



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월05일
(11) 등록번호 10-2583603
(24) 등록일자 2023년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57492 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7030162
(22) 출원일자(국제) 2018년03월16일
심사청구일자 2021년02월16일
(85) 번역문제출일자 2019년10월14일
(65) 공개번호 10-2019-0142330
(43) 공개일자 2019년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/056760
(87) 국제공개번호 WO 2018/167312
국제공개일자 2018년09월20일
(30) 우선권주장
17161411.8 2017년03월16일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2017503488 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
유니베르시테 리브레 드 브록셀즈
벨기에 1050 브록셀즈 아베뉴 에프.디. 루스벨
트 50
(72) 발명자
블랑팡, 세드릭
벨기에 1380 오엔 샘메 뒤 물랑 29
소티로폴루, 파나지오타
벨기에 1950 크라이넴 뽀띠 노르망디 9
파츠웬코, 이브제니아
벨기에 1040 브뤼셀 비12 판 마를란트스트라트 5
(74) 대리인
윤의섭, 김수진

전체 청구항 수 : 총 23 항

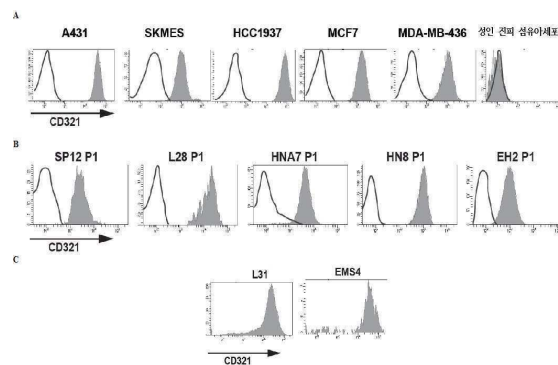
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 CD321 마커의 발현을 기반으로 한 순환 종양 세포의 검출, 정량 및/또는 분리

(57) 요약

본 출원은 순환 종양 세포(CTC)의 유용한 포괄적 마커인 CD321을 개시하고 있으며, 이와 관련된 방법, 그리고 CD321.5의 검출에 의존하는 부품들로 이루어진 키트를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2333/70596 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

G01N 2800/54 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02016118086 A1*

JP2007526761 A*

W02006130737 A1

Justin D Lathia et al, Cell Reports (2014.),
vol 6, no 1, pp 117-129.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

인간 유래 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 검출 또는 정량하고, 선택적으로는 생물 시료로부터 상기 CTC를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은, 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것임]와, 선택적으로 생물 시료로부터 CD321 발현 CTC를 분리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생물 시료는 인간의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비 유체로부터 유래한 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생물 시료는 인간의 말초혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 순환 CD321 양성 종양 세포는 상기 세포에 의한 범-백혈구 마커 적어도 하나 및 혈소판 마커 적어도 하나의 발현 비진행에 의해 비조혈세포인 것으로 동정되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

- a) 인간으로부터 유래하는 생물 시료를 제공하는 단계로서, 상기 생물 시료는 인간으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 단계;
- b) 적어도 하나의 범-백혈구 마커에 대해 음성이고, 적어도 하나의 혈소판 마커에 대해 음성인, 비조혈세포를 상기 생물 시료 중에서 검출하는 단계;
- c) b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계로서, b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생물 시료는 인간의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 또 다른 삼출물이나 분비 유체를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생물 시료는 인간의 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

- a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;

- e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는
- f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 종양은 고형 종양인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 종양은 상피, 간엽 또는 멜라닌세포 기원의 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 CD321의 발현을 검출하는 단계는 CD321 단백질 또는 CD321 mRNA 또는 이 둘 다를 검출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 CTC는 CD321에 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 사용하는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 기술은 적어도 하나의 범-백혈구 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 적어도 하나의 혈소판 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 추가로 이용하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 방법은 분리된 CTC, 이의 용해물 또는 이의 종양 항원 하나 이상을 종양 백신으로 제제화하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 종양 백신은 수지상 세포를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 방법은 상기 분리된 CTC를 생화학적 분석, 돌연변이 분석, 전사체 분석 및/또는 단백질 분석의 대상이 되게 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및

범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 19

CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및

혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 20

CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상;

범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및

혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 21

제20항에 있어서,

a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;

e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는

f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a

인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 22

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 제제는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술에 사용되도록 구성된 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 23

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 스캐폴드 또는 앵타머인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대상체 내에서 종양 세포, 더욱 구체적으로 순환 종양 세포(Circulating Tumor Cell; CTC)를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 방법, 신생물 형성 질환의 진단, 예후 또는 모니터링(monitring)을 위한 방법, 그리고 이러한 방법을 수행하기에 유용한 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 세포의 검출, 정량 또는 분리는 대상체 내에서 신생물 형성 질환의 특성규명, 진단, 예후 또는 모니터링을 도울 수 있다. 분리된 종양 세포는 또한 신생물형성 질환의 연구와, 종양 백신의 제조에 유용한 도구를 제공할 수도 있다.

[0003] 원발성 종양을 떠나서 순환계로 침투한 종양 세포는 순환 종양 세포(CTC)로서 공지되어 있다. CTC의 일부는 원위에 있는 부위에 침투하여 들어가, 2차 장기, 예컨대 간, 뼈 또는 폐에 파종성 종양 세포(disseminated tumor cell; DTC)로서 자리잡을 수 있으며, 이 DTC의 일부는 전이되는 방향으로 진행될 수 있다. 순환계 내 종양 세포를 검출, 정량 또는 분리하는 것은, 치료법에 반응하여 암이 진행되는지 여부와 전이의 잠재성을 추적하기 위한 최소한으로 침습적인 수단을 제공하는, 암 질환 관리에 매우 유의미하다.

[0004] 상피 세포 부착 분자(Epithelial Cell Adhesion Molecule; EpCAM)는 현재 CTC를 동정하는데 사용되는 표준 마커이다. 예를 들어 상업적으로 이용 가능한 Veridex CellSearch® CTC 검정법은 항 EpCAM 항체에 접합된 자성 입자를 사용하여, 혈액으로부터 CTC를 잡아낸다. 증량된 세포는, 유핵 세포를 동정하기 위해 DAPI, 즉 핵산 염료로 염색되고, 상피 기원의 세포를 동정하기 위해 피코에리트린(PE)에 접합된 항시토크라틴 항체로 염색되며, 모든 백혈구를 동정하기 위해 알로피코시아닌(APC)에 접합된 항백혈구 항체로 염색된다. 시료들은 CTC 계수를 위해 CellTracks Analyzer II®에서 분석된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 종양 세포, 구체적으로 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 대안적이고/대안적이거나 개선된 방법을 고안하여, 특히 대상체 내 신생물 형성 질환의 특성규명, 진단, 예후 또는 모니터링을 위한 대안적이고/대안적이거나 개선된 방법을 달성할 수 있도록 하는 것에 대한 필요성을 다루고 있다.

[0006] 본 발명의 임의의 대표적인 구현예들을 설명하고 있는 실험 섹션에 의해 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은 종양 및 CTC를 검출하는데 사용되었던 종래의 마커, 예컨대 EpCAM 또는 케라틴(Keratin)이 사실은 단지 암세포의 하위집단에 의해서만 발현됨을 증명하였다. 결과적으로 이러한 종래의 마커들을 기반으로 한 종양 세포 및 CTC 검출 방법은 종양 세포나 CTC의 존재를 검출하는데 실패할 수 있거나, 또는 적어도 시료 중 종양 세포 또는 CTC의 양을 유의미하게 적게 정량해낼 수 있다. 이와 유사하게, 이러한 종래 마커들을 기반으로 하는 현장 검출 방법은 종양의 완벽하고 정확한 시각화를 제공하는데 실패할 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 다수의 암세포주, 환자 유래 이종 이식편 및 원발성 종양에 대하여 광범위한 분석을 수행하였으며, 그 결과 CD321이 암세포에 의해 널리 발현되었고, 전통적 마커, 예컨대 EpCAM 또는 케라틴-14보다 더 보편적으로 발현되었음을 확인하였다. 따라서 예시적 종양 내 EpCAM-양성 세포 및 케라틴-14-양성 세포 모두는 CD321도 함께 발현하였던 반면에, 종양 세포들 중 상당 비율만큼은 CD321은 발현하였으나 EpCAM 및 케라틴-14는 발현하지 않았다. 게다가 본 발명자들은, CD321 발현은 CTC에서 확실하게 유지되었던 반면에 CTC에서 EpCAM 발현은 종종 이루어지지 않을뿐더러 훨씬 더 가변적이었음을 입증하였다. 그러므로 유리하게 CD321은, 종양 세포 자체의 상피-간엽 이행(EMT) 상태와는 독립적으로, 종양 세포, 더욱 구체적으로는 CTC의 동정을 허용하였는데, 이 점은 단독으로 사용되는 상피 마커, 예컨대 EpCAM, 간엽 마커 또는 특이적 EMT 마커에 비하여, CD321이 암세포, 특히 CTC에 대해 더욱 신뢰할 수 있고/신뢰할 수 있거나 감수성이 뛰어난 마커로서 자리잡게 만들었다.

[0008] 그러므로 본 발명자들의 데이터는 CD321이 실질적으로 종양 세포, 더욱 구체적으로는 고형 종양의 보편적이거나 포괄적인 마커, 구체적으로 CTC 검출 및 암의 현장 검출을 위한 믿을 수 있는 마커임을 확인시켜주었다.

- [0009] 그러므로 한 양태에서, 본 발명은 대상체로부터 유래한 생물 시료 중 종양 세포를 검출 또는 정량하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0010] 추가의 양태는, 대상체로부터 유래하는 생물 시료로부터 종양 세포를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계, 그리고 생물 시료로부터 CD321 발현 종양 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0011] 또 다른 양태는 대상체로부터 유래하는 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 검출 또는 정량하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계를 포함하되, 다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것인 방법을 제공한다.
- [0012] 추가의 양태는, 대상체로부터 유래하는 생물 시료로부터 순환 종양 세포(CTC)를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜 주는 것임], 생물 시료로부터 CD321 발현 CTC를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0013] 추가의 양태들은, 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법을 포함하는 방법들로서, 구체적으로
- [0014] - 대상체에서 신생물 형성 질환을 진단, 예후 또는 모니터링하기 위한 방법;
- [0015] - 대상체에서 신생물 형성 질환의 전이 잠재성을 확정하기 위한 방법[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 신생물 형성 질환이 전이 잠재성을 가짐을 확인시켜 주는 것임];
- [0016] - 대상체에서 신생물 형성 질환의 재발 여부를 확정하기 위한 방법[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 신생물 형성 질환이 재발되었음을 확인시켜 주는 것임];
- [0017] - 대상체가 항암 요법을 필요로 하는지 여부를 확정하기 위한 방법[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 대상체가 항암 요법을 필요로 함을 확인시켜 주는 것임]; 또는
- [0018] - 신생물 형성 질환이 발병한 대상체에서의 항암 요법의 효능을 확정하기 위한 방법으로서, 치료법 이전 및 도중 또는 이후에 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계[다만 치료법 도중이나 이후의 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 양의, 치료법 이전의 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 양에 비한 감소는 상기 치료법이 유효한 것임을 확인시켜 주는 것임]를 포함하는 방법
- [0019] 을 제공한다.
- [0020] 본원에 교시된 바와 같은 방법을 수행하는데 유용한 부품들로 이루어진 키트도 또한 제공된다.
- [0021] 그러므로 한 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0022] 또 다른 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0023] 추가의 또 다른 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상, 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상, 그리고 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체 내 종양을 현장에서 영상화하기 위한 방법으로서, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제를 대상체에 투여하는 단계[다만 상기 제제는 영상화 기법에 의해 검출 가능한 표지를 포함함], 상기 제제가 종양 세포에 의해 발현된 CD321과 특이적으로 결합하는 것을 허용하는 단계, 그리고 상기 영상화 기법을 이용하여 대상체 내 종양을 시각화하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 이와 같은 양태들과 추가의 양태들, 그리고 바람직한 구현예들이 이하 섹션 및 첨부된 특허청구범위에 기술되어 있다. 첨부된 특허청구범위의 특허 대상은 본원에서 본 명세서에 구체적으로 인용되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 CD321이 세포주, 환자 유래 이종 이식편(Patient-Derived Xenograft; PDX) 및 원발성 종양에서 균일하게 발현됨을 보여주고 있다. A: 유표피 암종 유래 세포주(A431), 폐 편평세포암종 유래 세포주(SKMES), 그리고

유선암 유래 세포주(HCC1937, MCF7, MBA-MD-436)는 CD321을 높은 수준으로 균일하게 발현하였던 반면에(속이 채워진 히스토그램), 성인 진피 섬유아세포는 CD321을 발현하지 못하였다. FACS 플롯은 단일 생세포 내에서 게이팅(gating)되었다. 속이 빈 히스토그램은 이소타입 대조군(isotype control)에 의한 염색을 시사한다. B: 1차 계대배양시 환자의 피부 유래 이중 이식편(SP12 P1), 폐 유래 이중 이식편(L28 P1), 두경부 유래 이중 이식편(HNA7 P1 및 HN8 P1), 그리고 식도암 유래 이중 이식편(EH2 P1)은 CD321을 균일하게 발현하였다(속이 채워진 히스토그램). FACS 플롯은 마우스 및 인간 기원의 면역 세포와 내피세포가 배제된 후 생세포 내에서 게이팅되었다. 속이 빈 히스토그램은 이소타입 대조군에 의한 염색을 시사한다. C: 폐암 유래 인간 원발성 종양(L31) 및 식도암 유래 인간 원발성 종양(EMS4) 내 CD321 발현. 플롯은 면역 세포와 내피세포, 그리고 대다수의 암 연관 섬유아세포가 배제된 후 생세포 내에서 게이팅되었다.

도 2는 CD321이, 전통적인 상피 마커 EpCAM에 비하여 더 높은 감수성으로 종양 세포를 표지화함을 보여준다. 피부암(A), 폐암(B) 및 두경부암(C)의 원발성 종양 유래 CD321+EpCAM+ 및 CD321+EpCAM- 종양 세포들의 대표적 FACS 플롯(상부 패널)과, 이들 세포 각각의 정량 결과(하부 패널). 보통 암세포를 동정하는데 사용되었던 전통적 상피 마커 EpCAM는 항상 CD321과 함께 공동 편재화되는 반면, CD321은 모든 경우에 훨씬 더 많은 수의 세포를 표지화하는데, 이 점은 CD321이 전통적 상피 세포 마커인 EpCAM보다 종양 세포를 더 큰 감수성으로 검출해낼 수 있음을 입증하는 것이다. 플롯은 면역 세포와 내피세포, 그리고 대다수의 암 연관 섬유아세포가 배제된 후 단일 생세포 내에서 게이팅되었다.

도 3은 CD321이 전통적 상피 마커인 케라틴-14보다 종양 세포를 더욱 큰 감수성으로 동정할 수 있도록 허용함을 보여준다. 두경부, 폐 및 피부 종양의 절편에 존재하는 CD321 및 케라틴-14의 대표적 면역형광 영상. 케라틴-14는 항상 CD321과 공동 편재화되는 반면에, CD321은 더 높은 비율의 암세포에서 발현되었음을 주목한다.

도 4는 CD321이, 종양 세포의 상피-간엽 이행(EMT) 상태와는 독립적으로 종양 세포의 동정을 허용함을 보여준다. A: 원발성 폐 SCC 유래 종양 상피 세포(CD321+EpCAM+, 게이트 P5) 및 종양 간엽 세포(CD321+EpCAM-, 게이트 P6)의 단리에 사용되었던 FACS 전략. 종양 세포는 면역 세포와 내피세포, 그리고 암 연관 섬유아세포 대다수가 배제된 후에 선택되었음을 주목한다. B 및 C: (A)에 기술된 바(CD321+EpCAM- 및 CD321p+EpCAM+ 종양 세포와 같은 하위집단을 단리하기 위한 FACS 전략은 면역 내피세포와 대다수의 암 연관 섬유아세포를 배제한 후 단일 생세포에 대해 게이팅됨)와 같은, 그리고 각각의 집단의 RNA 서열결정에 의해 추정되는 바와 같은, FACS 분취 CD321+EpCAM- 및 CD321p+EpCAM+ 종양 세포 내에서 발현되는 유전자의 상대적 발현.

도 5는 CD321이 EpCAM보다 감수성이 더 큰 순환 종양 세포(CTC) 동정을 허용함을 보여준다. A: 정상 공여 개체의 말초 혈액과, 유방암 또는 폐암이 발병한 환자의 말초 혈액의 CD321 염색 및 EpCAM 염색 결과에 대한 대표적 FACS 플롯. 플롯은 면역 세포와 혈소판을 배제한 후 단일 생세포 내에서 게이팅되었다. EpCAM+ 세포는 항상 CD321+이었던 반면에, CD321은 또한 EpCAM으로 마킹(marking)되지 않은 또 다른 세포를 표지화하였음을 주목한다. B: 인간 폐 다형성 암종이 이식된 마우스(검정 막대) 및 이식되지 않은 마우스(흰색 막대)의 말초 혈액 및 폐 조직 중 종양 세포로서, (마우스 세포를 인지하지 못하는) 인간 CD321로 염색된 종양 세포의 존재를 나타내는 히스토그램. CD321 면역염색의, 인간 기원의 암 순환 세포와 폐 전이 둘 다를 검출하는 능력을 주목한다.

도 6은 CD321이 세포주, 환자 유래 이중 이식편(PDX) 및 원발성 종양 내에서 균일하게 발현됨을 보여준다. a: 이소타입 대조군과 성인 진피 섬유아세포는 CD321에 염색되지 않는다. b ~ d: 결장직장암세포주(b), 유방암세포주(c) 및 폐암세포주(d)는 CD321을 높은 수준으로 균일하게 발현한다(속이 채워진 히스토그램). e 및 f: 흑색종 세포주는 CD321을 낮은 수준으로 균일하게 발현한다. g: 자궁내막암종, 식도암종, 외음부암종 및 피부암종 세포주는 CD321을 높은 수준으로 균일하게 발현한다. FACS 플롯은 단일 생세포 내에서 게이팅된다. h: 1차 계대배양시 상이한 유형의 암 환자 유래 이중 이식편은 CD321을 균일하게 발현한다(속이 채워진 히스토그램). FACS 플롯은 마우스와 인간 기원의 면역 세포 및 내피세포 배제 후에 생세포 내에서 게이팅된다. i: 원발성 폐암종 및 식도암종은 CD321을 높은 수준으로 발현한다(속이 채워진 히스토그램). FACS 플롯은 면역 세포와 내피세포, 그리고 대다수의 암 연관 섬유아세포 배제 후에 단일 생세포 내에서 게이팅된다. 속이 빈 히스토그램은 이소타입 대조군에 의한 염색을 시사한다.

도 7은 CD321이, 전통적 상피 마커인 EpCAM에 비하여 더 높은 감수성으로 종양 세포를 표지화함을 보여준다. a ~ c: CD321+EpCAM+ 및 CD321+EpCAM- 종양 세포가 존재함을 보여주는 폐암종 및 두경부 암종의 대표적 FACS 플롯. 이는, CD321이 전통적 상피 세포 마커인 EpCAM에 비하여 종양 세포를 더 높은 감수성으로 검출할 수 있음을 입증한다. 플롯은 면역 세포 및 내피세포, 그리고 대다수의 암 연관 섬유아세포 배제 이후에 단일 생세포 내에서 게이팅된다. d: CD321+EpCAM+ 종양 세포 및 CD321+EpCAM- 종양 세포가 존재함을 보여주는 폐암 환자 유래 이

중 이식편의 대표적 면역형광 영상.

도 8은 CD321이, 인간 대상체 내 순환 종양 세포(CTC)의 감수성 동정을 허용함을 보여준다. a: 건강한 인간 공여 개체와, 유방암, 폐암 및 결장직장암 인간 환자에 있어서 CD321+ 순환 종양 세포의 수를 보여주는 점 도표. 평균 \pm SEM. CD321+ 순환 종양 세포는 적혈구 용해 및 면역 세포와 혈소판 배제 이후에 단일 생세포를 대상으로 한 게이팅으로 계수되었다. b: 건강한 공여 개체와, 상이한 병기의 폐암 인간 환자에 있어서 CD321+ 순환 종양 세포의 수를 보여주는 점 도표로서, 이 점 도표는 순환 CD321+ 세포의 수와 병기 사이에 강력한 상관관계가 있음을 보여준다. 평균 \pm SEM. CD321+ 순환 종양 세포는 적혈구 용해 및 면역 세포와 혈소판 배제 이후에 단일 생세포를 대상으로 한 게이팅으로 계수되었다. c: 진행된 유방암 인간 환자의 항암 요법 이전과 이후에 있어 CD321+ 순환 종양 세포의 수를 보여주는 점 도표로서, 이 점 도표는 CD321+ 순환 종양 세포 수와 치료법에 대한 반응 사이의 상관관계를 보여준다. CD321+ 순환 종양 세포는 적혈구 용해 및 면역 세포와 혈소판 배제 이후에 단일 생세포를 대상으로 한 게이팅으로 계수되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태를 나타내는 "한", "하나의" 및 "본"은, 내용 중 명백히 달리 명시되지 않는 한, 단수인 지시대상과 복수인 지시대상 둘 다를 포함한다.
- [0028] 본원에서 사용된 바와 같은 "~를 포함하는(comprising)", "~를 포함하다(comprise(s))" 및 "~으로 구성된(compried of)"이란 용어들은 "~를 포함하는(including)", "~를 포함하다(include(s))" 또는 "~를 함유하는(containing)", "~를 함유한다(contain(s))"와 동의어로 사용되고 있고, 포괄적이거나 제약을 두지 않는 용어로서, 추가의 인용되지 않은 일원, 요소 또는 방법 단계를 배제하는 것은 아니다. 상기 용어들은 또한 특허 용어들 중 잘 정립되어 있는 의미를 가지는, "~으로 이루어진(consisting of)"과 "본질적으로 ~으로 이루어진(consisting essentially of)"을 포함한다.
- [0029] 한계치들에 의한 수치 범위의 인용에는, 각각의 범위 안에 포함되는 모든 수치 값과 소수점 값들뿐만 아니라, 인용된 한계치들도 포함된다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같은 "약" 또는 "대략적으로"란 용어는, 측정 가능한 값, 예컨대 매개변수, 양 및 시간으로 표현되는 지속기간 등을 지칭할 때, 명시된 값의, 그리고 명시된 값으로부터의 변화량, 예컨대 이러한 변화량이 개시된 발명에서 실현되기 적당한 한, 명시된 값의, 그리고 명시된 값으로부터의 $\pm 10\%$ 이하만큼의 변화량, 바람직하게는 $\pm 5\%$ 이하만큼의 변화량, 더욱 바람직하게 $\pm 1\%$ 이하만큼의 변화량, 그리고 더더욱 바람직하게 $\pm 0.1\%$ 이하만큼의 변화량을 포함하는 것으로 여겨진다. 수식이 "약"이 지칭하는 값은 또한 그 자체로서 구체적으로, 그리고 바람직하게 개시되어 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 어떤 일원들의 군 중 하나 이상의 일원, 또는 적어도 하나의 일원에서와 같이 "하나 이상" 또는 "적어도 하나"란 용어는 추가의 예시를 통해 그 자체로서 명백해지는 반면에, 이 용어는 특히 상기 일원들 중 임의의 하나, 또는 상기 일원들 중 임의의 2개 이상인 대상으로서, 상기 일원들 중 임의의 것 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 7개 이상 등과, 상기 일원들 모두까지라도 포함한다. 다른 예에서, "하나 이상" 또는 "적어도 하나"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 이 이상을 지칭할 수 있다.
- [0032] 본원의 발명에 대한 배경기술에 관한 논의는 본 발명의 내용을 설명하기 위해 포함된다. 이는, 예시된 재료 중 임의의 것이 특허청구범위 중 임의의 청구항에 대한 우선권 일자로 임의의 국가에서 통상 일반적인 지식 또는 그의 일부로서 공개 또는 공지되어 있음을 자인하는 것으로 받아들여져서는 안된다.
- [0033] 본 개시내용 전반에 걸쳐 다양한 공보, 특허 및 공개된 특허 명세서에 의해 언급되고 있다. 본 명세서에 인용된 모든 문서는 본원에 전체로서 참조로 인용되어 있다, 구체적으로 본원에 구체적으로 언급된 이러한 문헌들의 교시내용 또는 섹션들은 참조로 인용되어 있다.
- [0034] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명을 개시함에 있어 사용된 모든 용어들, 예컨대 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 당 업자에 의해 보통 이해되는 바와 같은 의미를 가진다. 용어의 정의는 추가의 안내에 의해 본 발명의 교시를 더 잘 이해시키기 위해 포함되어 있다. 특정 용어들이 본 발명의 특정 양태 또는 본 발명의 특정 구현예와 연계되어 정의될 때, 그 함축된 의미는 본 명세서 전반, 즉 달리 정의되지 않는 한 본 발명의 기타 양태들 또는 구현예들에 관한 내용 전반에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0035] 이하 문단들에 본 발명의 상이한 양태들 또는 구현예들이 더욱 상세히 정의되어 있다. 이처럼 정의된 양태 또는 구현예 각각은 달리 반대되게 명시되지 않는 한 임의의 다른 양태(들) 또는 구현예(들)와 합하여질 수 있다. 특

히 바람직하거나 유리하다고 시사된 임의의 특질은 바람직하거나 유리하다고 시사된 또 다른 임의의 특질 또는 특질들과 합하여질 수 있다.

- [0036] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예", "한 구현예"가 지칭하는 바는, 구현예와 연계되어 기술된 구체적인 특질, 구조 또는 특징이 본 발명의 구현예 적어도 하나에 포함됨을 의미한다. 그러므로 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예에서" 또는 "한 구현예에서"와 같은 어구의 출현은 모두 반드시 동일한 구현예를 지칭하기 위한 것은 아니지만, 그럴 수도 있긴 하다. 게다가 특정의 특질, 구조 또는 특징은 하나 이상의 구현예들에서 본 발명의 분야의 당 업자에게 명백할 바와 같은 임의의 적합한 방식으로 합하여질 수 있다. 뿐만 아니라 본원에 기술된 몇몇 구현예들은, 당 업자들에 의해 이해될 바와 같이, 다른 구현예들에 포함된 일부 특질들은 포함하되 그 외의 다른 특질들은 그렇지 않는 반면에, 상이한 구현예들의 특질의 조합은 본 발명의 범위 내에 있고, 다른 상이한 구현예들을 이를 것으로 여겨진다. 예를 들어 첨부된 특허청구범위에 있어서, 청구된 구현예들 중 임의의 것은 임의의 조합을 이루며 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 임의의 대표적 구현예들을 기술하는 실험 섹션에 의해 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은 CD321이 종양 세포의 실질적으로 보편적이거나 포괄적 마커, 구체적으로는 CTC 검출 및 암의 현장 검출을 위한 믿을 수 있는 마커임을 확인하였다.
- [0038] 그러므로 한 양태에서, 본 발명은 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포를 검출 또는 정량하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0039] 추가의 양태는, 대상체 유래 생물 시료로부터 종양 세포를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계와, 생물 시료로부터 CD321 발현 종양 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0040] 그러므로 종양 세포에 대한 생물마커, 구체적으로는 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포를 검출 또는 정량하는데 유용하거나, 또는 대상체 유래 생물 시료로부터 종양 세포를 분리하는데 유용한 생물마커로서의 CD321의 용도도 또한 제공된다.
- [0041] 또 다른 양태는 대상체 유래 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 검출 또는 정량하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜 주는 것임]를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0042] 추가의 양태는 대상체 유래 생물 시료로부터 CTC를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜 주는 것임], 생물 시료로부터 CD321 발현 CTC를 분리하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0043] 그러므로 CTC에 대한 생물마커, 구체적으로 대상체 유래 생물 시료 중 CTC를 검출 또는 정량하거나, 또는 대상체 유래 생물 시료로부터 CTC를 분리하는데 유용한 생물마커로서의 CD321의 용도도 또한 제공된다.
- [0044] 추가의 양태는 대상체 내 신생물 형성 질환을 진단, 예후 또는 모니터링하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법들 중 임의의 방법 하나에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0045] 추가의 양태는 대상체 내 신생물 형성 질환의 전이 잠재성을 확정하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법들 중 임의의 방법 하나에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 신생물 형성 질환이 전이의 잠재성을 가짐을 확인시켜 주는 것임]를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0046] 추가의 양태는 대상체 내 신생물 형성 질환의 재발을 확정하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법들 중 임의의 방법 하나에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 신생물 형성 질환이 재발되었음을 확인시켜 주는 것임]를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0047] 추가의 양태는 대상체가 항암 요법이 필요한지 여부를 확정하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법들 중 임의의 방법 하나에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계[다만 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 해당 대상체가 항암 요법을 필요로 함을 확인시켜 주는 것임]를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0048] 추가의 양태는 신생물 형성 질환이 발병한 대상체 내 항암 요법의 효능을 확정하기 위한 방법으로서, 해당 치료법을 수행하기 이전과 수행하는 도중, 또는 수행한 이후에 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 전술된 방법들 중 임의의 방법 하나에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 방법[다만 해당 치료법을 수행하는 도중이나 수행한 이후가, 해당 치료법을 수행하기 이전에 비하여 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 양이 (예컨대 시료의 주어진 중량이나 부피당 측정될 때) 감소함은 상기 치료법이 유효함을 확인시켜 주는 것임]을 제공한다.
- [0049] 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하기 위한 본 방법은, 생물 시료 중 상기 종양 세포 또는 CTC의 존재 또는 부재를 확정, 측정 또는 입증하거나, 또는 그러한 결론을 내리거나 그러한 함을 확인하는 것을 허용한다. 본 방법은 질적 결과[예를 들어 시료 중 종양 세포 또는 CTC가 '존재한다' 아니면 '부재한다', 또는 '검출된다' 아니면 '검출되지 않는다'에 대한 결론]를 제공할 수 있다. 본 방법은 또한 양적인 결과[예를 들어 시료 중 검출된 종양 세포 또는 CTC의 총수, 주어진 시료 중량 또는 부피당 검출된 종양 세포 또는 CTC의 수, 또는 시료에 포함된 모든 (유효) 세포를 기준으로 한 종양 세포 또는 CTC의 비율]를 제공할 수 있다.
- [0050] 본 방법은 또한 종양 세포 또는 CTC를 생물 시료로부터 분리하는 것을 허용할 수 있다. 본 명세서 전반에 걸쳐 조성물 또는 혼합물(예컨대 생물 시료)의 특정 성분(예컨대 종양 세포 또는 CTC)을 지칭할 때 사용되는 바와 같은 "단리"란 용어는, 이러한 성분이 해당 조성물 또는 혼합물의 기타 성분 하나 이상 또는 (실질적으로) 모두로부터 분리되도록 만드는 방법 또는 기술을 포함한다. 이 용어는, 절대적인 순도를 필요로 하지 않는다. 그 대신 어떤 성분의 단리는, 다른 성분 하나 이상 또는 모두에 비한 해당 성분의 존재비가 출발 조성물 또는 혼합물에서보다 훨씬 큰 독립된 환경을 만들 것이다. 독립된 환경은, 예컨대 단일 용액, 분산액, 겔, 침전물 등과 같은 단일 매질을 나타낼 수 있다. 그러므로 종양 세포 또는 CTC의 생물 시료로부터의 단리는 특히 생물 시료 중에 포함된 다른 세포 모두에 비한 종양 세포 또는 CTC의 존재비를 증가시킬 수 있다. 예를 들자면, 종양 세포 또는 CTC의 생물 시료로부터의 단리는 세포 집단을 산출할 수 있는데, 이 경우 종양 세포 또는 CTC는 상기 세포 집단을 이루는 모든 세포의 (수를 기준으로) 적어도 50%, 예컨대 상기 세포 집단을 이루는 모든 세포의 적어도 55%, 바람직하게 적어도 60% 또는 적어도 65%, 더욱 바람직하게 적어도 70% 또는 적어도 75%, 더욱 바람직하게 적어도 80% 또는 적어도 85%, 그리고 더욱 바람직하게 적어도 90% 또는 적어도 95%, 그리고 더욱더 바람직하게 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 심지어 100%를 이룬다.
- [0051] 종양 세포 또는 CTC를 검출, 정량 또는 단리하는 작업은 별도로 또는 임의의 조합을 이루며(순차적으로 또는 동시에) 수행될 수 있거나, 또는 별도로 수행될 수 없다. 예를 들자면 시료 중 종양 세포 또는 CTC를 정량하도록 구성된 방법은 또한 시료 중 상기 종양 세포 또는 CTC의 존재 또는 부재를 반드시 검출하기도 하여야 한다. 다른 예에서, 시료로부터 종양 세포 또는 CTC를 단리하도록 구성된 방법은 또한 시료 중 상기 종양 세포나 CTC의 존재 또는 부재를 반드시 검출하여야 하고, 선택적으로는 단리된 종양 세포 또는 CTC를 정량하는 것을 허용할 수 있다.
- [0052] "신생물 형성 질환"이란 용어는, 일반적으로 (주변 정상 조직을 침습하지 않고, 전이를 일으키지 않는) 양성이든, 전악성(전암성)이든, 또는 (인접 조직을 침습하고, 전이를 일으킬 수 있는) 악성이든 간에, 신생물 형성 세포 성장 및 증식에 의해 특징지어지는 임의의 질환 또는 장애를 지칭한다. 신생물 형성 질환이란 용어는, 일반적으로 형질변형된 세포 및 조직 모두와, 암성 세포 및 조직 모두를 포함한다. 신생물 형성 질환 또는 장애로서는 비정상 세포 성장, 양성 종양, 전악성 또는 전암성 병변, 악성 종양 및 암을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 신생물 형성 질환 또는 장애의 예들로서는 임의의 조직 또는 장기, 예컨대 전립선, 결장, 복부, 골, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비선(부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경(중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉곽 또는 비뇨생식기에 위치하는 양성, 전악성 또는 악성 신생물 형성이 있다.
- [0053] 본원에 사용되는 바와 같이, "종양" 또는 "종양 조직"이란 용어는, 과도한 세포 분열로 말미암는 비정상 조직 덩어리를 지칭한다. 종양 또는 종양 조직은 비정상 성장 특성을 보이고 체내 유용한 기능을 가지지 않는 신생물 형성 세포인 종양 세포를 포함한다. 종양, 종양 조직 및 종양 세포는 양성, 전악성 또는 악성일 수 있거나, 또는 그 어떠한 암으로서의 잠재성을 가지지 않는 병변을 나타낼 수 있다. 종양 또는 종양 조직은 또한 종양 연관 비종양 세포, 예컨대 혈관을 형성하여 종양이나 종양 조직을 지탱하게 만드는 혈관 세포를 포함할 수도 있다. 비종양 세포는 종양 세포에 의해 복제 및 발현(예를 들어 종양 또는 종양 조직 내 혈관신생 유도)될 수 있다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같은 "암"이란 용어는, 탈조절(deregulation) 또는 비조절(unregulation)되는 세포 성장에 의해 특징지어지는 악성 신생물을 지칭한다. "암"이란 용어는 원발성 악성 세포 또는 종양(예컨대 세포가 원래

