(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년01월02일
(11) 등록번호 10-1217958
(24) 등록일자 2012년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7014102
(22) 출원일자(국제) 2004년12월16일
심사청구일자 2009년11월20일
(85) 번역문제출일자 2006년07월13일
(65) 공개번호 10-2006-0133551
(43) 공개일자 2006년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/042339
(87) 국제공개번호 WO 2005/059520
국제공개일자 2005년06월30일
(30) 우선권주장
10/964,467 2004년10월13일 미국(US)
60/530,127 2003년12월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
J Histochem Cytochem. 1993 Nov;41(11):1599-604..*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 캄파니
미국 미네소타주 55133-3427 세인트 폴 피.오. 박스 33427 쓰리엠 센터
(72) 발명자
총 콘클린, 바스세바, 이.
미국 미네소타 55133-3427 세인트 폴 사서함 33427
팍스, 파트리크, 제이.
미국 미네소타 55133-3427 세인트 폴 사서함 33427
(74) 대리인
강승옥, 김성기, 김진희

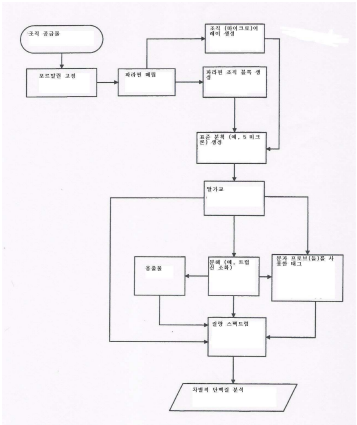
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **화학적으로 가교된 세포 샘플의 분석**

(57) 요 약

본 발명은 가교를 분해하고, 가열 또는 조사 단계에서 항원을 회수하여 세포 가교되고 (알데히드 고정되고) 그리고 매립된 세포 샘플의 분석 방법에 관한 것이다. 이러한 분석은 통상적으로 질량 스펙트럼에 기초한다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

화학적으로 가교된 분석물을 포함하는 세포 샘플을 제공하는 단계로서, 샘플은 유기 고형 물질에 매립된 화학적으로 고정된 조직 분획을 포함하는 것인 단계;

조직 분획을 기질에 부가 (affixation)하는 단계;

가교된 분석물 중의 화학 가교의 적어도 일부분을 역전시켜 탈가교된 분석물을 형성하는 단계로서, 화학 가교의 적어도 일부분의 역전은 조직 분획이 기질에 부가된 후에 화학 가교의 적어도 일부분을 역전시키는 것을 포함하는 것인 단계;

탈가교된 분석물 중에서 결합의 적어도 일부분을 분해하여 분석물 분절을 형성하는 단계로서, 분해는 탈가교된 분석물의 적어도 일부분의 제자리 (in situ) 소화를 포함하는 것인 단계;

질량 분광법을 사용하여 탈가교된 분석물을 분석하는 단계로서, 탈가교된 분석물의 분석은 분석물 분절을 분석하는 것을 포함하는 것인 단계; 및

분석물을 확인하는 단계

를 포함하는 분석물의 분석 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

명 세 서

[0001] 배경

[0002] 사람 및 동물 조직 모두의 현미경 검사 및 조직병리학 진단은 의료 진단 및 치료의 정확성뿐 아니라 질환 및 이의 잠재적 치료에 대한 연구의 개선을 돕는다. 분석 기법에서의 진보는 질병의 세포 기전을 이해하고 적절한 치료를 선택하는 기회를 제공한다. 질병의 분자 마커, 예컨대 종양 특이성 항원의 확인은 이러한 마커를 검출하기 위하여 분자 프로브 (예, 항체 및 핵산 프로브)의 사용에 의존하는 진단 및 예후 분석을 개발하도록 할 수 있다.

[0003] 역사적으로, 보존된 조직의 광학 현미경에 대한 최적의 검체 보존을 제공하도록 하기 위하여 조직을 이용한 포르말린 고정이 사용되어 왔다. 알데히드를 사용한 화학 고정은 측쇄 반응성 아민의 가교로부터 생성되는 변성과 관련되어 있다. 포르말린 고정으로 인하여 단백질간에는 그리고 단백질중에서는 메틸렌 가교가 발생하며, 이는 단백질의 면역 검출에 필요한 3차 구조를 효과적으로 감소시키거나 또는 제거하게 된다. 또한, 파라핀 매립은 단백질의 3차 구조의 손실을 야기하여 폴딩되지는 않았으나 무상해의 단백질을 형성하며, 면역 검출에 필요한 구조 (에피토프)를 제거할 뿐 아니라 이것이 존재하는 효소 활성을 제거하거나 감소시킬 수 있는 온도에서 실시한다.

[0004] 표준의 조직학적 염색 기법, 예컨대 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)은 일반적으로 제한된 양의 정보만을 규명할 수 있다. 현재의 현미경 평가 방법은 형태계측, 면역조직화학, 제자리 하이브리드 생성 등과 같은 방법을 포함하도

록 확대될 수 있다. 새로운 임상적 중요 분자 마커의 확인 및 개발은 다수의 임상적 검체에서의 이들 마커의 발현을 측정하는 느리고도 지루한 과정에 의하여 방해되어 왔다.

[0005] 휴먼 게놈 프로젝트로부터의 데이타의 자연적인 발전은 단일의 유전자로부터 다수의 유전자 (게놈학)로 이루어졌으며, 그리하여 모든 단백질 (단백질 유전 정보학)로 동시에 이루어지게 되었다. "단백질 칩"은 전위를 지녀서 농도를 측정하며, 아마도 기능하게 되며, 현재의 면역조직화학은 국소화가 가능한 유일한 방법이다. 면역조직화학에 의한 국소화는 본래는 정성적이지만 이는 기껏해야 숙련된 평가자에 의한 주관적인 평가를 이용해야하는 반정량적 분석이 된다.

[0006] 면역조직화학을 사용한 잠재적 치료에 대한 잠재적 약물 표적을 확인하는 능력은 단일의 현미경 슬라이드상에서 다수의, 통상적으로 500 내지 1,000 개의 조직 샘플의 배치를 수반하는 기법인 조직 마이크로어레이 (TMA)의 사용에 의하여 증폭되어 왔다. 단일 기질상에서의 다수의 조직 검체의 분류 방법은, 다수의 파라핀 매립된 조직 검체를 수동으로 절단하고, 이들을 복합 블록(Battifora et al., 1986, *Lab. Invest.* 55:244-248; 미국 특허 제4,820,504)으로 형성시키는 것에 의존하거나, 이들을, 횡단면을 얻을 수 있는 "스트로우" 또는 "로그"로 형성시키는 것에 의존하며 [Wan et al., 1987, *J. Immunol. Meth.* 103:121-129; 미국 특허 제4,914,022; Miller 및 Groothuis, 1991, A.J.C.P. 96: 228-232 참조], 문헌[Kononen et al., 1998, *Nat. Med.* 4:844-7]에는 아카이브 조직 블록으로부터의 천공된 샘플을 사용하여 수백개의 종양 검체를 포함하는 조직 어레이를 생성하기 위한 기법을 설명한다.

[0007] 조직 마이크로어레이는 표준의 질량 스펙트럼 방법을 사용한 분석에 대하여 통상적으로 이용 가능하지 않은 불용성 거대 단백질, 예컨대 세포외 기질 단백질을 측정하는 용량을 갖는다. 또한, 조직 마이크로어레이는 가용성 단백질을 측정하기 위한 전위를 갖는 단백질 마이크로어레이를 보충한다. 그러나, TMA와의 주요한 곤란점은 각각의 "히스토스폿" (마이크로어레이상에 스포팅된 0.15 ㎝ 직경 조직 분획)을 사용하는 제한된 양의 데이타이다.

[0008] DNA는 통상적으로 포르말린을 사용한 화학 고정후 파라핀 매립된 조직 검체로부터 분리된다. 그러나, 파라핀 분획의 형성을 수반하는 이러한 방법은 질량 스펙트럼을 비롯한 대부분의 분자 분석 방법으로부터 이들 분획을 배제시켜 왔다.

[0009] 개요

[0010] 본 발명은 화학적으로 가교된 분석물 (예, 포르말린으로 고정된 단백질)을 포함하는 세포 샘플 (예, 세포, 조직, 기관)의 분석에 관한 것이며, 여기서 샘플은 유기 고형 물질 (예, 파라핀)에 매립된다. 통상적으로 그리고 바람직하게는 이러한 분석은 질량 스펙트럼의 사용을 포함하지만, 이를 반드시 필요로 하지는 않는다.

[0011] 보다 상세하게는, 본 발명은 "항원 회수"로서 통상적으로 지칭되는 과정중에서의 탈가교된 분석물을 형성하기 위하여 화학적으로 가교된 분석물 (예, 가교된 단백질)의 적어도 일부분의 역전후 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직의 질량 스펙트럼을 사용한 분석 방법을 제공한다. 질량 스펙트럼은 물질의 이온화도에 의존하며 단백질의 경우 단백질의 이온화도에 의존하기 때문에, 단백질에 대한 질량 스펙트럼을 실시할 수 있는데, 이는 1차 구조가 유지되며, 질량 스펙트럼 (및 관련 방법)을 사용하여 분석하는 것은 1차 구조이기 때문이다. 방법, 예컨대 질량 스펙트럼이 단백질 (예, 펩티드 지문)을 확인하기 위하여 단백질 분절의 공지의 서열을 사용하기 때문에, 질량 스펙트럼은 파라핀 매립된 조직 샘플로부터 유도된 물품에 성공적으로 적용될 수 있다.

[0012] 그리하여, 본 발명의 항원 회수 단계 (탈가교)는 조직 마이크로어레이 (TMA)를 비롯한 미리 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직 샘플의 분석을 가능케 하여 풍부한 태핑되지 않은(untapped) 단백질 정보를 규명한다. 바람직한 구체예에서, 질량 스펙트럼 분석 기법의 사용으로 다수의 단백질의 동시 확인이 가능하다.

[0013] 한 구체예에서, 본 발명은 분석물의 분석 방법을 제공한다. 이러한 구체예에서, 이러한 방법은 화학적으로 가교된 분석물을 포함하는 세포 샘플을 제공하는 단계 (여기서 샘플은 유기 고형 물질에 매립됨); 가교된 분석물중의 화학 가교의 적어도 일부분을 역전시켜 탈가교된 분석물을 형성하는 단계; 및 탈가교된 분석물을 분석하는 단계를 포함한다.

[0014] 특히 바람직한 구체예에서, 세포 샘플은 화학적으로 고정(예, 포르말린-고정)되고 파라핀 매립된 조직이며, 분석물을 분석하는 것은 질량 스펙트럼, 특히 '매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 비행시간형 질량 스펙트럼(MALDI 또는 MALDI-TOF)의 사용을 포함한다.

[0015] 화학 가교의 역전 (즉, 분석물을 화학적으로 가교시켜 형성된 결합을 분해 또는 "탈가교")은 여러 가지 방법에

의하여 발생할 수 있다. 예를 들면, 에너지 적용에 의하여 물 또는 완충액의 존재하에서 pH 수치 범위에서 발생할 수 있다. 가한 에너지는 열 또는 방사선이 될 수 있다. 분석물중의 실질적으로 자연 발생되지 않는 결합이 분해되도록 역전 단계에서 조건을 선택하는 것이 바람직하다.

[0016] 특정의 구체예에서, 이러한 방법은 분석물 분절을 형성하기 위하여 탈가교된 분석물중의 자연 발생 결합 (또는 화학 고정제에 의하여 형성되지 않는 기타의 결합)의 적어도 일부분을 분해하는 것을 더 포함할 수 있다. 단백질의 경우, 통상적으로 분해는 효소, 예컨대 트립신을 사용하여 또는 화학 분해 시약, 예컨대 브롬화시아노겐에 의하여 발생된다. 이러한 분해 단계는 탈가교 이후에 실시되는 것이 바람직하기는 하지만, 이러한 단계는 탈가교 이전 또는 이후에 실시될 수 있다. 화학 및/또는 효소 분해에 의하여 이의 1차 구조에 의존하는 방법, 예컨대 질량 스펙트럼에 의한 분석에 의하여 단백질로부터 분석물, 예컨대 펩티드의 분절을 생성한다. 또한, 바람직한 것은 아니지만, 탈가교 단계는 탈가교 이외에 분석물의 단편화를 초래한다. 특정의 구체예에서, 탈가교된 분석물의 분석은 탈가교된 분석물을 확인 및/또는 정량화 하는 것을 포함할 수 있다.

[0017] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명은 분석물의 분석 방법을 제공하며, 이러한 방법은 1 이상의 화학적으로 고정된 분석물을 포함하는 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직 분획을 제공하는 단계, 화학적으로 고정된 조직중의 1 이상의 분석물중의 화학적으로 고정된 결합의 적어도 일부분을 분해하는 단계 및 질량 스펙트럼을 사용하여 분석물을 분석하는 단계를 포함한다.

[0018] 마이크로어레이를 포함하는 각종의 상이한 유형의 세포 샘플 (예, 조직 및/또는 각각의 세포)을 사용할 수 있다. 분석하의 검체가 마이크로어레이인 바람직한 구체예에서, 1 이상의 샘플은 사람으로부터의 것이다. 또다른 구체예에서, 1 이상의 샘플은 식물로부터의 것이다. 또다른 구체예에서, 1 이상의 샘플은 곤충으로부터의 것이다. 또다른 구체예에서, 1 이상의 샘플은 질병을 갖는 개체로부터의 것이다. 추가의 구체예에서, 질병은 진행성 질병이며, 샘플은 질병의 진행에서의 상이한 단계를 나타내는 다수의 샘플을 포함하는 마이크로어레이이다. 한 구체예에서, 질병은 암이다. 또다른 구체예에서, 질병은 호흡기 질환, 감염 질환, 면역 질환, 생식 기관 (남성 또는 여성)에 영향을 미치는 질환, 심혈관 질환, 내분비계에 영향을 미치는 질환, 비뇨기계에 영향을 미치는 질환, 소화기계에 영향을 미치는 질환, 신경변성 질환 및/또는 신경정신 질환이다. 만성 질환의 경우, 마이크로어레이는 관해 기간 및 악화 기간 모두를 나타내는 샘플을 포함할 수 있다.

