



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0092902
(43) 공개일자 2022년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7016575
(22) 출원일자(국제) 2020년10월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월17일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2020/051155
(87) 국제공개번호 WO 2021/077181
국제공개일자 2021년04월29일
(30) 우선권주장
2019904005 2019년10월24일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로드 300
(72) 발명자
롭 리차드
호주, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드
필러 안드레아스
호주, 퀸즐랜드 4006, 허스톤, 300 허스톤 로드
(74) 대리인
특허법인한얼

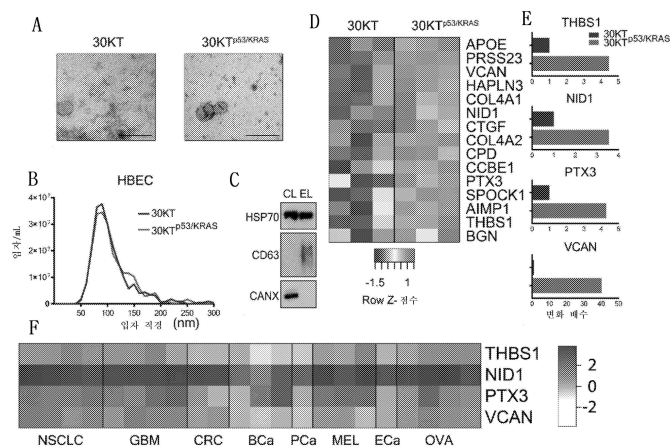
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 암 진단

(57) 요약

본 개시내용은 암 분야에 관한 것이다. 더욱 특히 본 발명은 암을 진단 및 치료하는 방법으로서, 이의 암 유형을 결정하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 마커의 검출을 포함한다.

대표도



도 1

(52) CPC특허분류

G01N 2800/52 (2021.08)

G01N 2800/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체(subject)에서 암 또는 암의 재발을 진단하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커(marker)의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 진단 또는 재발을 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 암으로 진단된 대상체에서 암 유형을 결정하는 추가의 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

암을 갖는 대상체에서 암 유형을 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암 유형을 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 5

대상체에서 암의 공격성(aggressiveness)을 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 APOE, PRSS23, VCAN, HAPLN3, COL4A1, NID1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, PTX3, SPOCK1, AIMP1, THBS1, BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 공격성 수준을 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 6

대상체에서 암에 대한 예후(prognosis)를 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 상기 암에 대한 덜 유리하거나 더 유리한 예후를 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 감소되거나 변화되지 않은 발현 수준은 더 유리한 예후 및/또는 덜 공격성인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있고/거나; 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 덜 유리한 예후 및/또는 고도로 공격성인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체를 (i) 고도로 공격성인 암 또는 덜 공격성인 암; 및/또는 (ii) 덜 유리한 예후 또는 더 유리한 예후를 가진 것으로 진단하는 추가의 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

대상체에서 항암 치료에 대한 암의 반응성을 예측 및/또는 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 변경되거나 조절된 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 증가되거나 감소된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 암을 치료하는 추가의 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하고, 이로부터 이루어진 결정을 기반으로 하여 항암 치료를 개시, 지속, 변형 또는 중단하는 단계를 포함하고, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암으로 진단된 대상체에서 암 유형을 결정하는 추가의 단계를 포함하는, 방법.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항암 치료는 대상체에게 하나 또는 복수 마커의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 항암제의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 엑소좀 샘플을 획득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 엑소좀 샘플 내의 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 각각의 하나 또는 복수의 마커의 참조 엑소좀 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 암 및/또는 암 유형은 폐암 (lung cancer) (예를 들어, 소세포 폐암 (small-cell lung cancer)), 예컨대 NSCLC 및 SCLC, 유방암 (breast cancer), 결장직장암 (colorectal cancer), 전립선암 (prostate cancer), 위암 (gastric cancer), 피부암 (skin cancer), 예컨대 흑색종 (melanoma), 뇌암 (brain cancer), 예컨대 다형성 교모세포종 (glioblastoma multiforme) (GBM), 난소암 (ovarian cancer), 식도암 (esophageal cancer) 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

대상체에서 암의 치료에 사용하기 위한 제제(agent)를 확인 또는 생산하는 방법으로서,

(a) VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, BGN 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 복수의 마커를 발현하는 세포를 후보 제제 (candidate agent)와 접촉시키는 단계; 및

(b) 후보 제제가 하나 또는 복수의 마커의 발현 및/또는 활성을 조절하는지를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 후보 제제는 마커의 발현 및/또는 활성을 적어도 부분적으로 감소, 제거, 저하 또는 억제하는, 방법.

청구항 19

제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 또는 복수의 마커는 VCAN, NID1, PTX3, THBS1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항의 방법에 따라 사용하기 위한, 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되는, 제제.

청구항 21

암에 걸렸거나 암을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 엑소솜 샘플, 및 하나 또는 복수의 VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1의 발현 수준을 결정하기 위한 시약(reagent)을 포함하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 엑소솜 샘플은, 단일 조성물에서, VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1 각각의 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는, 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 엑소솜 샘플은, 별개의 조성물에서, VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1 각각의 수준을 결정하기 위한 시약을 포함하는, 조성물.

청구항 24

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 특이적 결합 구성원(specific binding member)을 포함하는 진단 키트(kit) 또는 시험 장치로서, 이들 각각은 VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 및 상기 하나 이상의 특이적 결합 구성원을 검출하기 위한 하나 이상의 시약 또는 상기 특이적 결합 구성원 및 상기 마커에 의해 형성된 복합체(complex)의 형성을 검출 및/또는 정량화(quantifying)하기 위한 하나 이상의 시약으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커에 선택적으로 결합하는, 진단 키트 또는 시험 장치.

청구항 25

제24항에 있어서, 대상체에서 암 또는 암의 재발을 진단하는 방법에 사용하기 위한, 진단 키트 또는 시험 장치.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1을 포함하는, 진단 키트 또는 시험 장치.

청구항 27

대상체가 화학요법제의 치료에 감수성(susceptible)인지를 결정하기 위한 마커로서의, VCAN, NID1, PTX3, THBS1, APOE, PRSS23, HAPLN3, COL4A1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, SPOCK1, AIMP1, 및 BGN 중 하나 이상의 용도로서, 선택적으로 상기 용도는 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 따른 방법에서의 마커로서인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2019년 10월 24일에 출원된 호주 특허 출원 제 2019904005호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 문헌의

내용과 요소는 모든 목적을 위해 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 출원은 암에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 암을 진단하는 방법으로서, 암의 유형을 결정하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 스크리닝 및 치료의 발전에도 불구하고 전 세계적으로 암 사례는 꾸준히 증가하고 있으며 일생 동안 남성 3명 중 1명, 여성 4명 중 1명에서 암이 발병한다. 또한 남성 8명 중 1명과 여성 11명 중 1명이 치료 불가능한 암 진행으로 사망하며 암이 전 세계적으로 주요 사망 원인 중 하나가 되었다. 초기 단계에서 환자를 확인하고 암 사망률을 감소시키기 위한 신규한 치료법을 개발해야 하는 상당한 미충족 임상 요구가 있다. 대부분의 국소 암은 수술만으로 완치될 수 있으므로 암의 조기 발견이 중요하다. 이 때문에 혈액 검사와 같은 최소 침습적 표본 추출로부터 환자의 암을 진단하는 개선된 방법이 필요하다. 암에 대한 혈액 검사는 너무 많은 위양성 및 음성을 방지하기 위해 통상적인 인구 선별 검사로 시행되기 위해 매우 민감하고 특이적이어야 한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 대상체(subject)에서 특정 암 유형을 포함하는 암의 진단 마커(diagnostic marker)로서 하나 이상의 엑소좀 단백질의 발현 수준을 결정하는 것에 광범위하게 관련된다. 일부 측면에서, 본 발명은 또한 치료 선택 및/또는 의사 결정에 정보를 제공하기 위해 이러한 엑소좀 단백질을 사용한 암의 치료 및 예후 방법(prognostic method)에 관한 것이다.

[0007] 제1 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암 또는 암의 재발을 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E(apolipoprotein E), 세린 프로테아제 23(serine protease 23), 버시칸 코어 단백질(versican core protein), 히알루로난(hyaluronan) 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3(proteoglycan link protein 3), 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬(collagen type IV alpha 1 chain), 니도겐-1(nidogen-1), 결합 조직 성장 인자(connective tissue growth factor), 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬(collagen type IV alpha 2 chain), 카복시펩티다제 D(carboxypeptidase D), 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1(collagen and calcium-binding EGF domain-containing protein 1), 펜트락신 3(pentraxin 3), 테스티칸-1(testican-1), 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체(complex)-상호작용 다기능 단백질 1(aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1), 트롬보스폰딘-1(thrombospondin-1), 비글리칸(biglycan) 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 진단 또는 재발을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0008] 일부 실시양태에서, 본 측면의 방법은 암으로 진단된 대상체에서 암 유형을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 대상체에서 암 또는 암의 재발의 진단(diagnostic)이다.

[0010] 제2 측면에서, 본 발명은 암을 갖는 대상체에서 암 유형을 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암 유형을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0011] 제1 및 제2 측면의 방법의 경우, 하나 또는 복수의 마커는 적합하게는 버시칸 코어 단백질, 니도겐-1, 펜트락신 3, 트롬보스폰딘-1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특징의 일 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도겐-1, 펜트락신 3 및 트롬보스폰딘-1을 포함한다.

[0012] 제3 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 공격성(aggressiveness)을 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유

형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 공격성 수준을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0013] 제4 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암에 대한 예후를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체의 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 상기 암에 대한 덜 유리하거나 더 유리한 예후를 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0014] 전술한 2개의 측면의 특정 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 비교적 감소된 발현 수준은 더 유리한 예후 및/또는 덜 공격적인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있고/거나; 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 덜 유리한 예후 및/또는 고도로 공격적인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0015] 상기 측면의 특정 실시양태에서, 본 방법은 상기 대상체를 (i) 고도로 공격적인 암 또는 덜 공격적인 암; 및/또는 (ii) 덜 유리한 예후 또는 더 유리한 예후를 갖는 것으로 진단하는 단계를 추가로 포함한다.

[0016] 제5 측면에서, 본 발명은 대상체에서 항암 치료에 대한 암의 반응성을 예측 및/또는 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 변경되거나 조절된 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 증가되거나 감소된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

[0017] 전술한 측면의 방법은 적합하게는 대상체에서 암을 치료하는 추가의 단계를 포함한다.

[0018] 제6 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 이로부터 이루어진 결정을 기반으로 하여 항암 치료를 개시, 지속, 변형 또는 중단하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 특정 실시양태에서, 제3, 제4, 제5 및 제6 측면의 방법은 암으로 진단된 대상체에서 암 유형을 결정하는 추가의 단계를 포함한다.

[0020] 제5 및 제6 측면과 관련하여, 항암 치료는 적합하게는 대상체에게 하나 또는 복수 마커의 발현 및/또는 활성을 감소시키는 항암제의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0021] 제5 및 제6 측면의 경우, 본 방법은 대상체에 항암 치료 또는 항암제의 치료 유효량을 투여하는 추가의 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 전술한 측면의 실시양태에서, 본 방법은 대상체로부터 엑소솜 샘플을 획득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 상기 측면의 특정 실시양태에서, 본 방법은 엑소솜 샘플 내의 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 각각의 하나 또는 복수의 마커의 참조 엑소솜 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함한다.

