(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0151400
(43) 공개일자 2021년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0068167
(22) 출원일자 2020년06월05일
심사청구일자 2021년03월16일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김태범
서울특별시 서초구 잠원로8길 35, 101동 3202호(잠원동, 래미안 신반포 팰리스)
(74) 대리인
이명진

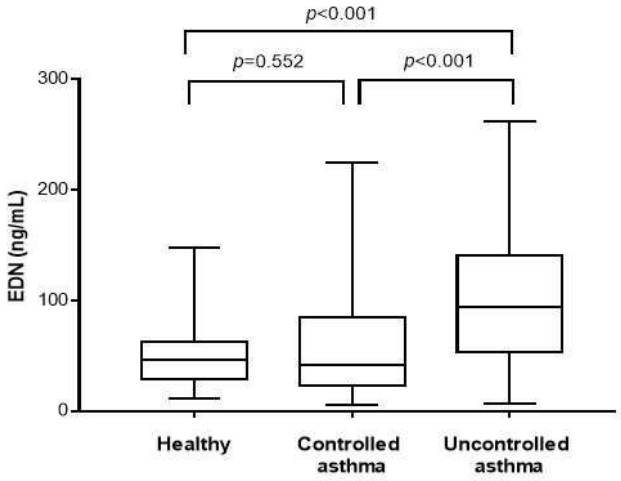
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **EDN을 이용한 천식 조절 상태 모니터링용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 천식 조절 상태 모니터링용 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명자들은 EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)이 조절되지 않는 천식 환자에서 정상군 및 조절된 천식 환자 대비 유의적으로 증가된 수준을 보임을 확인하였을 뿐만 아니라, EDN이 혈액 호산구 수치와 비교하여, 천식 조절 상태를 평가하기 위한 마커로서 우수한 정확도를 가짐을 확인하였다. 따라서, EDN을 천식 조절 상태 평가에 유용한 바이오마커로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/56972 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098594
과제번호	2019M3E5D3073367
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	오믹스기반정밀의료기술개발사업(R&D)
연구과제명	COREA 천식 코호트기반 정밀의료 실현
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2019.09.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

EDN(Eosinophil-derived neurotoxin) 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머인 것을 특징으로 하는, 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 단백질에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는, 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 EDN 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 EDN mRNA는 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 서열로 이루어지는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 천식은 중증 천식 및 비중증 천식으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 천식 조절 상태 모니터링용 조성물.

청구항 7

피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태를 모니터링하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

대조군과 비교하여 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준이 증가된 경우 천식이 잘 조절되지 않은 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 이상인 경우, 조절되지 않은 천식으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준은 객담 호산구 수치 및 객담 호중구 수치로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 상관관계가 없는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 모니터링하는 방법은 혈액 내 호산구 수를 진단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천식 조절 상태 모니터링용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 천식(asthma)은 여러가지 자극에 대한 기도의 과민반응성(bronchial hyperresponsiveness)을 그 특징으로 하는 질환으로 만성 기도 염증(chronic airway inflammation)을 일으키며 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명(喘鳴), 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들이 나타나는데 이는 자연적으로 또는 치료에 의해 가역적으로 호전될 수 있다.

[0004] 호산구성 중증 천식은 비호산구성 유형에 비하여 심한 악화, 부비동염 동반, 말초 기도침범, 기도개형, 폐기능 저하가 특징적인 양상으로 보고되었다. 반면 비호산구성 중증 천식은 주로 중성구 염증이 두드러지며, 천식 증상이 심하다. 호산구성 염증 표현형을 바탕으로 한 분류와 접근은 천식 치료제 선택에 도움을 줄 것으로 기대되고 있다.

[0005] 한편, 천식 조절의 목표는 천식이 잘 조절된 상태로 유지하는 것이다. 최신 세계천식기구(Global Initiative for Asthma, GINA)의 기준에 따르면 천식의 조절 상태는 주간 또는 야간에 증상 악화 빈도, 일상생활의 제약의 유무를 종합하여 평가한다. 다른 가이드라인에서는 이러한 임상적 증상 외에도 기도 염증 상태를 반영하는 객관적 지표를 포함하는 것을 권장하고 있다. 기도의 염증 상태를 파악하기 위한 객관적 지표 중 호기질소농도(fractional exhaled nitric oxide, FeNO)와 유도객담 내 호산구 수가 있으나 폐기능검사를 포함한 호기질소농도 또는 유도객담검사를 외래 방문 때마다 시행하는 것은 쉽지 않다.

[0006] 천식의 조절 정도는 1) 증상 조절, 2) 앞으로의 합병증 발생의 위험성, 이렇게 두 가지 영역을 가지고 있으며, 이는 항상 평가되어야 한다. 또한, 폐 기능은 향후 위험성을 평가하는 데 중요하며, 치료 시작 시, 치료 시작 3-6개월 뒤, 그 이후 지속적인 위험 평가를 위해 주기적으로 측정해야 한다.

[0007] 많은 선행 연구들에서 환자의 조절 수준에 대해 환자와 의료 제공자의 평가 사이의 불일치가 있음을 언급하고 있다. 즉, 환자가 자신의 조절 정도를 과대평가 하거나 질병의 심각도를 과소평가하는 것을 의미하는 것이 아니라 천식 조절이라는 의미를 의료전문가와 다르게 이해하고 사용한다는 것이다. 그래서 환자와 함께 천식 조절 정도를 평가한다면 이 의미를 반드시 설명해야 한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 대한내과학회지: 제 78 권 제 6 호 2010

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 천식 조절 상태를 평가하기 위한 마커를 개발하고자 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 이에, 본 발명의 목적은 EDN(Eosinophil-derived neurotoxin) 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태를 모니터링하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 키트를 제공하는 것이다.

[0015] 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

[0017] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 EDN(Eosinophil-derived neurotoxin) 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 단백질에 특이적인 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 EDN 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 EDN mRNA는 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 서열로 이루어지는 염기 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 천식은 중증 천식 및 비중증 천식으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 또한, 본 발명은 피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태를 모니터링하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 방법은 대조군과 비교하여 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준이 증가된 경우 천식이 잘 조절되지 않은 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 이상인 경우, 조절되지 않은 천식으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준은 객담 호산구 수치 및 객담 호중구 수치로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 상관관계가 없는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 모니터링하는 방법은 혈액 내 호산구 수를 진단하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 또한, 본 발명은 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 키트를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태를 예측하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태 평가 방법을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 EDN 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 천식 조절 상태 평가 용도를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 천식 환자의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태 예측 방법을 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 EDN 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 천식 조절 상태 예측 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0036] 본 발명자들은 EDN가 조절되지 않는 천식 환자에서 정상군 및 조절된 천식 환자 대비 유의적으로 증가된 수준을 보임을 확인하였을 뿐만 아니라, EDN이 혈액 호산구 수치와 비교하여, 천식 조절 상태를 평가하기 위한 마커로서 우수한 정확도를 가짐을 확인하였다.

