



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월02일

(11) 등록번호 10-2632490

(24) 등록일자 2024년01월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/80 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/80 (2013.01)
G01N 33/5002 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7012951
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월06일
심사청구일자 2021년10월05일
- (85) 번역문제출일자 2018년05월04일
- (65) 공개번호 10-2018-0083853
- (43) 공개일자 2018년07월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2016/000341
- (87) 국제공개번호 WO 2017/059477
국제공개일자 2017년04월13일
- (30) 우선권주장
2015904075 2015년10월07일 오스트레일리아(AU)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020120098403 A*
WO2013156806 A2*
Dzieciatkowska, Monika et al., Vox sanguinis, 2013, Vol. 105, pp 210-218. 1부.*
Pasini, Erica M. et al., Blood, 2006, Vol. 108, pp 791-801. 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
생귀 바이오 퍼티와이. 엘티디
오스트레일리아 뉴사우스웨일스주 2095 맨리 캉가루 스트리트 63
- (72) 발명자
카르스텐, 엘리자베스
오스트레일리아 뉴사우스웨일스주 2152 노스미드캠벨 스트리트 20/14-16
허버트, 벤
오스트레일리아 뉴사우스웨일스주 2121 노스 에핑더글라스 애비뉴 3
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 18 항

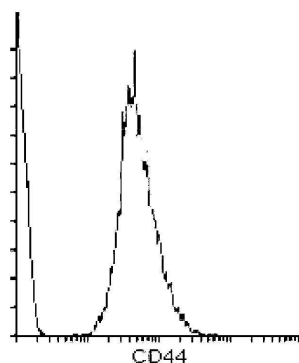
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 혈액 제제 및 프로파일링

(57) 요약

본 발명은 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 혈액 단백질 프로파일을 생성하는 방법에 관한 것이다. 개시된 방법은 혈액으로부터 단백질 프로파일을 생성하고, 단백질 검출을 증가시키는 새롭고 개선된 실험 기술을 나타낸다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/6863 (2013.01)

G01N 2570/00 (2013.01)

(72) 발명자

리들, 앨런

오스트레일리아 뉴사우스웨일스주 2095 맨리 캥가
루 스트리트 63

힐, 카메론

오스트레일리아 뉴사우스웨일스주 2065 레오나르즈
스트리트 서전츠 레인 1201/1

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 혈액 샘플을 수득하고;
 - b) 혈액 샘플로부터 혈장을 분리하여 세포 펠렛을 생성하고;
 - c) 세포 펠렛을 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
 - d) 작은 부피의 적혈구-농축 샘플을 배지에서 항온처리하고;
 - e) 적혈구-농축 샘플로부터 항온처리된 배지로 분비되거나 방출된 하나 이상의 단백질을 검출하되, 하나 이상의 단백질은 염기성 섬유아세포 성장 인자(FGF), 피부 T-세포 유인 케모카인(CTACK), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 간세포 성장 인자(HGF), 인터페론 알파 아형 $\alpha 2$ (IFN- $\alpha 2$), 인터페론 감마(IFN- γ), 인터류킨(IL) 12p35 및 p40 이중이량체(IL-12p70), IL-13, 인터류킨 12p40 서브유닛(IL-12p40), IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, 인터류킨 2 수용체 알파 사슬(IL-2ra), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, 인터페론 감마 유도 단백질 10(IP-10), 백혈병 억제 인자(LIF), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), IFN- γ 에 의해 유도된 모노카인(MIG), 대식세포 염증성 단백질-1 베타(MIP-1 β), 혈소판-유래 성장 인자 B 사슬 동중이량체(PDGF-BB), 간질 세포 유래 인자 1(SDF-1 α), 종양 괴사 인자 알파(TNF- α), TNF- β , TNF 관련 세포사멸 유도 리간드(TRAIL) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF)로 이루어진 군으로부터 선택되며,
- 생성된 단백질 프로파일은 항온처리된 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항온처리 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질이 상기 적혈구-농축 샘플 내 적혈구의 표면 또는 내부로부터 분비되거나 방출된 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 항온처리된 배지에서 하나 이상의 검출된 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 d)의 항온처리된 배지로부터 단계 d)의 적혈구-농축 샘플을 분리하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 분리된 적혈구 농축-샘플을 용해하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 용해된 적혈구 농축-샘플에서 하나 이상의 단백질의 수준을 검출하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 용해된 적혈구 농축-샘플에서 하나 이상의 검출된 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 세포 펠렛을 백혈구제거시키는 것은 텍스트란 침강에 의한 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 d)의 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 항온처리된 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질은 사이토카인인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 항온처리된 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL 및 VEGF로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 단백질인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 항온처리된 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL 및 VEGF로 이루어진 군으로부터 선택된 셋 이상의 단백질인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 생성된 단백질 프로파일은 D-도파크롬 상호변이효소(DDT), 에오타신, 성장 조절 종양유전자 알파(GRO- α), IL-8, IL-10, 단핵세포 화학 주성 단백질-1(MCP-1), 대식세포 이동 억제 인자(MIF), 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α) 및 발현되고 분비된 활성 시 조절되는 정상 T-세포(RANTES)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

- a) 혈액 샘플을 수득하고;
- b) 혈액 샘플로부터 혈장을 분리하여 세포 펠렛을 생성하고;
- c) 세포 펠렛을 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- d) 단계 c)의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 수준 및 단계 b)의 분리된 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하고;
- e) 분리된 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 측정된 수준에 대한 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 측정된 수준의 단백질 비를 계산하는 것을 포함하며,

생성된 단백질 프로파일은 적어도 2:1의 값을 갖는 계산된 단백질 비를 포함하고, 하나 이상의 단백질은 FGF, CTACK, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL 및 VEGF로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 단계 c)의 적혈구-농축 샘플 내의 측정된 하나 이상의 단백질이 상기 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구의 표면 또는 내부로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 적혈구-농축 샘플을 용해시켜 용해된 적혈구-농축 샘플을 생성하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 용해된 적혈구-농축 샘플 내의 측정된 하나 이상의 단백질은 상기 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구의 표면, 적혈구의 내부 또는 적혈구의 용해물로부터 유래되는 것인, 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 하나 이상의 단백질은 사이토카인인, 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 혈액학 분야에 관한 것이다. 본 발명은 또한 혈액 내의 단백질 프로파일링 및 특히, 적혈구-농축(red blood cell-enriched) 혈액 샘플 내의 사이토카인 및/또는 케모카인 프로파일을 비롯한 혈액 단백질 프로파일을 생성하거나 생성하는 방법에 관한 것이다.

교차 참조

[0002] 본 출원은 2015년 10월 7일에 출원되고 발명의 명칭이 "혈액 제제 및 프로파일링"인 호주 특허 출원 2015904075 호에 대한 우선권을 주장하며 이에 관련된다. 이 출원은 그 전체가 참고로 본원에 통합된다. 또한, 본 발명에서 참조되는 다른 참고문헌 또는 간행물 또한 그 전체가 참고로 본원에 통합된다.

배경 기술

[0004] 혈액의 단백질 프로파일링은 다양한 목적을 위해 이용된다. 예를 들어, 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 및 혈청/혈장 내의 지표 단백질(indicative protein)의 프로파일링은 질병 진단에서 보편적으로 사용된다. 부가적으로, 혈액 내의 단백질 프로파일을 모니터링하는 것은 치료에 대한 반응성과 경감 또는 퇴행의 징후를 모니터링하는 수단을 제공함으로써 더욱 효과적인 치료적 개입의 지시를 도울 수 있다.

[0005] 사이토카인, 케모카인 및 성장 인자와 같은 혈액 구획 내의 생물학적 지표는 염증, 면역 반응 및 회복에 대한 이해를 제공할 수 있다. 특히, 혈액 내의 프로(pro)- 및/또는 항-염증성 사이토카인 및 케모카인 수준의 검출 및 정량은 면역 상태를 판단하기 위하여 널리 이용된다. 이들 사이토카인 및 케모카인은 일부 질병 상태를 진단 하거나, 질병을 일으킬 소인을 결정하거나 및/또는 예후 결과를 예측하기 위하여 일반적으로 사용된다.

[0006] 전형적으로, 혈액 구획 내의 다양한 단백질의 검출 및 정량은 분리된 혈청/혈장 및/또는 PBMC를 이용하여 평가 된다. 이것은 혈액의 가장 풍부한 세포 성분이며 그 부피의 40%-50%를 차지하는 적혈구(RBC)를 효과적으로 무시 한다. RBC는 가공/분석을 복잡하게 하고/하거나 혈액의 전체적인 단백질 프로파일에 크게 기여하는 것으로 생각 되지 않기 때문에, RBC는 혈장/혈청 및/또는 백혈구에 대한 단백질 분석을 수행하기 전에 기계적으로 제거된다. 따라서, 현재의 분석법은 RBC가 혈액의 단백질 프로파일에 상당히 기여하고/하거나 다르게는 영향을 주는 경우에는 부적절하다.

[0007] 또한, 혈액 채취 기술 및/또는 혈액이 가공되는 방법에서의 불일치가 공지의 단백질 프로파일링의 정확성에 악 영향을 줄 수 있음이 명백해졌다.

[0008] 그러므로, 혈액 내의 단백질 프로파일을 결정하기 위한 보다 포괄적이고 및/또는 일관된 방법이 필요하다. 따라

서, 이들 및 본 명세서에 개시된 다른 문제점을 해결하기 위한 시스템, 방법 및/또는 키트가 필요하다. 본 발명은 본 명세서의 개시로부터 명백해질 것처럼 종래 기술의 단점 중 적어도 하나를 극복 및/또는 완화하는 것에 관한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은 놀랍게도 혈액 단백질 프로파일을 결정하고자 하는 혈액 단백질 프로파일 분석으로부터 일상적으로 제외되는 혈액의 주요 성분인 RBC가 그럼에도 불구하고 상당한 수준의 많은 상이한 단백질(예를 들어, 사이토카인, 케모카인, 성장 인자)의 공급원임을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 개별 혈액 구획(예를 들어, 적혈구, 혈장, 백혈구) 내에서 검출된 다양한 단백질의 수준이 혈액 및/또는 성분이 수집되고 가공되는 방식에 따라 유의하게 상이할 수 있음을 발견하였다. 따라서, 본 발명자들은 RBC에서 새롭게 확인된 단백질의 존재 또는 수준을 평가함으로써 농축 적혈구 샘플의 단백질 프로파일을 생성하는 새롭고 유용한 실험 기술을 만들었다. 상기 새롭고 유용한 실험 기술은 혈액으로부터 단백질 프로파일을 생성하기 위한 현재의 기술에 비하여 상당한 개선이며, 단백질 검출 능력을 증가시킨다(예를 들어, 검출 수준의 증가). 단백질은 RBC 내의 그들의 더 높은 농도, RBC 내의 그들의 검출가능한 수준을 더 증가시키기 위한 독특한 공정, 및 더 적은 세포 가공을 요하는 RBC 분리 방법으로 인해 농축 RBC 샘플에서 더욱 쉽게 검출된다. 더욱이, RBC에서의 단백질의 높은 농도는 그들이 작은 부피의 혈액에서 검출되도록 한다. 이론에 구애됨없이, RBC는 다양한 단백질(예를 들어, 사이토카인, 케모카인 및 성장 인자)을 위한 저장소로서 작용할 수 있으며, 혈액이 가공되는 방법이 RBC에 의한 이들 단백질의 방출 및/또는 격리에 영향을 줄 수 있다고 상정된다. 이것은 다시 혈액 및/또는 다른 혈액 구획(들)의 단백질 프로파일을 변경하고/하거나 향상시킬 수 있다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 또는 분획에서 단백질 프로파일을 생성하거나 생성하여, 단백질 프로파일에 대한 혈액 가공 효과를 감소시키거나 제거하기 위한 개선된 방법, 키트 및/또는 시스템을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일부 비제한적인 실시형태가 하기에 열거된다:
- [0012] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 수득하고; 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생산하고; 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하는 것을 포함하는, 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공하며, 이때 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L이며, 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플 내에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 추가로 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 전에 적혈구-농축 샘플을 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉시키는 것을 포함하며, 이때 양이온성 염은 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시킨다.
- [0013] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 수득하고; 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생산하고; 적혈구-농축 샘플을 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉시키며, 이때 적어도 하나의 양이온성 염은 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키며; 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하는 것을 포함하며, 이때 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L이며, 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플 내에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 양이온성 염의 양이온은 금속 이온 또는 암모늄 이온이다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 염, 포타슘 염, 마그네슘 염, 리튬 염, 루비듐 염, 세슘 염, 철 염, 프랑슘 염, 피리디늄 염 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 루비듐 클로라이드, 세슘 클로라이드, 리튬 클로라이드 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 클로라이드 염이다. 다른 실시형태에서,

적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 카보네이트, 포타슘 카보네이트, 루비듐 카보네이트, 세슘 카보네이트, 리튬 카보네이트 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 카보네이트 염이다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 양이온성 염은 암모늄 염이다. 또 다른 실시형태에서, 암모늄 염은 암모늄 카보네이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 니트레이트 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 수득하고; 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생산하고; 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구와 혈장을 분리하고; 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 및 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하고; 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준에 대한 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 포함하는 단백질 비를 계산하는 것을 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적어도 2:1의 단백질 비를 가진 하나 이상의 단백질을 포함하는, 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 수득하고; 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생산하고; 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구 세포를 배지에서 항온처리하고; 배지 내의 하나 이상의 단백질을 검출하는 것을 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하는, 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 배지는 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵스 평형 염액(hank's balanced salt solution)(HBSS), 및/또는 얼스 평형 염액(Earles' balanced salt solution)(EBSS), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(Roswell Park Memorial Institute medium)(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(Eagle's minimal essential medium)(EMEM), 돌베코스 변형 이글스 배지(Dubelco's modied Eagle's medium)(DMEM), 및/또는 이스코베스 변형 돌베코스 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Media)(IMDM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명은 작은 부피의 혈액 샘플을 수득하고; 작은 부피의 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생산하고; 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질을 검출하는 것을 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하는, 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 개체로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 20 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락, 발뒤꿈치, 귀 또는 꼬리로부터 수득된다. 추가 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락 찌르기(prick), 발뒤꿈치 찌르기, 귀 찌르기 또는 꼬리 찌르기에 의해 수득된다. 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 하루에 1회 이상, 하루에 2회 이상, 하루에 3회 이상, 하루에 4회 이상, 및 하루에 5회 이상으로 이루어지는 군으로부터 선택된 횟수로 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에 5회 이상, 1주에 6회 이상, 및 1주에 7회 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 수득된다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 매일 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회 및 4주에 1회로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 한달에 한번 수득된다.

[0017] 본 발명에서 제공되는 방법의 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체의 모세혈관 또는 개체의 정맥으로부터 수득된다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 인간 또는 비인간 동물이다. 일부 실시형태에서, 개체는 인간이다. 일부 다른 실시형태에서, 개체는 마우스, 래트, 햄스터, 흰당비, 게르빌루스쥐, 토끼, 원숭이, 침팬지, 말, 조랑말, 당나귀, 양, 돼지, 닭, 염소, 고양이 및 개로 이루어지는 군으로부터 선택된 비인간 동물이다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 질병 또는 질환을 갖는다.

[0018] 본 발명의 방법의 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 유세포분석, 자기 비드 분리, 원심분리, 셀로스 컬럼 및 텍스트란 침강으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 백혈구제거된다. 일부 실시형태에서, 적혈구는 텍스트란 침강에 의해 백혈구제거된다.

[0019] 본 발명의 방법의 일부 실시형태에서, 작은 부피의 적혈구-농축 샘플은 5 μ L 내지 20 μ L이다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피의 적혈구-농축 샘플은 5 μ L 이다.

- [0020] 본 발명에서 제공되는 방법의 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 적혈구의 표면, 적혈구의 내부, 적혈구의 용해물, 적혈구의 상등액, 적혈구를 함유하는 배지 및 이전에 적혈구를 함유했던 배지로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 장소로부터 검출되거나 측정된다.
- [0021] 본 발명에서 제공되는 방법의 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 2종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 2종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 3종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 3종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 4종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 4종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 5종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 5종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 10종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 10종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 30종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 30종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 항체를 이용하여 하나 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 하나 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 케모카인, 사이토카인, 성장 인자, 수용체, 세포내 신호 전달자, 호르몬, 핵 전사 인자, 신경전달자, 세포의 매트릭스 성분 및 효소로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 표 1에 열거된 단백질 또는 표 2에 열거된 단백질의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF, CRP, 및 DDT로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0022] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명은 질병 또는 질환을 가진 개체 및 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체로부터 본 발명에서 제공된 방법에 따라 생성된 적어도 하나의 단백질 프로파일을 획득하고; 질병 또는 질환을 가진 개체의 단백질 프로파일을 질병 또는 질환을 갖지 않는 개체의 단백질 프로파일과 비교하는 것을 포함하며, 이때 생성된 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않는 개체의 단백질 프로파일에 비하여 질병 또는 질환을 가진 개체로부터의 단백질 프로파일에서 상이한 존재 또는 수준을 갖는 하나 이상의 단백질을 포함하는, 적혈구-농축 혈액 샘플내의 질병 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 질병 또는 질환은 암이다. 추가 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TNF- α , TGF- β , 및 IFN- γ 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 암 단백질 프로파일이다. 다른 실시형태에서, 질병 또는 질환은 자간전증이다. 또 다른 실시형태에서, 질병 프로파일은 TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, 및 IL-12로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 자간전증 단백질 프로파일이다. 추가 실시형태에서, 자간전증 단백질 프로파일은 IL-6, IL-8, 및 IFN- γ 로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에서 제공되는 방법에 따라 생성된 개체의 단백질 프로파일을 획득하고; 개체의 단백질 프로파일을 질병 단백질 프로파일에 비교하는 것을 포함하며, 이때 질병 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에 비교할 때 개체의 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 유사성이 그 개체가 질병 또는 질환을 가짐을 나타내는, 개체가 질병 또는 질환을 갖는지 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 질병 또는 질환은 암, 자간전증, 자가면역 질병, 심혈관 질병, 신경퇴행성 질병, 당뇨병, 대사 질환, 근골격 질병, 감염성 질병, 유전 질환, 신장 질환 및 위장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료 전 및 치료 후에 개체로부터 본 발명에서 제공되는 방법에 따라 생성된 단백질 프로파일을 획득하고; 치료 전의 개체의 단백질 프로파일을 치료 후 개체의 단백질 프로파일에 비교하는 것을 포함하며, 이때 치료 후 개체의 단백질 프로파일에 비교할 때 치료 전 개체의 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 차이가 개체에 대한 치료의 효과를 나타내는, 개체에서 치료를 모니터링하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일은 치료를 받은 후 개체의 단백질 프로파일에 비교된다. 다른 실시형태에서, 시간상 한 지점에서의 치료 후 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일이 시간상 다른 지점에서 치료 후 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일에 비교된다. 추가 실시형태에서, 개체는 동일한 치료를 받았다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 상이한 치료를 받았다. 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 작은 부피의 혈액 샘플이다. 일부 다른 실시형태에서, 개체는 하루에 1회 이상, 하루에 2회 이상, 하루에 3회 이상, 하루에 4회 이상, 및 하루에 5회 이상으로 이루어지는 군으로부터 선택된 횟수로 모니터링된다. 추가 실시형태에서, 개체는 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에

5회 이상, 1주에 6회 이상, 및 1주에 7회 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 모니터된다. 다른 실시형태에서, 개체는 매일 모니터된다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회 및 4주에 1회로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 모니터된다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 한달에 한번 모니터된다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 치료를 받은 개체 및 치료를 받지 않은 개체로부터 본 발명에서 제공되는 방법에 따라 생성된 적어도 하나의 단백질 프로파일을 수득하고; 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일을 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일과 비교하는 것을 포함하며, 이때 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일과 비교하여 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일에서의 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 유사성이 치료의 유효성을 나타내는, 치료의 유효성을 결정하는 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 텍스트란과 접촉시키고; 혈액 샘플이 백혈구-함유 층 및 적혈구 밀집 층을 형성하도록 하고; 적혈구 밀집 층 내의 적혈구를 분리하여 적혈구-농축 혈액 샘플을 생성하고; 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하는 것을 포함하는, 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출 또는 측정의 정확성을 증가시키는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 혈액 샘플은 작은 부피의 혈액 샘플이다. 추가 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플 내의 혈액 대 텍스트란의 비는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 및 10:1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플로부터 백혈구 및 혈소판의 평균 고갈은 85% 내지 99%이다.

[0027] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 샘플을 백혈구제거시키고 적혈구-농축 샘플을 생산하기 위한 적어도 하나의 시약; 및 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 적어도 하나의 시약을 포함하는, 혈액 샘플의 단백질 프로파일을 측정하기 위한 키트를 제공한다. 일 실시형태에서, 키트는 개체로부터 혈액 샘플을 수득하기 위한 적어도 하나의 시약을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 시약은 하나 이상의 항체이다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 시약은 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA) 장치이다.

[0028] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명은 개체로부터 수득한 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며, 이때 혈액 샘플 및 혈액 샘플 성분은 각각 적혈구(RBC)를 포함한다.

[0029] 상기 방법의 일 실시형태에서, 단백질 프로파일은 혈액 샘플 성분으로부터 생성된다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, RBC의 수는 혈액 샘플 성분에 존재하는 총 혈액 세포의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 구성한다. 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 혈액 샘플 성분은 혈액 샘플의 백혈구제거에 의해 생산된 RBC-농축 분획이다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 백혈구제거는 혈액 샘플 또는 그 일부로부터의 백혈구의 원래 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 보다 많이 제거한다. 또 다른 실시형태에서, 백혈구제거는 분획 내의 혈액 세포의 총 수의 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과가 RBC인 RBC-농축 분획을 제공한다. 추가 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 그 일부는 혈소판 고갈을 거친다. 다른 실시형태에서, 혈소판 고갈은 혈액 샘플 또는 그 일부로부터의 혈소판의 원래 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 제거한다.

[0030] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF, CRP, DDT, 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질은 표 1에 열거된 단백질 또는 표 2에 열거된 단백질의 조합을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0031] 상기 방법의 일부 실시형태에서, RBC의 표면 상의 하나 이상의 단백질의 수준이 결정된다. 또 다른 실시형태에서, RBC 내의 하나 이상의 단백질의 수준이 결정된다. 다른 실시형태에서, RBC에 의해 방출된 하나 이상의 단백질의 수준이 결정된다. 또 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 건조 혈점 샘플(dried blood spot sample)(DBS)이다.

[0032] 본 발명의 일 양태에서, 단백질 프로파일의 생성은 RBC를 포함하는 세포 집단으로부터 세포 용해물, 세포 세척

액 또는 세포 상등액을 생산하고; 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 용해물을 이용하여 수행된다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 RBC를 신속 동결(snap freezing)하고; RBC를 해동하여 세포 용해물을 생성하고; 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정함으로써 수행된다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 세척액을 이용하여 수행된다. 추가 실시형태에서, 세포 세척액은 둘 이상의 세포 세척액을 조합하여 생산된다. 또 다른 실시형태에서, 세포 세척액은 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 행크스 평형 염액(HBSS), 및/또는 얼스 평형 염액(EBSS) 중 하나 이상을 포함하는 세척 액체를 이용하여 생산된다.

[0033] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 상등액을 이용하여 수행된다. 다른 실시형태에서, 세포 상등액은 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및/또는 이스코베스 변형 둘베코스 배지(IMDM) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 상등액을 생산하기 위해 사용된 세포를 배양함으로써 생산된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 다수의 세포 상등액 샘플을 이용하여 수행되며, 세포 상등액의 샘플은 세포 상등액을 생산하기 위하여 이용되는 세포의 배양물로부터 상이한 시점들에서 추출된다.

[0034] 일부 실시형태에서, 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; RBC로부터 분리된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 백혈구를 신속 동결하고; 백혈구를 해동하여 백혈구 용해물을 생성하고; 해동된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 백혈구를 세척하고/하거나 배양하여 생성된 세포 세척액 및/또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 추가 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; RBC로부터 분리된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈소판을 신속 동결하고; 혈소판을 해동하여 혈소판 용해물을 생성하고; 해동된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈소판을 세척하고/하거나 배양하여 생성된 세포 세척액 및/또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; RBC로부터 분리된 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0036] 본 방법의 다른 실시형태에서, 신속 동결은 -5°C , -10°C , -20°C , -30°C , -40°C , -50°C , -60°C , -70°C , -75°C , -80°C , 100°C , -120°C , -140°C , -160°C , -180°C , -190°C , -195°C , 또는 -196°C 이하의 온도에서이다. 본 방법의 다른 실시형태에서, 신속 동결 및 해동은 여러번의 동결-해동 사이클을 포함한다.

[0037] 본 방법의 다른 실시형태에서, 백혈구는 유세포분석 및/또는 텍스트란 침강에 의해 RBC로부터 분리된다. 다른 실시형태에서, 혈소판은 원심분리에 의해 RBC로부터 분리된다.

[0038] 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 채취 동안 혈액 안정화제와 혼합되었다. 다른 실시형태에서, 개체로부터 수득된 혈액 샘플은 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하기 전에 혈액 안정화제와 접촉된다. 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 혈액 안정화제는 단백질 억제제, 계면활성제, 단백질 변성화제, RNA 안정화제, 항응고제 및/또는 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제 중 하나 이상이다. 본 방법의 일부 실시형태에서, 혈액 안정화제는 항응고제가 아니다. 다른 실시형태에서, 혈액 안정화제는 아프로티닌(aprotinin), 류펩틴(leupeptin), α 2-마크로글로불린, 안티페인 디하이드로클로라이드(antipain dihydrochloride), 칼페인(calpain) 억제제 I, 칼페인 억제제 II, 키모스타틴, TLCK(CAS 131918-97-3), 트립신-억제제, 페파블록(Pefabloc) SC(로슈(Roche)), PMSF($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$ - 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)), 완전 프로테아제 억제제 콕테일(complete protease inhibitor cocktail)(로슈), 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제 억제제이다. 또 다른 실시형태에서, 항응고제는 헤파린, 헤파린 설페이트, 펠레칸(perlecan), 아그린(agrins), 신데칸(syndecan), 베타글리칸(betaglycan), 글리피칸(glypican), 세르글리신(serglycin), 시트레이트, 산 시트레이트 텍스트로스, EDTA, 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0039] 본 방법의 일부 실시형태에서, 혈액 샘플을 혈액 안정화제와 접촉시키는 단계는 개체로부터 혈액 샘플이 수득된 지 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 수행된다.

- [0040] 본 방법의 일 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체의 모세혈관으로부터 취득된다. 본 방법의 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체의 정맥으로부터 취득된다.
- [0041] 본 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 혈액 샘플이 취득된 때의 2 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 40 분, 50 분, 1 시간, 1.5 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간, 36 시간, 또는 48 시간 이내에 수행된다.
- [0042] 일부 양태에서, 본 방법은 개체로부터 혈액 샘플을 취득하는 제1 단계를 추가로 포함한다.
- [0043] 본 발명의 추가의 비제한적 실시형태는 하기에 열거된다:
- [0044] 본 발명의 일부 양태에서, 본 발명은 개체로부터 취득된 혈액 샘플로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분으로부터 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하는 단계; 및 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계를 포함하며, 이때 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분은 적혈구를 포함한다. 본 방법의 일 실시형태에서, 적혈구는 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분내에 존재하는 혈액 세포의 총 수의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 구성한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하기 전에 혈액 샘플 및/또는 혈액 샘플 성분의 백혈구제거를 포함한다. 본 방법의 또 다른 실시형태는 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분을 혈액 안정화제와 접촉시키고; 및/또는 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분을 신속 동결하는 단계를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명은 개체로부터 취득된 혈액 샘플로부터 단백질 프로파일을 생성하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분의 백혈구제거에 의해 적혈구(RBC)-농축 분획을 생산하는 단계; RBC-농축 분획으로부터 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하는 단계; 및 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 백혈구제거는 혈액 샘플 내에 존재하는 백혈구 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과가 제거된 RBC-농축 분획을 제공한다. 본 방법의 다른 실시형태에서, 백혈구제거는 총 혈액 세포 내의 RBC의 수의 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 포함하는 RBC-농축 분획을 제공한다.
- [0046] 다른 실시형태에서, 본 방법은 RBC-농축 분획을 혈액 안정화제와 접촉시키고; 및/또는 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하기 전에 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분을 신속 동결시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, RBC-농축 분획을 생산하는 단계는 상기 신속 동결 전에 수행된다. 또 다른 실시형태에서, RBC-농축 분획을 생산하는 단계는 상기 신속 동결 후에 수행된다.
- [0047] 본 방법의 일부 실시형태에서, 상기 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF, 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 상기 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질은 표 1에 열거된 단백질; 또는 표 2에 열거된 단백질의 조합을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0048] 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 혈소판 고갈을 포함한다. 일 실시형태에서, 혈소판 고갈은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분내에 존재하는 혈소판의 총 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 제거한다.
- [0049] 다른 실시형태에서, 혈액을 혈액 안정화제와 접촉시키고/시키거나 신속 동결하는 단계는 개체로부터 혈액 샘플이 취득되는 단계의 수행의 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 수행된다. 다른 실시형태에서, 세포 용해물을 생산하는 단계는 세포를 신속 동결하고 해동하는 사이클을 1회 이상 포함한다.
- [0050] 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 상기 백혈구제거로부터 취득된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 상기 백혈구제거로부터 취득된 백혈구를 신속 동결하고; 백혈구를 해동하고; 해동된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 추가 실시형태에서, 본

방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 상기 혈소판 고갈로부터 수득된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 상기 혈소판 고갈로부터 수득된 혈소판을 신속 동결하고; 혈소판을 해동하고; 해동된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0051] 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분으로부터 혈장을 분리하고; 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 추가 실시형태에서, 본 방법은 혈장을 신속 동결하고; 혈장을 해동하고; 해동된 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0052] 일부 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 혈소판 고갈은 원심분리에 의해서이다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분의 백혈구제거는 유세포분석 및/또는 텍스트란 침강에 의해서이다. 또 다른 실시형태에서, 신속 동결 단계는 -5°C , -10°C , -20°C , -30°C , -40°C , -50°C , -60°C , -70°C , -75°C , 또는 -80°C 미만의 온도에서이다. 추가 실시형태에서, 세포 용해물을 생성하기 위한 해동 단계는 1 동결-해동 사이클, 2 동결-해동 사이클, 3 동결-해동 사이클, 4 동결-해동 사이클, 5 동결-해동 사이클 또는 2 초과 동결-해동 사이클, 3 초과 동결-해동 사이클, 4 초과 동결-해동 사이클, 또는 5 초과 동결-해동 사이클을 포함한다.

[0053] 본 방법의 다른 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분은 헤파린 및/또는 EDTA를 포함한다.

[0054] 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 세포 세척액을 이용하여 수행된다. 다른 실시형태에서, 세포 세척액은 둘 이상의 세포 세척액을 조합하여 생산된다. 또 다른 실시형태에서, 세포 세척액은 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵크스 평형 염액(HBSS), 및 얼스 평형 염액(EBSS) 중 하나 이상을 포함하는 세척 유체를 이용하여 생산된다.

[0055] 본 방법의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 세포 상등액을 이용하여 수행된다. 다른 실시형태에서, 세포 상등액은 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및 이스 코베스 변형 돌베코스 배지(IMDM) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 상등액을 생산하기 위해 사용된 세포를 배양함으로써 생산된다.

[0056] 본 방법의 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 다수의 세포 상등액 샘플을 이용하여 수행되며, 세포 상등액의 샘플은 상등액을 생산하기 위하여 이용되는 세포의 배양물로부터 상이한 시점들에서 추출된다.

[0057] 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 백혈구제거로부터 수득된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 백혈구제거로부터 수득된 백혈구의 세척 및/또는 배양하여 생성된 세포 세척액 및/또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분의 혈소판 고갈로부터 수득된 혈소판의 세척 및/또는 배양에 의해 생성된 혈소판 세척액 및/또는 혈소판 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 방법은 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고; 혈액 샘플로부터 혈장을 분리하고; 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0058] 다른 실시형태에서, 혈소판 고갈은 원심분리를 포함한다. 다른 실시형태에서, 백혈구제거는 유세포분석 및/또는 텍스트란 침강을 포함한다.

[0059] 다른 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분은 헤파린 및/또는 EDTA를 포함한다. 추가 실시형태에서, 본 방법은 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하는 단계 이전에 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분을 혈액 안정화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 혈액 안정화제와 접촉시키는 단계는 개체로부터 혈액 샘플이 수득된 지 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 수행된다.

[0060] 일부 실시형태에서, 혈액 안정화제는 프로테아제 억제제, 단백질 변성화제, RNA 안정화제, 항응고제 및/또는 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제이며; 항응고제가 아니며; 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제이거나, 및/또는 헤파린, EDTA, EGTA, 시트레이트(예를 들어, 소듐 시트레이트), 또는 플루오라이

트(예를 들어, 소듐 플루오라이드)가 아니다.

- [0061] 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체의 모세혈관으로부터 취득된다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 개체의 정맥으로부터 취득된다.
- [0062] 본 방법의 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 혈액 샘플이 취득된 때의 2 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 40 분, 50 분, 1 시간, 1.5 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간, 36 시간, 또는 48 시간 이내에 수행된다.
- [0063] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명은 개체의 혈액 샘플로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 개체로부터 취득된 전혈 샘플로부터 세포 용해물을 생산하는 단계; 및 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 방법은 전혈 샘플을 신속 동결하고; 전혈 샘플을 해동하여 세포 용해물을 생산하고; 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 세포 용해물을 생성하기 위하여 전혈 샘플을 해동하는 상기 단계는 1 동결-해동 사이클, 2 동결-해동 사이클, 또는 3 동결-해동 사이클을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 신속 동결은 -5°C , -10°C , -20°C , -30°C , -40°C , -50°C , -60°C , -70°C , -75°C , -80°C , -90°C , -100°C , -120°C , -104°C , -160°C , -180°C , -190°C , -200°C 미만의 온도에서이다.
- [0064] 본 방법의 일부 실시형태에서, 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF, 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질은 표 1에 열거된 단백질; 또는 표 2에 열거된 단백질의 조합을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0065] 다른 실시형태에서, 본 방법은 세포 용해물을 생산하는 단계 이전에 전혈 샘플을 혈액 안정화제와 접촉시키는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 혈액 안정화제는 프로테아제 억제제, 단백질 변성화제, RNA 안정화제, 항응고제 및/또는 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제이며; 항응고제가 아니며; 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제이거나, 및/또는 헤파린, EDTA, EGTA, 시트레이트(예를 들어, 소듐 시트레이트), 또는 플루오라이드(예를 들어, 소듐 플루오라이드)가 아니다. 또 다른 실시형태에서, 전혈 샘플과 혈액 안정화제의 접촉은 전혈 샘플이 취득될 때, 또는 전혈 샘플이 취득된 때의 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 45 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 발생한다. 또 다른 실시형태에서, 본 방법은 전혈 샘플을 항응고제와 접촉시키는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항응고제는 헤파린 및/또는 EDTA이다. 본 방법의 추가 실시형태에서, 전혈 샘플은 개체의 모세혈관으로부터 취득된다. 다른 실시형태에서, 전혈 샘플은 개체의 정맥으로부터 취득된다.
- [0066] 본 방법의 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 개체로부터 전혈 샘플이 취득되는 단계의 2 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 40 분, 50 분, 1 시간, 1.5 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간, 36 시간, 또는 48 시간 이내에 수행된다.
- [0067] 발명의 개요에서 개시된 실시형태 뿐만 아니라, 다른 실시형태가 명세서, 도면 및 청구의 범위에 개시된다. 발명의 개요는 각각의 모든 실시형태를 커버하고자 하는 것이 아니며; 조합 또는 변형이 본 발명에서 고려된다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 본 발명의 실시형태는 단지 예시로서 첨부된 도면을 참고로 개시된다.

도 1a-1c는 IgG 대조군에 대한 CD44를 위한 RBC 면역표현형분석법의 결과를 보여준다. 세포(회색 히스토그램으로 충전됨)는 CD44에 대해 양성이다($n = 3$).

도 2는 세포(회색 히스토그램으로 충전됨)가 CD74에 대해 음성임을 입증하는 IgG 대조군에 대한 CD74를 위한 RBC 면역표현형분석법의 결과를 보여준다($n = 3$).

도 3은 혈액 슬라이드, 양성 (염색) 샘플의 알카라인 포스페이트 염색을 이용한 MIF에 대한 면역조직화학의 결과를 보여준다($n = 1$).

도 4는 혈액 슬라이드, 음성 (미염색) 대조군의 알카라인 포스페이트 염색을 이용한 MIF에 대한 면역조직화학의 결과를 보여준다(n = 1).

도 5는 RA 활막, 음성 대조군의 HRP 염색을 이용한 MIF에 대한 면역조직화학의 결과를 보여준다(n = 1).

도 6은 RA 활막, 양성 대조군의 HRP 염색을 이용한 면역조직화학의 결과를 보여준다(n = 1).

도 7은 손가락끝 찌르기로부터 채취된 혈액에서, FACS를 이용하여 분리된 RBC 내의 대식세포 이동 억제 인자 (MIF) 농도를 보여주는 그래프이다(n = 4).

도 8은 손가락끝 찌르기 및 정맥천자로부터 채취된 혈액에서, FACS를 이용하여 분리된 RBC 내의 MIF 농도를 보여주는 그래프이다(n = 1).

도 9는 정맥천자로부터 채취된 혈액에서, FACS, 텍스트란 침강 및 RBC 용해 버퍼를 이용하여 분리된 RBC를 보여주는 그래프이다(n = 1).

도 10a-10c는 IgG에 대한 CD45를 위한 면역표현형분석법을 이용한, 분리된 RBC 내의 WBC 오염에 대한 시험의 결과를 보여준다. 세포(회색 히스토그램으로 충전)는 대부분 CD45에 대해 음성이었다(n = 3).

도 11a-11gg는 세척에 의해 가공되지 않은 RBC에 비하여 세척에 의해 가공된 RBC 내의 다양한 단백질의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 12는 바이오플렉스(BioPlex)에 의해 측정되고 pg/mL(100uL PBS 내에 2천만 RBC)로 보고된, 37°C에서 24시간에 걸쳐 RBC로부터 PBS 내로 분비되거나 방출된 단백질을 요약하는 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다.

도 13은 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/mL(100uL PBS 내에 2천만 RBC)로 보고된, 37°C에서 24시간에 걸쳐 RBC로부터 PBS 내로 분비되거나 방출된 단백질을 요약하는 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다.

도 14는 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/mL(100uL PBS 내에 2천만 RBC)로 보고된, 37°C에서 24시간에 걸쳐 RBC로부터 PBS 내로 분비되거나 방출된 단백질을 요약하는 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다.

도 15는 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/mL(100uL PBS 내에 2천만 RBC)로 보고된, 37°C에서 24시간에 걸쳐 RBC로부터 PBS 내로 분비되거나 방출된 단백질을 요약하는 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 제시된다.

도 16a-16z는 RBC로부터 분비된 단백질의 농도(흑색 컬럼) 및 항온처리 후 세포내에 남아 있는 단백질의 농도(회색 컬럼)에 대한 프로테아제 억제제(PI)의 효과를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 17은 혈장 수준에 정규화된 경우 용해된 전혈 내의 CRP의 배수 변화를 보여주는 그래프이다.

도 18은 혈장 및 정제되고 용해된 RBC에서 CRP의 농도를 보여주는 그래프이다.

도 19a-19tt는 작은 부피의 전혈 내의 다양한 단백질의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 20a-20aa는 손가락 찌르기(FT) 또는 정맥천자(V)에 의해 건강한 개체로부터 획득된 전혈 샘플로부터 분리된 적혈구 내의 다양한 단백질의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 21a-21b는 적혈구 내의 다양한 단백질의 수준 대 혈장 내 수준의 비율을 나타내는 차트이다.

도 22a-22g는 리튬 클로라이드와 접촉된 적혈구 내의 다양한 단백질의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

도 23a-23vv는 건강한 개인, 건강한 임신한 여성, 자간전증을 가진 임신한 여성 및 암 환자로부터 분리된 적혈구 내의 다양한 단백질의 수준에서의 차이를 보여주는 일련의 그래프이다.

도 24a-24c는 암환자로부터 분리된 적혈구 내의 다양한 단백질의 수준 대 혈장 내의 수준의 비율을 나타내는 차트이다.

도 25a-25rr은 건강한 개인, 건강한 임신한 여성, 자간전증을 가진 임신한 여성 및 암 환자로부터 분리된 적혈구로부터 분비되거나 방출된 다양한 단백질의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

- [0070] 본 출원에서 사용될 때, 단수 형태는 문맥이 명확하게 다르게 나타내지 않으면 복수 형태를 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포 용해물"은 다수의 세포 용해물을 포함한다.
- [0071] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "포함하는(comprising)"은 포함하는(including)"을 의미한다. "포함하다"와 같은 단어 "포함하는"의 변형은 상응하게 변형된 의미를 갖는다. 따라서, 예를 들어, 단계 'A' 및 'B'를 "포함하는" 방법은 배타적으로 단계 'A' 및 'B'로 이루어질 수 있거나 하나 이상의 추가적인 단계(예를 들어, 단계 'A', 'B' 및 'C')를 포함할 수 있다.
- [0072] 상세한 설명에서 사용된 주제목은 참조 용이성 및 독자를 위해 포함되며 설명 또는 청구범위에 걸쳐 발견되는 청구 대상을 제한하기 위해 이용되어서는 안된다. 주제목은 청구범위의 범위 또는 청구범위 한계를 구성하는데 이용되어서는 안된다.
- [0073] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "개체"는 소, 말, 양, 영양류, 조류 및 설치류 종을 비롯한, 경제적, 사회적 또는 연구적으로 중요한 임의의 동물을 포함한다. 따라서, "개체"는 예를 들어, 인간 또는 비인간 포유동물과 같은 포유동물일 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "항체" 및 "항체들"은 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 포함), IgA(IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, 또는 IgM, 및 IgY, 단쇄 전체 항체를 비롯한 전체 항체, 및 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 항원-결합 항체 단편은 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, 단쇄 Fv (scFv), 단쇄 항체, 이황화-연결 Fv(sdFv) 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체는 임의의 동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 단쇄 항체를 비롯한 항원-결합 항체 단편은 가변 영역(들) 단독 또는 하기의 전체 또는 일부와 조합된 가변 영역(들)을 포함할 수 있다: 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인. 또한 가변 영역(들) 및 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인의 조합이 포함된다. 항체는 생물 분자에 특이적으로 결합하는 단클론, 다클론, 키메라, 다중특이적, 인간화 및 인간 단클론 및 다클론 항체일 수 있다.
- [0075] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단백질"은 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산으로 구성된 중합체를 말한다.
- [0076] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단백질 프로파일"은 샘플에 존재하는 단백질(들) 및/또는 단백질 단편(들)을 말한다. 샘플은 세포를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 만일 샘플이 세포를 포함하면, 단백질 또는 단백질 단편은 세포내에 존재하고/하거나 부분적으로 또는 완전히 세포 표면에 존재할 수 있다. 필수적이지는 않지만, 단백질 프로파일은 또한 샘플 내의 단백질(들) 및/또는 단백질 단편(들)에 대한 정량적 정보를 제공할 수 있다.
- [0077] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "혈액 샘플"은 적어도 부분적으로 혈액 및/또는 혈액 성분을 포함하는 샘플을 말한다. 혈액 샘플은 하나 이상의 개체로부터 직접 또는 하나 이상의 개체로부터의 혈액의 기존의 수집물로부터 취득될 수 있다. 혈액 샘플은 예를 들어, 신체 일부(예를 들어, 팔, 다리, 귀)의 정맥천자(예를 들어, 버터플라이 니들(butterfly needle) 및 진공채혈관(Vacutainer), 스트레이트 니들(straight needle) 및 진공채혈관, 및 버터플라이 니들 및 시린지)와 같은 당업계에 알려진 많은 방법에 의해 또는 찌르기(예를 들어, 손가락, 발뒤꿈치 또는 귀 찌르기)에 의해 인간 개체로부터 취득될 수 있다. 혈액 샘플은 예를 들어, 임의의 신체 일부(예를 들어, 꼬리, 팔, 다리(예를 들어, 넓적다리), 코, 얼굴, 귀, 흉부, 목/목구멍, 혀, 심장)의 정맥천자(예를 들어, 바늘 및 시린지)와 같은 당업계에 알려진 많은 방법에 의해 또는 찌르기(예를 들어, 손가락, 발뒤꿈치, 귀 또는 꼬리 찌르기)에 의해 비인간 포유동물 개체로부터 취득될 수 있다. 혈액 샘플은 예를 들어, 신체 일부(예를 들어, 날개, 목구멍, 심장)의 정맥천자(예를 들어, 바늘 및 시린지)와 같은 당업계에 알려진 많은 방법에 의해 다른 비인간 동물(예를 들어, 닭, 새)로부터 취득될 수 있다.
- [0078] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "혈액 세포" 또는 "혈액 샘플에 존재하는 세포"는 적혈구 및 백혈구를 포함하지만 혈소판은 제외한, 샘플내의 세포를 말한다.
- [0079] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "적혈구-농축 혈액 샘플" 또는 "RBC-농축 분획"은 RBC의 비율이 농축 이전의 혈액 샘플의 RBC 비율에 비하여 증가된 샘플 또는 샘플의 성분을 말한다. RBC의 비율은 예를 들어, RBC가 아닌 세포 타입(들)을 샘플로부터 제거함으로써(예를 들어, 백혈구의 제거(백혈구제거) 및/또는 혈소판의 제거), 및/또는 별도의 샘플을 제공하기 위하여 샘플 내의 다른 세포 타입(들)으로부터 RBC를 제거함으로써, 증가될 수 있다. RBC-농축 분획은 전체 혈액 세포 수의 99.5% 초과, 99.6% 초과, 99.7% 초과, 99.75% 초과, 99.8% 초과, 99.85% 초과, 99.9% 초과, 99.5% 초과, 약 100%의 적혈구 또는 100%의 적혈구를 포함할 수 있다.
- [0080] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "신속 동결"은 일반적으로 빠른 기간내에(예를 들어, 수 밀리초, 1-2 초, 1-5

초, 1-10 초, 1-15 초, 1-20 초, 10-20 초, 10-30 초, 30-60 초, 1분 미만, 또는 2분 미만의 기간내에) 혈액 세포(예를 들어, RBC) 및/또는 혈장/혈청을 그들의 동결점 미만의 온도로 동결하는 것을 말한다.

[0081] 본 명세서에서 사용될 때, "백혈구제거"는 예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분으로부터 백혈구를 제거함으로써, 또는 대안적으로는 별도의 백혈구제거된 샘플을 제공하기 위하여 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분으로부터 다른 혈액 구성원(들)을 제거함으로써, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분에서 백혈구 비율을 감소시키는 것을 말한다. 일부 실시형태에서, 백혈구제거는 혈소판 고갈을 포함한다.

[0082] 본 명세서에서 사용될 때, "혈소판 고갈"은 예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분으로부터 혈소판을 제거함으로써, 또는 대안적으로는 별도의 혈소판 고갈된 샘플을 제공하기 위하여 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분으로부터 다른 혈액 구성원(들)을 분리함으로써, 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분에서 혈소판 비율을 감소시키는 것을 말한다.

[0083] 본 명세서에서 사용될 때, "세포 상등액"은 주어진 시간동안, 예를 들어, 30 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 또는 120 시간 초과 동안 주어진 온도 또는 주어진 온도 범위에서 세포 집단을 배양하기 위해 이용된 세포 배양 배지를 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0084] 본 명세서에서 사용될 때, "세포 세척액"은 세포 집단을 린스하기 위해 사용된 액체를 의미하는 것으로 이해될 것이며, 세포 세척액이 세포 배양을 위한 배지로서 사용되지 않는 한 상기에서 정의된 세포 상등액과는 상이하다. 따라서, "세포 세척액"을 생성하기 위해 사용된 유체는 30 분, 20 분, 15 분, 10 분, 5 분, 4, 분, 3 분, 2 분, 1 분 또는 30 초 미만의 기간 동안 세포 집단과 혼합될 수 있다.

[0085] 본 명세서에서 사용될 때, "배지"는 혈액 샘플, 혈액 샘플로부터 분리된 세포, 또는 혈액 샘플로부터 분리된 세포로부터 생산된 세포 성분 내에서 세포의 생존능을 유지하는 능력을 가진 조성물을 말한다. 배지는 세포 성장 및 증식을 자극하거나 특정 및/또는 기존 상태에서 세포를 유지할 수 있다. 배지의 비제한적인 예는 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵크스 평형 염액(HBSS), 얼스 평형 염액(EBSS), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및 이스코베스 변형 돌베코스 배지(IMDM)를 포함한다.

[0086] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "작은 부피"는 1 밀리리터 이하의 혈액 부피를 말한다. 작은 부피는 1 μ L 내지 100 μ L, 100 μ L 내지 200 μ L, 200 μ L 내지 300 μ L, 300 μ L 내지 400 μ L, 400 μ L 내지 500 μ L, 500 μ L 내지 600 μ L, 600 μ L 내지 700 μ L, 700 μ L 내지 800 μ L, 800 μ L 내지 900 μ L 및 900 μ L 내지 1000 μ L일 수 있다. 일부 실시형태에서, 작은 부피는 50 μ L 내지 100 μ L, 100 μ L 내지 150 μ L, 150 μ L 내지 200 μ L, 200 μ L 내지 250 μ L, 250 μ L 내지 300 μ L, 300 μ L 내지 350 μ L, 350 μ L 내지 400 μ L, 400 μ L 내지 450 μ L, 450 μ L 내지 500 μ L, 500 μ L 내지 550 μ L, 550 μ L 내지 600 μ L, 600 μ L 내지 650 μ L, 650 μ L 내지 700 μ L, 700 μ L 내지 750 μ L, 750 μ L 내지 800 μ L, 800 μ L 내지 850 μ L, 850 μ L 내지 900 μ L, 900 μ L 내지 950 μ L, 950 μ L 내지 1000 μ L이다. 일부 실시형태에서, 작은 부피는 1 μ L 내지 10 μ L, 10 μ L 내지 20 μ L, 20 μ L 내지 30 μ L, 30 μ L 내지 40 μ L, 40 μ L 내지 50 μ L, 50 μ L 내지 60 μ L, 60 μ L 내지 70 μ L, 70 μ L 내지 80 μ L, 80 μ L 내지 90 μ L, 또는 90 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피는 1 μ L 내지 5 μ L, 5 μ L 내지 10 μ L, 10 μ L 내지 15 μ L, 15 μ L 내지 20 μ L, 20 μ L 내지 25 μ L, 25 μ L 내지 30 μ L, 30 μ L 내지 35 μ L, 35 μ L 내지 40 μ L, 40 μ L 내지 45 μ L, 45 μ L 내지 50 μ L, 50 μ L 내지 55 μ L, 55 μ L 내지 60 μ L, 60 μ L 내지 65 μ L, 65 μ L 내지 70 μ L, 70 μ L 내지 75 μ L, 75 μ L 내지 80 μ L, 80 μ L 내지 85 μ L, 85 μ L 내지 90 μ L, 90 μ L 내지 95 μ L, 또는 95 μ L 내지 100 μ L이다. 일부 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 10 μ L, 5 μ L 내지 15 μ L, 5 μ L 내지 20 μ L, 5 μ L 내지 25 μ L, 5 μ L 내지 30 μ L, 5 μ L 내지 35 μ L, 5 μ L 내지 40 μ L, 5 μ L 내지 45 μ L, 5 μ L 내지 50 μ L, 5 μ L 내지 55 μ L, 5 μ L 내지 60 μ L, 5 μ L 내지 65 μ L, 5 μ L 내지 70 μ L, 5 μ L 내지 75 μ L, 5 μ L 내지 80 μ L, 5 μ L 내지 85 μ L, 5 μ L 내지 90 μ L, 5 μ L 내지 95 μ L, 또는 5 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피는 1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, 5 μ L, 6 μ L, 7 μ L, 8 μ L, 9 μ L, 10 μ L, 11 μ L, 12 μ L, 13 μ L, 14 μ L, 15 μ L, 16 μ L, 17 μ L, 18 μ L, 19 μ L, 20 μ L, 21 μ L, 22 μ L, 23 μ L, 24 μ L, 25 μ L, 26 μ L, 27 μ L, 28 μ L, 29 μ L, 30 μ L, 31 μ L, 32 μ L, 33 μ L, 34 μ L, 35 μ L, 36 μ L, 37 μ L, 38 μ L, 39 μ L, 40 μ L, 41 μ L, 42 μ L, 43 μ L, 44 μ L, 45 μ L, 46 μ L, 47 μ L, 48 μ L, 49 μ L, 또는 50 μ L이다.

