



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113407  
(43) 공개일자 2024년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)  
G01N 33/558 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 33/57423 (2019.01)  
C12Q 1/6886 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0005188  
(22) 출원일자 2024년01월12일  
심사청구일자 2024년01월12일
- (30) 우선권주장  
1020230005610 2023년01월13일 대한민국(KR)
- (71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자  
김현우  
서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8, A동 402호 (반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)
- 최병현  
서울특별시 구로구 구로동로 148, 연구동 2층 흉부외과 연구실 (구로동, 고려대부속구로병원)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 무한

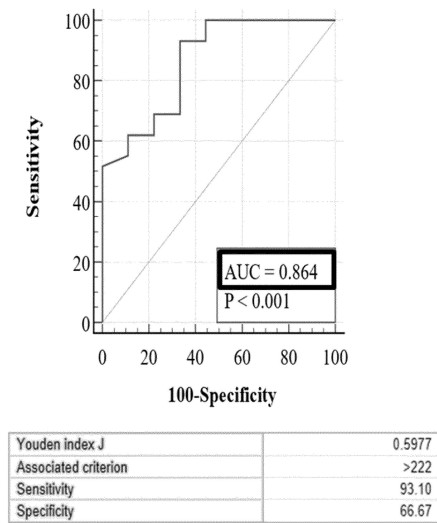
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 엑소솜을 이용한 편평상피세포 폐암 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 PBLD과발현 엑소솜을 포함하는 편평상피세포 폐암의 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면, 편평상피세포 폐암 서브타입을 비침습적이고 신속하며 정확하게 진단이 가능하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**G01N 33/558** (2021.08)

**G01N 33/6848** (2013.01)

**C12Q 2600/118** (2013.01)

**C12Q 2600/158** (2013.01)

(72) 발명자

**전옥화**

서울특별시 구로구 구로동로 148, 신관 6층 6277호  
홍부외과 의국 (구로동, 고려대부속구로병원)

**노지윤**

서울특별시 양천구 목동동로 100, 1329동 701호 (신정동, 목동신시가시아파트13단지)

**김경수**

서울특별시 은평구 가좌로7나길 30, 102동 902호  
(응암동, 응암우성아파트)

**김창근**

서울특별시 강서구 남부순환로11길 44, 403호 (공향동, 위하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345349127

과제번호 2021R111A1A01052142

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축

연구과제명 비소세포폐암 특이적 엑소좀 단백질 마커 발굴을 통한 종양 기전 규명

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711159574

과제번호 2021M3H4A4079630

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 나노소재기술개발

연구과제명 나노 입자 프린팅 기술을 이용한 고감도 다중 바이오마커 검출 및 기계학습을 통한 pattern 분석 기반의 폐암 진단 기술개발

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.02.01 ~ 2023.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711138151

과제번호 KMDF\_PR\_20200901\_0094-02

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 (재단)범부처전주기의료기기연구개발사업단

연구사업명 범부처전주기의료기기연구개발사업(R&D)(과기정통부, 복지부, 산업부)

연구과제명 (참여1)인공지능 기반 혈액 내 엑소좀 분석 폐암 진단 기기 제품화

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

PBLD(Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein, UniProt accession No. P30039) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 엑소솜을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물.

#### 청구항 2

엑소솜 내의 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머인, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

#### 청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

#### 청구항 5

- a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소솜을 추출하는 단계;
- b) 상기 추출된 엑소솜에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 방법은

- c) 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소솜을 추출하는 단계;
- d) 상기 엑소솜에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- e) 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함하는 것인, 정보제공방법.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 대상체의 상기 PBLD단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 편평상피세포 폐암이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것인, 정보제공방법.

## 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 대상체의 상기 PBLD단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 나쁜 예후를 갖는 것으로 예측하는 것인, 정보제공방법.

## 청구항 9

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단용 키트.

## 청구항 10

- a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;
- b) 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에서 엑소좀을 추출하는 단계; 및
- c) 상기 추출된 엑소좀에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 편평상피세포 폐암 치료제의 스크리닝 방법.

## 청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 상기 단계 이후에,

- d) 후보물질이 처리되지 않은 대조군 시료와 비교하여 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소된 후보물질을 선별하는 단계; 를 더 포함하는 것인, 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 엑소좀을 이용한 편평상피세포 폐암 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 편평상피세포 폐암은 편평세포에서 기원한 폐암으로 기관지 점막을 구성하는 편평상피세포에서 기원한 비소세포(non-small cell) 암의 일종이다. 편평상피는 납작한 모양을 가진 상피이며, 상피란 몸 바깥 표면의 세포층과, 체강(체벽과 내장 사이의 공간) 및 위장관의 내부 표면을 싸고 있는 세포층을 말한다. 편평상피세포암은 주로 폐 중심부에서 발견되며, 남자에게 흔하고 흡연과 관련성이 높으며, 기관지가 부분적으로 막히기 때문에 기침, 객혈, 쌕쌕거림 등의 증상이 나타나는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 암 진단의 표준 방법은 조직 생검으로, 저선량 흉부 CT를 통해 이상 병변이 확인되면, 흉강경 또는 PET/CT 촬영 하에 바늘 등의 도구를 이용해 검사에 사용할 조직을 얻게 되는데, 이러한 침습적 조직 검사는 환자의 통증을 유발하며, 생검 과정 중 출혈 등의 문제가 발생할 수 있다. 또한 저선량 흉부 CT의 위양성에 대한 문제도 존재하는데, 미국의 NSLT (National Lung Screen Trial)에서 보고한 위양성률은 26.8%, 우리나라에서 보고되는 위양성률은 약 14.8%이어서 적지 않은 수의 위양성률이 보고되고 있다.