[0037] 따라서, EDN을 천식 조절 상태 평가에 유용한 바이오마커로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 건강한 그룹, 조절된 천식 그룹, 및 조절되지 않은 천식 그룹에서 혈청 EDN 수준을 비교한 결과를 나타

낸 것이다. 평균 혈청 EDN 수준은 조절되지 않은 천식 (103.2 ± 60.2)에서 조절된 천식 (60.8 ± 49.7) 및 건강한 대조군 (49.6 ± 28.3) 그룹보다 더 높게 나타났다.

도 2는 모든 천식 환자에서 조절되지 않은 천식 상태를 예측하기 위한 혈청 EDN 및 혈액 호산구 수의 ROC 곡선을 나타낸 것이다. Hanley 및 McNeil에 의해 유도된 방법(Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. Radiology 1983;148:839-43)을 사용하여, 혈액 호산구 수와 비교한 결과, 혈청 EDN 수준은 조절되지 않은 상태 (p = 0.024)에 대한 더 나은 예측 인자인 것으로 나타났다.

도 3은 모든 천식 환자에서 혈청 EDN과 혈액 호산구 수의 상관 관계를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명은 EDN (Eosinophil-derived neurotoxin) 단백질 또는 이의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 조성물에 관한 것이다.

[0042] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0044] 본 명세서에서, 용어 “단백질”은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0045] 본 명세서에서, “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)” 또는 “핵산”은 단일 또는 이중 가닥의 형태로 된 데옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA) 또는 리보핵산(ribonucleic acid, RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 일반적으로 DNA는 아데닌(adenine, A), 구아닌(guanine, G), 시토신(cytosine, C), 티민(thymine, T) 등 네 가지 염기로 구성되어 있으며, RNA는 티민 대신 우라실(Uracil, U)을 가지고 있다. 핵산 이중 가닥에서 A는 T 또는 U, C는 G 염기와 수소결합을 이루는데, 이러한 염기의 관계를 ‘상보적(complementary)'이라고 한다.

[0046] 한편, 'mRNA(messenger RNA 또는 전령 RNA)'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 리보솜(ribosome)으로 전달하여 폴리펩티드 합성(단백질 번역, translation)의 청사진 역할을 하는 RNA이다. 유전자를 주형(template)으로 하여 단일 가닥의 mRNA가 전사(transcription) 과정을 통하여 합성된다.

[0047] 본 명세서에서, “EDN (Eosinophil-derived neurotoxin)”는 호산구 탈과립화의 산물로서 호산구에서 유래된 신경독을 의미한다. 효소 활성을 통해 ssRNA(single strand RNA) 바이러스의 활성을 줄일 수 있고, 면역세포를 끌어들이는 역할을 한다.

[0048] 본 명세서에서, EDN 단백질은 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 인간에서 유래한 것이다. 가장 바람직하게, 본 발명에서의 EDN 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 인간의 EDN (AAA50284.1, AAG31585.1) 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다(괄호 안은 NCBI Genebank accession number).

[0049] 상기 EDN mRNA는 바람직하게는 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 서열로 표시되는 인간 EDN mRNA (M28129.1, M30510.1, X55988.1, X55987.1) 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다(괄호 안은 NCBI Genebankaccession number). 상기한 인간의 EDN mRNA transcript variant들의 coding region(exon) 등의 특징 사항은 괄호 안에 기재된 Genebank accession number로 NCBI 데이터베이스를 검색하여 나오는 서열정보에서 확인된다.

[0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상보적(complementary)"은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 구체적으로는 생리학적 조건 하(세포 내)에서 핵산 분자 내 타겟팅 모이어티가 타겟(예컨대, EDN 유전자)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

[0051] 본 명세서에서, 용어 “검출”은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질, EDN)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미

이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 단백질의 발현수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 EDN 단백질 검출은 EDN 단백질의 존재 여부 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0052] 본 명세서에서, 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 모두 포함하는 개념이다. 바람직하게 본 발명에서의 진단은 EDN의 발현 수준을 측정하여 천식의 존재 또는 발병 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0053] 본 명세서에서, 용어 "천식 조절 상태"는 본 명세서에서 "천식 조절 수준"과 병용될 수 있으며, 환자에게서 천식의 증상이 관찰되는 정도 또는 치료에 의해 감소되었거나 없어진 정도를 의미한다. 천식 조절 수준은 환자의 유전적 배경, 질병의 진행과정, 환자들이 받고 있는 치료, 환경, 정신사회적인 요소들의 상호작용에 의해 결정된다. 본 명세서에서, 천식 조절 수준은 1) 증상 조절, 2) 앞으로의 합병증 발생의 위험성, 두 가지 영역을 포함한다. 본 명세서에서, 천식 조절 수준은 급성 악화, 기도 제한 정도 평가, 부작용 평가 및 폐기능 검사를 수행함으로써 평가되었다.

[0054] 본 명세서에서, 조절되지 않는 천식의 정의는 하기 조건 중 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0055] 1) 낮은 증상 조절: 한국 천식 진료 지침의 부분조절 상태, 또는 천식 조절 검사에서 20점 미만

[0056] 2) 잦은 천식 악화: 전신 스테로이드가 3일 이상 필요한 정도의 천식 악화가 연 2회 이상

[0057] 3) 중증 악화: 천식 악화로 입원이나 기계호흡이 필요한 경우

[0058] 4) 기류제한: 기관지확장제 사용 후 FEV1 < 80%.

[0059] 본 명세서에서, 상기 조절되지 않는 천식은 부분적으로 조절되지 않는 천식 및 조절되지 않는 천식을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 조절되지 않는 천식 그룹에 하기 GINA 가이드라인에 따른 부분조절 천식 및 조절안됨 천식을 포함하여, 실험을 진행하였다 (실시예 1.2 참조).

