(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0016523
(43) 공개일자 2015년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C40B 40/06 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7033326
(22) 출원일자(국제) 2013년04월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년11월26일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/053321
(87) 국제공개번호 WO 2013/160882
국제공개일자 2013년10월31일
(30) 우선권주장
1207297.1 2012년04월26일 영국(GB)

(71) 출원인
센자겐 아베
스웨덴 에스-21837 번크플로스트랜드 글랜스바게 가탄 13
(72) 발명자
린드스테드 말린
스웨덴 에스-21837 붕케플로스트란드 글란스바게 가탄 13
보레바에크 칼
스웨덴 에스-22363 룬드 헬고나베겐 21
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

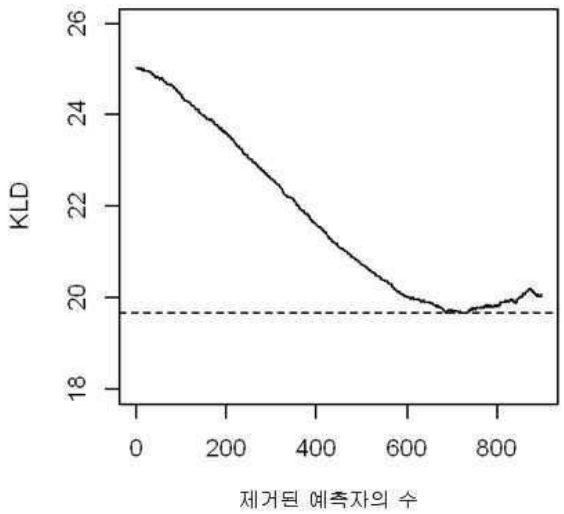
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 감작성을 유도할 수 있는 물질을 확인하는 방법 및 그 방법에서 사용하기 위한 어레이 및 분석 키트**

(57) 요 약

본 발명은 포유동물에서 호흡기 감작성(respiratory sensitization)을 유도할 수 있는 작용제를 확인하는 인 비트로 방법 및 그러한 방법에서 사용하기 위한 어레이 및 진단 키트에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 방법은 테스트 물질에 노출된 MUTZ-3 세포에서 표 1A, 표 1B, 및/또는 표 1C에 열거된 바이오마커의 발현의 측정을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자
요한손 헨리크
스웨덴 에스-21213 말뫼 벨만스가탄 2

알브렉트 안-소피에
스웨덴 에스-26020 테코마토르프 인파르트스가탄 7

특허청구의 범위

청구항 1

포유동물에서 호흡기 감작성(respiratory sensitization)을 유도할 수 있는 물질을 확인하는 방법으로서:

a) 수지상 세포의 집단, 또는 수지상-유사 세포의 집단을 테스트 물질(test agent)에 노출시키는 단계; 및

b) 상기 세포에서 표 1A 및/또는 표 1B에 정의된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 단계를 포함하거나, 또는 그로 구성되고,

단계 (b)에서 측정된, 상기 세포에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현은 테스트되는 시료의 감작 효과를 나타내는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

c) 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 군을 포유동물에서 호흡기 감작제(repiratory sensitizer)가 아닌 하나 이상의 음성 대조 물질(negative control agent)에 노출시키는 단계; 및

d) 단계 (b)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 상기 세포에서 측정하는 단계를 더 포함하고,

단계 (d)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (b)에서 측정된 대조 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 호흡기 감작제로 확인되는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서,

e) 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 군을 포유동물에서 호흡기 감작제인 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출시키는 단계; 및

f) 단계 (b)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커를 상기 세포에서 측정하는 단계를 더 포함하고,

단계 (f)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (b)에서 측정된 양성 대조 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하는 경우, 상기 테스트 물질은 호흡기 감작제로 확인되는 것인 방법.

청구항 4

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1A에 정의된 하나 이상의 바이오마커, 예를 들면, 표 1A에 정의된 바이오마커 중 2개 이상의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 5

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 OR5B21의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 6

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 SLC7A7의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 7

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 OR5B21 및 SLC7A7의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 8

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1B에 정의된 바이오마커 중 하나 이상, 예를 들면, 표 1B에 정의된 바이오마커 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 9

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1B에 정의된 모든 바이오마커의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 10

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1C에 정의된 바이오마커 중 하나 이상, 예를 들면, 표 1C에 정의된 바이오마커 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286 또는 287개의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 11

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1C에 정의된 모든 바이오마커의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 12

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 표 1에 정의된 모든 바이오마커의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 13

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 상기 하나 이상의 바이오마커를 코딩하는 핵산의 발현을 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 핵산 분자는 cDNA 분자 또는 mRNA 분자인 것인 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 핵산 분자는 mRNA 분자인 것인 방법.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 핵산 분자는 cDNA 분자인 것인 방법.

청구항 17

청구항 13 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것은 서던 혼성화(Southern hybridisation), 노던 혼성화(Northern hybridisation), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 효소 PCR (RT-PCR), 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR), 나노어레이(nanoarray), 마이크로어레이(microarray), 마크로어레이(macroarray), 자기방사법(autoradiography) 및 인 시투 혼성화(*in situ* hybridisation)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 18

청구항 13 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것은 DNA 마이크로어레이를 이용하여 결정되는 것인 방법.

청구항 19

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것은 하나 이상의 결합 모이어티(binding moiety)를 이용하여 수행되고, 각각의 결합 모이어티는 표 1에 표시된 바이오마커 중 하나를 코딩하는 핵산 분자에 선택적으로 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 핵산 분자를 포함하거나 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 DNA, RNA, PNA, LNA, GNA, TNA 또는 PMO를 포함하거나 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 22

청구항 19 또는 20에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 DNA를 포함하거나 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 23

청구항 20 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 5 내지 100개 뉴클레오티드로 이루어진 길이인 것인 방법.

청구항 24

청구항 20 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 핵산 분자는 15 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 길이인 것인 방법.

청구항 25

청구항 20 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 모이어티는 검출가능한 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티는 형광(fluorescent) 모이어티; 발광(luminescent) 모이어티; 화학발광(chemiluminescent) 모이어티; 방사성(radioactive) 모이어티(예를 들면, 방사성 원자); 또는 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티는 방사성 원자를 포함하거나, 그로 이루어지는 것인 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 방사성 원자는 테크네튬-99m, 요오드-123, 요오드-125, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 인-32, 황-35, 중수소, 삼중수소, 레늄-186, 레늄-188 및 이트륨-90으로 구

성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 29

청구항 26에 있어서, 상기 결합 모이어티의 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티인 것인 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 단계 (b)에서 정의된 하나 이상의 바이오마커의 단백질의 발현을 측정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것은 각각 표 1에 표시된 바이오마커 중 하나에 선택적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 모이어티를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 32

청구항 31에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 단일클론 항체 또는 그의 단편인 것인 방법.

청구항 34

청구항 32 또는 33에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 온전한(intact) 항체, Fv 단편(예를 들면, 단쇄 Fv 및 디술피드-결합 Fv), Fab-유사 단편(예를 들면, Fab 단편, Fab' 단편 및 $F(ab)_2$ 단편), 단일 가변 도메인(예를 들면, V_H 및 V_L 도메인) 및 도메인 항체(단일 및 이중 포맷 [즉, dAb-링커-dAb]를 포함한, dAb)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 35

청구항 34에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 단쇄 Fv (scFv)인 것인 방법.

청구항 36

청구항 31에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 항체-유사 결합제(antibody-like binding agent), 예를 들면, 어피바디(affibody) 또는 앱타머(aptamer)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 것인 방법.

청구항 37

청구항 31 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 검출가능한 모이어티를 포함하는 것인 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티, 발광 모이어티, 화학발광 모이어티, 방사성 모이어티 및 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 39

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b)는 어레이를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 40

청구항 39에 있어서, 상기 어레이는 비드-기반 어레이(bead-based array)인 것인 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 어레이는 표면-기반 어레이(surface-based array)인 것인 방법.

청구항 42

청구항 39 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어레이는 마크로어레이, 마이크로어레이, 나노어레이로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 43

선행하는 항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 사용하기 위한 어레이로서, 상기 어레이는 청구항 19 내지 29 및 31 내지 38 중 어느 한 항에서 정의된 것과 같은 하나 이상의 제1 결합제를 포함하는 것인 어레이.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 표 1에 정의된 모든 바이오마커에 집합적으로(collectively) 결합할 수 있는 결합제를 포함하는 것인 어레이.

청구항 45

청구항 43 또는 44에 있어서, 상기 제1 결합제는 고정화된 것인 어레이.

청구항 46

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 호흡기 과민 반응(respiratory hypersensitivity response)을 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위한 것인 방법.

청구항 47

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과민 반응은 체액성 과민 반응인 것인 방법.

청구항 48

청구항 46 또는 47에 있어서, 상기 과민 반응은 타입 I 과민 반응인 것인 방법.

청구항 49

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 호흡기 알레르기를 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위한 것인 방법.

청구항 50

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수지상 세포의 집단, 또는 수지상-유사 세포의 집단은 수지상-유사 세포의 집단인 것인 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 수지상-유사 세포는 골수 수지상-유사 세포인 것인 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 골수 수지상-유사 세포는 골수 수지상 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 골수 수지상 세포로부터 유래된 세포는 골수성 백혈병-유래 세포인 것인 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 골수성 백혈병-유래 세포는 KG-1, THP-1, U-937, HL-60, Monomac-6, AML-193 및 MUTZ-3으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 55

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수지상-유사 세포는 MUTZ-3 세포인 것인 방법.

청구항 56

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (c)에서 제공되는 하나 이상의 음성 대조 물질은 1-부탄올, 4-아미노벤조산, 클로로벤젠, 디메틸 포름아미드, 에틸 바닐린, 이소프로판올, 메틸 살리실레이트, 프로필렌 글리콜, 과망간산 칼륨, Tween 80™(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올리에이트) 및 황산아연으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서, 2개 이상의 대조 비-감작제(control non-sensitizing agent), 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상, 또는 11개 이상의 대조 비-감작제가 제공되는 것인 방법.

청구항 58

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (e)에서 제공되는 하나 이상의 양성 대조 물질은 암모늄 헥사클로로플라티네이트(ammonium hexachloroplatinate), 암모늄 퍼술페이트(ammonium persulfate), 글루타르알데이드, 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 말레산 무수물(maleic anhydride), 메틸렌 디페놀 디이소시아네이트, 프탈산 무수물, 톨루엔디이소시아테이트, 및 트리멜리트산 무수물(trimellitic anhydride)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하거나, 그로 구성되는 것인 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 2개 이상의 대조 감작제, 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19개 이상, 또는 20개 이상의 대조 감작제가 제공되는 것인 방법.

청구항 60

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 테스트되는 시료의 감작 효능(sensitizing potency)을 나타내는 것인 방법.

청구항 61

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 사용하기 위한 어레이로서, 상기 어레이는 청구항 19 내지 29 및 31 내지 38 중 어느 한 항에서 정의된 하나 이상의 결합 모이어티를 포함하는 것인 어레이.

청구항 62

청구항 61에 있어서, 상기 결합 모이어티는 표 1A에 정의된 모든 바이오마커에 결합할 수 있는 것인 어레이.

청구항 63

청구항 61 또는 62에 있어서, 상기 결합 모이어티는 표 1B에 정의된 모든 바이오마커에 결합할 수 있는 것인 어레이.

청구항 64

청구항 61, 62, 또는 63에 있어서, 상기 결합 모이어티는 표 1C에 정의된 모든 바이오마커에 결합할 수 있는 것인 어레이.

청구항 65

청구항 61 내지 64 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 모이어티는 표 1에 정의된 모든 바이오마커에 결합할 수 있는 것인 어레이.

청구항 66

청구항 61 내지 64 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 모이어티는 고정화된 것인 어레이.

청구항 67

호흡기 과민 반응 감작제를 확인하기 위한, 조합된, 표 1에 정의된 군으로부터 선택된 둘 이상의 바이오마커의

용도.

청구항 68

청구항 67에 있어서, 표 1에 정의된 바이오마커 모두가 과민 반응 감작제를 확인하기 위해 집합적으로 사용되는 것인 용도.

청구항 69

청구항 1 내지 60 중 어느 한 항에 따른 방법에서 사용하기 위한 분석 키트로서,

A) 청구항 61 내지 66 중 어느 한 항에 따른 어레이, 및

B) (선택적으로) 청구항 1 내지 60 중 어느 한 항에 정의된 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함하는 것인 분석 키트.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 하나 이상의 대조 시료를 더 포함하는 것인 분석 키트.

청구항 71

청구항 69에 있어서, 하나 이상의 비-감작제를 포함하는 것인 분석 키트.

청구항 72

청구항 69, 70, 또는 71에 있어서, 하나 이상의 감작제를 포함하는 것인 분석 키트.

청구항 73

본 명세서에 기재된 것과 실질적으로 동일한 방법 또는 용도.

청구항 74

본 명세서에 기재된 것과 실질적으로 동일한 어레이 또는 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호흡기 감적성을 유도할 수 있는 물질을 확인하는 방법 및 그러한 방법에서 사용하기 위한 어레이 및 분석 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로, 알레르기는 그 외에는 무해한 항원에 대한 면역 반응 후에 나타나는 불리한 상태(adverse condition)이다. 알레르기는 조직 손상을 초래하는 유해한 면역 반응으로 정의되는, 과민 반응(hypersensitivity reaction)으로 지칭되는 결과들의 부류(class)의 일원이다(Janeway, C., Travers, P., Hunt, S., Walport, M., 1997. Allergy and hypersensitivity. ImmunoBiology: The Immune System in Health and Disease. Garland Publishing, New York). 산업 독성학자들이 특히 관심을 갖는, 결과적으로 초래되는 질환은 호흡기 알레르기(respiratory allergy) 및 알레르기성 접촉성 피부염(ACD)이다. 호흡기 알레르기는 생체이물(xenobiotic)에 대한 상부 및/또는 하부 호흡기(respiratory tract)의 과민 반응이다. 이러한 과민 반응은 즉각적이고, 임상적 특징이 생체이물로의 노출 후 수분 내지 수시간 내에 일어나며, 재채기, 호흡곤란, 가슴 조임(tightness in the chest), 기관지 수축, 및/또는 비충혈(nasal congestion)을 포함할 수 있다. 극단적인 경우에, 과민 반응은 저혈압 및 생명을 위협하는 아니필락시스를 유발할 수 있다. 일반적인 집단에서, 호흡기 알레르기는 화분, 먼지 벌레 배설물, 및 동물 비듬을 포함한 환경 단백질에 의해 가장 흔하게 유도된다. 그러나, 직업적 셋팅(occupational setting)에서, 호흡기 알레르기는 고분자량(HMW) 화합물, 예를 들면, 단백질 디터전트, 및 저분자량(LMW) 화합물을 포함한 산업적 화합물에 의해 매개될 수 있다. 작은 크기 때문에, LMW 화합물 알레르겐은 먼저 단백질과 반응하여, 면역 반응을 개시할 수 있는 복합체를 형성하는 합텐(hapten)으로 작용한다.

[0003] HMW 및 LMW에 대한 호흡기 알레르기의 발병은 특정한 작업 환경에 기인될 수 있는 원인 및 조건에 의한 가변적인 공기흐름 제한 및/또는 비-특이적 기관지 과민증(bronchial hyper-responsiveness)을 특징으로 하는 직업성 천식에 기여할 수 있다(Chan-Yeung, M., Malo, J.L., 1994. Aetiological agents in occupational asthma. Eur. Respir. J. 7, 346-371; Karol, M.H., 1994. Animal models of occupational asthma. Eur. Respir. J. 7, 555-568). 이러한 면역학적 병인 외에, 자극제(irritant)와 같은 비-면역원성 물질도 직업성 천식의 발병에 유의성 있는 역할을 한다는 것에 주목하는 것이 중요하다. 임상적 조사는 최대 20%의 성인 천식이 직업적 인자에 의해 유발되고, 이러한 인자의 90%가 면역 메카니즘을 포함한다는 것을 시사한다(Mapp, C.E., 2005. Genetics and the occupational environment. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 5, 113-118). 또한, 직업성 천식은 선진국에서 가장 일반적인 직업성 폐질환이다. 그 결과, 호흡기 알레르겐(respiratory allergen)으로 작용할 가능성을 갖는 화합물의 확인 및 규명(characterization)이 산업 독성학자의 중요한 연구 영역이다.

[0004] 특이적 면역 반응을 유발하는 모든 화합물이 호흡기의 과민반응을 일으킬 가능성을 갖지는 않을 것이다. 보다 많은 수의 화합물이 피부 과민성 및 ACD의 발병과 연관되고, 호흡기에 대한 감작 효과를 갖지 않는 것으로 사료된다(Kimber, I., Dearman, R.J., 2005. What makes a chemical a respiratory sensitizer? Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 5, 119-124). 호흡기 알레르기와 달리, ACD는 세포-매개 면역 반응으로부터 초래되는 지연형 과민반응(delayed-type hypersensitivity reaction)의 예이다(Janeway et al., 1997 *supra*). ACD는 다수의 화합물이 원인 물질로 시사되는 가장 흔한 직업병 중 하나이고, 따라서, 이러한 화합물의 사전적인(proactive) 확인 및 특성규명이 또한 매우 중요하다 (Saary, J., Qureshi, R., Palda, V., DeKoven, J., Pratt, M., Skotnicki-Grant, S., Holness, L., 2005. A systematic review of contact dermatitis treatment and prevention. J. Am. Acad. Dermatol. 53, 845).

[0005] 호흡기 알레르기 또는 ACD를 초래하는 과민반응의 발병은 2개의 뚜렷한 단계로 구성된다. 제1 단계는 면역 상태의 발달을 포함하는 감작화(sensitization)이고, 제2 단계는 알레르기의 임상적 발현을 초래하는 유발(elicitation)이다(Briatico-Vangosa, G., Braun, C.L., Cookman, G., Hofmann, T., Kimber, I., Loveless, S.E., Morrow, T., Pauluhn, J., Sorensen, T., Niessen, H.J., 1994. Respiratory allergy: hazard identification and risk assessment. Fundam. Appl. Toxicol. 23, 145-158). 그 결과, 이전에 노출되지 않았으나(천연(naive)), 민감한(susceptible) 개체는 알레르기성(allergenic) 단백질 또는 화학물질에 최초로 노출되었을 때 알레르기 증장을 경험하지 않는다. 최소한, 2회의 노출을 요구한다; 그러나, 다수의 경우에, 수주 또는 수개월에 걸쳐 반복된 노출이 일어날 것을 요구할 수 있다. 민감한 개체의 알레르기성 화합물로의 최초 접촉 동안, 그 화합물은 수지상 세포(항원 처리 및 제시 세포)에 의해 외래 물질로 인식되고, T 세포에 제시되고, 특이적 일차 면역 반응이 유발되어, 감작화가 초래된다. 이는 감작된 개체의 동일한 화합물에 대한 후속 노출시 실제적인 알레르기의 유발로 이어질 수 있다. 유발은 면역 반응 및 결과적인 세포 신호의 활성화를 통해 매개되어, 염증 반응 및 알레르기 증상을 초래한다. 알레르기 반응의 속성 및 중증도는 개체의 유전적 배경, 알레르겐의 특징, 및 감작화 및 유발 단계 동안 노출의 경로, 지속시간, 및 강도를 포함한 다수의 인자들에 의존적이다(Arts, J.H., Kuper, C., 2003. Approaches to induce and elicit respiratory allergy: impact of route and intensity of exposure. Toxicol. Lett. 140-141, 213-222; Arts, J.H., Mommers, C., de Heer, C., 2006. Dose esponse relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy. Crit. Rev. Toxicol. 36, 219-251).

[0006] 일부 일반적인 유사성에도 불구하고, 호흡기 알레르기와 ACD의 현재 이해되고 있는 병인 간에 중요한 메카니즘상의 차이가 있다. 일반적으로, 호흡기 알레르기는 IgE를 포함하는 타입 I 과민 반응으로 분류되고, ACD는 T 세포에 의해 매개되는 타입 IV 과민 반응이다 (Janeway et al., 1997 *supra*). 이러한 과민 반응은 T 헬퍼(Th) 세포, 즉, Th1 및 Th2 세포의 기능적 소집단(functional subpopulation)의 차등적 활성화에 의존하는 특정한 메카니즘에 따라 발생하는 것으로 생각된다. 호흡기 감작화 및 알레르기의 발생은 T 림프구의 Th2 집단의 우선적(preferential) 유도와 연관되었다. Th2 세포는 다량의 인터루킨(IL)-4, -10 및 -13의 생산을 특징으로 한다. 이러한 사이토카인의 생산은 체액성 면역 기능, 및 IgE를 생산하는 B 세포의 자극 및 분화를 촉진한다(Dearman, R.J., Betts, C.J., Humphreys, N., Flanagan, B.F., Gilmour, N.J., Basketter, D.A., Kimber, I., 2003. Chemical allergy: considerations for the practical application of cytokine profiling. Toxicol. Sci. 71, 137-145에서 검토됨). 이러한 항체는 비만 세포 및 호염기성 백혈구의 표면에 있는 수용체에 결합한다. 알레르겐에 대한 후속 노출시, 이러한 세포는 히스타민, 류코트리엔, 및 사이토카인을 포함한, 다양한 염증 매개체(inflammatory mediator)를 분비하여, 호흡기 알레르기의 즉각적인 과민 반응을 초래한다. IgE 생산을 촉진하는 것 외에, Th2 사이토카인은 또한 비만 세포 및 호산성 백혈구를 포함한, 호흡기 알레르기에 관

여하는 기타 세포의 증식 및 분화를 촉진한다(Kimber, I., 1996. Chemical-induced hypersensitivity. In: Smialowicz, R.J., Holsapple, M.P. (Eds.), Experimental Immunotoxicology. CRC Press, New York, pp. 391-417에서 검토됨). 알레르기성 화합물로의 반복적인 노출 및 호흡기 알레르기의 유발 후, 천식 질환의 발생에 기여하는, 광대한 기도 리모델링(airway remodeling), 점막 축적 및 만성 염증 반응이 발생할 수 있다.

[0007] 대조적으로, 접촉 감작화 및 ACD의 발생은 주로 T 림프구의 Th1 집단의 유도와 연관되었다. 이 세포들은 IL-2, 인터페론-감마(IFN-γ), 및 종양 괴사 인자-β(TNF-β)의 생산을 특징으로 한다. 연구는 지연형 접촉 과민 반응의 발생이 Th1 세포 및 IFN-β의 생산에 특별히 의존적이라는 것을 보여주었다(Diamantstein, T., Eckert, R., Volk, H.D., Kupier-Weglinski, J.W., 1988. Reversal by interferon-gamma of inhibition of delayed-type hypersensitivity induction by anti-CD4 or anti-interleukin 2 receptor (CD25) monoclonal antibodies. Evidence for the physiological role of the CD4+ TH1+ subset in mice. Eur. J. Immunol. 18, 2101-2103). 감작화 반응은 메모리 T 세포의 생성과 연관되고, 메모리 T 세포는 항원과의 후속 접촉시 활성화되어, 과민 반응을 초래한다. 이러한 반응은 각질세포의 활성화 및 비-항원 특이적 T 세포 및 단핵세포를 접촉 부위로 동원하여, 급성 염증 반응을 초래하는 염증촉진성(proinflammatory) 사이토카인의 분비를 포함한다. 흥미롭게도, Th1 세포에 의해 생산된 IFN-γ도 Th2 세포 반응 및 IgE의 생산을 길항시키나, Th2 세포에 의해 생산된 IL-4는 Th1 세포의 발달을 길항시킨다. 또한, IFN-γ는 호흡기 알레르기에서 비만 세포 기능을 억제하고, IL-4는 ACD의 유발단계를 저하시키는 것으로 확인되었다(reviewed in Kimber, 1996 *supra*). 따라서, 각 Th 세포 타입의 사이토카인이 그들의 계통(lineage)의 증식 및 분화 및 후속 과민 반응을 촉진하나, 이들은 또한, 면역 반응을 더 지시하기 위한 수단으로서 나머지 세포 집단의 증식을 길항시킨다.

[0008] 호흡기 알레르기와 ACD의 전술된 구별은 위험 평가 및 규제적 관점에서 상당히 중요하다. 연구자들이 호흡기 알레르기를 유발할 가능성을 갖는 화합물을 확인하기 위하여 다수의 동물 모델 및 실험적 접근방법을 탐구하였으나, 광범위하게 적용되거나, 또한 연구계 또는 규제 기관에 의해 완전히 허용된 방법은 없다(Arts et al., 2006 *supra.*). 대조적으로, 접촉 감작화 및 ACD를 유발할 가능성을 갖는 화합물의 검출을 위한 다수의 가이드라인 분석법이 존재한다. 호흡기 알레르기와 ACD의 감작화 반응의 전반적인 유사성을 고려할 때, 접촉 감작화를 위한 가능성을 확인하기 위한 모델이 또한 호흡기 알레르기에 대한 가능성을 평가하기 위해 이용될 수 있다는 것이 시사되었다. 그러나, 공지된 메카니즘 상의 차이 및 호흡기 알레르겐으로의 분류에 대한 보다 심각한 보건 및 규제적 영향 때문에, 이러한 화합물의 정확한 확인 및 ACD 유발 화합물로부터의 구별이 중요하다. 단백질 및 화합물 모두의 호흡기 알레르기 가능성을 평가하는 체계적이고 허용되는 접근 방법이 요구된다.

