



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월06일
 (11) 등록번호 10-1424304
 (24) 등록일자 2014년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7008026
 (22) 출원일자(국제) 2007년09월20일
 심사청구일자 2012년09월19일
 (85) 번역문제출일자 2009년04월20일
 (65) 공개번호 10-2009-0074048
 (43) 공개일자 2009년07월03일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2007/079002
 (87) 국제공개번호 WO 2008/036802
 국제공개일자 2008년03월27일
 (30) 우선권주장
 11/525,598 2006년09월21일 미국(US)
 60/913,087 2007년04월20일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02002090964 A1
 W02006054991 A1

(73) 특허권자
 네스텍 소시에테아노님
 스위스연방 버베이 1800 아브뉴 네슬레 55
 (72) 발명자
 하비, 진
 미국 94550 캘리포니아 리버모어 아로요 로드
 1554
 상, 샤라트
 미국 94022 캘리포니아 로스 알토스 힐즈 줄리에
 타 레인 27359
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 20 항

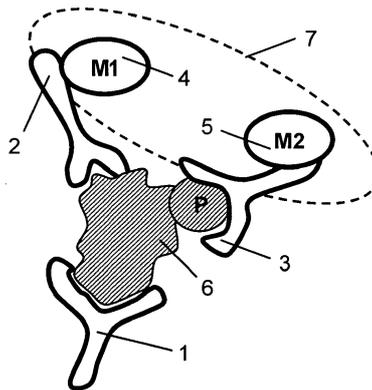
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **희귀 순환세포 내의 다수의 신호전달인자를 검출하기 위한 항체 기반 분석법**

(57) 요약

본 발명은 희귀 순환 세포 내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 검출하기 위한 항체-기반 어레이, 및 암 예후 및 진단 및 개인화된 표적 요법의 고안을 촉진하기 위한 상기 항체-기반 어레이의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김, 필립

미국 92612 캘리포니아 일바인 엑서터 28

리우, 신전

미국 92130 캘리포니아 샌디에고 카미니토 디에고
12890

바햄, 로버트

미국 92078 캘리포니아 샌마르코스 메도우락 랜치
씨클 2081

리우, 리민

미국 92130 캘리포니아 샌디에고 키빙스 로드
13280

특허청구의 범위

청구항 1

우수한 동적 범위를 갖는 다중 고속 처리 면역분석법(multiplex, high-throughput immunoassay)을 수행하는 방법으로서,

- (a) 세포 추출물과, 고체 지지체 상에 고정된 상기 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈(dilution series)를 인큐베이션시켜 다수의 포획 분석물을 형성시키는 단계;
- (b) 상기 다수의 포획 분석물과, 대응 분석물에 특이적인 검출 항체를 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 포획 분석물을 형성시키는 단계로서, 상기 검출 항체가, (1) 글루코오스 옥시다아제로 표지된 다수의 활성화 상태-비의존 항체(activation state-independent antibody) 및 (2) 신호 증폭쌍(signal amplification pair)의 제 1 일원으로 표지된 다수의 활성화 상태-의존 항체(activation state-dependent antibody)를 포함하며 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원이 퍼옥시다아제이고, 글루코오스 옥시다아제가 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 채널링(channeling)하여 이와 반응하는 과산화수소(H₂O₂)를 발생시키는 단계;
- (c) 상기 다수의 검출가능한 포획 분석물과 상기 신호 증폭쌍의 제 2 일원을 인큐베이션시켜 증폭 신호를 발생시키는 단계; 및
- (d) 상기 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 증폭 신호를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세포 추출물이 고형 종양의 순환 세포의 추출물을 포함하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 세포가 면역자기 분리(immunomagnetic separation)에 의해 환자의 샘플로부터 분리되는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 환자의 샘플이 전혈(whole blood), 혈청, 혈장, 소변, 담(sputum), 기관지 세정 유체, 눈물, 유두 흡입물(nipple aspirate), 림프, 타액, 미세침 흡입물 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 분리된 세포가 순환 종양 세포, 순환 내피 세포, 순환 내피 전구세포, 암 줄기 세포 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 분리된 세포가 i) 성장 인자를 이용하여 시험관 내에서 자극되거나; ii) 성장 인자 자극 전에 모노클로날 항체, 티로신 키나아제 억제제, 면역억제 작용제 및 이들의 조합물과 같은 항암 약물과 함께 인큐베이션되거나; iii) 성장 인자 자극 후에 용해되어 상기 세포 추출물을 생성시키는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 분석물이 다수의 신호 전달 분자를 포함하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 고체 지지체가 유리, 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막, 섬유 다발 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 활성화 상태-비의존 항체가 형광단(fluorophore)과 같은 검출가능한 부분을 추가로 포함

하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 검출가능한 부분의 양이 하나 이상의 분석물의 양과 상관이 있는 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 활성화 상태-비의존 항체가 글루코오스 옥시다아제로 직접 표시되는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 활성화 상태-비의존 항체가 상기 활성화 상태-비의존 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드와 상기 글루코오스 옥시다아제에 컨쥬게이션된 상보적 올리고뉴클레오티드 사이의 하이브리드화를 통해 글루코오스 옥시다아제로 표시되는 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 활성화 상태-의존 항체가 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 직접 표시되는 방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 활성화 상태-의존 항체가 상기 활성화 상태-의존 항체에 컨쥬게이션된 비오틴과 같은 결합쌍의 제 1 일원과 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원에 컨쥬게이션된 스트렙타비딘과 같은 결합쌍의 제 2 일원 사이의 결합을 통해 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표시되는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 상기 퍼옥시다아제가 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP)인 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 신호 증폭쌍의 제 2 일원이 비오틴-티라미드와 같은 티라미드(tyramide) 시약인 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 증폭 신호가 활성화된 티라미드를 생성시키는 비오틴-티라미드의 퍼옥시다아제 산화에 의해 발생하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 활성화된 티라미드가 직접 검출되는 방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, 상기 활성화된 티라미드가 스트렙타비딘-표지된 형광단과 같은 신호-검출 시약의 첨가 후에 검출되는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 신호-검출 시약이 스트렙타비딘-표지된 퍼옥시다아제와 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)과 같은 발색(chromogenic) 시약의 조합물인 방법.

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

명세서

기술분야

[0001] **관련 출원의 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2006년 9월 21에 출원된 미국 출원 번호 11/525,598호를 우선권으로 주장하며, 상기 출원은 미국 가출원 번호 _____ 및, 2007년 4월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 60/913,087호로 전환되었으며, 이들 출원의 전체 개시내용은 모든 목적상 참조로서 본원에 포함된다.

배경기술

[0003] 종양 세포는 종종 "미소전이(micrometastasis)"(전이된 종양 세포)로서 암의 다양한 초기 단계를 지닌 환자의 혈액에서 발견되고, 이는 또한 전이성 암에서 발견된다. 혈액 내의 종양 세포의 수는 종양의 단계 및 유형에 좌우된다. 종양은 극도로 비균일하다. 결과적으로, 단일 부위로부터의 생검은 종양 집단에서 비균일성을 나타내지 않을 수 있다. 생검은 통상적으로 원발성 종양에서 수득되나, 가장 전이성인 종양은 생검이 이루어지지 않아, 종양 샘플의 분자적 분석을 더욱 어렵게 한다.

[0004] 종양 전이 동안, 가장 공격적인 종양 세포는 원발성 종양을 떠나, 혈액 및 림프계를 통해 이동하여 원위에 도달한다. 따라서, 혈액으로부터 순환하는 종양 세포는 가장 공격적이고 균일한 집단의 종양 세포이다. 혈액 내의 전이 종양 세포의 수는 혈액 밀리리터 당 1개 내지 수천개의 세포로 다양할 수 있다. 따라서, 진단 및 예후 목적상 상기 세포를 검출하는 특이적이고 민감한 방법이 필요하다. 본 발명은 상기 요구를 충족시키며, 또한 관련 장점을 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0005] **발명의 개요**

[0006] 본 발명은 희귀 순환 세포에서 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 검출하기 위한 항체-기반 어레이 및 이의 사용 방법을 제공하며, 이는 효소면역측정법과 관련된 특이성, 신호 증폭과 관련된 민감성, 및 마이크로어레이와 관련된 다중 고속-처리(high-throughput multiplexing)의 이점을 지닌다.

[0007] 한 양태에서, 본 발명은 고체 지지체 상에 고정된 세포 추출물 중의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈(dilution series)를 포함하는 우수한 동적 범위를 지니는 어레이를 제공한다.

[0008] 또 다른 양태에서, 본 발명은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리(multiplex, high-throughput) 면역분석법을 수행하기 위한 방법을 제공하며, 이러한 방법은,

[0009] (a) 세포 추출물과, 고체 지지체 상에 고정된 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 인큐베이션시켜 다수의 포획 분석물을 형성시키는 단계;

[0010] (b) 다수의 포획 분석물과, 대응 분석물에 특이적인 검출 항체를 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 분석물을 형성시키는 단계;

[0011] (c) 다수의 검출가능한 포획 분석물과 신호 증폭쌍(signal amplification pair)의 제 1 및 제 2 일원을 인큐베이션시켜 증폭된 신호를 발생시키는 단계; 및

[0012] (d) 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 증폭된 신호를 검출하는 단계를 포함한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 면역분석법을 수행하기 위한 방법을 제공하며, 이러한 방법은,

[0014] (a) 세포 추출물과, 고체 지지체 상에 고정된 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 인큐베이션시켜 다수의 포획 분석물을 형성시키는 단계;

- [0015] (b) 다수의 포획 분석물과, 대응 분석물에 특이적인 검출 항체를 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 포획 분석물을 형성시키는 단계로서, 상기 검출 항체가, (1) 촉진 부분(facilitating moiety)으로 표지된 다수의 활성화 상태-비의존 항체(activation state-independent antibody), 및 (2) 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표지된 다수의 활성화 상태-의존 항체(activation state-dependent antibody)를 포함하고, 상기 촉진 부분이 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 보내져서 이와 반응하는 산화제를 생성시키는 단계;
- [0016] (c) 다수의 검출가능한 포획 분석물과 신호 증폭쌍의 제 2 일원을 인큐베이션시켜 증폭된 신호를 발생시키는 단계; 및
- [0017] (d) 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 증폭 신호를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0018] 본 발명은 또한, (a) 고체 지지체 상에 고정된 다수의 포획 항체의 희석 시리즈, 및 (b) 다수의 검출 항체를 포함하는 상기 기재된 항체-기반 어레이 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 기타 시약, 예를 들어 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원을 추가로 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0019] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 장점은 하기의 상세한 설명 및 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다.
- [0020] **도면의 간단한 설명**
- [0021] 도 1은 활성화된 분석물에 특이적으로 결합된 3개의 항체를 도시한다.
- [0022] 도 2는 활성화된 분석물에 특이적으로 결합된 표지된 항체가 고체 지지체 상에 고정되는 분석 도해를 도시한다.
- [0023] 도 3은 ELISA에서 포획 항체 및 검출 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 이용한 A431 세포 내의 전체 EGFR의 검출을 도시한다. (a) 샌드위치 ELISA의 표준 곡선. 민감도는 인간 EGFR의 재조합 세포의 도메인을 이용하여 약 0.25 pg/웰(we11)이었다. (b) 세포 적정 곡선. A431 세포 내의 EGFR 농도는 ELISA에 의해 검출되었다. (c) pg/웰 및 pg/세포로 계산된 EGFR 농도 표. 계산된 EGFR 농도는 각각의 A431 세포에서 약 0.6 pg이었다.
- [0024] 도 4는 ELISA에서 포획 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 EGFR에 대한 비오틴-표지된 모노클로날 항체를 이용한 A431 세포에서의 인산화된 EGFR의 검출을 도시한다. (a) 포획 항체의 희석 시리즈를 이용한 세포 적정 곡선. (b) 세포와 백그라운드(background) 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 0.0625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우 1개의 세포 수준에서의 신호/노이즈 비는 1.78이었다.
- [0025] 도 5는 ELISA에서 포획 항체 및 검출 항체로서 ErbB2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 ErbB2의 검출을 도시한다. (a) SKBr3 세포에서의 전체 ErbB2의 세포 적정. 검출 범위는 약 1,000개의 세포 내지 약 1.37개의 세포였다. (b) 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우 1.37개의 세포 수준에서 신호/노이즈 비는 2.71이었다.
- [0026] 도 6은 ELISA에서의 포획 항체로서 ErbB2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 ErbB2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 SKBr3 세포에서의 인산화된 ErbB2의 검출을 도시한다. (a) SKBr3 세포에서의 인산화된 ErbB2의 세포 적정. 검출 범위는 약 500개의 세포 내지 약 5개의 세포였다. (b) 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 경우 5개의 세포 수준에서 신호/노이즈 비는 3.03이었다.
- [0027] 도 7은 ELISA에서 포획 항체 및 검출 항체로서 Erk2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 Erk2 단백질 및 인산화된 Erk2 단백질의 검출을 도시한다. (a) 포획 항체 및 검출 항체로서 Erk2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 전체 Erk2 단백질의 검출. (b) 포획 항체로서 Erk2에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 Erk2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 인산화된 Erk2 단백질의 검출. (c) 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 전체 Erk2 및 인산화된 Erk2 둘 모두에 대해 1.37개의 세포 수준에서 신호/노이즈 비는 약 3이었다.
- [0028] 도 8은 마이크로어레이 ELISA에서의 포획 항체 및 검출 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 이용한 A431 세포에서의 전체 EGFR의 검출을 도시한다. (a) 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선. 마이크로어레이 ELISA는 희석 시리즈에서의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 EGFR을 검출하는 광범위한 동적 범위를 지녔다. (b) 포획 항체 농도의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선, 이는 EGFR이 1개의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타낸다(화살표). (c) 희석 시리즈의 다양한 포획 항체 농도에서의 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 0.0625 mg/ml 인 경우 1개의 세포

수준에서의 신호/노이즈 비는 2.11이었다(화살표).

- [0029] 도 9는 마이크로어레이 ELISA에서 포획 항체로서 EGFR의 세포외 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 EGFR에 대한 모노클로날 항체를 이용한 A431 세포에서의 인산화된 EGFR의 검출을 도시한다. (a) 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선. 마이크로어레이 ELISA는 희석 시리즈의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 인산화된 EGFR을 검출하는 광범위한 동적 범위를 지녔다. (b) 포획 항체 농도의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선, 이는 인산화된 EGFR이 하나의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타낸다. (c) 희석 시리즈의 다양한 포획 항체 농도에서의 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서의 신호/노이즈 비는 1.33이었다(화살표).
- [0030] 도 10은 마이크로어레이 ELISA에서 포획 항체 및 검출 항체로서 ErBb2의 세포외 도메인에 대한 모노클로날 항체를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 ErBb2의 검출을 도시한다. (a) 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선. 마이크로어레이 ELISA는 희석 시리즈의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 ErBb2를 검출하는 광범위한 동적 범위를 지녔다. (b) 포획 항체 농도의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선, 이는 ErBb2가 1개의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타낸다(화살표). (c) 희석 시리즈의 다양한 포획 항체 농도에서의 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서의 신호/노이즈 비는 15.27이었다(화살표).
- [0031] 도 11은 마이크로어레이 ELISA에서 포획 항체로서 ErBb2의 세포외 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 ErBb2에 대한 모노클로날 항체를 이용한 SKBr3 세포에서의 인산화된 ErBb2의 검출을 도시한다. (a) 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선. 마이크로어레이 ELISA는 희석 시리즈의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 ErBb2를 검출하는 광범위한 동적 범위를 지녔다. (b) 포획 항체 농도의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선, 이는 인산화된 ErBb2가 1개의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타낸다(화살표). (c) 희석 시리즈의 다양한 포획 항체 농도에서의 세포와 백그라운드 사이의 신호/노이즈(S/N) 비의 표. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서의 신호/노이즈 비는 5.45이었다(화살표).
- [0032] 도 12는 근접 이중 검출기(proximity dual detector) 마이크로어레이 ELISA 대 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA의 민감도의 비교를 도시한다. A431 세포는 10,000개의 세포로부터 0.01개의 세포로 희석되었다. 포획 항체는 1 mg/ml로부터 0.004 mg/ml로 연속적으로 희석되었다.
- [0033] 도 13은 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA 대 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA에 대한 분석 특이성을 도시한다. (a) 단일 검출기 포맷에서 다양한 포획 항체 농도에서의 A431 세포 내의 인산화된 EGFR의 적정 곡선. 이러한 포맷에서 단일 검출 항체의 특이성 결핍으로 인해 매우 높은 백그라운드가 관찰되었다. (b) 근접 이중 검출기 포맷에서 다양한 포획 항체 농도에서의 A431 세포 내의 인산화된 EGFR의 적정 곡선. 이러한 포맷에서 두 개의 검출 항체 사이의 근접성을 검출함으로써 수득되는 증가된 특이성으로 인해 매우 낮은 백그라운드가 관찰되었다.
- [0034] 도 14는 다수의 신호전달 분자의 활성화 상태를 결정하기 위한 포획 항체의 희석 시리즈를 이용한 어드레싱 가능 마이크로어레이(addressable microarray) 포맷의 예시적 구체예를 도시한다.
- [0035] 도 15는 자극된 A431 세포의 적정 분석에서의 인산화된 Shc 수준의 검출을 도시한다. 어드레싱 가능 어레이는 EGFR 및 HER2 인산화에 대한 정보를 동시에 제공하였다.
- [0036] 도 16은 항-EGFR 포획 항체의 희석 곡선을 도시한다. 이러한 분석의 동적 범위는 5 log를 초과하였다. 각각의 개별적 곡선은 약 2 log의 동적 범위를 지녔으나, 6개의 정보 곡선으로부터의 정보가 조합되는 경우 동적 범위는 현저하게 향상되었다.
- [0037] 도 17은 본 발명의 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트에 대한 품질 조절 절차를 도시한다. (a) 다양한 GO-올리고뉴클레오티드 분획의 마이크로어레이 스폿팅(spotting) 패턴이 도시되어 있다. (b) Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨쥬게이션된 항체가 분획 13-15에서 GO-올리고뉴클레오티드에 대해 가장 높은 결합 특이성을 지녔다.
- [0038] 도 18은 글루코오스 옥시다아제 (GO)-올리고뉴클레오티드에 하이브리드된 Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨쥬게이션된 항-EGFR 항체, HRP-컨쥬게이션된 항-인산화 EGFR 항체, 및 고체 지지체 상에 고정된 EGFR 포획 항체를 포함하는 다중 인산화 EGFR 복합체의 형성을 도시한다.
- [0039] 도 19는 전체 EGFR 및 인산화 EGFR의 동시 검출을 도시한다. (a) 10,000개의 세포에 존재하는 전체 EGFR은 Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨쥬게이션된 항-EGFR 항체로부터 발생된 Alexa 647 신호에 의해 검출되었다.

EGFR 인산화 정도는 티라미드(tyramide)에 의해 매개되어 증폭된 Alexa 555 신호를 모니터함으로써 검출되었다. (b) 전체 EGFR(t-EGFR)은 10개의 세포만큼 적은 세포로부터의 직접적인 결합 분석에 의해 검출되었고, 인산화된 EGFR(p-EGFR)은 1개의 세포로부터 검출되었다. $10e^5$ p-EGFR 분자는 근접 신호 증폭 방법을 이용하여 검출되었다. p-EGFR의 검출 한도는 근접 분석 포맷을 이용함으로써 100배 이상 증가되었다.

[0040] **발명의 상세한 설명**

[0041] **I. 서문**

[0042] 본 발명은 항체-기반 어레이 분석 시스템을 이용하여 희귀 순환 세포에서 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 검출하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 다중 고속 처리 면역분석법은 1개의 세포 수준에서 고휘도 종양의 순환 세포에서 하나 이상의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출할 수 있다. 사실, EGFR과 같은 신호 전달 분자는 약 100 켈토몰(zeptomole)의 민감도 및 약 100 켈토몰 내지 약 100 펨토몰(femtomole)의 선형 동적 범위로 검출될 수 있다. 이와 같이, 희귀 순환 세포에서 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태의 단일 세포 검출은 암 예후 및 진단 뿐만 아니라 개인화된 표적 요법의 고안을 촉진시킨다.

