



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0165093
(43) 공개일자 2022년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0073633
(22) 출원일자 2021년06월07일
심사청구일자 2021년06월07일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
허진원
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 1401호(신천동, 파크리오)
(74) 대리인
이명진

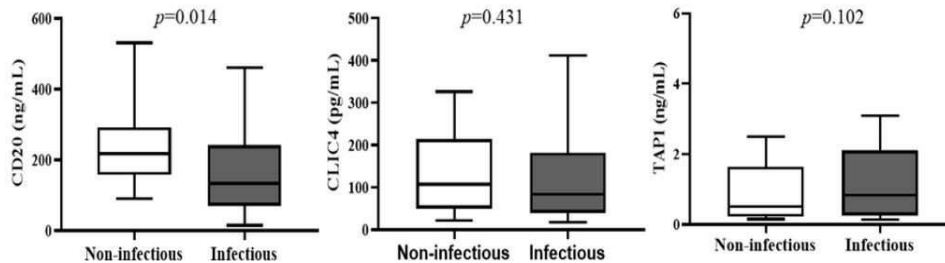
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 비감염성 폐질환 진단을 위한 바이오마커로서 CD20의 용도

(57) 요약

본 발명은 비감염성 폐질환 진단을 위한 정보제공방법 및 진단용 조성물 등에 관한 것으로, 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자의 기관지폐포세척액 내 CD20의 수준이 유의하게 증가된 것을 확인하여 완성된 것이다. 따라서, CD20 수준의 측정을 통해 침윤성 폐질환이 감염성 및 비감염성 원인 중 어느 것에 의한 것인지 정확하게 판별함으로써 환자의 상태를 정확히 진단할 수 있으며, 질환 원인에 따른 적절한 치료법을 선택하여 환자의 예후를 개선할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 진단은 기관지폐포세척액과 같은 호흡기 검체, 즉, 비침습적 검체를 이용하므로 진단 과정이 간단하고 환자의 불편을 줄일 뿐만 아니라 입원 및 검사 후 회복기간이 필요 없다는 장점이 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/6872 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/12 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318431
과제번호	2017R1D1A1B03035034
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	기계 환기에 의한 급성 폐손상에서 세포외 소포의 역할
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 비감염성(non-infectious) 폐질환의 진단을 위한 정보제공방법:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및

(S2) 단계 (S1)에서 측정된 CD20 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 면역억제 치료에 대한 반응성을 예측하기 위한 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CD20은 엑소좀(exosome) 내의 CD20인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 호흡기 검체인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대조군은 정상인 또는 감염성(infectious) 폐질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 CD20의 수준은 CD20의 단백질 발현 수준이고, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 CD20의 수준은 mRNA 발현 수준이고, 상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 폐질환은 폐렴, 폐부종, 폐출혈, 폐침윤, 폐경색, 및 폐색전증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 비감염성 폐질환은 간질성 폐질환(interstitial lung disease, ILD), 폐부종, 폐포출혈(alveolar hemorrhage), 약물, 급성 폐장염(acute interstitial pneumonia, AIP), 방사선, 경결성 폐렴(organizing pneumonia), 종양, 인공호흡기에 의한 폐손상, 간부전, 외상(trauma), 면역세포의 급증, 이물질 흡인, 유해액체 흡인, 가스 흡인, 및 알러지로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에 의해 유발된 것을 특징으로 하는, 정보제공 방법.

청구항 10

하기 단계를 포함하는, 비감염성 폐질환 치료 물질의 스크리닝 방법:

- (a) 비감염성 폐질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 대조군 시료와 비교해 상기 CD20의 수준을 감소시킨 시험물질을 비감염성 폐질환 치료 물질로 선별하는 단계.

청구항 11

CD20 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 조성물은 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것인, 진단용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 진단용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 진단용 조성물.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 키트.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 키트는 제1항의 정보제공방법이 기재된 설명서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 진단용 키트.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 키트는 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것인, 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비감염성 폐질환 진단을 위한 바이오마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양측성 폐침윤 (bilateral lung infiltrates)은 호흡부전이 있는 중환자에게서 흔히 나타나는 상태로, 폐의 병소로부터 염증이 주위 조직으로 퍼져 나가는 상태를 지칭한다. 양측성 폐침윤이 일어난 환자는 높은 이환율 및 사망률의 호흡부전으로 이어질 수 있다. 다양한 감염성 또는 비감염성 원인이 양측성 폐침윤을 유발하는 것으로 알려져 있으나, 양측성 폐침윤의 정확한 원인 진단에는 여전히 많은 어려움이 존재하며, 진단의 어려움은 높은 사망률과 같은 좋지 않은 예후로 이어진다.

[0003] 특히, 양측성 폐침윤 환자에서 폐의 감염 여부를 확인하고 적절한 치료법을 선택하는 것이 환자의 예후와 직결된다. 예컨대, 감염성 폐질환은 세균성 폐렴과 같이 항생제를 이용하여 치료하지만, 비감염성 폐질환은 특히 자가면역질환 등에 의해 유발되는 경우가 많아, 스테로이드와 같은 면역억제제를 이용한 치료를 활용하는 경우가 많다. 따라서 폐질환의 원인이 감염성인지 비감염성인지 구별하여 적절한 치료법을 선택하여야 하나, 감염성 원인을 확인하기 위한 미생물 배양 등의 과정은 진단 및 치료를 지연시키고, 불필요한 항생제 사용으로 이어질 수 있다. 특히, 환자가 비감염성 폐질환 환자인 경우, 광범위한 항생제는 환자에게 유해할 수 있으며, 다중-내성 (multi-resistant) 세균의 획득을 유발할 수 있다.