의 악성종양 또는 종양 부위 이외의 대상체 체내 부위들로 이동하지 않는 악성 세포 또는 종양), 그리고 속발성 악성 세포 또는 종양(예컨대 전이, 악성 세포 또는 종양 세포의 2차 부위(즉 원래 종양이 있던 부위와 상이한 부위)로의 이동으로 말미암아 발생하는 악성 세포 또는 종양)을 포함한다. "전이의" 또는 "전이"란 용어는, 일반적으로 암이 하나의 장기나 조직으로부터 인접하지 않는 다른 장기나 조직으로 퍼져 나가는 것을 지칭한다. 인접하지 않는 다른 장기나 조직에서의 신생물 형성 질환의 발생은 전이라 지칭된다.

[0055] 암의 예들로서는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병이나 림프 악성종양을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 암에 관한 더욱 구체적인 예들로서는 편평세포암(예컨대 상피 편평세포암), 폐암, 예컨대 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포암종 및 폐의 대세포암종, 복막의 암, 간세포암, 위 또는 위장 암, 예컨대 위장관암, 췌장암, 신경교종, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암종, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막암 또는 자궁암종, 타액선암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 항문암종, 음경암종, 그리고 CNS암, 흑색종, 두경부암, 골암, 골수암, 십이지장암, 식도암, 갑상선암 또는 혈액암을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 암 또는 악성종양의 기타 비제한적 예들로서는 급성 소아 림프아구성백혈병, 급성 림프아구성백혈병, 급성 림프구성백혈병, 급성 골수성백혈병, 부신피질암종, 성인(원발성)간세포암, 성인(원발성)간암, 성인 급성 림프구성백혈병, 성인 급성 골수성백혈병, 성인 호지킨병, 성인 호지킨림프종, 성인 림프구성백혈병, 성인비호지킨림프종, 성인 원발성 간암, 성인 연조직육종, AIDS 관련 림프종, AIDS 관련 악성종양, 항문암, 성상세포종, 담도암, 방광암, 골암, 뇌간교종, 뇌종양, 유방암, 신우 및 요도 암, 중추신경계(원발성) 림프종, 중추신경계 림프종, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종, 자궁경부암, 소아(원발성) 간세포암, 소아(원발성) 간암, 소아 급성 림프아구성백혈병, 소아 급성 골수성백혈병, 소아 뇌간교종, 교모세포종, 소아 소뇌성상세포종, 소아 대뇌성상세포종, 소아 두개외생식세포종양, 소아 호지킨병, 소아 호지킨림프종, 소아 시상하부 및 시각경로 교종, 소아 림프아구성 백혈병, 소아 수모세포종, 소아 비호지킨림프종, 소아 송과체 및 천막상 원시신경외배엽종양, 소아 원발성 간암, 소아 횡문근육종, 소아 연조직육종, 소아 시각경로 및 시상하부 교종, 만성 림프구성백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장암, 피부 T세포 림프종, 내분비췌장섬세포암종, 자궁내막암, 뇌실막세포종, 상피암, 식도암, 유잉 육종 및 관련 종양, 외분비췌장암, 두개외생식세포종양, 성선외생식세포종양, 간외담도암, 눈암, 여성유방암, 쓸개암, 위암, 위장관유암종, 이장관종양, 생식세포종양, 용모상피성종양, 모양세포백혈병, 두경부암, 간세포암, 호지킨병, 호지킨림프종, 고감마글로불린혈증, 하인두암, 장암, 안내흑색종, 섬세포암종, 섬세포췌장암, 카포시육종, 신장암, 후두암, 입술 및 구강 암, 간암, 폐암, 림프구증식 장애, 매크로글로불린혈증, 남성 유방암, 악성 중피종, 악성 흉선종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 전이성 잠복원발 편평경부암, 전이성 원발 편평경부암, 전이성 편평경부암, 다발성 골수종, 다발성 골수종/형질세포 신생물, 골수이형성증후군, 골수성백혈병, 골수백혈병, 골수증식성장애, 비강 및 부비동 암, 비인두암, 신경모세포종, 임신중 비호지킨 림프종, 비흑색종 피부암, 비소세포 폐암, 잠복원발 전이성 편평경부암, 구강인두암, 골육종/악성 섬유성 육종, 골육종/악성 섬유성 조직구종, 골육종/골 악성 섬유성 조직구종, 난소상피암, 난소생식세포종양, 난소 저 악성 잠재성 종양 (Low Malignant Potential Tumor), 췌장암, 이상단백혈증, 자반병, 부갑상선암, 음경암, 크롬친화세포종, 하수체종양, 형질세포신생물 형성/다발성골수종, 원발성 중추신경계림프종, 원발성간암, 전립선암, 직장암, 신세포암, 신우 및 요도 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 사르코이드증, 육종, 시자리증후군, 피부암, 소세포폐암, 소장암, 연조직육종, 편평경부암, 위암, 천막상원시신경외배엽종양 및 송과체종양, T 세포 림프종, 고환암, 흉선종, 갑상선암, 신우 및 요도의 이행세포암, 이행성 신우 및 요도 암, 영양막종양, 요도 및 신우 세포암, 요도암, 자궁암, 자궁육종, 질암, 시각경로 및 시상하부 교종, 외음부암, 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 또는 빌름 종양을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 고형 종양이다. 고형 종양은, 보통 낭포나 액체 영역을 함유하지 않는 신생물 덩어리를 형성하는 임의의 종양을 포함한다. 고형 종양은 양성, 전악성 또는 악성일 수 있다. 고형 종양의 예들로서는 암종, 육종, 흑색종 및 림프종이 있다. 백혈병은, 일반적으로 고형 종양을 형성하지 않는다. 그러므로 임의의 구현예들에서, 종양은 백혈병 이외의 종양일 수 있다. 고형 종양은 또한 고형 종양으로부터 기원하는 전이암을 포함하기도 한다.

[0058] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양의 임의의 전이암을 포함하여 고형 종양과 같은 종양, 예컨대 고형 종양의 임의의 전이암은 상피, 간엽 또는 멜라닌세포 기원의 전이암이다.

[0059] 상피 기원의 종양은 상피 조직으로부터 기원하는, 몇몇 부위들 중 임의의 부위, 예컨대 피부, 폐, 장, 결장, 유방, 방광, 두경부(입술, 구강, 타액선, 비강, 비인두, 부비강, 인두, 인후, 후두 및 연관 구조물 포함), 식도, 갑상선, 신장, 간, 췌장, 방광, 음경, 고환, 전립선, 질, 자궁경부 또는 항문(이에 한정되는 것은 아님)에서의

임의의 종양을 포함한다.

- [0060] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 암종, 예컨대 상피 조직으로부터 기원하는, 몇몇 부위들 중 임의의 부위, 예컨대 피부, 폐, 장, 결장, 유방, 방광, 두경부(입술, 구강, 타액선, 비강, 비인두, 부비강, 인두, 인후, 후두 및 연관 구조물 포함), 식도, 갑상선, 신장, 간, 췌장, 방광, 음경, 고환, 전립선, 질, 자궁경부 또는 항문(이에 한정되는 것은 아님)에서의 임의의 악성 신생물일 수 있다.
- [0061] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 편평세포암종(SCC)일 수 있다. SCC는 피부, 두경부(입술, 구강, 타액선, 비강, 비인두, 부비강, 인두, 인후, 후두 및 연관 구조물 포함), 갑상선, 식도, 폐, 음경, 전립선, 질, 자궁경부, 항문 또는 방광으로부터 기원하는 SCC를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 간엽 기원의 종양으로서 몇몇 부위들 중 임의의 것, 예컨대 골, 연골, 지방, 근육, 혈관, 섬유 조직 또는 기타 결합 조직이나 지지 조직(이에 한정되는 것은 아님)의 간엽 조직으로부터 기원하는 임의의 종양들을 포함한다.
- [0063] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 육종, 예컨대 몇몇 부위들 중 임의의 것, 예컨대 골, 연골, 지방, 근육, 혈관, 섬유 조직 또는 기타 결합 조직이나 지지 조직(이에 한정되는 것은 아님)의 간엽 조직으로부터 기원하는 임의의 악성 신생물일 수 있다.
- [0064] 멜라닌세포 기원의 종양은 몇몇 부위들 중 임의의 것, 예컨대 피부, 입, 눈 또는 소장(이에 한정되는 것은 아님)의 멜라닌 세포로부터 기원하는 임의의 종양들을 포함한다.
- [0065] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 흑색종, 예컨대 몇몇 부위들 중 임의의 것, 예컨대 피부, 입, 눈 또는 소장(이에 한정되는 것은 아님)의 멜라닌 세포로부터 기원하는 임의의 악성 신생물일 수 있다.
- [0066] 임의의 바람직한 구현예들에서, 종양은 피부암, 바람직하게 피부 편평세포암종; 폐암, 바람직하게 폐편평세포암종 또는 폐다형성암종; 두경부암; 유선암; 그리고 식도암을 포함하거나 이것들로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0067] 그러므로 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "종양 세포"란 용어는 넓게는 양성이든, 전악성(전암성)이든 또는 악성이든 간에 임의의 신생물 형성 세포를 포함한다. 이 용어는, 특히 암세포, 예컨대 원발성 및 속발성 악성 세포, 순환 종양 세포(CTC), 파종성 종양 세포(DTC) 및 전이성 종양 세포를 포함한다.
- [0068] "순환 종양 세포" 또는 "CTC"란 용어는, 종양, 예컨대 원발성 종양으로부터 떨어져 나와 순환계 또는 삼출물이나 분비 유체로 들어가는 임의의 종양 세포를 나타낸다. 임의의 구현예들에서, CTC는 종양으로부터 떨어져 나와 순환계, 예컨대 혈관조직이나 림프계로 들어갈 수 있다. 순환계 유체, 예컨대 혈액이나 림프는 CTC를 단일 세포 또는 세포 집단으로서 몸 전체에 운반할 수 있다. 그러므로 CTC는 혈액이나 림프 중에 존재할 수 있거나, 또는 소변, 대변 또는 기타 삼출물이나 분비 유체 중에 존재할 수 있다. CTC 또는 이 CTC의 일부는 원위에 있는 부위에 침투하여 들어가, 2차 장기에 파종성 종양 세포(DTC)로서 자리잡을 수 있다. DTC 또는 이 DTC의 일부는 2차 장기에서 전이되는 방향으로 진행될 수 있다.
- [0069] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 "시료" 또는 "생물 시료"란 용어는, 대상체로부터 취득된(단리된, 분리된) 임의의 생물 표본을 포함한다. 시료는 장기의 조직(예컨대 원발성 또는 전이성 종양 조직), 전혈, 혈장, 혈청, 전혈 세포, 적혈구, 백혈구(예컨대 말초혈액단핵구), 타액, 소변, 땀(대변), 눈물, 땀, 피지, 유두흡출물, 도관세척액, 종양 삼출물, 관절낭액, 뇌척수액, 흉수, 예컨대 흉곽삼출수, 복강액, 예컨대 복수액, 림프, 미세침흡출물, 양수, 기타 임의의 체액, 삼출물 또는 분비 유체, 세포 용해물, 세포 분비 생성물, 염증 유체, 정액 및 질 분비물을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 시료는 대상체로부터 유래하는 시료의 제공/분리/단리를 허용하는 비침습적 방법 또는 최소 침습적 방법, 예컨대 채혈('액체 생검'), 채뇨, 채변, 조직(예컨대 종양 조직) 생검 또는 미세침흡출물, 예컨대 흉수 시료채취 또는 복막액 시료채취에 의해 용이하게 취득될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "조직"이란 용어는, 인간 몸을 이루는 모든 유형의 세포, 예컨대 장기 세포 뿐만 아니라, 혈액 및 상기 예시된 기타 체액을 포함한다. 조직은 건강한 조직일 수 있거나, 또는 병리학적 변화가 일어난 조직, 예컨대 종양 조직일 수 있다. 조직은 살아있는 대상체로부터 유래할 수 있거나, 또는 시체의 조직일 수 있다.
- [0070] 특히 유용한 시료는 종양 세포를 포함하는 것으로 공지되거나, 종양 세포를 포함할 것이라 예상 또는 예측되거나, 종양 세포를 잠재적으로 포함하는 것으로 공지되거나, 또는 종양 세포를 잠재적으로 포함할 것이라 예상 또는 예측되는 것이다. 추가로 특히 유용한 시료는 순환 세포를 포함하는 것으로 공지되거나, 순환 세포를 포함할

것이라 예상 또는 예측되거나, 순환 세포를 잠재적으로 포함하는 것으로 공지되거나, 또는 순환 세포를 잠재적으로 포함할 것이라 예상 또는 예측되는 것이다. 추가로 특히 유용한 시료는 순환 종양 세포를 포함하는 것으로 공지되거나, 순환 종양 세포를 포함할 것이라 예상 또는 예측되거나, 순환 종양 세포를 잠재적으로 포함하는 것으로 공지되거나, 또는 순환 종양 세포를 잠재적으로 포함할 것이라 예상 또는 예측되는 것이다.

- [0071] 추가로 유용한 구현예들에서, 원발성 종양 부위의 바깥쪽에 있는 종양 세포, 구체적으로 고형 종양 세포가 검출 또는 정량될 수 있다. 예를 들어 시료는 원발성 (고형) 종양 부위 이외의 조직으로부터 수득될 수 있다. 비제한적인 예를 들자면, 종양 세포, 구체적으로 고형 종양 세포는 뇌척수액, 흉수, 예컨대 흉곽 삼출액, 또는 복강 유체, 예컨대 복수에서 검출 또는 정량될 수 있다. 임의의 구현예들에서, 원발성 종양 부위의 바깥쪽, 예컨대 상기 예시된 유체 시료 중에 종양 세포가 존재함은 대상체의 신생물 형성 질환이 전이의 잠재성을 가짐을 확인시켜줄 수 있다.
- [0072] 시료의 임의의 적합한 중량 또는 부피만큼 분석을 위해 대상체로부터 분리될 수 있다. 비제한적으로, 액체 시료의 부피는 1ml 내지 20ml, 예컨대 5ml, 7.5ml, 10ml, 15ml 또는 20ml일 수 있다. 고형 시료의 중량은 1g 내지 20g, 예컨대 5g, 7.5g, 10g, 15g 또는 20g일 수 있다.
- [0073] 임의의 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 조직 생검편 또는 조직 미세침흡출물이다. 다른 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 절제된 조직이다.
- [0074] 임의의 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 종양 생검편 또는 종양 미세침흡출물, 예컨대 원발성 또는 전이성 종양 조직으로부터 유래하는 생검편 또는 미세침흡출물이다. 다른 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 절제된 조직, 예컨대 절제된 원발성 또는 전이성 종양 조직이다.
- [0075] 추가로 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 순환 세포를 포함한다. 임의의 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 혈액, 소변, 대변, 림프로부터 유래하는 순환 세포, 또는 또다른 삼출물이나 분비 유체로부터 유래하는 순환 세포를 포함한다. 특히 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함한다.
- [0076] 임의의 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 순환 종양 세포를 포함한다. 임의의 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비 유체로부터 유래하는 순환 종양 세포를 포함한다. 특히 바람직한 구현예들에서, 생물 시료는 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 종양 세포를 포함한다.
- [0077] "대상체", "개체" 또는 "환자"란 용어는 본 명세서 전반에 걸쳐 호환되어 사용되고, 통상적이지아 바람직하게는 인간을 나타내지만, 인간 이외의 동물, 바람직하게 온혈 동물, 더욱 바람직하게 포유류, 예컨대 인간 이외의 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 양 및 돼지 등에 대한 언급대상도 또한 포함할 수 있다. "인간 이외의 동물"이란 용어는 모든 척추동물, 예컨대 포유류, 예컨대 인간 이외의 영장류(특히 고등 영장류), 양, 개, 설치류(예컨대 마우스 또는 래트), 기니아피그, 염소, 돼지, 고양이, 토끼, 소, 그리고 포유류 이외의 척추동물, 예컨대 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다. 임의의 구현예들에서, 대상체는 인간 이외의 포유류이다. 임의의 바람직한 구현예들에서, 대상체는 인간이다. 다른 구현예들에서, 대상체는 실험 동물이거나 질환 모델과 같은 대체동물이다. 이 용어는 특정의 나이나 성별의 대상체를 나타내지는 않는다. 따라서 (남성 또는 여성/수컷 또는 암컷인) 성숙 및 신생 대상체뿐만 아니라, 태아 개체까지도 포괄되도록 의도된다. 대상체의 예들로서는 인간, 개, 고양이, 소, 염소 및 마우스를 포함한다. "대상체"란 용어는 유전자이식 종을 포함하도록 의도되기도 한다.
- [0078] 적합한 대상체는 전문의에게 신생물 형성 질환에 대한 스크리닝을 제공하는 대상체, 전문의에게 신생물 형성 질환에 대한 지표가 되는 증상 및 징후를 제공하는 대상체, 신생물 형성 질환으로 진단된 대상체, 항암 요법을 받았던 대상체, 항암 치료 진행중인 대상체, 그리고 신생물 형성 질환에 대해 차도를 보이는 대상체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 그러므로 본원에서 의도되는 바와 같은 종양 세포는 동물 세포, 바람직하게 온혈 동물 세포, 더욱 바람직하게 척추동물 세포, 더욱더 바람직하게 포유류 세포, 예컨대 인간 및 인간 이외의 포유류일 수 있으며, 특히 바람직한 임의의 구현예들에서는 인간 세포일 수 있다.
- [0080] 본원에 개시된 바와 같은 세포, 예컨대 종양 세포 또는 순환 종양 세포는 본 명세서의 내용 중 하나 이상의 마커, 예컨대 하나 이상의 유전자, 폴리펩티드 또는 단백질, 예컨대 CD321의 "발현을 포함한다" 또는 반대로 "발현하지 않는다"라고 지칭될 수 있거나, 또는 하나 이상의 마커, 예컨대 하나 이상의 유전자, 폴리펩티드 또는 단백질, 예컨대 CD321에 대해 "양성(+)" 또는 반대로 "음성(-)"이라고 기술될 수 있다.

- [0081] 이러한 용어들은, 세포 표현형에 대한 특성규명시 숙련자에게 상식이거나 널리 이해되고 있다. 추가로 안내하자면, 세포가 주어진 마커, 예컨대 주어진 유전자, 폴리펩티드 또는 단백질, 예컨대 CD321에 대해 양성이거나 이를 발현하거나, 또는 이의 발현을 포함한다고 지칭될 때, 숙련자는 세포 내 또는 세포 상 마커를 검출 또는 정량할 수 있는 측정이 수행될 때 해당 마커에 대한 변별적 신호가 존재하거나 이러한 신호에 대한 증거가 있다는 결론을 내리게 될 것이다. 적합하게 마커에 대한 변별적 신호의 존재 또는 이에 대한 증거는, 세포에 대해 수득된 측정 결과의, 음성 대조군(예컨대 해당 마커를 발현하지 않는 것으로 공지된 세포) 및/또는 양성 대조군(예컨대 해당 마커를 발현하는 것으로 공지된 세포)에 대해 수행된 동일한 측정 결과와의 비교를 바탕으로 결론이 내려질 것이다. 측정 방법이 마커에 대한 정량적 평가를 허용하는 경우, 양성 세포는 음성 대조군 세포에 의해 마커에 대하여 발생된 신호 또는 음성 대조군 세포 집단에 의해 마커에 대하여 발생된 평균 신호보다 적어도 1.5배 더 높은, 예컨대 적어도 2배, 적어도 4배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 또는 그 이상 더 높은, 마커에 대한 신호를 발생시킬 수 있다. 또한, 양성 세포는 표준 편차 3.0 이상, 예컨대 3.5 이상, 4.0 이상, 4.5 이상 또는 5.0 이상으로, 음성 대조군 세포 집단에 의해 마커에 대하여 발생된 평균 신호보다 더 높은, 마커에 대한 신호를 발생시킬 수 있다.
- [0082] "마커"란 용어는 당 분야에 널리 알려져 있으며, 보통 광범위하게 시험 대상(예컨대 세포, 세포 집단, 조직, 장기 또는 유기체 중 또는 그 위, 예컨대 대상체의 생물 시료중)에서의 질적 및/또는 정량적 평가가 시험 대상의 표현형 및/또는 유전자형에 대한 양태 하나 이상과 관련된 예측 또는 정보제공의 수단이 되는 생물 분자, 더욱 구체적으로는 내인성 생물 분자 및/또는 검출 가능한 이의 일부분을 나타낸다. "마커" 및 "생물마커"란 용어는 본 명세서 전반에 걸쳐 호환되어 사용될 수 있다.
- [0083] 바람직하게 본원에서 의도되는 바와 같은 마커는 펩티드, 폴리펩티드 및/또는 단백질 기반의 것일 수 있거나, 또는 핵산 기반의 것일 수 있다. 예를 들어 마커는 주어진 유전자에 의해 암호화되는 펩티드(들), 폴리펩티드(들) 및/또는 단백질(들), 또는 이것들의 검출 가능한 일부분으로 구성될 수 있다. 더욱이 "핵산"이란 용어는, 일반적으로 DNA, RNA 및 DNA/RNA 잡종 분자를 포함하는 반면에, 마커에 관한 내용 중 상기 용어는, 통상 이중 핵 RNA(hnRNA), 전-mRNA, 메신저 RNA(mRNA), 또는 복사 DNA(cDNA), 또는 이것들의 검출 가능한 일부분을 지칭할 수 있다. 이러한 핵산 종은 유전자 발현에 관한 질적 및/또는 정량적 정보를 함유하므로, 이 핵산 종은 마커로서 특히 유용하다. 특히 바람직하게 핵산 기반 마커는 주어진 유전자의 mRNA, 또는 이 mRNA로 제조된 cDNA, 또는 이의 검출 가능한 일부분을 포함할 수 있다.
- [0084] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "단백질"이란 용어는, 일반적으로 하나 이상의 폴리펩티드 사슬, 즉 펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산 잔기들의 중합체 사슬을 포함하는 거대분자를 포함한다. 이 용어는 자연에서, 제조함에 의해서, 반합성에 의해서 또는 합성에 의해서 제조된 단백질을 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩티드 사슬(들)의 발현동시발생 변형 또는 발현후발생 변형, 예컨대 당화, 아세틸화, 인산화, 설포화, 메틸화, 유비퀴틴화, 신호 펩티드 제거, N-말단 Met 제거, 프로엔자임(pro-enzyme) 또는 프리호르몬(pre-hormone)의 활성 형태로의 전환 등(이에 한정되는 것은 아님) 하나 이상을 운반하는 단백질을 포함한다. 이 용어는 또한 대응하는 원산 단백질에 비해 아미노산 서열 변형, 예컨대 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환을 운반하는 단백질 변이체 또는 돌연변이체를 포함하기도 한다. 이 용어는, 전장 단백질과, 이러한 전장 단백질의 가공으로부터 얻어지는 단백질의 일부 또는 단편, 예컨대 자연 발생 단백질의 일부 둘 다를 고려한다.
- [0085] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "폴리펩티드"란 용어는, 일반적으로 펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산 잔기들의 중합체 사슬을 포함한다. 그러므로 단백질이 오로지 단일의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 한, "단백질" 및 "폴리펩티드"란 용어는 본원에서 이러한 단백질을 나타내는 것으로 호환되어 사용될 수 있다. 이 용어는 임의의 최소 길이를 가지는 폴리펩티드 사슬에 한정되지 않는다. 이 용어는 자연에서, 제조함에 의해서, 반합성에 의해서 또는 합성에 의해서 제조된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 폴리펩티드 사슬(들)의 발현동시발생 변형 또는 발현후발생 변형, 예컨대 당화, 아세틸화, 인산화, 설포화, 메틸화, 유비퀴틴화, 신호 펩티드 제거, N-말단 Met 제거, 프로엔자임 또는 프리호르몬의 활성 형태로의 전환 등(이에 한정되는 것은 아님) 하나 이상을 운반하는 폴리펩티드를 포함한다. 이 용어는 또한 대응하는 원산 폴리펩티드에 비해 아미노산 서열 변형, 예컨대 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환을 운반하는 폴리펩티드 변이체 또는 돌연변이체를 추가로 포함한다. 이 용어는, 전장 폴리펩티드와, 이러한 전장 폴리펩티드의 가공으로부터 얻어지는 폴리펩티드의 일부 또는 단편, 예컨대 자연 발생 폴리펩티드의 일부 둘 다를 고려한다.
- [0086] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "펩티드"란 용어는, 바람직하게 본원에 사용된 바와 같은 폴리펩티드로서, 본질적으로 50개 이하의 아미노산, 예컨대 45개 이하의 아미노산, 바람직하게 40개 이하의 아미노산, 예컨대 35개 이하의 아미노산, 더욱 바람직하게 30개 이하의 아미노산, 예컨대 25개 이하의 아미노산, 20개 이하

의 아미노산, 15개 이하의 아미노산, 10개 이하의 아미노산, 또는 5개 이하의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 지칭한다.