[0043] 희귀 순환 세포는 고휘도 종양으로부터 전이되거나 미소전이되는 고휘도 종양의 순환 세포를 포함한다. 순환 종양 세포, 암 줄기 세포, 및 종양으로 이동되는 세포(예를들어, 화학유인으로 인한), 예를들어 순환 내피 전구세포, 순환 내피 세포, 순환 전혈관형성(pro-angiogenic) 골수 세포, 및 순환 수지상 세포가 고휘도 종양의 순환 세포의 몇몇 예이다.

[0044] 관심 신호 전달 분자는 통상적으로 순환 세포의 정위(*in situ*) 활성화 상태를 보존하기 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(문헌[Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)] 참조).

[0045] 본원에서 보다 상세히 설명되는 바와 같이, 개별적 환자에 대한 잠재적인 항암 치료를 평가하기 위해, 분리된 세포는 다양한 용량의 하나 이상의 항암 약물과 함께 인큐베이션될 수 있다. 이후, 성장 인자 자극은 수분(예를들어, 약 1-5분) 또는 수시간(예를들어, 약 1-6시간) 동안 수행될 수 있다. 항암 약물을 이용하거나 이용하지 않은 신호전달 경로의 차별적 활성화는 각각의 개별적 환자에 대한 적절한 용량의 적절한 암 치료제의 선택을 도울 수 있다. 순환 세포는 또한 항암 약물 치료 동안 환자의 샘플로부터 분리될 수 있고, 치료에서 변화가 이루어져야 하는 지의 여부를 결정하기 위해 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 자극될 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 방법은 각각의 환자에 대해 정확한 시간에서 정확한 용량으로 정확한 항암 약물을 제공하는데 있어서 임상의를 유리하게 돕는다.

[0046] **II. 정의**

[0047] 본원에서 사용되는 하기 용어는 달리 언급되지 않는 경우 이들이 속하는 의미를 지닌다.

[0048] 용어 "암"은 이상 세포의 조절되지 않는 성장을 특징으로 하는 질병 부류의 임의의 일원을 포함한다. 상기 용어는 악성, 양성, 연성 조직 또는 고휘도 입을 특징으로 하거나 그렇지 않은 간에 모든 공지된 암 및 신생물 질환, 및 전이전 및 전이후 암을 포함하는 모든 단계 및 등급의 암을 포함한다. 다양한 유형의 암의 예는 폐암(예를들어, 비소세포폐암); 소화기암 및 위장암, 예를들어 직장결장암, 위장관 기질 종양, 위장관 카르시노이드 종양, 결장암, 직장암, 항문암, 담관암, 소장암, 및 복부(위)암; 식도암; 쓸개암; 간암; 췌장암; 맹장암; 유방암; 난소암; 신장암(예를들어, 신세포암); 중추신경계의 암; 피부암; 림프종; 용모막암종; 두경부암; 골원성 육종; 및 혈액암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 사용되는 "종양"은 하나 이상의 암 세포를 포함한다.

[0049] 용어 "분석물"은 존재, 양 및/또는 동일성이 결정되는 임의의 관심 분자, 통상적으로 거대 분자, 예를들어 폴리펩티드를 포함한다. 특정 예에서, 분석물은 고휘도 종양의 순환 세포의 세포 성분, 바람직하게는 신호 전달 분자이다.

[0050] 본원에서 사용되는 용어 "희석 시리즈"는 특정 샘플(예를들어, 세포 용해질) 또는 시약(예를들어, 항체)의 감소하는 농도의 시리즈를 포함한다. 희석 시리즈는 통상적으로 샘플 또는 시약의 출발 농도의 측정량에 희석제(예를들어, 희석 완충용액)를 혼합하여 보다 낮은 농도의 샘플 또는 시약을 생성시키고, 상기 과정을 충분한 수로 반복하여 요망되는 수의 연속 희석물을 수득하는 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 감소 농도의 샘플 또는 시약을 포함하는 희석 시리즈가 생성될 수 있다. 예를들어, 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.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "우수한 동적 범위"는 1개의 세포만큼 적은 수 또는 1000개의 세포만큼 많은 수에서 특정 분석물을 검출하는 본 발명의 분석 능력을 의미한다. 예를들어, 본원에 기재된 면역분석법은 포획 항체 농도의 희석 시리즈를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포(예를들어, 약 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 또는 10,000개의 세포)에서 관심 특정 신호 전달 분자를 유리하게 검출하므로 우수한 동적 범위를 지닌다.

[0052] 용어 "신호 전달 분자" 또는 "신호 전달인자"는 통상적으로 세포의 신호 또는 자극을 세포 내에서의 정연한 순서의 생화학 반응을 포함하는 반응으로 전환시키는 방법을 수행하는 단백질 및 기타 분자를 포함한다. 신호 전달 분자의 예는 수용체 티로신 키나아제, 예를들어 EGFR(예를들어, 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(예를들어, 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, 예를들어 BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, 및 LIMK; 티로신 키나아제 신호전달 캐스케이드(cascade) 성분, 예를들어 Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc(p66), PI3K, Ras(예를들어, 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.

[0053] 본원에서 사용되는 용어 "순환 세포"는 고형 종양으로부터 전이되거나 미소전이된 세포를 포함한다. 순환 세포의 예는 순환 종양 세포, 암 줄기 세포, 및/또는 종양으로 이동하는 세포(예를들어, 순환 내피 전구세포, 순환 내피 세포, 순환 전혈관형성(pro-angiogenic) 골수 세포, 순환 수지상 세포 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0054] 본원에서 사용되는 용어 "샘플"은 환자로 부터 수득된 임의의 생물학적 표본을 포함한다. 샘플은 전혈(whole blood), 혈장, 혈청, 적혈구, 백혈구(예를들어, 말초 혈액 단핵 세포), 타액, 소변, 대변(즉, 배설물), 담(sputum), 기관지 세정 유체, 눈물, 유두 흡입물(nipple aspirate), 림프(예를들어, 림프절의 분포된 종양 세포), 미세침 흡입물, 임의의 기타 신체 유체, 조직 샘플(예를들어, 종양 조직), 예를들어 종양의 생검(예를들어, 침 생검), 및 이들의 세포 추출물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 몇몇 구체에 있어서, 샘플은 전혈 또는 이의 분획 성분, 예를들어 혈장, 혈청 또는 세포 펠렛(pellet)이다. 바람직한 구체에 있어서, 샘플은 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여 전혈 또는 이의 세포 분획으로부터 고형 종양의 순환 세포를 분리시키고, 순환 세포의 세포 추출물을 제조함으로써 수득된다. 다른 구체에 있어서, 샘플은 예를들어 폐, 결장 또는 직장의 고형 종양으로부터의 포르말린 고정 파라핀 포매(formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 종양 조직 샘플이다.

[0055] 용어 "피검체" 또는 "환자"는 통상적으로 인간을 포함하나, 기타 영장류, 설치류, 개과, 고양이과, 말과, 양과, 돼지 등과 같은 기타 동물을 또한 포함한다.

[0056] "어레이" 또는 "마이크로어레이"는 고체 지지체, 예를들어 유리(예를들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드(예를들어, 자기 비드, 폴리스티렌 비드 등), 종이, 막(예를들어, 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(예를들어, 이온 결합, 소수성 상호작용, 수소 결합, 반데르발스 힘, 쌍극자-쌍극자 결합)을 통해 고체 지지체 상에 고착되거나 고정된다. 특정 예에서, 포획 항체는 고체 지지체에 결합된 포획 작용제와 상호작용하는 포획 태그(tag)를 포함한다. 본 발명의 분석에 사용되는 어레이는 통상적으로 다양한 공지된/어드레싱 가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링되는 다수의 다양한 포획 항체 및/또는 포획 항체 농축물을 포함한다.

[0057] 용어 "포획 항체"는 고형 종양의 순환 세포의 세포 추출물과 같은 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석물에 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.

[0058] 본원에서 사용되는 용어 "검출 항체"는 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석물에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출가능한 표지를 포함하는 항체를 포함한다. 용어는 또한 하나 이상의 관심 분석물에 특이적인 항체를 포함하며, 상기 항체는 검출가능한 표지를 포함하는 또 다른 종에 의해 결합될 수 있다. 검출가능한 표지의 예는 비오틴/스트렙타비딘 표지, 핵산(예를들어, 올리고뉴클레오티드) 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 테크놀로지스(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.

[0059] 용어 "활성화 상태-의존 항체"는 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석물의 특정 활성화 상태에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출 항체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 활성화 상태-의존 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자와 같은 하나 이상의 분석물의 인산화, 유비퀴틴화 및/또는 복합체 형성을 검출한다. 몇몇 구체예에서, 수용체 티로신 키나아제의 EGFR 패밀리의 일원의 인산화 및/또는 EGFR 패밀리의 일원 사이의 이종이합체 복합체의 형성이 활성화 상태-의존 항체를 이용하여 검출된다. 활성화 상태-의존 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:트렁케이션(truncation)된 (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); Tie1(p-Tie1); 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(p-mTor(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.

[0060] 용어 "활성화 상태-비의존 항체"는 활성화 상태와는 상관 없이 샘플 내의 하나 이상의 관심 분석물에 특이적(즉, 이러한 분석물에 결합하거나, 이에 의해 결합되거나, 이와 함께 복합체를 형성함)인 검출 항체를 포함한다. 예를들어, 활성화 상태-비의존 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자와 같은 하나 이상의 분석물의 인산화된 형태 및 인산화되지 않은 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.

[0061] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이들의 중합체, 예를들어 DNA 및 RNA를 포함한다. 핵산은 합성, 천연 발생 및 비-천연 발생의 공지된 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 골격 잔기 또는 결합을 포함하는 핵산을 포함하며, 이는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 지닌다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드, 및 펩티드-핵산(PNA)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특별히 제한하지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 지니는 천연 뉴클레오티드의 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.

- [0062] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 RNA, DNA, RNA/DNA 하이브리드의 단일 가닥 올리고머 또는 폴리머, 및/또는 이의 모방체(mimetic)를 의미한다. 특정 예에서, 올리고뉴클레오티드는 천연 발생(즉, 비변형) 핵염기, 당 및 뉴클레오시드간(골격) 결합으로 구성된다. 특정 기타 예에서, 올리고뉴클레오티드는 변형된 핵염기, 당 및/또는 뉴클레오시드간 결합을 포함한다.
- [0063] 본원에서 사용되는 용어 "미스매치 모티프" 또는 "미스매치 영역"은 상보적 서열과 100% 상보성을 지니지 않는 올리고뉴클레오티드의 부분을 의미한다. 올리고뉴클레오티드는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 미스매치 영역을 지닐 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.
- [0064] 구문 "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_m 은 평형에서 표적에 상보적인 프로브의 50%가 표적 서열에 하이브리드(규정된 이온 강도, pH 및 핵 농도하에서)되는 온도이다(표적 서열은 T_m 에서 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.
- [0065] 두개 이상의 핵산과 관련된 용어 "실질적으로 동일한" 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.
- [0066] 용어 "인큐베이션시킴"은 "접촉시킴" 및 "노출시킴"과 유의하게 사용되고, 달리 지시되지 않는 경우 임의의 특정 시간 또는 온도 필요조건을 수반하지 않는다.
- [0067] **III. 구체예의 기재**
- [0068] 본 발명은 희귀 순환 세포에서 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태 및/또는 전체량을 검출하기 위한 항체-기반 어레이, 및 개인화되고 표적화된 치료의 암 예후 및 진단 및 고안을 촉진하기 위한 상기 어레이의 사용 방법을 제공한다.
- [0069] **A. 항체 어레이**
- [0070] 한 양태에서, 본 발명은 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 우수한 동적 범위를 지니는 어레이를 제공하며, 상기 포획 항체는 고체 지지체 상에 고정된다.
- [0071] 몇몇 구체예에서, 세포 추출물은 고형 종양의 순환 세포의 추출물을 포함한다. 순환 세포는, 예를들어 면역자기 분리(예를들어, 문헌[Racila *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth *et al.*, *Int. J. Cancer*, 92:577-582 (2001)] 참조), 미세유체 분리(예를들어, 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(예를들어, 문헌[Mancuso *et al.*, *Blood*, 97:3658-3661 (2001)] 참조), 밀도 구배 원심분리(예를들어, 문헌[Baker *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:4865-4871 (2003)] 참조) 및 감소 방법(depletion method)(예를들어, 문헌[Meye *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 21:521-530 (2002)] 참조)을 포함하는 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 통상적으로 분리된다.
- [0072] 다른 구체예에서, 환자의 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 담, 기관지 세정 유체, 눈물, 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, 및/또는 고형 종양의 순환 세포, 예를들어 순환 종양 세포(CTC), 순환 내피 세포(CEC), 순환 내피 전구세포(CEPC), 암 줄기 세포(CSC), 및 이들의 조합물을 함유한다. 일반적으로 혈장 또는 혈청 분획은 특히 고형 종양의 순환 세포에 의해 방출되는 핵산(예를들어, DNA, RNA) 및 단백질을 함유한다.

[0073] 몇몇 예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 관심 항암 약물과의 인큐베이션 전, 인큐베이션 동안, 및/또는 인큐베이션 후에 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 시험관 내에서 자극될 수 있다. 자극 성장 인자는 상피 성장 인자(EGF), 헤레귤린(herregulin)(HRG), TGF- α , PIGF, 안지오펜터틴(angiopoietin)(Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, 사이토카인 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 기타 예에서, 분리된 순환 세포는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여, 예를들어 성장 인자 자극 및/또는 항암 약물 치료 후에 용해되어 세포 추출물(예를들어, 세포 용해질)이 생성될 수 있다. 바람직하게는, 세포 용해는 성장 인자 자극후 약 1 내지 360분 사이, 더욱 바람직하게는 (1) 성장 인자 자극후 약 1 내지 5분; 및 (2) 성장 인자 자극후 약 30 내지 180분의 두개의 상이한 시간 간격으로 개시된다. 대안적으로, 세포 용해질은 사용때까지 -80°C에서 저장될 수 있다.

[0074] 특정 구체예에서, 항암 약물은 항-신호전달체(즉, 세포증식억제 약물), 예를들어 모노클로날 항체 또는 티로신 키나아제 억제제; 항증식제; 화학요법제(즉, 세포독성 약물); 및/또는 이상 세포, 예를들어 암세포의 조절되지 않는 성장을 감소시키거나 폐기시키는 능력을 지닌 임의의 기타 화합물을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 화학요법제와 조합된 항-신호전달 작용제 및/또는 항-증식 작용제로 처리된다.

[0075] 본 발명에 사용하기에 적합한 항-신호전달 작용제의 예는 모노클로날 항체, 예를들어 트라스투주맙(trastuzumab)(Herceptin[®]), 알렘투주맙(alemtuzumab)(Campath[®]), 베바시주맙(bevacizumab)(Avastin[®]), 세툽시맙(cetuximab)(Erbix[®]), 겐투주맙(gemtuzumab)(Mylotarg[®]), 파니투무맙(panitumumab)(Vectibix[™]), 리툽시맙(rituximab)(Rituxan[®]), 및 토시투모맙(tositumomab)(BEXXAR[®]); 티로신 키나아제 억제제, 예를들어 게피티니브(gefitinib)(Iressa[®]), 수니티니브(sunitinib)(Sutent[®]), 에를로티니브(erlotinib)(Tarceva[®]), 라파티니브(lapatinib)(GW-572016), 카네르티니브(canertinib)(CI1033), 세막시니브(semaxinib)(SU5416), 바탈라니브(vatalanib)(PTK787/ZK222584), 소라페니브(sorafenib)(BAY 43-9006; Nexavar[®]), 이마티니브 메실레이트(imatinib mesylate)(Gleevec[®]), 및 레플루노미드(leflunomide)(SU101); 및 이들의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] 예시적 항-증식 작용제는 mTOR 억제제, 예를들어 시롤리무스(sirolimus)(rapamycin), 템시롤리무스(temsirolimus)(CCI-779), 및 에베롤리무스(everolimus)(RAD001); Akt 억제제, 예를들어 1L6-히드록시메틸-카이로(chiro)-이노시톨-2-(R)-2-O-메틸-3-O-옥타데실-sn-글리세로카르보네이트, 9-메톡시-2-메틸엘립티시늄(methylellipticinium) 아세테이트, 1,3-디히드로-1-(1-((4-(6-페닐-1H-이미다조[4,5-g]퀴놀살린-7-일)페닐)메틸)-4-피페리디닐)-2H-벤즈이미다졸-2-온, 10-(4'-(N-디에틸아미노)부틸)-2-클로로페녹사진, 3-포르밀크로몬 티오세미카르바존(Cu(II)Cl₂ 복합체), API-2, 원종양 유전자 TCL1의 아미노산 10-24로부터 유래된 15-머(mer) 펩티드(문헌[Hirumura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004)], 및 문헌[Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) and Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003)]에 기재된 화합물, KP372-1); 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0077] 화학요법제의 비제한적인 예는 백금-기반 약물(예를들어, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 스피로플라틴(spiroplatin), 이프로플라틴(iproplatin), 사트라플라틴(satraplatin) 등), 알킬화제(예를들어, 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 클로람부실(chlorambucil), 부숴판(busulfan), 멜팔란(melphalan), 메클로르에타민(mechlorethamine), 우라무스틴(uramustine), 티오테파(thiotepa), 니트로소우레아 등), 항대사물질(예를들어, 5-플루오로우라실, 아자티오프린(azathioprine), 6-머캅토피린, 메토티렉세이트, 류코보린, 카페시타빈(capecitabine), 시타라빈(cytarabine), 플록스우리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 페메트렉세드(pemetrexed), 랄티트렉세드(raltitrexed) 등), 식물 알칼로이드(예를들어, 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 비노렐빈(vinorelbine), 빈데신(vindesine), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel) 등), 국소이성화효소 억제제(예를들어, 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan), 암사크린(amsacrine), 에토포시드(etoposide)(VP 16), 에토포시드 포스페이트, 테니포시드

(teniposide) 등), 항종양 항생제(예를들어, 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.

[0078] 바람직한 구체예에서, 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물은 다수의 신호 전달 분자를 포함한다. 관심 신호 전달 분자의 예는 상기 기재되어 있으며, 이는 수용체 티로신 키나아제, 비-수용체 티로신 키나아제, 및/또는 티로신 키나아제 신호전달 캐스케이드 성분을 포함한다.

[0079] 몇몇 구체예에서, 포획 항체의 각각의 희석 시리즈는 감소하는 포획 항체 농도의 시리즈를 포함한다. 특정 예에서, 포획 항체는 2배 이상(예를들어, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 또는 1000배)으로 연속적으로 희석되어, 어레이로 스포팅(spotting)되는 감소하는 포획 항체 농도의 세트 수(예를들어, 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 스포팅된다.

[0080] 다른 구체예에서, 고체 지지체는 유리(예를들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막(예를들어, 나일론, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 등), 섬유 다발, 또는 임의의 기타 적절한 물질을 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, 포획 항체는 와트만 인코퍼레이티드(Whatman Inc.)(Florham Park, NJ)사에서 시판되는 FAST® 슬라이드와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드 상에 고정(예를들어, 공유 또는 비공유 상호작용을 포함)된다.

[0081] 비제한적인 예로서, 도 14는 각각의 희석 시리즈 내의 포획 항체가 EGFR, HER2, Shc, Erk 및 PI3K의 분석물 중 하나에 특이적인, EGFR, HER2, Shc, Erk 및 PI3K의 활성화 상태를 결정하기 위한 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 포함하는 어드레싱 가능 마이크로어레이를 도시한다. 따라서, 본 발명의 어레이는 감소하는 농도의 시리즈(즉, 연속 희석물) 중에 다수의 다양한 포획 항체를 포함하고, 이러한 포획 항체는 다양한 어드레싱 가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링된다.