[0004] 감염성 및 비감염성 폐질환 환자의 감별 진단을 위해 다양한 바이오마커가 연구되었으며, 현재 임상에서 사용되는 것들로 발열, 객담 등의 증상, 및 혈액 내의 염증 지표 (프로칼시토닌(procalcitonin), CRP, 백혈구 수 등) 등이 있으나, 이와 같은 지표들은 비감염성 폐질환 환자에서도 증가할 수 있으므로 특이성이 떨어진다. 따라서, 비감염성 폐질환을 정확히 진단하여 적절한 치료법을 선택할 수 있게 하는 강력한 바이오마커의 발굴이 시급하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0129833호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 폐침윤 환자들의 기관지폐포세척액으로부터 엑소좀을 분리하여 프로테오믹스 프로파일링을 수행하여 CD20을 비감염성 폐질환 환자의 후보 바이오마커로 선별하고, 실제 환자 샘플에서 CD20의 발현을 비교 관찰한 결과 감염성 폐침윤 환자에 비해 비감염성 폐침윤 환자에서 유의하게 증가된 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 비감염성 폐질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 비감염성 폐질환 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 비감염성 폐질환 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 비감염성(non-infectious) 폐질환의 진단 방법, 또는 상기 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0014] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0015] (S2) 단계 (S1)에서 측정된 CD20 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 방법은 면역억제 치료에 대한 반응성을 예측하기 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 CD20은 엑소좀(exosome) 내의 CD20일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 호흡기 검체일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 대조군은 정상인 또는 감염성(infectious) 폐질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 CD20의 수준은 CD20의 단백질 발현 수준이고, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 CD20의 수준은 mRNA 발현 수준이고, 상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 비감염성 폐질환 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0023] (a) 비감염성 폐질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;
- [0024] (b) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및
- [0025] (c) 대조군 시료와 비교해 상기 CD20의 수준을 감소시킨 시험물질을 비감염성 폐질환 치료 물질로 선별하는 단

계.

- [0026] 또한, 본 발명은 CD20 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 키트는 본 발명에 따른 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 키트는 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 폐질환은 폐렴, 폐부종, 폐출혈, 폐침윤, 폐경색, 및 폐색전증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 비감염성 폐질환은 간질성 폐질환(interstitial lung disease, ILD), 폐부종, 폐포출혈(alveolar hemorrhage), 약물, 급성 폐장염(acute interstitial pneumonia, AIP), 방사선, 경결성 폐렴(organizing pneumonia), 종양, 인공호흡기에 의한 폐손상, 간부전, 외상(trauma), 면역세포의 급증, 이물질 흡인, 유해액체 흡인, 가스 흡인, 및 알러지로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에 의해 유발된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 비감염성 폐질환을 진단하기 위한 CD20의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명은 비감염성 폐질환 진단을 위한 정보제공방법 및 진단용 조성물 등에 관한 것으로, 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자의 기관지폐포세척액 내 CD20의 수준이 유의하게 증가된 것을 확인하여 완성된 것이다. 따라서, CD20 수준의 측정을 통해 침윤성 폐질환이 감염성 및 비감염성 원인 중 어느 것에 의한 것인지 정확하게 판별함으로써 환자의 상태를 정확히 진단할 수 있으며, 질환 원인에 따른 적절한 치료법을 선택하여 환자의 예후를 개선할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 진단은 기관지폐포세척액과 같은 호흡기 검체, 즉, 비침습적 검체를 이용하므로 진단 과정이 간단하고 환자의 불편을 줄일 뿐만 아니라 입원 및 검사 후 회복기간이 필요 없다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 양측성 폐침윤 환자의 BALF 샘플 내 엑소좀의 프로테오믹스 프로파일링을 수행하여 폐침윤의 원인 및 환자의 생존 여부와 연관된 유전자 후보를 벤다이어그램으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 폐침윤의 원인(감염성 또는 비감염성)에 따른 후보 바이오마커들의 발현 수준을 측정한 결과이다.
- 도 3은 폐침윤의 원인(감염성 또는 비감염성)에 따른 후보 바이오마커들의 다변량 기호 논리학 회귀 분석 및 ROC 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명자들은 폐질환 환자 유래 시료에서 전반적인 단백질 발현 양상을 비교관찰한 결과, CD20이 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자에서 유의하게 증가한 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

