



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월16일
(11) 등록번호 10-1553723
(24) 등록일자 2015년09월10일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7003403</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2008년07월11일
심사청구일자 2013년07월04일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년02월16일</p> <p>(65) 공개번호 10-2010-0063011</p> <p>(43) 공개일자 2010년06월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2008/069764</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/012140
국제공개일자 2009년01월22일</p> <p>(30) 우선권주장
60/949,820 2007년07월13일 미국(US)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
WO2002090964 A1
WO2006054991 A1
J. Immunological Methods, 290권,107-120
면(2004)
PNAS, 100권, 16호, 9330-9335면(2003)</p> | <p>(73) 특허권자
네스텍 소시에테아노님
스위스연방 버베이 1800 아브뉴 네슬레 55</p> <p>(72) 발명자
상, 샤라트
미국 94022 캘리포니아 로스 알토스 힐즈 줄리에
타 레인 27359
하비, 진
미국 94550 캘리포니아 리버모어 아로요 로드
1554</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 17 항

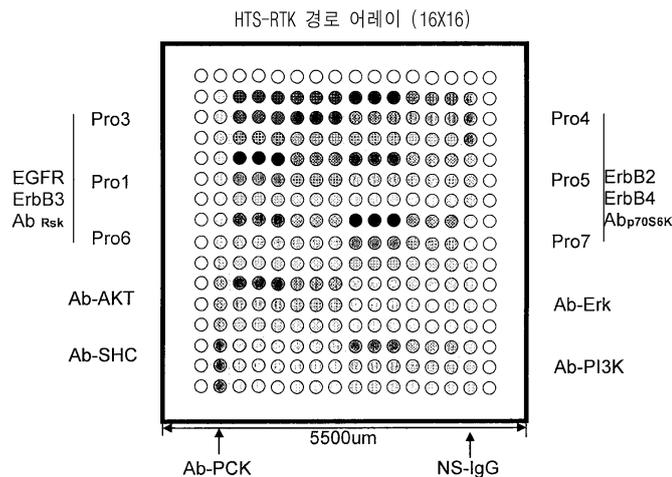
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 항체 - 기반 어레이를 사용한 폐 암 치료를 위한 약물 선별법

(57) 요약

본 발명은 중앙 세포내 신호 전달 경로의 구성요소의 활성화 상태를 검출하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 사용으로 유래된 신호 전달 경로의 구성요소의 활성화 상태에 관한 정보는 암 진단, 예후, 및 암 치료제의 설계에 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는, 폐 종양 치료를 위한 적합한 항암 약물을 선별하는 방법:

- (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 세포를 용해(lysis)시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- (c) 다수의 신호 전달 분자에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈(dilution series)를 포함하는 검정(assay)을 이용하여 상기 세포 추출물내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체상에 고정되고(restrained), 상기 다수의 신호 전달 분자가 Her3(ErbB3)을 포함하는 검출 단계; 및
- (d) 상기 다수의 신호 전달 분자에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일(reference activation profile)과 비교하는 단계.

청구항 2

하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양의 반응을 확인하는 방법:

- (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- (c) 다수의 신호 전달 분자에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체상에 고정되고, 상기 다수의 신호 전달 분자가 Her3(ErbB3)을 포함하는 검출 단계; 및
- (d) 상기 다수의 신호 전달 분자에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교하는 단계.

청구항 3

하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양을 지니는 환자의 반응을 예측하는 방법:

- (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- (c) 다수의 신호 전달 분자에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체상에 고정되고, 상기 다수의 신호 전달 분자가 Her3(ErbB3)을 포함하는 검출 단계; 및
- (d) 다수의 신호 전달 분자에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교하는 단계.

청구항 4

제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폐 종양이 편평세포암(squamous cell carcinoma),

선암, 대세포암(large cell carcinoma), 기관지폐포암(bronchoalveolar carcinoma, BAC), 및 연막세포암(oat cell carcinoma)과 같은 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)을 지니는 환자로부터 유래되는 방법.

청구항 5

제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 순환 종양 세포(circulating tumor cells), 순환 내피 세포(circulating endothelial cells), 순환 내피 선조 세포(circulating endothelial progenitor cells), 암 줄기 세포(cancer stem cells), 파종성 종양 세포(disseminated tumor cells), 및 이들의 조합물과 같은 폐 종양의 순환 세포를 포함하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 세포가 전혈, 혈청, 혈장, 가래(sputum), 기관지세척액체(bronchial lavage fluid), 소변, 유두 흡인물(nipple aspirate), 림프, 타액(saliva), 미세침 흡인물(fine needle aspirate), 및 이들의 조합물로 이루어진 군에서 선택된 샘플로부터 분리되는 방법.

청구항 7

제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 종양 조직으로부터 분리되는 방법.

청구항 8

제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암 약물이 암 세포내에서 활성화된 신호 전달 경로 구성요소의 기능을 방해하는 물질(agent)을 포함하는 방법.

청구항 9

제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다수의 신호 전달 분자가 EGFR(ErbB1), Her2(ErbB2), Her4(ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, PDGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFR, AbI, FTL3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, 또는 이들의 조합물을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

- 제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 검정이 하기 단계들을 포함하는 방법:
- (i) 상기 세포 추출물과 상기 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 함께 인큐베이션하여 다수의 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;
 - (ii) 상기 다수의 포획된 분석대상물과 상응하는 상기 분석대상물에 특이적인 활성화 상태-의존성 항체를 함께 인큐베이션하여 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;
 - (iii) 상기 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물과 신호 증폭쌍(signal amplification pair)의 제 1 및 제 2 일원을 함께 인큐베이션하여 증폭된 신호를 생성시키는 단계; 및
 - (iv) 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 생성된 상기 증폭된 신호를 검출하는 단계.

청구항 11

- 제 1항, 제 2항 또는 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 검정이 하기 단계들을 포함하는 방법:
- (i) 상기 세포 추출물과 상기 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 함께 인큐베이션하여 다수의 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;
 - (ii) 상기 다수의 포획된 분석대상물과 다수의 활성화 상태-비의존성 항체 및 상응하는 상기 분석대상물에 특이적인 다수의 활성화 상태-의존성 항체를 포함하는 검출 항체를 함께 인큐베이션하여 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계로서,
- 여기서 상기 활성화 상태-비의존성 항체가 촉진 모이어티(facilitating moiety)로 표지되고, 상기 활성화 상태-의존성 항체가 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표지되고, 상기 촉진 모이어티가 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원에

채널링(channelling)되고 상기 일원과 반응하는 산화제를 생성시키는 단계;

(iii) 상기 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물과 상기 신호 증폭쌍의 제 2 일원을 함께 인큐베이션하여 증폭된 신호를 생성시키는 단계; 및

(iv) 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원에서 생성된 상기 증폭 신호를 검출하는 단계.

청구항 12

제 1항의 방법에 따른, 폐 종양의 치료를 위한 적합한 항암 약물의 선별을 위한, 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체의 다수의 회석 시리즈를 포함하는 어레이(array)로서, 상기 각각의 회석 시리즈 중의 상기 포획 항체가 세포 추출물내 신호 전달 경로의 구성성분에 상응하는 하나 이상의 분석대상물에 특이적이고, 상기 포획 항체가 Her3(ErbB3)과 반응하는 항체를 포함하는 어레이.

청구항 13

제 2항의 방법에 따른, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양의 반응의 확인을 위한, 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체의 다수의 회석 시리즈를 포함하는 어레이(array)로서, 상기 각각의 회석 시리즈 중의 상기 포획 항체가 세포 추출물내 신호 전달 경로의 구성성분에 상응하는 하나 이상의 분석대상물에 특이적이고, 상기 포획 항체가 Her3(ErbB3)과 반응하는 항체를 포함하는 어레이.

청구항 14

제 3항의 방법에 따른, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양을 지니는 환자의 반응의 예측을 위한, 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체의 다수의 회석 시리즈를 포함하는 어레이(array)로서, 상기 각각의 회석 시리즈 중의 상기 포획 항체가 세포 추출물내 신호 전달 경로의 구성성분에 상응하는 하나 이상의 분석대상물에 특이적이고, 상기 포획 항체가 Her3(ErbB3)과 반응하는 항체를 포함하는 어레이.

청구항 15

제 12항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신호 전달 경로가 세포 증식 또는 종양 혈관신생에 관여하는 어레이.

청구항 16

제 12항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포획 항체가 EGFR, ErbB2, ErbB4, Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, P70S6K, VEGFR1, VEGFR2, Tie2, 및 V-카드헤린(Cadherin)-R2 복합체와 반응하는 항체들로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 일원을 추가로 포함하는 어레이.

청구항 17

제 12항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 추출물이 고체 종양의 순환 세포의 추출물을 포함하는 어레이.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

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

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

발명의 설명

배경 기술

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본원은 2007년 7월 13일에 출원된, 미국 가특허 출원 제60/949,820호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 특허문헌의 교시내용은 모든 목적을 위해 이의 전체로 참고문헌으로 본원에 통합된다.

[0003] **연방 지원 연구 또는 개발하에 이루어진 발명에 대한 권리에 관한 진술**

[0004] 해당사항 없음.

[0005] **"서열목록", 표, 또는 콤팩트 디스크로 제출된 컴퓨터 프로그램 수록 첨부물에 관한 설명**

[0006] 해당사항 없음.

[0007] **발명의 배경**

[0008] 세포내 신호 전달 과정은, 몇가지 예를 들어보면, 세포 분열 및 사멸, 물질대사, 면역 세포 활성화, 신경전달, 및 지각(sensory perception)을 포함하는 다양한 생물학적 기능에 관여한다. 따라서, 세포내에서 정상적인 신호 전달에서의 교란은 수많은 질병 상태, 예컨대, 당뇨병, 심장질환, 자가면역, 및 암을 유발할 수 있다.

[0009] 한가지 잘 특성규명된 신호 전달 경로는 MAP 키나아제 경로인데, 이 경로는 세포에서 세포 증식의 촉진을 위하여 내피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF)로부터의 신호를 전달하는데 관여한다(도 1 참조). EGF는 막통과 수용체-연관 티로신 키나아제인, 내피 성장 인자 수용체(EGFR)에 결합하고, 상기 수용체는 EGF의 결합에 의해 활성화된다. EGFR에 대한 EGF의 결합은 상기 수용체의 세포질 도메인의 티로신 키나아제 활성을 활성화시킨다. 이 키나아제 활성화의 한가지 결과는 티로신 잔기 상의 EGFR의 자가인산화(autophosphorylation)이다. 상기 활성화된 EGFR 상의 인산화된 티로신 잔기는 SH2 도메인을 함유하는 어댑터 단백질, 예컨대, GRB2의 결합을 위한 도킹 부위를 제공한다. 어댑터로서 이의 기능에서, GRB2는 GRB2 상의 SH3 도메인을 경유하여, 구아노신 뉴클레오티드 교환 인자인, SOS에 추가로 결합한다. EGFR-GRB2-SOS의 복합체의 형성은 Ras로부터 GDP의 제거를 촉진하는 구아노신 뉴클레오티드 교환 인자에 대한 SOS 활성화를 야기시킨다. GDP의 제거시, Ras는 GTP에 결합하고 활성화된다.

[0010] 활성화 후, Ras는 세린/트레오닌-특이적 단백질 키나아제인, RAF 키나아제에 결합하고, 상기 키나아제의 단백질 키나아제 활성을 활성화시킨다. 후속하여 세포 증식을 야기시키는 단백질 키나아제 캐스케이드의 활성화가 진행된다. 개관하면, 이후, RAF 키나아제는 또 다른 세린/트레오닌 키나아제인 MEK를 인산화시키고 이를 활성화시킨다. 활성화된 MEK는 유사분열물질-활성화단백질키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK)를 인산화시키고 이를 활성화시킨다. MAPK에 의한 추가 인산화 표적들 중에는 40S 리보솜 단백질 S6 키나아제(RSK)가 있다. MAPK에 의한 RSK의 인산화는 RSK의 활성화를 초래하고, RSK의 활성화는 차례로 리보솜 단백질 S6를 인산화시킨다. MAPK의 또 다른 공지된 표적은 전발암유전자(proto-oncogene)인 c-Myc인데, 이 유전자는 다양한 암에서 돌연변이되는, 세포 증식에 중요한 유전자이다. MAPK는 또한 또 다른 단백질 키나아제, MNK를 인산화시

키고 이를 활성화시키는데, 상기 MNK는 차례로 전사 인자, CREB를 인산화시킨다. 간접적으로, MAPK는 또한 Fos 유전자의 전사를 조절하는데, 상기 유전자는 세포 증식에 관여하는 여전히 또 다른 전사 인자를 엔코딩한다. 그러한 전사 인자의 수준 및 활성을 변형시킴으로써, MAPK는 EGF로부터의 본래의 세포의 신호를 전달하여 세포 주기 진행에 중요한 유전자들의 변형된 전사를 일으킨다.

[0011] 신호 전달 경로가 세포 성장에서 수행하는 중심적인 역할을 고려하면, 다수의 암은 세포 증식 경로의 비정상적 활성화로 귀결되는 신호 전달 구성요소에서의 돌연변이 및 다른 변형의 결과로 생겨난다. 예를 들어, EGFR의 과발현 또는 초과도활성은, 교모세포종 다형(multiforme), 대장암, 및 폐암을 포함하는, 다수의 암과 연관되어 있다. 이것은 폐암을 위한 제피티닙과 얼로티닙, 및 대장암을 위한 세톡시맙을 포함하는, EGFR에 대하여 유도되는 항암 치료제의 개발을 촉진하였다.

[0012] 세톡시맙은 EGFR의 세포외 리간드 결합 도메인에 결합하여, EGFR 티로신 키나아제를 활성화시키는 리간드의 결합을 막는, 모노클로날 항체 억제제의 일예이다. 대조적으로, 제피티닙과 얼로티닙은 세포내-위치 EGFR 티로신 키나아제를 억제시키는 작은 분자이다. 키나아제 활성의 부재시, EGFR은 GRB2와 같은, 다운스트림 어댑터 단백질의 결합의 전제조건인, 티로신 잔기들에서의 자동인산화를 겪을 수 없게 된다. 성장을 위해 이러한 경로에 의존하는 세포내 신호전달 캐스케이드를 정지시킴으로써, 종양 증식 및 이동이 감소된다.

[0013] 추가적으로, 다른 연구는 인간 흑색종의 약 70% 및 더 적은 비율(fraction)의 다른 종양이 MAPK 경로의 끊임없이 지속되는 활성화를 유도하는 Raf 유전자내 절 돌연변이(V599E)를 지니는 것을 밝혀냈다(예를 들어, 하기 문헌 참조: Davies et al, *Nature*, 417:949-954 (2002)). 이러한 결과는 특정 신호 전달 경로에서의 돌연변이가 특정 유형의 종양을 특징지을 수 있고 그러한 특이적인, 변형된 신호 전달 경로가 화학치료적 개입을 위한 전도유망한 표적이 될 수 있음을 제시한다.

[0014] 상이한 암 치료제를 고려하면, 특히 암 화학치료가 각각 세포 증식 또는 사멸에 연루된 세포 신호 전달 경로를 차단 또는 활성화시킴으로써 직접 또는 간접으로 기능할 수 있으며, 특정 형태의 암의 해당 신호 전달 경로의 활성화는 다양한 암 치료제의 효능의 양호한 지시자로 역할할 수 있다. 따라서, 다른 요구를 충족시키는 것과 더불어, 본 발명은 개별 환자를 위한 유력한 항암 치료제의 유효성을 평가하기 위한 방법을 제공한다. 꼭 그런 것은 아니지만, 본 발명은 전문가가 모든 환자에 대하여 올바른 투여량(dose) 및 올바른 시간에 적합한 암 치료제를 선택하는데 도움을 주기 위한 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0015] **발명의 간추린 요약**

[0016] 본 발명은 종양 세포(예를 들어, 폐 종양의 순환 세포)내 신호 전달 경로의 구성요소의 활성화 상태를 검출하기 위한 조성물 및 그러한 방법을 제공한다. 본 발명의 사용으로 유래된 신호 전달 경로의 구성요소의 활성화 상태에 관한 정보는 암 진단, 예후(prognosis)에 사용될 수 있으며, 암 치료제의 설계에 사용될 수 있다.

[0017] 일 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 폐 종양 치료를 위한 적합한 항암 약물을 선별하는 방법을 제공한다:

[0018] (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;

[0019] (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;

[0020] (c) 하나 이상의 분석대상물(analytes)에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈(dilution series)를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체상에 고정된(restrained), 검출 단계; 및

[0021] (d) 상기 하나 이상의 분석대상물에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일(reference activation profile)과 비교함으로써 상기 항암 약물이 상기 폐 종양의 치료에 적합한지 또는 부적합한지 여부를 결정하는 단계.

[0022] 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로의 치료를 위한 적합한 후보자인 폐 종양을 지니는 환자를 선택하는 방법을 제공한다:

[0023] (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하

는 단계;

- [0024] (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- [0025] (c) 하나 이상의 분석대상물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체에 고정된, 단계; 및
- [0026] (d) 하나 이상의 분석대상물에 관해 검출된 상기 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교함으로써 상기 환자가 상기 항암 약물에 의한 상기 폐 종양의 치료에 적합한지 또는 부적합한지 여부를 결정하는 단계.
- [0027] 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양의 반응을 확인하는 방법을 제공한다:
- [0028] (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- [0029] (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- [0030] (c) 하나 이상의 분석대상물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈(dilution series)를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체에 고정된, 검출 단계; 및
- [0031] (d) 하나 이상의 상기 분석대상물에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교함으로써 상기 폐 종양을 상기 항암 약물로의 치료에 대한 반응성 또는 비반응성으로 확인하는 단계.
- [0032] 여전히 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로의 치료에 대한 폐 종양을 지니는 환자의 반응을 예측하는 방법을 제공한다:
- [0033] (a) 항암 약물을 투여한 이후에, 또는 상기 항암 약물과 함께 인큐베이션하기 이전에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- [0034] (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- [0035] (c) 하나 이상의 분석대상물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체에 고정된, 단계; 및
- [0036] (d) 하나 이상의 상기 분석대상물에 대해 검출된 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시에 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교함으로써 상기 환자가 상기 항암 약물로의 치료에 반응할 확률을 예측하는 단계.
- [0037] 여전히 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 항암 약물로 치료된 폐 종양을 지니는 환자에 대한 임상 결과를 예측하는 방법을 제공한다:
- [0038] (a) 항암 약물을 투여한 이후에 폐 종양의 세포를 분리하는 단계;
- [0039] (b) 상기 분리된 세포를 용해시켜 세포 추출물을 생산하는 단계;
- [0040] (c) 하나 이상의 분석대상물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 검정을 이용하여 상기 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 활성화 상태를 검출하는 단계로서, 여기서 상기 포획 항체가 고체 지지체에 고정된, 단계; 및
- [0041] (d) 상기 하나 이상의 분석대상물에 대해 검출된 상기 활성화 상태를 상기 항암 약물의 부재시 생성된 대조 활성화 프로파일과 비교함으로써 상기 항암 약물로 치료된 상기 환자에 대한 임상 결과를 예측하는 단계.
- [0042] 추가 양상에서, 본 발명은 고체 지지체에 속박된 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 우수한 동적 범위를 지니는 어레이(array)를 제공하는데, 각 희석 시리즈내 상기 포획 항체는 세포 추출물내 신호 전달 경로의 구성요소에 상응하는 하나 이상의 분석대상물에 대해 특이적이다.
- [0043] 본 발명의 다른 목적, 특징, 및 이점은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터 당업계의 통상의 기술자에게 자명할

것이다.

[0044] **도면의 간단한 설명**

[0045] **도 1**은 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는 세포 증식에 관여하는 신호 전달 경로의 일례를 보여준다. 유사분열 신호를 세포 증식으로 전환시키기 위해 세포에 의해 사용되는 EGFR/MAPK/ERK 경로의 구성요소가 도시되어 있다.

[0046] **도 2**는 암 치료 과정을 통해 약물 선별을 위한 본 발명의 주소설정가능한 어레이(addressable array)의 적용을 도식적으로 보여주는 도면이다.

[0047] **도 3**은 EGFR/MAPK/ERK 경로내의 구성요소와 같은, 수용체 티로신 키나아제 경로의 구성요소에 대한 항체의 희석액(dilutions)을 포함하는 주소설정가능한 어레이의 도식적인 일례를 보여주는 도면이다.

[0048] **도 4**는 종양 혈관신생에서 활성화되는 신호 전달 경로이 구성요소에 대한 항체의 희석액을 포함하는 주소설정가능한 어레이의 도식적인 일례를 보여주는 도면이다.

[0049] **도 5A-B**는 환자 2002(A) 및 환자 2015(B)에서 Veridex CellSearch 시스템을 이용한 CTC 계수를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] **발명의 상세한 설명**

[0051] **1. 개요**

[0052] 상기한 바와 같이, 세포 증식에 관여하는 신호 전달 경로의 활성화 및 세포 사멸에 관여하는 경로의 불활성화는 다수의 상이한 유형의 암을 특징짓는 분자적 특징들의 비제한적인 일례이다. 많은 경우에 있어서, 특정 신호 전달 경로의 활성화, 및 이의 구성요소는 해당 유형의 암에 대한 분자적 시그니처로서 역할할 수 있다. 그러한 활성화된 구성요소는 치료적 개입을 위한 유용한 표적들을 추가로 제공할 수 있다. 따라서, 치료 전, 중, 후에 암 세포내 특정 신호 전달 시스템의 활성화 수준에 대한 지식은 주치의에게 채택하기 위한 적절한 치료 경로를 선택하기위해 사용될 수 있는 매우 적절한 정보를 제공한다. 더욱이 치료가 진행됨에 따라 암 세포내에서 활성화되는 신호 전달 경로의 지속적인 모니터링은 주치의에게 치료의 효능에 대한 추가 정보를 제공할 수 있으며, 이러한 모니터링은, 예를 들어, 암 세포가 동일 또는 또 다른 신호 전달 경로를 활성화시키는 추가의 변이(abberations)를 통해 치료에 대해 내성을 나타내는 경우, 주치의가 특정 경로의 치료를 지속할 것인지 또는 또 다른 치료 경로로 교체할 것인지 결정을 내리게 한다.

[0053] 따라서, 본 발명은 특정, 다중, 고-처리 검정(specific, multiplex, high-throughput assay)에서, 종양 조직 또는 종양의 세포, 예컨대, 고행 종양의 희귀한 순환 세포내 다수의 오조절된(deregulated) 신호 전달 분자의 발현 및 활성화 상태를 검출하는 방법 및 그러한 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 오조절된 신호전달 경로를 하향조절시키거나 정지시키기 위한 적절한 치료법(단일 약물 또는 약물들의 조합물)의 선택을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 따라서, 본 발명은 암 환자를 위한 개별화된(personalized) 치료법의 설계를 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

[0054] 단일 세포의 수준에서 신호 전달 경로의 활성화의 결정을 통한 순환내 종양 세포를 검출 및 확인하는 능력은 본 발명의 중요한 이점이다. 종양 세포는 종종 다양한 초기 단계의 암을 지니는 환자의 혈액내에서 "미세전이암(micrometastases)"(파종성 종양 세포)으로서 발견된다. 혈액내 종양 세포의 수는 종양의 단계 및 유형에 좌우될 것이다. 생검은 전형적으로 원발성(primary) 종양에서 획득되나, 대부분의 전이성 종양은 생검되지 않는데, 이것은 그러한 종양의 분자적 분석을 매우 어렵게 만든다. 종양 전이가 진행되는 동안, 대부분의 공격적인 종양 세포는 상기 원발성 종양을 떠나 혈액 및 림프 시스템을 통해 이동하여 멀리 떨어진 위치에 도달하게 된다. 따라서, 혈액으로부터의 순환 종양 세포는 가장 공격적이고 균질한 종양 세포 개체군을 대별한다. 그러나, 혈액내 전이성 종양 세포의 개수는 흔히 매우 낮은데, 상기 개수는 혈액 밀리리터당 한개 내지 수천개 세포로 다양하다. 그러한 희귀한 세포내의 신호 전달 경로를 동정 및 분석하는 능력과 더 효과적인 암 치료를 겨냥하여 이러한 정보를 적용하는 능력은 본 발명의 한가지 목표이다.

[0055] 일부 구체예들에서, 본 발명의 다중, 고-처리 면역검정은 단일 세포 수준에서 고행 종양의 순환 세포내의 하나 이상의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출할 수 있다. 사실상, EGFR과 같은 신호 전달 분자는 약 100 켈토몰(zeptomole)의 민감도 및 약 100 켈토몰 내지 약 100 펨토몰(femtomole)의 선형(linear) 동적 범위로 검출될 수 있다. 이와 같이, 희귀 순환 세포에서 다수의 신호 전달인자의 활성화 상태의 단일 세포 검출은 암 예후 및

진단 뿐만 아니라, 개인화된 표적 요법의 설계를 용이하게 한다.

