(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0024593
(43) 공개일자 2018년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0111062
(22) 출원일자 2016년08월30일
심사청구일자 2016년08월30일

(71) 출원인
주식회사 엠디헬스케어
서울특별시 마포구 월드컵북로56길 9, 1303호(상암동, 우리기술빌딩)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김윤근
경기도 남양주시 호평로 93, 1707동 805호 (호평동, 동원로얄듀크아파트)
오연목
서울특별시 강남구 삼성로85길 11, 101동 502호 (대치동, 롯데캐슬아파트)
김유선
서울특별시 강남구 남부순환로363길 30, 101동 404호 (도곡동, 도곡쌍용예가아파트)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 19 항

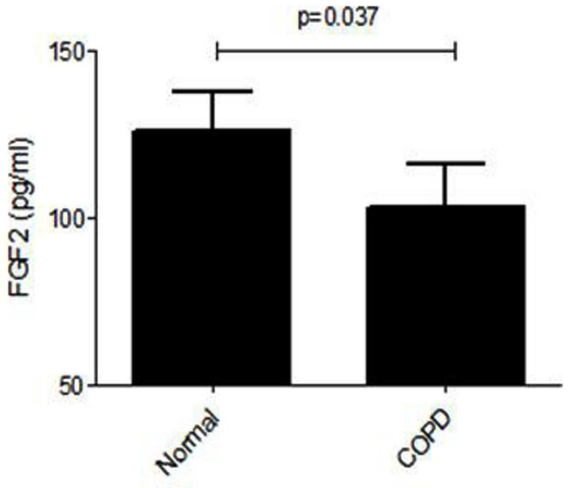
(54) 발명의 명칭 **폐질환 발병 위험도 예측을 위한 바이오마커 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물, 상기 유전자 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물, 및 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법 등에 관한 것이다.

본 발명에 따른 폐질환 발병 위험성 예측기술은 FGF2의 수준을 측정함으로써 폐기능 상태를 파악하여 폐질환이 발병하기 전 발병 위험성을 미리 예측하는 사전적 방법이므로, 폐질환 위험군을 조기에 진단 및 예측하여 적절한 관리를 통해 발병시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있고, 발병되더라도 폐질환을 조기진단 할 수 있어 폐질환의 발병률을 낮추고 치료효과를 높이는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/50 (2013.01)
G01N 2800/12 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 FGF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 FGF2 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폐질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 또는 폐암인 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 5

FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 FGF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 FGF2 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 폐질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 또는 폐암인 것을 특징으로 하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물.

청구항 11

제5항의 조성물을 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 키트.

청구항 12

인간 피검체 유래의 생물학적 시료에 대하여,

FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 FGF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 FGF2 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 폐질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 또는 폐암인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 mRNA 수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 17

제12항에 있어서,

상기 단백질 수준은 항체기반 또는 압타머기반 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 항체기반 방법은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 압타머기반 방법은 압타머의 광학 혹은 전기화학적 변화를 감지하는 것으로부터 선택되는 1종 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물, 상기 유전자 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물, 및 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐(lung)는 인체에서 호흡을 담당하는 필수적인 기관으로, 공기의 들숨과 날숨을 통해 산소를 얻고 이산화탄소를 배출하는 기관이다. 이러한 폐는 생명현상의 유지를 위해 기능하고, 폐에서 체액 성분이 활발하게 상피세포를 통해 흡수 또는 배출되며, 경우에 따라서는 흡입형 약물의 전달통로가 될 수 있다.

[0003] 이러한 폐에 나타나는 폐질환 중에서 대표적인 질환인 천식(Asthma)은 지난 20년 동안 발병률이 두 배로 증가하고 오늘날 8~10%의 세계 인구에 영향을 미치고 있는 질환이며, 주로 기도의 만성 염증에 의해 일어난다. 천식은 비 특이적 자극에 대한 기도과민성(Airway HyperResponsiveness; AHR) 및 기도개형으로 특징지어지며, 후자는 섬유모세포(Fibroblast) 및 근섬유모세포(Myofibroblasts)와 같은 관련 구성성분의 구조 및 기능의 변화가 수반된다. 천식의 종류에는 기관지 천식 및 심장성 천식 등이 있는데, 단순히 천식은 보통의 경우 기관지 천식을 의미한다.

[0004] 천식과 함께 대표적인 폐질환의 하나로 꼽히는 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)은 비가역적인 기도 폐색을 동반한다는 점에서 천식과 차이가 있다. 기도 및 폐실질 염증에 의한 세기관지 및 폐실질의 병리학적 변화에 의해 발생하는 질환으로 폐쇄성 세기관지염 및 폐기종을 특징으로 한다. 만성폐쇄성폐질환의 종류에는 만성폐쇄성기관지염(Chronic obstructive bronchitis), 만성세기관지염(Chronic bronchiolitis), 및 폐기종(Emphysema)이 있으며, 호흡곤란, 기침, 가래 등의 증상이 나타나고, 만성기관지염 환자 중의 대다수에서 나타난다고 알려져 있다. 전 세계적으로 3억 2900만 명, 혹은 전 세계 인구의 5%에 가까운 사람들이 이 질환을 앓고 있으며, 2012년 사망원인 3위로 보고된바 있다. 현재에도 여러 국가들의 고령화와 높은 흡연율로 사망자 수는 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다(Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030, PLoS Med., 3 (11): e442.).

[0005] 만성폐쇄성폐질환을 포함하여 폐질환의 80~90%정도 발병의 주된 원인은 흡연으로 알려져 있다. 이러한 폐질환은 대체적으로 초기부터 증상이 나타나지 않지만 발병 후 폐에 이상이 생기면서 가슴이 답답해지거나 만성 기침, 호흡곤란 등의 증상이 나타나고, 초반부터 증상이 확연히 드러나지 않기 때문에 적절한 치료시기를 놓치는 경우가 많다.

[0006] 따라서 폐질환이 발병한 후 증상이 나타나기 전 폐질환의 발병 여부를 미리 예측 가능하게 함으로써 조기진단 및 치료에 대한 대응방법을 차별화하는 것은 매우 중요하므로, 이에 대한 연구 및 기술개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 폐질환의 발병 위험성을 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 만성폐쇄성폐질환 환자 및 담배 연기에 노출시켜 폐 염증 및 폐포 파괴 등이 유발된 마우스 모델에서 FGF2의 유의적인 감소를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측용 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로, 상기 FGF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 FGF2 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 폐질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 또는 폐암일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및

안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 인간 피검체 유래의 생물학적 시료에 대하여, FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예로, 상기 mRNA 수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단백질 수준은 항체기반 또는 압타머기반 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항체기반 방법은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 압타머기반 방법은 압타머의 광학 혹은 전기화학적 변화를 감지하는 것으로부터 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의, 폐질환 발병 위험도 예측용도를 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 폐질환 발병 위험성 예측기술은 FGF2의 수준을 측정함으로써 폐기능 상태를 파악하여 폐질환이 발병하기 전 발병 위험성을 미리 예측하는 사전적 방법이므로, 폐질환 위험군을 조기에 진단 및 예측하여 적절한 관리를 통해 발병 시기를 늦추거나 발병을 예방할 수 있고, 발병되더라도 폐질환을 조기진단 할 수 있어 폐질환의 발병률을 낮추고 치료효과를 높이는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은, 정상인 및 만성폐쇄성폐질환(COPD) 환자의 혈청으로부터 FGF2 단백질 수준을 ELISA로 측정하여 나타낸 결과이다.

