

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6580546号  
(P6580546)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68

請求項の数 8 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2016-243869 (P2016-243869)	(73) 特許権者	510114734
(22) 出願日	平成28年12月16日(2016.12.16)		バイオマーカー ストラテジーズ リミテッド ライアビリティ カンパニー
(62) 分割の表示	特願2013-506214 (P2013-506214) の分割		アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル クラブス ブランチ ウェイ 15601
原出願日	平成23年4月18日(2011.4.18)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2017-106923 (P2017-106923A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成29年6月15日(2017.6.15)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成29年1月13日(2017.1.13)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/443,146	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成23年2月15日(2011.2.15)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	61/421,178		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成22年12月8日(2010.12.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物感受性、薬物抵抗性および疾患進行の予測のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、固形腫瘍によって特徴付けられる疾患の検出または予後予測のための方法：

(a) 細胞試料中のタンパク質の基礎レベルまたは基礎状態と、

(b) 機能的シグナル伝達プロファイルを惹起するために、該試料の一部を自動化システムのカートリッジ内でエキスピボでモジュレーターに接触させた後の該タンパク質のレベルまたは状態

との差異を決定する段階であって、該差異が、コンピュータによって該試料を機能的群に層別する機能的シグナル伝達プロファイルを生成するために使用される値として表され、疾患の存在、疾患の非存在、もしくは疾患を有するリスクを示すか、または予後予測を示し、該タンパク質が、リン酸化である翻訳後修飾によって修飾されており、該タンパク質が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせであり、且つ該モジュレーターが、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、EGF受容体阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせである、段階。

【請求項2】

(i) 前記試料が、組織、細胞株、異種移植片、腫瘍、およびそれらの組み合わせからなる群より選択され、該腫瘍試料が固形腫瘍に由来し、さらに、該腫瘍試料が、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られ；

(ii) 前記固形腫瘍が癌であり、該癌が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌

、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膵癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択され；

(iii) 前記試料を治療用作用物質またはその組み合わせに曝露させる段階をさらに含み；ならびに/または

(iv) 前記タンパク質が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて分析される、

請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記疾患が、乳癌、黒色腫、および膵癌からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項4】

以下の段階を含む、疾患または対象の治療過程を検査する方法：

(a) 治療過程の前、それと同時またはその後の細胞試料中のタンパク質の基礎レベルまたは基礎状態と、

(b) 機能的シグナル伝達プロファイルを惹起するために、治療過程の前、それと同時またはその後の該試料の一部分を自動化システムのカートリッジ内でエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該タンパク質のレベルまたは状態

との差異を、コンピュータを用いて決定する段階であって、該タンパク質の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、コンピュータによって該試料を機能的群に層別する機能的シグナル伝達プロファイルを生成するために使用される値として表され、ポジティブ(positive)治療またはネガティブ(negative)治療を示し、ポジティブ治療により、該対象が該治療過程のレスポンドであることが示され、またはネガティブ治療により、該対象が該治療過程に対して抵抗性を有することが示され、該タンパク質が、リン酸化である翻訳後修飾によって修飾されたタンパク質であり、該タンパク質が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせであり、該疾患が固形腫瘍であり、且つ該モジュレーターが、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、EGF受容体阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせである、段階。

【請求項5】

前記疾患が、乳癌、黒色腫、および膵癌からなる群より選択される、請求項4記載の方法。

【請求項6】

以下の段階を含む、治療用作用物質または治療レジメンに対する反応性に基づいて患者を層別するための方法：

(a) 対象由来の細胞試料中のタンパク質の基礎レベルまたは基礎状態と、

(b) 機能的シグナル伝達を惹起するために、該試料の一部分を、自動化システムのカートリッジ内でエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該タンパク質のレベルまたは状態

との差異を、コンピュータを用いて決定する段階であって、該タンパク質の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、コンピュータによって該試料を機能的群に層別する機能的シグナル伝達プロファイルを生成するために使用される値として表され、治療用作用物質または治療レジメンに対するポジティブ反応またはネガティブ反応を示し、ポジティブ反応により、該対象が該治療用作用物質もしくは治療レジメンに対するレスポンドであることが示され、またはネガティブ反応により、該対象が該治療用作用物質もしくは治療レジメンに対して抵抗性を有することが示され、該タンパク質が、リン酸化である翻訳後修飾によって修飾されたタンパク質であり、該タンパク質が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせであり、該治療用作用物質もしくは治療レジメンが、固形腫瘍のために治療される対象のためのものであり、且つ該モジュレーターが、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、EGF受容体阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれら

10

20

30

40

50

の組み合わせである、段階。

【請求項7】

前記固形腫瘍が、乳癌、黒色腫、および膵癌からなる群より選択される疾患を有する対象に由来する、請求項6記載の方法。

【請求項8】

前記タンパク質が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット法、およびRIAから選択される方法を用いて分析される、請求項1および3~7のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

発明の分野

本発明は、全体として、対象における薬物反応性の予測および疾患状態のモニタリングに関し、より具体的には、モジュレーション(modulation)に際しての癌細胞の機能的層別およびシグナル伝達プロファイルに関する。

【背景技術】

【0002】

背景情報

従来の病理学試料は、主として、試料の生物学的健全性を損なわせる処理手法を用いて細胞を死滅させることを伴う方法を用いて処理されてきた。そのような方法は一般に、診療現場からかなり離れた検査室で行われる。これらの従来の方法では、動的な生細胞関連バイオマーカを含む生細胞の検査は可能でなく、診療現場またはその付近で迅速な試料処理を行うことや分析結果を出すことも可能でない。このように情報を完備した形で迅速に入手できないことは、医師が適正な治療レジメンを特定すること、または、患者の生活の質に有害な影響を及ぼす過程を少なくとも遅くすることを妨げる恐れがある。

20

【0003】

例えば、腫瘍医は、標準治療として特徴づけられている薬物の種々の組み合わせを含み彼らにとって利用可能である、その数が増え続けているさまざまな治療選択肢を持ち、さらに、特定の癌に対するラベル表示の記載はないもののその癌における有効性の証拠が存在する多数の薬物も持っている。良好な治療成績が得られる見込みを最も高くするためには、利用しうる最適な癌治療を患者に割り当てること、およびこの割り当てを診断後にできるだけ早く行うことが必要である。

30

【0004】

ある種の癌はゲノムマーカーを用いて細分類および治療が行われ始めているが、信頼性のあるゲノムマーカーがすべての癌について利用可能なわけではなく、それらは、1つまたは(典型的には)多くの正常遺伝子の異常発現を呈するものとしてさらに良く特徴づけられる可能性がある。遺伝子発現に基づいて特定のタイプの癌を診断するための、および種々の治療戦略の有効性を見込みを評価するための、現在利用しうるバイオマーカ検査は、例えば以下の1つまたは複数の欠点を有する場合がある：(1)血液の検査用に検査を設計しても、それは固形腫瘍の検査には容易に適合しないことがあること；(2)固形腫瘍試料に対する試料調製方法は、生細胞を操作するのに、またはその後マーカー発現の測定を行うのに適さないことがあること；(3)少量試料、例えば細針生検を用いて入手したものである、徹底した分析のために十分な組織が得られないことがあること；(4)検査が、細胞のインビトロ培養、長期にわたるインキュベーション期間、および/または検査用細胞を患者から入手した時点と細胞を検査する時点との間にかなりの間隔を要し、その結果、マーカー発現に大きな変動および外的影響が及ぶ可能性が生じることがあること；(5)検査が、発現を異常であると認識して特徴づけるために決定的に重要と考えられる、多数の遺伝子、リンタンパク質または他のマーカーの発現を同時並行的に測定するには適さないことがあること；(6)検査が非定量的で、遺伝子の相対的発現レベルではなくタンパク質の有無を判定するための免疫組織化学検査に主として依拠していることが

40

50

あること；(7) 試薬および細胞操作条件が厳密に制御されておらず、検査間および検査室間の高度のばらつきにつながる可能性があること；(8) 核酸分子の不安定性、および十分に新鮮な試料を患者から入手することの実際上の困難さのために、検査が核酸レベルを分析するには適さないことがあること；ならびに(9) 検査が、選択した試薬の存在下または非存在下などで遺伝子発現解析を行えるようにする前に、細胞の固定を要することがあること。

#### 【0005】

最近、いくつかのグループが、マイクロアレイ遺伝子発現解析による、さまざまなタイプの癌の分類に関する研究を発表している(例えば、Golub et al., *Science* 286:531-537 (1999) (非特許文献1); Bhattacharjee et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001) (非特許文献2); Chen-Hsiang et al., *Bioinformatics* 17 (Suppl. 1): S316-S322 (2001) (非特許文献3); Ramaswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001) (非特許文献4)を参照)。遺伝子発現パターンに基づく、ヒト乳癌のある種の分類も報告されている(Martin et al., *Cancer Res.* 60:2232-2238 (2000) (非特許文献5); West et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467 (2001) (非特許文献6); Sorlie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001) (非特許文献7); Yan et al., *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001) (非特許文献8))。しかし、これらの研究はほとんど、乳癌を含むさまざまなタイプの癌の既に確立された分類の改善および精緻化を狙いとしており、差異を伴って発現される遺伝子または機能的な細胞情報の関係に関する新たな見通しを与えることは一般にない。これらの研究は、その知見を癌治療法の臨床成績を改善することを目的として治療戦略と結びつけることもなく、かつ、それらは細胞操作および分析の既存の手法の改善および標準化という問題に取り組んでもいない。

#### 【0006】

現代の分子生物学および生化学は、腫瘍細胞の挙動、それらの分化の状態、およびある特定の治療薬に対するそれらの感受性または抵抗性に対してその活性が影響を及ぼす、100超の遺伝子を明らかにしているが、少数の例外を除き、これらの遺伝子の状態は、薬物治療に関する臨床決断を定型的に下す目的には十分でない。明らかな例外の1つは、タモキシフェンなどの抗エストロゲン薬による治療に向けて患者を選択するための、乳癌におけるエストロゲン受容体(ER)タンパク質発現の利用である。別の例外の例は、Her2拮抗薬ハーセプチン(HERCEPTIN)(登録商標)(Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.)を用いる患者を選択するための、乳癌におけるErbB2(Her-2)タンパク質発現の利用である。しかし、ほとんどの癌では、遺伝子発現の病的変化(pathology)は比較的わずかであり、これには複数の遺伝子の発現パターン、または特定の刺激に応じた遺伝子の発現が含まれる。

#### 【0007】

標的化された治療薬に対する腫瘍細胞の反応は、標的の存在だけでなく、シグナル伝達ネットワークの内部の多数の分子およびそれらの変異体にも依存する。「エクスピボのバイオマーカー」という用語は、新規のクラスのバイオマーカー、つまり、生きている腫瘍細胞によりそれらが患者から取り出された後に惹起されるものを記述している。分子バイオマーカーの文脈において、これは、末梢血もしくは骨髄の採取、外科手術の間、循環性腫瘍細胞によって、または、細針吸引生検(FNA)などの低侵襲生検法によって、患者から生存細胞を取り出す過程のことを指す。続いて生存試料をインビトロで刺激する。腫瘍学の用途において、これらの刺激物は、新たな治療薬による標的化を受けるシグナル伝達ネットワークと関連のある、上皮増殖因子などの増殖因子であってよい。バイオマーカーそれ自体が何らかの動的な生体分子であることも可能であるが、シグナル伝達ネットワーク中の、新たに修飾されたリンタンパク質または新たに発現されたmRNAであってよい。エクスピボ刺激後に急速に(数分で)起こる細胞イベント、例えばタンパク質リン酸化イベントなどは、その刺激の「近位」にあるとみなしてよく、腫瘍によって利用される主要なシグナル伝達経路を決定する上で最も役立つと考えられる。エクスピボ刺激後にさらに遅

10

20

30

40

50

れて（数分～数時間で）起こるイベント、例えば新たなmRNA転写などは、「遠位」マーカールとみなしてよく、シグナル伝達イベントの複合的概観、および増殖またはアポトーシスなどの細胞機能に対するそれらの影響を評価する上でより有用であると考えられる。そのようなリタンパク質または遺伝子発現マイクロアレイの多重パネル（multiplexed panel）は、固定された組織から生成されるプロファイルとは異なる、より情報価値の高い包括的な機能的プロファイルの生成を容易にすると考えられる。場合によっては、経路に対する分子標的剤（MTA）の効果を、化学経路阻害物質またはMTAそれ自体などのモジュレーターの存在下で試料を刺激することによってモニターすることもできると考えられる。総合的にみて、エクスピボのバイオマーカーは、シグナル伝達ネットワーク全体を詳しく調べるための機能的アッセイ法の可能性をもたらす。そのようなアッセイ法は、臨床試験の設計または臨床管理を行う上での情報を与える、機能的情報に基づく患者層別、および標的化療法の開発に用いるための新規の薬力学アッセイ法を含む、潜在的ないくつかの用途をもたらす（Clark DP. *Ex vivo* biomarkers: functional tools to guide targeted drug development and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(8):787-94（非特許文献9））。

10

【0008】

したがって、機能的層別および/またはシグナル伝達プロファイルに基づいて、疾患状態を診断するためのおよび癌細胞の薬物感受性を判定するための、改良された組成物および方法を開発する必要性が依然としてある。

【先行技術文献】

20

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Golub et al., *Science* 286:531-537 (1999)

【非特許文献2】Bhattacharjee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001)

【非特許文献3】Chen-Hsiang et al., *Bioinformatics* 17 (Suppl. 1): S316-S322 (2001)

【非特許文献4】Ramaswamy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001)

【非特許文献5】Martin et al., *Cancer Res.* 60:2232-2238 (2000)

30

【非特許文献6】West et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467 (2001)

【非特許文献7】Sorlie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001)

【非特許文献8】Yan et al., *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001)

【非特許文献9】Clark DP. *Ex vivo* biomarkers: functional tools to guide targeted drug development and therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(8):787-94

【発明の概要】

【0010】

本発明は、対象に関する、疾患状態の診断、癌細胞の薬物抵抗性もしくは薬物感受性の判定、疾患のモニタリングもしくは治療用作用物質に対する反応性のモニタリング、および/または治療成績の予測のために、機能的層別および/またはシグナル伝達プロファイルを用いることができるという発見に基づく。本明細書において、患者における疾患の診断および/または予後予測のためのアッセイ法を提供する。また、標的化された治療用作用物質に対する疾患の抵抗性または感受性を治療レジメンの開始前に評価し、かつ治療レジメンの治療効果をモニターするための組成物および方法も提供する。

40

【0011】

したがって、1つの局面において、本発明は、対象における疾患の診断のための方法を提供する。本方法は、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該差異が、疾患の存在を示す値、疾患の非存在を示す値、または疾患を有するリスクを示す値として表される段階を含む。好ましくは、試料は生存（生）細

50

胞を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。1つの態様において、タンパク質は翻訳後修飾によって修飾されている。別の態様において、翻訳後修飾は、リン酸化、アセチル化、アミド化、メチル化、ニトロシル化、脂肪酸付加、脂質付加、グリコシル化およびユビキチン化からなる群より選択される。

**【0012】**

1つの態様において、腫瘍試料は固形腫瘍由来である。別の態様において、腫瘍試料は細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。別の態様において、本方法は、試料を治療用作用物質またはその組み合わせに曝露させる段階をさらに含む。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、LC-質量分析法、フローサイトメトリー、RIA、ノーザンプロット法、サザンプロット法、ウエスタンプロット法、およびPCRからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

10

**【0013】**

別の局面において、本発明は、対象における疾患の予後予測のための方法を提供する。本方法は、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、予後を示す段階を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。1つの態様において、タンパク質は翻訳後修飾によって修飾されている。別の態様において、翻訳後修飾は、リン酸化、アセチル化、アミド化、メチル化、ニトロシル化、脂肪酸付加、脂質付加、グリコシル化およびユビキチン化からなる群より選択される。

20

**【0014】**

1つの態様において、腫瘍試料は固形腫瘍由来である。別の態様において、腫瘍試料は、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。別の態様において、本方法は、試料を治療用作用物質またはその組み合わせに曝露させる段階をさらに含む。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンプロット法、サザンプロット法、ウエスタンプロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

30

**【0015】**

別の局面において、本発明は、1つの作用物質または複数の作用物質の組み合わせの効果を予測するための方法を提供する。本方法は、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、作用物質の正または負の効果を示す段階を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。別の態様において、作用物質は試料中の分子と直接相互作用する。別の態様において、効果は、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路の活性化または阻害である。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンプロット法、サザンプロット法、ウエスタンプロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

40

**【0016】**

50

別の局面において、本発明は、疾患を、または治療用作用物質、治療レジメンもしくは治療過程に対する反応性を、対象に関してモニターする方法を提供する。本方法は、任意で治療用作用物質、治療レジメンまたは治療過程の前、それらと同時またはそれらの後に、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエキスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、ポジティブ (positive) 治療またはネガティブ (negative) 治療を示す段階を含む。

**【 0 0 1 7 】**

別の局面において、本発明は、疾患または治療過程を対象に関してモニターする方法を提供する。本方法は、任意で治療過程の前、それと同時またはその後に、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエキスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、ポジティブ治療またはネガティブ治療を示す段階を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。別の態様において、ポジティブ治療により、対象が治療過程のレスポンドャーであることが示される。別の態様において、ネガティブ治療により、対象が治療過程に対して抵抗性を有することが示される。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンプロット法、サザンプロット法、ウエスタンプロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

**【 0 0 1 8 】**

別の局面において、本発明は、被験作用物質をある分子に対する効果についてスクリーニングする方法を提供する。本方法は、1つまたは複数の分子を含む試料をエキスピボで被験作用物質に接触させる段階、続いて、該試料中の該分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエキスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該被験作用物質に接触させる前および接触させた後の該分子の基礎レベルまたは基礎状態の差異が、該分子に対する効果を示す段階を含む。1つの態様においては、併用した2つの被験作用物質の効果を予測するために、機能的シグナル伝達回路を評価する。別の態様において、試料は、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。

**【 0 0 1 9 】**

1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。別の態様において、分子は、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路を活性化するかまたは阻害する。例示的な被験作用物質には、低分子化学物質、化学療法剤、ホルモン、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体、核酸、RNAi分子およびアンチセンス分子が非限定的に含まれる。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンプロット法、サザンプロット法、ウエスタンプロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

**【 0 0 2 0 】**

別の局面において、本発明は、治療用作用物質または治療レジメンに対する反応性に基づいて患者を層別するための方法を提供する。本方法は、対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエキスピボでモジュレーターに接触させた後

10

20

30

40

50

の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、治療用作用物質または治療レジメンに対する正または負の反応を示す段階を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。別の態様において、正の反応により、対象が治療用作用物質または治療レジメンに対するレスポナーであることが示される。別の態様において、負の反応により、対象が治療用作用物質または治療レジメンに対する抵抗性を有することが示される。例示的な被験作用物質には、低分子化学物質、化学療法剤、ホルモン、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体、核酸、RNAi分子およびアンチセンス分子が非限定的に含まれる。さらに別の態様において、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態との差異を決定する段階は、コンピュータを用いて行われる。さらに別の態様において、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンブロット法、サザンブロット法、ウエスタンブロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて、分子を分析する。

10

## 【0021】

別の局面において、本発明は、対象における薬物抵抗性または薬物感受性を判定する方法を提供する。本方法は、対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態を、刺激性化合物の非存在下におけるエキスピボ阻害後の該分子の該レベルまたは該状態と比較する段階を含む。1つの態様において、分子はタンパク質分子または核酸分子である。別の態様において、分子にはタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子が含まれる。

20

## 【0022】

さまざまな局面において、試料は、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。さまざまな局面において、腫瘍試料は固形腫瘍由来である。さまざまな局面において、腫瘍試料には、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、腔癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌が含まれる。