[0087] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "핵산"이란 용어는, 통상 임의의 길이를 가지고, 본질적으로 뉴클레오타이드 단위들로 구성된 중합체(바람직하게는 선형 중합체)를 지칭한다. 뉴클레오타이드 단위는 통상 헤테로사이클릭 염기 및 당기를 포함한다. 헤테로사이클릭 염기는 특히 자연 발생 핵산에 널리 존재하는 퓨린계 염기 및 피리미딘계 염기, 예컨대 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 티민(T) 및 우라실(U)과, 기타 자연 발생 염기(예컨대 잔틴, 이노신, 하이포잔틴)뿐만 아니라 화학적으로나 생화학적으로 변형된(예컨대 메틸화된) 비천연 또는 유도체화된 염기를 포함할 수 있다. 예시적 변형 핵염기로서는 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘, 그리고 N-2, N-6 및 O-6 치환 퓨린, 예컨대 2-아미노프로필아데닌, 5-프로필우라실 및 5-프로필닐시토신을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로 5-메틸시토신 치환은, 더욱더 구체적으로 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 합하여질 때, 예를 들어 안티센스 제제에서 바람직한 염기 치환일 수 있으며, 핵산 이중체의 안정성을 증가시키는 것으로 보였다. 당기는 특히 펜토스(펜토폴라노스)기, 예컨대 바람직하게 자연 발생 핵산에 일반적인 리보스 및/또는 2-데옥시리보스, 또는 아라비노스, 2-데옥시아라비노스, 트레오스 또는 핵소스 당기뿐만 아니라, 변형 또는 치환 당기(예컨대 2'-O-알킬화, 예컨대 2'-O-메틸화 또는 2'-O-에틸화 당, 예컨대 리보스; 2'-O-알킬옥시알킬화, 예컨대 2'-O-메톡시에틸화 당, 예컨대 리보스; 또는 2'-O,4'-C-알킬렌 결합, 예컨대 2'-O,4'-C-메틸렌 결합 또는 2'-O,4'-C-에틸렌 결합 당, 예컨대 리보스; 2'-플루오로-아라비노스 등(이에 한정되는 것은 아님))를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 단위는 다수의 공지된 뉴클레오타이드간 결합들, 예컨대 특히 자연 발생 핵산에 통상적인 포스포디에스테르 결합, 그리고 추가의 변형 인산염 기반 또는 포스포네이트 기반 결합, 예컨대 포스포로티오에이트, 알킬 포스포로티오에이트, 예컨대 메틸 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 예컨대 메틸포스포네이트, 알킬포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 예컨대 알킬포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 포스포로피페라지데이트, 포스포모폴리데이트, 가교 포스포라미데이트, 가교 메틸렌 포스포네이트, 가교 포스포로티오에이트; 그리고 추가의 실록산, 카보네이트, 설파메이트, 카보알콕시, 아세타미데이트, 카바메이트, 예컨대 3'-N-카바메이트, 모폴리노, 보라노, 티오에테르, 3'-티오아세탈, 그리고 설포뉴클레오타이드간 결합 중 임의의 하나에 의해 서로 결합될 수 있다. 바람직하게 뉴클레오타이드간 결합은 인산염 기반 결합, 예컨대 변형 인산염 기반 결합, 예컨대 더욱 바람직하게는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 결합 또는 이것들의 조합일 수 있다. "핵산"이란 용어는 또한 기타 임의의 핵염기 함유 중합체, 예컨대 핵산 모의체, 예컨대 펩티드 핵산(PNA), 인산염이기를 가지는 펩티드 핵산(PHONA), 잠금 핵산(Locked Nucleic Acid; LNA), 모폴리노 포스포로디아미데이트 주쇄 핵산(PMO), 사이클로핵산(CeNA), 트리사이클로-DNA(tcDNA), 그리고 알킬 링커 또는 아미노 링커와 주쇄부를 가지는 핵산(이에 한정되는 것은 아님)을 포함한다(예컨대 문헌(Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270: 1628-1644))참조). 본원에 사용된 바와 같은 "알킬"은 특히 저급 탄화수소기, 예컨대 C1-C4 선형 또는 분지형, 포화 또는 불포화 탄화수소, 예컨대 메틸, 에틸, 에테닐, 프로필, 1-프로페닐, 2-프로페닐 및 이소프로필을 포함한다. 본원에 의도되는 바와 같은 핵산은 자연 발생 뉴클레오타이드, 변형 뉴클레오타이드 또는 이것들의 조합을 포함할 수 있다. 변형 뉴클레오타이드는 변형 헤테로사이클릭 염기, 변형 당기, 변형 뉴클레오타이드간 결합 또는 이것들의 조합을 포함할 수 있다. "핵산"이란 용어는 추가로 바람직하게 DNA, RNA 및 DNA/RNA 잡종 분자, 특히 예를 들어 hnRNA, 전-mRNA, mRNA, cDNA, 게놈 DNA, 증폭 생성물, 올리고뉴클레오타이드 및 합성(예컨대 화학 합성) DNA, RNA 또는 DNA/RNA 잡종을 포함한다. 핵산은 자연 발생(예컨대 자연에 존재하거나 자연으로부터 단리)될 수 있고, 재조합된 것(즉 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 것)일 수 있으며/있거나 부분적으로나 전체적으로, 화학적으로나 생화학적으로 합성될 수 있다. "핵산"은 이중 가닥, 부분 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 핵산이 단일 가닥일 경우, 그 핵산은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥일 수 있다. 더욱이 핵산은 원형 또는 선형일 수 있다.

[0088] 임의의 마커, 예컨대 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산에 대한 언급대상은, 당 분야에 각각의 명칭으로서 통상 공지된 마커에 대응한다. 이 용어는 이것이 발견되는 임의의 유기체, 구체적으로는 동물, 바람직하게 온혈 동물, 더욱 바람직하게 척추동물, 더욱더 바람직하게 포유류, 예컨대 인간 및 인간 이외의 포유류, 더욱더 바람직하게 인간의 이러한 마커를 포함한다.

[0089] 상기 용어는, 원산 서열을 가지는 이러한 마커, 즉 1차 서열이 자연에서 발견되거나 자연으로부터 유래하는 마커의 1차 서열과 동일한 마커, 예컨대 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산을 특히 포함한다. 숙련자는 원산 서열이 상이한 종들 간 유전적 분화(genetic divergence)로 말미암아 이러한 종들 간에 상이할 수 있음을 이해한다. 더욱이 원산 서열은 주어진 종들 안에서의 정상적인 유전적 다양성(변화)으로 말미암아 동일 종들의 상이한 개체들 간 또는 그 안에서 상이할 수 있다. 또한, 원산 서열은 체세포 돌연변이나, 또는 전사후 또는 번역후 변형으로 말미암아 동일한 종들의 상이한 개체들 사이 또는 심지어 그 안에서도 상이할 수 있다. 마커의

이러한 임의의 변이체 또는 동형체(isoform)가 본원에서 의도된다. 그러므로 자연에서 발견되거나 자연으로부터 유래하는 마커의 모든 서열은 "원산"의 것으로 간주된다. 이 용어는, 살아있는 유기체, 장기, 조직 또는 세포의 일부를 이룰 때, 생물 시료의 일부를 이룰 때뿐만 아니라, 이러한 공급원으로부터 적어도 부분적으로 단리되었을 때의 마커를 포함한다. 이 용어는 또한 재조합 방법이나 합성 방법에 의해 제조될 때의 마커도 포함한다.

[0090] 임의의 구현예들에서, 마커, 예컨대 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산은 인간의 것일 수 있는데, 즉 마커의 1차 서열은 자연 발생 인간 마커의 대응 1차 서열 또는 자연 발생 인간 마커에 존재하는 대응 1차 서열과 동일할 수 있다. 그러므로 이와 관련된 수식어 "인간"은 각각의 마커의 기원이나 공급원에 관한 것이라기 보다는 각각의 마커의 1차 서열에 관한 것이다. 예를 들어 이러한 마커는 인간 대상체 시료 중에 존재할 수 있거나 이로부터 단리될 수 있거나, 또는 다른 방법(예컨대 재조합 발현, 무세포 전사 또는 번역, 또는 비생물 핵산 또는 펩티드의 합성)에 의해 획득될 수 있다.

[0091] 내용으로부터 달리 분명해지지 않는 한, 본원에서 임의의 마커, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산이나, 이것들의 단편에 대한 언급대상은, 일반적으로 예컨대 인산화, 당화, 지질화(lipidation), 메틸화, 시스테인화, 설폰화, 글루타치온화, 아세틸화, 메티오닌의 메티오닌 설폭시드 또는 메티오닌 설폰으로의 산화 등을 포함하여 발현 후 변형을 보유하는, 상기 마커, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산이나, 이것들의 단편의 변형된 형태를 또한 포함할 수 있다.

[0092] 본원에서 임의의 마커, 예컨대 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산에 대한 언급대상은 또한 이것들의 단편도 포함한다. 그러므로 본원에서 임의의 마커 하나를 측정하는 것(또는 이의 양을 측정하는 것)에 관한 언급대상은 마커를 측정하는 것 및/또는 이의 단편 하나 이상을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0093] 예를 들어 임의의 마커 및/또는 이의 단편 하나 이상은 총괄하여 측정될 수 있으므로, 측정된 양은 종의 총괄하여 측정된 종들의 양의 합에 대응한다. 다른 예에서, 임의의 마커 및/또는 이의 단편 하나 이상은 각각 개별적으로 측정될 수 있다.

[0094] 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질과 관련하여 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "단편"이란 용어는, 일반적으로 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 일부분, 예컨대 통상적으로 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단 절단형을 나타낸다. 바람직하게 단편은 상기 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열 길이의 적어도 약 30%, 예컨대 적어도 약 50% 또는 적어도 약 70%, 바람직하게 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85%, 더욱 바람직하게 적어도 약 90%, 그리고 더욱더 바람직하게 적어도 약 95% 또는 심지어 약 99%를 포함할 수 있다. 예를 들어 전장 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 길이를 초과하지 않는 한, 단편은 대응하는 전장 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 5개 이상의 연속 아미노산, 또는 10개 이상의 연속 아미노산, 또는 20개 이상의 연속 아미노산, 또는 30개 이상의 연속 아미노산, 예컨대 40개 이상의 연속 아미노산, 예컨대 50개 이상의 연속 아미노산, 예컨대 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 300개 이상, 400개 이상, 500개 이상 또는 600개 이상의 연속 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0095] 핵산(폴리뉴클레오타이드)과 관련하여 "단편"이란 용어는, 일반적으로 핵산의 5'- 및/또는 3'-절단형을 나타낸다. 바람직하게 단편은 상기 핵산의 핵산 서열 길이의 적어도 약 30%, 예컨대 적어도 약 50% 또는 적어도 약 70%, 바람직하게 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85%, 더욱 바람직하게 적어도 약 90%, 그리고 더욱더 바람직하게 적어도 약 95% 또는 심지어 약 99%를 포함할 수 있다. 예를 들어 전장 핵산의 길이를 초과하지 않는 한, 단편은 대응하는 전장 핵산의 5개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 또는 30개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 예컨대 40개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 예컨대 50개 이상의 연속 뉴클레오타이드, 예컨대 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 300개 이상, 400개 이상, 500개 이상 또는 600개 이상의 연속 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0096] 이 용어는 임의의 생체 내 및/또는 시험관 내 기작, 예컨대 대안적 전사 또는 번역, 외(exo)- 및/또는 내(endo)-단백분해, 외- 및/또는 내-핵산분해, 또는 예컨대 물리적, 화학적 및/또는 효소에 의한 단백질분해 또는 핵산분해에 의한 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산의 분해(이에 한정되는 것은 아님)에 의해 생성된 단편을 포함한다.

[0097] 본 명세서에서는, CD321이 암세포의 유용한 마커임을 교시한다. 언급된 바와 같이, CD321 마커는, 바람직하게 펩티드 기반, 폴리펩티드 기반 및/또는 단백질 기반 또는 핵산 기반의 것일 수 있다. 임의의 바람직한 구현예들에서, 본원에 교시된 바와 같은 CD321의 발현의 검출은 CD321 단백질 또는 CD321 mRNA, 아니면 이 둘다의 검출을 포함한다.

[0098] "CD321"에 대한 언급대상은, 당 분야에서 상기 명칭으로서 통상 공지되어 있는 바와 같은 CD321 마커, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산을 나타낸다. 추가로 안내하자면, CD321은 또한 접합부 부착 분자 A(JAM-A), 접합부 부착 분자 1(JAM-1), 혈소판 F11 수용체(F11R), 혈소판 부착 분자 1(PAM-1)로서도 공지되어 있다. CD321 암호화 유전자는 또한 명칭 *F11R*, *JAM1* 및 *JCAM*으로서도 공지되어 있다.

[0099] 예를 들자면, 인간 *F11R* mRNA 서열은 NCBI Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 승인 번호 NM_016946.4로서 주석이 달린다. NM_016946.4의 217번 뉴클레오타이드(출발 코돈) 내지 1170번 뉴클레오타이드(종결 코돈)는, CD321 암호화 서열을 구성하며, 이하와 같이 여기에 재현된다(서열 번호 1):

```
ATGGGGACAAAGGCGCAAGTCGAGAGGAACTGTTGTGCCTCTTCATATTGGCGATCC
TGTTGTGCTCCCTGGCATTGGGCAGTGTTACAGTGCACCTCTTCTGAACCTGAAGTCAGA
ATTCCTGAGAATAATCCTGTGAAGTTGTCTGTGCCTACTCGGGCTTTTCTTCTCCCCGT
GTGGAGTGGAAGTTTGACCAAGGAGACACCACCAGACTCGTTTGCTATAATAACAAGA
TCACAGCTTCCTATGAGGACCGGGTGACCTTCTTGCCAACTGGTATCACCTTCAAGTCC
GTGACACGGGAAGACACTGGGACATACACTTGTATGGTCTCTGAGGAAGGCGGCAAC
AGCTATGGGGAGGTCAAGGTCAAGCTCATCGTGCTTGTGCCTCCATCCAAGCCTACAG
TTAACATCCCCCTCCTCTGCCACCATTGGGAACCGGGCAGTGCTGACATGCTCAGAACA
AGATGGTTCCCCACCTTCTGAATACACCTGGTTCAAAGATGGGATAGTGATGCCTACG
AATCCCAAAAGCACCCGTGCCTTCAGCAACTCTTCCTATGTCCTGAATCCCACAACAG
GAGAGCTGGTCTTTGATCCCCGTGCAGCCTCTGATACTGGAGAATACAGCTGTGAGGC
ACGGAATGGGTATGGGACACCCATGACTTCAAATGCTGTGCGCATGGAAGCTGTGGAG
CGGAATGTGGGGGTATCGTGGCAGCCGTCCTTGTAACCCTGATTCTCCTGGAATCTT
GGTTTTTGGCATCTGGTTTGCCTATAGCCGAGGCCACTTTGACAGAACAAAGAAAGGG
ACTTCGAGTAAGAAGGTGATTTACAGCCAGCCTAGTGCCCCGAAGTGAAGGAGAATTCA
AACAGACCTCGTCATTCTCTGGTGTGA
```

[0100]

[0101] 예를 들자면, 인간 CD321 전구체 단백질 서열은 NCBI Genbank 승인 번호 NP_058642.1로서 주석이 달리며, 이하와 같이 재현된다(서열 번호 2):

```
MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSLAYSGFSSPRVEW
KFDQGDTRRLVCYNNKITASYEDRVTFLLPTGITFKSVTREDTGTYTCMVSEEGNSYGEVK
VKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPSEYTWFKDGIVMPTNPKSTRAFSNS
SYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMITSNAVRMEAVERNVGVIVAALVLT
LILLGILVFGIWFAYSRRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTSSFLV
```

[0102]

[0103] 숙련자는, 서열 데이터베이스 또는 본 명세서에 제시되어 있는 서열들은 마커, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산의 전구체의 것일 수 있으며, 성숙한 분자로부터 가공되어 생성된 일부를 포함할 수 있음을 알 수 있다. 예를 들자면, 서열 번호 2의 1번 내지 27번 아미노산은 성숙 CD321로부터 가공되어 생성된 신호 펩티드를 구성하는 것으로 보이거나 그렇게 예측되었다.

[0104] 숙련자는, 모든 CD321 동형체가 포함됨을 알 수 있다. 예를 들자면, CD321의 대안적 스플라이싱(alternative splicing)에 따른 동형체는 이하 여기에 제시된 바와 같은 서열 번호 3의 81번 내지 129번 아미노산이 결여된 것으로 공지되어 있다(서열 번호 3):

```
MGTKAQVERKLLCLFILAILLCSLALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSLAYSGFSSPRVEW
KFDQGDTRRLVCYNNKITVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPSEYTWFKDGIVM
PTNPKSTRAFSNSSYVLNPTTGELVFDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPMITSNAVRMEAVERNVGVIVAALVTLILLGILVFGIWFAYSRRGHFDRTKKGTSSKKVIYSQPSARSEGEFKQTSS
FLV
```

[0105]

[0106] 예를 들자면, 인간 CD45, LSP1, CD48, CD36, CD41, CD42a, CD42b 및 CD61의 mRNA 및 단백질 서열은 이하와 같은 NCBI Genbank 승인 번호들로서 주석이 달린다: CD45 단백질(NP_002829.3, NP_563578.2), CD45 mRNA(NM_002838.4, NM_080921.3); LSP1 단백질(NP_001013271.1, NP_001013272.1, NP_001013273.1,

NP_001229861.1 NP_001275934.1, NP_002330.1); LSP1 mRNA(NM_001013253.1, NM_001013254.1, NM_001013255.1, NM_001242932.1, NM_001289005.1, NM_002339.2); CD48 단백질(NP_001769.2); CD48 mRNA(NM_001778.3); CD36 단백질(NP_000063.2, NP_001001547.1, NP_001001548.1, NP_001120915.1, NP_001120916.1, NP_001276837.1, NP_001276838.1, NP_001276840.1, XP_005250770.1, XP_005250771.1, XP_005250772.1); CD36 mRNA(NM_000072.3, NM_001001547.2, NM_001001548.2, NM_001127443.1, NM_001127444.1, NM_001289908.1, NM_001289909.1, NM_001289911.1, XM_005250713.1, XM_005250714.1, XM_005250715.4); CD41 단백질(NP_000410.2, XP_011523051.1); CD41 mRNA(NM_000419.4, XM_011524749.1); CD42a 단백질(NP_000165.1, XP_005247431.1, XP_011511003.1, XP_011511004.1); CD42a mRNA(NM_000174.4, XM_005247374.3, XM_011512701.1, XM_011512702.1); CD42b 단백질(NP_000164.5); CD42b mRNA(NM_000173.6); CD61 단백질(NP_000203.2); CD61 mRNA(NM_000212.2).

- [0107] 본 명세서에 개시된 임의의 양태들과 구현예들은 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 동정하는 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 CTC임을 확인시켜주는 것임]를 포함하는 방법에 달려있다.
- [0108] "순환 세포"란 용어는, 대상체의 순환 유체 또는 삼출물이나 분비 유체 중에 존재하거나 이것에서 발견되는 임의의 세포를 나타낸다. 이 용어는, 특히 대상체의 순환 유체, 바람직하게 대상체의 혈액 또는 림프, 더욱 바람직하게 대상체의 혈액, 더욱더 바람직하게 대상체의 말초 혈액 중에 존재하거나 이것에서 발견되는 세포를 나타낼 수 있다.
- [0109] 순환 세포는 조혈세포 및 비조혈세포를 포함한다. "조혈세포"란 용어는 혈액 중 세포성 성분을 형성하는 세포, 더욱 구체적으로 조혈 줄기세포 또는 조혈 전구세포로부터 기원하고/기원하거나 적혈구계, 림프계 또는 골수계로부터 기원하는 세포를 나타낸다. 조혈세포의 예들로서는 적혈구, 백혈구 및 혈소판을 포함한다.
- [0110] 역으로, "비조혈세포"란 용어는 넓게 조혈 줄기세포 또는 조혈 전구세포로부터 기원하지 않거나, 또는 적혈구계, 림프계 및 골수계 이외의 세포계로부터 기원하는 임의의 세포를 포함한다. 비조혈세포의 예들로서는 적혈구, 백혈구 및 혈소판 이외의 세포를 포함한다. 예를 들자면, 순환 비조혈세포는 떨어져 나와 순환계, 예컨대 혈액이나 림프로 들어갈 수 있거나, 또는 혈액, 조혈조직 및 림프조직 이외의 조직이나 장기로부터 유래하는 삼출물 또는 분비 유체로 들어갈 수 있다.
- [0111] 순환 세포는 임의의 적합한 기준에 의해, 예컨대 세포 형태, 행동 및/또는 마커 발현에 대한 평가를 기반으로, 조혈세포 또는 비조혈세포 둘 중 하나로 동정 또는 분류될 수 있다. 예를 들자면, 형태학적으로 적혈구(적혈구)는 자체의 양오목(biconcave) 형상, 약 6 μm ~ 약 8 μm 의 직경, 그리고 세포핵의 결여에 의해 동정될 수 있고; 혈소판(혈소판)은 자체의 렌즈 형상, 약 2 μm ~ 약 3 μm 의 최장 직경, 그리고 세포핵의 결여에 의해 동정될 수 있다. 예를 들자면, 적혈구는 저장 용액, 예컨대 1x ACK(Ammonium Chloride Potassium) 완충제(155mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0.1mM EDTA, pH 7.3)에서의 용해에 대하여 비교적 더 큰 자체의 취약성에 의하거나, 또는 바람직하게 적혈구를 용해시키는 전통적인 저장 충격을 이용함으로써(즉 적합한 부피의 수중 NaCl 용액 0.2% w/v만큼을 첨가하여, 약 10초 ~ 20초 동안 적혈구가 용해되도록 허용한 다음, 동 부피의 수중 NaCl 용액 1.6% w/v만큼을 첨가하여 등장성을 회복시킴으로써), 아니면 또한 바람직하게 상업적으로 이용 가능한 BD FACSTM 용해 용액(cat. no 349202; <http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-1358.pdf>)을 이용함으로써 동정될 수 있다. 예를 들자면, 적혈구, 백혈구 및 혈소판은 분리되어, 항응고처리된 혈액의 침강에 의해 동정될 수 있으며, 이로써 적혈구는 혈장 저층에 수집되고, 백혈구와 혈소판은 혈장 저층과 상층 사이에 위치하는 백혈구 연층(buffy coat)에 수집된다.
- [0112] 임의의 구현예들에서, 백혈구는 적어도 하나의 범-백혈구 마커, 예컨대 CD45(단백질 티로신 인산화효소, 수용체 유형, C; PTPRC), 백혈구 특이 인단백질-1(LSP1), 및/또는 CD48(B-림프구 활성화 마커; BLAST-1; 신호전달 림프구 활성화 분자 2; SLAMF2) 발현의 진행에 의해(이러한 마커에 대해 양성인 것에 의해) 동정될 수 있다.
- [0113] 임의의 구현예들에서, 혈소판은 적어도 하나의 혈소판 마커, 예컨대 CD36(혈소판 당단백질 4; 지방산 자리옮김 효소; FAT), CD41(인테그린 알파-IIb; ITGA2B), CD42a(당단백질 IX(혈소판); GP9), CD42b(혈소판 당단백질 Ib 알파 사슬; GP1BA), 및/또는 CD61(인테그린 베타-3; ITGB3) 발현의 진행에 의해(이러한 마커에 대해 양성인 것에 의해) 동정될 수 있다.
- [0114] 임의의 구현예들에서, 적혈구가 아닌 순환 세포는 적어도 하나의 범-백혈구 마커와, 적어도 하나의 혈소판 마커의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해(이러한 마커에 대해 음성인 것에 의해) 비조혈세포인 것으로 동정될

수 있다.

- [0115] 임의의 구현예들에서, 적혈구가 아니고 혈소판도 아닌 순환 세포는 적어도 하나의 범-백혈구 마커의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해(이러한 마커에 대해 음성인 것에 의해) 비조혈세포인 것으로 동정될 수 있다.
- [0116] 임의의 구현예들에서, 적혈구가 아니고 백혈구도 아닌 순환 세포는 적어도 하나의 혈소판 마커의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해(이러한 마커에 대해 음성인 것에 의해) 비조혈세포인 것으로 동정될 수 있다.
- [0117] 그러므로 임의의 구현예들에서, 순환 CD321 양성 세포, 구체적으로 순환 CD321 양성 종양 세포는 적어도 하나의 범-백혈구 마커의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해 비조혈세포인 것으로 동정된다.
- [0118] 임의의 구현예들에서, 순환 CD321 양성 세포, 구체적으로 순환 CD321 양성 종양 세포는 적어도 하나의 범-백혈구 마커 및 적어도 하나의 혈소판 마커의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해 비조혈세포인 것으로 동정된다.
- [0119] 임의의 구현예들에서, 본원에 교시된 바와 같은 방법은 하기 단계들, 즉
- [0120] a) 대상체로부터 유래하는 생물 시료를 제공하는 단계[다만 상기 생물 시료는 대상체로부터 유래하는 순환 세포를 포함함];
- [0121] b) 적어도 하나의 범-백혈구 마커에 대해 음성이고, 적어도 하나의 혈소판 마커에 대해 음성인 비조혈세포를 상기 생물 시료 중에서 검출하는 단계; 및
- [0122] c) b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것임]
- [0123] 를 포함할 수 있다.
- [0124] 단계 a)에서, 생물 시료는, 바람직하게 대상체의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비 유체, 더욱 바람직하게는 대상체의 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함할 수 있다.
- [0125] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0126] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 구현예들에서, 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0127] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0128] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45이다.
- [0129] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 혈소판 마커는 CD42a이다.
- [0130] 본원에 교시된 방법과 용도에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45이고, 혈소판 마커는 CD42a이다.
- [0131] 마커, 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산이나, 2개 이상의 마커 군은, 바람직하게는 실질적으로 기타 분자와 피분석물, 예컨대 기타 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산을 제외하고, 이러한 마커 또는 이러한 마커 군의 존재 또는 부재, 그리고/또는 이의 양이, 시험되는 대상에서(예컨대 세포, 세포 집단, 조직, 장기 또는 유기체 상에서 또는 이 안에서, 예컨대 대상체 유래 생물 시료 중에서) 검출 또는 확정될 때, 이 시험되는 대상에서 "측정된다".
- [0132] 숙련자에 의해 평가 및 결정될 수 있는 인자들, 예컨대 특히 마커의 유형(예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산), 시험되는 대상의 유형(예컨대 세포, 세포 집단, 조직, 장기 또는 유기체, 예컨대 대상체의 생물 시료의 유형, 예컨대 전혈, 조직 생검편), 시험되는 대상 내 마커의 예상 존재비, 마커를 검출하는데 사용된 검출 방법의 유형, 견고성, 감수성 및/또는 특이성 등에 따라서, 마커는 시험되는 대상에서 직접 측정될 수 있거나, 또는 시험되는 대상은 마커의 정확한 측정을 달성하는 것을 목표로 하는 가공 단계 하나 이상에 돌입될 수 있다.
- [0133] 임의의 현존, 이용가능, 또는 종래의 분리, 검출 및/또는 정량 방법은 시험 대상에서(예컨대 세포, 세포 집단,

조직, 장기 또는 유기체 상에서 또는 이 안에서, 예컨대 대상체 유래 생물 시료 중에서) 마커의 존재 또는 부재 (예컨대 판독출력(readout)이 얻어졌는지 얻어지지 않았는지; 또는 검출가능한 양인지 검출 불가능한 양인지) 및/또는 이 마커의 양(예컨대 판독출력의 절대적이거나 상대적인 양)을 측정하는데 사용될 수 있다.

[0134] 임의의 예들에서, 이러한 방법은 생화학적 검정 방법, 예컨대 특히 마커, 예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산의 세포 신호전달 활성화, 유전자 조절 활성화, 물질 결합 활성화, 막 채널 활성화 또는 효소 활성화의 검정법을 포함할 수 있다.

[0135] 다른 예들에서, 이러한 방법은 면역학적 검정 방법을 포함할 수 있는데, 다만 여기서 해당 검정법이 마커(예컨대 바람직하게는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질)를 분리, 검출 및/또는 정량하는 능력은 분리 가능하고, 검출 가능하며/검출 가능하거나 정량 가능한 결합제, 예컨대 면역학적 결합제(항체) 및 마커 간의 특이 결합에 의해 주어진다. 면역학적 검정 방법으로서의 면역조직화화법, 면역세포화화법, 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법(FACS), 형광현미경, 마이크로유체 시스템을 사용하는 형광기반세포분취법, 면역친화성흡착 기반 기술, 예컨대 친화성 크로마토그래피, 자성입자분리, 자성 활성화 세포 분취법 또는 마이크로유체 시스템을 사용하는 비드 기반 세포 분취법, 효소 결합 면역흡착 검정법(ELISA) 및 ELISPOT 기반 기술, 방사능면역검정법(RIA), 웨스턴블롯팅(western blotting) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0136] 추가의 예들에서, 이러한 방법으로서의 질량분광분석방법을 포함할 수 있다. 일반적으로 본원에서는 펩티드 질량, 그리고 바람직하게는 또한 선택된 펩티드의 단편화 및/또는 (부분) 아미노산 서열에 대한 정확한 정보를 (예컨대 이중질량분광분석법(tandem mass spectrometry), MS/MS; 또는 다음원천붕괴(post source decay), TOF MS에서) 수득할 수 있는 임의의 질량분광분석(MS) 기술이 마커(예컨대 바람직하게 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질)를 분리, 검출 및/또는 정량하는데 유용할 수 있다. 적합한 펩티드 MS 및 MS/MS 기술 및 시스템은 그 자체로서 널리 공지되어 있고(예컨대 문헌(Methods in Molecular Biology, vol. 146: "Mass Spectrometry of Proteins and Peptides", Chapman 편저, Humana Press 2000, ISBN 089603609x; Biemann 1990. Methods Enzymol 193: 455-79; 또는 Methods in Enzymology, vol. 402: "Biological Mass Spectrometry", Burlingame 편저, Academic Press 2005, ISBN 9780121828073) 참조), 본원에 사용될 수 있다. 생물마커 펩티드 분석에 적합한 MS 배열, 기구 및 시스템으로서의 매트릭스 지원 레이저 탈착/이온화 비행시간(MALDI-TOF) MS; MALDI-TOF 다음원천붕괴(PSD); MALDI-TOF/TOF; 표면 증강 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량분광분석법(SELDI-TOF) MS; 전자분무이온화 질량분광분석법(ESI-MS); ESI-MS/MS; ESI-MS/(MS)ⁿ (여기서 n은 0보다 큰 정수임); ESI 3D 또는 선형(2D) 이온 트랩 MS; ESI 삼중 사중극자 MS; ESI 사중극자 직교 TOF(Q-TOF); ESI 푸리에 변환 MS 시스템; 실리콘상 탈착/이온화(DIOS); 2차 이온 질량분광분석법(SIMS); 대기압 화학이온화질량분광분석법(APCI-MS); APCI-MS/MS; APCI-(MS)ⁿ; 대기압 광이온화질량분광분석법(APPI-MS); APPI-MS/MS; 및 APPI-(MS)ⁿ를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 당 분야에 정립된 방법, 예컨대 충돌유도해리(CID)를 이용하여 이중 MS(MS/MS) 배열의 펩티드 이온 단편화가 달성될 수 있다. 질량분광분석법에 의한 마커의 검출 및 정량화는 다중 반응모니터링(MRM), 예컨대 특히 Kuhn외 다수에 의해 2004년에 기술된 바와 같은 방법(Proteomics 4: 1175-86)을 수반할 수 있다. MS 펩티드 분석 방법은 유리하게 상류 펩티드 또는 단백질 분리 또는 분획화 방법, 예컨대 크로마토그래피 및 기타 방법과 합하여질 수 있다.