[0087] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "검출가능한 수준" 또는 "검출 수준"은 샘플(예를 들어, 혈액 샘플) 내의, 단백질과 같은 원하는 분자의 존재를 나타내고/내거나 신호를 주는 조성물 또는 제제의 능력을 말한다. 예를 들어,

본 명세서에 개시된 방법에서 개시된 적혈구-농축 샘플에서는, 단백질의 검출가능한 수준은 검출에 이용가능한 단백질의 증가로 인해 증가할 수 있다. 이러한 증가는 하나 이상의 이유로 인한 것일 수 있으며, 예를 들어, 단백질의 검출을 방지하고/하거나 감소시키는 단백질-분자 상호작용(예를 들어, 단백질-단백질, 단백질-막, 단백질-핵산)의 파괴를 통해서일 수 있다.

[0088] 본 명세서에서 사용될 때, RBC로부터 단백질 "방출"은 (i) RBC의 세포내 영역 또는 내부로부터 RBC의 표면 및/또는 세포외 또는 외부 영역(예를 들어, 혈장, 혈청 또는 배지)로 활성 또는 비활성 기전에 의해 이동한 또는 (ii) RBC의 세포외 또는 외부 영역으로부터(예를 들어, 혈장, 혈청 또는 배지로부터) RBC의 표면 및/또는 세포외 영역 또는 외부로 이동한 단백질을 말한다. 일부 실시형태에서, 단백질은 당업계에서 알려진 세포 표면-단백질 결합 상호작용(예를 들어, 수용체, 공유 부착, 비공유 부착, 접합)에 의해 RBC의 표면에 결합된다. 추가 실시형태에서, 표면 결합된 단백질은 RBC의 세포외 또는 외부 영역 내로(예를 들어, 혈장, 혈청 또는 배지 내로) 다시 방출될 수 있다.

[0089] 본 명세서에서 사용될 때, "치료"는 질병, 질환, 또는 병태의 하나 이상의 증상 및/또는 그에 관련된 증상의 예방, 완화 또는 경감에서 비롯하여, 질병, 질환 또는 병태의 예방, 관리, 완화 또는 경감에서 사용될 수 있는 하나 이상의 치료법, 프로토콜, 방법 및/또는 제제를 말한다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료" 및 "치료들"은 의료인과 같은, 당업자에게 알려진 질병, 질환 또는 병태의 예방, 관리, 완화 및/또는 경감에서 유용한 생물학적 치료법, 지지 요법 및/또는 다른 치료법을 말한다.

[0090] 본 명세서에서 사용될 때, 어구 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 두 값(예를 들어, 단백질 농도/수준) 사이의 차이가 그 값들에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없다고 간주할 만큼 두 수치 값 사이에 유사도가 충분히 높음을 의미한다. 예를 들어, 두 값 사이의 차이는 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만일 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "키트"는 본 명세서에 개시된 방법을 수행하기 위하여 필요한 모든 성분을 가진 전달 시스템을 말한다. 비제한적인 예로서, 키트는 혈액 채취, 항응고제/들, 혈액 안정화제/들, RBC의 농축, 비-RBC 혈액 성분의 제거/분리, 혈액 또는 그의 성분/들의 신속-동결, 세포 용해, 세포 세척, 세포 배양, 세포내에서 및/또는 세포외에서 특정 타겟 단백질/들의 검출, 또는 그 조합을 위한 수단을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 개체로부터 혈액 샘플을 획득하기 위한 장치/들(예를 들어, 시린지, 바늘, 버터플라이 니들, 튜브, 지침기, 혈액 채취 세트, 전송 장치, 진공채혈관, 헤마펜(hemaPEN)TM); 개체로부터 건조 혈액 샘플을 획득하기 위한 장치/들(예를 들어, 여과지, 카드, 헤마스팟(HemaSpot)TM); 적혈구 분획, 백혈구 분획 및/또는 혈소판 분획을 액체 혈액 샘플로부터 획득하기 위한 장치/들(예를 들어, 항체 코팅된 자기 비드); 항응고제; 프로테아제 억제제; 단백질 변성화제; 및 기타 동등한 것. 그러한 전달 시스템은 반응 시약(예를 들어, 적절한 용기 내의 라벨, 기준 샘플, 지지 물질 등) 및/또는 지지 물질(예를 들어, 버퍼, 분석을 수행하기 위한 설명서 등)을 한 위치에서 다른 위치로 저장, 수송 또는 전달을 가능하게 하는 시스템을 포함한다. 예를 들어, 키트는 관련 반응 시약 및/또는 지지 물질을 함유한, 상자와 같은, 하나 이상의 동봉물을 포함할 수 있다. 용어 "키트"는 단편화된 키트 및 조합된 키트 둘 모두를 포함한다.

[0092] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "단편화된 키트"는 전체 키트 성분의 하위부분을 함유하는 둘 이상의 분리된 용기를 포함하는 전달 시스템을 말한다. 용기는 의도된 수용체에게 함께 또는 별도로 전달될 수 있다. 각각이 전체 키트 성분의 하위부분을 함유하는 둘 이상의 분리된 용기를 포함하는 전달 시스템은 용어 "단편화된 키트"의 의미 내에 포함된다.

[0093] 본 명세서에서 사용될 때, "조합된 키트"는 단일 용기내에(예를 들어, 원하는 성분의 각각을 보유한 단일 상자 내에) 반응 분석의 모든 성분을 함유한 전달 시스템을 말한다.

[0094] 본 명세서에서 종래 기술 문헌의 임의의 설명 또는 이들 문헌으로부터 유래되거나 이에 기초한 진술은 상기 문헌 또는 그로부터 유래된 진술이 관련 분야의 보편적인 일반 지식의 일부임을 인정하는 것이 아니다.

[0095] 상세한 설명

[0096] 혈액 내의 단백질 수준의 프로파일링을 위해 현재 이용되는 기술은 분석을 전형적으로 혈청/혈장 및/또는 PBMC로 제한한다. RBC는 일상적으로 단백질 프로파일의 생성 전에 혈액 가공 동안 제거된다.

[0097] 본 발명자들은 RBC가 다양한 사이토카인 및 케모카인을 비롯한 단백질 마커의 중요한 공급원을 제공한다는 예상

치못한 확인을 하였다. 따라서, 이전에는 RBC가 본 명세서에서 개시된 다양한 단백질 마커의 공급원을 제공하는 것으로 인식되지 못하였으며, 따라서 단백질 프로파일링으로부터 그들의 배제가 부적절하고/하거나 부정확한 평가를 제공한다는 점에서 기존 기술의 결함이 확인되었다. 본 발명은 RBC의 분석을 포함하는, 혈액으로부터의 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공함으로써 이러한 결함을 치유한다. 구체적으로, 본 발명은 RBC내의 새로 확인된 단백질의 존재 또는 수준을 평가함으로써 농축된 적혈구 샘플의 단백질 프로파일을 생성하기 위한 새로운 유용한 실험 기술을 제공한다.

[0098] 부가적으로, 혈액 내의 단백질 프로파일링이 예를 들어, 혈액의 공급원(예를 들어, 정맥, 모세혈관 등), 항응고제가 사용되는지 여부, 사용된 항응고제의 유형, 채취 후 단백질 함량이 측정되는 기간, 채취시 혈액이 처음에 안정화되는지 여부, 및 분석되는 구체적인 혈액 구획(들)을 비롯한 많은 인자들에 따라 변할 수 있음이 본 발명자들에 의해 확인되었다. 구체적인 작용 양상에 대한 제한없이, 상기에 언급한 것들을 비롯한 인자들로부터 발생하는 혈액 단백질 프로파일에서의 변화는 많은 상이한 단백질(예를 들어, 사이토카인 및 케모카인)을 격리하고 방출하는 이전에 알려지지 않은 RBC의 능력으로부터 적어도 부분적으로 발생하는 것으로 가정된다. RBC에 의한 단백질 방출(또는 대안적으로는 격리) 정도는 혈액 채취 및 가공 동안 발생하는 다양한 인자에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다. 따라서, 특정 혈액 구획(예를 들어, 혈장/혈청)의 단백질 프로파일이 혈액 공급원(예를 들어, 정맥, 모세혈관 등), 항응고제, 채취 후 측정 전 기간, 및/또는 안정화제의 존재/부재와 같은 인자에 의해 상당히 영향을 받을 것으로 알려지지 않았다는 점에서 현재 기술의 추가의 결함이 확인되었다. 본 발명은 혈액의 채취 및 가공 동안 RBC 단백질 프로파일에서의 변화를 최소화하면서 또한 RBC 구획의 단백질 프로파일을 고려하는 방식으로 혈액으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공함으로써 이러한 결함을 치유한다.

[0099] 하기의 설명은 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 충분히 상세하게 본 발명의 예시적인 실시형태를 전달한다. 개시된 다양한 실시형태의 특징 또는 한계는 본 발명의 다른 실시형태 또는 전체로서의 본 발명을 반드시 제한하지는 않는다. 따라서, 하기의 상세한 설명은 본 발명의 범위를 제한하지 않으며, 본 발명의 범위는 청구범위에 의해서만 정의된다.

[0100] 적혈구(RBC) 내의 단백질 프로파일링

[0101] 혈액 단백질 분석은 전형적으로 분리된 혈청/혈장 및/또는 PBMC를 이용하여 수행된다. 혈액의 주요 성분 및 지금까지 가장 풍부한 세포 유형(보통 총 혈액 세포의 >99%)을 대표함에도 불구하고, RBC는 일상적으로 단백질 프로파일링 분석으로부터 배제된다.

[0102] 본 발명은 RBC가 예를 들어, 개체에서 진단 및 예후 결과에 관련된 많은 상이한 단백질 마커를 함유한다는 예상치 못한 관찰로부터 적어도 부분적으로 발생한다. RBC가 혈액의 상당 부분 및 거의 그 전체 세포 성분을 나타낼 때, 혈액의 전체적인 단백질 마커 내용물의 보다 완전한 그림을 얻기 위하여 RBC의 단백질 프로파일을 평가하는 것이 유용하다.

[0103] 본 발명은 또한 혈액 샘플, 적혈구-농축 샘플, 및/또는 RBC를 포함하는 혈액 샘플 성분으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, RBC의 수는 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분에 존재하는 혈액 세포의 총 수의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 구성한다.

[0104] 혈액 샘플

[0105] 본 방법에서 수득되는 혈액 샘플은 본 명세서에서 정의된 대로이며(예를 들어, "혈액 샘플" 참고) 개체로부터 또는 기존의 혈액 채취물(예를 들어, 한명 이상의 개체로부터 이전에 수득된 혈액)로부터 수득될 수 있다. 혈액 샘플은 당업자에게 알려진 예시적인 수단을 이용하여 개체로부터 수득될 수 있다(예를 들어, World Health Organisation, "Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives", World Health Organisation Technical report Series, No. 840, 1994, Annex 2 참고). 비제한적인 예로서, 혈액 샘플은 정맥혈, 모세혈관 혈액, 동맥혈 또는 그 조합을 이용하여 개체로부터 수득될 수 있다.

[0106] 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 개체 또는 기존의 혈액 채취물로부터 수득된다. 작은 부피는 예를 들어, 찌르기(예를 들어, 손가락 찌르기, 발뒤꿈치 찌르기, 귀 찌르기, 꼬리 찌르기)에 의해서를 비롯한, 당업자에게 알려진 방법에 의해 개체로부터 수득될 수 있다. 일 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 (예를 들어, 인간으로부터) 손가락 찌르기, 발뒤꿈치 찌르기, 또는 귀 찌르기에 의해 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 (예를 들어, 마우스 또는 래트로부터) 꼬리 찌르기에 의해 수득된다. 다른 실시형태에

서, 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락 찌르기에 의해 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 (예를 들어, 유아로부터) 발뒤꿈치 찌르기에 의해 수득된다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 귀 찌르기에 의해 수득된다. 추가 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 꼬리 찌르기에 의해 수득된다.

[0107] 일부 실시형태에서, 작은 부피는 본 명세서에서 정의된 대로이다(예를 들어, "작은 부피" 참고). 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 50 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 20 μ L이다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 10 μ L이다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 이다.

[0108] 작은 부피의 혈액 샘플의 채취는 개체에 대한 해(예를 들어, 통증, 혈액 소실, 혈액 수준의 느린 회복)를 감소 시키므로, 작은 부피의 혈액 샘플의 수득은 예를 들어, 큰 부피의 혈액 샘플에 비하여 개체의 더 빈번한 샘플링을 가능하게 한다. 예를 들어, 현재의 방법을 이용하여, 작은 동물(예를 들어, 래트, 마우스)로부터 빈번한 혈액 샘플링을 이룰 수 없으며, 그 이유는 종합적인 혈액 분석은 동물이 희생되어야 할만큼 너무 많은 혈액을 요구하기 때문이다. 유사하게, 혈액 손실로부터의 해를 방지하기 위하여, 유아는 종종 찌르기(예를 들어, 발뒤꿈치 찌르기)에 의해서만 안전하게 샘플링될 수 있다. 본 발명에서 제공되는 방법에 따르면, 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플이 하루에 1회 이상, 하루에 2회 이상, 하루에 3회 이상, 하루에 4회 이상, 및 하루에 5회 이상의 빈도로 수득될 수 있다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에 5회 이상, 1주에 6회 이상, 및 1주에 7회 이상 수득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 매일 수득된다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 한번, 2주에 한번, 3주에 한번 및 4주에 한번 수득된다. 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 한달에 한번 수득된다.

[0109] **농축 적혈구 샘플 또는 분획**

[0110] 일부 실시형태에서, 본 방법은 적혈구-농축 혈액 샘플 또는 적혈구-농축 분획으로부터 단백질 프로파일을 생성 또는 생성하고 적혈구-농축 혈액 샘플 또는 분획 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것에 관련된다. 적혈구-농축 샘플 및 적혈구-농축 분획은 예를 들어, 백혈구제거 및/또는 혈소판 고갈에 의해 개체로부터 채취된 혈액 샘플로부터 생산될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, RBC는 적혈구-농축 샘플 또는 분획을 생산하기 위하여 샘플로부터 제거될 수 있다.

[0111] 백혈구제거 및 혈소판 고갈을 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Wenz, B., "Methods for leukodepletion" in "Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products", pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg; Novotny V., and Brand, A., "Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions" in "Modern Transfusion Medicine", pp117-121, 1995, CRC Press, Inc.; White and Jennings, "Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures", 1999, Academic Press 참고). 백혈구제거를 위한 적합한 기술의 비제한적인 예는 유세포분석, 텍스트란 침강, 피콜/피콜 밀도 구배 원심분리 등을 포함한다.

[0112] 본 발명은 또한 적혈구-농축 샘플을 생산하고 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정함으로써 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출 또는 측정의 민감성을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 혈액 대 텍스트란의 비는 1:1 내지 2:1, 1:1 내지 3:1, 1:1 내지 4:1, 1:1 내지 5:1, 1:1 내지 6:1, 1:1 내지 7:1, 1:1 내지 8:1, 1:1 내지 9:1, 1:1 내지 10:1이다. 다른 실시형태에서, 혈액 대 텍스트란의 비는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1이다. 또 다른 실시형태에서, 혈액 대 텍스트란의 비는 2:1이다. 추가 실시형태에서, 혈액 대 텍스트란의 비는 4:1이다.

[0113] 비제한적인 예로서, 적혈구-농축 샘플 또는 분획은 혈액 샘플에 존재했던 백혈구 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 또는 99.9% 초과 백혈구제거에 의해 생성될 수 있다. 이 맥락에서 '백혈구제거'은 혈액 샘플로부터 직접적으로 백혈구를 고갈시키거나, 및/또는 별도의 백혈구제거된 (RBC-농축된) 분획을 제공하기 위하여 샘플로부터 RBC를 제거함으로써 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 백혈구제거는 혈소판 고갈을 포함한다.

[0114] 부가적으로 또는 대안적으로, 적혈구-농축 샘플 또는 분획은 혈액 샘플에 존재했던 혈소판 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 또는 99.9% 초과 혈소판 고갈에 의해 생성될 수 있다. 이 맥락에서 '혈소판 고갈'은 혈액 샘플로부터 직접적으로 혈소판을 고갈시키거나, 및/또는 별도의 혈소판 고갈된 (RBC-농축된) 분획을 제공하기 위하여 샘플로부터 RBC를 제거함으로써 이루어질 수 있다.

[0115] 일부 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플 또는 분획은 (RBC-농축 분획 내에 존재하는 혈액 세포의 총 수의 성분으

로서) 99.75% 초과, 99.8% 초과, 99.9% 초과, 99.95% 초과, 약 100%, 또는 100%의 적혈구를 포함할 수 있다.

[0116] 주어진 농축된 샘플 또는 분획 내의 RBC의 백분율은 예를 들어, 유세포분석, 형광 현미경, 기타 항체계 기술 등을 비롯한 당업자에게 알려진 일상적인 방법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0117] **작은 부피의 적혈구-농축 샘플**

[0118] 본 발명은 또한 작은 부피의 적혈구-농축 혈액 샘플로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 작은 부피는 적혈구-농축 샘플에서의 단백질 검출 또는 단백질 측정의 후속 방법을 위해 당업계에서 알려지고 당업자에 의해 적절한 것으로 간주되는 방법에 의해 적혈구-농축 혈액 샘플로부터 수득될 수 있다(예를 들어, 하기의 단백질 프로파일링 참고). 작은 부피는 본 명세서에서 정의된 대로의 부피이다(예를 들어, "작은 부피" 참고). 비제한적인 예로서, 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 10 μ L, 5 μ L 내지 20 μ L, 5 μ L 내지 30 μ L, 5 μ L 내지 40 μ L, 5 μ L 내지 50 μ L, 5 μ L 내지 60 μ L, 5 μ L 내지 70 μ L, 5 μ L 내지 80 μ L, 5 μ L 내지 90 μ L, 또는 5 μ L 내지 100 μ L일 수 있다. 일 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L이다. 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 50 μ L이다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 20 μ L이다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L 내지 10 μ L이다. 일부 실시형태에서, 작은 부피는 5 μ L이다.

[0119] **RBC를 포함하는 전혈**

[0120] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 RBC를 포함하는 전혈 샘플의 분석에 관련된다. 이들 실시형태에서, 전혈 샘플은 샘플 내의 혈액 세포 유형들의 상대적 비율의 변경이 없거나 실질적으로 없이 그리고 혈장/혈청의 분리 없이 단백질 프로파일에 대해 분석된다.

[0121] 전혈 샘플은 당업자에게 알려진 예시적인 수단을 이용하여 수득될 수 있다(예를 들어, World Health Organisation, "Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives", World Health Organisation Technical report Series, No. 840, 1994, Annex 2 참고). 방법은 또한 본 명세서의 실시예에서 제시된다.

[0122] 비제한적인 예로서, 전혈 샘플은 정맥혈, 모세혈관 혈액, 동맥혈 또는 그 조합을 이용하여 수득될 수 있다.

[0123] 일부 실시형태에서, 전혈의 분석에 관련되는 본 발명의 방법은 건조 혈점(DBS) 샘플링을 이용하여 수행될 수 있다. DBS 샘플링의 비제한적인 이점은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 샘플 안정성, 최소 부피 요구(예를 들어, 점(spot) 당 30-100 μ L), 샘플 채취(예를 들어, 손가락, 발가락 또는 발뒤꿈치 찌르기) 및 수송 용이성. 본 발명에서 사용하기 위해 수득된 DBS 샘플은 예를 들어, 냉장하에서 및/또는 주위 온도에서 수개월 내지 수년 동안 안정성을 유지할 수 있다.

[0124] DBS를 위한 적합한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, McDade, *et al.*; Demography 2007, 44: 899-925; De Jesus *et al.* Clin Chem 2009, 55:1; 158-164; Sharma *et al.* Drug Testing and Analysis, 2014, 6(5), 399-414 참고).

[0125] 요약하면, 그리고 다시 단지 비제한적인 예로서, 전혈은 적절한 장비(예를 들어, 멸균 외과용 칼 또는 일회용 란셋)를 이용하여 관심 개체(예를 들어, 손가락, 발뒤꿈치 또는 발가락 찌르기)로부터 수득되고 예를 들어, 막 또는 종이(예를 들어, 여과지 카드) 상에 점찍힌다. 정량 분석을 위하여, 측정된 부피의 혈액이 적용될 수 있다. 그 후 혈액은 예를 들어, 실온에서 및/또는 질소 유동하에서 및/또는 제어된 습도하에서 건조될 수 있다. 건조 시간은 일반적으로 적어도 부분적으로 샘플 부피에 의존할 것이다. DBS 막 또는 종이는 주위 온도에서 저장되거나 냉장될 수 있으며, 습도를 피하기 위하여 적절하게 포장될 수 있다. DBS는 그 후 적합한 때에 분석을 위하여 (예를 들어, 추출 용매 또는 유사물을 이용하여) 추출될 수 있다.

[0126] **추가 혈액 구획의 분석**

[0127] 농축 RBC 분획 또는 RBC를 포함하는 전혈 샘플의 단백질 프로파일링에 더하여, 본 발명의 방법은 추가로 하나 이상의 추가의 혈액 구획(들)의 단백질 프로파일 분석을 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0128] 예를 들어, 단백질 프로파일 분석은 혈장, 혈청, 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등) 및 그 조합으로부터 선택된 하나 이상의 추가의 혈액 구획(들)에서 수행될 수 있다.

[0129] 분석을 위한 추가의 혈액 구획(들)은 공지 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 세포 성분은 유세포분

석, 자기 비드 분리, 원심분리 등에 의해 분리될 수 있다. 혈장/혈청 분리 기술 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 많은 표준 교과서 및 프로토콜이 이용가능하며 이들 목적을 위하여 널리 이용되며, 비제한적인 예로서 World Health Organisation, "Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives", World Health Organisation Technical report Series, No. 840, 1994, Annex 2; Wenz, B., "Methods for leukodepletion" in "Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products", pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg; Novotny V., and Brand, A. "Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions" in "Modern Transfusion Medicine", pp117-121, 1995, CRC Press, Inc.; White and Jennings, "Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures", 1999, Academic Press)를 참고한다.

[0130]

[0131]

혈액 안정화제 및 항응고제

[0132]

상기에 기재한 대로 그리고 다시 특정 기계론적 특징에 대한 제한없이, RBC는 상이한 단백질(예를 들어, 사이토카인 및 케모카인)을 격리하고 방출하는 능력을 가질 수 있는 것으로 가정되며, RBC에 의한 단백질 방출(또는 대안적으로는 격리) 정도는 혈액 채취 및 가공 동안 발생하는 다양한 인자들에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다.

[0133]

일부 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 혈액 샘플 또는 그 성분은 혈액 안정화제와 혼합될 수 있다. RBC를 안정화시키는 능력을 가진 제제는 가공 동안 RBC로부터 단백질의 격리 및/또는 방출을 감소시키거나 방지하기 위하여 유용하다.

[0134]

혈액 세포 안정화제는 개체로부터 혈액 샘플의 채취시에 및/또는 혈액 샘플 또는 그 성분(들)의 후속 가공동안 혈액 샘플과 혼합될 수 있다. 비제한적인 예로서, 혈액 안정화제는 개체로부터 혈액 샘플을 수득하고 1 초, 2 초, 3 초, 4 초, 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 혈액 샘플 또는 그 성분과 혼합될 수 있다.

[0135]

적합한 혈액 안정화제의 비제한적인 예는 프로테아제 억제제(예를 들어, 아프로티닌, 류펩틴, α_2 -마크로글로불린, 안티페인 다이하이드로클로라이드, 칼페인 억제제 I, 칼페인 억제제 II, 키모스타틴, TLCK(CAS 131918-97-3), 트립신-억제제, 페파블록 SC(로슈), PMSF($C_6H_5CH_2SO_2F$ - 써모 피셔 사이언티픽), 완전 프로테아제 억제제 카테일(로슈), 등), 항응고제, RNA 안정화제(예를 들어, RNALater - 써모 피셔 사이언티픽), 단백질 변성화제 또는 그 조합을 포함한다.

[0136]

예시적 실시형태에서, 혈액 안정화제는 항응고제이다. 항응고제는 개체로부터 혈액 샘플의 채취시에(예를 들어, 혈액 샘플이 채취되는 병 또는 용기가 항응고제를 함유할 수 있음), 및/또는 혈액 샘플 또는 그 성분(들)의 후속 가공 동안 항응고제와 혼합될 수 있다.

[0137]

적합한 항응고제의 비제한적인 예는 헤파린, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), EDTA 디소듐 염, EDTA 테트라소듐 염, EDTA 디포타슘 염, EDTA 디암모늄 염, 에틸렌비스(옥시에틸렌이트릴로)테트라아세트산(EGTA), EDTA 트리소듐 염, EDTA 트리포타슘 염, 에틸렌 글리콜-0,0-비스(2-아미노에틸)-N,N,N,N-테트라아세트산, N-(2-하이드록시에틸)에틸렌디아민-N,N,N-트리아세트산 트리소듐 염, 시트레이트, 산-시트레이트-텍스트로스, 디-암모늄 하이드로젠 시트레이트, 디-암모늄 타르트레이트, 와파린, N-(2-비스(카르복시메틸)아미노에틸)-N-(2-하이드록시에틸)글리신 염 디하이드레이트, 시트르산, 시트르산 모노소듐 염, 시트르산 디소듐 염, 시트르산 트리소듐 염, 시트르산 모노포타슘 염, 시트르산 트리포타슘 염, 단백질 C/단백질 S, 니트릴로트리아세트산, 포타슘 소듐 타르트레이트, 포타슘 하이드로젠 D-타르트레이트, L-타르타르산 모노소듐 염, L-타르타르산 디소듐 염, L-타르타르산 디포타슘 염, 스트렙토키나제, 프로타민 설페이트, 트리스(카르복시메틸)아민, 항-트롬빈 III, 페프로코우몬(phenprocoumon), 히루딘(hirudin), 니코우마론(nicoumalone), 쿠마딘(Coumadin), 글리코사미노글리세이드(glycosaminoglycans), 이부프로펜, 아세틸살리실산, 인도메타신, 프로스타글란딘, 설핀피라존, 유로키나제, 히루로그(hirulog), 조직 플라스미노겐 활성화자, 쿠마린 또는 그 조합을 포함한다.

[0138]

항응고제는 예를 들어, RBC-농축 분획의 분석에 더하여, 백혈구, 혈소판 및/또는 혈장 중 하나 이상의 단백질 프로파일링이 필요할 때, 사용하기에 유익할 수 있다. 항응고제는 또한 만일 혈액의 전체 세포 성분(즉, 혈액 세포에서 혈장 성분을 뺀 혼합 집단)의 단백질 프로파일링을 수행하는 것이 필요하다면 이용하기에 유익할 수

있다.

[0139] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 혈액 샘플은 항응고제와 혼합되지 않을 수 있다. 이것은 단백질 프로파일이 RBC, 농축된 RBC, 또는 전혈 샘플 상에서 수행될 경우일 수 있다. 그러한 경우에, 항응고제 활성이 없거나 공칭량의 항응고제 활성만을 가진 다른 안정화제가 혈액 샘플 또는 그 성분과 혼합될 수 있다.

[0140] 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 혈액 샘플 또는 그 성분은 동결(예를 들어, 신속 동결)에 의해 또는 건조(예를 들어, 건조 혈점)에 의해 안정화될 수 있다.

[0141] 용해물 분석

[0142] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은 세포 용해물로부터 단백질 프로파일을 생성하는 것을 포함한다.

[0143] 단지 비제한적인 예로서, 본 발명의 방법에 따라 제조된 농축된 RBC 분획은 하나 이상의 단백질의 수준이 결정되는 용해물을 제공하기 위해 처리될 수 있다. 예를 들어, 용해물은 전혈, 혈장, 혈청, 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등), 및 그 조합으로부터 선택된 하나 이상의 다른 혈액 구획(들)으로부터 생산될 수 있다.

[0144] 부가적으로 또는 대안적으로, RBC가 아니거나 최소량의 RBC(예를 들어, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0.5% 미만 RBC)를 함유하는 혈액의 다른 세포 성분이 하나 이상의 단백질의 수준이 결정되는 용해물을 제공하기 위하여 처리될 수 있다.

[0145] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 세포 용해물은 예를 들어, 액체 균질화, 기계적 파괴, 동결/해동 사이클, 고주파음파, 수동 분쇄, 화학적 투과화, 효소적 투과화, 스트렙타라이신을 이용한 투과화 등을 비롯한 적합한 수단을 이용하여 생산될 수 있다.

[0146] 일부 실시형태에서, 세포 용해물은 동결/해동의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 5 초과 사이클에 의해 제조된다. 이 기술은 동결 시점에 혈액 샘플 또는 그 성분(들)을 안정화시키고 용해 및 단백질 내용물의 분석 이전에 저장을 허용하는 수단을 제공하는 잠재적 이점을 제공한다. 전형적으로, 신속 동결은 -10℃, -20℃, -30℃, -40℃, -50℃, -60℃, -70℃, -75℃, -80℃, -90℃, -100℃, -120℃, -140℃, -160℃, -180℃, -190℃, -195℃, 또는 -196℃ 이하의 온도에서 수행될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 신속 동결은 -5℃, -10℃, -20℃, -30℃, -40℃, -50℃, -60℃, -70℃, -75℃, -80℃, -90℃, -100℃, -120℃, -104℃, -160℃, -180℃, -190℃, -200℃ 미만의 온도에서 수행된다. 또 다른 실시형태에서, 신속 동결은 -190℃, -191℃, -192℃, -193℃, -194℃, -195℃, -196℃, -197℃, -198℃, 또는 -199℃ 미만의 온도에서 수행된다. 전혈 샘플, RBC-농축 샘플 또는 분획, 및/또는 다른 상이한 세포 성분이 세포를 안정화시키기 위하여 신속 동결될 수 있다. 이것은 예를 들어, 가공 동안 RBC 및/또는 존재하는 다른 세포 유형으로부터 단백질의 격리 및/또는 방출을 감소시키거나 방지할 수 있다.

[0147]

[0148] 세포 세척액 및 상등액의 분석

[0149] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은 세포 세척액 및/또는 세포 상등액으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 것을 포함한다.

[0150] 세포 세척액 및/또는 세포 상등액은 혈액 샘플 또는 RBC를 포함하는 혈액 샘플 성분으로부터 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, RBC의 수는 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분에 존재하는 혈액 세포의 총 수의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 구성한다.

[0151] 일부 실시형태에서, 세포 세척액은 RBC-농축 세포를 세척하고/하거나 전혈, 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등), 또는 그 조합으로부터 선택된 하나 이상의 세포 혈액 구획(들)을 별도로 세척함으로써 생산될 수 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 세포 상등액은 RBC-농축 세포를 항온처리하거나 배양하고/하거나 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구

(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등), 또는 그 조합으로부터 선택된 하나 이상의 세포 혈액 구획(들)을 별도로 항온처리하거나 배양함으로써 생산될 수 있다. 그 후 세포 상등액은 세포로부터 분리되고, 항온처리되거나 배양된 세포에 의해 (세포내로 및/또는 세포 표면으로부터) 방출된 단백질에 대해 분석될 수 있다. 선택적으로, 상등액의 제거 후 남아 있는 세포는 세척되고 단백질 프로파일을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 세포 세척액은 세포 상등액과 조합되어 단백질 프로파일을 생성하거나, 또는 대안적으로는 개별 단백질 프로파일은 세포 세척액 및 세포 상등액으로부터 별도로 생성될 수 있다. 이것은 원한다면, 두 가지의 개별 프로파일의 비교를 가능하게 할 것이다.

[0153] 일정 기간 동안 상기한 대로 세포를 배양하고 다른 시점에 일련의 상등액을 수집함으로써 일련의 세포 상등액이 생산될 수 있다. 각각의 상등액은 다수의 시점에 걸쳐 단백질 프로파일 분석을 제공하기 위하여 단백질 내용물에 대해 분석될 수 있다. 선택적으로, 항온처리 또는 배양 조건(예를 들어, 배지의 내용물, 온도 등)은 상등액의 샘플링 시점 사이에서 변할 수 있다. 선택적으로, 하나 이상의 시점에서 상등액의 제거 후 남아 있는 세포는 세척되어 단백질 프로파일을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 세포 세척액은 주어진 시점(예를 들어, 동일한 시점)의 세포 상등액과 조합되어 단백질 프로파일을 생성할 수 있다. 대안적으로, 개별 세포 세척액 및 개별 세포 상등액으로부터 개별 단백질 프로파일은 생성될 수 있다. 대안적으로, 다수의 시점으로부터의 세포 세척액이 모아져서 단백질 프로파일을 생성하기 위해 분석될 수 있다. 유사하게, 다수의 시점으로부터의 세포 상등액이 모아지고 단백질 프로파일을 생성하기 위해 분석될 수 있다.

[0154] RBC-농축 세포를 항온처리하거나 배양하고/하거나 다른 세포 혈액 구획(들)을 별도로 항온처리하거나 배양하기 위한 적합한 예시적인 프로토콜 및/또는 배지는 당업자에게 알려져 있다(예를 들어, Koller, Palsson, Masters, (Eds) "Human Cell Culture: Vol IV. Primary Hematopoietic cells", 2006, Springer Science and Business Media; Mirtz and Hughes (Eds) 2001, "Human Cell Culture Protocols, Third edition", 2011, Humana Press 참고). 방법은 또한 본 명세서의 실시예에서 제시된다.

[0155] 세포 세척은 예를 들어, 포스페이트 완충 염수(PBS), 등장성 염액, 성장 배지, 배양 배지 또는 그 조합과 같은 적합한 배지를 이용하여 수행될 수 있다.

[0156] 본 발명의 방법에서 세포 세척 액체, 세포 배양 배지, 또는 세포 항온처리 배지로서 사용하기 적합한 배지의 비제한적인 예는 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 행크스 평형 염액(HBSS), 엘스 평형 염액(EBSS), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및 이스코베스 변형 둘베코스 배지(IMDM) 또는 그 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 배지는 비-성장 또는 증식 상태에서 RBC를 유지하기 위한 PBS 또는 HBSS이다. 다른 실시형태에서, 배지는 RBC의 성장 또는 증식을 자극하기 위한 RPMI이다.

[0157] 양이온성 염의 사용

[0158] 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은 적혈구-농축 샘플을, 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가 및/또는 향상시키는 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉시키는 것을 포함한다. 양이온성 염은 당업자가 결정할 때, 본 방법에서 사용하기 적합한 하나 이상일 수 있다. 일 실시형태에서, 양이온성 염은 1가 또는 다가(예를 들어, 2가, 3가) 금속 이온 염이다. 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 암모늄 염이다.

[0159] 본 방법에서 사용하기 적합한 1가 금속 양이온성 염은 예를 들어, 소듐 염, 포타슘 염, 리튬 염, 등 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 소듐 염은 예를 들어, 소듐 클로라이드, 소듐 시트레이트, 소듐 설페이트, 소듐 락테이트, 소듐 아세테이트, 소듐 바이카보네이트, 소듐 카보네이트, 소듐 스테아레이트, 소듐 아스코르베이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 바이포스페이트, 이염기성 소듐 포스페이트, 소듐 포스페이트, 소듐 바이설파이트, 소듐 보레이트, 소듐 글루코네이트, 소듐 메타실리케이트, 소듐 프로피오네이트 등, 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 포타슘 염은 예를 들어, 포타슘 클로라이드, 포타슘 시트레이트, 포타슘 브로마이드, 포타슘 이오다이드, 포타슘 바이카보네이트, 포타슘 니트라이드, 포타슘 퍼설파이트, 포타슘 설파이트, 포타슘 설페이트, 포타슘 바이설파이트, 포타슘 포스페이트, 포타슘 아세테이트, 포타슘 시트레이트, 포타슘 글루타메이트, 디포타슘 구아닐레이트, 포타슘 글루코네이트, 포타슘 말레이트, 포타슘 아스코르베이트, 포타슘 소르베이트, 포타슘 석시네이트, 포타슘 타르트레이트 및 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 리튬 염은 예를 들어, 리튬 클로라이드, 리튬 브로마이드, 리튬 카보네이트, 리튬 니트레이트, 리튬 설페이트, 리튬 아세테이트, 리튬 락테이트, 리튬 시트레이트, 리튬 아스파테이트, 리튬 글루코네이트, 리튬 말레이트, 리튬 아스코르베이트, 리튬 오르테이트, 리튬 석시네이트 또는 그 조합을 포함한다.

[0160] 본 방법에 사용하기 적합한 2가 금속 양이온 염은 예를 들어, 칼슘 염, 포타슘 염, 베릴륨 염, 스트론튬 염, 바륨 염, 라듐 염, 철(페러스) 염, 등, 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 칼슘 염은 예를 들어, 칼슘 클로라이드, 칼슘 설페이트, 칼슘 락테이트, 칼슘 시트레이트, 칼슘 카보네이트, 칼슘 아세테이트, 칼슘 포스페이트, 칼슘 알지나이트, 칼슘 스테아레이트, 칼슘 소르베이트, 칼슘 글루코네이트 등, 또는 그 조합을 포함한다. 적합한 마그네슘 염은 예를 들어, 마그네슘 플루오라이드, 마그네슘 클로라이드, 마그네슘 브로마이드, 마그네슘 이오다이드, 마그네슘 락테이트, 마그네슘 포스페이트, 마그네슘 설페이트, 마그네슘 설파이트, 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 옥사이드, 마그네슘 니트레이트, 마그네슘 보레이트, 마그네슘 아세테이트, 마그네슘 시트레이트, 마그네슘 글루코네이트, 마그네슘 말리에이트, 마그네슘 석시네이트, 마그네슘 말레이트, 마그네슘 타우레이트, 마그네슘 오로테이트, 마그네슘 글리시네이트, 마그네슘 나프테네이트, 마그네슘 아세틸아세토네이트, 마그네슘 포르메이트, 마그네슘 하이드록사이드, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 핵사플루오르실리케이트, 마그네슘 살리실레이트 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 베릴륨 염은 예를 들어, 베릴륨 포스페이트, 베릴륨 아세테이트, 베릴륨 타르테이트, 베릴륨 시트레이트, 베릴륨 글루코네이트, 베릴륨 말리에이트, 베릴륨 석시네이트, 소듐 베릴륨 말레이트, 베릴륨 알과 브롬 캄포르 설포네이트, 베릴륨 아세틸아세토네이트, 베릴륨 포르메이트 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 스트론튬 염은 예를 들어, 스트론튬 클로라이드, 스트론튬 포스페이트, 스트론튬 설페이트, 스트론튬 카보네이트, 스트론튬 옥사이드, 스트론튬 니트레이트, 스트론튬 아세테이트, 스트론튬 타르테이트, 스트론튬 시트레이트, 스트론튬 글루코네이트, 스트론튬 말리에이트, 스트론튬 석시네이트, 스트론튬 말레이트, L 및/또는 D-형태의 스트론튬 아스파테이트, 스트론튬 푸마레이트, L 및/또는 D-형태의 스트론튬 글루타메이트, 스트론튬 글루타레이트, 스트론튬 락테이트, 스트론튬 L-트레오네이트, 스트론튬 말로네이트, 스트론튬 라네레이트(유기 금속 킬레이트), 스트론튬 아스코르베이트, 스트론튬 부티레이트, 스트론튬 클로드로네이트, 스트론튬 이반드로네이트, 스트론튬 살리실레이트, 스트론튬 아세틸 살리실레이트 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 바륨 염은 예를 들어, 바륨 하이드록사이드, 바륨 플루오라이드, 바륨 클로라이드, 바륨 브로마이드, 바륨 이오다이드, 바륨 설페이트, 바륨 설파이트(S), 바륨 카보네이트, 바륨 퍼옥사이드, 바륨 옥사이드, 바륨 니트레이트, 바륨 아세테이트, 바륨 타르테이트, 바륨 시트레이트, 바륨 글루코네이트, 바륨 말리에이트, 바륨 석시네이트, 바륨 말레이트, 바륨 글루타메이트, 바륨 옥살레이트, 바륨 말로네이트, 바륨 나프테네이트, 바륨 아세틸아세토네이트, 바륨 포르메이트, 바륨 벤조에이트, 바륨 p-t-부틸벤조에이트, 바륨 아디페이트, 바륨 피멜레이트, 바륨 수베레이트, 바륨 아젤레이트, 바륨 세바케이트, 바륨 프탈레이트, 바륨 이소프탈레이트, 바륨 테레프탈레이트, 바륨 안트라닐레이트, 바륨 만델레이트, 바륨 살리실레이트, 바륨 티타네이트 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 라듐 염은 예를 들어, 라듐 플루오라이드, 라듐 클로라이드, 라듐 브로마이드, 라듐 이오다이드, 라듐 옥사이드, 라듐 니트라이드 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 적합한 라듐 염은 예를 들어, 라듐 플루오라이드, 라듐 클로라이드, 라듐 브로마이드, 라듐 이오다이드, 라듐 옥사이드, 라듐 니트라이드 등을 포함하였다. 적합한 철(페러스) 염은 예를 들어, 페러스 설페이트, 페러스 옥사이드, 페러스 아세테이트, 페러스 시트레이트, 페러스 암모늄 시트레이트, 페러스 글루코네이트, 페러스 옥살레이트, 페러스 푸마레이트, 페러스 말리에이트, 페러스 말레이트, 페러스 락테이트, 페러스 아스코르베이트, 페러스 에리트로베이트, 페러스 글리세레이트, 페러스 피루베이트, 등 또는 그 조합을 포함할 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 양이온성 염은 적혈구-농축 샘플에서 pH 변화를 방지하고/하거나 최소화할 수 있는 것이다 (예를 들어, 클로라이드 또는 카보네이트 염). 따라서, 일부 실시형태에서, 양이온성 염은 카보네이트 염이다. 추가 실시형태에서, 양이온성 염은 또한 세포막(예를 들어, RBC 막)에의 손상을 방지하거나 최소화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 양이온성 염은 클로라이드 염이다. 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 칼슘 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 스트론튬 클로라이드, 바륨 클로라이드, 라듐 클로라이드, 또는 그 조합이다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 루비듐 클로라이드, 세슘 클로라이드, 리튬 클로라이드, 또는 그 조합이다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 리튬 클로라이드이다. 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 소듐 클로라이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 양이온성 염은 칼슘 카보네이트, 포타슘 카보네이트, 스트론튬 카보네이트, 바륨 카보네이트, 또는 라듐 카보네이트일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 소듐 카보네이트, 포타슘 카보네이트, 루비듐 카보네이트, 세슘 카보네이트, 리튬 카보네이트, 또는 그 조합일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 리튬 카보네이트이다. 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 소듐 카보네이트이다.

[0162] 예를 들어, 알루미늄, 실리콘, 스칸듐, 티타늄, 바나듐, 크로뮴, 코발트, 니켈, 구리, 망간, 아연, 주석, 은 등, 또는 그 조합과 같은 3가 또는 다른 다가 염을 비롯한 1가 또는 2가 금속 양이온성 염 외의 다른 염이 본 방법에서 사용될 수 있다.

- [0163] 암모늄 염이 또한 본 방법에서 사용될 수 있으며, 적합한 암모늄 염은 암모늄 카보네이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 니트레이트, 암모늄 아세테이트, 암모늄 비오레이트, 암모늄 브로마이드, 암모늄 카르바메이트, 암모늄 세륨(IV) 설페이트, 암모늄 크로메이트, 암모늄 디크로메이트, 암모늄 디하이드로젠 포스페이트, 암모늄 플루오라이드, 암모늄 포르메이트, 암모늄 포스페이트, 암모늄 소듐 포스페이트 이염기성 테트라하이드레이트, 암모늄 티오설페이트, 암모늄 지르코늄 등 또는 그 조합을 포함한다.
- [0164] 일부 실시형태에서, 양이온성 염은 암모늄 클로라이드이다. 다른 실시형태에서, 양이온성 염은 암모늄 카보네이트이다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플은 샘플 내의 하나 이상의 단백질 수준의 검출가능한 수준을 증가 및/또는 향상시키기 위하여 전술한 양이온성 염의 하나 이상의 조합과 접촉된다. 일부 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플은 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플은 적어도 두가지의 양이온성 염과 접촉된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플은 적어도 세가지의 양이온성 염과 접촉된다.
- [0166] 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 혈액 샘플의 적혈구 농축 이전에 샘플 내의 하나 이상의 단백질 수준의 검출가능한 수준을 증가 및/또는 향상시키기 위하여 전술한 양이온성 염의 하나 이상의 조합과 접촉된다. 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉된다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 적어도 두가지의 양이온성 염과 접촉된다. 또 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 적어도 세가지의 양이온성 염과 접촉된다.
- [0167] 본 명세서에서 염(예를 들어, 소듐 함유 염)에 대한 언급은 염의 무수 형태 및 수화 형태를 포함한다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 전혈 샘플은 단백질 프로파일을 생성하기 위하여 전술한 양이온성 염 중 적어도 하나와 접촉된다. 전혈 샘플은 정맥혈, 모세혈관 혈액, 동맥혈 또는 그 조합으로부터, 당업자에게 알려진 방법을 이용하여 수득될 수 있다.
- [0169] 다른 실시형태에서, 혈장, 혈청, 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등), 및 그 조합으로부터 선택된 하나 이상의 추가의 혈액 구획(들)이 단백질 프로파일을 생성하기 위하여 전술한 양이온성 염 중 적어도 하나와 접촉된다. 분석을 위한 추가의 혈액 구획(들)은 공지 기술(예를 들어, 유세포분석, 자기 비드 분리, 원심분리 등)을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0170] **단백질 프로파일링**
- [0171] 본 발명은 RBC를 포함하는 혈액 샘플(예를 들어, RBC-농축 분획 또는 전혈 샘플)로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 그러한 프로파일의 생성은 염증, 면역 반응 및/또는 세포 회복, 또는 질병 상태를 비롯한, 그러나 이에 제한되지 않는 중요한 생물학적 과정에 대한 이해를 제공할 수 있다.
- [0172] 본 발명의 방법에 의한 단백질 프로파일 생성에서 검출될 수 있는 단백질의 유형(들)에 대한 특별한 제한을 부여하지 않으면서, 비제한적인 예는 시그널링 분자, 예를 들어, 케모카인, 사이토카인, 성장 인자, 수용체, 세포 내 시그널 전달자, 호르몬, 핵 전사 인자, 신경전달자, 세포외 매트릭스 성분 및 효소를 포함한다. 예를 들어, 성장 인자는 예를 들어, 피부 세포(예를 들어, 상피 성장 인자(EGF), 각질세포 성장 인자(KGF), 이동 자극 인자(MSF)), 신경 세포/신경계(예를 들어, 뉴레글린(예를 들어, 뉴레글린 1-4) 및 뉴로트로핀(예를 들어, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor)(BDNF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뉴로트로핀-4(NT-4))), 결합 조직 및 간엽 세포(예를 들어, 섬유아세포 성장 인자(FGF)), 혈관 세포(예를 들어, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 태반 성장 인자(PGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF)), 혈액 세포(예를 들어, 에리트로포이에틴, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)), 및 세포 증식(예를 들어, 인슐린-유사 성장 인자(IGF-1), 인슐린-유사 성장 인자-2(IGF-2))의 성장, 증식, 치유 또는 분화를 자극하는 것들 및 다면발현 성장인자(예를 들어, 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β), 형질전환 성장 인자-베타(TGF- α), 종양 괴사 인자(TNF))를 포함할 수 있다.
- [0173] 수용체는 세포내 수용체(예를 들어, 핵(예를 들어, 전사 인자), 세포질(예를 들어, 스테로이드), 및 소포체(예를 들어, IP₃) 수용체) 또는 세포 표면 수용체(예를 들어, 이온 채널-연결, G-단백질-연결, 효소-연결, 톨 게이트(toll gate), 및 리간드 관문 수용체(ligand gated receptors), 인테그린)를 포함할 수 있다. 호르몬은 지질-유도(예를 들어, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 프로스타실린, 트롬복세인); 아미노산-유도(예를 들어, 에피네프린, 멜라토닌, 티록신); 펩티드(예를 들어, 아밀린, 아디포넥틴, 안지오텐시노젠, 칼시토닌, 뇌 나트륨이노

펩티드(BNP), 에리트로포이에틴, 여포-자극 호르몬(FSH), 그렐린, 글루카곤-유사 펩티드-1(GLP-1), 인간 융모성 생식선 자극호르몬(hCG), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 등); 및 스테로이드(예를 들어, 안드로젠, 에스트로젠, 글루코코르티코이드, 황체호르몬제, 세코스테로이드 등)을 포함할 수 있다. 세포내 시그널 전달자 또는 전송자는 단백질 및 단백질 키나제 패밀리를 포함할 수 있다. 예를 들어, Ras 및 Src 패밀리를 포함할 수 있다. 신경전달자는 아미노산, 펩티드(예를 들어, β -엔돌핀, 오피오이드), 모노아민, 미량 아민(trace amines), 퓨린 및 기체성전달자(gasotransmitter)를 포함할 수 있다. 핵 전사 인자는 DNA 전사의 조절자(예를 들어, fos, myc, N-myc), 및 mRNA 전사의 조절자, 및 세포 분열의 억제제(예를 들어, p53, pRb)를 포함할 수 있다. 효소는 산화환원효소(예를 들어, 알콜, 알데히드, 아미노산, 황, 디페놀, 퍼옥시디제(oxidises) 등) NADH, NADPH, 뉴클레아제, 프로테아제, 키나제, 트랜스퍼라제, 하이드롤라제, 리아제, 이소머라제, 및 리가제를 포함할 수 있다. 케모카인 및 사이토카인은 많으며 예를 들어, 하기 표 1 및 표 2에 열거된 것들을 포함할 수 있다.

[0174] 일부 실시형태에서, 본 방법은 하기 표 1 및 2에 개시된 단일 단백질 또는 단백질의 조합으로 이루어지거나 이를 포함하는 단백질 프로파일을 생성하는 것을 포함한다. 프로파일은 RBC를 포함하는 혈액 샘플(예를 들어, 적혈구-농축 샘플, RBC-농축 분획, 또는 전혈 샘플)로부터 생성될 수 있다. 추가의 프로파일(들)은 혈장, 혈청, 혈소판, 백혈구, 농축 혈소판 분획, 농축 백혈구 분획, 혈소판-풍부 혈장, 백혈구-풍부 혈장, 혈소판과 백혈구의 혼합물, 특정 백혈구(들)(예를 들어, T 림프구 중 하나 이상(예를 들어, CD4+ T 림프구, CD8+ T 림프구), B 림프구, NK 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구 등), 또는 그 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 세포 구획(들)으로부터 생성될 수 있다.

