



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년03월21일
(11) 등록번호 10-2513020
(24) 등록일자 2023년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
G01N 33/57415 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2017-7025613
(22) 출원일자(국제) 2016년03월10일
심사청구일자 2021년03월03일
(85) 번역문제출일자 2017년09월12일
(65) 공개번호 10-2017-0123638
(43) 공개일자 2017년11월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/055143
(87) 국제공개번호 WO 2016/142471
국제공개일자 2016년09월15일
(30) 우선권주장
15382109.5 2015년03월11일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
Takayama Tatsuya et al, Japanese Journal of
Clinical Oncology (2006), vol 36, no 9, pp
564-569.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
편다시오 인스티튜트 드'인베스티가시오 바이오
메디칼 드 벨리비티게 (아이디벨)
스페인 바르셀로나 이-08908-엘' 오스피탈레트
데 요브레가트, 199, 그랜 비아 데 엘' 오스피탈
레트, 3에이 프란타, 호스피탈 두란 아이 레이날
스
인스티튜트 카탈라 디'온코로기아
스페인 이-08907-엘' 오스피탈레트 데 요브레가
트 그랜 비아 199-203
(72) 발명자
카사노바스 카사노바스 오리올
스페인 이-08019 바르셀로나 4-2 57-59 패스테이
지 가르시아 아이 파리아
지메네즈 발레리오 가브리엘라
스페인 이-08028 바르셀로나 4-4 12 포트보우
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 14 항

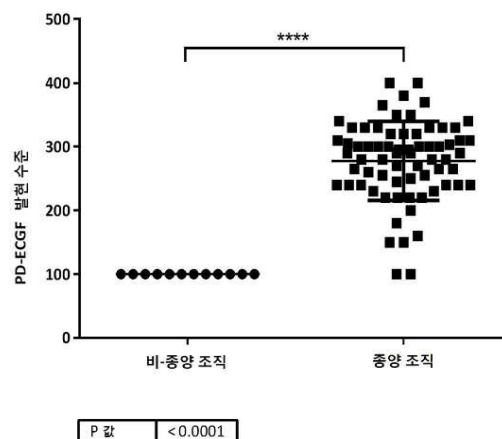
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 암 바이오마커로서 PD-ECGF

(57) 요약

본 발명은 암 분야에 해당하며 암 검출, 진단, 모니터링 및 치료 반응에 대한 예측, 특히 질환 발병 모니터링 및 항-혈관신생 치료에 대한 반응의 예측에 있어서 잠재적으로 가치가 있는 이의 용도를 위한 혈소판 유래-내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF) 수준에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57419 (2013.01)

G01N 33/57438 (2019.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2333/475 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

오초아 드 올라 마리아

스페인 이-08173 산 쿠가트 델 발레스 28 모차르트

나바로 페레즈 발렌티

스페인 이-08206 사바텔 4-2 52 폴리니 엘 벨

바사니 니콜라스

스페인 이-08209 바르셀로나 5-3 103 베를린

베르다게르 헬레나

스페인 이-08023 바르셀로나 프랄2° 12비스 파두
아

(56) 선행기술조사문헌

Tsui T et al, European Journal of Surgical
Oncology (2004), vol 30, no 3, pp 296-302.

Brostjan Christine et al, Cancer:
Interdisciplinary International Journal of the
American Cancer Society (2003), vol 98, no 10,
pp 2291-2301.

Metzger Ralf et al, Clinical Cancer Research
(1998), vol 4, no 10, pp 2371-2376.

Tokunaga Yukihiro et al, Surgery (2002), vol
131, no 5, pp541-547.

Mizutani Yoichi et al, Cancer Society (2003),
vol 98, no 4, pp 730-736.

Ruckaberle E et al, European Journal of Cancer
(2010), vol 46, no 3, pp 549-557.

명세서

청구범위

청구항 1

대상에서 암을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

- (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계; 및
 - (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계를 포함하고,
- 이때,

- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 상기 대상은 암으로 진단되고,
- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 상기 대상은 암이 아닌 것으로 진단되고,

상기 샘플이 혈액, 타액, 혈장, 혈청, 소변 및 뇌척수액으로 이루어진 군에서 선택되는 생물학적 유체이고,

상기 암이 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 2

암을 앓고 있는 대상의 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 이때, 상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아니고,

- (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계, 및
 - (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계를 포함하고,
- 이때,

- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 나쁜 반응을 나타내고.
- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 우수한 반응을 나타내는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 반응은 암의 조기 진행으로서 측정되는 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 항-혈관신생 치료는 PD-ECGF 수준의 측정 후에 개시되는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 샘플은 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조직 샘플은 종양으로부터의 샘플이며, 생물학적 유체 샘플은 혈장 샘플인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 종양은 1차 종양 또는 전이인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 기준치는 건강한 대상으로부터의 샘플 또는 암으로 진단되지 않은 대상으로부터의 샘플에서 측정되는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 측정된 PD-ECGF 수준은 PD-ECGF 단백질 수준인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 PD-ECGF 단백질 수준은 면역조직화학법, ELISA, 또는 웨스턴 블롯에 의해 측정되는 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 암은 신세포암 (RCC), 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 12

PD-ECGF 의 수준을 측정하는 제제를 포함하는,

암 진단용 조성물로서,

상기 암이 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 13

PD-ECGF 의 수준을 측정하는 제제를 포함하는,

항-혈관신생 치료에 대한 암 환자의 반응 예측용 조성물로서,

상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아닌, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암은 신세포암 (RCC), 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 분야, 특히 암 진단 및 예후에 유용한 바이오마커에 관한 것으로서, 대상의 샘플에서의 PD-ECGF 바이오마커의 변형된 수준은 대상에서 암을 진단하거나 암을 앓고 있는 환자의 예후에 유용하다.

배경 기술

[0002] 신세포 암 (RCC)의 발생률은 매년 꾸준히 증가하고 있다. 이러한 암의 생물학에 대한 우리의 이해에서 중요한 진보가 기술되어 왔다. 이러한 진보 덕분에, 진행성 질환 환자의 새로운 치료 전략이 개발되어 왔다.

[0003] 미국특허 제US8029981B2호는 저산소증-유도 단백질-2 (HIF2)의 수준을 결정하는 것을 포함하는 RCC를 진단하는 방법에 관한 것이다. 미국특허 제US7611839B2호는 신장 인자 1 알파 2 (EEF1A2) 및 톨(tol1)-유사 수용체 2 (TLR2)의 수준을 결하는 것을 포함하는 대상에서 RCC 진단을 확인하는 방법에 관한 것이다.

[0004] 그럼에도 불구하고, RCC와 관련하여 임상 시험에서 일상적으로 사용되는 바이오마커(biomarker)는 여전히 존재하지 않는다. 특히, 지난 10년 동안 RCC 예후에 사용된 방법은 변하지 않았다. 일반적으로 치료법은 조직학에 따라 분류되고; 환자는 징후 반응 확률 없이 잠재적으로 독성 치료에 계속 노출된다. 따라서, 당업계는 RCC의 진단 및/또는 예후에서 잠재적인 바이오마커를 동정할 필요성이 여전히 존재한다.

[0005] 전 세계적으로, 유방암은 2번째로 흔한 유형의 암이며 (10.4% ; 폐암 다음으로), 암 사망의 5번째로 흔한 원인이다 (폐암, 위암, 간암, 및 결장암 다음으로). 전 세계적인 여성 중에서, 유방암은 암 사망의 가장 흔한 원인이다. 1970년대 이후 전 세계적으로 사례의 수가 현저하게 증가하였으며, 이는 서양 세계의 현대 생활 양식에 부분적으로 원인이 있는 현상이다. 북미 여성들은 세계에서 유방암 발병률이 가장 높다.

[0006] 예후 및/또는 치료적 가치가 있는 일부 잘 정립된 유방 분자 마커는 에스트로겐 수용체 (ER) 및 프로게스테론

수용체 (PR)를 포함하는 호르몬 수용체, HER-2 발암유전자, Ki-67, 및 p53을 포함한다. 유방암에서 보다 최근에 동정된 분자 표적은 CXCR4, 카베올린 및 FOXF3을 포함한다.

- [0007] 전세계적으로 매년 655,000명의 사망자가 발생하는 결직장암은 서양에서 세 번째로 가장 흔한 형태의 암이며 암-관련 사망의 두 번째 요인이다. 다수의 결직장암은 결장에서 선종 폴립으로부터 비롯된 것으로 생각된다. 이러한 버섯 모양의 성장은 일반적으로 양성이지만, 일부는 시간이 지남에 따라 암으로 발달할 수 있다. 대부분의 시간에서, 국소 결장 암의 진단은 대장내시경을 통해 이루어진다.
- [0008] 외과적 절제는 초기 결직장암 (I기에서 III기까지)의 1차 치료 양상이고, 잠재적인 치료적 수술 후 예후를 평가하는 가장 강력한 도구는 절제된 표본의 병리학적 분석이다. 병리 단계를 결정하는 파라미터가 수술 후 결과의 가장 강력한 예측인자이지만, 다른 임상적, 분자적, 및 조직학적 특징이 병기와 무관하게 예후에 영향을 미칠 수 있다. IV기 질환의 환자에서, 예후는 원격 전이성 질환의 위치 및 정도와 더 밀접하게 연관되어 있다.
- [0009] 발암배아성 항원 (CEA)의 수준은 결직장암에서 가장 흔하게 사용되는 종양 마커이다. 이러한 수준은 예후를 예측하기 위해 수술 전에 확인될 수 있거나, 치료 중에 치료에 대한 반응을 평가하기 위해 또는 치료 완료 후 재발을 모니터링 하기 위해 사용될 수 있다. CA 19-9는 결직장암에서 상승될 수 있는 혈액 마커이다. MSI (현미부수체 불안정성 (Microsatellite instability))는 보다 적극적인 치료를 필요로 할 수 있는 초기 결장암을 확인하거나 여러 가지 암 유형과 관련된 패밀리 증후군에 대한 위험으로 인해 유전적 시험을 받아야 하는 환자를 확인하는데 사용될 수 있다. 최근에, 혈청 miR-21은 결직장암에서 조기 진단 및 예후 바이오마커로서 제안되어 왔다 (Toiyama *et al.* 2013 J. Natl. Cancer Inst. 105(12): 849-859).
- [0010] 그러나, 유방암 및 결직장암 둘 모두의 높은 발병률로 인하여, 상기 암의 반응의 진단 및/또는 예측 마커에 대한 당업계의 지속적인 요구가 존재한다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명자들은 면역조직화학법, ELISA 및 웨스턴 블롯에 의해 PD-ECGF 단백질의 발현 수준을 분석하였다. 면역조직화학법에 의해 분석된 PD-ECGF는 비-암성 조직 샘플 (12개 중 0개, 0%)에서는 검출되지 않았지만, PD-ECGF 단백질은 69명의 RCC 환자 중 67개 (97% 초과)의 조직 샘플에서 발견되었고, 유방암 환자의 조직 샘플에서 17개 중 10개 (59%)에서 관찰되었다. 따라서, 조직 샘플로부터 PD-ECGF 측정은 암 검출, 진단 및 모니터링에 사용될 수 있다.
- [0012] 또한, 본 발명자들은 치료의 개시 전에 종양에서의 PD-ECGF 수준을 초기 진행의 위험과 상관시킴으로써 나타난 바와 같이 (카플란-마이어 및 게한-브레슬로우-윌콕스 검정, $p < 0.045$), PD-ECGF 발현이 신세포암 및 결직장암 환자에서 항-혈관신생 치료법에 대한 반응의 예측 인자임을 발견하였다. 따라서, PD-ECGF 발현은 항-혈관신생 치료법에 대한 반응의 예측 인자로서 치료에 대한 암 진행을 예측하는데 잠재적인 가치를 갖는다.
- [0013] 또한, PD-ECGF의 보다 높은 혈장 수준을 갖는 결직장암 환자는 PD-ECGF 및 종양 진행에 대한 유의한 위험 비율 (hazard ratio) 분석에 의해 나타나는 바와 같이, 초기 진행 위험이 현저하게 높았다 (위험 비율, $p < 0.041$). 따라서, PD-ECGF 혈장 단백질 수준은 항-혈관신생 치료법에 대한 반응의 예측 인자로서 치료에 대한 암 반응을 예측하는데 잠재적인 가치가 있다.
- [0014] 이러한 발견은 RCC, 유방암, 결직장암 및 다른 유형의 암을 가진 환자에서 반응을 검출, 진단, 질환 모니터링 및 예측하기 위한 신규한 바이오마커로서 PD-ECGF의 사용을 지지한다.
- [0015] 따라서, 제1측면에서, 본 발명은 대상에서 암을 진단하는 방법에 관한 것으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0016] (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0017] (ii) 상기 (i) 단계에서 획득된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서
- [0018] 이때,
- [0019] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 상기 대상은 암으로 진단되고,
- [0020] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 상기 대상은 암이 아닌 것으로 진단된다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상의 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하는 방법에 관한 것

으로서, 이때, 상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아니며, 다음의 단계를 포함한다:

(i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계, 및

(ii) 상기 (i) 단계에서 측정된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서

이때,

- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 나쁜 반응을 나타내고.

- 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 우수한 반응을 나타낸다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에서 암 진단 및/또는 암 환자의 항-혈관신생 치료에 대한 반응 측정에 있어서 PD-ECGF의 용도에 관한 것으로서, 상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아니다.

도면의 간단한 설명

도 1은 면역조직화학법에 의해 측정된 환자 또는 건강한 대상의 종양 또는 비-종양 조직 샘플로부터의 PD-ECGF 수준이다.

도 2는 면역조직화학법에 의해 측정된 RCC 암 환자의 종양 조직 샘플로부터의 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 3은 면역조직화학법에 의해 측정된 유방암 환자의 종양 조직 샘플로부터의 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 4는 PD-ECGF 발현의 종양 조직 수준과 관련된 RCC 환자에서 무진행 생존의 카플란-마이어 생존 도표이다.

도 5는 건강한 기증자 또는 암 환자의 혈장 샘플로부터 ELISA에 의해 측정된 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 6은 RCC 암 환자의 혈장 샘플로부터의 ELISA에 의해 측정된 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 7은 유방암 환자의 혈장 샘플로부터의 ELISA에 의해 측정된 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 8은 결직장암 환자의 혈장 샘플로부터의 ELISA에 의해 측정된 PD-ECGF 단백질 수준이다.

도 9는 결직장암 환자에서의 종양 진행에 대한 PD-ECGF 혈장 단백질 수준의 위험 비율 연관성이다.

도 10은 PD-ECGF의 혈장 수준과 관련된 RCC 환자에서 무진행 생존의 카플란-마이어 생존 도표이다.

도 11은 PD-ECGF 발현이 변경된 결직장 선암종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (7개의 샘플). 참조: Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, Provisional).

도 12는 PD-ECGF 발현이 변경된 교모세포종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (291개의 샘플). 참조: Brennan CW et al., The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell. 2013 Oct10;155(2):462-77.

도 13은 PD-ECGF 발현이 변경된 신장 신 투명 세포암종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (413개의 샘플). 참조: Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (TCGA, Provisional).

도 14는 PD-ECGF 발현이 변경된 신장 신 투명 세포암종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (413개의 샘플). 참조: Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (TCGA, Provisional).

도 15는 PD-ECGF 발현이 변경된 신장 신 투명 세포암종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (392개의 샘플). 참조: Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. Nature. 2013 Jul 4;499(7456):43-9.

도 16은 PD-ECGF 발현이 변경된 신장 신 유두상 세포 암종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (161개의 샘플). 참조: Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma (TCGA, Provisional).

도 17은 PD-ECGF 발현이 변경된 폐 선암종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (230개의 샘플). 참조: Lung Adenocarcinoma (TCGA, Provisional).

도 18은 PD-ECGF 발현이 변경된 폐 선암종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (230개의 샘플). 참조: Lung Adenocarcinoma (TCGA, Provisional).

도 19는 PD-ECGF 발현이 변경된 전립선 선암종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (85개의 샘플). 참조: Taylor BS et al., Integrative genomic profiling of human 전립선암. Cancer Cell. 2010 Jul 13;18(1):11-22.

도 20은 PD-ECGF 발현이 변경된 고환 생식세포 암 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (149개의 샘플). 참조: Testicular Germ Cell Cancer (TCGA, Provisional).