[0019] 유형 및 질환 상태에서의 유사한 변화는 각종의 실험 동물, 예를 들면 마우스 또는 토끼로부터의 샘플에 적용될 수 있다. 조직 마이크로어레이에서와 같이 개개의 조직 또는 조직의 수집물은 약물 표적 확인 및/또는 증명에서의 방법의 용도를 나타내는, 사람 조직에 대하여 동일한 방법으로 분석할 수 있다. 사람을 제외한 동물이 질환에 대한 동물 모델인 것이 바람직하다. 또다른 구체예에서, 사람을 제외한 동물은 내부에 외인성 핵산을 갖는 1 이상의 세포 (즉 동물 또는 식물의 게놈에서 자연적으로 존재하지 않는 핵산)를 포함한다.

[0020] 추가의 구체예에서, 사람을 제외한 동물은 질병의 치료를 위한 요법으로 치료되어 왔다.

[0021] 또다른 방법에서, 세포 샘플을 중합체 물질 (예, 열 수축 필름)을 포함하는 기질에 배치하고, 이러한 방법은 처리된 기질이 투사된 표면적 및 토포그래피칼(topographical) 표면적을 갖고 상기 토포그래피칼 표면적은 상기 투사된 표면적보다 더 크도록 기질을 처리하는 (예, 열을 가함) 것을 더 포함한다. 또한, 본 발명은 투사된 표면적 및 토포그래피칼 표면적을 갖는 중합체 물질(토포그래피칼 표면적이 투사된 표면적보다 더 큼) 및 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직을 포함하는 다수의 조직 분획을 포함하는 조직 어레이를 제공한다. 이러한 구체예는 하기의 기질에 대한 부분에서 더욱 상세히 설명된다.

[0022] 하기의 정의는 하기의 설명에서 사용한 특정의 용어에 관한 것이다.

[0023] 용어 "포함한다" 및 이의 변형은 이러한 용어가 상세한 설명 및 청구의 범위에서 사용한 제한된 의미를 갖지는 않는다.

[0024] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "하나", "상기", "1 이상의" 및 "하나 이상"은 서로 번갈아 사용할 수 있다. 그리하여 예를 들면 화학적으로 가교된 분석물을 포함하는 샘플은 샘플이 "1 이상의" 상기 분석물을 포함하는 것을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "분석물"은 해당 샘플로부터 검출 또는 측정 또는 분리하고자 하는 천연 또는 합성된, 분자, 화합물, 조성물 또는 복합체를 의미한다. 분석물의 예로는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지방산, 핵산, 탄수화물, 호르몬, 스테로이드, 지질, 비타민, 박테리아, 바이러스, 의약품 및 대사물질 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 분석물은 화학 고정제에 의하여 가교될 수 있거나 또는 가교되지 않을 수 있다. 예를 들면, 특정의 분석물, 예컨대 의약품, 대사물질 및 비타민은 화학적으로 가교되지 않을 수 있으나, 이

러한 방법에서 분석될 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "화학적으로 가교된 분석물"은 예컨대 포르말린 또는 글루타르알데히드를 가교시킬 수 있는 화학 고정제의 첨가 결과로서 화학적 수단을 사용하여 가교된 분석물이다. 이는 에탄올 고정을 포함하지 않는다. 즉, 분석물이 화학 고정제의 첨가 이전에 분자내에서 가교를 포함할 수 있기는 하지만, 추가의 "화학 가교"는 화학 가교 시약 (예, 고정제)을 사용하여 분석물로 혼입된다.

[0027] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "세포 샘플"은 개개의 세포, 조직의 일부 또는 기관의 일부이든 간에 세포를 포함하는 사실상 생물학적 샘플이다. 예를 들면 생물학적 유체로부터 세포를 분리하고, 예를 들면 원심분리에 의하여 세포의 응집물을 형성하고, "세포 블록"으로 통상적으로 지칭되는 세포 응집물의 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 분획을 생성하는 것은 공지의 실시이다. 세포 블록내의 세포는 기원의 조직 및 기관을 반영한다.

[0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "조직"은 유기체에서의 특정의 기능을 수행하는 세포의 응집물이며, 특정의 생리적 부위로부터의 세포 및 세포상 물질 (예, 세포외 기질 물질)을 지칭한다. 특정의 조직중의 세포는 수가지의 상이한 세포 유형을 포함할 수 있다. 이의 비제한적인 예로는 뉴런 및 아교 세포뿐 아니라, 모세 내피 세포 및 혈액 세포를 더 포함하는 뇌조직 등이 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직 분획"이라는 것은 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 물질, 예컨대 포르말린으로 고정되고 파라핀 매립된 조직을 지칭한다. 이러한 용어는 종종 파라핀중에 매립된 조직, 세포 또는 기관을 통상적으로 지칭하는데 사용된다. 본 명세서에서, 이는 "화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 세포 샘플"로서 지칭한다. "분획"으로서 지칭하기도 하지만, 매립된 조직 또는 세포(들)는 일반적으로 임의의 형상 또는 크기를 지닐 수 있으며, 일반적으로 두께가 20 미크론 이하가 된다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "조직 마이크로어레이"는 다수의 현미경 부위를 포함하는 마이크로어레이이며, 각각의 부위는 조직 세포 및/또는 조직으로부터의 세포외 물질을 포함하며, 또는 세포는 통상적으로 조직을 침투하며, 여기서각각의 부위에서의 세포 또는 세포외 물질의 형태학적 특징은 현미경 검사에 의하여 볼 수 있다. 용어 "마이크로어레이"는 마이크로어레이상의 조직 샘플의 크기에 대한 상한치가 존재하지 않다는 것을 의미하지만, 이는 단순히 다수의 세포상 (예, 조직) 샘플을 포괄하는 것이며, 한 구체예에서는 현미경을 사용하여 관찰할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "상이한 유형의 조직"이라는 것은 상이한 기관으로부터인 것이 바람직하며, 적어도 동일한 기관에서의 해부학적 그리고 조직학적으로 전혀 다른 부위로부터의 조직을 의미한다.

[0031] 상기의 본 발명의 개요는 본 발명의 각각의 개시된 구체예 또는 개개의 실시를 설명하고자 하는 의도는 아니다. 하기의 설명은 예시한 구체예를 보다 상세하게 예시하는 것이다. 본 출원의 여러 곳에서는 예의 목록을 통하여 안내를 제공하고 있으며, 이러한 예는 각종의 조합으로 사용될 수 있다. 각각의 경우에서, 인용된 목록은 단지 대표군으로서만 작용하며, 이를 배타적인 목록으로서 해석하지 않아야 한다.

[0032] 도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 종래 기술에서 사용된 대표적인 방법의 개략도를 도시한다.

[0034] 도 2는 본 발명의 대표적인 방법의 개략도를 도시한다.

[0035] 도 3은 실시예 1의 돼지 상처 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0036] 도 4는 실시예 2의 전립선암 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0037] 도 5는 실시예 2의 전립선암 조직의 현미경 사진을 도시한다.

[0038] 도 6은 실시예 3의 유방암 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0039] 도 7은 실시예 3의 유방암 조직의 현미경 사진을 도시한다.

[0040] 도 8은 실시예 4의 난소암 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0041] 도 9 실시예 5의 결장암 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0042] 도 10은 실시예 6의 폐암 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0043] 도 11은 실시예 7의 식물 조직에 의하여 생성된 질량 스펙트럼의 대표적인 그래프를 도시한다.

[0044] 예시된 구체예의 상세한 설명

[0045] 본 발명은 화학적으로 가교된 분석물 (예, 포르말린으로 고정된조직)을 포함하는 세포 샘플 (예, 세포, 조직, 기관)의 분석에 관한 것이며, 여기서 샘플은 유기 고형 물질 (예, 파라핀 또는 기타의 매질, 예컨대 메틸메타크릴레이트 또는 기타의 "플라스틱" 매립 물질)에 매립된다. 이러한 분석은 반드시 필요한 것은 아니나 질량 스펙트럼의 사용을 포함하는 것이 통상적이며 바람직하다.

[0046] 세포 샘플은 사실상 생물학적인 샘플이며, 이는 개개의 세포, 조직의 일부 또는 기관의 일부이든 간에 세포를 포함한다. 세포 샘플은 조직 분획을 포함하는 것이 바람직하다. 세포 샘플은 포르말린으로 고정된 조직을 포함하는 것이 바람직하다.

[0047] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명은 질량 스펙트럼을 사용한 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직 분획을 분석하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 의하여 분석된 조직 샘플은 유전자 확인, 단백질 확인, 분자 프로파일링, 유망한 약물 표적의 선택, 발현된 서열 어레이 데이타의 분류 및 우선화 및, 질병과 관련된 비정상적인 생리학적 과정의 확인을 가능케 하는, MALDI 질량 스펙트럼을 사용한 고 처리량 평행 분석으로 평가될 수 있다.

[0048] 조직을 평가하는 통상의 기법의 대표예를 도 1에 도시하였다. 통상적으로, 조직 샘플을 냉동시키거나 또는 포르말린으로 고정 (즉, 가교)시킨다. 냉동 샘플은 면역조직화학 또는 조직병리학으로 직접 처리할 수 있다. 또한, 냉동된 조직 샘플을 추출하고, 겔 전기영동으로 처리하고, 질량 스펙트럼으로 분석할 수 있다. 포르말린으로 고정된 조직 샘플은 통상적으로 파라핀에 매립시키고, 블록 또는 마이크로어레이로 형성시키고, 후에 이들 모두는 5 미크론 두께의 분획으로 형성된다. 이러한 분획은 직접 조직병리학으로 처리할 수 있다. 또한, 면역 반응을 유발할 수 있는 가장 통상적인 단백질인 분석물은 화학 가교(즉, 포르말린에 의하여 형성된 가교)의 적어도 일부분을 역전시키는 방법으로 처리할 수 있다. 이는 통상적으로 "항원 회수"로 지칭되는데, 이는 종래 기술의 방법에서 이러한 분석물은 항원이 되기 때문이며, 분석 방법은 통상적으로 항원/항체에 기초한 기법에 제한된다. 이러한 "항원"을 면역조직화학으로 처리한다.

[0049] 이러한 "탈가교된 분석물"은 면역조직화학 및 조직병리학 이외의 방법에 의하여 분석하였는데, 질량 스펙트럼 및 단백질 분석 분야에서의 과학적 문헌에서는 화학적 가교 고정제, 예컨대 포르말린을 사용한 고정후 물질, 특히 단백질을 분석할 수 없는 것으로 나타났다.

[0050] 본 발명의 바람직한 구체예의 대표예를 도 2에 도시하였다. 이러한 바람직한 구체예에서, 유기 고형 물질 (예, 파라핀)에 매립된 화학적으로 가교되고 (예, 포르말린으로 고정시킴), 블록 또는 마이크로어레이로 형성되며, 이들 모두는 후에 통상적으로 5 미크론 두께의 분획으로 형성되는 세포 샘플 (예, 조직 샘플)은 화학 가교의 적어도 일부분을 역전시켜 분석물을 이용 가능하도록 하는 본 발명의 방법으로 처리하여 탈가교된 분석물을 형성할 수 있다. 이는 분석물중의 실질적으로 자연 발생이 아닌 결합 (또는 가교 이전에 존재하는 기타의 결합)을 분해하면서 달성하는 것이 바람직하다.

[0051] 필요할 경우, 샘플은 고형 유기 물질 (예, 파라핀)로부터 분리될 수 있다. 이는 가교를 역전시키기 이전에 발생할 수 있다. 이는 스팀 또는 임의의 가열 방법에 의하여 달성될 수 있다. 이는 탈가교를 일으키는 온도보다 낮은 온도에서 발생하는 것이 바람직하다.

[0052] 각종의 기법을 사용하여 화학 가교의 적어도 일부분을 역전시킬 수 있다. 이는 에너지 적용에 의하여 실시되는 것이 바람직하다. 이는 물 또는 완충액의 존재하에서 pH 수치 범위에서 실시할 수 있다. 에너지는 열 또는 방사선 에너지가 될 수 있다. 또한, 산, 예컨대 구연산을 비롯한 화학 시약을 사용하는 것을 포함하는 기타의 방법을 사용할 수 있다. 이러한 기법은 문헌 [Shi S-R, Cote R J, Taylor C R., "Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future," *J. Histochem Cytochem* 1997; 45(3):327-343]에 기재되어 있다.

[0053] 도 2를 살펴보면, 이러한 탈가교된 분석물은 방법, 예컨대 질량 스펙트럼에 의한 분석으로 직접 처리할 수 있다. 또는, 탈가교된 분석물을 분석물중의 자연 발생 결합 (또는 가교 이전에 존재하는 기타의 결합)의 적어도 일부분을 분해하는 방법으로 처리할 수 있다. 이는 예를 들면 화학적으로 또는 효소적으로 (예, 트립신을 사용하여) 수행할 수 있다.

[0054] 임의로, 탈가교된 및/또는 분해된 분석물을 조절된 방법으로 분석물의 시그날 강도를 증강시키거나 또는 억제시키는 것을 도울 수 있는 분자 프로브 (예, 염료)를 사용하여 처리 또는 태그시킬 수 있다. 이러한 시약 및 방법은 당업자에게 주지되어 있다. 예를 들면, 포스포펩티드를 태그시키는 것은 각종의 공지된 방법, 예를 들면 부동화 금속 친화도 크로마토그래피 (IMAC)를 통하여 발생할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "분자 프로브"는 임의의 검출 가능한 분자 또는, 생물학적 분자와 반응시 검출 가능한 시그날을 생성하는 분자이다. "반

응시키다"라는 것은 효소 반응을 결합, 표지 또는 개시시키는 것을 포괄한다. 이러한 검출 가능한 분자 프로브는 검출 가능한 결합 시약으로 인식될 수 있다. 본 명세서에서, "검출 가능한 결합 시약"이라는 것은 시약이 결합시 검출을 허락하는 성질을 갖는, 측정하고자 하는 분석물과 결합된 분자 프로브와 결합 또는 상호반응하고 그리고 특이적으로 인식된 제제를 의미한다. "특이적으로 인식되고 그리고 상호반응한다"라는 것은 결합제가, 샘플내에 존재하는 기타의 분석물을 실질적으로 배제시키도록 측정하고자 하는 분석물과 관련된 분자 프로부와 상호작용하는 것을 의미한다. 검출 가능한 결합 시약은 직접 검출을 허용하는 고유의 성질을 지닐 수 있거나 또는, 검출 가능한 부분으로 표지될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "검출 가능한 부분"이라는 것은 특정의 방법 또는 방법들에 의하여 결합 시약의 검출을 부여하게 되는 결합 시약에 결합될 수 있는 부분을 지칭한다. 검출 가능한 부분의 예로는 방사능 표지 (예, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I 등), 효소 (예, 알칼리성 포스파타제, 퍼옥시다제 등), 형광발색단 (예, 플루오레신, 아미노 쿠마린 아세트산, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 텍사스 레드, Cy3.0, Cy5.0, 그린 형광 단백질, 등) 및 콜로이드성 금속 입자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 이러한 방법은 탈가교된 분석물중의 기타 결합 (예, 가교 이전에 분석물내의 자연 발생 결합 또는 기타의 결합)의 적어도 일부분을 분해시켜 분석물 분절을 형성하는 것을 포함하는 것이 바람직하다. 그후, 이러한 분석물 분절을 분석할 수 있다. 탈가교된 분석물중의 결합의 적어도 일부분을 분해하는 것은 탈가교된 분석물을 효소 또는 화학 시약과 접촉시키는 것을 포함한다. 트립신, 펩신, 프로나제, 키모트립신 및 이의 조합물과 같은 효소를 사용하는 것이 바람직하다.