- [0041] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 양측성 폐침윤 환자 20명의 기관지폐포세척액에서 엑소솜을 분리하여 프로테오믹스 프로파일링을 수행한 결과, CD20, CLIC4, SCFD1, 및 TAP1이 감염성 및 비감염성 폐침윤 여부를 감별할 수 있는 후보 바이오마커임을 확인하였다 (실시예 1).
- [0042] 본 발명의 다른 실시예에서는, 실제 폐질환 환자의 기관지폐포세척액에서 상기 후보 바이오마커들의 발현 수준을 측정된 결과, CD20이 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자에서 유의하게 증가한 것을 확인하였다 (실시예 2).
- [0043] 이에, 본 발명의 목적은 하기의 단계를 포함하는, 비감염성(non-infectious) 폐질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다: (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및 (S2) 단계 (S1)에서 측정된 CD20 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.
- [0045] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0046] 본 발명에 있어서 “CD20”은 membrane-spanning 4A family member (MS4A1)에 의해 암호화되는 33 내지 37kDa의 B-림프구 항원으로, B 세포의 표면에서 발현되며, B 세포의 발달 및 형질세포(plasma cell)로의 분화에 기여하고, T 세포-독립적인 항체 반응에 관여한다. CD20의 DNA 및 아미노산 서열은 공지되어 있으며, 예를 들어 인간 CD20은 단백질 데이터베이스 Uniport에 P11836로 검색된다.
- [0047] 본 발명에 있어서 상기 CD20은 바람직하게는 엑소솜(exosome) 내의 CD20일 수 있다. “엑소솜(exosome)” 단백질, 지질, 핵산 등 세포로부터 생성된 다양한 성분을 내부에 포함하고 있는 세포의 소포(extracellular vesicle)의 일종으로, 세포로부터 방출되어 체액(body fluids) 내에 존재한다. 엑소솜은 세포 성분을 세포 바깥으로 이동시켜 세포간 전달자(cell-to-cell communicators)로서 기능하며, 기원(origin) 세포의 특이적인 마커를 가지고 있으므로, 신경계 질환, 심혈관 질환, 감염성 질환 등 여러 질환에서 바이오마커의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0048] 본 명세서에서 사용된 용어, “폐질환”에는 폐에서 일어나는 모든 질환이 이에 포함될 수 있으며, 구체적인 예시로는 폐렴, 폐부종, 폐출혈, 폐침윤, 폐경색, 및 폐색전증 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 또한, 본 발명에 있어서 “비감염성(non-infectious) 폐질환”이란 바이러스 또는 세균 등의 감염 등에 의하지 않고 발생하는 폐질환을 의미한다. 상기 질환의 비감염성 원인은 다양하며, 감염 외에 폐손상, 폐 기능 이상 등을 유발할 수 있는 원인이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 구체적인 예로는 간질성 폐질환(interstitial lung disease, ILD), 폐부종, 폐포출혈(alveolar hemorrhage), 약물, 급성 폐장염(acute interstitial pneumonia, AIP), 방사선, 경결성 폐렴(organizing pneumonia), 종양, 인공호흡기에 의한 폐손상, 간부전, 외상(trauma), 면역세포의 급증, 이물질 흡인, 유해액체 흡인, 가스 흡인, 및 알러지 등이 있다. 더 구체적으로는, 간질성 폐질환의 급성 악화(acute exacerbation interstitial lung disease, AE-ILD), 폐부종, 미만성 폐포출혈(diffuse alveolar hemorrhage), 악성종양, 호산구의 급증, 위식도 역류, 미세먼지 등 유해물질의 흡인 등을 예로 들 수 있다.
- [0050] 구체적으로, 비감염성 폐질환의 구체적인 예시로는 폐부종(pulmonary edema), 결체조직질환 관련 간질성폐질환(connective-tissue disease-associated ILD), 약물 유발 간질성 폐질환(drug-induced ILD), 간질성 폐질환(interstitial lung disease, ILD), 흡인성 폐장염(aspiration pneumonia), 미만성폐포출혈(diffuse alveolar hemorrhage, DAH), 급성 간질성 폐렴(acute interstitial pneumonia, AIP), 방사선성 폐렴(radiation pneumonitis), 경결성 폐렴(organizing pneumonia), 특발성 경결성 폐렴(Cryptogenic Organizing Pneumonia, COP), 특발성 폐섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF), 비특이성 간질성 폐렴(Nonspecific interstitial pneumonia, NSIP), 박리성 간질성 폐렴(Desquamative Interstitial pneumonitis, DIP), 호흡세기 관지염-간질성폐렴 (Respiratory Bronchiolitis-interstitial pneumonia, RB-ILD), 및 림프구성 폐장염(Lymphocytic Interstitial Pneumonia, LIP) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 용어, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 용어, “치료 반응성”은 개개의 환자에 대해 특정 치료법이 치료 효과를 나타내는지 여

부를 의미한다. 본 발명에 있어서 치료란 바람직하게는 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자에서 특히 효과적인 치료법이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 바람직하게는 면역억제제 등을 투여하여 염증 세포들의 기능을 억제하는 면역억제 치료를 의미할 수 있고, 더욱 바람직하게는 스테로이드의 투여를 통한 면역억제 치료를 의미할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, “예측”은 특정 유전자의 발현량과 같은 특징의 확인을 통해 특정 결과, 예를 들어, 치료 반응성을 미리 판단하는 것을 의미한다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 비감염성 폐질환을 진단하거나 면역억제 치료에 대한 반응성을 예측하기 위한 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 호흡기 검체인 것을 특징으로 한다. 상기 “호흡기 검체”는 호흡에 관여하는 기관, 즉, 코, 기관, 기관지, 폐 등으로부터 유래한 검체를 의미하며 구체적인 종류에는 제한이 없으나, 인후도말, 비인후도말, 비강흡입물, 비인두흡입물, 객담, 및 폐포 등이 이에 포함될 수 있으며, 가장 바람직하게는 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 정보제공방법에서 호흡기 검체를 사용하는 경우 실제 염증 등이 일어나는 장소에서 얻은 검체로 CD20 등의 발현을 확인하므로 정확도가 높으며 병리기전과 직접 관련성을 보인다는 장점이 있다. 나아가, 기관지폐포세척액과 같은 비침습적 검체를 이용하는 경우 검체의 채취 과정이 매우 간단하고 환자의 고통이 거의 없으며, 입원 및 검사 후 회복기간이 필요 없다는 이점을 가지고 있다. 또한, 이와 같은 액체 생검은 조직검사의 부작용을 피하는 동시에 폐질환이 발병하지 않은 잠재적 환자를 대상으로도 조기진단이 가능하며, 이미 발병한 환자의 치료 경과를 주기적으로 관찰하는데 유리하다는 장점이 있다.