[0060] 본 명세서에서, 상기 천식 조절 상태는 하기 표에 기초하여 구분될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

조절 상태 / 특징	조절 (모두 만족)	부분조절 (하나 이상)	조절 안됨
주간 증상	없음~주2회	주3회 이상	부분조절 내용 중 해당사항이 세가지 이상 있음
활동 제한	없음	있음	
야간 증상/수면 방해	없음	있음	
증상완화제 사용	없음~주2회	주3회 이상	
폐기능(PEF 또는 FEV_1)	정상	예측치 또는 개인 최고치의 80% 미만	

출처: GINA 가이드라인

[0061]

[0062] 본 명세서에서, 상기 천식 조절 상태는 천식 치료제에 대한 천식 조절 상태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 명세서에서, 상기 천식 치료제는 예를 들어, 흡입 코르티코스테로이드, 포모테롤(formoterol), 살메테롤(salmeterol), 톨로부테롤(tulobeterol)과 같은 베타2 항진제, 테오필린과 같은 잔틴계 약물, 부교감신경 차단제, 또는 몬테루카스트(montelukast), 프랜루카스트(pranlukast), 재피루카스트(zafirlukast)와 같은 류코트리

엔 조절제, 전신적 스테로이드제 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 명세서에서, 상기 천식 치료제는 흡입 코르티코스테로이드(ICS), ICS-LABA(inhaled corticosteroid- long acting b agonist), 및 ICS-LAMA(long acting muscarinic antagonist)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 일실시예에서는 천식 치료제 및 치료제의 용량과 관계없이 천식의 조절 상태와 EDN이 유의미한 상관관계를 나타냄을 확인하였다 (표 1 참조).

[0066] 본 명세서에서, 용어 “모니터링”은 천식에 걸린 것으로 진단되거나, 진단될 가능성이 있거나, 진단되었던 개체에 대하여 질환의 경과를 모니터링하는 것일 수 있다. 예를 들어, 천식의 진행이 악화되거나 호전되는 것을 모니터링할 수 있으며, 구체적으로 천식이 조절됐는지, 부분적으로 조절됐는지, 또는 조절되지 않았는지 모니터링할 수 있다. 상기 모니터링은 개체의 증상, 약물 사용 횟수 및 용량, 야간 증상, 수면 방해, 악화 여부, 응급실 방문 여부, 부작용 등을 관찰함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본 명세서에서, 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 이상인 경우, 조절되지 않은 천식으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본 명세서에서, 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 미만인 경우, 조절된 천식으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 명세서에서, 단백질의 '발현 증가(또는 고발현)'라는 의미는 발현되지 않던 것이 발현된 것(즉, 검출되지 않던 것이 검출된 것) 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 과발현된 것(즉, 검출량이 많아지는 것)을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

[0070] 본 명세서에서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 본 명세서에서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 EDN의 단백질에 특이적인 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 본 명세서에서, 상기 EDN의 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 이루어지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 명세서에서, 상기 EDN의 mRNA는 서열번호 3 내지 서열번호 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 서열로 이루어지는 염기 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 상기 '프라이머(primer)'는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, Tm)가 달라진다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 상기 EDN mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 각 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 EDN의 mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.

[0075] 상기 '프로브(probe)'는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 EDN mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 EDN mRNA의 발현양을 측정함으로써 천식 조절 상태 모니터링에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 본 발명에서 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

또한 프라이머 또는 프로브는 EDN mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지 물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0076] 상기 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명에 사용되는 항체는 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편(예를 들어, Fab 또는 (Fab)2 단편), 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 키메릭 항체 등일 수 있다.

[0077] EDN 단백질은 공지된 단백질이므로 본 발명에 사용되는 항체는 단백질을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 항체의 항원으로서 사용되는 EDN 단백질은 천연에서 추출하거나 합성될 수 있으며 DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 EDN 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 EDN 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질전환체로부터 EDN 단백질을 회수함으로써 수득될 수 있다.

[0078] 예를 들어, 다클론 항체는 EDN 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 항체는 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 칠면조, 토끼, 마우스 또는 래트와 같은 여러 온혈 동물을 이용하여 제조할 수 있다.

[0079] 단클론 항체도 공지된 융합방법(fusion method)(Kohler and Milstein, European J. Immnunol. 6:511-519, 1976), 재조합 DNA 방법(미국특허 제4816567호) 및 파지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991; Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 58:1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

[0080] 한편, 본 발명은 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 천식 조절 상태 모니터링용 키트를 제공한다.

[0081] 본 발명의 키트는 EDN의 단백질 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 도구 및/또는 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0082] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.

[0083] 면역학적 분석에 사용되는 도구 및/또는 시약으로는 적합한 담체 또는 지지체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 키트에 포함되는 EDN은 바람직하게는 적합한 담체 또는 지지체에 문헌에 개시된 바와 같은 다양한 방법을 이용하여 고정될 수 있으며(Antibodies: A Labotory Manual, Harlow & Lane;Cold SpringHarbor, 1988), 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 덱스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.

[0085] 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하며, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 효소로는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 헥소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티옥시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물질로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있

다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명은 피검체의 시료에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 천식 조절 상태를 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

[0088] 본 발명에서 상기 시료는 천식 조절 상태를 평가하거나 예측하고자 하는 피검체로부터 채취된 것이라면 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 생검 등으로 얻어진 세포나 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 각종 분비물, 소변, 대변 등일 수 있다. 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 복수, 질 분비물 및 소변으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 또는 혈청일 수 있다. 상기 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.

[0089] 상기 방법으로 측정한 피검체에서 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준을 동일한 방법으로 측정한 대조군과 비교하여, EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준이 증가한 경우, 상기 피검체를 천식이 조절되지 않는 것으로 평가할 수 있다. 즉, 대조군과 비교하여 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준이 증가된 경우 천식이 잘 조절되지 않은 것으로 평가할 수 있다.