도 2a 내지 도 2c는, 담배연기에 각각 1회(도 2a), 4일(도 2b), 및 6개월(도 2c) 동안 노출시킨 마우스의 폐 조직 내 FGF2 단백질 수준을 ELISA로 측정하여 나타낸 결과이다.

도 3a 내지 도 3d는, 단기간 담배연기에 노출된 마우스 모델의 표현형을 분석하기 위한 것으로, 정상대조군(Normal air) 및 담배연기 노출 군(Smoking) 간의 기관지폐포세척액 내 염증세포 수(도 3a), 폐포 파괴정도(도 3b), Caspase 3/7 활성(도 3c), 및 엘라스타아제(elastase) 활성(도 3d)을 측정하여 비교한 결과이다.

도 4a 내지 도 4c는, FGF2에 의한 폐 조직 내 염증세포 및 폐포 파괴정도 감소를 알아보기 위한 것으로, 4일 동안 매일 담배연기에 노출시킨 후 재조합 FGF2 단백질을 각각 0.1, 10, 1000 pg의 농도로 비강 투여한 마우스에서 기관지폐포세척액 내 염증세포(대식세포 및 림프구)의 수 감소(도 4a), 폐포 파괴정도 감소(도 4b 및 도 4c)를 확인한 결과이다.

도 5a 및 도 5b는, FGF2에 의한 폐 세포의 세포사멸(apoptosis) 감소를 알아보기 위한 것으로, 도 4와 동일한 마우스 대조군 및 실험군에서 폐 세포 내 Caspase 3/7 활성 감소(도 5a) 및 pro-와 active caspase 3 단백질 발현 감소(도 5b)를 확인한 결과이다.

도 6a 및 도 6b는, 폐기종 마우스 모델에서 FGF2에 의한 폐 조직 재생효과를 알아보기 위한 것으로, 엘라스타아제를 주입하여 폐기종을 유발시킨 마우스에 재조합 FGF2 단백질 10 pg을 비강으로 주입한 후 폐포 파괴 감소를 Mean Linear Intercept 지수(도 6a) 및 폐 조직의 H&E 염색(도 6b)을 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명자들은 폐질환의 발병 위험성을 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 만성폐쇄성폐질환 환자 및 담배 연기에 노출시켜 폐 염증 및 폐포 파괴 등이 유발된 마우스 모델에서 FGF2의 감소를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0029] 이에, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 FGF2(Fibroblast Growth Factor 2) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 조성물 및 이를 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측용 키트를 제공한다.

[0031] 본 발명의 상기 FGF2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 FGF2 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 폐질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환(COPD), 만성폐쇄성기관지염, 만성세기관지염, 폐기종, 또는 폐암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "폐질환 발병 위험도 예측" 이란 환자에 대하여 폐질환이 발병할 가능성이 있는지, 폐질환이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 폐질환이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명의 방법은 임의의 특정 환자에 대한 폐질환 발병 위험도가 높은 환자로써 특별하고 적절한 관리를 통하여 발병 시기를 늦추거나 발병하지 않도록 하는데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 폐질환을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료방식을 선택함으로써 치료를 결정하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.

[0034] 상기 FGF2 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.

[0037] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이종결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 용어, “압타머”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다.

[0040] 본 발명의 폐질환 발병 위험도 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.

[0041] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제,

DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량구조 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 본 발명의 마커 유전자가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이 형태일 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함하며, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함한다. 상기 ELISA 키트는 “항원-항체 복합체”를 형성한 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면 표지된 2차 항체, 발색단(chromopores), 효소, 및 그의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어 “항원-항체 복합체”란 유전자가 코딩하는 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미한다. 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 또한, 본 발명은 인간 피검체 유래의 생물학적 시료에 대하여, FGF2 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 폐질환 발병 위험도 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0047] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0048] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 또는 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 단백질 발현수준은 항체기반 또는 압타머기반 방법을 통해 측정될 수 있는데, 상기 항체기반 방법은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 또는 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있고, 상기 압타머기반 방법은 압타머의 광학 혹은 전기화학적 변화를 감지하는 것으로부터 선택되는 1종 이상의 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명자들은 만성폐쇄성폐질환 환자의 혈청 및 상기 질환과 유사한 표현형을 나타내는 단기간 담배연기에 노출시킨 마우스의 폐 조직에서 FGF2 생성이 유의하게 감소함을 확인함으로써 폐질환을 유발하는 폐 기능 저하와 FGF2에 밀접한 연관성이 있음을 규명하였다.

[0051] 본 발명의 일실시예에서는, 만성폐쇄성폐질환 환자와 혈청에서 FGF2 단백질 수준이 정상인에 비해 감소되어 있음을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0052] 본 발명의 다른 실시예에서는, 단기간 동안 담배연기에 노출시킨 마우스군에서 정상인에 비해 폐 조직 내 FGF2 수준이 감소됨을 확인하였고(실시예 3 참조), 상기 담배연기에 노출된 마우스들의 폐에서 나타나는 표현형 즉, 염증세포인 대식세포 수 증가, 폐 조직 파괴, 폐 세포 사멸 증가 등이 만성폐쇄성폐질환 환자와 유사함을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0053] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 담배연기에 노출시킨 마우스에 재조합 FGF2 단백질을 주입함으로써 염증세포 감소 및 폐 조직 개선, 세포사멸 감소 등을 통해 FGF2에 의한 폐 기능 개선 효과를 알 수 있었고(실시예 5 참조), 폐기종 마우스 모델에서도 FGF2 단백질 주입에 의한 폐 조직 재생 효과를 확인하였다(실시예 6 참조).

[0054] 상기 결과들을 통해 FGF2 유전자 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질이 폐질환의 발병 위험성 예측을 위한 분자마커로 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0058] [실시예]

[0059] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[0060] 1-1. 동물모델 제작

[0061] 동물모델 제작을 위해, C57BL/6J 마우스를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입한 후 서울아산병원의 무균 동물실험실에서 사육하였으며, 7주령의 암컷 마우스를 시중에서 구매 가능한 일반 담배연기에 노출시키는 방법을 이용하였다. 보다 구체적으로, 마우스를 펌프와 연결된 흡입상자(50 x 40 x 30)에 넣고 1회, 4일, 또는 일주일에 5일씩 6개월간 담배연기에 노출시켰다. 단기간 담배연기 노출에 따른 영향을 평가하기 위해서는 4일 동안 담배연기에 노출시킨 마우스를 희생시키고 폐를 적출하였다.

[0062] 또한, 담배연기에 노출된 마우스에서 FGF2의 영향을 알아보기 위해, 마우스를 매일 담배연기에 노출시킨 후 즉시 재조합 FGF2를 각각 0.1, 10, 1000 pg의 농도로 비강으로 투여하였다. 이후 5일째에 마우스를 희생시켜 폐를 적출하였다.