[0005] 또한, 높은 검사 비용과 방사선 피폭 등의 문제점으로 반복적인 추적 검사가 어려울 뿐 아니라 환자의 상태에 따라 조직 생검을 시행할 수 없는 경우가 발생할 수 있다. 조직 검사의 또 다른 문제점으로는 종양 조직간 혹은 종양 조직 내 생물학적 특성이 다른 이질성의 문제로 일부 조직에서 얻은 정보가 적절한 치료와 수술 계획을 수

립하는데 불충분할 수 있다.

- [0006] 암을 포함한 여러 질병들에 대한 조기 진단 필요성이 대두되면서 전통적인 조직 채취 기반의 조직 생검과, 조직 염색과 같은 이미징 기반 진단방법에서 바이오마커를 이용하는 액체 생검 (liquid biopsy)로 연구의 흐름이 바뀌고 있으며, 이러한 추세에서 DNA, RNA, 대사 물질, 단백질 및 단백질 조각 등에서 유래하는 분자생물학적 표지인 바이오마커 관련 연구가 활발히 이루어지고 있다.
- [0007] 다만, 폐암 진단에 사용되는 바이오마커는 현재 특별히 현저한 효과 있는 것이 보고된 바가 없고, 다른 암종에서 기원한 암 표지자 중 폐암에서 진단 유의성이 증가되는 것으로 발표된 몇몇 암 표지자 (CEA, SCC-Ag 등)을 폐암에 적용하여 사용하고는 있으나, 진단 민감도가 매우 낮아 임상에서 널리 사용하고 있지 않다.
- [0008] 따라서, 본 발명자들은 폐암 중 편평상피세포 폐암 서브타입에 특이적으로, 비침습성이며 고감도 및 고특이성으로 암을 조기에 진단할 수 있는 신규한 바이오마커를 발명으로 완성하여 제공하고자 한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 PBLD(Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein, UniProt accession No. P30039) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 엑소솜을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 엑소솜 내의 PBLD 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 PBLD(Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein, UniProt accession No. P30039) 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 엑소솜을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 엑소솜 내의 PBLD 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물이 제공된다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0019] a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소솜을 추출하는 단계;
- [0020] b) 상기 추출된 엑소솜에서 PBLD 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법이 제공된다.
- [0021] 일 측에 따르면,
- [0022] c) 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소솜을 추출하는 단계;
- [0023] d) 상기 엑소솜에서 PBLD 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0024] e) 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함할 수 있다.

- [0025] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 PBLD단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 편평상피세포 폐암이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0026] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 PBLD단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 나쁜 예후를 갖는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 진단용 조성물 중 어느 하나의 조성물을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단용 키트가 제공된다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면,
- [0029] a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0030] b) 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에서 엑소좀을 추출하는 단계; 및
- [0031] c) 상기 추출된 엑소좀에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 편평상피세포 폐암 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0032] 일 측에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 상기 단계 이후에,
- [0033] d) 후보물질이 처리되지 않은 대조군 시료와 비교하여 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소된 후보물질을 선별하는 단계; 를 더 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0035] 본 발명에 따르면 폐암 중 편평상피세포 폐암 서브타입에 특이적으로, 비침습성이며 고감도 및 고특이성으로 암을 조기에 진단하거나 예후를 예측할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 아니한 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 본 발명에서의 단백질분석 워크플로우를 나타낸다.
- 도 2는 대조군과 편평세포폐암군의 단백질 발현 양의 차이를 volcano plot으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 정상군과 편평상피세포 환자군의 혈액에서 엑소좀을 추출하여 PBLD ELISA assay를 한 결과이다.
- 도 4는 엑소좀 PBLD를 이용한 ROC 분석결과를 나타낸다.
- 도 5는 폐 선암 및 폐 편평상피세포암 환자의 혈액에서 엑소좀 PBLD ELISA를 수행한 결과이다.
- 도 6은 폐 선암 및 폐 편평상피세포암에 대한 ROC 및 AUC 분석결과이다.
- 도 7은 편평상피세포폐암 환자의 혈액에서 엑소좀을 추출하여 무재발생존곡선을 확인한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 본 발명자들은 편평상피세포 폐암 환자군으로부터 엑소좀을 채취하고, 이에 대한 단백질 분석을 수행하여 대조군 대비 편평상피세포 폐암 환자군에서 유의하게 높게 발현되는 PBLD 단백질을 확인하고 이를 바이오마커 및 편평상피세포 폐암 진단 또는 예후 예측용 조성물 발명으로 완성하여 제공하고자 한다.
- [0040] 본 발명자들은 PBLD(Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein, UniProt accession No. P30039) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 엑소좀을 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 용어 "PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 과발현하는 엑소좀"은 정상인으로부터

분리된 엑소좀의 PBLD 발현량 또는 소정의 컷오프 값과 비교하여 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 높은 수준으로 발현하는 엑소좀을 의미한다.