[0054] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0055] 또한, 상술한 바와 같이 본 발명에 있어서 CD20은 바람직하게는 엑소솜 내의 CD20일 수 있으므로, 본 발명에 따른 비감염성 폐질환의 진단을 위한 정보제공방법은 상기 생물학적 시료에서 엑소솜을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서 상기 대조군은 폐질환에 걸린 적 없는 개체 또는 건강한 개체, 즉 “정상인”일 수 있다. 또는, 상기 대조군은 세균 또는 바이러스 등의 감염에 의해 폐질환이 발병한 “감염성(infectious) 폐질환 환자”일 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류일 수 있으며, 비감염성 폐질환을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 개체일 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 용어, “측정”은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질 또는 이의 mRNA의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준 또는 mRNA의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 또는 mRNA 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 CD20 단백질 또는 mRNA의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 또는 mRNA의 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 용어, “분석”은 바람직하게는 “측정”을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서 상기 CD20의 수준은 CD20의 단백질 발현 수준일 수 있다. “단백질”은 “폴리펩타이드(polypeptide)” 또는 “펩타이드(peptide)”와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0061] 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 구체적으

로는 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 또는 단백질칩 등의 방법으로 측정될 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서 상기 CD20의 수준은 CD20의 mRNA 발현 수준일 수 있다. “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)” 또는 “핵산”은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. “mRNA”는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

[0063] RNA 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 또는 RNA 칩 등의 방법으로 측정될 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 비감염성 폐질환의 진단을 위한 정보제공방법은 피검체의 CD20의 수준이 대조군, 특히 감염성 폐질환 환자와 비교하여 증가된 경우, 비감염성 폐질환인 것으로 판정하는 단계 및/또는 면역억제 치료에 대한 반응성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 명세서에 있어서, “수준이 증가되어 있다”는 것은, 검출되지 않던 것이 검출된 것, 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 검출량이 많아지는 것을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

[0066] 예를 들어, 수준이 “증가”되어 있다는 것은, 실험군의 수준이 대조군의 그것에 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 그 이상, 예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 높은, 및/또는 0.5배, 1.1배, 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배 또는 그 이상 높은 것을 의미한다. 구체적으로는, 대조군의 그것에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 증가한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0067] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는, 비감염성 폐질환 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) 비감염성 폐질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 CD20의 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 대조군 시료와 비교해 상기 CD20의 수준을 감소시킨 시험물질을 비감염성 폐질환 치료 물질로 선별하는 단계.

[0068] 본 발명에 있어서 “시험물질”은 생물학적 시료 내의 CD20 수준에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 재조합 플라스미드(recombinant plasmid), 나노입자(nanoparticle), 단백질, 올리고펩타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어, “대조군”은 시험물질을 처리하지 않은 시료일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명은 또한 CD20 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것일 수 있다.

[0071] 본 발명의 조성물이 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있다.

[0072] 상기 CD20의 mRNA에 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용함으로써 피검체에서 상기 단백질 마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 사용된 용어, “프라이머”는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및

상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 용어, “프로브”란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수 백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0075] 상기 “프라이머” 또는 “프로브”는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 모든 기능적 등가물을 포함한다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0076] 상기 “기능적 등가물”이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준(reference) 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오타이드와 핵산서열 모두를 의미한다. 통상적으로, 그런 실질적 등가물인 서열은 단지 약 35%(즉, 실질적으로 등가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 등가적인 서열에서의 나머지 전체 숫자로 나누었을 때 약 0.35 또는 그 이하이다) 정도로 본 명세서에 나열된 것에서부터 다양하다. 그런 서열은 나열된 서열과 65%의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명에 따른 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 아미노산 서열은 나열된 아미노산 서열과 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90%의 서열 동일성을 갖는다. 실질적 등가물인 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 예를 들어, 유전자 암호의 중복(redundancy) 또는 축퇴(degeneracy)를 고려할 때, 더 낮은 백분율의 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오타이드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가져야 한다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 등가적인 생물학적 활성과 실질적으로 등가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다. 등가물을 결정하기 위해, 성숙 서열(예를 들어, 위(spurious) 종결코돈(stop codon)을 제조하는 돌연변이를 통한)의 절단(truncation)은 무시되어야 한다.

[0077] 본 발명의 조성물이 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있다.

[0078] 본 명세서에서 사용된 용어, “항체”는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 본 발명 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.

[0079] 본 명세서에서 사용된 용어, “앵타머(aptamer)”는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 상기 CD20 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체(본 발명에서는 피검체로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

- [0082] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 조성물을 포함하는, 비감염성 폐질환 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 면역억제 치료의 반응성 예측을 위한 것일 수 있다.
- [0083] 상기 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머 세트, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0084] 구체적인 양태로서 상기 진단 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 세트를 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0085] 다른 구체적인 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0086] 또한, 상기 진단용 키트는 본 발명에 따른 비감염성 폐질환 진단을 위한 정보제공방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.
- [0087] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0088] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0089] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0091] 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.
- [0093] **[실험예]**
- [0094] **실험예 1. 환자 분석 방법**
- [0095] 급성 폐 손상 환자는 ASAN 샘플 코호트(cohort)로부터 선택했다. 흉부 방사선 촬영 및 기관지폐포세척(bronchoalveolar lavage, BAL)을 이용한 기관지 내시경 검사(brochchoscopy)에서 양측성 폐침윤이 확인된 환자를 대상으로 감별진단(differential diagnosis)을 수행했다. ICU 코호트에서 중환자 샘플을 수집하였다. 모든 환자에 대해 하기의 데이터를 기록하였다: 기초 특성(baseline characteristics), 진단(diagnosis), 백혈구 수(leukocyte count), C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP)의 혈청 수준 및 프로칼시토닌(procalcitonin, PCT), 기관지 내시경 검사 당일의 흡기산소분율(inspired oxygen fraction)에 대한 동맥혈산소분압(partial pressure of arterial oxygen) 비율(P/F ratio), Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) 스코어, 및

