盲的随机化研究。将约 650 位患者以 1 : 1 的比例随机分配至两个治疗组之一 : 组 1 : Tarceva® + 安慰剂 ; 组 2 : Tarceva® + 贝伐单抗 ; (3) 埃洛替尼和贝伐单抗治疗从未吸烟的 IIIB 期或 IV 期原发性非小细胞肺癌患者 ; (4) 贝伐单抗和埃洛替尼, 然后用顺铂或碳铂和吉西他滨治疗具有新诊断的或复发的 IIIB 期或 IV 期非小细胞肺癌的患者 ; (5) RAD001 与碳铂、紫杉醇和贝伐单抗的组合治疗以前未经全身性疗剂治疗的非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者 ; (6) 西妥昔单抗、紫杉醇、碳铂和贝伐单抗治疗具有晚期非小细胞肺癌患者 ; (7) 帕佐帕尼 + 拉帕替尼 ; (8) 第一线化疗和贝伐单抗后, 甲磺酸伊马替尼和贝伐单抗治疗 IIIB 期或 IV 期非小细胞肺癌患者 ; 和 (9) AMG 706 或贝伐单抗与化疗组合对晚期 NSCLC 的 II 期试验。

[0677] 以下显示了采用本发明方法和组合物进行患者选择以使用各种药物组合治疗的例子。

[0678] 表 9

[0679] 肿瘤细胞

[0680]	受体	表达	活化	活化 + 贝伐单抗 + 埃洛替尼	活化 + 贝伐单抗
[0682]		(磷酸化水平)			
[0683]	EGFR :	中等	强	极弱	强
[0684]	ErbB2 :	中等	强	极弱	强
[0685]	ErbB3	低	中等	极弱	中等
[0686]	ErbB4	低	弱	极弱	弱
[0687]	Shc		强	极弱	强
[0688]	PI3K		强	极弱	强
[0689]	Erk		强	极弱	强
[0690]	Rsk		强	极弱	强
[0691]	Akt		强	极弱	强
[0692]	P70S6K		强	极弱	强

[0693] 表 10

[0694] 内皮细胞

[0695]	受体	表达	活化	活化 + 贝伐单抗 + 埃洛 替尼	活化 + 埃洛替尼
[0698]		(磷酸化水平)			
[0699]	VEGFR2 :	中等	强	弱	弱
[0700]	VEGFR1 :	中等	强	弱	弱
[0701]	Tie 2	低	弱	弱	弱
[0702]	V- 钙粘蛋白 -R2 复合物	无	中等	弱	弱
[0703]	Shc		强	弱	弱
[0704]	PI3K		强	弱	弱
[0705]	Erk		强	弱	弱

[0706]	Rsk		强	弱	弱
[0707]	Akt		强	弱	弱
[0708]	P70S6K		强	弱	弱

[0709] 表 9 和 10 中的信息表明 **Avastin[®]** 和 **Tarceva[®]** 的组合同时下调内皮细胞以及肿瘤细胞中的途径。

[0710] 表 11

[0711] 患者 5001 : (EGFR 突变)

[0712]	受体	表达	活化	活化 +	活化 +
[0713]				埃洛替尼	西妥昔单抗

[0714] (磷酸化水平)

[0715]	EGFR :	高	强	极弱	弱
[0716]	ErbB2 :	中等	强	极弱	弱
[0717]	ErbB3	低	中等	极弱	中等
[0718]	ErbB4	低	弱	极弱	弱
[0719]	Shc		强	极弱	弱
[0720]	PI3K		强	极弱	中等
[0721]	Erk		强	极弱	中等
[0722]	Rsk		强	极弱	中等
[0723]	Akt		强	极弱	中等
[0724]	P70S6K		强	极弱	中等

[0725] 表 11 的信息提示患者 5001 应用 **Tarceva[®]** 治疗, 因为加入 **Tarceva[®]** 后观察到受体磷酸化的完全抑制和下游效应。 **Erbix[®]** 未诱导相同的抑制水平。可以基于以下作出用 **Erbix[®]** 治疗的决定:

- [0726] • 肿瘤细胞中活化的途径 (根据可寻址芯片的活化状况);
- [0727] • 刺激后活化的途径 ; 或
- [0728] • 用 **Tarceva[®]** 对途径的抑制作用。

[0729] 表 12

[0730] 患者 5002 : (对 **Tarceva[®]** 耐受的 EGFR 突变)

[0731]	受体	表达	活化	活化 +	活化 +
[0732]				埃洛替尼	EKB 569

[0733] (磷酸化水平)

[0734]	EGFR :	高	强	强	弱
[0735]	ErbB2 :	中等	强	强	弱
[0736]	ErbB3	低	中等	中等	弱
[0737]	ErbB4	低	弱	弱	弱
[0738]	Shc		强	强	弱
[0739]	PI3K		强	强	弱
[0740]	Erk		强	强	弱
[0741]	Rsk		强	强	弱