[0082] 당업자는 어레이가 검출되는 활성화된 신호 전달 분자의 각각에 대한 별개의 신호를 가능케 하는 임의의 형태일 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를들어, 어레이는 지지체 표면 상의 별개의 영역의 선 또는 격자(예를들어, 도트(dot) 또는 스폿(spot))일 수 있으며, 각각의 영역은 다양한 포획 항체 또는 포획 작용제(즉, 포획 항체 상에 존재하는 포획 태그의 결합을 위한 것임)를 함유한다. 어레이는 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태가 단일한 다중 분석으로 검출되는 방법에 사용되도록 형성될 수 있다. 다양한 구체예에서, 상기 다수는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 이 이상의 신호 전달 분자를 포함한다.

[0083] **B. 신호 검출 분석**

[0084] 또 다른 양태에서, 고품 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포의 세포 추출물 내의 특정 관심 분석물의 활성화 상태를 검출하기 위한 분석은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 단일 검출(즉, 2-항체) 분석법이다. 비제한적인 예로서, 상기 분석에 사용되는 2개의 항체는 (1) 분석물에 특이적인 포획 항체; 및 (2) 분석물의 활성화된 형태에 특이적인 검출 항체(즉, 활성화 상태-의존 항체)를 포함할 수 있다. 활성화 상태-의존 항체는, 예를들어 분석물의 인산화, 유비퀴틴화, 및/또는 복합체 형성 상태를 검출할 수 있다. 대안적으로, 검출 항체는 세포 추출물 내의 분석물의 전체량을 검출하는 활성화 상태-비의존 항체를 포함한다. 활성화 상태-비의존 항체는 일반적으로 분석물의 활성화된 형태 및 비활성화된 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.

[0085] 한 바람직한 양태에서, 본 발명은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 면역분석을 수행하기 위한 방법을 제공하며, 이러한 방법은,

[0086] (a) 세포 추출물과, 고체 지지체 상에 고정된 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 인큐베이션시켜 다수의 포획 분석물을 형성시키는 단계;

[0087] (b) 다수의 포획 분석물과, 대응 분석물에 특이적인 검출 항체를 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 포획 분석물을 형성시키는 단계;

[0088] (c) 다수의 검출가능한 포획 분석물과 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원을 인큐베이션시켜 증폭된 신호를 발생시키는 단계; 및

[0089] (d) 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 증폭된 신호를 검출하는 단계를 포함한다.

- [0090] 몇몇 구체예에서, 세포 추출물은 고품 종양의 순환 세포의 추출물을 포함한다. 통상적으로, 순환 세포는, 예를 들어 면역자기 분리, 미세유체 분리, FACS, 밀도 구배 원심분리, 및 감소 방법을 포함하는 당 분야에 공지된 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 분리된다. 당업자는 순환 세포의 분리 및/또는 단리에 적합한 기타 방법을 인지할 것이다.
- [0091] 다른 구체예에서, 환자의 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 담, 기관지 세정 유체, 눈물, 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, 및/또는 고품 종양의 순환 세포, 예를 들어 CTC, CEC, CEPC 및/또는 CSC를 함유한다. 일반적으로 혈장 또는 혈청 분획은 특히 고품 종양의 순환 세포에 의해 방출되는 핵산(예를 들어, DNA, RNA) 및 단백질을 함유한다.
- [0092] 몇몇 예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 관심 항암 약물과의 인큐베이션 전, 인큐베이션 동안, 및/또는 인큐베이션 후에 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 시험관 내에서 자극될 수 있다. 자극 성장 인자는 상기에 기재되어 있다. 다른 예에서, 분리된 순환 세포는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여, 예를 들어 성장 인자 자극 및/또는 항암 약물 치료 후에 용해되어 세포 추출물(예를 들어, 세포 용해질)이 생성될 수 있다. 바람직하게는, 세포 용해는 성장 인자 자극후 약 1 내지 360분 사이, 더욱 바람직하게는 (1) 성장 인자 자극후 약 1 내지 5분; 및 (2) 성장 인자 자극후 약 30 내지 180분의 두개의 상이한 시간 간격으로 개시된다. 대안적으로, 세포 용해질은 사용때까지 -80°C에서 저장될 수 있다.
- [0093] 특정 구체예에서, 항암 약물은 항-신호전달 작용제(예를 들어, 모노클로날 항체, 티로신 키나아제 억제제 등), 항증식제, 화학요법제, 및/또는 암세포와 같은 이상 세포의 조절되지 않는 성장을 감소시키거나 폐기시키는 능력을 지닌 임의의 기타 화합물을 포함한다. 상기 일반적 부류의 치료제에 속하는 특정 항암 약물의 예는 상기 제공되어 있다.
- [0094] 바람직한 구체예에서, 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물은 다수의 신호 전달 분자를 포함한다. 관심 신호 전달 분자의 예는 상기 기재되어 있으며, 이는 수용체 티로신 키나아제, 비-수용체 티로신 키나아제 및/또는 티로신 키나아제 신호전달 캐스케이드 성분을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0095] 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)로 연속적으로 희석되어, 어레이로 스포팅되는 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 어레이에 스포팅된다.
- [0096] 다른 구체예에서, 고체 지지체는 유리(예를 들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막(예를 들어, 나일론, 니트로셀룰로오스, PVDF 등), 섬유 다발, 또는 임의의 기타 적절한 물질을 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, 포획 항체는 FAST® 슬라이드(Whatman Inc.; Florham Park, NJ)와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드 상에 고정된다.
- [0097] 특정 예에서, 세포 추출물은 고체 지지체 상에 이미 고정된 포획 항체와 함께 인큐베이션된다. 특정 기타 예에서, 세포 추출물은 먼저 용액 중에서 포획 항체와 함께 인큐베이션된 후, 고체 지지체와 접촉되어, 예를 들어 고체 지지체에 결합된 포획 작용제와 상호작용하는 포획 항체 상에 존재하는 포획 태그를 통해 포획 분석물이 고정된다.
- [0098] 몇몇 구체예에서, 검출 항체는 용액 중에서 포획 항체에 결합되거나 고체 지지체 상에 고정된 분석물과 함께 인큐베이션된다. 특정 예에서, 다수의 분석물을 포함하는 세포 추출물은 먼저 용액 중에서 검출 항체와 함께 인큐베이션된 후, 용액 중 또는 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체와 접촉된다. 특정 기타 예에서, 다수의 분석물을 포함하는 세포 추출물은 먼저 용액 중의 포획 항체 및 검출 항체와 함께 인큐베이션된 후, 고체 지지체와 접촉되어, 예를 들어 고체 지지체에 결합된 포획 작용제와 상호작용하는 포획 항체 또는 검출 항체 상에 존재하는 포획 태그를 통해 항체-분석물 복합체가 고정된다.
- [0099] 특정 예에서, 검출 항체는 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물의 전체량을 검출하는데 유용한 활성화 상태-비의존 항체를 포함한다. 비제한적인 예로서, 활성화 상태-비의존 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자의 인산화된 형태 및 인산화되지 않은 형태 둘 모두를 검출할 수 있다. 특정 기타 예에서, 검출 항체는 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물의 활성화 상태를 검출하는데 유용한 활성화 상태-의존 항체를 포함한다. 바람직하게는, 활성화 상태-의존 항체는 하나 이상의 신호 전달 분자의 인산화, 유비퀴틴화, 및/또는 복합체 형성 상태를 검출

한다.

- [0100] 포획 항체 및 검출 항체는 통상적으로 분석물 결합과 관련하여 항체 사이의 경쟁을 최소화하도록 선택된다(즉, 포획 항체 및 검출 항체 둘 모두는 이들의 대응 신호 전달 분자에 동시에 결합할 수 있다).
- [0101] 한 바람직한 구체예에서, 검출 항체는 결합쌍의 제 1 일원(예를들어, 비오틴)을 포함하고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 결합쌍의 제 2 일원(예를들어, 스트렙타비딘)을 포함한다. 결합쌍 일원은 당 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(예를들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP), 카탈라아제, 클로로퍼옥시다아제, 시토크롬 c 퍼옥시다아제, 호산구 퍼옥시다아제, 글루타티온 퍼옥시다아제, 락토퍼옥시다아제, 미엘로퍼옥시다아제, 갑상선 퍼옥시다아제, 탈이온효소 등)이고, 신호 증폭쌍의 제 2 일원은 티라미드(tyramide) 시약(예를들어, 비오틴-티라미드)이다. 이러한 예에서, 증폭된 신호는 티라미드 시약의 퍼옥시다아제 산화에 의해 생성되어, 과산화수소(H₂O₂)의 존재하에서 활성화된 티라미드가 생성된다.
- [0102] 활성화된 티라미드는 직접 검출되거나, 신호-검출 시약, 예를들어 스트렙타비딘-표지된 형광단 또는 스트렙타비딘-표지된 퍼옥시다아제와 발색(chromogenic) 시약의 조합물의 첨가 후에 검출된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 형광단의 예는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor[®]) 염료(예를들어, Alexa Fluor[®] 555), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon Green[™]); 로다민(rhodamine), 텍사스 레드(Texas red), 테트라로다민 이소티오시아네이트(tetrarhodamine isothiocyanate, TRITC), CyDye[™] 플루오르(예를들어, Cy2, Cy3, Cy5) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 스트렙타비딘 표지는 당 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 포르피리노젠을 포함한다.
- [0103] 당업자는 항체가 아닌 결합 파트너가 본원에 기재된 단일 검출 분석법에 따라 세포 추출물로부터 하나 이상의 분석물을 고정시키고/시키거나 검출하기 위해 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 이러한 결합 파트너의 비제한적인 예는 분석물의 리간드 또는 수용체, 분석물의 기질, 결합 도메인(예를들어, PTB, SH2 등), 앵타머(aptamer) 등을 포함한다.
- [0104] **C. 근접 이중 검출 분석**
- [0105] 또 다른 양태에서, 고휘도 종양의 순환 세포와 같은 종양 세포의 세포 추출물 내의 특정 관심 분석물의 활성화 상태를 검출하기 위한 분석법은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 근접(즉, 3-항체) 분석법이다. 비제한적인 예로서, 근접 분석법에 사용되는 3개의 항체는 (1) 분석물에 특이적인 포획 항체; (2) 분석물의 활성화된 형태에 특이적인 검출 항체(즉, 활성화 상태-의존 항체); 및 (3) 분석물의 전체량을 검출하는 검출 항체(즉, 활성화 상태-비의존 항체)를 포함할 수 있다. 활성화 상태-의존 항체는, 예를들어 분석물의 인산화, 유비퀴틴화, 및/또는 복합체 형성 상태를 검출할 수 있다. 활성화 상태-의존 항체는 일반적으로 분석물의 활성화된 형태 및 활성화되지 않은 형태 둘 모두를 검출할 수 있다.
- [0106] 한 바람직한 양태에서, 본 발명은 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 면역분석법을 수행하기 위한 방법을 제공하고, 이러한 방법은,
- [0107] (a) 세포 추출물과, 고체 지지체 상에 고정된 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물에 특이적인 포획 항체의 다수의 희석 시리즈를 인큐베이션시켜 다수의 포획 분석물을 형성시키는 단계;
- [0108] (b) 포획 분석물과, 대응 분석물에 특이적인 검출 항체를 인큐베이션시켜 다수의 검출가능한 포획 분석물을 형성시키는 단계로서, 상기 검출 항체가 (1) 촉진 부분으로 표지된 다수의 활성화 상태-비의존 항체, 및 (2) 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 표지된 다수의 활성화 상태-의존 항체를 포함하고, 상기 촉진 부분이 상기 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 보내져서 이와 반응하는 산화제를 발생시키는 단계;
- [0109] (c) 다수의 검출가능한 포획 분석물과 신호 증폭쌍의 제 2 일원을 인큐베이션시켜 증폭된 신호를 발생시키는 단계; 및
- [0110] (d) 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원으로부터 발생된 증폭 신호를 검출하는 단계를 포함한다.

- [0111] 도 1은 분석물이 하나의 포획 항체 및 두개의 검출 항체(즉, 활성화 상태-비의존 항체 및 활성화 상태-의존 항체)에 결합된 예시적인 근접 분석법을 도시한다. 포획 항체(1) 및 활성화 상태-비의존 항체(2)는 각각 분석물의 활성화 상태와 상관 없이 분석물(6)에 결합한다. 활성화 상태-의존 항체(3)는 분석물의 활성화 상태에 의존하여 분석물에 결합한다(예를들어, 활성화 상태-의존 항체는 인산화된 잔기를 지니는 분석물의 활성화된 형태에만 결합할 것이다). 활성화 상태-비의존 항체는 촉진 부분(M1으로 명명됨, 4)으로 표지되고, 활성화 상태-의존 항체는 신호 증폭쌍의 제 1 일원(M2로 명명됨, 5)으로 표지된다. 분석물에 대한 둘 모두의 검출 항체의 결합은 촉진 부분에 의해 발생된 신호가 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 전달되어 검출 및/또는 증폭 신호를 발생시킬 수 있도록, 신호 증폭쌍의 제 1 일원에 충분히 근접(점선(7) 내의 영역에 의해 표시됨)한 범위 내에 촉진 부분을 채널링시킨다. 근접 채널링(channeling)을 위한 다양한 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 이는 예를들어 FRET, 시간-분해 형광(time-resolved fluorescence)-FRET, LOCI 등을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 근접 채널링의 장점은 모든 3개의 항체에 분석물이 결합되는 경우에만 단일한 검출가능한 신호가 발생되어, 증가된 분석 특이성, 낮은 백그라운드 및 간소화된 검출을 발생시킨다는 점이다.
- [0112] 몇몇 구체예에서, 세포 추출물은 고휘 종양의 순환 세포의 추출물을 포함한다. 통상적으로, 순환 세포는, 예를 들어 면역자기 분리, 미세유체 분리, FACS, 밀도 구배 원심분리 및 감소 방법을 포함하는 당 분야에 공지된 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 분리된다.
- [0113] 다른 구체예에서, 환자의 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 담, 기관지 세정 유체, 눈물, 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, 및/또는 고휘 종양의 순환 세포, 예를들어 CTC, CEC, CEPC, 및/또는 CSC를 함유한다. 일반적으로 혈장 또는 혈청 분획은 특히 고휘 종양의 순환 세포에 의해 방출되는 핵산(예를들어, DNA, RNA) 및 단백질을 함유한다.
- [0114] 몇몇 예에서, 분리된 순환 세포는 하나 이상의 관심 항암 약물과의 인큐베이션 전, 인큐베이션 동안, 및/또는 인큐베이션 후에 하나 이상의 성장 인자를 이용하여 시험관 내에서 자극될 수 있다. 자극 성장 인자는 상기 기재되어 있다. 기타 예에서, 분리된 순환 세포는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 이용하여, 예를들어 성장 인자 자극 및/또는 항암 약물 치료 후에 용해되어 세포 추출물(예를들어, 세포 용해질)이 생성될 수 있다. 바람직하게는, 세포 용해는 성장 인자 자극후 약 1 내지 360분 사이, 더욱 바람직하게는 (1) 성장 인자 자극후 약 1 내지 5분; 및 (2) 성장 인자 자극후 약 30 내지 180분의 두개의 상이한 시간 간격으로 개시된다. 대안적으로, 세포 용해질은 사용때까지 -80°C에서 저장될 수 있다.
- [0115] 특정 구체예에서, 항암 약물은 항-신호전달제(예를들어, 모노클로날 항체, 티로신 키나아제 억제제 등), 항증식제, 화학요법제, 및/또는 이상 세포, 예를들어 암세포의 조절되지 않는 성장을 감소시키거나 폐기시키는 능력을 지닌 임의의 기타 화합물을 포함한다. 상기 일반적인 부류의 치료제에 해당하는 특정 항암 약물의 예는 상기 제공되어 있다.
- [0116] 바람직한 구체예에서, 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물은 다수의 신호 전달 분자를 포함한다. 관심 신호 전달 분자의 예는 상기 기재되어 있으며, 이는 수용체 티로신 키나아제, 비수용체 티로신 키나아제, 및/또는 티로신 키나아제 신호전달 캐스케이드 성분을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0117] 몇몇 구체예에서, 포획 항체의 각각의 희석 시리즈는 감소하는 포획 항체 농도의 시리즈를 포함한다. 특정 예에서, 포획 항체는 2배 이상(예를들어, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 또는 1000배)으로 연속적으로 희석되어, 어레이로 스폿팅(spottting)되는 감소하는 포획 항체 농도의 세트 수(예를들어, 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.
- [0118] 다른 구체예에서, 고체 지지체는 유리(예를들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드, 종이, 막(예를들어, 나일론, 니트로셀룰로오스, PVDF 등), 섬유 다발, 또는 임의의 기타 적절한 물질을 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, 포획 항체는 FAST® 슬라이드(Whatman Inc.; Florham Park, NJ)와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드 상에 고정된다.
- [0119] 특정 예에서, 세포 추출물은 고체 지지체 상에 이미 고정된 포획 항체와 함께 인큐베이션된다. 특정 기타 예에서, 세포 추출물은 먼저 용액 중에서 포획 항체와 인큐베이션된 후, 고체 지지체와 접촉되어, 예를들어 고체 지지체에 결합된 포획 작용제와 상호작용하는 포획 항체에 존재하는 포획 태그를 통해 포획 분석물이 고정된다.
- [0120] 몇몇 구체예에서, 검출 항체는 용액 중 또는 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체에 결합된 분석물과 함께 인큐

베이션된다. 특정 예에서, 다수의 분석물을 포함하는 세포 추출물은 먼저 용액 중에서 검출 항체와 인큐베이션된 후, 용액 중 또는 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체와 접촉된다. 특정 기타 예에서, 다수의 분석물을 포함하는 세포 추출물은 먼저 용액 중에서 포획 항체 및 검출 항체와 인큐베이션된 후, 고체 지지체와 접촉되어, 예를들어 고체 지지체에 결합된 포획 작용제와 상호작용하는 포획 항체 또는 검출 항체에 존재하는 포획 태그를 통해 항체-분석물 복합체가 고정된다. 검출 단계 전, 복합체를 형성하지 않은 항체를 제거하기 위해 고정된 복합체가 세척될 수 있고, 세척된 복합체는 지지체 표면으로부터 연속적으로 방출될 수 있으며, 분석되는 분석물의 각각에 대한 근접 채널링은 본원에 기재된 적절한 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0121] 지지체 표면이 어레이에 고정된 포획 작용제를 포함하는 구체예에서, 인큐베이션 단계는 반응을 완료시키기 위해 과량의 모든 3개의 항체를 이용하여, 용액 중의 다수의 분석물을 포함하는 세포 추출물과 포획 항체 및 검출 항체를 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법의 한 변형에서, 생성된 항체-분석물 복합체는 고체상에 부착되고, 결합되지 않은 항체를 제거하기 위해 세척된다. 도 2를 참조하면, 포획 항체(1)는 포획 태그(10)를 포함할 수 있다. 복합체는 고체상(12)에 부착되고 포획 태그에 결합된 포획 작용제(11)를 통해 고체상(12)에 부착됨으로써, 복합체가 고정된다. 고정된 복합체는 적절한 완충제로 세척된 후, 방출 작용제(13)의 첨가에 의해 고체상으로부터 방출된다. 방출 작용제는 세척된 복합체의 방출을 발생시키는 임의의 메커니즘에 의해 작용할 수 있다. 한 구체예에서, 포획 태그는 방출 작용제에 의해 인지되고 분열되는 분열가능한 부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 도 2에 도시된 바와 같이, 방출 작용제는 포획 작용제로의 결합에 대해 포획 태그와 경쟁한다. 예를들어, 포획 작용제는 포획 항체에 부착된 부분적으로 상보적인 올리고뉴클레오티드(즉, 포획 태그)와 하이브리드되는 제 1 올리고뉴클레오티드일 수 있고; 방출 작용제는 포획 작용제에 완전히 상보적인 올리고뉴클레오티드일 수 있어, 이는 가닥 치환 및 고체상으로부터 세척된 복합체의 방출을 발생시킨다. 사용될 수 있는 적절한 포획 태그/포획 작용제/방출 작용제의 기타 예는 2,4-디니트로페놀(DNP)/항-DNP 항체/2,4-DNP 리신; T2/항-T3 항체/T3; 우아바인(ouabain)/항-디곡신 항체/디곡신; 및 데티오비오티ن/스트렙타비딘/비오티를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다(예를들어, 문헌[Ishikawa *et al.*, *J. Clin. Lab Anal.*, 12:98-107 (1998)] 참조).