- [0042] 엑소좀(exosome)은 대부분의 세포에서 분비되는 나노 크기(30~150nm)의 작은 소포체이다. 엑소좀 내부 및 인지질 이중층막에는 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA), 지질 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 조직 유래의 엑소좀은 이를 분비한 조직의 상태를 반영하기 때문에, 질병의 진단에 이용될 수 있음이 보고된 바 있다.
- [0043] 이에 본 발명자들은 편평상피세포 폐암 유래 엑소좀에서 특이적으로 발현하는 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용하는 경우 정확하고 신속하게 암을 진단하거나 예후를 예측할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0044] 본 명세서에서 '진단'은 질병 발생의 예측 및 발병 위험도 (risk) 또는 발병 감수성(susceptibility)를 결정하거나 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.
- [0045] 본 발명의 목적상, 상기 진단은 편평상피세포 폐암의 진단을 의미한다. 본 발명에서의 "편평상피세포 폐암 (squamous cell lung cancer)"은 편평세포에서 기원한 폐암이며, 기관지 점막을 구성하는 편평상피세포에서 기원한 비소세포(non-small cell) 암의 일종을 의미한다.
- [0046] 본 발명에서 용어, '진단용 (바이오) 마커, 진단하기 위한 (바이오) 마커 또는 진단 마커'는 편평상피세포 폐암을 정상대조군과 구분하여 진단할 수 있는 것으로, 정상 세포에 비하여 편평상피세포 폐암을 가진 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등의 수준을 정상 세포와 구분할 수 있거나 그 수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하는 마커 또는 이에 포함되는 조성물을 의미한다.
- [0047] 본 발명에서 용어 "예후"는 편평상피세포 폐암의 치료 후 해당 개체의 재발, 전이, 약물 반응성, 내성 여부를 판단하는 것을 의미한다. 이는 개체의 치료로부터 분리된 엑소좀 내 PBLD의 발현 수준을 측정함으로써 해당 개체의 편평상피세포 폐암의 발병 여부뿐만 아니라, 향후 해당 개체의 생존 예후가 좋은지 여부에 대해서 예측하는 개념까지 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 엑소좀 내의 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측용 조성물이 제공된다.
- [0049] 본 명세서에서의 용어 "발현 수준을 측정"은 특정 단백질(펩타이드) 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 존재 여부, 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것으로서, 구체적으로 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.
- [0050] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서의 용어 "항체 (antibody)"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 예를 들어 상기 항체는 PBLD 단백질 또는 이의 단편에 대해 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 단편은 상기 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프 (epitope)를 가지고 있는 단백질 단편을 의미하며, 예를 들어 면역원성 단편일 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 재조합 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0052] 이러한 항체들을 이용하여 당해 기술분야에 공지된 효소 면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역 측정법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법 (sandwich assay), 폴리아크릴 겔상의 웨스턴 블롯팅 또는 면역 블롯팅 등의 방법에 의해 생물학적 샘플 중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인할 수 있다.
- [0053] 본 명세서에서의 용어 "항체 단편"은 온전한 항체, 펩티드 또는 단백질의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 또는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 단편은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 또는 Fv일 수 있다. 상기 결합 단편은 최소한 7개 이상의 아미노산, 예를 들면 9 개 이상의 아미노산, 12개 이상의 아미노산을 포함

할 수 있다.

[0054] 상기 단백질을 검출하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역분석(Immunoassay), 면역화학염색분석(Immunohistochemistry Assay), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다. 분석방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 이용한 방식이 사용될 수 있다.

[0056] 본 명세서에서의 용어 "프라이머(primer)"는 자유 3-말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 특정 염기 서열에 대해 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어 PBLD 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 편평상피세포 폐암 발병 여부 등을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0057] 본 명세서에서의 용어 "프로브(probe)"는 표적 핵산 예를 들면, mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 mRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 라벨링 (labeling)되어 있을 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들어 PBLD 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 편평상피세포 폐암 발병 여부 등을 진단할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0058] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 또는 바이오틴을 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 키트가 제공된다.

[0061] 예를 들어, 편평상피세포 폐암이 발생이 예상되거나 의심되는 조직을 포함하는 검체로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서 엑소솜을 추출하여 PBLD 단백질 검출 제제를 포함하는 조성물을 활용해 엑소솜 내의 해당 단백질의 발현 정도를 확인하여 편평상피세포 폐암 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 상기 키트는 면역분석키트 (Immunoassay)일 수 있다.

- [0062] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 편평상피세포 폐암 진단용 키트는 PBLD 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함하여 편평상피세포 폐암 진단에 활용되는 정보를 제공한다. 예를 들어, 편평상피세포 폐암이 발생이 예상되거나 의심되는 조직을 포함하는 검체로부터 생물학적 시료를 획득하고, 여기서 엑소좀을 추출한 PBLD 단백질을 암호화하는 핵산을 추출하고 이를 검출하는 제제를 포함하는 조성물을 활용해 시료 내의 해당 단백질을 암호화하는 핵산의 발현 정도(mRNA를 역전사한 시료를 활용하는 경우에는 cDNA와 cDNA를 검출하는 제제를 적용함)를 확인하여 편평상피세포 폐암 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 상기 키트는 DNA 칩일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소좀을 추출하는 단계;
- [0064] b) 상기 추출된 엑소좀에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 편평상피세포 폐암의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법이 제공된다.
- [0065] 본 명세서에서의 용어 "대상체"는 편평상피세포 폐암이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 개, 고양이, 마우스, 래트, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등의 포유동물을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 명세서에서의 용어 "시료"는 상기 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 폐조직생검, 비인두도말, 객담, 및 타액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 일 측에 따르면,
- [0068] c) 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터 엑소좀을 추출하는 단계;
- [0069] d) 상기 엑소좀에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0070] e) 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함할 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서의 용어 "대조군"은 편평상피세포 폐암이 발병되지 않은 일반 개체, 비-편평상피세포 폐암 환자군, 비환자군 등을 의미하는 것일 수 있다.
- [0072] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 편평상피세포 폐암이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 단백질의 발현수준이 상기 대조군에 비하여 1.6배이상 높은 경우, 상기 대상체를 편평상피세포 폐암이 발병한 것으로 판정하거나 발병위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0073] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 PBLD단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 나쁜 예후를 갖는 것으로 예측하는 것일 수 있다. 상기 나쁜 예후란 무재발 생존기간이 상대적으로 짧은 것일 수 있다.
- [0074] 상기 유전자의 발현수준은 대조군에 대비한 것일 수 있으나, 다른 측면으로는 엑소좀 pblD 농도 90pg/ml를 기준으로 하여 이보다 높은 경우 발현 수준이 높은 것으로, 이보다 낮은 경우 발현 수준이 낮은 것으로 판정할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면,
- [0077] a) 대상체로부터 분리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0078] b) 상기 후보물질이 처리된 생물학적 시료, 세포주 또는 인간을 제외한 동물모델에서 엑소좀을 추출하는 단계; 및
- [0079] c) 상기 추출된 엑소좀에서 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 를 포함하는, 편평상피세포 폐암 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0080] 상기 "대상체"는 본 명세서에 이전에 기술한 바와 같은 의미를 가진다. 상기 "시료"는 본 명세서에서 이전에 기술한 바와 같으나, 바람직하게는 조직생검시료일 수 있다.
- [0081] 상기 "세포주"는 바람직하게는 편평상피세포 폐암세포주일 수 있다.

