



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월25일
(11) 등록번호 10-1310000
(24) 등록일자 2013년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) A01N 37/18 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7023307
(22) 출원일자(국제) 2006년03월10일
심사청구일자 2011년03월02일
(85) 번역문제출일자 2007년10월11일
(65) 공개번호 10-2008-0044801
(43) 공개일자 2008년05월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/008578
(87) 국제공개번호 WO 2006/099126
국제공개일자 2006년09월21일
(30) 우선권주장
60/662,090 2005년03월11일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02004058044 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
싸이퍼젠 바이오시스템즈, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94555, 프레몬트, 덤바턴 서클 6611
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 201
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국, 매릴랜드 21218, 볼티모어, 3400 엔. 찰스 스트리트
(72) 발명자
퐁, 에릭, 토마스
미국, 캘리포니아 94022, 로스 알토스, 테 안자 레인 271
바스트, 로버트
미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 유닛 #0355, 홀콤베 불러바드 1515
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **난소암 및 자궁내막암에 대한 바이오마커 : 헵시딘**

(57) 요약

본 발명은 환자에서 난소암 상태 및 자궁내막암 상태를 검정하는데 유용한단백질-기반 바이오마커 및 바이오마커의 조합을 제공한다. 특히, 헵시딘이 난소암 및 자궁내막암 양자에 대한 바이오마커이고, 헵시딘, 트랜스티레틴(transferrin) 및 임의로 기타 마커들을 포함하는, 바이오마커들의 패널이 대상 샘플을 난소암 또는 비-난소암으로 분류하는데 유용하다는 것이 밝혀졌다. 바이오마커들은 SELDI 질량 분광측정법(mass spectrometry)에 의해 검출될 수 있다.

(72) 발명자

찬, 다니엘, 더블유.

미국, 매릴랜드 21029, 클락스빌, 웨스포드 파크
12925

송, 진

미국, 매릴랜드 21212, 볼티모어, 디 로저스 포즈
로드 248

포더스트, 블라디미르

미국, 캘리포니아 94538, 프레몬트, #202, 초핀 테
라스 1140

장, 쟈

미국, 매릴랜드 21036, 데이튼, 빅 브랜치 드라이
브 14104

특허청구의 범위

청구항 1

대상(subject)에서 난소암 상태를 검정(qualify)하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법으로서,

- (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 헵시딘을 측정하는 단계; 및
- (b) 측정치 또는 측정치들을, 난소암 및 비-난소암에서 선택된 난소암 상태와 상호관련시키는 단계를 포함하는, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 생물학적 샘플에서 복수의 바이오마커를 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 복수의 바이오마커는 트랜스티레틴(transferritin)을 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 복수의 바이오마커는, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 바이오마커를 추가로 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 복수의 바이오마커는, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 2개 이상의 바이오마커를 추가로 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 복수의 바이오마커는, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 3개 이상의 바이오마커를 추가로 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 복수의 바이오마커는, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편을 추가로 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 7

청구항 3에 있어서, 헵시딘은 헵시딘-25이고, 트랜스티레틴은 시스테인화(cysteinylation)된 트랜스티레틴이며, 또한 ITIH4 단편은 ITIH4 단편 1인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 8

청구항 3에 있어서, 상기 복수의 바이오마커는 β -2 마이크로글로불린을 추가로 포함하는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 질량 분광측정법(mass spectrometry)에 의해 측정되는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 질량 분광측정법은 SELDI-MS인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 면역분석법(immunoassay)에 의해 측정되는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 혈액 또는 혈액 유도체인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 난소낭액(ovarian cyst fluid), 복수(ascites), 또는 소변인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상호관련시키는 단계는 소프트웨어 분류 알고리즘을 실행하는 것에 의해 수행되는 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 비-난소암은 양성(benign) 난소 질환인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 난소암은 I기 또는 II기 난소암인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 난소암에 대한 치료를 받아오고 있으며, 상기 난소암은 재발된 암인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 비-난소암은 양성 난소낭, 자궁내막증, 자궁 섬유종, 유방암 및 자궁경부암에서 선택된 부인과적 병태(condition)인 것인, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, (c) 상기 대상에게 상태를 보고하는 단계를 추가로 포함하는, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, 유형의 매체에 상태를 기록하는 단계를 추가로 포함하는, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서, (c) 상기 상태에 기초하여 대상의 치료를 관리하는 단계를 추가로 포함하는, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, (d) 대상 관리 후 하나 이상의 바이오마커를 측정하고, 질병의 진행과 측정치를 상호관련시키는 단계를 추가로 포함하는, 난소암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 23

난소암의 경과를 측정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법으로서,

- (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 헵시딘을 첫번째로 측정하는 단계;
- (b) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 헵시딘을 두 번째로 측정하는 단계; 및
- (c) 첫 번째 측정 및 두 번째 측정을 비교하는 단계;

를 포함하고,

여기서 상기 비교 측정이 난소암의 경과를 결정하기 위한 것인, 난소암의 경과를 측정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

대상에서 자궁내막암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법으로서,

- (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 헵시딘을 측정하는 단계; 및
- (b) 측정치 또는 측정치들을, 자궁내막암 상태와 상호관련시키는 단계를 포함하는, 자궁내막암 상태를 검정하기 위한 정보를 제공하는 분석 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 임상 진단법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본 출원은 2005년 3월 11일자로 출원된 미국 가출원 제60/662,090호의 이익을 청구하며, 이는 그 내용 전체가 인용에 의해 삽입된다.

[0003] 난소암은 선진국에서 가장 치명적인 부인과 악성 종양 중 하나이다. 미국에서만 해마다 대략 23,000 명의 여성들이 상기 질병으로 진단되고, 거의 14,000 명의 여성이 이로 인해 사망한다(Jamal, A., 등, CA Cancer J. Clin, 2002; 52:23-47). 암 치료법의 진보에도 불구하고, 난소암 사망률은 과거 20 년 동안 실질적으로 변하지 않은 채 유지되고 있다(상기 문헌 참조). 상기 질병이 진단된 단계와 관련하여 생존이 가파르게 변하며, 조기 검출이 난소암 환자의 장기 생존의 개선에 있어서 여전히 가장 중요한 인자이다.

[0004] 말기 단계에서 진단된 난소암의 불량한 예후, 확진 절차와 관련된 비용과 위험성, 및 일반인에서 그 상대적으로 낮은 유병률은 함께 상기 일반인에게서 난소암을 발견하는데 사용되는 테스트의 감도와 특이성에 대한 매우 엄격한 요건을 부과한다.

- [0005] 암의 조기 검출 및 진단에 적합한 종양 마커의 동정(identification)은 환자의 임상적 성과를 개선시킬 중대한 가망성을 갖고 있다. 이는 막연한 증상 또는 무 증상을 나타내는 환자 또는 신체 검사로는 상대적으로 접근하기 어려운 종양이 있는 환자에게 특히 중요하다. 조기 검출에 대한 상당한 노력에도 불구하고, 비용 효과적인 스크리닝 테스트가 개발되지 않았으며(Paley PJ., *Curr Opin Oncol*, 2001; 13(5): 399-402), 여성들은 일반적으로 진단시 전이된(disseminated) 질환으로 나타난다(Ozols RF, 등, *Epithelial ovarian cancer*. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, editors. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2000. p. 981-1057).
- [0006] 가장 잘 특성화된 종양 마커인 CA125는, I기 난소암의 약 30 내지 40%에서 음성이고, 그 수준은 다양한 양성(benign) 질환들에서 상승한다(Meyer T, 등, *Br J Cancer*, 2000; 82(9): 1535-8; Buamah P., *J Surg Oncol*, 2000; 75(4): 264-5; Tuxen MK, 등, *Cancer Treat Rev*, 1995; 21(3): 215-45). 난소암의 조기 검출 및 진단을 위한 모집단-기준 스크리닝 도구로서 상기 마커의 사용은 낮은 감도 및 특이성에 의해 방해된다(MacDonald ND, 등, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999; 82(2): 155-7; Jacobs I, 등, *Hum Reprod*, 1989; 4(1): 1-12; Shih I-M, 등, *Tumor markers in ovarian cancer*. In: Diamandis EP, Fritsche, H., Lilja, H. Chan, D.W., 및 Schwartz, M., editor. *Tumor markers physiology, pathobiology, technology and clinical applications*. Philadelphia: AACC). 골반 및 보다 최근의 질 초음파 촬영술이 고 위험 환자의 선별에 사용되었지만, 어느 기술도 일반인에 적용시킬 정도로 충분한 감도와 특이성을 갖지 못한다(상기 MacDonald ND 등). 암 모델의 장기적인 위험성에서(Skates SJ, 등, *Cancer*, 1995; 76(10 Suppl): 2004-10), 추가의 종양 마커와 조합하여(Woolas RP XF, 등, *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85(21): 1748-51; Woolas RP 등, *Gynecol Oncol*, 1995; 59(1): 111-6; Zhang Z 등, *Gynecol Oncol*, 1999; 73(1): 56-61; Zhang Z 등, *Use of Multiple Markers to Detect Stage I Epithelial Ovarian Cancers: Neural Network Analysis Improves Performance*. American Society of Clinical Oncology 2001; Annual Meeting, Abstract), 및 제 2선 테스트로서 초음파와 협력하여(Jacobs I DA 등, *Br Med J*, 1993; 306(6884): 1030-34; Menon U TA 등, *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2000; 107(2): 165-69), CA125를 사용하는 최근의 노력은 상대적으로 낮은 유효성을 갖는 난소암과 같은 질병에 필수적인, 전체적인 테스트 특이성의 개선에 유망한 결과를 나타냈다. 또한 Menon 등의 *J. Clin. Oncology* (2005) 23(31): 7919-26을 참조한다.
- [0007] 말기 난소암의 비참한 예후에 기인하여, 의사는 10%의 최소 양성 예견치(minimal positive predictive value)를 갖는 테스트를 수용할 것임이 일반적으로 일치된 의견이다(Bast, R.C. 등, *Cancer Treatment and Research*, 2002; 107: 61-97). 이를 일반적인 집단으로 연장한다면, 일반적인 스크리닝 테스트는 70% 이상의 감도 및 99.6%의 특이성을 요구할 것이다. 현재, 기존의 혈청학적 마커들, 예를 들어 CA125, CA72-4 및 M-CSF 중 어느 것도 개별적으로 상기와 같은 성능을 수행하지 못한다(Bast, R.C. 등, *Int J Biol Markers*, 1998; 13: 179-87).
- [0008] 따라서, 개별적으로, 또는 다른 마커 또는 진단 양식과 함께 난소암의 조기 검출에 필요한 감도와 특이성을 가지는 신규의 혈청학적 마커들에 대한 중대한 필요성이 존재한다(Bast RC 등, *Early detection of ovarian cancer: promise and reality*. Ovarian Cancer: ISIS Medical Media Ltd., Oxford, UK).
- [0009] 난소암의 낮은 발생률 때문에, 무증상인 여성에 대해 충분한 양성 예후를 갖는 스크리닝 테스트는 찾기 어렵다. 그러나, 일반적인 스크리닝 테스트가 없는 경우라도, 난소암을 가진 환자의 장기 생존을 개선시키는 한 요소는 전문적인 부인과 종양의(oncologist)의 적절한 선별임이 입증되었다(Craig, CC 등, *Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients*, *J Natl Cane Inst*, 2006: 98, 172-80). 이는 특히 골반 종괴(pelvic mass)를 암시하는 증상을 의사에게 설명하는 여성들에게 해당된다.
- [0010] 따라서, 환자에서 난소암 상태를 측정하고, 이어서 상기 결과를 대상(subject)의 치료를 관리하기 위해 사용할 수 있는 신뢰할만하고 정확한 방법을 갖는 것이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

- [0011] **발명의 개요**
- [0012] 헵시딘(hepcidin)은 난소암(침습성 상피암)에 대한 바이오마커임이 밝혀졌다. 또한 헵시딘은 자궁내막암을 가진 대상에서 독특하게 존재하는 바이오마커임이 밝혀졌다. 더욱 상세하게는, 생물학적인 샘플에서의 헵시딘 수준은 비-난소암 대비 난소암에서, 및 비-자궁내막암 대비 자궁내막암에서 증가하는 것으로 밝혀졌다. 달리 말하면, 상승된 헵시딘 수준은 난소암 및 자궁내막암과 관련된 것이다.
- [0013] 일부 구현예에서, 구별될 질환은 : 난소암 대 양성 난소 질환; 난소암 대 양성 부인과 질환; 난소암 대 자궁내막증, 자궁 섬유종, 유방암 및 자궁경부암에서 선택된 부인과적 병태(condition); 난소암 대 기타 악성 종양(예를 들어, 유방암 또는 결장암); I기 난소암 대 비-난소암; 및 재발된 난소암 대 비-난소암이다. 측정된 상태에 기초하여, 추가의 진단 테스트 또는 치료 절차 또는 요법을 포함하는, 후속의 절차가 지시될 수 있다.
- [0014] 헵시딘 수준이 다른 바이오마커의 수준과 조합하여 사용될 때, 진단 테스트의 예측력이 향상된다는 것이 추가로 밝혀졌다. 더 구체적으로는, 헵시딘 수준의 증가 및 트랜스티레틴(transthyretin) 수준의 감소는 난소암과 관련된 것이다. Apo A1(감소된 수준), 트랜스페린(감소된 수준), CTAP-III(상승된 수준), 및 ITIH4 (상승된 수준)의 내부 단편 중 하나 이상의 수준과 함께, 헵시딘 수준의 증가 및 트랜스티레틴 수준의 감소 또한 난소암과 관련된 것이다. 이러한 바이오마커는 추가로 β -2 마이크로글로불린(상승된 수준), CA125(상승된 수준) 및/또는 진단 테스트에서 공지된 다른 난소암 바이오마커들과 조합될 수 있다.
- [0015] 한 측면에서, 본 발명은 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 측정하는 것을 포함하는, 대상에서 난소암의 상태를 정량하기 위한 방법을 제공하며, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 헵시딘이고, 또한 난소암 및 비-난소암에서 선택된 난소암 상태의 측정 또는 측정들과 상호 관련시킨다. 상기 방법의 한 구현예에서, 생물학적 샘플에 있는 복수의 바이오마커가 측정되고, 여기서 측정된 바이오마커는 헵시딘 외에도 트랜스티레틴을 추가로 포함한다. 상기 방법의 다른 구현예에서, 생물학적 샘플에 있는 복수의 바이오마커가 측정되고, 여기서 측정된 바이오마커는 헵시딘 외에도, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 바이오마커를 추가로 포함한다. 상기 방법의 추가의 측면에서, 생물학적 샘플에 있는 복수의 바이오마커가 측정되고, 여기서 측정된 바이오마커는 헵시딘 외에도, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 2개 이상의 바이오마커를 추가로 포함한다. 상기 방법의 또다른 추가의 측면에서, 생물학적 샘플에 있는 복수의 바이오마커가 측정되고, 여기서 측정된 바이오마커는 헵시딘 외에도, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편으로 구성된 그룹에서 선택된 3개 이상의 바이오마커를 추가로 포함한다. 또다른 추가의 측면에서, 복수의 바이오마커가 측정되고, 측정된 바이오마커는 β -2 마이크로글로불린을 포함한다.
- [0016] 한 구현예에서, 헵시딘은 헵시딘-25일 수 있고, 트랜스티레틴은 시스테인화(cysteinylation)된 트랜스티레틴일 수 있고, 및/또는 ITIH4 단편은 ITIH4 단편 1일 수 있다.
- [0017] 다른 구현예에서, 하나 이상의 바이오마커는 질량 분광측정법(mass spectrometry)에 의해 측정될 수 있다. 질량 분광측정법으로는 SELDI-MS가 적절하다. 추가의 측면에서, 하나 이상의 바이오마커는 면역분석법(immunoassay)에 의해 측정된다.
- [0018] 다양한 생물학적 샘플이 본 발명의 방법에 도입될 수 있으며, 예를 들면 상기 생물학적 샘플은 혈액 또는 혈액 유도체를 포함하거나, 난소낭액(ovarian cyst fluid), 복수(ascites), 또는 소변을 포함한다.

- [0019] 본 발명의 방법의 한 구현예에서, 비-난소암은 양성 난소 질환이다. 다른 구현예에서, 비-난소암은 양성 난소암, 자궁내막증, 자궁 섬유종, 유방암 및 자궁경부암과 같은 부인과적 병태이다. 추가의 구현예에서, 난소암은 I기 또는 II기 난소암이다. 일부 측면에서, 대상은 난소암에 대한 치료를 받아 오고 있으며, 상기 난소암은 재발된 암이다.
- [0020] 다른 측면에서, (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 측정하고, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 헵시딘이며; 및 (b) 측정치 또는 측정치들을, 자궁내막암 상태와 상호관련시키는 것을 포함하는, 대상에서 자궁내막암 상태를 검정(qualify)하기 위한 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 상태는 자궁내막암 대 비-암(non-cancer)이다.
- [0021] 본 발명의 방법은 또한 대상에게 상태를 보고하고, 유형의 매체에 상태를 기록하고, 및/또는 상태에 기초하여 대상의 치료를 관리하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 바이오마커는 대상의 관리 후 질병의 진행과 상호관련된 측정이 될 수 있다.
- [0022] 바람직한 측면에서, (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에 있는 하나 이상의 바이오마커를 첫 번째로 측정하고, 여기서 적어도 하나의 바이오마커는 헵시딘이며; (b) 대상으로부터의 생물학적 샘플에 있는 적어도 하나의 바이오마커를 두 번째로 측정하고; 또한 (c) 첫 번째 측정 및 두 번째 측정을 비교하고; 여기서 상기 비교 측정이 난소암의 경과를 결정하는 것을 포함하는, 난소암의 경과를 측정하기 위한 방법을 제공한다.
- [0023] 추가의 바람직한 측면에서, 대상으로부터의 샘플에 있는 헵시딘 및 트랜스티레틴을 측정하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플에 있는 Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편의 적어도 하나를 측정하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 다른 구현예에서, 본 발명은 (a) 고체 지지체(solid support)에 부착된 하나 이상의 포획제(capture reagent)를 포함하는 고체 지지체로서, 여기서 상기 포획제는 헵시딘과 결합하는 고체 지지체; (b) 헵시딘을 검출하기 위해서 고체 지지체를 사용하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 고체 지지체는 예를 들어, SELDI 프로브를 포함할 수 있다. 키트는 또한 헵시딘의 표준 참조표(standard reference)를 임의로 포함할 수 있다.
- [0025] 추가의 구현예에서, 본 발명은 (a) 고체 지지체에 부착된 하나 이상의 포획제를 포함하는 하나 이상의 고체 지지체이며, 여기서 상기 포획제(들)은 헵시딘 및 트랜스티레틴과 결합하는 고체 지지체; (b) 헵시딘 및 트랜스티레틴을 검출하기 위해서 고체 지지체(들)를 사용하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 고체 지지체는 예를 들어, SELDI 프로브를 포함할 수 있다. 키트는 또한 헵시딘 및 트랜스티레틴의 표준 참조표를 임의로 포함할 수 있다.
- [0026] 다른 추가의 구현예에서, 본 발명은 (a) 고체 지지체에 부착된 하나 이상의 포획제를 포함하는 하나 이상의 고체 지지체이며, 여기서 상기 포획제(들)은 헵시딘, 트랜스티레틴 및 Apo A1과, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편 중 하나 이상과 결합하는 고체 지지체; (b) 헵시딘, 트랜스티레틴과, Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편 중 하나 이상을 검출하기 위해서 고체 지지체(들)를 사용하기 위한 사용설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 고체 지지체는 예를 들어, SELDI 프로브를 포함할 수 있다. 키트는 또한 헵시딘 및 트랜스티레틴과; Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편 중 하나 이상;의 표준 참조표를 임의로 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한 (a) 샘플에 부여된 데이터에 접근(access)하는 코드로서, 상기 데이터는 샘플에서 하나 이상의

바이오마커의 측정치를 포함하고, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 헵시딘인 코드; (b) 측정치의 함수로서 샘플의 난소암 상태를 분류하는 분류 알고리즘을 실행하는 코드;를 포함하는 소프트웨어 제품을 포함한다. 한 측면에서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 트랜스티레틴을 추가로 포함한다. 다른 측면에서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편에서 선택된 하나 이상의 바이오마커를 추가로 포함한다. 다른 추가의 측면에서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 β 2-마이크로글로불린을 추가로 포함한다.

[0028] 본 발명은 또한 대상으로부터의 샘플에서 하나 이상의 바이오마커와 상관관계로부터 측정된 난소암 상태와 관련된 진단을 대상에게 정보전달(communicating)하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 헵시딘이다. 한 측면에서, 상기 하나 이상의 바이오마커는 트랜스티레틴을 추가로 포함한다. 상기 진단은 예를 들어, 컴퓨터-산출 매체를 통해 대상에게 적절하게 정보전달할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한 헵시딘과 상호작용하는 화합물을 동정(identifying)하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 방법은 a) 헵시딘을 테스트 화합물과 접촉시키고; b) 상기 테스트 화합물이 헵시딘과 상호작용하는지 여부를 측정하는 것을 포함한다.

[0030] 본 발명의 다른 측면은 하기에 상세히 설명한다.

실시예

[0042] 발명의 상세한 설명

[0043] 1. 서론

[0044] 바이오마커는 다른 표현형 상태(예를 들어 질병을 갖지 않음)와 비교하여 하나의 표현형 상태(예를 들어, 질병을 갖음)의 대상으로부터 얻어진 샘플 중에 독특하게 존재하는 유기 생체분자이다. 바이오마커는 상이한 그룹 중 바이오마커의 평균 또는 중간 발현 수준이 통계적으로 유의하게 계산되는 경우 상이한 표현형 상태 사이에 독특하게 존재한다. 이들 중 통계적 유의성에 대한 통상의 테스트는 t-테스트, ANOVA, 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis), 윌콕슨(Wilcoxon), 만-화이트니(Mann-Whitney) 및 오즈 비(odds ratio)를 포함한다. 바이오마커 단독 또는 이의 조합은 대상이 하나의 표현형 상태 또는 다른 표현형 상태에 속하는 상대적 위험의 측정을 제공한다. 그러므로, 이는 질병(진단), 약물의 치료학적 유효성(치료) 및 약물 독성에 대한 마커로서 유용하다.

[0045] 본 발명의 바이오마커는 SELDI를 사용하여 발견되었다. 따라서, 이들은 부분적으로, 질량 대 전하 비율, 질량 스펙트럼에서 피크의 형태 및 이들의 결합 특성을 특징으로 한다. 이들 특징들은 생체분자의 고유의 특징을 나타내며 생체분자가 식별되는 방식을 제한하지 않는다.

[0046] 본 발명의 바이오마커는 부분적으로 질량 대 전하 비율을 특징으로 한다. 각각의 바이오마커의 질량 대 전하 비율이 본 명세서에서 제공된다. 예를 들어, "M2789"로 지정된 특별한 분자 마커는, 2789 D의 측정된 질량 대 전하 비율을 갖는다. 상기 질량 대 전하 비율은 Ciphergen Biosystems, Inc.에서 제조된 PBS II 질량 분광계(mass spectrometer) 또는 Ciphergen PCS 4000 질량 분광계에 의한 질량 스펙트럼으로부터 측정되었다. PBS II는 약 ± 0.15 퍼센트의 질량 정확도를 가진 장비이다. 또한, 상기 장비는 약 400 내지 1000 m/dm의 질량 분해능(mass resolution)을 가지며, 여기서 m은 질량이며, dm은 0.5 피크 높이에서 질량 스펙트럼의 피크폭이다. PCS 4000 장비는 예측된 외부적으로 조정된 0.1%의 질량 정확도 및 내부적으로 조정된 0.01%의 질량 정확도와 함께, 약 $\pm 0.12\%$ 미가공 데이터의 질량 정확도를 가진다. 또한, 상기 장비는 약 1000 내지 2000m/dm의 질량 분해능을 가지며, 여기서 m은 질량이며, dm은 0.5 피크 높이에서 질량 스펙트럼의 피크폭이다. 바이오마커들의 질량 대 전하 비율은 Biomarker WizardTM 소프트웨어(Ciphergen Biosystems, Inc.)를 사용하여 측정하였다. Biomarker Wizard는 PBS II 또는 PCS4000에 의해 측정된 바와 같은, 분석된 모든 스펙트럼으로부터의 동일한 피크의 질량 대 전하 비율을 밀집시키고, 클러스터에서 최대 및 최소 질량 대 전하 비율을 취하여, 2로 나눠서

질량 대 전하 비율을 바이오마커에 할당한다. 따라서, 제공된 질량은 이러한 명세를 반영한다.

[0047] 본 발명의 바이오마커는 또한 비행 시간형(time-of-flight) 질량 분광측정법에서 스펙트럼 피크의 형태를 특징으로 한다. 바이오마커를 나타내는 피크를 보이는 질량 스펙트럼은 도면에 나타나 있다.