[0122] 세척된 복합체가 고체상으로부터 방출된 후, (1) 포획 항체 상의 포획 태그에 특이적으로 결합하는, 어레이에 고정된 포획 분자를 포함하는 고체 표면과 접촉되거나, (2) 분리되고, 분리된 검출 항체는 검출 항체 상의 포획 태그에 특이적으로 결합하는 포획 작용제를 포함하는 지지체 표면과 접촉된다. 도 2는 세척된 복합체가 분리되고, 분리된 검출 항체가 지지체 표면(14)과 접촉되는 구체예를 도시한다. 지지체 표면은 "어드레싱 가능(addressable)" 또는 "zip 코드(zip code)" 어레이에 고정된 다수의 포획 분자를 포함한다. 어레이의 각각의 별개 영역은 활성화 상태-비의존 검출 항체(2) 또는 활성화 상태-의존 항체(3) 상에 존재하는 포획 태그(8)에 특이적으로 결합하는 독특한 포획 작용제(9)를 포함함으로써, 어레이 내에서 태깅(tagging)된 검출 항체가 고정되고 구성된다. 한 바람직한 구체예에서, 포획 작용제 및 포획 태그는 서로 특이적으로 하이브리드되는 올리고뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드 포획 분자를 포함하는 어드레싱 가능 어레이는 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를들어, 문헌[Keramas *et al.*, *Lab Chip*, 4:152-158 (2004); Delrio-Lafreniere *et al.*, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 48:23-31 (2004)] 참조).

[0123] 어레이의 각각의 별개 영역에서의 검출 항체의 존재는 직접 검출되거나 촉진 부분(M1으로 명명됨, 4) 또는 신호 증폭쌍의 제 1 일원(M2로 명명됨, 5)과 같은 부분을 이용하여 간접적으로 검출될 수 있다. 직접적으로 검출될 수 있는 부분의 예는 형광단, 발색단, 콜로이드 골드(colloidal gold), 착색된 라텍스 등을 포함한다. 한 구체예에서, 둘 모두의 부분은 독립적으로 선택된 형광단이다. 서로 매우 근접하면서 구별가능한 판독을 제공하는 임의의 형광단 쌍, 예를들어 Cy3/Cy5, Cy5/피코에리트린 등이 사용될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드 어드레싱 가능 어레이가 사용되는 경우, 둘 모두의 부분은 다양한 zip 코드로 전달되는 동일한 형광단일 수 있다. 어레이 상에 부착된 형광단 부분을 검출하기 위해 공초점 레이저 주사현미경(Laser scanning confocal microscopy)이 사용될 수 있다. 가닥 치환 분석과 같은 검출 전에 복합체가 어레이로부터 방출되는 분석에서, 형광단 부분을 검출하는데 적합한 방법은 모세관 유동 공초점 레이저 유도 형광(capillary flow confocal laser induced fluorescence), 나노-HPLC, 마이크로-모세관 전기영동(micro-capillary electrophoresis) 등을 포함한다.

[0124] 몇몇 구체예에서, 활성화 상태-비의존 항체는 검출가능한 부분을 추가로 포함한다. 이러한 예에서, 검출가능한 부분의 양은 세포 추출물 내의 하나 이상의 분석물이 양과 상관성이 있다. 검출가능한 부분의 예는 형광 표지, 화학적 반응 표지, 효소 표지, 방사선 표지 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 검출가능한 부분은 형광단, 예를들어 알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 염료(예를들어, Alexa Fluor® 647), 플루오레세인

(fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 오레곤 그린(Oregon Green™); 로다민, 텍사스 레드, 테트라로다민 이소티오시아네이트(TRITC), CyDye™ 플루오르(fluor)(예를들어, Cy2, Cy3, Cy5) 등이다. 검출가능한 부분은 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 활성화 상태-비의존 항체에 직접적 또는 간접적으로 커플링될 수 있다.

[0125] 특정 예에서, 활성화 상태-비의존 항체는 촉진 부분을 이용하여 직접 표지된다. 촉진 부분은 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 활성화 상태-비의존 항체에 커플링될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적절한 촉진 부분은 촉진 부분에 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 부분의 예는 효소, 예를들어 글루코오스 옥시다아제 또는 전자 받개로서 산소 분자(O₂)를 수반하는 산화/환원 반응을 촉매하는 임의의 다른 효소, 및 감광제, 예를들어 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(예를들어, 글루코오스, 광 등)의 존재하에서, 촉진 부분(예를들어, 글루코오스 옥시다아제, 감광제 등)은 두개의 부분이 서로 근접하는 경우 신호 증폭쌍의 제 1 일원(예를들어, 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP), 보호기에 의해 보호된 합텐, 효소 억제제로의 티오에테르 결합에 의해 불활성화된 효소 등)으로 채널링하고 이와 반응하는 산화제(예를들어, 과산화수소(H₂O₂), 단일 산소 등)을 발생시킨다.

[0126] 특정 기타 예에서, 활성화 상태-비의존 항체는 활성화 상태-비의존 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커와 촉진 부분에 컨쥬게이션된 상보적 올리고뉴클레오티드 링커 사이의 하이브리드화를 통해 촉진 부분을 이용하여 간접적으로 표지된다. 올리고뉴클레오티드 링커는 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 촉진 부분에 커플링되거나 활성화 상태-비의존 항체에 커플링될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 촉진 부분에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커는 활성화 상태-비의존 항체에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커에 대해 100% 상보성을 지닌다. 다른 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 링커쌍은, 예를들어 엄격한 하이브리드화 조건하에서의 하이브리드화 후 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 미스매치 영역을 포함한다. 당업자는 다양한 분석물에 특이적인 활성화 상태-비의존 항체가 동일한 올리고뉴클레오티드 링커에 컨쥬게이션되거나 상이한 올리고뉴클레오티드 링커에 컨쥬게이션될 수 있음을 인지할 것이다.

[0127] 촉진 부분 또는 활성화 상태-비의존 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; 기호(signature) 도메인; 및 컨쥬게이션 도메인의 3개의 별개의 연속 도메인을 지니도록 고안될 수 있다. 바람직하게는, 올리고뉴클레오티드 링커는 이들이 컨쥬게이션되는 촉진 부분 또는 활성화 상태-비의존 항체의 기능을 파괴함이 없이 효율적으로 커플링되도록 고안된다.

[0128] 올리고뉴클레오티드 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 5°C 이하이다. 규정된 이온 농도 하에서 용융 온도, 2차 구조 및 헤어핀(hairpin) 구조를 결정하기 위한 컴퓨터 알고리즘(예를들어, OLIGO 6.0)이 각각의 링커 내의 3개의 상이한 도메인의 각각을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 전체 조합된 서열이 또한 다른 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 링커 서열에 대한 이들의 구조적 특성 및 상용성, 예를들어 이들이 엄격한 하이브리드화 조건하에서 상보적인 올리고뉴클레오티드 링커에 하이브리드되는지의 여부에 대해 분석될 수 있다.

[0129] 올리고뉴클레오티드 링커의 스페이스 영역은 올리고뉴클레오티드 가교 부위로부터의 컨쥬게이션 도메인의 적절한 분리를 제공한다. 컨쥬게이션 도메인은 핵산 하이브리드화를 통해 상보적인 올리고뉴클레오티드 링커 서열로 표지된 분자를 컨쥬게이션 도메인으로 연결시키는 기능을 한다. 핵산 매개 하이브리드화는 항체-분석물(즉, 항원) 복합체 형성 전 또는 후에 수행될 수 있고, 이는 보다 유연한 분석 포맷을 제공한다. 많은 직접적인 항체 컨쥬게이션 방법과는 달리, 비교적 작은 올리고뉴클레오티드를 항체 또는 기타 분자에 연결시키는 것은 표적 분석물에 대한 항체의 특정 친화성 또는 컨쥬게이션된 분자의 기능에 최소의 영향을 미친다.

[0130] 몇몇 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 링커의 기호 서열 도메인이 복잡한 다중 단백질 분석에 사용될 수 있다.

다중 항체는 다양한 기호 서열을 지닌 올리고뉴클레오티드 링커로 컨주게이션될 수 있다. 다중 면역분석에서, 적절한 프로브로 표지된 리포터 올리고뉴클레오티드 서열이 다중 분석 포맷에서 항체와 이의 항원 사이의 교차-하이브리드화를 검출하기 위해 사용될 수 있다.

- [0131] 올리고뉴클레오티드 링커는 여러 다양한 방법을 이용하여 항체 또는 기타 분자에 컨주게이션될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 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 올리고뉴클레오티드 링커는 SMCC와 같은 이중작용성(heterobifunctional) 교차 링커를 이용하여 항체 또는 기타 유형의 단백질의 일차 아민에 컨주게이션될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드 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, 올리고뉴클레오티드 링커는 3' 또는 5' 말단 상에서의 비오틴 변형을 이용하여 합성될 수 있고, 스트렙타비딘-표지된 분자에 컨주게이션될 수 있다.
- [0132] 올리고뉴클레오티드 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); and Wincott *et al.*, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997)]에 기재된 바와 같이 당 분야에 공지된 다양한 임의의 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 일반적으로, 올리고뉴클레오티드의 합성은 통상적인 핵산 보호 및 커플링 기, 예를 들어 5'-말단에서의 디메톡시트리틸 및 3'-말단에서의 포스포라미다이트(phosphoramidite)를 이용한다. 올리고뉴클레오티드 합성에 적합한 시약, 핵산 탈보호 방법, 및 핵산 정제 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0133] 특정 예에서, 활성화 상태-의존 항체는 신호 증폭쌍의 제 1 일원으로 직접 표지된다. 신호 증폭쌍 일원은 당 분야에 널리 공지된 방법을 이용하여 활성화 상태-의존 항체에 커플링될 수 있다. 특정 기타 예에서, 활성화 상태-의존 항체는 활성화 상태-의존 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-의존 항체에 커플링될 수 있다. 신호 증폭쌍 일원의 예는 퍼옥시다아제, 예를 들어 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP), 카탈라아제, 클로로퍼옥시다아제, 시토크롬 c 퍼옥시다아제, 호산구 퍼옥시다아제, 글루타티온 퍼옥시다아제, 락토퍼옥시다아제, 미엘로퍼옥시다아제, 갑상선 퍼옥시다아제, 탈이온효소 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 신호 증폭쌍 일원의 기타 예는 보호기에 의해 보호된 함텐 및 효소 억제제로의 티오에테르 결합에 의해 비활성화된 효소를 포함한다.
- [0134] 포획 항체, 활성화 상태-비의존 항체, 및 활성화 상태-의존 항체는 통상적으로 분석물 결합과 관련하여 항체 사이의 경쟁을 최소화하도록 선택된다(즉, 모든 항체는 이들의 대응 신호 전달 분자에 동시에 결합할 수 있다).
- [0135] 근접 채널링의 한 예에서, 촉진 부분은 글루코오스 옥시다아제(GO)이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 호스라디쉬 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, 예를 들어 루미놀 또는 이소루미놀 또는 형광 기질, 예를 들어 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 당 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 포르피리노젠을 포함한다.

[0136] 근접 채널링의 또 다른 예에서, 촉진 부분은 감광제이고, 신호 증폭쌍의 제 1 일원은 특정 결합 파트너(예를 들어, 리간드, 항체 등)으로의 합텐의 결합을 방지하는 보호기로 보호된 다수의 합텐으로 표시된 거대한 분자이다. 예를 들어, 신호 증폭쌍 일원은 보호된 비오틴, 쿠마린 및/또는 플루오레세인 분자로 표시된 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, 일중항 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 당 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.

[0137] 근접 채널링의 또 다른 예에서, 촉진 부분은 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.

[0138] 근접 채널링의 한 추가 예에서, 촉진 부분은 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 합체 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).

[0139] 당업자는 항체가 아닌 결합 파트너가 본원에 기재된 근접(즉, 3-항체) 분석법에 따라 세포 추출물로부터 하나 이상의 분석물을 고정시키고/시키거나 검출하기 위해 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 이러한 결합 파트너의 비제한적인 예는 분석물의 리간드 또는 수용체, 분석물의 기질, 결합 도메인(예를 들어, PTB, SH2 등), 압타머(apptamer) 등을 포함한다.

[0140] **D. 키트**

[0141] 한 추가 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 항체-기반 어레이 방법을 수행하기 위한 키트를 제공하고, 이는 (a) 고체 지지체 상에 고정된 다수의 포획 항체의 희석 시리즈; 및 (b) 다수의 검출 항체(예를 들어, 활성화 상태-비의존 항체 및/또는 활성화 상태-의존 항체)를 포함한다. 몇몇 예에서, 키트는 고형 종양의 순환 세포의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하기 위한 키트를 이용하는 방법을 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 본 발명의 특정 방법을 수행하는 것과 관련하여 상기 기재된 임의의 추가 시약, 예를 들어 신호 증폭쌍의 제 1 및 제 2 일원, 티라미드 신호 증폭 시약, 촉진 부분에 대한 기질, 세척 완충용액, 포획/방출 시약 등을 함유할 수 있다.

[0142] **IV. 항체 어레이의 작제**

[0143] 특정 양태에서, 본 발명은 고형 지지체 상에 고정된 포획 항체의 희석 시리즈를 이용하여 고형 종양의 순환 세포의 세포 추출물 내의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 검출하기 위한 항체-기반 어레이를 제공한다. 본 발명의 분석법에 사용되는 어레이는 통상적으로 다양한 어드레싱 가능 위치에서 고체 지지체의 표면에 커플링된 광범위한 포획 항체 농도의 다수의 다양한 포획 항체를 포함한다.

[0144] 고체 지지체는 단백질을 고정시키기 위한 임의의 적절한 기질을 포함할 수 있다. 고체 지지체의 예는 유리(예

를들어, 유리 슬라이드), 플라스틱, 칩, 핀, 필터, 비드(예를들어, 자기 비드, 폴리스티렌 비드 등), 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 와트만 인코퍼레이티드사(Whatman Inc.)(Florham Park, NJ)에서 시판되는 FAST® 슬라이드와 같은 니트로셀룰로오스 중합체로 코팅된 유리 슬라이드에 고정된다.

[0145] 요망되는 고체 지지체의 특정 양태는 대량의 포획 항체에 결합하는 능력, 최소 변성으로 포획 항체에 결합하는 능력, 및 다른 항체에 결합하지 않는 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 생성시킨다.

[0146] 포획 항체는 통상적으로 공유 또는 비공유 상호작용(예를들어, 이온 결합, 수소성 상호작용, 수소 결합, 반데르 발스 힘, 쌍극자-쌍극자 결합)을 통해 고체 지지체 상에 직접 또는 간접(예를들어, 포획 태그를 포함)적으로 고정된다. 몇몇 구체예에서, 포획 항체는 표준 가교 방법 및 조건을 이용하여 동종이기능성 또는 이종이기능성 가교제를 이용하여 고체 지지체 상에 공유적으로 부착된다. 적절한 가교제는 피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)(Rockford, IL)사와 같은 업체에서 시판된다.

[0147] 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 팩커드 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.

[0148] 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 형성시키는데 실용적일 수 있고, 용액-증착 단계가 각각의 반복 주기에서 다수의 고체 지지체의 각각에 대해 선택된 위치에 적용된다. 이러한 방법의 추가의 기재는 미국 특허 제 5,807,522호에 기재되어 있다.

[0149] 특정 예에서, 종이 상에 프린팅하기 위한 장치가 본 발명의 항체 어레이를 제조하는데 사용될 수 있다. 예를들어, 요망되는 포획 항체 희석물이 데스크탑 젯 프린터의 프린트헤드(printthead)로 로딩될 수 있고, 적절한 고체 지지체에 프린팅될 수 있다(예를들어, 문헌[Silzel *et al.*, *Clin. Chem.*, 44:2036-2043 (1998)] 참조).

[0150] 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.

[0151] 특정 예에서, 고체 지지체 상의 스폿은 각각 상이한 포획 항체를 나타낸다. 특정 기타 예에서, 고체 지지체 상의 다수의 스폿은 예를들어 감소하는 포획 항체 농도의 시리즈를 포함하는 희석 시리즈와 동일한 포획 항체를 나타낸다.

[0152] 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, 제20060263837호, 제20060292680호 및 제20070054326호; 및 문헌[Varnum *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 264:161-172 (2004)]에 기재되어 있다.

[0153] 항체 어레이를 스캐닝하는 방법은 당 분야에 공지되어 있고, 이는 단백질 또는 핵산 어레이를 스캐닝하는데 사

용되는 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 ScanArray3000이 정량을 위한 ImaGene 소프트웨어와 함께 사용될 수 있다.

V. 항체의 생성

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. 예를들어, 하나의 방법은 당 분야에 공지된 단백질 발현 및 정제 방법을 이용하여 관심 폴리펩티드(즉, 항원)을 발현시키고/시키거나 정제시키는 것인 반면, 또 다른 방법은 당 분야에 공지된 고상 펩티드 합성 방법을 이용하여 관심 폴리펩티드를 합성하는 것이다. 예를들어, 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); and Fujiwara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 44:1326-31 (1996)]을 참조하라. 정제되거나 합성된 폴리펩티드는 이후 예를들어 마우스 또는 래빗에 주사되어, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체가 생성될 수 있다. 당업자는 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. 당업자는 또한 항체를 모방하는 결합 단편 또는 Fab 단편이 또한 다양한 방법에 의해 유전적 정보로부터 제조될 수 있음을 인지할 것이다(예를들어, 문헌[*Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); and Huse et al., *J. Immunol.*, 149:3914-3920 (1992)] 참조).

또한, 다수의 간행물이 선택된 표적 항원으로의 결합에 대해 폴리펩티드의 라이브러리를 생성시키고 스크리닝하는 파지 전사 기술의 사용을 보고하고 있다(예를들어, 문헌[Cwirlla 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); and Ladner et al., U.S. Patent No. 5,571,698] 참조). 파지 전사 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 전사하는 파지는 표적 항원에 결합하고, 이러한 파지는 표적 항원에 대한 친화성 스크리닝에 의해 농화된다. 이러한 파지로부터 전사된 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(예를들어, 미국 특허 제 6,057,098호 참조).

이후, 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 항체의 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(예를들어, 생성되는 항체가 마우스 항체인 경우 알칼리성 포스파타아제에 컨쥬게이션된 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.

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, 예를들어 특정 항체 조합물이 다른 항체 조합물을 입체적으로 방해할 수 있으므로, 항체의 분석 수행은 항체의 절대 친화성 및 특이성 보다 중요한 척도일 수 있다.

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.

A. 폴리클로날 항체

- [0161] 폴리클로날 항체는 관심 폴리펩티드 및 애주번트의 다수의 피하(sc) 또는 복막내(ip) 주사에 의해 동물에서 생성된다. 관심 폴리펩티드를 이작용성 또는 유도체화 작용제를 이용하여 면역화되는 중에서 면역원성인 단백질 담체, 예를들어 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 컨주게이션시키는 것이 유용할 수 있다. 이작용성 또는 유도체화 작용제의 비제한적인 예는 말레이미도벤조일 술폰숙신이미드 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.
- [0162] 동물은, 예를들어 100 μg(래빗용) 또는 5 μg(마우스용)의 항원 또는 컨주게이트와 3 부피의 프로인트 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 본래량의 약 1/5 내지 1/10의 폴리펩티드 또는 컨주게이트를 이용하여 부스팅(boosting)된다. 7 내지 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 면역 반응을 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0163] **B. 모노클로날 항체**
- [0164] 모노클로날 항체는 일반적으로 실질적으로 동종성인 항체의 집단으로부터 획득되며, 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. 예를들어, 모노클로날 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법을 이용하거나, 당 분야에 공지된 임의의 재조합 DNA 방법(예를들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다.
- [0165] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물(예를들어, 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, 예를들어 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 골수종 세포와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다(예를들어, 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. 예를들어, 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.
- [0166] 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 뮤린 골수종 세포주, 예를들어 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 XG3-Ag8-653 세포(미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection)에서 입수가능; Rockville, MD), 및 인간 골수종 또는 마우스-인간 이종골수종 세포주(예를들어, 문헌[Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and 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.
- [0167] 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, 예를들어 방사선면역측정법(RIA) 또는 효소면역측정법(ELISA)에 의해 결정된다. 모노클로날 항체의 결합 특이성은, 예를들어 문헌[Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석(Scatchard analysis)을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0168] 요망되는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론은 희석 절차를 제한함으로써 서브클로닝되고, 표준 방법에 의해 성장할 수 있다(예를들어, 문헌[Goding, *Monoclonal*

Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)] 참조). 이러한 목적에 적합한 배지는, 예를들어 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, 예를들어 단백질 A-세파로오스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배지, 복수 또는 혈청으로부터 분리될 수 있다.

