

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-505959

(P2015-505959A)

(43) 公表日 平成27年2月26日(2015.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	Z N A A 4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G O 1 N 33/542 (2006.01)	G O 1 N 33/542	B
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2014-545002 (P2014-545002)	(71) 出願人	599132904 ネステク ソシエテ アノニム スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ 5 5
(86) (22) 出願日	平成24年12月5日 (2012.12.5)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月4日 (2014.8.4)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/068005	(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(87) 国際公開番号	W02013/086031	(74) 代理人	100140453 弁理士 戸津 洋介
(87) 国際公開日	平成25年6月13日 (2013.6.13)	(72) 発明者	シン, シャラット スイス, シーエイチ-1800 ヴヴェ イ, アヴェニュー ネスレ 5 5
(31) 優先権主張番号	61/567,085		最終頁に続く
(32) 優先日	平成23年12月5日 (2011.12.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/728,748		
(32) 優先日	平成24年11月20日 (2012.11.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 癌を有する患者に治療を選択する方法

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍細胞などの細胞におけるシグナル伝達分子の発現及び活性化の状態を、検出、測定、及び定量化するための方法を提供する。本発明は、治療を選択するため、治療を最適化するため、治療有効性をモニタリングするため、及び/又は治療抵抗性を検出するための方法も提供する。したがって、本方法は、癌治療の選択及び疾患のモニタリングを改善するのに有用である。

【選択図】 図 3 A

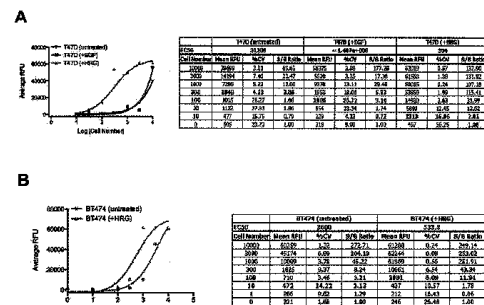


FIG. 3

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

癌と診断された対象に処置を選択するための方法であって、

(a) 経路プロファイルを決定するための近接アッセイを用いて、対象から採取した試料における HER1、HER2、HER3、cMET、IGF-1R、PI3K、AKT、ERK、MEK、p70S6K、PDK1、PRAS40、PTEN、RPS6、SHC 及びこれらの組合せからなる群から選択される 1 つ又は複数のシグナル伝達分析物の発現及び / 又は活性化レベルを測定するステップと、

(b) 対象の経路プロファイルに基づいて、対象が標的のインヒビター治療に応答する可能性があるか否かを決定することにより、標的のインヒビター治療を推奨するステップとを含む方法。

10

【請求項 2】

癌が、乳癌、直腸結腸癌、胃癌、肺癌、膵臓癌、及び前立腺癌からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (a) が、対象の経路プロファイルを基準経路プロファイルと比べることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

基準経路プロファイルが、癌細胞株からの試料を用いて決定される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

基準経路プロファイルが、特定のタイプの癌を有する対象からの試料を用いて決定される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

近接アッセイが協同的酵素増強反応性イムノアッセイ (CEER) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

標的のインヒビターが、チロシンキナーゼインヒビター、PI3K インヒビター、MEK インヒビター、HER2 インヒビター、HER3 インヒビター、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

PI3K インヒビターが、BYL719、BAY841236、BAY806946、SF1126、XL147、XL765、NVP-BEZ235、NVP-BGT226、NVP-BKM120、GDC-0941、PX-866、GSK1059615、CAL-101、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

MEK インヒビターが、BAY869766、MEK162、GDC-0973/RG7420、GDC-0623/RG7421、RG7167、RG7304、XL518、PD-325901、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

HER2 インヒビターが、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、エルツマクソマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ペリチニブ、CP-654577、CP-724714、カネルチニブ/C11033/PD183805、HKI-272、ラパチニブ、ネラチニブ、PKI-166/CGP-75166、AEE788、BMS-599626、HKI-727、HKI-357、BI202992、AG1478、ARRY-380、ARRY-334543、Bay846、D69491、DXL-702、JNJ-26483327、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

HER3 インヒビターが、MM-121、AMG-888、トラスツズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、MEHD7945A/RG7597、RG7116、ゲフィチニブ、エルロチニブ、カネルチニブ、ラパチニブ、MP-470、AZD8931、PF00299804、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 2】

試料が、細針吸引物、腫瘍組織生検、腫瘍細胞、又は循環腫瘍細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

癌を有する対象に対して、治療を最適化し、又は標的のインヒビターの治療有効性をモニタリングするための方法であって、

(a) 標的のインヒビターでの治療クールにわたって複数の時点で対象から採取した試料における、HER1、HER2、HER3、cMET、IGF-1R、PI3K、AKT、ERK、MEK、p70S6K、PDK1、PRAS40、PTEN、RPS6、SHC、及びそれらの組合せからなる群から選択される 1 つ又は複数のシグナル伝達分析物の発現及び/又は活性化レベルを測定して、経路プロファイルを決定するステップと、

(b) 対象の経路プロファイルに基づいて、対象が標的のインヒビターに応答性であるか否かを決定するステップと、

(c) 対象が応答性である場合、標的のインヒビターの投与を継続することを推奨するステップとを含む方法。

【請求項 1 4】

対象が非応答性である場合、標的のインヒビターの投与を改変することを推奨することをさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

対象が非応答性である場合、少なくとも 2 つの標的のインヒビターの投与を推奨することをさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

複数の時点における第 1 の時点が、標的のインヒビターでの治療クール前である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

複数の時点における 1 つ又は複数の後の時点が、標的のインヒビターでの治療クールの間にある、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

癌が、乳癌、直腸結腸癌、胃癌、肺癌、膵臓癌、及び前立腺癌からなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

試料が、細針吸引物、腫瘍組織生検、腫瘍細胞、又は循環腫瘍細胞である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

標的のインヒビターが、チロシンキナーゼインヒビター、PI3K インヒビター、MEK インヒビター、HER2 インヒビター、HER3 インヒビター、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

PI3K インヒビターが、BYL719、BAY841236、BAY806946、SF1126、XL147、XL765、NVP-BEZ235、NVP-BGT226、NVP-BKM120、GDC-0941、PX-866、GSK1059615、CAL-101、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

MEKインヒビターが、BAY 869766、MEK 162、GDC - 0973 / RG 7420、GDC - 0623 / RG 7421、RG 7167、RG 7304、XL 518、PD - 325901、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

HER2インヒビターが、トラスツズマブ、トラスツズマブ - DM1、エルツマクソマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ペリチニブ、CP - 654577、CP - 724714、カネルチニブ / CI 1033 / PD 183805、HKI - 272、ラパチニブ、ネラチニブ、PKI - 166 / CGP - 75166、AEE 788、BMS - 599626、HKI - 727、HKI - 357、BI BW 2992、AG 1478、Arry - 380、ARRY - 334543、Bay 846、D69491、DXL - 702、JNJ - 26483327、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

10

【請求項24】

HER3インヒビターが、MM - 121、AMG - 888、トラスツズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、MEHD 7945A / RG 7597、RG 7116、ゲフィチニブ、エルロチニブ、カネルチニブ、ラパチニブ、MP - 470、AZD 8931、PF 00299804、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【背景技術】

【0001】

[0002]腫瘍形成は機能不全のシグナル伝達経路をしばしば伴うため、細胞の成長及び生存を媒介するシグナル伝達経路は癌治療の標的である。シグナリング異常は、癌細胞に、成長能の増大をもたらし、DNA損傷性薬剤によって誘発されるアポトーシスを回避する能力をもたらす。

【0002】

[0003]例えば、十分に特徴付けられたシグナル伝達経路の一つに、ホスファチジルイノシトール3 - キナーゼ (PI3K) 経路がある。これは、悪性転換、成長因子のシグナリング、炎症、及び免疫などの様々な細胞の過程に関連付けられている。この経路の活性化は、成長因子又はリガンドが同族の受容体チロシンキナーゼ (RTK) に結合したときに開始する。これら受容体には、ヒト上皮成長因子受容体ファミリーのメンバー (HER、EGFR、又はErbB)、血小板由来成長因子 (PDGF) 受容体のメンバー、インスリン及びインスリン様成長因子1 (IGF - 1) 受容体のメンバーが含まれる。その後RTKが二量体化し、リン酸化することで、PI3Kヘテロ二量体は、活性化したRTK及び/又はアダプタータンパク質に直接結合できるようになる。活性化したPI3Kは、ホスファチジルイノシトール - 4, 5 - ニリン酸 (PI (4, 5) P2又はPIP2) の、ホスファチジルイノシトール - 3, 4, 5 - 三リン酸 (P (3, 4, 5) P3又はPIP3) へのリン酸化を触媒する。PIP3は、PI3K経路の中心的エフェクターであるAKTのリン酸化を促進する。AKTは、シグナルを下流の基質のホストに伝達し、このようにして成長、代謝、増殖、及び生存を含めた様々な中心的な細胞機能を制御する。

30

40

【0003】

[0004]PI3K経路の不適切な選択 (co - opting) は、通例、ヒトの癌において生じる。PI3K経路は、乳癌、及び他の腫瘍タイプにおいて活性化過剰であることが頻繁にある。乳癌の70%にPI3K経路の調節不全があることが示されている (Lopez - Knowlesら、Int. J. Cancer、126巻、1121 ~ 1131頁 (2010年))。PIK3CA遺伝子 (PI3K p110サブユニットをコードする) における変異は、乳癌、結腸癌、及び子宮体癌を含めた腫瘍、並びに神経膠芽腫腫瘍には一般的であることが十分に確立されている。さらに、多くの癌において、RTKはしばしば変異し、増幅され、又は過剰発現され、それにより異常なPI3K活性化を引き起こ

50

す。まとめると、これらの知見により、R T K及びP I 3 Kシグナリングは、癌治療に魅力的な標的となっている。

【0004】

[0005]現在、いくつかのP I 3 K経路インヒビターが前臨床試験において調査中であり、結果は有望であると思われる(Markmanら、Annls . Oncol .、21巻(4)、683~691頁(2010年))。癌細胞増殖の阻害は、P I 3 Kインヒビターを受けている幾名かの患者に見られた(Courtneyら、J . Clin . Oncol .、28巻(6)、1075~1083頁(2010年))。これらP I 3 K治療は癌の処置において成功を実証している一方(Markmanら、Ann . Oncol .、23巻(9)：2399~2408頁、(2012年)；Bendellら、J . Clin . Oncol .、30巻(3)：282~290頁、(2012年))、処置した対象の全てが応答し、又は良好に応答しているわけではないことを認めるのが重要である。標的のインヒビター治療に良好に応答する可能性がある対象を予想する方法が必要とされている。このように、特定の標的のインヒビター単独及び/又はインヒビター-組合せ治療に対する臨床的な感受性を決定するのに用いることができる、複数の主要なシグナリング経路を調べる、予測的な生物マーカーアッセイが必要とされている。本発明は、これら及びその他の必要性を満たすものである。

10

【発明の概要】

【0005】

[0006]P I 3 K、M E K、及びH E Rファミリーの経路を含めた複数のシグナリング経路は、乳癌、肺癌、胃癌、直腸結腸癌、膵臓癌、及び前立腺癌などの多くの癌に関係づけられており、既存の抗癌治療にもはや応答性でない患者にとっても、癌に対する有用な治療標的である。経路を目的とするインヒビターは開発中であり、いくつかの患者の研究において幾分の見込みを示している。本発明は、癌又は固形腫瘍を有する患者における複数のシグナリング経路をモニタリングし、次いで有効な治療レジメンを推奨するためのアッセイ方法を提供する。

20

【0006】

[0007]したがって、本発明は、活性化したシグナリング経路構成成分及び/又は近接のシグナリング経路に付随するタンパク質を、検出及び定量するための方法を提供する。方法はまた、既存の治療によって直接標的とならない、付随する又は近接の経路に、活性化及び/又は発現をそらすなど、腫瘍適応を評価するのににも有用である。この方法は、特定の標的のインヒビター、又は複数の標的のインヒビターの組合せ治療からの患者の臨床上の恩恵を予想するのに用いられる。本発明を実践することに由来する情報を、癌の診断、予後に、及び癌処置又はレジメンのデザインにおいて用いることができる。

30

【0007】

[0008]一態様において、本発明は、癌と診断された対象に処置を選択するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、(a)経路プロファイル又はシグネチャーを決定するために、近接アッセイ(proximity assay)を用いて、対象から採取した試料におけるH E R 1、H E R 2、H E R 3、c M E T、I G F - 1 R、P I 3 K、A K T、E R K、M E K、p 7 0 S 6 K、P D K 1、P R A S 4 0、P T E N、R P S 6、S H C及びこれらの組合せの群から選択される1つ又は複数のシグナル伝達分析物の発現(例えば、合計量)及び/又は活性化(例えば、リン酸化若しくは複合体形成)のレベルを測定するステップ、並びに(b)対象の経路プロファイル又はシグネチャーに基づいて、対象が標的のインヒビター治療に応答する可能性があるか否かを決定することにより、標的のインヒビター治療を推奨するステップを含む。いくつかの実施形態において、ステップ(b)は、対象の経路プロファイルを、基準経路プロファイルと比較することをさらに含む。

40

【0008】

[0009]いくつかの態様において、基準経路プロファイルは、癌細胞株からの試料、又は特定のタイプの癌(例えば、乳癌、直腸結腸癌、胃癌、肺癌、膵臓癌、若しくは前立腺癌

50

)を有する対象からの試料を用いて決定される。

【0009】

[0010]別の一態様において、本発明は、癌を有する対象に対して、治療を最適化し、又は標的のインヒビターの治療有効性をモニタリングするための方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、(a)標的のインヒビターでの治療クール(course of therapy)にわたって複数の時点で対象から採取した試料における、HER1、HER2、HER3、cMET、IGF-1R、PI3K、AKT、ERK、MEK、p70S6K、PDK1、PRAS40、PTEN、RPS6、SHC、及びこれらの組合せの群から選択される1つ又は複数のシグナル伝達分析物の発現及び/又は活性化レベルを測定して、経路プロファイルを決定するステップ、(b)対象の経路プロファイルに基づいて、対象が標的のインヒビターに応答性であるか否かを決定するステップ、並びに(c)対象が応答性である場合、標的のインヒビターの投与を継続することを推奨するステップを含む。いくつかの場合において、方法は、対象が非応答性である場合、標的のインヒビターの投与を改変し、低減し、又は排除することを推奨することをさらに含む。いくつかの場合において、治療クールにわたる複数の時点における第1の時点は、標的のインヒビターでの治療クール前である。いくつかの場合において、治療クールにわたる複数の時点における1つ又は複数の後の時点は、標的のインヒビターでの治療クールの間にある。

10

【0010】

[0011]いくつかの実施形態において、方法は、乳癌、直腸結腸癌、胃癌、肺癌、膵臓癌、又は前立腺癌を含めた癌を有する患者からの試料に対して行われる。他の実施形態において、方法は、乳癌、直腸結腸癌、胃癌、肺癌、膵臓癌、又は前立腺癌などの固形腫瘍タイプの癌を、発症する危険性があり、有することが疑われ、診断され、又は処置のための治療中である患者からの試料に対して行われる。いくつかの実施形態において、方法は、癌細胞株からの腫瘍細胞など、腫瘍細胞からの試料に対して行われる。

20

【0011】

[0012]いくつかの実施形態において、患者から採取した試料は、細針吸引物(FNA)、腫瘍組織生検、腫瘍細胞、又は循環腫瘍細胞である。好ましい実施形態において、試料は、循環腫瘍細胞又はFNAである。

【0012】

[0013]いくつかの実施形態において、近接アッセイは協同的酵素増強反応性(Collaborative Enzyme Enhanced Reactive)イムノアッセイ(CEER)である。

30

【0013】

[0014]いくつかの態様において、本発明の方法は、標的のインヒビターの処置を選択するのに有用である。いくつかの実施形態において、標的のインヒビターは、チロシンキナーゼインヒビター、PI3Kインヒビター、MEKインヒビター、HER2インヒビター、HER3インヒビター、又はこれらの組合せの群から選択される。

【0014】

[0015]いくつかの場合において、PI3Kインヒビターは、BAY841236、BAY806946、BYL719、SF1126、XL147、XL765、NVP-BEZ235、NVP-BGT226、NVP-BKM120、GDC-0941、PX-866、GSK1059615、CAL-101、及びこれらの組合せの群から選択される。いくつかの場合において、MEKインヒビターは、BAY869766、MEK162、GDC-0973/RG7420、GDC-0623/RG7421、RG7167、RG7304、XL518、PD-325901、及びこれらの組合せの群から選択される。いくつかの場合において、HER2インヒビターは、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、エルツマクソマブ(ertumaxomab)、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ペリチニブ、CP-654577、CP-724714、カネルチニブ/CI1033/PD183805、HKI-272、ラパチニブ、ネラチニブ、PKI-166/C

40

50

GP - 75166、AEE788、BMS - 599626、HKI - 727、HKI - 357、BI BW2992、AG1478、Arry - 380、ARRY - 334543、Bay846、D69491、DXL - 702、JNJ - 26483327、及びこれらの組合せの群から選択される。いくつかの場合において、HER3インヒビターは、MM - 121、AMG - 888、トラスツズマブ、ペルツズマブ、セツキシマブ、MEHD7945A/RG7597、RG7116、ゲフィチニブ、エルロチニブ、カネルチニブ、ラパチニブ、MP - 470、AZD8931、PF00299804、及びこれらの組合せの群から選択される。

【0015】

[0016]一態様において、本発明は、癌を有する対象に対して、インヒビター処置に対する応答をモニタリングするための方法であって、(a)対象から採取した第1の試料において、近接アッセイを用いてシグナル伝達分析物を測定して、第1の経路プロファイルを決定するステップと、(b)治療を受けている対象から採取した第2の試料において近接アッセイを用いて、ステップ(a)の特定の癌の経路のマーカーを測定して、第2の経路プロファイルを決定するステップ、並びに(c)第1及び第2の経路プロファイルにおける変化に基づいて、対象が、インヒビター処置に対して応答性であるか又は非応答性であるかを決定するステップを含む方法を提供する。

【0016】

[0017]いくつかの実施形態において、方法は、対象が非応答性である場合、標的のインヒビター処置の投与を改変することを推奨することをさらに含む。他の実施形態において、方法は、対象が非応答性である場合、少なくとも2つの標的のインヒビターの投与を推奨することをさらに含む。

【0017】

[0018]いくつかの実施形態において、対象がインヒビター処置を受ける前に第1の試料を採取する。いくつかの実施形態において、対象がインヒビター処置を受けるときに第1の試料を採取する。いくつかの場合において、インヒビター処置は、チロシンキナーゼインヒビター、PI3Kインヒビター、MEKインヒビター、HER2インヒビター、HER3インヒビター、又はこれらの組合せからなる群から選択される。

【0018】

[0019]いくつかの実施形態において、本発明の方法を、1つ又は複数の発癌性のシグナル伝達タンパク質を発現すること、治療を最適化すること、毒性を低減すること、治療的処置の有効性をモニタリングすること、及び/又は治療に対する適応性の非応答性(例えば、標的の薬剤に対する適応性の抵抗性)を検出することがすでに決定されている患者に対して行う。

【0019】

[0020]これら及び他の態様、目的、特徴、利点、及び実施形態は、当業者には、詳細な説明及び以下の図面により明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】CEERを用いて分析することができる、例示のシグナル伝達経路を示す図である。経路の構成成分は、検出可能なシグナル伝達分析物を含む。

【図2】CEERを用いた、2つの癌細胞株であるT47D及びBT474におけるPI3K活性化(例えば、複合体形成)の検出を示す図である。「%CV」は、変動係数のパーセント値を意味する。「S/B比」はシグナル対バックグラウンド比を意味する。

【図3A】成長因子での刺激した後の、T47D及びBT474の2つの癌細胞株におけるPI3K活性化(例えば、複合体形成)の検出を示す図である。PI3K活性化を非刺激のT47D細胞、及びEGF又はHRGで刺激した細胞において測定したことを示す。「%CV」は、変動係数のパーセント値を意味する。「S/B比」はシグナル対バックグラウンド比を意味する。

【図3B】成長因子での刺激した後の、T47D及びBT474の2つの癌細胞株にお

る P I 3 K 活性化 (例えば、複合体形成) の検出を示す図である。P I 3 K 活性化が、非刺激の B T 4 7 4 細胞、及びヘレグリン (H G R) で刺激した細胞において検出されたことを示す。「% C V」は、変動係数のパーセント値を意味する。「S / B 比」はシグナル対バックグラウンド比を意味する。

【図 4 A】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。様々な癌細胞株におけるホスホ - P I 3 K (p - P I 3 K) レベルの棒グラフを示す。

【図 4 B】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。全 (t - P I 3 K) レベルの棒グラフを示す。

【図 4 C】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。成長因子で刺激する前及び後の癌細胞株における、ホスホ P I 3 K (p - P I 3 K) レベルの棒グラフを示す。

【図 4 D】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。全 P I 3 K (t - P I 3 K) レベルの棒グラフを示す。

【図 4 E】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。成長因子で刺激する前及び後の癌細胞株における、ホスホ - P I 3 K の全 P I 3 K レベルに対する比のグラフを示す。

【図 5 A】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。細胞株におけるホスホ - P I 3 K レベルの棒グラフを示す。

【図 5 B】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。全 P I 3 K レベルの棒グラフを示す。

【図 5 C】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。ホスホ A K T レベルの棒グラフを示す。

【図 5 D】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。ホスホ R P S 6 レベルの棒グラフを示す。

【図 5 E】癌細胞株の経路プロファイリングを示す図である。癌細胞株における、ホスホ - P I 3 K の全 P I 3 K レベルに対する比のグラフを示す。

【図 6 A】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 1 1 5 5 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 6 B】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 1 1 5 5 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 7 A】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 1 2 9 9 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 7 B】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 1 2 9 9 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 8 A】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 2 2 2 8 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 8 B】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 2 2 2 8 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 9 A】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 6 6 1 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 9 B】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せの後の N C I - H 6 6 1 細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置 4 時間後又は 2 4 時間後 (*) のいずれかに測定した。

【図 10 A】P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又はこれらの組合せ

10

20

30

40

50

の後のNCI-H647細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置4時間後又は24時間後のいずれかに測定した。

【図10B】PI3Kインヒビター治療、MEKインヒビター治療、又はこれらの組合せの後のNCI-H647細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置4時間後又は24時間後のいずれかに測定した。

【図11】PI3Kインヒビター（例えば、BAY841236）治療、MEKインヒビター（例えば、BAY869766）治療、又はこれらの組合せの後のNCI-H460細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置4時間後又は24時間後のいずれかに測定した。

【図12】PI3Kインヒビター（例えば、BAY841236）治療、MEKインヒビター（例えば、BAY869766）治療、又はこれらの組合せの後のNCI-H1975細胞におけるシグナル伝達分析物の活性化を示す図である。分析物を、処置4時間後又は24時間後のいずれかに測定した。

【図13】様々な癌細胞株におけるPI3KインヒビターのIC50での、p-AKT阻害、p-PRAS40阻害、及びpRPS6阻害のレベルを強調する図である。表は、細胞株におけるPI3KインヒビターGDC0941のIC50を示す。

【図14】PI3K活性化を有する細胞株は、PI3Kインヒビターに対するIC50が低いことを示す図である。IC50値は、1つ又は複数のシグナル伝達経路における変更を2つ以上有する細胞株（例えば、Calu-6）で増大した。グラフは、ホスホ-PI3Kは、PI3Kインヒビターに対する感受性のマーカーであることを示す。

【図15】患者#1からの試料（SG1、SG2、及びSG3）における、シグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。試料は、治療の間、1クルールの治療を受ける前（SG1）、及び8日目（SG2）、及び28日目（SG3）に患者から得た。分析物のレベルを、対照のタンパク質であるサイトケラチン（CK）の発現に対して標準化した。

【図16】患者#2からの2試料（DP1及びDP2）における、シグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。試料は、1クルールの治療を受ける前（DP1）及び治療の間（DP2）に患者から得た。分析物のレベルを、対照のタンパク質であるサイトケラチン（CK）の発現に対して標準化した。

【図17】患者#3に対するシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを表す表である。患者にPIK3CA又はBRAF変異はない。1単位あたりの活性化した分析物及び1単位あたりの全分析物のレベルを、測定した各分析物のCUの決定値に基づいて算出した。

【図18】患者#4からの2つの生検試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図19】1クルールの治療を受ける前、及び治療の間に採取した、患者#5からの試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図20A】患者#6からの2つの生検試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図20B】患者#6からの2つの生検試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図21】1クルールの治療を受ける前、及び治療の間の、直腸結腸癌患者からの試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図22】1クルールの治療を受ける前、及び治療の間の、非小細胞肺癌患者からの試料におけるシグナル伝達分析物の発現及び活性化のレベルを示す図である。

【図23】乳癌患者60人からのFNA試料における、活性化したPI3K（左の棒）及び活性化したAKT（右の棒）のレベルを示す図である。

【図24】図23のデータの統計学的分析を示す図である。特に、p-PI3K及びp-AKTに対するカットオフ値を調べて、統計的に関連ある相関を同定した。

【図25】試料における様々なカットオフ値でのp-PI3Kレベルの分布を示す図であ

10

20

30

40

50

る。

【図 2 6】試料における様々なカットオフ値での p - A K T レベルの分布を示す図である。

【図 2 7】配列表に記載された抗原（配列番号：1）、及び他の P I 3 K 抗原に対して産生させた抗体のイムノプロット分析を示す図である。プロットは、抗体 T Y - 1 2 4 6 6、Y K - 1 2 4 6 9、及び 4 G 1 0 は、ヘレグリンで刺激した細胞における P I 3 K の p 8 5 サブユニットを検出することができることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

I. 序文

[0048] 上記に記載した通り、細胞の増殖に關与するシグナル伝達経路の活性化は、多くの異なるタイプの癌に特徴的である分子上の特色である。多くの場合、特定のシグナル伝達経路及びその構成成分の活性は、所与のタイプの癌に対する分子シグネチャーとして働き得る。このような活性化した構成成分は、治療的介入に有用な標的をさらに提供し得る。したがって、処置前、処置間、及び処置後の癌細胞内の特定のシグナル伝達システムの活性レベルの知識は、医師に、適用すべき好適な処置コース（course of treatment）を選択するのに用いることができる高度に關連のある情報を提供する。さらに、処置が進行するにつれ癌細胞において活性であるシグナル伝達経路を絶えずモニタリングすることにより、処置の有効性に対するさらなる情報を医師に提供することができ、例えば、同じ又は別のいずれかのシグナル伝達経路を活性化するさらなる異常によって、癌細胞が処置に抵抗性になっている場合に、特定の処置コースを継続するか、又は別の系統の処置に切り替えるか否かのいずれかを医師に促す。

【0022】

[0049] したがって、本発明は、腫瘍細胞（例えば、循環細胞、細針吸引物、又は組織生検）における、複数のシグナル伝達経路の構成成分の状態（例えば、発現及び/又は活性化のレベル）を検出するための方法を提供する。本発明を實踐することに由来する、シグナル伝達経路の構成成分の発現及び/又は活性化の状態に対する情報を、癌の診断、予後に、及び患者特異的な癌の処置のデザインにおいて用いることができる。本発明は、制御解除されたシグナリング経路を下方制御し、又は停止するのに好適な治療（単一の薬物又は薬物の組合せ）を選択するための方法も提供する。このように、本発明は、癌患者に個別化された治療のデザインを促進するのに用いることができる。

【0023】

[0050] 腫瘍の治療を開発する上での一手法は、活性化したシグナル伝達経路により細胞内シグナリングを阻止することである。前臨床モデルにより、P I 3 K 経路インヒビターを使用すると、P I 3 K 活性化を有する乳癌患者における劇的な抗癌性の応答を誘発することができることが実証されていた。最も興味深いのは、P I K 3 C A 変異の存在が P I 3 K 治療に応答した患者と相關しなかったことである。本発明の方法は、P I 3 K 経路の活性化、及び P I 3 K シグナリングを収束し、又は P I 3 K シグナル伝達を代償する他のシグナリング経路を測定する（例えば、検出及び定量化する）のに用いられる。これらの方法は、P I 3 K インヒビター及び P I 3 K インヒビター - 組合せ治療に対して臨床的に感受性である癌患者を選択するのに有用である。処置が進行するにつれ癌細胞において活性であるシグナル伝達経路を絶えずモニタリングすることで、処置の有効性に対するさらなる情報を医師に提供することができ、例えば、同じ又は別のいずれかのシグナル伝達経路を活性化するさらなる異常によって癌細胞が処置に対して抵抗性になった場合、医師に、特定の処置コースを継続し、又は別のラインの処置に切り替えることを促す。

【0024】

[0051] 本明細書の方法は、腫瘍細胞が、抗癌治療に応答して、1つ又は複数の代償性のシグナリング経路を活性化することができることを確かめるのに用いられている。いかなる特定の理論に拘泥しようとするものではないが、腫瘍細胞は、インヒビターの直接的な標的ではない、關連のシグナリング経路を活性化することにより、特定の経路のインヒビ