[0056] 이러한 분해 단계는, 탈가교 이후에 수행하는 것이 바람직하기는 하나, 탈가교 이전 또는 이후에 이러한 단계를 수행할 수 있다. 화학 및/또는 효소 분해에 의하여 이의 1차 구조에 의존하는 방법, 예컨대 질량 스펙트럼에 의한 분석에 따르는 분석물중의 분절, 예를 들면 단백질로부터의 펩티드가 생성된다. 또한, 바람직하지는 않지만, 또한 탈가교 단계는 탈가교 이외에 분석물의 단편화를 생성할 수 있다.

[0057] 다시 도 2를 살펴보면, 소화는 분석 방법, 예컨대 질량 스펙트럼으로 직접 처리할 수 있거나 또는 소화의 용출물을 제거하고, 이는 분석 방법으로 처리할 수 있다.

[0058] 탈가교된 분석물은 각종의 기법, 예컨대 질량 스펙트럼, 겔 전기영동, 효소 결합된 면역분석, DNA/RNA 발현 또는 면역화학을 사용하여 분석할 수 있다. 이러한 기법은 당업자에게 주지되어 있다. 질량 스펙트럼을 사용하는 것이 바람직하다.

[0059] 분석 단계는 정성적인 것이 될 수 있으며, 이는 분석물을 확인하는 것을 포함할 수 있다 (이러한 확인이 분석에 반드시 필요한 것은 아니지만). 특정의 구체예에서, 분석 단계는 정량적일 수 있다.

[0060] 분석물을 확인하는 것은 탈가교된 분석물의 독특한 식별자를 판독하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 독특한 식별자의 예로는 단백질의 펩티드 지문이 될 수 있다. 이들은 기법, 예컨대 질량 스펙트럼을 사용하여 "판독"할 수 있다.

[0061] 분석물을 정량화하는 것은 형광 또는 동위원소 태그를 포함할 수 있다. 이는 기법, 예컨대 질량 스펙트럼과 커플링된 안정한 동위원소 태그를 사용하여 수행될 수 있다.

[0062] 세포 샘플은, 가교되지 않고 차후에 탈가교되는 분석물을 포함할 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들면, 특정의 분석물, 예컨대 의약품, 대사물질 및 비타민은 화학적으로 가교되지 않을 수도 있다. 또한, 이러한 분석물은 본 발명의 방법을 사용한 탈가교된 분석물과 함께 분석할 수 있다.

[0063] 샘플 제조

[0064] 한 구체예에서, 샘플은 조직 샘플이다. 조직 샘플은 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직, 특히 포르말린 고정되고 파라핀 매립된 조직으로부터 얻을 수 있다. 본 발명에 의한 화학적으로 고정되고 파라핀 매립된 조직 샘플은 통상적으로 조직 및/또는 세포로부터 유래한 1 이상의 분획을 포함한다. 각각의 샘플은 1 이상의 공지의 생물학적 특성 (예 조직형 또는 세포형 또는 환자 공급)을 지니는 것이 바람직하다.

[0065] 조직은 조직 마이크로어레이, 예컨대 문헌[Kononen et al., 1998, *Nat. Med.* 4:844-7]에 기재된 것의 형태가 될 수 있다. 마이크로어레이의 형성은 조직 마이크로어레이 형성기, 예컨대 WO 99/44062, WO 99/44063 및 미국 특허 제6,136,592호에 개시된 것을 사용하여 부분적으로 또는 완전 자동화될 수 있다.

[0066] 또한, 세포를 얻어 1 이상의 샘플을 제공할 수 있다. 세포는 통상적으로 원심분리에 의하여 파라핀 분획으로 형

성된다. 세포는 조직으로부터 세포의 현탁액(예, 분쇄한 조직 세포의 현탁액, 예컨대 절개한 조직)으로부터, 체액(예, 혈액, 혈장, 혈청 등)으로부터, 점막 찰과표본 (예, 협측 찰과표본 또는 pap 도말표본)으로부터 및/또는 기타의 시술, 예컨대 기관지 손상, 양수천자 시술 및/또는 백혈구이동으로부터 얻을 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 분석하고자 하는 세포 모집단을 확장시키기 위하여 샘플의 일부를 생성하기 이전에 우선 배양한다. 또한, 연속 성장중인 세포주로부터의 세포, 1차 세포주로부터의 세포 및/또는 줄기 세포를 사용할 수 있다.

[0067] 한 구체예에서, 샘플은 단일의 개체로부터의 다수의 조직/세포를 포함하며, 즉 샘플은 개체의 "전신(whole body)"을 나타내는 마이크로어레이가 된다. 조직은 피부, 신경 조직, 심장 조직, 간 조직, 위 조직, 대장 조직, 결장 조직, 소장 조직, 식도 조직, 폐 조직, 심장 조직, 비장 조직, 췌장 조직, 신장 조직, 생식 기관(들) (남성 또는 여성)으로부터의 조직, 부신 조직 등으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 또한, 단일의 기관의 여러 가지의 해부학적 또는 조직학적 부위로부터의 조직은, 예컨대 기관이 뇌인 소뇌, 대뇌 및 연수로부터 얻을 수 있다. 특정의 마이크로어레이는 기관계 (즉, 기관계내의 다수의 기관으로부터의 샘플을 포함함), 예를 들면 호흡기계, 비뇨기계, 신장계, 심혈관계, 소화기계 및 생식기계 (남성 또는 여성)를 대표하는 샘플을 포함한다. 또한, 바람직한 구체예에서, 전신 마이크로어레이는 환자의 체액으로부터(예, 혈액 샘플로부터)의 세포 샘플을 더 포함한다.

[0068] 또한, 마이크로어레이는 형질을 공유하는 개체로부터의 다수의 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면 공유된 형질은 성별, 연령, 병상, 병상에 대한 소인, 감염 질환 (예, HIV)으로의 노출, 혈족 관계, 동일한 질환으로부터의 사망, 동일한 약물을 사용한 치료, 화학요법에 노출, 방사선 치료에 노출, 호르몬 치료에 노출, 수술에 노출, 동일한 환경 조건 (예, 발암원, 오염원, 석면, TCE, 퍼클로레이트, 벤젠, 클로로포름, 니코틴 등)에 노출, 동일한 유전적 변형 또는 변형의 군, 동일한 유전자 또는 유전제 세트의 발현 (예, 샘플은 공통의 일배체형, 예컨대 HLA 대립유전자의 세트를 공유하는 개체로부터일 수 있음)이 될 수 있다.

[0069] 샘플은 질환 또는 병리학적 상태를 갖는 개체로부터 얻을 수 있으며, 상기의 상태의 예로는 혈액 질환, 혈액 지질 질환, 자가면역 질환, 골 또는 관절 질환, 심혈관 질환, 호흡기 질환, 내분비 질환, 면역 질환, 감염 질환, 근육 소모 및 전신 소모 질환, 신경변성 및/또는 신경정신 질환을 비롯한 신경계 질환, 피부 질환, 신장 질환, 공피증, 졸중, 유전 출혈, 모세혈관확장, 당뇨병, 당뇨병과 관련된 질환 (예, PVD), 고혈압, 고셰병, 낭성 섬유증, 겸상 적혈구성 빈혈, 간 질환, 췌장 질환, 눈, 귀, 코 및/또는 목 질환, 생식 기관에 영향을 미치는 질환, 위장 질환 (결장 질환, 비장, 충수, 담낭 등의 질환) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 사람 acme 질환에 대한 추가의 논의는 문헌 [Mendelian Inheritance in Man: A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders by Victor A. McKusick (12th Edition (3 volume set) June 1998, Johns Hopkins University Press, ISBN:0801857422]을 참고한다. 정상의 인구통계학적으로 부합하는 개체로부터의 샘플 및/또는 질환을 갖는 환자로부터의 비-질환 조직으로부터의 샘플을, 동일하거나 또는 상이한 마이크로어레이상에 배치하여 대조군을 제공하는 것이 바람직하다.

[0070] 바람직한 구체예에서, 샘플은 세포 증식성 질환, 예컨대 암의 여러 가지 단계를 나타내는, 다수의 세포를 포함하는 마이크로어레이 포맷에 제공된다. 본 명세서에서, "세포 증식성 질환"은 주어진 유형의 세포수에서 또는 주어진 조직에서의 임의의 비정상적인 또는 정도를 벗어난 증가에 의하여 표시되는 상태이다. 암은 종종 기본적인 세포 증식성 질환으로서 인식되고 있으나, 여전히 질환, 예컨대 죽상동맥경화증, 재협착, 건선, 염증 질환, 특정의 자가면역 질환 (예, 류마티스 관절염)도 또한 세포의 비정상적인 증식에 의하여 야기되는 것으로서, 이는 세포 증식성 질환의 예가 된다.

[0071] 한 구체예에서, 질병 (예, 종양 샘플)의 1차 표적을 포함하는 샘플을 포함하는 것 이외에, 마이크로어레이는 암이 2차 조직/세포로의 전이되는 것을 나타내는 샘플을 포함한다. 또한, 마이크로어레이는 비정상적으로 증식한 조직을 얻게 되는 동일한 환자에게서의 정상 조직을 포함한다. 특정의 구체예에서, 1 이상의 마이크로어레이는 암 세포의 세포주(1차 또는 연속 세포주)로부터의 세포를 포함한다. 샘플은 단일 세포 유형 (예, 작은 포맷 또는 매우 작은 포맷 마이크로어레이)를 포함하여 균질형이 될 수 있거나 또는, 비정상적으로 증식하는 세포 (예, 샘플의 직경이 일반적으로 0.6 ㎜보다 더 큰 커다란 포맷 마이크로어레이에서의 경우) 이외에 세포 또는 세포상 물질의 1 이상의 추가의 유형을 포함하여 불균질형이 될 수 있다. 예를 들면, 샘플은 비정상적으로 증식하는 세포 및 1 이상의 섬유상 조직, 염증 조직, 괴사 세포, 아포프토시스 세포, 정상 세포 등을 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 조직 및/또는 세포 샘플은 사람 검체를 포함하며, 본 발명의 한 구체예에서, 기타의 유기체로부터의 검체를 사용한다. 한 구체예에서, 질환 또는 기타의 병리학적 상태의 모델을 제공하는 사람을 제외한 동물로부터의 검체를 사용한다. 샘플이 만성 질환을 갖는 동물 모델로부터의 검체를 나타낼

경우, 샘플은 예컨대 관해 기간 또는 악화 기간에서의 동물로부터와 같은 질병의 상이한 단계를 나타내는 검체를 비롯한 마이크로어레이의 형태가 될 수 있다. 또한, 마이크로어레이는 질병 또는 상태를 치료하기 위한 치료(예, 약물, 항체, 단백질 치료, 유전자 치료, 안티센스 치료, 이의 조합 등)에 노출되는 질병 또는 상태를 갖는 비-사람 동물로부터의 조직을 포함한다. 특정의 구체예에서, 사람을 제외한 동물은 외인성 핵산을 포함하는 1 이상의 세포를 포함할 수 있다. (예, 동물은 트랜스제닉 동물, 키메라 동물, 녹아웃 또는 녹-인 동물일 수 있음). 사람을 제외한 동물로부터의 어레이는 이러한 비-사람 동물로부터의 다수의 조직/세포 유형을 포함하는 것이 바람직하다. 한 구체예에서, 성장의 여러 단계에서의 조직/세포를 사용한다.

[0073] 또다른 구체예에서, 식물, 예컨대 문헌 [Schumacher U., "Immunohistochemical assessment of cell proliferation in plant tissues using formaldehyde-fixed paraffin-embedded material", *Acta Histochem.* 1995 Jul:97(3):291-4]에서 논의된 것을 사용할 수 있다. 샘플은 식물 조직의 생활 주기의 상이한 단계에서 및/또는 상이한 유형에서의 식물을 포함하는 마이크로어레이를 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, 식물 샘플은 외인성 핵산을 포함하는 1 이상의 세포를 포함할 수 있다. (예, 식물은 트랜스제닉 식물일 수 있다).

[0074] 한 구체예에서, 포르말린 고정되고 파라핀 매립된 조직의 분획을 얻었으며, 이를 H&E로 염색시켰다. 염색된 분획을 안내물로서 사용하여 샘플링을 위한 조직 분획상에서의 부위를 선택하였다. 특정의 구체예에서, 표준 조직 또는 세포 균주, 예컨대 H&E를 사용한 염색은 해당 세포 또는 조직 부위를 확인하는데 적절할 수 있으며, 기타의 구체예에서, 분획에 의하여 나타난 샘플에서의 1 이상의 생물학적 특징의 발현 (예, 유전자형, 전사 또는 펩티드, 폴리펩티드 또는 해당 단백질의 발현)에 대하여 평가하였다. 특정의 생물학적 특징을 발현시키거나 또는 발현시키지 않는 해당 부위를 확인할 수 있다.

[0075] 한 구체예에서, 샘플은 조직 샘플 분획을 슬라이스하여 (즉, 샘플의 종축에 대하여 조직 샘플로부터 횡방향으로 절단하여) 생성하고, 이를 구김 없이 기질상에 떨어뜨린다. 각각의 조직 샘플을 2 내지 20 미크론 두께로부터 150 내지 300 개의 분획을 생성하는 것이 바람직하다. 분획은 두께가 4 내지 12 미크론인 것이 더욱 바람직하다.