[0009] 호흡기 알레르기는 생체이물 단백질 또는 화학물질에 대한 상부 및 하부 호흡기의 타입 I 과민 반응이고, 임상적 증상은 일반적으로, 재채기, 호흡곤란, 가슴 조임, 기관지 수축, 및 천식 발작(asthmatic attack)을 포함한다 (Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, Krieger SM, et al. (2008) Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. Toxicol Appl Pharmacol 226: 1-13). 메카니즘 면에서, 호흡기 알레르기는 Th2 세포의 유도 및 B 세포에 의한 IgE 생산 증가와 연관된다. 비만 세포 및 호염기성 백혈구와 같은, 과립성 작용 세포(granular effector cell) 상에서 IgE/알레르겐 복합체에 의한 FcεRI:s의 가교(crosslinking)는 염증촉진성 분자의 분비를 초래한다(Boverhof *et al*., 2008, *supra*; Banks DE, Tarlo SM (2000) Important issues in occupational asthma. Curr Opin Pulm Med 6: 37-42; Sastre J, Vandenplas O, Park HS (2003) Pathogenesis of occupational asthma. Eur Respir J 22: 364-373). 타입 I 과민 반응은 고전적으로 단백질 알레르겐에 의해 촉발되나, 저분자량 화합물이 주로 Th1 및 $CD8^+$ 작동 세포의 유도와 연관된 타입 IV 과민 반응인 알레르기성 접촉 피부염(ACD)을 유발하는 경향을 갖는다. 그러나, 다수의 화학물질, 예를 들면, 디이소시아네이트 (Zammit-Tabona M, Sherkin M, Kijek K, Chan H, Chan-Yeung M (1983) Asthma caused by diphenylmethane diisocyanate in foundry workers. Clinical, bronchial provocation, and immunologic studies. Am Rev Respir Dis 128: 226-230), 산 무수물 (Bernstein DI, Patterson R, Zeiss CR (1982) Clinical and immunologic evaluation of trimellitic anhydride-and phthalic anhydride-exposed workers using a questionnaire with comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent and radioimmunoassay studies. J Allergy Clin Immunol 69: 311-318), 백금 염 (Murdoch RD, Pepys J, Hughes EG (1986) IgE antibody responses to platinum group metals: a large scale refinery survey. Br J Ind Med 43: 37-43), 반응성 염료 (Docker A, Wattie JM, Topping MD, Luczynska CM, Newman Taylor AJ, et al. (1987) Clinical and immunological investigations of respiratory disease in workers using reactive dyes. Br J Ind Med 44: 534-541), 및 클로라민 T (Bourne MS, Flindt ML, Walker JM (1979) Asthma due to industrial use of chloramine. Br Med J 2: 10-12)가 호흡기 감작화를 유도하고, 결과로 직업성 천식 및 비염

을 초래할 수 있다. 접촉 피부염을 유발하는 화합물에 비해, 더 적은 수의 화학물질이 호흡기 알레르기를 유발하는 것으로 알려져 있으나, 호흡기 알레르기는 치명적인 결과와 연관될 수 있으므로, 보건적 영향은 여전히 처참하다. 임상적 특징은 단백질에 대한 알레르기 반응과 유사하나, 반응의 속성은 종종 미해결이다.

[0010] REACH (Registration, Evaluation, and Authorisation of Chemicals) 규정은 유럽 연합 내에서 약 30,000개의 화학 물질을 포함한, 모든 신규한 화학 물질 및 기존 화학 물질이 유해 효과에 대해 테스트되어야 한다고 규정한다(Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA: A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. BMC Genomics 2011, 12:399). 잠재적 감작제의 확인은 현재 동물 시험을 요구하므로, REACH 입법은 시험을 위해 요구되는 동물의 수에 대한 엄청난 영향을 가질 것이다. 또한, Cosmetics Directive (76/768/EEC)에 대한 7차 개정은 2009년까지 발효될, 인간 사용을 위한 화장품 성분 대다수에 대한 동물 시험에 대한 금지를 부과하고, 2013년까지 일부 시험의 예외가 적용된다. 따라서, 화학 물질의 감작화 능력의 평가를 위한 실험 동물에 대한 신뢰가능한 인 비트로 대안의 개발이 시급하다.

[0011] 호흡기 감작화를 유도하는 화학물질의 위험 평가 방법은 매우 저개발 상태이고, 현재까지 검증된 분석법이 없다 (Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, et al. (2008) Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. Toxicol In Vitro 22: 1419-1431). 이 목적을 위해 설계된 주요한 인 비보 분석법이 마우스 IgE 테스트이다 (Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I (1992) Variable effects of chemical allergens on serum IgE concentration in mice. Preliminary evaluation of a novel approach to the identification of respiratory sensitizers. J Appl Toxicol 12: 317-323; Dearman RJ, Skinner RA, Humphreys NE, Kimber I (2003) Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE. J Appl Toxicol 23: 199-207). 유망한 초기 결과를 보이나, 실험실간 재현성 (interlaboratory reproducibility)이 이 분석법을 공식적으로 검증하기에 충분하지 않고, 현재 이 방법은 일상적으로 사용되지 않는다. 그러나, THP-1과 같은 수지상(dendritoid) 세포주 (Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicol In Vitro 23: 1151-1162.), 및 BEAS-2B (Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of a human bronchial epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicology 255: 151-159) 및 A549 (Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of a human alveolar epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicol Lett 185: 16-22)와 같은 상피 세포주를 이용한, 호흡기의 감작화를 위한 세포-기반 분석법을 개발하기 위한 노력이 이루어지고 있다. 또한, 화학적 반응성 분석법이 호흡기 감작화 및 ACD 내에서 연구되고 있다(Lalko JF, Kimber I, Dearman RJ, Gerberick GF, Sarlo K, et al. (2011) Chemical reactivity measurements: potential for characterization of respiratory chemical allergens. Toxicol In Vitro 25: 433-445). 그러나, 펩티드 반응성이 피부 및 호흡기 모두의 감작제에 대한 공통된 특징으로 확인되어, 두 그룹 간의 구별을 더 복잡하게 했다.

[0012] 수지상 세포(DC)는 선천성 면역과 적응성 면역 간의 필수적 연결을 결합(bridge)시키는 것에 의해 면역 반응에서 중요한 역할을 수행한다. 이들은, 촉발되면, 다량의 매개체를 생산하고, 이는 염증 부위에서 다른 세포의 이동 및 활성화에 영향을 미치고, 항원-제시(antigen-presentation)를 통해 세포 반응을 조정(fine-tune)하는 것에 의해 선택적으로 다양한 병원체 및 환경적 인자들에 반응한다. 따라서, 감작제에 의한 자극 동안, DC에 의한 면역학적 의사 결정을 연구하고 이용하는 것이 감작화의 예측을 위한 강력한 테스트 전략으로서 작용할 수 있다.

[0013] 그러나, 상이한 DC 소집단의 다면적 표현형 및 특화된 기능, 및 그들의 광범위하고 부족한 분포는 복잡하게 하는 인자이고, 이는 테스트 플랫폼으로서 일차 DC의 이용을 방해한다. 따라서, DC 수득의 가변성 및 어려움과 연관된 문제를 극복하는, 정확하고, 신뢰가능한 인 비트로 분석법에 대한 실질적인 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서, DC 기능의 예측가능성에 기초한 분석법의 개발은 바람직하게는 인 비보 DC의 대안적인 세포 타입, 또는 모방체(mimic)에 의존한다. 이 목적을 위해, DC 특징을 갖는 세포주는 안정하고, 재현가능하고 무한한 세포 공급원(supply)를 구성하므로, 유리할 것이다. DC 모방체의 측면에서, 분화된 골수단핵구(myelomonocytic) MUTZ-3 세포가 바람직한 후보이다 (Masterson, A. J., C. C. Sombroek, T. D. De Gruijl, Y. M. Graus, H. J. van der Vliet, S. M. Lougheed, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, and R. J. Scheper. 2002. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. Blood 100:701-703.). MUTZ-3은 $CD34^+$ DC 전구세포(progenitor)의 무한한 공급원이고, 사이토카인 자극시, 미성숙(immature) DC 또는 랑게르한스-유사(Langerhans-like) DC에 유사한 표현형을 얻고(Santegoets, S. J., M. W. Schreurs, A. J. Masterson, Y. P. Liu, S. Goletz, H. Baumeister, E. W. Kueter, S. M. Lougheed, A. J. van den Eertwegh, R. J. Scheper, E. Hooijberg, and T. D. de Gruijl. 2006. In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line. Cancer Immunol Immunother 55:1480-1490.), CD1d, MHC 클래스 I 및 II를 통해 항원을 제시하고 특이적 T-세포 증식을 유도할 수 있다 (Masterson, A. J., C. C. Sombroek, T. D. De Gruijl, Y. M. Graus, H. J. van der Vliet, S. M. Lougheed, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, and R. J. Scheper. 2002. MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. Blood 100:701-703.). MUTZ-3은 또한 염증 매개체에 의한 자극시, 성숙한 전사 및 표현형 프로파일을 보인다 (Larsson K, Lindstedt M, and Borrebaeck CAK. Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3. A myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. Immunology. 2006 Feb;117(2):156-66.)

[0015] 본 발명자들은 호흡기 감작제의 예측을 위한 신규한 테스트 원리를 개발했다. 놀랍게도, 호흡기 감작제가 세포를 일련의(a panel) 감작성 화합물, 비-감작성 화합물, 및/또는 기타 대조군(예를 들면, 희석제, 예를 들면, DMSO 및/또는 증류수만을 포함하는 비히클 대조군)으로 자극하는 것인 방법에서 추가적인 부화 없이, MUTZ-3 세포와 같은, DC-전구 세포를 이용하여 정확하게 확인/예측될 수 있다는 것을 발견하였다. 이는 실질적으로 절차를 감소화하고, 그의 재현성을 개선하는 것으로 확인되었다.

과제의 해결 수단

[0016] 따라서, 본 발명의 제1 양태는 포유동물에서 호흡기 감작성(respiratory sensitization)을 유도할 수 있는 작용제를 확인(identify)하는 방법으로서:

[0017] a) 수지상 세포, 또는 수지상-유사 세포의 집단을 테스트 물질(test agent)에 노출시키는 단계; 및

[0018] b) 상기 세포에서 표 1에 정의된 군으로부터 선택된 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 단계를 포함하거나, 또는 이들로 구성되고,

[0019] 단계 (b)에서 측정된, 상기 세포에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현은 테스트되는 시료의 감작 효과를 나타내는 것인 방법을 제공한다.

[0020] "호흡기 감작화를 유도할 수 있는 물질(agents capable of inducing respiratory sensitization)"에 의해, 본 발명자들은 포유동물의 호흡기에서 타입 I 즉시성 과민 반응을 유도하고 촉발할 수 있는 물질을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 사람이다. 바람직하게는, 타입 I 즉시성 과민 반응은 DC-매개이고, 및/또는 T 세포의 Th2 세포로의 분화를 포함한다. 바람직하게는, 타입 I 즉시성 과민 반응은 체액성 면역 및/또는 호흡기 알레르기를 초래한다.

[0021] 포유동물 폐의 전도 영역(conducting zone)은 기관, 기관지, 세기관지, 및 종말 세기관지를 포함한다. 호흡 영역(respiratory zone)은 호흡 세기관지, 폐포관(alveolar duct), 및 폐포를 포함한다. 전도 영역은 기도로 이루어지고, 혈액과 가스 교환이 없으며, 기도를 개방 상태로 유지시키기 위해 연골에 의해 강화된다. 전도 영역은 흡입된 공기를 축축하게 하고, 37℃ (99°F)까지 가온시킨다. 또한, 기도 전체의 벽에 위치한 섬모를 통해 입자를 제거하는 것에 의해 공기를 세정시킨다. 호흡 영역은 혈액과의 가스 교환 부위이다.

[0022] 일 구체예에서, "포유동물 피부의 감작화를 유도할 수 있는 물질(agents capable of inducing sensitization of mammalian skin)"은 포유동물의 폐 상피의 부위에서 타입 I 즉시형 과민 반응을 유도하고 촉발시킬 수 있는

물질이다. 바람직하게는, 폐 상피의 부위는 폐의 호흡 영역에 존재하나, 대안적으로, 또는 추가적으로 폐의 전도 영역에 존재할 수 있다.

[0023] 포유동물은 가축(domestic or farm animal)일 수 있다. 바람직하게는, 상기 포유동물은 랫트, 마우스, 기니어피그, 고양이, 개, 말, 또는 영장류이다. 가장 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0024] 수지상 세포(DC)는 포유동물 면역계의 일부를 구성하는 면역 세포이다. 이들의 주요 기능은 항원 물질을 가공하고 면역계의 다른 세포의 표면 상에 제시하여(즉, 이들은 항원 제시 세포로 기능한다), 선천성 면역계와 적응성 면역계를 연결시킨다.

[0025] 수지상 세포는 외부 환경과 접촉하는 조직, 예를 들면, 피부(랑게르한스 세포(Langerhans cell)로 지칭되는 특화된 수지상 세포 타입) 및 코, 폐, 위, 및 장의 내면(inner lining)에 존재한다. 이들은 또한 혈액에서 미성숙 상태로 발견된다. 일단 활성화되면, 이들은 림프절로 이동하고, 여기에서, 적응성 면역 반응을 개시하고 형성하기 위해 T 세포 및 B 세포와 상호작용한다. 특정한 발달 단계에서, 이들은 분지된 돌기(branched projection), 수지상으로 성장한다. 외형은 유사하나, 이들은 뉴런의 수상 돌기(dendrite)와 구별되는 구조이다. 미성숙 수지상 세포는 또한, 수지상보다는 큰 세포질 '베일(veil)'을 갖기 때문에 베일 세포(veiled cell)로도 지칭된다.

[0026] "수지상-유사 세포(dendritic-like cell)"에 의해, 본 발명자들은 수지상 세포에 특이적인 기능적 및 표현형적 특징, 예를 들면, 형태적 특징, 공동자극 분자(costimulatory molecule) 및 MHC 클래스 II 분자의 발현, 및 마크로분자를 음작용(pinocytose)하고, 휴지기 T 세포를 활성화하는 능력을 보이는 비-수지상 세포를 의미한다.

[0027] 일 구체예에서, 수지상-유사 세포는 $CD34^+$ 수지상 세포 전구체이다. 선택적으로, $CD34^+$ 수지상 세포 전구체는 사이토카인 자극시, CD1d, MHC 클래스 I 및 II를 통해 항원을 제시하는 표현형을 얻고, 특이적 T-세포 증식을 유도할 수 있고, 및/또는 염증성 매개체에 의한 자극시 성숙 전사 및 표현형 프로파일(즉, 미성숙 수지상 세포 또는 랑게르한스-유사 세포에 유사한 표현형)을 보일 수 있다.

[0028] 수지상 세포는 기능에 의해, 표현형에 의해, 및/또는 유전자 발현 패턴에 의해, 특히, 세포 표면 표현형에 의해 인식될 수 있다. 이러한 세포는 그들의 독특한 형태, 높은 수준의 표면 MHC-클래스 II 발현, 및 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포, 특히, 천연(naive) T 세포에 항원을 제시하는 능력을 특징으로 한다 (Steinman *et al*. (1991) Ann. Rev. Immunol. 9: 271).

[0029] 수지상 세포의 세포 표면은 특이하고, 특징적인 베일-유사 돌기를 가지며, 세포 표면 마커 CD11c 및 MHC 클래스 II의 발현을 특징으로 한다. 대부분의 DC는 T 세포, B 세포, 단핵세포/대식세포, 및 과립세포를 포함한 다른 백혈구 계통의 마커에 대해 음성이다. 수지상 세포의 소집단은 또한 33D1, CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CD1a-d, CD4, CD5, CD8alpha, CD9, CD11b, CD24, CD40, CD48, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD91, CD117, CD123 (IL3Ra), CD134, CD137, CD150, CD153, CD162, CXCR1, CXCR2, CXCR4, DCIR, DC-LAMP, DC-SIGN, DEC205, E-카데린(cadherin), 랑게린(Langerin), 만노오스 수용체(Mannose receptor), MARCO, TLR2, TLR3 TLR4, TLR5, TLR6, TLR9, 및 여러 렉틴을 포함한 추가적인 마커를 발현할 수 있다.

[0030] 이러한 세포 표면 마커의 발현 패턴은 수지상 세포의 성숙도, 그들의 기원 조직(tissue of origin), 및/또는 그들의 기원 종(species of origin)에 따라 변할 수 있다. 미성숙 수지상 세포는 낮은 수준의 MHC 클래스 II를 발현하나, 항원성 단백질을 흡수(endocytose)하고, MHC 클래스 II 분자와의 복합체로 제시하기 위해 가공할 수 있다. 활성화된 수지상 세포는 높은 수준의 MHC 클래스 II, ICAM-1 및 CD86을 발현하고, 천연(naive) 동종이계(allogeneic) T 세포의 증식을, 예를 들면, MLR(mixed leukocyte reaction)에서 자극할 수 있다.

[0031] 기능적으로, 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포는 항원 제시의 결정을 위한 통상적인 분석법에 의해 확인될 수 있다. 이러한 분석법은 테스트 항원의 제시, 및 뒤이은 T 세포 증식, IL-2의 분비 등의 결정에 의해 초회 항원 자극을 받은(antigen-primed) 및/또는 천연 T 세포를 자극하는 능력을 테스트하는 것을 포함할 수 있다.

[0032] "발현(expression)"에 의해, 본 발명자들은 mRNA 또는 단백질과 같은 유전자 산물의 수준 또는 양을 의미한다.

[0033] 단백질 및/또는 핵산의 농도를 검출 및/또는 특정하는 방법은 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, Sambrook and Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press를 참조한다.

[0034] 단백질의 검출 및/또는 특정을 위한 바람직한 방법은 웨스턴 블롯(Western blot), 노던-웨스턴 블롯(North-Western blot), 면역흡착(immunosorbent) 분석법(ELISA), 항체 마이크로어레이, 조직 마이크로어레이(TMA), 면

역침전, 인 시투 혼성화, 및 기타 면역화학 기법, 방사성면역분석법(RIA), IRMA(immunoradiometric assay) 및 단일클론 및/또는 다중클론 항체를 이용한 샌드위치 분석법을 포함한 IMEA(immunoenzymatic assay)를 포함한다. 대표적인 샌드위치 분석법은 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 미국 특허 제4,376,110호 및 제4,486,530호에서 David 등에 의해 기술된다. 슬라이드 상의 세포의 항체 염색이 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 잘 알려진 바와 같이, 세포학 실험실 진단 테스트(cytology laboratory diagnostic test)에서 잘 알려진 방법에서 이용될 수 있다.

[0035] 통상적으로, ELISA는 일반적으로 고체상 분석법에서, 유색 반응 산물을 제공하는 효소의 이용을 포함한다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase) 및 포스파타아제와 같은 효소가 널리 이용되고 있다. 포스파타아제 반응을 증폭시키는 방법은 제2 효소계를 위한 조효소로 작용하는 NAD를 생성하기 위한 기질로서 NADP를 이용하는 것이다. 대장균으로부터의 피로포스파아제(pyrophosphatase)는 조직에 존재하지 않고, 안정하며, 우수한 반응 색상을 생성하므로, 우수한 컨쥬게이트를 제공한다. 루시퍼라아제와 같은 효소에 기반한 화학-발광계(chemi-luminescent system)가 또한 이용될 수 있다.

[0036] 비타민 비오틴과의 컨쥬게이션은, 비오틴이 높은 특이성 및 친화도로 결합하는 효소-결합 아비딘 또는 스트렙타비딘과의 반응에 의해 용이하게 검출될 수 있으므로, 자주 이용된다.

[0037] 핵산(예를 들면, mRNA)의 검출 및/또는 측정을 위한 바람직한 방법은 서던 블롯, 노던 블롯, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 효소 PCR(RT-PCR), 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR), 나노어레이, 마이크로어레이, 마크로어레이, 자기방사법, 및 인 시투 혼성화를 포함한다.

[0038] 일 구체예에서, 상기 방법은:

[0039] c) 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 군을 포유동물에서 호흡기 감작제(repiratory sensitizer)가 아닌 하나 이상의 음성 대조 물질(negative control agent)에 노출시키는 단계; 및

[0040] d) 단계 (b)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 상기 세포에서 측정하는 단계를 더 포함하고,

[0041] 단계 (b)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (d)에서 측정된 대조 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 호흡기 감작제(respiratory sensitizer)로 확인된다.

[0042] "단계 (b)에서 측정된 대조 시료 중 하나 이상의 단백질의 존재 및/또는 양과 상이한(different from the presence and/or amount in the control sample of the one or more proteins measured in step (b))"에 의해, 본 발명자들은 테스트 시료 중 존재 및/또는 양이 하나 이상의 음성 대조 시료 중 존재 및/또는 양과 통계적으로 유의성 있는 방식으로 상이하다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 테스트 물질에 노출된 세포 집단에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현은:

[0043] 음성 대조 물질에 노출된 세포 집단의 발현의 80% 이하, 예를 들면, 음성 대조 물질에 노출된 세포 집단의 발현의 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하, 또는 0%이거나; 또는

[0044] 음성 대조 물질에 노출된 세포 집단의 발현의 120% 이상, 예를 들면, 적어도 121%, 122%, 123%, 124%, 125%, 126%, 127%, 128%, 129%, 130%, 131%, 132%, 133%, 134%, 135%, 136%, 137%, 138%, 139%, 140%, 141%, 142%, 143%, 144%, 145%, 146%, 147%, 148%, 149%, 150%, 151%, 152%, 153%, 154%, 155%, 156%, 157%, 158%, 159%, 160%, 161%, 162%, 163%, 164%, 165%, 166%, 167%, 168%, 169%, 170%, 171%, 172%, 173%, 174%, 175%, 176%, 177%, 178%, 179%, 180%, 181%, 182%, 183%, 184%, 185%, 186%, 187%, 188%, 189%, 190%, 191%, 192%, 193%, 194%, 195%, 196%, 197%, 198%, 199%, 200%, 225%, 250%, 275%, 300%, 325%, 350%, 375%, 400%, 425%, 450%, 475% 또는 음성 대조 물질에 노출된 세포 집단의 발현의 500% 이상 이다.

[0045] 상기 하나 이상의 음성 대조 물질은 1-부탄올, 4-아미노벤조산, 클로로벤젠, 디메틸 포름아미드, 에틸 바닐린, 이소프로판올, 메틸 살리실레이트, 프로필렌 글리콜, 과망간산 칼륨, Tween 80™(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올리에이트) 및 황산아연으로 구성된 군(즉, 표 2에 정의된 비-감작제의 군)으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0046] 상기 음성 대조 물질은 본 발명의 테스트 물질 또는 대조 물질과 사용하기 위한 용매일 수 있다. 따라서, 음성 대조군은 DMSO 및/또는 증류수일 수 있다.

[0047] 대안적으로, 또는 추가적으로, 테스트 물질로의 노출 전에 단계 (b)에서 측정된 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 하나 이상의 바이오마커의 발현이 음성 대조군으로 이용된다.

[0048] 추가적인 구체예는:

[0049] e) 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 군을 포유동물에서 호흡기 감작제인 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출시키는 단계; 및

[0050] f) 단계 (b)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커를 상기 세포에서 측정하는 단계를 더 포함하고,

[0051] 단계 (f)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (b)에서 측정된 양성 대조 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하는 경우, 상기 테스트 물질은 호흡기 감작제로 확인된다.

[0052] "하나 이상의 양성 대조 시료 중 발현과 일치한다(corresponds to the expression in the one or more positive control sample)"에 의해, 본 발명자들은 테스트 물질에 노출된 세포 집단에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현이 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출된 세포 집단의 발현과 동일하거나, 또는 그와 유의성 있게 다르지 않다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 테스트 물질에 노출된 세포 집단에서 하나 이상의 바이오마커의 발현은 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출된 세포 집단에서의 발현의 81% 내지 119%, 예를 들면, 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출된 세포 집단에서의 발현의 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%와 동일하거나 그보다 높고, 하나 이상의 양성 대조 물질에 노출된 세포 집단에서의 발현의 101%, 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, 116%, 117%, 118% 또는 119%와 동일하거나 그보다 낮다.

