



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102947706 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 27

(21) 申请号 201180030332. 9

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2011. 04. 18

代理人 赵蓉民 张全信

(30) 优先权数据

- 61/325, 717 2010. 04. 19 US
- 61/356, 495 2010. 06. 18 US
- 61/421, 178 2010. 12. 08 US
- 61/443, 146 2011. 02. 15 US

(51) Int. Cl.

- G01N 33/68(2006. 01)
- G06F 19/10(2006. 01)
- C12Q 1/68(2006. 01)
- G01N 33/53(2006. 01)
- G01N 33/15(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2012. 12. 19

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/US2011/032935 2011. 04. 18

(87) PCT申请的公布数据  
W02011/133477 EN 2011. 10. 27

(71) 申请人 生物标志物策略公司  
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 D·P·克拉克 A·沙姚伟茨  
C·卡布拉迪拉

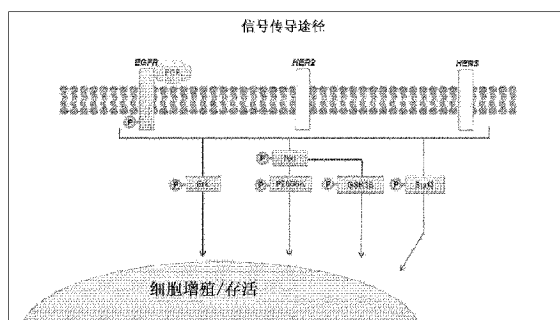
权利要求书 8 页 说明书 24 页 附图 25 页

## (54) 发明名称

预测药物敏感性、抗性和疾病进展的组合物和方法

## (57) 摘要

本发明基于下述发现：功能分级和 / 或信号传导图谱可用于诊断疾病状态、确定癌细胞的药物抗性 or 敏感性、监测疾病或对治疗剂的反应性，和 / 或预测受试者的治疗结果。本文提供用于在患者中疾病诊断和 / 或预后的试验。也提供评价疾病对靶向治疗剂的抗性 or 敏感性，然后启动治疗方案并且监控治疗方案疗效的组合物和方法。也提供确定样品中分子的基础水平或状态和在用调节剂离体刺激一部分活样品之后分子的水平或状态之间的差异的方法，其中所述差异表示为指示疾病的存在、缺乏或具有疾病风险的值。本发明的方法也可用于预测试剂对疾病的作用并且监测受试者的治疗过程。



1. 诊断疾病的方法,包括:

确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分所述样品与调节剂离体接触之后所述分子的水平或状态之间的差异,其中所述差异表示为指示疾病的存在、缺乏或具有疾病风险的值。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述样品选自:组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述疾病选自:中风、心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、心肌梗死、充血性心衰竭、心肌病、心肌炎、缺血性心脏病、冠状动脉疾病、心源性休克、血管性休克、肺动脉高压、肺水肿(包括心源性肺水肿)、癌、病原体介导的疾病、胸腔积液、类风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、色素性视网膜炎和视网膜病,包括糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病、炎性疾病、再狭窄、水肿(包括与病理状况比如癌相关的水肿和医学干预比如化疗诱导的水肿)、哮喘、急性或成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、狼疮、血管渗漏、移植(比如器官移植、急性移植或异种移植或同种移植(比如用于烧伤治疗))排斥;以免缺血性或再灌注损伤比如在器官移植期间导致的缺血性或再灌注损伤、移植耐受诱导;血管成形术之后的缺血性或再灌注损伤;关节炎(比如类风湿性关节炎、银屑病关节炎或骨关节炎);多发性硬化;炎性肠病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病;狼疮(系统性红斑狼疮);移植物抗宿主疾病;T-细胞介导的超敏反应疾病,包括接触过敏、迟发型过敏反应和谷蛋白敏感性肠道病(腹部疾病);1型糖尿病;银屑病;接触性皮炎(包括由于毒常春藤的皮炎);桥本氏甲状腺肿;斯耶格伦氏综合征;自身免疫性甲状旁腺机能减退,比如格雷夫斯病;阿狄森病(肾上腺的自身免疫性疾病);自身免疫性多腺疾病(也称为自身免疫性多腺综合征);自身免疫性脱发症;恶性贫血;白癜风;自身免疫性脑垂体功能减退症;格-巴二氏综合征;其他自身免疫性疾病;癌,包括其中激酶比如 Src- 家族激酶被活化的或过表达的那些,比如结肠癌和胸腺瘤,或激酶活性有助于肿瘤生长或存活的癌;肾小球炎、血清病;荨麻疹;过敏性疾病比如呼吸变态反应(哮喘、花粉症、过敏性鼻炎)或皮肤过敏;蕈状肉芽肿;急性炎症反应(比如急性或成人呼吸窘迫综合征和缺血性/再灌注损伤);皮炎;斑秃;慢性光线性皮炎;湿疹;贝切特疾病;掌跖脓疱病;坏疽性脓皮病;赛塞利综合征;特应性皮炎;全身性硬化;硬斑病;外周四肢缺血症和缺血性四肢疾病;骨病比如骨质疏松症、软骨病、甲状旁腺功能亢进症、佩吉特病和肾性骨营养不良症;血管渗漏综合征,包括化疗或免疫调节剂比如 IL-2 诱导的血管渗漏综合征;脊髓和脑损伤或创伤;青光眼;视网膜疾病,包括黄斑变性;玻璃体视网膜疾病;胰腺炎;血管炎,包括脉管炎、川崎病、闭塞性血栓性脉管炎、韦格纳肉芽肿病和贝切特疾病;硬皮病;先兆子痫;地中海贫血;卡波西氏肉瘤;和希-林二氏病。

5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述癌选自:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

6. 权利要求 4 所述的方法,其中所述病原体选自:细菌、真菌、病毒、螺旋菌和寄生虫。

7. 权利要求 6 所述的方法,其中所述病毒选自:单纯疱疹病毒 1 型 (HSV1)、单纯疱疹病毒 2 型 (HSV2)、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒 (MV)、人巨细胞病毒 (HCMV)、痘苗病毒、人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 和丙型肝炎病毒 (HCV)。

8. 权利要求 3 所述的方法,其中所述肿瘤样品来自实体瘤。

9. 权利要求 8 所述的方法,其中所述肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

10. 权利要求 2 所述的方法,其中通过翻译后修饰修饰所述蛋白质。

11. 权利要求 10 所述的方法,其中所述翻译后修饰选自:磷酸化、乙酰化、酰胺化、甲基化、亚硝基化、脂肪酸添加、脂质添加、糖基化和泛素化。

12. 权利要求 1 所述的方法,其中所述调节剂选自物理、生物或化学调节剂。

13. 权利要求 1 所述的方法,进一步包含将所述样品暴露于治疗剂或其组合。

14. 权利要求 1 所述的方法,其中所述确定使用计算机。

15. 权利要求 1 所述的方法,其中使用选自下述的方法分析所述分子:阵列、ELISA、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、PCR 和 RIA。

16. 用于疾病预后的方法,包括:

确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分所述样品与调节剂离体接触之后所述分子的水平或状态之间的差异;其中表示为值的所述分子的基础水平或状态的所述差异指示预后。

17. 权利要求 16 所述的方法,其中所述分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。

18. 权利要求 16 所述的方法,其中所述样品选自:组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。

19. 权利要求 16 所述的方法,其中所述疾病选自:中风、心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、心肌梗死、充血性心衰竭、心肌病、心肌炎、缺血性心脏病、冠状动脉疾病、心源性休克、血管性休克、肺动脉高压、肺水肿(包括心源性肺水肿)、癌、病原体介导的疾病、胸腔积液、类风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、色素性视网膜炎和视网膜病,包括糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病、炎性疾病、再狭窄、水肿(包括与病理状况比如癌相关的水肿和医学干预比如化疗诱导的水肿)、哮喘、急性或成人呼吸窘迫综合症(ARDS)、狼疮、血管渗漏、移植(比如器官移植,急性移植或异种移植或同种移植(比如用于烧伤治疗))排斥;以免缺血性或再灌注损伤比如在器官移植期间导致的缺血性或再灌注损伤、移植耐受诱导;血管成形术之后的缺血性或再灌注损伤;关节炎(比如类风湿性关节炎、银屑病关节炎或骨关节炎);多发性硬化;炎性肠病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病;狼疮(系统性红斑狼疮);移植物抗宿主疾病;T-细胞介导的超敏反应疾病,包括接触过敏、迟发型过敏反应,和谷蛋白敏感性肠道病(腹部疾病);1型糖尿病;银屑病;接触性皮炎(包括由于毒常春藤的皮炎);桥本氏甲状腺肿;斯耶格伦氏综合征;自身免疫性甲状旁腺机能减退,比如格雷夫斯病;阿狄森病(肾上腺的自身免疫性疾病);自身免疫性多腺疾病(也称为自身免疫性多腺综合征);自身免疫性脱发症;恶性贫血;白癜风;自身免疫性脑垂体功能减退症;格-巴二氏综合征;其他自身免疫性疾病;癌,包括其中激酶比如 Src- 家族激酶被活化的或过表达

的那些,比如结肠癌和胸腺瘤或激酶活性有助于肿瘤生长或存活的癌;肾小球炎、血清病;荨麻疹;过敏性疾病比如呼吸变态反应(哮喘、花粉症、过敏性鼻炎)或皮肤过敏;蕈状肉芽肿;急性炎症反应(比如急性或成人呼吸窘迫综合征和缺血性/再灌注损伤);皮炎;斑秃;慢性光线性皮炎;湿疹;贝切特疾病;掌跖脓疱病;坏疽性脓皮病;赛塞利综合征;特应性皮炎;全身性硬化;硬斑病;外周四肢缺血症和缺血性四肢疾病;骨病比如骨质疏松症、软骨病、甲状旁腺功能亢进症、佩吉特病和肾性骨营养不良症;血管渗漏综合征,包括化疗或免疫调节剂比如 IL-2 诱导的血管渗漏综合征;脊髓和脑损伤或创伤;青光眼;视网膜疾病,包括黄斑变性;玻璃体视网膜疾病;胰腺炎;血管炎,包括脉管炎、川崎病、闭塞性血栓性脉管炎、韦格纳肉芽肿病和贝切特疾病;硬皮病;先兆子痫;地中海贫血;卡波西氏肉瘤;和希-林二氏病。

20. 权利要求 19 所述的方法,其中所述癌选自:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

21. 权利要求 19 所述的方法,其中所述病原体选自:细菌、真菌、病毒、螺旋菌和寄生虫。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述病毒选自:单纯疱疹病毒 1 型(HSV1)、单纯疱疹病毒 2 型(HSV2)、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒(MV)、人巨细胞病毒(HCMV)、痘苗病毒、人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)和丙型肝炎病毒(HCV)。

23. 权利要求 18 所述的方法,其中所述肿瘤样品来自实体瘤。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

25. 权利要求 17 所述的方法,其中通过翻译后修饰修饰所述蛋白质。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述翻译后修饰选自:磷酸化、乙酰化、酰胺化、甲基化、亚硝基化、脂肪酸添加、脂质添加、糖基化和泛素化。

27. 权利要求 16 所述的方法,其中所述调节剂选自物理、生物或化学调节剂。

28. 权利要求 16 所述的方法,进一步包含将所述样品暴露于治疗剂或其组合。

29. 权利要求 16 所述的方法,其中所述确定使用计算机。

30. 权利要求 16 所述的方法,其中使用选自下述的方法分析所述分子:阵列、ELISA、bioplex、luminex、PCR、质谱、流式细胞术和 RIA。

31. 用于预测试剂的作用的方法,包括:

确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分所述样品与调节剂离体接触之后所述分子的水平或状态之间的差异,其中表示为值的所述分子的基础水平或状态的所述差异指示所述试剂的正面作用或负面作用。

32. 权利要求 31 所述的方法,其中所述试剂与所述样品中的所述分子直接作用。

33. 权利要求 31 所述的方法,其中所述作用是选自下述的细胞途径的活化或抑制:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

34. 权利要求 31 所述的方法,其中所述分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或

代谢物分子。

35. 权利要求 31 所述的方法,其中所述样品选自:组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。

36. 权利要求 31 所述的方法,其中所述确定使用计算机。

37. 权利要求 31 所述的方法,其中使用选自下述的方法分析所述分子:阵列、ELISA、bioplex、luminex、PCR、质谱、流式细胞术和 RIA。

38. 监测疾病或受试者治疗过程的方法,包括:

确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分所述样品与调节剂离体接触之后——任选地在治疗过程之前、同时或之后——所述分子的水平或状态之间的差异;其中表示为值的所述分子的基础水平或状态的所述差异指示正面治疗或负面治疗。

39. 权利要求 38 所述的方法,其中正面治疗指示所述受试者为所述治疗过程的响应者。

40. 权利要求 38 所述的方法,其中负面治疗指示所述受试者具有对所述治疗过程的抗性。

41. 针对对分子的作用筛选测试试剂的方法,包括:

使含有所述分子或多个所述分子的样品与所述测试试剂离体接触;

确定所述样品中所述分子的基础水平或状态和在一部分所述样品与调节剂离体接触之后所述分子的水平或状态之间的差异;其中在与所述测试试剂接触之前和之后的所述分子的基础水平或状态的差异指示对所述分子的作用。

42. 权利要求 41 所述的方法,其中评估功能信号传导路线以预测结合的两个测试试剂的作用。

43. 权利要求 41 所述的方法,其中所述样品选自:组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。

44. 权利要求 41 所述的方法,其中所述分子包含蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。

45. 权利要求 41 所述的方法,其中所述分子活化或抑制选自下述的细胞途径:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

46. 权利要求 41 所述的方法,其中所述测试试剂选自:小分子化学物质、化疗剂、激素、蛋白质、肽、拟肽、蛋白质、抗体、核酸、RNAi 分子和反义分子。

47. 基于对治疗剂或治疗方案的反应分级患者的方法,包括:

确定来自受试者的样品中的分子的基础水平或状态和在一部分所述样品与调节剂离体接触之后所述分子的水平或状态之间的差异;其中表示为值的所述分子的基础水平或状态的所述差异指示对治疗剂或治疗方案的正面反应或负面反应。

48. 权利要求 47 所述的方法,其中正面反应指示所述受试者是对所述治疗剂或治疗方案的响应者。

49. 权利要求 47 所述的方法,其中负面反应指示受试者具有对所述治疗剂或治疗方案

的抗性。

50. 确定药物敏感性或抗性的方法,包括将来自受试者的样品中分子的基础水平或状态与在缺乏或存在刺激化合物的情况下离体抑制之后所述分子的水平或状态进行比较。

51. 权利要求 50 所述的方法,其中所述分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。

52. 确定受试者的活肿瘤样品的功能分级的离体方法,包括:

在存在生长因子刺激和在缺乏生长因子刺激的情况下,并且,在存在抑制剂和在缺乏抑制剂的情况下,测量至少一种信号转导磷蛋白水平,以形成功能信号传导图谱。

53. 权利要求 52 所述的方法,其中所述抑制剂包括 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。

54. 权利要求 52 所述的方法,其中所述活肿瘤样品包括乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞或胰脏癌细胞。

55. 权利要求 52 所述的方法,其中所述磷蛋白包括 p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K 和 / 或 pGSK3  $\beta$ 。

56. 权利要求 52 所述的方法,其中确认至少两个不同组的功能信号传导图谱。

57. 权利要求 52 所述的方法,其中确认至少四个不同组的功能信号传导图谱。

58. 权利要求 52 所述的方法,其中所述生长因子刺激包括表皮生长因子受体配体。

59. 权利要求 58 所述的方法,其中所述表皮生长因子受体配体是表皮生长因子 (EGF)。

60. 分类癌细胞模型系统的方法,包括:

(a) 对选择组的癌细胞测量至少一种信号转导磷蛋白水平;

(b) 使所述癌细胞接触至少一种生长因子或至少一种抑制剂;

(c) 在步骤 (b) 之后测量至少一种信号转导磷蛋白水平;

(d) 基于来自步骤 (a) 和步骤 (c) 的测量计算调制分数;和

(e) 基于步骤 (d) 的所述调制分数分类所述癌细胞。

61. 权利要求 60 所述的方法,进一步包括基于活肿瘤样品的分类预测受试者的所述活肿瘤样品的药物抗性或敏感性的步骤。

62. 权利要求 60 所述的方法,其中所述癌细胞包括乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞或胰脏癌细胞。

63. 权利要求 60 所述的方法,其中所述磷蛋白包括 p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K 和 / 或 pGSK3  $\beta$ 。

64. 权利要求 60 所述的方法,其中确认至少两个不同组的癌细胞分类。

65. 权利要求 60 所述的方法,其中确认至少四个不同组的癌细胞分类。

66. 权利要求 60 所述的方法,其中所述生长因子刺激包含表皮生长因子受体配体。

67. 权利要求 66 所述的方法,其中所述表皮生长因子受体配体是表皮生长因子 (EGF)。

68. 预测受试者中治疗方案结果的方法,包括:

(a) 测量来自具有需要治疗的疾病的受试者的至少一种细胞的至少一种分子的基础水平;

(b) 将所述至少一种细胞离体暴露于调节剂;

(c) 在步骤 (b) 之后测量至少一种信号转导蛋白的水平;和

(d) 将在 (a) 和 (b) 中测量的所述水平之间的差异与具有已知药物抗性或敏感性性质的细胞比较,从而预测在所述受试者中所述治疗方案的结果。

69. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种分子包括信号转导蛋白。

70. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种细胞包括黑色素瘤细胞。

71. 权利要求 68 所述的方法,其中所述药物包含 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。

72. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行在 (a) 和 (b) 中测量的水平。

73. 权利要求 72 所述的方法,其中所述肿瘤样品来自实体瘤。

74. 权利要求 72 所述的方法,其中所述肿瘤样品包括选自下述的癌:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

75. 权利要求 68 所述的方法,其中所述药物抗性包括 BRAF 抑制剂抗性。

76. 权利要求 71 所述的方法,其中所述至少一种细胞包括丝氨酸 / 苏氨酸 - 蛋白激酶 B-Raf (BRAF) 突变。

77. 权利要求 76 所述的方法,其中所述至少一种黑色素瘤细胞包括 BRAF 突变和癌 Osaka 甲状腺致癌基因 (COT) 扩增。

78. 权利要求 76 所述的方法,其中所述 BRAF 突变是 V600E。

79. 权利要求 68 所述的方法,其中所述调节剂选自物理、生物或化学调节剂。

80. 权利要求 68 所述的方法,其中所述调节剂包括表皮生长因子 (EGF)、组织纤溶酶原激活物 (TPA)、其他生长因子或其组合。

81. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种分子包括选自下述细胞途径中涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

82. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中涉及的蛋白质。

83. 权利要求 68 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha / \beta$ 、pEGFR、pSTAT3 或其组合。

84. 权利要求 68 所述的方法,其中所述比较步骤用计算机进行。

85. 权利要求 68 所述的方法,其中所述测量使用选自下述的试验进行:阵列、ELISA、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、PCR 和 RIA。

86. 分类黑色素瘤细胞的方法,包括:

(a) 测量至少一种黑色素瘤细胞的至少一种分子的第一基础水平;

(b) 将在 (a) 中测量的所述第一基础水平与具有已知分类的黑色素瘤细胞的所述至少一种分子的第二基础水平进行比较,从而分类所述至少一种黑色素瘤细胞。

87. 权利要求 86 所述的方法,其中所述至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体测量所述第一基础水平。

88. 权利要求 87 所述的方法,其中所述肿瘤样品包括选自下述的癌:结直肠癌、食管

癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

89. 权利要求 86 所述的方法,其中所述至少一种分子包括选自下述细胞途径中涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

90. 权利要求 86 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中涉及的蛋白质。

91. 权利要求 86 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha$  /  $\beta$ 、pEGFR、pSTAT3 或其组合。

92. 权利要求 86 所述的方法,其中所述分类包括转移状态。

93. 权利要求 86 所述的方法,其中所述比较步骤用计算机进行。

94. 权利要求 86 所述的方法,其中所述测量使用选自下述的试验进行:阵列、ELISA、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、PCR 和 RIA。

95. 分类黑色素瘤细胞的方法,包括:

(a) 测量至少一种黑色素瘤细胞的至少一种分子的基础水平;

(b) 将所述至少一种黑色素瘤细胞暴露于抑制性测试试剂;

(c) 在步骤 (b) 之后测量所述至少一种分子的水平;和

(d) 将在 (a) 和 (b) 中测量的水平之间的差异与具有已知分类的黑色素瘤细胞比较,从而分类所述至少一种黑色素瘤细胞。

96. 权利要求 95 所述的方法,其中所述至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行测量。

97. 权利要求 95 所述的方法,其中所述肿瘤样品包含选自下述的癌:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

98. 权利要求 95 所述的方法,其中所述至少一种分子包括选自下述细胞途径中涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

99. 权利要求 95 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中涉及的蛋白质。

100. 权利要求 95 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha$  /  $\beta$ 、pEGFR、pSTAT3 或其组合。

101. 权利要求 95 所述的方法,其中所述抑制性测试试剂包含 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。

102. 权利要求 95 所述的方法,其中所述分类包括转移状态。

103. 权利要求 95 所述的方法,其中所述比较步骤用计算机进行。

104. 权利要求 95 所述的方法,其中所述测量使用选自下述的试验进行:阵列、ELISA、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、PCR 和 RIA。

105. 确认黑色素瘤细胞的药物抗性机制或致癌基因旁路机制的方法,包括:

(a) 将至少一种黑色素瘤细胞暴露于抑制性测试试剂;

(b) 在 (a) 的暴露之后测量多种分子的减少,从而确认药物抗性机制或致癌基因旁路机制。

106. 权利要求 105 所述的方法,其中所述至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行测量。

107. 权利要求 105 所述的方法,其中所述肿瘤样品包含选自下述的癌:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

108. 权利要求 105 所述的方法,其中所述至少一种分子包括选自下述细胞途径中涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

109. 权利要求 105 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中涉及的蛋白质。

110. 权利要求 105 所述的方法,其中所述至少一种分子包括 pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha$  /  $\beta$ 、pEGFR、pSTAT3 或其组合。

111. 权利要求 105 所述的方法,其中所述测量使用选自下述的试验进行:阵列、ELISA、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、PCR 和 RIA。

112. 权利要求 1、16、31、38、41、47 或 68 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂。

113. 权利要求 1、16、31、38、41、47 或 68 所述的方法,其中所述调节剂是刺激物。

## 预测药物敏感性、抗性和疾病进展的组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 技术领域

[0003] 本发明一般涉及受试者中药物反应的预测和监测疾病状态并且更具体地涉及调制后癌细胞的功能分级 (functional stratification) 和信号传导图谱 (signaling profile)。

[0004] 背景信息

[0005] 传统病理学样品主要使用包括使用损害样品生物完整性的加工技术杀死细胞的方法加工。这种方法一般在远离护理点的实验室中进行。这些传统的方法不允许检查活细胞,包括动态的、活细胞相关的生物标记,并且不允许在护理点或附近快速处理样品或产生分析结果。完整和快速获得的信息的这种缺乏可能阻止医生确认合适的处理方案或至少减缓不利影响患者生活质量的过程。

[0006] 例如,肿瘤学家有增长数量的他们可用的治疗选择,包括表征为护理标准的药物的不同组合,和不携带用于特定癌的标签声明但对所述癌有有效性证据的许多药物。最大可能性的良好治疗结果需要给患者指派最佳的可利用癌治疗并且这种指派尽可能快地在诊断之后进行。

[0007] 尽管一些癌正开始使用基因组标记再分组和处理,但可靠的基因组标记不是对所有癌都可用,其可能更好地表征为展示一个或(典型地)许多正常基因的异常表达。目前可用的基于基因表达诊断具体类型的癌并且评价不同治疗策略的可能有效性的生物标记试验可具有一种或多种缺点,例如:(1) 试验可设计用于测试血液并且不容易适合测试实体瘤;(2) 实体瘤样品的样品制备方法可能不适合处理活细胞或进行随后的标记表达的测量;(3) 例如使用细针活检获得的小样品可能无法提供用于完整分析的足够组织;(4) 试验可能需要细胞的体外培养,延长的温育周期和/或从患者获得试验细胞的时间和测试细胞的时间之间的显著延迟,导致标记表达的宽变化和外部影响的可能;(5) 试验可能不适合平行测量对于识别和表征表达为异常而言可能关键的基因多样性、磷蛋白或其他标记的表达;(6) 测试可能是非定量的,主要依赖于免疫组织化学以测定蛋白质的存在或缺乏,而不是基因表达的相对水平;(7) 试剂和细胞处理条件未严格控制,导致试验与试验和实验室与实验室之间的高度差异性;(8) 测试可不适合分析核酸水平,这是由于核酸分子的不稳定性和从患者获得足够新鲜样品的实际困难;和(9) 测试可能涉及例如在存在或缺乏所选择试剂情况下可进行任何基因表达分析之前固定细胞。

[0008] 最近,数个小组已经公开了考虑通过微阵列基因表达分析分类各种癌类型的研究(见,例如 Golub 等, *Science* 286:531-537(1999); Bhattacharjoe 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795(2001); Chen-Hsiang 等, *Bioinformatics* 17(增补 1):S316-S322(2001); Ramaswamy 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154(2001))。也已经报道了基于基因表达模式的人乳腺癌的某些分类(Martin 等, *Cancer Res.* 60:2232-2238(2000); West 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467(2001); Sorlie 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874(2001); Yan 等, *Cancer*