[0742]	Akt	强	强	弱
[0743]	P70S6K	强	强	弱

[0744] 从表 12 中的信息可以看出,可根据抑制状况用 EKB 569 治疗该患者。或者,可先用 **Tarceva**[®] 治疗该患者,复发后可用 EKB 569 治疗该患者。

[0745] 表 13

[0746] 患者 5003 : (cMet 扩增, 给予 **Tarceva**[®] 后复发)

[0747]	受体	表达	活化	活化 + 埃洛替尼	活化 + 埃洛替尼
[0748]					

[0749] (磷酸化水平)

[0750]	EGFR :	高	强	强	弱
[0751]	ErbB2 :	中等	强	强	弱
[0752]	ErbB3	低	中等	中等	弱
[0753]	ErbB4	低	弱	弱	弱
[0754]	cMet	高	强	强	弱
[0755]	Shc		强	强	弱
[0756]	PI3K		强	强	弱
[0757]	Erk		强	强	弱
[0758]	Rsk		强	强	弱
[0759]	Akt		强	强	弱
[0760]	P70S6K		强	强	弱

[0761] 该患者的活化状况显示 cMet 的高表达和磷酸化。因此,应用 cMet 和 EGFR 抑制剂的组合治疗该患者。

[0762] 表 14

[0763] 患者 5004 : (EGFR 活化连同 Her2 和 3 活化。(2/3 二聚体) 或 Her2 扩增)

[0764]	受体	表达	活化	活化 + 埃洛替尼	活化 + 拉帕塔尼 (Lapatanib)
[0765]					

[0766] (磷酸化水平)

[0767]	EGFR :	中等	强	极弱	极弱
[0768]	ErbB2 :	高或中等	强	强弱	
[0769]	ErbB3	低	强	强弱	
[0770]	ErbB4	低	弱	极弱	极弱
[0771]	Shc		强	强	极弱
[0772]	PI3K		强	强	极弱
[0773]	Erk		强	中等	极弱
[0774]	Rsk		强	中等	极弱
[0775]	Akt		强	强	极弱
[0776]	P70S6K		强	强	极弱

[0777] 表 14 中依据 Her 3 磷酸化的途径状况提示可用全 -Her 抑制剂。用拉帕塔尼观察到的强抑制作用强烈提示应选用该药剂治疗。

[0778] 表 15

[0779] 患者 5005 : (EGFR 活化加上 PI3K 突变或 PTEN 缺失)

[0780]	受体	表达	活化	活化 +	活化 +
[0781]				埃洛替尼	埃洛替尼 +Mek
[0782]					+mTor 抑制剂

[0783] (磷酸化水平)

[0784]	EGFR :	中等	强	极弱	极弱
[0785]	ErbB2 :	中等	中等	弱	弱
[0786]	ErbB3	低	弱	弱	弱
[0787]	ErbB4	低	弱	极弱	极弱
[0788]	Shc		强	弱	极弱
[0789]	PI3K		强	强	极弱
[0790]	Erk		强	中等	极弱
[0791]	Rsk		强	中等	极弱
[0792]	Akt		强	强	极弱
[0793]	P70S6K		强	强	极弱

[0794] 表 16

[0795] 患者 5006 : (EGFR 活化加上 Ras 突变)

[0796]	受体	表达	活化	活化 +	活化 +
[0797]				埃洛替尼	埃洛替尼 +Mek
[0798]					+mTor 抑制剂

[0799] (磷酸化水平)

[0800]	EGFR :	中等	强	极弱	极弱
[0801]	ErbB2 :	中等	中等	弱弱	
[0802]	ErbB3	低	弱	弱	弱
[0803]	ErbB4	低	弱	极弱	极弱
[0804]	Shc		强	弱	极弱
[0805]	PI3K		强	强	极弱
[0806]	Erk		强	中等	极弱
[0807]	Rsk		强	中等	极弱
[0808]	Akt		强	强	极弱
[0809]	P70S6K		强	强	极弱

[0810] 具有表 15 和 16 所示状况的肿瘤类型的增殖不仅由 ErbB 家族驱动,还由下游事件活化(通常是因 Ras 或 Raf 突变)。因此,状况信息表明这种患者应用 EGFR 抑制剂连同抑制下游途径,例如 MAPK 和 PI3K 途径的药物治疗。

[0811] 表 17

[0812] 患者 5007 :因内在化缓慢(输送问题)而联用**Tarceva® + Erbitux®**

[0813]	受体	表达	活化	活化 + 埃洛替	活化 +
[0814]				尼	埃洛替尼 + 西妥

[0815]					昔单抗
[0816]		(磷酸化水平)			
[0817]	EGFR :	中等	强	中等	极弱
[0818]	ErbB2 :	中等	强	中等	弱
[0819]	ErbB3	低	强	中等	弱
[0820]	ErbB4	低	弱	极弱	极弱
[0821]	Shc		强	弱极	弱
[0822]	PI3K		强	强极	弱
[0823]	Erk		强	中等	极弱
[0824]	Rsk		强	中等	极弱
[0825]	Akt		强	强	极弱
[0826]	P70S6K		强	强	极弱