[0076] 특정의 구체예에서, 접착 필름은 슬라이스로 한 후 분획이 평편하게 유지하고 분획이 찢어지거나 주름이 생기지 않도록 하면서 기질에 분획을 더욱 용이하게 이동시키는 표면을 제공하기 위하여 조직 샘플의 표면상에 배치한다. 이의 접착 백킹상의 분획을 기질 분획면을 아래로 전달하고, 접착 필름을 분획으로부터 박리시킨다. 접착 필름 및 접착제 코팅된 슬라이드는 모두 미국 뉴저지주 해큰색에 소재하는 인스트루메딕스, 인코포레이티드로부터 입수 가능하다. (크로얀 테이프 전달 시스템).

[0077] 일단 기질에 조직 샘플을 배치하면, 화학적 가교(즉, 화학 가교제, 예컨대 포르말린으로 형성된 가교)의 적어도 일부분을 역전시켜 조직 샘플을 처리한다. 이는 통상적으로 항원 회수 단계로서 공지되어 있다. 이러한 단계는 문헌 [Shi S-R, Cote R J, Taylor C R., "Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future," *J. Histochem Cytochem* 1997; 45(3):327-343]에 기재되어 있다. 이러한 탈가교 단계중에, 화학 고정은 통상적으로 물의 존재하에서 열을 가하여 역전시킨다. 예를 들면, 포르말린 고정되고 파라핀 매립된 조직의 탈가교중에, 조직 샘플을 구연산의 존재하에서 9.3 pH에서 100℃ 스팀으로 처리한다. 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 사용한 산, 온도 및/또는 pH의 변형으로 인하여 가교 및 항원 회수의 역전의 다양한 정도를 얻을 수 있다. 기타의 에너지 공급원의 예로는 방사선 에너지, 예컨대 극초단파 에너지 등이 있다.

[0078] 조직 분획을 기질에 부가(affixation) 전 또는 후에 가교 역전 방법 (통상적으로는 항원 회수로 지칭함)으로 처리할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 조직 분획을 가교의 역전(탈가교) 이전에 기질, 예컨대 유리 슬라이드에 부가한다.

[0079] 바람직한 구체예에서, 탈가교된 분석물을 효소 또는 화학 시약으로 처리하여 자연 발생 결합 또는 해당 분석물, 예컨대 단백질 또는 펩티드중에서의 가교 이전에 존재하는 결합의 적어도 일부분을 분해한다. 이는 제자리 소화를 포함하는 것이 바람직하다. 분석물을 분해하기에 적절한 효소의 예로는 트립신, 키모트립신, 프로나제 및 펩신 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 포르말린 고정되고 파라핀 매립된 조직을 사용한 한 구체예에서, 효소는 트립신이다. 또한, 결합을 분해하는 기타의 시약, 예컨대 포름산 및 브롬화시아노겐을 사용할 수 있다. 이러한 제제 및 기법은 당업자에게 주지되어 있다.

[0080] 사용 방법

[0081] 한 구체예에서, 본 발명에 의하여 분석된 샘플을 사용하여 암 특이성 마커 또는 종양 특이성 항원의 발현 및/또는 형성을 분석한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "암 특이성 마커" 또는 "종양 특이성 항원"은 암 세포

및 종양 세포 각각에서 잠재적으로 발현되고 성인 개체의 비-암/종양 세포에서의 적은 정도로 발현되는 분석물이다.

[0082] 본 명세서에서, "발현 특징에서의 차이" 또는 "차별적으로 발현"되는 유전자는 소정의 폴리펩티드의 측정 가능한 발현 특징에서의 증가 또는 감소를 지칭한다. 정량적인 측정 (예, 단백질을 암호화하는 RNA 또는 단백질의 양)에서의 증가 또는 감소 또는, 정성적인 측정 (예, 단백질의 위치)에서의 변화가 될 수 있다.

[0083] 암 특이성 마커는 암의 발병기전에 관련되거나 또는 상관 관계를 갖는 임의의 분석물이며, 발현 또는 형태의 특정의 구체예가 암의 존재 또는 진행에 영향을 미치거나 또는 이와 관련되어 있는 한, 이는 양의 또는 음의 방법으로 작용할 수 있다. 한 구체예에서, 분석물의 발현된 수준은 암의 진행 또는 재발의 징후를 제공하며, 본 발명의 또다른 구체예에서, 분석물의 발현된 형태는 징후 (예, 분해되거나 또는 분해되지 않은 상태, 인산화되거나 또는 비인산화된 상태)를 제공한다.

[0084] 암-특이성 마커는 세포 증식을 촉진하는 특징화된 유전자, 예컨대 세포 성장 관련 폴리펩티드의 생성물이 될 수 있거나 또는, 비특징화되거나 또는 부분적으로만 특징화 (예, 전술한 방법을 프로파일링하는 분자의 사용에 의하여 확인함)될 수 있다. 암-특이성 마커의 비제한적인 예로는 세포 증식에 필요한 유전자를 활성화시키는데 관여하는 성장 인자, 성장 인자 수용체, 신호 전달 경로 참여물 및 전사 등이 있다.

[0085] 또한, 이른바 종양 항원은 성장 관련 폴리펩티드에 포함된다. 종양 항원은 비-변형 세포보다 변형된 종양 세포에 의하여 상당한 정도로 발현되는 경향을 갖는 단백질 마커의 유형이 된다. 그래서, 일반적으로 종양 항원은 조직 또는 유기체의 초기 발육 단계중에 또는 낮은 농도에서도 비-종양 세포에 의하여 발현될 수 있다. 종양 항원의 예로는 전립선 특이성 항원 (PSA; Osterling, 1991, *J. Urol*. 145:907-923), 상피막 항원 (복수의 상피암종; Pinkus et al., 1986, *Am. J. Clin. Pathol*. 85:269-277), CYFRA 21-1 (폐암; Lai et al., 1999, *Jpn. J. Clin. Oncol*. 29:421-421) 및 Ep-CAM (범-암종; Chaubal et al., 1999, *Anticancer Res*. 19:2237-2242) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 종양 항원의 추가의 예로는 CA125 (난소암), 무손상 모노클로날 이뮤노글로블릭 또는 경쇄 분절 (골수종) 및 사람 융모성 생식샘자극호르몬의 베타 서브유니트 (HCG, 종자 세포 종양) 등이있다.

[0086] 본 발명의 추가의 구체예에서, 암 진행은 암 특이성 마커의 활성의 발현을 조사하여 검출 및/또는 모니터할 수 있다. 예를 들면, 한 구체예에서, 텔로머라제의 활성을 샘플내에서 현장내 모니터한다. 텔로머라제 활성의 현장내 검출 방법은 당업계에서 공지되어 있으며, 예를 들면 미국 특허 제6,194,206호에 개시되어 있다.

[0087] 또한, 조직 샘플은 샘플의 동일한 또는 기타의 유형을 사용한 기타 유형의 분석을 통하여 얻은 결과와 관련있거나 또는 이를 유효하게 하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 방법은 제자리 검출을 사용한 분석 및 면역조직화학을 사용한 가시화; 샘플의 레이저 포획 현미해부 (LCM), 예컨대 PCT 국제 출원 WO 09917094A2 및 WO 098352A1에 기재되어 있는 것; 겔 전기영동 및 기타를 사용한 분석과 함께 또는 그 대신에 사용될 수 있으며, 이들 모두는 PCT 국제 출원 WO 02/48674 A2에 기재되어 있다.

[0088] 또한, 본 발명에 의하여 제조된 조직 샘플은 하나 또는 복수의 분석물이 질환과 관련되어 있는 약물 표적을 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 약물 표적은 병리학적 과정중에 과발현되거나 발현이 부족한 분자가 될 수 있다. 약물 표적을 확인함으로써, 세포/조직의 정상적인 생리적 기능을 저장할 수 있는 약물에 대한 스크리닝이 가능케 된다. 예를 들면, 과발현 또는 발현 부족인 약물 표적이 분자인 경우, 적절한 약물은 분자 (예, 치료 항체, 폴리펩티드 또는 핵산)가 될 수 있으며, 이는 약물 표적의 실질적으로 정상인 수준을 저장하게 된다.

[0089] 한 구체예에서, 진단 분석물을 확인하는 것은 마이크로어레이상의 분자가 항상 질환 샘플중에 존재하고 그리고 건강한 샘플중에서는 실질적으로 항상 존재하지 않거나 또는, 질환 샘플중에는 실질적으로 항상 존재하지 않고 그리고 건강한 샘플중에는 실질적으로 항상 존재하거나, 또는, 질환 샘플중의 특정의 형태 또는 함량으로 실질적으로 항상 존재하고 그리고 건강한 샘플중의 특정의 다른 형태 또는 함량으로 실질적으로 항상 존재하는 것을 결정하여 실시한다. "실질적으로 항상"이라는 것은 분석물 또는 분석물 세트의 발현/형성 및 정도를 벗어난 생리적 과정, 예컨대 질환의 존재 사이의 통계적으로 유의적인 상관 관계가 존재하는 것을 의미한다.

[0090] 진단 분석물 또는 분석물 세트의 발현은 약물 처치된 환자로부터의 조직 및 미처치된 질환을 갖는 환자로부터의 조직 및/또는 건강한 환자로부터의 조직을 포함하는 마이크로어레이중에서 검사하는 것이 바람직하다. 이러한 구체예에서, 진단 분자(들)의 발현 프로파일이 소정의 치료 결과를 달성한 환자 또는 건강한 환자에게서의 동일한 분석물(들)의 발현 프로파일과 실질적으로 유사한 (예, 통상의 통계적 테스트에 의하여 측정되는 바와 같이 유의적으로 상이하지 않은) 프로파일로 변경되느냐를 결정함으로써 약물의 효능을 모니터링한다. 본 발명의 한

구체예에서, 조직 유형, 성장 또는 질환의 단계, 환자의 이력, 가족력, 진단, 예후, 투약, 형태학, 동시 질환, 분자 특성 (예, 마커)의 발현 등의 임의의 것 또는 전부와 관련된 데이타를 기록하고, 데이타베이스에 저장하고, 얻은 조직 샘플에 따라 인덱싱한다.

[0091] 기질

[0092] 기질은 기질상의 샘플의 질량을 농축시키거나 및/또는 샘플내의 분석물을 선택적으로 결합시켜 질량 스펙트럼을 사용한 기질 표면상의 조직 샘플의 분석을 돕는다. 기질의 크기 및 형태는 소정의 조직 분획 또는 샘플의 크기 및 형태에 따라 변형될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적절한 기질은 미국 특허 제6,376,619호; 제6,548,607호 및 제6,573,338호에 개시되어 있는 소형화된 어레이를 포함한다. 고밀도, 소형화 어레이가 바람직한데, 이러한 어레이를 사용할 경우 표준의 어레이와 비교시 제한되거나 또는 대량의 샘플에 대한 효율이 급격하게 증가될 수 있기 때문이다.

[0093] 기질은 여러 가지의 이유로 인하여 질량 스펙트럼과 함께 사용하기 위한 기질로서 매우 효과적이다. 기질은 검출 시그날 강도를 증가시키는 능력을 비롯하여 수반되는 고밀도 잇점 모두와 함께 조직 및/또는 세포 샘플의 농도 및 부가를 돕는다. 본 명세서에서, "부가하다(affix)"라는 것은 물질을 기질에 부착시키는 임의의 방식을 포함한다. 이러한 방식은 공유 및 이온 결합, 접착, 예컨대 접착제를 사용한 접착, 기질내에서의 물리적 포착 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0094] 표면적의 감소 이전 및 이후 모두에서, 기질은 조직 및/또는 세포 샘플에서의 해당 분석물을 농축시킬 수 있으며, 그리하여 이는 질량 분광계, 특히 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 사용하면 표준 제조 방법, 즉 예컨대 금속판보다 더 큰 감도를 산출하게 된다. 하기에 설명된 결합제를 사용하는 것과 같은 다수의 구체예에서 (본 명세서에서는 "결합제"라는 것은 "반응물"을 기질에 부가할 수 있는 임의의 화학종을 의미함), 기질은 부착된 조직 및/또는 세포 샘플과의 기질 상호반응을 안정화시킬 수 있으며, 질량 분광계에서의 진공 조건하에서 기질이 승화되는 경향을 감소시킬 수 있다. 특정의 경우에서, 기질에 대한 결합제 및 중합체 물질의 선택은 질량 스펙트럼에 의한 검출에 대하여 해당 분석물을 선택적으로 분리할 수 있다.

[0095] 상기에서 처리한 바와 같은 조직 분획을 갖는 기질은 미국 특허 제6,376,619호; 제6,548,607호 및 제6,573,338호에서 기재한 바와 같이, 열 수축된 물질을 사용한 경우의 열 적용에 의하여 또는, 탄성 물질을 사용한 경우 연신된 기질의 이완에 의하여 표면적이 감소될 수 있다. 부착된 조직 샘플을 갖는 감소된 기질을 표준 질량 스펙트럼 기법을 사용하여 분석할 수 있다.

[0096] 본 발명의 한 구체예에서, 중합체 기질은 표면적을 갖는 주요면을 포함한다. 조직 및/또는 세포 샘플은 기질의 주요면에 부가된다. 주요면의 표면적이 감소되며, 그리하여 기질상에서의 특이점의 밀도를 증가시킨다. 바람직한 구체예에서, 기질은 이축 연신, 열 수축 필름이다. 본 발명의 또다른 구체예에서, 열 수축 필름을 작용화시켜 조직 및/또는 세포 샘플의 차후의 부착을 위한 필름면상에서 결합제를 생성한다. 기질면의 표면적이 감소될 수 있으며, 그리하여 기질상의 결합제의 밀도를 증가시키게 된다. 열수축면은 아즐락톤 결합제를 사용하여 작용화될 수 있는 것이 바람직하다.

[0097] 본 발명의 또다른 구체예에서, 탄성 기질을 연신시키고, 작용화시켜 기질면상에 결합제를 생성시킨다. 조직 분획은 결합제에 의하여 기질에 부가될 수 있다. 기질은 차후에 이완되도록 하며, 그리하여 기질의 표면적을 감소시켜 기질상의 결합제의 밀도를 증가시키게 된다. 백킹 또는 기타의 구조물을 첨가하여 감소된 배향으로 기질을 유지할 수 있다.