Res. 61:8375-8380 (2001))。但是,这些研究主要集中在改善和改进已经确定的各种类型癌的分类,包括乳腺癌,而一般不提供对差异表达的基因的关系或功能细胞信息的新观点。这些研究未将所述发现与治疗策略关联以改善癌治疗的临床结果,并且它们未解决改善和标准化细胞处理和分析的现有技术的问题。

[0009] 尽管现代分子生物学和生物化学已经揭示了大于 100 种基因,它们的活性影响肿瘤细胞的行为、它们的分化状态和它们对某些治疗性药物的敏感性或抗性,少数例外,但这些基因的状态不足以用于就药物治疗常规上作出临床决定的目的。一个值得注意的例外是使用乳腺癌中雌激素受体 (ER) 蛋白质表达选择患者以用抗雌激素药物比如他莫昔芬治疗。另一例外的例子是使用乳腺癌中 ErbB2 (Her2) 蛋白质表达选择患者用 Her2 拮抗剂药物 **HERCEPTIN®** (Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.)。但是,对于大部分癌,基因表达的病理学可能较复杂并且可能涉及多个基因表达的模式或响应具体刺激的基因表达模式。

[0010] 肿瘤细胞对靶向治疗性药物的反应不仅仅依赖于靶标的存在,也依赖于信号网络中许多分子和它们的变体。术语“离体生物标记”定义新类型的生物标记——在它们从患者中去除之后由活肿瘤细胞引起的那些生物标记。在分子生物标记的背景下,这指通过在外科手术、循环肿瘤细胞期间的外周血液或骨髓收集或通过微创活检比如细针吸出活检 (FNA) 从患者移出有活力的细胞的过程。有活力的样品接着体外刺激。在肿瘤学应用中,这些刺激可以是与新治疗性药物靶向的信号转导网络相关的生长因子,比如表皮生长因子。生物标记本身可表示任何动态生物分子,但是可以是信号传导网络中新修饰的磷蛋白或新表达的 mRNA。在离体刺激之后快速 (数分钟) 发生的细胞事件,比如蛋白质磷酸化事件,可认为“最接近”刺激物,并且在确定肿瘤使用的主要信号转导途径中可以是最有价值的。离体刺激之后 (数分钟至数小时) 出现的事件,比如新 mRNA 转录,可认为是“远端”标记,并且可能对于评估信号转导事件的合成视图 (composite view) 和它们对细胞功能比如增殖或凋亡的影响更有用。这种磷蛋白的多组,或基因表达微阵列,可促进产生全面的功能图谱,其不同于产自固定组织的图谱并且比其提供更多的信息。在一些情况下,可通过在调节剂比如化学途径抑制剂或 MTA 本身的存在下刺激样品离体监测分子靶向剂 (MTA) 对途径的作用。总体上,离体生物标记提供询问整个信号转导网络的功能试验的可能性。这种实验提供数个可能的应用,包括基于功能信息的患者分级 (patient stratification) 以获悉临床试验设计或临床管理和新的药物动力学试验用于开发靶向治疗。(Clark DP. Ex vivo biomarkers: functional tools to guide targeted drug development and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(8):787-94)。

[0011] 因此,仍需要开发改进的组合物和方法,用于基于功能分级和 / 或信号传导图谱诊断疾病状况并且确定癌细胞的药物敏感性。

## 发明内容

[0012] 本发明基于下述发现:功能分级和 / 或信号传导图谱可用于诊断或预测疾病状态,确定癌细胞的药物抗性或敏感性,监测疾病或对治疗剂的反应性和 / 或预测受试者的治疗性结果。本文提供用于患者中疾病的诊断和 / 或预后的试验。也提供组合物和方法,其评价疾病对靶向治疗剂的抗性或敏感性,然后启动治疗方案并且监控治疗方案的疗效。

[0013] 因此,一方面,本发明提供受试者中疾病诊断的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分样品与调节剂离体接触之后分子的水平或状态之间的差异,其中该差异表示为指示存在疾病、没有疾病或具有患病风险的值。优选地,样品含有有活力的(活)细胞。在一种实施方式中,分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中,分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在一种实施方式中,蛋白质通过翻译后修饰被修饰。在另一种实施方式中,翻译后修饰选自:磷酸化、乙酰化、酰胺化、甲基化、亚硝基化、脂肪酸添加(fatty acid addition)、脂质添加(lipid addition)、糖基化和泛素化。

[0014] 在一种实施方式中,肿瘤样品来自实体瘤。在另一种实施方式中,肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检(core biopsy)、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。在另一种实施方式中,方法进一步包括将样品暴露于治疗剂或其组合。仍在另一种实施方式中,用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中,使用选自下述的方法分析分子:阵列、ELISA、bioplex、luminex、LC-质谱、流式细胞术、RIA、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹和 PCR。

[0015] 另一方面,本发明提供受试者中疾病预后的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分样品与调节剂离体接触之后分子的水平或状态之间的差异;其中表示为值的分子的基础水平或状态之间的差异指示预后。在一种实施方式中,分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中,分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在一种实施方式中,通过翻译后修饰修饰蛋白质。在另一种实施方式中,翻译后修饰选自:磷酸化、乙酰化、酰胺化、甲基化、亚硝基化、脂肪酸添加、脂质添加、糖基化和泛素化。

[0016] 在一种实施方式中,肿瘤样品来自实体瘤。在另一种实施方式中,肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。在另一种实施方式中,方法进一步包括将样品暴露于治疗剂或其组合。仍在另一种实施方式中,用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中,使用选自下述的方法分析分子:阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0017] 另一方面,本发明提供预测试剂或试剂组合效果的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分样品与调节剂离体接触之后分子的水平或状态之间的差异,其中表示为值的分子的基础水平或状态之间的差异指示试剂的正面作用或负面作用。在一种实施方式中,分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中,分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在另一种实施方式中,试剂与样品中的分子直接作用。在另一种实施方式中,作用是活化或抑制选自下述的细胞途径:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。仍在另一种实施方式中,用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中,使用选自下述的方法分析分子:阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0018] 另一方面,本发明提供监测疾病或受试者对治疗剂、治疗方案或治疗过程反应性的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分样品与调节剂离体接触之

后——任选地在治疗剂、治疗方案或治疗过程之前、同时或之后——分子的水平或状态之间的差异；其中表示为值的分子的基础水平或状态之间的差异指示正面治疗或负面治疗。

[0019] 另一方面，本发明提供监测受试者疾病或治疗过程的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态与在一部分样品与调节剂离体接触之后——任选地在治疗过程之前、同时或之后——分子的水平或状态之间的差异；其中表示为值的分子的基础水平或状态之间的差异指示正面治疗或负面治疗。在一种实施方式中，分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中，分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在另一种实施方式中，正面治疗指示受试者是治疗过程的响应者。在另一种实施方式中，负面治疗指示受试者具有对治疗过程的抗性。仍在另一种实施方式中，用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中，使用选自下述的方法分析分子：阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0020] 另一方面，本发明提供关于对分子的作用筛选测试试剂的方法。方法包括使含有一种或多种分子的样品与测试试剂离体接触，接着确定样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品与调节剂离体接触之后分子的水平或状态之间的差异；其中在与测试试剂接触之前和之后分子的基础水平或状态之间的差异指示对分子的作用。在一种实施方式中，评估功能信号传导路线以预测结合的两个测试试剂的作用。在另一种实施方式中，样品选自：组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。

[0021] 在一种实施方式中，分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中，分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在另一种实施方式中，分子活化或抑制选自下列的细胞途径：新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。示例性测试试剂包括但不限于小分子化学物质、化疗剂、激素、蛋白质、肽、拟肽、蛋白质、抗体、核酸、RNAi 分子和反义分子。仍在另一种实施方式中，用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中，使用选自下述的方法分析分子：阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0022] 另一方面，本发明提供基于对治疗剂或治疗方案的反应性分级患者的方法。方法包括确定来自受试者的样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品与调节剂离体接触之后分子的水平或状态之间的差异；其中表示为值的分子的基础水平或状态之间的差异指示对治疗剂或治疗方案正面反应或负面反应。在一种实施方式中，分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中，分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。在另一种实施方式中，正面反应指示受试者是对治疗剂或治疗方案的响应者。在另一种实施方式中，负面反应指示受试者具有对治疗剂或治疗方案的抗性。示例性测试试剂包括但不限于小分子化学物质、化疗剂、激素、蛋白质、肽、拟肽、蛋白质、抗体、核酸、RNAi 分子和反义分子。仍在另一种实施方式中，用计算机进行确定样品中分子的基础水平或状态之间的差异的步骤。仍在另一种实施方式中，使用选自下述的方法分析分子：阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0023] 另一方面，本发明提供确定受试者中药物抗性或敏感性的方法。方法包括比较来

自受试者样品中分子的基础水平或状态与在缺乏刺激化合物的情况下离体抑制之后分子的水平或状态。在一种实施方式中,分子是蛋白质或核酸分子。在另一种实施方式中,分子包括蛋白质、核酸、脂质、糖、碳水化合物或代谢物分子。

[0024] 在各个方面,样品选自:组织、血液、腹水、唾液、尿、汗液、眼泪、精液、血清、血浆、羊膜液、胸膜液、脑脊髓液、细胞系、异种移植物、肿瘤、心包液和其组合。在各个方面,肿瘤样品来自实体瘤。在各个方面,肿瘤样品可包括选自下述的癌:结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌(endocrine)、泌尿癌(urinary)、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌(hematopoietic)、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

[0025] 示例性疾病包括但不限于中风、心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、心肌梗死、充血性心衰竭、心肌病、心肌炎、缺血性心脏病、冠状动脉疾病、心源性休克、血管性休克、肺动脉高压、肺水肿(包括心源性肺水肿)、癌、病原体介导的疾病、胸腔积液、类风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、色素性视网膜炎和视网膜病,包括糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病、炎性疾病、再狭窄、水肿(包括与病理状况比如癌相关的水肿和医学干预比如化疗诱导的水肿)、哮喘、急性或成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、狼疮、血管渗漏、移植(比如器官移植、急性移植或异种移植或同种移植(比如用于烧伤治疗))排斥;以免缺血性或再灌注损伤比如在器官移植期间导致的缺血性或再灌注损伤、移植耐受诱导;血管成形术之后的缺血性或再灌注损伤;关节炎(比如类风湿性关节炎、银屑病关节炎或骨关节炎);多发性硬化;炎性肠病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病;狼疮(系统性红斑狼疮);移植物抗宿主疾病;T-细胞介导的超敏反应疾病,包括接触过敏、迟发型过敏反应,和谷蛋白敏感性肠道病(腹部疾病);1型糖尿病;银屑病;接触性皮炎(包括由于毒常春藤的皮炎);桥本氏甲状腺肿;斯耶格伦氏综合征;自身免疫性甲状旁腺机能减退,比如格雷夫斯病;阿狄森病(肾上腺的自身免疫性疾病);自身免疫性多腺疾病(也称为自身免疫性多腺综合征);自身免疫性脱发症;恶性贫血;白癜风;自身免疫性脑垂体功能减退症;格-巴二氏综合征;其他自身免疫性疾病;癌,包括激酶比如 Src-家族激酶被活化的或过表达的那些,比如结肠癌和胸腺瘤或激酶活性有助于肿瘤生长或存活的癌;肾小球炎、血清病;荨麻疹;过敏性疾病比如呼吸变态反应(哮喘、花粉症、过敏性鼻炎)或皮肤过敏;蕈状肉芽肿;急性炎症反应(比如急性或成人呼吸窘迫综合征和缺血性/再灌注损伤);皮炎;斑秃;慢性光线性皮炎(chronic actinic dermatitis);湿疹;贝切特疾病;掌跖脓疱病;坏疽性脓皮病;赛塞利综合征;特应性皮炎;全身性硬化;硬斑病;外周四肢缺血症和缺血性四肢疾病;骨病比如骨质疏松症、软骨病、甲状旁腺功能亢进症、佩吉特病和肾性骨营养不良症;血管渗漏综合征,包括化疗或免疫调节剂比如 IL-2 诱导的血管渗漏综合征;脊髓和脑损伤或创伤;青光眼;视网膜疾病,包括黄斑变性;玻璃体视网膜疾病;胰腺炎;血管炎,包括脉管炎、川崎病、闭塞性血栓性脉管炎、韦格纳肉芽肿病和贝切特疾病;硬皮病;先兆子痫;地中海贫血;卡波西氏肉瘤;和希-林二氏病。

[0026] 在各个方面,病原体选自:细菌、真菌、病毒、螺旋菌和寄生虫。在各个方面,病毒选自:单纯疱疹病毒 1 型(HSV1)、单纯疱疹病毒 2 型(HSV2)、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒(MV)、人巨细胞病毒(HCMV)、痘苗病毒、人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)和丙型肝炎病毒(HCV)。

[0027] 在各种实施方式中,调节剂包括刺激物或抑制剂。在各种实施方式中,调节剂选

自物理、生物或化学调节剂。在各种实施方式中,物理或化学调节剂包括温度变化、密度变化、pH 变化或颜色变化。在各种实施方式中,调节剂包括表皮生长因子 (EGF)、组织纤溶酶原激活物 (TPA)、其他生长因子或其组合。在各种实施方式中,至少一种分子包括选自下述的细胞途径中所涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。在各种实施方式中,至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中所涉及的蛋白质。在各种实施方式中,至少一种分子包括 pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha/\beta$ 、pmTOR、pSrc、pEGFR、pSTAT3 或其组合。

[0028] 另一方面,本发明提供确定受试者的活肿瘤样品功能分级的离体方法。方法包括在缺乏生长因子刺激或在缺乏生长激素刺激的情况下,并且在存在抑制剂和在缺乏抑制剂的情况下离体测量至少一种信号转导磷酸蛋白水平,用于产生功能信号传导图谱。在一种实施方式中,方法包括,响应生长因子刺激,在存在 MEK 抑制剂的情况下和在缺乏 MEK 抑制剂的情况下,离体测量至少一种信号转导磷酸蛋白水平,用于产生功能信号传导图谱。在一种实施方式中,抑制剂包括 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。在一种实施方式中,活肿瘤样品包括乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞或胰脏癌细胞。在另一种实施方式中,磷酸蛋白包括 p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc 和 / 或 pGSK3  $\alpha/\beta$ 。在另一种实施方式中,磷酸蛋白选自:p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc、pGSK3  $\alpha/\beta$  或其组合。在各种实施方式中,磷酸蛋白选自下述至少之一:4EBP1、4EBP1pS65、53BP1、ACC S79、ACC1、AIB-1、AKT、AKT S473、AKT T308、AMPK、AMPK T172、Annexin、AR、Bak、BAX、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-xL、Beclin、Bid、BIM、钙粘着蛋白 -E、钙粘着蛋白 -N、钙粘着蛋白 -P、胱天蛋白酶 3 活性的、胱天蛋白酶 7 切割的 Asp198、Catenin Beta、Caveolin1、CD31、CDC2、Chk1、Chk1 pSer345、Chk2(1C12)、Chk2pThr68、cJun P-S73、Claudin7 CLDN7、胶原 VI、Cox-2、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E1、DJ-1、eEF2、eEF2K、EGFR、EGFR Y992、EGFRY1173、eIF4E、ER-a S118、ERCC1、FAK、纤连蛋白、FOXO3a、FOXO3aS318/321、Gata3、GSK3 S21/S9、GSK3-Beta、HER2 pY1248、IGFBP2、IGFR1b、INPP4B、IRS-1、Jnk2、Kit-c、K-RAS、Ku80、MAPK P-T202/204、MEK1、MEK1 pS217/221、MIG-6、Mre11 (31H4)、MSH2、MSH6、Myc、NF-kB p65、NF2、Notch1、Notch3、p21、p27、p27 pT157、p27pT198、p38/MAPK、p38 T180/182、p53、p70S6K、p70S6K T389、p90RSK P-T359/S363、PARP 切割的、Paxillin、PCNA、PDK1 P-S241、Pea15、Pea15 pS116、PI3K P110a、PI3K-p85、PKC S657、PKCa、PR、Pras40pT246、PTCH、PTEN、Rab25、Rad50、Rad51、Raf-A pS299、Raf-B、Raf-C、Raf-c pS388、Rb (4H1)、Rb pS807/811、S6 S235/236、S6S240/244、Shc pY317、Smad3、Snail、Src、Src P-Y527、Src Y416、Stat3 P-S705、Stat5、Stathmin、Tau、Taz、Taz P-Ser79、端粒末端转移酶、谷氨酰胺转移酶、Tuberin/TSC2、Vasp、VEGFR2、Xiap、XRCC1、Y Box 结合蛋白 1、YAP、YAP pS127、YB1 pS102 或其组合。在一种实施方式中,确认至少两个不同组的功能信号传导图谱。在另一种实施方式中,确认至少四个不同组的功能信号传导图谱。在一种实施方式中,生长因子刺激包括表皮生长因子受体配体。在另外的实施方式中,表皮生长因子受体配体是表皮生长因子 (EGF)。在各种实施方式中,生长因子包括表皮生长因子 (EGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、源自血小板的生长因子 (PDGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、黑色素细胞刺激激素、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子 (VEGF)、PTK7、Trk、Ros、MuSK、Met、Ax1、Tie、Eph、Ret Ryk、DDR、Ros、LMR、ALK、STYK1 或其组合。

[0029] 另一方面,本发明提供分类癌细胞模型系统的方法。方法包括(a)对选择组的癌细胞测量至少一种信号转导磷蛋白水平;(b)使癌细胞接触至少一种生长因子或至少一种抑制剂;(c)在步骤(b)之后测量至少一种信号转导磷蛋白水平;(d)基于来自步骤(a)和步骤(c)的测量计算调制分数;和(e)基于步骤(d)的调制分数分类癌细胞。在一种实施方式中,方法进一步包括基于活肿瘤样品的分类预测受试者的活肿瘤样品的药物抗性或敏感性的步骤。

[0030] 在一种实施方式中,癌细胞包括乳腺癌细胞。在另一种实施方式中,癌细胞包括乳腺癌细胞、黑色素瘤细胞或胰脏癌细胞。在另一种实施方式中,磷蛋白包括 p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc 和 / 或 pGSK3  $\alpha$  /  $\beta$ 。在另一种实施方式中,磷蛋白选自:p-Erk1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc、pGSK3  $\alpha$  /  $\beta$  或其组合。在各种实施方式中,磷蛋白选自下述至少之一:4EBP1、4EBP1 pS65、53BP1、ACC S79、ACC1、AIB-1、AKT、AKT S473、AKT T308、AMPK、AMPK T172、Annexin、AR、Bak、BAX、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-xL、Beclin、Bid、BIM、钙粘着蛋白 -E、钙粘着蛋白 -N、钙粘着蛋白 -P、胱天蛋白酶3活性的、胱天蛋白酶7切割的Asp198、Catenin Beta、Caveolin1、CD31、CDC2、Chk1、Chk1 pSer345、Chk2(1C12)、Chk2 pThr68、cJun P-S73、Claudin7 CLDN7、胶原 VI、Cox-2、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E1、DJ-1、eEF2、eEF2K、EGFR、EGFR Y992、EGFR Y1173、eIF4E、ER- $\alpha$  S118、ERCC1、FAK、纤连蛋白、FOXO3a、FOXO3a S318/321、Gata3、GSK3 S21/S9、GSK3-Beta、HER2 pY1248、IGFBP2、IGFR1b、INPP4B、IRS-1、Jnk2、Kit-c、K-RAS、Ku80、MAPK P-T202/204、MEK1、MEK1 pS217/221、MIG-6、Mre11(31H4)、MSH2、MSH6、Myc、NF- $\kappa$ B p65、NF2、Notch1、Notch3、p21、p27、p27pT157、p27pT198、p38/MAPK、p38T180/182、p53、p70S6K、p70S6K T389、p90 RSK P-T359/S363、PARP cleaved、Paxillin、PCNA、PDK1 P-S241、Pea15、Pea15 pS116、PI3K P110a、PI3K-p85、PKC S657、PKCa、PR、Pras40 pT246、PTCH、PTEN、Rab25、Rad50、Rad51、Raf-A pS299、Raf-B、Raf-C、Raf-c pS388、Rb(4H1)、RbpS807/811、S6S235/236、S6S240/244、Shc pY317、Smad3、Snail、Src、Src P-Y527、Src Y416、Stat3 P-S705、Stat5、Stathmin、Tau、Taz、Taz P-Ser79、端粒末端转移酶、谷氨酰胺转移酶、Tuberin/TSC2、Vasp、VEGFR2、Xiap、XRCC1、Y Box 结合蛋白 1、YAP、YAP pS127、YB1pS102 或其组合。在一种实施方式中,确认至少两个不同组的癌细胞分类。在另一种实施方式中,确认至少四个不同组的癌细胞分类。在一种实施方式中,生长因子刺激包括表皮生长因子受体配体。在另外的实施方式中,表皮生长因子受体配体是表皮生长因子(EGF)。在各个方面,生长因子包括表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、源自血小板的生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、黑色素细胞刺激激素、肝细胞生长因子、血管内皮生长因子(VEGF)、PTK7、Trk、Ros、MuSK、Met、Axl、Tie、Eph、Ret Ryk、DDR、Ros、LMR、ALK、STYK1 或其组合。

[0031] 另一方面,本发明提供预测受试者中治疗方案结果的方法。方法包括(a)测量来自具有需要治疗的疾病的受试者的至少一种细胞的至少一种分子的基础水平;(b)将至少一种细胞离体暴露于调节剂;(c)在步骤(b)之后测量至少一种信号转导蛋白的水平;和(d)将在(a)和(b)中测量的水平之间的差异与具有已知药物抗性或敏感性性质的细胞比较,从而预测受试者中治疗方案的结果。

[0032] 另一方面,本发明提供预测细胞药物抗性或敏感性的方法。方法包括(a)测量至少一种细胞的至少一种分子的基础水平;(b)将至少一种细胞离体暴露于调节剂;(c)在步

骤 (b) 之后测量至少一种信号转导蛋白的水平 ; 和 (d) 将在 (a) 和 (b) 中测量的水平之间的差异与具有已知药物抗性或敏感性性质的细胞比较, 从而预测至少一种细胞的药物抗性或敏感性。在一种实施方式中, 细胞包括黑色素瘤细胞。在另一种实施方式中, 药物包括 BRAF 抑制剂。在另一种实施方式中, 药物包括 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。

[0033] 在一种实施方式中, 至少一种分子包括信号转导蛋白。在另一种实施方式中, 至少一种细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行在 (a) 和 (b) 中测量的水平。在各种实施方式中, 肿瘤样品来自实体瘤。在另外的实施方式中, 肿瘤样品包括选自下述的癌 : 结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。在各种实施方式中, 肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

[0034] 在一种实施方式中, 药物抗性包括 BRAF 抑制剂抗性。在另一种实施方式中, 至少一种细胞包括丝氨酸 / 苏氨酸 - 蛋白激酶 B-Raf (BRAF) 突变。在另一种实施方式中, 至少一种细胞包括 BRAF 突变和癌 Osaka 甲状腺致癌基因 (COT) 扩增。在另外的实施方式中, BRAF 突变是 V600E。

[0035] 在各种实施方式中, 用计算机进行比较步骤。在各种实施方式中, 使用选自下述的试验进行测量 : 阵列、ELISA、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA 印迹、DNA 印迹、蛋白质印迹、PCR 和 RIA。

[0036] 另一方面, 本发明提供分类黑色素瘤细胞的方法。方法包括 (a) 测量至少一种黑色素瘤细胞的至少一种分子的第一基础水平 ; (b) 将在 (a) 中测量的第一基础水平与具有已知分类的黑色素瘤细胞的至少一种分子的第二基础水平进行比较, 从而分类至少一种黑色素瘤细胞。在一种实施方式中, 至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体测量第一基础水平。在各种实施方式中, 分类包括转移状态。在各种实施方式中, 肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

[0037] 另一方面, 本发明提供分类黑色素瘤细胞的方法。方法包括 (a) 测量至少一种黑色素瘤细胞的至少一种分子的基础水平 ; (b) 将至少一种黑色素瘤细胞暴露于抑制性测试试剂 ; (c) 在步骤 (b) 之后测量至少一种分子的水平 ; 和 (d) 将在 (a) 和 (b) 中测量的水平之间的差异与具有已知分类的黑色素瘤细胞水平比较, 从而分类至少一种黑色素瘤细胞。在一种实施方式中, 至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行测量。在一种实施方式中, 抑制性测试试剂包括 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂、BRAF 抑制剂或其组合。在另一种实施方式中, 分类包括转移状态。在各种实施方式中, 肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

[0038] 另一方面, 本发明提供确认黑色素瘤细胞的药物抗性机制或致癌基因旁路机制的方法。方法包括 (a) 将至少一种黑色素瘤细胞暴露于抑制性测试试剂 ; (b) 在 (a) 的暴露之后测量多个分子的减少, 从而确认药物抗性机制或致癌基因旁路机制。

[0039] 在一种实施方式中, 至少一种黑色素瘤细胞包括来自受试者的肿瘤样品并且离体进行测量。在各种实施方式中, 肿瘤样品包括选自下述的癌 : 结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝

癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。在各种实施方式中,至少一种分子包括选自下述的细胞途径中所涉及的蛋白质:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。在各种实施方式中,至少一种分子包括 RAS-RAF-MEK-ERK 途径中所涉及的蛋白质。在各种实施方式中,至少一种分子包括 pErk1/2, pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\alpha / \beta$ 、pEGFR、pSTAT3、pmTOR、pSrc 或其组合。在各种实施方式中,肿瘤样品通过细针吸出、空心针活检、循环肿瘤细胞或外科手术切除的组织样品获得。

[0040] 附图简述

[0041] 图 1 是图解图,其总结源自含有 29 种不同磷蛋白的磷蛋白组的数据。

[0042] 图 2A 和 2B 是 5 个乳腺癌细胞系的组的基线(图 2A)和 EGF 刺激的(图 2B)功能信号传导图谱。

[0043] 图 3 显示本发明使用的信号转导途径的示例性图解。

[0044] 图 4 显示本发明的示例性方法流程图。活肿瘤样品典型地获得自受试者并且接着施加至少一种刺激,以在活肿瘤样品中激发信号转导事件。可评价各种 mRNA 或蛋白质的基础水平和刺激的水平并且接着测定功能分级。

[0045] 图 5 显示施加刺激至受试者的活肿瘤样品的各种步骤/仪器的示例性图解。

[0046] 图 6 显示数个乳腺癌细胞系的功能分级。上左室针对 AKT。上中室针对 Erk。上右室针对 EGFR。下左室针对 GSK3Beta。下中室针对 STAT3。下右室针对 P70S6K。

[0047] 图 7 显示基于功能分级的示例性细胞系分级聚类。

[0048] 图 8 显示单层细胞系和加工细胞系(即,在刺激比如 SnapPath™ 之后)之间的示例性关系。

[0049] 图 9 显示 HCC-1937 的加工的细胞系和异种移植物之间的关系。

[0050] 图 10 显示 MDA-MB-231 的加工的细胞系和异种移植物之间的关系。

[0051] 图 11 显示示例性功能分级和潜在的药物关系,其中图解了药物敏感性和在刺激之后诱导的倍数变化。

[0052] 图 12 显示功能分级和潜在的治疗选择之间的关系。

[0053] 图 13 显示示例性图解,其中潜在的药物敏感性与 TNBC 的功能信号传导图谱关联。上排包括 pAKT、pErk 和 pEGFR。下排包括 pGSK、pSTAT3 和 p70S6k。

[0054] 图 14 显示示例性图解,其中离体分级和细胞功能路线分析通过药物抑制并且例如在 SnapPath™ 系统上是可能的。该分析包括 pAKT、pErk、pGSK、p70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0055] 图 15 显示 EGF 刺激后示例性黑色素瘤功能信号传导图谱(调制)。测量 pAKT、pERK、pGSK3、p70S6K、pSTAT、RPMI-7951 中 pEGFR、SK-MEL 2、SK-MEL 28 和 SK-MEL 31 细胞中的蛋白质水平。计算在 EGF 刺激之前和之后蛋白质水平的倍数变化。

[0056] 图 16 显示通过 U0126 进行 MEK 抑制后,示例性黑色素瘤功能信号传导图谱(抑制)。测量 pERK、pAKT、pGSK3  $\alpha / \beta$ 、p70S6K、pSTAT、RPMI-7951 中 pEGFR、SK-MEL 2、SK-MEL 28 和 SK-MEL 31 细胞中的蛋白质水平。

[0057] 图 17 显示在 TPA 的刺激之后通过 pErk 诱导的 PLX-4032 抗性细胞系 RPMI-7951 的示例性分化。

[0058] 图 18 显示示例性胰脏肿瘤功能信号传导图谱。所有样品除了 10195 是人胰脏神

经内分泌癌肿瘤 (PanNET) 的例子。10195 是人胰脏腺癌样品。数据揭示了使用三个不同磷蛋白生物标记 (p-ERK1/2、p-GSK  $\alpha / \beta$  和 p-STAT3) 的基于 TPA 刺激的功能图谱的差异。

[0059] 图 19 显示在 SnapPath™ 仪器上用 TPA 刺激之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0060] 图 20 显示在 SnapPath™ 仪器上用 EGF 刺激之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0061] 图 21 显示在 SnapPath™ 仪器上在缺乏 EGF 的情况下用 U0126 抑制之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3、和 pEGFR。

[0062] 图 22 显示在 SnapPath™ 仪器上在存在 EGF 的情况下用 U0126 抑制之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0063] 图 23 显示在 SnapPath™ 仪器上 PDGF- $\beta$  的刺激之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0064] 图 24 显示在 SnapPath™ 仪器上在 PDGF- $\beta$  的刺激和由 U0126 的 MEK 抑制之后示例性黑色素瘤细胞系功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0065] 图 25 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 SK-MEL-28 中磷蛋白抑制的示例性动力学曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0066] 图 26 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 SK-MEL-28 中磷蛋白抑制的示例性剂量反应曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0067] 图 27 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 RPMI-7951 中磷蛋白抑制的示例性动力学曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0068] 图 28 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 RPMI-7951 中磷蛋白抑制的示例性剂量反应曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k、和 pSTAT3。

[0069] 图 29 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 SK-MEL-31 中磷蛋白抑制的示例性动力学曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0070] 图 30 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 SK-MEL-31 中磷蛋白抑制的示例性剂量反应曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0071] 图 31 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细胞系 SK-MEL-2 中磷蛋白抑制的示例性动力学曲线。测量的蛋白质水平包括 pAk、pErk、pGSK3  $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0072] 图 32 显示在 SnapPath™ 仪器上用 BRAF 抑制剂 (PLX-4702) 处理后的黑色素瘤细

胞系 SK-MEL-2 中磷酸蛋白抑制的示例性剂量反应曲线。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pGSK3 $\beta$ 、pP70S6k 和 pSTAT3。

[0073] 图 33 显示在 SnapPath™ 仪器上 EGF 的刺激之后的示例性黑色素瘤细胞系 (SK-MEL-28) 功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pMEK。

[0074] 图 34 显示在 SnapPath™ 仪器上 EGF 的刺激以及用 PLX-4702 和 U0126 的 BRAF 和 ERK 抑制之后的示例性黑色素瘤细胞系 (RPMI-7951) 功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pMEK。

[0075] 图 35 显示在 SnapPath™ 仪器上 EGF 的刺激以及用 PLX-4702 和 U0126 的 BRAF 和 ERK 抑制之后的示例性黑色素瘤细胞系 (RPMI-7951) 功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pMEK 和 pEGFR。

[0076] 图 36 显示在 SnapPath™ 仪器上 PDGF $\beta$  的刺激以及用 PLX-4702 和 U0126 的 BRAF 和 ERK 抑制之后的示例性黑色素瘤细胞系 (RPMI-7951) 功能信号传导图谱。测量的蛋白质水平包括 pAKT、pErk、pMEK。

[0077] 发明详述

[0078] 在描述本组合物、方法和治疗方法之前,应当理解本发明不限于所描述的具体组合物、方法和实验条件,因为可改变组合物、方法和条件。也应当理解本文中使用的术语仅仅用于描述具体实施方式的目的,并且不打算限制性的,因为本发明的范围仅仅由所附权利要求限定。

[0079] 如在本说明书和所附权利要求中所使用,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代,除非上下文清楚地相反指出。因此,例如,提及“该方法”包括一种或多种方法和/或在阅读本公开后本领域技术人员清楚的本文所述类型的步骤,等等。

[0080] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科技术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同意思。尽管任何与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实施或测试,但现在描述优选的方法和材料。

[0081] 本发明提供安全、高效、精确、准确、可重复、廉价、成本有效、有效的、快速和方便的方法和“基于柱体(cartridge-based)”的系统用于离体收集、处理和加工细胞样本。这些方法和柱体可保持样品在加工期间的活性,以保持生物标记完整性,并且任选地,通过离体刺激和/或抑制诱发在起始样品中不存在的生物标记比如磷酸蛋白和核酸分子。本发明提供在完整诊断细胞学实验室系统中的充分完整的样本和信息管理以及在活检之后的控制的条件,其使测试之间的差异性最小化,使生物污染的风险最小化,并且使样品制备过程本身对生物标记表达的影响最小化。

[0082] 本发明的实施方式可用于促进疾病的靶向治疗,并且任选地也提供组织样品适当性评价,比如细胞计数、细胞功能和/或其他相关的分析。

[0083] 如本领域技术人员将认识到的,如本文描述的设备、系统、试剂盒和方法在临床或研究背景下提供许多优势。例如,它们可用于提供快速的、就近患者的活检处理而不需要将样本送到遥远的实验室。它们可也用于以成本有效的方式使活检处理标准化和自动化。本发明可比目前的病理学方法允许的提供关于细胞的更详细的分子信息,其使得能够在活检中更加细分类细胞(例如,癌或疾病细胞),任选地使用新离体生物标记。本发明优势在一起使得在护理点附近快速诊断并且随后产生更有效的患者特异性治疗方案。

[0084] 应当理解本发明的方法可单独进行或结合在通过引用并入本文的美国公开号 2009/0162853 中阐释的系统和设备实施。

[0085] 一方面,本发明提供分子试验,能够诊断和 / 或预后受试者中的疾病。另外,本发明的分子试验能够在开始治疗之前评价患者疾病对试剂的敏感性或抗性和监测在治疗期间的治疗效果。诊断试验指导治疗和测定用靶向疗法治疗的患者的预后。

[0086] 因此,本发明提供受试者中疾病诊断和 / 或预后的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后分子的水平或状态之间的差异,其中差异表示为指示疾病的存在、疾病的缺少或具有疾病风险的值。

[0087] 示例性调节剂包括但不限于物理、生物或化学调节剂。术语“调节剂”包括刺激物和抑制剂,比如小分子(例如埃罗替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)或拉帕替尼(lapatinib),和抗体(例如,HERCEPTIN®)。在一种实施方式中,调节剂是表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂或活化剂。如本文所使用,术语“EGFR”指 erbB 基因家族产物。本领域技术人员应当理解 EGFR 可以由来自 erbB 基因家族的任何基因编码的任何 erbB 受体的产物,和已知这些分子形成的任何同源二聚物和异源二聚物。尽管 erbB-1 产物是主要受体,但是其表达已经在之前的研究中检测到,有理由认为本文测试的细胞系和肿瘤也表达其他 erbB 基因家族成员。最近,我们使用的 EGFR 配体或配体的组合结合几乎所有已知的 EGFR 受体形式,并且因此我们的试验测量那些蛋白质施加的作用。在另一种实施方式中,调节剂是比如一种或多种调节剂例如一种或多种 EGF、TGF- $\alpha$  和调蛋白的组合。

[0088] 因此,测量的定量或定性效果可以是基因比如立即或延迟早期基因家族成员的表达水平。适当的立即或延迟早期基因家族成员包括但不限于 FOS、JUN 和 DUSP 1-28。

[0089] 如本文所使用,广义使用术语“疾病”,指由于各种原因,比如感染、遗传缺陷或环境压力引起的受试者局部、器官或全身的任何病理学状况,并且表征为任何可确认的征兆或症状组。示例性疾病包括但不限于中风、心血管疾病、慢性阻塞性肺疾病、心肌梗死、充血性心衰竭、心肌病、心肌炎、缺血性心脏病、冠状动脉疾病、心源性休克、血管性休克、肺动脉高压、肺水肿(包括心源性肺水肿)、癌、病原体介导的疾病、胸腔积液、类风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、色素性视网膜炎和视网膜病,包括糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病、炎性疾病、再狭窄、水肿(包括与病理状况比如癌相关的水肿和医学干预比如化疗诱导的水肿)、哮喘、急性或成人呼吸窘迫综合症(ARDS)、狼疮、血管渗漏、移植(比如器官移植,急性移植或异种移植或同种移植(比如用于烧伤治疗))排斥;以免缺血性或再灌注损伤比如在器官移植期间导致的缺血性或再灌注损伤、移植耐受诱导;血管成形术之后的缺血性或再灌注损伤;关节炎(比如类风湿性关节炎、银屑病关节炎或骨关节炎);多发性硬化;炎性肠病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病;狼疮(系统性红斑狼疮);移植物抗宿主疾病;T-细胞介导的超敏反应疾病,包括接触过敏、迟发型过敏反应,和谷蛋白敏感性肠道病(腹部疾病);1型糖尿病;银屑病;接触性皮炎(包括由于毒常春藤的皮炎);桥本氏甲状腺肿;斯耶格伦氏综合征;自身免疫性甲状旁腺机能减退,比如格雷夫斯病;阿狄森病(肾上腺的自身免疫性疾病);自身免疫性多腺疾病(也称为自身免疫性多腺综合征);自身免疫性脱发症;恶性贫血;白癜风;自身免疫性脑垂体功能减退症;格-巴二氏综合征;其他自身免疫性疾病;癌,包括其中激酶比如 Src- 家族激酶被活化的或过表达的那些,比如结肠癌和胸腺瘤或激酶活性有助于肿瘤生长或存活的癌;肾小球炎、血清病;荨麻疹;过敏性疾病

比如呼吸变态反应（哮喘、花粉症、过敏性鼻炎）或皮肤过敏；蕈状肉芽肿；急性炎症反应（比如急性或成人呼吸窘迫综合征和缺血性/再灌注损伤）；皮炎；斑秃；慢性光线性皮炎；湿疹；贝切特疾病；掌跖脓疱病；坏疽性脓皮病；赛塞利综合征；特应性皮炎；全身性硬化；硬斑病；外周四肢缺血症和缺血性四肢疾病；骨病比如骨质疏松症、软骨病、甲状旁腺功能亢进症、佩吉特病和肾性骨营养不良症；血管渗漏综合征，包括化疗或免疫调节剂比如 IL-2 诱导的血管渗漏综合征；脊髓和脑损伤或创伤；青光眼；视网膜疾病，包括黄斑变性；玻璃体视网膜疾病；胰腺炎；血管炎，包括脉管炎、川崎病、闭塞性血栓性脉管炎、韦格纳肉芽肿病和贝切特疾病；硬皮病；先兆子痫；地中海贫血；卡波西氏肉瘤；和希-林二氏病。

[0090] 在一种实施方式中，疾病是癌。示例性癌包括但不限于结直肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、子宫癌、乳腺癌、皮肤癌、内分泌癌、泌尿癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、头颈癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小肠癌、造血癌、阴道癌、睾丸癌、肛门癌、肾癌、脑癌、眼癌、白血病、淋巴瘤、软组织癌、黑色素瘤和其转移。

[0091] 在另一种实施方式中，疾病是病原体介导的疾病。示例性病原体包括但不限于细菌、真菌、病毒、螺旋菌和寄生虫。示例性病毒包括但不限于单纯疱疹病毒 1 型 (HSV1)、单纯疱疹病毒 2 型 (HSV2)、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒 (MV)、人巨细胞病毒 (HCMV)、痘苗病毒、人免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 和丙型肝炎病毒 (HCV)。

[0092] 如本文所使用，术语“样品”和“生物样品”指适合本发明提供的方法的任何样品。本方法中使用的细胞样品可获得自受试者的组织样品或体液，或者通过活检过程（例如，针活检）或外科过程获得的组织。因此，示例性样品包括但不限于组织样品、冷冻组织样品、活检样本、外科样本、细胞样本、细胞系、异种移植物、肿瘤、细针吸出、全血液、骨髓、脑脊髓液、腹膜液、胸膜液、淋巴液、血清、血浆、羊膜液、粘液、血浆、尿、乳糜、粪便、痰、汗液、眼泪、精液、乳头抽吸、唾液和其任意组合。在某些实施方式中，样品可以是血液样品的一部分比如外周血液淋巴细胞 (PBL) 部分。用于从全血液分离 PBL 的方法是本领域熟知的。另外，可能使用血液样品并且使用本领域熟知的方法从感兴趣的组织例如卵巢、乳腺等富集小量的循环细胞。

[0093] 细针吸出 (FNA) 已经证明是以足够的量取得肿瘤物质以连续方式评估药物动力学终点的稳固和安全的方法。另外，提供初步的证据，表明该方法可有效地用于获取组织以再现体外条件并且开发离体分子敏感性和抗性试验。该方法已经典型地吸引了大量的注意力并且许多这些研究的结果和最终的重要性已经成为最近综述的主题。大部分研究分析源自活力肿瘤组织样品的细胞当在体外条件下暴露于所选择的治疗剂时是否显示响应。因此，在一种实施方式中，试验基于任何损伤的细针吸出和吸出物质的加工，用于蛋白质和/或核酸分析。取决于使用的具体药理学试剂，试验允许确定损伤对治疗的敏感性，特定途径阻塞的有效性，和在分子水平监测治疗效果。试验可用最小的发病率和不适进行，并且可用于药物敏感性评估、剂量方案、治疗效果测量和预测。

[0094] SnapPath™ 离体生物标记平台：细针吸出活检 (FNAB) 是在美国广泛使用的用于取样人肿瘤的微创方法。历史上 FNAB 样品已经提供足够的材料用于微观检查，但是靶向癌药物的成功发展和使用也将需要源自这些临床样品的生物标记信息。

[0095] 尽管离体生物标记已经成功地在患者的床边使用人工活组织操作用于各种临床试验，但离体测试在临床上是不可行的，除非存在自动的快速处理设备，比如 SnapPath™。

SnapPath™ 生物标记平台许诺能够用新的离体生物标记问询以测定对个体患者最有效的癌治疗。

[0096] SnapPath™ 台式装置在独特设计的可插入柱体中利用自动化流动技术加工和操作活肿瘤活检样品。在 SnapPath™ 系统中,放射人员在将针从患者移出之后立即把活检样品放入 (FNA) SnapPath™ 柱体。接着柱体将以与通过流式细胞术加工淋巴瘤样品所需要的类似过程快速输送至其中放置 SnapPath™ 平台的病理学。

[0097] 用来自国家癌症协会的 230 万美元快速 - 跟踪 SBIR 合同正开发 SnapPath™ 生物标记平台。在 NCI 的合同授予中,当局声明公司的 SnapPath™ 技术提供“创新的”FNA 活检方法和仪器,其“尤其响应”NCI 的合同通告,表达感兴趣“保留肿瘤中分子图谱的活检仪器和设备”,包括将“产生完全新的诊断领域”并且“基于关于信号转导途径、分析药物靶标和生物标记的精确信息能够实现实体瘤个性化分子治疗”。NCI 最近也声明关注离体诊断和离体组织分析的技术是 NCI 的 SBIR Phase II Bridge Award 程序的“优先事项”。

[0098] 如本文中使用的术语“受试者”指实施主题方法的任何个体或患者。尽管如本领域技术人员认识的,受试者可以是动物,但是一般受试者是人。因此其他动物,包括哺乳动物比如啮齿动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、猫、狗、兔、包括母牛、马、山羊、绵羊、猪等的农场动物和灵长类(包括猴子、黑猩猩、猩猩和大猩猩),都包括在受试者的定义内。另外,术语“受试者”可指细胞的培养物,其中体外实施本发明的方法以评估例如治疗剂的效能。

[0099] 如本文所使用,术语“分子”或“生物分子”指在活的生物中的任何有机分子。示例性生物分子包括但不限于肽、脂质、核酸、代谢物和碳水化合物。在一种实施方式中,生物分子是肽,比如蛋白质或核酸分子。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可替换使用,指通过肽键或修饰的肽键,即,肽电子等排体彼此连接的两个或多个氨基酸残基。此术语应用于其中一种或多种氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物,含有修饰的残基的那些,和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0100] 在本文广义使用的术语“核酸分子”意思是通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核苷酸或核糖核苷酸的序列。这样,术语“核酸分子”意思是包括可以是单链的或双链的 DNA 和 RNA,以及 DNA/RNA 杂合体。此外,如本文所使用,术语“核酸分子”包括可以从细胞分离的天然存在的核酸分子,例如,感兴趣的具体基因,以及可以通过例如化学合成方法或通过酶促方法比如通过聚合酶链式反应 (PCR) 制备的合成分子,并且,在各种实施方式中,可含有除了磷酸二酯键外的核苷酸类似物或主链键。

[0101] 如本文所使用,术语“EGFR 调节剂”指是生物分子或小分子的化合物或药物,其直接或间接调制 EGFR 活性或 EGFR 信号转导途径。如本文中使用的化合物或药物旨在包括小分子和生物分子二者。直接或间接调制包括 EGFR 活性或 EGFR 信号转导途径的活化或抑制。抑制指抑制 EGFR 结合至包括例如 EGF 的 EGFR 配体。另外,抑制可也指 EGFR 激酶活性的抑制。

[0102] EGFR 调节剂包括例如 EGFR 特异性配体、小分子 EGFR 抑制剂和 EGFR 单克隆抗体。一方面,EGFR 调节剂抑制 EGFR 活性和 / 或抑制 EGFR 信号转导途径。另一方面,EGFR 调节剂是 EGFR 抗体,其抑制 EGFR 活性和 / 或抑制 EGFR 信号转导途径。

[0103] EGFR 调节剂包括生物分子或小分子。生物分子包括分子量大于 450 的所有脂质和单糖、氨基酸和核苷酸的聚合物。因此,生物分子包括,例如,寡糖、多聚糖、寡肽、多肽、肽、

蛋白质、寡核苷酸、和多核苷酸。寡核苷酸和多核苷酸包括,例如, DNA 和 RNA。生物分子进一步包括上述任何分子的衍生物或组合。例如,生物分子的衍生物包括脂质和寡肽、多肽、肽和蛋白质的糖基化衍生物。

[0104] 除了上面讨论的生物分子,在本发明中可用的 EGFR 调节剂也可以是小分子。不是生物分子的任何分子可在本文认为是小分子。小分子的一些例子包括有机化合物、有机金属化合物、有机化合物和有机金属化合物的盐、糖、氨基酸和核苷酸。小分子进一步包括除了它们的分子量不大于 450,其他方面认为是生物分子的分子。因此,小分子可以是分子量为 450 或更小的脂质、寡糖、寡肽和寡核苷酸以及它们的衍生物。

[0105] 应当注意小分子称为小分子,仅仅因为它们典型地分子量小于 450。小分子包括在自然中发现的化合物以及合成的化合物。在一种实施方式中,EGFR 调节剂是抑制表达 EGFR 的肿瘤细胞生长的小分子。在另一种实施方式中,EGFR 调节剂是抑制表达 EGFR 的难医治的肿瘤细胞生长的小分子。许多小分子已经描述为可用于抑制 EGFR 并且是本领域熟知的。

[0106] 本发明也包括专用微阵列,例如,寡核苷酸微阵列或 cDNA 微阵列,其包含一种或多种生物标记,显示与对一种或多种刺激例如 EGFR 调节剂相关的敏感性或抗性的表达图谱。这种微阵列可在体外试验中使用,用于评估在来自肿瘤活检的测试细胞中的生物标记的表达水平,并且确定这些测试细胞是否可能对刺激例如 EGFR 调节剂抗性或敏感。来自受试者的细胞或活组织可被分离并且暴露于一种或多种刺激,例如 EGFR 调节剂。在施加分离自未处理的和处理的细胞的核酸至一种或多种专用微阵列之后,可测定测试的细胞的基因表达模式,并且与来自用于在微阵列上形成生物标记组的对照细胞组的生物标记模式比较。基于来自经历测试的细胞的基因表达模式结果,可以确定细胞是否显示基因表达的抗性或敏感性图谱。

[0107] 本发明也包括试剂盒,用于确定或预测患者是否易受包括一种或多种刺激例如 EGFR 调节剂的治疗的影响或对其有抗性。患者可具有癌或肿瘤,比如,例如,乳腺癌或肿瘤。这种试剂盒将可用于临床环境,以用于测试患者的癌样品,以例如测定或预测患者的肿瘤或癌是否对给定的处理或治疗是抗性的或敏感的。试剂盒包括适当的容器,其包括一种或多种微阵列,例如,寡核苷酸微阵列或 cDNA 微阵列,其包括与对刺激例如 EGFR 调节剂尤其是 EGFR 抑制剂的抗性和敏感性相关的那些生物标记;一种或多种刺激,例如用于测试来自患者的癌样品或细胞的 EGFR 调节剂;和使用说明书。另外,本发明考虑的试剂盒可进一步包括,例如,用于在 mRNA 或蛋白质水平监测本发明生物标记表达的试剂或材料,这使用本领域实施的其他技术和系统,比如,例如 RT-PCR 试验,其使用在一种或多种生物标记基础上设计的引物;免疫试验,比如酶联免疫吸附试验 (ELISA);免疫印迹,例如,蛋白质印迹或原位杂交和类似技术。

[0108] 在一种实施方式中,蛋白质是翻译后修饰的蛋白质,其中蛋白质通过下述一种或多种被修饰:磷酸化、乙酰化、酰胺化、甲基化、亚硝基化、脂肪酸添加、脂质添加、糖基化和泛素化。

[0109] 在另一种实施方式中,方法进一步包括将样品暴露于一种或多种治疗剂或其组合。对于实体瘤或其他癌应用,治疗剂可包括靶向药物制剂,比如,例如,抗肿瘤单克隆抗体,例如曲妥珠单抗(Herceptin®),西妥昔单抗(Erbitux®),贝伐单抗(Avastin®)和利妥昔单抗(Rituxan®和/或Mabthera®),和小分子抑制剂,例如,吉非替尼(Iressa®)或埃罗

