



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0041192
(43) 공개일자 2017년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/5073 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7001924
(22) 출원일자(국제) 2015년06월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2015/050663
(87) 국제공개번호 WO 2015/198334
국제공개일자 2015년12월30일
(30) 우선권주장
62/016,773 2014년06월25일 미국(US)

(71) 출원인
텔 하쇼머 메디컬 리서치 인프라스트럭처 앤드 서
비스 리미티드.
이스라엘, 5262000 라맛-간, 텔 하쇼머, 더 체임
쉐바 메디컬 센터
(72) 발명자
데켈, 벤자민
이스라엘, 6248509 텔-아비브, 40 소코로브 스트
리트
하라리-스테인베르그, 오리트
이스라엘, 43312 라아나나, 87 하하가나 스트리트
(74) 대리인
나승택

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 암 줄기세포 마커의 동정 및 진단 및 치료를 위한 그의 사용

(57) 요약

본 발명에서는 인간 일차 종양에서 암 줄기세포 마커를 동정하는 방법이 제공된다.

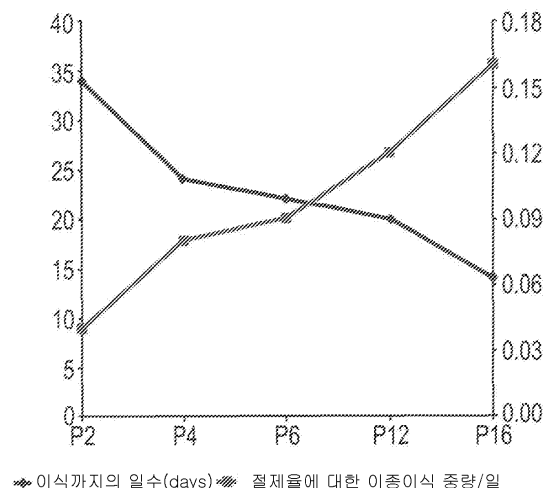
상기 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

(a) 일차 종양을 생체내에서 계대배양하는 단계; 및

(b) 계대배양된 일차 종양의 종양 세포들의 제1 개체군에서의 적어도 하나의 항원 수준을 상기 일차 종양의 종양 세포들의 제2 개체군과 비교하는 단계,

여기서 상기 종양 세포들의 제2 개체군에서의 상기 항원의 양과 비교하여 상기 종양 세포들의 제1 개체군에서의 상기 항원의 양의 증가는 인간 일차 종양에서의 암 줄기세포 마커들의 지표가 된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류
G01N 33/5088 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계들을 포함하는, 인간 일차 종양에서 암 줄기세포 마커를 동정하는 방법:

(a) 일차 종양을 생체내에서 계대배양하는 단계; 및

(b) 계대배양된 일차 종양의 종양 세포들의 제1 개체군에서의 적어도 하나의 항원 수준을 상기 일차 종양의 종양 세포들의 제2 개체군과 비교하는 단계, 여기서 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 다음의 (i) 또는 (ii)이다:

(i) 상기 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들; 또는

(ii) 상기 인간 일차 종양의 생체내 계대배양된 세포들, 여기서 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군보다 적어도 1회 더 적은 계대수로 생체내 계대배양된 것이고,

상기 종양 세포들의 제2 개체군에서의 상기 항원의 양과 비교하여 상기 종양 세포들의 제1 개체군에서의 상기 항원의 양의 증가는 인간 일차 종양에서의 암 줄기세포 마커들의 지표가 된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

계대배양된 세포들의 상기 제1 개체군의 계대수는 적어도 2 계대수의 연속적인 계대배양 동안 유의적으로 증가하지 않는 명백한 공격성 종양 표현형이 나타나도록 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 개체군의 계대수는 계대배양된 세포의 제1 개체군의 5000개 세포들을 사용하여 다음 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배 증가하도록 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 계대수는 상기 계대배양된 세포들의 제1의 개체군에 있어서 암 줄기세포:비-암 줄기세포의 비율이 1:1000보다 크도록 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 폴리펩타이드인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 세포 당 상기 폴리펩타이드의 발현 수준의 증가인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포들의 양의 증가인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 세포 당 상기 폴리펩타이드의 발현 수준의 증가 및 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포들의 양의 증가인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 세포들의 제1 개체군에서의 암 줄기세포 빈도:상기 종양 세포들의 제2 개체군에서의 암 줄기세포 빈도가 5:1보다 큰 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 일차 종양은 소아 종양인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 일차 종양은 비정형 유기형/간상 종양(ATRT), 유잉 육종, 혈관근육지방종, 흉막과 폐의 모세포종 및 월름스 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군은 최소 2 계대수로 계대배양된 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양 세포들의 제2 개체군은 5 이하의 계대수로 연속적으로 생체내 계대배양되는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 5 계대수로 생체내 계대배양되는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계대배양은 마우스에서 수행되는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계대배양은 상기 일차 종양의 이종이식의 조직 샘플의 비-해리된 동물세포들 내로의 이식에 의해 수행되는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 계대배양은 일차 종양의 이종이식의 동물 단일 세포 현탁액 내로의 이식에 의해 수행되는 방법.

청구항 18

제5항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드의 발현은 mRNA 수준에 의해 결정되는 방법.

청구항 19

제5항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩타이드의 발현은 단백질 수준에 의해 결정되는 방법.

청구항 20

제2항에 있어서,

상기 암 세포의 공격성 표현형은 암 세포 마커, 유전자 발현 프로파일, 이중이식의 소요 시간, 이중이식의 발생에 요구되는 세포수, 세포이동 능력, 비-암성 조직에 대한 침투 능력 및 증식 수준으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

종양 세포들의 제1 개체군은 면역세포분리가 수행되지 않은 것인 방법.

청구항 22

항원의 발현을 하향 조정 및/또는 항원의 활성을 억제하는 제제의 치료적 유효량을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상인 암 치료 방법.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 항원은 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라 동정된 암 줄기세포 마커인 암 치료 방법.

청구항 24

진단 대상의 종양에서의 항원의 수준을 분석하는 것을 포함하고, 여기서 상기 항원의 존재는 암의 지표이며, 상기 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상인 암 진단 방법.

청구항 25

암 치료 대상에게 암 치료의 적용 후에, 상기 대상의 일차 종양에서의 항원의 수준을 분석하는 것을 포함하고, 여기서 상기 암 치료의 적용 전의 상기 항원의 수준과 비교되는 상기 항원의 감소는 치료적 처치의 지표가 되고, 상기 대상의 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 대상의 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상인, 대상의 암 치료를 모니터링하는 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원은 폴리펩타이드인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 일차 종양에서의 상기 폴리펩타이드 발현: 상기 생체내 계대배양된 세포들에서의 폴리펩타이드 발현의 비율은 적어도 1:5인 방법.

청구항 28

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생체내 계대배양된 세포들은 적어도 3 계대수로 생체내 계대배양된 세포들을 포함하는 방법.

청구항 29

다음의 단계들을 포함하는, 암 치료 대상의 암 치료를 위한 제제를 선택하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라 상기 대상의 일차 종양에서의 적어도 하나의 암 줄기세포 마커를 동정하는 단계; 및
- (b) 상기 암 줄기세포 마커들의 발현을 하향 조정 및/또는 그들의 활성을 억제하는 제제를 선택함으로써, 암 치료를 위한 제제를 선택하는 단계.

청구항 30

비정형 유기형/간상 종양의 치료가 필요한 대상에 있어서 비정형 유기형/간상 종양을 치료하는 방법으로서, 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), hepatocyte 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드와 결합 및/또는 그의 발현을 하향 조절하는 제제의 치료적 유효량을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 폴리펩타이드는 리실옥시다아제(LOX)인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 제제는 β -아미노프로피오니트릴(BAPN)인 방법.

청구항 33

다음의 단계들을 포함하는, 대상의 암 치료를 모니터링하는 방법:

- (a) 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라, 상기 대상의 일차 종양에서의 적어도 하나의 암 줄기세포 마커를 동정되는 단계; 및
- (b) 암 치료 후에 상기 대상의 종양에서의 상기 암 줄기세포 마커의 양을 분석하는 단계; 여기서 상기 치료 이전의 상기 암 줄기세포 마커의 양과 비교하여 상기 종양에서의 상기 암 줄기세포 마커의 양의 감소는 효과적인 암 치료의 지표이다.

청구항 34

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라 상기 대상의 생물학적 샘플에서의 적어도 하나의 암 세포줄기 마커를 동정하는 것을 포함하고, 여기서 상기 암 줄기세포 마커의 존재는 암의 지표가 되는 암 진단 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 암 줄기세포 마커는 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), hepatocyte 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 상기 암은 비정형 유기형/간상 종양(ATRT)인 방법.

청구항 36

항원의 발현을 하향 조절 및/또는 항원의 활성을 억제하는 제제로서, 여기서 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 암 치료에 사용하기 위해 미리 결정된 수준 이상인 제제.

청구항 37

제36항에 있어서,

상기 항원은 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라 동정된 암 줄기세포 마커인 제제.

청구항 38

세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드와 결합 및/또는 그의 발현을 하향 조절하는, 비정형 유기형/간상 종양(ATRT)의 치료용 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 일부 구체예에서, 1차 종양에서 암 줄기세포들을 농축(enriching) 및 동정(identifying)하고, 선택적으로 그로부터 분리하는 방법에 관한 것이다. 암 줄기세포를 1차 종양에 존재하는 다른 암 세포들로부터 구별하는 마커들(markers)은 암의 진단을 돕기 위해 동정될 수 있다. 또한, 상기 마커들은 암의 치료를 위해 표적화(targeting)될 수 있다.

배경 기술

[0002] 최근, 수년동안 고형 종양에서 암-개시/암 줄기세포들(CSCs)의 놀라운 발견들이 이루어져 왔다. 줄기세포 연구로부터 확립된 원리들을 적용함으로써, 인간 CSCs는 기능적으로 이종 이식(xenograft; Xn) 마우스 모델을 사용하여 암을 재생시키는 능력이 강화된 것으로 규정된다. 정상 줄기세포와 유사하게, CSCs는 자기-재생(self-renewal) 과정을 통해 그들 스스로를 재생할 수 있는데, 이는 일련의 이식(transplantation) 분석을 통해 연구될 수 있다. 또한, 정제된 CSCs로부터 유래된 암은 그들이 유래된 부모 암의 이종성 표현형을 재현하고, 이는 CSCs의 분화 능력을 반영한다. CSCs의 가능한 분리는 표면 마커 발현에 기초하여 수행되어 왔고, 이는 세포 배양에 앞서 유동 세포 분석법(flow cytometry)에 의해 줄기 세포의 고도로 정제된 개체군의 반복된 분리를 가능하게 한다.

[0003] 악성 간상소체 종양(malignant rhabdoid tumors)은 특히 어린이들에게서 가장 공격적이고 매우 악성인 배아성 종양이다. 이 종양은 신장(간상소체 종양), 신외 조직(extra-renal tissues) 또는 중추신경계(ATRT)에서 발생할 수 있다. 이 종양은 SMARCB1 손실(loss of SMARCB1)의 거의 완전한 침투, 염색체 22의 장완(long arm) 부분(11.2)(22q11.2)에 위치한 SWI/SNF 염색질 리모델링 컴플렉스의 코어 성분에 의해 특징지어진다. 돌연변이가 보고되어 있고, 이는 진단시 매우 어린 나이, 다양한 위치들에서의 동시성(synchronous) 및 비동시성(metachronous) 종양들 및 최악의 예후와 연관되어 있다. SWI/SNF 기능의 손실에 기인한 비정상적인 유전자 발현은 시토카인 신호전달, 분화, 전분화능(pluripotency) 및 자가 재생에 있어서의 염색질 리모델링의 중요한 역할과 함께, 발암 작용에 주된 역할을 하는 것으로 여겨진다. 수술, 화학요법 및 방사선 치료를 포함하는 최적화된 적용가능한 의학적 치료 관리에도 불구하고, 육종양(rhabdoid tumor)은 매우 낮은 진단율을 유지하고 있고, 전체적인 생존율이 대략 25%에 불과하다. 치료율을 향상시키기 위하여, 그리고 단기 및 장기 사망률을 감소시키기 위하여, 종양의 기원에 관한 이해도의 계속적인 확장, 종양 암에 관한 의문 해소를 위한 모델의 개발, 및 더욱 견디기 쉬운 생물학적으로 타겟팅된 신규의 치료법의 개발이 요구되고 있다.

[0004] 관련 선행문헌들에는, Pode-Shakked et al., EMBO Molecular Medicine, Volume 5, Issue 1, pages 18-37, 2013; Metildi et al, Cancer Res 2014;74(19 Suppl):Abstract nr 4960. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-4960; Shukrun et al., Pediatric Nephrology, Vol. 29, No. 5 1 May 2014; US Patent Application No. 2011/111434, Metsuyanin et al., Stem Cells, Aphamed Press, Dayton OH, US, Vol. 26., No. 7 2008, pages 1808-1817; Ghani et al Biochemical and Biophyscial Research Communications, Academic Press Inc., Orlando, Florida, Vol. 404, No. 2 14 January 2011, pages 735-742; and Ginn et al, Frontiers in Oncology, Vol. 2, 1 January 2012가 포함된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 다음의 단계들을 포함하는, 인간 일차 종양에서 암 줄기세포 마

커들을 동정하는 방법이 제공된다:

- [0006] (a) 일차 종양을 생체내에서 계대배양하는 단계; 및
- [0007] (b) 계대배양된 일차 종양의 종양 세포들의 제1 개체군에서의 적어도 하나의 항원의 수준을 상기 일차 종양의 종양 세포들의 제2 개체군과 비교하는 단계,
- [0008] 여기서, 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 다음의 (i) 또는 (ii)이다:
- [0009] (i) 상기 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은(non-passaged) 세포들; 또는
- [0010] (ii) 상기 인간 일차 종양의 생체내 계대배양된 세포들, 여기서 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군 보다 적어도 1회 더 더 적은 계대수로 생체내 계대배양된 것이고,
- [0011] 상기 종양 세포들의 제2 개체군에서의 상기 항원의 양(amount)과 비교하여 상기 종양 세포들의 제1 개체군에서의 상기 항원의 양의 증가는 상기 인간 일차 종양에서의 암 줄기세포 마커들의 지표가 된다.
- [0012] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 항원의 발현을 하향 조절 및/또는 항원의 활성을 억제하는 제제(agent)의 치료적 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 대상(subject)에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료에 필요한 대상의 암을 치료하는 방법이 제공되고, 여기서, 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상이다. 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 진단 대상의 종양의 항원의 수준을 분석하는 것을 포함하는, 상기 대상에 있어서의 암을 진단하는 방법이 제공되고, 여기서 상기 종양의 생체내 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상이다.
- [0013] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 암 치료 대상에게 암 치료의 적용 후에 상기 대상의 일차 종양에서의 항원의 수준을 분석하는 것을 포함하는, 상기 대상에 대한 암 치료를 모니터링하는 방법이 제공되고, 여기서 암 치료의 적용 전의 상기 항원의 수준과 비교되는 상기 항원의 감소는 치료적 처치의 지표가 되고, 상기 대상의 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 대상의 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상이다.
- [0014] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 다음의 단계들을 포함하는, 암 치료 대상의 암 치료를 위한 제제를 선택하는 방법이 제공된다:
- [0015] (a) 본 발명의 방법에 따라 상기 대상의 일차 종양에서 적어도 하나의 암 줄기세포 마커를 동정하는 단계; 및
- [0016] (b) 상기 암 줄기세포 마커들의 발현을 하향 조절 및/또는 활성을 억제하는 제제를 선택함으로써, 암 치료를 위한 제제를 선택하는 단계.
- [0017] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 비정형 유기형/간상 종양(atypical teratoid rhabdoid tumor; ATRT)의 치료가 필요한 대상에 있어서 비정형 유기형/간상 종양을 치료하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드와 결합 및/또는 그의 발현을 하향 조절하는 제제의 치료적 유효량을 상기 대상에게 투여하는 것을 포함함으로써 ATRT를 치료한다.
- [0018] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 다음을 포함하는, 암 치료 대상에게서 암 치료를 모니터링하는 방법이 제공된다:
- [0019] (a) 본 발명의 방법에 따라, 상기 대상의 일차 종양에 있어서 적어도 하나의 암 줄기세포 마커를 동정하는 단계;
- [0020] (b) 암 치료 후에 상기 대상의 종양에서의 상기 암 줄기세포 마커의 양을 분석하는 단계, 여기서, 상기 치료 이전의 상기 암 줄기세포 마커의 양과 비교하여 상기 종양에서의 상기 암 줄기세포 마커의 양의 감소는 효과적인 암 치료의 지표가 된다.
- [0021] 본 발명의 일부 구체예들의 일 측면에 따르면, 암 진단 대상의 암 진단 방법이 제공되고, 상기 방법은 본 발명의 방법에 따라 상기 대상의 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 암 줄기세포 마커를 동정하는 것을 포함하고, 상기 암 줄기세포 마커의 존재는 암의 지표가 된다.
- [0022] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 계대수(계대수)는, 적어도 2 계대수의

연속적인 계대배양 동안 유의적으로 증가하지 않은 명백한 공격성 종양 표현형이 나타나도록 선택된다.

- [0023] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 제1 개체군의 계대수는, 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 5000개 세포들을 사용하여 다음 세대 이종이식(later generation xenograft)을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배 증가하도록 선택된다.
- [0024] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 계대수는, 계대배양된 세포들의 제1 개체군에서의 암 줄기세포:비-암 줄기세포의 비율이 1:1000 보다 크도록 선택된다.
- [0025] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 항원은 폴리펩타이드이다.
- [0026] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 세포 당 상기 폴리펩타이드의 발현 수준의 증가이다.
- [0027] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포들의 양의 증가이다.
- [0028] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 폴리펩타이드의 양의 증가는 세포 당 상기 폴리펩타이드의 발현 수준의 증가이고, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포들의 양의 증가이다.
- [0029] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군에서의 암 줄기세포 빈도:종양 세포들의 제2 개체군에서의 암 줄기세포 빈도의 비율은 5:1 보다 크다.
- [0030] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 일차 종양은 소아 종양(pediatric tumor)이다.
- [0031] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 일차 종양은 비정형 유기형/간상 종양(ATRT), 어빙 육종(Ewings's sarcoma), 혈관근육지방종(Angiomyolipoma), 흉막과 폐의 모세포종(Pleuropulmonary Blastoma), 및 윌름스 종양(Wilms' tumor)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0032] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군은 최소 2계대수로 계대배양된다.
- [0033] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 5 이하의 계대수로 연속적으로 생체내 계대배양된다.
- [0034] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 5 계대수로 생체내 계대배양된다.
- [0035] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 계대배양은 마우스에서 실현된다.
- [0036] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 계대배양은 상기 일차 종양의 이종이식의 조직 샘플의 비-해리 동물세포들(animal non-dissociated cells) 내로의 이식에 의해 실현된다.
- [0037] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 계대배양은 일차 종양의 이종이식의 단일 세포 현탁액 내로의 이식에 의해 실현된다.
- [0038] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 적어도 하나의 폴리펩타이드의 발현은 mRNA 수준에 의해 결정된다.
- [0039] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 적어도 하나의 폴리펩타이드의 발현은 단백질 수준에 의해 결정된다.
- [0040] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 암 세포의 공격성 표현형(aggressiveness phenotype)은 암 세포 마커, 유전자 발현 프로파일, 이종이식의 소요 시간, 이종이식 발생에 요구되는 세포수, 세포이동 능력, 비-암성(non-cancerous) 조직에 대한 침투 능력 및 증식 수준으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0041] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군에 대해서는 면역세포분리(immunoisolation)가 수행되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 항원은 본 발명의 방법에 따라 동정된 암 줄기세포 마커이다.
- [0043] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 항원은 폴리펩타이드이다.
- [0044] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 일차 종양에서의 폴리펩타이드의 발현:생체내 계대배양된 세포들에서의 폴리펩타이드의 발현의 비율은 적어도 1:5이다.
- [0045] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, the in-vivo passaged cells comprise cells which have undergone 적어도

3 in-vivo passages.

- [0046] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 폴리펩타이드는 리실옥시다아제 (LOX)이다.
- [0047] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 제제(agent)는 β -아미노프로피오니트릴(BAPN)이다.
- [0048] 본 발명의 일부 구체예들에 따르면, 상기 암 줄기세포 마커가 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 경우, 상기 암은 ATRT이다.
- [0049] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 개시된 것과 유사 내지는 동등한 방법들과 재료들이 본 발명의 구체예들의 실시예에 사용될 수 있는데, 이하에서는 예시적인 방법들 및/또는 재료들이 기재되어 있다. 분쟁이 있는 경우, 용어들의 정의를 포함하는 본 특허명세서에 의해 조정될 것인바 또한, 물질들, 방법들, 및 실시예들은 단지 예시적인 것으로, 이들에 반드시 제한되는 의도는 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 본 발명의 일부 구체예들이 첨부된 도면들을 참조하여 단지 실시예로서 기재된다. 도면들을 특별히 참조하여 상세하게 설명하나, 도시된 구체 사항들은 본 발명의 구체예들을 실시예를 통해 예시적으로 설명하기 위한 것이다. 이와 관련하여, 도면을 참조하여 이루어진 설명들에 의해, 본 발명의 구체예들이 어떻게 실시될 수 있는지가 당 분야의 기술자들에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명도 1a 내지 1d - MRT의 장기간 증식(long-term propagation)은 CSC 빈도의 증가와 연관된다: (도 1a) 종양 접종(engraftment)(파란색)을 위한 단축된 시간과 상관되는 연속적 Xn 증식 및 절제술에 대한 시간에 따른 중량(weight)의 증가(빨간색), 이는 더욱 공격적인 표현형을 나타내는 종양의 거동에 있어서의 변화를 나타낸다; (도 1b) 일차 MRT, 초기 계대배양(early passage) Xn (P2), 중기 계대배양(intermediate passage) Xn (P7) 및 후기 계대배양(late passage) Xn (P14)의 H&E 염색. Xn 종양 세포들은 기본적인 육종양-유사 세포 형태를 유지하고, 유사 방추세포의 획득, 넓은 면적의 괴사, 적은 세포사멸체 및 많은 유사 분열(흰색 화살표들)을 포함하는 일부 형태학적 차이를 나타낸다. 스케일 바(scale bar), 100 μ m (상부) 및 50 μ m (하부); (도 1c) 시토크라틴(cytokeratin) AE1/AE3, 상피막 항원 (EMA), 신경미세섬유 단백질 (NFP) 및 비멘틴(vimentin)에 대한 연속 섹션들에서의 일차 MRT의 IHC, 초기 계대배양 Xn (P2), 중기 계대배양 Xn (P7) 및 후기 계대배양 Xn (P14). 고수준(high generation) Xn은 분화 마커들의 손실을 나타내고(상부의 3개 패널들), 반면에 일차 종양 및 Xn 조직들은 비멘틴을 강하게 발현한다(하부 패널). 스케일 바, 200 μ m; (도 1d) 일차 종양, 초기 계대배양 Xn (P3), 및 후기 계대배양 Xn (P17) 간의 E-카드헤린(cadherin) 및 비멘틴의 발현 수준을 비교하는 qRT-PCR 분석. 상피 마커인 E-카드헤린은 연속 증식에 걸쳐 하향 조절되고, 반면에 비멘틴의 발현은 변함없이 유지된다. qRT-PCR 분석을 위하여, 일차 종양 세포들의 값들이 정규화(=1)를 위해 사용되었고, 모든 다른 값들은 일차 종양 세포들의 값들에 대해 계산되었다. 결과들은, 3회의 별개 실험들의 평균값 \pm S.E.M으로 표시된다. * p<0.05; (도 1d) 단일 세포 현탁액에 대한 CD24, CD34, CD90, CD56, CD326 및 ALDH1 항원들을 포함하는 여러 CSC 마커들의 발현을 위한 초기 MRT 계대배양, 중기 MRT 계대배양 및 후기 MRT 계대배양으로부터의 Xn 세포들의 대표적인 유세포 분석기 분석(flow cytometry analysis). 그 결과들은, Xn 계대배양을 통해 증가된 발현 패턴을 보여주는 ALDH1이 우수한 MRT CSC 마커 후보라는 것이 밝혀졌다.

도 2a 내지 도 2e - 증대된 종양 개시 활성화와 관련된 글로벌 유전자 표지(global gene signature)는 추정 CSC 바이오마커들 및 새로운 치료 타겟을 나타낸다. (도 2a) 여러 다양한 샘플들을 비교하는 마이크로어레이 유전자 발현 분석: 1. 일차 MRT, 2. 초기 MRT Xn (P2), 3. 중기 MRT Xn (P7), 4. 후기 MRT Xn (P17), 5. 인간 배아줄기세포 (hESCs), 6. 태아 신장 (FK), 7. 성인 신장 (AK), 8. 태아 뇌 (FB), 9. 성인 뇌 (AB). 비감독 계층 클러스터링(un-supervised hierarchical clustering)은 MRT 후기 계대배양 및 hESCs 사이의 큰 유사성을 나타내었고, 이는 그들의 비분화 성질을 강조하는 것이다; (도 2b) MRT 조직들의 비교는, 두가지의 구별되는 유전자 발현 패턴들을 나타내었다; 계대배양 동안 상향 조절된 유전자들(빨간색) 및 하향 조절된 유전자들(녹색); (도 2c) 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)를 포함하는 MRT에서 증가된 CSC 기능과 관련된 가장 상향 조절된 10개의 유전자들; (도 2d) 다양한 MRT 샘플들 간의 여러 증식 마커들의 발현 패턴들을 비교하는 유전자 히트 맵(gene heat map) (예를 들어, *KI67*, *CDC20*, *CDK1* 및 *CCNA2*)은 고도의 계대배양에 의해 고도의 증식이 이루어짐

을 나타낸다; (E) ingenuity© 기능 분석은, 일차 종양 및 낮은 계대수의 계대배양 Xn과 비교하여, 높은 계대수의 계대배양 Xn에서 감소된 괴사, 세포사멸 및 세포 분화를 나타냄을 보여주었다.

도 3a 내지 도 3e - ALDH1은 MRT CSC의 추정 마커이다: (도 3a) NOD/SCID 마우스에서 인간 MRT Xn의 연속적 증식에 의해, ALDH1을 발현하는 세포들의 증대가 초래된다, 그림 참조; (도 3b) 다양한 MRT Xn 계대배양들에 대한 대표적인 FACS 분석. 종양들이 진행됨에 따라, ALDH1 발현 세포들의 비율은 현저히 증가하였다: P4 세포들로부터 유래된 세포들의 경우 4% (왼쪽), 및 P10 세포들로부터 유래된 세포들의 경우 25% (오른쪽), 이는 Xn 연속 증식을 통해 ALDH1⁺를 발현하는 세포들이 증대되었음을 나타내는 것이다; (도 3c) ALDH1에 대한 일차 MRT의 IHC, 중기 계대배양 Xn (P7) 및 후기 계대배양 Xn (P13)은 Xn 연속 증식에 따른 발현 증가를 나타낸다. 스케일 바, 200 μ m; (도 3d) ALDH1에 대한 일차 MRT의 확대 IHC는 높은 수준의 ALDH1 발현 세포들은 주로 큰 육종양 세포들임을 보여준다. 스케일 바, 200 μ m; (도 3e) qRT-PCR을 통해, 후기 계대배양들에서의 높은 ALDH1 발현이 확인되었다, 일차 종양에 비해 약 40배 더 높음. qRT-PCR 분석을 위하여, 일차 종양 세포들에 대한 값들이 정규화(=1)를 위하여 사용되었고, 따라서 모든 다른 값들이 계산되었다. 결과들은 3회의 별개 실험들의 평균값 \pm S.E.M으로 나타내어진다. * p<0.05; ** p<0.01.