[0048] 본 발명의 바이오마커는 또한 흡착제 표면에 대한 결합 특성을 특징으로 한다. 각각의 바이오마커의 결합 특성도 본 명세서에서 상세히 설명한다.

[0049] 2. 난소암에 대한 바이오마커

[0050] 2.1. 헵시딘

[0051] 헵시딘은 항균 활성을 나타내며, 원래 인간 혈장 및 소변에 있는 25 아미노산 펩티드(헵시딘-25)로 동정되었다. 전체 길이(full-length) 헵시딘 전구체는 신호 서열 및 프로-영역(pro-region)(Kulaksiz, H. 등 (2004) Gut 53:735-743 참조)을 포함하는 84 아미노산 단백질(SwissProt Accession No. P81172)이다. 본 발명의 헵시딘 바이오마커들은 전체 길이 헵시딘 단백질의 C-말단으로부터 유래한다. 헵시딘은 예를 들어, U.S. Biological(카탈로그 H2008-51) (www.usbio.net, Swampscott, MA)로부터 입수가 가능한 항체에 의해 인식된다. 본 발명의 바이오마커로서 유용한 헵시딘의 4개의 상이한 변형체들은 2789, 2673, 2436, 및 2191의 계산된 질량 대 전하 비율을 특징으로 한다.

[0052] 헵시딘은 Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA) ("Ciphergen")로부터의 단백질칩(ProteinChip) 어레이를 채택하는 SELDI 기술을 사용하여 난소암 및 자궁내막암에 대한 바이오마커인 것으로 밝혀졌다. 더 구체적으로, 헵시딘 수준은 비-암, 자궁경부암 및 양성 난소 질환 각각으로부터 난소암을 구별할 수 있다. 또한 자궁내막암 및 비-암도 구별할 수 있다. 소변 및 혈청 샘플을 난소암, 자궁내막암, 자궁경부암으로 진단된 대상 및 정상 또는 양성 질환을 가진 것으로 진단된 대상으로부터 수집하였다. ITIH4 3272 m/z 단편과 동시-면역침전(co-immunoprecipitation)과 함께 또는 없이(국제공개공보 제W02004/099432호 참조), ITIH4 단편 1(하기에서 더욱 상세히 설명됨)에 대한 항체를 사용하여, 샘플에 바이오칩을 적용하고, 샘플 중의 폴리펩티드 스펙트럼을 비행 시간형 질량 분광측정법에 의해 Ciphergen PBSIIc 또는 PCS4000 질량 분광계에 생성하였다. 그렇게 얻어진 스펙트럼을 Ciphergen Biosystems, Inc.로부터의 바이오마커 패턴 소프트웨어(Biomarker Pattern Software) 및 바이오마커 위저드(Biomarker Wizard)와 함께 Ciphergen ExpressTM Data Manager Software로 분석하였다. 각 그룹에 대한 질량 스펙트럼은 산란 플롯 분석으로 수행하였다. 산란 플롯에서 각각의 단백질 클러스터에 대해서 대조군 및 난소암을 비교하기 위하여 만-화이트니(Mann-Whitney) 테스트 분석을 채택하였고, 단백질은 두 그룹 간에 유의하게($P < 0.01$) 상이하게 선택하였다. 이러한 방법은 실시예 섹션에서 더욱 상세히 설명한다.

[0053] 그에 따라 발견된 특이적인 바이오마커는 표 1에 나타낸다. "단백질칩 분석(ProteinChip assay)" 컬럼은 실시예에서 기술된 바와 같이, 바이오마커가 발견되는 크로마토그래피 분획, 바이오마커가 결합하는 바이오칩의 타입 및 세척 상태를 언급한다. 각각의 경우에, 바이오마커 각각은 다양한 택일적인(alternate) 단백질칩 분석을 사용하여 발견될 수 있다. "이론 질량(theoretical mass)"은 아미노산 서열 및 이황화결합과 같은 변형에 기초한 예측된 질량을 제공한다.

표 1

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
헵시딘-25 M2789 (이론 질량 = 2789.41 D)	0.002	상향	소변, CM10, pH4, 아세트산나트륨 100mM로 세척
	0.0011	상향	소변, IMAC30-Cu ⁺⁺ , pH7, 0.5 M NaCl, 아세트산나트륨 100mM로 세척
	0.0000069	상향	혈청, IMAC30- Cu ⁺⁺ , pH6.0, 205 mM NaCl, 인산나트륨 버퍼 50mM로 세척

[0054]

	샘플 세트 1 발견 난소암 대 대조군 : 0.001040 난소암 대 기타암 : 0.000002	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 2 확인 0.000007	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 3 확인 0.000000	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
헵시딘-24 M2673 (이론 질량 = 2674.32 D)	0.001	상향	소변, CM10, pH4, 아세트산나트륨 100mM로 세척
	0.01	상향	소변, IMAC30-Cu ⁺⁺ , pH7, 0.5 M NaCl, 인산나트륨 100mM로 세척
	샘플 세트 1 발견 난소암 대 대조군 : 0.000009 난소암 대 기타암 : 0.000002	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 2 확인 0.000097	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 3 확인 0.000001	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척

[0055]

헵시딘-22 M2436 (이론 질량 = 2436.07)	0.0002	상향	소변, CM10, pH4, 아세트산나트륨 100mM로 세척
	0.0619	상향	소변, IMAC30-Cu ⁺⁺ , pH7, 0.5 M NaCl, 인산나트륨 100mM로 세척
	샘플 세트 1 발견 난소암 대 대조군 : 0.000030 난소암 대 기타암 : 0.000015	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4, PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 2 확인 0.002027	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 3 확인 0.000000	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ ,로 용출, 유기 버퍼로 세척
헵시딘-20 M2191 (이론 질량 = 2191.78)	0.0061	상향	소변, CM10, pH4, 아세트산나트륨 100mM로 세척
	0.0023	상향	소변, IMAC30-Cu ⁺⁺ , pH7, 0.5 M NaCl, 인산나트륨 100mM로 세척
	샘플 세트 1 발견 난소암 대 대조군 : 0.000009 난소암 대 기타암 : 0.000007	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
	샘플 세트 2 확인 0.020419	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ ,로 용출, 유기 버퍼로 세척

[0056]

	샘플 세트 3 확인 0.000000	상향	혈청, 면역 침전 ITIH4 (3272 m/z 단편), PBS/0.1% 트리톤으로 세척, 유기 버퍼, IMAC- Cu ⁺⁺ 로 용출, 유기 버퍼로 세척
--	---------------------------	----	---

[0057]

[0058] 헵시딘-25, -24, -22 및 -20의 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0059] 헵시딘-25 (서열식별번호: 13): DTHFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT

[0060] 헵시딘-24 (서열식별번호: 14): THFPICIFCCGCHRSKCGMCCKT

[0061] 헵시딘-22 (서열식별번호: 16): FPICIFCCGCHRSKCGM CCKT

- [0062] 헵시딘-20 (서열식별번호: 18): ICIFCCGCCHRSKCGMCCKT
- [0063] 본 발명의 바이오마커는 추가로 크로마토그래피 표면에 대한 결합 특성을 특징으로 한다. pH 4에서 100 mM 아세트산나트륨으로 세척 후, 헵시딘은 양이온 교환성 흡착제(예를 들어, CIPHERGEN® CM10 ProteinChip® 어레이)에 결합한다. 100 mM 인산나트륨, 0.5 M NaCl, pH 7로 또는 유기 버퍼로 세척 후, 헵시딘은 또한 금속 킬레이트 흡착제(예를 들어, CIPHERGEN® IMAC-Cu⁺⁺ ProteinChip® 어레이)에 결합한다. 하기와 같이, 헵시딘은 ITIH4를 시각화하는데 사용되는 것과 동일한 분석법으로 시각화될 수 있다.
- [0064] 헵시딘의 검출을 위한 바람직한 생물학적 소스는 소변 또는 혈청이다. 헵시딘은 또한 복수액(ascites fluid)과 낭액(cyst fluid), 간과 같은 장기 및 조직, 및 마크로파지와 같은 특정 세포에서 검출될 수 있다.
- [0065] **2.2. 트랜스티레틴**
- [0066] "프리-알부민(pre-albumin)"으로도 불리우는, 트랜스티레틴은 본 발명의 방법에 유용한 또다른 바이오마커이다. 트랜스티레틴 및 그 변형체들은 미국 특허 공개 제2005-0059013A1호 및 국제 특허 공개 제WO 2005/098447호에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. 비변형 트랜스티레틴은 147 아미노산 전구체(SwissProt Accession No. P02766)로부터 유도된 127 아미노산 단백질이다. 본 발명의 트랜스티레틴 바이오마커는 임의의 또는 모든 비변형 트랜스티레틴 및 다양한 변형된 형태를 포함한다. 트랜스티레틴은 예를 들어, Dako(카탈로그 A0002)(www.dako.com, Glostrup, Denmark)로부터 입수가 가능한 항체에 의해 인식될 수 있다.
- [0067] 혈청의 질량 스펙트럼에서, 트랜스티레틴은 약 13.9K 달톤 근처에서 피크를 갖는 클러스터인 것으로 나타났다. 이 클러스터는 비변형 트랜스티레틴, S-술폰화(sulfonated) 트랜스티레틴, S-시스테인닐화(cysteinylation) 트랜스티레틴, S-Gly-Cys 트랜스티레틴 및 S-글루타티오니화(glutathionylation) 트랜스티레틴을 포함하는 몇몇 형태의 트랜스티레틴을 포함한다. 임의의 및/또는 모든 이러한 트랜스티레틴들은 난소암에 대한 바이오마커로서 유용하다. 그러나, S-시스테인닐화된 버전이 스펙트럼에서 월등한 형태로 나타났고, 질량 분광측정법을 사용할 때 바람직한 바이오마커이다. 바이오마커로서 유용한 트랜스티레틴의 또다른 변형체는 트랜스티레틴 ΔN10이다. 그렇게 발견된 특성의 트랜스티레틴 바이오마커들은 표 2에 나타난다.

표 2

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
트랜스티레틴 ΔN10 (M12,870.9) (예측된 질량 12,887 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이
비변형 트랜스티레틴 (M13900) (예측된 질량 13,761 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이
술폰화 트랜스티레틴 (M13850) (예측된 질량 13,841 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이
시스테인화 트랜스티레틴 (M13,890.8) (예측된 질량 13,880 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이
CysGly 변형 트랜스티레틴 (M13944) (예측된 질량 13,937 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이
글루타미노닐화 트랜스티레틴 (M14,086.9) (예측된 질량 14,066 달톤)	p<0.001	하향 (난소 v. 비난소)	100mM 인산나트륨 버퍼, pH 7.0 (PB 버퍼)을 사용한 Q10 어레이

[0068]

[0069] 2.3. ApoA1

[0070] 본 발명의 방법에서 유용한 또다른 바이오마커는 아포지방단백질(apolipoprotein) A1이며, 이는 또한 Apo A1으로 언급된다. Apo A1은 미국 특허 공개 제2005-0059013A1호 및 국제 특허 공개 제WO 2005/098447호에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. Apo A1은 267 아미노산 전구체(SwissProt Accession No. P02647)로부터 유도된 243 아미노산 단백질이다. Apo A1은 예를 들어, EMD Biosciences, Inc.(카탈로그 178474)(www.emdbiosciences.com/home.asp, San Diego, CA)로부터 입수가능한 항체에 의해 인식될 수 있다. 특정의 Apo A1 바이오마커들을 표 3에 나타낸다. Apo A1은 H50 어레이 또는 IMAC30 또는 IMAC50 어레이에서 시각화될 수 있으나, H50 어레이에서 바람직하게 시각화된다.

표 3

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
ApoA1 (M28043) (예측된 질량: 28,078.62 D)	<.000001	하향	H50 버퍼 (10% 아세트오니트릴, 0.1% TFA IMAC Cu ⁺⁺)
ApoA1 변형체 (M29977.4) (28,043 D에서 피크에 대한 어깨 정도로 나타남)		하향	H50 버퍼 (10% 아세트오니트릴, 0.1% TFA)

[0071]

[0072] 본 발명의 바람직한 방법은 Apo A1의 변형된 형태의 사용을 포함한다. Apo A1의 변형은 다양한 화학 그룹의 번역-후(post-translational) 부가, 예를 들어, 당화(glycosylation) 및 지질화(lipidation)를 포함할 수 있다.

[0073] 2.4. 트랜스페린

[0074] 본 발명의 방법에서 유용한 또다른 바이오마커는 트랜스페린이다. 트랜스페린은 미국 특허 공개 2005-0214760A1 호에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. 트랜스페린은 698 아미노산 전구체(GenBank Accession No. NP_001054 GI:4557871 ; SwissProt Accession No. P02787)로부터 유도된 679 아미노산 단백질이다. 트랜스페린은 예를 들어, Dako (카탈로그 A006)(www.dako.com, Glostrup, Denmark)로부터 입수가 가능한 항체에 의해 인식될 수 있다. 트랜스페린은 당화된다. 그러므로, 측정된 분자량은 당화(glycosylation)를 고려하지 않은 이론량보다 높다. 특정의 트랜스페린 바이오마커는 표 4에 나타낸다.

표 4

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
트랜스페린 (M79K) (예측된 질량: 75,181 D)	<0.0001	하향	IMAC-Ni 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6.0 IMAC-Cu 50mM 인산나트륨, 0.25M NaCl pH 6.0

[0075]

[0076] 2.5. CTAP-III:

[0077] 본 발명의 방법에서 유용한 또다른 바이오마커는 CTAP-III(결합 조직 활성화 펩티드 III(connective tissue activating peptide III))이며, 이는 혈소판 기반 단백질로부터 유도된다. CTAP-III은 2005년 6월 22일자로 출원된, 미국 가출원 제 60/693,324호(Zhang 등)에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. CTAP-III 은 85 아미노산 단백질(SwissProt P02775)이다. CTAP-III은 예를 들어, Chemicon International(카탈로그 1484P)(www.chemicon.com, Temecula, CA.)로부터 입수가 가능한 항체에 의해 인식된다. CTAP-III은 혈소판 기반 단백질의 단편이며 혈소판 기반 단백질의 아미노산 44-128을 포함한다. 특정의 CTAP-III 바이오마커는 표 5에 나타낸다.

표 5

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
CTAP-III (M9290) (예측된 질량: 9287.74 D)	<0.0001	상향	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM 인산나트륨, pH 7.0

[0078]

[0079] 2.6. ITIH4 단편

[0080] 본 발명의 방법에서 유용한 다른 바이오마커는 하나 이상의 인터(inter)-α-트립신 억제제 중쇄 H4 전구체의 절단 단편들의 밀접하게 관련된 세트이며, 본 명세서에서는 "ITIH4 단편(ITIH4 fragment)"으로 지칭한다. ITIH4 단편은 미국 특허 공개 제2005-0059013A1호, 국제 특허 공개 제WO 2005/098447호, 및 Fung 등의 Int. J. Cancer 115:783-789(2005)에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. ITIH4 단편은 ITIH4 단편 1번,

ITIH4 단편 2번, 및 ITIH4 단편 3번으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다. 특정의 ITIH4 내부(internal) 단편 바이오마커는 표 6에 나타낸다.

표 6

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
ITIH4 단편 1 (M3272) (예측된 질량: 3273.72 D)	<0.01	상향	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM 인산나트륨, pH 7.0
ITIH4 단편 2 (M2725) (예측된 질량: 2725.06 D)	<0.02	상향	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM 인산나트륨, pH 7.0
ITIH4 단편 3 (M2627) (예측된 질량: 2627.94 D)	<0.0057	상향	IMAC-Cu ⁺⁺ 100 mM 인산나트륨, pH 7.0

[0082] ITIH4 단편의 아미노산 서열은 하기와 같이 측정되었다 :

[0083] ITIH4 단편 1 (서열식별번호: 23): MNFRPGVLS SRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

[0084] ITIH4 단편 2 (서열식별번호: 24): PGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

[0085] ITIH4 단편 3 (서열식별번호: 25): GVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF

[0086] ITIH4 전구체는 930 아미노산 단백질(SwissProt Q14624)이다. ITIH4 단편 1은 인간 ITIH4 전구체의 대략 658-687 아미노산이다. ITIH4 단편 2는 ITIH4 전구체의 대략 662-687 아미노산이다. ITIH4 단편 3은 ITIH4 전구체의 대략 663-687 아미노산이다.

[0087] 추가로, 본 발명의 바람직한 방법은 ITIH4 단편의 변형된 형태의 사용을 포함한다. ITIH4 단편의 변형은 다양한 화학 그룹의 번역-후(post-translational) 부가, 예를 들어, 당화(glycosylation), 지질화(lipidation), 시스테인화(cysteinylation) 및 글루타티오닐화(glutathionylation)를 포함할 수 있다.

[0088] 2.7. β -2 마이크로글로불린

[0089] 본 발명의 방법에서 유용한 또다른 바이오마커는 β -2 마이크로글로불린이다. β -2 마이크로글로불린은 2005년 6월 24일자로 출원된, 미국 가출원 제60/693,679호(Fung 등)에 난소암에 대한 바이오마커로 기재되어 있다. β -2 마이크로글로불린은 119 아미노산 전구체(GI:179318; SwissProt Accession No. P61769)로부터 유도된 99 아미노산 단백질이다. β -2 마이크로글로불린은 예를 들어, Abcam (카탈로그 AB759)(www.abcam.com, Cambridge, MA)로부터 입수가 가능한 항체에 의해 인식된다. 특정의 β -2 마이크로글로불린 바이오마커는 표 7에 나타낸다.

표 7

마커	P-값	난소암에서 상향 또는 하향 조절	ProteinChip® 분석
β2-마이크로글로불린 (M11.7K) (예측된 질량: 11729.17 D)	<0.0001	상향	IMAC-Cu ⁺⁺

[0090]

[0091]

3. 바이오마커 및 단백질의 상이한 형태

[0092]

단백질은 종종 복수의 상이한 형태의 샘플로 존재한다. 이러한 형태들은 번역-전 및 번역-후 변형(modification) 중 어느 하나 또는 양자에 기인한다. 번역-전(pre-translational) 변형된 형태는 대립(allelic) 변형체, 스플라이스(splice) 변형체 및 RNA 교정(editing) 형태를 포함한다. 번역 후 변형된 형태는 단백질분해 절단(예를 들어, 모 단백질(parent protein)의 단편), 당화, 인산화(phosphorylation), 지질화, 산화, 메틸화, 시스테인닐화(cysteinylation), 술폰화(sulphonation) 및 아세틸화(acetylation)에 기인한 형태를 포함한다. 샘플 중에서 단백질을 검출 또는 측정할 때, 상이한 형태의 단백질을 구분하는 능력은 검출 또는 측정하는데 사용되는 방법 및 차이점의 본성에 의존한다. 예를 들어, 단클론 항체를 사용하는 면역분석법은 에피토프를 함유하는 모든 형태의 단백질을 검출할 것이며, 그들을 구별하지는 못할 것이다. 그러나, 단백질 상의 상이한 에피토프에 대해 지시된 두 항체를 사용하는 샌드위치 면역분석법은 양 에피토프를 함유하는 모든 형태의 단백질을 검출할 것이고 에피토프 중 하나만을 함유하는 형태들을 검출하지 못할 것이다. 진단적 분석에서, 상이한 형태의 단백질을 구별할 수 없는 것은 사용된 특별한 방법에 의해 거의 검출된 형태들이 임의의 특별한 형태로서 동등하게 우수한 바이오마커일 경우 효과를 갖지 못한다. 그러나, 단백질의 특별한 형태(또는 특별한 형태의 서브세트)가 특별한 방법과 함께 검출된 상이한 형태의 수집(collection)보다 우수한 바이오마커인 경우, 분석의 능력으로 고생할 수 있다. 이 경우, 단백질의 형태들을 구분하는 분석법을 채택하는 것이 유용하며 이는 원하는 형태(들)의 단백질을 특이적으로 검출하고 측정한다. 상이한 형태의 분석물을 구별하거나 또는 특별한 형태의 분석물을 특이적으로 검출하는 것을 분석물의 "분석능(resolving)"으로 언급한다.

[0093]

질량 분광측정법은 상이한 형태의 단백질을 분석(resolve)하는 특히 강력한 방법론이며 그 이유는 상이한 형태들은 질량 분광측정법에 의해 분석될 수 있는 상이한 질량을 전형적으로 갖기 때문이다. 따라서, 다른 형태의 바이오마커에 비해 한 형태의 단백질이 질병에 대한 우수한 바이오마커인 경우, 질량 분광측정법은 종래의 면역분석법으로는 그 형태들을 구별할 수 없고 또한 유용한 바이오마커를 특이적으로 검출할 수 없었던 유용한 형태를 특이적으로 검출하고 측정할 수 있다.

[0094]

하나의 유용한 방법론은 질량 분광측정법과 면역분석법을 조합한 것이다. 우선, 생체특이적(biospecific) 포획제(예를 들어, 바이오마커 및 그 다른 형태들을 인식하는 항체, 압타머(aptamer) 또는 어피바디(Affibody))를 관심 있는 바이오마커를 포획하기 위해 사용하였다. 바람직하게는 생체특이적 포획제는 비드, 플레이트, 막 또는 칩과 같은 고체 상에 결합된다. 결합되지 않은 재료는 세척하여 제거한 후, 포획된 분석물이 질량 분광측정법에 의해 검출 및/또는 측정된다.(이 방법은 또한 상기 단백질에 결합되거나 또는 항체에 의해 인식된 단백질 상호작용제 및 그 자체가 바이오마커가 될 수 있는 단백질 상호작용제의 포획을 초래할 것이다. 전통적인 MALDI 또는 SELDI와 같은 레이저 탈착 접근법(laser desorption approach) 및 전기분사 이온화법(electrospray ionization)을 포함하는, 다양한 형태의 질량 분광측정법은 단백질 형태들을 검출용으로 유용하다.

[0095]

따라서, 본 명세서에서 특별한 단백질을 검출하거나 특별한 단백질의 양을 측정하는 것에 관련해서는, 다양한 형태의 단백질을 분석하거나 또는 분석하지 않고 단백질을 검출 및 측정하는 것을 의미한다. 예를 들어, "헵시딘의 측정(measuring hepcidin)" 단계는 다양한 형태의 단백질을 구별하지 않는 수단(예를 들어, 일부 면역분석법)뿐만 아니라 일부 형태들을 다른 형태들과 구별하거나 또는 단백질의 특정 형태(예를 들어, 임의의 및/또는 모든 헵시딘-25, 헵시딘-24, 헵시딘-22 및 헵시딘-20, 개별적으로 또는 조합하여)를 측정하는 수단에 의해 헵시

단을 측정하는 것을 포함한다. 이와 대조적으로, 예를 들어 헵시딘의 특별한 형태와 같이, 단백질의 특별한 형태(들)를 측정하는 것이 요구되는 경우, 상기 특별한 형태(들)가 특정된다. 예를 들어, "헵시딘-25의 측정"은 이것을 다른 형태의 헵시딘, 예를 들어 헵시딘-24, 헵시딘-22 및 헵시딘-20과 구별하는 방법으로 헵시딘-25를 측정하는 것을 의미한다. 이와 유사하게, "트랜스티레틴의 측정"은 개별적으로 또는 조합하여, 대상 테스트 샘플에서 발견되는 임의의 및/또는 모든 형태의 트랜스티레틴의 측정을 포함하는 반면, "시스테인화 트랜스티레틴의 측정"은 예를 들어 트랜스티레틴 Δ N10, 비변형 트랜스티레틴, 글루타티오닐화 트랜스티레틴, 술폰화 트랜스티레틴 등과 같이 환자 샘플에서 발견되는 다른 형태의 트랜스티레틴으로부터 시스테인화 트랜스티레틴의 구별이 가능한 방법으로 트랜스티레틴을 측정하는 것을 의미한다. "비-분할(un-cleaved) 트랜스티레틴의 측정"은 임의의 개별적인 또는 조합된 비변형 트랜스티레틴, 술폰화 트랜스티레틴, 시스테인화 트랜스티레틴, CysGly 변형된 트랜스티레틴 및 글루타티오닐화 트랜스티레틴을 측정하는 것을 의미한다.

[0096] 4. 난소암에 대한 바이오마커의 검출

[0097] 본 발명의 바이오마커는 임의의 적절한 방법에 의해 검출될 수 있다. 검출 패러다임은 광학적 방법, 전기화학적 방법(전압측정법 및 전류측정법 기술), 원자력 현미경법, 및 무선 주파수(radio frequency)법, 예를 들어 다극성 공명 분광법을 포함한다. 공초점 및 비-공초점 양자의 현미경법에 더하여, 광학적 방법의 예시는 형광, 발광, 화학발광, 흡광도, 반사율, 투과율 및 복굴절 또는 굴절률(예를 들어, 표면 플라즈몬 공명, 타원편광법, 공명 거울법, 회절격자 커플러 도파관법 또는 간섭법)의 검출이다.