[0053] 따라서, 본 발명의 제1 양태에 따른 방법은 OR5B21 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SLC7A7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0054] 상기 방법은 PIP3-E 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BTNL8 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CLEC4A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HIST4H4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 YKT6 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FLJ32679 /// GOLGA8G /// GOLGA8E 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PACSIN3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PDE1B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NQO1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CAMK1D 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MYB 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000387396 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GRK5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0055] 상기 방법은 CD86 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD1A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 WWOX 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 IKZF2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FUCA1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C10orf76 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AMICA1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PDPK2 /// PDPK1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AZU1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ACN9 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PDPN 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LOC642587 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SEC61A2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ELA2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BMP2K 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HCCS 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CXorf26 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TYSND1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CARS 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NECAP1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CDH26 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SERPINB1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 STEAP4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TXNIP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386628 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C12orf35 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HMGA2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KRT16 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GGTLC2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386437 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 OSBPL11 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법

은 FAM71F1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ATP6V1B2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LOC128102 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TBX19 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NID1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LPXN 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C15orf45 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RNF111 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386861 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD33 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TANK 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ANKRD44 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 WDFY1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SDC4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TMPRSS11B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AFF4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HBEGF 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 XK 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SLAMF7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 S100A4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MPZL3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GENSCAN00000044853 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TRAV8-3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LOC100131497 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KIAA1468 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SPHK2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000309260 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CCR6 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GSTA3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RALA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C7orf53 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AF480566 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CERCAM 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 hsa-mir-147 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NFYC 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD53 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PSEN2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CISD1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SCD 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MED19 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SYT17 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KRT16 /// LOC400578 /// MGC102966 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C18orf51 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD79A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C19orf56 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AGFG1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FOXP1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TLR6 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SUSD3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000387842 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000387842 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GPA33 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CDC123 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C10orf11 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000322493 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PTMAP7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ARRDC4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000388199 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000388437 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KRT9 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000379371 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HDAC4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD200 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PAPSS1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ORAI2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 AK124536 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZBTB10 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000387422 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RAB9A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 7895613 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DRD5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CNR2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 OIT3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386981 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C10orf90 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 OR52D1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZNF214 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386959 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ART4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RCBTB2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HOMER2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 WWP2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 WDR24 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MED31 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CALM2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DLX2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BTBD3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000339367 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TBCA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GIN1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NOL7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000402365 발현을 측정하는 것을 포함할

수 있다. 상기 방법은 C7orf28B /// C7orf28A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DPP7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 hCG_1749005 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PNPLA4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 USP51 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HLA-DQA1 /// HLA-DRA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FAAH 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GDAP2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD48 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PTPRJ 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EXPH5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RPS26 /// LOC728937 /// RPS26L /// hCG_2033311 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ALDH2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CALM1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NOX5 /// SPESP1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RHBDL1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CYLD 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 OSBPL1A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GYPC 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RQCD1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RBM44 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000384680 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C3orf58 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MFSD1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HACL1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SATB1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 USP4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000410125 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000384055 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 L7R 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000364497 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FAM135A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD164 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DYNLT1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NRCAM 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZNF596 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000332418 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TCEAL3 /// TCEAL6 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SNAPIN 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DENND2D 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SAMD8 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LHPP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SLC37A2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FLI1 /// EWSR1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 OR9G4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LOC338799 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HEXDC 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NOTUM 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MCOLN1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PRKACA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CRIM1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CECR5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RNF13 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 40969 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZNF366 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000410754 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GIMAP5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000362484 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TFE3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RHOU 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MED8 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CASQ2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NUDT5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C11orf73 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PAK1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PRSS21 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000332418 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BTBD12 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DHRS13 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CCDC102B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BCL2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZNF211 /// ZNF134 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NDUFV2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MYCN 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000385528 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000264275 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CASP8 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RTN4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PLCG1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MGC42105 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EMB 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000386433 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 COL21A1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LRP12 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LMNA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000385567 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000362863 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZNF503 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NLRX1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000391173 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NDRG2 발현을 측정하는 것을 포

함할 수 있다. 상기 방법은 TRAF7 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KRT40 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 KRT40 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 DRD5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZC3H8 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MMP9 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PLTP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000362686 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SPEF2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LRRC16A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FBXO9 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EEPD1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FCN1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EFNA3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000314893 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TMEM19 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PLXNC1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NHLRC3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MBNL2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EIF5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PLEKHG4 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 COPS3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FAM171A2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LOC653653 /// AP1S2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 VAPA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MATK 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ACTR2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BPI 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ERG 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LAMB2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BC090058 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PHTF2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000333261 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 C8orf55 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 PDE7A 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 NAPRT1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HLA-DRA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SLC22A15 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FCGR1A /// FCGR1B /// FCGR1C 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SLC27A3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ID3 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TBCEL 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FAM138D 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 POMP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SNN 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MED13 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ZFP36L2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 UXS1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CD40 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000362620 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GGT5 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 BC035666 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 G6PD 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000384272 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CLCC1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SCGB2A1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GAA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SERPINB2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 GPI 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 LASS6 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 EIF4A2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 HLA-DRA 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ENST00000385586 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 ANXA2P2 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FANCG 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 FAM53B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 RFXAP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 UBR1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 TBC1D2B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SERPINB10 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 SEC23B 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 MN1 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 CRTAP 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0056] 상기 방법은 단계 (b)에서, 표 1A에 정의된 하나 이상의 바이오마커, 예를 들면, 표 1A에 정의된 바이오마커 중 2개 이상을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 OR5B21의 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명은 SLC7A7의 발현을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 단계 (b)에서 OR5B21 및 LC7A7의 발현을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0057] 상기 방법은 추가적으로 또는 대안적으로, 단계 (b)에서 표 1B에 정의된 하나 이상의 바이오마커, 예를 들면, 표 1B에 정의된 바이오마커 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개의 발현을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0058] 상기 방법은 추가적으로 또는 대안적으로, 단계 (b)에서 표 1C에 정의된 하나 이상의 바이오마커, 예를 들면,

표 1C에 정의된 바이오마커 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286 또는 287개의 발현을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0059] 따라서, 표 1A에 정의된 모든 바이오마커 및/또는 표 1B에 정의된 모든 바이오마커 및/또는 표 1C에 정의된 모든 바이오마커의 발현이 단계 (b)에서 측정될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 단계 (b)에서 표 1에 정의된 모든 바이오마커를 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0060] 바람직한 구체예에서, 단계 (b)는 상기 하나 이상의 바이오마커를 코딩하는 핵산 분자의 발현을 측정하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다. 상기 핵산 분자는 cDNA 분자 또는 mRNA 분자일 수 있다. 바람직하게는, 상기 핵산 분자는 mRNA 분자일 수 있다. 그러나, 상기 핵산 분자는 cDNA 분자일 수 있다.

[0061] 일 구체예에서, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것은 서던 혼성화(Southern hybridisation), 노던 혼성화(Northern hybridisation), 중합효소 연쇄 반응(PCR), 역전사 효소 PCR (RT-PCR), 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR), 나노어레이(nanoarray), 마이크로어레이(microarray), 마크로어레이(macroarray), 자기방사법(autoradiography) 및 인 시투 혼성화(*in situ* hybridisation)로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 이용하여 수행된다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현은 DNA 마이크로어레이를 이용하여 측정된다.

[0062] 상기 방법은 하나 이상의 결합 모이어티를 이용하여 단계 (b)에서 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있고, 각각의 결합 모이어티는 표 1에 표시된 바이오마커 중 하나를 코딩하는 핵산 분자에 선택적으로 결합할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 핵산 분자를 포함하거나 또는 그로 구성된다. 추가적인 구체예에서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 DNA, RNA, PNA, LNA, GNA, TNA 또는 PMO를 포함하거나 또는 그로 구성된다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 결합 모이어티 각각은 DNA를 포함하거나 또는 그로 구성된다. 일 구체예에서, 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 5 내지 100개 뉴클레오티드로 이루어진 길이이다. 그러나, 대안적인 구체예에서, 이들은 15 내지 35개 뉴클레오티드로 이루어진 길이이다.

[0063] 적절한 결합제(binding agent)(결합 분자로도 지칭됨)는 하기에서 검토되는 바와 같이, 주어진 핵산, 단백질, 또는 아미노산 모티프에 결합하는 능력에 근거하여, 라이브러리로부터 선택되거나 또는 스크리닝될 수 있다.

[0064] 바람직한 구체예에서, 상기 결합 모이어티는 검출가능한 모이어티(detectable moiety)를 포함한다.

[0065] "검출가능한 모이어티(detectable moiety)"에 의해, 본 발명자들은 직접적으로 또는 간접적으로, 그의 존재 및/또는 상대적 양 및/또는 위치(예를 들면, 어레이 상의 위치)가 결정될 수 있게 하는 모이어티를 포함한다.

[0066] 적절한 검출가능한 모이어티가 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다.

[0067] 예를 들면, 검출가능한 모이어티는 특정한 조건에 노출되면, 검출될 수 있는 형광 및/또는 발광 및/또는 화학발광 모이어티일 수 있다. 이러한 형광 모이어티는 형광 모이어티의 여기(excitation)를 유발하여, 검출될 수 있는 특정 파장에서 검출될 수 있는 형광을 방출할 수 있게 하기 위해, 특정 파장 및 강도에서 조사(즉, 광)에 노출될 필요가 있을 수 있다.

[0068] 대안적으로, 검출가능한 모이어티는 (바람직하게는 검출될 수 없는) 기질을 시각화되고 및/또는 검출될 수 있는 검출가능한 산물로 전환시킬 수 있는 효소일 수 있다. 적절한 효소의 예는 하기에서 보다 상세하게, 예를 들면,

ELISA 분석과 관련하여 검토된다.

[0069] 따라서, 상기 검출가능한 모이어티는 형광(fluorescent) 모이어티; 발광(luminescent) 모이어티; 화학발광(chemiluminescent) 모이어티; 방사성(radioactive) 모이어티(예를 들면, 방사성 원자); 또는 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 검출가능한 모이어티는 방사성 원자를 포함하거나, 그로 이루어질 수 있다. 상기 방사성 원자는 테크네튬-99m, 요오드-123, 요오드-125, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 인-32, 황-35, 중수소, 삼중수소, 레늄-186, 레늄-188 및 이트륨-90으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0070] 명확하게, 검출될 물질(예를 들면, 본 명세서에 기재된 테스트 시료 및/또는 대조 시료 중 하나 이상의 바이오마커 및/또는 선택된 단백질의 검출에서 사용하기 위한 항체 분자)은 검출가능한 모이어티가 용이하게 검출될 수 있게 하기 위해 충분한 양의 적합한 동위원소를 가져야 한다.

[0071] 대안적인 바람직한 구체예에서, 결합 모이어티의 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티이다.

[0072] 방사성- 또는 기타 표지가 공지된 방식으로 본 발명의 방법의 시료에 존재하는 바이오마커 및/또는 본 발명의 결합 모이어티 내로 결합(incorporate)될 수 있다. 예를 들면, 결합제가 폴리펩티드인 경우, 이는 생합성될 수 있거나 또는 예를 들면, 수소 대신 불소-19를포함하는 적절한 아미노산 전구체를 이용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수 있다. ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{186}Rh, ^{188}Rh 및 ^{111}In과 같은 표지는 예를 들면, 결합 모이어티 중 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 라이신 잔기를 통해 부착될 수 있다. IODOGEN 방법 (Fraker *et al* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **80**, 49-57)이 ^{123}I를 결합시키기 위해 이용될 수 있다. 참조문헌 ("Clonoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989)이 기타 방법을 상세하게 기술한다. 기타 검출가능한 모이어티(예를 들면, 효소, 형광, 발광, 화학발광, 또는 방사성 모이어티)를 단백질에 접합시키는 방법이 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다.

[0073] 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 테스트되는 시료 중 바이오마커가 상기 단백질의 존재, 양 및/또는 위치를 결정하는 것을 간접적으로 보조하는 모이어티로 표지될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 상기 모이어티는 다성분(multicomponent) 검출가능한 모이어티의 한 성분을 구성할 수 있다. 예를 들면, 테스트되는 시료 중 바이오마커는 비오틴으로 표지될 수 있고, 이는 검출가능한 표지와 융합되거나 또는 달리 결합된 스트렙타비딘을 이용하여 그의 후속 검출을 가능하게 한다.

[0074] 본 발명의 제1 양태에서 제공된 방법은 단계 (b)에서, 표 1에 정의된 하나 이상의 바이오마커의 단백질의 발현을 결정하는 것을 포함하거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 상기 방법은 표 1에 표시된 바이오마커 중 하나에 선택적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 모이어티를 이용하여, 단계 (b)에서 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 예를 들면, 단일클론 항체 또는 그의 단편을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0075] 용어 "항체(antibody)"는 합성 항체, 재조합 항체, 또는 항체 하이브리드를 포함하고, 예를 들면, 면역글로불린 경쇄 및/또는 중쇄 가변 및/또는 불변 영역의 파아지-표시(phage-display)에 의해 생산된 단쇄 항체 분자, 예를 들면, 단쇄 항체 분자, 또는 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 공지된 면역분석법 포맷에서 항원에 결합할 수 있는 기타 면역상호작용(immunointeractive) 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 본 발명자들은 또한 항체-유사 결합제, 예를 들면, 어피바디(affibody) 및 앱타머를 포함한다.

[0077] 특이적 결합 부위를 보유하는 항체 단편의 합성에 관여된 기법의 전체적 검토는 Winter & Milstein (1991) *Nature* **349**, 293-299에서 찾을 수 있다.

[0078] 추가적으로, 또는 대안적으로, 제1 결합 분자의 하나 이상은 앱타머일 수 있다 (Collett *et al.*, 2005, *Methods* **37**:4-15 참조).

[0079] 분자 라이브러리(molecular library), 예를 들면, 항체 라이브러리 (Clackson *et al*, 1991, *Nature* **352**, 624-628; Marks *et al*, 1991, *J Mol Biol* **222**(3): 581-97), 펩티드 라이브러리 (Smith, 1985, *Science* **228**(4705): 1315-7), 발현된 cDNA 라이브러리 (Santi et al (2000) *J Mol Biol* 296(2): 497-508), 어피바디와 같은 항체 프레임워크(antibody framework)가 아닌 기타 스캐폴드(scaffold)에 관한 라이브러리 (Gunneriusson *et al*, 1999, *Appl Environ Microbiol* **65**(9): 4134-40) 또는 앱타머에 기반한 라이브러리 (Kenan *et al*, 1999, *Methods Mol Biol* **118**, 217-31)가 주어진 모티프에 특이적인 결합 분자가 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 선

택될 수 있는 공급원으로 이용될 수 있다.

[0080] 분자 라이브러리는 원핵 세포 (Clackson *et al*, 1991, *op. cit.*; Marks *et al*, 1991, *op. cit.*) 또는 진핵 세포 (Kieke *et al*, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(10):5651-6)에서 인 비보로 발현될 수 있거나, 또는 세포의 관여 없이 인 비트로에서 발현될 수 있다(Hanes & Pluckthun, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(10):4937-42; He & Taussig, 1997, *Nucleic Acids Res* **25**(24):5132-4; Nemoto *et al*, 1997, *FEBS Lett*, **414**(2):405-8).

[0081] 단백질 기반 라이브러리가 이용되는 경우, 잠재적 결합 분자의 라이브러리를 코딩하는 유전자들은 종종 바이러스에 패키징되고 잠재적 결합 분자는 바이러스의 표면에 표시된다 (Clackson *et al*, 1991, *supra*; Marks *et al*, 1991, *supra*; Smith, 1985, *supra*).

[0082] 아마도, 가장 일반적으로 사용되는 표시 시스템(display system)은 그들의 표면에 항체 단편을 표시하는 필라멘트형 박테리오파아지(filamentous bacteriophage)이고, 상기 항체 단편은 상기 박테리오파아지의 소수 외피 단백질(minor coat protein)과의 융합체(fusion)로 발현된다 (Clackson *et al*, 1991, *supra*; Marks *et al*, 1991, *supra*). 그러나, 표시를 위한 기타 적합한 시스템은 다른 바이러스 (EP 39578), 박테리아 (Gunneriusson *et al*, 1999, *supra*; Daugherty *et al*, 1998, *Protein Eng* **11**(9):825-32; Daugherty *et al*, 1999, *Protein Eng* **12**(7):613-21), 및 효모 (Shusta *et al*, 1999, *J Mol Biol* **292**(5):949-56)를 사용하는 것을 포함한다.

[0083] 또한, 소위 리보솜 표시 시스템(ribosome display system)에서 폴리펩티드 산물의 그를 코딩하는 mRNA로의 결합(linkage)(Hanes & Pluckthun, 1997, *supra*; He & Taussig, 1997, *supra*; Nemoto *et al*, 1997, *supra*), 또는, 대안적으로 폴리펩티드 산물의 그를 코딩하는 DNA로의 결합 (US Patent No. 5,856,090 및 WO 98/37186 참조)을 이용한, 표시 시스템이 개발되었다.

[0084] 항체의 가변 중쇄 (V_H) 및 가변 경쇄 (V_L) 도메인이 항원 인식에 관련되고, 이는 초기 프로테아제 처리(protease digestion) 실험에 의해 최초로 확인된 사실이다. 추가적인 확인이 설치류 항체의 "인간화(humanisation)"에 의해 이루어졌다. 결과적으로 수득되는 항체가 설치류 모 항체(rodent parented antibody)의 항원 특이성을 유지하도록 설치류 기원의 가변 도메인이 인간 기원의 불변 도메인에 융합될 수 있다(Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6851-6855).

[0085] 항원 특이성은 가변 도메인에 의해 부여되고, 불변 도메인과 독립적이라는 것이 모두 하나 이상의 불변 도메인을 포함하는 항체 단편들의 박테리아 발현을 포함하는 실험으로부터 알려져 있다. 이러한 분자들은 Fab-유사 분자 (Better *et al* (1988) *Science* **240**, 1041); Fv 분자 (Skerra *et al* (1988) *Science* **240**, 1038); V_H 및 V_L 파트너 도메인이 유연한 올리고펩티드를 통해 결합된 것인 단쇄 Fv (ScFv) (Bird *et al* (1988) *Science* **242**, 423; Huston *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5879) 및 단리된 V 도메인을 포함하는 단일 도메인 항체 (dAb) (Ward *et al* (1989) *Nature* **341**, 544)를 포함한다. 항체의 특이적 결합 부위를 보유하는 항체 단편의 합성에 관련된 기법의 일반적 검토를 Winter & Milstein (1991) *Nature* **349**, 293-299에서 찾을 수 있다.

[0086] 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 온전한(intact) 항체, Fv 단편(예를 들면, 단쇄 Fv 및 디술피드-결합 Fv), Fab-유사 단편(예를 들면, Fab 단편, Fab 단편 및 $F(ab)_2$ 단편), 단일 가변 도메인(예를 들면, V_H 및 V_L 도메인) 및 도메인 항체(단일 및 이중 포맷 [즉, dAb-링커-dAb]를 포함한, dAb)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 단쇄 Fv (scFv)이다.

[0087] 상기 하나 이상의 결합 모이어티는 대안적으로, 항체-유사 결합제, 예를 들면, 어피바디 또는 앱타머를 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0088] "ScFv 분자"에 의해, 본 발명자들은 V_H 및 V_L 파트너 도메인이 유연한 올리고펩티드를 통해 연결된 것인 분자를 의미한다.

[0089] 전체 항체가 아닌, 항체 단편을 사용하는 것의 장점은 여러 가지이다. 단편의 더 작은 크기는 개선된 약리학적 특성, 예를 들면, 고형 조직의 보다 우수한 침투를 가져올 수 있다. 보체 결합과 같은, 전체 항체의 작용(effector) 기능이 제거된다. Fab, Fv, ScFv 및 dAb 항체 단편이 모두 대장균에서 발현되고 그로부터 분비될 수 있어서, 다량의 상기 단편의 용이한 생산을 가능하게 한다.

[0090] 전체 항체, 및 $F(ab')_2$ 단편은 이가(bivalent)이다. "이가(bivalent)"에 의해, 본 발명자들은 상기 항체 및 $F(ab')_2$ 단편이 두 개의 항원 결합 부위를 갖는다는 것을 의미한다. 대조적으로, Fab, Fv, ScFv 및 dAb 단편은

1가이어서, 단 하나의 항원 결합 부위를 갖는다.

[0091] 항체는 단일클론 또는 다중클론일 수 있다. 적절한 단일클론 항체는 공지된 기법, 예를 들면, 참조에 의해 본 명세서에 포함된, "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) 및 "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982)에 개시된 기법들에 의해 제조될 수 있다.

[0092] 잠재적 결합 분자가 라이브러리로부터 선택되는 경우, 정의된 모티프를 갖는 선택자 펩티드(selector peptide)가 통상적으로 이용된다. 잠재적 결합 분자가 라이브러리로부터 선택되는 경우, 정의된 모티프를 갖는 하나 이상의 선택기 펩티드(selector peptide)가 통상적으로 이용된다. 펩티드에 구조, 감소되는 유연성(flexibility), 또는 하전된(charged), 극성 또는 소수성 곁사슬을 제공하여 결합 분자와의 상호작용을 가능하게 하는 아미노산 잔기가 선택기 펩티드를 위한 모티프의 설계에서 이용될 수 있다. 예를 들면:

[0093] 프롤린은 그의 곁사슬이 알파 탄소 및 질소 모두에 결합하므로 펩티드 구조를 안정화시킬 수 있고;

[0094] 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판은 방향족 곁사슬을 가지며, 고도로 소수성(highly hydrophobic)이고, 반면에, 루이신 및 이소루이신은 지방족 곁사슬을 갖고, 또한 소수성이며;

[0095] 라이신, 아르기닌 및 히스티딘은 염기성 곁사슬을 갖고, 중성 pH에서 양으로 하전될 것이나, 아스파르테이트 및 글루타메이트는 산성 곁사슬을 갖고, 중성 pH에서 음으로 하전될 것이며;

[0096] 아스파라긴 및 글루타민은 중성 pH에서 중성이나, 수소 결합에 참여할 수 있는 아미드 기를 포함하고;

[0097] 세린, 쓰레오닌 및 티로신 곁사슬은 수소 결합에 참여할 수 있는 히드록시 기를 포함한다.

[0098] 통상적으로, 결합 분자의 선택은 결합 분자의 타입에 해당하는 스팟으로의 결합을 분석하기 위한 어레이 기술 및 시스템의 용도를 포함할 수 있다.

[0099] 상기 하나 이상의 단백질-결합 모이어티는 검출가능한 모이어티를 포함할 수 있다. 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티, 발광 모이어티, 화학발광 모이어티, 방사성 모이어티 및 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0100] 본 발명의 추가적 구체예에서, 단계 (b)는 하나 이상의 단백질에 결합할 수 있는 제2 결합제를 포함하고, 상기 결합제는 또한 검출가능한 모이어티를 포함하는 것인 분석법을 이용하여 수행될 수 있다. 적절한 제2 결합제는 제1 결합제와 관련하여 앞서 상세하게 기술된다.

[0101] 따라서, 테스트되는 시료 중 목적 단백질을 먼저 제1 결합제를 이용하여 단리하고 및/또는 고정화시키고, 그 후, 상기 바이오마커의 존재 및/또는 상대적 양을 제2 결합제를 이용하여 결정할 수 있다.

[0102] 일 구체예에서, 상기 제2 결합체는 항체 또는 그의 항원-결합 단편; 재조합 항체 또는 그의 단편이다. 편리하게, 상기 항체 또는 그의 단편은 scFv; Fab; 면역글로불린 분자의 결합 도메인으로 구성된 군으로부터 선택된다. 적절한 항체 및 단편, 및 이들을 제조하는 방법이 앞서 상세하게 기술된다.

[0103] 대안적으로, 상기 제2 결합제는 항체-유사 결합제, 예를 들면, 어피바디 또는 앱타머일 수 있다.

[0104] 대안적으로, 테스트되는 시료 중 단백질의 검출가능한 모이어티가 특정한 결합 쌍의 일원(예를 들면, 비오틴)을 포함하거나 또는 그로 구성되는 경우, 상기 제2 결합제는 상기 특정 결합 쌍의 상보적 일원(예를 들면, 스트렙타비딘)을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0105] 검출 분석법이 이용되는 경우, 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티; 발광 모이어티; 화학발광 모이어티; 방사성 모이어티; 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 적절한 검출가능한 모이어티의 예는 전술된다.

[0106] 혈청 또는 혈장 단백질을 검출하기 위한 바람직한 분석법은 단일클론 및/또는 다중클론 항체를 이용한 샌드위치 분석법을 포함한, 효소 결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 방사성 면역 측정법 (RIA), 면역 방사 측정법 (immunoradiometric assay)(IRMA) 및 면역효소 분석법(immunoenzymatic assay)(IEMA)을 포함한다.

[0107] 대표적인 샌드위치 분석법이 참조에 의해 본 명세서에 포함된, 미국특허 제4,376,110호 및 제4,486,530호에서 David 등에 의해 기술된다. 슬라이드 상에서 세포의 항체 염색(antibody staining)이 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 세포학 실험실 진단 테스트에서 잘 알려진 방법에서 이용될 수 있다.

[0108] 따라서, 일 구체예에서, 분석법은 일반적으로, 고체상 분석법에서 유색 반응 산물을 생성하는 효소의 사용을 통상적으로 포함하는, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)이다. 호스래디쉬 퍼옥시다아제 및 포스파타아제와 같은 효소가 널리 이용되고 있다. 포스파타아제 반응을 증폭시키는 방법은 제2 효소계(second enzyme system)를 위한 조효소로 작용하는 NAD를 생성하기 위한 기질로서 NADP를 이용하는 것이다. 대장균으로부터의 피로포스파아제(pyrophosphatase)는 조직에 존재하지 않고, 안정하며, 우수한 반응 색상을 생성하므로, 우수한 컨쥬게이트를 제공한다. 루시퍼라아제와 같은 효소에 기반한 화학-발광계(chemi-luminescent system)가 또한 이용될 수 있다.

[0109] 비타민 비오틴과의 컨쥬게이션은, 높은 특이성 및 친화도로 결합하는 효소-결합 아비딘 또는 스트렙타비딘과의 반응에 의해 용이하게 검출될 수 있으므로, 자주 이용된다.

[0110] 대안적인 구체예에서, 단백질 검출을 위해 이용되는 분석법은 편리하게 형광 분석법이다. 따라서, 제2 결합제의 검출가능한 모이어티는 형광 모이어티, 예를 들면, *Alexa* 형광단 (예를 들면, *Alexa*-647)일 수 있다.

[0111] 바람직하게는, 단계 (b)는 어레이를 이용하여 수행된다. 이 어레이는 비드-기반 어레이 또는 표면-기반 어레이일 수 있다. 어레이는 마크로어레이, 마이크로어레이, 나노어레이로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0112] 일 구체예에서, 상기 방법은 호흡기 과민 반응을 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위한 것이다. 바람직하게는, 상기 과민 반응은 체액성 과민 반응, 예를 들면, 타입 I 과민 반응이다. 바람직하게는, 상기 방법은 호흡기 알레르기를 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위한 것이다.

[0113] 일 구체예에서, 상기 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 집단은 수지상 세포의 집단이다. 바람직하게는, 상기 수지상 세포는 일차 수지상 세포(primary dendritic cell)이다. 바람직하게는, 상기 수지상 세포는 골수 수지상 세포이다.

[0114] 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 집단은 바람직하게는 포유동물 기원이다. 바람직하게는, 포유동물은 랫트, 마우스, 기니어 피그, 고양이, 개, 말, 또는 영장류이다. 가장 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0115] 일 구체예에서, 수지상 세포의 집단, 또는 수지상-유사 세포의 집단은 수지상-유사 세포, 바람직하게는 골수 수지상-유사 세포의 집단이다.

[0116] 일 구체예에서, 수지상-유사 세포는 CD54, CD86, CD80, HLA-DR, CD14, CD34 및 CD1a로 구성된 군으로부터 선택된 마커 중 하나 이상, 예를 들면, 상기 마커 중 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개를 발현한다. 추가적 구체예에서, 상기 수지상-유사 세포는 마커 CD54, CD86, CD80, HLA-DR, CD14, CD34 및 CD1a를 발현한다.

[0117] 추가적 구체예에서, 수지상-유사 세포는 골수 수지상 세포로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 상기 수지상-유사 세포는 골수성 백혈구-유래 세포이다. 바람직하게는, 상기 골수성 백혈구-유래 세포는 KG-1, THP-1, U-937, HL-60, Monomac-6, AML-193 및 MUTZ-3으로 구성된 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 수지상-유사 세포는 MUTZ-3 세포이다. MUTZ-3 세포는 Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, Braunschweig, Germany (www.dsmz.de)로부터 기탁번호 ACC 295 하에 1995년 5월 15일부터 입수가능한 인간 급성 골수단핵구 백혈병 세포이다. .

[0118] 일 구체예에서, 사이토카인에 의한 자극 후, 수지상-유사 세포는 CD1d, MHC 클래스 I 및 II를 통해 항원을 제시하고 및/또는 특이적 T-세포 증식을 유도한다.