도 4a 내지 도 4d - MRT CSC 바이오마커로서의 ALDH1의 기능 확인: (도 4a) 콜로니 형성능력은 ALDH1+ MRT 세포들과 ALDH1- MRT 세포들 간에 비교되었다. ALDH1+ 세포들에 의해 형성된 콜로니들의 수는 ALDH1- 세포들에 비교하여 매우 높았다 (왼쪽 상부 막대그래프; p=0.0083). 세포/콜로니의 수는 ALDH1- 세포들에 비하여 ALDH1+ 세포들에서 매우 높았다 (왼쪽 하부 막대그래프; p=0.0024). ALDH1+ 세포들 및 ALDH1- 세포들로부터 형성된 콜로니들의 대표적인 이미지들은 오른쪽에 나타내었다. 실험은 3회씩 수행되었다; (도 4b) ALDH1+ 세포들로부터 야기된 종양들은 추가적으로 2차 수용체들(recipients) 내로 연속적으로 이식되었고, 이는 생체내 자가-재생 능력을 보여주는 것이고, 이 개체군에서의 종양 개시 능력의 존재와 일치된다; (도 4c) RNA 서열화 실험은, ALDH- 세포들에 비하여 ALDH+ 세포들에서 가장 상향 조절된 유전자들은, 일차 종양에 비하여 후기 Xn 계대배양들에서 매우 과발현된 유전자들이었음을 보여주었다(예를 들어, *ANXA1*, *GPM6A*, *HGF* 및 *LOX*). (도 4d) qRT-PCR를 통한 확인은, ALDH- 세포들에 비하여, 분류된 ALDH+ 세포들에서 높은 LOX 발현이 있음을 나타내었다. qRT-PCR 분석을 위하여, ALDH- 세포들에 대한 값들이 정규화(=1)를 위하여 사용되었고, 따라서 모든 다른 값들이 계산되었다. 결과들은 3회의 별개 실험들의 평균값 \pm S.E.M으로 나타내어진다; * p<0.05.

도 5a 내지 도 5d - 잠재적 MRT 치료 타겟으로서의 LOX 억제제의 기능 확인: (도 5a) LOX에 대한 일차 종양, 초기 (P2), 중기 (P7) 및 후기 (P14) MRT 계대배양물의 IHC 염색. 상기 염색은 Xn 연속 증식에 따른 광범위한 발현 증대를 나타내었다. 스케일 바, 10 μ m; (도 5b) 윌름스 종양(WT) Xn 세포들에 대한 BAPN의 효과, 마우스에서 연속 증식된 신장의 공통 소아 고형 종양. 결과들은 WT 세포 증식에 대해 아무런 영향이 없음을 나타내었고, 이는 MRT 세포들에 대한 LOX 억제제의 특이적 효과를 나타내는 것이다. ** p<0.01; (도 5c) MRT 세포들에 대한 BAPN 처리에 의해 유도된, 핵 농축(nuclear condensation) 및 세포 팽윤을 포함하는 형태학적 변화. 스케일 바, 100 μ m (상부) 및 50 μ m (하부); (도 5d) 세포이동 분석(migration assay)은 48시간 동안의 100 μ M BAPN 처리에 의해, MRT 세포들의 이동 능력이 비처리 세포들에 비하여 현저히 억제되었음을 보여준다. 스케일 바, 1000 μ m.

도 6 - ATRT Xn 모델의 확립, 그림 참조. 일차 종양 이식편들은 2~5mm의 종양 조각들을 면역 결핍된 마우스에게 피하 이식하여 형성하였다. 모든 마우스에서 종양 증식을 가능하게 하는 종양 취득(tumor take)이 관찰되었다. NOD/SCID 마우스에서 ATRT Xn의 연속 증식(serial propagation)은 1x10⁶ 세포의 고정된 세포수를 이용하여, 조직 샘플 이식(transplantation) 또는 단일 세포 현탁액 이식(grafting)에 의해 수행하였다. 연속 증식에 의해 낮은 계대수의 계대배양(<P5), 중간 계대수의 계대배양(P5-P10) 및 높은 계대수의 계대배양(P10-P15)의 ATRT Xn 계대배양들의 확립이 가능하게 되었다. 또한, 조직 단편들이 IHC 염색, RNA, DNA 및 단백질 분리를 위하여 사용되었다. 부착 세포들 또한 종양 세포들의 시험관내 연구를 위하여 사용되었다.

도 7a 내지 도 7b - ATRT CIC/CSC 치료제로서의 LOX 억제제의 기능 확인: (도 7a) 처리 후 세포 생존력 분석(Cell viability assay). 세포 생존력을 시험하는 MTS 분석은 다양한 농도의 BAPN(10-1000f μ M)으로 48시간 동안 성장시킨 P2 Xn 세포들에 대해 수행되었다. 100 μ M BAPN으로 처리한 후, 결과적으로 증식이 상당히 감소되었다(UT 세포들에 비하여 47%). **, p<0.01. (도 7b) BAPN 처리에 의해, ATRT 세포들에서 형태학적 변화들이 야기되었다. 처리 후에 관찰된 변화들 중에는 핵 농축 및 세포 팽윤이 포함된다. 스케일 바, 100 μ m (상부) 및 50 μ m (하부). (도 7c) BAPN 처리는, 세포 이동을 억제한다. 세포이동 분석은, 48시간 동안의 100 μ M BAPN 처리는 비처리 세포들에 비하여 ATRT 세포의 이동 능력을 상당히 억제하였음을 보여준다. 스케일 바, 1000 μ m. (도 7d) BAPN은 ATRT 세포들에서 LOX 활성을 효과적으로 억제한다. LOX 활성 정량 키트는 P3 및 P10 세포들에 대한

100 μ M BAPN 처리 후에 상당한 억제 효과가 이루어짐을 보여준다(각각 81% 및 63%).

도 8a 및 도 8b - 종양이 나타나기까지의 평균 일수를 이중이식 계대배양의 함수로서 나타낸 그래프들. 유잉 육종(도 8a) 및 윌름스 종양(도 8b)에서 종양 접종 시간의 단축과 관련되는 연속 Xn 증식, 이는 더욱 공격적인 표현형으로 나타나는 종양 거동에서의 변화를 보여주는 것이다.

도 9 - 고도로 증식되는 종양 이중이식의 후기 계대배양들을 나타내는 유전자 히트 맵으로서, 전이성 거동을 예상하게 하는 침투성 유전자 표지에 따른, 자가-재생 유전자들의 상향 조절(up-regulation)을 나타낸다.

도 10a - NCAM1에 대한 여러 Xn 계대배양(P4, P8, P12 및 P17)의 면역화학염색(immunohistochemistry; IHC)은 Xn 연속 증식에 따른 증가된 발현을 나타낸다. 스케일 바, 200 μ m;

도 10b - qRT-PCR 분석은, 성인 폐 대조군(오른쪽)에 비하여 일차 종양에서 높은 NCAM1 발현을 나타내고, 성인 폐(왼쪽)에 비하여 태아 폐에서 높은 NCAM1 발현을 나타낸다. 결과들은 3회의 별개 실험들의 평균값±S.E.M으로 나타내어진다; *, $p < 0.05$.

도 11a - CD44에 대한 여러 Xn 계대배양(P4, P8, P12 및 P17)의 IHC은 Xn 연속 증식에 따른 증가된 발현을 나타낸다. 스케일 바, 200 μ m;

도 11b - CD44에 대한 일차 PPB의 확대 IHC는 높은 CD44 발현 세포들이 종양을 따라 분산되어 있는 것을 보여준다. 스케일 바, 200 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 본 발명의 일부 구체에는 일차 종양에서 암 줄기세포의 농축(enriching) 및 동정(identifying), 및 선택적으로 그들을 분리하는 방법에 관한 것이다. 암 줄기세포를 일차 종양에 존재하는 다른 암 세포들과 차별화하는 마커들은 암의 진단에 도움을 주기 위하여 동정될 수 있다. 또한, 상기 마커들은 암의 치료를 위한 타겟이 될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 적어도 하나의 구체예를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 그의 적용이 하기 설명 또는 예시된 실시예들에 제시된 상세 사항들에 반드시 한정되는 것은 아님이 이해되어야 할 것이다. 본 발명은 다른 구체예들로 구현될 수 있고, 또는 여러 다양한 방법들로 실시 또는 수행될 수 있다.
- [0053] 암 줄기세포(CSC)는 계층적으로 조직화된 종양들에서 악성 세포 서브세트들(malignant cell subsets)을 지칭하며, 이는 선택적으로 종양 개시 및 자가-재생이 가능하고, 분화를 통해 비-종양형성성(non-tumorigenic) 암세포 자손의 집단을 생성시킬 수 있다.
- [0054] 생리학적 줄기세포들의 약물-내성 표현형에 대한 관찰의 필연적 결과로서, CSC는 또한 화학 요법 및 방사선 요법에 대한 증가된 내성으로 특징지어지는 암 내의 소집단(subpopulation)을 지칭할 수 있는 것으로 가정되어 왔다. 따라서, 특이적 마커들을 통해 CSC를 표적화하는 암 치료법은 재발 및 전반(dissemination)의 위험성을 감소시킴으로써, 기존의 치료법들의 효율을 잠재적으로 증가시킬 수 있을 것이다. 암 줄기세포의 동정은 특히 그들이 전형적으로 매우 적은 수의 종양 세포들에서 발현되는 점에서 복잡한 작업이다.
- [0055] 소아 고형 종양에서는, 다수의 신선한 종양 시료에 대한 제한된 접근이 상기 문제를 복잡하게 만들어서, 내성 CSC 분석 및 효과적인 새로운 치료 전략의 개발을 방해한다.
- [0056] 본 발명자들은 CSC 표현형의 발견을 위하여, 면역결핍 마우스에서, 매우 공격적이고 치명적인 소아 신생물인 인간 비정형 유기형/간상 종양(ATRT)의 장기간 생체내 증식법을 한계 희석 이중이식법(limiting dilution xenotransplantation)과 조합하였다. 이러한 방법을 사용하여, 본 발명자들은 낮은 계대수의 계대배양(low-passage) 이중이식에 비하여 40배 미만에 해당되는 50개의 세포를 사용하여 ATRT를 생성시킬 수 있었다.
- [0057] 본 발명자들은 이러한 실험들로부터, 이중이식의 연속 사이클들은 추가의 CSC 표현형들을 선택하기 위해 사용될 수 있고, 이 방법은 암의 진단 및 치료 모두를 위한 가치있는 수단이 될 수 있다고 추론하였다.
- [0058] ATRT와 유사하게, 본 발명자들은 유잉육종, 윌름스 종양 및 흉막과 폐의 모세포종(PPB)의 연속 증식은, 계대배양에 따라 종양의 공격성이 촉진되었음을 보여주는 종양 접종에 대한 시간 단축 및 종양 성장 촉진과 관련된 이중이식들(Xns)을 생성시켰음을 발견하였다.
- [0059] 특정 종양에 대한 CSCs에 대한 지식은 새로운 치료법의 개발에 도움을 준다. 이는 개인적 필요 수준(즉, 특정 환자의 종양에서 CSCs 관찰 및 그에 따른 치료) 또는 보다 일반적인 수준(특정 암들에 대한 치료법의 개발)에

영향을 미칠 수 있다.

- [0060] 본 발명의 일 측면에 따르면, 다음의 단계들을 포함하는, 인간 일차 종양에서 암 줄기세포 마커들을 동정하는 방법이 제공된다:
- [0061] (a) 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군을 생성시키기 위한 계대수로 상기 일차 종양을 생체내에서 계대배양하는 단계; 및
- [0062] (b) 계대배양된 일차 종양의 종양 세포들의 제1 개체군에서의 적어도 하나의 항원의 수준을 상기 일차 종양의 종양 세포들의 제2 개체군과 비교하는 단계,
- [0063] 여기서, 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 다음의 (i) 또는 (ii)이다:
- [0064] (i) 상기 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은(non-passaged) 세포들; 또는
- [0065] (ii) 상기 인간 일차 종양의 생체내 계대배양된 세포들, 여기서 상기 종양 세포들의 제2 개체군은 계대배양된 종양 세포들의 제1 개체군 보다 적어도 1회 더 적은 계대수로 생체내 계대배양된 것이고,
- [0066] 상기 종양 세포들의 제2 개체군에서의 상기 항원의 양(amount)과 비교하여 상기 종양 세포들의 제1 개체군에서의 상기 항원의 양의 증가는 상기 인간 일차 종양에서의 암 줄기세포 마커들의 지표가 된다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "암 줄기세포", ("CSC"로 언급되기도 함)는 이중이식(Xn) 마우스 모델을 사용하여 암을 생성시키는 능력을 갖는 세포를 의미한다. CSCs는 자가-재생 과정을 통해 자신들을 재생할 수 있고, 이는 연속 이식 분석법으로 연구될 수 있다. 또한, 정제된 CSCs로부터 유래된 암들은 그들이 유래된 부모 암의 이중성 표현형들을 재현하고, 이는 CSCs의 분화능력을 반영한다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 용어 "종양(tumor)"은 조절되지 않은(misregulated) 세포 증식에 의해 형성된 세포들 또는 조직의 그룹을 의미한다. 종양은 구조적 조직화(structural organization) 및 정상조직과의 기능적 협력의 부분적 또는 완전한 결핍을 나타내고, 일반적으로 분리된 조직 덩어리를 형성하며, 이는 양성 또는 악성일 수 있다. 하나의 구체예에서, 용어 "종양"은 악성 종양을 의미한다. 하나의 구체예에 따르면, 용어 "종양 세포들"은 또한 백혈병 세포들과 같은 비-고형 암 세포들을 포함한다. 다른 구체예에 따르면, 각각의 비-고형 암 세포들은 상기 용어 "종양 세포들"의 범위에 포함되지 않는다.
- [0069] 특정 구체예에 따르면, 종양은 배아 줄기세포 기원(origin)을 갖는 고형 종양(예를 들어, 소아 종양)이다.
- [0070] 그러한 고형 종양들의 예로는, 비제한적인 예로서 다음과 같은 육종암(sarcomas) 및 암종(carcinomas)을 포함하나, 이들에 제한되는 것은 아니다: 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 흉막과 폐의 모세포종(pleulmonary blastoma), 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골원성 육종(teogenic sarcoma), 척삭종(chordoma), 혈관육종(angiosarcoma), 내피 육종(endotheliosarcoma), 림프관 육종(lymphangiosarcoma), 림프관 내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 활막종(synovioma), 중피종(mesothelioma), 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종(leiomyosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 결장암(colon carcinoma), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 기저세포암(basal cell carcinoma), 선암(adenocarcinoma), 한선암종(sweat gland carcinoma), 피지선암종(sebaceous gland carcinoma), 유두상암종(papillary carcinoma), 유두상선암종(papillary adenocarcinomas), 낭종암(cystadenocarcinoma), 수양암(medullary carcinoma), 기관지원성암종(bronchogenic carcinoma), 신장암(renal cell carcinoma), 간암(hepatoma), 담관암(bile duct carcinoma), 융모암(choriocarcinoma), 정상피종(seminoma), 태생기암(embryonal carcinoma), 윌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암(cervical cancer), 고환암(testicular tumor), 폐암종(lung carcinoma), 소세포폐암(small cell lung carcinoma), 방광암종(bladder carcinoma), 원주상피암(epithelial carcinoma), 신경교종(glioma), 성상세포종(astrocytoma), 수모세포종(medulloblastoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 상의세포종(ependymoma), 송과체종(pinealoma), 혈관아세포종(hemangioblastoma), 청신경종(acoustic neuroma), 뿔지교종(oligodendroglioma), 뇌수막종(meningioma), 악성흑색종(melanoma), 신경아세포종(neuroblastoma), 및 망막아세포종(retinoblastoma). 소아 고형 종양의 예로는, 다음을 포함하나, 이들에 제한되는 것은 아니다: 윌름스 종양/신아세포종(Wilms' tumor/Nephroblastoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 유잉계 종양/원시신경외배엽종양(Ewing's family of tumors/primitive neuroectodermal tumor), 골육종(Osteosarcoma), 말초원시신경외배엽종양(peripheral neuroectodermal tumors), 소아 생식세포종(Childhood Germ Cell Tumor), 성선외생식세포종(Extragenital Germ Cell Tumor), 신장암(Kidney Cancer), 간암(Liver Cancer), 신경아세포종(Neuroblastoma),

난소암(Ovarian Cancer), 망막아세포종(Retinoblastoma), 육종(Sarcoma), 더욱 구체적으로는, 고골육종(Osteosarcoma), 횡문근육종(Rhabdomyosarcoma), 결합조직성 소원형세포종양(Desmoplastic small round-cell tumor), 간모세포종(Hepatoblastoma), 배세포종양(Germ cell tumors), 신경아세포종(neuroblastoma) 및 수모세포종(Medulloblastoma).

- [0071] 본 명세서에서 사용된 용어 "일차 종양(primary tumor)"은, 종양 진행이 시작되어 암 덩어리를 형성하게 되는 해부학적 위치로부터 얻어지는 세포들을 의미한다.
- [0072] 상기 항원은, 이중이식(Xn) 마우스 모델을 이용하여 암을 생성시키는 능력을 갖지 않고, 자가-재생 과정을 통해 스스로를 재생시킬 수 없는 동종의 종양의 암세포들과 비교할 때, CSC에서 차별화되는 양으로 존재하는 임의의 분자일 수 있다.
- [0073] 따라서, 예를 들어, CSC 마커는 폴리펩타이드, 탄수화물, 펩타이드, 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0074] 상기 항원은 세포의 표면에 위치할 수 있고, 또는 세포내 분자일 수 있다.
- [0075] 특정 구체예에 따르면, CSC 마커는 폴리펩타이드이다.
- [0076] 상기 폴리펩타이드는 세포 표면 단백질(즉, 막 단백질)일 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 상기 세포 표면 단백질은 탄수화물 결합 분자(예를 들어, 레시틴)이다.
- [0077] 다른 구체예에 따르면, 상기 단백질은 세포의 단백질(예를 들어, 가용성 단백질)이다.
- [0078] 상기 폴리펩타이드는, 예를 들어 전사 인자, 경로 관련 마커 등의 기능을 수행할 수 있다.
- [0079] 본 명세서에서 사용된 용어 "생체내 계대배양(in vivo passaging)"은 일차 종양을 동물(예를 들어, 마우스) 내로 초기 이식(initial implantation)하고, 2차 종양으로 진행될 때까지 일정 기간 기다린 다음, 종양 세포들을 수확하여 2차 동물 내로 상기 종양 세포들을 이식(예를 들어, 연속 이식(serial transplantations))하는 것을 포함하는 과정을 의미한다. 그런 다음, 연속적인 일련의 계대배양이 수행될 수 있다. 본 발명은 적어도 1 계대수의 계대배양, 적어도 2 계대수의 계대배양, 적어도 3 계대수의 계대배양, 적어도 4 계대수의 계대배양, 적어도 5 계대수의 계대배양, 적어도 6 계대수의 계대배양, 적어도 7 계대수의 계대배양, 적어도 8 계대수의 계대배양, 적어도 9 계대수의 계대배양, 적어도 10 계대수의 계대배양, 적어도 11 계대수의 계대배양, 적어도 12 계대수의 계대배양, 적어도 13 계대수의 계대배양, 적어도 14 계대수의 계대배양, 적어도 15 계대수의 계대배양, 적어도 16 계대수의 계대배양, 적어도 17 계대수의 계대배양, 적어도 18 계대수의 계대배양, 적어도 19 계대수의 계대배양, 적어도 20 계대수의 계대배양으로 계대배양을 수행하는 것을 포함한다.
- [0080] 특정 구체예에 따르면, 상기 계대배양은 5 계대수 이상, 예를 들어 5~30, 또는 5~20 계대수의 계대배양이다.
- [0081] 특정 구체예에 따르면, 상기 계대배양은 10 계대수 이상, 예를 들어 10~30, 또는 10~20 계대수의 계대배양이다.
- [0082] 특정 구체예에 따르면, 상기 종양 세포들(종양 세포들의 제1 개체군 및/또는 종양 세포들의 제2 개체군)은 시험관내 계대배양을 하지 않은 것이다.
- [0083] 다른 특정 구체예에 따르면, 상기 종양 세포들은 일 라운드(one round) 초과의 시험관내 계대배양을 하지 않은 것이다.
- [0084] 생체내 계대배양에 사용되는 동물들의 예로는, 선충(nematodes), 초파리(fruit flies), 제브라피쉬(zebrafish)를 포함하고; 바람직하게는 마우스 (누드 마우스, SCID 마우스, NOD/SCID 마우스, 베이지(Beige)/SCID 마우스), 쥐(rat), 토끼, 또는 영장류(예를 들어, 인간)와 같은 실험실용 포유류가 사용된다. 하나의 구체예에 따르면, 면역결핍 동물들이 사용된다. 다른 구체예에 따르면, 생체내 계대배양을 위해 인간이 사용된다.
- [0085] 전형적으로, 동일한 종의 동물이 각각의 생체내 계대배양에 사용된다. 따라서, 예를 들어, 만약 면역결핍 마우스가 초기 이식에 사용되면, 다음 계대배양을 위해서 면역결핍 마우스가 사용된다.
- [0086] 일차 종양이 제2 동물 내에서 2차 종양의 진행을 개시시키는 한, 일차 종양은 어떤 양으로도 사용될 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 일차 종양은 조각들(예를 들어, 1~10 mm 조각들)로 절단된다. 바람직하게는, 일차 종양의 세포들은 효소를 사용하여 해리되지 않은 것이다. 또한, 일차 종양의 세포들은 바람직하게는 저미거나(minced) 또는 갈은(ground) 것이 아니다.
- [0087] 특정 구체예에 따르면, 일차 종양의 세포들은 이식 전에 정제 과정(예를 들어, NCAM에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 유동세포 계수법(flow cytometry)과 같은 면역-분리법(immune-isolation))을 거치지 않은

것이다. 또한, 이어지는 생체내 계대배양에서 이종이식 세포들 역시 바람직하게는 정제 과정(예를 들어, NCAM에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 유동세포 계수법(flow cytometry)과 같은 면역-분리법(immune-isolation))을 거치지 않은 것이다.

- [0088] 상기 종양은 그것이 종양 진행을 개시시키는 한, 동물 내에 어떤 방식으로든 이식될 수 있다. 하나의 구체예에 따르면, 상기 종양은 피하 이식된다.
- [0089] 전형적으로, 종양들은 이식 후 약 1~3개월 후 또는 그들의 크기가 1~3cm, 예를 들어 직경 1.5cm에 도달했을 때 수확된다.
- [0090] 이어지는 이종이식 증식은 이종이식 단일 세포 현탁액(single cells suspensions) 또는 이종이식 조직 단편들을 이식함으로써 실현될 수 있다.
- [0091] 단일 세포 현탁액의 경우, 해리된 세포들의 수는 생체내 계대배양에 사용된 동물 및 종양의 공격성(aggressiveness)에 따라 달라질 것이다. 전형적으로는, 새로이 회수된(freshly retrieved) Xn 조직으로부터 유래된 약 $0.5 \sim 3 \times 10^6$ 개의 해리 세포들이 사용된다.
- [0092] 이종이식 조직 단편들은 전형적으로 1~10 mm, 더욱 바람직하게는 2~5 mm이다.
- [0093] 단일 세포 현탁액은 적절한 매질(바람직하게는 항체들도 포함함) 내에서 저미기(mincing), 갈기(grinding) 또는 분산을 수행하고, 이어서 콜라게나아제와 같은 단백질 분해효소로 처리함으로써 얻어질 수 있다. 그런 다음, 효소 처리된 조직은 적절한 매질 내에서 연마(triturated)될 수 있다.
- [0094] 특정 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 계대배양되지 않은 인간 일차 종양의 세포들이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 1 계대수로 계대배양된 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 2 계대수로 계대배양된 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 3 계대수로 계대배양된 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 4 계대수로 계대배양된 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제2 개체군은 5 초과 계대수로 계대배양된 것은 아니다.
- [0095] 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 1회(one round)의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 2회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 3회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 4회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 5회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 6회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 7회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 8회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 9회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 10회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 15회의 생체내 계대배양을 한 것이다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 적어도 20회의 생체내 계대배양을 한 것이다.
- [0096] 전형적으로, 종양 세포들의 제1 개체군은, 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 5000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식(later generation xenograft)을 개시시키는 빈도(frequency)가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배까지 증가되도록 생체내 계대배양을 한 것이다.
- [0097] 본 명세서에서 사용된 용어 "이종이식(xenograft)"은 하나의 종(species), 속(genus) 또는 과(family)의 개체로부터 유래된 조직 또는 기관(organs)을 다른 종, 속, 또는 과의 개체 내로 외과적으로 이식(transplant 또는 graft)하는 것을 의미한다.
- [0098] 바람직하게는, 후손 세대 이종이식을 개시시키는 상기 빈도는 적어도 통계학적으로 유의한 수가 얻어지도록 적어도 2마리, 예를 들어 3마리, 5마리 또는 더욱 바람직하게는 10마리까지의 동물들에서 결정된다.
- [0099] 따라서, 예로서, 만약 종양 세포들의 제2 개체군이 테스트된 10마리의 마우스 중 한마리에서 후손 세대 이종이식을 개시시킨다면, 동일한 수의 종양 세포들을 사용하여, 종양 세포들의 제1 개체군이 10마리의 마우스 중 적어도 5마리에서 후손 세대 이종이식을 개시시키도록 충분히 생체내 계대배양되어야 한다. 전형적으로, 후손 세대 이종이식을 개시시키기 위해 사용되는 상기 종양 세포들은 단일 세포 현탁액 내에 존재한다.
- [0100] 후손 세대 이종이식이 개시되었는지의 여부를 테스트하는 것은, 당 분야 기술자의 전문 지식의 범주에 속한다.

이종이식이 개시되었는지의 여부를 결정하는데 사용될 수 있는 예시적인 방법들에는, 육안적 종양 촉진(gross tumor palpation), 캘리퍼스(calipers), 초음파 유도하 이미징화(ultrasound-guided imaging) 등이 포함된다.