[0098] 한 구현예에서, 샘플을 바이오칩에 의해 분석하였다. 바이오칩은 일반적으로 실질적으로 평평한 표면을 갖는 고체 기질(solid substrate)을 포함하고, 여기에 포획제(또한 흡착제 또는 친화제로 칭함)가 부착된다. 종종, 바이오칩의 표면은 복수의 지정가능한 위치를 포함하며, 이들 각각은 거기에 결합되는 포획제를 갖는다.

[0099] 단백질 바이오칩은 폴리펩티드의 포획을 위해 개조된 바이오칩이다. 많은 단백질 바이오칩이 당업계에 설명되어 있다. 이들로는 예를 들어 CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, CA), Zyomyx (Hayward, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA), Biacore (Uppsala, Sweden) 및 Procognia (Berkshire, UK)에 의해 생산되는 단백질 바이오칩을 포함한다. 상기 단백질 바이오칩의 예는 하기 특허 또는 공개된 특허출원에 기재되어 있다: 미국특허번호 제 6,225,047호(Hutchens & Yip); 미국특허번호 제 6,537,749호(Kuimelis 및 Wagner); 미국특허번호 제 6,329,209호(Wagner 등); PCT 국제공개 제WO 00/56934호(Englert 등); PCT 국제공개 제WO 03/048768호(Boutell 등) 및 미국특허번호 제 5,242,828호(Bergstrom 등).

[0100] 4.1. 질량 분광측정법에 의한 검출

[0101] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 바이오마커는 질량 분광측정기를 채택하여 기체상(gas phase) 이온을 검출하는 방법인, 질량 분광측정법에 의해 검출된다. 질량 분광측정기의 예로는 비행 시간형, 자기 섹터, 4중극(quadrupole) 필터, 이온 트랩, 이온 사이클로트론 공명, 정전기적 섹터 분석기 및 이들의 혼합이 있다.

[0102] 다른 바람직한 방법에서, 질량 분광측정기는 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정기이다. 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정법에서, 분석물은 질량분석 프로브의 표면에 배치되고, 장치는 질량 분광측정기의 프로브 경계면을 포함하고, 이온화 및 질량 분광측정기로의 도입을 위한 이온화 에너지를 분석물에 제공하도록 개조된다. 레이저 탈착 질량 분광측정기는 통상적으로 자외선으로부터의 레이저 에너지뿐만 아니라 적외선 레이저로부터의 에너지를 사용하여 표면으로부터 분석물을 탈착시키고, 이를 휘발성화시키고 이온화시키며 질량 분광측정기의 이온 광학에 이용가능하게 한다. LDI에 의한 단백질의 분석은 MALDI 또는 SELDI의 형태를 취할 수 있다.

[0103] 4.1.1. SELDI

[0104] 본 발명에서 사용하는 바람직한 질량 분광측정 기술로는 예를 들어 미국특허 제 5,719,060호 및 제 6,225,047호(Hutchens and Yip)에 기술된 "표면 강화된 레이저 탈착 및 이온화(Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization)" 또는 "SELDI"가 있다. 이는 분석물(여기서는 하나 이상의 바이오마커)이 SELDI 질량 분광측정 프

로브의 표면에 포획되는 탈착/이온화 가스상 이온 분석(예를 들어, 질량 분광측정) 방법을 칭한다.

- [0105] SELDI는 또한 "친화성 포획 질량 분광측정(affinity capture mass spectrometry)" 또는 "표면-강화된 친화성 포획(Surface-Enhanced Affinity Capture)("SEAC")로 칭한다. 이러한 버전은 물질과 분석물 간의 비공유 친화도 상호작용(흡수)을 통해 분석물을 포획하는 프로브 표면 상에 물질을 갖는 프로브의 사용을 포함한다. 이러한 물질은 "흡착제", "포획제", "친화제" 또는 "결합 모이어티"로 다양하게 불리운다. 이러한 프로브는 "친화 포획 프로브"로 및 "흡착표면"을 갖는 것으로 언급될 수 있다. 이러한 포획제는 분석물을 결합시킬 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 포획제는 물리적 흡착(physisorption) 또는 화학적 흡착(chemisorption)에 의해 프로브 표면에 부착될 수 있다. 일부 구현예에서, 프로브는 상기 표면에 이미 부착된 포획제를 갖는다. 다른 구현예에서, 프로브는 사전 활성화되고, 예를 들어, 공유 또는 배위 공유 결합을 형성하는 반응을 통해 포획제를 결합할 수 있는 반응성 모이어티를 포함한다. 에폭사이드 및 아실-이미다졸은 세포 수용체 또는 항체와 같은 폴리펩티드 포획제를 공유적으로 결합시키는 유용한 반응성 모이어티이다. 니트릴로트리아세트산 및 이미노디아세트산은 히스티딘 함유 펩티드와 비공유적으로 상호작용하는 금속 이온을 결합시키는 킬레이트제로서 작용하는 유용한 반응성 모이어티이다. 흡착제는 일반적으로 크로마토그래피 흡착제 및 생체특이적 흡착제로 분류된다.
- [0106] "크로마토그래피 흡착제"는 크로마토그래피에서 통상적으로 사용되는 흡착 물질을 언급하는 것이다. 크로마토그래피 흡착제는 예를 들어, 이온교환 물질, 금속 킬레이트제(예를 들어, 니트릴로트리아세트산 또는 이미노디아세트산), 고정된 금속 킬레이트, 소수성 상호작용 흡착제, 친수성 상호작용 흡착제, 염료, 단순한 생체분자(예를 들어, 뉴클레오타이드, 아미노산, 간단한 당 및 지방산) 및 혼합된 모드 흡착제(예를 들어, 소수성 인력/정전기적 반발 흡착제)를 포함한다.
- [0107] "생체특이적 흡착제"는 생체분자, 예를 들어 핵산 분자(예를 들어, 압타머), 폴리펩티드, 다당류, 지질, 스테로이드 또는 이들의 콘쥬게이트(예를 들어, 글리코단백질, 지질단백질, 글리코지질, 핵산(예를 들어, DNA)-단백질 콘쥬게이트)를 포함하는 흡착제를 의미한다. 특정 예에서, 생체특이적 흡착제는 멀티프로틴 복합체, 생물학적 막 또는 바이러스와 같은 거대분자 구조일 수 있다. 생체특이적 흡착제의 예로는 항체, 수용체 단백질 및 핵산이 있다. 생체특이적 흡착제는 통상적으로 크로마토그래피 흡착제보다 타겟 분석물에 대해 더 높은 특이성을 갖는다. SELDI에 사용되는 흡착제의 또다른 예는 미국특허 제6,225,047호에서 확인될 수 있다. "생체선택적 흡착제(bioselective adsorbent)"는 10^{-8} M 이상의 친화력을 갖는 분석물에 결합하는 흡착제를 의미한다.
- [0108] Ciphergen Biosystems, Inc.에 의해 생산되는 단백질 바이오칩은 지정가능한 위치에 부착되는 크로마토그래피성 또는 생체특이적 흡착제를 갖는 표면을 포함한다. Ciphergen ProteinChip[®] 어레이는 NP20(친수성); H4 및 H50(소수성); SAX-2, Q-10 및 (음이온 교환); WCX-2 및 CM-10(양이온 교환); IMAC-3, IMAC-30 및 IMAC-50(금속 킬레이트); 및 PS-10, PS-20(아실-이미다졸, 에폭사이드를 갖는 반응성 표면) 및 PG20(아실-이미다졸을 통해 결합된 단백질 G)을 포함한다. 소수성 단백질칩 어레이는 이소프로필 또는 노닐페녹시-폴리(에틸렌글리콜)메타크릴레이트 작용성을 갖는다. 음이온 교환 단백질칩 어레이는 4차 암모늄 작용성을 갖는다. 양이온 교환 단백질칩 어레이는 카르복실레이트 작용성을 갖는다. 고정된 금속 킬레이트 단백질칩 어레이는 전이금속이온, 예를 들어 구리, 니켈, 아연 및 갈륨을 킬레이트화에 의해 흡착시키는 니트릴로트리아세트산 작용성(IMAC 3 및 IMAC 30) 또는 O-메타크릴로일-N,N-bis-카르복시메틸 티로신 작용성(IMAC 50)을 갖는다. 예비활성화된 단백질칩 어레이는 공유 결합을 위한 단백질 상에서 기와 반응할 수 있는 아실-이미다졸 또는 에폭사이드 작용기를 갖는다.
- [0109] 이러한 바이오칩은 또한 미국특허 제6,579,719호(Hutchens 및 Yip, "Retentate Chromatography" 2003년 6월 17일); 미국특허 제6,897,072호(Rich 등, "Probes for a Gas Phase Ion Spectrometer" 2005년 5월 24일); 미국특허 제6,555,813호(Beecher 등, "Sample Holder with Hydrophobic Coating for Gas Phase Mass Spectrometer" 2003년 4월 29일); 미국특허공개 제2003-0032043 A1 (Pohl 및 Papanu, "Latex Based Adsorbent Chip" 2002년 7월 16일); 및 PCT 국제공개 제WO 03/040700호(Um 등, "Hydrophobic Surface Chip" 2003년 5월 15일); 미국특허공개 제2003-0218130 A1(Boschetti 등, "Biochips With Surfaces Coated With Polysaccharide-Based

Hydrogels," 2003년 4월 14일) 및 미국특허공개 제2005-059086 A1(Huang 등, "Photocrosslinked Hydrogel Blend Surface Coatings" 2005년 3월 17일):에 기재되어 있다.

[0110] 일반적으로, 흡착제 표면을 갖는 프로브는 샘플 중에 존재할 수 있는 바이오마커(들)를 흡착제에 결합시키기에 충분한 시간 동안 샘플과 접촉된다. 인큐베이션 기간 후에, 기질(substrate)은 세척되어 비결합된 물질을 제거한다. 임의의 적합한 세척 용액이 사용되며, 바람직하게는 수용액이 사용된다. 분자가 결합을 유지하는 정도는 엄격하게 세척을 조정하여 조절될 수 있다. 세척 용액의 용리 특성은 예를 들어, pH, 이온강도, 소수성, 카오토로피즘(chaotropism) 정도, 세정 강도, 및 온도에 의존할 수 있다. 프로브가 SEAC 및 SEND 특성(본원에 기술됨) 모두를 갖지 않는 경우, 에너지 흡수 분자는 결합된 바이오마커와 함께 기질에 적용된다.

[0111] 또다른 방법에서, 바이오마커에 결합하는 항체를 가진 고체-상 결합 면역-흡착제로 바이오마커를 포획할 수 있다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 흡착제를 세척한 후, 바이오마커를 고체 상으로부터 용출하고 바이오마커와 결합한 SELDI 칩에 적용하여 검출하고, SELDI에 의해 분석한다.

[0112] 기질에 결합된 바이오마커는 비행 시간형 질량 분광측정기와 같은 기체상 이온 분광측정기에서 검출된다. 바이오마커는 레이저와 같은 이온화 소스에 의해 이온화되며, 발생된 이온은 광학 어셈블리에 의해 수집되고, 이어서 질량 분석기(mass analyzer)는 통과 이온을 분산시키고 분석한다. 이후 검출기는 검출된 이온의 정보를 질량-대-전하 비율로 해석한다. 바이오마커의 검출은 통상적으로 신호 강도의 검출과 관련될 것이다. 따라서, 바이오마커의 양 및 질량이 결정될 수 있다.

[0113] 4.1.2. SEND

[0114] 레이저 탈착 질량 분광측정법의 다른 방법은 표면-강화된 순탈착(Surface-Enhanced Neat Desorption)("SEND")으로 불린다. SEND는 프로브 표면("SEND 프로브")에 화학적으로 결합되는 에너지 흡수 분자를 포함하는 프로브의 사용을 포함한다. 어구 "에너지 흡수 분자(energy absorbing molecules)"(EAM)는 레이저 탈착/이온화 소스로부터 에너지를 흡수할 수 있는 분자를 의미하며, 이후 이와 접촉한 분석물 분자를 탈착시키고 이온화하는데 기여한다. EAM 카테고리는 종종 "매트릭스"로 언급되는, MALDI에서 사용되는 분자를 포함하고, 신남산(cinnamic acid) 유도체, 시나핀산(sinapinic acid; SPA), 시아노-히드록시-신남산(CHCA) 및 디히드록시벤조산, 페룰산, 및 히드록시아세토-페논 유도체로 예시된다. 특정 구현예에서, 에너지 흡수 분자는 선형 또는 가교 중합체, 예를 들어 폴리메타크릴레이트에 도입된다. 예를 들어, 조성물은 α -시아노-4-메타크릴로일옥시신남산과 아크릴레이트의 공중합체일 수 있다. 다른 구체예에서, 조성물은 α -시아노-4-메타크릴로일옥시신남산, 아크릴레이트 및 3-(트리-에톡시)실릴 프로필 메타크릴레이트의 공중합체이다. 다른 구체예에서, 조성물은 α -시아노-4-메타크릴로일옥시신남산 및 옥타데실메타크릴레이트의 공중합체("C18 SEND")이다. SEND는 또한 미국특허 제6,124,137호 및 PCT 국제공개 제WO 03/64594호(Kitagawa, "Monomers And Polymers Having Energy Absorbing Moieties Of Use In Desorption/Ionization Of Analytes," 2003년 8월 7일)에 기재되어 있다.

[0115] SEAC/SEND는 포획제와 에너지 흡수 분자 모두가 샘플 제시 표면에 부착되는 레이저 탈착 질량 분광측정법의 버전이다. 그러므로, SEAC/SEND 프로브는 외부 매트릭스의 적용을 필요로 하지 않고 친화성 포획 및 이온화/탈착을 통해 분석물을 포획할 수 있다. C18 SEND 바이오칩은 포획제로서 작용하는 C18 모이어티, 및 에너지 흡수 모이어티로서 작용하는 CHCA 모이어티를 포함하는, SEAC/SEND의 버전이다.

[0116] 4.1.3. SEPAR

[0117] LDI의 다른 버전은 표면-강화된 광불안정한 부착 및 박리(Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release)(SEPAR)로 불린다. SEPAR는 분석물과 공유적으로 결합하고, 이어서 광, 예를 들어 레이저 광에 노출시킨 후 모이어티에 광불안정한 결합을 깨트려 분석물을 방출할 수 있는 표면에 부착된 모이어티를 갖는 프로브의 사용을 포함한다(참조, 미국특허번호 제5,719,060호). SEPAR 및 SELDI의 다른 형태는 본 발명에 따라, 바이오마커 또는 바이오마커 프로필을 검출하기 위해 용이하게 개조된다.

[0118] 4.1.4. MALDI

[0119] MALDI는 단백질 및 핵산과 같은 생체분자를 분석하기 위해 사용되는 레이저 탈착/이온화의 종래의 방법이다. 한 MALDI 법에서, 샘플은 매트릭스와 혼합되고 MALDI 칩에 직접 놓는다. 그러나, 혈청 또는 소변과 같은 생물학적 샘플의 복잡성때문에 샘플의 예비 분획 없이는, 이러한 방법은 최적 이하의 것이 되었다. 따라서, 바이오마커가 있는 일부 구현예들에서 바람직하게는 수지(예를 들어, 스핀 칼럼 중에서)와 같은 고체 지지체에 결합된 크로마토그래피 또는 생체특이적(예를 들어, 항체) 재료와 첫 번째로 포획된다. 본 발명의 바이오마커와 결합하는 특이적인 친화성 재료는 전술과 같다. 친화성 재료 상에서 정제한 후, 바이오마커를 용출시키고, 이어서 MALDI로 검출하였다.

[0120] 4.1.5. 질량 분광측정법에서 다른 형태의 이온화

[0121] 기타 방법에서, 바이오마커는 LC-MS 또는 LC-LC-MS에 의해 검출된다. 이는 샘플에 있는 단백질을 액체 크로마토그래피에 이어 질량 분광측정법 분석, 통상적으로 전기분사 이온화합을 통해 하나 또는 두 경로에 의해 분석하는 것을 포함한다.

[0122] 4.1.6. 데이터 분석

[0123] 비행 시간형 질량 분광측정법에 의한 분석물의 분석은 비행 시간형 스펙트럼을 생성한다. 궁극적으로 분석된 비행 시간형 스펙트럼은 통상적으로 샘플에 대해 이온화 에너지의 단일 펄스로부터의 신호가 아니라, 다수의 펄스로부터 신호의 합계를 나타낸다. 이는 노이즈를 감소시키고 동적 범위를 증가시킨다. 이어서 이러한 비행 시간형 데이터는 데이터 프로세싱으로 수행된다. Ciphergen의 ProteinChip® 소프트웨어에서, 데이터 프로세싱은 통상적으로 질량 스펙트럼을 생성하는 TOF-대-M/Z 변환, 기기 오프셋을 제거하기 위한 기준선 삭감, 및 고주파수 노이즈를 감소시키기 위한 고주파수 노이즈 필터링을 포함한다.

[0124] 바이오마커의 탈착 및 검출에 의해 생성된 데이터는 프로그램가능한 디지털 컴퓨터를 사용하여 분석될 수 있다. 컴퓨터 프로그램은 데이터를 분석하여 검출된 바이오마커의 수, 및 선택적으로 검출된 각각의 바이오마커에 대한 측정된 분자 질량 및 신호의 강도를 나타낸다. 데이터 분석은 바이오마커의 신호 강도를 측정하는 단계 및 소정의 통계적 분포로부터 벗어난 데이터를 제거하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 관찰된 피크는 일부 기준과 비교하여 각 피크의 높이를 계산하여 표준화될 수 있다.

[0125] 컴퓨터는 디스플레이를 위해 결과로 얻어진 데이터를 다양한 포맷으로 변환시킬 수 있다. 표준 스펙트럼이 디스플레이될 수 있으나, 하나의 유용한 포맷에서 피크 높이 및 질량 정보만이 스펙트럼 관찰로부터 유지되어, 더 선명한 이미지를 수득하고 거의 동일한 분자량을 갖는 바이오마커를 보다 용이하게 관찰할 수 있게 한다. 다른 유용한 포맷에서, 샘플 간의 상향- 또는 하향-조정되는 바이오마커 및 돋보이는 독특한 바이오마커를 편리하게, 두 개 이상의 스펙트럼을 비교한다. 임의의 이러한 포맷의 사용으로, 특정 바이오마커가 샘플 중에 존재하는지의 여부를 용이하게 결정할 수 있다.

[0126] 분석은 일반적으로 분석물로부터의 신호를 나타내는 스펙트럼에서 피크의 동정을 포함한다. 피크 선택은 시각적으로 수행될 수 있지만, 피크의 검출을 자동화할 수 있는, Ciphergen의 ProteinChip® 소프트웨어 패키지의 일부로서 소프트웨어를 이용 가능하다. 일반적으로, 이러한 소프트웨어는 선택된 스레시홀드(threshold)를 초과하는 신호-대-노이즈 비율을 갖는 신호를 확인하고 피크 신호의 중심에 피크의 질량을 표지함으로서 작용한다. 한 유용한 적용에서, 많은 스펙트럼은 질량 스펙트럼의 일부 선택된 백분율에 존재하는 동일한 피크를 확인하기 위해 비교된다. 이러한 소프트웨어의 한 버전은 규정된 질량 범위 내의 다양한 스펙트럼에 나타나는 모든 피크를 클러스터하고, 질량(M/Z) 클러스터의 중간점 가까이에 있는 모든 피크에 대한 질량(M/Z)을 할당한다.

- [0127] 데이터를 분석하기 위해 사용되는 소프트웨어는 신호가 본 발명에 따른 바이오마커에 대응하는 신호의 피크를 나타내는지의 여부를 측정하기 위해 신호의 분석에 알고리즘을 적용하는 코드를 포함할 수 있다. 소프트웨어는 또한 관찰된 바이오마커 피크와 관련한 데이터를 분류 트리(tree) 또는 ANN 분석을 수행하여, 시험하에서 특정 임상적 파라미터의 상태를 나타내는 바이오마커 피크의 조합 또는 바이오마커 피크가 존재하는지의 여부를 결정한다. 데이터의 분석은 샘플의 질량 분광측정 분석으로부터, 직접 또는 간접적으로 수득되는 다양한 파라미터의 "열쇠(keyed)"가 될 수 있다. 이러한 파라미터는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 피크의 존재 또는 부재, 피크 또는 피크의 군의 형태, 하나 이상의 피크의 높이, 하나 이상의 피크 높이의 로그(log), 및 피크 높이 데이터의 다른 산술적 조종(arithmetic manipulation)을 포함한다.
- [0128] **4.1.7. 난소암에 대한 바이오마커의 SELDI 검출을 위한 일반적인 프로토콜**
- [0129] 본 발명의 바이오마커의 검출용으로 바람직한 프로토콜은 이하와 같다. 예를 들어 혈청과 같은, 실험될 생물학적인 샘플은 바람직하게는 SELDI 분석 전에 예비 분획된다. 이는 샘플을 간소화하고 감도를 향상시킨다. 사전 분획의 바람직한 방법은 Q HyperD(BioSeptra, SA)와 같은 음이온교환 크로마토그래피 물질과 샘플을 접촉시키는 것을 포함한다. 이어서 결합된 물질은 pH 9, pH 7, pH 5 및 pH 4에서 버퍼를 사용하여 단계별로 pH 용출을 수행하였다.(또한 바이오마커가 용출된 분획은 표 1에 나타난다.) 바이오마커를 함유하는 다양한 분획들을 수집하였다.
- [0130] 이어서 시험될 샘플(바람직하게는 사전 분획된)은 양이온교환 흡착제(바람직하게는 CM10 단백질칩 어레이(Ciphergen Biosystems, Inc.)) 또는 IMAC 흡착제(바람직하게는 IMAC30 단백질칩 어레이(Ciphergen Biosystems, Inc.))를 포함하는 친화성 포획 프로브와 접촉되며, 이것 또한 표 1에 나타난 바와 같다. 프로브는 비결합된 분자를 세척하면서 바이오마커를 보유한 버퍼로 세척된다. 각각의 바이오마커에 대한 적절한 세척은 표 1에서 확인된 버퍼이다. 바이오마커는 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정법에 의해 검출한다.
- [0131] 대안적으로, 적절한 어레이 결합 버퍼에서, 변성(denaturing) 또는 변성 없이, 샘플을 용출하고, 결합시키고 각각의 분석물을 탐지하기 위해 최적화된 조건 하에서 세척할 수 있다.
- [0132] 테칸 아쿠아리우스(Tecan Aquarius)-96상에서 수행된 ApoA1 크로마토그래피 분석
- [0133] 1. 혈청의 변성 : 7.5 ul 9M 요소 2% CHAPS 50mM Tris HCl pH9를 5 ul의 인간 혈청에 가하고, 상온에서 20분간 혼합하였다. 0.12 mg/ml E. coli 용해질(lysate) 및 H50 버퍼(10% 아세트오니트릴, 0.1% TFA)를 함유하는 용액으로 1:400으로 희석하였다.
- [0134] 2. H50 어레이의 사전 활성화 : 웰당 50% 아세트오니트릴로 바이오프로세서(BioProcessor)의 각각의 웰을 세척하였다. 상온에서 5분간 인큐베이트하고, 용액을 제거하였다. 150 μl H50 세척 버퍼(10% 아세트오니트릴/0.1% TFA)로 각각 5분간 2회 평형시키고, 버퍼를 제거하였다.
- [0135] 3. 50ul의 1 : 400으로 희석된 혈청 샘플을 각각의 웰에 가하였다. 상온에서 120분간 인큐베이트하였다.
- [0136] 4. 150ul의 H50 버퍼로 어레이를 4회 세척하고, 150ul의 물로 1회 세척하였다.
- [0137] 5. 바이오프로세서 상부(top)를 제거하고, 10분간 공기로 건조시켰다.
- [0138] 6. 바이오닷(BioDot)을 사용하여, 스폿당 0.75 ul의 시나편산 매트릭스(SPA, Ciphergen, 50% 아세트오니트릴/0.5% TFA/ 0.1% TX 100 중 12.5mg/ml)를 가하였다. 바이오닷 챔버에서 10분간 공기로 건조시켰다. 스폿당 추가로 0.75 ul SPA 용액을 가하였다. PCS4000에서 어레이를 판독하기 전에 챔버에서 30분간 공기 건조하였다.
- [0139] 7. 28,000 Da의 초점 질량(focus mass)으로 PCS 4000에서 판독하고, 스폿당 총 530 촬영(shot)에 대해서 파티션당 10 촬영을 수집하였다.
- [0140] 테칸 아쿠아리우스-96상에서 수행된 트랜스티레틴 크로마토그래피 분석:

- [0141] 1. 샘플 희석 : 0.05 mg/ml E. coli 용해질의 첨가와 함께 pH 7.0 (PB 버퍼), 100mM 인산나트륨 버퍼를 함유하는 용액에서 혈청 샘플을 1:250으로 희석하고, 잘 혼합하였다.
- [0142] 2. Q10 어레이를 PB 버퍼로 전처리하고, 5분 인큐베이트하였다. 버퍼를 제거하고, 1회 반복한다.
- [0143] 3. 각각의 웰에 50ul의 1:250으로 희석된 혈청 샘플을 가하고, 상온에서 120분간 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하였다.
- [0144] 4. 150ul의 PB 버퍼로 어레이를 4회 세척하였다. 각각의 세척 후 버퍼를 제거하였다.
- [0145] 5. 150ul의 물로 어레이를 1회 세척하고, 물을 제거하였다.
- [0146] 6. 바이오프로세서를 제거하고, 30분간 어레이를 공기 건조하였다.
- [0147] 7. 바이오닷을 사용하여, 스폿당 0.75 ul의 시나핀산 매트릭스(SPA, CIPHERGEN, 50% 아세트니트릴/ 0.5% TFA/ 0.1% TX 100 중 12.5mg/ml)를 가하였다. 바이오닷 챔버에서 10분간 공기로 건조시켰다. 스폿당 추가로 0.75 ul SPA 용액을 가하였다. PCS4000에서 어레이를 판독하기 전에 챔버에서 30분간 공기 건조하였다.
- [0148] 8. 14,000 Da의 초점 질량으로 PCS 4000에서 판독하고, 스폿당 총 530 촬영에 대해서 파티션당 10 촬영을 수집하였다.
- [0149] 테칸 아쿠아리우스-96상에서 수행된 ITIH4 크로마토그래피 분석
- [0150] 1. 샘플 희석 : IMAC 결합/세척 버퍼(50mM 인산나트륨 0.25M NaCl pH 6.0) 에서 혈청 샘플을 1:50으로 희석하고, 잘 혼합하였다.
- [0151] 2. IMAC50 어레이 사전 활성화 s: 바이오프로세서에서 웰당 50mM CuSO₄를 가하였다. 상온에서 10분간 인큐베이트하고, 물로 4회 세척하였다. 결합 버퍼로 IMAC50 어레이를 2회 평형시켰다.
- [0152] 3. 각각의 웰에 50ul의 1:50으로 희석된 혈청 샘플을 가하고, 상온에서 120분간 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하였다.
- [0153] 4. 150ul의 IMAC50 결합/세척 버퍼로 어레이를 3회 세척하였다. 각각의 세척 후 버퍼를 제거하였다.
- [0154] 5. 150ul의 물로 어레이를 2회 세척하고, 물을 제거하였다.
- [0155] 6. 바이오프로세서를 제거하고, 30분간 어레이를 공기 건조하였다.
- [0156] 7. 바이오닷을 사용하여, 스폿당 0.75 ul의 시나핀산 매트릭스(SPA, CIPHERGEN, 50% 아세트니트릴/ 0.5% TFA 중 12.5mg/ml)를 가하였다. 바이오닷 챔버에서 10분간 공기로 건조시켰다. 스폿당 추가로 0.75 ul SPA 용액을 가하였다. PCS4000에서 어레이를 판독하기 전에 챔버에서 30분간 공기 건조하였다.
- [0157] 8. 3,273 Da의 초점 질량으로 PCS 4000에서 판독하고, 스폿당 총 530 촬영에 대해서 파티션당 10 촬영을 수집하였다.
- [0158] 대안적으로, 바이오마커를 인식하는 항체가, 예를 들면 Dako, U.S. Biological, Chemicon, Abcam and Genway로부터 입수 가능한 경우, 이들은 사전활성화된 PS10 또는 PS20 단백질칩 어레이(CIPHERGEN Biosystems, Inc.)와 같은, 프로브의 표면에 부착될 수 있다. 이들 항체들은 샘플로부터의 바이오마커를 프로브 표면상으로 포획할 수 있다. 이어서 바이오마커는 예를 들어, 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정법에 의해 검출될 수 있다.
- [0159] 유체공학 작용을 수행하는 어떠한 로봇이라도 이러한 분석에 사용가능하며, 예를 들어, Hewlett Packard 및 Hamilton으로부터 입수할 수 있다.
- [0160] **4.2. 면역분석법에 의한 검출**
- [0161] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 바이오마커는 질량 분광측정법 이외의 방법 또는 바이오마커의 질량의

측정에 의존하는 다른 방법 이외의 방법에 의해 측정할 수 있다. 질량에 의존하지 않는 한 구현예에서는, 본 발명의 바이오마커는 면역분석법에 의해 측정된다. 면역분석법은 바이오마커를 포획하기 위해 항체와 같은 생체특이적 포획제를 필요로 한다. 항체는 당업계에 널리 공지된 방법, 예를 들어, 동물을 바이오마커로 면역시키는 방법에 의해 형성될 수 있다. 바이오마커는 이들의 결합 특성을 기초로 하여 샘플로부터 분리된다. 대안적으로는 폴리펩티드 바이오마커의 아미노산 서열이 공지된 경우, 폴리펩티드가 합성되어, 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 항체를 생성하는데 사용할 수 있다.

[0162] 본 발명은 예를 들어, ELISA 또는 형광-기반 면역분석법을 포함하는 샌드위치 면역분석법, 및 기타 효소 면역분석법을 포함하는 종래의 면역분석법이 고려된다. 혼탁측정법(nephelometry)은 액체 상에서 수행되는 분석법이며, 여기서 항체는 용액 중에 존재한다. 항체에 대한 항원의 결합은 흡광도의 변화를 초래하며, 이것을 측정한다. SELDI-기반 면역분석법에서, 바이오마커용 생체특이적 포획제는, 예를 들어 사전 활성화된 단백질칩 어레이와 같은, MS 프로브의 표면에 부착된다. 이후 바이오마커는 이러한 시약을 통해 바이오칩상에 특이적으로 포획되며, 포획된 바이오마커는 질량 분광측정법에 의해 검출된다.

[0163] 5. 대상의 난소암 상태의 측정

[0164] 본 발명의 바이오마커를 진단 테스트에 사용하여 대상의 난소암 상태를 평가할 수 있으며, 예를 들어 난소암을 진단할 수 있다. 어구 "난소암 상태(ovarian cancer status)"는 비-질환을 포함하여, 질환의 구별가능한 소견을 포함하는 것이다. 예를 들어, 난소암 상태는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 질환의 존재 또는 부재(예를 들어, 난소암 대 비-난소암), 질환 발생의 위험도, 질환의 단계, 질환의 진행(예를 들어, 시간에 따른 질환의 진척 또는 질환의 완화) 및 질환의 치료에 대한 효율성 또는 반응도를 포함한다.

[0165] 난소암 상태와 테스트 결과의 상관성은 상태를 형성하는 결과에 대한 일부 종류의 분류 알고리즘을 적용하는 것과 관련된다. 분류 알고리즘은 측정된 헵시딘의 양이 특정 컷-오프(cut-off) 수 이상 또는 이하인지 여부를 측정할 정도로 간단해지기도 한다. 복합의 바이오마커를 사용한 경우, 분류 알고리즘은 선형 회귀식(linear regression formula)일 수 있다. 대안적으로, 분류 알고리즘은 본 명세서에 기재된 임의의 많은 학습 알고리즘(learning algorithm)의 산출일 수 있다.

[0166] 복합 분류 알고리즘의 경우에, 데이터 상에서 알고리즘을 수행하고, 그에 의해 예를 들어 프로그램가능한 디지털 컴퓨터와 같은 컴퓨터를 사용하여, 분류를 결정하는 것이 필요할 수 있다. 어느 경우에도, 그 후 유형의 매체 상에서, 예를 들어 메모리 드라이브 또는 디스크와 같은 컴퓨터-판독가능한 포맷으로 또는 단순히 종이에 프린트하여 상태를 기록할 수 있다. 결과는 또한 컴퓨터 스크린상에 기록될 수 있다.

[0167] 5.1. 단일 마커

[0168] 정확하게 상태를 예측하는 진단 테스트의 능력은 분석의 감도, 분석의 특이성 또는 수신자 동작 특성(receiver operated characteristic)("ROC") 곡선 아래의 면적으로서 일반적으로 측정된다. 감도는 테스트에 의해 양성으로 예측된 진양성(true positive)의 백분율인 반면, 특이성은 테스트에 의해 음성으로 예측된 진음성(true negative)의 백분율이다. ROC 곡선은 1-특이성의 작용으로서 테스트의 감도를 제공한다. ROC 곡선 아래의 면적이 크면 클수록, 테스트의 예측치는 더욱 강력하다. 테스트의 효율성 중 다른 유용한 측정은 양성 예측치 및 음성 예측치이다. 양성 예측치는 실제로 양성인, 양성으로 테스트된 사람의 백분율이다. 음성 예측치는 실제로 음성이, 음성으로 테스트된 사람의 백분율이다.

[0169] 본 발명의 바이오마커는 상이한 난소암 상태에서 통계적인 차이를 나타낸다. 이러한 바이오마커들을 단독으로 또는 조합하여 사용하는 진단 테스트는 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 및 약 100%의 특이성 및 감도를 나타낸다.

[0170] 표 1에 리스트된 각각의 바이오마커는 난소암에 독특하게 존재하며, 따라서, 각각은 난소암 상태의 측정을 보조하는데 개별적으로 유용하다. 상기 방법은, 우선 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여, 예를 들어 SELDI 바이오칩에 포획하고 이어서 질량 분광측정법에 의해 검출하여, 대상 샘플에서 선택된 바이오마커를 측정하고, 두 번째로 양성 난소암 상태를 음성 난소암 상태와 구별하는 컷-오프 또는 진단량(diagnostic amount)과 측정치를 비교하는 것을 포함한다. 진단량은 그 이상 또는 이하에서 대상이 특정의 난소암 상태를 가지고 있는 것으로 분류되는 바이오마커의 측정된 양을 나타낸다. 예를 들어, 헵시딘은 정상에 비해 난소암에서 상당히 조절되기 때문에, 진단적 컷오프보다 높은 헵시딘의 측정량은 난소암의 진단을 제공한다. 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 분석법에서 사용되는 특정의 진단적 컷-오프를 조정함으로써, 진단자의 선택에 의존하여 진단적 분석의 특이성 또는 감도를 증대시킬 수 있다. 특정의 진단적 컷-오프는, 여기에서 행해진 바와 같이, 예를 들어 상이한 난소암 상태를 가진 대상으로부터의 샘플의 통계적으로 유효한 수에서 바이오마커의 양을 측정하고, 진단자의 감도 및 특이성의 요구되는 수준에 적합하게 컷-오프를 이끌어내는 것에 의해, 결정할 수 있다.

[0171] 5.2. 마커의 조합

[0172] 개개의 바이오마커가 유용한 진단 바이오마커인 경우, 바이오마커의 조합이 단일 바이오마커 단독보다 특정 상태의 더 큰 예측치를 제공할 수 있음을 발견하였다. 구체적으로, 샘플 중 다수의 바이오마커의 검출은 테스트의 감도 및/또는 특이성을 증가시킬 수 있다. 적어도 2개의 바이오마커의 조합은 종종 "바이오마커 프로파일(biomarker profile)" 또는 "바이오마커 지문(biomarker fingerprint)"으로 언급된다. 따라서, 진단 테스트의 특이성 및/또는 감도를 향상시키기 위해서 헵시딘은 자궁암 또는 자궁내막암용의 다른 바이오마커와 조합될 수 있다.

[0173] 특히, 헵시딘 및 트랜스티레틴 양자의 측정을 포함하는 난소암 상태용 진단 테스트는 헵시딘 단독의 측정에 비해 더 큰 예측력을 가진 것으로 밝혀졌다. 나타난 바와 같이, 헵시딘 수준은 난소암에서 증가하고, 트랜스티레틴 수준은 감소한다. 적어도 3개의 바이오마커, 또는 일부의 경우에, 7개의 바이오마커를 결합하는 것은 헵시딘 및 트랜스티레틴 양자의 측정치보다 더 큰 예측력을 제공하는 것이 추가로 밝혀졌다. 더욱 상세하게는, 난소암 상태용 진단 테스트가 헵시딘, 트랜스티레틴 및 Apo A1, 트랜스페린, CTAP-III 및 ITIH4 단편 중 적어도 하나를 측정하고, 이러한 측정치를 난소암 상태와 서로 관련시키는 것을 포함하는 것이 계획된다. 또한, 4개의 전술한 바이오마커 중 임의의 하나와 함께, β 2-마이크로글로불린이 헵시딘 및 트랜스티레틴과 조합될 수 있도록 계획된다.

[0174] 일본인 코호트(Japanese cohort)의 샘플의 연구에서, 헵시딘, ApoA1, β 2 마이크로글로불린 및 CTAP-III의 조합은 진단적 조합에 특히 유효한 것으로 밝혀졌다.

[0175] 난소암의 진단은 통상적으로 CA125의 측정을 포함하며, 이러한 마커의 증가된 수준은 난소암과 연관된 것이다. 따라서, CA125의 수준은 난소암 상태를 측정함에 있어서 상기 마커들의 임의의 조합과 연관시킬 수 있다.

[0176] 헵시딘과 조합할 수 있는 다른 바이오마커들로는, 이에 한정되는 것은 아니지만, CA125, CA125 II, CA15-3, CA19-9, CA72-4, CA 195, 종양 관련 트립신 억제제(TATI), CEA, 태반 알칼린 인산효소(placental alkaline phosphatase)(PLAP), 시알릴(Sialyl) TN, 갈락토실트랜스퍼라아제, 마크로파지 과립구 자극 인자(M-CSF, CSF-1), 리소포스파티딘산(LPA), 표피 성장 인자 수용체의 세포외 도메인의 110 kD 성분(p110EGFR), 조직 칼리크레인, 예를 들어 칼리크레인 6 및 칼리크레인 10(NES-1), 프로스타신, HE4, 크레아틴 키나아제 B (CKB), LASA, HER-2/neu, 뇨중 고나도트로핀 펩티드, 디아논(Dianon) NB 70/K, 조직 펩티드 항원(TPA), 오스테오폰틴(osteopontin), 및 합토클로빈(haptoglobin), 렙틴(leptin), 프로락틴(prolactin), 인슐린 유사 성장 인자(insulin like growth factor) I 또는 II를 포함한다. CA125는 통상적으로 정밀검사의 일상적인 부분으로서 테스트된 CA125를 갖는 난소암에 대한 테스트를 수행하는 여성들에게 특히 유용하다.

[0177] **5.3. 난소암 상태**

[0178] 난소암 상태를 결정하는 것은 통상적으로 진단 테스트의 결과에 기초하여 개체를 둘 이상의 그룹(상태) 중 하나로 분류하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 진단 테스트는 다수의 상이한 상태를 분류하기 위하여 사용될 수 있다.

[0179] **5.3.1. 질환의 존재**

[0180] 한 구현예에서, 본 발명은 대상에서 난소암의 존재 또는 부재를 측정하기 위한 방법을 제공한다(상태 : 난소암 대 비-난소암). 난소암의 존재 또는 부재는 상응하는 바이오마커 또는 바이오마커들을 측정하고, 이어서 분류 알고리즘에 제시하거나 또는 이들을 특정의 위험 수준과 관련된 바이오마커의 패턴 및/또는 참고량(reference amount)과 비교함으로써 결정된다.

[0181] **5.3.2. 질환 진행의 위험 측정**

[0182] 한 구현예에서, 본 발명은 대상에서 난소암 진행의 위험을 측정하기 위한 방법을 제공한다(상태 : 저-위험 대 고-위험). 바이오마커의 양 또는 패턴은 다양한 위험 상태, 예를 들어 고, 중, 또는 저 위험 상태의 특성이다. 질환 진행의 위험은 상응하는 바이오마커 또는 바이오마커들을 측정하고, 이어서 이들을 분류 알고리즘에 제시하거나 또는 이들을 특정의 위험 수준과 관련된 바이오마커의 패턴 및/또는 참고량과 비교함으로써 결정된다.

[0183] **5.3.3. 질환의 단계 측정**

[0184] 한 구현예에서, 본 발명은 대상에서 질환의 단계를 측정하기 위한 방법을 제공한다. 질환의 각 단계는 바이오마커의 특징적인 양 또는 바이오마커들의 세트의 상대적인 양을 갖는다(패턴). 질환의 단계는 상응하는 바이오마커 또는 바이오마커들을 측정하고, 이어서 이들을 분류 알고리즘에 제시하거나 또는 이들을 특정의 단계와 관련된 바이오마커의 패턴 및/또는 참고량과 비교함으로써 결정된다. 예를 들어, 초기 단계 난소암 및 비-난소암 간이나, 또는 I기 난소암, II기 난소암 및 III기 난소암을 분류할 수 있다.

[0185] **5.3.4. 질환의 경과 (진행/완화) 측정**

[0186] 한 구현예에서, 본 발명은 대상에서 질환의 경과를 측정하기 위한 방법을 제공한다. 질환의 경과는 시간에 따른 질환의 상태의 변화를 의미하며, 질환의 진행(악화) 및 질환의 완화(개선)를 포함한다. 시간에 따라, 바이오마커의 양 또는 상대적인 양(예를 들어, 패턴)은 변한다. 예를 들어, 헵시딘은 질환이 있으면 증가하는 반면, 트랜스티레틴은 질환이 있으면 감소한다. 따라서, 이러한 마커의 동향, 질환 또는 비-질환에 대한 시간에 따른 증가 또는 감소는 질환의 경과를 나타낸다. 그에 따라, 본 방법은 대상에서 적어도 두 상이한 시점, 예를 들어, 제1 시간 및 제2 시간에 대한 하나 이상의 바이오마커를 측정하고, 만약 있다면, 양의 변화를 비교하는 것을 포함한다. 질환의 경과는 이러한 비교에 기초하여 측정된다.

[0187] **5.4. 상태 보고**

[0188] 본 발명의 추가의 구현예는 예를 들어, 기술자, 의사 또는 환자에게 분석 결과 또는 진단, 또는 양자를 정보전달(communication)하는 것에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 컴퓨터는 예를 들어 의사 및 그들의 환자와 같은 관심 있는 당사자들 모두에게 분석 결과 또는 진단, 또는 양자의 정보전달을 위해 사용될 것이다. 일부 구현예에서, 분석이 수행될 것이며 또는 분석 결과는 결과 또는 진단이 정보전달되는 지역 또는 관할과 상이한 지역 또는 관할에서 분석될 것이다.

[0189] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 표 1의 임의의 바이오마커의 테스트 대상에 차별적으로 존재하는 것에 기초한 진단은 진단이 얻어진 후 최대한 빨리 대상에 정보전달된다. 진단은 대상을 치료하는 의사에 의해 대상에게 정

보전될 것이다. 대안적으로, 진단은 이메일에 의해 테스트 대상에게 발송되거나, 전화에 의해 대상에게 정보 전달될 것이다. 컴퓨터는 진단을 이메일 또는 전화로 정보전달하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 진단 테스트의 결과를 포함한 메시지는 전기 통신업자에게 익숙한 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어의 조합을 사용하여 생성되고 대상에게 자동으로 전달될 수 있다. 건강관리-지향 정보전달 시스템의 한 예는 미국특허번호 제 6,283,761호에 기술되어 있으나; 본 발명은 이러한 특정의 정보전달 시스템을 사용하는 방법으로 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 방법의 일부 구체예에서, 샘플을 분석하고, 질병을 진단하고, 분석 결과와 진단을 정보전달하는 것을 포함하는 방법 단계의 전체 또는 일부는 다른(예를 들어 외국) 관할에서 수행될 수 있다.

[0190] 5.5. 대상 관리

[0191] 난소암 상태를 검정하는 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 상태에 기초한 대상 치료의 관리를 추가로 포함한다. 상기 관리는 난소암 상태의 측정에 이어 의사 또는 임상사의 행위를 포함한다. 예를 들어, 의사가 난소암의 진단을 행한 경우, 후속하여 처방 또는 화학 요법의 투여와 같은, 일정한 치료 요법이 뒤따른다. 선택적으로, 비-난소암의 진단 또는 비-난소암은 환자가 겪고 있을 법한 특정의 질환을 측정하기 위한 추가의 테스트가 후속한다. 또한, 진단 테스트가 난소암 상태에 관한 비확정적인 결과를 제공하는 경우, 추가의 테스트가 요구될 수 있다.

[0192] 6. 난소암 상태의 검정을 위한 분류 알고리즘의 생성

[0193] 일부 구현예에서, "공지된 샘플"과 같은 샘플을 사용하여 생성된 스펙트럼(예를 들어, 질량 스펙트럼 또는 비행 시간형 스펙트럼)으로부터 유도된 데이터는 이어서 분류 모델을 "트레이닝"하는데 사용될 수 있다. "공지된 샘플"은 미리 분류된 샘플이다. 스펙트럼으로부터 유도되고 분류 모델을 형성하는데 사용되는 데이터는 "트레이닝 데이터 세트"로 언급될 수 있다. 트레이닝 후에, 분류 모델은 비공지 샘플을 사용하여 생성된 스펙트럼으로부터 유도된 데이터에서 패턴을 인식할 수 있다. 이어서 분류 모델은 비공지 샘플을 클래스로 분류하는데 사용될 수 있다. 이는 예를 들어 특정 생물학적 샘플이 특정한 생물학적 조건(예를 들어, 질병화 대 비-질병화)과 관련되는지의 여부를 예측하는데 유용할 수 있다.

[0194] 분류 모델을 형성하는데 사용되는 트레이닝 데이터 세트는 미가공 데이터 또는 사전-가공된 데이터를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 미가공된 데이터는 비행 시간형 스펙트럼 또는 질량 스펙트럼으로부터 직접적으로 얻을 수 있고, 이어서, 전술한 바와 같이, 임의적으로 "사전-가공"될 수 있다.

[0195] 분류 모델은 데이터에 존재하는 대상 파라미터를 기초로 한 클래스로 데이터 본체(body)를 분리하는 임의의 적합한 통계적 분류(또는 "학습(learning)") 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 분류 방법은 관리되거나 비관리될 수 있다. 관리 및 비관리되는 분류 방법의 예는 Jain, "Statistical Pattern Recognition: A Review", *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, Vol. 22, No.1, (2000년 1월)에 기술되어 있으며, 이의 교시는 참고에 의해 도입된다.

[0196] 관리되는 분류에서, 공지된 카테고리의 예를 포함하는 트레이닝 데이터는 학습 메카니즘으로 나타내며, 이는 공지된 부류 각각을 규정하는 하나 이상의 관계 세트를 학습하는 것이다. 이어서 새로운 데이터는 학습 메카니즘에 적용될 수 있으며, 이후 학습된 관계를 사용하여 새로운 데이터를 분류한다. 관리되는 분류 공정의 예로는 선형회귀 공정(예를 들어 다중 선형회귀(MLR), 부분최소자승(PLS) 회귀 및 주성분 회귀(PCR), 이성분 결정 트리(예를 들어 CART와 같은 회귀분할 공정 -분류 및 회귀 트리), 역증식 네트워크와 같은 인공적 신경 네트워크, 판별 분석(예를 들어 베이에시안 분류자(Bayesian classifier) 또는 피셔 분석), 논리적 분류자 및 지지 벡터 분류자(지지 벡터 기계)를 포함한다.

[0197] 바람직한 관리되는 분류 방법은 회귀분할(recursive partitioning) 공정이다. 회귀분할 공정은 회귀분할 트리를 사용하여 공지되지 않은 샘플로부터 유도된 스펙트럼을 분류한다. 회귀분할 공정에 대한 상세한 설명은 미국특

허 제6,675,104호(Paulse 등, "Method for analyzing mass spectra")에서 제공된다.