도 21은 PD-ECGF 발현이 변경된 흉선종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (124개의 샘플). 참조: Thymoma (TCGA, Provisional).

도 22는 PD-ECGF 발현이 변경된 흉선종 환자의 카플란-마이어 무병 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (124개의 샘플). 참조: Thymoma (TCGA, Provisional).

도 23은 PD-ECGF 발현이 변경된 유두 갑상선암종 환자의 카플란-마이어 전체적인 생존 도표이다. 모두 완전한 종양 (388개의 샘플). 참조: Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. Cell. 2014 Oct 23;159(3):676-90.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 정의

[0030] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항-혈관신생 치료"(anti-angiogenic treatment) 또는 "항-혈관신생 치료"는 하나 이상의 항-혈관신생제에 기초한 치료에 관한 것이다. 용어 "항-혈관신생제 제제"(anti-angiogenic agent) 또는 "항-혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 비제한적으로 종양 혈관신생을 포함하여 혈관신생 (예컨대, 혈관을 형성하는 과정)에 표적화된 제제에 관한 것이다. 이러한 문단에서, 억제는 혈관의 형성을 차단하는 것 및 혈관 성장을 중단시키거나 속도를 늦추는 것을 가리킬 수 있다.

[0031] 용어 "암"은 제어되지 않은 세포 분열 (또는 생존 또는 세포사멸 내성의 증가) 및 다른 인접 조직을 침범 (침습)하여 신체의 다른 부위로 확산케 하여 이곳에서 세포가 림프 및 혈관을 통해 정상적으로 위치하지 않고 (전이) 혈류를 따라 순환한 다음 신체의 다른 곳에서 정상 조직을 침습하는 상기 세포의 능력을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 침습 및 전이에 의해 확산될 수 있는지 여부에 따라, 종양은 양성 또는 악성으로 분류된다: 양성 종양은 침습 또는 전이에 의해 확산될 수 없는 종양으로, 즉, 국소적으로만 성장하는 반면; 악성 종양은 침습 및 전이에 의해 확산될 수 있는 종양이다. 암과 관련된 것으로 알려진 생물학적 과정은 혈관신생, 면역 세포 침윤, 세포 이동 및 전이를 포함한다. 암이라는 용어는, 비제한적으로 폐암, 육종, 악성 흑색종, 흉막중피종, 방광암종, 전립선암, 췌장암종, 위암종, 난소암, 간암, 유방암, 결직장암, 신장 암, 식도암, 부신암, 이하선 암, 두경부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 간암, 중피종, 다발성 골수종, 백혈병, 및 림프종을 포함한다. 본 발명의 특정 양태에서, 암은 신세포암 (RCC), 유방암 또는 결직장암이다. 용어 "유방암"은 유방 세포, 가장 일반적으로는 유선관 (milk duct) 의 내부 라이닝 또는 유선관에 공급되는 소엽 (lobule)의 임의의 악성 증식성 장애에 관한 것이다. 관으로부터 유래한 암은 관상 암종으로 알려져 있고, 소엽으로부터 유래한 암은 소엽암으로 알려져 있다. 용어 "결직장암"은 또한 "결장암", "직장암" 또는 "장암"으로도 알려져 있으며, 결장 또는 직장, 또는 충수에서 제어되지 않은 세포 성장으로 인한 암을 지칭한다. 용어 "신세포암"은 또한 "신장암" 또는 "신장 선암"으로도 알려져 있으며, 종양 세포가 투명한 세포 암종 (파립 세포와 혼합되어 있거나 혼합되지 않음), 호염색성 암, 신장의 간상 종양, 협색소 암, 호산성 암, 집노관 암, 이행세포암 및 육종양 종양을 포함하는 신장의 임의의 조직에서 발견되는 암을 지칭한다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "진단"은 대상에서 가능한 질병을 결정 및/또는 식별하기 위한 시도의 과정, 즉 진단 과정, 및 이러한 과정에 의해 도달된 견해, 즉, 진단 견해 둘 모두를 지칭한다. 따라서, 이는 개인의 상태를 치료 및 예후에 대한 의학적 결정이 이루어지게 하는 별개의 구분되는 범주로 분류하려는 시도로 간주될 수도 있다. 특히, 용어 "암 진단"은 대상에서 종양의 존재를 확인하거나 검출할 수 있는 능력과 관련 있다. 이러한 검출은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분석된 샘플이 100%로 정확함을 주장하지 않는다. 그러나, 통계적으로 유의한 양의 분석된 샘플이 정확하게 분류될 것이 요구된다. 통계적으로 유의한 양은 상이한 통계 도구를 사용하여 당업자에 의해 확립될 수 있으며, 상기 통계 도구의 예시적이고 비제한적인 예는 신뢰 구간 결정, p-값 결정, 스튜던트 t-검정 또는 피셔 판별 함수 등 (예컨대, Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983 참조)을 포함한다. 신뢰 구간은 바람직하게는 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.1 미만, 0.05 미만, 0.01 미만, 0.005 미만 또는 0.0001 미만이다. 본 발명의 교시는 바람직하게는 측정된 군 또는 분석된 집단의 대상의 60% 이상, 70% 이상,

80% 이상, 또는 90% 이상을 정확하게 진단할 수 있도록 한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현 수준"은 대상의 샘플에서 유전자에 의해 생산된 유전자 산물의 측정 가능한 양을 나타내며, 이때, 유전자 산물은 전사 산물 또는 번역 산물일 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질을 수준을 측정 함으로서 정량화될 수 있다. 본 발명의 문단에서, PD-ECGF를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 상기 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 수준을 측정함으로써, 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질, 즉, PD-ECGF 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. PD-ECGF 단백질 변이체는 단백질의 기능이 유지된다면 생리학적으로 관련된 모든 번역 후 화학적 변형 형태의 단백질, 예컨대 당화, 인산화, 아세틸화 등을 포함한다. 상기 용어는 임의의 포유류 종, 예컨대 비제한적으로 가축 및 농장 동물 (소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류), 영장류 및 인간을 포함한다. 바람직하게는, PD-ECGF 단백질은 인간 단백질이다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈소판 유래-내피 세포 성장 인자" 또는 "PD-ECGF"는 "혈소판-유래 내피 세포 성장 인자-1", "ECGF-1" 또는 "ECGF1", "글리오스타틴(gliostatin)", "혈소판-유래 내피 세포 미토젠", "티미딘 포르포릴라아제" 또는 "TP"로도 알려져 있으며, 내피세포 유사분열 활성을 나타내는 혈소판으로부터 처음에 분리된 세포질 단백질에 관한 것이다. 이는 N-말단 처리에 의해 유도된 482개의 아미노산의 전구체로서 합성되는 45 kDa의 산성 비-글리코실화된 단백질이다. 태반으로부터 분리된 단백질은 N-말단에 5개의 추가의 아미노산을 함유한다. PD-ECGF는 생체 내의에서 세린 잔기에서 인산화될 수 있지만, 이러한 인산화 단계의 생물학적 중요성은 알려져 있지 않다. PD-ECGF를 암호화하는 인간 유전자는 22번 염색체에 위치해 있고, 유전자 번호 1890이 부여되어 있다 (NCBI GenBank, 2014년 3월 1일 업데이트). 다수의 전사 변이체가 PD-ECGF에 대해 기술되어 있다: 전사 변이체 1 (NCBI GenBank의 기탁 번호 NM_001113755.2), 변이체 2, 3 및 4가 아닌 동일한 이소형 1을 암호화함; 전사 변이체 2 (NM_001953.4), 5' UTR에서 선택적 스플라이싱 부위를 사용함; 전사 변이체 3 (NM_001113756.2), 변이체 1과 비교하여 5' UTR이 다름; 전사 변이체 4 (NM_001257988.1), 변이체 1과 비교하여 5' UTR에서 선택적 스플라이싱 부위를 사용함; 및 전사 변이체 5 (NM_001257989.1), 변이체 1과 비교하여 5' UTR 및 3' 암호화 영역에서 선택적 스플라이싱 부위를 사용하고 이소형 2를 암호화함, 상기 이소형 2는 이소형 1과 비교하여 C-말단 영역에 추가의 분절(segment)을 가짐. 인간 PD-ECGF의 아미노산 서열은 NCBI GenBank에 기탁번호 AAB03344.2 (482개 아미노산, 2000년 2월 3일 버전) 및 UniProtKB/Swiss-Prot에 기탁번호 P19971.2 (2014년 2월 19일의 Uniprot 버전 167)에 위치해 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항-혈관신생 치료에 대한 반응 예측"은 항-혈관신생 치료를 이용한 치료적 개입 후 의학적 결과의 예측에 관한 것이다. 치료 후 결과는 환자 진행에 대한 임의의 공통 종점, 예컨대, 나쁘거나 좋은 결과 (예컨대, 장기 생존, 전체적인 생존, 질환-특이적 생존, 무진행 생존 또는 무병 생존 가능성); 재발, 질환 진행, 또는 사망률을 사용하여 결정될 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 반응의 예측은, 바람직하기는 하지만, 진단되거나 평가되는 대상의 100%에 대해 정확할 필요는 없다. 그러나, 이러한 용어는 통계적으로 유의한 부분의 대상이 치료에 대한 반응으로 주어진 결과를 가질 확률이 증가한 것과 같이 확인될 수 있다. 대상이 통계적으로 유의한지 여부는 다양한 널리 공지된 통계적 평가 도구, 예컨대 신뢰 구간 결정, p-값 결정, 스튜던트 t-검정, 만-휘트니 검정 등을 사용하여 당업자에 의해 추가의 노고 없이 결정될 수 있다. 상세한 내용은 문헌 [Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983]에서 나와 있다. 바람직한 신뢰 구간은 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.05, 0.025, 0.001 또는 이보다 낮다. 환자의 반응을 결정하기 위해 널리 받아들여지는 임의의 파라미터가 질환의 진행을 제한 없이 포함하여 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기준치"는 대상의 실험실 실험 또는 대상으로부터 수집된 대상 샘플에 의해 취득된 값/데이터에 대한 기준으로서 사용된 실험실 값을 지칭한다. 기준치 또는 기준 수준은 절대값, 상대값, 상한 또는 하한을 갖는 값, 값의 범위, 평균 값, 중앙 값, 평균 값, 또는 특정 대조군 또는 기준 값과 비교한 값일 수 있다. 기준치는 개별적인 샘플 값, 예컨대 시험되는 대상으로부터의 샘플로부터 취득된 값에 기초할 수 있지만, 보다 이른 시점에서 이루어질 수 있다. 기준치는 연대순 연령 매칭된 군의 대상의 집단과 같은 다수의 샘플, 또는 시험되는 샘플이 포함되거나 제외된 샘플 풀에 기초할 수 있다. 적절한 기준치는 암 진단을 결정하거나 항-혈관신생 치료법으로 치료되는 암을 가진 대상의 반응을 예측하기 위한 본 발명의 방법의 문단에서 지시된다.

[0037] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상으로부터 분리된 생물학적 물질을 지칭한다. 생물학적 샘플은 RAN 또는 단백질 수준을 검출하는데 적절한 임의의 생물학적 물질을 포함한다. 특정 양태에서, 샘플은 연구중인 대상으로부터의 유전 물질, 예컨대 DNA, 게놈 DNA, 상보적 DNA (cDNA), RNA, 이중성 핵

RNA (hnRNA), mRNA 등을 포함한다. 샘플은 임의의 적절한 조직 또는 생물학적 유체 예컨대 혈액, 타액, 혈장, 혈청, 소변, 뇌척수액 (CSF), 대변, 수술 검체, 생검으로부터 수득된 검체, 및 파라핀에 침지된 조직 샘플로부터 분리될 수 있다. 샘플을 분리하는 방법이 당업계에 널리 공지되어 있다. 특히, 생검으로부터 샘플을 수득하는 방법은 질량의 총 분배, 또는 마이크로-해부 또는 다른 당업계에 공지된 세포-분리 방법을 포함한다. 샘플의 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 이는 포르말린으로 고정되고 파라핀에 침지될 수 있거나 우선 냉동되고 이어서 신속한 동결을 가능케 하는 극도로 초저온인 매질에 침지시킴으로써 초저온 고체화 될 수 있는 매질, 예컨대 OCT-화합물에 침지될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 대상으로부터의 샘플은 생물학적 유체 샘플이다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 대상으로부터의 샘플은 혈액, 혈청, 혈장 및 조직 샘플로 이루어진 군; 보다 바람직하게는 혈장 및 조직 샘플로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0038] 용어 "대상" 또는 "개인" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유류"는 포유류로 분류되는 모든 동물에 관한 것이며, 비제한적으로 가축 및 농장 동물, 영장류, 및 인간, 예컨대 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함한다. 바람직하게는, 대상은 임의의 연령, 성별 또는 인종의 남성 또는 여성 인간이다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 본원에 기술된 바와 같은 임상적 상태에 대한 취약성의 종결, 예방, 개선 및/또는 감소를 목적으로 하는 임의의 유형의 치료를 포함한다. 바람직한 양태에서, 용어 치료는 예방적 치료 (즉, 본원에서 정의된 바와 같은 임상 상태, 장애 또는 병태의 취약성을 감소시키기 위한 치료)에 관한 것이다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, "치료", "치료하기" 등은 목적하는 약리학 및/또는 생리학적인 효능을 수득하는 것을 지칭하며, 인간을 포함하여 포유류에서 병리학적인 상태 또는 장애의 임의의 치료를 포괄한다. 효능은 이의 장애 또는 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고/있거나 장애 및/또는 장애로 인한 악영향에 대한 부분적 또는 완전한 치료의 관점에서 치료적일 수 있다. 즉, "치료"는 다음을 포함한다: (1) 대상에서 장애의 발생 또는 재발을 예방하는 것, (2) 장애를 억제하는 것, 예컨대 이의 발병을 억제하는 것, (3) 예컨대 기능의 손실, 분실 또는 결함을 회복시키거나 수리함으로써 또는 비효율적인 과정을 자극함으로써 장애 또는 이의 증상의 퇴보를 야기하는 것과 같이 장애 또는 최소한 이와 관련된 증상을 중단하거나 종결시켜 숙주가 더 이상 이러한 장애 또는 이의 증상을 앓지 않는 것, 또는 (4) 장애 또는 이와 관련된 증상을 완화, 경감 또는 개선하는 것으로서, 이때, 개선은 적어도 파라미터, 예컨대 염증, 통증, 및/또는 면역 결핍의 크기의 감소를 지칭하는 넓은 의미로 사용된다.

[0040] 본 발명의 암 진단 방법

[0041] 본 발명의 저자는 조직 샘플을 면역조직화학으로 분석하였을 때 PD-ECGF 발현이 비-암성 조직 샘플에서는 검출되지 않지만(12개 중 0개, 0%), PD-ECGF 단백질 발현이 69명의 RCC 환자 중에서 67개 (97% 초과)의 조직 샘플에서 검출되고, 유방암 환자로부터의 조직 샘플에서 16개 중 9개(56%)에서 검출됨을 발견하였다 (실시예 1 참조). 유사하게, ELISA로 분석된 PD-ECGF 발현이 16명의 RCC 환자 중에서 14개 (87% 초과) 혈장 샘플에서 관찰되었고, 유방암 환자로부터의 혈장 샘플에서 16개 중 11개 (69%), 및 결직장암 환자로부터의 혈장 샘플에서 58개 중 52개 (90%)에서 관찰되었다 (실시예 2 참조).

[0042] 따라서, 제1측면에서, 본 발명은 대상에서 암을 진단하는 방법에 관한 것이며, 다음의 단계를 포함한다:

[0043] (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계; 및

[0044] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서

[0045] 이때,

[0046] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 상기 대상은 암으로 진단되고,

[0047] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 상기 대상은 암이 아닌 것으로 진단된다.