- [0056] 희귀 순환 세포는 고휘 종양으로부터 전이되거나 미소전이된 고휘 종양의 순환 세포를 포함한다. 순환 종양 세포, 암 줄기 세포, 및 종양으로 이동되는 세포(예를 들어, 화학유인으로 인한), 예컨대, 순환 내피 선조 세포, 순환 내피 세포, 순환 항혈관형성(pro-angiogenic) 골수 세포, 및 순환 수지상 세포가 고휘 종양과 관련된 순환 세포의 몇몇 예이다.
- [0057] 관심 신호 전달 분자는 통상적으로 이들의 정위치에서(*in situ*) 활성화 상태를 보전하기 위해 상기 순환 세포가 분리된 직후, 바람직하게는 약 24, 6 또는 1시간 이내, 더욱 바람직하게는 약 30, 15 또는 5분 이내에 추출된다. 분리된 세포는 또한 신호 전달 분자의 활성화를 회복시키거나 자극시키기 위해 약 1 내지 30분 동안 보통 나노몰 내지 마이크로몰 농도에서 하나 이상의 성장 인자와 함께 인큐베이션될 수 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조: Irish *et al.*, *Cell*, 118:217-228 (2004)).
- [0058] 본원에서 보다 상세히 설명되는 바와 같이, 개별 환자에 대한 잠재적인 항암 치료를 평가하기 위해, 분리된 세포는 다양한 투여량의 하나 이상의 항암 약물과 함께 인큐베이션될 수 있다. 이후, 성장 인자 자극은 수분(예를 들어, 약 1-5분) 또는 수시간(예를 들어, 약 1-6시간) 동안 수행될 수 있다. 항암 약물을 이용하거나 이용하지 않은 신호전달 경로의 차별적 활성화는 각각의 개별 환자에 대한 적절한 투여량의 적절한 암 치료제의 선택을 도울 수 있다. 순환 세포는 또한 항암 약물 치료 동안 환자의 샘플로부터 분리될 수 있고, 치료에서 변화가 이루어져야 하는지 여부를 결정하기 위해 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 자극될 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 방법은 각각의 환자에 대해 정확한 시간에 정확한 용량으로 정확한 항암 약물을 제공하는데 있어서 임상을 유리하게 돕는다.
- [0059] **II. 정의**
- [0060] 본원에서 사용되는 하기 용어들은 달리 언급되지 않는 경우 이들이 속하는 의미를 지닌다.
- [0061] 용어 "암"은 이상 세포의 조절되지 않는 성장을 특징으로 하는 질병 부류의 임의의 일원을 포함하기 위해 의도적으로 사용된다. 상기 용어는 악성, 양성, 연성 조직 또는 고휘임을 특징으로 하거나 그렇지 않던 간에, 모든 공지된 암 및 신생물 질환, 및 전이전 및 전이후 암을 포함하는 모든 단계 및 등급의 암을 포함한다. 다양한 유형의 암의 예는 폐암(예를 들어, 비소세포폐암); 소화기암 및 위장암, 예를 들어, 직장결장암, 위장관 기질 종양, 위장관 카르시노이드 종양, 결장암, 직장암, 항문암, 담관암, 소장암, 및 복부(위)암; 식도암; 쓸개암; 간암; 췌장암; 맹장암; 유방암; 난소암; 신장암(예를 들어, 신세포암); 중추신경계의 암; 피부암; 림프종; 용모막암종; 두경부암; 골원성 육종; 및 혈액암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 사용되는 "종양"은 하나 이상의 암 세포를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 폐 종양은, 예를 들어, 편평상피암, 선암, 대세포암, 기관지폐포암(BAC), 또는 연맥세포암과 같은 비소세포폐암을 지니는 환자에서 유래된다.
- [0062] 용어 "분석대상물"은 존재, 양 및/또는 동일성이 결정되는 임의의 관심 분자, 통상적으로 거대 분자, 예를 들어, 폴리펩티드를 포함한다. 특정 예에서, 분석물은 고휘 종양의 순환 세포의 세포 성분, 바람직하게는 신호 전달 분자이다.
- [0063] 본원에서 사용되는 용어 "희석 시리즈"는 특정 샘플(예를 들어, 세포 용해물) 또는 시약(예를 들어, 항체)의 농도가 감소되는 시리즈를 포함한다. 희석 시리즈는 통상적으로 샘플 또는 시약의 출발 농도의 측정된 양에 희석제(예를 들어, 희석 완충용액)를 혼합하여 보다 낮은 농도의 샘플 또는 시약을 생성시키고, 상기 과정을 충분한 수로 반복하여 요망되는 수의 연속 희석물을 획득하는 방법에 의해 생성된다. 샘플 또는 시약은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 또는 1000배 이상으로 연속적으로 희석되어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개 이상의 감소된 농도의 샘플 또는 시약을 포함하는 희석 시리즈가 생성될 수 있다. 예를 들어, 1 mg/ml 출발 농도의 포획 항체 시약의 2배 연속 희석을 포함하는 희석 시리즈는 포획 항체의 출발 농도의 양과 희석 완충제의 동일한 양을 혼합하여 0.5 mg/ml 농도의 포획 항체를 생성시키고, 이러한 과정을 반복하여 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.0325 mg/ml 등의 포획 항체 농도를 수득함으로써 생성될 수 있다.
- [0064] 본원에서 사용되는 용어 "우수한 동적 범위"는 1개의 세포만큼 적은 수 또는 1000개의 세포만큼 많은 수에서 특정 분석물을 검출하는 본 발명의 분석 능력을 의미한다. 예를 들어, 본원에 기재된 면역분석법은 포획 항체 농도의 희석 시리즈를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 관심 특정 신호 전달 분자를 유리하게 검출하므로 우수한 동적 범위를 지닌다.
- [0065] 용어 "신호 전달 분자" 또는 "신호 전달인자"는 통상적으로 세포의 신호 또는 자극을 세포 내에서의 정연한 순

서의 생화학 반응을 포함하는 반응으로 전환시키는 방법을 수행하는 단백질 및 기타 분자를 포함한다. 신호 전달 분자의 예는 수용체 티로신 키나아제, 예를 들어, EGFR(예를 들어, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR(예를 들어, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR(인슐린 수용체), IGF-1R, IGF-IIR, IRR(인슐린 수용체-관련 수용체), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK(백혈구 티로신 키나아제), ALK(역형성 림프종 키나아제), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, 및 RTK 106; 비-수용체 티로신 키나아제, 예를 들어 BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, 및 LIMK; 티로신 키나아제 신호전달 캐스케이드 성분, 예를 들어, Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc(p66), PI3K, Ras(예를 들어, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6 키나아제, p53, 시클린 D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67, 및 팍실린(paxillin); 및 이들의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "순환 세포"는 고형 종양으로부터 전이되거나 미소전이된 종양의 세포를 포함한다. 순환 세포의 예는 순환 종양 세포, 암 줄기 세포, 및/또는 종양으로 이동하는 세포(예를 들어, 순환 내피 선조세포, 순환 내피 세포, 순환 항혈관형성 골수 세포, 순환 수지상 세포 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0067] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 환자로부터 취득된 임의의 생물학적 표본을 포함한다. 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 적혈구, 백혈구(예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포), 타액, 소변, 대변(즉, 배설물), 가래(sputum), 기관지 세척 유체, 눈물, 유두 흡인물(nipple aspirate), 림프(예를 들어, 림프절의 분포된 종양 세포), 미세침 흡입물, 임의의 기타 신체 유체, 조직 샘플(예를 들어, 종양 조직), 예를 들어, 종양의 생검(예를 들어, 침 생검), 및 이들의 세포 추출물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 몇몇 구체예에서, 샘플은 전혈 또는 이의 분획 성분, 예를 들어 혈장, 혈청 또는 세포 펠렛(pellet)이다. 바람직한 구체예에서, 샘플은 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여 전혈 또는 이의 세포 분획으로부터 고형 종양의 순환 세포를 분리시키고, 순환 세포의 세포 추출물을 제조함으로써 취득된다. 다른 구체예에서, 샘플은, 예를 들어, 폐, 결장 또는 직장의 고형 종양으로부터의 포르말린 고정 파라핀 포매(formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 종양 조직 샘플이다.

[0068] "생검"은 진단 또는 예후 평가를 위한 조직 샘플을 떼어내는 과정, 및 조직 견본 그 자체를 의미한다. 당업계에 공지된 임의의 생검 기술은 본 발명의 방법 및 조성물에 적용될 수 있다. 적용되는 생검 기술은 기타 인자들 중에서, 일반적으로 평가되는 조직 유형 및 종양의 크기 및 유형(즉, 고형 또는 현탁형(즉, 혈액 또는 복수(ascites))에 좌우될 것이다. 대표적인 생검 기술은 절제 생검(excisional biopsy), 절개 생검(incisional biopsy), 침 생검(예를 들어, 중심침생검(core needle biopsy), 미세침흡인생검(fine-needle aspiration biopsy) 등), 외과 생검, 및 골수 생검을 포함한다. 생검 기술은, 예를 들어, 문헌[Principles of Internal Medicine, Kasper, et al, eds., 16th ed., 2005, Chapter 70]과 상기 문헌의 제 5장 전체에서 논의되어 있다.

[0069] 용어 "피검체" 또는 "환자"는 통상적으로 인간을 포함하나, 기타 영장류, 설치류, 개과, 고양이과, 말과, 양과, 돼지 등과 같은 기타 동물을 또한 포함한다.

[0070] "어레이" 또는 "마이크로어레이"는 고체 지지체, 예를 들어, 유리(예를 들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드(예를 들어, 자기 비드, 폴리스티렌 비드 등), 종이, 막(예를 들어, 나일론, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 등), 섬유 다발, 또는 임의의 기타 적절한 물질에 고착되거나 고정된 포획 항체의 별개의 세트 및/또는 희석 시리즈를 포함한다. 포획 항체는 일반적으로 공유 또는 비공유 상호작용(예를 들어, 이온 결합, 소수성 상호작용, 수소 결합, 반데르발스 힘, 쌍극자-쌍극자 결합)을 통해 고체 지지체 상에 고착되거나 고정된다. 본 발명의 분석에 사용되는 어레이는 통상적으로 다양한 공지된/어디레싱 가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링되는 다수의 다양한 포획 항체 및/또는 포획 항체 농축물을 포함한다.

[0071] 용어 "포획 항체"는 고형 종양의 순환 세포의 세포 추출물과 같은 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석대상물에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 고정된 항체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 포획 항체는 어레이에서 고체 지지체 상에 고정된다. 고체 지지체 상에 임의의 다양한 신호 전달 분자를 고정시키기에 적절한 포획 항체는 업스테이트(Upstate)(Temecula, CA), 바이오소스(Biosource)(Camarillo, CA), 셀 시그널링 테크놀로지스(Cell Signaling Technologies)(Danvers, MA), 알앤디 시스템즈(R&D Systems)(Minneapolis, MN), 랩 비전(Lab Vision)(Fremont, CA), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)(Santa Cruz, CA), 시그마(Sigma)(St. Louis, MO), 및 비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences)(San Jose, CA)사에서 시판된다.

- [0072] 본원에서 사용되는 용어 "검출 항체"는 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석대상물에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출가능한 표지를 포함하는 항체를 포함한다. 용어는 또한 하나 이상의 관심 분석대상물에 특이적인 항체를 포함하며, 상기 항체는 검출가능한 표지를 포함하는 또 다른 종에 의해 결합될 수 있다. 검출가능한 표지의 예는 비오틴/스트렙타비딘 표지, 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드) 표지, 화학적 반응 표지, 형광 표지, 효소 표지, 방사선 표지, 및 이들의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 임의의 다양한 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 검출하는데 적합한 검출 항체는 업스테이트(Temecula, CA), 바이오소스(Camarillo, CA), 셀 시그널링 테크놀로지(Danvers, MA), 알앤디 시스템즈사(Minneapolis, MN), 랩 비전(Fremont, CA), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz, CA), 시그마(St. Louis, MO), 및 비디 바이오사이언시즈(San Jose, CA)사에서 시판된다. 비제한적인 예로서, EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Raf 및 MEK와 같은 신호 전달 분자의 다양한 인산화된 형태에 대한 포스포(phospho)-특이적 항체가 산타 크루즈 바이오테크놀로지사에서 시판된다.
- [0073] 용어 "활성화 상태-의존성 항체"는 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석대상물의 특정 활성화 상태에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출 항체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 활성화 상태-의존성 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자와 같은 하나 이상의 분석대상물의 인산화, 유비퀴틴화 및/또는 복합체 형성을 검출한다. 몇몇 구체예에서, 수용체 티로신 키나아제의 EGFR 패밀리 일원의 인산화 및/또는 EGFR 패밀리 일원 사이의 이종이합체 복합체의 형성이 활성화 상태-의존성 항체를 이용하여 검출된다. 활성화 상태-의존성 항체를 이용한 검출에 적합한 활성화 상태(괄호 내에 나열됨)의 비제한적인 예는 EGFR(EGFRvIII, 인산화된 (p-) EGFR, EGFR: Shc, 유비퀴틴화된 (u-) EGFR, p-EGFRvIII); ErbB2 (p85:절두된(truncated) (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p85:Tr-p-ErbB2, Her2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3(p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4(p-ErbB4, ErbB4:Shc); IGF-1R(p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT(p-KIT); FLT3(p-FLT3); HGFR1(p-HGFR1); HGFR2(p-HGFR2); RET(p-RET); PDGFRa(p-PDGFRa); PDGFRP(p-PDGFRP); VEGFR1(p-VEGFR1, VEGFR1:PLC γ , VEGFR1:Src); VEGFR2(p-VEGFR2, VEGFR2:PLC γ , VEGFR2:Src, VEGFR2:헤파린 설페이트, VEGFR2:VE-카드헤린); VEGFR3(p-VEGFR3); FGFR1(p-FGFR1); FGFR2(p-FGFR2); FGFR3(p-FGFR3); FGFR4(p-FGFR4); Tiel(p-Tiel); Tie2(p-Tie2); EphA(p-EphA); EphB(p-EphB); NFKB 및/또는 IKB(p-IK(S32), p-NFKB(S536), p-P65:IKBa); Akt(p-Akt(T308, S473)); PTEN(p-PTEN); Bad(p-Bad(S112, S136), Bad:14-3-3); mTor(pmTor(S2448)); p70S6K(p-p70S6K(T229, T389)); Mek(p-Mek (S217, S221)); Erk(p-Erk(T202, Y204)); Rsk-1(p-Rsk-1(T357, S363)); Jnk(p-Jnk(T183, Y185)); P38(p-P38(T180, Y182)); Stat3(p-Stat-3(Y705, S727)); Fak(p-Fak (Y576)); Rb(p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53(p-p53(S392, S20)); CREB(p-CREB(S133)); c-Jun(p-c-Jun(S63)); cSrc(p-cSrc(Y416)); 및 팍실린(paxillin)(p-팍실린(Y118))을 포함한다.
- [0074] 용어 "활성화 상태-비의존성 항체"는 활성화 상태와는 상관 없이 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석대상물에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출 항체를 포함한다. 예를 들어, 활성화 상태-비의존성 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자와 같은 하나 이상의 분석대상물의 인산화된 형태 및 인산화되지 않은 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.
- [0075] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 중합체, 예를 들어, DNA 및 RNA를 포함한다. 핵산은 합성, 천연 발생 및 비-천연 발생의 공지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 결합을 포함하는 핵산을 포함하며, 이는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 지닌다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 및 펩티드-핵산(PNA)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특별히 제한하지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 지니는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 언급하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 이의 보존적으로 변형된 변형체 및 상보성 서열 뿐만 아니라 명백히 표시된 서열을 암묵적으로 포함한다.
- [0076] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 RNA, DNA, RNA/DNA 하이브리드의 단일 가닥 올리고머 또는 폴리머, 및/또는 이의 모방체(mimetic)를 의미한다. 특정 예에서, 올리고뉴클레오타이드는 천연 발생(즉, 비변형) 핵염기, 당 및 뉴클레오시드간(골격) 결합으로 구성된다. 특정 기타 예에서, 올리고뉴클레오타이드는 변형된 핵염기, 당 및/또는 뉴클레오시드간 결합을 포함한다.
- [0077] 본원에서 사용되는 용어 "미스매치 모티프" 또는 "미스매치 영역"은 상보적 서열과 100% 상보성을 지니지 않는 올리고뉴클레오타이드의 부분을 의미한다. 올리고뉴클레오타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 미스매치 영역을 지

닐 수 있다. 미스매치 영역은 인접하여 있을 수 있거나, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 이 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리되어 있을 수 있다. 미스매치 모티프 또는 영역은 단일한 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 2, 3, 4, 5 또는 이 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0078] 어구 "엄격한 하이브리드화 조건"은 올리고뉴클레오티드가 이의 상보적 서열에 하이브리드되나, 다른 서열에는 하이브리드되지 않는 조건을 의미한다. 엄격한 조건은 서열 의존적이며, 이는 다양한 환경에서 다양할 것이다. 보다 긴 서열은 보다 높은 온도에서 특이적으로 하이브리드된다. 핵산의 하이브리드에 대한 광범위한 안내는 문헌[Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays"(1993)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강도 pH에서 특정 서열에 대해 열용융점(T_m) 보다 약 5-10°C 낮도록 선택된다. T_m은 평형에서 표적에 상보적인 프로브의 50%가 표적 서열에 하이브리드(규정된 이온 강도, pH 및 핵 농도하에서)되는 온도이다(표적 서열은 T_m에서 과량으로 존재하고, 프로브의 50%가 평형에서 점유되어 있다). 엄격한 조건은 또한 포름아미드와 같은 불안정화 작용제의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화를 위해, 양성 신호는 백그라운드의 적어도 두배, 바람직하게는 백그라운드의 10배의 하이브리드화이다.

[0079] 두개 이상의 핵산과 관련된 용어 "실질적으로 동일함" 또는 "실질적 동일"은 서열 비교 알고리즘을 이용하거나 수작업 정렬 및 시각 검사에 의해 측정시 비교 윈도우(window) 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 일치율 비교하거나 정렬하는 경우 동일하거나, 동일한 뉴클레오티드의 특정 백분율(즉, 특정 영역에 걸쳐 약 60% 이상, 바람직하게는 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 동일성)을 지니는 두개 이상의 서열 또는 부서열(subsequence)을 의미한다. 이러한 정의는 또한 문맥에서 지시되는 경우 유사하게 서열의 상보체를 의미한다. 바람직하게는, 실질적 동일성은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 또는 100개 이상의 뉴클레오티드 길이의 영역에 걸쳐 존재한다.

[0080] **III. 구체예에 대한 설명**

[0081] 일 구체예에서, 본 발명은 특이적, 다중, 고처리 검정에서 고체 중앙의 중앙 조직 또는 순환 세포에서 유래된 중앙 세포내의 다수의 오조절된 신호 전달자의 발현 및 활성화 상태를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 오조절된 신호전달 경로를 하향-조절하거나 정지시키기 위한 적절한 치료법의 선별을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 따라서, 본 발명의 구체예는 해당 환자의 중앙내 활성화된 신호 전달 단백질의 수집에 의해 제공되는 특정 분자 시그너처에 기반하여 개인화된 치료법의 설계를 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

[0082] 고행 중앙의 순환 세포는 암 줄기 세포 또는 중앙으로 이동하는 세포(예를 들어, 화학유인에 기인함), 예컨대, 내피 선조 세포, 순환 내피 세포, 주위세포(pericytes), 순환 항-혈관형성 골수 세포, 수지상 세포 등을 포함하는, 고행 중앙으로부터 전이되거나 미소전이된 세포를 포함한다. 상기 순환 세포를 함유한 환자 샘플은 임의의 접근가능한 생물학적 유체(예를 들어, 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 기관지세척유체, 소변, 유두 흡입물, 림프, 타액, 미세침 흡입물 등)에서 획득될 수 있다. 특정 경우에 있어서, 전혈 샘플은 혈장 또는 혈청 분획 및 세포 분획(즉, 세포 펠렛)으로 분리된다. 세포 분획은 전형적으로 적혈구, 백혈구, 및/또는 고행 중앙의 순환 세포, 예컨대, 순환 중앙 세포(CTCs), 순환 내피 세포(CECs), 순환 내피 선조 세포(CEPCs), 암 줄기 세포(CSCs), 림프질의 파종성 중앙 세포, 및 이들의 조합물을 함유한다. 혈장 또는 혈청 분획은 일반적으로, 그 중에서도(inter alia), 핵산(예를 들어, DNA, RNA) 및 고행 중앙의 순환 세포에 의해 방출된 단백질을 함유한다.

[0083] 순환 세포는, 예를 들어, 면역자기 분리(예를 들어, 문헌[Racila et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., *Int. J. Cancer*, 92:577-582 (2001)] 참조), 이뮤니콘(Immunicon)에 의한 CellTrack™ 시스템(Huntingdon Valley, PA), 미세유체 분리(예를 들어, 문헌[Mohamed et al., *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 3:251-256 (2004); Lin et al., Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)] 참조), FACS(예를 들어, 문헌[Mancuso et al., *Blood*, 97:3658-3661 (2001)] 참조), 밀도 구배 원심분리(예를 들어, 문헌[Baker et al., *Clin. Cancer Res.*, 13:4865-4871 (2003)] 참조) 및 고갈 방법(depletion method)(예를 들어, 문헌[Meye et al., *Int. J. Oncol.*, 21:521-530 (2002)] 참조)을 포함하는 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 통상적으로 분리된다.

[0084] 일 구체예에서, 정위치(*in situ*) 활성화 상태를 보존하기 위해, 신호 전달자는 세포가 분리된 직후, 바람직하게는 96, 72, 48, 24, 6, 또는 1시간 이내, 더 바람직하게는 30, 15, 또는 5분 이내에 추출되는 것이 유리하다. 상기 분리된 세포는 또한 신호 전달자 활성화를 소생시키거나 자극시키기 위해 약 1 내지 30분 동안 대개 나노몰 내지 마이크로몰 농도로 성장 인자와 함께 인큐베이션하는 것이 유리할 수 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조:

Irish et al, *Cell*, 118:217-228 (2004)). 자극성 성장 인자는 내피 성장 인자(EGF), 헤레귤린(hereregulin)(HRG), TGF- α , PIGF, 안지오펜피에틴(angiopoietin)(Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, 사이토카인 등을 포함한다. 성장 인자 자극에 앞서, 개별 환자를 위한 유력한 항암 치료제를 평가하기 위해, 상기 분리된 세포는 다양한 용량의 하나 이상의 항암 약물과 함께 인큐베이션될 수 있다. 성장 인자 자극은 수분 또는 수시간(예를 들어, 1 내지 5분 내지 1 내지 6시간) 동안 실행될 수 있다. 항암 약물 존재 및 부재에 따른 신호전달 경로의 차별적인 활성화는 각각의 개별 환자를 위한 적당한 용량으로 적합한 항암 치료제를 선별하는데 도움이 된다. 분리, 항암제 치료, 및/또는 성장 인자 자극후, 세포는 당업계의 공지된 임의의 기술을 사용하여 신호 전달자를 추출하기 위해 용해된다. 바람직하게는, 세포 용해는 성장 인자 자극후 약 1 내지 360분, 더 바람직하게는 2가지 상이한 시간 간격으로 개시된다: (1) 성장 인자 자극후 약 1 내지 5분; 및 (2) 성장 인자 자극후 약 30 내지 180분. 대안적으로, 용해물은 사용시까지 약 -80°C에서 저장될 수 있다.

[0085] 일부 구체예에서, 항암 약물은 암 세포내 활성화된 신호 전달 경로 구성요소의 기능을 방해하는 물질을 포함한다. 그러한 물질의 비제한적인 예는 하기에 나열된 것들을 포함한다:

[0086] **표 A**

EGFR (A) (ErbB1) Her 2 (C) (ErbB2) Her 3 (ErbB3)(E) Her4 (ErbB4) 표적

세록시맙	트라스투주맙	항체 (U3)
파니투무맙	(Herceptin)	
마투주맙	피투주맙 (DNA)	
니모투주맙	BMS-599626 (이종이합체화 Her1/2; 1 기)	
EGFR 백신		

EGFR (B) (ErbB1) Her 2 (D) (ErbB2)

엘로티닙	CP-724714(Pfizer)
제퍼티닙	
EKB 569 (Wyeth, 회복불능(irreversible), II CRC)	
CL-387-785 (Wyeth, 회복불능, 임상전(Preclinical))	

ErbB1/2 (F)

라파티닙	
HKI-272(Wyeth, 회복불능, 1/1 NSCLC, 유방)	
HKI-357(임상전)	
BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim, 회복불능, 1/1 전립선, 난소, 유방)	

ErbB1/2/4 (G)

카너티닙 (Pfizer, 회복불능, II NSCLC, 유방)	
ARRY-334543	
JNJ-26483327	
JNJ-26483327	

Raf (H) SRC

소라페닙	AZ
PLX4032 (Plexxikon)	

[0087]

Mek: (I) NFkB-IkB

PD-325901 (II: NSCLC)
 AZD6244-Array/Az
 XL518 Exelixis/DNA

mTor 표적(J)

Rad 001: 에버롤리무스(Novartis, 제페티닙/얼로티닙의 조합; I/II: NSCLC, 교모세포종)
 텡시롤리무스(Wyeth, 제페티닙/얼로티닙의 조합; I/II 기: NSCLC, 교모세포종)
 AP-23573 (Ariad, I/II 기: 자궁내막)

PI3K:

PX-866 (PHO알파 특이적 억제; ProIX Pharma; 임상전 NSCLC)

VEGF 표적(표적 VEGFR2, 및 VEGFR1) (K)

아바스틴(DNA)
 HuMV833 (PDL) 항-VEGFa
 VEGF-Trap - Regeneron/Aventis(수용체 모방제)(2 기)

VEGFR-2 표적(L) EPH A-D

DC101 - Imclone(2/3? 기)
 IMC-1C11 VEGFR2에 대한 키메라 IgG1
 IMC1121 B 완전히 인간화됨
 CDP-791 (Celltech, R2에 대한 폐길화된 di-Fab 항체)
 파조파닙 (GSK)(다발성 골수종, 난소, RCC 3기 등록 완료됨, 육종 II)
 CDP-791 (UCB)
 CP-547632 (OSI, PFIZER): (+ EGFR + PDGFR) (NSCLC, 난소 2기)
 AG13736 (Pfizer): VEGFR1, 2 및 PDGFRbeta) (RCC II)
 E-7080 (Eisai)
 CHIR-258 (VEGFR1, 2, FGFR3, PDGFR) OSI-930 (+ cKit, PDGFR)
 Bay-579352 (+ PDGFR)
 ABT-869 (+ CSF1 R, Erk, Fit-3,PDGFR)
 BMS-540215 (+ FGFR1)
 KRN-951
 BBIW

VEGFR 1/2/3:

AZD 2171 (NSCLC, CRC)
 AMG-706 (+ PDGFR)

VEGFR 2/ErbB1/2 (EGFR)/cMet/FGFR (M)

ZD6474 (반테타닙) (III 기: 갑상선, NSCLC)
 XL647 (Exelixis; 또한 EPHB2): (얼로티닙에 대한 내성 환자; 아시아 환자) (2 기)
 ABE 788 (Novartis, 1/2 기)

[0088]

VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N) TIE 1/2
 소라페닙 (RCC, HCC, NSCLC (II), 흑색종 (III)),

VEGFR2/1/3,Flt-3,cFMS, PDGFR/cKit/ (O)	PDGFR 표적(P)
PTK787 (Not cFMS, FLT-3)	탄두티닙
수니티닙	니콜티닙
XL-999	
SU-6668 (Pfizer)	
GSK AZ	
(AZD2171)	
BMS	
Novartis (AEE-788)	
Amgen	
기타	

Abl 표적: (Q)	FTL 3	RET
이마티닙		
다사타닙		
니로티닙		
AT-9283		
AZD-0530		
보수티닙		

Kit 표적(R)	HGFR1/2	FGFR1-4
AMG-706		Chiron
XL-880		
XL-999		

IGF-1R 표적 (S)
 Merck
 Pfizer
 Novartis

HSP90 억제제:
 IPI-504 (Infinity Pharma, 돌연변이 EGFR, I/II 다발성 골수종, GIST)
 17-AAG (Kosan, I/II 고형 종양)

항-유사분열 약물:
 독세탁셀(미세소관 안정화제; 에주번트 및 진행된 유방암; NSCLC, 안드로겐 비의존성 전립선암)
 파클리탁셀(미세소관 안정화제, 에주번트 및 진행된 유방암; NSCLC, 난소암, AIDS 관련 카포시 육종)
 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈오렐빈(미세소관 불안정화제)

기타 표적:
 HDAC 억제제
 BCL2
 화학치료제 (분해(breakdown))
 프로테아좀 억제제

[0089]

[0090]

또 다른 구체예에서, 본 발명은 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 우수한 동적 범위를 갖는 주소설정가능한 어레이를 제공하는데, 각각의 희석 시리즈내 상기 포획 항체는 신호 전달 경로의 구성요소에 상응하는 하나 이상의 분석대상물에 특이적이다. 다양한 양상에서, 이 구체예는 특정 종양에 특징적인 신호 전달 경로, 예를 들어, 폐암 세포에서 활동적인 신호 전달 경로의 구성요소를 포함하는 어레이를 포함한다. 따라서, 본 발명은 각 유형의 암이 단일 어레이 또는 칩상에 제공되어 실시되는 것이 유리할 수 있다. 일부 양상에서, 특정 종양 세포내에서 활동적인 해당 신호 전달 경로의 구성요소는 세포 내부의 신호 전달 경로를 통해 정보가 릴레이되는 서열에 상응하는 선형 서열로 어레이된다. 그러한 어레이의 예는 도 3과 4에 제시되어 있다.

[0091]

본 발명에 사용되는 것이 고려될 수 있는 신호 전달 경로의 비제한적 예는 하기 표 1에 제시된 것들을 포함한다.