10

20

30

40

50

ターに適応すると考えられている。このように、経路特異的 (p a t h w a y - d i r e c t e d) インヒビターとの組合せ治療は、いくつかの癌の処置に対する最適な応答を実現するのに必要とされ得る。さらに、これらの所見は、臨床上の設定において、活性化したシグナリング経路をモニタリングするための方法に対する必要性を強調するものである。

【 0 0 2 5 】

II . 定義

[0052]「癌」の語は、異常な細胞の非制御の成長によって特徴付けられる一クラスの疾患の任意のメンバーを含むことが意図される。この語は、悪性、良性、軟組織、又は固形と特徴付けられても、いなくても、全ての知られている癌及び新生物性の状態を含み、転移前及び転移後の癌を含めた全ての病期及び進行度の癌を含む。様々なタイプの癌の例には、それだけには限定されないが、消化性及び胃腸の癌、例えば、胃癌（例えば、胃の癌）、直腸結腸癌、消化管間質腫瘍 (G I S T)、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、及び食道癌；乳癌；肺癌（例えば、非小細胞肺癌 (N S C L C) ）；胆嚢癌；肝臓癌；膵臓癌；虫垂癌；前立腺癌、卵巣癌；腎臓癌（例えば、腎細胞癌）；中枢神経系の癌；皮膚癌；リンパ腫；神経膠腫；絨毛癌；頭部及び頸部の癌；骨原性肉腫；並びに血液の癌が含まれる。非小細胞肺癌の例には、それだけには限定されないが、扁平上皮癌、大細胞癌、及び腺癌が含まれる。本明細書で用いられる「腫瘍」は、1つ又は複数の癌性細胞を含む。

10

20

【 0 0 2 6 】

[0053]「分析物」の語は、その存在、量（発現レベル）、活性化状態、及び／又は同一性が決定される、対象の任意の分子、典型的にはポリペプチドなどの巨大分子を含む。ある場合において、分析物は、シグナル伝達分子、例えば、HER 1、HER 2、HER 3、c M e t、I G F - 1 R、M E K、又はP I 3 K / A K Tシグナリング経路の成分などである。他のシグナル伝達分子は以下に列挙するものである。

【 0 0 2 7 】

[0054]「シグナル伝達分子」又は「シグナル伝達物質」の語は、それにより細胞が細胞外シグナル又は細胞外刺激を応答に変換するプロセスを実行するタンパク質及びその他の分子を含み、細胞の内側の順序づけられた配列の生化学反応を伴うのが典型的である。シグナル伝達分子の例には、それだけには限定されないが、受容体チロシンキナーゼ、例えば、E G F R（例えば、E G F R / H E R 1 / E r b B 1、H E R 2 / N e u / E r b B 2、H E R 3 / E r b B 3、H E R 4 / E r b B 4）、V E G F R 1 / F L T 1、V E G F R 2 / F L K 1 / K D R、V E G F R 3 / F L T 4、F L T 3 / F L K 2、P D G F R（例えば、P D G F R A、P D G F R B）、c - K I T / S C F R、I N S R（インスリン受容体）、I G F - I R、I G F - I I R、I R R（インスリン受容体 - 関連受容体）、C S F - 1 R、F G F R 1 ~ 4、H G F R 1 ~ 2、C C K 4、T R K A ~ C、c - M E T、R O N、E P H A 1 ~ 8、E P H B 1 ~ 6、A X L、M E R、T Y R O 3、T I E 1 ~ 2、T E K、R Y K、D D R 1 ~ 2、R E T、c - R O S、V - カドヘリン、L T K（白血球チロシンキナーゼ）、A L K（未分化リンパ腫キナーゼ）、R O R 1 ~ 2、M U S K、A A T Y K 1 ~ 3、及びR T K 1 0 6；切断型の受容体チロシンキナーゼ、例えば、欠損したアミノ末端細胞外ドメインを有する切断されたHER 2受容体（例えば、p 9 5 E r b B 2 (p 9 5 m)、p 1 1 0、p 9 5 c、p 9 5 nなど）、欠損したアミノ末端細胞外ドメインを有する切断されたc M E T受容体、及び欠損したアミノ末端細胞外ドメインを有する切断されたHER 3受容体；受容体チロシンキナーゼ二量体（例えば、p 9 5 H E R 2 / H E R 3；p 9 5 H E R 2 / H E R 2；H E R 1、H E R 2、H E R 3、又はH E R 4を有する切断されたHER 3受容体；H E R 2 / H E R 2；H E R 3 / H E R 3；H E R 2 / H E R 3；H E R 1 / H E R 2；H E R 1 / H E R 3；H E R 2 / H E R 4；H E R 3 / H E R 4など）；非受容体チロシンキナーゼ、例えば、B C R - A B L、S r c、F r k、B t k、C s k、A b l、Z a p 7 0、F e s / F p s、F a k、J a k、A c k、及びL I M K；チロシンキナーゼシグナリングカスケード構成成分、例えば

30

40

50

、AKT（例えば、AKT1、AKT2、AKT3）、MEK（MAP2K1）、ERK2（MAPK1）、ERK1（MAPK3）、PI3K（例えば、PIK3CA（p110）、PIK3R1（p85））、PDK1、PDK2、ホスファターゼ及びテンシンホモログ（PTEN）、SGK3、4E-BP1、P70S6K（例えば、p70S6キナーゼスプライスバリエーションアルファI）、タンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、PTP1B、PTPN13、BDP1など）、RAF、PLA2、MEKK、JNKK、JNK、p38、Shc（p66）、Ras（例えば、K-Ras、N-Ras、H-Ras）、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p53、サイクリンD1、STAT1、STAT3、ホスファチジルイノシトール4,5-ニリン酸（PIP2）、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸（PIP3）、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、GSK-3、RSK1~3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67、及びバキシリン；核ホルモン受容体、例えば、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体、ビタミンA受容体、ビタミンD受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、及びオーファン受容体；核受容体コアアクチベーター及びリプレッサー、例えば、それぞれ、乳癌における増幅-1（amplified in breast cancer-1）（AIB1）及び核内受容体コリプレッサー1（NCOR）；並びにこれらの組合せが含まれる。

【0028】

[0055]「活性化状態」の語は、特定のシグナル伝達分子、又はPI3Kシグナリング経路構成成分などの分析物が活性化されているか否かを意味する。同様に、「活性化レベル」の語は、PI3Kシグナリング構成成分などの特定のシグナル伝達分子が活性化されている度合いを意味する。活性化状態は、1つ又は複数のシグナル伝達分子の、リン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体形成の状態に相当するのが典型的である。活性化状態の非限定的な例（カッコ内に列挙する）には、HER1/EGFR（EGFRvIII、リン酸化（p-）EGFR、EGFR：Shc、ユビキチン化（u-）EGFR、p-EGFRvIII）；ErbB2（p-ErbB2、p95HER2（切断されたErbB2）、p-p95HER2、ErbB2：Shc、ErbB2：PI3K、ErbB2：EGFR、ErbB2：ErbB3、ErbB2：ErbB4）；ErbB3（p-ErbB3、切断されたErbB3、ErbB3：PI3K、p-ErbB3：PI3K、ErbB3：Shc）；ErbB4（p-ErbB4、ErbB4：Shc）；c-MET（p-c-MET、切断されたc-MET、c-Met：HGF複合体）；AKT1（p-AKT1）；AKT2（p-AKT2）；AKT3（p-AKT3）；PTEN（p-PTEN）；P70S6K（p-P70S6K）；MEK（p-MEK）；ERK1（p-ERK1）；ERK2（p-ERK2）；PDK1（p-PDK1）；PDK2（p-PDK2）；SGK3（p-SGK3）；4E-BP1（p-4E-BP1）；PIK3R1（p-PIK3R1）；c-KIT（p-c-KIT）；ER（p-ER）；IGF-1R（p-IGF-1R、IGF-1R：IRS、IRS：PI3K、p-IRS、IGF-1R：PI3K）；INSR（p-INSR）；FLT3（p-FLT3）；HGF-R1（p-HGF-R1）；HGF-R2（p-HGF-R2）；RET（p-RET）；PDGFRα（p-PDGFRα）；PDGFRβ（p-PDGFRβ）；VEGFR1（p-VEGFR1、VEGFR1：PLC、VEGFR1：Src）；VEGFR2（p-VEGFR2、VEGFR2：PLC、VEGFR2：Src、VEGFR2：ヘパリン硫酸、VEGFR2：VE-カドヘリン）；VEGFR3（p-VEGFR3）；FGFR1（p-FGFR1）；FGFR2（p-FGFR2）；FGFR3（p-FGFR3）；FGFR4（p-FGFR4）；TIE1（p-TIE1）；TIE2（p-TIE2）；EPHA（p-EPHA）；EPHB（p-EPHB）；GSK-3（p-GSK-3）；NFKB（p-NFKB）、IKB（p-IKB、p-P65：IKB）；BAD（p-BAD、BAD：14-3-3）；mTOR（p-mTOR）；Rsk-1（p-Rsk-1）；Jnk（p-Jnk）；P38（p-P38）；STAT1（

10

20

30

40

50

p - S T A T 1) ; S T A T 3 (p - S T A T 3) ; F A K (p - F A K) ; R B (p - R B) ; K i 6 7 ; p 5 3 (p - p 5 3) ; C R E B (p - C R E B) ; c - J u n (p - c - J u n) ; c - S r c (p - c - S r c) ; パキシリン (p - パキシリン) ; G R B 2 (p - G R B 2) 、 S h c (p - S h c) 、 R a s (p - R a s) 、 G A B 1 (p - G A B 1) 、 S H P 2 (p - S H P 2) 、 G R B 2 (p - G R B 2) 、 C R K L (p - C R K L) 、 P L C (p - P L C) 、 P K C (例えば、 p - P K C 、 p - P K C 、 p - P K C) 、 アデュシン (p - アデュシン) 、 R B 1 (p - R B 1) 、 及び P Y K 2 (p - P Y K 2) が含まれる。

【 0 0 2 9 】

【0056】「シグナリング」又は「経路」の語は、この語が言及するシグナル伝達経路の任意の構成成分を含む。例えば、P I 3 Kシグナリング経路のメンバーは、P I 3 K、A K T、P T E N、P I P 3、P D K 1、P K B、4 E - 8 P 1、m T O R、P 7 0 S 6 K、及びR P S 6を含めた、P I 3 Kシグナリング経路の任意のメンバーを意味する。M E Kシグナリング経路のメンバーには、R A S、R A F、M E K、E R K (M A P K)、E L K 1、F O S、M N K 1、R S K、及びe l f 4 3が含まれる。

10

【 0 0 3 0 】

【0057】「標的の治療」又は「経路特異的治療」の語は、疾患状態において制御解除されるタンパク質又は分子の、発現及び / 又は活性化の状態を変更することができる治療薬剤の使用を含む。

【 0 0 3 1 】

【0058】「腫瘍適応」の語は、腫瘍が、治療介入後に進行する能力を含む。例えば、腫瘍適応は、腫瘍が、抗癌治療に抵抗性になると生じる。腫瘍適応は、腫瘍細胞におけるシグナリング経路がインヒビター処置によって阻止され、別のシグナリング経路が活性化され、このようにして腫瘍細胞がインヒビター処置に抵抗性になる場合に生じ得る。

20

【 0 0 3 2 】

【0059】「疾患進行」の語は、癌のさらなる徴候又は症状をもたらし得る、成長又は伝播を続ける癌の分類を含む。例えば、N S C L Cを有する患者の肺組織における腫瘍の再発を、本明細書において疾患進行と記述する。

【 0 0 3 3 】

【0060】「フィードバック阻害」又は「ネガティブフィードバックループ」の語は、シグナル伝達経路の特定の構成成分があるレベルに蓄積すると、特定のシグナル伝達経路が阻害され (例えば、阻止される、不活性化される) 、それによって経路の活性が制御される、シグナル伝達のメカニズムを含む。

30

【 0 0 3 4 】

【0061】「疾患進行」の語は、癌のさらなる徴候又は症状をもたらし得る、成長又は伝播を続ける癌の分類を含む。例えば、N S C L Cを有する患者の肺組織における腫瘍の再発を、本明細書において疾患進行と記述する。

【 0 0 3 5 】

【0062】本明細書で用いられる「応答性」の語は、発癌性のシグナリング経路を抑止し、又は疾患状態を軽減する治療に対して、腫瘍細胞又は対象が応答する (例えば、反応する、変化する、改変する) 能力を含む。例えば、薬物処置に応答性である対象は、疾患進行若しくは腫瘍適応における低減、又は疾患の寛解を経験し得る。「非応答性」の語は、腫瘍細胞又は対象が治療に反応する能力がないことを含む。

40

【 0 0 3 6 】

【0063】「経路プロファイル」又は「経路のシグネチャー」の語は、細胞株又は患者の癌からの腫瘍細胞における1つ又は複数のシグナル伝達分子の、活性化状態の決定 (例えば、測定、カテゴリー化、分析、又は分類) を含む。いくつかの場合において、プロファイル又はシグネチャーは、任意の抗癌薬の非存在下又は存在下で、腫瘍細胞を用いて産生される。

【 0 0 3 7 】

50

[0064]「系列変化」の語は、異なる時点で対象から採取した試料における、タンパク質の発現レベル及び／又は活性化レベルにおける変化をアッセイが検出する能力を含む。例えば、PI3Kタンパク質の発現レベル及び／又は活性化レベルを、治療を開始する前の時間を含めた治療クールの間、患者においてモニタリングすることができる。

【0038】

[0065]本明細書で用いられる「希釈系列」の語は、特定の試料（例えば、細胞可溶化物）又は試薬（例えば、抗体）の一連の下降性の濃度を含むことが意図される。希釈系列は、測定した量の出発濃度の試料又は試薬を希釈剤（例えば、希釈バッファー）と混合してより低濃度の試料又は試薬を作り出し、このプロセスを所望の数の系列希釈を得るのに十分な回数繰り返す一プロセスによって作成されるのが典型的である。試料又は試薬を、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、500、又は1000倍連続的に希釈して、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、又は50の下降性の濃度の試料又は試薬を含む希釈系列を作成することができる。例えば、出発濃度1mg/mlの捕獲抗体試薬の2倍系列希釈を含む希釈系列は、ある量の出発濃度の捕獲抗体を等量の希釈バッファーと混合して、0.5mg/ml濃度の捕獲抗体を作り出し、このプロセスを繰り返して、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml、0.0325mg/mlなどの捕獲抗体の濃度を得ることにより作成することができる。

10

20

【0039】

[0066]本明細書で用いられる「優れたダイナミックレンジ」の語は、アッセイが、1個ほどの少数の細胞において、又は何千もの多数の細胞において、特定の分析物を検出する能力を意味する。例えば、希釈系列の捕獲抗体濃度を用いて約1~10,000細胞（例えば、約1、5、10、25、50、75、100、250、500、750、1000、2500、5000、7500、又は10,000細胞）における、特定の対象のシグナル伝達分子を検出するのが有利であるという理由で、本明細書に記載するイムノアッセイは優れたダイナミックレンジを有する。

【0040】

[0067]本明細書で用いられる「循環細胞」の語は、固形腫瘍から転移又は微小転移のいずれかをした腫瘍外の（extratumoral）細胞を含む。循環細胞の例には、それだけには限定されないが、循環腫瘍細胞、癌幹細胞、及び／又は腫瘍に向かって遊走する細胞（例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環プロ血管新生骨髄細胞、循環樹状細胞など）が含まれる。循環細胞を含む患者試料は、任意の入手可能な生物学的液体（例えば、全血、血清、血漿、痰、気管支洗浄液、尿、乳頭吸引液、リンパ、唾液、細針吸引物など）から得ることができる。ある場合において、全血試料は、血漿又は血清の分画と、細胞分画（すなわち、細胞ペレット）に分離される。細胞分画は、赤血球、白血球、及び／又は固形腫瘍の循環細胞、例えば、循環腫瘍細胞（CTC）、循環内皮細胞（CEC）、循環内皮前駆細胞（CEPC）、癌幹細胞（CSC）、リンパ節の播種された腫瘍細胞、及びこれらの組合せを含むのが典型的である。血漿又は血清の分画は通常、とりわけ、核酸（例えば、DNA、RNA）、及び固形腫瘍の循環細胞によって放出されるタンパク質を含む。

30

40

【0041】

[0068]循環細胞は、例えば、免疫磁気分離法（例えば、Racilaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻、4589~4594頁（1998年）；Bilkenrothら、Int. J. Cancer、92巻、577~582頁（2001年）を参照されたい）、Immunicon（Huntingdon Valley、PA）によるCell Tracks（登録商標）System、マイクロ流体分離（microfluidic separation）（例えば、Mohamedら、IEEE Trans. Nanobiosci.、3巻、251~256頁（2004年）；Linら、第97回AACR年次会合、Washington、D.C.（2006年）抄録

50

第5147号を参照されたい)、FACS(例えば、Mancusoら、Blood、97巻、3658~3661頁(2001年)を参照されたい)、密度勾配遠心分離(例えば、Bakerら、Clin. Cancer Res.、13巻、4865~4871頁(2003年)を参照されたい)、及び枯渇法(depletion method)(例えば、Meyerら、Int. J. Oncol.、21巻、521~530頁(2002年)を参照されたい)を含めた1つ又は複数の分離方法を用いて、患者試料から単離されるのが典型的である。

【0042】

[0069]本明細書で用いる「試料」の語は、患者から得た任意の生物学的検体を含む。試料は、制限なく、全血、血漿、血清、赤血球、白血球(例えば、末梢血単核細胞)、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ(例えば、播種されたリンパ節の腫瘍細胞)、骨髓吸引液、唾液、尿、糞便(すなわち、大便)、痰、気管支洗浄液、涙液、細針吸引物(例えば、ランダム乳輪周囲細針吸入(random periareolar fine needle aspiration)によって収集したもの)、任意の他の体液、組織試料(例えば、腫瘍組織)、例えば、腫瘍(例えば、針生検)又はリンパ節(例えば、センチネルリンパ節生検)の生検、組織試料(例えば、腫瘍組織)、例えば、腫瘍の外科切除、並びにこれらの細胞抽出物が含まれる。いくつかの実施形態において、試料は全血又はその分画構成成分、例えば、血漿、血清、若しくは細胞ペレットである。好ましい実施形態において、試料は、固形腫瘍の循環細胞を、全血又はその細胞分画から、当技術分野において知られている任意の技術を用いて単離することによって得られる。他の実施形態において、試料は、例えば、胃又は消化管の他の部分の固形腫瘍からの、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍組織試料である。

10

20

【0043】

[0070]「生検」は、診断又は予後の評価のために組織試料を除去するプロセス、及び組織検体自体を意味する。当技術分野において知られている任意の生検技術を、本発明の方法及び組成物に適用することができる。適用される生検技術は、一般的に、他の要因の中で、評価しようとする組織のタイプ、並びに腫瘍のサイズ及びタイプ(すなわち、固形又は懸濁(すなわち、血液若しくは腹水))に依存する。代表的な生検技術には、切除生検、切開生検、針生検(例えば、コア針生検、細針吸引生検など)、外科生検、及び骨髓生検が含まれる。生検技術は、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine、Kasperら編集、第16版、2005年、チャプター70に、及びPart Vを通して論じられる。当業者であれば、生検技術は、所与の組織試料において、癌細胞及び/又は前癌細胞を同定するのに行うことができることを理解されよう。

30

【0044】

[0071]本明細書で用いられる「循環細胞」の語は、固形腫瘍から転移又は微小転移のいずれかをした腫瘍外の細胞を含む。循環細胞の例には、それだけには限定されないが、循環腫瘍細胞、癌幹細胞、及び/又は腫瘍に向かって遊走する細胞(例えば、循環内皮前駆細胞、循環内皮細胞、循環プロ血管新生骨髓細胞、循環樹状細胞など)が含まれる。

40

【0045】

[0072]「対象」又は「患者」又は「個体」の語はヒトを含むのが典型的であるが、例えば、他の霊長動物、齧歯動物、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどの他の動物も含むことができる。

【0046】

[0073]前立腺癌に対する「グリーソングレード」の語は、1~10のグレードと規定される。第1のグレードに対する1つのスコア及び第2のグレードに対する1つのスコアの、2つのグリーソングレード数を実際に決定し、次いで加算して最終のグリーソンスコアを得る。グリーソンスコアは、病理学者により生検された組織試料の、第1のグレードと第2のグレードの和である。グリーソングレードスケール上の最低数は1であり、最高は5である。その結果、合計スコアは2(1+1)~10(5+5)であり得る。2~4の

50

スコアは、癌の侵襲スケール上、非常に低い。5～6のスコアは、軽度の侵襲性である。スコア7は、癌が中程度に侵襲性であることを示す。8～10のスコアは、癌が高度に侵襲性であることを示す。

【0047】

III. 実施形態の説明

[0074]一実施形態において、本発明は、患者からの腫瘍試料における、シグナル伝達分析物の発現のレベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）の度合いを測定（例えば、検出及び定量化）するための方法を提供する。別の一態様において、方法は患者に特異的な経路プロファイルを提供し、プロファイルは、基準経路プロファイルに対する、シグナル伝達分析物の発現及び／又は活性化の状態を表す。いくつかの実施形態において、基準プロファイルは、健常対象又は癌を有することが疑われない対象の経路プロファイルを表す。他の実施形態において、基準プロファイルは、癌細胞株の経路プロファイルを表す。

10

【0048】

[0075]したがって、本発明は、乳癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、胃癌、膵臓癌、前立腺癌、及び直腸結腸癌などの固形腫瘍を有する患者に利益を提供するのが有利である。いくつかの実施形態において、方法は、抗癌薬（例えば、HERファミリーインヒビター、PI3Kインヒビター、AKTインヒビター、MEKインヒビター、mTORインヒビター、アロマターゼインヒビター、PTENインヒビター、cMETインヒビターなど）及びこれらの組合せに対して臨床的に感受性である癌患者を選択するのに有用である。いくつかの実施形態において、方法は、患者に対して第一線の治療を選択するのに用いられる。他の実施形態において、方法は、進行性の、再発性の、又は再燃性の癌を有する患者に対して治療を選択するために行われる。本明細書の方法は、組合せ治療を選択するのに、又は適切な投与量及び処置レジメンを選択するのに、やはり有用である。

20

【0049】

[0076]いくつかの実施形態において、基準経路プロファイルは、抗癌薬処置の前に、特定のタイプの癌（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍、直腸結腸腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍など）を有する患者から得た試料を用いて産生される。

【0050】

[0077]別の一実施形態において、本発明は、癌細胞株に由来する試料における、シグナル伝達分析物の発現のレベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化又は複合体形成）の度合いを測定（例えば、検出及び定量化）することによる、基準経路プロファイルを決定するための方法を提供する。いくつかの場合において、癌細胞株を、成長因子（例えば、ヘレグリン、EGF、FGF、TGF- など）、及び／又は標的のインヒビターで刺激する。別の一態様において、方法は、細胞株及び／又は標的のインヒビターに特異的な経路プロファイルを提供し、プロファイルは、標的のインヒビター又はその組合せでの処置の前、間、及び／又は後の、細胞株のシグナル伝達分析物の発現及び／又は活性化の状態を表す。

30

【0051】

[0078]いくつかの実施形態において、細胞株は、それだけには限定されないが、乳癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、胃癌、皮膚癌、膵臓癌、前立腺癌、及び直腸結腸癌などの癌を有する患者に由来する。他の実施形態において、細胞株は、膀胱、乳房、肺、膵臓、胃、皮膚などのヒトの組織に由来する。さらに他の実施形態において、細胞株は癌細胞株である。いくつかの実施形態において、方法は、抗癌薬で処置した癌細胞株において、1つ又は複数のシグナル伝達分析物における変化を測定するのに有用である。

40

【0052】

[0079]別の一実施形態において、本発明は、抗癌薬の存在下又は非存在下のいずれかで、腫瘍試料におけるシグナル伝達タンパク質の活性化状態の検出及び／又は定量化を比較することによる、固形腫瘍癌を有する患者に抗癌薬の処置を選択するための方法を提供する。例えば、患者からの試料を様々な抗癌薬に暴露し、特定のセットのシグナル伝達分析物の活性化状態によって決定される通り、細胞に対して最も深刻な抗癌効果を誘発する抗

50

癌薬が、最適の治療として患者に選択される。本発明の方法を用いて、癌に対して患者特異的な個別化治療をデザインすることができる。他の実施形態において、方法を用いて、新たな治療を開発するための、新薬の開発につながる (d r u g g a b l e) 標的を同定することができる。

【 0 0 5 3 】

[0080]本発明は、癌に伴う1つ又は複数の制御解除されたシグナル伝達経路を下方制御 (例えば、不活性化又は停止) するのに好適な治療を選択するための方法も提供する。このように、本発明を用いて、所与の患者の腫瘍又は試料における、全ての及び/又は活性化したシグナル伝達タンパク質の収集によって提供される特定の分子シグネチャーに基づく、個別化治療のデザインを促進することができる。

10

【 0 0 5 4 】

[0081]別の一実施形態において、本発明は、治療クルの間に採取した、患者からの腫瘍試料におけるシグナル伝達分析物の、発現のレベル及び/又は活性化 (例えば、リン酸化) の度合いを測定 (例えば、検出及び定量化) することにより、疾患進行をモニタリングするための方法を提供する。処置の進行とともに癌細胞において活性であるシグナル伝達経路を絶えずモニタリングすることで、医師に、処置の有効性に対するさらなる情報をもたらされ、例えば、癌細胞が、同じ又は別のいずれかのシグナル伝達経路の活性化によって処置に対して抵抗性になった場合に、医師に、特定の処置コースを続け、又は別の処置のラインに切り替えるかのいずれかを促す。本明細書に記載する方法は、患者における腫瘍細胞が、抗癌治療に応答して1つ又は複数の代償性のシグナル経路を活性化したのを確認するのに用いられる。

20

【 0 0 5 5 】

[0082]いくつかの実施形態において、疾患をモニタリングするための方法を周期的に行って、経時の腫瘍細胞における変化を追跡する。経路の分析物の変化の長期的な分析は、治療応答又は疾患進行の予後マーカーであり得る。さらに別の一実施形態において、本発明の組成物及び方法は、標的のプロテインキナーゼにおける変異のため抗癌治療に対して抵抗性である患者、治療薬に対する抵抗性を獲得している患者、シグナル伝達分子により治療に適応している患者、治療レジメンに不服従である患者、及び/又は最適以下の薬物の投薬量を投与されている患者を同定するのに有利である。いくつかの実施形態において、方法は、特定の抗癌治療に対する患者の応答を予想することを含む。例えば、本発明の方法を、特定の経路プロファイル (例えば、活性化した P I 3 K、E G F R、H E R 2、及び/又は H E R 3) を有する患者は、患者が以前にトリプルネガティブ乳癌 (例えば、E R -、P R -、H E R 2 -) と診断されたとしても、組合せ治療 (例えば、H E R 2 調節性薬物及び T K I) の恩恵を受ける可能性があることを予想するのに用いることができる。

30

【 0 0 5 6 】

[0083]いくつかの実施形態において、本発明の方法は、1つ又は複数の標的の治療を受けている患者からの試料に対して、治療クルにわたって試料をスクリーニング及びモニタリングし、患者が代替の標的の治療又は組合せ治療に切り替えるか否かを評価することにより行われる。ある態様において、本発明は、癌又は腫瘍が現存する抗癌治療に適応しているか否かを決定するための方法を提供する。ある場合において、治療に対する腫瘍適応は、代償性のシグナル伝達経路の活性化をもたらし、この活性化は本発明の方法を用いて検出することができる。他の場合において、患者における腫瘍適応の決定により、患者の処置を代替の標的の治療又は組合せ治療に切り替えることが指摘される。

40

【 0 0 5 7 】

[0084]ある態様において、本明細書に記載する方法は、癌又は腫瘍の現存する抗癌治療に対する適応をモニタリング及び追跡することである。ある場合において、C E E R 技術を用いて経路の分析物の活性化を追跡及びモニタリングすることにより、例えば、活性化及び/又は発現に関連する経路にそらすことにより、現存する治療に対する経路の代償が存在するか否かを確認することができる。これらの技術により、治療の有効性の評価が可

50

能になる。オリジナルの経路の活性化が停止又は低減した場合、関連の経路を調査して、別の経路に経路の代償が存在するか否かを確認することが重要である。これらの場合には、組合せ治療のレジメンを推奨してもよく、又は治療を完全に切り替えることを推奨してもよい。例えば、本明細書に記載する実施例 3、4、及び 6 において説明する通り、本発明の方法を用いて、抗癌治療時に再発した患者からの腫瘍細胞における、活性化した H E R 1、H E R 2、H E R 3、c M E T、I G F - 1 R、P I 3 K、A K T、E R K、M E K、p 7 0 S 6 K、P D K 1、P R A S 4 0、P T E N、R P S 6、S H C のレベルをモニタリングする。これらの患者の腫瘍において、治療によって直接標的とならない代償性のシグナリング経路が活性化された。有利なことに、本明細書の方法を用いて、経路プロファイリング分析は、患者が P I 3 K インヒビター治療、M E K インヒビター治療、又は組合せ治療の臨床的恩恵を受け得ることを指摘する。