- [0082] 상기 “동물모델”은 바람직하게는 편평상피세포 폐암 동물모델일 수 있다.
- [0083] 상기 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현수준의 측정은 본 명세서에서 이전에 기술한 바와 같이 이루어질 수 있다.
- [0084] 일 측에 따르면, 상기 스크리닝 방법은 상기 단계 이후에,
- [0085] d) 후보물질이 처리되지 않은 대조군 시료와 비교하여 PBLD 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소된 후보물질을 선별하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0087] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0088] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0089] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0091] **실시예 1. 시료의 수집**
- [0092] 실시예 1-1. 세포 배양액
- [0093] 본 발명에 사용된 세포주는 HPAepiC, BEAS-2B, HSAEC1-KT, H1703, H2170 및 SW900으로 150mm 세포 배양 접시에  $10^6$  개를 분주한 후 36도 인큐베이터에서 세포 배양접시의 약 70 ~ 80%까지 성장시켰다. 이후 엑소좀이 제거된 FBS가 포함된 세포 배양액으로 48시간 배양된 배양액을 확보하여 1,500 rpm, 5분의 원심분리를 통해 세포 잔여물을 제거한 후 3,000 rpm, 30분의 원심분리를 통해 상등액만 회수하여 -80℃의 초저온 냉동고에 엑소좀 추출 시까지 보관하였다.
- [0095] 실시예 1-2. 혈액시료
- [0096] EDTA, SST 튜브에 채혈된 전혈 검체는 3,000 rpm, 30분 및 4℃의 조건으로 원심분리하여 혈장이나 혈청을 회수한 후 -80℃의 초저온 냉동고에 엑소좀 추출 시까지 보관하였다.
- [0098] **실시예 2. 시료로부터 엑소좀의 추출**
- [0099] 세포 배양액에서 엑소좀 추출을 위해 200ml의 배양액을 100KDa Amicon Ultra 50ml Filter tube를 이용하여 5,000 rcf, 15분 동안 원심분리하여 농축시킨 0.5ml의 농축액을 크기 배제 크로마토그래피 컬럼에 넣은 후 PBS를 부어주어 6-9 분획(1분획 당 0.5ml, 총 2ml)의 엑소좀 농축액을 확보하여 사용하였다.
- [0100] 혈장 유래 엑소좀 추출을 위해 -80℃ 초저온 냉동고에 보관한 혈장을 10,000 rcf, 30분, 4도 조건으로 원심분리하여 침전물을 제거한 후 0.5ml의 혈장을 크기 배제 크로마토그래피 컬럼에 넣은 후 PBS를 부어주어 11-12 분획

(1분획 당 0.5ml, 총 2ml)의 엑소좀 농축액을 확보하여 사용하였다.

### [0102] 실시예 3. 단백질 분석

[0103] 편평상피세포 폐암 세포주 유래 엑소좀 단백질 표지자 발굴을 위하여, 정상 폐 세포 3종과 편평상피세포 3종에서 엑소좀을 추출하여 단백질 분석을 실시하였다. 단백질 분석을 위해 사용된 엑소좀 단백질의 농도는 하기 표 1과 같았다.

표 1

| 세포주                | 정상 폐 세포 1 | 정상 폐 세포 2 | 정상 폐 세포 3 | 편평상피세포 폐암 세포 1 | 편평상피세포 폐암 세포 2 | 편평상피세포 폐암 세포 3 |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| exosome 농도 (mg/ml) | 1.9       | 1.9       | 2.6       | 2.1            | 1.9            | 2              |

[0105] 상기 단백질 분석을 위한 엑소좀 단백질 중 LC-MS 분석을 위해 필요한 peptide 농도는 tryptophan based fluorescence assay 방법으로 측정하였으며, 그 농도는 하기 표 2에 표시한 바와 같았다.

표 2

| Exosome sample type | Peptide 농도 (ug/uL) | Total peptide amount (ug) for TMT labeling |
|---------------------|--------------------|--------------------------------------------|
| 정상 폐 세포 1           | 0.4346             | 30                                         |
| 정상 폐 세포 2           | 0.3587             | 30                                         |
| 정상 폐 세포 3           | 0.2246             | 30                                         |
| 편평상피세포 폐암 세포 1      | 0.3328             | 30                                         |
| 편평상피세포 폐암 세포 2      | 0.3810             | 30                                         |
| 편평상피세포 폐암 세포 3      | 0.3625             | 30                                         |

[0107] 단백질 분석은 다음과 같이 수행하였다. 편평상피세포 폐암 세포주 유래 엑소좀 샘플 중 200ug에 해당하는 부피를 취하여 완전히 말린 후 2% SDS에 녹인 뒤 FASP 방법으로 단백질 전처리를 진행하였다. 단백질 다이제스티온이 끝난 각 펩타이드 샘플에 Tandem Mass Tag (TMT 6 plex)시약을 라벨링하여 합한 후 24개의 펩티드 분획으로 나눈 뒤 24개의 분획으로 NanoLC-MS 분석을 진행하였다. 상기 과정의 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0108] 분석 결과, 대조군과 편평세포폐암군의 단백질 발현 양의 차이를 부기 위해 t-test를 진행하여 p-value < 0.05, fold change > 1.2배 이상 기준을 모두 만족하는 단백질들을 정리하여 volcano plot으로 정리하여 이를 도 2에 나타내었다. 그 결과 62개의 단백질들이 편평세포폐암군에서 상향조절(upregulated)되어 있으며, 대조군에서는 34개의 단백질이 상향조절되어 있음이 확인되었다. 이들 중 PBLD(Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein, UniProt accession No. P30039)를 편평세포폐암 특이적인 엑소좀 마커로 확인하였다.