[0137] 다른 예들에서, 이러한 방법으로서의 크로마토그래피 방법을 포함할 수 있다. "크로마토그래피"란 용어는 물질, 예컨대 화학 물질 또는 생물 물질, 예컨대 마커, 예컨대 바람직하게는 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질(보통 말하는 그런 것들로서, 당 분야에서 널리 이용 가능한 것이라고 하는 것)을 분리하기 위한 방법을 포함한다. 바람직한 접근법에서, 크로마토그래피란, 액체 또는 가스가 정지 액체 또는 고체 상("정지상") 주위를 돌아 흐르거나 그 위를 흐를 때, 이 액체 또는 가스의 이동하는 흐름("이동상")에 의해 운반되는 물질들(피분석물)의 혼합물이, 상기 이동상과 상기 정지상 사이의 피분석물 차등 분포로 말미암아 여러 성분으로 분리되는 방법을 지칭한다. 정지상은 보통 미분 고체, 필터 재료의 시트, 또는 고체 표면 위 액체 박막 등일 수 있다. 크로마토그래피는 또한 생물 기원의 화학적 화합물, 예컨대 아미노산, 단백질, 단백질 또는 펩티드 단편 등을 분리하기 위해 널리 적용 가능하다.

[0138] 크로마토그래피는, 바람직하게 컬럼형(즉 정지상이 컬럼 내에 퇴적(depositing)되어 있거나 또는 팩킹(packin g)되어 있는 형태), 바람직하게는 액체 크로마토그래피, 더욱더 바람직하게는 HPLC일 수 있다. 크로마토그래피 에 관한 명세는 당 분야에 널리 공지되어 있는데, 추가의 안내를 하자면, 예컨대 문헌[Meyer M., 1998, ISBN: 047198373X, and "Practical HPLC Methodology and Applications", Bidlingmeyer, B. A., John Wiley & Sons Inc., 1993]을 참조한다. 크로마토그래피의 예시적 유형으로서의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 정상

HPLC(NP-HPLC), 역상 HPLC(RP-HPLC), 이온 교환 크로마토그래피(IEC), 예컨대 양이온 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 친수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 크기별 배제 크로마토그래피(SEC), 예컨대 겔 여과 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피, 크로마토조점맞춤, 친화성 크로마토그래피, 예컨대 면역친화성 크로마토그래피 및 부동화 금속 친화성 크로마토그래피 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0139] 마커, 예컨대 바람직하게 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 분리, 검출 및/또는 정량화하기 위한 추가의 기술이, 선택적으로는 진술된 분석 방법들 중 임의의 것과 연계하여 사용될 수 있다. 이러한 방법으로서는 화학적 추출 분배(chemical extraction partitioning), 등전점 초점맞춤(IEF), 예컨대 모세관 등전점초점맞춤(CIEF), 모세관 등속전기영동(CITP) 및 모세관 전기크로마토그래피(CEC) 등, 1차원 폴리아크릴아미드겔전기영동(PAGE), 2차원 폴리아크릴아미드겔전기영동(2D-PAGE), 모세관 겔전기영동(GE), 모세관 대역전기영동(CZE) 및 미셀 동전 크로마토그래피(MEKC), 자유흐름 전기영동(FFE) 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0140] 임의의 예들에서, 이러한 방법은 마커를 핵산 수준으로, 더욱 구체적으로는 RNA 수준으로, 예컨대 hnRNA, 전-mRNA, mRNA, 또는 cDNA 수준으로 분리, 검출 및/또는 정량하는 단계를 포함할 수 있다. 당 분야에 공지된 표준 정량적 RNA 또는 cDNA 측정용 도구가 사용될 수 있다. 비제한적 예들로서는 잡종화 기반 분석법, 마이크로어레이 발현 분석법, 디지털 유전자 발현 프로파일링(DGE), RNA-현장 잡종화(RISH) 및 노던 블롯 분석법 등; PCR, RT-PCR, RT-qPCR, 종말점 PCR 또는 디지털 PCR 등; 지지 올리고뉴클레오티드 검출법, 피로-서열결정법(pyrosequencing), 합성에 의한 폴로니(polony) 순환 서열결정법, 2방향 동시 서열결정법, 단일 분자 서열결정법, 단일 분자 실시간 서열결정법, 진정 단일 분자 서열결정법, 잡종화 지원 나노포어(nanopore) 서열결정법, 합성에 의한 서열결정법 또는 단일 세포 RNA 서열결정법(sc-RNA seq) 등을 포함한다.

[0141] 추가의 예에서, 방법들, 예컨대 본원에 논의된 방법들의 임의의 조합이 사용될 수 있다.

[0142] 세포, 예컨대 본원에 명시된 바와 같은 종양 세포 또는 CTC는, 일반적으로 세포, 예컨대 구체적으로 CD321 양성 종양 세포 또는 CTC에 의해 발현되거나 발현되지 않는 임의의 마커(들) 또는 마커들의 조합(들), 예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산의 조합(들)을 기준으로 기술되거나 특성규명된다. 그러므로 명시된 세포를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 본 방법은 마커를 기반으로 할 수 있는데, 즉 마커(들) 또는 마커들의 조합(들)을 발현하거나 발현하지 않는 세포를 검출, 정량화 또는 분리하는 것을 수반할 수 있거나, 또는 검출을 수반할 수 있되, 다만 발현 또는 발현의 비진행은 명시된 세포를 특징분석(typifying) 또는 특성규명(characterizing)하는 것이라 본원에 교시되어 있다.

[0143] 시험되는 대상(예컨대 세포 집단, 조직, 장기, 유기체 또는 대상체 유래 생물 시료) 내 명시된 세포의 존재 또는 부재(예컨대 판독 출력이 수득되는지 또는 수득되지 않는지; 또는 검출 가능한 양으로 수득되는지 아니면 검출 불가능한 양으로 수득되는지)를 측정하고/측정하거나 (예컨대 판독 출력의 절대량 또는 상대량을) 정량하기 위하여, 또는 시험되는 대상으로부터 명시된 세포를 분리하기 위하여, 현존하는 이용 가능한 임의의 분리, 검출 및/또는 정량 방법 또는 종래의 임의의 분리, 검출 및/또는 정량 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 시험되는 대상(예컨대 대상체 유래 세포 집단, 조직, 장기, 유기체 또는 생물 시료)을 구성하는 다른 세포를 실질적으로는 배제한 채, 이 시험되는 대상 내 명시 세포 또는 이로부터 유래하는 명시 세포를 검출, 정량 또는 분리하는 것을 허용한다. 이러한 방법은 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 바람직하게 적어도 70%, 적어도 75%, 더욱 바람직하게 적어도 80%, 적어도 85%, 더욱더 바람직하게 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%의 감수성, 및/또는 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 바람직하게 적어도 70%, 적어도 75%, 더욱 바람직하게 적어도 80%, 적어도 85%, 더욱더 바람직하게 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%의 감수성으로 명시된 세포를 검출, 정량 또는 분리하는 것을 허용할 수 있다. 예를 들자면, 이러한 방법에 의해 검출, 정량 또는 분리된 모든 세포의 (수를 기준으로) 적어도 40%, 예를 들어 적어도 45%, 바람직하게 적어도 50%, 적어도 55%, 더욱 바람직하게 적어도 60%, 적어도 65%, 더욱더 바람직하게 적어도 70%, 적어도 75%, 더욱더 바람직하게 적어도 80%, 적어도 85%, 그리고 더욱더 바람직하게 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 심지어 100%가, 명시된 세포, 예컨대 구체적으로 명시된 종양 세포 또는 CTC에 대응할 수 있다.

[0144] 임의의 구현예들에서, 명시된 세포를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 방법은 세포의 생존 능력을 줄이거나 없애는 처리(들) 또는 단계(들)를 포함할 수 있다. 예를 들어 통상 세포막의 투과처리와 가능하게는 세포의 고정을 필요로 하는, 세포내 마커(들)를 측정하는 단계를 포함하는 방법; 그리고 핵산 마커(들)를 측정하는 단계를 포

합하는 방법은, 통상 세포로부터 핵산(예컨대 구체적으로 RNA, 더욱 구체적으로 mRNA)을 수득하는 단계를 필요로 할 수 있다. 임의의 다른 구현예들에서, 명시된 세포를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법은 실질적으로 세포의 생존 능력을 보존할 수 있다. 예를 들어 세포의 또는 세포 표면 마커(들)를 측정하는 단계를 포함하는 방법은 세포막의 일체성을 뒤흔들필요는 없으며, 세포의 고정/투과처리를 필요로 하지 않을 수도 있다.

[0145] 임의의 구현예들에서, 명시된 세포를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법은 단일 세포 기반의 방법일 수 있는데, 즉 명시된 세포를 개별 세포로서 따로따로 검출, 정량 또는 단리하는 것을 허용할 수 있다. 다른 구현예들에서, 명시된 세포를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법은 세포 집단 기반의 방법일 수 있는데, 즉 명시된 세포를 오로지 세포 군 또는 세포 무리로서 검출, 정량 또는 단리하는 것을 허용하되, 다만 이 방법은 개별 세포에 대한 정보를 제공하지 못하거나 개별 세포의 단리를 허용하지 않는다.

[0146] 마커(들)의 분리, 또는 질적 측정 및/또는 정량적 측정이, 명시된 세포의 검출, 정량 또는 단리와 상관계되어 있을 수 있거나 또는 명시된 세포의 검출, 정량 또는 단리로서 바뀌어 수행될 수 있는 한, 명시된 세포를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법은 마커를 측정하기 위한 전술된 기술들 중 임의의 기술을 이용할 수 있다. 예를 들어 마커를 측정하기 위한 방법으로서, 전술된 생화학 검정 방법, 면역학적 검정 방법, 질량분광분석 방법, 크로마토그래피 방법 또는 핵산 분석 방법 중 임의의 방법, 또는 이러한 방법들의 조합이 명시된 세포의 검출, 정량 또는 단리를 위해 사용될 수 있다.

[0147] 그러므로 임의의 구현예들에서, 종양 세포 또는 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분류법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 이용하여 검출, 정량 또는 단리된다.

[0148] 유세포분석법은, 세포 집단의 개별 세포가 레이저 빔을 관통하며 단일 파일의 협소한 흐름을 통과할 때, 세포 집단의 개별 세포 자체의 광학 특성(예컨대 흡광성, 광 산란 및 형광 특성 등)에 의해 분석되는 방법을 포함한다. 형광세포분석 방법은 특정의 광학 특성을 가지는 세포 집단이 다른 세포로부터 분리되는 형광 활성화 분류(FACS) 방법을 포함한다.

[0149] 원소 질량분광분석 기반 유세포분석법, 또는 질량세포분석법은, 형광색소 표지된 결합 시약을 질량 태그된 결합 시약, 즉 한정된 질량을 가지는 동위원소나 원소로 태그된 결합 시약으로 치환하여 세포를 분석하기 위한 접근법을 제공한다. 이러한 방법에 있어서, 표지된 입자는 질량세포분석기로 도입되고, 여기에서 이 입자는 개별적으로 원자화 및 이온화된다. 그 다음 개별 입자는 원소분석의 대상이 되고, 사용된 질량 태그가 동정되며 이의 존재비가 측정된다. 이후 각각의 입자와 결합된 동위원소의 양과 동일성이 저장 및 분석된다. 원자 분석의 해상도와, 사용될 수 있는 동위 원소의 수를 기반으로, 단일 입자에 대한 매개변수 100가지 이하 또는 그 이상을 동시에 측정하는 것이 가능하다.

[0150] 형광 현미경은 넓게는 세포 집단의 개별 세포가 자체의 형광 특성에 의해 현미경 분석되는 방법을 포함한다. 형광현미경 접근법은 수동으로, 또는 바람직하게 반자동이나 자동으로 수행될 수 있다.

[0151] 친화성 크로마토그래피라고도 칭하여지는 친화성 분리법은 넓게는 이동상, 예컨대 적합한 액체상에 존재하는 세포들(예컨대 수성 현탁액 중 세포 집단)과 정지상, 예컨대 적합한 고체상의 특이적 상호작용, 그리고 이로 말미암은 세포의 정지상, 예컨대 적합한 고체상에의 흡착과; 이후 정지상의 이동상 나머지로부터의 분리; 그리고 흡착된 세포의 정지상으로부터의 회수(예컨대 용리)를 수반하는 기술을 포함한다. 친화성 분리법은 컬럼상에서 이루어질 수 있거나, 또는 대안적으로 회분식 처리, 즉 정지상이 적합한 기술, 예컨대 원심분리 또는 자기장 적용(예컨대 정지상이 자성 기질, 예컨대 자성 입자나 비드를 포함하는 경우)에 의해 액체상으로부터 수집/분리되는 처리를 수반할 수 있다. 그러므로 자성 세포 분리법도 또한 본원에서 상상될 수 있다.

[0152] 마이크로유체 시스템은 다양한 물리적 원리를 이용하면서 정확하고 처리량이 많은 세포의 검출, 정량 및/또는 분류를 허용한다. 마이크로칩상 세포 분류는 필요한 장비 크기를 줄이고, 잠재적으로 생물유해한 에어로졸을 없애며, 통상 세포 분류와 연관되어 복잡했던 프로토콜을 단순화함으로써 다수의 이점을 제공한다. 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "마이크로유체 시스템"이란 용어는, 넓게는 유체 마이크로채널(microchannel)을 하나 이상 가지는 시스템을 지칭한다. 마이크로채널은 최대 횡단면 치수가 통상 1 mm 미만, 바람직하게 500 μ m 미만, 더욱 바람직하게 400 μ m 미만, 더욱 바람직하게 300 μ m 미만, 더욱 바람직하게 200 μ m 미만, 예컨대 100 μ m 또는 이보다 작은 유체 채널을 지칭한다. 이러한 마이크로유체 시스템은 유체 및/또는 대상, 예컨대 액적, 기포, 캡슐, 입자 및 세포 등을 조직하기 위해 사용될 수 있다. 마이크로유체 시스템은, 예를 들어 형광 표지 기반(예컨대 형광색소 집합 결합제(들), 예컨대 형광색소 집합 항체(들) 사용), 비드 기반(예컨대 비드 집합

결합제(들), 예컨대 비드 접합 항체(들) 사용), 또는 무표지 세포 분취(문헌(Shields et al., Lab Chip. 2015, vol. 15: 1230-1249)에 검토됨)를 허용할 수 있다.

- [0153] 임의의 구현예들에서, 전술된 방법 및 기술은 본원에 명시된 세포, 예컨대 종양 세포 또는 CTC에 의해 발현되거나 발현되지 않는 하나 이상의 마커, 예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산과 특이적으로 결합할 수 있는 제제(들)를 이용할 수 있다.
- [0154] 그러므로 임의의 구현예들에서, 상기 기술은 CD321에 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 이용한다.
- [0155] 추가의 구현예들에서, 상기 기술은
- [0156] - 범-백혈구 마커 적어도 하나, 예컨대 CD45, LSP1 및 CD48로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상, 그리고 혈소판 마커 적어도 하나, 예컨대 CD36, CD41, CD42a, CD42b 및 CD61로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 또는
- [0157] - 범-백혈구 마커 적어도 하나, 예컨대 CD45, LSP1 및 CD48로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 또는
- [0158] - 혈소판 마커 적어도 하나, 예컨대 CD36, CD41, CD42a, CD42b 및 CD61로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0159] 을 추가로 이용한다.
- [0160] 결합제는 다양한 형태, 예컨대 동결건조 형태, 용액 중 자유로운 형태 또는 고체상 위에 부동화된 형태를 가질 수 있다. 결합제는, 예컨대 다중웰 평판에 제공될 수 있거나, 또는 어레이(array)나 마이크로어레이(microarray)로서 제공될 수 있거나, 아니면 결합제는 별도로, 개별적으로 또는 조합되어 포장될 수 있다.
- [0161] 본 명세서 전반에 걸쳐 의도되는 바와 같은 결합제는 특히 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드(scaffold), 앵타머, 스파이겔머(spiegelmer)(L-앵타머), 광 앵타머, 단백질, 펩티드, 펩티도모의체, 핵산, 예컨대 올리고뉴클레오타이드(예컨대 잡종화용 프로브 또는 증폭 또는 서열결정용 프라이머, 그리고 프라이머 쌍), 소분자 또는 이것들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0162] 임의의 바람직한 구현예들에서, 하나 이상의 결합제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머이다.
- [0163] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "특이적으로 결합하다"란 용어는, (본원에서 "결합제" 또는 "특이적 결합제"라고도 칭하여지는) 제제가 다른 분자, 즉 무작위의 분자나 관련이 없는 분자는 실질적으로 배제하고, 선택으로는 구조적으로 관련이 있는 다른 분자도 실질적으로 배제한, 원하는 분자 또는 피분석물(예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산) 하나 이상과 결합함을 의미한다. "특이적으로 결합하다"란 용어는 반드시 제제가 자체의 목표 표적(들)과 배타적으로 결합해야 하는 것을 필요로 하는 것은 아니다. 예를 들어 제제는, 만일 결합 조건하에서의 이러한 목표 표적(들)에 대한 이 제제 자체의 친화성이 비표적 분자, 예컨대 적합한 대조군 분자(예컨대 소 혈청 알부민, 카세인)에 대한 이 제제 자체의 친화성보다 적어도 약 2배, 바람직하게 적어도 약 5배, 더욱 바람직하게 적어도 약 10배, 더욱더 바람직하게 적어도 약 25배, 더욱더 바람직하게 적어도 약 50배, 그리고 더욱더 바람직하게 적어도 약 100배, 또는 적어도 약 1000배, 또는 적어도 약 10^4 배, 또는 적어도 약 10^5 배, 또는 적어도 약 10^6 배, 또는 이 이상 더 크다면, 해당 제제는 관심 표적(들)에 특이적으로 결합하였다고 일컬어질 수 있다.
- [0164] 바람직하게 특이 결합제는 자체의 목표 표적(들)과 이러한 결합에 대한 친화성 상수(K_A), 즉 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 더욱 바람직하게 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 더욱더 바람직하게 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 더욱더 바람직하게 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 그리고 더욱더 바람직하게 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 또는 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A , 또는 $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 이상의 K_A 로 결합할 수 있는데, 여기서 K_A 는 $[\text{SBA}_T]/[\text{SBA}][\text{T}]$ 이고, SBA는 특이 결합제를 나타내며, T는 목표 표적을 나타낸다. K_A 의 확정은 당 분야에 공지된 방법, 예를 들어 평형투석 및 스캐차드 플롯 분석(Scatchard plot analysis)에 의해 수행될 수 있다.

- [0165] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"란 용어는 이 용어 자체의 최광의로서 사용되어, 일반적으로 임의의 면역학적 결합제를 지칭한다. 이 용어는 특히 비변형 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 비변형 항체로부터 생성되는 다가 항체(예컨대 2가, 3가 또는 이 이상의 역가를 가지는 항체) 및/또는 다중 특이적 항체(예컨대 2중 이상으로 특이적인 항체), 그리고 원하는 생물 활성(특히 관심 항원, 즉 항원 결합 단편과 특이적으로 결합하는 능력)을 보이는 한 항체의 단편뿐만 아니라, 이러한 단편의 다가 및/또는 다중 특이적 복합체를 포함한다. "항체"란 용어는 면역화를 포함하는 방법에 의해 제조된 항체를 포함할 뿐만 아니라, 관심 항원상 에피토프와 특이적으로 결합할 수 있는 상보성결정영역(CDR) 적어도 하나를 포함하도록 제조된 임의의 폴리펩티드, 예컨대 제조합 발현 폴리펩티드를 포함하기도 한다. 그러므로 상기 용어는 시험관 내에서 제조되는지 아니면 생체 내에서 제조되는지 여부에 상관없이 이러한 분자에 적용된다.
- [0166] 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 군 중 임의의 것일 수 있으며, 바람직하게는 IgG 군 항체일 수 있다. 항체는 폴리클로날 항체, 예컨대 항혈청 또는 이로부터 정제된(예컨대 친화성 정제된) 면역글로불린일 수 있다. 항체는 모노클로날 항체 또는 모노클로날 항체들의 조합일 수 있다. 모노클로날 항체가 더 큰 선택성과 재현가능성을 보이며 특정의 항원 또는 항원 내 특정의 에피토프를 표적화할 수 있다. 비제한적인 예를 들자면, 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al. 1975 (Nature 256: 495)에 처음 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 (예컨대 US 4,816,567에서와 같은) 제조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한, 예를 들어 문헌[Clackson et al. 1991 (Nature 352: 624-628) 및 Marks et al. 1991 (J Mol Biol 222: 581-597)에 기술된 바와 같은 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0167] 항체 결합제는 항체 단편일 수 있다. "항체 단편"은 항원 결합 영역 또는 이의 가변 영역을 포함하는, 비변형 항체의 일부분을 포함한다. 항체 단편의 예들로서는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 및 scFv 단편, 단일 도메인(sd) Fv, 예컨대 VH 도메인, VL 도메인 및 VHH 도메인; 다이아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체 분자, 구체적으로 중쇄 항체; 그리고 항체 단편(들)으로부터 생성된 다가 및/또는 다중 특이적 항체, 예컨대 다이아바디, 트리바디 및 멀티바디를 포함한다. 상기 명칭들, 즉 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv 등은 당 분야에서 정립된 의미를 가지도록 의도된다.
- [0168] 항체란 용어는, 임의의 동물 종, 바람직하게 척추동물 종, 예컨대 조류(bird) 및 포유류로부터 기원하거나 또는 이로부터 유래하는 일부분 하나 이상을 포함하는 항체를 포함한다. 비제한적으로, 항체는 닭, 칠면조, 거위, 오리, 기니아 가금류, 메추리 또는 공작의 것일 수 있다. 또한, 비제한적으로 항체는 인간, 젓과동물(예컨대 마우스, 래트 등), 당나귀, 토끼, 염소, 양, 기니아 피그, 낙타(예컨대 카멜루스 박트리아누스(*Camelus bactrianus*) 및 카멜루스 드로마데리우스(*Camelus dromaderius*)), 라마(예컨대 라마 파코스(*Lama paccos*), 라마 글라마(*Lama glama*) 또는 라마 비쿠그나(*Lama vicugna*)) 또는 말의 것일 수 있다.
- [0169] 숙련자는, 하나 이상의 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환(예컨대 보존적 치환)과 같은 변경이 항체의 각각의 항원과의 결합을 보존하는 한, 항체는 하나 이상의 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환(예컨대 보존적 치환)을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 항체는 또한 자체의 구성적 아미노산 잔기의 하나 이상의 원산 또는 인공 변형(예컨대 당화 등)을 포함할 수 있다.
- [0170] 폴리클로날 및 모노클로날 항체뿐만 아니라, 이것들의 단편을 제조하는 방법이 제조합 항체 또는 이의 단편을 제조하기 위한 방법으로서 당 분야에 널리 공지되어 있다[예를 들어 문헌(Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1988; Harlow and Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1999, ISBN 0879695447; "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", Zola 편저, CRC Press 1987, ISBN 0849364760; "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach", Dean & Shepherd 편저, Oxford University Press 2000, ISBN 0199637229; Methods in Molecular Biology, vol. 248: "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Lo 편저, Humana Press 2004, ISBN 1588290921) 참조].
- [0171] 임의의 구현예들에서, 제제는 Nanobody®일 수 있다. "Nanobody®" 및 "Nanobodies®"란 용어는 Ablynx NV(벨기에)의 상표이다. "나노바디"란 용어는 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 본원에서는 이의 최광의로서 사용되고 있는데, (1) 중쇄 항체, 바람직하게는 낙타과로부터 유래하는 중쇄 항체의 V_H 도메인 단리; (2) V_H 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 발현; (3) 자연 발생 V_H 도메인의 "인간화" 또는 이러한 인간화 V_H 도메인을 암호화하는 핵산의 발현; (4) 임의의 동물 종, 구체적으로 포유류 종, 예컨대 인간으로부터 유래하는 V_H 도메인의 "낙타화", 또는 이 처럼 낙타화된 V_H 도메인을 암호화하는 핵산의 발현; (5) 당 분야에 기술된 바와 같

은 "도메인 항체" 또는 "dAb"의 "낙타화", 또는 이 처럼 낙타화된 dAb를 암호화하는 핵산의 발현; (6) 그 자체로서 공지된 단백질, 폴리펩티드 또는 기타 아미노산 서열을 제조하기 위한 합성 기술 또는 반합성 기술의 사용; (7) 그 자체로서 공지된 핵산 합성을 위한 기술을 사용하는, 나노바디를 암호화하는 핵산의 제조 후, 이로부터 수득된 핵산의 발현; 및/또는 (8) 전술된 것들 중 한 가지 이상의 임의의 조합에 의해 수득된 면역학적 결합제를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "낙타과"는, 구세계(old world) 낙타과(카멜루스 박트리아누스 및 카멜루스 드로마데리우스) 및 신세계(new world) 낙타과(예컨대 라마 파코스, 라마 글라마 또는 라마 비쿠그나)를 포함한다.

[0172] 인간 CD321과 결합할 수 있는 항체의 예들로서는 하기 제조사들, 즉 Merck Millipore(#04-593, 토끼 모노클로날, 클론 EP1042Y); R&D Systems(#MAB1103, 마우스 모노클로날, 클론 654806); OriGene Antibodies(#TA506034, 마우스 모노클로날, 클론 OTI6E11; #TA506017, 마우스 모노클로날, 클론 OTI3H3); Novus Biologicals(#H00050848-M01, 마우스 모노클로날, 클론 2E3-1C8); Abcam(#ab17261, 마우스 모노클로날, 클론 M.Ab.F11; #ab201562, 마우스 모노클로날, 클론 MM0785-60M31); Invitrogen(#14-9321-82, 마우스 모노클로날, 클론 WK9; #MA1-34731, 마우스 모노클로날, 클론 M.Ab.F11); 및 Santa Cruz(#sc-135956, 마우스 모노클로날, 클론 43; sc-53624, 마우스 모노클로날, 클론 1H2A9; #sc-53623, 마우스 모노클로날, 클론 J10.4; #sc-53622, 마우스 모노클로날, 클론 J3F.1; #sc-52690, 마우스 모노클로날, 클론 M.Ab.F11)(다만 "#"는 카탈로그 번호를 나타냄)로부터 입수 가능한 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 주어진 항체의, 주어진 항원 검출 기술 또는 방법에서의 적합성에 관한 정보는 항체 제조사로부터 용이하게 입수 가능하다.

[0173] 본원에 기술된 다른 마커, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질, 예컨대 범-백혈구 마커, 예컨대 CD45, LSP1 또는 CD48에의 다수의 항체 결합, 또는 혈소판 마커, 예컨대 CD36, CD41, CD42a, CD42b 또는 CD61에의 다수의 항체 결합은 또한 다양한 제조사로부터 상업적으로 입수 가능하다. 이러한 정보는 각각의 제조사로부터 수득될 수 있고, 또한 편리하게 카탈로그로 작성되어, 공중이 이용 가능한 데이터베이스, 예컨대 Weizmann Institute에 의해 관리되는 GeneCards® 데이터베이스(www.genecards.org)("항체 생성물" 분야)를 통해 조회될 수 있다

[0174] "항체 유사 단백질 스캐폴드" 또는 "조작된 단백질 스캐폴드"란 용어는, 광범위하게, 통상 조합된 조작(예컨대 파지 전시 또는 기타 분자 선택 기술과 병행되는 부위 유도성 무작위 돌연변이유발)에 의해 수득되는 단백질성 비면역글로불린 특이적 결합제를 포함한다. 일반적으로 이러한 스캐폴드는 견고하고 작은 가용성 단량체 단백질(예컨대 Kunitz 억제제 또는 리포칼린(lipocalin)), 또는 안정적으로 폴딩(folding)된 세포 표면 수용체의 막외 도메인(예컨대 단백질 A, 피브로넥틴 또는 안키린 반복부)으로부터 유래한다.

[0175] 이러한 스캐폴드는 문헌[Binz et al., Gebauer and Skerra, Gill and Damle, Skerra 2000, 및 Skerra 2007]에서 광범위하게 검토되어 있으며, 자체의 알파 나선체 2개의 계면을 제공하고, 58개의 잔기로 이루어진 3중 나선 묶음인 스타필로코커스 단백질 A의 Z-도메인을 기반으로 하는 아피바디(Nygren); 통상 인간 기원이고 소형(약 58개 잔기)이면서 견고한 이황화 가교 세린 프로테아제 억제제로서, 상이한 프로테아제 특이성을 위해 조작될 수 있는 조작 Kunitz 도메인(예컨대 LACI-D1)(Nixon and Wood); Ig-유사 베타 샌드위치 폴딩(94개 잔기)을 채택하고, 2개 ~ 3개의 루프가 노출되되, 중심 이황화 가교는 결여된, 인간 피브로넥틴 III의 10번째 세포외 도메인(10Fn3)을 기반으로 하는 모노바디 또는 아드넥틴(Koide and Koide); 8가닥 베타-배럴 단백질(약 180개 잔기)의 별종 과인 리포칼린으로부터 유래하고, 구조적으로 가변성인 루프 4개에 의해 개방 말단에서 자연적으로 소형 리간드에 대한 결합 부위들을 형성하며, 인간, 곤충 및 다수의 기타 유기체에 풍부한 안티칼린(Skerra 2008); 통상 반복 베타-턴(beta-turn) 3개로 인해 형성되는 단단한 계면을 제공하는 계획 안키린 반복 도메인(166개 잔기)인 DARPin(Stumpp et al.); 아미버(다량체화 LDLR-A 모듈)(Silverman et al.); 시스테인 풍부 노틴(knottin) 펩티드(Kolmar)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0176] "애포타머"란 용어는, 표적 분자, 예컨대 펩티드에 특이적으로 결합하는 단일 가닥 또는 이중 가닥 올리고-DNA, 올리고-RNA 또는 올리고-DNA/RNA, 또는 이것들의 임의의 유사체를 지칭한다. 유리하게, 애포타머는 이의 표적에 대해 매우 큰 특이성과 친화성(예컨대 크기 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 만큼의 K_A)을 보인다. 애포타머 제조는 특히 본원에 참조로 인용되어 있는 문헌들[US 5,270,163; Ellington & Szostak 1990 (Nature 346: 818-822); Tuerk & Gold 1990 (Science 249: 505-510); 또는 "The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications", Klussmann 편저, Wiley-VCH 2006, ISBN 3527310592]에 기술되어 있다. "광 애포타머"란 용어는, 표적 분자와 공유 결합할 수 있게 해주거나 가교할 수 있게 해주는 하나 이상의 광반응성 작용기를 함유하는 애포타머를 지칭한다. "스파이젤머"란 용어는, L-DNA, L-RNA, 또는 기타 좌향나사(left-handed) 뉴클레오티드 유도체 또는 뉴클레오티드 유사 분자를 포함하는 애포타머를 지칭한다. 좌향나사 뉴클레오티드를 함유하는 애포타머는,

보통 우향나사 뉴클레오티드를 함유하는 기질에 작용하는 자연 발생 효소에 의한 분해에 내성을 가진다. "펩티도모의체"란 용어는, 대응하는 펩티드의 토폴로지(topology) 유사체인 비펩티드 제제를 지칭한다. 펩티드의 펩티도모의체를 합리적으로 디자인하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 황산화 8량체 펩티드 CCK26-33을 기반으로 하는 펩티도모의체 3개의 합리적 디자인과, 11량체 펩티드인 P 물질을 기반으로 하는 펩티도모의체 2개의 합리적 디자인, 그리고 관련된 펩티도모의체 디자인 원리는 문헌[Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134)]에 기술되어 있다.