10

【 0 0 5 8 】

[0085] 標的のタンパク質又は遺伝子変異単独の発現の分析には、癌を有する対象、又は癌を有すると疑われる対象に対して臨床的有効性が最大である好適な治療レジメンを選択するのに限界がある。シグナル伝達分析物の包括的な経路プロファイリングにより、特定の抗癌剤の意図する標的のタンパク質に対する、これら抗癌剤の有効性に対する見識ある情報がもたらされる。本発明の方法は、代償性の経路の活性化など、潜在的な薬物抵抗性のメカニズムに関する価値ある情報も提供し、効果的な治療的処置に対する指針、及び癌を有する患者に対するレジメンを提供する。

20

【 0 0 5 9 】

A . 抗体アレイ

[0086] ある態様において、乳癌、肺癌、膵臓癌、直腸結腸癌、胃癌、皮膚癌、又は他の癌の細胞などの癌細胞の細胞抽出物における、1 つ又は複数の（例えば、複数の）シグナル伝達分子（例えば、受容体チロシンキナーゼ、例えば、H E R 2、若しくは E r b B ファミリーの他のメンバー、若しくは P I 3 K などのシグナリング経路構成成分）の発現レベル及び / 又は活性化状態を、支持体上に固定されている希釈系列の捕獲抗体を含む抗体ベースのアレイを用いて検出する。アレイは、様々なアドレス指定できる（a d d r e s s a b l e）位置において固体支持体の表面にカップリングされている、ある範囲の捕獲抗体濃度の、複数の様々な捕獲抗体を含むのが典型的である。

30

【 0 0 6 0 】

[0087] いくつかの特定の実施形態において、本発明のシグナル伝達経路プロファイリングは、少なくとも 1 つ又は複数の H E R 1、H E R 2、c M E T、c K I T、I G F - I R、P I 3 K、A K T、E R K、及び / 又は C K（すなわち、サイトケラチン）の発現レベル（例えば、合計量）を決定すること、並びに / 或いは少なくとも 1 つ又は複数の H E R 1（例えば、p H E R 1）、H E R 2（例えば、p H E R 2）、H E R 3（例えば、p H E R 3）、c M E T（例えば、p c M E T）、c K I T（例えば、p c K I T）、I G F - 1 R（例えば、p I G F - 1 R）、P I 3 K（例えば、P I 3 K 複合体）、A K T（例えば、p A K T）、E R K（例えば、p E R K）、S H C（例えば、p S H C）、P R A S 4 0（例えば、p P R A S 4 0）、p 7 0 S 6 K（例えば、p - p 7 0 S 6 K）、R P S 6（例えば、p R P S 6）、M E K（例えば、p M E K）、P D K 1（例えば、p P D K 1）、及び / 又は P T E N（例えば、p P T E N）の活性化レベル（例えば、リン酸化（「p」）若しくは複合体形成のレベル）を決定することを含む。

40

【 0 0 6 1 】

[0088] 特定の一実施形態において、本発明は、固体支持体上に固定されている複数の希釈系列の捕獲抗体を含む、優れたダイナミックレンジを有するアドレス指定できるアレイを提供するものであり、固体支持体では、各希釈系列の捕獲抗体は、シグナル伝達経路の構成成分及び他の標的タンパク質に対応する 1 つ又は複数の分析物に特異的である。様々な態様において、この実施形態は、特定の腫瘍に特徴的なシグナル伝達経路、例えば、腫瘍細胞において活性であるシグナル伝達経路（例えば、H E R 経路、c M E T 経路、I G F 1 R 経路、M E K 経路、P I 3 K 経路）の構成成分を含むアレイを含む。このように、

50

本発明は実践すると有利であり得、各シグナル伝達分子、又は癌を引き起こす潜在的な発現若しくは活性化の欠損を有する対象の他のタンパク質が単一のアレイ又はチップ上に表される。いくつかの態様において、特定の癌細胞において活性である所与のシグナル伝達経路の構成成分は、情報が細胞内のシグナル伝達経路によって中継される配列に対応する直線状の配列で整列している。特定の癌細胞において活性である所与のシグナル伝達経路の1つ又は複数の構成成分に特異的な捕獲抗体は、表面に関連する任意のアーチファクトを最小にするようにランダム化された様式でプリントすることもできる。このような多重化されたイムノアレイの例には、協同的近接イムノアッセイ (Collaborative Proximity Immunoassay) (COPIA) としても知られる、協同的酵素増強反応性イムノアッセイ (CEER) が含まれる。CEERは、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、以下の特許文書である、米国特許第8,163,499号; 国際公開第2008/036802号パンフレット、国際公開第2009/012140号パンフレット、国際公開第2009/108637号パンフレット、国際公開第2010/132723号パンフレット、国際公開第2011/008990号パンフレット、国際公開第2011/050069号パンフレット、及び2011年12月21日出願の国際出願PCT/US2011/66624、2012年3月2日出願の国際出願PCT/US12/27574、及び2012年8月31日出願の国際出願PCT/US2012/53505に記載されている。

10

【0062】

[0089]他の実施形態において、癌細胞の細胞抽出物における、シグナル伝達分析物(複数可)の1つ又は複数の(例えば、複数の)発現レベル及び/又は活性化状態を、ELISAなどのイムノアッセイを用いて検出する。シグナル伝達分析物の存在又はレベルを決定するのに適するELISAキットには、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、PeproTech (Rocky Hill, NJ)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)、及び/又はAbazyme (Needham, MA)がある。

20

30

【0063】

1. 単一検出アッセイ

[0090]いくつかの実施形態において、腫瘍細胞などの細胞の細胞抽出物における、対象の特定の分析物(例えば、PI3Kシグナリング経路、MEKシグナリング経路、HER2シグナリング経路、HER3シグナリング経路、及び/又は他の受容体チロシンキナーゼシグナリング経路の構成成分などのシグナル伝達分子)の発現及び/又は活性化のレベルを検出するためのアッセイは、優れたダイナミックレンジを有する、多重化された、ハイスループット2抗体アッセイである。非限定的な例として、アッセイにおいて用いられる2つの抗体は、(1)分析物に特異的な捕獲抗体、及び(2)活性化形態の分析物に特異的な検出抗体(すなわち、活性化状態依存的抗体)を含むことができる。活性化状態依存的抗体は、例えば、リン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体形成の状態の分析物を検出することができる。或いは、検出抗体は、細胞抽出物における分析物の合計量を検出する、活性化状態依存的抗体を含む。

40

【0064】

[0091]特定の一実施形態において、対象の分析物の発現又は活性化のレベルを検出するための2抗体のアッセイは、

(i)細胞抽出物を、1つ又は複数の希釈系列の捕獲抗体とインキュベートして、複数の捕獲された分析物を形成させるステップと、

(ii)複数の捕獲された分析物を、対応する分析物に特異的な検出抗体とインキュベ

50

ートして、複数の検出可能な捕獲された分析物を形成させるステップであって、検出抗体が、分析物の活性化（例えば、リン酸化）のレベルを検出するための活性化状態依存的抗体、又は分析物の発現レベル（例えば、合計量）を検出するための活性化状態非依存的抗体を含むステップと、

（ i i i ）複数の検出可能な捕獲された分析物を、シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーとインキュベートして、増幅したシグナルを産生させるステップと、

（ i v ）シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーから産生された、増幅したシグナルを検出するステップとを含む。

【 0 0 6 5 】

[0092] 捕獲抗体及び検出抗体が、分析物の結合に関して、抗体間の競合を最小にするように選択されるのが好ましい（すなわち、捕獲抗体及び検出抗体の両方が、対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる）。

【 0 0 6 6 】

[0093] 一実施形態において、検出抗体は、スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子にコンジュゲートしている。いくつかの態様において、スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子の分子量は 5 0 0 k D a である。

【 0 0 6 7 】

[0094] 一実施形態において、検出抗体は、結合対の第 1 のメンバー（例えば、ビオチン）を含み、シグナル増幅対の第 1 のメンバーは、結合対の第 2 のメンバー（例えば、ストレプトアビジン）を含む。結合対のメンバーは、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、検出抗体に、又はシグナル増幅対の第 1 のメンバーに、直接的又は間接的にカップリングしていてもよい。ある場合において、シグナル増幅対の第 1 のメンバーはペルオキシダーゼ（例えば、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ（H R P）、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロム c ペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨウ素酵素など）であり、シグナル増幅対の第 2 のメンバーはチラミド試薬（例えば、ビオチンチラミド）である。これらの場合において、増幅したシグナルをチラミド試薬のペルオキシダーゼ酸化によって産生して、過酸化水素（ H_2O_2 ）の存在下で活性化したチラミドを生成する。

【 0 0 6 8 】

[0095] 活性化したチラミドは、直接検出される、又は、例えば、ストレプトアビジン標識したフルオロフォア、若しくはストレプトアビジン標識したペルオキシダーゼと色素産生性試薬との組合せなどのシグナル検出試薬を添加したときに検出される。本発明において使用するのに適するフルオロフォアの例には、それだけには限定されないが、A l e x a F l u o r（登録商標）色素（例えば、A l e x a F l u o r（登録商標）5 5 5）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、O r e g o n G r e e n（商標）、ローダミン、T e x a s r e d、テトラローダミンイソチオシアネート（T R I T C）、C y D y e（商標）蛍光（例えば、C y 2、C y 3、C y 5）などが含まれる。ストレプトアビジン標識は、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、フルオロフォア又はペルオキシダーゼに、直接的又は間接的にカップリングしていてもよい。本発明における使用に適する色素産生性試薬の非限定的な例には、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンチジン（T M B）、3, 3' - ジアミノベンチジン（D A B）、2, 2' - アジノ - ビス（3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸）（A B T S）、4 - クロロ - 1 - ナフトール（4 C N）、及び / 又はボルフィリノーゲンが含まれる。

【 0 0 6 9 】

[0096] 本明細書に記載する 2 抗体アッセイを行うための例示のプロトコールは、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 8 6 3 7 号パンフレットにおいて提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

[0097] 2 抗体の手法の別の実施形態において、本発明は、切断された受容体の発現又は活性化のレベルを検出するための方法を提供し、方法は、

(i) 細胞抽出物を、全長の受容体の細胞外ドメイン (E C D) 結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートするステップと、

(i i) 複数のビーズを細胞抽出物から除去し、それによって全長の受容体を除去して、全長の受容体のない細胞抽出物を形成させるステップと、

(i i i) 全長の受容体のない細胞抽出物を、全長の受容体の細胞内ドメイン (I C D) 結合領域に特異的な希釈系列の 1 つ又は複数の捕獲抗体とインキュベートして、捕獲され切断された複数の受容体を形成させるステップと、

(i v) 捕獲された切断された複数の受容体を、全長の受容体の I C D 結合領域に特異的な検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕獲され切断された受容体を形成させるステップであって、検出抗体が、切断された受容体の発現レベル (例えば、全量) を検出するための、切断された受容体又は活性化状態非依存的抗体の活性化 (例えば、リン酸化) レベルを検出するための、活性化状態依存的抗体を含むステップと、

(v) 複数の検出可能な捕獲され切断された受容体を、シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーとインキュベートして、増幅したシグナルを産生するステップと、

(v i) シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーから産生された増幅したシグナルを検出するステップと

を含む。

【 0 0 7 1 】

[0098] ある実施形態において、切断された受容体は p 9 5 H E R 2 であり、全長の受容体は H E R 2 である。他のある実施形態において、細胞外ドメイン (E C D) 結合領域に特異的な複数のビーズは、ストレプトアビジン - ビオチン対を含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している (例えば、抗体は、全長の受容体の E C D 結合領域に特異的である) 。

【 0 0 7 2 】

[0099] その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 8 6 3 7 号パンフレットは、対象の受容体の細胞外ドメイン (E C D) に対する抗体でコーティングされているビーズは、全長の受容体 (例えば、H E R 2) に結合して、アッセイからいかなる全長の受容体を除去するが、切断された受容体 (例えば、p 9 5 H E R 2) には結合しないことを示している。国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 8 6 3 7 号パンフレットは、切断された受容体 (例えば、p 9 5 H E R 2) は、捕獲抗体にひとたび結合すると、次いで全長の受容体 (例えば、H E R 2) の細胞内ドメイン (I C D) に特異的な検出抗体によって検出され得ることを示している。検出抗体は、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ (H R P) に直接コンジュゲートし得る。次いで、チラミドシグナル増幅 (T S A) を行って、検出しようとするシグナルを産生してもよい。切断された受容体 (例えば、p 9 5 H E R 2) の発現レベル又は活性化状態を調べて、例えば、その合計濃度、又はそのリン酸化状態、ユビキチン化状態、及び / 又は複合体形成状態を決定することができる。

【 0 0 7 3 】

2 . 二重検出アッセイ

[0100] 一実施形態において、本発明は、それだけには限定されないが、H E R 1 / H E R 2 二量体、H E R 1 / H E R 3 二量体、H E R 2 / H E R 3 二量体、H E R 2 / H E R 2 二量体、H E R 2 / H E R 4 二量体、p 9 5 H E R 2 / H E R 3 二量体、p 9 5 H E R 2 / H E R 2 二量体などを含めた、受容体チロシンキナーゼ (R T K) のホモ二量体化又はヘテロ二量体化を、検出及び / 又は定量化するための方法を提供する。ホモ二量体は、ホモ二量体化と呼ばれるプロセスにおいて、H E R 2 / H E R 2 などの 2 つの同一の分子によって形成され、ヘテロ二量体は、ヘテロ二量体化と呼ばれるプロセスにおいて、H E R 1 / H E R 3 などの 2 つの異なる巨大分子によって形成される。この態様において、近

接アッセイは、(1)二量体対の1メンバーに特異的な捕獲抗体、(2)二量体対の第1のメンバーに特異的な第1の検出抗体(第1の検出抗体は、捕獲抗体と異なるドメインに特異的である)、及び(3)二量体対の第2のメンバーに特異的な第2の検出抗体の3つの抗体を含む。癌細胞におけるRTK二量体化の検出に関するCEER技術は、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許公開第2008/0261829号、第2009/0035792号、第2010/0167945号、第2011/0071042号、及び第2011/0281748号に記載されている。

【0074】

[0101]別の一実施形態において、本発明は、PI3K複合体の量、並びにPI3K複合体の活性化及び/又はリン酸化の量を、検出及び/又は定量化するための方法を提供する。PI3K複合体は、i)二量体化した受容体チロシンキナーゼ対、ii)PI3K p85サブユニット及びPI3K p110(例えば、又は)サブユニットを含む。アッセイは、(1)PI3K p85又はPI3K p110のいずれかのサブユニットに特異的な捕獲抗体、(2)二量体対の第1のメンバー又はPI3Kサブユニットに特異的な第1の検出抗体であって、第1の検出抗体が捕獲抗体と異なるドメインに特異的であり、PI3Kサブユニットが活性化していてもよい、第1の検出抗体、及び(3)二量体対の第2のメンバー又はPI3Kサブユニットに特異的な第2の検出抗体の3つの抗体を含む。

【0075】

[0102]特定の一実施形態において、a)二量体化した受容体チロシンキナーゼ対、b)PI3K p85サブユニット及びPI3K p110サブユニットを含むPI3K複合体のレベルを測定(例えば、検出及び定量化)するための近接アッセイは、

(i)細胞抽出物を、1つ又は複数の希釈系列の捕獲抗体とインキュベートして、複数の捕獲された分析物を形成させるステップと、

(ii)複数の捕獲された分析物を、a)二量体化した受容体チロシンキナーゼ対の1メンバーに特異的な、第1の若しくは複数の第1の活性化状態非依存的抗体、又はb)PI3K p110サブユニットのいずれかを含む第1の検出抗体、並びにa)二量体化した受容体チロシンキナーゼ対、PI3K p85、若しくはPI3K p110サブユニットの1メンバーに特異的な、a)第2の若しくは複数の第2の活性化状態非依存的抗体、又はb)PI3K p85サブユニット及び/若しくはPI3K p110サブユニットに特異的な活性化状態依存的抗体のいずれかを含む第2の検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な、捕獲され、二量体化され、複合体化された分析物を形成するステップであって、

第1の検出抗体が、促進性部分で標識されており、第2の検出抗体がシグナル増幅対の第1のメンバーで標識されており、促進性部分が、シグナル増幅対の第1のメンバーに向けて流れ、第1のメンバーと反応する酸化剤を産生するステップと、

(iii)複数の検出可能な、捕獲され、二量体化された分析物を、シグナル増幅対の第2のメンバーとインキュベートして、増幅したシグナルを産生するステップと、

(iv)シグナル増幅対の第1のメンバー及び第2のメンバーから産生された増幅したシグナルを検出するステップであって、増幅したシグナルの量が細胞抽出物におけるPI3K複合体の量に相関的であるステップとを含む。

【0076】

[0103]いくつかの実施形態において、PI3K複合体のレベルを、i)少なくとも2つの受容体チロシンキナーゼ(RTK)の二量体化、ii)PI3K p85サブユニット及びPI3K p110サブユニットを含む前記PI3K複合体に対して産生された検量線に対して校正する。

【0077】

[0104]いくつかの実施形態において、PI3K複合体活性化のレベルを、a)ホスホ-PI3Kの量を、試料中に存在するPI3Kの合計レベルと比べること、及びb)活性化

10

20

30

40

50

した P I 3 K 複合体の全 P I 3 K に対する比を確立することにより決定する。P I 3 K 複合体活性化のレベルは、比に基づいて決定される。いくつかの場合において、P I 3 K 複合体活性化のレベルはカットオフ閾値未満であり、これは対象が P I 3 K インヒビター処置の恩恵を受けないことを指摘する。いくつかの場合において、P I 3 K 複合体活性化のレベルはカットオフ閾値を超え、これは対象が P I 3 K インヒビター処置の恩恵を受けることを指摘する。

【 0 0 7 8 】

[0105]いくつかの実施形態において、P I 3 K 複合体活性化（例えば、リン酸化した P I 3 K 複合体）のレベルは、P I 3 K インヒビター単独を対象に選択しなければならないことを指摘する。他の実施形態において、P I 3 K 複合体活性化のレベルは、P I 3 K インヒビター及び別の抗癌薬を含む組合せ治療を対象に選択しなければならないことを指摘する。

10

【 0 0 7 9 】

[0106]腫瘍細胞における P I 3 K 複合体形成の検出に関する C E E R 技術は、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、2012年8月31日出願の国際出願 P C T / U S 2 0 1 2 / 0 5 3 5 0 5 に記載されている。

【 0 0 8 0 】

[0107]いくつかの実施形態において、特定のシグナル伝達分析物の活性化状態の決定は、活性化した分析物の量の、分析物合計の量に対する比を産生することを含む。例えば、活性化した P I 3 K の全 P I 3 K に対する比は、試料中の P I 3 K の活性化状態を表す。対象の活性化した分析物の全分析物に対する比により、対象の分析物の様々な発現を有する試料間の比較が可能になる。

20

【 0 0 8 1 】

[0108]いくつかの実施形態において、患者試料からの1セットのシグナル伝達分析物の活性化状態は、1つ又は複数の統計上のアルゴリズムによって、経路プロファイルに変換される。

【 0 0 8 2 】

[0109]いくつかの実施形態において、腫瘍細胞などの細胞の細胞抽出物における、対象の特定の分析物（例えば、H E R 2 シグナリング経路、H E R 3 シグナリング経路、及び/又は他の受容体チロシンキナーゼシグナリング経路の構成成分などのシグナル伝達分子）の、発現及び/又は活性化レベルを検出するためのアッセイは、複合の、ハイスループットの、優れたダイナミックレンジを有する近接（すなわち、3抗体）アッセイを含む。非限定的な例として、近接アッセイにおいて用いられる3抗体は、（1）分析物に特異的な捕獲抗体、（2）活性化型の分析物に特異的な検出抗体（すなわち、活性化状態依存的抗体）、及び（3）全量の分析物を検出する検出抗体（すなわち、活性化状態非依存的抗体）を含むことができる。活性化状態依存的抗体は、分析物の、例えば、リン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体形成状態を検出することができる。活性化状態非依存的抗体は、全量の分析物を検出することができる。特定の実施形態において、本明細書に記載する近接アッセイを協同的酵素増強反応性イムノアッセイ（C E E R）と呼ぶ。

30

【 0 0 8 3 】

[0110]特定の一実施形態において、対象の分析物の活性化レベル又は状態を検出するための近接アッセイ（例えば、C E E R）は、

40

（i）細胞抽出物を、1つ又は複数の希釈系列の捕獲抗体とインキュベートして、複数の捕獲された分析物を形成させるステップと、

（i i）複数の捕獲された分析物を、1つ又は複数の活性化状態非依存的抗体、及び対応する分析物に特異的な活性化状態依存的抗体の1つ又は複数を含む検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕獲された分析物を形成するステップであって、

活性化状態非依存的抗体が促進性部分で標識されており、活性化状態依存的抗体がシグナル増幅対の第1のメンバーで標識されており、促進性部分が、シグナル増幅対の第1のメンバーに向けて流れ、第1のメンバーと反応する酸化剤を産生するステップと、

50

(i i i) 複数の検出可能な捕獲された分析物を、シグナル増幅対の第 2 のメンバーとインキュベートして増幅したシグナルを産生するステップと、

(i v) シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーから産生された増幅したシグナルを検出するステップとを含む。

【 0 0 8 4 】

[0111]別の特定の一実施形態において、切断された受容体である対象の分析物の活性化レベル又は状態を検出するための近接アッセイ(例えば、C E E R)は、

(i) 細胞抽出物を、全長の受容体の細胞外ドメイン(E C R)結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートするステップと、

(i i) 複数のビーズを細胞抽出物から除去し、それによって全長の受容体を除去して、全長の受容体のない細胞抽出物を形成させるステップと、

(i i i) 全長の受容体のない細胞抽出物を、全長の受容体の細胞内ドメイン(I C D)結合領域に特異的な捕獲抗体の 1 つ又は複数とインキュベートして、捕獲され切断された複数の受容体を形成させるステップと、

(i v) 捕獲され切断された複数の受容体を、1 つ又は複数の活性化状態非依存的抗体、及び全長の受容体の I C D 結合領域に特異的な 1 つ又は複数の活性化状態依存的抗体を含む検出抗体とインキュベートして、検出可能な捕獲され切断された複数の受容体を形成させるステップであって、

活性化状態非依存的抗体が促進性部分で標識され、活性化状態依存的抗体がシグナル増幅対の第 1 のメンバーで標識され、促進性部分はシグナル増幅対の第 1 のメンバーに向けて流れ、第 1 のメンバーと反応する酸化剤を産生するステップと、

(v) 検出可能な捕獲され切断された複数の受容体を、シグナル増幅対の第 2 のメンバーとインキュベートして増幅したシグナルを産生させるステップと、

(v i) シグナル増幅対の第 1 のメンバー及び第 2 のメンバーから産生された増幅したシグナルを検出するステップとを含む。

【 0 0 8 5 】

[0112]ある実施形態において、切断された受容体は p 9 5 H E R 2 であり、全長の受容体は H E R 2 である。他のある実施形態において、細胞外ドメイン(E C D)結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン - ビオチン対を含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している(例えば、抗体は全長の受容体の E C D 結合領域に特異的である)。

【 0 0 8 6 】

[0113]一実施形態において、検出抗体は、スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子にコンジュゲートしている。スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子の分子量は約 5 0 0 k D a (例えば、2 5 0、3 0 0、3 5 0、4 0 0、4 5 0、5 0 0、5 5 0、6 0 0、6 5 0、7 0 0、又は 7 5 0 k D a)であるのが典型的である。

【 0 0 8 7 】

[0114]代替の実施形態において、活性化状態依存的抗体を促進性部分で標識してもよく、活性化状態非依存的抗体をシグナル増幅対の第 1 のメンバーで標識してもよい。

【 0 0 8 8 】

[0115]別の非限定的な一例として、本明細書に記載する近接アッセイ(例えば、C E E R)において用いる 3 抗体は、(1)分析物に特異的な捕獲抗体、(2)全量の分析物を検出する特異的な第 1 の検出抗体(すなわち、第 1 の活性化状態非依存的抗体)、及び(3)全量の分析物を検出する第 2 の検出抗体(すなわち、第 2 の活性化状態非依存的抗体)を含むことができる。好ましい実施形態において、第 1 及び第 2 の活性化状態非依存的抗体は、分析物上の異なる(例えば、個々の)エピトープを認識する。

【 0 0 8 9 】

[0116]特定の一実施形態において、対象の分析物の発現レベルを検出するための近接ア

10

20

30

40

50

ッセイ（例えば、C E E R）は、

（ i ）細胞抽出物を、1つ又は複数の希釈系列の捕獲抗体とインキュベートして、複数の捕獲された分析物を形成させるステップと、

（ i i ）複数の捕獲された分析物を、相当する分析物に特異的な1つ又は複数の、第1及び第2の活性化状態非依存的抗体を含む検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕獲された分析物を形成させるステップであって、

第1の活性化状態非依存的抗体が促進性部分で標識されており、第2の活性化状態非依存的抗体がシグナル増幅対の第1のメンバーで標識されており、促進性部分がシグナル増幅対の第1のメンバーに向けて流れ、第1のメンバーと反応する酸化剤を産生するステップと、

10

（ i i i ）複数の検出可能な捕獲された分析物を、シグナル増幅対の第2のメンバーとインキュベートして増幅したシグナルを産生するステップと、

（ i v ）シグナル増幅対の第1のメンバー及び第2のメンバーから産生された、増幅したシグナルを検出するステップとを含む。

【 0 0 9 0 】

[0117]特定の別の一実施形態において、切断された受容体である対象の分析物の発現レベルを検出するための近接アッセイ（例えば、C E E R）は、

（ i ）細胞抽出物を、全長の受容体の細胞外ドメイン（ E C D ）結合領域に特異的な複数のビーズとインキュベートするステップと、

20

（ i i ）複数のビーズを細胞抽出物から除去し、それにより全長の受容体を除去して全長の受容体のない細胞抽出物を形成させるステップと、

（ i i i ）全長の受容体のない細胞抽出物を、全長の受容体の細胞内ドメイン（ I C D ）結合領域に特異的な1つ又は複数の捕獲抗体とインキュベートして、捕獲され切断された複数の受容体を形成させるステップと、

（ i v ）捕獲され切断された複数の受容体を、全長の受容体の I C D 結合領域に特異的な第1及び第2の活性化状態非依存的抗体の1つ又は複数を含む検出抗体とインキュベートして、複数の検出可能な捕獲され切断された受容体を形成させるステップであって、

第1の活性化状態非依存的抗体が促進性部分で標識されており、第2の活性化状態非依存的抗体がシグナル増幅対の第1のメンバーで標識されており、促進性部分がシグナル増幅対の第1のメンバーに向けて流れ、第1のメンバーと反応する酸化剤を産生するステップと、

30

（ v ）複数の検出可能な捕獲され切断された受容体を、シグナル増幅対の第2のメンバーとインキュベートして、増幅したシグナルを産生させるステップと、

（ i v ）シグナル増幅対の第1のメンバー及び第2のメンバーから産生された、増幅したシグナルを検出するステップとを含む。

【 0 0 9 1 】

[0118]ある実施形態において、切断された受容体は p 9 5 H E R 2 であり、全長の受容体は H E R 2 である。他のある実施形態において、細胞外ドメイン（ E C D ）結合領域に特異的な複数のビーズはストレプトアビジン - ビオチン対を含み、ビオチンはビーズに付着しており、ビオチンは抗体に付着している（例えば、抗体は全長の受容体の E C D 結合領域に特異的である）。

40

【 0 0 9 2 】

[0119]代替の実施形態において、第1の活性化状態非依存的抗体は、シグナル増幅対の第1のメンバーで標識されていてよく、第2の活性化状態非依存的抗体は促進性部分で標識されていてよい。

【 0 0 9 3 】

[0120]本明細書に記載する近接アッセイは、様々なアドレス指定できる位置で固体支持体の表面にカップリングしている、ある範囲の捕獲抗体濃度の1つ又は複数の様々な捕獲

50

抗体を含む、抗体ベースのアレイであるのが典型的である。本発明において用いるのに適する固体支持体の例を上記に記載する。

【0094】

[0121]捕獲抗体、活性化状態非依存的抗体、及び活性化状態依存的抗体は、分析物の結合に関して抗体間の競合を最小にするように選択されるのが好ましい（すなわち、全ての抗体が、これらの対応するシグナル伝達分子に同時に結合することができる）。

【0095】

[0122]いくつかの実施形態において、1つ又は複数の分析物の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存的抗体、又は代替的に、1つ又は複数の分析物の発現レベルを検出するための第1の活性化状態非依存的抗体は、検出可能な部分をさらに含んでいる。このような場合には、検出可能な部分の量は、細胞抽出物における1つ又は複数の分析物の量に相関的である。検出可能な部分の例には、それだけには限定されないが、蛍光標識、化学反応性標識、酵素標識、放射性標識などが含まれる。検出可能な部分が、Alexa Fluor（登録商標）色素（例えば、Alexa Fluor（登録商標）647）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）；ローダミン、Texas red、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、CyDye（商標）蛍光（例えば、Cy2、Cy3、Cy5）などのフルオロフォアであるのが好ましい。検出可能な部分は、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、活性化状態非依存的抗体に、直接的又は間接的にカップリングしてもよい。