[0175] 표 1: 본 발명의 방법에 의해 생성된 단백질 프로파일에 포함될 수 있는 개별 단백질의 비제한적인 예. 단백질 프로파일은 열거된 단백질 하나 이상을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

단일 단백질(두문자어)	단일 단백질(전체 명칭)
염기성FGF	염기성 섬유아세포 성장 인자
CTACK (CCL27)	피부 T-세포 당김 케모카인
에오타신 1	CCL11 #1
G-CSF (G-CSF)	과립구-콜로니 자극 인자
GM-CSF (CSF2)	과립구-대식세포 콜로니-자극 인자
HGF	간세포 성장 인자
IFN- α 2	인터페론 알파 서브타입 α 2
IFN- γ	인터페론 감마
IL-10	인터루킨 10
IL-12 (IL-12p70)	인터루킨 12 p35 및 p40 이중이량체
IL-13	인터루킨 13
IL-12p40	인터루킨 12 p40 서브유닛
IL-15	인터루킨 15
IL-16	인터루킨 16
IL-17A	인터루킨 17A
IL-18	인터루킨 18
IL-1 α	인터루킨 1 알파
IL-1 β	인터루킨 1 베타
IL-2	인터루킨 2
IL-2ra	인터루킨 2 수용체 알파 체
IL-3	인터루킨 3
IL-5	인터루킨 5
IL-6	인터루킨 6
IL-7	인터루킨 7
IL-9	인터루킨 9
IP-10 (CXCL10)	인터페론 감마-유도 단백질 10
LIF	백혈병 억제 인자
M-CSF (CSF1)	대식세포 콜로니-자극 인자
MIG (CXCL9)	IFN감마에 의해 유도된 모노카인, 케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 9

[0176]

MIP-1 α (CCL3)	대식세포 염증성 단백질-1 알파
MIP-1 β (CCL4)	대식세포 염증성 단백질-1 알파
PDGF-BB	혈소판-유래 성장 인자 8 세 동종이량체
SDF-1 α (CXCL12)	기질 세포-유래 인자 1
TNF- α (카케신)	중양 과사 인자 알파
TNF- β (림프독소)	중양 과사 인자 베타
TRAIL	TNF-관련 어파토시스-유도 리간드
VEGF	혈관 내피 성장 인자
IL-8	인터루킨 8
MCP-1 (CCL2)	단핵구 화학유인물질 단백질-1
MGSA	게놈 안정성 유지 단백질 A (maintenance of genome stability protein A)
PGE-2	프로스타글란딘 E2
RANTES (CCL5)	활성화시에 조절됨, 정상 T 세포 발현 및 분비됨
MIF (MMIF)	대식세포 이동 억제 인자
GRO- α (CXCL1)	성장 조절된 암유전자 α
CRP	C- 반응성 단백질
DDT (MIF-2)	D- 도파크를 토모라제
IGF-1	인슐린 유사 성장 인자 1

[0177]

[0178]

표 2: 본 발명의 방법에 의해 생성된 단백질 프로파일에 포함될 수 있는 단백질 쌍의 비제한적인 예. 단백질 프로파일은 열거된 단백질쌍 하나 이상을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
염기성 FGF	CTACK	CTACK	예오타신 1	예오타신 1	G-CSF	G-CSF	GM-CSF
염기성 FGF	예오타신 1	CTACK	G-CSF	예오타신 1	GM-CSF	G-CSF	HGF
염기성 FGF	G-CSF	CTACK	GM-CSF	예오타신 1	HGF	G-CSF	IFN- α 2
염기성 FGF	GM-CSF	CTACK	HGF	예오타신 1	IFN- α 2	G-CSF	IFN- γ
염기성 FGF	HGF	CTACK	IFN- α 2	예오타신 1	IFN- γ	G-CSF	IL-10
염기성 FGF	IFN- α 2	CTACK	IFN- γ	예오타신 1	IL-10	G-CSF	IL-12
염기성 FGF	IFN- γ	CTACK	IL-10	예오타신 1	IL-12	G-CSF	IL-13
염기성 FGF	IL-10	CTACK	IL-12	예오타신 1	IL-13	G-CSF	IL-12p40
염기성 FGF	IL-12	CTACK	IL-13	예오타신 1	IL-12p40	G-CSF	IL-15
염기성 FGF	IL-13	CTACK	IL-12p40	예오타신 1	IL-15	G-CSF	IL-16
염기성 FGF	IL-12p40	CTACK	IL-15	예오타신 1	IL-16	G-CSF	IL-17A
염기성 FGF	IL-15	CTACK	IL-16	예오타신 1	IL-17A	G-CSF	IL-18
염기성 FGF	IL-16	CTACK	IL-17A	예오타신 1	IL-18	G-CSF	IL-1 α
염기성 FGF	IL-17A	CTACK	IL-18	예오타신 1	IL-1 α	G-CSF	IL-1 β
염기성 FGF	IL-18	CTACK	IL-1 α	예오타신 1	IL-1 β	G-CSF	IL-2
염기성 FGF	IL-1 α	CTACK	IL-1 β	예오타신 1	IL-2	G-CSF	IL-2ra
염기성 FGF	IL-1 β	CTACK	IL-2	예오타신 1	IL-2ra	G-CSF	IL-3
염기성 FGF	IL-2	CTACK	IL-2ra	예오타신 1	IL-3	G-CSF	IL-5
염기성 FGF	IL-2ra	CTACK	IL-3	예오타신 1	IL-5	G-CSF	IL-6
염기성 FGF	IL-3	CTACK	IL-5	예오타신 1	IL-6	G-CSF	IL-7
염기성 FGF	IL-5	CTACK	IL-6	예오타신 1	IL-7	G-CSF	IL-9
염기성 FGF	IL-6	CTACK	IL-7	예오타신 1	IL-9	G-CSF	IP-10
염기성 FGF	IL-7	CTACK	IL-9	예오타신 1	IP-10	G-CSF	LIF
염기성 FGF	IL-9	CTACK	IP-10	예오타신 1	LIF	G-CSF	M-CSF
염기성 FGF	IP-10	CTACK	LIF	예오타신 1	M-CSF	G-CSF	MIG
염기성 FGF	LIF	CTACK	M-CSF	예오타신 1	MIG	G-CSF	MIP-1 α
염기성 FGF	M-CSF	CTACK	MIG	예오타신 1	MIP-1 α	G-CSF	MIP-1 β
염기성 FGF	MIG	CTACK	MIP-1 α	예오타신 1	MIP-1 β	G-CSF	PDGF-BB
염기성 FGF	MIP-1 α	CTACK	MIP-1 β	예오타신 1	PDGF-BB	G-CSF	SDF-1 α
염기성 FGF	MIP-1 β	CTACK	PDGF-BB	예오타신 1	SDF-1 α	G-CSF	TNF- α
염기성 FGF	PDGF-BB	CTACK	SDF-1 α	예오타신 1	TNF- α	G-CSF	TNF- β
염기성 FGF	SDF-1 α	CTACK	TNF- α	예오타신 1	TNF- β	G-CSF	TRAIL
염기성 FGF	TNF- α	CTACK	TNF- β	예오타신 1	TRAIL	G-CSF	VEGF

[0179]

염기성 FGF	TNF-β	CTACK	TRAIL	예오탁신 1	VEGF	G-CSF	IL-8
염기성 FGF	TRAIL	CTACK	VEGF	예오탁신 1	IL-8	G-CSF	MCP-1
염기성 FGF	VEGF	CTACK	IL-8	예오탁신 1	MCP-1	G-CSF	MGSA
염기성 FGF	IL-8	CTACK	MCP-1	예오탁신 1	MGSA	G-CSF	PGE-2
염기성 FGF	MCP-1	CTACK	MGSA	예오탁신 1	PGE-2	G-CSF	RANTES
염기성 FGF	MGSA	CTACK	PGE-2	예오탁신 1	RANTES	G-CSF	MIF
염기성 FGF	PGE-2	CTACK	RANTES	예오탁신 1	MIF	G-CSF	GRO-α
염기성 FGF	RANTES	CTACK	MIF	예오탁신 1	GRO-α	G-CSF	CRP
염기성 FGF	MIF	CTACK	GRO-α	예오탁신 1	CRP	G-CSF	DDT
염기성 FGF	GRO-α	CTACK	CRP	예오탁신 1	DDT		
염기성 FGF	CRP	CTACK	DDT				
염기성 FGF	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
GM-CSF	HGF	HGF	IFN-α2	IFN-α2	IFN-γ	IFN-γ	IL-10
GM-CSF	IFN-α2	HGF	IFN-γ	IFN-α2	IL-10	IFN-γ	IL-12
GM-CSF	IFN-γ	HGF	IL-10	IFN-α2	IL-12	IFN-γ	IL-13
GM-CSF	IL-10	HGF	IL-12	IFN-α2	IL-13	IFN-γ	IL-12p40
GM-CSF	IL-12	HGF	IL-13	IFN-α2	IL-12p40	IFN-γ	IL-15
GM-CSF	IL-13	HGF	IL-12p40	IFN-α2	IL-15	IFN-γ	IL-16
GM-CSF	IL-12p40	HGF	IL-15	IFN-α2	IL-16	IFN-γ	IL-17A
GM-CSF	IL-15	HGF	IL-16	IFN-α2	IL-17A	IFN-γ	IL-18
GM-CSF	IL-16	HGF	IL-17A	IFN-α2	IL-18	IFN-γ	IL-1α
GM-CSF	IL-17A	HGF	IL-18	IFN-α2	IL-1α	IFN-γ	IL-1β
GM-CSF	IL-18	HGF	IL-1α	IFN-α2	IL-1β	IFN-γ	IL-2
GM-CSF	IL-1α	HGF	IL-1β	IFN-α2	IL-2	IFN-γ	IL-2ra
GM-CSF	IL-1β	HGF	IL-2	IFN-α2	IL-2ra	IFN-γ	IL-3
GM-CSF	IL-2	HGF	IL-2ra	IFN-α2	IL-3	IFN-γ	IL-5
GM-CSF	IL-2ra	HGF	IL-3	IFN-α2	IL-5	IFN-γ	IL-6
GM-CSF	IL-3	HGF	IL-5	IFN-α2	IL-6	IFN-γ	IL-7
GM-CSF	IL-5	HGF	IL-6	IFN-α2	IL-7	IFN-γ	IL-9
GM-CSF	IL-6	HGF	IL-7	IFN-α2	IL-9	IFN-γ	IP-10
GM-CSF	IL-7	HGF	IL-9	IFN-α2	IP-10	IFN-γ	LIF
GM-CSF	IL-9	HGF	IP-10	IFN-α2	LIF	IFN-γ	M-CSF
GM-CSF	IP-10	HGF	LIF	IFN-α2	M-CSF	IFN-γ	MIG
GM-CSF	LIF	HGF	M-CSF	IFN-α2	MIG	IFN-γ	MIP-1α
GM-CSF	M-CSF	HGF	MIG	IFN-α2	MIP-1α	IFN-γ	MIP-1β
GM-CSF	MIG	HGF	MIP-1α	IFN-α2	MIP-1β	IFN-γ	PDGF-BB
GM-CSF	MIP-1α	HGF	MIP-1β	IFN-α2	PDGF-BB	IFN-γ	SDF-1α
GM-CSF	MIP-1β	HGF	PDGF-BB	IFN-α2	SDF-1α	IFN-γ	TNF-α
GM-CSF	PDGF-BB	HGF	SDF-1α	IFN-α2	TNF-α	IFN-γ	TNF-β
GM-CSF	SDF-1α	HGF	TNF-α	IFN-α2	TNF-β	IFN-γ	TRAIL
GM-CSF	TNF-α	HGF	TNF-β	IFN-α2	TRAIL	IFN-γ	VEGF
GM-CSF	TNF-β	HGF	TRAIL	IFN-α2	VEGF	IFN-γ	IL-8
GM-CSF	TRAIL	HGF	VEGF	IFN-α2	IL-8	IFN-γ	MCP-1
GM-CSF	VEGF	HGF	IL-8	IFN-α2	MCP-1	IFN-γ	MGSA
GM-CSF	IL-8	HGF	MCP-1	IFN-α2	MGSA	IFN-γ	PGE-2
GM-CSF	MCP-1	HGF	MGSA	IFN-α2	PGE-2	IFN-γ	RANTES
GM-CSF	MGSA	HGF	PGE-2	IFN-α2	RANTES	IFN-γ	MIF
GM-CSF	PGE-2	HGF	RANTES	IFN-α2	MIF	IFN-γ	GRO-α
GM-CSF	RANTES	HGF	MIF	IFN-α2	GRO-α	IFN-γ	CRP
GM-CSF	MIF	HGF	GRO-α	IFN-α2	CRP	IFN-γ	DDT
GM-CSF	GRO-α	HGF	CRP	IFN-α2	DDT		
GM-CSF	CRP	HGF	DDT				
GM-CSF	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
IL-10	IL-12	IL-12	IL-13	IL-13	IL-12p40	IL-12p40	IL-15

[0180]

IL-10	IL-13	IL-12	IL-12p40	IL-13	IL-15	IL-12p40	IL-16
IL-10	IL-12p40	IL-12	IL-15	IL-13	IL-16	IL-12p40	IL-17A
IL-10	IL-15	IL-12	IL-16	IL-13	IL-17A	IL-12p40	IL-18
IL-10	IL-16	IL-12	IL-17A	IL-13	IL-18	IL-12p40	IL-1α
IL-10	IL-17A	IL-12	IL-18	IL-13	IL-1α	IL-12p40	IL-1β
IL-10	IL-18	IL-12	IL-1α	IL-13	IL-1β	IL-12p40	IL-2
IL-10	IL-1α	IL-12	IL-1β	IL-13	IL-2	IL-12p40	IL-2ra
IL-10	IL-1β	IL-12	IL-2	IL-13	IL-2ra	IL-12p40	IL-3
IL-10	IL-2	IL-12	IL-2ra	IL-13	IL-3	IL-12p40	IL-5
IL-10	IL-2ra	IL-12	IL-3	IL-13	IL-5	IL-12p40	IL-6
IL-10	IL-3	IL-12	IL-5	IL-13	IL-6	IL-12p40	IL-7
IL-10	IL-5	IL-12	IL-6	IL-13	IL-7	IL-12p40	IL-9
IL-10	IL-6	IL-12	IL-7	IL-13	IL-9	IL-12p40	IP-10
IL-10	IL-7	IL-12	IL-9	IL-13	IP-10	IL-12p40	LIF
IL-10	IL-9	IL-12	IP-10	IL-13	LIF	IL-12p40	M-CSF
IL-10	IP-10	IL-12	LIF	IL-13	M-CSF	IL-12p40	MIG
IL-10	LIF	IL-12	M-CSF	IL-13	MIG	IL-12p40	MIP-1α
IL-10	M-CSF	IL-12	MIG	IL-13	MIP-1α	IL-12p40	MIP-1β
IL-10	MIG	IL-12	MIP-1α	IL-13	MIP-1β	IL-12p40	PDGF-BB
IL-10	MIP-1α	IL-12	MIP-1β	IL-13	PDGF-BB	IL-12p40	SDF-1α
IL-10	MIP-1β	IL-12	PDGF-BB	IL-13	SDF-1α	IL-12p40	TNF-α
IL-10	PDGF-BB	IL-12	SDF-1α	IL-13	TNF-α	IL-12p40	TNF-β
IL-10	SDF-1α	IL-12	TNF-α	IL-13	TNF-β	IL-12p40	TRAIL
IL-10	TNF-α	IL-12	TNF-β	IL-13	TRAIL	IL-12p40	VEGF
IL-10	TNF-β	IL-12	TRAIL	IL-13	VEGF	IL-12p40	IL-8
IL-10	TRAIL	IL-12	VEGF	IL-13	IL-8	IL-12p40	MCP-1
IL-10	VEGF	IL-12	IL-8	IL-13	MCP-1	IL-12p40	MGSA
IL-10	IL-8	IL-12	MCP-1	IL-13	MGSA	IL-12p40	PGE-2
IL-10	MCP-1	IL-12	MGSA	IL-13	PGE-2	IL-12p40	RANTES
IL-10	MGSA	IL-12	PGE-2	IL-13	RANTES	IL-12p40	MIF
IL-10	PGE-2	IL-12	RANTES	IL-13	MIF	IL-12p40	GRO-α
IL-10	RANTES	IL-12	MIF	IL-13	GRO-α	IL-12p40	CRP
IL-10	MIF	IL-12	GRO-α	IL-13	CRP	IL-12p40	DDT
IL-10	GRO-α	IL-12	CRP	IL-13	DDT		
IL-10	CRP	IL-12	DDT				
IL-10	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
IL-15	IL-16	IL-16	IL-17A	IL-17A	IL-18	IL-18	IL-1α
IL-15	IL-17A	IL-16	IL-18	IL-17A	IL-1α	IL-18	IL-1β
IL-15	IL-18	IL-16	IL-1α	IL-17A	IL-1β	IL-18	IL-2
IL-15	IL-1α	IL-16	IL-1β	IL-17A	IL-2	IL-18	IL-2ra
IL-15	IL-1β	IL-16	IL-2	IL-17A	IL-2ra	IL-18	IL-3
IL-15	IL-2	IL-16	IL-2ra	IL-17A	IL-3	IL-18	IL-5
IL-15	IL-2ra	IL-16	IL-3	IL-17A	IL-5	IL-18	IL-6
IL-15	IL-3	IL-16	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-18	IL-7
IL-15	IL-5	IL-16	IL-6	IL-17A	IL-7	IL-18	IL-9
IL-15	IL-6	IL-16	IL-7	IL-17A	IL-9	IL-18	IP-10
IL-15	IL-7	IL-16	IL-9	IL-17A	IP-10	IL-18	LIF
IL-15	IL-9	IL-16	IP-10	IL-17A	LIF	IL-18	M-CSF
IL-15	IP-10	IL-16	LIF	IL-17A	M-CSF	IL-18	MIG
IL-15	LIF	IL-16	M-CSF	IL-17A	MIG	IL-18	MIP-1α
IL-15	M-CSF	IL-16	MIG	IL-17A	MIP-1α	IL-18	MIP-1β
IL-15	MIG	IL-16	MIP-1α	IL-17A	MIP-1β	IL-18	PDGF-BB
IL-15	MIP-1α	IL-16	MIP-1β	IL-17A	PDGF-BB	IL-18	SDF-1α
IL-15	MIP-1β	IL-16	PDGF-BB	IL-17A	SDF-1α	IL-18	TNF-α
IL-15	PDGF-BB	IL-16	SDF-1α	IL-17A	TNF-α	IL-18	TNF-β
IL-15	SDF-1α	IL-16	TNF-α	IL-17A	TNF-β	IL-18	TRAIL
IL-15	TNF-α	IL-16	TNF-β	IL-17A	TRAIL	IL-18	VEGF

[0181]

IL-15	TNF-β	IL-16	TRAIL	IL-17A	VEGF	IL-18	IL-8
IL-15	TRAIL	IL-16	VEGF	IL-17A	IL-8	IL-18	MCP-1
IL-15	VEGF	IL-16	IL-8	IL-17A	MCP-1	IL-18	MGSA
IL-15	IL-8	IL-16	MCP-1	IL-17A	MGSA	IL-18	PGE-2
IL-15	MCP-1	IL-16	MGSA	IL-17A	PGE-2	IL-18	RANTES
IL-15	MGSA	IL-16	PGE-2	IL-17A	RANTES	IL-18	MIF
IL-15	PGE-2	IL-16	RANTES	IL-17A	MIF	IL-18	GRO-α
IL-15	RANTES	IL-16	MIF	IL-17A	GRO-α	IL-18	CRP
IL-15	MIF	IL-16	GRO-α	IL-17A	CRP	IL-18	DDT
IL-15	GRO-α	IL-16	CRP	IL-17A	DDT		
IL-15	CRP	IL-16	DDT				
IL-15	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
IL-1α	IL-1β	IL-1β	IL-2	IL-2	IL-2ra	IL-2ra	IL-3
IL-1α	IL-2	IL-1β	IL-2ra	IL-2	IL-3	IL-2ra	IL-5
IL-1α	IL-2ra	IL-1β	IL-3	IL-2	IL-5	IL-2ra	IL-6
IL-1α	IL-3	IL-1β	IL-5	IL-2	IL-6	IL-2ra	IL-7
IL-1α	IL-5	IL-1β	IL-6	IL-2	IL-7	IL-2ra	IL-9
IL-1α	IL-6	IL-1β	IL-7	IL-2	IL-9	IL-2ra	IP-10
IL-1α	IL-7	IL-1β	IL-9	IL-2	IP-10	IL-2ra	LIF
IL-1α	IL-9	IL-1β	IP-10	IL-2	LIF	IL-2ra	M-CSF
IL-1α	IP-10	IL-1β	LIF	IL-2	M-CSF	IL-2ra	MIG
IL-1α	LIF	IL-1β	M-CSF	IL-2	MIG	IL-2ra	MIP-1α
IL-1α	M-CSF	IL-1β	MIG	IL-2	MIP-1α	IL-2ra	MIP-1β
IL-1α	MIG	IL-1β	MIP-1α	IL-2	MIP-1β	IL-2ra	PDGF-BB
IL-1α	MIP-1α	IL-1β	MIP-1β	IL-2	PDGF-BB	IL-2ra	SDF-1α
IL-1α	MIP-1β	IL-1β	PDGF-BB	IL-2	SDF-1α	IL-2ra	TNF-α
IL-1α	PDGF-BB	IL-1β	SDF-1α	IL-2	TNF-α	IL-2ra	TNF-β
IL-1α	SDF-1α	IL-1β	TNF-α	IL-2	TNF-β	IL-2ra	TRAIL
IL-1α	TNF-α	IL-1β	TNF-β	IL-2	TRAIL	IL-2ra	VEGF
IL-1α	TNF-β	IL-1β	TRAIL	IL-2	VEGF	IL-2ra	IL-8
IL-1α	TRAIL	IL-1β	VEGF	IL-2	IL-8	IL-2ra	MCP-1
IL-1α	VEGF	IL-1β	IL-8	IL-2	MCP-1	IL-2ra	MGSA
IL-1α	IL-8	IL-1β	MCP-1	IL-2	MGSA	IL-2ra	PGE-2
IL-1α	MCP-1	IL-1β	MGSA	IL-2	PGE-2	IL-2ra	RANTES
IL-1α	MGSA	IL-1β	PGE-2	IL-2	RANTES	IL-2ra	MIF
IL-1α	PGE-2	IL-1β	RANTES	IL-2	MIF	IL-2ra	GRO-α
IL-1α	RANTES	IL-1β	MIF	IL-2	GRO-α	IL-2ra	CRP
IL-1α	MIF	IL-1β	GRO-α	IL-2	CRP	IL-2ra	DDT
IL-1α	GRO-α	IL-1β	CRP	IL-2	DDT		
IL-1α	CRP	IL-1β	DDT				
IL-1α	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
IL-3	IL-5	IL-5	IL-6	IL-6	IL-7	IL-7	IL-9
IL-3	IL-6	IL-5	IL-7	IL-6	IL-9	IL-7	IP-10
IL-3	IL-7	IL-5	IL-9	IL-6	IP-10	IL-7	LIF
IL-3	IL-9	IL-5	IP-10	IL-6	LIF	IL-7	M-CSF
IL-3	IP-10	IL-5	LIF	IL-6	M-CSF	IL-7	MIG
IL-3	LIF	IL-5	M-CSF	IL-6	MIG	IL-7	MIP-1α
IL-3	M-CSF	IL-5	MIG	IL-6	MIP-1α	IL-7	MIP-1β
IL-3	MIG	IL-5	MIP-1α	IL-6	MIP-1β	IL-7	PDGF-BB
IL-3	MIP-1α	IL-5	MIP-1β	IL-6	PDGF-BB	IL-7	SDF-1α
IL-3	MIP-1β	IL-5	PDGF-BB	IL-6	SDF-1α	IL-7	TNF-α
IL-3	PDGF-BB	IL-5	SDF-1α	IL-6	TNF-α	IL-7	TNF-β
IL-3	SDF-1α	IL-5	TNF-α	IL-6	TNF-β	IL-7	TRAIL
IL-3	TNF-α	IL-5	TNF-β	IL-6	TRAIL	IL-7	VEGF
IL-3	TNF-β	IL-5	TRAIL	IL-6	VEGF	IL-7	IL-8
IL-3	TRAIL	IL-5	VEGF	IL-6	IL-8	IL-7	MCP-1

[0182]

IL-3	VEGF	IL-5	IL-8	IL-6	MCP-1	IL-7	MGSA
IL-3	IL-8	IL-5	MCP-1	IL-6	MGSA	IL-7	PGE-2
IL-3	MCP-1	IL-5	MGSA	IL-6	PGE-2	IL-7	RANTES
IL-3	MGSA	IL-5	PGE-2	IL-6	RANTES	IL-7	MIF
IL-3	PGE-2	IL-5	RANTES	IL-6	MIF	IL-7	GRO-α
IL-3	RANTES	IL-5	MIF	IL-6	GRO-α	IL-7	CRP
IL-3	MIF	IL-5	GRO-α	IL-6	CRP	IL-7	DDT
IL-3	GRO-α	IL-5	CRP	IL-6	DDT		
IL-3	CRP	IL-5	DDT				
IL-3	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
IL-9	IP-10	IP-10	LIF	LIF	M-CSF	M-CSF	MIG
IL-9	LIF	IP-10	M-CSF	LIF	MIG	M-CSF	MIP-1α
IL-9	M-CSF	IP-10	MIG	LIF	MIP-1α	M-CSF	MIP-1β
IL-9	MIG	IP-10	MIP-1α	LIF	MIP-1β	M-CSF	PDGF-BB
IL-9	MIP-1α	IP-10	MIP-1β	LIF	PDGF-BB	M-CSF	SDF-1α
IL-9	MIP-1β	IP-10	PDGF-BB	LIF	SDF-1α	M-CSF	TNF-α
IL-9	PDGF-BB	IP-10	SDF-1α	LIF	TNF-α	M-CSF	TNF-β
IL-9	SDF-1α	IP-10	TNF-α	LIF	TNF-β	M-CSF	TRAIL
IL-9	TNF-α	IP-10	TNF-β	LIF	TRAIL	M-CSF	VEGF
IL-9	TNF-β	IP-10	TRAIL	LIF	VEGF	M-CSF	IL-8
IL-9	TRAIL	IP-10	VEGF	LIF	IL-8	M-CSF	MCP-1
IL-9	VEGF	IP-10	IL-8	LIF	MCP-1	M-CSF	MGSA
IL-9	IL-8	IP-10	MCP-1	LIF	MGSA	M-CSF	PGE-2
IL-9	MCP-1	IP-10	MGSA	LIF	PGE-2	M-CSF	RANTES
IL-9	MGSA	IP-10	PGE-2	LIF	RANTES	M-CSF	MIF
IL-9	PGE-2	IP-10	RANTES	LIF	MIF	M-CSF	CRP
IL-9	RANTES	IP-10	MIF	LIF	GRO-α	M-CSF	DDT
IL-9	MIF	IP-10	GRO-α	LIF	CRP		
IL-9	GRO-α	IP-10	CRP	LIF	DDT		
IL-9	CRP	IP-10	DDT				
IL-9	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
MIG	MIP-1α	MIP-1α	MIP-1β	MIP-1β	PDGF-BB	PDGF-BB	SDF-1α
MIG	MIP-1β	MIP-1α	PDGF-BB	MIP-1β	SDF-1α	PDGF-BB	TNF-α
MIG	PDGF-BB	MIP-1α	SDF-1α	MIP-1β	TNF-α	PDGF-BB	TNF-β
MIG	SDF-1α	MIP-1α	TNF-α	MIP-1β	TNF-β	PDGF-BB	TRAIL
MIG	TNF-α	MIP-1α	TNF-β	MIP-1β	TRAIL	PDGF-BB	VEGF
MIG	TNF-β	MIP-1α	TRAIL	MIP-1β	VEGF	PDGF-BB	IL-8
MIG	TRAIL	MIP-1α	VEGF	MIP-1β	IL-8	PDGF-BB	MCP-1
MIG	VEGF	MIP-1α	IL-8	MIP-1β	MCP-1	PDGF-BB	MGSA
MIG	IL-8	MIP-1α	MCP-1	MIP-1β	MGSA	PDGF-BB	PGE-2
MIG	MCP-1	MIP-1α	MGSA	MIP-1β	PGE-2	PDGF-BB	RANTES
MIG	MGSA	MIP-1α	PGE-2	MIP-1β	RANTES	PDGF-BB	MIF
MIG	PGE-2	MIP-1α	RANTES	MIP-1β	MIF	PDGF-BB	GRO-α
MIG	RANTES	MIP-1α	MIF	MIP-1β	GRO-α	PDGF-BB	CRP
MIG	MIF	MIP-1α	GRO-α	MIP-1β	CRP	PDGF-BB	DDT
MIG	GRO-α	MIP-1α	CRP	MIP-1β	DDT		
MIG	CRP	MIP-1α	DDT				
MIG	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
SDF-1α	TNF-α	TNF-α	TNF-β	TNF-β	TRAIL	TRAIL	VEGF
SDF-1α	TNF-β	TNF-α	TRAIL	TNF-β	VEGF	TRAIL	IL-8
SDF-1α	TRAIL	TNF-α	VEGF	TNF-β	IL-8	TRAIL	MCP-1
SDF-1α	VEGF	TNF-α	IL-8	TNF-β	MCP-1	TRAIL	MGSA
SDF-1α	IL-8	TNF-α	MCP-1	TNF-β	MGSA	TRAIL	PGE-2
SDF-1α	MCP-1	TNF-α	MGSA	TNF-β	PGE-2	TRAIL	RANTES
SDF-1α	MGSA	TNF-α	PGE-2	TNF-β	RANTES	TRAIL	MIF

[0183]

SDF-1α	PGE-2	TNF-α	RANTES	TNF-β	MIF	TRAIL	GRO-α
SDF-1α	RANTES	TNF-α	MIF	TNF-β	GRO-α	TRAIL	CRP
SDF-1α	MIF	TNF-α	GRO-α	TNF-β	CRP	TRAIL	DDT
SDF-1α	GRO-α	TNF-α	CRP	TNF-β	DDT		
SDF-1α	CRP	TNF-α	DDT				
SDF-1α	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
VEGF	IL-8	IL-8	MCP-1	MCP-1	MGSA	MGSA	PGE-2
VEGF	MCP-1	IL-8	MGSA	MCP-1	PGE-2	MGSA	RANTES
VEGF	MGSA	IL-8	PGE-2	MCP-1	RANTES	MGSA	MIF
VEGF	PGE-2	IL-8	RANTES	MCP-1	MIF	MGSA	GRO-α
VEGF	RANTES	IL-8	MIF	MCP-1	GRO-α	MGSA	CRP
VEGF	MIF	IL-8	GRO-α	MCP-1	CRP	MGSA	DDT
VEGF	GRO-α	IL-8	CRP	MCP-1	DDT		
VEGF	CRP	IL-8	DDT				
VEGF	DDT						
단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2	단백질 #1	단백질 #2
PGE-2	RANTES	RANTES	MIF	MIF	GRO-α	GRO-α	CRP
PGE-2	MIF	RANTES	GRO-α	MIF	CRP	GRO-α	DDT
PGE-2	GRO-α	RANTES	CRP	MIF	DDT		
PGE-2	CRP	RANTES	DDT				
PGE-2	DDT						
단백질 #1	단백질 #2						
CRP	DDT						

[0184]

[0185]

일부 실시형태에서, 1종 이상, 2종 이상, 3종 이상, 4종 이상, 5종 이상, 6종 이상, 7종 이상, 8종 이상, 9종 이상, 10종 이상, 11종 이상, 12종 이상, 13종 이상, 14종 이상, 15종 이상, 16종 이상, 17종 이상, 18종 이상, 19종 이상, 20종 이상, 21종 이상, 22종 이상, 23종 이상, 24종 이상, 25종 이상, 26종 이상, 27종 이상, 28종 이상, 29종 이상 또는 30종 이상의 단백질의 존재 또는 수준이 적혈구-농축 샘플에서 검출되거나 측

정된다.

[0186] 일부 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 1종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 1종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 2종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 2종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 3종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 3종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 4종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 4종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 5종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 5종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 6종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 6종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 7종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 7종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 8종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 8종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 8종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 8종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 9종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 9종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 10종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 10종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 11종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 11종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 일부 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 12종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 12종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 일부 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 13종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 13종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 14종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 14종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 추가 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 15종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 15종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 16종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 16종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 17종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 17종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 18종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 18종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 19종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 19종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 20종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 20종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 21종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 21종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 22종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 22종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 23종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 23종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 24종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 24종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 25종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 25종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 26종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 26종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 27종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 27종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 28종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 28종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 29종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 29종 이상의 단백질의 수준이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 적혈구-농축 샘플에서 30종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 30종 이상의 단백질의 수준이 측정된다.

[0187] 단백질 프로파일은 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 제조된 용해물, 세포 세척액, 세포 상등액, 또는 그 조합 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출함으로써 생산되거나 생성될 수 있다. 검출된 단백질(들)은 또한 단백질 프로파일을 생성하거나 생성하기 위하여 정량(예를 들어, 수준 측정)될 수 있다.

[0188] 단일 또는 혼합 혈액 세포 집단 및 혈장/혈청 내의 단백질의 검출 및/또는 정량을 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 적합한 방법의 비제한적인 예는 항체계 방법, 일반적으로 유세포분석, ELISA, 측면 유동(lateral flow), 면역염색, 면역형광, 면역전기영동(예를 들어, 웨스턴 블롯 포함) 등을 포함한다. 대안적으로, 단백질은 질량분석법, 분광학, 크로마토그래피, 전기영동, 바이신초탄산 분석(BCA), 효소 분석 등을 이용하여 검출 및/또는 정량될 수 있다. 다시 단지 예로서, 단백질 정량 방법은 미국 특허 7,501,286호, 미국 특허 8,530,182호, 및 미국 특허 공개 2013028838호에 개시된다. 방법은 또한 본 명세서의 실시예에 제시된다.

[0189] 본 발명은 또한 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 대 혈장 내의 이들 동일한 하나 이상의 단백질의 수준을 포함하는 단백질 비를 계산함으로써 적혈구-농축 샘플로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 단백질 비는 RBC 및 혈장 내의 측정된 단백질 농도를 정규화한 후 RBC 내의 단백질(들)의 농도를 혈장 내의 단

백질(들)의 농도로 나눔으로써 계산될 수 있다. RBC 및 혈장 내의 단백질(들)의 농도는 전혈 내 밀리리터 당 그들의 상대적 농도(전혈 내 퍼센트)를 계산함으로써 정규화된다.

[0190] 일부 실시형태에서, 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 대 혈장 내의 이들 하나 이상의 단백질의 수준을 포함하는 단백질 비는 적어도 2:1, 적어도 10:1, 적어도 20:1, 적어도 30:1, 적어도 40:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 적어도 100:1, 적어도 110:1, 적어도 120:1, 적어도 130:1, 적어도 140:1, 적어도 150:1, 적어도 160:1, 적어도 170:1, 적어도 180:1, 적어도 190:1, 또는 적어도 200:1이다. 다른 실시형태에서, 단백질 비는 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 적어도 10:1, 적어도 11:1, 적어도 12:1, 적어도 13:1, 적어도 14:1, 적어도 15:1, 적어도 16:1, 적어도 17:1, 적어도 18:1, 적어도 19:1, 적어도 20:1, 적어도 21:1, 적어도 22:1, 적어도 23:1, 적어도 24:1, 적어도 25:1, 적어도 26:1, 적어도 27:1, 적어도 28:1, 적어도 29:1, 적어도 30:1, 적어도 31:1, 적어도 32:1, 적어도 33:1, 적어도 34:1, 적어도 35:1, 적어도 36:1, 적어도 37:1, 적어도 38:1, 적어도 39:1 또는 적어도 40:1이다.

[0191] 질병 프로파일

[0192] 본 발명은 본 명세서에서 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 질병 단백질 프로파일을 생성하는 방법을 제공한다. 질병 프로파일은 적혈구-농축 샘플과 연관된 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서 차이가 있는 임의의 질병 또는 질환에 대해 생성될 수 있다. 비제한적인 예로서, 질병 프로파일은 표 1에 개시된 단백질 중 하나 이상 또는 표 2에 개시된 단백질의 하나 이상의 조합의 존재 또는 수준에서 차이가 있는 임의의 질병 또는 질환에 대해 생성될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 프로파일링된 질병 또는 질환은 암, 자간전증, 자가면역질환, 심혈관 질환, 신경퇴행성 질환, 당뇨병, 대사 질환, 근골격 질환, 감염성 질환, 유전 질환, 신장 질환 및 위장관 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0193] 질병 단백질 프로파일(들)은 질병 또는 질환을 가진 하나 이상의 개체로부터 생성된 단백질 프로파일 및 질병 또는 질환을 갖지 않은 하나 이상의 개체로부터 생성된 단백질을 포함함으로써 본 방법에 따라 생성된다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 가진 개체로부터 획득되고 적어도 하나의 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체로부터 획득된다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 질병 또는 질환을 가진 하나 이상의 개체로부터 획득되고 모아진다. 다른 실시형태에서, 혈액 샘플은 질병 또는 질환을 갖지 않은 하나 이상의 개체로부터 획득되고 모아진다. 그 후, 질병 또는 질환을 가진 하나 이상의 개체 및/또는 질병 또는 질환을 갖지 않은 하나 이상의 개체의 모아진 혈액 샘플로부터 단백질 프로파일이 획득된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 가진 개체로부터 획득되고 하나 이상의 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체로부터 획득되며, 질병 또는 질환을 가진 개체에 대한 단백질 프로파일과 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에 대한 단백질을 (단백질의 존재 및/또는 수준에서의 통계적으로 관련된 차이에 의해) 구성하는 단백질을 결정하기 위하여 통계적 분석이 수행된다. 질병 또는 질환을 가진 개체의 단백질 프로파일 및 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체의 단백질 프로파일은 질병 단백질 프로파일을 결정하기 전에 임의의 시점에 생성될 수 있다.

[0194] 일 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 가진 개체에서 존재하지만 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에서는 존재하지 않는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 가진 개체에서는 존재하지 않지만 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에서는 존재하는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에서의 하나 이상의 단백질에 비하여 질병 또는 질환을 가진 개체에서 더 높은 수준을 갖는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에서의 하나 이상의 단백질에 비하여 질병 또는 질환을 가진 개체에서 더 낮은 수준을 갖는 하나 이상의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 개체에서의 하나 이상의 단백질에 비하여 질병 또는 질환을 가진 개체에서 하나 이상의 단백질의 수준이 상이한(예를 들어, 더 높은, 더 낮은, 또는 더 높고 더 낮은 둘 모두) 단백질을 포함한다.

[0195] 일부 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TNF- α , TGF- β , 및 IFN- γ 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 암 단백질 프로파일이다. 다른 실시형태에서, 질병 단백질 프로파일은 TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8, 및 IL-12로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 자간전증 단백질 프로파일이다. 구체적 실시형태에서, 자간전증 단백질 프로파일은 IL-6, IL-8, 및 IFN- γ 로 이루어진 군으로부터

터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함한다.

[0196] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 방법에 의해 생성된 질병 프로파일을 이용하여 개체가 질병 또는 질환을 갖는지 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 제공되는 방법 중 하나에 의해 생성되거나/생성되었던 단백질 프로파일은 개체로부터 획득될 수 있다. 개체의 단백질 프로파일은 두 단백질 프로파일 사이의 유사성(예를 들어, 단백질 존재 또는 단백질 수준에서)에 대해 질병 단백질 프로파일에 비교될 수 있다. 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일 사이의 유사성은 개체가 질병 또는 질환을 가짐을 나타낼 수 있다. 일 실시형태에서, 적어도 1종 단백질, 적어도 2종 단백질, 적어도 3종 단백질, 적어도 4종 단백질, 적어도 5종 단백질, 적어도 6종 단백질, 적어도 7종 단백질, 적어도 8종 단백질, 적어도 9종 단백질, 적어도 10종 단백질, 적어도 11종 단백질, 적어도 12종 단백질, 적어도 13종 단백질, 적어도 14종 단백질, 적어도 15종 단백질, 적어도 16종 단백질, 적어도 17종 단백질, 적어도 18종 단백질, 적어도 19종 단백질, 적어도 20종 단백질, 적어도 21종 단백질, 적어도 22종 단백질, 적어도 23종 단백질, 적어도 24종 단백질, 적어도 25종 단백질, 적어도 26종 단백질, 적어도 27종 단백질, 적어도 28종 단백질, 적어도 29종 단백질, 또는 적어도 30종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 1종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 3종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 5종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 10종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 15종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 20종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 30종 단백질 사이에 유사성이 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일 및 질병 단백질 프로파일은 존재하는 하나 이상의 동일한 단백질을 가져서, 개체가 질병 또는 질환을 가질 수 있음을 나타낸다. 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일 및 질병 단백질 프로파일은 동일하거나 실질적으로 유사한 수준의 하나 이상의 단백질을 가져서, 개체가 질병 또는 질환을 가질 수 있음을 나타낸다. 하나 이상의 단백질의 동일하거나 실질적으로 유사한 수준은 예를 들어, 통계적 분석 또는 결정된 역치 배수 차이(예를 들어, 2배 차이 미만)에 의해 당업자에 의해 충분히 상이한 것으로 결정된 단백질 수준과 동일한(예를 들어, 당업자가 결정할 때 관련 통계적 분석 이내) 단백질 수준을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 동일하다. 또 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 실질적으로 유사하다. 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 당업자에게 알려진 통계적 방법에 의해 결정된다(예를 들어, p-값이 0.05 이상인 T-테스트). 또 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 당업자에게 알려진 소정의 기준 범위(예를 들어, 건강한 또는 정상 농도 범위)에의 비교에 의해 결정된다. 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 0.5배 미만 상이하다. 일부 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 1배 미만 상이하다. 또 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 1.5배 미만 상이하다. 또 다른 실시형태에서, 개체의 단백질 프로파일과 질병 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 2배 미만 상이하다.

[0198] 치료 평가

[0199] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 방법에 의해 생성된 단백질 프로파일을 이용하여 개체에서 치료를 모니터링하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 제공되는 방법에 따라 생성된 단백질 프로파일은 치료 전 및 치료 후에 개체로부터 획득되고 단백질 프로파일은(예를 들어, 단백질 존재 또는 단백질 수준에서의) 둘 사이의 차이에 대해 비교된다. 일 실시형태에서, 치료를 받고 있는 개체는 하나 이상의 치료 또는 많은 치료를 받고 있을 수 있다. 다른 실시형태에서, 개체는 특정 치료를 받았고/받았거나 받고 있다. 일 실시형태에서, 치료 전에 획득된 단백질 프로파일은 치료를 받지 않았던 개체로부터 획득될 수 있으며, 치료 후 개체의 단백질 프로파일에 비교된다. 다른 실시형태에서, 단백질 프로파일은 치료 과정 동안 측정되고, 치료 동안 한 시점에서 획득된 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일은 치료 동안 상이한 시점에 획득된 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일에 비교된다. 일부 실시형태에서, 치료 전 및 치료 후의 단백질 프로파일은 치료 과정 동안 동일한 치료를 받고 있는 개체로부터 획득된다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 치료 후의 단백질 프로파일은 치료 과정 동안 상이한 치료를 받고 있는 개체(예를 들어, 치료를 변경한 개체)로부터 획득된다.

[0200] 치료 전 및 치료 후의 개체의 단백질 프로파일(예를 들어, 단백질 존재 또는 수준) 사이의 차이는 치료가 개체에게 효과가 있음을 나타낼 수 있다. 일 실시형태에서, 적어도 1종 단백질, 적어도 2종 단백질, 적어도 3종 단백질, 적어도 4종 단백질, 적어도 5종 단백질, 적어도 6종 단백질, 적어도 7종 단백질, 적어도 8종 단백질, 적

어도 9종 단백질, 적어도 10종 단백질, 적어도 11종 단백질, 적어도 12종 단백질, 적어도 13종 단백질, 적어도 14종 단백질, 적어도 15종 단백질, 적어도 16종 단백질, 적어도 17종 단백질, 적어도 18종 단백질, 적어도 19종 단백질, 적어도 20종 단백질, 적어도 21종 단백질, 적어도 22종 단백질, 적어도 23종 단백질, 적어도 24종 단백질, 적어도 25종 단백질, 적어도 26종 단백질, 적어도 27종 단백질, 적어도 28종 단백질, 적어도 29종 단백질, 또는 적어도 30종 단백질 사이에 차이가 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 1종 단백질 사이에 차이가 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 3종 단백질 사이에 차이가 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 5종 단백질 사이에 차이가 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 10종 단백질 사이에 차이가 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 15종 단백질 사이에 차이가 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 20종 단백질 사이에 차이가 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 30종 단백질 사이에 차이가 있다.

[0201] 일부 실시형태에서, 치료 전에 획득된 개체의 단백질 프로파일은 치료 후에 획득된 단백질 프로파일과 상이한 단백질(들)을 포함하여, 치료가 개체에게 효과가 있었을 수 있음을 나타낸다. 다른 실시형태에서, 치료 전에 획득된 개체의 단백질 프로파일은 치료 후에 획득된 단백질 프로파일에 비하여 하나 이상의 단백질의 수준이 상이하여, 치료가 개체에게 효과가 있었을 수 있음을 나타낸다. 하나 이상의 단백질의 상이한 수준은 예를 들어, 1 배보다 큰 차이인 수준을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 1-배 초과, 1.5 배 초과, 2-배 초과, 2.5 배 초과, 3-배 초과, 3.5-배 초과, 4-배 초과, 4.5 배 초과, 5-배 초과, 5.5 배 초과, 6-배 초과, 6.5-배 초과, 7-배 초과, 7.5-배 초과, 8-배 초과, 8.5-배 초과, 9-배 초과, 9.5-배 초과, 및 10-배 초과이다. 일부 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 1.5-배 초과이다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 2-배 초과이다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 2.5-배 초과이다. 또 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 3-배 초과이다. 또 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 4-배 초과이다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 5-배 초과이다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 6-배 초과이다. 또 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 7-배 초과이다. 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 8-배 초과이다. 또 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 9-배 초과이다. 또 다른 실시형태에서, 치료 전 및 후의 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 10-배 초과이다.

[0202] 일부 실시형태에서, 개체의 치료를 모니터링하기 위한 치료 전 및 치료 후에 단백질 프로파일을 생성하기 위하여 작은 부피의 혈액 샘플이 획득된다. 작은 부피의 혈액 샘플은 개체가 자주 샘플링되도록 하며, 결과적으로 이전에는 이루기 힘들었던 빈도로 치료 모니터링이 가능하도록 한다. 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 하루 1회 이상, 하루 2회 이상, 하루 3회 이상, 하루 4회 이상 그리고 하루 5회 이상의 빈도로 획득될 수 있다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에 5회 이상, 1주에 6회 이상 및 1주에 7회 이상 획득된다. 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 매일 획득된다. 또 다른 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 한번, 2주에 한번, 3주에 한번, 및 4주에 한번 획득된다. 일부 실시형태에서, 작은 부피의 혈액 샘플은 한달에 한번 획득된다.

[0203] 본 발명은 또한 본 발명에서 제공된 방법에 의해 생성된 단백질 프로파일을 이용하여 개체에서 치료의 유효성을 결정하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 단백질 프로파일은 치료를 받은 개체로부터 획득된다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 단백질 프로파일은 치료를 받지 않은 개체로부터 획득되며 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일이 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일에 비교된다. 다른 실시형태에서, 단백질 프로파일은 치료를 받지 않은 하나 이상의 개체로부터 획득된 혈액 샘플을 이용하여 생성되고 혈액 샘플은 모아진다. 다른 실시형태에서, 단백질 프로파일은 치료를 받은 개체로부터 획득된 하나 이상의 혈액 샘플을 이용하여 생성되고 혈액 샘플은 모아진다. 그 후 단백질 프로파일은 치료를 받지 않은 하나 이상의 개체의 모아진 혈액 샘플 및/또는 치료를 받지 않은 개체로부터의 하나 이상의 혈액 샘플로부터 획득된다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 단백질 프로파일은 치료를 받지 않은 하나 이상의 개체로부터 획득되고/되거나 하나 이상의 단백질 프로파일은 치료를 받은 개체로부터 획득되며, 통계적 분석은 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일 및 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일을 (존재 및/또는 수준에서의 차이에 의해) 구성할 단백질을 결정하기 위하여 당업계에 알려진 수단에 의해 수행된다. 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일 및 치료를 받지 않은 개체의 단백

질 프로파일은 두 단백질 프로파일의 비교 이전에 임의의 시점에 생성될 수 있다.

[0204] 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일에 비교한, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일 사이에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 유사성은 치료의 효효성을 나타낼 수 있다. 일 실시형태에서, 적어도 1종 단백질, 적어도 2종 단백질, 적어도 3종 단백질, 적어도 4종 단백질, 적어도 5종 단백질, 적어도 6종 단백질, 적어도 7종 단백질, 적어도 8종 단백질, 적어도 9종 단백질, 적어도 10종 단백질, 적어도 11종 단백질, 적어도 12종 단백질, 적어도 13종 단백질, 적어도 14종 단백질, 적어도 15종 단백질, 적어도 16종 단백질, 적어도 17종 단백질, 적어도 18종 단백질, 적어도 19종 단백질, 적어도 20종 단백질, 적어도 21종 단백질, 적어도 22종 단백질, 적어도 23종 단백질, 적어도 24종 단백질, 적어도 25종 단백질, 적어도 26종 단백질, 적어도 27종 단백질, 적어도 28종 단백질, 적어도 29종 단백질, 또는 적어도 30종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 1종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 3종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 5종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 10종 단백질 사이에 유사성이 있다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 15종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 20종 단백질 사이에 유사성이 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 30종 단백질 사이에 유사성이 있다.

[0205] 일부 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일 및 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일은 동일한 하나 이상의 존재하는 단백질을 가져서, 치료가 효과적이었을 수 있음을 나타낸다. 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일 및 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일은 동일하거나 실질적으로 유사한 수준의 하나 이상의 단백질을 가져서, 치료가 효과적이었을 수 있음을 나타낸다. 하나 이상의 단백질의 동일하거나 실질적으로 유사한 수준은 예를 들어, 통계적 분석 또는 결정된 역치 배수 차이(예를 들어, 2배 차이 미만)에 의해 당업자에 의해 충분히 상이한 것으로 결정된 단백질 수준과 동일한(예를 들어, 당업자가 결정할 때 관련 통계적 분석 이내) 단백질 수준을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준이 동일하다. 또 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준이 실질적으로 유사하다. 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 당업자에게 알려진 통계적 방법에 의해 결정된다(예를 들어, p -값이 0.05 이상인 T-테스트). 또 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준에서의 차이는 당업자에게 알려진 소정의 기준 범위(예를 들어, 건강한 또는 정상 농도 범위)에의 비교에 의해 결정된다. 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 0.5배 미만 상이하다. 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 1배 미만 상이하다. 또 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 1.5배 미만 상이하다. 또 다른 실시형태에서, 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일과 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일의 하나 이상의 단백질의 수준은 2배 미만 상이하다.

[0206] **개체**

[0207] 일부 실시형태는 개체로부터의 혈액 샘플 또는 그 성분의 단백질 프로파일의 결정에 관련된다.

[0208] 개체는 혈액이 적혈구를 포함하는 동물일 수 있다(예를 들어, 포유류, 조류, 어류, 파충류, 또는 양서류). 적합한 개체의 비제한적인 예는 소, 말, 양, 영장류, 조류 및 설치류 종을 포함한다. 따라서, 일부 실시형태에서 개체는 인간, 비인간 포유류, 마우스, 래트, 햄스터, 흰담비, 게르빌루스쥐, 토끼, 원숭이, 침팬지, 말, 조랑말, 당나귀, 양, 돼지, 닭, 염소, 고양이 또는 개일 수 있다.

[0209] **키트**

[0210] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 방법을 수행하는데 필요한 성분을 포함하는 키트를 제공한다.

[0211] 비제한적인 예로서, 키트는 혈액 채취, 항응고제(들), 혈액 안정화제(들), RBC의 농축, 비-RBC 혈액 성분의 제거/분리, 혈액 또는 그 성분(들)의 신속-동결, 세포 용해, 세포 세척, 세포 배양, 세포내 및/또는 세포의 특정 표적 단백질(들) 검출, 및/또는 그 조합을 위한 수단을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 혈액 샘플을 백혈구제거시키고 적혈구-농축 샘플을 생산하기 위한 적어도 하나의 시약 및 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 적어도 하나의 시약을 포함한다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 시약은 ELISA 장치이다. 다른 실시

태에서, 키트는 추가로 개체로부터 혈액 샘플을 수득하기 위한 적어도 하나의 시약을 포함한다.

[0212] 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 키트는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 개체로부터 혈액 샘플을 수득하기 위한 장치(예를 들어, 시린지, 바늘, 버터플라이 니들, 튜브, 지침기, 혈액 채취 세트, 전송 장치, 진공채혈관, 헤마펜™); 개체로부터 건조 혈액 샘플을 수득하기 위한 장치(들)(예를 들어, 여과지, 카드, 헤마스팟™); 적혈구 분획, 백혈구 분획 및/또는 혈소판 분획을 액체 혈액 샘플로부터 수득하기 위한 장치(들)(예를 들어, 항체 코팅된 자기 비드); 항응고제; 단백질 변성화제; 등.