[0063] 이에 더하여 엘라스타아제(elastase)에 의한 폐기종 마우스 모델에서 FGF2의 영향을 알아보기 위해, C57BL/6 마우스에 0.4U의 돼지 엘라스타아제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 기관내로 투여하였고, 이후 7일~13일째까지 하루에 한번 FGF2를 비강으로 투여하였으며, FGF2 수용체 1 및 3의 억제제인 PD173074는 복강 내 투여하였다. 이후 14일째에 마우스를 희생시켜 폐를 적출하였다. 모든 마우스 동물실험은 아산병원의 실험동물운영위원회로부터 승인받은 후 진행하였다.

[0065] 1-2. FGF2 측정

[0066] 정상인 및 만성폐쇄성폐질환(COPD) 환자의 혈청을 이용해 FGF2를 측정하였고, 마우스의 FGF2를 측정하기 위해 폐 조직에 RIPA buffer(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 첨가하고 균질화한 후 Brad-ford assay를 이용해 단백질 정량을 수행하였다. FGF2 수준은 R&D systems(Minneapolis, MN)을 이용해 제공된 프로토콜에 따라 ELISA를 실시하여 측정하였다.

[0068] 1-3. 기관지폐포세척액 내 염증세포 수 측정

[0069] 기관지폐포세척액에서 염증세포 수를 측정하기 위해, PBS를 이용해 폐에서 얻은 기관지폐포세척을 원심분리하여 모든 세포들을 수집하였다. 기관지폐포세척액으로부터 얻어진 총 세포 수를 트리판 블루(trypan-blue) 염색법을 이용해 측정하였고, 세포 펠렛은 500 ㎕ PBS로 희석하였다. 염증세포 및 기관지폐포세척액 분화 세포는 Diff-Quick 염색법을 이용해 개수를 측정하였으며, 염증세포는 대식세포(macrophage), 림프구(lymphocyte), 중성구(neutrophils), 또는 호산구(eosinophils)로 분류하였다.

[0071] 1-4. 폐기종의 조직학 및 정량화

[0072] 폐를 PBS로 관류시킨 후, 25 cmH_2O에서 0.5% low-melting agar를 기관내로 투입하여 부풀리고 4% 파라포름알데히드로 폐 조직을 고정시킨 후 파라핀에 포매시켰다. 이후 파라핀 포매 조직을 4 ㎛ 두께로 절단하고 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 실시하였다. MLI(mean linear intercepts)는 맹검법을 이용해 두 명의 조사자들로 하여금 각각 결정하도록 하였다.

[0074] 1-5. caspase-3/7 활성 측정 및 웨스턴 블롯

[0075] RIPA buffer를 첨가하고 폐 조직을 균질화하여 얻은 단백질 10 ㎍을 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 Apo-one homogeneous caspase 3/7 assay kit(Promega, Madison, WI)를 이용해 각 샘플의 형광을 측정하여 caspase 3/7

의 활성을 측정하였다. 또한, 폐 조직세포에서 pro- 및 활성형태의 caspase 3의 단백질을 정량화하기 위해 anti-caspase 3 다클론 항체(Enzo)를 이용해 웨스턴 블롯을 실시하였다.

[0077] **1-6. 엘라스타아제 활성 측정**

[0078] 단백질 분해효소 억제제(protease inhibitor)가 첨가되지 않은 단백질 용해 버퍼(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)를 넣고 폐 조직을 균질화 한 후 EnzCheck Elastase Asssay kit(Moleuclar Probes)를 이용해 폐 조직세포 내 엘라스타아제의 활성을 측정하였다.

[0080] **1-7. 통계분석**

[0081] 데이터는 평균±표준오차로 표시하였고, 두 그룹간 결과 비교를 위해 Mann-Whitney test를 이용하였다. 2 way ANOVA test는 기간지폐포세척액 세포질의 통계분석을 위해 이용하였다.

[0083] **실시예 2. 만성폐쇄성폐질환 환자에서 FGF2 수준 측정**

[0084] FGF2 수준과 만성폐쇄성폐질환(COPD)과의 관련성을 알아보기 위해, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 FEV_1 수치를 제외하고 연령 및 다른 조건이 유사한 사람들로 구성된 COPD 환자 또는 정상인의 혈청을 이용해 상기 실시예 1-2의 방법에 따라 ELISA를 실시하여 FGF2 단백질의 수준을 측정하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 정상인에 비해 COPD 환자의 혈청에서 FGF2 수준이 감소되어 있는 것을 확인하였다.

표 1

[0085]

	Subjects	
	Normal	COPD
Number of subjects	10	10
Age, years	63±8	63±8
Male subjects, %	100%	80%
Smoke PY	28±7	28±7
FEV_1 Predict, %	95±8	33±10

[0086]

[0087] **실시예 3. 담배연기에 노출된 마우스 모델에서 FGF2 생성 감소 확인**

[0088] FGF2 생성에 있어서 담배연기 노출이 영향을 미치는지 알아보기 위해, 상기 실시예 1-1의 방법에 따라 동물실험을 실시하였다.

[0089] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 마우스를 담배연기에 한번 노출시킨 후 3시간 또는 24시간에 마우스의 폐 조직에서 FGF2 단백질 수준을 측정한 경우, 담배연기에 노출되지 않은 정상대조군(Normal air)에 비해 FGF2의 단백질 수준이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 또한, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 담배연기에 4일 동안 지속적으로 노출시킨 마우스의 경우에도 정상대조군에 비해 폐 조직 내 FGF2 단백질 수준이 감소하였다. 반면에 도 2c를 통해 6개월 동안 담배연기에 노출시킨 마우스의 경우에는 정상대조군과 거의 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0090] 상기 결과를 통해 단기간 동안 담배연기에 노출된 경우 폐 조직 내 FGF2 단백질 수준이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0092] **실시예 4. 단기간 담배연기에 노출된 마우스의 표현형 분석**

[0093] 상기 실시예 3의 결과를 통해 초기의 담배연기에 대한 노출이 FGF2 단백질 수준 감소에 영향을 미침을 확인하였는바, C57BL/6 마우스를 4일 동안 담배연기에 노출시킨 후 표현형을 분석하고자 하였다. 이를 위해, 담배연기

노출 5일 후 마우스들에 대하여 COPD 환자들에서 나타나는 표현형인 염증 및 폐기종 지수(index)를 평가하였다.

[0094] 먼저 기관지폐포세척액 내 염증세포 수를 측정한 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 정상대조군(Normal air)에 비하여 담배연기에 노출된 마우스(Smoking)의 경우 기관지폐포세척액 내에 대식세포 수가 현저히 증가한 것을 확인하였다. 다음으로 폐 조직에 대해 H&E 염색을 실시하여 폐포 조직 파괴정도를 관찰한 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이 정상대조군에 비해 담배연기에 노출 군에서 폐포 파괴정도가 유의적으로 증가한 것을 알 수 있었다.