- [0198] 다른 구체예에서, 생성되는 분류 모델은 비관리되는 학습법을 사용하여 형성될 수 있다. 비관리되는 분류는 트레이닝 데이터 세트가 유도되는 스펙트럼을 사전분류하지 않고, 트레이닝 데이터 세트에 있는 유사성을 기초로 한 분류를 학습하는 것을 시도한다. 비관리되는 학습 방법은 클러스터 분석을 포함한다. 클러스터 분석은 데이터를, 서로 매우 유사하고 다른 클러스터의 멤버와 매우 유사하지 않는 멤버를 이상적으로 가질 수 있는 군 또는 "클러스터"로 분리하는 것을 시도한다. 이어서 유사성은, 데이터 아이템과 서로 더 밀접한 데이터 아이템과 결합한 클러스터 간의 거리를 측정하는, 일부 거리 미터법(distance metric)을 사용하여 측정된다. 클러스터화 기술은 맥퀸의 K-수단(MacQueen's K-means) 알고리즘 및 코호넨의 자기-조직화 맵(Kohonen's Self-Organizing Map) 알고리즘을 포함한다.
- [0199] 생물학적 정보를 분류하는데 사용하기 위해 가정되는 학습 알고리즘은 예를 들어, PCT 국제공개번호 WO 01/31580호(Barnhill 등, "Methods and devices for identifying patterns in biological systems and methods of use thereof"), 미국특허출원 제2002 0193950 A1호(Gavin 등, "Method or analyzing mass spectra"), 미국특허출원 제2003 0004402 A1호(Hitt 등, "Process for discriminating between biological states based on hidden patterns from biological data"), 및 미국특허출원 제2003 0055615A1호(Zhang 및 Zhang, "Systems and methods for processing biological expression data")에 기재되어 있다.
- [0200] 분류 모델은 임의의 적합한 디지털 컴퓨터에서 형성되고 사용될 수 있다. 적합한 디지털 컴퓨터는 작동 시스템을 기초로 한 유닉스, 윈도우™ 또는 리눅스™와 같은 임의의 표준화 또는 특수한 운영 체제를 사용하는 마이크로, 미니, 또는 대형 컴퓨터를 포함한다. 사용되는 디지털 컴퓨터는 관심을 갖는 스펙트럼을 생성시키는데 사용되는 질량 분광계와 물리적으로 분리되거나, 또는 질량 분광계와 결합될 수 있다.
- [0201] 본 발명의 구현예에 따른 트레이닝 데이터 세트 및 분류 모델은 디지털 컴퓨터에 의해 실행되거나 사용되는 컴퓨터 코드에 의해 구현될 수 있다. 컴퓨터 코드는 광학적 또는 자기 디스크, 스틱, 테이프 등을 포함하는 임의의 적합한 컴퓨터 해독가능한 매체 상에 저장될 수 있고, C, C++, 비주얼 베이직 등을 포함하는 임의의 적합한 컴퓨터 프로그래밍 언어로 기록될 수 있다.
- [0202] 전술한 학습 알고리즘은 이미 발견된 바이오마커용 분류 알고리즘을 개발하거나, 또는 난소암용의 신규의 바이오마커를 탐색하는 것 모두에 유용하다. 분류 알고리즘은, 차례로, 단일 또는 조합하여 사용되는 바이오마커에 대해 진단 값(예를 들어, 컷-오프 포인트)을 제공함으로써 진단 시험에 대한 기준을 형성한다.
- [0203] 로지스틱 회귀 분석은 하기(더 작은 샘플 세트)의 실시예 4에 기재된 실험으로부터 생성된 데이터 상에서 수행되었다. 분석은 7개의 바이오마커:헵시딘, ITIH4 단편 1, CTAP-III, 트랜스티레틴, 트랜스페린, 베타-2 마이크로글로불린 및 Apo-A1에 기초하여 비-난소암으로부터 난소암을 구분하기 위한 분류 알고리즘을 생성하였다. 상기 알고리즘은 2 단계를 포함한다. 제1 단계에서 수는 하기 식에 기초한 테스트 샘플로부터 생성되었다.
- [0204]
$$\text{Logit} = -1.673 + 0.7349 \cdot \text{hepc} - 0.6252 \cdot \text{ITIH4conc} + 0.1458 \cdot \text{CTAP-III2} -$$
- [0205]
$$0.4923 \cdot \text{Itconc} - 0.5023 \cdot \text{TFR} - 0.1595 \cdot \text{M2B} + 0.0265 \cdot \text{Apo A1conc}$$
- [0206] 측정치는 표준화된 피크 강도 또는 분석물 농도(지정된 "cone")를 나타냈다. 제2 단계에서, 난소암을 갖는 대상으로부터 나온 샘플의 가능성은 식 : $e^{\text{Logit}} / (1 + e^{\text{Logit}})$ 에 의해 결정되었다. 이어서 테스트의 원하는 감도 또는 특이성에 기초하여 컷-오프가 적용된다. 컷-오프 수가 높을수록, 분석의 감도가 우수하다. 이러한 분석에서 사용된 특정의 수들은 사용된 장비 및 분석 조건에 의존하며, 분석이 세팅될 때마다 재조정될 필요가 있다.

[0207] **7. 요소의 조합(COMPOSITIONS OF MATTER)**

[0208] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커에 기초한 요소(matter)의 조합을 제공한다.

[0209] 한 구현예에서, 본 발명은 정제된 형태로 본 발명의 바이오마커를 제공한다. 정제된 바이오마커는 항체를 생성하기 위한 항원으로서 효용성을 갖는다. 정제된 바이오마커는 또한 분석 공정에서의 표준으로서 효용성을 갖는다. 여기에서 사용된, "정제된 바이오마커"는 다른 단백질 및 펩티드, 및/또는 바이오마커가 발견되는 생물학적 샘플로부터 유래한 다른 물질로부터 분리되어진 바이오마커이다. 바이오마커는 소변이나 혈청과 같은 생체액(biological fluid)으로부터 분리할 수 있다. 바이오마커는, 이에 한정되는 것은 아니지만, 기계적 분리(예를 들어, 원심분리), 황산암모늄 침전, 투석(사이즈-배제 투석을 포함함), 전기영동(예를 들어, 아크릴아미드 겔 전기영동) 사이즈-배제 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 및 메탈-킬레이트(metal-chelate) 크로마토그래피를 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 상기 방법은 임의의 적절한 스케일, 예를 들어 크로마토그래피 칼럼이나, 또는 바이오칩 상에서 수행될 수 있다.

[0210] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커와 특이적으로 결합하는, 선택적으로 정제된 형태로, 생체특이적 포획제를 제공한다. 한 구현예에서, 생체특이적 포획제는 항체이다. 상기 조합은 예를 들어, 진단용으로, 검출 분석에서 바이오마커의 검출을 위해 유용하다.

[0211] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커와 결합하는 생체특이적 포획제를 포함하는 물품을 제공하며, 여기서 상기 제제는 고체상(solid phase)에 결합된다. 예를 들어, 본 발명은 생체특이적 포획제로 유도된 비드, 칩, 막, 단일체(monolith), 마이크로역가 플레이트(microtiter plate)를 포함하는 장치를 고안한다. 상기 물품은 바이오마커 검출 분석에 유용하다.

[0212] 본 발명의 다른 측면에서는, 본 발명의 바이오마커에 결합되는, 항체와 같은 생체특이적 포획제를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 선택적으로 정제된 형태일 수 있다. 상기 조성물은 바이오마커의 정제용으로 또는 바이오마커를 검출하기 위한 분석에 유용하다.

[0213] 다른 구현예에서, 본 발명은 예를 들어, 크로마토그래피성 흡착제와 같은 흡착제 또는 생체특이적 포획제가 부착되거나, 본 발명의 바이오마커가 추가로 결합되는 고체 기질을 포함하는 물품을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 물품은 예를 들어, SELDI 프로브와 같은 질량 분광측정법용 프로브 또는 바이오칩이다. 상기 물품은 바이오마커의 정제용으로 또는 바이오마커의 검출용으로 유용하다.

[0214] **8. 난소암에 대한 바이오마커의 검출용 키트**

[0215] 다른 측면에서, 본 발명은 난소암 상태의 검출용 키트를 제공하며, 상기 키트는 본 발명에 따른 바이오마커를 검출하기 위해 사용된다. 한 구현예에서, 키트는 고체 지지체, 예를 들어, 칩, 마이크로역가 플레이트, 비드 또는 이에 부착된 흡착제를 갖는 수지를 포함하며, 여기서 포획제는 본 발명의 바이오마커와 결합한다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 키트는 SELDI용 질량 분광측정법 프로브, 예를 들어 ProteinChip® 어레이를 포함할 수 있다. 생체특이적 포획제의 경우에, 키트는 반응성 표면을 갖는 고체 지지체, 및 생체특이적 포획제를 포함하는 용기를 포함할 수 있다.

[0216] 키트는 또한 세척 용액 또는 세척 용액을 제조하기 위한 설명서를 포함하며, 여기서 포획제 및 세척 용액의 조합은 예를 들어 질량 분광측정법에 의한 후속의 검출용 고체 지지체 상의 바이오마커들이나 바이오마커를 포획할 수 있다. 키트는 흡착제 타입 이외의 것을 포함할 수 있으며, 각각은 상이한 고체 지지체 상에 존재한다.

[0217] 추가의 구현예에서, 상기 키트는 라벨 또는 별도의 삽입물 형태의 적절한 작동 파라미터용 설명서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 설명서는 샘플을 수집하는 방법, 프로브나 검출되는 특정 바이오마커를 세척하는 방법을 소비자에게 알려줄 것이다.

[0218] 또다른 구현예에서, 키트는 눈금용 표준으로서 사용될 수 있는 바이오마커 샘플을 구비한 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0219] 9. 약학적 약물의 치료효능을 측정

[0220] 다른 구현예에서, 본 발명은 약학적 약물의 치료 효능을 측정하기 위한 방법을 제공한다. 이러한 방법은 약물의 임상 시험을 수행하고, 약물에 대한 환자의 진척을 모니터링하는데 유용하다. 치료 또는 임상 시험은 특정의 요법으로 약물을 투여하는 것과 관련된다. 이러한 요법은 약물의 단일 투여량 또는 시간에 걸쳐 약물의 다중 투여량과 관련된다. 의사 또는 임상 연구자는 투여 경로에 따라 환자 또는 대상에서 약물의 효과를 모니터링한다. 약물이 병태에 대해 약리적인 효과를 갖는 경우, 본 발명의 바이오마커의 양 또는 상대적인 양(예를 들어 패턴 또는 프로파일)은 비-질환 프로파일 쪽으로 변한다. 예를 들어, 헵시딘은 질환과 함께 증가하는 반면, 트랜스티레틴은 질환에서 감소한다. 그러므로, 치료과정 중 대상에 있는 이들 바이오마커의 양의 경로를 따를 수 있다. 따라서, 이러한 방법은 약물 치료를 받고 있는 대상에서 하나 이상의 바이오마커를 측정하고, 바이오마커의 양을 대상의 질환 상태와 연관시키는 것을 포함한다. 본 방법의 한 구현예는 약물 치료 과정 중 둘 이상의 상이한 시점, 예를 들어 제 1 시간 및 제 2 시간에 바이오마커의 수준을 측정하고, 만약 있다면, 양의 변화를 비교하는 것을 포함한다. 예를 들어, 바이오마커는 약물 투여 전 및 후에, 또는 약물 투여 동안 두 상이한 시점에서 측정될 수 있다. 치료법의 효과는 이들 비교를 기초로 하여 결정된다. 치료가 효과적인 경우, 바이오마커는 정상으로 향할 것이며, 반면 치료가 비효과적인 경우, 바이오마커는 질병 지시쪽으로 향할 것이다. 치료가 효과적인 경우, 바이오마커는 정상쪽으로 향할 것이고, 반면 치료가 비효과적인 경우, 바이오마커는 질병 지시쪽으로 향할 것이다.

[0221] 10. 스크리닝 분석에서 난소암에 대한 바이오마커의 사용 및 난소암을 치료하는 방법

[0222] 본 발명의 방법은 또한 다른 적용을 갖는다. 예를 들어, 바이오마커는 시험관내 또는 생체내에서 바이오마커의 발현을 조절하는 화합물을 스크린하는데 사용될 수 있으며, 상기 화합물은 차례로 환자에서 난소암을 예방하거나, 또는 치료하는데 유용할 수 있다. 다른 예에서, 바이오마커는 난소암 치료에 대한 반응을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 바이오마커는 대상에서 난소암이 진행할 위험성이 있는지 여부를 결정하기 위한 유전형질 연구에 사용될 수 있다.

[0223] 치료적 시험에 적합한 화합물은 본 명세서에 나열된 하나 이상의 바이오마커 및 헵시딘과 상호작용하는 화합물을 동정하는 것에 의해 최초로 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 스크리닝은 바이오마커를 재조합으로 발현하고, 바이오마커를 정제하고, 바이오마커를 기질에 부착시키는 것을 포함할 수 있다. 이어서 테스트 화합물은 통상적으로 수성 조건에서 기질과 접촉될 것이며, 테스트 화합물과 바이오마커의 상호작용은, 예를 들어 염 농도의 함수로서 용리 속도를 측정함으로써 측정된다. 일부 단백질은 표 1의 하나 이상의 바이오마커를 인식하고 분열시킬 수 있으며, 이러한 경우에, 상기 단백질은 표준 분석에서 하나 이상의 바이오마커의 소화를 모니터링함으로써, 예를 들어 단백질의 겔 전기영동에 의해 검출될 수 있다.

[0224] 관련된 구현예에서, 하나 이상의 바이오마커의 능력을 억제하기 위한 테스트 화합물의 능력이 측정될 수 있다. 당업자는 특정 바이오마커의 활성을 측정하는데 사용되는 기술이 바이오마커의 기능 및 특성에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 적절한 기질이 이용가능한 경우 및 기질의 농도 또는 반응 생성물의 형태가 용이하게 측정가능한 경우 바이오마커의 효소 활성이 분석될 수 있다. 제공된 바이오마커의 활성을 억제하거나 향상시키는 잠재적으로 치료적 테스트 화합물의 능력은 테스트 화합물의 존재 또는 부재하에서 촉매작용의 속도

를 측정함으로써 측정될 수 있다. 헵시딘 또는 여기에 기재된 다른 하나 이상의 바이오마커의 비-효소적(예를 들어, 구조적) 기능 또는 활성을 방해하는 테스트 화합물의 능력을 또한 측정할 수 있다. 예를 들어, 헵시딘을 포함하는 다중-단백질 복합체의 자기-어셈블리는 테스트 화합물의 존재 또는 부재하에서 분광법에 의해 모니터링될 수 있다. 대안적으로는, 바이오마커가 전사의 비-효소적 향상제(enhancer)인 경우, 전사를 향상시키기 위해 바이오마커의 능력을 방해하는 테스트 화합물은, 테스트 화합물의 존재 또는 부재하에서 시험관내 또는 생체 내에서 바이오마커-의존 전사의 수준을 측정함으로써 확인될 수 있다.

[0225] 표 1의 임의의 바이오마커의 활성을 조절할 수 있는 테스트 화합물은 난소암 또는 다른 암으로 발전할 위험이 있거나 또는 고통받고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 특정 바이오마커의 활성을 증가시키는 테스트 화합물의 투여는 생체내 특정 바이오마커의 활성이 난소암에 대한 단백질의 축적을 예방하는 경우, 환자에서 난소암의 위험을 감소시킬 수 있다. 반대로, 특정 바이오마커의 활성을 감소시키는 테스트 화합물의 투여는, 바이오마커의 증가된 활성이 적어도 부분적으로 난소암 발병의 원인이 되는 경우에, 환자에게서 난소암의 위험을 감소시킬 수 있다.

[0226] 추가의 측면에서, 본 발명은 변형된 형태의 헵시딘의 증가된 수준과 관련된 난소암과 같은 질병의 치료용으로 유용한 화합물을 동정하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 한 구현예에서는, 세포 추출물 또는 발현 라이브러리가 전체 길이 헵시딘의 절단에 촉매작용을 하여 절단된 형태의 헵시딘을 형성하는 화합물에 대해 스크리닝될 수 있다. 이러한 스크리닝 분석의 한 구현예에서, 헵시딘의 절단은 헵시딘이 절단되지 않는 경우 반응종결(quench)된 채 남아있지만, 단백질이 절단된 경우 형광을 내는 헵시딘에 형광단(fluorophore)을 부착시킴으로써 검출될 수 있다. 대안적으로는, 아미노산 x 및 y 간에 있는 아마이드 결합이 절단되지 않도록 변형된 전체 길이 헵시딘의 버전은 생체내에서 이러한 사이트에 전체 길이 헵시딘을 절단하는 세포 단백질분해효소를 "트랩(trap)"하거나, 또는 선택적으로 결합시키는데 사용할 수 있다. 단백질분해효소 및 이들의 타겟을 스크리닝하고 동정하기 위한 방법은 과학문헌[예를 들어, Lopez-Ottin 등, (Nature Reviews, 3:509-519(2002))]에 기재되어 있다.

[0227] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 예를 들어, 절단된 헵시딘의 증가된 수준과 관련된, 난소암과 같은 질환의 가능성이나 진행을 감소시키거나, 치료하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 전체 길이 헵시딘을 절단하는 하나 이상의 단백질이 동정된 후, 결합 라이브러리들(combinatorial libraries)이 동정된 단백질의 절단 활성을 억제하는 화합물에 대해 스크리닝될 것이다. 상기 화합물에 대한 화학적 라이브러리들을 스크리닝하는 방법은 당업계에 공지이다. 예를 들어, Lopez-Otin 등 (2002)을 참조한다. 선택적으로, 억제 화합물들은 헵시딘의 구조에 기초하여 이성적으로 디자인될 수 있다.

[0228] 전체 길이 헵시딘은 신체의 철분 저장의 조절뿐 아니라, 유전성 혈색소침착증, 만성 신부전, 및 신장 빈혈증과 연관된 것으로 생각된다. 헵시딘 발현은 또한 인터루킹 연쇄반응(interleuking cascade)을 통한 신체의 면역 반응의 일부로서 유발된다. 헵시딘은 예비-프로(pre-pro) 및 프로- 폼(pro- form)으로부터 고도로 가공되기 때문에, 그를 타겟으로 하고 절단하는 단백질분해효소가 있을 것으로 생각된다. 따라서, 추가의 구현예에서, 본 발명은 타겟 단백질분해효소에 대한 절단된 헵시딘의 친화성을 증가시키는 화합물을 동정하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, 화합물은 헵시딘을 절단하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 이어서 헵시딘의 절단 또는 헵시딘과 상호작용하는 분자의 활성을 조절할 수 있는 테스트 화합물은 대상에서 난소암 및/또는 자궁내막암의 진행을 지연시키거나 중지시키는 능력에 대해 생체내에서 테스트될 수 있다.

[0229] 임상 수준에서, 테스트 화합물의 스크리닝은 대상이 테스트 화합물에 노출되기 전 및 후에 테스트 대상으로부터의 샘플을 입수하는 것을 포함한다. 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커의 샘플의 수준이 측정되고 테스트 화합물에 노출된 후 바이오마커의 수준의 변화 여부를 결정하기 위해 분석될 수 있다. 샘플은 본 명세서에 기재된 바와 같이, 질량 분광측정법에 의해 분석될 수 있거나, 또는 샘플은 기술분야의 당업자에게 공지된 임의의 적절한 수단에 의해 분석될 수 있다. 예를 들어, 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커의 샘플의 수준은 바이오마커에 특이적으로 결합하는 방사성- 또는 형광-표지된 항체를 사용한 웨스턴 블롯에 의해 직접적으로 측정될

수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 바이오마커를 코딩하는 mRNA의 수준의 변화가 측정되고 대상에게 제공된 테스트 화합물의 투여와 연관시킬 수 있다. 추가의 구현예에서, 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준에서의 변화가 생체내 방법 및 재료를 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 표 1의 하나 이상의 바이오마커를 발현할 수 있거나, 또는 발현하는 인간 조직 배양 세포를 테스트 화합물과 접촉시킬 수 있다. 테스트 화합물로 치료되어온 대상은 치료에 기인한 생리적 효과에 대해 일상적으로 검사될 것이다. 특히, 테스트 화합물은 대상에 있음직한 질환을 감소시키는 능력에 대해 평가될 것이다. 대안적으로, 테스트 화합물이 이전에 난소암으로 진단되었던 대상에게 투여되는 경우, 테스트 화합물은 질환의 진행을 지연시키거나 정지시키는 능력에 대해 스크리닝될 것이다.

[0230] 11. 실시예

[0231] 11.1. 실시예 1. 난소암에 대한 바이오마커의 발견

[0232] 여기에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시를 위한 것이며 그 견지에서 다양한 변경 및 변화가 기술 분야에서의 당업자에게 제안될 것이나 이들은 본 출원의 정신과 범위 및 첨부한 특허청구범위의 범주 내에 포함될 것으로 이해된다.

[0233] 샘플 : 혈청 및 소변 샘플을 MDACC 난소암 샘플 은행(MD Anderson)으로부터 입수하였다. 2000년에서 2004년까지 수술 전 암 환자로부터 샘플을 수집하고 -80℃에서 보관하였다. 샘플 분포는 다음과 같다 : 난소암(OvCa), 200; 자궁내막암, 50; 자궁경부암, 50 및 양성, 50. 전부는 아니지만 많은 OvCa 및 양성 혈청 및 소변 샘플은 동일한 환자로부터 유래하였다. 샘플들은 2 세트로 운용하였다. 제1 세트는 200 난소암 샘플 및 50 양성 샘플로 구성된다. 이는 최초 리스트의 후보 바이오마커를 제공한다. 이러한 후보 바이오마커의 종양-유형 특이성을 테스트하기 위해서, 50 자궁내막암 및 50 자궁경부암 샘플과, 50 양성 샘플과 함께, 난소암 샘플의 서브세트(50)를 분석하였다.

[0234] 혈청 프로파일링 : 혈청 프로파일링을 난소암 및 양성 샘플 상에서만 수행하였다. 프로파일링될 샘플을 함유하는 임의로 추출한 템플릿(template)을 CIPHERGEN Express 소프트웨어 프로그램을 사용하여 생성하였다. 종양 은행으로부터의 샘플을 얼음 상에서 해동시키고, 96 웰 플레이트에 가하고(배열을 위한 템플릿을 따라), 4000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 이어서 혈청의 부분표본(aliquot)을 신선한 96 웰 플레이트에 넣고 사용시까지 -80℃에서 보관하였다. 혈청 샘플을 트리플리케이트 ProteinChip 어레이상 Q10(하기 프로토콜 참조)에서 및 IMAC-Cu⁺⁺에서 프로파일링하였다. 모든 복제물(replicate)은 동일한 날에 제조하였고 PBS IIc(제조 다음 날 아침에 시작) 및 PCS4000(제조 후 2~3일에 시작)에서 관독하였다. 어레이는 Biomek 2000 로봇을 사용하여 샘플과 함께 처리하였다.

[0235] IMAC-Cu 혈청 프로파일링 프로토콜 : 혈청을 첫 번째로 요소 처리에 의해 변성시켰다. 5 µl 혈청을 96-웰 v-플레이트에서 7.5 µl 9M 요소 2% CHAPS 50mM Tris HCl pH 9에 가하였다. 플레이트를 테이프로 커버하고, Rm T에서 20분간 교반하였다. 237.5 µl의 결합 버퍼(50 mM 인산나트륨 버퍼, 250 mM NaCl, pH 6.0)를 각각의 웰에 가하고(= 1:50 희석) 잘 혼합하였다. 50 µl의 희석된 혈청을 다른 96-웰 v-플레이트에 가하고 150 µl의 결합 버퍼를 가하였다(= 1:200 희석). 웰당 50 µl의 50 mM CuSO₄를 가하여 IMAC 어레이를 예비-활성화하고 진탕 없이 10분간 RmT에서 인큐베이트하였다. 어레이를 1회 상하로 혼합하여 150 µl/스폿의 물로 세척하고, 이어서 스폿당 50 µl의 50 mM NaAc pH 4로 세척한 후, 진탕 없이 5분간 상온에서 인큐베이트하였다. 이어서 각각 1회씩 상하로 혼합하여, 150 µl 물/스폿으로 2회 세척하였다.

[0236] IMAC30 칩들을 결합 버퍼로 2회 평형시켰다. 상기 칩들을 진탕 없이 각각 5분간 인큐베이트하였다. 50 µl의 1:200 희석된 혈청을 각각의 웰에 가하고 진탕 없이 120분간 상온에서 인큐베이트하였다. 상기 칩들을 웰당 150 µl의 결합 버퍼로 3회 세척하고, 이어서 진탕 없이, "십 앤드 스픿(sip and spit)" 방식으로 3회 혼합하였다.

상기 칩들을 3개의 믹싱 사이클로 150 μ l의 물로 2회 세척하고, 이어서 바이오프로세서 저장소를 제거하였다. 물을 흡인기로 빨아내고, 상기 칩들을 10분간 공기 건조하였다. 50% 아세트니트릴 / 0.5% TFA 물 중 1 μ l의 SPA 매트릭스(12.5 mg/ml)를 스폿당 가하고, 상기 칩들을 10분간 공기 건조하였다. 적용을 반복하고, 상기 칩들을 밤새 공기 건조하였다.