[0092]

표 1

경로 1	EGFR	EGFR 포스포	EGFR Shc	EGFR 유비쿼틴	EGFR-P13K	PTEN		
경로 2	EGFR	EGFRVIII	EGFR 포스포	EGFR Shc	EGFR 유비쿼틴	EGFRVIII 포스포	PTEN	
경로 3	ERBB2	ERBB2 포스포	Her 2 Shc	ERBB2: PI3K 복합체	ErbB2 유비쿼틴	PTEN		
경로 4	ERBB2	P85 결두원 ERBB2	ERBB2 포스포	P85결두원 ERBB2 포스포	Her 2 Shc	ERBB2: PI3K 복합체	ErbB2 유비쿼틴	
경로 5	ERBB3	ERBB3 포스포	ERBB3-PI3K 복합체	ERBB3 PI3K 포스포	ERBB3:Shc			
경로 6	ERBB4	ERBB4 포스포	ERBB4:Shc					
경로 7	IGF-1R	IGF-1R 포스포	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	포스포 IRS	IGF-1R :PI3K		
경로 8	INSR	INSR 포스포						
경로 9	KIT	KIT 포스포						
경로 10	FLT3	FLT3 포스포						
경로 11	HGFR 1	HGFR 1 포스포						
경로 12	HGFR 2	HGFR 2 포스포						
경로 13	RET	RET 포스포						
경로 14	PDGFR 알파	PDGFR 알파 포스포						
경로 15	PDGFR 베타	PDGFR 베타 포스포						
경로 16	VEGFR 1	VEGFR 1 포스포	VEGFR 1: PLCγ복합체	VEGFR 1: Src				
경로 17	VEGFR 2	VEGFR 2 포스포	VEGFR 2: PLCγ 복합체	VEGFR 2: Src	VEGFR- 2 상호인자 복합체	VEGFR- 2, VE- 2, VE- 카드헤린 복합체		
경로 18	VEGFR 3	VEGFR 3 포스포						
경로 19	FGFR 1	FGFR 1 포스포						
경로 20	FGFR 2	FGFR 2 포스포						
경로 21	FGFR 3	FGFR 3 포스포						
경로 22	FGFR 4	FGFR 4 포스포						
경로 23	TIE 1	TIE 1 포스포						
경로 24	TIE 2	TIE 2 포스포						
경로 25	EPHA	EPHA 포스포						
경로 26	EPHB	EPHB 포스포						
경로 27	NFκB- IκB 복합체	포스포 IκB (S32) 혹 IκB	혹 NFκB 포스포 NFκB(S536)	혹 P65 IκBa 포스포 P65 IκBa				
경로 28	ER	포스포 ER	ER-AIB1	기타 ER 복합체				
경로 29	PR	포스포 Pr		PR 복합체				
경로 30	Hedgehog 경로							
경로 31	Wnt 경로							
경로 32	Notch							

[0093]

경로 33	혹 Mek 포스포 Mek (S217/S2 21)	혹 Erk 포스포 Erk (T202/Y204)	혹 Rsk-1 포스포 Rsk- 1 (T357/S363)	혹 Stat3 포스포 Stat- 3 (Y705) (S727) 혹 Stat 1 포스포 Stat1 (Y 701)	포스포 Bad (S112) Bad (혹)	혹 Fak 포스포 Fak (Y576)	혹 cSrc 포스포 cSrc(Y416)	혹 Ras 포스포 Ras
경로 34	Akt (혹) 포스포 Akt (T473)	포스포 Akt (T308)	포스포 Bad (S112) Bad (혹)	포스포 Bad (S136)	Bad:14-3-3 복합체	혹 mTor 포스포 mTor (S2448)	혹 p70S6K 포스포 p70S6K (T229) (T389)	GSK3beta 혹 (포스포 Ser 9)
경로 35	혹 Jnk 포스포 Jnk (T183/Y1 85)	혹 P38 포스포 P38 (T180/Y182)	혹 Rb 포스포 Rb (S249/T252) 포스포 Rb (S780)	혹 p53 포스포 p53 (S392) 포스포 p53 (S20)	포스포 - CREB(S133) Total CREB	혹 c- Jun 포스포 - c-Jun; (S63)	혹 p130Cas 포스포 p130Cas (Y118)	
경로 36	Ki67	결단원 카스파제 3,8,9 기타						
경로 37	TGF베타							

[0094]

[0095]

특정 구체예에서, 항암 약물은 항-신호전달제(즉, 세포증식억제 약물), 예컨대, 모노클로날 항체 또는 티로신 키나아제 억제제; 항증식제; 화학치료제(즉, 세포독성 약물); 방사선치료제; 백신; 및/또는 이상 세포, 예컨대, 암세포의 조절되지 않는 성장을 감소시키거나 폐기시키는 능력을 지닌 임의의 기타 화합물을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 화학치료제와 조합된 항-신호전달 작용제 및/또는 항-증식 작용제로 처리된다.

[0096]

본 발명에 사용하기에 적합한 항-신호전달 작용제의 예는 모노클로날 항체, 예컨대, 트라스투주맙(Hercept in®), 알렘투주맙(Campath®), 베바시주맙(Avastatin®), 세록시맙(Erbtux®), 겐투주맙(Mylotarg®), 파니투무맙(Vectibix™), 리톡시맙(Rituxan®), 및 토시투모맙(BEXXAR®); 티로신 키나아제 억제제, 예컨대, 제피티닙(Iressa®), 수니티닙(Sutent®), 얼로티닙(Tarceva®), 라파티닙(GW-572016), 카니티닙(CI 1033), 세막시닙(SU5416), 바탈라닙(PTK787/ZK222584), 소라페닙(BAY 43-9006; Nexavar®), 이마티닙 메실레이트(Gleevec®), 레플루노미드(SU101), 및 반데타닙(ZACTIMA™; ZD6474); 및 이들의 조합물을 포함하나, 이로만 국한되는 것은 아니다.

- [0097] 예시적 항-증식 작용제는 mTOR 억제제, 예컨대, 시롤리무스(sirolimus)(rapamycin), 템시롤리무스(temsirolimus)(CCI-779), 및 에베롤리무스(everolimus)(RAD001); Akt 억제제, 예컨대, 1L6-히드록시메틸-카이로(chiro)-이노시톨-2-(R)-2-O-메틸-3-O-옥타데실-sn-글리세로카르보네이트, 9-메톡시-2-메틸엘리프티시늄(methylellipticinium) 아세테이트, 1,3-디히드로-1-(1-((4-(6-페닐-1H-이미다조[4,5-g]퀴놀살린-7-일)페닐)메틸)-4-피페리딘)-2H-벤즈이미다졸-2-온, 10-(4'-(N-디에틸아미노)부틸)-2-클로로페녹사진, 3-포르밀크로몬 티오세미카르바존(Cu(II)C12 복합체), API-2, 원종양 유전자 TCL1의 아미노산 10-24로부터 유래된 15-머(mer) 펩티드(문헌[Hiromura et al., *J. Biol. Chem.*, 279:53407-53418 (2004)], KP372-1, 및 문헌[Kozikowski et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 125:1144-1145 (2003) 및 Kau et al., *Cancer Cell*, 4:463-476 (2003)]에 기재된 화합물); 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0098] 화학치료제의 비제한적인 예는 백금-기반 약물(예를 들어, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 스피로플라틴(spiroplatin), 이프로플라틴(iproplatin), 사트라플라틴(satraplatin) 등), 알킬화제(예를 들어, 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 클로람부실(chlorambucil), 부숄판(busulfan), 멜팔란(melphalan), 메클로레타민(mechlorethamine), 우라무스틴(uramustine), 티오테파(thiotepa), 니트로소우레아 등), 항대사물질(예를 들어, 5-플루오로우라실, 아자티오프린(azathioprine), 6-머캅토피린, 메토티렉세이트, 류코보린, 카페시타빈(capecitabine), 시타라빈(cytarabine), 플록스우리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine)(Gemzar®), 페메트렉세드(pemetrexed)(ALIMTA®), 랄티트렉세드(raltitrexed) 등), 식물 알칼로이드(예를 들어, 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 빈오렐빈(vinorelbine), 빈데신(vindesine), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 파클리탁셀(paclitaxel)(Taxol®), 도세탁셀(docetaxel) 등), 국소이성화효소 억제제(예를 들어, 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 암사크린(amsacrine), 에토포시드(etoposide)(VP16), 에토포시드 포스페이트, 테니포시드(teniposide) 등), 항종양 항생제(예를 들어, 독소루비신(doxorubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin), 악티노마이신(actinomycin), 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신(mitomycin), 미톡산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin) 등), 이들의 약학적으로 허용되는 염, 입체 이성질체, 유도체, 유사체, 및 이들의 조합물을 포함한다.
- [0099] 본 발명에 유용한 암 백신의 비제한적 일예는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 액티브 바이오테크(Active Biotech) 사로부터의 ANYARA, 노스웨스트 바이오테라퓨틱스(Northwest Biotherapeutics) 사로부터의 DCVax-LB, 아이디엠 파마(IDM Pharma) 사로부터의 GV1001, 이데라 파마슈티칼즈(Idera Pharmaceuticals) 사로부터의 IO-2055, 인트로젠 테라퓨틱스(Introgen Therapeutics) 사로부터의 INGN 225 및 바이미라/머크(Biomira/Merck) 사로부터의 Stimuvax를 포함한다.
- [0100] 방사선치료제의 예는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 중양 항원에 대해 유도되는 항체에 컨주게이션되거나 비컨주게이션된, 방사선택중(radionuclides), 예컨대, ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, 및 ²¹²Pb를 포함한다.
- [0101] 몇몇 구체예에서, 포획 항체의 각각의 희석 시리즈는 감소하는 포획 항체 농도의 시리즈를 포함한다. 특정 예에서, 포획 항체는 2배 이상(예를 들어, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 또는 1000배)으로 연속적으로 희석되어, 어레이로 스폿팅(spottting)되는 감소하는 포획 항체 농도의 세트 수(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25개 또는 이 이상)를 포함하는 희석 시리즈가 생성된다. 바람직하게는, 각각의 포획 항체 희석물의 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 복제물이 어레이로 스폿팅된다.
- [0102] 다른 구체예에서, 고체 지지체는 유리(예를 들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막(예를 들어, 나일론, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 등), 섬유 다발, 또는 임의의 기타 적절한 물질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 포획 항체는 와트만 인코퍼레이티드(Whatman Inc.)(Florham Park, NJ)사에서 시판되는 FAST® 슬라이드와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드 상에 고정(예를 들어, 공유 또는 비공유 상호작용을 포함)된다.
- [0103] 몇몇 구체예에서, 세포 추출물은 고품 종양의 순환 세포의 추출물을 포함한다. 순환 세포는, 예를 들어, 면역 자기 분리, CellTrack™ 시스템, 미세유체 분리, FACS, 밀도 구배 원심분리, 고갈 방법을 포함하는, 당업계에 공지된 하나 이상의 분리 방법을 사용하여 환자 샘플로부터 전형적으로 분리된다.
- [0104] 다른 구체예에서, 환자의 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 기관지 세척 유체, 소변, 유두 흡입물(nipple aspirate), 림프, 타액, 및/또는 미세침 흡입물 샘플을 포함한다. 특정 예에서, 전혈 샘플은 혈장 또는 혈청

분획 및 세포 분획(즉, 세포 펠렛)으로 분리된다. 세포 분획은 통상적으로 적혈구, 백혈구, 림프구 및/또는 고형 종양의 순환 세포, 예컨대, CTC, CEC, CEPC, 림프질의 과중성 종양 세포, 및/또는 CSC를 함유한다. 일반적으로 혈장 또는 혈청 분획은, 특히, 고형 종양의 순환 세포에 의해 방출되는 핵산(예를 들어, DNA, RNA) 및 단백질을 함유한다.

[0105] 몇몇 예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 관심 항암 약물과의 인큐베이션 전, 중, 및/또는 후에 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 시험관내에서 자극될 수 있다. 자극 성장 인자는 위에 기술되어 있다. 다른 예에서, 분리된 순환 세포는 당업계에 공지된 임의의 기술을 이용하여, 예를 들어, 성장 인자 자극 및/또는 항암 약물 치료 후에 용해되어 세포 추출물(예를 들어, 세포 용해물)이 생성될 수 있다. 바람직하게는, 세포 용해는 성장 인자 자극 후 약 1 내지 360분 사이, 더욱 바람직하게는 (1) 성장 인자 자극 후 약 1 내지 5분; 및 (2) 성장 인자 자극 후 약 30 내지 180분의 두개의 상이한 시간 간격으로 개시된다. 대안적으로, 세포 용해물은 사용될 때까지 -80°C에서 저장될 수 있다.

[0106] 바람직한 구체예에서, 고형 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포내 다수의 신호 전달 분자의 발현 및/또는 상기 분자의 활성화 상태는 하기한 것과 같은 단일 검출 또는 근접 이중 검출 검정(proximity dual 검출 assay)을 사용하여 검출된다.

[0107] **IV. 항체 어레이의 제작**

[0108] 특정 양태에서, 본 발명은 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체의 희석 시리즈를 포함하는 항체-기반 어레이를 이용하여 고형 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포의 세포 추출물 내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태가 검출된다. 상기 어레이는 통상적으로 다양한 다룰 수 있는 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링된 광범위한 포획 항체 농도의 다수의 다양한 포획 항체를 포함한다.

[0109] 고체 지지체는 단백질을 고정시키기 위한 임의의 적절한 기질을 포함할 수 있다. 고체 지지체의 예는 유리(예를 들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막, 섬유 다발, 젤, 금속, 세라믹 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 나일론(Biotrans™, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA)), 니트로셀룰로오스(Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) 및 PVDF(Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA))과 같은 막이 본 발명의 어레이에서 고체 지지체로 사용하기에 적합하다. 바람직하게는, 포획 항체는 왓만 인코퍼레이티드사(Whatman Inc.)(Florham Park, NJ)에서 시판되는 FAST® 슬라이드와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드에 고정된다.

[0110] 요망되는 고체 지지체의 특정 양태는 대량의 포획 항체에 결합하는 능력과 최소 변성으로 포획 항체에 결합하는 능력을 포함한다. 또 다른 적절한 양태는 포획 항체를 함유하는 항체 용액이 지지체에 적용되는 경우 고체 지지체가 최소 "위킹(wicking)"을 나타내는 것이다. 최소 위킹을 지니는 고체 지지체는 적은 분취량의 포획 항체 용액이 지지체에 적용되는 것을 가능케 하여, 작은 규정된 스폿의 고정 포획 항체를 야기시킨다.

[0111] 포획 항체는 통상적으로 공유 또는 비공유 상호작용(예를 들어, 이온 결합, 소수성 상호작용, 수소 결합, 반데르발스 힘, 쌍극자-쌍극자 결합)을 통해 고체 지지체 상에 직접 또는 간접(예를 들어, 포획 태그를 포함)적으로 고정된다. 몇몇 구체예에서, 포획 항체는 표준 가교 방법 및 조건을 이용하여 동중이기능성 또는 이종이기능성 가교제를 이용하여 고체 지지체 상에 공유적으로 부착된다. 적절한 가교제는 피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)(Rockford, IL)사와 같은 업체에서 시판된다.

[0112] 본 발명의 어레이를 제조하는 방법은 단백질 또는 핵산 어레이를 작제하는데 사용되는 임의의 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 몇몇 구체예에서, 포획 항체는 스플릿 핀(split pin), 블런트 핀(blunt pin) 또는 잉크젯 프린팅(ink jet printing)이 통상적으로 장착된 로봇식 프린터인 마이크로스포터(microspotter)를 이용하여 어레이로 스폿팅된다. 본원에 기재된 항체 어레이를 프린팅하기에 적합한 로봇식 시스템은 ChipMaker2 스플릿 핀(TeleChem International; Sunnyvale, CA)을 지닌 PixSys 5000 로봇(Cartesian Technologies; Irvine, CA), 뿐만 아니라, 바이오로빅스(BioRobics)(Woburn, MA) 및 팩카드 인스트루먼트 코퍼레이션(Packard Instrument Co.)(Meriden, CT)사에서 시판되는 다른 로봇식 프린터를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 포획 항체 희석물의 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 복제물이 어레이에 스폿팅된다.

[0113] 본 발명의 항체 어레이를 제조하는 또 다른 방법은 규정된 부피의 액체를 지지체에 그리는데 효과적인 조건하에서 고체 지지체 상에 모세 디스펜서(capillary dispenser)를 접촉시킴으로써 각각의 선택된 어레이 위치에서 공지된 부피의 포획 항체 희석물을 분배시키는 것을 포함하고, 이러한 과정이 각각의 선택 어레이 위치에서 선택된 포획 항체 희석물을 이용하여 반복되어, 완전한 어레이가 생성된다. 상기 방법은 다수의 상기 어레이를 형성

시키는데 실용적일 수 있고, 용액-증착 단계가 각각의 반복 주기에서 다수의 고체 지지체의 각각에 대해 선택된 위치에 적용된다. 이러한 방법에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제 5,807,522호에서 찾아 볼 수 있다.

[0114] 특정 예에서, 종이 상에 프린팅하기 위한 장치가 본 발명의 항체 어레이를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 요망되는 포획 항체 희석물이 데스크탑 젯 프린터의 프린트헤드(printthead)로 로딩될 수 있고, 적절한 고체 지지체에 프린팅될 수 있다(예를 들어, 문헌[Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)] 참조).

[0115] 몇몇 구체예에서, 고체 지지체 상에서 생성된 어레이는 약 5 스폿/cm² 이상, 바람직하게는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 또는 9000 또는 10,000 스폿/cm² 이상의 밀도를 지닌다.

[0116] 특정 예에서, 고체 지지체 상의 스폿은 각각 상이한 포획 항체를 나타낸다. 특정 기타 예에서, 고체 지지체 상의 다수의 스폿은, 예를 들어, 감소하는 포획 항체 농도의 시리즈를 포함하는 희석 시리즈와 동일한 포획 항체를 나타낸다.

[0117] 고체 지지체 상에 항체 어레이를 제조하고 작제하기 위한 방법의 추가 예는 미국 특허 제 6,197,599호, 제 6,777,239호, 제 6,780,582호, 제 6,897,073호, 제 7,179,638호 및 제 7,192,720호; 미국 특허 공보 제 20060115810호, 제 20060263837호, 제 20060292680호 및 제 20070054326호; 및 문헌[Varnum et al., Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004)]에 기재되어 있다.

[0118] 항체 어레이를 스캐닝하는 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 이는 단백질 또는 핵산 어레이를 스캐닝하는데 사용되는 임의의 기술을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 마이크로어레이 스캐너는 퍼킨엘머(PerkinElmer)(Boston, MA), 아질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)(Palo Alto, CA), 어플라이드 프리시전(Applied Precision)(Issaquah, WA), GSI 루모닉스 인코퍼레이티드(GSI Lumonics Inc.)(Billerica, MA) 및 액손 인스트루먼트(Axon Instruments)(Union City, CA)사에서 시판된다. 비제한적인 예로서, 형광 검출을 위한 GSI Scan어레이3000이 정량을 위한 ImaGene 소프트웨어와 함께 사용될 수 있다.

[0119] **V. 단일 검출 어레이**

[0120] 또 다른 양태에서, 고품 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포의 세포 추출물 내의 특정 관심 분석대상물(예를 들어, 단일의 전달 분자)의 활성화 상태를 검출하기 위한 검정은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 2-항체 검정이다. 비제한적인 예로서, 상기 검정에 사용되는 2개의 항체는 (1) 분석대상물에 특이적인 포획 항체; 및 (2) 분석대상물의 활성화된 형태에 특이적인 검출 항체(즉, 활성화 상태-의존성 항체)를 포함할 수 있다. 활성화 상태-의존성 항체는, 예를 들어, 분석대상물의 인산화, 유비퀴틴화, 및/또는 복합체 형성 상태를 검출할 수 있다. 대안적으로, 검출 항체는 세포 추출물 내의 분석대상물의 전체량을 검출하는 활성화 상태-비의존성 항체를 포함한다. 활성화 상태-비의존성 항체는 일반적으로 분석대상물의 활성화된 형태 및 비활성화된 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.

[0121] 바람직한 구체예에서, 상기 2-항체 검정은 하기 단계들을 포함한다:

[0122] (i) 세포 추출물과 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 함께 인큐베이션시켜 다수의 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;

[0123] (ii) 상기 다수의 포획된 분석대상물과, 대응하는 분석대상물에 특이적인 검출 항체를 함께 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;

[0124] (iii) 상기 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물과 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원을 함께 인큐베이션시켜 증폭된 신호를 발생시키는 단계; 및

[0125] (iv) 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 상기 증폭된 신호를 검출하는 단계.

[0126] 본원에 기재된 2-항체 검정은 전형적으로 상이한 주소결정가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링된 소정 범위의 포획 항체 농도로 다수의 상이한 포획 항체를 포함하는 항체-기반 어레이이다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 고체 지지체의 예는 위에 기재되어 있다.

[0127] 포획 항체 및 검출 항체는 결합하는 분석대상물과 관련하여 이들 사이의 경쟁을 최소화시킬 수 있도록 선택되는 것이 바람직하다(즉, 포획 및 검출 항체 둘 모두가 이들의 대응하는 신호 전달 분자에 동시 결합할 수 있다).

- [0128] 일 구체예에서, 검출 항체는 결합쌍의 제 1 일원(예를 들어, 비오틴)을 포함하고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 결합쌍의 제 2 일원(예를 들어, 스트렙트아비딘)을 포함한다. 결합쌍 일원은 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 검출 항체에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있거나, 신호 증폭쌍의 제 1 일원에 커플링될 수 있다. 특정 예에서, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 퍼옥시다아제(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP), 카탈라아제, 클로로퍼옥시다아제, 시토크롬 c 퍼옥시다아제, 호산구 퍼옥시다아제, 글루타치온 퍼옥시다아제, 락토퍼옥시다아제, 미엘로퍼옥시다아제, 갑상선 퍼옥시다아제, 탈이온효소 등)이고, 신호 증폭쌍의 제 2 일원은 티라미드(tyramide) 시약(예를 들어, 비오틴-티라미드)이다. 이러한 예에서, 증폭된 신호는 티라미드 시약의 퍼옥시다아제 산화에 의해 생성되어, 과산화수소(H₂O₂)의 존재하에서 활성화된 티라미드가 생성된다.
- [0129] 활성화된 티라미드는 직접 검출되거나, 신호-검출 시약, 예를 들어, 스트렙트아비딘-표지된 형광단 또는 스트렙트아비딘-표지된 퍼옥시다아제와 발색(chromogenic) 시약의 조합물의 첨가 후에 검출된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 형광단의 예는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 염료(예를 들어, Alexa Fluor®555), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon Green™); 로다민(rhodamine), 텍사스 레드(Texas red), 테트라로다민 이소티오시아네이트(tettrarhodamine isothiocyanate, TRITC), CyDye™ 플루오르(예를 들어, Cy2, Cy3, Cy5) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 스트렙트아비딘 표지는 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 형광단 또는 퍼옥시다아제에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 발색 시약의 비제한적인 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), 3,3'-디아미노벤지딘(DAB), 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(ABTS), 4-클로로-1-나프톨(4CN), 및/또는 포르피리노겐을 포함한다.
- [0130] 본원에 기재된 2-항체 검정을 수행하기 위한 대표적인 프로토콜은 실시예 3에 제공된다.
- [0131] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 상기한 2-항체 검정을 실행하기 위한 키트를 제공한다: (a) 고체 지지체 상에 고정된 다수의 포획 항체의 희석 시리즈; 및 (b) 다수의 검출 항체 (예를 들어, 활성화 상태-비의존성 항체 및/또는 활성화 상태-의존성 항체). 일부 경우에 있어서, 상기 키트는 고형 종양의 순환 세포의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하기 위해 상기 키트를 사용하는 방법에 관한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 예를 들어, 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원, 티라미드 신호 증폭 시약, 세척 완충액 등과 같은, 본 발명의 특정 방법의 실행에 관한 상기한 추가 시약들 중 임의의 시약을 함유할 수 있다.
- [0132] **VI. 근접 이중 검출 검정**
- [0133] 몇몇 구체예에서, 고형 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포의 세포 추출물 내의 특정 관심 분석대상물(예를 들어, 신호 전달 분자)의 활성화 상태를 검출하기 위한 검정은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 근접(즉, 3-항체) 검정이다. 비제한적인 예로서, 근접 검정에 사용되는 3개의 항체는 (1) 분석대상물에 특이적인 포획 항체; (2) 분석대상물의 활성화된 형태에 특이적인 검출 항체(즉, 활성화 상태-의존성 항체); 및 (3) 분석대상물의 전체량을 검출하는 검출 항체(즉, 활성화 상태-비의존성 항체)를 포함할 수 있다. 활성화 상태-의존성 항체는, 예를 들어, 분석대상물의 인산화, 유비퀴틴화, 및/또는 복합체 형성 상태를 검출할 수 있다. 활성화 상태-의존성 항체는 일반적으로 분석물의 활성화된 형태 및 활성화되지 않은 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.
- [0134] 바람직한 구체예에서, 근접 검정은 하기 단계들을 포함한다:
- [0135] (i) 상기 세포 추출물과 상기 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 함께 인큐베이션하여 다수의 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계;
- [0136] (ii) 상기 다수의 포획된 분석대상물과 다수의 활성화 상태-비의존성 항체 및 상응하는 상기 분석대상물에 특이적인 다수의 활성화 상태-의존성 항체를 포함하는 검출 항체를 함께 인큐베이션하여 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물을 형성시키는 단계로서,
- [0137] 여기서 상기 활성화 상태-비의존성 항체가 촉진 모이어티(facilitating moiety)로 표지되고, 상기 활성화 상태-의존성 항체가 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표지되고, 상기 촉진 모이어티(facilitating moiety)가 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원에 채널링(channelling)되고 상기 일원과 반응하는 산화제를 생성시키는, 단계;
- [0138] (iii) 상기 다수의 검출가능한 포획된 분석대상물과 상기 신호 증폭쌍의 제 2 일원과 함께 인큐베이션하여 증폭

된 신호를 생성시키는 단계; 및

- [0139] (iv) 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원에서 생성된 상기 증폭 신호를 검출하는 단계.
- [0140] 대안적으로, 상기 활성화 상태-비의존성 항체는 촉진 모이어티로 표지될 수 있고, 상기 활성화 상태-비의존성 항체는 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표지될 수 있다.
- [0141] 본원에 기재된 근접 검정은 전형적으로 상이한 주소설정가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링된 소정 범위의 포획 항체 농도로 다수의 상이한 포획 항체를 포함하는 항체-기반 어레이이다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 고체 지지체의 예는 위에 기재되어 있다.
- [0142] 포획 항체, 활성화 상태-비의존성 항체, 및 활성화 상태-의존성 항체는 결합하는 분석대상물과 관련하여 이들 사이의 경쟁을 최소화시킬 수 있도록 선택되는 것이 바람직하다(즉, 모든 항체는 이들의 대응하는 신호 전달 분자에 동시에 결합할 수 있다).
- [0143] 몇몇 구체예에서, 활성화 상태-비의존성 항체는 검출가능한 모이어티를 추가로 포함한다. 그러한 경우에 있어서, 검출가능한 모이어티의 양은 세포 추출물내의 하나 이상의 분석대상물의 양과 상관관계가 있다. 검출가능한 모이어티의 예는, 이로부터 국한되는 것은 아니나, 형광 표지, 화학적으로 반응하는 표지, 효소 표지, 방사능 표지 등을 포함한다. 바람직하게는, 검출가능한 모이어티는 형광단, 예컨대, Alexa Fluor® 염료(예를 들어, Alexa Fluor® 647), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), Oregon Green™; 로다민, 텍사스 레드, 테트라하도민 이소티오시아네이트(TRITC), CyDye™ fluor(예를 들어, Cy2, Cy3, Cy5) 등이다. 검출가능한 모이어티는 당해 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 활성화 상태-의존성 항체에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다.
- [0144] 특정 예에서, 활성화 상태-비의존성 항체는 촉진 모이어티로 직접적으로 표지된다. 촉진 모이어티는 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 활성화 상태-비의존성 항체에 커플링될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적절한 촉진 모이어티는 촉진 모이어티에 근접(즉, 공간적으로 인접하거나 밀접)한 또 다른 분자로 채널링(즉, 이로 향함)하여 상기 또 다른 분자와 반응(즉, 또 다른 분자에 결합하거나, 또 다른 분자에 의해 결합되거나, 또 다른 분자와 복합체를 형성함)하는 산화제를 발생시킬 수 있는 임의의 분자를 포함한다. 촉진 모이어티의 예는 효소, 예를 들어 글루코오스 옥시다아제 또는 전자 받개로서 산소 분자(O₂)를 수반하는 산화/환원 반응을 촉매하는 임의의 다른 효소, 및 감광제, 예를 들어, 메틸렌 블루, 로즈 벵갈(rose bengal), 포르피린, 스퀘레이트(squarate) 염료, 프탈로시아닌 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 산화제의 비제한적인 예는 과산화수소(H₂O₂), 단일 산소, 및 산화/환원 반응에서 산소 원자를 전달하거나 전자를 획득하는 임의의 다른 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 적절한 기질(예를 들어, 글루코오스, 광 등)의 존재하에서, 촉진 모이어티(예를 들어, 글루코오스 옥시다아제, 감광제 등)은 두개의 부분이 서로 근접하는 경우 신호 증폭쌍의 제 1 일원(예를 들어, 호스레디쉬 퍼옥시다아제(HRP), 보호기에 의해 보호된 합텐, 효소 억제제로의 티오에테르 결합에 의해 불활성화된 효소 등)으로 채널링하고 이와 반응하는 산화제(예를 들어, 과산화수소(H₂O₂), 단일 산소 등)을 발생시킨다.
- [0145] 특정 기타 예에서, 활성화 상태-비의존성 항체는 활성화 상태-비의존성 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커와 촉진 모이어티에 컨쥬게이션된 상보적 올리고뉴클레오티드 링커 사이의 하이브리드화를 통해 촉진 모이어티를 이용하여 간접적으로 표지된다. 올리고뉴클레오티드 링커는 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 촉진 모이어티에 커플링되거나 활성화 상태-비의존성 항체에 커플링될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 촉진 모이어티에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커는 활성화 상태-비의존성 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커에 대해 100% 상보성을 지닌다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 링커쌍은, 예를 들어, 엄격한 하이브리드화 조건하에서의 하이브리드화 후 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 미스매치 영역을 포함한다. 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 다양한 분석물에 특이적인 활성화 상태-비의존성 항체가 동일한 올리고뉴클레오티드 링커에 컨쥬게이션되거나 상이한 올리고뉴클레오티드 링커에 컨쥬게이션될 수 있음을 인지할 것이다.
- [0146] 촉진 모이어티 또는 활성화 상태-비의존성 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커의 길이는 다양할 수 있다. 일반적으로, 링커 서열은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 또는 100개 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 통상적으로, 무작위 핵산 서열이 커플링에 대해 생성된다. 비제한적인 예로서, 올리고뉴클레오티드 링커의 라이브러리는 스페이스(spacer) 도메인; 시그너처(signature) 도메인; 및 컨쥬게이션 도메인의 3개의 별개의 연속 도메인을 지니도록 고안될 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 링커는 이들이 컨쥬게이션되는 촉진 모이어티 또는 활성화 상태-비의존성 항체의 기능을 파괴함이 없이 효율적으로 커플링되도록

록 고안된다.