10

20

【0096】

[0123]ある場合において、1つ又は複数の分析物の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存的抗体、又は代替的に、1つ又は複数の分析物の発現レベルを検出するための第1の活性化状態非依存的抗体は、促進性部分で直接標識されている。促進性部分は、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、活性化状態非依存的抗体にカップリングしていてもよい。本発明において用いるのに適する促進性部分には、促進性部分に対して近接の（すなわち、空間的に近く、又は密接した）別の分子に向けて流れ（すなわち、それに向かい）、別の分子と反応する（すなわち、結合し、それにより結合され、若しくはそれと複合体を形成する）酸化剤を生成することができる任意の分子が含まれる。促進性部分の例には、制限なく、電子受容体として分子酸素（ O_2 ）を伴う酸化/還元反応を触媒するグルコースオキシダーゼ又は任意の他の酵素などの酵素、及びメチレンブルー、ローズベンガル、ポルフィリン、スクアレート（squarate）色素、フタロシアニンなどの光増感剤が含まれる。酸化剤の非限定的な例には、過酸化水素（ H_2O_2 ）、一重項酸素、及び酸化/還元反応において酸素原子を輸送し、又は電子を獲得する任意の他の化合物が含まれる。適切な基質（例えば、グルコース、光など）の存在下で、促進性部分（例えば、グルコースオキシダーゼ、光増感剤など）が、2つの部分が相互に近接している場合にシグナル増幅対の第1のメンバー（例えば、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ（HRP）、保護基によって保護されているハプテン、酵素インヒビターに対するチオエーテル連結によって不活化されている酵素など）に向けて流れ、第1のメンバーと反応する酸化剤（例えば、過酸化水素（ H_2O_2 ）、一重項酸素など）を生成するのが好ましい。

30

40

【0097】

[0124]ある場合において、促進性部分及び活性化状態非依存的抗体は、スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子にコンジュゲートしていてもよい。スルフヒドリルが活性化するデキストラン分子の分子量は、約500 kDa（例えば、約250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、又は750 kDa）であるのが典型的である。

【0098】

[0125]他のある場合において、1つ又は複数の分析物の活性化レベルを検出するための活性化状態非依存的抗体、又は代替的に、1つ又は複数の分析物の発現レベルを検出する

50

ための第1の活性化状態非依存的抗体は、活性化状態依存的抗体にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドリンカーと促進性部分にコンジュゲートしている相補的なオリゴヌクレオチドリンカーとの間のハイブリダイゼーションによって、促進性部分で間接的に標識されている。オリゴヌクレオチドリンカーは、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、促進性部分又は活性化状態非依存的抗体にカップリングしていてもよい。いくつかの実施形態において、促進性部分にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドリンカーは、活性化状態非依存的抗体にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドリンカーに対して100%の相補性を有する。他の実施形態において、オリゴヌクレオチドリンカー対は、例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーション時に、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、又はそれを超えるミスマッチ領域を含む。当業者であれば、様々な分析物に特異的な活性化状態非依存的抗体は、同じオリゴヌクレオチドリンカー又は異なるオリゴヌクレオチドリンカーのいずれかにコンジュゲートしていてもよいことを理解されよう。

10

20

30

40

50

【0099】

[0126]促進性部分又は活性化状態非依存的抗体にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドリンカーの長さは変動することができる。一般的に、リンカー配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、又は100ヌクレオチドの長さであってよい。ランダムな核酸配列がカップリングのために産生されるのが典型的である。非限定的な一例として、ライブラリーのオリゴヌクレオチドリンカーを、スペーサドメイン、シグネチャドメイン、及びコンジュゲーションドメインの、3つの別々の隣接するドメインを有するようにデザインすることができる。オリゴヌクレオチドリンカーが、それに対してリンカーがコンジュゲートしている、促進性部分又は活性化状態非依存的抗体の機能を損なわずに、効率的にカップリングするようにデザインされるのが好ましい。

【0100】

[0127]オリゴヌクレオチドリンカー配列は、様々なアッセイ条件下で、任意の2次構造の形成を防ぎ、又は最小にするようにデザインすることができる。融解温度は、全体的なアッセイ手順にリンカーが関与できるように、リンカー内の各セグメントに対して注意深くモニタリングされるのが典型的である。一般的に、リンカー配列のセグメントの融解温度の範囲は、1～10の間である。規定されたイオン濃度下で融解温度、二次構造、及びヘアピン構造を決定するためのコンピュータアルゴリズム（例えば、OLIGO6.0）を用いて、各リンカー内の3つの異なるドメイン各々を分析することができる。全体的な組み合わせられた配列を、その構造の特徴付け、及び他のコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドリンカー配列に対するその互換性、例えばストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、相補的なオリゴヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするか否かについて分析することもできる。

【0101】

[0128]オリゴヌクレオチドリンカーのスペーサ領域により、コンジュゲーションドメインの、オリゴヌクレオチド架橋部位からの十分な分離がもたらされる。コンジュゲーションドメインは、相補的なオリゴヌクレオチドリンカー配列で標識された分子を、核酸ハイブリダイゼーションによりコンジュゲーションドメインに連結するように機能する。核酸媒介性ハイブリダイゼーションを、抗体-分析物（すなわち、抗原）複合体形成の前又は後のいずれかに行うことができ、より柔軟なアッセイフォーマットが提供される。直接的抗体コンジュゲーション法の多くと異なり、比較的小型のオリゴヌクレオチドの、抗体又は他の分子への連結は、抗体の、その標的の分析物に対する特異的な親和性に対して、又はコンジュゲートした分子の機能に対して影響が最小である。

【0102】

[0129]いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドリンカーのシグネチャー配列ドメインを、複合の多重化されたタンパク質アッセイにおいて用いることができる。複数の抗体を、様々なシグネチャー配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーとコンジュゲ

トすることができる。多重化されたイムノアッセイにおいて、好適なプローブで標識されたレポーターオリゴヌクレオチド配列を、多重化されたアッセイフォーマットにおける抗体と抗原との間の交差反応性を検出するのに用いることができる。

【0103】

[0130]オリゴヌクレオチドリンカーは、いくつかの異なる方法を用いて、抗体又は他の分子にコンジュゲートしていてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドリンカーは、5'末端又は3'末端のいずれか上のチオール基と合成することができる。チオール基は還元剤（例えば、TCEP-HCl）を用いて脱保護することができ、得られたリンカーは脱塩スピンカラムを用いて精製することができる。得られた脱保護されたオリゴヌクレオチドリンカーは、SMCCなどのヘテロ二官能基架橋剤を用いて、抗体の一級アミン又は他のタイプのタンパク質にコンジュゲートしていてもよい。或いは、オリゴヌクレオチド上の5'-リン酸基を、水溶性のカルボジイミドEDCで処理してリン酸エステルを形成させ、引き続きアミン含有分子にカップリングさせてもよい。ある場合において、3'-リボース残基上のジオールを酸化してアルデヒド基にし、次いで還元的アミノ化を用いて抗体のアミン基又は他のタイプのタンパク質にコンジュゲートしてもよい。他のある場合において、オリゴヌクレオチドリンカーを、3'又は5'末端いずれかにビオチン修飾をして合成し、ストレプトアビジン標識した分子にコンジュゲートしてもよい。

10

【0104】

[0131]オリゴヌクレオチドリンカーは、Usmanら、J. Am. Chem. Soc.、109巻、7845頁（1987年）；Scarlingeら、Nucleic Acids Res.、18巻、5433頁（1990年）；Wincottら、Nucleic Acids Res.、23巻、2677～2684頁（1995年）；及びWincottら、Methods Mol. Biol.、74巻、59頁（1997年）に記載されているものなど、当技術分野において知られている任意の様々な技術を用いて合成することができる。一般的に、オリゴヌクレオチドの合成は、5'-末端のジメトキシトリチル及び3'-末端のホスホラミダイトなど、通常の核酸保護基及びカップリング基を使用する。オリゴヌクレオチド合成に適する試薬、核酸の脱保護に適する方法、及び核酸の精製に適する方法は、当業者には知られている。

20

【0105】

[0132]ある場合において、1つ又は複数の分析物の活性化レベルを検出するための活性化状態依存的抗体、又は代替的に、1つ又は複数の分析物の発現レベルを検出するための第2の活性化状態非依存的抗体を、シグナル増幅対の第1のメンバーで直接標識する。シグナル増幅対のメンバーを、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、活性化状態依存的抗体とカップリングさせて活性化レベルを検出することができ、又は第2の活性化状態非依存的抗体とカップリングさせて発現レベルを検出することができる。他のある場合において、活性化状態依存的抗体又は第2の活性化状態非依存的抗体にコンジュゲートしている結合対の第1のメンバーと、シグナル増幅対の第1のメンバーにコンジュゲートしている結合対の第2のメンバーとの間の結合によって、活性化状態依存的抗体又は第2の活性化状態非依存的抗体を、シグナル増幅対の第1のメンバーで間接的に標識する。結合対のメンバー（例えば、ビオチン/ストレプトアビジン）を、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、シグナル増幅対のメンバーに、又は活性化状態依存的抗体若しくは第2の活性化状態非依存的抗体にカップリングさせてもよい。シグナル増幅対メンバーの例には、それだけには限定されないが、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ（HRP）、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、シトクロムcペルオキシダーゼ、好酸球ペルオキシダーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、甲状腺ペルオキシダーゼ、脱ヨウ素酵素などのペルオキシダーゼが含まれる。シグナル増幅対のメンバーの他の例には、保護基によって保護されているハプテン、及び酵素インヒビターに対するチオエーテル連結によって不活性化されている酵素が含まれる。

30

40

【0106】

50

[0133]近接チャネリング (proximity channeling) の一例において、促進性部分はグルコースオキシダーゼ (GO) であり、シグナル増幅対の第1のメンバーはセイヨウワサビのペルオキシダーゼ (HRP) である。GOがグルコースなどの基質と接触すると、酸化剤 (すなわち、過酸化水素 (H_2O_2)) を産生する。HRPがGOに対してチャネリング近接内にある場合、GOによって産生された H_2O_2 がHRPに向けて流れ、HRPと複合体形成してHRP- H_2O_2 複合体を形成し、これが、シグナル増幅対の第2のメンバー (例えば、ルミノール若しくはイソルミノールなどの化学発光基質、又はチラミド (例えば、ビオチン-チラミド)、ホモバニリン酸、若しくは4-ヒドロキシフェニル酢酸などの蛍光発生的基質) の存在下で、増幅したシグナルを産生する。近接アッセイにおいてGO及びHRPを用いる方法は、例えば、Langryら、U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999年) に記載されている。ビオチン-チラミドをシグナル増幅対の第2のメンバーとして用いる場合、HRP- H_2O_2 複合体がチラミドを酸化して反応性チラミドラジカルを産生し、これが近くの求核性残基に共有結合する。活性化したチラミドは、直接検出され、又は、例えば、ストレプトアビジン標識したフルオロフォア若しくはストレプトアビジン標識したペルオキシダーゼと色素産生性試薬との組合せなどのシグナル検出試薬を添加したときに検出される。本発明において用いるのに適するフルオロフォアの例には、それだけには限定されないが、Alexa Fluor (登録商標) 色素 (例えば、Alexa Fluor (登録商標) 555)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、Oregon Green (商標); ローダミン、Texas red、テトラローダミンイソチオシアネート (TRITC)、CyDye (商標) 蛍光 (例えば、Cy2、Cy3、Cy5) などが含まれる。ストレプトアビジン標識を、当技術分野においてよく知られている方法を用いて、フルオロフォア又はペルオキシダーゼに直接的又は間接的にカップリングしてもよい。本発明における使用に適する色素産生性試薬の非限定的な例には、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン (TMB)、3, 3'-ジアミノベンチジン (DAB)、2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、4-クロロ-1-ナフトール (4CN)、及び/又はポルフィリノーゲンが含まれる。

【0107】

[0134]近接チャネリングの別の一例において、促進性部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは、ハプテンの特異的な結合パートナー (例えば、リガンド、抗体など) に対する結合を妨げる保護基で保護されている、複数のハプテンで標識されている大型分子である。例えば、シグナル増幅対のメンバーは、保護されているビオチン、クマリン、及び/又はフルオレセイン分子で標識されているデキストラン分子であってよい。適切な保護基には、それだけには限定されないが、フェノキシ-、アナリノ- (anilino-)、オレフィン-、チオエーテル-、及びセレノエーテル保護基が含まれる。本発明の近接アッセイにおいて用いるのに適するさらなる光増感剤及び保護されているハプテン分子は、米国特許第5, 807, 675号に記載されている。光増感剤を光で励起させると酸化剤 (すなわち、一重項酸素) を産生する。ハプテン分子が光増感剤に対してチャネリング近接内にある場合、光増感剤によって産生された一重項酸素は、ハプテンの保護基上のチオエーテルに向けて流れ、チオエーテルと反応してカルボニル基 (ケトン又はアルデヒド) 及びスルフィン酸を産生し、ハプテンから保護基を放出する。次いで、非保護のハプテンは、シグナル増幅対の第2のメンバー (例えば、検出可能なシグナルを産生することができる特異的な結合パートナー) に特異的に結合するのに利用可能である。例えば、ハプテンがビオチンである場合、特異的な結合パートナーは酵素標識されているストレプトアビジンであってよい。例示の酵素には、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、HRPなどが含まれる。非結合の試薬を洗浄して除去した後、酵素の検出可能な (例えば、蛍光、化学発光性、色素産生性などの) 基質を加えることによって、検出可能なシグナルを産生し、当技術分野において知られている適切な方法及び計測手段 (instrumentation) を用いて検出してもよい。或いは、検出可能なシグナ

ルを、チラミドシグナルの増幅を用いて増幅してもよく、活性化したチラミドを、直接検出し、又は上記に記載したシグナル検出試薬の添加時に検出してもよい。

【0108】

[0135]近接チャネリングのさらに別の一例において、促進性部分は光増感剤であり、シグナル増幅対の第1のメンバーは酵素 - インヒビター複合体である。酵素及びインヒビター（例えば、リン酸で標識したデキストラン）は、切断可能なリンカー（例えば、チオエーテル）によって一緒に連結されている。光増感剤が光で励起されると、酸化剤（すなわち、一重項酸素）を産生する。酵素 - インヒビター複合体が、光増感剤に対してチャネリング近接内にある場合、光増感剤によって産生された一重項酸素は切断可能なリンカーに向けて流れ、切断可能なリンカーと反応し、酵素からインヒビターを放出し、それによって酵素が活性化する。酵素の基質を加えて検出可能なシグナルを産生し、又は代替的に、増幅試薬を加えて増幅したシグナルを産生する。

10

【0109】

[0136]近接チャネリングのさらなる一例において、促進性部分はHRPであり、シグナル増幅対の第1のメンバーは上記に記載した通り、保護されているハプテン又は酵素 - インヒビター複合体であり、保護基はp - アルコキシフェノールを含む。フェニレンジアミン及びH₂O₂を加えると反応性フェニレンジイミンが産生され、これが保護されたハプテン又は酵素 - インヒビター複合体を流れ、p - アルコキシフェノール保護基と反応して、暴露されたハプテン又は反応性酵素を産生する。増幅したシグナルを、上記に記載した通りに産生及び検出する（例えば、米国特許第5,532,138号及び第5,445,944号を参照されたい）。

20

【0110】

[0137]本明細書に記載する近接アッセイを行うための例示のプロトコールは、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、国際公開第2009/108637号パンフレットに提供されている。

【0111】

[0138]別の一実施形態において、本発明は、上記に記載した近接アッセイを行うためのキットであって、(a)固体支持体上に固定されている、希釈系列の1つ又は複数の捕獲抗体、並びに(b)1つ又は複数の検出抗体（例えば、活性化レベルを検出するための活性化状態非依存的抗体と活性化状態依存的抗体との組合せ、並びに/又は発現レベルを検出するための第1及び第2の活性化状態非依存的抗体の組合せ）を含むキットを提供する。いくつかの場合において、キットは、腫瘍細胞などの細胞の1つ又は複数のシグナル伝達分子の発現及び/又は活性化状態を検出するための、キットを用いた方法に対する指示書をさらに含むことができる。キットはまた、例えば、シグナル増幅対の第1のメンバー及び第2のメンバー、チラミドシグナル増幅試薬、促進性部分のための基質、洗浄バッファーなど、本発明の特定の方法を行うことに関して、上記に記載した任意のさらなる試薬を含むことができる。

30

【0112】

3. 抗体

[0139]本明細書に記載する方法は、シグナル伝達分析物（例えば、HER1、HER2、HER3、cMET、IGF-1R、PI3K、AKT、ERK、MEK、p70S6K、PDK1、PRAS40、PTEN、RPS6、及びSHC）の、発現のレベル及び/又は活性化の度合い（例えば、リン酸化若しくは複合体生成）を、検出し、測定し、定量化するための抗体を利用するものである。本発明において使用するための抗体は、例えば、Millipore、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Life Technologies (Carlsbad, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)、Abcam (Cambridge, MA)、及びLab

40

50

V i s i o n (K a l a m a z o o , M I) から市販されている。

【 0 1 1 3 】

[0140]いくつかの実施形態において、シグナル伝達分析物の活性化状態を検出するのに有用な抗体には、それだけには限定されないが、p - H E R 2 (例えば、Y 1 2 4 8)、p - E R K (例えば、T 2 0 2 / Y 2 0 4)、p - A K T (例えば、T 3 0 8、S 4 7 3)、p - M E K (例えば、S 2 1 7 / 2 2 1)、p - S H C、p - P D K 1、p - P T E N、p - P 7 0 S 6 K (例えば、T 3 8 9 (T 2 2 9))、p - P I 3 K (例えば、p 8 5 サブユニット Y 6 8 8)、p - P R A S 4 0 (例えば、T 2 4 6)、及び p - R P S 6 (例えば、S 2 3 5 / 2 3 6)を含めた、活性化したシグナル伝達分析物(例えば、分析物のリン酸化されたアミノ酸残基)を認識する(例えば、結合し、又はそれと複合体を形成することができる)抗体が含まれる。

10

【 0 1 1 4 】

[0141]P I 3 K 又は活性化した P I 3 K を検出するのに有用な抗体には、p 8 5 アルファサブユニット、p 8 5 の N - S H 2 エピトープ、N - S H 3 エピトープ若しくは p 8 5、p 1 1 0 アルファ触媒性サブユニット、及び/又は P I 3 K のヒト p 1 1 0 サブユニットのアミノ酸 1 0 5 2 ~ 1 0 6 8 に対応するペプチドを認識する抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、活性化した P I 3 K に対する抗体は、ペプチド C G F A E P Y N L - p Y - S S L K E L V (配列番号: 1)に結合する。

【 0 1 1 5 】

[0142]受容体チロシンキナーゼの H E R ファミリーを検出するための抗体には、受容体の細胞外ドメイン、受容体の c - 末端、受容体の細胞質内ドメイン、及び H E R 3 のアミノ酸 1 2 9 5 ~ 1 3 2 3 又は 1 2 4 2 ~ 1 2 5 5 に相当するペプチドを認識する抗体が含まれる。H E R ファミリーのメンバーを検出するための抗体には、T 4 7 D、S K B R 3、及び M A D 1 0 9 などの細胞株に結合する抗体が含まれる。

20

【 0 1 1 6 】

[0143]c - M E T 又は活性化した c - M E T を認識する抗体には、c - M E T の細胞外ドメイン(例えば、N - 末端)、タンパク質の細胞質体ドメイン(例えば、C - 末端)、c - M E T の Y 1 2 3 4 周囲のアミノ酸残基に対応する非リンペプチド、及び c - M E T のホスホ Y 1 0 0 3 周囲のアミノ酸残基に対応するリンペプチドに結合する抗体が含まれる。

30

【 0 1 1 7 】

[0144]I G F - 1 R 及び活性化した I G F - 1 R を検出するのに有用な抗体には、I G F - 1 R の サブユニット、I G F - 1 R の サブユニット、I G F - 1 R のアミノ酸 3 1 ~ 9 3 2 間のエピトープ、タンパク質の細胞外ドメイン、及びホスホ Y 1 1 5 8、ホスホ Y 1 1 5 8 / Y 1 1 6 2 / Y 1 1 6 3、ホスホ Y 1 1 6 2 / Y 1 1 6 3、又はホスホ Y 1 1 6 1 / Y 1 1 6 5 / Y 1 1 6 6 周囲のアミノ酸残基に対応するリンペプチドを認識する抗体が含まれる。

【 0 1 1 8 】

[0145]A K T 又は活性化した A K T を検出するのに有用な抗体には、S 4 7 3、T 3 0 8、タンパク質の N - 末端領域(例えば、アミノ酸 1 ~ 1 4 9 及び 2 ~ 4 8 0)を認識する抗体が含まれる。

40

【 0 1 1 9 】

[0146]E R K 又は p - E R K を検出するための抗体には、ホスホ T 2 0 2 / Y 2 0 4、ホスホ T 1 8 5 / Y 1 8 7、及び E R K 2 のアミノ酸 1 ~ 3 6 0 間のエピトープに結合する抗体が含まれる。

【 0 1 2 0 】

[0147]p 7 0 S 6 K 又は活性化した p 7 0 S 6 K を検出するのに有用な抗体には、p 7 0 S 6 K のホスホ T 2 2 9 又はホスホ T 3 8 9、及び p 7 0 S 6 K のアミノ酸 2 6 ~ 4 3 間のエピトープを認識する抗体が含まれる。

【 0 1 2 1 】

50

[0148] P R A S 4 0 又は p - P R A S 4 0 を検出するのに有用な抗体には、P R A S 4 0 のホスホ T 2 4 6、全長のタンパク質、及び P R A S 4 0 のアミノ酸 1 1 9 ~ 2 5 6 間のエピトープを認識する抗体が含まれる。

【 0 1 2 2 】

[0149] P D K 1 又は p - P D K 1 を検出するのに有用な抗体には、P D K 1 のホスホ S 2 4 1 及びアミノ酸 1 ~ 5 5 6 又は 4 1 1 ~ 5 5 6 間の P D K 1 のエピトープを認識する抗体が含まれる。

【 0 1 2 3 】

[0150] R P S 6 又は活性化した R P S 6 を検出するのに有用な抗体には、R P S 6 の 1 ~ 2 4 9 間のエピトープ、及び R P S 6 のホスホ S 2 3 5 / S 2 3 6 を認識する抗体が含まれる。

10

【 0 1 2 4 】

[0151] S H C 又は p - S H C を検出するのに有用な抗体には、S H C のホスホ S 3 6、ホスホ Y 2 3 9、又はホスホ Y 3 1 7、タンパク質の S H 2 ドメイン、及び S H C のアミノ酸 3 7 9 ~ 4 7 0、4 8 8 ~ 5 7 9 間のエピトープを認識する抗体が含まれる。

【 0 1 2 5 】

[0152] P T E N 又は p - P T E N を検出するのに用いることができる抗体には、P T E N のホスホ S 3 7 0、ホスホ S 3 8 0、又はホスホ S 3 8 5、全長のタンパク質、P T E N の C - 末端ドメイン、及び P T E N のアミノ酸 2 ~ 4 0 3、2 3 9 ~ 4 0 3、3 8 5 ~ 4 0 3 間のエピトープを認識する抗体が含まれる。

20

【 0 1 2 6 】

[0153] M E K 又は p - M E K を検出するのに有用な抗体には、M E K 1 のアミノ酸 2 ~ 3 9 3 間のエピトープ、M E K のホスホ S 2 1 8 / 2 2 2、及びタンパク質の N - 末端を認識する抗体が含まれる。

【 0 1 2 7 】

B．経路プロファイリング

[0154] いくつかの実施形態において、方法は、基準経路プロファイル及び試験経路プロファイルの 1 つ又は複数の経路プロファイルを産生し、次いでこれらと比較して特定の処置レジメンの効果を決定することを含む。乳房腫瘍を処置するための抗癌薬を選択するために経路プロファイルを産生する詳細な説明は、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許第 8 , 1 6 3 , 4 9 9 号に見出される。

30

【 0 1 2 8 】

[0155] いくつかの実施形態において、基準経路プロファイルは、抗癌薬処置の前に、特定のタイプの癌（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍、直腸結腸腫瘍など）を有する患者から得た試料を用いて産生される。癌性腫瘍に由来する稀な循環細胞を、例えば、当業者には知られている、免疫磁気分離技術、又は 2 0 1 2 年 2 月 1 6 日出願の国際出願 P C T / U S 2 0 1 2 / 0 2 5 4 9 に記載されているものなどのろ過分離技術を用いて試料から単離する。単離した循環細胞を、*in vitro* で、1 つ又は複数の成長因子で刺激する。次いで、刺激した細胞を溶解して、細胞抽出物を生成する。細胞抽出物を、患者の癌のタイプにおいて変更され得る対象の各シグナル伝達分析物の活性化状態を検出するアッセイ（例えば、C E E R アッセイ）に適用する。基準経路プロファイルをこのように産生し、任意の抗癌薬の非存在下で、患者におけるシグナル伝達分子の活性化状態が提供される。

40

【 0 1 2 9 】

[0156] いくつかの実施形態において、試験経路プロファイルを、抗癌薬処置の前又は抗癌薬の投与の後のいずれかに（例えば、癌処置コースにわたる任意のときに）、特定のタイプの癌（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍、直腸結腸腫瘍など）を有する患者から得た第 2 の試料を用いて産生する。癌性腫瘍に由来する稀な循環細胞を、試料から単離する。単離した細胞を抗癌薬での処置を受けていなかった患者から得る場合、単離した細胞を、上記に記載した基準経路プロファイルから決定した活性化したシグナル伝達分子の 1 つ又は複数

50

基準経路プロファイルから決定される場合は、細胞を P I 3 K インヒビター単独と、又は別の抗癌薬と組み合わせてインキュベートしてもよい。次いで、単離した細胞を、*in vitro*で、1つ又は複数の成長因子で刺激してもよい。次いで、単離した細胞を溶解して、細胞抽出物を生成する。細胞抽出物を、対象の各シグナル伝達分析物の活性化状態を検出するアッセイ（例えば、C E E R アッセイ）に適用する。患者に対する試験経路プロファイルをこのように産生し、特定の抗癌薬の存在下で患者の癌におけるシグナル伝達分子の活性化状態が提供される。

【0130】

[0157] 試験経路プロファイルを基準経路プロファイルと比べることにより、抗癌薬が、患者の癌の処置に適するか、又は不適であるかを決定する。例えば、薬物処置により、殆ど又は全てのシグナル伝達分子が、薬物の非存在下におけるよりも活性化が実質的に低くなった場合（例えば、薬物のないときは強力であった活性化から、薬物で活性化が弱く、非常に弱く、又はほとんどなくなる変化）、処置は患者の癌に適すると決定する。このような場合において、薬物治療を受けなかった患者には適切な抗癌薬で処置を開始し、又は薬物をすでに投与していた患者には適切な抗癌薬でその後の処置を継続する。しかし、薬物処置が、患者の癌の処置に不適切であると思われる場合、異なる薬物が選択され、使用されて新たな試験経路プロファイルを産生し、次いでこれを基準活性化プロファイルと比較する。このような場合において、薬物治療を受けなかった患者には適切な抗癌薬で処置を開始し、又は現在不適切な薬物を投与している患者にはその後の処置を適切な抗癌薬に変更する。

10

20

【0131】

[0158] 一実施形態において、基準経路プロファイル及び試験経路プロファイルは、癌細胞株の細胞を用いて産生される。基準経路プロファイルに対して、細胞を、*in vitro*で、1つ又は複数の成長因子で刺激する。次いで、刺激した細胞を溶解して、細胞抽出物を生成する。細胞抽出物を、任意の抗癌薬の非存在下の細胞株で変更され得る対象の各シグナル伝達分析物の活性化状態を検出するアッセイ（例えば、C E E R アッセイ）に適用する。試験経路プロファイルを、同じ細胞株からの第2の試料を用いて産生する。細胞を、1つ又は複数の抗癌薬とインキュベートする。いくつかの実施形態において、薬物は、上記に記載した基準経路プロファイルから決定した活性化したシグナル伝達分子の1つ又は複数を標的とする。例えば、P I 3 K が活性化されたことが基準経路プロファイルから決定される場合、細胞を P I 3 K インヒビター単独と、又は別の抗癌薬との組合せでインキュベートしてもよい。次いで、単離した細胞を、*in vitro*で、1つ又は複数の成長因子で刺激し、次いで溶解して細胞抽出物を生成する。細胞抽出物を、対象の各シグナル伝達分析物の活性化状態を検出するアッセイ（例えば、C E E R アッセイ）に適用する。細胞株に対する試験経路プロファイルを、このように産生し、特定の抗癌薬の存在下で、シグナル伝達分子の活性化状態が提供される。基準経路プロファイルと試験経路プロファイルとの間の活性化状態における変化を比べることにより、抗癌薬が、特定の分析物の活性化を阻害するか否かを決定することができる。薬物が代償性のシグナル伝達経路を誘発するか否かも決定することができる。

30

40

【0132】

[0159] いくつかの実施形態において、基準経路プロファイルを癌細胞株の細胞を用いて産生し、試験経路プロファイルを、抗癌薬処置の前又は抗癌薬の投与の後のいずれかに（例えば、癌処置コースにわたる任意のときに）、特定のタイプの癌（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍、直腸結腸腫瘍、前立腺腫瘍、胃腫瘍、膵臓腫瘍など）を有する患者から得た試料を用いて産生する。基準経路プロファイルと試験経路プロファイルとの間の活性化状態における変化を比較することにより、抗癌薬が特定の分析物の活性化を阻害するか否かを決定することができる。