[0237] *Q-10 혈청 프로파일링 프로토콜*: 샘플을 결합 버퍼로 희석하였다. 샘플 희석 : 1:250, pH 7.0, 100mM 인산염 버퍼(PB) 중 환자 혈청 샘플 희석. 상기 Q10 칩을 pH 7.0, 150 μ l의 100mM PB로 2회 전처리하고, 진탕 없이 5분간 인큐베이트하였다. 50 μ l의 1:250으로 희석된 환자 샘플을 각각의 웰에 가하였다. 상기 칩들을 원심분리기에 45초간 900rpm으로 회전시키고, 진탕 없이 상온에서 120분 인큐베이트하였다. 상기 칩들을 웰당 pH 7, 150 μ l의 100mM PB로 4회 세척하고, 각각의 세척에 대해 진탕 없이, 3회 "십 앤드 스폿" 방식으로 혼합하였다. 상기 칩들을 3개의 믹싱 사이클로 150 μ l의 물로 1회 세척하였다. 바이오프로세서 저장소를 제거하고, 물을 제거하고, 상기 칩들을 10분간 공기 건조하였다. 50% 아세트니트릴 / 0.5% TFA 물 중 1 μ l의 SPA 매트릭스(12.5 mg/ml)를 스폿당 가하고, 상기 칩들을 10분간 공기 건조하였다. 적용을 반복하고, 상기 칩들을 밤새 공기 건조하였다.

[0238] 소변 프로파일링 : 소변 프로파일링은 최초 세트(200 난소암 샘플 및 50 양성 샘플)뿐 아니라 제2 세트(50개 각각의 난소암, 양성, 자궁내막암, 및 자궁경부암) 양자 상에서 수행하였다. 중앙 은행으로부터의 샘플을 얼음 상에서 해동시키고, 96 웰 플레이트에 가하고(배열을 위한 전술한 템플릿을 따라), 4000rpm에서 20분간 원심분리하였다(최초의 냉동 및 샘플 은행에서의 보관 전에 소변은 원심분리된 적이 없음). 이어서 혈청의 부분표본을 신선한 96 웰 플레이트에 넣고 사용시까지 -80℃에서 보관하였다. 소변 프로파일링의 2개의 운용을 수행하였다. 제1 운용에서는, OvCa 및 양성 샘플만을 사용하였다. 샘플을 Q10에서 및 IMAC-Cu⁺⁺에서 프로파일링하였다. 혈청 프로파일링을 위해 생성된 동일한, 임의로 추출된 템플레이트를 사용하였으나; 환자의 소변 샘플과 매치되지 않는 일부 샘플이 있었고, 이런 경우, 다른 환자 샘플로 교체하였다. 소변 샘플을 듀플리케이트 ProteinChip 어레이 상에서 프로파일링하였다(하기 프로토콜 참조). 모든 복제물은 동일한 날 제조하였고, PBS IIc(제조 다음 날 아침에 시작) 및/또는 PCS4000(제조 후 2~3일에 시작)에서 판독하였다. 어레이는 Biomek 2000 로봇을 사용하여 샘플과 함께 처리하였다. 제2 운용에서는, 자궁내막암, 자궁경부암, 양성, 및 원래의 OvCa 샘플(제1 운용으로부터)의 서브그룹을 프로파일링하였다. 샘플을 Q10에서 및 IMAC-Cu⁺⁺에서 프로파일링하였다. 원래의 임의로 추출된 템플레이트를 다시 사용하였으나, 100개의 OvCa 샘플은 자궁내막암 또는 자궁경부암 소변 샘플로 대체하고, 50개의 원래 세트의 OvCa 샘플만을 포함하였다.

[0239] *CM10 소변 프로파일링 프로토콜* : 15 μ L의 소변 샘플을 23 μ L의 변성 버퍼 (9M 요소/2% CHAPS)에 가하고, 4℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 263 μ l의 결합 버퍼(BB), 100mM 아세트산나트륨 pH 4를 각각의 변성된 샘플에 가하고, 잘 혼합하였다. 칩 표면을 2회의 5분 BB 세척으로 제조하였다. 버퍼를 제거하고, 150 μ l의 희석된 소변 샘플을 각각의 웰에 가하고, 30분간 진탕하면서 상온에서 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하고, 적절한 스폿에 신선한 125 μ l의 동일한 희석된 샘플로 대체하고, 이어서 30분간 진탕하면서 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하고, 상기 칩을 5분 BB 세척으로 3회 세척하였다. 버퍼를 제거하고, 상기 칩을 물로 2회 급속히 세척하였다(인큐베이션 없음). 바이오프로세서 저장소를 제거하고, 상기 칩을 공기 건조하였다. 50% 아세트니트릴 / 0.5% TFA 물 중 1 μ l의 SPA 매트릭스(12.5 mg/ml)를 스폿당 가하고, 상기 칩을 10분간 공기 건조하였다. 적용을 반복하고, 상기 칩들을 밤새 공기 건조하였다.

[0240] *IMAC-Cu⁺⁺ 소변 프로파일링 프로토콜*: 15 μ L의 소변 샘플을 23 μ L의 변성 버퍼(9M 요소/2% CHAPS)에 가하였다. 샘플을 4℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 263 μ l의 결합 버퍼(BB), 100mM 인산나트륨 + 0.5 M NaCl pH 7를, 각각의 변성된 샘플에 가하고 잘 혼합하였다. 웰당 50 μ l의 50mM CuSO₄를 가하여 구리로 IMAC 칩을 제조하고 상온에서 10분간 인큐베이트하였다. 상기 칩을 150 μ l/스폿의 물로 1회 2분간 세척하고 스폿당 50 μ l의 50mM NaAc pH4로 5분간 인큐베이트하고, 이어서 150 μ l/스폿의 물로 1회 2분간 세척하였다. 물을 제거하고, IMAC30 칩을 결합 버퍼 BB로 5분간 2회 평형시켰다. 버퍼를 제거하고, 150 μ l의 희석된 소변 샘플을 가하였다. 상기 칩을 30분

간 진탕하면서 상온에서 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하고, 적절한 스폿에 신선한 125 μ l의 동일한 희석된 샘플로 대체하고, 상기 칩들을 30분간 진탕하면서 상온에서 인큐베이트하였다. 샘플을 제거하고, 상기 칩들을 5분간 BB로 3회 세척하였다. 버퍼를 제거하고, 상기 칩을 물로 2회 급속히 세척하였다(인큐베이션 없음). 바이오프로세서 저장소를 제거하고, 상기 칩을 공기 건조하였다. 50% 아세트오니트릴 / 0.5% TFA 물 중 1 μ l의 SPA 매트릭스(12.5 mg/ml)를 스폿당 가하고, 상기 칩을 10분간 공기 건조하였다. 적용을 반복하고, 상기 칩들을 밤새 공기 건조하였다.

[0241] 데이터 분석 : CiphergenExpress 소프트웨어를 사용하여 데이터를 얻었다. 질량 교정(mass calibration)은 외부 교정자(external calibrant)를 사용하여 수행하였고, 강도 표준화는 외부 표준화 요인을 사용한 전체 이온 전류에 기초하며, 기준선 삭감을 수행하였다. 피크 검출은 피크가 3:1의 신호/노이즈 비를 갖고 스펙트럼의 20%에 존재하여야 한다는 기준을 사용하여 CiphergenExpress 소프트웨어로 수행하였다. 만-화이트니(Mann-Whitney) 테스트(2개의 그룹, 예를 들어, 양성 대 난소암에 대해서) 또는 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis) 테스트(여러 그룹의 대조에 대해서, 예를 들어 양성 대 난소암 대 자궁내막암)를 사용하여 CiphergenExpress 소프트웨어로 통계적 분석을 수행하였다.

[0242] 결과 : 소변 샘플(200 난소암 및 50 양성 질환)의 분석으로부터의 데이터를 첫 번째로 분석하였다.

[0243] 테이블 2 : 양성 대 난소암을 비교할 때, 만-화이트니 테스트를 사용하여 $p < .05$ 로부터의 피크

[0244] 어레이	p 값	AUC	m/z
[0245] IMAC30	2.52E-04	0.664118	2785.654
[0246] IMAC30	8.01E-04	0.642618	2187.061
[0247] IMAC30	0.002658	0.642618	2431.063

[0248] $AUC > 0.5$ 는 양성 그룹에서보다 난소암 그룹에서 피크가 더 큰 것을 나타내는 반면, $AUC < 0.5$ 는 양성 그룹에서보다 난소암 그룹에서 피크가 더 낮은 것을 나타낸다.

[0249] 테이블 3 : 각각의 비교에 대해 $p < .05$ 의 피크. 양성 질환 및 자궁경부암에 대한 비교에 대해서 난소암 및 자궁내막암 특이적 마커는 $p < .05$ 의 피크로 정의된다.

조건	기준선	결량	p 값: 난소 대			중간값 강도(Median intensity)			
			양성	자궁경부	자궁내막	양성	자궁경부	자궁내막	난소
난소 및 자궁내막암 마커									
IMAC low	5	2193.623	0.0023	0.0211	0.5997	10.83	15.54	23.58	28.63
CM10 low	5	2194.852	0.0061	0.0012	0.0855	21.61	20.34	29.83	47.21
CM10 low	5	2434.871	0.002	0.0936	0.5628	5.459	13.16	16.13	22.21
IMAC low	5	2437.971	0.0619						
IMAC low	5	2664.621	0.01	0.0045	0.1311	1.468	1.437	1.755	2.076
CM10 low	5	2664.983	0.0001	0.0001	0.0132	4.211	3.612	7.373	10.96
IMAC low	5	2792.399	0.0011	0.0311	0.9721	2.37	5.568	10.73	13.55
CM10 low	5	2793.231	0.002	0.0004	0.0578	7.158	5.549	14.51	40.42

[0251] 난소암에 대한 이러한 피크들의 특이성을 측정하기 위해서, 다양한 부인과적 암(50 난소암, 50 자궁내막암, 및 50 자궁경부암) 및 양성 골반 질환(n=50)으로부터의 소변 샘플을 프로파일링하였다. 여러 그룹간의 유의성에 대해서 테스트하기 위해 크루스칼-윌리스 테스트를 사용한 점을 제외하고는, 제1 세트에 대해서 프로파일링 및 데이터 분석을 수행하였다.

[0252] 소변 샘플에 대해서 혈청 샘플로부터 얻은 데이터의 분석을 수행하였다. 테이블 3은 IMAC ProteinChip 어레이를 사용한 혈청 분석으로부터 얻은 유의한 피크($p < .05$, 양성 대 난소암을 비교하기 위하여 만-화이트니 테스트를 사용)를 나타낸다. 상기와 같이, $AUC < 0.5$ 는 난소암에서 피크가 하향 조절(down-regulated)된 것을 나타내는 반면, $AUC > 0.5$ 는 난소암에서 피크가 상향 조절(up-regulated)된 것을 나타낸다. 이러한 피크들은 전술한 헵시딘의 형태를 나타내는 것으로 확인되었다. 2789.4에서의 피크는 헵시딘-25이다.

[0253] 테이블 4

[0254] 질량 P 값 AUC ID 코멘트

[0255] 2789.4 0.0000069 0.70 헵시딘

[0256] 11.2. MD 앤더슨(MD Anderson) 소변 샘플로부터의 2789의 정제 및 동정:

[0257] 소변 샘플을 MDACC 난소암 샘플 은행으로부터 입수하였다. 샘플을 2000년에서 2004년까지 수술 전 암 환자로 부터 수집하고 -80°C 에서 보관하였다. 샘플 분포는 다음과 같다 : 난소암(OvCa), 200; 자궁내막암, 50; 자궁경부암, 50 및 양성, 50. 샘플들은 2 세트로 운용하였다. 실험 #1 : 제1 세트는 200 난소암 샘플 및 50 양성 샘플로 구성된다. 이는 최초 리스트의 후보 바이오마커를 제공한다. 샘플을 CM10 및 IMAC-Cu 양자에서 프로파일링하였다. 실험 #2 : 이러한 후보 바이오마커들의 종양-유형 특이성을 테스트하기 위해서, 50 자궁내막암 및 50 자궁경부암 샘플과, 50 양성 샘플과 함께, 난소암 샘플의 서브세트(50)를 분석하였다. 샘플을 CM10 및 IMAC-Cu 양자에서 프로파일링하였다.

[0258] 1.0ml의 소변을 구리로 미리 로드된(pre-loaded) 375ul의 IMAC HyperCel (Biosepra) 비드에 가하고, 1시간 동안 4°C 에서 인큐베이트하였다. 상기 비드를 350ul의 100mM NaPO_4 , pH7로 1회, 100mM NaAc, pH5로 2회, 유기 용매(33.3% 아세트ونی트릴, 16.7% 이소프로판올 및 0.1% TFA)로 2회 세척하였다. 2789 Da 마커의 대부분은 유기 세척제에 존재하였다. 5ul를 NP20 칩(Ciphergen C553- 0043) 상에 가하였다. 2789 Da이 가해진 상기 NP20 칩을 SPA(Ciphergen C300-0002)로 처리하고 ProteinChip Interface(Ciphergen Z200-0003)가 장착된 MicroMass Q-TOF에 로드했다. $130\text{mJ}/\text{mm}^2$ 의 평균 펄스 유도(fluence)를 전달하는, 초당 30 펄스로 작동되는 펄스된 질소 레이저(Laser Science Inc. VSL 337 NDS, Franklin, MA)를 사용하여 이온을 생성하였다. 10 밀리토르의 압력에서, 질소 가스를 형성된 이온의 충돌 냉각(collisional cooling)을 위해 사용하였고, 모든 낮은 에너지 충돌-유도 해리 실험에 대해 아르곤을 충돌 가스로 사용하였다. 전술한 CHCA 매트릭스 시스템을 산 가수분해 산물의 직렬 분석을 위해 사용하였다. 적용된 충돌 에너지는 일반적으로 50eV/kDa의 범칙에 따랐고, 각각의 획득은 통상적으로 5분의 스펙트럼의 합이다. MS 및 MS/MS 모드에 대해서, 상기 시스템은 공지된 펩티드들의 혼합물을 사용하여 외부적으로 조정되었다. CID 스펙트럼을 부드럽게 하고(smoothed), 센트로이드로 하고(centroided), 시퀀스 파일(sequest file)로 익스포트하였다. 단백질 동정을 Matrix Science Mascot Program(<http://www.matrixscience.com>에서 온라인으로 입수가가능)을 사용하여 수행하였다.

[0259] 11.3. JHU 혈청 샘플로부터의 2789의 정제 및 동정:

[0260] 전체 178개의 보관된 혈청 표본을 Johns Hopkins Medical Institutions에서 기관의 승인을 얻어 수집하였다. 샘플 세트는 40 건강한 여성(연령, 평균 $\pm$ SD, 42 ± 7 세), III기/IV기(23/17 건) 난소암에 걸린 40 환자(연령, 평균 $\pm$ SD, 56 ± 14 세), 각각 0기/I기/II기/III기(3/5/8/3 건) 유방암(연령, 평균 $\pm$ SD, 54 ± 15 세)에 걸리거나 또는 I기/II기/III기(1/10/8 건) 결장암(연령, 평균 $\pm$ SD, 69 ± 16 세)에 걸린 19 환자의

그룹, 각각 I기/II기/III기(1/12/7 건) 전립선암(연령, 평균 $\pm$ SD, 58 $\pm$ 8 세)에 걸리거나, II기/III기(4/16 건) 췌장암(연령, 평균 $\pm$ SD, 66 $\pm$ 8 세)에 걸린 20 환자, 또는 당뇨병(연령, 평균 $\pm$ SD, 52 $\pm$ 18 세)의 표본을 포함하였다. 유방암, 결장암, 췌장암, 및 당뇨병을 가진 모든 환자들은 여성이었다. 상기 혈청 샘플 모두는 수집 후 즉시 가공하고, 사용시까지 -70°C에서 보관하였다. 추가로, III기/IV기 난소암(연령, 평균 $\pm$ SD, 57 $\pm$ 13 세)을 가진 3 환자로부터의 3 쌍의 혈장 및 혈청 샘플 및 건강한 대조군으로부터의 한 혈청 샘플을 새로 수집하고 즉시 가공하였다. 혈장 준비를 위해 BD Plus Plastic K2EDTA 튜브를 사용하였다. 모든 표본은 치료 전 및 수술 전에 입수하였다.

[0261] 7.5mg의 토끼 항-ITI4 항체(MNFRPGVLSSRQLGLPGPDVDPDHAAYHPF(서열식별번호: 26)에 대해 특이적인 주분형 항체)를 12.5ml의 AminoLink® 커플링 비드(Pierce P/N 20501B)에 연결하였다. 70ul 혈청 샘플을 0.05% Tween과 함께 630ul의 PBS pH 7.2로 희석하고 70ul의 항-ITI4 비드 상에 로드했다. 40°C에서 밤새 인큐베이션 후, 상기 비드를 1ml의 PBS + 0.1% Tween 버퍼로 3회 세척에 이어 1ml의 물로 1회 세척하였다. 이어서 상기 비드를 50ul의 유기 용출액(33.3% 이소프로판올/ 16.7% 아세토니트릴/ 0.1% 트리플루오로아세트산)으로 3회 용출하였다. 흐름(flow through) 및 유기 용리액과 함께 3개의 PBS 세척한 것을 PBS II ProteinChip 리더를 사용하여 IMAC30-구리 ProteinChip 어레이(Ciphergen C553-0078) 상으로 프로파일링하였다. 상기 2789 Da 단백질은 흐름뿐 아니라 모든 3개의 PBS 및 유기 용리액에도 존재하였다. IP로부터의 흐름 분획을 YM10 막(Millipore 42407) 상으로 로드하고, YM10으로부터의 50ul의 흐름 분획을 IMAC 30 구리(Ciphergen C553-0078) 어레이에 프로파일링하였다. 상기 IMAC30-구리 어레이를 SPA (Ciphergen C300-0002)로 처리하고, 직렬 질량 분광측정법을 위해 Ciphergen Interface(Ciphergen Z200-0003)가 장착된 Q-TOF에 로드하였다. 또한, IP로부터의 800ul 용리액을 YM10 막(Millipore 42407)에 로드하였다. YM10 막으로부터의 흐름 분획을 건조시키고 50ul의 50% 아세토니트릴에서 재수화하였다. 이러한 농축된 용리액 1ul를 매트릭스로서 SPA와 함께 NP 20 칩에 적용하였다. 이러한 NP 20 칩을 직렬 질량 분광측정법을 위해 Ciphergen Interface가 장착된 Q-TOF에 로드하였다. MS/MS 실험을 위해, 스펙트럼을 Ciphergen (Fremont, CA) ProteinChip 어레이 인터페이스(ProteinChip Qq-TOF)가 장착된 Micromass QTOF II 직렬 질량 분광계에 획득하였다. 130mJ/mm²의 평균 펄스 유도를 전달하는, 초당 30 펄스로 작동되는 펄스된 질소 레이저(Laser Science Inc. VSL 337 NDS, Franklin, MA)를 사용하여 이온을 생성하였다. 10 밀리토르의 압력에서, 질소 가스를 형성된 이온의 충돌 냉각(collisional cooling)을 위해 사용하였고, 모든 낮은 에너지 충돌-유도 해리 실험에 대해 아르곤을 충돌 가스로 사용하였다. 전술한 CHCA 매트릭스 시스템을 산 가수분해 산물의 직렬 분석을 위해 사용하였다. 적용된 충돌 에너지는 일반적으로 50eV/kDa의 범칙에 따랐고, 각각의 획득은 통상적으로 5분의 스펙트럼의 합이다. MS 및 MS/MS 모드에 대해서, 상기 시스템은 공지된 펩티드들의 혼합물을 사용하여 외부적으로 조정되었다. CID 스펙트럼을 부드럽게 하고, 센트로이드로 하고, 시퀀스트 파일로 익스포트하였다. 단백질 동정을 Matrix Science Mascot Program(<http://www.matrixscience.com>에서 온라인으로 입수가능)을 사용하여 수행하였다.

[0262] 11.4. MD 앤더슨 혈청 샘플로부터의 2789의 정제 및 동정:

[0263] 160ul의 혈청 샘플을 240ul의 9M 요소, 50mM Tris, pH9, 2% CHAPS로 4°C에서 20분간 변성시켰다. 변성된 혈청을 720ul의 Q-hyper-DF 비드(Biosepra 20078) 상으로 로드하고 4°C에서 40분간 인큐베이트하였다. 12 분획을 감소하는 단계의 pH 구배로 수집하였다. 상기 분획을 PBS II ProteinChip 리더를 사용하여 CM10 ProteinChip 어레이(Ciphergen C553-007)에서 프로파일링하였으며, 2789 Da 단백질은 흐름에 존재하였다. 이어서 흐름의 pH를 IM HOAc에 의해 pH4로 조정하고, 50ul를 CM10 칩에 로드하였다. 이러한 CM10을 SPA (Ciphergen C300-0002)로 처리하고 직렬 질량 분광측정법을 위해 Ciphergen Interface(Ciphergen Z200-0003)가 장착된 Q-TOF에 로드하였다. MS/MS 실험을 위해, 스펙트럼을 Ciphergen (Fremont, CA) ProteinChip 어레이 인터페이스(ProteinChip Qq-TOF)가 장착된 Micromass QTOF II 직렬 질량 분광계에 획득하였다. 130mJ/mm²의 평균 펄스 유도를 전달하는, 초당 30 펄스로 작동되는 펄스된 질소 레이저(Laser Science Inc. VSL 337 NDS, Franklin, MA)를 사용하여 이온을 생성하였다. 10 밀리토르의 압력에서, 질소 가스를 형성된 이온의 충돌 냉각(collisional cooling)을 위해 사용하였고, 모든 낮은 에너지 충돌-유도 해리 실험에 대해 아르곤을 충돌 가스로 사용하였다. 전술한 CHCA 매트릭스 시스템을 산 가수분해 산물의 직렬 분석을 위해 사용하였다. 적용된 충돌 에너지는 일반적으로 50eV/kDa의 범칙에 따랐고, 각각의 획득은 통상적으로 5분의 스펙트럼의 합이다. MS 및 MS/MS 모드에 대해서, 상기 시스템은 공지된 펩티드들의 혼합물을 사용하여 외부적으로 조정되었다. CID 스펙트럼을 부드럽게

하고, 센트로이드로 하고, 시퀀스 파일로 익스포트하였다. 단백질 동정을 Matrix Science Mascot Program(<http://www.matrixscience.com>에서 온라인으로 입수가능)을 사용하여 수행하였다.

[0264] 11.5. 실시예 2. 난소암에 대한 바이오마커의 발견

[0265] 이전의 연구는 인터-알파 트립신 억제제 중쇄 4(ITIH4, 또한 종종 ITIH4로 언급됨)의 단편을, 난소암을 검출할 때 식별력을 가진 바이오마커로 동정하였다. 본 실시예는, ITIH4 단편과 동시-침전(co-precipitate)하는 임상 혈청 샘플에 있는 단백질들의 발현을 사용하여 구성된 상관관계 네트워크를 분석하였다.

[0266] 제1 분석은 142 혈청 샘플(41 샘플의 난소암, 41 샘플의 건강한 대조군, 및 각각 20 샘플의 유방암, 직장결장암, 및 전립선암)의 패넬을 사용하여 행해졌다. 발현 데이터는 ITIH4 3272 m/z 단편에 대해 생성된 다클론(polyclonal) 항체를 사용하여 면역침전/하강(immunoprecipitation/pull-down)을 통해 트리플리케이트로 생성되었고, 표면-강화된 레이저 탈착/이온화 질량 분광측정법이 후속하였다. 확인을 위해서, 두 추가적인 사이트(site)로부터의 샘플을 유사하게 가공하였다. 제1 세트는 114 난소암 샘플(16 치료전, 17 치료후, 37 암이 없는 모니터링 케이스, 및 30 재발된 케이스)로 구성된다. 제2 세트는 11 난소암 케이스, 16 양성 케이스, 및 30 건강한 대조군이였다.

[0267] 상관관계 네트워크 분석을 사용하여, ITIH4 단편에 더하여, 상향 조절되고 41 난소암 케이스 중 밀접하게 관련되거나, 불충분하게 발현되고 건강한 대조군 및 다른 암 샘플 중 최소로 관련된 4 피크의 그룹을 발견하였다. 이러한 피크들은 헵시딘의 변형체로서 추가로 동정되었다. 도 2는 4개의 관련된 단편, 헵시딘-25, 헵시딘-24, 헵시딘-22, 및 헵시딘-20을 포함하여, 다양한 헵시딘 단편의 서열을 나타낸다.