[0827] 上表 17 显示的信息表明该患者应用**Tarceva[®]**和**Erbbitux[®]**的组合治疗。

[0828] 表 18

[0829] 患者 5008 :选择对 TKI 有反应但对化疗无反应的患者

[0830]	受体	表达	活化	活化 +	活化 +
[0831]				埃络替尼	埃络替尼 +Mek
[0832]					+mTor 抑制剂

[0833] (磷酸化水平)

[0834]	EGFR :	中等	强	极弱	极弱
[0835]	ErbB2 :	中等	中等	弱	弱
[0836]	ErbB3	低	弱	弱	弱
[0837]	ErbB4	低	弱	极弱	极弱
[0838]	Shc		强	弱	极弱
[0839]	PI3K		强	强	极弱
[0840]	Erk		强	中等	极弱
[0841]	Rsk		强	中等	极弱
[0842]	Akt		强	强	极弱
[0843]	P70S6K		强	强	极弱

[0844] 上表 18 所示信息表明具有 Ras 突变的患者可能对化疗无反应。因此,具有这种状况的患者可能是用 TKI 组合治疗的候选对象。

[0845] 实施例 11. 监测肺癌患者的 EGFR 和 / 或 HER-2 活化来指导治疗选择

[0846] 通过 Veridex CellSearch[™]系统评估所治疗的 9 位肺癌患者的 CTC 数量,采用本文的邻近试验评估 EGFR 和 HER-2 磷酸化。还利用 Veridex CellSearch[™]肿瘤分型试剂 EGFR,通过染色测试了其中 5 位患者的 EGFR 表达。患者人口统计学、癌症病史和目前的药物分别见表 19、20 和 21。表 22 显示在各样品中检测到的 CTC 数量和 EGFR 及 HER-2 的相对磷酸化水平。通过减去在微阵列上运行的正常对照值来计算相对磷酸化水平。图 5(A 和 B) 显示用 DAPI 对所选患者 CTC 的 EGFR、细胞角蛋白 (CK) 和细胞角蛋白作染色的图像。细胞系对照分别是 EGFR 和 HER-2 表达阳性的 SKBr3 和 A431。

[0847] 利用 CellSearch™ 系统检测到患者 2002 的 7.5ml 血液中具有 2 个 CTC。检测到两个细胞具有 EGFR 和 HER-2 表达。该患者正用贝伐单抗治疗。单用贝伐单抗或与化疗联用,或单用化疗不足以治疗该患者。这些数据告诉医师应采用包含同时靶向 EGFR 和 HER-2 的药剂,例如拉帕替尼、赫赛汀 + 凡达它尼、赫赛汀 + 西妥昔单抗、赫赛汀 + 吉非替尼、或赫赛汀 + 埃洛替尼的治疗。

[0848] 利用 CellSearch™ 系统进行分型检测到患者 2015 具有 11 个 CTC。利用 Veridex 试剂盒还检测到这些细胞中许多对 EGFR 表达呈阳性。EGFR 和 HER-2 显著活化。该患者正用贝伐单抗、吉西他滨和泰索帝治疗。单用贝伐单抗或与化疗联用,或单用化疗不足以治疗该患者。这些数据告诉医师应采用包含同时靶向 EGFR 和 HER-2 的药剂,例如拉帕替尼、赫赛汀 + 凡达它尼、赫赛汀 + 西妥昔单抗、赫赛汀 + 吉非替尼、或赫赛汀 + 埃洛替尼的治疗。

[0849] 利用 CellSearch™ 系统未检测到患者 1023、2040、1037 和 1035 的 7.5ml 血液中含有 CTC。如预计那样,采用邻近试验还检测到它们对 EGFR 和 HER-2 磷酸化呈阴性。这些患者的当前治疗是:患者 1023 用碳铂;患者 2040 用贝伐单抗;患者 1037 用贝伐单抗、碳铂、紫杉醇;患者 1035 用贝伐单抗、碳铂、吉西他滨。如果这些患者的血液中未检测到 CTC,表明可以继续当前的治疗。

[0850] 利用 CellSearch™ 系统检测到患者 2016 和 1025 的 7.5ml 血液中各具有 3 个 CTC。在这两个病例中,Veridex EGFR 染色显示所有细胞上均有 EGFR 表达。然而,这些患者无一检测到 EGFR 或 HER2 磷酸化阳性。这些患者尚未开始全身性治疗。这些数据告诉医师患者的肿瘤细胞不是由 EGFR/HER-2 途径驱动,虽然肿瘤细胞上有 EGFR 表达。不建议用针对 EGFR 或 HER-2 的靶向剂治疗这些患者。