[0024] 적합하게는, 상기 측면의 암 및/또는 암 유형은 폐암, 예컨대 NSCLC 및 SCLC, 유방 암, 결장직장 암, 전립선 암, 위 암, 피부 암, 예컨대 흑색종, 뇌 암, 예컨대 다형성 교모세포종 (GBM), 난소 암, 식도 암 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0025] 제7 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 치료에 사용하기 위한 제제(agent)를 확인 또는 생산하는

방법으로서,

- [0026] (a) 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 복수의 마커를 발현하는 세포를 후보 제제(candidate agent)와 접촉시키는 단계; 및
- [0027] (b) 후보 제제가 하나 또는 복수의 마커의 발현 및/또는 활성을 조절하는지를 결정하는 단계
- [0028] 를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 후보 제제는 마커의 발현 및/또는 활성을 적어도 부분적으로 감소, 제거, 저하 또는 억제한다.
- [0030] 적합하게는, 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7 측면의 방법의 경우, 하나 또는 복수의 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도겐-1, 펜트락신 3, 트롬보스폰딘-1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 제3, 제4, 제5, 제6 및 제7 측면의 일부 실시양태에서, 본 방법은 대상체의 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 추가의 마커, 예컨대 트롬보스폰딘-1의 발현 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0032] 제8 측면에서, 본 발명은 제5 또는 제6 측면의 방법에 따라 사용하기 위한 제7 측면의 방법에 의해 확인 또는 생산된 제제를 제공한다.
- [0033] 적합하게는, 상기 측면의 대상체는 포유류, 바람직하게는 인간이다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암에 걸렸거나 암을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 엑소솜 샘플, 및 하나 또는 복수의 VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1의 발현 수준을 결정하기 위한 시약(reagent)을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 엑소솜 샘플은, 단일 조성물에서, VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1 각각의 수준을 결정하기 위한 시약을 포함한다. 일부 대안적 실시양태에서, 엑소솜 샘플은, 별개의 조성물에서, VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1 각각의 수준을 결정하기 위한 시약을 포함한다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 진단 키트(kit) 또는 시험 장치는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 특이적 결합 구성원(specific binding member)을 포함하고, 이들 각각은 APOE, PRSS23, VCAN, HAPLN3, COL4A1, NID1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, PTX3, SPOCK1, AIMP1, THBS1, 및 BGN 및 상기 하나 이상의 특이적 결합 구성원을 검출하기 위한 하나 이상의 시약 또는 상기 특이적 결합 구성원 및 상기 마커에 의해 형성된 복합체의 형성을 검출 및/또는 정량화(quantifying)하기 위한 하나 이상의 시약으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커에 선택적으로 결합한다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 진단 키트 또는 시험 장치는 대상체에서 암 또는 암의 재발을 진단하거나, 대상체에서 암의 유형을 결정하는 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 마커는 VCAN, NID1, PTX3, 및 THBS1을 포함한다.
- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체가 화학요법제의 치료에 감수성(susceptible)인지를 결정하기 위한 마커로서, APOE, PRSS23, VCAN, HAPLN3, COL4A1, NID1, CTGF, COL4A2, CPD, CCBE1, PTX3, SPOCK1, AIMP1, THBS1, 및 BGN 중 하나 이상의 용도를 제공하고, 선택적으로 상기 용도는 상기 또는 본 명세서의 다른 부분에 기재된 임의의 하나의 측면에 따른 방법에서의 마커로서이다.
- [0040] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 용어 "~를 포함하다", "~를 포함한다" 및 "~를 포함하는" 또는 유사한 용어는 비배타적인 포함을 의미하는 것으로 의도되어, 요소 또는 특징의 열거된 목록은 언급되거나 열거된 요소만을 포함하지 않으며, 열거되거나 언급되지 않은 다른 요소 또는 특징을 포함할 수 있다.
- [0041] 단수형('a' 및 'an')은 본 명세서에서 단수 또는 복수 요소 또는 특징을 지칭하거나 포괄하는데 사용되며 "하나" 또는 "단일" 요소 또는 특징을 의미하거나 규정하는 것으로 고려되어서는 안 된다. 예를 들어, "하나의" 세포는 하나의 세포, 하나 이상의 세포 및 복수의 세포를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1: 세포 유래 엑소좀의 단백질 구성에 대한 발암 유발성 변화. (A) 단리된 엑소좀의 형태를 투과 전자 현미경을 사용하여 평가하였다. 정상 및 형질전환된 HBEC 유래 엑소좀의 이미지(크기 막대 200 nm). (B) HBEC로부터 단리된 엑소좀의 가변 저항 펄스 감지(TRPS)를 사용한 나노입자 분석은 엑소좀의 대부분이 30 내지 150 nm 사이의 크기 범위를 가지며 형질전환이 엑소좀 분비를 증가시키지 않는다는 것을 보여준다. (C) 엑소좀 단백질 HSP70 및 CD63의 존재 및 세포 마커 칼넥신(calnexin)의 부재를 입증하는 HBEC로부터 엑소좀의 웨스턴 블롯. (D) 정량적 질량 분광분석은 형질전환된 HBEC로부터 유래된 엑소좀의 세포의 표면에서 유의하게 상향조절되는 15개의 단백질을 확인하였다(FDR < 0.02). (E) 질량 분광분석 결과는 THBS1, NID1, PTX3 및 VCAN 정상 및 형질전환된 HBEC에 대한 ELISA를 사용하여 확인되었다. (F) NSCLC, GBM, CRC, BCa, PCa, MEL, ECa 및 OVA의 22개 세포주의 엑소좀은 정상 HBEC 엑소좀의 발현 수준에 대비하여 THBS1, NID1, PTX3 및 VCAN의 발현이 분명히 증가함을 보여준다.

도 2: 발암성 엑소좀 시그니처(signature)는 환자 혈장에서 암을 진단한다. (A) 암 환자에서 THBS1, NID1, PTX3 및 VCAN의 발현 수준은 건강한 대조군과 비교하여 증가한다. (B) 로지스틱 회귀는 AUC가 0.96인 4-단백질 엑소좀 패널의 우수한 진단 능력을 보여준다. (C) 각 암에 대한 진단 엑소좀 시그니처의 민감성(sensitivity)은 95%의 고정 특이성에서 평가되었다. 오차 막대는 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 3: (A)THBS1, (B) NID1, (C) PTX3, 및 (D) VCAN의 진단 능력을 ELISA에 의해 개별적으로 평가하면, 각각의 엑소좀 단백질이 비-소세포 폐암, 교모세포종, 결장직장 암, 전립선 암, 흑색종, 위 암, 식도 암 및 소세포 폐암에서 다양한 진단 능력을 갖는다는 것을 보여주며, 이는 수용체 작동 특성(ROC) 곡선으로 평가되는 바와 같다.

도 4: 종양 단계에 따른 진단 엑소좀 시그니처의 민감성. A, 진단 엑소좀 시그니처는 NSCLC, 식도 및 위암에서 초기 I기 환자와 후기 II 내지 IV기 환자를 95% 특이도로 검출할 수 있다. 오차 막대는 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 5: 기기 판독은 암 유형을 확인하는데 도움이 될 수 있다. 암 유형에 대해 정확하거나 부정확하게 확인된 환자의 백분율은 엑소좀 시그니처가 존재하는 암 유형을 확인하는데 도움이 될 수 있음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

본 발명은 종양유발성 돌연변이로 형질전환된 정상 인간 기관지 상피 세포(HBEC)로부터 시험관내 상향조절된 것으로 확인된 엑소좀 단백질이 광범위한 암에 대한 정확한 진단 바이오마커라는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 기반한다. 확장을 통해, 이러한 엑소좀 마커는 환자에서 암 진행 및 공격성뿐만 아니라 항암 치료에 대한 반응의 바이오마커 역할을 할 수도 있다.

[0044]

넓은 형태에서, 본 발명은 도 1에서 대상체의 엑소좀 샘플에서 제공된 것들과 같은 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하거나 측정함으로써 대상체에서 암의 재발을 포함하는 암을 진단 또는 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0045]

따라서, 일 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암 또는 암의 재발을 진단하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E (APOE; Uniprot 수탁번호 P02649), 세린 프로테아제 23 (PRSS23; Uniprot 수탁번호 095084), 버시칸 코어 단백질 (VCAN; Uniprot 수탁번호 P13611), 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3 (HAPLN3; Uniprot 수탁번호 Q96S86), 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬 (COL4A1; Uniprot 수탁번호 P02462), 니도젠-1 (NID1; Uniprot 수탁번호 P14543), 결합 조직 성장 인자 (CTGF; Uniprot 수탁번호 P29279), 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬 (COL4A2; Uniprot 수탁번호 P08572), 카복시펩티다제 D (CPD; Uniprot 수탁번호 075976), 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1 (CCBE1; Uniprot 수탁번호 Q6UXH8), 펜트락신 3 (PTX3; Uniprot 수탁번호 P26022), 테스티칸-1 (SPOCK1; Uniprot 수탁번호 Q08629), 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1 (AIMP1; Uniprot 수탁번호 Q12904), 트롬보스폰딘-1 (THBS1; Uniprot 수탁번호 P07996), 비글리칸 (BGN; Uniprot 수탁번호 P21810) 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 진단 또는 재발을 나타내거나 이와 상관관계가 있다. 이들 발현 번호에 의해 규정된 단백질은 통상적으로 인간 야생형 아미노산 서열의 것이지만, 유전자 또는 단백질에 대한 언급은 다른 포유류 서열(예를 들어, 포유류 상동체)을 포함할 수 있다.

[0046]

일부 실시양태에서, 본 측면의 방법은 암으로 진단된 대상체에서 암 유형을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

- [0047] 관련 측면에서, 본 발명은 암을 갖는 대상체에서 암 유형을 결정 또는 진단하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지 단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시캡티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암 유형을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0048] 용어 "진단(diagnosis)", "진단(diagnosing)" 및 "진단(diagnostic)"은 숙련된 기술자가 환자가 암 또는 특정 암 유형과 같은 소정의 질병 또는 병태를 앓고 있는지 아닌지를 예측 및/또는 결정할 수 있는 방법을 지칭한다. 숙련된 기술자는 종종, 병태의 존재, 중증도 또는 부재의 지표일 수 있는 하나 이상의 진단 지표(예를 들어, 엑소좀 마커), 존재, 부재, 양 또는 양의 변화를 기반으로 진단을 한다. 또한 "진단하다"라는 용어는 100% 정확도로 암과 같은 특정 질병의 존재 또는 부재를 결정하는 능력이나 심지어 소정의 과정이나 결과가 발생하지 않은 상태보다 발생할 가능성이 더 높다는 것을 지칭하지는 않는다. 대신, 숙련된 기술자는 "진단하다"라는 용어가 암 또는 특정 암 유형과 같은 특정 질병, 장애 또는 병태가 대상체에 존재할 확률이 증가함을 지칭한다는 것을 이해할 것이다.
- [0049] 따라서, 특정 실시양태에서, 암 또는 암 유형의 양성 진단은 대상체에 암 또는 암 유형이 존재하는 경우 또는 확률의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% (또는 그 안의 임의의 범위)를 나타낸다. 이 문맥에서 용어 "약"은 +/- 2%를 나타낸다.
- [0050] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 바와 같이, 용어 "암", "종양", "악성의" 및 "악성"은 종종 종양 발생, 종양 마커의 발현, 종양 억제인자 발현 또는 활성의 상실 및/또는 이상 또는 비정상 세포 표면 마커 발현과 관련된 하나 이상의 유전적 돌연변이 또는 기타 유전적 변화를 포함하는 이상 또는 비정상 분자 표현형을 포함하는 이상 또는 비정상 세포 증식, 분화 및/또는 이동을 특징으로 하는 질병 또는 병태, 또는 질병 또는 병태와 관련된 세포 또는 조직을 지칭한다.
- [0051] 암은 모든 주요 암 형태, 예를 들어 다음에 제한되는 것은 아니나, 육종, 암종, 림프종, 백혈병 및 모세포종을 포함하여 <http://www.cancer.gov/cancertopics/alphalist>의 NCI Cancer Index에 나열된 것과 같은 임의의 공격적이거나 잠재적으로 공격적인 암, 종양 또는 기타 악성 종양을 포함할 수 있다. 본 명세서에는 다음에 제한되는 것은 아니나, 유방암(breast cancer), 폐 선암종(lung adenocarcinoma) 및 중피종(mesothelioma)을 포함하는 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁암(uterine cancer), 고환암(testicular cancer) 및 전립선암(prostate cancer)을 포함하는 생식계 암(cancers of the reproductive system), 뇌 및 신경계 암(cancers of the brain and nervous system), 두경부암(head and neck cancers), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 식도암(esophageal cancer) 및 위암(gastric cancer)을 포함하는 위장암(gastrointestinal cancer), 간암(liver cancer), 방광암(bladder cancer), 신장암(kidney cancer), 흑색종(melanoma) 및 피부암종(skin carcinoma)과 같은 피부암(skin cancer), 림프계 암(lymphoid cancer) 및 골수단핵구암(myelomonocytic cancer)을 포함하는 혈구암(blood cell cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 부신암(adrenal cancer) 및 뇌하수체암(pituitary cancer)과 같은 내분비계 암(cancers of the endocrine system), 골 및 연조직암(bone and soft tissue cancer)을 포함하는 근골격암(musculoskeletal cancer)을 포함할 수 있다.
- [0052] 특정 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 암 및/또는 암 유형은 폐암, 예컨대 비-소세포 암종(NSCLC)(즉, 편평 세포 암종, 선암종 및 대세포 암종), 소세포 암종(SCLC) 및 중피종, 유방암, 결장직장암, 전립선암, 위암, 피부암, 예를 들어 흑색종, 뇌암, 예를 들어 다형성 교모세포종(GBM), 난소암, 식도암 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0053] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 바와 같이, 용어 "재발" 및 "암 재발"은 개선 또는 관해 기간 후에 암의 징후 및 증상의 복귀를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암이 검출될 수 없는 기간 후에, 또는 암이 적어도 부분적으로 외과적으로 제거된 후에, 또는 암의 성장이 치료적 치료에 의해 억제된 후에 암이 재발하였다. 암은 원(원발성) 종양과 동일한 위치 또는 전이성 재발과 같은 신체의 다른 위치에서 재발하거나 다시 발생할 수 있다.
- [0054] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "전이" 또는 "전이성"은 통상적으로 종양, 암 또는 신생물의 주요 중심부로부터 신체의 먼 부위로 순환계 또는 림프계 또는 자연 체강을 통한 악성 종양 세포의 이동 또는 전이 및 하나 이상의 새로운 위치에서 하나 이상의 이차 종양 또는 이의 콜로니의 후속 발달을 지칭한다. "전이"는 전이의 결과

로 형성된 이차 종양 또는 콜로니를 지칭하며, 림프절을 포함한 국소 전이 및 미세 전이 및 먼 거리 전이를 포함한다.