[0169] 모노클로날 항체를 엔코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 분리되고 서열확인될 수 있다(예를들어, 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, 예를들어 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(예를들어, 문헌[Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); and Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992)] 참조). DNA는 또한, 예를들어 동종성 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 대체(예를들어, 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.

[0170] 한 추가 구체예에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편은, 예를들어 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 발생된 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.

[0171] **C. 인간화된 항체**

[0172] 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 과가변(hypervariable) 영역 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 대체함으로써 수행될 수 있다. 예를들어, 문헌[Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); and Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)]을 참조하라. 따라서, 이러한 "인간화된" 항체는 키메라 항체(예를들어, 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.

[0173] 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(예를들어, 문헌[Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); and 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(예를들어, 문헌[Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); and Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151 :2623 (1993)] 참조).

[0174] 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, 당업자에게 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 능력에 영향을 주는 잔기의 분

석을 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.

[0175] 본 발명에 따른 다양한 형태의 인간화된 항체가 고려된다. 예를들어, 인간화된 항체는 Fab 단편과 같은 항체 단편일 수 있다. 대안적으로, 인간화된 항체는 무손상 IgA, IgG 또는 IgM 항체와 같은 무손상 항체일 수 있다.

[0176] **D. 인간 항체**

[0177] 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(예를들어, 마우스)이 생성될 수 있다. 예를들어, 키메라 및 생식-계열 돌연변이 마우스에서의 항체 중쇄 결합 영역(JH) 유전자의 동종접합 결실은 내인성 항체 생성의 완전한 억제를 야기시키는 것으로 기재되어 있다. 상기 생식-계열 돌연변이 마우스에서의 인간 생식-계열 면역글로블린 유전자 어레이의 이동은 항원 공격(challenge)시 인간 항체를 생성시킬 것이다. 예를들어, 문헌[Jakovovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakovovits *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.

[0178] 대안적으로, 면역화되지 않은 공여체로부터의 면역글로블린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리를 이용하여 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성시키기 위해 파지 전사 기술(예를들어, 문헌[McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-553 (1990)] 참조)이 사용될 수 있다. 이러한 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 섬유상 박테리오파지, 예를들어 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, 예를들어 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. 예를들어, 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.

[0179] 특정 예에서, 인간 항체는, 예를들어 미국 특허 제 5,567,610호 및 제 5,229,275호에 기재된 바와 같이 시험관 내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다.

[0180] **E. 항체 단편**

[0181] 항체 단편을 생성하기 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편은 무손상 항체의 단백질분해성 분해를 통해 유래되었다(예를들어, 문헌[Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24: 107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이러한 단편은 현재 재조합 숙주 세포를 이용하여 직접 생성될 수 있다. 예를들어, 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(예를들어, 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. 예를들어, PCT 공보 WO 93/16185호; 및 미국 특허 제 5,571,894호 및 제 5,587,458호를 참조하라. 항체 단편은 또한, 예를들어 미국 특허 제 5,641,870호에 기재된 바와 같이 선형 항체일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이성이거나 이특이성일 수 있다.

[0182] **F. 이특이성 항체**

[0183] 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(예를들어, F(ab')₂ 이특이성 항체)로 제조될 수 있다.

- [0184] 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(예를들어, 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.
- [0185] 다양한 방법에 따르면, 요망되는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 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.
- [0186] 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. 예를들어, PCT 공보 WO 94/04690호 및 문헌[Suresh *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 121:210 (1986)]을 참조하라.
- [0187] 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 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인 중 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제 1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄(예를들어, 티로신 또는 트립토판)을 대체한다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 측쇄(예를들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제 2 항체 분자의 계면에서 큰 측쇄(들)과 동일하거나 유사한 크기의 보충 "공동(cavity)"이 생성된다. 이는 동종이합체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이중이합체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.
- [0188] 이특이성 항체는 가교된 항체 또는 "헤테로컨쥬게이트(heteroconjugate)" 항체를 포함한다. 예를들어, 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, 예를들어 미국 특허 제 4,676,980호에 기재되어 있다.
- [0189] 항체 단편으로부터 이특이성 항체를 생성하기에 적절한 기술이 또한 당 분야에 공지되어 있다. 예를들어, 이특이성 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 특정 예에서, 이특이성 항체는 무손상 항체가 단백질분해적으로 분해되어 F(ab')₂ 단편을 발생시키는 절차에 의해 생성될 수 있다(예를들어, 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.
- [0190] 몇몇 구체예에서, Fab'-SH 단편은 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 이특이성 항체가 형성될 수 있다. 예를들어, 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.
- [0191] 재조합 세포 배양물로부터 직접 이특이성 항체 단편을 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를들어, 이특이성 항체는 류신 지퍼(leucine zipper)를 이용하여 생성된다. 예를들어, 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 인지 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.

[0192] 2개 이상의 결합가를 지니는 항체가 또한 고려된다. 예를들어, 삼특이성 항체가 제조될 수 있다. 예를들어, 문헌[Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]을 참조하라.

[0193] **G. 항체 정제**

[0194] 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, 예를들어 원심분리 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 페닐메틸술폰폴리플루오라이드(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, 예를들어 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.

[0195] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를들어 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(예를들어, 문헌[Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)] 참조). 단백질 G는 모든 마우스 동형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다(예를들어, 문헌[Guss *et al.*, *EMBO J.*, 5:1567-1575 (1986)] 참조). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로오스이나, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를들어 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, 예를들어 이온 교환 컬럼에서의 분획법, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를들어, 폴리아스파르트산 컬럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

[0196] 임의의 예비 정제 단계(들) 후, 관심 항체 및 오염물질을 포함하는 혼합물은 바람직하게는 저염 농도(예를들어, 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.

실시예

[0197] **VI. 실시예**

[0198] 하기의 실시예는 청구된 본 발명을 예시하기 위해서 제공되나, 이는 상기 청구된 본 발명을 제공하고자 하는 것이 아니다.

[0199] **실시예 1. 순환 세포의 분리, 자극 및 용해.**

[0200] 고휘 종양의 순환 세포는 고휘 종양으로부터 전이되거나 미소전이되는 세포를 포함하고, 순환 종양 세포(CTC), 암 줄기 세포(CSC), 및/또는 종양으로 이동하는 세포(예를들어, 순환 내피 전구세포(CEPC), 순환 내피 세포(CEC), 순환 전혈관형성 골수 세포, 순환 수지상 세포 등)를 포함한다. 순환 세포를 함유하는 환자의 샘플은

임의의 이용가능한 생물학적 유체(예를들어, 혈액, 소변, 유두 흡입물(nipple aspirate), 림프, 타액, 미세침 흡입물 등)으로부터 수득될 수 있다. 순환 세포는, 예를들어 면역자기 분리(예를들어, 문헌[Racila *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth *et al.*, *Int. J. Cancer*, 92:577-582 (2001)] 참조), 미세유체 분리(예를들어, 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(예를들어, 문헌[Mancuso *et al.*, *Blood*, 97:3658-3661 (2001)] 참조), 밀도 구배 원심분리(예를들어, 문헌[Baker *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:4865-4871 (2003)] 참조), 및 감소 방법(예를들어, 문헌[Meye *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 21 :521-530 (2002)] 참조)과 같은 하나 이상의 분리 방법을 이용하여 환자의 샘플로부터 분리될 수 있다.

[0201] CTC의 수작업 분리:

[0202] CTC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:

[0203] 1) 미리 항-EpCAM 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences; Leiden, The Netherlands)에 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450; Dynal AS; Oslo, Norway)를 사용하였다.

[0204] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이아비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척하였다.

[0205] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이아비드를 1 ml의 샘플에 첨가하였다.

[0206] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시켰다.

[0207] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 두었다.

[0208] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기 분리하였다.

[0209] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충용액에 재현탁시켰다.

[0210] 샘플 제조:

[0211] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리코화 튜브에 두었다. 처음 3-5 ml를 버려 천자된 정맥으로부터 방출되는 상피 세포를 지닌 오염물질을 회피하였다.

[0212] 2) 1 ml의 전혈을 사용 전에 0.9% NaCl로 1:3 희석시켰다.

[0213] 대조군 제조:

[0214] 1) 인간 암세포주를 HL-60 세포로 스파이킹(spiking)시킴으로써 세포주 대조군을 제조하였다.

[0215] 2) 세포주 대조군을 2.5×10^6 세포/ml의 농도로 사용하였다.

[0216] CEC 및 CEPC의 수작업 분리:

[0217] 비제한적인 예로서, 살아있는 CEC 및 CEPC가 문헌[Beerepoot *et al.*, *Ann. Oncology*, 15:139-145 (2004)]에 기재된 면역자기 분리/농화 기술을 이용하여 분리될 수 있다. 간단하게, 말초 혈액을 항-CD146 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences)에 이미 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450 IgG₁)와 함께 인큐베이션하였다. 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(예를들어, 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 이용하였다.

[0218] CEC 및 CEPC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:

[0219] 1) 미리 항-CD146 모노클로날 항체(Kordia Life Sciences)에 컨쥬게이션된 자기 비드(Dynal M450)를 사용하였다.

[0220] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이아비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척하였다.

[0221] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이아비드를 1 ml의 샘플에 첨가하였다.

[0222] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시켰다.

- [0223] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 두었다.
- [0224] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기 분리하였다.
- [0225] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충용액에 재현탁시켰다.
- [0226] 샘플 제조:
- [0227] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리콘화 튜브에 두었다. 처음 3-5 ml를 버려 천자된 정맥으로부터 방출되는 내피 세포를 지닌 오염물질을 회피하였다.
- [0228] 2) 1 ml의 전혈을 사용 전에 0.9% NaCl로 1:3 희석시켰다.
- [0229] 대조군 제조:
- [0230] 1) 인간 배꼽 정맥 내피 세포(HUVEC)를 HL-60 세포로 스파이킹(spiking)시킴으로써 세포주 대조군을 제조하였다.
- [0231] 2) 세포주 대조군을 2.5×10^6 세포/ml의 농도로 사용하였다.
- [0232] CEPC (CEC 비함유)의 수작업 분리:
- [0233] 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 전구세포(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 프로토콜로부터 변형된 프로토콜이 사용된다.
- [0234] CEPC의 면역자기 분리 - 수작업 분리 후의 활성화 분석:
- [0235] 1) 자기 비드(Dyna1 M450 CD34)를 사용하였다. 이러한 비드에 CD34 표면 항원에 특이적인 모노클로날 항체를 코팅하였다.
- [0236] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이내비드(Dynabead)를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척하였다.
- [0237] 3) 25 μ l의 미리 코팅된 다이내비드를 1 ml의 샘플에 첨가하였다.
- [0238] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 20분 동안 인큐베이션시켰다.
- [0239] 5) 튜브를 2분 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 두었다.
- [0240] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기 분리하였다.
- [0241] 7) 샘플을 100 μ l의 자극 완충용액에 재현탁시켰다.
- [0242] 샘플 제조:
- [0243] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 1 mg/ml EDTA를 함유하는 실리콘화 튜브에 두었다. 처음 3-5 ml를 버려 천자된 정맥으로부터 방출되는 내피 세포를 지닌 오염물질을 회피하였다.
- [0244] 2) 10 ml의 혈액을 평형염액으로 1:1 희석시켰다.
- [0245] 3) 4 ml의 희석 혈액을 10 ml 튜브 중의 3 ml의 피콜-페크(Ficoll-Paque) 상에 층을 이루도록 하였다.
- [0246] 4) 튜브를 18-20°C에서 30-40분 동안 400 x g로 회전시켰다.
- [0247] 5) 혈장 및 혈소판을 함유하는 상부 층을 멸균 파스퇴르 파이펫을 이용하여 빼내어, 계면에 흔들리지 않은 단핵 세포층을 남겼다.
- [0248] 6) 단핵 세포를 멸균 파이펫을 이용하여 멸균 원심분리 튜브로 옮겼다.
- [0249] 7) 6 ml의 평형염액을 첨가하고, 세포를 가볍게 재현탁시켰다.

- [0250] 8) 혼합물을 18-20℃에서 10분 동안 60-100 x g에서 원심분리하였다.
- [0251] 9) 상층액을 제거하고, 각각의 튜브로부터의 단핵 세포를 1 ml PBS 중에 재현탁시켰다.
- [0252] **베리덱스(Veridex) 시스템을 이용한 CTC, CEC 및 CEPC의 분리:**
- [0253] 베리덱스(Warren, NJ)사는 셀프랩(CellPrep) 시스템, 셀서치 에피셀리얼 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 에피셀리얼 셀 키트는 내피 세포에 특이적인 항-EpCAM 항체로 코팅된 자성유체(ferrofluid); 사이토케라틴 8, 18 및 19에 대한 피코에리트린 컨쥬게이션된 항체; 알로피코시아닌에 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 베리덱스 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.
- [0254] 베리덱스 시스템 - CTC 농화 후 계산:
- [0255] 1) 7.5 ml의 혈액을 6 ml의 완충용액과 혼합하고, 10분 동안 800 x g에서 원심분리하고, 셀프랩 시스템에 두었다.
- [0256] 2) 기계로 상층액을 흡출한 후, 기계에 자성유체를 첨가하였다.
- [0257] 3) 기계로 인큐베이션 및 이후에 자기 분리 단계를 수행하였다.
- [0258] 4) 결합되지 않은 세포 및 잔여 혈장을 흡출하였다.
- [0259] 5) 형광 염색을 위해 투과 완충용액과 함께 염색 시약을 첨가하였다.
- [0260] 6) 시스템에 의한 인큐베이션 후, 세포를 다시 자기적으로 분리시키고, 셀스포터 분석기를 이용한 분석을 위해 마그네스트 셀 프레젠테이션(MagNest Cell Presentation) 장치에 재현탁시켰다.
- [0261] 7) 상기 장치를 4색 반자동 형광 현미경인 셀스포터 분석기에 두었다.
- [0262] 8) 베리덱스 규정 기준을 충족시키는 영상을 포착하고, 최종 수작업 선택을 위해 웹-기반 브라우저를 통해 나타내었다.
- [0263] 9) 세포 계산 결과를 7.5 ml의 혈액당 세포수로 나타내었다.
- [0264] 베리덱스 시스템 - CTC 농화 후 활성화 분석:
- [0265] 1) 7.5 ml의 혈액을 6 ml의 완충용액과 혼합하고, 10분 동안 800 x g에서 원심분리시킨 후, 셀프랩 시스템에 두었다.
- [0266] 2) 기계로 상층액을 흡출한 후, 기계에 자성유체를 첨가하였다.
- [0267] 3) 기계로 인큐베이션을 수행한 후, 자성 분리 단계를 수행하였다.
- [0268] 4) 결합되지 않은 세포 및 잔여 혈장을 흡출하였다.
- [0269] 5) 샘플을 100 μl의 자극 완충용액에 재현탁시켰다.
- [0270] 베리덱스 시스템 - CEC 및 CEPC 농화 후 활성화 분석:
- [0271] 1) 베리덱스는 항-CD146 항체를 이용한 CEC 및 CEPC의 포획을 이용하는 셀트랙 엔도셀리얼 셀 키트(CellTracks Endothelial Cell Kit)를 제공한다. 셀트랙 엔도셀리얼 셀 키트를 혈액 샘플 제조를 위한 베리덱스의 셀트랙 오토프랩 시스템 및 전혈로부터 CEC 및 CEPC를 계수하고 특성규명하기 위한 셀트랙 분석기 II와 함께 사용하였다. 프로토콜은 셀서치 에피셀리얼 셀 키트와 동일하였다.
- [0272] 샘플 제조:
- [0273] 1) 인간 피검체로부터의 말초 혈액을 제조업체의 설명서에 따라 셀세이브 프리저베이티브(CellSave Preservative) 튜브에 두었다. 처음 3-5 ml를 버려 천자된 정맥으로부터 방출되는 상피 또는 내피 세포를 지닌 오염물질을 회피하였다.

[0274] CSC의 수작업 분리:

[0275] 종양이 독특한 자체 재생(self-renewal) 및 생존 메커니즘을 지닌 잠정적인 암 줄기 세포의 작은 집단을 함유한다는 증거가 확립되고 있다(예를들어, 문헌[Sells, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 51:1-28 (2004); Reya *et al.*, *Nature*, 414:105-111 (2001); Dontu *et al.*, *Trends Endocrinol. Metal*, 15:193-197 (2004); and 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.

[0276] 면역자기 CSC 분리 - 수작업 분리 후 활성화 분석:

[0277] 1) 자기 비드(Dynal AS; Oslo, Norway)를 사용하였다. 이러한 비드에 CD34 또는 CD133 표면 항원에 특이적인 모노클로날 항체를 코팅하였다.

[0278] 2) 사용 직전에, 미리 코팅된 다이나비드를 0.01%의 BSA를 지닌 동일 부피의 PBS로 1회 세척하였다.

[0279] 3) 미리 코팅된 1-10⁷개의 다이나비드를 3 ml의 샘플에 첨가하였다.

[0280] 4) 혼합물을 가볍게 틸팅(tilting) 및 회전시키면서 2-8°C에서 60분 동안 인큐베이션시켰다.

[0281] 5) 혼합물을 1 ml의 부분으로 나누고, 각각의 튜브를 6분 이상 동안 자기 분리기(MPL-1 magnet)에 두었다.

[0282] 6) 상층액을 버리고, 비드 결합된 세포를 0.01%의 BSA를 지닌 PBS 중에 재현탁시킴으로써 3회 세척하고, 자기 분리하였다.

[0283] 7) 샘플을 100 μl의 자극 완충용액에 재현탁시켰다.

[0284] 샘플 제조:

[0285] 1) 환자의 고지에 의한 동의 후에 초기 유방암 환자로부터 골수 표본을 수득하였다.

[0286] 2) 골수 흡출물의 처리를 문헌[Bauer *et al.*, *Clin. Can. Res.*, 6:3552-3559 (2000)]에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다. 임의의 과중성 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 세척하였다.

[0287] 분리된 CTC의 세포 자극 및 용해:

[0288] 세포 자극:

[0289] 1) 성장 인자 TGF-α (100 nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF (100 nM)를 세포에 첨가하고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

[0290] 약물 처리를 이용한 세포 자극:

[0291] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴(Herceptin), 라파타니브(Lapatanib), 타르세바(Tarceva) 및/또는 라파마이신(Rapamycin) 유사체로 처리하였다.

[0292] 2) 이후, 성장 인자 TGF-α (100 nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

[0293] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리(feedback loop)):

[0294] 1) 샘플을 37°C에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리하였다.

[0295] 2) 이후, 세포를 TGF-α (100 nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)에 의해 자극시키고, 120분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다.

[0296] 자극된 CTC를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시켰다:

- [0297] 1) 표 1에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조하였다.
- [0298] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각된 완충용액 중의 얼음에 재현탁시켰다.
- [0299] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행하였다.
- [0300] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜 용해질로부터 비드를 분리시켰다.
- [0301] 5) 분석 및 -80℃에서의 저장을 위해 용해질을 새로운 튜브로 옮겼다.

