(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0001596
(43) 공개일자 2018년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5023 (2013.01)
C12Q 1/68 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7037415(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년01월19일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7018141
원출원일자(국제) 2009년01월19일
심사청구일자 2016년08월04일
(85) 번역문제출일자 2017년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/031395
(87) 국제공개번호 WO 2009/092068
국제공개일자 2009년07월23일
(30) 우선권주장
61/022,033 2008년01월18일 미국(US)
61/073,434 2008년06월18일 미국(US)

(71) 출원인
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17
(72) 발명자
카시스, 아민, 아이.
미국 02467 매사추세츠주 체스트넛 힐 사우스 스트리트 28
(74) 대리인
양영준, 김영

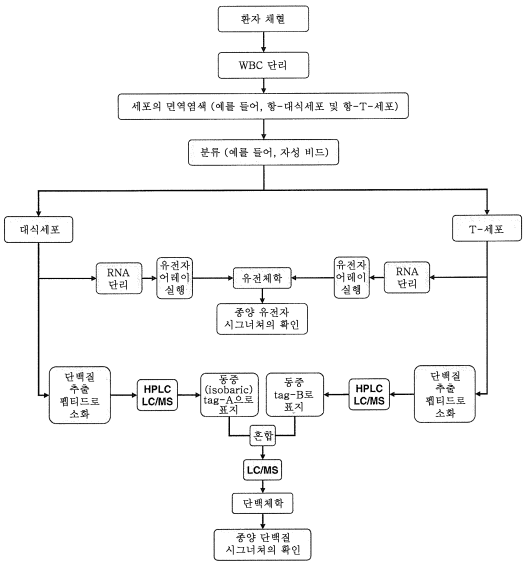
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **체액 내에서 질병 또는 병태의 시그너쳐의 검출 방법**

(57) 요 약

개체에서 암 세포의 존재를 진단하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 암이 있는 개체에서 종양-특이적 시그너쳐를 확인하기 위한 방법 및 조성물을 또한 제공한다. 감염된 개체에서 감염 물질의 존재를 진단하고/하거나 감염 물질-특이적 시그너쳐를 확인하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 개체에서 질병의 존재를 진단하기 위한 방법 및 조성물을 또한 제공한다. 질병이 있는 개체에서 질병-특이적 시그너쳐를 확인하기 위한 방법 및 조성물을 또한 제공한다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 33/5047 (2013.01)
G01N 33/505 (2013.01)
G01N 33/5052 (2013.01)
G01N 33/5055 (2013.01)
G01N 33/569 (2013.01)
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간을 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 미국 특허 출원**

[0002] 본원은 각각 그 전부가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함되는, 2008년 6월 18일 출원된 미국 특허 가출원 61/073,434 및 2008년 1월 18일 출원된 61/022,033의 출원일의 이익을 주장한다.

[0003] 본 발명은 환자의 체액으로부터 얻은 세포에서 태아의 성별과 같은 상태 또는 질병의 마커 (marker), 예를 들어 종양 게놈, 단백체 (proteomic), 대사체, 복합당질체 (glycomic), 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 시그너처 (signature)의 확인 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 종양은 정상 세포로부터 유전자 및 후생학적 (epigenetic) 변경의 축적 시에 유발된다. 상기 다단계 과정은 정상 세포의 악성 표현형으로의 점진적인 변환을 일으키는 다수의 유전자 변경을 수반한다. 이들 변경은 DNA 서열에서 비가역적인 변화 (예를 들어, 돌연변이, 결실, 전위)로 이루어지고, 발암유전자의 활성화, 종양 억제인자 유전자의 불활성화, 및 유전자의 융합을 일으킨다. 이들 사건의 확률성은 그들에 특유한 표현형을 제공하는 암의 표시인 형질전환된 세포 분자 지문 (예를 들어, 하나 이상의 세포 성분, 예를 들어 DNA, RNA, 단백질, 지질, 탄수화물 등)을 제공하는 유전적 이질성을 부여한다. 결론적으로, 다양한 종양에 의해 특유한 유전자 세트 특징/시그너처가 발현되는 것으로 알려져 있다 ([Perou et al. (2000) Nature 406:747]; [Lobenhoferet al. (2001) Health Perspect. 109:881]; [van't Veer et al. (2002) Nature 415:530 (2002)]; [Liotta and Kohn (2003) Nat. Genet. 33:10]; [Ginos et al. (2004) Cancer Res. 64:55]; [Liu (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:3531]; [Grigoriadis et al. (2006) Breast Cancer Research 8:R56]).

[0005] 원발성 종양과 전이성 종양은 모두 증상을 보이지 않은 상태로 수년 동안 검출되지 않을 수 있다. 그러나, 이들 잠복 및 잠재 종양, 및 이전에 진단된 원발성 및 전이성 고형 종양은 매일 순환계 내로 종양 1 g당 약 1백만 내지 6백만 개의 세포를 흘려보낸다. 많은 비율의 이들 순환 종양 세포 (CTC로 알려짐)는 세포자멸 (apoptosis)을 겪고 죽는 반면, 구별되는 세포 집단들은 전이성 질병으로 발달할 수 있다. 종양 세포 세포자멸체, DNA, 뉴클레오좀 (nucleosome), RNA 및 단백질이 또한 암 환자의 혈액 내에서 발견된다 (Holmgren et al., Blood 93, 3956 (1999)). 종양의 시그너처가 확인될 수 있는지 및 이들이 암을 검출 또는 모니터링하기 위해 사용될 수 있는지 조사하기 위해 노력이 경주되었다 (문헌 [Ransohoff, Nature Reviews Cancer 5, 142 (2005)] 및 [McLerran et al., Clin. Chem. 54, 44 (2008)] 참조).

[0006] DNA는 다양한 진핵 세포 내로 쉽게 형질감염될 수 있고, 즉, 일단 세포의 세포질 내로 내재화되면 그의 유전자를 숙주 세포의 게놈 내로 통합시킬 수 있다. 예를 들어, 호중구 및 대식세포는 빠르고 매우 효율적으로 (50%-90%) 형질감염될 수 있다. 원핵 세포로부터 진핵 세포로의 DNA의 통과가 또한 입증되었고, 진핵 세포로부터 진핵 세포로 발생하는 것으로 생각된다. 종양 세포로부터 방출된 DNA는 높은 형질전환 활성을 갖는다. 배양된 종양 세포로부터의 상등액 배지를 정상 세포에 첨가하면, 칼슘 침전물로서 투여된 클로닝된 ras 유전자를 사용한 형질감염 후에 발생하는 것만큼 많은 형질전환된 병소 (focus)가 발생한다. 또한, 건강한 래트에게 종양 보유 래트로부터의 혈장 (따라서, 종양 DNA 함유)을 주사할 때, 종양 마커 유전자가 그들의 폐 세포의 DNA에서 발견되었고, 즉, 종양 유전자가 폐 세포 내에서 전사되었다.

[0007] 백혈구는 만능 조혈 줄기세포로서 골수에서 시작하고, 골수계 (단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구 및 호염기구) 또는 림프계 (T 및 B 림프구 및 천연 킬러 세포)를 따라 발달한다. 골수계 세포 (예를 들어, 호중구 및 대식세포)의 주기능은 감염성 유기체, 살아있는 원치 않는 손상된 세포, 늙은 세포와 죽은 세포 (세포자멸성 및 괴사

성)의 포식작용, 및 세포 파쇄물의 청소이다. 건강한 동물로부터의 포식세포는 복제하지 않고 이배체(diploid)이고, 즉, DNA 지수가 1이다. 평균적으로, 각각의 세포는 <10 ng DNA, <20 ng RNA, 및 <300 ng의 단백질을 함유한다.

[0008] 변이, 예를 들어, 세포 유형, 성별, 나이, 개체간 차이 등과 연관된 것의 뚜렷한 유전자 발현 패턴이 건강한 공여자의 WBC에서 인식되었다. 예를 들어, "림프구-연관된" 클러스터 (cluster)는 55개의 특유한 유전자를 갖는다. 호중구에서, 52개의 특유한 유전자 클러스터의 발현에서 유의한 변이성이 또한 보고되었다. 상기 클러스터 내의 유전자는 다음과 같이 3개의 특이성이 더 커지는 순서의 패밀리로 분류될 수 있다: (i) 많은 종류의 순환 면역세포 내에서 어디서나 발현되는 것; (ii) 골수계의 세포에 의해 발현된 것; 및 (iii) 과립구에 특이적인 것.

[0009] 다양한 WBC 아집단의 생애는 수일 (예를 들어, 호중구) 내지 수개월 (예를 들어, 대식세포)로 다르다. 다른 세포 유형처럼, 백혈구는 나이가 들고 결국 죽는다. 그들의 노화 과정 동안, 인간 혈액- 및 조직-유래 포식세포 (예를 들어, 호중구)는 모두 프로그래밍된 (programmed) 세포 사멸 (즉, 세포자멸)의 전형적인 마커, 예를 들어 카스파제 활성화, 농축핵, 및 염색질 절편화를 보인다. 이들 세포는 또한 그들의 형질막의 세포외 표면 상에 많은 "이트-미 (eat-me)" 깃발 (예를 들어, 포스파티딜세린, 당)을 나타낸다. 그 결과, 죽어가는 및 죽은 세포 및 그의 하위세포형 (subcellular) 단편은 다른 포식세포에 의해 조직 및 혈액으로부터 제거된다.

[0010] 포식세포의 세포자멸은 그들의 활성화 후에 가속된다. 예를 들어, 호중구에 의한 에스. 아우레우스 (*S. aureus*)의 탐식 후에, 포스파티딜세린이 그들의 형질막 상에 외면화되어, 대식세포에 의한 그들의 신속한 포식작용을 일으킨다. 활성화된 단핵구는 또한 상승된 수준의 포스파티딜세린을 갖는 다양한 종양-세포주에 결합하는 것으로 나타났다.

[0011] 순환 포식세포는 살아있는 및 죽은 CTC와 그의 단편을 탐식하는 것으로 알려져 있다 (포식 세포의 DNA (및 다른 세포 구성분) 함량의 증가를 일으키는 과정). 예를 들어, 세포자멸성 종양 세포는 대식세포 및 수지상 세포에 의해 포식되는 것으로 나타났다. 그러한 포식 활성의 결과로, 전립선암 환자로부터 얻은 혈액 대식세포는 양성 전립선 병태의 환자로부터 얻은 대식세포보다 훨씬 더 높은 수준의 전립선-특이적 항원 (PSA)을 세포 내에 함유하는 것으로 나타났다 (문헌 [Herwig et al., Clinical Prostate Cancer 3, 184 (2004)] 및 [Herwig et al., Prostate 62 290 (2005)] 참조). 이는 종양 세포를 포식한 결과인 것으로 생각된다. 태아 줄기세포, 유핵 적혈구, 태아 림프구, 및 유의한 양의 무세포 태아 핵산이 모체 혈액 내에 순환하는 것으로 알려져 있다 (문헌 [Cheung et al., Nat. Genet. 14, 264 (1996)] 참조).

[0012] 인간 버킷 (Burkitt) 림프종 세포로부터 유래된 세포자멸체 (막-봉입된 세포 단편)를 인간 단핵구 (포식성) 또는 혈관 평활근 세포 (비-포식성)와 함께 배양할 때, 단핵구는 높은 비율의 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 (EBV)-특이적, 종양-유전자-양성 세포를 보인 반면, 평활근 세포는 약 0.01% 빈도의 섭취 (uptake) 및 발현을 보이는 것으로 또한 나타났다.

[0013] 개체, 예를 들어 질병에 걸린 것으로 알려지지 않은 개체 또는 재발성 질병에 걸린 개체에서 질병 (예를 들어, 종양)의 존재의 조기 진단을 가능하게 하는 방법이 필요하다. 본 발명의 하나의 목적은 인간을 포함한 동물에서 백혈구 (WBC)의 아집단 내에서 질병-특이적 (예를 들어, 종양-특이적) 마커, 예를 들어, 단백질, RNA, DNA, 탄수화물 및/또는 지질 등의 검출을 용이하게 하는 것이다.

발명의 내용

[0014] <발명의 개요>

[0015] 본 발명의 실시태양은 특정 질병 또는 병태와 연관된 마커의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 포식세포의 사용에 기초한다. 본 발명의 특정 실시태양에 따르면, 포식세포는 특정 질병 또는 병태의 특징인 혈액 내에 순환하는 세포 및/또는 그의 단편 및/또는 성분을 포함한다. 포식세포 함유물은 예를 들어 세포 내의 DNA 및/또는 단백질 함유를 통해, 또는 세포에 의한 DNA 또는 단백질 발현을 통해 질병 또는 병태에 대한 마커 프로파일을 제공한다. 포식성 및 비-포식성 WBC의 DNA 발현 프로파일을 비교하면, 비-포식세포 내에서 발현되지 않거나 과소발현된, 포식세포 내의 종양 특이적, 질병 특이적 또는 병태 특이적 DNA 시그너쳐를 검출한다. 마찬가지로, 포식성 및 비-포식성 WBC의 단백질 발현 프로파일은 비-포식세포 내에서 발현되지 않거나 과소발현된, 포식세포 내의 종양 특이적, 질병 특이적 또는 병태 특이적 단백질 시그너쳐를 검출한다. 따라서, 특정 실시태양에서, 본 발명의 방법은 암이 있는 것으로 의심되는 개체에서 고형 종양 (예를 들어, 원발성 및 전이성 병변)의 존재를 확인하고/하거나 병적 징후 및 증상의 표명 전에 암의 존재를 확인하고 질병 재발을 검출한다. 다른 실시태

양에 따르면, 본 발명의 방법은 혈액 또는 다른 체액으로부터 특이적 시그너쳐를 확인함으로써 특정 질병 또는 다른 병태를 진단한다.

[0016] 본 발명은 부분적으로, 개체의 혈액 세포 성분, 예를 들어 포식세포 및 비-포식세포가 종양 특이적 및 정상적인 비특이적 시그너쳐의 용이한 확인 및 분화, 및 따라서 유전자 발현의 고유한 개체간 변이 (예를 들어, 나이, 성별, 인종적 배경, 건강 상태) 및 일시적 변이의 결과로서 기준선의 불균등성의 제거를 위해 이상적으로 적합하다는 발견에 기초한다.

[0017] 예시적인 특정 실시태양에서, 암 및/또는 하나 이상의 다른 질병 또는 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되는 개체의 WBC (혈액 또는 다른 체액, 예를 들어, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액 등으로부터 얻은) 내의 종양- 및/또는 다른 질병-특이적 시그너쳐의 확인을 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 실시태양은 환자 특이적 결과를 제공하고, "건강한" 대조군으로부터 얻은 집단-유래된 평균 시그너쳐 프로파일 및 값에 의존하지 않고, 즉, 기준선/배경 시그너쳐(들)은 평가되는 개체의 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체, 및/또는 지질단백체 프로파일(들)에 특이적이다. 본 발명의 실시태양은 질병의 스크리닝, 진단, 및 모니터링에 대한 개인 맞춤된 소인을 제공한다.

[0018] 특정 실시태양에서, 도 1을 참고로 하여, 본 발명은 생존가능한, 죽어가는 및 죽은 세포 (예를 들어, 세포자멸성 세포, 괴사성 세포), 미생물 (예를 들어, 세균 (예를 들어, 리케챠), 바이러스, 진균, 효모, 원생동물 등) 하위세포형 입자 및/또는 그의 단편 (카잘체 (cajal body), 세포막, 중심소체, 중심체, 젬 (gem), 골지체, 리소좀, 미토콘드리아, 핵막, 핵, 핵소체, 파라스펙클 (paraspeckle), 전골수구성 백혈병체 (PML body), 리보좀, 조면 소포체, 활면 소포체, 액포, 소포, 미세소포 (microvesicle) 등), 및 세포 파쇄물, 예를 들어 염색체, DNA (핵 및 미토콘드리아), 엑손, 유전자, 인트론, 단백질, 프리온, 탄수화물-결합 단백질, 당단백질, 지질단백질, RNA, 마이크로RNA, 지질, 세포자멸체, 핵, 미세소포, 엑소좀 (exosome), 뉴클레오좀, 다형성 간기 핵소체 회합 (PIKA), 스플라이싱 스프레클 (splicing spreckle) 등)을 탐식하고 섭취하는 포식세포의 능력, 및 비-포식세포에서 이들 특징의 부재에 기초한다. 따라서, 포식성 WBC의 DNA (핵, 미토콘드리아), RNA, 마이크로RNA, 단백질, 프리온, 탄수화물 결합 단백질, 당단백질, 지질, 지질단백질, 세포자멸체, 핵, 미세소포, 엑소좀 및/또는 뉴클레오좀 및/또는 발현 프로파일의 분석, 및 동일한 공여자의 혈액 또는 다른 체액으로부터 얻은 비-포식세포로부터의 것과 이들의 비교는 비-포식세포에서 발현되지 않거나 유의하게 차별적으로 발현된 (환자-특이적 노이즈 (noise)), 포식세포 내의 종양- 및/또는 질병-특이적 시그너쳐 (환자-특이적 신호)의 확인을 제공한다. 포식세포 및 비-포식세포는 모두 골수 내에서 동일한 만능 줄기세포로부터 발생하므로, 비-종양-연관된/유도된 시그너쳐 프로파일 (비-포식세포에서 확인된)을 포식세포에서 발견된 시그너쳐로부터 공제하면 도 2에 제시된 바와 같이 특정 환자의 샘플 내에서 종양- 및/또는 질병-특이적 시그너쳐의 확인을 허용한다. 특정한 다른 실시태양에 따르면, 체액 내의 세포 파쇄물은 엔토시스 (entosis) (세포 흡수), 세포내이입 (endocytosis) 및 음세포작용 (pinocytosis)에 의해 내재화된다.

[0019] 본 발명의 한 실시태양에 따르면, 도 3을 참고로 하여, 혈액 샘플을 포식세포 및 비-포식세포 (예를 들어, WBC)를 모두 포함하는 혈액 샘플을 갖는 개체로부터 수득한다. 이어서, 포식세포(들) (예를 들어, 호중구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 포말 (foam) 세포)을 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 비-포식세포(들) (예를 들어, T 세포, B 세포, 무표지(null) 세포, 호염기구)로부터 분리한다. 본 발명에 따라, WBC의 표현형은 혈액 내에 존재하는 살아있는/죽어가는/죽은 CTC (및 그의 하위세포형 단편) 및/또는 종양- 및/또는 질병-특이적 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질의 포식작용에 의해 변경된다. 포식작용은 이들 종양 및/또는 질병 시그너쳐를 포식하는 세포 내로 내재화시키고, 가능하게는 그의 종양-특이적 체세포 돌연변이 (또는 다른 질병-관련 돌연변이)를 갖는 종양-세포 DNA를 정상 포식세포 DNA 내로 통합시킨다 (즉, 그의 표적 세포의 염색체의 형질감염). 포식세포의 "형질감염된" DNA의 RNA로의 후속적인 전사 및 후자의 단백질로의 번역이 비-포식성 WBC와 상이한 표현형을 생성시킨다.

[0020] 따라서, 암 (및/또는 하나 이상의 다른 질병)이 있는 개체로부터 얻은 포식성 및 비-포식성 WBC의 DNA, RNA, 단백질, 및/또는 지질 발현 프로파일의 당업자에게 공지된 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 방법을 사용한 비교 (도 3에 제시된 바와 같이)를 이용하여 선택적으로 포식세포에서 종양-특이적 (및/또는 질병-특이적 및/또는 병태 특이적) 시그너쳐(들) 및/또는 프로파일(들)을 확인하고, 이에 의해 개체에서 잠재 종양(들) (또는 다른 질병 또는 병태)의 존재를 확인한다. 본 발명에 따라, 비-포식세포로부터 포식세포의 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 프로파일을 공제하면 특정 환자의 혈액 샘플 (및/또는 다른 생물학적 샘플)에서 종양-특이적 (및/또는 질병-특이적) 시그너쳐를 (예를 들어, 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 분석 후에) 확인하고, 도 2에 제시된 바와 같이 잠재 종양(들)

및/또는 다른 질병의 존재를 표시하는 방법을 제공한다.

[0021] 예시적인 특정 실시태양에서, 포식세포 및 비-포식세포 (예를 들어, 혈액 또는 하나 이상의 다른 생물학적 샘플, 예를 들어, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액 등으로부터 얻은)를 분리시킨다. 포식성 WBC에 의한 CTC (및 그의 하위세포형 단편)의 포식작용은 종양 세포를 포식세포의 세포질 내로 내재화시키므로, 포식세포 내의 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질의 양은 비-포식세포의 양보다 더 많을 것이다. 따라서, 포식세포 및 비-포식세포 사이에서 이들 성분의 양 및 프로파일의 비교는 암의 존재의 표시로서 사용된다.

[0022] 예시적인 특정 실시태양에서, 개체에서 암 세포의 존재를 진단하는 방법을 제공한다. 이 방법은 개체로부터의 혈액 포식세포로부터 제1 발현 프로파일을 얻는 단계, 개체로부터의 혈액 비-포식세포로부터 제2 발현 프로파일을 얻는 단계, 제1 및 제2 발현 프로파일을 비교하는 단계, 제1 발현 프로파일에 특이적인 하나 이상의 마커의 차별적인 발현을 확인하는 단계, 제1 발현 프로파일에 특이적인 하나 이상의 마커의 차별적인 발현을 개체 내의 암 세포의 존재에 관련시키는 단계를 포함한다.

[0023] 예시적인 특정 실시태양에서, 암이 있는 개체에서 종양-특이적 시그너쳐를 확인하는 방법을 제공한다. 이 방법은 암이 있는 개체로부터의 혈액 포식세포로부터 제1 발현 프로파일을 얻는 단계, 암이 있는 개체로부터의 혈액 비-포식세포로부터 제2 발현 프로파일을 얻는 단계, 제1 및 제2 발현 프로파일을 비교하는 단계, 제1 발현 프로파일에 특이적인 2개 이상의 마커의 차별적인 발현을 확인하는 단계, 특이적인 2개 이상의 마커의 차별적인 발현을 암이 있는 개체 내의 종양-특이적 시그너쳐에 관련시키는 단계를 포함한다.

[0024] 예시적인 특정 실시태양에서, 개체로부터의 혈액 포식세포로부터 제1 발현 프로파일을 얻는 단계, 개체로부터의 혈액 비-포식세포로부터 제2 발현 프로파일을 얻는 단계를 포함하는, 개체에서 암 세포의 존재를 진단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 제1 및 제2 발현 프로파일을 비교하는 단계, 제1 발현 프로파일에 특이적인 순환 종양 세포 또는 그의 하위세포형 단편의 존재를 확인하는 단계, 순환 종양 세포 또는 그의 하위세포형 단편의 존재를 개체에서 암 세포의 존재에 관련시키는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 제2 발현 프로파일에 비해 제1 발현 프로파일에서 마커의 양의 증가는 순환 종양 세포 또는 그의 하위세포형 단편의 존재를 나타낸다.