생존 결과(survival outcome). 환자들은 연구 참여에 대해 사전에 서면 동의 하였다(IRB 번호: 2011-0001).

[0097] 실험예 2. 진단의 검증

[0098] 두 명의 폐질환 전문의가 116명의 환자의 의료 기록을 검토하고 각각 독립적으로 감염성 또는 비감염성 질환으로 분류하였다. 진단 결과에 대해 합의가 이루어진 66명의 환자를 대상으로 본 연구를 수행했다. 감염 진단은 임상적 증상, 미생물학적 증거, 및 영상 소견을 기초로 이루어졌다. 비감염 진단은 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid) 또는 내관성 흡인 가래(endobronchial aspirated sputum)의 배양체(culture)에서는 유의미한 세균 성장이 없으면서, 폐침윤의 또다른 원인이 확인된 경우에 내려졌다.

[0100] 실험예 3. 엑소좀(exosome) 추출 및 프로테오믹스 프로파일링(proteomics profiling)

[0101] 3-1. 엑소좀의 분리

[0102] 양측성 폐침윤이 있는 20명의 환자 유래의 BALF 내에 존재하는 엑소좀의 프로테오믹스 프로파일링을 수행하여, 비감염성 폐질환 환자의 단백질 바이오마커 후보를 선별하였다. 프로테오믹스 프로파일링을 위해 환자들을 네 그룹으로 나누었다: 감염성/생존자, 감염성/비생존자, 비감염성/생존자, 및 비감염성/비생존자.

[0103] 엑소좀은 제조사(Invitrogen)의 설명서를 기초로 차등적 초원심분리(differential ultracentrifugation)를 수행하여 추출하였다. 세포 및 기타 잔해(debris 등)를 제거하기 위해, BAL 샘플을 1600 rpm에서 원심분리하였다. 상층액은 12,000 rpm에서 원심분리하고, 0.22 μ m 필터에 통과시켰다. 이어서 상층액을 총 엑소좀 분리 시약(total exosome isolation reagent)와 혼합하고 혼합액이 균질해질 때까지 볼텍싱(vortexing)하였다. 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션(incubation) 한 후 용액을 4℃에서 1시간 동안 10,000 xg로 원심분리하여 상층액을 수득했다. 잔여물은 25℃에서 10,000 xg로 원심분리하여, 튜브 바닥의 엑소좀 펠렛을 수득하여 이후의 실험을 위해 인산완충 생리식염수(phosphate-buffered saline)에 재현탁시켰다.

[0105] 3-2. 프로테오믹스 프로파일링

[0106] 엑소좀의 프로테오믹스 프로파일링은 nanoflow LC-MS/MS 기반의, 표지가 없는(label-free) 정량적 프로테오믹스 방법으로 수행하였다. 1.5배 이상의 발현 수준을 나타내는 단백질을 상대적 정량화를 위해 LC-multiple reaction monitoring (MRM) MS 방법 개발에 적용하였다. 결과를 기반으로, 감염성 원인 및 생존 여부에 따라 엑소좀에서 유의미하게 높은 상대적 발현을 나타내는 단백질을 후보 단백질 바이오마커로 선별하였다 (주어진 단백질에 해당하는 모든 단백질형 펩타이드에 대한 Wilcoxon rank sum test P-값 < 0.2).

[0108] 실험예 4. 바이오마커의 측정

[0109] 116명의 환자로부터 수득한 BAL 샘플에서 후보 바이오마커의 수준을 측정하였다. Human CD20 ELISA kit (LS Bio Inc.), Human CLIC4 ELISA kit (MyBioSource), Human Sec1 Family Domain-Containing Protein 1 (SCFD1) ELISA Kit (MyBioSource), 및 Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for TAP1 (MyBioSource)을 제조사의 설명에 따라 사용하여 각 샘플에서 후보 바이오마커(CD20, CLIC4, SCFD1, 및 TAP1)의 수준을 정량 측정하였다.

[0111] 실험예 5. 통계적 분석

[0112] 모든 수치는 연속 변수에 대한 평균 $\pm$ SD 또는 범주 변수에 대한 백분율로 표시하였다. 수치 데이터에 대한 Mann-Whitney U 검정과 범주형 데이터에 대한 Pearson's chi-square 검정을 그룹간 변수 비교에 사용하였다. 감염성 원인 또는 사망률을 예측하기 위한 바이오마커의 최적의 컷오프(cutoff) 값을 설명하기 위해 ROC (Receiver-operating-characteristic) 곡선을 구성하였다. 회귀 분석을 사용하여 비감염성 원인에 대한 독립적인 위험 인자를 확인하였다. 일변량분석에서 P 값이 0.1 미만인 변수를 다변량 모델에 입력하였다. 바이오마커 수준 및 BALF의 세포 비율 간의 Spearman 상관계수도 결정하였다. 양측(two-tailed) P 값이 0.05 미만인 경우에 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다. 데이터는 SPSS 21 통계분석 소프트웨어(IBM)를 사용하여 분석했

다.