- [0147] 올리고뉴클레오타이드 링커 서열은 다양한 분석 조건하에서 임의의 2차 구조 형성을 방지하거나 최소화시키도록 고안될 수 있다. 용융 온도는 통상적으로 링커 내의 각각의 세그먼트에 대해 조심스럽게 모니터링되어 전체 분석 과정에서의 참여를 가능케 한다. 일반적으로, 링커 서열의 세그먼트의 용융 온도 범위는 1 내지 10°C이다. 규정된 이온 농도 하에서 용융 온도, 2차 구조 및 헤어핀(hairpin) 구조를 결정하기 위한 컴퓨터 알고리즘(예를 들어, OLIGO 6.0)이 각각의 링커 내의 3개의 상이한 도메인의 각각을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 전체 조합된 서열이 또한 다른 컨주게이션된 올리고뉴클레오타이드 링커 서열에 대한 이들의 구조적 특성 및 상용성, 예를 들어, 이들이 엄격한 하이브리드화 조건하에서 상보적인 올리고뉴클레오타이드 링커에 하이브리드되는지의 여부에 대해 분석될 수 있다.
- [0148] 올리고뉴클레오타이드 링커의 스페이서 영역은 올리고뉴클레오타이드 가교 부위로부터의 컨주게이션 도메인의 적절한 분리를 제공한다. 컨주게이션 도메인은 핵산 하이브리드화를 통해 상보적인 올리고뉴클레오타이드 링커 서열로 표시된 분자를 컨주게이션 도메인으로 연결시키는 기능을 한다. 핵산 매개 하이브리드화는 항체-분석대상물(즉, 항원) 복합체 형성 전 또는 후에 수행될 수 있고, 이는 보다 유연한 분석 포맷을 제공한다. 많은 직접적인 항체 컨주게이션 방법과는 달리, 비교적 작은 올리고뉴클레오타이드를 항체 또는 기타 분자에 연결시키는 것은 표적 분석물에 대한 항체의 특정 친화성 또는 컨주게이션된 분자의 기능에 최소의 영향을 미친다.
- [0149] 몇몇 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 링커의 기호 서열 도메인이 복잡한 다중 단백질 분석에 사용될 수 있다. 다중 항체는 다양한 기호 서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 링커로 컨주게이션될 수 있다. 다중 면역분석에서, 적절한 프로브로 표시된 리포터 올리고뉴클레오타이드 서열이 다중 분석 포맷에서 항체와 이의 항원 사이의 교차-하이브리드화를 검출하기 위해 사용될 수 있다.
- [0150] 올리고뉴클레오타이드 링커는 여러 다양한 방법을 이용하여 항체 또는 기타 분자에 컨주게이션될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 링커는 5' 또는 3' 말단 상의 티올기를 이용하여 합성될 수 있다. 티올기는 환원제(예를 들어, TCEP-HCl)를 이용하여 탈보호될 수 있고, 생성된 링커는 탈염 회전 컬럼을 이용하여 정제될 수 있다. 생성된 탈보호된 올리고뉴클레오타이드 링커는 SMCC와 같은 이중작용성(heterobifunctional) 교차 링커를 이용하여 항체 또는 기타 유형의 단백질의 일차 아민에 컨주게이션될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 상의 5'-포스페이트기는 수용성 카르보다이미드 EDC로 처리되어, 포스페이트 에스테르를 형성할 수 있고, 이는 이후 아민 함유 분자에 커플링될 수 있다. 특정 예에서, 3'-리보오스 잔기 상의 디올은 알데히드 기로 산화될 수 있고, 이는 이후 환원성 아민화를 이용하여 항체 또는 기타 유형의 단백질의 아민기에 컨주게이션될 수 있다. 특정 기타 예에서, 올리고뉴클레오타이드 링커는 3' 또는 5' 말단 상에서의 비오틴 변형을 이용하여 합성될 수 있고, 스트렙타비딘-표지된 분자에 컨주게이션될 수 있다.
- [0151] 올리고뉴클레오타이드 링커는 문헌[Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 및 Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)]에 기재된 바와 같이 당 분야에 공지된 다양한 임의의 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드의 합성은 통상적인 핵산 보호 및 커플링 기, 예를 들어, 5'-말단에서의 디메톡시트리틸 및 3'-말단에서의 포스포르아미다이트(phosphoramidite)를 이용한다. 올리고뉴클레오타이드 합성에 적합한 시약, 핵산 탈보호 방법, 및 핵산 정제 방법은 당해 기술분야의 통상이 기술자에게 공지되어 있다.
- [0152] 특정 예에서, 활성화 상태-의존성 항체는 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 직접적으로 표지된다. 신호 증폭쌍 일원은 당분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 활성화 상태-의존성 항체에 커플링될 수 있다. 특정 기타 예에서, 활성화 상태-의존성 항체는 활성화 상태-의존성 항체에 컨주게이션된 결합쌍의 제 1 일원과 신호 증폭쌍의 제 1 일원에 컨주게이션된 결합쌍의 제 2 일원 사이의 결합을 통해 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 간접적으로 표지된다. 결합쌍 일원(예를 들어, 비오틴/스트렙타비딘)은 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 신호 증폭쌍 일원 또는 활성화 상태-의존성 항체에 커플링될 수 있다. 신호 증폭쌍 일원의 예는 퍼옥시다아제, 예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP), 카탈라아제, 클로로퍼옥시다아제, 시토크롬 c 퍼옥시다아제, 호산구 퍼옥시다아제, 글루타티온 퍼옥시다아제, 락토퍼옥시다아제, 미엘로퍼옥시다아제, 갑상선 퍼옥시다아제, 탈이온 효소 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 신호 증폭쌍 일원의 기타 예는 보호기에 의해 보호된 합텐 및 효소 억제제로의 티오에테르 결합에 의해 비활성화된 효소를 포함한다.
- [0153] 근접 채널링의 한 예에서, 촉진 모이어티는 글루코오스 옥시다아제(GO)이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)이다. GO가 글루코오스와 같은 기질과 접촉되는 경우, 이는 산화제(즉, 과산화수소

(H₂O₂)를 발생시킨다. HRP가 GO에 대해 채널링 근접 내에 존재하는 경우, GO에 의해 발생된 H₂O₂는 HRP로 채널링하고 이와 복합체를 이루어 HRP-H₂O₂ 복합체를 형성하고, 신호 증폭쌍의 제 2 일원(예를 들어, 화학발광 기질, 예컨대, 루미놀 또는 이소루미놀 또는 형광 기질, 예컨대, 티라미드(예를 들어, 비오틴-티라미드), 호모바닐린산(homovanillic acid) 또는 4-히드록시페닐 아세트산)의 존재하에서 증폭된 신호를 발생시킨다. 근접 분석에서 GO 및 HRP를 이용하는 방법은, 예를 들어, 문헌[Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999)]에 기재되어 있다. 신호 증폭쌍의 제 2 일원으로서 비오틴-티라미드가 사용되는 경우, HRP-H₂O₂ 복합체는 티라미드를 산화시켜, 가까운 친핵성 잔기에 공유적으로 결합하는 반응성 티라미드 라디칼을 발생시킨다. 활성화된 티라미드는 직접적으로 검출되거나, 스트렙타비딘-표지된 형광단 또는 스트렙타비딘-표지된 퍼옥시다아제와 발색 작용제의 조합물과 같은 신호-검출 시약의 첨가 후에 검출된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 형광단의 예는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 염료(예를 들어, Alexa Fluor®555), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon Green™); 로다민, 텍사스 레드, 테트라로다민 이소티오시아네이트(TRITC), CyDye™ 플루오르(예를 들어, Cy2, Cy3, Cy5) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 스트렙타비딘 표지는 당해 기술 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 형광단 또는 퍼옥시다아제에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 발색 시약의 비제한적인 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), 3,3'-디아미노벤지딘(DAB), 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(ABTS), 4-클로로-1-나프톨(4CN), 및/또는 포르피리노겐을 포함한다.

[0154] 근접 채널링의 또 다른 예에서, 촉진 모이어티는 감광제이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 특정 결합 파트너(예를 들어, 리간드, 항체 등)으로의 합텐의 결합을 방지하는 보호기로 보호된 다수의 합텐으로 표지된 거대한 분자이다. 예를 들어, 신호 증폭쌍 일원은 보호된 비오틴, 쿠마린 및/또는 플루오레세인 분자로 표지된 텍스트란 분자일 수 있다. 적절한 보호기는 페녹시-보호기, 아날리노-보호기, 올레핀-보호기, 티오에테르-보호기, 및 셀레노에테르-보호기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 근접 분석에 사용하기에 적합한 추가 감광제 및 보호된 합텐 분자는 미국 특허 제 5,807,675호에 기재되어 있다. 감광제가 광에 의해 여기되는 경우, 이는 산화제(즉, 싱글렛 산소(singlet oxygen))를 발생시킨다. 합텐 분자가 감광제에 대해 채널링 근접하여 존재하는 경우, 감광제에 의해 발생된 일중항 산소는 합텐의 보호기 상의 티오에테르로 채널링하고 이와 반응하여, 카르보닐기(케톤 또는 알데히드) 및 술폰산을 발생시키고, 합텐으로부터 보호기를 방출시킨다. 보호되지 않은 합텐은 이후 신호 증폭쌍의 제 2 일원(예를 들어, 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 특정 결합 파트너)에 특이적으로 결합하는데 이용가능하다. 예를 들어, 합텐이 비오틴인 경우, 특정 결합 파트너는 효소-표지된 스트렙타비딘일 수 있다. 예시적 효소는 알칼리성 포스파타아제, β-갈락토시다아제, HRP 등을 포함한다. 결합되지 않은 시약을 제거하기 위한 세척 후, 검출가능한 신호는 효소의 검출가능한(예를 들어, 형광, 화학발광, 색소 등) 기질을 첨가함으로써 발생될 수 있고, 이는 당해 기술 분야에 공지된 적절한 방법 및 기계를 이용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, 검출가능한 신호는 티라미드 신호 증폭을 이용하여 증폭될 수 있고, 활성화된 티라미드는 직접 검출되거나 상기 기재된 바와 같은 신호-검출 시약의 첨가 후에 검출된다.

[0155] 근접 채널링의 또 다른 예에서, 촉진 모이어티는 감광제이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 효소-억제제 복합체이다. 효소 및 억제제(예를 들어, 포스폰산-표지된 텍스트란)은 분해가능한 링커(예를 들어, 티오에테르)에 의해 함께 연결된다. 감광제가 광에 의해 여기되는 경우, 이는 산화제(즉, 일중항 산소)를 발생시킨다. 효소-억제제 복합체가 감광제에 채널링 근접하여 존재하는 경우, 감광제에 의해 발생된 일중항 산소는 분해가능한 링커로 채널링하고 이와 반응하여, 효소로부터 억제제를 방출시킴으로써 효소를 활성화시킨다. 효소 기질이 첨가되어 검출가능한 신호가 발생되거나, 대안적으로 증폭 시약이 첨가되어 증폭 신호가 발생된다.

[0156] 근접 채널링의 한 추가 예에서, 촉진 모이어티는 HRP이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 보호된 합텐 또는 상기 기재된 바와 같은 효소-억제제 복합체이고, 보호기는 p-알콕시 페놀을 포함한다. 페닐렌디아민 및 H₂O₂의 첨가는 보호된 합텐 또는 효소-억제제 복합체로 채널링하고 p-알콕시 페놀 보호기와 반응하는 반응성 페닐렌 디아민을 발생시켜, 노출된 합텐 또는 반응성 효소를 생성시킨다. 증폭된 신호가 발생되고, 이는 상기 기재된 바와 같이 검출된다(예를 들어, 미국 특허 제 5,532,138호 및 제 5,445,944호 참조).

[0157] 본원에 기재된 근접 검정을 실행하기 위한 예시적인 프로토콜은 실시예 4에 제공되어 있다.

[0158] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 상기한 근접 검정을 실행하기 위한 키트를 제공한다: (a) 고체 지지체 상에 고정된 다수의 포획 항체의 희석 시리즈; 및 (b) 다수의 검출 항체(예를 들어, 활성화 상태-비의존성 항체 및 활성화 상태-의존성 항체). 몇몇 경우에 있어서, 상기 키트는 고정 중앙의 순환 세포의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하기 위해 상기 키트를 사용하는 방법에 관한 사용설명서를 추가로

포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 예를 들어, 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원, 티라미드 신호 증폭 시약, 촉진 모이어티용 기질, 세척 완충액 등과 같은, 본 발명의 특정 방법의 실행과 관련하여 상기한 추가 시약들 중 임의의 시약을 포함할 수 있다.

[0159]

VII. 항체의 생산

[0160]

본 발명에 따라 회귀 순환 세포에서 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 분석하기 위한 시판되지 않는 항체의 생성 및 선택이 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 한 방법은 당해 기술 분야에 공지된 단백질 발현 및 정제 방법을 이용하여 관심 폴리펩티드(즉, 항원)을 발현시키고/시키거나 정제시키는 것인 반면, 또 다른 방법은 당해 기술 분야에 공지된 고상 펩티드 합성 방법을 이용하여 관심 폴리펩티드를 합성하는 것이다. 예를 들어, 문헌[*Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.*, Vol. 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, ed., *Meth. Enzymol.*, Vol. 289 (1997); Kiso et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids*, 1:255-60, (1995); 및 Fujiwara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 44:1326-31 (1996)]을 참조하라. 정제되거나 합성된 폴리펩티드는 이후 예를 들어 마우스 또는 래빗에 주사되어, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체가 생성될 수 있다. 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 문헌[*Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988)]에 기재된 바와 같이 다양한 방법이 항체의 생성에 이용가능하다는 것을 인지할 것이다. 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 또한 항체를 모방하는 결합 단편 또는 Fab 단편이 또한 다양한 방법에 의해 유전적 정보로부터 제조될 수 있음을 인지할 것이다(예를 들어, 문헌[*Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); 및 Huse et al., *J. Immunol.*, 149:3914-3920 (1992)] 참조).

[0161]

또한, 다수의 간행물이 선택된 표적 항원으로의 결합에 대해 폴리펩티드의 라이브러리를 생성시키고 스크리닝하는 파지 전사 기술의 사용을 보고하고 있다(예를 들어, 문헌[Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Scott et al., *Science*, 249:386-388 (1990); 및 Ladner et al., 미국 특허 제 5,571,698호] 참조). 파지 디스플레이 방법의 기본적인 개념은 파지 DNA에 의해 엔코딩된 폴리펩티드와 표적 항원 사이의 물리적 회합의 성립이다. 이러한 물리적 회합은 폴리펩티드를 엔코딩하는 파지 유전체를 둘러싸는 캡시드의 일부로서 폴리펩티드를 전사하는 파지 입자에 의해 제공된다. 폴리펩티드와 이들의 유전적 물질 사이의 물리적 회합의 성립은 다양한 폴리펩티드를 지니는 매우 많은 수의 파지의 동시적인 대규모 스크리닝을 가능케 한다. 표적 항원에 친화성을 지니는 폴리펩티드를 디스플레이하는 파지는 표적 항원에 결합하고, 이러한 파지는 표적 항원에 대한 친화성 스크리닝에 의해 농화된다. 이러한 파지로부터 디스플레이된 폴리펩티드의 확인은 각각의 유전체로부터 결정될 수 있다. 이러한 방법을 이용하여, 요망되는 표적 항원에 대해 결합 친화성을 지니는 것으로 확인된 폴리펩티드는 이후 통상적인 수단에 의해 대량으로 합성될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 6,057,098호 참조).

[0162]

그런 다음, 상기 방법에 의해 생성되는 항체는 먼저 정제된 관심 폴리펩티드 항원을 이용하여 친화성 및 특이성에 대해 스크리닝하고, 필요시 이러한 결과를 결합으로부터 배제되는 것이 요망되는 기타 폴리펩티드 항원을 이용한 체의 친화성 및 특이성과 비교함으로써 선택될 수 있다. 스크리닝 절차는 미세역가 플레이트의 분리된 웰에서의 정제된 폴리펩티드 항원의 고정을 포함할 수 있다. 잠재적인 항체 또는 항체 그룹을 함유하는 용액은 이후 각각의 미세역가 웰에 배치되고, 약 30분 내지 2시간 동안 인큐베이션된다. 미세역가 웰은 이후 세척되고, 표지된 2차 항체(예를 들어, 생성되는 항체가 마우스 항체인 경우 알칼리성 포스포타아제에 컨쥬레이션된 항-마우스 항체)가 웰에 첨가되고, 약 30분 동안 인큐베이션된 후, 세척된다. 기질이 웰에 첨가되고, 고정된 폴리펩티드 항원에 대해 항체가 존재하는 경우 색 반응이 나타날 것이다.

[0163]

이렇게 확인된 항체는 이후 친화성 및 특이성에 대해 추가로 분석될 수 있다. 표적 단백질의 면역분석법의 개발에 있어서, 정제된 표적 단백질은 선택되는 항체를 이용하여 면역분석법의 민감성 및 특이성을 판단하는 표준으로 작용한다. 다양한 항체의 결합 친화성이 다양하고, 예를 들어, 특정 항체 조합물이 다른 항체 조합물을 입체적으로 방해할 수 있으므로, 항체의 분석 수행은 항체의 절대 친화성 및 특이성 보다 중요한 척도일 수 있다.

[0164]

당업자는 항체 또는 결합 단편의 생성, 및 다양한 관심 폴리펩티드에 대한 친화성 및 특이성의 스크리닝 및 선택에서 다양한 방법이 이용될 수 있으나, 이러한 방법이 본 발명의 범위를 변경하지 않음을 인지할 것이다.

[0165]

A. 폴리클로날 항체

- [0166] 폴리클로날 항체는 관심 폴리펩티드 및 애주번트의 다수의 피하(sc) 또는 복막내(ip) 주사에 의해 동물에서 생성된다. 관심 폴리펩티드를 이작용성 또는 유도체화 작용제를 이용하여 면역화되는 종에서 면역원성인 단백질 담체, 예를 들어, 키흐림펩트 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로블린 또는 대두 트립신 억제제에 컨주게이션시키는 것이 유용할 수 있다. 이작용성 또는 유도체화 작용제의 비제한적인 예는 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통해 컨주게이션), N-히드록시숙신이미드(리신 잔기를 통해 컨주게이션), 글루타르알데히드, 숙신 무수물, SOCl₂ 및 R₁N=C=NR을 포함하고, 여기서 R 및 R₁은 상이한 알킬기이다.
- [0167] 동물은, 예를 들어, 100 μg(레빗) 또는 5 μg(마우스)의 항원 또는 컨주게이트와 3 부피의 프레온트 완전 애주번트를 조합시키고, 이 용액을 다수의 부위에 피내 주사함으로써 관심 폴리펩티드 또는 이의 면역원성 컨주게이트 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1개월 후, 동물은 다수의 부위에서 피하 주사에 의해 프로인트 불완전 애주번트 중의 본래 양의 약 1/5 내지 1/10의 폴리펩티드 또는 컨주게이트를 이용하여 부스팅(boosting)된다. 7내지 14일 후, 동물은 채혈되고, 항체 역가에 대해 혈청이 분석된다. 동물은 통상적으로 역가 안정기(plateaus)까지 부스팅된다. 바람직하게는, 동물은 동일한 폴리펩티드의 컨주게이트로 부스팅되나, 상이한 면역원성 단백질로의 컨주게이션 및/또는 상이한 가교 시약을 통한 컨주게이션이 이용될 수 있다. 컨주게이트는 또한 융합 단백질로서 재조합 세포 배양물에서 제조될 수 있다. 특정 예에서, 명반과 같은 응집 작용제가 면역반응을 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0168] **B. 모노클로날 항체**
- [0169] 모노클로날 항체는 일반적으로 실질적으로 동종성인 항체의 집단으로부터 수득되며, 즉 개별적 항체를 포함하는 집단은 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특성을 나타낸다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌[Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법을 이용하거나, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다.
- [0170] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물(예를 들어, 햄스터)은 상기 기재된 바와 같이 면역화되어, 면역화에 사용되는 관심 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화된다. 면역화된 림프구는 이후 적절한 융합 작용제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 골수종 세포와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다(예를 들어, 문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)] 참조). 이에 따라 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 모(parental) 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적절한 배지에 시딩되고 성장된다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(HGPRT)가 결핍되어 있는 경우, 하이브리도마 세포용 배지는 통상적으로 HGPRT-결여 세포의 성장을 방지하는 하이포잔틴, 아미놉테린 및 티미딘(HAT 배지)를 포함할 것이다.
- [0171] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합하고/하거나, 선택된 항체-생성 세포에 의한 안정적인 고수준의 항체 생성을 지지하고/하거나, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 골수종 세포이다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 바람직한 골수종 세포주의 예는 무린 골수종 세포주, 예를 들어 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양(살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 입수가능; San Diego, CA), SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포(미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection)에서 입수가능; Rockville, MD), 및 인간 골수종 또는 마우스-인간 이종골수종 세포주(예를 들어, 문헌[Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); 및 Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63 (1987)] 참조)로부터 유래된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0172] 하이브리도마 세포가 성장하는 배지는 관심 폴리펩티드에 특이적인 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석될 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어, 방사선면역측정법(RIA) 또는 효소면역측정법(ELISA)에 의해 결정된다. 모노클로날 항체의 결합 특이성은, 예를 들어, 문헌[Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석(Scatchard analysis)을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0173] 요망되는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론은 희석 절차를 제한함으로써 서브클로닝되고, 표준 방법에 의해 성장할 수 있다(예를 들어, 문헌[Goding, *Monoclonal*

Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)] 참조). 이러한 목적에 적합한 배지는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장될 수 있다. 서브클론에 의해 분비되는 모노클로날 항체는 통상적인 항체 정제 과정, 예를 들어 단백질 A-세파로오스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배지, 복수 또는 혈청으로부터 분리될 수 있다.

[0174] 모노클로날 항체를 엔코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 분리되고 서열확인될 수 있다(예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 엔코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함). 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로 작용한다. 분리된 후, DNA는 발현 벡터에 배치될 수 있고, 이후 숙주 세포, 예를 들어 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포, 또는 다른 항체는 생성하지 않는 골수종 세포에 트랜스펙션되어, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성이 유도된다(예를 들어, 문헌[Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); 및 Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992)] 참조). DNA는 또한, 예를 들어 동종성 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호; 및 문헌[Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)] 참조)하거나, 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부에 면역글로불린 코딩 서열을 공유적으로 연결시킴으로써 변형될 수 있다.

[0175] 추가 구체예에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어 문헌[McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]; 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 사슬 셔플링(shuffling)에 의한 고 친화성(nM 범위) 인간 모노클로날 항체의 생성이 문헌[Marks et al., *BioTechnology*, 10:779-783 (1992)]에 기재되어 있다. 매우 큰 파지 라이브러리를 작제하기 위한 방법으로서 조합 감염(Combinatorial infection) 및 생체내 재조합의 이용이 문헌[Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)]에 기재되어 있다. 따라서, 이러한 기술은 모노클로날 항체의 생성을 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 방법에 대한 실용적인 대안이다.

[0176] **C. 인간화된 항체**

[0177] 비-인간 항체를 인간화시키기 위한 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 바람직하게는, 인간화된 항체는 비인간인 공급원으로부터 항체로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 지닌다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입(import)" 잔기로 언급되고, 이는 통상적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 비-인간 항체의 초가변(hypervariable) 영역 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 대체함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); 및 Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)]을 참조하라. 따라서, 이러한 "인간화된" 항체는 키메라 항체(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조)이며, 이는 실질적으로 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환되는 것이 아니다. 실제로, 인간화된 항체는 통상적으로 몇몇 과가변 영역 잔기 및 혹은 몇몇 프레임워크 영역(FR) 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 대체되는 인간 항체이다.