[0095] 또한, 상기와 같은 폐포 파괴는 대표적으로 폐 상주세포들의 세포사멸(apoptosis) 및 단백질 분해효소 활성 증가를 야기한다. 따라서 폐 세포의 세포사멸 여부를 알아보기 위해 caspase 3/7의 활성을 측정한 결과, 도 3c에 나타낸 바와 같이 폐포 파괴 증가가 관찰된 담배연기 노출 군에서 caspase 3/7의 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 반면에 도 3d에서 볼 수 있듯이 혈관벽 구성성분이며 엘라스틴 분해효소인 엘라스타아제의 활성은 정상대조군과 담배연기 노출 군에서 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0096] 상기 결과를 통해, 단기간 동안 담배연기에 노출된 마우스에서 대식세포에 의한 염증 및 폐포 파괴와 같은 COPD 환자와 유사한 표현형이 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0098] **실시예 5. 단기간 담배연기에 노출된 마우스에서 재조합 FGF2에 의한 보호효과 확인**

[0099] **5-1. 염증세포 및 폐포 파괴 정도 감소 확인**

[0100] 상기 실시예 3 및 4의 결과를 바탕으로, FGF2가 단기간 동안 담배연기가 노출된 마우스의 폐 조직에 대해 보호효과를 나타낼 수 있는지 검증하고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-1의 방법에 따라 4일 동안 담배연기에 노출시킨 마우스에 연기 노출 즉시 하루에 한번 씩 재조합 FGF2 단백질을 0.1, 10, 1000 pg의 농도로 비강 투여하였다.

[0101] 그 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 재조합 FGF2 단백질을 10 및 1000 pg으로 투여한 경우에는 담배연기에만 노출시킨 마우스와 비교하여 기관지폐포세척액 내 염증세포(대식세포 및 림프구)의 수가 감소한 것을 확인하였다. 또한, 도 4a 및 도 4c에 나타낸 바와 같이, 재조합 FGF2 단백질을 10 및 1000 pg 투여한 경우 폐포 파괴정도도 유의하게 감소한 것을 관찰하였다.

[0102] 상기 결과들을 통해 담배연기 노출에 의해 유발된 초기 COPD의 원인 중 하나가 FGF2의 생성 감소이며, 재조합 FGF2 투여에 의해 폐조직 보호효과가 나타남을 알 수 있었다.

[0104] **5-2. 세포사멸 감소 확인**

[0105] 상기 실시예 4에서 단기간 담배연기에 노출된 마우스의 경우 폐포 파괴에 의해 폐세포의 아폽토시스가 유발됨을 확인하였는바, 재조합 FGF2 단백질 투여에 의해 폐 세포의 caspase 3 의존적 아폽토시스가 감소하는지 알아보고자 하였다.

[0106] 그 결과, 담배연기 노출과 함께 FGF2 단백질을 투여한 경우 담배연기에만 노출시킨 그룹에 비해 Caspase 3/7 활성이 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 도 5b의 웨스턴 블롯 결과를 통해 pro- 및 활성화 형태의 caspase 3 단백질 발현량 감소를 통해서도 알 수 있었다.

[0108] **실시예 6. 엘라스타아제에 의한 폐기종 마우스 모델에서 재조합 FGF2 단백질의 폐 조직 재생 효과 확인**

[0109] FGF2의 재생효과를 평가하기 위해, 돼지의 엘라스타아제를 이용해 폐기종을 유발시킨 마우스 모델에 상기 실시예 1-1의 방법에 따라 엘라스타아제 주입 7일 후 4일 동안 10 pg의 FGF2 단백질을 비강으로 주입하였다.

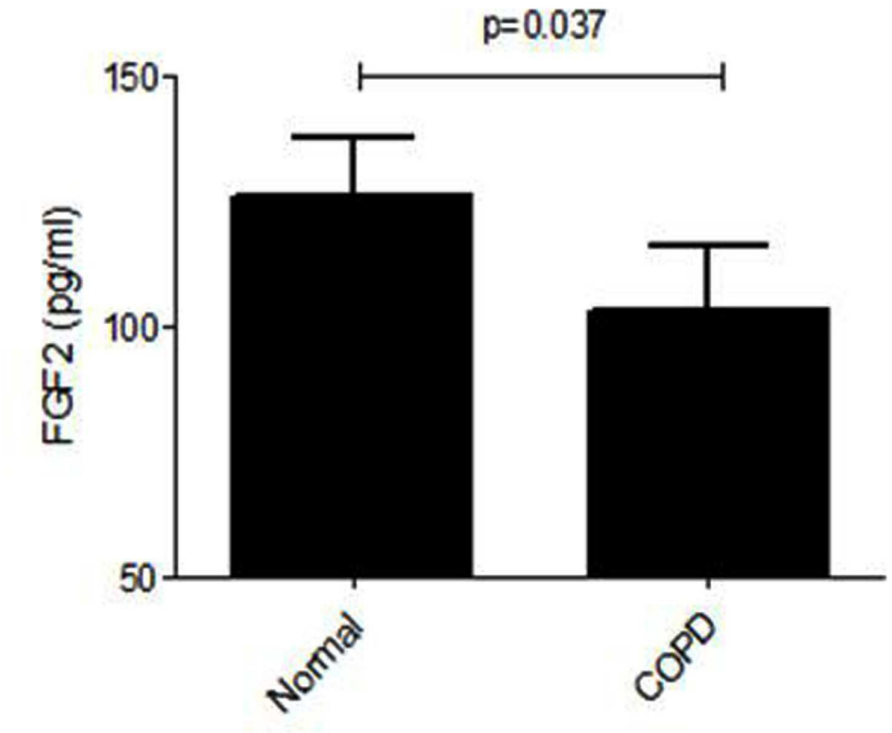
[0110] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, 엘라스타아제만을 주입(Ela)하거나 엘라스타아제와 함께 FGF2 수용체 1 및 3의 억제제인 PD173074를 투여한 그룹에서는 폐포 파괴가 현저히 증가한데 반해, FGF2를 투여한 그룹의 경우 폐포 파괴정도가 감소한 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 비강으로 투여된 FGF2가 엘라스타아제 주입에 의한 폐기종 마우스 모델에서 폐 조직 재생 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0112] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본

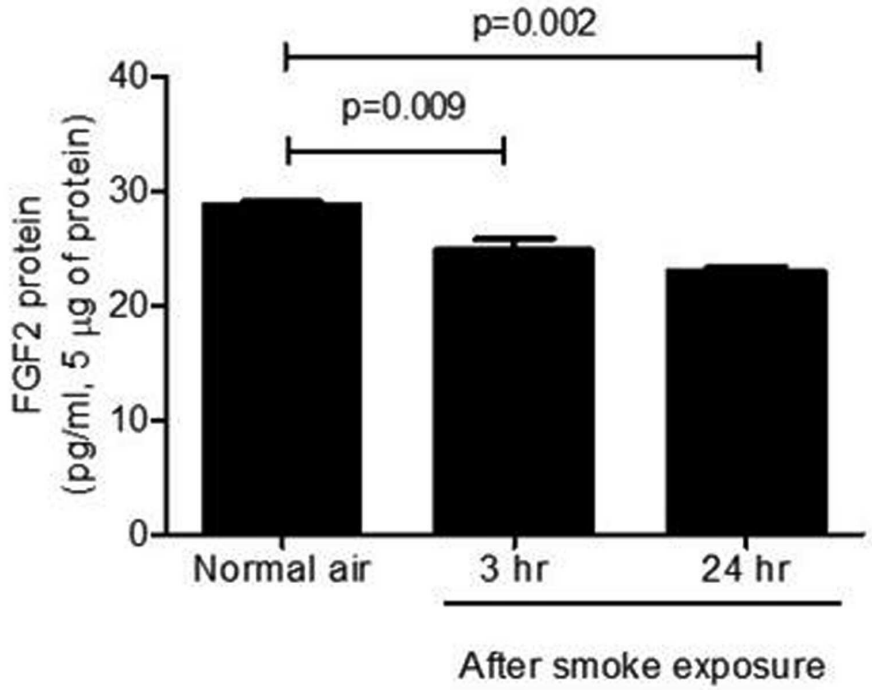
발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