[0851] 利用 CellSearch™ 系统分析时,检测到患者 1012 的血液中有 3 个 CTC。利用 Veridex 试剂盒未检测到 EGFR 染色。邻近试验分析表明没有 EGFR 或 HER2 磷酸化。该患者正用贝伐单抗、碳铂和紫杉醇治疗。不建议用针对 EGFR 或 HER-2 的靶向剂治疗该患者。

[0852] 表 22 总结了各患者的诊断信息以及根据 CTC 数量和 EGFR 及 HER2 磷酸化的数据推荐的剂。

[0853] 表 19.9 位肺癌患者的人口统计学

[0854]

患者编号	出生日期	性别	人种/种族
02-002	19/04/45	男性	高加索人
01-012	20/06/43	男性	高加索人
02-015	9/12/50	男性	高加索人
02-016	5/03/38	女性	高加索人
01-025	4/12/42	男性	西班牙人/拉丁美洲人
01-023	2/12/51	男性	西班牙人/拉丁美洲人
01-040	16/09/63	男性	亚洲人
01-037	5/04/55	男性	亚洲人
01-035	15/09/47	男性	亚洲人

[0855] 表 20.9 位肺癌患者的癌症病史

[0856]

患者编号	癌症类型	分期	转移部位	诊断日期	治疗类型
02-002	肺	4	肾上腺	01/07/2005	化疗
01-012	肺	4	脑	09/10/2007	放疗 化疗
02-015	肺	4	骨, 脑	24/10/2007	化疗
02-016	肺	4	肝	18/08/2007	化疗
01-025	肺	4	肝	18/04/2007	化疗
01-023	肺	4	淋巴结, 骨	29/08/2007	化疗
02-040	肺	4	骨, 肾上腺, 小脑	06/12/2006	化疗 放疗
01-037	肺	4	右下叶肝	25/08/2007	化疗
01-035	肺	4	其它肺	22/12/2006	化疗

[0857] 表 21.9 位肺癌患者的当前药物

[0858]

患者编号	药物名称	治疗相关的诊断	剂量
02-002	贝伐单抗	癌症	1400MGQD
01-012	贝伐单抗	肺癌的化疗	1000MGQ 2 周
01-012	苯海拉明	预化疗	25MG Q 2 周
01-012	贝那普利	高血压	20MG 1Q D
01-012	盐酸贝那普利	高血压	10MG 1Q D
01-012	碳铂	肺癌化疗	775MG Q 2 周
01-012	地卡特隆	预化疗	20MG Q 2 周
01-012	地塞米松	癌症化疗前药物	4MG 1TID
01-012	泰胃美	预化疗	300MG Q 2 周
01-012	紫杉醇	肺癌的化疗	315MG Q 2 周

01-012	枢复宁	预处理	32MG Q 2 周
01-012	唑吡坦	睡眠辅助	10MG 1Q D
02-015	匹格列酮	2 型糖尿病	30MGQD
02-015	贝伐单抗	肺癌	1400MG Q 28D
02-015	苯海拉明	皮疹	25MGQ 28D
02-015	丙氯拉嗪	恶心	10MGQ 6-8HRP
02-015	地卡特隆	恶心	32MG 每隔 3 小时
02-015	地卡特隆	恶心	20MG Q 28D
02-015	狄兰汀	癫痫发作	800MG 每隔 3 小时
02-015	代文	高血压	120MG BID
02-015	依那普利	高血压	80MG 4XD
02-015	头孢卡品	前列腺肥大	8MG BID
02-015	吉西他滨	肺癌	2200MG Q 28D
02-015	立普妥	高胆固醇血症	20MG BID
02-015	氧化镁制剂	健康补充剂	BID 800MG
02-015	吗啡	癌症疼痛	Q 12HR 15MG
02-015	加巴喷丁	神经病	2400MG TID
02-015	泰胃美	胃食管返流疾病	300MGQ 28D
02-015	泰索帝	肺癌	130MGQ 28D
02-015	维克定 (VICODIN E. S)	疼痛	750MG Q 4HR PR
02-015	安宁神	焦虑	BID 1MG PRN
02-015	枢复宁	恶心	32MGQ 28D
02-015	枢复宁	恶心	8MG Q HR HR
02-015	唑来膦酸	肺癌	4MG Q 28D

02-016	氟替卡松和沙美特罗吸入剂	肺气肿	500MGQD
02-016	丙酸氟替卡松	季节性变态反应	100MCG BID
02-016	呋塞米	高血压	40MGQD
02-016	左氧氟沙星制剂	支气管炎	500MG QD
02-016	左甲状腺素钠制剂	甲状腺机能减退	0.15MGQD
02-016	立普妥	高胆固醇血症	20MGQD
02-016	赖诺普利	高血压	10MGQD
02-016	劳拉西泮	失眠	3MG TID
02-016	耐绞宁	心绞痛	0.4MG PRN
02-016	硝酸甘油	心绞痛	5MG BID