[0048] 따라서, 본 발명의 진단 방법의 첫 번째 단계에서, PD-ECGF의 발현 수준은 진단이 결정되는 대상의 샘플에서 측정된다. PD-ECGF의 발현 수준이 결정된 샘플은 잠재적인 종양으로부터의 세포를 함유하는 임의의 샘플일 수 있다. 특정 양태에서, 잠재적인 종양으로부터의 세포를 함유하는 샘플은 생물학적 유체 샘플이다. 특정 양태에서, 잠재적인 종양으로부터의 세포를 함유하는 샘플은 잠재적인 종양 조직 또는 이의 일부이다. 보다 특정한 양태에서, 상기 잠재적인 종양 조직 샘플은 신장암의 진단이 결정되는 환자로부터의 신장 조직 샘플, 유방암의 진단이

결정되는 환자로부터의 유방 조직 샘플, 또는 결직장암의 진단이 결정되는 환자로부터의 결직장 조직 샘플이다. 상기 샘플은 의학 분야의 당업자에게 널리 공지된 방법을 사용하여 통상적인 방법, 예컨대 생검, 외과적 절제 또는 흡인에 의해 취득될 수 있다. 생검으로부터 샘플을 취득하는 방법은 질량의 총 분배, 또는 미세절제술 또는 다른 당업계에 공지된 세포-분리 방법 예컨대 신절제술 및 부분적인 종양절제술을 포함한다. 종양 세포는 추가적으로 미세 바늘 흡인 세포학으로부터 취득될 수 있다. 샘플의 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 이는 포르말린으로 고정되고 파라핀에 침지될 수 있거나 우선 냉동되고 이어서 신속한 동결을 가능케 하는 극도로 초저온인 매질에 침지시킴으로써 초저온 고체화 될 수 있는 매질, 예컨대 OCT-화합물에 침지될 수 있다.

[0049] 또 다른 양태에서, PD-ECGF의 발현 수준이 측정되는 샘플은 진단이 결정되는 환자로부터의 생체 유체이다. 바람직한 양태에서, 생체 유체는 혈액, 특히 말초 혈액, 혈장 또는 혈청으로부터 선택된다. 혈액 샘플은 전형적으로 동맥 또는 정맥, 통상적으로 팔꿈치의 안쪽 부분 또는 손등의 정맥을 천공하는 방식으로 추출되며, 혈액 샘플은 기밀식 바이알 또는 주사기에 수집된다. 일반적으로 발 뒤꿈치 또는 손가락의 말단 지골에 모세관 천공은 미세법 (micromethod)의 방법에 의한 분석법을 사용하여 수행될 수 있다. 혈청은 완전한 혈액 샘플과 항응고제가 없는 상태에서 샘플을 10분 동안 정치시켜 응고시키고 이어서 혈청 (상등액)으로부터 세포 (침전물)를 분리하기 위한 목적으로 1,500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 취득될 수 있다. 이어서, 혈장 샘플을 취득하기 위해, 완전한 혈액을 항응고제와 접촉시키고 3,000 rpm에서 20분 동안 원심분리된다. 상기 원심분리의 침전물은 형성된 요소에 해당하고, 상등액은 혈장에 해당한다. 상기 취득된 혈청 또는 혈장은 본 발명의 방법의 방식에 의해 샘플을 분석하기 위해 저장 튜브로 이동될 수 있다.

[0050] 본 발명의 진단 방법의 특정 양태에서, PD-ECGF 발현 수준이 결정되는 샘플은 혈장 샘플 또는 조직 샘플이다. 특정 양태에서, PD-ECGF 발현 수준은 유방암 진단이 결정되어야 할 때 혈장 샘플 또는 유방 조직 샘플에서 측정된다. 특정 대안적인 양태에서, PD-ECGF 발현 수준은 신세포암 (RCC) 진단이 결정되어야 할 때 혈장 샘플 또는 신장 조직에서 측정된다. 또 다른 특정 대안적인 양태에서 PD-ECGF 발현 수준은 결직장암 진단이 결정되어야 할 때 혈장 샘플 또는 결직장 조직 샘플에서 측정된다.

[0051] 전술된 바와 같이, 발현 수준은 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질, 즉, PD-ECGF 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 측정함으로써 정량화될 수 있다. PD-EGGF 단백질 변이체는 단백질의 기능이 유지된다면 생리학적으로 관련된 모든 번역 후 화학적 변형 형태의 단백질, 예컨대 당화, 인산화, 아세틸화 등을 포함한다. 상기 용어는 임의의 포유류 종, 예컨대 비제한적으로 가축 및 농장 동물 (소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류), 영장류 및 인간의 PD-ECGF 단백질을 포함한다. 바람직하게는, PD-ECGF 단백질은 인간 단백질이다.

[0052] 유전자의 mRNA 수준을 측정하기 위하여, 생물학적 샘플은 조직 또는 세포 구조를 물리적으로, 기계적으로 또는 화학적으로 파괴하여 세포내 구성성분을 수용액 또는 유기 용액으로 방출하여 추가의 분석을 위한 핵산을 제조할 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지되고 상업적으로 이용 가능한 방법에 의해 샘플로부터 추출된다. 이어서, RNA는 당해 분야에 통상적인 임의의 방법, 예컨대 문헌[Sambrook, J., et al., 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3]에 의해 냉동 또는 신선한 샘플로부터 추출된다. 바람직하게는, 추출 공정 중에 RNA가 분해되지 않도록 주의해야 한다.

[0053] 발현 수준은 포르말린으로 고정되고 파라핀에 침지된 조직 샘플로부터 취득된 mRNA를 사용하여 측정될 수 있다. mRNA는 처음으로 탈파라핀화된 보관 병리학적 샘플 또는 생검 샘플로부터 분리될 수 있다. 예시적인 탈파라핀화 방법은 파라핀화된 샘플을 유기 용매, 예컨대 자일렌으로 세척하는 것을 포함한다. 탈파라핀화된 샘플은 저급 알코올의 수용액으로 재수화될 수 있다. 적절한 저급 알코올은 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올을 포함한다. 탈파라핀화된 샘플은 예컨대 감소 농도의 저급 알코올 용액으로 연속적으로 세척하여 재수화될 수 있다. 다르게는, 샘플은 연속적으로 탈파라핀화되고 재수화된다. 이어서, 샘플은 용해(lysis)되고 RNA가 RNA가 상기 샘플로부터 추출된다. 샘플은 또한 신선한 종양 조직 예컨대 절제된 종양으로부터 취득될 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 신선한 종양 조직 또는 OCT 침지된 냉동된 조직으로부터 취득될 수 있다. 또 다른 바람직한 양태에서, 샘플은 대장내시경 및 이어서 파라핀-침지에 의해 취득될 수 있다.

[0054] 상이한 샘플들 사이의 mRNA 발현 값을 정규화하기 위해, 시험 샘플에서 관심 mRNA의 발현 수준을 대조군 RNA의 발현과 비교하는 것이 가능하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "대조군 RNA"는 이의 발현 수준이 종양 세포에서 비-종양 세포에 대해 변하지 않거나 제한된 양으로만 변하는 RNA를 지칭한다. 바람직하게는, 대조군 RNA는 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)로부터 유래된 mRNA이고 구성적으로 발현되고 필수적인 세포 기능을 수행하는 단백질을 암호화한다. 본 발명에서 사용하기 위한 바람직한 하우스키핑 유전자는 β -2-마이크로글로불린, 유비

퀴틴, 18-S 리보솜 단백질, 사이클로필린, IPO8, HPRT, GAPDH, PSMB4, 튜불린 및 β -액틴을 포함한다. 바람직한 양태에서, 대조군 RNA는 GAPDH, IPO8, HPRT, β -액틴, 18-S 리보솜 단백질 또는 PSMB4 mRNA이다.

[0055] 하나의 양태에서, 상대적인 유전자 발현의 정량화는 내인성 대조군으로서 GAPDH, IPO8, HPRT, β -액틴 또는 PSMB4 및 교정자(calibrator)로서 상업적 RNA 대조군을 사용하여 비교 임계 주기(Ct) 방법에 따라 계산된다. 최종 결과는 식 $2^{-(\Delta Ct \text{ 샘플} - \Delta Ct \text{ 교정자})}$ 에 따라 결정되며, 이때, 교정자 및 샘플의 ΔCt 값은 대조군 유전자의 값으로부터 표적 유전자의 Ct 값을 뺀으로써 결정된다.

[0056] mRNA 수준에서 유전자 발현 수준을 측정하기 위한 적절한 방법은, 비제한적으로 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 표준 분석법, 예컨대 qPCR, RT-PCR, RNA 보호 분석, 노던 블롯, RNA 도트 블롯, 원 위치 혼성화, 마이크로어레이 기법, 태그 기반 방법 예컨대 LongSAGE 및 SuperSAGE와 같은 변형을 포함하는 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), 마이크로어레이, Flow-FISH, qFISH 및 이중 융합 FISH(D-FISH)와 같은 변형을 포함하는 형광 원위치 혼성화(FISH) 등을 포함한다.

[0057] 단백질 수준에서 유전자 발현 수준을 측정하기 위한 적절한 방법은, 비제한적으로 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 통상적인 방법, 예컨대 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질(또는 항원 결정기를 포함하는 이의 단편)에 특이적으로 결합하는 능력을 가진 항체를 사용하고 후속하여 생성된 항체-항원 복합체를 정량화하는 방법을 포함한다. 특정 양태에서, PD-ECGF 단백질 수준은 단백질 발현 수준을 측정하기 위한 표준 분석법 예컨대 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 트랜스퍼, ELISA(효소-연결된 면역 흡착 분석법), RIA(방사면역분석법), 경쟁적 EIA(경쟁적 효소 면역분석법), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학 및 면역조직화학 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 바이오칩 또는 마이크로 어레이의 사용에 기초한 기법 또는 덤스틱과 같은 포맷에서의 콜로이드성 침전에 기초한 분석법의 사용에 의해 정량화될 수 있다.

[0058] 이러한 분석법에서 사용되는 항체는, 예컨대 폴리클로날 혈청, 하이브리도마 상등액 또는 모노클로날 항체, 항체 단편, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, ScFv, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디 및 인간화된 항체일 수 있다. 동시에, 항체는 표지되거나 표지되지 않을 수 있다. 사용될 수 있는 예시적이지만 비배타적인 마커의 예는 방사선 동위원소, 효소, 형광 발색단, 화학발광 시약, 효소 기질 또는 보조인자, 효소 억제제, 입자, 착색제 등을 포함한다. 비표지된 항체(1차 항체) 및 표지된 항체(2차 항체)를 사용하는 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 널리 공지된 분석법이 존재하며; 이러한 기법 중에는 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 트랜스퍼, ELISA, RIA, 경쟁적 EIA, DAS-ELISA, 면역세포화학 및 면역조직화학 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 바이오칩 또는 마이크로 어레이의 사용에 기초한 기법 또는 덤스틱과 같은 포맷에서의 콜로이드성 침전에 기초한 분석법이 포함된다. 관심 단백질의 수준을 검출하고 정량화하는 다른 방법은 친화도 크로마토그래피 기법, 결합-리간드 분석법 등을 포함한다.

[0059] 한편, PD-ECGF 단백질 수준의 측정은 조립된 대상 샘플을 함유하는 조직 마이크로어레이(TMA)를 구축하고 면역조직화학적 기법에 의해 해당하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 것에 의해 수행될 수 있다. 면역염색 강도는 2인 이상의 상이한 병리학자에 의해 평가될 수 있으며 방법의 재현성을 유지하기 위해 균일하고 명확한 컷-오프 기준을 사용하여 채점된다. 불일치는 동시 재평가에 의해 해결될 수 있다. 요컨대, 면역염색의 결과는 종양 세포에서의 발현 및 각 마커에 대한 특이적 컷-오프를 고려하여 음성 발현(0) 대 양성 발현, 및 저 발현(1+) 대 중간(2+) 및 고(3+) 발현으로서 기록될 수 있다. 일반적인 기준으로서, 컷-오프는 재현성을 촉진하고 가능한 경우 생물학적 사건을 번역하기 위해 선택된다. 다르게는, 면역염색 강도는 영상 기법 및 자동화된 방법 예컨대 문헌[Rajo, M.G. *et al.* (Folia Histochem. Cytobiol.2009; 47: 349-54) 또는 Mulrane, L. *et al.* (Expert Rev. Mol. Diagn. 2008; 8: 707-25)]에 개시된 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0060] 다르게는, 또 다른 특정 양태에서, PD-ECGF 단백질의 수준은 웨스턴 블롯에 의해 측정된다. 웨스턴 블롯은 변성 조건 하에서 겔 전기영동에 의해 미리 분해되고 항체적 특이적 및 현상 시스템(예컨대 화학발광)과 함께 인큐베이션 함으로써 막, 일반적으로 니트로셀룰로스 상에 고정된 단백질의 검출에 기초한다.

[0061] 특정 양태에서, 본 발명의 진단 방법에서 측정되는 PD-ECGF 발현 수준은 PD-ECGF 단백질 수준으로서 측정된다. 보다 특정한 양태에서, PD-ECGF 단백질 수준은 ELISA, 웨스턴 블롯에 의해 또는 면역조직화학법에 의해 측정된다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질, 보다 특히 효소의 "활성 수준"이라는 용어는 효소 활성의 측정, 특히 단위 시간 당 변환된 기질의 몰로서 측정된 것을 지칭한다.

[0063] 효소의 활성 수준을 측정하기 위한 분석법이 당업자에게 공지되어 있으며, 비제한적으로 초기 속도 분석법, 진

행 곡선 분석법, 일시적 동력학 분석법 및 이완 분석법을 포함한다. 효소 활성의 연속적인 분석법은, 비제한적으로 분광광도, 형광, 열량, 화학 발광, 빛 산란 및 마이크로스케일 열환원 분석을 포함한다. 효소 활성의 불연속적인 분석법은, 비제한적으로 방사 및 크로마토그래피 분석을 포함한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 효소 활성에 영향을 미칠 수 있는 인자는 염 농도, 온도, pH, 및 기질 농도를 포함한다.

- [0064] 본 발명의 진단 방법의 제2단계에서, 진단이 결정되는 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF의 발현 수준은 기준치와 비교된다.
- [0065] 대상에서 암의 진단을 위한 본 발명의 방법의 문단에서, 기준치는 건강한 대상, 즉, 암으로 진단되지 않은 대상 또는 암으로 진단된 대상으로부터의 비-종양 조직 샘플에서 측정된 PD-ECGF 발현 수준이며, 바람직하게는, 기준치는 건강한 대상 또는 암으로 진단되지 않은 대상으로부터의 샘플에서 측정된 PD-ECGF 발현 수준이다.
- [0066] 이러한 기준치가 일단 확립되면, 샘플에서 발현된 PD-ECGF 수준은 상기 기준치와 비교될 수 있으므로, "증가된" 또는 "감소된" 발현 수준이 부여될 수 있다. 예컨대, 기준치와 비교하여 기준치의 적어도 1.1배, 1.5배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 그 이상 높은 발현 수준의 증가는 "증가된" 발현 수준으로 간주된다. 반대로, 기준치와 비교하여 기준치의 적어도 0.9배, 0.75배, 0.2배, 0.1배, 0.05배, 0.025배, 0.02배, 0.01배, 0.005배 또는 그 이하의 낮은 발현 수준의 감소는 "감소된" 발현 수준으로 간주된다.
- [0067] 따라서, 기준치와 비교하여 진단이 결정되는 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 증가된 발현 수준이 관찰되는 경우, 대상은 암으로 진단된다. 다르게는, 기준치와 비교하여 진단이 결정되는 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 발현 수준이 감소하면, 대상은 암이 아닌 것으로 진단된다.
- [0068] 본 발명에 따른 항-혈관신생 치료에 대한 반응의 예측 방법
- [0069] 본 발명의 저자는 암 환자에서 측정된 PD-ECGF의 수준이 항-혈관신생 치료법으로 치료한 후 환자가 조기 진행을 나타내는 위험과 통계적으로 유의한 상관관계를 나타낸다는 것을 발견하였다. 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 암을 앓고 있고 항-종양 치료가 진행중인 대상에서 치료 반응을 예측하는 방법에 관한 것이며, 이는 다음의 단계를 포함한다:
- [0070] (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계, 및
- [0071] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서
- [0072] 이때,
- [0073] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 이는 암 환자의 치료에 대한 나쁜 반응을 나타내고,
- [0074] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 이는 암 환자의 치료에 대한 우수한 반응을 나타낸다.
- [0075] 특정 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상의 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하는 방법에 관한 것이며, 다음의 단계를 포함한다:
- [0076] (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계, 및
- [0077] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서
- [0078] 이때,
- [0079] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 나쁜 반응을 나타내고,
- [0080] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 우수한 반응을 나타낸다.
- [0081] 보다 특정한 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상의 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하는 방법에 관한 것이며, 이때, 상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아니며, 다음의 단계를 포함한다:
- [0082] (i) 상기 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 수준을 측정하는 단계, 및