[0213] **실시예**

[0214] 본 발명은 이제 구체적 실시예(들)를 참고로 개시될 것이며, 이들은 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0215] **실시예 1. RBC의 표면 상의 MIF 수용체의 존재의 조사**

[0216] RBC는 MIF를 함유한다. RBC가 MIF에 결합하는 수용체를 갖는지를 결정하기 위하여 그들을 MIF에 대한 가장 잘 알려진 수용체인, 세포 표면 상의 CD44와 CD74 사이에 형성된 복합체에 대해 분석하였다. 면역표현형분석법을 이용하여 RBC 상의 CD44 및 CD74의 부재 또는 존재를 확인하였다. 전혈(WB)을 EDTA 진공채혈관내로 채취하고, PBS + FBS(2%)에서 두번 세척하고(5분 동안 500 g에서 원심분리됨) 마지막으로 1 mL의 용액으로 재현탁시켰다. 5 μ L의 용액을 각각의 튜브에 첨가하였다. 그 후 세포를 5 μ L 또는 20 μ L 의 각 항체(항-CD44, 항-CD74, 항-CD45 및 IgG 대조군) 및 50 μ L 의 PBS + FBS(2%)로 염색하였다. 세포 용액을 15분 동안 실온에서 암실에서 항온처리하고 항온처리 후, 세포를 1x PBS(500 g, 5 분)에서 세번 세척하였다. 세포를 200 μ L의 PBS에서 재현탁시키고 사분면 통계학 및 오버레이(overlay) 히스토그램을 이용하여 유세포분석에 의해 분석하였다.

[0217] 도 1a-1c에 나타난 대로, RBC는 수용체 CD44에 대해 양성이었다. 하지만, 그들은 CD74에 대해서는 양성인 것으로 나타나지 않았다(도 2). 예상한 대로, RBC는 백혈구(WBC) 마커 CD45에 대해 양성인 것이 아니었다(데이터 도시 안 함). RBC가 CD44에 대해 양성이지만 CD74에 대해서는 양성인 것이 아니었으므로, RBC는 주요 MIF 수용체를 갖지 않는다. 따라서, 만일 MIF가 RBC의 표면 상에 있다면, MIF는 다른 기전에 의해 결합해야 한다.

[0218]

[0219] **실시예 2. RBC 내의 MIF 국재성**

[0220] 면역세포화학을 이용하여 MIF의 국재성에 대해 RBC를 분석하였다. 전혈을 시린지내로 채취하고 1x PBS에서 2회 세척하였다(5분 동안 500 g에서 원심분리기에서 회전). 세포 펠렛을 이용하여 혈액 도말표본(10 μ L/슬라이드)을 제조하고 혈액 슬라이드를 실온에서 적어도 2 시간동안 건조시켰다. 일단 슬라이드가 완전히 건조되면, 도말표본을 실온에서 5분 동안 100% 메탄올에서 고정시켰다. 슬라이드가 고정된 후, 그들을 메탄올로부터 제거하고 ~10 분동안 공기 건조시켰다. 슬라이드를 1x PBS로 완전히 세척하고 혈액 도말표본을 그 후 블롯 건조시켰다. 도말표본을 실온에서 1시간 동안 PBS + 5 % BSA로 차단시켰다. 차단 후, 샘플을 일차 MIF 항체(항-인간, 토끼 MIF 항체, 1 μ g/mL)가 있거나 없이 밤새 4 °C에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 슬라이드를 1x PBS로 잘 세척한 후 실온에서 30분 동안 이차 항체(항-토끼, AP 접합 항체, 1:50 희석)와 항온처리하였다. 슬라이드를 1x PBS로 잘 린스하고 과량의 유체를 제거하였다. 새로 제조된 기질(AP 현상 버퍼: 기질 A : 기질 B = 100:1:1)을 슬라이드 위에 점적하고, 실온에서 20분 동안 항온처리하고, Milli-Q 물로 반응을 종결시켰다. 슬라이드를 건조시키고 고정시키고 광현미경을 이용하여 이미지를 수집하였다.

[0221] 다음으로, RA 활막(인간)의 파라핀 매립 샘플을 절단하고 유리 슬라이드에 적용하였다. 자일렌(2회, 5 분) 및 에탄올(100%, 100%, 95%, 70%, 각각 3 분) 및 마지막으로 수돗물에서의 세척을 이용하여 샘플로부터 파라핀을 제거하였다. 그 후 하기 방법에 의해 끓는 수조를 이용하여 열-유도 에피토프 회수를 수행하였다: 티슈-텍(Tissue-Tek) 용기를 버퍼(pH 6)로 채우고 수조에서 95 °C로 가열하고; 슬라이드를 끓는 수조내의 용기내에 두고 20 분 동안 항온처리하고; 수조로부터 슬라이드를 제거하여 실온에서 20 분 동안 식히고; 냉수를 점진적으로 가하고 마지막으로 슬라이드를 2-3 분 동안 차가운 수돗물에서 세척하였다. 슬라이드를 시퀀자(Sequenza) 트레이에 부착시키고 세척 버퍼(TBST)로 6 분 동안 세척하였다. 다코 단백질 차단 혈청 프리(Dako Protein Block Serum Free)(100 μ L, 10분)를 이용하여 색전을 차단하였다. 일차 항체(또는 상응하는 음성 IgG 대조군)을 준비된 농도로 슬라이드에 첨가하고 밤새 항온처리하였다(100 μ L, 4°C; 0.5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 4 μ g/mL). 항온처리 후, 슬라이드를 TBST로 세척하였다(6 분, 실온). 이차 항체(엔비전(EnVision) 중합체, 토끼, HRP)를 슬라이드에 첨가하고(3 방울) 슬라이드를 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 후 슬라이드를 TBST(6 분, 실

온)로 세척하고, 시젠자 트레이로부터 제거하고, HRP 기질 시약(NovaRED)을 각 슬라이드상에 시약을 직접 적가하여 각 슬라이드에 첨가하였다(200 μ L). 실온에서 15 분 동안 슬라이드를 항온처리하였다. 그 후 반응을 중단시키기 위하여 슬라이드를 5 분 동안 흐르는 수돗물에서 세척하고 샘플을 헤마톡실린(2 분, 실온) 및 스코트 블루(Scott's Blue)(30 초, 실온)로 대조염색하였다. 그 후 샘플을 증가하는 농도의 에탄올 및 그 후 자일렌에서 탈수시키고, 고정시키고, 광현미경으로 관찰하였다.

[0222] 예상한 대로 백혈구의 명백한 세포내 염색(도 3)이 관찰되었다(WBC는 높은 세포내 MIF 집단을 함유함). 이들 결과는 또한 RBC의 세포 표면이 염색되었음을 보여주어(도 3), MIF가 세포 표면 상에 존재함을 제안한다. RBC상의 명백한 세포내 염색은 없었다(도 3). 음성 대조군이 도 4에 나타난다.

[0223] 활막 섹션 염색 또한 성공적이었다. 음성 대조군에서는 염색이 거의 또는 전혀 없었으며(도 5) 양성 대조군에서는 내피 세포 및 염증성 세포의 우수한 염색이 있었다(도 6). 혈관 내부의 RBC의 염색이 나타났으나; 염색의 국재성은 결정되지 않았다.

[0224] 이들 결과는 MIF가 세포막 상에 국재화되지만 세포내에는 국재화되지 않음을 나타내었다. 대조적으로, RBC 고스트(ghost) 및 RBC 용해물은 MIF 염색을 나타내지 않았다(데이터 도시 안함). WBC는 세포내 MIF를 함유한다.

[0225] 실시예 3. RBC 내의 MIF의 존재 조사

[0226] MIF 수준이 혈장에서보다 RBC에서 ~1000 배 더 높았기 때문에, 그들의 MIF의 세포내 수준에 대해 RBC를 분석하였다. 전혈을 모세혈관상으로부터 채취하였다(손가락끝 채취). 혈액을 EDTA(30 mg/mL) 용액으로 항-응고시키고(1:1) PBS + FBS (2%)로 2회 세척하였다. 세포를 암실에서 실온에서 15분 동안 CD45-FITC(5 μ L)로 염색하였다. 항온처리 후, 세포를 1x PBS로 2회 세척하고 그 후 유세포분석(FACS)에 의해 음성 분류(negative sorting)를 이용하여 RBC를 분리하였다. RBC 및 WB를 원심분리에 의해 펠렛화시키고(2000 g, 10 분) 250,000 세포/50 μ L로 재현탁시켰다. 세포를 -80 $^{\circ}$ C에서 동결시키고 샘플을 3회의 동결/해동 사이클을 거쳐 모든 세포를 용해시켰다. 그 후 샘플을 Hu MIF ELISA에서 분석하였다. 손가락끝 및 정맥 혈액의 경우, 전혈을 모세혈관상으로부터(손가락끝 채취) 또는 정맥으로부터 채취하였다. 혈액을 EDTA(30 mg/mL) 용액으로 항-응고시키고(1:1), PBS + FBS (2%)로 2회 세척하고 세포를 암실에서 실온에서 15분 동안 CD45-FITC(5 μ L)로 염색하였다. 항온처리 후, 세포를 1x PBS로 2회 세척하고 FACS에서의 음성 분류를 이용하여 RBC를 분리하였다. RBC 및 WB를 원심분리에 의해 펠렛화시키고(2000 g, 10 분) 250,000 세포/50 μ L로 재현탁시켰다. 세포를 -80 $^{\circ}$ C에서 동결시키고, 샘플을 3회의 동결/해동 사이클을 거쳐 모든 세포를 용해시켰다. 샘플을 Hu MIF ELISA에서 분석하였다.

[0227] 도 7에 나타난 대로, MIF는 FACS 분리된 RBC에서 고농도로 확인되었다. 하지만, 수준은 전혈에서 측정된 것보다 약 10배 더 낮았다. 도 8에 나타난 대로, 손가락끝 대 정맥 채취로부터 채취된 RBC에서 MIF 농도에서 차이가 있었다. 전혈 내의 MIF의 농도는 ELISA에 의해 분석하기에는 너무 높았다(데이터 도시 안함). 결과는 MIF가 RBC에 존재하지만, 측정가능한 MIF 농도는 채취 부위(손가락끝 또는 정맥) 및 선택된 항응고제(EDTA 또는 헤파린)에 따라 상이함을 입증하였다.

[0228] 실시예 4. RBC 분리의 최적화

[0229] 4.1 텍스트란 침강 대 유세포분석

[0230] 정맥 채취에 의해 전혈을 EDTA 및 헤파린 진공채혈관 내로 채취하였다. FACS, 텍스트란 침강, 또는 RBC 용해 버퍼를 이용하여 RBC를 분리하였다. FACS 분리를 위하여, 혈액을 원심분리(5분 동안 1000 g)에 의해 FACS 세척 버퍼(PBS + 2% FBS)로 2회 세척하였다. 생성되는 세포 펠렛을 50 μ L의 FACS 세척 버퍼에서 재현탁시키고, CD45-FITC(5 μ L, FITC-마우스 항-인간 CD45, H130, 이바이오사이언스(eBioscience) 11-0459-42)로 염색하고, 암실에서 실온에서 15분 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 세포를 FACS 세척 버퍼(5 분동안 1000 g)로 2회 세척하고 그 후 버퍼에서 재현탁된 RBC를 FACS(팍스아리아(FACSAria) III 유세포분석기, 4 레이저)에서의 음성 분류를 이용하여 분리하였다. RBC 및 WBC를 전방 산란(forward scatter) 및 측방 산란(side scatter)에 의해 크기에 따라 혈소판으로부터 게이팅(gate)하였다. 그 후 CD45 염색의 WBC 결핍에 의해 WBC로부터 RBC를 게이팅하였다. 텍스트란 침강의 경우, 항-응고된 WB를 고분자량 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내에 6% w/v, 1:1 혈액: 텍스트란)에 첨가하고, 용액을 부드럽게 혼합하여 RBC가 침강하도록 실온(~ 23 $^{\circ}$ C)에서 최대 60분 동안 정치시키고, 침강 후, RBC를 분리하고 1x PBS에서 2회 세척하였다. RBC 및 WB를 원심분리(2000 g, 10 분)에 의해 펠렛화시키고 250,000 세포/50 μ L로 재현탁시켰다. 그 후 RBC를 용해시켰다: 250 x 10⁶ 세포를 6 mL의 빙냉 Milli-Q 물에 첨가하고 30초 동안 항온처리시키며; 항온처리 후, 2 mL의 빙냉 0.6 M KCl을 첨가하여 등장성을 복구시키고; 용액을 빙냉 PBS로 최대 50 mL로 희석시키고; 오염 세포를 펠렛화시키고 용해물을 수집하고

(250,000 세포/50 μ L와 동일); 마지막으로 샘플을 -80 °C에서 동결하고, 3 동결/해동 사이클을 거쳐 모든 세포를 용해시켰다.

[0231] 용해된 세포 내의 MIF의 농도는 MIF ELISA(R&D 시스템즈(Systems), 미국)를 이용하여 측정하였으며 MIF ELISA를 위한 흡광도 데이터는 시너지(Synergy) 2 플레이트 판독기(바이오텍(BioTeck), 미국)로 450 nm에서 수집하였다(570 nm에서의 흡광도 보정). 검정 곡선은 log/log 곡선 핏을 이용하여 분석하였다(그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어(ver. 6, 미국)).

[0232] 분리된 RBC의 순도를 결정하기 위하여, 전혈을 EDTA 진공채혈관 내로 채취하고 상기한 대로 텍스트란 침강을 이용하여 RBC를 분리하였다. RBC를 PBS + FBS (2%), 500 g, 5 분에서 2회 세척하고 마지막으로 1 mL의 용액으로 재현탁시켰다. 5 μ L의 용액을 각 튜브에 첨가하고 세포를 5 μ L 또는 20 μ L의 각 항체(항-CD45 및 IgG 대조군) 및 50 μ L의 PBS + FBS(2%)로 염색하였다. 세포 용액을 15분 동안 실온에서 암실에서 항온처리하고 항온처리 후, 세포를 1x PBS(500 g, 5 분)에서 3회 세척하였다. 세포를 200 μ L의 PBS에서 재현탁시키고 사분면 통계학 및 오버레이 히스토그램(코울터 액트 디프(Coulter AcT Diff), 벡크만 코울터(Beckman Coulter))을 이용하여 유세포분석에 의해 분석하였다.

[0233] 도 9에 나타난 대로, RBC의 텍스트란 침강은 RBC 용해 버퍼 또는 FACS 분리를 이용하는 것보다 더 높은 측정 농도의 MIF를 생성하였다(농도는 1 mL의 전혈에의 상대적 기여에 대해 정규화됨). 텍스트란 자체의 존재는 측정된 MIF의 수준을 변경시키지 않았다(데이터 도시 안함). 또한, 텍스트란 침강을 이용하여 분리된 RBC는 오염성 CD45+ 세포(WBC)의 존재에 대해 염색되었다. RBC는 약 0.0025% 순수하였다(도 10a-10c).

[0234] 결과는 RBC 집단에서 측정된 MIF의 양이 RBC 분리의 방법에 의존함을 입증하였다. 텍스트란 침강은 높은 수준의 순도를 가진 RBC의 최고의 수를 생성하는 최적의 RBC 분리 기술이었다. 결과는 텍스트란 침강이 다른 일반적으로 이용되는 RBC 분리 기술만큼 효과적이거나, 또는 보다 더욱 효과적임을 나타냈다. 또한, 텍스트란 침강은 훨씬 더 높은 수준의 MIF의 검출을 야기하여, 상기 방법이 단백질 수준의 측정을 위한 다른 방법보다 훨씬 더 정확할 수 있음을 나타냈다.

[0235] 4.2 RBC 프로세싱: 텍스트란 침강 대 다른 방법

[0236] 정맥천자($n = 1$)에 의해 건강한 지원자로부터 전혈을 직접 EDTA 진공채혈관 (k_2 EDTA 진공채혈관, BD 바이오사이언시즈(Biosciences)) 내로 채취하였다. 모든 혈액 분획을 채취하고 채취 4시간 이내에 실온에서 가공하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스(BioPlex) 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C에서 저장하고 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다.

[0237] 적혈구는 하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g, 10 분) 상부 혈장 층을 버렸다. 나머지 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6 % w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 세포 현탁액에 첨가하였다. 이 용액을 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층을 버리고 하부 적혈구 분획을 수집하였다. 하부 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g, 5 분)에서 1회 세척하거나 PBS에서 뒤집기를 이용하여 3회 완전히 세척하였다. 생성된 적혈구를 신선하게 이용하거나 동결시켰다(-80 °C).

[0238] 적혈구의 분액을 PBS에서 400×10^6 세포/mL로 희석시키고 37 °C 및 5 % CO₂ 에서 24 시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 적혈구 및 생성된 조절된 PBS를 분리하고 동결시켰다(-80 °C).

[0239] 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 적혈구를 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 적혈구 용해물을 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시켰다. 이들 용해물을 그 후 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 분석하였다. 두 가지 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 첫번째는 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었으며, 두번째는 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널이었다(바이오-플렉스 프로(Bio-Plex Pro) 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드(Bio-Rad)). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명

서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스(Luminex)® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.

데이터는 텍스트란 침강에 의한 적혈구의 분리가 95% 보다 큰 평균 백혈구 및 혈소판 고갈을 야기함을 다시 한 번 보여주었다(표 3).

표 3. 텍스트란 침강을 이용하여 생산된 농축 적혈구 분획으로부터 백혈구 및 혈소판의 백분율 고갈.

백혈구 고갈 (%)	혈소판 고갈 (%)	적혈구 순도 (%)
95.5 ± 5.0	96.1 ± 5.5	99.992 ± 0.004

RBC 분리 방법에서 전형적으로 사용되는 세척 단계의 효과 평가하기. 적혈구의 텍스트란 침강 분리 후 완전한 세척 단계의 추가는 이러한 세척 단계를 거치지 않은 세포에 비교할 때 변경된 사이토카인 프로파일을 야기하였다. 세척된 세포에서 측정가능한 사이토카인의 전체적인 감소가 있었다(도 11a-11gg).

세척된 적혈구 내의 대부분의 단백질의 농도는 예를 들어, IFN- γ (2-배 적음), G-CSF(4-배 적음), 및 PDGF-bb(6-배 적음)에서 나타난 대로, 미세척 적혈구에서 관찰되는 것보다 주목할만하게 낮았다. 이 점에 더하여, 단백질 집합의 수준은 미세척 대조군과 달리 검출 수준 미만이었다. IFN- α 2 및 IL-17이 미세척 적혈구에서 검출 가능했던 반면, 그들은 세척된 세포에서는 전적으로 부재하였다. 이들 결과는 적혈구의 과다한 세척이 그들의 사이토카인 프로파일을 변경시킬 수 있음을 입증한다. 이 세척은 대부분의 적혈구 분리 기술에서 중요한 단계이다.

RBC 용해가 불완전하므로, 데이터는 텍스트란 침강이 MIF 수준에 관하여 가장 정확한 답을 제공하였음을 제안한다. RBC 분리 기술 간의 주요 차이는 각각이 얼마나 광범위하게 가공되었는지이다. 텍스트란 침강 방법은 상대적으로 부드러우며 최소한의 세척 단계에 관련되는 한편, FACS 방법은 세포가 많은 세척 단계 및 세포 분류를 위해 세포분석기를 통한 고속 유동을 거쳐야 한다.

실시예 5. 혈액 성분에 걸친 MIF의 분포

RBC가 MIF를 위한 주요 저장소인지 여부를 결정하기 위하여, MIF의 존재에 대해 RBC를 분석하였다. 정맥 채취에 의해 전혈을 EDTA 진공채혈관대로 채취하였다. 원심분리 후 혈장을 수집하고 FACS 또는 텍스트란 침강을 이용하여 세포를 분리하였다. FACS 분리를 위하여, 혈액을 PBS + FBS (2%)로 2회 세척하고, 세포를 CD45-FITC(5 μ L)로 암실에서 실온에서 15분 동안 염색한 후, 1x PBS로 2회 세척하였다. 그 후, RBC를 FACS에서의 음성 분류를 이용하여 분리하고 WBC를 CD45에 대한 양성 염색을 이용하여 분리하고; 혈소판은 크기에 따라 분리하였다. 상기한 대로 텍스트란 침강을 수행한 후, WBC 및 혈소판을 원심분리를 이용하여 상등액으로부터 분리하였다. 세포 및 WB를 원심분리(2000 g, 10 분)에 의해 펠렛화시키고 설정 농도로 재현탁시켰다. 샘플을 -80 °C에서 동결시키고, 모든 세포를 용해시키기 위하여 샘플을 3x 동결/해동 사이클을 거쳤다. 그 후 샘플을 Hu MIF ELISA에서 분석하였다.

세포를 FACS 또는 텍스트란 침강에 의해 분리하였을 때 MIF 분포가 표 4 및 5에 나타난다. MIF가 혈액의 모든 성분에서 존재한 한편, RBC는 전체 MIF의 최대 비율을 기여하였다. WBC는 세포 당 최고 농도의 MIF를 함유하였으나; 혈액에는 1000배 더 많은 RBC가 있었다.

[0249] 표 4: 텍스트란 침강을 이용한 분리 후 전혈에 비교한 혈액 성분 간의 MIF의 분포($n = 1$)

혈액 분획	MIF 기여의 백분율 (%)	1mL 전혈에의 총 MIF 기여 (ng/mL)	측정된 MIF/ 세포 (fg/세포)	이전에 보고된 MIF/세포 (fg/세포)
전혈	100	21,179	n/a	n/a
RBCs	82.6	17,500	2.97	n/a
WBCs	2.0	416	70.6	3.9 – 100
혈소판	1.2	258	1.49	0.3
혈장	0.05	11.53	n/a	n/a

[0250]

[0251] 표 5: FACS를 이용한 분리 후 전혈에 비교한 혈액 성분 간의 MIF의 분포($n = 1$)

혈액 분획	MIF 기여의 백분율 (%)	1 mL 전혈 에의 총 MIF 기여 (ng/mL)	측정된 MIF/세포 (fg/세포)	이전에 보고된 MIF/세포 (fg/세포)
전혈	100	21,179	n/a	n/a
RBCs	11.4	2,420	0.41	n/a
WBCs	0.7	157	2.67	3.9 – 100
혈소판	0.3	72	0.42	0.3
혈장	0.05	11.53	n/a	n/a

[0252]

[0253] 표 6: 텍스트란 침강을 이용한 분리 후 전혈에 비교한 혈액 성분 간의 MIF의 분포, 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로서 제시됨($n = 3$)

혈액 분획	MIF 기여의 백분율 (%)	1 mL 전혈 에의 총 MIF 기여 (ng/mL)	측정된 MIF/세포 (fg/세포)	이전에 보고된 MIF/세포 (fg/세포)
전혈	100	17,297 $\pm$ 3,682	n/a	n/a
RBCs	43.9	7,591 $\pm$ 1,223	1.4 $\pm$ 0.2	n/a
WBCs	0.13	23.1 $\pm$ 13.6	4.0 $\pm$ 3.3	3.9 – 100
혈소판	0.04	7.1 $\pm$ 0.5	0.02 $\pm$ 0.02	0.3
혈장	0.10	16.8 $\pm$ 1.3	n/a	n/a

[0254]

[0255] 실시예 6. RBC에 존재하는 단백질의 확인.

[0256] RBC가 MIF 외의 다른 단백질의 저장소인지 여부를 조사하기 위하여, RBC 내의 다른 단백질의 수준을 평가하였다. 정맥 채취에 의해 전혈을 EDTA 진공채혈관 내로 채취하였다. 혈장을 원심분리 후 수집하고 세포를 상기한 대로 FACS 또는 텍스트란 침강을 이용하여 분리하였다. 분리된 세포 및 WB를 원심분리(2000 g, 10 분)에 의해 펠렛화시키고 설정 농도로 재현탁시켰다. 샘플을 -80 °C에서 동결시키고, 모든 세포를 용해시키기 위하여 샘플을 3회 동결/해동 사이클을 거쳤다. 샘플을 Hu 27-plex 바이오플렉스에서 분석하였다. 또한, RBC에 의해 방출되거나 분리된 단백질을 분석하였다. 정맥 채취에 의해 전혈을 EDTA 진공채혈관 내로 채취하고 앞서 개시한 대로 텍스트란 침강에 의해 RBC를 분리하였다. 분리된 RBC를 100 μ L의 PBS 또는 PBS + 프로테아제 억제제(1x) 내의 2천만 세포로 분취하고 세포를 24 시간 동안 5% CO₂에서 37 °C에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 상등액과 세포를 원심분리에 의해 분리하고, 샘플을 -80 °C에서 동결시키고, 모든 세포를 용해시키기 위하여 샘플을 3회 동결/해동 사이클을 거쳤다. 샘플을 Hu 27-plex 바이오플렉스에서 분석하였다.

[0257] 샘플을 바이오플렉스에서 러닝한 후 다른 혈액 성분 뿐만 아니라 많은 단백질이 RBC내에 존재하는 것으로 확인되었다. 분석은 전혈과 RBC 둘 모두에서 상당한 양으로 존재하는 16가지 단백질(총 27개 중)의 각 농도를 보고한다(표 7-11). 총 수율은 전혈에서 측정된 단백질에 역 비교한 각 혈액 성분으로부터의 단백질의 총 수율로서 보고된다(표 7-11).

[0258] 표 7: 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/전혈 mL로서 보고된 전혈 및 혈액 성분 내의 프로-염증성 사이토카인의 요약, 총 수율은 전혈 내의 단백질 농도에 따라 보고됨(n = 1). 밑줄친 값은 표준 곡선의 바닥으로부터 외삽되었음.

혈액 성분	IFN- γ	IL-1 β	IL-5	IL-8	IL-9	IL-12 (p70)	IL-15	IL-17	TNF- α
전혈	2,401	<u>71</u>	<u>38</u>	<u>242</u>	728	<u>484</u>	2,546	5,044	1687
RBCs	805	<u>50</u>	<u>18</u>	<u>242</u>	321	<u>165</u>	2,366	4,883	<u>401</u>
WBCs	324	<u>20</u>	<u>4</u>	159	48	59	83	323	323
혈소판	380	<u>28</u>	<u>7</u>	<u>114</u>	238	<u>195</u>	890	2,188	419
혈장	36	0.71	1	6	5	7	5	12	21
총 수율 (%)	64.3	<u>139</u>	<u>79</u>	<u>215</u>	84.1	<u>88</u>	131.3	146.8	<u>69</u>

[0259]

[0260] 표 8: 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/전혈 mL로서 보고된 전혈 및 혈액 성분 내의 항-염증성 사이토카인의 요약, 총 수율은 전혈 내의 단백질 농도에 따라 보고됨(n = 1). 밑줄친 값은 표준 곡선의 바닥으로부터 외삽되었음.

혈액 성분	IL-1 α	IL-4	IL-10	IL-13
전혈	-	106	991	<u>124</u>
RBCs	-	-	<u>760</u>	<u>53</u>
WBCs	684	17	<u>46</u>	54
혈소판	-	39	<u>391</u>	<u>39</u>
혈장	76	0.98	3.55	31
총 수율 (%)	-	<u>54</u>	<u>121</u>	<u>143</u>

[0261]

[0262] 표 9: 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/전혈 mL로서 보고된 전혈 및 혈액 성분 내의 성장 인자의 요약, 총 수율은 전혈 내의 단백질 농도에 따라 보고됨(n = 1). 밑줄친 값은 표준 곡선의 바닥으로부터 외삽되었음.

혈액 성분	bFGF	G-CSF	GM-CSF	PDGF	VEGF	IL-7
전혈	5,381	6,340	109,454	28,586	2,950	-
RBCs	2,717	2,844	107,721	2,287	2,254	-
WBCs	368	773	3,355	18,349	92	43
혈소판	2,027	921	41,436	1007	800	-
혈장	23	36	-	50	11	3
총 수율 (%)	95.4	72.1	139.3	75.9	107.0	-

[0263]

[0264] 표 10: 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/전혈 mL로서 보고된 전혈 및 혈액 성분 내의 케모카인의 요약, 총 수율은 전혈 내의 단백질 농도에 따라 보고됨($n = 1$). 밑줄친 값은 표준 곡선의 바닥으로부터 외삽되었음.

혈액 성분	에오타신	IP-10	MCP-1	MIP-1a	MIP-1b	RANTES
전혈	1617	3,233	2,738	133	732	432,325
RBCs	486	1,494	1,636	77	610	37,197
WBCs	91	273	84	38	347	26,163
혈소판	167	618	748	28	89	50,907
혈장	14	81	7	1	7	741
총 수율 (%)	47	76.3	90.4	108.3	144	26.6

[0265]

[0266] 표 11: 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/전혈 mL로서 보고된 전혈 및 혈액 성분 내의 다중 기능을 가진 사이토카인의 요약, 총 수율은 전혈 내의 단백질 농도에 따라 보고됨($n = 1$). 밑줄친 값은 표준 곡선의 바닥으로부터 외삽되었음.

혈액 성분	IL-2	IL-6
전혈	1,345	540
RBCs	834	218
WBCs	72	59
혈소판	441	154
혈장	5	7
총 수율 (%)	100.5	81.1

[0267]

[0268] 37 °C에서 24시간 동안 PBS에서 RBC가 배양된 후 많은 단백질이 방출되거나 분비되었다. 항염증성, 프로-염증성, 케모카인 또는 성장 인자로서의 단백질 분류를 위해 표 7-11을 참고한다. 도 12-15는 바이오플렉스에 의해 측정되고 pg/mL(100uL PBS 내의 2천만 RBC)로서 보고된 37 °C에서 24시간에 걸쳐 RBC로부터 PBS 내로 방출되거나 분비된 분석물의 요약을 보여준다. 도면은 각 단백질의 검출된 평균 농도에 따라 분리된다. RBC 배양 동안 프로테아제 억제제의 첨가는 단백질 방출 또는 분비를 변경시켰다(37 °C에서 24시간).

[0269] 배양 조건은 다음과 같았다:

- [0270] 1. RBC + PBS (100 μ L PBS 내에 2천만 RBC)
- [0271] 2. RBC + PBS + 프로테아제 억제제(PI)(100 μ L PBS + PI 내에 2천만 RBC)
- [0272] **도 16a-16z**에 나타난 일련의 그래프는 RBC로부터 방출되거나 분비된 단백질의 농도(흑색 컬럼) 및 분비 후 세포에 남아있는 단백질의 농도(회색 컬럼)에 대한 프로테아제 억제제(PI)의 효과를 도시한다. 배양 용액 내에 프로테아제 억제제의 포함은 전형적으로 방출 또는 분비 및 세포 용해물 둘 모두를 위해 더 낮은 검출가능한 농도를 야기하였지만, 일부 예외는 있었다(즉, MIP-1b). 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로서 제시된다.
- [0273] 데이터는 많은 사이토카인이 RBC에 존재함을 입증하였다. 전혈 내의 사이토카인 수준이 혈장 내에 비하여 많이 상이하므로, 그들은 말초 혈액의 사이토카인 프로파일의 매우 상이한 그림을 제공하며, 이것은 바이오마커 분석에 대해 영향을 갖는다.
- [0274] **실시예 7. RBC 내 또는 RBC 상의 CRP의 존재**
- [0275] CRP 염증성 마커가 RBC와 결합되는지를 조사하기 위하여, 란셋을 이용한 손가락 찌르기에 의해 WB를 채취하였다. 신선한 혈액(혈장 수준을 검출함)에서 또는 모든 세포를 용해시키기 위하여 3회의 동결-해동 사이클 후에(전혈 수준을 위하여) 아이크로마(iChroma) 장비를 이용하여 CRP 수준에 대해 혈액을 분석하였다. 정제된 RBC(텍스트란 침강 후)를 수집하고 3 동결-해동 사이클을 이용하여 용해시키고, 아이크로마 장비에서 러닝하고, 단백질 수준을 저장된 혈장 샘플 내의 수준에 비교하였다.
- [0276] **도 17**에 나타난 대로, 혈장 성분에서 보다 용해된 전혈에서 더 높은 수준으로 CRP가 검출가능하였다. CRP는 또한 상응하는 혈장 농도에 비교할 때 RBC 용해물에서 유사한 비율로 검출가능하였다(**도 18**). 결과는 CRP가 RBC와 결합되며, RBC는 전혈에서 검출가능한 총 CRP의 약 50%를 차지함을 제안하였다.
- [0277]
- [0278] **실시예 8. 작은 혈액 부피에서 단백질 수준의 측정**
- [0279] 혈장 내의 동등한 부피에서의 그들의 수준에 비하여 적혈구 내의 다양한 단백질의 고수준의 발견은 예를 들어, 작은 부피의 전혈 및/또는 RBC가 단백질 마커를 확인하기 위하여 사용될 수 있음을 제안하였다. 많은 단백질의 수준을 전혈과 RBC의 작은 부피에서 분석하였다.
- [0280] 손가락 찌르기($n = 1$)에 의해 건강한 지원자로부터 전혈을 직접 EDTA 용액(3 mg/mL) 내로 채취하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고, 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C 에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 적혈구를 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 5 μ L 전혈(45 μ L PBS 내), 10 μ L 전혈(40 μ L PBS 내), 15 μ L 전혈(35 μ L PBS 내), 20 μ L 전혈(30 μ L PBS 내), 또는 25 μ L 전혈(25 μ L PBS 내)에서의 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 전혈을 분석하였다. 두 개의 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 첫번째는 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었고, 두번째는 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널이었다(바이오-플렉스 프로 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200TM 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.
- [0281] 다양한 희석(1:10, 1:5, 1:3.3, 1:2.5, 1:2)에서 전혈 내의 표시된 단백질의 농도가 **도 19a-19tt**에 나타난다(미희석 농도로 역 계산됨). 전혈의 분석은 많은 단백질의 존재를 밝혔으며 이들 단백질은 또한 다양한 희석에서도 존재하였다. 하지만, 분석된 단백질 다수에 대해서는 희석 선형성이 없었으며, 이는 전혈에 유일하지는 않으며; 바이오플렉스와 같은 루미넥스 플랫폼에서의 혈장 분석에서도 관찰된다(더 많은 단백질이 전형적으로 희석에서 검출된다). 결과는 단백질이 작은 부피의 전혈(5 μ L까지 낮음)에서 모니터링될 수 있음을 나타낸다. 전혈 내의 많은 단백질의 검출 용이성은(예를 들어, 손가락끝에서 수득된) 매우 작은 혈액 부피가 단백질 수준의 분석을 위해 채취되고 이용될 수 있음을 입증한다.

[0282] **실시예 9. 손가락끝 대 정맥 혈액 샘플 내의 단백질의 존재.**

[0283] 작은 혈액 부피 내의 단백질의 검출을 더 탐구하기 위하여, 손가락 찌르기에서 많은 단백질의 수준을 공지 방법에 의해 채취된 정맥혈 내의 그들의 수준에 비교하였다.

[0284] 정맥천자에 의해 또는 손가락 찌르기에 의해($n > 12$)에 의해 건강한 지원자로부터 전혈을 직접 EDTA 진공채혈관(k_2 EDTA 진공채혈관, BD 바이오사이언시즈) 또는 EDTA 용액(3 mg/mL) 내로 채취하였다. 모든 혈액 분획을 채취하고 채취 4시간 이내에 실온에서 가공하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C 에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 혈장과 적혈구를 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g, 10 분) 상부 혈장 층을 수집하였다. 나머지 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6 % w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 세포 현탁액에 첨가하였다. 이 용액을 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층을 버리고 하부 적혈구 분획을 분리하였다. 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g, 5 분)에서 2회 세척하고 남은 적혈구 펠렛을 계수하고(코울터 액트 디프, 백크만 코울터) 분석할 때까지 동결시켰다(-80°C).

[0285] 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 적혈구를 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 적혈구 용해물을 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시켰다. 이들 용해물을 그 후 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 분석하였다. 하나의 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 이것은 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF(바이오-플렉스 프로 27-plex, 바이오-라드)에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었다. 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.

[0286] 정맥혈 및 손가락끝 혈액으로부터 분리된 혈장 또는 정맥혈 및 손가락끝 혈액으로부터 분리된 적혈구의 용해물 내의 표시된 단백질의 농도는 도 20a-20aa에서 도시된다. 유의한 차이($p < 0.05$)는 스튜던트 T-테스트를 이용하여 결정하였다. 손가락끝 혈액과 정맥혈을 비교하였을 때 혈장과 적혈구 내의 단백질 수준 사이에는 일관된 경향이 있었다. 예를 들어, IL-6의 농도는 정맥혈장에서와 반대로 손가락끝으로부터 분리된 혈장에서 유의하게 더 높은 농도였다. 이와 동일한 경향이 적혈구에서도 관찰되어, 손가락끝 혈액으로부터 분리된 세포에서 유의하게 더 높은 수준의 단백질이 관찰되었다. 이 경향은 예를 들어, IL-2, RANTES, 및 IP-10을 비롯한 많은 단백질에 대해 관찰되었다. 예를 들어, IL-1 β , IL-8, 및 TNF- α 를 비롯한 많은 단백질의 경우, 더 높은 농도가 손가락끝 혈액으로부터 분리된 혈장 및 적혈구에서 관찰되었다.

[0287] 적혈구의 경우, 생물학적 변화(표준 편차)가 정맥 샘플보다 손가락끝 샘플에서 더 낮았다(예를 들어, MIP-1 β , G-CSF). 이것은 손가락끝으로부터 채취된 적혈구의 분석이 정맥혈의 분석보다 더 재생가능할 것임을 제안하였다. 반대상황이 혈장 내의 많은 단백질에 대해 관찰되었으며, 정맥 혈장은 손가락끝 혈액보다 덜 가변성이었다(예를 들어, IL-7, PDGF-bb). 이들 결과는 빈번한 혈액 채취가 이용될 수 있는 손가락끝으로부터의 적혈구의 분리와 분석을 위한 경우를 지지하였다.

[0288] **실시예 10. RBC 대 혈장 내의 단백질의 프로파일.**

[0289] 적혈구 내의 상대적으로 높은 수준의 단백질을 고려하여, 적혈구 용해물 내의 단백질 수준을 혈장 내의 수준과 비교하였다. 정맥천자에 의해($n = 6$) 건강한 지원자로부터 전혈을 직접 EDTA 진공채혈관(k_2 EDTA 진공채혈관, BD 바이오사이언시즈) 내로 채취하였다. 모든 혈액 분획을 채취하고 채취 4시간 이내에 실온에서 가공하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C 에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다.

[0290] 하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 혈장, 적혈구 및 백혈구를 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g, 10 분) 상부 혈장 층을 버렸다. 남은 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6 % w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 이 세포 현탁

액에 첨가하였다. 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 이 용액을 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층 및 하부 적혈구 분획을 분리하고 개별 튜브 내로 첨가하였다. 하부 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g, 5 분)에서 2회 세척하고 남은 적혈구 펠렛을 동결시켰다(-80 °C). 상부 백혈구 풍부 층을 PBS(1000 g, 10 분)에서 2회 세척하였다. 상등액을 버리고, 30초 동안 3 mL Milli-Q 물에서 세포 펠렛을 재현탁시켜 저장성 쇼크에 의해 임의의 오염성 적혈구를 용해시켰다. 이 시간 후, 1 mL 포타슘 클로라이드 (0.65 M)를 첨가하여 등장성을 회복시키고 용액을 PBS로 최대 15 mL로 희석시켰다. 나머지 세포를 펠렛화시키고 PBS(1000 g, 5 분)에서 2회 세척하였다. 남은 세포 펠렛을 PBS에 재현탁시키고 -80°C에서 즉시 동결시켰다.

[0291] 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 적혈구와 백혈구를 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 적혈구 용해물을 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시키고, 백혈구 용해물을 20,000 세포/mL로 희석시켰다. 이들 용해물을 그 후 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 분석하였다. 두 개의 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 첫번째는 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었고, 두번째는 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널이었다(바이오-플렉스 프로 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.

[0292] 혈장 내 및 적혈구 용해물(400×10^6 세포/mL) 내의 표시된 단백질의 농도를 나타내는 차트가 도 21a-21b에 나타난다. 단백질 농도를 전혈 mL(약 50억 세포/mL) 당 상대적 농도로 역계산하였으며 백혈구 오염에 대해 보정하였다. 보정된 적혈구 단백질 농도와 혈장 단백질 농도 사이의 배수 차이 또한 결정하였다(도 21a-21b). 분석된 48가지 단백질(예를 들어, 사이토카인, 케모카인)중에서, 혈장에서보다 RBC에서 실질적으로 더 높은 농도를 가진 단백질이 31가지였다. RBC에서의 단백질 농도 대 혈장에서의 농도(RBC:혈장 비)에서의 배수 변화 증가의 범위는 3.6 내지 3970이었다. 중앙값 RBC:혈장 비는 11.3이었다. 이들 결과는 작은 부피의 혈액 (예를 들어, 작은 부피의 혈액으로부터 분리된 전혈 또는 RBC의 부피의 $1/10^{th}$)이 관심 단백질(실험에서 확인된 단백질 포함)을 검출하기 위해 사용될 수 있음을 제안하였다. 또한, 작은 부피의 혈액을 (예를 들어, 손가락 찌르기를 통해) 샘플링하는 능력은 빈번한, 최소로 침습적인 샘플링을 가능하게 할 것이다.

[0293] 실시예 11. 양이온성 염을 이용한 RBC 내의 단백질 프로파일

[0294] 하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 적혈구를 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g, 10 분) 상부 혈장 층을 버렸다. 남은 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6 % w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 이 세포 현탁액에 첨가하였다. 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 이 용액을 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층 및 하부 적혈구 분획을 분리하고 백혈구를 버렸다. 하부 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g, 5 분)에서 2회 세척하였다. 상등액을 버리고, 적혈구 펠렛을 PBS 또는 100 mM LiCl을 함유한 PBS에 재현탁시켰다.

[0295] 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 적혈구를 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 적혈구 용해물을 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시켰다. 적혈구 용해물을 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널에서 분석하였다(바이오-플렉스 프로 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.

[0296] 도 22에 나타난 대로, 리튬 클로라이드는 분석에서 단백질 중 여러가지의 수준을 증가시키고/향상시켰다.

[0297] 실시예 12. 건강한 개인 대 자간전증 또는 암을 가진 개인으로부터의 RBC 내의 단백질 프로파일.

[0298] 질병 또는 질환을 가진 개인에 비교한 건강한 개인의 혈액 내의 단백질 수준에서의 차이를 측정하였다. 1) 건강한 지원자, 2) 건강한 임신한 여성, 3) 자간전증을 가진 임신한 여성 및 4) 암환자를 비롯한 4 그룹의 사람들로 부터 전혈을 채취하였다(표 12 참고). 건강한 임신한 대조군은 임신기간에 따라 자간전증 샘플과 매치시켰다. 정맥천자에 의해($n \geq 3$) 각 지원자로부터 혈액을 직접 EDTA 진공채혈관 (k_2 EDTA 진공채혈관, BD 바이오사이언 시즈) 내로 채취하였다.

[0299] 표 12. 참가자 요약.

개 체	병 태	관련 정보
OBS-101	림프종	화학요법 및 방사선요법
OBS-102	림프종	화학요법
OBS-103	암(구체적 타입 모름)	화학요법
PE-001	자간전증	3번째 분기
PE-002	자간전증	3번째 분기
PE-003	자간전증	3번째 분기

[0300]

[0301] 모든 혈액 분획을 채취하고 채취 4시간 이내에 실온에서 가공하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C 에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다.

[0302]

하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 혈장 및 적혈구를 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g , 10 분) 상부 혈장 층을 수집하였다. 남은 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6% w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 이 세포 현탁액에 첨가하였다. 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 이 용액을 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층을 버리고 하부 적혈구 분획을 분리하였다. 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g , 5 분)에서 2회 세척하고 남은 적혈구 펠렛을 계수하고(코울터 액트 디프, 벡크만 코울터) 그 후 분석때까지 동결시켰다(-80°C).

[0303]

완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 적혈구를 3 동결-해동 사이클을 거쳤다. 용해 후, 적혈구 용해물을 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시켰다. 이들 용해물과 혈장 샘플(미희석)을 그 후 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 분석하였다. 두 개의 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 첫번째는 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었고, 두번째는 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널이었다(바이오-플렉스 프로 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용하여 분석하였다.

[0304]

도 23a-23vv는 전혈 mL(약 5×10^9 세포/mL) 당 상대적 농도로 역 계산된 참가자 그룹으로부터의 적혈구의 용해물(400×10^6 세포/mL) 및 혈장 내의 표시된 단백질의 농도를 보여준다. 유의한 차이($p < 0.05$)는 스튜던트 T-테스트를 이용하여 결정하였다. 건강한 (비임신) 개인의 혈액 내의 단백질 수준을 암환자에 비교하고 건강한 임신한 개인의 단백질 수준을 자간전증을 가진 임신한 개인의 단백질 수준에 비교하였다. 도 24a-24c는 혈장과 반대되는 적혈구 내의 단백질의 농도 사이의 배수 차이를 보여준다.

[0305]

단백질 집합에서 건강한 대조군 개인에서의 단백질 수준과 질병 또는 질환을 가진 개인에서의 단백질 수준 사이

에는 유의한 차이가 있었다. 예를 들어, IL-2는 건강한 그룹에서보다 암 그룹으로부터 채취한 적혈구에서 유의하게 낮았으며(약 10배 낮음) 케모카인 CTACK은 건강한 임신 그룹보다 자간전증 그룹으로부터 채취된 적혈구에서 유의하게 더 높았다. 또한, 48가지 사이토카인 중 28가지는 혈장 수준을 실질적으로 초과한 RBC에서의 단백질 수준을 가졌으며(2:1 보다 큼), 배수 변화는 2:1 내지 ~280:1(RBC:혈장 비) 범위였다. 중앙값 RBC-혈장 비는 5.9:1이었다. 연구 결과는 적혈구가 질병에서의 바이오마커를 확인하기 위한 유용한 도구일 수 있음을 입증하였다. 또한, 혈장과 함께 적혈구의 분석은, 특히, 혈장 단독에서의 단백질 수준에서는 명백한 차이가 없으나 적혈구에서(예를 들어, bFGF) 또는 적혈구와 혈장 사이에서 확인가능한 차이가 있는 경우에, 현재로서는 이를 수 없는 질병 상태에 대한 더 많은 정보를 제공할 수 있었다.

[0306] 실시예 13. RBC에서의 단백질 프로파일 및 건강한 개인 대 자간전증 또는 암을 가진 개인으로부터의 RBC 단백질 방출.

[0307] 적혈구에 의해 방출된 단백질의 수준을 건강한 개인 및 질병 또는 질환을 가진 개인에서 평가하였다. 1) 건강한 지원자, 2) 건강한 임신한 여성, 3) 자간전증을 가진 임신한 여성 및 4) 암환자를 비롯한 4 그룹의 사람으로부터 전혈을 채취하였다(표 13).

[0308] 표 13. 참가자 요약

개 체	병 태	관련 정보
OBS-101	림프종	화학요법 및 방사선요법
OBS-102	림프종	화학요법
OBS-103	암(구체적 타입 모름)	화학요법
PE-001	자간전증	3번째 분기
PE-002	자간전증	3번째 분기
PE-003	자간전증	3번째 분기

[0309]

[0310] 건강한 임신한 대조군 샘플은 임신기간에 따라 자간전증 샘플과 매치시켰다. 정맥천자에 의해($n \geq 3$)에 의해 각 지원자로부터 혈액을 직접 EDTA 진공채혈관 (k_2 EDTA 진공채혈관, BD 바이오사이언시즈) 내로 채취하였다. 모든 혈액 분획을 채취하고 채취 4시간 이내에 실온에서 가공하였다. 멀티플렉스 분석(바이오플렉스 분석)을 위하여, 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고 분석 전 완전한 세포 용해를 보장하기 위하여 -80°C 에서 3 동결-해동 사이클을 거쳤다.

[0311] 하기와 같이 텍스트란 침강을 이용하여 적혈구를 분리하였다. 전혈을 원심분리하고(1500 g, 10 분) 상부 혈장 층을 버렸다. 남은 세포 펠렛을 동일한 부피의 소듐 클로라이드(0.15 M)에서 재현탁시켰다. 텍스트란(0.15 M 소듐 클로라이드 내의 6 % w/v)을 그 후 1:4 비율로(텍스트란: 세포 현탁액) 이 세포 현탁액에 첨가하였다. 튜브 바닥으로 적혈구를 침강시키기 위하여 이 용액을 30 분 동안 실온에서 정치시켰다. 이 시간 후, 상부 백혈구 풍부 층을 버리고 하부 적혈구 분획을 분리하였다. 적혈구 분획을 포스페이트 완충 염수(PBS, 500 g, 5 분)에서 2회 세척하고 남은 적혈구 펠렛을 계수하였다(코울터 액트 디프, 벡크만 코울터). 적혈구를 그 후 PBS에서 400×10^6 세포/mL이 되도록 희석시키고 24시간 동안 37°C 및 5 % CO_2 에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 생성된 조절된 PBS를 원심분리(500 g, 5 분)에 의해 분리하였다. 모든 샘플을 -80°C 에서 저장하고, 분석 전에 3 동결/해동 사이클을 거쳤다. 그 후 조절된 PBS 샘플을 멀티플렉스 사이토카인 분석에서 분석하였다. 두 개의 멀티플렉스 분석을 이용하였다. 첫번째는 염기성 FGF, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , 및 VEGF에 대해 분석하는 27-plex 인간 사이토카인 패널이었고, 두번째는 IL-1 α , IL-2Ra, IL-3, IL-12, IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, M-CSF, MIF, MIG, β -NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL에 대해 분석하는 21-plex 인간 사이토카인 패널이었다(바이오-플렉스 프로 27-plex 및 21-plex, 바이오-라드). 분석은 세척 단계를 위하여 자동화된 자기 세척 스테이션(바이오플렉스 프로 II, 바이오-라드)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 분석은 루미넥스® 200™ 시스템(바이오-라드)에서 실시하였으며 형광 값을 수집하였다. 각 사이토카인에 대한 검정 곡선을 바이오오플렉스 매니저 소프트웨어(ver. 5.0, 바이오-라드, 미국)를 이용하여 5 파라미터 로지스틱 곡선 회귀를 이용

하여 분석하였다.

[0312] **도 25a-25rr**은 참가자 그룹으로부터의 적혈구 조절된 PBS 내의 표시된 단백질의 농도를 보여준다. 조절된 PBS는 37°C에서 24시간 동안 적혈구 항온처리 후 생산되었다. 유의한 차이($p < 0.05$)는 스튜던트 T-테스트를 이용하여 결정하였다. 건강한 대조군 개인과 질병 그룹 내의 개인 사이에서 단백질 수준에는 유의한 차이가 있었다. 예를 들어, 건강한 대조군에 비교할 때 암을 가진 사람들로부터 분리된 적혈구로부터 유의하게 적은 IL-1 α 및 GCS-F가 방출되었으며, 건강한 개인보다 암환자로부터 분리된 적혈구로부터 유의하게 많은 IL-12(p40) 및 에오타신이 방출되었다. 유사하게, MIF와 같은 몇몇 사이토카인은 건강한 임신한 그룹과 자간전증을 가진 그룹 사이에서 유의하게 상이하였다.

[0313] 결과는 적혈구의 세크리토(secretome)의 분석이 질병에서의 바이오마커를 확인하고 추적하기 위한 유용한 진단 도구일 수 있음을 제안하였다. 적혈구의 분비(적혈구 단백질 방출)의 분석은 질병 상태에 관한 추가 정보를 제공할 수 있었다.

[0314] **실시예 14. 다른 예시적인 비제한적 실시형태**

[0315] 청구된 주제의 추가 효과는 청구된 주제의 일부 실시형태를 개시하는 하기 실시예로부터 명백해질 것이다.