[0090] 본 명세서에서, mRNA의 발현량 측정은 RT-PCR, 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 RT-PCR(Quantitative or semi-Quantitative real-time RT-PCR), 노던 블롯(northern blot) 및 DNA 또는 RNA 칩(chip)으로 이루어지는 군에서 하나 이상 선택된 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 명세서에서, 상기 단백질 발현량 측정은 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 방법을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 상기 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 이상인 경우, 조절되지 않은 천식으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 상기 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 미만인 경우, 조절된 천식으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0094] 상기 EDN 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 수준은 객담 호산구 수치 및 객담 호중구 수치로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 상관관계가 없는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0095] 본 발명의 상기 조성물, 모니터링하는 방법 및 키트는 AUC가 0.6 이상, 0.65 이상, 0.7 이상, 0.72 이상, 0.75 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 AUC는 조절된 천식 그룹 및 조절되지 않은 천식 그룹에서 각각 분리된 시료에서 측정된 EDN 수준을 천식 조절 상태를 모니터링하는 기준으로 설정하고, X축은 1-특이도, 및 Y축은 민감도로 하는 모든 시료의 점을 연결한 그래프(ROC)를 그렸을 때, 상기 그래프의 면적을 의미한다.

[0096] 또한, 본 발명의 상기 조성물, 모니터링하는 방법 및 키트는 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 약 100%의 민감도를 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0097] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 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.

[0098] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0100] **[실시예]**

[0101] **<실시예 1. 실험 방법>**

[0102] **1.1 대상**

[0103] 2005년 1월부터 2018년 12월까지 아산 병원(Asan Medical Center)에서 가용한 혈청 시료와 의료 기록이 있는 131명의 천식 환자를 등록하였다. 포함 기준(criteria)은 다음과 같다 : (1) 18세 초과; (2) 3개월 이상 호흡곤란, 천명 또는 기침과 같은 증상; 및 (3) 유발 검사(provocation test)를 통해 6mg/mL(PC 20) 의 메타콜린 용량으로 1초간노력성호기량(FEV1)이 20% 감소로 표시된 기도 과민증이거나; 속효성 β-항진제 흡입 후 FEV1 > 12%(및 적어도 200 mL)에서의 기도 가역성.

[0104] 심각한 폐 손상, 기관지 확장증 또는 폐 절제 병력이 있는 환자는 제외하였다. 분무된 멸균 식염수 용액을 흡입한 후 기침 및 기도 분비물의 거름으로써 가래 샘플을 수득하였다. 또한, 아산 병원에서 알레르기 질환 없는 43명의 건강한 대조군의 혈청 EDN 수치를 측정하였다. 본 연구는 아산 병원의 기관 검토위원회의 승인을 받았으며(2019-0376) 모든 환자는 서면 동의서를 제공하였다.

[0106] **1.2 천식 조절 상태 및 표현형의 정의**

[0107] 천식 조절 상태는 등록 시점에 임상의에 의해 평가되었고, 환자는 잘 조절되거나 조절되지 않은 질환을 나타내는 것으로 분류되었다. 천식의 정의는 세계 천식 기구/국립 보건원(National Institutes of Health) 가이드라인의 치료 목표로부터 도출되었으며, 다음 결과를 포함하는 복합 측정법이다 : 증상, 구조 약물 사용, 야간 각성, 악화, 응급 방문 및 부작용. 조절되지 않은 그룹에는 부분적으로 조절되거나 조절되지 않고 악화된 천식 상태가 있는 환자가 포함되었다.

[0108] 세부 그룹의 분석을 위해, 환자는 중증 및 호산구 천식 표현형에 따라 중증 호산구 천식(SEA, Severe eosinophilic asthma), 비중증 호산구 천식(NSEA, Non-severe eosinophilic asthma) 및 중증 비호산구 천식(SNEA, Severe non-eosinophilic asthma) 그룹으로 분류되었다. 국제 유럽 천식 호흡기 협회/미국 흉부 학회 지침에 따라 중증 천식이 결정되었으며, 중증 천식은 등록시 호산구 염증이 300 /μL 이상의 혈액 호산구 수로 정의되었다.

[0109] 따라서, SEA 그룹에는 중증 천식 및 호산구 수가 ≥300 /μL 인 환자가 포함되었으며, SNEA 그룹은 혈액 호산구 수가 300 /μL 미만인 그룹을 포함하였다. 마지막으로 NSEA 그룹에는 비중증 천식 환자와 호산구 수가 300 /μL 이상인 환자가 포함되었다.

[0111] **1.3 혈청 EDN(Eosinophil-derived neurotoxin) 수준 측정**

[0112] 혈청 EDN 농도는 K® EDN ELISA 키트(SKIMS-BIO Co., Seoul, Korea)를 사용하여 측정되었으며, 결과는 밀리리터당 나노그램(ng/mL)으로 표시되었다. ELISA는 6.0 및 400 ng/mL의 최소 및 최대 검출 한계로 각각 인간 EDN을 검출하고, ECP(Eosinophil cationic protein)와의 교차 반응성을 갖는다.

[0113] 보다 구체적인 ELISA 방법은 [Kim CK, Callaway Z, Park JS, Kwon E. Utility of serum eosinophil-derived neurotoxin (EDN) measurement by ELISA in young children with asthma. Allergol Int 2017;66:70-4.] 문헌에 기재되었다.

[0115] **1.4 통계분석**

[0116] Student's t-test와 Pearson chi-square test는 연속 변수와 이분법 변수에 대한 그룹 간 차이를 결정하는 데 사용되었다. 세 그룹 간(SEA, NSEA, SNEA)의 차이의 중요성을 확인하기 위해 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행하였다. Dunn의 다중 비교 사후 테스트(Dunn's multiple comparison post-hoc test)는 두 그룹 각각의 차이의 중요성을 확인하기 위해 수행되었다. 로지스틱 회귀 분석을 사용하여 EDN이 천식 조절 상태를 결정하기 위한 독립적인 매개 변수인지 확인하였다. 다변량 분석을 위해 유의한 단변량 변수($p < 0.05$)가 포함되었다. 조절되지 않은

상태를 예측하기 위한 EDN 및 혈액 호산구 수의 진단 성능은 수신기 작동 특성 곡선 아래 면적 (AUC, ROC)을 사용하여 평가되었다. Hanley와 McNeil에서 파생된 방법을 사용하여 각 변수의 AUC를 비교하였다. 예측성을 개선하기 위한 유의미한 변수의 증분값은 R 패키지를 사용한 순 재분류 개선(NRI, net reclassification improvement) 지수와 비교되었다. Spearman 순위 상관 분석을 사용하여 연속 변수 간의 상관을 확인하였다. 모든 계산은 R(버전 3.5.2) 및 MedCalc(버전 15.5) 통계 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. P <0.05는 유의미한 것으로 간주하였다.