- [0101] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 5000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 10배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0102] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 5000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 20배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0103] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 1000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0104] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 1000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 10배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0105] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 1000개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 20배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0106] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 500개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0107] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 500개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 10배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0108] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 500개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 20배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0109] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 100개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0110] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 100개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 10배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0111] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 100개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 20배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0112] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 50개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 5배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0113] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 50개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 10배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.
- [0114] 하나의 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 상기 계대배양된 세포들의 제1 개체군의 50개 세포들을 사용하여 후손 세대 이종이식을 개시시키는 빈도가 인간 일차 종양의 계대배양되지 않은 세포들과 비교하여 적어도 20배까지 증가되도록 충분히 생체내 계대배양된 것이다.

- [0115] 전형적으로, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 1회(one round) 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 2회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 3회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 4회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 5회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 6회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 7회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 8회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 9회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 10회 더 계대배양된다. 다른 구체예에 따르면, 종양 세포들의 제1 개체군은 종양 세포들의 제2 개체군보다 10회 이상 더 계대배양된다.
- [0116] 하나의 구체예에서, 종양 세포들의 제1 개체군은, 적어도 2회의 연속적 계대배양 동안 유의하게 증가되지 않은 명백한 종양 공격성 표현형(tumor aggressiveness phenotype)이 나타나도록 계대배양된다.
- [0117] 초기 계대배양 동안, 종양 공격성 표현형의 증가 비율이 높다는 것이 인식될 것이다. 이어지는 계대배양 동안, 특정 계대배양에 이르기까지 종양 공격성 표현형의 증가 비율은 낮아져서 정체기(plateau)에 도달한다. 이 시점에서, 종양 공격성 표현형의 수준은 일정하게 유지되거나, 또는 이어지는 계대배양에서 심지어 감소될 수 있다.
- [0118] 본 발명자들은 종양 공격성 표현형이 정체기에 도달하도록 하는 계대수까지 종양을 계대배양하는 것을 고려하였다. 상기 정체기에서의 종양 공격성 표현형의 변화는 바람직하게는 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 심지어 1% 이하이다.
- [0119] 본 발명의 상기 측면에 따라 측정될 수 있는 종양 공격성 표현형들의 예로는, 제한되지는 않지만, 특히 다음을 포함한다: 암 세포 마커의 수준, 유전자 발현 프로파일, 침투(invasiveness) 수준, 전이 능력, 전이 수준, 이중 이식에 걸리는 시간(즉, 동물 모델에서 이중이식이 종양을 특정 크기로 생성시키기 위한 시간), 동물 모델에서 특정 크기의 이중이식을 발생시키는데 필요한 세포 수. 측정가능한 추가의 종양 공격성 표현형들은 염색체 안정성, 키나아제(kinase) 활성, 세포 부착, 세포 자멸(apoptosis), 암 세포 성장, 시클린(cyclin) 생성, 세포 증식, 증식성 세포(clonogenicity) 측정(연질 한천 분석법), 비부착 증식(anchorage-independent growth) 측정, 세포 주기 조절(cell cycle regulation) 측정, 암 세포 운동성(motility) 측정, 혈관신생(angiogenesis) 측정, 및 세포 사멸 측정.
- [0120] 상기 측정들은 생체내(즉, 동물 모델에서) 또는 시험관내(예를 들어, 세포 배양물에서)에서 실현될 수 있다.
- [0121] 세포 증식 분석은, 제한되지는 않지만, MTT 분석(예를 들어, VybrantTM MTT 세포 증식 분석 키트(Invitrogen)); BrdU 표지(incorporation) 분석(예를 들어, Absolute-S SBIP 분석(Invitrogen)); 세포내 ATP 수준 측정(이 분석법의 상업적 버전은 ATPLiteTM-M, 1,000 분석 키트(PerkinElmer) 및 ATP 세포 생존능 분석 키트(BioVision)); DiOc18 분석, 막 침투성 염료(Invitrogen); 글루코오스-6-포스페이트 탈수소화 효소 활성 분석(예를 들어, Vibrant 세포독성(cytotoxicity) 분석(Invitrogen)); 세포 LDH 활성 측정; 및 ³H-티미딘 통합 분석 및 Cell Titer Glo 분석(Promega)을 포함한다.
- [0122] 세포주기 진행(Cell-cycle progression)은 브로모데옥시우리딘(BRDU) 표지법으로 분석될 수 있다. 그러한 분석법은 새로이 합성된 DNA 내로 BRDU를 통합시켜서 DNA 합성을 하는 세포 개체군을 동정한다. 그런 다음, 새로이 합성된 DNA는 항-BRDU 항체(Hoshino et al., 1986, int. J. Cancer 38, 369; Campana et al., 1988, J. Immunol. Meth. 107, 79), 또는 다른 수단들을 사용하여 검출될 수 있다. 세포 증식은 또한 포스포-히스톤 H3 염색법으로 분석될 수 있는데, 이는 유사분열하는 세포 개체군을 히스톤 H3의 인산화 반응에 의해 동정한다. 세린 10(serine 10)에서의 히스톤 H3의 인산화 반응은 히스톤 H3의 세린 10 잔기의 인산화 형태에 특이적인 항체를 사용하여 검출된다(Chadlee, D. N. 1995, J. Biol. Chem. 270:20098-105). 또한, 세포 증식은 ³H-티미딘 표지(thymidine incorporation)를 사용하여도 검사될 수 있다(Chen, J., 1996, Oncogene 13:1395-403; Jeoung, J., 1995, J. Biol. Chem. 270:18367-73). 이 분석법은 S-파아제(phase) DNA 합성의 정량적 분석을 가능하게 하는 분석법이다. 이 분석법에서는, DNA를 합성하는 세포들이 새로이 합성된 DNA 내로 ³H-티미딘을 도입시킬 것이다. 그런 다음, 상기 도입(incorporation)은 신틸레이션 카운터(scintillation counter; 예로서, Beckman LS 3800 Liquid Scintillation Counter)에서 방사성 동위원소를 카운팅하는 것과 같은 표준 기술에 의해 측정될

수 있다. 다른 증식 분석법은, 살아있는 세포들 내에서 환원될 경우 형광을 나타내어 세포수의 간접적 측정을 제공하는 염료 Alamar Blue(Biosource International로부터 입수 가능)를 사용한다(Voytik-Harbin S L at al., 1998, In Vitro Cell Dev Biol Anim 34:239-46). 또 다른 증식 분석법인 MTS 분석은 산업적 화학물질들의 시험관내 세포독성(cytotoxicity) 분석에 기초하고, 테트라졸륨 염인 MTS를 사용한다. MTS 분석은 상업적으로 이용 가능하고, Promega CellTiter 96.RTM. 수성 비-방사성 동위원소 세포 증식 분석법(Cat# G5421)을 포함한다. 또한, 세포 증식은 연결 한천에서의 콜로니 형성에 의해서도 분석될 수 있다 (Sambrook at al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor (1989)). 또한, 세포 증식은 대사 활성 세포들의 표지자로서의 ATP 수준을 측정함으로써도 분석될 수 있다. 그러한 분석법들은 상업적으로 이용가능하고, Cell Titer-Glo.TM.(Promega)를 포함한다. 세포 주기 증식은 또한 유동세포 계수법(flow cytometry)에 의해서도 분석될 수 있다(Gray J W at al. (1986) Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 49:237-55). 세포들은 프로피디움 요오드화물(propidium iodide)로 염색되어, 세포 주기의 각 다른 단계들에서 세포들의 축적을 측정하기 위하여 유동세포 계수기로 평가될 수 있다.

[0123] 측정될 수 있는 종양 공격성 표현형들의 다른 예는, 장벽(barrier)을 통과하는 능력이다. 바람직하게는, 종양 세포들은 장벽을 통과하지 못하도록 방해받는다. 상기 종양 세포들에 대한 장벽은 시험관내의 인공 장벽 또는 생체내의 천연 장벽일 수 있다. 시험관내 장벽들은, 제한되지는 않지만, Matrigel과 같은 세포외 매트릭스 코팅 멤브레인을 포함한다. 따라서, 종양 세포들은, Parish, C. R., et al., "A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells, " Int. J. Cancer (1992) 52:378-383에 상세히 기재된 바와 같은 Matrigel 침투 분석 시스템에서, 그들의 종양 세포 침투 억제 능력에 대해 테스트된다. Matrigel은, 타입 IV 콜라겐, 라미닌(laminin), bFGF에 결합하여 bFGF를 국소화하는 퍼레칸(perlecan)과 같은 세포외 매트릭스 단백질, 비트로넥틴 뿐 아니라, 종양증식인자-베타(TGF-β), 유로키나아제-타입 플라스미노겐 활성화인자(uPA), 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA), 및 플라스미노겐 활성화인자 억제제 타입 1(PAI-1)로 알려진 세르핀(serpin)을 포함하는 재구성된 기저막이다. 전이(metastasis)를 위한 다른 시험관내 분석 및 생체내 분석은 선행 문헌, 예로서 1999년 8월 10일에 등록된 미국특허등록 번호 제 5,935,850호에 기재되어 있고, 상기 특허는 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다. 생체내 장벽은 대상의 신체 내에 존재하는 세포외 장벽을 의미한다.

[0124] 종양의 증식 특징들 또한 종양 공격성 표현형들(예를 들어, 개체군 배가능(population doubling capability), 배가 시간(doubling time), 세포노화까지의 세대배양(passages to senescence))로서의 역할을 할 수 있다. 또한, 유전자 발현 프로파일링(예를 들어, 유전자 칩 어레이; 종합효소 연쇄반응(예를 들어, 역전사효소 PCR, 실시간 PCR, 및 일반 PCR))이 종양 공격성 표현형들을 분석하기 위해 사용될 수 있다.

[0125] 본 발명에 의해 고려될 수 있는 추가의 분석법들은 Pouliot N, Pearson HB, Burrows A. Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000에 요약되어 있고, 이의 내용은 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된다.

[0126] 종양 공격성과 연관되어 증가되는 암 세포 마커들의 예로는, 증식 마커들(예로서, *KI67*, *E2F2*, 및 *CDK1*), 자가 재생 폴리콤(polycomb) 유전자들(예로서, *BMI1*, *TOP2A*, 및 *EZH2*), 및 전이 표지 유전자들(metastasis signature genes; 예로서, *SPARC*, *CXCR4* 및 *LTBP1*)이 포함된다.

[0127] 본 발명의 상기 측면에 따른 방법을 수행함으로써 암 세포들의 제2 개체군에 대하여 암 세포들의 제1 개체군에서 암 줄기세포들을 농축하는 것이 가능해 진다는 것이 인식될 것이다. 본 발명은 암 줄기세포들의 농축 수준을 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 10배 이상, 15배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상 또는 심지어 100배 이상까지로 하는 것을 포함한다.

[0128] 종양 세포들의 제2 개체군에서의 암 줄기세포 수는 1000개의 종양 세포들에서 1 미만, 2000개의 종양 세포들에서 1 미만, 3000개의 종양 세포들에서 1 미만, 4000개의 종양 세포들에서 1 미만, 5000개의 종양 세포들에서 1 미만, 6000개의 종양 세포들에서 1 미만, 7000개의 종양 세포들에서 1 미만, 8000개의 종양 세포들에서 1 미만, 9000개의 종양 세포들에서 1 미만, 10000개의 종양 세포들에서 1 미만일 수 있다.

[0129] 종양 세포들의 제1 개체군에서의 암 줄기세포의 수는 전형적으로 1000개의 종양 세포들에서 1 초과, 900개의 종양 세포들에서 1 초과, 800개의 종양 세포들에서 1 초과, 700개의 종양 세포들에서 1 초과, 600개의 종양 세포들에서 1 초과, 500개의 종양 세포들에서 1 초과, 400개의 종양 세포들에서 1 초과, 300개의 종양 세포들에서 1 초과, 200개의 종양 세포들에서 1 초과, 100개의 종양 세포들에서 1 초과 또는 심지어 10개의 종양 세포들에서 1 초과이다.

- [0130] 바람직하게는, 종양 세포들의 제1 개체군에서의 암 줄기세포:비-암 줄기세포의 비율(즉, 암 줄기세포의 빈도수)은 허용가능한 표지:노이즈의 비율로써 유전자 발현 분석에 의해 마커들을 검출하는 것을 가능하게 하는 정도이다. 항원의 양의 증가는 세포 당 항원 양(예로서, 세포 당 폴리펩타이드의 발현수준)의 증가에 기인할 수 있고, 그리고/또는 항원을 포함하는 세포의 빈도(예로서, 상기 폴리펩타이드를 발현하는 세포들의 수)의 증가에 기인할 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0131] 종양 세포들의 제2 개체군에서의 항원의 양에 비교하여, 종양 세포들의 제1 개체군에서의 항원의 양의 전체적인 증가는, 전형적으로 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배 또는 심지어 적어도 5배이다.
- [0132] 상기 항원을 포함하는 세포의 빈도수의 증가는 2배 증가, 3배 증가, 4배 증가, 5배 증가, 6배 증가, 7배 증가, 8배 증가, 9배 증가, 10배 증가, 20배 증가, 30배 증가, 40배 증가, 50배 증가, 60배 증가, 70배 증가, 80배 증가, 90배 증가, 100배 증가 또는 그 이상일 수 있다.
- [0133] 단백질의 발현을 분석하는 방법들이 이하에 제공된다. 그 방법은 RNA 수준 또는 단백질 수준에 대해 수행될 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0134] **RNA의 발현 수준을 검출하는 방법**
- [0135] 본 발명의 일부 구체예들에서, 세포들에서의 RNA의 발현 수준은 당 분야에 공지된 방법들을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0136] **노던 블롯 분석 (Northern Blot analysis):** 본 방법은 RNA 혼합물에서 특정 RNA를 검출하는 것을 포함하는 방법이다. RNA 샘플은, 염기쌍 간에 수소결합을 방지하는 시약(예로서, 포름알데하이드)으로 변성 처리되어, 모든 RNA 분자들이 접하지 않은(unfolded) 선형 구조를 갖도록 한다. 그런 다음, 개개의 RNA 분자들은 겔 전기영동에 의해 크기별로 분리되어, 니트로셀룰로오스 또는 나일론계 멤브레인으로 옮겨져서 거기에 변성된 RNA가 부착된다. 그 후, 상기 멤브레인은 표지된 DNA 프로브들에 노출된다. 프로브들은 방사성 동위원소들 또는 효소 연결 뉴클레오타이드들을 사용하여 표지될 수 있다. 검출은 방사선자동사진법(autoradiography), 발색 반응(colorimetric reaction) 또는 화학발광(chemiluminescence)을 사용하여 수행될 수 있다. 이 방법은, 전기영동 동안 겔에서의 이동 거리의 지표인 상대적 위치에 의해, 특정 RNA 분자들의 정량 및 그것의 동정을 모두 가능하게 한다.
- [0137] **RT-PCR 분석:** 이 방법은 상대적으로 수가 적은 RNA 분자들의 증폭에 사용된다. 우선, RNA 분자들은 세포들로부터 정제되어, 역전사효소(예로서, MMLV-RT) 및 올리고 dT, 랜덤 헥사머들 또는 유전자 특이 프라이머들과 같은 프라이머들을 사용하여 상보적 DNA(cDNA)로 전환된다. 그런 다음, 유전자 특이 프라이머 및 Taq DNA 폴리머라아제를 적용함으로써, PCR 기기에서 PCR 증폭 반응이 수행된다. 당분야의 기술자들은, 특이적 RNA 분자들의 검출에 적합한 유전자 특이 프라이머들의 길이와 서열 및 PCR 조건들(즉, 어닐링 온도, 사이클수 등)을 선택할 수 있다. 반정량적 RT-PCR 반응은 PCR 사이클수를 조절하고, 공지의 대조군들과 증폭산물을 비교함으로써 수행될 수 있다는 것이 인식될 것이다.
- [0138] **RNA 인시튜 혼성염색법(in situ hybridization stain):** 이 방법에서, DNA 또는 RNA 프로브들이 세포들 내에 존재하는 RNA 분자들에 부착된다. 일반적으로, 상기 세포들은 우선 세포 구조를 보존하고, RNA 분자들이 분해되는 것을 방지하기 위하여 현미경 슬라이드에 고정되고, 그런 다음 표지 프로브를 포함하는 혼성화 버퍼(hybridization buffer)에 노출된다. 상기 혼성화 버퍼는, 포름아마이드, 및 프로브의 비특이적 결합을 방지하면서, 타겟이 되는 mRNA 분자들을 인시튜로 DNA 또는 RNA 프로브들과 특이적으로 혼성화할 수 있는 염들(예로서, 소듐클로라이드 및 소듐시트레이트)과 같은 시약들을 포함한다. 당분야의 기술자들은 특이적 프로브들 및 세포들의 타입에 따라 혼성화 조건들(즉, 온도, 염 및 포름아마이드의 농도 등)을 조절할 수 있다. 혼성화 후에, 임의의 비결합 프로브는 세척하여 제거되고, 결합 프로브는 공지의 방법들을 사용하여 검출된다. 예를 들어, 방사성 동위원소로 표지된 프로브가 사용된 경우에는, 상기 슬라이드는 방사성 동위원소로 표지된 프로브들을 사용하여 생성된 시그널들을 나타내어주는 인화성(photographic) 에멀전으로 처리된다; 상기 프로브가 효소로 표지된 경우에는, 발색 반응의 형성을 위하여 효소 특이적 기질이 첨가된다; 상기 프로브가 형광성 표지로 표지된 경우에는, 결합된 프로브는 형광 현미경을 사용하여 나타내어진다; 상기 프로브가 태그(예로서, 디곡시게닌(digoxigenin), 비오틴 등)를 사용하여 표지된 경우에는, 결합된 프로브는 공지의 방법으로 검출될 수 있는 태그-특이적 항체와의 상호반응으로 검출될 수 있다.
- [0139] **인시튜(in situ) RT-PCR 염색:** 이 방법은 Nuovo GJ, et al. [Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. Am J Surg Pathol. 1993, 17: 683-90] 및 Komminoth P,

et al. [Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* RT-PCR. Pathol Res Pract. 1994, 190: 1017-25]에 기술되어 있다. 요약하면, RT-PCR 반응은 표지된 뉴클레오타이드를 PCR 반응에 도입함으로써 고정된 세포들(fixed cells) 상에서 수행된다. 상기 반응은, Arcturus Engineering사(Mountainview, CA)의 레이저-캡처 현미해부 PixCell I LCM 시스템과 같은 인시튜 RT-PCR 장치를 사용하여 수행된다.

[0140] **DNA 마이크로어레이(microarrays)/DNA 칩(chips):** 수천개의 유전자들의 발현은 DNA 마이크로어레이들을 사용하여 동시에 분석될 수 있고, 이에 의해 특이적 진행 과정 또는 생리학적 반응 동안에 유기체의 완전한 전사 프로그램의 분석이 가능해진다. DNA 마이크로어레이들은 유리제 현미경 슬라이드와 같은 지지체의 표면 상에 밀접하게 패킹된 면적에 부착된 수천개의 개개의 유전자 서열들로 구성된다. 다양한 방법들이 DNA 마이크로어레이를 제조하기 위해 개발되어왔다. 하나의 방법에 있어서, 분석을 위한 각 유전자의 코딩 영역의 약 1 킬로베이스(kilobase) 단편(segment)이 개별적으로 PCR 증폭된다. 각각의 증폭된 DNA 샘플을 유리제 현미경 슬라이드의 표면 상의 밀접하게 간격을 둔 구역들(closely spaced zones)에 적용하기 위하여, 로봇식 장치가 사용되고, 이어서 상기 지지체의 상기 표면에 DNA 서열들을 결합시켜 그들을 변성시키기 위하여 열화학적 처리를 수행한다. 전형적으로, 그러한 어레이들은 약 2 x 2 cm 크기이고, 약 6000 스폿(spots)의 개별 핵산들을 포함한다. 상기 기술의 하나의 변형예에서는, 지지체의 표면에 공유결합된 초기 뉴클레오타이드로부터 통상 20 뉴클레오타이드 길이의 다중 DNA 올리고뉴클레오타이드가 합성되어, 수만개의 동등한 올리고뉴클레오타이드가 상기 지지체의 표면 상의 작은 사각형 구역 내에서 합성된다. 단일 유전자로부터 유래된 다중 올리고뉴클레오타이드 서열들이 상기 유전자의 발현을 분석하기 위한 슬라이드의 인접 영역들에서 합성된다. 따라서, 수천개의 유전자들이 하나의 유리 슬라이드 상에서 나타날 수 있다. 합성 올리고뉴클레오타이드들의 그러한 어레이들은 상기한 [Lodish et al. (eds.). Chapter 7.8: DNA Microarrays: Analyzing Genome-Wide Expression. In: Molecular Cell Biology, 4th ed., W. H. Freeman, New York. (2000)]에 기재된 바와 같이, 당분야에서 "DNA 마이크로어레이들"과는 다르게 "DNA 칩들"로 언급될 수 있다.

[0141] **올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이(Oligonucleotide microarray)** - 이 방법에서는, 본 발명의 일부 구체예들의 폴리뉴클레오타이드들과 특이적으로 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브들이 고체 표면(예를 들어, 유리 웨이퍼)에 부착된다. 각각의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 약 20~25 핵산 길이이다. 특정 세포 샘플(예를 들어, 혈액 세포들)에서 본 발명의 일부 구체예들의 폴리뉴클레오타이드들의 발현 패턴을 검출하기 위하여, 당분야에서 공지된 방법들(예를 들어, TRIZOL 용액, Gibco BRL, USA)을 사용하여, 상기 세포 샘플로부터 RNA가 추출된다. 혼성화(Hybridization)는 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브들(예로서, 5'-비오틀화 프로브들), 또는 상보 DNA(cDNA) 또는 상보 RNA(cRNA)의 표지된 단편들을 사용하여 수행될 수 있다. 요약하면, 제조사(Invitrogen Life Technologies, Frederick, MD, USA)의 지시사항에 따라, 이중가닥 cDNA는 역전사효소(RT)(예를 들어, Superscript II RT), DNA 리가아제 및 DNA 폴리머라아제 I로부터 제조된다. 표지된 cRNA를 제조하기 위하여, 상기 이중가닥 cDNA는 비오틀화 뉴클레오타이드의 존재하에, 예를 들어 BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo, Diagnostics, Affymetrix Santa Clara CA)를 사용하여 시험관내 전사 반응에 적용된다. 효율적인 혼성화를 위하여, 표지된 cRNA는, 40 mM 트리스 아세테이트(pH 8.1), 100 mM 포타슘 아세테이트 및 30 mM 마그네슘 아세테이트 중에서 35분간 94℃에서 상기 RNA를 인큐베이팅함으로써 단편화될 수 있다. 혼성화 후에, 마이크로어레이는 세척되고, 혼성화 시그널은 상기 프로브 어레이들에 결합된 표지된 cRNA에 의해 방출된 형광 강도를 측정하는 공초점형 레이저 형광스캐너를 사용하여 스캔된다.

[0142] 예를 들어, Affymetrix 마이크로어레이(Affymetrix®, Santa Clara, CA)에서, 어레이 상의 각 유전자는 일련의 다른 올리고뉴클레오타이드 프로브들에 의해 나타내어지고, 각 프로브 쌍은 완전일치형(perfect match) 올리고뉴클레오타이드 및 불일치형(mismatch) 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 완전-매치형 프로브는 특정 유전자에 정확히 상보적인 서열을 가짐으로써 상기 특정 유전자의 발현 수준의 측정을 가능하게 하는 반면, 불일치형 프로브는 중앙 염기 위치에서 하나의 염기 치환에 의해 완전일치형 프로브와 구별된다. 상기 혼성화 시그널은 Agilent 스캐너를 사용하여 스캔되고, Microarray Suite software는 완전일치형 프로브로부터의 시그널로부터 불일치형 프로브로부터의 비-특이적 시그널을 제외시킨다.

[0143] **단백질 발현 및/또는 활성의 검출방법**

[0144] 본 발명의 일부 구체예들의 배양물 중의 세포들에서 발현된 단백질들의 발현 및/또는 활성 수준은 당분야에서 공지된 방법들을 사용하여 결정될 수 있다.

- [0145] **효소 표지 면역분석법(ELISA):** 이 방법은 단백질 기질을 포함하는 샘플(예로서, 고정 세포들 또는 단백질 용액)을 미세적정판(microtiter plate)의 웰(well)과 같은 표면에 고정화(fixation)하는 것을 포함한다. 효소에 결합된 기질 특이적 항체가 상기 기질에 적용되어 기질에 결합된다. 그런 다음, 상기 항체의 존재가 검출되고, 상기 항체에 결합된 효소를 적용하는 발색 반응에 의해 정량화된다. 이 방법에 통상 사용되는 효소들에는 겨자 무과산화효소(horseradish peroxidase) 및 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 포함된다. 잘 보정되고, 반응의 선형 범위 내에 있다면, 상기 샘플 중에 존재하는 기질의 양은 발색된 색의 양에 비례한다. 정량적 정확도를 향상시키기 위하여, 일반적으로 기질 표준이 사용된다.
- [0146] **웨스턴 블롯(Western blot):** 이 방법은 아크릴아마이드 겔을 이용하여 다른 단백질로부터 기질을 분리한 후, 상기 기질을 멤브레인(예로서, 나일론 또는 PVDF)으로 이동시키는 것을 포함한다. 그런 다음, 상기 기질의 존재는 상기 기질에 특이적인 항체들에 의해 검출되고, 상기 항체들은 항체 결합 시약들(antibody binding reagents)에 의해 검출된다. 항체 결합 시약들은, 예를 들어 단백질 A, 또는 다른 항체들일 수 있다. 항체 결합 시약들은 상기 기에 기재한 바와 같이 방사성동위원소로 표지되거나 효소로 표지될 수 있다. 검출은 방사선자동사진법, 발색 반응 또는 화학발광에 의해 수행될 수 있다. 이 방법은 전기영동 동안 아크릴아마이드 겔에서의 이동 거리의 지표인, 멤브레인 상에서의 상대적 위치에 의해, 기질의 양의 정량화 및 그것의 동정을 모두 가능하게 한다.
- [0147] **방사성동위원소 표지 면역검정법(Radio-immunoassay, RIA):** 일 형태에서, 이 방법은 특이적 항체 및 아가로스 비드와 같은 침전성 담체(carrier)상에 고정된 방사성동위원소 표지 항체 결합 단백질(예로서, I^{125} 로 표지된 단백질 A)을 이용하여 원하는 단백질(예를 들어, 기질)을 침전시키는 것을 포함한다. 침전된 펠렛의 수는 기질의 양에 비례한다.
- [0148] RIA의 다른 형태에서는, 표지된 기질 및 표지되지 않은 항체 결합 단백질이 사용된다. 미지의 양의 기질을 포함하는 샘플이 다양한 양으로 첨가된다. 표지된 기질로부터 침전된 수의 감소는 첨가된 샘플 중의 기질의 양에 비례한다.
- [0149] **형광표지세포 분류 분석법(Fluorescence activated cell sorting, FACS):** 이 방법은 기질 특이적 항체들에 의해 인시튜로 기질을 검출하는 것을 포함한다. 상기 기질 특이적 항체들은 형광물질(fluorophores)로 표지된다. 검출은 광 빔(light beam)을 통과하는 각 세포로부터 방출된 광의 파장을 판독하는 세포 분류기를 이용하여 수행된다. 이 방법은 둘 이상의 항체들을 동시에 사용할 수 있다.
- [0150] **면역조직화학 분석법(Immunohistochemical analysis):** 이 방법은 기질 특이적 항체들에 의해 고정 세포들에서 인시튜로 기질을 검출하는 것을 포함한다. 상기 기질 특이적 항체들은 효소 표지 또는 형광 표지될 수 있다. 검출은 현미경 관찰 및 주관적(subjective) 평가 또는 자동 평가에 의해 수행된다. 효소 표지 항체들이 사용되는 경우, 발색 반응이 필요할 수 있다. 흔히, 면역조직화학 분석에 이어서, 예를 들어 헤마톡실린(Hematoxyline) 또는 김자액(Giemsa) 염색을 이용한 세포핵의 대비염색(counterstaining)이 수행된다.
- [0151] **인시튜 활성 분석법(In situ activity assay):** 이 방법에 따르면, 발색성 기질이 활성 효소를 포함하는 세포들에 적용되고, 상기 효소는 반응을 촉매하여 상기 기질을 분해시켜 광(light) 또는 형광현미경에 의해 볼 수 있는 발색성 산물을 생성한다.
- [0152] **시험관내 활성 분석법(In vitro activity assays):** 이 방법에서는, 세포들로부터 추출된 단백질 혼합물에서 특정 효소의 활성이 측정된다. 상기 활성은 발색 방법들을 사용하여 분광광도계로 측정될 수 있거나 또는 비-변성 아크릴아마이드 겔(즉, 활성 겔)에서 측정될 수 있다. 전기영동에 이어서, 겔을 기질 및 발색 시약들을 포함하는 용액에 침지한다. 결과의 염색된 밴드는 목적하는 단백질의 효소 활성에 대응된다. 잘 보정되고, 반응의 선형 범위 내에 있다면, 상기 샘플 중에 존재하는 효소의 양은 발색된 색의 양에 비례한다. 정량적 정확도를 향상시키기 위하여, 일반적으로 효소 표준이 사용된다.
- [0153] 일단 암 줄기세포 마커들이 동정되면, 본 발명의 발명자들은 그러한 마커들이 암 줄기세포들의 분리를 위해 사용될 수 있다는 것을 고려한다. 고려된 방법들은 원심분리에 기초한 방법들, 세정법(elutriation), 밀도 구배 분리법, 분리반출법(apheresis), 친화도 선별법, 비중 선별법(panning), 형광 활성화 세포 분류법(FACS)과 같은 면역학적 시스템; 면역친화 교환법(immunoaffinity exchange); 원하는 세포들을 분리하기 위하여 특정 세포 타입에 결합하는 항체-코팅 자성 미립자들을 이용하는 자성 세포분류법을 포함하는 비광학적(non-optical) 세포 분류법을 포함한다.
- [0154] 추가적으로, 본 발명은 처리를 목적으로 CSC 마커들을 표적화하는 것을 포함한다.