30

## 【0023】

例示的な疾患には、脳卒中、心血管疾患、慢性閉塞性肺障害、心筋梗塞、うっ血性心不全、心筋症、心筋炎、虚血性心疾患、冠動脈疾患、心原性ショック、血管性ショック、肺高血圧症、肺水腫（心原性肺水腫を含む）、癌、病原体媒介性疾患、胸水貯留、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜色素変性症、および、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含む網膜症、炎症性疾患、再狭窄、浮腫（癌などの病的状態に随伴する浮腫、および化学療法などの医学的介入によって誘導される浮腫を含む）、喘息、急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群（ARDS）、ループス、血管性漏出、移植片（例えば、臓器移植片、急性移植片または異種移植片または同種移植片（熱傷治療に使用されるものなど））拒絶反応；臓器移植中に受ける虚血傷害または再灌流傷害などの虚血傷害または再灌流傷害からの保護、移植寛容誘導；血管形成術後の虚血傷害または再灌流傷害；関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎または骨関節炎など）；多発性硬化症；潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患；ループス（全身性エリテマトーデス）；移植片対宿主病；接触過敏症、遅延型過敏症およびグルテン過敏性腸症（セリアック病）を含むT細胞媒介性過敏性疾患；1型糖尿病；乾癬；接触性皮膚炎（ツタウルシに起因するものを含む）；橋本甲状腺炎；シェーグレン症候群；グレーブス病などの自己免疫性甲状腺機能亢進症；アジソン病（副腎の自己免疫疾患）；多腺性自己免疫疾患（多腺性自己免疫症候群としても知られる）；自己免疫性脱毛症；悪性貧血；白斑症；自己免疫性下垂体機能低下症；ギラン・バレー症候群；他の自己免疫疾患；Srcファミリーキナーゼなどのキナーゼが活性化もしくは過剰発現されるものを含む癌、例えば結腸癌および胸腺腫など、またはキナーゼ活性

40

50

が腫瘍の増殖または生存を促進する癌；糸球体腎炎、血清病；蕁麻疹；呼吸器アレルギー（喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎）または皮膚アレルギーなどのアレルギー性疾患；菌状息肉腫；急性炎症反応（急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群、および虚血/再灌流傷害など）；皮膚筋炎；円形脱毛症；慢性光線性皮膚炎；湿疹；ペーチェット病；掌蹠膿疱症；壊疽性膿皮症；セザリ－症候群；アトピー性皮膚炎；全身性硬化症；モルフェア；末梢性肢虚血および虚血性肢疾患；骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、パジェット病および腎性骨ジストロフィーなどの骨疾患；化学療法またはIL-2などの免疫モジュレーターによって誘導される血管性漏出症候群を含む血管性漏出症候群；脊髄および脳の損傷または外傷；緑内障；黄斑変性症を含む網膜疾患；硝子体網膜疾患；膀胱炎；血管炎、川崎病、閉塞性血栓血管炎、ヴェグナー肉芽腫症およびペーチェット病を含む脈管炎（vasculatides）；強皮症；子癩前症；サラセミア；カポジ肉腫；ならびにフォンヒッペル・リンダウ病が非限定的に含まれる。

10

## 【0024】

さまざまな局面において、病原体は、細菌、真菌、ウイルス、スピロヘータおよび寄生生物からなる群より選択される。さまざまな局面において、ウイルスは、単純ヘルペスウイルス1（HSV1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV2）、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス（MV）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ワクシニアウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）およびC型肝炎ウイルス（HCV）からなる群より選択される。

## 【0025】

さまざまな態様において、モジュレーターには刺激物質または阻害物質が含まれる。さまざまな態様において、モジュレーターは、物理的、生物的または化学的なモジュレーターから選択される。さまざまな態様において、物理的または化学的なモジュレーターには、温度変化、密度変化、pH変化または色調変化が含まれる。さまざまな態様において、モジュレーターには、上皮増殖因子（EGF）、組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）、他の増殖因子、またはそれらの組み合わせが含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に関与するタンパク質が含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、RAS-RAF-MEK-ERK経路に関与するタンパク質が含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pmTOR、pSrc、pEGFR、pSTAT3

20

30

## 【0026】

別の局面において、本発明は、対象の腫瘍生試料の機能的層別を判定するためのエクスピボ方法を提供する。本方法は、増殖因子刺激の非存在下におけるまたは成長ホルモン刺激の非存在下における、ならびに阻害物質の存在下におけるおよび阻害物質の非存在下におけるエクスピボでの機能的シグナル伝達プロファイルを作成するために、少なくとも1つのシグナル伝達リントタンパク質レベルを測定する段階を含む。1つの態様において、本方法は、MEK阻害物質の存在下における、およびMEK阻害物質の非存在下における、増殖因子刺激に応じたエクスピボでの機能的シグナル伝達プロファイルを作成するために、少なくとも1つのシグナル伝達リントタンパク質レベルを測定する段階を含む。1つの態様において、阻害物質にはMEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせが含まれる。1つの態様において、腫瘍生試料には乳癌細胞、黒色腫細胞または膀胱癌細胞が含まれる。別の態様において、リントタンパク質には、p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrcおよび/またはpGSK3 / が含まれる。別の態様において、リントタンパク質は、p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc、pGSK3 / 、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。さまざまな態様において、リントタンパク質は、4EBP1、4EBP1 pS65、53BP1、ACC S79、ACC1、AIB-1、AKT、AKT S473、AKT T308、AMPK、AMPK T172、アネキシン、AR、Bak、BAX、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-xL、ベクリン（Beclin）、Bid、BIM、カドヘリン-E、カドヘリン-N、カドヘリン-P、活性型カスパーゼ3、Asp198切断型カスパーゼ7（Caspase 7 cleaved Asp198）、カテニン、カベオ

40

50

リン1、CD31、CDC2、Chk1、Chk1 pSer345、Chk2 (1C12)、Chk2 pThr68、cJun P-S73、クロロディン7 CLDN7、コラーゲンVI、Cox-2、サイクリンB1、サイクリンD1、サイクリンE1、DJ-1、eEF2、eEF2K、EGFR、EGFR Y992、EGFR Y1173、eIF4E、ER-a S118、ERCC1、FAK、フィブロネクチン、FOXO3a、FOXO3a S318/321、Gata3、GSK3 S21/S9、GSK3-、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、ノッチ1、ノッチ3、p21、p27、p27 pT157、p27 pT198、p38/MAPK、p38 T180/182、p53、p70S6K、p70S6K T389、p90 RSK P-T359/S363、切断型PARP (PARP cleaved)、パキシリン、PCNA、PDK1 PS-241、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)、Rb pS807/811、S6 S235/236、S6 S240/244、Shc pY317、Smad3、Snail、Src、Src P-Y527、Src Y416、Stat3 P-S705、Stat5、スタスミン、Tau、Taz、Taz P-Ser79、テロメラゼ、トランスグルタミナーゼ、ツベリン/TSC2、Vasp、VEGFR2、Xiap、XRCC1、Y Box結合タンパク質1、YAP、YAP pS127、YB1 pS102、またはそれらの組み合わせからなる群のうち少なくとも1つより選択される。1つの態様においては、機能的シグナル伝達プロファイルのうち少なくとも2つの異なる群を特定する。別の態様においては、機能的シグナル伝達プロファイルのうち少なくとも4つの異なる群を特定する。1つの態様において、増殖因子刺激は上皮増殖因子受容体リガンドを含む。1つのさらなる態様において、上皮増殖因子受容体リガンドは上皮増殖因子 (EGF) である。さまざまな態様において、増殖因子には、上皮増殖因子 (EGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、メラニン細胞刺激ホルモン、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子 (VEGF)、PTK7、Trk、Ros、MuSK、Met、Ax1、Tie、Eph、Ret、Ryk、DDR、Ros、LMR、ALK、STYK1、またはそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【0027】

別の局面において、本発明は、癌細胞モデルシステムを分類するための方法を提供する。本方法は、(a) 癌細胞の選択された群に対して少なくとも1つのシグナル伝達リントタンパク質レベルを測定する段階；(b) 該癌細胞を少なくとも1つの増殖因子または少なくとも1つの阻害物質に接触させる段階；(c) 段階(b)の後に少なくとも1つのシグナル伝達リントタンパク質レベルを測定する段階；(d) 段階(a)および段階(c)による測定に基づいてモジュレーションスコアを算出する段階；ならびに(e) 段階(d)のモジュレーションスコアに基づいて該癌細胞を分類する段階を含む。1つの態様において、本方法は、腫瘍生試料の分類に基づいて対象の該腫瘍生試料の薬物抵抗性または薬物感受性を予測する段階をさらに含む。

#### 【0028】

1つの態様において、癌細胞には乳癌細胞が含まれる。別の態様において、癌細胞には、乳癌細胞、黒色腫細胞または膵癌細胞が含まれる。別の態様において、リントタンパク質には、p-Erk 1/2、p-AKT、pEGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrcおよび/またはpGSK3 / が含まれる。別の態様において、リントタンパク質は、p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6K、pmTOR、pSrc、pGSK3 / 、またはそれらの組み合わせからなる群より選択される。さまざまな態様において、リントタンパク質は、4EBP1、4EBP1 pS65、53BP1、ACC S79、ACC1、AIB-1、AKT、AKT S473、AKT T308、AMPK、AMPK T172、アネキシン、AR、Bak、BAX、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-xL、ベクリン、Bid、BIM、カドヘリン-E、カドヘリン-N、カドヘリン-P、活性型カスパーゼ3、Asp198切断型カスパーゼ7、カテニン、カベオリン1、CD31、CDC2、Chk1、Chk1 pSer345、Chk2 (1C12)、Chk2 pThr68、cJun P-S73、クロロディン7 CLDN7、コラーゲンVI、Cox-2、サイクリンB1、サイクリンD1、サイクリンE1、DJ-1、eEF2、eEF2K、EGFR、EGFR Y992、EGFR Y1173、eIF4E、ER-a S118、ERCC1、FAK、フィブロネクチン、FOXO3a、FOXO3a S318/321、Gata3、GSK3 S21/S9、GSK3-、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、ノッチ1、ノッチ3、p21、p27、p27 pT157、p27 pT198、p38/MAPK、p38 T180/182、p53、p70S6K、

10

20

30

40

50

p70S6K T389、p90 RSK P-T359/S363、切断型PARP、パキシリン、PCNA、PDK1 PS-241、Pea 15、Pea15 pS116、PI3K P110a、PI3K-p85、PKC S657、PKCa、PR、Pras40 pT246、PTCH、P TEN、Rab25、Rad50、Rad51、Raf-A pS299、Raf-B、Raf-C、Raf-c pS388、Rb (4H1)、Rb pS807/811、S6 S235/236、S6 S240/244、Shc pY317、Smad3、Snail、Src、Src P-Y527、Src Y416、Stat3 P-S705、Stat5、スタスミン、Tau、Taz、Taz P-Ser79、テロメラーゼ、トランスグルタミナーゼ、ツベリン/TSC2、Vasp、VEGFR2、Xiap、XRCC1、Y Box結合タンパク質1、YAP、YAP pS127、YB1 pS102、またはそれらの組み合わせからなる群のうちの少なくとも1つより選択される。1つの態様においては、機能的シグナル伝達プロファイルのうちの少なくとも2つの群が同定される。別の態様においては、異なる機能的シグナル伝達プロファイルのうちの少なくとも4つの群が同定される。1つの態様において、増殖因子刺激は上皮増殖因子受容体リガンドを含む。1つのさらなる態様において、上皮増殖因子受容体リガンドは上皮増殖因子(EGF)である。さまざまな態様において、増殖因子には、上皮増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、メラニン細胞刺激ホルモン、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子(VEGF)、PTK7、Trk、Ros、MuSK、Met、Ax1、Tie、Eph、Ret Ryk、DDR、Ros、LMR、ALK、STYK1、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0029】

別の局面において、本発明は、対象における治療レジメンの成績を予測するための方法を提供する。本方法は、(a)治療を必要とする疾患を有する対象に由来する少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの分子の基礎レベルを測定する段階；(b)少なくとも1つの該細胞をエキスピボでモジュレーターに曝露させる段階；(c)段階(b)の後に少なくとも1つのシグナル伝達タンパク質のレベルを測定する段階；ならびに(d)(a)および(b)で測定したレベル間の差異を、薬物抵抗性または薬物感受性に関する性質が公知である細胞と比較する段階であって、それにより、該対象における治療レジメンの成績を予測する段階を含む。

【0030】

別の局面において、本発明は、細胞の薬物抵抗性または薬物感受性を予測するための方法を提供する。本方法は、(a)少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの分子の基礎レベルを測定する段階；(b)少なくとも1つの該細胞をエキスピボでモジュレーターに曝露させる段階；(c)段階(b)の後に少なくとも1つのシグナル伝達タンパク質のレベルを測定する段階；ならびに(d)(a)および(b)で測定したレベル間の差異を、薬物抵抗性または薬物感受性に関する性質が公知である細胞と比較する段階であって、それにより、少なくとも1つの該細胞の薬物抵抗性または薬物感受性を予測する段階を含む。1つの態様において、細胞には黒色腫細胞が含まれる。別の態様において、薬物にはBRAF阻害物質が含まれる。別の態様において、薬物には、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0031】

1つの態様において、少なくとも1つの分子にはシグナル伝達タンパク質が含まれる。別の態様において、少なくとも1つの細胞には対象由来の腫瘍試料が含まれ、(a)および(b)における測定されたレベルはエキスピボで行われる。さまざまな態様において、腫瘍試料は固形腫瘍由来である。1つのさらなる態様において、腫瘍試料には、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌が含まれる。さまざまな態様において、腫瘍試料は、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。

【0032】

1つの態様において、薬物抵抗性にはBRAF阻害物質抵抗性が含まれる。別の態様において、少なくとも1つの細胞は、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼB-Raf(BRAF)突然

変異を含む。別の態様において、少なくとも1つの細胞は、BRAF突然変異およびCancer Os aka thyroid oncogene (COT) 増幅を含む。1つのさらなる態様において、BRAF突然変異はV600Eである。

【0033】

さまざまな態様において、比較する段階はコンピュータを用いて行われる。さまざまな態様において、測定は、アレイ、ELISA、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンブロット法、サザンブロット法、ウエスタンブロット法、PCR、およびRIAからなる群より選択されるアッセイ法を用いて行われる。

【0034】

別の局面において、本発明は、黒色腫細胞を分類するための方法を提供する。本方法は、(a) 少なくとも1つの黒色腫細胞の少なくとも1つの分子の第1の基礎レベルを測定する段階；(b) (a) で測定した該第1の基礎レベルを、分類群が公知である黒色腫細胞の少なくとも1つの該分子の第2の基礎レベルと比較する段階であって、それにより、少なくとも1つの該黒色腫細胞を分類する段階を含む。1つの態様において、少なくとも1つの黒色腫細胞には対象由来の腫瘍試料が含まれ、第1の基礎レベルはエクスピボで測定される。さまざまな態様において、分類群には転移状態が含まれる。さまざまな態様において、腫瘍試料は、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。

10

【0035】

別の局面において、本発明は、黒色腫細胞を分類するための方法を提供する。本方法は、(a) 少なくとも1つの黒色腫細胞の少なくとも1つの分子の基礎レベルを測定する段階；(b) 少なくとも1つの該黒色腫細胞を阻害性被験作用物質に曝露させる段階；(c) 段階(b) の後に少なくとも1つの該分子のレベルを測定する段階；ならびに(d) (a) および(b) で測定したレベル間の差異を、分類群が公知である黒色腫細胞と比較する段階であって、それにより、少なくとも1つの該黒色腫細胞を分類する段階を含む。1つの態様において、少なくとも1つの黒色腫細胞には対象由来の腫瘍試料が含まれ、測定はエクスピボで行われる。1つの態様において、阻害性被験作用物質には、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせが含まれる。別の態様において、分類群には転移状態が含まれる。さまざまな態様において、腫瘍試料は、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。

20

30

【0036】

別の局面において、本発明は、黒色腫細胞の薬物抵抗性機構または癌遺伝子バイパス (oncogene bypass) 機構を特定するための方法を提供する。本方法は、(a) 少なくとも1つの黒色腫細胞を阻害性被験作用物質に曝露させる段階；(b) (a) の曝露後の複数の分子の減少を測定する段階、それにより、薬物抵抗性機構または癌遺伝子バイパス機構を特定する段階を含む。

【0037】

1つの態様において、少なくとも1つの黒色腫細胞には対象由来の腫瘍試料が含まれ、測定はエクスピボで行われる。さまざまな態様において、腫瘍試料には、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、腔癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌が含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に関与するタンパク質が含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、RAS-RAF-MEK-ERK経路に関与するタンパク質が含まれる。さまざまな態様において、少なくとも1つの分子には、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、pmTOR、pSrc、またはそれらの組み合わせが含まれる。さまざまな態様において、腫瘍試料は、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる。

40

50

## [本発明1001]

以下の段階を含む、疾患の診断のための方法：

試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該差異が、疾患の存在を示す値、疾患の非存在を示す値または疾患を有するリスクを示す値として表される段階。

## [本発明1002]

前記分子がタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子を含む、本発明1001の方法。

## [本発明1003]

前記試料が、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、本発明1001の方法。

## [本発明1004]

前記疾患が、脳卒中、心血管疾患、慢性閉塞性肺障害、心筋梗塞、うっ血性心不全、心筋症、心筋炎、虚血性心疾患、冠動脈疾患、心原性ショック、血管性ショック、肺高血圧症、肺水腫（心原性肺水腫を含む）、癌、病原体媒介性疾患、胸水貯留、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜色素変性症、および、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含む網膜症、炎症性疾患、再狭窄、浮腫（癌などの病的状態に随伴する浮腫、および化学療法などの医学的介入によって誘導される浮腫を含む）、喘息、急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群（ARDS）、ループス、血管性漏出、移植片（例えば、臓器移植片、急性移植片または異種移植片または同種移植片（熱傷治療に使用されるものなど））拒絶反応；臓器移植中に受ける虚血傷害または再灌流傷害などの虚血傷害または再灌流傷害からの保護、移植寛容誘導；血管形成術後の虚血傷害または再灌流傷害；関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎または骨関節炎など）；多発性硬化症；潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患；ループス（全身性エリテマトーデス）；移植片対宿主病；接触過敏症、遅延型過敏症およびグルテン過敏性腸症（セリアック病）を含むT細胞媒介性過敏性疾患；1型糖尿病；乾癬；接触性皮膚炎（ツタウルシに起因するものを含む）；橋本甲状腺炎；シェーグレン症候群；グレーブス病などの自己免疫性甲状腺機能亢進症；アジソン病（副腎の自己免疫疾患）；多腺性自己免疫疾患（多腺性自己免疫症候群としても知られる）；自己免疫性脱毛症；悪性貧血；白斑症；自己免疫性下垂体機能低下症；ギラン・バレー症候群；他の自己免疫疾患；Srcファミリーキナーゼなどのキナーゼが活性化もしくは過剰発現されるものを含む癌、例えば結腸癌および胸腺腫など、またはキナーゼ活性が腫瘍の増殖または生存を促進する癌；糸球体腎炎、血清病；蕁麻疹；呼吸器アレルギー（喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎）または皮膚アレルギーなどのアレルギー性疾患；菌状息肉腫；急性炎症反応（急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群、および虚血/再灌流傷害など）；皮膚筋炎；円形脱毛症；慢性光線性皮膚炎；湿疹；ペーチェット病；掌蹠膿疱症；壊疽性膿皮症；セザリー症候群；アトピー性皮膚炎；全身性硬化症；モルフェア；末梢性肢虚血および虚血性肢疾患；骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、パジェット病および腎性骨ジストロフィーなどの骨疾患；化学療法またはIL-2などの免疫モジュレーターによって誘導される血管性漏出症候群を含む血管性漏出症候群；脊髄および脳の損傷または外傷；緑内障；黄斑変性症を含む網膜疾患；硝子体網膜疾患；睪炎；血管炎、川崎病、閉塞性血栓血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症およびペーチェット病を含む脈管炎（vasculatides）；強皮症；子癩前症；サラセミア；カボジ肉腫；ならびにフォンヒッペル・リンドウ病からなる群より選択される、本発明1001の方法。