- [0055] 특정 실시양태에서, 본 측면의 방법은 암의 임의의 최소 잔류 질병을 진단하는데 이용될 수 있다. 이와 관련하여, 용어 "최소 잔류 질병"은 치료 동안 또는 치료 후에 대상체가 관해 상태에 있고 일반적으로 암의 증상 또는 징후를 나타내지 않을 때 대상체에 남아 있는 적은 수의 암세포를 의미한다.
- [0056] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "암 유형"은 암이 발생한 조직의 유형(조직학적 유형) 또는 원발성 부위, 또는 암이 처음 발병한 신체의 위치 또는 그것이 유래된 세포의 종류뿐만 아니라, 암세포의 모양에 따라 결정되는 암의 유형을 의미한다.
- [0057] 흥미롭게도, 본 출원인은 특정 유형 및/또는 하위 유형의 암으로 진단되면 본 명세서에 기재된 하나 이상의 엑소좀 마커의 발현 특성 또는 시그니처가 대상체에서 암을 진단하거나 검출하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 암을 분류하거나 확인하는 데에도 사용될 수 있음을 결정하였다. 따라서, 이들 엑소좀 마커는 후속적으로 임상 의에 의해 대상체에서 진단된 특정 암 유형에 특이적인 예를 들어 암 공격성, 생존 예후, 치료 요법, 치료에 대한 반응 등의 표시를 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0058] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "암 하위유형"은 암 유형에 속하는 암 유형의 2차 분류를 의미한다. 이는 암의 분자적 분류로 지칭될 수 있다. 특히, 암 하위유형은 분자 변이, 암 생존, 뚜렷한 임상 및 병리학적 특성, 특정 유전자 발현 시그니처, 및 탈조절된 신호전달 경로와 연관될 수 있다.
- [0059] 암 유형을 결정하는 것과 관련하여 이는 하기의 단계 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다:
- [0060] (a) 대상체의 엑소좀 샘플과 같은 생물학적 샘플에서 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 엑소좀 마커로부터 발현 특성 또는 시그니처를 계산하거나 획득하는 단계;
- [0061] (b) 대상체로부터의 생물학적 샘플의 발현 특성을 하나 이상의 시험 또는 참조 암 유형에 해당하는 하나 이상의 참조 발현 특성과 비교하는 단계; 및
- [0062] (c) 생물학적 샘플의 발현 특성을 암 유형에 매핑하는 단계로서, 암 유형은 대상체의 생물학적 샘플의 발현 특성과 비교하여 시험 암 유형의 가장 근접하거나 가장 밀접하게 정렬된 참조 발현 특성에 해당하는 시험 암 유형으로서 확인되는 단계.
- [0063] 일부 실시양태에서, 암 진단 또는 암 유형은 대상체가 암 치료로부터 이익을 획득할 것인지를 결정하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다. 예를 들어, 덜 공격적인 암 또는 암 유형의 진단을 받은 환자는 암 및/또는 전이의 급속한 국소 진행을 경험할 가능성이 적고 보다 공격적인 모니터링 및/또는 요법에서 벗어날 수 있다.
- [0064] 또 다른 실시양태에서, 암 진단 및/또는 암 유형은 대상체에 대한 치료 전략을 개발하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 전술한 측면의 진단 방법은 대상체에서 진단된 암 및/또는 암 유형에 대한 적절한 치료 계획과 조합된다.
- [0065] 엑소좀이 포식작용 유래의 작은(즉, 통상적으로 30 내지 150 nm) 세포 유래 막 소포라는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 이는 지질, 핵산 및 단백질을 포함할 수 있으며 원형질막과 융합될 때 세포의 환경으로 방출된다. 일반적으로 엑소좀은 CD63, CD9, HSP70, 플로틸린-1(Flotillin-1) 및 TSG101을 포함한 마커 단백질의 존재와 형태 및 크기를 특징으로 한다.
- [0066] 본 발명의 방법에 따르면, 하나 이상의 엑소좀을 포함하는 엑소좀 샘플은 제한없이 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 낭포액, 흉막액, 복막액, 뇌척수액, 눈물, 소변, 타액, 가래, 유두 흡인물, 림프액, 호흡기, 장 및 비뇨생식기의 체액, 모유, 기관계내액, 또는 이의 조합을 포함하는 대부분의 생물학적 유체를 포함하거나 이로부터 획득될 수 있다. 이를 위해, 엑소좀 샘플은 위에 제공된 것과 같은 생물학적 유체 또는 샘플로부터 분리되거나 정제되어 오염된 단백질, 지단백질 등의 제거를 촉진할 수 있다.
- [0067] 이를 위해, 엑소좀 또는 엑소좀 샘플은 다음에 제한되는 것은 아니나, 초원심분리, 크기 배제 크로마토그래피, 엑소좀 침전(예를 들어, System Biosciences의 ExoQuick), 친화도 기반 엑소좀 포획(예를 들어, CD63, CD81, CD82, CD9, Alix, 아넥신, EpCAM 및 Rab5에 대한 항체를 사용한 친화도 정제) 및 이의 임의의 조합과 같은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 분리될 수 있다.
- [0068] 적합하게는, 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩

티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1 및/또는 비글리칸의 하나 또는 복수의 엑소좀 마커는 단일 바이오마커 또는 하나 또는 복수의 바이오마커의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 등 또는 그 이상(예를 들어, 발현 특성 또는 시그니처) 중 임의의 것의 조합으로서 사용될 수 있다.

[0069] 하나의 특정 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커는 적합하게는 버시칸 코어 단백질, 니도겐-1, 펜트락신 3, 트롬보스폰딘-1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 따라서, 하나의 특정 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도겐-1, 펜트락신 3 및 트롬보스폰딘-1을 포함한다.

[0070] 특정 실시양태에서, 상기 측면의 방법은 대상체의 생물학적 샘플, 예컨대 혈액 샘플에서 하나 또는 복수의 추가 마커 또는 바이오마커의 발현 수준을 결정하는 추가의 단계를 포함한다.

[0071] 추가 바이오마커는 대상체에서 암 진단 또는 검출 및/또는 암 유형 결정에 이용될 수 있는 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있음이 예상된다. 예를 들어, 추가 바이오마커는 8개의 순환 단백질 바이오마커(예를 들어, 암 항원 125(CA-125), 암배아 항원(CEA), 암 항원 19-9(CA19-9), 프로락틴(PRL), 간세포 성장 인자(HGF), 오스테오폰틴(OPN), 골수과산화효소(MPO) 및 금속단백질분해효소 1의 조직 억제제 (TIMP-1)) 및/또는 CancerSEEK 시험에 대해 기재된 순환 DNA의 종양 특이적 돌연변이) 중 하나 이상을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Cohen, Science 2018] 참조).

[0072] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 바와 같이, 도 1에서 상향조절된 것으로 확인된 하나 이상의 엑소좀 마커 단백질의 발현 수준은 달리 명시되지 않는 한 상기 단백질을 인코딩하는 핵산 (예를 들어, RNA, mRNA 및 cDNA), 단백질 자체 또는 둘 모두의 발현 수준을 나타낼 수 있다.

[0073] 본 발명의 목적을 위해, "단리된"은 자연 상태에서 제거되거나 그렇지 않으면 인간 조작을 거친 물질을 의미한다. 단리된 물질은 자연 상태에서 일반적으로 수반되는 성분이 실질적으로 또는 필수적으로 부재할 수 있거나, 자연 상태에서 일반적으로 수반하는 성분과 함께 인공 상태가 되도록 조작될 수 있다. 단리된 물질은 천연, 화학적 합성 또는 재조합 형태일 수 있다.

[0074] "단백질"은 아미노산 중합체를 의미한다. 아미노산은 천연 또는 비천연 아미노산, D- 또는 L-아미노산일 수 있으며 당업계에 잘 알려져 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 용어 "단백질"은 또한 단백질의 인산화된 형태(즉, 인단백질) 및/또는 단백질의 글리코실화된 형태(즉, 당단백질)를 그 범위 내에 포함한다. "펩타이드"는 오십(50)개 이하의 아미노산을 갖는 단백질이다. "폴리펩타이드"는 오십(50)개 초과인 아미노산을 갖는 단백질이다.

[0075] 또한, 단백질 "변이체", 예를 들어 자연 발생 변이체(예를 들어, 대립인자 변이체) 및 도 1에 열거된 것과 같은 본 명세서에 제공된 하나 이상의 마커의 오르소로그(ortholog) 또는 이소형이 제공된다. 바람직하게는, 단백질 변이체는 본 명세서에 개시되거나 당업계에 공지된 하나 또는 복수의 마커의 아미노산 서열과 적어도 70% 또는 75%, 바람직하게는 적어도 80% 또는 85% 또는 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다. 이를 위해, 열거된 단백질 마커의 단백질 서열의 예의 참조 수탁번호는 당업계에서 잘 이해되는 바와 같이 위에 기재되어 있고 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0076] 또한, 전체 아미노산 서열의 100% 미만을 포함하는 펩타이드 단편을 포함하는 단백질 단편이 제공된다. 특정 실시양태에서, 단백질 단편은 예를 들어, 상기 단백질의 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 및 1200개의 인접 아미노산을 포함할 수 있다.

[0077] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "유전자"는 제한 없이, 프로모터 및 다른 5' 비번역 서열, 인트론, 폴리아데닐화 서열 및 다른 3' 비번역 서열을 포함하는 하나 이상의 비-인코딩 뉴클레오타이드 서열 및 하나 이상의 아미노산-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있는 게놈의 구조적 유전자 단위인 핵산이다. 대부분의 세포 유기체에서 유전자는 이중 가닥 DNA를 포함하는 핵산이다.

[0078] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산"은 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 및 RNA를 지정한다. DNA에는 게놈 DNA와 cDNA가 포함된다. RNA에는 mRNA, RNA, RNAi, siRNA, cRNA 및 자가촉매 RNA가 포함된다. 핵산은 또한 DNA-RNA 혼성체일 수 있다. 핵산은 일반적으로 A, G, C, T 또는 U 염기를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 그러나, 뉴클레오타이드 서열은 제한 없이 이노신, 메틸리시토신,

메틸이노신, 메틸아데노신 및/또는 티오우리딘과 같은 다른 염기를 포함할 수 있다.

- [0079] 또한, 천연 발생(예를 들어, 대립인자) 변이체의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 "변이체" 핵산 및 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커를 각각 인코딩하는 핵산의 오르소로그(예를 들어, 상이한 종)가 포함된다. 바람직하게는, 핵산 변이체는 본 명세서에 개시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70% 또는 75%, 바람직하게는 적어도 80% 또는 85% 또는 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다.
- [0080] 또한 핵산 단편이 포함된다. "단편"은 각각 뉴클레오타이드 서열의 100% 미만을 구성하는 핵산의 절편, 도메인, 부분 또는 영역이다. 비제한적인 예는 증폭 산물 또는 프라이머 또는 프로브이다. 특정 실시양태에서, 핵산 단편은 예를 들어, 상기 핵산의 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 및 7500개의 인접 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "폴리뉴클레오타이드"는 팔십(80)개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 갖는 핵산이며, "올리고뉴클레오타이드"는 팔십(80)개 미만의 인접 뉴클레오타이드를 갖는다. "프로브"는 예를 들어 노던 또는 서던 블롯팅에서 상보적 서열을 검출하기 위해 적합하게 표지된 단일 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. "프라이머"는 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이고, 바람직하게는 15 내지 50개의 인접 뉴클레오타이드를 갖고, 상보적 핵산 "주형"에 어닐링할 수 있고 DNA 중합효소, 예컨대 *Taq* 중합효소, RNA 의존성 DNA 중합효소 또는 Sequenase™의 작용에 의해 주형 의존적 방식으로 확장될 수 있다. "주형" 핵산은 핵산 증폭에 적용된 핵산이다.
- [0082] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 명세서에 제공된 하나 이상의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 상대적으로 대조군 또는 참조 샘플의 발현 수준, 또는 임계값 발현 수준과 비교할 때(i) 더 높거나, 증가되거나 또는 더 클 수 있고; 또는 (ii) 더 낮거나, 저하되거나 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 참조 집단의 평균 및/또는 중앙값 발현 수준을 초과하는 경우 더 높은 증가 또는 더 큰 것으로 분류될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 참조 집단의 평균 및/또는 중앙값 발현 수준 미만인 경우 더 낮거나 저하되거나 감소된 것으로 분류될 수 있다. 이와 관련하여, 참조 집단은 발현 수준이 결정되는 상기 포유류와 동일한 암 유형, 하위그룹, 병기 및/또는 등급을 갖는 대상체의 그룹일 수 있다. 다른 실시양태에서, 참조 집단은 암이 없거나 암이 없는 것으로 확인된 건강한 대상체의 그룹일 수 있다. 추가 실시양태에서, 대조군 샘플은 암 또는 암 유형의 진단을 위해 시험되기 전에 문제의 대상체로부터 획득된다.
- [0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "더 높은", "증가된" 및 "더 큰"과 같은 용어는 대조군 또는 참조 수준 또는 양과 비교할 때 엑소좀 샘플에서와 같은 핵산 및/또는 단백질의 상승된 양 또는 수준을 지칭한다. 하나 또는 복수의 마커의 핵산 및/또는 단백질의 발현 수준은 상대적이거나 절대적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준이 대조군 또는 참조 수준 또는 양에서 각각의 또는 해당하는 유전자 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준보다 약 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% 또는 적어도 약 500% 더 큰 경우 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현이 더 높거나, 증가하거나 더 크다.
- [0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "더 낮은", "감소된" 및 "저하된"은 대조군 또는 참조 수준 또는 양과 비교하여 엑소좀 샘플에서와 같이 핵산 및/또는 단백질의 더 낮은 양 또는 수준을 지칭한다. 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 핵산 및/또는 단백질의 발현 수준은 상대적이거나 절대적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준이 대조군 또는 참조 수준 또는 양에서 각각의 또는 해당하는 유전자 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준보다 약 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 더 낮거나, 심지어 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 또는 0.0001% 더 낮은 경우 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현이 더 낮거나, 감소하거나 저하된다.
- [0085] "대조군 샘플"이라는 용어는 일반적으로 암이 없는 (건강한) 무질병 개체로부터의 생물학적 샘플, 예컨대 엑소좀 샘플을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플은 암이 없는 것으로 확인된 대상체로부터 또는 보다 앞선 시점에 대상체로부터 획득된 샘플일 수 있다. 대안적으로, 대조군 샘플은 암이 완화된 대상체로부터 유래될 수 있다. 대조군 샘플은 풀링, 평균 또는 개별 샘플일 수 있다. 내부 대조군은 시험 중인 동일한 생물학적 샘플(예를 들어, 엑소좀 샘플)의 마커이다.