替尼(Tarceva®)或细胞毒性化疗剂。

[0110] 示例性化疗剂包括但不限于抗代谢物,比如甲氨蝶呤, DNA 交联剂,比如顺铂/卡铂;烷基化试剂,比如 canbusil;拓扑异构酶 I 抑制剂比如 dactinomycin;微管抑制剂比如紫杉醇(太平洋紫杉醇)和类似物。其他化疗剂包括例如长春花生物碱,丝裂霉素型抗生素,博来霉素型抗生素,抗叶酸素,秋水仙碱,秋水仙胺,依托泊甙,紫杉烷,蒽环类抗生素,多柔比星,柔红霉素,洋红霉素,表柔比星,伊达比星,米托蒽醌(mithoxanthrone), 4-二甲氧基-道诺霉素,11-脱氧柔红霉素,13-脱氧柔红霉素,亚德里亚霉素-14-苯甲酸酯,亚德里亚霉素-14-辛酸酯,亚德里亚霉素-14-萘乙酸酯,安吡啶,卡莫司汀,环磷酰胺,阿糖胞苷,依托泊甙,洛伐他汀,美法仑,拓扑替康,奥沙利铂,苯丁酸氮芥,甲氨蝶呤(methotrexate),洛莫司汀,硫鸟嘌呤,天冬酰胺酶,长春碱,长春地辛,他莫昔芬或氮芥。尽管不打算限制性的,治疗性抗体包括针对 HER2 蛋白的抗体,比如曲妥珠单抗;针对生长因子或生长因子受体的抗体,比如贝伐单抗,其靶向血管内皮生长因子,和 OSI-774,其靶向表皮生长因子;靶向整合蛋白受体的抗体,比如 Vitaxin(也称为 MEDI-522),和类似物。适合用于本发明组合物和方法的抗癌剂的分类包括但不限于:1) 生物碱,包括,微管抑制剂(例如,长春新碱、长春碱和长春地辛等),微管稳定剂(例如,太平洋紫杉醇[紫杉醇],和多西紫杉醇、泰索蒂(Taxotere)等),和染色质功能抑制剂,包括,拓扑异构酶抑制剂,比如,表鬼臼毒素(例如,依托泊甙[VP-16]和替尼泊苷[VM-26]等),和靶向拓扑异构酶 I 的药剂(例如,喜树碱和抗癌妥[CPT-11]等);2) 共价 DNA 结合剂[烷化剂],包括,氮芥(例如,盐酸氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺和白消安[Myleran]等),亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫司汀和司莫司汀等),和其他烷化剂(例如,达卡巴嗪,羟甲基三聚氰胺,塞替派,和丝裂霉素等);3) 非共价 DNA 结合剂[抗肿瘤抗生素],包括,核酸抑制剂(例如,更生霉素[放线菌素 D]等),蒽环类(例如,柔红霉素[道诺霉素和柔红霉素]、多柔比星[亚德里亚霉素]和伊达比星[Idamycin]等),蒽二酮类(例如,蒽环类抗生素类似物,比如,[米托蒽醌]等),博来霉素(硫酸博来霉素)等,和普卡霉素(光辉霉素)等;4) 抗代谢物,包括抗叶酸素(例如,甲氨蝶呤、Folex 和 Mexate 等),嘌呤抗代谢物(例如,6-硫嘌呤[6-MP,硫嘌呤],6-硫鸟嘌呤[6-TG],硫唑嘌呤,阿昔洛韦,更昔洛韦,氟代脱氧腺苷,2-氯脱氧腺苷[CdA],和 2'-脱氧助间型霉素[喷司他丁]等),嘧啶拮抗剂(例如,氟尿嘧啶[例如,5-氟尿嘧啶(Adrucil),5-氟脱氧尿苷(FdUrd)(氟脲苷)]等),和胞嘧啶阿糖核苷(例如,赛德萨[ara-C]和氟达拉滨等);5) 酶,包括, L-天冬酰胺酶;6) 激素,包括,糖皮质激素,比如,抗雌激素(例如,他莫昔芬等),非甾体类抗雌激素(例如,氟他胺等),和芳香酶抑制剂(例如,阿那曲唑[瑞宁得]等);7) 铂化合物(例如,顺铂和卡铂等);8) 与抗癌药物、毒素和/或放射性核素等缀合的单克隆抗体;9) 生物应答修饰剂(例如,干扰素[例如,IFN- $\alpha$ 等]和白细胞介素[例如,IL-2等]等);10) 继承性免疫疗法;11) 造血生长因子;12) 诱导肿瘤细胞分化的试剂(例如,全反式视黄酸等);13) 基因疗法技术;14) 反义疗法技术;15) 肿瘤疫苗;16) 针对肿瘤转移的疗法(例如,Batimistat 等);和 17) 血管发生抑制剂。因此,在一种实施方式中,治疗方案是结合紫杉醇施用顺铂。

[0111] 另一方面,本发明提供预测试剂或试剂组合效果的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后分子的水平或状态之间的差异,其中表示为值的分子的基础水平或状态的差异指示试剂的正面作用或负面作用。在一

种实施方式中,试剂与样品中的分子直接作用。在另一种实施方式中,作用是活化或抑制选自下述的细胞途径:新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。

[0112] 另一方面,本发明提供针对对分子的作用筛选测试试剂的方法。因此,测试试剂的存在或缺乏的作用可也通过检测离体生物标记,例如,翻译后修饰的蛋白质、离子或酶测定。方法包括使含有一种或多种分子的样品与测试试剂离体接触,接着确定样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后分子的水平或状态之间的差异;其中在与测试试剂接触之前和之后分子的基础水平或状态的差异指示对分子的作用。

[0113] 合适的测试试剂包括但不限于下述的一种或多种:小分子化学物质、化疗剂、激素、蛋白质、肽、拟肽、蛋白质、抗体、核酸、RNAi 分子和反义分子。在一种实施方式中,可在施用测试试剂之后测量分散的或分布的细胞对靶离体生物标记或生物分子的定量或定性作用。

[0114] 在另一种实施方式中,可测定测试试剂是否影响一种或多种标记的表达,其中这种表达的存在、缺失或相对程度指示细胞对所选药物制剂的易感性。这些标记可包括许多的离体生物标记,比如 mRNA、microRNA、cDNA、蛋白质、磷蛋白、蛋白质的翻译后修饰或组蛋白修饰或 DNA 包装。例如,标记可以是用于与对药物制剂的易感性关联的早期应答基因(例如 FOS 或 JUN)的 mRNA 或 cDNA。在测试试剂存在的情况下,标记组合表达的存在、缺乏或相对程度可指示细胞对所选择测试试剂比如药物制剂的易感性。

[0115] 对于某些分析方法,测试试剂可以是可检测试剂。可检测试剂可单独使用或作为缀合的或以其他方式连接至另一化合物(例如,缀合至抗体的可检测试剂)。合适的可检测试剂包括但不限于酶、荧光物质、发光物质、生物发光物质、放射性物质、使用正电子发射层析成像的正电子发射金属、或非放射性顺磁金属离子。

[0116] 一旦确定疾病并且启动治疗方案,本发明的方法可以有规律重复以评价与受试者中疾病相关的症状的水平或强度是否开始接近在正常受试者中所观察到的。从连续试验中获得的结果可用于显示在从数天至数月期间治疗的效果。所以,本发明也涉及监测受试者的治疗过程的方法。方法包括确定样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后——任选地在治疗过程之前、同时或之后——分子的水平或状态之间的差异;其中表达为值的分子的基础水平或状态的差异指示正面治疗或负面治疗。因此,正面治疗指示受试者是治疗过程的响应者。类似地,负面治疗指示受试者具有对治疗过程的抗性。

[0117] 在一种实施方式中,方法可进一步包括比较在治疗之前和治疗期间与疾病相关的征兆和症状的水平,其中疾病的征兆和症状减轻表示治疗的效果。所以,本领域技术人员能够根据需要认识并且调整治疗方法。

[0118] 本文所述的方法可用或不用通过引用并入本文的美国公开号 2009/0162853 中描述的柱体进行。本文方法和设备的一个优势是可在护理点添加测试试剂和/或可预先加载在柱体的指定孔中。这允许使用活细胞检测离体生物标记,任选地在护理点附近。这些方法和设备可与特定测试试剂一起使用以离体操作样品,以便于开发新的预测性生物标记,监测和测定对特定药物制剂的细胞敏感性,以及本领域技术人员将认识到的其他用途。

[0119] 例如,来自患者的实体瘤样品可在护理点进行分解、分配并且接着对一系列目前可得到的癌疗法测试。然后,如果必要,样品可被稳定和/或固定,并且分析。取决于每个测

试试剂的结果,医师可在护理点或附近快速确定哪种疗法对于个体患者的肿瘤最有效。该个性化的医学提供许多好处,尤其是,以快速、成本有效的方式使用靶向的癌疗法和方案。

[0120] 本发明的实施方式涉及通过给予至少一种试剂以产生对靶离体生物标记或生物分子的可测量的定量或定性作用,分析分布的细胞(例如,癌细胞)。定量或定性作用可以是细胞途径的活化或抑制。示例性细胞途径包括但不限于新陈代谢途径、复制途径、细胞信号传导途径、致癌信号传导途径、细胞凋亡途径和促血管生成途径。例如,定量或定性作用可以是对G-蛋白偶联受体或受体酪氨酸激酶,比如,表皮生长因子受体(EGFR)和下游途径的激动性或拮抗性作用的量度。

[0121] 在各种实施方式中,使用一种或多种选自下述的方法分析细胞和/或分子:阵列、酶联免疫吸附试验(ELISA)、multiplex、bioplex、luminex、质谱、流式细胞术、RNA印迹、DNA印迹、蛋白质印迹和放射免疫试验(RIA)。在其他实施方式中,使用本领域用于分析核酸的已知设备分析细胞和/或分子。在其他实施方式中,使用计算机测定来自受试者样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后分子的水平或状态之间的差异。

[0122] 另一方面,本发明提供基于对治疗剂或治疗方案的反应性分级患者的方法。方法包括确定来自受试者样品中分子的基础水平或状态和在一部分样品用调节剂离体刺激之后分子的水平或状态之间的差异;其中表示为值的分子的基础水平或状态的差异指示对治疗剂或治疗方案正面反应或负面反应。因此,正面反应指示受试者是治疗过程的响应者。类似地,负面反应指示受试者具有对治疗过程的抗性。

[0123] 如本文所使用,使用本发明处理的细胞可以以许多方式制备并且稳定以允许对它们进行许多细胞分析。例如,可制备细胞用于核酸分析、蛋白质分析和/或使用活细胞探针进行分析。对于核酸分析,稳定剂比如RNA later®、RNA Protect Cell Reagent®(二者可从Qiagen获得)或乙醇可添加至细胞。稳定的细胞可接着任选地进行细胞溶解或者以其他方式提取感兴趣的核酸。然后可分析提取的和纯化的核酸,例如,使用PCR技术。

[0124] 在一些实施方式中,本文所述的方法产生用于进一步分析的核酸分子。对于这些样品,在分散和任选的富集之后,核酸可被稳定或(任选地)提取以产生高质量和数量的核酸分子。这可通过例如溶解期望的细胞然后暴露于测试试剂并且接着使用逆转录酶和DNA引物获得cDNA进行。DNA引物可包括与聚A互补的非特异性引物,例如寡聚(dT)12-18或与感兴趣的mRNA转录体互补的特异性引物。如本领域技术人员将认识到,细胞可使用各种方法比如化学或机械方式进行溶解。

[0125] 任选地,细胞可用试剂稳定以检测和/或保存生物标记信息,例如,使用逆转录酶和DNA引物以获得cDNA转录体,制备RNA、DNA和蛋白质,用于下游分子分析。

[0126] 对于蛋白质或核酸分析,可使用全细胞或溶解的细胞。完整的全细胞可用聚合物固定和稳定,这样样品粘附至分离的室,例如,玻璃载片。这些样品可接着进行分析,例如,免疫组织化学(IHC)分析。溶解的或以其他方式破裂的细胞可用于试验比如蛋白质印迹并且可不需要稳定或固定。

[0127] 病理学者形态学观察的玻片制品和IHC的蛋白质分析可以是本文所述方法的输出。因此,细胞也可任选地使用聚合物在玻片上制备用于形态学分析和/或免疫组织化学。

[0128] 活细胞探针分析可包括在处理细胞的方法中细胞是活的的任何点添加分子探针

(比如 Mito Tracker®)。应当在固定或以其他方式允许细胞死亡之前进行该活细胞探针的这种添加。例如,这种探针可在细胞稳定之前或在之后但在细胞固定之前添加。

[0129] 在一些实施方式中,细胞可通过允许随后分子分析和标记检测的任何适当的方式稳定或固定。一般而言,交联固定剂比如福尔马林不是优选的,但是可以以不干扰随后分析的少量存在。在生物标记是具体基因或多种基因的表达的情况下,在一种实施方式中细胞被溶解并且暴露于逆转录酶和适当的引物,从而在细胞中产生 mRNA 转录体的 cDNA 转录体。这有助于随后的分析,因为 cDNA 比 mRNA 不易降解。

[0130] 在一些实施方式中, $1 \times 10^4$  个或更多的细胞被处理以稳定下述的任何一种或全部:RNA、DNA、蛋白质和 / 或磷蛋白。

[0131] 在一些实施方式中,细胞可在处理之后固定。可使用任何适当的固定方式,例如,空气干燥技术,添加化合物比如醇,例如包含低级烷醇如甲醇或乙醇的固定剂,添加福尔马林,添加 RNase 抑制剂,添加琼脂糖,添加聚乙二醇,添加聚-L-赖氨酸或添加一种或多种螯合剂或抗氧化剂。在一些实施方式中,固定剂包括琼脂糖、聚乙二醇、辛基苯氧基-聚乙二醇、聚-L-赖氨酸、试剂醇和水。

[0132] 另一方面,本发明的方法包括从受试者制备实体组织细胞的方法,例如,从具有实体瘤的动物或人受试者制备实体瘤细胞的方法,例如,用于确定细胞对所选择的靶向药物制剂的敏感性。示范性方法可包括下述步骤:(a) 获得包含来自受试者的期望细胞的实体组织;(b) 将组织分散(例如,使用剪切力)成单个活细胞和 / 或不多于 100 个活细胞例如 10 至 100 个细胞的聚集体;(c) 富集样品,例如从活细胞去除污染物质;(d) 在分离室中将活细胞分布成测试等分试样;(e) 将活细胞暴露于一种或多种测试试剂;和 (f) 用固定剂和 / 或稳定剂(例如,稳定 RNA、DNA、蛋白质和 / 或磷蛋白的试剂)处理细胞以固定肿瘤细胞和 / 或标记,用于进一步分析;其中肿瘤细胞和 / 或标记的固定在从受试者中移出组织的 4 个小时内以自动或人工方式完成。

[0133] 本发明的另一实施方式提供测试细胞的方法,其中实体瘤细胞从哺乳动物(例如,人患者)移出,并且在大部分细胞,例如,至少 65% 的细胞,例如,至少 75% 的细胞是有活力的并且还未在身体外复制时,将所有或部分细胞离体暴露于一种或多种测试试剂,并且稳定细胞,任选地用可保存包括细胞 DNA、RNA、蛋白质和 / 或磷蛋白的生物标记信息的固定剂(例如,聚合物)。这些生物标记可使用本领域技术人员熟知的分子分析或使用本文所公开的新的离体生物标记试验测试。

[0134] 提供下列实施例以进一步说明本发明的优势和特征,但是不意欲限制本发明的范围。尽管它们是不可能使用的典型那些,但是可选地可使用本领域技术人员熟知的其他程序、方法或技术。

[0135] 实施例 1

[0136] 磷蛋白阵列的功能信号传导图谱

[0137] 图 1 是柱状图,其总结源自含有 29 种不同磷蛋白的磷蛋白阵列的数据。数据源自已经用 EGF 处理的 3 个乳腺癌细胞系。柱表示相对于没有 EGF 刺激的基础状态的磷蛋白上调。注意,这些细胞系显示 EGF 刺激之后非常不同组的上调磷蛋白,给出关于这些细胞的信号转导网络的信息。

[0138] 使用与本文提供的类似的原始数据,将使用算法为每种肿瘤形成“图谱”。例如,基

于之前测定的切割值 (cut value), 各单个磷蛋白的水平将被赋予 0、低、中和高之间的“分数”。然后, 来自肿瘤中每个分析的蛋白质的分数将聚集成称为功能信号传导图谱的组。每个图谱将提供关于肿瘤细胞功能状态的信息, 其可然后用于预测肿瘤的靶向药物敏感性/抗性。一组 5 个乳腺癌细胞系的这种功能信号传导图谱的例子显示在图 2A 和 2B 中。

[0139] 实施例 2

[0140] 乳腺癌细胞的功能分级能够实现预测性治疗策略

[0141] 大部分靶向治疗仍缺乏有效的预测性生物标记。已存在类型的生物标记的主要限制是缺乏关于由分子靶向药物靶向的信号转导网络的功能信息。本发明提供基于活肿瘤细胞产生的离体生物标记的功能试验。在存在或缺乏 MEK 抑制剂的情况下, 通过短期表皮生长因子 (EGF) 刺激得出图谱。产生的信号转导磷蛋白水平的变化用于产生功能信号传导图谱, 该图谱将肿瘤细胞系分级为功能组。该功能信号传导图谱通过负责肿瘤活检处理的自动平台是可行的。

[0142] 增殖乳腺癌细胞系 (BT-474、MDA-MD-231、SKBR3、HCC-1937、BT-20、T47D、MCF-7、BT-549) 并且通过轻轻刮擦从板中移出, 以模拟 FNA 活检样品。移出之后, 将细胞放置在 SnapPath™ 活肿瘤细胞处理平台上 (BiMarker Strategies, LLC), 以诱发离体生物标记。SnapPath™ 分散样品, 富集肿瘤细胞, 等分至测试孔, 并且通过 EGF (200ng/ml) 在存在或缺乏 MEK 抑制剂 U0126 (1 μM) 的情况下, 施加离体刺激。细胞溶解产物接着使用 BioPlex 平台分析下述的磷蛋白: p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3 (BioRad)。基于磷蛋白的水平为每个细胞系形成功能图谱。

[0143] 在 U0126 存在的情况下用 EGF 刺激的乳腺癌细胞系的功能信号传导图谱揭示能够分级的不同功能组。基于 pAKT 磷酸化水平确认两个功能组: 一组展示可变的但低水平的 p-AKT 抑制, 而另一组显示未预料到的 p-AKT 上调。该第二组可能对 MEK 抑制抗性, 但是对 MEK/AKT 抑制的组合敏感。基于 pEGFR 磷酸化水平确认两个其他功能组: 一组展示可变的但低的 p-EGFR 抑制, 而另一组显示未预料到的 p-EGFR 上调。该第二组可能对 MEK 抑制抗性, 但是对 MEK/EGFR 抑制的组合敏感。

[0144] 人癌的功能信号传导图谱揭示信号转导网络的独特细节, 其允许通过传统生物标记不可获得的肿瘤分级。这些图谱可与靶向药物敏感性或抗性相关并且可产生成功的伴随诊断, 包括靶向剂的组合治疗。这些功能图谱可在自动平台上从少量的肿瘤细胞重复获得, 表明该预测性测试的方法对于人肿瘤活检样品是可能的。

[0145] 实施例 3

[0146] 基于获得自活肿瘤细胞的功能磷蛋白信号传导图谱的乳腺癌分级

[0147] 异常信号转导网络是已有的和即将出现的分子靶向剂 (MTA) 的常用靶。不幸地, 指导治疗性选择的大部分预测性生物标记基于通过 DNA 突变或转录图谱的信号转导的间接评估而不是信号转导蛋白本身的动态评估。基于源自在活乳腺癌细胞的生长因子刺激后诱导的一组信号传导磷蛋白的功能信号传导图谱的乳腺癌的分类可能为 MTA 选择比使用固定的或冷冻组织的间接方法提供更精确的系统。

[0148] 该实施例为基于响应离体刺激从活肿瘤细胞获得的功能信号传导图谱而分级多种乳腺癌模型系统提供了证明。将乳腺癌细胞系 (MCF-7、HCC-1937、MDA-MB-231、BT474 和 SKBR3) 暴露于媒介 (对照) 或用 200ng/ml 的表皮生长因子 (EGF) 刺激 5 分钟, 接着进行

细胞溶解和蛋白质提取。涉及 EGF 的信号转导途径显示在图 3 中。使用多重珠免疫试验 (BioPlex, BioRad) 以 6 个一组测定 6 个磷蛋白 (pEGFR、pErk、pAKT、pP70S6k、pGSK3 $\beta$  和 pSTAT3) 的平均荧光强度 (MFI) 水平并且为每个计算定义为  $\log_2(\text{MFI 刺激的} / \text{MFI 对照})$  的调制分数 (MS)。样品获取和处理方法显示在图 4 和 5 中。通过相对于中值 (0.66) 和四分位数间距 (IQR) (1.54) 的百分位数对分数划分等级。中等响应者分类为 MS 在第 75 百分位数 (2.20) 和第 75 百分位数加 IQR (3.74) 的那些。高响应者是  $\text{MS} > 3.74$  的那些。低响应者是 MS 落在 IQR 和第 75 百分位数之间 (1.54-2.20) 的那些, 而没有响应者归类为  $\text{MS} < 1.54$ 。

[0149] 测试的乳腺癌细胞系的功能分级显示在图 6 中, 并且基于功能分级的细胞系分级聚类显示在图 7 中。EGF 刺激导致除了 BT474 的所有细胞的高水平 EGFR- 磷酸化, BT474 中等响应 (2.57)。MCF-7 细胞中对于 pErk 的 MS 是高的 (3.92), HCC-1937 中的为中等 (2.89) 并且对于测试的其他系不存在。中等 STAT-3 磷酸化仅仅在 MCF-7 细胞中观察到 (2.34), 而低 pAKT MS 仅在 SKBR3 中观察到 (1.78)。测试的 5 个细胞系中所有其他标记不是响应者 ( $< 1.54$ ), 对于所有 5 个细胞系, pGSK3 $\beta$  和 pP70S6K 产生  $\text{MS} < 1.0$ 。有趣地, 所有 6 个蛋白质的相关 MS 等级顺序在每个细胞系之间不同, 表明分级的进一步机会。

[0150] 单层细胞系和 SnapPath™ 加工的细胞系之间的关系显示在图 8 中, 并且加工的细胞系聚类显示在表 1 中。该实施例提供 SnapPath™ 能够实现细胞系和异种移植物的功能分级。SnapPath™ 加工的细胞系和异种移植植物之间的关系显示在图 9 (HCC-1937) 和图 10 (MDA-MB-231) 中。

[0151]

	BT-20	BT-474	BT-549	HCC-1937	MCF-7	MDA-MB-231	SKBR3	T-47D
BT-20	-	0.33	<b>0.93</b>	<b>0.90</b>	0.18	<b>0.96</b>	0.15	0.62
BT-474		-	0.05	0.69	<b>0.99</b>	0.06	0.67	<b>0.91</b>
BT-549			-	0.78	-0.31	<b>0.98</b>	0.31	0.49
HCC-1937				-	0.22	0.78	0.55	<b>0.90</b>
MCF-7					-	0.24	0.19	0.50
MDA-MB-231						-	0.17	0.46
SKBR3							-	0.77
T-47D								-

[0152]

[0153] 图 11 显示功能分级和潜在的药物相关性之间的关系, 其中图解了药物敏感性和在刺激之后诱导的倍数变化。图 12 显示功能分级和潜在的治疗选择之间的关系。不同的乳腺癌细胞系显示独特的功能磷蛋白信号传导图谱, 从而提供基于单个信号转导途径活化分级肿瘤的机制。

[0154] 图 13 显示其中潜在的 药物敏感性与 TNBC 的功能信号传导图谱关联的图解。上排包括 pAKT、pErk 和 pEGFR。下排包括 pGSK、pSTAT3 和 p70S6k。图 14 显示图解,其中通过药物抑制在 SnapPath™ 系统上离体分级和细胞功能路线分析是可能的。该分析也包括 pAKT、pErk、pGSK、p70S6k、pSTAT3 和 pEGFR。

[0155] SnapPath™ 系统是自动平台,其能够从细胞系和异种移植物肿瘤引起功能信号传导图谱。获得自 SnapPath™ 系统的功能信号传导图谱可与药物敏感性和抗性数据相关联,提供预测性诊断平台的基础。

[0156] 本发明还提供通过使用通过本文所述的方法获得的各种细胞,评价试剂、化合物、药品、毒物或类似物的生理学功能或毒性的方法。

[0157] 实施例 4

[0158] 黑色素瘤功能信号传导图谱

[0159] 数年来,已经认识到黑色素瘤通过控制细胞增殖、存活和凋亡的数个分子途径的复杂和多相相互作用而发育。

[0160] 尤其, RAS-RAF-MEK-ERK 途径似乎起到重要的作用。约 20% 的黑色素瘤含有 NRAS 的突变并且另一 66% 含有 BRAF 的突变。除了它们在黑色素瘤发病机制中的作用,这些分子缺陷也已经证明是有用的药物靶。例如, RAF 抑制剂 PLX-4032 在 I 期和 II 期临床试验中已经显示显著的应答率。不幸地,原发性和获得性抗性都总是出现在用这种 RAF 抑制剂治疗的患者中。