[0025] 특정 예시적인 실시태양에서, 도 4-6을 참고로 하여, 개체로부터 포식세포의 집단을 단리하는 단계, >2n 포식세포로부터 2n 포식세포를 분리하는 단계를 포함하는, 개체에서 암 세포의 존재를 진단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 2n 포식세포로부터 제1 발현 프로파일을 얻는 단계, >2n 포식세포로부터 제2 발현 프로파일을 얻는 단계, 제1 및 제2 발현 프로파일을 비교하는 단계, 제1 발현 프로파일에 특이적인 하나 이상의 마커의 차별적인 발현을 확인하는 단계를 포함한다. 이 방법은 또한 제1 발현 프로파일에 특이적인 하나 이상의 마커의 차별적인 발현을 개체 내의 암 세포의 존재에 관련시키는 단계를 포함한다.

[0026] 본원에서 설명되는 방법의 특정 측면에서, 마커는 DNA, RNA, 마이크로RNA (예를 들어, 암 유전자, 발암유전자, 종양 억제인자 유전자 또는 이들의 임의의 조합물에 대응하는 DNA 또는 RNA), 단백질 (예를 들어, 암 유전자, 발암유전자, 종양 억제인자 유전자 또는 이들의 임의의 조합물에 의해 코딩되는 단백질 또는 폴리펩티드), 지질, 탄수화물 및/또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다. 특정 측면에서, 혈액 포식세포는 호중구, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 호산구, 포말 세포 또는 이들의 임의의 조합이다. 특정 측면에서, 혈액 비-포식세포는 T 세포, B 세포, 무표지 세포, 호염기구 또는 이들의 임의의 조합이다. 다른 측면에서, 혈액 포식세포 및 혈액 비-포식세포는 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어 항체를 사용하여 전혈로부터 단리된다. 또 다른 측면에서, 혈액 포식세포 및 혈액 비-포식세포는 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 백혈구의 집단으로부터 단리된다. 다른 측면에서, 혈액 포식세포 및 혈액 비-포식세포는 WBC 집단의 형질막 상에 발현되는 분자 수용체에 결합하는 리간드를 사용하여 분리된다. 또 다른 측면에서, 혈액 포식세포 및 혈액 비-포식세포는 여과, 구배 기반 원심분리, 용출, 미세유체공학 (microfluidics) 등을 포함하는 하나 이상의 방법에 의해 분리된다. 특정 측면에서, 개체는 하나 이상의 잠재 (예를 들어, 잠복, 비진단된, 숨겨진 또는 드러나지 않은) 암, 이전에 진단된 원발성 암 및 전이성 암을 갖는다. 특정 측면에서, 방법은 하나 이상의 마커의 존재를 암 치료법의 효능에 관련시키는 단계를 포함한다.

[0027] 예시적인 특정 실시태양에서, 상기한 방법은 감염 물질 또는 암 이외의 다른 질병의 마커 특징의 차별적인 발현을 결정하기 위해서 포식세포 및 비-포식세포의 발현 프로파일을 비교함으로써, 감염 물질 또는 암 이외의 다른 질병의 존재를 검출, 확인 또는 진단하기 위해 적용된다. 또 다른 측면에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법은 병원체 (예를 들어, 바이러스, 세균, 리케챠, 원생동물, 연충, 진균, 효모 등) 및 다른 질병 또는 병상 (예를 들어, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 치매, 심부전, 죽상경화증, 관절염, 유전 질환, 뼈 질병, 위장관 질병, 프리온 질병 및 감염성 질병)의 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 프로파일을 검출하기 위해 사

용된다.

[0028] 본원에서 설명되는 방법의 특정 측면에서, 마커는 병원체 DNA, 병원체 RNA, 병원체 단백질, 병원체 폴리펩티드, 병원체 지질 및 이들의 임의의 조합물을 포함한다. 특정 측면에서, 감염 물질은 바이러스, 세균, 진균, 기생충, 감염성 단백질 및 이들의 임의의 조합물이다. 특정 측면에서, 방법은 하나 이상의 마커의 존재를 병원체 치료법의 효능에 관련시키는 단계를 포함한다.

[0029] 따라서, 본원에서 설명되는 방법 및 조성물은 "건강한" 대조군으로부터 얻은 집단-유래된 평균 시그너처 프로파일 및 값에 의존하지 않으면서, 환자의 혈액 샘플 내에서 종양 특이적 시그너처의 용이한 확인을 가능하게 한다. 구체적으로, 본원에서 설명되는 방법 및 조성물은 쉽고 경제적으로, (i) 병적 징후 및 증상의 표명 전에 개체에서 종양 (원발성 및 전이성 병변)의 존재를 확인하고/하거나; (ii) 암이 있는 것으로 의심되는 개체에서 종양 (원발성 및 전이성 병변)의 존재를 확인하고/하거나; (iii) 다양한 치료를 받고 있는/받은 후에 개체에서 종양 (원발성 및 전이성 병변)의 재발을 검출할 수 있다.

[0030] 따라서, 본원에서 설명되는 방법 및 조성물은 (i) 암의 비침습성 스크리닝을 가능하게 하고; (ii) 특히 가장 빠른 시점에 종양의 진단을 허용하고; (iii) 유의미한 개입(들)을 종양 진행 경로에서 훨씬 더 이른 지점으로 옮겨서, 전이성 질병의 발병을 방지하고; (iv) 일상적 또는 실험적 치료(들)에 대한 초기 반응을 모니터링하고; (v) 일상적 또는 실험적 치료(들)에 대한 반응을 예측하고; (vi) 그의 부작용이 예상된 이익에 의해 상쇄될 수 없는 무효한 치료의 신속한 확인을 허용함으로써 효과적으로 치료의 선택을 용이하게 하고; (vii) 환자 불편 및 무력함을 최소화하고; (viii) 종양 검출, 진단 및 치료가 밀접하게 결합되도록 허용하고 (예를 들어, 항암 요법의 개인 맞춤); (ix) 종양 종류와 병기 결정의 예측 및 조기 검출을 제공하고; (x) 치료법 선택을 제공하고; (xi) 종양이 전이성인지 아닌지 결정하고; (xii) 질병의 모니터링을 위한 방법을 제공하고; (xiii) 질병의 예후를 위한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원의 사본은 필요한 비용을 납부하면서 요청할 경우 특허청에서 제공할 것이다. 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 잇점은 첨부 도면과 함께 아래의 예시적인 실시태양의 상세한 설명으로부터 보다 충분히 이해될 것이다:

도 1은 살아있는 CTC, 세포자멸성 CTC, 단편화된 (fragmented) CTC, 생육가능 및/또는 세포자멸성 종양 세포에 의해 방출된 종양 DNA, RNA, 단백질, 및 지질의 탐식 후에 포식세포에 의한 종양-특이적 DNA, RNA, 단백질 및/또는 지질 시그너처의 획득을 야기하는 제시된 경로를 개략적으로 도시한 것이다. 포식세포만 (비-포식세포가 아니라) 종양 시그너처를 획득함에 주목한다.

도 2는 난소암 (OC) 환자의 포식세포에서/포식세포에 의해 발현된 암 시그너처의 확인에 사용되는 분석 방법을 개략적으로 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 방법의 한 실시태양의 일반적인 흐름도를 개략적으로 도시한 것이다.

도 4는 살아있는 CTC, 세포자멸성 CTC, 단편화된 CTC, 생육가능 및/또는 세포자멸성 종양 세포에 의해 방출된 종양 DNA, RNA, 단백질 및 지질의 탐식 후에 혈액 포식세포에 의한 종양-특이적 DNA, RNA, 단백질 및 지질 시그너처의 획득을 야기하는 제시된 경로를 개략적으로 도시한 것이다. 포식작용 후의 포식세포의 DNA 함량은 >2n 임을 주목한다.

도 5는 유방암 (BC)-보유 동물에서 유방암 (BC) 시그너처의 확인에 사용되는 분석 방법을 개략적으로 도시한 것이다.

도 6은 본 발명의 방법의 다른 실시태양의 일반적인 흐름도를 개략적으로 도시한 것이다.

도 7은 LNCaP 및 LLC1 세포로부터 단리된 총 RNA의 겔 전기영동 분석을 도시한 것이다.

도 8은 마우스 백혈구 (WBC)로부터 얻은 RNA의 수율 및 질을 나열한 것이다.

도 9A-9D는 LNCaP (인간 전립선암) 종양 보유 누드 마우스로부터의 호중구에서 검출된 7개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LNCaP 종양. (B) LNCaP 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 호중구 (N_T). (C) LNCaP 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 누

드 마우스로부터 얻은 호중구 (N_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 호중구 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 호중구 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. N_T에서의 발현은 N_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 10A-10D은 LNCaP (인간 전립선암) 종양 보유 누드 마우스로부터의 대식세포에서 검출된 3개의 상향조절된 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LNCaP 종양. (B) LNCaP 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_T). (C) LNCaP 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. M_T에서의 발현은 M_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 11A-11D는 LS174T (인간 결장암) 종양 보유 누드 마우스로부터의 호중구에서 검출된 4개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LS174T 종양. (B) LS174T 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 호중구 (N_T). (C) LS174T 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 호중구 (N_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 호중구 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 호중구 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. N_T에서의 발현은 N_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 12A-12D는 LS174T (인간 결장암) 종양 보유 누드 마우스로부터의 대식세포에서 검출된 3개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LS174T 종양. (B) LS174T 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_T). (C) LS174T 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. M_T에서의 발현은 M_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 13A-13D는 LLC1 (마우스 전이성 폐암) 종양-보유 C57/B1 마우스로부터의 호중구에서 검출된 5개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LLC1 종양. (B) LLC1 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 호중구 (N_T). (C) LLC1 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 호중구 (N_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 호중구 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 호중구 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. N_T에서의 발현은 N_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 14A-14D는 LLC1 (마우스 전이성 폐암) 종양-보유 C57/B1 마우스로부터의 대식세포에서 검출된 2개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) LLC1 종양. (B) LLC1 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_T). (C) LLC1 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 호중구 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 호중구 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. M_T에서의 발현은 M_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 15A-15D는 B16F10 (마우스 전이성 흑색종) 종양 보유 C57/B1 마우스로부터의 호중구에서 검출된 2개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) B16F10 종양. (B) B16F10 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 호중구 (N_T). (C) B16F10 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T). (D) 비-종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 호중구 (N_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 호중구 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 호중구 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. N_T에서의 발현은 N_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 16A-16D는 B16F10 (마우스 전이성 흑색종) 종양-보유 C57/B1 마우스로부터의 대식세포에서 검출된 1개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) B16F10 종양. (B) B16F10 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_T). (C) B16F10 종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 T 세포 (T_T).

(D) 비-종양 보유 C57/B1 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_N). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (A)에서 및 종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (B)에서 발현되고, 비-종양 보유 마우스로부터의 대식세포 (D)에서 및 비-포식성 T 세포 (C)에서 최소로 발현된 것이다. M_T에서의 발현은 M_N 및 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 17A-17D는 두경부암 (편평세포 암종)의 환자로부터의 호중구에서 검출된 5개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) 정상 조직 (피부) 생검. (B) 종양 조직 생검. (C) 환자 혈액으로부터 얻은 호중구 (N_T), (D) 환자 혈액으로부터 얻은 T 세포 (T_T). 원으로 표시된 시그너쳐는 종양 세포 (B)에서 및 환자 혈액으로부터의 호중구 (C)에서 발현되고, 정상 피부 (A)에서 또는 비-포식성 T 세포 (D)에서 최소로 발현되거나 발현되지 않은 것이다. N_T에서의 발현은 T_T 및 피부에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 18A-18D는 난소암 (선암종)의 환자로부터의 대식세포에서 검출된 23개의 상향조절된 (2배 이상) 암 관련 유전자를 보여주는 어레이를 도시한 것이다. (A) 환자 혈액으로부터 얻은 대식세포 (M_T). (B) 환자 혈액으로부터 얻은 T 세포 (T_T). 원으로 표시된 시그너쳐는 환자로부터 얻은 대식세포 (A)에서 발현되고, 비-포식성 T 세포 (B)에서 최소로 발현된 것이다. M_T에서의 발현은 T_T에서보다 2배 이상 더 컸다.

도 19는 포식세포 내의 종양 시그너쳐를 확인하기 위해 사용되는 방법을 도시한 것이다. 본 예에서, 종양 보유 동물로부터의 대식세포 (M_T)에서의 암 연관 유전자의 발현 강도를 동일한 동물로부터의 T 세포 (T_T)에서의 강도와 비교하여 정량하였고, 2배 초과로 과다발현된 유전자가 확인되었다. 이어서, M_T에서 발현된 모든 유전자의 강도를 비-종양 보유 동물로부터 얻은 대식세포 (M_{NT})에서의 강도와 비교하여 정량하였고, 2배 초과로 과다발현된 유전자가 확인되었다. 두 목록에 공통적인 유전자를 선택하여, 동일한 종양에 의해 발현된 것과 비교하였다 (음영 영역).

도 20A-20B는 (A) LNCaP 인간 전립선 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 대식세포 (M_{LNCaP}) 및 동일한 동물로부터의 T 세포 (T 세포$_{LNCaP}$), (B) M_{LNCaP} 및 비-종양 보유 마우스로부터 얻은 대식세포 ($M_{비-종양}$), (C) LNCaP 인간 전립선 종양 보유 누드 마우스로부터 얻은 호중구 (N_{LNCaP}) 및 동일한 동물로부터의 T 세포 (T 세포$_{LNCaP}$), 및 (D) N_{LNCaP} 및 비-종양 보유 마우스로부터 얻은 대식세포 ($N_{비-종양}$)에서 유전자 발현 강도 비교를 도시한 것이다. 적색의 유전자는 2배 초과로 과다발현되었고; 녹색의 유전자는 2배 초과로 과소발현되었다.

도 21은 포식성 호중구 (N) 및 대식세포 (M) 내에서 암 관련 유전자의 발현을 나열한 것이다.

도 22는 비-포식성 T 세포에 비해 난소암 환자의 포식성 대식세포에서 상향조절된 (2배 초과) 암 관련 유전자를 나열한 것이다.

도 23은 마우스 WBC로부터 얻은 단백질 샘플 (5.9 ㎍)의 SDS 겔 (10%) 전기영동을 도시한 것이다.

도 24는 종양 보유 마우스로부터 얻은 T 세포 및 단핵구/대식세포 (M/M)에서 TAG-72 및 PSA 발현에 대한 웨스턴 블롯 (Western blot) 분석을 도시한 것으로, 포식세포 내에만 시그너쳐가 존재함을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명의 실시태양은 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일에 기초하여 질병, 감염 물질 및 신체 상태와 연관된 마커의 환자-특이적 발현 프로파일을 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 측면에 따라, 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 특정 질병 상태를 검출하고/하거나 진단하기 위해 특정 질병 상태에 대한 공지의 마커에 비교한다. 본 발명의 추가의 측면에 따라, 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 단일 환자의 혈액으로부터의 비-포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일에 비교한다. 비-포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 포식세포의 것으로부터 공제하면 개체의 질병 상태를 대표하는 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일만을 생성시킨다.

[0033] 본 발명의 추가의 실시태양에 따라, 개체로부터 포식세포 집단을 얻고, DNA 함량이 2n보다 큰 집단으로부터의 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 DNA 함량이 2n인 동일한 집단으로부터의 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일에 비교한다. 본 발명의 추가의 실시태양에 따라, 개체로부터의 포식세포 집단을 얻고, RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 함량이 정상보다 많고, DNA 지수가 1을 초과하는 집단으로부터의 포식세포의 발현 프로파일을 RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 함량이 정상이고/이거나 DNA 지수가 1인 동일한

집단으로부터의 포식세포의 발현 프로파일에 비교한다.

[0034] 상기 환자 특이적 발현 프로파일은 개체에서 특정 질병의 검출 또는 진단에 오차를 도입할 수 있는 특정 질병 또는 감염 물질에 대한 집단-유래된 평균 시그너쳐 프로파일에 대한 의존성을 제거한다. 본 발명의 질병 상태에 대한 상기 환자 특이적 발현 프로파일은 검출, 진단 및 치료가 개체에게 개인 맞춤되도록 허용한다.

[0035] 도 1-3을 참고로 하여 본 발명의 특정 실시태양에 따르면, 인간 피하 (s.c.) 종양 (전립선 LNCaP 선암종 또는 LS174T 결장 선암종) 또는 마우스 종양 (정맥내 투여된 B16F10 전이성 흑색종, 또는 s.c 주사된 LLC1 폐암)을 보유하는 약 3주령의 마우스로부터 얻은 포식성 및 비-포식성 WBC의 유전자 발현 프로파일을 비교하였다. 결과는 이들 종양 보유 마우스로부터 얻은 호중구 및 대식세포가 각각의 개별 종양에서 또한 발현되는 다양한 발암 유전자 및 다른 암 관련 유전자 시그너쳐를 발현하는 것을 입증하였다 (도 9-16 및 19-21 참조). 이들 암 관련 유전자 및 발암유전자 (예를 들어, ERBB2, Jun, Fos 등)는 발현되지 않거나, (i) 종양 보유 마우스로부터 단리된 비-포식성 T 세포, 및 (ii) 비-종양 보유 마우스로부터 얻은 호중구 및 대식세포에 의해 최소로 발현된다. 또한, 종양 보유 마우스로부터의 포식세포는 단지 종양-특이적 단백질만을 발현하는 것으로 밝혀졌다 (도 23 및 24 참조). 마우스의 혈액 내의 CTC 및/또는 종양-특이적 DNA 및/또는 단백질이 포식되었고, 일부의 종양-세포 DNA는 그의 종양-특이적 돌연변이 및 유전자와 함께 아마도 형질감염에 의해 (특정 이론에 매이도록 의도되지 않음) 정상 포식세포 DNA 내로 통합되고, RNA로 전사되고, 단백질로 번역되었다.

[0036] 도 1-3을 참고로 하여 본 발명의 특정 예시적인 실시태양에 따르면, 두경부 종양 또는 난소암의 환자로부터 얻은 포식성 및 비-포식성 WBC의 유전자 발현 프로파일을 또한 비교하였다. 결과는 이들 환자로부터 얻은 호중구 및 대식세포가 개별 종양에서 또한 발현되는 다양한 발암유전자 및 다른 암 관련 유전자 시그너쳐를 발현함을 입증하였다 (도 17-18 및 22 참조). 이들 암 관련 유전자 및 발암유전자는 동일한 개별 환자로부터 단리된 비-포식성 T 세포에 의해 발현되지 않거나 최소로 발현되었다. 환자의 혈액 내의 CTC 및/또는 종양-특이적 DNA 및 RNA가 포식되었고, 일부의 종양-세포 DNA 및/또는 RNA는 그의 종양-특이적 돌연변이 및 유전자와 함께 아마도 형질감염을 통해 (특정 이론에 매이도록 의도되지 않음) 정상 포식세포 DNA 내로 통합되고, RNA로 전사되고, 단백질로 번역되었다.

[0037] 도 4-6을 참고로 하여 특정 예시적인 실시태양에 따르면, (1) DNA 함량이 >2n ($P_{n>2}$)이거나, (2) RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 함량이 정상보다 더 많은 혈액 또는 하나 이상의 다른 생물학적 샘플 (예를 들어, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액 등)으로부터 얻은 포식세포 (예를 들어, 대식세포), 즉, 포식된 CTC 및/또는 그들의 하위세포형 단편 또는 DNA/RNA/지질 (즉, 종양-특이적 시그너쳐 또는 다른 질병-특이적 시그너쳐)을 갖고/갖거나 DNA 지수가 1을 초과하는 세포의 DNA (핵 및/또는 미토콘드리아), RNA, 마이크로RNA, 단백질, 및/또는 지질 발현 프로파일의 정량 분석, 및 이를 (1) DNA 함량이 2n ($P_{n=2}$)이거나, (2) RNA, 단백질, 탄수화물 및/또는 지질 함량이 정상인 동일한 포식세포 집단 (예를 들어, 대식세포), 즉, 포식된 CTC 및/또는 그들의 하위세포형 단편을 갖지 않고 DNA 지수가 1인 세포와 비교하는 것은 $P_{n=2}$ 세포에서 발현되지 않거나 최소로 발현되는 (환자-특이적 노이즈) $P_{n>2}$ 세포 내의 종양-특이적 (또는 다른 질병-특이적) 시그너쳐 (환자-특이적 신호)를 검출하는 방법을 제공한다. 도 6을 참고로 하여, $P_{n=2}$의 DNA, RNA, 단백질, 및/또는 지질 프로파일을 도 5에 제시된 바와 같이 $P_{n>2}$의 것으로부터 공제하는 것은 암 (및/또는 질병 및/또는 신체 상태)이 있는 동물 및/또는 인간의 혈액 샘플 (또는 하나 이상의 다른 생물학적 샘플, 예를 들어, 다른 체액) 내에서 종양-특이적 (및/또는 질병-특이적 및/또는 병태 특이적) 시그너쳐를 (예를 들어, 하나 이상의 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 분석 후에) 확인하고, 잠재 종양(들) 및/또는 다른 질병 및/또는 다른 병태의 존재를 표시하는 방법을 제공한다. 포식세포의 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 프로파일을 비-포식세포의 것과 비교한 상기 설명된 방법과는 달리, 본 발명에 따른 상기 분석 검출 방법의 주요 잇점은 (i) "종양-특이적" (예를 들어, $P_{n>2}$ 대식세포) 및 "정상-비-특이적" (예를 들어, $P_{n=2}$ 대식세포) 시그너쳐의 공급원으로서 단일 포식세포 아집단을 이용하고, 즉, 둘 모두 동일한 기준선 유전자형을 공유하고; (ii) 시그너쳐-획득 세포 (예를 들어, $P_{n>2}$ 호중구)가 죽은 CTC 및/또는 그의 단편을 포식하지 않고 따라서 그를 획득하지 않은 것 (예를 들어, $P_{n=2}$ 호중구)으로 희석되지 않는다는 것이다.