[0177] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "올리고뉴클레오티드"란 용어는, 본원에 정의된 바와 같은 핵산(핵산 유사체 및 모의체 포함) 올리고머 또는 중합체를 지칭한다. 바람직하게 올리고뉴클레오티드, 예컨대 더욱 구체적으로는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 (실질적으로) 단일 가닥이다. 본원에 의도되는 바와 같은 올리고뉴클레오티드는 그 길이가, 바람직하게 약 10개 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 단위(즉 뉴클레오티드 또는 뉴클레오타이드 유사체), 바람직하게는 약 15개 내지 약 50개, 더욱 바람직하게는 약 20개 내지 약 40개, 또한 바람직하게 약 20개 내지 약 30개일 수 있다. 본원에 의도되는 바와 같은 올리고뉴클레오티드는 비자연발생 헤테로사이클릭 염기 하나 이상 또는 전부 및/또는 비자연발생 당 기 하나 이상 또는 전부 및/또는 비자연발생 뉴클레오타이드간 결합 하나 이상 또는 전부를 포함할 수 있는데, 이러한 것들의 포함은, 예컨대 뉴클레아제의 존재하에서도 증가한 안정성과, 증가한 잡종화 친화성, 미스매치에 대한 증가한 관용성 등과 같이 개선된 특성들을 달성할 수 있다.

[0178] 핵산 결합제, 예컨대 올리고뉴클레오티드 결합제는 통상 적어도 부분적으로 관심 표적 핵산에 대해 안티센스이다. "안티센스"란 용어는, 일반적으로 제제(예컨대 올리고뉴클레오티드)가, 표적 핵산, 예컨대 표적 DNA, hnRNA, pre-mRNA 또는 mRNA와 같은 표적 핵산 내 주어진 서열과 특이적으로 어닐링(annealing)(잡종화)되도록 구성되고, 통상적으로는 상기 표적 핵산 서열에 상보성이거나 실질적으로 상보성인 핵산 서열을 포함하거나, 이러한 핵산 서열로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어져 있는 경우를 지칭한다. 본원에 사용되기 적합한 안티센스 제제, 예컨대 잡종화 프로브, 또는 증폭 또는 서열결정 프라이머 및 프라이머 쌍은 통상적으로 높은 염중도 조건에서 각각의 표적 핵산 서열과 어닐링(잡종화)될 수 있고, 생리학적 조건하에서 표적과 특이적으로 잡종화될 수 있다. 본 명세서 전반에 걸쳐 핵산과 관련하여 사용된 바와 같은 "상보성인" 또는 "상보성"이란 용어는, 단일 가닥 핵산이, 허용 가능한 염 조건(이온 세기) 및 온도 조건하에서 염기 쌍 형성, 바람직하게 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기 쌍 형성에 의해 결합되는 보통의 경우를 지칭한다. 예를 들자면, 상보성 왓슨-크릭 염기 쌍 형성은 염기 A와 T 사이, A와 U 사이, 또는 G와 C 사이에서 일어난다. 예를 들어 서열 5'-A-G-U-3'은 서열 5'-A-C-U-3'에 대해 상보성이다.

[0179] 올리고뉴클레오티드에 대한 언급대상은, 구체적으로, 하지만 비제한적으로 핵산 검출 기술에서 통상 사용되는 바와 같은 잡종화 프로브 및/또는 증폭 프라이머 및/또는 서열결정 프라이머 등을 포함한다.

[0180] "소분자"란 용어는, 그 크기가 제약업계에서 일반적으로 사용되는 유기 분자의 크기와 거의 동일한 화합물, 바람직하게 유기 화합물을 지칭한다. 이 용어는, 생물 거대분자(예컨대 단백질, 펩티드, 핵산 등)는 배제한다. 바람직한 소형 유기 분자의 크기 범위는 약 5000 Da 이하, 예컨대 약 4000 Da 이하, 바람직하게 3000 Da 이하, 더욱 바람직하게 2000 Da 이하, 더욱더 바람직하게 약 1000 Da 이하, 예컨대 약 900 Da, 약 800 Da, 약 700 Da, 약 600 Da 또는 약 500 Da 이하이다.

[0181] 본원에 논의된 바와 같은 결합제는 적합하게, 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. "표지"란 용어는 검출 가능하고, 바람직하게는 정량 가능한 판독출력 또는 특성을 제공하는데 사용될 수 있고, 관심 실체, 예컨대 결합제에 부착될 수 있거나 이의 일부를 이룰 수 있는 임의의 원자, 분자, 기 또는 생물분자를 지칭한다. 표지는, 예를 들어 질량 분광분석법, 분광학적 방법, 광학적 방법, 비색 방법, 자기적 방법, 광화학적 방법, 생화학적 방법, 면역화학적 방법 또는 화학적 방법에 의해 적합하게 검출 가능할 수 있다. 표지로서는 염료; 방사능표지, 예컨대 ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I; 전자 농축 시약(electron-dense reagent); 효소(예컨대 면역검정에서 보통 사용되는 바와 같은 서양고추냉이 퍼옥시다아제 또는 알칼리 포스파타아제); 결합기, 예컨대 바이오틴-스트렙타비딘; 헵텐, 예컨대 디곡시게닌; 발광, 인광 또는 형광발생 기; 질량 태그; 그리고 형광 염료 단독, 또는 형광공명에너지전이(FRET)에 의하여 발광 스펙트럼을 억제 또는 이동시킬 수 있는 기와의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0182] 몇몇 구현예들에서, 결합제에는, 다른 제제(예컨대 프로브 결합 파트너)에 의한 검출을 허용하는 태그가 제공될 수 있다. 이러한 태그는, 예컨대 바이오틴, 스트렙타비딘, his-태그, myc 태그, 말토스, 말토스 결합 단백질, 또는 당 분야에 공지된 다른 종류의 임의의 태그로서, 결합 파트너를 가지는 태그일 수 있다. 단백질:결합 파트

너 배열에 이용될 수 있는 결합의 예는 임의의 것일 수 있으며, 예를 들어 바이오틴:스트렙타비딘, his-태그:금속 이온(예컨대 Ni^{2+}), 말토스:말토스 결합 파트너 등을 포함할 수 있다.

[0183] 마커-결합제의 접합체는 검출을 촉진하기 위해 검출 제제와 결합할 수 있거나 또는 이에 부착될 수 있다. 검출 제제의 예들로서는, 발광 표지; 비색 표지, 예컨대 염료; 형광 표지; 또는 화학 표지, 예컨대 전기 활성 제제(예컨대 페로시아나이드); 효소; 방사능 표지; 또는 고주파 표지를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 검출 제제는 입자일 수 있다. 이러한 입자의 예들로서는 콜로이드 금 입자; 콜로이드 황 입자; 콜로이드 셀레늄 입자; 콜로이드 황산바륨 입자; 콜로이드 황산철 입자; 금속 요오드산염 입자; 은 할로겐화물 입자; 실리카 입자; 콜로이드 금속(합수) 산화물 입자; 콜로이드 금속 황화물 입자; 콜로이드 납 셀레늄화물 입자; 콜로이드 카드뮴 셀레늄화물 입자; 콜로이드 금속 인산염 입자; 콜로이드 금속 아철산염 입자; 상기 예시된 콜로이드 입자들 중 임의의 것으로서, 유기층 또는 무기층이 코팅된 입자; 단백질 또는 펩티드 분자; 리포솜; 또는 유기 중합체 라텍스 입자, 예컨대 폴리스티렌 라텍스 비드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 입자는 콜로이드 금 입자일 수 있다.

[0184] 이미 언급된 바와 같이, 임의의 양태들은 신생물 형성 질환의 진단, 예후 또는 모니터링과 관련된 응용예에 있어서 본원에 교시된 바와 같이 종양 세포 또는 CTC를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 방법과, 이를 위한 용도를 이용한다.

[0185] "진단" 및 "모니터링"이란 용어는 의료 실무에서 흔히 사용되며 널리 이해되고 있다. 추가의 비제한적 설명을 하자면, "진단"이란 용어는, 일반적으로 증상과 징후를 바탕으로 하고/바탕으로 하거나 다양한 진단 절차의 결과(예를 들어 진단된 질환이나 병태의 특징을 이루는 생물마커 하나 이상의 존재, 부재 및/또는 그 양을 파악한 결과)에 입각하여 대상체에 있어서 어떤 질환이나 병태를 인지하거나, 결정을 내리거나 결론을 내는 과정 또는 행위를 지칭한다.

[0186] "모니터링"이란 용어는, 일반적으로 대상체의 질환이나 병태에 있어 시간이 경과함에 따라서 발생할 수 있는 어떤 변화들을 추적하는 것을 지칭한다.

[0187] "예후"란 용어는, 일반적으로 질환이나 병태의 진행 및 회복의 전망(예컨대 확률, 소요기간 및/또는 정도)을 예상하는 것을 지칭한다. 본원에 교시된 질환이나 병태의 좋은 예후는, 일반적으로 허용 가능한 기간 이내에 질환 또는 병태가 만족스럽게 부분 회복 또는 완전 회복됨을 예상하는 것을 포함할 수 있다. 이와 같이 좋은 예후는, 더욱 통상적으로 질환이나 병태가, 바람직하게는 주어진 기간 이내에 더 악화되거나 나빠지지 않음을 예상하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 교시된 바와 같은 질환이나 병태의 나쁜 예후는, 일반적으로 이러한 질환이나 병태의 표준에 못미치는 회복 및/또는 만족스럽지 못하게 느린 회복, 또는 실질적으로 해당 질환이나 병태를 회복하지 못하는 것 또는 심지어 해당 질환이나 병태가 더 악화됨을 예상하는 것을 포함할 수 있다.

[0188] 이 용어는 또한 질환을 예측하는 것도 포함한다. "예측하는 것" 또는 "예측"이란 용어는, 일반적으로 질환이나 병태가 (아직) 발병하지 않은 대상체에 있어서 해당 질환이나 병태를 미리 진술, 시사 또는 예견하는 것을 지칭한다. 예를 들어 대상체에 있어서 질환이나 병태를 예측하는 것은, 해당 대상체에서 해당 질환이나 병태가, 예를 들어 임의의 기간 이내에 또는 특정 나이까지 발현될 확률, 가능성 또는 위험을 시사할 수 있다. 상기 확률, 가능성 또는 위험은 특히 절대값, 범위 또는 통계치로서 시사될 수 있거나, 또는 적합한 대조군 대상체 또는 대상체 집단과 비교되어(예컨대 일반적이거나, 정상적이거나 건강한 대상체 또는 대상체 집단과 비교되어) 시사될 수 있다. 그러므로 대상체가 질환이나 병태를 발현할 확률, 가능성 또는 위험은, 유리하게는 적합한 대조군 대상체 또는 대상체 집단과 비교하였을 때 증가 또는 감소한 확률, 가능성 또는 위험으로서, 또는 이처럼 적합한 대조군 대상체 또는 대상체 집단과 비교하였을 때 확률, 가능성 또는 위험의 증가 배수 또는 감소 배수로서 시사될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 교시된 바와 같은 병태나 질환의 "예측"이란 용어는 또한 구체적으로 대상체가 이러한 병태나 질환에 대해 "양성"인 것, 즉 대상체가 이러한 병태나 질환이 발병할 위험이 있음을 의미할 수 있다(예컨대 위험은 대조군 대상체나 대상체 집단에 비하여 유의미하게 증가함). 본원에 기술된 바와 같이, 본원에 교시된 바와 같은 질환이나 병태가 "발병하지 않는다는 예측"이란 용어는, 구체적으로 대상체가 이러한 질환이나 병태에 대해 "음성"임, 즉 대상체에서 이러한 병태나 질환이 발병할 위험이 대조군 대상체 또는 대상체 집단에서의 위험에 비하여 유의미하게 증가하지 않음을 의미할 수 있다.

[0189] 증식성 질환의 진단, 예측, 예후 및/또는 모니터링을 위한 본 방법은, 이 방법이 대상체로부터 분리된 시료에 하나 이상의 시험관 내 가공 및/또는 분석 단계를 적용할 수 있다는 점에서 적당하게는 시험관 내 방법으로서의 자격이 주어질 수 있다. "시험관 내"란 용어는, 일반적으로 신체, 예컨대 동물이나 인간의 신체 밖 또는 외부로

나타낸다.

- [0190] 예를 들자면, 대상체로부터 유래한 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC의 존재는, 대상체에 신생물 형성 질환이 발생하였다는 시사를 제공할 수 있는데, 즉 대상체에서의 신생물 형성 질환의 진단을 제공하거나 진단에 기여할 수 있으며; 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC의 존재는, 신생물 형성 질환에 관해가 달성된 것으로 공지된 대상체에서 신생물 형성 질환이 재발되었다는 시사를 제공할 수 있고; 대상체 유래 생물 시료 중 CTC의 존재는, 대상체에 전이 잠재성을 가지는 신생물 형성 질환이 발생하였다는 시사를 제공할 수 있으며[다만 "전이 잠재성"이란 용어는 넓게는 종양, 예컨대 원발성 종양이 전이를 일으키는 능력을 지칭하며, 특히 전이성 질환의 재발 잠재성, 전이성 암의 빠른 진행 잠재성 및/또는 전이성 암이 치료법, 예컨대 화학요법 및/또는 면역요법에 대하여 내성을 보일 잠재성을 또한 포함할 수도 있음]; 대상체 유래 생물 시료 중 CTC의 비교적 더 많은 양은, 대상체에 전이 잠재성이 비교적 더 큰 신생물 형성 질환이 발생하였다는 시사를 제공할 수 있고; 대상체 유래 생물 시료 중 CTC의 비교적 더 적은 양은, 대상체에 전이 잠재성이 비교적 더 작은 신생물 형성 질환이 발생하였다는 시사를 제공할 수 있으며; 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC의 비교적 더 많은 양은, 대상체에 비교적 더 나쁜 신생물 형성 질환 예후가 내려졌다는 시사를 제공할 수 있고; 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC의 비교적 더 적은 양은, 대상체에 비교적 더 좋은 신생물 형성 질환 예후가 내려졌다는 시사를 제공할 수 있으며; 2차 또는 그보다 더 이후의 시점에서 획득된 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC 양의, 1차 또는 그보다 더 앞선 시점에서 동일 대상체로부터 획득된 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC 양에 비한 증가는, 대상체의 신생물 형성 질환이 상기 1차 시점과 2차 시점 사이에서 진행 또는 악화되었다는 시사를 제공할 수 있고; 2차 또는 그보다 더 이후의 시점에서 획득된 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC 양의, 1차 또는 그보다 더 앞선 시점에서 동일 대상체로부터 획득된 생물 시료 중 종양 세포 또는 CTC 양에 비한 감소는, 대상체의 신생물 형성 질환이 상기 1차 시점과 2차 시점 사이에서, 예를 들어 자발적으로 및/또는 치료법에 대응하여 퇴행하였다는 시사를 제공할 수 있다.
- [0191] 임의의 구현예들에서, 본 방법은 환자 유래 시료 중에서 측정된 종양 세포 또는 CTC 양을, 기준 값과 비교하는 것에 달려있을 수 있는데, 이 경우 상기 기준 값은 신생물 형성 질환의 공지된 예측, 진단 및/또는 예후를 나타낸다.
- [0192] 예를 들어 변별적 기준값은 신생물 형성 질환 발병의 위험(예컨대 비정상적으로 상승한 위험) 예측과, 이 신생물 형성 질환 발병의 위험이 없거나 정상이라는 예측을 제시할 수 있다. 다른 예에서, 변별적 기준 값은 이러한 신생물 형성 질환의 발병 위험 정도에 차이가 있다는 예측을 제시할 수 있다.
- [0193] 추가의 예에서, 변별적 기준 값은 주어진 신생물 형성 질환의 진단과, 이러한 신생물 형성 질환이 발병하지 않았다는 진단(예컨대 건강하다는 진단 또는 상기 신생물 형성 질환으로부터 회복되었다는 진단 등)을 제시할 수 있다. 다른 예에서, 변별적 기준 값은 이러한 신생물 형성 질환이 그 심각성이 가변적이라는 진단을 제시할 수 있다.
- [0194] 또 다른 예에서, 변별적 기준 값은 본원에 교시된 바와 같은 주어진 신생물 형성 질환에 대해 좋은 예후와, 이러한 신생물 형성 질환에 대한 나쁜 예후를 제시할 수 있다. 추가의 예에서, 변별적 기준 값은 이러한 신생물 형성 질환에 대해 가변적으로 유리하거나 불리한 예후를 제시할 수 있다.
- [0195] 이러한 비교는, 일반적으로 비교되는 값들 간 적어도 하나의 차 또는 편차의 존재 또는 부재, 그리고 선택적으로는 이러한 차 또는 편차의 크기를 확정하기 위한 임의의 수단을 포함할 수 있다. 비교는, 시각적 검사, 측정치들의 산술적 또는 통계학적 비교를 포함할 수 있다. 이러한 통계학적 비교는 규칙을 적용하는 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0196] 기준 값들은 다른 세포 집단과 생물마커에 대해 이미 이용되었던 공지의 절차에 따라서 정립될 수 있다. 예를 들어 기준 값은 상기 신생물 형성 질환에 대한 구체적 진단, 예측 및/또는 예후에 의해 특징지어지는 개체 또는 개체의 집단(즉 신생물 형성 질환에 대해 내려진 상기 진단, 예측 및/또는 예후가 들어맞는 개체 또는 개체의 집단)에서 정립될 수 있다. 이러한 집단은 2명 이상, 10명 이상, 100명 이상, 또는 심지어 수백명 이상의 개체를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0197] 제1 값의 제2 값으로부터의 "편차"는, 일반적으로 변화에 대한 임의의 방향성(예컨대 증가: 제1 값 > 제2 값; 또는 감소)과, 변화에 대한 임의의 정도를 포함할 수 있다.
- [0198] 예를 들어 편차는 비교가 이루어지는 제2 값에 비한 제1 값의 적어도 약 10%(약 0.9배 이하), 또는 적어도 약 20%(약 0.8배 이하), 또는 적어도 약 30%(약 0.7배 이하) 또는 적어도 약 40%(약 0.6배 이하), 또는 적어도 약

50%(약 0.5배 이하), 또는 적어도 약 60%(약 0.4배 이하), 또는 적어도 약 70%(약 0.3배 이하), 또는 적어도 약 80%(약 0.2배 이하), 또는 적어도 약 90%(약 0.1배 이하)까지의 감소(이에 한정되는 것은 아님)를 포함할 수 있다.

[0199] 예를 들어 편차는 비교가 이루어지는 제2 값에 비한 제1 값의 적어도 약 10%(약 1.1배 이상), 또는 적어도 약 20%(약 1.2배 이상), 또는 적어도 약 30%(약 1.3배 이상), 또는 적어도 약 40%(약 1.4배 이상), 또는 적어도 약 50%(약 1.5배 이상), 또는 적어도 약 60%(약 1.6배 이상), 또는 적어도 약 70%(약 1.7배 이상), 또는 적어도 약 80%(약 1.8배 이상), 또는 적어도 약 90%(약 1.9배 이상), 또는 적어도 약 100%(약 2배 이상), 또는 적어도 약 150%(약 2.5배 이상), 또는 적어도 약 200%(약 3배 이상), 또는 적어도 약 500%(약 6배 이상), 또는 적어도 약 700%(약 8배 이상) 등까지의 증가(이에 한정되는 것은 아님)를 포함할 수 있다.

[0200] 바람직하게 편차는 통계학적으로 유의미하게 관찰된 변화를 지칭한다. 예를 들어 편차는 주어진 모집단에 있어서 기준 값의 오차 범위 밖에 있는 것으로 관찰된 변화(예를 들어 표준 편차 또는 표준 오차에 의해 표현되거나 또는 이의 소정 배수에 의해 표현되는데, 예컨대 $\pm 1xSD$, 또는 $\pm 2xSD$, 또는 $\pm 3xSD$, 또는 $\pm 1xSE$, 또는 $\pm 2xSE$, 또는 $\pm 3xSE$ 와 같이 표현됨)를 지칭할 수 있다. 편차는 또한 주어진 모집단에 있어서 값들에 의해 한정되는 기준 범위의 밖에 있는 값(예를 들어 상기 집단에 있어서 어떤 값의 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 또는 80% 이상, 또는 85% 이상, 또는 90% 이상, 또는 95% 이상, 또는 심지어 100% 이상을 포함하는, 어떤 범위의 밖에 있는 값)을 지칭할 수 있다.

[0201] 추가의 구현예에서, 편차는 관찰된 변화가 주어진 역치 값(threshold) 또는 컷-오프(cut-off) 값을 초과하는지에 대해 결론내릴 수 있다. 이러한 역치 값 또는 컷-오프 값은 예측 방법의 선택된 감수성 및/또는 특이성, 예컨대 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 감수성 및/또는 특이성을 제공하는 것으로 당 분야에 일반적으로 공지된 바와 같이 선택될 수 있다.

[0202] 예를 들어 수신자 조작 특징(Receiver-Operating Characteristic; ROC) 곡선 분석은, 허용 가능한 감수성과 특이성을 기반으로 본 진단 시험을 임상적으로 사용하기 위해 종양 세포 또는 CTC의 양, 또는 생물마커의 양에 대한 최적의 컷-오프 값, 또는 그 자체로서 널리 공지된 관련 성과 측정값, 예컨대 양성 예측 값(PPV), 음성 예측 값(NPV), 양성 우도 비율(LR+), 음성 우도 비율(LR-), 또는 유덴 지수(Youden index) 등을 선택하는데 사용될 수 있다.

[0203] 비제한적 예를 들자면, 말초 혈액 시료 7.5ml 중 CTC 적어도 1개의 검출은, 대상체에 신생물 형성 질환, 더욱 구체적으로 전이 잠재성을 가지는 신생물 형성 질환이 발병하였다는 시사를 제공할 수 있다. 대상체 내 CTC의 비교적 더 많은 양(예컨대 말초 혈액 1ml 당 0.5 CTC 이상, 1 CTC 이상, 2 CTC 이상 또는 3 CTC 이상)의 검출은, 해당 대상체에서 CTC 양이 비교적 더 적은(예컨대 말초 혈액 1ml 당 0.5 CTC 미만, 1 CTC 미만, 2 CTC 미만 또는 3 CTC 미만인) 대상체에서 보다 비교적 더 나쁜 신생물 형성 질환의 예후가 내려졌다는 시사를 제공할 수 있다.

[0204] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "치료법" 또는 "치료"란 용어는 병리학적 병태, 예컨대 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상이나 측정 가능한 마커를 경감 또는 측정 가능한 정도로 줄이는 것을 지칭한다. 이 용어는, 1차 치료뿐만 아니라, 신보조 치료, 보조 치료 및 부가 치료법을 포함한다. "항암 요법" 또는 "항암 치료"란 용어는, 넓게 신생물 형성 질환의 하나 이상의 증상 또는 측정 가능한 마커를 경감 또는 측정 가능한 정도로 줄이는 것을 지칭한다. 측정 가능한 정도로 줄이는 것은, 측정 가능한 마커 또는 증상에 있어 임의의 통계학적으로 유의미한 감퇴를 포함한다. 일반적으로 이 용어는 치유적 치료와, 질환의 증상을 감소시키고/감소시키거나 그 진행을 늦추는 방향의 치료 둘 다를 포함한다. 이 용어는, 이미 발현된 병리학적 병태를 치료적으로 치료하는 것뿐만 아니라, 병리학적 병태의 발생 가능성을 예방 또는 줄이는 것이 목적인 예방적 또는 방어적 수단 둘 다를 포함한다. 임의의 구현예들에서, 이 용어들은 치료적 치료에 관한 것일 수 있다. 또 다른 임의의 구현예들에서, 이 용어들은 방어적 치료에 관한 것일 수 있다. 관해 기간 중 만성 병리학적 병태의 치료는 또한 치료적 치료를 구성하는 것으로 여겨질 수 있다. 이 용어는 본 발명의 내용 중 적당한대로 생체 외 또는 시험관 내 치료를 포함할 수 있다.

[0205] 항암 요법의 비제한적 예로서는 수술, 방사선요법, 화학요법, 생물요법 및 이의 조합을 포함한다.

[0206] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "수술"이란 용어는, 넓게 신생물 형성 조직 또는 세포를 대상체로부터 수술적으로 제거하는 단계를 포함하는 치료를 나타낸다. 암 수술은 종양 전체를 제거할 수 있거나, 종양의 일부

를 제거할 수 있거나(debulking), 또는 통증이나 압력을 일으키거나 부과하는 종양 또는 종양의 일부분을 제거할 수 있다. 암 수술은 특히 종래의 관혈적 수술, 복강경 수술, 극저온 수술, 레이저 수술, 열 응고술, 예컨대 고열 레이저 응고술 또는 고주파 응고술, 광에너지 요법, 그리고 이의 조합을 포함한다.

[0207] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "방사선요법"이란 용어는, 넓게 신생물 형성 조직을 이온화 방사선, 예컨대 x-선, 감마선, 중성자, 양성자 또는 기타 원천으로부터 나오는 방사선에 노출시키는 단계를 포함하는 치료를 나타낸다. 방사선 원은 외부 장치일 수 있거나(체외 방사선 요법(external-beam radiation therapy)), 또는 방사능 물질은 체내 신생물 형성 조직 근처에 투입될 수 있거나(내부 방사선요법 또는 근접 방사선요법), 또는 방사능 물질은 주사, 주입 또는 섭취에 의해 전신에 전달될 수 있으며(전신 방사성 동위원소요법), 자발적으로 또는 표적화기, 예컨대 암 표적화 항체에 의해 신생물 형성 조직에 집약될 수 있다.

[0208] 본원에 사용된 바와 같은 "화학요법"이란 용어는 넓게 생각되어, 일반적으로 화학 물질이나 조성물이 사용되는 치료를 포함한다. 화학요법제는, 통상적으로 세포독성 효과 또는 세포증식억제 효과를 보일 수 있다.

[0209] 임의의 구현예들에서, 화학요법제는 알킬화제, 세포독성 화합물, 항대사물질, 식물성 알칼로이드, 테르페노이드, 토포이소머라아제 억제제 또는 이것들의 조합일 수 있다.

[0210] "알킬화제"란 용어는, 일반적으로 생리학적 조건하에서 친핵성 작용기를 알킬화할 수 있는 제제를 지칭한다. 알킬화제의 예들로서는 사이클로포스파미드, 카르무스틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 메클로레타민, 멜파란(염산염), 클로람부실, 이포스파미드, 로무스틴, 미토마이신 C, 티오TEPA, 부설판 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0211] "세포독성 화합물"이란 용어는, 일반적으로 세포에 독성인 제제를 지칭한다. 세포독성 화합물의 예들로서는 악티노마이신(악티노마이신이라고도 공지됨), 안트라사이클린, 예컨대 독소루비신, 도노루비신, 발루비신, 이다루비신 및 에피루비신; 블레오마이신; 플리카마이신; 미토잔트론; 미토마이신; 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0212] "항대사물질"이란 용어는, 일반적으로 대사물질, 예컨대 퓨린 또는 피리미딘의 사용을 억제할 수 있는 제제를 지칭한다. 항대사물질은 퓨린과 피리미딘이 세포 주기 중 S기 동안 DNA에 혼입되는 것을 막아주어, 발달과 분열을 정상적으로 중지시킨다. 항대사물질의 예들로서는 아자티오프린, 카페시타빈, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 머캅토피린, 메토크세이트, 벨라라빈, 페메트렉시드 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0213] 식물성 알칼로이드 및 테르페노이드는 식물로부터 유래하는 것으로서, 미세소관의 기능을 억제하여 세포 분열을 차단시킨다. 비제한적 예들로서는 빈카 알칼로이드 및 타산, 그리고 이것들의 조합을 포함한다. 빈카 알칼로이드의 예들로서는 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈데신 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 타산의 예들로서는 파클리탁셀, 도세탁셀 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0214] "토포이소머라아제 억제제"란 용어는, 일반적으로 DNA의 토포로지를 유지시키는 효소를 지칭한다. 비제한적 예들로서는 I형 및 II형 토포이소머라아제 억제제를 포함한다. I형 토포이소머라아제 억제제의 예들로서는 캄프토테신, 예컨대 이리노테칸, 토포테칸 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. II형 토포이소머라아제 억제제의 예들로서는 암사크린, 독소루비신, 도노루비신, 에토포시드, 에토포시드 인산염, 미토잔트론, 테니포시드 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0215] 임의의 구현예들에서, 화학요법제는 사이클로포스파미드, 독소루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 보르테조미, 디곡신, 디지톡신, 하이퍼리신, 시코닌, 오고닌, 소라페닙, 에버로리무스, 이마티닙, 젤다나마이신, 파노비노스타트, 카르무스틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 메클로레타민, 멜파란(염산염), 클로람부실, 이포스파미드, 부설판, 악티노마이신, 도노루비신, 발루비신, 에피루비신, 블레오마이신, 플리카마이신, 미토잔트론, 미토마이신, 아자티오프린, 머캅토피린, 플루오로우라실, 메토크세이트, 벨라라빈, 페메트렉시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈데신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 이리노테칸, 토포테칸, 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 인산염, 테니포시드, 아나스트로졸, 엑스메스탄, 보수티닙, 이리노테칸, 반데타닙, 비글루타미드, 로무스틴, 클로파라빈, 카보잔티닙, 시타라빈, 시톡산, 데시카빈, 텍사메타손, 하이드록시우레아, 데카바진, 루프롤리드, 에피루비신, 아스파라기나아제, 에스트라무스틴, 비스모데깁, 아미포스틴, 플루타미드, 토레미펜, 폴베스트란트, 레트로졸, 데가렐릭스, 플루다라빈, 프랄라트렉세이트, 플록시우리딘, 겐시타빈, 카르무스틴 웨이퍼, 에리블린, 알트레타민, 토포테칸, 악시티닙, 게피티닙, 로미넵신, 익사베필론, 룩소리티닙, 카바지탁셀, 카필조밍, 클로람부실, 사그라모스탐, 클라드리빈, 루프롤리드, 미토탄, 프로카바진,

메게스트롤, 메스나, 스트론튬-89 염화물, 미토마이신, 필그라스티م, 페그필그라스티م, 소라페닙, 닐루타미드, 펜토스타틴, 타목시펜, 페가스파가제, 데니루킨 디프티톡스, 알리트레티노인, 카르보플라틴, 프레드니손, 머캅토피린, 졸레드론산, 레날리도미드, 옥트레오티드, 다사티닙, 레고라페닙, 히스트렐린, 수니티닙, 오마세탁신, 티오구아닌, 엘로티닙, 백사로텐, 데카바진, 테모졸로미드, 티오테파, 탈리도미드, BCG, 템시롤리무스, 벤다무스틴 염산염, 트립토텔린, 삼산화비소, 라파티닙, 발루비신(방광내), 트레티노인, 아자시티딘, 파조파닙, 테니포시드, 루코보린, 크리조티닙, 카페시타빈, 엔잘루타미드, 지브-아플리버셉트, 스트렙토조신, 베무라페닙, 고세렐린, 보리노스타트, 졸레드론산, 아비라테론 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0216] 본원에 사용된 바와 같은 "생물요법"이란 용어는 넓게 여겨지는 것으로서, 일반적으로 생물 물질 또는 조성물, 예컨대 생물분자 또는 생물 제제, 예컨대 바이러스나 세포를 사용하는 치료를 포함한다. 임의의 구현예들에서, 생물 물질 또는 조성물은 치료적 이익을 저변에 깔고 약리학적 작용 또는 효과를 발휘할 수 있다. 임의의 다른 구현예들에서, 생물 물질 또는 조성물은 화학요법제 또는 방사성 동위원소를 신생물 형성 조직이나 세포에 전달 또는 이를 표적화하는데 사용될 수 있는데, 예를 들어 생물 물질 또는 조성물은 화학요법제 또는 방사성 동위원소와 접합될 수 있다(비제한적 예를 들자면 암 표적화 모노클로날 항체 및 세포독성 화학적 화합물의 접합체).