[0302] 표 1

[0303]

용해 완충용액 레시피(recipe)(10 ml)			
시약	스톡(stock) 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
0.1M Na ₃ VO ₄	0.1	0.001	0.10
1 mg/ml 펩스타틴(pepstatin)	1	0.10	
완전 미니 프로테아제			1 정제
0.5M EDTA	0.5	0.005	0.10
		전체(ml)	3.00
		물(ml)	7.00

[0304] 분리된 CEC 및/또는 CEPC의 세포 자극 및 용해:

[0305] 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)). 상기 이유에 대해, CEC 및/또는 CEPC는 용해 전에 VEGF와의 인큐베이션에 의해 활성화된다.

[0306] 세포 자극:

[0307] 1) 각각 100 nM의 성장 인자 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 세포에 첨가하고, 5분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.

[0308] 약물 처리를 이용한 세포 자극:

[0309] 1) 샘플을 37℃에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 아바스틴(Avastin), 넥사바르(Nexavar), 수텐트(Suten) 및/또는 라파마이신 유사체로 처리하였다.

[0310] 2) 이후, 세포를 각각 100 nM의 성장 인자 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 첨가함으로써 자극시키고, 5분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.

[0311] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리):

[0312] 1) 샘플을 37℃에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 아바스틴, 넥사바르, 수텐트 및/또는 라파마이신 유사체로 처리하였다.

[0313] 2) 이후, 각각 100 nM의 VEGF, FGF, PDGF, PIGF 및/또는 안지오펜터틴을 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.

[0314] 분리된 CEC 및/또는 CEPC 세포를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시켰다:

[0315] 1) 표 1에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조하였다.

[0316] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각된 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시켰다.

- [0317] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행하였다.
- [0318] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해질로부터 비드를 분리시켰다.
- [0319] 5) 분석 또는 -80℃에서의 저장을 위해 용해질을 새로운 튜브로 옮겼다.
- [0320] 분리된 CSC의 세포 자극 및 용해:
- [0321] 세포 자극:
- [0322] 1) 성장 인자 TGF- α (100nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 세포에 첨가하고, 5분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.
- [0323] 약물 처리를 이용한 세포 자극:
- [0324] 1) 샘플을 37℃에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리하였다.
- [0325] 2) 이후, 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 세포를 자극하였고, 5분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.
- [0326] 약물 처리를 이용한 세포 자극(피드백 고리):
- [0327] 1) 샘플을 37℃에서 30분 동안 치료적 유효 농도의 헤르셉틴, 라파타니브, 타르세바 및/또는 라파마이신 유사체로 처리하였다.
- [0328] 2) 이후, 세포를 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레굴린(100 nM) 및/또는 IGF(100 nM)를 첨가함으로써 자극시키고, 120분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다.
- [0329] 분리된 CSC 세포를 하기 프로토콜을 이용하여 용해시켰다:
- [0330] 1) 표 1에 나열된 시약을 혼합시킴으로써 새로운 용해 완충용액을 새로이 제조하였다.
- [0331] 2) 최종 세척 후, 세포를 100 μ l의 냉각 완충용액 중의 얼음 상에 재현탁시켰다.
- [0332] 3) 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션을 수행하였다.
- [0333] 4) 혼합물을 10분 동안 최대 속도로 원심분리기에서 회전시켜, 용해질로부터 비드를 분리시켰다.
- [0334] 5) 분석 또는 -80℃에서의 저장을 위해 용해질을 새로운 튜브로 옮겼다.
- [0335] **실시예 2. 티라미드 신호 증폭을 이용하는 단일 검출기 샌드위치 ELISA를 이용한 단일 세포 검출.**
- [0336] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 단일 검출기 샌드위치 ELISA를 예시한다:
- [0337] 1) 96-웰 미세역가 플레이트를 4℃에서 밤새 포획 항체로 코팅시켰다.
- [0338] 2) 플레이트를 다음날 1시간 동안 2% BSA/TBS-Tween으로 블로킹시켰다.
- [0339] 3) TBS-Tween을 이용한 세척 후, 세포 용해질 또는 재조합 단백질을 연속 희석물에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0340] 4) 플레이트를 TBS-Tween으로 4회 세척한 후, 실온에서 2시간 동안 비오틴-표지된 검출 항체와 함께 인큐베이션시켰다.
- [0341] 5) 검출 항체와의 인큐베이션 후, 플레이트를 TBS-Tween으로 4회 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 스트렙타비딘-표지된 호스라디쉬 퍼옥시다아제(SA-HRP)와 인큐베이션시켜, SA-HRP가 비오틴-표지된 검출 항체에 결합되도록 하였다.
- [0342] 6) 신호 증폭을 위해, 비오틴-티라미드를 0.015% H₂O₂와 함께 5 μ g/ml로 첨가하고, 15분 동안 반응시켰다.
- [0343] 7) TBS-Tween으로 6회 세척 후, SA-HRP를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다.
- [0344] 8) TBS-Tween으로 6회 세척 후, HRP 기질 TMB를 첨가하고, 어두운 곳에서 2-10분 동안 색을 발달시켰다. 0.5M

H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 신호를 450/570 nm에서 마이크로플레이트 판독기에서 판독하였다.

- [0345] 도 3은 포획 항체 및 검출 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 ELISA를 이용한 A431 세포에서의 전체 EGFR의 검출을 도시한다. 면역분석의 민감성은 인간 EGFR의 재조합 세포의 도메인에 기초하여 약 0.25 pg/웰이었다. 계산된 EGFR 농도는 각각의 A431 세포에서 약 0.6 pg이었다.
- [0346] 도 4는 포획 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 EGFR에 대한 비오틴-표지된 모노클로날 항체를 포함하는 ELISA를 이용한 A431 세포에서의 인산화된 EGFR의 검출을 도시한다. 포획 항체의 2배 연속 희석의 수행은 포획 항체 농도가 0.0625 µg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 1.78배 증가(신호/노이즈 비)한 것을 나타내었다.
- [0347] 도 5는 포획 항체 및 검출 항체로서 ErbB2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 ELISA를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 ErbB2의 검출을 도시한다. 면역분석의 검출 범위는 약 1,000개의 세포 내지 약 1.37개의 세포였다. 포획 항체 농도가 1 µg/ml인 경우 1.37개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 2.71배 증가(신호/노이즈 비)하였다.
- [0348] 도 6은 포획 항체로서 ErbB2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 ErbB2에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 ELISA를 이용한 SKBr3 세포에서의 인산화된 ErbB2의 검출을 도시한다. 면역분석법의 검출 범위는 약 500개의 세포 내지 약 5개의 세포였다. 포획 항체 농도가 1 µg/ml인 경우 5개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 3.03배 증가(신호/노이즈 비)하였다.
- [0349] 도 7은 포획 항체 및 검출 항체로서 Erk2에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 ELISA를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 및 인산화된 Erk2 단백질의 검출을 도시한다. 1.37개의 세포 수준에서 전체 Erk2에 대해서 백그라운드에 비해 신호가 3.25배 증가(신호/노이즈 비)하였다. 또한, 1.37개의 세포 수준에서 인산화된 Erk2에 대해서 백그라운드에 비해 신호가 3.17배 증가(신호/노이즈 비)하였다.
- [0350] **실시예 3. 티라미드 신호 증폭을 이용하는 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA를 이용한 단일 세포 검출.**
- [0351] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 단일 검출기 마이크로어레이 샌드위치 ELISA를 예시한다:
- [0352] 1) 포획 항체를 2배 연속 희석을 이용하여 16-pad FAST 슬라이드(Whatman Inc.; Florham Park, NJ) 상에 프린팅시켰다.
- [0353] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 와트만 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.
- [0354] 3) 80 µl의 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0355] 4) TBS-Tween으로 6회 세척 후, 80 µl의 비오틴 표지된 검출 항체를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0356] 5) 6회 세척 후, 스트렙타비딘-표지된 호스라디쉬 퍼옥시다아제(SA-HRP)를 첨가하고, 1시간 동안 인큐베이션시켜, SA-HRP가 비오틴-표지된 검출 항체에 결합되도록 하였다.
- [0357] 6) 신호 증폭 후, 80 µl의 5 µg/ml 비오틴-티라미드를 첨가하고, 15분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 TBS-Tween으로 6회 세척하고, 20% DMSO/TBS-Tween으로 2회 세척하고, TBS로 1회 세척하였다.
- [0358] 7) 80 µl의 SA-Alexa 555를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 슬라이드를 2회 세척하고, 5분 동안 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너(Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA)에서 스캐닝하였다.
- [0359] 도 8은 포획 항체 및 검출 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 마이크로어레이 ELISA를 이용한 A431 세포에서의 전체 EGFR의 검출을 도시한다. 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선 실험은 마이크로어레이 ELISA 포맷이 희석 시리즈 내의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 EGFR을 검출하는 광범위한 동적 범위를 지니는 것을 나타내었다. 포획 항체 농축액의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선 실험은 EGFR이 하나의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타내었다. 포획 항체 농도가 0.0625 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 2.11배 증가(신호/노이즈 비)하였다.
- [0360] 도 9는 포획 항체로서 EGFR의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 EGFR에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 마이크로어레이 ELISA를 이용한 A431 세포에서의 인산화된 EGFR의 검출을 도시한다. 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선 실험은 마이크로어레이 ELISA 포맷이 희석 시리즈 내의 포획

항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 인산화된 EGFR을 검출하는 광범위한 동적 범위를 지니는 것을 나타내었다. 포획 항체 농축액의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선 실험은 1개의 세포로부터 인산화된 EGFR이 검출될 수 있음을 나타내었다. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 1.33배 증가(신호/노이즈 비)하였다.

[0361] 도 10은 포획 항체 및 검출 항체로서 ErBb2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 마이크로어레이 ELISA를 이용한 SKBr3 세포에서의 전체 ErBb2의 검출을 도시한다. 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선 실험은 마이크로어레이 ELISA 포맷이 희석 시리즈 내의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 ErBb2를 검출하는 광범위한 동적 범위를 지니는 것을 나타내었다. 포획 항체 농축액의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선 실험은 ErBb2가 1개의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타내었다. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 15.27배 증가(신호/노이즈 비)하였다.

[0362] 도 11은 포획 항체로서 ErBb2의 세포의 도메인에 대한 모노클로날 항체 및 검출 항체로서 인산화된 ErBb2에 대한 모노클로날 항체를 포함하는 마이크로어레이 ELISA를 이용한 SKBr3 세포에서의 인산화된 ErBb2의 검출을 도시한다. 세포수에 기초한 포획 항체 희석 곡선 실험은 마이크로어레이 ELISA 포맷이 희석 시리즈 내의 포획 항체의 다양한 농도를 이용하여 약 1 내지 10,000개의 세포에서 ErBb2를 검출하는 광범위한 동적 범위를 지니는 것을 나타내었다. 포획 항체 농축액의 희석 시리즈에 기초한 세포 적정 곡선 실험은 인산화된 ErBb2가 1개의 세포로부터 검출될 수 있음을 나타내었다. 포획 항체 농도가 0.125 mg/ml인 경우 1개의 세포 수준에서 백그라운드에 비해 신호가 5.45배 증가(신호/노이즈 비)하였다.

[0363] **실시예 4. 티라미드 신호 증폭을 이용하는 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA를 이용한 단일 세포 검출.**

[0364] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리 근접 이중 검출기 마이크로어레이 샌드위치 ELISA를 예시한다:

[0365] 1) 포획 항체를 1 mg/ml로부터 0.004 mg/ml로의 연속 희석을 이용하여 16-pad FAST 슬라이드(Whatman Inc.) 상에 프린팅시켰다.

[0366] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 왓트먼 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.

[0367] 3) 80 μl의 A431 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0368] 4) TBS-Tween으로 6회 세척 후, TBS-Tween/2% BSA/1% FBS에 희석된 근접 분석을 위한 80 μl의 검출 항체를 슬라이드에 첨가하였다. 사용된 검출 항체는, (1) 글루코오스 옥시다아제(GO)에 직접 컨쥬게이션된 항-EGFR 모노클로날 항체; 및 (2) 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP)에 직접 컨쥬게이션된 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0369] 5) 대안적으로, 검출 단계는 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체의 비오틴-컨쥬게이트를 이용하였다. 이러한 예에서, 6회 세척 후, 1시간 동안 스트렙타비딘-HRP를 이용한 인큐베이션의 추가 연속 단계를 포함시켰다.

[0370] 6) 대안적으로, 검출 단계는 항-EGFR 항체의 올리고뉴클레오티드-매개 글루코오스 옥시다아제(GO) 컨쥬게이트를 이용하였다. 인산화된 EGFR 항체에 직접 컨쥬게이션되거나 비오틴-스트렙타비딘(SA) 연결된 HRP의 컨쥬게이트를 사용하였다.

[0371] 7) 신호 증폭을 위해, 80 μl의 5 μg/ml 비오틴-티라미드를 첨가하고, 15분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 TBS-Tween으로 6회 세척하고, 20% DMSO/TBS-Tween으로 2회 세척하고, TBS로 1회 세척하였다.

[0372] 8) 80 μl의 SA-Alexa 555를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 슬라이드를 2회 세척하고, 5분 동안 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너(Perkin-Elmer, Inc.)에서 스캐닝하였다.

[0373] 도 12는 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA 대 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA의 비교를 도시한다. 표 2는 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA 대 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA의 민감도를 도시한다. 각각의 A431 세포 농도에 대해, 근접 및 단일 검출기 포맷에 대한 백그라운드에 비해 신호(신호/노이즈 비)가 제공되어 있다. 표 2에 예시된 바와 같이, 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA는 1개의 세포 수준에서 약 3배로 민감도를 추가로 증가시켰다.

[0374] 표 2

[0375]

세포수	신호	특이적 신호	근접 포맷 (S/N 비)	단일 검출기 포맷 (S/N 비)
100	547	465	6.6	2.1
10	388	306	4.7	1.3
1	295	213	3.6	1.3
0	82			

[0376]

도 13은 단일 검출기 마이크로어레이 ELISA 대 근접 이중 검출기 마이크로어레이 ELISA에 대한 분석 특이성을 도시한다. 단일 검출기 포맷에서 다양한 포획 항체 농도의 인산화된 EGFR의 적정 곡선을 발생시키는 실험은 단일 검출 항체의 특이성의 결핍으로 인해 매우 높은 백그라운드를 나타내었다. 대조적으로, 근접 이중 검출기 포맷에서 다양한 포획 항체 농도의 인산화된 EGFR의 적정 곡선을 발생시키는 실험은 2개의 검출 항체 사이의 근접성을 검출함으로써 획득된 증가된 특이성으로 인해 매우 낮은 백그라운드를 나타내었다.

[0377]

실시예 5. 어드레싱 가능 근접 이중 검출기 마이크로어레이를 이용한 다수의 신호 전달인자의 활성화 상태의 단일 세포 검출.

[0378]

본 실시예는 회귀 순환 세포 중의 다수의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하는데 적합한 우수한 동적 범위를 지니는 다중 고속 처리의 어드레싱 가능 근접 이중 검출기 마이크로어레이 분석법을 예시한다:

[0379]

1) 포획 항체를 16-pad FAST 슬라이드(Whatman Inc.)에 프린팅하였다. 프린팅된 포획 항체는 EGFR, HER2, Erk, Shc, PI3K 및 범-사이토케라틴(pan-cytokeratin)이었다. 각각의 포획 항체의 2배 희석 시리즈(0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml 및 0.0625 mg/ml)를 사용하였고, 각각의 항체 희석물에 대해 이중 및 사중 스폿을 제조하였다.

[0380]

2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 와트만 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.

[0381]

3) 80 μ l의 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0382]

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 옥시디아제(GO)에 직접 컨쥬게이션된 항-EGFR 모노클로날 항체; 및 (2) HRP에 직접 컨쥬게이션된 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0383]

5) 대안적으로, 검출 단계는 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체의 비오틴-컨쥬게이트를 이용하였다. 이러한 예에서, 6회 세척 후, 1시간 동안 스트렙타비딘-HRP를 이용한 인큐베이션의 추가 연속 단계를 포함시켰다.

[0384]

6) 대안적으로, 검출 단계는 항-EGFR 항체의 올리고뉴클레오티드-매개 글루코오스 옥시디아제 컨쥬게이트를 이용하였다. 인산화된 EGFR 항체에 직접 컨쥬게이션되거나 비오틴-스트렙타비딘(SA) 연결된 HRP의 컨쥬게이트를 사용하였다.

[0385]

7) 전체 HER2 및 인산화된 단백질을 검출하기 위해, EGFR을 인지하는 모노클로날 항체 대신 HER2를 인지하는 모노클로날 항체를 이용하여 단계 4), 5) 또는 6)을 수행하였다.

[0386]

8) 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.

[0387]

9) 80 μ l의 SA-Alexa 555를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 슬라이드를 2회 세척하고, 5분 동안 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너(Perkin-Elmer, Inc.)에서 스캐닝하였다.

[0388]

도 14는 어드레싱 가능 마이크로어레이 포맷의 예시적인 구체예를 도시한다. 5개의 표적은 특이적 포획 항체 (예를들어, EGFR, HER2, Shc, Erk 및 PI3K)를 통해 어드레싱(addressing)이 가능하다. EGFR 또는 HER2를 지니는 Shc, Erk 또는 PI3K의 인산화된 복합체는 근접 이중 검출기 포맷을 이용하는 상기 어레이에서 검출될 수 있다. 범-사이토케라틴(PanCK)이 상피 세포의 수를 규격화시키는 대조군으로 제공되었다.

[0389]

도 15는 자극된 A431 세포의 적정 분석에서 인산화된 Shc 수준의 검출을 도시한다. 어드레싱 가능 어레이는 EGFR 및 HER2 인산화에 대한 정보를 동시에 제공하였다.

[0390] **실시예 6. 근접 이중 검출기 마이크로어레이의 동적 범위 확장.**

[0391] 본 실시예는 희귀 순환 세포 중의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하기 위한 동적 범위가 다중 고속 처리 근접 이중 검출기 마이크로어레이 분석법에서 포획 항체에 대한 희석 시리즈를 수행함으로써 향상될 수 있음을 예시한다:

[0392] 1) 포획 항체를 16-pad FAST 슬라이드(Whatman Inc.)에 프린팅하였다. 각각의 포획 항체를 전체 9개의 농축물에 대해 연속적으로 2배 희석시켰다(1 mg/ml 출발; 0.004 mg/ml 종료).

[0393] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 왓만 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.

[0394] 3) 80 μ l의 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0395] 4) TBS-Tween으로 6회 세척한 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) HRP에 직접 컨쥬게이션된 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0396] 5) 대안적으로, 검출 단계는 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체의 비오틴-컨쥬게이트를 이용하였다. 이러한 예에서, 6회 세척 후, 1시간 동안 스트렙타비딘-HRP를 이용한 인큐베이션의 추가 연속 단계를 포함시켰다.

[0397] 6) 대안적으로, 검출 단계는 항-EGFR 항체의 올리고뉴클레오티드-매개 글루코오스 옥시다아제 컨쥬게이트를 이용하였다. 인산화된 EGFR 항체에 직접 컨쥬게이션되거나 비오틴-스트렙타비딘(SA) 연결된 HRP의 컨쥬게이트를 사용하였다.

[0398] 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.

[0399] 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.

[0400] 도 16은 항-EGFR 포획 항체의 희석 곡선을 도시한다. 어드레싱 가능 어레이를 이용하여, 자극된 A431 세포에 대해 1개의 세포 수준에서 인산화된 EGFR 및 전체 EGFR를 검출하였다. 이러한 분석의 동적 범위는 5 log를 초과하였다. 각각의 개별적 곡선은 약 2 log의 동적 범위를 지녔으나, 6개의 정보 곡선으로부터의 정보가 조합되는 경우 동적 범위는 현저하게 향상되었다.

[0401] **실시예 7. 항체에 대한 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이션.**

[0402] 본 실시예는 올리고뉴클레오티드-컨쥬게이션된 항체 또는 효소를 생성시키기 위한 컨쥬게이션 및 품질 조절 절차를 예시한다.

[0403] 컨쥬게이션:

[0404] 1) 5'-SH기 및 6-탄소 스페이서(spacer)를 이용하여 72-머 올리고뉴클레오티드 링커를 합성하였다.