- [0155] 또한, 본 발명자들은 진단을 목적으로 상기 마커들의 존재 및/또는 수준을 분석하고, 최적의 처리를 결정하고, 처리 효율을 모니터링하고, 그리고/또는 스테이징(staging)하는 것을 제시한다.
- [0156] 따라서, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 대상 환자의 종양에서 항원의 존재를 분석하는 것을 포함하는, 대상 환자에게서 암을 진단하는 방법이 제공되고, 상기 항원의 존재는 암의 표지자가 되고, 상기 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 종양의 일차 세포들의 비율은 미리 결정된 수준 이상이다.
- [0157] 본 명세서에서 사용된 용어 "진단(diagnosing)"은 암을 갖고 있는 대상으로분류(categorizing)하는 것을 의미하고, 이는 암을 분류하고, 암의 심각도(등급 또는 단계)를 결정하고, 암의 진행을 모니터링하고, 암의 결과를 예상하고, 그리고/또는 회복을 전망하는 것을 포함한다.
- [0158] 본 발명의 방법들은 겉으로는 건강한 개인들의 초기 암을 검출하는데 특히 유용하다.
- [0159] 상기 대상은 건강한 동물 또는 규칙적으로 건강 검사를 받는 인간일 수 있다. 또는, 상기 대상은 암에 걸릴 위험(예를 들어, 유전적 경향이 있는 대상, 암 병력 및/또는 가족 암병력이 있는 대상, 발암물질, 직업적 위험, 환경적 위험에 노출되어온 대상, 및/또는 암의 임상적 의심 증상을 나타내는 대상[예를 들어, 혈변 또는 흑색변, 원인불명 통증, 발한, 원인불명 발열, 식욕감소에 이르는 원인불명 체중감소, 배변 습관의 변화(변비 및/또는 설사), 이급후증(tenesmus)(직장암에 특이적 증상인 불완전한 배변감), 빈혈 및/또는 전반적인 허약함)에 놓여있을 수 있다.
- [0160] CSC의 양은 암의 종류 및 단계에 따라 달라질 수 있다. 일부 구체예들에서, CSC 마커의 수준은 암의 표지자이다. 다른 구체예들에서, CSC 마커의 존재(그 수준에 관계없이)는 암의 표지자이다.
- [0161] 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 항원:종양의 일차세포들의 발현 비율은 적어도 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 50:1 또는 심지어 적어도 100:1 보다 크다.
- [0162] 상기 종양의 생체내 계대배양된 세포들은, 바람직하게는 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회, 적어도 10회, 적어도 11회, 적어도 12회, 적어도 13회, 적어도 14회, 적어도 15회, 적어도 16회, 적어도 17회, 적어도 18회, 적어도 19회, 적어도 20회 계대배양된 것이다.
- [0163] CSC 마커의 발현을 분석하는 것은 상기에서 언급한 방법들을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0164] 특정 구체예에 따르면, 상기 분석은 CSC 마커를 인식하는 항체를 사용하여 실현된다.
- [0165] 다양한 타입의 검출가능한 성분들(moieties) 또는 리포터 성분들이 상기 항체에 컨쥬게이션될 수 있다. 이들은, 제한되지는 않지만, 방사성 동위원소(예로서, ¹²⁵요오드), 인광성 화학물질, 화학발광성 화학물질, 형광성 화학물질(발형광단; fluorophore), 효소, 형광성 폴리펩타이드, 친화성 태그(affinity tag), 및 양전자 방출 단층촬영(Positron Emission Tomography; PET) 또는 자기공명영상(MRI)에 의해 검출될 수 있는 분자들(조영제들)을 포함한다.
- [0166] 적합한 발형광단의 예로는, 제한되지는 않지만, 피코에트린(phycoerythrin; PE), 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate; FITC), Cy-크롬(Cy-chrome), 로다민(rhodamine), 그린 형광성 단백질(green fluorescent protein; GFP), 블루 형광성 단백질(blue fluorescent protein; BFP), 텍사스 레드(Texas red), PE-Cy5 등이 포함된다. 발형광단의 선택, 발형광단을 다양한 타입의 분자들에 연결하는 방법들에 관한 추가적인 안내는 Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5th ed., Molecular Probes, Inc. (1994); U.S. Pat. No. 6,037,137 to Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press New York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995. Biochemistry 34:293; Stubbs *et al.*, 1996. Biochemistry 35:937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer," in "Receptors: A Practical Approach," 2nd ed., Stanford C. and Horton R. (eds.), Oxford University Press, UK. (2001); U.S. Pat. No. 6,350,466 to Targesome, Inc.]에 기재되어 있다. 형광 검출가능 성분에 컨쥬게이트된 항체를 검출하기 위해 사용될 수 있는 형광 검출 방법들은, 예를 들어 형광 활성화 유세포분석기(fluorescence activated flow cytometry; FACS), 면역형광법 공초점 현미경(immunofluorescence confocal microscopy), 인시튜 형광혼성화(fluorescence *in-situ* hybridization; FISH) 및 형광 공명에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET)를 포함한다.

- [0167] 다양한 타입의 효소들[예를 들어, 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase; HPR), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 및 알칼린 포스파타아제(alkaline phosphatase; AP)]이 항체에 부착될 수 있고, 효소-컨쥬게이트된 항체들의 검출은 ELISA(예를 들어, 용액 중에서), 효소 표지 면역조직학적 분석(예를 들어, 고정된 조직에서), 효소 표지 화학발광 분석(예를 들어, 전기영동으로 분리된 단백질 혼합물에서) 또는 당분야에서 공지된 다른 방법들[예를 들어, Khatkhatay MI. and Desai M., 1999. J Immunoassay 20:151-83; Wisdom GB., 1994. Methods Mol Biol. 32:433-40; Ishikawa E. *et al.*, 1983. J Immunoassay 4:209-327; Oellerich M., 1980. J Clin Chem Clin Biochem. 18:197-208; Schuurs AH. and van Weemen BK., 1980. J Immunoassay 1:229-49 참조]을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0168] 동정될 수 있는(identifiable) 성분들(moieties)의 예로는, 제한되지는 않지만, 그린 형광성 단백질, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 히스티딘 태그, 비오틴, 오렌지 형광성 단백질 및 스트레파비딘(streptavidin)을 포함한다.
- [0169] CSCs의 동정은, 개인별로 최적화된 암 치료, 치료 대상에 대한 항암 치료의 모니터링, 치료 대상을 위한 항암 치료의 결정, 및 암을 치료할 수 있는 치료 제제의 결정에 관한 다양한 적용법을 갖는다는 것이 인식될 것이다.
- [0170] 따라서, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 암 치료의 적용에 있어서 치료 대상의 일차 종양에서의 항원의 양을 분석하는 것을 포함하는 치료 대상에 대한 암 치료의 모니터링 방법이 제공되고, 이 방법에서 암 치료 적용 전의 상기 항원의 수준과 비교하여 상기 항원의 수준의 감소는 치료적 효과의 지표가 되고, 상기 종양의 생체내 계대배양된 세포들에서의 상기 항원의 양:상기 종양의 일차 세포들에서의 상기 항원의 양의 비율은 미리 결정된 수준 이상이다.
- [0171] 본 발명의 상기 측면에 따라 분석되어질 암 치료는, 후술되는 바와 같이, 치료 제제 또는 치료 조건일 수 있다.
- [0172] 본 명세서에서 사용된 용어 "제제(agent)"는 생물학적 제제 또는 화학적 제제를 포함하는 시험 조성물을 의미한다.
- [0173] 본 발명의 방법에 따라서 잠재적 항암제로서 시험될 수 있는 생물학적 제제의 예로는, 제한되지는 않지만, 핵산, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, siRNA 및 안티센스 분자들(제한없이, RNA, DNA, RNA/DNA 혼성체(hybrids), 펩타이드 핵산, 및 변경된 주쇄 및/또는 염기 구조 또는 다른 화학적 변경을 갖는 폴리뉴클레오타이드 유사체를 포함함); 단백질, 폴리펩타이드(예를 들어, 펩타이드들), 탄화수소물, 지질 및 "소분자(small molecule)" 의약 후보들(drug candidates)을 포함한다. "소분자"는, 예를 들어 천연적으로 발생하는 화합물들(예를 들어, 식물 추출물, 미생물 브로스(broth)등으로부터 유래된 화합물들), 또는 약 10,000 달톤 미만, 바람직하게는 약 5,000 달톤 미만, 및 가장 바람직하게는 약 1,500 달톤 미만의 분자량을 갖는 합성 유기화합물들이나 합성 유기금속화합물들일 수 있다.
- [0174] 본 발명의 방법에 따라서 잠재적 항암제들에 대한 시험 조건들의 예로는, 제한되지는 않지만, 방사선 노출(예를 들어, 감마선 조사, UV 조사, X선 조사)이 포함된다.
- [0175] 본 발명의 상기 측면에 따르면, "CSC 마커"는 또한 암 치료 이전 및 이후에 비교가 수행될 수 있도록, 암 치료의 적용 전에 분석된다.
- [0176] 본 발명의 상기 측면의 다른 구체예에 따르면, 상기 제제는 항암 효과를 나타내기에 충분히 긴 기간동안 암 세포들에 적용된다.
- [0177] 상기한 바와 같이, 암 줄기세포 마커들의 동정은 또한 그러한 마커들을 발현하는 암의 치료를 가능하게 한다.
- [0178] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료(treating)"는 상태의 진행을 멈춤(abrogating), 실질적으로 억제, 지연(slowing) 또는 역전(reversing)시키는 것, 상태의 임상적 또는 심미적(aesthetical) 증상들을 실질적으로 개선시키는 것, 또는 상태의 임상적 또는 심미적 증상들의 출현을 실질적으로 방지하는 것을 포함한다.
- [0179] 암 줄기세포 마커들이 세포 표면 항원인 경우, 본 발명의 발명자들은 상기 마커들에 결합할 수 있는 분자들(예를 들어, 항체들)을 사용하여, 치료 성분들(therapeutic moieties)을 해당 세포들에 표적화하는 것을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 상기 치료 성분은, 예를 들어 세포독성 성분, 독성 성분, 시토킨 성분 및 본 발명의 항체들에 대해 다른 특이성을 포함하는 제2 항체 성분일 수 있다.

[0180] 바람직하게는, 상기 항체는 CSC 마커의 적어도 하나의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "에피토프(epitope)"는 항체의 파라토프(paratope)가 결합하는 항원에 대한 임의의 항원결정기(antigenic determinant)를 의미한다.

[0181] 에피토프 결정기들(epitopic determinants)은 일반적으로 아미노산 또는 탄화수소 측쇄와 같은 분자들의 화학적 활성 표면 그룹들로 구성되고, 일반적으로 비전하(specific charge) 특성뿐 아니라, 특이적인 3차원 구조적 특성들을 갖는다.

[0182] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 완전한 분자뿐 아니라, 그들의 기능적 단편들, 예를 들어 매크로파지에 결합할 수 있는 Fab, F(ab')₂, 및 Fv를 포함한다. 이들 기능적 항체 단편들은 다음과 같이 정의된다: (1) Fab, 항체 분자의 일가(monovalent) 항원-결합 단편을 포함하는 단편으로서, 완전한 경쇄 및 하나의 중쇄의 일부를 수득하기 위해 효소 과파인으로 전체 항체를 소화시킴으로써 생성될 수 있다; (2) Fab', 완전한 경쇄 및 중쇄의 일부를 수득하기 위하여, 전체 항체를 펩신으로 처리한 다음 환원시켜 얻어질 수 있는 항체 분자의 단편; 항체 분자 당 2개의 Fab' 단편들이 얻어진다; (3) (Fab')₂, 전체 항체를 효소 펩신으로 처리하고, 추가의 환원처리 없이 얻어질 수 있는 항체의 단편; F(ab')₂는 2개의 디설파이드 결합에 의해 함께 결합된 2개의 Fab' 단편들의 이량체이다; (4) Fv, 경쇄의 가변영역 및 2개의 사슬로 발현되는 중쇄의 가변영역을 포함하는 유전자 조작된 단편으로서 정의된다; 그리고, (5) 단일쇄 항체("SCA"), 적절한 폴리펩타이드 링커에 의해 연결되어 유전적으로 융합된 단일쇄를 이루는, 경쇄의 가변영역 및 중쇄의 가변영역을 포함하는 유전자 조작된 분자.

[0183] 본 발명의 항체에 컨쥬게이트될 수 있는 치료 성분의 비제한적 예들이 하기 표 1에 제시되어 있다.

[0184] [표 1]

치료성분 (Therapeutic moiety)	아미노산 서열	핵산 서열
슈도모나스 엑소톡신	ABU63124	EU090068
디프테리아 독신	AAV70486	AY820132.1
인터류킨 2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	NP_000560.5	NM_000569.6
인터류킨 4	NP_000580.1	NM_000589.2
HLA-A2	P01892	K02883
인터류킨 10	P22301	M57627
라이신(Ricin) 독신	EEF27734	EQ975183

[0185]

[0186] 치료 성분은 또한, 펩타이드 결합(기능 성분이 폴리펩타이드인 경우)을 통해, 또는 링커 펩타이드 또는 유기 폴리머와 같은 다른 화학 성분과 같은 개재성 링커 요소에의 공유결합을 통해, 직간접의 임의의 적절한 화학 연결을 사용하는 것과 같은 당분야에서 널리 실시되는 표준 화학 합성 기술들을 사용하여, 본 발명의 항체에 부착될 수 있다[예를 들어, [hypertexttransferprotocol://worldwideweb\(dot\)chemistry\(dot\)org/portal/Chemistry](http://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/Chemistry)] 참조], 키메릭 펩타이드는 펩타이드의 카복실 말단(C) 또는 아미노 말단(N)에서의 결합을 통해, 또는 직쇄형, 분지형 또는 고리형 측쇄, 내부 탄소원자 또는 질소원자 등과 같은 내부 화학기들에서의 결합을 통해 연결될 수 있다. 항체들의 형광 표지에 관한 설명은 미국특허 제 3,940,475호, 제4,289,747호 및 제4,376,110호에 상세히 기술되어 있다.

[0187] CSC 마커들을 인식하는 항체들은 세포독성 제제를 포함하는 입자들에 부착될 수 있다.

[0188] 본 명세서에서 사용된 용어 "캡슐화 입자(encapsulating particle)"는 하나 이상의 내부 기공을 형성하는 지질들 및/또는 지방산들로 조성된 하나 이상의 벽들(walls) 또는 멤브레인들의 존재로 특징되는 개체(entity)를 의미한다. 상기 벽들 또는 멤브레인들은 동심원 형태 또는 다른 형태일 수 있다. 소낭(vesicles)의 벽들 또는 멤브레인들은 실질적으로 고형(균질)일 수 있고, 또는 예를 들어 리포솜, 지방구(lipospheres), 나노리포솜(nanoliposomes), 입자, 교질입자(micelles), 기포, 미세기포, 미세구(microspheres), 나노구(nanospheres), 나노구조체(nanostructures), 마이크로벌룬(microballoons), 마이크로캡슐, 에어로겔, 클라트레이트(clathrate) 결합 비히클, 핵사고날/큐빅/핵사고날 II상 구조체 등으로 언급될 수 있다.

[0189] 상기 캡슐화 입자들에 포함되는 지질 성분은, 공지의 방법들에 따라서, 표적화 분자로 피복된(derivatized) 지질, 또는 미리 성형된 입자들 내에서 표적화 분자로 피복될 수 있는 극성-헤드(polar-head) 화학기를 갖는 지질들을 포함할 수 있다.

[0190] 표적화 성분을 캡슐화 입자들에 공유 부착시키는 다른 방법들은, 아마이드 결합, 에스테르 결합, 또는 에테르 결

합, 스트렙타아비딘 및 비오틴의 사용(예를 들어, 미국특허 제5,171,578호 참조), 및 폴리펩타이드를 카르보이미드로 활성화시킨 후, 활성화된 카르복실기에 커플링시키는 것(미국특허 제5,204,096호)을 포함한다. 지질에 폴리펩타이드를 공유결합시키는데 사용될 수 있는 다른 방법들의 예들은 미국특허 제 5,258,499호에 기재되어 있다.

- [0191] 또한, 본 발명은 암 치료에 사용될 수 있는 제제를 사용하여 CSC 마커의 발현을 하향조절(down-regulating)하는 것을 포함한다.
- [0192] 상기 하향조절은 단백질 수준(예로서, 중화 항체를 사용) 또는 RNA 수준(예로서, siRNA, DNAzyme, 리보자임, miRNA 등)에 대해 실현될 수 있다.
- [0193] 본 발명의 특정 측면에 따르면, 상기 암은 비정형 유기형/간상 종양(ATRT)이다. 이 암의 치료를 위해 사용될 수 있는 제제의 예로는, 다음의 폴리펩타이드들 중 적어도 하나를 표적화 (및 하향조절)함으로써 ATRT를 치료하는 제제들이 포함된다: 세마포린 3C (SEMA3C), 리실옥시다아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1).
- [0194] 따라서, ATRT의 치료에 사용될 수 있는 예시적 제제는 리실옥시다아제(LOX) - 예로서, β -아미노프로피오니트릴(BAPN)를 표적화 (및 하향조절)하는 제제이다.
- [0195] 상기 제제는 그 자체로서, 또는 약학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.
- [0196] 본 명세서에서 사용된 "약학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 명세서에서 기재된 하나 이상의 활성 성분들과 함께 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제들과 같은 다른 화학 성분들의 조제물을 의미한다. 약학적 조성물의 목적은 임의의 화합물을 유기체에 투여하는 것을 용이하게 하는 것이다.
- [0197] 본 명세서에 기재된 용어 "활성 성분(active ingredient)"은 생물학적 효과를 나타내는 성분을 의미한다.
- [0198] 이하에서, 서로 호환적으로 사용될 수 있는 용어들인 "생리학적으로 허용가능한 담체" 및 "약학적으로 허용가능한 담체"는 유기체에 심각한 자극(irritation)을 일으키지 않고, 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 성능을 방해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 보조제(adjuvant)도 상기 용어들의 범주에 포함된다.
- [0199] 본 명세서에 기재된 용어 "부형제(excipient)"는 활성 성분의 투여를 더욱 촉진하기 위하여 약학적 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 의미한다. 부형제의 예로서, 제한되지는 않지만, 칼슘카보네이트, 칼슘포스페이트, 여러 종류의 당류(sugars) 및 여러종류의 전분, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물유 및 폴리에틸렌글리콜류가 포함된다.
- [0200] 약물을 제제화하고 투여하기 위한 기술들은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에 기재되어 있고, 이는 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된다.
- [0201] 적합한 투여경로는, 예를 들어, 경구, 직장내, 점막흡수(transmucosal), 특히 경비(transnasal), 장내(intestinal) 전달, 또는 근육내, 피하, 골수내 주사뿐 아니라 척추강내, 직접적으로 심실내, 심장내, 예를 들어 우심실강 또는 좌심실강 내, 심장동맥내, 일반 관상동맥내, 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 안구내 주사를 포함하는 비경구(parenteral) 전달을 포함할 수 있다.
- [0202] 중추신경계(CNS)로 약물을 전달하기 위한 통상적인 접근법은 다음을 포함한다: 신경외과적 방법(예로서, 대뇌내 주사 또는 뇌혈관내 주입); BBB의 내생적 이송 경로들 중의 하나를 이용하기 위한, 제제의 분자 조작(molecular manipulation)(예로서, 그 자체로서 BBB를 통과할 수 있는 제제와 함께, 내피세포 표면 분자에 대한 친화성을 갖는 수송(transport) 펩타이드를 포함하는 키메릭 융합 단백질의 생성); 제제의 지용성을 증가시키기 위하여 설계된 약물학적 방법들(예로서, 지질 또는 콜레스테롤 담체에 수용성 제제를 컨쥬게이션함); 및 (목동맥 내로의 만니톨 용액의 주입 또는 안지오텐신 펩타이드와 같은 생물학적 활성 제제의 사용으로 인해 초래되는) 고삼투압성 분리에 의한 BBB의 완전성의 일시적 붕괴. 그러나, 상기 방법들의 각각은, 외과적 수술 과정과 관련된 내재적 위험성, 내생적 이송 시스템들에 내재된 한계에 의한 크기의 제한, CNA 외에서 활성적일 수 있는 담체 모티프를 포함하는 키메릭 분자의 전신 투여와 관련된 잠재적인 바람직하지 않은 생물학적 부작용, 및 BBB가 붕괴된 뇌의 영역 내에서의 뇌 손상의 잠재적 위험성과 같은 한계를 가짐으로 인하여, 그러한 방법은 차선적인 전달 방법이다.
- [0203] 대안으로서, 약학적 조성물은 전신 투여 대신에, 예를 들어 약학적 조성물을 환자의 조직 영역 내로 직접 주사하는 것을 통하여 국부적으로 투여될 수 있다.

- [0204] 본 발명의 약학적 조성물은 당분야에 잘 알려진 공정들, 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정화, 가루화(levigating), 에멀전화, 캡슐화, 트랩핑화(entrapping), 또는 동결건조 공정들에 의해 제조될 수 있다.
- [0205] 따라서, 본 발명에 따라 사용되기 위한 약학적 조성물들은, 활성 성분들을 제제화하는 것을 용이하게 하는 약학적으로 사용될 수 있는 부형제들 및 보조제들을 포함하는 생리학적으로 허용가능한 담체들을 사용하여, 통상의 방법으로 제제화될 수 있다. 적절한 제제화는 선택된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다.
- [0206] 주사 투여를 위해서는, 약학적 조성물의 활성 성분들은 수용액, 바람직하게는 행크 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution), 또는 생리학적인 염 완충액과 같은 생리학적으로 혼화가능한 완충액 내로 제제화될 수 있다. 점막흡수 투여를 위해서는, 침투되어야 할 장벽에 적합한 침투제들이 제제화에 사용된다. 그러한 침투제들은 당 분야에 일반적으로 알려져 있다.
- [0207] 경구 투여를 위해서는, 약학적 조성물은 당분야에 잘 알려진 약학적으로 허용가능한 담체들과 활성 화합물들을 조합함으로써 쉽게 제제화될 수 있다. 그러한 담체들은, 환자에 의한 경구 섭취를 위하여, 약학적 조성물을 정제, 환, 당의정(dragee), 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제제화하는 것을 가능하게 한다. 경구용 약물학적 제제는, 정제 또는 당의정 코어를 얻기 위하여, 필요하다면 적절한 보조제들을 첨가한 후에, 고체 부형제를 사용하여, 선택적으로 결과의 혼합물을 그라인딩하고, 과립 혼합물을 가공하여 제조될 수 있다. 적합한 부형제들은, 특히 락토오즈, 슈크로오즈, 만니톨, 또는 솔비톨을 포함하는 당류와 같은 필러들; 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 셀룰로오스 조제물; 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)과 같은 생리학적으로 허용가능한 폴리머들이다. 바람직하다면, 가교 폴리비닐피롤리돈, 한천, 또는 알긴산 또는 알긴산나트륨과 같은 그의 염과 같은 분해제들(disintegrating agents)이 첨가될 수 있다.
- [0208] 당의정 코어는 적절히 코팅되어 제공될 수 있다. 이를 위하여, 농축 당용액이 사용될 수 있고, 이는 선택적으로 아라비안 검, 탈크, 폴리비닐피롤리돈, 카보폴 젤, 폴리에틸렌글리콜, 이산화티타늄, 락커 용액 및 적합한 유기 용매들 또는 용매 혼합물들을 함유할 수 있다. 활성 화합물 투여물들의 서로 다른 조합물들을 확인 및 구별하기 위하여, 색소 또는 염료가 정제 또는 당의정 코팅에 첨가될 수 있다.
- [0209] 경구 투여로 사용될 수 있는 약학적 조성물들은, 젤라틴 및 글리세롤 또는 솔비톨과 같은 가소제로 제조된 연질의 밀봉 캡슐뿐 아니라 젤라틴으로 제조된 끼워맞춤형(push-fit) 캡슐을 포함한다. 끼워맞춤형 캡슐은 락토오즈와 같은 필러, 전분과 같은 바인더, 탈크 또는 마그네슘스테아레이트와 같은 윤활제, 및 선택적으로 안정화제와 활성 성분들의 혼합물을 포함할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분들은 지방산 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌글리콜과 같은 적합한 액체내에 용해 또는 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 경구 투여용 모든 제제들은 선택된 투여 경로에 적합한 투여량으로 제제화될 수 있다.
- [0210] 구강 투여를 위하여, 조성물은 통상의 방법으로 제제화된 정제 또는 로젠지(lozenges) 정제의 형태일 수 있다.
- [0211] 비강내 흡입에 의한 투여를 위하여, 본 발명에 따라 사용되는 활성 성분들은, 편리하게는, 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소를 사용하는 압력 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 압력 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양으로 투여하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 디스펜서(dispenser)에 사용하기 위한, 젤라틴 캡슐 및 젤라틴 카트리지는 활성 화합물 및 락토오즈 또는 전분과 같은 적절한 분말 베이스의 분말 믹스를 포함하여 제제화될 수 있다.
- [0212] 본 발명의 약학적 조성물은, 예를 들어 볼러스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여를 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제제는, 예를 들어, 선택적으로 첨가된 보존제를 포함하는 앰플 또는 다중투여 용기의 단위 투여 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물은 오일 비히클 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액, 또는 에멀전일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화 첨가제들을 포함할 수 있다.
- [0213] 비경구 투여용 약학적 조성물은 수용성 형태의 활성 조제물의 수성 용액을 포함한다. 추가적으로, 활성 성분들의 현탁액이 오일계 또는 수성계 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매들 또는 비히클들은 참기름, 또는 에틸올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르류와 같은 지방산 오일을 포함한다. 수성 주사 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 또는 텍스트린과 같은, 현탁액의 점도를 증가시키는 물질들을 포함할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 고농축 용액의 제조가 가능하도록, 활성 성분들의 가용성을 증가시키는 적합한 안정화제 또는 첨가제들을 포함할 수 있다.