[0217] 임의의 구현예들에서, 생물분자는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 핵산 또는 소분자(예컨대 1차 대사물질, 2차 대사물질 또는 천연 생성물) 또는 이것들의 조합일 수 있다. 적합한 생물분자의 예들로서는 인터루킨, 시토카인, 항시토카인, 종양 괴사 인자(TNF), 시토카인 수용체, 백신, 인터페론, 효소, 치료 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0218] 적합한 생물분자의 예들로서는 알테스루킨, 알렘투주맙, 아테졸리주맙, 베바시주맙, 블리나투모맙, 브렌톡시맙, 베도틴, 카툼악소맙, 세톡시맙, 다라투무맙, 데니루킨 디프티톡스, 데노수맙, 디누톡시맙, 엘로투주맙, 겐투주맙, 오조가미신, ⁹⁰Y-이브리투모맙 티옥세탄, 이다루시주맙, 인터페론 A, 이필리무맙, 네시투무맙, 니볼루맙, 오비누투주맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 파니투무맙, 펄브롤리주맙, 라무시루맙, 리톡시맙, 타소너민, ¹³¹I-토시투모맙, 트라스투주맙, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 그리고 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0219] 적합한 암 살상 바이러스의 예들로서는 탈리모젠 라헤르파렙벡(talimogene laherparepvec)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0220] 항암 요법의 추가 카테고리로서는, 특히 호르몬요법(내분비요법), 면역요법 및 줄기세포요법을 포함하는데, 이것들은 통상 생물요법 안에 포함되는 것으로 간주된다.

[0221] 호르몬요법 또는 내분비요법은 호르몬 의존성 또는 호르몬 감수성 암, 예컨대 특히 호르몬 의존성 또는 호르몬 감수성 유방암, 전립선암, 난소암, 고환암, 자궁내막암 또는 신장암을 치료하기 위해 호르몬이나 항호르몬 약물 이 투여되는 치료를 포함한다.

[0222] 적합한 호르몬요법의 예들로서는 타목시펜; 아로마타아제 억제제, 예컨대 아타나스트로졸, 엑스메스탄, 레트로졸 및 이것들의 조합; 황체형성호르몬 차단제, 예컨대 고세렐린, 루프로렐린, 트립토텔린 및 이것들의 조합; 항안드로겐, 예컨대 비칼루타미드, 사이프로테론 아세트산염, 플루타미드 및 이것들의 조합; 성생식선자극호르몬 방출 호르몬 차단제, 예컨대 데가렐릭스; 프로게스테론 치료, 예컨대 메드록시프로게스테론 아세트산염, 메게스트롤 및 이것들의 조합; 그리고 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0223] "면역요법"이란 용어는, 넓게 대상체의 면역계를 조정하는 임의의 치료를 포함한다. 구체적으로 이 용어는 면역 반응, 예컨대 체액성 면역 반응, 세포 매개 면역 반응 또는 이 둘 다를 조정하는 임의의 치료를 포함한다. 면역 반응은, 통상적으로 면역계 세포, 예컨대 B 세포, 세포독성 T 세포(CTL), T 조력자(Th) 세포, 조절 T(Treg) 세포, 항원 제시 세포(APC), 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 자연 살해(NK) 세포, 호염기구, 호산구 또는 호중구의 자극원에 대한 반응을 수반할 수 있다. 항암 치료에 관한 내용 중, 면역요법은, 바람직하게 면역 반응, 예컨대 구체적으로 종양 조직이나 세포에 특이적인 면역 반응을 끌어내거나, 유도하거나 또는 향상시킴으로써, 예컨대 종양 세포 사멸을 달성할 수 있다. 면역요법은 면역계의 임의의 구성원, 예컨대 임의의 면역 세포, 예컨대 T 세포(예컨대 CTL 또는 Th 세포), 수지상 세포 및/또는 NK 세포(이에 한정되는 것은 아님)의 존재비, 기능 및/또는 활성을 조정, 예컨대 증가 또는 향상시킬 수 있다.

[0224] 면역요법은 면역 세포, 예컨대 T 세포 및/또는 수지상 세포가 환자에게 운반되는 세포 기반 면역요법을 포함한다. 이 용어는 또한 대상체의 면역계를 조정하는 물질 또는 조성물, 예컨대 화학적 화합물 및/또는 생물분자(예

컨대 항체, 항원, 인터루킨, 시토카인 또는 이것들의 조합)의 투여를 포함한다.

- [0225] 암 면역요법의 예들로서는 모노클로날 항체, 예컨대 종양 세포에 의해 발현되는 단백질에 대한 Fc-조작 모노클로날 항체, 면역 관문 억제제, 예방적 또는 치료적 암 백신, 입양 세포 요법, 그리고 이것들의 조합을 이용하는 치료를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0226] 추가의 안내를 하자면, Fc-최적화 모노클로날 항체는 종양 세포에 의해 발현된 단백질, 예컨대 종양 항원과 특이적으로 결합하도록 구성되고, 효과기 기능, 예컨대 항체 의존적 세포성 세포독성, 보체 의존적 세포독성 및/또는 항체 의존적 세포 매개 식세포작용을 매개하는, 조작된 Fc 일부분을 포함한다.
- [0227] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "종양 항원"이란 용어는, 정상 또는 비신생물 형성 세포보다는 종양 세포에 의해 종양 세포 내 또는 종양 세포 표면(바람직하게는 종양 세포 표면)에 유일하거나 차등적으로 발현되는 항원을 지칭한다. 예를 들자면, 종양 항원은 종양 세포 내 또는 종양 세포 상에 존재할 수 있으며, 통상은 정상 세포 또는 비신생물 형성 세포 내 또는 이러한 세포 상에는 존재하지 않거나(예컨대 제한된 수의 정상 조직, 예컨대 고환 및/또는 태반에 의해서만 발현되거나), 또는 종양 항원은 종양 세포 내 또는 종양 세포 상에, 정상 세포 또는 비신생물 형성 세포 내 또는 이러한 세포 상에서보다 더 많은 양으로 존재할 수 있거나, 또는 종양 항원은 정상 세포 또는 비신생물 형성 세포 내 또는 이러한 세포 상에서 발견되는 형태와는 상이한 형태로 종양 세포 내 또는 종양 세포 상에 존재할 수 있다. 그러므로 이 용어는, 종양 특이적 항원(TSA), 예컨대 종양 특이적 막 항원, 종양 연관 항원(TAA), 예컨대 종양 연관 막 항원, 종양 상 배 항원, 성장 인자 수용체, 성장 인자 리간드 등을 포함한다. 이 용어는 암/고환(CT) 항원을 추가로 포함한다. 종양 항원의 예들로서는 β -인간 융모 성생식선자극호르몬(β HCG), 당단백 100(gp100/Pme117), 암배 항원(CEA), 티로시나아제, 티로시나아제 관련 단백질 1(gp75/TRP1), 티로시나아제 관련 단백질 2(TRP-2), NY-BR-1, NY-CO-58, NY-ESO-1, MN/gp250, 이디오타입, 텔로머라아제, 활막 육종 X 구획점 2(SSX2), 뮤신 1(MUC-1), 흑색종 연관 항원(MAGE) 과의 항원, 고분자량 흑색종 연관 항원(HMW-MAA), T 세포 1에 의해 인지되는 흑색종 항원(MART1), 빌름 종양 유전자 1(WT1), HER2/neu, 메소텔린(MSLN), 알파 태아 단백질(AFP), 암 항원 125(CA-125), 그리고 ras 또는 p53의 비정상적 형태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 신생물 형성 질환에 있어서 추가의 표적로서는 CD37(만성림프성 백혈병), CD123(급성골수성백혈병), CD30(호지킨/대세포 림프종), MET(NSCLC, 위식도암), IL-6 (NSCLC) 및 GTR(악성 흑색종)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0228] 면역 관문은 면역 반응을 늦추거나 중지시키고, 면역 세포의 제어되지 않는 활성화에 따른 과도한 조직 손상을 막아주는 억제 경로이다. 면역 관문 표적의 억제는 종양 세포에 대한 면역 세포, 예컨대 CTL에 의한 면역 반응을 촉진시킬 수 있다.
- [0229] 억제를 위한 면역 관문 표적의 예들로서는 PD-1(PD-1 억제제의 예들로서는 펙트롤리주맙, 니볼루맙 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님), CTLA-4(CTLA-4 억제제의 예들로서는 이필리무맙, 트레멜리무맙 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님), PD-L1(PD-L1 억제제의 예들로서는 아테졸리주맙을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님), LAG3, B7-H3 (CD276), B7-H4, TIM-3, BTLA, A2aR, 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체(KIR), IDO 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0230] "백신"이란 용어는, 일반적으로 백신화된 대상체에서 면역 반응 발생, 바람직하게 방어적 면역 반응 발생을 유도하는 성분을 포함하거나 또는 면역 관용성을 유도하는 성분을 포함하는(관용화 백신) 치료적 약학 조성물 또는 예방적 약학 조성물로서, 대상체로의 생체 내 투여를 위한 것을 지칭한다.
- [0231] 선택적으로 백신은 면역 반응을 향상시키기 위한 아주반트 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 아주반트로서는, 예를 들어 사포닌, 무기 겔, 예컨대 수산화알루미늄, 표면활성물질, 예컨대 리소레시틴, 플루로닉 폴리에틸렌, 다가음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 간균 칼메트-게랑(Calmette-Guerin; BCG), 키홀-림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin; KLH), 모노포스포릴 지질 A(MPL), 코린박테리움 파르븀(*Corynebacterium parvum*), 비메틸화 CpG 모티프 함유 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 QS-21을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0232] 선택적으로 백신은 면역 자극 분자 하나 이상, 또는 면역 관용성을 촉진하는 분자 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 분자의 비제한적 예들로서는 다양한 시토카인, 림포카인 및 케모카인을 포함한다. 면역 자극, 면역 증가 및 전염증 활성을 가지는 분자의 비제한적 예를 들자면, 예컨대 인터루킨(예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-13); 성장 인자(예컨대 과립구-대식세포(GM)-콜로니 자극 인자(CSF)); 그리고 기타 면역 자극 분자, 예컨대 대식세포 염증 인자, Flt3 리간드, B7.1; B7.2 등이 있다.

- [0233] 종양 백신으로서는 a) 암 유발 바이러스 감염을 막아주거나, b) 현재 발병한 암을 치료하거나(치료적 암 백신), 또는 c) 암 발현을 막아주거나, 또는 암의 영향력을 경감시키는(예방적 암 백신) 백신을 포함한다.
- [0234] 치료적 종양 백신 또는 면역요법 종양 백신이라고도 공지되어 있는 상기 b)형 또는 c)형 종양 백신을 제조하기 위한 한 가지 접근법은, 암 환자로부터 종양 세포를 분리하고, 상기 종양 세포를 생존 불가능한 상태로 만들거나, 상기 종양 세포의 용해물을 제조하거나, 상기 종양 세포로부터 단백질을 분리하여 상기 종양 세포로부터 면역원성 조성물을 제조한 다음, 상기 면역원성 조성물을 포함하는 백신으로 대상체(예컨대 동일한 암 환자 또는 다른 대상체)를 면역화하는 것이다. 본 면역원성 조성물은 상기 종양 세포에 의해 발현되는 종양 항원(들)을 함유하므로, 백신화는 종양 항원(들) 및 이 종양 항원(들)을 발현하는 종양 세포에 대한 면역 반응(예컨대 B 세포 또는 CTL 반응)을 끌어내거나 자극할 수 있다.
- [0235] 치료적 항암 백신화에 대한 또 다른 접근법은, 환자 내 면역 반응을 현장에서 발생시키는 것이다. 이는, 살상 바이러스(적합한 암 살상 바이러스에 대한 예들로서는 탈리모겐 라헤르파렙백을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님) 복제 후 방출되는 종양 항원에 대한 항종양 면역 반응을 향상시키고, 결국에는 환자 특이적 항종양 백신을 현장에서 제공하게 된다. 또 다른 접근법은, 암 발생에 있어 생리학적 역할을 담당하는 화합물로 환자를 면역화하고, 이후 인간의 신체가 상기 화합물을 제거하도록 하는 것이다. 이러한 경우, 화합물은 환자에 투여되었을 때 강력한 면역 반응을 일으키지 않지만, 담체에 접합될 때 적당한 면역 반응을 유도할 수 있는 자기 항원(self-antigen)이거나 자기 햅텐(self-hapten)이다.
- [0236] 치료적 항암 백신화를 위한 또 다른 접근법으로서는 수지상 세포 백신을 포함한다. 이 용어는 넓게는 면역 반응이 요망되는 경우에 대비하여 항원(들)을 로딩(loading)한 수지상 세포를 포함하는 백신을 포함한다.
- [0237] "수지상 세포(DC)"란 용어는, 림프 조직 또는 비림프 조직에서 발견되는 형태학상 유사한 세포 유형의 다양한 집단을 이루는 임의의 일원을 지칭할 수 있다. DC는, 예를 들어 "전문적인" 항원 제시 세포를 포함할 수 있고, MHC-제한 T 세포를 감작시키는 역량이 뛰어나다. DC는, 예를 들어 기능, 표현형 및/또는 유전자 발현 패턴, 구체적으로 세포 표면 표현형에 의해 인지될 수 있다. 이러한 세포는 자체의 변별적 형태, 높은 표면 II군 MHC의 발현 수준 및 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포, 구체적으로 처녀 T 세포에 항원을 제시하는 능력에 의해 특징지어질 수 있다. 기능상 DC는 항원 제시를 확정하기 위한 것으로 당 업자에게 공지된 임의의 적합한 검정에 의해 동정될 수 있다. 그러한 검정으로서, 예를 들어 시험 항원을 제시하여 항원 프라이밍(priming)을 도모하고/도모하거나 처녀 T 세포를 자극하는 능력을 시험하고, T 세포가 증식하여 IL-2와 같은 시토카인 등을 방출시키는지 확정하는 것을 포함할 수 있다. 수지상 세포는 당 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생물 시료로부터 분리 또는 생성될 수 있다. DC의 분리 또는 생성에 적합한 생물 시료로서는 말초 혈액 시료, 골수 시료 또는 제대혈 시료 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 비제한적 예를 들자면, 생물 시료 중에 존재하는 DC는, 이 DC에 의해 발현되거나 발현되지 않는다고 공지된 선택적 표면 마커의 면역형광 표지화 또는 면역자성 표지화와, 대응하는 형광 활성화 세포 분취법(FACS) 게이팅 전략 또는 면역자성 분리법 각각의 병행에 의해 분리될 수 있다. 대안적으로 DC는, 이 DC를 적합한 시토카인과 함께 항온처리됨으로써 CD14+ 단핵구로부터 생성될 수 있다(Zhou & Tedder, Proc Natl Acad Sci USA. 1996, vol. 93, 2588-92).
- [0238] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "항원 로딩"이란 용어는, 하나 이상의 항원을 면역 세포, 예컨대 구체적으로는 항원 제시 세포, 예컨대 더욱 구체적으로는 수지상 세포에 전달하여, 이 항원(들)의 항원 에피토프가 MHC 상에 제시되도록 만드는, (세포 내에서 이루어지거나, 또는 면역 세포 표면 상에서 이루어지는) 방법 또는 과정을 지칭한다. 통상적으로 면역 세포는, 항원(들)을 포함하는 조성물 또는 항원(들)을 암호화하는 핵산(들)을 포함하는 조성물과 면역 세포를 시험관 내/생체 외에서 조건, 즉 면역 세포가 접촉하고, (필요하다면) 항원(들)을 발현하며, 이 항원(들)을 가공하여 MHC에 제시하는 것이 허용되는 조건하에 접촉시키거나 이것들을 함께 항온처리하는 단계를 포함하는 과정에 의해 항원(들)으로 로딩될 수 있다. 당 업자는 항원의 효과적인 로딩이 허용되기에 충분한 항온처리 온도와 기간을 알 것이다. 예를 들어 항온처리 단계는, 통상 약 1시간 내지 약 2시간 또는 약 4시간에 걸쳐 약 25℃ 내지 약 37℃의 온도에서 이루어질 수 있고/있거나 밤새도록 약 4℃에서 이루어질 수 있는 식이다. 예를 들자면, 면역 세포는, 분리된 항원, 예컨대 자연 발생 항원 공급원으로부터 분리된 항원, 또는 적합한 숙주 또는 숙주 세포 발현계에 의해 재조합적으로 생산되어 이것들(예컨대 적합한 세균, 효모, 진균, 식물 또는 동물 숙주 또는 숙주 세포 발현계)로부터 분리된 항원, 또는 무세포 전사 또는 번역에 의해 재조합적으로 생산되거나, 또는 비생물 핵산 또는 펩티드 합성에 의해 생산된 항원을 포함하는 조성물과 접촉될 수 있다. 또 다른 예를 들자면, 면역 세포는 자연 발생 항원 공급원을 포함하는 조성물과 접촉될 수 있는데, 즉 실질적으로 상기 자연 발생 공급원으로부터 항원을 분리하는 과정이 생략될 수 있다. 예를 들어 면역 세포는, 자연에서 항원을 발현하는 세포, 예컨대 종양 항원(들)을 발현하는 종양 세포 또는 이러한 세포의 세포

파편을 포함하는 조성물과 접촉될 수 있다. 적합하게 이러한 세포는 생존 불가능한 상태로 만들어질 수 있고, 바람직하게는 용해, 예컨대 사멸될 수 있으며, 바람직하게는 기계적, 화학적 또는 물리적 처리에 의해 용해될 수 있는데, 예컨대 열 사멸, 세포자살, 괴사될 수 있거나, 또는 달리 가공될 수 있다. 추가의 예를 들자면, 면역 세포는 항원을 제조합적으로 생산하는, 즉 상기 세포로부터 항원을 실질적으로 단리하지 않고 생산하는, 적합한 숙주의 세포 또는 숙주 세포 발현계와 접촉될 수 있다. 적합하게, 이러한 세포는 생존 불가능한 상태로 만들어질 수 있고, 바람직하게는 용해, 예컨대 사멸될 수 있으며, 바람직하게는 기계적, 화학적 또는 물리적 처리에 의해 용해될 수 있는데, 예컨대 열 사멸 또는 달리 가공될 수 있다. 면역 세포는 또한 항원을 암호화하는 핵산, 통상적으로는 제조합 핵산을 면역 세포에 도입하여 항원으로 로딩될 수도 있으며, 이로써 면역 세포가 항원을 발현하게 된다.

- [0239] 입양 세포 요법(ACT)이란, 면역학적 기능 및 특징들을 새로운 숙주에 운반하기 위한 목적으로 세포, 가장 일반적으로는 면역 유도 세포, 예컨대 구체적으로 세포독성 T 세포(CTL)를, 동일한 환자 또는 새로운 수용개체 숙주에게 역으로 다시 운반하는 방법을 지칭할 수 있다. 가능하다면 자기유래 세포를 사용하는 것이, 조직 거부 및 이식편대숙주병의 문제를 최소화하여 수용개체를 돕는 것이다.
- [0240] 자기유래 종양 침습 림프구(TIL) 또는 유전적으로 재유도된 말초혈액단핵구의 입양 운반은, 고형 종양, 예컨대 흑색종 및 결장직장암종이 진행된 환자뿐만 아니라, CD19 발현 혈액학적 악성종양 환자를 성공적으로 치료하는데 사용되었다. 선택된 항원, 예컨대 종양 연관 항원에 특이적인 면역계 세포, 예컨대 T 세포의 입양 운반이 구체적으로 상상된다.
- [0241] 다양한 전략이, 예를 들어 선택된 펩티드 특이성을 보이는 신규 TCR α 및 β 사슬을 도입시켜 T 세포 수용체(TCR)의 특이성을 변경함으로써 T 세포를 유전적으로 변형하는데 사용될 수 있다. 대안적으로 선택된 표적, 예컨대 악성 세포에 특이적인 면역반응성 세포, 예컨대 T 세포를 생성하기 위해 키메라 항원 수용체(CAR)가 사용될 수 있는데, 매우 다양한 수용체 키메라 구조물이 기술된 바 있다.
- [0242] CAR 구조물의 예들로서는 1) 항원에 특이적인 항체의 단일 사슬 가변 단편으로 이루어진 CAR, 예컨대 특이 항체의 V_H 에 결합된 V_L 이 가요성 링커, 예를 들어 CD8 α 경첩 도메인 및 CD8 α 경막 도메인에 의해 CD3 ζ 또는 FcR γ 중 어느 하나의 경막 및 세포 내 신호전달 도메인에 결합된 채 포함되어 있는 CAR; 그리고 2) 공동 자극분자, 예컨대 CD28, OX40(CD134) 또는 4-1BB(CD137) 하나 이상의 세포 내 도메인이 엔도도메인(endodomain) 내에 추가로 혼입되어 있거나, 또는 심지어 이러한 공동 자극 엔도도메인들의 조합을 포함하는 CAR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0243] 암에 대한 줄기세포 요법은, 방사선요법 및/또는 화학요법에 의해 파괴된 골수 줄기세포를 대체하는 것을 목표로 하며, 자기유래, 동계 또는 동종이계 줄기세포 이식을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 줄기세포, 구체적으로 조혈 줄기세포는, 통상적으로 골수, 말초혈액 또는 제대혈로부터 취득된다.
- [0244] 항암제 투여 경로, 용량 및 치료 계획에 관한 상세한 설명은 당 분야에 공지되어 있는데, 예컨대 문헌["Cancer Clinical Pharmacology" (2005) ed. By Jan H. M. Schellens, Howard L. McLeod and David R. Newell, Oxford University Press]에 기술된 바와 같다.
- [0245] 본원에 교시된 바와 같은 방법에 의해 단리된 종양 세포 또는 CTC는 다양한 응용예에 사용될 수 있다.
- [0246] 비제한적 예를 들자면, 유리하게 생존 불가능한 상태로 만들어진 이러한 종양 세포 또는 CTC, 또는 이의 용해물이나, (예컨대 단리된 단백질 자체가거나, 종양 세포 또는 CTC로부터 단리된 단백질 조성물 중에 포함된) 이의 종양 항원 하나 이상은 본 명세서의 어딘가에 교시된 바와 같은 종양 백신으로 제제화될 수 있다. 선택적으로 이러한 종양 백신은 본 명세서의 어딘가에 설명된 바와 같은 수지상 세포를 추가로 포함할 수 있다.
- [0247] 비제한적인 또 다른 예를 들자면, 이러한 종양 세포 또는 CTC는 세포의 특성을 밝히거나 특성규명하기 위한 추가 분석의 대상이 될 수 있다. 예를 들어 세포는 생화학적 분석, 돌연변이 분석, 전사체 분석 및/또는 단백질체 분석의 대상이 될 수 있다, 이러한 분석은, 예를 들어 신생물 형성 질환 및/또는 세포의 순환 표현형의 원인일 수 있거나 이와 연관될 수 있는, 세포의 생화학적 특성, 게놈 및/또는 미토콘드리아 돌연변이, 유전자 발현 프로파일 및 시그니처(signature), 그리고 단백질 발현 프로파일 및 시그니처를 규명할 수 있다.
- [0248] 본 발명의 추가 양태는 대상체 내 종양의 현장 영상화를 위한 방법으로서, CD321에 특이적으로 결합할 수 있는 제제, 즉 영상화 기법에 의해 검출 가능한 표지를 포함하는 제제를 대상체에 투여하는 단계, 상기 제제가 종양 세포에 의해 발현되는 CD321과 특이적으로 결합하는 것을 허용하는 단계, 그리고 상기 영상화 기법을 이용하여

대상체 내 종양을 시각화하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

- [0249] "영상화"란 용어는, 넓게 신체 내부에 관한 시각적 표상 및/또는 장거나 조직의 기능에 대한 시각적 표상을 만들기 위한 임의의 의료적 영상화 기술 또는 방법을 포함한다. 본원에서 상상되는 바와 같은 영상화 기법 또는 기술은 X-선 방사선촬영, X-선 컴퓨터단층촬영(CT), 자기공명영상화(MRI), 양전자방출단층촬영(PET), PET-CT, 그리고 단일광자방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 영상화 기법은 PET 기반의 기법, 예컨대 PET, PET-CT 또는 SPECT일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 PET일 수 있다.
- [0250] 본 영상화 방법에 있어서, CD321 특이적 결합제는, 예컨대 검출 가능하도록, 즉 적당한 영상화 기법에 의한 검출 및 시각화가 허용되도록 표지화된다. 비제한적 예를 들자면, PET 기반 영상화 기술에 적합한 표지로서는 방사성핵종, 예컨대 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{89}Zr 또는 ^{82}Rb 를 포함한다.
- [0251] 추가의 양태들은 본 명세서 전반에 걸쳐 기술된 바와 같은 방법과 용도를 실행 및 실현하는데 유용한 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0252] 그러므로 한 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는, 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0253] 또 다른 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는, 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0254] 또 다른 추가의 양태는, CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상, 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상, 그리고 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 포함하는, 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 것이다.
- [0255] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 "부품들로 이루어진 키트" 및 "키트"란 용어는, 명시된 방법들을 수행하는데 필요한 구성부품들을 함유하고, 이 구성부품의 운반과 보관을 허용하도록 포장된 제품을 지칭한다. 키트에 포함된 구성부품을 포장하기에 적합한 재료로서는 크리스탈, 플라스틱(예컨대 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카보네이트), 병, 플레이트, 바이알, 앰플, 종이, 봉투 또는 기타 유형의 용기, 운반체 또는 지지체를 포함한다. 키트가 다수의 구성부품을 포함하는 경우, 적어도 이 구성부품들의 하위세트(예컨대 구성부품들 다수 개 중 2개 이상), 또는 이 구성부품 전부는 물리적으로 분리될 수 있는데, 예를 들어 별도의 용기, 운반체 또는 지지체 내에 포함되어 있을 수 있거나 이것들 위에 포함되어 있을 수 있다. 키트 내에 포함된 구성부품들은 명시된 방법들을 수행하는데 충분할 수 있거나 충분하지 않을 수 있어서, 이러한 방법들을 수행하기 위해서는 각각 외부 시약 또는 물질이 필요할 수 있거나 또는 필요하지 않을 수 있다. 통상적으로 키트는 표준 실험실 장비, 예컨대 액체 취급 장비, 환경(예컨대 온도) 제어 장비, 분석 기구 등과 함께 사용된다. 본원에 교시된 바와 같이 언급된 결합제(들)로서, 선택적으로는 아레이나 마이크로아레아 상에 제공되는 결합제(들), 예컨대 항체, 잡종화 프로브, 증폭 및/또는 서열결정 프라이머 이외에도, 본 키트는 또한 명시된 방법에 유용한 용매, 완충제(예컨대 히스티딘-완충제, 시트르산염-완충제, 숙신산염-완충제, 아세트산염-완충제, 인산염-완충제, 포름산염-완충제, 벤조산염 완충제, TRIS(트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄) 완충제 또는 말레산염 완충제 또는 이것들의 혼합물(이에 한정되는 것은 아님)), 효소(예컨대 열안정성 DNA 중합효소(이에 한정되는 것은 아님)), 검출 가능한 표지, 검출 시약 및 (양성 및/또는 음성) 대조군 제제 중 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 통상적으로 키트는 또한 이의 사용에 관한 지침을, 예컨대 인쇄된 삽입물 또는 컴퓨터 가독성 매체로서 포함할 수도 있다. 본 용어는, 본 내용 중에서 사용될 때 넓게는 임의의 인공 유형 구조 제품을 포함하는 "제조 물품"이란 용어와 호환되어 사용될 수 있다.
- [0256] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0257] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 구현예들에서, 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0258] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0259] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45이다.