[실시예]

실시예 1. 후보 단백질 바이오마커의 선별

실험예 3에 따라 양측성 폐렴이 있는 환자 20명의 BALF 샘플에서 엑소솜을 분리하여 프로테오믹스 프로파일링을 수행한 결과, CD20, Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4), Sec1 Family Domain Containing 1 (SCFD1) 및 Transporter associated with Antigen Processing 1 (TAP1)가 감염성 및 비감염성 폐렴 여부를 감별할 수 있는 후보 바이오마커로 선별되었다 (도 1). 표 1은 BAL 샘플 내 엑소솜의 프로테오믹스 프로파일링을 받은 20명의 환자의 특성을 정리한 것이다.

표 1

그룹	환자 번호	나이(해)/성별	진단
감염성/생존자	1	60/F	Pneumonia
	2	77/F	E.coli pneumonia
	3	79/F	MRSA pneumonia
	4	79/F	CRAB Pneumonia
	5	45/M	Pneumonia
감염성/비-생존자	6	77/M	Acinetobacter baumannii pneumonia
	7	56/M	Legionella pneumonia
	8	40/F	Klebsiella pneumoniae pneumonia
	9	62/M	E.faecium pneumonia
	10	61/M	S.maltophilia Pneumonia
비-감염성/생존자	11	64/M	Drug induced pneumonitis (MTX)
	12	19/M	AEP
	13	57/M	ILD AE
	14	67/F	Drug induced pneumonitis (Rituximab)
	15	74/F	AIP
비-감염성/비-생존자	16	54/M	Malignancy (Lymphoma)
	17	65/F	Drug induced pneumonitis (Erlotinib)
	18	34/F	ILD AE
	19	52/M	Malignancy (Lymphoma)
	20	82/F	ILD AE

실시예 2. 후보 바이오마커를 이용한 감염성 및 비감염성 폐렴 구분

2-1. 분석 대상 환자의 특성

BALF 내의 후보 바이오마커 (CD20, CLIC4, TAP1, 및 SCFD1)의 수준 측정 실험에 총 116명의 환자가 참여했다. 피험자의 평균 연령은 63세였으며, 86%가 남성이었다 (표 2). 사망률, SOFA 스코어, P/F 비율, 혈청 CRP 및 PCT는 감염성 질환 환자와 비감염성 질환 환자간에 차이가 없었다. 감염성 원인의 가장 흔한 미생물 병인은 21명의 환자에서 확인된 메티실린 저항성 황색포도상구균(methicillin staphylococcus aureus, MRSA)이었다 (표 3). 간질성 폐질환의 급성 악화가 가장 일반적인 비감염성 원인이었다 (n=13).

표 2

양측성 폐렴의 감염성 및 비감염성 원인간 기초 특성 비교				
특성	모든 환자	비감염성	감염성	P
환자 수	116	58	58	
나이, 해(years)	63.0 ± 14.2	59.3 ± 15.7	66.7 ± 11.5	0.004
남성	86 (74.1)	43 (74.1)	43 (74.1)	1.000
흡연자	55 (47.4)	27 (46.6)	28 (48.3)	0.852
동반질병(Comorbidities)				

- 심혈관계 질환	41 (35.3)	17 (29.3)	24 (41.4)	0.174
- 당뇨	13 (11.2)	4 (6.9)	9 (15.5)	0.141
- 만성 신장 질환	11 (9.5)	5 (8.6)	6 (10.3)	0.751
- 만성 호흡기 질환	48 (41.4)	24 (41.4)	24 (41.4)	1.000
- 위장질환	21 (18.1)	8 (13.8)	13 (22.4)	0.228
- 신경계 질환	12 (10.3)	2 (3.4)	10 (17.2)	0.015
- 악성종양	41 (35.3)	20 (34.5)	21 (36.2)	0.846
SOFA 스코어 ^a	6.5 ± 2.9	6.5 ± 3.2	6.6 ± 2.7	0.900
P/F 비율	182.8 ± 88.5	192.7 ± 94.3	172.8 ± 81.8	0.228
WBC, / μL	13384.5 ± 9352.3	11405.2 ± 6559.2	15363.8 ± 11201.3	0.022
C-반응성 단백질, mg/dL	13.6 ± 9.8	13.0 ± 8.7	14.3 ± 10.9	0.457
프로칼시토닌, ng/mL	3.16 ± 12.4	1.91 ± 5.50	4.2 ± 16.1	0.425
기관지폐포세척액				
- 호중구, %	49.2 ± 32.5	40.5 ± 28.5	58.4 ± 34.2	0.003
- 림프구, %	9.2 ± 10.7	9.8 ± 9.5	8.5 ± 12.0	0.506
- 폐포대식세포, %	33.8 ± 27.5	39.5 ± 27.2	27.8 ± 26.8	0.023
CD20, ng/mL	213.4 ± 156.2	248.6 ± 154.5	177.6 ± 150.9	0.014
CLIC4, pg/mL	161.8 ± 233.0	144.7 ± 142.1	178.9 ± 297.9	0.431
TAP1, ng/mL	1.4 ± 3.1	1.0 ± 0.9	2.0 ± 4.3	0.102
SCFD1, ng/mL	7.0 ± 5.2	5.8 ± 5.1	8.1 ± 5.2	0.194
데이터는 평균 ± 표준편차 또는 수치(%)로 나타냄. SOFA 스코어, 순차적인 장기부전 평가 스코어; P/F 비율, 동맥혈산소분압 및 흡기산소분율(inspired oxygen fraction)의 비율; WBC, 백혈구				