- [0214] 선택적으로, 활성 성분들은 사용 전에는, 적합한 비히클, 예를 들어 발열물질(pyrogen)이 없는 살균된 수계 용액과 조합되어질 분말 형태일 수 있다.
- [0215] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은, 예를 들어 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드류와 같은 통상의 좌약 베이스를 사용하여, 좌약 또는 정제 관장제(retention enemas)와 같은 직장내 투여용 조성물로 제제화될 수 있다.
- [0216] 본 발명에서의 사용에 적합한 약학적 조성물들은 활성 성분들이 의도한 목적을 달성하기 위한 유효량으로 포함되어 있는 조성물들을 포함한다. 더욱 구체적으로는, 치료적 유효량이라 함은 장애 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나, 치료 대상 환자의 생존 기간을 연장하기에 효과적인 활성 성분들의 양을 의미한다.
- [0217] 치료적 유효량의 결정은, 특히 본 명세서에 개시된 상세 내용들에 근거하여, 당분야의 기술자들의 능력 범위 내에서 잘 이루어질 수 있다.
- [0218] 본 발명의 방법에 사용된 제제의 치료적 유효량 또는 투여량은 우선 시험관내 분석 및 세포 배양물 분석으로부터 결정될 수 있다. 예를 들어, 투여량은 원하는 농도 또는 역가(titer)를 달성하기 위하여 동물 모델에서 제제화될 수 있다. 그러한 정보는 인간에 대한 투여량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0219] 본 명세서에서 기재된 활성 성분들의 독성 및 치료 효율은 시험관내, 세포 배양물 내, 또는 실험 동물들에게서 표준 약학적 과정들에 의해 결정될 수 있다. 이러한 시험관내 분석, 세포 배양물 분석, 또는 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 적용하기 위한 투여량 범위를 제제화하는데 사용될 수 있다. 투여량은 사용될 투여 형태 및 적용될 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제제화, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태의 관점에서 개별 의사에 의해 선택될 수 있다. (예를 들어, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조).
- [0220] 투여량 및 투여 간격은 생물학적 효과를 유도 또는 억제하기에 충분한 활성 성분들의 수준(최소 유효 농도, MEC)을 제공하기 위하여 개별적으로 조절될 수 있다. MEC는 각 제제에 따라 다를 수 있으나, 시험관내 데이터로부터 결정될 수 있다. MEC를 달성하기 위해 필요한 투여량은 개인별 특성들 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 혈장 농도를 결정하기 위하여 검출 분석이 사용될 수 있다.
- [0221] 치료되어야 할 상태의 심각도 및 민감성에 따라서, 투여는 단일 투여 또는 복수 투여일 수 있고, 이는 수일 내지 수주 동안 또는 치료가 효과를 나타내고 질병 상태의 완화가 달성될 때까지 지속되는 치료 과정으로 이루어질 수 있다.
- [0222] 투여되어질 조성물의 양은, 물로, 치료 대상, 고통의 심각도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따를 것이다.
- [0223] 본 발명의 조성물들은, 필요한 경우, FDA에 의해 승인된 키트와 같은 팩 또는 분주기(dispenser device) 내에 제공될 수 있고, 이는 활성 성분들을 포함하는 하나 또는 그 이상의 단위 투여 형태를 포함할 수 있다. 팩은, 예를 들어 블리스터 팩과 같이 금속 호일 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있. 팩 또는 분주기는 투여를 위한 지시사항과 함께 제공될 수 있다. 팩 또는 분주기는 또한 의약의 제조, 사용 또는 판매를 관리하는 정부기관에 의해 규정된 형태의 용기와 관련된 안내사항(notice)을 포함할 수 있고, 상기 안내사항은 해당 조성물의 형태, 인간 또는 가축에의 투여에 대한 정부 기관의 승인을 반영하는 것이다. 그러한 안내사항은, 예를 들어 처방 의약에 대한 미국 식품의약국에 의해 승인된 라벨 또는 승인된 제품 삽입물일 수 있다. 또한, 적합한 약학적 담체와 함께 제제화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물들은 적합한 용기로 제조되어 그 용기 내에 포함될 수 있고, 하기에 서술하는 바와 같이, 지시된 상태의 치료를 위해 라벨링될 수 있다.
- [0224] 용어들 "포함하다", "포함하는", "함유하다", "함유하는", "갖는" 및 이들 용어들의 활용형들은 "포함하나, 이에 제한되지는 않는"을 의미한다. 이 용어는 "구성되는" 및 "필수적으로 구성되는"과 같은 용어들을 포함한다.
- [0225] 용어 "필수적으로 구성되는"은, 추가 성분들 및/또는 추가 단계들이 청구된 조성물 또는 방법의 기본 특징들 및 신규 특징들을 실질적으로 변경하지 않는다면, 상기 조성물 또는 방법은 추가 성분들 및/또는 추가 단계들을 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0226] 본 명세서에서 사용된 단수형 "a", "an" 및 "상기"는 본 명세서에서 달리 명시하지 않는 한, 복수형을 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 복수의 화합물 및 그들의 혼합물들을 포함할 수 있다.
- [0227] 본 명세서의 전반에서, 본 발명의 다양한 구체예들이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기재는 단순

히 편리성 및 간편성을 위한 것일 뿐이고, 본 발명의 범위에 대한 융통성없는 한정으로 해석되어서는 안된다는 것이 이해되어야만 한다. 따라서, 범위에 관한 기재는 해당 범위 내의 각각의 수치들뿐 아니라 가능한 부분범위들(subranges) 모두를 특정적으로 기재한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는, 그 범위 내의 각각의 수치들, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 및 6뿐 아니라, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 부분범위들을 특정적으로 기재한 것으로 해석되어야 한다. 이는 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

[0228] 본 명세서에서 수치 범위가 제시되는 경우마다, 그것은 제시된 범위 내의 임의의 인용수(분수 또는 적분)를 포함하는 것을 의미한다. 본 명세서에서, 첫번째 수치 "내지" 두번째 수치, 및 첫번째 수치와 두번째 수치 "사이의 범위" 라는 용어와, 첫번째 수치 "로부터 " 두번째 수치 "까지"라는 용어는 호환적으로 사용되고, 제시된 첫번째 수치와 두번째 수치 자체를 포함하고, 그들 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하는 것을 의미한다.

[0229] 본 명세서에서 사용된 용어 "방법"은 주어진 과제를 완수하기 위한 방식들(manners), 수단들(means), 기술들(techniques) 및 과정들(procedures)을 의미하고, 이는 화학, 약물학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 기술자들에게 알려진 방식들, 수단들, 기술들 및 과정들, 또는 이들 알려진 방식들, 수단들, 기술들 및 과정들로부터 상기 기술자들이 쉽게 개발할 수 있는 방식들, 수단들, 기술들 및 과정들을 포함하나, 이들에 제한되지는 않는다.

[0230] 본 명세서에서 사용된 용어 "예시(exemplary)"는 "예(example), 사례(instance) 또는 실례(illustration)로서 나타내는"을 의미한다. "예시"로서 기재된 임의의 구체예는 다른 구체예들 보다 바람직하거나 유리한 것으로 반드시 해석되는 것은 아니고, 그리고/또는 다른 구체예들의 특징들을 통합하는 것을 배제하는 것으로 해석되는 것은 아니다.

[0231] 본 명세서에서 사용된 용어 "선택적으로(optionally)"는 "일부 구체예들에서는 제공되지만, 다른 구체예들에서는 제공되지 않는"의 의미로 사용된다. 본 발명의 어느 특정 구체예는, 복수의 특징들이 서로 대립되지 않는 한, 그러한 복수의 특징들을 포함할 수 있다.

[0232] 명확한 기재를 위하여 본 발명의 별개의 구체예들에 각각 기재한 본 발명의 임의의 특징들은 또한 하나의 구체예에서 조합되어 제공될 수도 있음이 이해될 것이다. 역으로, 간략한 기재를 위하여 본 발명의 하나의 구체예에 기재한 다양한 특징들은 각각 개별적으로 또는 임의의 적합한 부분조합으로 또는 본 발명의 임의의 다른 구체예에서 적합하게 제공될 수도 있다. 본 발명의 다양한 구체예들에서 기재된 임의의 특징들은, 그러한 특징들 없이는 그 구체예가 실시되지 못하는 경우가 아닌 한, 그들 구체예들의 필수적인 특징들로 간주되어서는 안된다.

[0233] 상기에서 상세하게 기술되고, 하기의 청구범위에서 청구된 본 발명의 다양한 구체예들 및 다양한 측면들은 하기의 실시예들에서 실험적으로 뒷받침된다.

[0234] 실시예들

[0235] 본 발명의 일부 구체예들을 설명하는 상기 상세한 설명과 함께 비제한적인 방식으로 다음의 실시예들이 기술된다.

[0236] 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 본 발명에서 사용된 실험 공정들은 분자학, 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA의 기술들을 포함한다. 이러한 기술들은 다음 문헌들에서 상세하게 설명된다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980) 참조; 이용가능한 면역측정법은 특허 및 과학 문헌 내에서 광범위하게 기재되어 있으며, 예를 들어 U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262;

3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 and 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996) 참조; 이들 문헌들 모두의 전체 내용은 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다. 다른 일반 참고문헌들은 본 명세서 전체에 걸쳐 제공된다. 상기 참고문헌들에 기재된 공정들은 당 분야의 기술자들에게 잘 알려진 것으로, 독자의 편의를 위해 제공된다. 상기 참고문헌들에 포함된 모든 정보들은 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다.

- [0237] **실시예 1**
- [0238] **암 줄기세포를 동정, 분리 및 표적화하기 위한 플랫폼으로서의 인간 비정형 유기형/간상 종양의 이종이식 모델의 장기간 증식**
- [0239] **물질들 및 방법들**
- [0240] **일차 비정형 유기형/간상 종양 샘플:** 일차 ATRT 샘플은 수술 후 1시간 이내에 환자로부터 얻었다. 헬싱키 선언에 따라 관련된 환자의 법적 보호자에게 사전 동의를 받았다.
- [0241] **생체내 이종이식 형성:** 동물 실험은 웨바 메디컬 센터의 동물 실험을 위한 실험 지침에 따라 수행하였다. 5~8주령, 암컷, 자연발증 당뇨병 면역결핍(NOD/SCID) 마우스에 대한 초기 ATRT 이종이식은 상기에 기재된 Dekel et al., 2006a에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 일차 ATRT 조직을 2~5mm의 조각들로 컷팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다. 마우스는 병원체가 없는 환경에서 유지되었으며, 종양 성장에 대하여 매주 모니터링하였다. 매주 마다 이차 종양들이 촉진(palpation)에 의해 검출되었다. 종양들은 이식 후 대략 1~3개월에, 또는 그것들이 1.5cm의 직경의 크기가 되었을 때 채취하였다. 각각 접종된 Xn에 대하여 접종까지의 시간, 절제까지의 시간, 종량 및 부피를 기록하였다. Xn 조직은 즉시 작은 조각들로 컷팅하였고, 다음과 같은 추가 실험을 진행하였다: (i) 추출된 분석물의 후속 분자 특성화를 위한 급속 동결; (ii) 이후 면역조직화학(IHC) 연구를 위한 포르말린 고정 및 파라핀 삽입; (iii) NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 조직 삽입, 및 (iv) 후속하는 Xn 증식 및 시험관내 실험을 위해 하기에 설명한 바와 같은 단일 세포 현탁액의 제조(시험관내 연구, 한계 희석 분석 및 FACS 분류).
- [0242] 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)가 함유된 IMDM(Iscove's modification of Dulbecco's medium) 내에서 샘플을 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 얻은 다음, 37°C에서 2시간 동안 콜라게나아제 IV로 처리하였다. 효소로 처리된 조직을 IMDM을 사용하여 2배 부피의 콜라게나아제 용액으로 연마하고, 현탁액을 여과하여(100 μ m 세포 스트레이너), 항생제가 함유된 IMDM으로 2회 세척하였다. 적혈구는 ACK RBS 용해용 버퍼(lysis buffer)로 제거하였다.
- [0243] Xn 연속적 계대배양은 두가지 방법을 사용하여 수행하였다: 1. 신선하게 회수된 ATRT Xn으로부터의 약 1×10^6 개의 해리된 세포들의 연속적 주입; 세포들을 무혈청 배지/마트리젤 1:1(BD Biosciences, San Jose, CA) 100 μ l 내에 주입하였다. 2. ATRT Xn 조직을 2~5mm 조각들로 컷팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다.
- [0244] **종양 증식 세포들의 상대 빈도의 평가:** 낮은 계대수의 계대배양 및 높은 계대수의 계대배양으로부터 Xnx 세포의 종양 형성 활성을 평가하고 비교하기 위해, 100 μ l의 PBS와 100 μ l의 매트릭스 내에 현탁된 세포의 연속 희석액(1×10^6 - 50세포들)을 NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 암 증식 세포들의 상대적 빈도의 평가는 ELDA 소프트웨어 온라인을 사용하여 온라인 계산하였다(bioinfodotwehidotedudotau/software/elda/).
- [0245] **고ALDH 세포들에서 종양 증식 세포들의 상대적 빈도의 평가:** 저ALDH 세포들에 대한 고ALDH 세포들의 종양 증식 세포의 빈도를 결정하기 위해, 상기한 바와 같이, 한계 희석 분석을 사용하였다. 간단하게, Xn으로부터 수득된 세포에서 ALDH1^{hi}의 높은 발현에 따른 세포 분류 후에, [ALDH1^{hi}, ALDH1^{low} 및 분류되지 않은 세포들(US)]로 분류된 개체군들을 멸균 DMEM으로 수집하였다. 상기 세포들은 100 μ l의 PBS 및 100 μ l 매트릭스 내에 재현탁하였고, 연속 희석하여 NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다.
- [0246] **형광-활성화 세포 분류(FACS) 분석:** 일차 ATRT 세포들의 FACS 분석 및 이후의 새로운 Xn 유래 세포들의 FACS 분

석을, 상기에 기재된 Dekel et al., 2006a에 따라 수행하였다. 작은 종양 조각들은 단일 세포들로 해리되었고, 4℃에서 2분 동안, 1ml/5ml의 세포 현탁액 비율에서 RBCs 용해 버퍼(이중 증류수 H₂O 내에 8.3g의 NH₄Cl, 1.0g의 KHCO₃, 1.8ml의 5% EDTA를 포함)로 세척하였다. 그런 다음, 최종 원심분리 전에, 세포들을 30μm 나일론 메쉬를 통해 여과하였다. 모든 세포들을 0.5% 소혈청 알부민(BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis)과 PBS 내의 0.02% 소듐 아자이드로 이루어진 FACS 버퍼 내에 재현탁시켰다. 표면 마커 항원들[CD24 (eBioscience, 120247-42), CD34 (Miltenyi, 3008100), CD56 (eBioscience, 1205942), CD90 (Beckman Coulter, IM3600U)]은 항체들의 내재화를 방지하기 위하여, 4℃에서 30분 동안 어두운 곳에서 10⁶ 세포들 당 5μg 항체의 농도에서 형광 컨주게이트된 항체와 함께 배양함으로써 표지화하였다. 또한, 7-아미노-악티노마이신-D(7AAD; eBioscience, San Diego, CA)를 생존가능한 세포 게이팅(gating)을 위해 사용하였다. 모든 세척 단계는 FACS 버퍼로 수행하였다. 모든 정량 측정은 IgG 동종 항체(eBioscience, San Diego, CA)와 비교하여 이루어졌다. 높은 ALDH1 효소 활성을 갖는 세포의 검출은 상기에 기재된 Christophe Ginestier et al., 2007; Dylla et al., 2008에 따라 알데플루어 키트(Aldefluor kit)(StemCell Technologies, Durham, NC, USA)를 사용하여 수행하였다. 세포들은 전하를 띠지 않는 ALDH1 기질인 BODIPY-아미노아세트알데하이드(BAAA)가 들어있는 알데플루어 분석 완충액에 현탁시킨 후, 어둠 속 37℃에서 30~45분간 배양하였다. BAAA는 수동적인 확산을 통해 오직 살아있는 세포에 의해서만 흡수된 다음, ALDH1을 음으로 하전된 반응 생성물인 BODIPY-아미노아세테이트로 세포 내 전환시켰고, 이는 높은 수준의 ALDH1를 발현하는 세포 내에 유지되어 이들 세포가 밝은 형광색을 갖게 한다. 이들 ALDH1 발현 세포들(ALDH1+)의 형광색은 FACSria(BD Biosciences, San Jose, CA)의 녹색 형광 채널(520~540nm)에 의해 검출될 수 있다. 음성 대조군으로서, 각 세포들의 샘플에 대하여 동일한 조건에서 처리된 분취액을 특정 ALDH1 억제제인 디에틸 아미노벤즈알데하이드(DEAB)와 추가로 배양하였다. DEAB의 첨가없이 BAAA를 갖는 세포들의 배양에 의해 ALDH1+ 개체군을 정의하는 BAAA 형광의 이동이 나타난다. 손상되지 않은 세포막을 갖는 세포들만이 알데플루어 반응 생성물을 보유할 수 있기 때문에, 생존 가능한 ALDH1+ 세포만이 동정되었다.

[0247] **FACS 분류:** 상기한 바와 같이 세포들을 채취하고, 최종 원심 분리 전에 30μm 나일론 메쉬를 통해 여과한 다음, FACS 버퍼 또는 알데플루어 버퍼 중 어느 하나에 재현탁시켰다. FACS 아리아(Aria)는 표면 마커들 및 높은 ALDH1 활성을 발현하는 세포들을 농축(enrich)하기 위해 사용되었다. 100-μm 노즐(BD Biosciences, San Jose, CA), 제곱 인치당 20~25파운드의 외장 압력(PSI) 및 초당 1,000~3,000회의 획득 속도가 ATRT 세포 분류에 최적화된 조건으로서 사용되었다. 단일 생존 세포들은 7AAD에 기반을 두고, 그런 다음, 모든 후속 실험을 위해 수집 튜브 내로 물리적으로 분류되었다. FlowJo 소프트웨어를 사용하여 데이터를 추가적으로 분석하고 제시하였다.

[0248] **칩 어레이:** 칩 어레이 데이터는 공개 라이브러리(GEO)에 저장된다. 모든 실험들을 Affymetrix HU GENE1.0st 올리고뉴클레오타이드 어레이(Pode-Shakked et al., 2009)를 사용하여 수행하였다. 각 샘플로부터의 전체 RNA는 제조사의 지침에 따라 비오티닐화(biotinylated)된 표적 DNA를 제조하기 위해 사용되었다. 각 시료로부터 생성된 표적 cDNA는 Affymetrix Gene Chip Instrument System을 사용하여 제조사의 지침에 따라 처리하였다. 품질 관리 규정에 대한 세부 사항은 온라인에서 확인할 수 있다. 유의적으로 변화된 유전자를 여과하였고, 적어도 2배(p값: 0.05)까지 변화하였다.

[0249] **정량적 실시간 역전사 PCR 분석 - 유전자 발현 분석:** 정량적 역전사 PCR (qRT-PCR)은 유전자의 선택적 발현의 접합 변화를 결정하기 위해 수행하였다. 제조사의 지시에 따라, RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA에 대한 고용량 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems, California USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. TaqMan Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems, California, USA)의 존재하에서, ABI7900HT 서열 검출 시스템(Perkin-Elmer/Applied Biosystems, California, USA)을 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 유전자 특이적 TaqMan Gene Expression Assay-Pre-Made 키트(Applied Biosystems, California, USA)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 각각의 분석 반응은 3회 수행되었다. HPRT1 또는 GAPDH는 실험 분석을 통해 내인성 대조군으로 사용되었다. PCR 결과는 SDS RQ Manager 1.2 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 통계학적 분석은 네펜어 양측 검정(non-paired 2-tails T-test)을 사용하여 수행하였다. 통계학적 유의성은 P<0.05로 고려되었다.

[0250] **H&E 염색:** 파라핀에 포매된 조직의 H&E 염색: 파라핀 포매 조직의 5μm 절편을 super frost / plus glass 위에 올려놓고 60℃에서 40분간 배양하였다. 탈파라핀화 후, 슬라이드를 Mayer의 헤마톡실린 용액(Sigma-Aldrich)에서 배양하고, 70% 에탄올 내의 1% HCl로 1분 동안 배양하였다. 그런 다음, 슬라이드를 에오신(Sigma-Aldrich)에서 10초 동안 배양하였다. 이미지를 올림푸스 BX51TF를 사용하여 생성하였다.

[0251] **일차 ATRT와 ATRT Xn의 면역조직화학 염색:** 4-μm 두께의 절편들을 면역조직화학 검사를 위해 일차 ATRT 및 ATRT

Xn으로부터 절단하였다. 면역 염색은 상기에 기술한 바와 같이 Dekel et al., 2006b에 따라 수행하였다. 간단하게, 상기 절편들은 항원의 산화를 피하기 위해 가공되었다. 면역 염색 전에, 항원 회수를 위해 절편들을 97℃에서 10분 동안 PH 6.0의 10mM의 구연산 버퍼로 처리한 다음, 10분 동안 3%의 H₂O₂로 처리하였다. 이어서, 히스토스테인 플러스 키트(Zymed, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 표지된 스트렙타비딘-비오틴(LAB-SA) 방법을 사용하여 상기 슬라이드를 염색하였다. 상기 면역 반응은 HRP-계 chromogen/substrate 시스템(액체 DAB 기질 키트 - Zymed, San Francisco, CA, USA)에 의해 시각화되었다. 항-인간 ALDH1 항체(BD Biosciences, #611195)를 1:100으로 희석하여 사용하였다. 상기 면역 반응은 HRP계 chromogen/substrate 시스템(액체 DAB 기질 키트 - Zymed, San Francisco, CA, USA)에 의해 시각화되었다. 모든 절편들은 또한 종래의 면역조직화학 공정을 사용하여 비오틴, 상피막 항원(EMA), 평활근 액틴(SMA), AE1/AE3, NFP 및 INI1에 대하여 염색하였다. 모든 항체 희석은 염색 항체의 제조사의 지침대로 수행되었다.

[0252] **LOX 활성 분석들:** 상기 LOX 효소 활성은 상기 15843371에 기술된 바와 같이, 앰플렉스 레드 형광 분석(AAA Bioquest, 15255)을 사용하여 측정하였다. 상기 분석 반응 혼합물은 50mM 소듐 보레이트 (pH 8.2), 1.2M 요소, 50_μM 앰플렉스 레드, 0.1unit/ml 겨자무과산화효소, 및 10mM의 1,5-디아미노펜탄(cadaverine) 기질로 이루어졌다. 상기 단백질 샘플들은 100_μM의 BAPN 존재 또는 부재하에서 반응 믹스에 첨가하였고, 그런 다음 30분 동안 37℃에서 배양하였다. 상기 형광 생성물은 흡광도 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 590nm에서 측정하였다.

[0253] **MTS - 세포 생존 분석:** 5x10³ 세포들을 3중으로 플레이팅하고, 하룻밤 동안 96-웰 플레이트에서 성장시켰다. 다음날 배지를 바꿔 다양한 농도의 BAPN으로 보충한 후, 세포들을 48시간 동안 더 배양하였다. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세포 증식을 측정하였다. 간단히 설명하자면, 상기 세포들을 37℃에서 3시간 동안 MTS 용액으로 배양하였고, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 492nm에서의 흡광도를 측정하였다. 세가지의 독립적인 실험을 수행하였다.

[0254] **세포 이동 분석:** 배지를 바꾸고 100_μM의 BAPN으로 보충한 후, 세포를 하룻밤 동안 성장시켰다. 48시간 후, 플라스틱 1ml 피펫 팁으로 용합 단층을 통해 굵힌 자국을 만들었다. 이어서, 처리된 세포 및 대조군 세포를 동일한 시점(24 및 48시간)에서 촬영하였다.

[0255] **통계 분석:** 달리 명시하지 않는 한, 결과들은 평균 ±S.E.M으로 표시한다. ATRT 세포 개체군들 사이의 유전자 발현형의 통계적 차이는 스튜던트 T-테스트를 사용하여 평가하였다. 생체내 실험의 통계적 차이는 ANOVA / Chi-square test를 사용하여 계산되었다. 모든 통계 분석에서, 유의한 수준은 달리 명시하지 않는 한 p <0.05로 설정되었다.