[0038] 도 4-6을 참고로 하여 특정 예시적인 실시태양에 따르면, 다른 살아있는, 죽어가는, 또는 죽은 (예를 들어, 세포자멸성 또는 괴사성) 세포, 세포자멸체, 핵, 미세소포, 엑소좀, 뉴클레오좀, 미토콘드리아, 소포체 등의 포식작용 또는 내재화의 결과로서 세포내 함유물이, 정상 세포내 함유물을 갖는 동일한 포식세포 집단 (예를 들어,

대식세포) (P_{NIC}), 즉, 임의의 상기 언급된 세포 및/세포 파쇄물을 포식하지 않은 세포 (환자-특이적 노이즈)의 것보다 더 큰 혈액 또는 하나 이상의 다른 생물학적 샘플 또는 체액 (예를 들어, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액 등)으로부터 얻은 포식세포 (예를 들어, 대식세포)의 정량 분석은 정상 세포내 함유물을 갖는 포식세포에서 발현되지 않거나 최소로 발현되는 (환자-특이적 노이즈), 증가된 세포내 함유물을 갖는 포식세포 (P_{IIC}) 내에서 종양-특이적 (또는 다른 질병-특이적 또는 다른 병태 특이적) 시그너쳐를 검출하는 방법을 제공한다. 도 6을 참고로 하여, P_{NIC}의 DNA, RNA, 단백질 및/또는 지질 프로파일을 도 5에 제시된 바와 같이 P_{IIC}의 것으로부터 공제하면 암 또는 다른 질병이 있는 동물의 혈액 샘플 (또는 하나 이상의 다른 생물학적 샘플, 예를 들어, 다른 체액) 내에서 종양-특이적 (및/또는 질병-특이적) 시그너쳐를 (예를 들어, 하나 이상의 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체, 및/또는 지질단백체 분석 후에) 확인하고, 잠재 종양(들) 및/또는 다른 질병의 존재를 표시하는 방법을 제공한다. 포식세포의 게놈, 단백체, 대사체, 복합당질체, 당단백체, 지질체 및/또는 지질단백체 프로파일을 비-포식세포의 것과 비교한 상기 설명된 방법과는 달리, 본 발명에 따른 상기 분석 검출 방법의 주요 잇점은 (i) "질병-특이적" (예를 들어, P_{IIC} 대식세포) 및 "정상-비-특이적" (예를 들어, P_{NIC} 대식세포) 시그너쳐의 공급원으로서 단일 포식세포 아집단을 이용하고, 즉, 둘 모두 동일한 기준선 유전자형을 공유하고; (ii) 시그너쳐-획득 세포 (예를 들어, P_{IIC} 호중구)가 죽은 CTC 및/또는 그의 단편을 포식하지 않고 따라서 그를 획득하지 않은 것 (예를 들어, P_{NIC} 호중구)으로 희석되지 않는다는 것이다.

[0039] 본원에서 설명되는 방법은 (i) 높은 특이성, 감수성 및 정확성을 갖고, 혈액 샘플 (또는 예를 들어, 체액과 같은 다른 생물학적 샘플) 내에 존재하는 종양-특이적 (및/또는 다른 질병-특이적) 및 정상적인 비특이적 시그너쳐의 검출을 가능하게 할 것이고; (ii) 유전자 발현에서 고유한 변이 (예를 들어, 나이, 성별, 인종적 배경, 건강 상태 등) 및 일시적 변이로 인해 개체들 사이에서 발생하는 것으로 알려진 "기준선의 불균등성"을 제거한다. 따라서, 특정 측면에서, 본 발명은 질병이 통상적인 영상화 기술 (예를 들어, PET, MRI, CT 등)에 의해 진단될 수 있기 전에 환자에서 잠재 원발성 및 전이성 종양 (및/또는 하나 이상의 다른 질병 또는 병태)의 조기 검출을 위한 비침습 분석을 제공하고, 따라서, 암이 있는 개체의 개입, 예방 및 치료를 위한 필요 및 전략에 비해 개선된 결정을 위한 기반을 제공한다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양 특이적 마커"는 하나 이상의 세포 성분, 예를 들어 하나 이상의 DNA 서열, 하나 이상의 RNA 서열, 하나 이상의 단백질, 하나 이상의 폴리펩티드, 하나 이상의 지질 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는 것으로 의도된다. 특정 측면에서, 종양 특이적 마커는 하나 이상의 WBC, 예를 들어, 호중구, 대식세포 및/또는 수지상 세포에 존재한다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암 관련 유전자"는 예를 들어 암성 세포 (예를 들어, WBC, 예를 들어, 대식세포, 호중구, T 세포 등)에서 변경된 발현 (예를 들어, 비암성 세포에 비해 증가된 발현 또는 감소된 발현)을 갖는 암 유전자, 발암유전자 및/또는 종양 억제인자 유전자와 같은 유전자를 의미한다. 많은 암 관련 유전자가 당업계에 공지되어 있다. 암 관련 유전자는 예를 들어 ERBB2, JUN, RB1, SUPP1, MDM2, MAP2K1, MMP2, PDGFB, PLAUR, FGR, MYCL1, BLYM, NRAS1, PE1, SKI, TRK, ABL2, MYCN, RAB1, REL, RALB, LCO, ERBB4, RAF1, ECT2, KIT, FGF5, GRO1, GRO2, GRO3, FMS, PIM, KRAS1P, FYN, MYB, ROS1, MAS1, RALA, MYCLK1, GL13, ARAF2, MET, BRAF, MOS, LYN, MYBL1, MYC, OVC, VAV2, BMI1, RET, HRAS, SPI1, RELA, SEA, EMS1, ETS1, KRAS2, ERBB3, GLI, FLT, BRCA2, RB1, FOS, AKT1, ELK2, FES, MAF, TP53, CRK, ERBA1, NF1, EVI2, ERBBB2, INT4, BRCA1, YES1, JUND, JUNB, MEL, LPSA, VAV1, AKT2, FOSB, RRAS, HKR1, HKR2, ERBAL2, SRC, MYBL2, ETS2, ERG, ARAF1, YUASA, HS2, INT3, SNO, RMYC, BMYC, HRASP, TC21, TIM, PTI-1, JAK, CEA 패밀리의 하나 이상의 멤버 (예를 들어, 문헌 [Zhou et al. (2001) Gene 264:105)] 참조), PSA, MUC-16 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암"은 다양한 종류의 악성 신생물을 의미하고, 그 대부분은 주위 조직을 침습할 수 있고, 상이한 부위로 전이될 수 있다 (예를 들어, 그 전부가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된 문헌 [PDR Medical Dictionary, 1st edition (1995)] 참조). 용어 "신생물" 및 "종양"은 세포 증식에 의해 정상보다 더 빠르게 성장하고 증식을 개시한 자극이 제거된 후에도 계속 성장하는 비정상적인 조직을 의미한다 (상기 문헌 참조). 상기 비정상적인 조직은 구조적 조직화 및 정상 조직과의 기능적 협동의 부분적인 또는 완전한 결여를 보이고, 양성 (즉, 양성 종양) 또는 악성 (즉, 악성 종양)일 수 있다.

[0043] 암의 일반적인 범주의 예는 암종 (즉, 상피 세포 유래 악성 종양, 예를 들어, 통상적인 형태의 유방, 전립선, 폐 및 결장암), 육종 (즉, 연결 조직 또는 중간엽 세포 유래 악성 종양), 림프종 (즉, 조혈 세포 유래 악성 종

양), 백혈병 (즉, 조혈 세포 유래 악성 종양), 생식세포 종양 (즉, 전능성 (totipotent) 세포 유래 종양, 성인은 정소 또는 난소에서 가장 자주 발견되고; 태아, 유아 및 아동은 신체의 정중선, 특히 미골의 끝부분에서 가장 자주 발견됨), 모세포성 종양 (즉, 일반적으로 미성숙 또는 배아 조직에 유사한 악성 종양) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명에 포함되는 것으로 의도되는 신생물의 종류의 예는 신경 조직, 혈액 형성 조직, 유방, 피부, 뼈, 전립선, 난소, 자궁, 자궁경부, 간, 폐, 뇌, 후두, 담낭, 췌장, 직장, 부갑상선, 갑상선, 부신, 면역계, 두경부, 결장, 위, 기관지, 및/또는 신장의 암과 연관된 신생물을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0045] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 모체 혈액 내의 태아 세포 및 DNA의 존재로 인해 태아 염색체 이상 (예를 들어, 다운 (Down) 증후군, 자폐증 및 관련 자폐 스펙트럼 장애 (아스퍼거 (Asperger) 증후군 및 달리 분류되지 않는 전반적 발달장애를 포함하고, 이로 제한되지 않음), 겸상적혈구 빈혈, 지중해 빈혈 등)의 존재와 연관된 질환의 검출, 확인 및/또는 진단에 적용된다. 하나 이상의 상기 질환의 스크리닝 및 진단은 모체 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 염색체 마커, 예를 들어 DNA 및 RNA 등을 검출하기 위해 본원에서 설명되는 방법 및/또는 조성물을 사용하여 수행될 수 있다.

[0046] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 태아 줄기세포, 유핵 적혈구, 태아 림프구, 및 유의한 양의 세포 미함유 태아 핵산이 모체 혈액에서 순환하는 것으로 알려져 있기 때문에, 임신한 여성의 혈액 내에서 태아-유래 단백체, 지질체, 및/또는 게놈 시그너처의 존재를 검출함으로써 임신한 여성의 태아의 성별을 시험하기 위해 적용될 수 있다. 본원에서 설명되는 방법에 따르면, 포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 임신한 여성의 혈액으로부터의 비-포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일과 비교한다. 비-포식세포의 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 포식세포의 것으로부터 공제하면, 임신한 여성의 태아의 성별을 나타내는 세포내 함유물 및/또는 발현 프로파일을 생성시킬 수 있다.

[0047] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 죽어가는/죽은 근세포 및/또는 그의 단편 (예를 들어, DNA, 단백질 등)의 존재를 검출함으로써 심장병 (예를 들어, 심근경색, 만성 심부전, 허혈성 심장병, 심혈관 사멸 등)이 존재하거나 발생할 위험이 있는 대상의 혈액 내의 단백체 및/또는 게놈 근세포 시그너처의 존재와 연관된 질환의 검출, 확인 및/또는 진단에 사용될 수 있다. 하나 이상의 상기 질환의 스크리닝 및 진단은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어 DNA 및 RNA, 단백질 등을 검출하기 위해 본원에서 설명되는 방법 및/또는 조성물을 사용하여 수행될 수 있다.

[0048] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 관상동맥 협착, 복부 대동맥류 등에 의해 죽상경화증이 존재하거나 발생할 위험이 있는 대상의 혈액 내의 단백체, 지질체, 및/또는 게놈 시그너처의 존재와 연관된 질환의 검출, 확인 및/또는 진단에 사용될 수 있다. 상기 질환의 스크리닝 및 진단은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어 DNA 및 RNA, 단백질 등을 검출하기 위해 본원에서 설명되는 방법 및/또는 조성물을 사용하여 수행될 수 있다.

[0049] 생검-확인 (biopsy-confirmed) 거부 (동종이식 거부에 대한 하나의 진단 방법)는 침습성이고, 샘플링 오차가 발생한다. 따라서, 이식 장기 거부를 진단하고 관리하기 위한 분자 생체마커를 검출하는 비침습 분석의 개발은 (a) 거부가 이식 기능부전을 야기하기 전에 치료 개입을 허용하는 예비-거부 (pre-rejection) 프로파일을 검출하고, (b) 거부 진단의 감수성 및 특이성을 개선하고, (c) 예후를 개선할, 거부에 대한 새로운 분류 시스템을 개발하고, (d) 약물 독성을 최소화하면서 거부를 예방할 수 있는 개별적인 면역억제 요법을 설계하기 위한 정보를 제공함으로써 이식 수여자의 관리에 유용하다.

[0050] 따라서, 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 단백질 등을 검출함으로써 장기 이식을 받은 대상의 혈액 내의 단백체, 지질체, 및 게놈 시그너처의 존재와 연관된 질환의 검출, 확인 또는 진단에 사용될 수 있다.

[0051] 미토콘드리아 질병은 미토콘드리아의 부전에 의해 발생한다. 세포 손상 및 심지어 세포 사멸이 뒤따른다. 미토콘드리아 질병은 뇌, 심장, 간, 골격근, 신장 및 내분비 및 호흡계의 세포에 대한 대부분의 손상, 및 당뇨병, 호흡기 합병증, 발작, 알츠하이머병, 시력/청력 문제, 락트산증, 발달 지연, 감염 감수성, 및 암을 야기하는 것으로 보인다.

[0052] 따라서, 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 게놈의 미토콘드리아-연관 DNA 마커를 검출함으로써 미토콘드리아 질병을 스크리닝하고/하거나, 진단하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0053] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 단백질 등을 검출함으로써 알츠하이머병 및/또는 치매를 스크리닝하고/하거나, 진단하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0054] 전신 홍반 루푸스 (SLE)는 다양한 장기 및 시스템에 영향을 주는 복잡한 자가면역 질환이다. 따라서, 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 지질, 단백질 등을 검출함으로써 SLE를 스크리닝하고/하거나, 진단하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0055] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 단백질 등을 검출함으로써 치료 및/또는 영상화 분자의 개발에 유용한 게놈 및/또는 단백체 시그너쳐를 스크리닝하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0056] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및/또는 조성물은 혈액 포식세포 내에서 하나 이상의 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 단백질, 지질 등을 검출함으로써 하나 이상의 외부 또는 내부 손상 (예를 들어, 방사능 폭탄 노출, 방사선 노출, 화학물질 노출, 방사선 요법, 방사성 의약품 투여, 치료 분자 노출, 라돈 노출, 석면 노출, 공해물질 노출 등)에 의한 질병 및 병상의 검출에 유용한 게놈, 단백체 및/또는 지질체 시그너쳐의 변경을 스크리닝하고/하거나, 진단하고/하거나 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유기체"는 인간 개체, 비-인간 영장류, 소, 말, 양, 염소, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 마우스, 래트, 저빌 (gerbil), 개구리, 두꺼비 및 이들의 트랜스제닉 (transgenic) 종을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 용어 "유기체"는 병원체, 예를 들어 기생충, 효모 세포, 효모 4분체 (tetrad), 효모 콜로니, 세균, 세균 콜로니, 비리온, 비로좀, 바이러스-유사 입자 및/또는 이들의 임의의 배양액 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 병원성 유기체를 더 포함한다.

[0058] 예시적인 특정 실시태양에서, 본원에서 설명되는 분석은 감염 물질의 검출 및/또는 감염 물질에 의한 세포, 조직, 장기 등의 감염과 연관된 질환의 진단을 위해 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 감염 물질의 검출 및/또는 감염과 연관된 질환의 진단은 하나 이상의 감염 물질로부터 하나 이상의 감염 물질 마커, 예를 들어, DNA, RNA, 단백질, 지질 등을 검출하기 위해 본원에서 설명되는 방법 및/또는 조성물을 사용하여 수행된다.

[0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "감염 물질"은 병원성 유기체, 예를 들어 바이러스, 세균, 진균, 기생충, 감염성 단백질 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0060] 바이러스는 DNA 또는 RNA 동물 바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, RNA 바이러스는 바이러스 패밀리, 예를 들어 피크르나비리대 (*Picornaviridae*) (예를 들어, 폴리오바이러스), 레오비리대 (*Reoviridae*) (예를 들어, 로타바이러스), 토가비리대 (*Togaviridae*) (예를 들어, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 풍진 바이러스), 오르토믹소비리대 (*Orthomyxoviridae*) (예를 들어, 인플루엔자 바이러스), 파라믹소비리대 (*Paramyxoviridae*) (예를 들어, 호흡기 세포융합 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스), 랍도비리대 (*Rhabdoviridae*) (예를 들어, 광견병 바이러스), 코로나비리대 (*Coronaviridae*), 분야비리대 (*Bunyaviridae*), 플라비비리대 (*Flaviviridae*), 필로비리대 (*Filoviridae*), 아레나비리대 (*Arenaviridae*), 분야비리대 및 레트로비리대 (*Retroviridae*) (예를 들어, 인간 T 세포 림프친화성 바이러스 (HTLV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV))를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, DNA 바이러스는 파포바비리대 (*Papovaviridae*) (예를 들어, 유두종 바이러스), 아데노비리대 (*Adenoviridae*) (예를 들어, 아데노바이러스), 헤르페스비리대 (*Herpesviridae*) (예를 들어, 단순 포진 바이러스), 및 폭스비리대 (*Poxviridae*) (예를 들어, 천연두 바이러스)와 같은 바이러스과를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0061] 세균은 그람 양성 세균, 그람 음성 세균, 항산균 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0062] 본원에서 사용되는 바와 같이, 그람 양성 세균은 악티노메두래 (*Actinomedurae*), 악티노마이세스 이스라엘리이 (*Actinomyces israelii*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스 (*B. cereus*), 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실레 (*C. difficile*), 클로스트리듐 페르프린겐스 (*C. perfringens*), 클로스트리듐 테타니 (*C tetani*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 엔테로코커스 파에칼리스 (*Enterococcus faecalis*), 리스테리아 모노시토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 노카르디아 (*Nocardia*), 프로피오니박테리움 아크네스 (*Propionibacterium acnes*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 에피덤 (*S. epiderm*), 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus*

mutans), 스트렙토코커스 뉴모니아에 (*S. pneumoniae*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0063] 본원에서 사용되는 바와 같이, 그람 음성 세균은 아피피아 펠리스 (*Afipia* felis), 박테리오데스 (*Bacteriodes*), 바르토넬라 바실리포르미스 (*Bartonella bacilliformis*), 보르타델라 페르투시스 (*Bortadella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 레쿠렌티스 (*B. recurrentis*), 브루셀라 (*Brucella*), 칼림마토박테리움 그라눌로마티스 (*Calymmatobacterium granulomatis*), 캄필로박터 (*Campylobacter*), 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 프란시셀라 툴라렌시스 (*Francisella tularensis*), 가르드네렐라 바기날리스 (*Gardnerella vaginalis*), 해모필리우스 아에깁티우스 (*Haemophilius aegyptius*), 해모필리우스 두크레이이 (*H. ducreyi*), 해모필리우스 인플루엔지아에 (*H. influenziae*), 헬리코박터 필로리 (*Heliobacter pylori*), 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*), 렙토스피라 인테로간스 (*Leptospira interrogans*), 네이세리아 메닝기티디아 (*Neisseria meningitidia*), 포르피로모나스 깅기발리스 (*Porphyromonas gingivalis*), 프로비덴시아 스투르티 (*Providencia sturti*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리디스 (*Salmonella enteridis*), 살모넬라 티피 (*S. typhi*), 세라티아 마르세센스 (*Serratia marcescens*), 시겔라 보이디이 (*Shigella boydii*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스 (*Streptobacillus moniliformis*), 스트렙토코커스 피오게네스 (*S. pyogenes*), 트레포네마 팔리둠 (*Treponema pallidum*), 비브리오 콜레라에 (*Vibrio cholerae*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스 (*Yersinia pestis*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, 항산균은 미오박테리움 아비움 (*Myobacterium* avium), 미오박테리움 레프라에 (*M. leprae*), 미오박테리움 투베르큘로시스 (*M. tuberculosis*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 다른 3개의 범주에 속하지 않는 다른 세균은 바르토넬라 헨세이아에 (*Bartonella henseiae*), 클라미디아 시타시 (*Chlamydia psittaci*), 클라미디아 트라코마티스 (*C. trachomatis*), 콕시엘라 부르네티이 (*Coxiella burnetii*), 미코플라스마 뉴모니아에 (*Mycoplasma pneumoniae*), 리케챠 아카리 (*Rickettsia akari*), 리케챠 프로와제키이 (*R. prowazekii*), 리케챠 리케치이 (*R.* rickettsii), 리케챠 쯔쯔가무시 (*R. tsutsugamushi*), 리케챠 티피 (*R. typhi*), 우레아플라스마 우레아리티쿰 (*Ureaplasma urealyticum*), 디플로코커스 뉴모니아에 (*Diplococcus pneumoniae*), 에를리치아 차펜시스 (*Ehrlichia chafensis*), 엔테로코커스 파에시움 (*Enterococcus faecium*), 메닝고코시 (*Meningococci*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, 진균은 아스페르길리 (*Aspergilli*), 칸디다에 (*Candidae*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 콕시디오이데스 이미티스 (*Coccidioides immitis*), 크립토코키 (*Cryptococci*), 및 이들의 조합을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, 기생 미생물은 발란티듐 콜라이 (*Balantidium* coli), 크립토스포리듐 파르붐 (*Cryptosporidium parvum*), 시클로스포라 카야타넨시스 (*Cyclospora cayatanensis*), 엔세팔리토조아 (*Encephalitozoa*), 엔타모에바 히스톨리티카 (*Entamoeba histolytica*), 엔테로시토준 비에네우시 (*Enterocytozoon bieneusi*), 기아르디아 람블리아 (*Giardia lamblia*), 레슈마니아에 (*Leishmaniae*), 플라스모디이 (*Plasmodii*), 톡소플라스마 곤디이 (*Toxoplasma gondii*), 트리파노소마에 (*Trypanosomae*), 트라페조이달 아메바 (*trapezoidal amoeba*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 기생충은 벌레 (예를 들어, 연충), 특히 선충 (회충, 예를 들어, 편충, 십이지장충, 요충, 회충속, 사상충 등), 촌충류 (예를 들어, 촌충)를 포함하고, 이로 제한되지 않는 기생 벌레를 포함한다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 감염성 단백질은 프리온을 포함한다. 프리온에 의해 야기되는 질환은 인간 질환, 예를 들어 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob) 병 (CJD) (예를 들어, 의원성 (iatrogenic) 크로이츠펠트-야콥 질병 (iCJD), 변종 크로이츠펠트-야콥 질병 (vCJD), 가족성 크로이츠펠트-야콥 질병 (fCJD), 및 산발성 크로이츠펠트-야콥 질병 (sCJD) 포함), 게르스트만-쉬트로이슬러 샤잉커 (Gerstmann-Straeussler-Scheinker) 증후군 (GSS), 치명적 가족성 불면증 (fFI), 산발성 치명적 불면증 (sFI), 쿠루병 등, 및 동물 질환, 예를 들어 스크래피 (scrapie) (양 및 염소), 소 해면상 뇌병증 (BSE) (소), 전염성 밍크 뇌병증 (TME) (밍크), 만성 소모성 질병 (CWD) (엘크, 뮬 사슴 (mule deer)), 고양이 해면상 뇌병증 (고양이), 광록병 (EUE) (니알라 (nyala), 큰 영양, 그레이터 쿠두 (greater kudu)), 타조의 해면상 뇌병증 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0070] 예시적인 특정 실시태양에서, 생물학적 샘플에서 핵산 서열 (예를 들어, DNA, RNA 등), 단백질, 폴리펩티드, 지

질 다당류 등과 같은 마커의 검출 방법이 제공된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산"은 DNA 분자 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA) 및 RNA 분자 (예를 들어, mRNA) 및 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하고자 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노산"은 염기성 아미노기 및 산성 카르복실기를 모두 함유하는 유기 화합물을 포함한다. 상기 용어에는 천연 아미노산 (예를 들어, L-아미노산), 변형된 및 비통상적인 아미노산 (예를 들어, D-아미노산 및 β-아미노산), 및 생물학적으로 유리되거나 조합된 형태로 발생하는 것으로 알려져 있지만 대체로 단백질에서 발생하지 않는 아미노산이 포함된다. 천연 단백질 존재 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글라이신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 세린, 트레오닌, 타이로신, 트립토판, 프롤린, 및 발린을 포함한다. 천연 비-단백질 아미노산은 아르기노숙신산, 시트룰린, 시스테인 황산, 3,4-디히드록시페닐알라닌, 호모시스테인, 호모세린, 오르니틴, 3-모노요오도타이로신, 3,5-디요오도타이로신, 3,5,5-트리요오도타이로신, 및 3,3',5,5'-테트라요오도타이로신을 포함한다. 변형된 또는 비통상적인 아미노산은 D-아미노산, 히드록시라이신, 4-히드록시프롤린, N-Cbz-보호된 아미노산, 2,4-디아미노부티르산, 호모아르기닌, 노르류신, N-메틸아미노부티르산, 나프틸알라닌, 페닐글라이신, 알파-페닐프롤린, t-류신, 4-아미노시클로헥실알라닌, N-메틸-노르류신, 3,4-데히드로프롤린, N,N-디메틸아미노글라이신, N-메틸아미노글라이신, 4-아미노피페리딘-4-카르복실산, 6-아미노카프로산, 트랜스-4-(아미노메틸)-시클로헥산카르복실산, 2-, 3-, 및 4-(아미노메틸)-벤조산, 1-아미노시클로펜탄카르복실산, 1-아미노시클로프로판카르복실산, 및 2-벤질-5-아미노펜탄산을 포함한다.