[0119] 일 구체예에서, 하나 이상의 음성 대조 물질은 1-부탄올, 4-아미노벤조산, 클로로벤젠, 디메틸 포름아미드, 에틸 바닐린, 이소프로판올, 메틸 살리실레이트, 프로필렌 글리콜, 과망간산 칼륨, Tween 80™(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올리에이트) 및 황산아연으로 구성된 군(즉, 표 2에 정의된 비-감작제의 군)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하거나 또는 그로 구성된다. 따라서, 단계 (c)는 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 집단을 표 2에 정의된 음성 대조 물질 각각에 노출시키는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0120] 상기 방법은 2개 이상의 음성 대조 물질(즉, 비-감작성 물질), 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99개 이상 또는 100개 이상의 음성 대조 물질을 포함하거나 또

는 그로 구성될 수 있다.

[0121] 또 다른 구체예에서, 상기 하나 이상의 양성 대조 물질은 암모늄 헥사클로로플라티네이트(ammonium hexachloroplatinate), 암모늄 퍼술페이트(ammonium persulfate), 글루타르알데이드, 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 말레산 무수물(maleic anhydride), 메틸렌 디페놀 디이소시아네이트, 프탈산 무수물, 톨루엔이소시아테이트, 및 트리멜리트산 무수물(trimellitic anhydride)로 구성된 군(즉, 표 2에 정의된 감작제의 군)으로부터 선택된 하나 이상의 물질을 포함하거나, 그로 구성된다. 따라서, 단계 (d)는 수지상 세포 또는 수지상-유사 세포의 별개의 집단을 표 2에 정의된 음성 대조 물질 각각에 노출시키는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0122] 상기 방법은 2개 이상의 양성 대조 물질(즉, 감작제)의 이용, 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99개 이상, 또는 100개 이상의 양성 대조 물질의 이용을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다.

[0123] 따라서, 일 구체예에서, 상기 방법은 테스트 물질이 호흡기 감작제(respiratory sensitizing agent)인지 아닌지 여부를 나타낸다. 대안적인 또는 추가적인 구체예에서, 상기 방법은 테스트되는 시료의 호흡기 감작 효능을 나타낸다.

[0124] 따라서, 일 구체예에서, 상기 방법은 테스트 물질의 감작제 효능(즉, 테스트 물질이 비-감작제, 약한 감작제, 중간강도(moderate) 감작제, 또는 강한 감작제, 또는 극단적인(extreme) 감작제인지)을 나타낸다. PCA에서의 결정 값(decision value) 및 거리는 감작제 효능과 상관된다.

[0125] 대안적으로 또는 추가적으로, 테스트 물질 효능은 단계 (e)에서:

[0126] (i) 하나 이상의 극단적인(extreme) 호흡기 감작제 양성 대조 물질;

[0127] (ii) 하나 이상의 강한 호흡기 감작제 양성 대조 물질;

[0128] (iii) 하나 이상의 중등도(moderate) 호흡기 감작제 양성 대조 물질; 및/또는

[0129] (iv) 하나 이상의 약한 호흡기 감작제 양성 대조 물질을 제공하는 것에 의해 결정될 수 있고,

[0130] 단계 (b)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (f)에서 측정된 극단적인 양성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하고; 및/또는 단계 (f)에서 측정된 강한, 중등도, 약한, 및/또는 음성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 극단적인 호흡기 감작제(extreme respiratory sensitizer)로 확인되고,

[0131] 단계 (b)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (f)에서 측정된 강한 양성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하고; 및/또는 단계 (f)에서 측정된 극단적인, 중등도, 약한, 및/또는 음성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 강한 호흡기 감작제(strong respiratory sensitizer)로 확인되며,

[0132] 단계 (b)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (f)에서 측정된 중등도 양성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하고; 및/또는 단계 (f)에서 측정된 극단적인, 강한, 약한, 및/또는 음성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 중등도 호흡기 감작제(moderate respiratory sensitizer)로 확인되고, 및

[0133] 단계 (b)에서 측정된 테스트 시료 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양이 단계 (f)에서 측정된 약한 양성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 일치하고; 및/또는 단계 (f)에서 측정된 극단적인, 강한, 중등도, 및/또는 음성 대조 시료(존재하는 경우) 중 상기 하나 이상의 바이오마커의 존재 및/또는 양과 상이한 경우, 상기 테스트 물질은 약한 호흡기 감작제(weak respiratory sensitizer)로 확인된다.

[0134] 따라서, 단계 (e)는 호흡기 감작제 양성 대조 물질의 하기 카테고리를 제공하는 것을 포함하거나 또는 그로 구성될 수 있다:

[0135] (a) 극단적, 강한, 중등도 및 약한(extreme, strong, moderate and weak);

[0136] (b) 강한, 중등도 및 약한(strong, moderate and weak);

[0137] (c) 극단적, 중등도 및 약한(extreme, moderate and weak);

[0138] (d) 극단적, 강한 및 중등도(extreme, strong and moderate);

[0139] (e) 극단적 및 강한(extreme and strong);

[0140] (f) 강한 및 중등도(strong and moderate);

[0141] (g) 중등도 및 약한(moderate and weak);

[0142] (h) 강한 및 약한(strong and weak);

[0143] (i) 극단적 및 중등도(extreme and moderate);

[0144] (j) 극단적 및 약한(extreme and weak);

[0145] (k) 극단적(extreme);

[0146] (l) 강한(strong);

[0147] (m) 중등도(moderate);

[0148] (n) 약한(weak).

[0149] 음성 및 양성 대조군(대조 물질)은 인간에서 임상적 관찰(clinical observation)에 근거하여, 호흡기 비-감작제(respiratory non-sensitizer) 또는 호흡기 감작제(respiratory sensitizer)로 분류될 수 있다.

[0150] 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 방법은 단계 (b)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 단계 (c) 및/또는 단계 (e)에서 측정된 상기 하나 이상의 바이오마커의 발현을 나타내는 하나 이상의 미리 정해진 기준 값(reference value)와 비교하는 것을 포함할 수 있다.

[0151] 일반적으로, 호흡기 감작제는 0.55 이상의 ROC AUC, 예를 들면, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99 이상의 ROC AUC, 또는 1.00의 ROC AUC를 갖는 것으로 결정된다. 바람직하게는, 피부 감작제(skin sensitizing agent)는 0.85 이상의 ROC를 갖고, 가장 바람직하게는 1의 ROC AUC를 갖는 것으로 결정된다.

[0152] 통상적으로, 호흡기 감작을 유도할 수 있는 물질은 http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html (e.g. e1071 1.5-24)로부터 입수가능한 것을 포함한, SVM(support vector machine)을 이용하여 확인된다. 그러나, 다른 적합한 수단도 이용될 수 있다. SVM은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 표 1 바이오마커를 포함하거나 또는 그로 이루어진 바이오마커 시그니처(biomarker signature)의 ROC AUC를 결정하기 위해 이용될 수 있다.

[0153] SVM(support vector machine)은 분류(classification) 및 회귀를 위해 이용되는 관련된 감독 학습(supervised learning) 방법의 세트이다. 각각 두 카테고리 중 하나에 속하는 것으로 표시된, 일 세트의 훈련(training) 예가 주어지면, SVM 훈련 알고리즘은 새로운 예가 하나의 카테고리 또는 나머지 카테고리에 속하는지 여부를 예측하는 모델을 구축한다. 직관적으로, SVM 모델은 별개의 카테고리의 예가 가능한 한 넓은 명확한 갭에 의해 분리되도록, 공간에 맵핑된 점(point)인 예의 표현(representation)이다. 그 후, 새로운 예가 동일한 공간 내로 맵핑되고 그들이 갭의 어느 쪽에 속하는지에 근거하여 카테고리에 속할 것으로 예측된다.

[0154] 보다 형식적으로, SVM은 높은 차원 또는 무한 차원 공간(infinite dimensional space)에 초평면(hyperplane) 또는 일련의 초평면을 구축하고, 이는 분류, 회귀, 또는 기타 작업을 위해 이용될 수 있다. 직관적으로, 일반적으로 마진(margin)이 더 클수록, 분류자(classifier)의 일반화 오류가 더 낮기 때문에, 임의의 클래스의 가장 근접한 훈련 데이터포인트까지 가장 큰 거리(소위 기능 마진(functional margin))를 갖는 초평면에 의해 우수한 분리가 달성된다. SVM에 관한 보다 많은 정보는, 예를 들면, Burges, 1998, *Data Mining and Knowledge Discovery*, **2**:121-167를 참조한다.

[0155] 본 발명의 일 구체예에서, SVM은 공지된 물질(즉, 공지된 감작제 또는 비-감작제)의 바이오마커 프로파일을 이용하여 본 발명의 방법을 수행하기 전에 '훈련된(trained)'다. 이러한 훈련 시료를 작동(run)시키는 것에 의해, SVM은 어떠한 바이오마커 프로파일이 감작화를 유도할 수 있는 물질과 연관되는지를 학습할 수 있다. 일단 훈련 과정이 완료되면, SVM은 테스트된 바이오마커 시료가 감작제 또는 비-감작제로부터 유래된 것인지 여부를 결정할 수 있다.

[0156] 이는 테스트 물질이 감작제 또는 비-감작제로 분류될 수 있게 한다. 또한, SVM을 공지된 효능의 감작제(즉, 비-감작제, 약한 감작제, 중등도 감작제, 강한 감작제, 또는 극단적 감작제)로 훈련시키는 것에 의해, 테스트 물질의 효능도 비교에 의해 확인될 수 있다.

[0157] 그러나, 이러한 훈련 절차는 SVM을 필요한 훈련 파라미터로 미리-프로그래밍하는 것에 의해 생략될 수 있다. 예를 들면, 감작화를 유도할 수 있는 물질은 표 1에 열거된 모든 바이오마커의 측정에 근거하여, 표 3에 상술된 SVM 알고리즘을 이용하여 공지된 SVM 파라미터에 따라 확인될 수 있다.

[0158] 당해 기술 분야의 통상의 기술자는 SVM 기계를 데이터의 적절한 선택(즉, 공지된 감작제 및/또는 비-감작제에 노출된 세포로부터의 바이오마커 측정값)으로 훈련시키는 것에 의해 표 1에 열거된 바이오마커의 조합에 대해 적절한 SVM 파라미터가 결정될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 당해 기술 분야에 공지된 적절한 통계 방법에 따라, 호흡기 감작화를 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위해 표 1 바이오마커를 이용할 수 있다.

[0159] 대안적으로, 표 1 데이터는 당해 기술 분야에서 공지된 다른 적절한 통계적 방법(예를 들면, ANOVA, ANCOVA, MANOVA, MANCOVA, 다변량 회귀 분석(Multivariate regression analysis), 주성분 분석(Principal components analysis) (PCA), .인자 분석(Factor analysis), 정준 상관 분석(Canonical correlation analysis), RA(Redundancy analysis), CA(Correspondence analysis; 상호 평균법(reciprocal averaging)), 다차원 척도법(Multidimensional scaling), 판별 분석(Discriminant analysis), LDA(Linear discriminant analysis), .클러스터 시스템(Clustering system), 재귀 분할(Recursive partitioning) 및 인공 신경망(Artificial neural networks))에 따라, 호흡기 감작화를 유도할 수 있는 물질을 확인하기 위해 이용될 수 있다.

[0160] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 65% 이상의 정확도(accuracy), 예를 들면, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 정확도를 갖는다.

[0161] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 65% 이상의 민감도, 예를 들면, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 민감도를 갖는다.

[0162] 바람직하게는, 본 발명의 방법은 65% 이상의 특이도(specificity), 예를 들면, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 특이도를 갖는다.

[0163] "정확도(accuracy)"에 의해, 본 발명자들은 방법의 올바른 결과의 비율을 의미하고, "민감도(specificity)"에 의해, 본 발명자들은 올바르게 양성으로 분류된 모든 양성 화학물질의 비율을 의미하며, "특이도(specificity)"에 의해, 본 발명자들은 올바르게 음성으로 분류된 모든 음성 화학물질의 비율을 의미한다.

[0164] 일 구체예에서, 본 발명의 제1 양태의 방법은 참조에 의해 본 명세서에 포함된 PCT 공개 WO 2012/056236에 기재된 포유동물 피부의 감작화를 유도할 수 있는 물질을 확인하는 방법을 동시에 또는 순차적으로 수행하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 포유동물 피부의 감작화를 유도할 수 있는 물질을 확인하는 방법은 본 발명의 제1 양태의 방법(즉, 테스트 물질에 노출된 동일한 세포 시료에서 관련된 마커 발현을 측정하는 것에 의해 테스트 화합물이 피부 및/또는 호흡기 감작제인지 여부를 결정하는 것)과 동시에 수행된다.

[0165] 본 발명의 제2 양태는 본 발명의 제1 양태의 방법(또는 그의 구체예 또는 그의 구체예의 조합)에서 사용하기 위한 어레이로서, 상기 어레이는 앞서 정의된 하나 이상의 결합 모이어티를 포함하는 것인 어레이를 제공한다. 일 구체예에서, 상기 결합 모이어티는 (집합적으로) 표 1A에 정의된 바이오마커 모두에 결합할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 결합 모이어티는 (집합적으로) 표 3B에 정의된 바이오마커 모두에 결합할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 결합 모이어티는 표 3B에 정의된 바이오마커 모두에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 상기 결합 모이어티는 표 1에 정의된 모든 바이오마커에 (집합적으로) 결합할 수 있다.

[0166] 결합 모이어티는 고정화될 수 있다.

[0167] 어레이 자체는 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 통상적으로, 이들은 고체 지지체의 표면에 형성된, 떨어져 배치된(즉, 별개의(discrete)) 영역("스팟(spot)")의 선형 또는 2차원 구조로 이루어지고, 각 영역은 한정된 면적(finite area)을 갖는다. 어레이는 또한 각 비드가 분자 코드 또는 색상 코드에 의해 식별되거나, 또는 연속 흐름에서 식별될 수 있는 것인 비드(bead) 구조일 수 있다. 시료가 각각 용액으로부터 그 클래스(class)의 분자를 흡착하는 일련의 스팟을 통과하는 것인 분석이 또한 순차적으로 수행될 수 있다. 고체 지지체는 통상적으로 유리 또는 폴리머이고, 가장 흔히 사용되는 폴리머는 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌이다. 고체 지지체는 튜브, 비드, 디스크, 실리콘 칩, 마이크로플레이트, 폴리비닐리덴 디플로오라이드(PVDF) 막, 니트로셀룰로오스 막, 나일론 막, 기타 다공성(porous) 막, 비-다공성 막(예를 들면, 특히, 플라스틱, 폴리머, 퍼스펙스(perspex), 실리콘), 복수의 폴리머 핀, 또는 복수의 마이크로타이터 웰(microtitre well), 또는 단백질, 폴리뉴클레오티드의 고정화 및 면역분석법의 수행에 적합한 기타 표면의 형태일 수 있다. 결합 과정은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있고, 일반적으로 단백질 분자, 폴리뉴클레오티드 등을 고체 지지체에 가교 공유결합 시키거나 또는 물리적으로 흡착시키는 것으로 이루어진다. 대안적으로, 친화도-택(affinity-tag) 또는 유사한 구조물을 통한 프로브의 친화도 커플링이 이용될 수 있다. 잘 알려진 기법, 예를 들면, 접촉 또는 비-접촉 프린팅, 마스킹(masking), 또는 포토리소그래피(photolithography)를 이용하는 것에 의해, 각 스팟의 위치가 정의될 수 있다. 검토를 위해, Jenkins, R.E., Pennington, S.R. (2001, *Proteomics*, **2**,13-29) 및 Lal *et al* (2002, *Drug Discov Today* **15**;7(18 Suppl):S143-9)을 참조한다.

[0168] 통상적으로, 상기 어레이는 마이크로어레이이다. "마이크로어레이(microarray)"에 의해, 본 발명자들은 약 $100/cm^2$ 이상 및 바람직하게는, 약 $1000/cm^2$ 이상의 개별 영역의 밀도를 갖는 영역의 어레이의 의미를 포함한다. 마이크로어레이의 영역은 통상적인 크기, 예를 들면, 약 10-250 ㎛ 범위의 직경을 갖고, 어레이 중 다른 영역으로부터 거의 같은 거리만큼 분리되어 있다. 상기 어레이는 대안적으로, 마이크로어레이 또는 나노어레이일 수 있다.

[0169] 적절한 결합 분자(앞서 검토됨)가 확인되고 단리되면, 통상의 기술자는 분자 생물학 분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여 어레이를 제조할 수 있다; 하기 실시예 참조.

[0170] 본 발명의 제3 양태는 과민 반응 감작제(hypersensitivity response sensitising agent)를 확인하기 위한, 조합된, 표 1A, 표 1B, 및/또는 표 1C에 정의된 군으로부터 선택된 하나 이상(바람직하게는 두개 이상)의 바이오마커의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 표 1A 및 표 1B에 정의된 바이오마커 모두가 과민 반응 감작제를 확인하기 위해 집합적으로 사용된다. 바람직하게는, 상기 용도는 본 발명의 제1 양태에 기술된 방법, 및 본 명세서에 기술된 구체예와 일치한다.

[0171] 본 발명의 제4 양태는 본 발명의 제1 양태에 따른 방법에서 사용하기 위한 분석 키트(analytical kit)로서,

[0172] A) 본 발명의 제2 양태에 따른 어레이; 및

[0173] B) 본 발명의 제1 양태에 따른 방법을 수행하기 위한 설명서(선택적)를 포함하거나 또는 그로 구성되는 것인 분석 키트를 제공한다.

[0174] 상기 분석 키트는 하나 이상의 대조 물질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 분석 키트는 하나 이상의 음성 대조 물질 및/또는 하나 이상의 양성 대조 물질과 함께, 전술된 특징을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.

[0175] 본 발명의 제5 양태는 환자에서 호흡기 타입 I 과민 반응(예를 들면, 호흡기 천식)을 치료 또는 예방하는 방법으로서,

[0176] (a) 상기 환자가 노출되거나 노출되었던 하나 이상의 테스트 물질을 제공하는 단계;

[0177] (b) 본 발명의 제1 양태에서 제공된 방법을 이용하여, 단계 (a)에서 제공된 하나 이상의 테스트 물질이 호흡기 감작제인지 여부를 결정하는 단계; 및

[0178] (c) 하나 이상의 테스트 물질이 호흡기 감작제로 확인되는 경우, 호흡기 감작제로 확인된 하나 이상의 테스트 물질에 대한 상기 환자의 노출을 감소시키거나 또는 방지하는 단계를 포함하거나 그로 구성되는 것인 방법을 제공한다.

[0179] 바람직하게는, 환자가 노출되거나 또는 노출되었던 하나 이상의 테스트 물질은 환자가 현재 1개월당 1회 이상, 예를 들면, 2주당 1회 이상, 1주당 1회 이상, 또는 1일 1회 이상 노출되는 물질이다.

도면의 간단한 설명

[0180] 본 발명의 특정 양태를 구현하는, 바람직한, 비-한정적 실시예가 이제 하기 도면을 참조하여 설명될 것이다:

도 1: 호흡기 감작화에 대한 잠재적 바이오마커의 후진 제거법(backward elimination). p-값 분류(sorting)에 의해 선택된, 1029개의 유전자를 인풋(input)으로 이용했다. 727개의 유전자의 제거 후, KLD에서 국소 최소점(local minumum)을 관찰했다. 따라서, 나머지 302개의 유전자가 전체로(collectively) 호흡기 감작제(respiratory sensitizer)를 비-감작제로부터 분리하기 위해 적절한 대부분의 정보를 갖는다. 이 바이오마커 시그니처(biomarker signature)를 GARD Respiratory Prediction Signature로 부른다.

도 2: p-값 필터링 및 후진 제거법에 의해 선택된 302개의 전사물(transcript)에 근거한 주성분 분석(principal component analysis). 호흡기 감작제로 자극된 시료(청색)와 비-감작제로 자극된 시료(녹색) 간의 완전한 분리가 관찰된다.

도 3: 교차 검증(cross-validation)을 이용한, GARD Respiratory Prediction Signature의 예측력(predictive power)의 평가. 20개의 Validation Biomarker Signature를 무작위로 선택된 데이터의 70%(트레인 세트)를 이용하여 작성했다. 그 후, Validation Biomarker Signature를 데이터의 나머지 30%(테스트 세트)에서 시료를 분류하기 위해 이용했다. A) 테스트 세트에서 시료의 SVM 예측 후 ROC AUC 분포. B) 주성분 분석으로 예시된 예측 성능의 대표적 표시.

도 4: 화학물질 자극 후 MUTZ-3 세포의 CD86 발현. 표시된 데이터는 표준 편차를 나타내는 오차 막대(error bar)와 함께, (화학물질 자극, n=3, DMSO, 및 미자극 세포(n=6)의 평균이다. 통계적 유의성은 각 자극을 그의 대응되는 비히클과 비교하는, 스튜던트-t 검정에 의해 결정되었고, $p < 0.05$는 *로 표시된다.

도 5: 예측적 바이오마커 시그니처의 구축. A) p-값 필터링에 의해 선택된 1029개 전사물에 기반한 주성분 분석. B) 후진 제거법에 의해 선택된 302개 전사물에 기반한 주성분 분석. 시료는 호흡기 감작제(청색, n=27), 또는 비-감작제(녹색, n=47)로 채색된다. 모든 재현물(replicate)을 포함한, 74개의 시료로 구성된 모든 데이터가 표시된다. C) 호흡기 감작제는 기계적 서브도메인(mechanistic subdomain)에 따라 채색된다.

도 6: 도 3. 외래 테스트 세트 및 교차 검증을 이용한 GRPS의 예측력의 평가. A) 비-감작제의 3개의 재현물(triplicate)로 구성된 외래 데이터 세트를 GRPS에 의해 구축된 PCA 공간 내로 맵핑하였다. 트레인 세트만 주성분에 영향을 미칠 수 있게 하였다. 시료의 모든 재현물을 표시한다(트레인 데이터 n=74, 테스트 데이터 n=48). B) 무작위로 선택된 데이터의 70%(트레인 세트)를 이용하여 Validation Biomarker Signature를 구축했다. 트레인 세트를 변수 입력으로 Validation Biomarker Signature를 이용하여, PCA 공간을 수립하기 위해 이용했다. 데이터의 나머지 30%(테스트 세트)를 주성분에 영향을 미치지 않게 하면서, 이 공간 내로 맵핑하였다. C) 데이터의 트레인 세트와 테스트 세트로의 무작위 분배를 20회 반복했다. ROC AUC 분포를 박스 플롯(box plot)으로 보고하고, 불규칙한 데이터 포인트(jittered data point)를 오버레이했다. ROC AUC 중앙값(median)은 0.84였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0181] **개요**

[0182] 저분자량 화합물에 대한 호흡기 감작화가 직업성 천식의 일반적인 원인이고, 직업성 천식은 치명적인 결과와 연관되었다. 호흡기 화학적 감작제의 발생을 방지하고, 작업 환경에서 위험을 최소화하기 위해, 화합물이 호흡기 감작화를 유도하는 능력을 예측할 분석법을 개발하기 위한 노력이 이루어지고 있다. 그러나, 현재까지, 화학물질의 호흡기 감작제로의 정확한 분류를 신뢰성 있게 달성하는, 검증된(validated) 인 비트로 또는 인 비보 방법이 존재하지 않는다. 최근에, 본 발명자들은 GARD로 불리는, 피부 감작제의 평가를 위한 신규한 인 비트로 방법을 제시했다(Johansson *et al.*, 2011, *BMC Genomics*, 12:339). 본 발명자들은 GARD의 응용성을 수지상 세포의 성숙을 초래하는 면역학적 사건과 연관된 302개 유전자를 포함하는 새로운 게놈 바이오마커 시그니처를 이용하여, 호흡기 감작제를 분류할 수 있도록 확대했다. 따라서, 본 발명자들은 분석된 화합물에서 피부 및 호흡기 감작화 능력을 예측하는 통합된 능력을 갖는 분석법을 제시한다.

[0183] **재료 및 방법**

[0184] 화학물질

[0185] 9개의 호흡기 감작제 및 11개의 비-감작제로 이루어진, 20개의 화학 화합물의 패널을 세포 자극을 위해 이용하였다. 감작제는 글루타르알데히드, 암모늄 퍼술페이트, 프탈산 무수물, 메틸렌 디페놀 디이소시아네이트, 암모늄 헥사클로로플라티네이트, 트리멜리트산 무수물, 헥사메틸렌 디이소시아네이트, 말레산 무수물, 및 톨루엔디이소시아네이트였다. 비-감작제는 클로로벤젠, 황산아연, 4-아미노벤조산, 메틸 살리실레이트, 에틸 바닐린, 이소프로판올, 디메틸 포름아미드, 1-부탄올, 과망간산 칼륨, 프로필렌 글리콜 및 트윈 80이었다(표 2). 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA로부터 얻었다. 화합물을 디메틸술폭시드(DMSO) 또는 증류수에 용해시켰다. 자극 전에, 모든 화합물의 세포독성을 제조사에 의해 제공된 프로토콜을 이용하여, 프로피디움 요오드화물 (PI)(BD Biosciences, San Diego, CA)를 이용하여 모니터링하였다. 자극된 세포의 상대적 생존력(relative viability)을 하기와 같이 계산하였다:

[0186] $$\text{상대적 생존력} = \frac{\text{생존한 자극세포의 분획}}{\text{생존한 자극되지 않은 세포의 분획}} \cdot 100$$

[0187] 독성 화합물의 경우, 90% 상대적 생존력을 가져오는 농도(Rv90)를 이용하였다. 무독성 화합물의 경우, 500 μM의 농도를 이용하였다. 매질 중 500 μM에서 불용성인 무독성 화합물의 경우, 최고 가용 농도(highest soluble concentration)를이용하였다. DMSO에 용해된 화합물의 경우, 각 웰에서 DMSO의 최종 농도는 0.1%였다. 주어진 화합물에 대해 사용된 농도를 'GARD 인풋 농도(GARD input concentration)'로 지칭하고, 표 2에 열거한다.