[0268] 142 샘플 중에서, 수신자 동작 특성(receiver-operating-characteristic) (ROC) 곡선 분석은, 전체 길이 헵시딘에 대응하는 피크가, 건강한 대조군으로부터 난소암을 분리하는 경우(도 1 참조) 0.876(95% CI: 0.795-0.957), 3 유형의 암으로부터 난소암을 분리하는 경우(도 4 참조) 0.774(0.678-0.871)의 곡선 아래 면적(AUC)을 가짐을 나타냈다. 제1 확인 세트에서, 헵시딘은 치료후 및 암이 없는 모니터링 그룹(AUC = 0.756 (0.702-0.811))에서보다 치료전 및 재발 그룹에서 더 높았고, 재발된 케이스는 가장 높은 헵시딘 수준을 가졌다(도 5 참조). 제2 확인 세트에서, 양성 및 건강한 대조군으로부터 난소암을 분리하는 경우, AUC는 0.722(0.693-0.851)이었다(양자의 확인 세트에 대하여, 모든 트리플리케이트는 분석에 포함되었다;도 5 참조). 예비 결과는 헵시딘 및 ITIH4 단편이 결합 파트너임을 나타냈다.

[0269] 제1 접근법에서, 10ul의 혈청을 0.05% 트리톤(Triton)으로 된 90ul PBS에서 10ul의 ITIH4 비드에 가하였다. 상기 비드를 4℃에서 밤새 인큐베이트하였다. 이 단계에서, 흐름(100ul)을 제거하고, 5ul를 IMAC 및 CM10 칩에서 분석하였다. 상기 비드를 0.1% 트리톤으로 된 150ul PBS로 3회 세척하였다. 각각의 세척 후, 20ul의 세척 버퍼를 제거하고, IMAC 및 CM10 칩에서 분석하였다. 상기 비드를 각각의 세척 후 50ul 유기 용출 버퍼로 용출하였다. 이어서 50ul의 전체 용리액을 IMAC 및 CM10 칩에서 분석하였다. 제2 접근법에서, ITIH4 IP 흐름 분획 A13으로부터의 샘플을 농축하고 IMAC 칩에서 분석하였다.

[0270] 도 3은 ITIH4 단편에 대한 항체를 사용하여 면역침전/하강 후 혈청 샘플의 SELDI 스펙트럼을 나타낸다. 직사각형 라벨에 있는 피크는 ITIH4의 공지의 단편이다. 발견된 4개의 헵시딘 변형체들은 대략 m/z 위치 2191, 2436, 2673, 및 2788(화살표로 나타냄)에서 이 스펙트럼 내에 있다. 상관관계 네트워크 분석은 4개 피크(m/z 2191, 2436, 및 2788)가 그들 사이에 매우 관련되어 있고, 난소암 환자로부터의 혈청 샘플에 있는 ITIH4 단편의 그룹과 역으로 관련되어 있음을 나타냈다. 상관관계는 건강한 대조군 사이만큼 강하지 않았다. 유사한 상관관계 네트워크 분석을 난소암, 전립선암, 유방암, 및 건강한 대조군 간 수행하였다. 4개의 피크 가운데 가장 강한 상관관계는 난소암과의 것이었다. 도 6은 헵시딘 변형체를 표시하는 4개의 피크 중 2개에 있는 샘플의 5개 그룹의 산란플롯을 나타낸다. 도 7은 2개의 헵시딘 피크를 사용하여 독립적인 확인 세트로부터 환자의 5개 그룹의 산란

플롯을 나타낸다. 이는 이러한 피크들이 암이 없는 환자 및 치료 후의 환자들에서 더 낮고, 난소암 치료전의 환자와 난소암이 재발된 환자들에서 더 높음을 나타낸다. 헵시딘 수준은 종양 양(tumor load)과 서로 관련된다. 도 8은 2개의 헵시딘 피크를 사용하여 제2의 독립적인 확인 세트로부터 환자의 5개 그룹의 산란플롯을 나타낸다. 이는 이러한 피크들이 건강한 대조군 및 양성 질환을 가진 환자들에서 더 낮고, 난소암을 가진 환자들에서 더 높음을 나타낸다.

[0271] 11.6. 실시예 3. 큰 샘플 세트를 사용한 바이오마커 분석

[0272] 난소암 마커로서 헵시딘의 품질을 더 평가하기 위하여, 큰 다중-규격화된(multi-institutional) 연구를 수행하였다. 5 사이트로부터의 전체 607 혈청 샘플을 7 바이오마커에 대해 최적화된 SELDI TOF-MS 프로토콜을 사용하여 분석하였다. 이들은 양성 부인과 질환을 가진 234 여성, 및 침습성 상피 난소암(초기 단계 101, 말기 단계 231, 밝혀지지 않은 단계 40)을 가진 373 환자를 포함한다. 이들 중, 165 양성 및 228 암은 분석의 시점에서 가능한 CA125를 가졌다. 양성, 초기 단계, 및 말기 또는 밝혀지지 않은 단계에 대한 CA125의 중간값 및 4분위수는 각각 26/11/57 IU, 80/22/434 IU, 및 234/40/1114 IU이었다. 바이오마커들은 만-화이트니 U 테스트를 사용하여 개별적으로 평가되었다. 선형 복합 지수(linear composite index)를 한 사이트로부터의 데이터를 사용하여 비지시된 방식으로 유도하고, 이어서 고정된 식을 사용하여 남아있는 데이터에 대해 계산하였다. 개별적인 사이트 및 결합된 모든 사이트로부터의 데이터 상에서 ROC 곡선 분석을 수행하였다.

[0273] 5개의 사이트로부터의 607 혈청 샘플의 전체를 7개의 바이오마커인 헵시딘-25(M2789), 시스테이닐화 트랜스티레틴, Apo A1(M28043), 트랜스페린 (M79K), CTAP-III(M9313.9), ITIH4 단편 1(M3272) 및 β -마이크로글로불린(M11.7K) ("7개의 마커 패널")에 대해 최적화된 SELDI TOF-MS 프로토콜을 사용하여 분석하였다. 이들은 양성 부인과 질환을 가진 234 여성, 및 침습성 상피 난소암(초기 단계 101, 말기 단계 231, 밝혀지지 않은 단계 40)을 가진 373 환자를 포함한다. 이들 중, 165 양성 및 228 암은 분석의 시점에서 가능한 CA125를 가졌다. 양성, 초기 단계, 및 말기 또는 밝혀지지 않은 단계에 대한 CA125의 중간값 및 4분위수는 각각 26/11/57 IU, 80/22/434 IU, 및 34/40/1114 IU이었다. 바이오마커들은 만-화이트니 U 테스트를 사용하여 개별적으로 평가되었다. 선형 복합 지수를 한 사이트로부터의 데이터를 사용하여 비지시된 방식으로 유도하고, 이어서 고정된 식을 사용하여 남아있는 데이터에 대해 계산하였다. 개별적인 사이트 및 결합된 모든 사이트로부터의 데이터 상에서 ROC 곡선 분석을 수행하였다. 7개의 바이오마커 모두 통계적으로 유의한 식별력이 개별적으로 증명되었고, 대다수는 p -값 < 0.00001 을 가졌다. 6 사이트에 대한 ROC 분석에서 복합 지수의 AUC는, 양성으로부터 모든 단계에서 암을 검출함에 있어서 0.602, 0.566, 0.821, 0.813, 및 0.592이었다. 결합된 데이터에서, 지수 및 CA125 간 AUC의 차이는, 모든 단계(AUC=0.706 대 0.725) 또는 초기 단계(AUC=0.534 대 0.653)만에서의 암의 검출에 대해서 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나, 지수는 고-감도 구역에서 더 나았다. 86%의 고정된 감도에서, 지수의 특이성은 CA125의 26%(42/163)에 비교하여 34%(77/226)였다. 초기 단계 케이스에 대해서, 84%의 고정된 감도에서, 지수의 특이성은 CA125의 14%(22/163)에 비교하여 24%(55/226)였다.

[0274] 11.7. 실시예 4. 작은 샘플 세트를 사용한 바이오마커 분석

[0275] 난소 병리학에 대해 평가되고 있는 202명의 속발성(consecutive) 환자로부터의 수술전(pre-operative) 혈청 샘플을 부분표본으로 하고, 수집 6시간 이내에 냉동하였다. 상기 혈청 샘플을 7 마커 패널에 대해서 SELDI-TOF-MS 프로테오믹스 분석을 사용하여 평가하였다. 모델을 트레이닝하기 위해서 126 샘플들을 사용하였고, 나머지 샘플들은 맹검 시험을 위해 사용하였다. 202 환자들 중, 132명은 양성 질환(자궁내막증, 양성 골반 낭포, 자궁 섬유종을 포함함)을 갖고 있었고, 11명은 경계선 종양을 갖고 있었고, 50명은 침습성 상피 난소암을 갖고 있었고, 3명은 생식 세포 종양을 갖고 있었고, 나머지들은 전이성 비-부인과 암을 갖고 있었다. 양성 질환 그룹의 평균 연령은 48.3세(범위 20-84세), 침습성 난소암 그룹의 경우 65.1세(범위 40-89세)였다.

[0276] 난소 병리학에 대해 평가되고 있는 202명의 속발성(consecutive) 환자로부터의 수술전(pre-operative) 혈청 샘플을 부분표본으로 하고, 수집 6시간 이내에 냉동하였다. 상기 혈청 샘플을 7 마커 패널에 대해서 SELDI-TOF-MS 프로테오믹스 분석을 사용하여 평가하였다. 모델을 트레이닝하기 위해서 126 샘플들을 사용하였고, 나머지 샘플들은 맹검 시험을 위해 사용하였다. 202 환자들 중, 132명은 양성 질환(자궁내막증, 양성 골반 낭포, 자궁 섬유

종을 포함함)을 갖고 있었고, 11명은 경계선 종양을 갖고 있었고, 50명은 침습성 상피 난소암을 갖고 있었고, 3명은 생식 세포 종양을 갖고 있었고, 나머지들은 전이성 비-부인과 암을 갖고 있었다. 양성 질환 그룹의 평균 연령은 48.3세(범위 20-84세), 침습성 난소암 그룹의 경우 65.1세(범위 40-89세)였다. 트레이닝 세트에서, CA125는 100%(95% CI: 88.1-100.0%)의 감도 및 63.3% (95% CI: 52.2-73.3%)의 특이성을 가진 반면, 테스트 세트에서, CA125는 95.0% (95% CI: 75.1 - 99.9%)의 감도 및 67.5% (95% CI: 50.9-81.4%)의 특이성을 가졌다. 7개의 마커 및 CA125를 병합한 다중변형 알고리즘은 트레이닝 세트에서 86.2% (95% CI: 68.3 - 96.1%)의 감도 및 94.4% (95% CI: 87.5-98.2%)의 특이성을 가졌고, 테스트 세트에서 80.0% (95% CI: 68.3 - 96.1%)의 감도 및 90.0% (95% CI: 76.4-97.2%)의 특이성을 가졌다. 7개의 마커 패널은 지속성 골반 종괴(pelvic mass)에 대해 평가되고 있는 환자 선별을 돕는데 유용할 수 있다. 이러한 마커 패널은, 비록 CA125의 감도를 감소시키지만, 특이성을 향상시킨다.

[0277] 하기 패널에 대해서, 감도는 95% CI 65.4% ~ 95.1%로 85.2%; 특이성은 95% CI 89.9% ~ 99.1%로 96.7%이다.

[0278] 3 마커:

[0279] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4

[0280] Apo, 트랜스티레틴, 트랜스페린

[0281] 4 마커:

[0282] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4, 트랜스페린

[0283] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4, CTAP-III

[0284] 5 마커:

[0285] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4, 트랜스페린, CTAP-III

[0286] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4, 트랜스페린, β 2 마이크로글로불린

[0287] 6 마커:

[0288] Apo, 트랜스티레틴, ITIH4, 트랜스페린, CTAP-III, β 2 마이크로글로불린

[0289] 하기 패널에 대해서, 감도는 95% CI 61.3% ~ 93.0%로 81.5%; 특이성은 95% CI 91.4% ~ 99.6%로 97.8%이다.

[0290] 3 마커:

[0291] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘

[0292] 4 마커:

[0293] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘, 트랜스페린

[0294] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘, CTAP-III

[0295] 5 마커:

[0296] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘, 트랜스페린, CTAP-III

[0297] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘, 트랜스페린, $\beta 2$ 마이크로글로불린

[0298] 6 마커:

[0299] Apo, 트랜스티레틴, 헵시딘, 트랜스페린, CTAP-III, $\beta 2$ 마이크로글로불린

[0300] 여기에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시를 위한 것이며 그 견지에서 다양한 변경 및 변화가 기술 분야에서 의 당업자에게 제안될 것이나 이들은 본 출원의 정신과 범위 및 첨부한 특허청구범위의 범주 내에 포함될 것으로 이해된다. 여기에 인용된 모든 공개공보, 특허, 및 특허 출원은 모든 목적에 대해 전체로서 참고로 본 명세서에 도입된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 m/z 2789에서 건강한 대조군으로부터 난소암을 식별하는 헵시딘 피크의 능력을 나타낸 ROC 곡선 분석을 나타낸다. AUC는 0.876이고, p-값<0.0001로 0.5보다 유의하게 크다.

[0032] 도 2는 4개의 상호 관련된 단편인 헵시딘-25 (서열식별번호: 13), 헵시딘-24 (서열식별번호: 14), 헵시딘-22 (서열식별번호: 16), 및 헵시딘-20 (서열식별번호: 18)을 포함하는, 다양한 헵시딘 단편의 서열을 나타낸다. 21 개의 서열들이 위에서부터 아래로 서열식별번호 : 1 내지 서열식별번호 : 22로 번호가 부여된다.

[0033] 도 3은 ITIH4 단편(m/z 3272)에 대한 항체를 사용하여 면역침전/하강(immunoprecipitation/pull-down) 후 혈청 샘플의 SELDI 스펙트럼을 나타낸다. 직사각형 라벨에 있는 피크는 ITIH4의 공지의 단편이다. 발견된 4개의 헵시딘 변형체들은 대략 m/z 위치 2191, 2436, 2673, 및 2788(화살표로 나타냄)에서 이 스펙트럼 내에 있다.

[0034] 도 4는 m/z 2789에서 헵시딘 피크가 다른 암으로부터 난소암을 식별하는 능력을 나타낸 ROC 곡선 분석을 나타낸다. AUC는 0.774이고, p-값<0.0001로 0.5보다 유의하게 크다.

[0035] 도 5는 두 독립적인 확인 세트(validation set)에 대한 헵시딘 피크의 능력을 나타낸 ROC 곡선 분석을 나타낸다. AUC는 0.756 및 0.772이고, 양자는 p-값<0.0001로 0.5보다 크다.

[0036] 도 6은 헵시딘 변형체를 표시하는 4개의 피크 중 2개에 있는 샘플의 5개 그룹의 산란플롯을 나타낸다.

[0037] 도 7은 2개의 헵시딘 피크를 사용하여 독립적인 확인 세트로부터 환자의 5개 그룹의 산란플롯을 나타낸다. 이는 이러한 피크들이 암이 없는 환자 및 치료 후의 환자들에서 더 낮고, 난소암 치료전의 환자와 난소암이 재발된 환자들에서 더 높음을 나타낸다. 헵시딘 수준은 종양 양(tumor load)과 서로 관련된다.

[0038] 도 8은 2개의 헵시딘 피크를 사용하여 제2의 독립적인 확인 세트로부터 환자의 5개 그룹의 산란플롯을 나타낸다. 이는 이러한 피크들이 건강한 대조군 및 양성 질환을 가진 환자들에서 더 낮고, 난소암을 가진 환자들에서 더 높음을 나타낸다.

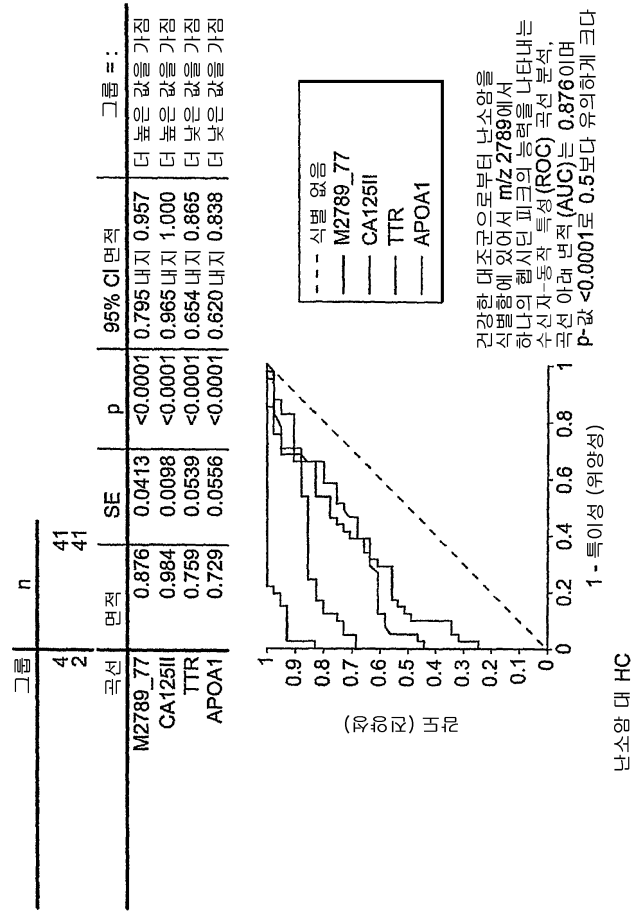
[0039] 도 9A-9G는 본 명세서에 언급된 다양한 바이오마커들을 표시하는 SELDI 질량 스펙트럼을 나타낸다. 도 9A는 구리로 채워진 IMAC-50 바이오칩 상에 포획된 ITIH4 단편 1을 나타낸다. 도 9B는 구리로 채워진 IMAC-50 바이오칩 상에 포획된 헵시딘-25를 나타낸다. 도 9C는 구리로 채워진 IMAC-50 바이오칩 상에 포획된 CTAP-III을 나타낸다. 도 9D는 구리로 채워진 IMAC-50 바이오칩 상에 포획된 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 나타낸다. 도 9E는 Q-IO 바이오칩 상에 포획된 트랜스티레틴을 나타낸다. 도 9F는 H50 바이오칩 상에 포획된 Apo A1을 나타낸다. 도 9G는 구리로 채워진 IMAC-50 바이오칩 상에 포획된 트랜스페린을 나타낸다.

[0040] 도 10은 혈청 중 트랜스티레틴 형태의 질량 스펙트럼의 클로즈업을 나타낸다.

[0041] 도 11은 후술하는 실시예 4의 미니-분석을 나타내는 ROC 곡선 분석을 나타낸다.

도면

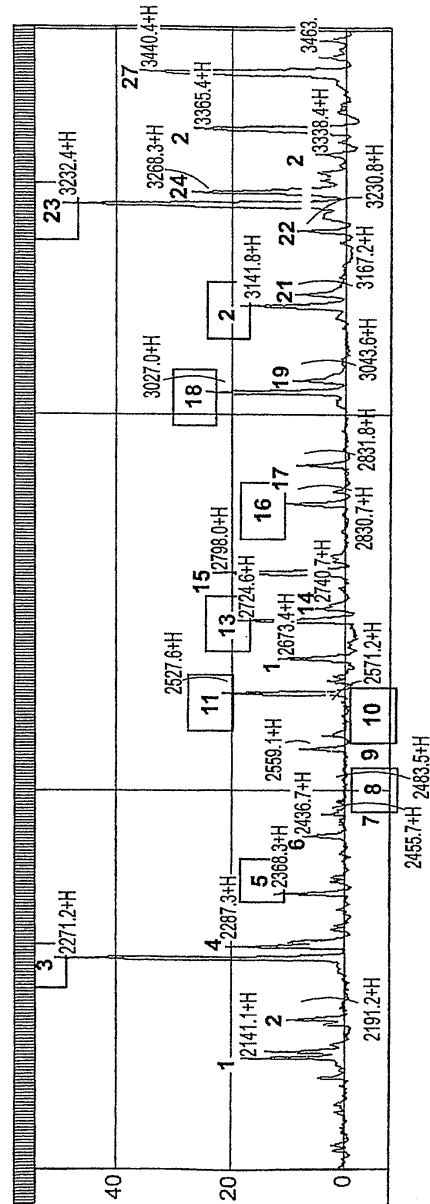
도면1



도면2

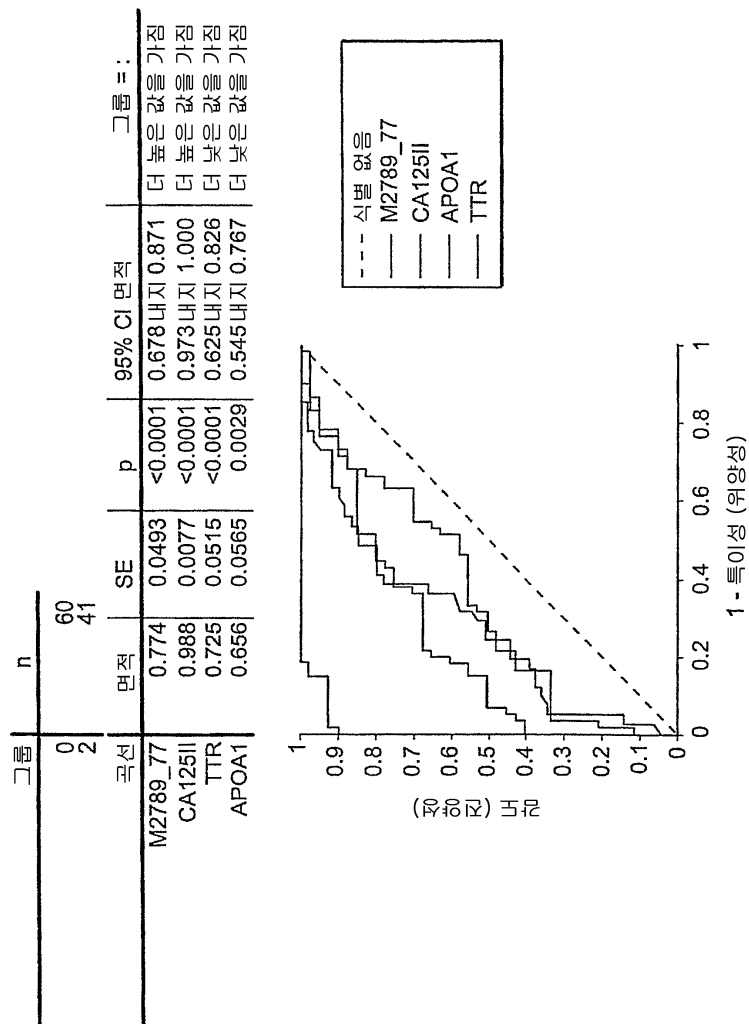
SWMPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	pI/Mw(M+H)
WMPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 4487.44
MPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 4400.37
PMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 4214.15
MFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.39 / 4082.96
FQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 3985.84
QRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 3854.65
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 3707.47
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37 / 3579.34
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.17 / 3423.16
RRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.97 / 3266.97 (4-s-s oxid. of Met, 3275 Da)
RRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.76 / 3110.78
RDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53 / 2954.59
DTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.22 / 2798.41 (헬시딘 25)
THFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.51 / 2682.32 (헬시딘 24)
HFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53 / 2581.21
FPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53 / 2444.07 (헬시딘 -22)
PICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.60 / 2296.89
ICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53 / 2199.78 (헬시딘 -20)
CIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53 / 2086.62
CIFCC GCCHRSKCGM CCK	8.53 / 1985.51
CIFCC GCCHRSKCGM CC	8.22 / 1857.34

도면3



ITI4 단편 (m/z 3272)에 대한 항체를 사용한 면역 침 전/하강 후 열정 샘플의 SELDI 스펙트럼
 직사각형 라벨에 있는 피크는 ITI4의 공지의 단편이다.
 발견된 4개의 헬시딘 변형체들은 대략 m/z 위치 2191, 2436, 2673, 및 2788 (적색 화살표로
 나타냄)에서 이 스펙트럼 내에 있다.