표 3

[0124]

감염성 원인	58
MRSA	21 (36.2)
CRAB	13 (22.4)
Corynebacterium	6 (10.3)
Stenotrophomonas maltophilia	5 (8.6)
Pseudomonas aeruginosa	4 (6.9)
그람 음성 종(Gram negative species) ^a	9 (15.5)
그람 양성 종(Gram positive species) ^b	3 (5.2)
기타 ^c	1 (1.7)
비감염성 원인	58
AE-ILD	13 (22.4)
폐울혈(Pulmonary congestion)	10 (17.2)
DAH	9 (15.5)
약물에 의한 폐손상	7 (12.1)
AIP	5 (8.6)
방사선성 폐렴(Radiation pneumonitis)	3 (5.2)
경결성 폐렴(Organizing pneumonia)	3 (5.2)
악성종양	3 (5.2)
기타 ^d	5 (8.6)

데이터는 수치(%)로 나타냈다.

- MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CRAB, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; E-ILD, acute exacerbation of interstitial lung disease; DAH, diffuse alveolar hemorrhage; AIP, acute interstitial pneumonia.
- ^a그람 음성 종은 *Chryseobacterium meningosepticum* (n = 3), *Klebsiella pneumoniae* (n = 2), *Serratia marcescens* (n = 1), *Hemophilus influenzae* (n = 1), *Enterobacter cloacae* (n = 1), *E.coli* (n = 1)를 포함한다.
- ^b그람 양성 종은 *Streptococcus pneumoniae* (n = 1), *Enterococcus faecium* (n = 1), *Burkholderia cepacia* (n = 1)를 포함한다.
- ^c기타는 인플루엔자 A (n = 1)를 포함한다.
- ^d기타는 수술 후 인공호흡기로 인한 폐손상 (n = 2), 간부전에 의한 급성 호흡곤란 증후군 (n = 1), 외상 (trauma) (n = 1), 급성 호산구성 폐렴 (n = 1)을 포함한다.

[0126] 2-2. 후보 바이오마커를 이용한 비감염성 폐침윤 진단 가능성 확인

[0127] 네 가지 후보 바이오마커 CD20, CLIC4, TAP1, 및 SCFD1 중 CD20이 감염성 원인에 의한 폐침윤 환자에 비해 비감염성 원인에 의한 폐침윤 환자에서 유의하게 수준이 증가해 있었다 (248.6 vs 177.6 ng/ml; $P=0.014$) (도 2). CLIC4, TAP1, 및 SCFD1의 수준은 두 그룹간에 유의미한 차이가 없었다.

[0128] 다변량 기호 논리학 회귀 분석(multivariate logistic regression analysis)에서, BALF 내의 높은 CD20 수준 (167.6 ng/ml 이상) (교차비(odd ratio, OR), 2.985; 95% CI, 1.314-6.780; $P=0.009$)은 비감염성 원인과 독립적으로 연관되어 있었다 (표 4).

표 4

[0129]

위험 인자 (Risk factors)	교차비 (Odds ratio)	95% CI	P
단변량 분석 (Univariate analysis)			
CD20, ng/mL	1.003	1.001 - 1.006	0.018
CD20 $\geq$ 167.6 ng/mL	4.105	1.887 - 8.930	0.000
WBC, / μ L	1.000	1.000 - 1.000	0.031
BAL WBC, / μ L	1.000	0.999 - 1.000	0.059
BAL 호중구 (neutrophil), %	0.986	0.975 - 0.997	0.016
BAL 폐포 대식세포 (alveolar macrophage), %	1.018	1.004 - 1.033	0.012
다변량 분석 (Multivariate analysis)			
CD20 $\geq$ 167.6 ng/mL	2.985	1.314 - 6.780	0.009
BAL WBC, / μ L	1.000	1.000 - 1.000	0.267
BAL 호중구 (neutrophil), %	0.996	0.980 - 1.013	0.652
BAL 폐포 대식세포 (alveolar macrophage), %	1.008	0.989 - 1.028	0.411

[0131] ROC 분석에서, BALF 내의 CD20은 비감염성 원인의 유의미한 예측 인자인 것으로 나타났다 (도 3; AUC = 0.668; 95% CI, 0.567-0.769; $P < 0.001$; 컷오프값, 167.6 ng/mL; 민감도, 74.1%; 특이성, 63.2%).

[0132] BALF 내의 CD20의 수준은 호중구 ($r=-0.190$, $P=0.042$) 및 폐포대식세포(alveolar macrophages) ($r=0.232$, $P=0.013$)의 비율과 연관되어 있었다.