## [本発明1005]

前記癌が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、腔癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される、本発明1004の方法。

10

20

30

40

50

## [本発明1006]

前記病原体が、細菌、真菌、ウイルス、スピロヘータおよび寄生生物からなる群より選択される、本発明1004の方法。

## [本発明1007]

前記ウイルスが、単純ヘルペスウイルス1 (HSV1)、単純ヘルペスウイルス2 (HSV2)、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス (MV)、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ワクシニアウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) およびC型肝炎ウイルス (HCV) からなる群より選択される、本発明1006の方法。

## [本発明1008]

前記腫瘍試料が固形腫瘍由来である、本発明1003の方法。

10

## [本発明1009]

前記腫瘍試料が、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる、本発明1008の方法。

## [本発明1010]

前記タンパク質が翻訳後修飾によって修飾されている、本発明1002の方法。

## [本発明1011]

前記翻訳後修飾が、リン酸化、アセチル化、アミド化、メチル化、ニトロシル化、脂肪酸付加、脂質付加、グルコシル化およびユビキチン化からなる群より選択される、本発明1010の方法。

## [本発明1012]

前記モジュレーターが物理的、生物的または化学的なモジュレーターから選択される、本発明1001の方法。

20

## [本発明1013]

前記試料を治療用作用物質またはその組み合わせに曝露させる段階をさらに含む、本発明1001の方法。

## [本発明1014]

前記決定する段階がコンピュータを用いる、本発明1001の方法。

## [本発明1015]

アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、PCR、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて前記分子を分析する、本発明1001の方法。

30

## [本発明1016]

以下の段階を含む、疾患の予後予測のための方法：

試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、予後を示す段階。

## [本発明1017]

前記分子がタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子を含む、本発明1016の方法。

## [本発明1018]

前記試料が、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、本発明1016の方法。

40

## [本発明1019]

前記疾患が、脳卒中、心血管疾患、慢性閉塞性肺障害、心筋梗塞、うっ血性心不全、心筋症、心筋炎、虚血性心疾患、冠動脈疾患、心原性ショック、血管性ショック、肺高血圧症、肺水腫（心原性肺水腫を含む）、癌、病原体媒介性疾患、胸水貯留、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜色素変性症、および、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含む網膜症、炎症性疾患、再狭窄、浮腫（癌などの病的状態に随伴する浮腫、および化学療法などの医学的介入によって誘導される浮腫を含む）、喘息、急性呼吸促迫症候群または成人

50

呼吸促進症候群（ARDS）、ループス、血管性漏出、移植片（例えば、臓器移植片、急性移植片または異種移植片または同種移植片（熱傷治療に使用されるものなど））拒絶反応；臓器移植中に受ける虚血傷害または再灌流傷害などの虚血傷害または再灌流傷害からの保護、移植寛容誘導；血管形成術後の虚血傷害または再灌流傷害；関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎または骨関節炎など）；多発性硬化症；潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患；ループス（全身性エリテマトーデス）；移植片対宿主病；接触過敏症、遅延型過敏症およびグルテン過敏性腸症（セリアック病）を含むT細胞媒介性過敏性疾患；1型糖尿病；乾癬；接触性皮膚炎（ツタウルシに起因するものを含む）；橋本甲状腺炎；シェーグレン症候群；グレーブス病などの自己免疫性甲状腺機能亢進症；アジソン病（副腎の自己免疫疾患）；多腺性自己免疫疾患（多腺性自己免疫症候群としても知られる）；自己免疫性脱毛症；悪性貧血；白斑症；自己免疫性下垂体機能低下症；ギラン・バレー症候群；他の自己免疫疾患；Srcファミリーキナーゼなどのキナーゼが活性化もしくは過剰発現されるものを含む癌、例えば結腸癌および胸腺腫など、またはキナーゼ活性が腫瘍の増殖または生存を促進する癌；糸球体腎炎、血清病；蕁麻疹；呼吸器アレルギー（喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎）または皮膚アレルギーなどのアレルギー性疾患；菌状息肉腫；急性炎症反応（急性呼吸促進症候群または成人呼吸促進症候群、および虚血/再灌流傷害など）；皮膚筋炎；円形脱毛症；慢性光線性皮膚炎；湿疹；ペーチェット病；掌蹠膿疱症；壊疽性膿皮症；セザリー症候群；アトピー性皮膚炎；全身性硬化症；モルフェア；末梢性肢虚血および虚血性肢疾患；骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、パジェット病および腎性骨ジストロフィーなどの骨疾患；化学療法またはIL-2などの免疫モジュレーターによって誘導される血管性漏出症候群を含む血管性漏出症候群；脊髄および脳の損傷または外傷；緑内障；黄斑変性症を含む網膜疾患；硝子体網膜疾患；脾炎；血管炎、川崎病、閉塞性血栓性血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症およびペーチェット病を含む脈管炎；強皮症；子癇前症；サラセミア；カボジ肉腫；ならびにフォンヒッペル・リンダウ病からなる群より選択される、本発明1016の方法。

[本発明1020]

前記癌が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記病原体が、細菌、真菌、ウイルス、スピロヘータおよび寄生生物からなる群より選択される、本発明1019の方法。

[本発明1022]

前記ウイルスが、単純ヘルペスウイルス1（HSV1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV2）、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス（MV）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ワクシニアウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）、およびC型肝炎ウイルス（HCV）からなる群より選択される、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記腫瘍試料が固形腫瘍由来である、本発明1018の方法。

[本発明1024]

前記腫瘍試料が、細針吸引、コア生検、循環性腫瘍細胞、または外科的に切除された組織試料によって得られる、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記タンパク質が翻訳後修飾によって修飾されている、本発明1017の方法。

[本発明1026]

前記翻訳後修飾が、リン酸化、アセチル化、アミド化、メチル化、ニトロシル化、脂肪酸付加、脂質付加、グルコシル化およびユビキチン化からなる群より選択される、本発明1025の方法。

[本発明1027]

10

20

30

40

50

前記モジュレーターが物理的、生物的または化学的なモジュレーターから選択される、本発明1016の方法。

[本発明1028]

前記試料を治療用作用物質またはその組み合わせに曝露させる段階をさらに含む、本発明1016の方法。

[本発明1029]

前記決定する段階がコンピュータを用いる、本発明1016の方法。

[本発明1030]

アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、PCR、質量分析法、フローサイトメトリー、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて前記分子を分析する、本発明1016の方法。

10

[本発明1031]

以下の段階を含む、作用物質の効果を予測するための方法：

試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、該作用物質の正または負の効果を示す値として表される段階。

[本発明1032]

前記作用物質が前記試料中の前記分子と直接相互作用する、本発明1031の方法。

[本発明1033]

20

前記効果が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路の活性化または阻害である、本発明1031の方法。

[本発明1034]

前記分子がタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子を含む、本発明1031の方法。

[本発明1035]

前記試料が、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、本発明1031の方法。

30

[本発明1036]

前記決定する段階がコンピュータを用いる、本発明1031の方法。

[本発明1037]

アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、PCR、質量分析法、フローサイトメトリー、およびRIAからなる群より選択される手法を用いて前記分子を分析する、本発明1031の方法。

[本発明1038]

以下の段階を含む、疾患、または、対象の治療過程をモニターする方法：

任意で治療過程の前、それと同時にまたはその後に、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、ポジティブ (positive) 治療またはネガティブ (negative) 治療を示す、段階。

40

[本発明1039]

ポジティブ治療により、前記対象が前記治療過程のレスポンドであることが示される、本発明1038の方法。

[本発明1040]

ネガティブ治療により、前記対象が前記治療過程に対して抵抗性を有することが示される、本発明1038の方法。

[本発明1041]

50

以下の段階を含む、被験作用物質をある分子に対する効果についてスクリーニングする方法：

1つまたは複数の該分子を含む試料をエクスピボで該被験作用物質に接触させる段階；

該試料中の該分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該被験作用物質に接触させる前および接触させた後の該分子の基礎レベルまたは基礎状態の差異が、該分子に対する効果を示す段階。

[本発明1042]

併用した2つの前記被験作用物質の効果を予測するために、機能的シグナル伝達回路を評価する、本発明1041の方法。

10

[本発明1043]

前記試料が、組織、血液、腹水、唾液、尿、汗、涙液、精液、血清、血漿、羊水、胸水、脳脊髄液、細胞株、異種移植片、腫瘍、心膜液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、本発明1041の方法。

[本発明1044]

前記分子がタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子を含む、本発明1041の方法。

[本発明1045]

前記分子が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路を活性化または阻害する、本発明1041の方法。

20

[本発明1046]

前記被験作用物質が、低分子化学物質、化学療法剤、ホルモン、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体、核酸、RNAi分子およびアンチセンス分子からなる群より選択される、本発明1041の方法。

[本発明1047]

以下の段階を含む、治療作用物質または治療レジメンに対する反応性に基づいて患者を層別するための方法：

対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピボでモジュレーターに接触させた後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、治療作用物質または治療レジメンに対する正または負の反応を示す段階。

30

[本発明1048]

正の反応により、前記対象が前記治療作用物質または前記治療レジメンに対するレスポンスであることが示される、本発明1047の方法。

[本発明1049]

負の反応により、前記対象が前記治療作用物質または前記治療レジメンに対する抵抗性を有することが示される、本発明1047の方法。

[本発明1050]

対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態を、刺激性化合物の存在下または非存在下におけるエクスピボ阻害後の該分子の該レベルまたは該状態と比較する段階を含む、薬物感受性または薬物抵抗性を判定する方法。

40

[本発明1051]

前記分子がタンパク質、核酸、脂質、糖、炭水化物または代謝産物分子を含む、本発明1050の方法。

[本発明1052]

以下の段階を含む、対象の腫瘍生試料の機能的層別を判定するためのエクスピボ方法：  
増殖因子刺激の存在下におけるおよび増殖因子刺激の非存在下における、ならびに阻害物質の存在下におけるおよび阻害物質の非存在下における機能的シグナル伝達プロファイルを作成するために、少なくとも1つのシグナル伝達リントタンパク質レベルを測定する段

50

階。

[本発明1053]

前記阻害物質がMEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記腫瘍生試料が乳癌細胞、黒色腫細胞または膵癌細胞を含む、本発明1052の方法。

[本発明1055]

前記リタンパク質が、p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6Kおよび/またはpGSK3 を含む、本発明1052の方法。

[本発明1056]

機能的シグナル伝達プロファイルのうちの少なくとも2つの異なる群を特定する、本発明1052の方法。

[本発明1057]

機能的シグナル伝達プロファイルのうちの少なくとも4つの異なる群を特定する、本発明1052の方法。

[本発明1058]

前記増殖因子刺激が上皮増殖因子受容体リガンドを含む、本発明1052の方法。

[本発明1059]

前記上皮増殖因子受容体リガンドが上皮増殖因子(EGF)である、本発明1058の方法。

[本発明1060]

以下の段階を含む、癌細胞モデルシステムを分類するための方法：

(a) 癌細胞の選択された群に対して少なくとも1つのシグナル伝達リタンパク質レベルを測定する段階；

(b) 該癌細胞を、少なくとも1つの増殖因子または少なくとも1つの阻害物質に接触させる段階；

(c) 段階(b)の後に少なくとも1つのシグナル伝達リタンパク質レベルを測定する段階；

(d) 段階(a)および段階(c)による測定に基づいてモジュレーションスコアを算出する段階；ならびに

(e) 段階(d)の該モジュレーションスコアに基づいて該癌細胞を分類する段階。

[本発明1061]

腫瘍生試料の分類に基づいて対象の該腫瘍生試料の薬物抵抗性または薬物感受性を予測する段階をさらに含む、本発明1060の方法。

[本発明1062]

前記癌細胞が乳癌細胞、黒色腫細胞または膵癌細胞を含む、本発明1060の方法。

[本発明1063]

前記リタンパク質が、p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3、pP70S6Kおよび/またはpGSK3 を含む、本発明1060の方法。

[本発明1064]

少なくとも2つの異なる癌細胞分類群を特定する、本発明1060の方法。

[本発明1065]

少なくとも4つの異なる癌細胞分類群を特定する、本発明1060の方法。

[本発明1066]

前記増殖因子刺激が上皮増殖因子受容体リガンドを含む、本発明1060の方法。

[本発明1067]

前記上皮増殖因子受容体リガンドが上皮増殖因子(EGF)である、本発明1066の方法。

[本発明1068]

以下の段階を含む、対象における治療レジメンの成績を予測するための方法：

(a) 治療を必要とする疾患を有する対象に由来する少なくとも1つの細胞の少なくとも1つの分子の基礎レベルを測定する段階；

10

20

30

40

50

- (b) 少なくとも1つの該細胞をエキスピボでモジュレーターに曝露させる段階；  
 (c) 段階(b)の後に少なくとも1つのシグナル伝達タンパク質のレベルを測定する段階；ならびに  
 (d) (a)および(b)で測定したレベル間の差異を、薬物抵抗性または薬物感受性に関する性質が公知である細胞と比較する段階であって、それにより、該対象における該治療レジメンの成績を予測する段階。

[本発明1069]

少なくとも1つの前記分子がシグナル伝達タンパク質を含む、本発明1068の方法。

[本発明1070]

少なくとも1つの前記細胞が黒色腫細胞を含む、本発明1068の方法。

10

[本発明1071]

前記薬物がMEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1068の方法。

[本発明1072]

少なくとも1つの前記細胞が、対象由来の腫瘍試料を含み、かつ(a)および(b)における測定された前記レベルがエキスピボで行われる、本発明1068の方法。

[本発明1073]

前記腫瘍試料が固形腫瘍由来である、本発明1072の方法。

[本発明1074]

前記腫瘍試料が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膵癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌を含む、本発明1072の方法。

20

[本発明1075]

前記薬物抵抗性がBRAF阻害物質抵抗性を含む、本発明1068の方法。

[本発明1076]

少なくとも1つの前記細胞がセリン/トレオニン-プロテインキナーゼB-Raf (BRAF) 突然変異を含む、本発明1071の方法。

[本発明1077]

少なくとも1つの前記黒色腫細胞が、BRAF突然変異およびCancer Osaka thyroid oncogene (COT) 増幅を含む、本発明1076の方法。

30

[本発明1078]

前記BRAF突然変異がV600Eである、本発明1076の方法。

[本発明1079]

前記モジュレーターが物理的、生物的または化学的なモジュレーターから選択される、本発明1068の方法。

[本発明1080]

前記モジュレーターが、上皮増殖因子(EGF)、組織プラスミノゲンアクチベーター(TPA)、他の増殖因子、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1068の方法。

40

[本発明1081]

少なくとも1つの前記分子が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に關与するタンパク質を含む、本発明1068の方法。

[本発明1082]

少なくとも1つの前記分子が、RAS-RAF-MEK-ERK経路に關与するタンパク質を含む、本発明1068の方法。

[本発明1083]

少なくとも1つの前記分子が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1068の方法。

50

[本発明1084]

前記比較する段階がコンピュータを用いて行われる、本発明1068の方法。

[本発明1085]

前記測定が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、PCR、およびRIAからなる群より選択されるアッセイ法を用いて行われる、本発明1068の方法。

[本発明1086]

以下の段階を含む、黒色腫細胞を分類するための方法：

(a) 少なくとも1つの該黒色腫細胞の少なくとも1つの分子の第1の基礎レベルを測定する段階；

(b) (a)で測定した該第1の基礎レベルを、分類群が公知である黒色腫細胞の少なくとも1つの該分子の第2の基礎レベルと比較する段階であって、それにより、少なくとも1つの該黒色腫細胞を分類する段階。

[本発明1087]

少なくとも1つの前記黒色腫細胞が、対象由来の腫瘍試料を含み、かつ前記第1の基礎レベルがエクスピボで測定される、本発明1086の方法。

[本発明1088]

前記腫瘍試料が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌を含む、本発明1087の方法。

[本発明1089]

少なくとも1つの前記分子が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に關与するタンパク質を含む、本発明1086の方法。

[本発明1090]

少なくとも1つの前記分子が、RAS-RAF-MEK-ERK経路に關与するタンパク質を含む、本発明1086の方法。

[本発明1091]

少なくとも1つの前記分子が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1086の方法。

[本発明1092]

前記分類群が転移状態を含む、本発明1086の方法。

[本発明1093]

前記比較する段階がコンピュータを用いて行われる、本発明1086の方法。

[本発明1094]

前記測定が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、PCR、およびRIAからなる群より選択されるアッセイ法を用いて行われる、本発明1086の方法。

[本発明1095]

以下の段階を含む、黒色腫細胞を分類するための方法：

(a) 少なくとも1つの黒色腫細胞の少なくとも1つの分子の基礎レベルを測定する段階；

(b) 少なくとも1つの該黒色腫細胞を阻害性被験作用物質に曝露させる段階；

(c) 段階(b)の後に少なくとも1つの該分子のレベルを測定する段階；ならびに

(d) (a)および(b)で測定したレベル間の差異を、分類群が公知である黒色腫細胞と比較する段階であって、それにより、少なくとも1つの該黒色腫細胞を分類する段階。

[本発明1096]

少なくとも1つの前記黒色腫細胞が、対象由来の腫瘍試料を含み、かつ測定がエクスピ

10

20

30

40

50

ボで行われる、本発明1095の方法。

[本発明1097]

前記腫瘍試料が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌を含む、本発明1095の方法。

[本発明1098]

少なくとも1つの前記分子が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に關与するタンパク質を含む、本発明1095の方法。

10

[本発明1099]

少なくとも1つの前記分子が、RAS-RAF-MEK-ERK経路に關与するタンパク質を含む、本発明1095の方法。

[本発明1100]

少なくとも1つの前記分子が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1095の方法。

[本発明1101]

前記阻害性被験作用物質が、MEK阻害物質、mTOR阻害物質、BRAF阻害物質、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1095の方法。

20

[本発明1102]

前記分類群が転移状態を含む、本発明1095の方法。

[本発明1103]

前記比較する段階がコンピュータを用いて行われる、本発明1095の方法。

[本発明1104]

前記測定が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、PCR、およびRIAからなる群より選択されるアッセイ法を用いて行われる、本発明1095の方法。

[本発明1105]

以下の段階を含む、黒色腫細胞の薬物抵抗性機構または癌遺伝子バイパス (oncogene bypass) 機構を特定するための方法：

30

(a) 少なくとも1つの黒色腫細胞を阻害性被験作用物質に曝露させる段階；

(b) (a) の曝露後の複数の分子の減少を測定する段階であって、それにより、薬物抵抗性機構または癌遺伝子バイパス機構を特定する段階。

[本発明1106]

少なくとも1つの前記黒色腫細胞が、対象由来の腫瘍試料を含み、かつ測定がエクスピボで行われる、本発明1105の方法。

[本発明1107]

前記腫瘍試料が、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膵癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌を含む、本発明1105の方法。

40

[本発明1108]

少なくとも1つの前記分子が、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路に關与するタンパク質を含む、本発明1105の方法。

[本発明1109]

少なくとも1つの前記分子が、RAS-RAF-MEK-ERK経路に關与するタンパク質を含む、本発明1105の方法。

50

[本発明1110]

少なくとも1つの前記分子が、pErk1/2、pAKT、pP70S6k、pGSK3 / 、pEGFR、pSTAT3、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1105の方法。