도면4



도면5

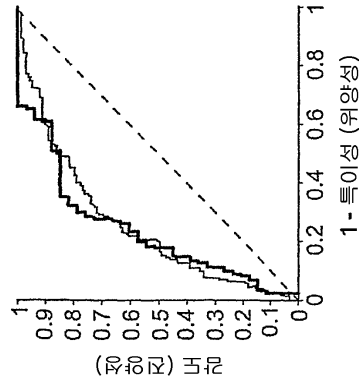
NCI n (트리플리케이트를 포함) 171 ie 트리플리케이트 300 (케이스 배제; 손실된 값에 기인한 42 표지된 "X"

DX		n	DX		n
0	1	138	0	1	162
1	1	33	1	1	138

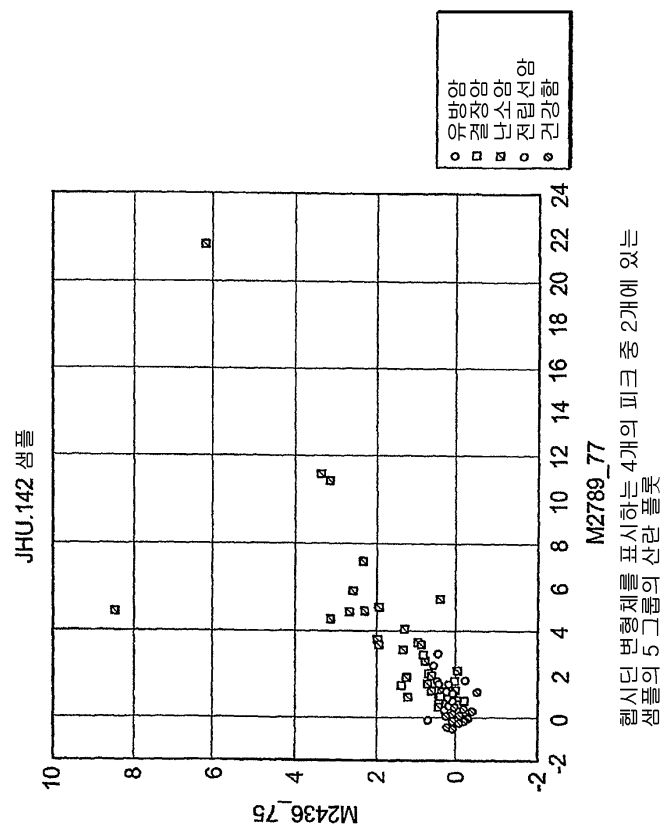
곡선	면적	SE	p	95% CI 면적	DX = 1
M2790_74 GRN 샘플	0.756	0.0279	<0.0001	0.702 내지 0.811	더 높은 값을 가짐
M2790_74 NCI 샘플	0.772	0.0403	<0.0001	0.693 내지 0.851	더 높은 값을 가짐

두 독립적인 확인 세트에 대한 한 행시인 피크의 식별 능력을 나타내는 ROC 곡선 분석, AUC는 0.756 및 0.772이며, 양자는 p-값 <0.0001로 0.5보다 크다.

대조	차이	p
m2437_28 v M2790_74	-0.083	0.0117

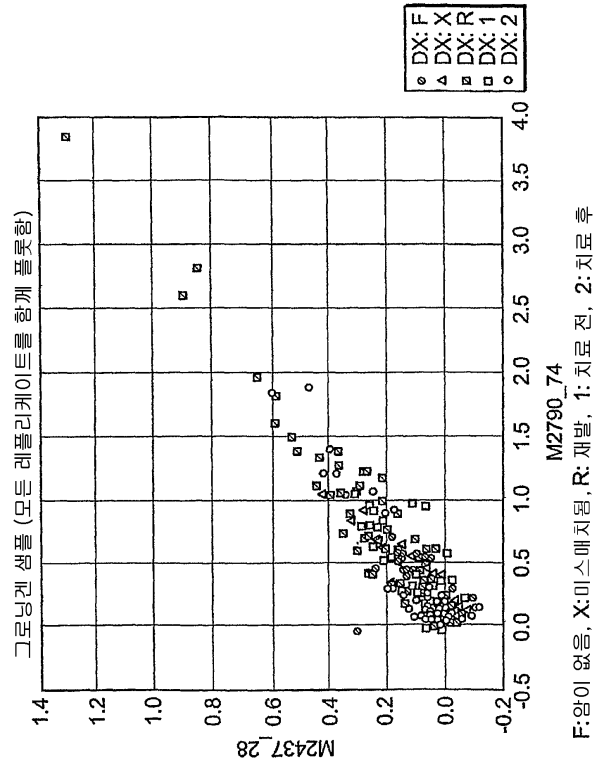


도면6



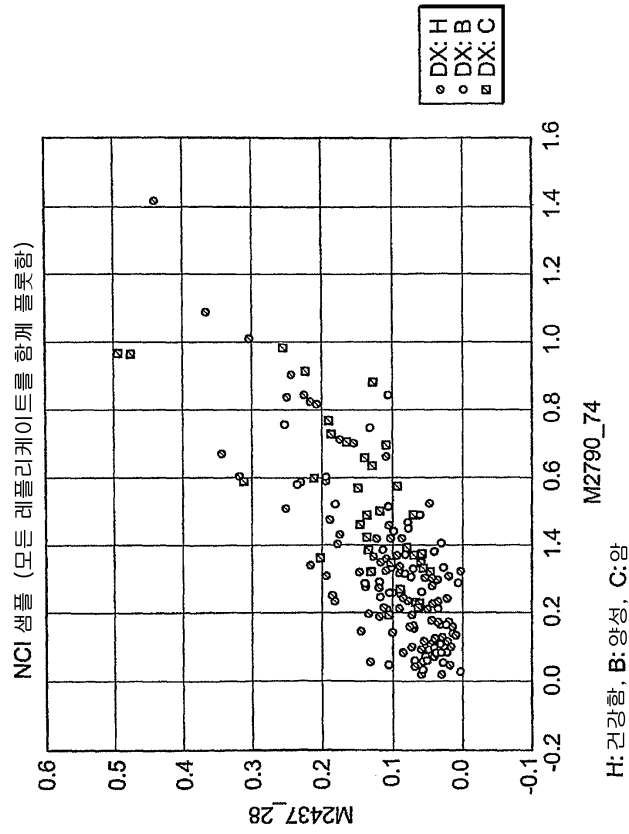
도면7

2개의 헵시딘 피크를 사용한 독립적인 확인 세트로부터 5개 그룹의 환자의 산란 플롯. 이는 이러한 피크들이 암이 없는 환자들 및 치료 후의 환자들에서 더 낮고, 난소암 치료 전의 환자 와 난소암이 재발된 환자들에서 더 높은 것을 나타낸다. 헵시딘 수준은 종양 양을 반영한 것으로 보인다.

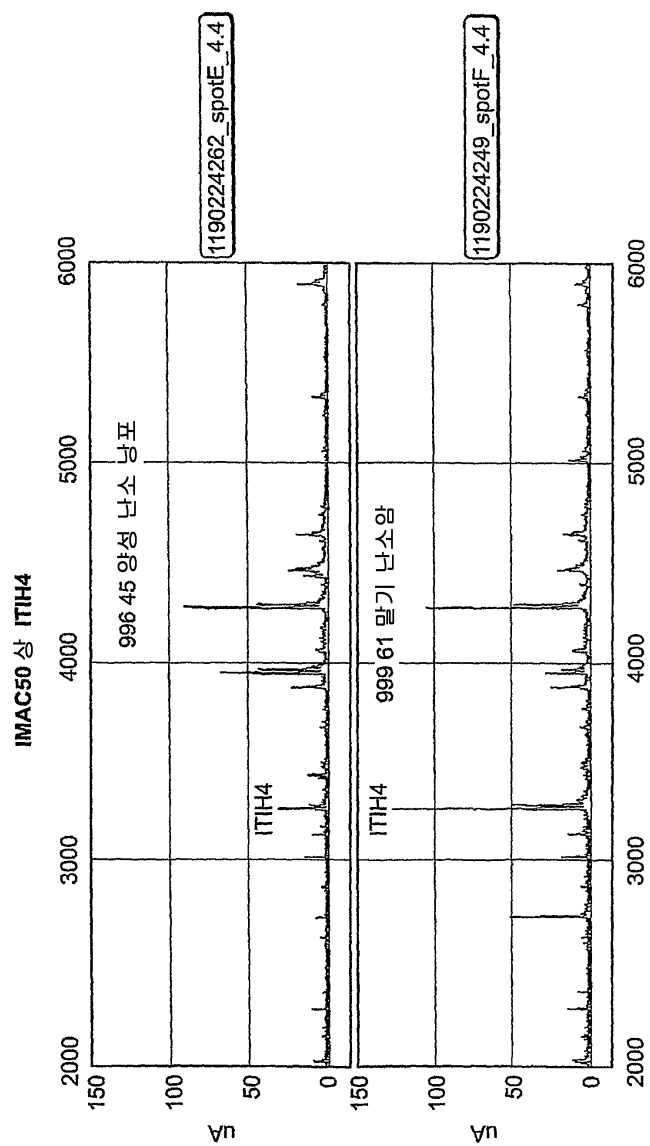


도면8

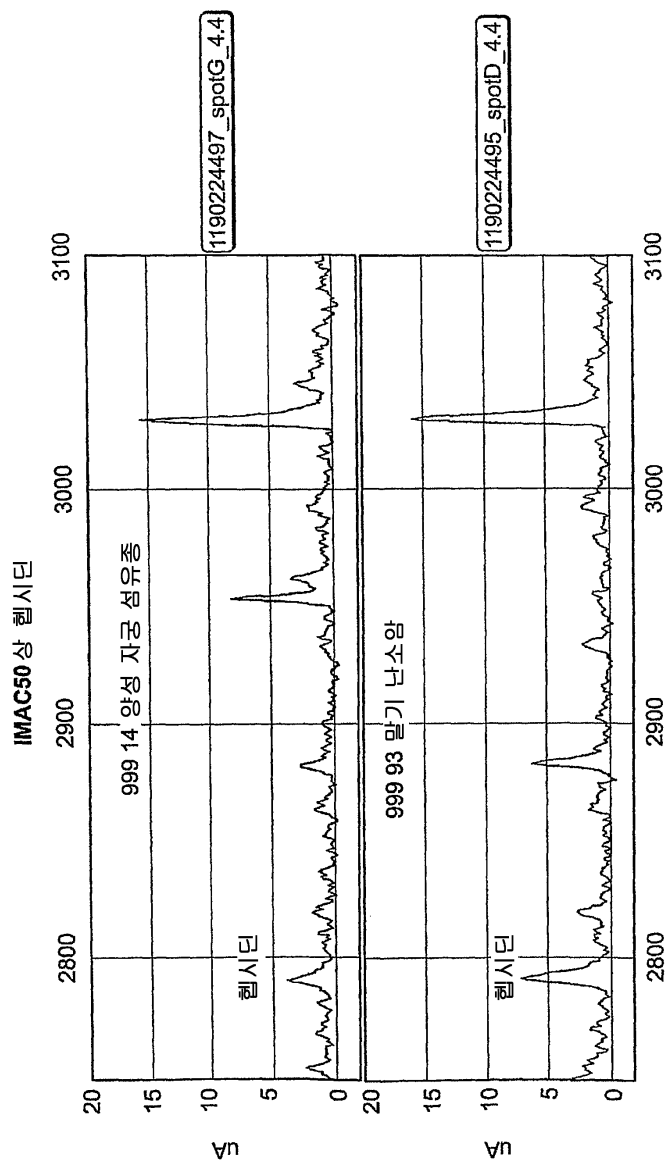
2개의 헬시딘 피크를 사용한, 제2의 독립적인 확인 세트로부터 5개 그룹의 환자의 신란 플롯. 이는 이러한 피크들이 건강함, 대조군 및 양성 질환을 가진 환자들에서 더 낮고, 난소암을 가진 환자들에서 더 높음을 나타낸다.



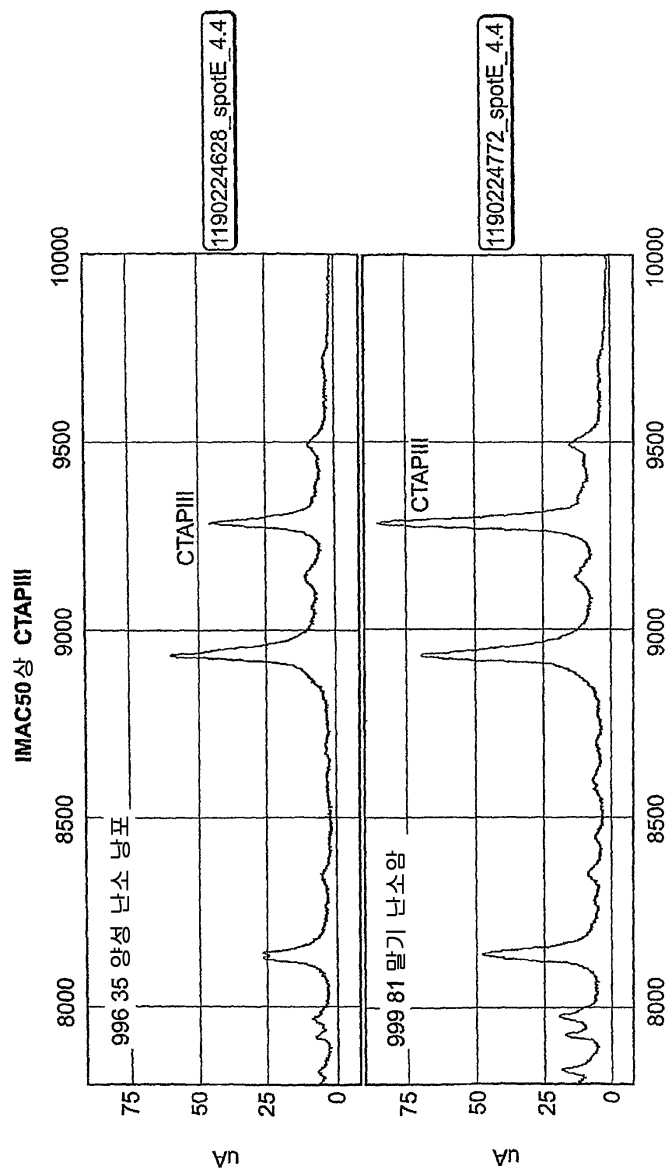
도면9a



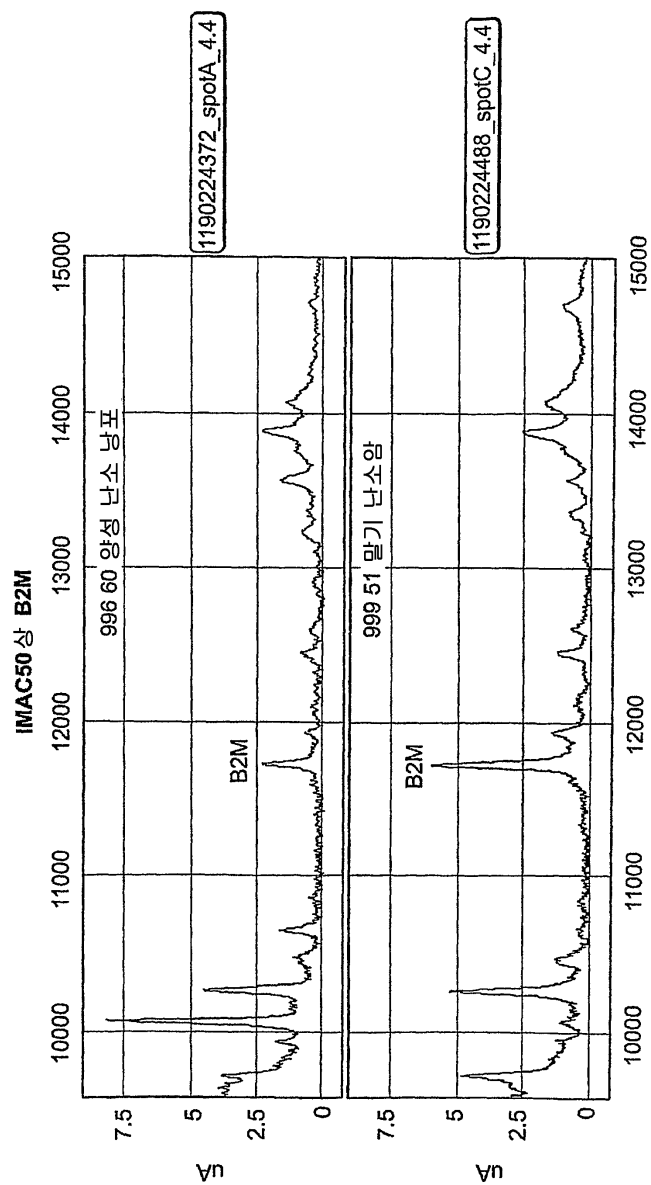
도면9b



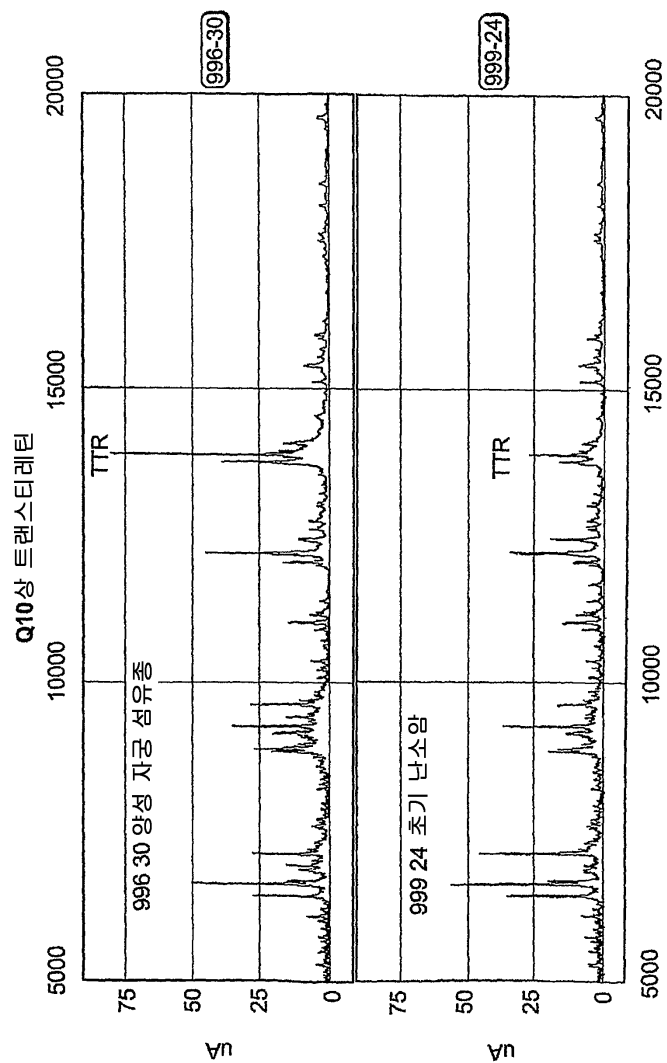
도면9c



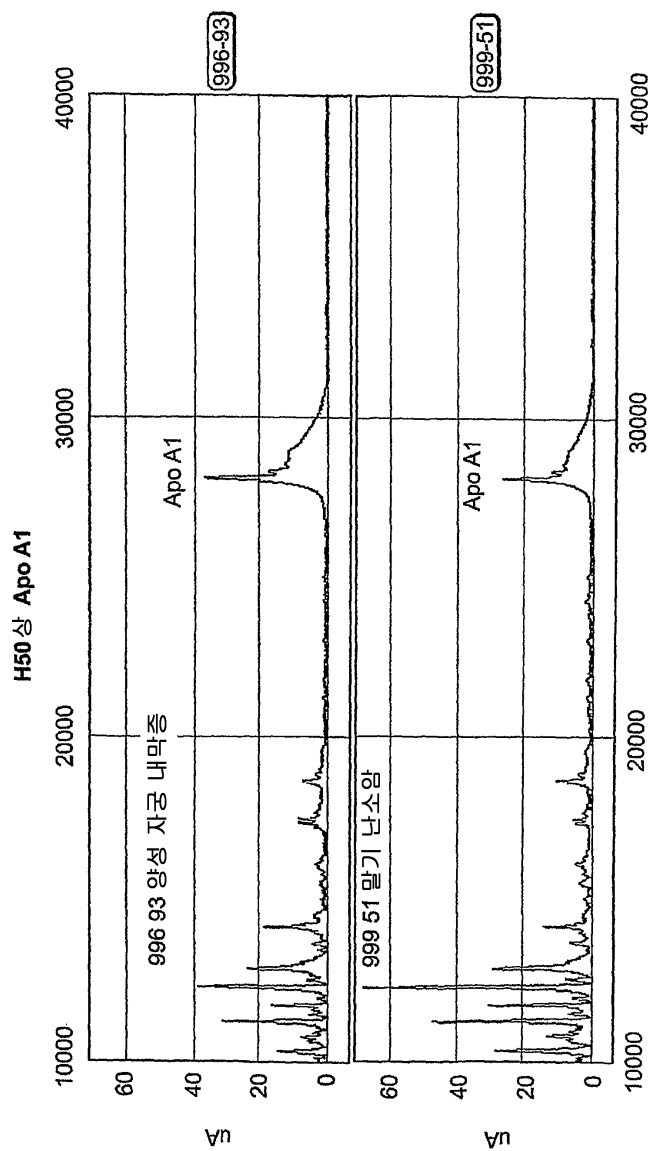
도면9f



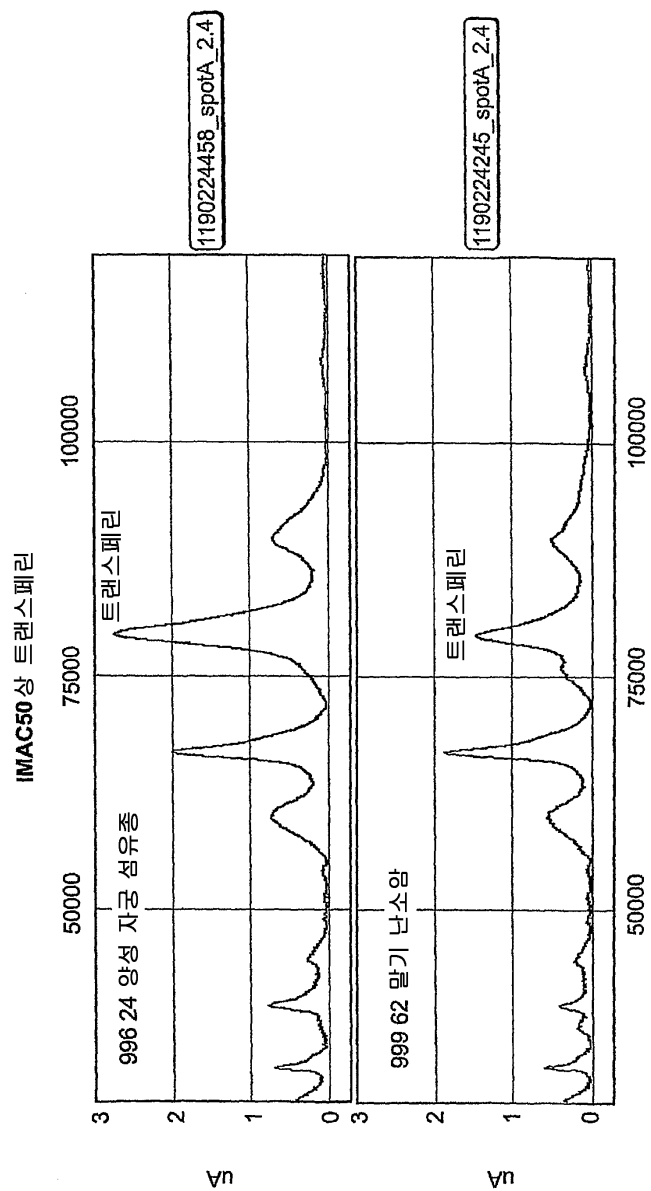
도면9e



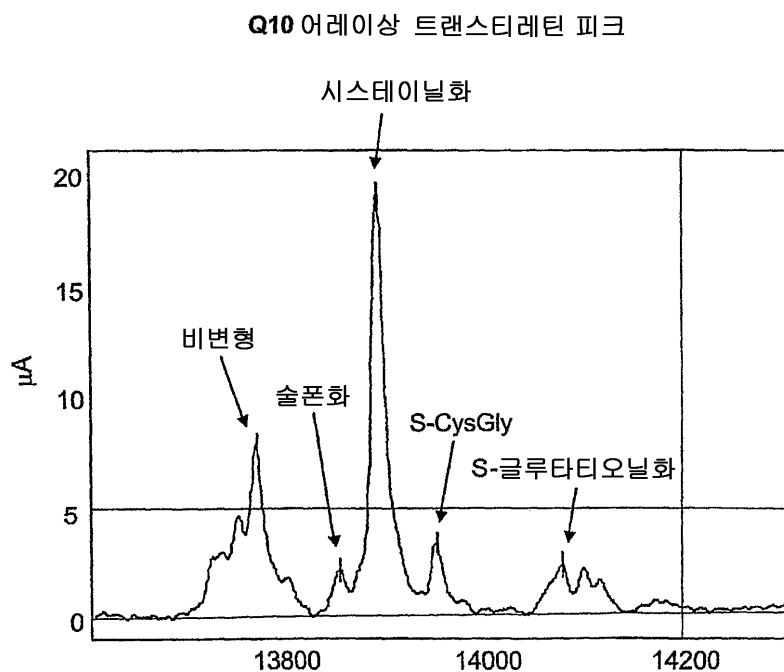
도면9f



도면9g



도면10



도면11

미니 분석 연구에서 7마커와 ROC
곡선 아래 면적 (AUC): 0.79

AUC: 0.79