[0188] 세포의 화학적 노출

[0189] 기재된 바와 같이, 인간 골수성 백혈병-유래 세포주 MUTZ-3 (DSMZ, Braunschweig, Germany)를 20% (volume/volume) 우태혈청 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 40 ng/ml rhGM-CSF (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Seattle, WA)이 보충된 α-MEM (Thermo Scientific Hyclone, Logan, UT)에서 유지시켰다 (Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA: A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomaics* 2011, 12:399; Rasaiyaah J, Yong K, Katz DR, Kellam P, Chain BM: Dendritic cells and myeloid leukaemias: plasticity and commitment in cell differentiation. *Br J Haematol* 2007, 138(3):281-290). 배양물을 확장 동안 200.000 세포/ml로 유지시켰고, 3 내지 4일마다 배지를 교체했다. 분화 단계를 수행하지 않고, 대신에, 자극을 위해 증식하는 전구 세포 MUTZ-3을 이용했다. 각 실험 전에, 품질 대조군으로서, 유동 세포측정법(flow cytometry)을 이용하여 세포를 면역표현형 분석하였다. 세포를 200.000 세포/ml로 6-웰 플레이트에 접종하였다. 각 화합물의 스톡 용액을 DMSO 또는 증류수 중에 준비하고, 뒤이어 희석하여, 웰-내(in-well) 농도가 GARD 인풋 농도와 일치했고, DMSO의 웰-내 농도는 0.1%였다. 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다.

그 후, 세포를 회수하고 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 이와 병행하여, 회수된 세포를 TRIzol 시약 (Invitrogen)에서 용해시키고 RNA 추출까지 -20℃에서 보관하였다. 화학물질에 의한 자극을 3개의 독립적인 실험에서 수행하여, 3개의 재현물(replicate) 시료를 수득하였다.

[0190] 유동 세포 측정법에 의한 표현형 분석

[0191] 모든 세포 표면 염색 및 세척 단계를 1% BSA (w/v)를 포함하는 PBS에서 수행하였다. 세포를 4℃에서 15분 동안 특정한 마우스 mAb와 인큐베이션시켰다. 유동 세포 측정법을 위해 하기 mAb를 사용하였다: FITC-접합 CD1a (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), CD34, CD86, 및 HLA-DR (BD Biosciences), PE-접합 CD14 (DakoCytomation), CD54 및 CD80 (BD Biosciences). FITC 또는 PE에 접합된, 마우스 IgG1을 이소형(isotype) 대조군(BD Biosciences)으로 이용하고, 세포 생존력을 **평가하기 위해,** PI를 이용하였다. FACSCanto II 장치 (BD Bioscience)에 의한 데이터 획득을 위해 FACSDiva 소프트웨어를 이용하였다. 10,000개의 사건을 획득하고, 파편 및 생존 불가능한(nonviable) 세포를 제거하기 위해 광 산란 특성에 근거하여 게이트를 설정하였다. FCS

Express V3 (De Novo Software, Los Angeles, CA)을 이용하여 추가적인 데이터 분석을 수행하였다.

[0192] *표현형 분석, 화학적 노출, 세포 회수(cell harvest) 및 RNA 분리*

[0193] MUTZ-3의 유지 및 화학적 자극 및 뒤이은 RNA의 분리 및 cDNA의 제조를 이전에 기술된 바와 같이 수행하였다 (Johansson H, Albrekt AS, Borrebaeck CAK, Lindstedt M (2012) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. Toxicol in Vitro). 요약하면, 화학적 자극 전에, MUTZ-3의 표현형 조절(phenotypic control)을 수행하였다. 자극된 세포를 회수하고, RNA를 분리하였다. 세포의 성숙 상태의 조절을 CD86의 유동 세포측정 분석에 의해 수행하였다. cDNA의 제조 및 Human Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)의 혼성화, 세척, 및 스캐닝을 제조사(Affymetrix)에 의해 제공된 표준화된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0194] *마이크로어레이 데이터 분석 및 통계적 방법*

[0195] 예측적 시그니처를 수립한 방법이 이전에 개시되었다 (Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. BMC Genomics 12: 399). 요약하면, 마이크로어레이 데이터를 정규화하고, Affymetrix Expression Console (Affymetrix)을 이용하여 RMA 알고리즘으로 품질을 확인하였다. 호흡기 감작제와 비-감작제를 비교하는 ANOVA로부터의 p-값에 의해 상위 1029개의 예측자(predictor)를 선택하였다. 후진 제거(Backward Elimination)를 위한 알고리즘 (Johansson *et al.*, 2011, *supra.*; Carlsson A, Wingren C, Kristensson M, Rose C, Ferno M, et al. (2011) Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 14252-14257)을 상위 1029개의 예측자에 적용하여, 바이오마커 시그니처 크기를 더 감소시켰다. ROC AUC(Area Under the Receiver Operating Characteristic)가 1.0에 도달하는 경우, 지속된 시그니처 최적화를 가능하게 하기 위해, ROC AUC를 최대화하기(Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, Ohno-Machado L (2005) The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. J Biomed Inform 38: 404-415) 보다, Kullback-Leibler 오류(Kullback S, Leibler RA (1951) On Information and Sufficiency. Annals of Mathematical Statistics 22: 79-86)를 최소화하기 위해 Backward Elimination 알고리즘을 변형하였다. 선택된 상위 302개의 예측자를 포괄적으로 "GARD Respiratory Prediction Signature"(GRPS)로 지정하였다. Backwards Eliminations을 위한 스크립트를 추가적인 패키지 e1071 (Weingart SN, Iezzoni LI, Davis RB, Palmer RH, Cahalane M, et al. (2000) Use of administrative data to find substandard care: validation of the complications screening program. Med Care 38: 796-806)과 함께, R (R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria)에 프로그래밍하였다. ANOVA 분석 및 Principal Component Analysis (PCA)에 의한 결과의 시각화 (Ringner M (2008) What is principal component analysis? Nat Biotechnol 26: 303-304)를 Qlucore Omics Explorer 2.3 (Qlucore AB, Lund, Sweden)를 이용하여 수행하였다. GRPS의 예측 성능을 기술된 바와 같이 (Johansson *et al.*, 2011, *supra.*), 음성 화학적 자극으로 이루어진 외부 데이터세트 및 SVM(Support Vector Machine)(Noble WS (2006) What is a support vector machine? Nat Biotechnol 24: 1565-1567)에 기반한 교차-검증을 위한 방법을 이용하여 평가하였다. GRPS의 생물학적 관련성을 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Inc. Mountain View, USA)을 이용하여, '코어 분석(Core Analysis)'를 수행하는 것에 의해 연구하였다. 상위 1029개의 유전자를 배수 변화 값(fold change value)와 함께 IPA 인풋으로 이용하였다. 인풋 분자와 연관된 규범적 경로(Canonical Pathway)를 탐구하여, 생물학적 관련성(biological relevance)을 확립하였다. 어레이 데이터를 식별번호(accession number) E-MEXP-3773로 ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/)에 업로드하였다.

[0196] 예측 시그니처(Prediction Signature)의 확인 방법의 의문(interrogation)

[0197] 데이터 세트를 각각 화합물 70% 및 30%로 구성된 훈련(training set)와 테스트 세트로 분리했다. 분리는 각 서브세트에서 감작제와 비-감작제의 비율을 완전한 데이터 세트에서와 동일한 비율로 유지하면서, 무작위로 수행했다. 전술된 바와 같이, ANOVA 필터링 및 후진 제거를 이용하여, 훈련 세트에서 테스트 바이오마커 시그니처를 확인하였다. 이 테스트 시그니처를 훈련 세트를 이용하여, SVM(Support Vector Machine)(Noble WS: What is a

support vector machine? *Nat Biotechnol* 2006, 24(12):1565-1567)을 훈련하기 위해 이용하고, 그 후, 이를 테스트 세트의 시료를 예측하기 위해 적용했다. 이 과정을 20회 반복하고, ROC AUC(the area under the Receiver Operating Characteristic) (Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, Ohno-Machado L: The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *J Biomed Inform* 2005, 38(5):404-415)를 모델의 성능 측정값으로 이용하였다.

[0198] **결과**

[0199] 화학적으로 자극된 MUTZ-3 세포의 전사 프로파일의 분석

[0200] 기준 화합물의 패널에 의한 24시간 자극 후, 전사 프로파일(transcriptional profiling)을 위해 MUTZ-3으로부터의 mRNA를 수집하였다. 자극은 9개의 상이한 호흡기 감작제 및 11개의 상이한 비-감작제를 포함했고, 4-아미노벤조산 및 과망간산 칼륨을 제외하고는 모두 3개의 생물학적 재현물(biological triplicate)로 시료를 채취하고, 4-아미노벤조산은 내부 대조군 때문에 6개의 재현물로 시료를 채취하고, 과망간산 칼륨은 불완전한 어레이 때문에, 단지 2개의 재현물로 시료를 채취했다. 또한, DMSO 및 증류수를 비히클 대조군으로서, 각각 6개의 재현물로 시료를 채취하였다. 요약하면, 분석을 위해 준비된 데이터세트는 74개의 어레이로 구성되고, 각각 29141개의 전사물의 측정값을 포함했다.

[0201] 분석의 제1 단계는 두 그룹을 비교하는 ANOVA에 의해 결정된 바와 같이, 호흡기 감작제를 비-감작제로부터 분리하는 능력에 따른 유전자의 p-값 필터링을 포함했다. 이전 경험에 근거하여, 약 1000개의 유전자가 후진 제거를 위한 알고리즘에서 인풋으로 이용하기 위한 잠재적 예측자의 적절한 양이다(Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA: A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. *BMC Genomics* 2011, 12:399.). 0.0067(FDR 19%)의 p-값 컷오프(cutoff)를 이용하여, 1029개의 유전자를 확인하였다. 후진 제거 알고리즘을 적용하여, 반복적 방식으로 가장 적은 정보를 기여하는 예측자를 제거했다. 727개의 예측자가 제거되었을 때, Kullbach-Liebler Divergence (KLD)의 국소 최소값이 관찰되었다(도 1). 나머지 302개의 유전자를 집합적으로 , "GARD Respiratory Prediction Signature"로 지칭하고, 그들이 호흡기 화학적 감작제와 비-감작제를 구별하는 능력이 도 2에 도시된다.

[0202] Prediction Signature를 확인하기 위해 이용된 분석의 의문

[0203] 본 발명자들의 시그니처의 예측력(predictive power)을 검증하기 위해, 본 발명자들은 감작 및 비-감작 화학물질에 의해 유도된 유전자 발현의 분리를 최대화하기 위해 공간에 훈련 세트로부터의 데이터를 맵핑하는, SVM(Support Vector Machind)(Noble, 2006, *supra.*)이라 불리는 기계 학습 방법을 이용했다. 훈련 세트로서, 데이터 세트의 70%를 무작위로 선택하고, 바이오마커 선택의 전체 과정을 반복했다. 29,141개의 전사물로 출발하여, 전술된 바와 같이, ANOVA 필터링 및 후진 제거를 이용하여, 시그니처를 GARD Respiratory Prediction Signature와 동일한 크기의 유전자 목록으로, 즉, "Validation Biomarker Signature"로 지칭되는 302개의 전사물로 감소시켰다. Validation Biomarker Signature를 이용하여, SVM을 트레인 데이터에서 훈련시켰다. 그 후, 훈련된 SVM을 데이터의 나머지 30%, 즉, 테스트 세트에서 각 시료를 호흡기 감작제 또는 비-감작제로 분류하기 위해 이용했다. 분류의 성능은 ROC AUC (the area under the Receiver Operating Characteristic)로 평가했다. 이러한 전체 교차-검증을 20회 반복했고, 매 회 상이한 트레인 및 테스트 세트를 생성하고, 각 트레인 세트는 상이한 Validation Biomarker Signature를 초래했다. 이러한 교차-검증의 결과가 도 3에 예시된다. ROC AUC 중앙값은 0.84이고 범위는 0.66 내지 0.96인 것으로 확인되었다. 예측 성능의 큰 변화는 데이터의 30%의 무작위 제외가 Validation Biomarker Signature의 조성에 크게 영향을 미친다는 것을 암시한다. 그러나,0.96까지의 ROC AUC를 달성하는 능력은 이 모델이 모든 입수가능한 데이터에 대해 훈련되는 경우, 정확한 분류가 실제로 가능하다는 강한 증거이다. 이러한 교차-검증은 GARD Respiratory Prediction 바이오마커가 미지의 시료의 호흡기 감작 특성을 정확하게 예측할 수 있다는 것을 보여준다.

[0204] 자극되지 않은 세포 및 자극된 세포의 MUTZ-3 표현형

[0205] 화학적 자극(chemical challenge) 전에, 유동 세포측정법을 이용하여, 공통된 골수 및 수지상 세포 마커의 세포

발현을 측정하여 품질 관리하였다. 이러한 마커들은 CD1a, CD14, CD34, CD54, CD80, CD86 및 HLA-DR을 포함했다. 이전에 발표된 데이터로부터 편차가 없어서(Johansson *et al.*, 2011, *supra.*), 자극되지 않은 세포가 성공적으로 미성숙 상태로 유지되었다는 것을 보장했다. 화학적 자극 후에, 공동-자극 마커 CD86의 발현에 의해 결정된 바와 같이, 세포의 전반적 성숙 상태가 다시 제어되었고, 결과가 도 4에 표시된다. 다수의 화학적 자극 후에, CD86의 상향조절이 명확했으나, 큰 표준 편차 때문에, 글루타르알데이드와 헥사메틸렌 디이소시아네이트만이 CD86의 통계적으로 유의성 있는 상향 조절을 초래했다. 또한, 통계적으로 유의하지는 않으나, CD86의 상향조절은 다수의 대조 자극(control stimulation) 후에도 명확했다. 따라서, 본 발명자들은 CD86이 호흡기 화학적 감증제를 위한 적합하지 않은 바이오마커인 것으로 결론지었다. 그러나, 본 연구에서 자극을 위해 이용된 화합물 중 다수는 세포 배지에서 난용성(poorly soluble)이었고, 세포독성을 유도하기에 충분한 농도로 이용될 수 없었다. 이 목적을 위해, CD86 발현의 증가가 화학적 자극의 생체이용률을 보장하기 위한 보완적 툴(complementary tool)로 작용할 수 있다.

[0206] 화학적으로 자극된 MUTZ-3 세포의 전사 프로파일의 분석

[0207] 기준 화합물의 패널에 의한 24시간 자극 후에, 전사 프로파일링을 위해 MUTZ-3으로부터의 mRNA를 수집하였다. 자극은 9개의 상이한 호흡기 감작제 및 11개의 상이한 비-감작제를 포함했고, 4-아미노벤조산 및 과망간산 칼륨을 제외하고는 모두 3개의 생물학적 재현물로 시료를 채취하고, 4-아미노벤조산은 내부 대조군 때문에 6개의 재현물로 시료를 채취하고, 과망간산 칼륨은 불완전한 어레이 때문에, 단지 2개의 재현물로 시료를 채취했다. 또한, DMSO 및 증류수를 비히클 대조군으로서, 각각 6개의 재현물로 시료를 채취하였다. 요약하면, 분석을 위해 준비된 데이터세트는 74개의 어레이로 구성되고, 각각 29,141개의 전사물의 측정값을 포함했다.

[0208] 분석의 제1 단계는 두 그룹을 비교하는 ANOVA에 의해 결정된 바와 같이, 호흡기 감작제를 비-감작제로부터 분리하는 능력에 따른 유전자의 p-값 필터링을 포함했다. 전산적 한계(computational limit) 때문에, 약 1000개의 유전자가 Backward Elimination을 위한 알고리즘에서 인풋으로 사용하기 위한 잠재적 예측자의 적합한 양이다. 현재의 데이터 세트에서, 이러한 예측자 후보의 사전-선택은 19%의 FDR(False Discovery Rate)를 갖는 0.0067 이하의 p-값으로, 1029개의 유전자를 초래했다 (Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B 57: 289-300). 전체적으로, 이러한 유전자들은 호흡기 감작제를 비-감작제로부터 분리할 수 있었다. 그러나, 3D Principal Component Analysis (PCA) (도 5A)에 도시된 바와 같이, 명확한 분리는 이루어지지 않았다. p-값에 의해 주어진 랭킹에 의해 예측자의 개수를 더 감소시키는 것은, 데이터가 10^{-10}까지의 p-값을 갖는 예측자 후보를 포함했으나, 명확한 분리를 달성하지 못했다. 그 후, Backward Elimination 알고리즘을 적용하여, 가장 적은 정보(the least information)를 기여하는 예측자(유전자)를 제거했다. 727개의 예측자가 제거되었을 때(데이터는 표시되지 않음), Kullbach-Liebler Divergence (KLD) 중 국소 최소값(local minimum)이 관찰되었다. 남은 302개 유전자를 집합적으로 "GARD Respiratory Prediction Signature"(GRPS)로 지칭하고, 이들이 화학적 감작제와 비-감작제를 구별하는 능력이 도 5B에 도시된다. 유전자의 정체(identity)가 표 1에 열거된다.

[0209] 주목되는 것은, 비-감작제 군에 비해, 호흡기 감작제의 군 내에서 전사 프로파일의 유의성 있게 더 큰 변화가 있다는 것이다. 감작제의 효능 및 상이한 화학물질이 상이한 신호전달 경로를 유도하는 경향에 관한 것인, 피부 감작제를 연구할때도 유사한 현상이 관찰되었다 (Johansson *et al.*, 2011, *supra.*). 그러나, 이러한 호흡기 화학적 감작제에 대해, 명확히 정의된 감작 효능은 없다 (Basketter DA, Kimber I (2011) Assessing the potency of respiratory allergens: uncertainties and challenges. Regul Toxicol Pharmacol 61: 365-372). 실제로, 본 발명자들은 각 화학적 감작제의 메카니즘 서브도메인과 관련하여 전사 프로파일의 차이를 기술하는 것을 목표로했다 (Enoch SJ, Roberts DW, Cronin MT (2010) Mechanistic Category Formation for the Prediction of Respiratory Sensitization. Chem Res Toxicol). 도 5C는 도 5B에서와 동일한 PCA 플롯을 보여주고, 감작제는 표 2에 열거된 바와 같은 그들의 메카니즘 서브도메인에 따라 착색되었다. 암모늄 염은 비-감작제의 클러스터로부터 더 멀리 위치하는 경향이 있고, 이는 전사 프로파일의 측면에서 비-감작제와 가장 큰 차이(dissimilarity)를 나타낸다. 그러나, 디이소시아네이트 및 산 무수물은 가까이 함께 클러스터를 형성하여, 이 점에서 이들 두 그룹 간에 차이가 있다는 결론을 도출할 가능성을 제거한다. 본 발명자들이 아는 한, 글루타르알데히드는 산 무수물 및 디이소시아네이트와 가까이 그룹핑되나, 메카니즘 서브도메인에 할당되지 않았고, 이 시료들은 따라서 "미지의 서브도메인(subdomain unknown)"으로 표시된다(도 5C).

[0210] Prediction Signature의 예측 정확도의 평가

[0211] GRPS의 예측 성능을 두 가지로 평가하였다. 먼저, GRPS에 근거하여, PCA 플롯에서 그들의 위치를 확인하기 위해, 비-감작제로 구성된 외부 테스트 세터를 이용하였다. 둘째로, 본 발명자들은 데이터를 훈련 세트와 테스트 세트로 무작위로 분리하는 교차-검증 방법을 이용했고, 이들을 Support Vector Machine 분류를 훈련시키고 평가하기 위해 이용했다.

[0212] 첫째 방법은 GRPD가 최초로 고안되었던,이전 세트의 실험에서 이용된, 추가적인 세트의 대조 호합물의 이용가능성 때문에 수행할 수 있었다 (Johansson *et al.*, 2011, *supra.*). 이 테스트 세트의 화합물은 벤즈알데히드, 클로로벤젠, 디에틸 프탈레이트, 글리세롤, 락트산, 옥탄산, 살리실산 및 소디움 도데실 술페이트였고, 이들은 모두 3개의 생물학적 재현물(biological triplicates)로 샘플링하였다. 또한, 테스트 세트는 각각 자극되지 않은 대조군 및 DMSO의 9개의 시료를 포함했다. 도 6A는 도 5B에서와 동일한 PCA 플롯을 보여주고, 여기에서 테스트 세트는 주성분에 영향을 미치지 않으면서, 시료의 전사 프로파일에 근거하여 맵핑되었다. 테스트 세트의 모든 시료를 트레인(train) 세트의 비-감작제와 함께 올바르게 그룹핑하였다. 이 테스트 세트에서 호흡기 감작제의 부재는 GRPS를 확립하기 위해 이용된 분석을 수행하면서, 이 시료들 중 어느 것도 무시하지 않으려고 했기 때문이었다.이 분석에 포함된 시료는 과적합(overfitting)의 위험 때문에 테스트 세트에 포함하시키기에 부적합하다.

[0213] 진정한 테스트 세트에 호흡기 감작제가 없다는 문제를 극복하기 위해, 본 발명자들은 교차-검증 방법을 이용했다. 훈련 세트로서, 데이터 세트의 70%를 무작위로 선택하고, 바이오마커 선택의 전제 과정을 반복했다. 29,141개의 전사물로 출발하여, 전술된 바와 같이, ANOVA 필터링 및 후진 제거를 이용하여, 시그니처를 GARD Respiratory Prediction Signature와 동일한 크기의 유전자 목록으로, 즉, "Validation Biomarker Signature"로 지칭되는 302개의 전사물로 감소시켰다. Validation Biomarker Signature를 이용하여, SVM(Noble WS (2006) What is a support vector machine? Nat Biotechnol 24: 1565-1567)을 훈련 데이터 세트에서 훈련시켰다. 그 후, 훈련된 SVM을 데이터의 나머지 30%, 즉, 테스트 세트에서 각 시료를 호흡기 감작제 또는 비-감작제로 분류하기 위해 이용했다. 분류의 성능은 ROC AUC (the area under the Receiver Operating Characteristic)로 평가했다. 이러한 전체 교차-검증을 20회 반복했고, 매 회 상이한 트레인 및 테스트 세트를 생성하고, 각 훈련 세트는 상이한 Validation Biomarker Signature를 초래했다. 이러한 교차-검증의 결과가 도 6B 내지 C에 예시된다. ROC AUC 중앙값은 0.84이고 범위는 0.66 내지 0.96인 것으로 확인되었다. 또한, GRPS 중 각 유전자에 대한 Validation Call Frequency (VCF)가 표 1에 열거된다. VCF는 특정 유전자가 20개의 Validation Biomarker Signature 중 하나에 포함된 빈도를 나타내고, 따라서, 그 예측자가 평가(rank)될 수 있는 제2 측정값을 제공한다.

[0214] GARD Respiratory Prediction Signature와 연관된 Canonical Pathway

[0215] MUTZ-3 세포에서 호흡기 화학적 감작제에 의해 개시된 생물학적 반응을 조사하기 위해서, Ingenuity Pathway Analysis (IPA)로 데이터를 분석하였다. p-값 필터링에 의해 선택된 상위 1029개 유전자를, 각 유전자에 대한 배수 변화 값과 함께, IPA로의 인풋으로 이용하였다. 1029개의 유전자 중, IPA는 933개를 고유한 ID에 맵핑할 수 있었다. 이중 재현물(duplicate)를 고려하여, IPA 분석을 위해 준비된 데이터세트는 901rodml 분자로 구성되었다. 일차 목적은 확인된 분자들과 연관된 규범적 경로(canonical pathway)를 밝히는 것이었다. 결과가 IPA에 따른 통계적 유의성의 순서로, 표 1에 열거된다.

[0216] 이러한 확인되고 유의성 있게 조절되는 경로의 명확한 대다수는 한정된 세트의 분자에 의해 주로 작동된다. 이러한 경로는 TREM1 신호전달, 류마티스 관절염에서 변경된 T 세포 및 B 세포 신호전달, 적응성 면역 세포와 선천성 면역 세포 간의 소통(communication), B 세포 발달, 아릴 탄화수소 수용체 신호전달, 수지상 세포 성숙, T-헬퍼 세포 중 CD28 신호전달, CD1에 의한 지질 항원 제시, 표적 세포의 세포독성 T 세포 매개 아폽토시스 및 자가면역 갑상성 질환 신호전달을 포함한다. 주목할 것은, 모든 이러한 경로의 중심은 수지상 세포의 성숙을 초래하는, 선천성 면역과 적응성 면역 간의 연결(bridge), 및 외래 물질의 인식에 의해 개시된 선천성 면역 반응의 참여(engagement)이다. GRPS에 의해 잘 모니터링되는 이 과정의 주요한 측면은 TLR 및 AHR과 같은 선천성 수용체의 상향조절, HLA 및 CD1 과 같은 항원 제시-연관 분자의 상향조절, CD86 및 CD40과 같은 공동-자극 분자의 상향 조절, 및 IL-8 및 IL-1B와 같은 염증촉진성 작동 분자의 상향 조절을 포함한다.

[0217] 검토

[0218] 다양한 화학물질이 피부 및 호흡기의 알레르기성 감작화(allergic sensitization)을 유도하여, 직업성 천식 및 기타 증상을 초래한다(Kimber I, Dearman RJ (1997) Cell and molecular biology of chemical allergy. Clin Rev Allergy Immunol 15: 145-168). 알레르기성 접촉 피부염을 초래하는 피부 감작화를 유도하는 화학물질만큼 널리 퍼져있지는 않으나, 호흡기 화학적 감작제의 확인 및 위험 평가는 특히, 치명적 결과를 가져올 수 있는 심각한 증상 때문에 동일하게 중요하다 (Chester DA, Hanna EA, Pickelman BG, Rosenman KD (2005) Asthma death after spraying polyurethane truck bedliner. Am J Ind Med 48: 78-84; Kimber I, Wilks MF (1995) Chemical respiratory allergy. Toxicological and occupational health issues. Hum Exp Toxicol 14: 735-736).