[0098] 다수의 중합체 물질은 기질로서 사용하기에 적절할 수 있다. 그러나, 결합제 코팅의 높은 표면적을 갖는 면을 형성하기 위하여, 하기에서 상세히 설명된 바와 같이, 물질은 배향될 수 있는 것, 즉 에너지, 바람직하게는 열을 필름에 소정의 시간 동안 가할 경우 필름면상에서 적어도 한 방향으로 수축되는 필름이 바람직하다. 조직 및/또는 세포 샘플의 부가 이전에 적어도 한 방향으로 연신되고, 샘플의 부가중에 연신된 상태로 구속하며, 그후 회복되도록 하여 연신된 상태로부터의 기질면의 투사된 표면적(즉, 표면의 "x" 및 "y"축을 포함하는 면에 대하여 계산한 바와 같은 표면에 대한 표면적)을 감소시키는 탄성 물질은 본 발명에 사용하기에 적절하다. 기질 물질은 소정의 분석 방법의 시약 및 조건, 예컨대 온도 및 pH와 상용성을 갖는 것이 바람직하다.

[0099] 배향 필름에 관하여, 실질적으로 균일한 수축이 바람직하기는 하나, 필름면내에서 임의의 2 개의 직교하는 방향에서 수축이 반드시 동일할 필요는 없다. 필름면에서의 방향의 함수로서의 수축을 고려하면, 실질적으로 균일한 것이 바람직하며, 즉 필름은 필름면상의 위치와는 상관 없이 각각의 방향에서 실질적으로 동일한 함량으로 수축되는 것이 바람직하다. 사용한 필름이 실질적으로 균일한 수축 특성을 나타내지 않을 경우, 등록 지표를 추가할

수 있다.

[0100] 본 발명의 출발 기질 물질은 배향 필름을 포함하며, 본 발명의 기질은 일반적으로 이완되고, 즉 일반적으로는 더 이상 배향되지 않거나 또는 사실상 등방성이다. 백킹은 기질에 적용되어 다소 배향된 상태로 기질을 유지할 수 있다. 백킹은 박리 라이너를 임의로 포함할 수 있어서 필요할 경우 백킹이 제거되도록 한다.

[0101] 기질은 코팅 및/또는 반응물이 부가될 수 있는 비-다공성인 표면을 제공하는 것이 바람직하다. 주요면의 표면적의 감소 또는 배향된 기질의 이완시, 기질은 이의 표면상의 코팅 및/또는 반응물에 지지 및 일체성을 제공한다. 또한, 기질은 조직 및/또는 세포 샘플의 상대적인 공간 관계를 유지한다.

[0102] 본 명세서에서, "반응물"은 해당 샘플중의 분석물을 단독으로 결합시킬 수 있거나 또는, 분석물을 기질에 결합시키는 것을 돕는 분자 또는 화합물, 예컨대 조효소와 함께 결합시킬 수 있는, 자연 발생 또는 합성된 임의의 화학 분자, 화합물, 조성물 또는 복합체를 의미한다. 본 발명의 반응물은 화학 또는 생화학 측정, 검출 또는 분리에 유용하다. 따라서, 용어 "반응물"은 전술한 바와 같이 분석물을 결합시키지 않는 분자, 화합물, 조성물 또는 복합체, 예컨대 잉크를 특이적으로 배제시킨다. 반응물의 예로는 아미노산, 올리고뉴클레오티드 및 cDNA를 비롯한 핵산, 탄수화물 및 단백질, 예컨대 효소 및 항체 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 바람직한 배향 필름으로는 이축 연신 저밀도 폴리에틸렌; 이축 연신 선형 저밀도 폴리에틸렌; 및 이축 연신 초저밀도 폴리에틸렌 등이 있다. 이축 연신 필름은 2 개의 직교하는 평면내 방향 (이하에서는 이를 "x" 및 "y" 방향으로 지칭함)으로 수축되기 때문에 바람직하다. 본 발명에 사용하기에 적절할 수 있는 기타의 배향 필름에는 당업자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 용융-배향; 취입 필름, 버블, 더블-버블 및 관형 방법; 길이 배향, 텐터링 방법; 맨드렐상에서의 신장; 열성형; 및 취입 성형 등 (단 이들에 한정되지는 않음)에 의하여 제조된 단축, 이축 또는 다축 배향 필름 등이 있다.

[0104] 각각의 필름에 사용될 수 있는 중합체로는 고밀도 폴리에틸렌, 저밀도 폴리에틸렌, 선형 저밀도 폴리에틸렌, 초저밀도 폴리에틸렌, 에틸렌의 공중합체 (에틸렌 프로필렌 공중합체 및 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체 포함)을 비롯한 폴리에틸렌; 이소택틱 폴리프로필렌, 신디오택틱 폴리프로필렌 및 폴리메틸펜텐을 비롯한 폴리올레핀; 폴리아세탈; 폴리아미드 6 및 폴리아미드 66을 비롯한 폴리아미드; 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리부틸렌 테레프탈레이트 및 폴리에틸렌 나프탈레이트를 비롯한 폴리에스테르; 폴리염화비닐, 폴리염화비닐리덴, 폴리클로로트리플루오로에틸렌, 폴리불화비닐 및 폴리불화비닐리덴을 비롯한 할로겐화 중합체; 범용 폴리스티렌 및 신디오택틱 폴리스티렌을 비롯한 스티렌 중합체; 셀룰로스 아세테이트 및 셀룰로스 프로피오네이트를 비롯한 셀룰로스 에스테르; 폴리에테르에테르케톤 및, 일산화탄소와 에틸렌 및/또는 프로필렌의 공중합체 및 삼원중합체를 비롯한 폴리케톤; 비스페놀 A의 폴리카보네이트를 비롯한 폴리카보네이트; 폴리페닐렌 설피드를 비롯한 페닐환 중합체; 폴리설폰; 폴리우레탄; 아크릴산 및 메타크릴산 및 이의 에스테르의 중합체; 이오노머; 및 상기에서 명명한 중합체 중 임의의 것의 공중합체, 혼합물 또는 층상 구조물 등이 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이들 중합체의 임의의 배향 필름은 임의로 가교될 수 있다.

[0105] 본 발명에 사용하기에 적절할 수 있는 탄성 물질의 예로는 천연 고무, 폴리이소프렌, 폴리클로로프렌, 폴리이소부틸렌, 폴리부텐, 니트라이트, 폴리우레탄, 실리콘, 램덤 공중합체 및 삼원중합체 (예컨대 에틸렌-프로필렌 공중합체 및 에틸렌-프로필렌-디엔 단량체 삼원중합체) 및 블록 공중합체 등이 있다.

[0106] 기질은 결합제를 포함하는 코팅을 임의로 포함한다. 결합제는 기질에 부가하고자 하는 조직 및/또는 세포 샘플 및, 샘플이 사용되는 적용예를 기준으로 하여 선택한다.

[0107] 특정의 구체예에서, 결합제는 코팅이 기질에 적어도 부분적으로 접착되도록 기질의 주요면상에 코팅된다. 결합제를 포함하는 코팅은 투사된 표면적 및 토포그래피칼 표면적을 갖는다. 기질상의 코팅은 일반적으로 외관이 평활하다. 따라서, 투사된 표면적 및 토로그래피칼 표면적은 실질적으로 등가이다. 본 명세서에서, "투사된 표면적"이라는 것은 표면의 "x" 및 "y"축을 포함하는 평면에 대하여 계산한 바와 같이 표면에 대한 표면적을 의미하며; "토포그래피칼 표면적"이라는 것은 표면의 "x", "y" 및 "z"축을 포함하는 평면에 대하여 계산한 바와 같이 표면의 표면적, 즉 코팅의 표면 특징의 측정치를 의미한다.

[0108] 하기에서 상세하게 설명한 바와 같이, 기질의 이완시, 토포그래피칼 표면적은 투사된 표면적보다 더 크게 된다. 코팅의 토포그래피칼 표면적은 투사된 표면적보다 2 배 이상, 바람직하게는 5 배 이상, 더욱 바람직하게는 15 배 이상 크다.

[0109] 바람직한 구체예에서, 기질의 이완시, 결합제의 코팅은 파상 형태가 된다. 파상은 임의의 식별 가능한 패턴에 대하여 불규칙이 될 수 있으며, 파상의 규칙 패턴은 본 발명의 방법에 의하여 얻을 수 있다는 것으로 간주된다.

본 명세서에서, "파상 또는 파상형"이라는 것은 포선형의 파도형 형태를 의미한다. "파상 또는 파상형"은 예를 들면, 인쇄, 엠보싱, 주조, 성형, 레이저인자, 포토리토그래피, 에칭, 기계적 스크래칭 또는 스코어링과 같은 방법에 의하여 생성되는 저장소 또는 마이크로웰과 같은 구조는 포함하지 않는다.

[0110] 0.1 미크론 내지 10 미크론의 코팅이 바람직하며, 더 두꺼운 코팅을 사용한 경우 발생할 수 있는 확산 곤란성을 최소화하기 위하여 1 미크론 미만의 코팅이 바람직하다.

[0111] 바람직한 결합제로는 아즐락톤 부분, 예컨대 미국 특허 제4,304,705호; 제4,451,619호; 제5,262,484호; 제5,344,701호; 및 제5,403,902호에 개시된 바와 같은 공중합체에 의하여 제공되는 것 등이 있다. 특히 바람직한 공중합체로는 친수성 또는 수용성 공단량체, 예컨대 아크릴아미드 및 아크릴아미드 유도체, 히드록시에틸아크릴레이트 및 메타크릴레이트 등을 사용하여 생성된 것이다. 아즐락톤 결합제 이외에, 기타의 결합제를 포함한 공중합체를 사용할 수 있다. 이의 예로는 반응물의 부동화를 위하여 당업자에게 공지된 에폭시, 카르복실산, 히드록실, 아민, N-히드록시숙신이미드, 이소- 및 이소티오시아네이트, 무수물, 알데히드 및 기타의 기 등이 있다. 결합제를 포함하는 공중합체는 당업자에게 공지된 바와 같은 단계 성장 또는 연쇄 성장 중합 방법에 의하여 생성될 수 있다.

[0112] 코팅을 적용할 수 있거나 또는 가교되거나 또는 불용화되도록 처리하거나, 유리 전이 온도(Tg)를 변형시키거나 또는 코팅의 접착 성질을 변형시킬 수 있다. 예를 들면, Tg가 낮은 공중합체는 생성된 코팅의 Tg를 증가시키기 위하여 가교제와 함께 배합될 수 있다. 코팅은 당업자에게 공지된 다수의 통상의 방법, 예컨대 압출 코팅, 다이 코팅, 침지 코팅, 에어-나이프 코팅, 그라비아 코팅, 커튼 코팅, 분무 코팅, 와이어 권취 코팅 로드의 사용 등에서 임의의 것에 의하여 기질에 적용될 수 있다. 코팅은 용해시킨 후, 용제의 제거에 의하여 또는 100% 고형분 배합의 핫 멜트 코팅에 의하여 생성될 수 있다.

[0113] 코팅의 기질로의 접착은 필요할 경우 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의하여 개선될 수 있다. 이러한 방법은 주요면상에서의 각종 전처리 또는 코팅, 예컨대 코로나 또는 플라즈마 처리 또는 프라이머의 적용 등이 있다. 적절한 프라이머의 예로는 폴리에틸렌이민, 폴리염화비닐리덴, 프라이머, 예컨대 미국 특허 제5,602,202호에 기재된 것 및 예컨대 미국 특허 제5,204,219호, 제5,464,900호 및 제5,639,546호에 기재된 양쪽작용성 실란과 조합된 무기 금속 산화물의 콜로이드성 분산액 등이 있다. 공중합체의 폴리올레핀 기질에 대한 접착력을 증가시키는 기타의 방법은 미국 특허 제5,500,251호에 기재되어 있다.

[0114] 결합제는 기질면의 전체 부위, 예컨대 주요면에 걸쳐 또는, 이러한 표면상에서의 규칙 또는 불규칙 패턴에 존재할 수 있는 스폿에서 또는 실질적으로 코팅될 수 있다. 후자의 경우, 기질의 이완시, 각각의 스폿의 토포그래피칼 표면적은 이러한 스폿의 투사된 표면적보다 더 크게 될 수 있다. 또한, 결합제를 포함하는 1 초과의 중합체층을 기질에 코팅할 수 있다. 결합제의 제1 코팅은 파상을 얻기 위하여 결합제를 포함하는 제2의 코팅에 의하여 오버코팅될 수 있다.

[0115] 결합제 이외에, 기질은 조직 및/또는 세포 샘플을 부가하는 것을 돕는 결합 부위를 생성하거나 또는, 조직 및/또는 세포 마이크로어레이를 생성하도록 반응물로 추가로 코팅될 수 있다. 사용하고자 하는 반응물의 유형은 해당 적용예 및 분석물에 따라 달라질 수 있다. 본 명세서에서, "결합 부위"라는 것은 반응물이 사용될 경우 이에 부가되는 기질상에서의 불연속 위치를 의미한다. 단일의 결합 부위는 기질에 부가된 소정량의 1 이상의 동일한 반응물을 포함할 수 있다.

[0116] 마스크층을 더 포함하는 기질, 예컨대 미국 특허 제6,395,483호 및 제6,593,089호에 개시된 마스크층이 유용할 수 있다. 금속, 예컨대 티타늄의 마스크층은 중합체 물질과 코팅의 사이에 부착되며, 코팅은 시그날 대 노이즈 비율을 개선시킬 수 있거나 또는 분석의 질을 향상시킬 수 있다.

[0117] 조직 분획은, 조직 분획을 기질에 부가시키는데 사용될 수 있는 당업계에서 공지된 임의의 수의 방법에 의하여 기질에 부가한다. 부가의 방식은 물질의 의도한 분석 및 선택에 따라 달라질 수 있는 것으로 이해하여야 한다.

[0118] 조직 분획은 주요면의 감소 또는 기질의 이완 이전, 도중에 또는 이후에 부가될 수 있다. 그러나, 달성될 수 있는 샘플 밀도의 농축을 이용하기 위하여 기질의 이완 또는 주요면의 감소 이전에 샘플을 부가시키는 것이 바람직하다.

[0119] 기질 출발 물질은 적어도 부분적으로 배향된다. 배향 필름은 이의 배향중에 필름의 연신도에 부분적으로 의존하는 부위 수축 감소를 나타낸다. 부위 수축 감소는 이의 배향된 수축전 치수로부터 에너지를 필름에 가하여 필름을 수축시킨 후의 치수까지의 필름의 부위 수축의 측정치이다. 25%의 부위 수축 감소가 본 발명에 사용하기에

적절하다.