### [0110] 실시예 4. PBLD를 이용한 진단의 유용성 평가

[0111] 엑소좀 PBLD를 이용한 편평상피세포 폐암 환자의 진단 유용성을 평가하기 위하여, 정상군 9명, 편평상피세포폐암 환자 29명의 혈액에서 엑소좀을 추출하여 PBLD ELISA assay를 수행하였으며 이를 도 3에 나타내었다. ELISA 분석 결과, 정상군 보다 편평상피세포폐암 환자군에서 PBLD 농도는 1.6배 (p = 0.0013)배 증가되어 있음을 확인하였으며, 병리학적 병기(pathological stage)가 증가함에 따라 농도가 증가하는 것이 확인되었다.

[0112] 엑소좀 PBLD를 이용한 ROC 분석결과를 도 4에 나타내었으며, AUC 값은 0.864, 민감도는 93.1%, 특이도 66.7%로 확인되었다.

### [0114] 실시예 5. PBLD를 이용한 폐 선암과 폐 편평상피세포암의 진단 비교 평가

[0115] 엑소좀 PBLD를 이용하여 폐 선암 환자 및 폐 편평상피세포암의 진단 유용성을 평가하기 위하여, 정상군 10명, 폐 선암 15명, 폐 편평상피세포암 환자 15명의 혈액에서 엑소좀 PBLD ELISA를 수행하였으며, 이를 도 5에 나타

내었다. ELISA 분석 결과, 정상군 보다 폐 선암 환자군에서 정상군의 농도대비 1.4배( $p = 0.2164$ ) 증가되었으나, 폐 편평상피세포암 환자에서는 2.2배( $p = 0.0115$ ) 증가되어 있음을 확인하였다.

[0116] ROC 분석 결과를 도 6에 나타내었으며, 폐 선암의 엑소좀 PBLD AUC는 0.65 ( $p = 0.2020$ )이나 폐 편평상피세포암에서의 AUC는 0.80 ( $p = 0.126$ )으로 폐 편평상피세포암의 진단에 더욱 유의성이 있음을 확인하였다.

[0118] 실시예 6. PBLD를 이용한 폐 편평상피세포 폐암의 예후 평가

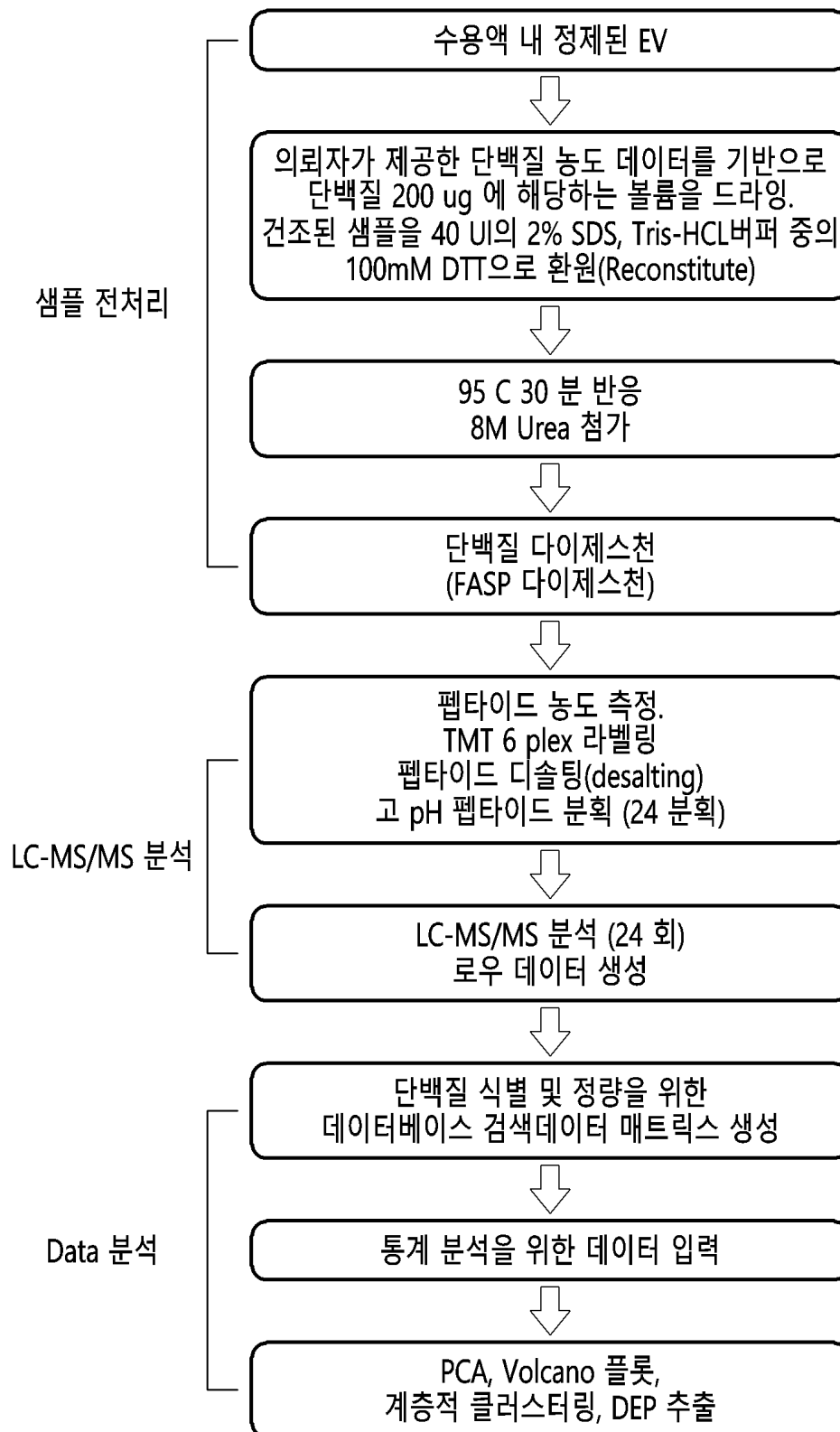
[0119] 엑소좀 PBLD를 이용한 편평상피세포 폐암 환자의 예후를 평가하기 위하여, 편평상피세포폐암 환자 18명의 혈액에서 엑소좀을 추출하여 PBLD ELISA assay를 수행한 후 카플란-마이어 생존 분석을 통해 무재발생존곡선을 도 7에 나타내었다. 무재발생존 분석 결과 엑소좀 PBLD의 농도가 높은 환자군의 무재발 생존 기간은 약 10개월로 농도가 낮은 환자군 (약 57개월) 보다 유의한 차이 ( $p = 0.048$ )가 있음이 확인되었다.