[0118] **<실시예 2. 실험 결과>**

[0119] **2.1 천식 조절 상태에 따른 개체의 임상적 특성**

[0120] 131명의 천식 환자의 기준 및 임상 특성을 표 1에 요약하였다. 환자는 천식 조절 상태에 따라 두 그룹으로 분류되었고, 각각 56명 및 75명이 조절된 및 조절되지 않은 천식 그룹에 포함되었다. 대조군과 조절되지 않은 천식 그룹 사이에 연령, 성별, 체질량 지수 (BMI), 천식 기간 및 흡연 이력에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

[0121] 또한, 아토피, 알레르기성 비염, 전년의 악화 사건(exacerbation events) 및 등록시 흡입 코르티코스테로이드(ICS) 용량에 따른 유병률에서 차이가 관찰되지 않았다. 조절되지 않은 천식 환자는 조절된 천식에 비해 천식 조절 검사(ACT, asthma control test)(15.4±4.2 대 21.3±3.8, p<0.001) 점수와 기준 FEV1 수준(67.4±20.0 대 80.4±16.4, p<0.001)이 낮았다.

[0122] 객담 호산구와 호중구 비율은 크게 다르지 않았지만, 혈액 호산구 수는 조절된 천식 그룹보다 조절되지 않은 천식 그룹에서 더 높았다(658.6±524.0 대 554.0 ± 783.7 / μL, p = 0.001).

[0123] 즉, 도 1에 나타난 바와 같이, 혈청 EDN 수준은 조절된 천식 그룹보다 조절되지 않은 천식 그룹에서 유의하게 더 높았다(103.2±60.2 대 60.8±49.7 ng/ml, p <0.001).

[0124] 이에 더하여, 조절되는 천식과 조절되지 않는 천식에 대한 ROC curve의 cut off value가 48.5 ng/ml로 나타났는 바, 시료 내 EDN의 농도가 48.5 ng/ml 이상인 경우, 조절되지 않은 천식으로 평가할 수 있음을 확인하였다.

표 1

[0126]

	Total (n=131)	Controlled asthma (n=56)	Uncontrolled asthma (n=75)	*P*
나이 (yr)	51.9 ± 15.7	53.3 ± 15.7	50.9 ± 15.7	0.387
성별 (female, %)	72 (55.0)	30 (53.6)	42 (56.0)	0.921
BMI	25.4 ± 4.1	25.7 ± 3.7	25.2 ± 4.4	0.457
천식 기간 (yr)	3.5 ± 4.6	3.9 ± 5.1	3.1 ± 4.2	0.485
흡연 (%)				0.280
비흡연	73 (55.7)	34 (60.7)	39 (52.0)	
과거	39 (29.8)	17 (30.4)	22 (29.3)	
현재	19 (14.5)	5 (8.9)	14 (18.7)	
아토피 (%)*	32 (46.4)	15 (41.7)	17 (51.5)	0.563
알레르기성 비염 (%)	61 (81.3)	27 (87.1)	34 (77.3)	0.439
악화 (전년) (%)	58 (87.9)	28 (87.5)	30 (88.2)	1.000
ICS 용량 (%)				0.124
Low	8 (11.9)	3 (7.0)	5 (20.8)	
Moderate to high	59 (88.1)	40 (93.0)	19 (79.2)	
ACT 점수	18.0 ± 5.0	21.3 ± 3.8	15.4 ± 4.2	<0.001
총 IgE (kU/L)	416.4 ± 639.8	399.9 ± 574.7	475.6 ± 870.3	0.745
FEV1, pred, pre-BD (%)	73.6 ± 19.6	80.4 ± 16.7	67.4 ± 20.0	<0.001
FEV1/FVC (%)	69.1 ± 15.4	70.2 ± 13.3	68.2 ± 17.2	0.488
객담 호산구 (%)†	28.73 ± 28.27	2	30.6 ± 28.3	0.346
객담 호중구 (%)†	55.6 ± 27.2	82	52.2 ± 26.9	0.338
혈액 호산구, absolute count (/uL)	613.9 ± 647.2	554.0 ± 783.7	658.6 ± 524.0	0.001

혈청 EDN (ng/ml)	85.1 ± 59.6	60.8 ± 49.7	103.2 ± 60.2	<0.001

[0127] * 아토피는 하나 이상의 일반적인 에어로알레르겐에 대한 피부 단자 검사 반응이 긍정적이거나 아토피성 피부염 또는 알레르기성 비염의 병력이 있는 것으로 정의되었다.

[0128] † 분석에 적합한 객담 샘플은 조절된 (n=1) 및 조절되지 않은 천식 (n=14) 환자를 포함한다.

[0130] **2.2 천식 조절 상태에 대한 EDN 수준의 예측 가능성 확인**

[0131] 천식 조절 상태에 대한 EDN의 예측 가능성은 단변량 및 다변량 로지스틱 회귀 분석에 의해 분석되었다(표 2 참조). 분산 팽창 인자수(VIF, variance inflation factor)는 EDN과 혈액 호산구 수 사이의 공선성(collinearity)을 조사하기 위해 계산되었으며, 1.35 인 것으로 밝혀졌다. VIF가 <4이기 때문에, EDN과 혈액 호산구 수 사이에 공선성이 없는 것으로 간주하였다.

[0132] 단변량 분석은 혈청 EDN 수준 및 기준선 FEV1가 조절되지 않은 천식 상태를 예측하기 위한 중요한 임상 파라미터라는 것을 나타냈다(각각 p = 0.001 및 p <0.001). 또한, 이들은 다변수 분석에서 조절되지 않은 천식 상태를 예측하기 위한 유의미한 독립적 지표임을 확인하였다(각각 p = 0.001 및 p <0.001).

표 2

[0134]

Clinical variables	OR	95% CI	*P*
Univariate analysis			
나이 (yr)	0.990	0.968-1.012	0.384
천식 기간 (yr)	0.962	0.816-1.126	0.629
아토피 (%)	1.488	0.576-3.897	0.413
알레르기성 비염 (%)	0.504	0.127-1.690	0.288
악화 (전년) (%)	1.071	0.233-4.927	0.927
총 IgE (kU/L)	1.000	0.999-1.001	0.739
FEV1, pred, pre-BD (%)	0.962	0.939-0.983	0.001
FEV1/FVC (%)	0.422	0.033-4.705	0.486
객담 호산구 (%)	1.966	1.051-34.379	0.349
객담 호중구 (%)	0.913	0.639-1.030	0.329
혈액 호산구, absolute count (/μL)	1.000	0.999-1.000	0.368
혈청 EDN (ng/mL)	1.015	1.008-1.023	<0.001
Multivariate analysis			
FEV1, pred, pre-BD (%)	0.960	0.935-0.983	0.001
Serum EDN (ng/mL)	1.019	1.010-1.031	<0.001

[0136] **2.3 조절되지 않은 천식을 예측하기 위한 EDN 및 혈액 호산구 수의 효과 비교**

[0137] 혈청 EDN 수준 및 혈액 호산구 수의 ROC 곡선을 분석하여 조절되지 않은 천식 상태에 대한 그들의 예측성을 비교하였다.