- [0086] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 이의 절대적 또는 상대적인 양일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 "하우스키핑(housekeeping)"의 유전자 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현의 수준과 같은 대조군 발현 수준과 비교된다.
- [0087] 추가 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 엑소좀 샘플에서 유전자 및/또는 단백질 발현의 수준과 같은 임계값 수준의 발현과 비교된다. 발현의 임계값 수준은 일반적으로 본 발명의 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현의 정량화된 수준이다. 통상적으로, 발현의 임계값 수준을 초과하거나 저하된 엑소좀 샘플 내의 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 특정 질병 상태 또는 결과를 예측한다. 발현의 임계값 수준의 특성 및 수치 값(존재하는 경우)은 예를 들어 대상체에서 암, 암 유형, 예후 및/또는 항암 요법에 대한 반응의 진단을 결정하는데 사용되는 하나 이상의 유전자 또는 이의 산물의 발현을 결정하기 위해 선택된 방법에 따라 통상적으로 달라질 것이다.
- [0088] 당업자는 예를 들어 본 명세서에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 유전자 또는 단백질 발현을 측정하는 임의의 방법을 사용하여, 암, 암 유형, 예후 및/또는 항암 요법에 대한 반응의 진단을 결정하는데 사용될 수 있는 엑소좀 샘플에서 유전자 및/또는 단백질 발현의 임계값 수준(예를 들어, 소정의 임계값)을 결정할 수 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 임계값 수준은 예를 들어 발현 수준이 결정되는 상기 대상체와 동일한 암 유형, 하위그룹, 병기 및/또는 등급을 갖는 참조 집단에서 하나 또는 복수의 마커의 평균 및/또는 중앙값 유전자 및/또는 단백질 발현 수준(중앙값 또는 절대값)이다. 또한 임계값 발현 수준의 개념은 단일 값이나 결과로 제한되어서는 안 된다. 이와 관련하여, 발현의 임계값 수준은 예를 들어 대상체의 암의 전이의 예를 들어, 높거나, 중간이거나 낮은 확률을 의미할 수 있는 다중 임계값 발현 수준을 포함할 수 있다.
- [0089] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "소정의 임계값"은 치료에 대한 질병의 반응성 또는 질병의 일반적인 예후를 나타내는 이상 또는 이하의 값을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 목적을 위해 소정의 임계값은 암을 갖는 것으로 알려지거나 암이 재발되기 쉬운 대상체 또는 다수의 대조군 대상체 또는 다수의 대조군 대상체의 중앙값 또는 평균과 같은 적절한 대조군 대상체의 샘플에서 단백질의 수준 또는 활성, 또는 단백질을 인코딩하는 핵산의 발현 수준을 나타낼 수 있다. 따라서, 임계값 이상 또는 이하의 활성 또는 발현 수준은 본 명세서에 교시된 바와 같이 대상체에 암이 존재하거나 대상체에서 암이 재발하거나 항암 요법에 반응하는 종양의 가능성을 나타낸다. 다른 예에서, 소정의 임계값은 소정의 임계값 이상 또는 이하의 수준 또는 비율이 대상체에 암이 존재하거나, 대상체에서 암이 재발하거나, 항암 요법에 반응하는 종양을 나타내는 더 높은 신뢰도를 통합하기 위해 대조군 대상체에 대해 결정된 수준보다 더 크거나 더 작은 값을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 소정의 임계값은 1, 2, 3 이상의 표준 편차를 더하거나 빼서 대조군 대상체의 그룹에서 본 명세서에 개시된 마커의 평균 또는 중앙값 활성 수준을 나타낼 수 있다. 당업자는 적절한 대조군 대상체로부터의 생물학적 샘플의 분석에 기반하여 적절한 소정의 임계값을 쉽게 결정할 수 있다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 대상체에서 암 또는 암의 재발의 진단이다. 관련 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 감소되거나 상대적으로 변화되지 않은 발현 수준은 암이 없거나 암이 재발한 대상체의 진단이다.
- [0091] 용어 "결정", "측정", "평가", "확인" 및 "분석"은 본 명세서에서 상호 혼용되며, 이하에서 설명되는 것과 같은 당업계에 공지된 임의의 형태의 측정을 포함할 수 있다.
- [0092] 하나 또는 복수의 엑소좀 단백질의 단백질 수준을 결정, 확인, 평가, 분석 또는 측정하는 것은 표면 상에서든 엑소좀에서 내부적으로 발현되든 또는 대상체의 엑소좀 샘플로부터 단리, 추출 또는 그외로 획득된 단백질인지에 상관없이 이러한 단백질을 검출할 수 있는 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 수행될 수 있다. 이러한 기술에는 제한없이 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 사용하는 항체 기반 검출, 전기영동, 등전점 포커싱, 단백질 시퀀싱, 크로마토그래피 기술 및 질량 분광법 및 이의 조합이 포함된다. 항체 기반 검출은 제한없이, 형광 표지된 항체를 이용한 유세포분석, ELISA, 면역블롯팅, 면역침전, 방사성면역검정(RIA) 및 면역세포화학을 포함할 수 있다.
- [0093] RNA, mRNA 및 cDNA와 같은 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 해당 핵산을 결정, 확인, 평가, 분석 또는 측정하는 것은 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 수행될 수 있다. 이들은 핵산 서열 증폭, 핵산 혼성화, 뉴클레오타이드 시퀀싱, 질량 분광법 및 이의 조합을 포함하는 기술일 수 있다.
- [0094] 핵산 증폭 기술은 일반적으로 적절한 조건 하에 하나 이상의 프라이머를 "주형" 뉴클레오타이드 서열에 어닐링

하고 증합효소를 사용하여 표적에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 합성함으로써 표적 뉴클레오타이드 서열을 "증폭"시키는 반복 사이클을 포함한다. 핵산 증폭 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다음에 제한되는 것은 아니나, 증합효소 연쇄 반응(PCR); 가닥 변위 증폭(SDA); 롤링 서클 복제(RCR); 핵산 서열 기반 증폭(NASBA), Q-β 복제효소 증폭; 헬리카제 의존적 증폭(HAD); 루프 매개 증폭(LAMP); 다행성 효소 증폭 반응(NEAR) 및 재조합효소 증합효소 증폭(RPA)을 포함한다. 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 "증폭 산물"은 핵산 증폭 기술에 의해 생성된 핵산 산물을 지칭한다.

- [0095] PCR은 정량적 및 반정량적 PCR, 실시간 PCR, 대립인자 특이적 PCR, 메틸화 특이적 PCR, 비대칭 PCR, 중첩 PCR, 멀티플렉스 PCR, 터치다운 PCR, 디지털 PCR 및 "기본" PCR 증폭에 대한 기타 변경 및 변형을 포함한다.
- [0096] 핵산 증폭 기술은 세포 또는 조직 공급원으로부터 추출, 단리 또는 그외에 획득된 DNA 또는 RNA를 사용하여 수행될 수 있다. 다른 실시양태에서, 핵산 증폭은 적절하게 처리된 세포 또는 조직 샘플에서 직접 수행될 수 있다.
- [0097] 핵산 혼성화는 통상적으로 적절한 조건 하에 표적 뉴클레오타이드 서열에 통상적으로 프로브 형태의 뉴클레오타이드 서열을 혼성화시키는 단계를 포함하고, 이에 의해 혼성화된 프로브-표적 뉴클레오타이드 서열이 후속적으로 검출된다. 비제한적인 예는 제한 없이 노던 블로팅, 슬롯 블로팅, 인시튜 혼성화 및 형광 공명 에너지 전달(FRET) 검출을 포함한다. 핵산 혼성화는 적절하게 처리된 세포 또는 조직 샘플에서 직접 또는 세포 또는 조직 공급원으로부터 추출, 단리, 증폭 또는 그외에 획득된 DNA 또는 RNA를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0098] 핵산 증폭 및 핵산 혼성화의 조합이 이용될 수 있음이 또한 이해될 것이다.
- [0099] 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 발현을 결정하는 단계는 핵산 증폭 및/또는 핵산 혼성화에 의한 것과 같은 이의 핵산 수준, 및 이의 단백질 수준 둘 모두를 결정하는 단계를 포함할 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 대상체의 엑소좀 샘플로부터 하나 또는 복수의 마커의 발현의 검출 및/또는 측정은 제한없이 본 명세서에 기재된 임의의 방법 또는 이의 조합에 의해 수행될 수 있다(예를 들어, mRNA 수준 또는 이의 증폭된 cDNA 카피 측정 및/또는 이의 단백질 산물 측정에 의함).
- [0100] 전술한 내용에 비추어, 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 RNA, mRNA 및 cDNA와 같은 핵산, 및/또는 단백질을 포함하는 발현된 유전자 또는 이의 유전자 산물의 절대적 또는 상대적인 양일 수 있음이 추가로 이해될 것이다.
- [0101] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 공격성을 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 암의 공격성 수준을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0102] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암에 대한 예후를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도겐-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 상기 암에 대한 덜 유리하거나 더 유리한 예후를 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0103] 상기 측면의 특정 실시양태에서, 본 방법은 상기 대상체를 (i) 고도로 공격성인 암 또는 덜 공격성인 암; 및/또는 (ii) 덜 유리한 예후 또는 더 유리한 예후를 갖는 것으로 진단하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0104] "공격성" 및 "공격적"은 제한 없이, 암 치료에 이용가능한 요법에 대한 적어도 부분적 내성; 침입성; 전이 가능성; 치료 후 재발; 및 환자 생존의 낮은 확률을 포함하는 특징 또는 인자의 조합 중 하나 이상으로 인해 암이 비교적 나쁜 예후를 나타내는 특성 또는 경향을 의미한다.
- [0105] 특정 실시양태에서, 도 1에 제공된 것과 같은 본 명세서에 제공된 단백질은 공격성 질병, 특히 병리학적 재발에 대한 더 짧은 시간 및/또는 더 짧은 환자 생존 시간에 대한 예후를 나타낸다. 추가 실시양태에서, 도 1에 제공

된 것과 같은 본 명세서에 제공된 단백질은 전이성 암과 상관관계가 있거나 이를 나타낸다.