[0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "펩티드"는 펩티드 결합에 의해 연결되는 2개 이상의 아미노산으로 이루어지는 화합물을 포함한다. 펩티드의 분자량은 10,000 달톤 미만, 5,000 달톤 미만, 또는 2,500 달톤 미만일 수 있다. 용어 "펩티드"는 또한 펩티드 및 비-펩티드 성분, 예를 들어 슈도펩티드 (pseudopeptide) 또는 펩티드모방체 (peptidomimetic) 잔기 또는 다른 비-아미노산 성분을 모두 함유하는 화합물을 포함한다. 펩티드 및 비-펩티드 성분을 모두 함유하는 그러한 화합물은 "펩티드 유사체"로도 언급될 수 있다.

[0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질"은, 선형 사슬로 배열되고 인접 아미노산 잔기의 카르복실기와 아미노기 사이의 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산으로 구성된 화합물을 포함한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지질"은 일반적으로 양친매성이고 생체적합성인 합성 또는 천연 생성 화합물을 포함한다. 지질은 일반적으로 친수성 성분 및 소수성 성분을 포함한다. 예시적인 지질은 지방산, 중성 지방, 포스파티드, 당지질 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지질 조성물"은 일반적으로 수성 매질 내에 지질 화합물을 포함하는 조성물을 의미한다. 예시적인 지질 조성물은 현탁액, 에멀젼, 소포 조성물 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0075] 생물학적 샘플 내에서 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드 또는 핵산의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 예시적인 방법은 시험 대상으로부터 생물학적 샘플 (예를 들어, 체액 샘플 (예를 들어, 혈액) 및/또는 종양 샘플)을 얻고, 생물학적 샘플을 하나 이상의 마커 (예를 들어, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드, 탄수화물, 지질 등)를 검출할 수 있는 화합물 또는 물질과 접촉시키는 것을 수반한다.

[0076] 본원에서 설명되는 검출 방법은 시험관 내에서 및 생체 내에서 생물학적 샘플 내의 하나 이상의 마커 (예를 들어, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드, 탄수화물, 지질 등)를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, mRNA의 검출을 위한 시험관내 기술은 노던 (Northern) 혼성화 및 계내 (in situ) 혼성화를 포함한다. 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드의 검출을 위한 시험관내 기술은 효소 연결 면역흡착 분석 (ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전 및 면역형광을 포함한다. 게놈 DNA의 검출을 위한 시험관내 기술은 서던 (Southern) 혼성화를 포함한다. 또한, 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드의 검출을 위한 시험관내 기술은 폴리펩티드에 대해 작용하는 표지된 항체를 대상 내에 도입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 항체는 그의 대상 내의 존재 및 위치를 표준 영상화 기술에 의해 검출할 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.

[0077] 생물학적 샘플에서 지질 함량을 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Kang et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta. 1128:267]; [Weylandt et al. (1996) Lipids 31:977]; [J. Schiller et al. (1999) Anal. Biochem. 267:46]; [Kang et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4050]; [Schiller et al. (2004) Prog. Lipid Res. 43:499] 참조). 예시적인 지질 분석 방법은 생물학적 샘플로부터 지질을 추출하고 (예를 들어, 0.005% 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT, 항산화제로서)을 함유하는 클로로포름:메탄올 (2:1, vol:vol)을 사용하여), 지방산 메틸 에스테르를 제조하고 (예를 들어, 14% BF3-메탄올 시약), 지방산 메틸 에스테르를 정량하는 것이다 (예를 들어, HPLC, TLC, 상업적으로 이용가능한 기체 크로마토그래프, 질량 분광계,

및/또는 기체 크로마토그래프/질량 분광계의 조합을 사용한 기체 크로마토그래피-질량 분광분석에 의해). 지방산 질량은 다양한 분석되는 지방산의 면적을 고정된 농도의 내부 표준품의 면적과 비교함으로써 결정된다.

[0078] 진단 및 예후 분석의 일반적인 원칙은 마커 및 프로브가 상호작용하고 결합하여 반응 혼합물에서 제거 및/또는 검출될 수 있는 복합체를 형성할 수 있는 적절한 조건 하에서 및 충분한 시간 동안 마커 (예를 들어, 하나 이상의 DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드, 탄수화물, 지질 등) 및 프로브를 함유할 수 있는 샘플 또는 반응 혼합물의 제조를 포함한다. 상기 분석은 다양한 방식으로 수행될 수 있다.

[0079] 예를 들어, 상기 분석을 수행하는 한 방법은 기재로도 불리는 고상 지지체 상에 마커 또는 프로브를 고정시키고, 반응 종료시에 고상에 고정된 표적 마커/프로브 복합체를 검출하는 것을 포함할 것이다. 상기 방법의 한 실시태양에서, 마커의 존재 및/또는 농도에 대해 분석되는 대상으로부터의 샘플은 담체 또는 고상 지지체에 고정될 수 있다. 다른 실시태양에서, 프로브가 고상에 고정될 수 있고, 대상으로부터의 샘플이 분석물의 비고정된 성분으로서 반응하도록 허용될 수 있는 반대의 상황도 가능하다.

[0080] 분석 성분을 고상에 고정하기 위한 많은 확립된 방법이 존재한다. 이들 방법은 비오틴 및 스트렙타비딘의 컨쥬게이션을 통해 고정된 마커 또는 프로브 분자 (이로 제한되지 않음)를 포함한다. 상기 비오티닐화 분석 성분은 당업계에 공지된 기술 (예를 들어, 비오티닐화 키트, 피어스 케미칼스 (Pierce Chemicals, 미국 일리노이주 록포드))을 사용하여 비오틴-NHS (N-히드록시-숙신이미드)로부터 제조되고, 스트렙타비딘-코팅된 96웰 플레이트 (피어스 케미칼)의 웰에 고정된다. 특정 실시태양에서, 고정된 분석 성분이 존재하는 표면을 미리 제조하여 보관할 수 있다.

[0081] 상기 분석에 적합한 다른 담체 또는 고상 지지체는 마커 또는 프로브가 속하는 분자 종류에 결합할 수 있는 임의의 물질을 포함한다. 잘 공지된 지지체 또는 담체는 유리, 폴리스티렌, 나일론, 폴리프로파일렌, 나일론, 폴리에틸렌, 덱스트란, 아밀라제, 천연 및 변형된 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암, 및 자철석을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0082] 상기 언급된 방법을 사용하여 분석을 수행하기 위해서, 제2 성분이 고정된 고상에 비-고정된 성분이 첨가된다. 반응이 완료된 후에, 복합체를 형성하지 않은 성분은 형성된 임의의 복합체가 고상에 고정된 상태로 유지되도록 하는 조건 하에 제거될 수 있다 (예를 들어, 세척에 의해). 고상에 고정된 마커/프로브 복합체의 검출은 본원에서 개관되는 많은 방법으로 수행될 수 있다.

[0083] 예시적인 특정 실시태양에서, 프로브가 비고정된 분석 성분일 때, 프로브는 본원에서 논의되고 당업자에게 잘 알려져 있는 검출가능한 표지로 직접 또는 간접적으로 검출 및 분석 판독을 위해 표지될 수 있다.

[0084] 또한, 예를 들어 형광 에너지 전달 기술 (예를 들어, 미국 특허 5,631,169 및 4,868,103 참조)을 이용하여 성분 (마커 또는 프로브)의 추가 조작이나 표지를 실시하지 않으면서 마커/프로브 복합체 형성을 직접 검출할 수 있다. 제1 '공여자' 분자 상의 형광단 표지는, 적절한 파장의 입사광을 사용한 여기시에 그의 방출된 형광 에너지가 제2 '수여자' 분자 상의 형광 표지에 의해 흡수되고, 흡수된 에너지에 의해 다시 형광을 낼 수 있도록 선택된다. 별법으로, '공여자' 단백질 분자는 단순히 트립토판 잔기의 천연 형광 에너지를 이용할 수 있다. '수여자' 분자 표지가 '공여자' 분자 표지와 구별될 수 있도록 상이한 파장의 광을 방출하는 표지가 선택된다. 표지 사이의 에너지 전달 효율은 분자를 분리하는 거리에 관련되기 때문에, 분자 사이의 공간적 관계가 평가될 수 있다. 분자 사이에 결합이 발생하는 상황 하에서, 분석에서의 '수여자' 분자 표지의 형광 방출은 최대이어야 한다. FET 결합 사건은 당업계에 공지된 표준 형광 검출 수단을 통해 편리하게 측정될 수 있다 (예를 들어, 형광계를 사용하여).

[0085] 다른 실시태양에서, 마커를 인식하는 프로브의 능력 결정은 실시간 생체분자 상호작용 분석 (BIA)과 같은 기술을 이용하여 분석 성분 (프로브 또는 마커)을 표지하지 않으면서 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338 2345] 및 [Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699 705] 참조). 본원에서 사용되는 바와 같이, "BIA" 또는 "표면 플라즈몬 공명"은 임의의 상호작용물을 표지하지 않으면서 생체특이적 상호작용을 실시간으로 연구하기 위한 기술 (예를 들어, BIAcore)이다. 결합 표면의 질량 변화 (결합 사건의 지표임)는 표면 근처에서 광의 굴절률을 변경시키고 (표면 플라즈몬 공명 (SPR)의 광학 현상), 이에 의해 생물학적 분자들 사이에서 실시간 반응의 표시로서 사용될 수 있는 검출가능한 신호가 생성된다.

[0086] 별법으로, 다른 실시태양에서, 유사한 진단 및 예후 분석은 액상 내의 용질로서 마커 및 프로브를 사용하여 수행할 수 있다. 상기 분석에서, 복합체를 형성한 마커 및 프로브는 분별 원심분리, 크로마토그래피, 전기영동

및 면역침전을 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 많은 표준 기술에 의해 비복합체화 성분으로부터 분리된다. 분별 원심분리에서, 마커/프로브 복합체는 그들의 상이한 크기 및 밀도를 기초로 한 복합체의 상이한 침강 평형 때문에 일련의 원심분리 단계를 통해 비복합체화 분석 성분으로부터 분리될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rivas and Minton (1993) Trends Biochem. Sci. 18:284] 참조). 표준 크로마토그래피 기술도 비복합체화 분자로부터 복합체화 분자를 분리하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피는 분자를 크기를 기초로 하여, 컬럼 방식에 적절한 겔 여과 수지를 이용하여 분리하고, 예를 들어 비교적 더 큰 복합체는 비교적 더 작은 비복합체화 성분으로부터 분리될 수 있다. 유사하게, 비복합체화 성분에 비해 마커/프로브 복합체의 비교적 상이한 전하 특성은 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피 수지를 이용하여 비복합체화 성분으로부터 복합체를 구별하기 위해 이용될 수 있다. 상기 수지 및 크로마토그래피 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Heegaard (1998) J. Mol. Recognit. 11:141]; [Hage and Tweed (1997) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 12:499] 참조). 또한, 겔 전기영동이 복합체화된 분석 성분을 비결합된 성분으로부터 분리하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987 1999] 참조). 상기 기술에서, 단백질 또는 핵산 복합체는 예를 들어 크기 또는 전하를 기초로 하여 분리된다. 전기영동 과정 동안 결합 상호작용을 유지하기 위해서, 비-변성 겔 매트릭스 물질 및 환원제 부재 하의 조건이 일반적으로 바람직하다. 특정 분석에 적절한 조건 및 그의 성분은 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0087] 예시적인 특정 실시태양에서, 마커에 대응하는 mRNA의 수준은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 계내 및/또는 시험관내 방식에 의해 결정될 수 있다. 많은 발현 검출 방법은 단리된 RNA를 이용한다. 시험관내 방법을 위해, mRNA의 단리를 선택하지 않는 임의의 RNA 단리 기술이 혈액 세포로부터 RNA의 정제를 위해 이용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987 1999] 참조). 추가로, 매우 많은 세포 및/또는 샘플이 당업자에게 잘 공지된 기술, 예를 들어 촘진스키 (Chomczynski)의 1단계 RNA 단리 과정 (1989, 미국 특허 4,843,155)을 사용하여 쉽게 처리될 수 있다.

[0088] 단리된 mRNA는 서던 또는 노던 분석, 중합효소 연쇄 반응 분석 및 프로브 어레이를 포함하고 이로 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 분석에 사용될 수 있다. 예시적인 특정 실시태양에서, mRNA 수준의 검출을 위한 진단 방법은 검출되는 유전자에 의해 코딩되는 mRNA에 혼성화할 수 있는 핵산 분자 (프로브)와 단리된 mRNA를 접촉시키는 것을 포함한다. 핵산 프로브는 예를 들어 전장 cDNA, 또는 그의 일부, 예를 들어 길이가 적어도 7, 15, 30, 50, 100, 250 또는 500개 뉴클레오티드이고 엄격한 조건 하에 본 발명의 마커를 코딩하는 mRNA 또는 게놈 DNA에 특이적으로 혼성화하기에 충분한 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 진단 분석에 사용하기 위한 다른 적합한 프로브가 본원에서 설명된다. mRNA와 프로브의 혼성화는 해당 마커가 발현되고 있음을 나타낸다.

[0089] 한 방식에서, mRNA는 고체 표면에 고정되고, 예를 들어 단리된 mRNA를 아가로스 겔 상에서 전개시키고, mRNA를 겔로부터 막, 예를 들어 니트로셀룰로스로 전달함으로써 프로브와 접촉하게 된다. 다른 방식에서, 프로브(들)은 고체 표면에 고정되고, mRNA는 예를 들어 유전자 칩 어레이에서 프로브(들)과 접촉된다. 당업자는 본 발명의 마커에 의해 코딩되는 mRNA의 수준을 검출할 때 사용하기 위한 공지의 mRNA 검출 방법을 쉽게 적용할 수 있다.

[0090] 샘플에서 본 발명의 마커에 대응하는 mRNA의 수준을 결정하기 위한 다른 방법은 예를 들어 rtPCR (미국 특허 4,683,195 및 4,683,202에 제시된 실험 실시태양), COLD-PCR (Li et al. (2008) Nat. Med. 14:579), 리가제 연쇄 반응 (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189), 자기 지속 서열 복제 (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874), 전사 증폭 시스템 (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173), Q-베타 레플리카제 (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), 롤링 서클 (rolling circle) 복제 (미국 특허 5,854,033) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의한 핵산 증폭 과정, 이어서 당업자에게 잘 공지된 기술을 사용한 증폭 분자의 검출을 수반한다. 상기 검출 방식은 핵산 분자가 매우 적은 수로 존재할 경우 상기 분자의 검출에 특히 유용하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 증폭 프라이머는 유전자의 5' 또는 3' 구역에 어닐링되고 그 사이에 짧은 구역이 존재할 수 있는 한 쌍의 핵산 분자 (각각 + 및 - 가닥 또는 그 반대)로서 규정된다. 일반적으로, 증폭 프라이머는 그 길이가 약 10 내지 30개의 뉴클레오티드이고, 길이가 약 50 내지 200개의 뉴클레오티드인 구역의 측면에 인접한다. 적절한 조건 하에 적절한 시약을 사용할 때, 상기 프라이머는 프라이머가 측면에 인접하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자의 증폭을 허용한다.

[0091] 계내 방법을 위해, mRNA는 검출 전에 샘플 (예를 들어, 체액 (예를 들어, 혈액 세포))로부터 단리될 필요가 없다. 상기 방법에서, 세포 또는 조직 샘플은 공지의 조직학적 방법을 사용하여 제조/처리된다. 이어서, 샘플은

지지체, 일반적으로 유리 슬라이드 상에 고정된 후, 마커를 코딩하는 mRNA에 혼성화할 수 있는 프로브와 접촉된다.

[0092] 마커의 절대적인 발현 수준을 기초로 하여 결정하는 대안으로서, 결정은 마커의 정규화된 발현 수준을 기초로 할 수 있다. 발현 수준은 그의 발현을 마커가 아닌 유전자, 예를 들어, 구성적으로 발현되는 하우스키핑 (housekeeping) 유전자의 발현에 비교함으로써 마커의 절대적인 발현 수준을 보정하여 정규화된다. 정규화에 적합한 유전자는 하우스키핑 유전자, 예를 들어 액틴 유전자, 또는 상피 세포-특이적 유전자를 포함한다. 이러한 정규화를 통해, 예를 들어 개체로부터의 포식 혈액 세포를 그 개체로부터의 비-포식 혈액 세포에 비교하기 위해 한 공급원으로부터의 환자 샘플 내의 발현 수준을 다른 공급원으로부터의 환자 샘플과 비교할 수 있다.

[0093] 다른 예시적인 실시태양에서, 마커에 대응하는 단백질 또는 폴리펩티드가 검출된다. 예시적인 특정 실시태양에서, 본 발명의 폴리펩티드를 검출하기 위한 물질은 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체, 예를 들어 검출가능한 표지를 갖는 항체이다. 항체는 폴리클로날, 또는 보다 바람직하게는, 모노클로날 항체일 수 있다. 무손상 항체, 또는 그의 단편 (예를 들어, Fab 또는 $F(ab')_2$)이 사용될 수 있다. 프로브 또는 항체에 대한 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링 (즉, 물리적으로 연결)시키는 프로브 또는 항체의 직접 표지, 및 직접 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지를 포함하고자 의도된다. 간접적인 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 DNA 프로브를 비오틴으로 말단 표지하는 것을 포함한다.

[0094] 샘플이 제시된 항체에 결합하는 단백질을 함유하는지를 결정하기 위해 다양한 방식이 이용될 수 있다. 상기 방식의 예는 효소 면역분석 (EIA), 방사성 면역분석 (RIA), 웨스턴 블롯 분석, 효소 연결 면역흡착 분석 (ELISA) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 당업자는 세포 (예를 들어, 체액 세포, 예를 들어 혈액 세포)가 본 발명의 마커를 발현하는지를 결정할 때 사용하기 위해 공지의 단백질/항체 검출 방법을 쉽게 적용할 수 있다.

[0095] 한 방식에서, 항체 또는 항체 단편은 발현된 단백질을 검출하기 위해 웨스턴 블롯 또는 면역형광 기술과 같은 방법에 사용될 수 있다. 이러한 용도에서, 항체 또는 단백질을 고체 지지체 상에 고정시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 적합한 고상 지지체 또는 담체는 항원 또는 항체에 결합할 수 있는 임의의 지지체를 포함한다. 잘 공지된 지지체 또는 담체는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로파일렌, 폴리에틸렌, 덱스트란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암, 자철석 등을 포함한다.

[0096] 당업자는 항체 또는 항원에 결합하기 위한 많은 다른 적합한 담체를 알 것이고, 상기 지지체를 본 발명에 사용하기 위해 적용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포 (예를 들어, 체액 세포, 예를 들어 혈액 세포)로부터 단리된 단백질은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에서 전개되어, 고상 지지체, 예를 들어 니트로셀룰로스 상에 고정될 수 있다. 이어서, 지지체를 적합한 버퍼로 세척한 후, 검출가능하게 표지된 항체로 처리할 수 있다. 이어서, 고상 지지체를 다시 버퍼로 세척하여 비결합 항체를 제거할 수 있다. 이어서, 고체 지지체 상에 결합된 표지의 양은 통상적인 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0097] 예시적인 특정 실시태양에서, 진단 분석이 제공된다. 생물학적 샘플 내에서 신체 병태, 암과 연관된 질병 및/또는 질환, 감염 물질, 및/또는 다른 질병의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 예시적인 방법은 시험 대상으로부터의 생물학적 샘플을 얻고, 마커 핵산 또는 핵산에 의해 코딩되는 마커 펩티드의 존재가 생물학적 샘플에서 검출되도록 생물학적 샘플을, 암과 연관된 질병 및/또는 질환, 감염 물질, 및/또는 다른 질병 또는 병태의 하나 이상의 마커, 예를 들어, 마커 핵산 (예를 들어, mRNA, 게놈 DNA), 마커 핵산에 의해 코딩되는 마커 펩티드 (예를 들어, 폴리펩티드 또는 단백질) 또는 마커 지질을 검출할 수 있는 화합물 또는 물질과 접촉시키는 것을 포함한다. 한 실시태양에서, 마커 mRNA 또는 게놈 DNA를 검출하기 위한 물질은 마커 mRNA 또는 게놈 DNA에 혼성화할 수 있는 표지된 핵산 프로브이다. 핵산 프로브는 예를 들어 전장 마커 핵산 또는 그의 일부일 수 있다. 본 발명의 진단 분석에 사용하기 위한 다른 적합한 프로브가 본원에서 설명된다.

[0098] 마커 펩티드를 검출하기 위한 물질은 마커 펩티드에 결합할 수 있는 항체, 예를 들어 검출가능한 표지를 갖는 항체일 수 있다. 항체는 폴리클로날, 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 무손상 항체, 또는 그의 단편 (예를 들어, Fab 또는 $F(ab')_2$)이 사용될 수 있다. 프로브 또는 항체에 대한 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링 (즉, 물리적으로 연결)시키는 프로브 또는 항체의 직접 표지, 및 직접 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적인 표지를 포함하고자 의도된다. 간접적인 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출 및 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있도록 DNA 프로브를 비오틴으로 말단 표지하는 것을 포함한다.