[本発明1111]

前記測定が、アレイ、ELISA、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、PCR、およびRIAからなる群より選択されるアッセイ法を用いて行われる、本発明1105の方法。

[本発明1112]

前記モジュレーターが阻害物質である、本発明1001、1016、1031、1038、1041、1047または1068のいずれかの方法。

10

[本発明1113]

前記モジュレーターが刺激物質である、本発明1001、1016、1031、1038、1041、1047または1068のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】29種の異なるリンタンパク質を含むリンタンパク質アレイに由来するデータをまとめたグラフ図である。

【図2】図2Aおよび2Bは、5種の乳癌細胞株のセットに関する、ベースライン（図2A）およびEGF刺激下（図2B）の機能的シグナル伝達プロファイルである。

【図3】本発明によって用いられるシグナル伝達経路の例示的な説明図を示している。

20

【図4】本発明の例示的な工程フローチャートを示している。腫瘍生試料を典型的には対象から入手し、続いて、腫瘍生試料においてシグナル伝達イベントを引き起こすために、少なくとも1つの刺激を加える。さまざまなmRNAまたはタンパク質の基礎レベルおよび刺激下レベルを評価し、続いて機能的層別を判定することができる。

【図5】対象の腫瘍生試料に刺激を加えるためのさまざまな段階/設備に関する例示的な説明図を示している。

【図6】いくつかの乳癌細胞株の機能的層別を示している。左上のチャンバーはAKTに関するものである。中央上のチャンバーはErkに関するものである。右上のチャンバーはEGFRに関するものである。左下のチャンバーはGSK3 に関するものである。中央下のチャンバーはSTAT3に関するものである。右下のチャンバーはP70S6Kに関するものである。

30

【図7】機能的層別に基づく、例示的な細胞株の階層的クラスタリングを示している。

【図8】単層細胞株と処理細胞株（すなわち、SnapPath（商標）などの刺激後）との例示的な相関関係を示している。

【図9】HCC-1937に関して、処理した細胞株と異種移植片との相関関係を示している。

【図10】MDA-MB-231に関して、処理した細胞株と異種移植片との相関関係を示している。

【図11】例示的な機能的層別および潜在的薬物相関関係を示しており、薬物感受性および刺激後の誘導変化倍率が図示されている。

【図12】機能的層別と、潜在的治療選択肢との関係を示している。

【図13】潜在的薬物感受性がTNBCの機能的シグナル伝達プロファイルと関連していた、例示的な説明図を示している。上の列はpAKT、pErkおよびpEGFRを含む。下の列はpGSK、pSTAT3およびp70S6kを含む。

40

【図14】エクスピボでの層別および細胞の機能的回路の分析が、例えばSnapPath（商標）システム上で、薬物阻害を通じて可能であるという例示的な説明図を示している。この分析は、pAKT、pErk、pGSK、p70S6k、pSTAT3およびpEGFRを含む。

【図15】EGF刺激に際しての、黒色腫の例示的な機能的シグナル伝達プロファイル（モジュレーション）を示している。RPMI-7951細胞、SK-MEL 2細胞、SK-MEL 28細胞およびSK-MEL 31細胞において、pAKT、pERK、pGSK3、p70S6K、pSTAT、pEGFRに関してタンパク質レベルを測定している。EGF刺激の前および後のタンパク質レベルに関して変化倍率を算出している。

50

【図16】U0126によるMEK阻害に際しての、黒色腫の例示的な機能的シグナル伝達プロファイル（阻害）を示している。RPMI-7951細胞、SK-MEL 2細胞、SK-MEL 28細胞およびSK-MEL 31細胞において、pERK、pAKT、pGSK3 / 、p70S6K、pSTAT、pEGFRに関してタンパク質レベルを測定している。

【図17】TPAによる刺激後のpErkの誘導を介する、PLX-4032抵抗性細胞株RPMI-7951の例示的な分化を示している。

【図18】膵臓腫瘍の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。10195を除き、試料はすべて、ヒト膵神経内分泌腫瘍（PanNET）の例である。10195はヒト膵臓腺癌の試料である。このデータにより、3種の異なるリンタンパク質バイオマーカー（p-ERK 1/2、p-GSK / およびp-STAT3）を用いたTPA刺激に基づく機能的プロファイルの差異が判明している。

10

【図19】SnapPath（商標）計器上での、TPAによる刺激後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

【図20】SnapPath（商標）計器上での、EGFによる刺激後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

【図21】SnapPath（商標）計器上での、EGFの非存在下における、U0126による阻害後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

20

【図22】SnapPath（商標）計器上での、EGFの存在下における、U0126による阻害後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

【図23】SnapPath（商標）計器上での、PDGF- 刺激後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

【図24】SnapPath（商標）計器上での、PDGF- 刺激およびU0126によるMEK阻害の後の黒色腫細胞株の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6k、pSTAT3およびpEGFRが含まれる。

【図25】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-28におけるリンタンパク質阻害の例示的な動態曲線（kinetic curve）を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

30

【図26】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-28におけるリンタンパク質阻害の例示的な用量反応曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

【図27】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株RPMI-7951におけるリンタンパク質阻害の例示的な動態曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

40

【図28】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株RPMI-7951におけるリンタンパク質阻害の例示的な用量反応曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

【図29】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-31におけるリンタンパク質阻害の例示的な動態曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

【図30】SnapPath（商標）計器上での、BRAF阻害物質（PLX-4702）による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-31におけるリンタンパク質阻害の例示的な用量反応曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3 、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる

50

。【図3 1】SnapPath(商標)計器上での、BRAF阻害物質(PLX-4702)による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-2におけるリンタンパク質阻害の例示的な動態曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAkt、pErk、pGSK3、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

【図3 2】SnapPath(商標)計器上での、BRAF阻害物質(PLX-4702)による処置後の黒色腫細胞株SK-MEL-2におけるリンタンパク質阻害の例示的な用量反応曲線を示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pGSK3、pP70S6kおよびpSTAT3が含まれる。

【図3 3】SnapPath(商標)計器上での、EGF刺激後の黒色腫細胞株(SK-MEL-28)の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pMEKが含まれる。

【図3 4】SnapPath(商標)計器上での、EGF刺激ならびにPLX-4702およびU0126によるBRAFおよびERKの阻害の後の、黒色腫細胞株(RPMI-7951)の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pMEKが含まれる。

【図3 5】SnapPath(商標)計器上での、EGF刺激ならびにPLX-4702およびU0126によるBRAFおよびERKの阻害の後の、黒色腫細胞株(RPMI-7951)の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pMEKおよびpEGFRが含まれる。

【図3 6】SnapPath(商標)計器上での、PDGF刺激ならびにPLX-4702およびU0126によるBRAFおよびERKの阻害の後の、黒色腫細胞株(RPMI-7951)の例示的な機能的シグナル伝達プロファイルを示している。測定したタンパク質レベルには、pAKT、pErk、pMEKが含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0039】

発明の詳細な説明

本組成物、方法および治療方法について説明する前に、本発明が、記載された特定の組成物、方法および実験条件に限定されず、したがって組成物、方法および条件を変更してもよいことが理解されるべきである。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲においてのみ限定されるため、本明細書で用いる専門用語は特定の態様を説明することのみを目的としており、限定を意図するものではないことも理解されるべきである。

【0040】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、別に明記する場合を除き、複数の指示対象も含む。したがって、例えば「その方法」への言及は、本開示を読めば当業者に明らかとなる、本明細書に記載された種類の1つまたは複数の方法および/または段階などを含む。

【0041】

別に定める場合を除き、本明細書で用いる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されたものと類似または同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および材料を以下に説明する。

【0042】

本発明は、エクスピボでの細胞標本の採取、操作および処理のための、安全で、有効で、精度が高く、正確で、再現性があり、安価で、費用対効果が高く、効率が良く、迅速かつ簡便な方法および「カートリッジ式」システムを提供する。これらの方法およびカートリッジは、バイオマーカーの完全性を維持するための工程の間に試料の生存能力を維持させ、かつ任意で、エクスピボでの刺激および/または阻害を通じて、元の試料には存在しないリンタンパク質および核酸分子などのバイオマーカーを惹起させることができる。本発明は、生検後、完結した細胞診断検査システムおよび制御された条件における標本および情報の完全に一体化された管理をもたらし、それは検査問のばらつきを最小限に抑え、微生物汚染のリスクを最小限に抑え、かつ試料調製工程それ自体がバイオマーカー発現

10

20

30

40

50

に及ぼす影響も最小限に抑える。

【0043】

本発明の態様は、疾患の標的化治療を容易にするために用いることができ、かつ任意で、細胞数、細胞機能および/または他の連結分析といった組織試料の妥当性評価も提供する。

【0044】

当業者は、本明細書に記載された機器、システム、キットおよび方法が、臨床および研究の現場で数多くの利点を持つことを理解するであろう。例えば、それらを用いることで、標本を離れた検査室に搬送することを必要とせずに、患者の近くで迅速な生検試料処理を行うことができる。また、それらを用いて、生検試料処理を費用対効果の高い様式で標準化および自動化することもできる。本発明は、現行の病理検査過程が可能であるものよりも、細胞に関するより詳細な分子情報を提供することができ、任意で新たなエクスピオのバイオマーカーを用いて、生検試料中の細胞（例えば、癌または疾患細胞）のさらなる細分類を行うことを可能にする。以上を総合すると、本発明の利点により、診療現場付近での迅速診断、およびそれに引き続き、より有効な患者特異的治療レジメンの構築が可能になる。

10

【0045】

本発明の方法は、単独で行うこともできること、または、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2009/0162853号に記述されたシステムおよび機器と併用して行うこともできることが理解されるべきである。

20

【0046】

1つの局面において、本発明は、対象における疾患の診断および/または予後予測を可能にする分子アッセイ法を提供する。加えて、本発明の分子アッセイ法は、作用物質に対する患者の疾患の感受性または抵抗性を治療の開始前に評価すること、および治療中の治療効果をモニターすることをいずれも可能にする。この診断アッセイ法は、治療法を方向づけるとともに、標的化療法によって治療される患者の予後も予測する。

【0047】

したがって、本発明は、対象における疾患の診断および/または予後予測のための方法を提供する。本方法は、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部分をエクスピオでモジュレーターにより刺激した後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該差異が、疾患の存在を示す値、疾患の非存在を示す値、または疾患を有するリスクを示す値として表される段階を含む。

30

【0048】

例示的なモジュレーターには、物理的、生物的または化学的なモジュレーターが非限定的に含まれる。「モジュレーター」という用語には、低分子（例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブまたはラパチニブ（lapatanib））および抗体（例えば、ハーセプチン（登録商標））などの刺激物質および阻害物質が含まれる。1つの態様において、モジュレーターは上皮増殖因子受容体（EGFR）の阻害物質または活性化物質である。本明細書において用いる場合、「EGFR」という用語は、erbB遺伝子ファミリーの産物のことを指す。EGFRがerbB遺伝子ファミリーの任意の遺伝子によってコードされる任意のerbB受容体の産物、ならびにこれらの分子が形成することが知られている任意のホモ二量体およびヘテロ二量体であってよいことは、当業者には理解されるであろう。以前の諸研究で発現が検出されているerbB-1産物は主な受容体であるものの、本明細書において検査した細胞株および腫瘍が他のerbB遺伝子ファミリーメンバーも発現すると考えられる理由はある。なお、本発明者らが用いたEGFRリガンドまたはリガンドの組み合わせは公知のEGFR受容体形態のほぼすべてに結合するため、本発明者らのアッセイ法は、そのようなタンパク質によって発揮される効果を計測する。別の態様において、モジュレーターは1つまたは複数のモジュレーターの組み合わせ、例えば、EGF、TGF- およびヒレグリンのうち1つまたは複数などである。

40

【0049】

50

したがって、計測される量的または質的な効果は、前初期または後初期遺伝子ファミリーメンバーなどの遺伝子の発現レベルであってよい。適した前初期または後初期遺伝子ファミリーメンバーには、FOS、JUNおよびDUSP 128が非限定的に含まれる。

#### 【0050】

本明細書で用いる場合、「疾患」という用語は、感染、遺伝的欠陥または環境ストレスといったさまざまな原因に起因し、識別可能な徴候群または症状群によって特徴づけられる、対象の一部、臓器または全身のあらゆる病的状態を指して広義に用いられる。例示的な疾患には、脳卒中、心血管疾患、慢性閉塞性肺障害、心筋梗塞、うっ血性心不全、心筋症、心筋炎、虚血性心疾患、冠動脈疾患、心原性ショック、血管性ショック、肺高血圧症、肺水腫（心原性肺水腫を含む）、癌、病原体媒介性疾患、胸水貯留、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、網膜色素変性症、および、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含む網膜症、炎症性疾患、再狭窄、浮腫（癌などの病的状態に随伴する浮腫、および化学療法などの医学的介入によって誘導される浮腫を含む）、喘息、急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群（ARDS）、ループス、血管性漏出、移植片（例えば、臓器移植片、急性移植片または異種移植片または同種移植片（熱傷治療に使用されるものなど））拒絶反応；臓器移植中に受ける虚血傷害または再灌流傷害などの虚血傷害または再灌流傷害からの保護、移植寛容誘導；血管形成術後の虚血傷害または再灌流傷害；関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎または骨関節炎など）；多発性硬化症；潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む炎症性腸疾患；ループス（全身性エリテマトーデス）；移植片対宿主病；接触過敏症、遅延型過敏症およびグルテン過敏性腸症（セリアック病）を含むT細胞媒介性過敏性疾患；1型糖尿病；乾癬；接触性皮膚炎（ツタウルシに起因するものを含む）；橋本甲状腺炎；シェーグレン症候群；グレーブス病などの自己免疫性甲状腺機能亢進症；アジソン病（副腎の自己免疫疾患）；多腺性自己免疫疾患（多腺性自己免疫症候群としても知られる）；自己免疫性脱毛症；悪性貧血；白斑症；自己免疫性下垂体機能低下症；ギラン・バレー症候群；他の自己免疫疾患；Srcファミリーキナーゼなどのキナーゼが活性化もしくは過剰発現されるものを含む癌、例えば結腸癌および胸腺腫など、またはキナーゼ活性が腫瘍の増殖または生存を促進する癌；糸球体腎炎、血清病；蕁麻疹；呼吸器アレルギー（喘息、花粉症、アレルギー性鼻炎）または皮膚アレルギーなどのアレルギー性疾患；菌状息肉腫；急性炎症反応（急性呼吸促迫症候群または成人呼吸促迫症候群、および虚血/再灌流傷害など）；皮膚筋炎；円形脱毛症；慢性光線性皮膚炎；湿疹；ペーチェット病；掌蹠膿疱症；壊疽性膿皮症；セザリイ症候群；アトピー性皮膚炎；全身性硬化症；モルフェア；末梢性肢虚血および虚血性肢疾患；骨粗鬆症、骨軟化症、副甲状腺機能亢進症、パジェット病および腎性骨ジストロフィーなどの骨疾患；化学療法またはIL-2などの免疫モジュレーターによって誘導される血管性漏出症候群を含む血管性漏出症候群；脊髄および脳の損傷または外傷；緑内障；黄斑変性症を含む網膜疾患；硝子体網膜疾患；脾炎；血管炎、川崎病、閉塞性血栓血管炎、ヴェゲナー肉芽腫症およびペーチェット病を含む脈管炎；強皮症；子癩前症；サラセミア；カポジ肉腫；ならびにフォンヒッペル・リンダウ病が非限定的に含まれる。

#### 【0051】

1つの態様において、疾患は癌である。例示的な癌には、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌、前立腺癌、子宮癌、乳癌、皮膚癌、内分泌癌、泌尿器癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、肝癌、骨癌、胆道癌、小腸癌、造血器癌、膣癌、精巣癌、肛門癌、腎癌、脳癌、眼癌、白血病、リンパ腫、軟部組織癌、黒色腫、およびそれらの転移癌からなる群より選択される癌が非限定的に含まれる。

#### 【0052】

別の態様において、疾患は病原体媒介性疾患である。例示的な病原体には、細菌、真菌、ウイルス、スピロヘータおよび寄生生物が非限定的に含まれる。例示的なウイルスには、単純ヘルペスウイルス1（HSV1）、単純ヘルペスウイルス2（HSV2）、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス（MV）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ワクシニアウイルス、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）およびC型肝炎ウイルス（HCV）が非限定的に含まれる

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 3 】

本明細書で用いる場合、「試料」および「生物試料」という用語は、本発明によって提供される方法に適したあらゆる試料のことを指す。本方法に用いる細胞の試料は、対象由来の組織試料もしくは体液から、または生検手法（例えば、針生検）もしくは外科的処置によって得られる組織から入手することができる。したがって、例示的な試料には、組織試料、凍結組織試料、生検標本、外科標本、細胞診標本、細胞株、異種移植片、腫瘍、細針吸引、全血、骨髓、脳脊髄液、腹水、胸水、リンパ液、血清、血漿、羊水、粘液、血漿、尿、乳糜、便、痰、汗、涙液、精液、乳頭吸引液、唾液、およびそれらの任意の組み合わせが非限定的に含まれる。ある態様において、試料は、血液試料の画分、例えば末梢血リンパ球（PBL）画分などであってよい。全血からPBLを単離するための方法は当技術分野において周知である。加えて、血液試料を使用し、かつ、関心対象の組織、例えば卵巣、乳房などから、当技術分野で公知の方法を用いて少量の循環性細胞を濃縮することもできる。

10

## 【 0 0 5 4 】

細針吸引（FNA）は、薬力学的評価項目を連続様式で評価するのに十分な量の腫瘍材料を収集するための強力かつ安全な方法であることが実証されている。加えて、インビトロ条件を再現するための、ならびにエクスピボでの分子感受性および抵抗性アッセイ法を開発するための組織の獲得に、この方法を効率的に用いることができるという予備的証拠も得られている。このアプローチは伝統的に多くの関心を集めており、これらの多数の研究の成果および根本的意義は最近の総説の主題となっている。ほとんどの研究は、生存腫瘍組織の試料に由来する細胞が、選択した治療作用物質にインビトロ条件下で曝露された場合に反応を示すかどうかを分析している。したがって、1つの態様において、本アッセイ法は、タンパク質および/または核酸分析のための、任意の病変の細針吸引および吸引した材料の処理に基づく。用いる具体的な薬剤によっては、本アッセイ法は、治療に対する病変の感受性の判定と、特定経路遮断の有効性の判定と、分子レベルでの治療効果のモニタリングとを可能にする。本アッセイ法は、病的状態および不快感をほとんど伴わずに行うことができ、薬物感受性評価、投与計画、治療効果測定および予後予測のために用いることができる。

20

## 【 0 0 5 5 】

SnapPath（商標）エクスピボバイオマーカープラットフォーム：細針吸引生検（FNAB）は、米国で広く用いられている、ヒト腫瘍の試料採取のための低侵襲性方法である。歴史的には、FNAB試料は顕微鏡検査のための十分な材料となったが、標的化された抗癌剤の成功した開発および使用には、これらの臨床試料から導き出されるバイオマーカー情報も必要であると考えられる。

30

## 【 0 0 5 6 】

エクスピボバイオマーカーは、患者のベッドサイドでの手作業による生組織操作を用いたさまざまな臨床試験で使用することに成功している。SnapPath（商標）などの自動化された迅速処理機器がなければ、エクスピボ検査は臨床的に実施可能でない。個々の患者に対する最も有効な癌治療を決定するために、新規のエクスピボのバイオマーカー検査を用いて腫瘍生細胞を詳しく調べることができる点に、SnapPath（商標）バイオマーカープラットフォームの将来性がある。