[0256] **결과들**

[0257] **MRT 이중이식 모델 및 세포 배양 특성화의 확립:**

[0258] 인간의 악성 간상소체 종양 샘플을 신생아의 왼쪽 자궁 경부에서 수득하였다. 일차 종양의 H&E 염색은 원형 핵, 미세 염색질 및 거대 호산성 핵(eosinophilic nucleoli)이 있는 중형 내지 대형의 다각형(polygonal) 종양 세포를 나타냈다. 면역조직화학적 프로파일이 결합된 종양 세포들의 형태학적 특징은 악성 간상소체 종양의 진단을 확인시켰다. 실제로, 대부분의 종양 세포들은 INI-1 단백질의 발현을 나타내지 않았다. 일차 종양 세포에서 유동 세포 분석법(Flow cytometry)을 실시하여 크기가 다른 2개의 세포 개체군을 확인하였다. 시험관내 특성화를 위해, 상기 세포들을 두가지 상이한 조건에서 성장시켰다: 10% FBS 및 무혈청 배지를 갖는 DMEM을 성장 요소에 따라 보충하였다. 두개의 형태학적으로 구별되는 유형의 세포가 관찰되었다: 부착 섬유아세포와 같은 세포들 및 부착 세포들에 느슨하게 부착된 원형세포들은 상기에서 기술된 바와 같은 배양 내에서 MRT 세포들의 형태와 일치한다. 이들 세포들이 10% FBS가 함유된 DMEM 내에서 배양될 때, 유의한 세포 성장이 관찰되었다. 일차 종양 세포들의 배양물에서의 형태는 약 8 계대수의 계대배양 동안 유지되었다. 2~5mm의 종양 조각들을 4마리의 면역 결핍성 마우스에 피하 이식하여 일차종양 이식편들을 형성하였다(도 6). 종양 증식이 더욱 가능한 4/4 마우스에서 종양 접종이 관찰되었다. NOD/SCID 마우스 내에서 MRT Xn의 연속적 증식은 1x10⁶ 세포들의 고정된 수를 이용하여 조직 샘플 이식 또는 단일 세포 현탁액 접종에 의해 수행되었다(표 2 및 도 6). 연속 증식에 의해, 본 발명자들이 MRT CSC 표현형(phenotype) 특성화 및 MRT-개시능(initiating capacity)과 관련된 병원의 경로(pathogenic pathways)를 설명하기 위해 연구한, 낮은 계대수(<P5), 중간 계대수(P5-P10) 및 높은-계대수(P10-P16)의 MRT Xn 계대배양을 확립할 수 있었다.

[0259] [표 2]

[0260] *NOD/SCID* 마우스에서 인간 *ATRT Xn* 모델의 생성 및 확립

조직 이식			세포 주입*			
접종(%)	접종된 조직수	이식수	접종(%)	접종된 조직수	주입수	계대배양
100	4	4	Na	0	0	P1
100	8	8	67	4	6	P2
93	13	14	83	10	12	P3
100	6	6	88	7	8	P4
75	3	4	100	8	8	P5
67	4	6	100	4	4	P6
50	2	4	100	2	2	P7
50	1	2	50	2	4	P8
na	0	0	100	4	4	P9
na	0	0	100	2	2	P10
100	2	2	100	4	4	P11
100	2	2	100	2	2	P12
100	2	2	100	4	4	P13
100	2	2	100	4	4	P14
100	1	1	100	4	4	P15
na	0	0	100	4	4	P16
88	50	57	90	65	72	합계

[0261]

[0262] 연속적 1×10^6 세포 주입 및 조직 이식으로부터 일차 인간 *ATRT Xn*의 생성. 일차 종양 조직은 신생아의 *ATRT*에서 얻었다.

[0263] *MRT*의 장기간 증식은 증가된 *CSC* 빈도와 관련된다.

[0264] 1×10^6 세포들의 고정된 세포 수를 갖는 *MRT Xn*의 연속적 증식은 종양 접종까지의 보다 짧은 시간 및 가속화된 종양 성장과 관련이 있고(도 1a 및 표 3), 이는 계대배양에 따른 암 공격성의 축진을 보여주는 것이다.

[0265] [표 3]

[0266] 증식 동안의 ATRT Xn 빈도 및 특성들

절제율에 대한 Xn 중량 /일수(days) (평균)	접종까지의 일수(days)	접종율(%)	계대배양	
0.04	34	4/6	P2	낮음
0.07	23	10/12	P3	
0.08	24	7/8	P4	
0.06	26	21/26(80)		
0.11	15	8/8	P5	중간
0.09	22	4/4	P6	
0.12	15	2/2	P7	
0.10	28	2/4	P8	
0.06	23	4/4	P9	
0.06	22	2/2	P10	
0.09	20	22/24(92)		
0.05	19	4/4	P11	높음
0.12	20	2/2	P12	
0.08	16	4/4	P13	
0.11	16	4/4	P14	
0.19	14	4/4	P15	
0.16	14	4/4	P16	
0.12	16	22/22(100)		

[0267]

[0268] ATRT Xn에서 얻어지고 더욱 증식된 1×10^6 세포들로부터 이차 종양 형성의 빈도와 특성을 요약한 표. ATRT Xn의 연속 증식 동안에 종양 접종까지의 보다 짧은 시간 및 가속화된 종양 성장을 나타냈다. 낮은 계대수의 Xn 계대배양과 중간 계대수의 계대배양의 비교에서 *p<0.01이다.

[0269] 본 발명자들은 MRT 증식으로 인해 CSC 능력이 기능적으로 증대되는지를 다음 의문으로 제기하였다. 이에 낮은 계대수, 중간 계대수 및 높은 계대수의 계대배양 Xn에서 유래된 MRT 세포를 이용하여 한계 희석 이종이식 실험을 수행하였다. 상기 분석은 높은 계대수의 계대배양 Xn에서 CSC 빈도에 대한 유의적인 양성 선별(positive selection)을 나타낸다(표 4).

[0270] [표 4]

[0271] 증식 동안, 종양 CSC 빈도를 나타내는 한계 희석 이중이식의 요약

점종 종양수/주입 횟수			주입된 종양 세포들의 수
높음	중간	낮음	
9/10	4/6	1/10	1000
2/2	1/2	-	750
3/5	2/3	2/10	500
2/2	-	-	250
6/8	-	1/16	100
1/2	-	0/4	50
1/120	1/1801	1/3930	종양 증식 세포 빈도 (95% CI)

[0272]

[0273] 높은 계대수의 계배배양 MRT Xn이 보다 많은 수의 CSC를 농축한다는 사실이 관찰되었고, 계배배양에 따른 CSC 표현형의 획득을 수반하는 조직학적 및 면역조직화학적 변화가 분석되었다(도 1b~c). H&E 염색은 Xn 유래된 종양이 기본적인 육종양같은 세포 형태를 유지한다는 것을 보여 주었다. 그럼에도 불구하고, 방추세포와 같은 세포 형태의 획득, 괴사의 광대한 영역, 적은 세포 사멸체 및 더 많은 유사분열을 포함하는 높은 세대 Xn(high generation Xn)에서 일부 형태학적 차이가 관찰되었다(도 1b). 면역조직화학(IHC) 염색은 일차 종양 및 Xn 세포들 모두가 간엽(mesenchymal) 마커인 비멘틴을 강하게 발현한다는 것을 밝혀냈다(도 1c). 그러나, 일차 종양과 반대로, 높은 세대 Xn은 상피막 항원(EMA), 시토케라틴 AE1/AE3 및 신경미세섬유 단백질(NFP)을 포함하는 차별화되는 마커들의 손실을 나타냈다. IHC 결과들을 검증하기 위해, 초기 및 후기 Xn에서 일차 종양에 대하여 qRT-PCR을 수행하였다. 상기 유전자 발현 분석은 상피 분화 마커(epithelial differentiation marker)인 E-카드헤린의 손실과 함께 비멘틴의 유지를 증명하였다. 따라서, 증대된 CSC 빈도는 유사한 병리조직학적 육종양의 형태를 유지하고 간엽 표현형으로 탈분화를 나타내는 MRT Xn과 관련이 있다.

[0274] 증대된 종양 개시 활성화와 관련된 글로벌 유전자 표지는 추정 CSC 바이오 마커들을 나타낸다

[0275] 본 발명자들은 CSC 표현형에 대한 선택을 수반하는 연속적 MRT Xn의 글로벌 분자 프로파일을 특성화하고자 하였다. 이러한 목적을 위하여, 여러 가지 다른 샘플을 비교하는 마이크로어레이 유전자 발현 분석을 수행했다: 1. 일차 MRT, 2. 초기 MRT Xn (P2), 3. 중기 MRT Xn (P7), 4. 후기 MRT Xn (P16), 5. 인간 배아줄기세포(hESCs), 6. 태아 신장 (FK), 7. 성인 신장 (AK), 8. 태아 뇌 (FB), 9. 성인 뇌 (AB). 글로벌 발현 분석 결과, 증식된 MRT Xn 세포들은 계층형 클러스터링에 의해 설명된 바와 같이, 원래의 그들의 일차 종양보다 오히려 hESC와 더 밀접하게 밀집된 것으로 나타났다(도 2a). 또한, Xn 조직과 인간 태아 조직의 유사성이 더욱 컸다. 전적으로, 이러한 결과들은 종양이 증식되는 동안의 줄기세포 표현형에 대한 선택성을 확인시켜준다. 일차 MRT와 연속적 MRT Xn의 더욱 면밀한 조사(낮은, 중간 및 높은 계대수의 계배배양)는 계배배양을 통해 상향 조절 및 하향 조절되는 두 개의 주요 유전자 클러스터를 포함하는 다양한 유전자 발현 패턴을 동정했다(도 2b). 상향 조절된 유전자들의 집단은 세마포린3C(SEMA3C), 리실옥시디아제(LOX), 글리코프로테인 M6A(GPM6A), 헤파토사이트 성장인자(HGF/SF) 및 알데하이드 디하이드로게나아제1(ALDH1)과 같은 관찰된 CSC 표현형의 획득에 수반되는 분자들을 포함하였다(도 2c). 상기 유전자 발현 프로파일은 또한 고도의 증식과 같은 후기 계배배양을 나타내는 유전자 히트 맵(Gene heat map)에 의해 나타나는 것과 같이 계배배양에 따라 종양 생물학을 검증할 수 있었다(예를 들면, KI-67, CDK1 및 AURKA) (Figure 2D). 또한, ngenuity© 기능 분석은 감소된 괴사, 세포사멸 및 세포 분화를 입증하였고(도 2e), 이들 결과들의 두가지 근거는 일차 종양과 낮은 계대수의 계배배양 Xn과 비교하여 높은 계대수의 계배배양 Xn에서의 감소된 세포사멸, 증가된 유사분열 및 분화 마커의 손실을 증명하는 H&E 및 IHC 염색으로부터 얻었다. 따라서, 연속적 Xn 증식 모델은 MRT에서 지속되는 종양 개시 및 종양 진행 및 CSC 표현형의 증가에 관여하는 추정 바이오 마커 분자를 생성하였다.

[0276] MRT CSC 바이오 마커로서의 ALDH1의 기능 검증

[0277]

본 명세서에서의 분자 스크린이 MRT에서의 CSC 표현형 수득의 마커로서 ALDH1을 독립적으로 정확하게 보여준다는 것이 관찰되었으므로, 본 발명자들은 그것의 발현 및 기능적 역할을 추가로 조사하였다. 중요하게도 ALDH1이 CSC 마커로 제시되었고, 따라서 상기 접근법을 검증할 수 있었다. 발현 분석은 ALDH1의 비율이 종양 증식에 따라 현저하게 증가한다는 것을 입증하였다(도 3a). Xn 증식의 다른 단계들에서 ALDH1 개체군의 비율을 정량화하기 위한 FACS 분석은, 후기 계대수의 계대배양(계대배양 10)에서 25%의 세포가 ALDH1+인 것과 비교하여 낮은 계대수의 계대배양 Xn 세포들(계대배양 4)에서 단지 4%의 세포들만이 ALDH1+임을 밝혀내었다(도 3b). 또한, ALDH1 IHC 염색법은 계대배양에 따라 ALDH1의 증가된 발현을 증명하였다(도 3c). 더욱이, ALDH1^{high} 발현 세포들은 주로 거대한 간상 세포들이었다(도 3d). 유전자 발현 수준에서, qRT-PCR 분석은 일차 종양에 비해 후기 계대배양에서 약 40배 더 높은 ALDH1 발현을 나타내었다(도 3e). 이어서, 본 발명자들은 그것들이 CSC로서 자격이 있는지를 결정하기 위하여 ALDH1+ 분획을 분류하였다. 암 줄기세포를 정의하는 특성은 시험관내에서 클론을 형성하는 그들의 기능적 능력이었다. 콜로니 형성 분석은 CSC 표현형에 따른 xALDH⁻ MRT 세포들과 비교하여 ALDH1+ 내에서 현저하게 높은 클론의 개수 및 보다 큰 콜로니들을 나타내었다(도 4a). 또한, CSCs는 면역 결핍 마우스 내로 이식 시에 종양을 개질하는 그들의 능력에 의해 정의된다. 생체내에서 ALDH1+ 세포들의 종양 형성성(tumorigenicity)을 조사하기 위해, 한계 희석 분석(18)을 사용하여 NOD/SCID 마우스의 옆구리에 FACS 정제된 ALDH1+ 및 ALDH1- 세포들을 점점 감소되는 양으로 주입하였다(18). 분류되지 않은 세포들을 대조구로서 주입하였다(표 2). 낮은 계대수의 계대배양(P3)에서, 2000개 이하의 ALDH1+ 세포들이 주입된 6마리의 마우스 중 4마리는 종양을 형성하였으나, ALDH1- 세포를 주사한 마우스는 종양을 형성하지 않았다($p < 0.05$). 높은 계대수의 계대배양(P12)에서, 1000개 이하의 ALDH1+ 세포들을 주사한 모든 마우스들은 이차 종양이 형성된 반면에, ALDH1- 세포들이 주사된 11마리의 마우스 중 2마리만이 종양으로 발전하였는데, 이는 상기 개체군은 소량의 암줄기세포가 상대적으로 대폭 감소하였음을 나타내는 것이다(표 2). 중요한 것은, ALDH1+ 세포들에서 발생한 종양은 상기 개체군에서의 종양 개시 능력의 존재와 일치되게 이차 수용체 내로 연속적으로 이식될 수 있었고, 이는 ALDH+ 세포들의 생체내 자가-재생 능력을 증명하는 것이다(도 4b). 전체적으로, 이들 데이터는 ALDH1이 CSC 표현형 수득의 링크를 검증하는 MRT CSC를 위한 마커임을 나타내므로, 본 발명자들은 ALDH1과 같은 특정 분자들에 대한 장기간 증식으로 정의하였다. 분자 수준에서 분류된 ALDH+ CSC를 더욱 특성화하고, 그들이 장기간 증식으로 예측된 CSC 바이오 마커를 농축하였는지를 결정하기 위해, MRT Xn에서 얻어 분류된 ALDH+ 및 ALDH- 세포들에 대한 RNA 시퀀싱 실험을 수행하였다(도 4c). 흥미롭게도, ALDH- 세포들과 비교하여 ALDH+ 세포들에서 대부분 상향 조절된 유전자들 중에는 일차 종양(예를 들면, *ANXA1*, *GPM6A*, *HGF* 및 *LOX*)과 비교하여 후기 Xn 계대배양에서 현저하게 과발현된 유전자가 있다는 것이 밝혀졌다. qRT-PCR 분석을 수행하여 ALDH- 세포들과 비교하여 ALDH+ 세포들에서 높은 *LOX* 발현을 확인하였다(도 4e). 이러한 결과들은 종양의 공격성 및 CSC 빈도와 관련된 분자들 및 경로를 동정하기 위한 모델로서 본 발명자들의 Xn 증식 기술의 유효성을 강조하고 있다. 진행된 MRT Xn 및 분류된 ALDH+ CSC 분획에서 *LOX*의 높은 발현은 우리가 *LOX*를 치료 표적으로서 사용할 수 있는지를 조사하게 하였다.

[0278]

MRT CSC 치료제로서 LOX 억제제의 기능적 검증

[0279]

세포 외 매트릭스-리모델링 효소인 LOX는 초기 세포 분화 및 조직 발달(22) 뿐만 아니라 염색질 밀집(chromatin compaction)(19), 유전자 전사(20, 21)와 같은 경우들을 조절하므로, 따라서 유사한 활성을 조절하는 INI-1 손실에 의해 특징지어지는 MRT와 연관이 있다. 최근 연구에 따르면, LOX는 유방암, 대장암 및 췌장암들을 비롯한 여러 악성 종양에서 과발현되며(23, 24), 종양 진행 및 전이와 관련이 있다(25). 일차 MRT, 초기 계대수(P2), 중기 계대수(P7) 및 후기 계대수(P14)의 Xn 계대배양에서 LOX의 발현을 분석한 IHC 염색법은 간상 세포내에서 유의하게 발현한 계대배양을 통하여 발현형이 광범위하게 증가함을 확인하였다(도 5a). 이전에는 LOX 억제제인 BAPN이 다양한 암세포들에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(23). 상기 LOX 유전자는 분류된 MRT CSCs내에서 뿐만 아니라 증식 및 CSC 표현형을 선별하는 동안에 Xn 내에서 상향 조절되었기 때문에, 본 발명자들은 LOX 억제가 MRT 세포에 영향을 미치는지를 조사하고자 하였다. 우선, Xn 세포들을 48시간 동안 상이한 농도의 BAPN에서 성장시켰다. 세포 생존력을 조사한 MTS 분석에서는, 3가지 다른 실험에서 100 μ M BAPN 처리 후, 증식이 현저하게 감소함을 나타내었다(데이터는 표시하지 않음). 다음으로, 마우스에서 연속적으로 증식된 소아 신장의 일반 고형 종양인 WT Xn 세포에 대한 BAPN의 효과를 조사했다. 상기 결과들은 WT 세포 증식에 영향을 미치지 않음을 나타내며, 이는 MRT 세포들에 대한 LOX 억제제의 특정한 효과가 있음을 증명하였다(도 5b). 본 발명자들은 다음으로 BAPN 처리의 결과로서 MRT 세포들의 형태를 조사하였고, 상기 처리가 핵 응결(nuclear condensation) 및 세포 연하(cell swallowing)를 포함하는 형태학적 변화를 유도한다는 것을 나타내었다(도 5c). 중요하게도, 이동 분석(migration assay)은 48시간 동안 BAPN 처리된 세포들을, BAPN 처리되지 않은 세포들과 비교할 때, MRT 세포 이동 능력을 현저하게 억제한다는 것을 밝혀냈다(도 5d). 모든 시험관내 결과들은 중기 Xn 계대배양

(P10)을 사용하여 얻어졌기 때문에, 본 발명자들은 BAPN이 일차 종양과 매우 유사한 세포들에서도 비슷한 효과를 갖는지를 측정하도록 정하였다. 유사한 실험들이 P2 세포들에서 수행되었고, 동일한 결과들이 나타났다(도 7a~c). LOX 활성 측정은, 100 μ M BAPN이 실제로 LOX 활성을 현저하게 억제한다는 것을 증명하였다(도 7d). 이들 결과들은 새로운 MRT CSC 바이오 마커를 표적화하는 것은, 종양의 성장을 막고, 가능한 MRT 치료 표적으로서의 LOX를 보증할 수 있음을 제시한다.

[0280] 실시예 1에 대한 참고문헌들

- [0281] 1. Pode-Shakked N, Metsuyanin S, Rom-Gross E, Mor Y, Fridman E, Goldstein I, et al. Developmental tumorigenesis: NCAM as a putative marker for the malignant renal stem/progenitor cell population. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009 Aug;13(8B):1792-808.
- [0282] 2. Dekel B, Metsuyanin S, Schmidt-Ott KM, Fridman E, Jacob-Hirsch J, Simon A, et al. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer research*. 2006 Jun 15;66(12):6040-9.
- [0283] 3. Metsuyanin S, Pode-Shakked N, Schmidt-Ott KM, Keshet G, Rechavi G, Blumental D, et al. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008 Jul;26(7):1808-17.
- [0284] 4. Pode-Shakked N, Dekel B. Wilms tumor--a renal stem cell malignancy. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2011 Sep;26(9):1535-43.
- [0285] 5. Pode-Shakked N, Shukrun R, Mark-Danieli M, Tsvetkov P, Bahar S, Pri-Chen S, et al. The isolation and characterization of renal cancer initiating cells from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets. *EMBO molecular medicine*. 2013 Jan;5(1):18-37.
- [0286] 6. Shukrun R, Dekel B, Pode-Shakked N, Pleniceanu O, Omer D, Vax E, et al. Wilms' Tumor Blastemal Stem Cells Dedifferentiate to Propagate the Tumor Bulk. *Stem Cell Reports*. 2014.
- [0287] 7. Parham DM, Weeks DA, Beckwith JB. The clinicopathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumors. An analysis of 42 cases studied with immunohistochemistry or electron microscopy. *The American journal of surgical pathology*. 1994 Oct;18(10):1010-29.
- [0288] 8. Wick MR, Ritter JH, Dehner LP. Malignant rhabdoid tumors: a clinicopathologic review and conceptual discussion. *Seminars in diagnostic pathology*. 1995 Aug;12(3):233-48.
- [0289] 9. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*. 1998 Jul 9;394(6689):203-6.
- [0290] 10. Olson TA, Bayar E, Kosnik E, Hamoudi AB, Klopfenstein KJ, Pieters RS, et al. Successful treatment of disseminated central nervous system malignant rhabdoid tumor. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1995 Feb;17(1):71-5.
- [0291] 11. Douglass EC, Valentine M, Rowe ST, Parham DM, Wilimas JA, Sanders JM, et al. Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotypic changes. *Genes, chromosomes & cancer*. 1990 Sep;2(3):210-6.
- [0292] 12. Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *Journal of neurosurgery*. 1996 Jul;85(1):56-65.
- [0293] 13. Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2002 Nov;8(11):3461-7.
- [0294] 14. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer research*. 1999 Jan 1;59(1):74-9.
- [0295] 15. Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M. SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *The Journal of biological chemistry*. 2012 Sep 7;287(37):30897-905.

- [0296] 16. Tomlinson GE, Breslow NE, Dome J, Guthrie KA, Norkool P, Li S, et al. Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' Tumor Study: age at diagnosis as a prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7641-5.
- [0297] 17. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
- [0298] 18. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods*. 2009 Aug 15;347(1-2):70-8.
- [0299] 19. Mello ML, Contente S, Vidal BC, Planding W, Schenck U. Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Experimental cell research*. 1995 Oct;220(2):374-82.
- [0300] 20. Di Donato A, Lacal JC, Di Duca M, Giampuzzi M, Ghiggeri G, Gusmano R. Micro-injection of recombinant lysyl oxidase blocks oncogenic p21-Ha-Ras and progesterone effects on *Xenopus laevis* oocyte maturation. *FEBS letters*. 1997 Dec 8;419(1):63-8.
- [0301] 21. Giampuzzi M, Botti G, Di Duca M, Arata L, Ghiggeri G, Gusmano R, et al. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagene III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Nov 17;275(46):36341-9.
- [0302] 22. Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, Sormunen R, Makikallio K, Kivirikko KI, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 2002 Nov 5;106(19):2503-9.
- [0303] 23. Bondareva A, Downey CM, Ayres F, Liu W, Boyd SK, Hallgrimsson B, et al. The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PloS one*. 2009;4(5):e5620.
- [0304] 24. Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6525-30.
- [0305] 25. Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews*. 2012 Aug;12(8):540-52.
- [0306] 26. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. *Cancer gene therapy*. 2014 May 2.
- [0307] 27. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Poised with purpose: cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013 Sep 1;12(17):2713-4.
- [0308] 28. Lander AD. The 'stem cell' concept: is it holding us backx *Journal of biology*. 2009;8(8):70.
- [0309] 29. Bertucci F, Bouvier-Labit C, Finetti P, Metellus P, Adelaide J, Mokhtari K, et al. Gene expression profiling of solitary fibrous tumors. *PloS one*. 2013;8(5):e64497.
- [0310] 30. Ma LJ, Li YG, Huang L, Han M, Ma BJ, Sun BJ, et al. [Expression of LOX and MMP-2 in gastric cancer tissue and the effects of LOX and MMP-2 on tumor invasion and metastasis]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2011 Jan;33(1):37-41.
- [0311] 31. Thomas C, Karnoub AE. Lysyl oxidase at the crossroads of mesenchymal stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2013 Mar;4(3):376-7.
- [0312] 32. Kordes U, Gesk S, Fruhwald MC, Graf N, Leuschner I, Hasselblatt M, et al. Clinical and molecular features in patients with atypical teratoid rhabdoid tumor or malignant rhabdoid tumor. *Genes*,

chromosomes & cancer. 2003 Feb;49(2):176-81.

[0313] 실시예 2

[0314] 인간 윌름스 종양 및 유잉 육종 이종증식의 장기간 증식

[0315] 물질들 및 방법들

[0316] **생체내 이종이식 형성 및 이식까지의 시간의 계산:** 동물 실험은 웨바 메디컬 센터의 동물 실험을 위한 실험 지침에 따라 수행하였다. 5~8주령, 암컷, 자연발증 당뇨병 면역결핍(NOD/SCID) 마우스에 대한 초기 ATRT 이종이식은 상기에 기재된 바에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 일차 ATRT 조직을 2~5mm의 조각들로 커팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다. 마우스는 병원체가 없는 환경에서 유지되었으며, 종양 성장에 대하여 매주 모니터링하였다. 매주 마다 이차 종양들이 촉진에 의해 검출되었다. 종양들은 1.5cm의 직경의 크기가 되었을 때 채취하였다. 각각 이식된 Xn에 대하여 이식까지의 시간, 절제까지의 시간, 중량 및 부피를 기록하였다. Xn 조직은 즉시 작은 조각들로 커팅하였고, NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 조직 삽입을 진행하였으며, 후속하는 Xn 증식을 위해 하기에 설명한 바와 같은 단일 세포 현탁액의 제조를 진행하였다. 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)가 함유된 IMDM(Iscove's modification of Dulbecco's medium) 내에서 샘플을 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 얻은 다음, 37°C에서 2시간 동안 콜라게나아제 IV로 처리하였다. 효소로 처리된 조직을 IMDM을 사용하여 2배 부피의 콜라게나아제 용액으로 연마하고, 현탁액을 여과하여(100 μ m 세포 스트레이너), 항생제가 함유된 IMDM으로 2회 세척하였다. 적혈구는 ACK RBS 용해용 버퍼(lysis buffer)로 제거하였다.

[0317] Xn 연속 계대배양은 두가지 방법을 사용하여 수행하였다: 1. 신선하게 회수된 ATRT Xn으로부터의 약 1×10^6 개의 해리된 세포들의 연속적 주입; 세포들을 무혈청 배지/마트리젤 1:1(BD Biosciences, San Jose, CA) 100 μ l 내에 주입하였다. 2. Xn 조직을 2~5mm 조각들로 커팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다.

[0318] 결과들

[0319] 유잉 육종(도 8a)과 윌름스 종양(도 8b) Xn의 연속적 증식은 종양 접종까지의 보다 짧은 시간과 연관이 있는데, 이는 보다 공격적인 표현형으로의 종양 거동의 변화를 나타낸다.