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 대상으로부터의 단리된 조직, 세포 (예를 들어, 포식세포, 비-포식세포, 2n 세포, >2n 세포 등) 및 생물학적 유체 (예를 들어, 전혈, WBC 등), 및 대상 내에 존재하는 조직, 세포 (예를 들어, 포식세포, 비-포식세포, 2n 세포, >2n 세포 등) 및 체액 (예를 들어, 소변, 전혈, WBC 등)을 포함하고자 의도된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관 내에서 및 생체 내에서 생물학적 샘플 내의 마커 폴리펩티드, 단백질, 탄수화물, 지질, 올리고당, mRNA, 마이크로RNA, 게놈 DNA 등을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시태양에서, 생물학적 샘플은 시험 대상으로부터의 단백질, 폴리펩티드, 지질 및/또는 올리고당을 함유한다. 별법으로, 생물학적 샘플은 시험 대상으로부터의 mRNA 분자 및/또는 시험 대상으로부터의 게놈 DNA 분자를 함유할 수 있다. 한 실시태양에서, 생물학적 샘플은 대상으로부터 통상적인 수단에 의해 단리된 혈청 샘플, 타액 샘플 또는 생검 샘플이다.

[0100] 다른 실시태양에서, 방법은 대조 대상으로부터 대조 생물학적 샘플 (예를 들어, 비-포식세포 또는 2n 세포)을 얻고, 대조 샘플 (예를 들어, 비-포식세포 또는 2n 세포)을 생물학적 샘플 내에서 마커 폴리펩티드, 단백질, 지질, 올리고당, mRNA, 마이크로RNA, 게놈 DNA 등을 검출할 수 있는 화합물 또는 물질과 접촉시키고, 대조 샘플 내의 마커 폴리펩티드, 단백질, 지질, 올리고당, mRNA, 게놈 DNA 등의 존재를 시험 샘플 (예를 들어, 포식세포 또는 >2n 세포) 내의 마커 폴리펩티드, 단백질, 지질, 올리고당, mRNA, 게놈 DNA 등의 존재와 비교하는 것을 더 포함한다. 별법으로, 시험 샘플 (예를 들어, 포식세포 또는 >2n 세포) 내의 마커 폴리펩티드, 단백질, 지질, 올리고당, mRNA, 게놈 DNA 등의 존재는 검출 또는 진단을 위해 데이타 베이스 또는 차트 상의 정보와 비교할 수 있다.

[0101] 또한, 본 발명은 생물학적 샘플 내에서 암 및/또는 감염 물질과 연관된 하나 이상의 마커의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 생물학적 샘플 내에서 마커 폴리펩티드, 단백질, 지질, 올리고당, mRNA, 마이크로RNA, 게놈 DNA 등을 검출할 수 있는 표지된 화합물 또는 물질; 샘플 내의 마커의 양을 결정하기 위한 수단; 및 샘플 내의 마커의 양을 표준품 (예를 들어, 비-포식세포 또는 2n 세포)과 비교하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 화합물 또는 물질은 적합한 용기 내에 포장될 수 있다. 키트는 마커 펩티드 또는 핵산을 검출하기 위해 키트를 사용하기 위한 지시서를 더 포함할 수 있다.

[0102] 예시적인 특정 실시태양에서, 예후 분석이 제공된다. 본원에서 설명되는 진단 방법은 또한 암 및/또는 감염 물질과 연관된 질병 및/또는 질환, 또는 본원에서 설명되는 하나 이상의 마커의 상향조절된 (또는 하향조절된) 발현과 연관된 본원에서 설명되는 다른 질환이 존재하거나 발생할 위험이 있는 대상을 확인하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 설명되는 분석, 예를 들어 상기 진단 분석 또는 하기 분석은 암 및/또는 감염 물질과 연관된 질병 및/또는 질환 및/또는 본원에서 설명되는 하나 이상의 다른 질환이 존재하거나 발생할 위험이 있는 대상을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0103] 본원에서 설명되는 예후 분석은 암 및/또는 감염 물질과 연관된 질병 및/또는 질환, 및/또는 본원에서 설명되는 하나 이상의 마커와 연관된 본원에서 설명되는 하나 이상의 다른 질환의 치료를 위해 물질 (예를 들어, 작용제, 길항제, 펩티드모방체, 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 또는 다른 약물 후보)을 대상에게 투여할 수 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 대상이 암과 연관된 하나 이상의 증상을 치료, 개선 또는 감소시키기 위한 물질로 효과적으로 치료될 수 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 암 및/또는 감염 물질과 연관된 질병 및/또는 질환, 및/또는 본원에서 설명되는 하나 이상의 다른 질환에 대한 물질로 대상이 효과적으로 치료될 수 있는지를 결정하기 위한 방법을 제공한다.

[0104] 또한, 본 발명의 방법은 마커 유전자 내의 유전자 변경을 검출하여, 변경된 유전자가 존재하는 대상에, 암 및/또는 감염 물질과 연관된 질병 및/또는 질환, 및/또는 마커 단백질 활성 또는 핵산 발현의 오조절을 특징으로 하는 본원에서 설명되는 하나 이상의 다른 질환, 예를 들어 암의 발생 위험이 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 이 방법은 대상으로부터의 세포 (예를 들어, 체액 세포, 예를 들어 혈액 세포)의 샘플에서 마커 펩티드를 코딩하는 유전자 및/또는 마커 유전자의 통합성에 영향을 주는 변경을 특징으로 하는 유전자 변경의 존재 또는 부재의 검출을 포함한다. 예를 들어, 상기 유전자 변경은 다음 중의 적어도 하나의 존재를 확인함으로써 검출될 수 있다: 1) 하나 이상의 마커 유전자로부터 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실; 2) 하나 이상의 마커 유전자에 대한 하나 이상의 뉴클레오티드의 부가; 3) 하나 이상의 마커 유전자의 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 4) 하나 이상의 마커 유전자의 염색체 재배열; 5) 하나 이상의 마커 유전자의 mRNA 전사체의 수준 변경; 6) 하나 이상의 마커 유전자의 이상 변형, 예를 들어 게놈 DNA의 메틸화 패턴의 이상 변형; 7) 하나 이상의 마커 유전자의 mRNA 전사체의 비-야생형 스플라이싱 패턴의 존재; 8) 하나 이상의 마커 단백질의 비-야생형 수준; 9) 하나 이상의 마커 유전자의 대립유전자 손실; 및 10) 하나 이상의 마커 단백질의 부적절한 번역후 변형. 본원에서 설명되는 바와 같이, 하나 이상의 마커 유전자의 변경을 검출하기 위해 사용될 수 있는

매우 많은 분석이 당업계에 공지되어 있다.

[0105] 특정 실시태양에서, 변경의 검출은 중합효소 연쇄 반응 (PCR) (예를 들어, 미국 특허 4,683,195, 4,683,202 및 5,854,033 참조), 예를 들어 실시간 PCR, COLD-PCR, 앵커 (anchor) PCR, 순환 (recursive) PCR 또는 RACE PCR에서, 또는 별법으로 라이게이션 연쇄 반응 (LCR) (예를 들어, 문헌 [Landegran et al. (1988) Science 241:1077]; [Prodromou and Pearl (1992) Protein Eng. 5:827]; 및 [Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360] 참조)에서 프로브/프라이머의 사용을 수반하고, 후자는 특히 마커 유전자 내의 점 돌연변이의 검출에 유용할 수 있다 (문헌 [Abravaya et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23:675] 참조). 상기 방법은 대상으로부터 세포의 샘플을 모으고, 핵산 (예를 들어, 게놈, mRNA 또는 둘 모두)을 샘플의 세포로부터 단리하고, 마커 유전자 (존재할 경우)의 혼성화 및 증폭이 발생하도록 하는 조건 하에서 핵산 샘플을 마커 유전자에 특이적으로 혼성화하는 하나 이상의 프라이머와 접촉시키고, 증폭 산물의 존재 또는 부재를 검출하거나, 증폭 산물의 크기를 검출하고, 길이를 대조 샘플과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. PCR 및/또는 LCR은 본원에서 설명되는 돌연변이를 검출하기 위해 사용되는 임의의 기술과 함께 예비 증폭 단계로서 사용하는 것이 바람직할 수 있는 것으로 예상된다.

[0106] 다른 증폭 방법은 자기 지속 서열 복제 (Guatelli et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874), 전사 증폭 시스템 (Kwoh et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173), Q-베타 레플리카제 (Lizardi et al. (1988) Bio-Technology 6:1197), 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법, 및 이어서 당업자에게 잘 공지된 기술을 사용한 증폭 분자의 검출을 포함한다. 상기 검출 방식은 핵산 분자가 매우 적은 수로 존재할 경우 상기 분자의 검출에 특히 유용하다.

[0107] 별도의 실시태양에서, 샘플 세포로부터의 하나 이상의 마커 유전자 내의 돌연변이는 제한 효소 절단 패턴의 변경에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 샘플 및 대조 DNA는 단리되고, 임의로 증폭된 후, 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제에 의해 소화되고, 단편 길이 크기를 겔 전기영동으로 결정하고, 비교한다. 샘플과 대조 DNA 사이의 단편 길이 크기의 차이는 샘플 DNA 내의 돌연변이를 나타낸다. 또한, 서열 특이적 리보자임 (예를 들어, 미국 특허 5,498,531 참조)은 리보자임 절단 부위의 발생 또는 상실에 의해 특이적 돌연변이의 존재를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0108] 다른 실시태양에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 마커의 유전자 돌연변이는 샘플 및 대조 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA를 수백 또는 수천 개의 올리고뉴클레오티드 프로브를 함유하는 고밀도 어레이에 혼성화시킴으로써 확인될 수 있다 ([Cronin et al. (1996) Human Mutation 7: 244]; [Kozal et al. (1996) Nature Medicine 2:753]). 예를 들어, 마커 핵산 내의 유전자 돌연변이는 문헌 [Cronin, M. T. et al. 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 광 생성 DNA 프로브를 함유하는 2차원 어레이에서 확인될 수 있다. 간단히 설명하면, 프로브의 제1 혼성화 어레이는 순차적으로 중복되는 프로브의 선형 어레이를 제조함으로써 서열 사이의 염기 변화를 확인하기 위해 샘플 및 대조군 내의 DNA의 긴 스트레치를 스캐닝하기 위해 사용될 수 있다. 이 단계에 의해, 점 돌연변이를 확인할 수 있다. 이 단계에 이어서, 검출되는 모든 변이체 또는 돌연변이에 상보성인 보다 작은 특수 프로브 어레이를 사용함으로써 특이적인 돌연변이의 특성화를 가능하게 하는 제2 혼성화 어레이가 사용된다. 각각의 돌연변이 어레이는 야생형 유전자에 상보성인 프로브 및 돌연변이체 유전자에 상보성인 다른 프로브의 병렬 프로브 세트로 이루어진다.

[0109] 또다른 실시태양에서, 샘플 마커 유전자의 서열을 대응하는 야생형 (대조) 서열과 비교함으로써 마커 유전자의 서열을 직접 결정하고 돌연변이를 검출하기 위해 당업계에 공지된 임의의 다양한 서열결정 반응을 사용할 수 있다. 서열결정 반응의 예는 막삼 (Maxam) 및 길버트 (Gilbert) ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560) 또는 생거 (Sanger) ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463)에 의해 개발된 기술을 기초로 한 것을 포함한다. 또한, 진단 분석 ((1995) Biotechniques 19:448)을 수행할 때, 질량 분광법 (예를 들어, PCT 국제 공개 WO 94/16101; [Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36:127-162]; 및 [Griffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147] 참조)에 의한 서열결정을 포함하여 임의의 다양한 자동 서열결정 절차를 이용할 수 있음이 고려된다.

[0110] 마커 유전자에서 돌연변이를 검출하기 위한 다른 방법은 RNA/RNA 또는 RNA/DNA 이종이중체에서 미스매치된 염기를 검출하기 위해 절단제로부터의 보호가 사용되는 방법을 포함한다 (Myers et al. (1985) Science 230:1242). 일반적으로, 당업계의 "미스매치 절단" 기술은 야생형 마커 서열을 함유하는 (표지된) RNA 또는 DNA를 조직 샘플로부터 얻은 잠재적인 돌연변이체 RNA 또는 DNA와 혼성화시킴으로써 형성된 이종이중체를 제공함으로써 개시된다. 이중 가닥 이중체는 대조 가닥과 샘플 가닥 사이의 염기쌍 미스매치에 의해 존재하는 것과 같은 이중체

의 단일 가닥 구역을 절단하는 물질로 처리된다. 예를 들어, 미스매치된 구역을 효소에 의해 소화시키기 위해서 RNA/DNA 이중체는 RNase로 처리되고, DNA/DNA 혼성체 (hybrid)는 S1 뉴클레아제로 처리될 수 있다. 다른 실시태양에서, DNA/DNA 또는 RNA/DNA 이중체는 미스매치된 구역을 소화시키기 위해서 히드록실아민 또는 사산화 오스뮴으로 및 피페리딘으로 처리될 수 있다. 미스매치된 구역의 소화 후에, 생성되는 물질은 돌연변이 부위를 결정하기 위해서 변형 폴리아크릴아미드 겔 상에서 크기에 의해 분리된다. 예를 들어, 문헌 [Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397]; [Saleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217:286]을 참조한다. 한 실시태양에서, 대조 DNA 또는 RNA는 검출을 위해 표지될 수 있다.

[0111] 또다른 실시태양에서, 미스매치 절단 반응은 세포의 샘플로부터 얻은 마커 cDNA 내의 점 돌연변이를 검출하고 매핑하기 위해 규정된 시스템에서 이중 가닥 DNA 내의 미스매치된 염기쌍을 인식하는 하나 이상의 단백질 ("DNA 미스매치 복구" 효소로도 불림)을 이용한다. 예를 들어, 이. 콜라이의 mutY 효소는 G/A 미스매치에서 A를 절단하고, HeLa 세포로부터의 티미딘 DNA 글리코실라제는 G/T 미스매치에서 T를 절단한다 (Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15:1657). 예시적인 실시태양에 따르면, 마커 서열, 예를 들어 야생형 마커 서열을 기초로 한 프로브는 시험 세포(들)로부터의 cDNA 또는 다른 DNA 산물에 혼성화된다. 이중체는 DNA 미스매치 복구 효소로 처리되고, 존재할 경우 절단 산물은 전기영동 프로토콜 등에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,459,039를 참조한다.

[0112] 다른 실시태양에서, 전기영동 이동성의 변화가 마커 유전자 내의 돌연변이를 확인하기 위해 사용될 것이다. 예를 들어, 단일 가닥 입체형태 다형성 (SSCP)은 돌연변이체 핵산과 야생형 핵산 사이의 전기영동 이동성의 차이를 검출하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Orita et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766], 또한, 문헌 [Cotton (1993) Mutat. Res. 285:125]; 및 [Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73] 참조). 샘플 및 대조 마커 핵산의 단일 가닥 DNA 단편은 변성된 후, 재생되도록 허용될 것이다. 단일 가닥 핵산의 2차 구조는 서열에 따라 상이하고, 생성되는 전기영동 이동성의 변화를 통해 심지어 단일 염기 변화도 검출할 수 있다. DNA 단편은 표지되거나 또는 표지된 프로브로 검출될 수 있다. 분석 감도는 2차 구조가 서열의 변화에 보다 감수성인 RNA (DNA보다는)를 사용하여 향상시킬 수 있다. 한 실시태양에서, 이 방법은 전기영동 이동성의 변화를 기초로 하여 이중 가닥 이종이중체 분자를 분리하기 위해 이종이중체 분석을 이용한다 (Keen et al. (1991) Trends Genet. 7:5).

[0113] 또 다른 실시태양에서, 변성제의 구배가 존재하는 폴리아크릴아미드 겔에서 돌연변이체 또는 야생형 단편의 이동은 변성 구배 겔 전기영동 (DGGE)을 사용하여 분석한다 (Myers et al. (1985) Nature 313:495). DGGE가 분석 방법으로서 사용될 때, DNA는 예를 들어 PCR에 의해 약 40 bp의 고융점 GC-풍부 DNA의 GC 클램프 (clamp)를 첨가함으로써, DNA가 완전히 변성되지는 않음을 보장하도록 변형될 것이다. 추가의 실시태양에서, 대조 및 샘플 DNA의 이동성의 차이를 확인하기 위해 온도 구배가 변성 구배 대신에 사용된다 (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753).

[0114] 점 돌연변이를 검출하기 위한 다른 기술의 예는 선택적인 올리고뉴클레오티드 혼성화, 선택적인 증폭 또는 선택적인 프라이머 연장을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 공지의 돌연변이가 중앙에 배치된 후, 완전한 매치가 발견된 경우에만 혼성화를 허용하는 조건 하에서 표적 DNA에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 제조할 수 있다 ([Saiki et al. (1986) Nature 324:163]; [Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230]). 상기 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드가 혼성화 막에 부착되고 표지된 표적 DNA와 혼성화될 때 PCR 증폭된 표적 DNA 또는 많은 상이한 돌연변이에 혼성화된다.

[0115] 별법으로, 선택적인 PCR 증폭에 의존하는 대립유전자 특이적 증폭 기술을 본 발명과 함께 사용할 수 있다. 특이적인 증폭을 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드는 분자의 중앙에 (증폭이 차별적인 혼성화에 의존하도록) (Gibbs et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:2437), 또는 적절한 조건 하에 미스매치가 중합효소 연장을 억제하거나 감소시킬 수 있는, 한 프라이머의 3'의 최말단부에 (Prossner (1993) Tibtech 11:238) 관심있는 돌연변이를 보유할 수 있다. 또한, 절단에 기초하여 검출할 수 있도록 신규한 제한 부위를 돌연변이의 구역 내에 도입하는 것이 바람직할 수 있다 (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1). 특정 실시태양에서, 증폭은 또한 증폭을 위해 Taq 리가제를 사용하여 수행될 수 있음이 예상된다 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189). 이 경우에, 증폭의 존재 또는 부재를 확인함으로써 특이적인 부위에서 공지의 돌연변이의 존재를 검출할 수 있도록 5' 서열의 3' 말단에 완전한 매치가 존재하는 경우에만 라이게이션이 발생할 것이다.

[0116] 상기 설명한 본 발명의 실시태양은 단지 본 발명의 원리의 적용례의 일부를 예시한 것임을 이해하여야 한다.

본 발명의 진정한 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 제시된 교시내용을 기초로 하여 당업자에 의해 많은 변형이 실시될 수 있다. 본원에 걸쳐서 언급되는 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원 공개의 내용은 그 전부가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0117] 다음 실시예는 본 발명의 대표적인 것으로서 설명된다. 이들 실시예는 이들 및 다른 동등한 실시태양이 본 명세서, 도면 및 첨부되는 특허청구범위를 살펴보아 명백해질 것이므로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0118] **실시예 1**

[0119] **비-포식세포로부터 포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적**인 방법 I

[0120] 1. 도 2 및 3을 참고로 하여, 플레이트를 아비딘으로 코팅한다.

[0121] 2. 비-포식 혈액 세포 (예를 들어, T 세포)에 대한 비오티닐화 항체를 웰에 첨가하고, 30 min 동안 RT에서 인큐베이팅하고, 웰을 세척한다.

[0122] 3. 자기 비드를 첨가한다.

[0123] 4. WBC 혈액 샘플을 첨가한다.

[0124] 5. 37℃에서 (30분 - 1시간) 인큐베이팅한다.

[0125] 6. 포식세포에 의한 비드의 포식작용 및 비-포식세포에 대한 아비딘-비오틴-항체의 결합 후에, 플레이트를 자석 상부에 놓고, 세척한다 (자기 비드를 내재화한 포식세포 및 항체에 결합된 비-포식세포는 유지될 것이고; 다른 모든 세포는 세척 제거될 것이다).

[0126] 7. 자석을 제거하고, 포식세포를 모은다.

[0127] 8. 포식세포 (예를 들어, 자기 비드에 결합된 세포)로부터 및 비-포식세포 (예를 들어, 결합된 항-비-포식세포 비오티닐화 항체-아비딘을 통해 웰의 바닥에 부착된 세포)의 RNA를 단리하고, cDNA, cRNA를 제조하고, 포식세포 및 비-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 전체 유전자 어레이 및/또는 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해 사용한다.

[0128] 9. 각각의 세포 샘플로부터 DNA를 단리하고, 포식세포 내에 선택적으로 존재하는 (즉, 비-포식세포 내에 부재하는) 종양-DNA 시그너쳐를 확인하고; 프로파일 (예를 들어, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 전체 유전자 어레이, DNA 돌연변이 및/또는 SNP)을 비교한다.

[0129] 10. 각각의 세포 샘플로부터 단백질을 단리하고, 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다. 별법으로, 질량 분광분석을 이용하여 단백질을 확인한다.

[0130] 11. 각각의 세포 샘플로부터 지질을 단리하고, 예를 들어 HPLC를 이용하여 양 및 품질을 비교한다.

[0131] **실시예 2**

[0132] **비-포식세포로부터 포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적**인 방법 II

[0133] 1. 도 2 및 3을 참고로 하여, 혈액 샘플 내의 RBC를 용해시킨다.

[0134] 2. WBC를 유리 슬라이드 상에서 세포원심분리 (cytospinning)한다.

[0135] 3. 세포를 아세톤/메탄올 (5분 동안 -20℃) 내에서 고정시킨다.

[0136] 4. 헤마톡실린 및 에오신 스테인 및 항-T 세포 항체를 사용하여 염색한다.

[0137] 5. 레이저 포획 현미경 (LCM)을 사용하여 T 세포 (비-포식성) 및 대식세포 (포식성)을 단리한다.

[0138] 6. 포식세포로부터 및 비-포식세포의 RNA를 단리하고, cDNA, cRNA를 제조하고, 포식세포 및 비-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 전체 유전자 어레이 및/또는 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해 사용한다.

[0139] 7. 각각의 세포 샘플로부터 DNA를 단리하고, DNA 어레이를 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일 (예를 들어, 전체 유전자 어레이, DNA 돌연변이 및/또는 SNP)을 비교한다.

[0140] 8. 각각의 세포 샘플로부터 단백질을 단리하고, 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다. 별법으로, 질량 분광분석을 이용하여 단백질을 확인한다.

[0141] 9. 각각의 세포 샘플로부터 지질을 단리하고, 예를 들어 HPLC를 이용하여 양 및 품질을 비교한다.

[0142] **실시예 3**

[0143] **비-포식세포로부터 포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적**인 방법 III

[0144] 1. 도 2 및 3을 참고로 하여, 혈액 샘플로부터 RBC를 용해시킨다.

[0145] 2. 자성 항체-컨쥬게이팅된 비드를 사용하여 전혈로부터 비-포식세포 (예를 들어, T 세포) 및 포식세포 (예를 들어, 호중구 및/또는 대식세포 및/또는 단핵구)를 단리한다.

[0146] 3. 각각의 세포 샘플로부터 RNA를 단리하고, cDNA, cRNA를 제조하고, 포식세포 및 비-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해 사용한다.

[0147] 4. 각각의 세포 샘플로부터 DNA를 단리하고, DNA 어레이를 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다.