[0120] 부가의 방식에 따라서, 기질은 결합제를 생성하기 위하여 표면을 작용화시켜 추가로 생성될 수 있다. 작용화의 유형은 기질 및 반응물(들)의 유형에 의존한다. 예를 들면, 배향 필름, 예컨대 배향 폴리에틸렌을 사용한 한 구체예에서, 결합제는 아즐락톤 부분이다. 상기에서 설명한 아즐락톤 공중합체 이외에, 적절한 아즐락톤 작용성 화합물은 예를 들면 미국 특허 제4,485,236호 및 제5,149,806호에 개시되어 있다.

[0121] 표면을 작용화시키는 방법은 기질을 산 세척한 후, 비스-아미노 분자를 첨가하여 아민-작용성 표면을 생성하며, 이에 아즐락톤 결합제를 부가하는 것을 포함한다. 중합체의 작용화를 위한 기타의 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 이들은 반응물, 예를 들면 미국 특허 제5,436,147호에 개시된 헤테로 이작용성 가교제의 부가를 위한 결합제를 생성하는데 사용될 수 있는 정도로 적절하다. 결합제는 주요면의 표면적의 감소후 기질에 실질적으로 부가된 상태를 유지하는 것이 바람직하며, 그리고 표면적의 감소에 의하여 실질적으로 분해되지 않는 것이 더욱 바람직하다.

[0122] 또한, 당업자는 탄성 물질의 표면이 화학적으로 반응성이 되도록 하는 각종의 접근법이 공지되어 있으며, 반응물의 차후의 부가를 위하여 이의 사용이 기질상의 결합제를 생성하는 정도로 본 발명에 사용될 수 있는 것으로 이해하여야 할 것이다. 결합제는 기질의 이완 또는 주요면의 표면적의 감소후 기질에 실질적으로 부가된 상태를 유지하는 것이 바람직하며, 이러한 감소 또는 이완에 의하여 실질적으로 분해되지 않는 것이 더욱 바람직하다. 분석물 부착을 위한 표면을 처리하기 위한 이러한 접근법의 일례는 미국 특허 제5,258,041호에 개시되어 있다.

[0123] 조직 샘플은 등록을 위한 공지의 패턴으로 기질에 도입되는 것이 바람직하다. 일단 기질의 크기가 예를 들면 분석을 실시하는데 사용되는 치수로 감소되면 샘플의 초기 출발 위치는 이러한 위치를 최종 위치와 상관 관계를 갖도록 하는 것으로 공지되어 있다. 이의 예로는 표지, 염료 사용 등이 있다.

[0124] 조직 샘플을 기질에 부가한 후, 바람직하게는 이의 주요면 또는 특정의 경우 결합제를 생성하기 위한 기질의 작용화 후, 기질을 이완시키고, 배향 필름의 경우 기질의 주요면의 표면적을 에너지, 예컨대 열을 가하여 그리고 탄성 물질의 경우 연신력의 이완에 의하여 감소시킨다. 조직 및/또는 세포 샘플 및 반응물 및 필요할 경우 결합제의 밀도가 급격히 증가할 수 있다. 검출의 증가된 시그날이 요구되는 이러한 샘플의 증가된 밀도는 예를 들면 질량 스펙트럼을 실시하는 경우 이롭다.

[0125] 배향 필름에 대하여, 열을 가하여 감소를 실시하는 것이 바람직하다. 그러나, 주요면의 표면적의 감소를 야기하는 임의의 방식은 본 발명의 목적에 충분할 수 있다. 크기 변조의 방식, 예컨대 열을 가하는 것은 반응물의 활성을 실질적으로 손상시키지 않는 것이 바람직하다. 본 발명에서는, 질량 스펙트럼을 사용하여 생성된 기질을 분석하는 능력을 손상시키지 않으면서 이에 부가된 조직 분획을 갖는 기질을 수축시키기 위하여 열을 사용할 수 있다.

[0126] 탄성 물질에 대하여, 표면적 감소는 물질을 연신된 상태로 유지하고 있는 힘을 해제하여 표면적 감소를 달성할 수 있다. 그후, 기질은 감소된 포맷으로 기질을 유지하도록 처리할 수 있다. 또는, 백킹 또는 기타의 물리적 수단은 기질에 부가되어 크기가 변형된 포맷으로 유지할 수 있다. 기질의 크기 변형후, 필요한 경우 기질은 감소된 표면적 상태로 기질을 유지하도록 처리할 수 있다. 이러한 처리는 기질을 가교시키는 것을 포함한다. 또한, 물리적 방식은 예를 들면 기질에 백킹을 부가시키는데 사용될 수 있다.

[0127] 실시예

[0128] 이들 실시예는 예시를 위하여서만 제시하는 것이며, 첨부된 청구의 범위를 제한하는 것은 아니다. 이들 실시예 및 나머지 명세서에서의 모든 부, %, 비율 등은 특별한 언급이 없는 한 중량을 기준으로 한다. 또한, 이들 실시예 및 나머지 명세서에서의 분자량은 특별한 언급이 없는 한 중량 평균 분자량이다.

표 1

[0129]

실시예	도면	조직 샘플의 설명
1	3	돼지 상처 조직 - 만성 상처에 대한 동물 모델 발육에서의 임상전 시험 문헌[Bernatchez, SF, PJ Park, DM Grussing, SL Matalas, GS Nelson, 돼지에게서의 지연된 상처 치유 모델의 조직학적 특성화. *Wound Rep. Reg.* 6: 223-233, 1998]의 일부로서 1998년에 생성된 회복중인 전장 두께 상처
2	4 & 5	전립선암 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판

3	6 & 7	유방암 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판
4	8	난소암 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판
5	9	결장암 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판
6	10	폐암 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판
7	11	식물 조직. 조직 마이크로어레이로부터 취한 샘플, 여성암 검사 2A, 카타로그 ID: LS-SCA2A; 미국 워싱턴주 시애틀에 소재하는 라이프스팬 바이오사이언시즈, 인코포레이티드에서 시판

[0130] 각각의 실시예에 대하여, 포르말린 고정 파라핀 매립된 조직의 샘플을 취하고, 이를 절단하였다. 4-미크론 두께의 분획을 미국 특허 제6,376,619호의 실시예 14에 기재된 바와 같이 제조한 필름에 장착하였다. 실시예 2-7은 전술한 바와 같이 필름상에 장착하지는 않았으며 이미 절단하였는데, 이는 조직 마이크로어레이로서 시판되기 때문이다. 그 다음, 항원 회수 단계중에, 포르말린으로 고정되고 파라핀 매립된 조직을 구연산의 존재하에서 pH 9.3에서 100℃ 스팀으로 처리하였다. 항원 회수 단계 후, 조직을 동결건조시킨 트립신 (T8658, 미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마에서 시판)으로 현장내에서 처리에 의하여 소화시키고, 이를 50 mM 중탄산암모늄 (시그마)중에서 pH 8.3에서 1.0 ㎍/㎕의 최종 농도로 용해시키고, 37℃에서 8 시간 동안 배양시켰다. 소화된 용액을 제거하고, 분석 때까지 4℃에서 보관하였다. 실시예 1의 경우, 히트 건 (HG-501A, 미국 위스컨신주 래신에 소재하는 매스터 애플라이언스 코포레이션)을 사용하여 필름을 x 및 y 치수가 25 배 수축되도록 하였으며, 이를 양면 테이프 (3엠, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재)로 분쇄 샘플 표적판에 접착시켰다. 또한, 실시예 1의 경우, α-시아노-히드록시신남산의 기질 용액 (세콰자임 키트, 미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재하는 애플라이드 바이오시스템스)을 필름에 첨가하였다.

[0131] 공기 건조후, 생성된 펩티드를 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 비행시간형 질량 스펙트럼 (MALDI-TOF MS)을 사용하여 지문을 생성하였다. 양의 이온화 및 20 또는 25 kV의 가속화된 전위의 선형 모드로 그리고 반사경내에서의 Voyager DE-STR (미국 매사추세츠주 프래밍엄에 소재하는 애플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 실시예 1 내지 7에서 분석을 실시하였다. 기기를 질량 정확도에 대하여 세콰자임 키트 (애플라이드 바이오시스템즈)로부터 펩티드 및 단백질 표준물질로 보정하였다. 질소 레이저는 파장이 337 ㎚이고, 기기는 샘플 스폿 1개당 150 스펙트럼을 얻도록 조정하였다. 레이저 비임은 약 150-200 ㎛의 선형 스폿 직경을 갖는다. 그후, 스펙트럼의 합계를 구하였으며, 예는 도 3, 4, 6, 8-11에 도시하였다.

[0132] 단백질 데이타베이스 조사 절차

[0133] 단백질 확인의 경우, 실시예 1-3의 질량 스펙트럼에서 관찰된 펩티드 질량을 공식적으로 입수 가능한 단백질 데이타베이스-검색 엔진, 예컨대 프로틴 프로스펙터 (http://prospector.ucsf.edu) 및 MASCOT (http://www.matrixscience.com)에 입력한다. 관찰된 펩티드로부터의 이들 단백질에 대한 아미노산 서열 범위는 (대략적으로) 25 내지 75%이다. 최고 확률의 점수를 갖는 단백질 히트(hit)를 하기 표 2 내지 4에 나타낸 바와 같이 표로 나타내었다. 표 2는 확인된 단백질의 목록과 함께 실시예 1의 돼지 상처 조직과 관련된 등전점 분자량을 나타낸다. 표 3은 확인된 단백질의 목록과 함께 실시예 2의 전립선암 조직과 관련된 등전점 분자량을 나타낸다. 표 4는 확인된 단백질의 목록과 함께 실시예 3의 유방암 조직과 관련된 등전점 분자량을 나타낸다.

표 2

[0134]

돼지 상처 조직 전자 데이터베이스로부터 확인된 단백질 및 등전점 분자량(pl)	
단백질	등전점 분자량(pl)
아드레노독신 리덕타제	9.32
ATP 신타제 B 쇄, 미토콘드리아	9.14
베타 결정질 B3 (베타 B3 결정질)	6.36

베타 B3 결정질	6.07
카제인 키나제 I, 감마 3 이소형	9.39
콜라겐 알파 1 (II) 쇄 전구체 [2 개중 분절 1]	8.97
사이클린 의존성 키나제 5 활성제	9.44
사이클린 의존성 키나제 5 활성제 1 전구체 (타우 단백질 키나제 II 23 kD 서브유니트)	9.44
시토크롬 C 옥시다제 폴리펩티드 IV 전구체	9.32
시토크롬 P450 (11 베타)-3	9.51
시토크롬 P450 11 베타	9.41
시토크롬 P450 11B1 전구체	9.43
시토크롬 P450(C21) (M12918)	8.53
부고환 분비 단백질 E1 전구체 (EPV20)	8.20
페레독신-NADP + 리덕타제 (EC 1.18.1.2), 긴 형태 전구체	8.61
신경교원 섬유 산 단백질, 성상교세포 (GFAP)	5.30
글루카곤 전구체	6.11
H^+ 트랜스포틴 ATPase (EC 3.6.1.35 쇄 A, 공포)	5.42
IgM 중쇄 불변 부위	5.68
면역글로블린 중쇄 불변 부위	5.25
인터페론 베타-1 전구체	5.95
LP2-지방산 결합 단백질, 표피 (분화 관련 지질 결합 단백질 LP2)	7.58
LP2 (U55188)	7.58
황체형성 호르몬 베타 서브유니트 프레펩티드	8.30
루트로핀 베타 쇄 전구체 (황체형성 호르몬 베타 서브유니트) (LSH-베타)	8.00
리소자임 C 전구체	7.55
메틸말로네이트-세미알데히드 데히드로게나제 (아실화), 미토콘드리아 전구체 (MMSDH)	8.29
MHC 유형 I 중쇄	6.95
MHC 유형 II	8.37
MHC 유형 II 베타-쇄	6.14
MHC 유형 II DQB 전구체 (AF037315)	6.66
NADH 아드레노독신 옥시도리덕타제, 미토콘드리아 전구체	8.67
NADH 유비퀴논 옥시도리덕타제 30 kD 서브유니트 전구체	6.54
NADH 유비퀴논 옥시도리덕타제 B18 서브유니트 (복합체 I-B18) (CI-B18)	8.35
전활성제 폴리펩티드 전구체 [사포신 A, 사포신 B, (스핑고지질 활성제 단백질 1) 함유]	5.13
프로사포신	5.08
Put. S-항원 C-말단	5.75
RAC-알파 세린/트레오닌 키나제 (단백질 키나제 B)	5.57
Rieske 철-황 단백질 전구체	9.47
S-아데노실메티오닌 데카르복실라제 효소전구체	5.71
스테로이드 11베타-모노옥시게나제 (EC1.14.15.4) 시토크롬 P450 11B1-3 전구체	9.51
스테로이드 11베타-모노옥시게나제 (EC1.14.15.4) 시토크롬 P450 11B1-2 전구체	9.41
타우 단백질 키나제 (EC 2.7.1.135) II 23K 쇄 전구체	9.40
T-세포 수용체 베타 쇄 가변 분절	6.06
UDP-글루코스 6-데히드로게나제	7.51
공포 ATP 신타제 촉매 서브유니트 A, 편재성 이소형	5.42
공포 H ATPase 서브유니트 70 kD	5.47
비타민 D3 수용체	6.18
전압 의존성 칼슘 채널 베타2B 서브유니트	8.36
제타-결정질	8.77

표 3

[0135]

전립선암 조직 전자 데이타베이스로부터 확인한 단백질 및 등전점 분자량(pI)	
단백질	등전점 분자량(pI)
KIAA1160 단백질 [호모 사피엔스]	5.17
S100 칼슘 결합 단백질 A11 (calgizzarin) [호모 사피엔스]	6.56
Bcl-2 결합 성분 6 [호모 사피엔스]	10.12
용질 담체 패밀리 4 중탄산나트륨 보조전달기형 구성원 10 [호모 사피엔스]	6.05
미요신 중쇄 베타-서브유니트	6.75
DRB1 이식 항원 - 사람 (분절)	4.58
포스포디에스테라제 7A [호모 사피엔스]	8.94
핵 자가항원 [호모 사피엔스]	10.61
미토콘드리아 중간 펩티다제 [호모 사피엔스]	6.60
각추 스테로이드 21-히드록실라제 [호모 사피엔스]	7.88
가설의 단백질 DKFZp761G1515.1 - 사람 (분절)	9.35
13 kD 분화-관련 단백질 - 사람 (분절)	8.82
면역글로블린 중쇄 가변 부위 [호모 사피엔스]	8.53
ORF 2~개시 코돈 없음 [호모 사피엔스]	6.25
BM023 [호모 사피엔스]	7.79
PTE1 [호모 사피엔스]	7.68
과산화소체 아실-보조효소 A 티오에스테르 히드롤라제 1(과산화소체 장쇄 아실-coA 티오에스테라제 1) (HIV-Nef 관련 아실 coA 티오에스테라제) (티오에스테라제 II)	7.23
PRO1181 [호모 사피엔스]	10.36
EF-핸드 모티브 2 이소형 b를 갖는 세린/트레오닌 단백질 포스파타제; EF 핸드 2를 갖는 단백질 포스파타제 [호모 사피엔스]	8.60
면역글로블린 중쇄 가변 부위 [호모 사피엔스]	6.08