[0405] 2) 동결건조된 올리고뉴클레오티드 링커를 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)에 용해시켰다. 이후, 125 nmole의 링커에 2시간 동안 실온에서 50 mM의 최종 농도로 0.5M TCEP-HCl(Pierce; Rockford, IL)을 처리하였다. 반응 혼합물 중의 Tris, TCEP 및 컨쥬게이션되지 않은 링커를 탈염 회전 컬럼을 이용하여 제거하였다.

[0406] 3) 생성된 탈보호된 올리고뉴클레오티드 링커를 100 μ l 반응 부피의 SMCC와 같은 이중이기능성 가교제를 이용하여 표적 단백질(예를들어, 항체 또는 효소)의 일차 아민에 컨쥬게이션시켰다.

[0407] 4) 반응 혼합물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 올리고뉴클레오티드-컨쥬게이션된 항체 또는 효소를 세파크릴(Sephacryl) S-200 HR 컬럼(GE Healthcare; Piscataway, NJ)을 이용한 젤 여과를 이용하여 정제하였다.

[0408] 컨쥬게이트 제한(Qualification):

[0409] 1) 글루코오스 옥시다아제(GO) 분자를 제 1 올리고뉴클레오티드 링커에 컨쥬게이션시킨 후, 생성된 GO-올리고뉴클레오티드의 3개의 분획을 정제 후에 수집하고, 10배 희석 시리즈의 니트로셀룰로오스-코팅된 슬라이드에 프린

팅하였다.

- [0410] 2) IgG를 Alexa 647 및 제 1 올리고뉴클레오티드 링커에 상보적인 서열을 지니는 제 2 올리고뉴클레오티드 링커에 컨주게이션시켰다. 생성된 Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨주게이션된 항체를 칩 상에 적용시키고, 실온에서 1시간 동안 1X PBS 완충용액 중에서 하이브리드화시키고, 수회 세척하였다.
- [0411] 3) 슬라이드를 건조시키고, 마이크로어레이 스캐너로 스캐닝하여, 뉴클레오티드 서열-특이적 하이브리드화를 확인하였다.
- [0412] 4) 글루코오스 옥시다아제 효소 분석으로 컨주게이션 방법이 효소의 기능을 변경시키지 않았음을 확인하였다.
- [0413] 도 17은 Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨주게이션된 항체가 분획 13-15에서 GO-올리고뉴클레오티드에 대해 가장 높은 결합 친화성을 지니는 것을 나타낸다.
- [0414] **실시예 8. 전체 EGFR 및 인산화된 EGFR의 동시 검출을 위한 올리고뉴클레오티드-컨주게이션된 항체.**
- [0415] 본 실시예는 실시예 7에 기재된 올리고뉴클레오티드 컨주게이트를 이용한 희귀 순환 세포에서의 신호 전달 분자의 활성화 상태를 분석하기 위한 다중 고속 처리 마이크로어레이 분석법을 예시한다:
- [0416] 1) 포획 항체를 16-pad FAST 슬라이드(Whatman Inc.)에 프린팅하였다.
- [0417] 2) 밤새 건조시킨 후, 슬라이드를 와트만 블로킹 완충용액으로 블로킹시켰다.
- [0418] 3) 80 μ l의 세포 용해질을 10배 연속 희석을 이용하여 각각의 패드에 첨가하였다. 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0419] 4) TBS-Tween으로 6회 세척 후, TBS-Tween/2% BSA/1% FBS 중에 희석된 근접 분석을 위한 80 μ l의 검출 항체를 슬라이드에 첨가하였다. 사용된 검출 항체는 (1) Alexa 647 및 올리고뉴클레오티드 링커에 직접 컨주게이션된 항-EGFR 모노클로날 항체로서, 상기 올리고뉴클레오티드 링커가 글루코오스 옥시다아제(GO)에 컨주게이션된 올리고뉴클레오티드 링커에 상보적인 서열을 포함하는 항-EGFR 모노클로날 항체; 및 (2) 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP)에 직접 컨주게이션된 인산화된 EGFR을 인지하는 모노클로날 항체였다. Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨주게이션된 항-EGFR 항체를 GO-올리고뉴클레오티드와 접촉시켜, 도 18에 도시된 복합체를 형성시켰다. TBS-Tween으로 6회 세척하여 과량의 결합되지 않은 시약을 제거하였다.
- [0420] 5) 이후, 글루코오스를 티라미드-Alexa 555와 함께 반응물에 첨가하였다.
- [0421] 6) 전체 EGFR 수준을 Alexa 647-올리고뉴클레오티드-컨주게이션된 항-EGFR 항체의 직접적인 결합에 의해 검출하였다. 인산화된 EGFR을 HRP-컨주게이션된 항-p-EGFR 항체에 대한 GO-올리고뉴클레오티드의 근접 결합에 의해 검출하고, 티라미드 신호 증폭에 의해 시각화시켰다.
- [0422] 7) 슬라이드를 마이크로어레이 스캐너(Perkin-Elmer, Inc.) 상에서 Alexa 647 및 Alexa 555에 특이적인 레이저를 이용하여 스캐닝하였다.
- [0423] 도 19는 전체 EGFR 및 인산화된 EGFR의 동시 검출을 도시한다. 전체 EGFR(t-EGFR)을 10개의 세포만큼 적은 세포로부터의 직접적인 결합 분석에 의해 검출하고, 인산화된 EGFR(p-EGFR)을 1개의 세포로부터 검출하였다. $10e^5$ p-EGFR 분자를 근접 신호 증폭 방법을 이용하여 검출하였다. 근접 분석 포맷을 이용함으로써 p-EGFR의 검출 한도는 100배 이상 증가하였다.
- [0424] **실시예 9. 유방암 환자에서의 순환 종양 세포(CTC) 신호전달의 검출.**
- [0425] 마이크로어레이 제작 및 처리는 문헌[Chan *et al.*, *Nat. Med.*, 10:1390-1396 (2004)]에 기재된 방법으로부터 적합되었다. 신호 전달인자 EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, IGF-1R, Akt, Erk, p70S6K, Bad, Rsk, Mek, cSrc, 사이토케라틴, 튜블린, β -액틴 및 항-마우스 항체(양성 대조군)(4/4 어레이)에 대한 항체(1 mg/ml)를 FAST[®] 슬라이드(Whatman Inc.; Florham Park, NJ)에 항체를 스포팅하기 위한 고체 스포팅 핀이 설치된 접촉 프린팅 로봇식 마이크로어레이어(microarrayer)(Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA)를 이용하여 384-웰 폴리프로필렌 플레이트(50 μ l/웰)로 옮겼다. 8개의 부채꼴로 분할된 패드로 코팅된 슬라이드를 사용하였다. 프린팅 후, 슬라이드를 3% 카세인 용액으로 블로킹시켰다. 슬라이드를 사용 전에 건조 상태 하에서 적어도 밤새 저장하였다.
- [0426] 환자 선택 기준, 샘플 제조 방법 및 연구 고안은 유방암을 지니는 것으로 여겨지는 여성에서 순환 종양 세포를 평가하는 공표된 연구로부터 적합된다(예를들어, 문헌[Wulfing *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 12:1715-1720

(2006); and Reinholz *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11 :3722-3732 (2005)] 참조. 화상진찰에서 검출된 유방 이상을 지니고 유방 생검을 겪은 여성을 이 연구에서 다루었다. 원발성 유방암을 지니는 것으로 진단된 42명 이상의 환자를 포함시켰다. 35명 이상의 환자는 1차 진단 시점에서 명백한 전이의 징후를 지니지 않았다. 7명 이상의 환자는 진단시 원위 전이를 지니고, 양성 참조 군으로 간주되었다. 환자중 누구도 이전의 암의 병력을 지니지 않았다. 연령 및 치료 정보(예를들어, 외과 치료, 화학요법, 방사선요법, 내분비 요법 등)를 각각의 환자에 대해 수집하였다. 약 20 ml의 혈액을 각각의 환자로부터 수집하고, 모든 혈액 샘플에 독특한 확인 번호를 지정하였다. 모든 분석을 생검 결과에 대해 블라인드 처리된 연구자들이 수행하였다.

[0427] 말초 혈액(18 ml)을 어쿠스핀 히스토페이크-1077(Accuspin Histopaque-1077) 시스템(Sigma Aldrich; St. Louis, MO)에 첨가하고, 베크먼 CS-6R 테이블탑(Beckman CS-6R tabletop) 원심분리기(Beckman Instruments; Palo Alto, CA)에서 10분 동안 1,500 rpm에서 원심분리하였다. 단핵 세포층을 분리하고, PBS로 2회 세척하고, PBS/0.1% 우혈청 알부민을 이용하여 1 ml로 희석시켰다. 상피 세포를 제조업체(Dynal AS; Oslo, Norway)의 설명서에 따라 다이나비드 상피 농화 키트를 이용하여 자기 비드에 부착된 Ber-EP4에 대한 항체를 이용한 면역자기 포획에 의해 농화시켰다. 세포를 1시간 동안 진동시키면서 20 ml의 부피의 1-107 비드와 혼합시켰다. Ber-EP4 항체는 편평 상피 세포, 간세포 및 벽세포의 표면층을 제외하고는 상피 세포의 표면 상 및 세포질 내의 2개의 당단백질을 인지한다. 현탁액을 6분 이상 동안 자석 위에 두고, 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 자기 비드에 부착된 세포를 1 ml PBS/0.1% 우혈청 알부민으로 3회 세척하였다. 성장 인자 TGF- α (100 nM), 헤레글린 (100 nM) 및 IGF(100 nM)을 세포에 첨가하고, 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포를 농축시키고, 키트에 공급된 용해 결합 완충용액으로 용해시켰다. 용해된 세포 현탁액(부착된 비드와 함께)을 처리때까지 80°C에서 저장하였다.

[0428] 분석 방법 1: 용해질(40 μ l)을 어레이에 적용시키고, 밤새 인큐베이션하고, 세척 완충용액으로 3회 세척하였다. 신호 전달인자의 각각에 대한 HRP-표지된 항-포스포 항체(예를들어, 문헌[Kuhlmann, *Immuno Enzyme Techniques*, Verlag Chemie, Weinheim, pp 1-162 (1984)]에 기재된 바와 같이 컨쥬게이션됨) 및 글루코오스 옥시다아제로 표지된 항-전체 항체(즉, 활성화 상태-비의존)(상기 문헌[Kuhlmann]에 기재된 바와 같이 컨쥬게이션됨)를 어레이에 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션시키고, 세척 완충용액으로 3회 세척하였다. 티라미드 시약(Molecular Probes) 및 글루코오스를 첨가하고, 반응을 1시간 동안 발달시키고, 3회 세척하였다. 어레이를 30분 동안 스트렙타비딘-HRP과 함께 인큐베이션시키고, 세척하고, 향상된 루미놀(enhanced luminol)(Molecular Probes)을 이용하여 발달시켰다. CCD 카메라를 이용하여 신호를 검출하였다.

[0429] 분석 방법 2: 2,4-디니트로페놀(DNP)에 대한 항체(1 mg/ml)를 FAST[®] 슬라이드(Whatman Inc.; Florham Park, NJ)로 항체를 스포팅하기 위한 고체 스포팅 핀이 장비된 접촉 프린팅 로봇식 마이크로어레이어(Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA)를 이용하여 384-웰 폴리프로필렌 플레이트(5 μ l/웰)로 옮겼다. 8개의 부채꼴로 분할된 패드로 코팅된 슬라이드를 사용하였다. 프린팅 후, 슬라이드를 3% 카세인 용액으로 블로킹시켰다. 슬라이드를 사용 전에 건조 조건하에서 적어도 밤새 저장하였다.

[0430] 용해질(40 μ l)을 상기 신호 전달인자의 각각에 대한 전체 DNP-표지된 항체와 함께 혼합시키고, Oligo 및 Alexa Fluor[®] 647로 표지된 항-포스포 항체 및 Oligo 및 Alexa Fluor[®] 647로 표지된 항-전체 항체를 항-DNP 항체에 첨가하고, 밤새 인큐베이션시키고, 세척 완충용액으로 3회 세척하였다. 2,4-디니트로 리신(Molecular Probes)을 첨가하여 항-DNP 항체로부터 면역 복합체를 방출시켰다. 방출된 면역 복합체를 집-코드 어레이(예를들어, 문헌[Keramas *et al.*, *Lab Chip*, 4:152-158 (2004); and Delrio-Lafreniere *et al.*, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 48:23-31 (2004)] 참조)에 첨가하고, 밤새 인큐베이션하였다. 어레이를 3회 세척하고, 처리된 슬라이드를 10 마이크로미터 해상도에서 젠픽스(GenePix) 4000A 마이크로어레이 스캐너(Axon Scanner)를 이용하여 스캐닝하였다.

[0431] 실시예 10. 유방암 환자에서의 순환 내피 세포(CEC) 및 순환 내피 전구세포(CEP)의 검출.

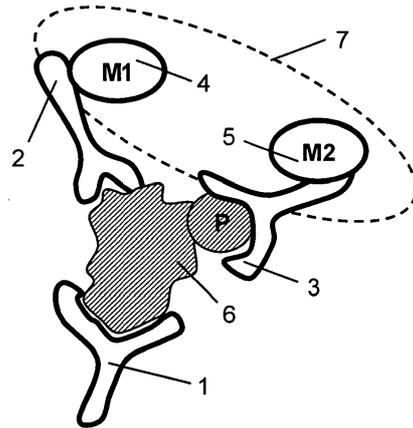
[0432] CEC 및 CEP 세포를 자기 다이나비드에 부착된 모노클로날 항체 PIH12 또는 CD146을 이용한 면역자기 포획에 의해 농화시킨 것을 제외하고는, 실시예 9에 기재된 것과 동일한 환자의 샘플, 샘플 제조물 및 분석 방법을 사용하였다. 어레이된 항체가 하기 분석물에 특이적인 것을 제외하고는, 실시예 9에 기재된 방법을 이용하여 마이크로어레이를 제작하고, 처리하였다: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, TIE1, TIE2, PDGFR- α , PDGFR- β , FGFR1, FGFR2, Akt, Erk, p70S6K, Rsk, cSrc 및 β -액틴. CEC 및 CEP 신호전달을 검출하기 위해 실시예 9에 기재된 분석 방법을 사용하였다.

[0433]

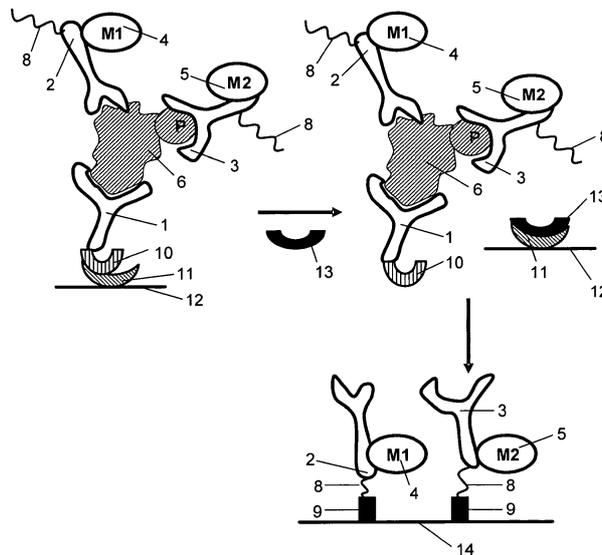
본 명세서에 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별적 간행물 또는 특허 출원이 참조로서 포함되는 것으로 특별하고 개별적으로 지정된 것과 같이 참조로서 본원에 포함된다. 상술된 발명은 명료한 이해를 위해 예시 및 예를 들어서 다소 상세하기 기재되었으나, 첨부된 청구의 범위의 사상 또는 범위로부터 벗어남이 없이 발명에 대해 특정 변경 및 변형이 이루어질 수 있음이 본 발명의 교시내용에 비추어 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

도면

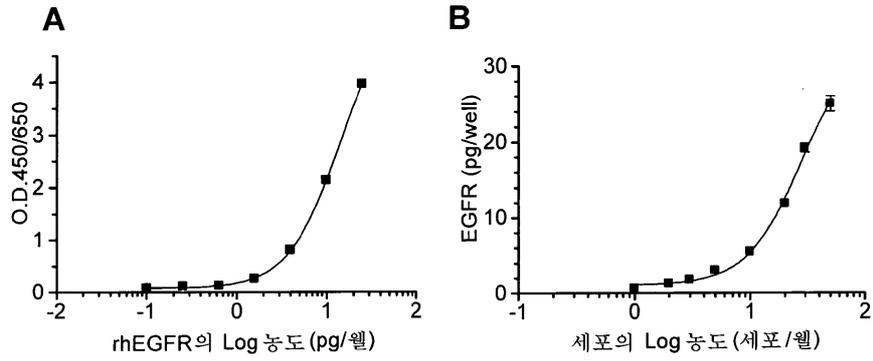
도면1



도면2



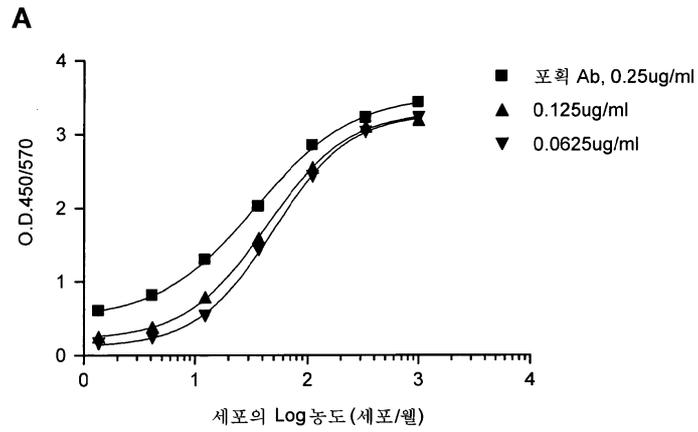
도면3



C

세포/웰	EGFR (pg/웰)	EGFR (pg/세포)
50	25.00 ± 1.40	0.50
30	19.20 ± 0.83	0.64
20	11.87 ± 0.08	0.59
10	5.49 ± 0.251	0.55
5	3.00 ± 0.016	0.60
3	1.75 ± 0.019	0.58
2	1.28 ± 0.068	0.64
1	0.66 ± 0.012	0.66

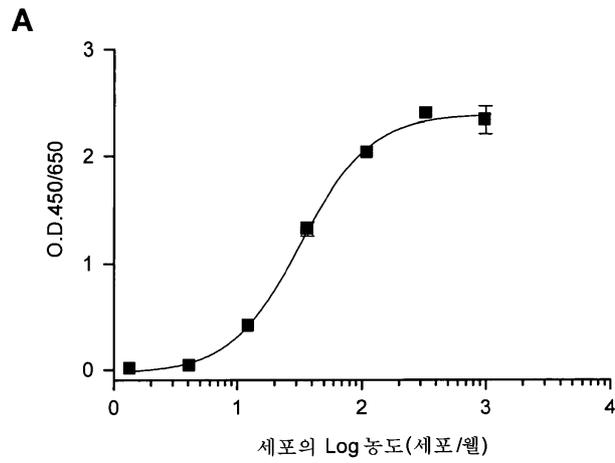
도면4



B

S/N 비 세포/웰	포획 Ab 농도		
	0.25ug/ml	0.125ug/ml	0.0625ug/ml
1,000	9.10	19.71	36.12
333	8.57	19.17	34.02
111	7.58	15.70	27.27
37	5.38	9.81	16.15
12	3.47	4.88	5.98
4	2.16	2.33	2.60
1	1.60	1.53	1.78
0	1.00	1.00	1.00

