

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 8월 25일 (25.08.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/133324 A1

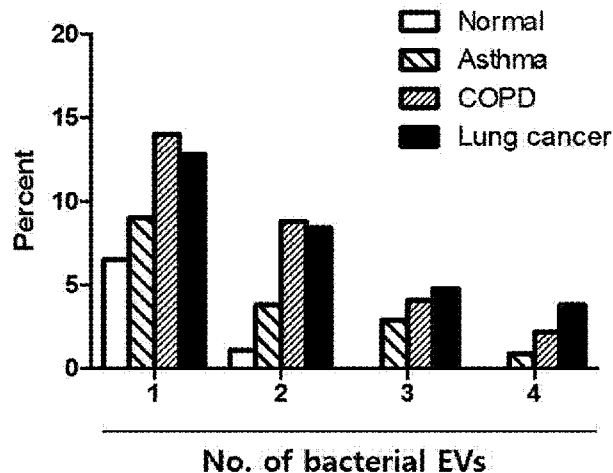
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001502
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 15일 (15.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0024249 2015년 2월 17일 (17.02.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동), Seoul (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로 43길 88 (풍납동), Seoul (KR). 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 (DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 31116 충청남도 천안시 동남구 단대로 119 (안서동), Chungcheongnam-do (KR).

- (72) 발명자: 김윤근 (KIM, Yoon-Keun); 10895 경기도 파주시 가람로 70, 413 동 201호 (와동동, 가람마을 4단지 한양수자인), Gyeonggi-do (KR). 김유선 (KIM, You-Sun); 06269 서울시 강남구 남부순환로 363길 30, 101동 404호 (도곡동, 도곡쌍용에가아파트), Seoul (KR). 지영구 (JEE, Young Koo); 13608 경기도 성남시 분당구 정자로 143, 208동 1702호 (정자동, 한솔마을 LG아파트), Gyeonggi-do (KR). 오연목 (OH, Yeon-Mok); 06195 서울시 강남구 삼성로 85길 11, 101동 502호 (대치동, 롯데캐슬아파트), Seoul (KR). 조유숙 (CHO, You Sook); 13595 경기도 성남시 분당구 황새울로 200번길 9-7, 현대판테온 2408호 (수내동), Gyeonggi-do (KR). 최준표 (CHOI, Jun-Pyo); 07202 서울시 영등포구 양평로 28길 15-1 (양평동 6가), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING INFLAMMATORY RESPIRATORY DISEASES USING OUTER MEMBRANE VESICLES DERIVED FROM BACTERIA

(54) 발명의 명칭 : 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 호흡기 염증성 질환의 진단방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing inflammatory respiratory diseases using outer membrane vesicles derived from bacteria and, more specifically, to a method for diagnosing asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer by measuring specific antibodies to outer membrane vesicles derived from bacteria existing in indoor dust or to proteins derived from the outer membrane vesicles. The outer membrane vesicles derived from *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., and *Enterobacter* spp., which exist in large quantities in dust in the indoor air, may cause inflammatory respiratory diseases, and thus the present invention can be favorably used as a method for diagnosing asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer, by measuring specific antibodies to outer membrane vesicles/proteins derived from the bacteria in patient samples.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/133324 A1



PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 호흡기 염증성 질환의 진단방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 실내 먼지에 존재하는 세균 유래 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질에 대한 특이 항체를 측정함으로써 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암을 진단하기 위한 방법에 관한 것이다. 실내 공기의 먼지에 다량으로 존재하는 포도상구균 (*Staphylococcus*), 아시네토박터 (*Acinetobacter*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 및 엔테로박터 (*Enterobacter*) 속 세균 유래 세포막 소포체는 호흡기 염증성 질환을 유발할 수 있으므로, 본 발명은 환자 샘플 내 상기 세균 유래 세포막 소포체/단백질에 대한 특이 항체를 측정함으로써 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암을 진단하기 위한 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 호흡기 염증성 질환의 진단방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 호흡기 염증성 질환의 진단방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 실내 먼지에 존재하는 세균 유래 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질에 대한 특이 항체를 측정함으로써 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암을 진단하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 실내에 존재하는 먼지에는 바실러스(*Bacillus* sp.), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 스트렙토마이세테스(*Streptomyces*), 코리네박테리아세아에(*Corynebacteriaceae*), 대장균(*Escherichia coli*) 등 그람 음성균과 그람 양성균을 포함하는 여러 종류의 세균이 서식한다. 이들 세균에서 유래한 물질, 예를 들어, 내독소(lipopolysaccharide; LPS)나 펩티도글리칸(peptidoglycan) 등은 면역세포 및 폐 표피 세포에서 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다고 알려져 있다.
- [3] 그람 음성균은 외부로 세포막 소포체(outer membrane vesicles 이라고도 함)를 상시 분비한다. 세균이 분비하는 나노미터 크기의 세포막 소포체는 세포 사이에 정보 교환을 위해 분비되는 물질로 초미세먼지에 해당한다. 그람 음성균에서 분비되는 세포막 소포체는 구형의 인지질 이중층으로 되어 있으며, 그 크기는 20-200 nm이다. 상기 세포막 소포체는 LPS 뿐만 아니라 숙주의 염증반응을 조절할 수 있는 외막 단백질(outer membrane protein)을 가지고 있다. 또한, 그람 양성균에서도 외부로 세포막 소포체가 분비됨이 보고되었고, 프로테오姆(proteome) 분석을 통해 소포체 내에는 염증을 유도하는 단백질이 포함되어 있음이 보고되었다. 따라서 실내 먼지내 세포막 소포체를 흡입했을 때 폐포 내 대식세포뿐만 아니라 기도의 상피세포에서도 염증반응을 유발할 수 있다.
- [4] 한편, 호흡기 염증성 질환은 크게 상기도에 발생하는 비염 및 부비동염, 하기도에 발생하는 천식 및 기관지염, 소기도에 발생하는 세기관지염 및 폐기종으로 분류할 수 있다. 임상적으로 기도폐색을 초래하는 질환으로, 천식은 가역적인 기도폐색을 특징으로 하고, 전 세계 3억 5000만 명, 국내 약 230만 명의 환자가 존재한다. 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)은 비가역적 기도폐색을 특징으로 하는데, 만성폐쇄성기관지염, 만성폐쇄성세기관지염, 폐기종 등이 만성폐쇄성폐질환의 원인 질환이다. 염증성 호흡기질환의 원인과 관련해서, 천식인 경우 실내 공기 중에 존재하는