- [0083] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득된 수준을 기준치와 비교하는 단계로서
- [0084] 이때,
- [0085] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 증가한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 나쁜 반응을 나타내고.
- [0086] - 상기 대상으로부터의 샘플에서의 PD-ECGF 수준을 기준치와 비교하였을 때 감소한 경우, 이는 항-혈관신생 치료에 대해 우수한 반응을 나타낸다.
- [0087] 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하기 위한 본 발명의 방법의 제1단계에서, PD-ECGF 발현 수준은 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 암을 앓고 있는 대상으로부터의 샘플에서 측정된다.
- [0088] PD-ECGF의 발현 수준이 측정된 샘플은 종양으로부터의 세포를 함유하는 임의의 샘플일 수 있다. 특정 양태에서, 잠재적 종양으로부터의 세포를 함유하는 샘플은 생물학적 유체 샘플이다. 특정 양태에서, 종양으로부터의 세포를 함유하는 샘플은 종양 조직 또는 이의 일부이다. 보다 특정한 양태에서, 상기 종양 조직은 신장암의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 환자로부터의 신장 종양 조직 샘플, 또는 유방암의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 환자로부터의 유방 종양 조직 샘플, 또는 결직장암의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 환자로부터의 결직장 종양 조직 샘플이다. 상기 샘플은 의학 분야와 관련된 당업자에게 널리 공지된 방법을 사용하여 통상적인 방법, 예컨대 생검, 외과적 절제 또는 흡인에 의해 수득될 수 있으며, 본 발명의 진단적 방법의 문단에 전술되어 있다. 하나의 양태에서, 종양 세포를 함유하는 샘플은 1차 종양의 샘플이다. 또 다른 양태에서, 종양은 전이성 종양이고 PD-ECGF 수준이 측정되는 샘플은 전이된 샘플이다.
- [0089] 또 다른 양태에서, PD-ECGF 발현 수준이 측정되는 샘플은 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 암을 앓고 있는 환자로부터의 생체 유체이다. 바람직한 양태에서, 생체유체는 혈액, 특히 말초 혈액, 혈장 또는 혈청으로부터 선택된다. 혈액, 혈청 및 혈장 샘플의 수득을 위한 방법이 당업자에게 공지되어 있으며 본 발명의 진단 방법의 문단에 전술되어 있다.
- [0090] 항-혈관신생 치료에 대한 반응을 예측하기 위한 본 발명의 특정 양태의 방법에서, PD-ECGF 발현 수준이 측정되는 샘플은 혈장 샘플 또는 조직 샘플이다. 특정 양태에서, PD-ECGF 발현 수준은 유방암의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 혈장 샘플 또는 유방 종양 조직에서 측정된다. 특정한 대안적인 양태에서, PD-ECGF 발현 수준은 신세포암(RCC)의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 혈장 샘플 또는 신장 종양 조직 샘플에서 측정된다. 또 다른 특정한 대안적인 양태에서, PD-ECGF 발현 수준은 결직장암의 항-혈관신생 치료에 대한 반응이 예측되어야 하는 혈장 샘플 또는 결직장 종양 조직 샘플에서 측정된다.
- [0091] 전술된 바와 같이, 유전자 발현 수준은 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질 또는 상기 유전자에 의해 암호화된 단백질, 즉 PD-ECGF 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 측정함으로써 정량화될 수 있다. PD-ECGF 단백질 변이체가 전술되어 있으며 여기에 포함된다.
- [0092] mRNA 수준 및 단백질 수준, 특히 PD-ECGF mRNA 수준 및 PD-ECGF 단백질 수준에 기초한 발현 수준의 측정 방법이 본 발명의 진단 방법의 문단에 전술되어 있으며 여기에 포함된다.
- [0093] 특정 양태에서, 본 발명의 항-혈관신생 치료 방법에 대한 반응의 예측에서 측정되는 PD-ECGF 발현 수준은 PD-ECGF 단백질 수준으로서 측정된다. 보다 특정한 양태에서, PD-ECGF 단백질 수준은 ELISA, 웨스턴 블롯에 의해 또는 면역조직화학법에 의해 측정된다.
- [0094] 특정 양태에서, 치료에 대한 반응의 예측이 본 발명의 방법에 의해 측정되는 암을 앓고 있는 대상은 항-혈관신생 치료를 받고 있으며, 이때, 상기 암의 항-혈관신생 치료는 하나 이상의 항-혈관신생제를 기초로 한다.
- [0095] 본 발명에 따른 항-혈관신생제 및 치료는, 비제한적으로 항-VEGF 제제, 예컨대 모노클로날 항체 예컨대 베바시주맙(아바스틴, 시험관 내 및 생체 내 분석 시스템에서 인간 VEGFA에 결합하여 생물학적 활성을 억제하는 재조합 인간화된 모노클로날 IgG1 항체), 항체 유도체 예컨대 라니비주맙(루센티스), 또는 항체 단편 예컨대 Fab IMC 1121 또는 F200 Fab, 또는 VEGF에 의해 자극된 티로신 키나아제를 억제하는 경구적으로 이용가능한 작은 분자 예컨대 라파티닙(타이커브), 수니티닙(수텐트), 소라페닙(넥사바), 엑시티닙, 및 파조파닙; 항-섬유아세포 성장 인자(항-FGF) 제제, 예컨대 수라민 및 이의 유도체, 펜토산폴리설페이트, 세디라닙, 파조파닙, 또는 BIBF 1120); 항-EGF 제제, 예컨대 세툽시맙, 제피티닙 또는 엘로티닙, 및 항-HGF 제제, 예컨대 ARQ197, JNJ-38877605, PF-04217903, SGX523, NK4, 또는 AMG102; 및 항혈관신생 폴리펩티드 예컨대 엔지오스타틴, 엔도스타

틴, 항-혈관신생 항-트롬빈 III 또는 sFRP- 4를 포함한다.

- [0096] 추가의 항-혈관신생제는 마리마스타트; AG3340; COL-3, BMS-275291, 탈리도마이드, 엔도스타틴, SU5416, SU6668, EMD121974, 2-메톡시옥스트라디올, 카복시아미도트라이아졸, CMIOI (GBS 독소), 펜토산폴리설페이트, 엔지오폐이에틴 2 (리제론), 허비마이신 A, PNU145156E, 16K 프로락틴 단편, 리노마이드, 탈리도마이드, 펜톡시필린, 제니스테인, TNF470, 엔도스타틴, 파클리탁셀, 아큐틴, 엔지오스타틴, 시도포비르, 빈크리스틴, 블레오마이신, AGM- 1470, 혈소판 인자 4 또는 미노사이클린을 포함한다.
- [0097] 추가의 항-혈관신생제는 혈관 신생을 억제할 수 있는 폴리펩티드를 나타내는 항-혈관신생 폴리펩티드이고, 비제한적으로 엔지오스타틴, 엔도스타틴, 항-혈관신생 항-트롬빈 III, 국제공개특허 제W02007115376호에 기술된 바와 같은 sFRP- 4, 항-VEGF 항체 예컨대 아니비주맙, 베바시주맙 (아바스틴), Fab IMC 1121 및 F200 Fab을 포함한다.
- [0098] 추가의 항-혈관신생제는 폐갑탄닌, 수니티닙, 파조파닙, 소라페닙, 바탈라닙 및 아플리버셉트 (VEGF-트랩)를 포함한다.
- [0099] 추가의 항-혈관신생제는 VEGFR2 차단 항체, 예컨대 라무시루맙 (IMC-1121B) 및 DC101 (항-Flk-1 mAb로도 알려짐)을 포함한다.
- [0100] 특정 양태에서, 항-혈관신생제는 수니티닙, 베바시주맙, 및 DC101로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0101] 하나의 양태에서, 항혈관신생 치료는 안트라사이클린 항생제를 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 독소루비신을 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 인터페론을 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 유형 I 인터페론 및/또는 유형 II 인터페론을 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ 및 IFN- ω 를 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 IFN- γ 를 포함하는 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 보조적 (adjuvant) 치료, 즉, 종양의 외과적 절제 후의 치료이다. 하나의 양태에서, 항혈관신생 치료는 인터페론을 포함하는 보조적 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 유형 I 인터페론 및/또는 유형 II 인터페론을 포함하는 보조적 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ 및 IFN- ω 를 포함하는 보조적 치료가 아니다. 또 다른 양태에서, 항혈관신생 치료는 IFN- γ 를 포함하는 보조적 치료가 아니다.
- [0102] 특정 제제의 항신생혈관 활성을 측정하기 위한 분석법이, 제한 없이 국제공개특허 제W0 2003086299호에 기술되어 있다.
- [0103] 본 발명의 방법의 반응의 예측의 제2단계에서, 항-혈관신생 치료에 대한 예측이 결정되어야 하는 암을 앓고 있는 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 발현 수준은 기준치와 비교된다.
- [0104] 대상에서 항-혈관신생 치료법에 의한 치료에 대한 암의 반응을 예측하기 위한 본 발명의 방법의 문단에서, 적절한 기준치는 암을 갖거나 항-혈관신생 치료법에 의한 치료에 대해 우수한 반응을 나타내는 암을 가지고 있었던 대상으로부터의 샘플에서 측정된 PD-ECGF 발현 수준일 수 있으며, 상기 발현 수준은 환자가 치료되는 시점에서 측정되었다. 또 다른 양태에서, 기준치는 건강한 환자, 즉, 치료에 대한 반응의 예측이 요구되는 암 유형으로 진단되지 않은 환자의 PD-ECGF 수준이다.
- [0105] 이러한 기준치가 일단 확립되면, 샘플에서 발현된 PD-ECGF 수준은 상기 기준치와 비교될 수 있으므로, "증가된" 또는 "감소된" 발현 수준이 부여될 수 있다. 예컨대, 기준치와 비교하여 기준치의 적어도 1.1배, 1.5배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 그 이상 높은 발현 수준의 증가는 "증가된" 발현 수준으로 간주된다. 반대로, 기준치와 비교하여 기준치의 적어도 0.9배, 0.75배, 0.2배, 0.1배, 0.05배, 0.025배, 0.02배, 0.01배, 0.005배 또는 그 이하의 낮은 발현 수준의 감소는 "감소된" 발현 수준으로 간주된다.
- [0106] 따라서, 기준치와 비교하여 치료에 대한 반응의 예측이 결정되는 암을 앓고 있는 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 증가된 발현 수준이 관찰되는 경우, 이는 치료에 대한 불량한 반응을 나타낸다. 다르게는, 기준치와 비교하여 치료에 대한 반응의 예측이 결정되는 암을 앓고 있는 대상으로부터의 샘플에서 PD-ECGF의 발현 수준이 감소하면, 이는 치료에 대한 우수한 반응을 나타낸다.
- [0107] 본 발명의 용도

- [0108] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에서 암의 진단 및/또는 항-혈관신생 치료에 대한 암 환자의 반응의 예측에 있어서 PD-ECGF의 용도에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 대상에서 암의 진단 및/또는 항-혈관 신생에 대한 암 환자의 반응의 예측에 있어서 PD-ECGF의 용도에 관한 것으로서, 이때, 상기 항-혈관신생 치료는 독소루비신 또는 인터페론 치료법이 아니다.
- [0109] 용어 "암 진단" 및 "암 환자의 항-혈관신생 치료에 대한 반응 예측"은 위에 정의되어 있고 본 발명에 따른 용도에도 동일하게 적용가능 하다. 바람직한 양태에서, 암은 신세포암 (RCC), 유방암 및 결직장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 용도는 PD-ECGF 폴리펩티드의 사용을 포함한다. 하나의 양태에서, PD-ECGF 폴리펩티드는 PD-ECGF에 특이적으로 결합할 수 있는 제제, 예컨대 항체 또는 앵타머를 사용하여 수준을 측정함으로써 사용된다. 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 용도는 PD-ECGF 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 사용을 포함한다. 하나의 양태에서, PD-ECGF 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 PD-ECGF를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합할 수 있는 제제, 예컨대 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 사용하여 수준을 측정함으로써 사용된다.
- [0110] 본 발명은 이하의 실시예에 의해 설명되며, 이는 단지 예시적인 것으로 간주되어야 하며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- [0111] **실시예**
- [0112] 실시예 1. 환자에서 암을 검출, 진단 및 모니터링하기 위한 암 마커로서 조직 PD-ECGF 수준을 확인하였다. 비-암성 또는 종양 조직 샘플에서의 PD-ECGF 단백질 수준을 면역조직화학법에 의해 측정하였다.
- [0113] 환자로부터의 종양에서 PD-ECGF 발현을 면역검출에 의해 분석하였다. 마우스 모노클로날 항-티미딘 포스포릴라아제 [P-GF, 44C] 항체를 사용하였다 (Abcam, ab 3151).
- [0114] 결과가 다음과 같이 나타났다:
- [0115] - 12개의 비-암성 조직에서, PD-ECGF가 검출되지 않았다; 따라서 암 환자에서 비-암성 조직 및 종양 덩어리의 PD-ECGF 수준간의 유의한 차이는 없다 (만-휘트니 검정, $p < 0.0001$) (도 1).
- [0116] - 면역조직화학법에 의한 분석된 PD-ECGF 단백질 발현은 69명의 RCC 환자 중 67개 (97% 초과)의 조직 샘플에서 발견되었고, 유방암 환자로부터의 조직 샘플에서 16개 중 9개 (59%)에서 관찰되었다.
- [0117] - PD-ECGF는 상이한 위치 (막, 세포질 및 핵)를 가지며, 이는 위치에 따른 상이한 정도의 발현 수준의 평가를 가능케 한다. 그리고
- [0118] - PD-ECGF는 각 종양의 고유한 특성에 따라 상이한 발현 수준을 나타낸다.
- [0119] PD-ECGF의 기본 (전-처리) 발현 수준을 분석하였을 때, 종양은 각 종양의 고유한 특성에 따른 것일 수 있는 상이한 기본 발현 수준을 보였다 (도 2 및 3).
- [0120] 실시예 2. 환자에서 암을 검출, 진단 및 모니터링하기 위한 암 마커로서 혈장 PD-ECGF 수준을 확인하였다. 혈장 샘플에서 PD-ECGF 단백질 수준을 ELISA에 의해 측정하였다.
- [0121] 건강한 대상 및 암 환자로부터의 혈장에서 PD-ECGF 발현을 ELISA에 의해 분석하였다. 인간 티미딘 포스포릴라아제, TP ELISA 키트 [CSB-E10814h]를 사용하였다.
- [0122] 결과가 다음과 같이 나타났다:
- [0123] - 혈장 PD-ECGF 수준은 암 환자에 비해 건강한 대상에서 검출가능하지 않았다. 정량적으로, 건강한 대상의 PD-ECGF 수준과 암 환자에서의 PD-ECGF의 혈장 수준간의 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 (만-휘트니 검정, $p = 0.0013$) (도 5).
- [0124] - ELISA로 분석된 PD-ECGF의 단백질 발현이 16명의 RCC 환자 중에서 14개 (87 % 초과) 혈장 샘플에서 관찰되었고, 유방암 환자로부터의 혈장 샘플에서 16개 중 11개 (69%), 및 결직장암 환자로부터의 혈장 샘플에서 58개 중 52개 (90%)에서 관찰되었다.
- [0125] - PD-ECGF는 각 환자의 특성에 따라 상이한 발현 수준을 나타냈다.
- [0126] - PD-ECGF 기본 발현 수준을 분석하였을 때, 환자는 각 환자의 고유한 특성에 따른 것일 수 있는 상이한 기본 발현 수준을 나타내는 것으로 관찰되었다 (도 6, 7 및 8).