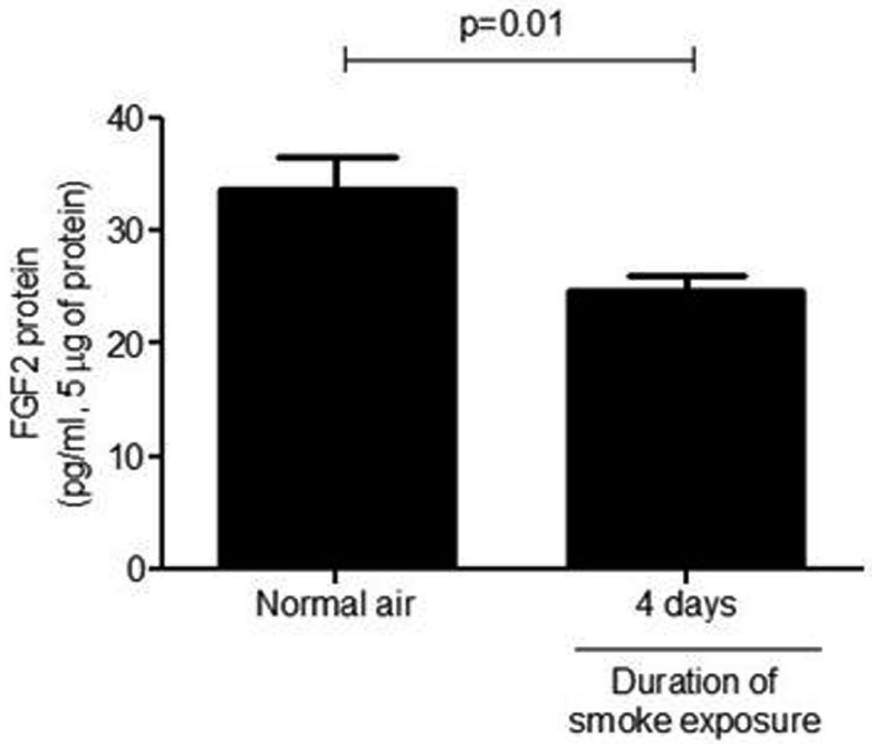
도면1



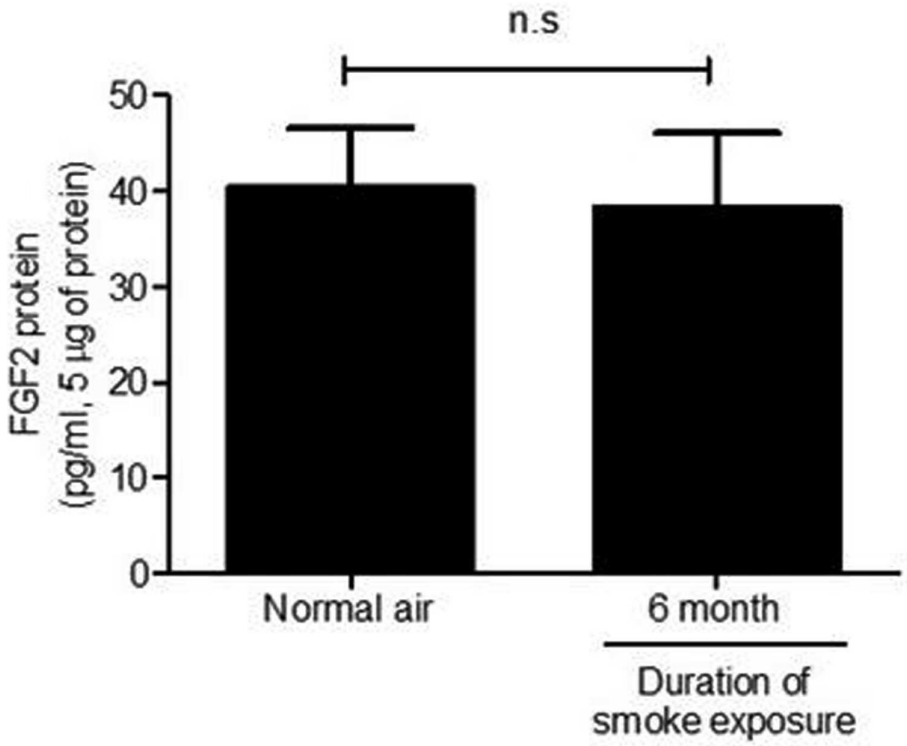
도면2a


p=0.002
p=0.009
40
30
20
10
0
FGF2 protein
(pg/ml, 5 μg of protein)
Normal air
3 hr
24 hr
After smoke exposure

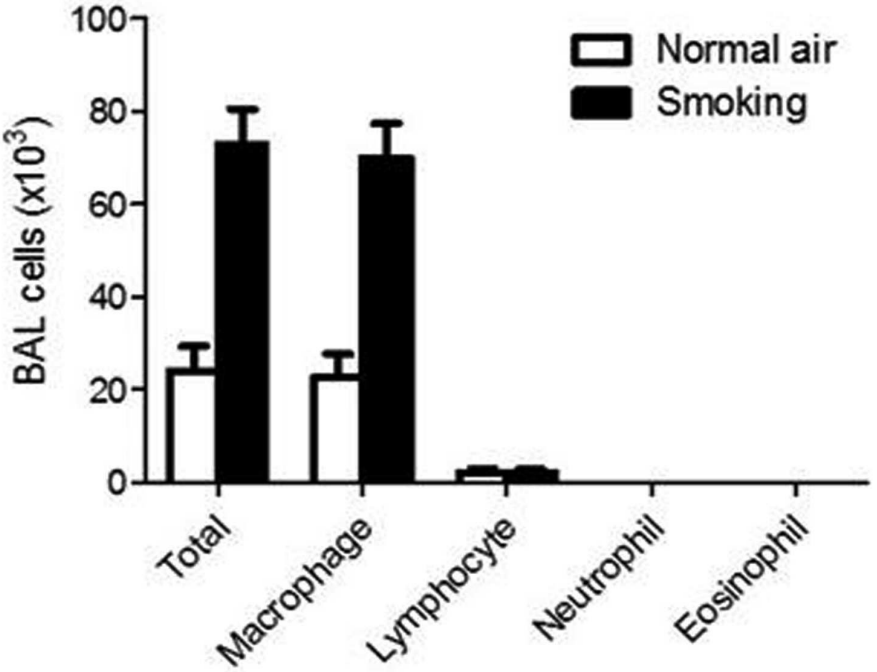
도면2b


p=0.01
40
30
20
10
0
FGF2 protein
(pg/ml, 5 μg of protein)
Normal air
4 days
Duration of
smoke exposure