[0136]

표 4

[0137]

유방암 조직 전자 데이타베이스로부터 확인한 단백질 및 등전점 분자량(pI)	
단백질	등전점 분자량(pI)
양이온성 트립시노겐 [호모 사피엔스]	10.14
쇄 A, Cul1-Rbx1-Skp1-F Boxskp2 Scf 유비퀴틴 리가제 복합체의 구조	6.37
코로닌, 악틴 결합 단백질, 1C; 코로닌, 악틴-결합 단백질, 1C; 코로닌 1C [호모 사피엔스]	6.65
HSPC065 [호모 사피엔스]	5.53
가설의 단백질 DKFZp434N035 [호모 사피엔스]	8.95
가설의 단백질 DKFZp762H186.1 - 사람 (분절)	8.34
면역글로블린 중쇄 제3의 상보성-결정 부위 [호모 사피엔스]	6.43
면역글로블린 중쇄 가변 부위 [호모 사피엔스]	8.91
면역글로블린 중쇄 VHDJ 부위 [호모 사피엔스]	8.98
면역글로블린 람다 경쇄 가변 부위 [호모 사피엔스]	5.82
면역글로블린 경쇄 가변 부위 [호모 사피엔스]	8.68
MHC 유형 II 항원 HLA-DR-베타 3 [호모 사피엔스]	9.12
미토콘드리아 말레이트 데히드로게나제, 전구체 [호모 사피엔스]	8.92
미요신 경쇄 키나제 [호모 사피엔스]	5.52
파라독사나제-3 [호모 사피엔스]	5.24
PDCD6IP 단백질 [호모 사피엔스]	6.13

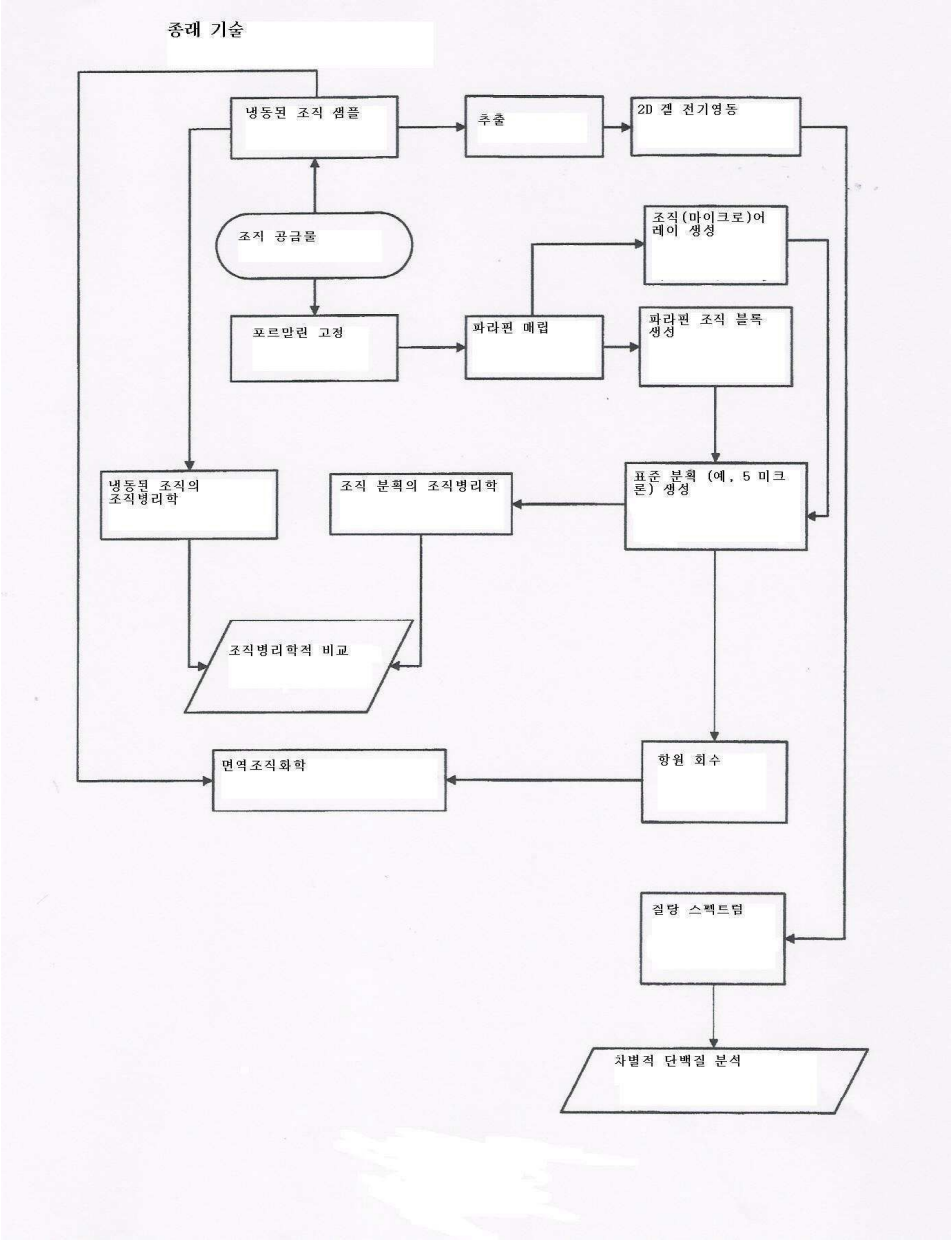
페로몬 수용체 [호모 사피엔스]	9.23
PREDICTED: 골고환 포스파타제와 유사함; 단백질 티로신 포스파타제 수용체 유형 V; 단백질 티로신 포스파타제 수용체 유형 W; 단백질 티로신	5.98
세린 프로테아제 억제제, Kazal 유형 4; 위장 펩티드 [호모 사피엔스]	7.57
유형 XVIII 콜라겐 [호모 사피엔스]	9.26
유비퀴틴-접합 효소 [호모 사피엔스]	7.71
유비퀴틴-접합 효소 E2L 6 이소형 1; 유비퀴틴-단백질 리가제; 유비퀴틴 담체 단백질; 레티노산 유발 유전자 B 단백질 [호모 사피엔스	7.71
미제의 단백질 생성물 [호모 사피엔스]	9.65

[0138] 도 5는 실시예 2의 전립선 암 조직의 현미경 사진이며, 이는 표 3의 단백질 확인 및 도 4에 도시된 질량 스펙트럼에 해당한다. 마찬가지로, 도 7은 실시예 3의 유방암 조직의 현미경 사진이며, 이는 표 4의 단백질 확인 및 도 6에 도시된 질량 스펙트럼에 해당한다.

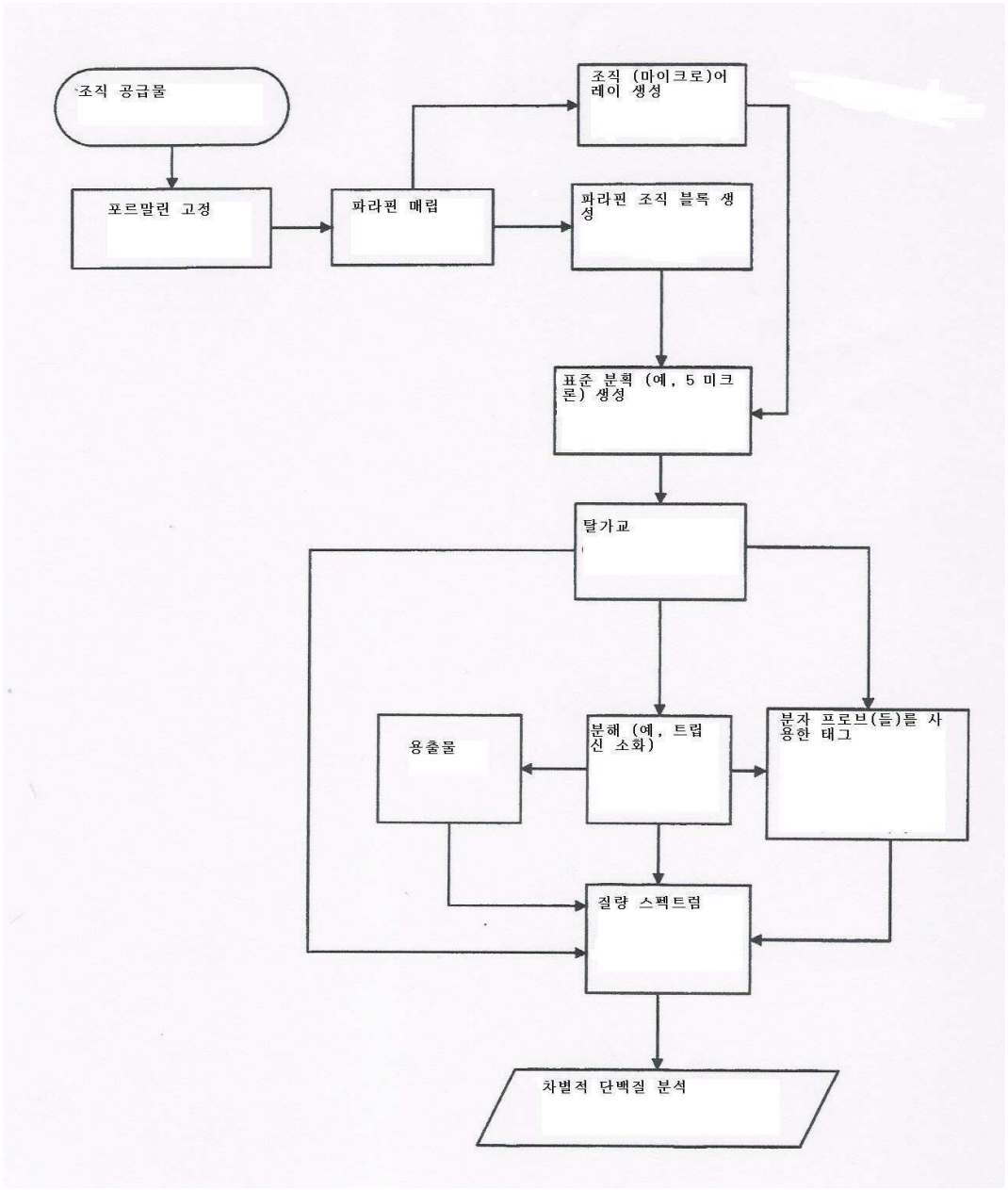
[0139] 본 명세서에서 인용된 특허, 특허 문헌 및 공개는 이들 각각을 개별적으로 인용할 경우에서와 같이 이들 전체를 참조하여 본 명세서에 인용한다. 본 발명의 다양한 변형예 및 수정예는 본 발명의 범위 및 정신으로부터 벗어남이 없이 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명은 본 명세서에서 설명된 예시의 구체예에 의하여 부당하게 한정되지 않으며, 이러한 구체예는 하기에 제시된 청구의 범위에 의하여서만 한정시키고자 하는 것으로 이해하여야 한다.

도면

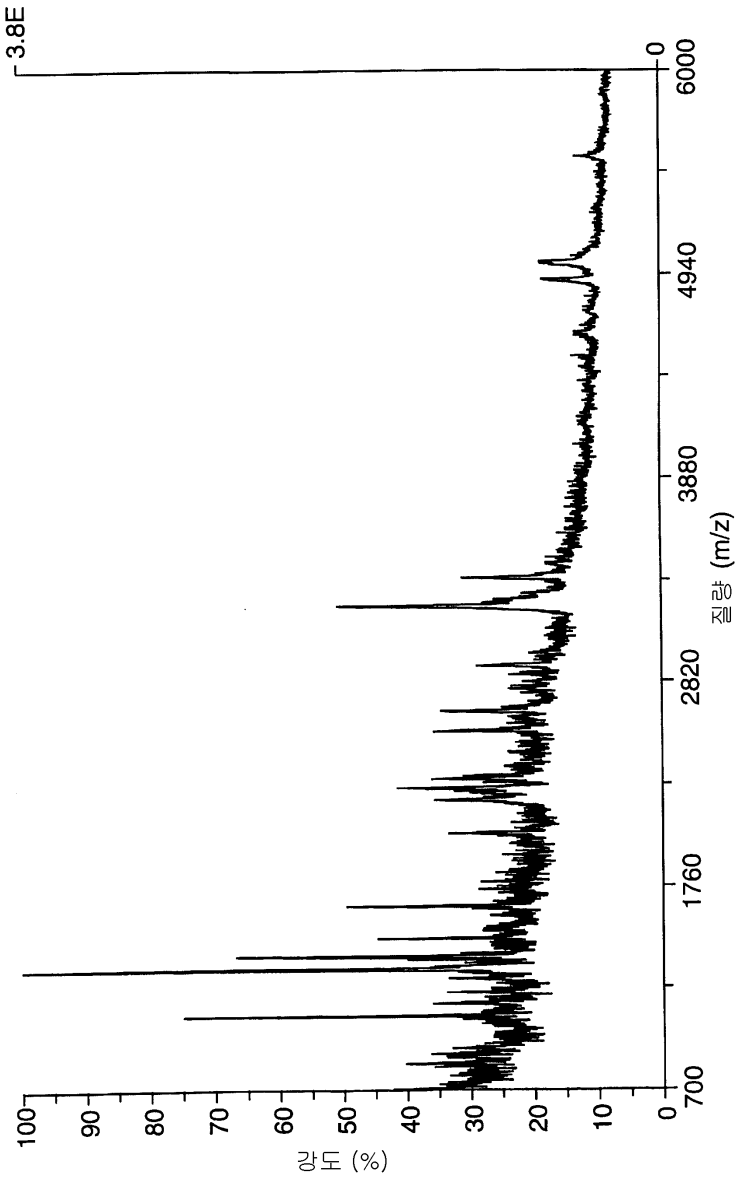
도면1


종래 기술
냉동된 조직 샘플
추출
2D 겔 전기영동
조직 공급물
조직(마이크로)어레이 생성
포르말린 고정
파라핀 매립
파라핀 조직 블록 생성
냉동된 조직의 조직병리학
조직 분획의 조직병리학
표준 분획 (예, 5 미크론) 생성
조직병리학적 비교
면역조직화학
항원 회수
질량 스펙트럼
차별적 단백질 분석