[0121] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

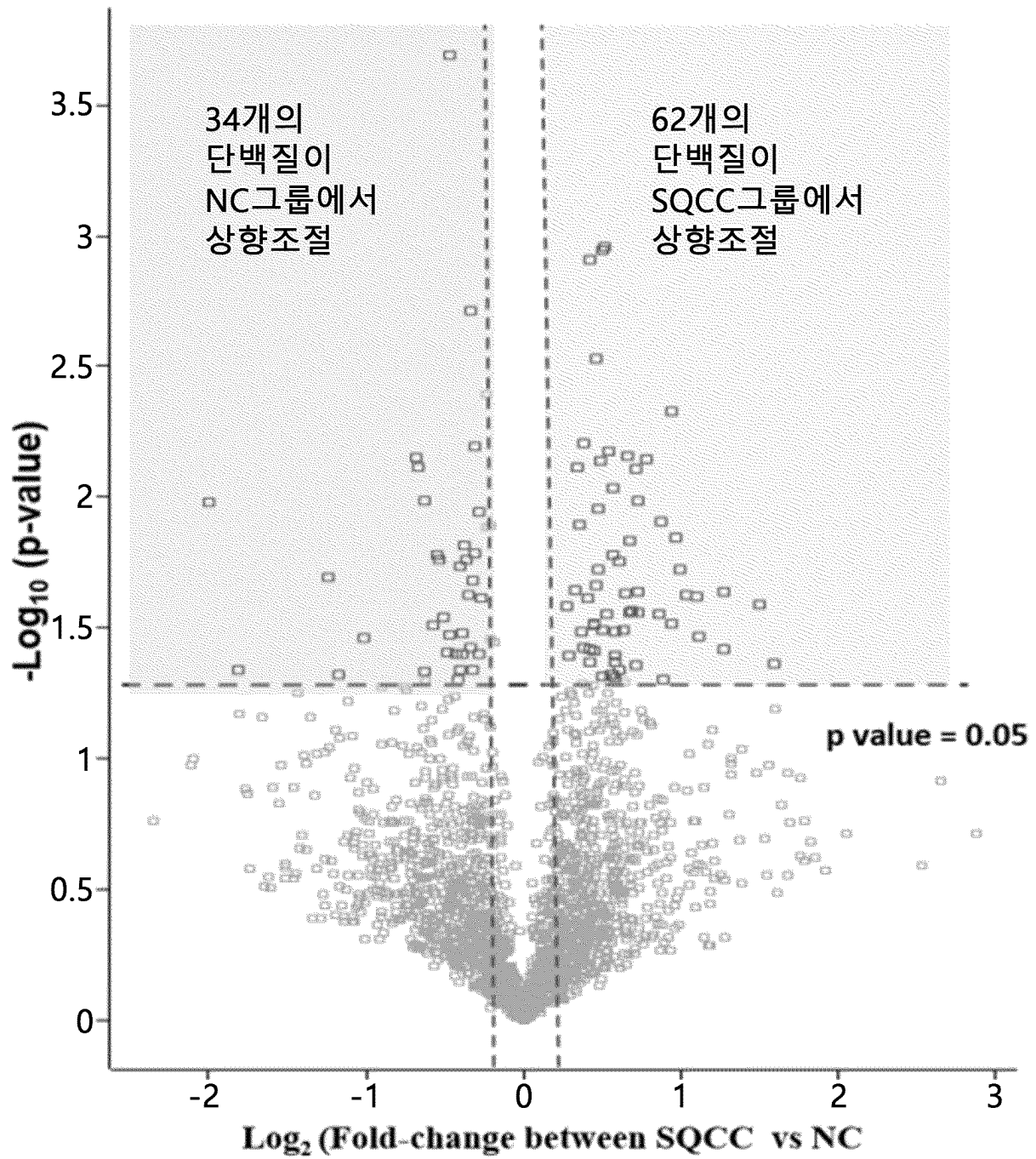
[0122] 그러므로, 다른 구현들, 다른 제조예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