- [0127] 실시예 3. 항-혈관신생 치료에 대한 반응의 예측 인자로서 면역조직화학법 및 ELISA에 의해 PD-ECGF를 확인하였다.
- [0128] 면역검출에 의해 환자로부터의 종양에서 PD-ECGF 발현을 분석하였다. 마우스 모노클로날 항-티미딘 포스포릴라아제 [P-GF, 44C] 항체를 사용하였다 (Abcam, ab 3151).
- [0129] 결과가 다음과 같이 나타났다:
- [0130] - 63명의 환자로부터의 RCC 조직 샘플에서 PD-ECGF를 평가하였다; RCC 환자에서 PD-ECGF의 보다 높은 조직 수준과 조기 진행의 보다 높은 위험 사이의 유의한연관성이 존재했다 (카플란-마이어 및 멩게한-브레슬로우-윌콕슨 검정, $p=0.045$) (도 4).
- [0131] 한편, 환자로부터의 혈장에서 PD-ECGF 발현을 ELISA에 의해 분석하였다. 인간 티미딘 포스포릴라아제, TP ELISA 키트 [CSB-E10814h]를 사용하였다.
- [0132] 결과가 다음과 같이 나타났다:
- [0133] - 52명의 환자로부터의 결직장암 혈장 샘플에서 PD-ECGF를 평가하였다; 결직장암 환자에서 PD-ECGF의 혈장 수준과 질환 진행에서 PD-ECGF 수준에 대한 유의한 위험 비율에 의해 나타난 조기 진행 위험간의 유의한 연관성이 존재했다 (위험 비율의 사후 확률을 데이터를 평가하는데 사용하였고, 위험 비율이 1보다 큰 사후 확률은 0.041 이었고, 이는 종양 진행과 PD-ECGF 수준간의 연관성을 나타낸다) (도 9).
- [0134] - 14명의 환자로부터의 RCC 혈장 샘플에서 PD-ECGF를 평가하였다; RCC 환자에서 PD-ECGF의 보다 높은 혈장 수준과 조기 진행의 보다 높은 위험간의 유의한 연관성이 존재했다 (카플란-마이어 및 Logrank (만텔-콕스) 검정, $p<0.07$). (도 10).
- [0135] 따라서, PD-ECGF 발현은 치료된 환자에서 암 진행을 예측하는데 잠재적인 가치가 있다. 이러한 발견은 RCC, 유방암, 결직장암 및 다른 유형의 암 치료에 대한 반응의 예측 가치가 있는 신규한 바이오마커로서의 PD-ECGF의 용도를 뒷받침한다.
- [0136] 실시예 4. PD-ECGF 발현 수준 및 암 예후
- [0137] PD-ECGF 발현 수준과 암 예후간의 관계를 분석하기 위하여, 본 발명자들은 Cancer Genomics의 cBioPortal (www.cbioportal.org)을 사용하여 PD-ECGF의 저발현 또는 고발현을 갖는 암 환자에 기초하여 카플란-마이어 생존 곡선을 생성하였다 (도 A 내지 M).
- [0138] 도 11 내지 23을 생성하기 위해 다음의 프로토콜을 따랐다: 웹사이트 www.cbioportal.org의 홈페이지상의 "Query"를 선택하라; Select Cancer Study로부터 "studies in cancer patients (*)"를 선택하라. "Select Genomic Profiles"에서, "mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)"만 선택하라. "Enter Gene set"에 "TYMP"를 입력하고, "Submit"을 클릭하라. Oncoprint는 변경 비율 (아래 표 1 및 표2 참조)을 제공하며 "Survival" 탭을 클릭하면, 전체적인 생존 카플란-마이어 추정치가 나타날 것이다.

표 1

- [0139] 암 세포주에서의 PD-ECGF 변경 비율

암세포주에서의 연구	PD-ECGF (변경 %)
암 세포주 백과사전 (Novartis/Broad, Nature 2012) 모두 완전한 종양 (877개 샘플)	12
NCI-60 세포주 (NCI, Cancer Res. 2012) 모두 완전한 샘플 (60개 샘플)	7

표 2

- [0140] 암 환자에서 PD-ECGF 변경 비율

암 환자에서의 연구	PD-ECGF 변경 %
결직장 선암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (7개 샘플)	14%
교모세포종 (TCGA, Nature 2008) 모두 완전한 종양 (91개 샘플)	2%

교모세포종 (TCGA, Cell 2013) 모두 완전한 종양 (291개 샘플)	3%
위 선암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (33개 샘플)	3%
신장 신 투명 세포암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (413개 샘플)	4%
신장 신 투명 세포암종 (TCGA, Nature 2013) 모두 완전한 종양 (392개 샘플)	5%
신장 신 유두상 세포 암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (161개 샘플)	5%
폐 선암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (230개 샘플)	6%
전립선 선암종 (MSKCC, Cancer Cell 2010) 모두 완전한 종양 (85개 샘플)	2%
전립선 선암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (332개 샘플)	4%
고환 생식세포 암 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (149개 샘플)	4%
흉선종 (TCGA, Provisional) 모두 종양 (124개 샘플)	5%
갑상선 암종 (TCGA, Provisional) 모두 완전한 종양 (397개 샘플)	6%
유두 갑상선암종(TCGA, Cell 2014) 모두 완전한 종양 (388개 샘플)	6%

[0141] 결과가 다음과 같이 나타났다:

[0142] - PD-ECGF 변형을 가진 결직장 선암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 11).

[0143] - PD-ECGF 변형을 가진 교모세포종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 12).

[0144] - PD-ECGF 변형을 가진 신장 신 투명 세포암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 13).

[0145] - PD-ECGF 변형을 가진 신장 신 투명 세포암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 14).

[0146] - PD-ECGF 변형을 가진 신장 신 투명 세포암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 15).

[0147] - PD-ECGF 변형을 가진 신장 신 유두상 세포 암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 16).

[0148] - PD-ECGF 변형을 가진 폐 선암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 17).

[0149] - PD-ECGF 변형을 가진 폐 선암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 18).

[0150] - PD-ECGF 변형을 가진 전립선 선암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 19).

[0151] - PD-ECGF 변형을 가진 고환 생식세포 암의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 20).

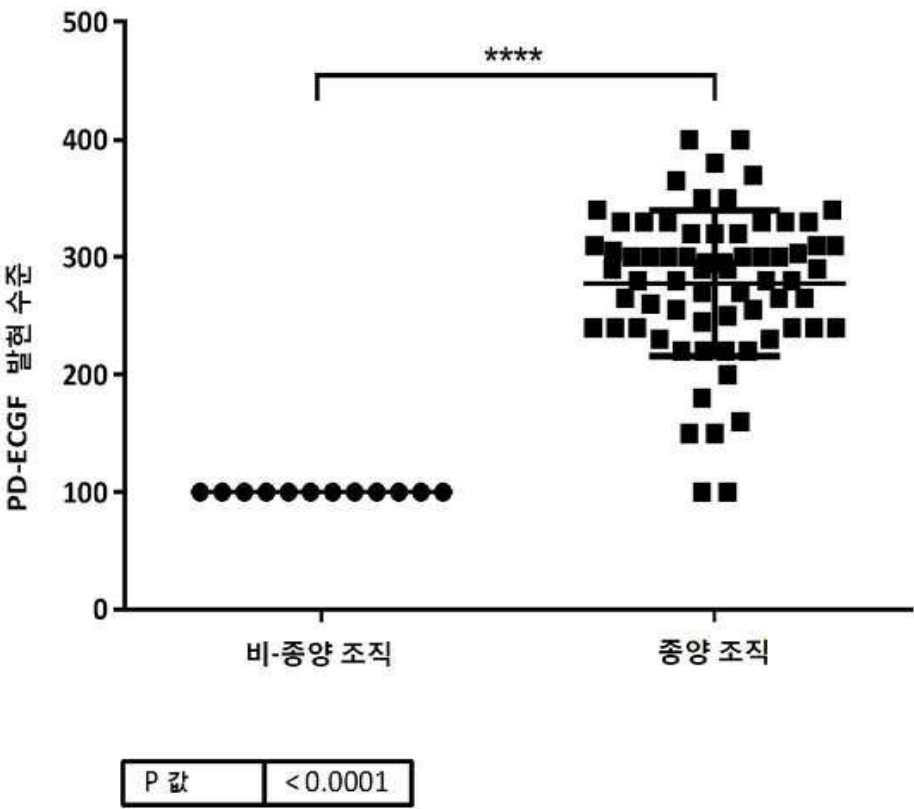
[0152] - PD-ECGF 변형을 가진 흉선종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 21).

[0153] - PD-ECGF 변형을 가진 흉선종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 무병 생존을 가졌다 (도 21). 그리고

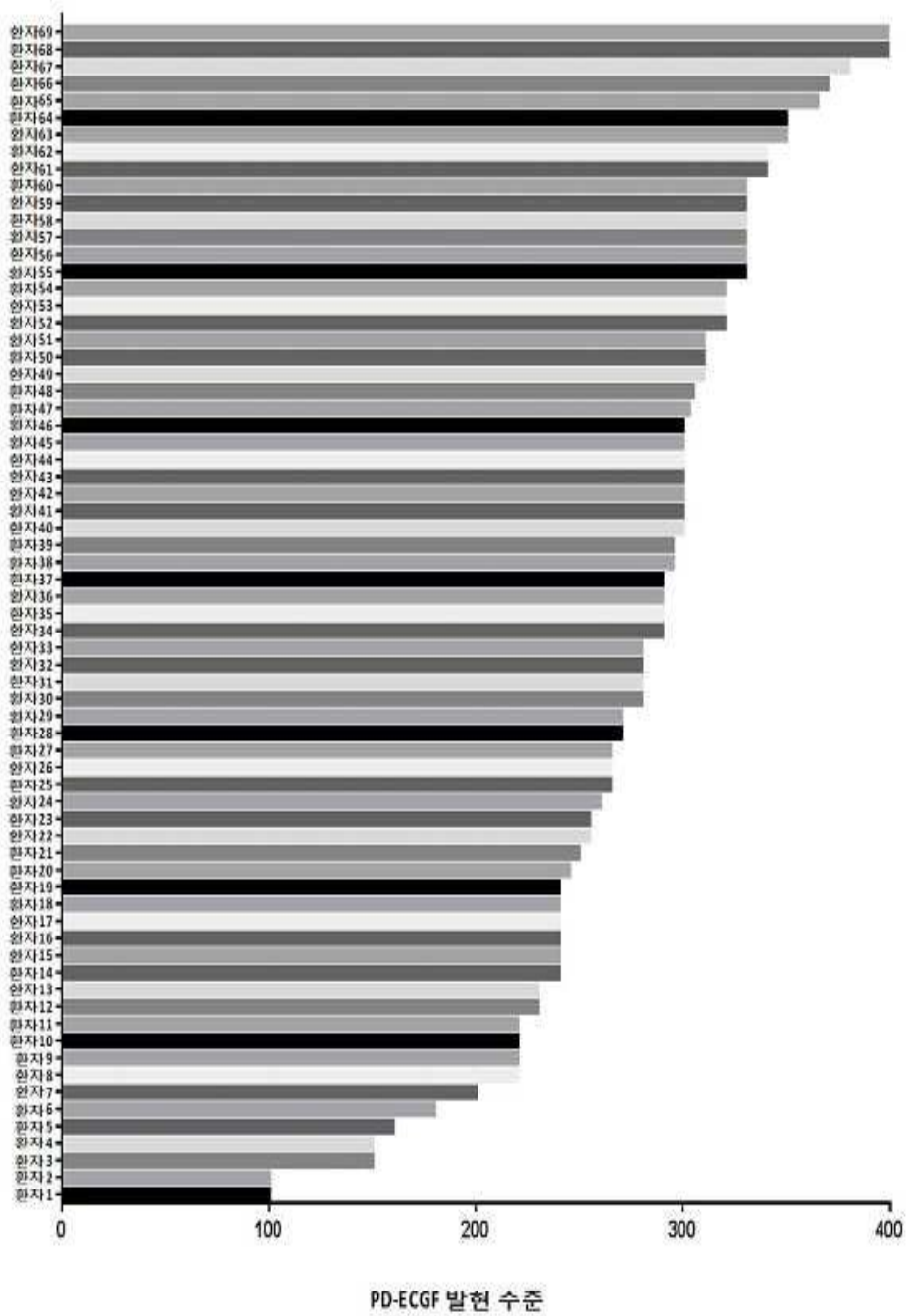
[0154] - PD-ECGF 변형을 가진 유두 갑상선암종의 경우 PD-ECGF 변형이 없는 경우보다 좋지 않은 전체적인 생존을 가졌다 (도 21).