[0178] 본원에 기재된 인간화된 항체를 제조하는데 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는데 있어서 중요한 고려사항이다. 소위 "최-적합성(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 설치류의 서열과 가장 근접한 인간 서열이 이후 인간화된 항체를 위한 인간 FR로서 수용된다(예를 들어, 문헌[Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); 및 Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)] 참조). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 콘센서스(consensus) 서열로부터 유래된 특정 FR을 이용한다. 여러 상이한 인간화된 항체에 대해 동일한 FR이 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)] 참조).

[0179] 항체가 항원에 대한 높은 친화성 및 기타 바람직한 생물학적 특성을 보유하면서 인간화되는 것이 또한 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 인간화된 항체는 모(parental) 서열 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념상의 인간화된 생성물의 분석 방법에 의해 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델은 시판되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 예상적인 3차원 형태의 구조를 예시하고 전시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 전시의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력

에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능케 한다. 이러한 방식에서, FR 잔기가 선택될 수 있고, 이는 수용체 및 유입 서열로부터 조합될 수 있어, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 요망되는 항체 특성이 달성된다. 일반적으로, 과가변 영역 잔기는 항원 결합의 영향에 있어서 직접적이고 특이적으로 관련된다.

[0180] 본 발명에 따른 다양한 형태의 인간화된 항체가 고려된다. 예를 들어, 인간화된 항체는 Fab 단편과 같은 항체 단편일 수 있다. 대안적으로, 인간화된 항체는 무손상 IgA, IgG 또는 IgM 항체와 같은 무손상 항체일 수 있다.

[0181] **D. 인간 항체**

[0182] 인간화에 대한 대안으로서, 인간 항체가 생성될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 면역화 후 내인성 면역글로블린 생성물의 부재 하에서 인간 항체의 전체 레퍼토리(repertoire)를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)이 생성될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식-계열 돌연변이 마우스에서의 항체 중쇄 결합 영역(JH) 유전자의 동종접합 결실은 내인성 항체 생성의 완전한 억제체를 야기시키는 것으로 기재되어 있다. 상기 생식-계열 돌연변이 마우스에서의 인간 생식-계열 면역글로블린 유전자 어레이의 이동은 항원 공격(challenge)시 인간 항체를 생성시킬 것이다. 예를 들어, 문헌[Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immun.*, 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 제 5,591,669호, 제 5,589,369호, 및 제 5,545,807호를 참조하라.

[0183] 대안적으로, 면역화되지 않은 공여체로부터의 면역글로블린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리를 이용하여 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성시키기 위해 파지 전사 기술(예를 들어, 문헌[McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990)] 참조)이 사용될 수 있다. 이러한 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 섬유상 박테리오파지, 예를 들어, M13 또는 fd의 메이저(major) 및 마이너(minor) 코트 단백질 유전자로 인-프레임(in-frame)으로 클로닝되고, 이는 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로 전사된다. 섬유상 입자는 파지 유전체의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하므로, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택은 또한 상기 특성을 나타내는 항체를 엔코딩하는 유전자의 선택을 초래한다. 따라서, 파지는 B 세포의 몇몇 특성을 모방한다. 파지 전사는, 예를 들어, 문헌[Johnson et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:564-571 (1993)]에 기재된 바와 같이 다양한 포맷으로 수행될 수 있다. V-유전자 세그먼트의 여러 공급원이 파지 전사에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]을 참조하라. 면역화되지 않은 인간 공여체로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 작제될 수 있고, 다양한 어레이의 항원(자가 항원(self-antigen)을 포함함)에 대한 항체가 본질적으로 문헌[Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)]; 및 미국 특허 제 5,565,332호 및 제 5,573,905호에 기재된 기술에 따라 분리될 수 있다.

[0184] 특정 예에서, 인간 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제 5,567,610호 및 제 5,229,275호에 기재된 바와 같이 시험관 내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다.

[0185] **E. 항체 단편**

[0186] 항체 단편을 생성하기 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편은 무손상 항체의 단백질분해성 분해를 통해 유래되었다(예를 들어, 문헌[Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24: 107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이러한 단편은 현재 재조합 숙주 세포를 이용하여 직접 생성될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 분리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 대장균 세포로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편이 형성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Carter et al., *BioTechnology*, 10:163-167 (1992)] 참조). 또 다른 방법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편을 생성하기 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 구체예에서, 선택 항체는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다. 예를 들어, PCT 공보 WO 93/16185호; 및 미국 특허 제 5,571,894호 및 제 5,587,458호를 참조하라. 항체 단편은 또한, 예를 들어 미국 특허 제 5,641,870호에 기재된 바와 같이 선형 항체일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이성이거나 이특이성일 수 있다.

[0187] **F. 이특이성 항체**

[0188] 이특이성 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 지니는 항체이다. 예시적인 이특이성 항체는 관심 동일 폴리펩티드의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 기타 이특이성 항체는 하나 이상의 추가 항원에 대한 결합 부위(들)을 지니는 관심 폴리펩티드에 대한 결합 부위에 결합할 수 있다. 이특이성 항체는 전장의 항체 또는 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 이특이성 항체)로 제조될 수 있다

- [0189] 이특이성 항체를 제조하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 전통적인 전장의 이특이적 항체의 생성은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 하며, 상기 2개의 사슬은 상이한 특이성을 지닌다(예를 들어, 문헌[Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)] 참조). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이러한 하이브리도마(쿼드로마(quadromas))는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생성시키고, 이중 단지 하나만이 올바른 이특이성 구조를 지닌다. 올바른 분자의 정제는 보통 친화성 크로마토그래피에 의해 수행된다. 유사한 절차가 PCT 공보 WO 93/08829호 및 문헌[Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 기재되어 있다.
- [0190] 다양한 방법에 따르면, 요망되는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)를 지니는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 이용하며, 이는 힌지(hinge), CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 융합물의 적어도 하나에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제 1 중쇄 불변 영역(CH1)을 지니는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물 및 요망시 면역글로불린 경쇄를 엔코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터로 삽입되고, 적절한 숙주 유기체로 공동 트랜스펙션된다. 이는 최적의 수율을 제공하는 작제물에서 동등하지 않은 비율의 3개의 폴리펩티드 사슬이 사용되는 구체예에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율의 조정에 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2개 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현이 높은 수율을 발생시키거나 상기 비율이 특별한 유의성이 없는 경우 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터로 삽입시키는 것이 가능하다.
- [0191] 이러한 방법의 한 바람직한 구체예에서, 이특이성 항체는 하나의 암(arm)의 제 1 결합 특이성을 지니는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 또 다른 암의 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제 2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이러한 비대칭 구조는 이특이성 분자의 단지 절반에서의 면역글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 수단을 제공함에 따라 원치않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터 요망되는 이특이성 화합물의 분리를 촉진한다. 예를 들어, PCT 공보 WO 94/04690호 및 문헌[Suresh et al., *Meth. Enzymol.*, 121:210 (1986)]을 참조하라.
- [0192] 미국 특허 제 5,731,168호에 기재된 또 다른 방법에 따르면, 항체 분자쌍 사이의 계면이 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이합체의 백분율을 최대화시키기 위해 공학처리될 수 있다. 바람직한 인터페이스(interface)는 항체 불변 도메인의 CH3 도메인 중 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제 1 항체 분자의 인터페이스로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)을 대체한다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제 2 항체 분자의 인터페이스에서 큰 측쇄(들)과 동일하거나 유사한 크기의 보충 "공동(cavity)"이 생성된다. 이는 이중이합체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이중이합체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.
- [0193] 이특이성 항체는 가교된 항체 또는 "헤테로컨쥬게이트(heteroconjugate)" 항체를 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨쥬게이트의 항체중 하나는 아비딘에 커플링되고, 나머지는 비오틴에 커플링될 수 있다. 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 통상적인 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적절한 가교제 및 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 제 4,676,980호에 기재되어 있다.
- [0194] 항체 단편으로부터 이특이성 항체를 생성하기에 적절한 기술이 또한 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 이특이성 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 특정 예에서, 이특이성 항체는 무손상 항체가 단백질 분해적으로 분해되어 F(ab')₂ 단편을 발생시키는 절차에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 이러한 단편은 디티올 복합체 형성 작용제인 소듐 아르세나이트의 존재하에서 환원되어, 인접한 디티올이 안정화되고, 분자간 디설피드 형성이 방지된다. 생성된 Fab' 단편은 이후 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. Fab'-TNB 유도체중 하나는 이후 머캅토에틸아민을 이용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어, 이특이성 항체가 형성된다.
- [0195] 몇몇 구체예에서, Fab'-SH 단편은 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 이특이성 항체가 형성될 수 있다. 예를 들어, 완전히 인간화된 이특이성 항체 F(ab')₂ 분자는 문헌[Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)]에 기재된 방법에 의해 생성될 수 있다. 각각의 Fab' 단편은 대장균으로부터 개별적으로 분리되고, 시험관내에서 특이적인 화학적 커플링에 적용되어, 이특이성 항체가 형성된다.
- [0196] 재조합 세포 배양물로부터 직접 이특이성 항체 단편을 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 이특이성 항체는 류신 지퍼(leucine zipper)를 이용하여 생성된다. 예를 들어, 문헌[Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-1553 (1992)]을 참조하라. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드는 유

전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결된다. 항체 동종이합체는 현지 영역에서 환원되어, 모노머가 형성되고, 이후 재산화되어, 항체 이종이합체가 형성된다. 이러한 방법은 또한 항체 동종이합체의 생성에 이용될 수 있다. 문헌[Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디(diabody)" 기술이 이특이성 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 메커니즘을 제공한다. 단편은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 페어링(pairing)을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 VH 및 VL 도메인은 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루게 됨으로써, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일 사슬 Fv (sFv) 이합체의 사용에 의해 이특이성 항체 단편을 제조하는 또 다른 방법은 문헌[Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]에 기재되어 있다.

[0197] 2개 이상의 결합가를 지니는 항체가 또한 고려된다. 예를 들어, 삼특이성 항체가 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]을 참조하라.

[0198] **G. 항체 정제**

[0199] 재조합 기술을 이용하는 경우, 항체는 분리된 숙주 세포 내 또는 숙주 세포의 원형질막 주위공간 내에서 생성될 수 있거나, 숙주 세포로부터 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생성되는 경우, 예를 들어, 원심 분리 또는 초여과에 의해 특정 부스러기가 먼저 제거된다. 문헌[Carter et al., *BioTech.*, 10:163-167 (1992)]에는 대장균의 원형질막 주위공간으로 분비되는 항체를 분리하는 방법이 기재되어 있다. 간단하게, 세포 페이스트가 아세트산 나트륨(pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰플루오라이드(PMSF)의 존재하에서 약 30분 동안 해동된다. 세포 부스러기는 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상층액은 일반적으로 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 초여과 유닛을 이용하여 농축된다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제가 단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계중 어느 단계에 포함될 수 있고, 항생제가 외래 오염물질의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0200] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 동형(isotype)에 좌우된다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초하여 항체를 정제하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)] 참조). 단백질 G는 모든 마우스 동형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다(예를 들어, 문헌[Guss et al., *EMBO J.*, 5:1567-1575 (1986)] 참조). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로오스이나, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어, 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로오스를 이용하여 달성될 수 있는 것보다 빠른 유속 및 보다 짧은 처리 시간을 가능케 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지(J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어, 이온 교환 컬럼에서의 분획법, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 해파린 SEPHAROSE™에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를 들어, 폴리아스 파르트산 컬럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

[0201] 임의의 예비 정제 단계(들) 후, 관심 항체 및 오염물질을 포함하는 혼합물은 바람직하게는 저염 농도(예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는 약 2.5 내지 4.5의 pH에서 용리 완충용액을 이용하는 낮은 pH의 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[0202] 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 항체와 유사한 기능을 갖는 임의의 결합 분자, 예를 들어, 샘플내 관심있는 하나 이상의 분석대상물에 특이적인 결합 분자 또는 결합 파트너가 또한 본 발명의 방법 및 조성물에 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 적절한 항체-유사 분자의 예는, 이로운 국한되는 것은 아니지만, 도메인 항체, 유니바디(unibodies), 나노바디, 상어 항원 반응 단백질(shark antigen reative proteins), 에비머(avimers), 어드넥틴(adnect ins), 안티칼스(anticalms), 친화성 리간드, 필로머((phylomers), 앵타머, 어피바디(affibodies), 트라이넥틴(trinectins) 등을 포함한다.

[0203] **VIII. 투여 방법**

[0204] 본 발명의 방법에 따라, 본원에 기재된 항암 약물은 당해 기술 분야에 공지된 임의의 간편한 수단에 의해 피검체에게 투여된다. 본 발명의 방법은 피검체내 종양(예를 들어, 폐 종양)의 치료를 위한 적합한 항암 약물 또는

항암 약물의 조합물을 선별하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 항암 약물 또는 항암 약물의 조합물로의 치료를 위한 적합한 후보자인 종양(예를 들어, 폐 종양)을 지니는 피검체를 선별하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 항암 약물 또는 항암 약물의 조합물로의 치료를 위한 피검체내 종양(예를 들어, 폐 종양)의 반응을 확인하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 항암 약물 또는 항암 약물의 조합물로의 치료를 위한 종양(폐 종양)을 지니는 피검체의 반응을 예측하는데 사용될 수 있다. 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 항암 약물이 단독으로 또는 종래의 화학치료, 방사능요법, 호르몬 요법, 면역요법, 및/또는 수술과 조합된 치료적 방법의 일부로서 투여될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0205] 특정 구체예에서, 항암 약물은 항-신호전달제(즉, 세포증식억제 약물), 예컨대, 모노클로날 항체 또는 티로신 키나아제 억제제; 항증식제; 화학치료제(즉, 세포독성 약물); 방사선치료제; 백신; 및/또는 이상 세포, 예컨대, 암세포의 조절되지 않는 성장을 감소시키거나 폐기시키는 능력을 지닌 임의의 기타 화합물을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 피검체는 하나 이상의 화학치료제와 조합된 항-신호전달 작용제 및/또는 항-증식제로 처리된다. 예시적인 모노클로날 항체, 티로신 키나아제 억제제, 항-증식제, 화학치료제, 방사선치료제, 및 백신은 위에 기재되어 있다.

[0206] 본원에 기재된 항암 약물은 또한 이로만 국한되는 것은 아니지만, 스테로이드(예를 들어, 텍사메타손), 피나스테라이드, 아로마타제 억제제, 타목시펜, 및 고나드르핀-방출 호르몬 효능제(gonadotropin-releasing hormone agonists, GnRH), 예컨대, 고세렐린을 포함하는 종래의 호르몬 요법제와 함께 동시투여될 수 있다.

[0207] 추가적으로, 본원에 기재된 항암 약물은, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 면역자극제(예를 들어, 바실루스 칼메트-게랭(Bacillus Calmette-Guerin, BCG), 레바미솔, 인터루킨-2, 알파-인터페론 등), 면역독소(예를 들어, 항-CD33 모노클로날 항체-칼리케아미신 컨주게이트, 항-CD22 모노클로날 항체-슈도모나스 엑소톡신 컨주게이트 등), 및 방사선면역치료제(예를 들어, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, 또는 ¹³¹I 등에 컨주게이션된 항-CD20 모노클로날 항체, 등)을 포함하는 종래의 면역치료제와 함께 동시투여될 수 있다.

[0208] 항암 약물은 필요에 따라 적합한 약제학적 부형제와 함께 투여될 수 있고 승인된 투여 양상 중 임의의 양상을 통해 투여가 진행될 수 있다. 따라서, 투여는, 예를 들어, 경구, 구강(buccal), 설하, 잇몸(gingival), 입천장(palatal), 정맥내(intravenous), 국소, 피하, 경피(transcutaneous), 경피(transdermal), 근내(intramuscular), 관절내(intra-joint), 비경구(parenteral), 소동맥내(intra-arteriole), 진피내(intradermal), 뇌실내(intraventricular), 두개내(intracranial), 복막내(intraperitoneal), 방광내(intravesical), 경막내(intrathecal), 병변내(intralesional), 비내(intranasal), 직장, 질내, 또는 흡입 투여일 수 있다. "동시-투여하다(co-administer)"는 항암 약물을 동일 시간에, 제 2의 약물(예를 들어, 또 다른 항암 약물, 항암 약물 치료제, 방사선치료제, 호르몬 치료제, 면역치료제 등과 연관된 부작용을 감소시키기 위해 사용되는 약물 등)의 투여 직전, 또는 직후에 투여되는 것을 의미한다.

[0209] 치료학적으로 유효량의 항암 약물은 반복하여, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8회 또는 그 이상 투여될 수 있거나, 용량이 연속 주입으로 투여될 수 있다. 용량은 고체, 반고체, 동결건조된 분말, 또는 액체 투여량 형태, 예컨대, 정제, 환, 펠렛, 캡슐, 분말, 용액, 현탁제, 에멀전, 좌제, 체류 관장제(retention enemas), 크림, 연고, 로션, 젤, 에어졸, 기포 등으로, 바람직하게는, 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여량 형태를 취할 수 있다.

[0210] 본원에 사용된, 용어 "단위 투여량 형태"는 인간 피검체 및 다른 포유동물을 위한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 유닛을 포함하며, 각각의 유닛은 적합한 약제학적 부형제(예를 들어, 앰플)와 연계하여, 요망되는 개시, 내성, 및/또는 치료적 효과를 생산하도록 계산된 사전결정된 양의 항암 약물을 함유한다. 또한, 더 농축된 투여량 형태가 이후 생산될 수 있다. 그리하여 상기 더 농축된 투여량 형태는 예를 들어, 상기 항암 약물의 양의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10배 이상 실질적으로 더 많은 양을 함유할 것이다.

[0211] 그러한 투여량 형태를 제조하는 방법은 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조: REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). 투여량 형태는 전형적으로 종래의 약제학적 담체 또는 부형제를 포함하고 추가적으로 다른 의약제(medicinal agents), 담체, 애주번트, 희석제, 조직 투과 증강제, 가용화제(solubilizers) 등을 포함한다. 적절한 부형제는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법으로 특정 투여량 형태 및 투여 경로에 관해 맞추어질 수 있다(예를 들어, 하기 문헌 참조: REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 전제서).

[0212] 적합한 부형제의 예는, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 스

타치, 껌 아카시아, 칼슘포스페이트, 알기네이트, 트라가칸스, 젤라틴, 칼슘 실리케이트, 미세결정 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 살린, 시럽, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 및 폴리아크릴산, 예컨대, 카르보폴(Carbopols), 예를 들어, 카르보폴 941, 카르보폴 980, 카르보폴 981 등을 포함한다. 투여량 형태는 추가적으로, 운환제, 예컨대, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일; 습윤제; 에멀전화제; 현탁제; 보존제, 예컨대, 메틸-, 에틸-, 및 프로필-히드록시-벤조에이트(즉, 파라벤); pH 조절제, 예컨대, 무기 및 유기산 및 염기; 감미제(sweetening agents); 및 착향제(flavoring agents)를 포함한다. 투여량 형태는 또한 생분해성 폴리머 비드, 텍스트란, 및 시클로텍스트린 포함 복합체를 포함할 수 있다.

[0213] 경구 투여 투여의 경우, 치료학적으로 유효 용량은 정제, 캡슐, 에멀전, 현탁제, 용액, 시럽, 스프레이, 로젠지, 분말, 및 지연-방출 제형의 형태일 수 있다. 경구 투여를 위한 적합한 부형제는 약제학적 등급의 만니톨, 락토오스, 스타치, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 탈컴, 셀룰로오스, 글루코스, 젤라틴, 수크로스, 마그네슘 카보네이트 등을 포함한다.

[0214] 몇몇 구체예에서, 치료학적으로 유효 용량은 환, 정제, 또는 캡슐의 형태를 취하고, 그리하여 투여량 형태는 항암 약물과 더불어, 하기한 것들 중 임의의 것들을 함유할 수 있다: 희석제, 예컨대, 락토오스, 수크로스, 디칼슘 포스페이트 등; 붕해제, 예컨대, 스타치 또는 이의 유도체; 운환제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트 등; 및 결합제(binder), 예컨대, 스타치, 껌 아카시아, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 셀룰로오스 및 이의 유도체. 항암 약물은 또한 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 담체 중에 배치된 좌재로 제형화될 수 있다.

[0215] 액체 투여량 형태는 예를 들어, 경구, 국소, 또는 정맥내 투여를 위한 용액 또는 현탁액을 형성시키기 위해, 예를 들어, 수성 살린(예를 들어, 0.9% w/v 소듐 클로라이드), 수성 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과 같은 담체 중에 항암 약물 및 임의로 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 애주버트를 용해 또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 항암 약물은 또한 체류 관장제로 제형화될 수 있다.

[0216] 국소 투여의 경우, 치료학적으로 유효 용량은 에멀전, 로션, 젤, 기포, 크림, 젤리, 용액, 현탁액, 연고, 및 경피 패치의 형태일 수 있다. 흡입에 의한 투여의 경우, 항암 약물은 네블라이저들 통한 건조 분말 또는 액체 형태로 전달될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 치료학적으로 유효 용량은 멸균 주사가능 용액 및 멸균 패키징된 분말의 형태일 수 있다. 바람직하게는, 주사가능 용액은 약 4.5 내지 약 7.5의 pH로 제형화된다.

[0217] 치료학적으로 유효 용량은 또한 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 그러한 투여량 형태는, 투여 직전에 재구성을 위한, 완충액, 예를 들어, 바이카보네이트를 포함할 수 있거나, 상기 완충액은, 예를 들어, 물로의 재구성을 위한 동결건조된 투여량으로 포함될 수 있다. 동결건조된 투여량 형태는 적합한 혈관수축제, 예를 들어, 에피네프린을 추가로 포함할 수 있다. 동결건조된 투여량 형태는, 재구성된 투여량 형태가 즉시 피검체에 투여될 수 있도록, 주사기, 임의로 재구성용 물로 조합되어 패키징되어 제공될 수 있다.

[0218] 피검체는 또한 특정 치료 섭생의 효능을 평가하기 위해 주기적인 시간 간격으로 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 특정 신호 전달 분자의 활성화 상태는 본원에 기재된 하나 이상의 항암 약물로의 치료의 치료 효과에 기반하여 변화될 수 있다. 피검체는 개별화된 방법으로 특정 약물 또는 치료제의 반응을 평가하고 상기 약물 또는 치료제의 효과를 이해하기 위해 모니터링될 수 있다. 추가적으로, 특정 항암 약물 또는 항암 약물의 조합물에 대하여 초기에 반응하는 피검체는 당해 약물 또는 약물 조합물에 대하여 난치성이 될 수 있는데, 이것은 이들 피검체가 후천성 약물 내성을 발달시켰음을 지시한다. 이러한 피검체는 이들의 현재 치료법 및 본 발명의 방법에 따라 처방된 대안적인 치료제에 대해 중단될 수 있다.

[0219] 특별한 다른 경우에 있어서, 다중화된 고처리면역검정 및 단백질 검정을 수행하는 방법은 참고문헌으로 본 명세서에 통합된 WO 2008/036802호에 교시되어 있다. 본원은, 특히, 희귀 순환 세포내 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 총량을 검출하기 위한 항체-기반 어레이 및 암 예후 및 진단 및 개인화된, 표적화된 치료의 설계를 용이하게 하기 위한 상기 어레이의 사용 방법을 교시한다. 본원은 "주소설정가능한" 또는 "zip 코드(zip code)" 어레이에 고정된 다수의 포획 분자를 포함하는 지지체 표면을 추가로 교시한다. 상기 어레이 각각의 독특한 영역은 활성화 상태-비의존성 검출 항체 또는 활성화 상태-의존성 항체 상에 존재하는 포획 태그에 특이적으로 결합하여, 상기 어레이내 상기 태깅된 검출 항체를 고정시키고 조직화시키는 독특한 포획 물질을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 포획 물질 및 포획 태그는 서로에 대해 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0220] IX. 실시예

- [0221] 하기 실시예들은 청구된 발명을 설명하기 위해 제공되나, 청구된 발명을 제한하기 위해 제공되지 아니한다.
- [0222] **실시예 1. 순환 세포의 분리, 자극, 및 용해**
- [0223] 고행 종양의 순환 세포는 고행 종양으로부터 전이되거나 미소전이되는 세포를 포함하고, 순환 종양 세포(CTC), 암 줄기 세포(CSC), 및/또는 종양으로 이동하는 세포(예를 들어, 순환 내피 선조세포(CEPC), 순환 내피 세포(CEC), 순환 항혈관형성 골수 세포, 순환 수지상 세포 등)을 포함한다. 순환 세포를 함유하는 환자의 샘플은 임의의 이용가능한 생물학적 유체(예를 들어, 혈액, 소변, 유두 흡인물, 림프, 타액, 미세침흡입물 등)으로부터 취득될 수 있다. 순환 세포는, 예를 들어, 면역자기 분리(예를 들어, 문헌[Racila et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., *Int. J. Cancer*, 92:577-582 (2001)] 참조), 이뮤니콘(Huntingdon Valley, PA)에 의한 CellTrack™ 시스템, 미세유체 분리(예를 들어, 문헌[Mohamed et al., *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 3:251-256 (2004); Lin et al., Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)] 참조), FACS(예를 들어, 문헌[Mancuso et al., *Blood*, 97:3658-3661 (2001)] 참조), 밀도 구배 원심분리(예를 들어, 문헌[Baker et al., *Clin. Cancer Res.*, 13:4865-4871 (2003)] 참조), 및 고갈 방법(예를 들어, 문헌[Meye et al., *Int. J. Oncol.*, 21 :521-530 (2002)] 참조)과 같은 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 분리될 수 있다.
- [0224] CTC의 수작업 분리:
- [0225] CTC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:
- [0226] 1) 미리 항-EpCAM 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences; Leiden, The Netherlands)에 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450; Dynal AS; Oslo, Norway)를 사용한다.
- [0227] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이내비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척한다.
- [0228] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이내비드를 1 ml의 샘플에 첨가한다.
- [0229] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시킨다.
- [0230] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 둔다.
- [0231] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기 분리한다.
- [0232] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충용액에 재현탁시킨다.
- [0233] 샘플 제조:
- [0234] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리코화 튜브에 두었다. 천자된 정맥으로부터 방출되는 상피 세포로 오염되는 것을 피하기 위해 처음 3-5 ml를 버린다.
- [0235] 2) 1 ml의 전혈을 사용 전에 0.9% NaCl로 1:3 희석시킨다.
- [0236] 대조군 제조:
- [0237] 1) 인간 암세포주를 HL-60 세포로 스파이킹(spiking)시킴으로써 세포주 대조군을 제조한다.
- [0238] 2) 세포주 대조군을 2.5×10^6 세포/ml의 농도로 사용한다.
- [0239] CEC 및 CEPC의 수작업 분리:
- [0240] 비제한적인 예로서, 살아있는 CEC 및 CEPC를 문헌[Beerepoot et al., *Ann. Oncology*, 15:139-145 (2004)]에 기재된 면역자기 분리/농화 기술을 이용하여 분리할 수 있다. 간단하게, 말초 혈액을 항-CD146 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences)에 이미 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450 IgG₁)와 함께 인큐베이션한다. 이러한 항체는 말초 혈액에서 모든 계통의 내피 세포를 인지하나, 조혈 또는 상피 세포는 인지하지 않는다(George et al., *J. Immunol. Meth.*, 139:65-75 (1991)). 적절한 항체(예를 들어, 백혈구 감소에 대해서는 Dynal-CD45 비드, 단핵구 감소에 대해서는 Dynal-CD14 비드, 상피 세포 감소에 대해서는 Dynal-EpCAM(Invitrogen; Carlsbad, CA))에 컨쥬게이션된 자기 비드를 이용한 양성 선택 전에 조혈 및 상피 세포의 음성 선택이 이용될 수 있다. 본 실시예에서는, 양성 선택만을 이용한다.