- [0106] 용어 "예후" 및 "예후적"은 임상 결과(의학적 치료의 존재 또는 부재 하) 예측, 적절한 치료 과정(또는 치료가 효과적인지)의 선택 및/또는 현재 치료의 모니터링 및 치료의 변화 가능성을 제공할 수 있는 예후를 구성하는 것을 포함하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 이는 추가 단백질 및/또는 트롬보스폰딘-1 또는 이전에 CancerSEEK에 대해 기재된 것과 같은 다른 핵산 바이오마커의 발현 수준을 결정하는 단계와 조합될 수 있는 본 발명의 방법에 의해 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준을 결정하는 단계에 적어도 부분적으로 기반할 수 있다. 예후는 또한 암이 성공적으로 치료되거나 그외에 해결된 후 대상체가 겪는 암의 지속 또는 영구적인 물리적 또는 심리적 효과에 대한 예측, 예견 또는 예상을 포함할 수 있다. 또한, 예후는 전이 가능성 또는 발생, 치료 반응성, 적절한 치료 요법의 실행, 요법 후 암 재발의 확률, 가능성 또는 잠재성 결정 및 확립된 요법(예를 들어, 화학요법)에 대한 내성의 발생 예측 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 양성 예후는 통상적으로 대상체의 암의 재발 없는 장기 생존과 같은 유리한 임상 결과 또는 전망을 지칭하며, 음성 예후는 통상적으로 암 재발 또는 진행과 같은 부정적인 임상 결과 또는 전망을 지칭한다.
- [0107] 상기 언급된 2가지 측면의 방법의 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 감소되거나 상대적으로 변화되지 않은 발현 수준은 더 유리한 예후 및/또는 덜 공격적인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있고/거나; 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 덜 유리한 예후 및/또는 고도로 공격적인 암을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0108] 특정의 일 실시양태에서, 암 예후 또는 공격성은 상기 대상체에서 암의 전이 가능성을 결정하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다.
- [0109] 적합하게는, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 감소되거나 변화되지 않은 발현 수준은 상기 암의 감소된 전이 가능성을 나타내거나 이와 상관관계가 있고/거나; 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 증가된 발현 수준은 상기 암의 증가된 전이 가능성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 암 예후 또는 공격성은 대상체가 암 치료로부터 이익을 획득할 것인지를 결정하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다. 예를 들어, 유리한 예후 및/또는 덜 공격적인 암을 갖는 환자는 암 및/또는 전이의 급속한 국소 진행을 경험할 가능성이 더 적을 수 있고/거나, 보다 공격적인 모니터링 및/또는 요법으로부터 보호될 수 있다.
- [0111] 또 다른 실시양태에서, 암 예후 또는 공격성은 대상에 대한 치료 전략을 개발하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 암 예후 또는 공격성은 대상체에서 최소 잔류 질병, 질병 진행 또는 재발을 결정하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 암 예후 또는 공격성은 추정된 생존 시간을 결정하기 위해 적어도 부분적으로 사용된다.
- [0114] 적합하게는, 전술한 측면의 방법은 상기 대상체를 (i) 고도로 공격적인 암 또는 덜 공격적인 암; 및/또는 (ii) 덜 유리한 예후 또는 더 유리한 예후를 갖는 것으로 진단하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0115] 일부 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 더 낮은 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 증가된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다. 대안적 실시양태에서, 본 명세서에 제공된 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 더 낮은 유전자 및/또는 단백질 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 감소된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0116] 적합하게는, 암은 제한 없이, 앞서 기재된 유형의 것이다.
- [0117] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에서 항암 치료에 대한 암의 반응성을 예측 및/또는 결정하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 대상체의 엑소좀 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루론산 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도젠-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트라신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 하나 또는 복수의 마커의 변경되거나 조절된 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 증가되거나 감소된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.

- [0118] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자 또는 단백질의 발현 수준은 발현 수준이 대조군 또는 참조 샘플 또는 발현 수준, 예컨대 임계값 수준과 비교하여 더 높거나/증가하거나, 더 낮거나/감소된 경우, "변이" 또는 "조절"된 것으로 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 수준은 참조 집단의 평균 및/또는 중앙값 상대 발현 수준보다 더 크면 높은 것으로 분류될 수 있고, 발현 수준이 참조 집단의 평균 및/또는 중앙값 발현 수준보다 더 작으면 낮은 것으로 분류될 수 있다. 이와 관련하여, 참조 집단은 발현 수준이 결정되는 상기 포유류와 동일한 암 유형, 하위그룹, 병기 및/또는 등급을 갖는 대상체의 그룹일 수 있다. 또한, 발현 수준은 상대적이거나 절대적일 수 있다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도젠-1, 펜트락신 3, 트롬보스폰딘-1, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 특히, 하나 또는 복수의 마커는 적합하게는 버시칸 코어 단백질, 니도젠-1 및 펜트락신 3을 포함하고, 선택적으로 트롬보스폰딘-1의 추가의 바이오마커를 추가로 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 더 높은 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 증가된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다. 대안적 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 상대적으로 더 높은 발현 수준은 항암 치료에 대한 암의 상대적으로 감소된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준, 예를 들어 이의 상대적으로 더 높은 발현 수준은 암의 지속적인 존재(예를 들어, 최소 잔류 질병), 진행 또는 재발 또는 항암 치료에 대한 암의 반응성 부재 또는 감소를 나타내거나 이와 상관관계가 있다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 대상체에서, 또는 대상체로부터 유래된 샘플(예를 들어, 엑소솜 샘플)에서 하나 이상의 바이오마커의 활성, 발현 또는 양을 평가하여 더 많은 바이오마커의 샘플 특성을 획득하는 단계; 및 하나 이상의 바이오마커의 샘플 특성에 기반하여 예측을 하는 단계를 포함한다. 선택적으로, 샘플 특성을 대조군 특성과 비교하여 예측이 이루어진다. 예를 들어, 사용될 수 있는 적합한 대조군 특성은 다음과 같다: (i) 암을 갖는 대조군 대상체의 집단으로부터 획득됨; 또는 (ii) 재발성 암인 암을 갖는 대조군 대상체 또는 대조군 대상체 집단으로부터 획득됨; (iii) 암을 갖는 대조군 대상체 또는 대조군 대상체 집단으로부터 획득된 바이오마커 발현, 활성 또는 양 값의 "평균값, 중앙값 또는 평균" 또는 "표준 범위"의 소정의 특성; (iv) 암을 갖는 대조군 대상체 또는 대조군 대상체의 집단을 나타내는 바이오마커의 확인된 "평균값, 중앙값 또는 평균" 값을 갖는 대조군 샘플로부터 획득됨; (v) 암을 갖는 대조군 대상체 또는 대조군 대상체 집단으로부터 획득된 바이오마커 발현, 활성 또는 양 "임계값" 값의 소정의 특성; 또는 (vi) 암을 갖는 대조군 대상체 또는 대조군 대상체의 집단을 나타내는 바이오마커의 확인된 "임계값" 값을 갖는 대조군 샘플로부터 획득됨.
- [0123] 전술한 측면의 발명과 관련하여, 본 방법은 적절하게는 대상체에서 암을 치료하는 추가의 단계를 포함한다.
- [0124] 본 발명의 추가 측면은 대상체에서 암의 치료에 관한 것이다.
- [0125] 일 특정 측면에서, 암 치료는 암 치료를 계획, 개시, 지속, 변형 또는 중단하는 결정에 기반하여 대상체의 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계와 함께 수행되며, 마커는 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도젠-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트락신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0126] 하나의 특정 실시양태에서, 하나 또는 복수의 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도젠-1, 펜트락신 3, 트롬보스폰딘-1, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 특히, 하나 또는 복수의 마커는 적합하게는 버시칸 코어 단백질, 니도젠-1 및 펜트락신 3을 포함하고, 선택적으로 트롬보스폰딘-1의 추가 바이오마커를 추가로 포함한다.
- [0127] 이와 관련하여, 항암제에 대한 암의 반응성을 예측 및/또는 결정하기 위한 본 명세서에 기재된 방법은 포유류에게 치료 유효량의 항암 치료, 예컨대 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있음이 이해될 것이다. 바람직한 실시양태에서, 항암 치료는 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준이 항암제에 대한 암의 상대적으로 증가된 반응성을 나타내거나 이와 상관관계가 있을 때 투여된다.
- [0128] 다른 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 마커의 유전자 및/또는 단백질 발현 수준이 암의 지

속적인 존재(예를 들어, 최소 잔류 질병), 진행 또는 암의 재발, 또는 항암 치료에 대한 암의 반응성의 부재 또는 감소를 나타내거나 이와 상관관계가 있는 경우 항암 치료가 변형되거나 중단된다.

- [0129] 적합하게는, 제제(들)는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 대상체에게 투여된다. 이와 관련하여, 본 명세서에 제공된 것과 같은 임의의 투여 형태 및 투여 경로가 대상체에게 본 발명의 조성물을 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0130] 암 치료에는 제한 없이, 약물 요법, 예컨대 유기 또는 무기 소분자, 화학 요법, 항체, 핵산 및 기타 생체 분자 요법, 방사선 요법, 수술, 영양 요법, 이완 또는 명상 요법 및 기타 자연 요법 또는 전체론 요법이 포함될 수 있다. 일반적으로, 약물(예를 들어, 유기 또는 무기 소분자), 생체분자(예를 들어, 항체, siRNA와 같은 억제 핵산) 또는 화학요법제는 본 명세서에서 "항암 치료제" 또는 "항암제"로 지칭된다.
- [0131] 암을 치료하는 방법은 예방적, 방지적 또는 치료적일 수 있고 포유류, 특히 인간에서 암의 치료에 적합할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 적어도 암 및/또는 이의 증상의 발병의 개시 후에 암의 증상을 적어도 개선하는 치료적 개입, 작용 과정 또는 프로토콜을 지칭한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 암 및/또는 암의 증상이 발병하기 전에 개시되어, 암 또는 증상의 발병 또는 진행을 예방, 억제 또는 지연시키는 치료적 개입, 작용 과정 또는 프로토콜을 지칭한다.
- [0132] "치료 유효량"이라는 용어는 특정 제제로 치료되는 대상에서 적절한 효과를 달성하기에 충분한 특정 제제의 양을 기재한다. 예를 들어, 이는 암 또는 암 관련 질병, 장애 또는 병태를 감소, 경감 및/또는 예방하는데 필요한 화학요법제의 양일 수 있다. 일부 실시양태에서, "치료 유효량"은 암의 증상을 감소 또는 제거하기에 충분하다. 다른 실시양태에서, "치료 유효량"은 적절한 생물학적 효과를 달성하기에 충분한 양, 예를 들어 암 성장 및/또는 전이를 감소 또는 예방하는데 효과적인 양이다.
- [0133] 이론적으로, 제제의 치료 유효량은 대상체에서 실질적인 세포독성 효과를 일으키지 않으면서 적절한 결과를 유도하기에 충분한 양이다. 암을 감소, 경감 및/또는 예방하는데 유용한 제제의 유효량은 치료되는 대상체, 임의의 관련 질병, 장애 및/또는 병태의 유형 및 중증도(예를 들어, 임의의 관련 전이의 수 및 위치), 및 치료 조성물의 투여 방식에 따라 상이할 수 있다.
- [0134] 적합하게는, 항암 치료제는 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 포유류에게 투여된다.
- [0135] "약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제"는 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라, 당업계에 잘 알려진 다양한 담체가 사용될 수 있다. 이들 담체는 당, 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 맥아, 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 리포솜 및 기타 지질계 담체, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충 용액, 유화제, 등장 식염수 및 염, 예를 들어 염산염, 브롬화물 및 황산염을 포함하는 무기산염, 아세트산염, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산과 같은 염 및 발열원 무함유 물을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0136] 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 및 부형제를 기재하고 있는 유용한 참조문헌은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)]으로서, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0137] 환자에게 본 발명의 조성물을 제공하기 위해 임의의 안전한 투여 경로가 사용될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 비경구, 설하, 협측, 정맥내, 관절내, 근육내, 피부내, 피하, 흡입, 안내, 복강내, 뇌실내, 경피 등이 사용될 수 있다. 근육내 및 피하 주사는 예를 들어 면역치료 조성물, 단백질 백신 및 핵산 백신의 투여에 적합하다.
- [0138] 투여 형태는 정제, 분산액, 현탁액, 주사제, 용액, 시럽(syrup), 트로키제(troche), 캡슐(capsule), 좌제(suppository), 에어로졸(aerosol), 경피 패치(transdermal patch) 등을 포함한다. 이러한 투여 형태는 또한 이러한 목적을 위해 특별히 설계된 제어 방출 장치 또는 이러한 방식으로 추가로 작용하도록 변형된 다른 형태의 이식체를 주사 또는 이식하는 단계를 포함할 수 있다. 치료제의 제어 방출은 예를 들어 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알코올, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 히드록시프로필메틸 셀룰로스와 같은 특정 셀룰로스 유도체를 포함하는 소수성 중합체로 이를 코팅함으로써 달성될 수 있다. 또한, 제어 방출은 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0139] 경구 또는 비경구 투여에 적합한 본 발명의 조성물은 소정의 양의 본 발명의 하나 이상의 치료제를 각각 포함하는 캡슐, 샷렛(sachet) 또는 정제와 같은 개별 단위로서, 분말 또는 과립 또는 수성 액체, 비수성 액체, 수중유

에멀전 또는 유중수 액체 에멀전 중의 용액 또는 현탁액으로서 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 약제학적 방법에 의해 제조될 수 있지만 모든 방법은 하나 이상의 필수 성분을 구성하는 담체와 상기 기재된 바와 같은 하나 이상의 제제를 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 본 조성물은 본 발명의 제제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두를 균일하고 조밀하게 혼합한 다음, 필요한 경우 산물을 적절한 형태로 성형함으로써 제조된다.