[0161] 令人吃惊地,该抗性未归因于靶蛋白药物结合结构域的二次突变的已知机制。而是,患者表现出恢复 MAPK 途径或利用替代的旁路信号传导机制。因为突变的简单 DNA 分析不能分辨这些抗性机制,因此功能试验是理想的识别抗性和预测适当靶向疗法的方法 (Soon, Soon 等, The Ochsner Journal 2010 ;10(2) :93-98 ;McMahon, M :Parsing out the complexity of RAF inhibitor resistance. Pigment Cell&Melanoma Research。文章首次在线公开 :2011 年 1 月 12 日)。

[0162] 表 2 总结用于产生功能信号传导图谱的黑色素瘤细胞系的基因型和表型,其表示实际人黑色素瘤样品的谱型。

[0163] 如在图 15-17 和 19-36 中所显示,基于它们信号转导路线的差异,功能信号传导图谱可区分并且分级黑色素瘤样品。可通过比较各种蛋白质(包括 pErk, pAKT、pP70S6k、pGSK3 $\beta$ , pEGFR 和 STAT3)的基础水平与当细胞暴露于各种试剂(包括 EGF、TPA、其他生长因子)时的水平,产生这种图谱。另外,通过将黑色素瘤细胞暴露于各种试剂(比如 MEK 抑制剂、BRAF 抑制剂等)干扰信号转导网络可揭示另外的功能信息,包括阐释药物抗性机制和致癌基因旁路机制。这些功能信号传导图谱在一起可形成预后、预测、药物动力学或监测试验的基础。

[0164]

黑色素瘤细胞	基因型	PLX-4032 表型
SK-MEL-31	BRAF-wt, RAS-wt	抗性的
SK-MEL-28	BRAF-mut(V600E)	敏感的
SK-MEL-2	NRAS-mut	未知
RPMI-7951	BRAF-mut(V600E) COT 扩增	抗性的

[0165] 图 15-17 和 19-36 也表明功能信号传导图谱特征的数个特定例子,其区别开黑色素瘤样品并且与药物敏感性或抗性相关。例如,图 15 显示 SK-MEL-31 和 RPMI-7951 细胞系在 EGF 刺激后展示最高的 pEGFR 诱导。令人吃惊地,这两个细胞系也展示对 BRAF 抑制剂 PLX-4032 的抗性。各种蛋白质的基础水平可也区别开黑色素瘤。例如,SK-MEL-31、SK-MEL-28、SK-MEL-2 和 RPMI-7951 细胞系展示不同的 pERK(分别 1816、3880、1948 和 776avg. MFI) 和 pAKT 的基础水平。另外,图 16 显示通过 U0126 的 MEK 抑制也表明每个细胞系独特的功能路线,包括未预料到的间接(collateral)途径增强,比如 pERK 和 pEGFR 标记的那些。图 17 显示在 TPA 的刺激之后通过 pErk 的诱导分化 PLX-4032 抗性细胞系 RPMI-7951。另外,图 19-34 表明基于用 TPA、EGF、PDGF  $\beta$  的调制或 PLX-4702 或 U0126 的抑制区分黑色素瘤细胞系的能力。

[0166] 图 19-36 表明基于 TPA、EGF、PDGF  $\beta$  的调制或 PLX-4702 或 U0126 的抑制区分黑色素瘤细胞系的能力。例如,图 19 和 20 显示从用 TPA 和 EGF 调制的 4 个不同的黑色素瘤细胞系引出的功能信号传导图谱。如在图 20 中可见,在用 EGF 刺激之后,RPMI-7951 和 SK-MEL-31 具有不同的 pEGFR 水平。

[0167] 图 21 和 22 表明在 4 个黑色素瘤细胞系中在缺乏(图 21)和存在(图 22)EGF 调制的情况下,通过 U0126 的 MEK 抑制的影响。SK-MEL-28 细胞中,在缺乏 EGF 刺激和 MEK 抑制的情况下,pErk 被抑制而 pEGFR 被活化。在 SK-MEL-31 细胞中,pErk 也以相当的水平被同样抑制,虽然 pAkt 在抑制之后被上调。相当的趋势也表明在图 22 中。

[0168] 图 23 和 24 表明 PDGF  $\beta$  刺激对黑色素瘤细胞系的影响以及 PDGF  $\beta$  刺激的 MEK 抑制。与其他黑色素瘤细胞系相比,PDGF  $\beta$  刺激仅在 RPMI-7951 细胞系中活化 pPDGF。MEK 抑制在 SK-MEL-21、SK-MEL-28 和 RPMI-7951 细胞系中减小 pErk 约 50%。pErk 在 SK-MEL-2 细胞系中不被 MEK 抑制影响。

[0169] 图 33 和 34 表明在 BRAF 抑制剂 PLX-4702 和 MEK 抑制剂 U0126 存在的情况下 EGF 刺激对 SK-MEL-28 细胞系的影响。PLX 抑制加 EGF 刺激减少 pErk 表达,尽管不如 MEK 抑制显著。在 MEK 抑制剂和 EGF 存在的情况下 pMEK 也增加。

[0170] 图 35 表明 EGF 刺激和 PLX-4702 或 MEK 抑制在 RPMI-7951 细胞中的影响。在所有 EGF 调制之后 pEGFR 显著增加,而在 MEK 抑制之后 pErk 降低。

[0171] 图 36 表明在缺乏或存在 MEK 抑制剂 U0126 或 BRAF 抑制剂 PLX-4702 的情况下,RPMI-7951 细胞的 PDGFR  $\beta$  活化。在 PLX-4702 存在的情况下,pMEK 被下调,而 MEK 抑制表

现出较不有效。

[0172] 实施例 5

[0173] 胰腺癌细胞的功能信号传导图谱

[0174] 胰脏神经内分泌癌肿瘤 (PancNETs) 是第二最常见的胰腺肿瘤, 尽管它们很有可能代表多相组的相关肿瘤。PancNET 的恶性可能性广泛变化并且不能基于显微分析或标准的免疫组织化学测试比如用于增殖速率的那些预测。功能信号传导图谱提供识别具有差预后后的肿瘤的机会, 以及确认分子特征的可能性, 其将能够实现适当靶向治疗的预测。

[0175] 如在图 18 中所显示, 可区分功能信号传导图谱并且基于它们信号转导路线的差异分级胰脏肿瘤样品。这种图谱可通过比较各种蛋白质 (包括 pErk, pAKT、pP70S6k、pGSK3  $\beta$ , pEGFR 和 pSTAT3) 的基础水平与当将细胞暴露于各种试剂 (包括 EGF、TPA、其他生长因子等) 之后的水平产生。另外, 通过将黑色素瘤细胞暴露于各种试剂 (比如 MEK 抑制剂、mTOR 抑制剂等) 干扰信号转导网络可揭示另外的功能信息, 包括阐释药物抗性机制和致癌基因旁路机制。这种功能信号传导图谱在一起可形成预后、预测、药物动力学或监测测试的基础。

[0176] 图 18 也显示数个功能信号传导图谱特征, 其区分胰脏肿瘤样品并且与药物敏感性或抗性相关。这些研究利用来自具有胰脏神经内分泌癌肿瘤或胰脏腺癌的个体的真实人肿瘤样品。例如, 图 18 显示 4 个 PancNET 可通过它们功能图谱区分, 如通过 TPA 刺激之后 pERK 和 pGSK 的诱导所测定的。令人吃惊地, 具有最不同功能图谱的样品 (10189 ;10 倍 pERK 诱导) 是唯一转移的肿瘤。这表明这种功能图谱可提供关于胰脏肿瘤的预后信息。各种蛋白质的基础水平可也区别胰脏肿瘤。基于试剂比如药物——包括 mTOR 抑制剂——的干扰的功能图谱提供另外的信息, 其中一些可形成预测性测试的基础。

[0177] 尽管已经参考上面的实施例描述了本发明, 但是应当理解改进和改变包括在本发明的精神和范围内。所以, 本发明仅仅由所附权利要求限定。

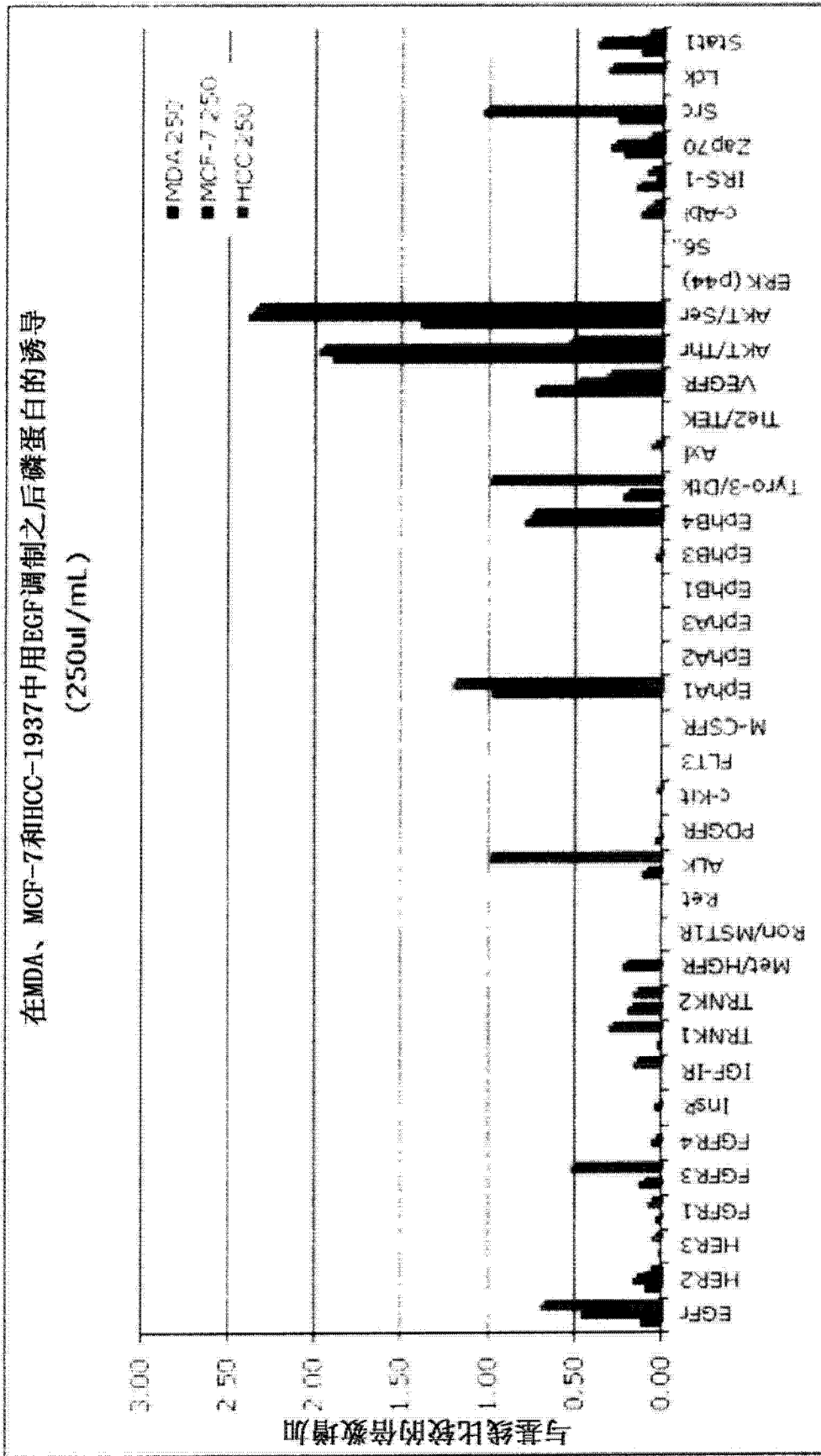


图 1

基线

	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lck					
Met					
Ron					
	高				
	中				
	低				
	没有反应				

图 2A

EGF刺激

	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lck					
Met					
Ron					
	高 = 1+ 倍诱导				
	中 = 0.5-1.0 倍诱导				
	低 = 0.2-0.49 倍诱导				
	没有反应 = 0-0.19				