40

## 【 0 0 5 7 】

SnapPath（商標）ベンチトップユニットは、独自に設計された挿入可能なカートリッジの内部で、自動化された流体力学技術を利用して、腫瘍生検生試料の処理および操作を行う。SnapPath（商標）システムでは、患者から針を除去した後に直ちに、放射線科医師がSnapPath（商標）カートリッジに（FNA）生検試料を入れる。続いて、フローサイトメトリーによって処理されるリンパ腫試料に必要とされるものに類似した工程において、SnapPath（商標）プラットフォームが設置されている病理検査室に、カートリッジを速やかに搬送する。

50

## 【0058】

SnapPath (商標) バイオマーカープラットフォームは、National Cancer Instituteとの230万ドルに上るFast-Track SBIR契約の下で開発されている。NCIとの契約締結の際、この機関は、当社のSnapPath (商標) 技術が、「全く新しい診断領域を生み出し」かつ「シグナル伝達経路、分子薬標的およびバイオマーカーに関する正確な情報に基づいた固形腫瘍の個別化された分子治療法を可能にする」と考えられるものを含む、「腫瘍における分子プロファイルを保つ生検試料用計器および機器」への関心を表明したNCIの契約告示に「極めて良く応えた」、「革新的な」FNA生検アプローチおよび計器を提示したと表明している。また、NCIは最近、エクスピボ診断法およびエクスピボ組織分析に狙いを定めた技術が、NCIのSBIR Phase II Bridge Awardプログラムの「優先課題」であるとも表明している。

10

## 【0059】

本明細書で用いる「対象」という用語は、本方法が行われるあらゆる個体または患者のことを指す。一般に対象はヒトであるものの、当業者には理解されるであろうが、対象は動物であってもよい。したがって、齧歯動物(マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットを含む)、ネコ、イヌ、ウサギ、家畜、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなど、および霊長動物(サル、チンパンジー、オランウータンおよびゴリラを含む)などの哺乳動物を含む他の動物も、対象の定義の範囲に含まれる。加えて、「対象」という用語は、本発明の方法が、例えば治療用作用物質の有効性を評価するためにインビトロで行われる場合には、細胞の培養物を指してもよい。

20

## 【0060】

本明細書で用いる場合、「分子」または「生体分子」という用語は、生きている生物体の中のあらゆる有機分子のことを指す。例示的な生体分子には、ペプチド、脂質、核酸、代謝産物および炭水化物が非限定的に含まれる。1つの態様において、生体分子は、タンパク質または核酸分子などのペプチドである。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合によって互いに連結した2つまたはそれ以上のアミノ酸残基、すなわちペプチド同配体のことを指して、本明細書中で互換的に用いられる。これらの用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的化学模倣体であるアミノ酸重合体のほか、天然に存在するアミノ酸重合体、修飾残基を含むもの、および天然に存在しないアミノ酸重合体も該当する。

30

## 【0061】

「核酸分子」という用語は、ホスホジエステル結合によって一緒になって連結されたデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの配列を意味して、本明細書において広義に用いられる。したがって、「核酸分子」という用語は、一本鎖または二本鎖でもよいDNAおよびRNA、ならびにDNA/RNAハイブリッドを含むものとする。その上、本明細書で用いる「核酸分子」という用語は、細胞から単離しうる天然の核酸分子、例えば関心対象の特定の遺伝子のほか、例えば化学合成法によって、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの酵素的な方法によって調製しうる合成分子も含み、かつ、さまざまな態様においては、ヌクレオチド類似体、またはホスホジエステル結合以外の骨格結合も含みうる。

40

## 【0062】

本明細書で用いる場合、「EGFRモジュレーター」という用語は、EGFR活性またはEGFRシグナル伝達経路を直接または間接的にモジュレートする(modulate)生体分子または低分子である化合物または薬物のことを指す。本明細書で用いる化合物または薬物は、低分子および生体分子の両方を含むものとする。直接的または間接的なモジュレーションには、EGFR活性またはEGFRシグナル伝達経路の活性化または阻害が含まれる。阻害とは、EGFRの、例えばEGFを含むEGFRリガンドとの結合の阻害のことを指す。加えて、阻害が、EGFRのキナーゼ活性の阻害を指すこともできる。

## 【0063】

EGFRモジュレーターには、例えば、EGFR特異的リガンド、低分子EGFR阻害物質、およびEGFRモノクローナル抗体が含まれる。1つの局面において、EGFRモジュレーターはEGFR活

50

性を阻害する、かつ/またはEGFRシグナル伝達経路を阻害する。1つの局面において、EGFRモジュレーターは、EGFR活性を阻害する、かつ/またはEGFRシグナル伝達経路を阻害する、EGFR抗体である。

【0064】

EGFRモジュレーターには生体分子または低分子が含まれる。生体分子には、450を上回る分子量を有する、あらゆる脂質ならびに単糖、アミノ酸およびヌクレオチドの重合体が含まれる。したがって、生体分子には、例えば、オリゴ糖、多糖、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドには、例えば、DNAおよびRNAが含まれる。生体分子にはさらに、上記の分子のいずれかの誘導体または組み合わせも含まれる。例えば、生体分子の誘導体には、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質の脂質およびグリコシル化誘導体が含まれる。

10

【0065】

上記で考察した生体分子に加えて、本発明において有用なEGFRモジュレーターが低分子であってもよい。生体分子でない任意の分子は、本明細書において低分子であるとみなすことができる。低分子のいくつかの例には、有機化合物、有機金属化合物、有機化合物および有機金属化合物の塩、糖、アミノ酸ならびにヌクレオチドが含まれる。低分子にはさらに、その分子量が450を上回らないという点を除けば生体分子とみなすことのできる分子も含まれる。したがって、低分子は、分子量が450またはそれ未満である、脂質、オリゴ糖、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチド、ならびにそれらの誘導体であってもよい。

20

【0066】

低分子は、それらが典型的には450未満の分子量を有するという理由から低分子と呼ばれるに過ぎないことに留意されたい。低分子には、天然に認められる化合物のほかに、合成化合物も含まれる。1つの態様において、EGFRモジュレーターは、EGFRを発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。別の態様において、EGFRモジュレーターは、EGFRを発現する不応性腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。数多くの低分子がEGFRを阻害するために有用であると記述されており、それらは当技術分野において周知である。

【0067】

本発明はまた、1つまたは複数の刺激物、例えばEGFRモジュレーターなどに対する感受性または抵抗性のいずれかと相関する発現プロファイルを示す1つまたは複数のバイオマーカーを含む、特化したマイクロアレイ、例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはcDNAマイクロアレイも含む。そのようなマイクロアレイは、腫瘍生検試料由来の被験細胞におけるバイオマーカーの発現レベルを評価して、これらの被験細胞が刺激物、例えばEGFRモジュレーターに対して抵抗性または感受性である可能性が高いと判定するためのインビトロアッセイ法に使用することができる。対象由来の細胞または生組織試料を単離して、1つまたは複数の刺激物、例えばEGFRモジュレーターに曝露させることができる。非処置細胞および処置細胞の両方から単離した核酸を、特化したマイクロアレイの1つまたは複数に適用した後に、被験細胞の遺伝子発現のパターンを判定して、マイクロアレイ上にバイオマーカーのセットを作成するために用いた対照細胞パネルによるバイオマーカーパターンのもものと比較する。検査を受けた細胞による遺伝子発現パターンに基づいて、細胞が遺伝子発現の抵抗性または感受性プロファイルを示すかどうかを判定することができる。

30

40

【0068】

本発明はまた、患者が、1つまたは複数の刺激物、例えばEGFRモジュレーターを含む治療に対して感受性であるか抵抗性であるかを判定または予測するためのキットも含む。患者は、例えば乳癌または腫瘍などの癌または腫瘍を有する可能性がある。そのようなキットは、例えば、患者の腫瘍または癌が所定の治療または治療法に対して抵抗性であるか感受性であるかを判定または予測するために、臨床現場で患者の癌試料を検査するために有用であると考えられる。キットは、刺激物、例えばEGFRモジュレーター、特にEGFR阻害物

50

質に対する抵抗性および感受性と相関するバイオマーカーを含む1つまたは複数のマイクロアレイ、例えば、オリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはcDNAマイクロアレイ；患者由来の癌試料または細胞の検査に用いるための1つまたは複数の刺激物、例えばEGFRモジュレーター；および使用説明書を含む、適した容器を含む。加えて、本発明によって想定されるキットは、例えば、当技術分野において実施されている他の手法およびシステム、例えば、バイオマーカーの1つまたは複数に基づいて設計されたプライマーを使用するRT-PCRアッセイ法、固相酵素免疫アッセイ法（ELISA）などのイムノアッセイ法、イムノプロット法、例えばウエスタンブロット法またはインサイチューハイブリダイゼーションなどを用いて、本発明のバイオマーカーの発現をmRNAまたはタンパク質のレベルでモニターするための試薬または材料をさらに含むことができる。

10

## 【0069】

1つの態様において、タンパク質は翻訳後修飾されたタンパク質であり、ここでタンパク質はリン酸化、アセチル化、アミド化、メチル化、ニトロシル化、脂肪酸付加、脂質付加、グリコシル化およびユビキチン化の1つまたは複数によって修飾されている。

## 【0070】

別の態様において、本方法は、試料を1つまたは複数の治療用作用物質、またはそれらの組み合わせに曝露させる段階をさらに含む。固形腫瘍または他の癌の用途の場合、治療用作用物質には、標的化薬剤、例えば、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、セツキシマブ（エルピタックス（Erbix）（登録商標））、ペバシズマブ（アバスタチン（Avastin）（登録商標））およびリツキシマブ（リツキサン（Rituxan（登録商標））および/またはマブテラ（Mabthera）（登録商標））などの抗腫瘍モノクローナル抗体、ならびにゲフィチニブ（イレッサ（Iressa）（登録商標））エルロチニブ（タルセバ（Tarceva）（登録商標））などの低分子阻害物質、または細胞傷害性化学療法剤が含まれる。

20

## 【0071】

例示的な化学療法剤には、メトトレキサートなどの代謝拮抗剤、シスプラチン/カルボプラチンなどのDNA架橋剤；カンブシルなどのアルキル化剤；ダクチノマイシンなどのトポイソメラーゼI阻害剤；タキソール（パクリタキセル）などの微小管阻害剤なども非限定的に含まれる。他の化学療法剤には、例えば、ピンカアルカロイド、マイトマイシン系抗生物質、プレオマイシン型抗生物質、葉酸拮抗薬、コルヒチン、デメコリン、エトポシド、タキサン、アントラサイクリン系抗生物質、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、カルミノマイシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、4-ジメトキシ-ダウノマイシン、11-デオキシダウノルピシン、13-デオキシダウノルピシン、アドリアマイシン-14-ベンゾエート、アドリアマイシン-14-オクタノエート、アドリアマイシン-14-ナフタレンアセテート、アムサクリン、カルムスチン、シクロホスファミド、シタラピン、エトポシド、ロバスタチン、メルファラン、トペテカン、オキサラプラチン、クロラムブシル、メトトレキサート、ロムスチン、チオグアニン、アスパラギナーゼ、ピンブラスチン、ピンデシン、タモキシフェン、またはメクロレタミンが含まれる。限定することを望むわけではないが、治療用抗体には、トラスツズマブなどのHER2タンパク質に対する抗体；増殖因子または増殖因子受容体に対する抗体、例えば血管内皮増殖因子を標的とするペバシズマブ、および上皮増殖因子を標的とするOSI-774など；インテグリン受容体を標的とする抗体、例えばビタキシン（Vitaxin）（MEDI-522としても公知である）などが含まれる。本発明の組成物および方法における使用に適した抗癌剤のクラスには、以下が非限定的に含まれる：（1）微小管阻害剤（例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびピンデシンなど）、微小管安定化剤（例えば、パクリタキセル〔タキソール〕およびドセタキセル、タキソテルなど）、およびエピポドフィロトキシン（例えば、エトポシド〔VP-16〕およびテニポシド〔VM-26〕など）などのトポイソメラーゼ阻害剤、およびトポイソメラーゼIを標的とする作用物質（例えば、カンプトテシンおよびイシリノテカン（Isirinotecan）〔CPT-11〕など）を含むアルカロイド；（2）ナイトロジェンマスタード（例えば、メクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イフォスファミドおよびブスルファン〔マイレラン（Myleran）〕など）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、

30

40

50

ロムスチンおよびセムスチンなど)および他のアルキル化剤(例えば、ダカルバジン、ヒドロキシメチルメラミン、チオテパおよびマイトサイシンなど)を含む共有結合性DNA結合剤[アルキル化剤];(3)核酸阻害剤(例えば、ダクチノマイシン[アクチノマイシンD]など)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン[ダウノマイシンおよびセルピジン(Cerubidine)]、ドキシソルピシン[アドリアマイシン]およびイダルピシン[イダマイシン]など)、アントラセンジオン(例えば、[ミトキサントロン]などのアントラサイクリン類縁体など)、ブレオマイシン(ブレノキサソ)など、およびプリカマイシン(ミトラマイシン)などを含む非共有結合性DNA結合剤[抗腫瘍抗生物質];(4)葉酸拮抗薬(例えば、メトトレキサート、フォレックスおよびメキセートなど)、プリン代謝拮抗薬(例えば、6-メルカプトプリン[6-MP、プリンツール(Purinethol)]、6-チオグアニン[6-TG]、アザチオプリン、アシクロビル、ガンシクロビル、クロロデオキシアデノシン、2-クロロデオキシアデノシン[CdA]および2'-デオキシコフォルミシン[ペントスタチン]など)、ピリミジン拮抗剤(例えば、フルオロピリミジン[例えば、5-フルオロウラシル(アドルシル)、5-フルオロデオキシウリジン(FdUrd)(フロクスウリジン)]など)およびシトシンアラビノシド(例えば、サイトサル[ara-C]およびフルダラピンなど)を含む代謝拮抗薬;(5)L-アスパラギナーゼを含む酵素;(6)抗エストロゲン(例えば、タモキシフェンなど)、非ステロイド性抗アンドロゲン(例えば、フルタミドなど)およびアロマターゼ阻害剤(例えば、アナストロゾール[Arimidex]など)を含むホルモン;(7)白金化合物(例えば、シスプラチンおよびカルボプラチンなど);(8)抗癌剤、トキシンおよび/または放射性核種などに結合したモノクローナル抗体;(9)生物応答調節剤(例えば、インターフェロン[例えば、IFN- など]およびインターロイキン[例えば、IL-2など]など);(10)養子免疫療法;(11)造血増殖因子;(12)腫瘍細胞分化を誘導する作用物質(例えば、全トランスレチノイン酸など);(13)遺伝子治療法;(14)アンチセンス治療法;(15)腫瘍ワクチン;(16)腫瘍転移に対する治療法(例えば、パチミスタットなど);ならびに(17)血管新生の阻害剤が含まれる。したがって、1つの態様において、治療レジメンは、シスプラチンとパクリタキセルの併用投与である。

#### 【0072】

別の局面において、本発明は、1つの作用物質または複数の作用物質の組み合わせの効果を予測する方法を提供する。本方法は、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、試料の一部をエクスピボでモジュレーターにより刺激した後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、作用物質の正または負の効果を示す段階を含む。1つの態様において、作用物質は試料中の分子と直接相互作用する。別の態様において、効果は、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路からなる群より選択される細胞経路の活性化または阻害である。

#### 【0073】

別の局面において、本発明は、被験作用物質をある分子に対する効果についてスクリーニングする方法を提供する。すなわち、被験作用物質の存在または非存在による影響を、エクスピボのバイオマーカー、例えば、翻訳後修飾されたタンパク質、イオンまたは酵素を検出することによって決定することができる。本方法は、1つまたは複数の分子を含む試料をエクスピボで被験作用物質に接触させる段階、続いて、該試料中の該分子の基礎レベルまたは基礎状態と、該試料の一部をエクスピボでモジュレーターにより刺激した後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、該被験作用物質に接触させる前および接触させた後の該分子の基礎レベルまたは基礎状態の差異が、該分子に対する効果を示す段階を含む。

#### 【0074】

適した被験作用物質には、以下のうちの1つまたは複数が非限定的に含まれる:低分子化学物質、化学療法剤、ホルモン、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、タンパク質、抗体、核酸、RNAi分子およびアンチセンス分子。1つの態様において、被験作用物質の

投与に続いて、分散または分配させた細胞の標的エクスピバイオマーカ―または生体分子に対する量的または質的な効果を測定することができる。

【0075】

別の態様において、被験作用物質が1つまたは複数のマーカ―の発現に影響を及ぼすかどうかを判定することができ、そのような発現の存在、非存在または相対的度合いにより、選択された薬剤に対する細胞の感受性が示される。これらのマーカ―には、mRNA、マイクロRNA、cDNA、タンパク質、リンタンパク質、タンパク質の翻訳後修飾物、またはヒストンの修飾物もしくはDNAパッケージング物といった多様なエクスピバイオマーカ―が含まれる。例えば、マーカ―は、薬剤の感受性と関連のある初期応答遺伝子（例えば、FOSまたはJUN）に対するmRNAまたはcDNAであってよい。被験試薬の存在下におけるマーカ―の組み合わせの発現の存在、非存在または相対的度合いにより、選択された被験試薬、例えば薬剤などに対する細胞の感受性を示すことができる。

10

【0076】

ある分析方法において、被験作用物質は検出可能な作用物質でありうる。検出可能な作用物質は個別に用いてもよく、別の化合物と結合または別の様式で連結させて用いてもよい（例えば、抗体と結合させた検出可能な作用物質）。適した検出可能な作用物質には、酵素、蛍光性材料、発光性材料、生物発光性材料、放射性材料、ポジトロン放出断層撮影法を用いるポジトロン放出性金属、または非放射性常磁性金属イオンが非限定的に含まれる。

【0077】

20

ひとたび疾患を確認しかつ治療プロトコルを開始すると、対象における疾患に関連する症状のレベルまたは強度が正常対象で観察されるものに近づき始めているかどうかを評価するために、本発明の方法を定期的に繰り返してもよい。連続的なアッセイ法から得られる結果を用いることで、数日から数カ月の範囲に及ぶ期間にわたる治療の有効性を示すことができる。したがって、本発明は、患者の治療過程をモニターするための方法も対象とする。本方法は、任意で治療過程の前、それと同時またはその後に、試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、試料の一部をエクスピボでモジュレーターにより刺激した後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の該基礎レベルまたは該基礎状態の差異が、ポジティブ治療またはネガティブ治療を示す段階を含む。すなわち、ポジティブ治療により、対象が治療過程のレスポンスであることが示される。同様に、ネガティブ治療により、対象が治療過程に対して抵抗性を有することが示される。

30

【0078】

1つの態様において、本方法は、疾患に関連する徴候および症状のレベルを治療の前および最中において比較する段階をさらに含んでもよく、疾患の該徴候および該症状の軽減は治療の有効性を示す。したがって、当業者は、治療アプローチを必要に応じて把握して調整することができると考えられる。

【0079】

本明細書に記載された方法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2009/0162853号に記載されたカートリッジとともに行うことも、またはそれなしで行うこともできる。本明細書における方法および機器の利点は、被験作用物質を診療現場で添加しうること、および/またはカートリッジの特定のウェルにあらかじめ添加して持ち込めることである。これにより、エクスピボのバイオマーカ―の検査を、任意で診療現場の付近で、生細胞を用いて行うことが可能になる。これらの方法および機器は、新規の予測的バイオマーカ―の開発を推進するために、特定の薬剤に対する細胞感受性をモニターおよび判定するために、ならびに当業者には理解されるであろう他の用途のために、エクスピボで試料を操作する目的で特定の被験作用物質とともに用いることができる。