- [0260] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 혈소판 마커는 CD42a이다.
- [0261] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 바람직한 구현예들에서, 범-백혈구 마커는 CD45이고, 혈소판 마커는 CD42a이다.
- [0262] 마커, 예컨대 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산, 예컨대 CD321, CD45, LSP1, CD48, CD36, CD41, CD42a, CD42b 또는 CD61에 특이적으로 결합할 수 있는 제제는 본 명세서의 어딘가에 기술된 바 있다.
- [0263] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 구현예들에서, 하나 이상의 제제는 본 명세서의 어딘가에 설명된 바와 같은 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술에 사용되도록 구성된다.
- [0264] 본원에 교시된 바와 같은 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트에 관한 임의의 구현예들에서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 본 명세서의 어딘가에 설명된 바와 같은 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머이다.
- [0265] 본원에 개시된 바와 같은 키트의 예들로서는 이하의 것들이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:
- [0266] - A), B1) 및 C1)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0267] - A), B2) 및 C2)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0268] - A), B3) 및 C3)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0269] - A) 및 B1)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0270] - A) 및 B2)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0271] - A) 및 C3)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0272] - A) 및 C1)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0273] - A) 및 C2)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0274] - A) 및 C3)의 조합을 포함하는 용기를 포함하는 키트;
- [0275] - A)를 포함하는 용기와, B1) 및 C1)의 조합을 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트;
- [0276] - A)를 포함하는 용기와, B2) 및 C2)의 조합을 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트;
- [0277] - A)를 포함하는 용기와, B3) 및 C3)의 조합을 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트;
- [0278] - A)를 포함하는 용기와, B1)을 포함하는 별도의 용기, 그리고 C1)을 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트;
- [0279] - A)를 포함하는 용기와, B2)를 포함하는 별도의 용기, 그리고 C2)를 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트; 또는
- [0280] - A)를 포함하는 용기와, B3)를 포함하는 별도의 용기, 그리고 C3)를 포함하는 별도의 용기를 포함하는 키트
- [0281] [다만 여기서 "A)"는 항인간 CD321 항체를 나타내고; "B1)"은 항인간 범-백혈구 마커 항체를 나타내며; "C1)"은 항인간 혈소판 마커 항체를 나타내고; "B2)"는 항인간 CD45 항체, 항인간 LSP1 항체, 그리고 항인간 CD48 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체를 나타내며; "C2)"는 항인간 CD36 항체, 항인간 CD41 항체, 항인간 CD42a 항체, 항인간 CD42b 항체, 그리고 항인간 CD61 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체를 나타내고; "B3)"은 항인간 CD45 항체를 나타내며; "C3)"은 항인간 CD42a 항체를 나타냄].
- [0282] 그러므로 본 출원은 하기 진술 1 ~ 28에 제시된 바와 같은 특히 바람직한 양태들과 구현예들을 제공한다:
- [0283] 진술 1. 대상체 유래 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 검출 또는 정량하고, 선택적으로는 생물 시료로부터 상기 CTC를 분리하기 위한 방법으로서, 생물 시료 중 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈세포에 의한 CD321의 발현은, 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것임]와, 선택적으로 생물 시료로부터 CD321 발현 CTC를 분리하는 단계를 포함하는 방법.
- [0284] 진술 2. 진술 1에 따른 방법으로서, 생물 시료는 대상체의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비

유체로부터 유래하고, 바람직하게는 대상체의 말초혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 방법.

- [0285] 진술 3. 진술 1 또는 2에 따른 방법으로서, 순환 CD321 양성 종양 세포는 상기 세포에 의한 범-백혈구 마커 적어도 하나 및 혈소판 마커 적어도 하나의 발현 비진행에 의해 비조혈세포인 것으로 동정되는 방법.
- [0286] 진술 4. 진술 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 방법으로서,
- [0287] a) 대상체로부터 유래하는 생물 시료를 제공하는 단계로서, 상기 생물 시료는 대상체로부터 유래하는 순환 세포, 바람직하게 대상체의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 또 다른 삼출물이나 분비 유체, 더욱 바람직하게 대상체의 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 단계;
- [0288] b) 적어도 하나의 범-백혈구 마커에 대해 음성이고, 적어도 하나의 혈소판 마커에 대해 음성인, 비조혈세포를 상기 생물 시료 중에서 검출하는 단계;
- [0289] c) b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현을 검출하는 단계로서, b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 CD321의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것인 단계
- [0290] 를 포함하는 방법.
- [0291] 진술 5. 진술 3 또는 4에 따른 방법으로서,
- [0292] a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0293] b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0294] c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0295] d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;
- [0296] e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는
- [0297] f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a
- [0298] 인 방법.
- [0299] 진술 6. 진술 1 내지 5 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 종양은 고형 종양인 방법.
- [0300] 진술 7. 진술 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 종양은 상피, 간엽 또는 멜라닌세포 기원의 것인 방법.
- [0301] 진술 8. 진술 1 내지 7 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 대상체는 인간인 방법.
- [0302] 진술 9. 진술 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 방법으로서, CD321의 발현을 검출하는 단계는 CD321 단백질 또는 CD321 mRNA 또는 이 둘 다를 검출하는 것을 포함하는 방법.
- [0303] 진술 10. 진술 1 내지 9 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 단리되는 방법.
- [0304] 진술 11. 진술 10에 따른 방법으로서, 기술은 CD321에 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 사용하는 방법.
- [0305] 진술 12. 진술 10 또는 11에 따른 방법으로서, 기술은 적어도 하나의 범-백혈구 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 적어도 하나의 혈소판 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 추가로 이용하는 방법.
- [0306] 진술 13. 진술 11 또는 진술 12에 따른 방법으로서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 방법.
- [0307] 진술 14. 진술 1 내지 9 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 CTC는 CD321에 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 사용하는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 단리되는 방법.
- [0308] 진술 15. 진술 14에 따른 방법으로서, 기술은 적어도 하나의 범-백혈구 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 제제

하나 이상과, 적어도 하나의 혈소판 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 추가로 사용하는 방법.

- [0309] 진술 16. 진술 14 또는 15에 따른 방법으로서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 방법.
- [0310] 진술 17. 진술 14 내지 진술 16 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분류법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.
- [0311] 진술 18. 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 분리된 CTC, 이의 용해물 또는 이의 종양 항원 하나 이상을 종양 백신으로 제제화하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 종양 백신은 수지상 세포를 추가로 포함하는 방법.
- [0312] 진술 19. 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 분리된 CTC를 생화학적 분석, 돌연변이 분석, 전사체 분석 및/또는 단백질 분석의 대상이 되게 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0313] 진술 20. 대상체 내 신생물 형성 질환을 진단, 예후 또는 모니터링하기 위한 방법으로서, 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 방법.
- [0314] 진술 21. 대상체 내 신생물 형성 질환의 전이 잠재성을 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하고, 대상체 내 CTC의 존재는 신생물 형성 질환이 전이 잠재성을 가짐을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0315] 진술 22. 대상체 내 신생물 형성 질환의 재발을 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하고, 대상체 내 CTC의 존재는 신생물 형성 질환이 재발하였음을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0316] 진술 23. 대상체가 항암 요법을 필요로 하는지 여부를 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하고, 대상체 내 CTC의 존재는 대상체가 항암 요법을 필요로 함을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0317] 진술 24. 신생물 형성 질환이 발병한 대상체에서 항암 요법의 효능을 확정하기 위한 방법으로서, 치료법 이전 및 도중 또는 이후에 진술 1 내지 17 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하고, 치료법 도중이나 이후의 대상체 내 CTC 양의, 치료법 이전의 대상체 내 CTC 양에 비한 감소는 상기 치료법이 효능이 있음을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0318] 진술 25.
- [0319] a) - CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0320] - 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0321] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트;
- [0322] b) - CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0323] - 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0324] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트
- [0325] c) - CD321과 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상;
- [0326] - 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0327] - 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0328] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트
- [0329] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0330] 진술 26. 진술 25에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서,
- [0331] a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

- [0332] b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0333] c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0334] d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;
- [0335] e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는
- [0336] f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a
- [0337] 인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0338] 진술 27. 진술 25 또는 26에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서, 하나 이상의 제제는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분취법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술에 사용되도록 구성된 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0339] 진술 28. 진술 25 내지 27 중 어느 하나에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서, 상기 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 스캐폴드 또는 앵타머인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0340] 실시예 1의 표에 제시된 추가의 마커도 또한 CD321에 관해 본 명세서에 기술된 바와 같은 응용예에 대응하는 응용예에 유용하다. 이러한 마커로서는, 구체적으로 CD40, CD49e, CD146, 베타 2 마이크로글로불린 및 이것들의 조합을 포함한다.
- [0341] 그러므로 본 출원은 또한 하기 진술 1' 내지 31'에 제시된 바와 같은 양태들과 구현예들을 제공한다:
- [0342] 진술 1'. 대상체 유래 생물 시료 중 종양 세포를 검출 또는 정량하기 위하고, 선택적으로는 생물 시료로부터 종양 세포를 단리하기 위한 방법으로서, 이 방법은 CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커의, 생물 시료 중 종양 세포에 의한 발현을 검출하는 단계, 그리고 선택적으로 상기 마커를 발현하는 종양 세포를 생물 시료로부터 단리하는 단계를 포함하는 방법.
- [0343] 진술 2'. 진술 1'에 따른 방법으로서, 상기 생물 시료는 종양 생검편 또는 미세침흡출물 또는 절제된 종양 조직인 방법.
- [0344] 진술 3'. 진술 1'에 따른 방법으로서, 대상체 유래 생물 시료 중 순환 종양 세포(CTC)를 검출 또는 정량하기 위하고, 선택적으로는 생물 시료로부터 상기 CTC를 단리하기 위한 방법으로서, CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커의, 생물 시료 중 순환 비조혈 세포에 의한 발현을 검출하는 단계[다만 순환 비조혈 세포에 의한 상기 마커의 발현은 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜 주는 것임], 그리고 선택적으로 상기 마커를 발현하는 CTC를 생물 시료로부터 단리하는 단계를 포함하는 방법.
- [0345] 진술 4'. 진술 3'에 따른 방법으로서, 생물 시료는 대상체의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비 유체, 바람직하게 대상체의 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 방법.
- [0346] 진술 5'. 진술 3' 또는 4'에 따른 방법으로서, 상기 마커에 대해 양성인 순환 종양 세포는 범-백혈구 마커 적어도 하나와 혈소판 마커 적어도 하나의 상기 세포에 의한 발현의 비진행에 의해 비조혈세포인 것으로 확인되는 방법.
- [0347] 진술 6'. 진술 3' 내지 5' 중 어느 하나에 따른 방법으로서,
- [0348] a) 대상체 유래 생물 시료를 제공하는 단계로서, 상기 생물 시료는 대상체 유래 순환 세포, 바람직하게 대상체의 혈액, 소변, 대변, 림프 또는 다른 삼출물이나 분비 유체로부터 유래하는 순환 세포, 더욱 바람직하게 대상체의 말초 혈액으로부터 유래하는 순환 세포를 포함하는 단계;
- [0349] b) 상기 생물 시료 중에서 범-백혈구 마커 적어도 하나에 대해 음성이고, 혈소판 마커 적어도 하나에 대해 음성인 비조혈 세포를 검출하는 단계;
- [0350] c) b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한, CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커의 발현을 검출하는 단계로서, b)에서 검출된 바와 같은 세포에 의한 상기 마커의 발

현은, 상기 세포가 순환 종양 세포임을 확인시켜주는 것인 단계

를 포함하는 방법.

진술 7'. 진술 5' 또는 6'에 따른 방법으로서,

a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;

e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는

f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a

인 방법.

진술 8'. 진술 1' 내지 7' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 종양은 고형 종양인 방법.

진술 9'. 진술 1' 내지 8' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 종양은 상피, 간엽 또는 멜라닌세포 기원의 것인 방법.

진술 10'. 진술 1' 내지 9' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 대상체는 인간인 방법.

진술 11'. 진술 1' 내지 10' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 상기 마커의 발현을 검출하는 단계는 마커 단백질이나 마커 mRNA, 또는 이 둘 다를 검출하는 것을 포함하는 방법.

진술 12'. 진술 1' 내지 11' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 종양 세포 또는 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분류법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.

진술 13'. 진술 12'에 따른 방법으로서, 기술은 CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 사용하는 방법.

진술 14'. 진술 12' 또는 13'에 따른 방법으로서, 기술은 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 추가로 사용하는 방법.

진술 15'. 진술 13' 또는 14'에 따른 방법으로서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 방법.

진술 16'. 진술 1' 내지 11' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 종양 세포 또는 CTC는 CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 사용하는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.

진술 17'. 진술 16'에 따른 방법으로서, 기술은 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상과, 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상을 추가로 사용하는 방법.

진술 18'. 진술 16' 또는 17'에 따른 방법으로서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 방법.

진술 19'. 진술 16' 내지 18' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 종양 세포 또는 CTC는 유세포분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분류법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술을 사용하여 검출, 정량 또는 분리되는 방법.

진술 20'. 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 분리된 종양 세포 또는 CTC, 이의 용해물 또는 이의 종양 항원 하나 이상을 종양 백신으로 제제화하는 단계를 추가로 포함하고, 선택적으로 종양 백신은 수지상 세포를 추가로 포함하는 방법.

- [0373] 진술 21'. 진술 1' 내지 19 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 단리된 종양 세포 또는 CTC를 대상으로 생화학적 분석, 돌연변이 분석, 전사체 분석 및/또는 단백질 분석을 실시하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0374] 진술 22'. 대상체 내 신생물 형성 질환을 진단, 예후 또는 모니터링하기 위한 방법으로서, 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 방법.
- [0375] 진술 23'. 대상체 내 신생물 형성 질환의 전이 잠재성을 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하되, 이때 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 신생물 형성 질환이 전이 잠재성을 가짐을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0376] 진술 24'. 대상체 내 신생물 형성 질환의 재발을 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하되, 이때 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 신생물 형성 질환이 재발되었음을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0377] 진술 25'. 대상체가 항암 요법을 필요로 하는지 여부를 확정하기 위한 방법으로서, 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하되, 이때 대상체 내 종양 세포 또는 CTC의 존재는 대상체가 항암 요법을 필요로 함을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0378] 진술 26'. 신생물 형성 질환이 발병한 대상체에서 항암 요법의 효능을 확정하기 위한 방법으로서, 치료법 이전 및 도중 또는 이후에 진술 1' 내지 19' 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 방법에 의해 대상체 내에서 종양 세포 또는 CTC를 검출 또는 정량하는 단계를 포함하되, 치료법 도중이나 이후의 대상체 내 종양 세포 또는 CTC 양의, 치료법 이전의 대상체 내 종양 세포 또는 CTC 양에 비한 감소는 상기 치료법이 효능이 있음을 확인시켜주는 것인 방법.
- [0379] 진술 27'. 대상체 내 종양의 현장 영상화를 위한 방법으로서, CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제를 대상체에 투여하는 단계[다만 상기 제제는 영상화 기법에 의해 검출 가능한 표지임], 상기 제제가 종양 세포에 의해 발현되는 상기 마커에 특이적으로 결합하는 것을 허용하는 단계, 그리고 상기 영상화 기법을 사용하여 대상체 내 종양을 시각화하는 단계를 포함하는 방법.
- [0380] 진술 28'.
- [0381] a) - CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2, 그리고 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0382] - 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0383] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트;
- [0384] b) - CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2, 그리고 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0385] - 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0386] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트
- [0387] c) - CD321, CD40, CD49e, CD146, 베타 2, 그리고 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상;
- [0388] - 범-백혈구 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상; 및
- [0389] - 혈소판 마커 적어도 하나와 특이적으로 결합할 수 있는 제제 하나 이상
- [0390] 을 포함하는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트
- [0391] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0392] 진술 29'. 진술 28'에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서,
- [0393] a) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

- [0394] b) 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0395] c) 상기 범-백혈구 마커는 CD45, LSP1, CD48 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 혈소판 마커는 CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되거나;
- [0396] d) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이거나;
- [0397] e) 상기 혈소판 마커는 CD42a이거나; 또는
- [0398] f) 상기 범-백혈구 마커는 CD45이고, 상기 혈소판 마커는 CD42a
- [0399] 인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0400] 진술 30'. 진술 28' 또는 29'에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서, 하나 이상의 제제는 유세포 분석법, 질량세포분석법, 형광 활성화 세포 분류법, 형광현미경, 친화성 분리법, 자성 세포 분리법, 마이크로유체 분리법 및 이것들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기술에 사용되도록 구성된 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0401] 진술 31'. 진술 28' 내지 30' 중 어느 하나에 따른 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트로서, 하나 이상의 제제는 각각 독립적으로 하나 이상의 항체, 항체 단편, 항체 유사 단백질 스캐폴드 또는 앵타머인 제조 물품 또는 부품들로 이루어진 키트.
- [0402] 본 발명이, 본 발명의 특정 구현예들과 연계하여 기술되었을 때, 전술된 발명의 설명에 비추어 보았을 때 다수의 대안, 변형 및 변화는 당 업자들에게 분명할 것임은 명료하다. 그러므로 첨부된 청구항들의 넓은 범위와 사상 안에 하기와 같은 대안, 변형 및 변화 모두가 포함될 것이다.
- [0403] 본원에 개시된 본 발명의 양태들과 구현예들은 이하 비제한적 실시예들에 의해 추가로 뒷받침된다.
- [0404] **실시예**
- [0405] **실시예 1 - CD321은 세포주, 환자 유래 이중 이식편(PDX) 및 원발 종양에서 일관되게 발현된다**
- [0406] 각각의 암세포주 무리(SKMES 편평세포암종 세포주, A431 표피모양 암종 세포주), 환자 유래 이중 이식편(3차 계대 배양한 두경부암 PDX) 및 원발성 종양(원발성 피부편평세포 암종)으로부터 유래한 세포에서의 251개 세포 표면 마커의 발현을, 성인 진피 섬유아세포에서의 세포 표면 마커 발현과 비교하여 평가하였다. 이하 표는 상기 마커들의 발현의 반정량적 표상을 제공한다.

항 원	SKMES 폐	A431 피부	H&N PDX P3	원발성 피부 SCC	성인 진피 섬유아세포
CD8b	-	B	-	NA	-
CD9	xx	xx	xx	-	xx
CD10	x	-	-	NA	xx
CD13	xx	-	-	NA	xx
CD15	-	-	x	NA	x?
CD24	B	xx	-	-	-
CD29	x	x	x	-	xx
CD30	x	-	-	NA	-
CD36	x	-	-	NA	-
CD39	x	-	-	NA	-
CD40	xx	xx	-	-	-
CD44	B	xx	B	x	xx
CD46	xx	xx	xx	-	xx
CD47	xx	xx	xx	xx	xx
CD49a	-	x	-	NA	x
CD49b	-	xx	x	-	xx
CD49c	-	xx	xx	-	xx
CD49d	-	B	-	NA	xx
CD49e	xx	xx	-	-	-
CD49f	-	xx	x	-	-
CD51/61	xx	-	x	-	x
CD54	-	xx	-	NA	x
CD55	-	xx	xx	x	xx
CD56	-	xx	-	NA	xx
CD58	-	-	xx	NA	xx
CD59	xx	xx	xx	xx	x
CD61	x	-	B	-	-

[0407]

항 원	SKMES 폐	A431 피부	H&N PDX P3	원발성 피부 SCC	성인 진피 섬유아세포
CD63	xx	xx	xx	-	xx
CD66	-	B	x	-	-
CD69	x	-	-	NA	x
CD71	xx	xx	xx	-	x
CD73	xx	xx	NA	-	xx
CD77	-	B	-	NA	B
CD81	xx	xx	x	-	xx
CD91	-	?	-	NA	xx
CD95	-	xx	xx	-	xx
CD98	-	xx	xx	-	xx
CD99	xx	x	-	-	xx
CD104	xx	x	?	-	-
CD107a	-	x	xx	-	xx
CD108	-	x	-	NA	x
CD109	-	x	-	NA	-
CD117	-	-	B	NA	-
CD119	-	x	-	NA	xx
CD127	xx	-	-	NA	-
CD128	xx	-	-	NA	-
CD130	-	x	-	NA	xx
CD141	-	xx	-	NA	xx
CD142	-	xx	-	NA	xx
CD146	xx	B	xx	-	-
CD147	xx	xx	xx	xx	xx
CD151	x	B	xx	-	xx
CD164	x	xx	xx	-	xx
CD165	B	-	-	-	xx
CD166	xx	xx	xx	-	xx
CD171	x	?	-	-	-
CD201	-	xx	-	NA	xx
CD205	-	x	-	NA	-
CD220	-	-	xx	NA	-
CD221	-	xx	xx	-	xx
CD227	-	B	x	-	x
CD271	-	x	-	NA	-
CD274	xx	xx	-	-	-
CD321	xx	xx	xx	x	-
CD326	x	xx	xx	-	-
CD338	-	x	-	NA	-
CD340	x	xx	xx	-	x
B2M	xx	xx	xx	NA	-
CLA	-	x	-	NA	-
EGFR	xx	xx	-	-	xx
Dis-GD2	B	-	-	NA	B
fMLP-R	x	-	-	NA	-
SSEA4	B	xx	-	x	B

[0408]

항 원	SKMES 폐	A431 피부	H&N PDX P3	원발성 피부 SCC	성인 진피 섬유아세포
TRA-1-60	B	-	-	NA	-
TRA-1-81	B	-	-	NA	-

[0409]

'B'는 '이원 양식의 발현'을 나타내고, 마커의 발현은 이중성으로서,
몇몇 세포는 양성이고 다른 세포는 그렇지 않음

[0410]

CD321은 시험된 모든 암 조직에 의해 확실히 발현되지만, 성인 진피 섬유아세포에 의해서는 발현되지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0411]

추가적 광범위한 인 증은, CD321이 암세포주, 환자 유래 이중 이식편(PDX) 및 원발성 종양에 의해 일관되게 발현 되었음을 확인시켜주었다(도 1 및 도 6).

[0412]

상기 표에 제시된 추가의 마커들도 또한 CD321에 대해 본 명세서에 기술된 응용예들과 대응하는 응용예에 유용 할 것으로 상정된다. 이러한 마커로서는, 구체적으로 CD40, CD49e, CD146, 베타 2 마이크로글로불린(B2M), 그리고 이것들의 조합을 포함한다.

[0413] **실시예 2 - 종양 세포에 의한 CD321 발현과 종래의 상피 마커 발현의 비교**

[0414] 전통적 마커인 EpCAM은 종래에 암세포를 동정하는데 사용되었다. CD321 및 EpCAM의 발현을, 피부와 폐의 원발성 종양 및 두경부 암으로부터 유래하는 종양 세포에서 비교하였다. EpCAM은 항상 CD321과 공동 편재화되었던 반면, 모든 경우에서 CD321은 훨씬 더 많은 수의 세포를 표지화하였는데, 이 점은 CD321이 EpCAM보다 더 큰 감수성으로 종양 세포를 검출하였음을 입증한다(도 2 및 도 7).

[0415] 뿐만 아니라 CD321과 전통적 상피 마커인 케라틴-14의 발현을, 두경부 종양, 폐 종양 및 피부 종양의 조직 절편에서 비교하였다. 케라틴-14는 항상 CD321과 공동 편재화되었던 반면, CD321은 더 많은 비율의 암세포에서 발현되었는데, 이 점은 CD321이 케라틴-14보다 더 큰 감수성으로 종양 세포를 검출하였음을 입증한다(도 3).

[0416] 상피 마커, 예컨대 EpCAM 및 사이토케라틴은 상피-간엽 이행(EMT) 동안에 소멸되는데, 이 과정은 혈관외유출(extravasation)에 요구되고, 종양 개시 세포(tumor initiating cell)의 특징을 이루는 것으로 생각된다.

[0417] 다른 한편, CD321은 종양 세포의 EMT 상태와는 독립적으로 종양 세포의 동정을 허용하였다(도 4).

[0418] **실시예 3 - CD321 발현은 순환 종양 세포(CTC)의 감수성 동정을 허용한다**

[0419] 정상 공여 개체 및 유방암 또는 폐암 환자의 말초 혈액으로부터 유래한 세포를, 면역세포 및 혈소판 배제 후 CD321 및 EpCAM에 대해 염색하였다. EpCAM+ 세포는 항상 CD321+이었던 반면에, CD321은 EpCAM에 의해 마킹되지 않았던 추가의 세포를 표지화하였다(도 5a).

[0420] 인간 폐 다형성 암종을 이식한 마우스의 폐조직과 말초 혈액으로부터 유래한 세포를 인간 CD321에 대해 염색하였다. 인간 CD321+ 세포는 순환하면서 폐내 전이되는 것으로 확실히 검출되었다(도 5b).

[0421] CD321은, 인간 암 환자 대상체 내 순환 종양 세포(CTC)의 감수성 동정을 허용한다(도 8a). CTC 검출은 암의 상이한 병기와 상관되어 있고(도 8b) 항암 요법에 대한 반응과도 상관되어 있다(도 8c).

[0422] **실시예 4 - 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 방법**

[0423] 본 발명의 원리를 구현하는 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 분리하기 위한 방법의 일례는 하기 단계들 또는 작업들을 포함할 수 있다.

[0424] 암이 발병하였거나 암이 발병한 것으로 의심되는 인간 대상체로부터 말초 혈액 시료를 (예컨대 1ml 내지 20ml, 예컨대 5ml, 7.5ml 또는 10ml만큼) 수득하였다. 이 혈액 시료를 통상의 방법으로 채혈한 다음, 항응고제 함유(예컨대 EDTA 함유) 용기 또는 튜브에 보관하였다.

[0425] 적혈구(RBC)는 하기 절차들 중 어느 하나 또는 하기 절차들의 조합에 의해 분석에서 배제하였다.

[0426] - RBC를 용해하기 위해 종래의 방법, 예컨대 시판중인 RBC 용해 완충제, 예컨대 1x ACK(염화칼륨암모늄) 완충제 (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH 7.3)를 사용하거나, 바람직하게는 전통적인 저장 충격을 가하여 적혈구를 용해하거나(적합한 부피의 수중 NaCl 용액 0.2% w/v를 첨가한 다음, 약 10초 내지 약 20초 동안 적혈구가 용해되도록 허용한 후, 여기에 동일한 부피의 수중 NaCl 용액 1.6% w/v를 첨가하여 등장성을 회복시킴), 또는 역시 바람직하게 시판중인 BD FACS™ 용해 용액(cat. no 349202; <http://www.bdbiosciences.com/ds/is/tds/23-1358.pdf>)을 사용하여 항체 염색 이전 또는 이후에 말초 혈액 시료를 처리하는 절차; 및/또는

[0427] - 말초 혈액 시료를 원심분리에 의해 혈장, 백혈구 연층(백혈구 함유 분획) 및 RBC 분획들로 나누는 절차[다만 혈소판 및 CTC는 하류 분석을 위해 사용됨].

[0428] 항체 염색 전, 예를 들어 사멸 세포와 생세포를 선택적으로 표지화하는 염료 적당량을 시료와 접촉시킴으로써, 사멸한 세포를 분석에서 배제할 수 있었다. 예를 들어 비변형(투과처리 안한) 세포 시료와 Hoechst 33342를 접촉시켰을 때, 생세포는 자체의 핵에 이 염료를 혼입시키지 않을 것인 반면에, 사멸 또는 사멸하고 있는 세포는 자체의 핵에 이 염료를 혼입시킬 것이다. 그 다음, Hoechst-양성 세포를 FACS에서 선택, 예컨대 게이팅-아웃(gating-out)하여, 분석이 오로지 생세포에서만 수행되도록 허용하여, 사멸 또는 사멸하고 있는 세포에 의한 비특이적 항체 결합으로 말미암아 혼동이 초래되지 않도록 하였다.

[0429] 항체 염색 전, 세포를 수집한 후 적합한 완충제, 예컨대 1x 인산염 완충 염수(PBS), 선택적으로는 0.5% w/v 소혈청 알부민(BSA)을 함유하는 PBS로 세척할 수 있었지만, 반드시 그럴 필요는 없었다. 그러므로 사전 세척이 이

루어지지 않고, 전혈 시료 또는 백혈구 연층 분획 중에서 항체 염색이 가능하였다.

[0430] 세포를 항원-항체 결합을 유도하는 조건, 예컨대 적합한 완충제, 예컨대 1x PBS 중에서 2% w/v ~ 3% w/v BSA 또는 5% w/v ~ 10% w/v 소 태아 혈청(FBS), 그리고 1% w/v 아지드화나트륨과 함께, 적어도 30분 동안, 약 4℃에서, 1) 형광 표지화한 항인간 CD321 항체, 2) 형광 표지화한 항인간 범-백혈구 마커 항체, 그리고 3) 형광 표지화한 항인간 혈소판 마커 항체와 함께 항온처리하였다. 예를 들어 시료를 1) 형광 표지화한 항인간 CD321 항체, 2) 형광 표지화한 항인간 CD45 항체, 그리고 3) 형광 표지화한 항인간 CD42a 항체와 함께 항온처리하였다. 비 CD321 이소타입 항체를 음성 대조군으로 사용하였다. 항체는, 바람직하게 모노클로날 항체였다. 1)에서의 형광 색소는 유세포분석법 또는 형광현미경에 의해 2) 및 3)에서의 각각의 형광 색소와 구별 가능하였다. 2) 및 3)에서의 형광 색소는 유세포분석법 또는 형광현미경에 의해 서로 간에 구별 가능할 수 있었지만, 반드시 그러한 것은 아니었다. 예를 들어 1)에서의 형광 색소는 알로피코시아닌(APC)이었고, 2) 및 3)에서의 형광 색소는 R-피코에리트린(PE)이었거나, 또는 이와 반대였다.

[0431] 통상적으로 항체와의 항온처리 후, 세포를 적합한 완충제, 예컨대 1x PBS에서 0.5% w/v BSA 및 1% w/v 아지드화나트륨과 함께 1회 내지 3회 세척하였으며, 이로써 항체 결합의 특이성을 보장하였다.

[0432] 이처럼 처리된 세포를 종래의 유세포분석법 또는 수동식 또는 (반)자동식 형광현미경으로 분석하였으며, 형광 색소 1)에 양성이고, 형광 색소 2) 및 3)에 음성인 세포로서, CD321 양성 CTC를 이루는 세포를 검출 및 계수하였다. 유세포분석 또는 형광현미경 데이터는, 예를 들어 표의 형태로, 또는 단일 변수 또는 이중 변수 히스토그램으로서 적합하게 표상되었다. CTC 로딩량은, 예컨대 시료당 또는 혈액 1ml당 CTC 갯수로서 적합하게 제시될 수 있다.

[0433] 선택적으로 CTC를 분취 및 단리하기 위해서는 형광 활성화 세포 분취법(FACS)이 사용될 수 있다.