- [0140] 상기 조성물은 투여 제형과 상호 적합한 방식으로, 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명과 관련하여 환자에게 투여되는 투여량은 적절한 기간에 걸쳐 환자에게 유리한 반응을 나타내기에 충분해야 한다. 투여될 제제(들)의 양은 연령, 성별, 중량 및 전반적인 건강 상태를 포함하여 치료 대상체에 따라 달라질 수 있으며, 이는 의사의 판단에 따를 것이다.
- [0141] 특정 실시양태에서, 항암 치료 및/또는 제제는 하나 또는 복수의 마커의 작용을 억제하고/거나, 발현을 감소시키는 것에 관한 것일 수 있다.
- [0142] 다른 실시양태에서, 항암 치료 및/또는 제제는 암의 전이를 예방 또는 억제하는 것에 관한 것일 수 있다.
- [0143] 대안적인 실시양태에서, 항암 치료 및/또는 제제는 본 발명의 하나 또는 복수의 마커 이외의 유전자 또는 유전자 산물에 관한 것일 수 있다. 예를 들어, 항암 치료는 하나 또는 복수의 마커와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 것으로 공지된 유전자 또는 유전자 산물을 표적화할 수 있다.
- [0144] 특정 실시양태에서, 본 발명은 암 치료에 관한 "동반 진단(companion diagnostic)"을 제공하고, 이에 의해 본 발명의 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준은 상기 암 치료의 안전 및/또는 효과적인 투여를 위해 사용되는 정보를 임상의 등에게 제공한다.
- [0145] 적합하게는, 암은 제한 없이, 앞서 기재된 유형의 것이다.
- [0146] 특정 실시양태에서, 본 방법은 엑소솜 샘플에서 하나 또는 복수의 마커의 발현 수준을 전술한 바와 같은 각각의 하나 또는 복수의 마커의 참조 또는 대조군 엑소솜 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0147] 전술한 측면을 참조하면, 본 방법은 적합하게는 상기 기재된 상기 생물학적 샘플 및/또는 분리 방법과 같은 대상체로부터 엑소솜 샘플을 획득하는 초기 단계를 포함한다.
- [0148] 특정 실시양태에서, 전술한 측면의 방법은 대상체에서 암 유형을 결정하는 추가의 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방식으로, 암 유형은 예를 들어 대상체에서 암 공격성, 예후, 치료 요법 및/또는 암 치료에 대한 반응성을 결정하는데 이용될 수 있다.
- [0149] 추가 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암의 치료에 사용하기 위한 제제를 확인 또는 생산하는 방법으로서,
- [0150] (a) 아포지단백질 E, 세린 프로테아제 23, 버시칸 코어 단백질, 히알루로난 및 프로테오글리칸 연결 단백질 3, 콜라겐 유형 IV 알파 1 사슬, 니도젠-1, 결합 조직 성장 인자, 콜라겐 유형 IV 알파 2 사슬, 카복시펩티다제 D, 콜라겐 및 칼슘 결합 EGF 도메인 포함 단백질 1, 펜트라신 3, 테스티칸-1, 아미노아실 tRNA 합성효소 복합체-상호작용 다기능 단백질 1, 트롬보스폰딘-1, 비글리칸 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커를 발현하는 세포를 후보 제제와 접촉시키는 단계; 및
- [0151] (b) 후보 제제가 마커의 발현 및/또는 활성을 조절하는지를 결정하는 단계
- [0152] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 후보 제제는 마커의 발현 및/또는 활성을 적어도 부분적으로 감소, 제거, 저하 또는 억제한다.
- [0154] 적합하게는, 본 제제는 유의한 표적외 및/또는 비특이적 효과를 거의 또는 전혀 갖지 않거나 나타내지 않는다.
- [0155] 바람직하게는, 본 제제는 항체 또는 소분자이다.
- [0156] 적합하게는, 마커는 버시칸 코어 단백질, 니도젠-1, 펜트라신 3, 트롬보스폰딘-1 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0157] 항체 억제제와 관련된 실시양태에서, 항체는 다클론 또는 단일클론, 천연 또는 재조합일 수 있다. 항체 생산, 정제 및 사용에 적용 가능한 잘 알려진 프로토콜은 예를 들어 문헌[Chapter 2 of Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994) and Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies: A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌은 둘 모두 본 명세서에 참조로 포함된다.

- [0158] 일반적으로, 본 발명의 항체는 마커의 단리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체에 결합하거나 접합된다. 예를 들어, 항체는 다클론 항체일 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 마커 단백질 산물의 단리된 단백질, 단편, 변이체 또는 유도체를 마우스 또는 토끼를 포함할 수 있는 생산 종(production species)내로 주사하여 다클론 항혈청을 획득함으로써 제조할 수 있다. 다클론 항체를 생산하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 사용될 수 있는 예시적인 프로토콜은 예를 들어 문헌[Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, *supra*, and in Harlow & Lane, 1988, *supra*]에 기재되어 있다.
- [0159] 단일클론 항체는 예를 들어 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Köhler & Milstein, 1975, Nature 256, 495]의 기사에 기재된 바와 같은 표준 방법을 사용하거나, 예를 들어 문헌[Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, *supra*]에 기재된 바와 같은 이의 보다 최근의 변형에 의해 단리된 마커 단백질 산물 및/또는 이의 단편, 변이체 및/또는 유도체 중 하나 이상으로 접종된 생산 종에서 유래된 비장 또는 다른 항체 생산 세포를 불멸화함으로써 생산될 수 있다.
- [0160] 통상적으로, 후보 억제제 항체의 억제 활성은 항체의 존재 하에 마커 단백질의 발현 수준 및/또는 활성을 검출하거나 측정하는 시험관내 및/또는 생체내 분석에 의해 평가될 수 있다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 억제제와 같은 조절제가 합리적으로 설계될 수 있다. 이러한 방법에는 마커의 구조적 분석 및 마커의 활성에 결합하거나, 이와 상호작용하거나, 그외에 이를 조절하는 분자의 설계 및/또는 작제를 포함될 수 있다. 이러한 방법은 특히 후보 조절제 및 마커 사이의 상호작용에 대한 컴퓨터 지원 3차원 모델링을 포함할 수 있다.
- [0162] 다른 실시양태에서, 유기 소분자 억제제와 같은 조절제는 수십만 내지 수백만 개의 후보 억제제(합성, 유기 소분자 또는 천연 산물을 포함하는 화학적 화합물, 예를 들어 억제 펩타이드 또는 단백질) 번호의 대형 화합물 라이브러리의 스크리닝을 포함할 수 있으며, 이는 잠재적인 신약 또는 선두 화합물을 찾기 위해 수백 개의 분자 표적 중 어느 하나에서 생물학적 활성에 대해 스크리닝되거나 시험될 수 있다. 스크리닝 방법에는 다음에 제한되는 것은 아니나, 컴퓨터 기반("인실리코") 스크리닝 및 시험관내 분석에 기반한 고처리량 스크리닝이 포함될 수 있다.
- [0163] 통상적으로, 이러한 초기 스크리닝 과정으로부터의 활성 화합물, 또는 "적중"은 활성 화합물을 추가로 특성화하기 위해 일련의 다른 시험관내 및/또는 생체내 시험을 통해 순차적으로 시험된다. 각 단계에서 점진적으로 더 적은 수의 "성공적인" 화합물이 후속 시험을 위해 선택되고, 결과적으로 하나 이상의 약물 후보가 선택되어 인간 임상 시험에서 시험을 진행하게 된다.
- [0164] 임상 수준에서, 후보 제제를 스크리닝하는 단계는 대상체가 시험 화합물에 노출되기 전 및 후에 시험 대상체로부터 샘플을 획득하는 단계를 포함할 수 있다. 그 다음, 마커 단백질의 샘플, 예컨대 엑소솜 샘플 내의 수준을 측정 및 분석하여 마커 단백질의 수준 및/또는 활성이 후보 제제에 노출된 후 변화하는지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 샘플에서 단백질 산물 수준은 질량 분광분석, 웨스턴 블롯, ELISA, 전기화학 및/또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 적절한 수단에 의해 결정될 수 있다.
- [0165] 이와 관련하여, 마커의 발현 수준 및/또는 활성을 감소, 제거, 저하 또는 억제할 수 있는 것으로 확인된 후보 약제가 암을 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 바이오마커의 증가된 활성이 적어도 부분적으로, 암의 진행 및/또는 발병의 원인이 되는 경우, 마커의 활성 및/또는 발현을 억제하거나 감소시키는 후보 제제의 투여는 암을 치료하고/거나, 암 위험을 감소시킬 수 있다.
- [0166] 최종 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 사용하기 위한, 상기 언급된 측면에 의해 확인되거나 생산된 제제를 제공한다.
- [0167] 앞서 언급한 측면과 관련하여, 용어 "대상체"는 다음에 제한되는 것은 아니나, 인간, 수행 동물(예를 들어, 말, 낙타, 그레이하운드), 가축(예를 들어, 소, 양, 말) 및 반려동물(예를 들어, 고양이 및 개)을 포함하는 포유류를 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.
- [0168] 본 명세서에 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특허 및 과학 문헌은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0169] 본 발명의 경우, 본 명세서에 제공된 것과 같은 유전자 또는 단백질, 뿐만 아니라 유전자 및/또는 단백질 서열 또는 이와 관련된 서열에 대해 본 명세서에 제공된 데이터베이스 수탁 번호 또는 고유 확인자가 본 명세서에 참

조로 포함된다.

[0170] 본 발명의 바람직한 실시양태가 충분히 이해되고 실질적인 효과를 획득할 수 있도록, 다음의 비제한적인 실시예를 참조한다.

[0171] 실시예

[0172] 엑소좀이라고 하는 작은 세포의 소포는 최근에 잠재적으로 암을 확인하기 위한 비침습적 방법으로 작용하는 것으로 나타났다. 엑소좀은 암세포를 포함한 모든 세포에서 방출되는 작은 막 결합 소포(직경 30 내지 150 nm)이다. 엑소좀의 단백질 함량은 유래 세포에 따라 달라지며 엑소좀이 진단 및 예후 목적을 위한 실행 가능한 물질 공급원이라는 사실이 대두되고 있다. 그러나 현재 암세포 및 정상세포로부터 유래한 엑소좀을 구별하는 특정 마커에 대한 이용 가능한 증거는 부족한 실정이다. 암 특이적 엑소좀 마커를 확인하면 암 환자를 확인할 수 있고 잠재적으로 생존율이 향상될 수 있다.

[0173] 종양 분비 인자 및 순환 종양 DNA(ctDNA)의 분석을 포함하여 암의 존재를 확인하기 위한 인간 생체 유체의 최적 분석을 확인하기 위한 수많은 시도가 있었다. 암 유래 엑소좀은 증가된 반감기와 엑소좀 분비의 활성 과정으로 인해 ctDNA와 비교하여 우수한 액체 바이오마커 역할을 할 수 있어 암 항원 또는 바이오마커의 일관된 존재를 제공할 수 있다. 본 실시예에서 본 발명자들은 암 진단을 위해 암 유래 엑소좀 단백질을 활용하는 포괄적인 임상 분석을 기재한다. 이 분석의 임상 성능은 고도로 민감하고 특이적이며 초기 단계 1에서 암을 검출하므로 많은 암 환자에서 조기 검출 및 생존 개선의 기회를 제공한다.

[0174] 세포 배양

[0175] 짧은 직렬 반복 특성을 사용하여 세포주 인증을 수행하였다. p53 녹다운 및 Kras v12 과발현(30KT^{p53/KRAS})으로 형질전환된 동종 불멸화 정상 인간 기관지 상피 세포 (HBEC30KT)는 Dr. Jill Larsen^{22,27}에 의해 제공되었다. HBEC를 EGF (5ng/mL) 및 소 뇌하수체 추출물 (50 mg/L)이 보충된 케라티노사이트 무혈청 배지(KSFM)에서 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 다른 모든 세포주를 5% 소 태아 혈청, 100 U/mL 페니실린 및 100 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 DMEM 또는 RPMI에서 유지하고 37℃에서 5%로 인큐베이션하였다. 무혈청 배지에서 배양된 세포로부터 세포 조건 배지(CCM)를 수집하였다. CCM을 100,000 g_{avg}에서 밤새 원심분리를 통해 소 엑소좀이 고갈된 KSFM의 HBEC 세포로부터 수집하였다.

[0176] 엑소좀 분리 및 분석

[0177] 엑소좀을 이전에 기재된 바와 같이 분리하고 분석하였다^{8,28}. 질량 분광분석 분석을 위한 엑소좀의 경우 CCM을 4℃에서 300 g에서 10분 동안 원심분리하고 0.22 μm 필터를 통해 여과하여 부유 세포 및 큰 세포의 소포를 제거하였다. 그런 다음 정제된 CCM을 500 μL로 농축하고 불연속적인 요오드사눌 밀도 구배에 두고 4℃에서 100,000 g_{avg}에서 16시간 동안 원심분리하였다. 엑소좀 포함 분획을 PBS에서 20 mL로 희석하고 2시간 동안 4℃에서 100,000 g_{avg}로 원심분리하였다. 생성된 펠릿을 PBS에 재현탁하고 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 유사하게, 시험관내 CCM으로부터의 다른 모든 엑소좀 단리를 위에서 기재한 바와 같이 정제하고 농축한 다음 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 인간 혈장에서 엑소좀 단리를 위해 혈장을 상온에서 해동하고 1,500 g 및 10,000 g에서 각각 10분 및 20분 동안 원심분리하여 남아 있는 혈소판 및 큰 소포를 제거하여 제조하였다. 제조된 혈장을 크기 배제 컬럼에 둔 후 PBS로 용출하고 Amicon® Ultra-4 10 kDa 공칭 분자량 원심 필터 장치에 농축하고 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 세포 배양 및 인간 혈장으로부터의 엑소좀 단리를 이전에 기재한 바와 같이 웨스턴 블롯, 가변 저항 펄스 감지(TRPS) 및 투과 전자 현미경으로 확인하였다⁸.

[0178] 항체 및 시약

[0179] 다음 항체를 웨스턴 블롯팅에 사용하였다: 칼넥신(Cell Signaling Technology, 2679S), CD63(Abcam, ab8219), HSP70(Transduction Laboratories, 610608). 양고추냉이 과산화효소 (HRP) 접합 이차 항체는 Thermo Scientific에서 구입하였다. THBS1, NID1 및 PTX3 ELISA DuoSet은 R&D Systems에서 구입했으며 VCAN ELISA 키트는 Novus Biologicals에서 구입하였다. qEV 컬럼을 Izon에서 구입하여 4℃에서 PBS(0.1% 아지드화나트륨)에 보관하였다.