도면

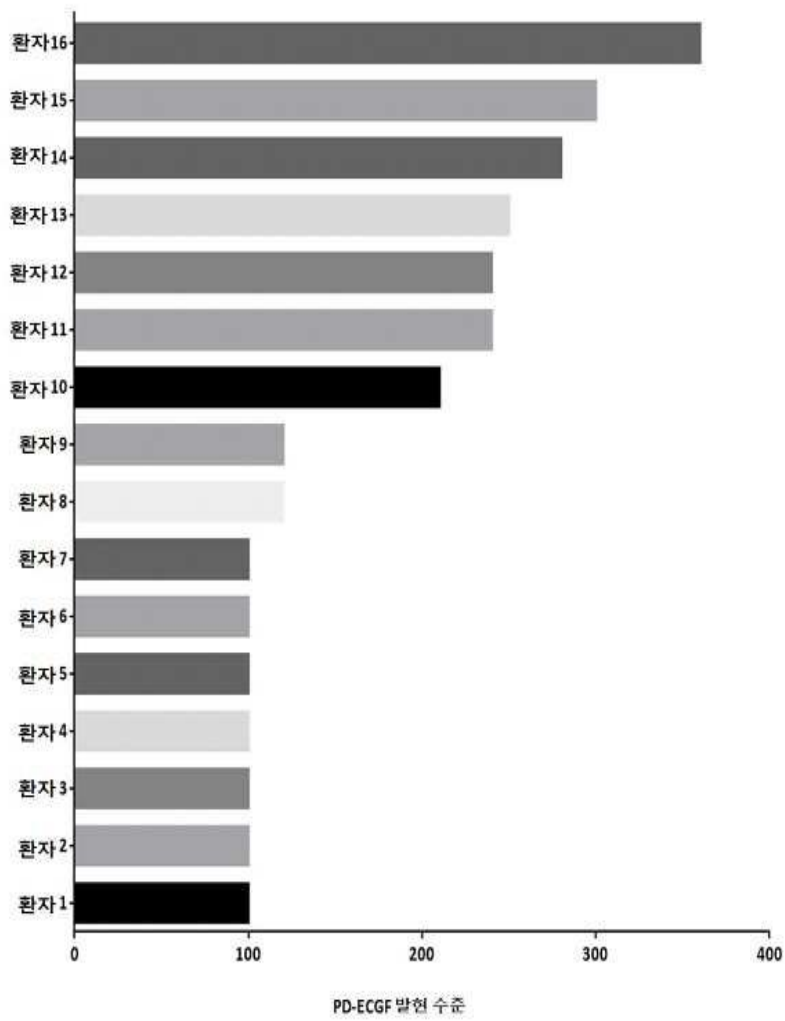
도면1



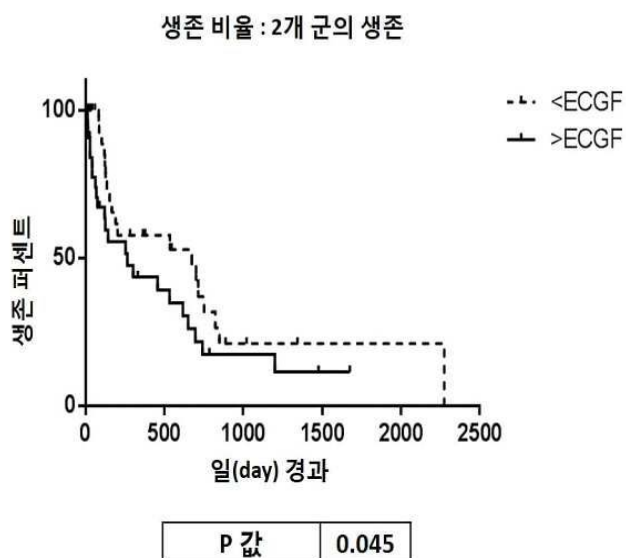
도면2



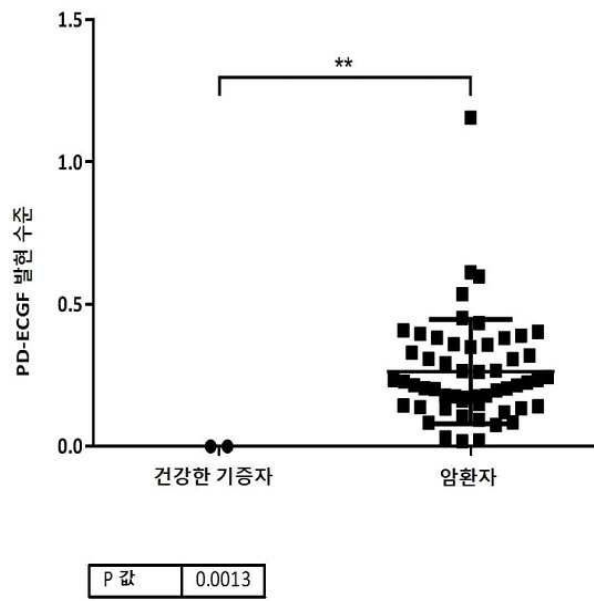
도면3



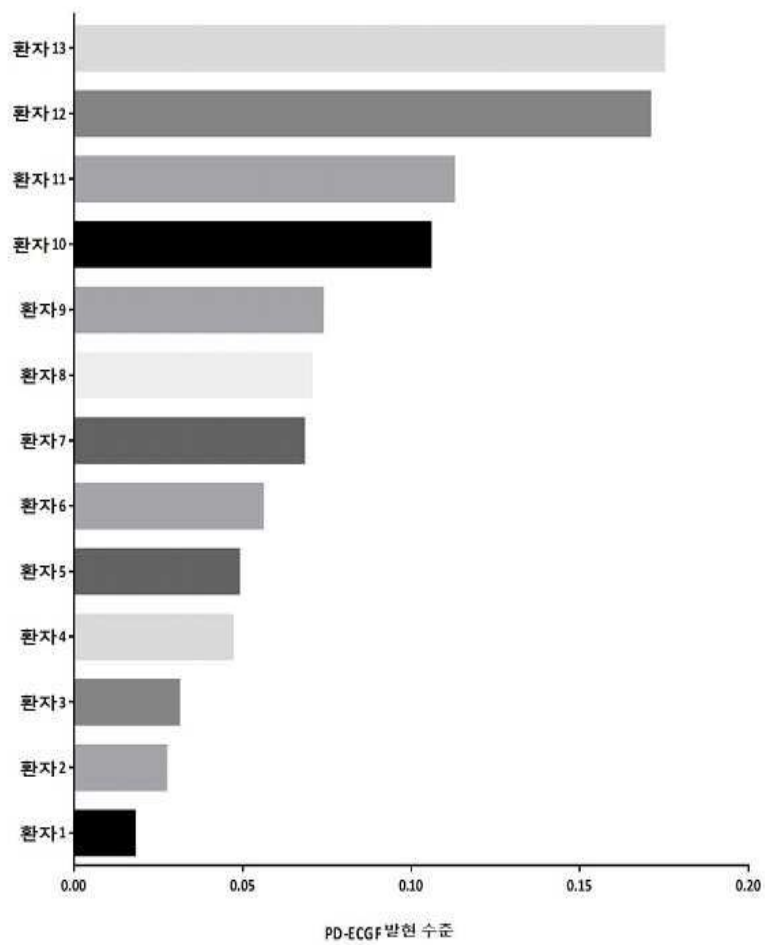
도면4



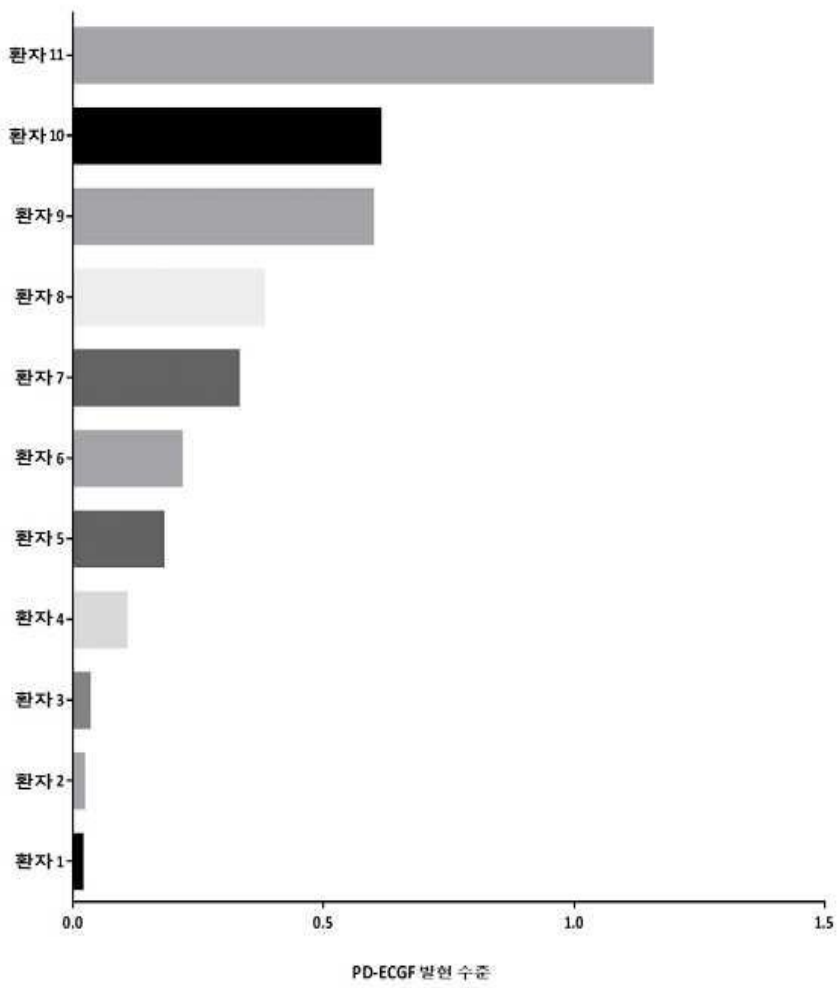
도면5



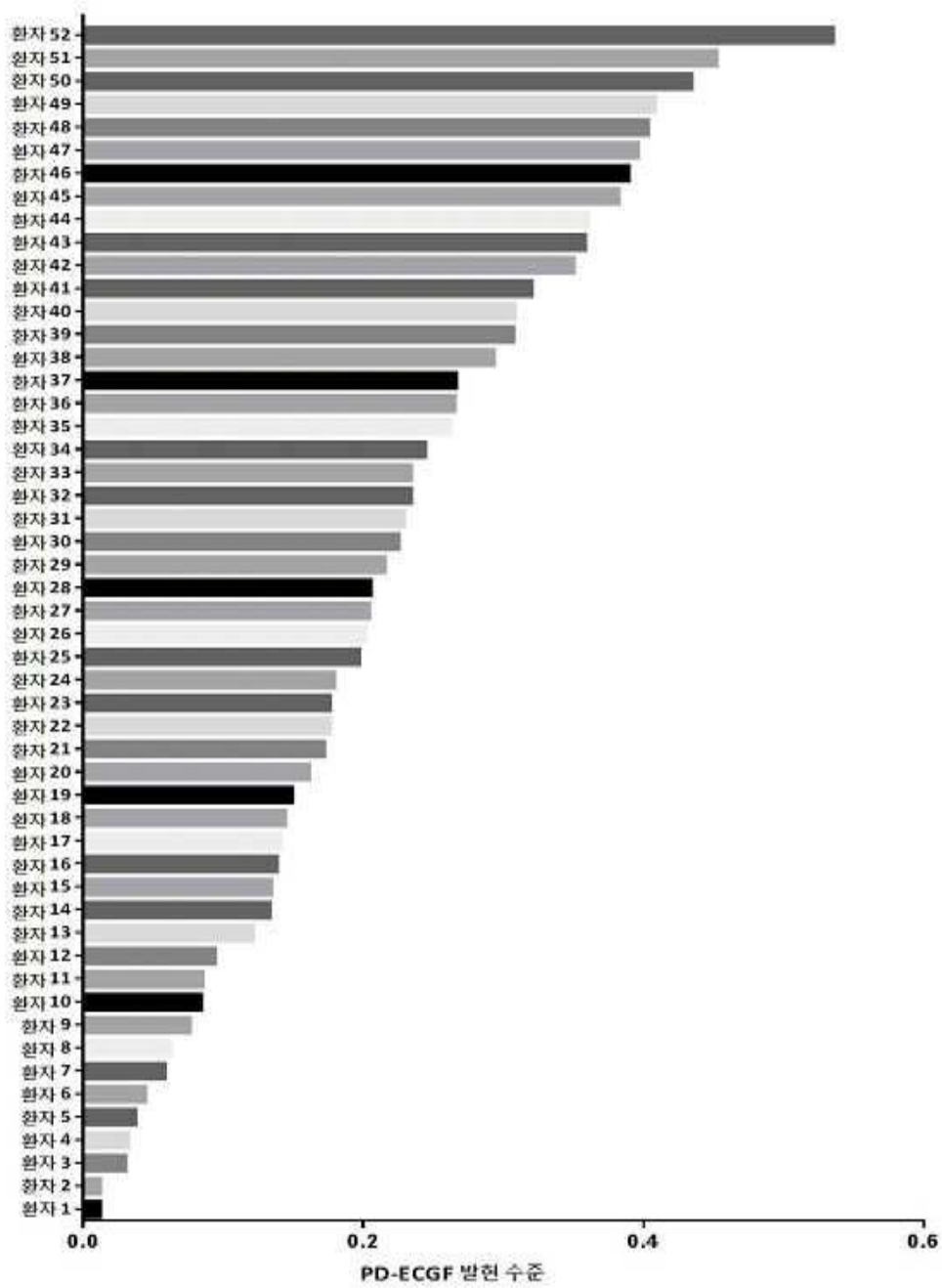
도면6



도면7



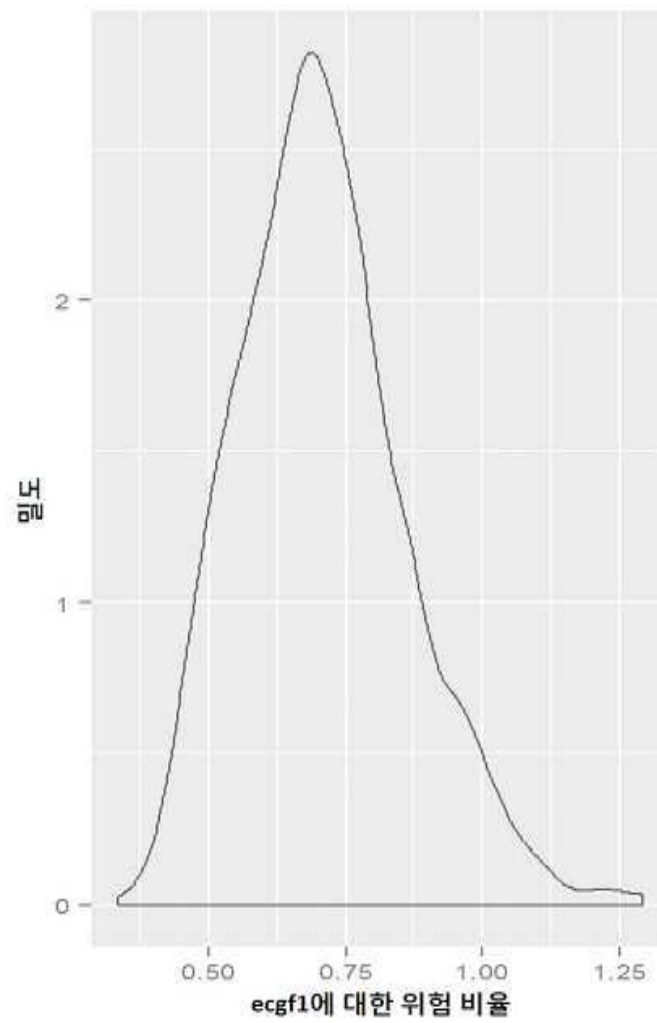
도면8



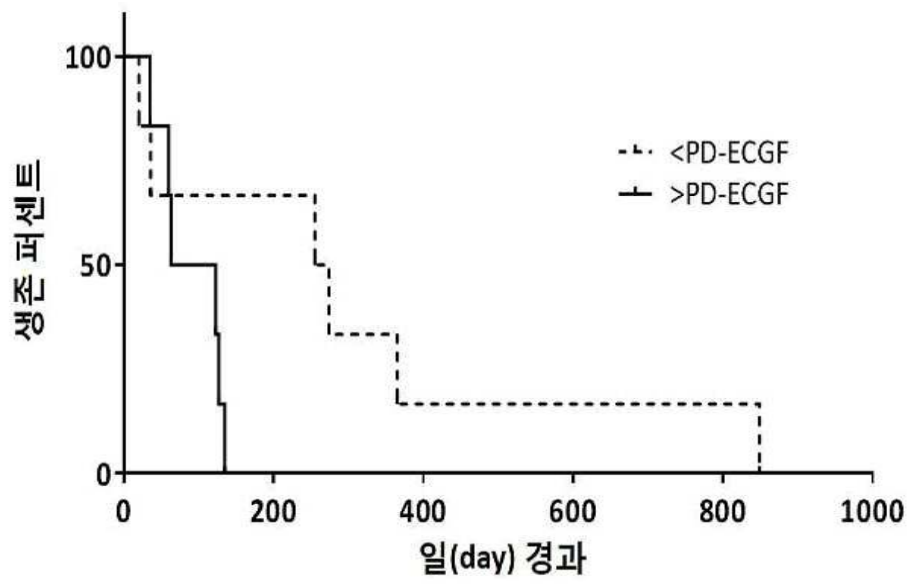
도면9

위험 비율

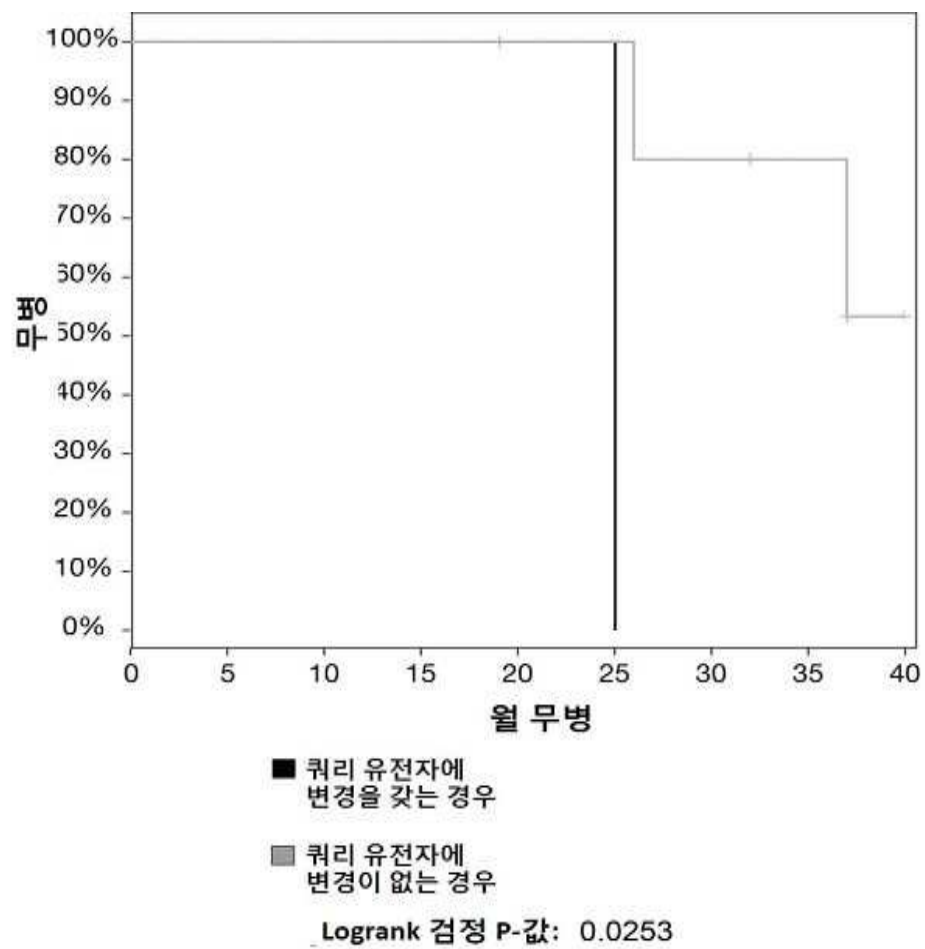
	평균	표준편차	2,50%	중앙값	97,50%	P(HR>1)
PD-ECGF	0.708	0.151	0.457	0.697	1.034	0.041