[0316] 1. a.) 혈액 샘플을 수득하고;

[0317] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;

[0318] c.) 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하되, 상기 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L인 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,

[0319] 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플 내에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하며;

[0320] 상기 방법은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함하며;

[0321] 상기 방법은 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 전에 적혈구-농축 샘플을 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 이때 양이온성 염은 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

[0322] 2. a.) 혈액 샘플을 수득하고;

[0323] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;

[0324] c.) 적혈구-농축 샘플을 적어도 하나의 양이온성 염과 접촉시키며, 이때 양이온성 염은 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키며;

[0325] d.) 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하되, 상기 작은 부피는 5 μ L 내지 100 μ L인 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,

[0326] 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플 내에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하며;

[0327] 적어도 하나의 양이온성 염의 양이온은 금속 이온 또는 암모늄 이온이며;

[0328] 적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 염, 포타슘 염, 마그네슘 염, 리튬 염, 루비듐 염, 세슘 염, 철 염, 프랑슘 염, 피리디늄 염 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0329] 적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 루비듐 클로라이드, 세슘 클로라이드, 리튬 클로라이드 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 클로라이드 염이며;

[0330] 적어도 하나의 양이온성 염은 소듐 카보네이트, 포타슘 카보네이트, 루비듐 카보네이트, 세슘 카보네이트, 리튬 카보네이트 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 카보네이트 염이며;

[0331] 적어도 하나의 양이온성 염은 암모늄 염이며;

[0332] 암모늄 염은 암모늄 카보네이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 니트레이트 및 그 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

[0333] 3. a.) 혈액 샘플을 수득하고;

- [0334] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- [0335] c.) 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구와 혈장을 분리하고;
- [0336] d.) 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 및 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하고;
- [0337] e.) 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 대 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 포함하는 단백질 비를 계산하는 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0338] 생성된 단백질 프로파일은 적어도 2:1의 단백질 비를 가진 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0339] 적혈구 및 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준은 적혈구-농축 샘플로부터의 작은 부피에서 측정되며;
- [0340] 단백질 비는 적어도 10:1, 적어도 20:1, 적어도 30:1, 적어도 40:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 적어도 100:1, 적어도 110:1, 적어도 120:1, 적어도 130:1, 적어도 140:1, 적어도 150:1, 적어도 160:1, 적어도 170:1, 적어도 180:1, 적어도 190:1, 및 적어도 200:1로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0341] 단백질 비는 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 및 적어도 10:1로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.
- [0342] 4. a.) 혈액 샘플을 수득하고;
- [0343] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- [0344] c.) 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구와 혈장을 분리하고;
- [0345] d.) 적혈구를 양이온성 염과 접촉시키며, 이때 적어도 하나의 양이온성 염은 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키며;
- [0346] e.) 작은 부피의 적혈구-농축 샘플에서 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 및 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하고;
- [0347] f.) 적혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준 대 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 포함하는 단백질 비를 계산하는 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0348] 생성된 단백질 프로파일은 적어도 2:1의 단백질 비를 가진 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0349] 단백질 비는 적어도 10:1, 적어도 20:1, 적어도 30:1, 적어도 40:1, 적어도 50:1, 적어도 60:1, 적어도 70:1, 적어도 80:1, 적어도 90:1, 적어도 100:1, 적어도 110:1, 적어도 120:1, 적어도 130:1, 적어도 140:1, 적어도 150:1, 적어도 160:1, 적어도 170:1, 적어도 180:1, 적어도 190:1, 및 적어도 200:1로 이루어진 군으로부터 선택되며;
- [0350] 단백질 비는 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1, 적어도 8:1, 적어도 9:1, 및 적어도 10:1로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.
- [0351] 5. a.) 혈액 샘플을 수득하고;
- [0352] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- [0353] c.) 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구를 배지에서 항온처리하고;
- [0354] d.) 배지 내의 하나 이상의 단백질을 검출하는 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0355] 생성된 단백질 프로파일은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0356] 상기 방법은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0357] 배지는 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵스 평형 염액(HBSS), 및/또는 얼스 평형 염액(EBSS), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및/또는 이스코베스 변형 둘베코스 배지(IMDM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

- [0358] 6. a.) 혈액 샘플을 수득하고;
- [0359] b.) 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- [0360] c.) 적혈구-농축 샘플 내의 적혈구를 배지에서 항온처리하며, 이때 배지는 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키는 양이온성 염을 함유하며;
- [0361] d.) 배지 내의 하나 이상의 단백질을 검출하는 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0362] 생성된 단백질 프로파일은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0363] 상기 방법은 배지에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0364] 배지는 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵크스 평형 염액(HBSS), 및/또는 얼스 평형 염액(EBSS), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 돌베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및/또는 이스코베스 변형 돌베코스 배지(IMDM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.
- [0365] 7. a.) 작은 부피의 혈액 샘플을 수득하고;
- [0366] b.) 작은 부피의 혈액 샘플의 적어도 일부를 백혈구제거시켜 적혈구-농축 샘플을 생성하고;
- [0367] c.) 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질을 검출하는 것을 포함하는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0368] 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0369] 상기 방법은 적혈구-농축 샘플에서 검출된 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함하며, 이때 생성된 단백질 프로파일은 적혈구-농축 샘플에서 측정된 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0370] 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 100 μ L이며;
- [0371] 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 20 μ L이며;
- [0372] 혈액 샘플은 개체로부터 수득되며;
- [0373] 개체는 인간 또는 비인간 동물이며;
- [0374] 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락, 발뒤꿈치, 귀 또는 꼬리로부터 수득되며;
- [0375] 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락 찌르기, 발뒤꿈치 찌르기, 또는 귀 찌르기에 의해 수득되며;
- [0376] 개체는 인간이며;
- [0377] 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락, 발뒤꿈치, 또는 귀로부터 수득되며;
- [0378] 작은 부피의 혈액 샘플은 손가락 찌르기, 발뒤꿈치 찌르기, 귀 찌르기 또는 꼬리 찌르기에 의해 수득되며;
- [0379] 개체는 마우스, 래트, 햄스터, 흰담비, 게르빌루스쥐, 토끼, 원숭이, 침팬지, 말, 조랑말, 당나귀, 양, 돼지, 닭, 염소, 고양이 및 개로 이루어지는 군으로부터 선택된 비인간 동물이며;
- [0380] 작은 부피의 혈액 샘플은 꼬리 찌르기, 또는 귀 찌르기에 의해 수득되며;
- [0381] 작은 부피의 혈액 샘플은 하루에 1회 이상, 하루에 2회 이상, 하루에 3회 이상, 하루에 4회 이상, 및 하루에 5회 이상으로 이루어지는 군으로부터 선택된 횟수로 수득되며;
- [0382] 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에 5회 이상, 1주에 6회 이상, 및 1주에 7회 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 수득되며;
- [0383] 작은 부피의 혈액 샘플은 매일 수득되며;
- [0384] 작은 부피의 혈액 샘플은 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회 및 4주에 1회로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 수득되며;
- [0385] 작은 부피의 혈액 샘플은 한달에 한번 수득되는, 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

- [0386] 8. a.) (i) 질병 또는 질환을 가진 개체, 및 (ii) 질병 또는 질환을 갖지 않은 적어도 하나의 개체로부터 상기 실시예 중 하나 이상에 따라 생성된 적어도 하나의 단백질 프로파일을 획득하고;
- [0387] b.) 질병 또는 질환을 가진 개체의 단백질 프로파일을 질병 또는 질환을 갖지 않은 적어도 하나의 개체의 단백질 프로파일에 비교하는 것을 포함하는, 질병 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0388] 생성된 질병 단백질 프로파일은 질병 또는 질환을 갖지 않은 적어도 하나의 개체의 단백질 프로파일에 비교하여 질병 또는 질환을 가진 개체로부터의 단백질 프로파일에서 상이한 존재 또는 수준을 갖는 하나 이상의 단백질을 포함하며;
- [0389] 질병 또는 질환은 암이며;
- [0390] 질병 단백질 프로파일은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TNF- α , TGF- β , 및 IFN- γ 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 암 단백질 프로파일이며;
- [0391] 질병 또는 질환은 자간전증이며;
- [0392] 질병 프로파일은 TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-8 및 IL-12로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 자간전증 단백질 프로파일이며;
- [0393] 자간전증 단백질 프로파일은 IL-6, IL-8, 및 IFN- γ 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는, 질병 단백질 프로파일을 생성하는 방법.
- [0394] 9. a.) 상기 실시예 중 하나 이상에 따라 생성된 개체의 단백질 프로파일을 획득하고;
- [0395] b.) 개체의 단백질 프로파일을 질병 단백질 프로파일에 비교하는 것을 포함하는, 개체가 질병 또는 질환을 갖는지 여부를 결정하는 방법으로서,
- [0396] 질병 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에 비교하여 개체의 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 유사성은 개체가 질병 또는 질환을 가짐을 나타내며;
- [0397] 질병 또는 질환은 암, 자간전증, 자가면역질환, 심혈관 질환, 신경퇴행성 질환, 당뇨병, 대사 질환, 근골격 질환, 감염성 질환, 유전 질환, 신장 질환 및 위장관 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 개체가 질병 또는 질환을 갖는지 여부를 결정하는 방법.
- [0398] 10. a.) 치료 전 및 치료 후에 개체로부터 상기 실시예 중 하나 이상에 따라 생성된 단백질 프로파일을 획득하고;
- [0399] b.) 치료 전 개체의 단백질 프로파일을 치료 후 개체의 단백질 프로파일과 비교하는 것을 포함하는, 개체에서 치료를 모니터링하는 방법으로서,
- [0400] 치료 후 개체의 단백질 프로파일에 비교할 때 치료 전 개체의 단백질 프로파일에서 하나 이상의 단백질의 존재 또는 수준에서의 차이는 개체에 대한 치료의 효과를 나타내며;
- [0401] 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일이 치료를 받은 후 개체의 단백질 프로파일에 비교되며;
- [0402] 한 시점에서 치료 후 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일이 상이한 시점에서 치료 후 개체의 적어도 하나의 단백질 프로파일에 비교되며;
- [0403] 개체는 동일한 치료를 받았으며;
- [0404] 개체는 상이한 치료를 받았으며;
- [0405] 혈액 샘플은 작은 부피의 혈액 샘플이며;
- [0406] 개체는 하루에 1회 이상, 하루에 2회 이상, 하루에 3회 이상, 하루에 4회 이상, 및 하루에 5회 이상으로 이루어지는 군으로부터 선택된 횟수로 모니터링되며;
- [0407] 개체는 1주에 1회 이상, 1주에 2회 이상, 1주에 3회 이상, 1주에 4회 이상, 1주에 5회 이상, 1주에 6회 이상, 및 1주에 7회 이상으로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 모니터링되며;
- [0408] 개체는 매일 모니터링되며;
- [0409] 개체는 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회 및 4주에 1회로 이루어진 군으로부터 선택된 횟수로 모니터링되며;

- [0410] 개체는 한달에 한번 모니터되는, 개체에서 치료를 모니터하는 방법.
- [0411] 11. a.) (i) 치료를 받은 개체, 및
- [0412] (ii) 치료를 받지 않은 개체로부터 상기 실시예 중 하나 이상에 따라 생성된 적어도 하나의 단백질 프로파일을
수득하고;
- [0413] b.) 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일에 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일을 비교하는 것을 포함하
는, 치료의 유효성을 결정하는 방법으로서,
- [0414] 치료를 받지 않은 개체의 단백질 프로파일에 비교할 때 치료를 받은 개체의 단백질 프로파일에서 하나 이상의
단백질의 존재 또는 수준에서의 유사성은 치료의 유효성을 나타내는, 치료의 유효성을 결정하는 방법.
- [0415] 12. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플이 개체로부터 수득되는 방법.
- [0416] 13. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플이 개체의 모세혈관 또는 개체의 정맥으로부터 수득되는 방
법.
- [0417] 14. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 개체가 인간 또는 비인간 동물인 방법.
- [0418] 15. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 개체가 인간인 방법.
- [0419] 16. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 작은 부피의 적혈구-농축 샘플이 5 μ L 내지 20 μ L인 방법.
- [0420] 17. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 작은 부피의 적혈구-농축 샘플이 5 μ L 인 방법.
- [0421] 18. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 항체를 이용하여 1종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나
1종 이상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0422] 19. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구-농축 샘플에서 3종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 3종 이
상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0423] 20. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구-농축 샘플에서 5종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 5종 이
상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0424] 21. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구-농축 샘플에서 10종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 10종
이상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0425] 22. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구-농축 샘플에서 20종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 20종
이상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0426] 23. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구-농축 샘플에서 30종 이상의 단백질의 존재가 검출되거나 30종
이상의 단백질의 수준이 측정되는 방법.
- [0427] 24. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 단백질은 케모카인, 사이토카인, 성장 인자, 수용체, 세
포내 신호 전달자, 호르몬, 핵 전사 인자, 신경전달자, 세포외 매트릭스 성분 및 효소로 이루어지는 군으로부터
선택되는 방법.
- [0428] 25. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 단백질은 표 1에 열거된 단백질 또는 표 2에 열거된 단백
질의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0429] 26. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF,
HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β ,
IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB,
SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF, CRP, 및 DDT로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0430] 27. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플은 유세포분석, 자기 비드 분리, 원심분리, 셀룰로스 컬럼
및 텍스트란 침강으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법에 의해 백혈구제거되는 방법.
- [0431] 28. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 적혈구는 텍스트란 침강에 의해 백혈구제거되는 방법.
- [0432] 29. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 단백질은 적혈구의 표면, 적혈구의 내부, 적혈구의 용해
물, 적혈구의 상등액, 적혈구를 함유하는 배지 및 이전에 적혈구를 함유했던 배지로 이루어지는 군으로부터 선

택된 하나 이상의 장소로부터 검출되거나 측정되는 방법.

- [0433] 30. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 개체는 질병 또는 질환을 가진 방법.
- [0434] 31. a.) 혈액 샘플을 텍스트란과 접촉시키고;
- [0435] b.) 혈액 샘플이 백혈구-함유 층 및 적혈구 밀집 층을 형성하도록 하고;
- [0436] c.) 적혈구 밀집 층 내의 적혈구를 분리하여 적혈구-농축 혈액 샘플을 생성하고;
- [0437] d.) 적혈구-농축 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하는 것을 포함하는, 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출 또는 측정의 정확성을 증가시키는 방법으로서,
- [0438] 혈액 샘플은 작은 부피의 혈액 샘플이며;
- [0439] 작은 부피의 혈액 샘플은 5 μ L 내지 100 μ L이며,
- [0440] 혈액 샘플 내의 혈액 대 텍스트란의 비는 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 및 10:1로 이루어지는 군으로부터 선택되며;
- [0441] 혈액 샘플로부터 백혈구와 혈소판의 평균 고갈은 85% 내지 95%인,
- [0442] 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출 또는 측정의 정확성을 증가시키는 방법.
- [0443] 32. a.) 혈액 샘플을 백혈구제거시키고 적혈구-농축 샘플을 생산하기 위한 적어도 하나의 시약; 및
- [0444] b.) 작은 부피의 적혈구-농축 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 적어도 하나의 시약을 포함하는, 혈액 샘플의 단백질 프로파일을 측정하기 위한 키트로서,
- [0445] 양이온성 염은 혈액 샘플 내의 하나 이상의 단백질의 검출가능한 수준을 증가시키며;
- [0446] 상기 방법은 개체로부터 혈액 샘플을 획득하기 위한 적어도 하나의 시약을 추가로 포함하며;
- [0447] 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 시약은 하나 이상의 항체이며;
- [0448] 하나 이상의 단백질의 존재를 검출하거나 수준을 측정하기 위한 시약은 효소-연결 면역흡착 분석(ELISA) 장치인,
- [0449] 혈액 샘플의 단백질 프로파일을 측정하기 위한 키트.
- [0450] 33. a.) 혈액 샘플 또는 혈액 샘플 성분 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하며;
- [0451] b.) 혈액 샘플 및 혈액 샘플 성분은 각각 적혈구(RBC)를 포함하는 것을 포함하는, 개체로부터 획득한 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법으로서,
- [0452] 단백질 프로파일은 혈액 샘플 성분으로부터 생성되며;
- [0453] RBC는 혈액 샘플 성분에 존재하는 총 혈액 세포의 수의 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 98%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 구성하며;
- [0454] 혈액 샘플 성분은 혈액 샘플의 백혈구제거에 의해 생산된 RBC-농축 분획이며;
- [0455] 백혈구제거는 혈액 샘플 또는 그 일부로부터 백혈구의 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 보다 많이 제거하며;
- [0456] 백혈구제거는 분획 내의 혈액 세포의 수의 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과가 RBC인 RBC-농축 분획을 제공하며;
- [0457] 혈액 샘플 또는 그 일부는 혈소판 고갈을 거치며;
- [0458] 혈소판 고갈은 혈액 샘플 또는 그 일부로부터 혈소판의 수의 90%, 92.5%, 95%, 97.5%, 99%, 99.5%, 99.75%, 99.9%, 또는 99.95% 초과를 제거하며;
- [0459] 하나 이상의 단백질은 염기성 FGF, CTACK, 에오타신, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-12p40, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-2ra, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IP-10, LIF, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, SDF-1 α , TNF- α , TNF- β , TRAIL, VEGF,

CRP, DDT, 및 임의의 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0460] 하나 이상의 단백질은

[0461] a.) 표 1에 열거된 단백질; 또는

[0462] b.) 표 2에 열거된 단백질의 조합을 포함하거나 이로 이루어지는, 개체로부터 수득한 혈액 샘플 또는 혈액 샘플의 성분으로부터 단백질 프로파일을 생성하는 방법.

[0463] 34. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,

[0464] a.) RBC의 표면 상의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하거나;

[0465] b.) RBC 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하거나;

[0466] c.) RBC에 의해 방출된 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것 중 하나 이상을 포함하며,

[0467] 혈액 샘플은 건조 혈점 샘플(dried blood spot sample)(DBS)인 방법.

[0468] 35. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 단백질 프로파일의 생성은

[0469] a.) RBC를 포함하는 세포 집단으로부터 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액을 생산하고;

[0470] b.) 세포 용해물, 세포 세척액 또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며,

[0471] 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 용해물을 이용하여 수행되는 방법.

[0472] 36. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,

[0473] a.) RBC를 신속 동결(snap freezing)하고;

[0474] b.) RBC를 해동하여 세포 용해물을 생성하고;

[0475] c.) 세포 용해물 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며,

[0476] 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 세척액을 이용하여 수행되며;

[0477] 세포 세척액은 둘 이상의 세포 세척액을 조합하여 생산되며;

[0478] 세포 세척액은 등장성 염액, 평형 염액, 염수, 포스페이트 완충 염수(PBS), 헵크스 평형 염액(HBSS), 및/또는 얼스 평형 염액(EBSS) 중 하나 이상을 포함하는 세척 액체를 이용하여 생산되며;

[0479] 하나 이상의 단백질의 수준의 결정은 세포 상등액을 이용하여 수행되며;

[0480] 세포 상등액은 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 최소 필수 배지(MEM), 개량 최소 필수 배지(IMEM), 이글스 최소 필수 배지(EMEM), 둘베코스 변형 이글스 배지(DMEM), 및/또는 이스코베스 변형 둘베코스 배지(IMDM) 중 어느 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 상등액을 생산하기 위해 사용된 세포를 배양함으로써 생산되며;

[0481] 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 다수의 세포 상등액 샘플을 이용하여 수행되며;

[0482] 세포 상등액의 샘플은 세포 상등액을 생산하기 위하여 이용되는 세포의 배양물로부터 상이한 시점들에서 추출되는 방법.

[0483] 37. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,

[0484] a.) 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고;

[0485] b.) RBC로부터 분리된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며,

[0486] i.) 백혈구를 신속 동결하고;

[0487] ii.) 백혈구를 해동하여 백혈구 용해물을 생성하고;

[0488] iii.) 해동된 백혈구 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 추가로 포함하며;

[0489] 백혈구를 세척하고/하거나 배양하여 생성된 세포 세척액 및/또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

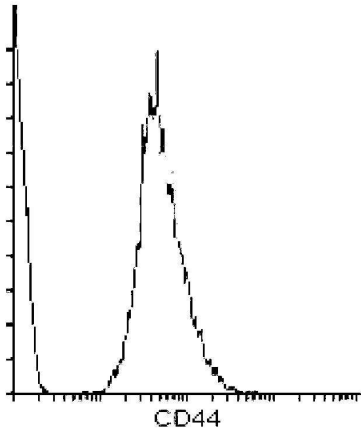
- [0490] 38. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,
- [0491] a.) 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고;
- [0492] b.) RBC로부터 분리된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며,
- [0493] i.) 혈소판을 신속 동결하고;
- [0494] ii.) 혈소판을 해동하여 혈소판 용해물을 생성하고;
- [0495] iii.) 해동된 혈소판 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 추가로 포함하며,
- [0496] 혈소판을 세척하고/하거나 배양하여 생성된 세포 세척액 및/또는 세포 상등액 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0497] 39. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,
- [0498] a.) 혈액 샘플을 항응고제와 접촉시키고;
- [0499] b.) RBC로부터 분리된 혈장 내의 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 것을 포함하며,
- [0500] 신속 동결은 -10°C , -20°C , -30°C , -40°C , -50°C , -60°C , -70°C , -75°C , -80°C , 100°C , -120°C , -140°C , -160°C , -180°C , -190°C , -195°C , 또는 -196°C 이하의 온도에서인 방법.
- [0501] 40. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 신속 동결 및 해동은 여러번의 동결-해동 사이클을 포함하는 방법.
- [0502] 41. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 백혈구는 유세포분석 및/또는 텍스트란 침강에 의해 RBC로부터 분리되는 방법.
- [0503] 42. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈소판은 원심분리에 의해 RBC로부터 분리되는 방법.
- [0504] 43. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플은 채취 동안 혈액 안정화제와 혼합된 방법.
- [0505] 44. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서,
- [0506] 개체로부터 취득된 혈액 샘플을 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하기 전에 혈액 안정화제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며,
- [0507] 혈액 안정화제는 프로테아제 억제제, 단백질 변성화제, RNA 안정화제, 항응고제 및 항응고제가 아닌 다른 안정화제와 조합된 항응고제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이며;
- [0508] 혈액 안정화제는 항응고제가 아니며;
- [0509] 혈액 안정화제는 아프로티닌, 류페틴, $\alpha 2$ -마크로글로불린, 안티페인 디하이드로클로라이드, 칼페인 억제제 I, 칼페인 억제제 II, 키모스타틴, TLCK(CAS 131918-97-3), 트립신-억제제, 페파블록 SC(로슈), PMSF($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$ - 써모 피셔 사이언티픽), 완전 프로테아제 억제제 콕테일(로슈), 및 임의의 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제 억제제이며;
- [0510] 혈액 안정화제는 헤파린, 시트레이트, 산 시트레이트 텍스트로스, EDTA, 및 임의의 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항응고제이며;
- [0511] 혈액 안정화제와 접촉시키는 단계는 개체로부터 혈액 샘플이 취득되는 단계를 수행한 지 5 초, 10 초, 20 초, 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 7.5 시간 또는 10 시간 이내에 수행되는 방법.
- [0512] 45. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플은 개체의 모세혈관으로부터 취득되는 방법.
- [0513] 46. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 혈액 샘플은 개체의 정맥으로부터 취득되는 방법.
- [0514] 47. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 하나 이상의 단백질의 수준을 결정하는 단계는 혈액 샘플이 취득된 때의 2 분, 5 분, 10 분, 15 분, 20 분, 25 분, 30 분, 40 분, 50 분, 1 시간, 1.5 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간, 36 시간, 또는 48 시간 이내에 수행되는 방법.
- [0515] 48. 상기 실시예 중 하나 이상에 있어서, 개체로부터 혈액 샘플을 취득하는 제1 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0516]

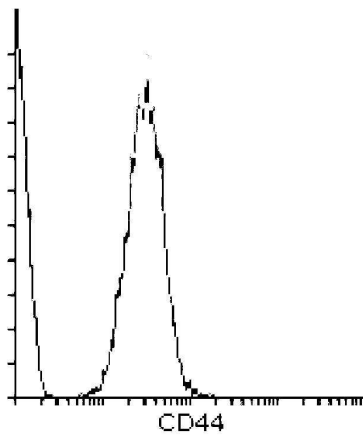
당업자는 많은 변화 및/또는 변형이 넓게 개시된 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 구체적 실시형태에서 개시된 본 실시형태에 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 실시형태는 모든 면에서 예시적이며 제한적이지 않다.