[0180] 웨스턴블롯 분석

- [0181] 웨스턴 블롯을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다^{1,2}. 간단히 말해서, 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분해하고, 폴리불화비닐리덴 막으로 옮기고, PBS-T(0.5% Tween-20) 중 5% 무지방 분유에서 차단하고 항체로 프로빙하였다. 강화된 화학발광 시약(Amersham ECL Select)으로 단백질 밴드를 검출하였다.
- [0182] **질량 분광분석**
- [0183] 2% SDS, 프로테아제 억제제(SigmaAldrich, P8340) 및 50 mM Tris.HCl pH 8.8의 존재 하에 10 mM 디티오프레이톨(4℃ 1시간, 22℃ 2시간)을 첨가하여 엑소좀 제조물을 환원시켰다. 그런 다음 샘플을 25 mM(22℃ 1시간)에 요오도아세트아미드를 첨가하여 알킬화하고 메탄올을 트립신과 함께 -20℃에서 밤새 공침시켰다(1:100 효소:기질). 펠렛을 10% 아세트오닐리트, 40 mM 중탄산암모늄에 재현탁하고 2시간 후에 추가 트립신을 첨가하여 37℃에서 8시간 동안 분해시켰다(1:100 효소:기질).
- [0184] 산성화된 분해물(트리플루오로아세트산)의 LCMS 분석을 수행하고, NanoAcquity UPLC(Waters) 후 Elite Orbitrap ETD 질량 분광분석기(Thermo Fisher Scientific)에 적용하였다. 2마이크로그래ムの 분해물을 20 mm x 180 μm Symmetry C18 트랩(Waters)에 로딩하고 일련의 선형 구배(완충액 A : 수성 0.1% 포름산; 완충액 B: 아세트오닐리트 중 0.1% 포름산) 5분에 걸쳐 2% B 내지 5% B, 75분에 걸쳐 30% B, 10분에 걸쳐 50% B, 5분에 걸쳐 95% B를 사용하고, 6분 유지하고, 2% B에서 재평형화하여 200 mm x 75 μm, BEH130 1.7 μm 컬럼(Waters) 상에서 120분 동안 분리하였다. 컬럼의 용출액을 10 μm P200P 코팅된 실리카 이미터(New Objective) 및 Nanospray-Flex 전원(Proxeon Biosystems A/S)를 통해 질량 분광분석기에 도입하였다. 전원 전압 1.8 kV, 가열된 모세관 온도 275℃, 120,000 분해능 AGC 1E6, 이온 트랩 AGC 1E4의 MS2, 최대 주입 시간 50 ms로 오비트랩에서 획득한 상위 15개 방법 MS를 사용하였다. 445.120024의 MS1 잠금 질량을 사용하였다.
- [0185] MaxQuant(버전 1.4.1.2)를 사용하여 단백질 확인 및 무표지 정량화를 수행하였다³. MaxQuant를 Xcalibur 원시 파일(Thermo Fisher Scientific, Germany)에서 피크 목록을 추출하는데 사용하였으며 내장 데이터베이스 검색 엔진 Andromeda⁴를 사용하여 펩타이드 대 스펙트럼 매칭 (Peptide-to-Spectrum Match)(PSM)을 배분하였다. 검색된 데이터베이스는 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*)에 대한 완전한 프로테오믹스로 구성되었다(88,378개의 표준 서열은 www.uniprot.org에서 2013년 8월에 다운로드함). 역방향 서열 및 MaxQuant 오염 데이터베이스를 또한 검색하였다. 무표지 정량화를 수행하고 기기 유형을 Orbitrap으로 설정하고 전구체 질량 허용 오차를 첫 번째 검색에 대해 20 ppm으로 설정하고 주 검색에 대해 4.5 ppm을 설정하고 단편 이온 질량 허용 오차를 0.5 Da로 설정하고 효소 특이성을 트립신/P로 설정하고, 최대 2개의 누락된 절단이 허용되었고, 카르바미도메틸 시스테인을 단백질 N-말단의 고정 변형 및 아세틸화로 특징하고, 아스파라긴/글루타민의 탈아미드화 및 메티오닌의 산화를 다양한 변형으로 특징하였다. 두 번째 펩타이드 검색 및 실행 간의 매칭을 기본 설정으로 수행할 수 있었다. 확인을 위해 PSM 및 단백질 수준 FDR을 0.01로 설정하였다. 다른 모든 매개변수에는 기본 설정을 적용하였다. 스펙트럼 계산(정규화 포함)에 의한 단백질 추론 및 무표지 정량화를 이전에 기재한 바와 같이 수행하였다⁵.
- [0186] **환자 코호트**
- [0187] 2001 내지 2019년 사이에 수집된 환자 혈장/혈청 샘플의 환자 코호트에 대한 후향적 분석을 수행하였다.
- [0188] **통계 분석**
- [0189] GraphPad Prism 버전 6.0, EdgeR 버전 2.6.10, MedCalc 버전 16.8.4 및 IPA를 모든 계산에 사용하였다. 비쌍스튜던트 t-시험을 시험관내에서 엑소좀의 단백질 발현 값의 차이를 계산하는데 사용하였다. 단백질의 세포내 국소화를 IPA(QIAGEN Inc)를 통해 생성하였다. 음의 이항 일치 시험을 사용하여 FDR을 제어하기 위해 Benjamini-Hochberg 조정이 적용된 질량 분광분석에서 유래된 스펙트럼 갯수를 평가하였다. 0.05 미만의 p-값을 갖는 차이를 0.001의 FDR 임계값을 제외하고 유의한 것으로 고려하였다(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).
- [0190] **결과**
- [0191] **암에 대한 엑소좀 단백질 시그니처의 발생(generation)**
- [0192] 본 발명자들은 발암성 돌연변이를 갖는 HBEC가 별개의 엑소좀 단백질 특성을 갖는 엑소좀을 분비할 것이라고 가정하였다. 본 발명자들은 정상 HBEC에서 분비되는 엑소좀과 형질전환된 HBEC^(p53/KRAS)를 분리하였다. TEM, 나노입자 추적 및 웨스턴 블로팅은 엑소좀이 통상적인 크기 분포를 나타내고 표준 엑소좀 마커를 포함한다는 것을 나타내었다(도 1a 내지 도 1c). 정상 및 형질전환된 HBEC의 프로테오믹스를 이후 질량 분광분석기를 사용하여 평가하

였다. 스펙트럼 계수에 의한 무표지 정량화는 정상 HBEC와 비교하여 형질전환된 HBEC에서 상향조절된 15개의 세포의 단백질을 확인하였다(도 1d). THBS1, NID1, PTX3 및 VCAN을 추가 평가를 위해 선택하고 HBEC에서 ELISA로 확인하였다(도 1e).

[0193] 모든 고형 악성종양에 대한 현재의 임상 관리는 원발성 종양의 조직병리학 및/또는 분자적 특성에 의해 유도된다. 그러나 종양 분류를 위한 바이오마커의 발현은 개별 종양 내에서도 매우 가변적일 수 있다. 암이 진행되는 동안 암세포는 다양한 표현형을 나타낼 수 있으며, 그 중 일부는 후성 유전적 변화, 발암성 형질전환 또는 변이된 환경 신호에 의해 유발된다. 특정 암(폐, 뇌, 흑색종) 내에서도 종양은 다양한 임상 및 분자 분류에 의해 반영되는 매우 이질적인 질병이다. 이를 감안할 때, 본 발명자들은 단백질이 다양한 암주에서 보편적으로 상향 조절되는지 또는 암세포의 특정 하위 집단에 특이적인지 확인하기 위해 추가 암세포주에서 이 4가지 단백질의 발현을 평가하였다. 이 문제를 해결하기 위해 본 발명자들은 다음으로 구성된 총 22개의 세포주에서 엑소솜을 분리하였다: 비소세포 폐암 (NSCLC), 교모세포종 (GBM), 결장직장 (CRC), 유방 (BCa), 전립선 (PCa), 흑색종 (MEL), 식도 (ECa), 및 난소 (OVA) 암. 흥미롭게도 본 발명자들은 암 유형에 관계없이 4개의 마커, 특히 NID1이 모두 정상 HBEC 엑소솜과 비교하여 암세포 유래 엑소솜에서 상향조절된다는 것을 발견하였다.

[0194] **암 환자에서의 엑소솜 단백질 시그니처의 평가**

[0195] 그런 다음 본 발명자들은 발암 유발성 엑소솜 변화가 암 환자의 질병 존재에 대한 진단 바이오마커로 활용될 수 있다고 가정하였다. 엑소솜을 250명의 건강한 대조군과 폐, 뇌, 결장직장, 전립선, 흑색종, 위, 및 식도의 암으로 진단받은 497명의 암 환자의 혈청/혈장에서 분리하였다. 건강한 대조군과 진단 시 환자의 종양값 연령은 65.5세였다.

[0196] 흥미롭게도, 조합된 4개의 단백질 엑소솜 시그니처(THBS1, NID1, PTX3, 및 VCAN)는 건강한 대조군과 비교하여 암 대상체로부터 유래된 엑소솜에서 증가하였다(도 2a). 엑소솜 시그니처의 각 단백질은 수용체 작동 특성(ROC) 곡선에 의해 평가된 바와 같이 다양한 암 코호트에서 다양한 진단 기능을 나타내었다(도 3). 흥미롭게도, 로지스틱 회귀를 사용하는 시그니처 단백질의 조합을 사용하여 본 발명자들은 건강한 개체와 암 환자의 명확한 분리를 생성할 수 있었으며, 곡선하면적(AUC)이 0.96이었다(도 2b). 중요하게도, 95%의 고정된 특이성에서 8가지 암 유형에서 진단 엑소솜 시그니처의 민감성 중앙값은 77.6%(95% CI: 72.0%, 82.3%)였다. 이는 전립선암의 44%에서 위암의 100%까지 다양하였다(도 2c).

[0197] 다음으로 본 발명자들은 초기 암 환자를 확인하는데 있어 진단 엑소솜 시그니처의 능력을 평가하고자 하였다. 액체 생검에서 가장 큰 이점을 얻으려면 전체 암 생존을 크게 향상시키기 위해 가능한 가장 빠른 단계에서 환자를 확인해야 한다. 본 발명자들은 NSCLC, 식도, 및 위암에서 단계 I 엑소솜 바이오마커의 민감성을 단계 II 내지 IV와 비교하여 평가할 수 있었다. 중요하게도, 95% 특이성에서의 민감성은 3가지 모든 암의 후기 단계와 비슷했으며(도 4), 이는 진단 엑소솜 시그니처가 초기 단계 암 환자를 확인할 수 있음을 보여준다.

[0198] 최근에 CancerSEEK(REF)는 액체 생검을 사용하여 암에 대한 존재뿐만 아니라 기기 학습을 사용한 임상 추적에 위한 종양 유형을 확인할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명자들은 엑소솜 시그니처가 환자가 가진 암 유형을 정확하게 확인할 수 있는지를 조사하였다. 시험의 정확도는 NSCLC에서 예측이 가장 정확하고 위암에서 가장 낮은 것으로 매우 다양하였다(도 5).

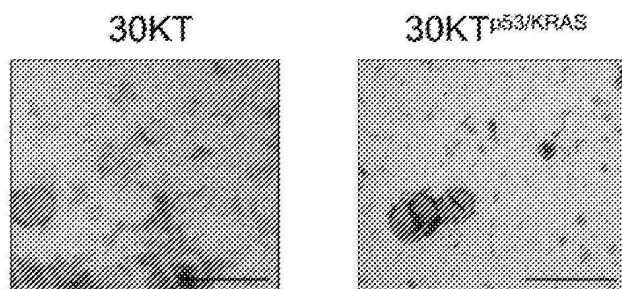
[0199] 참조문헌

1. Lobb, R.J., *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* **4**, 27031 (2015).
2. Lobb, R.J., *et al.* Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. *International journal of cancer* **141**, 614-620 (2017).
3. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26**, 1367-1372 (2008).
4. Cox, J., *et al.* Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research* **10**, 1794-1805 (2011).
5. Dave, K.A., *et al.* A comprehensive proteomic view of responses of A549 type II alveolar epithelial cells to human respiratory syncytial virus infection. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **13**, 3250-3269 (2014).