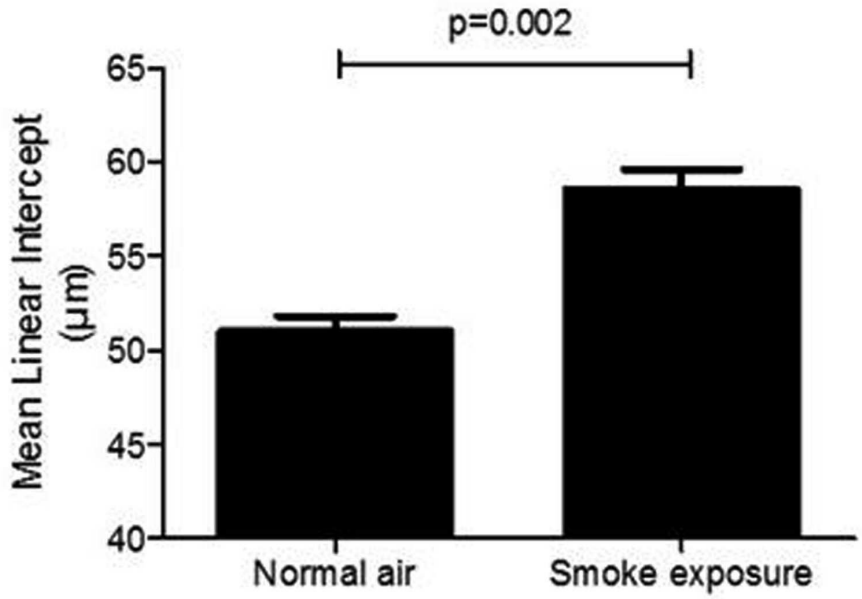
도면2c


n.s
50
40
30
20
10
0
FGF2 protein
(pg/ml, 5 μg of protein)
Normal air
6 month
Duration of
smoke exposure

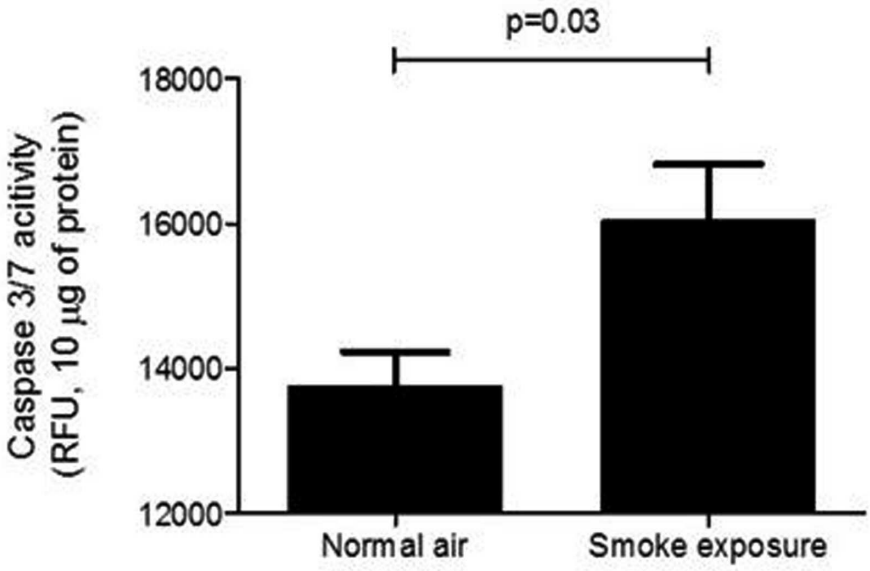
도면3a


100
80
60
40
20
0
BAL cells (x10³)
Normal air
Smoking
Total
Macrophage
Lymphocyte
Neutrophil
Eosinophil

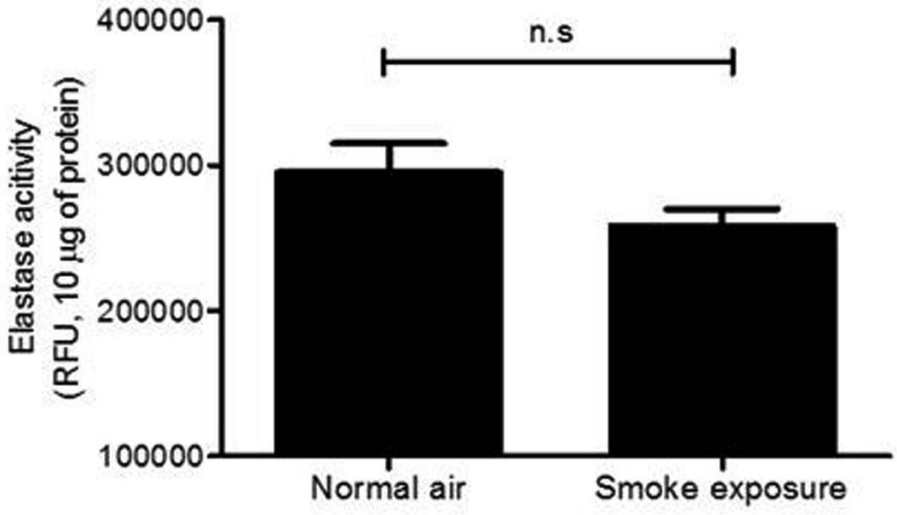
도면3b


p=0.002
65
60
55
50
45
40
Mean Linear Intercept (μm)
Normal air
Smoke exposure

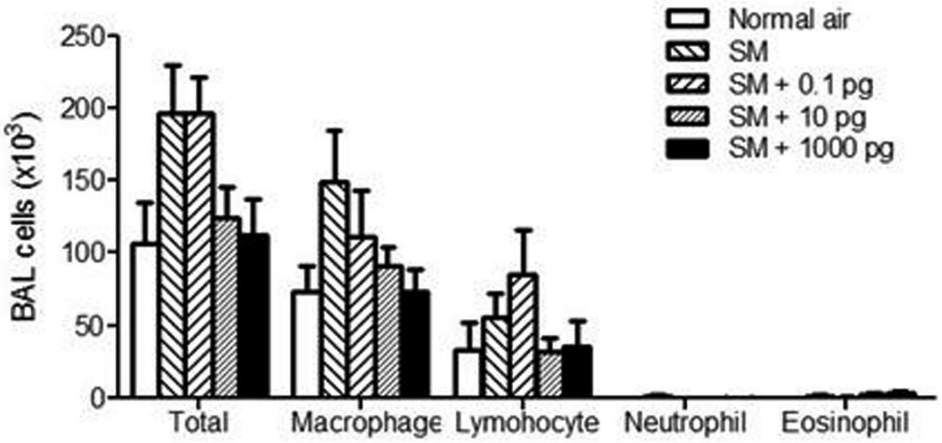
도면3c


p=0.03
18000
16000
14000
12000
Caspase 3/7 acitivity (RFU, 10 μg of protein)
Normal air
Smoke exposure