[0219] 최근에, 본 발명자들은 화학물질을 높은 정확도로 분류할 수 있는, GARD로 불리는, 피부 감작제에 대한 세포-기반 인 비트로 테스트 방법을 제시했다 (Johansson *et al.*, 2011, *supra.*; Johansson H, Albrekt AS, Borrebaeck CAK, Lindstedt M (2012) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. Toxicol in Vitro). 이 분석법은 화합물 자극 후, 미리정의된 바이오마커 시그니처를 판독물(readout)로 이용한, MUTZ-3 세포의 전사 프로파일링에 의존한다. 이러한 바이오마커의 측정이 발현 어레이 기술에 기반하므로, 이 분석의 응용성 도메인을 확장시킬 큰 기회가 존재한다. 현재의 연구에서, 본 발명자들은 GARD Respiratory Prediction Signature (GRPS)로 불리는 별개의 바이오머커 시그니처를 이용하여, 호흡기 화학적 감작제의 확인을 가능하게 하는, GARD의 추가적인 개발을 제시한다. 호흡기 감작제 또는 비-감작제로 알려진 일련의 기준 화합물을 이용하고, ANOVA p-값 필터링 및 뒤이은 Backward Elimination을 위한 특징(feature) 선택 알고리즘에 의해 이 두 그룹에서 차등적으로 발현되는 유전자를 확인하여, GRPS를 확인하였다. 수득된 GRPS의 의도된 용도는 따라서, MUTZ-3 세포를 분류될 미지의 화합물로 자극하는 것인, 합쳐진(combined) 인 비트로 분석법일 것이다. 두 개의 별개의 바이오마커 시그니처를 이용하여, 화합물이 피부 감작제, 호흡기 감작제, 또는 비-감작제로 분류될 수 있다. 호흡기 및 피부 감작 모두를 유도할 수 있는 화학물질은 구체적으로 그렇게 분류될 것이다.

[0220] 호흡기 화학적 알레르겐을 분류하는데 있어서 이 분석법의 예측 성능을 두 가지 형태의 검증에 의해 평가하였다. 첫째로, 9개의 음성 자극의 삼중 재현물(triplicate)로 구성된 외부 테스트 세트를 도 6A에 도시된 바와 같이, 성공적으로 분류했다. 둘째로, 데이터의 30%를 무작위로 반복적으로 제외시켜 테스트 세트를 형성하고, 이를 데이터의 나머지 70%에 대해 훈련된 SVM 모델로 나중에 하는 것인 교차-검증의 완전한 방식을 적용하였다. 이 교차-검증의 결과가 0.66 내지 0.96의 범위에서 0.84의 중앙값을 갖는 ROC AUC로 제시된다 (도 6B 및 6C). 예측 성능의 큰 변화가 데이터의 30%의 무작위 배제가 Validation Biomarker Signature의 조성에 크게 영향을 미친다는 것을 암시한다. 실제로, 상이한 Validation Biomarker Signature 간의 변화가 이전 경험으로부터 예상되는 것보다 더 크고, VCF:s는 더 작다(Johansson *et al.*, 2011, *supra.*). 각 Validation Biomarker Signature의 조성의 효과가 조사되었고, 트레인 세트 중 특정한 메카니즘 도메인의 존재 및 각 훈련 세트에서 제거된 각 자극의 재현물의 개수와 같은 다수의 인자들에 대해 상관관계가 고려되었다. 예측 성능의 변화를 설명할 수 있는 명확한 패턴은 밝혀지지 않았다. 편차는 따라서, 이용가능한 기준 화합물의 적은 수의 결과인, 자극을 위해 사용된 상대적으로 작은 수의 시료에 의존하는 것으로 사료된다. 그러나, 0.96 까지의 ROC AUC를 달성하는 능력은 이 모델이 모든 이용가능한 데이터로 훈련되는 경우, 정확한 분류가 실제로 가능하다는 것의 강력한 증거를 보여준다.

[0221] 호흡기 감작을 유도하는 화합물의 위험 평가를 위한 검증되거나, 또는 심지어 널리 허용되는 방법의 부재는 주로 화학적 호흡기 감작이 일어나는 면역학적 메카니즘의 이해 부족 때문이다(.Isola D, Kimber I, Sarlo K, Lalko J, Sipes IG (2008) Chemical respiratory allergy and occupational asthma: what are the key areas of uncertainty? J Appl Toxicol 28: 249-253). 구체적으로, 해결되어야 하는 가장 어려운 이슈 중 하나는 ecifically, 화학물질에 대한 호흡기의 알레르기성 감작에서 IgE 항체의 역할, 및 이러한 감작이 달성될 수 있는, IgE 항체와 독립된메카니즘이 존재하는지 여부이다(Kimber I, Dearman RJ (2002) Chemical respiratory allergy: role of IgE antibody and relevance of route of exposure. Toxicology 181-182: 311-315). 실제로, 다수의 화학적 알레르겐, 예를 들면, 산 무수물에 대한 임상적 증상과 IgE 항체 수준 간의 상관관계가 있다. 대조적으로, 디이소시아네이트로 감작된 환자의 절반 이하는 혈청 중 특이적 IgE를 보인다. 그러나, 일치된 의견은 IgE 항체와 화학적 호흡기 알레르기 간의 관계가 강하다는 것이다 (Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ (2011) Chemical allergy: translating biology into hazard

characterization. Toxicol Sci 120 Suppl 1: S238-268). 가장 설득력 있는 주장은 화학적 합텐에 특이적인 IgE 항체를 성공적으로 검출하는 프로브를 설계하는 데 기술적 어려움이 있다는 것이다. 또한, 마지막 노출 시간 대비 알레르겐-특이적 IgE를 위한 혈액 시료 채취 시간이 이러한 분석법의 결과에 영향을 미칠 수 있다.

[0222] 상이한 호흡기 화학적 알레르겐의 전사 프로파일을 모니터링하고 비교하기 위한 시도로, 도 1C는 GRPS 유전자에 기반한 PCA를 보여주고, 화학물질은 메카니즘 도메인에 따라 색으로 표시된다. 이 플롯에서 디이소시아네이트와 산 무수물 간에 명확한 차이는 검출가능하지 않고, 이는 이 두 그룹이 가깝게 함께 클러스터링되기 때문이다. 이는 인 비보 감작화에서 상이한 메카니즘 경로, IgE 의존적 또는 IgE 독립적 경로의 이슈를 해소하지 않으나, 이 그룹의 화학물질이 MUTZ-3에서 유사한 전사적 변화를 유도한다는 것을 확인한다. 대신에, 가장 극단적인 전사적 변화는 암모늄 헥사클로로플라티네이트 및 암모늄 퍼술페이트와 같은, 암모늄 염에 의해 유도된다. 그러나, 감작제는 비-감작제로부터 분리되므로, 이 두 화합물의 전사 프로파일의 주요 차이는 제1 주성분의 축을 따라, 즉 동일한 벡터 방향에서 검출가능하다. 따라서, 본 발명자들은 GRPS가 다양한 메카니즘 서브도메인으로부터의 알레르겐을 정확하게 분류할 수 있는 것으로 결론짓는다.

[0223] MUTZ-3에 대한 감작성 화학물질의 생물학적 효과를 더 탐구하기 위해, IPA 분석을 수행하였다. 데이터에서 충분한 유의성을 달성하기 위해, GRPS의 302개의 유전자가 아니라, p-값 필터링으로부터의 상위 1029개의 유전자를 IPA 소프트웨어의 인풋으로 이용하였다. 표 1에 제시된 IPA 아웃풋은 상위 1029개 유전자가 가장 유의성 있게 연관된 규범적 신호전달 경로(canonical signaling pathway)를 열거한다. 이 경로들의 대부분은 CD86, CD40, TLR1, TLR6, 다양한 HLA-DR 분자 및 CD1 분자를 포함한, 코어 세트의 분자들에 의해 주로 주도된다. 따라서, 호흡기 화학적 감작제는 아릴 탄화수소 수용체(AHR) 신호전달 및 글루타티온 대사의 유의성에 의해 나타난 바와 같이, 거의 틀림없이, 다양한 패턴 인식 수용체(PRR)의 라이게이션 및 세포내 산화적 스트레스에 반응하여, MUTZ-3에서 증가된 항원 제시 및 공동-자극 분자의 상향조절을 유도한다.

[0224] 종합하면, 화학적 호흡기 알레르겐에 대한 MUTZ-3에서의 생물학적 반응은 궁극적으로 이 수지상 세포의 세포 성숙을 초래하고, 최종 결과로서, 증가된 항원 제시 및 다른 면역 세포와의 상호작용을 가져오는, 선천적 면역 반응 신호전달(signaling) 경로에 의해 지배된다. 또한, 이전에 단백질 알레르겐에 대한 호흡기 감작과 연관되었던 신호전달 경로의 용도(usage)의 새로운 발견은 화학적 알레르겐에 반응하여 호흡기의 감작화를 초래하는 생물학적 과정을 일부 설명했다. 따라서, GRPS는 실제로 면역학적 메카니즘의 관점에서 중요하고, 호흡기 감작을 초래하는 생물학적 사건을 모니터링하는 전사물의 측정을 제공한다.

[0225] 결론적으로, 본 발명자들은 피부 감작제의 평가를 위한 전술된 GARD 분석법을 보완하는, MUTZ-3 세포에서 호흡기 화학적 감작제를 위한 예측적 바이오마커 시그니처를 제시한다. 동일한 시료에서 두 개의 상이한 종말점(endpoint)에 대해 테스트하는 능력은 인 비트로 환경에서 안전성 평가를 위한 매력적이고, 지금까지 유일한(unique) 분석법을 제공한다.

[0226] **참조문헌**

[0227] 1. Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, Krieger SM, et al. (2008) Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. Toxicol Appl Pharmacol 226: 1-13.

[0228] 2. Banks DE, Tarlo SM (2000) Important issues in occupational asthma. Curr Opin Pulm Med 6: 37-42.

[0229] 3. Sastre J, Vandenplas O, Park HS (2003) Pathogenesis of occupational asthma. Eur Respir J 22: 364-373.

[0230] 4. Zammit-Tabona M, Sherkin M, Kijek K, Chan H, Chan-Yeung M (1983) Asthma caused by diphenylmethane diisocyanate in foundry workers. Clinical, bronchial provocation, and immunologic studies. Am Rev Respir Dis 128: 226-230.

[0231] 5. Bernstein DI, Patterson R, Zeiss CR (1982) Clinical and immunologic evaluation of trimellitic anhydride-and phthalic anhydride-exposed workers using a questionnaire with comparative analysis of enzyme-linked immunosorbent and radioimmunoassay studies. J Allergy Clin Immunol 69: 311-318.

[0232] 6. Murdoch RD, Pepys J, Hughes EG (1986) IgE antibody responses to platinum group metals: a large scale refinery survey. Br J Ind Med 43: 37-43.

[0233] 7. Docker A, Wattie JM, Topping MD, Luczynska CM, Newman Taylor AJ, et al. (1987) Clinical and immunological investigations of respiratory disease in workers using reactive dyes. Br J Ind Med 44: 534-541.

[0234] 8. Bourne MS, Flindt ML, Walker JM (1979) Asthma due to industrial use of chloramine. Br Med J 2: 10-12.

[0235] 9. Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, et al. (2008) Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. Toxicol In Vitro 22: 1419-1431.

[0236] 10. Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I (1992) Variable effects of chemical allergens on serum IgE concentration in mice. Preliminary evaluation of a novel approach to the identification of respiratory sensitizers. J Appl Toxicol 12: 317-323.

[0237] 11. Dearman RJ, Skinner RA, Humphreys NE, Kimber I (2003) Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE. J Appl Toxicol 23: 199-207.

[0238] 12. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicol In Vitro 23: 1151-1162.

[0239] 13. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of a human bronchial epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicology 255: 151-159.

[0240] 14. Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, et al. (2009) Gene profiles of a human alveolar epithelial cell line after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. Toxicol Lett 185: 16-22.

[0241] 15. Lalko JF, Kimber I, Dearman RJ, Gerberick GF, Sarlo K, et al. (2011) Chemical reactivity measurements: potential for characterization of respiratory chemical allergens. Toxicol In Vitro 25: 433-445.

[0242] 16. Johansson H, Lindstedt M, Albrekt AS, Borrebaeck CA (2011) A genomic biomarker signature can predict skin sensitizers using a cell-based in vitro alternative to animal tests. BMC Genomics 12: 399.

[0243] 17. Johansson H, Albrekt AS, Borrebaeck CAK, Lindstedt M (2012) The GARD assay for assessment of chemical skin sensitizers. Toxicol in Vitro.

[0244] 18. Santegoets SJ, Masterson AJ, van der Sluis PC, Lougheed SM, Fluitsma DM, et al. (2006) A CD34(+) human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14(+)CD11b(+) Langerhans cell precursor. J Leukoc Biol 80: 1337-1344.

[0245] 19. Masterson AJ, Sombroek CC, De Gruijl TD, Graus YM, van der Vliet HJ, et al. (2002) MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. Blood 100: 701-703.

[0246] 20. Larsson K, Lindstedt M, Borrebaeck CA (2006) Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. Immunology 117: 156-166.

[0247] 21. Carlsson A, Wingren C, Kristensson M, Rose C, Ferno M, et al. (2011) Molecular serum portraits

in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 14252-14257.

[0248] 22. Kullback S, Leibler RA (1951) On Information and Sufficiency. Annals of Mathematical Statistics 22: 79-86.

[0249] 23. Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, Ohno-Machado L (2005) The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. J Biomed Inform 38: 404-415.

[0250] 24. R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

[0251] 25. Weingart SN, Iezzoni LI, Davis RB, Palmer RH, Cahalane M, et al. (2000) Use of administrative data to find substandard care: validation of the complications screening program. Med Care 38: 796-806.

[0252] 26. Ringner M (2008) What is principal component analysis? Nat Biotechnol 26: 303-304.

[0253] 27. Noble WS (2006) What is a support vector machine? Nat Biotechnol 24: 1565-1567.

[0254] 28. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B 57: 289-300.

[0255] 29. Basketter DA, Kimber I (2011) Assessing the potency of respiratory allergens: uncertainties and challenges. Regul Toxicol Pharmacol 61: 365-372.

[0256] 30. Enoch SJ, Roberts DW, Cronin MT (2010) Mechanistic Category Formation for the Prediction of Respiratory Sensitization. Chem Res Toxicol.

[0257] 31. Kimber I, Dearman RJ (1997) Cell and molecular biology of chemical allergy. Clin Rev Allergy Immunol 15: 145-168.

[0258] 32. Chester DA, Hanna EA, Pickelman BG, Rosenman KD (2005) Asthma death after spraying polyurethane truck bedliner. Am J Ind Med 48: 78-84.

[0259] 33. Kimber I, Wilks MF (1995) Chemical respiratory allergy. Toxicological and occupational health issues. Hum Exp Toxicol 14: 735-736.

[0260] 34. Isola D, Kimber I, Sarlo K, Lalko J, Sipes IG (2008) Chemical respiratory allergy and occupational asthma: what are the key areas of uncertainty? J Appl Toxicol 28: 249-253.

[0261] 35. Kimber I, Dearman RJ (2002) Chemical respiratory allergy: role of IgE antibody and relevance of route of exposure. Toxicology 181-182: 311-315.

[0262] 36. Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ (2011) Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. Toxicol Sci 120 Suppl 1: S238-268.

표 1

[0263] GARD 호흡 예측 시그니처(respiratory prediction signature)로부터의 "핵심(core)", "바람직한(preferred)" 및 "선택적(optional)" 바이오마커

유전자 기호	Entrez 유전자 ID	Affymetrix 프로브 세트 ID	Validation Call Frequency
(A) 핵심 바이오마커			
1. OR5B21	ENST00000360374	7948330	100
2. SLC7A7	ENST00000404278	7977786	95
(B) 바람직한 바이오마커			
3. PIP3-E	ENST00000265198	8130408	85

4.	BTNL8	ENST00000400706	8116537	85
5.	CLEC4A	ENST00000360500	7953723	90
6.	HIST4H4	ENST00000358064	7961483	80
7.	YKT6	ENST00000223369	8132580	80
8.	FLJ32679 /// GOLGA8G /// GOLGA8E	ENST00000327271	7981895	85
9.	PACSIN3	ENST00000298838	7947801	90
10.	PDE1B	ENST00000243052	7955943	80
11.	NQO1	ENST00000320623	8002303	80
12.	CAMK1D	ENST00000378845	7926223	95
13.	MYB	ENST00000341911	8122202	95
14.	---	ENST00000387396	8065752	80
15.	GRK5	ENST00000369106	7930894	90
(C) 선택적 바이오마커				
16.	CD86	ENST00000330540	8082035	100
17.	CD1A	ENST00000289429	7906339	85
18.	WWOX	ENST00000355860	7997352	85
19.	IKZF2	ENST00000374319	8058670	85
20.	FUCA1	ENST00000374479	7913694	80
21.	C10orf76	ENST00000370033	7935951	80
22.	AMICA1	ENST00000356289	7952022	80
23.	PDPK2 /// PDPK1	ENST00000382326	7998825	80
24.	AZU1	ENST00000334630	8024038	80
25.	ACN9	ENST00000360382	8134415	80
26.	PDPN	ENST00000400804	7898057	75
27.	LOC642587	NM_001104548	7909422	75
28.	SEC61A2	ENST00000379051	7926189	75
29.	ELA2	ENST00000263621	8024056	75
30.	BMP2K	ENST00000335016	8096004	75
31.	HCCS	ENST00000321143	8165995	75
32.	CXorf26	ENST00000373358	8168447	75
33.	TYSND1	ENST00000287078	7934114	70
34.	CARS	ENST00000380525	7945803	70
35.	NECAP1	ENST00000339754	7953715	70
36.	CDH26	ENST00000348616	8063761	70
37.	SERPINB1	ENST00000380739	8123598	70
38.	STEAP4	ENST00000301959	8140840	70
39.	TXNIP	ENST00000369317	7904726	65
40.	---	ENST00000386628	7925821	65
41.	C12orf35	ENST00000312561	7954711	65
42.	HMGA2	ENST00000393578	7956867	65
43.	KRT16	ENST00000301653	8015376	65
44.	GGTLC2	ENST00000215938	8071662	65
45.	---	ENST00000386437	8089926	65
46.	OSBPL11	ENST00000393455	8090277	65
47.	FAM71F1	ENST00000315184	8135945	65
48.	ATP6V1B2	ENST00000276390	8144931	65
49.	LOC128102	AF252254	7904429	60
50.	TBX19	ENST00000367821	7907146	60
51.	NID1	ENST00000264187	7925320	60
52.	LPXN	ENST00000263845	7948332	60
53.	C15orf45	AK057017	7982375	60
54.	RNF111	ENST00000380504	7983953	60
55.	---	ENST00000386861	7993183	60
56.	CD33	ENST00000262262	8030804	60
57.	TANK	ENST00000259075	8045933	60

58.	ANKRD44	ENST00000282272	8057990	60
59.	WDFY1	ENST00000233055	8059361	60
60.	SDC4	ENST00000372733	8066513	60
61.	TMPRSS11B	ENST00000332644	8100701	60
62.	AFF4	ENST00000265343	8114083	60
63.	HBEGF	ENST00000230990	8114572	60
64.	XK	ENST00000378616	8166723	60
65.	SLAMF7	ENST00000368043	7906613	55
66.	S100A4	ENST00000368715	7920271	55
67.	MPZL3	ENST00000278949	7952036	55
68.	---	GENSCAN00000044853	7967586	55
69.	TRAV8-3	ENST00000390435	7973298	55
70.	LOC100131497	GENSCAN00000046821	7980481	55
71.	KIAA1468	ENST00000299783	8021496	55
72.	SPHK2	ENST00000245222	8030078	55
73.	---	ENST00000309260	8096554	55
74.	CCR6	ENST00000283506	8123364	55
75.	GSTA3	ENST00000370968	8127087	55
76.	RALA	ENST00000005257	8132406	55
77.	C7orf53	ENST00000312849	8135532	55
78.	---	AF480566	8141421	55
79.	CERCAM	ENST00000372842	8158250	55
80.	---	hsa-mir-147	8163729	55
81.	NFYC	ENST00000372655	7900468	50
82.	CD53	ENST00000271324	7903893	50
83.	PSEN2	ENST00000366783	7910146	50
84.	CISD1	ENST00000333926	7927649	50
85.	SCD	ENST00000370355	7929816	50
86.	MED19	ENST00000337672	7948293	50
87.	SYT17	ENST00000396244	7993624	50
88.	KRT16 /// LOC400578 /// MGC102966	ENST00000399124	8013465	50
89.	C18orf51	ENST00000400291	8023864	50
90.	CD79A	ENST00000221972	8029136	50
91.	C19orf56	ENST00000222190	8034448	50
92.	AGFG1	ENST00000409979	8048847	50
93.	FOXP1	ENST00000318796	8088776	50
94.	TLR6	ENST00000381950	8099841	50
95.	SUSD3	ENST00000375472	8156393	50
96.	---	ENST00000387842	8176921	50
97.	---	ENST00000387842	8177424	50
98.	GPA33	ENST00000367868	7922029	45
99.	CDC123	ENST00000281141	7926207	45
100.	C10orf11	ENST00000354343	7928534	45
101.	---	ENST00000322493	7937971	45
102.	PTMAP7	AF170294	7976239	45
103.	ARRDC4	ENST00000268042	7986350	45
104.	---	ENST00000388199	7997738	45
105.	---	ENST00000388437	8009299	45
106.	KRT9	ENST00000246662	8015357	45
107.	---	ENST00000379371	8035868	45
108.	HDAC4	ENST00000345617	8060030	45
109.	CD200	ENST00000315711	8081657	45
110.	PAPSS1	ENST00000265174	8102214	45
111.	ORAI2	ENST00000356387	8135172	45
112.	---	AK124536	8144569	45
113.	ZBTB10	ENST00000379091	8147040	45
114.	---	ENST00000387422	8159963	45

115.	RAB9A	ENST00000243325	8166098	45
116.	---	---	7895613	40
117.	DRD5	ENST00000304374	7905025	40
118.	CNR2	ENST00000374472	7913705	40
119.	OIT3	ENST00000334011	7928330	40
120.	---	ENST00000386981	7933008	40
121.	C10orf90	ENST00000356858	7936996	40
122.	OR52D1	ENST00000322641	7938008	40
123.	ZNF214	ENST00000278314	7946288	40
124.	---	ENST00000386959	7954690	40
125.	ART4	ENST00000228936	7961507	40
126.	RCBTB2	ENST00000344532	7971573	40
127.	HOMER2	ENST00000304231	7991034	40
128.	WWP2	ENST00000359154	7996976	40
129.	WDR24	ENST00000248142	7998280	40
130.	MED31	ENST00000225728	8011968	40
131.	CALM2	ENST00000272298	8052010	40
132.	DLX2	ENST00000234198	8056784	40
133.	BTBD3	ENST00000399006	8060988	40
134.	---	ENST00000339367	8075817	40
135.	TBCA	ENST00000380377	8112767	40
136.	GIN1	ENST00000399004	8113403	40
137.	NOL7	ENST00000259969	8116969	40
138.	---	ENST00000402365	8117628	40
139.	C7orf28B /// C7orf28A	ENST00000325974	8138128	40
140.	DPP7	ENST00000371579	8165438	40
141.	hCG_1749005	NR_003933	8167640	40
142.	PNPLA4	ENST00000381042	8171229	40
143.	USP51	ENST00000330856	8173174	40
144.	HLA-DQA1 /// HLA-DRA	ENST00000383127	8178193	40
145.	FAAH	ENST00000243167	7901229	35
146.	GDAP2	ENST00000369443	7918955	35
147.	CD48	ENST00000368046	7921667	35
148.	PTPRJ	ENST00000278456	7939839	35
149.	EXPH5	ENST00000265843	7951545	35
150.	RPS26 /// LOC728937 /// RPS26L /// hCG_2033311	ENST00000393490	7956114	35
151.	ALDH2	ENST00000261733	7958784	35
152.	CALM1	ENST00000356978	7976200	35
153.	NOX5 /// SPESP1	ENST00000395421	7984488	35
154.	RHBDL1	ENST00000352681	7992010	35
155.	CYLD	ENST00000311559	7995552	35
156.	OSBPL1A	ENST00000357041	8022572	35
157.	GYPC	ENST00000259254	8045009	35
158.	RQCD1	ENST00000295701	8048340	35
159.	RBM44	ENST00000316997	8049552	35
160.	---	ENST00000384680	8051862	35
161.	C3orf58	ENST00000315691	8083223	35
162.	MFSD1	ENST00000264266	8083656	35
163.	HACL1	ENST00000321169	8085608	35
164.	SATB1	ENST00000338745	8085716	35
165.	USP4	ENST00000351842	8087380	35
166.	---	ENST00000410125	8089928	35
167.	---	ENST00000384055	8097445	35
168.	IL7R	ENST00000303115	8104901	35
169.	---	ENST00000364497	8117018	35
170.	FAM135A	ENST00000370479	8120552	35
171.	CD164	ENST00000310786	8128716	35

172.	DYNLT1	ENST00000367088	8130499	35
173.	NRCAM	ENST00000379027	8142270	35
174.	ZNF596	ENST00000308811	8144230	35
175.	---	ENST00000332418	8170322	35
176.	TCEAL3 /// TCEAL6	ENST00000372774	8174134	35
177.	SNAPIN	ENST00000368685	7905598	30
178.	DENND2D	ENST00000369752	7918487	30
179.	SAMD8	ENST00000372690	7928516	30
180.	LHPP	ENST00000368842	7931204	30
181.	SLC37A2	ENST00000298280	7944931	30
182.	FLI1 /// EWSR1	ENST00000344954	7945132	30
183.	OR9G4	ENST00000395180	7948157	30
184.	LOC338799	ENST00000391388	7967210	30
185.	HEXDC	ENST00000337014	8010787	30
186.	NOTUM	ENST00000409678	8019334	30
187.	MCOLN1	ENST00000394321	8025183	30
188.	PRKACA	ENST00000350356	8034762	30
189.	CRIM1	ENST00000280527	8041447	30
190.	CECR5	ENST00000336737	8074227	30
191.	RNF13	ENST00000392894	8083310	30
192.	40969	ENST00000339875	8103508	30
193.	ZNF366	ENST00000318442	8112584	30
194.	---	ENST00000410754	8120979	30
195.	GIMAP5	ENST00000358647	8137257	30
196.	---	ENST00000362484	8147242	30
197.	TFE3	ENST00000315869	8172520	30
198.	RHOU	ENST00000366691	7910387	25
199.	MED8	ENST00000290663	7915516	25
200.	CASQ2	ENST00000261448	7918878	25
201.	NUDT5	ENST00000378940	7932069	25
202.	C11orf73	ENST00000278483	7942932	25
203.	PAK1	ENST00000356341	7950578	25
204.	PRSS21	ENST00000005995	7992722	25
205.	---	ENST00000332418	7997907	25
206.	BTBD12	ENST00000294008	7999008	25
207.	DHRS13	ENST00000394901	8013804	25
208.	CCDC102B	ENST00000319445	8021685	25
209.	BCL2	ENST00000398117	8023646	25
210.	ZNF211 /// ZNF134	ENST00000396161	8031784	25
211.	NDUFV2	ENST00000340013	8039068	25
212.	MYCN	ENST00000281043	8040419	25
213.	---	ENST00000385528	8045561	25
214.	---	ENST00000362957	8046522	25
215.	CASP8	ENST00000264275	8047419	25
216.	RTN4	ENST00000394611	8052204	25
217.	PLCG1	ENST00000244007	8062623	25
218.	MGC42105	ENST00000326035	8105146	25
219.	EMB	ENST00000303221	8112007	25
220.	---	ENST00000386433	8121249	25
221.	COL21A1	ENST00000370817	8127201	25
222.	LRP12	ENST00000276654	8152280	25
223.	LMNA	ENST00000368301	7906085	20
224.	---	ENST00000385567	7907535	20
225.	---	ENST00000362863	7926805	20
226.	ZNF503	ENST00000372524	7934553	20
227.	NLRX1	ENST00000397884	7944463	20
228.	---	ENST00000391173	7954775	20
229.	NDRG2	ENST00000298687	7977621	20