[0148] 5. 각각의 세포 샘플로부터 단백질을 단리하고, 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다. 별법으로, 질량 분광분석을 이용하여 단백질을 확인한다.

[0149] 6. 각각의 세포 샘플로부터 지질을 단리하고, 예를 들어 HPLC를 이용하여 양 및 품질을 비교한다.

[0150] **실시예 4**

[0151] **비-포식세포로부터 포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적**인 방법 IV

[0152] 1. 도 2 및 3을 참고로 하여, WBC를 특정 세포 아집단 (예를 들어, 호중구, 대식세포, 단핵구, T 세포 등)에 대해 특이적인 형광 항체로 염색한다.

[0153] 2. 세포를 (예를 들어, FACS에 의해) 분류한다.

[0154] 3. 각각의 세포 샘플로부터 RNA를 단리하고, cDNA, cRNA를 제조하고, 포식세포 및 비-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해 사용한다.

[0155] 4. 각각의 세포 샘플로부터 DNA를 단리하고, DNA 어레이를 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다.

[0156] 5. 각각의 세포 샘플로부터 단백질을 단리하고, 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다. 별법으로, 질량 분광분석을 이용하여 단백질을 확인한다.

[0157] 6. 각각의 세포 샘플로부터 지질을 단리하고, 예를 들어 HPLC를 이용하여 양 및 품질을 비교한다.

[0158] **실시예 5**

[0159] **비-포식세포로부터 포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적**인 방법 V

[0160] 1. 도 5 및 6을 참고로 하여, WBC를 각각의 세포 아집단 (예를 들어, 호중구, 대식세포, 단핵구, 및 T 세포)에 대한 형광 항체로 염색한 후, DNA 염료 (예를 들어, 프로피듐 요오다이드)로 염색한다.

[0161] 2. 세포를 T 세포, 호중구 (2n), 호중구 (>2n), 대식세포 (2n), 대식세포 (>2n), 단핵구 (2n), 및 단핵구 (>2n)로 분류한다 (FACS).

[0162] 3. T 세포, 호중구 (>2n), 대식세포 (>2n), 및 단핵구 (>2n)로부터 RNA를 단리한다. 이어서, cDNA, cRNA를 제조하고, 포식세포 및 비-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해

사용한다.

[0163] 4. T 세포, 호중구 (>2n), 대식세포 (>2n), 및 단핵구 (>2n)로부터 DNA를 단리한다. DNA 어레이를 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다.

[0164] 5. T 세포, 호중구 (>2n), 대식세포 (>2n), 및 단핵구 (>2n)로부터 단백질을 단리한다. 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 포식세포 및 비-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다. 별법으로, 질량 분광분석을 이용하여 단백질을 확인한다.

[0165] 6. T 세포, 호중구 (>2n), 대식세포 (>2n), 및 단핵구 (>2n)로부터 지질을 단리한다. 예를 들어, HPLC를 이용하여 지질의 양 및 품질을 비교한다.

[0166] **실시예 6**

[0167] **포식세포의 분리 및 발현 프로파일의 분석을 위한 대표적인 방법 VI**

[0168] 1. 도 5 및 6을 참고로 하여, WBC를 하나 이상의 포식세포 (예를 들어, 호중구, 대식세포, 또는 단핵구)에 대해 특이적인 형광 항체로 염색한 후, DNA-결합 염료 (예를 들어, 프로피듐 요오다이드)로 염색한다.

[0169] 2. 세포를 2n 및 >2n 포식세포로 분류한다 (FACS).

[0170] 3. 각각의 2n 및 >2n 포식세포로부터 RNA를 단리한다. cDNA, cRNA를 제조하고, 2n-포식세포 및 >2n-포식세포의 유전자 프로파일 (예를 들어, 암 유전자 어레이)을 구별하기 위해 사용한다.

[0171] 4. 각각의 2n 및 >2n 포식세포로부터 DNA를 단리한다. DNA 어레이를 실행하고, 2n-포식세포 및 >2n-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다.

[0172] 5. 각각의 2n 및 >2n 포식세포로부터 단백질을 단리한다. 인간 종양에 의해 과다발현된 공지의 단백질 (예를 들어, 전립선암에서 PSA 및 PSMA; 결장암에서 CEA; 및 난소암에서 CA125)에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯을 실행하고, 2n-포식세포 및 >2n-포식세포에서 얻어진 프로파일을 비교한다.

[0173] 6. 각각의 2n 및 >2n 포식세포로부터 지질을 단리한다. 예를 들어, HPLC를 이용하여 지질의 양 및 품질을 비교한다.

[0174] **실시예 7**

[0175] **종양 보유 마우스로부터 얻은 포식세포에서 종양-특이적 유전자 시그너쳐의** 검출

[0176] 본 발명의 실시태양에 따라, 혈액 또는 다른 체액 내에서 "정상 비-특이적 노이즈" 및 "종양-특이적" 및/또는 "질병-특이적" 시그너쳐 사이를 구별하는 방법을 제공한다. 종양 보유 마우스로부터의 혈액 단핵구/대식세포 및 호중구의 유전자-발현 프로파일을 동일한 공여자 마우스로부터의 비-포식성 T 세포의 것과 비교하여, 동일한 종양 보유 마우스로부터 및 비-종양 보유 동물로부터의 비-포식세포에서 발현되지 않거나 유의하게 차별적으로 발현되는 포식세포 내의 종양-특이적 시그너쳐를 확인하였다.

[0177] **인간 전립선 LNCaP 암세포**

[0178] 무흉선 누드 마우스 (n = 5)에게 인간 전립선 LNCaP 암세포를 피하 (s.c.) 주사하였다. 27일 후에 (종양 크기 = 약 0.4 cm), 마우스를 심장 천자에 의해 EDTA-함유 튜브 내로 출혈시킨 (약 1 mL/마우스) 후, 이를 원심분리하였다. 연막 (buffy coat)을 단리하고 세척하고, 호중구, 대식세포, 및 T 세포를 각각 항-마우스 호중구-, 대식세포-, 및 T 세포-면역자성 DynaBeads를 사용하여 분리하였다. RNA를 각각의 세포 샘플로부터 단리하였다 (Triazol®). RNA 품질은 도 3에 제시된 바와 같이 결정하였다. RNA 수율은 도 20에 제시한다. cDNA 및 비오티닐화 cRNA (cRNA-B)를 제조하였다. 마지막으로, cRNA-B 샘플을 암-유전자 인간 마이크로어레이 (Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033 - 수퍼어레이 바이오사이언스 (SuperArray Bioscience))와 함께 인큐베이팅하였다. 혼성화 후에, 막을 세척하고, 아비딘-알칼리성 포스파타제로 염색하고, 유전자를 화학발광 (X-선 필름)을 사용하여 검출하였다.

[0179] **인간 LS174T 결장 선암종 종양, LLC1 암종 세포, B16F10 마우스 흑색종 세포**

[0180] 인간 LS174T 결장 선암종 종양 (종양 크기= 약 0.3 cm)을 s.c. 주사한 무흉선 누드 마우스 (n = 5), 루이스

(Lewis) 마우스 LLC1 폐 암종 세포 (종양 크기= 약 0.6 cm)를 s.c. 주사한 C57B1 마우스 (n = 5), 및 10^6개의 B16F10 마우스 흑색종 세포를 22일 전에 정맥내 주사한 C57B1 마우스 (n = 5)로부터 단리된 세포를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다 (종양 세포가 마우스 기원의 것일 때, cRNA-B 샘플을 Oligo GEArray® Mouse Cancer PathwayFinder Microarray - OMM-033 - 수퍼어레이 바이오사이언스)와 혼성화시켰다). RNA를 또한 지수적으로 증식하는 LS174T, LLC1, B16F10, 및 LNCaP 세포로부터 배양액 내에서, 및 비-종양-보유 C57B1 및 누드 마우스로부터 단리된 호중구, 대식세포 및 T 세포로부터 단리하고, 그들의 암 관련 유전자 프로파일을 결정하였다.

[0181] 이들 실험 실험으로부터 수득하고 도 9-17에 제시된 데이타에 따르면, 호중구 및 대식세포 (인간 전립선 또는 결장 종양 세포를 주사한 마우스로부터 및 마우스 폐암 또는 흑색종을 보유하는 마우스로부터 수득한)는 그들의 각각의 종양 세포에서 또한 발견되는 다양한 암 관련 유전자 시그너쳐를 갖는다. 상기 암 관련 유전자는 (i) 종양 보유 마우스로부터 단리된 비-포식성 T 세포; 및 (ii) 비-종양 보유 마우스로부터 얻은 포식성 호중구 및 대식세포에 의해 발현되지 않거나 최소로 발현되었다.

[0182] 예를 들어, LNCaP 인간 전립선암 세포를 보유하는 누드 마우스의 혈액으로부터 단리된 호중구는 LNCaP 세포에서 또한 발현되는 몇몇 인간 종양 유전자 시그너쳐 (Human Cancer PathwayFinder Microarray)를 발현하였다 (도 9A 및 9B 내의 어레이의 프로파일을 비교한다). 이들 유전자는 종양 보유 마우스로부터 얻은 T 세포 또는 정상 마우스로부터 단리된 호중구에서 발현되지 않거나 최소로 발현되었다 (도 9C 및 9D의 프로파일 참조). 유사하게, LLC1 마우스 폐암 세포를 보유하는 마우스의 혈액으로부터 단리된 호중구는 LLC1 세포에서 발현되는 몇몇 마우스 종양 유전자 시그너쳐 (Mouse Cancer PathwayFinder Microarray)를 발현하였다 (도 13A 및 13B 내의 어레이의 프로파일을 비교한다).

[0183] 이들 유전자는 종양 보유 마우스로부터 얻은 T 세포 또는 정상 마우스로부터 단리된 호중구에서 발현되지 않거나 최소로 발현되었다 (도 13C 및 13D에 제시된 프로파일 참조). 마지막으로, 어레이를 스캐닝하고, 각각의 유전자의 강도를 회사에서 제공되는 소프트웨어를 사용하여 정량하고, 포식세포에 의해 선택적으로 과다발현된 유전자를 도 19 및 20에 제시된 바와 같이 확인하였다. 도 21 및 22에서는 종양 보유 마우스의 포식성 WBC에 의해 획득되고 차별적으로 발현된 유전자 시그너쳐를 나열한다. 도 21에 제시된 바와 같이, 많은 발암유전자 (적색으로 도시된 유전자, 예를 들어, *ERBB2* 및 *Jun*)가 검출되었고, 종종 이들은 대식세포 및 호중구에서 동시에 발현되었다.

[0184] C57B1 마우스 (n = 5)에게 1E6 루이스 마우스 폐 암종 세포 (LLC1)을 피하 주사하였다. 20일 후에, 마우스를 마취하고, 심장 천자에 의해 EDTA-함유 튜브 내로 출혈시켰다 (약 1 mL/마우스). 2,000 rpm에서 5분 동안 실온에서 원심분리 후에, 연막을 튜브에 옮기고, PBS로 세척하였다.

[0185] 항-마우스 대식세포/단핵구 래트 IgG 항체 (단핵구/대식세포 마커 - F4/80 - IgG2b (에이비디 세로텍 (AbD Serotec, 미국 노쓰캐롤라니아주 롤리)로부터))를 항-래트 IgG 항체 자기 비드 (DYNABEAD® 양 항-래트 IgG (INVITROGEN™, 미국 캘리포니아주 칼스바드)로부터))와 함께 인큐베이팅하였다 (30분 동안 실온). 이어서, 항-대식세포/단핵구 비드를 PBS 내에서 세척하고, 얼음 상에 저장하였다.

[0186] 항-마우스 호중구 래트 IgG (호중구 마커 NIMP-R14 - IgG2a - 산타 크루즈 바이오테크놀로지 (Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아주 산타 크루즈))를 항-래트 IgG 항체 자기 비드 (DYNABEAD® 양 항-래트 IgG - INVITROGEN™)와 함께 인큐베이팅하고 (30분 동안 실온), PBS 내에서 세척하고, 얼음 상에 저장하였다.

[0187] DYNABEAD® 마우스 Pan T (Thy1.2) 비드 (INVITROGEN™)를 또한 PBS 내에서 세척하고, 얼음 상에 저장하였다.

[0188] 마우스 혈액 대식세포 및 단핵구를 항-대식세포/단핵구 비드를 사용하여 상기 제조된 WBC 현탁액으로부터 단리하였다. 본질적으로, 비드를 WBC 샘플에 첨가하고, 이들의 인큐베이션 (30분 동안 4℃) 후에, 대식세포-결합된 비드를 자석을 사용하여 단리하고, PBS로 3회 세척하고, 얼음 상에 저장하였다.

[0189] 이어서, 마우스 T 세포를 나머지 WBC로부터 단리하였다. 간단히 설명하면, 항-마우스 T 세포 비드를 WBC 현탁액에 첨가하고, 샘플을 인큐베이팅하고 (30분 동안 4℃), T 세포-결합된 비드를 자석을 사용하여 단리하고, PBS로 세척하고, 얼음 상에서 저장하였다.

[0190] 마지막으로, 마우스 호중구를 나머지 WBC 샘플로부터 단리하였다. 항-마우스 호중구 자기 비드를 세포에 첨가하고, 샘플을 인큐베이팅하였다 (30분 동안 4℃). 호중구-결합된 비드를 자석을 사용하여 단리하고, PBS로 세

척하고, 얼음 상에서 저장하였다.

[0191] 이어서, 각각의 샘플로부터 RNA를 단리하였다 (TRIZOL® (INVITROGEN™, 미국 캘리포니아주 칼스바드)를 사용하여). RNA 품질은 도 7에 제시된 바와 같이 결정하였다. RNA 수율은 도 8에 제시한다. 이어서, cDNA (비오티닐화)를 제조하고, 암-유전자 인간 마이크로어레이 (OLIGO GEARRAY® Human Cancer PathwayFinder Microarray OMM-033, 수퍼어레이 바이오사이언스, 미국 매릴랜드주 프레더릭)와 함께 인큐베이팅하였다 (60℃ 철야). 혼성화 후에, 막을 세척하고 아비딘-알칼리성 포스파타제로 염색하고, 유전자를 화학발광 (X-선 필름)을 사용하여 검출하였다.

[0192] **인간 LS175T 결장 선암종 종양, LLC1 암종 및 B16F10 마우스 흑색종 세포**

[0193] 인간 LS174T 결장 선암종 종양 (종양 크기= 약 0.3 cm)을 s.c. 주사한 무흉선 누드 마우스 (n = 5), 루이스 마우스 LLC1 폐 암종 세포 (종양 크기= 약 0.6 cm)를 s.c. 주사한 C57/B1 마우스 (n = 5), 및 10^6개의 B16F10 마우스 흑색종 세포를 22일 전에 정맥내 주사한 C57B1 마우스 (n = 5)로부터 단리된 세포를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다 (종양 세포가 마우스 기원의 것일 때, cRNA-B 샘플을 Oligo GEArray® Mouse Cancer PathwayFinder Microarray - OMM-033 - 수퍼어레이 바이오사이언스)와 혼성화시켰고, 종양이 인간 기원의 것일 때, Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033 -을 사용하였다). RNA를 또한 지수적으로 증식하는 LS174T, LLC1, B16F10, 및 LNCaP 세포로부터 배양액 내에서, 및 비-종양 보유 C57B1 및 누드 마우스로부터 단리된 호중구, 대식세포 및 T 세포로부터 단리하고, 그들의 암 관련 유전자 프로파일을 결정하였다.

[0194] 이들 실험으로부터 수득하고 도 9A-9D, 10A-10D, 11A-11D, 12A-12D, 13A-13D, 14A-14D, 15A-15D, 16A-16D에 제시된 데이타에 따르면, 호중구 및 대식세포 (인간 전립선 또는 결장 종양 세포를 주사한 마우스로부터 및 마우스 폐암 또는 흑색종을 보유하는 마우스로부터 얻은)는 그들의 각각의 종양 세포에서 또한 발견되는 다양한 암-관련 유전자 시그너쳐를 가졌다 (도 21). 이들 암 관련 유전자는 (i) 종양 보유 마우스로부터 단리된 비-포식성 T 세포; 및 (ii) 비-종양 보유 마우스로부터 얻은 포식성 호중구 및 대식세포에 의해 발현되지 않거나 최소로 발현되었다.

[0195] 예를 들어, LNCaP 인간 전립선암 세포를 보유하는 누드 마우스의 혈액으로부터 단리된 호중구는 LNCaP 세포에서 또한 발현되는 7가지의 인간 종양 유전자 시그너쳐 (Human Cancer PathwayFinder Microarray)를 발현하였다 (도 9A 및 9B 내의 어레이의 프로파일을 비교한다). 이들 유전자는 종양 보유 마우스로부터 얻은 T 세포 또는 정상 마우스로부터 단리된 호중구에서 발현되지 않거나 최소로 발현되었다 (도 9C 및 9D 내의 프로파일 참조). 마지막으로, 어레이를 스캐닝하고, 각각의 유전자의 강도를 회사에서 제공되는 소프트웨어를 사용하여 정량하고, 포식세포에 의해 선택적으로 과다발현된 유전자를 도 19 및 20에 제시된 바와 같이 확인하였다. 도 21 및 22에서는 종양 보유 마우스의 포식성 WBC에 의해 획득되고 차별적으로 발현된 유전자 시그너쳐를 나열한다. 도 21에 제시된 바와 같이, 많은 발암유전자 (예를 들어, *ERBB2* 및 *Jun*)가 검출되었고, 종종 이들은 대식세포 및 호중구에서 동시에 발현되었다 (초록색으로 강조한 유전자에 의해 제시됨).

[0196] **실시예 8**

[0197] **암 환자로부터 얻은 포식세포에서 종양-특이적 유전자 시그너쳐의 검출**

[0198] 본 발명의 특정 실시태양에 따라, 암 환자로부터의 혈액 단핵구/대식세포 및 호중구의 유전자-발현 프로파일을 동일한 공여자 개체로부터의 비-포식성 T 세포의 것과 비교하여, 비-포식세포에서 발현되지 않거나 유의하게 차별적으로 발현되는 포식세포 내의 종양-특이적 시그너쳐를 확인하였다.

[0199] **두경부 종양의 환자**

[0200] 경부의 편평세포 암종을 갖고 수술이 예약된 환자로부터 10 밀리리터의 정맥 혈액을 얻었다 (EDTA-함유 튜브 내로). 2,000 rpm에서 5분 동안 실온에서 원심분리 후에, 연막을 튜브에 옮기고 PBS로 세척하였다.

[0201] T 세포-, 호중구-, 및 대식세포/단핵구-래트 항-인간 면역자성 DynaBeads® (INVITROGEN™, 미국 캘리포니아주 칼스바드)를 사용하여 세포를 분리하였다. 본질적으로, WBC 샘플에 비드를 연속적으로 첨가하고, 각각 4℃에서 30분 인큐베이션 후에, T 세포-, 호중구-, 및 대식세포/단핵구-결합된 비드를 자석을 사용하여 단리하고, PBS로 3회 세척하였다.

[0202] 이어서, 각각의 샘플로부터 RNA를 단리하였다 (TRIZOL® (INVITROGEN™, 미국 캘리포니아주 칼스바드)를 사용하여). RNA 양 및 품질을 결정하고, cDNA 및 비오티닐화 cRNA (cRNA-B)를 제조하였다. 마지막으로, cRNA-B 샘플을 암-유전자 인간 마이크로어레이 (Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033 - 수퍼어레이 바이오사이언스)와 함께 인큐베이팅하였다 (60℃ 철야). 혼성화 후에, 막을 세척하고 아비딘-알칼리성 포스파타제로 염색하고, 유전자를 화학발광 (X-선 필름)을 사용하여 검출하였다.

[0203] 이들 실험으로부터 수득한 데이타에 따르면, 호중구 및 대식세포 (두경부암 환자로부터 얻은)는 그들의 각각의 종양 세포에서 또한 발견되는 다양한 암 관련 유전자 시그너쳐를 가졌다. 상기 암 관련 유전자는 비-포식성 T 세포에 의해 발현되지 않거나 최소로 발현되었다.

[0204] 예를 들어, 하나의 그러한 환자의 혈액으로부터 단리된 호중구는 동일한 환자로부터 얻은 종양 생검에서 또한 발현되는 4가지의 인간 종양 유전자 시그너쳐 (Human Cancer PathwayFinder Microarray)를 발현하였다 (**도 17B 및 17C** 내의 어레이의 프로파일을 비교한다). 이들 유전자는 정상 피부 생검에서 및 동일한 혈액 샘플로부터 단리된 T 세포에서 발현되지 않거나 최소로 발현되었다 (각각 **도 17A 및 17D** 내의 프로파일 참조). 마지막으로, 어레이를 스캐닝하고, 각각의 유전자의 강도를 회사에서 제공되는 소프트웨어를 사용하여 정량하고, 포식세포에 의해 선택적으로 (>2배) 과다발현된 다음 유전자를 확인하였다: E26 바이러스 발암유전자 상동체 (ETS2), HIV-1 Tat 상호작용성 단백질 (HTAT1P2), IL8 (호중구 활성화 및 화학주성), Jun 발암유전자 (JUN), 및 매트릭스 메탈로프로테이나제 9 (MMP9).

[0205] **난소암 환자**

[0206] 난소암의 환자로부터 단리된 세포를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 이들 실험으로부터 수득한 데이타에 따르면, 호중구 및 대식세포 (질병에 걸린 여성으로부터 얻은)는 비-포식성 T 세포에 의해 발현되지 않거나 최소로 발현되는 많은 암 관련 유전자를 발현하였다.

[0207] 예를 들어, 난소암 환자의 혈액으로부터 단리된 대식세포는 동일한 혈액 샘플로부터 단리된 T 세포에서 발현되지 않거나 최소로 발현되는 23가지의 인간 종양 유전자 시그너쳐 (Human Cancer PathwayFinder Microarray)를 발현하였다 (도 18A 및 18B 내의 프로파일을 비교한다). 마지막으로, 어레이를 스캐닝하고, 각각의 유전자의 강도를 회사에서 제공되는 소프트웨어를 사용하여 정량하고, 각각의 세포 종류에서 각각의 암 관련 유전자의 강도를 결정하였다. 대식세포에서 차별적으로 상향조절된/과다발현된 23개의 암 관련 유전자, 및 대식세포-대-T 세포 강도 비를 또한 도 22에 제시한다. 총 5개의 발암유전자가 검출되었음에 주목한다 (도 21에서 적색으로 제시함).