도면

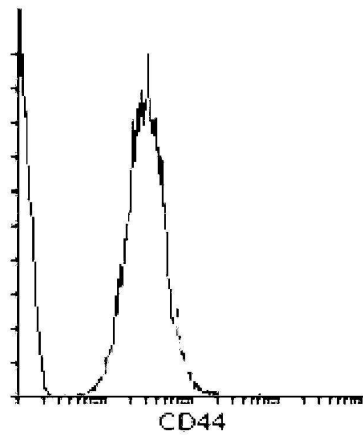
도면1a



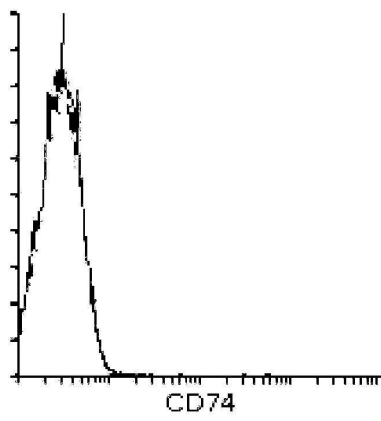
도면1b



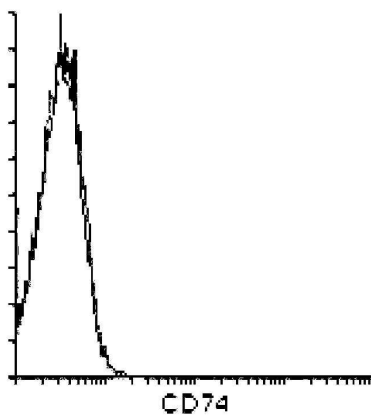
도면1c



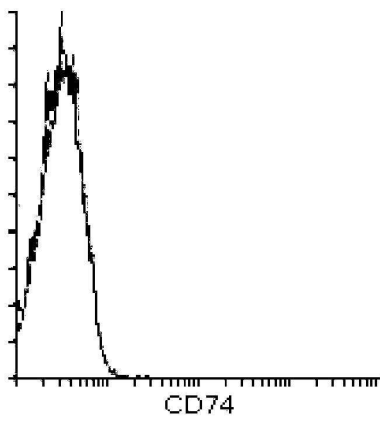
도면2a



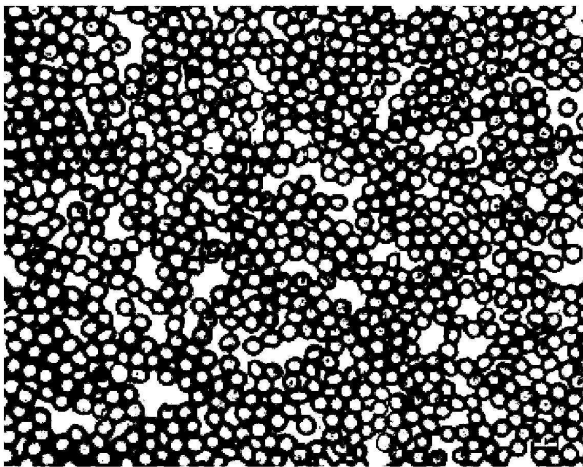
도면2b



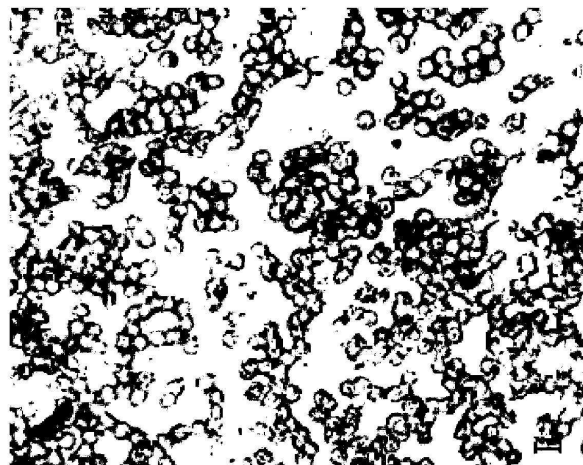
도면2c



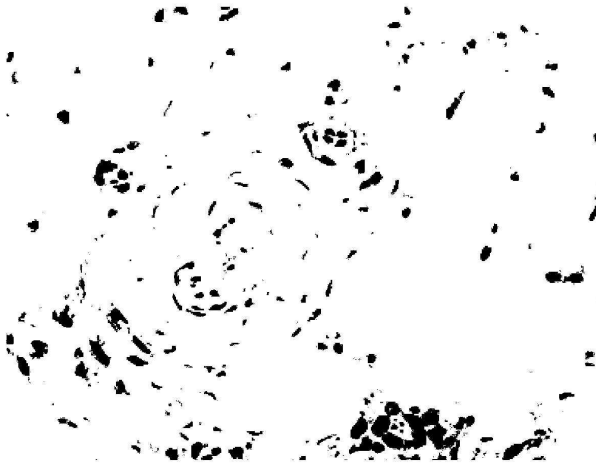
도면3



도면4



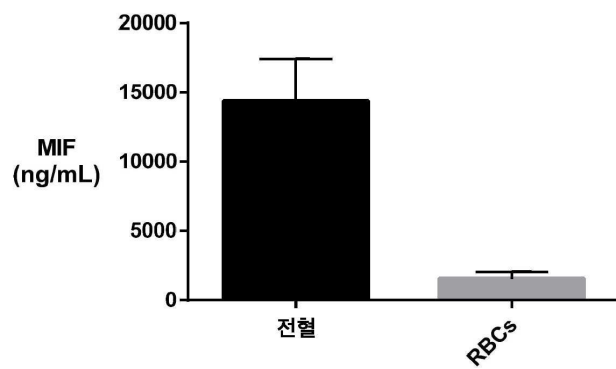
도면5



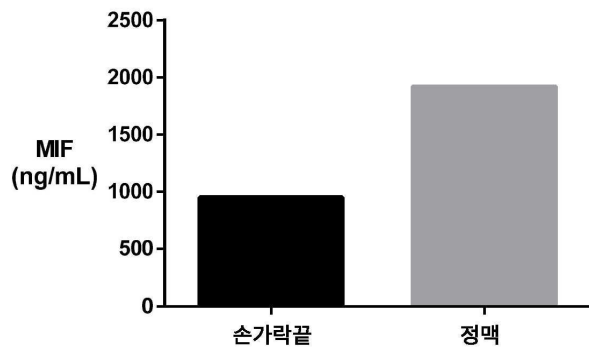
도면6



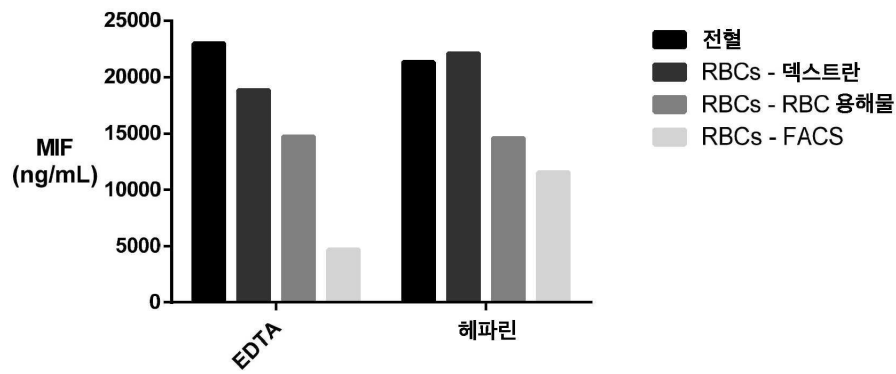
도면7



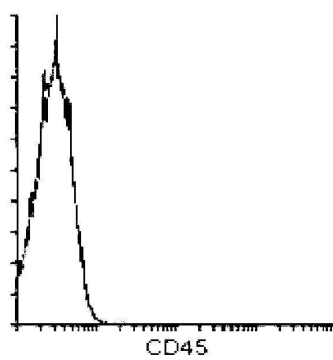
도면8



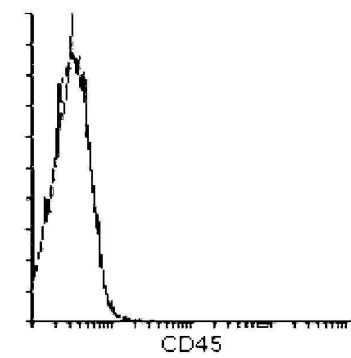
도면9



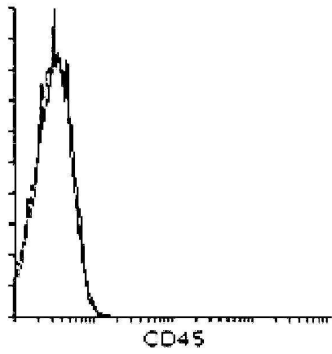
도면10a



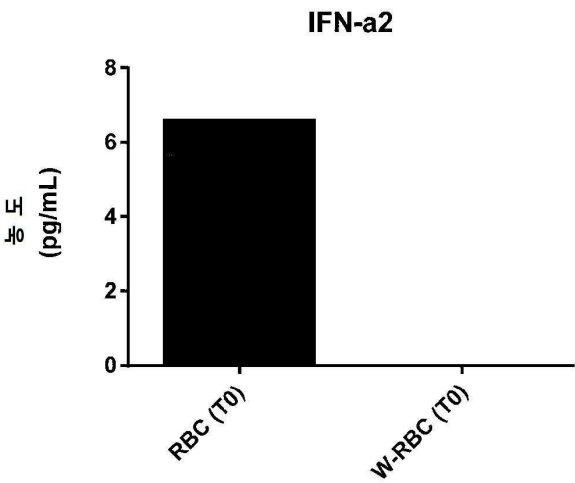
도면10b



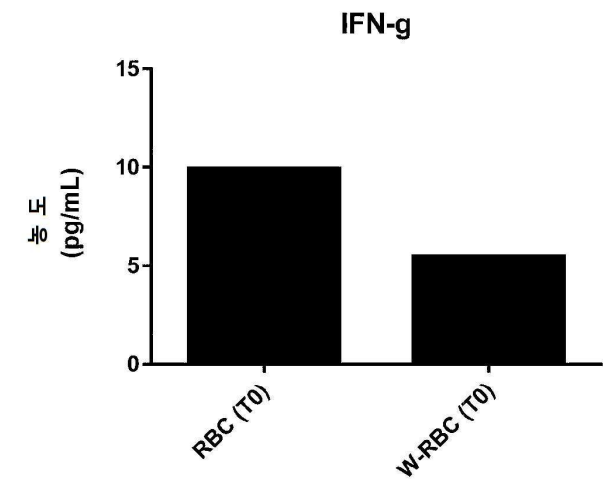
도면10c



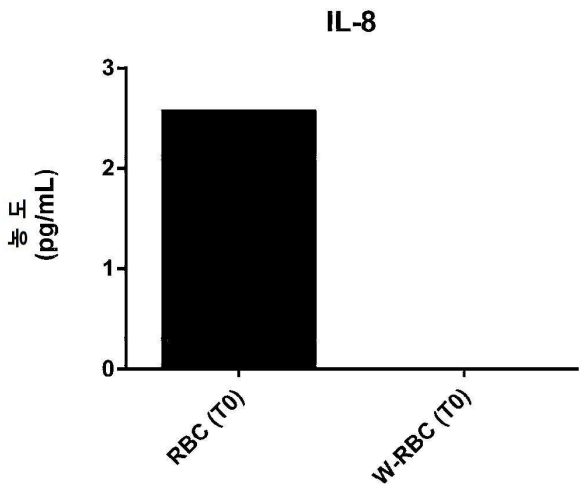
도면11a



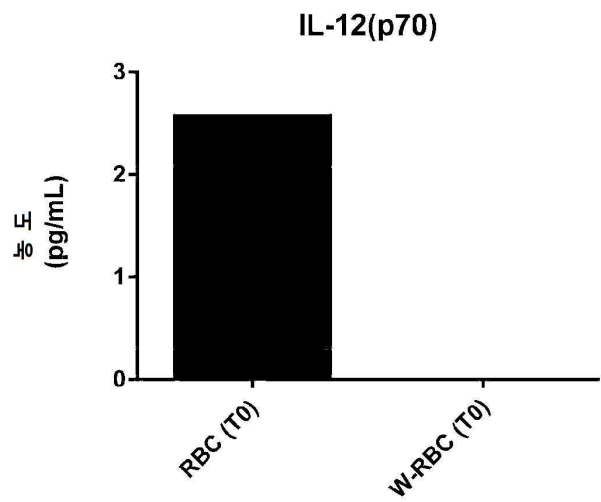
도면11b



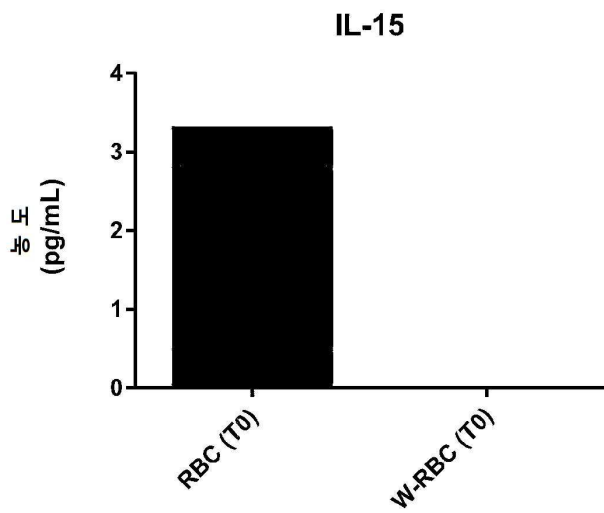
도면11c



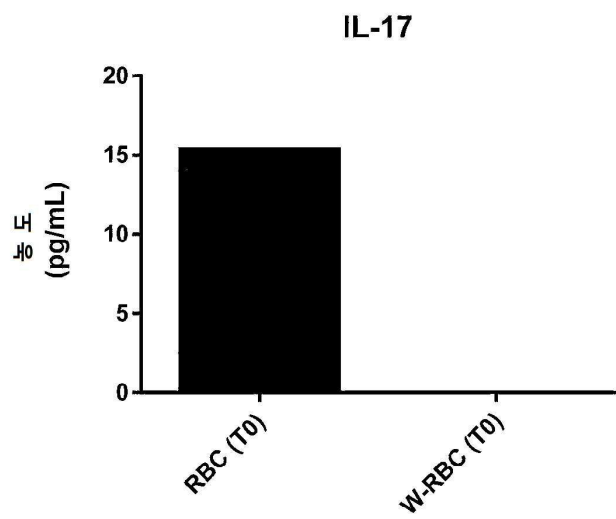
도면11d



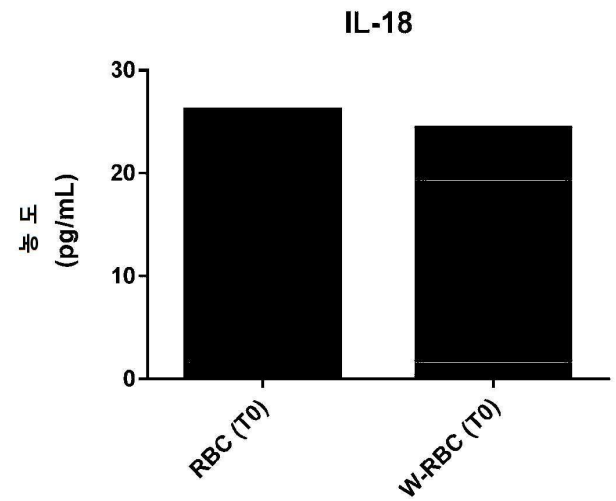
도면11e



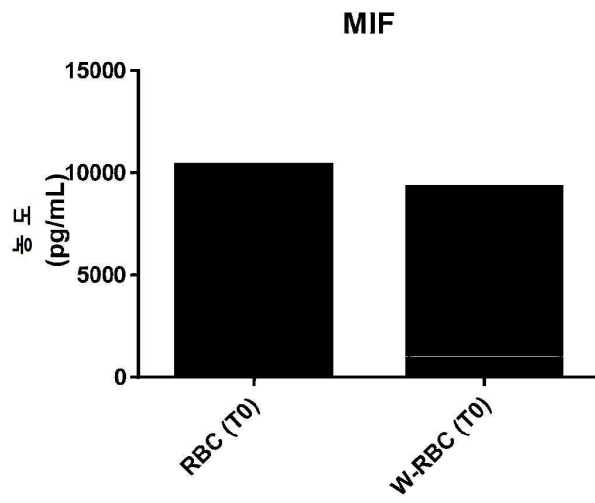
도면11f



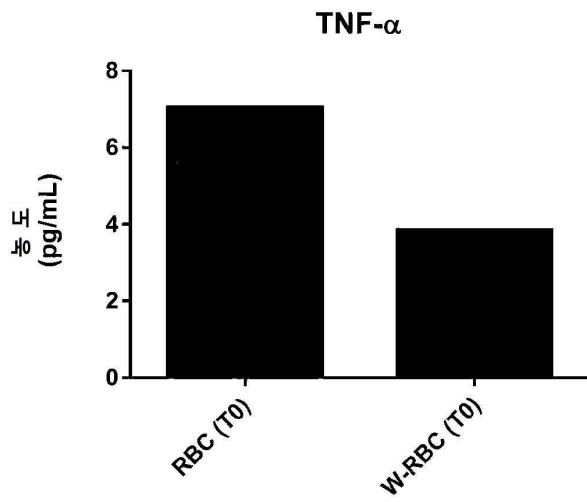
도면11g



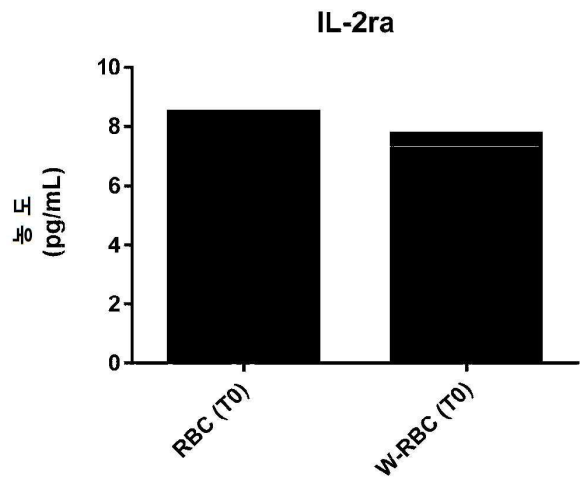
도면11h



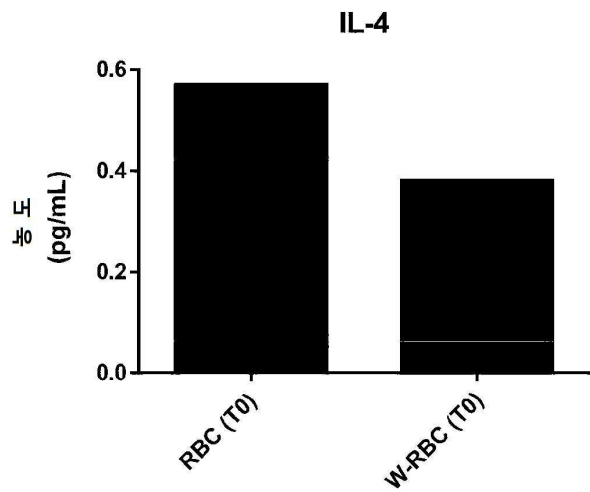
도면11i



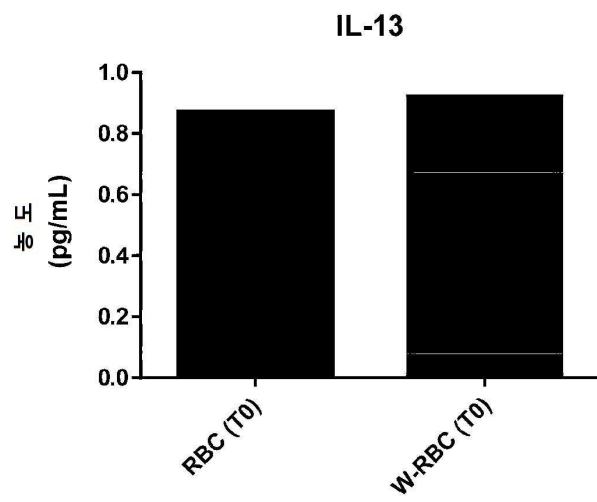
도면11j



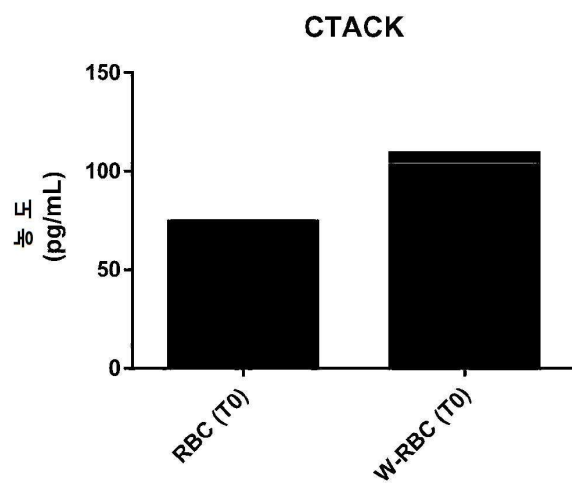
도면11k



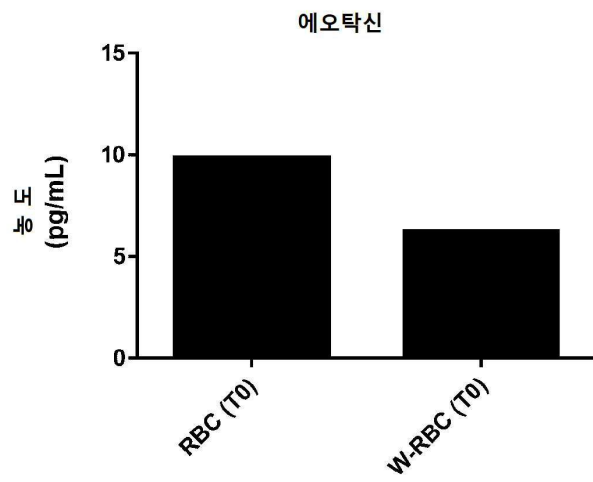
도면11l



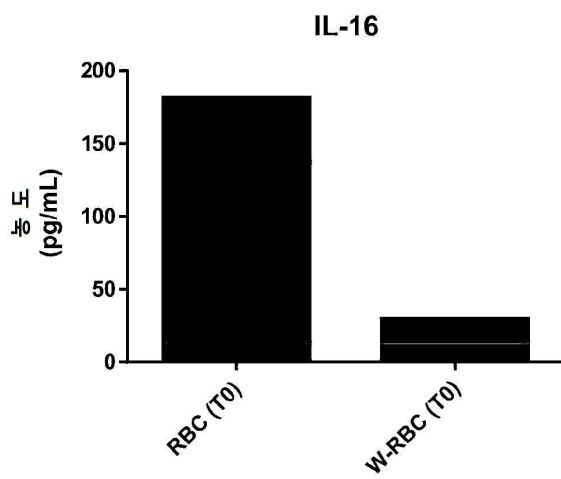
도면11m



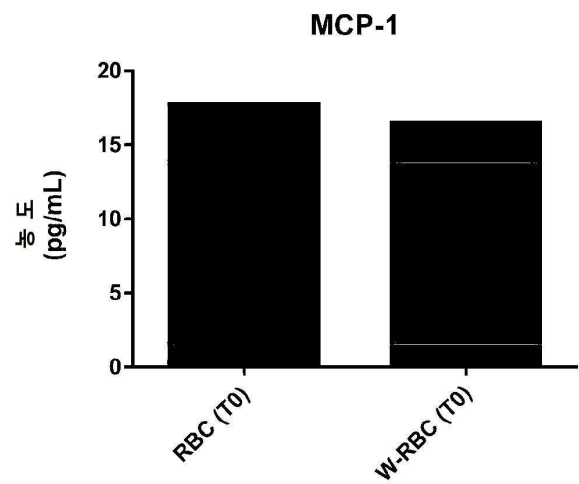
도면11n



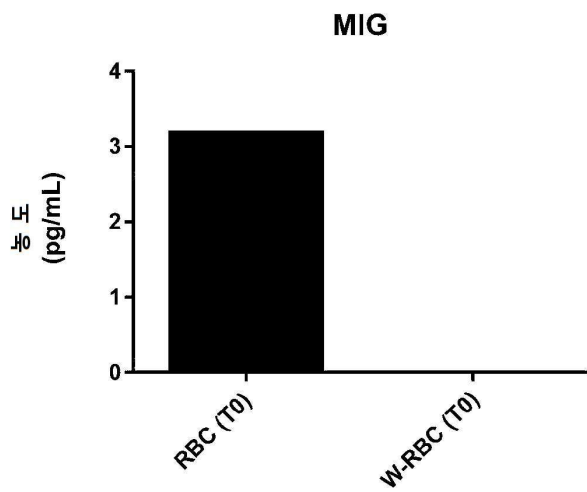
도면11o



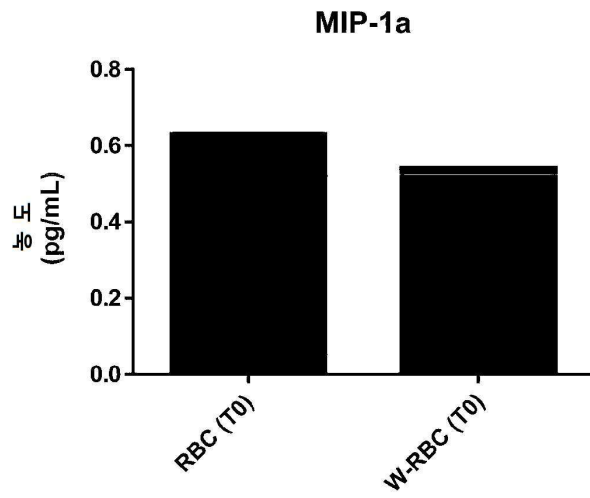
도면11p



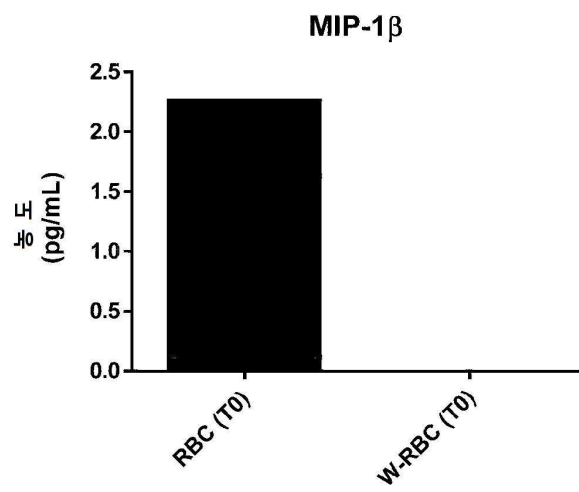
도면11q



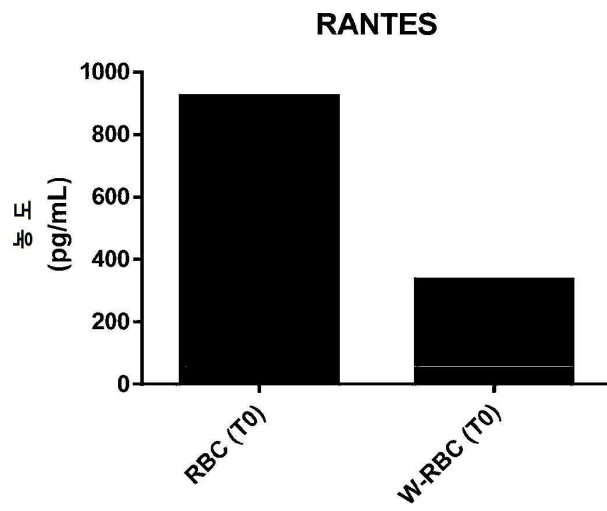
도면11r



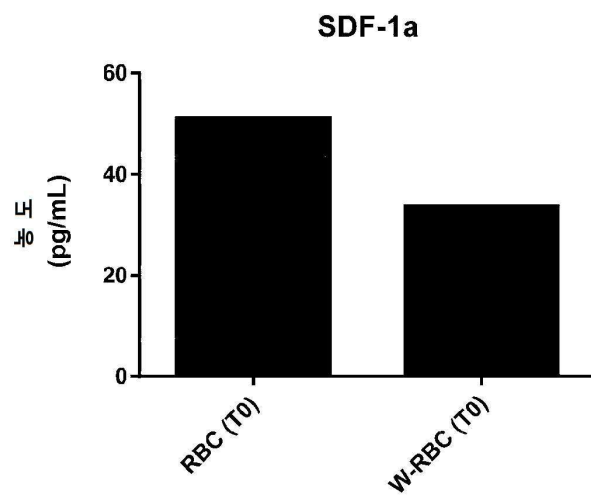
도면11s



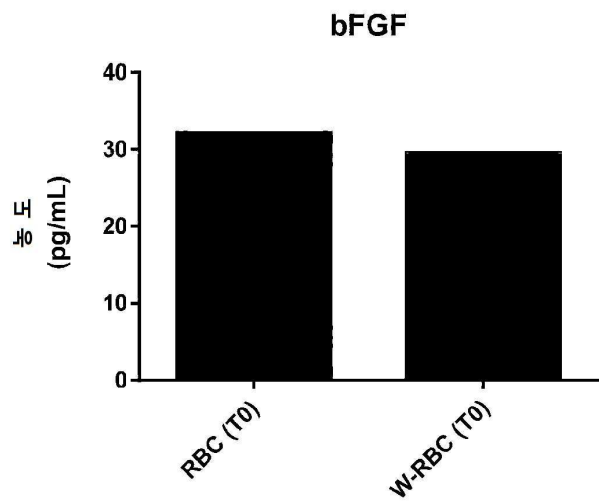
도면11t



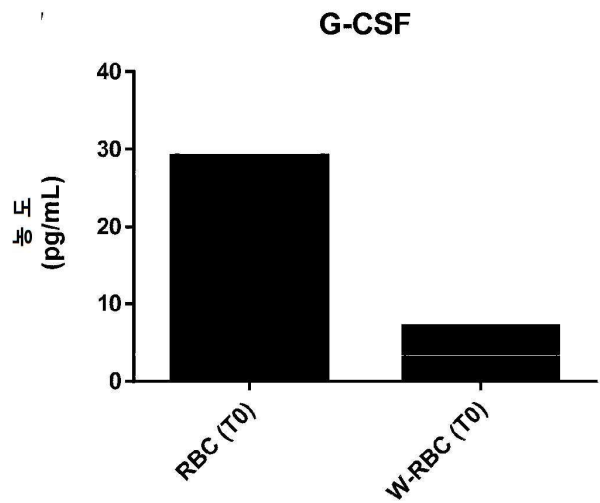
도면11u



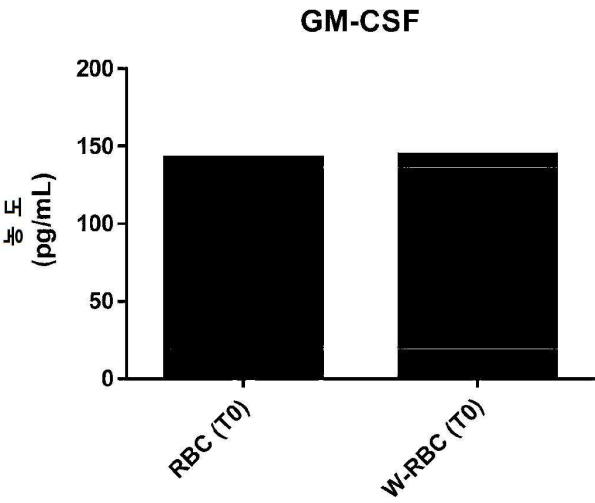
도면11v



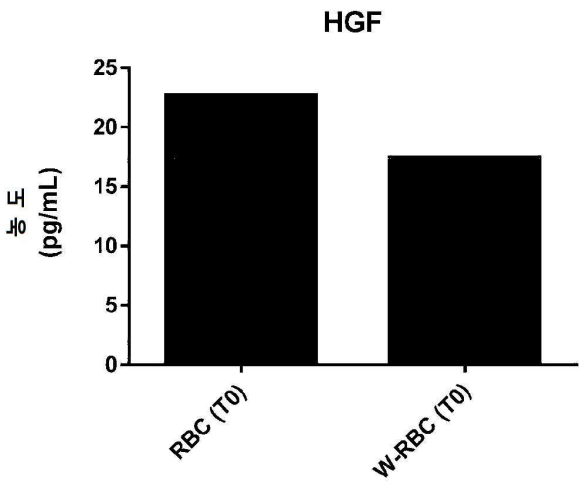
도면11w



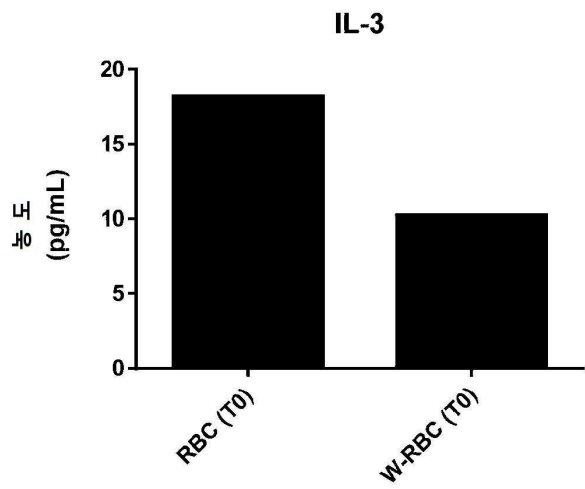
도면11x



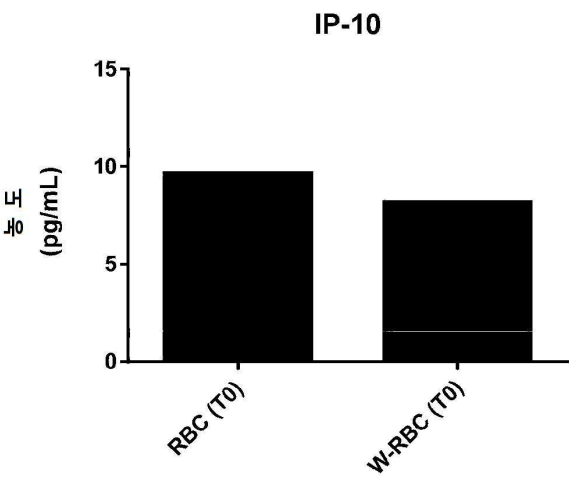
도면11y



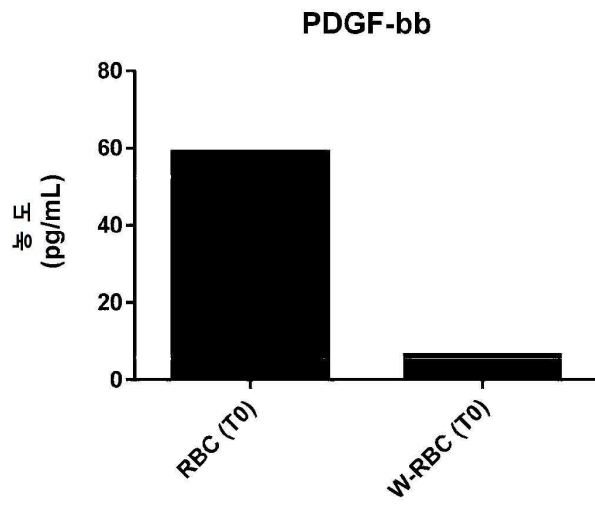
도면11z



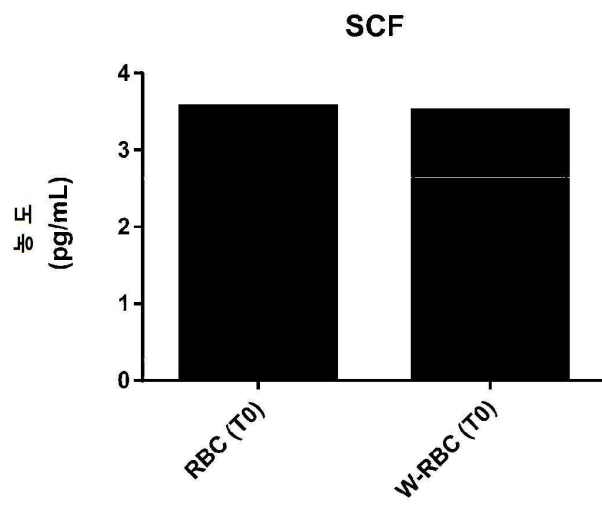
도면11aa



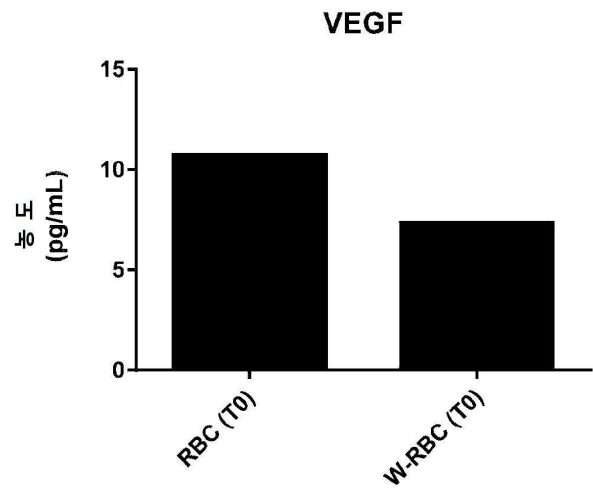
도면11bb



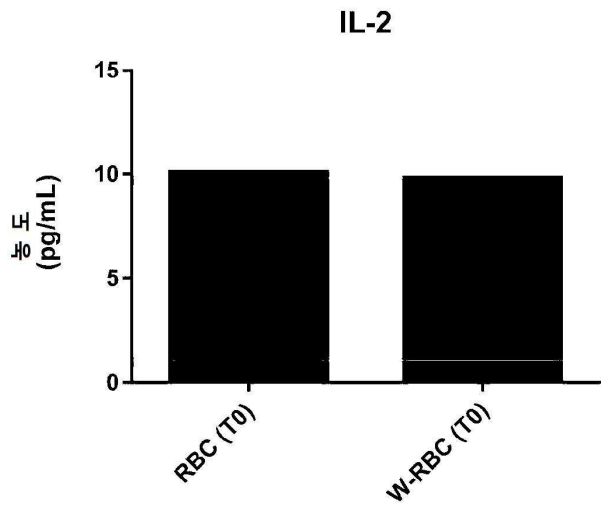
도면11cc



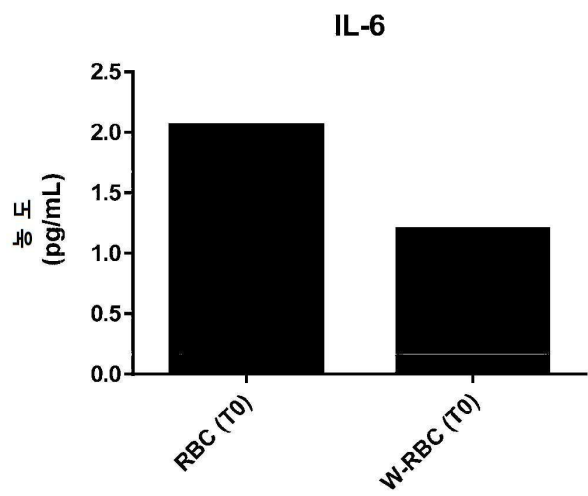
도면11dd



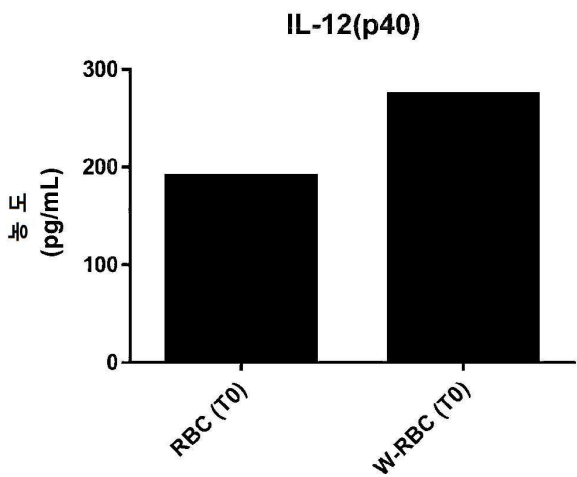
도면11ee



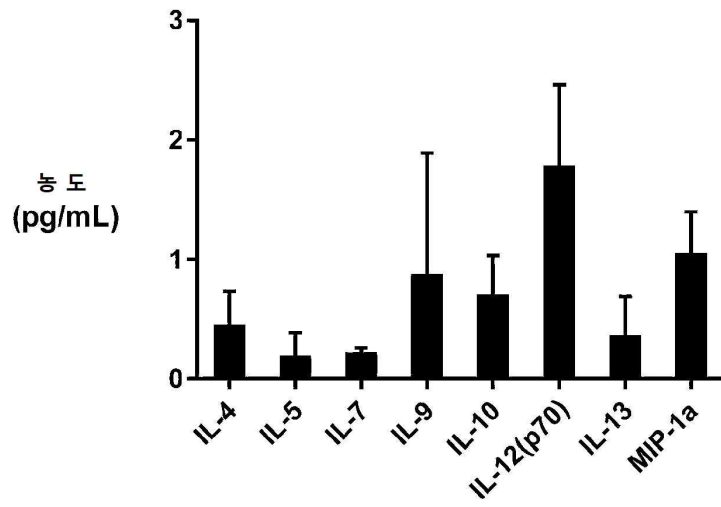
도면11ff



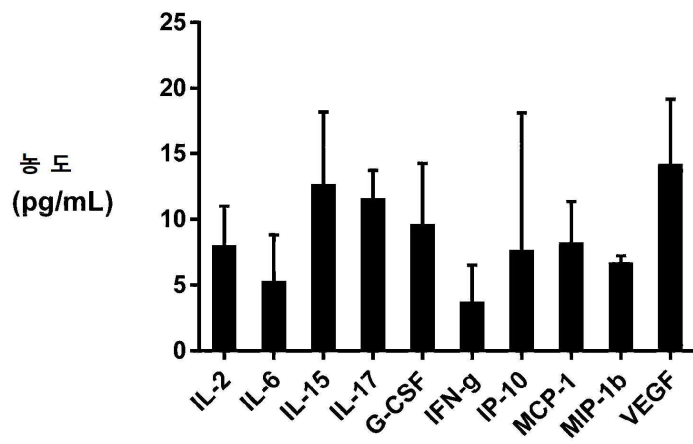
도면11gg



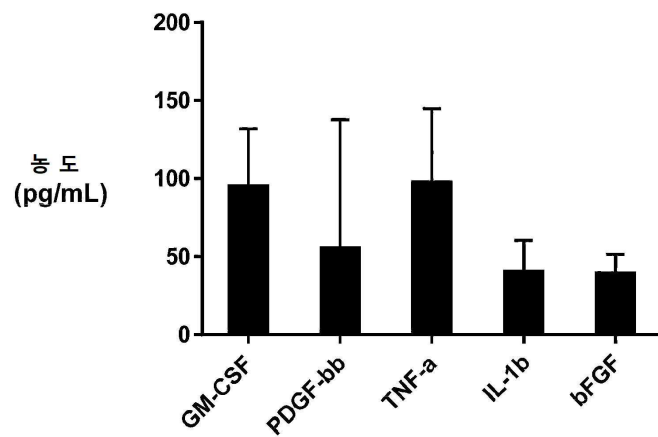
도면12



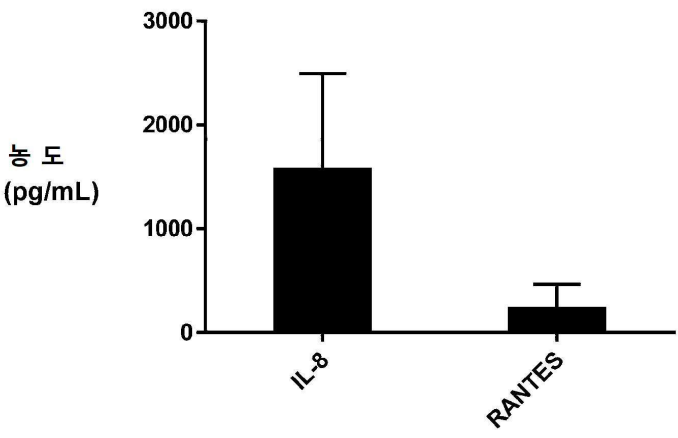
도면13



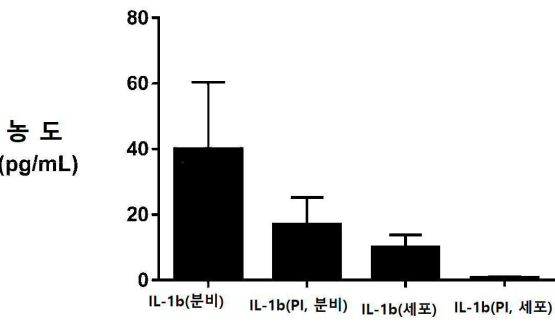
도면14



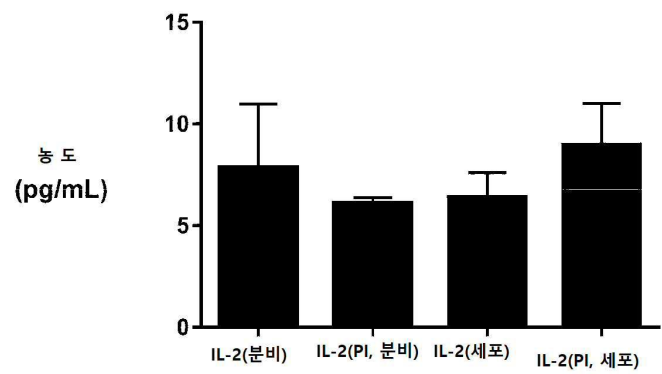
도면15



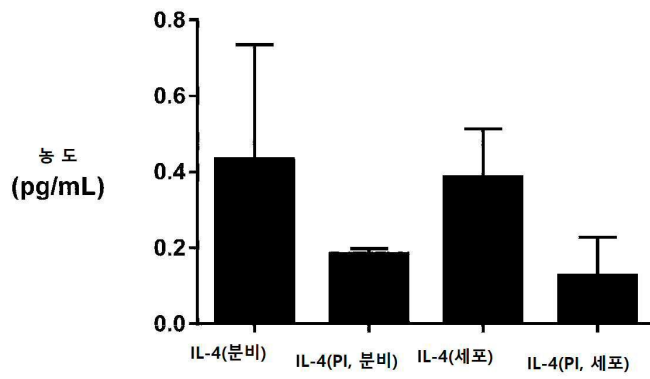
도면16a



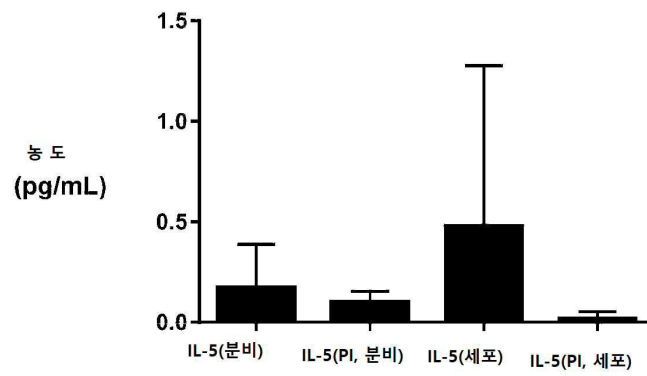
도면16b



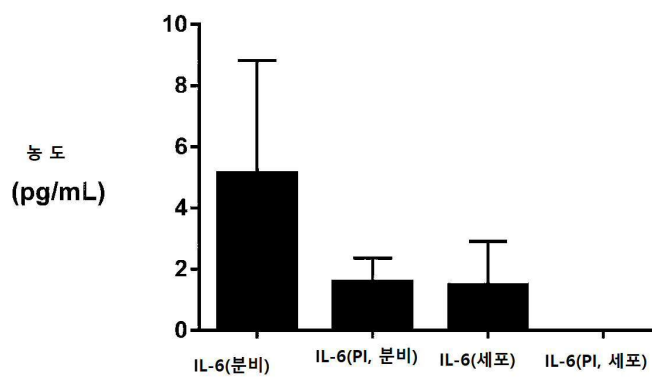
도면16c



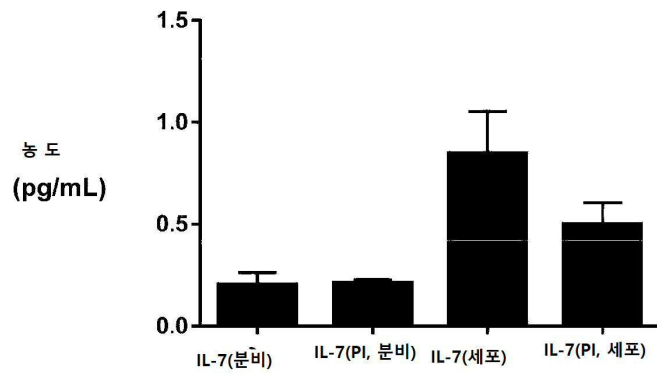
도면16d



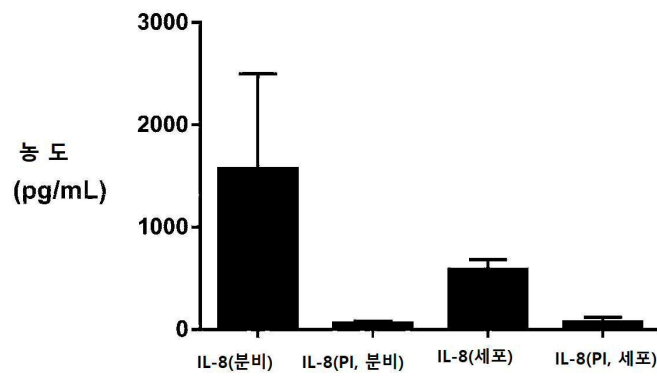
도면16e



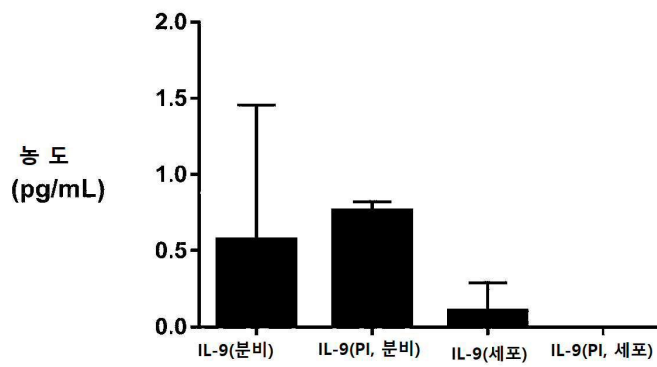
도면16f



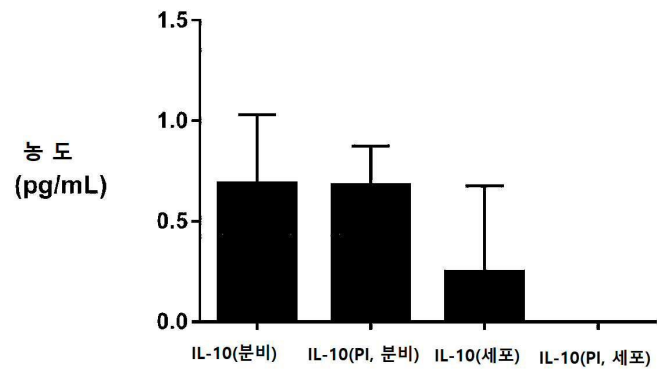
도면16g



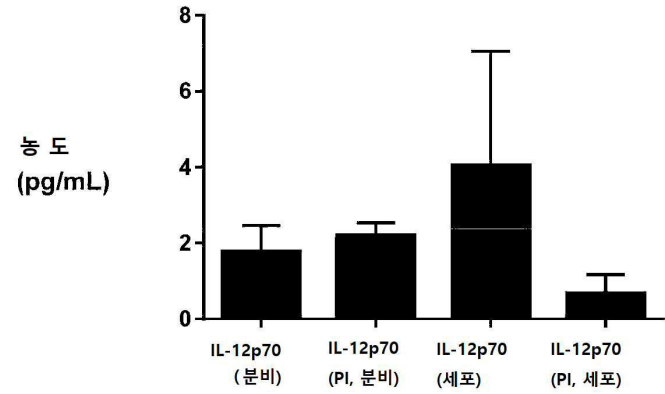
도면16h



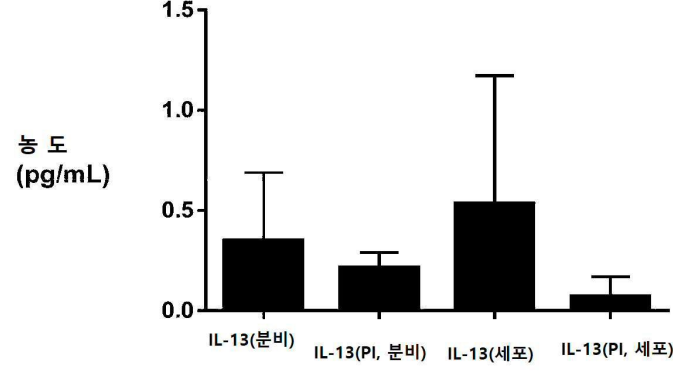
도면16i



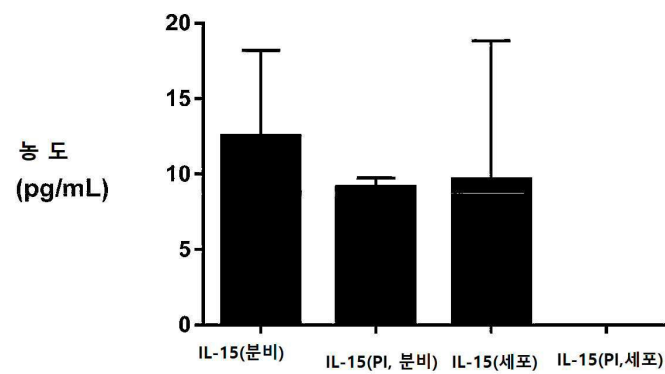
도면16j



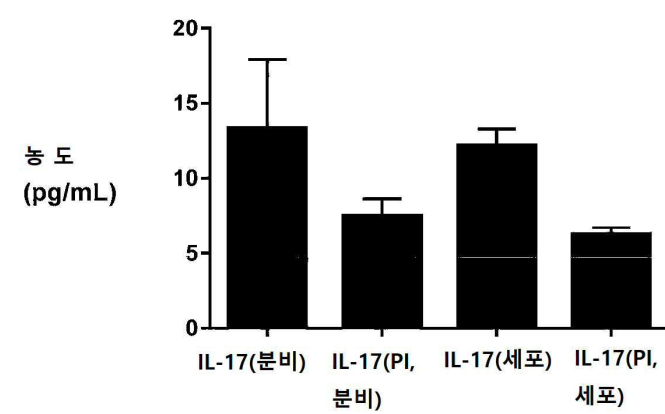
도면16k



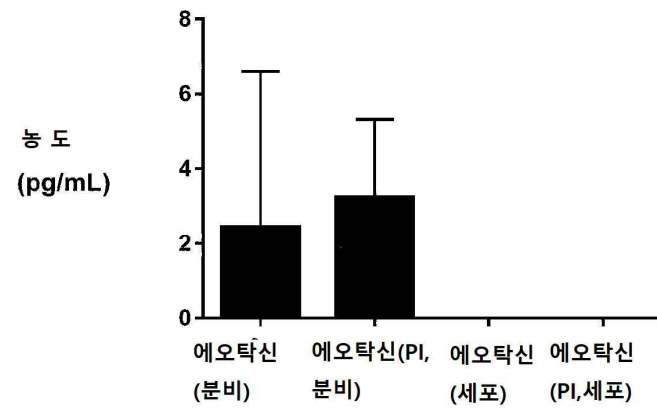
도면16l



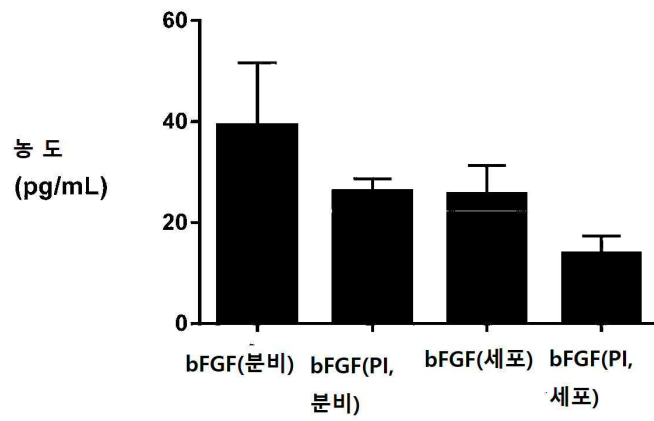
도면16m



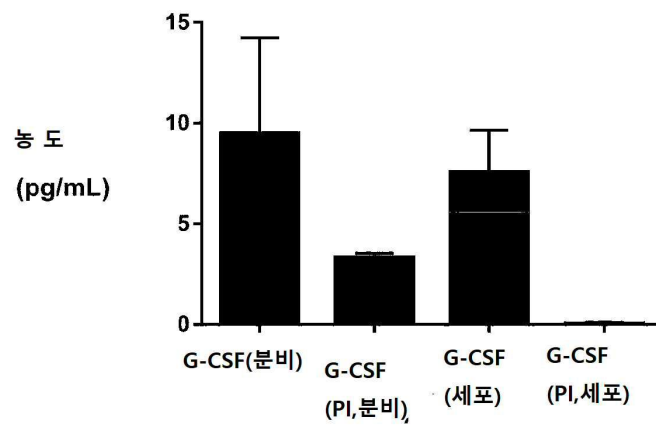
도면16n



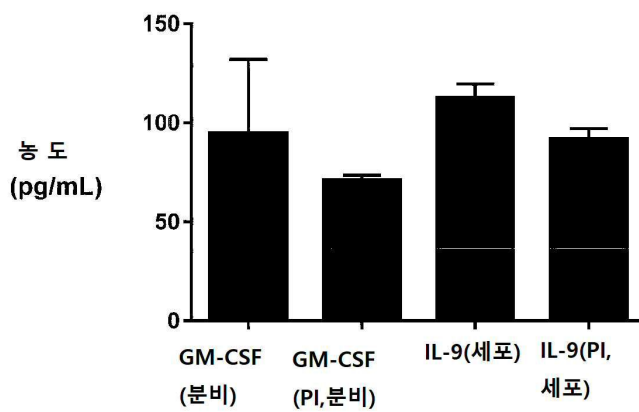
도면16o



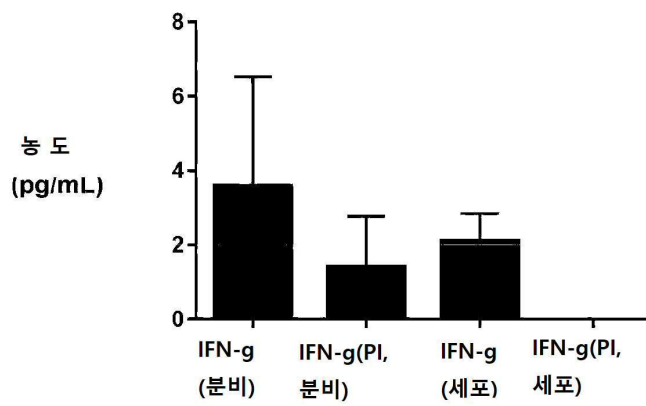
도면16p



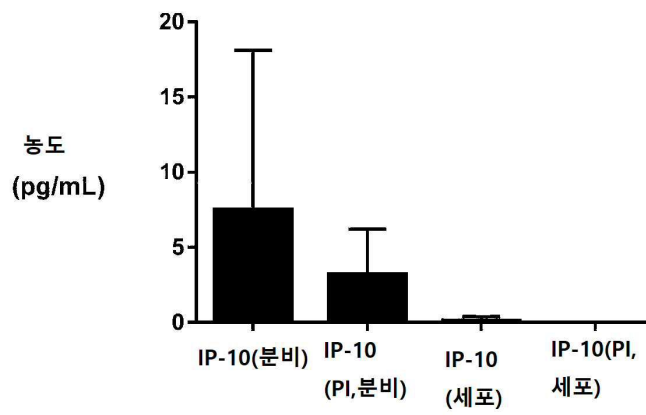
도면16q



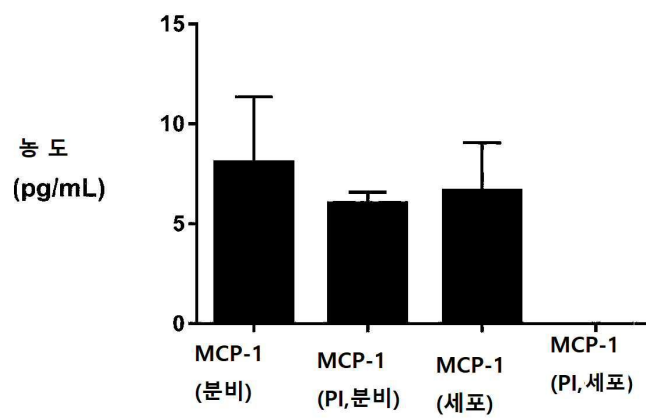
도면16r



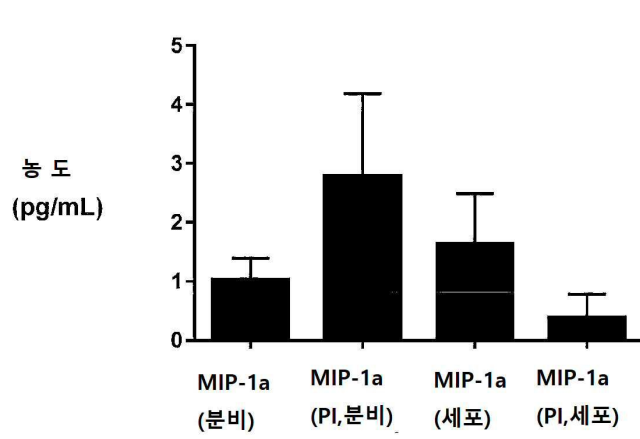
도면16s



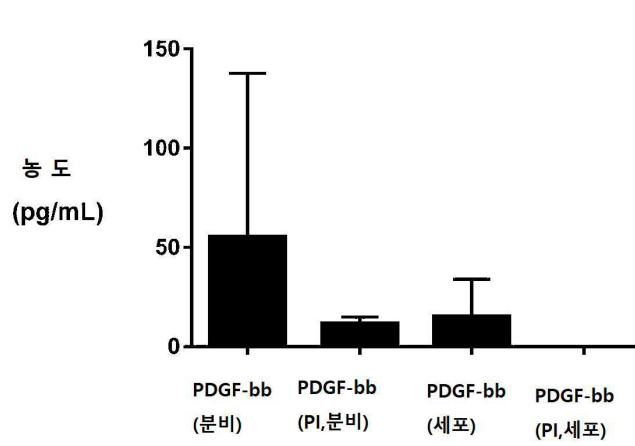
도면16t



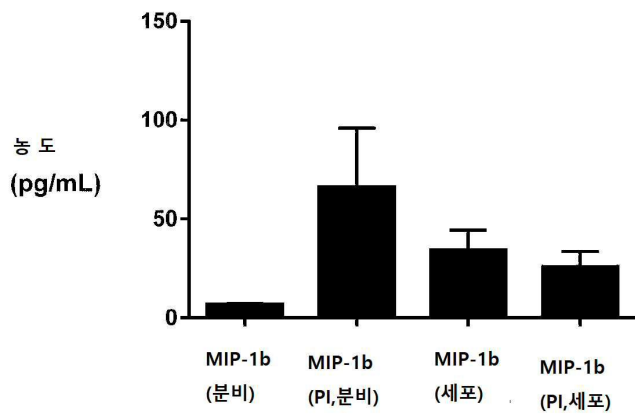
도면16u



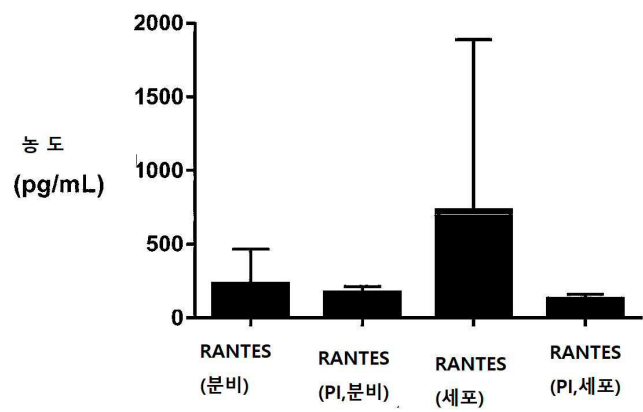
도면16v



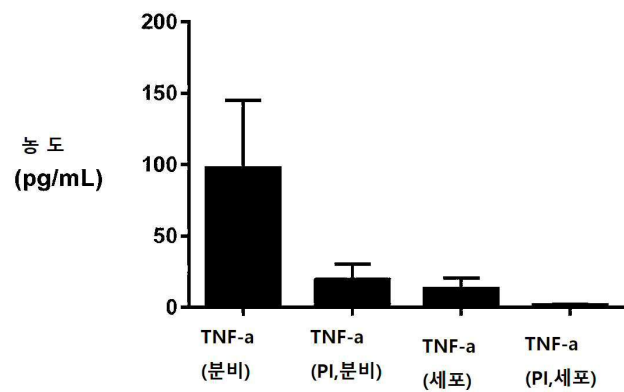
도면16w



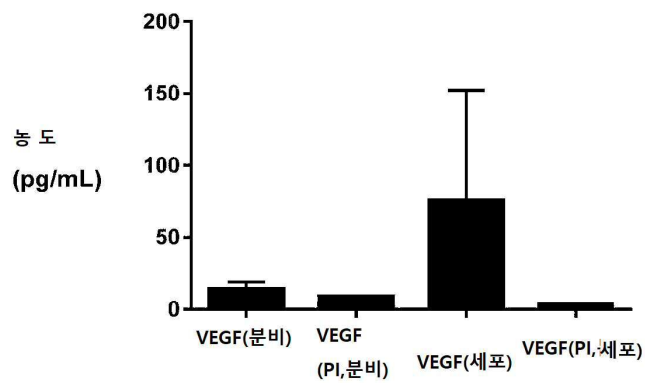
도면16x



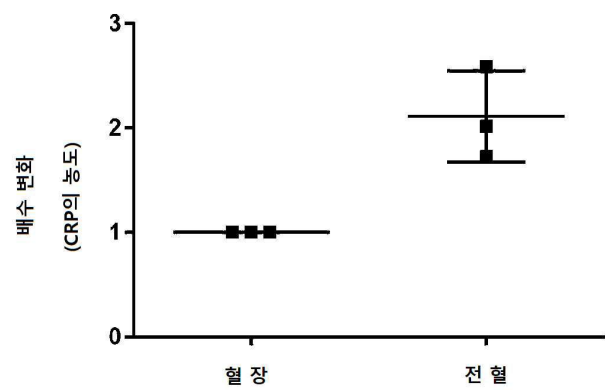
도면16y



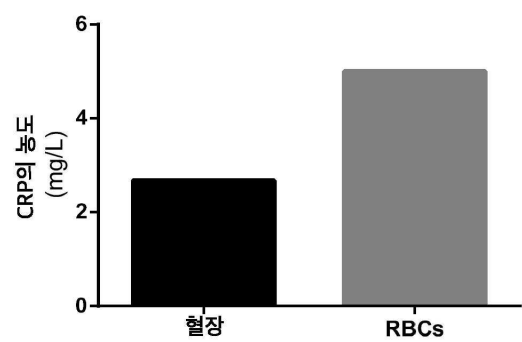
도면16z



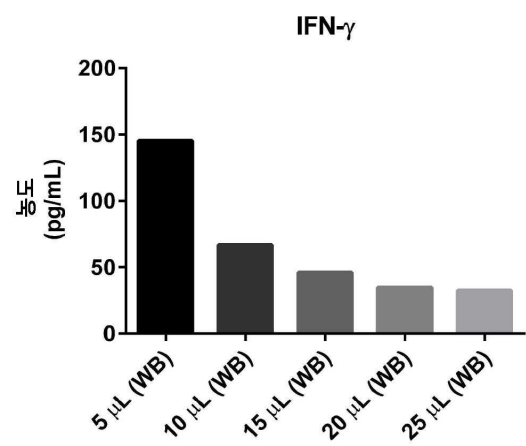
도면17



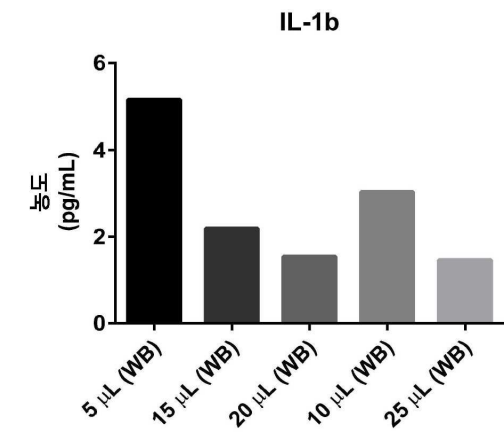
도면18



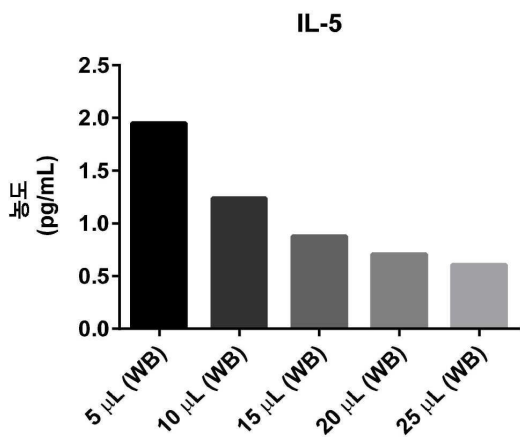
도면19a



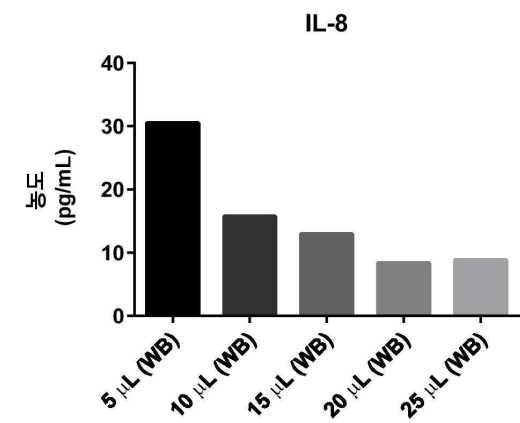
도면19b



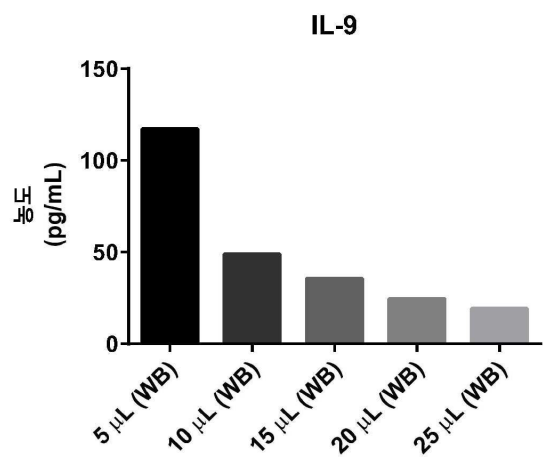
도면19c



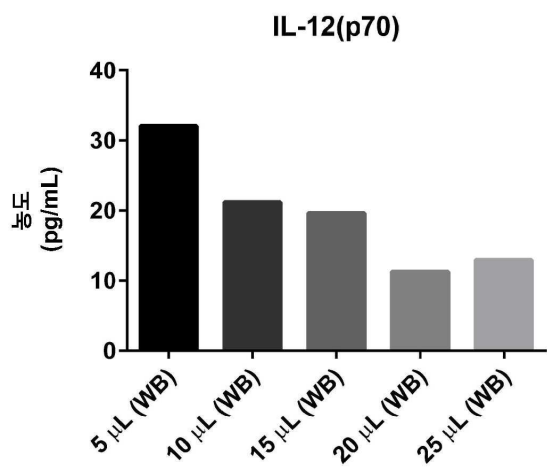
도면19d



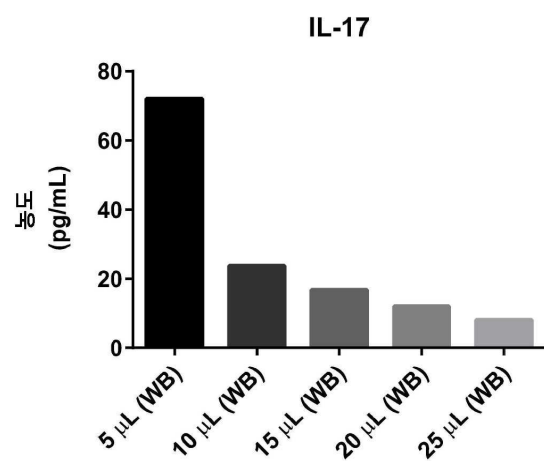
도면19e



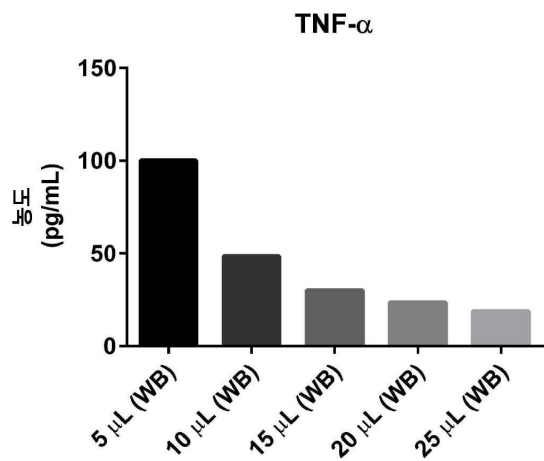
도면19f



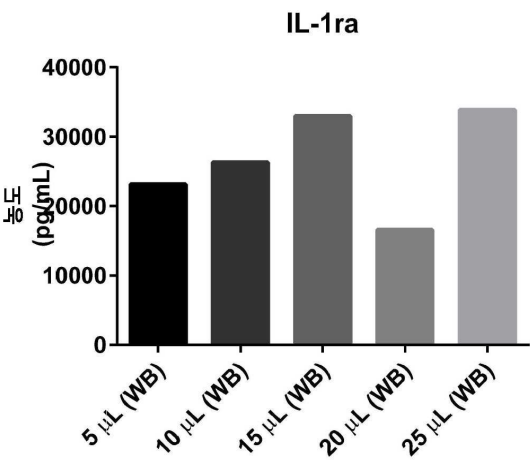
도면19g



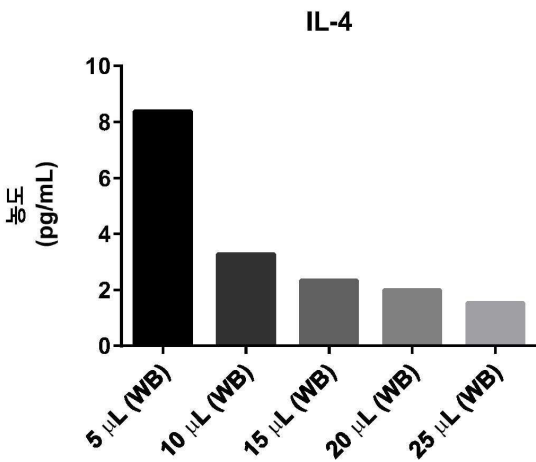
도면19h



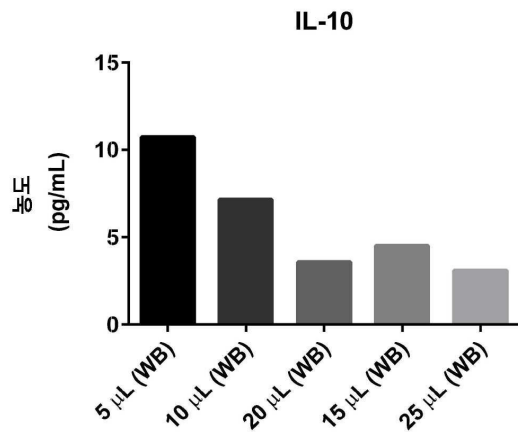
도면19i



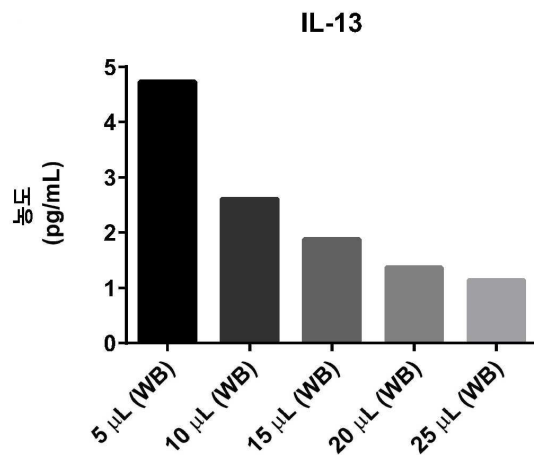
도면19j



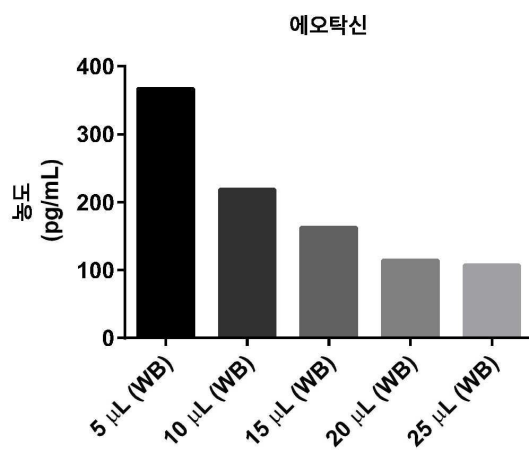
도면19k



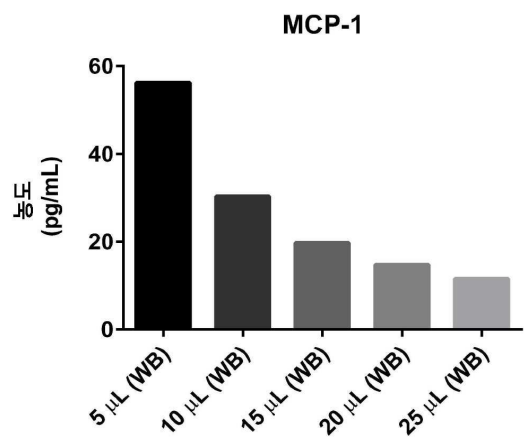
도면19l



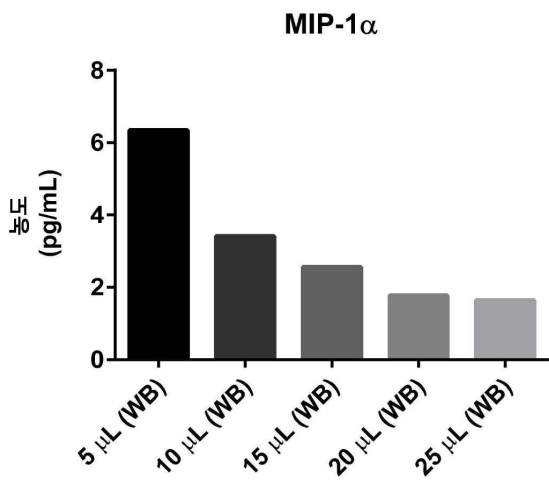