230.	TRAF7	ENST00000326181	7992529	20
231.	KRT40	ENST00000400879	8015152	20
232.	KRT40	ENST00000400879	8019604	20
233.	DRD5	ENST00000304374	8053725	20
234.	ZC3H8	ENST00000409573	8054664	20
235.	MMP9	ENST00000372330	8063115	20
236.	PLTP	ENST00000372420	8066619	20
237.	---	ENST00000362686	8100476	20
238.	SPEF2	ENST00000282469	8104856	20
239.	LRRC16A	ENST00000332168	8117243	20
240.	FBXO9	AK095315	8120269	20
241.	EEPD1	ENST00000242108	8132305	20
242.	FCN1	ENST00000371807	8165011	20
243.	EFNA3	ENST00000368408	7905918	15
244.	---	ENST00000314893	7910385	15
245.	TMEM19	ENST00000266673	7957167	15
246.	PLXNC1	ENST00000258526	7957570	15
247.	NHLRC3	ENST00000379599	7968703	15
248.	MBNL2	ENST00000397601	7969677	15
249.	EIF5	ENST00000216554	7977058	15
250.	PLEKHG4	ENST00000360461	7996516	15
251.	COPS3	ENST00000268717	8013094	15
252.	FAM171A2	ENST00000398346	8016033	15
253.	LOC653653 /// AP1S2	ENST00000380291	8017210	15
254.	VAPA	ENST00000340541	8020129	15
255.	MATK	ENST00000395040	8032682	15
256.	ACTR2	ENST00000377982	8042337	15
257.	BPI	ENST00000262865	8062444	15
258.	ERG	ENST00000398905	8070297	15
259.	LAMB2	ENST00000305544	8087337	15
260.	---	BC090058	8133752	15
261.	PHTF2	ENST00000248550	8133818	15
262.	---	ENST00000333261	8133902	15
263.	C8orf55	ENST00000336138	8148559	15
264.	PDE7A	ENST00000379419	8151074	15
265.	NAPRT1	ENST00000340490	8153430	15
266.	HLA-DRA	ENST00000383127	8179481	15
267.	SLC22A15	ENST00000369503	7904226	10
268.	FCGR1A /// FCGR1B /// FCGR1C	ENST00000369384	7905047	10
269.	SLC27A3	ENST00000271857	7905664	10
270.	ID3	ENST00000374561	7913655	10
271.	TBCEL	ENST00000284259	7944623	10
272.	FAM138D	ENST00000355746	7960172	10
273.	POMP	ENST00000380842	7968297	10
274.	SNN	ENST00000329565	7993259	10
275.	MED13	ENST00000262436	8017312	10
276.	ZFP36L2	ENST00000282388	8051814	10
277.	UXS1	ENST00000409501	8054395	10
278.	CD40	ENST00000279061	8063156	10
279.	---	ENST00000362620	8066960	10
280.	GGT5	ENST00000327365	8074991	10
281.	---	BC035666	8103023	10
282.	G6PD	ENST00000393562	8176133	10
283.	---	ENST00000384272	7902365	5
284.	CLCC1	ENST00000369971	7918255	5
285.	SCGB2A1	ENST00000244930	7940626	5
286.	GAA	ENST00000302262	8010354	5
287.	SERPINB2	ENST00000404622	8021635	5

288.	GPI	ENST00000356487	8027621	5
289.	LASS6	ENST00000392687	8046086	5
290.	EIF4A2	AB209021	8084704	5
291.	HLA-DRA	ENST00000383127	8118548	5
292.	---	ENST00000385586	8136889	5
293.	ANXA2P2	M62898 /// NR_003573	8154836	5
294.	FANCG	ENST00000378643	8160935	5
295.	FAM53B	ENST00000337318	7936884	0
296.	RFXAP	ENST00000255476	7968653	0
297.	UBR1	ENST00000382177	7987981	0
298.	TBC1D2B	ENST00000409931	7990657	0
299.	SERPINB10	ENST00000397996	8021645	0
300.	SEC23B	ENST00000377481	8061186	0
301.	MN1	ENST00000302326	8075126	0
302.	CRTAP	ENST00000320954	8078450	0

[0264] ANOVA 및 후진 제거(backward elimination)에 의해 확인된, 호흡기의 화학적 감작에 대한 잠재적 예측 유전자(predictor gene)의 목록. 유전자는 (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)에서 찾아진 Entrez 유전자 ID를 이용한 주석이 달려있다. Human ST 1.0 Array에 대한 Affymetrix 프로브 세트 ID가 제공된다. Validation call frequency (%)는 교차-검정(cross-validation) 중 수득된 20 Validation 바이오마커 시그니처에서 각 유전자의 발생율(occurence)이다.

표 2

[0265] 각 기준 화합물에 대해 이용된 농도 및 비히클

화합물	약자	비히클	최대 용해도 (μM)	Rv90 (μM)	GARD 인풋 농도 (μM)
호흡기 감작제					
암모늄 헥사클로로플라티네이트 (ammonium hexachloroplatinate)	AH	물	35	-	35
암모늄 퍼술페이트(ammonium persulfate)	AP	DMSO	-	-	500
글루타르알데이드	GA	물	-	10	10
헥사메틸렌 디이소시아네이트	HDI	DMSO	100	-	100
말레산 무수물(maleic anhydride)	MA	DMSO	-	-	500
메틸렌 디페놀 디이소시아네이트	MDI	DMSO	50	-	50
프탈산 무수물	PA	DMSO	200	-	200
톨루엔이소시아테이트	TDI	DMSO	40	-	40
트리멜리트산 무수물(trimellitic anhydride)	TMA	DMSO	150	-	150
비-감작제					
1-부탄올	BUT	DMSO	-	-	500
4-아미노벤조산	PABA	DMSO	-	-	500
클로로벤젠	CB	DMSO	98	-	98
디메틸 포름아미드	DF	물	-	-	500
에틸 바닐린	EV	DMSO	-	-	500
이소프로판올	IP	물	-	-	500
메틸 살리실레이트	MS	DMSO	-	-	500
프로필렌 글리콜	PG	물	-	-	500
과망간산 칼륨	PP	물	38	-	38
Tween 80	T80	DMSO	-	-	500
황산아연	ZS	물	126	-	126

[0266] 분석 개발에 사용된 각 표준 화합물에 대해 이용된 농도 및 비히클의 목록.

[0267] 표준 화합물은 사람에서의 임상적 관찰을 통해 호흡기 감작제 또는 비-호흡기 감작제로 분류되었다.

[0268] 표 3. 서포트 벡터 머신 (support vector machine: SVM) 알고리즘

1. R-Script for SVM predictions of unknown data

```
#The submitted script reads traindata.txt, testdata.txt and predictionsignature.txt, with
example files provided.

source("NaiveBayesian")
library(e1071)

#PART 1. USER INPUT

filnamnTraining<-"traindata.txt" #Provide the correct filname for traindata
filnamnTest<-"testdata.txt" #Provide the correct filname for testdata

lista <- read.delim("predictionsignature.txt",header=FALSE) ##Provide the correct filname for
the prediction signature
lista <- as.character(lista[[1]])

group1<- "pos" #Provide the correct label of sample class 1
group2<- "neg" #Provide the correct label of sample class 2

#PART 2. READ DATA

rawfile <- read.delim(filnamnTraining, header=FALSE)
rawfile <- t(rawfile)
samplenames <- as.character(rawfile[-1,1])
groupsTraining <- rawfile[-1,2]
dataTraining <- t(rawfile[-1,-c(1,2)])
dimdataTraining <- dim(dataTraining)
dataTraining <- as.numeric(dataTraining)
dim(dataTraining) <- dimdataTraining
ProteinNames <- as.character(rawfile[1,-c(1,2)])
rownames(dataTraining) <- ProteinNames
colnames(dataTraining) <- samplenames
logdataTraining <- dataTraining

listaBoolean <- is.element(ProteinNames, lista)
logdataTraining <- logdataTraining[listaBoolean,]

rawfile <- read.delim(filnamnTest, header=FALSE)
rawfile <- t(rawfile)
samplenames <- as.character(rawfile[-1,1])
groupsTest <- rawfile[-1,2]
dataTest <- t(rawfile[-1,-c(1,2)])
dimdataTest <- dim(dataTest)
dataTest <- as.numeric(dataTest)
dim(dataTest) <- dimdataTest
ProteinNames <- as.character(rawfile[1,-c(1,2)])
rownames(dataTest) <- ProteinNames
colnames(dataTest) <- samplenames
logdataTest <-dataTest
```

[0269] `logdataTest <- logdataTest[listaBoolean,]`

```
# PART 3. TRAIN THE SVM AND USE IT TO PREDICT SAMPLE CLASS OF TEST SET

svmfacTraining<- factor(rep('rest',ncol(logdataTraining)),levels=c(group1, group2, 'rest'))
subset1Training<- is.element(groupsTraining , strsplit(group1,",")[[1]])
subset2Training<- is.element(groupsTraining , strsplit(group2,",")[[1]])
svmfacTraining[subset1Training] <- group1
```

[0270]

```
svmfacTraining[subset2Training] <- group2
facTraining <-factor(as.character(svmfacTraining
[subset1Training|subset2Training]),levels=c(group1,group2))

svmfacTest<- factor(rep('rest',ncol(logdataTest)),levels=c(group1, group2, 'rest'))
subset1Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group1,",")[[1]])
subset2Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group2,",")[[1]])
svmfacTest[subset1Test] <- group1
svmfacTest[subset2Test] <- group2
facTest <-factor(as.character(svmfacTest
[subset1Test|subset2Test]),levels=c(group1,group2))
 n1 <- sum(facTest ==levels(facTest )[1])
 n2 <- sum(facTest ==levels(facTest )[2])
 nsamples <- n1+n2
SampleInformation <- paste(levels(facTest )[1]," ",n1," , ",levels(facTest )[2]," ",n2,sep="")

svmtrain <- svm(t(logdataTraining) , facTraining , kernel="linear" )
pred<-predict(svmtrain , t(logdataTest) , decision.values=TRUE)
res<-attr(pred, "decision.values")
names <- colnames(logdataTest, do.NULL=FALSE)
orden <- order(res , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden],res[orden],facTest[orden])
ROCdata <- myROC(res,facTest)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(res,facTest)

# PART 4. IF SAMPLE CLASSES OF TEST DATA ARE KNOWN, PRINT ROC
ROCplot(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdat
a[2],SenSpe <- SenSpe,samples=Samples), sensspecnumber=4)

# PART 5. FOR UNKNOWN SAMPLES, PRINT DECISION VALUES
write.table(res, file="Predicted_resultsp1206.txt", sep= "\t", row.names = TRUE)
```

[0271]

2. R-script for establishment of a Prediction Signature using Backward Elimination

```
filnamn <- "inputdata.txt" #Provide correct filename for inputdata. Correct Format should be
t(traindata).
group1 <- "pos" #Provide label of sample class 1
group2 <- "neg" #Provide label of sample class 2

# Include
source("NaiveBayesian")
library(e1071)

# Hämta data
rawfile <- read.delim(filnamn)
```

[0272]

```
# Läs in grupper
groups <- rawfile[,2]

# Hämta provnamn i datafilen
samplenames <- as.character(rawfile[,1])

# Skapa dataset ur råfilen
data <- t(rawfile[,-c(1,2)])

# Log
# data <- log(data)/log(2)

# antal prover

nsamples <- ncol(data)

# Skapa antikroppsnamnlista ur NYA datafilen
ProteinNames <- read.delim(filnamn,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-(1:2)]

# Kolla antal Ab i nya datasetet
antal <- length(ProteinNames)

# Ge rätt prov- och Ab-namn
rownames(data) <- ProteinNames
colnames(data) <- samplenames

# Skapa subsets
subset1 <- is.element(groups , strsplit(group1,",")[[1]])
subset2 <- is.element(groups , strsplit(group2,",")[[1]])

# Skapa factorlista
svmfac <-  factor(rep('rest',ncol(data )),levels=c(group1,group2,'rest'))
svmfac[subset1] <- group1
svmfac[subset2] <- group2
svmfac <- svmfac[subset1|subset2]
```

[0273]

```
# Skapa vektor för K-L felen där det minsta för varje signaturlängd sparas
smallestErrorPerLength <- rep(NA,antal)

# Beräkna medelvärde för varje Ab över alla prov som är med
averages <- apply(data, 1, mean)

# Skapa vektor för Ab-ordningen efter K-L felen som erhållits när
# respektive antikropp var satt till medelvärde.
abOrder <- rep(NA,antal)

# Skapa ett dataset att eliminera i
elimData <- data[,subset1|subset2]


# Lista att förvara SVM-modellerna i
models <- numeric(nsamples)

# Skapa variabel för att hålla reda på hur många Ab som tagits bort
borttagna <- 0
```

[0274]

```
##################################################################
# BEGIN BACKELIM    ############################################
##################################################################

print(Sys.time())

# Kör tills bara två analyter återstår
for(j in 1:(antal-1))
{
 # Check if groups are given in correct order
 control <- as.numeric(svmfac)
 if(sum(control[subset1]) > sum(control[subset2]))
 {
        print("ERROR: Change order of your group1 and group2!!!")
        break
 }

 # För varje signaturlängd, där alla är med från början, träna en modell för
 # varje N-1 kombiantion av prover med den data som finns i elimData
 for (i in 1:nsamples)
 {
  # Modellerna sparas i en array av listor kallad models
  models[i] <- list(svm(t(elimData[,-i]), svmfac[-i], kernel="linear"))
 }

 # Nu är alla modeller som behövs för LOO tränade och ska testas på elimData.
 # I elimData sätts först en analyt till medelvärde, sen testas var och en av
 # modellerna med det prov som var borttaget när den tränades.
 # När alla modellerna är testade en gång beräknas KL-fel som sparas i errors.
 # Nu sätts nästa analyt till medelvärde och testprocessen görs om, tills alla
 # analyter varit medelvärdeseliminerade en gång. Resultatet blir en KL-fel
 # lista lika lång som antalet analyter som är kvar i datasetet.
```

[0275]

```
  # Skapa en lista med K-L fel en viss signaturlängd (antal + 1 - j lång)
  # där areorna för varje körning där en Ab i taget har satts till medelvärde
  errors <- testModels(models, elimData, averages)

  # Lägg namnet på Ab med sämst inverkan på felet i abOrder
  abOrder[j] <- getWorstAb(errors, row.names(elimData))

  # Lägger till värdet på det minsta felet
  smallestErrorPerLength[j] <- getSmallestError(errors)

  # Tar bort sämsta Ab ur medelvärdeslistan
  averages <- getNewAverages(errors, averages)

  # Tar bort sämsta Ab ur elimData
  elimData <- getNewElimData(errors, elimData)

  # Noterar att en Ab tagits bort
  borttagna <- borttagna + 1

  # Ange hur många analyter som eliminerats, samt vad klockan är.
  print(paste(j, "analytes eliminated @", Sys.time()), sep="")
}

# Lägg till namnet på sista analyetn, som aldrig blen eliminerad
abOrder[length(abOrder)] <- setdiff(ProteinNames, abOrder)

# Spara resultatet till fil
filename <- paste("Backward elimination result(",rnorm(1)+1,").txt",sep="")
write.table(cbind(smallestErrorPerLength,abOrder), file=filename, sep="\t", quote =
F,row.names = F)
```

3. Various R-functions called by script 1 and 2.

```
# getWorstAb: Rapporterar namnet på antikroppen som kommer tas bort
# (den där ROC-arean var som störst)
getWorstAb <- function(errors, abNames)
{
  return(abNames[order(errors, decreasing = F)[1]])
}


# testModels: testar alla modeller som finns i 'models' med alla
# analyser satta till medelvärde en gång
```

[0276]

```
testModels <- function(models, elimData, averages)
{
  nsamples <- ncol(elimData)
  d <- as.numeric(svmfac)-1
  y <- numeric(nsamples)
  E <- numeric(nsamples)
  analytes <- nrow(elimData)
  errors <- numeric(nrow(elimData))
```

[0277]

```
  for(k in 1:analytes)
  {
   # Sätt  analyt k till medelvärde i elimData
    # Men  spara först analytens orginalvärde
   backup <- elimData[k,]
   elimData[k,] <- averages[k]


   # Gör LOO  loop för datasetet med de redan  färdiga modellena
   for (i in 1:nsamples)
   {
    pred <- predict(models[[i]] , t(elimData[,i]), decision.values=TRUE)
    #spara  decision values
    y[i] <- as.numeric(attributes(pred)$decision.values)
   }

   # Beräkna "sannolikheterna"
   y = 1-(1/(1  + exp(-y)))

   # Beräkna KL-fel när aktuell analyt är eliminerad
   for (i in 1:nsamples)
   {
    E[i] <- -(d[i]*log(y[i])+(1-d[i])*log(1-y[i]))
   }

   # Spara felet
   errors[k] <- sum(E)

   # Lägg tillbaka analyten
   elimData[k,] <- backup
  }
  return( errors )
 }


 # getNewElimData:  Väljer  vilken antikropp som ska tas bort ur tränigsdatan och tar bort den
 getNewElimData <- function(errors, elimData)
 {
  # Positionen för det minsta felet
  tasBort <- order(errors,decreasing  = F)[1]
  return(elimData[-tasBort,])
 }
```

[0278]

```
# getSmallestError:  Rapporterar  minsta K-L felet
getSmallestError <- function(errors)
{
 return(min(errors))
}
```

[0279]

```
# getNewAverages: skapar en ny lista med medelvärden efter att en analyt
# eliminerats.
getNewAverages <- function(errors, averages)
{
 # Positionen för det minsta felet
 tasBort <- order(errors, decreasing = F)[1]
 return(averages[-tasBort])
}



# getRemovedAb: tar fram ID på analyt som eliminerats
getRemovedAb <- function(errors, abNames)
{
 return(abNames[order(errors, decreasing = T)[1]])
}

NBtrainer <- function(data, fac){
 MeanVariancePval <- function(vec , fac){
  vec1 <- vec[fac==levels(fac)[1]]
  vec2 <- vec[fac==levels(fac)[2]]
  if (sum(!is.na(vec1))<=2 | sum(!is.na(vec2))<=2){
   return(c(NA,NA,NA,NA,NA))
  }
  mean1 <- mean(vec1 , na.rm=TRUE)
  var1 <- var(vec1 , na.rm=TRUE)
  mean2 <- mean(vec2 , na.rm=TRUE)
  var2 <- var(vec2 , na.rm=TRUE)
  if (var1==0 | var2==0){return(c(NA,NA,NA,NA,NA))}
  pval <- t.test(vec1,vec2,var.equal=TRUE)$p.value
  return(c(mean1,var1,mean2,var2,pval))
 }
 return(t(apply(data , 1 , MeanVariancePval , fac)))
}

NBpredicter <- function(testdata , NBtrained , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut =1){
 if (topnumber==Inf){
  indices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut & abs(NBtrained[,1]-
NBtrained[,3])>=logfoldcut
 }else{
  preindices <- !is.na(NBtrained[,5]) & NBtrained[,5]<=pcut
  abs(NBtrained[preindices,1]-NBtrained[preindices,3]) -> foldchange
  cutfold <- sort(foldchange , decreasing=TRUE )[min(topnumber,length(foldchange))]
  indices <- preindices & (abs(NBtrained[,1]-NBtrained[,3]) >= cutfold)
 }
 NBtrainedred <- matrix(NBtrained[indices,],ncol=ncol(NBtrained))
 testdatared <- matrix(testdata[indices,], ncol=ncol(testdata))
 singlegene <- function( genepred){
  l1 <- -((genepred[6] - genepred[1])^2)/(2*genepred[2])-0.5*log(2*pi*genepred[2])
  l2 <- -((genepred[6] - genepred[3])^2)/(2*genepred[4])-0.5*log(2*pi*genepred[4])
  #print(genepred)
  return(l1-l2)
```

[0280]

```
}
NBvectorpredicter <- function(vec){
 combined <- cbind(NBtrainedred , vec)
 combined <- matrix(combined[!is.na(vec),], ncol=6)
 return(sum(apply( combined , 1 , singlegene)))
}
return(apply(testdatared , 2 , NBvectorpredicter))

}

myROC <- function(numbers , fac){
n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
wilcoxresult <- wilcox.test(numbers~fac , alternative="greater")
ROCarea  <- as.numeric(wilcoxresult$statistic)/(n1*n2)
pval <- wilcoxresult$p.value
return(c(ROCarea,pval))
}

SensitivitySpecificity <- function(numbers, fac){
n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
un <- sort(unique(numbers),  decreasing=TRUE)
SenSpe <- function(x){
 sen <-  sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[1])/n1
 spe <-  1 - sum(numbers>=x & fac==levels(fac)[2])/n2
 return(list(Sensitivity=sen,Specificity=spe))
}
return(t(sapply(un  , SenSpe)))
}

NBloopreparer <- function(data , fac){
nsamples <- ncol(data)
ngenes <- nrow(data)
NBtrainedarray  <- array(NA  , dim=c(ngenes,5,nsamples))
for (i in 1:nsamples){ print(i)
 NBtrainedarray[,,i] <- NBtrainer(matrix(data[,-i],ncol=nsamples-1),fac[-i])
}
return(NBtrainedarray)
}

NBleaveoneout <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 ,
pcut=1){
nsamples <- ncol(data)
loglikelihoods <- rep(NA , nsamples)
for (i in 1:nsamples){
 loglikelihoods[i]<-
NBpredicter(matrix(data[,i],ncol=1),NBtrainedarray[,,i],topnumber,logfoldcut,pcut)
}
return(loglikelihoods)
}
```

[0281]

```
NBloocv <- function(NBtrainedarray , data , fac , topnumber=Inf , logfoldcut=0 , pcut=1){
 n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
 n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
 SampleInformation <- paste(levels(fac)[1]," ",n1," , ",levels(fac)[2]," ",n2,sep="")
 loglikelihoods <- NBleaveoneout(NBtrainedarray  , data,fac,topnumber,logfoldcut,pcut)
 names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
 orden <- order(loglikelihoods , decreasing=TRUE)
 Samples <- data.frame(names[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden])
 ROCdata <- myROC(loglikelihoods,fac)
 SenSpe <- SensitivitySpecificity(loglikelihoods,fac)

return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2
],
            topnumber=topnumber,pcut=pcut,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}


NBtwooutpreparer <- function(data , fac){
 nsamples <- ncol(data)
 ngenes <- nrow(data)
 NBdoublearray <- array(NA  , dim=c(ngenes,5,nsamples*(nsamples-1)/2))
 for (i in 2:nsamples){
  for (j in 1:(i-1)){ print(paste(i," ",j));
   NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+j]  <- NBtrainer(matrix(data[,-c(i,j)],ncol=nsamples-2),fac[-c(i,j)])
  }
 }
 return(NBdoublearray)
}

NBmaximizer <- function(NBtrainedarray  , data , fac){
 functomaximize <- function(pcut , topnumber){
  NBloocv(NBtrainedarray  , data , fac , topnumber=top , pcut=pcut)$ROCarea
 }
 rocmax <- 0
 pcutmax <- numeric(0)
 topmax <- numeric(0)
 pcutset <- c(1,0.05,0.01,0.005,0.001,  0.0003 , 0.0005,0.0001)
 topset <- c(1,2,5,10,20,50,100)
 for (pcut in pcutset){
  for (top in topset){
   currentroc <- functomaximize(pcut,top); # print(paste(pcut," ",top, " ",currentroc))
   if (currentroc >= rocmax){
    rocmax <- currentroc
    pcutmax <- pcut
    topmax <- top
   }
  }
 }
 print(paste("Result ",pcutmax," ",topmax," ",rocmax))
 return(c(pcutmax,topmax))
}
```

[0282]

```
NBtotalvalidation <- function(NBdoublearray , NBtrainedarray , data ,fac){
 n1 <- sum(fac==levels(fac)[1])
 n2 <- sum(fac==levels(fac)[2])
 nsamples <- n1+n2
 ngenes <- nrow(data)
 SampleInformation <- paste(levels(fac)[1]," ",n1," , ",levels(fac)[2]," ",n2,sep="")
 maxarray <- matrix(NA , nrow=nsamples , ncol=2)
 colnames(maxarray) <- c('pcut','topnumber')
 NormScore <- numeric(nsamples)
 loglikelihoods <-numeric(nsamples)
 for (i in 1:nsamples){
  NBtemptrainedarray <- array(NA , dim=c(ngenes,5,nsamples-1))
  if (i >1){
   for (j in 1:(i-1)){
    NBtemptrainedarray[,,j] <- NBdoublearray[,,(i-1)*(i-2)/2+j]
   }
  }
  if (i < nsamples){
   for (j in (i+1):nsamples){
    NBtemptrainedarray[,,j-1] <- NBdoublearray[,,(j-1)*(j-2)/2+i]
   }
  }
  maxarray[i,] <- NBmaximizer( NBtemptrainedarray , data[,-i] , fac[-i])
  temploglikelihoods <- NBpredicter( data, NBtrainedarray[,,i] , pcut = maxarray[i,1] ,
topnumber=maxarray[i,2])

  loglikelihoods[i] <- temploglikelihoods[i]
  meanll <- mean(temploglikelihoods[-i])
  sdll <- sd(temploglikelihoods[-i])
  NormScore[i] <- (temploglikelihoods[i] - meanll)/sdll
 }
 names <- colnames(data , do.NULL=FALSE)
 orden <- order( NormScore , decreasing=TRUE)
 Samples <-
data.frame(names[orden],NormScore[orden],loglikelihoods[orden],fac[orden] ,maxarray[orden
,])
 ROCdata <- myROC(NormScore,fac)
 SenSpe <- SensitivitySpecificity(NormScore,fac)

return(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p.value=ROCdata[2
],
            ,SenSpe <- SenSpe,samples=Samples))
}

ROCplot <- function(clasRes , sensspecnumber=6){
 Sensitivity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,1])
 Specificity <- as.numeric(clasRes[[sensspecnumber]][,2])
 OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
 ROCarea  <- round(clasRes$ROC,digits=2)
 plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
 title(paste("ROC area = ",ROCarea),font.main=1)
}
```