图 2B

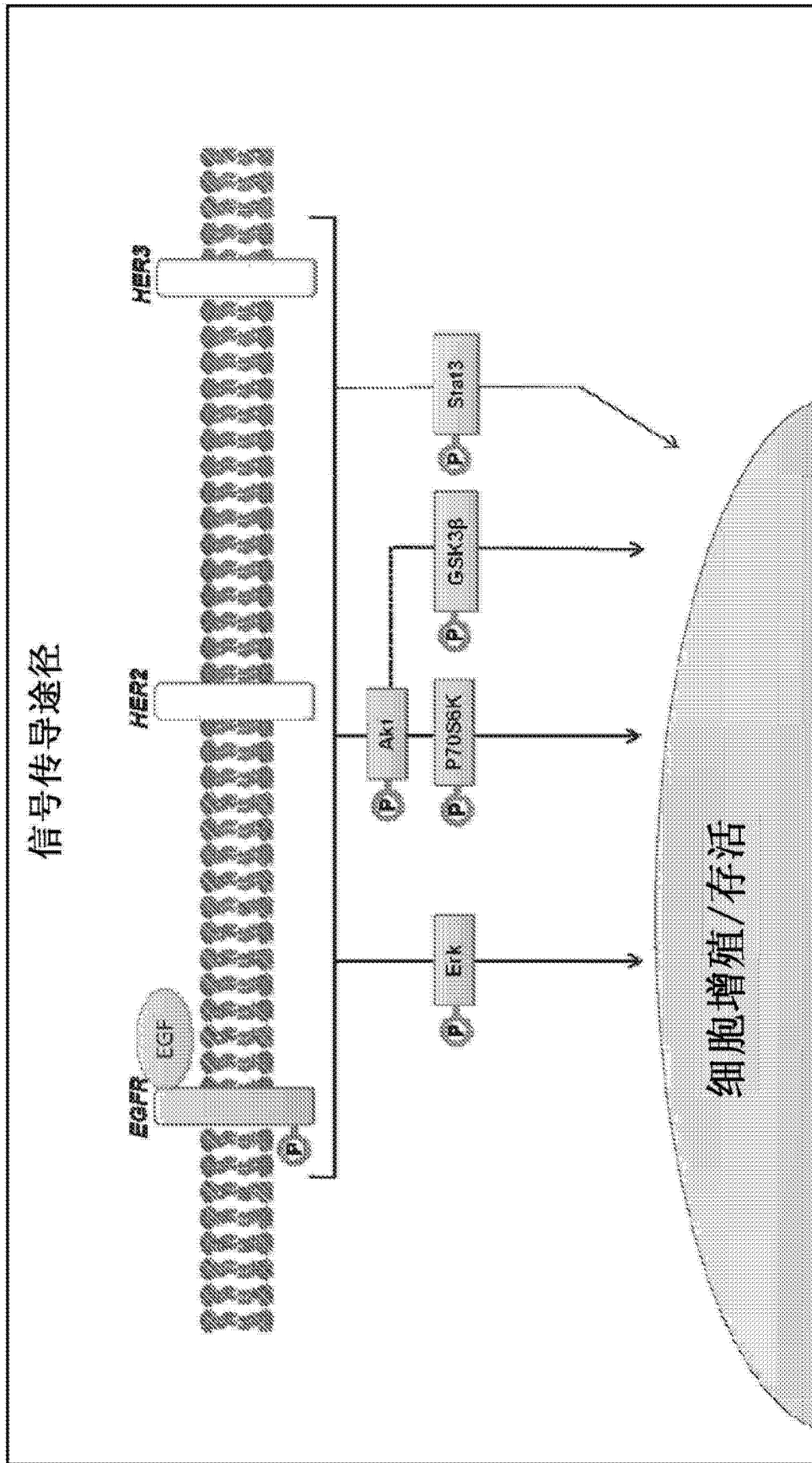


图 3

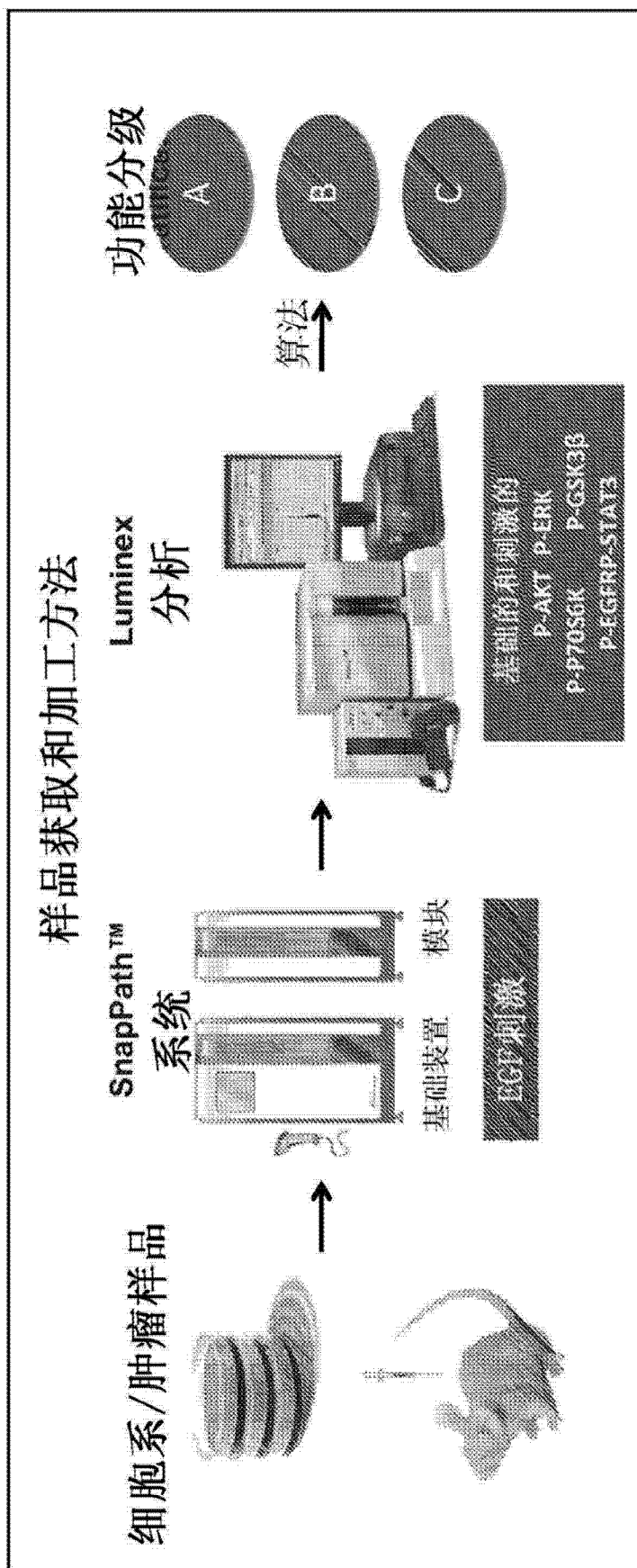


图 4

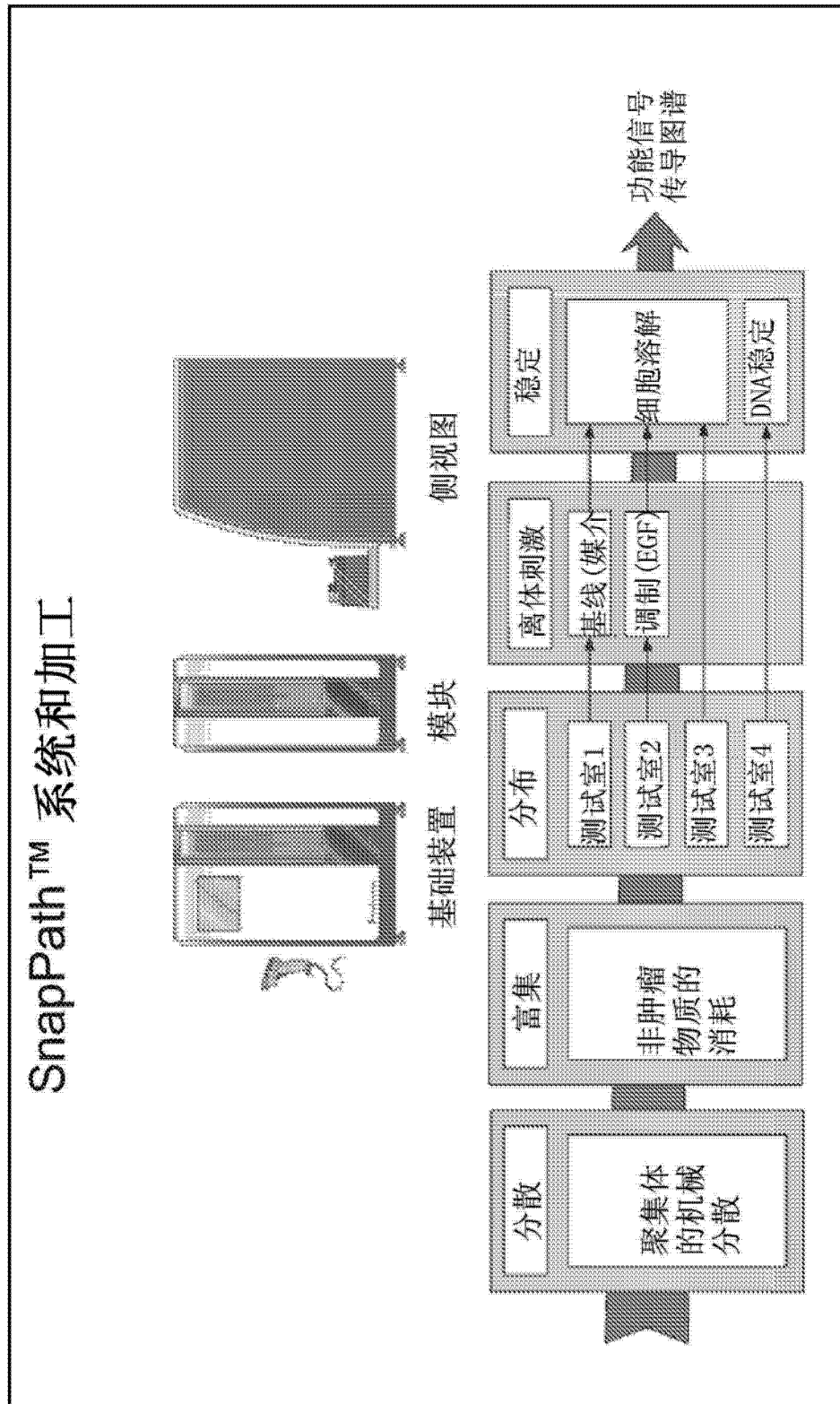


图 5

单层细胞系功能图谱

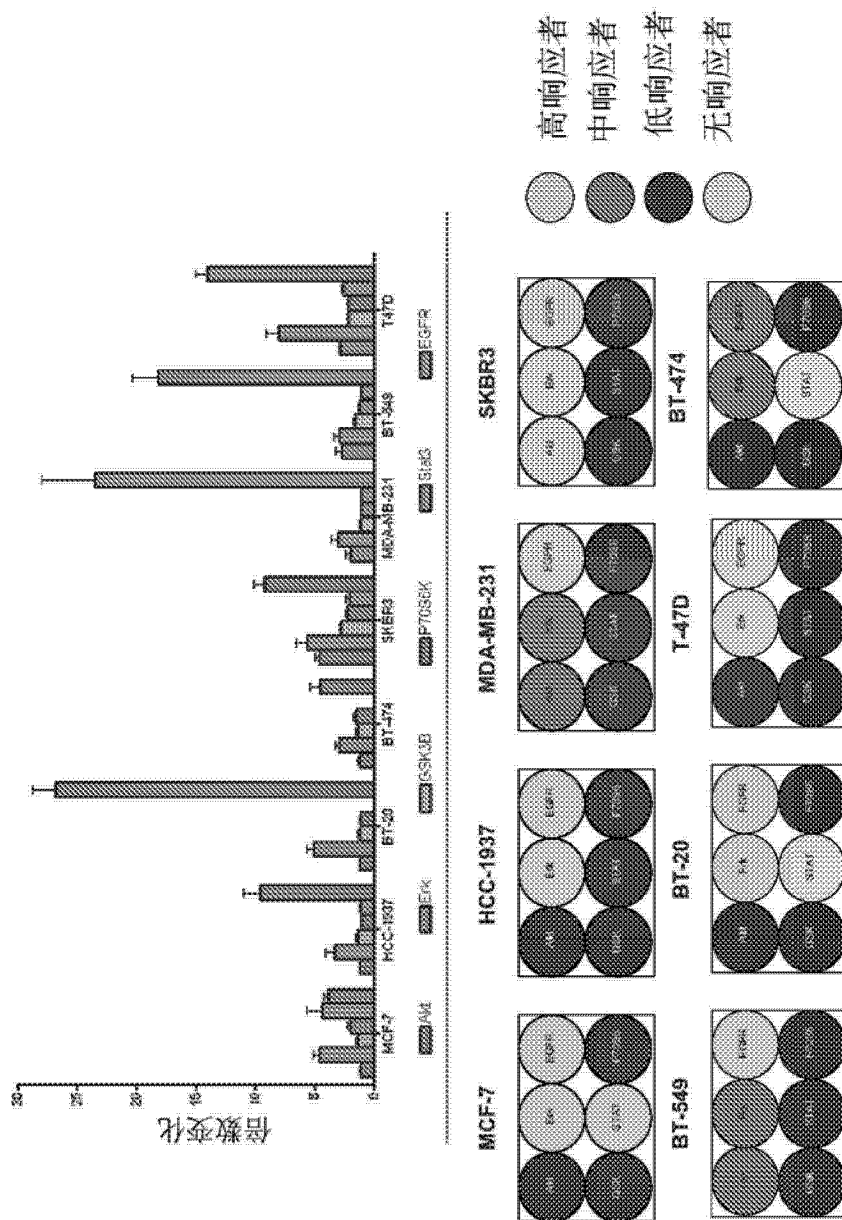


图 6

细胞系分层聚类

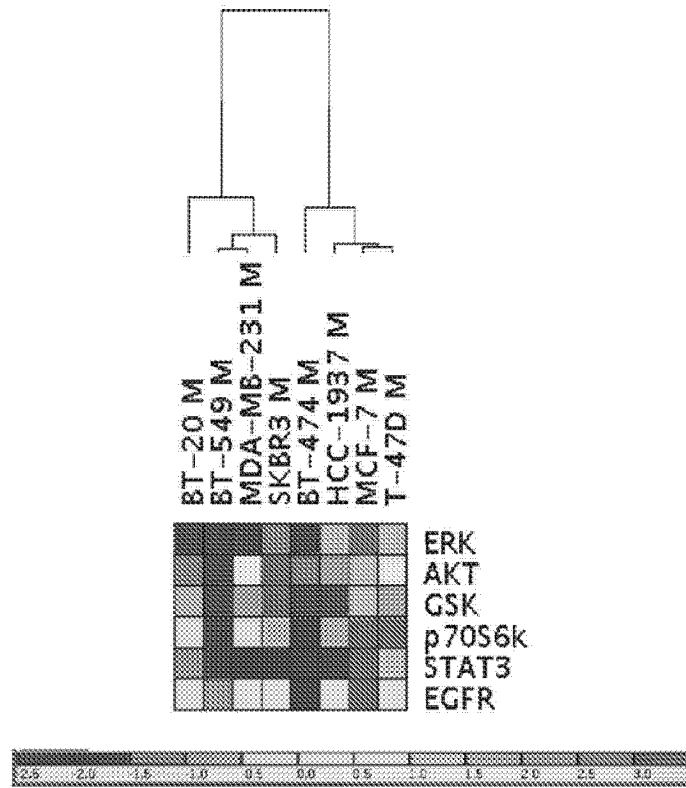


图 7

单层细胞系和SnapPath™ 加工的细胞系的关系

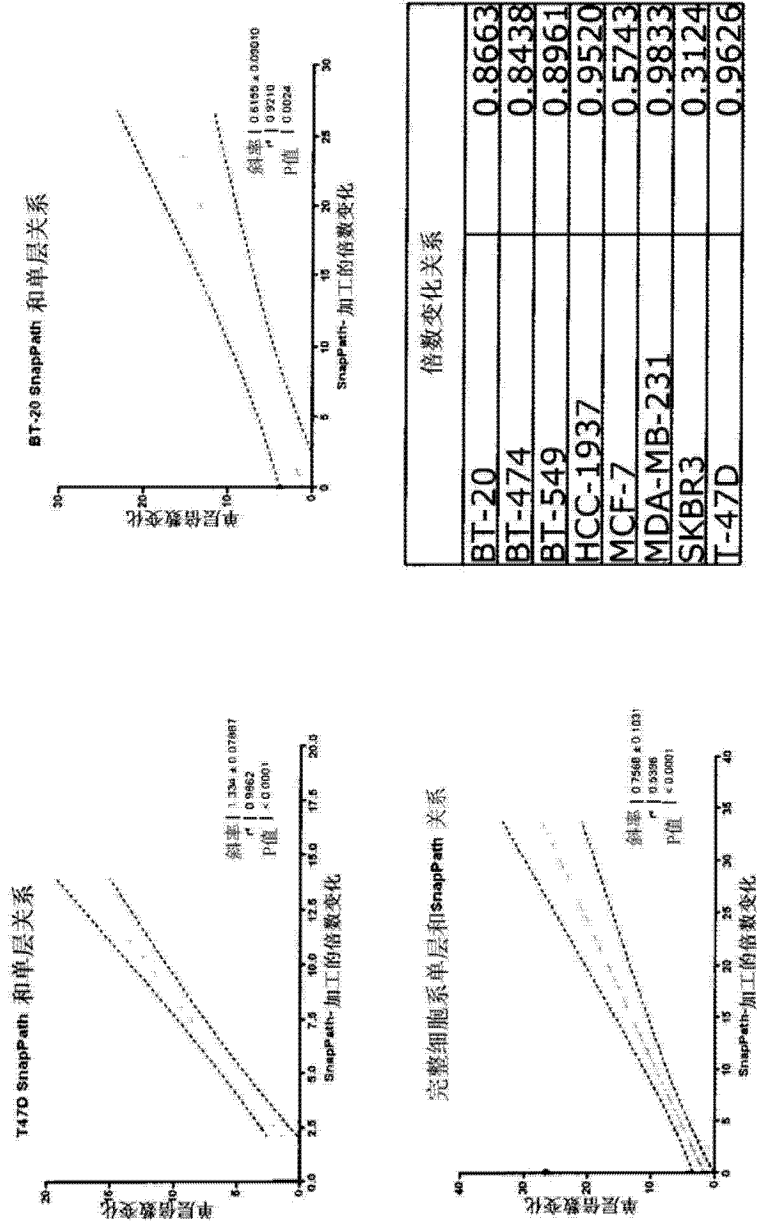


图 8

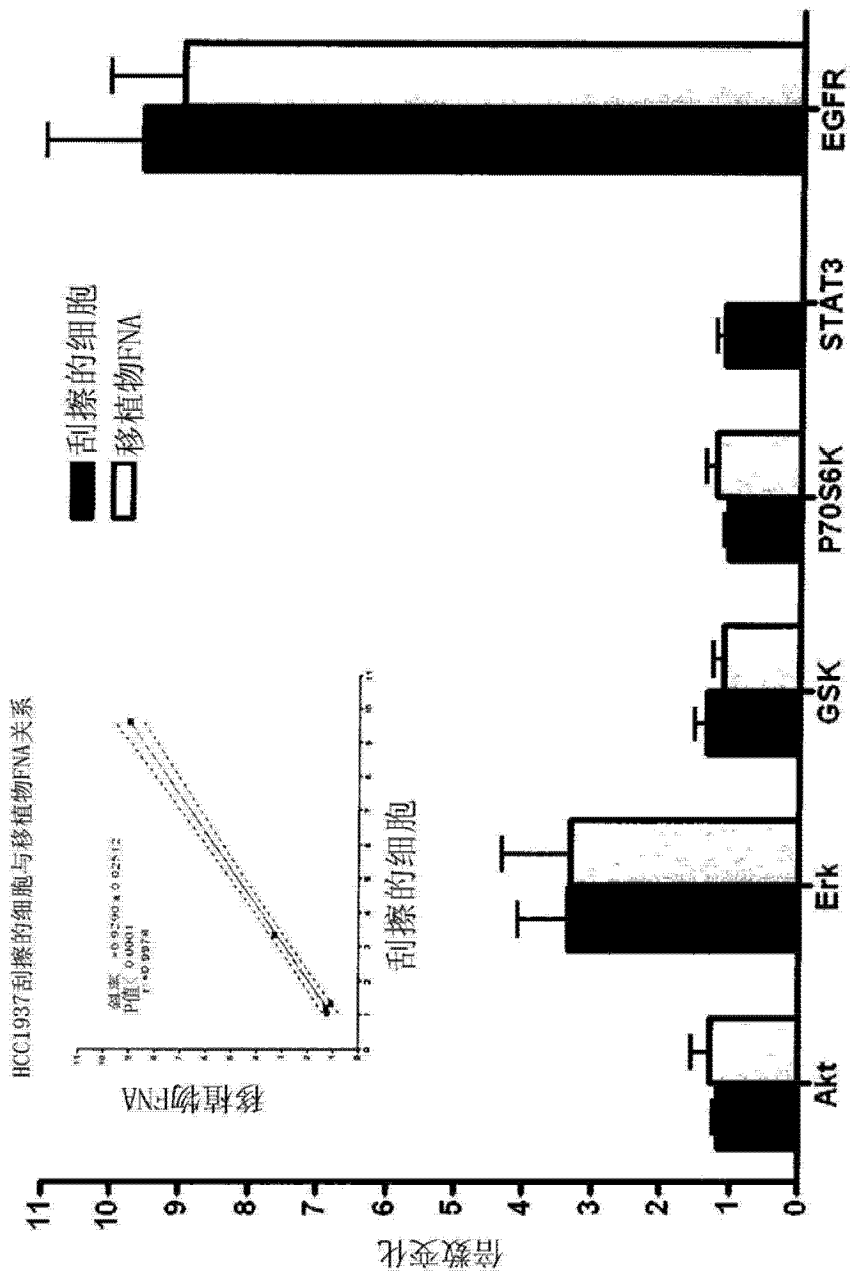


图 9

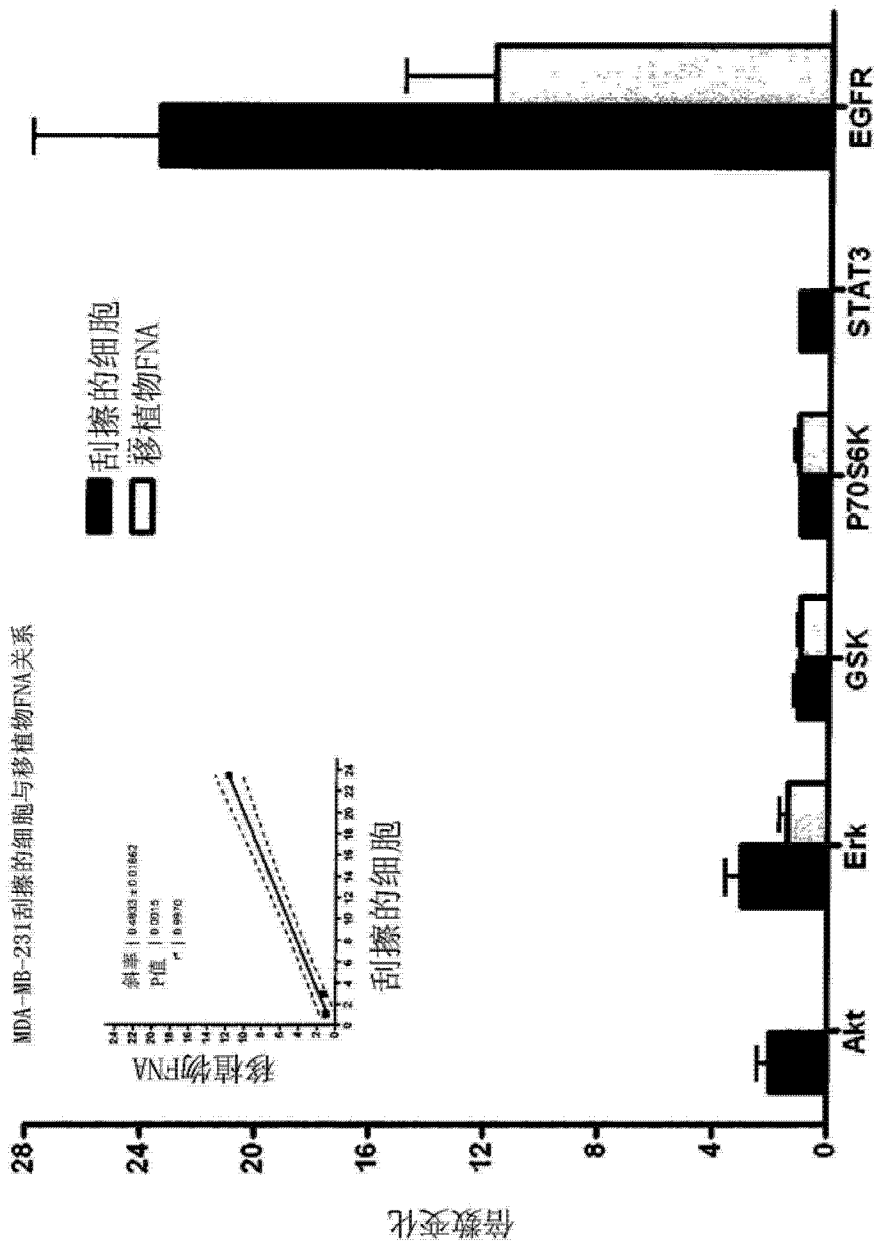
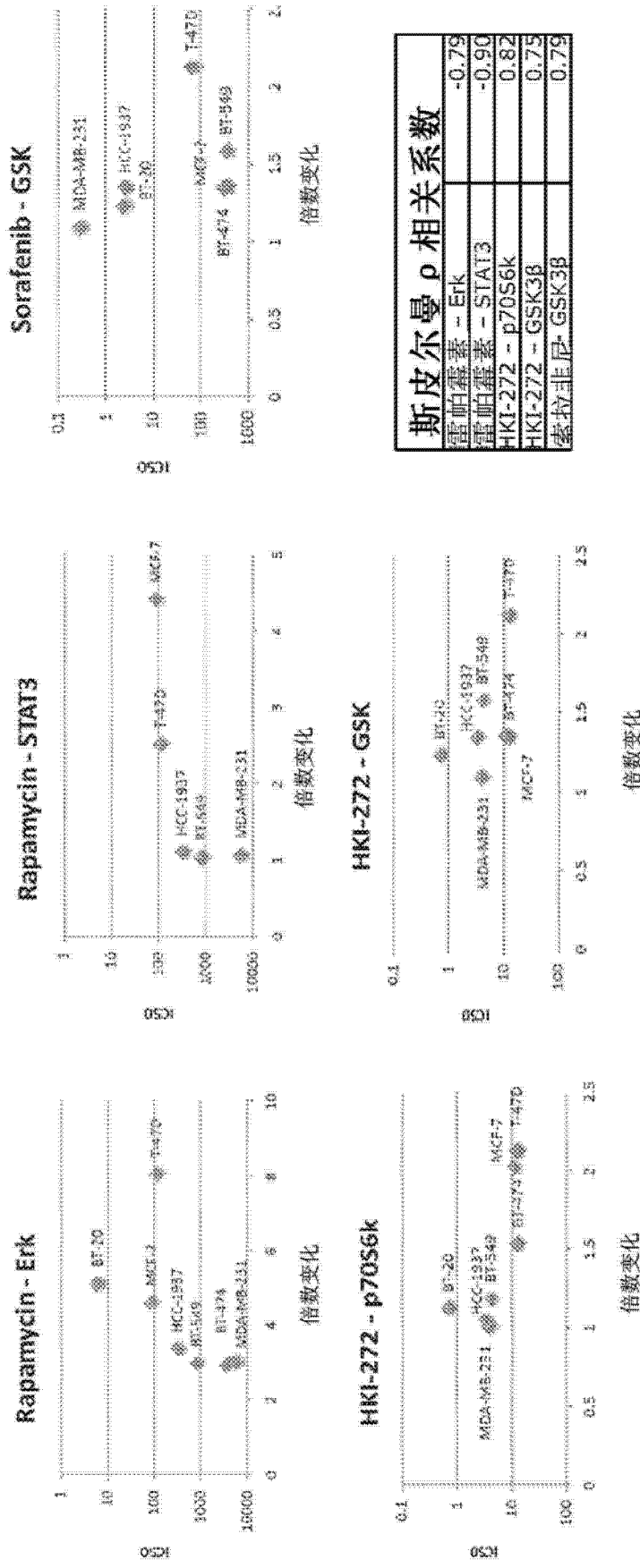


图 10



**斯皮尔曼 ρ 相关系数**

雷帕霉素 - Erk	-0.79
雷帕霉素 - STAT3	-0.90
HKI-272 - p70S6k	0.82
HKI-272 - GSK3β	0.75
索拉非尼 - GSK3β	0.79

图 11

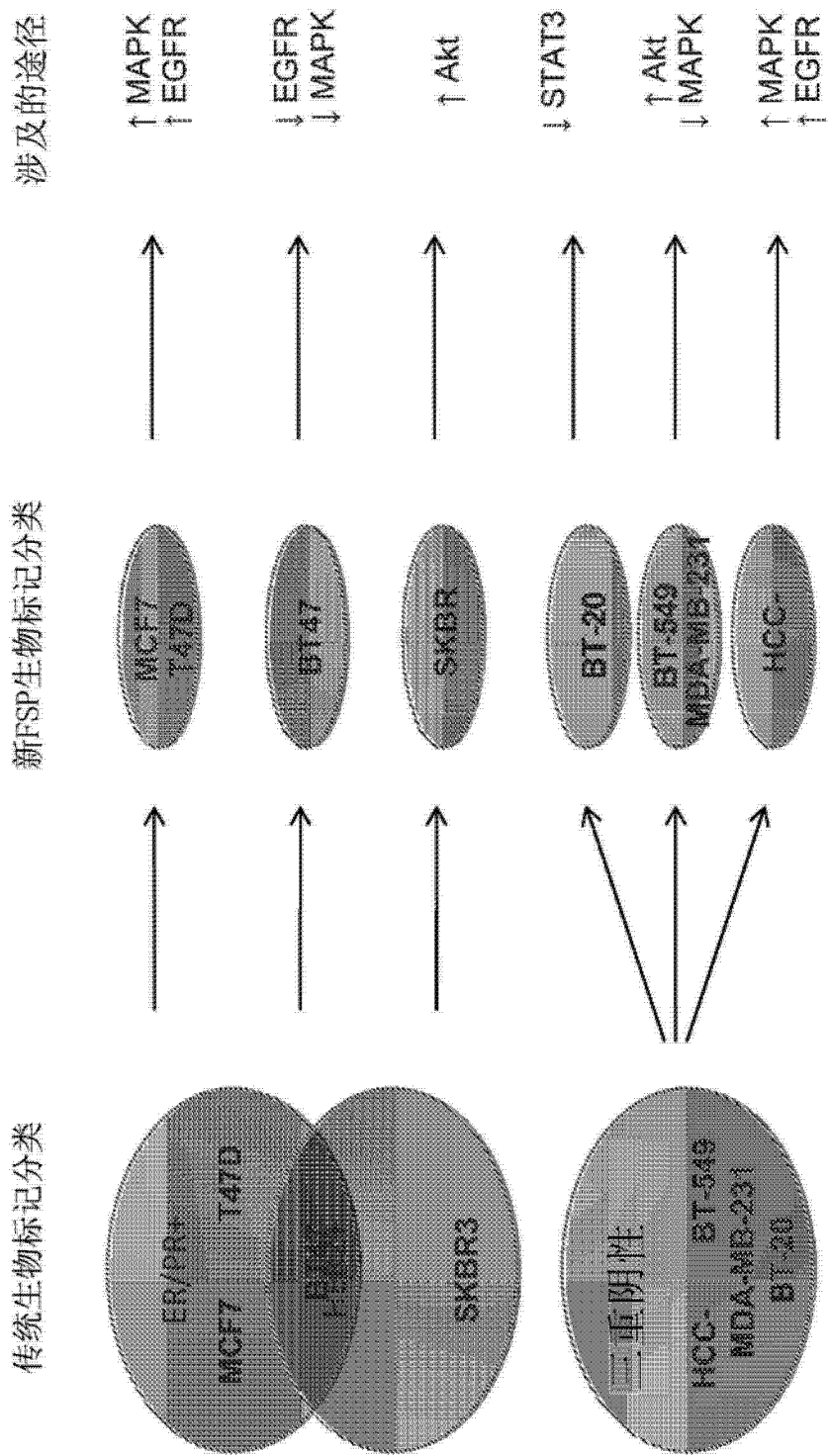


图 12

与TNBC的功能信号传导途径相关的潜在的药物敏感性

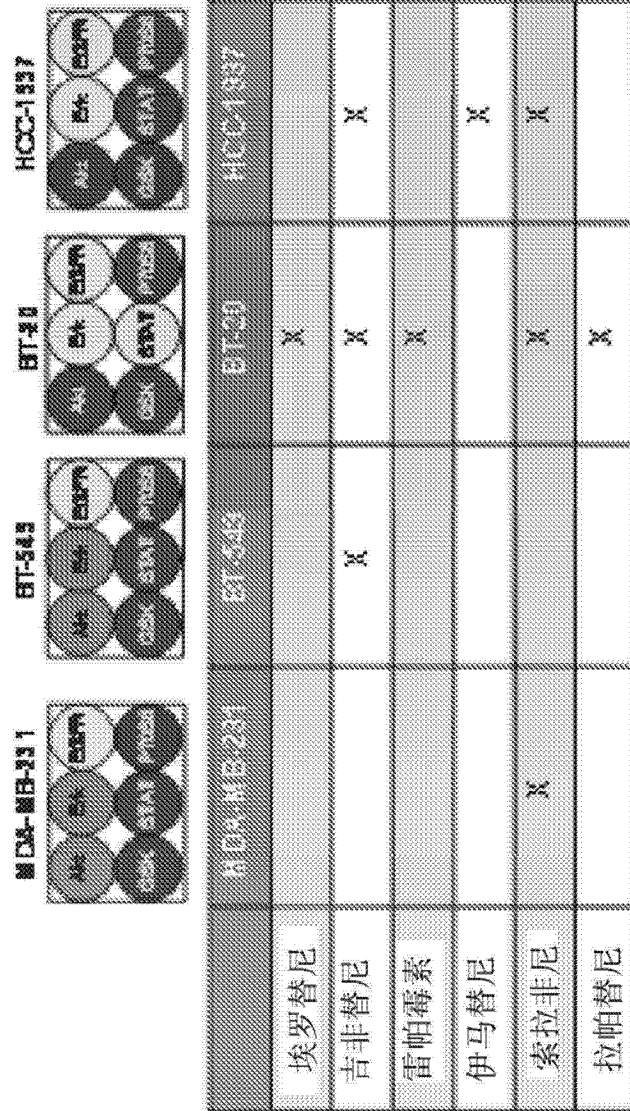
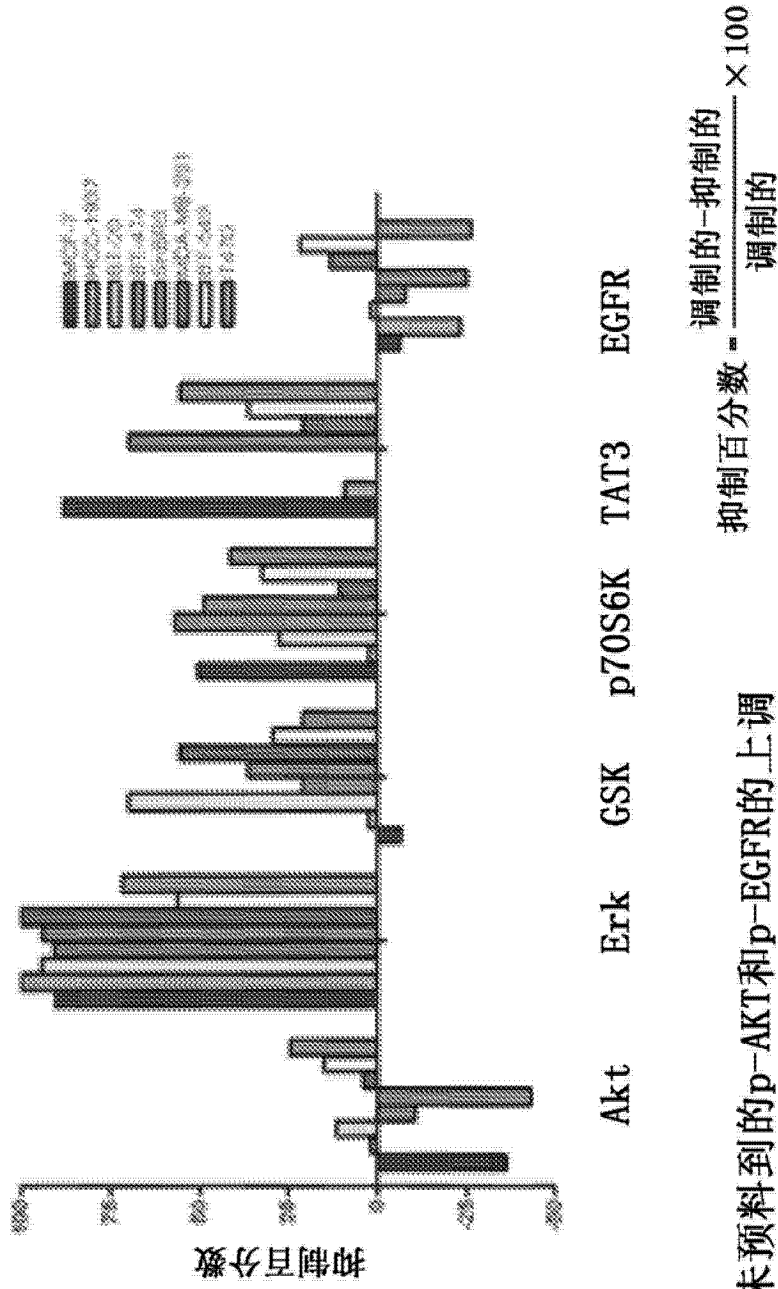