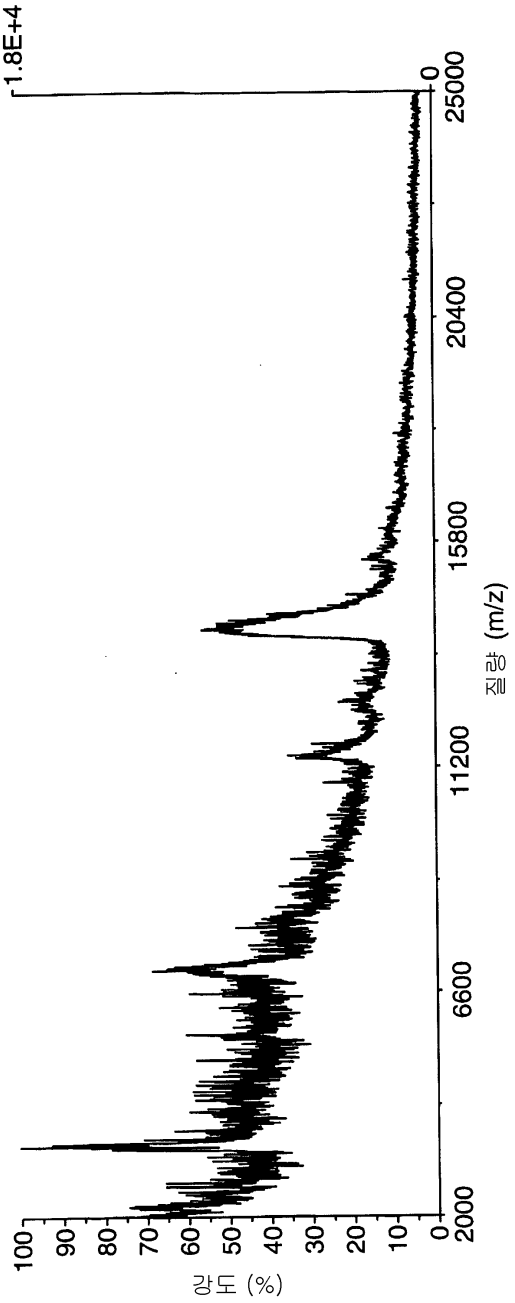
도면2


조직 공급물
포르말린 고정
파라핀 매립
조직 (마이크로)어레이 생성
파라핀 조직 블록 생성
표준 분획 (예, 5 미크론) 생성
탈가교
용출물
분해 (예, 트립신 소화)
분자 프로브(들)를 사용한 태그
질량 스펙트럼
차별적 단백질 분석

도면3


3.8E
0
6000
4940
3880
2820
1760
700
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)

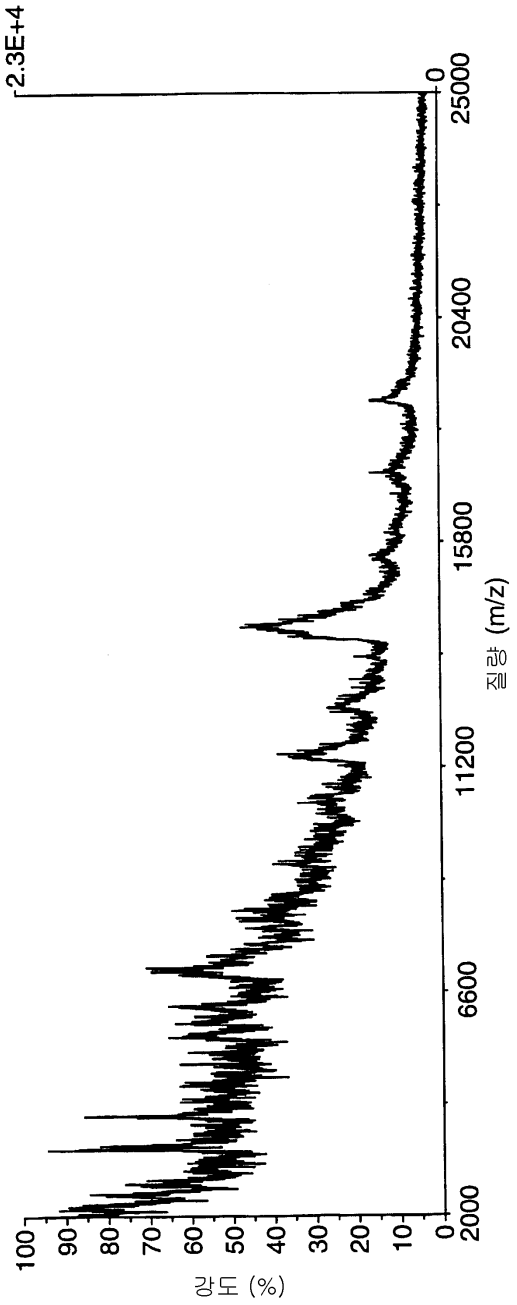
도면4


1.8E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)

도면5



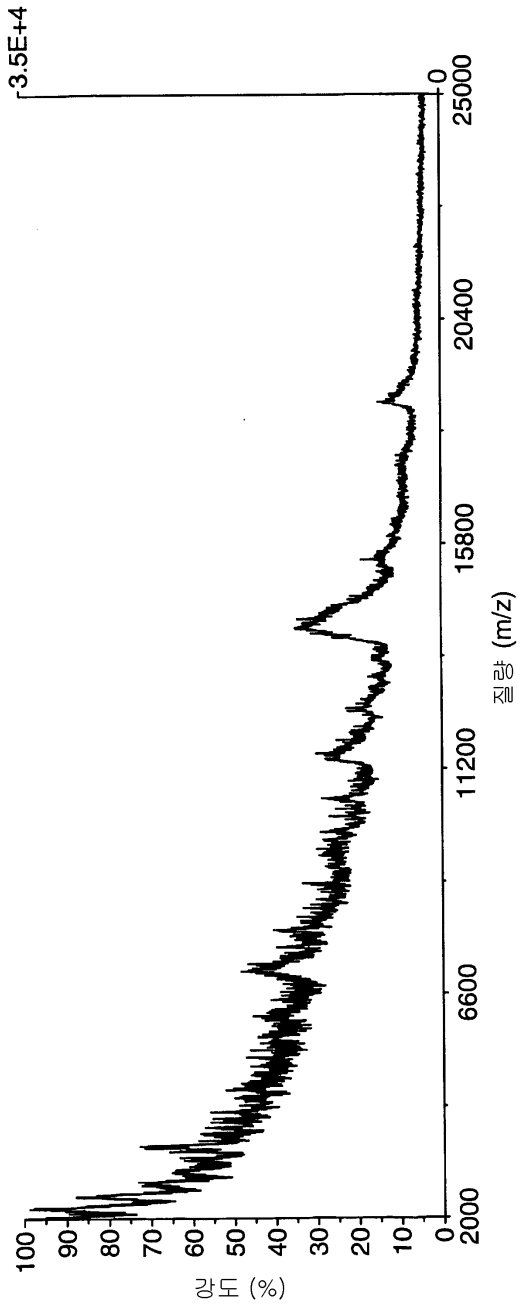
도면6


2.3E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
0
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)

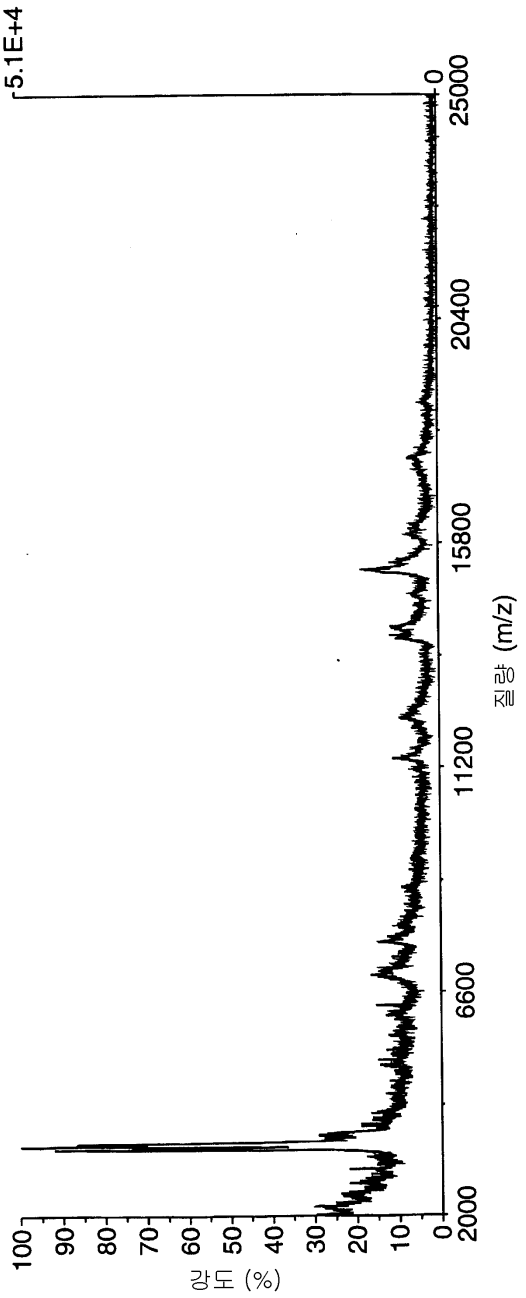
도면7



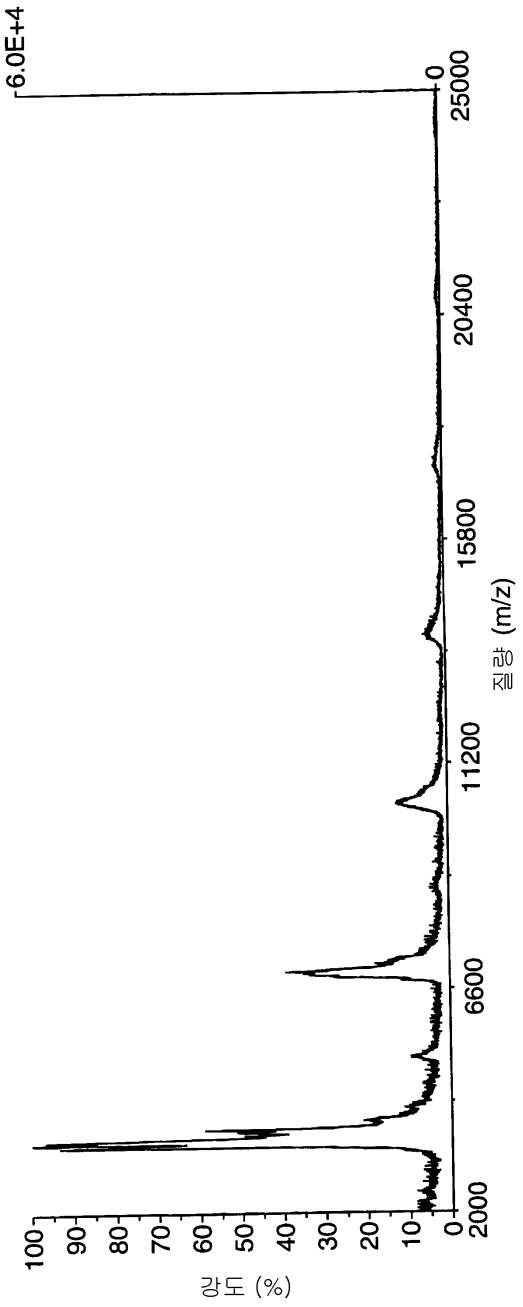
도면8


3.5E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)
질량 (m/z)

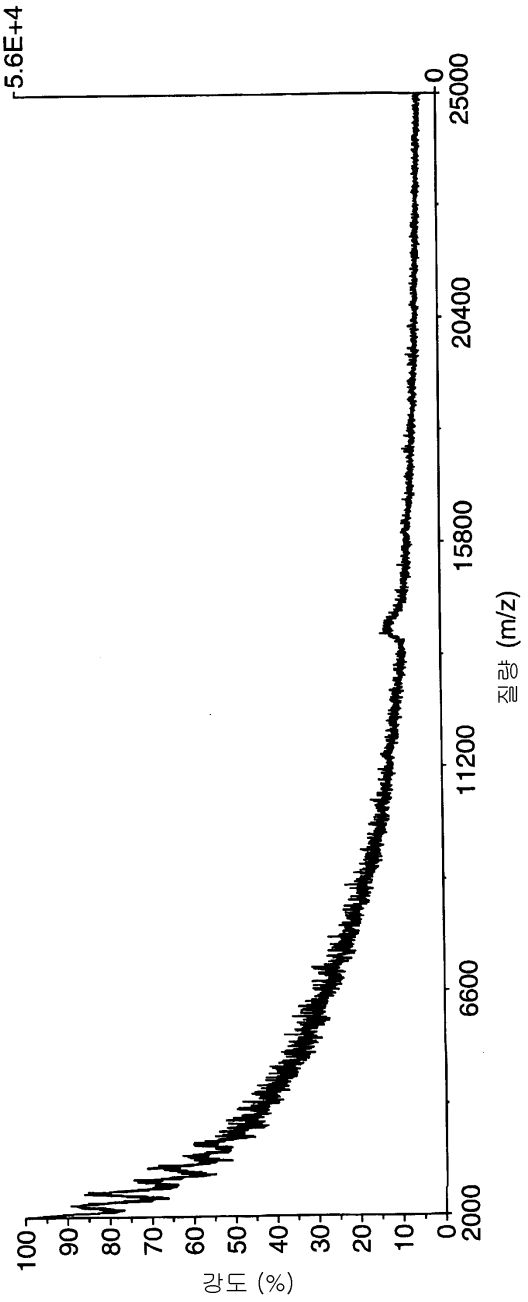
도면9


5.1E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)

도면10


6.0E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)

도면11


5.6E+4
0
25000
20400
15800
11200
6600
2000
질량 (m/z)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
강도 (%)