[0320] 실시예 3

[0321] 인간 막과 폐의 모세포종(PPB) 이종이식의 장기간 증식

[0322] **생체내 이종이식 형성 및 이식까지의 시간의 계산:** 동물 실험은 웨바 메디컬 센터의 동물 실험을 위한 실험 지침에 따라 수행하였다. 5~8주령, 암컷, 자연발증 당뇨병 면역결핍(NOD/SCID) 마우스에 대한 초기 ATRT 이종이식은 상기에 기재된 바에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 일차 ATRT 조직을 2~5mm의 조각들로 커팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다. 마우스는 병원체가 없는 환경에서 유지되었으며, 종양 성장에 대하여 매주 모니터링하였다. 매주 마다 이차 종양들이 촉진에 의해 검출되었다. 종양들은 1.5cm의 직경의 크기가 되었을 때 채취하였다. 각각 이식된 Xn에 대하여 이식까지의 시간, 절제까지의 시간, 중량 및 부피를 기록하였다. Xn 조직은 즉시 작은 조각들로 커팅하였고, NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 조직 삽입을 진행하였으며, 후속하는 Xn 증식을 위해 하기에 설명한 바와 같은 단일 세포 현탁액의 제조를 진행하였다. 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)가 함유된 IMDM(Iscove's modification of Dulbecco's medium) 내에서 샘플을 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 얻은 다음, 37°C에서 2시간 동안 콜라게나아제 IV로 처리하였다. 효소로 처리된 조직을 IMDM을 사용하여 2배 부피의 콜라게나아제 용액으로 연마하고, 현탁액을 여과하여(100 μ m 세포 스트레이너), 항생제가 함유된 IMDM으로 2회 세척하였다. 적혈구는 ACK RBS 용해용 버퍼(lysis buffer)로 제거하였다.

[0323] Xn 연속적 계대배양은 두가지 방법을 사용하여 형성하였다: 1. 신선하게 회수된 ATRT Xn으로부터의 약 1×10^6 개의 해리된 세포들의 연속적 주입; 세포들을 무혈청 배지/마트리젤 1:1(BD Biosciences, San Jose, CA) 100 μ l 내에 주입하였다. 2. Xn 조직을 2~5mm 조각들로 커팅하였고, 마우스의 등쪽에 피하 이식하였다.

[0324] **종양 증식 세포들의 상대적 빈도의 평가:** 낮은 계대수의 계대배양 및 높은 계대수의 계대배양으로부터의 Xn 세포들의 종양 형성 활성을 평가하고 비교하기 위해, 100 μ l의 PBS와 100 μ l의 매트릭셀 내에 현탁된 세포의 연속 희석액(1×10^6 - 50세포들)을 NOD/SCID 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 암 증식 세포들의 상대적 빈도의 평가는 ELDA 소프트웨어 온라인을 사용하여 온라인 계산하였다(bioinfodotwehidotedudotau/software/elda/).

[0325] **칩 어레이:** 모든 실험들을 Affymetrix HU GENE1.0st 올리고뉴클레오타이드 어레이를 사용하여 수행하였다. 각 샘플

플로부터의 전체 RNA는 제조사의 지침에 따라 비오틴화(biotinylated)된 표적 DNA를 제조하기 위해 사용되었다. 각 시료로부터 생성된 표적 cDNA는 Affymetrix Gene Chip Instrument System을 사용하여 제조사의 지침에 따라 처리하였다. 품질 관리 규정에 대한 세부 사항은 온라인에서 확인할 수 있다. 유의적으로 변화된 유전자를 여과하였고, 적어도 2배(p값: 0.05)까지 변화하였다.

[0326] **PPB Xn의 면역조직화학 염색:** 4- μ m 두께의 절편들을 면역조직화학 검사를 위해 일차 PPB 및 PPB Xn으로부터 절단하였다. 면역 염색은 상기에 기술한 바와 같이 수행하였다. 간단하게, 상기 절편들은 항원의 산화를 피하기 위해 가공되었다. 면역 염색 전에, 항원 회수를 위해 절편들을 97℃에서 10분 동안 PH 6.0의 10mM의 구연산 버퍼로 처리한 다음, 10분 동안 3%의 H₂O₂로 처리하였다. 이어서, 히스토티에인 플러스 키트(Zymed, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 표지된 스트렙타비딘-비오틴(LAB-SA) 방법을 사용하여 상기 슬라이드를 염색하였다. 상기 면역 반응은 HRP-계 chromogen/substrate 시스템(액체 DAB 기질 키트 - Zymed, San Francisco, CA, USA)에 의해 시각화되었다. 항-인간 NCAM 항체(BD Biosciences, #611195)를 1:1200으로 희석하여 사용하였다. 상기 면역 반응은 HRP계 chromogen/substrate 시스템(액체 DAB 기질 키트 - Zymed, San Francisco, CA, USA)에 의해 시각화되었다.

[0327] **정량적 실시간 역전사 PCR 분석 - 유전자 발현 분석:** 정량적 역전사 PCR (qRT-PCR)은 NCAM의 발현의 접힘 변화를 결정하기 위해 수행하였다. 제조사의 지침에 따라, RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하여 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. 전체 RNA에 대한 고용량 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems, California USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. TaqMan Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems, California, USA)의 존재하에서, ABI7900HT 서열 검출 시스템(Perkin-Elmer/Applied Biosystems, California, USA)을 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 유전자 특이적 TaqMan Gene Expression Assay-Pre-Made 키트(Applied Biosystems, California, USA)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 각각의 분석 반응은 3회 수행되었다. HPRT1 또는 GAPDH는 실험 분석을 통해 내인성 대조군으로 사용되었다. PCR 결과는 SDS RQ Manager 1.2 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 통계적 분석은 네페어 양측 검정(non-paired 2-tails T-test)을 사용하여 수행하였다. 통계학적 유의성은 P<0.05로 고려되었다.

[0328] **결과들**

[0329] PPB Xn의 연속적 증식은 종양 접종까지의 보다 짧은 시간 및 가속화된 종양 성장과 관련이 있고, 이는 계대배양에 따른 종양 공격성의 촉진을 나타낸다. 초기 (계대배양 1~4)와 후기 (계대배양 7~12) Xn을 비교하면, 종양 접종에 대한 계대배양 시간은 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 58일에서 33일로 감소하였다 (p <0.02).

[0330] [표 6]

	접종비율(%)	접종까지의 시간(일)*	절제까지의 시간(일)	평균 종량	평균 부피	절제율에 대한 종량/시간(평균)
초기	63.16	58.08	77.57	1.43	0.88	0.02
후기	87.50	33.85	51.94	1.83	1.03	0.04

[0331] 한계 희석 이중이식 실험들은 초기 및 후기-계대배양 Xn으로부터 유래된 PPB 세포들로 수행하였다. 상기 분석은 높은 계대수의 계대배양 Xn에서 CSC 빈도에 대한 현저한 양성 선별을 나타낸다. 하기 표 7에 나타낸 바와 같이, 초기 및 후기 Xn 계대배양 CSC 빈도를 비교한 바, 1/1581에서 1/304 세포들(p=0.009)로 상승하였다.

[0332] [표 7]

계대배양	주입된 세포수	접종율 (engraftment rate)	출기세포 빈도
초기	1000	3/4	1/1581
	500	3/4	
	100	0/4	
후기	1000	3/4	1/304
	500	4/4	
	100	2/4	
	50	1/4	
	10	0/4	

[0333] 유전자 히트 맵을 도 9에 나타내었고, 상이한 PPB 샘플들, 성인 폐(AL) 및 태아 폐(FL) 사이의 몇몇 증식 마커들(예를 들면, *K167*, *E2F2*, 및 *CDK1*), 자가 재생 폴리콤 유전자(예를 들면, *BMI1*, *TOP2A*, and *EZH2*), 전이 표지(metastasis signature) 유전자들의 발현 패턴을 비교하면, 높은 계대수의 계대배양물은 고도로 증식되고 침

투성 유전자 표지를 갖는 자가 재생 유전자의 상향 조절을 나타내고, 이는 전이 거동을 예상케한다는 것을 나타내었다.

[0336] NCAM1에 대한 몇개의 Xn 계대배양(P4, P8, P12 및 P17)의 면역조직화학 (IHC)은 도 10a에 도시한 바와 같이 Xn 연속 증식과 함께 증가된 발현을 나타낸다. qRT-PCR 분석 결과, 성인 폐 대조구(오른쪽)와 비교하여 일차 종양 내에서 고도의 NCAM1 발현을 나타내고, 성인 폐(왼쪽)와 비교하여 태아 폐에서의 고도의 NCAM1 발현을 나타내었고, 이는 NCAM1이 발암(carcinogenesis) 및 암 발전 과정에서 중요한 역할을 한다는 사실을 강조한다(도 10b).

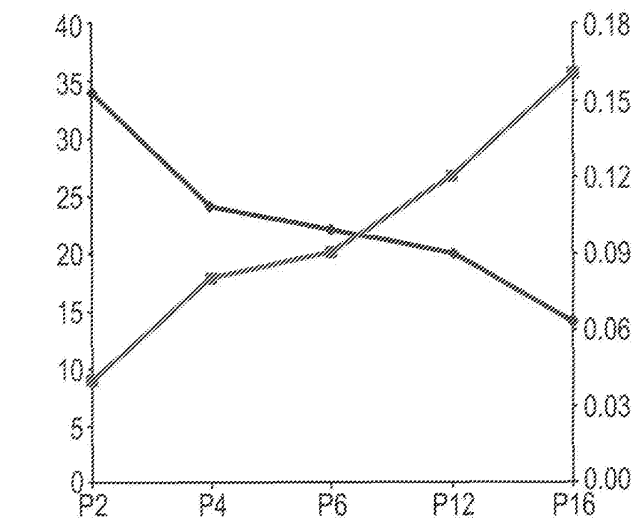
[0337] CD44에 대한 몇개의 Xn 계대배양(P4, P8, P12 및 P17)의 IHC는 도 11a~b에 도시된 바와 같이, Xn 연속 증식으로 발현이 증가됨을 나타낸다.

[0338] 비록 본 발명이 이들의 특정한 구체예들과 관련되어 기술되었지만, 많은 대안들, 변경들 및 변형들이 당업자에게 명백하다는 것은 자명하다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구항들의 기술사상 및 넓은 범위 내에 있는 모든 대안들, 변경들 및 변형들을 포함한다.

[0339] 구체적 및 개별적으로 나타낸 각각의 출원들, 특허 또는 특허 출원들은 참고문헌으로 본 명세서에 통합된 것처럼, 본 명세서에서 언급된 모든 간행물들, 특허 및 특허 출원들은 동일한 범위 내에서 참고문헌으로서 전체 내용이 본 명세서에 통합된다. 또한, 본 출원에서 임의의 참고 문헌의 인용 또는 확인은 그러한 참고가 본 발명의 선행 기술로서 이용가능하다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 부분 명칭들이 사용되었으나, 그들은 반드시 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다.

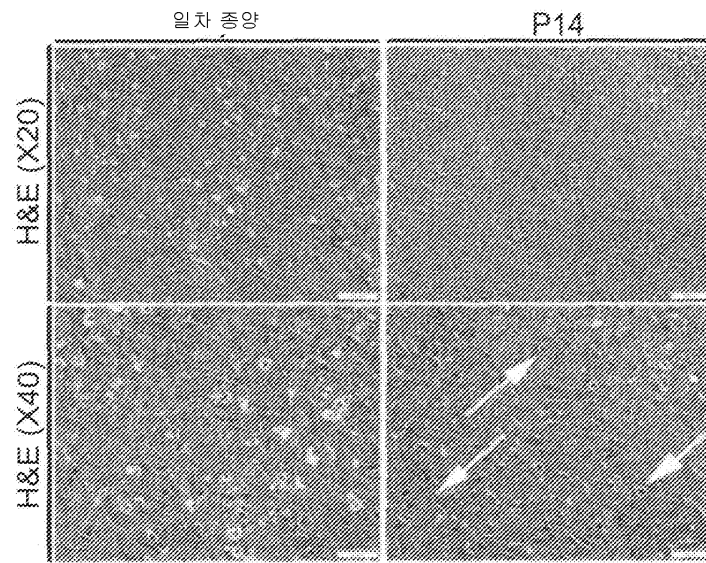
도면

도면1a

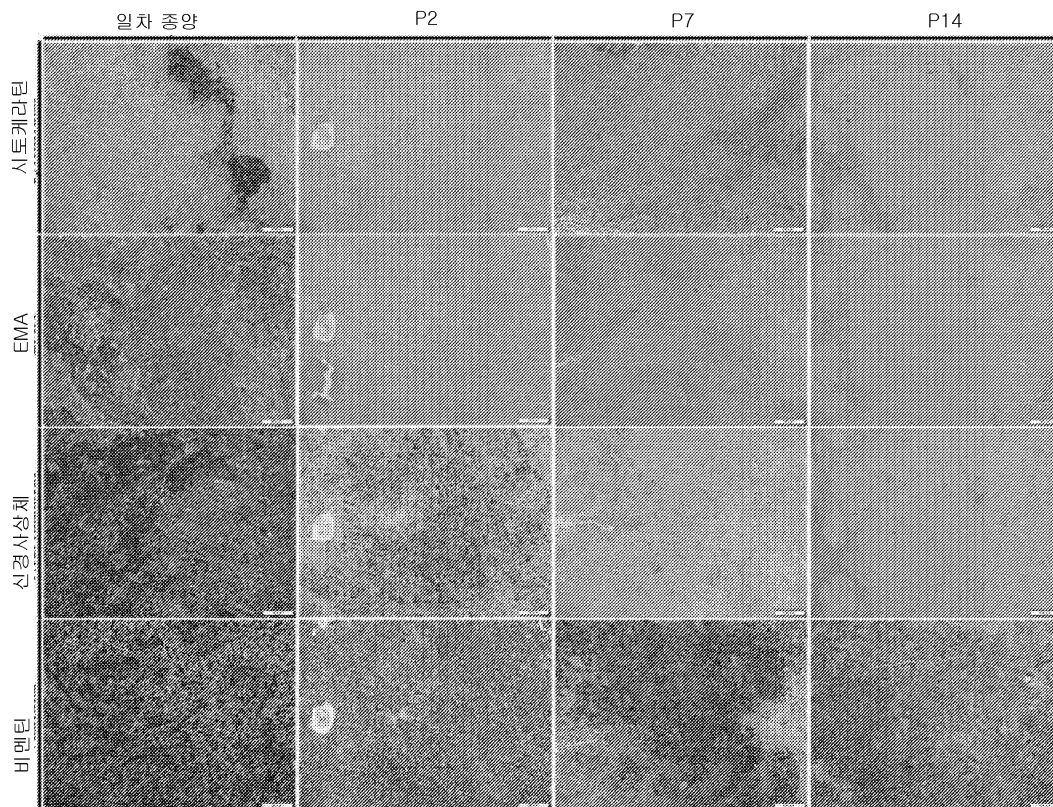


● 이식까지의 일수(days) ■ 절제술에 대한 이종이식 종량/일

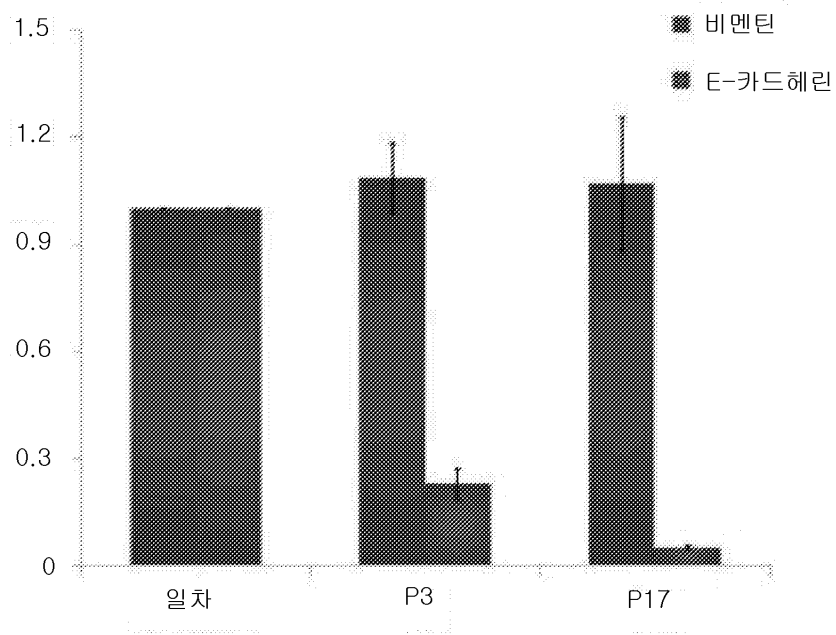
도면1b



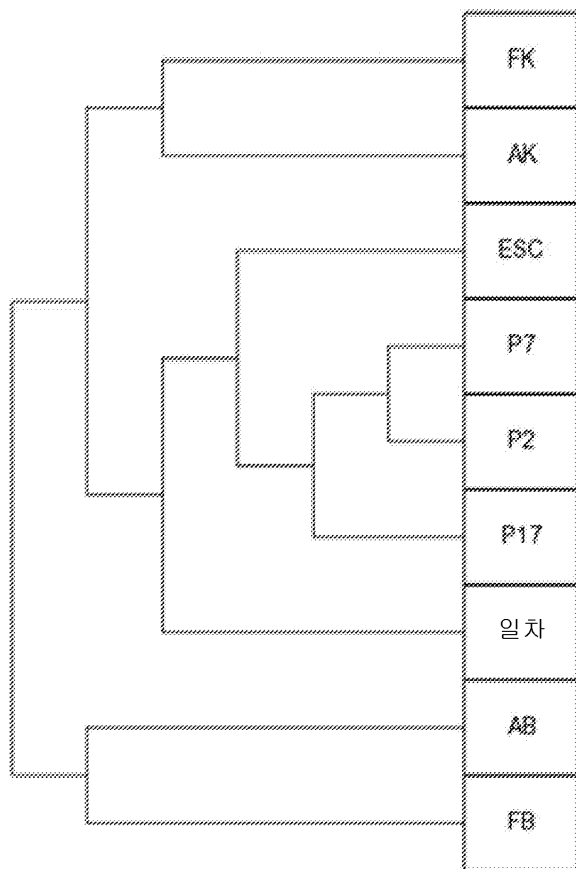
도면1c



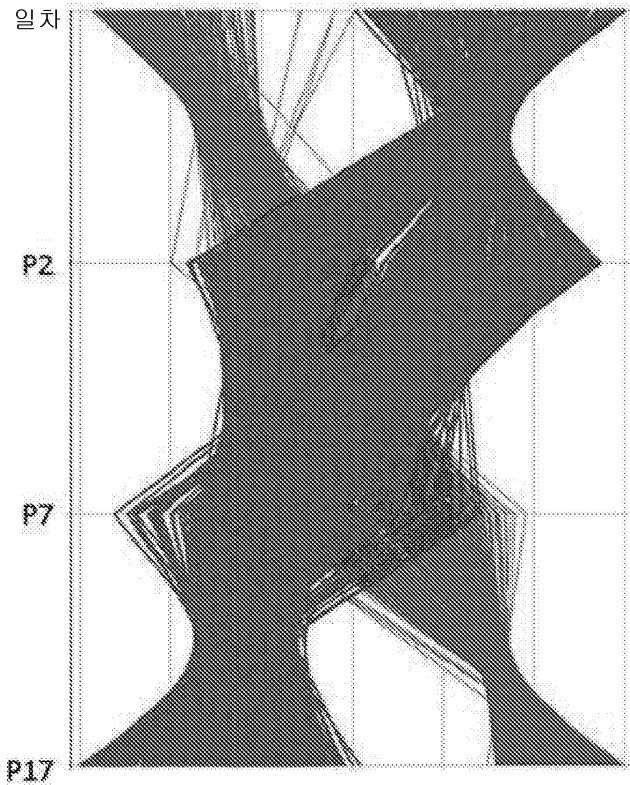
도면1d



도면2a



도면2b



도면2c

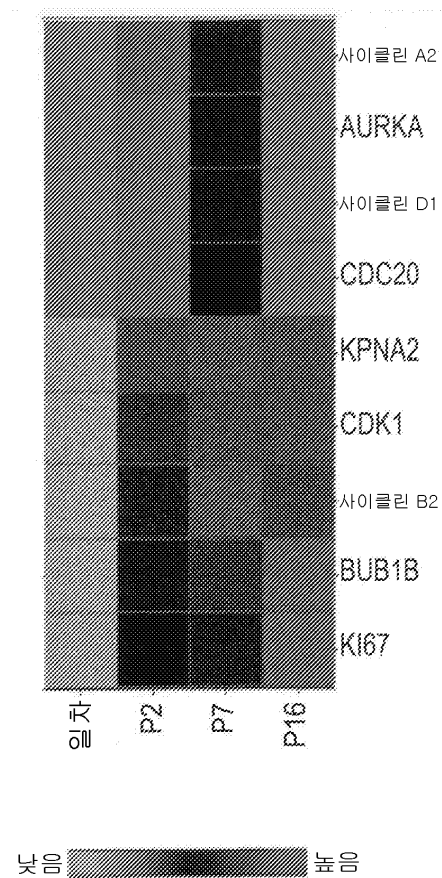
최대 상향 조절된 10개의 유전자들

유전자	ID	기호	P2 vs P	P7 vs P	P17 vs P
CXCL6	11730801	케모카인(C-X-C모티프)리간드6	12.2	119.4	267.0
CXCL5	11728715	케모카인(C-X-C모티프)리간드5	12.1	55.8	246.8
SEMA3C	11723668	세마 도메인	55.0	105.2	235.4
GP6A	11730201	글리코프로테인 M6A	28.5	120.7	169.4
FSTL5	11743828	폴리스타틴형 5	10.2	110.8	139.9
ALDH1A1	11743044	알데하이드 디하이드로게나아제1 패밀리, A1	23.7	100.8	130.4
ANXA1	11717514	아넥신 A1	41.9	63.3	115.0
LOX	11728200	리실옥시다아제	32.5	25.4	109.5
DSEL	11730623	데르마탄 설페이트 에피머라아제형	14.0	38.6	97.6
DLX2	11735181	디스탈-리스 호메오박스 2	5.7	4.6	76.0

최대 하향 조절된 10개의 유전자들

유전자	ID	기호	P2 vs P	P7 vs P	P17 vs P
HBG1	11758698	헤모글로빈, 감마 A	-363.1	-381.3	-433.4
EBF3	11725867	초기 B-세포 인자 3	-1.2	-2.0	-197.7
HB8	11715347	헤모글로빈, 베타	-147.2	-120.8	-168.6
SPP1	11727790	분비된 포스포프로테인 1	-86.2	-18.1	-123.0
CD163	11728679	CD163 분자	-87.4	-96.3	-102.5
SDC2	11720753	신데칸 2	-1.5	-12.4	-94.1
RNASE1	11718222	리보뉴클레아제 RNAase A 패밀리, 1	-69.7	-86.5	-82.3
FIBIN	11720338	핀 버드 개시 인자 동족체 (fin bud initiation factor homolog)	-3.5	-3.6	-73.5
SERPINE2	11716631	세르핀 펩티다아제 억제제, 클레이드 B	-4.4	-82.3	-68.9
SSTR1	11728041	소마토스타틴 수용체 1	-8.7	-8.1	-68.4

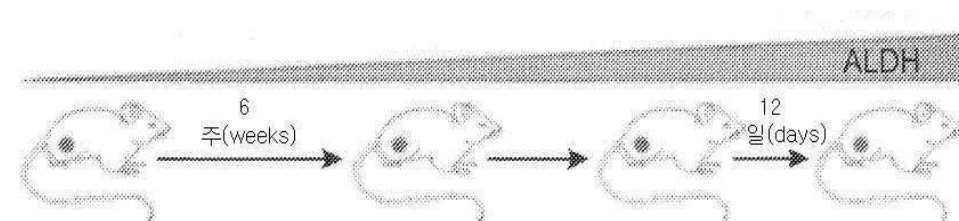
도면2d



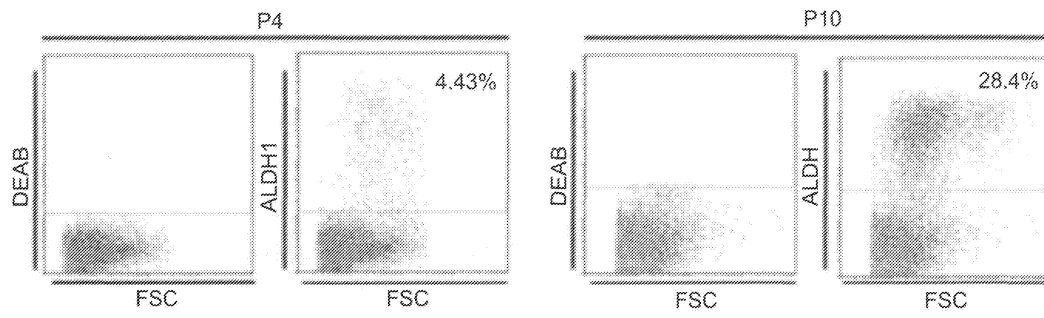
도면2e

기능성 주석	p-값	예측된 활성 상태	활성화 z-스코어	#분자들
세포 사멸	2.20E-15	감소	-2.8	457
괴사	2.27E-14	감소	-2.431	363
세포 분화	3.97E-12	감소	-4.112	287