[0283]

```
ROCplotReverse <- function(clasRes){
 Sensitivity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,2]))
 Specificity <- rev(as.numeric(clasRes[[4]][,1]))
 OneMinusSpecificity <- 1- Specificity
 ROCarea  <- round(clasRes$ROC,digits=2)
 plot(OneMinusSpecificity , Sensitivity , type="l" , xlab="1-specificity" , ylab="sensitivity")
 title(paste("ROC area = ",ROCarea),font.main=1)
}
```

4. Example files of traindata, testdata and predictionsignature.

4.1 Train data. Table should be saved as a tab delimited .txt-file

Sample	sample1	sample2	sample3	sample4	sample5	sample6	sample7	sample8	sample9	sample10
Sample Class	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
predictor1	10	7	4	10	4	4	6	1	9	1
predictor2	5	9	2	6	2	9	3	5	4	10
predictor3	8	3	9	1	9	2	5	1	6	3
predictor4	4	8	7	7	5	6	8	2	2	3
predictor5	9	2	2	6	3	4	7	8	9	8
predictor6	5	4	7	10	4	2	1	9	1	10
predictor7	6	4	5	5	10	1	5	7	10	1
predictor8	5	4	1	10	1	6	2	6	8	4
predictor9	7	1	3	10	3	1	2	10	2	2
predictor10	10	8	2	8	2	6	3	4	6	10

[0284]

4.2 Test data. Table should be saved as a tab delimited .txt-file

Sample	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl	sampl
	e11	e12	e13	e14	e15	e16	e17	e18	e19	e20
Sample Class	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
predictor1	8	3	10	7	6	8	4	6	3	3
predictor2	6	4	8	9	5	9	7	5	3	9
predictor3	4	10	1	8	9	2	2	6	6	2
predictor4	5	9	10	10	8	4	4	9	4	1
predictor5	1	10	1	6	1	10	1	3	8	5
predictor6	6	4	1	3	2	5	9	9	10	10
predictor7	5	1	3	3	3	5	6	3	3	6
predictor8	8	2	2	7	2	2	10	4	10	10
predictor9	4	10	8	6	5	10	9	9	4	1
predictor10	3	4	8	3	2	3	8	10	7	1

4.3 Prediction signature. Table should be saved as a tab delimited .txt-file

predictor3
predictor5
predictor9

[0285]

[0286] 표 4. GRPS와 연관된 canonical pathways

Canonical Pathway	-log(p-값)	조절된 분자[1]
TREM1 신호전달	5.4	CASP1, CCL2, CCL3, **CD40**, **CD86**, FCGR2B, IL8, IL1B, MPO, **PLCG1**, SIGIRR, TLR1, **TLR6**
류마티스 관절염에서 변형된 T 세포 및 B 세포 신호전달	3.7	**CD40**, **CD86**, **CD79A**, FAS, FCER1G, HLA-DQA1, **HLA-DRA**, IL1B, IL1RN, PRTN3, SPP1, TLR1, **TLR6**
니코티네이트 및 니코틴아마이드 대사	3.6	CD38, CDK6, DFFB, ENPP2, **GRK5**, MAP2K1, MAPK6, NADK, **NAPRT1**, NNT, **PAK1**, PPM1F, **PTPRJ**, PTPRO, SGK1
적응면역세포와 내재면역세포 간 의사소통	2.9	CCL3, **CD40**, **CD86**, FCER1G, **HLA-DRA**, IFNA5, IL8, IL1B, IL1RN, TLR1, **TLR6**
B 세포 발달	2.9	**CD40**, **CD86**, **CD79A**, HLA-DQA1, **HLA-DRA**, **IL7R**
스핑고지질 대사	2.6	ASAH2, CERK, CERS6, FUT4, KDSR, NAAA, PPM1F, **PTPRJ**, PTPRO, **SPHK2**, SPTLC2
염색체 복제의 세포 주기 조절	2.6	CDK6, CDT1, MCM2, MCM4, MCM6, MCM7
리보플라빈 대사	2.6	ACPP, ENPP2, PPM1F, **PTPRJ**, PTPRO
글루타치온 대사	2.5	**G6PD**, **GGT5**, **GGTLC2**, GLRX, **GSTA3**, H6PD, IDH2, MGST1,
아릴 탄화수소 수용체 신호전달	2.4	AHR, ALDH1A1, CDK6, CDKN1A, CYP1B1, FAS, **GSTA3**, IL1B, JUN, MCM7, MGST1, NCOA3, **NQO1**, NQO2, RB1
이식편-대-숙주 방어 신호전달	2.3	**CD86**, FAS, FCER1G, HLA-DQA1, **HLA-DRA**, IL1B, IL1RN
수지상 세포 성숙	2.3	**CD40**, **CD86**, **CD1A**, CD1B, CD1C, CREB3L4, FCER1G, FCGR2A, FCGR2B, HLA-DQA1, **HLA-DRA**, IFNA5, IL1B, IL1RN, MAPK12, PIK3CD, **PLCG1**
T-보조 세포의 CD28 신호전달	2.3	**ACTR2**, CALM1, **CD86**, FCER1G, HLA-DQA1, **HLA-DRA**, JUN, MAP2K1, MAPK12, **PAK1**, PDPK1, PIK3CD, **PLCG1**
CD1 에 의한 지질 항원 제시	2.3	**CD1A**, CD1B, CD1C, FCER1G
표적 세포의 세포독성 T 세포 매개 아폽토시스	2.2	**BCL2**, **CASP8**, DFFB, FAS, FCER1G, HLA-DQA1, **HLA-DRA**
지방산 생합성	2.1	ACACA, FASN, **SLC27A3**
자가면역 갑상선 질환 신호전달	2.0	**CD40**, **CD86**, FAS, FCER1G, HLA-DQA1, **HLA-DRA**

[0287]

[0288]

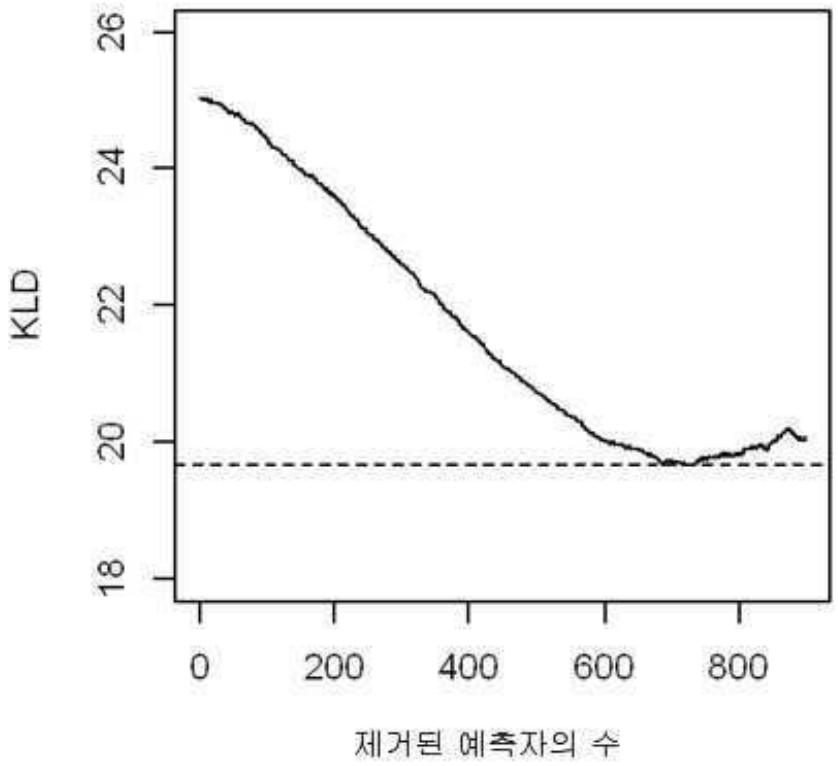
[0289] [1]굵게 표시된 분자는 GARD 호흡 예측 시그니처에 존재한다. 붉은 색의 분자는 상향

[0290] 표 4 범례. 상위(top) 1029개의 예측자(predictor)와 연관된 Top Canonical Pathway는 호흡기 화학적 감작제를

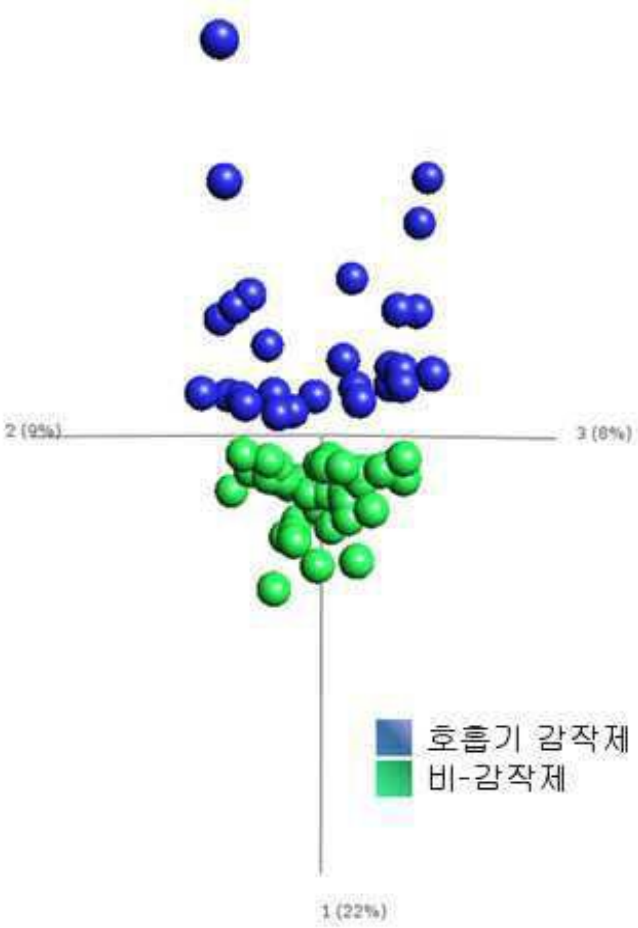
비-감작제로부터 분리할 수 있다. 굵게 표시된 분자는 GRPS에 존재한다. 붉은 색의 분자는 화학적 호흡기 감작제에서 상향 조절되고, 녹색의 분자는 화학적 호흡기 감작제에서 하향 조절된다.

도면

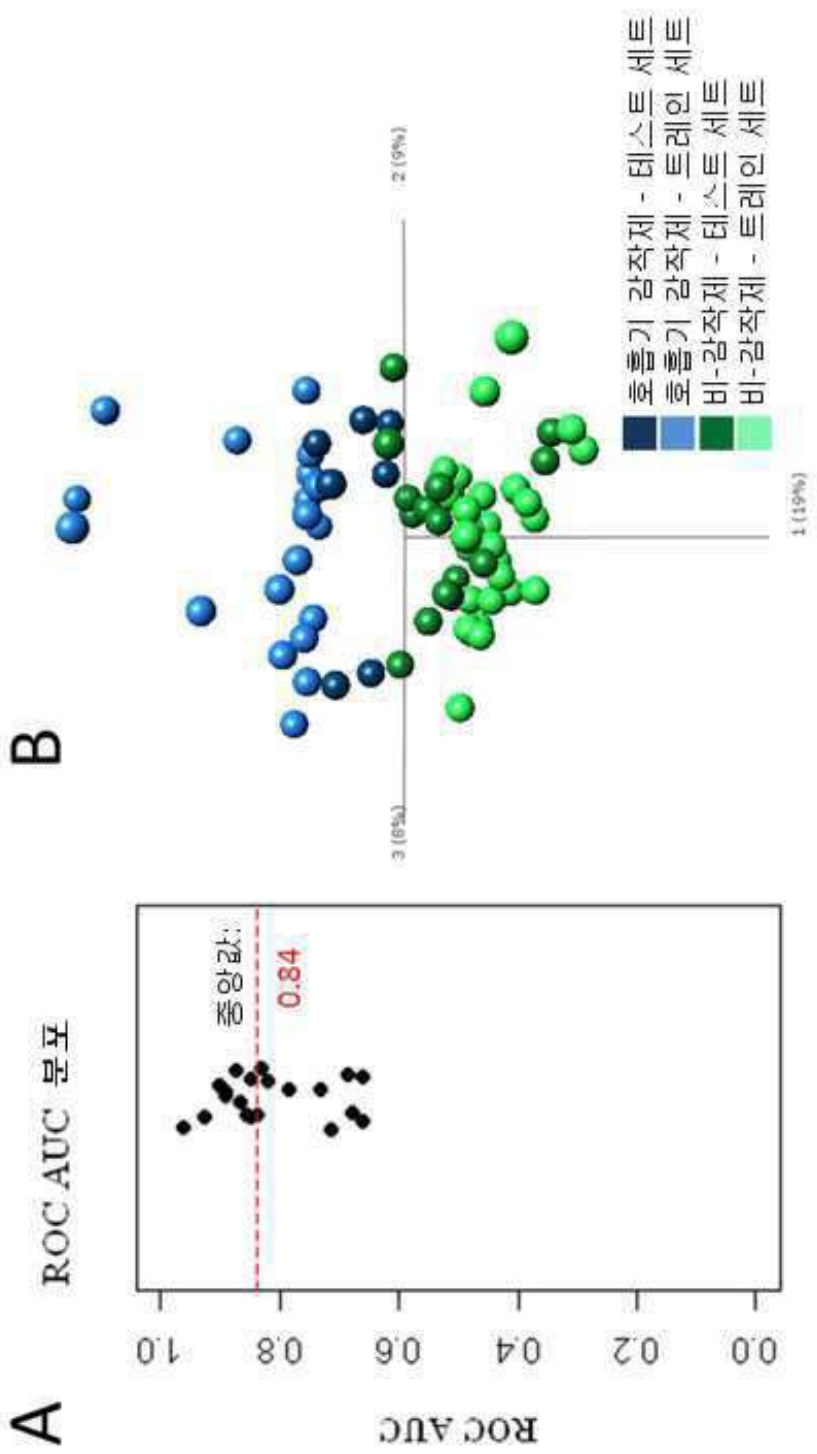
도면1



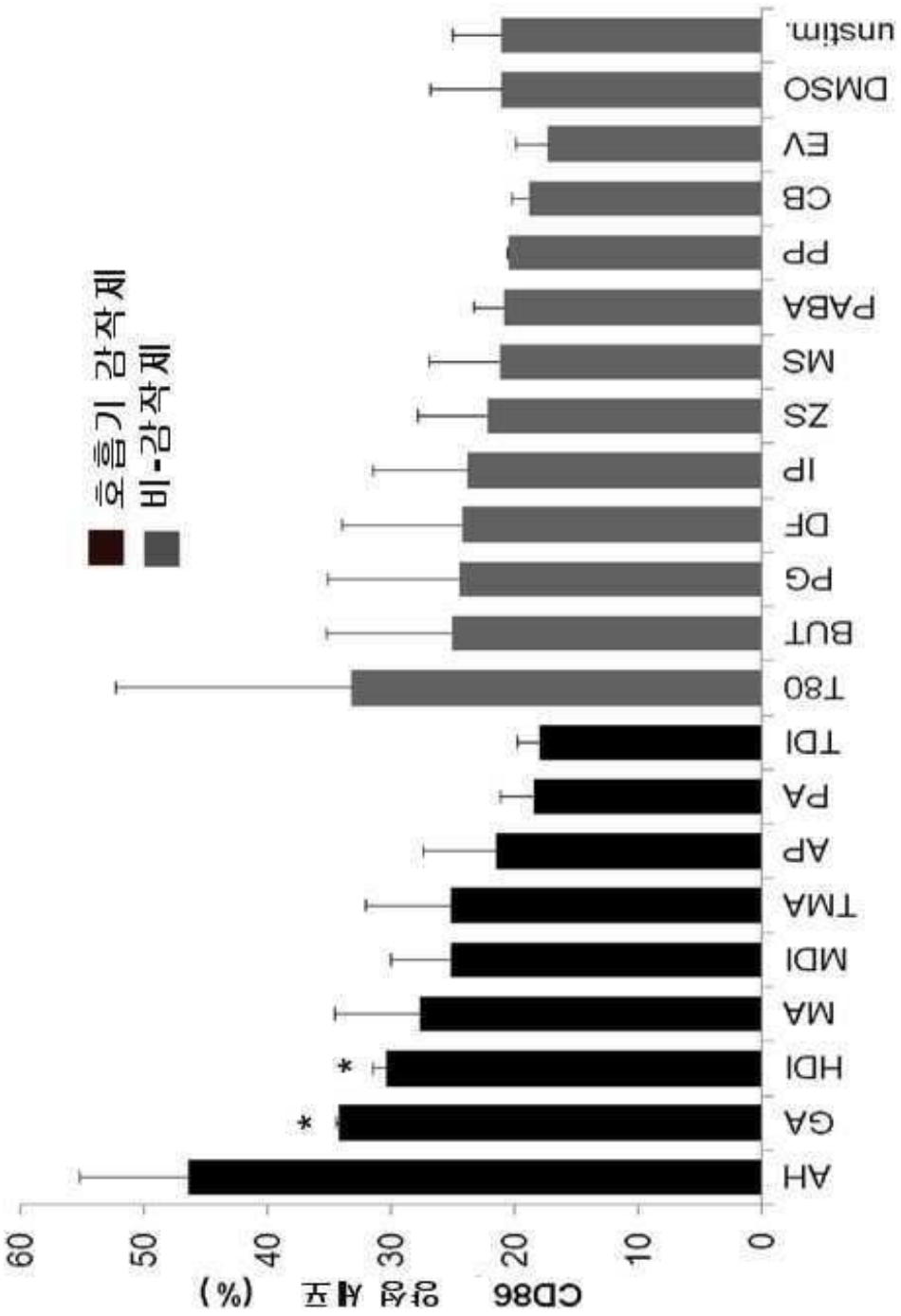
도면2



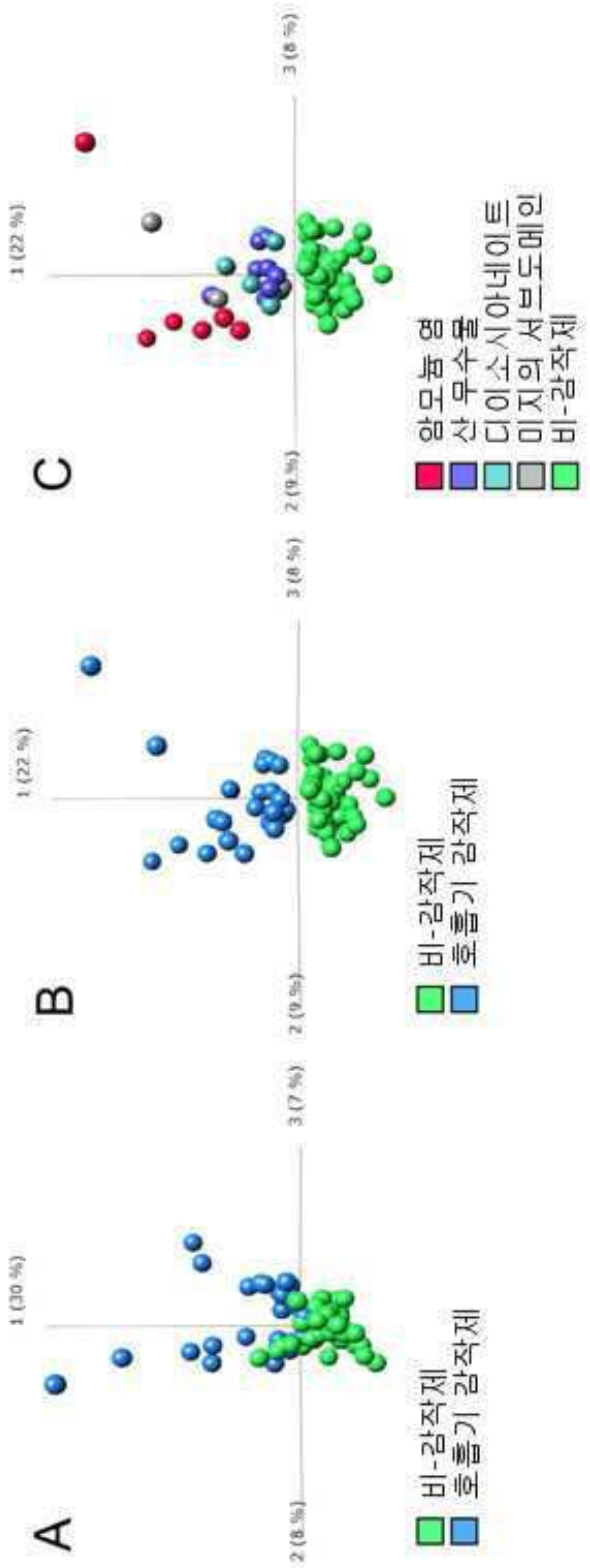
도면3


A
ROC AUC 분포
중앙값:
0.84
ROC AUC
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
B
2 (9%)
3 (6%)
1 (19%)
호흡기 감작제 - 테스트 세트
호흡기 감작제 - 트레인 세트
비-감작제 - 테스트 세트
비-감작제 - 트레인 세트

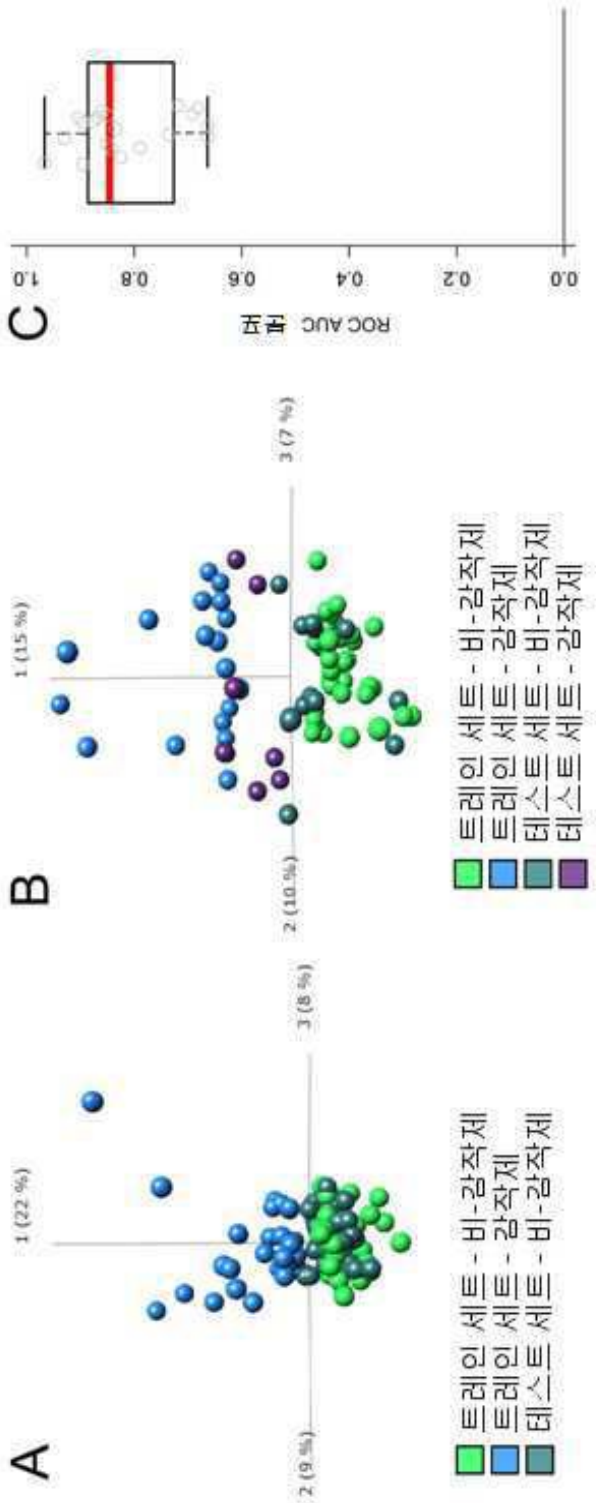
도면4


CD86 양성 세포 (%)
0
10
20
30
40
50
60
AH
GA
HDI
MA
MDI
TMA
AP
PA
TDI
T80
BUT
PG
DF
IP
ZS
MS
PABA
PP
CB
EV
DMSO
unstim.
비-감작제
호흡기 감작제
*
*

도면5


A
1 (30 %)
2 (8 %)
3 (7 %)
비-감작제
호흡기 감작제
B
1 (22 %)
2 (9 %)
3 (8 %)
비-감작제
호흡기 감작제
C
1 (22 %)
2 (9 %)
3 (8 %)
암모늄 염
산 무수물
디이소시아네이트
미지의 서브도메인
비-감작제

도면6


A
1 (22 %)
2 (9 %)
3 (8 %)
트레인 세트 - 비-감작제
트레인 세트 - 감작제
테스트 세트 - 비-감작제
B
1 (15 %)
2 (10 %)
3 (7 %)
트레인 세트 - 비-감작제
트레인 세트 - 감작제
테스트 세트 - 비-감작제
테스트 세트 - 감작제
C
ROC AUC 분포
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0