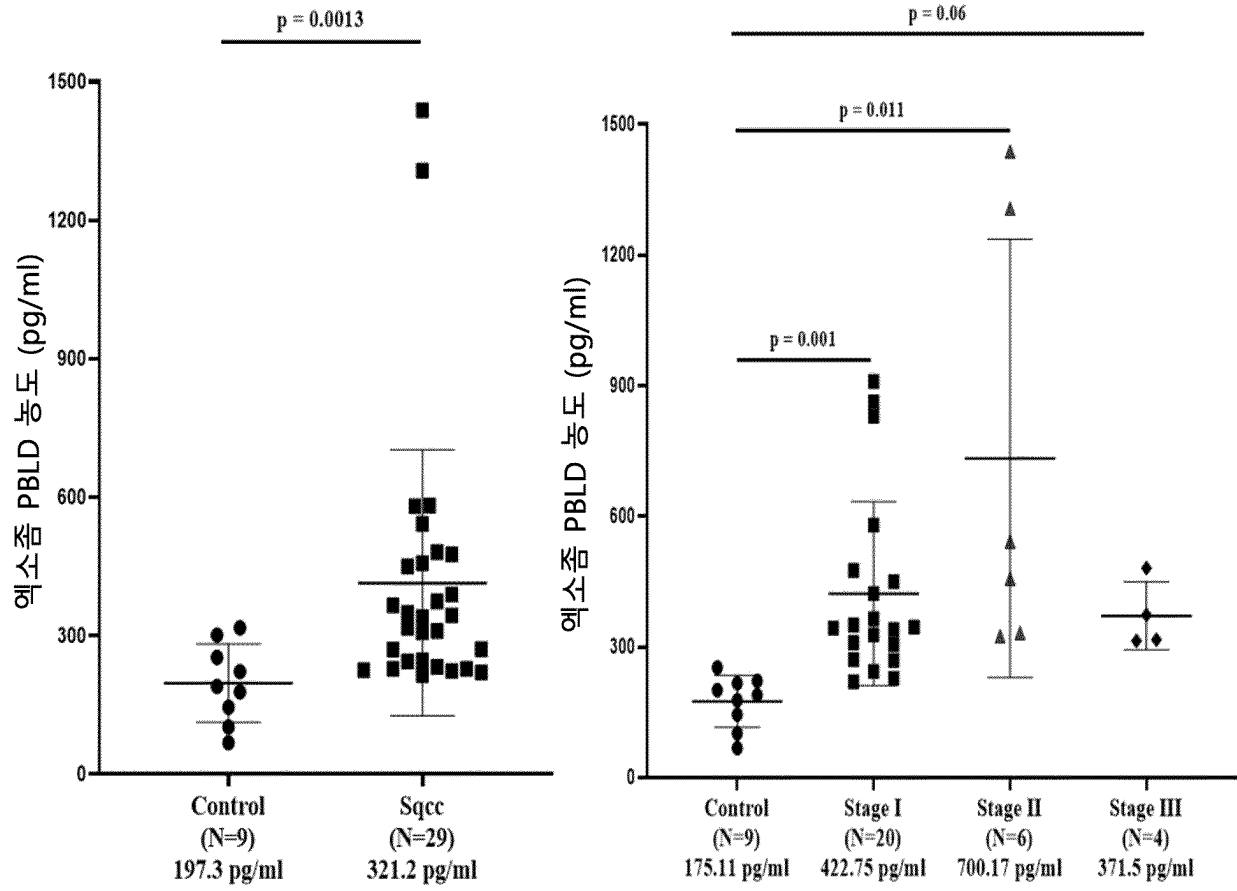
도면1



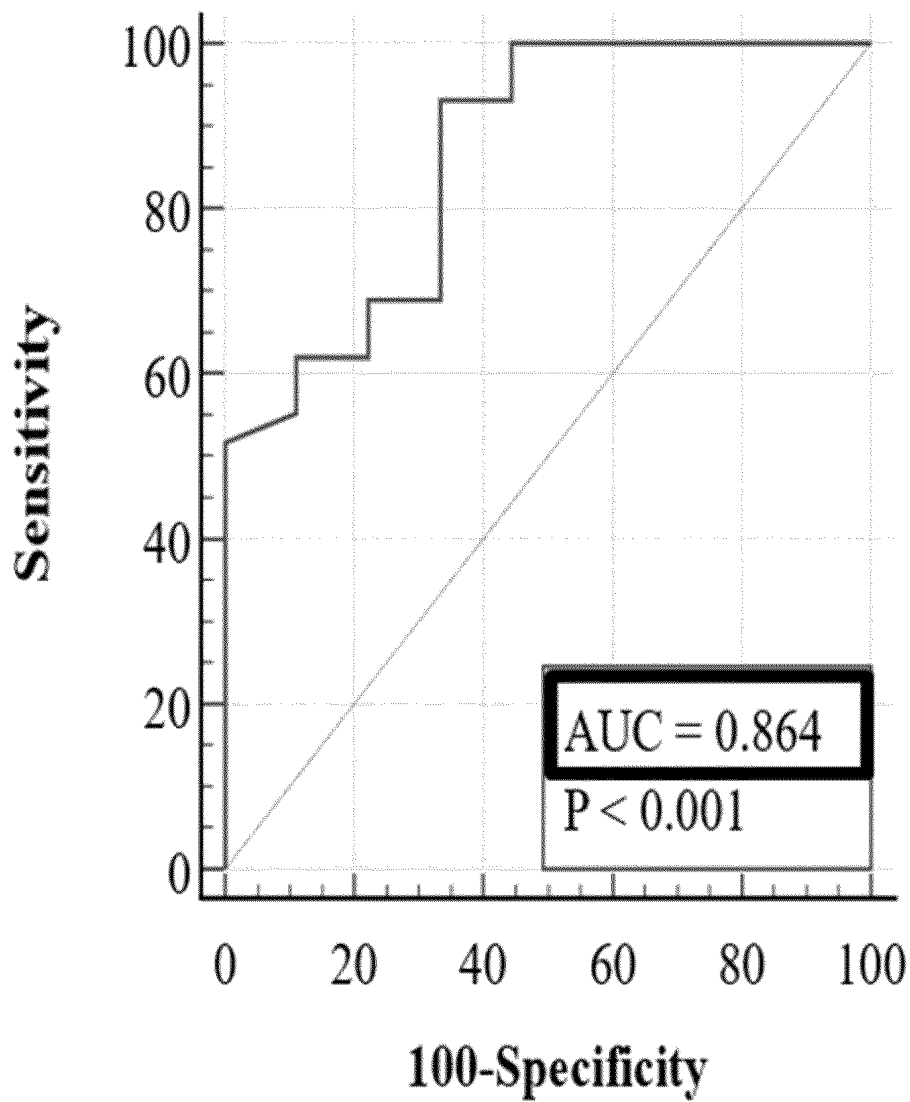
도면2



도면3

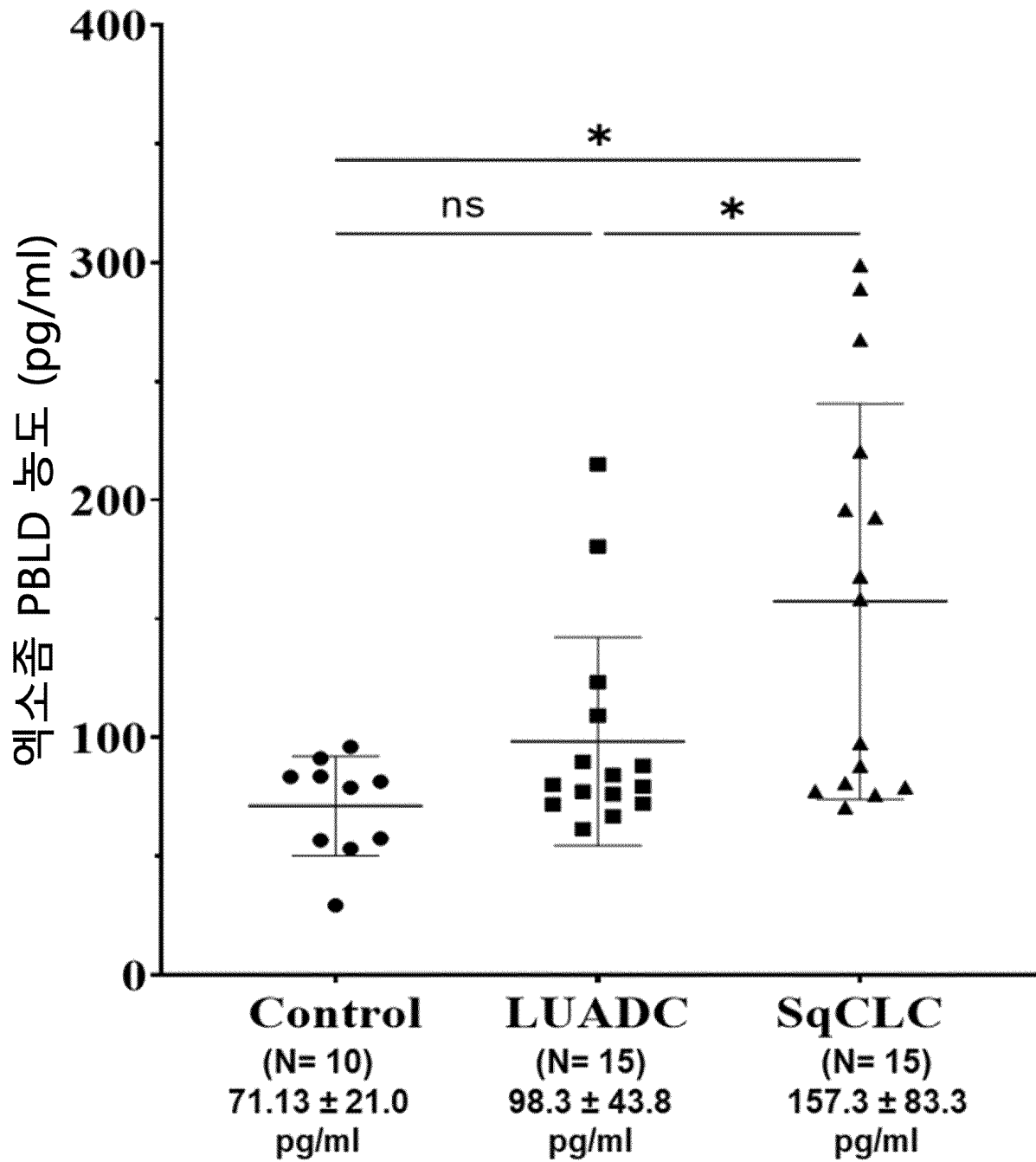


도면4



|                      |        |
|----------------------|--------|
| Youden index J       | 0.5977 |
| Associated criterion | >222   |
| Sensitivity          | 93.10  |
| Specificity          | 66.67  |

도면5



도면6

| 암종        | AUC  | P-value | 민감도 (%) | 특이도 (%) |
|-----------|------|---------|---------|---------|
| 폐 선암      | 0.65 | 0.2020  | 66.67   | 40.00   |
| 폐 편평상피세포암 | 0.80 | 0.0126  | 73.33   | 50.00   |

도면7