도면19m



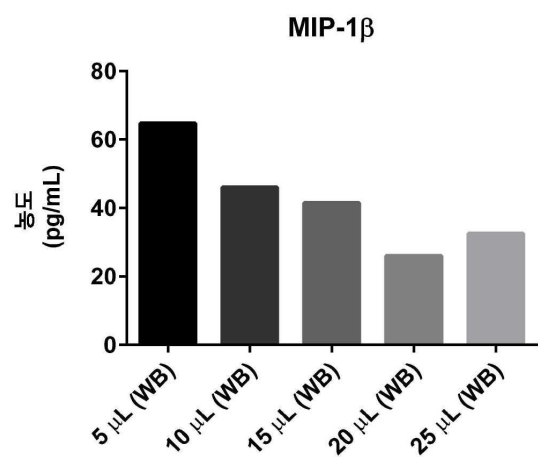
도면19n



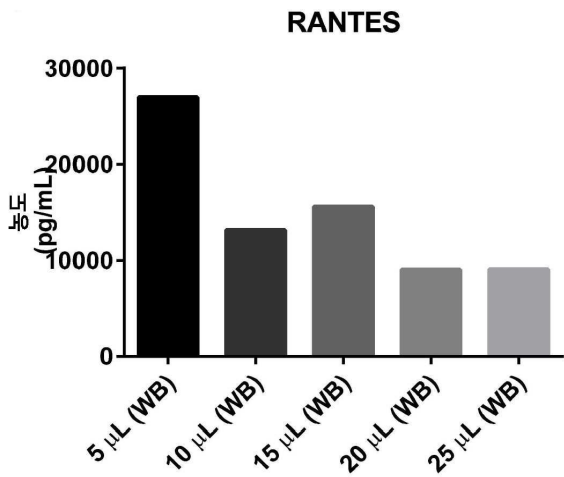
도면19o



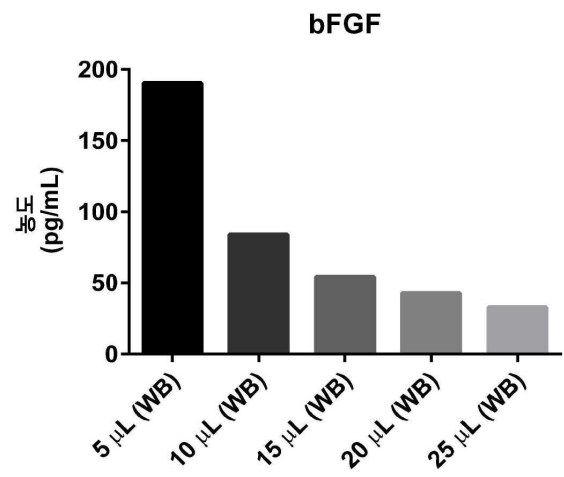
도면19p



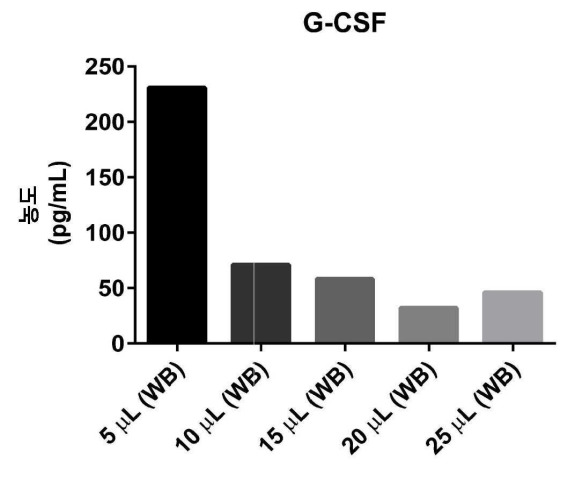
도면19q



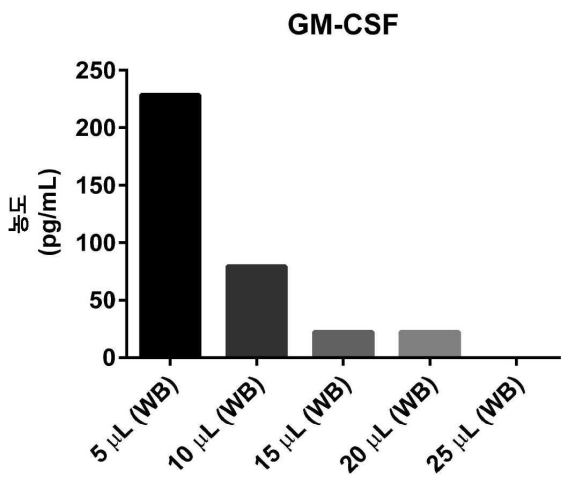
도면19r



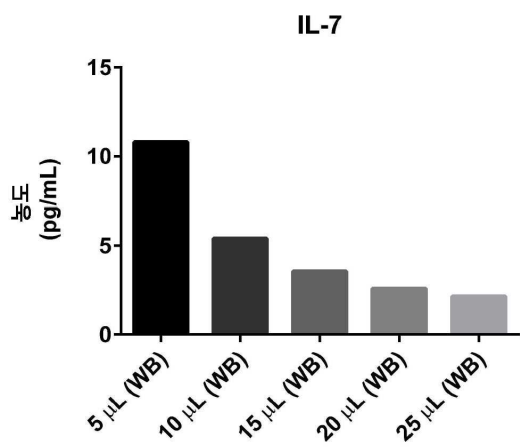
도면19s



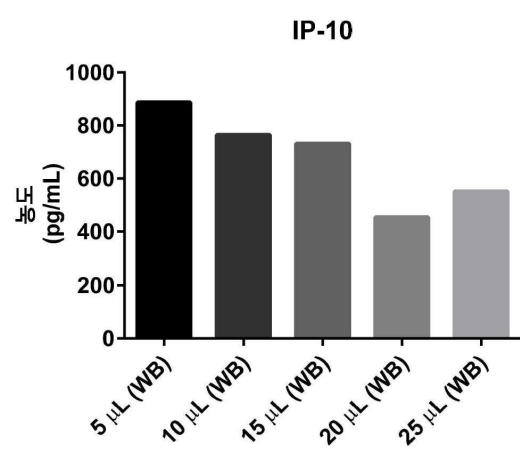
도면19t



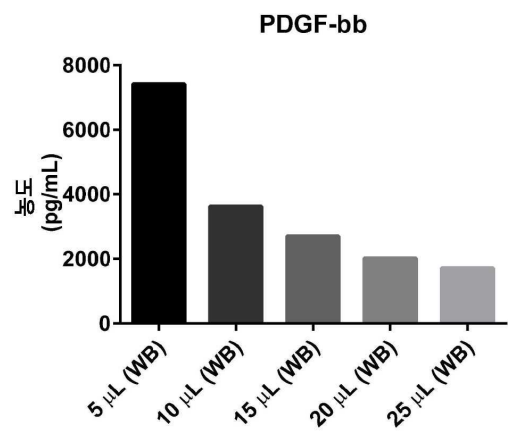
도면19u



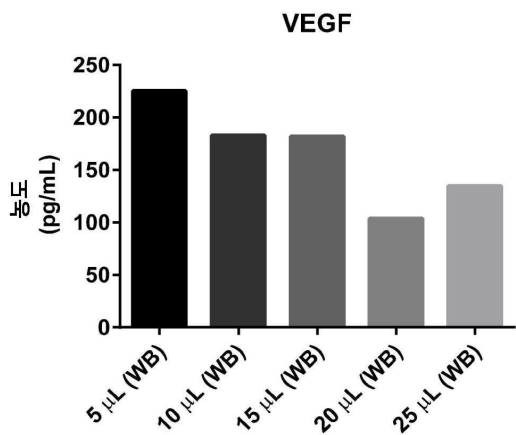
도면19v



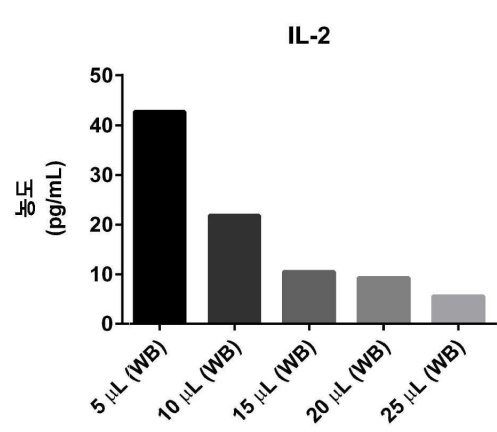
도면19w



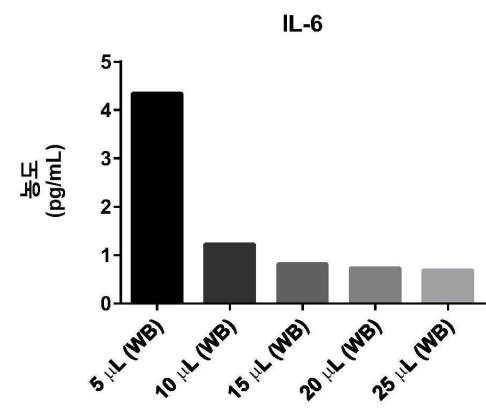
도면19x



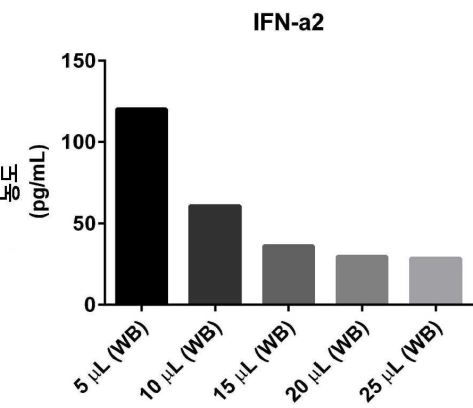
도면19y



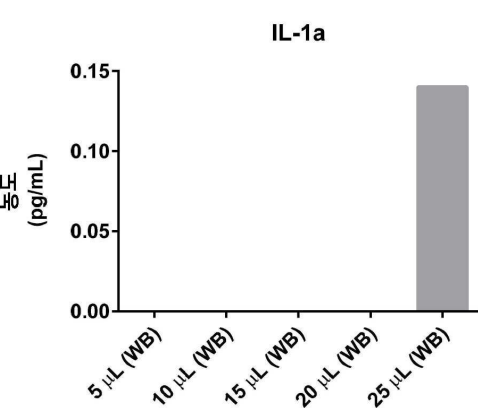
도면19z



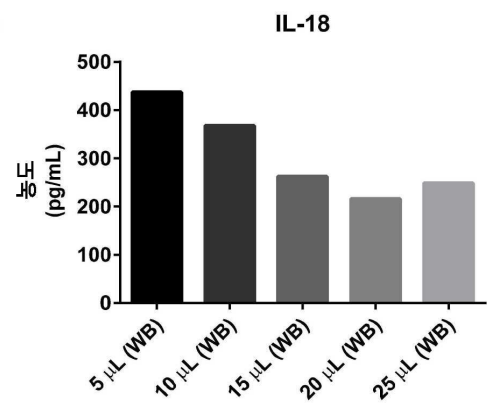
도면19aa



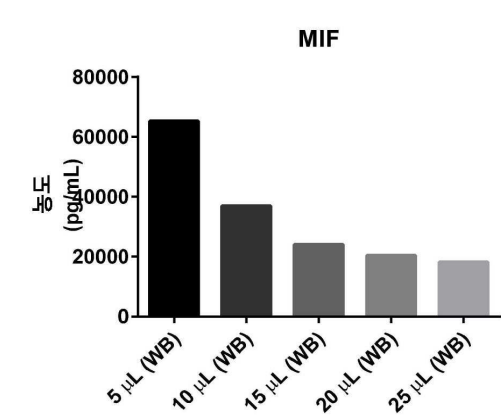
도면19bb



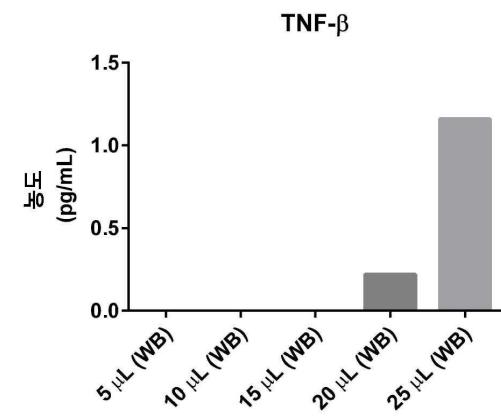
도면19cc



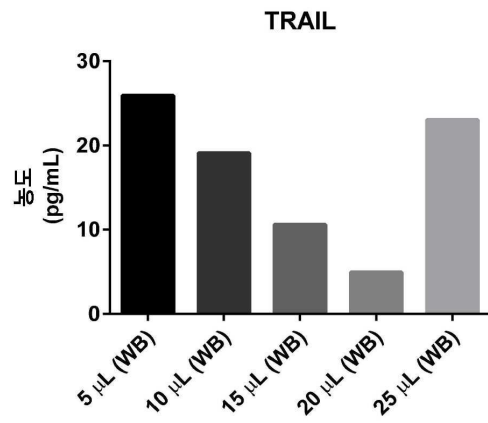
도면19dd



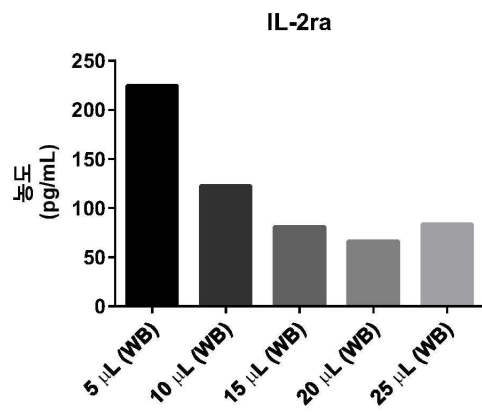
도면19ee



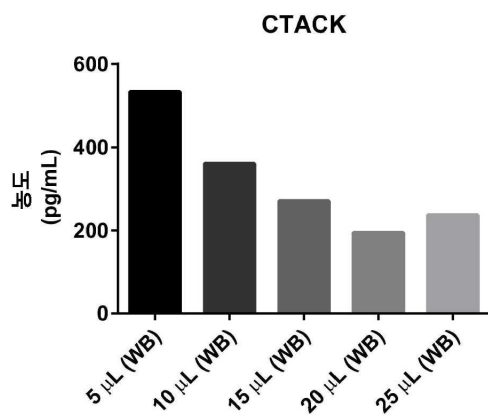
도면19ff



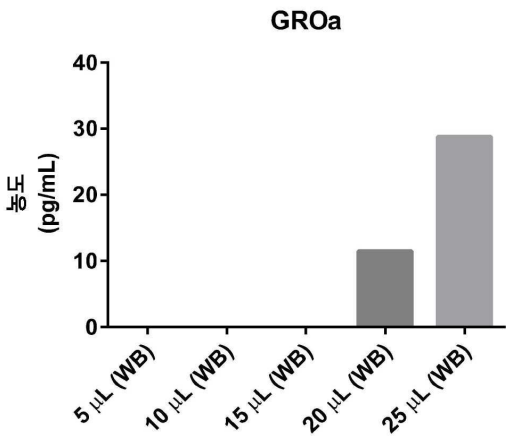
도면19gg



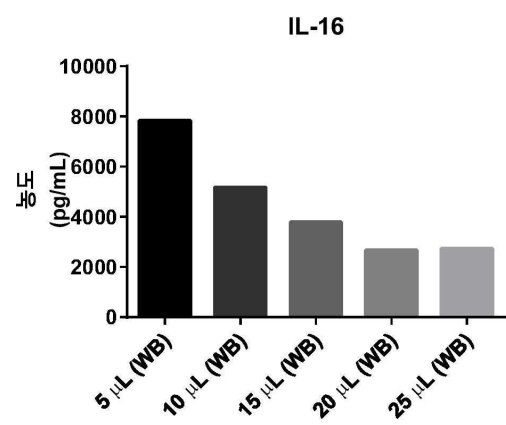
도면19hh



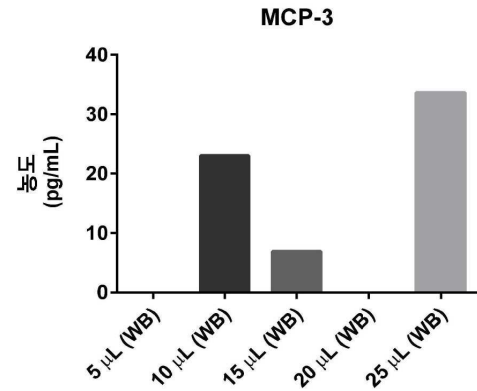
도면19ii



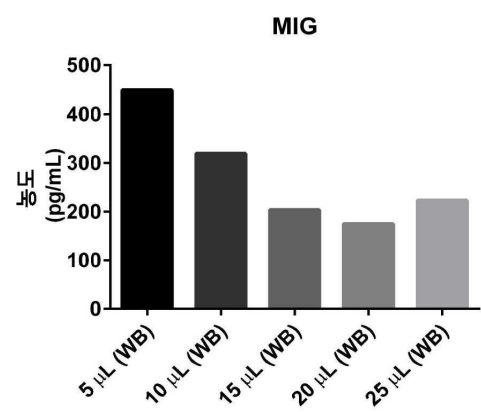
도면19jj



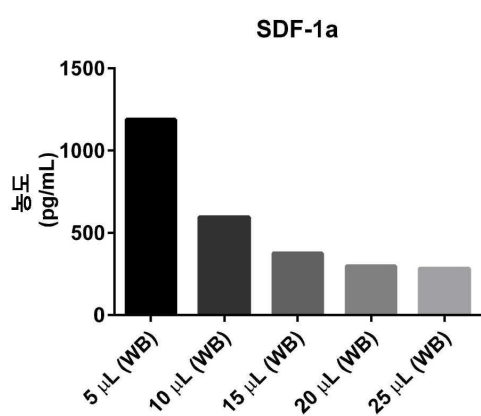
도면19kk



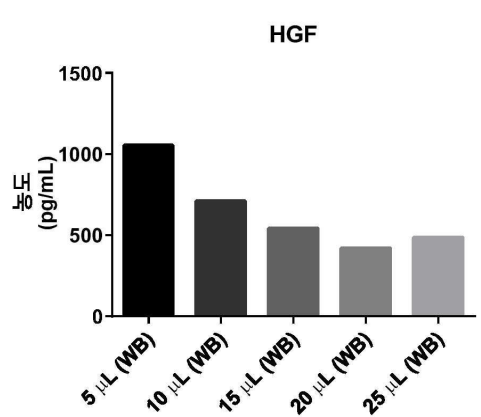
도면1911



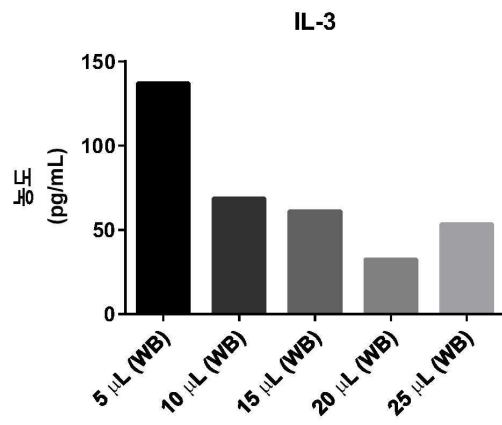
도면19mm



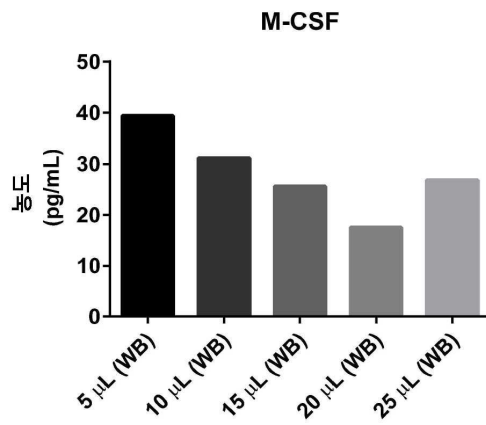
도면19nn



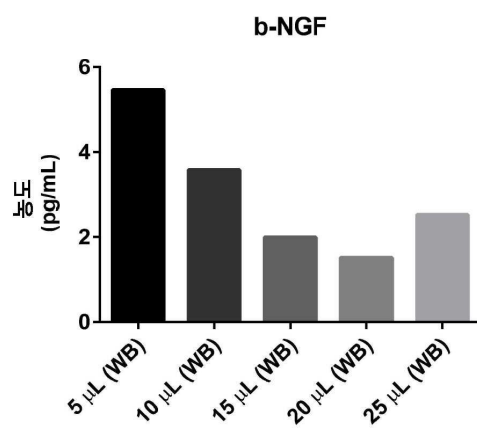
도면19oo



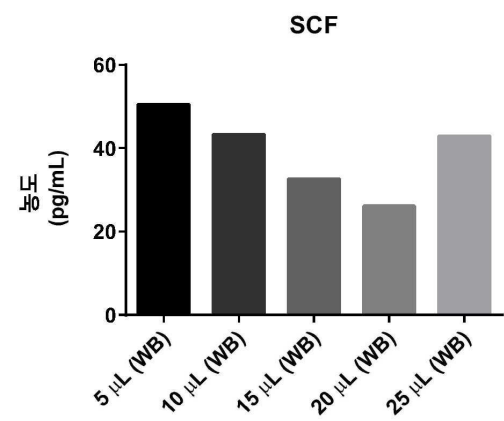
도면19pp



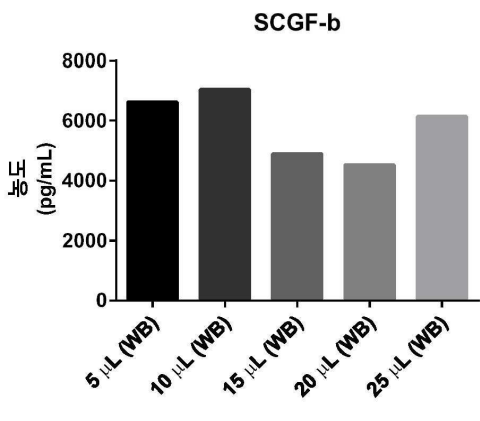
도면19qq



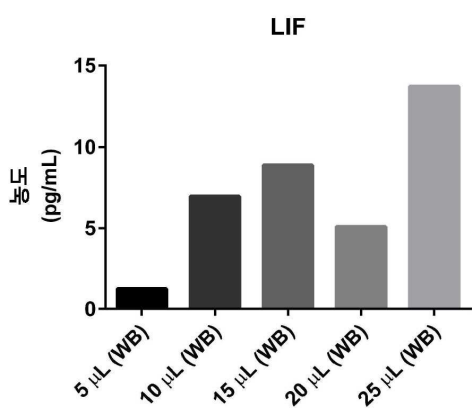
도면19rr



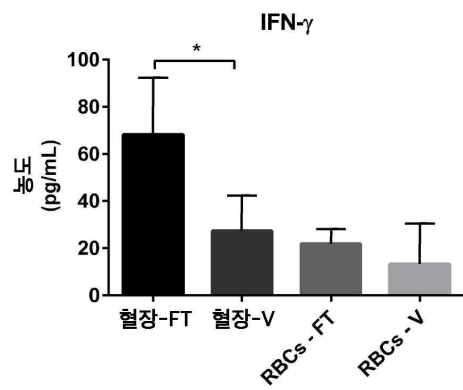
도면19ss



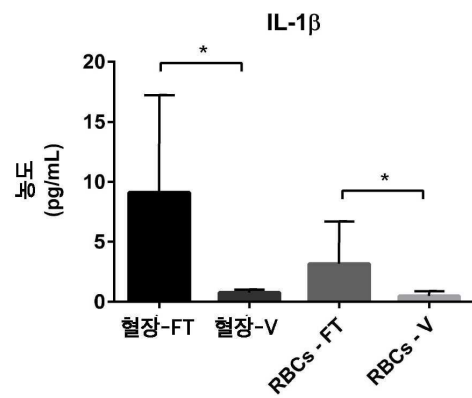
도면19tt



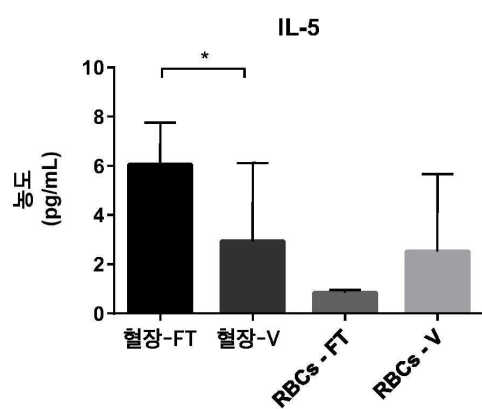
도면20a



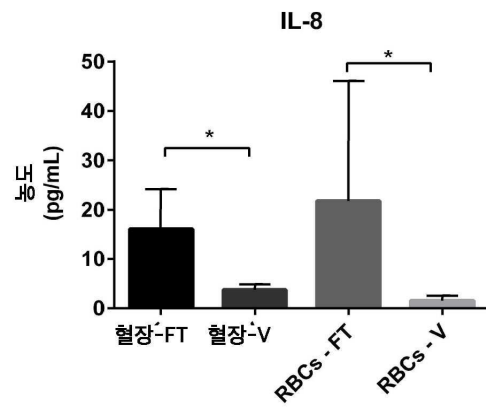
도면20b



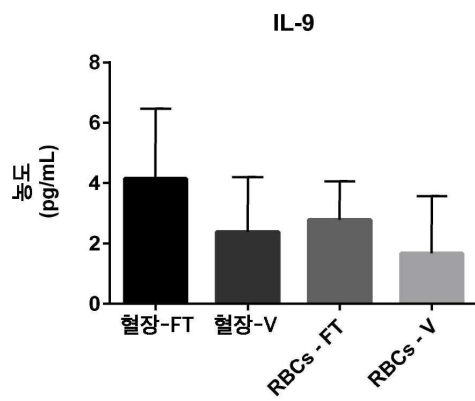
도면20c



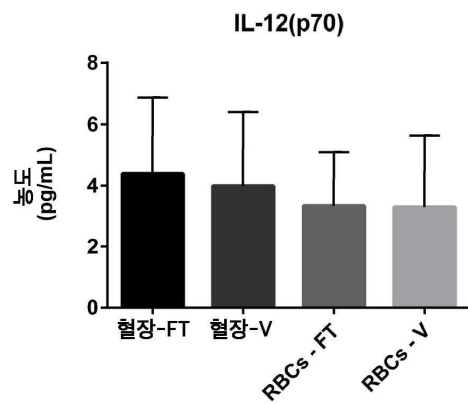
도면20d



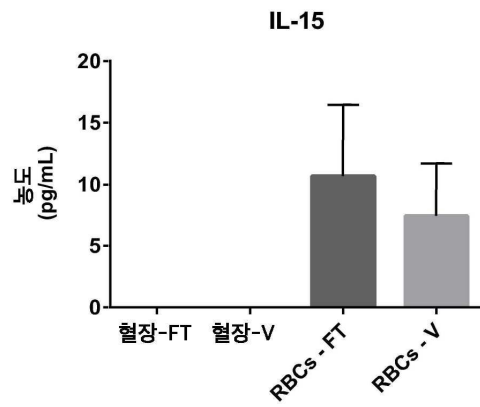
도면20e



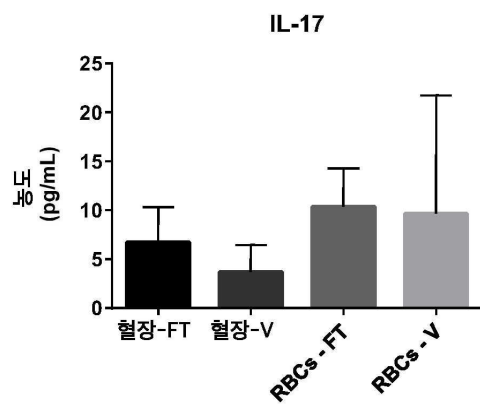
도면20f



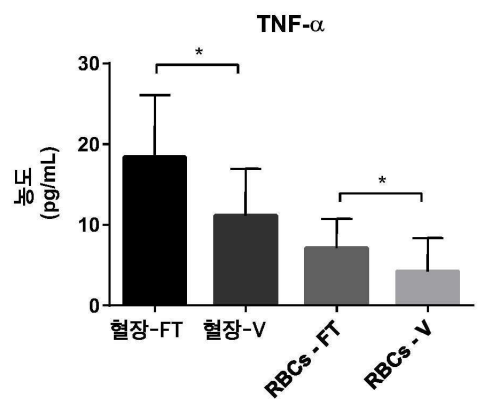
도면20g



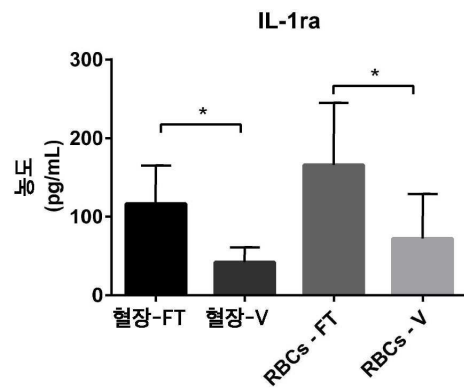
도면20h



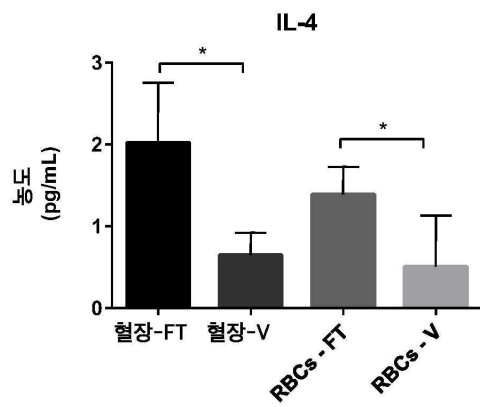
도면20i



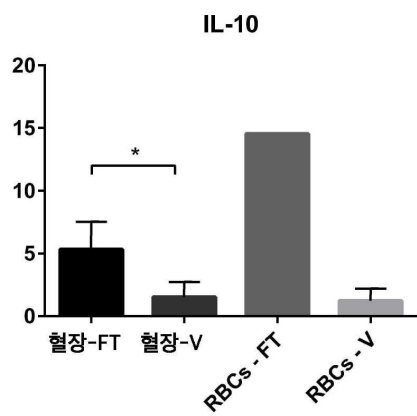
도면20j



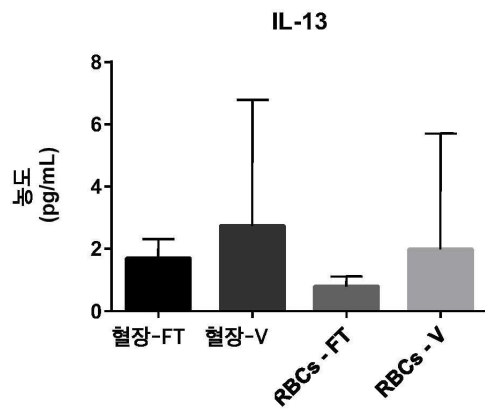
도면20k



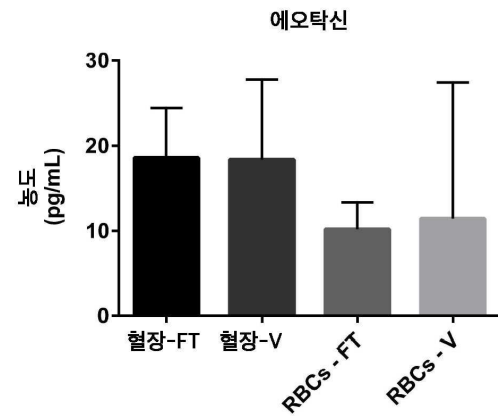
도면20l



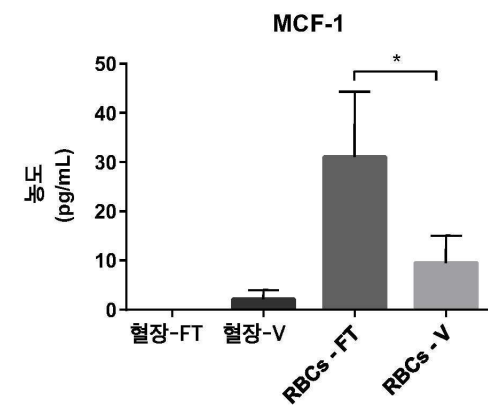
도면20m



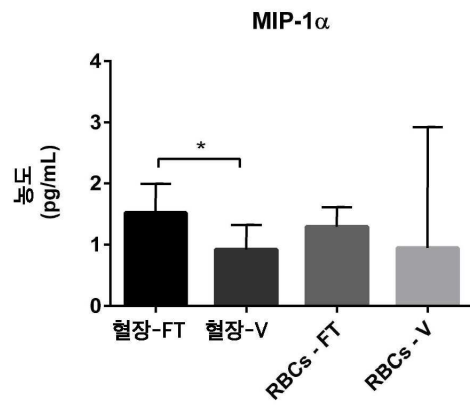
도면20n



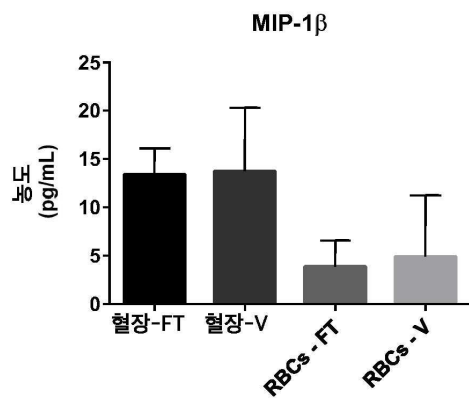
도면20o



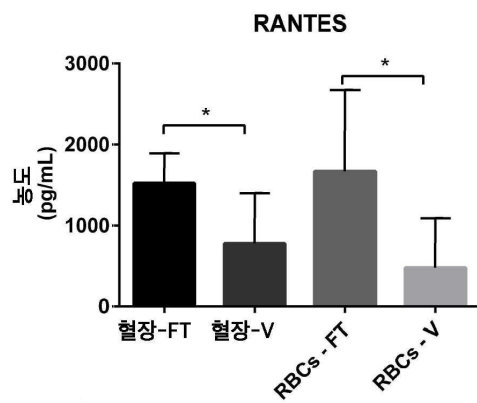
도면20p



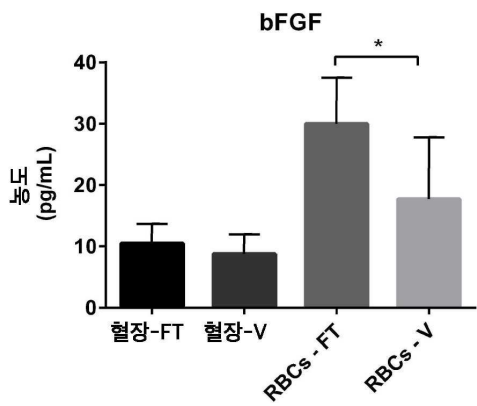
도면20q



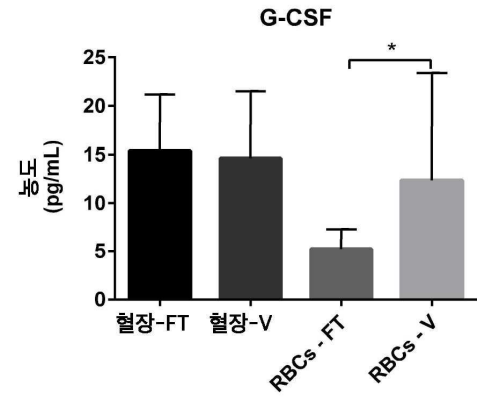
도면20r



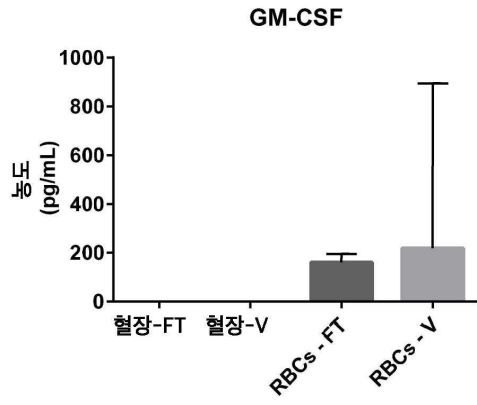
도면20s



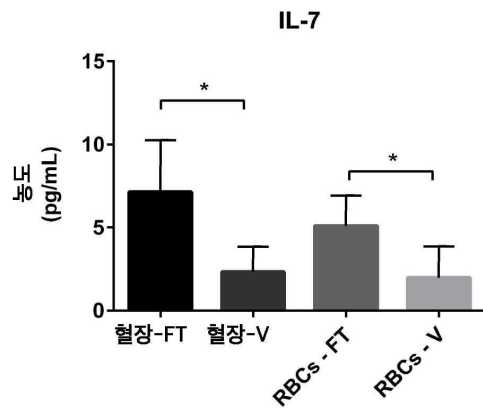
도면20t



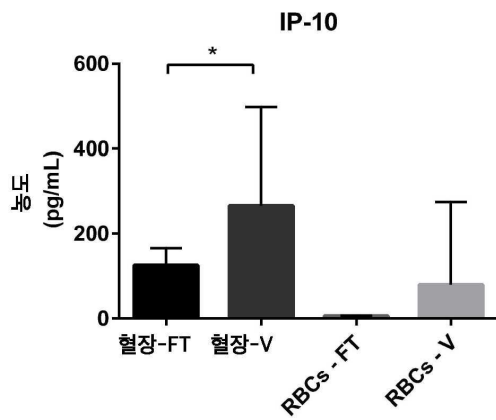
도면20u



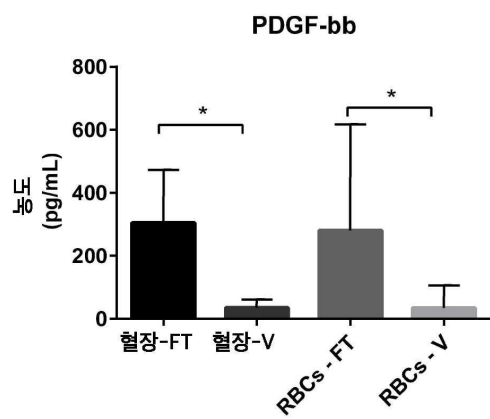
도면20v



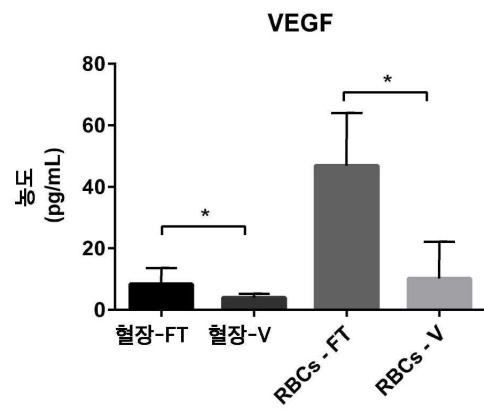
도면20w



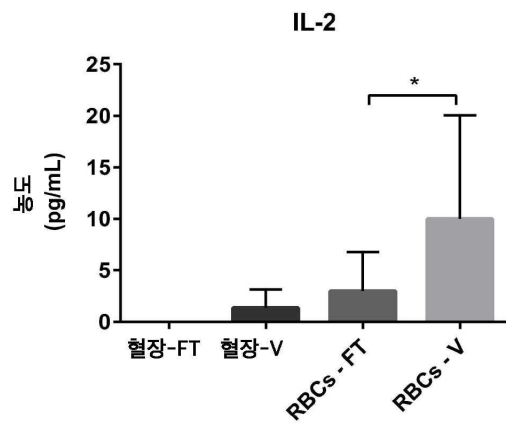
도면20x



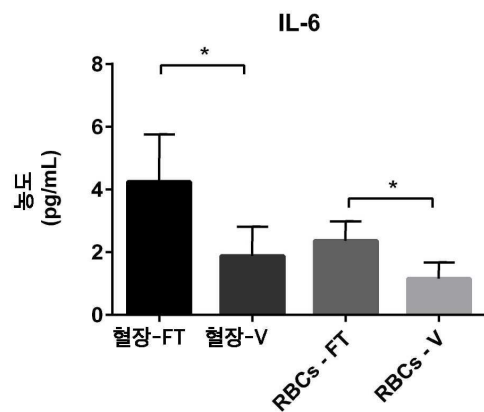
도면20y



도면20z



도면20aa



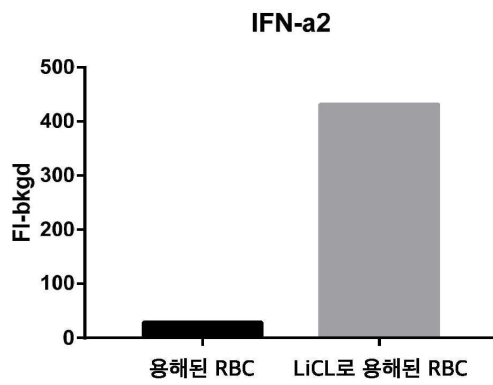
도면21a

단백질	혈장*			RBCs*					배수 변화
	개체의 수	pg/mL 전혈		개체의 수	pg/mL 전혈		WBC 오염에 대해 보정됨(pg/mL)		
		Conc.	SD		Conc.	SD	Conc.	SD	
항-염증성									
IL-1ra	5	20.8	6.6	1	299.6	-	-	-	-
IL2-ra	6	29.3	5.3	3	282.6	31.7	280.9	28.8	10
IL-4	4	0.4	0.2	2	4.6	0.8	3.3	0.9	8
IL-10	1	1.4	-	0	-	-	-	-	-
IL-13	5	2.0	1.0	3	2.3	2.3	1.4	2.3	1
케모카인									
CTACK	6	36.3	9.3	5	222.2	85.7	131.4	100.5	4
예오타신	5	6.4	2.2	6	79.3	38.4	74.6	38.4	12
GRO-α	3	6.0	1.7	4	187.3	47.8	184.0	54.3	31
IL-16	6	46.6	11.2	5	2904.9	3231.7	2904.9	3231.7	62
MCP-1	0	-	-	2	55.0	6.8	36.1	7.7	-
MCP-3	4	23.4	5.5	0	-	-	-	-	-
MIG	6	70.2	34.5	0	-	-	-	-	-
MIP-1α	6	0.5	0.3	4	5.2	2.3	3.9	2.1	8
MIP-1β	6	6.3	3.5	2	42.7	56.3	25.7	48.9	4
RANTES	6	510.7	268.5	6	8744	11,785	5618	10,489	11
SDF-1α	6	121.9	11.3	6	872.4	206.2	811.8	193.4	7

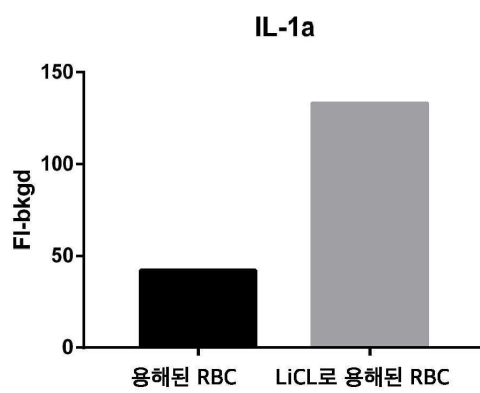
도면21b

단백질	혈장*			RBCs*					배수 변화
	개체의 수	pg/mL 전혈		개체의 수	pg/mL 전혈		WBC 오염에 대해 보정됨(pg/mL)		
		Conc.	SD		Conc.	SD	Conc.	SD	
성장 인자									
bFGF	6	4.8	2.0	6	197.1	72.4	147.2	87.3	31
G-CSF	6	5.3	3.6	3	148.8	79.0	131.1	79.1	25
GM-CSF	0	-	-	5	939.7	460.2	772.3	538.5	-
HGF	6	39.8	7.8	6	800.3	490.5	691.2	500.3	17
IL-3	6	18.1	2.0	6	345.8	209.7	334.2	217.6	18
IL-7	5	1.7	0.9	2	34.6	5.2	34.0	6.2	20
IP-10	6	132.5	142.7	4	147.8	87.1	134.0	83.3	1
M-CSF	6	4.3	3.2	3	115.6	7.9	99.5	13.2	23
β-NGF	5	1.2	0.2	0	-	-	-	-	-
PDGF-bb	6	20.3	17.4	5	1073.5	2004.9	115.4	2095.6	6
SCF	6	6.5	1.5	1	54.1	-	51.9	-	8
SCGF-β	3	944.3	563.9	0	-	-	-	-	-
VEGF	5	2.1	0.8	6	113.9	50.3	82.8	53.7	39
다중 기능을 가진 분석물									
IL-2	0	-	-	0	-	-	-	-	-
IL-6	2	0.5	0.1	0	-	-	-	-	-
Il-12p40	1	44.5	-	3	1914.7	357.9	1693.7	254.7	38
LIF	6	5.7	3.2	3	119.5	27.5	119.5	27.5	21