[0138] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 혈청 EDN 수준은 혈액 호산구 수보다 AUC가 유의하게 높았다(AUC = 0.726, p <0.001). 혈청 EDN은 조절되지 않은 천식 상태를 예측하기 위해 81.3%의 민감도와 57.1%의 특이도를 나타냈다. 혈액 호산구 수의 ROC 곡선 분석으로부터의 AUC는 64.0% 민감도 및 64.3% 특이도(p=0.011)을 갖는 0.628이었다. 즉, 혈청 EDN 수준은 혈액 호산구 수와 비교하여, 조절되지 않은 상태를 더 잘 예측할 수 있음을 확인하였다(AUC, 0.726 vs. 0.628, p=0.024). 또한, 조절되지 않은 상태를 예측하기위한 NRI 테스트에서 EDN을 포함하는 모델은 0.4925의 NRI 점수(95% CI, 0.1523-0.8327; p=0.005)로, 그 성능이 현저하게 우수한 것으로 나타났다.

[0140] **2.4 혈청 EDN 수준과 임상 매개 변수 사이의 상관 관계 확인**

[0141] 도 3에 나타난 바와 같이, 혈청 EDN 수준은 혈액 호산구 수와 유의한 상관 관계가 있었다.

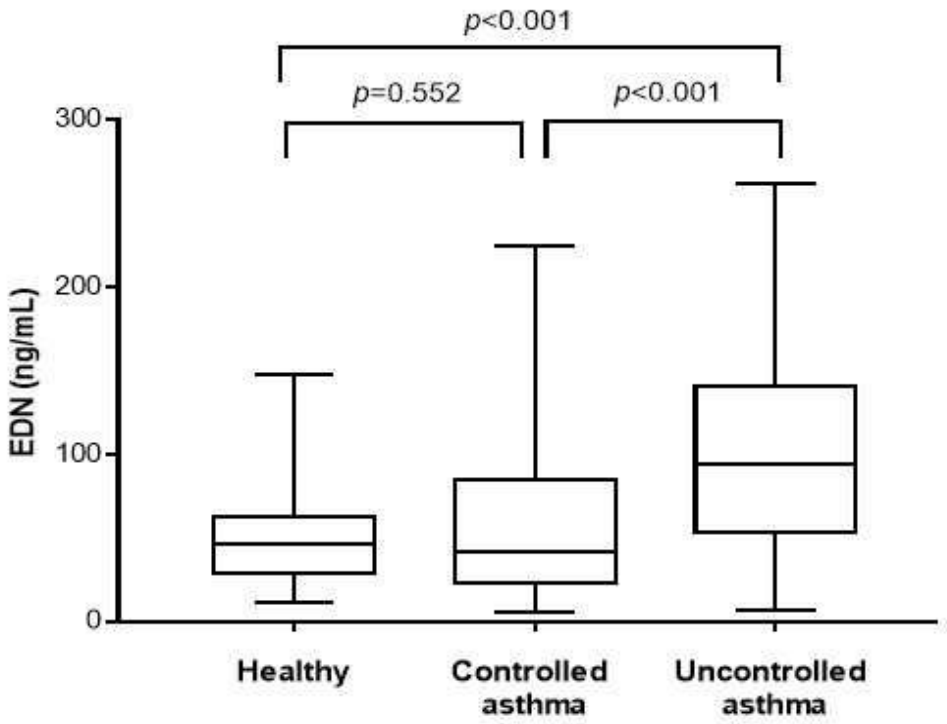
[0142] 그러나, 혈청 EDN 수준은 객담 호산구 및 호중구 비율과 상관 관계가 없었다. 폐 기능과 관련하여, FEV1(% Predicted), FEV1/FVC(forced vital capacity) (%) 및 PC20은 혈청 EDN 수준과 상관관계가 없었다. 또한, 혈청 EDN 수준과 염증 파라미터 인 C-반응성 단백질 (CRP) 사이에는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다.

[0144] 이상의 실시예를 종합하면, 혈청 EDN 수준을 측정함으로써 천식의 조절 상태를 예측할 수 있음을 확인하였다. 또한, EDN이 천식 조절 상태를 예측하기 위한 독립적인 바이오마커임을 확인하였다.

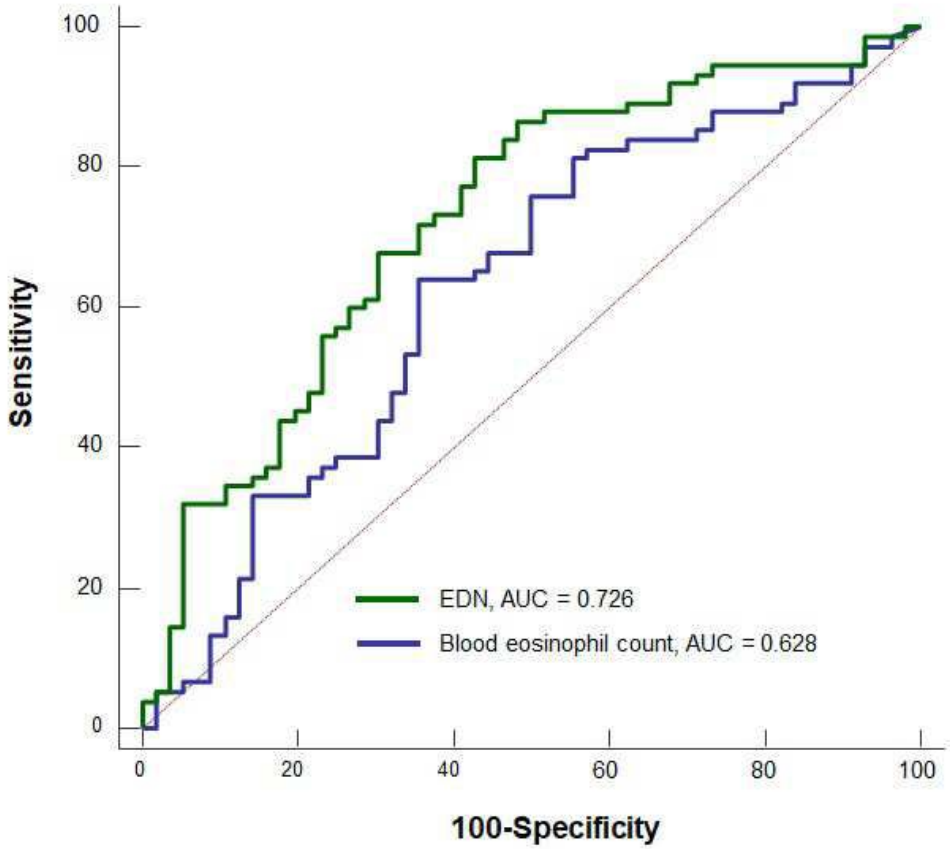
[0146] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