40

【0080】

例えば、患者由来の固形腫瘍の試料を、診療現場で、解離させ、分配させ、続いて現在利用可能な一群の癌治療薬に対して検査することができる。続いて試料を、必要に応じて

50

安定化および/または固定して、分析することができる。各被験作用物質に関する結果に応じて、医師は、診療現場またはその付近で、個々の患者の腫瘍に対してどの治療薬が最も有効であると考えられるかを敏速に決定することができる。この個別化された医療は数多くの利点をもたらす、特に、標的化された癌治療薬およびレジメンを迅速に費用対効果の高い様式で使用することができる。

#### 【0081】

本発明の態様は、少なくとも1つの作用物質を投与して、標的エクスピバイオマーカーまたは生体分子に対する測定可能な量的または質的な効果を生じさせることによって、分配された細胞（例えば、癌細胞）を分析することを対象とする。量的または質的な効果は、細胞経路の活性化または阻害であってよい。例示的な細胞経路には、代謝経路、複製経路、細胞シグナル伝達経路、発癌シグナル伝達経路、アポトーシス経路および血管新生促進経路が非限定的に含まれる。例えば、量的または質的な効果は、Gタンパク質共役受容体、または上皮増殖因子受容体（EGFR）などの受容体チロシンキナーゼ、および下流経路に対するアゴニスト効果またはアンタゴニスト効果の測定値であってよい。

10

#### 【0082】

さまざまな態様において、アレイ、固相酵素免疫アッセイ法（ELISA）、マルチプレックス法、bioplex、ルミネックス、質量分析法、フローサイトメトリー、ノーザンブロット法、サザンブロット法、ウエスタンブロット法、およびラジオイムノアッセイ法（RIA）から選択される1つまたは複数の手法を用いて、細胞および/または分子を分析する。他の態様において、核酸を分析するための当技術分野において公知の任意の装置を用いて、細胞および/または分子を分析する。他の態様において、対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、試料の一部をエクスピボでモジュレーターにより刺激した後の分子のレベルまたは状態との差異は、コンピュータを用いて決定される。

20

#### 【0083】

別の局面において、本発明は、治療作用物質または治療レジメンに対する反応性に基づいて患者を層別するための方法を提供する。本方法は、対象由来の試料中の分子の基礎レベルまたは基礎状態と、試料の一部をエクスピボでモジュレーターにより刺激した後の該分子の該レベルまたは該状態との差異を決定する段階であって、値として表される、該分子の基礎レベルまたは基礎状態の該差異が、治療作用物質または治療レジメンに対する正または負の反応を示す段階を含む。すなわち、正の反応により、対象が治療過程に対するレスポンスであることが示される。同様に、負の反応により、対象が治療過程に対する抵抗性を有することが示される。

30

#### 【0084】

本明細書に記載した通り、本発明を用いて処理した細胞は、それらに対して行われる多様な細胞分析を可能にするさまざまな方式で調製および安定化することができる。例えば、細胞を、核酸分析、タンパク質分析のために調製すること、および/または生細胞プロンプを用いて分析することができる。

#### 【0085】

核酸分析のためには、RNA later（登録商標）、RNA Protect Cell Reagent（登録商標）（いずれもQiagenから入手可能）などの安定化試薬、またはエタノールを細胞に加える。続いて、安定化された細胞を任意で溶解させること、または関心対象の核酸を他の様式で抽出することができる。抽出されて精製された核酸を、続いて、例えばPCR法を用いて分析することができる。

40

#### 【0086】

いくつかの態様において、本明細書に記載された方法は、さらなる分析のための核酸分子を生じさせる。これらの試料に関しては、分散後および任意での濃縮後に、核酸を安定化して、または抽出（任意で）して、高品質および多くの量の核酸分子を生じさせることができる。これは例えば、被験作用物質に対する曝露後に所望の細胞を溶解させ、続いて、逆転写酵素およびDNAプライマーを用いてcDNAを入手することによって行うことができる。DNAプライマーには、ポリAに対して相補的な非特異的プライマー、例えばオリゴ（dT

50

) 12-18、または関心対象のmRNA転写物に対して相補的な特異的プライマーが含まれる。当業者は理解するであろうが、細胞は、化学的または機械的な手段などの種々の方法を用いて溶解させることができる。

【0087】

任意で、バイオマーカー情報の検出および/または保持のための試薬によって細胞を安定化し、例えば逆転写酵素およびDNAプライマーを用いてcDNAを入手して、下流分子分析のためにRNA、DNAおよびタンパク質を調製することもできる。

【0088】

タンパク質分析または核酸分析のためには、全細胞または溶解細胞のいずれを用いることもできる。単離されたチャンバー、例えばスライドガラスに試料が付着するように、無傷の全細胞をポリマーによって固定および安定化することができる。続いて、これらの試料を、例えば免疫組織化学(IHC)分析などの分析に供する。溶解した細胞または他の様式で破壊した細胞は、ウエスタンブロット法などのアッセイ法に用いることができ、安定化も固定も必要としないと考えられる。

10

【0089】

病理医による形態学的検査およびIHCによるタンパク質分析のためのスライド調製物が、本明細書に記載された方法の生産物であってもよい。したがって、形態学および/または免疫組織化学による分析のために、任意でポリマーを用いて、細胞をスライドガラス上に調製することもできる。

【0090】

生細胞プローブ分析は、細胞が活着している場合に該細胞を処理する方法の任意の時点で、分子プローブ(MitoTracker(登録商標)など)を添加することを含みうる。この生細胞プローブの添加は固定の前に行うべきであり、そうしなければ細胞を死滅させることになる。例えば、そのようなプローブは、細胞安定化の前または後であるが細胞固定の前に、添加することができる。

20

【0091】

いくつかの態様において、細胞は、その後の分子分析およびマーカーの検出を可能にする任意の適した手段によって安定化および固定することができる。一般に、ホルマリンなどの架橋固定剤は、好ましくないが、その後の分析に干渉しないと考えられる少量なら存在してもよい。バイオマーカーが特定の1つまたは複数の遺伝子の発現である場合、1つの態様においては、細胞を溶解させ、逆転写酵素および適したプライマーに曝露させて、細胞内のmRNA転写物のcDNA転写物が生成されるようにする。cDNAはmRNAよりも分解を受けにくいいため、これにより、その後の分析が容易になる。

30

【0092】

いくつかの態様においては、以下のうちのいずれかまたは以下のすべてを安定化するために、 $1 \times 10^4$ 個またはそれ以上の細胞を処理する：RNA、DNA、タンパク質および/またはリンタンパク質。

【0093】

いくつかの態様においては、細胞を処理後に固定してもよい。例えば、風乾法、アルコールなどの化合物、例えばメタノールもしくはエタノールなどの低級アルコールを含む固定剤の添加、ホルマリンの添加、RNアーゼ阻害物質の添加、アガロースの添加、ポリエチレングリコールの添加、ポリ1-リジンの添加、または1つもしくは複数のキレート剤もしくは抗酸化剤の添加といった、任意の適した固定の手段を用いることができる。いくつかの態様において、固定剤にはアガロース、ポリエチレングリコール、オクチルフェノキシ-ポリエチレングリコール、ポリ-1-リジン、試薬級アルコールおよび水が含まれる。

40

【0094】

別の局面において、本発明の方法は、対象由来の固形組織細胞、例えば固形腫瘍を有する動物またはヒト対象由来の固形腫瘍細胞を、例えば、選択された標的化薬剤に対する細胞の感受性の判定のために調製するための方法を含む。一例となる方法は、(a)所望の細胞を含む固形組織を対象から入手する段階；(b)該組織を単独の生細胞および/または

50

100個を上回らない、例えば10～100個の生細胞の凝集物に（例えば、剪断力を用いて）分散させる段階；（c）試料を濃縮する段階、例えば、混入材料を生細胞から除去する段階；（d）該生細胞を単離されたチャンバー中に被験アリコートとして分配する段階；（e）該生細胞を1つまたは複数の被験試薬に曝露させる段階；ならびに（f）該細胞を固定剤および/または安定化剤（例えば、RNA、DNA、タンパク質および/またはリンタンパク質を安定化する剤）で処理して、腫瘍細胞および/またはマーカーをさらなる分析のために固定する段階を含むことができ、腫瘍細胞および/またはマーカーの固定を、該対象から組織を取り出してから4時間以内に、自動化方式または手作業方式で完了させる。

【0095】

本発明の別の態様は、細胞の検査の方法であって、固形腫瘍細胞を哺乳動物（例えば、ヒト患者）から取り出して、細胞の大半が、例えば、該細胞の少なくとも65%、例えば、該細胞の少なくとも75%が、生存しておりかつ体外で複製していない間に、該細胞のすべてまたは一部分をエクスピボで1つまたは複数の被験試薬に曝露させ、かつ、該細胞を、任意で、細胞性のDNA、RNA、タンパク質および/またはリンタンパク質を含むバイオマーカー情報を保持させることのできる固定剤（例えば、ポリマー）によって安定化する方法を提供する。これらのバイオマーカーは、当業者に公知の分子分析を用いて、または本明細書に開示された新規エクスピボバイオマーカー検査を用いて、検査することができる。

10

【0096】

以下の実施例は、本発明の利点および特徴をさらに例示するために提供されるものであり、本発明の範囲を限定することは意図していない。それらは用いられることができると考えられるものの典型であるが、当業者に公知の他の手順、方法または手法を代わりに用いてもよい。

20

【実施例】

【0097】

実施例1

リンタンパク質アレイの機能的シグナルプロファイル

図1は、29種の異なるリンタンパク質を含むリンタンパク質アレイに由来するデータをまとめた棒グラフである。このデータは、EGFで処置した3種の乳癌細胞株に由来する。バーは、EGF刺激を行っていない基礎状態と比較したリンタンパク質の上方制御を表している。これらの細胞株が、これらの細胞のシグナル伝達ネットワークに関する情報を与える、EGF刺激に際して上方制御される極めて異なるリンタンパク質のセットを提示していることに注目されたい。

30

【0098】

本明細書に提示したものに類似した生データを用い、アルゴリズムを用いることで、各腫瘍に関する「プロファイル」が生成されると考えられる。例えば、以前に決定したカット値に基づき、個々の各リンタンパク質のレベルに対して、0の、低い、中間のおよび高い「スコア」を指定することができる。続いて、腫瘍内の分析した各タンパク質からのスコアを集めて、機能的シグナル伝達プロファイルと命名した群にすることができる。各プロファイルは腫瘍細胞の機能的状態に関する情報を与えられ、続いてそれを用いて、腫瘍の標的化薬物感受性/抵抗性を予測することができる。5種の乳癌細胞株のセットに関するそのような機能的シグナル伝達プロファイルの一例が、図2Aおよび2Bに示されている。

40

【0099】

実施例2

乳癌細胞の機能的層別は予測的治療戦略を可能にする

ほとんどの標的療法は、有効な予測的バイオマーカーを依然として有していない。既存のクラスのバイオマーカーの大きな限界は、分子標的薬によって標的化されるシグナル伝達ネットワークに関する機能的情報を持たないことである。本発明は、腫瘍生細胞によって産生されるエクスピボバイオマーカーに基づく機能的アッセイ法を提供する。プロファイルは、MEK阻害物質の存在下または非存在下における短期的な上皮増殖因子（EGF）刺激

50

によって誘発される。その結果起こるシグナル伝達リントタンパク質レベルの変化を利用して、腫瘍細胞株を機能的群に層別する機能的シグナル伝達プロファイルを生成させる。この機能的シグナル伝達プロファイルは、腫瘍生検試料処理に適用しうる自動化プラットフォームによって実現可能である。

#### 【0100】

乳癌細胞株 (BT-474、MDA-MD-231、SKBR3、HCC-1937、BT-20、T47D、MCF-7、BT-549) を増殖させ、穏やかな擦過によってプレートから取り出して、FNA生検試料を模した状態にする。取り出した後に、細胞をSnapPath (商標) 腫瘍生細胞処理プラットフォーム (BioMarker Strategies, LLC) に入れて、エクスピボのバイオマーカーを惹起させる。SnapPath (商標) は、試料を分散させ、腫瘍細胞を濃縮し、被験ウェルに等分し、MEK阻害物質 U0126 (1 μM) の存在下または非存在下においてEGF (200ng/ml) によるエクスピボ刺激を行い、続いてBioplexプラットフォームを用いて細胞溶解物を以下のリントタンパク質について分析する: p-Erk 1/2、p-AKT、p-EGFR、p-Stat3 (BioRad)。リントタンパク質のレベルに基づき、各細胞株に関する機能的プロファイルを作成する。

#### 【0101】

U0126の存在下でEGFにより刺激した乳癌細胞株の機能的シグナル伝達プロファイルにより、層別を可能にする明確に異なる機能的群が明らかになった。2つの機能的群がpAKTリン酸化レベルに基づいて特定されている。一方の群は、ばらつきがあるが低レベルのp-AKT阻害を呈するものの、別の群は、p-AKTの予想外の上方制御を示す。この2つ目の群は、MEK阻害に対しては抵抗性であるがMEK/AKT阻害の組み合わせに対しては感受性があると考えられる。他に2つの機能的群がpEGFRリン酸化レベルに基づいて特定されている。一方の群は、ばらつきがあるが弱いp-EGFR阻害を呈するものの、もう一方の群は、p-EGFRの予想外の上方制御を示す。この2つ目の群は、MEK阻害に対しては抵抗性であるがMEK/EGFR複合阻害に対しては感受性があると考えられる。

#### 【0102】

ヒト癌の機能的シグナル伝達プロファイルにより、従来のバイオマーカーでは得ることのできない腫瘍の層別を可能にするシグナル伝達ネットワークに関する特有な詳細が明らかになった。これらのプロファイルは標的化薬物感受性または抵抗性と相関する可能性があり、標的化剤による併用療法を含む、適切なコンパニオン診断 (companion diagnostics) が得られる可能性がある。そのような機能的プロファイルは、自動化プラットフォーム上で少数の腫瘍細胞から再現性を伴って誘発させることができ、このことは予測的検査に向けたこのアプローチがヒト腫瘍生検試料に対して可能であることを示唆する。

#### 【0103】

実施例3

#### 腫瘍生細胞から誘発したリントタンパク質の機能的シグナル伝達プロファイルに基づく乳癌の層別

異常なシグナル伝達ネットワークは、既存の分子標的剤 (MTA) および間もなく登場する分子標的剤の一般的な標的である。残念ながら、治療選択の手引きとなるほとんどの予測的バイオマーカーは、シグナル伝達タンパク質それ自体の動的評価ではなく、DNA突然変異または転写プロファイルを介したシグナル伝達の間接的評価に基づく。乳癌生細胞の増殖因子刺激に際して誘導されるシグナル伝達リントタンパク質のセットに由来する機能的シグナル伝達プロファイルに基づく乳癌の分類は、固定組織または凍結組織を利用する間接的な方法よりも正確な、MTA選択のためのシステムをもたらす可能性が高い。

#### 【0104】

本実施例では、エクスピボ刺激に応じて腫瘍生細胞から誘発した機能的シグナル伝達プロファイルに基づく複数の乳癌モデルシステムの層別の実証を提示する。乳癌細胞株 (MCF-7、HCC-1937、MDA-MB-231、BT474およびSKBR3) をビヒクル (対照) に曝露させるか、または200ng/mlの上皮増殖因子 (EGF) で5分間刺激し、続いて溶解させて、タンパク質を抽出する。EGFが関与するシグナル伝達経路を図3に示している。6種のリントタンパク質 (pEGFR、pErk、pAKT、pP70S6K、pGSK3 およびpSTAT3) の平均蛍光強度 (MFI) レベルを、6

10

20

30

40

50

つずつの組として、多重ビーズ免疫アッセイ法 (BioPlex、BioRad) を用いて決定し、log 2 (MFI刺激下/MFI対照) と定義されるモジュレーションスコア (MS) をそれぞれについて算出する。試料の収集および処理の方法は図4および5に示されている。中央値 (0.66) および四分位数間範囲 (IQR) (1.54) と比較したパーセンタイルにより、スコアのランク付けを行う。中位レスポナーは、75パーセンタイル (2.20) と、75パーセンタイルに IQRを加えた数 (3.74) との間のMSを有するものと分類される。高レスポナーはMSが3.74を上回るものである。低レスポナーはMSがIQRと75パーセンタイルとの間 (1.54-2.20) にあるものであり、非レスポナーはMSが1.54未満と定義される。

【0105】

乳癌細胞株の機能的層別を図6に示し、機能的層別に基づく細胞株の階層的クラスタリングを図7に示している。EGF刺激は、中程度に反応する (2.57) BT474を除くすべての細胞において、高レベルのEGFR-リン酸化をもたらす。pErkに関するMSは、MCF-7細胞では高く (3.92)、HCC 1937では中位 (2.89) であり、検査した他の株ではなしであった。中位のSTAT-3リン酸化はMCF-7細胞 (2.34) のみで観察され、一方、pAKTの低MSはSKBR3 (1.78) のみで観察される。5種の細胞について検査した他のマーカーはすべて非レスポナー (<1.54) であり、pGSK3およびpP70S6Kについては5種の細胞株すべてでMS<1.0が得られている。興味深いことに、6種のタンパク質すべての相対的なMS順位は細胞株ごとに異なり、このことは層別に関してさらに可能性があることを示唆する。

10

【0106】

単層細胞株とSanpPath (商標) で処理した細胞株との相関関係を図8に示し、処理した細胞株のクラスタリングを表1に示している。本実施例は、SnapPath (商標) が細胞株および異種移植片における機能的層別を行えることを提示している。SnapPath (商標) で処理した細胞株と異種移植片との相関関係を、図9 (HCC-1937) および図10 (MDA-MB-231) に示している。

20

【0107】

(表1) SnapPath (商標) で処理した細胞株のクラスタリング

	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								-

30

40

【0108】

図11は、機能的層別および潜在的薬物相関関係との関係を示しており、薬物感受性および刺激後の誘導変化倍率が図示されている。図12は、機能的層別と潜在的治療選択肢との関係を示している。異なる乳癌細胞株は特有の機能的リントタンパク質シグナル伝達プロファイルを呈しており、それにより、個々のシグナル伝達経路活性化に基づいて腫瘍を層別するための機構がもたらされる。

【0109】

図13は、潜在的薬物感受性がTNBCの機能的シグナル伝達プロファイルと関連していた説

50

明図を示している。上の列はpAKT、pErkおよびpEGFRを含む。下の列はpGSK、pSTAT3およびP70S6kを含む。図14は、エクスピボでの層別および細胞の機能的回路の分析が、SnapPath（商標）システム上での薬物阻害によって可能であるという説明図を示している。この分析もpAKT、pErk、pGSK、p70S6k、pSTAT3およびpEGFRを含む。

【0110】

SnapPath（商標）システムは、細胞株および異種移植片腫瘍から機能的シグナル伝達プロファイルを惹起することのできる自動化プラットフォームである。SnapPath（商標）システムから誘発された機能的シグナル伝達プロファイルを薬物の感受性および抵抗性のデータと関連づけて、予測診断プラットフォームの基盤とすることができる。

【0111】

本発明はさらに、本明細書に記載された方法によって得られるさまざまな細胞を用いることによって、作用物質、化合物、医薬、毒物などの生理的機能または毒性を評価するための方法も提供する。

【0112】

実施例4

#### 黒色腫の機能的シグナル伝達プロファイル

黒色腫は、細胞増殖、生存およびアポトーシスを制御するいくつかの分子経路の複雑かつ種々雑多な相互作用を通じて発症することが近年認識されている。

【0113】

特に、RAS-RAF-MEK-ERK経路は重要な役割を果たすと考えられる。黒色腫のおよそ20%はNRASに突然変異を含み、別の66%はBRAFに突然変異を含む。黒色腫の病態におけるそれらの役割に加えて、これらの分子的欠陥は有用な薬物標的であることも明らかになっている。例えば、RAF阻害物質PLX-4032は、第I相および第II相臨床試験において顕著な奏効率を示している。残念ながら、そのようなRAF阻害物質による治療を受けた患者では一次抵抗性および獲得抵抗性が常に出現する。