【0133】

[0160] いくつかの態様において、本発明は、統計学的アルゴリズムを1つ又は複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

50

17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、若しくはそれを超える組合せ)の経路の分析物に適用して経路プロファイルを生成することにより、抗癌薬治療を選択するための方法、抗癌薬治療を最適化するための方法、及び/又は抗癌薬処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。特定の実施形態において、四分位数分析を、1つ又は複数のマーカーの発現又は活性化の状態に適用して、抗癌薬治療を受けている患者に対して処置の決定を指導する。他の実施形態において、学習統計分類子(learning statistical classifier)システムの1つ、又は2つ以上の組合せを、1つ又は複数のマーカーの発現又は活性化の状態に適用して、抗癌薬治療を受けている患者に対して処置の決定を指導する。本発明の方法の統計学的分析により、有利にも、初期の抗癌薬治療を選択するための、並びに抗癌薬のその後の投与量をいつ若しくはどのように調整若しくは改変(例えば、増大若しくは低減)するか、いつ若しくはどのように1つ若しくは複数の抗癌薬(例えば、増大、低減、若しくは同じ投与量の)と組み合わせるか、及び/又はいつ若しくはどのように現在の治療クールを変更するか(例えば、異なる抗癌薬に切り替えるか)を決定するための、改善された感度、特異性、負の予測値、正の予測値、並びに/或いは全体的な正確さが提供される。

10

20

30

【0134】

[0161]「統計学的分析」又は「統計学的アルゴリズム」又は「統計学的プロセス」の語には、変数間の関係を決定するのに用いられる、任意の様々な統計学的方法及びモデルが含まれる。本発明において、変数は、少なくとも1つの対象のマーカーの存在、レベル、又は遺伝子型である。本明細書に記載する統計学的分析を用いて、任意の数のマーカーを分析することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、又はそれを超えるマーカーの存在又はレベルが、統計学的分析に含まれ得る。一実施形態において、ロジスティック回帰分析が用いられる。別の実施形態において、直線回帰が用いられる。さらに別の実施形態において、普通の最小二乗回帰又は無条件ロジスティック回帰が用いられる。好ましいある実施形態において、本発明の統計学的分析は、変数として、所与の集団内などの、1つ又は複数のマーカーの四分位数測定を含む。四分位数は、試料のデータを、等数の観察を(できる限り)含んでいる群に分割する、1セットの「カットポイント」である。例えば、四分位数は、試料のデータを、等数の観察を(できる限り)含んでいる4群に分割する値である。四分位数が低いほどデータ値は指令されたデータセットによって4分の1上がり、四分位数が高いほどデータ値は指令されたデータセットによって4分の1下がる。四分位数は、試料のデータを、等数の観察を(できる限り)含んでいる5群に分割する値である。本発明は、統計学的分析における変数として(連続的な変数と一緒に)、百分位範囲のマーカーレベル(例えば、三分位値、四分位値、五分位値など)、又はこれらの累積指数(例えば、四分位数和スコア(QSS))を得るためのマーカーレベルの四分位値の和など)の使用も含むことができる。

【0135】

[0162]ある実施形態において、本発明は、四分位値分析を用いて、1つ又は複数の対象のマーカーの、存在、レベル(例えば、規模)、及び/又は遺伝子型を、検出又は決定することを伴う。このタイプの統計学的分析において、対象のマーカーのレベルは、基準試料のデータベースに関して、第1の四分位値(<25%)、第2の四分位値(25~50%)、第3の四分位値(51~<75%)、又は第4の四分位値(75~100%)にあると規定される。これらの四分位値はそれぞれ、1、2、3、及び4の四分位値スコアに割り当てることができる。ある場合において、試料において検出されないマーカーには四分位値スコア0又は1が割り当てられ、試料(例えば、試料はマーカーに対してポジティブである)において検出される(例えば、存在する)マーカーには四分位値スコア4が割り当てられる。いくつかの実施形態において、四分位値1はマーカーレベルが最も低い試料を表し、四分位値4はマーカーレベルが最も高い試料を表す。他の実施形態において、四分位値1は特定のマーカーの遺伝子型(例えば、野生型アレル)を有する試料を表し、

40

50

四分位値 4 は別の特定のマーカーの遺伝子型（例えば、アレルバリエーション）を有する試料を表す。試料の基準データベースは、固形腫瘍癌を有する大スペクトラムの患者を含むことができる。このようなデータベースより、四分位値のカットオフを確立することができる。

【0136】

[0163]いくつかの実施形態において、本発明の統計学的分析は、1つ又は複数の学習統計分類子システムを含む。本明細書で用いられる「学習統計分類子システム」の語は、複雑なデータセット（例えば、対象のマーカーのパネル）を適用し、このようなデータセットに基づいて決定を行うことができる機械学習アルゴリズム技術を含む。いくつかの実施形態において、単一学習統計分類子システム、例えば、決定/分類木（例えば、ランダムフォレスト（RF）、又は分類及び回帰木（C&RT））が用いられる。他の実施形態において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれを超える組合せの学習統計分類子システムが用いられ、直列におけるのが好ましい。学習統計分類子システムの例には、それだけには限定されないが、帰納学習（例えば、決定/分類木、例えば、ランダムフォレスト、分類及び回帰木（C&RT）、増幅木（boosted tree）など）、計算機的学習理論（Probably Approximately Correct）（PAC）学習、コネクショニスト学習（例えば、ニューラルネットワーク（NN）、人工ニューラルネットワーク（ANN）、ニューロファジーネットワーク（neuro fuzzy network）（NFN）、ネットワーク構造（network structure）、コックス比例ハザードモデル（Cox Proportional-Hazards Model）（CPHM）、パーセプトロン、例えば、多層パーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークのアプリケーション、belief network）におけるベイジアン学習など）、強化学習（例えば、既知の環境における受動学習、例えば、ナイーブ学習（naive learning）、適応型ダイナミック学習（adaptive dynamic learning）、及び時間差学習（temporal difference learning）、未知の環境における受動学習、未知の環境における能動学習、学習行動価値関数（learning action-value function）、強化学習のアプリケーションなど）、並びに遺伝的アルゴリズム、及び進化的プログラミングを用いるものが含まれる。他の学習統計分類子システムには、サポートベクターマシン（例えば、カーネル法）、多変量適応型回帰スプライン（multivariate adaptive regression splines）（MARS）、レーベンバーグ-マーカートアルゴリズム、ガウス-ニュートンアルゴリズム、ゴーション（Gaussians）の混合、勾配降下アルゴリズム、及び学習ベクトル量子化（LVQ）が含まれる。

【0137】

[0164]ランダムフォレストは、Leo Breiman及びAdele Cutlerによって開発されたアルゴリズムを用いて構築される、学習統計分類子システムである。ランダムフォレストは、多数の個々の決定木を用い、個々の木によって決定されるクラスのモード（すなわち、最も頻繁に生じるもの）を選択することによってクラスを決定する。ランダムフォレスト分析は、Salford Systems（San Diego, CA）から入手可能なRandom Forestsソフトウェアなどを用いて行うことができる。例えば、ランダムフォレストの説明には、Breiman、Machine Learning、45：5～32頁（2001年）；及びhttp://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htmを参照されたい。

【0138】

[0165]分類及び回帰木は、古典的な回帰モデルの適合に対するコンピュータ集中的な代替を代表し、1つ又は複数の前兆に基づいて、対象の分類上の応答又は継続的な応答に対する最良の可能なモデルを決定するのに用いられるのが典型的である。分類及び回帰木分

析は、例えば、Salford Systemsから入手可能なC&RTソフトウェア、又はStatSoft, Inc. (Tulsa, OK)から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウェアを用いて行うことができる。分類及び回帰木の説明は、例えば、Breimanら、「Classification and Regression Trees」、Chapman and Hall, New York (1984年)；及びSteinbergら、「CART: Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis」、Salford Systems, San Diego、(1995年)に見出される。

【0139】

[0166]ニューラルネットワークは、計算に対するコネクショニスト手法に基づいたインフォメーションプロセッシングに対する数学的又は計算的なモデルを用いる、相互接続されたグループの人工ニューロンである。ニューラルネットワークは、ネットワークを通じて流れる外部的又は内部的な情報に基づいてその構造を変更する、適応性のあるシステムであるのが典型的である。ニューラルネットワークの特定の例には、フィードフォワードニューラルネットワーク、例えば、パーセプトロン、単層パーセプトロン、多層パーセプトロン、バックプロパゲーションネットワーク、ADALINEネットワーク、MADALINEネットワーク、Learnmatrixネットワーク、ラジアル基底関数(RBF)ネットワーク、及び自己組織化マップ又はKohonen自己組織化ネットワーク；リカレントニューラルネットワーク、例えば、シンプルリカレントネットワーク及びHopfieldネットワーク；確率的ニューラルネットワーク、例えば、ボルツマンマシン；モジュラーニューラルネットワーク、例えば、コミッティーオブマシンス(committee of machines)及びアソシアティブニューラルネットワーク；並びに他のタイプのネットワーク、例えば、即時訓練型(instantaneously trained)ニューラルネットワーク、スパイクングニューラルネットワーク、ダイナミックニューラルネットワーク、及びカスケードリングニューラルネットワークが含まれる。ニューラルネットワーク分析は、例えば、StatSoft, Inc.から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウェアを用いて行うことができる。例えば、ニューラルネットワークの説明には、Freemanら、「Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques」、Addison-Wesley Publishing Company (1991年)；Zadeh, Information and Control、8巻、338～353頁(1965年)；Zadeh、「IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics」、3:28～44頁(1973年)；Gershoら、「Vector Quantization and Signal Compression」、Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London (1992年)；及びHassoun、「Fundamentals of Artificial Neural Networks」、MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London (1995年)を参照されたい。

【0140】

[0167]サポートベクターマシンは、分類及び回帰に用いられる1セットの関連の教師あり学習技術であり、例えば、Cristianiniら、「An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods」、Cambridge University Press (2000年)に記載されている。サポートベクターマシン分析は、例えば、Thorsten Joachims (Cornell University)によって開発されたSVM^{light}ソフトウェアを用いて、又はChih-Chung Chang及びChih-Jen Lin (National Taiwan University)によって開発されたLIBSVMソフトウェアを用いて行うことができる。

【 0 1 4 1 】

[0168]本明細書に記載する様々な統計学的方法及びモデルを、健常個体及び癌を有する患者からのコホートの試料（例えば、循環腫瘍細胞、FNA、及び生検）を用いて、訓練及び試験することができる。例えば、医師によって、好ましくは腫瘍学者によって、細胞診などを用いて、癌又はその臨床上のサブタイプを有すると診断された患者からの試料は、本発明の統計学的方法及びモデルを訓練及び試験する上で用いるのに適する。健常個体からの試料は、癌の試料と同定されなかったものを含むことができる。当業者であれば、本発明の統計学的方法及びモデルを訓練及び試験する上で用いることができるコホートの患者試料を得るためのさらなる技術及び診断基準を知っている。

【 0 1 4 2 】

C．治療抵抗性の検出

[0169]単一薬剤標的治療は、1つ又は複数の平行する／補償性のシグナリング経路のフィードバックの阻害又は活性化のために、無効であることがある。いくつかの場合において、1つのシグナリング経路の阻害は、別の関連の、又は非関連のシグナリング経路の活性化をもたらす。本発明の方法は、単剤薬物治療のため、フィードバックの阻害の存在及び／又は代償性のシグナリング経路の活性化を検出するのに、並びに癌の処置のための組合せの薬物治療の選択を推奨するのに用いられる。例えば、薬物処置により、第1のシグナリング経路における殆ど又は全てのシグナル伝達分子が薬物の非存在下におけるよりも実質的に活性化が低くなる場合（例えば、薬物がないときは強力であった活性化から、薬物で活性化が弱く、非常に弱く、又はほとんどなくなる変化）、及び第2のシグナリング経路における殆ど又は全てのシグナル伝達分子が薬物の非存在下におけるよりも実質的に活性化される場合（例えば、薬物がないときは弱かった活性化から、薬物で活性化が強く、又は非常に強くなる変化）、薬物処置は組合せの薬物治療を含まなければならない。例えば、患者は、第1のシグナリング経路に対する標的の薬物治療、及び第2のシグナリング経路に対する標的の薬物治療を受けなければならない。いくつかの場合において、複数のシグナリング経路を標的とする単剤薬物を用いることができる（例えば、マルチ-キナーゼ又はパン-キナーゼ（pan-kinase）インヒビター）。治療クルの間、薬物処置が患者の癌の処置に不適切であると思われる場合、産生するのに、異なる薬物が選択され、用いられ、次いで新たな試験経路プロファイルを基準活性化プロファイルと比較する。

【 0 1 4 3 】

[0170]いくつかの実施形態において、方法は、対象からの試料における活性化したPI3K及びAKTのレベルの増大を検出し、対象が、癌を回復するのにPI3Kインヒビター単独又はPI3Kインヒビターの組合せ治療に応答する可能性があることを予想するのに有用である。

【 0 1 4 4 】

[0171]いくつかの実施形態において、方法は、活性化したPI3Kシグナリングのレベルの増大、及び単一薬剤のMEKインヒビターを投与している患者からの試料におけるHER3シグナリングのレベルの上昇を検出し、患者にMEK及びPI3Kインヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに有用である。いくつかの実施形態において、MEKインヒビターは、EGFR及びHER2に対するERK媒介性の負のフィードバックメカニズム、特に、EGFR（T669）及びHER2（T677）の膜近接ドメインのスレオニンリン酸化を軽減し、それによってPI3Kシグナリング経路を活性化し、HER3ヘテロ二量体（例えば、EGFR：HER3及びHER2：HER3）の形成を増大し、HER3のリン酸化を駆動する。

【 0 1 4 5 】

[0172]いくつかの実施形態において、方法は、PI3Kインヒビターを投与している患者からの試料における、活性化したMEKシグナリングのレベルの増大及び活性化したPI3Kシグナリングのレベルの低減を検出し、患者にPI3K及びMEKインヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 4 6 】

[0173]別の実施形態において、方法は、P I 3 K インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したH E R 2 シグナル伝達のレベルの増大及び活性化したP I 3 K シグナル伝達のレベルの低減を検出し、患者にP I 3 K 及びH E R 2 インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 4 7 】

[0174]別の実施形態において、方法は、P I 3 K インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したH E R 3 シグナリングのレベルの増大及び活性化したP I 3 K シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にP I 3 K 及びH E R 3 インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

10

【 0 1 4 8 】

[0175]いくつかの実施形態において、方法は、M E K インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したP I 3 K シグナリングのレベルの増大及び活性化したM E K シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にM E K 及びP I 3 K インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 4 9 】

[0176]いくつかの実施形態において、方法は、M E K インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したH E R 2 シグナリングのレベルの増大及び活性化したM E K シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にM E K 及びH E R 2 インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

20

【 0 1 5 0 】

[0177]いくつかの実施形態において、方法は、M E K インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したH E R 3 シグナリングのレベルの増大及び活性化したM E K シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にM E K 及びH E R 3 インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 5 1 】

[0178]他の実施形態において、方法は、H E R 2 インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したM E K シグナリングのレベルの増大及び活性化したH E R 2 シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にH E R 2 及びM E K インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

30

【 0 1 5 2 】

[0179]さらに別の実施形態において、方法は、H E R 2 インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したP I 3 K シグナリングのレベルの増大及び活性化したH E R 2 シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にH E R 2 及びP I 3 K インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 5 3 】

[0180]他の実施形態において、方法は、H E R 3 インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したM E K シグナリングのレベルの増大及び活性化したH E R 3 シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にH E R 3 及びM E K インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

40

【 0 1 5 4 】

[0181]さらに別の実施形態において、方法は、H E R 3 インヒビターを投与している患者からの試料における活性化したP I 3 K シグナリングのレベルの増大及び活性化したH E R 3 シグナリングのレベルの低減を検出し、患者にH E R 3 及びP I 3 K インヒビター治療の組合せを投与することを推奨するのに用いられる。

【 0 1 5 5 】

D . 投与の方法

[0182]本発明の方法にしたがい、本明細書に記載する抗癌薬は、当技術分野において知られている任意の便利な手段によって対象に投与される。本発明の方法を用いて、腫瘍（例えば、原発又は転移性の乳房腫瘍）の、1つ又は複数の抗癌薬での処置に対する応答を

50

決定、予想、同定、及び／又はモニタリングすることができる。本発明の方法を用いて、対象における腫瘍（例えば、原発又は転移性の乳房腫瘍）の処置に適する１つ又は複数の抗癌薬を選択することもできる。当業者であれば、抗癌薬（複数可）を単独で、又は従来の化学療法、放射線療法、ホルモン療法、免疫療法、及び／若しくは外科手術と組み合わせた治療的手法の一部として投与することができることを理解されよう。

【 0 1 5 6 】

[0183]ある実施形態において、抗癌薬は、抗シグナリング剤（*anti-sig n a l i n g a g e n t*）（すなわち、細胞分裂阻害剤）例えば、モノクローナル抗体又はチロシンキナーゼインヒビター；抗増殖剤；化学療法剤（すなわち、細胞毒性薬）；ホルモン療法剤；放射線療法剤；ワクチン；及び／又は癌性細胞などの異常な細胞の非制御の成長を低減若しくは抑止する能力のある任意の他の化合物を含む。いくつかの実施形態において、対象を、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせて、１つ又は複数の抗シグナリング剤、抗増殖剤、及び／又はホルモン療法剤で処置する。例示のモノクローナル抗体、チロシンキナーゼインヒビター、抗増殖剤、化学療法剤、ホルモン療法剤、放射線療法剤、及びワクチンを本明細書に記載する。

10

【 0 1 5 7 】

[0184]特定の実施形態において、抗癌薬は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼインヒビター、及びこれらの組合せを含めた、HER2 活性を調節する１つ又は複数の化合物を含む。HER2 調節性化合物の非限定的な例には、モノクローナル抗体、例えば、トラスツズマブ、（*Herceptin*（登録商標））、トラスツズマブ - DM1（トラスツズマブエムタンシン）、エルツマクソマブ及びペルツズマブ（2C4；*Omnitarg*（商標））；小分子チロシンキナーゼインヒビター、例えば、ゲフィチニブ（*Iressa*（登録商標））、エルロチニブ（*Tarceva*（登録商標））、ペリチニブ（*Wyeth*）、CP - 654577（*Pfizer*）、CP - 724714（*Pfizer*）、カネルチニブ / CI1033 / PD183805（*Parke-Davis / Pfizer*）、HKI - 272（*Wyeth*）、ラパチニブ（GW - 572016；*Tykerb*（登録商標））、ネラチニブ（*Pfizer*）、PKI - 166 / CGP - 75166（*Novartis*）、AEE788（*Novartis*）、BMS - 599626（*Bristol Myers Squibb*）、HKI - 727（*Wyeth*）、HKI - 357（*Wyeth*）、BI BW2992（*Boehringer Ingelheim*）、AG1478、ARRY - 380（*Array Biopharma*）、ARRY - 334543（*Array Biopharma*）、Bay846、D69491（*Sugen*）、DXL - 702（*InNexus Biotechnology*）、JNJ - 26483327；（*Johnson and Johnson*）、及びこれらの組合せが含まれる。ある実施形態において、HER2 調節性化合物は、本明細書に記載する、又は当業者には知られている１つ又は複数の他の抗癌薬と組み合わせて用いることができる。

20

30

【 0 1 5 8 】

[0185]他の実施形態において、抗癌薬は、モノクローナル抗体、チロシンキナーゼインヒビター、及びこれらの組合せを含めた、HER3 及び他のErbBファミリーメンバーの活性を調節する１つ又は複数の化合物を含む。これらの化合物の非限定的な例には、モノクローナル抗体、例えば、MM - 121、AMG - 888（U3 - 1287）、トラスツズマブ（*Herceptin*（登録商標））、ペルツズマブ（2C4；*Omnitarg*（商標））、セツキシマブ（*Erbitux*（登録商標））、MEHD7945A / RG7597（*Roche*）、RG7116（*Roche*）；小分子チロシンキナーゼインヒビター、例えば、ゲフィチニブ（*Iressa*（登録商標））、エルロチニブ（*Tarceva*（登録商標））、カネルチニブ（CI1033）、ラパチニブ（GW - 572016；*Tykerb*（登録商標））、MP - 470、AZD8931、PF00299804、及びこれらの組合せが含まれる。ある実施形態において、HER1 - 、HER2 - 、及びHER3 - 調節性化合物は、本明細書に記載する、又は当業者には知られている 1

40

50

つ又は複数の他の抗癌薬と組み合わせて用いることができる。

【0159】

[0186]他の実施形態において、抗癌薬は、モノクローナル抗体、インヒビター、及びこれらの組合せを含めた、PI3K活性を調節する1つ又は複数の化合物を含む。これらの化合物の非限定的な例には、SF1126 (Semafore Pharmaceuticals)、LY294002、XL147 (Exelixis/Sanofi)、XL765 (Exelixis/Sanofi)、NVP-BEZ235 (Novartis)、NVP-BGT226 (Novartis)、NVP-BKM120 (Novartis)、NVP-BYL719 (Novartis)、BAY80946 (Bayer)、BAY841236 (Bayer)、GDC-0941 (Genentech/Piramed Pharma)、GDC-0032/RG7604 (Genentech/Roche)、GDC-0980/RG7422 (Genentech/Roche)、GDC-0941/RG7321 (Genentech/Roche)、PX-866 (ProIX Pharmaceuticals)、GSK1059615 (GlaxoSmithKline)、GSK2126458 (GlaxoSmithKline)、CAL-101 (Calistoga Pharmaceuticals)、INK1117 (Intellikine)、ZSTK474 (全薬工業株式会社)、PWT33597 (Pathway Therapeutics)、AEZS-136 (Aeterna Zentaris)、PKI-587 (Pfizer)、PF-4691502 (Pfizer)、PF-05212384 (Pfizer)、IPI-145 (Infinity Pharmaceuticals) 及びこれらの組合せが含まれる。

10

20

【0160】

[0187]本発明における使用に適する抗シグナリング剤の例には、制限なく、モノクローナル抗体、例えば、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))、ペルツズマブ (2C4; Omnitarg (商標))、アレムツズマブ (Campath (登録商標))、ベバシズマブ (Avastin (登録商標))、セツキシマブ (Erbix (登録商標))、ゲムツズマブ (Mylotarg (登録商標))、パニツムマブ (Vectibix (商標))、リツキシマブ (Rituxan (登録商標))、及びトシツモマブ (BEXXAR (登録商標))；チロシンキナーゼインヒビター、例えば、ゲフィチニブ (Iressa (登録商標))、スニチニブ (Sutent (登録商標))、エルロチニブ (Tarceva (登録商標))、ラバチニブ (GW-572016; Tykerb (登録商標))、カネルチニブ (CI1033)、セマキシニブ (SU5416)、パタラニブ (PTK787/ZK222584)、ソラフェニブ (BAY43-9006; Nexavar (登録商標))、イマチニブメシレート (Gleevec (登録商標))、レフルノミド (SU101)、バンデタニブ (ZACTIMA (商標); ZD6474)、ピリチニブ (pilotinib)、CP-654577、CP-724714、HKI-272、PKI-166、AEE788、BMS-599626、HKI-357、BIBW2992、ARRY-334543、JNJ-26483327、及びJNJ-26483327、並びにこれらの組合せが含まれる。

30

【0161】

[0188]本発明における使用に適するMEKインヒビターの例には、制限なく、トラメチニブ (trametinib)、BAY869766 (Bayer)、MEK162 (Novartis)、GDC-0973/RG7420 (Roche)、GDC-0623/RG7421 (Roche)、RG7167 (Roche)、RG7304 (Roche)、XL518 (Genentech)、PD-325901 (Pfizer)、及びこれらの組合せが含まれる。

40

【0162】

[0189]例示の抗増殖剤には、mTORインヒビター、例えば、GDC-0980 (Genentech)、OSI-027 (OSI Pharmaceuticals)、AZD8055 (AstraZeneca)、INK-128 (Intellikine)、

50

シロリムス(ラパマイシン)、テムシロリムス(CCI-779)、及びエベロリムス(RAD001); AKTインヒビター、例えば、MK-2206(Merck)、GDC-0068/RG7440(Genentech/Array BioPharma)、GDC-0980/RG7422(Genentech/Roche)、GSK2110183(GlaxoSmithKline)、SR13668、ペリフォシン(perifosine)、1L6-ヒドロキシメチル-カイロ-イノシトール-2-(R)-2-O-メチル-3-O-オクタデシル-sn-グリセロカーボネート、9-メトキシ-2-メチルエリプチシニウム(methylellipticinium)アセテート、1,3-ジヒドロ-1-(1-(4-(6-フェニル-1H-イミダゾ[4,5-g]キノキサリン-7-イル)フェニル)メチル)-4-ピペリジニル)-2H-ベンズイミダゾール-2-オン、10-(4'-(N-ジエチルアミノ)ブチル)-2-クロロフェノキサジン、3-ホルミルクロモンチオセミカルバゾン(formylchromone thiosemicarbazone)(Cu(II)Cl₂複合体)、API-2、プロトオンコジーンTCL1のアミノ酸10~24に由来する15-merペプチド(Hiromuraら、J. Biol. Chem.、279巻、53407~53418頁(2004年)、KP372-1、並びにKozikowskiら、J. Am. Chem. Soc.、125巻、1144~1145頁(2003年)及びKauら、Cancer Cell、4巻、463~476頁(2003年)に記載されている化合物、並びにそれらの組合せが含まれる。

【0163】

[0190]化学療法剤の非限定的な例には、白金ベースの薬物(例えば、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、スピロプラチン、イプロプラチン、サトラプラチンなど)、アルキル化剤(例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシル、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチン、チオテバ、ニトロソ尿素など)、代謝拮抗剤(例えば、5-フルオロウラシル、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ロイコボリン、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン(Gemzar(登録商標))、ペメトレキセド(ALIMTA(登録商標))、ラルチトレキセドなど)、植物アルカロイド(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ボドフィトロキシニン、パクリタキセル(Taxol(登録商標))、ドセタキセル(Taxotere(登録商標))など)、トポイソメラーゼインヒビター(例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド(VP16)、エトポシドホスフェート、テニポシドなど)、抗腫瘍抗生物質(例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エビルビシン、アクチノマイシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシンなど)、薬学的に許容されるその塩、その立体異性体、その誘導体、その類似体、並びにそれらの組合せが含まれる。

【0164】

[0191]ホルモン療法剤の例には、制限なく、アロマターゼインヒビター(例えば、アミノグルテチミド、アナストロゾール(Arimidex(登録商標))、レトロゾール(Femara(登録商標))、ボロゾール、エキセメスタン(Aromasin(登録商標))、4-アンドロステン-3,6,17-トリオン(6-OXO)、1,4,6-アンドロスタトリエン-3,17-ジオン(ATD)、フォルメスタン(Lentaron(登録商標))など)、選択的エストロゲン受容体モジュレーター(例えば、バゼドキシフェン、クロミフェン、フルベストラント、ラソフォキシフェン、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェンなど)、ステロイド(例えば、デキサメタゾン)、フィナステリド、及びゴナドトロピン放出ホルモンアゴニスト(GnRH)、例えば、ゴセレリン、薬学的に許容されるその塩、その立体異性体、その誘導体、その類似体、及びそれらの組合せが含まれる。

【0165】

[0192]本発明において有用な癌ワクチンの非限定的な例には、Active Biot

echからのANYARA、Northwest BiotherapeuticsからのDCVax-LB、IDM PharmaからのEP-2101、PharmexaからのGV1001、Idera PharmaceuticalsからのIO-2055、Introgen TherapeuticsからのINGN225、及びBiomiira/MerckからのStimuvaxが含まれる。

【0166】

[0193]放射線療法剤の例には、それだけには限定されないが、腫瘍抗原に対する抗体に場合によりコンジュゲートしている、放射性核種、例えば、 ^{47}Sc 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{87}Y 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{117}mSn 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、及び ^{212}Bi が含まれる。

10

【0167】

[0194]いくつかの実施形態において、本明細書に記載する抗癌薬を、それだけには限定されないが、免疫賦活薬（例えば、カルメットゲラン桿菌（BCG）、レバミゾール、インターロイキン-2、アルファ-インターフェロンなど）、免疫毒素（例えば、抗-CD33モノクローナル抗体-カリケアマイシンコンジュゲート、抗-CD22モノクローナル抗体-シュードモナス外毒素コンジュゲートなど）、及び放射免疫療法（例えば、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、又は ^{131}I にコンジュゲートしている抗-CD20モノクローナル抗体など）を含めた従来の免疫療法剤と同時投与することができる。

20

【0168】

[0195]抗癌薬は、必要に応じて適切な製薬上の賦形剤と一緒に投与することができ、投与の任意の許容される様式によって行うことができる。このように、投与は、例えば、経口、頬側、舌下、歯肉、口蓋、静脈内、局所、皮下、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）、筋肉内、関節内（intra-joint）、非経口、細動脈内（intra-arteriole）、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、膀胱内（intravesical）、くも膜下腔内、病巣内、鼻腔内、直腸内、腔内、又は吸入によるものであってよい。「同時投与」は、抗癌薬を、第2の薬物（例えば、別の抗癌薬、抗癌薬治療に付随する副作用を低減するのに有用な薬物、放射線療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤など）の投与と同時に、直前に、又は直後に投与することを意味する。