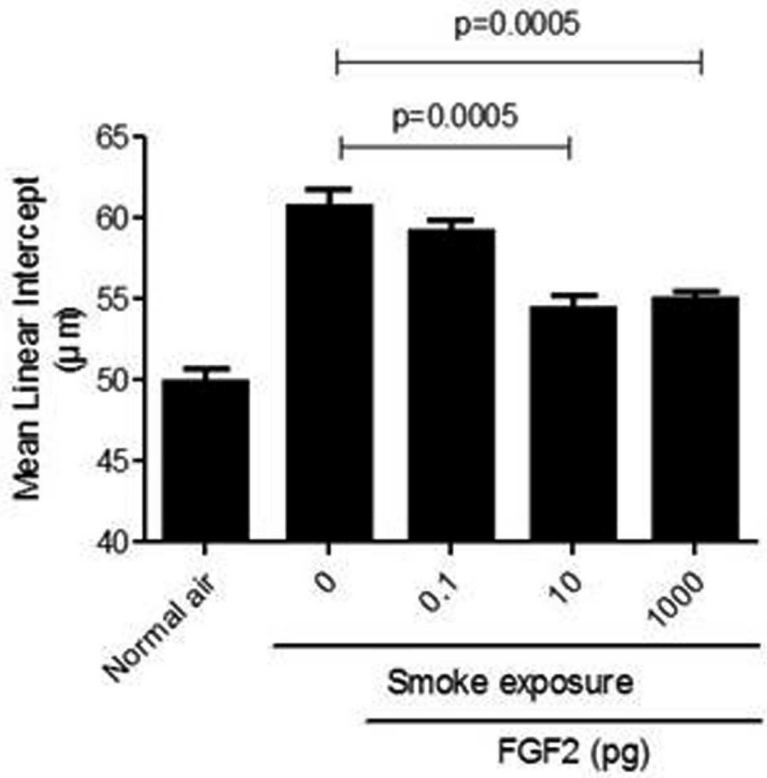
도면3d


400000
300000
200000
100000
Elastase acitivity
(RFU, 10 μg of protein)
n.s
Normal air
Smoke exposure

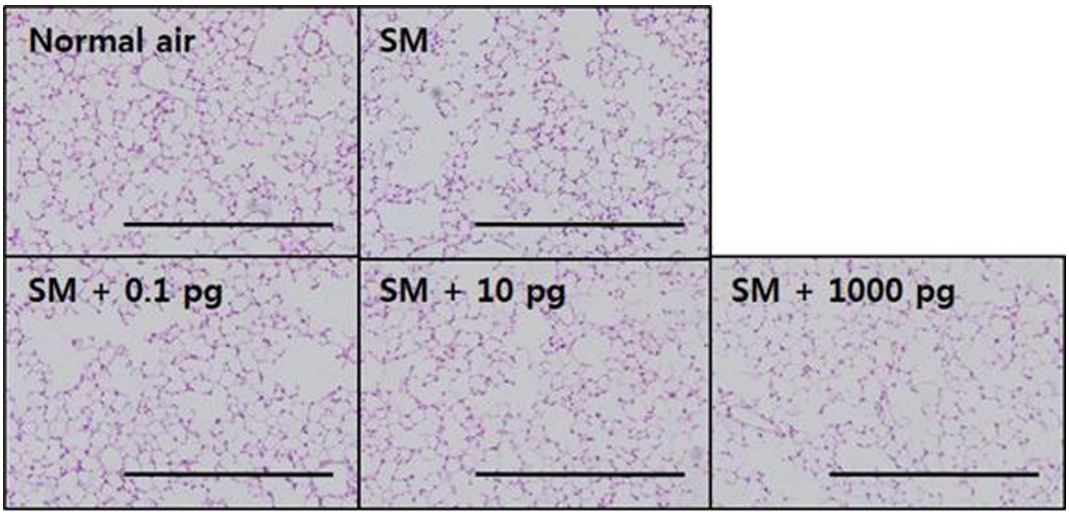
도면4a


250
200
150
100
50
0
BAL cells (x10³)
Normal air
SM
SM + 0.1 pg
SM + 10 pg
SM + 1000 pg
Total
Macrophage
Lymohocyte
Neutrophil
Eosinophil

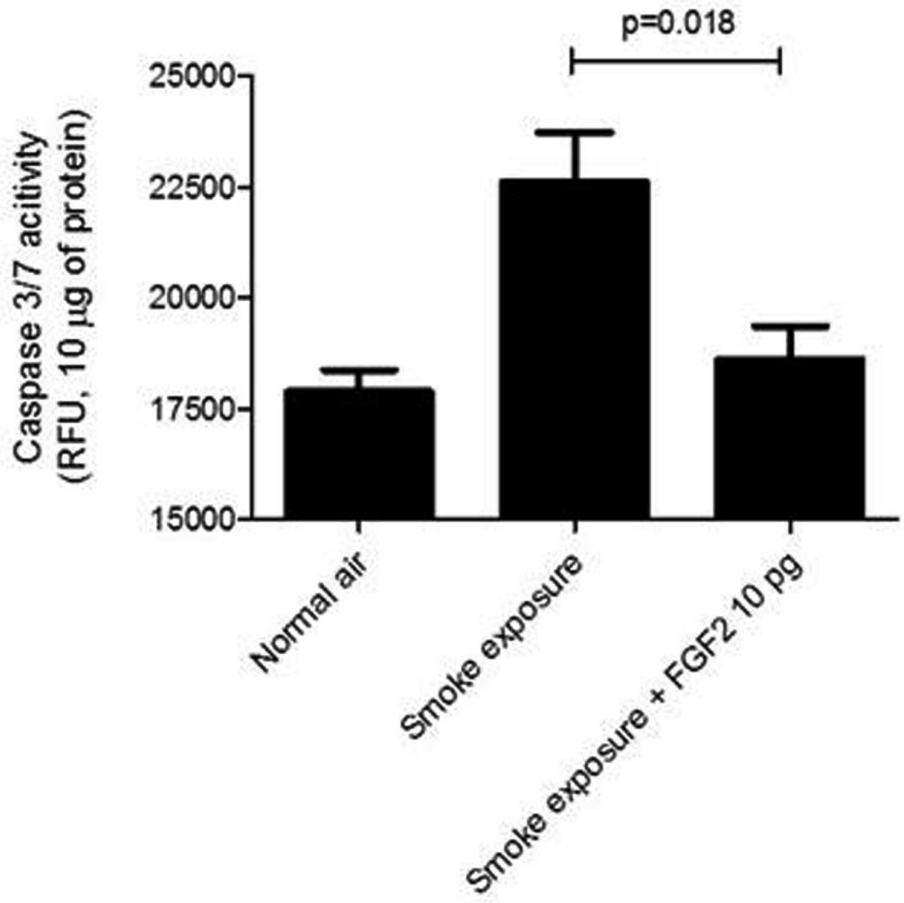
도면4b


p=0.0005
p=0.0005
Mean Linear Intercept (μm)
65
60
55
50
45
40
Normal air
0
0.1
10
1000
Smoke exposure
FGF2 (pg)