【0114】

驚いたことに、この抵抗性は、標的タンパク質の薬物結合ドメインにおける二次突然変異の公知の機構が原因ではない。その代わりに、患者はMAPK経路を再活性化させるか、または代替的なバイパスシグナル伝達機構を利用している。突然変異に関する単純なDNA解析ではこれらの抵抗性機構を解明することができないため、機能的アッセイ法は抵抗性を特定して適切な標的化治療法を予測するための理想的アプローチである（Soon, Soon et al. The Ochsner Journal 2010;10(2):93-98; McMahon, M: Parsing out the complexity of RAF inhibitor resistance. Pigment Cell & Melanoma Research. Article first published online: 12 JAN 2011）。

【0115】

表2は、機能的シグナル伝達プロファイルを誘発させるために用いた黒色腫細胞株の遺伝子型および表現型をまとめており、これらは実際のヒト黒色腫試料の範囲に相当する。

【0116】

図15~17および19~36に示されているとおり、機能的シグナル伝達プロファイルは、黒色腫試料を、それらのシグナル伝達回路の差異に基づいて識別し、層別することができる。そのようなプロファイルは、さまざまなタンパク質（pErk、pAKT、pP70S6k、pGSK3、pEGFRおよびSTAT3を含む）の基礎レベルを、細胞をさまざまな作用物質（EGF、TPA、他の増殖因子を含む）に曝露させた際のレベルと比較することによって作成することができる。加えて、黒色腫細胞をさまざまな作用物質（MEK阻害物質、BRAF阻害物質など）に曝露させることによってシグナル伝達ネットワークを擾乱させることで、薬物抵抗性機構および癌遺伝子バイパス機構の解明を含む、さらなる機能的情報を明らかにすることができる。以上を総合すると、このような機能的シグナル伝達プロファイルは、予後予測的、予測的、薬力学的またはモニタリング用の検査の基盤となりうる。

【0117】

（表2）黒色腫細胞の遺伝子型および薬物抵抗性に関する表現型

黒色腫細胞	遺伝子型	PLX-4032表現型
SK-MEL-31	BRAF 野生型、RAS 野生型	抵抗性
SK-MEL-28	BRAF 変異体 (V600E)	感受性
SK-MEL-2	NRAS 変異体	不明
RPMI-7951	BRAF 変異体 (V600E) COT増幅	抵抗性

## 【 0 1 1 8 】

図15～17および19～36はまた、黒色腫試料を識別し、薬物感受性または薬物抵抗性と相関するという、機能的シグナル伝達プロファイルの特徴のいくつかの具体例も実証している。例えば、図15は、SK-MEL-31細胞株およびRPMI-7951細胞株がEGF刺激に際してpEGFRの最も高度な誘導を呈することを示している。驚いたことに、これらの2種の細胞株はBRAF阻害物質PLX-4032に対する抵抗性も呈する。また、さまざまなタンパク質の基礎レベルによっても黒色腫を識別しうる。例えば、SK-MEL-31、SK-MEL-28、SK-MEL-2およびRPMI-7951細胞株は、pERK (MFIはそれぞれ平均1816、3880、1948および776) およびpAKTの異なる基礎レベルを呈する。さらに、図16は、U0126によるMEK阻害によっても、pERKおよびpEGFRによって示されるものなどの、側副経路の予想外の増強を含む、各細胞株の独特な機能的回路が実証されている。図17は、TPAによる刺激後のpErkの誘導を介する、PLX-4032抵抗性細胞株RPMI-7951の分化を示している。さらに、図19～34は、TPA、EGF、PDGF によるモジュレーション、またはPLX-4702もしくはU0126による阻害に基づいて、黒色腫細胞株を識別しうることを実証している。

## 【 0 1 1 9 】

図19～36は、TPA EGF、PDGF によるモジュレーション、PLX-4702もしくはU0126による阻害に基づいて、黒色腫細胞株を識別しうることを実証している。例えば、図19および20は、TPAおよびEGFによってモジュレートした4種の異なる黒色腫細胞株からの、惹起された機能的シグナル伝達プロファイルを示している。図20に見られる通り、RPMI-7951およびSK-MEL-31はEGFによる刺激後に異なるレベルのpEGFRを有する。

## 【 0 1 2 0 】

図21および22は、4種の黒色腫細胞株における、EGFモジュレーションの非存在下 (図21) および存在下 (図22) での、U0126によるMEK阻害の影響を実証している。SK-MEL-28細胞におけるEGF刺激およびMEK阻害の非存在下では、pErkが阻害され、一方、pEGFRは活性化される。SK-MEL-31細胞では、阻害後にpErkは同等なレベルで阻害されるが、pAktは上方制御される。同等な傾向は図22でも実証されている。

## 【 0 1 2 1 】

図23および24は、黒色腫細胞株に対するPDGF 刺激、ならびにPDGF 刺激のMEK阻害の影響を実証している。PDGF 刺激は、RPMI-7951細胞株において、他の黒色腫細胞株と比較して唯一、pPDGFを活性化させた。SK-MEL-21、SK-MEL-28およびRPMI-7951細胞株において、MEK阻害はpErkをおよそ50%減少させる。SK-MEL-2細胞株では、pErkはMEK阻害による影響を受けない。

## 【 0 1 2 2 】

図33および34は、BRAF阻害物質PLX-4702およびMEK阻害物質U0126の存在下における、SK-MEL-28細胞株に対するEGF刺激の影響を実証している。PLX阻害+EGF刺激により、pERK発現は低下したが、MEK阻害ほどには顕著ではなかった。MEK阻害物質およびEGFの存在下ではpMEKも増加した。

## 【 0 1 2 3 】

図35は、RPMI-7951細胞におけるEGF刺激、およびPLX-4072またはMEK阻害の影響を実証している。pEGFRはいずれのEGFモジュレーション後にも劇的に増加し、一方、pErkはMEK阻害後に減少した。

10

20

30

40

50

## 【0124】

図36は、MEK阻害物質U0126またはBRAF阻害物質PLX-4702の非存在下または存在下におけるRPMI-7951細胞のPDGFR 活性化を実証している。pMEKはPLX-4702の存在下において下方制御されるが、MEK阻害はより有効性が低いと考えられる。

## 【0125】

## 実施例5

膵癌細胞の機能的シグナル伝達プロファイル

膵神経内分泌腫瘍（PancNET）は膵臓の腫瘍の中で2番目に頻度の高いものであるが、それらは関連性のある腫瘍の異種混交的な群である可能性が非常に高い。PancNETの悪性度には大きな違いがあり、増殖速度に関するものなどの、顕微鏡分析または標準的な免疫組織化学検査に基づいて予測することはできない。機能的シグナル伝達プロファイルは、予後不良な腫瘍を特定するという見込み、ならびに適切な標的化治療法の予測を可能にする分子的特徴を特定しうる可能性をもたらす。

10

## 【0126】

図18に示されているとおり、機能的シグナル伝達プロファイルにより、膵臓腫瘍試料をそれらのシグナル伝達回路の差異に基づいて識別して層別することができる。そのようなプロファイルは、さまざまなタンパク質（pErk、pAKT、pP70S6k、pGSK3、pEGFRおよびpSTAT3を含む）の基礎レベルを、細胞をさまざまな作用物質（EGF、TPA、他の増殖因子などを含む）に曝露させた際のレベルと比較することによって作成することができる。加えて、黒色腫細胞をさまざまな作用物質（MEK阻害物質、mTOR阻害物質など）に曝露させることによってシグナル伝達ネットワークを擾乱させることで、薬物抵抗性機構および癌遺伝子バイパス機構の解明を含む、さらなる機能的情報を明らかにすることができる。以上を総合すると、このような機能的シグナル伝達プロファイルは、予後予測的検査、予測的検査、薬力学的検査またはモニタリング用検査の基盤となりうる。

20

## 【0127】

図18はまた、膵癌試料を識別し、薬物感受性または薬物抵抗性と相関するという、機能的シグナル伝達プロファイルのいくつかの特徴も示している。これらの研究には、膵神経内分泌腫瘍または膵臓腺癌を有する個体からの実際のヒト腫瘍試料を利用した。例えば、図18は、4種のPancNETを、TPA刺激に際してのpERKおよびpGSKの誘導によって判定される場合の、それらの機能的プロファイルによって識別しうることを示している。驚いたことに、最も識別性の高い機能的プロファイルを有していた試料（10189；10倍のpERK誘導）は、転移性であった唯一の腫瘍であった。このことは、このような機能的プロファイルが膵臓腫瘍に関する予後情報を与えることを示唆する。また、さまざまなタンパク質の基礎レベルによっても膵臓腫瘍を識別することができる。mTOR阻害物質を含む薬物などの作用物質による擾乱に基づく機能的プロファイルはさらなる情報を与え、そのいくつかは予測的検査の基盤となりうる。

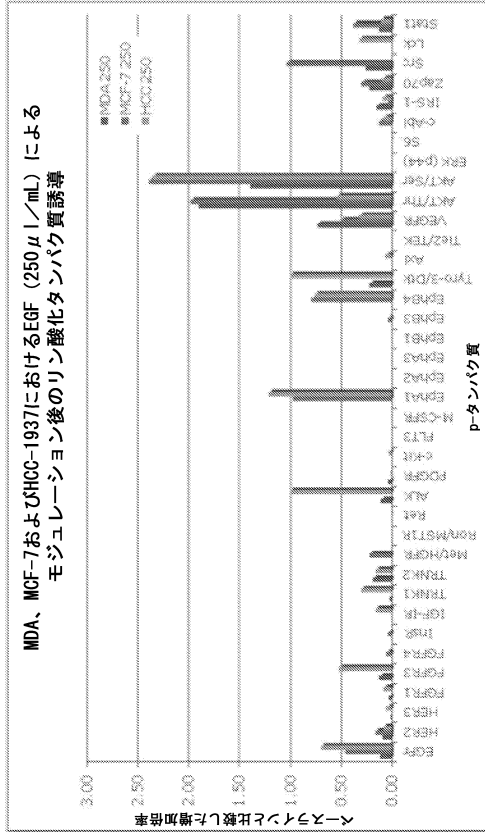
30

## 【0128】

上記の実施例を参照しながら本発明を説明してきたが、修正および変更も本発明の趣旨および範囲に含まれることは理解されるであろう。したがって、本発明は以下の特許請求の範囲のみによって限定される。

40

【図1】



【図2】

ベースライン

	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lek					
Met					
Ron					
高					
中間					
低					
反応なし					

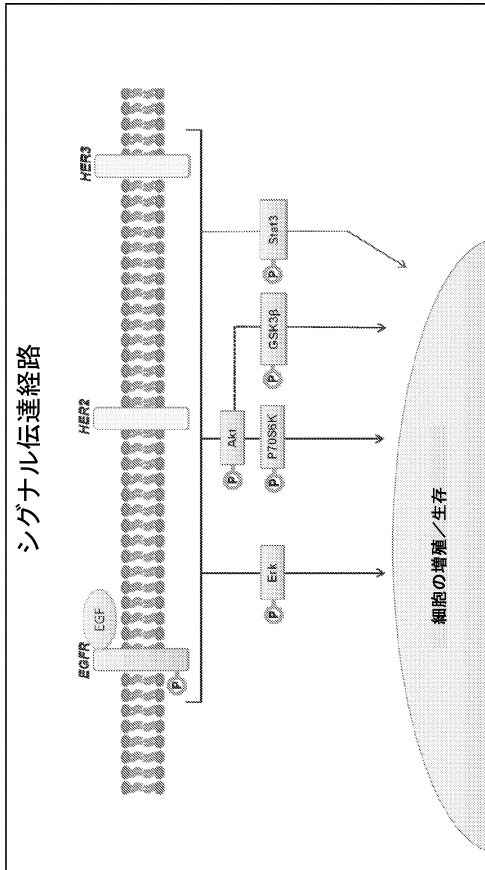
A

EGF刺激下

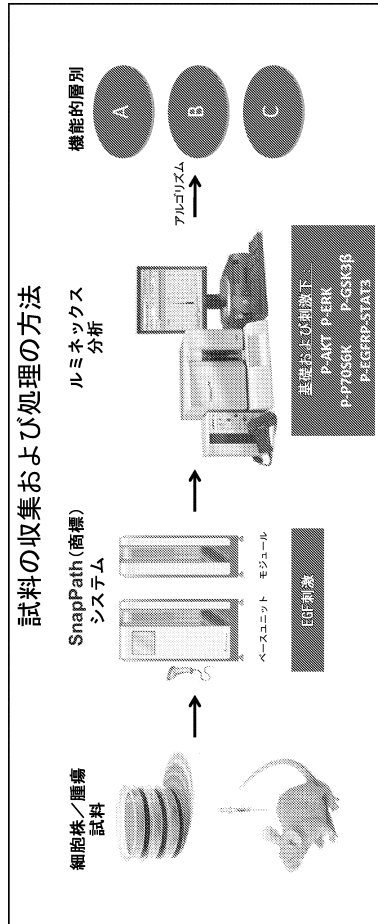
	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lek					
Met					
Ron					
高=1倍を上回る誘導					
中間=0.5~1.0倍の誘導					
低=0.2~0.49倍の誘導					
反応なし=0~0.19					