图 13

通过在SnapPath™系统上的药物抑制离体分级和细胞功能  
路线分析是可能的

SnapPath加工的细胞系的抑制百分数



注：未预料到的p-AKT和p-EGFR的上调

图 14

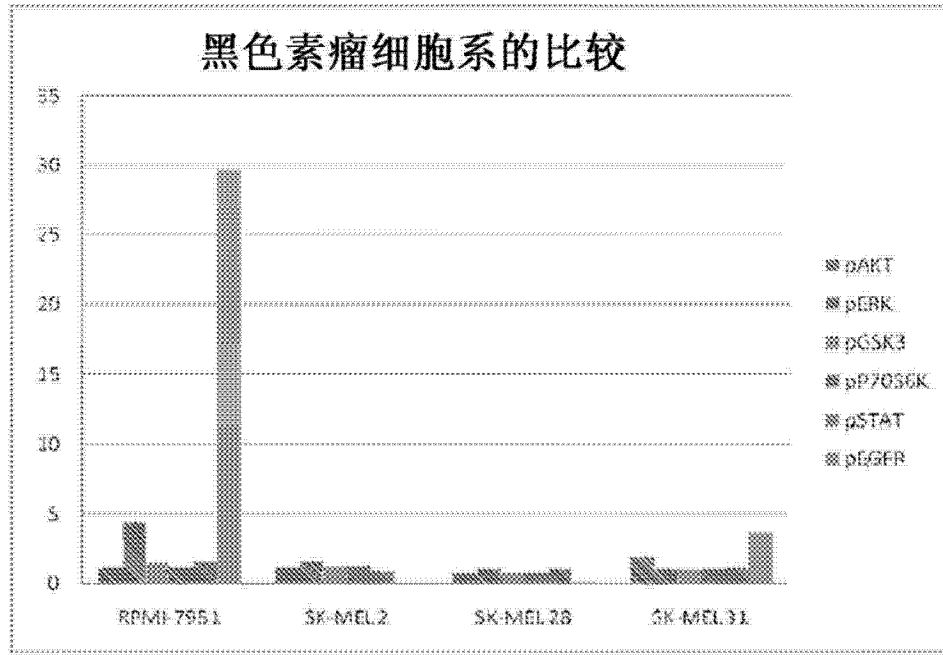


图 15

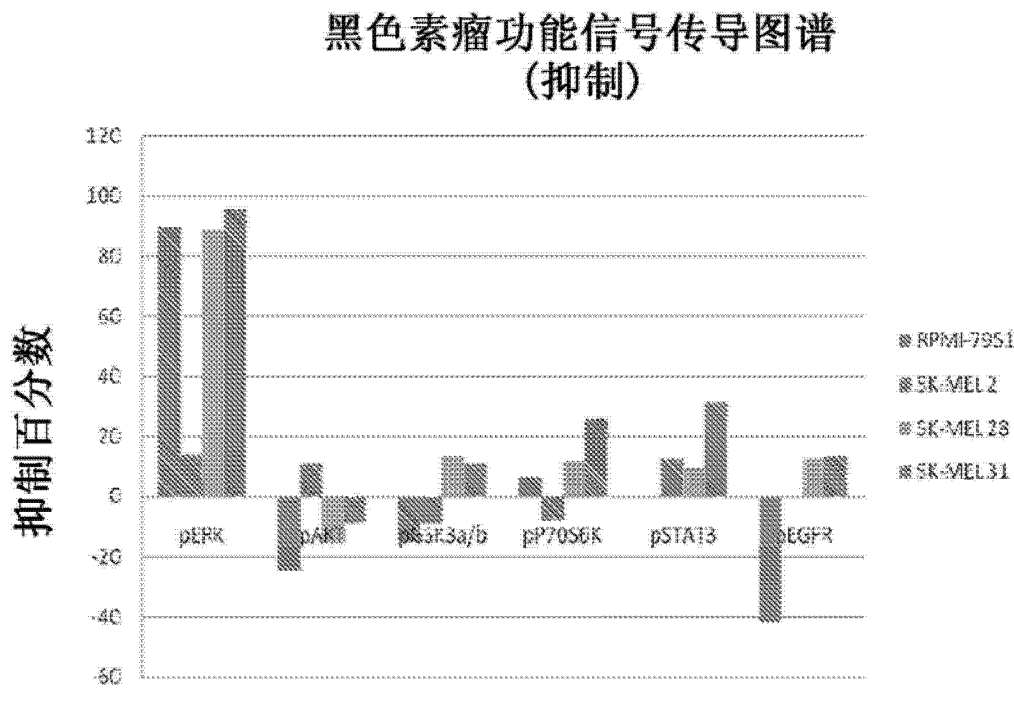


图 16

### 黑色素瘤功能信号传导图谱-TPA调制

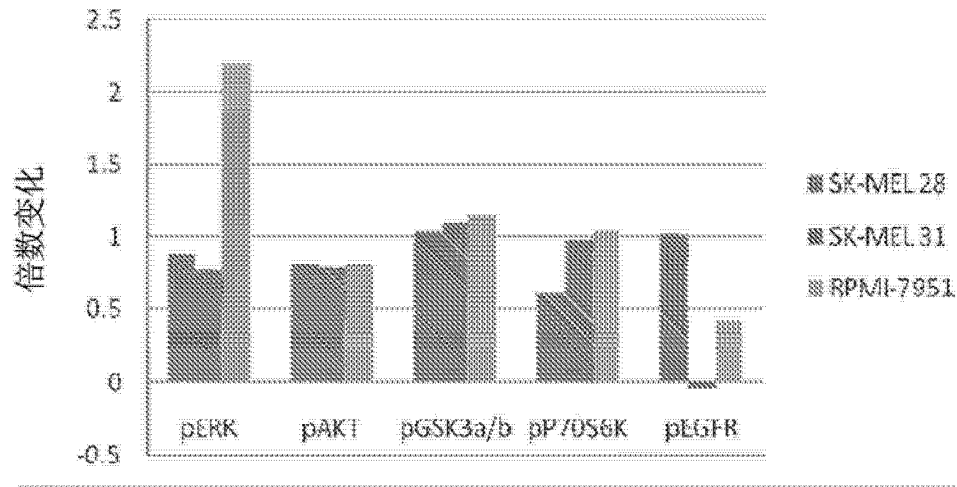


图 17

### 胰腺肿瘤功能信号传导图谱

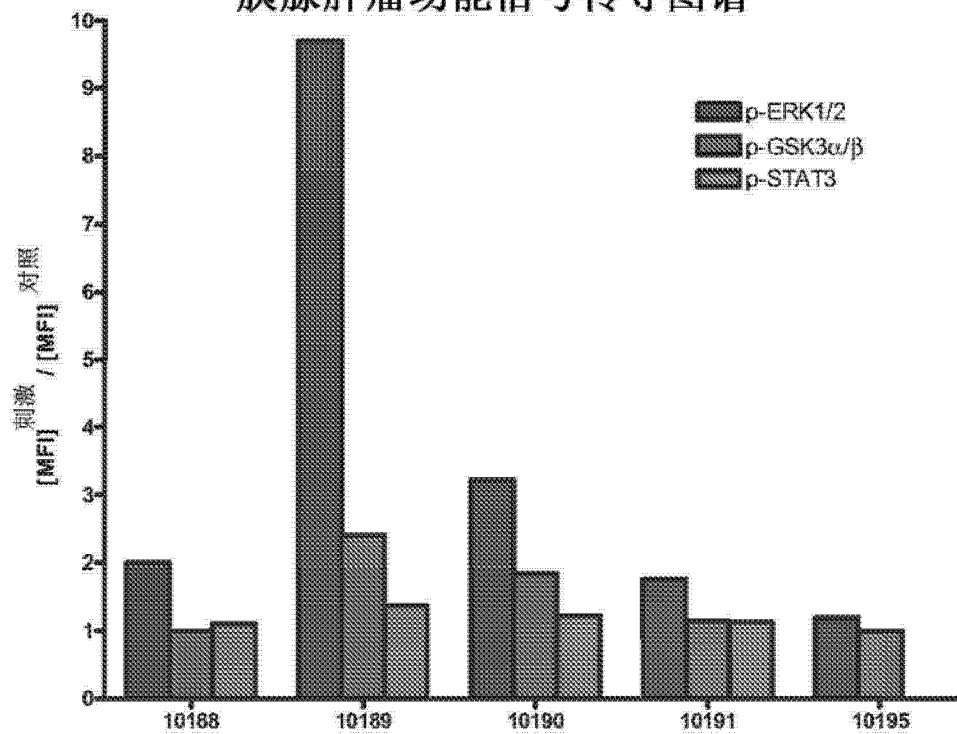


图 18

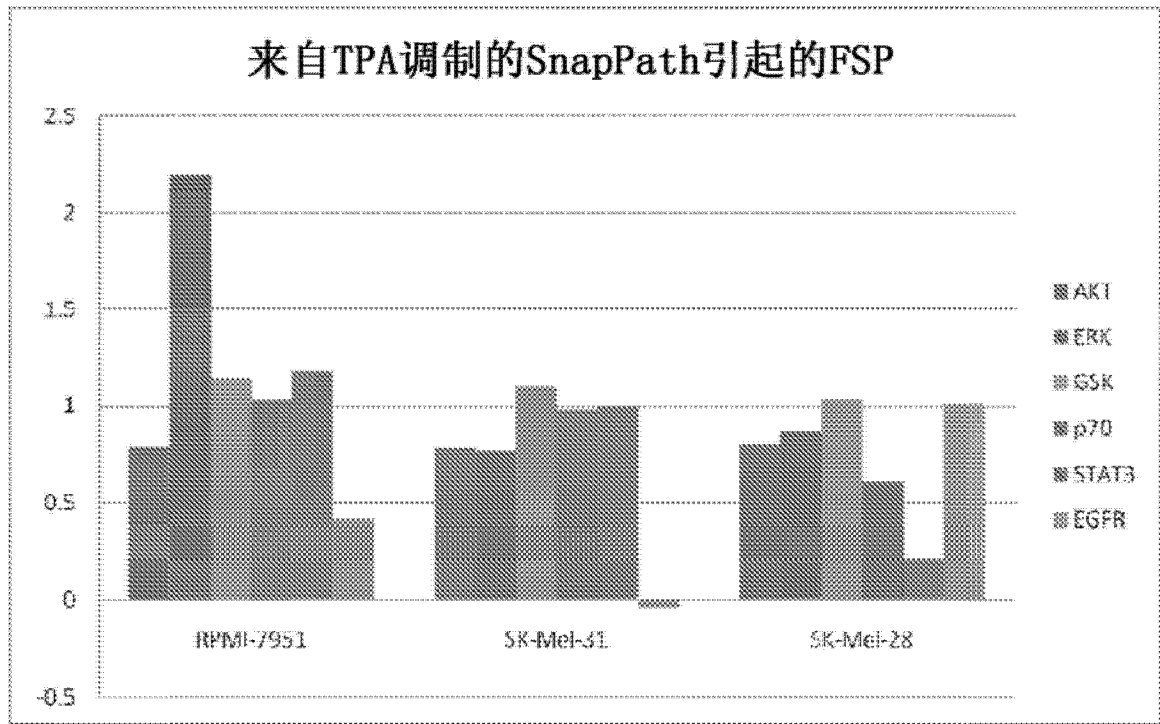


图 19

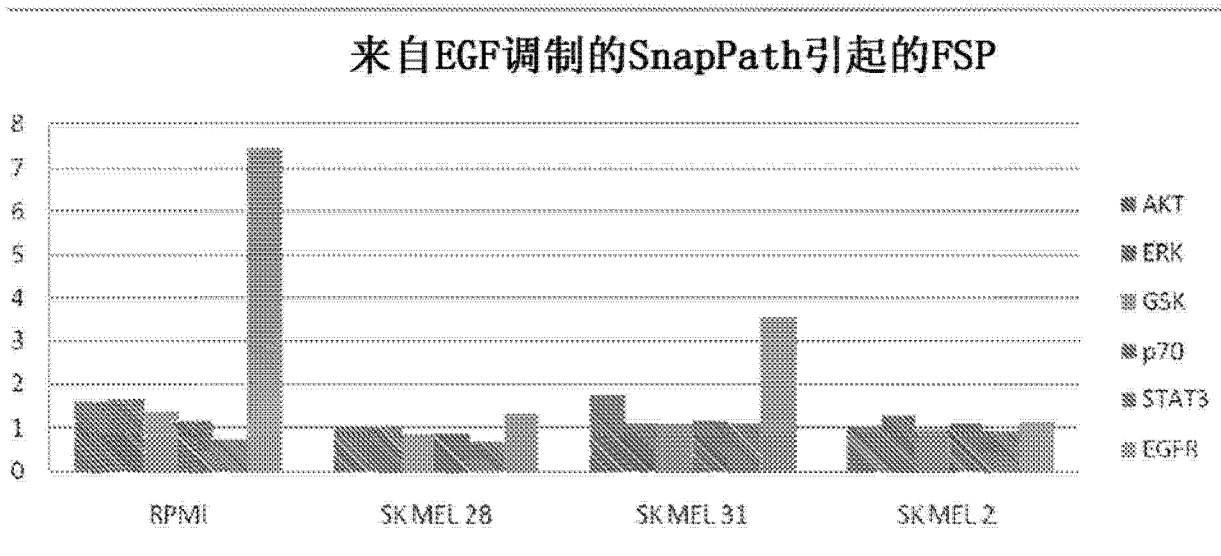


图 20

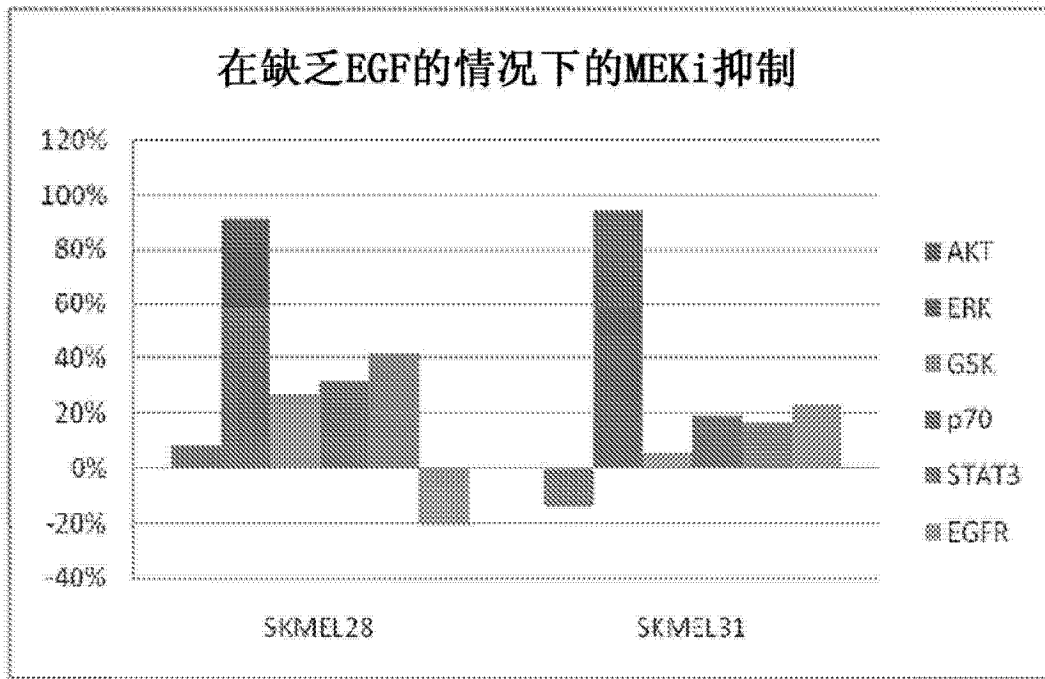


图 21

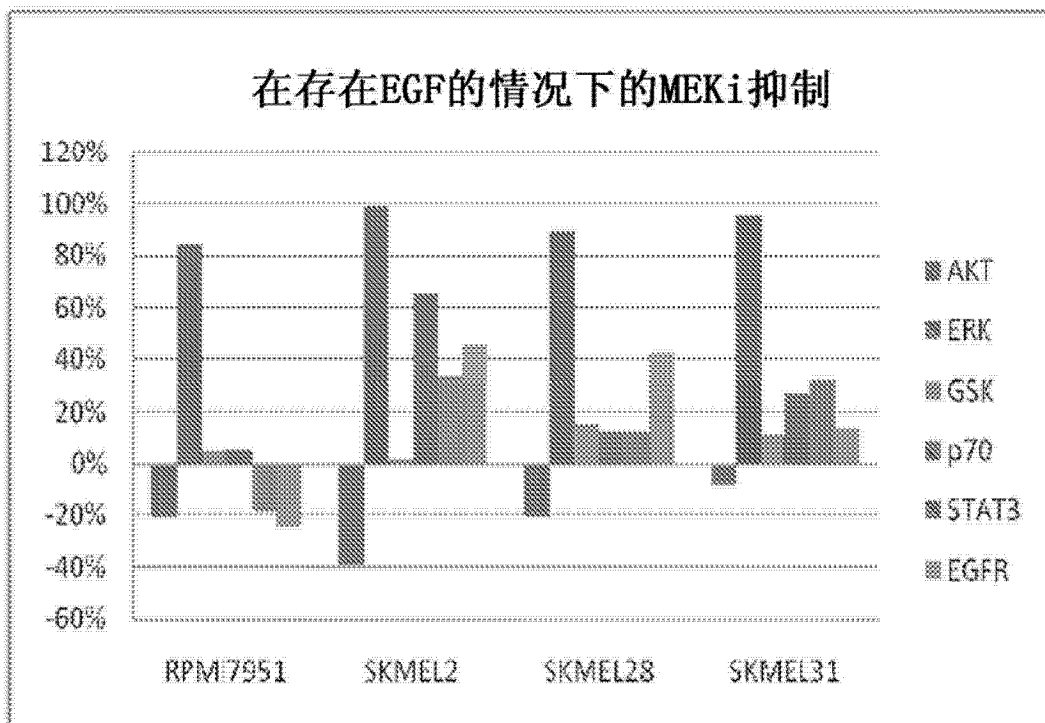


图 22

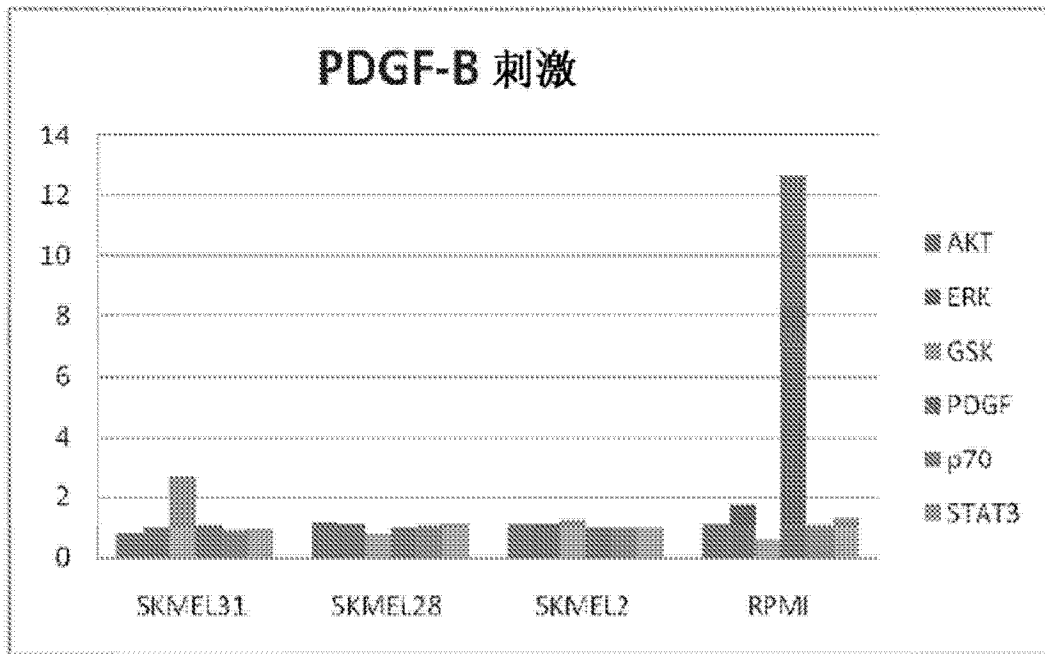


图 23

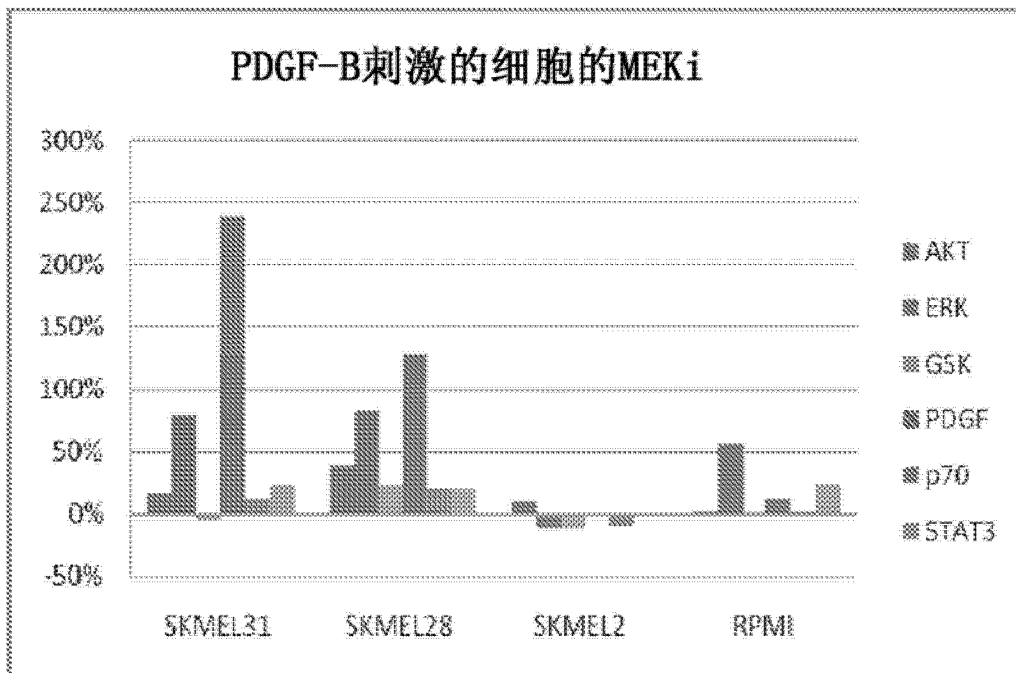


图 24

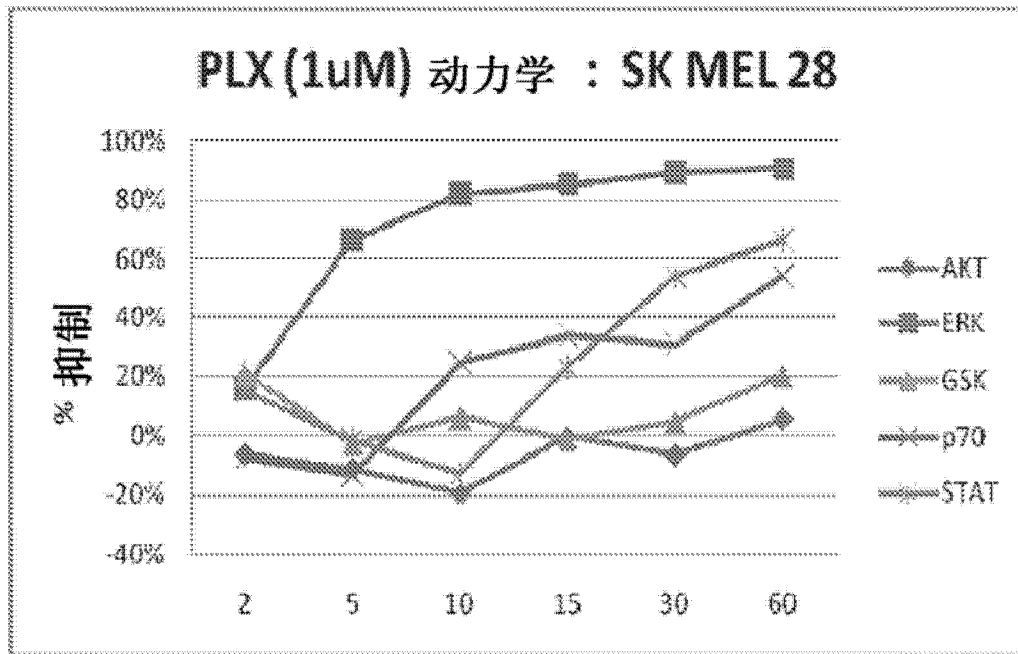


图 25

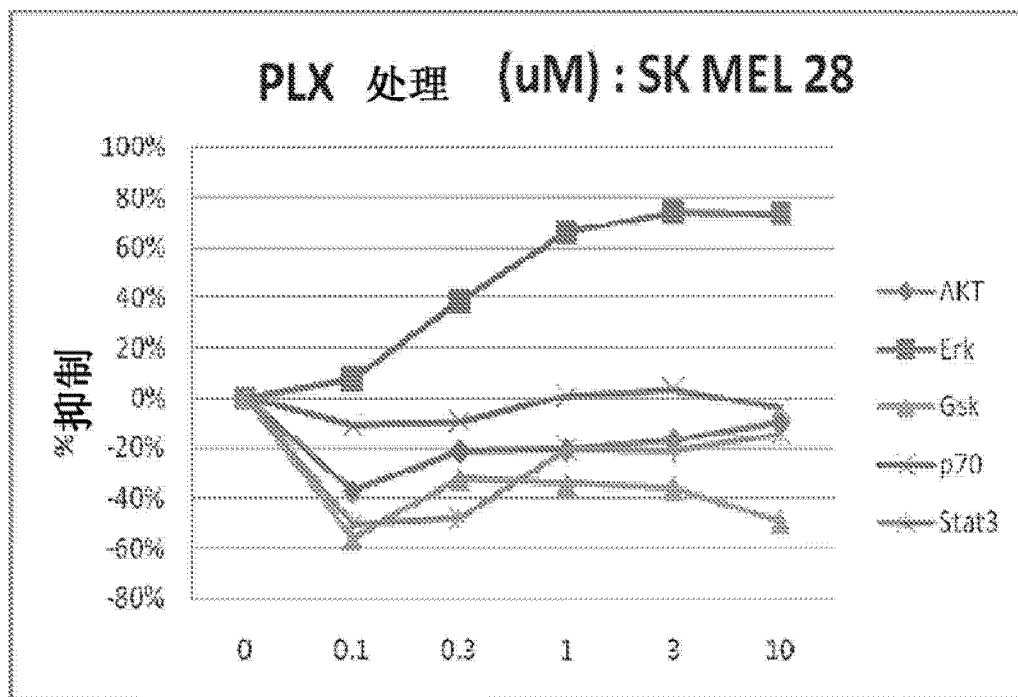


图 26

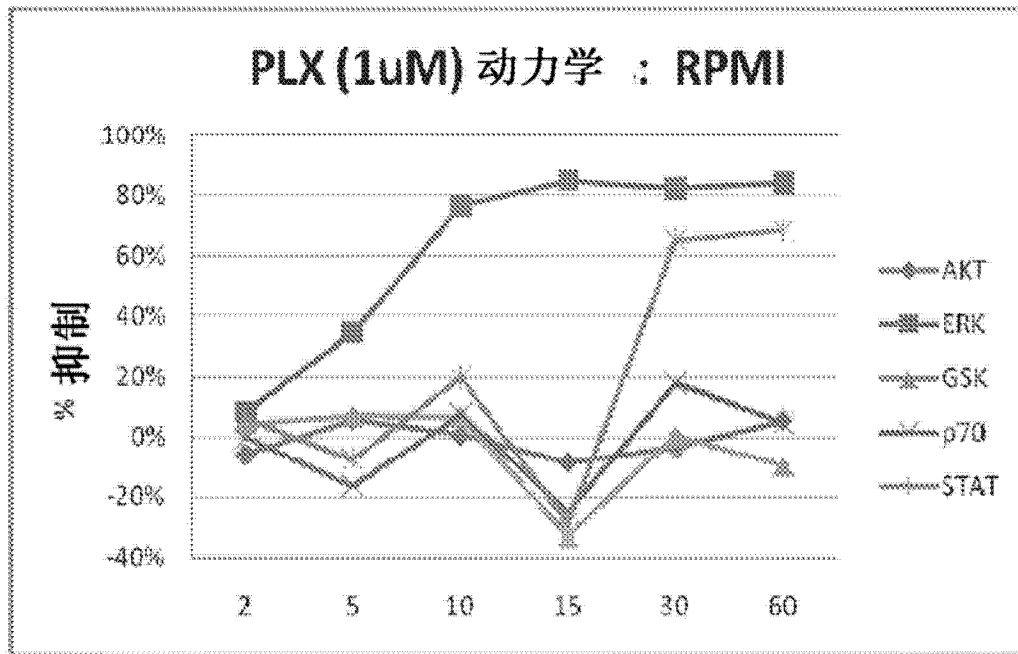


图 27

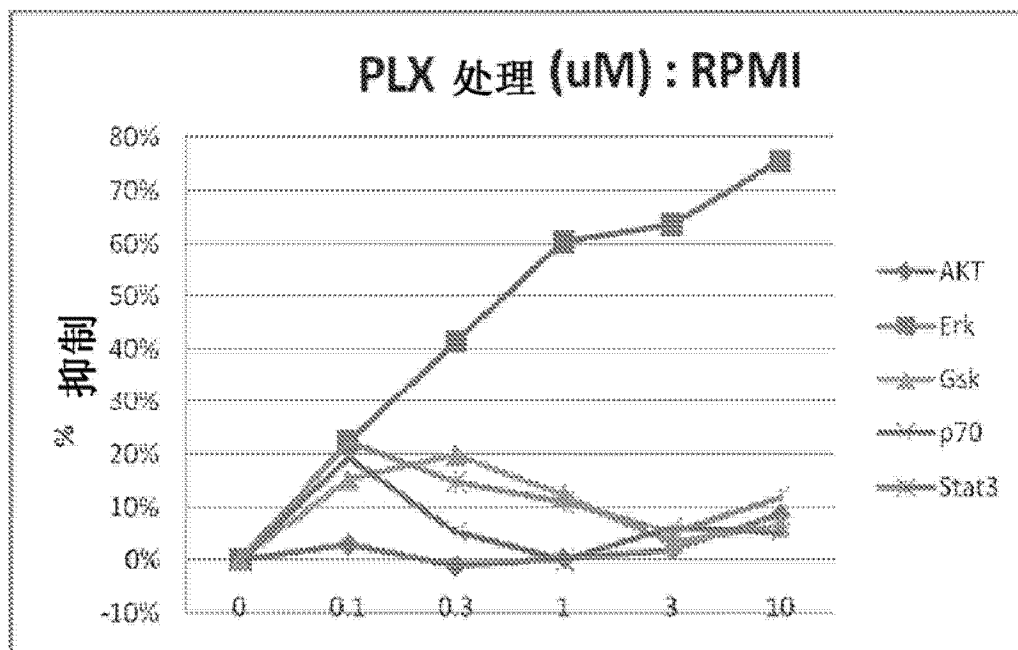


图 28

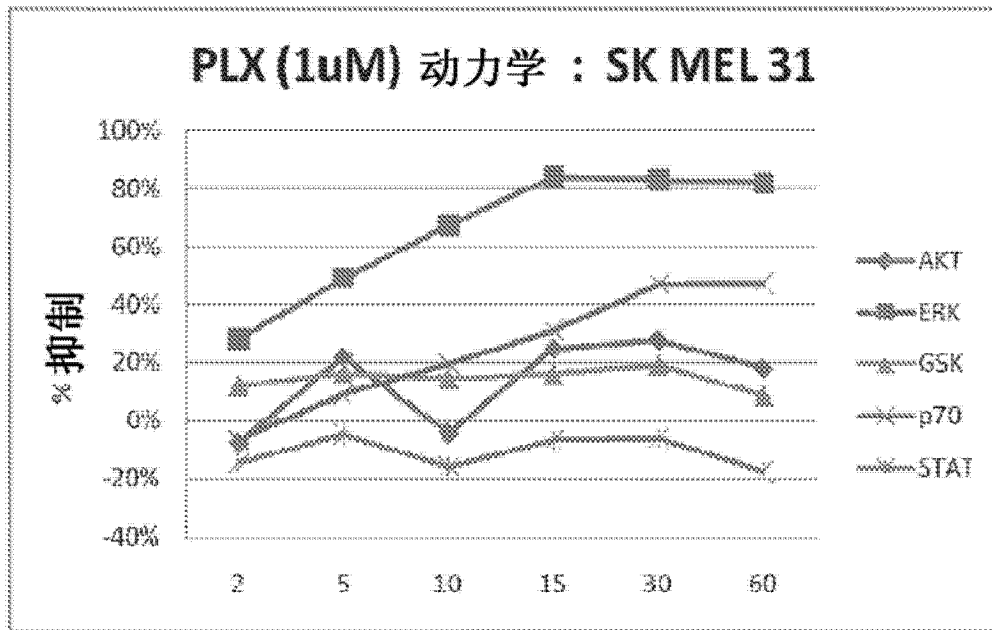


图 29

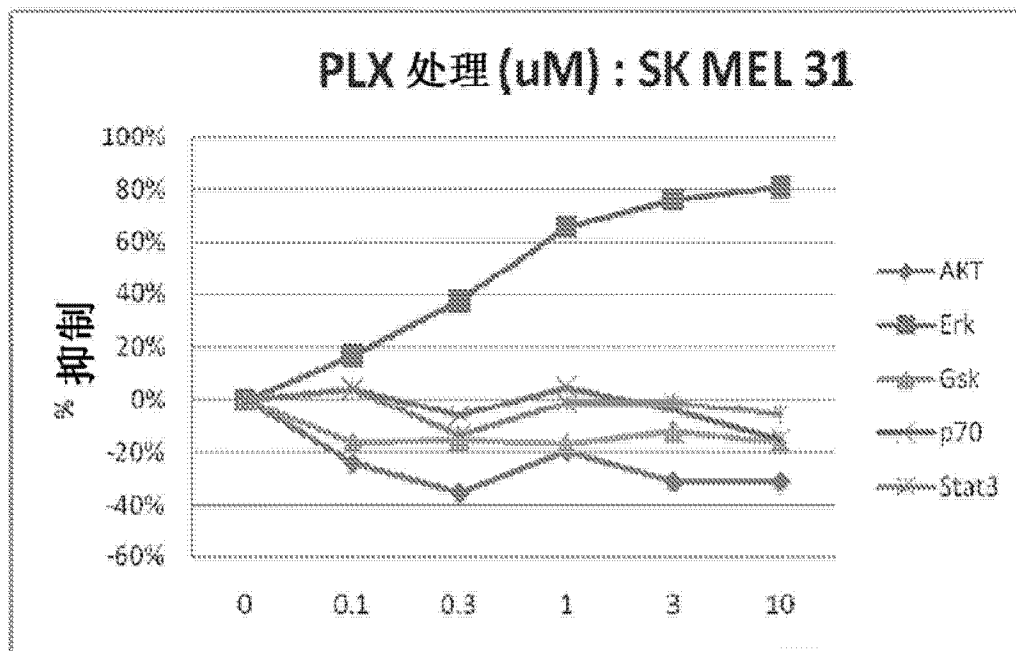


图 30

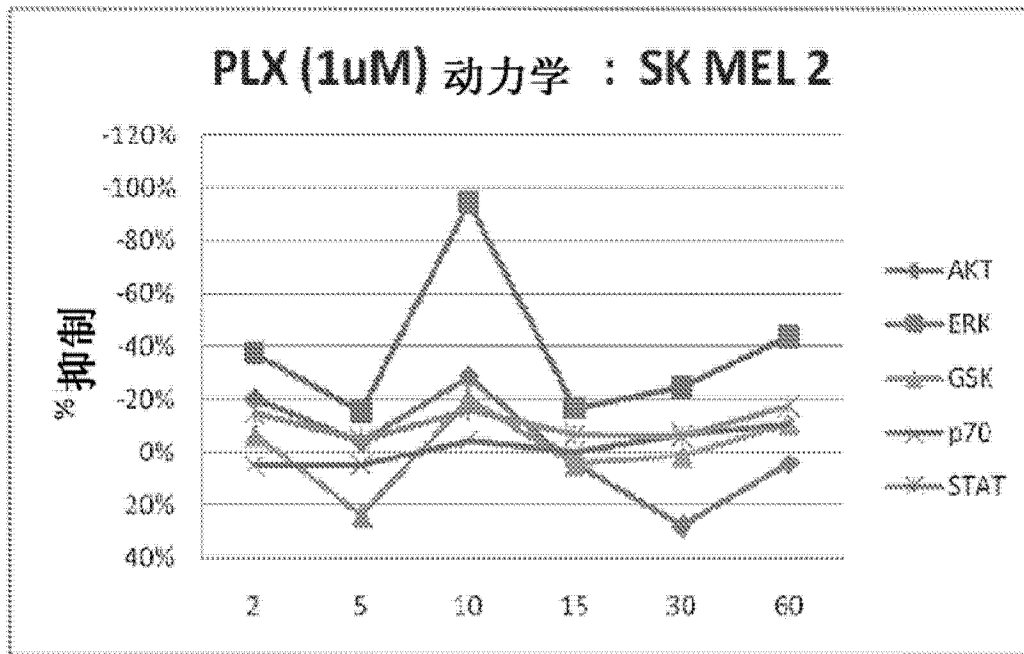


图 31

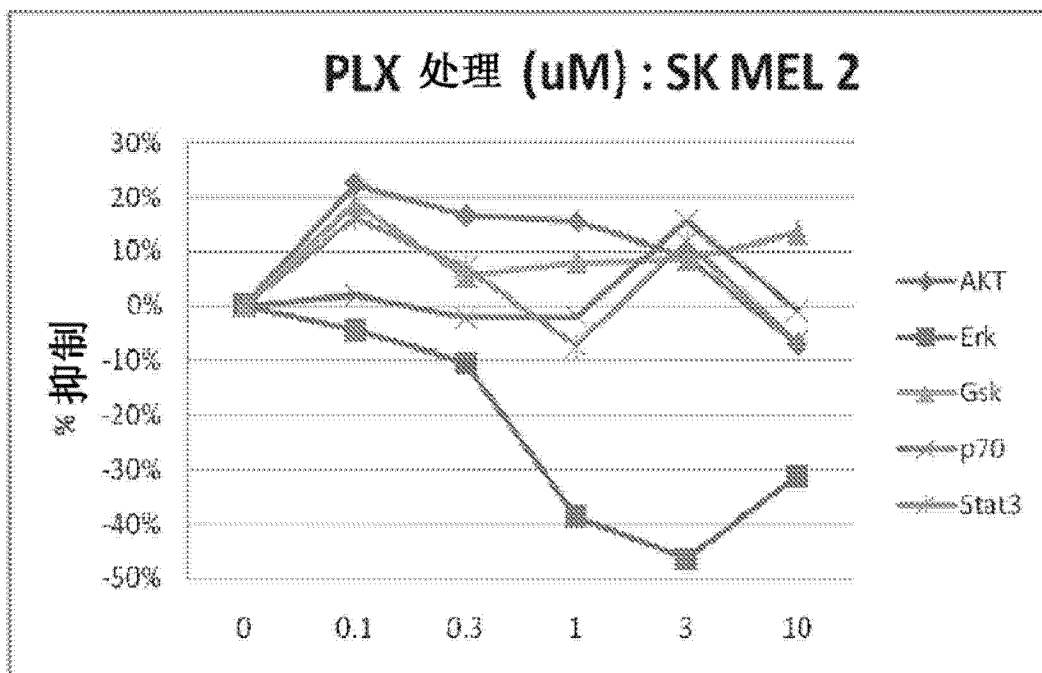


图 32

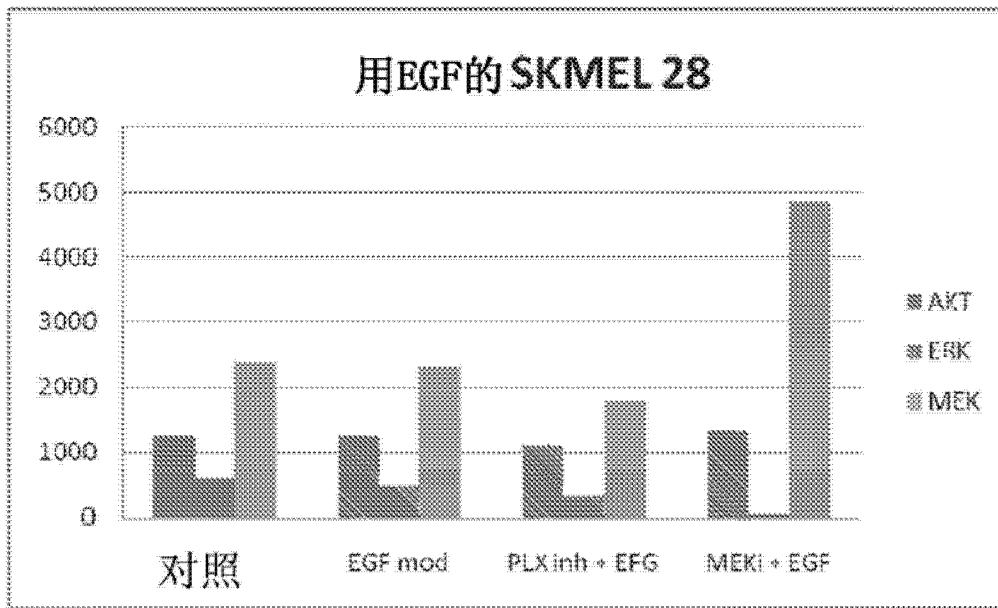


图 33