- [0241] CEC 및 CEPC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:
- [0242] 1) 미리 항-CD146 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences)에 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450)를 사용한다.
- [0243] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이나비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척한다.
- [0244] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이나비드를 1 ml의 샘플에 첨가한다.
- [0245] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시킨다.
- [0246] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 둔다.
- [0247] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기분리한다.
- [0248] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충용액에 재현탁시킨다.
- [0249] 샘플 제조:
- [0250] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리코화 튜브에 둔다. 천자된 정맥으로부터 방출되는 내피 세포로의 오염을 회피하기 위해 처음 3-5 ml를 버린다.
- [0251] 2) 1 ml의 전혈을 사용 전에 0.9% NaCl로 1:3 희석시킨다.
- [0252] 대조군 제조:
- [0253] 1) 인간 배꼽 정맥 내피 세포(HUVEC)를 HL-60 세포로 스파이킹(spiking)시킴으로써 세포주 대조군을 제조한다.
- [0254] 2) 세포주 대조군을 2.5×10^6 세포/ml의 농도로 사용한다.
- [0255] CEPC (CEC 비함유)의 수작업 분리:
- [0256] CEPC는 다양한 혈관생성 성장 인자에 대한 반응으로 성숙 내피 세포로 분화하는 능력을 지니는 골수 유래 전구 세포의 순환 서브타입이다. CEPC는 표면 마커 CD34를 인지하는 항체를 이용한 선택에 의해 분리될 수 있다. CD133은 CEPC로부터 미성숙 내피 선조세포(EPC) 또는 원시 조혈 줄기 세포(HSC)를 분화시키는 표면 마커이다. 부착 배양 또는 자기 마이크로비드를 이용한 다양한 공급원으로부터의 CEPC의 다양한 분리 방법이 기재되어 있다. 본 실시예에서는, 문헌[Asahara et al., *Science*, 275:964-967 (1997)]에 기재된 프로토콜을 변형한 프로토콜을 사용한다.
- [0257] CEPC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:
- [0258] 1) 자기 비드(Dynal M450 CD34)를 사용한다. 이러한 비드에 CD34 표면 항원에 특이적인 모노클로날 항체를 코팅시킨다.
- [0259] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이나비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척한다.
- [0260] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이나비드를 1 ml의 샘플에 첨가한다.
- [0261] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시켰다.
- [0262] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 둔다.
- [0263] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기분리한다.
- [0264] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충액에 재현탁시킨다.
- [0265] 샘플 제조:
- [0266] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리코화 튜브에 둔다. 천자된 정맥으로부터 방출되는 내피 세포로의 오염을 회피하기 위해 처음 3-5 ml를 버린다.
- [0267] 2) 10 ml의 혈액을 평형염액으로 1:1 희석시킨다.
- [0268] 3) 4 ml의 희석 혈액을 10 ml 튜브 중의 3 ml의 피콜-파크(Ficoll-Paque) 상에 층을 형성하도록 한다.

- [0269] 4) 튜브를 18-20℃에서 30-40분 동안 400 x g로 회전시킨다.
- [0270] 5) 혈장 및 혈소관을 함유하는 상부 층을 멸균 파스퇴르 파이펫을 이용하여 빼내어, 계면에 흔들리지 않은 단핵 세포층을 남긴다.
- [0271] 6) 단핵 세포를 멸균 파이펫을 이용하여 멸균 원심분리 튜브로 옮긴다.
- [0272] 7) 6 ml의 평형염액을 첨가하고, 세포를 가볍게 재현탁시킨다.
- [0273] 8) 혼합물을 18-20℃에서 10분 동안 60-100 x g에서 원심분리한다.
- [0274] 9) 상층액을 제거하고, 각각의 튜브로부터의 단핵 세포를 1 ml PBS 중에 재현탁시킨다.
- [0275] 베리텍스(Veridex) 시스템을 이용한 CTC, CEC 및 CEPC의 분리:
- [0276] 베리텍스(Warren, NJ)사는 셀프랩(CellPrep) 시스템, 셀서치 에피থে리얼 셀 키트(CellSearch Epithelial Cell Kit) 및 셀스포터(CellSpotter) 분석기로 구성되는 셀서치 시스템(CellSearch system)을 시판한다. 셀프랩 시스템은 반자동화 샘플 제조 시스템(Kagan et al., J. Clin. Ligand Assay, 25:104-110(2002))이다. 셀서치 에피থে리얼 셀 키트는 내피 세포에 특이적인 항-EpCAM 항체로 코팅된 자성유체(ferrofluid); 사이토케라틴 8, 18 및 19에 대한 피코에리트린 컨쥬게이션된 항체; 알로코피시아닌에 컨쥬게이션된 항-CD45 항체; DAPI 염료; 세포를 세척하고, 투과화시키고, 재현탁시키기 위한 완충용액으로 구성된다. 본 실시예에 사용된 프로토콜은 또한 문헌[Allard et al., Clin. Cancer Res., 10:6897-6904 (2004)]에 기재되어 있다. 전체 베리텍스 시스템은 CTC 계산에 사용될 수 있거나, 셀프랩 시스템을 이용한 분리 후 수작업으로 샘플을 분리시킴으로써 경로 활성화에 대한 분석 전에 분리 방법을 제공할 수 있다. CTC의 수는 알고리즘 개발에 유익할 수 있다.
- [0277] 베리텍스 시스템 - CTC 농화 후 계산:
- [0278] 1) 7.5 ml의 혈액을 6 ml의 완충용액과 혼합하고, 10분 동안 800 x g에서 원심분리하고, 셀프랩 시스템에 둔다.
- [0279] 2) 기계로 상층액을 흡출한 후, 기계에 자성유체를 첨가한다.
- [0280] 3) 기계로 인큐베이션 및 이후에 자기 분리 단계를 수행한다.
- [0281] 4) 결합되지 않은 세포 및 잔여 혈장을 흡출한다.
- [0282] 5) 형광 염색을 위해 투과 완충액과 함께 염색 시약을 첨가한다.
- [0283] 6) 시스템에 의한 인큐베이션 후, 세포를 다시 자기적으로 분리시키고, 셀스포터 분석기를 이용한 분석을 위해 마그네스트 셀 프레젠테이션(MagNest Cell Presentation) 장치에 재현탁시킨다.
- [0284] 7) 상기 장치를 4색 반자동 형광 현미경인 셀스포터 분석기에 둔다.
- [0285] 8) 베리텍스 규정 기준을 충족시키는 영상을 포착하고, 최종 수작업 선택을 위해 웹-기반 브라우저를 통해 나타낸다.
- [0286] 9) 세포 계산 결과를 7.5 ml의 혈액당 세포수로 나타낸다.
- [0287] 베리텍스 시스템 - CTC 농화 후 활성화 분석:
- [0288] 1) 7.5 ml의 혈액을 6 ml의 완충용액과 혼합하고, 10분 동안 800 x g에서 원심분리시킨 후, 셀프랩 시스템에 둔다.
- [0289] 2) 기계로 상층액을 흡출한 후, 기계에 자성유체를 첨가한다.
- [0290] 3) 기계로 인큐베이션을 수행한 후, 자성 분리 단계를 수행한다.
- [0291] 4) 결합되지 않은 세포 및 잔여 혈장을 흡출한다.
- [0292] 5) 샘플을 100 μl의 자극 완충용액에 재현탁시킨다.
- [0293] 베리텍스 시스템 - CEC 및 CEPC 농화 후 활성화 분석:
- [0294] 1) 베리텍스는 항-CD146 항체를 이용한 CEC 및 CEPC의 포획을 이용하는 셀트랙스 엔도থে리얼 셀 키트(CellTracks Endothelial Cell Kit)를 제공한다. 셀트랙스 엔도থে리얼 셀 키트를 혈액 샘플 제조를 위한 베리텍스의 셀트랙스 오토프랩 시스템 및 전혈로부터 CEC 및 CEPC를 계수하고 특성규명하기 위한 셀트랙스 분석기

II와 함께 사용한다. 프로토콜은 셀서치 에피셀리얼 셀 키트와 동일하다.

- [0295] 샘플 제조:
- [0296] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 제조업체의 설명서에 따라 셀세이브 프리저베이티브(CellSave Preservative) 튜브에 두었다. 천자된 정맥으로부터 방출되는 상피 또는 내피 세포로의 오염을 회피하기 위해 처음 3-5 ml를 버린다.
- [0297] CSC의 수작업 분리:
- [0298] 종양이 독특한 자체 재생(self-renewal) 및 생존 메커니즘을 지닌 잠정적인 암 줄기 세포의 작은 집단을 함유한다는 증거가 확립되고 있다(예를 들어, 문헌[Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28 (2004); Reya et al., Nature, 414:105-111 (2001); Dontu et al., Trends Endocrinol. Metab., 15:193-197 (2004); 및 Dick, Nature, 423:231-233 (2003)] 참조). 암 줄기 세포(CSC)는 장기간 동안 비활동 상태로 존재할 수 있고, 이는 이들을 분열 세포를 표적으로 하는 화학치료 약물에 대해 내성이 되도록 한다. 이러한 암-개시 집단은 선택적 제거를 위해 표적화된 요법에 종속되는 자체 재생 및 생존 경로의 활성화를 특징으로 할 수 있다. 부착 배양 또는 자기 마이크로비드를 이용하는 CSC의 분리 절차가 기재되어 있다. 본 실시예에서는, 문헌[Cote et al., Clin. Can. Res., 12:5615 (2006)]에 기재된 프로토콜로부터 변형된 프로토콜이 사용된다.
- [0299] 면역자기 CSC 분리 - 수작업 분리 후 활성화 분석:
- [0300] 1) 자기 비드(Dynal AS; Oslo, Norway)를 사용한다. 이러한 비드에 CD34 또는 CD133 표면 항원에 특이적인 모노클로날 항체를 코팅시킨다.
- [0301] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이내비드를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척한다.
- [0302] 3) 미리 코팅된 1-10⁷개의 다이내비드를 3 ml의 샘플에 첨가한다.
- [0303] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 60분 동안 인큐베이션시킨다.
- [0304] 5) 혼합물을 1 ml의 부분으로 나누고, 각각의 튜브를 6분 이상 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 둔다.
- [0305] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기분리한다.
- [0306] 7) 샘플을 100 µl의 자극 완충용액에 재현탁시킨다.
- [0307] 샘플 제조:
- [0308] 1) 환자의 고지에 의한 동의 후에 초기 유방암 환자로부터 골수 표본을 수득한다.
- [0309] 2) 골수 흡출물의 처리를 문헌[Bauer et al., Clin. Can. Res., 6:3552-3559 (2000)]에 기재되어 있는 바와 같이 수행한다. 임의의 파종성 종양 세포를 함유하는 단핵 세포 분획을 35분 동안 4000 x g에서 베크먼(Beckman) GS-6 원심분리기를 이용하여 피콜-하이페크(Ficoll-Hypaque) 밀도 구배 원심분리에 의해 농화시키고, PBS로 2회 세척한다.
- [0310] 분리된 CTC의 세포 자극 및 용해:
- [0311] 세포 자극:
- [0312] 1) 성장 인자 TGF-α (100 nM), 헤레쿨린(100 nM) 및/또는 IGF (100 nM)를 세포에 첨가하고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0313] 약물 처리를 이용한 세포 자극:
- [0314] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴(Herceptin), 라파타니브(Lapatanib), 타르세바(Tarceva) 및/또는 라파마이신(Rapamycin) 유사체로 처리한다.
- [0315] 2) 이후, 성장 인자 TGF-α (100 nM), 헤레쿨린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0316] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리(feedback loop)):
- [0317] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체

로 처리한다.

[0318] 2) 이후, 세포를 TGF- α (100 nM), 헤레귤린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)에 의해 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.

[0319] 자극된 CTC를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시킨다:

[0320] 1) 표 1에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조한다.

[0321] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각된 완충용액 중의 얼음에 재현탁시킨다.

[0322] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.

[0323] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜 용해물로부터 비드를 분리시킨다.

[0324] 5) 분석 및 -80°C에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.

[0325] **표 2**

용해 완충액 레시피 (10 ml)			
시약	표준 농도	최종 농도	부피
10% Triton X-100	10	1	1.00
1M Tris, pH 7.5	1	0.05	0.05
1M NaF	1	0.05	0.05
5M NaCl	5	0.1	0.20
2M B-글리세롤포스페이트	1	0.05	0.50

[0326]

0.1M Na ₃ VO ₄	0.1	0.001	0.10
1 mg/ml 팩스타틴	1	0.10	
컴플리트 미니프로테아제			1 정제
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		전체 (ml)	3.00
		물 (ml)	7.00

[0327]

[0328] 분리된 CEC 및/또는 CEPC의 세포 자극 및 용해:

[0329] VEGF는 CEPC(Larrivee et al., *J. Biol. Chem.*, 278:22006-22013 (2003)) 및 성숙 CEC 둘 모두에서 항세포사멸 경로를 활성화시킴으로써 생존을 촉진하는 것으로 생각되며, 이들은 혈관벽을 벗어난다(Solovey et al., *Blood*, 93:3824-3830 (1999)). VEGF는 또한 CEPC 또는 성숙 CEC의 증식을 자극할 수 있으나, 성숙 CEC는 CEPC에 비해 단지 제한된 증식 능력을 지니는 것으로 보인다(Lin et al., *J. Clin. Invest.*, 105:71-77 (2000)). 이러한 이유로, CEC 및/또는 CEPC는 용해 전에 VEGF와의 인큐베이션에 의해 활성화된다.

[0330] 세포 자극:

[0331] 1) 각각 100 nM의 성장 인자 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 세포에 첨가하고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.

[0332] 약물 처리를 이용한 세포 자극:

[0333] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 아바스틴(아바스틴), 넥사바르(Nexavar), 수텐트(Suten) 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.

[0334] 2) 이후, 세포를 각각 100 nM의 성장 인자 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.

[0335] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리):

[0336] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 아바스틴, 넥사바르, 수텐트 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.

[0337] 2) 이후, 각각 100 nM의 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.

[0338] 분리된 CEC 및/또는 CEPC 세포를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시킨다:

- [0339] 1) 표 2에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조한다.
- [0340] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각된 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시킨다.
- [0341] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.
- [0342] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해물로부터 비드를 분리시킨다.
- [0343] 5) 분석 또는 -80°C 에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.
- [0344] 분리된 CSC의 세포 자극 및 용해:
- [0345] 세포 자극:
- [0346] 1) 성장 인자 TGF- α (100nM), 헤레귤린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 세포에 첨가하고, 5분 동안 37°C 에서 인큐베이션시킨다.
- [0347] 약물 처리를 이용한 세포 자극:
- [0348] 1) 샘플을 37°C 에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0349] 2) 이후, 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레귤린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 세포를 자극하고, 5분 동안 37°C 에서 인큐베이션시킨다.
- [0350] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리):
- [0351] 1) 샘플을 37°C 에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0352] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레귤린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37°C 에서 인큐베이션시킨다.
- [0353] 분리된 CSC 세포를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시킨다:
- [0354] 1) 표 2에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조한다.
- [0355] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시킨다.
- [0356] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.
- [0357] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해물로부터 비드를 분리시킨다.
- [0358] 5) 분석 또는 -80°C 에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.
- [0359] **실시예 2. 조직, 생검, 또는 일차 배양물로부터의 종양 세포 추출물의 제조.**
- [0360] 본 실시예는 종양 조직 또는 생검 건본으로부터 세포를 분리, 자극, 및 용해시키는 방법을 설명한다. 본 실시예에는 또한 조직, 생검, 또는 전혈로부터 분리된 종양 세포의 일차 배양물을 분리, 자극, 및 용해시키는 방법을 설명한다. 화학치료제를 스크리닝하기 위한 생물학적 건본으로부터 종양 세포를 분리 및 배양하기 위한 추가적인 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,728,541호; 제6,416,967호; 제6,887,680호; 제6,900,027호; 제6,933,129호; 및 제7,112,415호; 및 미국 공개 특허 제20040023375호 및 제20050202411호에 기재되어 있다. 본 실시예에 따라 제조된 세포 추출물은 본원에 기재된 단일 검출 또는 근접 검정에 사용될 수 있다.
- [0361] 일차 또는 전이 조직으로부터 종양 세포의 분리:
- [0362] 세포 분리 및 배양:
- [0363] 1) 대략 5-100 mg 비피저성, 비오염된 종양 조직을 외과적으로 수확하고 멸균된 세포 배양 배지(예를 들어, 10% FBS와 항생제와 함께 RPMI-1640)를 함유한 100 ml 병에 둔다.
- [0364] 2) 샘플을 추출 72시간 이내에 실온에서 저장하거나 구입할 수 있다.
- [0365] 3) 샘플을 세포 배양 배지로 3회 세척한다.
- [0366] 4) 조직을 메스를 사용하여 작은 조각으로 다지고 이후 가는 선 메쉬를 통해 통과시켜 세포 현탁액으로 해체시

킨다.

- [0367] 5) 대안적으로, 다진 조직을 항생제를 함유한 무혈청 세포 배양 배지에 희석시킨 0.25% 콜라게나제 (Collagenase) II 및 0.001% DNA분해효소를 함유한 각테일로 처리한다. 인큐베이션을 유순한 진탕과 함께 15 내지 20분 동안 한다. 효소를 세포 배양 배지로 3회 세척함으로써 처리후 제거한다.
- [0368] 6) 세포 농도를 10^6 /ml로 조정하고 세포를 6-웰 플레이트에 파종하고 밤새 정착되게 한다. 다음날, 세포를 트립신처리하고 리간드로의 자극 및/또는 표적화된 약물로의 억제에 위해 마이크로타이터 플레이트내로 재파종한다.
- [0369] 세포 자극 및 해체된 종양으로부터의 용해:
- [0370] 세포 자극:
- [0371] 1) 성장 인자 TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM), 및/또는 IGF(100 nM)을 세포에 첨가하고 5분 동안 37°C에서 인큐베이션한다.
- [0372] 약물 처리로 세포 자극:
- [0373] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0374] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레글린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0375] 약물 처리로 세포 자극(피드백 고리):
- [0376] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0377] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레글린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0378] 자극된 세포를 하기 프로토콜을 사용하여 용해시킨다:
- [0379] 1) 표 2에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충액을 새로이 제조한다.
- [0380] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시킨다.
- [0381] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.
- [0382] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해물로부터 비드를 분리시킨다.
- [0383] 5) 검정 또는 -80°C에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.
- [0384] 생검 견본으로부터의 종양 세포의 분리:
- [0385] 세포 분리 및 배양:
- [0386] 1) 코어 생검(Core biopsies)을 외과적으로 추출하고(진공-보조 생검의 경우 1 내지 2 생검과 함께, 14 게이지 바늘의 경우 2 코어, 16 게이지 바늘의 경우 3 코어, 및 18 게이지 바늘의 경우 4 코어) 종양 견본을 위하여 세포 배양 배지를 함유한 10 ml 멸균 바이얼에 둔다.
- [0387] 2) 샘플을 추출 72시간 이내에 실온에서 저장하거나 구입할 수 있다.
- [0388] 3) 코어 생검으로부터의 세포 물질을 미세 선 메쉬를 통과시킴으로써 세포 현탁액으로 해체시킨다.
- [0389] 4) 대안적으로, 생검을 항생제를 함유한 세포 배양 배지에 희석시킨 0.25% 콜라게나제 II 및 0.001% DNA분해효소를 함유한 각테일로 처리할 수 있다. 인큐베이션을 유순한 진탕과 함께 15 내지 20분 동안 한다. 효소를 세포 배양 배지로 3회 세척함으로써 처리후 제거한다.
- [0390] 5) 세포 농도를 10^6 /ml로 조정하고 세포를 6-웰 플레이트에 파종하고 밤새 정착시킨다. 다음날, 세포를 트립신 처리하고 리간드로의 자극 및/또는 표적화된 약물로의 억제에 위해 마이크로타이터 플레이트내로 재파종한다.

- [0391] 세포 자극 및 생검으로부터의 세포의 용해:
- [0392] 세포 자극:
- [0393] 1) 성장 인자 TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM), 및/또는 IGF(100 nM)을 세포에 첨가하고 5분 동안 37°C에서 인큐베이션한다.
- [0394] 약물 처리로 세포 자극:
- [0395] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0396] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레글린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0397] 약물 처리로 세포 자극(피드백 고리):
- [0398] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0399] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레글린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0400] 자극된 세포를 하기 프로토콜을 사용하여 용해시킨다:
- [0401] 1) 표 2에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충액을 새로이 제조한다.
- [0402] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시킨다.
- [0403] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.
- [0404] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해물로부터 비드를 분리시킨다.
- [0405] 5) 검정 또는 -80°C에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.
- [0406] 조직, 생검, 또는 전혈로부터 분리된 종양 세포로부터의 일차 배양의 개시:
- [0407] 세포 배양:
- [0408] 1) 조직, 생검, 또는 전혈로부터 분리된 종양 세포를 분리된 종양 세포의 수에 따라 작은 멸균 플라스크(예를 들어, T-25), 페트리 디쉬(예를 들어, 10 mm), 또는 플레이트(예를 들어, 24-웰 플레이트)에서 배양한다.
- [0409] 2) 인큐베이션을 5% CO₂가 보충된 습윤 37°C 인큐베이션으로 세포 배양 배지(2% FBS와 항생제와 함께 RPMI-1640)에서 수행한다. 배양시간 내내, 세포는 용기 바닥에 단일층을 형성하고 분열하기 시작한다. 세포가 융합(confluence)에 근접할 때, 세포를 트립신처리하고 리간드 자극 및/또는 표적화된 약물로의 억제를 위해 마이크로타이터 플레이트에 재과중한다.
- [0410] 세포 자극 및 조직, 생검, 또는 전혈로부터 분리된 종양 세포로부터의 일차 배양물의 용해:
- [0411] 세포 자극:
- [0412] 1) 성장 인자 TGF- α (100 nM), Hrg(100 nM), 및/또는 IGF(100 nM)을 세포에 첨가하고 5분 동안 37°C에서 인큐베이션한다.
- [0413] 약물 처리로 세포 자극:
- [0414] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리한다.
- [0415] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), Hrg(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0416] 약물 처리로 세포 자극(피드백 고리):
- [0417] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체

로 처리한다.

- [0418] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), Hrg(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시킨다.
- [0419] 자극된 세포를 하기 프로토콜을 사용하여 용해시킨다:
- [0420] 1) 표 2에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충액을 새로이 제조한다.
- [0421] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시킨다.
- [0422] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행한다.
- [0423] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해물로부터 비드를 분리시킨다.
- [0424] 5) 검정 또는 -80°C에서의 저장을 위해 용해물을 새로운 튜브로 옮긴다.
- [0425] **실시예 3. 티라미드 신호 증폭을 이용하는 단일 검출 마이크로어레이 ELISA.**
- [0426] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 단일 검출 마이크로어레이 ELISA를 예시한다:
- [0427] 1) 포획 항체를 1 mg/ml로부터 0.004 mg/ml로의 연속 희석을 이용하여 16-패드(pad) FAST 슬라이드(Whatman Inc.) 상에 프린팅시켰다.
- [0428] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 와트먼 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.
- [0429] 3) 80 μ l의 A431 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0430] 4) TBS-Tween으로 6회 세척 후, 80 μ l의 비오틴-표지된 검출 항체(예를 들어, pEGFR을 인지하는 모노클로날 항체 또는 활성 상태에 관계없이 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체)를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0431] 5) 6회 세척 후, 스트렙타비딘-표지된 호스래디쉬 퍼옥시다제(SA-HRP)를 첨가하고 1시간 동안 인큐베이션하여 상기 SA-HRP가 비오틴-표지된 검출 항체에 결합하게 하였다.
- [0432] 6) 7) 신호 증폭을 위해, 80 μ l의 5 μ g/ml 비오틴-티라미드를 첨가하고, 15분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 TBS-Tween으로 6회 세척하고, 20% DMSO/TBS-Tween으로 2회 세척하고, TBS로 1회 세척하였다.
- [0433] 7) 80 μ l의 SA-Alexa 555를 첨가하고 30분 동안 인큐베이션하였다. 이후 슬라이드를 2회 세척하고, 5분 동안 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너에서 스캐닝하였다(Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).
- [0434] **실시예 4. 티라미드 신호 증폭을 이용한 근접 이중 검출 마이크로어레이 ELISA.**
- [0435] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 근접 이중 검출 마이크로어레이 ELISA를 예시한다:
- [0436] 1) 포획 항체를 1 mg/ml로부터 0.004 mg/ml로의 연속 희석을 이용하여 16-패드 FAST 슬라이드(Whatman Inc.) 상에 프린팅시켰다.
- [0437] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 와트먼 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.
- [0438] 3) 80 μ l의 A431 세포 용해물을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0439] 4) TBS-Tween으로 6회 세척 후, TBS-Tween/2% BSA/1% FBS에 희석된 근접 분석을 위한 80 μ l의 검출 항체를 슬라이드에 첨가하였다. 사용된 검출 항체는, (1) 글루코오스 옥시다아제(GO)에 직접 컨쥬게이션된 항-EGFR 모노클로날 항체; 및 (2) 호스래디쉬 퍼옥시다아제(HRP)에 직접 컨쥬게이션된 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0440] 5) 대안적으로, 검출 단계는 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체의 비오틴-컨쥬게이트를 이용하였다. 이 경우에 있어서, 6회 세척 후, 1시간 동안 스트렙타비딘-HRP를 이용한 인큐베이션의 추가 연속 단계를 포함시켰다.
- [0441] 6) 대안적으로, 검출 단계는 항-EGFR 항체의 올리고뉴클레오티드-매개 글루코오스 옥시다아제(GO) 컨쥬게이트

를 이용하였다. 인산화된 EGFR 항체에 직접 컨쥬게이션되거나 비오틴-스트렙트아비딘(SA) 연결된 HRP의 컨쥬게이트를 사용하였다.

[0442] 7) 신호 증폭을 위해, 80 μ l의 5 μ g/ml 비오틴-티라미드를 첨가하고, 15분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 TBSTween으로 6회 세척하고, 20% DMSO/TBS-Tween으로 2회 세척하고, TBS로 1회 세척하였다.

[0443] 8) 80 μ l의 SA-Alexa 555를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 슬라이드를 2회 세척하고, 5분 동안 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너(Perkin-Elmer, Inc.)에서 스캐닝하였다.

[0444] **실시예 5. 약물 선별을 위한 활성화 프로파일의 생성.**

[0445] 본 발명의 방법 및 조성물은 암 치료를 위한 약물 선별에 적용될 수 있다. 전형적인 프로토콜은 2개의 프로파일, 대조(reference) 활성화 프로파일 및 시험 활성화 프로파일의 생성을 수반하는데, 상기 프로파일은 이후 특정 약물 치료 선택이 효능을 결정하기 위해 비교된다(도 2 참조).