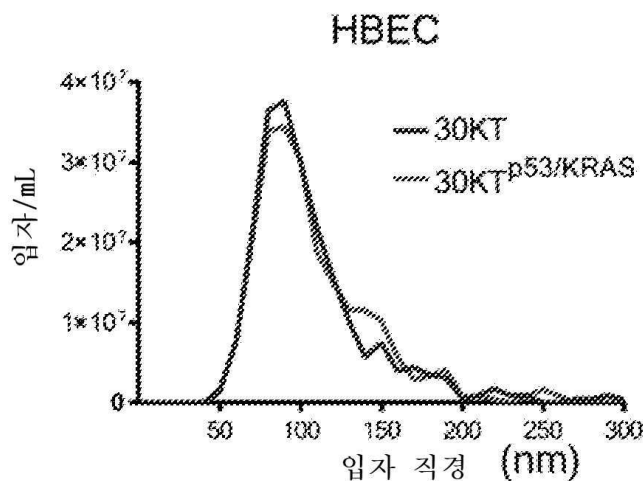
[0200]

도면

도면1a



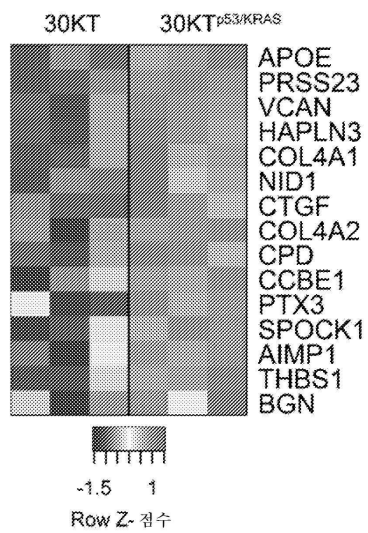
도면1b



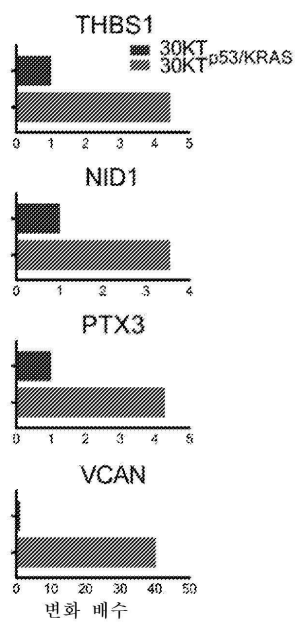
도면1c



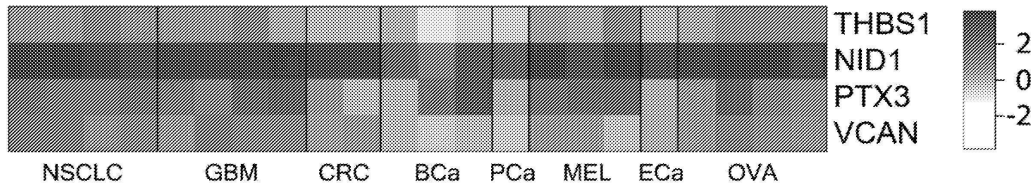
도면1d



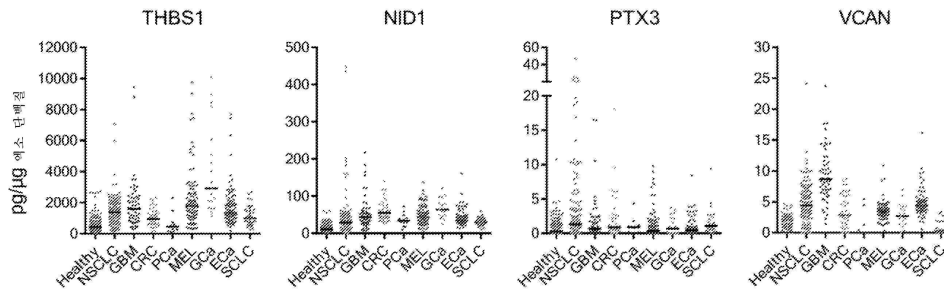
도면1e



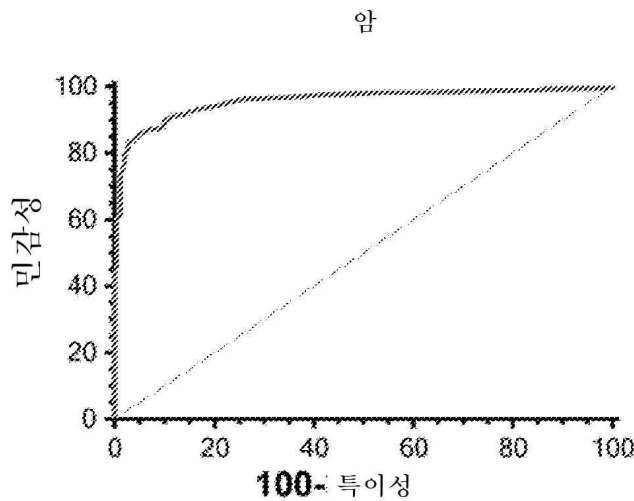
도면1f



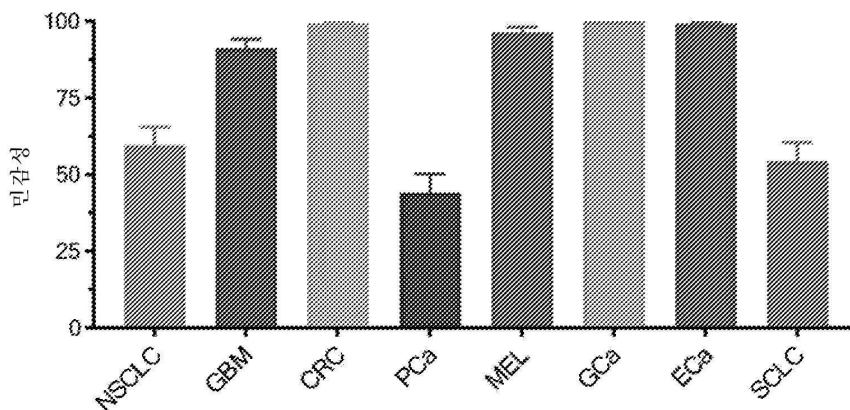
도면2a



도면2b

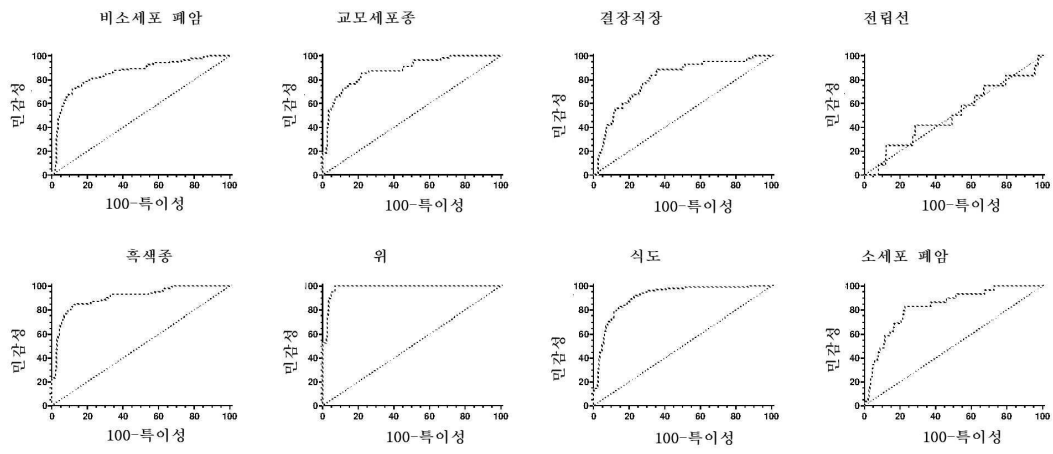


도면2c



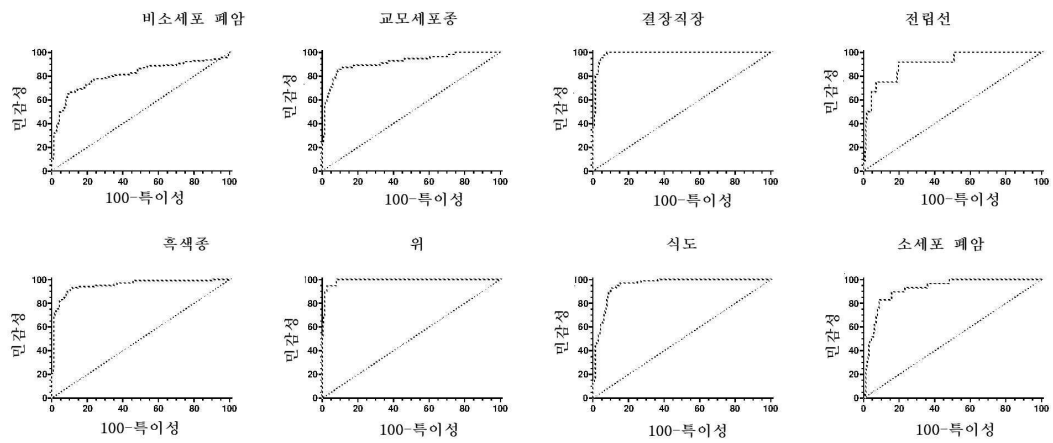
도면3a

THBS1



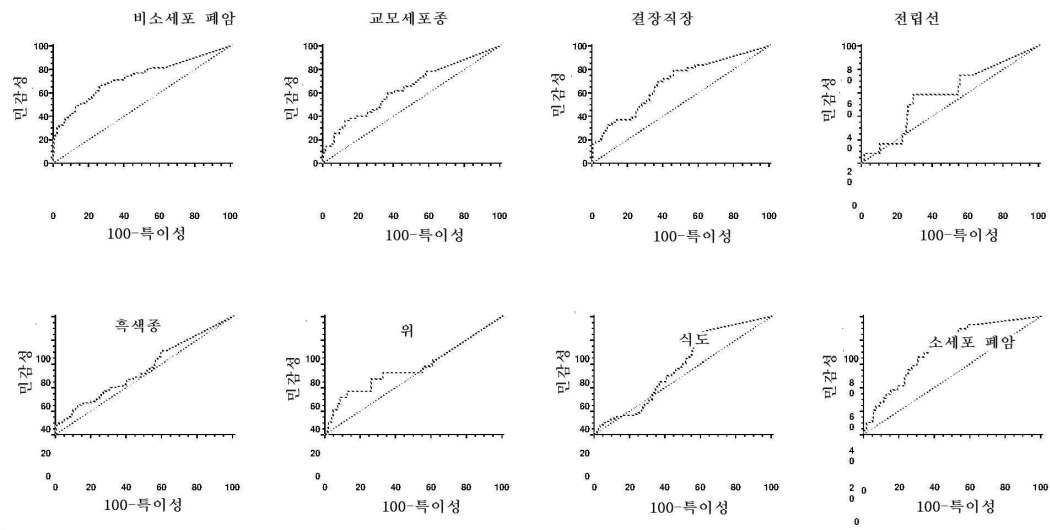
도면3b

NID1



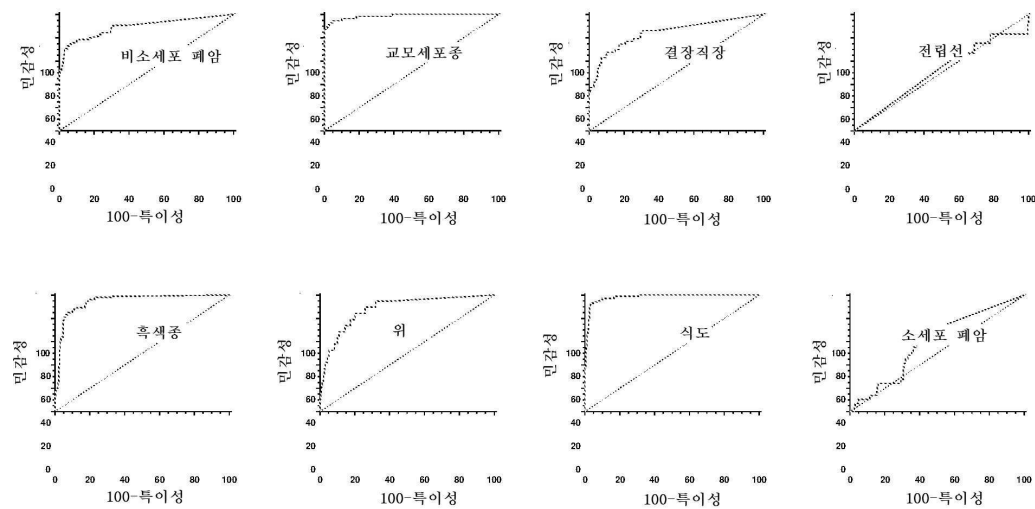
도면3c

PTX3



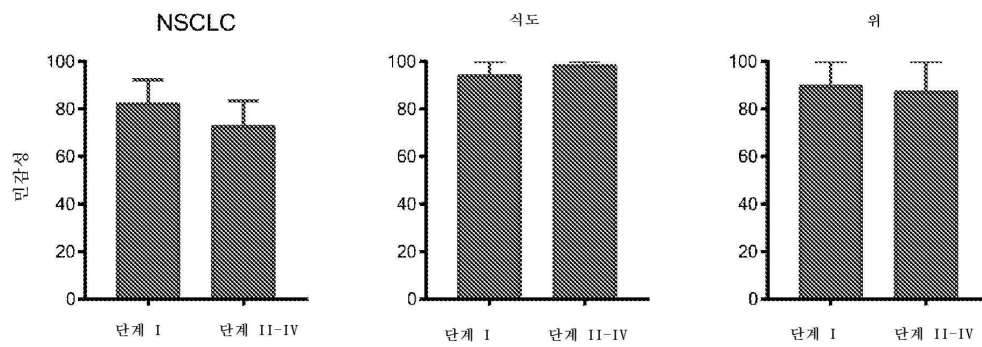
도면3d

VCAN



도면4

A



도면5

A