[0859]

患者编号	药物名称	治疗相关的诊断	剂量
02-016	重组人类红细胞生成素 α	心绞痛	40,000 单位 5Q
02-016	维克定	癌症疼痛	10-325MGQ-
02-016	善胃得	胃食管返流疾病	300MGBID
01-025	别嘌醇	胃食管返流疾病	300MG 1QD
01-025	克拉霉素制剂	预防	500MG 1PRN
01-025	氢氯噻嗪	高血压	50MG 1QD
01-025	布洛芬	疼痛	800MG 1PRN
01-025	左旋甲状腺素	甲状腺功能减退	0.175MG 1QD
01-025	赖诺普利	高血压	40MG 1QD
01-025	洛伐他汀	高胆固醇血症	40MG 1QD
01-025	帕罗西汀	抑郁	20MG 1QD
01-025	泮托拉唑制剂	胃食管返流疾病	40MG 1QD

01-025	噻托溴铵	慢性阻塞性肺病	18MCG 1QHS
01-025	维拉帕米	高血压	240MG 1BID
01-023	苯海拉明	化疗前药物	50MG Q 3周
01-023	碳铂	化疗	500MG Q 3周
01-023	地卡特隆	化疗前药物	20MG Q 3周
01-023	凯特瑞	化疗前药物	1MG Q 3周
01-023	生理盐水	水合	250MGPRN
01-023	泰胃美	化疗前药物	300MGQ 3周
02-040	贝伐单抗	肺癌	700MGQ 3周
02-040	乐可舒 (DULCOLOX)	便秘	10MG 1TAB QD
02-040	法莫替丁	胃食管返流疾病	10MG PRN
02-040	喹那普利	高血压	10MGQD
02-040	唑来膦酸	肺癌	4MG Q 3周
01-037	贝伐单抗	肺癌化疗	1200MGQ 21天
01-037	苯海拉明	预化疗	50MG Q 21-天
01-037	比索洛尔	高血压	5MG 1QD
01-037	碳铂	肺癌化疗	700MG Q 21-天
01-037	地卡特隆	预化疗	20MG Q 21-天
01-037	氟康唑	真菌	200MG 2QD
01-037	格列本脲	糖尿病	2.5MG 1QD
01-037	泮托拉唑制剂	返酸	40MG 1QD
01-037	泰胃美	预化疗	300MG Q 21-天
01-037	紫杉醇	肺癌化疗	340MG Q 21-天
01-037	枢复宁	预化疗	32MGQ 21-天

01-035	贝伐单抗	肺癌化疗	1,000MGQ21 天
01-035	碳铂	肺癌化疗	700MGQ 21 天
01-035	地卡特隆	化疗前药物	20MG Q 21 天
01-035	吉西他滨	肺癌化疗	1,800MGQ21 天
01-035	梅格施	增加食欲	20MLQD
01-035	枢复宁	化疗前药物	32MG Q 21- 天

[0860] 表 22.9 份肺癌样品的的 CTC 数量 (每 7.5ml)、Veridex EGFR 染色和相对 EGFR 及 HER2 磷酸化水平。从这些数据获得治疗指导。

[0861]

患者 ID	CTC 数量	Veridex EGFR 染色	相对 pEGFR	相对 pHER2	治疗指导
2002	2	+	1.62	1.89	推荐 EGFR/HER2 抑制剂
1012	3	-	0.83	0.8	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
2015	11	+	1.74	1.72	推荐 EGFR/HER2 抑制剂
2016	3	+	0.61	0.65	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
1025	3	+	0.94	0.69	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
1023	0	nd	0.66	0.72	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
2040	0	nd	1.0	1.0	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
1037	0	nd	0.93	0.64	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂
1035	0	nd	0.01	0.05	不推荐 EGFR/HER2 抑制剂

[0862] 就如同各出版物或专利申请专门而单独表明通过引用纳入本文一样,本说明书引用的所有出版物和专利申请通过引用纳入本文。虽然出于明确理解的目的通过说明和实施例详细描述了上述发明,但本领域普通技术人员不难明白鉴于本发明的指导可作出明显改变和改进但不脱离随附权利要求书的构思或范围。