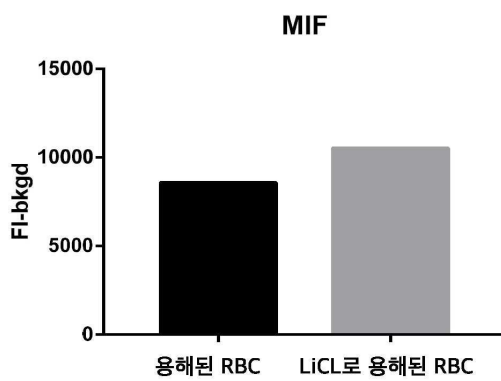
도면22a



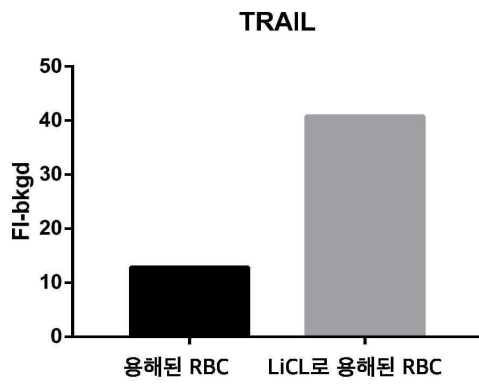
도면22b



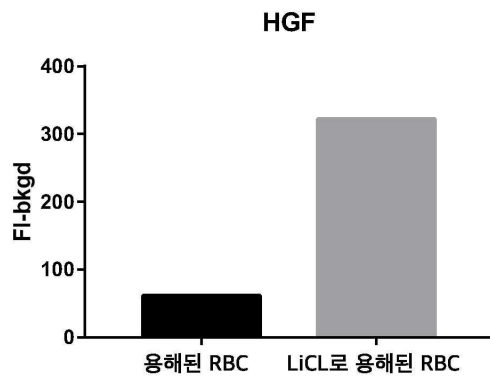
도면22c



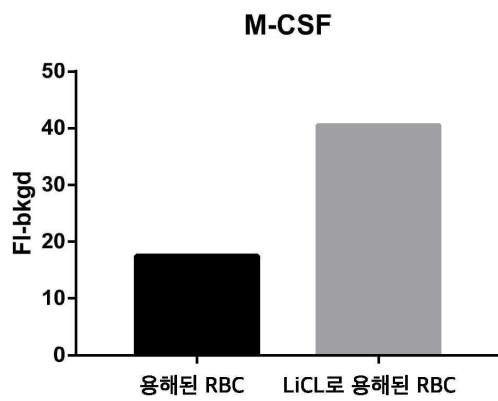
도면22d



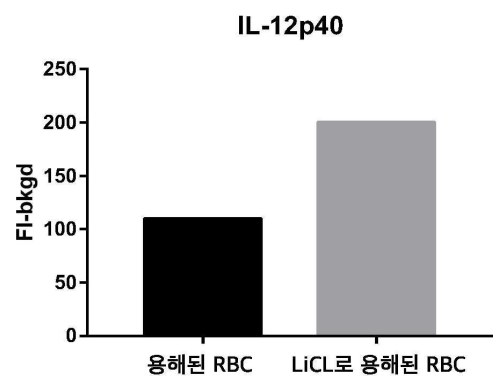
도면22e



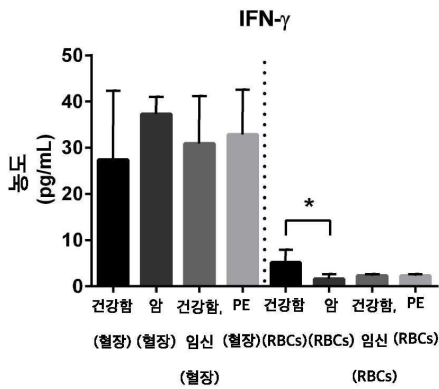
도면22f



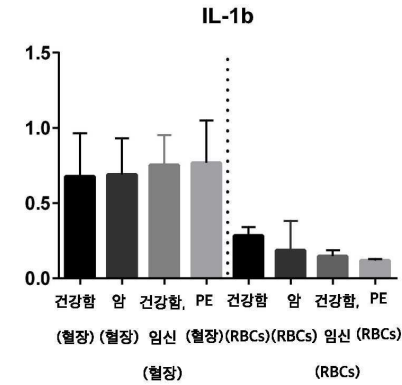
도면22g



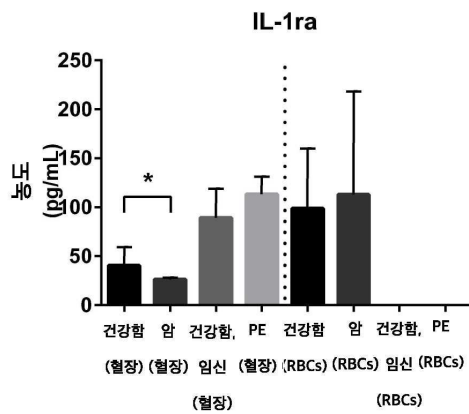
도면23a



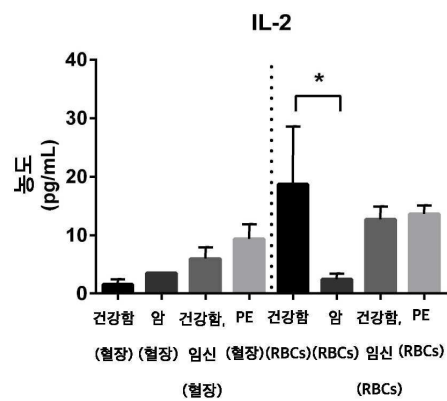
도면23b



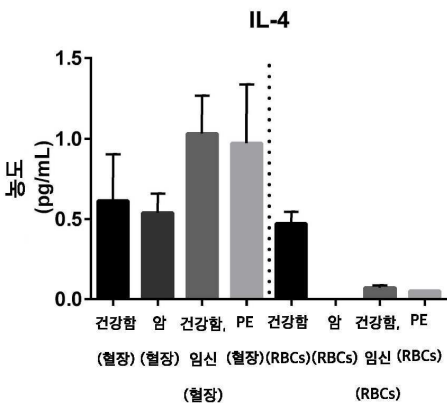
도면23c



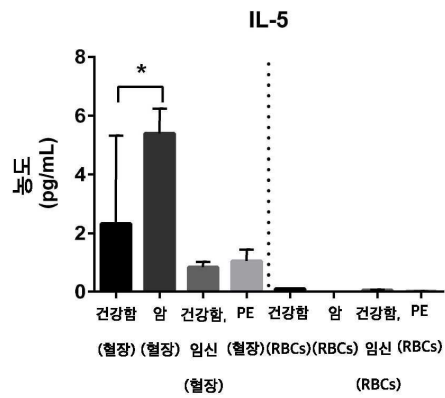
도면23d



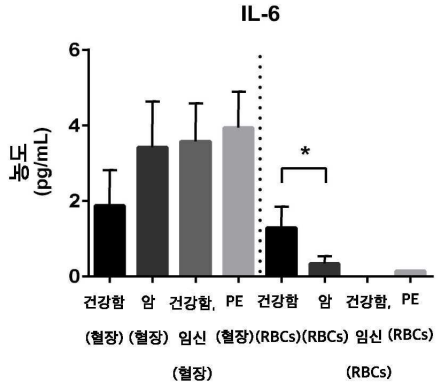
도면23e



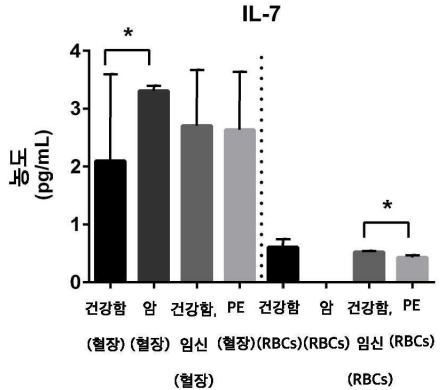
도면23f



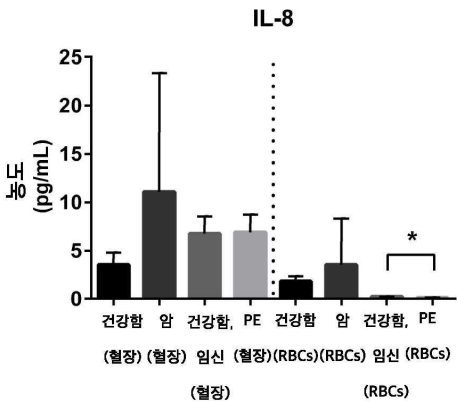
도면23g



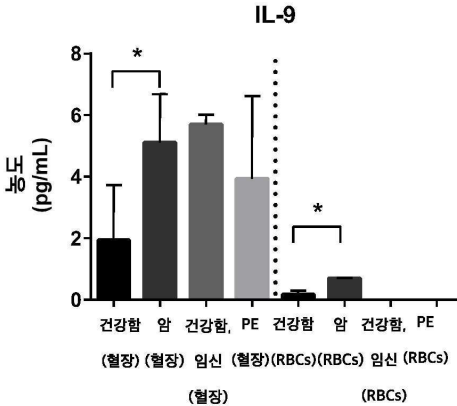
도면23h



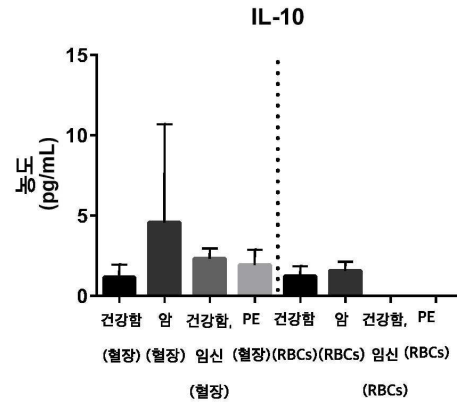
도면23i



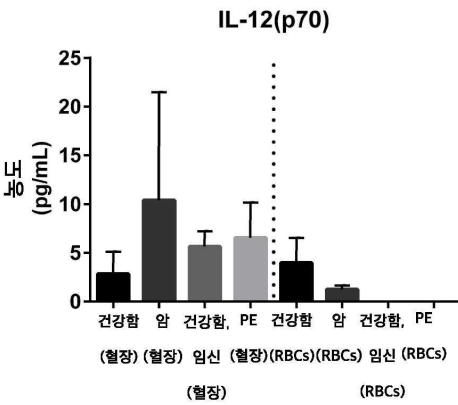
도면23j



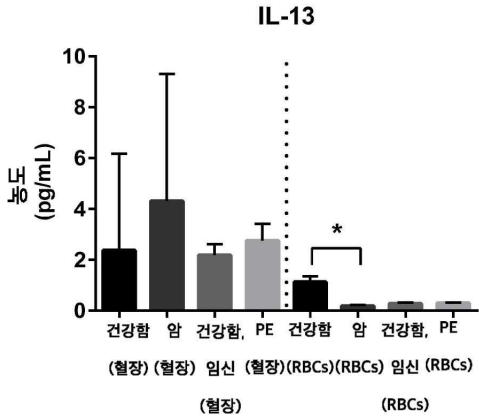
도면23k



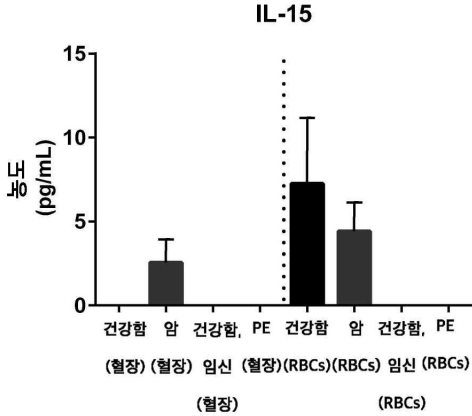
도면23l



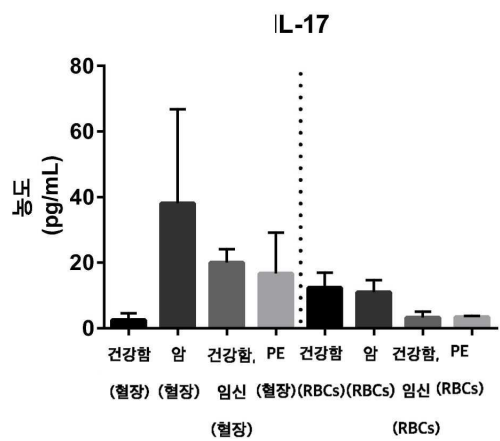
도면23m



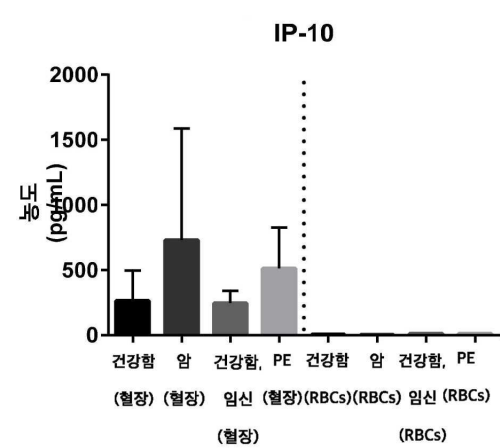
도면23n



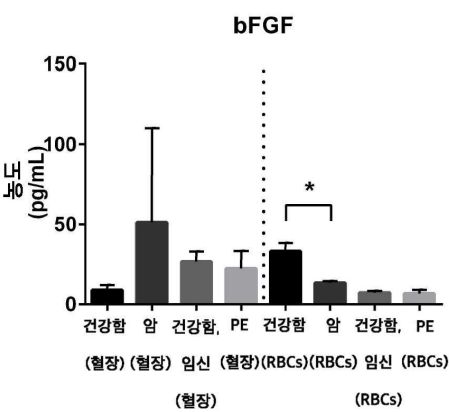
도면23o



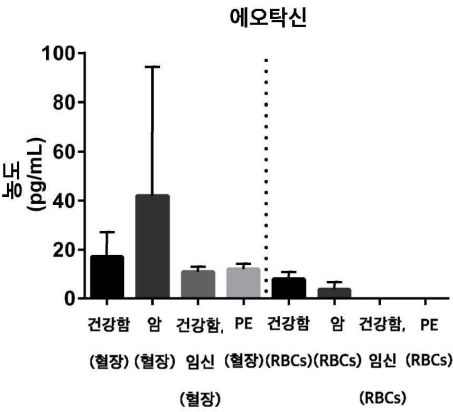
도면23p



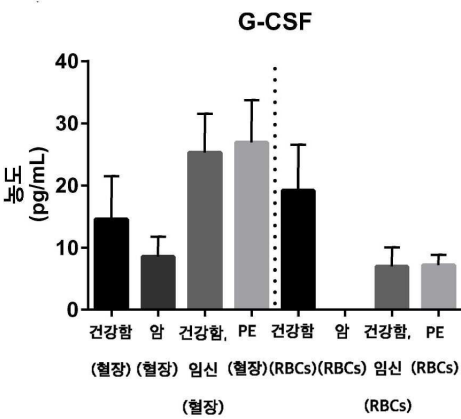
도면23q



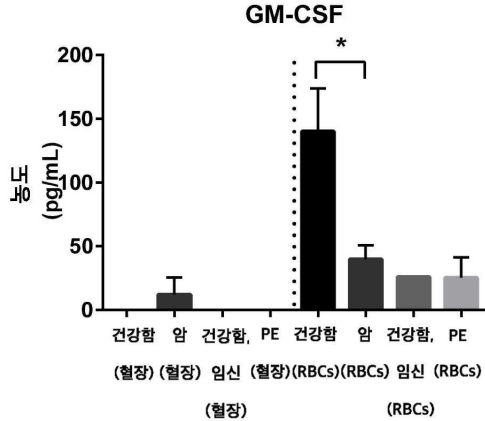
도면23r



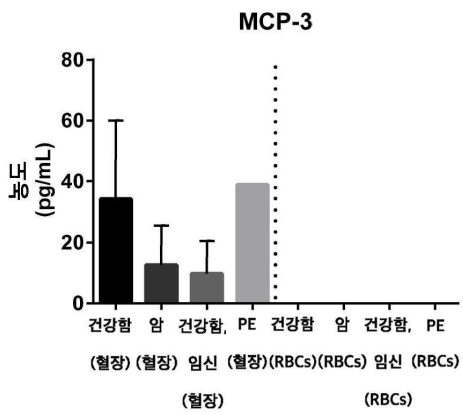
도면23s



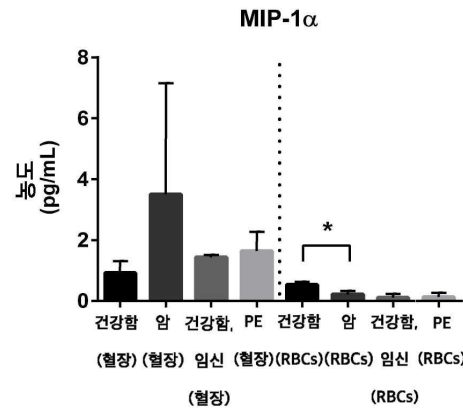
도면23t



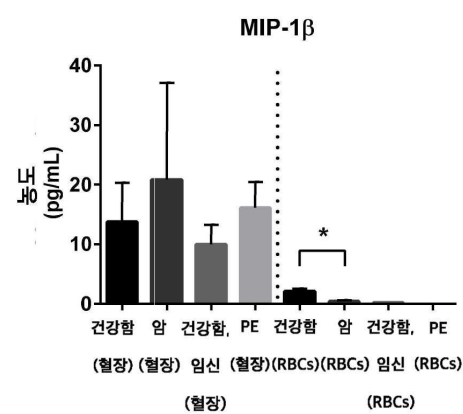
도면23u



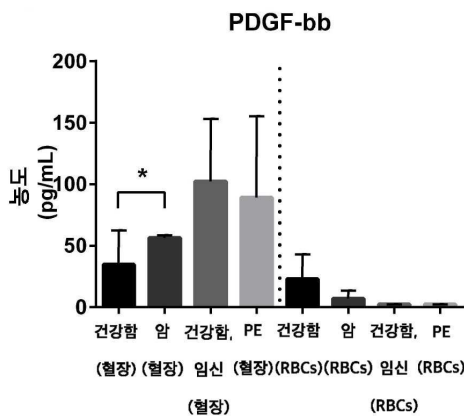
도면23v



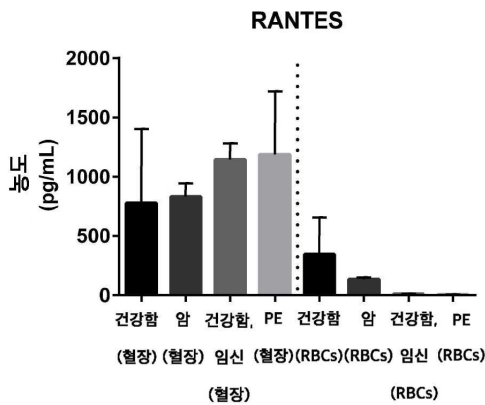
도면23w



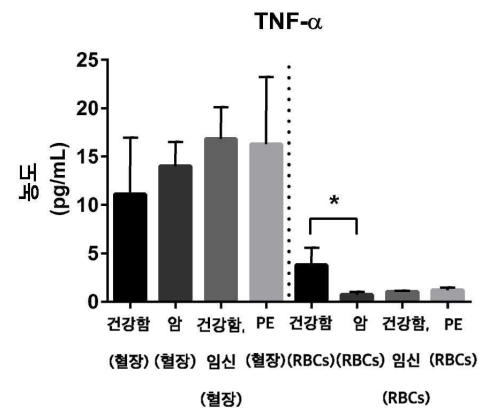
도면23x



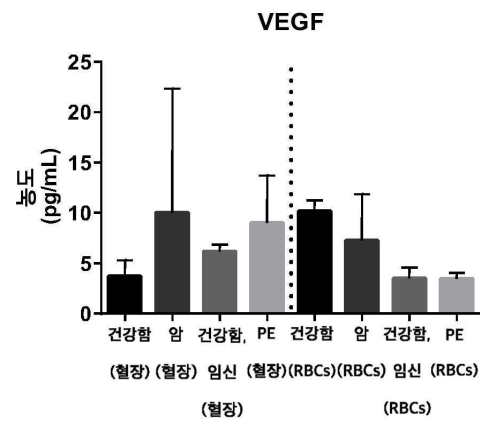
도면23y



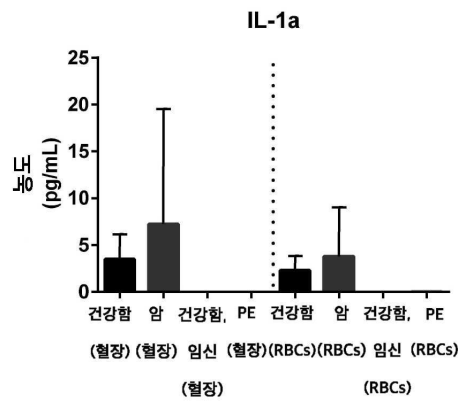
도면23z



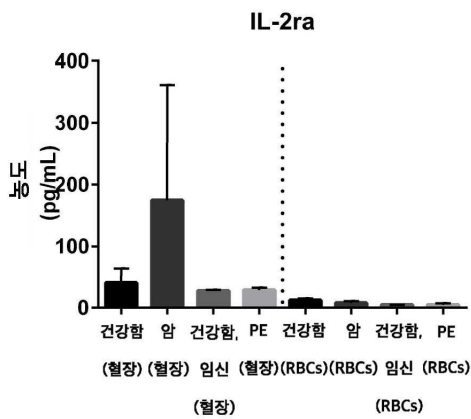
도면23aa



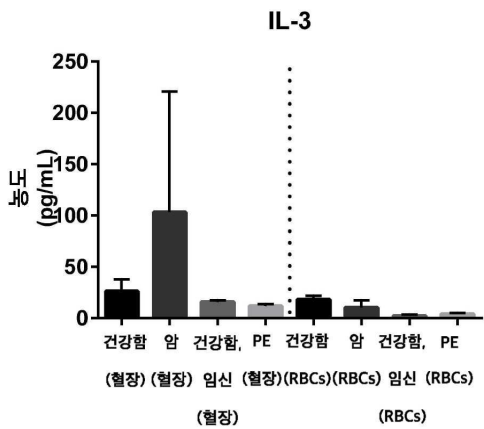
도면23bb



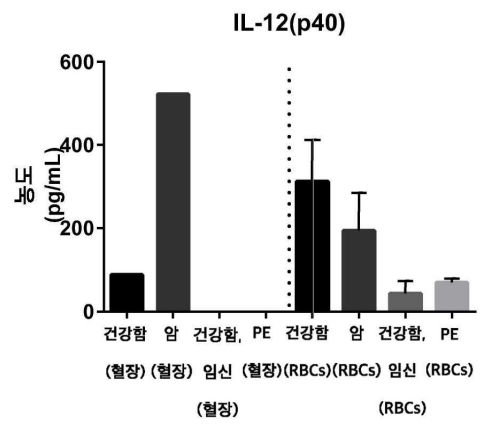
도면23cc



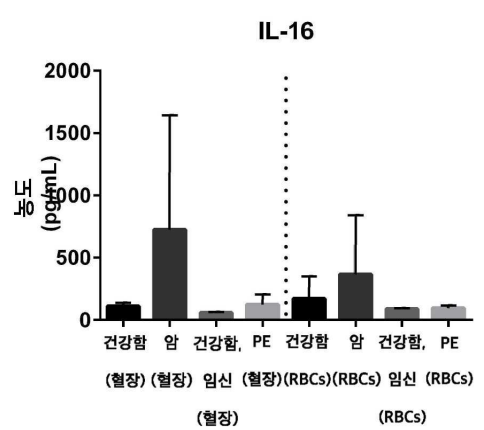
도면23dd



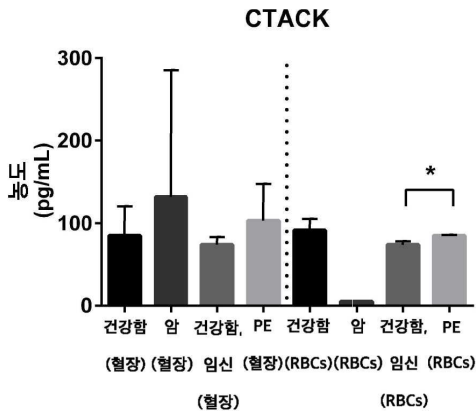
도면23ee



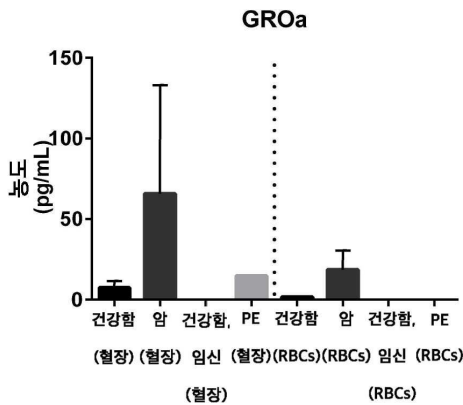
도면23ff



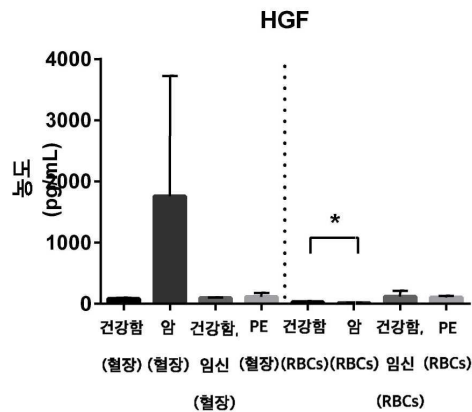
도면23gg



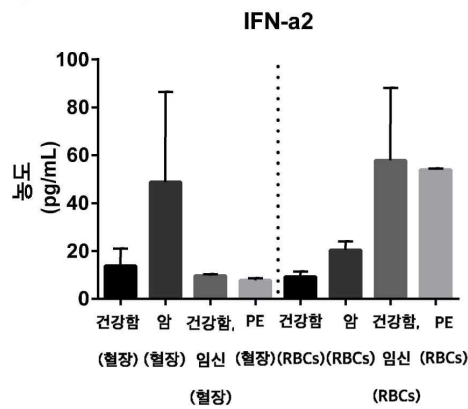
도면23hh



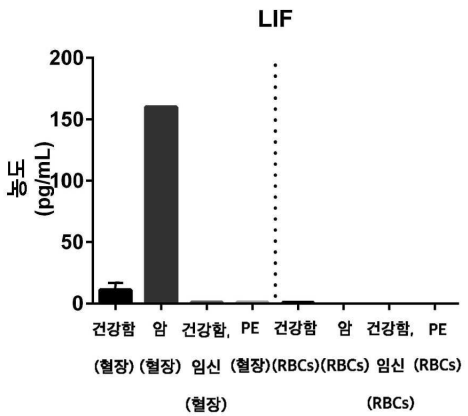
도면23ii



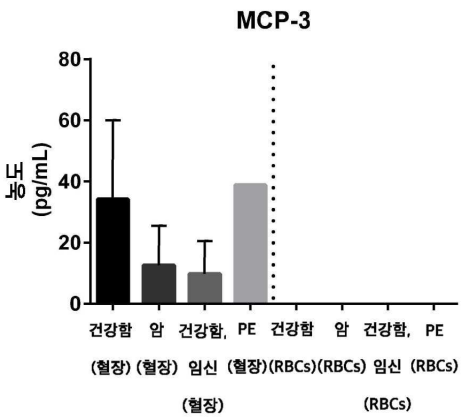
도면23jj



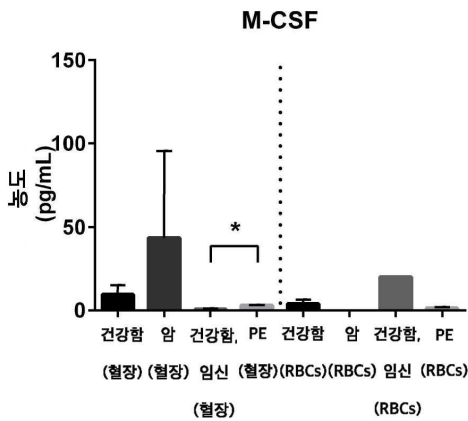
도면23kk



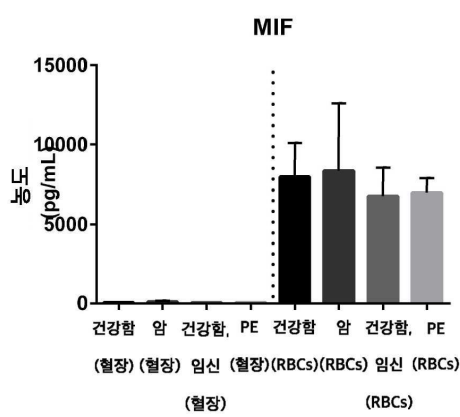
도면23ll



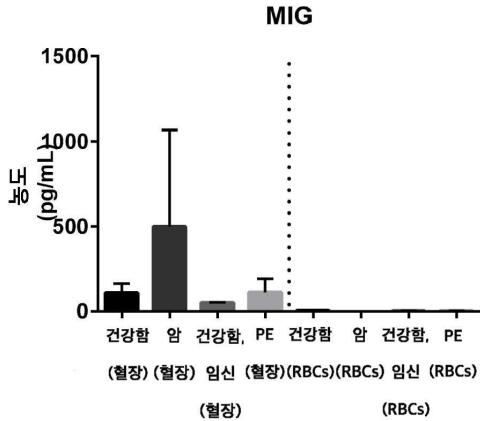
도면23mm



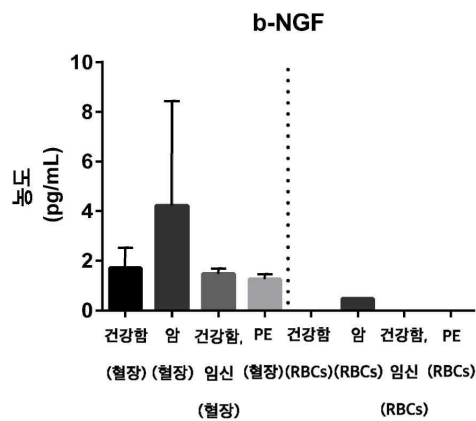
도면23nn



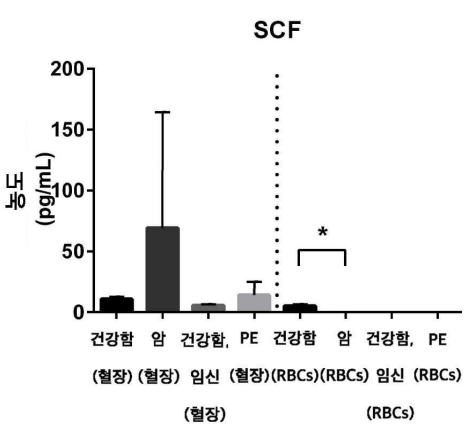
도면23oo



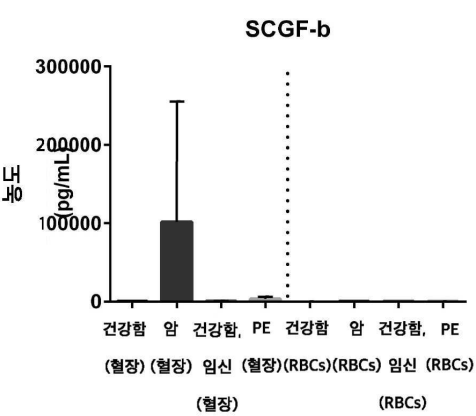
도면23pp



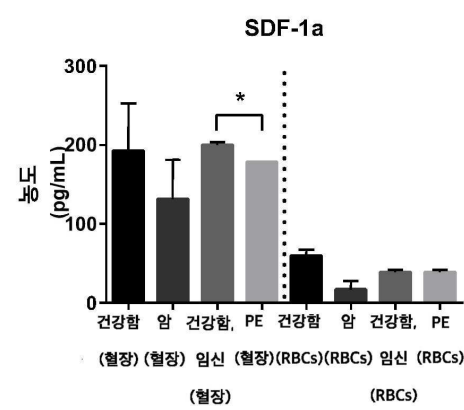
도면23qq



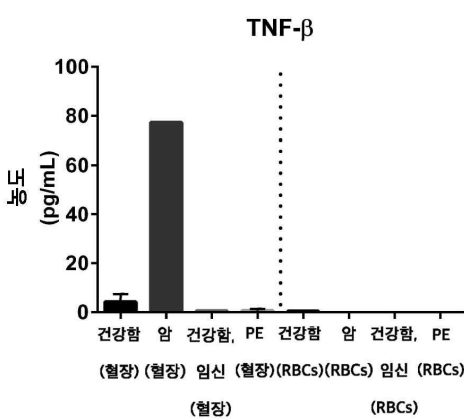
도면23rr



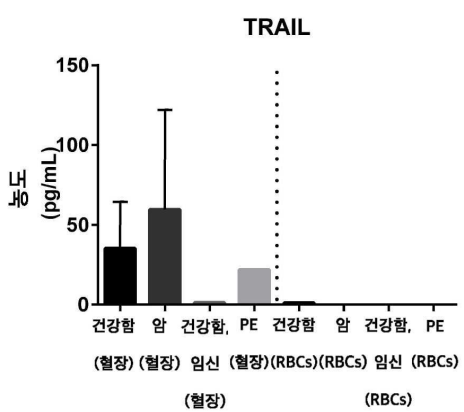
도면23ss



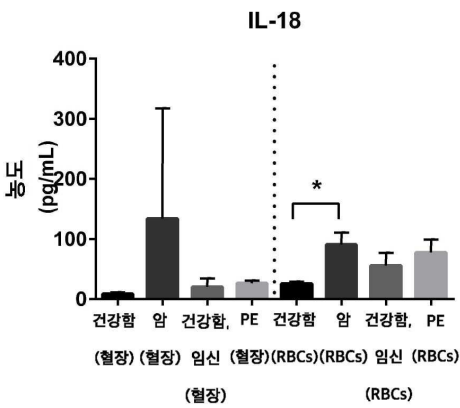
도면23tt



도면23uu



도면23vv



도면24a

분석물	혈장*			RBCs*			배수 변화
	개체의 수	pg/mL 전혈		개체의 수	pg/mL 전혈		
		Conc.	SD		Conc.	SD	
프로-염증성							
IFN-α2	3	24.4	18.9	3	251.5	32.4	14.97
IFN-γ	3	18.6	1.9	3	18.3	12.2	0.96
IL-1α	3	3.6	6.2	3	35.9	44.3	156.39
IL-1β	3	0.3	0.1	3	1.9	1.5	7.28
IL-5	3	2.7	0.4	0	-	-	-
IL-8	3	5.5	6.2	2	31.9	41.8	1.93
IL-9	3	2.6	0.8	2	7.8	2.5	2.10
IL-12(p70)	3	5.2	5.6	3	15.3	5.6	6.11
IL-15	3	1.3	0.7	3	53.6	20.3	62.29
IL-17	3	19.1	14.4	3	132.8	26.2	9.75
IL-18	3	67.0	91.9	3	1209.7	535.3	79.51
MIF	3	45.5	47.2	3	8348.1	4259.3	280.31
TNF-α	3	7.0	1.3	2	8.5	6.0	0.83
TNF-β	1	77.24	-	0	-	-	-
TRAIL	3	29.9	31.2	0	-	-	-

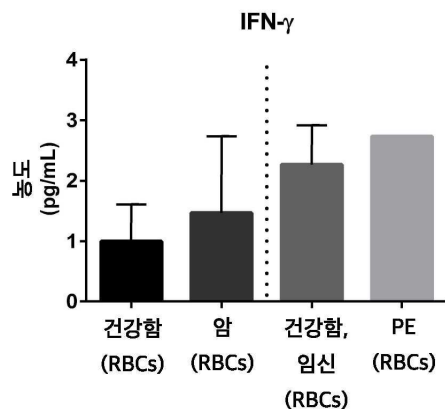
도면24b

분석물	혈장*			RBCs*			배수 변화
	개체의 수	pg/mL 전혈		개체의 수	pg/mL 전혈		
		Conc.	SD		Conc.	SD	
항-염증성							
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87.35
IL2-ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42
케모카인							
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81
예오팩신	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10.11
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12.29
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95.56
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3.76
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4.10
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82

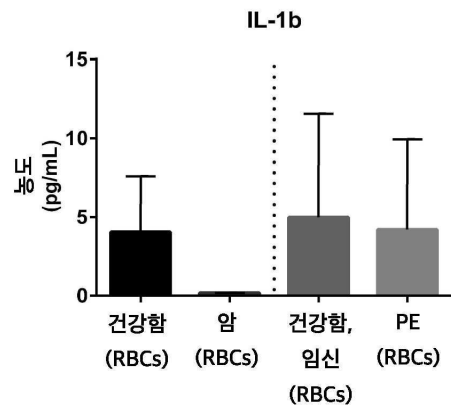
도면24c

분석물	혈장*			RBCs*			배수 변화
	개체의 수	pg/mL 전혈		개체의 수	pg/mL 전혈		
		Conc.	SD		Conc.	SD	
항-염증성							
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87.35
IL2-ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42
케모카인							
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81
예오팩신	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10.11
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12.29
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95.56
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3.76
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4.10
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82

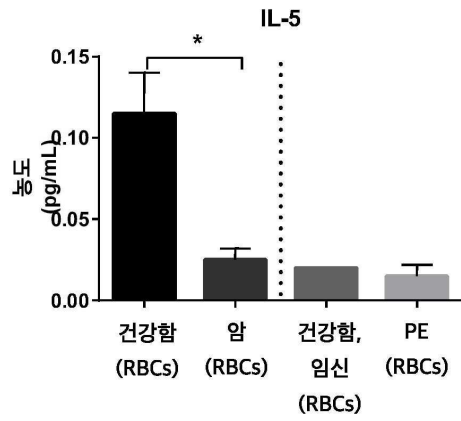
도면25a



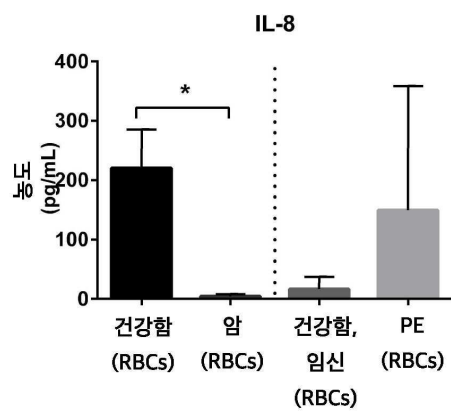
도면25b



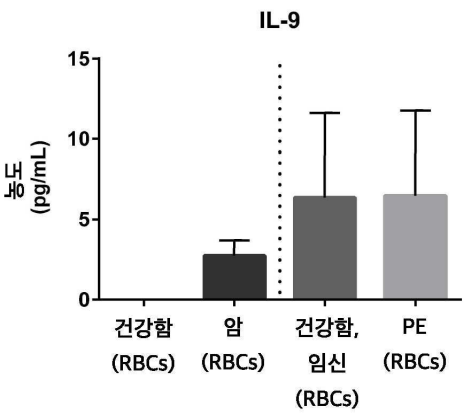
도면25c



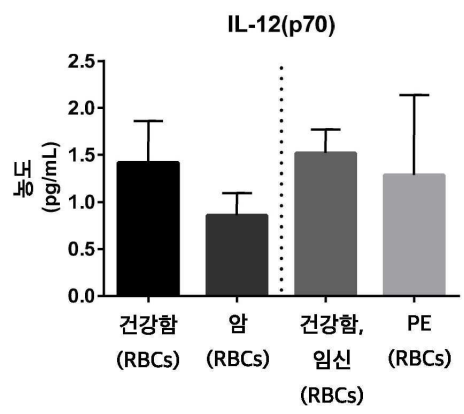
도면25d



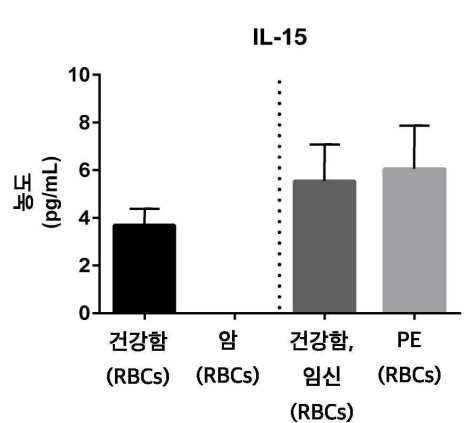
도면25e



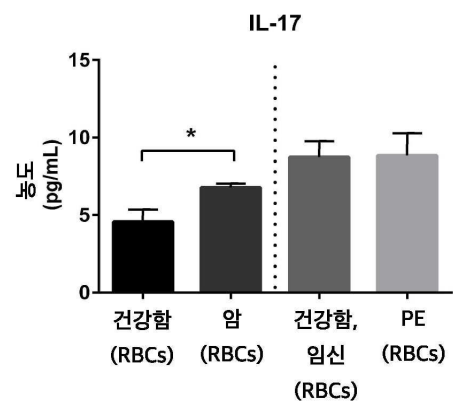
도면25f



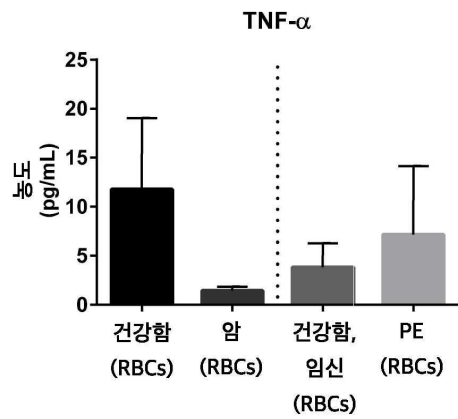
도면25g



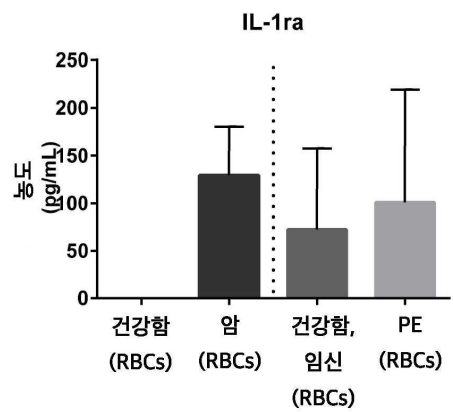
도면25h



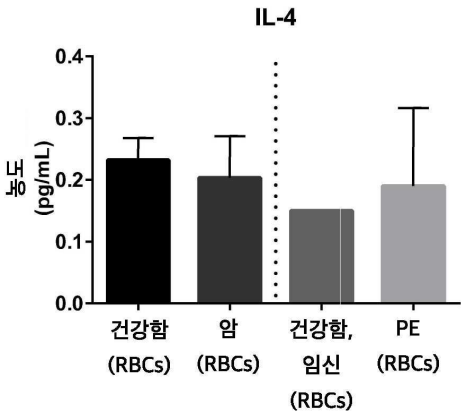
도면25i



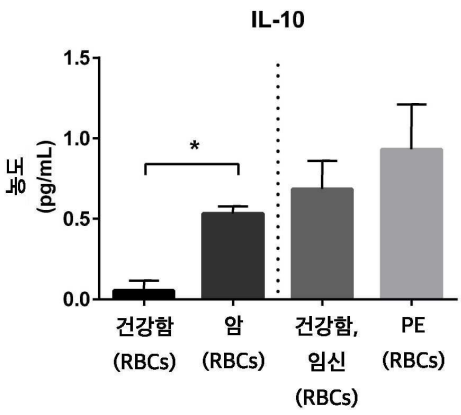
도면25j



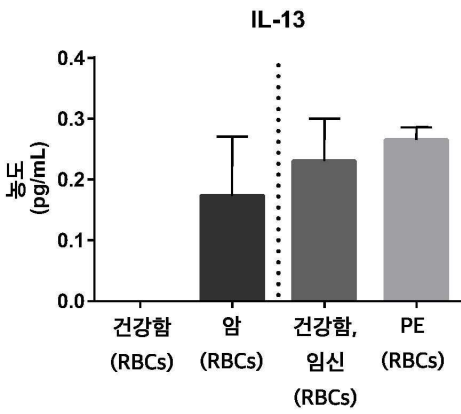
도면25k



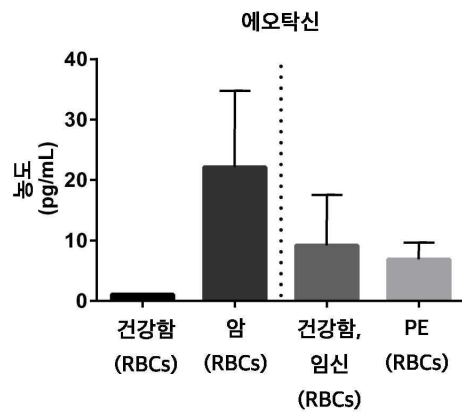
도면25l



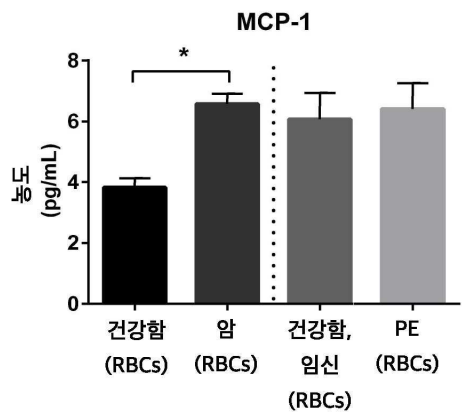
도면25m



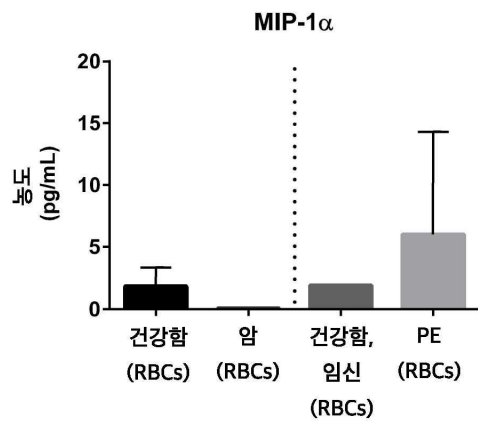
도면25n



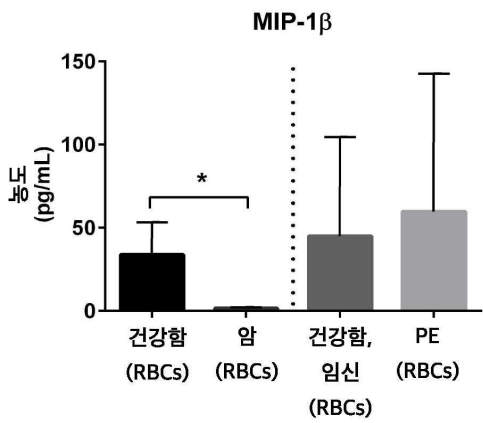
도면25o



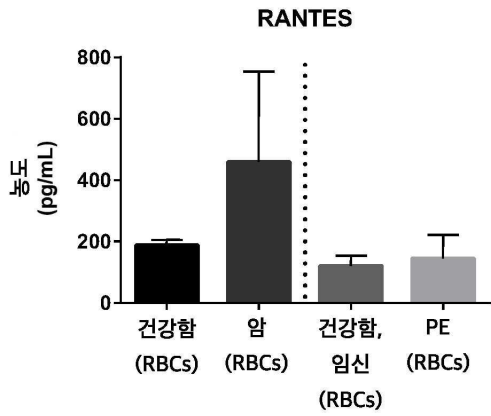
도면25p



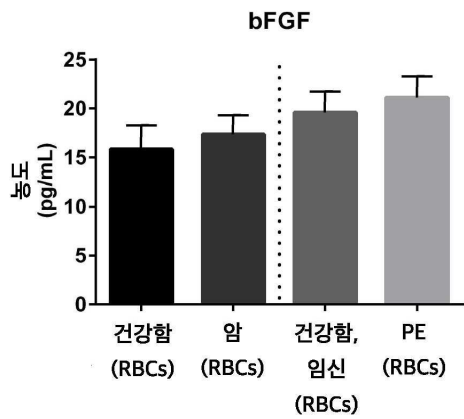
도면25q



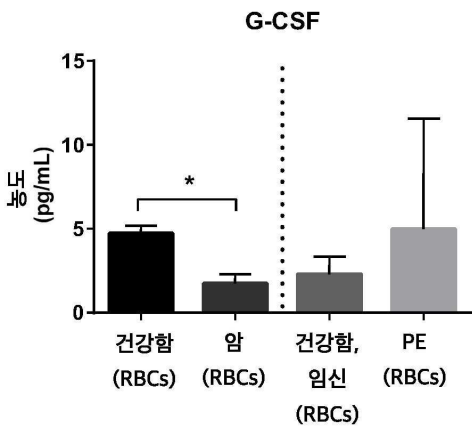
도면25r



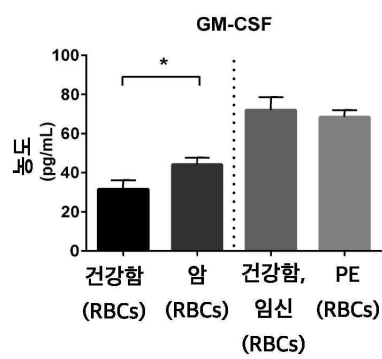
도면25s



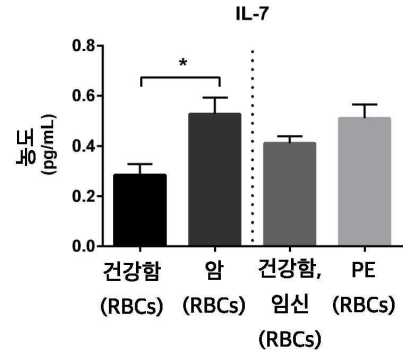
도면25t



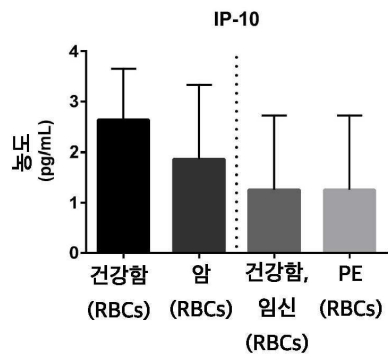
도면25u



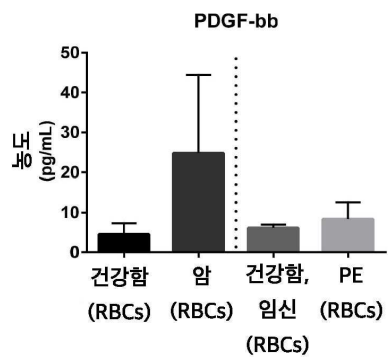
도면25v



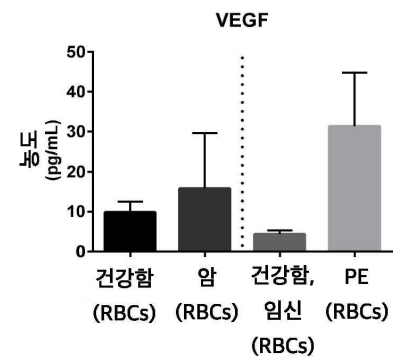
도면25w



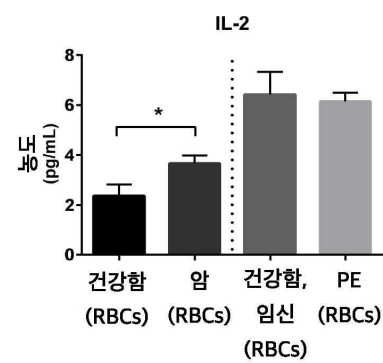
도면25x



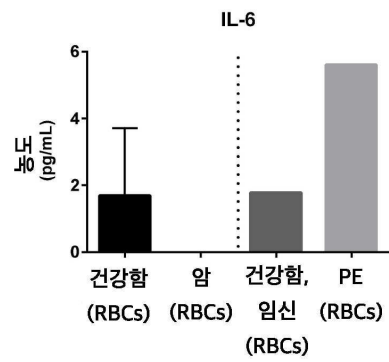
도면25y



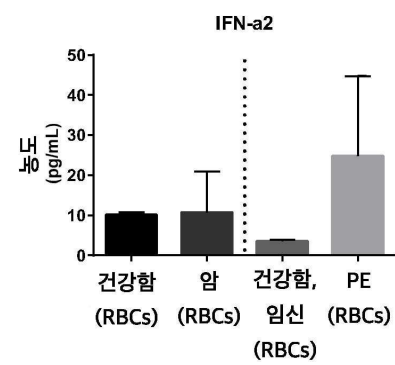
도면25z



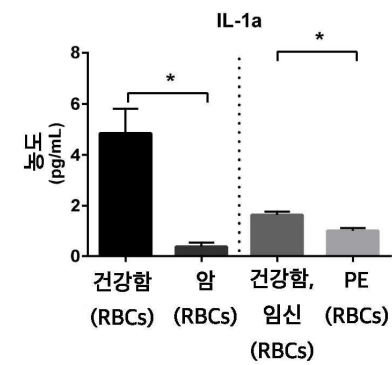
도면25aa



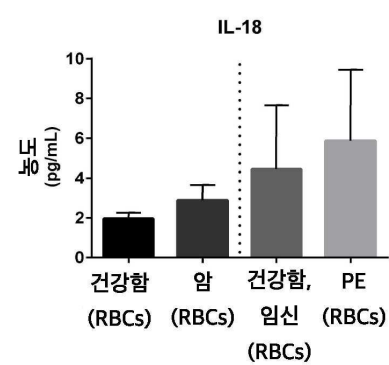
도면25bb



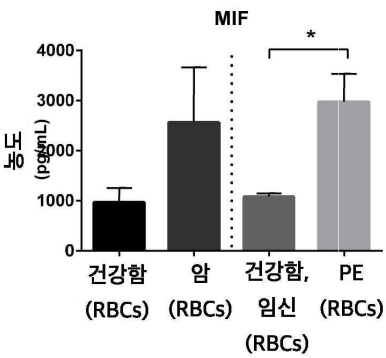
도면25cc



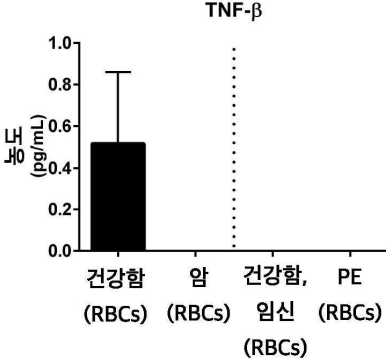
도면25dd



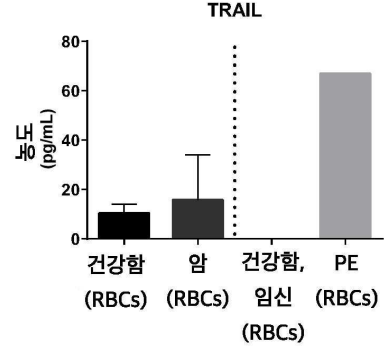
도면25ee



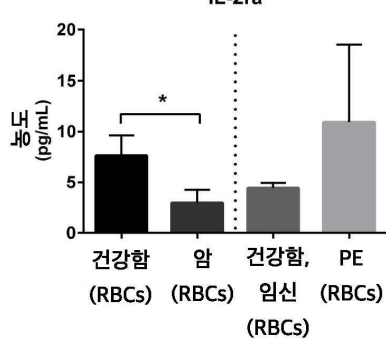
도면25ff



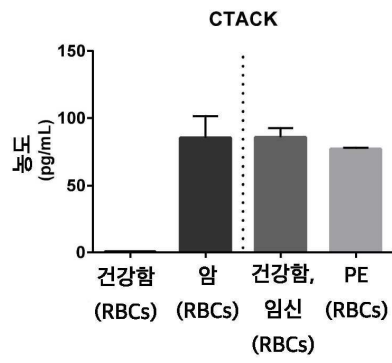
도면25gg



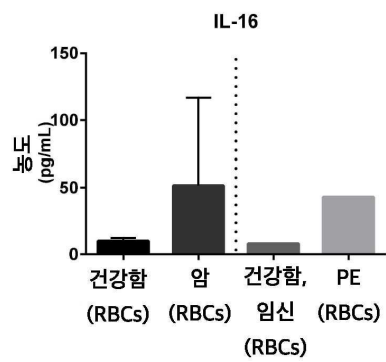
도면25hh



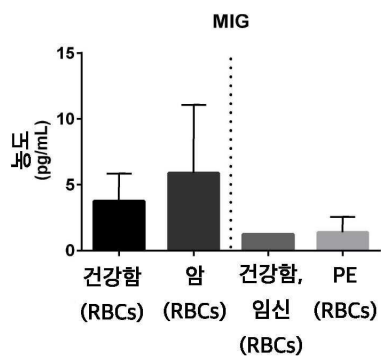
도면25ii



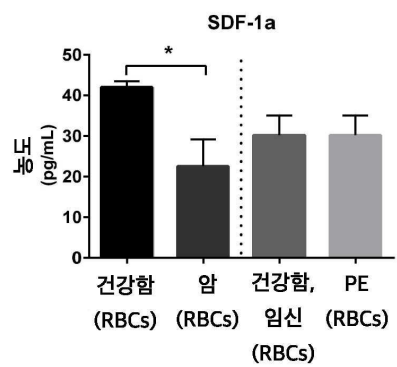
도면25jj



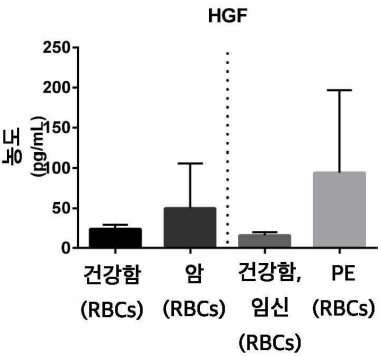
도면25kk



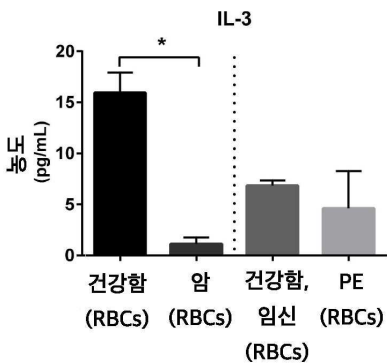
도면25ll



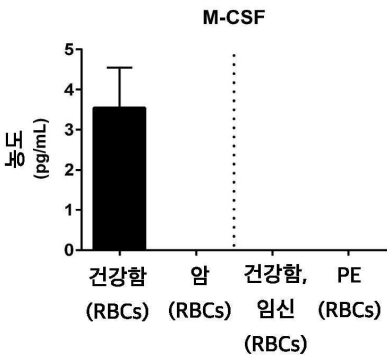
도면25mm



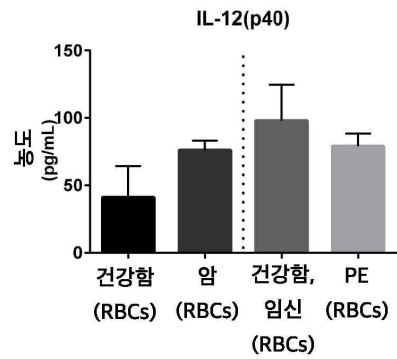
도면25mm



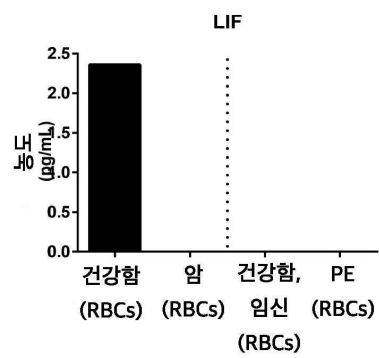
도면2500



도면25pp



도면25qq



도면25rr