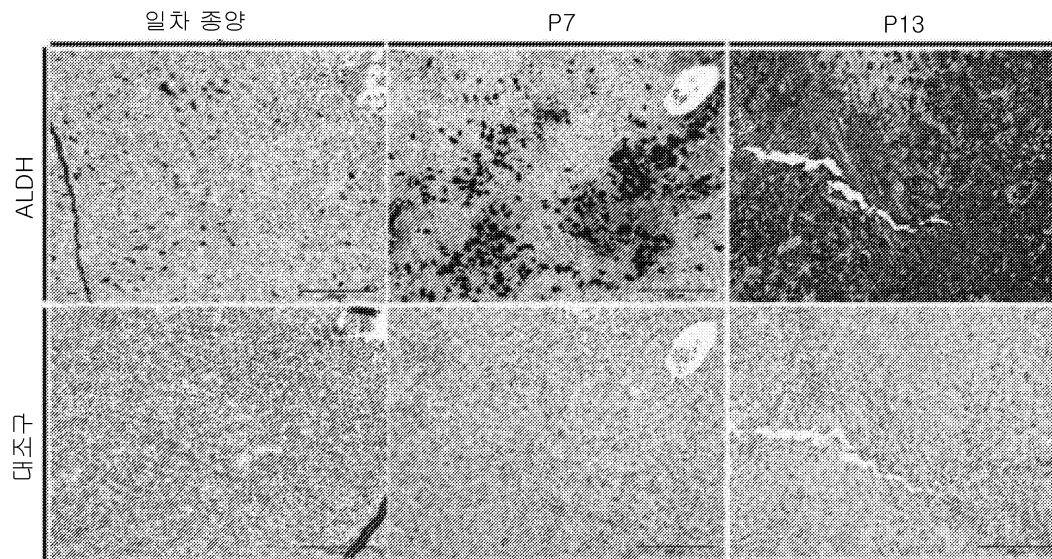
도면3a



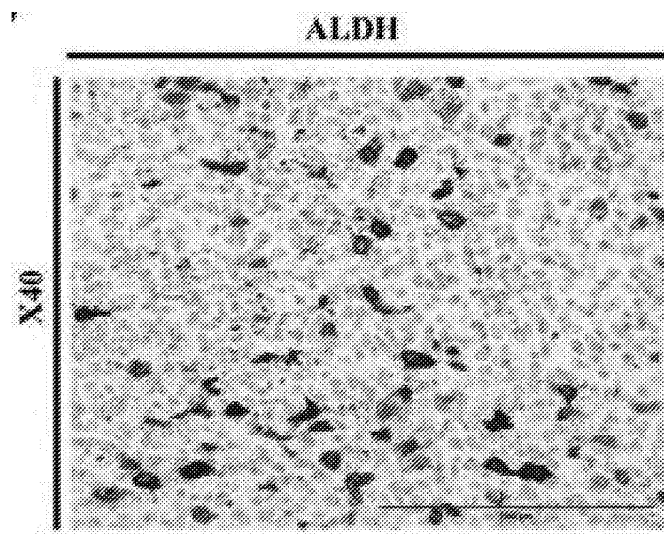
도면3b



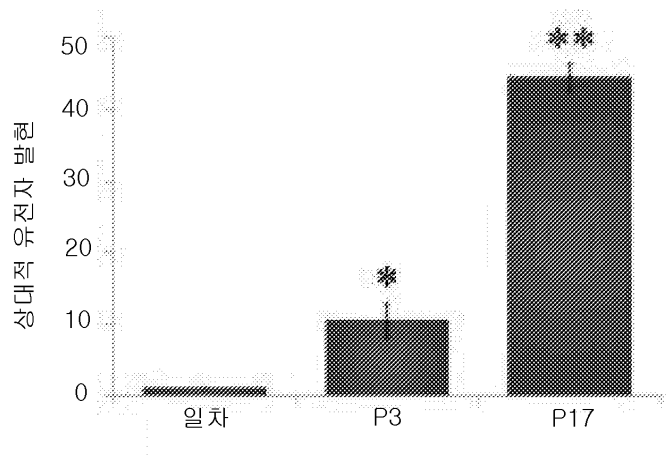
도면3c



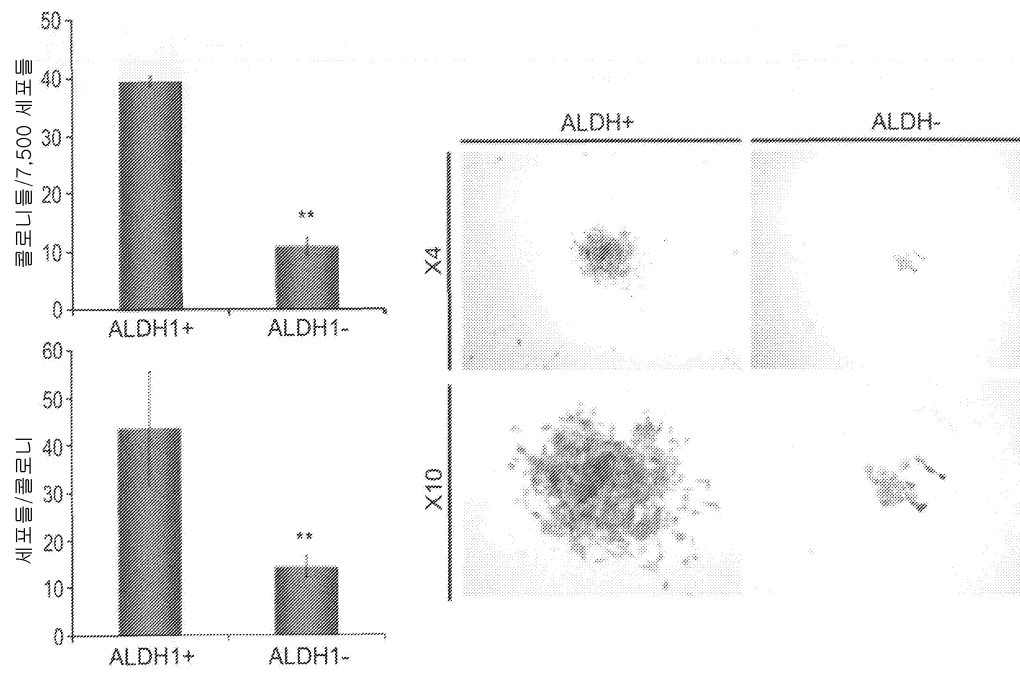
도면3d



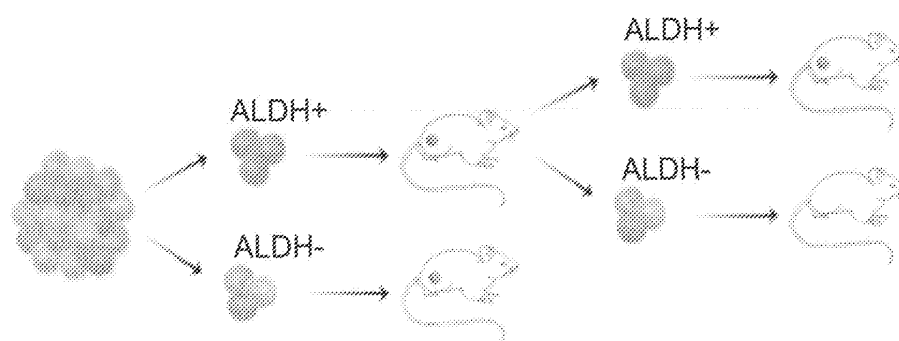
도면3e



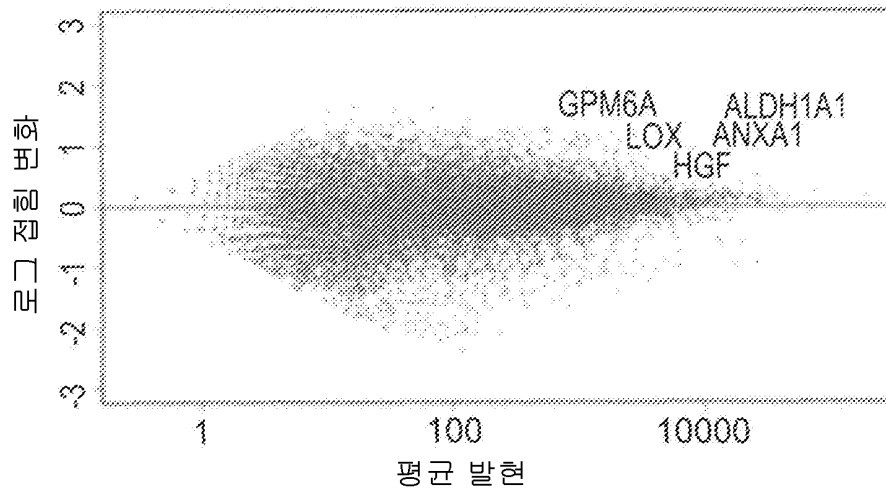
도면4a



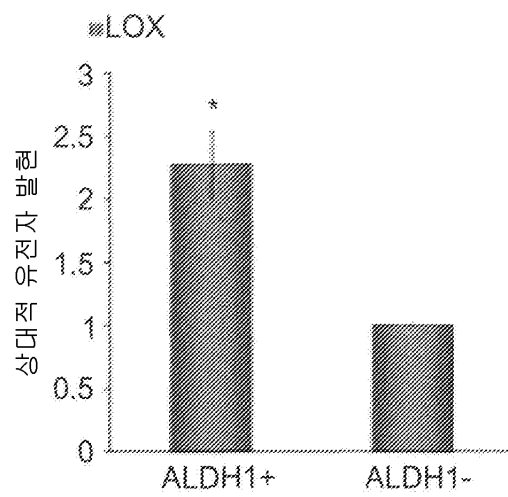
도면4b



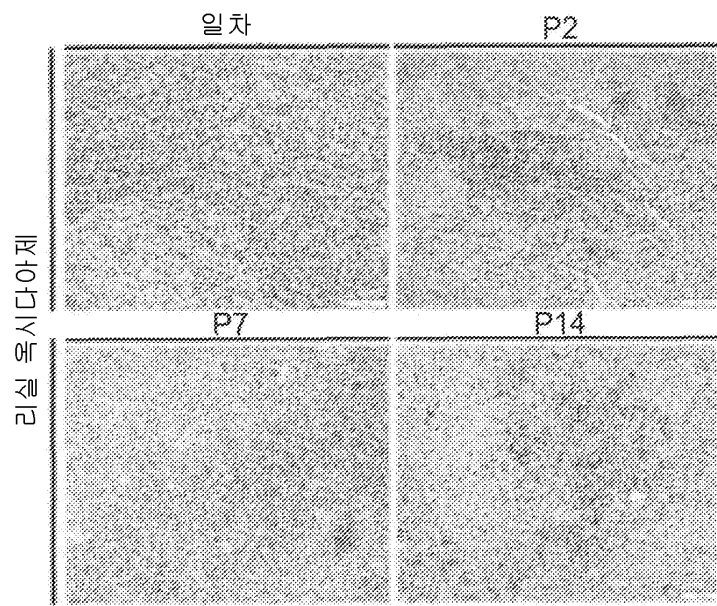
도면4c



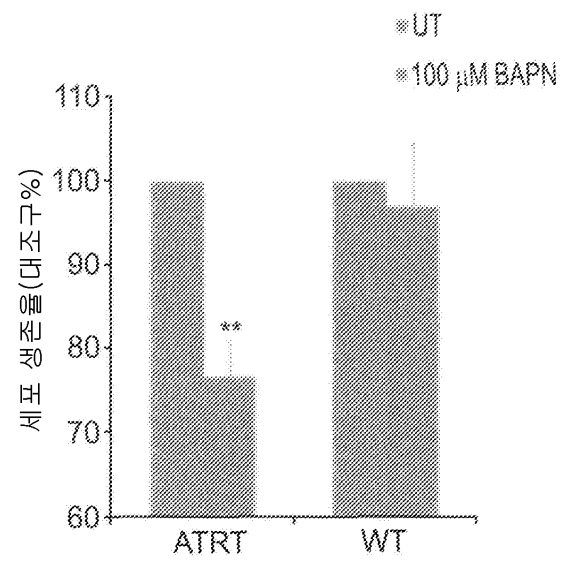
도면4d



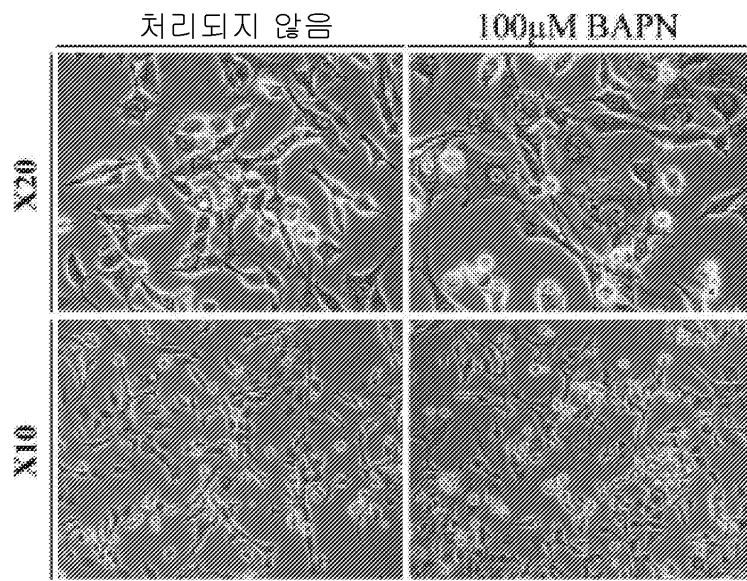
도면5a



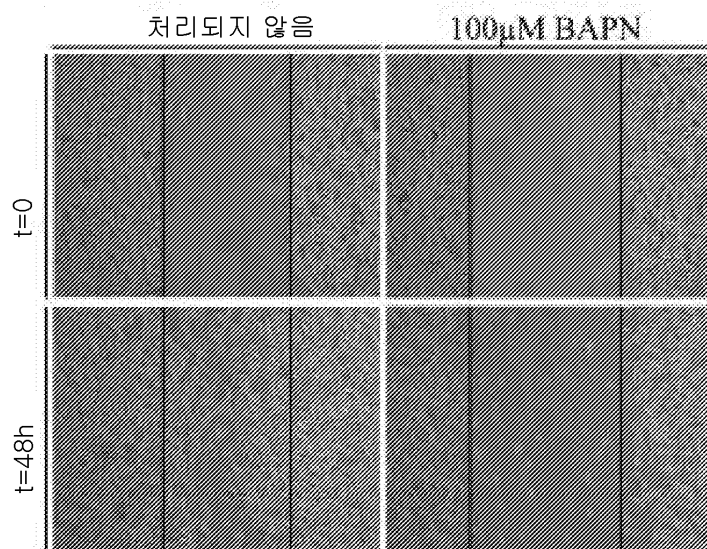
도면5b



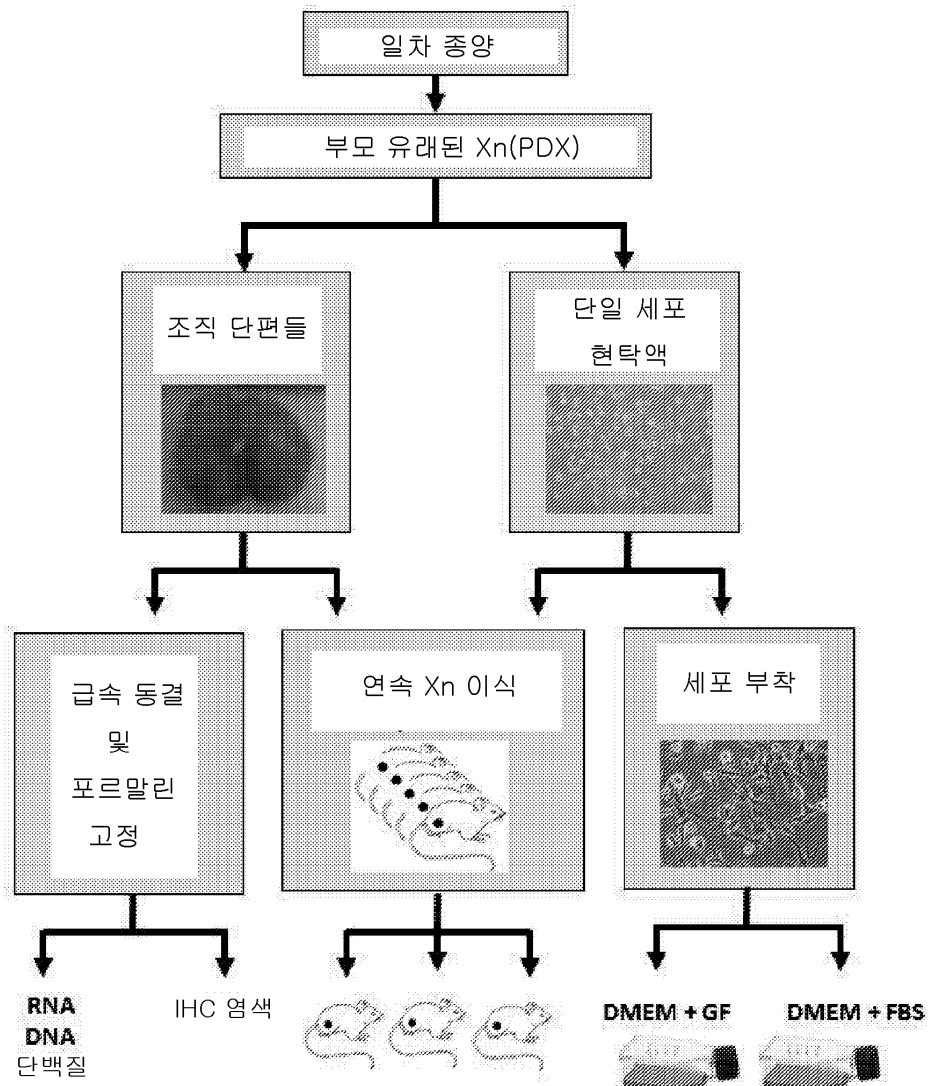
도면5c



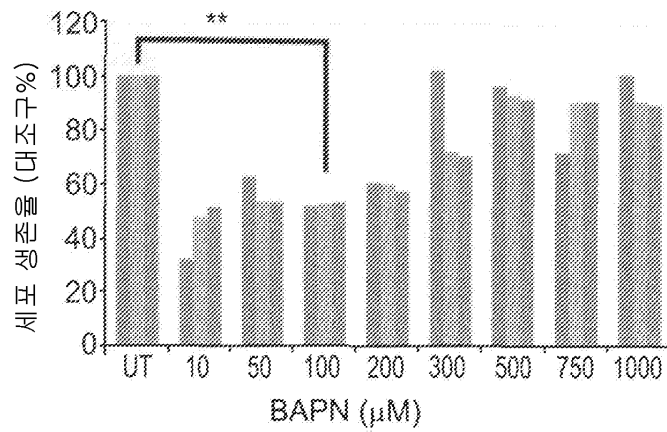
도면5d



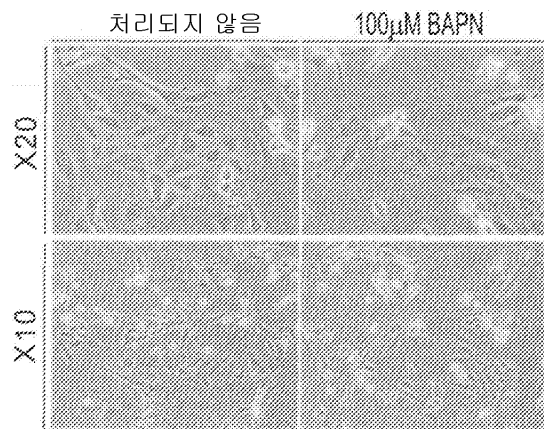
도면6



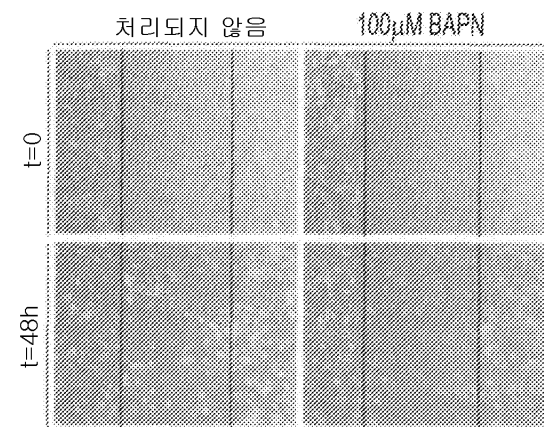
도면7a



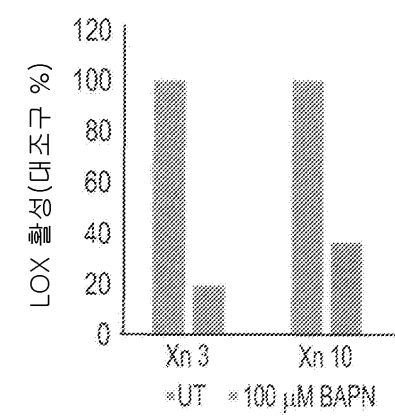
도면7b



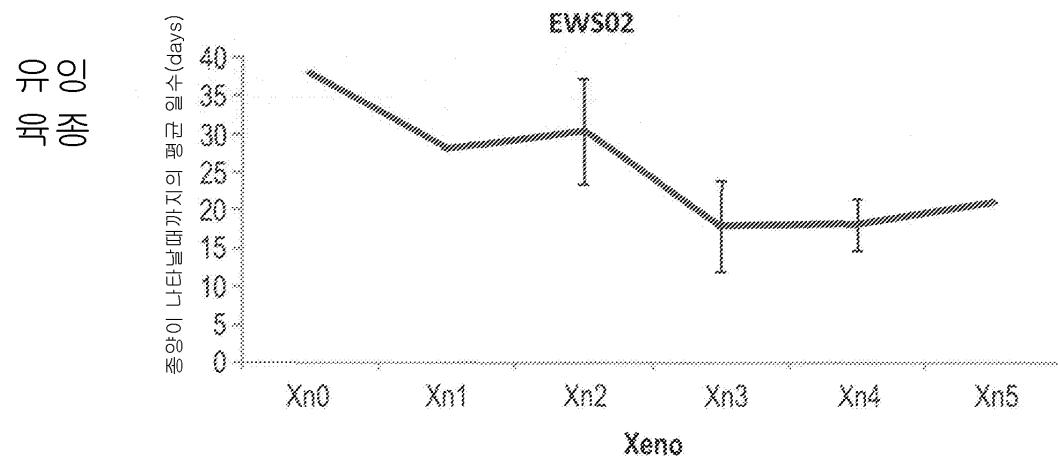
도면7c



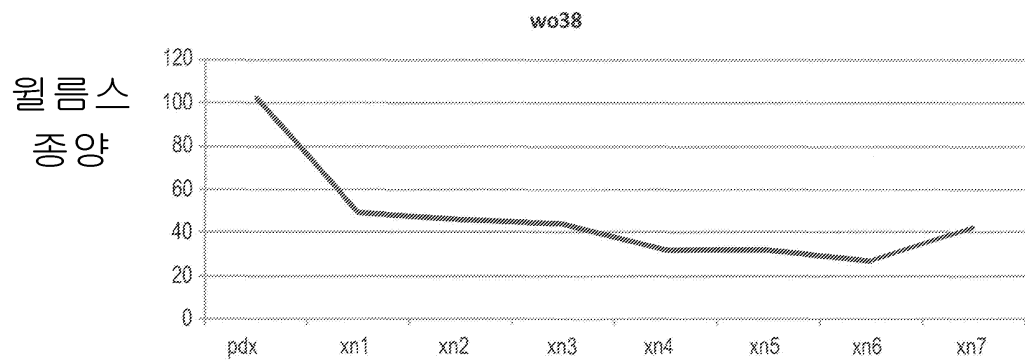
도면7d



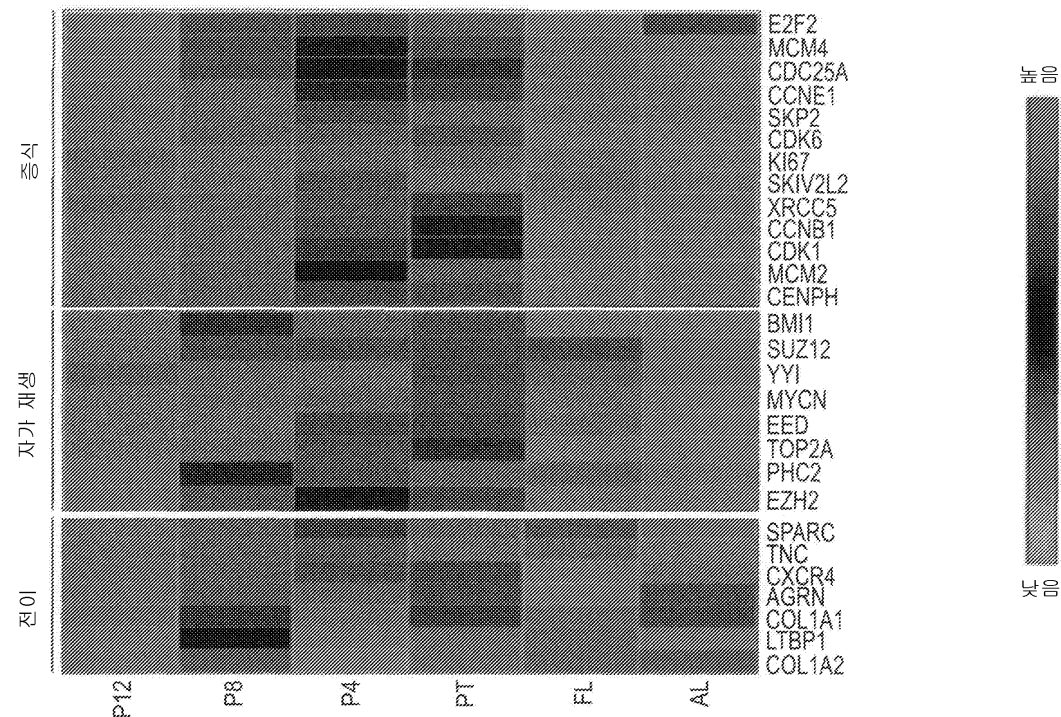
도면8a



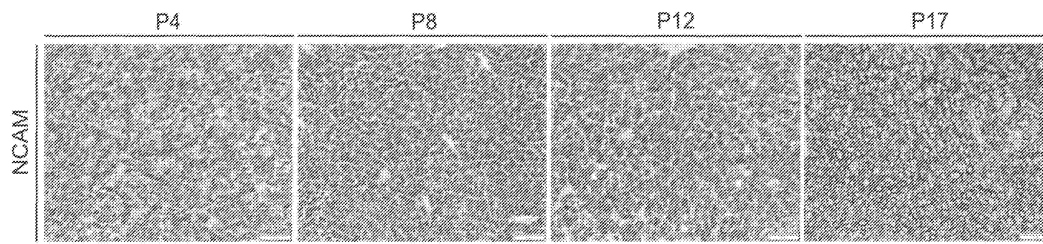
도면8b



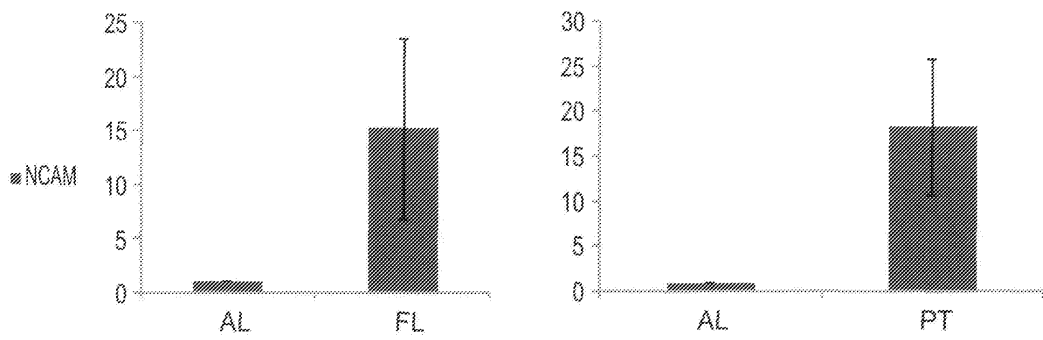
도면9



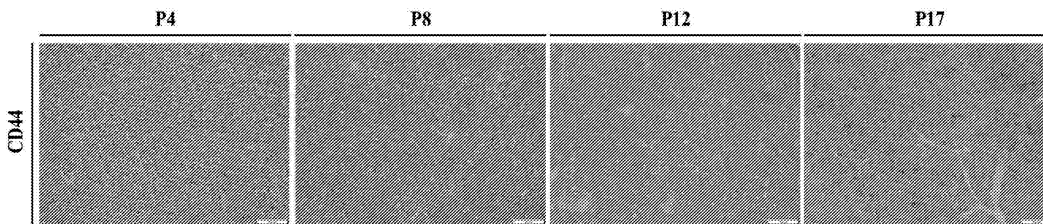
도면10a



도면10b



도면11a



도면11b