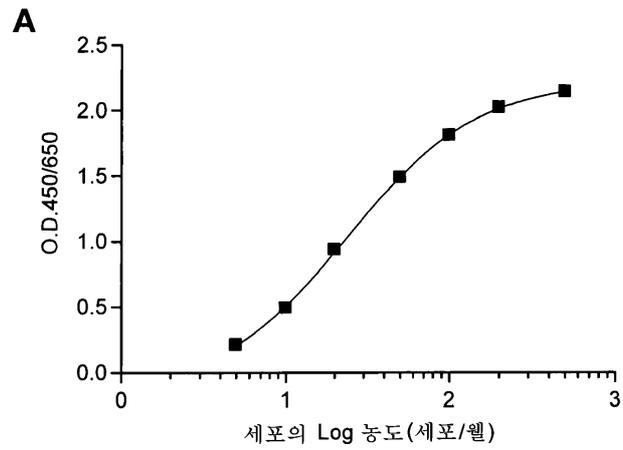
도면5



B

세포/웰	O.D.450/650		평균	S/N 비
1,000.00	2.47	2.208	2.339	668.29
333.33	2.432	2.363	2.3975	685.00
111.11	2.019	2.048	2.0335	581.00
37.04	1.255	1.386	1.3205	377.29
12.35	0.393	0.435	0.414	118.29
4.12	0.04	0.037	0.0385	11.00
1.37	0.012	0.007	0.0095	2.71
0	0.004	0.003	0.0035	1.00

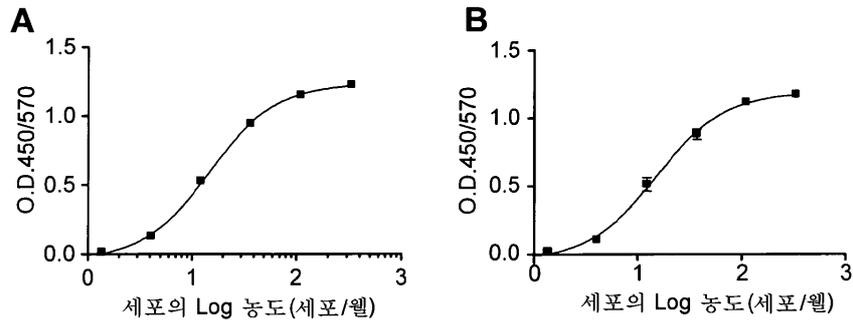
도면6



B

세포/웰	O.D.450/650		S/N 비
500	2.135	2.143	30.56
200	2.002	2.035	28.84
100	1.796	1.818	25.81
50	1.489	1.483	21.23
20	0.956	0.915	13.36
10	0.495	0.487	7.01
5	0.208	0.216	3.03
0	0.07	0.07	1.00

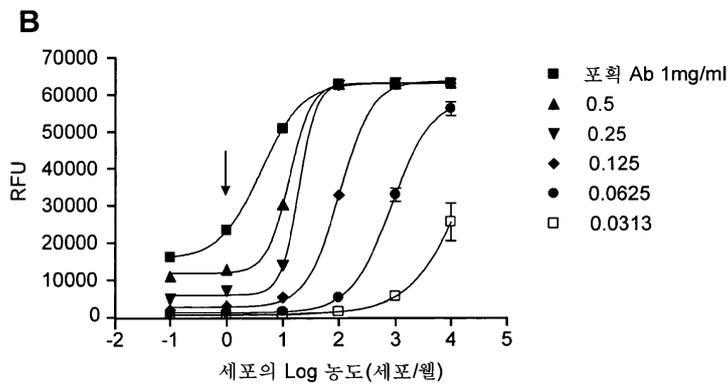
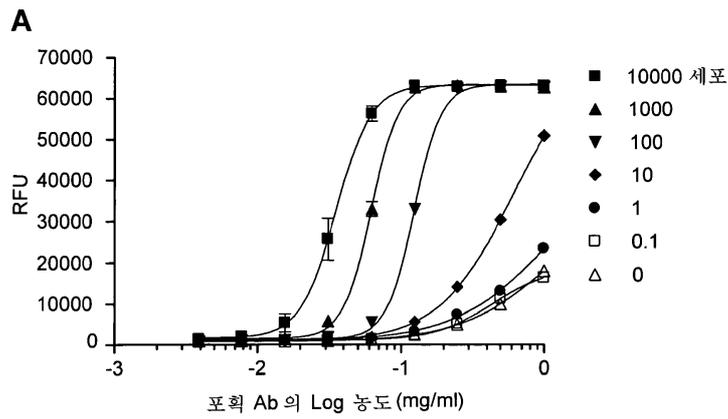
도면7



C

세포 (세포/웰)	전체 Erk2		S/N 비	포스포-Erk2		S/N 비
	(O.D.450/570)			(O.D.450/570)		
1000	1.097	1.076	271.63	1.086	1.054	356.67
333.3333	1.241	1.214	306.88	1.193	1.144	389.50
111.1111	1.163	1.141	288.00	1.136	1.087	370.50
37.03704	0.958	0.923	235.13	0.913	0.838	291.83
12.34568	0.52	0.533	131.63	0.555	0.455	168.33
4.115226	0.114	0.139	31.63	0.102	0.093	32.50
1.371742	0.016	0.01	3.25	0.012	0.007	3.17
0	0.004	0.004	1.00	0.003	0.003	1.00

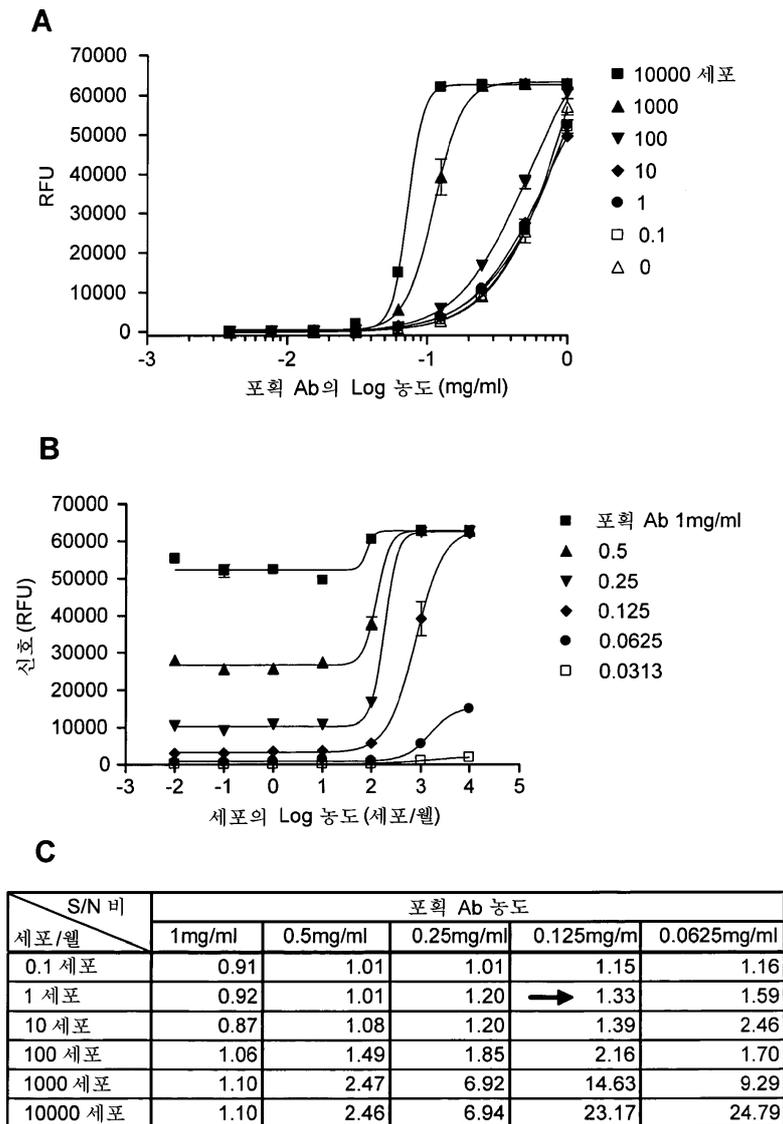
도면8



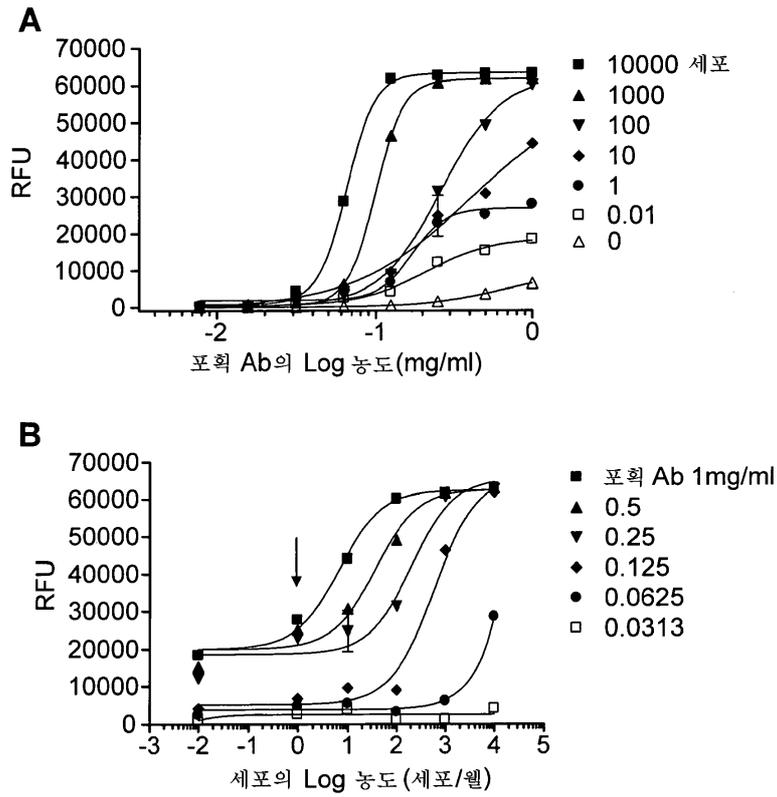
C

S/N 비 세포/웰	포획 Ab 농도				
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	0.0625mg/ml
0.1 세포	0.90	1.15	1.03	0.86	1.17
1 세포	1.32	1.35	1.59	1.50	→ 2.11
10 세포	2.94	3.30	3.30	3.07	3.14
100 세포	3.64	6.95	15.52	21.35	16.52
1000 세포	3.63	6.96	15.69	41.34	118.78
10000 세포	3.66	6.98	15.63	41.57	204.97

도면9



도면10

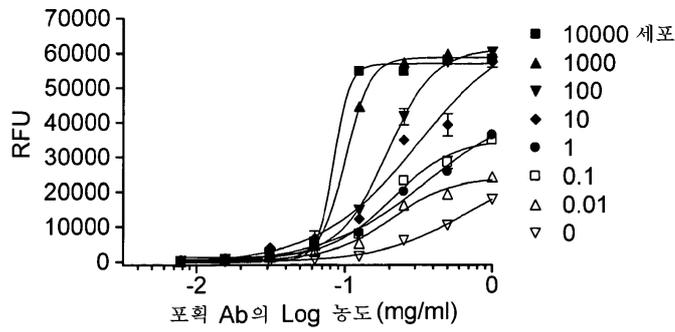


C

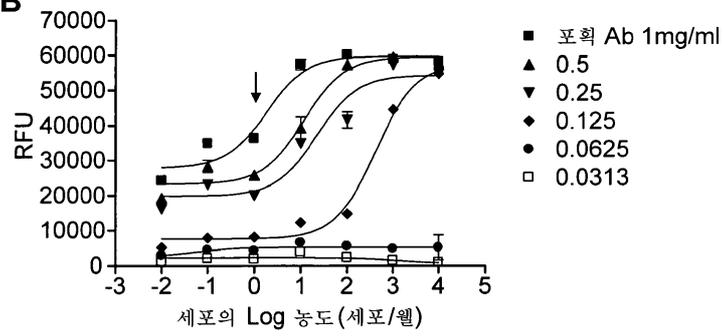
S/N 비 세포/웰	포획 Ab 농도				
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/m	0.0625mg/ml
0.01 세포	2.86	4.26	7.59	9.40	16.23
1 세포	4.31	7.00	14.34	15.27	32.21
10 세포	6.84	8.56	15.49	21.74	35.90
100 세포	9.32	13.66	19.58	20.24	21.30
1000 세포	9.58	17.19	37.90	104.95	40.58
10000 세포	9.79	17.55	39.15	139.96	188.23

도면11

A



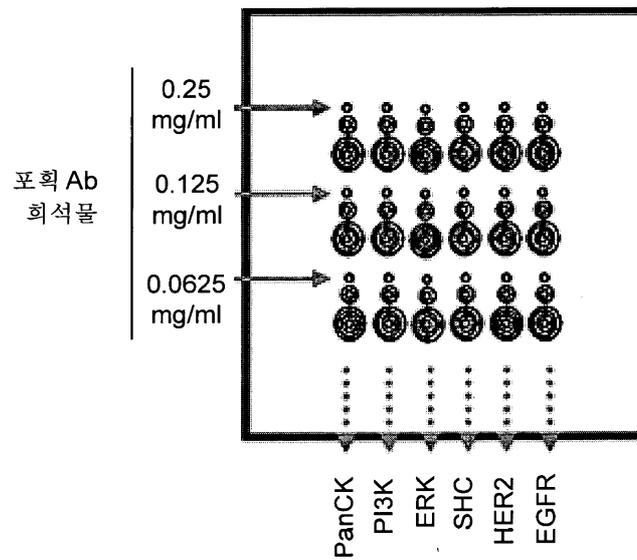
B



C

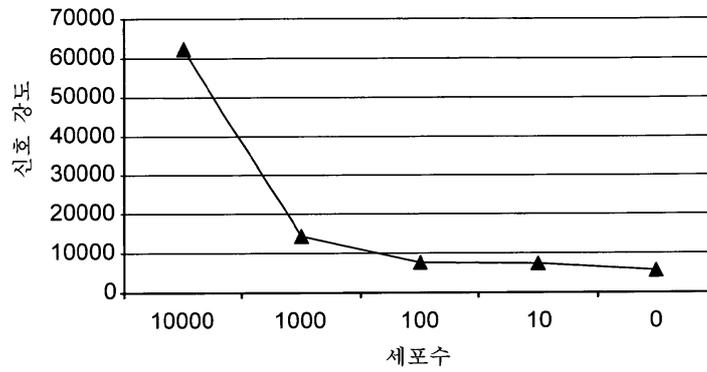
S/N 비 세포/웰	포획 Ab 농도				
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	0.0625mg/ml
0.01 세포	1.36	1.87	2.69	3.47	5.22
0.1 세포	1.95	2.74	3.86	5.24	8.01
1 세포	2.04	2.49	3.34	→ 5.45	7.62
10 세포	3.21	3.79	5.81	8.21	11.72
100 세포	3.37	5.54	6.93	9.86	9.99
1000 세포	3.29	5.75	9.54	29.81	8.53
10000 세포	3.26	5.59	9.11	36.63	9.34

도면14

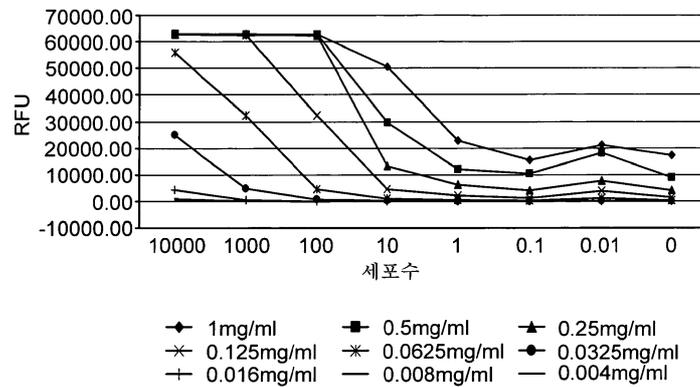


도면15

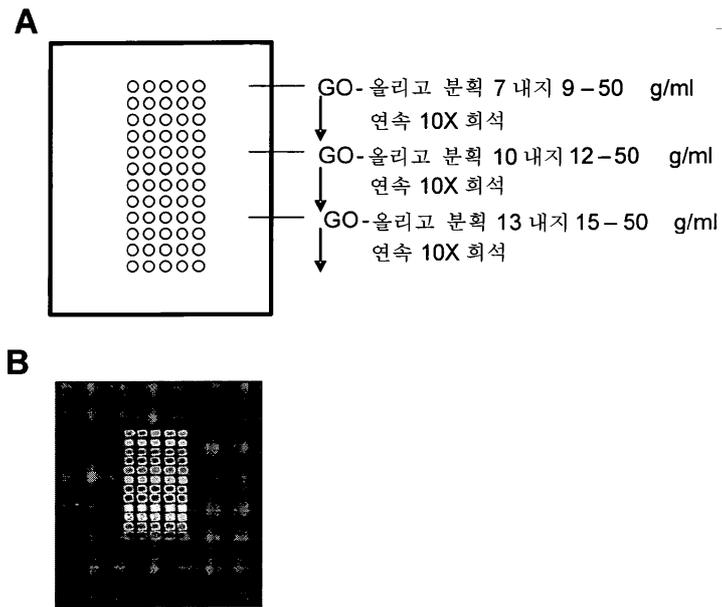
SHC에 대한 A431 세포 적정



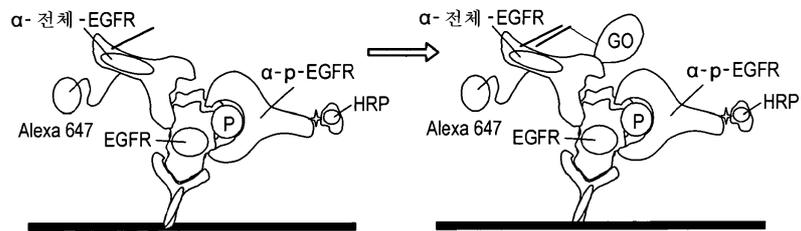
도면16



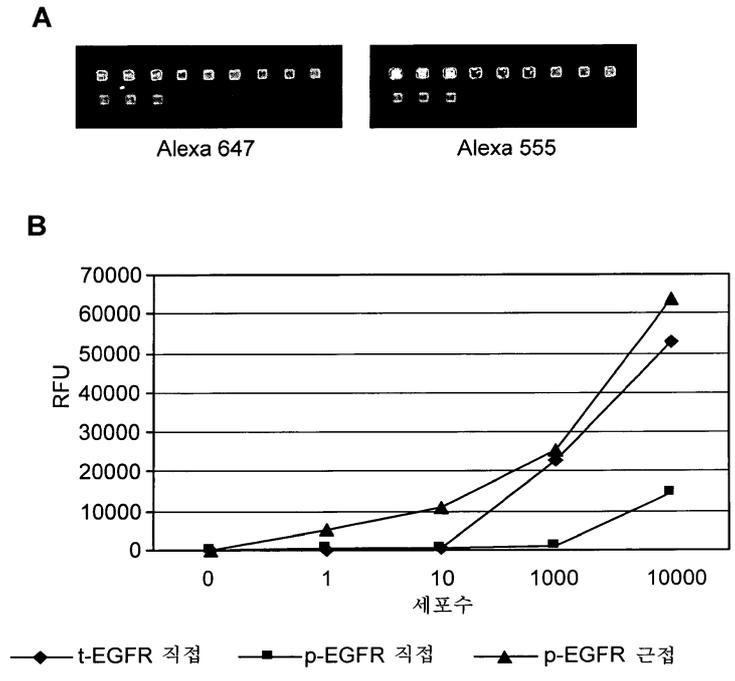
도면17



도면18



도면19



专利名称(译)	用于检测稀有循环细胞中多种信号因子的基于抗体的分析		
公开(公告)号	KR101424304B1	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	KR1020097008026	申请日	2007-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	네스텍소시에테아노님		
当前申请(专利权)人(译)	네스텍소시에테아노님		
[标]发明人	HARVEY JEANNE 하비진 SINGH SHARAT 싱샤라트 KIM PHILLIP 김필립 LIU XINJUN 리우신전 BARHAM ROBERT 바햄로버트 LIU LIMIN 리우리민		
发明人	하비,진 싱,샤라트 김,필립 리우,신전 바햄,로버트 리우,리민		
IPC分类号	G01N33/543 A61P35/00 G01N33/533 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/54306		
优先权	11/525598 2006-09-21 US 60/913087 2007-04-20 US		
其他公开文献	KR1020090074048A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)	ÒKIPO0026 #WIPO 2009		