30

【0169】

[0196]治療有効量の抗癌薬を、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8回又はそれを超えて繰り返して投与してもよく、又は投薬を持続的な注入によって投与してもよい。投薬は、固体、半固体、凍結乾燥粉末、又は液体剤形、例えば、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、坐剤、保持浣腸剤（retention enema）、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、エアロゾル剤、泡沫剤など、好ましくは正確な投与量を簡単に投与するのに適する単位剤形の形態をとることができる。

【0170】

[0197]本明細書で用いられる「単位剤形」の語は、ヒト対象及び他の哺乳動物に対する単位の投与量として適する物理的に別個の単位を意味し、各単位は、適切な製薬上の賦形剤と会合している、所望のオンセット、認容性、及び/又は治療効果を生成するように計算された、あらかじめ決定された量の抗癌薬を含む（例えば、アンプル）。さらに、より濃縮された剤形を調製してもよく、それからより薄い単位剤形を次いで生成してもよい。このように、より濃縮された剤形は、実質的に、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍を超え、又はそれを超える量の抗癌薬を含む。

40

【0171】

[0198]このような剤形を調製するための方法は当業者には知られている（例えば、RE MINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、第18版、Mac k Publishing Co.、Easton、PA（1990年）を参照され

50

たい)。剤形は、慣例的な製薬上の担体又は賦形剤を含むのが典型的であり、他の薬用の薬剤、担体、補助剤、希釈剤、組織浸透増強剤、可溶化剤などをさらに含むことができる。好適な賦形剤を、当技術分野においてよく知られている方法によって、特定の剤形及び投与経路に逃れてもよい（例えば、上記 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES を参照されたい）。

【0172】

[0199]適切な賦形剤の例には、それだけには限定されないが、ラクトース、デキストロース、ショ糖、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリアクリル酸、例えば、Carbopol、例えば、Carbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981などが含まれる。剤形は、滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び鉱油；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；保存剤、例えば、メチル-、エチル-、及びプロピル-ヒドロキシ安息香酸（すなわち、パラベン）；pH調整剤、例えば、無機及び有機の酸及び塩基；甘味剤；並びに香味剤をさらに含むことができる。剤形は、生分解性のポリマービーズ、デキストラン、及びシクロデキストリン包接複合体も含んでいてもよい。

10

【0173】

[0200]経口投与には、治療上有効な投薬は、錠剤、カプセル剤、乳剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤、噴霧剤、ロゼンジ剤、散剤、及び徐放製剤の形態であってよい。経口投与に適する賦形剤には、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム（talcum）、セルロース、グルコース、ゼラチン、ショ糖、炭酸マグネシウムなどが含まれる。

20

【0174】

[0201]いくつかの実施形態において、治療上有効な投薬は、丸剤、錠剤、又はカプセル剤の形態をとり、したがって剤形は、抗癌薬の他に任意の以下のもの：希釈剤、例えば、ラクトース、ショ糖、リン酸二カルシウムなど；崩壊剤、例えば、デンプン又はその誘導体；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなど；並びに結合剤、例えば、デンプン、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース、及びこれらの誘導体を 30 含んでいてもよい。抗癌薬は、ポリエチレングリコール（PEG）担体などにおいて処理されている、坐剤に調合してもよい。

30

【0175】

[0202]液体剤形は、抗癌薬、及び場合により1つ又は複数の薬学的に許容される補助剤を、例えば食塩水溶液（例えば、0.9% w/v 塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの担体中に溶解又は分散して、液剤又は懸濁液剤（例えば、経口、局所、又は静脈内投与用の）を形成することにより調製することができる。抗癌薬を、保持浣腸剤に調合することもできる。

【0176】

[0203]局所投与に対して、治療上有効な投薬は、乳剤、ローション剤、ゲル剤、泡沫剤、クリーム剤、ゼリー剤、液剤、懸濁剤、軟膏剤、及び経皮パッチ剤の形態であってよい。吸入による投与に対して、抗癌薬は乾燥粉末として、又はネブライザーによる液体形態において送達することができる。非経口投与に対して、治療上有効な投薬は、無菌の注射用液剤及び無菌の包装された粉末の形態であってよい。注射用液剤が、約4.5～約7.5のpHで調合されるのが好ましい。

40

【0177】

[0204]治療上有効な投薬は、凍結乾燥形態において提供することもできる。このような剤形は、投与前に再構成するための重炭酸塩などのバッファーを含むことができ、又はバッファーは、水などで再構成するための凍結乾燥剤形に含まれていてもよい。凍結乾燥剤形は、エピネフリンなどの適切な血管収縮剤をさらに含むことができる。凍結乾燥剤形は 50

50

、再構成された剤形を対象にすぐに投与することができるように、場合により再構成用のバッファと組み合わせて包装されている、シリンジにおいて提供することができる。

【0178】

[0205]対象を、周期的な時間間隔でモニタリングして、ある治療レジメンの有効性を評価することもできる。例えば、あるシグナル伝達分子の活性化状態は、本明細書に記載する1つ又は複数の抗癌薬での処置の治療効果に基づいて変化し得る。対象をモニタリングして応答を評価することができ、個別化された手法におけるある薬物又は処置の効果を理解することができる。さらに、特定の抗癌薬又は抗癌薬の組合せに最初応答した対象が、薬物又は薬物の組合せに対して不応性になることがあり、これらの対象が後天性の薬物抵抗性を発生したことが指摘される。これらの対象は、現在の治療、及び本発明の方法にしたがって処方された代替の処置を中断してもよい。

10

【0179】

[0206]ある態様において、本明細書に記載する方法は、リンパ節転移陰性の疾患などを有する女性の様々な集団において、乳癌の予後及び/又は再発の可能性を予想する遺伝子発現マーカーのパネルと組み合わせて用いることができる。これらの遺伝子パネルは、再発を経験する見込みのない、したがって補助的な化学療法の恩恵を受ける見込みのない、女性を同定するのに有用であり得る。発現パネルは、無病(disease-free)及び全体的な生存の結果にネガティブに影響を及ぼさずに、補助的な化学療法を安全に避けることができる女性を同定するのに用いることができる。適切なシステムには、それだけには限定されないが、Genomic Health, Incからの21遺伝子パネルであるOncotype DX(商標)、Agendiaからの70遺伝子パネルであるMammaPrint(登録商標)、及びVeridexからの76遺伝子パネルが含まれる。

20

【0180】

[0207]さらに、他のある態様において、本明細書に記載する方法を、原発が知られていない癌(CUP)に対するオリジナルの腫瘍を同定する遺伝子発現マーカーのパネルと併用して用いることができる。これらの遺伝子パネルは、最初に乳癌と診断された女性に投与したものと一致する治療の恩恵を受ける、転移癌を有する女性を同定するのに有用であり得る。適切なシステムには、それだけには限定されないが、Aviara Cancer TYPE IDアッセイ、39の腫瘍タイプに対する起源の原発部位を同定するために92の遺伝子を測定するRT-PCRベースの発現アッセイ、及びマイクロアレイ上の1600を超える遺伝子の発現を測定し、これらの15の既知の組織タイプに対して腫瘍の遺伝子発現「シグネチャー」を比較するPathwork(登録商標)Tissue of Origin Testが含まれる。

30

【実施例】

【0181】

[0208]以下の実施例は、請求項に係る本発明を限定するためでなく、説明のために提供するものである。

【0182】

実施例1：成長因子で刺激した癌細胞株においてシグナル伝達分析物をプロファイリングするためのCEERの使用

40

[0209]この実施例は、様々な細胞株において、HER1、HER2、cMET、PI3K、AKT、ERK、PTEN、MEK、p70S6K、PRAS40、RPS6、及びPDK1(図1)を含めた癌経路の生物マーカーをプロファイリングするためにCEERを用いる方法を説明する。CEERの詳細な記載は、その開示の全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる、2012年4月24日発行の米国特許第8,163,499号に見出される。

【0183】

[0210]CEERでは、多数のシグナル伝達分析物の発現及び/又は活性化のレベルを、限られた量又は限られた入手可能性の試料から決定することができる。例えば、活性化し

50

たタンパク質のレベルを、単一の毛嚢から検出することができる。アッセイの分析感度は、いくつかのシグナル伝達分析物に対して10細胞未満（例えば、10 pg）である（表1）。

【表1】

表1. 様々なシグナル伝達分析物の分析感度

マーカー	分析感度	マーカー	分析感度
HER1	<1細胞	p70S6K	3～10細胞(10pg)
HER2	<1細胞	RPS6	1細胞(10pg)
cMET	<1細胞	MEK	3～10細胞(10pg)
PI3K	3～10細胞	ERK	3～10細胞(3pg)
AKT	1～3細胞(1pg)	PDK1	1～3細胞(3pg)
PRAS40	1～3細胞	PTEN	125細胞(10pg)

10

【0184】

[0211] C E E R は超高感度及び超高度異性を有する。示す通り、C E E R は、単一細胞のレベルで多数のシグナル伝達タンパク質の活性化状態を同時に検出することができる。アッセイは、多数の細胞株において、対象の分析物の活性化状態を比較するのに用いることができる。例えば、活性化したPI3K複合体が、T47D及びBT474の2つの乳癌細胞株において検出された。成長因子刺激前のベースライン時のレベルを図2に示す。刺激後のレベルを図3に示す。両方の細胞株とも、PI3Kを活性化することにより、ヘレグリン（HRG）に応答した（図3）。

20

【0185】

[0212] 肺癌、乳癌、皮膚癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌、及びミエローマに由来する癌細胞株を含めた様々な癌細胞株における、シグナル伝達分析物の発現及び/又は活性化を分析した。表2は、実験に用いた細胞株のいくつかを示すものである。PI3Kの状態、PTENの状態、ホスホ-AKTの存在、及び体細胞変異（例えば、EGFR又はBRAF/KRAS変異）の存在は、細胞株間で変動した。

【表2】

表2. 様々な細胞株におけるマーカーの変異/検出の状態

細胞株	タイプ	PI3Kの状態	PTENの状態	pAKT	その他
NCI-H1650	肺	野生型	ヌル	+	EGFR
ZR75	乳房	野生型	L108R		
A431	皮膚	野生型	野生型		
MDA-MD-231	乳房	野生型	野生型		BRAF/KRAS
BT474	乳房	K111N	野生型	++	
MDA-MD-468	乳房	野生型	ヌル	+++	
MCF7	乳房	E545K	野生型	+++	
HCC827	肺	野生型	野生型	+	EGFR
NCI-H1975	肺	野生型	野生型		EGFR
BxPc3	膵臓	野生型	野生型		
KPL4	乳房	変異	野生型	++	
Kato III	胃	野生型	野生型		
RT112	膀胱	野生型	野生型		
T47D	乳房	H1047	野生型	++	
KMS11	ミエローマ		野生型		FGFR

30

40

【0186】

[0213] C E E R によって検出されたホスホ-PI3K（図4A）及び全PI3K（図4B）のレベルは、各細胞株に対して異なっていた。細胞の成長因子刺激の、ホスホ-PI3K（図4C）、全PI3Kタンパク質（図4D）、及び全PI3Kに対するホスホ-PI3Kの比（図4E）に対する効果を比べた。HCC827のp-PI3K/全PI3K比は高く、AKTの活性化を表したが、PI3K変異は保有しない。データは、ある細胞

50

における P T E N 状態は P I 3 K 活性化に相関しないことも示していた。

【 0 1 8 7 】

[0214] C E E R を用いた癌細胞株の分析は、C a l u - 3、C a l u - 6、E K V X、H 5 2 2、H 6 6 1、H 1 3 9 5、H 1 6 5 1、H 1 7 7 0、H 2 0 3 0、H 2 0 8 7、H 2 3 4 7、N C I - H 1 3 3 8、N C I - H 1 3 7 3、N C I - H 2 0 0 9、N C I - H 2 2 2 8、N C I - H 2 9 2、N C I - H 5 2 0、N C I - H 6 4 7、N C I - H 1 2 9 9、N C I - H 2 2 6、N C I - H 2 3、N C I - H 1 1 5 5、及び N C I - H 1 6 5 0 を含むように拡大した。ホスホ - P I 3 K (図 5 A)、全 P I 3 K (図 5 B)、ホスホ - A K T (図 5 C)、及びホスホ - R P S 6 (図 5 D) のレベルを比べた。実験により、N C I - H 2 0 0 9 は、他の細胞株に比べてホスホ - P I 3 K / 全 P I 3 K 比が最も高かったことが示された (図 5 E)。P I 3 K C A 増幅変異を有する C a l u - 3 細胞株は、P I 3 K 変異のない他の細胞株 (例えば、N C I - H 2 0 0 9) に比べてホスホ - P I 3 K / 全 P I 3 K 比がより低かった。これは、P I 3 K 変異の分析は、高レベルのホスホ - P I 3 K の単一の予測因子として用いることができないことを示していた。データは、C E E R は、活性化したシグナル伝達分析物の存在を決定するのに有用であることを示している。

10

【 0 1 8 8 】

実施例 2 : インヒビター処理した癌細胞株においてシグナル伝達分析物をプロファイリングするための C E E R の使用

[0215] 本実施例は、本明細書に記載する方法を用いて、特定の細胞が単一のインヒビター治療に応答する可能性があるか、又は代替的に組合せのインヒビター治療に応答する可能性があるかを決定することができることを説明するものである。C E E R 技術を用いて、P I 3 K 経路及び他の下流のシグナル伝達タンパク質を、様々な癌細胞株においてプロファイリングした。

20

【 0 1 8 9 】

[0216] 肺癌細胞株を、様々なインヒビター治療で処理し (例えば、P I 3 K インヒビター、M E K インヒビター、及びそれらの組合せでの、様々なインヒビターの量及び処理時間)、P I 3 K 活性化のレベルは細胞株及び特定のインヒビター治療に依存することが示された。H E R 1、H E R 2、c M E T、P I 3 K、A K T、E R K、P T E N、M E K、p 7 0 S 6 K、P R A S 4 0、R P S 6、及び P D K を含めた、経路の他の下流のシグナリング構成成分のレベルを測定した。N C I - H 4 6 0、N C I - H 6 4 7、N C I - H 1 1 5 5、N C I - 1 2 9 9、N C I - 1 9 7 5、N C I - H 2 2 2 8、及び N C I - H 6 6 1 など、非小細胞肺癌に由来する細胞株も用いた。試験した様々な治療には、低投薬量又は高投薬量の P I 3 K インヒビター単独、低投薬量又は高投薬量の M E K インヒビター単独、共に低投薬量又は高投薬量の P I 3 K インヒビタープラス M E K インヒビターが含まれた。細胞は、処理 4 時間後又は 2 4 時間後のいずれかにアッセイした (図 6 ~ 1 0 における * を参照されたい)。

30

【 0 1 9 0 】

[0217] 図 6 A、B は、細胞株 H 1 1 5 5 において、ホスホ - M E K (例えば、リン酸化した S 2 1 7、S 2 2 1)、ホスホ - P I 3 K、ホスホ - R S K、全 P I 3 K、ホスホ - A K T (例えば、リン酸化した S 4 7 3)、ホスホ - P R A S 4 0 (例えば、リン酸化した T 2 4 6)、ホスホ - E R K (例えば、リン酸化した T 2 0 2、Y 2 0 4)、及びホスホ - R P S 6 (例えば、リン酸化した S 2 3 5、S 2 3 6) のレベルは、P I 3 K インヒビター単独、M E K インヒビター単独、及び M E K インヒビターと組み合わせた P I 3 K インヒビターの処理後に変動することを示す。図 6 は、これらの生物マーカーの活性化状態は、処理 4 時間後及び 2 4 時間後に変化したことも示す。

40

【 0 1 9 1 】

[0218] 図 7 A、B は、細胞株 H 1 2 9 9 における、ホスホ - M E K、ホスホ - P I 3 K、ホスホ - R S K、全 P I 3 K、ホスホ - A K T、ホスホ - P R A S 4 0、ホスホ - E R K、及びホスホ - R P S 6 のレベルは、与えた処理及び試験した時点に依存することを示

50

す。

【0192】

[0219] 図8 A、Bは、様々な処理後の細胞株H2228における、ホスホ-MEK、ホスホ-PI3K、ホスホ-RSK、ホスホ-AKT、ホスホ-PRAS40、ホスホ-ERK、及びホスホ-RPS6のレベルを示す。ホスホ-PI3Kのレベルが低いほど、H2228細胞は、高投薬量の組合せ処理よりも低投薬量の組合せ処理に応答性であったことが指摘された。細胞はまた、高投薬量のMEKインヒビター単独に応答し、ホスホ-PI3K、ホスホ-RSK、及びホスホ-ERKのレベルはより低かった。

【0193】

[0220] 図9 A、Bは、様々な処理をした後の細胞株H661における、ホスホ-MEK、ホスホ-PI3K、ホスホ-RSK、ホスホ-AKT、ホスホ-PRAS40、ホスホ-ERK、及びホスホ-RPS6のレベルを示す。

10

【0194】

[0221] 図10 A、Bは、様々な処理をした後の細胞株H647における、ホスホ-PI3K、ホスホ-RSK、ホスホ-AKT、ホスホ-PRAS40、ホスホ-ERK、及びホスホ-RPS6のレベルを示す。

【0195】

[0222] 図11は、PI3Kインヒビター（例えば、BAY841236）、MEKインヒビター（例えば、BAY869766）、及びそれらの組合せを含めた、様々な処理レジメンに対する細胞株H460の応答を示す。CEER分析により、HER1/HER2/cMET経路の活性化したタンパク質（p-PI3K、p-AKT、p-PRAS40、p-70S6K、及びp-RPS6）は、PI3Kインヒビター単独又はMEKインヒビターと組み合わせたPI3Kインヒビターに応答して下方制御されることが明らかになった。経路プロファイルを、8日目、9日目、12日目、及び13日目を含めた処置コースの間のいくつかの時点、並びに薬物暴露4時間又は24時間のいずれかに決定した。

20

【0196】

[0223] 図12は、活性化したPI3Kのレベルは、PI3Kインヒビター（例えば、BAY841236）、MEKインヒビター（例えば、BAY869766）、又はそれらの組合せのいずれかで処理したH1975細胞において比較的同様であることを示す。CEER分析は、他の活性化したタンパク質（p-MEK、p-ERK、p-AKT、p-PRAS40、p-70S6K、及びp-RPS6）のレベルは、処理に応答して大幅に低いことを示した。

30

【0197】

[0224] 図13は、CEERアッセイを用いて、活性化したPI3K及びHER1/HER2/cMET経路の他の下流の構成成分のレベルに対して、抗癌薬のIC50を算出することができることを示す。図13は、いくつかの細胞株において、PI3K阻害は、AKT、PRAS40、及びRPS6などの下流のタンパク質の阻害に相関し得ることも示す。いくつかの癌細胞において、PI3K活性化の阻害は、下流のタンパク質の活性化の阻害に相当する。さらに、阻害の度合いは、細胞株及びインヒビター処理に特異的である。

40

【0198】

[0225] PI3Kインヒビター薬物（GDC0941）のIC50と活性化したPI3Kレベルとの間の関係を、いくつかの細胞株において分析した。PI3K活性化を有する細胞株（例えば、H1651又はH2087）のIC50は低いことが決定された。H1651細胞は既知の遺伝子変異を保有しないが、EGFR発現が高い。H2087はNRAS変異及びBRAF変異を有する。多重変異（例えば、MAPK変異）及びPI3Kの活性化などの変更をさらに2つ有する細胞株（例えば、Calu-6）のIC50値は高かった。したがって、ホスホ-PI3Kは、PI3Kインヒビターの感受性の指標又は予測因子であり得る。図14は、不活性なPTEN（例えば、点変異又は無発現変異）を有する細胞株は、PTEN野生型状態を有する細胞株よりもIC50値が高かったことも示す。

50

。

【 0 1 9 9 】

[0226]この実施例は、特定の癌細胞におけるシグナル伝達分析物は、特定の発現及び活性化を有することを示すものである。さらに、分析物の発現及び活性化の状態は、細胞が抗癌薬又はその組合せに暴露されると変化する。したがって、シグナル伝達分析物をモニタリングして、抗癌薬の腫瘍細胞に対する有効性を決定することができる。経路をプロファイリングする方法を用いて、新たな抗癌薬を開発するための代替の標的を同定することもできる。

【 0 2 0 0 】

実施例 3：インヒビター治療に対する患者の応答を予想するための P I 3 K C E E R の使用

[0227]この実施例は、C E E R によって検出される P I 3 K の活性化を用いて、患者が P I 3 K インヒビター治療に応答する可能性を決定することができることを示す。本実施例は、本明細書の方法が、処置コースの間、長期的な薬物のモニタリングに有用であることも示す。

【 0 2 0 1 】

[0228]遡及研究において、癌を有する患者から採取した一連の試料を評価して、C E E R アッセイを用いた経路のプロファイリングが、P I 3 K 処置の応答性を予測するものであるかを決定した。分析した試料には、治療を受ける前、治療を開始した後、及び治療クルの間など、治療の時間経過上の患者からの試料が含まれていた。結果は、シグナル伝達分析物の測定及び患者の経路のプロファイリングの決定は、患者が特定の薬物治療の恩恵を受ける可能性があるか否かを決定するのに効果的であることを明らかに示していた。さらに、癌を有する患者に対して薬物治療を選択する方法、及び長期的な薬物のモニタリング及び処置のための方法を実証した。

【 0 2 0 2 】

[0229]この実施例は、癌に対する C E E R を用いて、患者の生物学的試料（例えば、F N A ）における癌の経路をプロファイリングすることができ、そのため臨床家が治療クルの間、疾患進行をモニタリングできるようになることを実証する。この方法により、臨床家はまた、特定の処置の治療有効性を決定できるようになり、この方法は展開する疾患状態に特異的な処置を調整又は改変することができる。

【 0 2 0 3 】

[0230]患者 # 1 からの試料は、スクリーニング段階の間に治療を受ける前、並びに P I 3 K インヒビター処置段階の 8 日目及び 2 8 日目に採取した。スクリーニング段階からの試料を用いて、患者に対するベースラインの経路プロファイルを確立した。アッセイにおいて、H E R 1 / H E R 2 / c M E T 経路における活性化したタンパク質及び全タンパク質のレベルを測定し、サイトケラチン (C K) のレベルに対して標準化した。患者 # 1 は S G 1 の処置前に P I 3 K の活性化を示したことが決定された (図 1 5)。しかし、インヒビター処置の 8 日目 (S G 1)、患者 # 1 は、より低レベルの活性化した P I 3 K を有した。p - P D K、p - A K T、p P R A S、及び p - M E K などの下流の分析物も、8 日目に下方制御されていた。この分析により、患者 # 1 は処置に応答したことが指摘され、P E T によりさらに確認された。P I 3 K の C E E R を用いた長期間の薬物モニタリングは、ホスホ - H E R 3 による P I 3 K 経路の活性化によって指摘される通り、患者 # 1 は 2 8 日目 (S G 2) までの処置時に再発したことを示した (図 1 5)。結果は、シグナリング経路の他の構成成分 (図 1) は、インヒビター治療によって作り出される任意の妨害物を代償し得ることを示していた。

【 0 2 0 4 】

[0231]患者 # 2 は、P I 3 K インヒビター治療を受け、処置時に再発した。P I 3 K の C E E R を用いた分析により、H E R 1 / H E R 2 / c M E T 経路の構成成分は、P I 3 K インヒビターで処置した癌において上方制御されることが示された。治療を開始した後に採取した試料 (D P 1) により、患者 # 2 は P I 3 K 治療に応答したことが示された (

図 1 6)。再発後に採取した第 2 の試料 (D P 2) は、H E R 1 / H E R 2 / c M E T 経路の構成成分が増大したことを示していた。特に、活性化したタンパク質及び全てのタンパク質が、スクリーニングしたマーカーの殆どに対して、D P 1 試料に比べて D P 2 試料においてより高かった。P I 3 K インヒビターは p - P I 3 K を低減するのに効果的だった (図 1 6) が、他の活性化したシグナル伝達分子が増大し、それゆえ P I 3 K 阻害を代償した。患者 # 2 の経路プロファイルは、腫瘍適応後、組合せ治療が推奨されることを示す。

【 0 2 0 5 】

[0232] 患者 # 3 は、治療前に採取した試料において高い P I 3 K 活性を示した。活性化した P I 3 K は P I 3 K C A 変異によって起こったものではなかったのは注目すべきである。P I 3 K インヒビター薬物である B A Y 8 0 6 9 4 6 で処置した後、別の試料を採取し、分析した。この F N A 試料は、P I 3 K が駆動する細胞の増殖が P I 3 K インヒビター処置によって上首尾に阻害されたことを示した。この知見は C T スキャンによって確認された。図 1 7 は、患者 # 3 の C E E R プロファイルを示す。

10

【 0 2 0 6 】

[0233] この実施例は、患者の試料におけるシグナル伝達分析物の測定は、抗癌薬 (例えば、P I 3 K インヒビター) に対する患者の応答を予想することを実証するものである。この実施例はまた、治療クルの間に分析物をモニタリングすることで、患者が薬物にもはや応答せず、及び / 又は再発していることを示し得ることも示す。本明細書に記載する方法を用いて、治療に対する腫瘍適応をモニタリングすることができる。

20

【 0 2 0 7 】

実施例 4 : 癌を有する患者からの試料において P I 3 K 活性化を評価するための P I 3 K C E E R の使用

[0234] この実施例は、患者からの腫瘍試料の経路のプロファイリングは、癌の進行、処置の応答、及び疾患の状態に関する有用な情報を提供することを示すものである。

【 0 2 0 8 】

[0235] 患者 # 4 は、ステージ I I I のトリプルネガティブ乳癌 (例えば、E R - 、P R - 、H E R 2 -) と診断された 3 5 歳の患者を表す。患者は根治的乳房切断を受けた。ルーチンのフォローアップ検査により、患者の肝臓及び肺に多数の転移性病巣が明らかになった。患者 # 4 は、H E R 2 インヒビター (H e r c e p t i n) 及び T K I (L a p a t i n i b) の組合せ治療を受けた。患者 # 4 は処置に応答し、7 か月を超えて良好な状態にあった。

30

【 0 2 0 9 】

[0236] C E E R 分析が処置の応答を予測するか否かを決定するために、患者 # 4 が治療を受ける前に採取した (図 1 8)、生検試料 2 検体 (生検 # 1 及び生検 # 2) を分析した。両方の生検に、H E R 3 と c M E T の同時発現に加えて、H E R 2 の過剰発現及び活性化のエビデンスが存在した。H E R 2 及び H E R 3 の低レベルのリン酸化が観察された。A K T 及び M A P K の両経路の下流の活性化が検出された。P I 3 K C A 変異である H 1 0 4 7 R が生検中に存在した。試料の経路のプロファイリングにより、患者 # 4 は H E R 2 インヒビター治療の恩恵を受けることが予想された。

40

【 0 2 1 0 】

[0237] 患者 # 5 は、ステージ I I I のトリプルネガティブ乳癌 (例えば、E R - 、P R - 、H E R 2 -) と診断された 7 5 歳の患者を表す。患者は根治的乳房切断を受けた。フォローアップ評価により、脳及び骨における腫瘍を含めた多数の転移性病巣の存在が明らかになった。患者 # 5 は、H e r c e p t i n のラパチニブ又はベルツズマブとの組合せ治療を受け、6 か月を超えて治療に対する応答を示した。

【 0 2 1 1 】

[0238] 処置の開始前 (例えば、ベースライン) 及び処置後 (図 1 9) に患者 # 5 から採取した、いくつかの試料の経路プロファイル进行分析した。試料は、脳脊髄液 (C S F)、細針吸引物 (F N A)、及び生検であった。C E E R 分析により、P I 3 K 活性化、並び

50

に H E R 2 及び I G F 1 R の活性化が処置後に低減することが示され、患者 # 5 はラパチニブの処置に应答することが予想された。

【 0 2 1 2 】

[0239] 患者 # 6 は前立腺癌を有する患者を表す。2つの別々の腫瘍部位からの F N A 試料を、C E E R 分析によってプロファイリングした。分析により、患者の試料において H E R 1、H E R 2、H E R 3、c M E T、I G F - 1 R、及び P I 3 K のシグナリング経路が活性であることが示された。H E R 1、H E R 2、H E R 3、及び P I 3 K の過剰活性化が検出された。p - A K T 及び p - E R K の活性化が腫瘍の増殖と相関した。経路プロファイル (図 2 0 A、B) は、癌の進行が高悪性度の性質であったことをさらに指摘し、これは患者 # 6 のグリーソンスコアが 9 であることと一致する。患者の経路プロファイル及びグリーソンスコアの両方とも、患者 # 6 が、疾患進行の可能性のある (例えば、転移) 高悪性度の癌を有することを指摘するものである。

10

【 0 2 1 3 】

[0240] P I 3 K の C E E R を用いて、トリプルネガティブ乳癌の処置に対する可能な、新薬の開発につながるような標的を同定した。特に、患者 # 7 (トリプルネガティブ B C A 患者) は低レベルの活性化した H E R 2 並びに高レベルの p - A K T 及び p - E R K を、活性化した J A K 1、J A K 2、J A K 3、C R K L、S T A T 1、S T A T 3、及び F A K に加えて有していた。腫瘍試料が P I 3 K C A 変異誘発遺伝子である H 1 0 4 7 R を保有していたことも決定された。