[0446] 대조 활성화 프로파일

[0447] 대조 활성화 프로파일을 유도하기 위해, 혈액 샘플을 항암 약물 치료에 앞서 특정 유형의 암(예를 들어, 폐 종양)을 지니는 환자로부터 얻는다. 암성 종양에서 유래된 희귀 순환 세포는, 예를 들어, 본원에서 상당히 자세하게 기재된 면역자기 분리를 사용하여 혈액 샘플에서 분리된다. 분리된 순환 세포는 하나 이상의 성장 인자로 시험관내에서 자라날 수 있다. 이후 자라난 세포는 용해되어 세포 추출물을 생성시킨다. 세포 추출물은 활성화 상태가 환자의 암 유형에서 변경될 수 있는 신호 전달 분자에 특이적인 포획 항체의 패널의 희석 시리즈를 함유하는 주소설정가능한 어레이에 적용된다. 단일 검출 또는 근접 검정이 관심있는 각각의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 결정하기 위해 적절한 검출 항체(예를 들어, 활성화 상태-비의존성 항체 및/또는 활성화 상태-의존성 항체)를 사용하여 수행된다. 표 1에 제시된 "경로 선택" 표는 어떠한 활성화 상태가 환자의 암 유형에 기반하여 검출되는지를 선별하는데 특히 유용하다. 예를 들어, 한 환자는 표 1의 "경로 1"에 제시된 EGFR 경로의 활성화 상태를 나타내는 암 유형을 지닐 수 있다. 대안적으로, 또 다른 환자는 표 1의 "경로 2"에 제시된 EGFR 경로의 활성화 상태를 나타내는 암의 또 다른 유형을 지닐 수 있다. 따라서, 대조 활성화 프로파일은 임의의 항암 약물의 부재시 환자의 암에서 신호 전달 분자의 활성화 상태를 제공하면서 생성된다.

[0448] 시험 활성화 프로파일

[0449] 시험 활성화 프로파일을 얻기 위해, 제 2 혈액 샘플을 항암 약물 치료 전 또는 항암 약물의 투여후(예를 들어, 암 치료 전 경과와 임의의 시간에) 특정 유형의 암(예를 들어, 폐 종양)을 지니는 환자로부터 얻는다. 암성 종양에서 유래된 희귀 순환 세포를 혈액 샘플에서 분리한다. 분리된 세포를 항암 약물로 치료를 받지 않은 환자에서 얻는 경우, 상기 분리된 세포를 상기한 대조 활성화 프로파일로부터 결정된 하나 이상의 활성화된 신호 전달 분자를 표적으로 삼는 항암 약물과 함께 인큐베이션한다. "약물 선별" 표(표 A)는 특정 활성화된 표적 신호 전달 분자를 억제시키는 승인되거나 임상 시도중인 적절한 항암 약물을 선별하는데 특히 유용하다. 예를 들어, 항암 약물이 EGFR을 활성화시키는 대조 활성화 프로파일에서 결정되는 경우, 상기 세포를 표 A의 컬럼 "A" 또는 "B"에 나열된 하나 이상의 약물과 함께 인큐베이션할 수 있다. 분리된 세포는 이후 하나 이상의 성장 인자로 시험관내에서 자라날 수 있다. 분리된 세포는 이후 용해되어 세포 추출물을 생성시킨다. 세포 추출물을 주소 설정가능한 어레이에 적용하고 근접 검정을 수행하여 관심있는 각각의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 결정한다. 따라서, 특정 항암 약물의 존재시 환자의 암에서 신호 전달 분자의 활성화 상태를 제공하는, 환자를 위한 시험 활성화 프로파일이 생성된다.

[0450] 약물 선택

[0451] 항암 약물이 시험 활성화 프로파일과 대조 활성화 프로파일을 비교함으로써 환자의 암의 치료에 적합 또는 부적합 여부를 결정한다. 예를 들어, 약물 치료가 신호 전달 분자의 대부분 또는 전부가 실질적으로 당해 약물의 부재시보다 실질적으로 덜 활성화되도록 야기시키면(예를 들어, 약물 부재시 강한 활성화로부터 약물 존재시 약하거나 매우 약한 활성화로의 변화), 상기 치료는 환자의 암에 적합한 것으로 결정된다. 그러한 경우에 있어서, 치료는 약물 치료를 받지 않은 환자에서 적합한 항암 약물로 개시되거나 후속 치료가 이미 상기 약물을 투여받은 환자에서 적합한 항암 약물로 지속된다. 그러나, 약물 치료가 환자의 암의 치료에 부적합한 것으로 여겨지면, 상이한 약물이 선택되고 신규 시험 활성화 프로파일을 생성시키기 위해 사용되며, 이후 상기 시험 활성화 프로파일은 대조 활성화 프로파일과 비교된다. 그러한 경우에 있어서, 치료는 약물 치료를 받지 않은 환자에서 적합한 항암 약물로 개시되거나 후속 치료가 지금까지 부적합한 약물을 투여받은 환자에서 적합한 항암

약물로 변경된다.

[0452] **실시예 6. 활성화된 수용체 티로신 키나아제 의 분석을 위한 주소설정가능한 어레이.**

[0453] 도 3은 본 발명의 주소설정가능한 수용체 티로신 키나아제 어레이를 도시한다. 본원에서 논의된 바와 같이, 수용체 티로신 키나아제는 세포 증식에 관여하는 다수의 신호 전달 경로의 중요 구성요소이다. 예를 들어, 수용체 티로신 키나아제의 ErbB 패밀리는 4개의 패밀리 일원이고 세포 증식, 분화, 및 생존과 같은 기본적인 세포 과정에 중요한 역할을 한다. 수용체 티로신 키나아제의 이 패밀리는 다수의 상이한 암에서 과발현되는 것으로 보고되었고 악화된 임상적 결과와 연관되어 있다. 성장 인자 결합시, ErbB1 또는 EGFR, ErbB3 또는 HER3, 및 ErbB4 또는 HER4는 동종-이합체화 및 이종-이합체화하여 다수의 상이한 신호전달 경로를 활성화시킨다. ErbB2 또는 HER2는 성장 인자에 결합하지 않으며 모두 3개의 패밀리 일원에 대한 바람직한 이종-이합체 파트너이다. ErbB2는 또한 신호전달 경로에서 과발현되고 활성화될 때 동종-이합체화될 수 있다. ErbB 패밀리의 동종-이합체화 또는 이종-이합체화는 트랜스 인산화를 야기시킨다. 자가- 또는 트랜스-인산화는 수용체 티로신 키나아제의 억제성 형태를 경감시켜, 완전한 키나아제 활성화를 가능케 하며, 동시에 다수의 SH2-함유 신호전달 분자, 예컨대, Src, Shc, SHP-1, SHEP-1, 및 PI(3)K를 위한 결합 부위를 생성시킨다. Shc, Grb2, 또는 PI3K와 같은 어댑터 단백질 또는 신호전달 단백질은 인산화된 수용체를 모집시킨다. 어댑터 단백질의 인산화는 MAPK 및 AKT 경로의 활성화를 야기시킨다. MAPK 경로 활성화는 Erk 및 Rsk의 인산화 상태를 결정함으로써 평가될 수 있으며, 반면 PI3K 경로 활성화는 Akt 및 p70S6K의 인산화 상태를 결정함으로써 평가될 수 있다.

[0454] 따라서, 도 3에 도시된 주소설정가능한 ErbB 패밀리 칩은 4개의 수용체 티로신 키나아제의 발현 뿐만 아니라, 이들의 활성화 상태를 결정하는 것을 가능케 한다. MAPK 및 PI3K/Akt 경로 활성화 둘 모두가 또한 주소설정가능한 상에서 연구될 수 있다.

[0455] 칩의 또 다른 특징은 종양 내용(content)을 결정하기 위한 내부 대조군 및 임의의 비특이적 결합을 결정하기 위한 비특이적 IgG의 존재이다.

[0456] **실시예 7. 혈관신생에서 신호 전달 경로의 분석을 위한 주소설정가능한 어레이.**

[0457] 도 4는 혈관신생에 관여하는 신호 전달 구성요소의 활성화 상태를 결정하기 위한 주소설정가능한 어레이의 배열(configuration)을 도시한다. 본원에 기재된, 종양 혈관신생은 다수의 고형 종양의 성장에 중요하다. 그 중에서, 어레이된 중요 신호 전달 분자는 수용체 티로신 키나아제의 VEGFR, FGFR, 및 TIE 패밀리의 일원을 포함하며, 상기 일원은 내피 세포에서 현저하게 발현된다. PDGFR은 전형적으로 주위세포에서 발현된다. 이러한 수용체의 발현 및 활성화 상태는 개별 종양 표본에서 혈관신생의 우세한 메카니즘을 결정하는데 중요하다. VEGF와 PlGF와 같은 성장 인자는 VEGFR-1과 VEGFR-2에 결합하고 동종-이합체화 및 이종-이합체화를 개시시킨다. 이합체화에 앞서 이러한 수용체의 인산화가 일어나며, 차례로, 상기 인산화에 앞서 MAPK 및 PI3K/Akt 신호전달 경로의 활성화가 일어난다. FGFR, TIE, 및 PDGFR 수용체는 또한 유사한 방식으로 활성화된다. 자가- 또는 트랜스-인산화는 완전한 키나아제 활성화를 가능케하는, 수용체 티로신 키나아제의 억제성 형태를 완화시키고 동시에 다수의 SH2-함유 신호전달 분자, 예컨대, Src, Shc, SHP-1, V-카드헤린(cadherin), SHEP-1, 및 PI3K를 위한 결합 부위를 생성시킨다. 어댑터 단백질 또는 Shc, Grb2, 또는 PI3K와 같은 신호전달 단백질은 인산화된 수용체에 모집된다. 어댑터 단백질의 인산화는 MAPK 및 AKT 경로의 활성화를 야기시킨다. MAPK 경로 활성화는 Erk 및 Rsk의 인산화 상태를 결정함으로써 평가될 수 있고, 반면 PI3K 경로 활성화는 Akt 및 p70S6K의 인산화 상태를 결정함으로써 평가될 수 있다.

[0458] 따라서, 주소설정가능한 혈관신생 칩, 예컨대, 도 4에 도시된 칩은 환자 샘플내 모든 수용체 티로신 키나아제의 발현을 결정가능케 할 뿐만 아니라, 이들의 활성화 상태도 결정가능케 한다. MAPK 및 PI3K/Akt 경로 활성화 둘 모두는 또한 주소설정가능한 칩상에서 연구될 수 있다. 칩은 종양 또는 종양 연관 세포(CECs, CEP's, 주위세포 등)를 결정하기 위한 내부 대조군 및 임의의 비특이적 결합을 결정하기 위한 비특이적 IgG를 지닌다.

[0459] **실시예 8. 비소세포 폐암의 치료를 위한 환자의 선택**

[0460] 비소세포 폐암(NSCLC)의 현재 치료는 화학치료제 및 항-혈관신생 치료제 둘 모두의 사용을 수반한다. 일차 치료제로서, 담당의는 전형적으로비-편평세포(non-squamous cell) 환자에 대해 카르보플라틴(C) 또는 카르보플라틴과 Taxol®(T) 및 아바스틴®을 사용한다. 이차 약물은 Taxol®, ALIMT A®, 및 Tarceva®(비흡연자, 여성, 및 아시아인의 경우)을 포함한다. 진행중인 임상 시도는 하기를 포함하는 다양한 약물 조합물의 효능을 시험중이다: 비편평 호나자에서 아바스틴® + Tarceva®; 편평세포 암을 포함하는 모든 NSCLC에서 소라페닙 + 카르보플라틴 + Taxol®; 및 편평세포 암을 포함하는 모든 NSCLC에서 ZD6474 (ZACTIMA™) + 카르보플라틴 + Taxol®.

[0461] 중요 신호 전달 구성요소에서의 다수의 변형(alterations)은 NSCLC에서 입증되었다. 이들은 하기를 포함한다: 활성화를 야기시키는 EGFR 돌연변이; c-met와 같은 다른 수용체 티로신 키나아제의 활성화; HER2 및 3 활성화 또는 HER2 증폭을 동반하는 EGFR 활성화; PI3K 돌연변이를 지니는 EGFR 활성화; PTEN 결실을 지니는 EGFR 활성화; Ras 돌연변이를 동반하는 EGFR 활성화. 신호 전달 경로의 상이한 구성요소에서의 다양한 변형이 화학치료의 다양한 형태에 의해 표적화되었다.

[0462] 동시에, 종양 세포를 위한 새로운 혈관의 형성, 혈관신생으로 불리우는 과정이 표적화될 수 있다. VEGF는 신생 혈관의 형성에 필수적인 내피 세포 생존 인자이다. 따라서, VEGF-매개 혈관신생의 조절을 위한 한가지 방법은 VEGF 단백질 그 자체 또는 VEGFR에 대해 유도되는 항체를 사용하는 것이다. 베바시주맙, VEGF에 대한 재조합 인간화된 모노클로날 항체는 화학치료과 시너지적으로 작용하며 결장직장, 유방, 및 폐암을 지니는 환자에서 생존을 개선시키는 것으로 드러났다.

[0463] 표 3에서 제시된 예는 내피세포 또는 EPC에서 활성있는 경로의 분석이 임상이가 효과적인 치료 경로에 대한 결정을 내리는데 도움이 되도록 어떻게 사용될 수 있는지를 설명한다. 요약하면, 내피 세포 또는 EPC에서 VEGF 경로의 상이한 구성요소의 활성화 수준은 시험 치료제의 상이한 조합물의 부재의 존재시에 결정될 수 있다.

[0464] **표 3**

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 아바스틴	활성화 + C + T + 아바스틴
VEGFR2:	중간	강함	약함	약함
VEGFR1:	중간	강함	약함	약함
Tie 2	낮음	약함	약함	약함
V-카드헤린- R2 복합체	약함	중간	약함	약함
Shc		강함	약함	약함
PI3K		강함	약함	약함
Erk		강함	약함	약함
Rsk		강함	약함	약함
Akt		강함	약함	약함
P70S6K		강함	약함	약함

[0465]

[0466] 표 3에 제시된 정보는 강한 인산화 수준에 의해 나타난 강한 활성화를 나타내는 신호 전달 구성요소가 아바스틴 또는 C + T + 아바스틴으로 치료에 의해 약한 수준으로 감소됨을 나타낸다. 따라서, 활성화된 VEGFR-2 및 VEGFR-1 경로를 지니는 환자는 아바스틴 또는 C + T + 아바스틴으로 치료되어야 한다.

[0467] 혈관신생 신호 전달 경로를 표적으로 삼고 시험 활성화 프로파일을 생성시키는데 상요될 수 있는 다른 치료제의 예는 하기 표 4에 제시되어 있다.

[0468] **표 4**

[0469] NSCLC에서 VEGFR 티로신 키나아제 억제제의 안정성 및 효능

억제제	표적	일반적 독성	NSCLC 에서 임상적 활성
바탈라닙	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	피로, 구역질, 구토, 간 효소 증강, 고혈압	보고된 바 없음
AZD2171	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR	피로, 설사, 고혈압, 식욕부진 (anorexia), 호흡곤란 (dyspnea)	SD [?]
수니티닙 말레이트	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	피로, 발진, 모발 탈색소증, 모발 탈색, 고혈압	PR [?]
AG013736	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	고혈압, 객혈, 구내염, 구역질, 설사	종양 공동현상 (Tumor cavitation)
소라페닙	VEGFR-2, -3, PDGFR, c-Kit, Raf	설사, 간 효소 증강, 고혈압, 피로	SD [?]
GW786034	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	고혈압, 폐색전 (pulmonary embolism), 구역질, 피로, 모발 탈색소증	SD [?]
ZD6474	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	설사, 발진, 고혈압	PR [?]
CP-547632	VEGFR-2	발진과 메아른 입	PR [?]

[0470]

[0471]

상기 표 4는 신규한 항-혈관신생 약물에 대한 표적을 나열하고 있다. 본 발명은 생존을 가장 잘 예견할 활성화 마커의 지능적인 선별을 가능케 한다. 가장 적절한 활성화 마커는 상이한 약물들 간에 달라질 수 있고, 항-혈관신생 단일치료 대 조합 치료 사이에서 구별을 위한 지침으로서 사용될 수 있다.

[0472]

실시에 9. 다른 항-혈관신생 약물로의 치료를 위한 환자의 선택

[0473]

표 4에 제시된 다양한 약물의 적합성의 결정을 위한 본 발명에 의해 개시된 경로 분석의 적용의 추가 예는 하기에 제시되어 있다.

[0474]

ZD6474

[0475]

ZD6474(ZACTIMA™)은 EGFR 유도된 치료제가 듣지 않는 환자의 치료를 위하여 현재 임상 III기가 진행중이다. 구체적으로, 이 연구는 단순 보조 치료(best supportive care, BSC)에 ZD6474를 부가하는 것이 이전의 화학치료 및 EGFR 티로신 키나아제 억제제(TKI)로 치료후 질병이 재발된 비소세포 폐암을 지니는 환자의 치료를 위해, 단독의 단순 보조 치료 보다 더 효과적인지 여부를 평가하기 위해 수행되고 있다. ZD6474는 종양을 위한 신규 혈관의 성장을 표적으로 삼는 항암 약물이고 그에 따라 종양이 성장하는 속도를 늦출 수 있다. 초기 연구는 ZD6474가 종양이 후속 단계를 진행할 수 있는 시간에 긍정적인 효과를 나타냄을 제시한다. 제 3선 치료의 경우, ZD6474가 화학치료 및 EGFR TKI에 대해 재발된 환자에 투여된다. ZD6474의 구조는 Tarceva®/Iressa® 과 상이하고, 그리하여 이것이 여전히 EGFR과 항-혈관신생 경로(예를 들어, VEGFR-1, -2, 및 -3)를 억제할 것으로 기대된다.

[0476]

따라서, 하기 시도가 진행중이다:

[0477]

- 페메트렉세드와 조합한 ZD6474 및 단독의 페메트렉세드를 비교한 효능 연구;

[0478]

- 비소세포 폐암 (NSCLC)에서 도세탁셀과 조합한 ZACTIMA™ 및 단독의 도세탁셀의 상대적 시도;

[0479]

- 외과수술로 제거될 수 있는 단계 I, 단계 II, 또는 단계 III NSCLC를 지니는 환자 치료시 반데타닙, 카르보플라틴, 및 파클리탁셀; 및

[0480]

- 적어도 한가지의 종래 화학치료의 실패후 NSCLC에서 ZD6474과 얼로티닙을 비교하는 효능 시도.

[0481] 표 5에 제시된 것과 같은, 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 ZD6474를 포함하는 약물 조합물에 반응하는 환자의 선택이 임상 III기의 환자의 수를 감소시킬 뿐만 아니라 더 나은 환자 치료를 가져올 것이다.

[0482] 표 5

[0483] 종양 세포:

수용체 (인산화 수준)	발현	활성화 ZD 6474	활성화 + 아바스틴	활성화 +
EGFR:	중간	강함	매우 약함	강함
ErbB2:	중간	강함	매우 약함	강함
ErbB3	낮음	중간	매우 약함	중간
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	약함
Shc		강함	매우 약함	강함
PI3K		강함	매우 약함	강함
Erk		강함	매우 약함	강함
Rsk		강함	매우 약함	강함
Akt		강함	매우 약함	강함
P70S6K		강함	매우 약함	강함

[0484]

[0485] 표 6

[0486] 내피 세포:

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + ZD 6474
VEGFR2:	중간	강함	약함
VEGFR1:	중간	강함	약함
Tie 2	낮음	약함	약함
V-카드헤린 - -R2 복합체	없음	중간	약함
Shc		강함	약함
PI3K		강함	약함
Erk		강함	약함
Rsk		강함	약함
Akt		강함	약함
P70S6K		강함	약함

[0487]

[0488] 표 5 및 6의 정보는 ZD6474가 내피 세포를 비롯한 종양 세포 둘 모두에서 경로를 하향조절한다는 것을 나타낸다.

[0489] AZD2171

[0490] PDGFR과 VEGFR을 억제하는 물질인, AZD2171로의 다수의 임상 시도가 진행 중이다. 예를 들어, AZD2171와 페메트렉세드 디소듐의 조합물이 재발된 비소세포 폐암을 지니는 환자의 치료에 관해 시험되고 있다. 이러한 조합의 이론적 근거는 페메트렉세드 디소듐이 세포 분열에 필요한 효소를 억제시킴으로써 종양 세포의 성장을 중단시킬 수 있다는 것이다. AZD2171은 종양으로의 혈류를 차단시킴으로써 종양 세포의 성장을 중단시키는 것에 추가적인 기여를 제공한다. 따라서, 페메트렉세드 디소듐과 함께 AZD2171을 투여하는 것은 더 많은 종양 세포를 사멸시키는데 시너지 효과를 지닐 수 있다.

[0491] 또 다른 임상적 시도는 전이성 또는 절제불가능 고형 종양 또는 림프종을 지닌 환자의 치료에서 베바시주맵 (Avastin®)과 AZD2171을 짝지웠다. 이 조합의 이론적 근거는 모노클로날 항체, 예컨대, 베바시주맵이 여러가지 방식으로 암 성장을 차단할 수 있다. 일부는 암 세포가 성장하고 전파되는 활성을 차단시킨다. 다른 것들은 암 세포를 발견하고 이들을 사멸시키는 것을 돕거나 암-사멸 물질을 암 세포에 전달하는 것을 돕는다. 베바시주맵 및 AZD2171은 또한 암으로의 혈류를 차단시킴으로써 암 세포의 성장을 중단시킬 수 있다. 따라서, 베바

시주맙과 함께 AZD2171을 투여하는 것은 더 많은 종양 세포를 사멸시키는데 시너지 효과를 지닐 수 있다.

[0492] 다른 임상 시도는 단계 IIIB 또는 단계 IV 비소세포 폐암을 지니는 환자를 치료하는데 있어서 제 1선 치료법으로서 AZD2171 존재 또는 부재하의 젠시타빈과 카르보플라틴의 조합을 시험중이며, 단계 III 또는 단계 IV 비소세포 폐암을 지니는 환자를 치료하는데 있어서 AZD2171 존재 또는 부재하의 파클리탁셀과 카르보플라틴의 조합을 시험중이다.

[0493] 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 AZD2171을 포함하는 약물 조합물에 대하여 반응성인 환자의 선택은 표 7에 제시되어 있다.

[0494] **표 7**

[0495] **내피 세포 및 주위세포:**

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + AZD 2171	활성화 + 아바스틴
VEGFR2:	중간	강함	약함	약함
VEGFR1:	중간	강함	약함	중간
Tie 2	낮음	약함	약함	약함
V-카드헤린- -R2 복합체	없음	중간	약함	약함
PDGFRa	중간	높음	약함	높음
PDGFRb	중간	높음	약함	높음
Shc		강함	약함	약함
PI3K		강함	약함	약함
Erk		강함	약함	약함
Rsk		강함	약함	약함
Akt		강함	약함	약함
P70S6K		강함	약함	약함

[0496]

[0497] PDGF가 아바스틴®-내성 환자에서 과발현되기 때문에, 표 7에 제시된 것과 같은 정보는, PDGFR를 비롯한 VEGFR을 억제시키는, AZD2171이 그러한 종양을 치료하기 위한 선택 물질일 수 있음을 시사한다.

[0498] **소라페닙**

[0499] 또한 소라페닙 (BAY 43-9006)으로의 다수의 임상 시도가 진행중이다. 예를 들어, 하기 연구가 진행중이다: (1) 비소세포 폐암을 지닌 화학치료제-무경험(chemo-naive) 환자에서 카르보플라틴 및 파클리탁셀 ± 소라페닙 비교; (2) 단계 III-IV 비소세포 폐암을 지닌 화학치료제-무경험 환자에서 카르보플라틴 및 파클리탁셀 ± 소라페닙의 안정성 및 효능을 비교하는 무작위화된 조절된 시도; 및 (3) 난치성, 전이성, 또는 절제불가능 고형 종양을 지닌 환자의 치료에 있어서 소라페닙 및 베바시주맙.

[0500] 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 소라페닙 을 포함하는 약물 조합물에 대하여 반응성인 환자의 선택은 하기 표 8에 제시되어 있다.

[0501] **표 8**

[0502] **내피 세포 및 주위세포:**

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 소라피닙	활성화 + 아바스틴
VEGFR2:	중간	강함	약함	약함
VEGFR1:	중간	강함	약함	약함
Tie 2	낮음	약함	약함	약함
V-카드헤린- -R2 복합체	없음	중간	약함	약함
PDGFRa	중간	높음	약함	높음
PDGFRb	중간	높음	약함	높음
Shc		강함	약함	약함
PI3K		강함	약함	약함
Erk		강함	약함	약함
Rsk		강함	약함	약함
Akt		강함	약함	약함
P70S6K		강함	약함	약함

[0503]

[0504] VEGF 및 PDGF 둘 모두가 아바스틴®-내성 환자에서 과발현되기 때문에, 아바스틴®과 소라피닙의 조합이 두 경로를 차단시키는데 효과적일 수 있다. 또한, 소라피닙은 Raf를 억제시키고 그리하여 모든 세포 유형에서 MAPK 경로를 억제시킬 수 있다.

[0505] **실시예 10. 기타 항-혈관신생 및 항-신호전달 치료제 조합**

[0506] 혈관 내피 성장 인자 및 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 둘 모두가 종양 조직내 혈관신생에 기여할 수 있고 다운 스트림 신호전달 경로를 공유할 수 있다. 그러므로, 두 경로를 표적으로 삼는 것이, 원칙적으로, 부가적 또는 시너지적 항종양 효과를 야기시킨다. 최근의 I/II 기 연구는 비편편성 난치성 진행성 비소세포 폐암(NSCLC)을 지닌 환자에서 베바시주맵과 EGFR 소분자 티로신 키나아제 억제제(TKI) 얼로티닙의 조합을 평가하였다. II기 연구에서, 얼로티닙과 조합된 베바시주맵은 EGFR 티로신 키나아제 돌연변이 상태와 독립적으로 혜택을 제공하는 것으로 드러났음이 입증되었다(예를 들어, 하기 문헌 참조: Herbst et al, J. Clin. Oncol, 23:2544-2555 (2005)). 따라서, EGFR 및 VEGFR-2 둘 모두를 명확하게 차단시키는 것은 환자에게 이로운 것으로 생각된다.