도면10

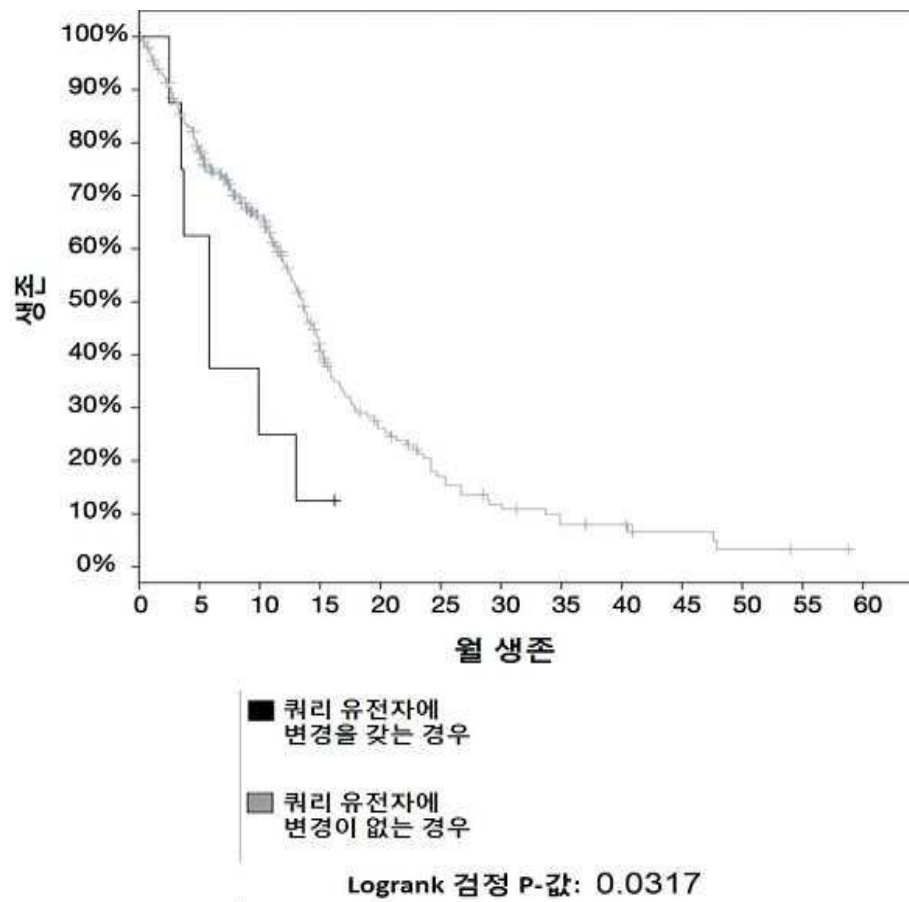


도면11



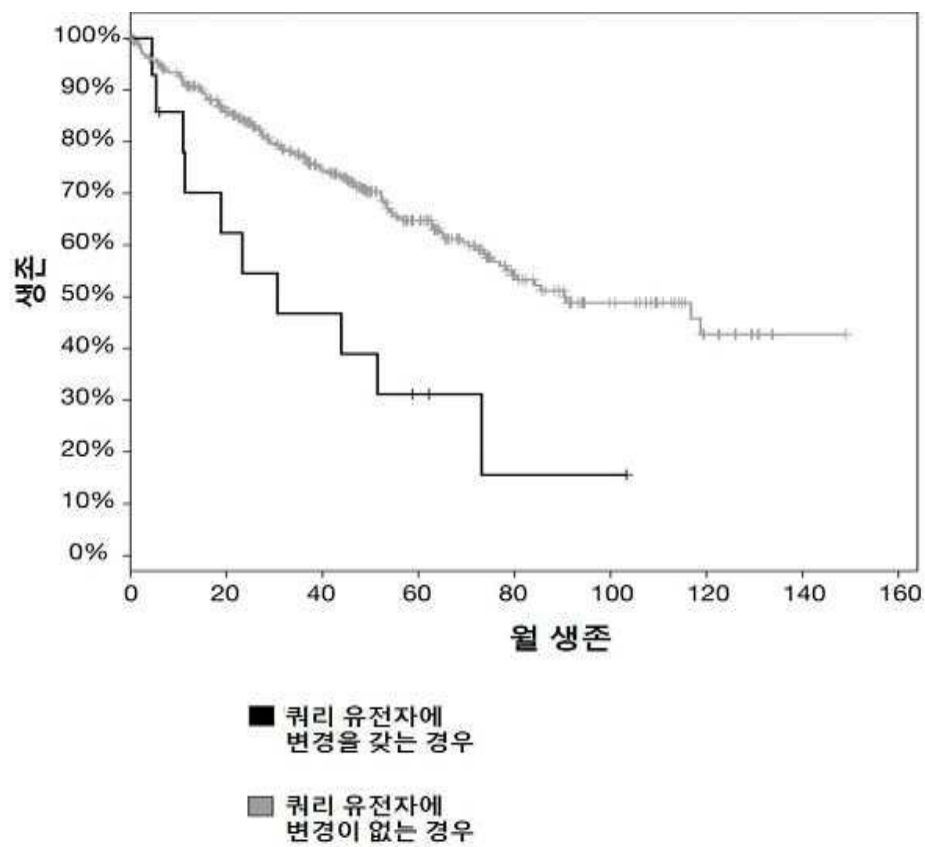
	총 경우의 수	재발된 경우 의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	1	1	25.03
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	6	2	NA

도면12



	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	8	7	5.8
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	247	161	13.6

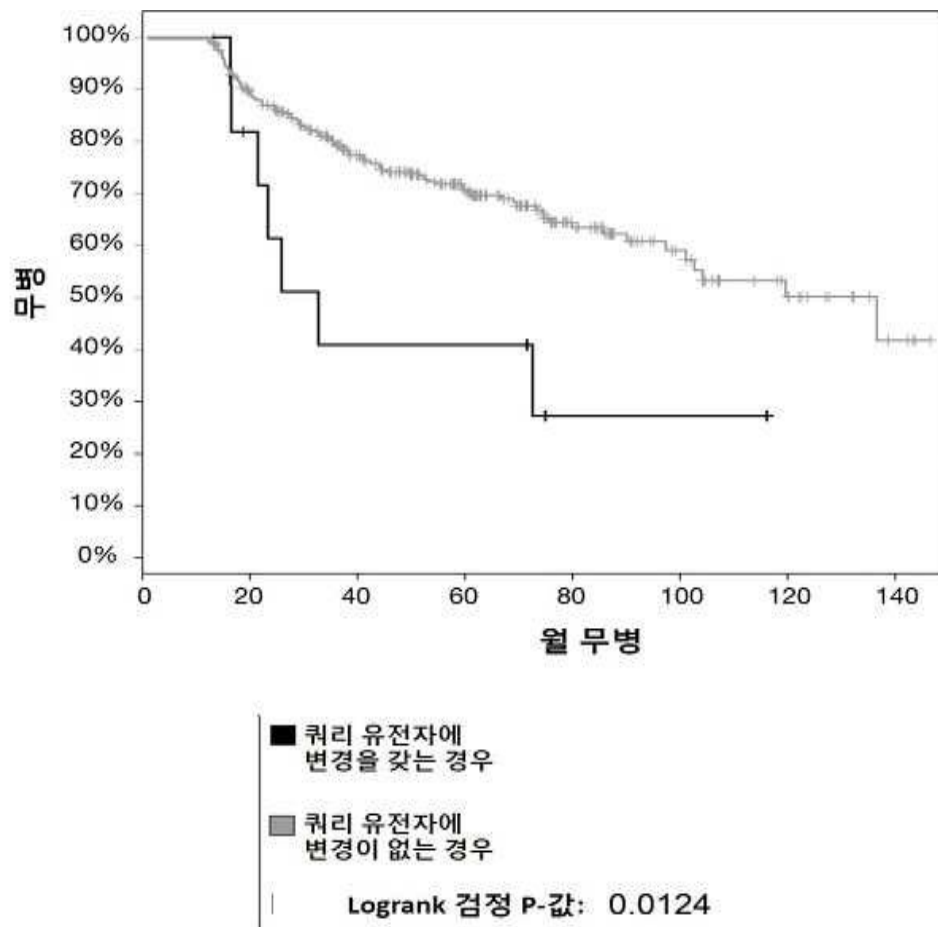
도면13



Logrank 검정 P-값: 0.00137

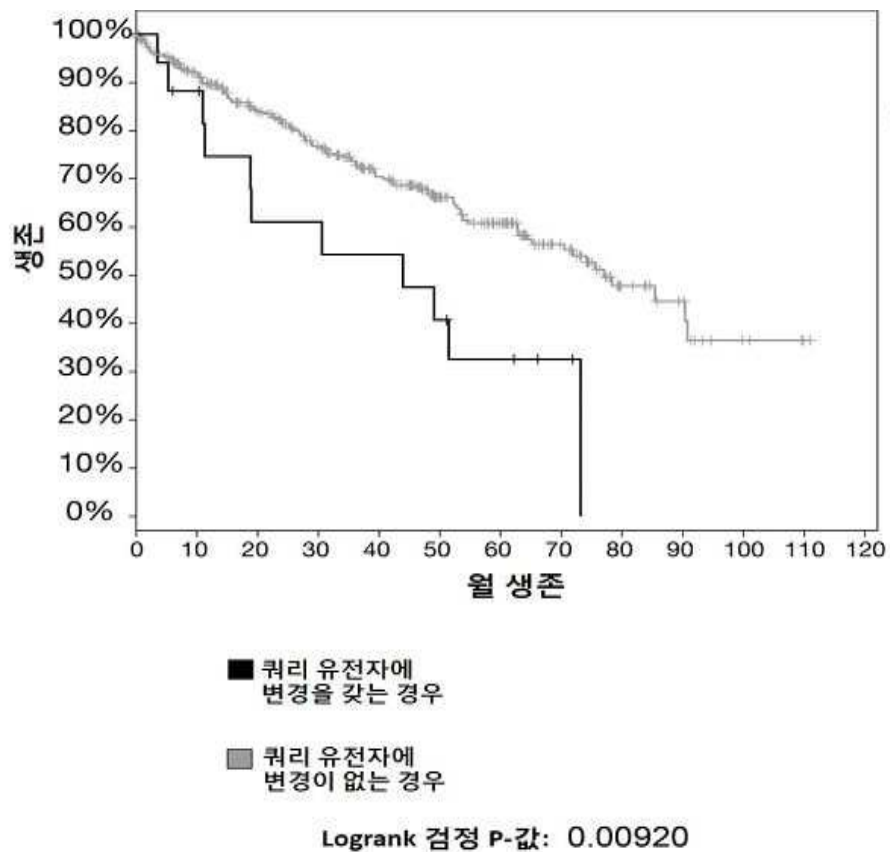
	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	15	10	30.62
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	398	135	90.8

도면14



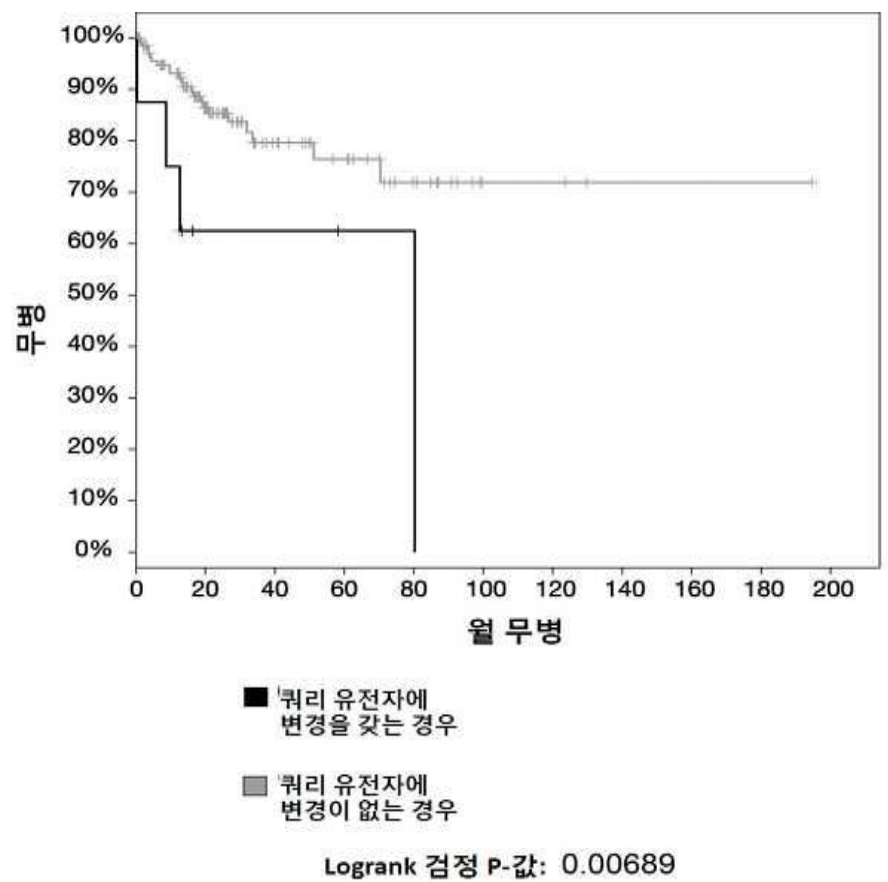
	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	12	7	19.97
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	323	101	123.72

도면15

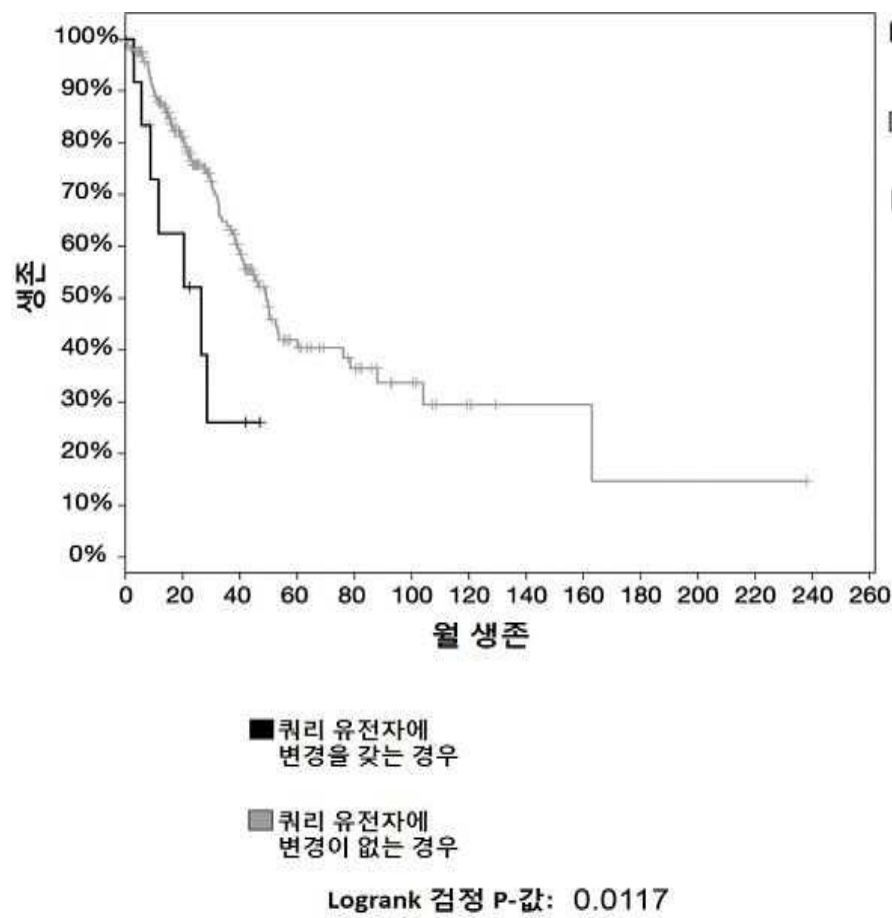


	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	18	11	34.927
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	372	122	76.979