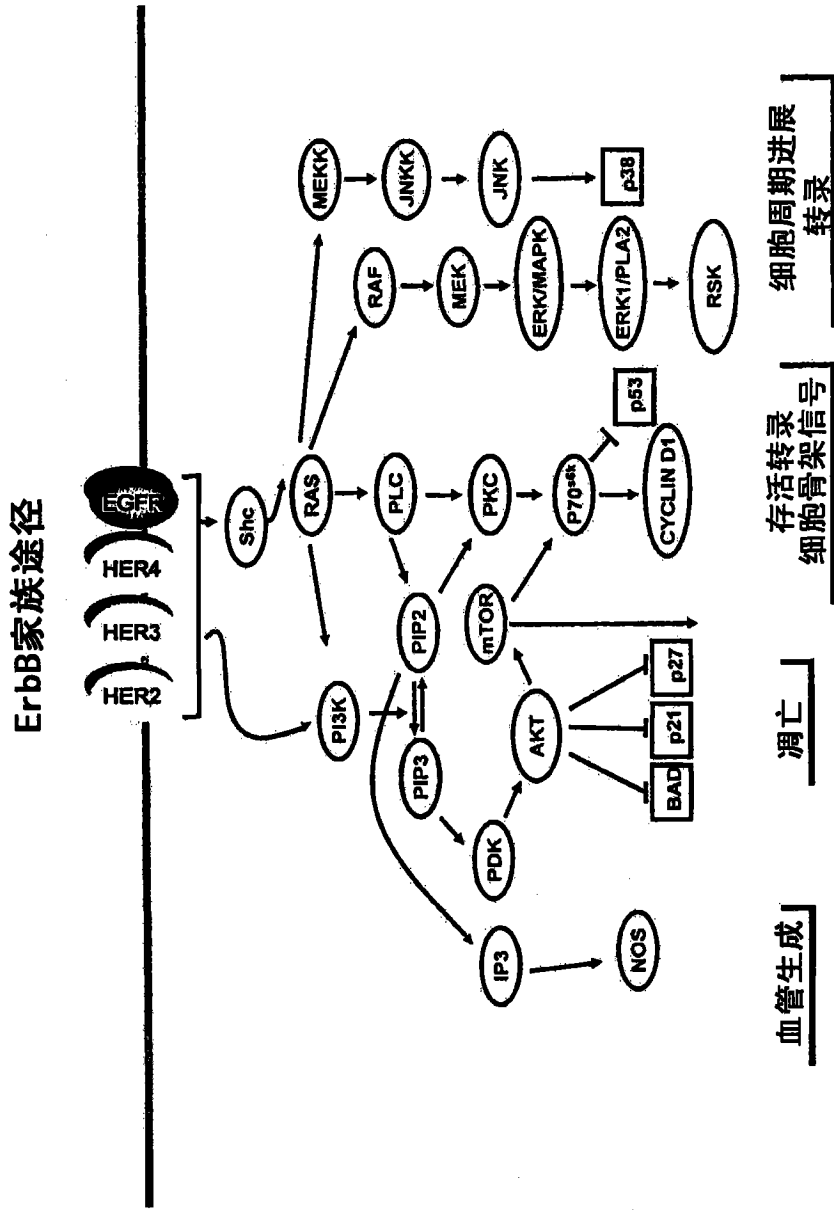


图 1

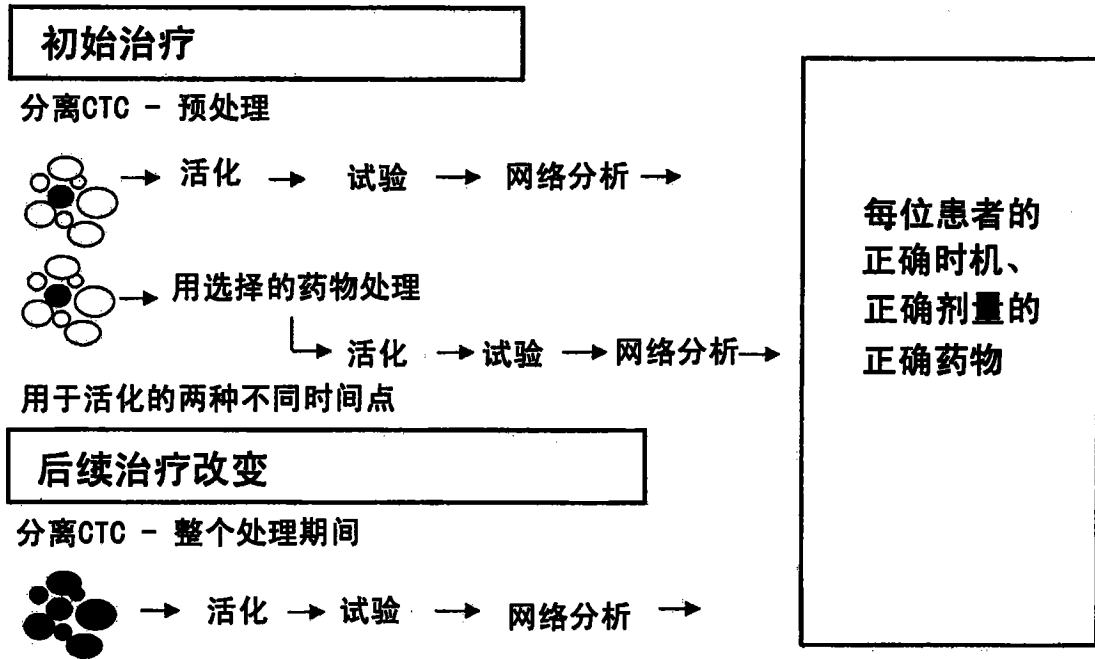


图 2

HTS - RTK途径阵列(16X16)