[0134] 2-3. 후보 바이오마커를 이용한 생존 예측 가능성 확인

[0135] CD20 (207.8 ± 150.8 vs 222.2 ± 165.5 ; $P=0.632$), CLIC4 (153.3 ± 237.0 vs 175.3 ± 228.5 ; $P=0.623$), TAP1 (1.6 ± 3.9 vs 1.1 ± 0.9 ; $P=0.414$), 및 SCFD1 (3.5 ± 3.6 vs 5.6 ± 5.6 ; $P=0.342$)의 수준 모두 생존자와 비생존자 사

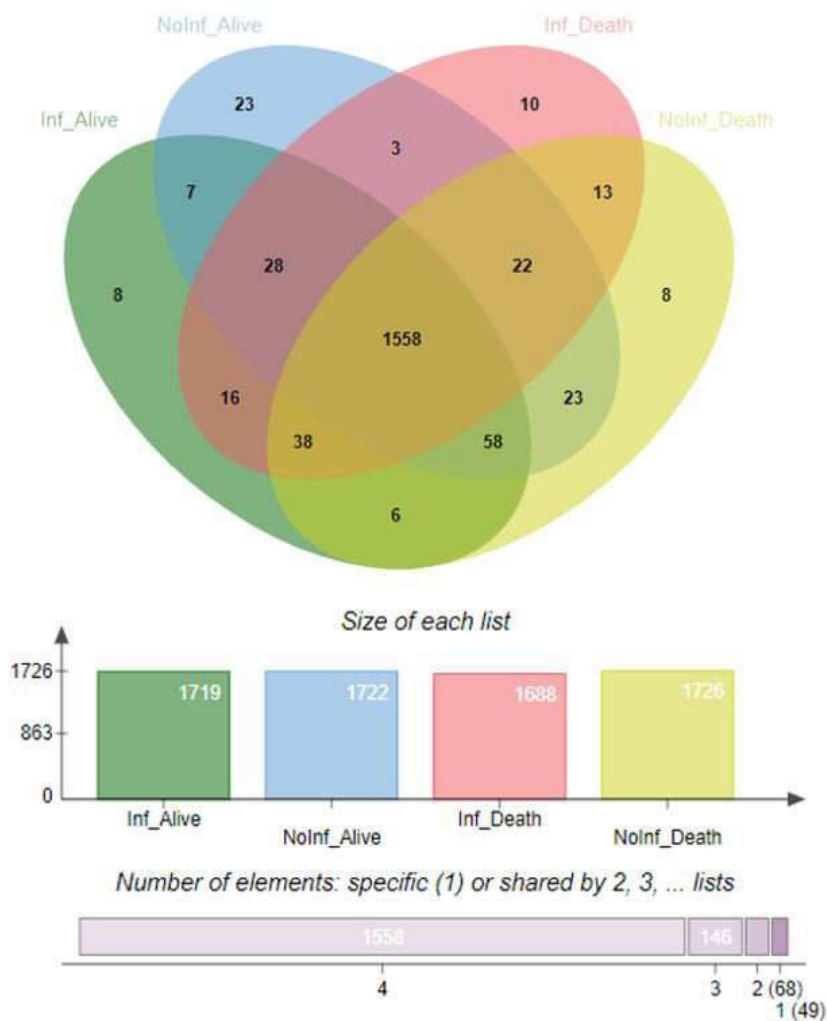
이에 유의미한 차이가 없었다.

[0137] 이상 살펴본 바와 같이, 양측성 폐침윤 환자의 BALF 내 엑소좀의 프로테오믹스 프로파일링을 수행한 결과 CD20 은 감염성 및 비감염성 폐침윤 여부를 감별할 수 있는 바이오마커로 선별되었으며, 100여명의 임상 환자를 대상으로 BALF 내의 CD20 수준을 실제 측정된 결과 감염성 폐질환 환자에 비해 비감염성 폐질환 환자에서 CD20의 수준이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 따라서, CD20을 이용한 비감염성 폐질환 진단 마커의 개발 및 확립화는 비감염성 폐질환의 진단 및 치료 선택에 있어서 필수적인 마커로 사용될 것으로 사료된다.

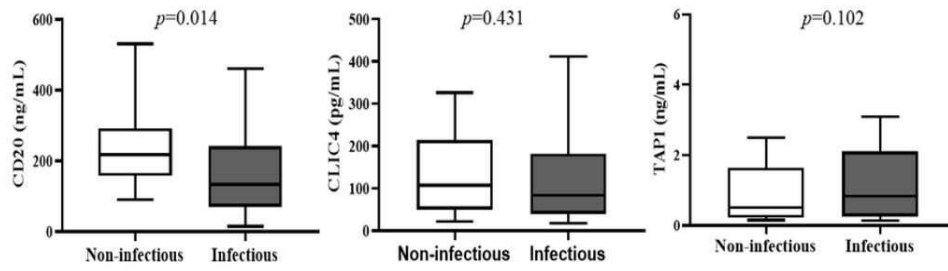
[0139] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

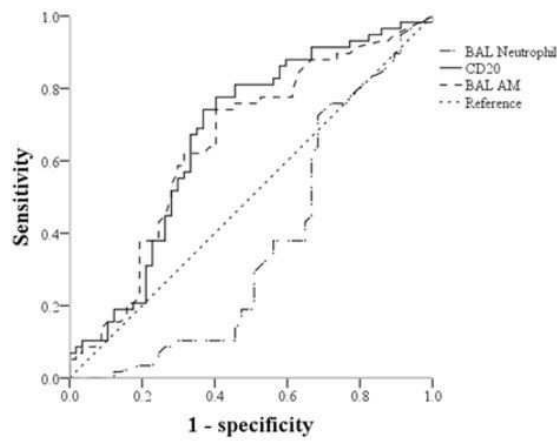
도면1



도면2



도면3



	CD20, ng/mL	BAL AM, %	BAL Neutrophil, %
AUC	0.668	0.650	0.371
CI	0.567- 0.769	0.548-0.752	0.266-0.477
P-value	0.002	0.006	0.017
Cut off value	≥ 167.6	≥ 22.0	≤ 16.5
Sensitivity	74.1	74.1	72.4
Specificity	63.2	59.6	31.6