20

【 0 2 1 4 】

[0241] 直腸結腸癌又は非小細胞肺癌を有する患者の、処置前及び処置後の経路プロファイルと比較した。図 2 1 及び 2 2 は、腫瘍細胞が、処置前及び処置後に異なる経路プロファイルを有することを示し、癌患者は、特定の、差示的な経路又はシグネチャーを有することを指摘するものである。経路プロファイル又はシグネチャーは患者間で変動するが、頑強な経路の活性化パターンが癌を有する患者において観察された。結果は、機能的な経路のプロファイリングが、潜在的な治療の应答を予想し、癌患者を処置するための治療を選択するのに決定的であることを示している。本明細書に記載する方法は、治療を開始し、治療中の患者をモニタリングして癌細胞の経路プロファイルにおける変化を測定する前に患者を選択するのに用いることができる。

30

【 0 2 1 5 】

実施例 5 : P I 3 K 調節性化合物に対して患者を選択するための P I 3 K 活性化の定量分析

[0242] この実施例は、それだけには限定されないが、H E R 1、H E R 2、c M E T、P I 3 K、A K T、m T O R、p 7 0 S 6 K、R P S 6、M E K、E R K、P D K 1、及び P T E N を含めた、全ての P I 3 K 複合体及び活性化した P I 3 K 複合体の経路の構成成分の存在に相関する、活性化した (リン酸化された) P I 3 K 複合体の存在を実証するものである。この実施例は、いくつかの場合において、P I 3 K 活性化のレベルの上昇した乳癌患者は、活性化した (リン酸化された) A K T をやはり発現することを示す。

【 0 2 1 6 】

[0243] 経路プロファイリング分析を、乳癌患者から収集した 6 0 個の F N A 試料に対して行った。C E E R アッセイを利用して、経路のタンパク質の発現及びリン酸化のレベルを決定した。検出されたシグナル伝達分析物には、H E R 1、H E R 2、H E R 3、c M E T、P I 3 K、A K T、E R K、M E K、p 7 0 S 6 K、P D K 1、P R A S 4 0、P T E N、R P S 6、S H C 及び関連の下流タンパク質が含まれた。

40

【 0 2 1 7 】

[0244] C E E R 分析には、統計学的アルゴリズムを用いて、標準の対照に対して、シグナル伝達分析物の発現 / 活性化レベルの測定値を標準化することが含まれる。特に、相対蛍光単位 (R F U) 値を、分析物の発現レベルが分かっている細胞株の対照に基づいて、標準の測定の機能単位である計算単位 (C o m p u t e d U n i t) (C U) に変換する。C E E R アッセイの各スライドに対して、系列希釈した細胞可溶化物の標準曲線を、

50

特定の分析物にポジティブな細胞株に対して調製する（例えば、HER1 ポジティブ細胞株はMDA-MB-468であり、HER2 ポジティブ細胞株はSKBR3である）。したがって、特定の各分析物の標準化レベル、及び各試料におけるリン酸化の度合いを、標準の細胞株に対して得ることができる。

【0218】

[0245]例えば、HER1の発現が1CUである試料は、標準対照のMDA-MB-468細胞のRFU値1に等しいRFU値を有する。基準細胞は、細胞1個あたりHER1又はHER2受容体を約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個有し、リン酸化されている受容体は約10%であるので、1CUはRTK $1 \sim 2 \times 10^6$ 又はリン酸化されているRTK $1 \sim 2 \times 10^5$ 個を表す。CUによる検出限界（LOD）値を、CEERアッセイにおいて各分析物に対して実験的に決定する。

10

【0219】

[0246]活性化したPI3Kを有する患者21人中、殆ど（ $n = 20$ ）でホスホ-AKTのレベルが上昇した。これは、ホスホ-AKTは下流のPI3Kに作用し、PI3Kの活性化がAKTの活性化をもたらすという発見を支持するものである。乳癌患者の試料におけるPI3K活性化とリン酸化したAKTとの間に高度の相関があること（ p 値 = 0.0222、図23及び24）は、PI3K経路の活性化が腫瘍原性に生物学的に関連があることを確認するものである。 p 値を、帰無仮説の棄却、及びPI3KとAKTとの間のポジティブの相関の代替に対して計算した。

20

【0220】

[0247]試験した乳癌試料における p -PI3Kレベル及び p -AKTレベルの分布を、それぞれ図25及び26に示す。図において、レベルを、高CUから低CUに並べ替え、CUカットオフを表示する。CEERの感度は、PI3Kに対して3~10CU、及び p -AKTに対して1~3CUであった。

【0221】

[0248]結果は、AKT誘発性の細胞増殖は、一つには、活性化したPI3Kによることも示す。図23は、活性化したPI3Kを有する患者21人中5人だけがPI3KCA変異を保有していたことも示す。したがって、PI3KCAの変異分析はPI3K活性化の唯一の尺度であるべきではなく、PI3Kインヒビター治療に応答する可能性のある患者（例えば、活性化したPI3Kを有する患者）を同定するには、CEERなど、タンパク質ベースの分析が必要とされる。データは、PI3KCA変異のない癌患者は、PI3Kインヒビター治療の恩恵を受け得ることを指摘する。

30

【0222】

[0249] p -PI3Kを測定するためのCEERにおいて用いることができる抗体には、図27において図示する抗原に対して産生されたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が含まれる。抗原のアミノ酸配列（配列番号：1）はCGFAEPYNL-pY-SSELELVであり、 p Yはリン酸化されたチロシン残基を表す。

【0223】

実施例6：乳癌（BCA）臨床試料の分析及びPI3Kインヒビターで処置したときのシグナリング経路プロファイルにおける変化の同定

40

[0250]この実施例は、PI3KインヒビターであるBYL719（Novartis）で処置した患者からの、BCA臨床試料のCEERベースの分析を示す。特に、個々の患者からのシグナリング経路プロファイルは、BYL719処置コースの間に移行することが示されている。したがって、PI3K関連経路のCEERベースの分析により、臨床成績を改善するためのBYL719処置の、応答性の、個別化されたマネジメントが可能になる。発癌性受容体チロシンキナーゼ（HER1、HER2、HER3、cMET、IGF-1R、及びcKIT）、並びにPI3K、並びにSHC、AKT、ERK、MEK、RSK、pRAS40、RPS6、P70S6K、及びPTENを含めた他のチロシンキナーゼシグナリングカスケード構成成分を定量化した。全タンパク質及び活性化したタンパク質のレベルを測定した。

50

【0224】

[0251]全般的に、経路プロファイルの移行は患者間で変動することが観察された。例えば、処置前、患者1はHER2の過剰発現、HER3及びPI3Kの活性化、並びにp-AKT、p-PRAS、p-P70S6、p-RPS6、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKの上方制御を示した。またこの時点で、HER2は高度に活性化し、患者1はPTENポジティブであった。患者1をBYL719で処置すると、HER3、ERK、MEK、及びRSKの活性化の増大、並びにAKTの活性化の低減がもたらされた。処置8日目、活性化したHER3のレベルの増大、並びにp-AKT、p-pPRAS、p-P70S6、及びp-RPS6の下方制御と一致して、全HER3発現が増大した。PRAS40の活性化における初期の低減が観察され、処置の進行とともに活性化における増大が続いた。処置28日目、p-AKT、p-PRAS、p-P70S6、及びp-RPS6のレベル、並びにHER3の発現及び活性化は、8日目よりも高かった。

10

【0225】

[0252]処置の前、患者2はPTENポジティブであり、p-AKT、p-PRAS、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKの活性化を示した。患者2をBYL719で処置すると、AKT及びPRAS40の活性化における低減がもたらされた。ERK、MEK、及びRSKの活性化における、初期の増大、その後、処置の進行とともに低減が観察された。処置8日目、p-AKT及びp-PRASは下方制御され、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKは上方制御された。28日目、p-AKT、p-PRAS、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKは下方制御された。

20

【0226】

[0253]患者3の経路プロファイルは、前処置時、HER1、HER2、HER3、及びcMETが発現され、HER2及びcMETが高度に活性化していたことを示した。HER1、HER3、及びPI3Kも活性化していたことが見てとれた。分析により、患者3はPTENポジティブであることが明らかになり、高レベルの活性化したp-AKT及びp-RASが示された。活性化したp-MEK、p-ERK、及びp-RSKも、前処置時の患者3に検出された。8日目、活性化したHER2、HER3、及びcMETは全て下方制御され、活性化したHER1は上方制御された。またこの時点で、患者3は、p-AKT、p-PRAS、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKのレベルの下方制御を示した。RTK活性化における全体的な低減が、患者3をBYL719で処置したときに観察された。

30

【0227】

[0254]前処置の間、患者4はPTENポジティブであり、活性化したp-AKT、p-PRAS、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKを表した。8日目、患者は、p-AKT、p-PRAS、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKの下方制御を示した。BYL719治療は、患者4のPRAS40活性化における低減をもたらした。

【0228】

[0255]患者5の経路プロファイルにより、活性化したHER1、HER2、PI3K、p-AKT、p-PRAS、RPS6、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKに加えて、HER1、HER2、HER3、及びcMETが処置の間に発現されたことが明らかになった。患者5はまた、前処置の間、PTENポジティブであった。BYL719治療は、患者5のPRAS40活性化における低減をもたらした。p-AKT及びp-RASはわずかに上方制御され、p-RPS6は高度に上方制御された。治療8日目に、p-MEK、p-ERK、及びp-RSKレベルに対する変化は殆ど検出されなかった。

40

【0229】

[0256]本明細書に引用する出版物及び特許出願は全て、個々の各出版物又は特許出願が特に、及び個々に参照によって組み入れられることが指摘される如く、参照によって本明細書に組み入れられる。前述の発明を、理解を明確にする目的で図及び例により幾分詳しく記載してきたが、当業者であれば、本発明の教示に鑑みて、添付の特許請求の範囲の精神及び範囲から逸脱せずに、ある種の変更及び改変をそれに対して行うことができること

50

は、容易に明らかであろう。
【 0 2 3 0 】

[0001]本出願は、2011年12月5日出願の米国仮特許出願第61/567,085号、及び2012年11月20日出願の第61/728,748号の優先権を主張するものであり、これらの開示はその全文が全ての目的で参照によって本明細書に組み入れられる。

【 図 1 】

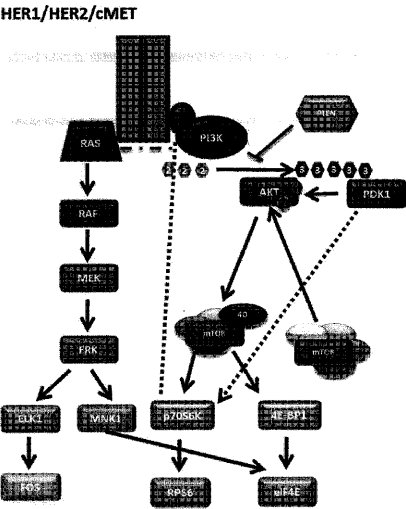
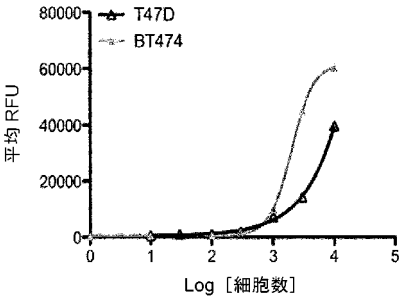


FIG. 1

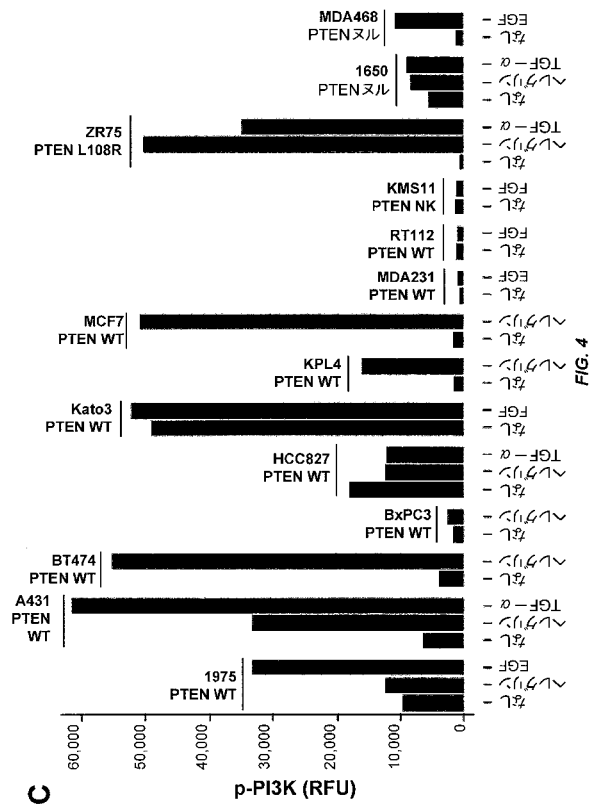
【 図 2 】



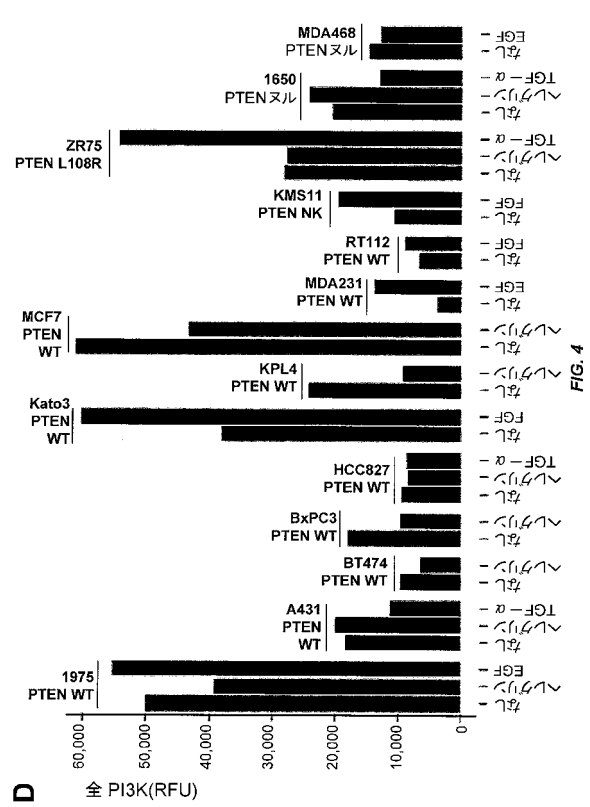
EC50	BT474			T47D		
	平均 RFU	%CV	S/B 比	平均 RFU	%CV	S/B 比
細胞数						
10000	60359	1.32	272.71	39699	3.01	65.65
3000	45174	6.89	204.10	14194	7.40	23.47
1000	10009	3.78	45.22	7256	5.22	12.00
300	1825	9.37	8.24	1848	4.13	3.06
100	710	3.46	3.21	1015	21.27	1.88
30				1122	37.33	1.86
10	472	14.22	2.13	477	15.75	0.79
1	286	9.62	1.29			
0	221	1.88	1.00	605	23.73	1.00