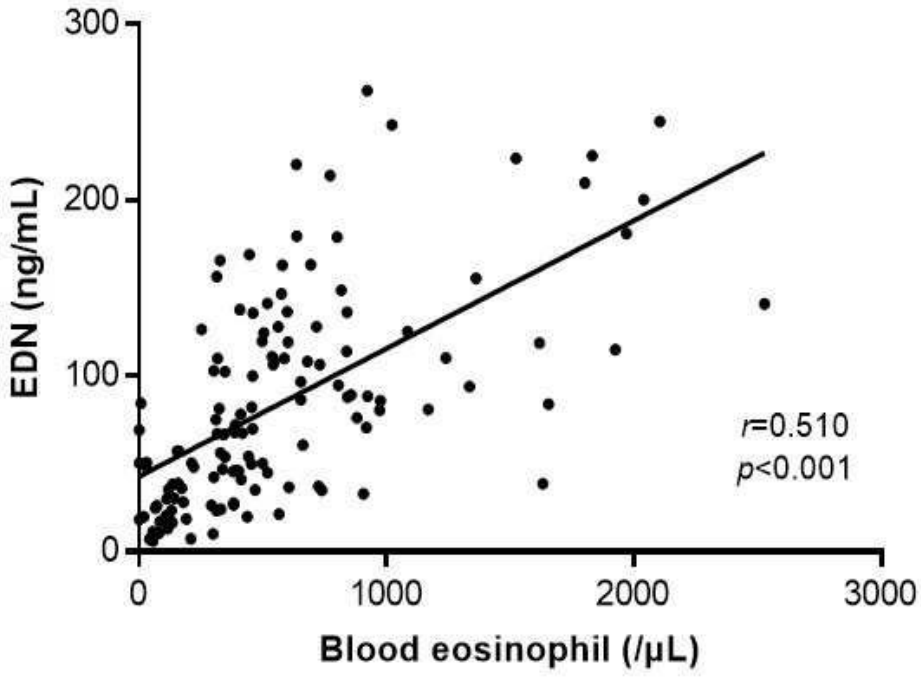
도면1



도면2


100
80
60
40
20
0
Sensitivity
0
20
40
60
80
100
100-Specificity
EDN, AUC = 0.726
Blood eosinophil count, AUC = 0.628

도면3


300
200
100
0
EDN (ng/mL)
0
1000
2000
3000
Blood eosinophil (/μL)
r=0.510
p<0.001

서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Composition for monitoring the condition of asthma control using EDN

<130> MP20-068

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 1

Met Val Pro Lys Leu Phe Thr Ser Gln Ile Cys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Leu Ala Val Glu Gly Ser Leu His Val Lys Pro Pro Gln Phe
20 25 30

Thr Trp Ala Gln Trp Phe Glu Thr Gln His Ile Asn Met Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Cys Thr Asn Ala Met Gln Val Ile Asn Asn Tyr Gln Arg Arg Cys
50 55 60

Lys Asn Gln Asn Thr Phe Leu Leu Thr Thr Phe Ala Asn Val Val Asn
65 70 75 80

Val Cys Gly Asn Pro Asn Met Thr Cys Pro Ser Asn Lys Thr Arg Lys
85 90 95

Asn Cys His His Ser Gly Ser Gln Val Pro Leu Ile His Cys Asn Leu
100 105 110

Thr Thr Pro Ser Pro Gln Asn Ile Ser Asn Cys Arg Tyr Ala Gln Thr
115 120 125

Pro Ala Asn Met Phe Tyr Ile Val Ala Cys Asp Asn Arg Asp Gln Arg
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val His Leu Asp Arg Ile

145 150 155 160

Ile

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 2

Met Val Pro Lys Leu Phe Thr Ser Gln Ile Cys Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Leu Ala Val Glu Gly Ser Leu His Val Lys Pro Pro Gln Phe
20 25 30