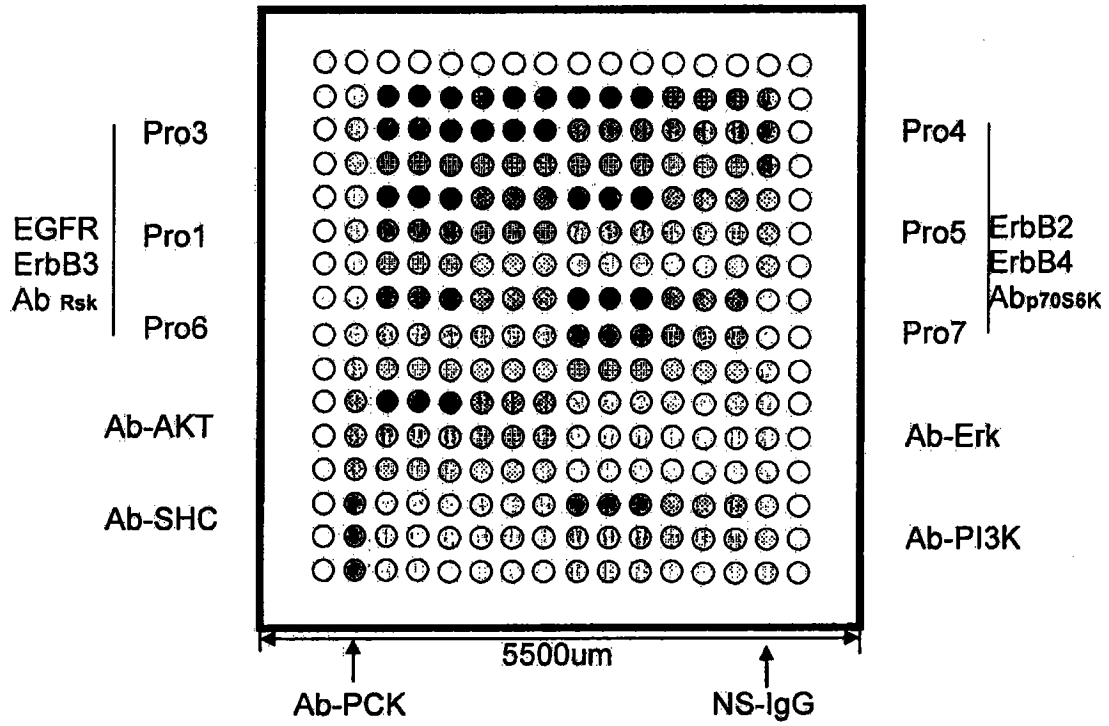


图 3

血管生成芯片

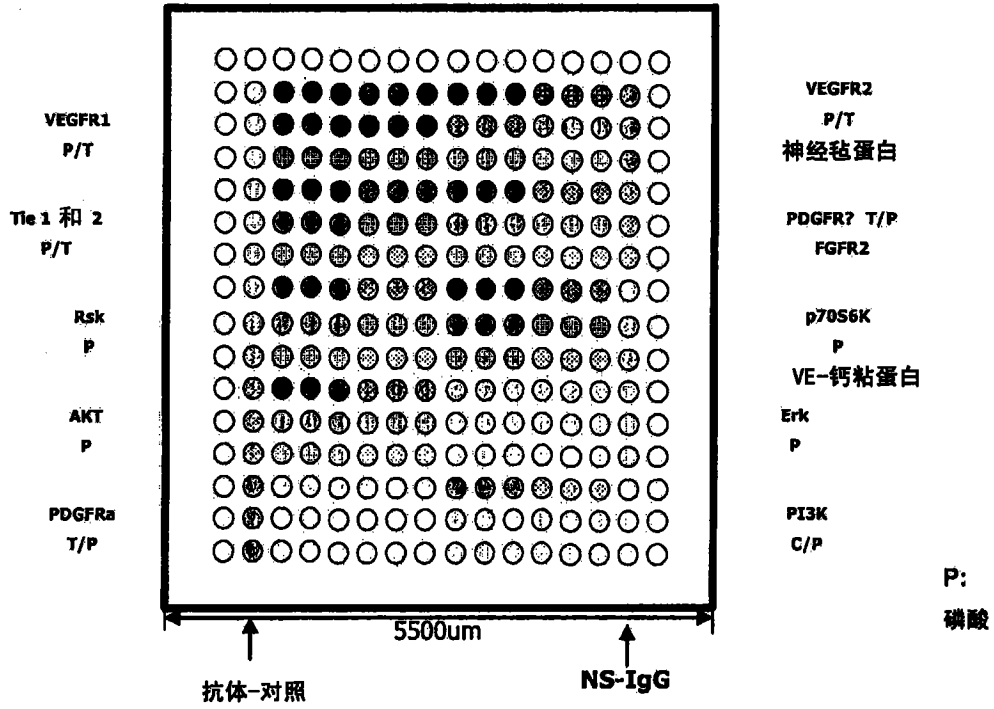
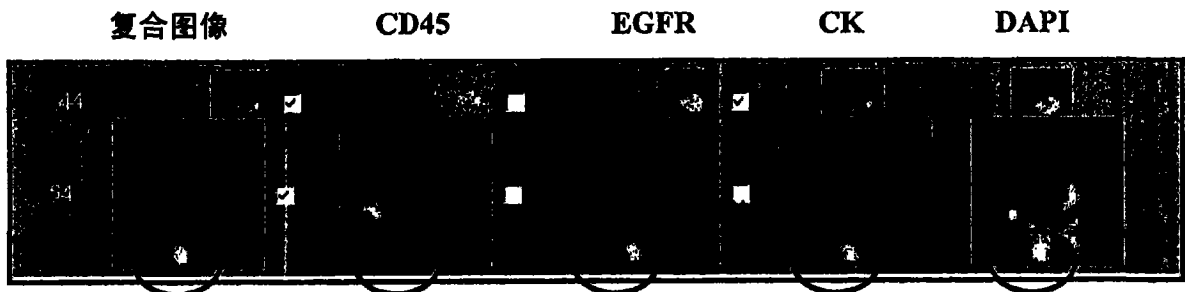