도면16

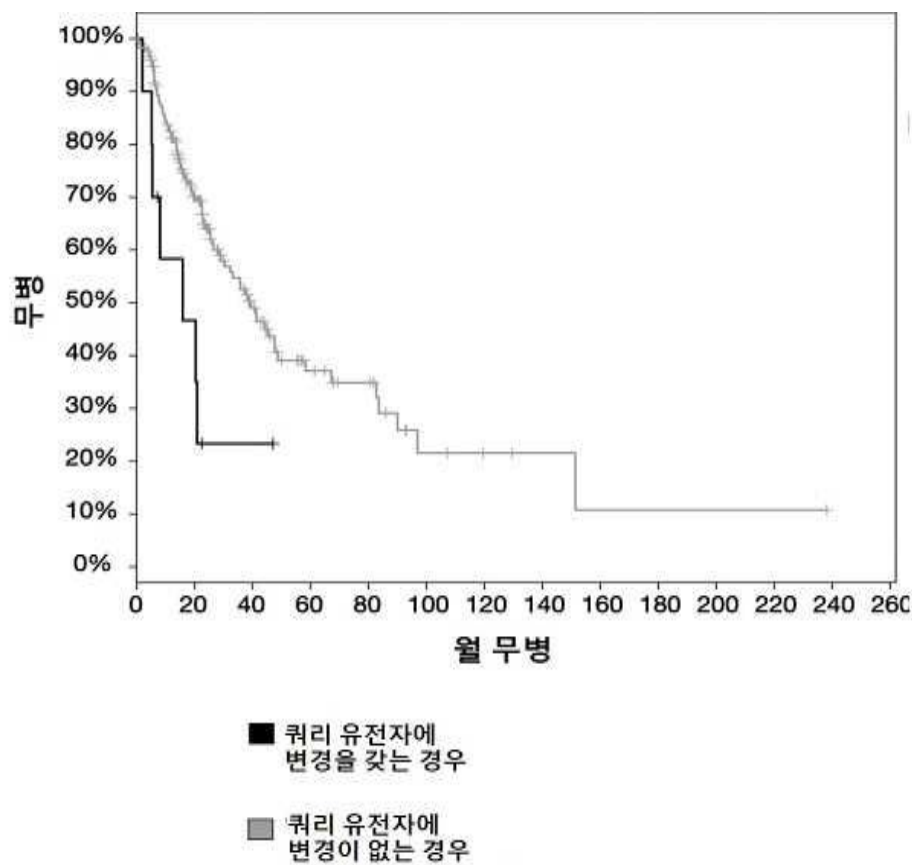


도면17



	총 경우의 수	재발된 경우 의 수	평균 월 무병
켜리 유전자에 변형을 갖는 경우	12	7	26.54
켜리 유전자에 변형이 없는 경우	209	84	46.24

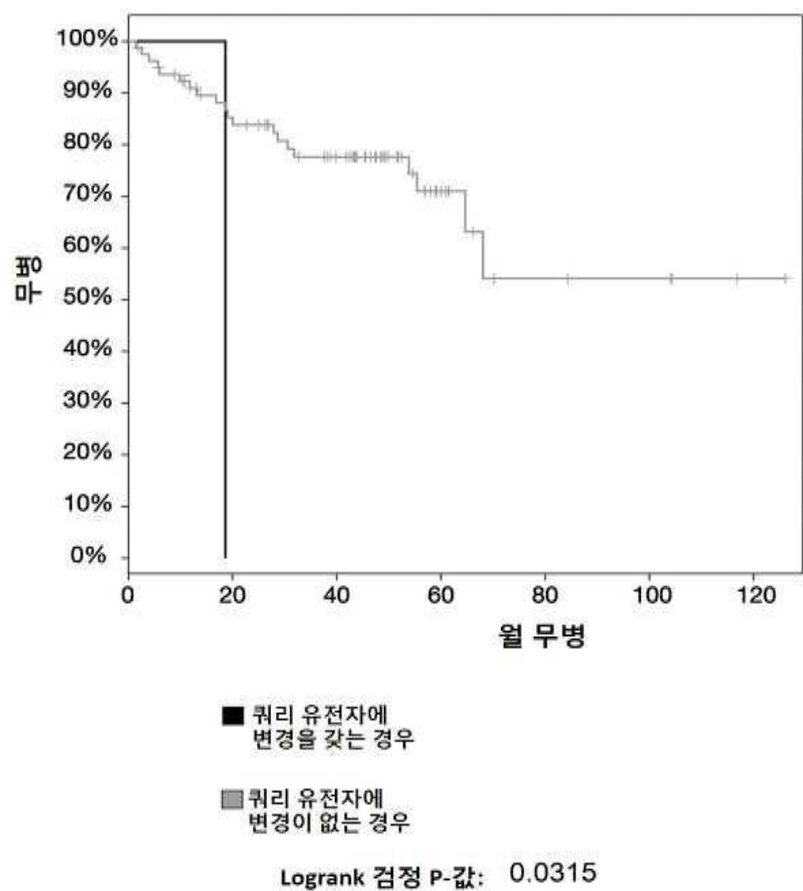
도면18



Logrank 검정 P-값: 0.0100

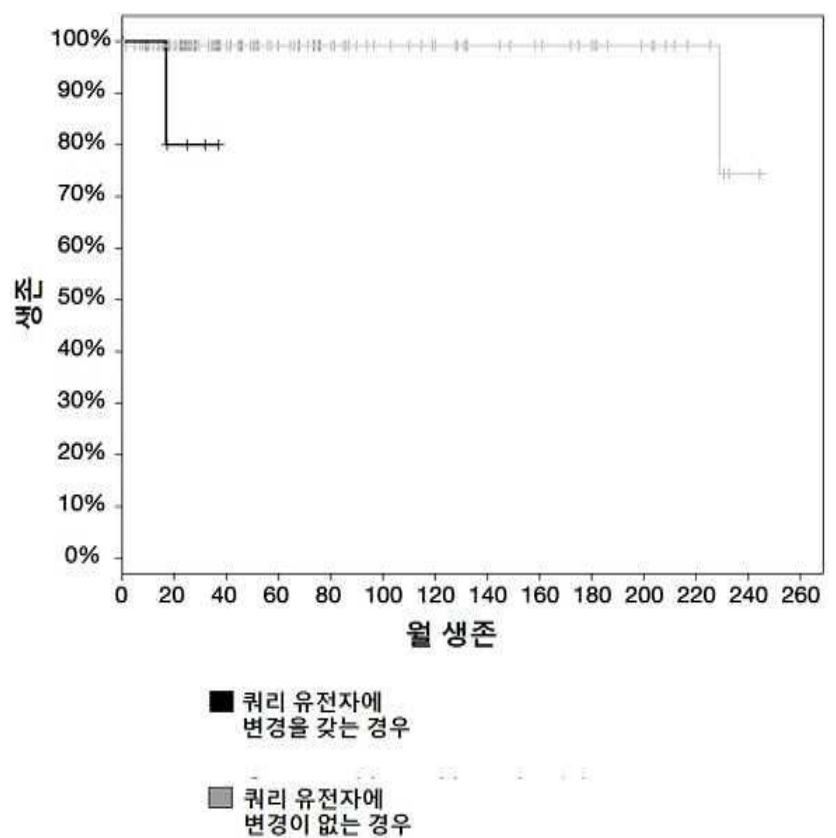
	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	10	7	15.87
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	176	82	39.49

도면19



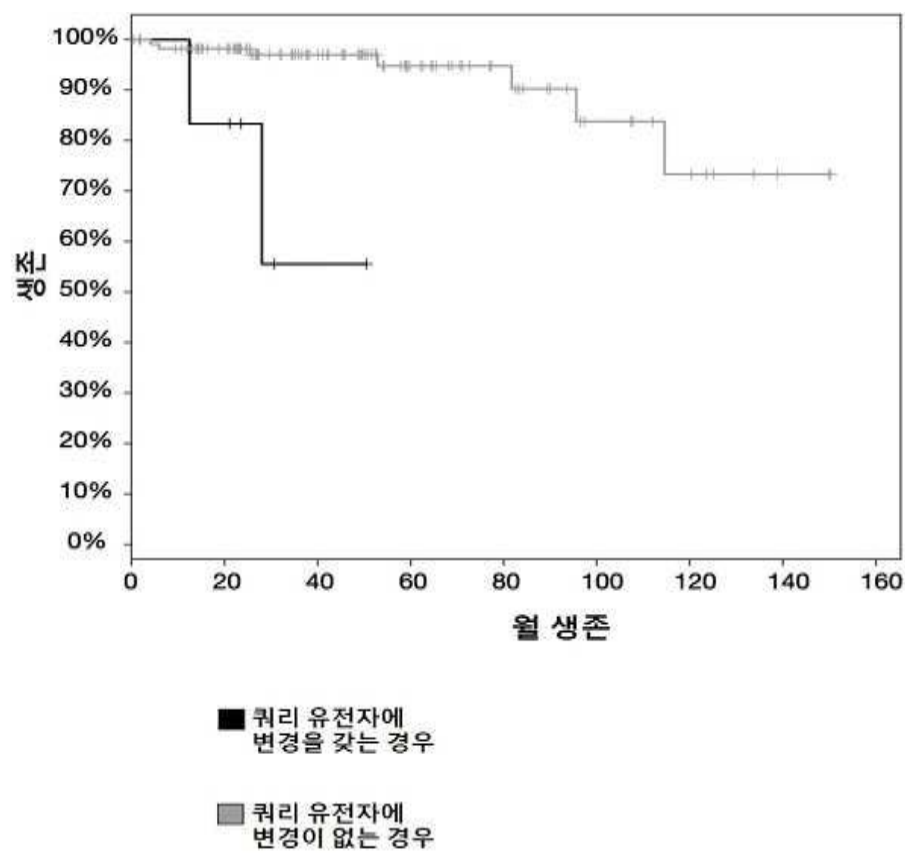
	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
퀴리 유전자에 변경을 갖는 경우	1	1	18.83
퀴리 유전자에 변경이 없는 경우	79	20	NA

도면20



	총 경우의 수	재발된 경우 의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	5	1	NA
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	127	2	NA

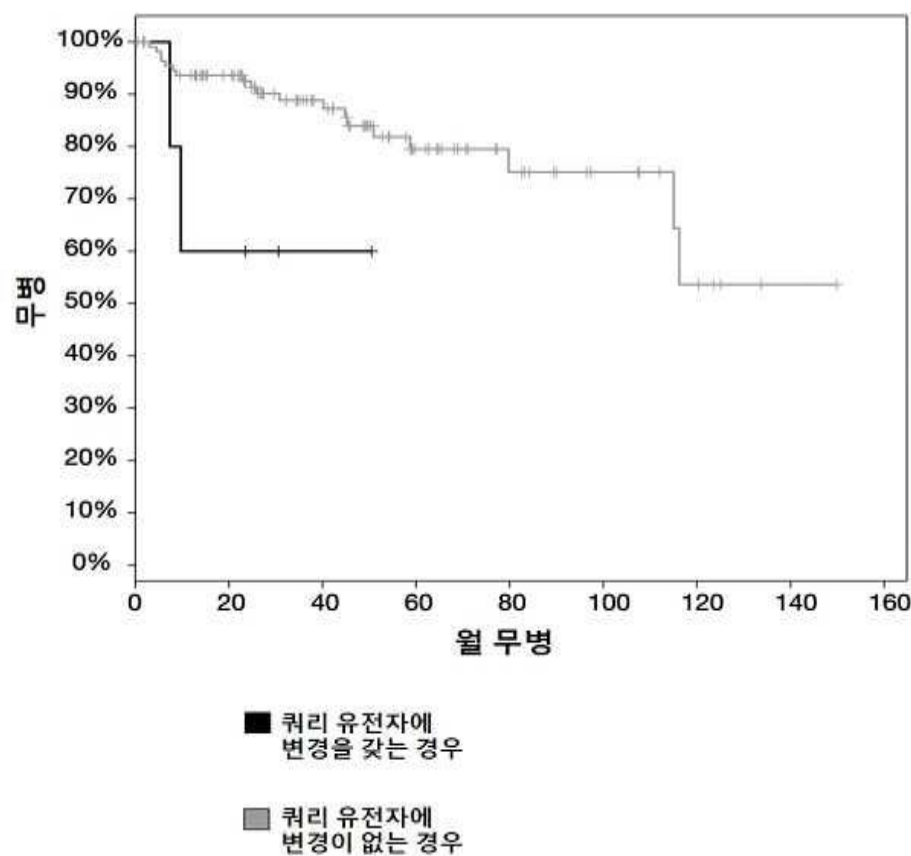
도면21



Logrank 검정 P-값: 1.397e-4

	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변형을 갖는 경우	6	2	NA
쿼리 유전자에 변형이 없는 경우	116	7	NA

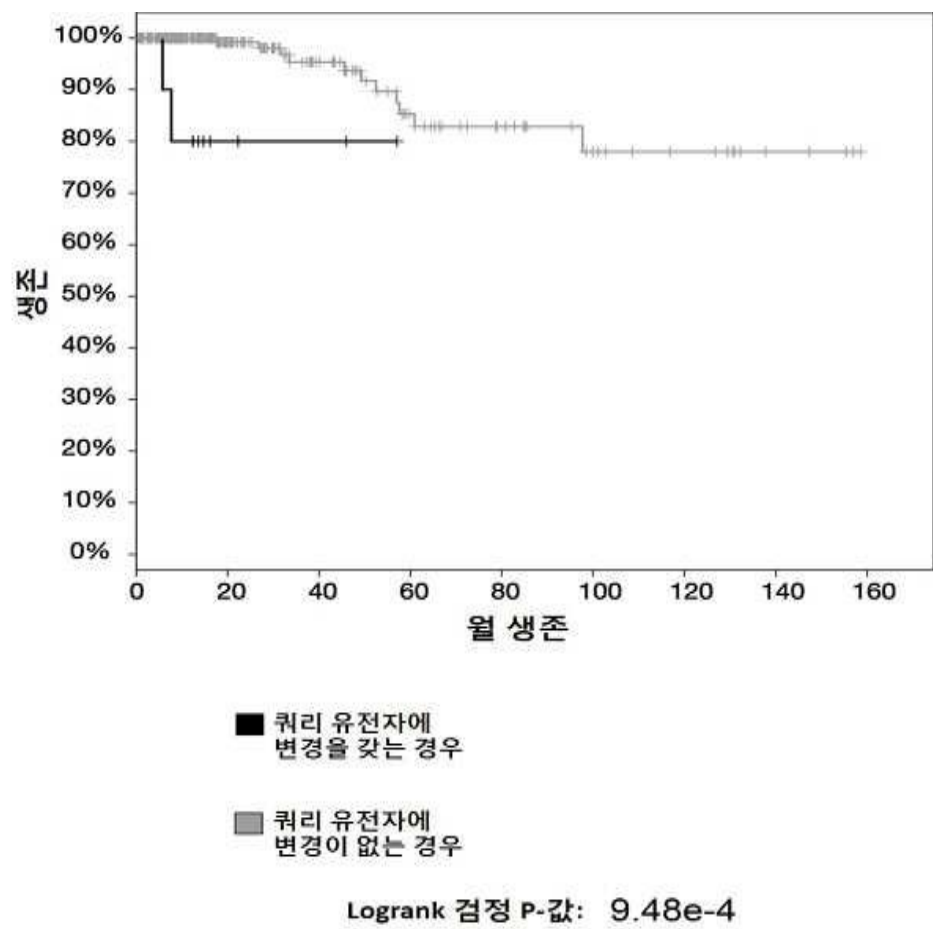
도면22



Logrank 검정 P-값: 0.0403

	총 경우의 수	재발된 경우의 수	평균 월 무병
쿼리 유전자에 변경을 갖는 경우	5	2	NA
쿼리 유전자에 변경이 없는 경우	113	19	NA

도면23



	총 경우의 수	재발된 경우 의 수	평균 월 무병
켜리 유전자에 변경을 갖는 경우	18	2	NA
켜리 유전자에 변경이 없는 경우	296	11	NA