B

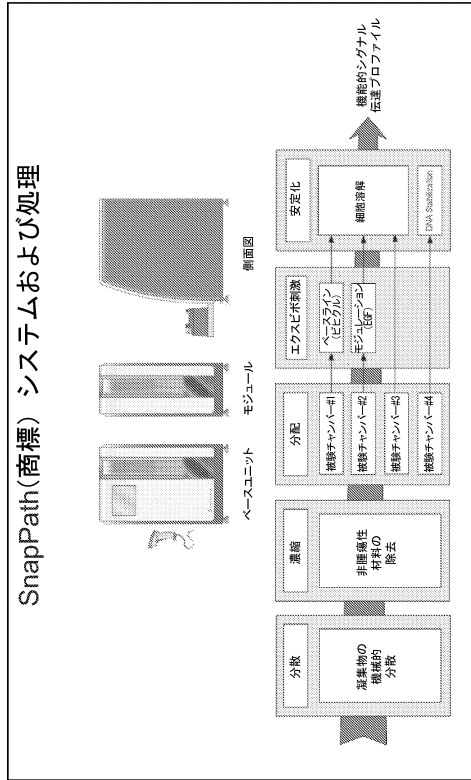
【図3】



【図4】

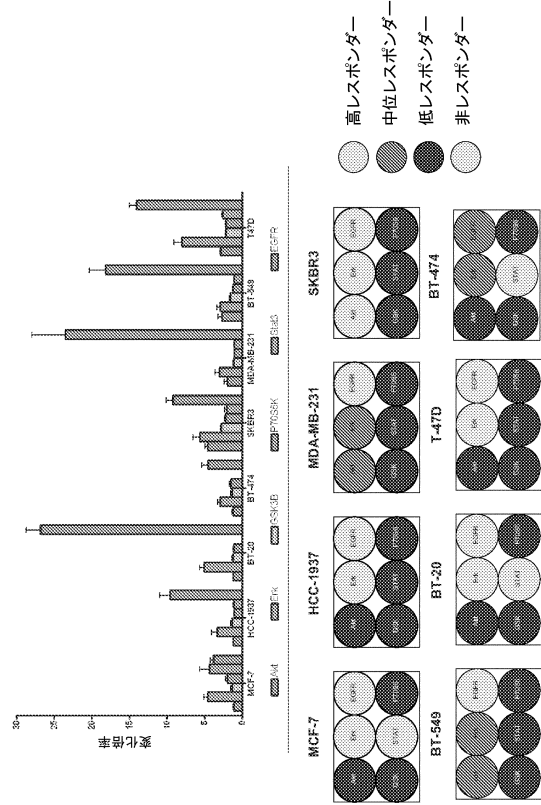


【図5】



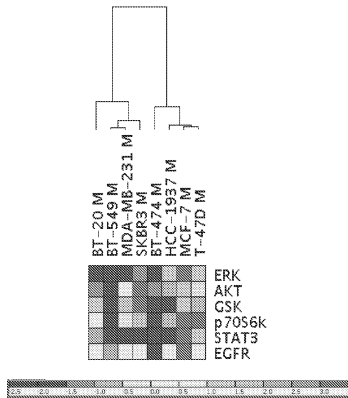
【図6】

単層細胞株の機能的プロファイリング



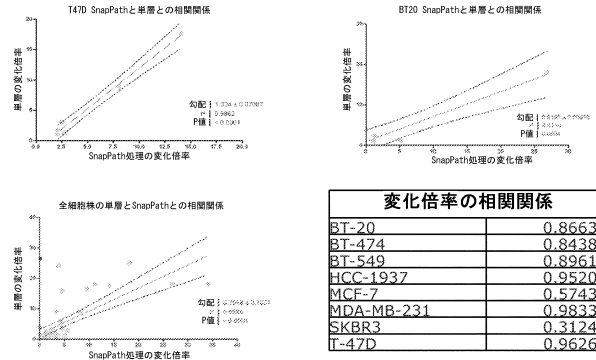
【図7】

細胞株の階層的クラスタリング

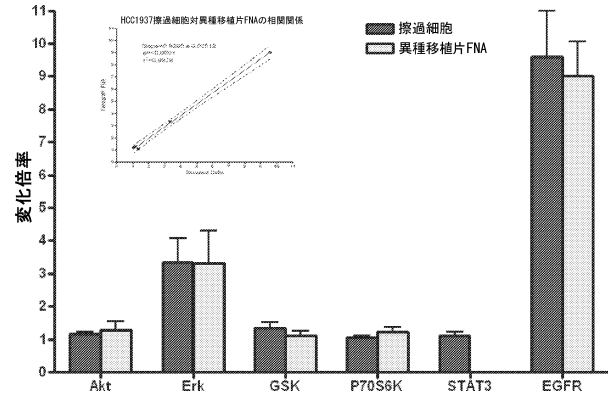


【図8】

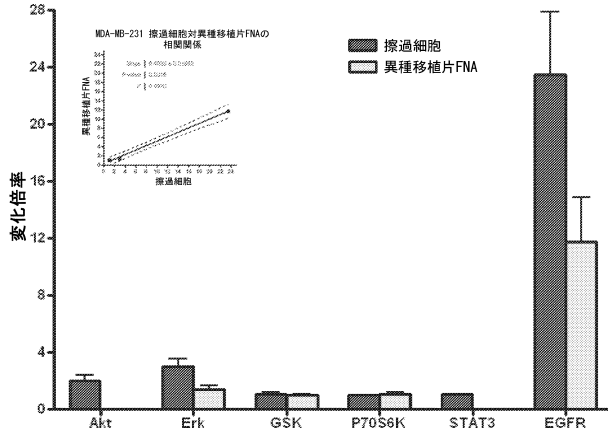
単層細胞株とSnapPath (商標) で処理した細胞株との相関関係



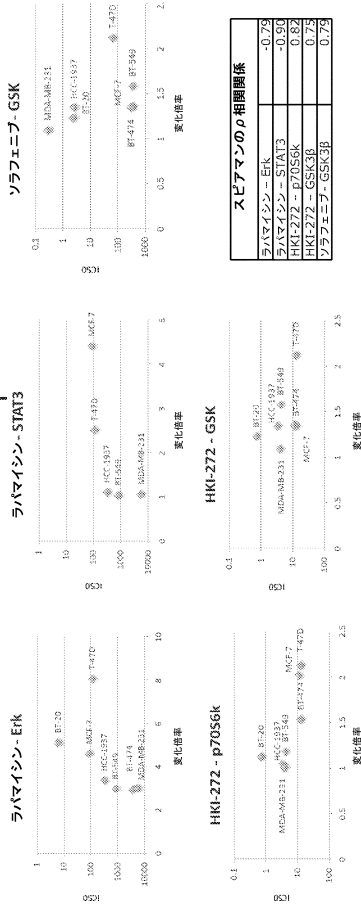
【図9】



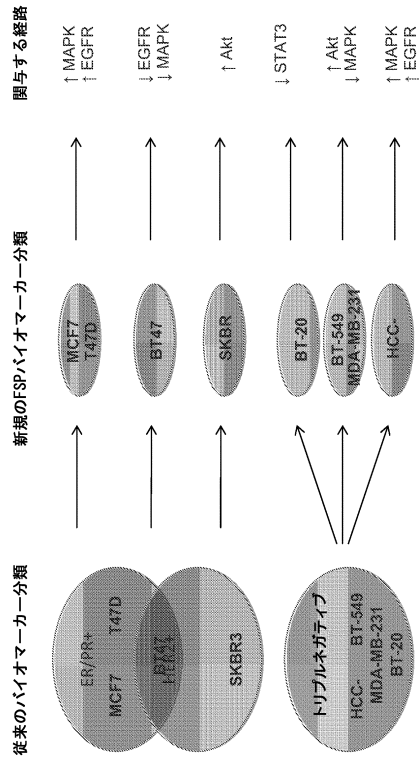
【図 1 0】



【図 1 1】



【図 1 2】

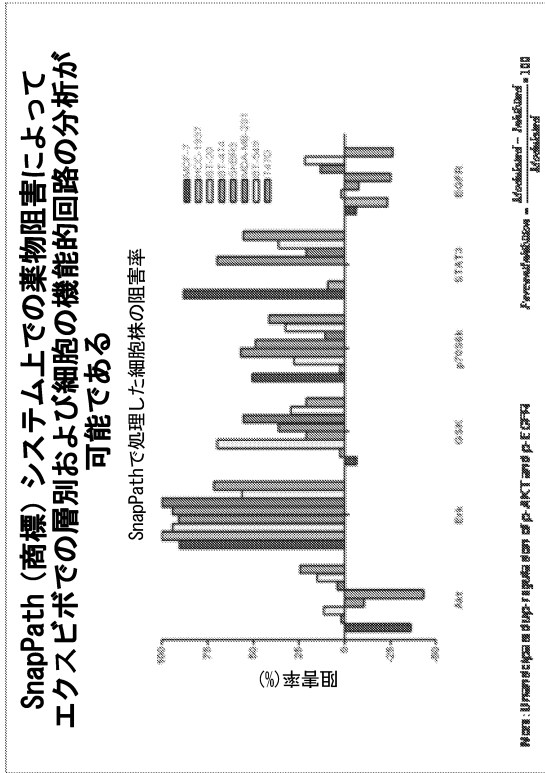


【図 1 3】

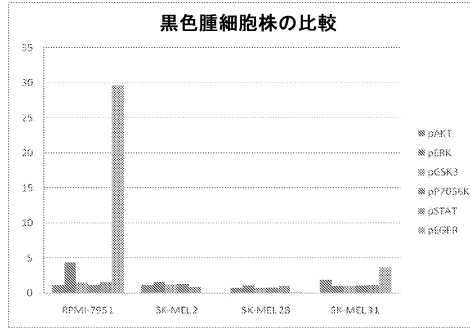
TNBCの機能的シグナル伝達プロファイルと関連した潜在的な薬物感受性

	MDA-MB-231	BT-549	BT-20	HCC-1937
エルロチニブ	X	X	X	X
ゲフィチニブ	X	X	X	X
ラパマイシン	X	X	X	X
イマチニブ	X	X	X	X
ソラフェニブ	X	X	X	X
ラパチニブ	X	X	X	X

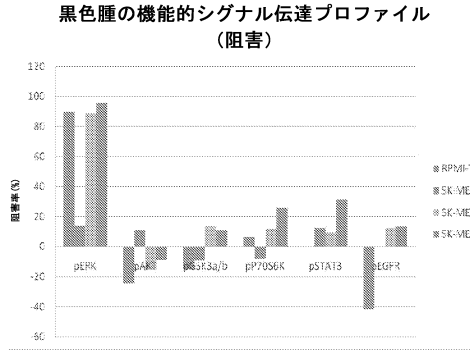
【 図 1 4 】



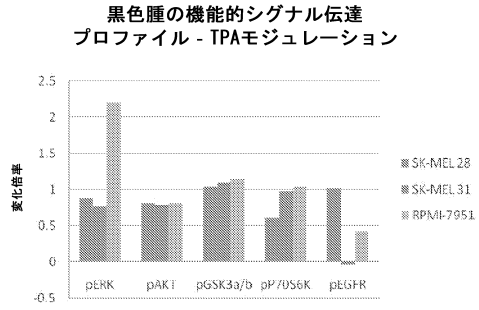
【 図 1 5 】



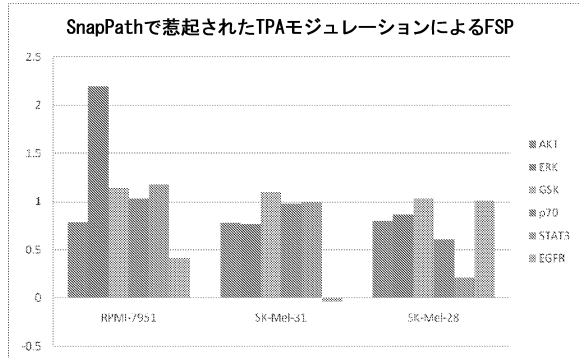
【 図 1 6 】



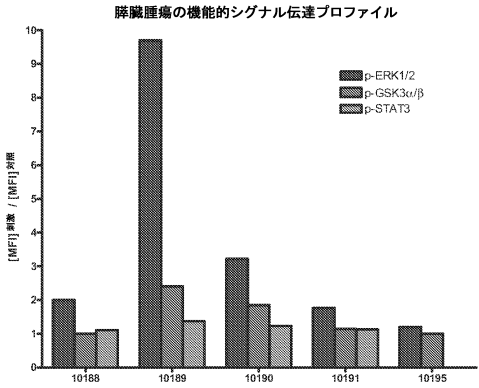
【 図 1 7 】



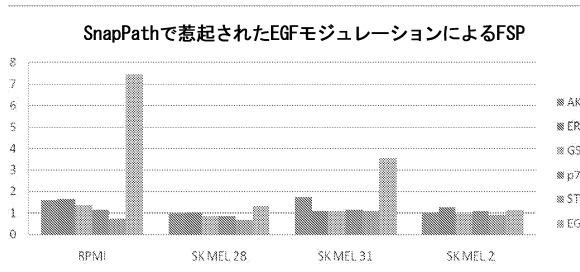
【 図 1 9 】



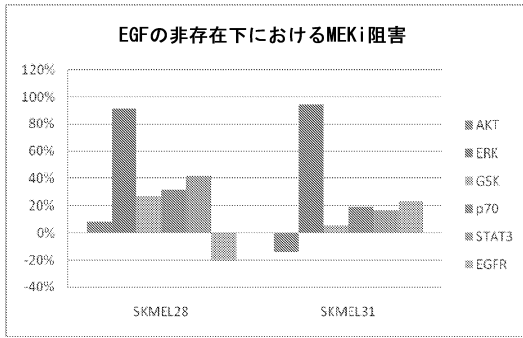
【 図 1 8 】



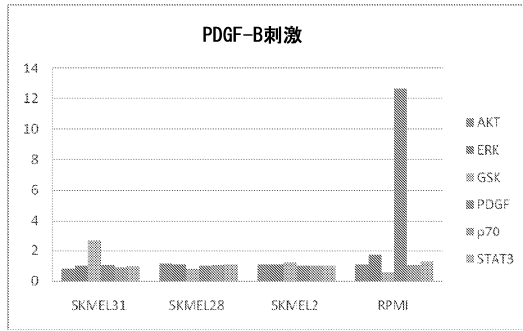
【 図 2 0 】



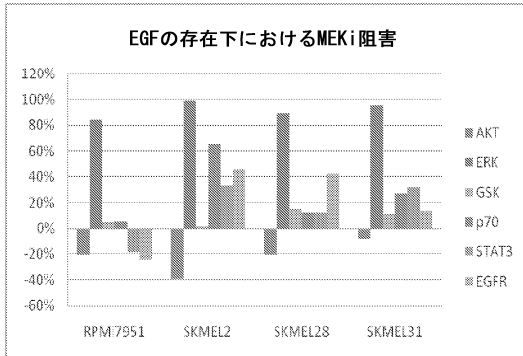
【 図 2 1 】



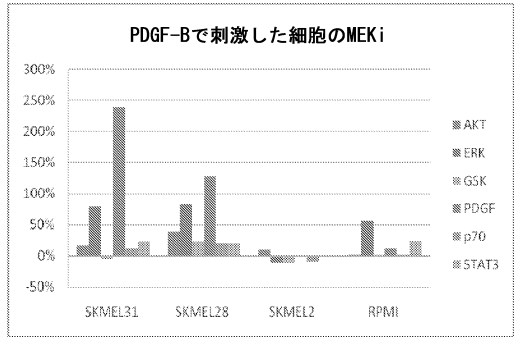
【 図 2 3 】



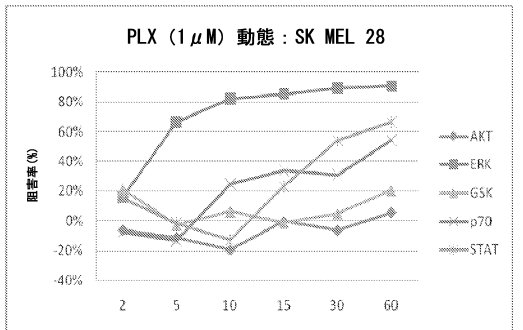
【 図 2 2 】



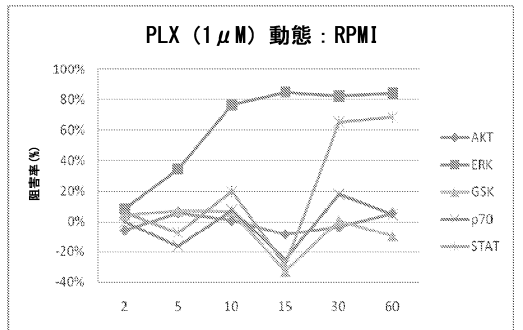
【 図 2 4 】



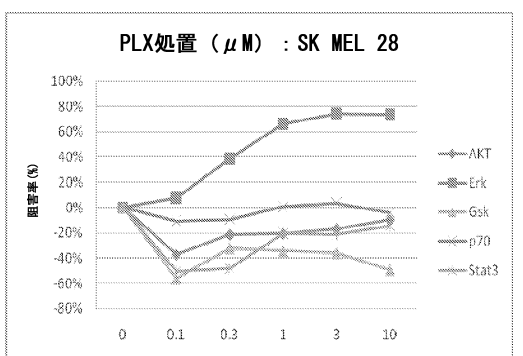
【 図 2 5 】



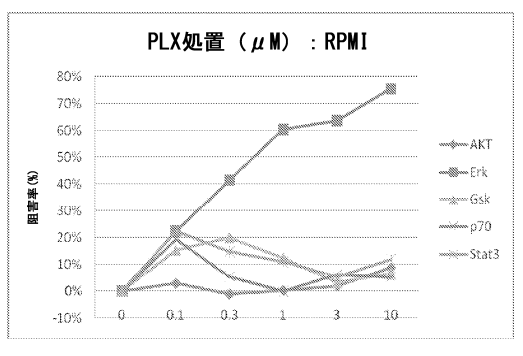
【 図 2 7 】



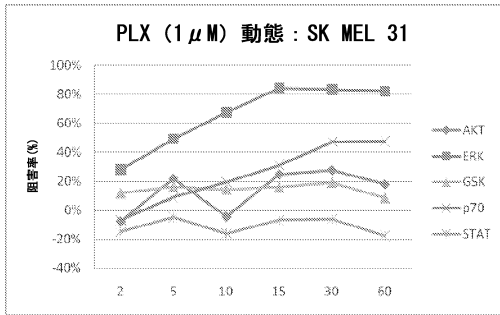
【 図 2 6 】



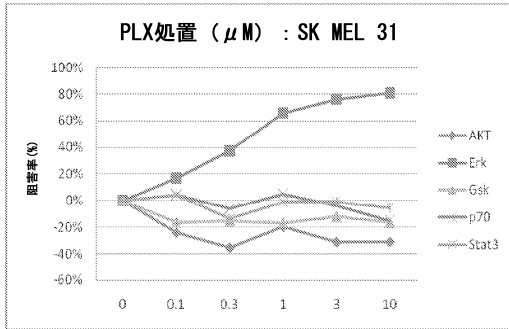
【 図 2 8 】



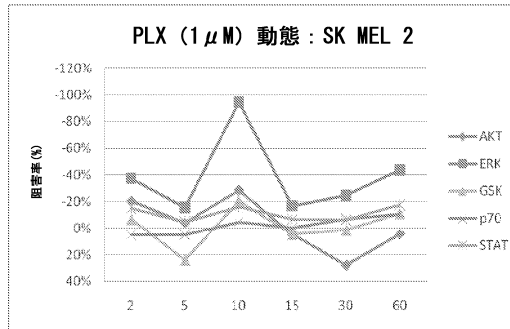
【 図 2 9 】



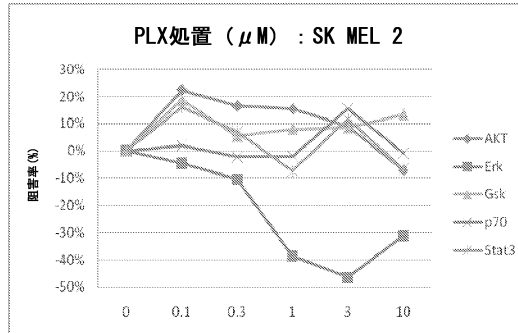
【 図 3 0 】



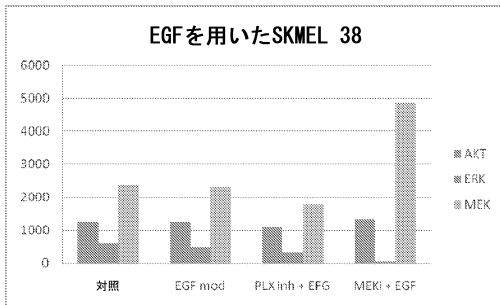
【 図 3 1 】



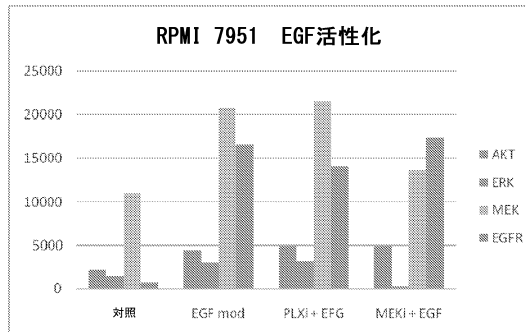
【 図 3 2 】



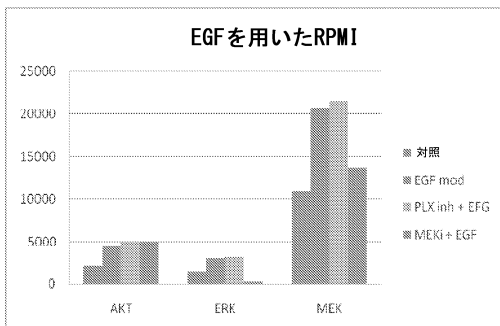
【 図 3 3 】



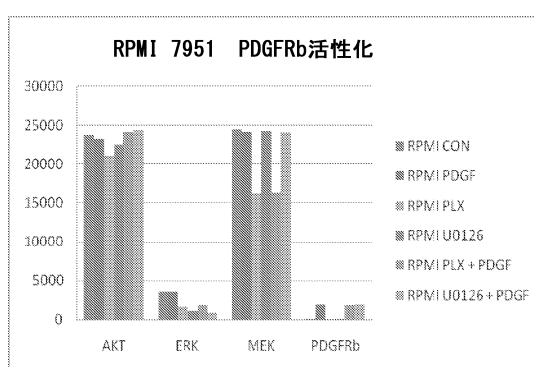
【 図 3 5 】



【 図 3 4 】



【 図 3 6 】



## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/356,495

(32)優先日 平成22年6月18日(2010.6.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 61/325,717

(32)優先日 平成22年4月19日(2010.4.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クラーク ダグラス ピー .

アメリカ合衆国 メリーランド州 ボルチモア タプロ ロード 304

(72)発明者 シャイオヴィッツ アダム

アメリカ合衆国 メリーランド州 ベテスタ バッテリー プレイス 8907

(72)発明者 カブラディラ シリロ

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサーズバーグ ベル チェイス コート 6624

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2009/055052(WO, A2)

特表2008-539794(JP, A)

国際公開第2006/125143(WO, A2)

Douglas P Clark, Ex vivo biomarkers: functional tools to guide targeted drug development and therapy, Expert Rev. Mol. Diagn., 2009年, Vol. 9, No.8, 787-794

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C12Q 1/04

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	预测药物敏感性，耐药性和疾病进展的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6580546B2</a>	公开(公告)日	2019-09-25
申请号	JP2016243869	申请日	2016-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	生物标志物策略公司		
申请(专利权)人(译)	生物标记策略有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物标记策略有限责任公司		
[标]发明人	クラークダグラスピー シャイオヴィッツアダム カブラディラシリロ		
发明人	クラーク ダグラス ピー. シャイオヴィッツ アダム カブラディラ シリロ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/04 C12Q1/68		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N37/00.102 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/09.200 C12N15/12 C12Q1/68.A C12Q1/686.Z G01N33/15.Z G01N33/50.P G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/DA36 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/443146 2011-02-15 US 61/421178 2010-12-08 US 61/356495 2010-06-18 US 61/325717 2010-04-19 US		
其他公开文献	JP2017106923A5 JP2017106923A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明基于以下发现：功能分层和/或信号传导谱可用于诊断疾病状态，确定癌细胞的耐药性或敏感性，监测疾病或对治疗剂的反应性和/或预测治疗结果对于一个主题。本文提供了用于诊断和/或预后患者疾病的测定法。还提供了在开始治疗方案之前评估疾病对靶向治疗剂的抗性或敏感性并监测治疗方案的治疗效果的组合物和方法。还提供了确定样品中分子的基础水平或状态与离体调节剂对活样品的一部分进行体外刺激后分子水平或状态之间差异的方法，其中所述差异表示为指示存在，不存在或患病风险的值。本发明的方法还可用于预测药剂对疾病的作用并监测受试者的治疗过程。

(5) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68

請求項の数 8 (全 47 頁)

(21) 出願番号	特願2016-243869 (P2016-243869)	(73) 特許権者	510114734
(22) 出願日	平成28年12月16日 (2016.12.16)		バイオマーカー ストラテジーズ リミテッド ライアビリティ カンパニー
(62) 分割の表示	特願2013-506214 (P2013-506214) の分割		アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル クラップス プランチ ウェイ 1 5 6 0 1
原出願日	平成23年4月18日 (2011.4.18)		
(65) 公開番号	特開2017-106923 (P2017-106923A)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成29年6月15日 (2017.6.15)		100102118 弁理士 嶋名 雅夫
審査請求日	平成29年1月13日 (2017.1.13)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕季
(31) 優先権主張番号	61/443,146		100119507 弁理士 冨部 俊
(32) 優先日	平成23年2月15日 (2011.2.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/421,178		
(32) 優先日	平成22年12月8日 (2010.12.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物感受性、薬物抵抗性および疾患進行の予測のための組成物および方法