图 4

A. 具有2个CTC的患者2002



B. 具有11个CTC的患者2015

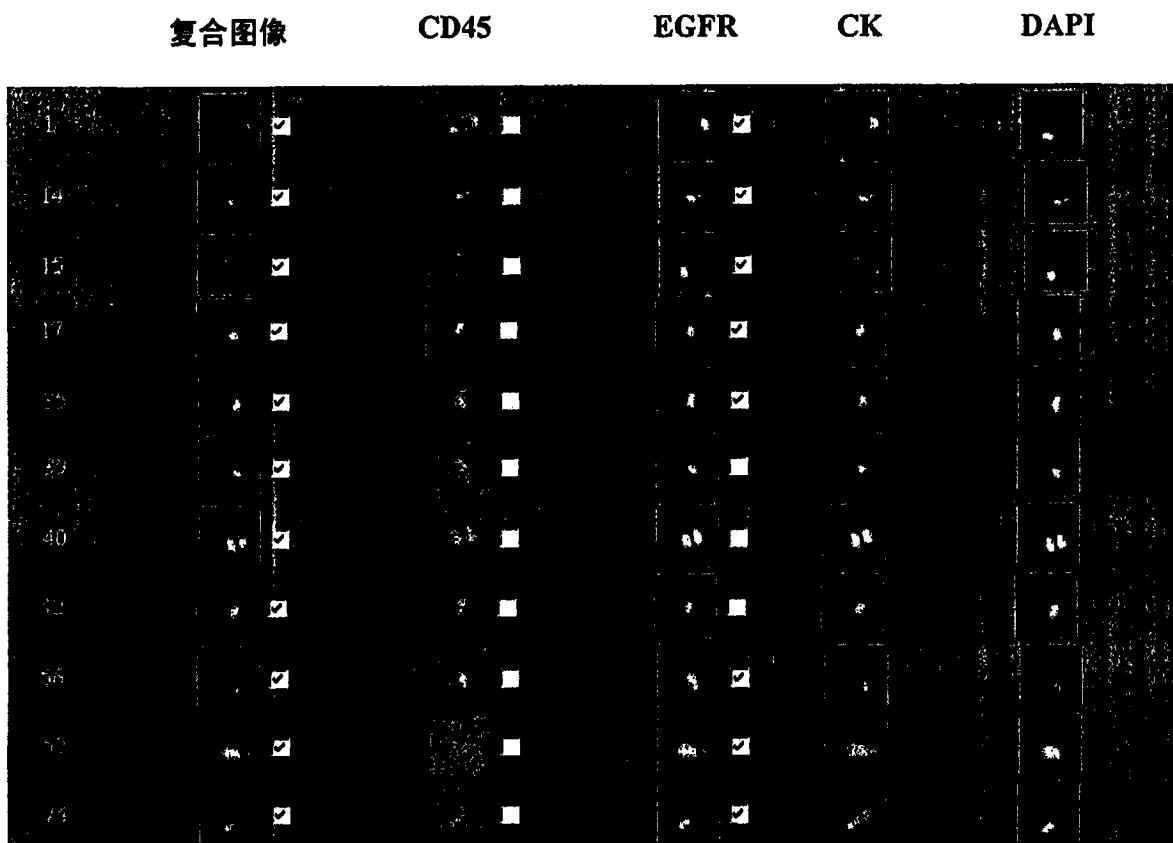


图 5