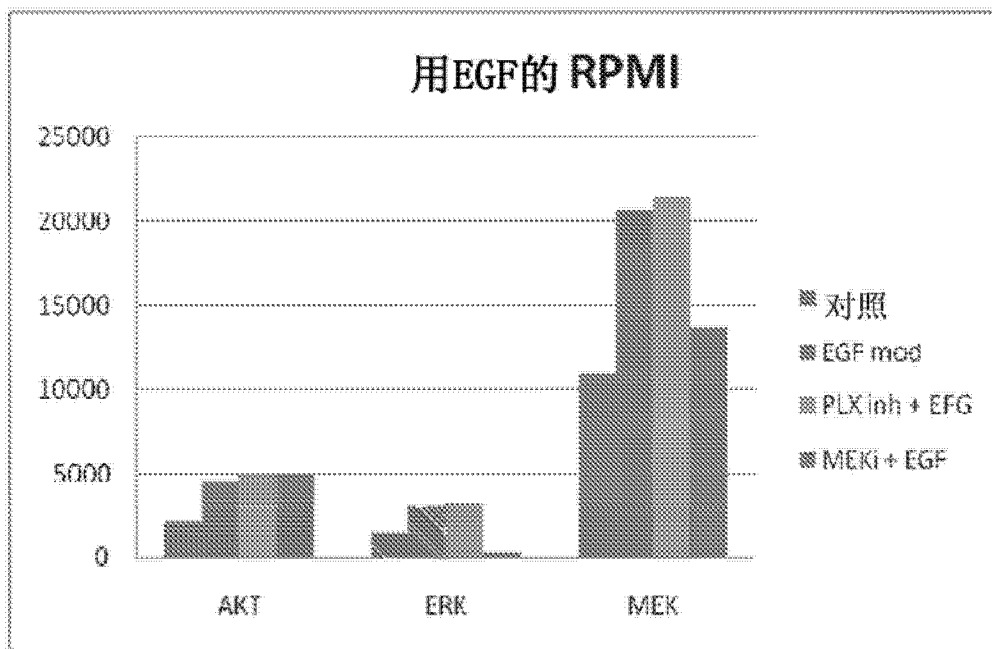


图 34

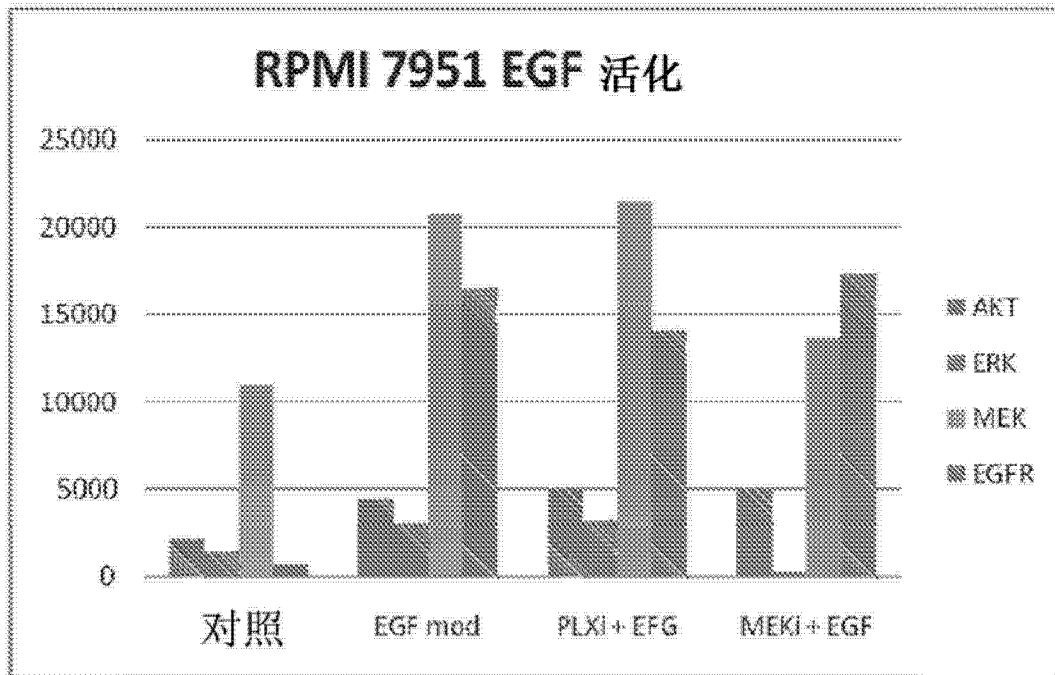


图 35

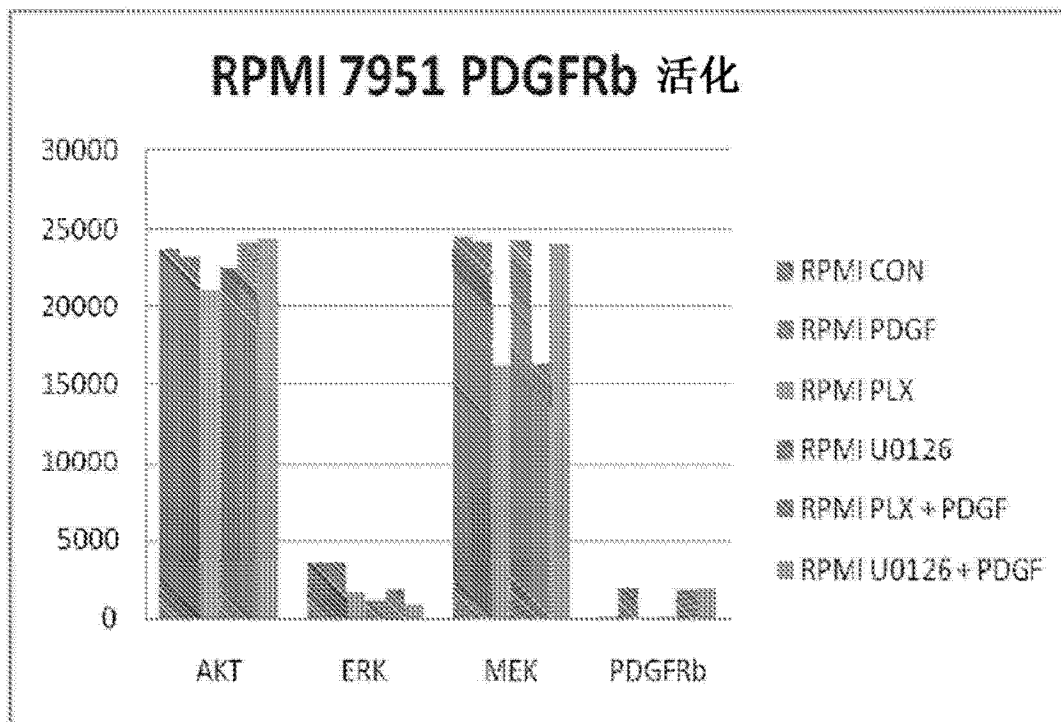


图 36

专利名称(译)	预测药物敏感性、抗性和疾病进展的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102947706A</a>	公开(公告)日	2013-02-27
申请号	CN201180030332.9	申请日	2011-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	生物标志物策略公司		
申请(专利权)人(译)	生物标志物策略公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物标志物策略公司		
[标]发明人	DP克拉克 A沙姚伟茨 C卡布拉迪拉		
发明人	D·P·克拉克 A·沙姚伟茨 C·卡布拉迪拉		
IPC分类号	G01N33/68 G06F19/10 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/15		
CPC分类号	G01N33/5041 G06F19/12 G01N33/6842 G06F19/18 G01N2800/52		
代理人(译)	张全信		
优先权	61/325717 2010-04-19 US 61/356495 2010-06-18 US 61/421178 2010-12-08 US 61/443146 2011-02-15 US		
其他公开文献	CN102947706B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明基于下述发现：功能分级和/或信号传导图谱可用于诊断疾病状态、确定癌细胞的药物抗性或敏感性、监测疾病或对治疗剂的反应性，和/或预测受试者的治疗结果。本文提供用于在患者中疾病诊断和/或预后的试验。也提供评价疾病对靶向治疗剂的抗性或敏感性，然后启动治疗方案并且监控治疗方案疗效的组合物和方法。也提供确定样品中分子的基础水平或状态和在用调节剂离体刺激一部分活样品之后分子的水平或状态之间的差异的方法，其中所述差异表示为指示疾病的存在、缺乏或具有疾病风险的值。本发明的方法可也用于预测试剂对疾病的作用并且监测受试者的治疗过程。