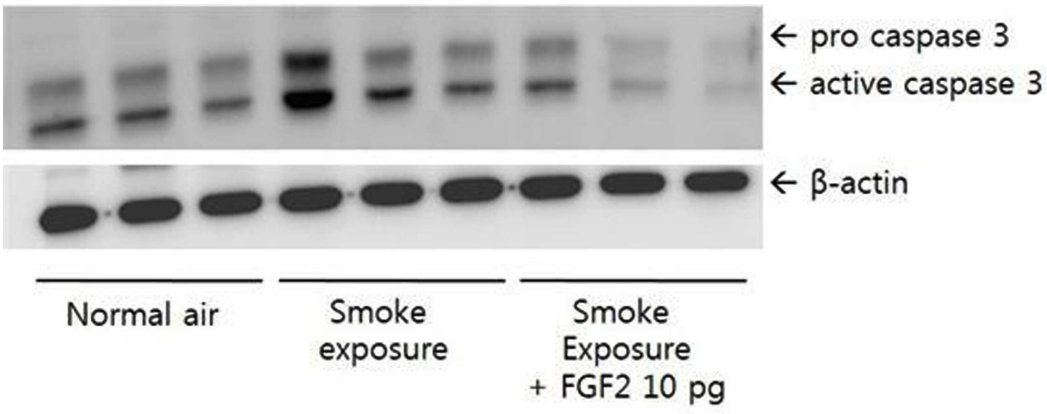
도면4c


Normal air
SM
SM + 0.1 pg
SM + 10 pg
SM + 1000 pg

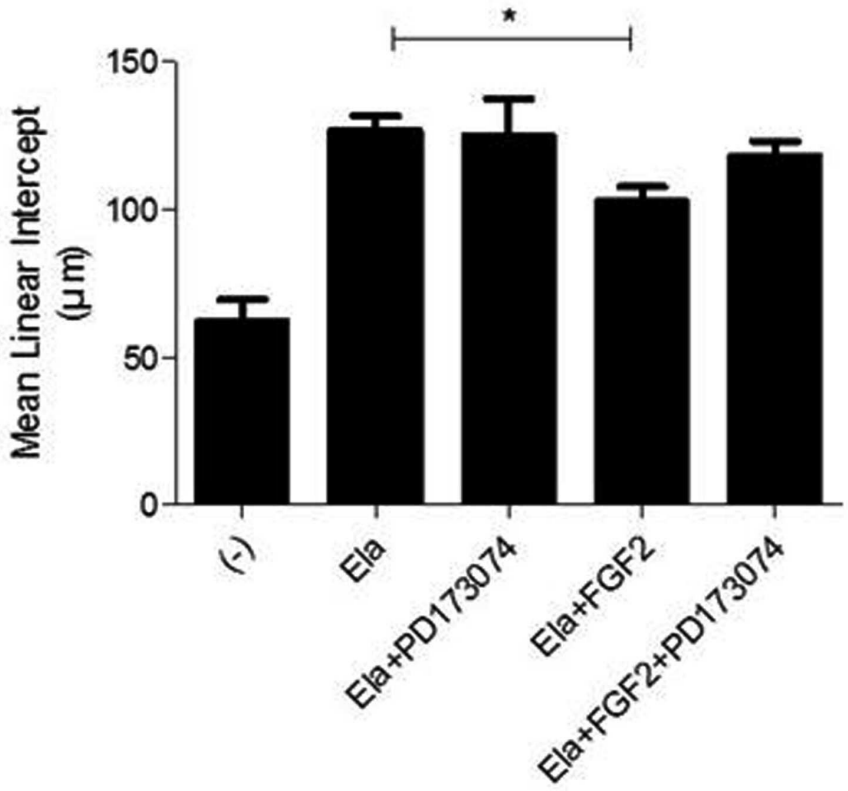
도면5a


p=0.018
Caspase 3/7 acitivity
(RFU, 10 μg of protein)
25000
22500
20000
17500
15000
Normal air
Smoke exposure
Smoke exposure + FGF2 10 pg

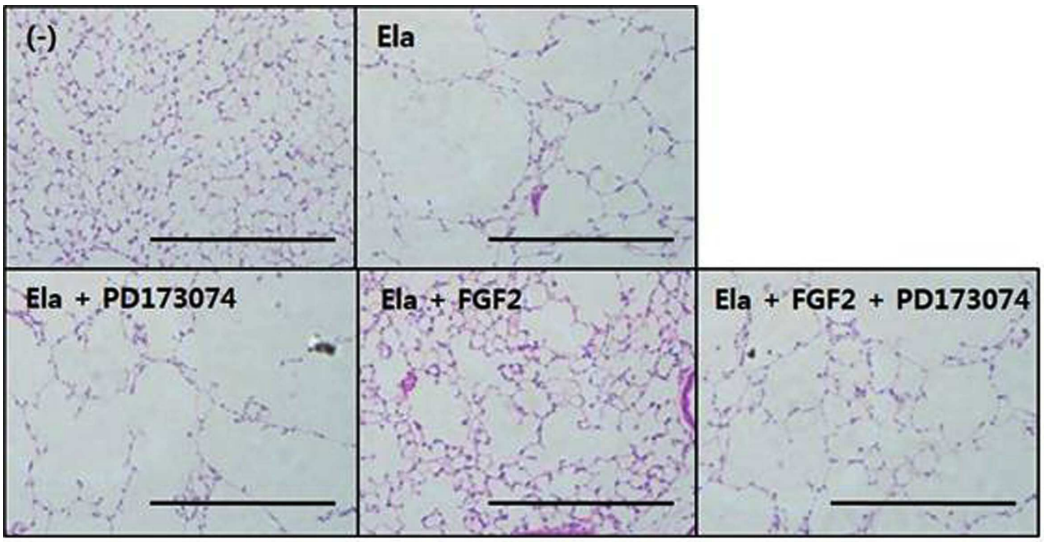
도면5b


← pro caspase 3
← active caspase 3
← β-actin
Normal air
Smoke exposure
Smoke Exposure + FGF2 10 pg

도면6a



도면6b



서 열 목 록

<110> MD Healthcare Inc.

<120> Biomarker for predicting a risk of developing lung diseases and use thereof

<130> MP16-387

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 438

<212> DNA

<213> human FGF2

<400> 1

cccgccttgc ccgaggatgg cggcagcggc gccttcccgc ccggccactt caaggacccc 60

aagcggctgt actgcaaaaa cgggggcttc ttcctgcgca tccaccccga cggccgagtt 120

gacggggtcc gggagaagag cgaccctcac atcaagctac aacttcaagc agaagagaga 180

ggagttgtgt ctatcaaagg agtgtgtgct aaccgttacc tggctatgaa ggaagatgga 240

agattactgg cttctaaatg tgttacggat gagtgtttct tttttgaacg attggaatct 300

aataactaca atacttaccg gtcaaggaaa tacaccagtt ggtatgtggc actgaaacga 360

actgggcagt ataaacttgg atccaaaaca ggacctgggc agaaagctat acttttttctt 420

ccaatgtctg ctaagagc 438

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> human FGF2

<400> 2

Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His
1 5 10 15

Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu
20 25 30

Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp
35 40 45

Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser
50 55 60

Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
65 70 75 80

Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
85 90 95

Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
100 105 110
Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
115 120 125
Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
130 135 140
Lys Ser
145