Thr Trp Ala Gln Trp Phe Glu Thr Gln His Ile Asn Met Thr Ser Gln
35 40 45

Gln Cys Thr Asn Ala Met Gln Val Ile Asn Asn Tyr Gln Arg Arg Cys
50 55 60

Lys Asn Gln Asn Thr Phe Leu Leu Thr Thr Phe Ala Asn Val Val Asn
65 70 75 80

Val Cys Gly Asn Pro Asn Met Thr Cys Pro Ser Asn Lys Thr Arg Lys
85 90 95

Asn Cys His His Ser Gly Ser Gln Val Pro Leu Ile His Cys Asn Leu
100 105 110

Thr Thr Pro Ser Pro Gln Asn Ile Ser Asn Cys Arg Tyr Ala Gln Thr

115 120 125

Pro Ala Asn Met Phe Tyr Ile Val Ala Cys Asp Asn Arg Asp Gln Arg
130 135 140

Arg Asp Pro Pro Gln Tyr Pro Val Val Pro Val Asn Leu Asp Arg Ile
145 150 155 160

Ile

<210> 3

<211> 718

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 3

ggcagctgga tcagttctca caggagctac agcgcggaga ctgggaaaca tggttccaaa 60

actgttcact tcccaaattt gtctgcttct tctgttgggg cttctggctg tggagggctc 120

actccatgtc aaacctccac agtttacctg ggctcaatgg tttgaaaccc agcacatcaa 180

tatgacctcc cagcaatgca ccaatgcaat gcaggtcatt aacaattatc aacggcgatg 240

caaaaaccaa aatactttcc ttcttacaac ttttgctaac gtagttaatg tttgtggtaa 300

cccaaatatg acctgtccta gtaacaaaac tcgcaaaaat tgtcaccaca gtggaagcca 360

ggtgccttta atccactgta acctcacaac tccaagtcca cagaatattt caaactgcag 420

gtatgcgcag acaccagcaa acatgttcta tatagttgca tgtgacaaca gagatcaacg 480

acgagaccct ccacagtatc cggtggttcc agttcacctg gatagaatca tctaagctcc 540

tgtatcagca ctcctcatca tcactcatct gccaagctcc tcaatcatag ccaagatccc 600

atctctccat atactttggg tatcagcatc tgtcctcatc agtctccata ccccttcagc 660

tttcctgagc tgaagtgcct tgtgaaccct gcaataaact gctttgcaaa ttcaaaaa 718

<210> 4

<211> 694

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 4

cacaggagct acagcgcgga gactggaaac atggttccaa aactgttcac ttcccaaatt 60

tgtctgcttc ttctgttggg gcttctggct gtggagggct cactccatgt caaacctcca 120

cagtttacct gggctcaatg gtttgaaacc cagcacatca atatgacctc ccagcaatgc 180

accaatgcaa tgcaggtcat taacaattat caacggcgat gcaaaaacca aaatactttc 240

cttcttacaa cttttgctaa cgtagttaat gtttgtggta acccaaatat gacctgtcct 300

agtaacaaaa ctcgcaaaaa ttgtcaccac agtggaagcc aggtgccttt aatccactgt 360

aacctcacaa ctccaagtcc acagaatatt tcaaactgca ggtatgcgca gacaccagca 420

aacatgttct atatagttgc atgtgacaac agagatcaac gacgagaccc tccacagtat 480

ccggtggttc cagttcacct ggatagaatc atctaagctc ctgtatcagc actcctcatc 540

atcactcatc tgccaagctc ctcaatcata gccaagatcc catctctcca tatactttgg 600

gtatcagcat ctgtcctcat cagtctccat acccccttcag ctttcctgag ctgaagtgcc 660

ttgtgaaccc tgcaataaac tgctttgcaa attc 694

<210> 5

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 5

gctgcccctg aaccccagaa caaccagctg gatcagttct cacaggagct acaggccgga 60

gactgggaaa catggttcca aaactgttca cttcccaaat ttgtctgctt cttctgttgg 120

ggcttctggc tgtggagggc tcactccatg tcaaacctcc acagtttacc tgggctcaat 180

ggtttgaaac ccagcacatc aatatgacct cccagcaatg caccaatgca atgcaggtca 240

ttaacaatta tcaacggcga tgcaaaaacc aaaatacttt ccttcttaca acttttgcta 300

acgtagttaa tgtttgtggt aacccaaata tgacctgtcc tagtaacaaa actcgcaaaa 360

attgtcacca cagtggaagc caggtgcctt taatccactg taacctcaca actccaagtc 420

cacagaatat ttcaaactgc aggtatgcgc agacaccagc aaacatgttc tatatagttg 480

catgtgacaa cagagatcaa cgacgagacc ctccacagta tccggtggtt ccagttcacc 540

tggatagaat catctaagct cctgtatcag cactcctcat catcactcat ctgccaagct 600

cctcaatcat agccaagatc ccatctctcc atatactttg ggtatcagca tctgtcctca 660

tcagtctcca tacccttca gctttcctga gctgaagtgc cttgtgaacc ctgcaataaa 720

ctgctttgca aattc 735

<210> 6

<211> 1501

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EDN(Eosinophil-derived neurotoxin)

<400> 6

gaatatcacc caccacgtct gcagcaggca tatagttttc atccagagtt tggatctaac 60

cagcaaaact ctgtcttaca caggatgact tggaattaga gtccttatag cagaaagagc 120

agcagggctg tccttgggta tccgttgctc agccaagtca tcaaataaaa aggatgattg 180

cacaagtgac tatgtaccaa tctgtgggtt tctcgatcgc aagagccaga ccctcctctg 240

cgtctgctgg cccaacccac caagggatgc tttatttaaa cagttccaag taggggagac 300

cagctgcccc tgaaccccag aacaaccagc tggatcagtt ctcacaggag ctacagcgcg 360

gagactgggt aagtcaacga tccccagagc tgggacagaa ggggcagcaa tggggcagca 420

actgagggag aagagagctg acgttagtgc ttaggagacg ttgcacactt tgcagacagg 480

aagtaaagga aatgggaccc cagagtggcc gcagaggggc tgtggggtaa gacactacag 540

tgtgtgtcat aaccaagacc cgatcaggag tagttacttc tcttcttttc ttacaggaaa 600

catggttcca aaactgttca cttcccaaat ttgtctgctt cttctgttgg ggcttctggc 660

tgtggagggc tcactccatg tcaaacctcc acagtttacc tgggctcaat ggtttgaaac 720

ccagcacatc aatatgacct cccagcaatg caccaatgca atgcaggtca ttaacaatta 780

tcaacggcga tgcaaaaacc aaaatacttt ccttcttaca acttttgcta acgtagttaa 840

tgtttgtggt aacccaaata tgacctgtcc tagtaacaaa actcgcaaaa attgtcacca 900

cagtggaagc caggtgcctt taatccactg taacctcaca actccaagtc cacagaatat 960

ttcaaactgc aggtatgcgc agacaccagc aaacatgttc tatatagttg catgtgacaa 1020

cagagatcaa cgacgagacc ctccacagta tccggtggtt ccagttcacc tggatagaat 1080

catctaagct cctgtatcag cactcctcat catcactcat ctgccaagct cctcaatcat 1140

agccaagatc ccatctctcc atatactttg ggtatcagca tctgtcctca tcagtctcca 1200

taccccttca gctttcctga gctgaagtgc cttgtgaacc ctgcaataaa ctgctttgca 1260

aattcatctg aaagtgtctg tgtgtcttca ttagccgctc tgctgtcatt tagtgacaat 1320

ctactctaga gatttttttct tcctctaacc tgagacttcc gggaaacaga gagatttgaa 1380

gataagagat gctttctgtc atgaaacagc acagtcttat cctctccctg ctttaggctg 1440

agaagctgag gtctcaaccg atatctagca actgtcgaag catcttgctt tgatcaagct 1500

t 1501