[0434] 실시예 5 - 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법

[0435] 본 발명의 원리를 구현하는, 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법의 또 다른 예는 하기 단계들 또는 작업들을 포함할 수 있다:

[0436] 암이 발병하였거나 암이 발병한 것으로 의심되는 인간 대상체로부터 말초 혈액 시료를 (예컨대 1ml 내지 20ml, 예컨대 5ml, 7.5ml 또는 10ml만큼) 수득하였다. 이 혈액 시료를 통상의 방법으로 채혈한 다음, 항응고제 함유 (예컨대 EDTA 함유) 용기 또는 튜브에 보관하였다.

[0437] 시료를, 항원-항체 결합을 유도하는 조건에서 제1 항인간 CD321 항체와 접합한 자성유체 입자와 함께 항온처리하였다. 제1 항인간 CD321 항체와 결합한 세포를 면역자성적으로 증량하였다. CD321-자성유체 표지화된 세포를 1) 형광 표지화한 제2 항인간 CD321 항체[다만 제1 및 제2 항인간 CD321 항체는 CD321에 대해 비경쟁적으로 결합함], 2) 형광 표지화한 항인간 범-백혈구 마커 항체, 예컨대 형광 표지화한 항인간 CD45 항체, 그리고 3) 적합한 세포 투과성 핵 대비염색, 예컨대 DNA 결합 염료, 예컨대 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI) 또는 Hoechst 33342와 함께 항온처리하였다. 항체는, 바람직하게 모노클로날 항체였다. 1)에서의 형광 색소는 유세포분석법 또는 형광현미경에 의해 2)에서의 형광 색소와 구별 가능하였다. 예를 들어 1)에서의 형광 색소는 알로피코시아닌(APC)이었고, 2)에서의 형광 색소는 R-피코에리트린(PE)이었거나, 아니면 이와 반대였다.

[0438] 형광 표지화된 세포의 임의의 세척 및 자성 분리 이후, 세포를, 예컨대 CellTracks Analyzer II®(Janssen Diagnostics, LLC)를 사용하는 반자동 형광현미경으로 분석하였다. CTC를, CD321에 양성으로, 그리고 CD45에 음성으로 염색되는 유핵 세포라 정의내렸으며, 전혈 시료의 설정 부피(예컨대 혈액 1ml 또는 7.5ml당 부피) 단위로 계수하였다.

[0439] 실시예 6 - 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법

[0440] 본 발명의 원리를 구현하는 순환 종양 세포(CTC), 구체적으로 전례, 예컨대 도 8의 예의 인간 혈액 시료 중 CTC에 대한 데이터 수집에 사용된 순환 종양 세포(CTC)를 검출, 정량 또는 단리하기 위한 방법의 또 다른 예들은 하기의 단계들 또는 작업들을 포함하였다.

[0441] BD 용해 완충제를 이용하는 방법

[0442] 혈액 시료 7.5ml 내지 10ml만큼을 하기 프로토콜 지침에 따라 처리 및 분석하였다:

[0443] - 혈액을 50ml들이 Falcon 튜브에 옮겨담고, 여기에 FACS 완충제(PBS + 2% v/v FBS)를 첨가함;

- [0444] - 350g에서 10분 동안 원심분리함;
- [0445] - 세포 펠릿이 붕괴되지 않도록 상청액을 조심스럽게 따라냄;
- [0446] - FACS 완충제에 의한 세척을 1회 이상 반복함;
- [0447] - 실온에서 10분 동안 1X BD FACS™ 용해 용액(cat. no 349202)으로 적혈구 용해를 수행한 다음(단 이 때 BD 용해 완충제는 PFA를 함유함), 세포를 고정시키거나 투과처리함;
- [0448] - 350g에서 10분 동안 원심분리함;
- [0449] - 상청액을 따라냄;
- [0450] - 적당한 부피(세포 수에 따라서는, 일반적으로 300 μ l ~ 400 μ l)의 FACS 완충제 중에 세포 펠릿을 재현탁함;
- [0451] - 항체, 즉 항인간 CD321-PE(BD cat #552556)(희석률 1:50), 항인간 Epcam-APC(BD cat#347200)(희석률 1:50), 항인간 CD45-BV421(BD cat#563879)(희석률 1:100), 항인간 CD42a-FITC(BD cat#558818)(희석률 1:50)를 첨가함;
- [0452] - 4°C 및 암실에서 30분 동안 얼음으로 항온처리함;
- [0453] - FACS 완충제로 세척함;
- [0454] - FACS 완충제 300 μ l ~ 400 μ l 중에 재현탁한 다음, FACS로 분석함.
- [0455] **저장성 RBC 용해를 이용하는 방법**
- [0456] 혈액 시료 7.5ml 내지 10ml만큼을, 하기 프로토콜 지침을 적용하여 처리 및 분석하였다:
- [0457] - 혈액 1ml당 0.2% w/v NaCl 25ml 만큼을 첨가함;
- [0458] - 10초 동안 대기함;
- [0459] - 혈액 1ml당 1.6% w/v NaCl 25ml 만큼을 첨가함;
- [0460] - 350g에서 10분 동안 원심분리함;
- [0461] - 상청액을 따라냄;
- [0462] - BD 용해 완충제 프로토콜에 진술한 바와 같이 염색 및 FACS 분석을 진행함.
- [0463] 이 프로토콜에서 세포를 마지막으로 세척한 이후와 분석 이전에, 사멸한 세포를 배제하기 위해 Hoechst 33342 염료 1:2000을 첨가하였다.

[0464]

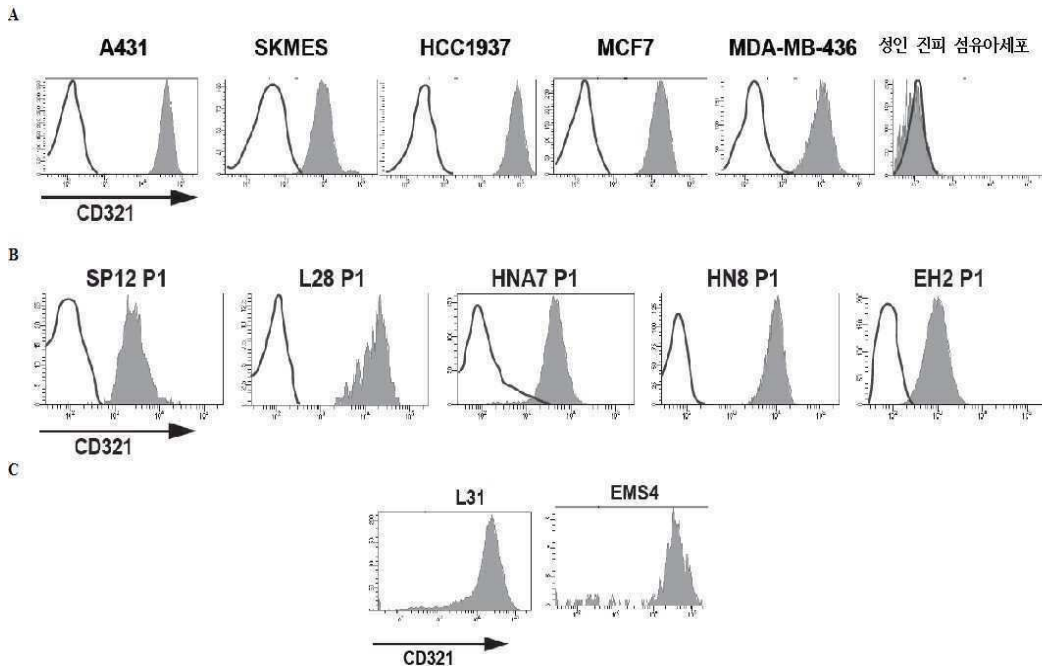
참고문헌

- Binz et al.: Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 2005, 23:1257-1268.
- Gebauer and Skerra: Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 2009, 13:245-55.
- Gill and Damle: Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds. *Curr Opin Biotechnol* 2006, 17:653-658.
- Koide and Koide: Monobodies: antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain. *Methods Mol Biol* 2007, 352:95-109.
- Kolmar: Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins. *FEBS J* 2008, 275:2684-2690.
- Nixon and Wood: Engineered protein inhibitors of proteases. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2006, 9:261-268.
- Nygren: Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J* 2008, 275:2668-2676.
- Silverman et al.: Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol* 2005, 23:1556-1561.
- Skerra: Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J Mol Recognit* 2000, 13:167-187.
- Skerra: Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 2007, 18:295-304.
- Skerra: Alternative binding proteins: Anticalins—harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J* 2008, 275:2677-2683.
- Stumpp et al.: DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 2008, 13:695-701.

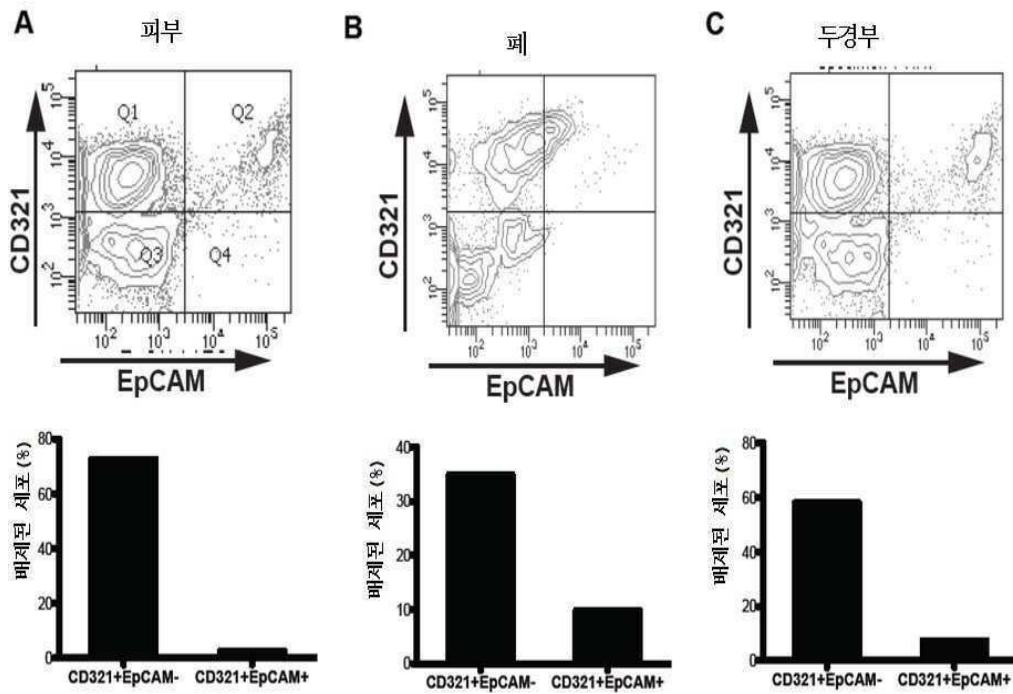
[0465]

도면

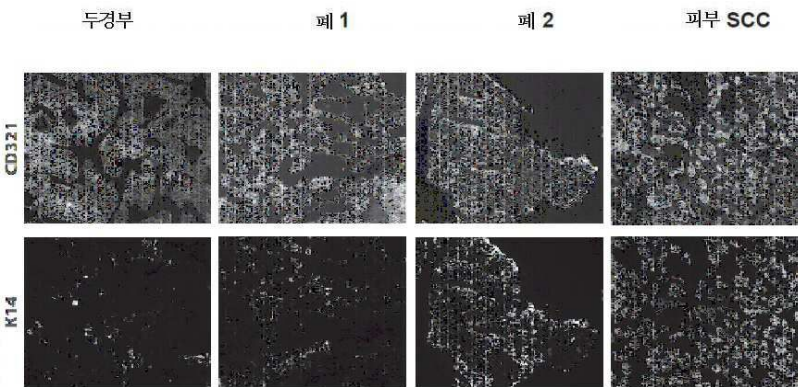
도면1



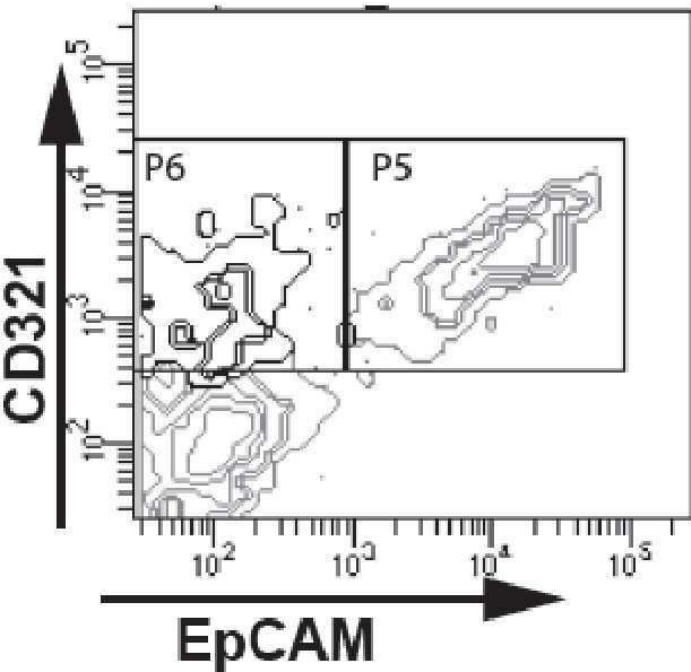
도면2



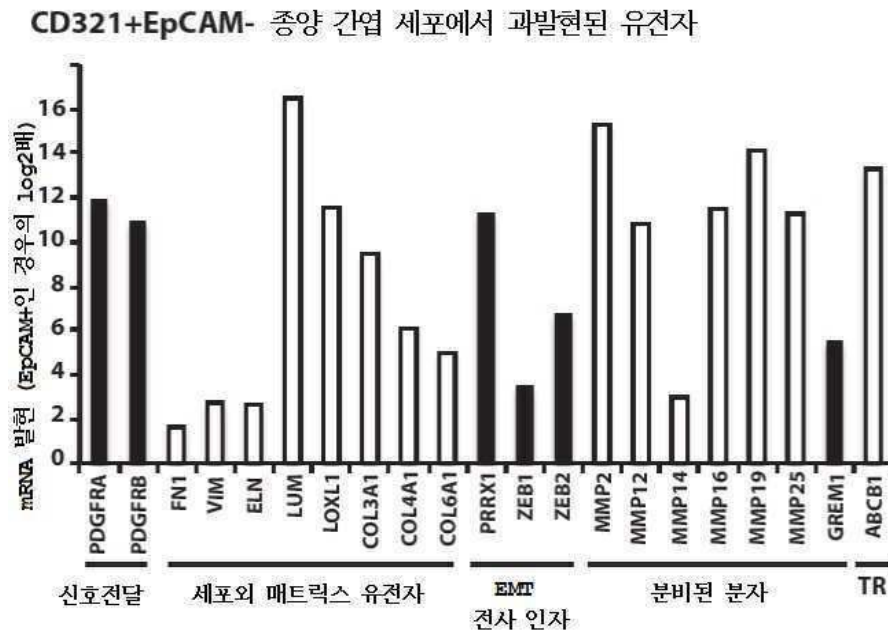
도면3



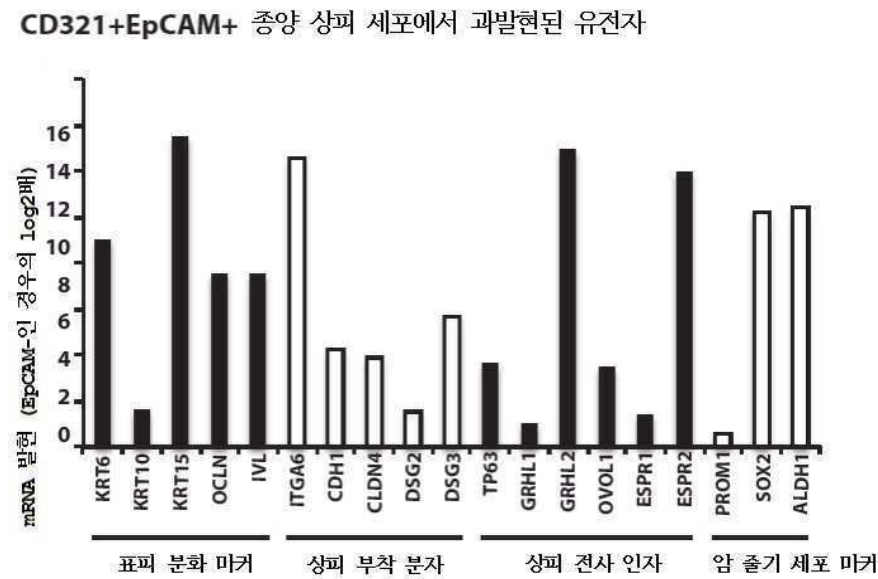
도면4a



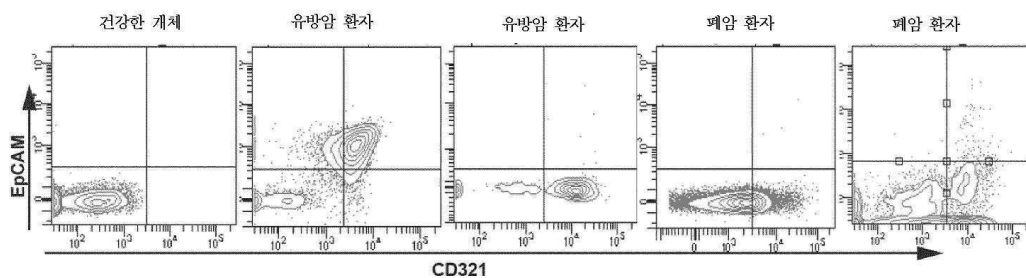
도면4b



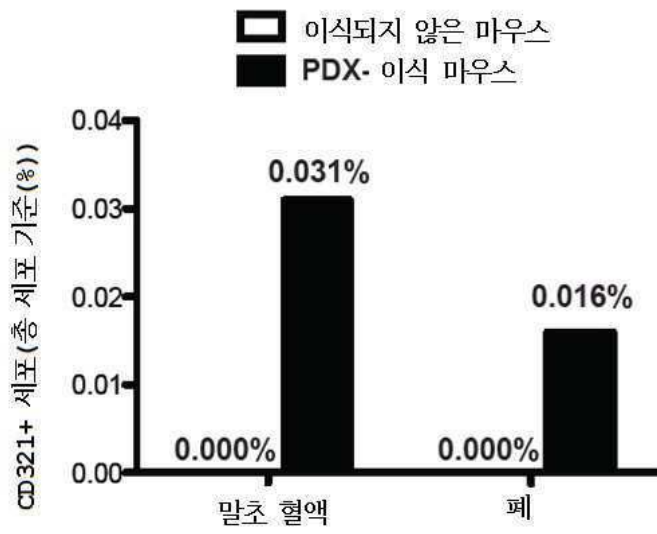
도면4c



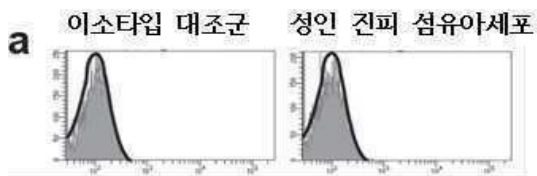
도면5a



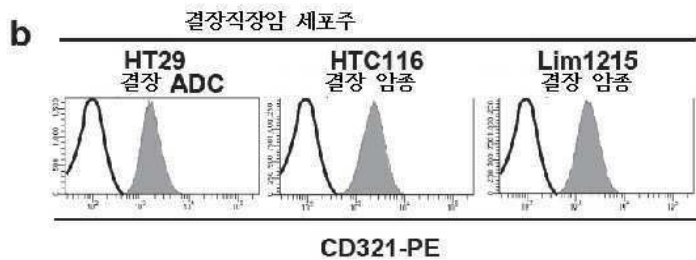
도면5b



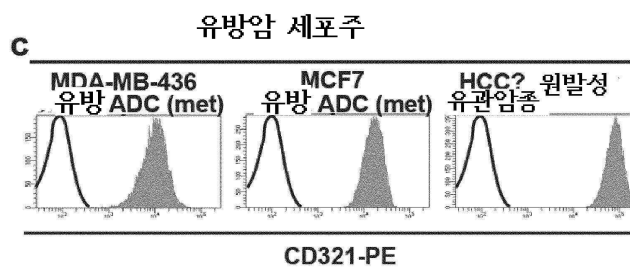
도면6a



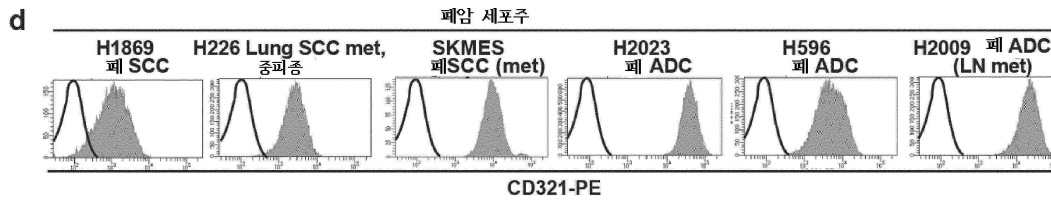
도면6b



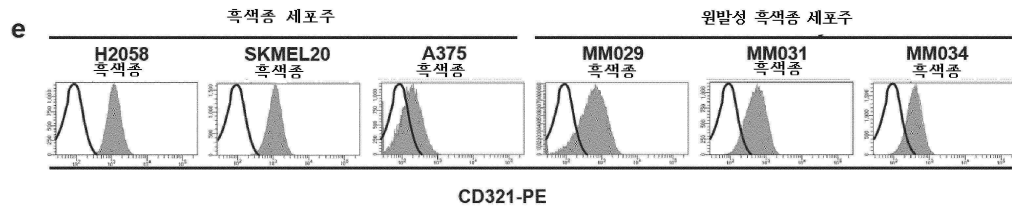
도면6c



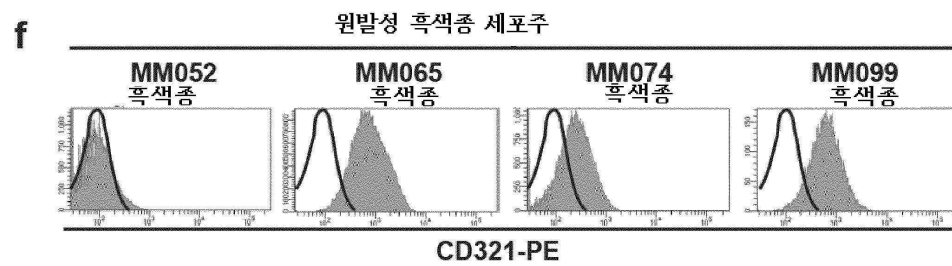
도면6d



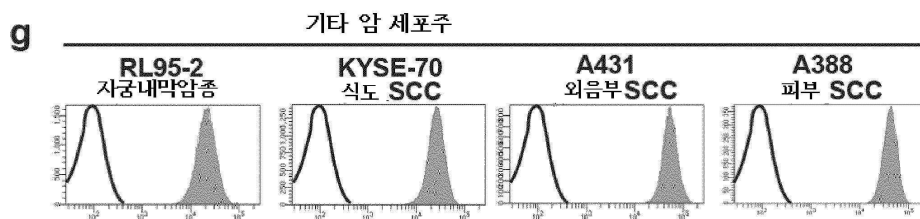
도면6e



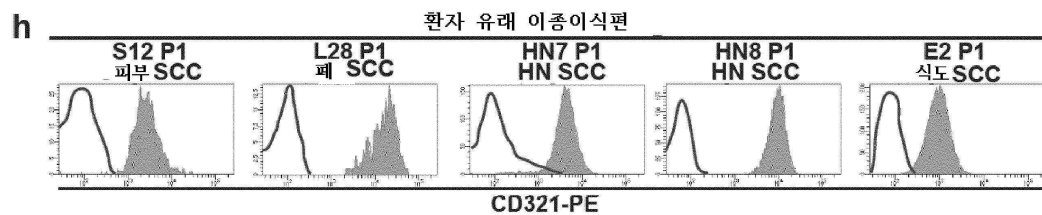
도면6f



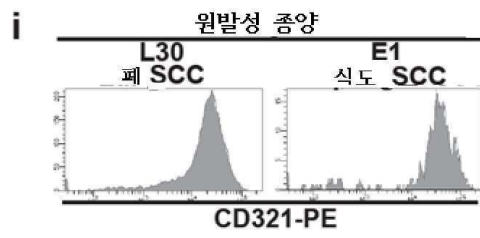
도면6g



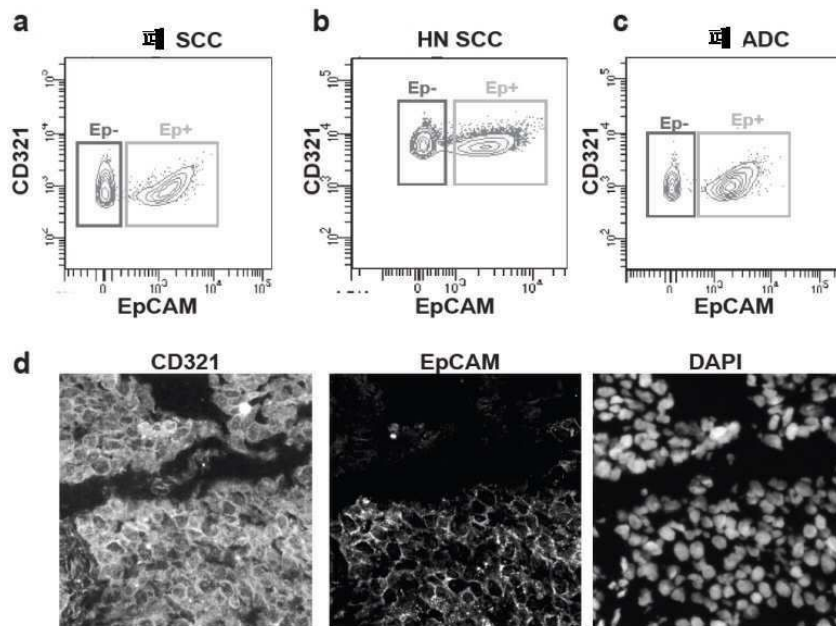
도면6h



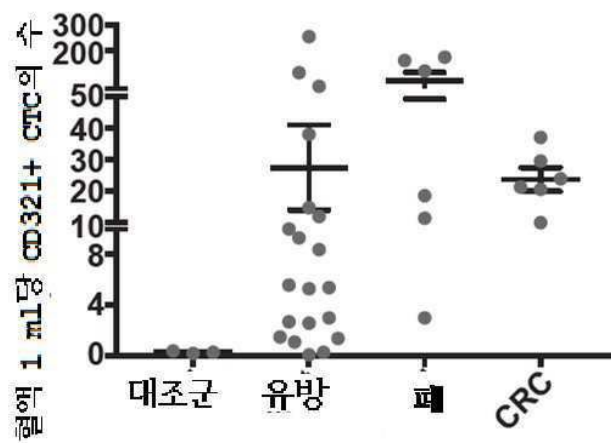
도면6i



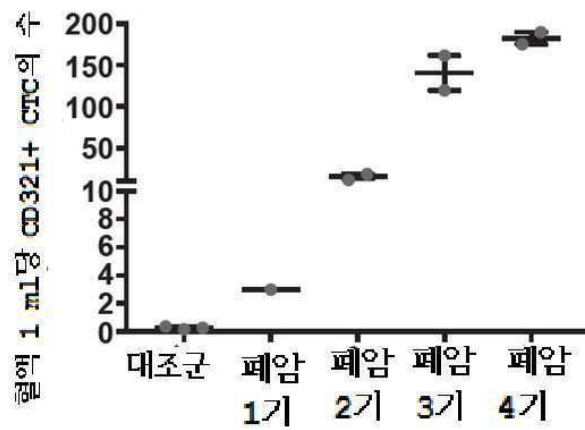
도면7



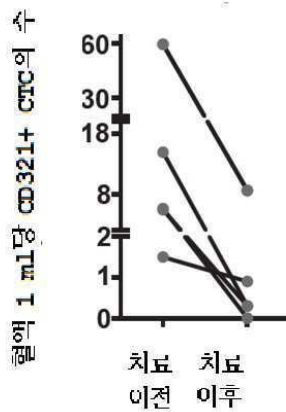
도면8a



도면8b



도면8c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Universit?Libre de Bruxelles

<120> DETECTION, QUANTIFICATION OR ISOLATION OF TUMOR CELLS

<130> ULB-095-PCT

<150> EP17161411.8

<151> 2017-03-16

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggggacaa aggcgcaagt cgagaggaaa ctgttggtgcc tcttcataatt ggcgatcctg      60
ttgtgctccc tggcattggg cagtgttaca gtgcactctt ctgaacctga agtcagaatt      120
cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt gcctactcgg gcttttcttc tccccgtgtg      180

gagtggaagt ttgaccaagg agacaccacc agactcgttt gctataataa caagatcaca      240
gcttcctatg aggaccgggt gaccttcttg ccaactggta tcaccttcaa gtccgtgaca      300
cgggaagaca ctgggacata cacttgatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg      360
gaggtcaagg tcaagctcat cgtgcttggt cctccatcca agcctacagt taacatcccc      420
tcctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatgct cagaacaaga tggttcccca      480
ccttctgaat acacctgggt caaagatggg atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc      540
cgtgccttca gcaactcttc ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat      600

ccctgtcag cctctgatac tggagaatac agctgtgagg cacggaatgg gtatgggaca      660
cccatgactt caaatgctgt gcgcatggaa gctgtggagc ggaatgtggg ggtcatcgtg      720
gcagccgtcc ttgtaacct gattctcctg ggaatcttgg tttttggcat ctggtttgcc      780
tatagccgag gccactttga cagaacaaag aaagggactt cgagtaagaa ggtgatttac      840
agccagccta gtccccgaag tgaaggagaa ttcaaacaga cctcgtcatt cctgggtgtga      900

```

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile

```

1             5             10             15
Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His

20             25             30
Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu

35             40             45
Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe

50             55             60
Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr

65             70             75             80

```

Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe
85 90 95
Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser
100 105 110
Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val
115 120 125
Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr
130 135 140
Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro
145 150 155 160
Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn
165 170 175
Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro
180 185 190
Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly
195 200 205
Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser
210 215 220
Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val
225 230 235 240
Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly
245 250 255
Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly
260 265 270
Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu
275 280 285
Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
290 295
<210> 3
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile

1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His

20 25 30

Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu

35 40 45

Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe

50 55 60

Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr

65 70 75 80

Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile

85 90 95

Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro

100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro

115 120 125

Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr

130 135 140

Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu

145 150 155 160

Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn

165 170 175

Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala

180 185 190

Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile

195 200 205

Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr

210 215 220

Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu Gly

225 230 235 240

Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
245 250