FIG. 2

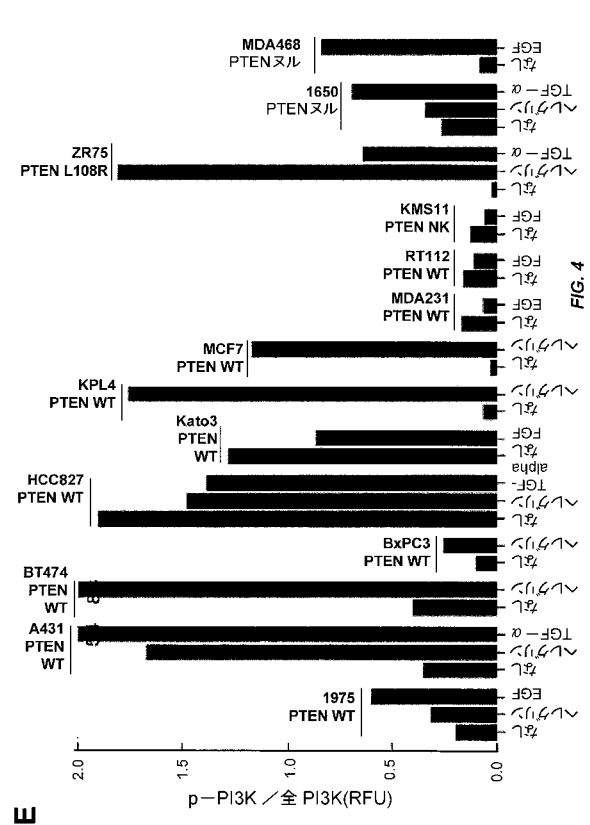
【図 4 C】



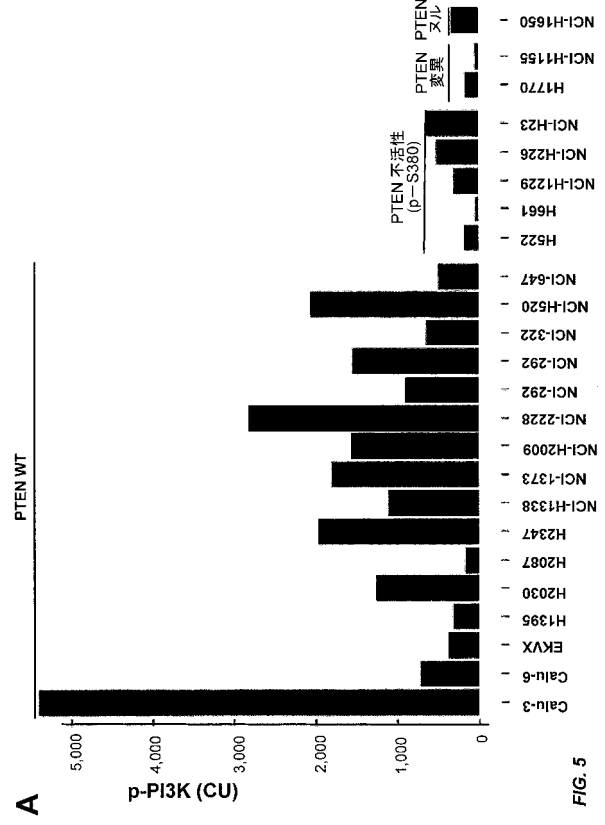
【図 4 D】



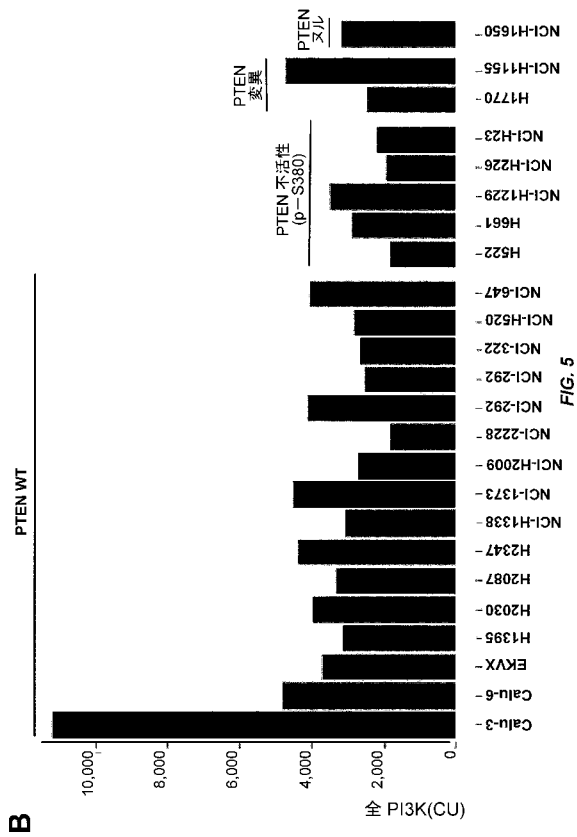
【図 4 E】



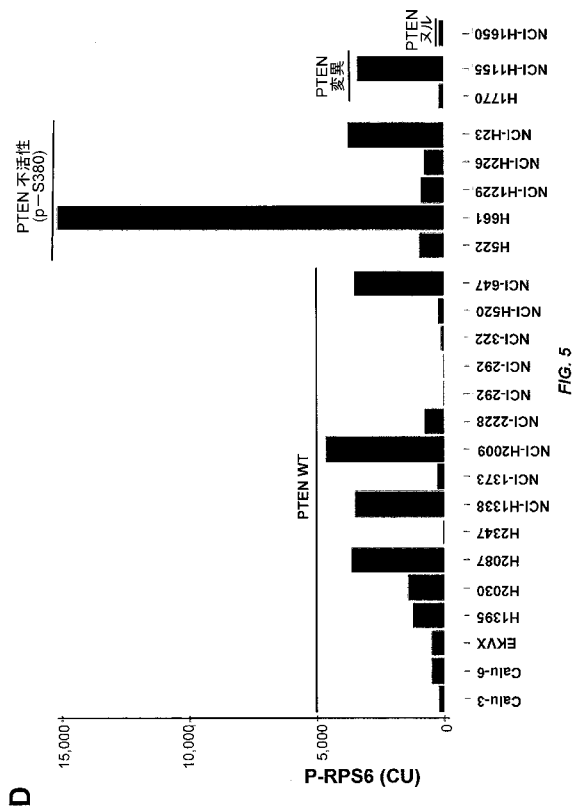
【図 5 A】



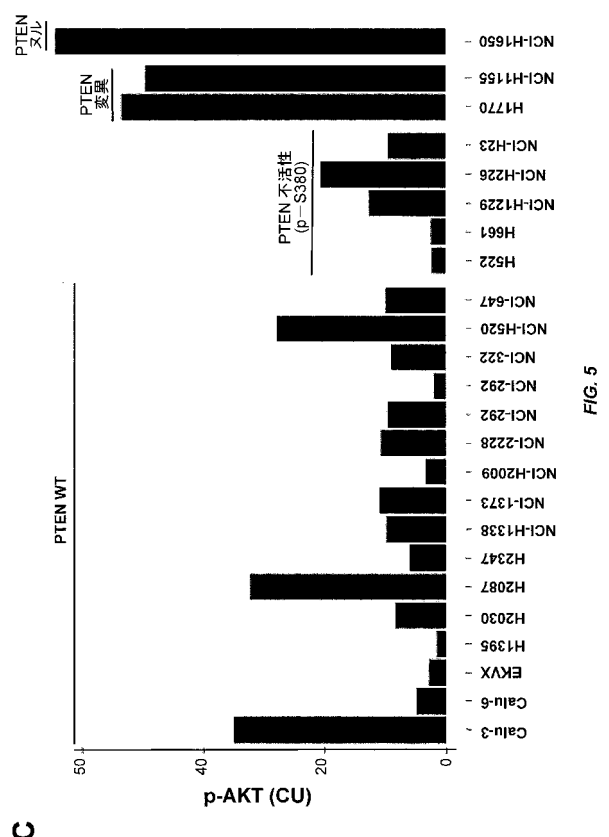
【図 5 B】



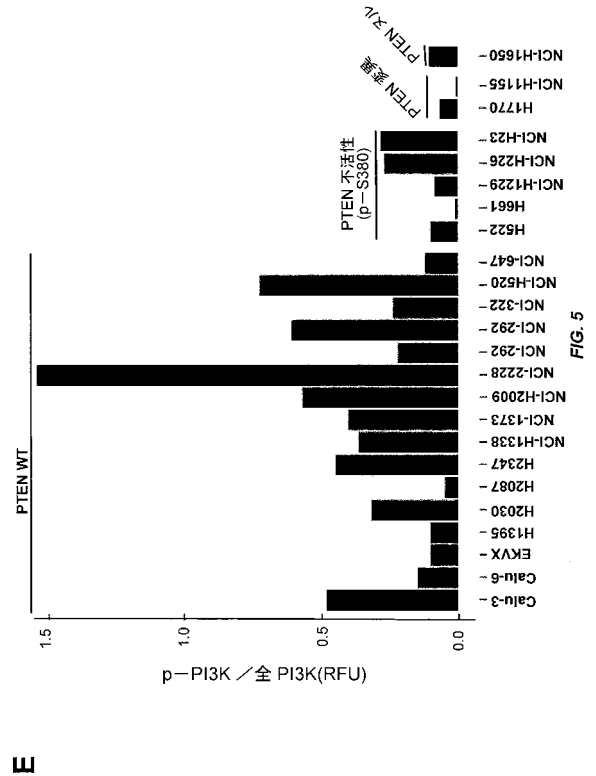
【図 5 D】



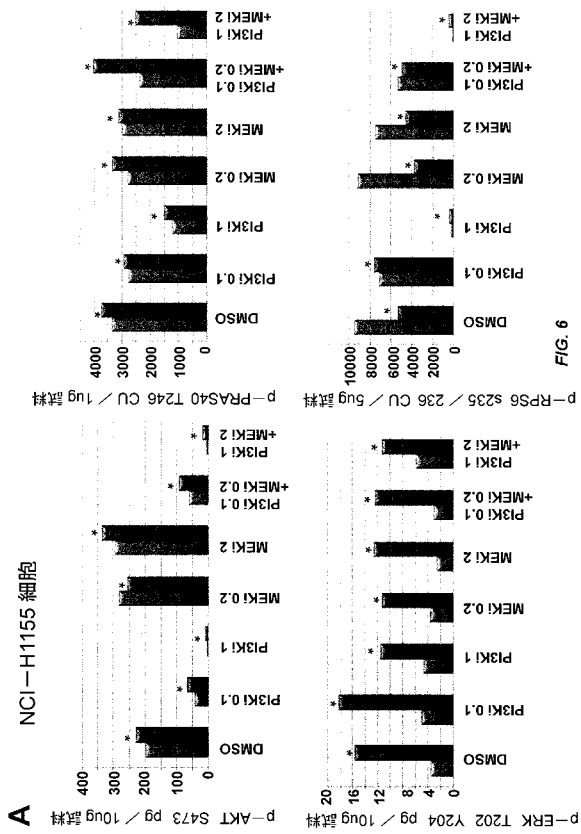
【図 5 C】



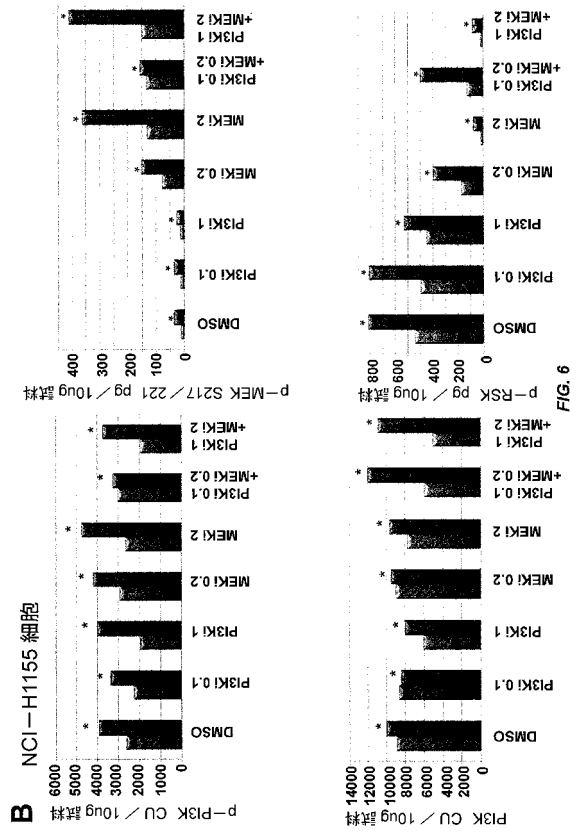
【図 5 E】



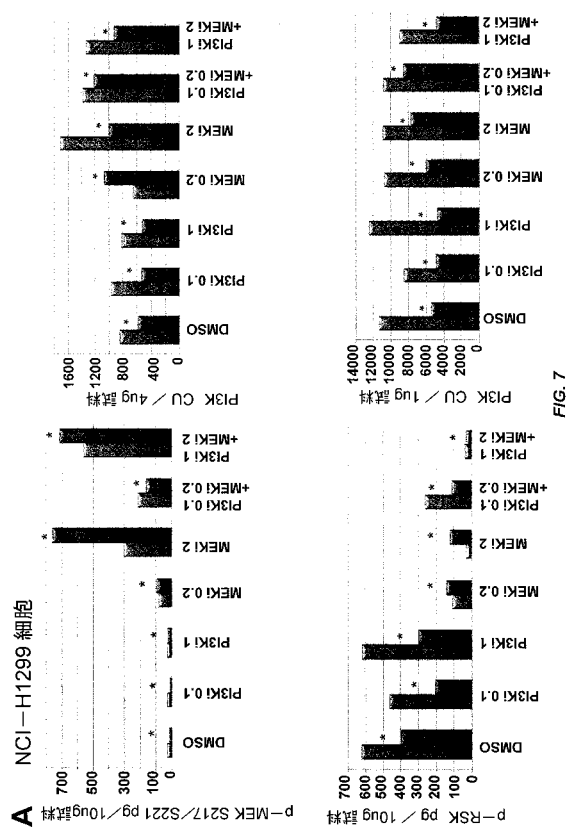
【図 6 A】



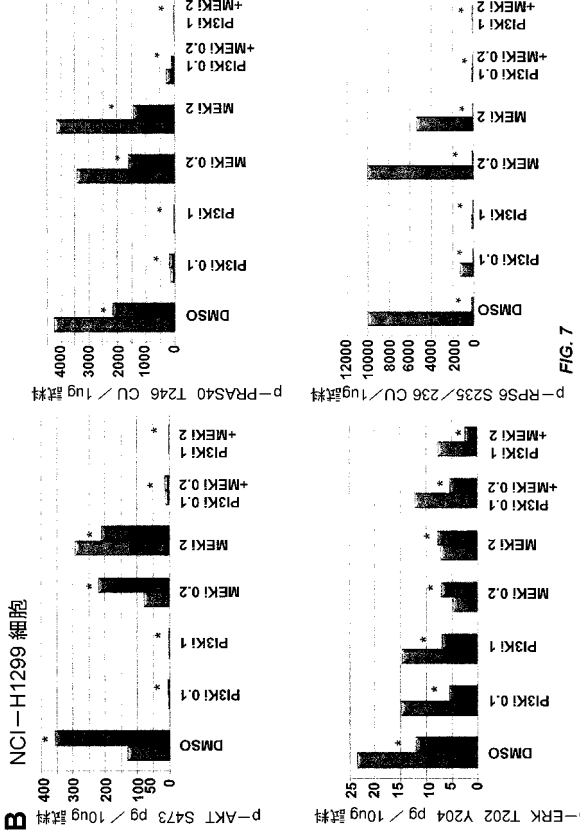
【図 6 B】



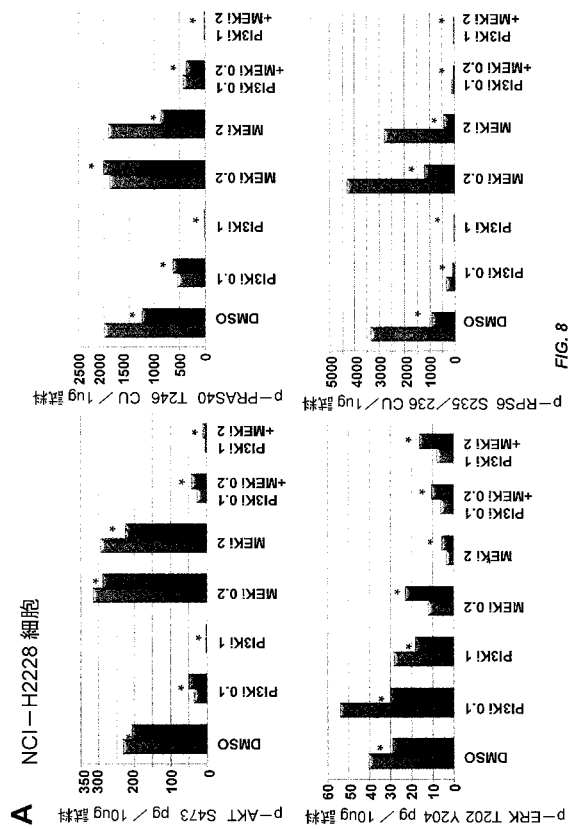
【図 7 A】



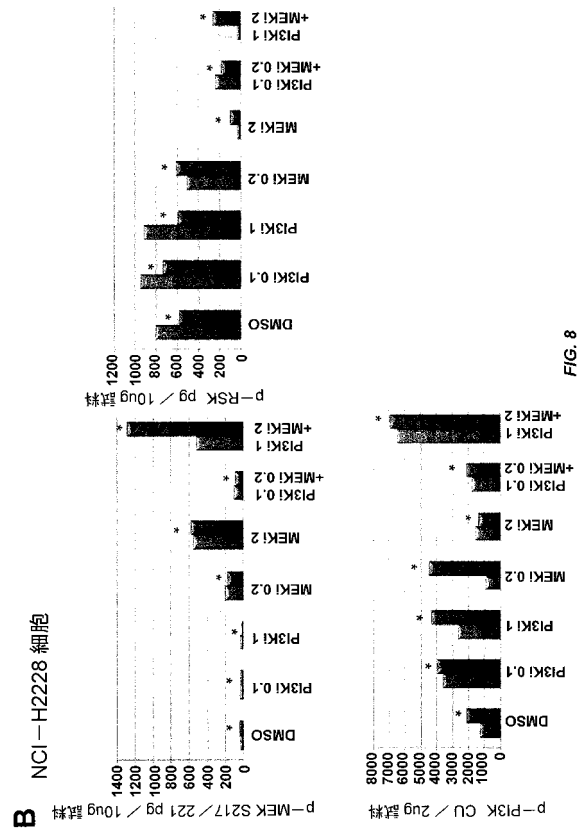
【図 7 B】



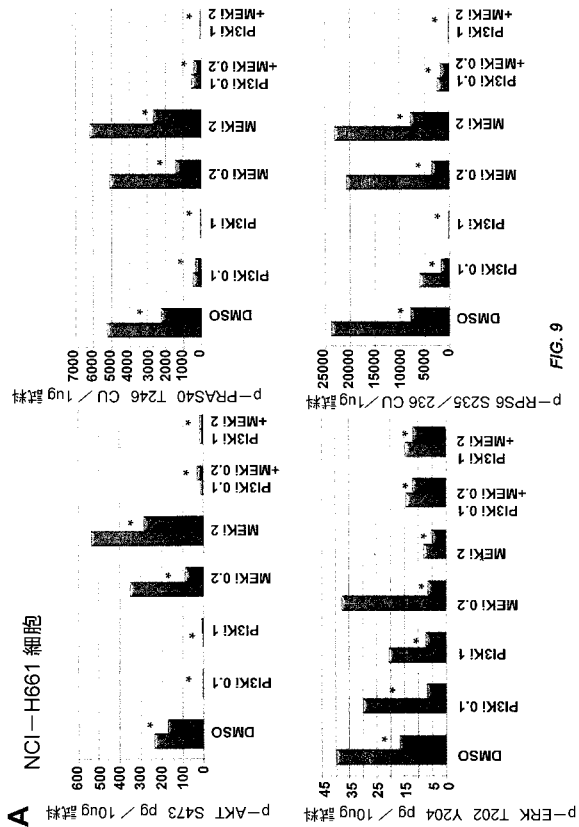
【図 8 A】



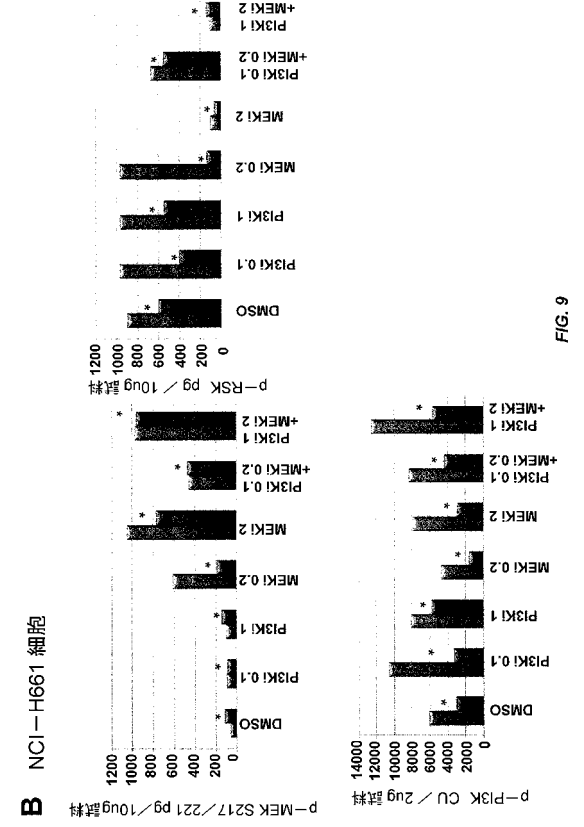
【図 8 B】



【図 6 A】



【図 6 B】



【図 10 A】

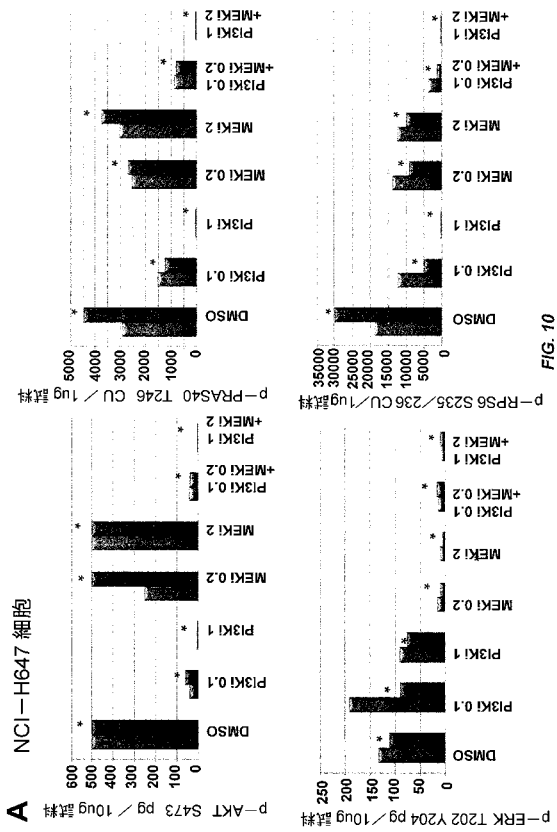


FIG. 10

【図 10 B】

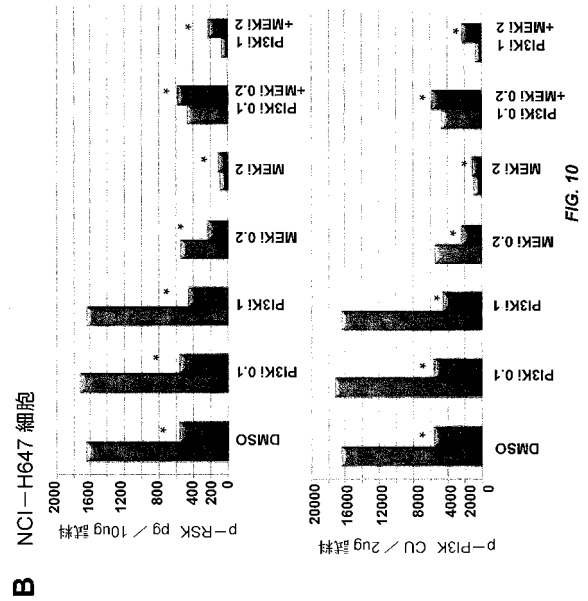


FIG. 10

【図 11】

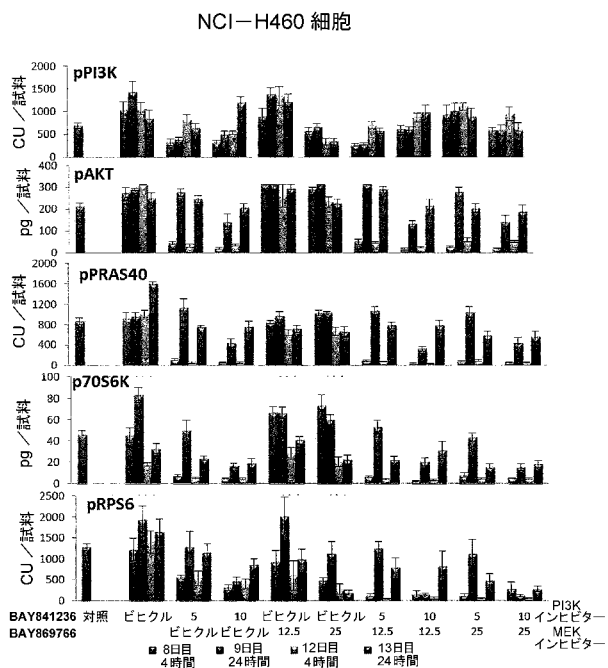


FIG. 11

【図 12】

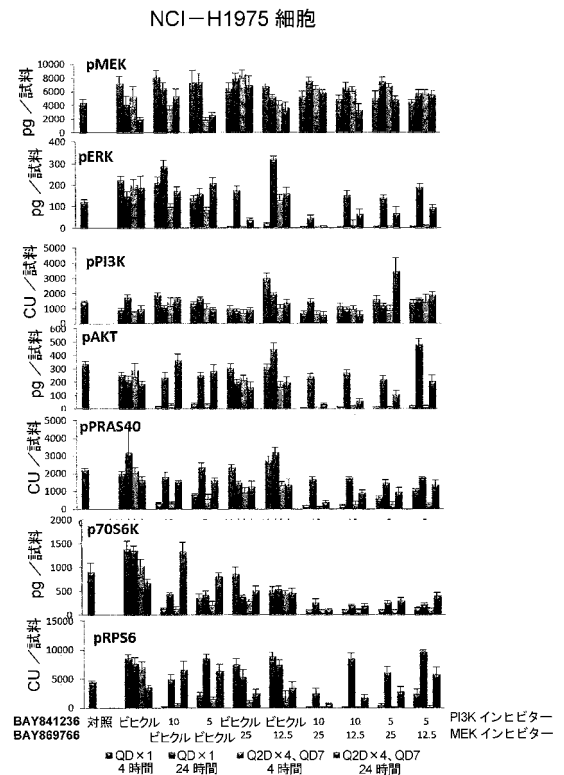


FIG. 12

【 図 1 3 】

細胞株	p-AKT阻害 (PI3K阻害) おおよその 有効性、 おおよそのIC50	p-PRAS40阻害 (PI3K阻害) おおよその 有効性、 おおよそのIC50	p-RPS6阻害 (PI3K阻害) おおよその 有効性、 おおよそのIC50	gDC0941_IC50 (μM)
NCI-H1155	~75%, <0.1μM(単位?)	<10%, >0.1	~25%, >0.1	24.14
NCI-H1299	~100%, <0.1	~100%, <0.1	~90%, <0.1	52.46
H661	~100%, <0.1	~90%, 0.1	~80%, <0.1	39.88
NCI-H647	~90%, <0.1	~50%, ~0.1	~50%, ~0.1	4.94
A375	67%, 3.75nM	97%, 5nM	68%, 23nM	2.33
A431	85%, 3nM	99%, 3nM	97%, 3nM	1.40
H1975	96%, 5nM	91%, 8nM	96%, 3nM	430.09
H1993	81%, 3nM	97%, 4nM	98%, 4nM	11.78
H460	99%, 3nM	99%, 5nM	95%, 4nM	0.89
KPL4	98%, 3nM	97%, 5nM	99%, 4nM	5.92
PC3	92%, 21nM	98%, 51nM	97%, 44nM	9.20
U87	96%, 30nM	99%, 107nM	97%, 44nM	
	95%, 8nM	92%, 26nM	99%, 7nM	

FIG. 13

【 図 1 4 】

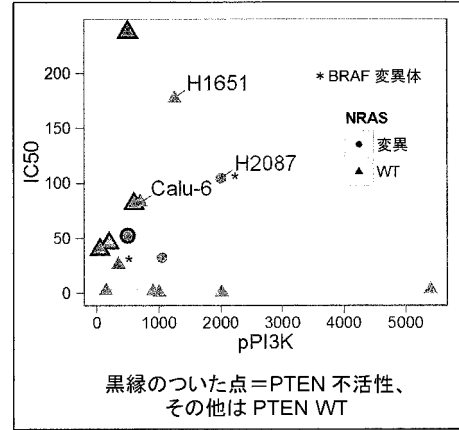
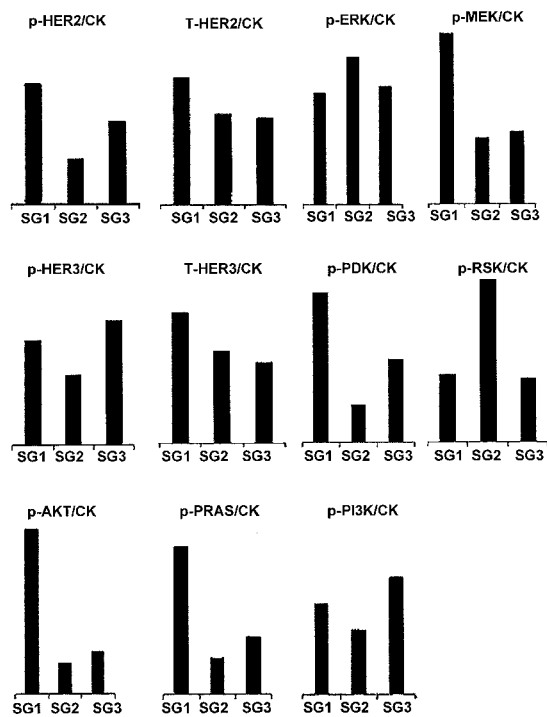


FIG. 14

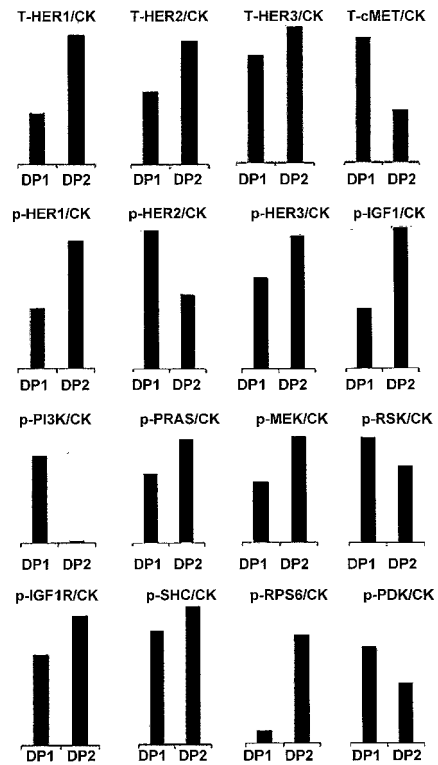
【 図 1 5 】



患者 #1

FIG. 15

【 図 1 6 】



患者 #2

FIG. 16

【図 20 B】

B

	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	CK	HER1	HER2	HER3	cMET	IGF1R		pPI3K	pShc	pAKT	pERK
腫瘍	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
治療	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)
	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)	腫瘍 (2)	腫瘍 (1)

FIG. 20

【図 21】

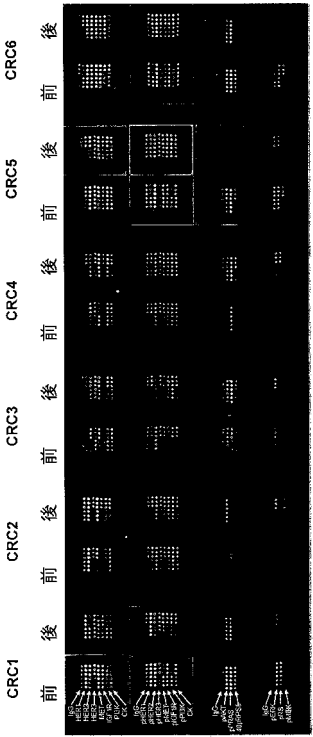


FIG. 21

【図 22】

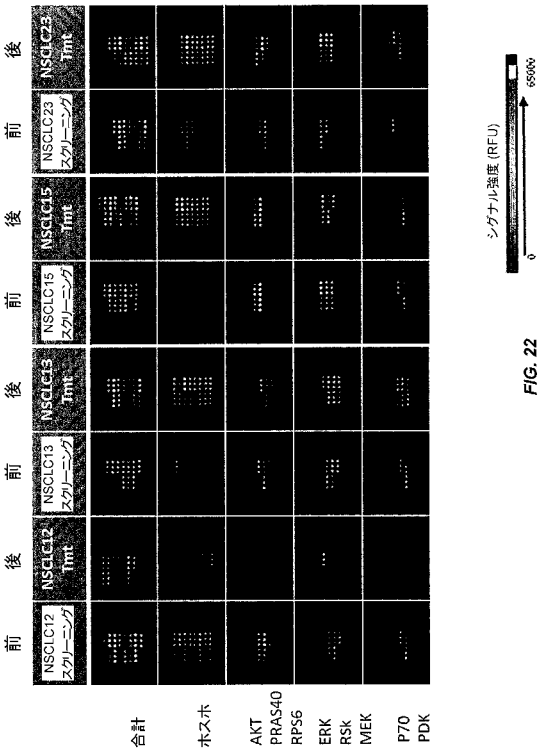


FIG. 22

【図 23】

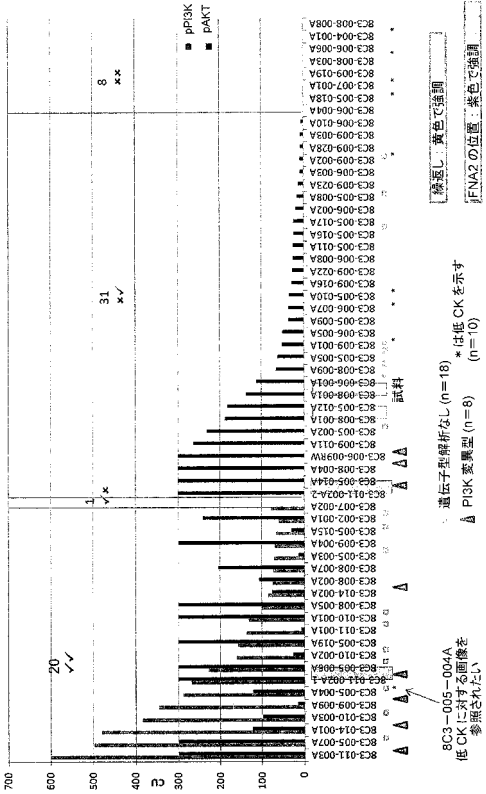


FIG. 23

【図 24】

PI3K カットオフ ≥ 60CU						
PI3K & AKT	✓✓	✓✕	✕✓	✕✕	PI3K ポジティブ	AKT ポジティブ
AKT ≥ 24	17	4	20	19	21	37
AKT ≥ 8	19	2	26	13	21	45
PI3K カットオフ ≥ 90						
PI3K & AKT	✓✓	✓✕	✕✓	✕✕	PI3K ポジティブ	AKT ポジティブ
AKT ≥ 24	11	2	26	21	13	37
AKT ≥ 8	12	1	33	14	13	45
AKT ≥ 4	13	0	38	9	13	51
PI3K カットオフ ≥ 24						
PI3K & AKT	✓✓	✓✕	✕✓	✕✕	PI3K ポジティブ	AKT ポジティブ
AKT ≥ 24	24	6	13	17	30	37
p 値						
						0.00364

FIG. 24

【図 25】

FNA 乳癌試料 60 検体のホスホ PI3K レベル

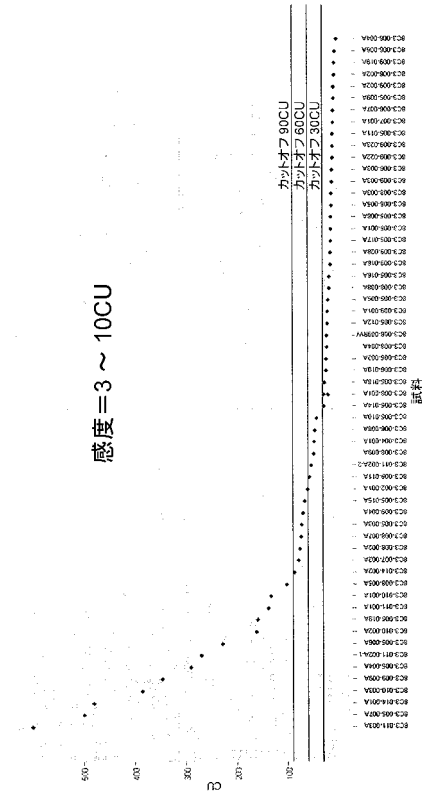


FIG. 25

【図 26】

FNA 乳癌試料 60 検体のホスホ AKT レベル

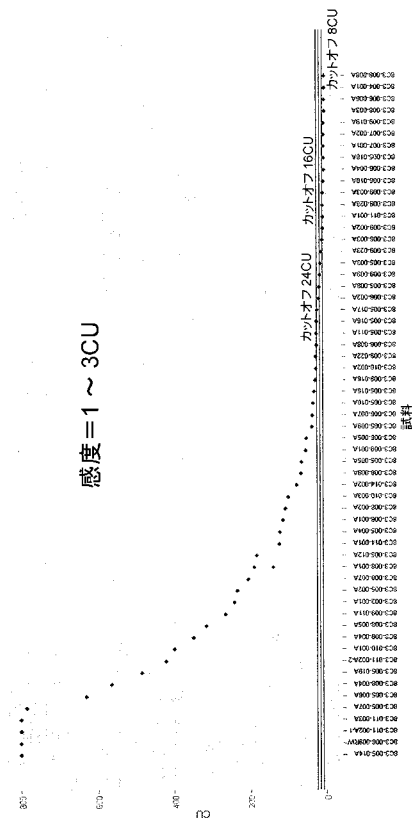
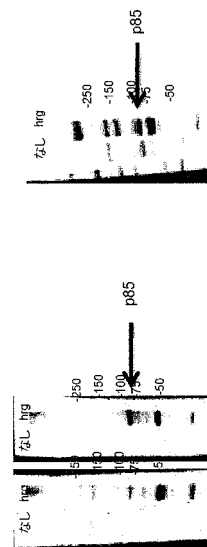


FIG. 26

【図 27】

用いた抗体 TY-12466 YK-12469 4G10





用いた抗原: CGFAEPYNL-pY-SSLKELV

FIG. 27

【配列表】

2015505959000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/068005
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/15(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/15; C12Q 1/02; /; C12Q 1/26; C12Q 1/68; C40B 30/04; C12M 1/34; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: cancer, therapy, signal transduction analyte, her1, her2, her3, cmet, igf-1r, pi3k, akt, erk, mek, p70s6k, pdk1, pras40, pten, rps6, shc		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2011-0281748 A1 (SINGH, SHARAT et al.) 17 November 2011 See paragraphs [0088],[0370]; claims 1, 4, 5, 9-11, 14, 16, 18, 21 and 61.	1-5,7,12 6 8-11,13-24
X Y A	WO 2011-088149 A2 (PROMETHEUS LABORATORIES INC.) 21 July 2011 See paragraphs [0040],[0078],[0169]; claims 1, 11-15, 17, 18, 21 and 22.	13-20 6 1-5,7-12,21-24
X Y A	US 2010-0167945 A1 (SINGH, SHARAT et al.) 01 July 2010 See paragraphs [0096],[0357]; claims 1, 9, 11, 13, 19, 21, 22 and 62.	1-5,7,12 6 8-11,13-24
X Y A	US 2009-0035792 A1 (SINGH, SHARAT et al.) 05 February 2009 See paragraphs [0050],[0113]; claims 1, 4, 9, 11, 12, 18, 20, 23 and 67.	1-5,7,12 6 8-11,13-24
A	US 2009-0191559 A1 (HUANG, WEIDONG et al.) 30 July 2009 See claim 1.	1-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March 2013 (27.03.2013)		Date of mailing of the international search report 28 March 2013 (28.03.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer BYUN, Sung Cheal Telephone No. 82-42-481-8262 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/068005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0281748 A1	17.11.2011	AU 2012-273319 A1 CA 2768013 A1 EP 2454598 A1 WO 2011-008990 A1	23.02.2012 20.01.2011 23.05.2012 20.01.2011
WO 2011-088149 A2	21.07.2011	AU 2012-205343 A1 CA 2787225 A1 WO 2011-088149 A3	02.08.2012 21.07.2011 27.10.2011
US 2010-0167945 A1	01.07.2010	AU 2009-219437 A1 CA 2716826 A1 CN 102016581 A EP 2250498 A1 EP 2250498 B1 IL 207637 D0 JP 2011-514522 A MX 2010009140 A US 8163499 B2 WO 2009-108637 A1	03.09.2009 03.09.2009 13.04.2011 17.11.2010 31.10.2012 30.12.2010 06.05.2011 20.12.2010 24.04.2012 03.09.2009
US 2009-0035792 A1	05.02.2009	AU 2009-276251 A1 CA 2693013 A1 CN 101802618 A EP 2179291 A2 EP 2179291 A4 JP 2010-533842 A KR 10-2010-0063011 A MX 2010000405 A NZ 582618 A RU 2010105037 A US 2011-0275097 A9 WO 2009-012140 A2 WO 2009-012140 A3	22.01.2009 22.01.2009 11.08.2010 28.04.2010 07.07.2010 28.10.2010 10.06.2010 04.03.2010 27.07.2012 20.08.2011 10.11.2011 22.01.2009 05.03.2009
US 2009-0191559 A1	30.07.2009	CA 2711843 A1 EP 2235536 A1 EP 2235536 A4 WO 2009-086197 A1	09.07.2009 06.10.2010 04.05.2011 09.07.2009

フロントページの続き

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

(72)発明者 クーラー, アン
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

(72)発明者 リー, タニ アン ティー.
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

(72)発明者 ハズラール, サスワティ
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

(72)発明者 カークランド, リチャード
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

(72)発明者 リュー, シンジョン
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

(72)発明者 キム, フィリップ
 スイス, シーエイチ 1800 ヴヴェイ, アヴェニュー ネスレ 55

F ターム(参考) 4B063 QA07 QQ08 QR48 QS33 QX02
 4C084 AA17 NA05 NA06 ZB262