[0208] **실시예 9**

[0209] **인간 전립선 LNCaP 종양 및 인간 결장 LS174T 종양을 보유하는 마우스로부터** 얻은 포식세포에서 종양-특이적 단백질 시그너쳐의 검출

[0210] 단백질 정제 키트 (노르겐, 인코포레이티드 (Norgen, Incorporated), Product #23500)를 사용하여, 마우스 WBC, T 세포, 및 대식세포로부터 단백질을 단리하고 정제하였다. 분석은 매우 단순하고 신속하였고 (약 30분), 고 품질 및 뛰어난 수율의 단리된 단백질 (117.6±10.60 ㎍/4 mL 혈액, n = 5)은 많은 하류 용도, 예를 들어 도 23에 제시된 바와 같은 SDS-PAGE 분석 및 웨스턴 블롯에서 사용될 수 있다.

[0211] 단백질 샘플을 LNCaP 및 LS174T 종양을 보유하는 마우스로부터 얻은 포식세포 (단핵구/대식세포) 및 비-포식세포 (T-림프구)로부터 단리하였고, 상기 종양들은 전자의 세포주는 PSA를 발현하고 ([Denmeade et al. (2001) Prostate 48:1]; [Lin et al. (2001) J. Urol. 166:1943]), 후자는 종양-특이적 당단백질 (TAG-72), 고분자량 뮤신을 발현하므로 ([Colcher et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3199]; [Colcher et al. (1984) Cancer Res. 44:5744]; [Kassis et al. (1996) J. Nucl. Med. 37:343]) 이들 연구를 위해 선택되었다. 16 ㎍의 정제된 단백질 샘플을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 본질적으로, 각각의 샘플을 2 부피의 SDS 로딩 버퍼와 혼합하고, 10% SDS-PAGE 상에서 염색하지 않은 프리시전 플러스 (precision plus) 단백질 표준품 (바이오라드 (Biorad))과 함께 Tris-글라이신-SDS 버퍼 (pH 8.4) 내에서 200볼트에서 전개시켰다. 단백질을 Mini Trans-Blot (바이오라드) 장치 및 25 mM Tris (pH 8.4), 192 mM 글라이신, 및 20% 메탄올을 함유하는 전달 버퍼를 사용하여 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다 (4℃에서 철야). 막을 5% 무지방 분유 (실온 (RT)에서 60분)를 사용하여 차단시키고, B72.3 (인간 TAG-72에 대한 마우스 모노클로날 항체), 또는 ER-PR8 (인간 PSA에 대한 마우스 모노클로날 항체)과 함께 인큐베이팅하였다 (1시간, RT). 블롯을 세척한 후, Immun-Star 염소 항-마

우스-HRP 컨쥬게이트 (바이오라드) (마우스 IgG에 특이적인 2차 항체)와 함께 인큐베이팅하고, 루미놀 용액 및 퍼옥시드 버퍼의 1:1 혼합물 (바이오라드)과 함께 인큐베이션 (5 min, RT)에 의해 발색시킨 후 자가방사선 촬영을 실시하였다.

[0212] 데이타는 LNCaP 종양 보유 마우스로부터의 포식세포가 PSA에 대해 양성인 반면, 도 24에 제시된 바와 같이 상기 단백질은 동일한 동물로부터의 비-포식성 T 세포에서 검출될 수 없음을 명백하게 나타냈다. 유사하게, TAG-72는 LS174T 종양 보유 마우스로부터 얻은 단핵구/대식세포에 의해 발현되었고, 동일한 동물로부터의 T 세포에서는 완전히 부재한다. 이들 발견은 포식세포에 의한 종양-특이적 단백질 시그너쳐의 "획득" 및 발현을 입증한다.

[0213] 이들 데이타는 암이 있는 동물, 및 마우스의 혈액으로부터 얻은 포식세포 및 비-포식세포에 특이적이지만, 설명된 방법은 인간에서 및 하나 이상의 다른 질환 및/또는 질병의 진단 및/또는 검출에서 및 다른 체액으로부터 얻은 포식세포 및 비-포식세포를 사용할 때 또한 유용하다.

[0214] **실시예 10**

[0215] **프로파일링 실험**

[0216] **혈액 포식세포의 단리**

[0217] 환자로부터 혈액 샘플을 얻는다. 혈액 (약 5 mL)을 50 μL의 0.5 M EDTA (최종 EDTA 농도 = 약 4.8 mM)을 함유하는 50-mL 튜브에 옮긴다. 튜브를 부드럽게 볼텍싱하고, 25 mL의 RBC 용해 버퍼 (노르겐, 인코포레이티드)를 첨가한다. 튜브를 다시 부드럽게 볼텍싱하고, 용액의 색상이 밝은 적색으로 변할 때까지 (3-5 min) 실온에서 인큐베이팅하고, 2,000 rpm에서 3 min 동안 원심분리한다. 상등액을 주의깊게 흡인한 후, WBC를 40 mL Ca/Mg-비함유 0.1 M PBS (2% FBS, 2 mM EDTA, 및 20 mM 글루코스 함유)로 세척하고, 이어서 세포 (10^6/mL)를 다음을 함유하는 세포-함유 용액과 함께 인큐베이팅한다 (30 min, 4℃, 암소에서): (i) DNA, 생육가능 세포-침투성 염색제 Hoechst 33342 (4 μg/mL; Em = 483 nm), (ii) 항-인간 단핵구/대식세포 모노클로날 항체 (Alexa Fluor® 647-컨쥬게이트; Em = 668 nm) (이것은 순환 단핵구/대식세포에 의해 발현되는 인간 F4/80 항원을 인식한다), 및 (iii) 항-인간 호중구 모노클로날 항체 (RPE-컨쥬게이트; Em = 578 nm) (이것은 인간 순환 호중구를 인식한다). 이어서, 세포를 세척하고, 호중구 ($N_{n=2}$), 호중구 ($N_{n>2}$), 단핵구/대식세포 ($M/M_{n=2}$), 및 단핵구/대식세포 ($M/M_{n>2}$)로 분류한다 (BD FACSAria).

[0218] **유전자 프로파일링**

[0219] 인간 전체-게놈 유전자 프로파일링을 수행한다. 인간 종양 세포 또는 호중구 ($N_{n=2}$, $N_{n>2}$) 및 단핵구/대식세포 ($M/M_{n=2}$, $M/M_{n>2}$)로부터 얻은 RNA 샘플에 대해, GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (애피메트릭스, 인코포레이티드 (Affymetrix, Incorporated))를 사용한다. 상기 어레이는 38,500개 웰의 잘 특성화된 인간 유전자를 포함한 47,000개를 초과하는 전사체 및 변이체의 발현 수준을 분석한다. 일반적으로, 추출된 RNA는 상기 언급된 어레이를 사용하여 인간 유전자의 발현 프로파일을 결정하기 위해 사용될 것이다. 어레이 재현가능성을 보장하기 위해, 각각의 샘플은 삼중으로 프로파일링되고, 실험은 1회 반복된다. 마이크로어레이 데이타를 아래 설명되는 바와 같이 암-유도-관련 유전자에 대해 여과하고, 정량적 실시간, 역전사효소, 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)을 이용하여 입증할 것이다.

[0220] **암-유도-관련 유전자의 상향조절/하향조절**

[0221] RNA를 Triazol (인비트로겐, 인코포레이티드 (Invitrogen, Incorporated))을 사용하여 단리하고, 키트 내에 제공된 카트리지를 사용하여 정제한다. RNA 품질 및 양은 Bioanalyzer 2100 (애질런트 테크놀로지스, 인코포레이티드 (Agilent Technologies, Incorporated, 미국 캘리포니아주 팔로 알토)) 및 Degradometer 소프트웨어 버전 1.41 (Worldwide Web: dnaarrays.org)을 사용하여 평가한다. 이들 실험 결과는 종양의 존재로 인해 혼란된 분자 경로를 구분하는 것을 도울 것이다.

[0222] **마이크로어레이 실험의 분석**

[0223] 생성된 대규모/고출력 분자 발현 데이타의 분석은 (i) DNA 함량>2인 포식세포에서 차별적으로 발현된 유전자를 확인하고, (ii) 확인된 유전자에 주석을 달고, (iii) 주석을 단 유전자를 특이적 종양에 의해 특이적으로 발현되는 것으로 배정하는 능력에 크게 의존할 것이다. 마이크로어레이 데이타의 통계학적 분석은 예를 들어, 상기

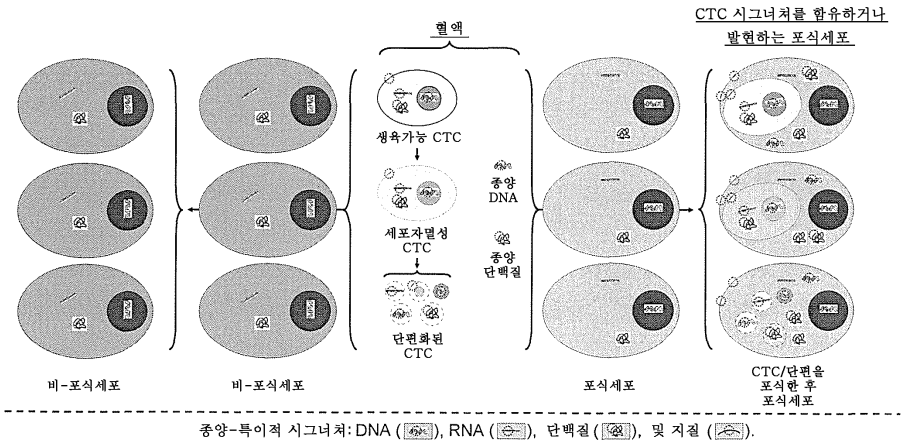
종류의 유전자 목록 작성을 그의 "샘플의 분석/비교" 메뉴 내에 쉽게 수용하는 dChip 패키지를 사용하여 이루어질 수 있다. Affymetrix GeneChips을 사용할 때, 하나 이상의 Gene Chips 및 연관된 방법이 비처리 (raw) 마이크로어레이 데이타의 품질을 입증하기 위해 적용될 것이다 (Gautier et al. (2004) Bioinformatics 20:307). 또한, (발현 값을 생성하기 위해) 프로브 세트의 정규화 및 요약화를 위한 최적 프로토콜에 도달하도록 다양한 배경 보정 및 정규화 절차가 이용될 것이다 ([Huber et al. (2002) Bioinformatics 18 (Suppl. 1):S96]; [Wu et al. (2004) Journal of the American Statistical Association 99:909]; [Seo and Hoffman (2006) BioMed Central Bioinformatics 7:395]). 2-단계 여과 방안에서, 본 발명자들은 $P_{n=2}$의 유전자 프로파일을 $P_{n>2}$의 것에 비교하고, 발현된 유전자의 목록을 작성한 후, 이들 유전자를 각각의 종양 세포주에 대해 확인된 종양-특이적 유전자에 비교한다 (도 5에 제시된 바와 같은 $P_{n=2}$ 유전자 프로파일의 여과 후). 예를 들어, (i) 혈액을 유방암 환자로부터 얻고; (ii) 호중구 (n>2 및 n=2)를 단리하고 그들의 유전자 프로파일을 삼중으로 결정하고; (iii) 각각의 확인된 유전자의 평균 (3개의 샘플로부터의) 및 그의 각각의 표준 오차 (SE)를 각각의 군 ($N_{n>2}$ 및 $N_{n=2}$)에 대해 계산하고; 이어서, (iv) 2개의 군의 유전자 발현 프로파일을 비교하고, 발현된 유전자의 목록 (L-1)을 웰치 (Welch) 변형된 2-샘플 t-검정에 따라 절대치 ≥2배 로그 변화 ($N_{n>2}/N_{n=2}$)에 기초하여 확인하고; (v) $N_{n=2}$ 및 유방암 (종양 및 정상 유방 조직 생검으로부터 얻은)의 유전자 발현 프로파일을 비교하고, 발현된 유전자의 목록 (L-2)를 확인하고; (vi) L-1 및 L-2에서 유전자를 비교하고 ("샘플의 분석/비교/비교의 조합", dChip) 공통 유전자를 여과함으로써 $N_{n>2}$에 의해 획득/확인된 유방암-특이적 유전자 시그너쳐를 확인한다.

[0224] **단백질 프로파일링**

[0225] 각각의 종류의 세포로부터 50 내지 100 마이크로그램의 총 단백질을 변성시키고, 트리스-(2-카르복시에틸)포스핀트립신 (1 mM) 및 0.02% 소듐 도데실 술페이트를 사용하여 60℃에서 1시간 동안 환원시킨다. 시스테인을 후속적으로 차단시키고, 총 단백질을 37℃에서 12-16시간 동안 트립신으로 소화시킨다. 생성되는 펩티드를 1시간 동안 iTRAQ-표지한다 (태그 113-119 및 121 사용) (비교할 세포 유형의 수에 따라 4-플렉스 (plex) 또는 8-플렉스). 표지한 후에, 따로 태깅된 샘플을 합하고, 강한 양이온 교환 컬럼 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 4.6 x 100 Porous)이 장치된 Agilent 1200 Series HPLC 시스템 내로 주입한다. 이어서, 96개의 수집된 분획을 14개의 분획으로 모으고, 각각의 분획을 역상 조건 하에 제2 라운드의 분획화를 위해 LC Packings Ultimate HPLC 시스템 (LC Packings 15 cm x 75 ㎛ 분석 컬럼) 내로 주입한다. 역상 분획을 LC Packings Probot를 사용하여 표적 플레이트 상에 직접 점적하고, 질량 분광법 (어플라이드 바이오시스템즈 4800 Plus 단백체 분석기)으로 분석한다. 데이타 획득 후에, 스펙트럼을 ProteinPilot 소프트웨어 패키지 (어플라이드 바이오시스템즈 MDS Sciex)를 사용하여 처리하고, 각각의 세포 유형 내의 개별 단백질을 그들의 상대 발현 수준과 함께 ProteinPilot™ 소프트웨어를 사용하여 확인한다 (암-연관 단백체 시그너쳐의 분석 및 확인은 게놈 시그너쳐에 대해 도 5에 개략된 것과 유사할 것이다).

도면

도면1



도면2

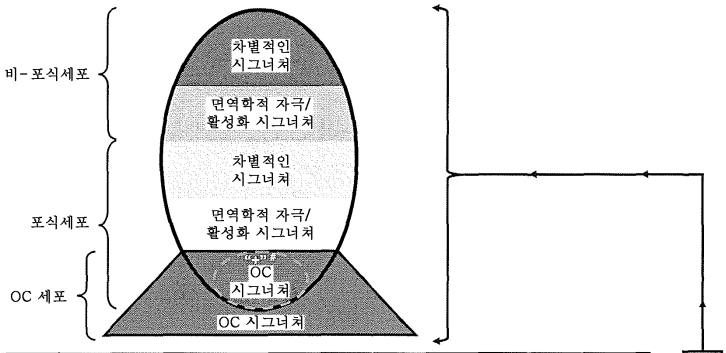
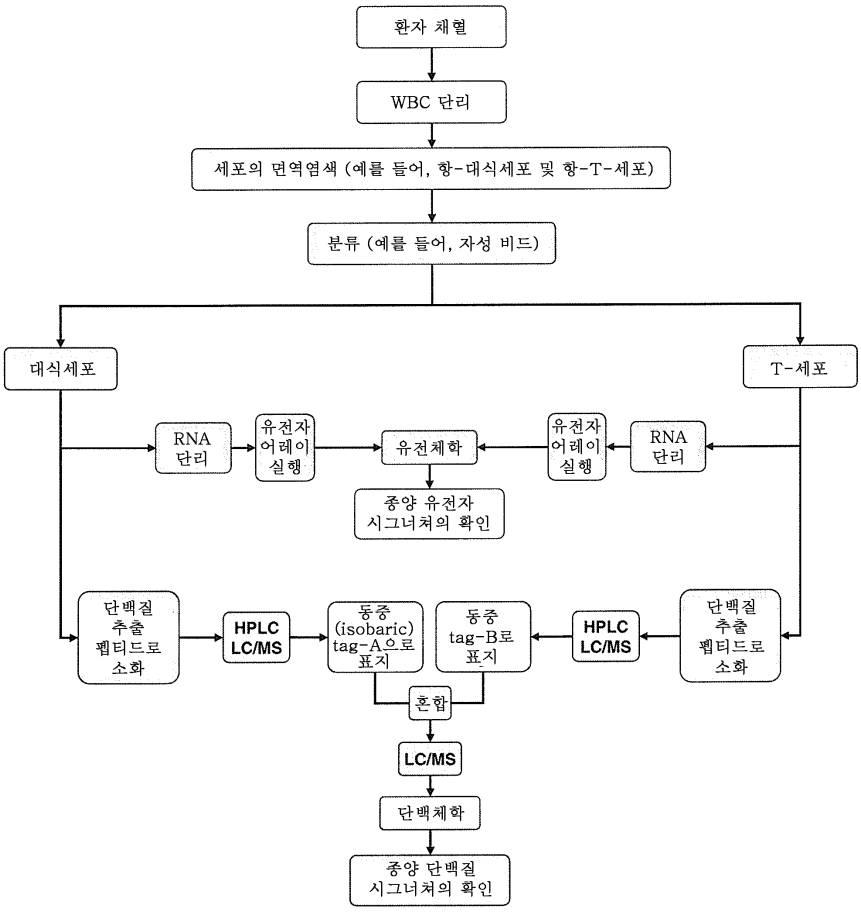


표 1. 난소암 환자의 포식세포에서 암 시그너처의 발현

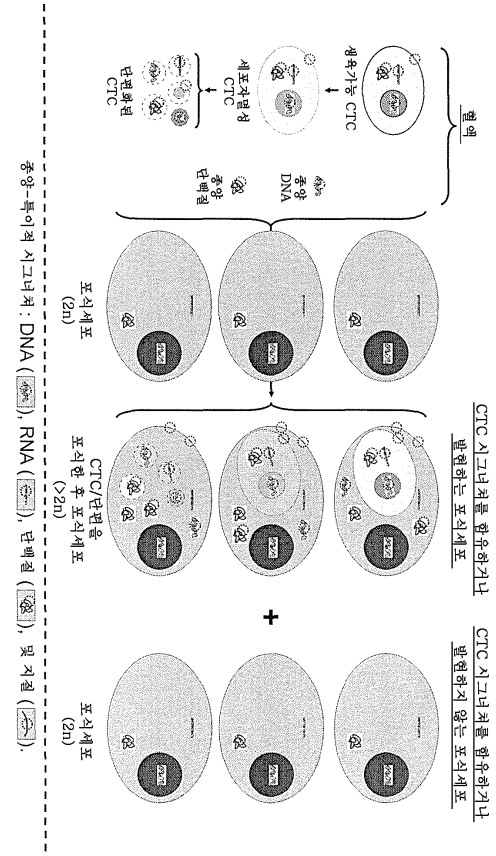
	환자 유전자형-특이적 시그너처	차별적인 시그너처			면역학적 자극/활성화 시그너처*		OC 특이적 시그너처
		P†	NP‡	정상 난소	P†	NP‡	
P†	+	+	–	–	+	–	
NP‡	+	–	+	–	–	+	–
L_1††	0	+	+	–	+	+	
OC 세포	+	–	–	+	–	–	+
정상 난소	+	–	–	+	–	–	–
L_2††	0	–	–	0	–	–	+

* 난소 CTC 및/또는 그의 다른 단편의 포식작용의 결과로서 발현되지 않음
# 난소 CTC 및/또는 그의 다른 단편의 포식작용의 결과로서 발현됨
† 포식세포 (예를 들어, 대식세포, 단핵구, 호중구)
‡ 비-포식세포 (예를 들어, T-세포, B-세포)
†† 확인된 시그너처의 목록 (예를 들어, dChip 소프트웨어를 사용하여)

도면3


환자 채혈
WBC 단리
세포의 면역염색 (예를 들어, 항-대식세포 및 항-T-세포)
분류 (예를 들어, 자성 비드)
대식세포
T-세포
RNA 단리
유전자 어레이 실행
유전체학
유전자 어레이 실행
RNA 단리
종양 유전자 시그너쳐의 확인
단백질 추출 펩티드로 소화
HPLC LC/MS
동중 (isobaric) tag-A으로 표지
동중 tag-B로 표지
HPLC LC/MS
단백질 추출 펩티드로 소화
혼합
LC/MS
단백체학
종양 단백질 시그너쳐의 확인

도면4


혈액
생육가능 CTC
세포자멸성 CTC
단편화된 CTC
종양 DNA
종양 단백질
포식세포 (2n)
CTC/단편을 포식한 후 포식세포 (>2n)
CTC 시그너처를 함유하거나 발현하는 포식세포
+
포식세포 (2n)
CTC 시그너처를 함유하거나 발현하지 않는 포식세포
종양-특이적 시그너처 : DNA ( ), RNA ( ), 단백질 ( ), 및 지질 ( ).