[0507] 이 분야에서 진행중인 임상 시도 중에는 다음과 같은 것이 있다: (1) 비소세포 폐암(ATLAS)의 제 1선 치료의 경우 얼로티닙의 존재 또는 부재하의 베바시주맵 치료를 비교하는 연구; 국소적으로 진행된 NSCLC 또는 전이성 NSCLC을 지닌 피검체에서 화학치료법 + 베바시주맵에 후속하여 베바시주맵 + 얼로티닙 대 베바시주맵 + 얼로티닙위약의 안정성 및 효능을 평가하기 위한 IIIb 기, 다중심(multicenter), 무작위화된, 위약-조절 시도; (2) 진행된 비소세포 폐암의 경우 Tarceva®과 조합된 베바시주맵의 효능을 평가하기 위한 연구; 제 2선 III 기, 다중심, 위약-조절된, 이중-맹검, 무작위화된 연구. 대략 650명의 환자가 2가지 치료 무기(arms) 중 하나에 대해 1:1 비율로 무작위화될 것이다: 무기 1: Tarceva® + 위약; 무기 2: Tarceva® + 베바시주맵; (3) 전혀 흡연경험이 없는 단계 IIIB or 단계 IV 원발성 비소세포 폐암을 지닌 환자를 치료하는데 있어서 얼로티닙 및 베바시주맵; (4) 새롭게 진단되거나 재발한 단계 IIEB 또는 단계 IV 비소세포 폐암을 지닌 환자를 치료하는데 있어서 베바시주맵 및 얼로티닙에 후속하여 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 켈시타빈; (5) 전신 치료법으로 이전에 치료되지 않은 비소세포 폐암(NSCLC) 환자에서 RAD001과 카르보플라틴, 파클리탁셀 및 베바시주맵의 조합; (6) 진행된 비소세포 폐암을 지니는 환자를 치료하는데 있어서 세툽시맵, 파클리탁셀, 카르보플라틴, 및 베바시주맵; (7) 파조파닙 + 라파타닙; (8) 단계 IIIB 또는 단계 IV 비소세포 폐암을 지니는 환자를 치료하는데 있어서 제 1선 화학치료법 및 베바시주맵 치료후 이마티닙메실레이트 및 베바시주맵; 및 (9) 진행된 NSCLC의 경우 화학치료법과 조합된 AMG 706 또는 베바시주맵의 II 기 시도.

[0508] 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 다양한 약물 조합으로 치료를 위한 환자 선택의 예가 하기에 제시된다.

[0509] **표 9**

[0510] **종양 세포:**

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 아바스틴+타르세바	활성화 + 아바스틴
EGFR:	중간	강함	매우 약함	강함
ErbB2:	중간	강함	매우 약함	강함
ErbB3	낮음	중간	매우 약함	중간
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	약함
Shc		강함	매우 약함	강함
PI3K		강함	매우 약함	강함
Erk		강함	매우 약함	강함
Rsk		강함	매우 약함	강함
Akt		강함	매우 약함	강함
P70S6K		강함	매우 약함	강함

[0511]

[0512] **표 10**

[0513] 내피 세포:

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 아바스틴+다르세바	활성화 + 아바스틴
VEGFR2:	중간	강함	약함	약함
VEGFR1:	중간	강함	약함	약함
Tie 2	낮음	약함	약함	약함
V-카드헤린- -R2 복합체	없음	중간	약함	약함
Shc		강함	약함	약함
PI3K		강함	약함	약함
Erk		강함	약함	약함
Rsk		강함	약함	약함
Akt		강함	약함	약함
P70S6K		강함	약함	약함

[0514]

[0515] 표 9 및 10의 정보는 아바스틴® 및 Tarceva®의 조합하 내피 세포를 비롯한 중앙 세포 둘 모두에서 경로를 하향조절시킨다는 것을 나타낸다.

[0516] **표 11**

[0517] 환자 5001: (EGFR 돌연변이)

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 다르세바	활성화 + 일비투스
EGFR:	높음	강함	매우 약함	약함
ErbB2:	중간	강함	매우 약함	약함
ErbB3	낮음	중간	매우 약함	중간
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	약함
Shc		강함	매우 약함	약함
PI3K		강함	매우 약함	중간
Erk		강함	매우 약함	중간
Rsk		강함	매우 약함	중간
Akt		강함	매우 약함	중간
P70S6K		강함	매우 약함	중간

[0518]

[0519] 표 11의 정보는 환자 5001이 수용체 인산화의 완전한 억제로 Tarceva®로 치료되어야 하며 다운스트림 이펙터 (efector)가 Tarceva® 첨가시 관찰되었음을 제시한다. Erbitux®는 동일한 수준의 억제를 유도하지 않았다. Tarceva®로의 치료에 대한 결정은 하기한 것들에 기초할 수 있다:

[0520]

· 중앙 세포에서 활성화된 경로(주소설정가능한 칩에 기반한 활성화 프로파일);

[0521]

· 자극시 활성화되는 경로; 또는

[0522]

· Tarceva®로의 경로의 억제.

[0523] **표 12**

[0524] 환자 5002: (Tarceva®에 내성인 EGFR 돌연변이)

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 다르세바	활성화 + EKB 569
EGFR:	높음	강함	강함	약함
ErbB2:	중간	강함	강함	약함
ErbB3	낮음	중간	중간	약함
ErbB4	낮음	약함	약함	약함
Shc		강함	강함	약함
PI3K		강함	강함	약함
Erk		강함	강함	약함
Rsk		강함	강함	약함
Akt		강함	강함	약함
P70S6K		강함	강함	약함

[0525]

[0526] 표 12의 정보로부터, 이 환자는 억제 프로파일에 기초하여 EKB 569로 치료될 것이다. 대안적으로, 환자는 Tarceva®로 초기에 치료될 수 있고, 재발시, 환자는 EKB 569로 치료될 수 있다.

[0527]

표 13

[0528]

환자 5003: (Tarceva®로 개발된, cMet 증폭)

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바	활성화 + PHB + 타르세바
EGFR:	높음	강함	강함	약함
ErbB2:	중간	강함	강함	약함
ErbB3	낮음	중간	중간	약함
ErbB4	낮음	약함	약함	약함
cMet	높음	강함	강함	약함
Shc		강함	강함	약함
PI3K		강함	강함	약함
Erk		강함	강함	약함
Rsk		강함	강함	약함
Akt		강함	강함	약함
P70S6K		강함	강함	약함

[0529]

[0530]

이 환자의 활성화 프로파일은 cMet의 높은 발현 및 인산화를 보여준다. 따라서, 환자는 cMet 및 EGFR 억제제의 조합으로 치료되어야 한다.

[0531]

표 14

[0532]

환자 5004: (Her 2와 3 활성화와 함께 EGFR 활성화. (2/3 이합체) 또는 Her2 증폭):

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바	활성화 + 라파타닙
EGFR:	중간	강함	매우 약함	매우 약함
ErbB2:	높음 또는 중간	강함	강함	약함
ErbB3	낮음	강함	강함	약함
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	매우 약함
Shc		강함	강함	매우 약함
PI3K		강함	강함	매우 약함
Erk		강함	중간	매우 약함
Rsk		강함	중간	매우 약함
Akt		강함	강함	매우 약함
P70S6K		강함	강함	매우 약함

[0533]

[0534]

Her 3 인산화에 기초한 표 14의 경로 프로파일은 팬(pan)-Her 억제제를 사용하는 것을 제시한다. 라파타닙으로 관찰된 강한 억제는 이 물질이 선택 치료제임이 분명하다는 것을 제시한다.

[0535]

표 15

[0536]

환자 5005: (EGFR 활성화 + PI3K 돌연변이 또는 PTEN 결실):

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바	활성화 + 타르세바 +Mek +mTor 억제제
EGFR:	중간	강함	매우 약함	매우 약함
ErbB2:	중간	중간	약함	약함
ErbB3	낮음	약함	약함	약함
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	매우 약함
Shc		강함	약함	매우 약함
PI3K		강함	강함	매우 약함
Erk		강함	중간	매우 약함
Rsk		강함	중간	매우 약함
Akt		강함	강함	매우 약함
P70S6K		강함	강함	매우 약함

[0537]

[0538]

표 16

[0539] 환자 5006: (EGFR 활성화 + Ras 돌연변이):

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바	활성화 + 타르세바 +Mek +mTor 억제제
EGFR:	중간	강함	매우 약함	매우 약함
ErbB2:	중간	중간	약함	약함
ErbB3	낮음	약함	약함	약함
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	매우 약함
Shc		강함	약함	매우 약함
PI3K		강함	강함	매우 약함
Erk		강함	중간	매우 약함
Rsk		강함	중간	매우 약함
Akt		강함	강함	매우 약함
P70S6K		강함	강함	매우 약함

[0540]

[0541]

표 15 및 16에 제시된 프로파일을 지니는 종양 유형의 증식은 ErbB 패밀리에 의해서 뿐만 아니라 다운스트림 사건(전형적으로 Ras 또는 Raf 돌연변이체에 기인함)에 의해 유도된다. 따라서, 프로파일링 정보는 그러한 환자들이 다운스트림 경로, 예컨대, MAPK 및 PI3K 경로를 억제시키는 약물과 함께 EGFR 억제제로 치료되어야 함을 제시한다.

[0542]

표 17

[0543]

환자 5007: 느린 내재화(internalization)로 인한 Tarceva® + Erbitux®의 조합 사용(트래픽 문제)

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바 +	활성화 + 타르세바 + 엘비톡스
EGFR:	중간	강함	중간	매우 약함
ErbB2:	중간	강함	중간	약함
ErbB3	낮음	강함	중간	약함
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	매우 약함
Shc		강함	약함	매우 약함
PI3K		강함	강함	매우 약함
Erk		강함	중간	매우 약함
Rsk		강함	중간	매우 약함
Akt		강함	강함	매우 약함
P70S6K		강함	강함	매우 약함

[0544]

[0545]

상기 표 17에 제시된 정보는 이 환자가 Tarceva® 및 Erbitux®의 조합물로 치료되어야 함을 제시한다.

[0546]

표 18

[0547]

환자 5008: TKI에 반응하고 화학치료법에 반응하지 않는 환자의 선택

수용체	발현	활성화 (인산화 수준)	활성화 + 타르세바	활성화 + 타르세바 +Mek +mTor 억제제
EGFR:	중간	강함	매우 약함	매우 약함
ErbB2:	중간	중간	약함	약함
ErbB3	낮음	약함	약함	약함
ErbB4	낮음	약함	매우 약함	매우 약함
Shc		강함	약함	매우 약함
PI3K		강함	강함	매우 약함
Erk		강함	중간	매우 약함
Rsk		강함	중간	매우 약함
Akt		강함	강함	매우 약함
P70S6K		강함	강함	매우 약함

[0548]

[0549]

상기 표 18에 제시된 정보는 Ras 돌연변이를 지니는 환자가 화학치료법에 반응할 가능성이 없음을 제시한다. 따라서, 그러한 프로파일을 지니는 환자는 TKI의 조합물로의 치료를 위한 후보자가 될 수 있다.

[0550]

실시예 11. 치료 선택을 안내하기 위한 EGFR 및/또는 HER-2 활성화를 위한 폐암 환자 모니터링

[0551]

치료법에 대한 9명의 폐암 환자를 Veridex CellSearch™ 시스템에 의한 CTC 수 및, 본원에 기재된 근접 검정을 사용하여 EGFR 및 HER-2 인산화에 관해 평가하였다. 또한 이들 환자들 중 5명을 Veridex CellSearch™ 종양 표

현형검사 시약 EGFR을 사용하여 검색하여 CTC 상의 EGFR 발현에 관해 시험하였다. 환자 인구통계 (demographics), 암 히스토리, 및 현재의 약(medications)을 표 19, 20, 21에 각각 제시되어 있다. 표 22는 각 샘플내에서 검출된 CTC의 수와 EGFR 및 HER-2에 관한 상대적 인산화 수준을 나타낸다. 상대적 인산화 수준을 마이크로어레이 상의 정상 대조군 런의 값을 제함으로써 계산하였다. 도 5(A 및 B)는, 선택된 환자에 대한, EGFR, 사이토케라틴(CK) 및 사이토케라틴과 DAPI에 대한 CTC 검색의 이미지로 보여준다. 세포주 대조군은 SKBr3 및 A431인데, 이들은 각각 EGFR과 HER-2 발현에 대해 양성이다.

[0552] 환자 2002는 CellSearch™ 시스템에서 시험된 7.5 ml의 혈액에서 2개의 CTC가 검출되었다. 두 세포는 EGFR와 HER-2의 발현이 검출되었다. 이 환자를 아바스틴으로 치료하였다. 단독 또는 화학치료제와 조합된, 아바스틴, 또는 단독의 화학치료제로의 치료는 이 환자의 경우 적절한 치료가 되지 않을 것이다. 이러한 데이터는 임상 의에게, 예를 들어, 라파티닙, 허셉틴 + 작티마, 허셉틴 + 얼비투스, 또는 허셉틴 + 트라세바와 같은, EGFR과 HER-2 둘 모두를 표적으로 삼는 물질을 포함하는 치료제가 권장됨을 알려준다.

[0553] 환자 2015는 CellSearch™ 시스템을 사용하는 분석에서 11개 CTC이 검출되었다. 또한 이러한 세포들 중 다수는 Veridex 키트를 사용하여 EGFR 발현에 관해 양성인 것으로 시험되었다. EGFR 및 HER-2 둘 모두의 유의미한 활성화가 존재하였다. 이 환자는 아바스틴, 겐자(gemzar), 및 탁소티어(taxotere)로 치료하였다. 단독 또는 화학치료제와 조합된, 아바스틴, 또는 단독의 화학치료제로의 치료는 이 환자의 경우 적절한 치료가 되지 않을 것이다. 이러한 데이터는 임상 의에게, 예를 들어, 라파티닙, 허셉틴 + 작티마, 허셉틴 + 얼비투스, 또는 허셉틴 + 트라세바와 같은, EGFR과 HER-2 둘 모두를 표적으로 삼는 물질을 포함하는 치료제가 권장됨을 알려준다.

[0554] 환자 1023, 2040, 1037, 및 1035는 CellSearch™ 시스템으로 시험한 결과 7.5 ml의 혈액에서 CTC가 검출되지 않았다. 또한 이들은, 예상한대로, 근접 검정을 사용한 시험 결과, EGFR과 HER-2 인산화에 대해 음성인 것으로 나타났다. 이러한 환자들에 대한 현재의 치료는 다음과 같다: 환자 1023에 대해 카르보플라틴; 환자 2040에 대해 아바스틴; 환자 1037에 대해 아바스틴, 카르보플라틴, 탁솔; 환자 1035에 대해 아바스틴, 카르보플라틴, 겐자. 이러한 환자들의 혈액에서 CTC가 검출되지 않음을 고려하면, 현재 치료제의 지속이 권장된다.

[0555] 환자 2016 및 1025 각각은 CellSearch™ 시스템으로 시험한 결과 7.5 ml의 혈액에서 3개의 CTC가 검출되었다. 두 경우에 있어서, Veridex EGFR 검색에 의해 드러난 것과 같이 모든 세포상의 EGFR의 발현이 존재하였다. 그러나, 이러한 환자들의 샘플 중 어느 것도 시험 결과 EGFR 또는 HER2 인산화에 대해 양성인 것으로 나타나지 않았다. 전신 치료가 이러한 환자에서 아직 개시되지 않았다. 이러한 데이터는 임상 의에게 환자의 종양 세포가, 종양 세포 상의 EGFR 발현이 존재한다는 사실에도 불구하고, EGFR/HER-2 경로에 의해 유도되지 않는다는 것을 알려준다. EGFR 또는 HER-2 중 어느 하나에 대해 유도되는 표적화된 치료제로 이러한 환자들을 치료하는 것은 권장되지 아니할 것이다.

[0556] 환자 1012는 CellSearch™ 시스템으로 분석한 결과 혈액 중에 3개의 CTC를 지녔다. Veridex 키트를 사용한 검색 결과 EGFR은 없었다. 근접 검정 분석에 의해 EGFR 또는 HER2 인산화가 없음이 나타났다. 이 환자를 아바스틴, 카르보플라틴, 및 탁솔로 치료하였다. EGFR 또는 HER-2 중 어느 하나에 대해 유도되는 표적화된 치료제로 이러한 환자를 치료하는 것은 권장되지 아니할 것이다.

[0557] 표 22는 각각의 환자에 대한 진단 정보 및 CTC 수와 EGFR과 HER2 인산화에 관한 데이터에 근거한 치료 권장사항을 요약한 표이다.

[0558] 표 19. 폐암 환자 9명의 인구통계

환자 번호	생년월일	성별	인종/민족
02-002	19-Apr-45	남성	백인
01-012	20-Jun-43	남성	백인
02-015	9-Dec-50	남성	백인
02-016	5-Mar-38	여성	백인
01-025	4-Dec-42	남성	히스패닉/라틴
01-023	2-Dec-51	남성	히스패닉/라틴
01-040	16-Sep-63	남성	아시아
01-037	5-Apr-55	남성	아시아
01-035	15-Sep-47	남성	아시아

[0559]

[0560]

표 20. 폐암 환자 9명의 암 히스토리

환자 번호	암 유형	단계	전이 부위 (Site of Mets)	진단일자	치료 유형
02-002	폐	4	부신	01-Jul-2005	화학치료
01-012	폐	4	뇌	09/OCT/2007	방사선치료 화학치료
02-015	폐	4	골, 뇌	24/OCT/2007	화학치료
02-016	폐	4	간	18/AUG/2007	화학치료
01-025	폐	4	간	18/APR/2007	화학치료
01-023	폐	4	림프절, 골	29/AUG/2007	화학치료
02-040	폐	4	골, 부신, 소뇌	06/DEC/2006	화학치료 방사선치료
01-037	폐	4	간 우측하엽	25/OCT/2007	화학치료
01-035	폐	4	기타 폐	22/DEC/2006	화학치료

[0561]

[0562]

표 21. 폐암 환자 9명의 현재 약(치료)

환자 번호	약물 명칭	치료와 연관된 진단	용량
02-002	AVASTIN	암	1400 MG QD
01-012	AVASTIN	폐암을 위한 화학치료	1000 MG Q 2 WEEK
01-012	BENADRYL	사전-화학치료	25 MG Q 2 WEEKS
01-012	BENZAEPRIIL	고혈압	20 MG ONE Q D
01-012	BENZAEPRIIL HCL	고혈압	10 MG ONCE Q D
01-012	CARBOPLATIN	폐암을 위한 화학치료	775 MG Q 2 WEEKS
01-012	DECADRON	사전-화학치료	20 MG Q 2 WEEKS
01-012	DEXAMETHASONE	암 화학치료를 위한 예비-투약(pre-med)	4 MG ONE TID
01-012	TAGAMET	사전-화학치료	300 MG Q 2 WEEKS
01-012	TAXOL	폐암을 위한 화학치료	315 MG Q 2 WEEKS
01-012	ZOFRAN	사전-화학치료	32 MG Q 2 WEEKS
01-012	ZOLPIDEM	수면제	10 MG ONE Q D
02-015	ACTOS	제 2형 당뇨병	30 MG QD
02-015	AVASTIN	폐암	1400 MG Q 28 D
02-015	BENADRYL	발진	25 MG Q 28 D
02-015	COMPAZINE	구역질	10 MG Q 6-8 HR P
02-015	DECADRON	구역질	32 MG EVERY 3 HR
02-015	DECADRON	구역질	20 MG Q 28 D
02-015	DILANTIN	발작	800 MG EVERY 3 H
02-015	DIOVAN	고혈압	120 MG BID
02-015	ENALAPRIL	고혈압	80 MG 4XD
02-015	FLOMAX	전립선 비대	8 MG BID
02-015	GEMZAR	폐암	2200 MG Q 28 D
02-015	LIPITOR	과콜레스테롤혈증	20 MG BID
02-015	MAG-OX	건강 보조제	BID 800 MG
02-015	MORPHINE	암 통증	Q 12 HR 15 MG
02-015	NEURONTIN	신경병증	2400 MG TID
02-015	TAGAMET	위식도 역류질환(GERD)	300 MG Q 28 D
02-015	TAXOTERE	폐암	130 MG Q 28 D

[0563]

환자 번호	약물 명칭	치료와 연관된 진단	용량
02-015	VICODIN E.S	통증	750 MG Q 4 HR PR
02-015	XANAX	불안증	BID 1 MG PRN
02-015	ZOFRAN	구역질	32 MG Q 28 D
02-015	ZOFRAN	구역질	8 MG Q HR HR
02-015	ZOMETA	폐암	4 MG Q 28 D
02-016	ADVAIR DISKUS	폐기종	500 MG QD
02-016	FLONASE	계절성 알레르기	100 MCG BID
02-016	LASIX	고혈압	40 MG QD
02-016	LEVAQUIN	기관지염	500 MG QD
02-016	LEVOXYL	감상선기능저하증	0.15 MG QD
02-016	LIPITOR	과콜레스테롤혈증	20 MG QD
02-016	LISINOPRIL	고혈압	10 MG QD
02-016	LORAZEPAM	불면증	3 MG TID
02-016	NITRO STAT	협심증	0.4 MG PRN
02-016	NITROGLYCERIN	협심증	5 MG BID
02-016	PROCRIT	빈혈	40,000 UNITS 5Q
02-016	VICODIN	암 통증	10 - 325 MG Q -
02-016	ZANTAC	위식도 역류질환	300 MG BID
01-025	ALLOPURINOL	위식도 역류질환	300 MG ONE QD
01-025	BIAXIN	예방 (PROPHYLAXIS)	500 MG ONE PRN
01-025	HYDROCHLOROTHIAZIDE	고혈압	50 MG ONE QD
01-025	IBUPROFEN	통증	800 MG ONE PRN
01-025	LEVOTHYROXINE	감상선기능저하증	0.175 MG ONE QD
01-025	LISINOPRIL	고혈압	40 MG ONE QD
01-025	LOVASTATIN	과콜레스테롤혈증	40 MG ONE QD
01-025	PAXIL	우울증	20 MG ONE QD
01-025	PROTONIX	위식도 역류질환	40 MG ONE QD
01-025	SPIRIVA	COPD	18 MCG ONE QHS
01-025	VERAPAMIL	고혈압	240 MG ONE BID
01-023	BENADRYL	사전-화학치료 투약(PRE-CHEMO MED)	50 MG Q 3 WEEKS
01-023	CARBOPLATIN	화학치료	500 MG Q 3 WEEKS
01-023	DECADRON	사전-화학치료 투약	20 MG Q 3 WEEKS

[0564]

환자 번호	약물 명칭	치료와 관련된 진단	용량
01-023	KYTRIL	사전-화학치료 투약	1 MG Q 3 WEEKS
01-023	NORMAL SALINE	하이드레이션	250 MG PRN
01-023	TAGAMET	사전-화학치료 투약	300 MG Q 3 WEEKS
02-040	AVASTIN	폐암	700 MG Q 3 WKS
02-040	DULCOLOX	변비	10 MG 1 TAB QD
02-040	PEPCID	위식도 역류질환	10 MG PRN
02-040	QUINAPRIL	고혈압	10 MG QD
02-040	ZOMETA	폐암	4 MG Q 3 WKS
01-037	AVASTIN	폐암을 위한 화학치료	1200 MG Q 21 DAY
01-037	BENADRYL	사전-화학치료	50 MG Q 21 - DAY
01-037	BISOPROLOL	고혈압	5 MG ONE QD
01-037	CARBOPLATIN	폐암을 위한 화학치료	700 MG Q 21 - DA
01-037	DECADRON	사전-화학치료 투약	20 MG Q 21- DAYS
01-037	FLUCONAZOLE	진균증(FUNGAL)	200 MG TWO QD
01-037	GLYBURIDE	당뇨	2.5 MG ONE QD
01-037	PROTONIX	산 역류	40 MG ONE QD
01-037	TAGAMET	사전-화학치료	300 MG Q 21 - DA
01-037	TAXOL	폐암을 위한 화학치료	340 MG Q 21 - DA
01-037	ZOFRAN	사전-화학치료	32 MG Q 21 - DAY
01-035	AVASTIN	폐암을 위한 화학치료	1,000 MG Q 21 DA
01-035	CARBOPLATIN	폐암을 위한 화학치료	700 MG Q 21 DAY
01-035	DECADRON	화학치료를 위한 사전-투약	20 MG Q 21 DAY
01-035	GEMZAR	폐암을 위한 화학치료	1,800 MG Q 21 DA
01-035	MEGACE	식욕 증가	20 ML QD
01-035	ZOFRAN	화학치료를 위한 사전-투약	32 MG Q 21 - DAY

[0565]

[0566]

표 22. 폐암 샘플 9개에 대한 CTC 수(7.5 ml 당), Veridex EGFR 염색, 및 상대적인 EGFR 및 ER2 인산화 수준. 치료 지침이 데이터에서 유래된다.

환자 ID	CTCs 수	Veridex EGFR 염색	상대적 pEGFR	상대적 pHER2	치료 지침
2002	2	+	1.62	1.89	EGFR/HER2 억제제 권장됨
1012	3	-	0.83	0.8	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
2015	11	+	1.74	1.72	EGFR/HER2 억제제 권장됨
2016	3	+	0.61	0.65	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
1025	3	+	0.94	0.69	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
1023	0	nd	0.66	0.72	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
2040	0	nd	1.0	1.0	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
1037	0	nd	0.93	0.64	EGFR/HER2 억제제 비권장됨
1035	0	nd	0.01	0.05	EGFR/HER2 억제제 비권장됨

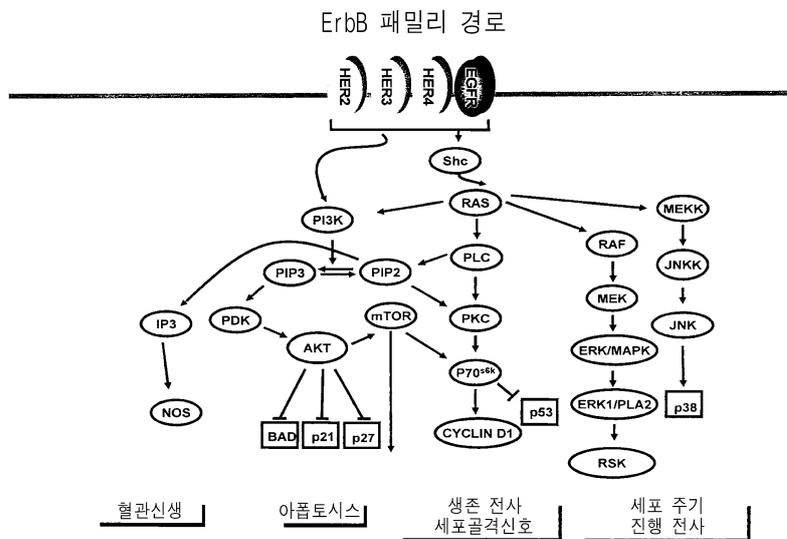
[0567]

[0568]

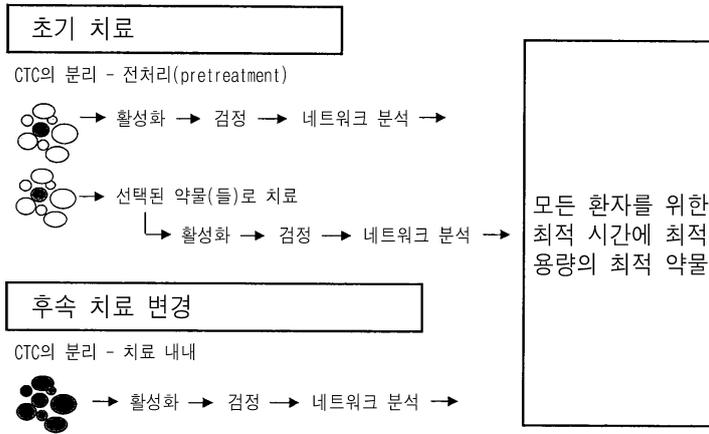
본 명세서에서 인용된 모든 간행물 및 특허 출원서는 본원에서 각 개별 간행물 또는 특허 출원서가 참고문헌으로 통합되어 구체적으로 개별적으로 지적한 것과 같이 참고문헌으로 여기에 통합된다. 앞서 기술한 본 발명이 명확한 이해를 목적으로 도시 및 실시예에 의해 다소 상세하게 기재되었으나, 본 발명의 교시에 비추어 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 특정 수정 및 변형이 첨부된 특허청구범위의 기술사상 또는 범위에서 일탈됨이 없이 이루어질 수 있음은 자명할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