도면5

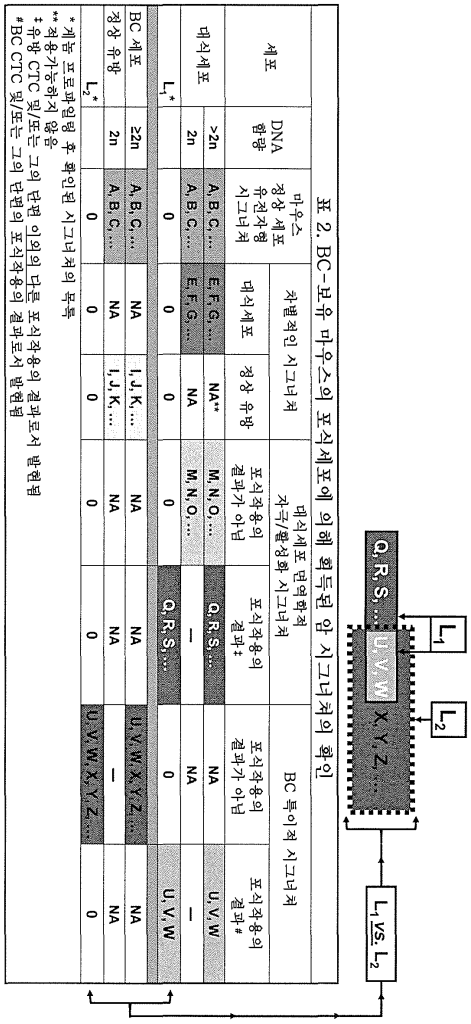
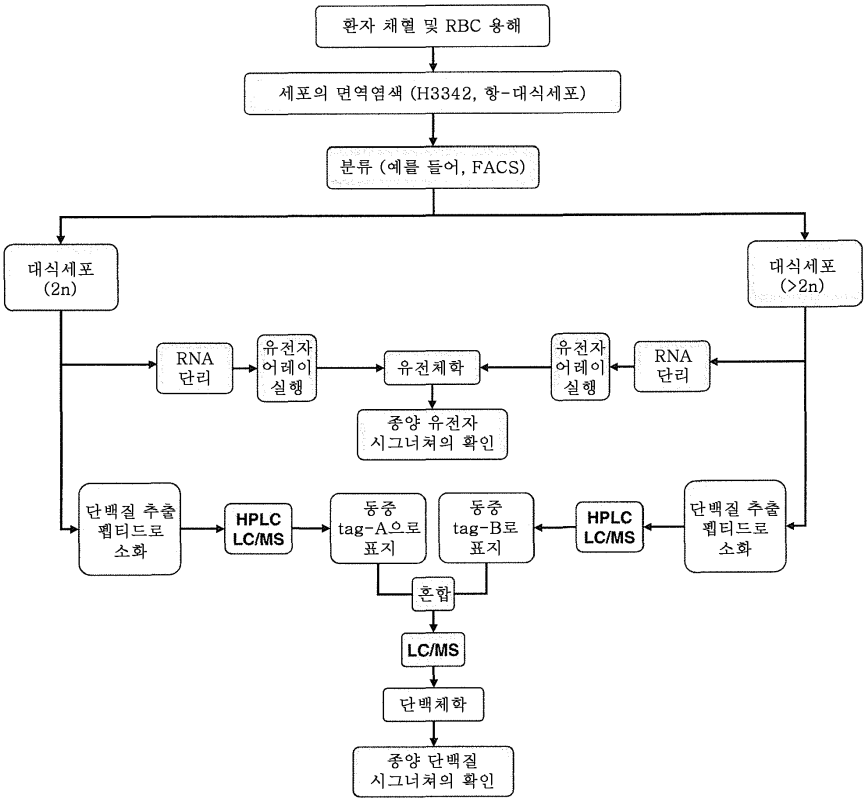


표 2. BC-보유 마우스의 포식세포에 의해 획득된 암 시그너처의 확인

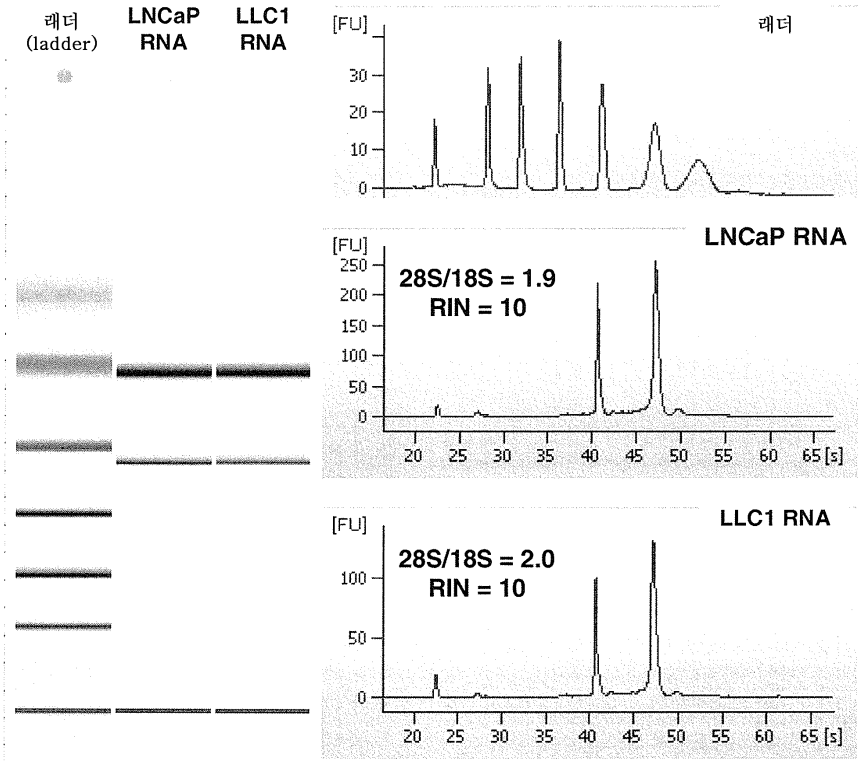
세포			마우스 정상 세포 유전자형 시그너처	차별적인 시그너처		대식세포 면역원적 차극/활성화 시그너처		BC 특이적 시그너처	
	DNA 함량			대식세포	정상 유방	포식작용의 결과가 아님	포식작용의 결과‡	포식작용의 결과가 아님	포식작용의 결과#
대식세포	>2n	L_1*	A, B, C, ...	E, F, G, ...	NA**	M, N, O, ...	Q, R, S, ...	NA	U, V, W
	2n		A, B, C, ...	E, F, G, ...	NA	M, N, O, ...	—	NA	—
		L_1*	0	0	0	0	Q, R, S, ...	0	U, V, W
BC 세포	≥2n		A, B, C, ...	NA	I, J, K, ...	NA	NA	NA	U, V, W, X, Y, Z, ...
정상 유방	2n		A, B, C, ...	NA	I, J, K, ...	NA	NA	NA	—
		L_2*	0	0	0	0	0	U, V, W, X, Y, Z, ...	0

* 게놈 프로파일링 후 확인된 시그너처의 목록
** 적용가능하지 않음
‡ 유방 CTC 및/또는 그의 단편 이외의 다른 포식작용의 결과로서 발현됨
# BC CTC 및/또는 그의 단편의 포식작용의 결과로서 발현됨

도면6


환자 채혈 및 RBC 용해
세포의 면역염색 (H3342, 항-대식세포)
분류 (예를 들어, FACS)
대식세포 (2n)
대식세포 (>2n)
RNA 단리
유전자 어레이 실행
유전체학
유전자 어레이 실행
RNA 단리
종양 유전자 시그너쳐의 확인
단백질 추출 펩티드로 소화
HPLC LC/MS
동중 tag-A으로 표지
동중 tag-B로 표지
HPLC LC/MS
단백질 추출 펩티드로 소화
혼합
LC/MS
단백체학
종양 단백질 시그너쳐의 확인

도면7


래더 (ladder)
LNCaP RNA
LLC1 RNA
[FU]
래더
LNCaP RNA
28S/18S = 1.9
RIN = 10
LLC1 RNA
28S/18S = 2.0
RIN = 10
[s]

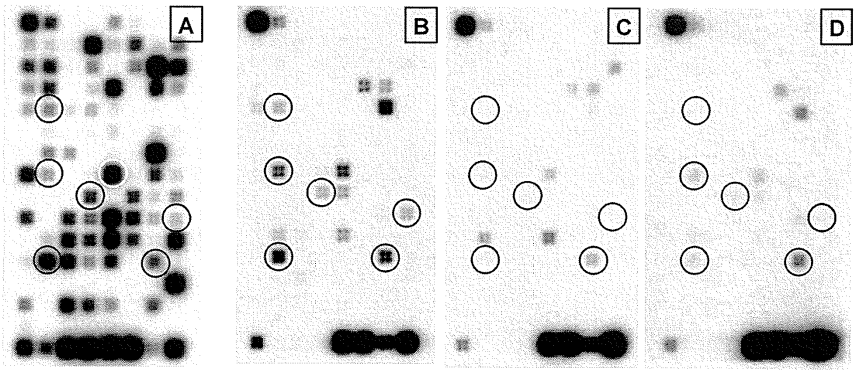
도면8

표 3. 마우스 WBC로부터 얻은 RNA의 수율 및 질

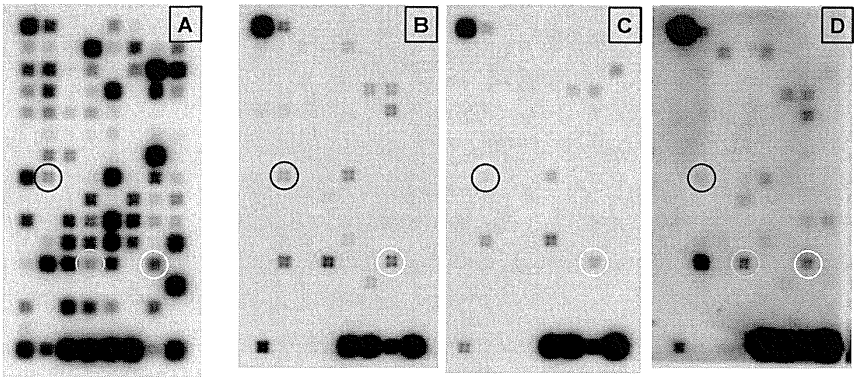
	수율 (μg)	28S/18S 비	RNA 통합성 수 (RIN)
대식세포*	0.53 ± 0.22	1.9 ± 0.2	9.4 ± 0.8
T-세포*	0.42 ± 0.20	1.9 ± 0.3	8.4 ± 0.9
호중구*	0.62 ± 0.16	1.9 ± 0.3	9.6 ± 0.7

*각각 6개 세포 집단의 평균

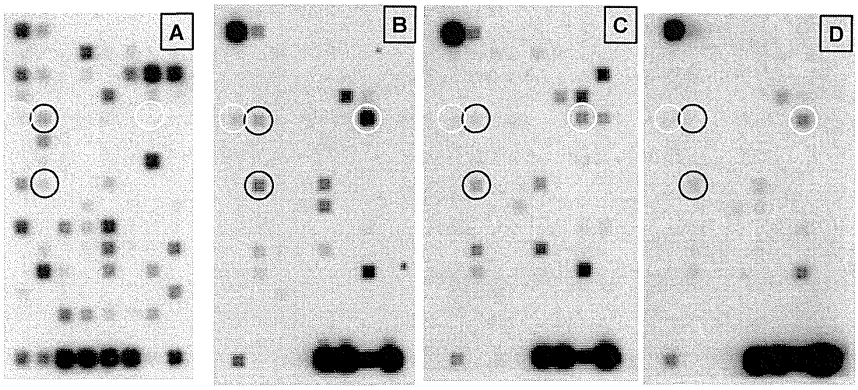
도면9



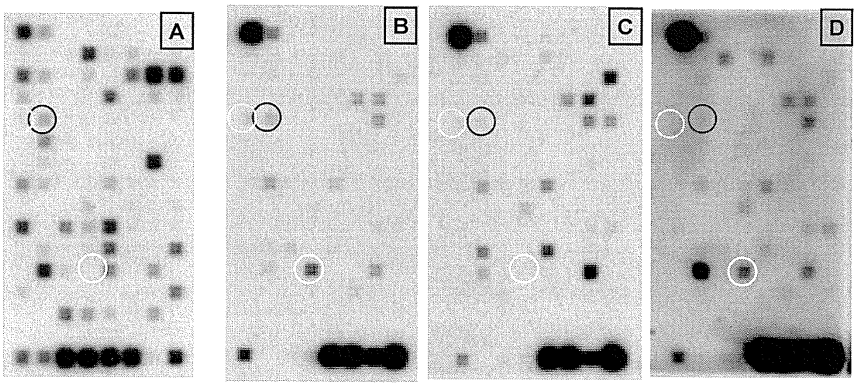
도면10



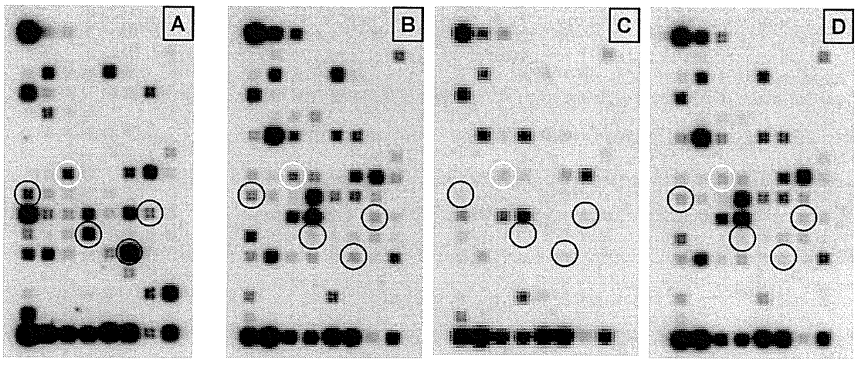
도면11



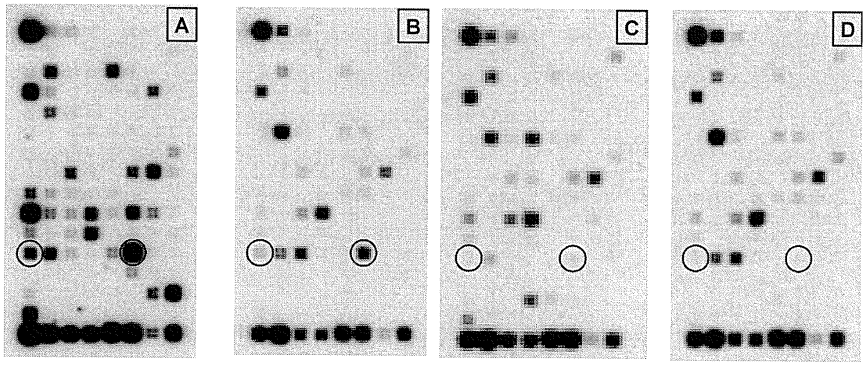
도면12



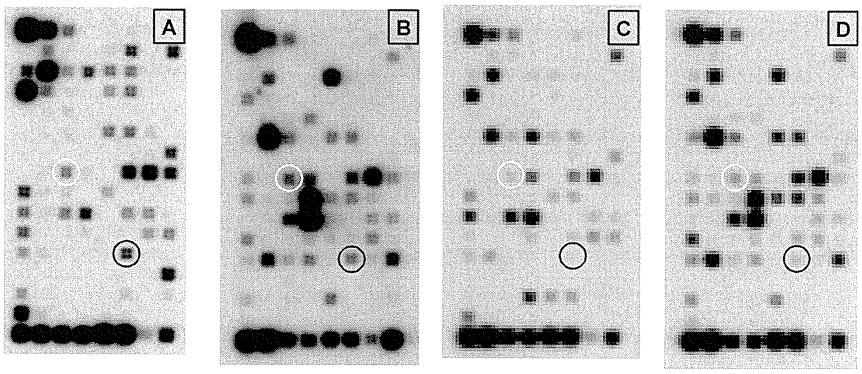
도면13



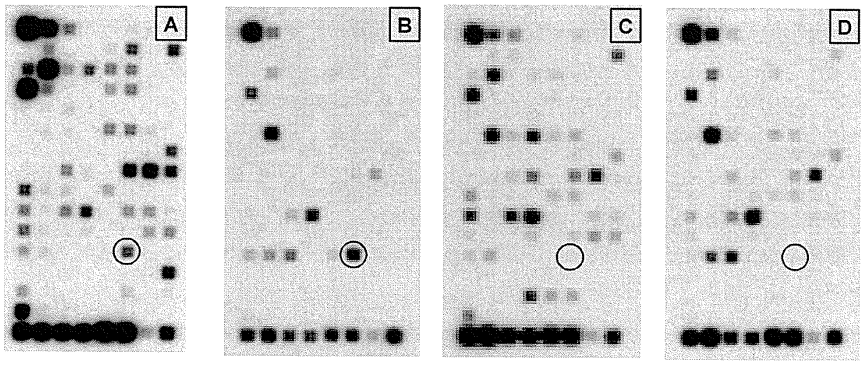
도면14



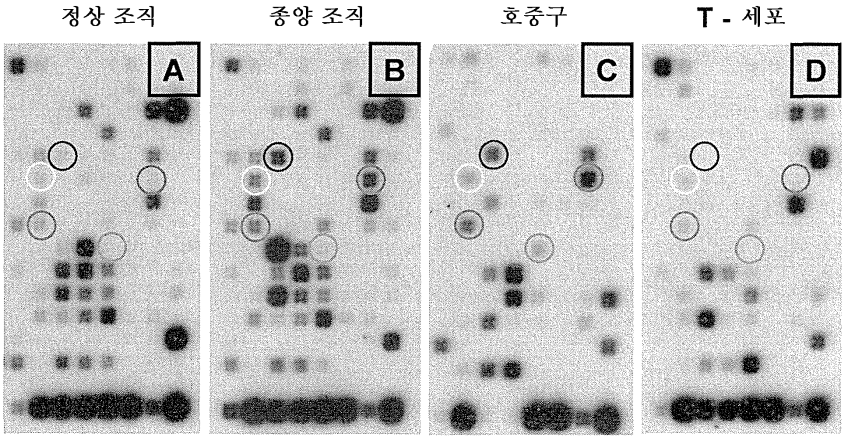
도면15



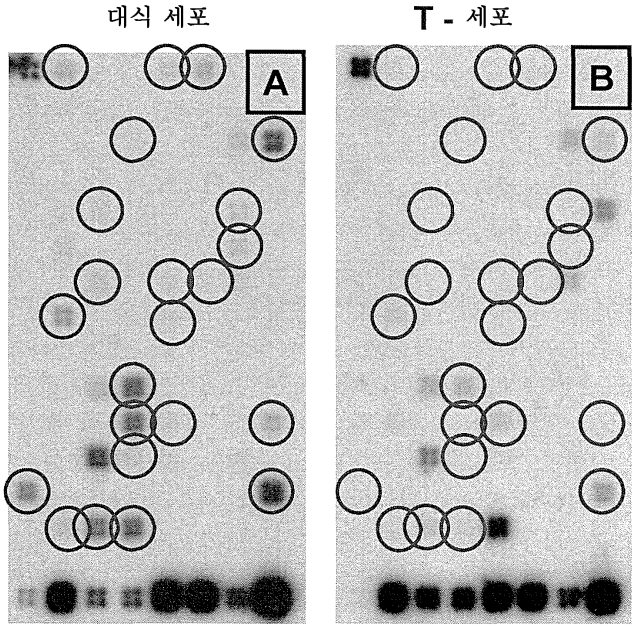
도면16



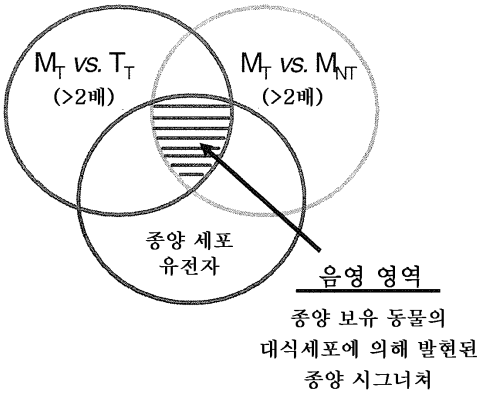
도면17



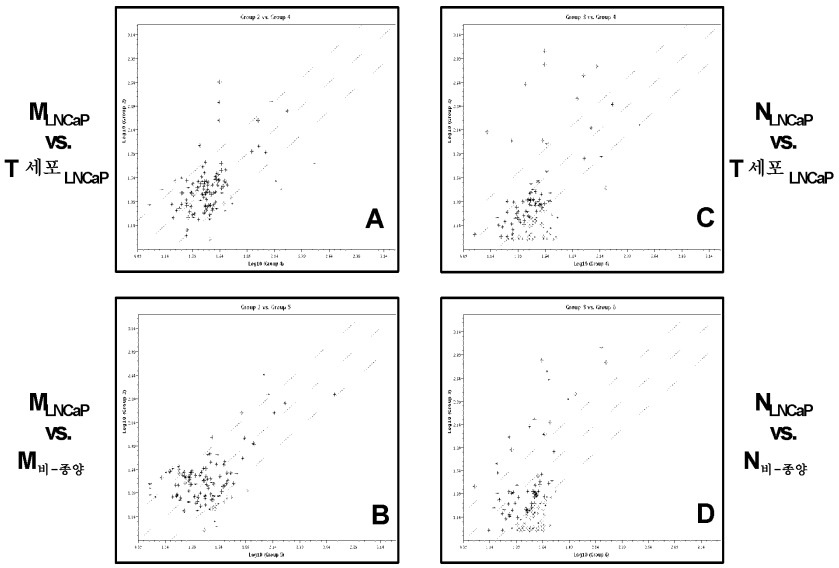
도면18



도면19



도면20



도면21

표 5 포식성 호중구 (N) 및 대식세포 (M) 내에서 암-관련 유전자의 발현

	과다발현된 유전자	LNCaP (인간 전립선암) (누드 마우스)		LS174T (인간 결장암) (누드 마우스)		B16F10 (마우스 흑색종) (블랙 마우스)		LLC1 (마우스 폐암) (블랙 마우스)	
		M	N	M	N	M	N	M	N
	BAK1	–	–	–	–	+	+	–	–
	EGFR	–	–	+	+	–	–	–	–
	ERBB2	–	+	+	+	–	–	–	–
	FOS	–	–	–	+	–	–	–	–
	JUN	+	+	–	+	–	–	–	+
	MAP2K1	–	+	–	–	–	–	–	–
	Mdm2								+
	MMP2	–	+	–	–	–	–	–	–
	PDGFB	–	+	–	–	–	–	–	+
	Plaur								+
	RB1	–	+	–	–	–	–	+	–
	SNCG	+	+	–	–	–	–	–	–
	SERPINB2	+	–	+	–	–	–	–	–
	SPP1	–	–	–	–	–	+	+	+
총	12	3	7	3	4	1	2	2	5
포식세포 (M+N)에서 과다발현된 유전자		8		5		2		6	

적색 = 종양유전자; 청색 = 종양-특이적 유전자; 및 흑색 = 종양-관련유전자.
= M 및 N에 의해 동시에 획득된/발현된 유전자.

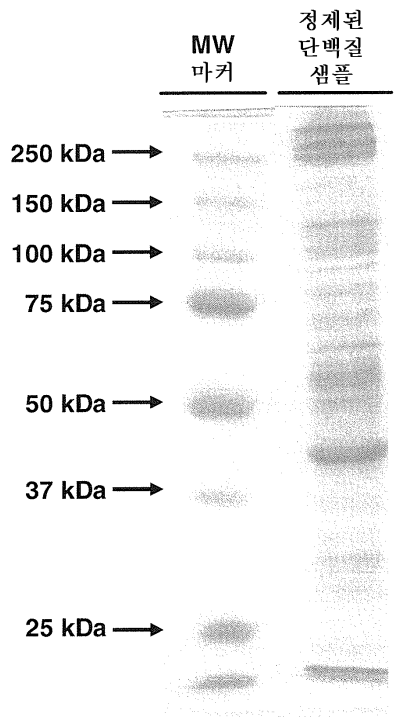
도면22

표 6 난소암 환자의 대식세포에서
상향조절된 (>2배) 암 관련 유전자

유전자 기호	대식세포/T 세포
*AKT1**	4.62
APAF1	**4.95**
ATM	**5.26**
CDC25A	**2.01**
CDKN1A	**4.57**
ETS2	3.47
FOS	6.49
IL8	**3.62**
ITGA4	**6.58**
ITGA6	**3.53**
ITGAV	**2.50**
JUN	3.01
MAP2K1	**3.09**
NFKBIA	**2.77**
PLAU	**2.13**
PLAUR	**38.79**
RAF1	8.13
SERPINB2	**5.37**
SYK	**20.81**
TIMP1	**2.04**
TNF	**3.75**
TNFRSF10B	**3.67**
TNFRSF1A	**6.96**

* = 종양유전자

도면23



도면24