단백질 항원(알레르겐)이 중요하다고 알려져 있고, 만성폐쇄성폐질환의 원인과 관련해서 흡연과 같은 자극성 인자가 중요하다고 알려져 있다.

- [5] 나아가 염증이 암을 일으킨다는 사실은 오래전부터 제기되었고, 최근에는 장내에 서식하는 세균에서 유래한 독소에 대한 Th17 면역반응에 의해 대장암이 발생한다고 보고되었으며, 위에 공생한다고 알려진 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 균에 의해서 만성 위염이 발생하고, 이는 위암 발생의 중요한 위험인자로 보고되었다. 만성폐쇄성폐질환과 폐암의 병인과 관련해서 두 가지 질병은 동일한 원인인자에 의해 발생한다고 제시되고 있고, 두 질환의 원인인자로 흡연이 중요하다고 알려져 있으나, 최근 임상연구에서는 흡연과 상관없이 만성폐쇄성폐질환 자체가 폐암 발생의 중요한 위험인자라는 사실이 보고되었다. 또한, 비흡연자에서 발생하는 만성폐쇄성폐질환과 폐암이 다수 존재한다는 사실은 흡연 이외에도 이 두 가지 질환을 일으키는 원인인자가 존재함을 알 수 있다.

- [6] 하지만 천식과 더불어 만성폐쇄성폐질환 및 폐암 발병에 있어서, 실내 먼지 속에 포함된 세균 유래 세포막 소포체가 미치는 영향 및 상기 질환들의 원인인자로써 실내 먼지 내 세포막 소포체 유래 세균을 동정하고 이를 이용하여 질환을 진단하는 방법에 대해서는 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 메타게놈 분석을 통하여 실내 먼지에서 분리한 세균 유래 세포막 소포체에서 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암 발병의 원인인자로 작용할 수 있는 세균들을 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [8] 이에, 본 발명은 실내 먼지에 포함된 세균 유래 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질을 이용하여 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암을 진단하기 위한 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 호흡기 염증성 질환의 진단방법을 제공한다.
- [11] (A) 환자샘플을 실내먼지 세균 유래의 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질과 반응시키는 단계;
- [12] (B) 상기 반응물에 항-인간 IgG 항체를 반응시켜 샘플내 IgG 항체의 양을 측정하는 단계; 및
- [13] (C) 상기 샘플내 IgG 항체의 양이 정상인에 비하여 2배 이상 증가되어 있을

경우 호흡기 염증성 질환으로 판정하는 단계.

- [14] 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포밖 소포체 및 단백질은 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 엔테로박터(*Enterobacter*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 군에서 유래되는 것일 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 포도상구균은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이고, 상기 아시네토박터는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)이고, 상기 슈도모나스는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이고, 상기 엔테로박터는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 환자샘플은 혈액 및 객담으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 IgG 항체는 IgG1 또는 IgG4일 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 10-300 nm인 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 호흡기 염증성 질환은, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 실내먼지 세균 유래 세포밖 소포체의 호흡기 염증성 질환의 진단용도를 제공한다.

발명의 효과

- [21] 실내 공기의 먼지에 다량으로 존재하는 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 및 엔테로박터(*Enterobacter*) 속 세균 유래 세포밖 소포체는 호흡기 염증성 질환을 유발할 수 있으므로, 본 발명은 환자 샘플내 상기 세균 유래 세포밖 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질에 대한 특이 항체를 측정함으로써 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암을 진단하기 위한 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은, 계절별로 실내 먼지를 수거하여 세포밖 소포체를 분리한 후 소포체 양을 정량한 결과이다.
- [23] 도 2는, 계절별로 실내 먼지에서 분리한 세포밖 소포체의 형태를 전자현미경을 통해 관찰한 결과이다.
- [24] 도 3은, 계절별로 실내 먼지에서 분리한 세포밖 소포체의 크기를 동적광산란법으로 측정한 결과이다.
- [25] 도 4는, 계절별로 실내 먼지에서 분리한 세균 및 세포밖 소포체의 분포를 메타게놈 분석을 통해 문(*phylum*) 수준에서 분석한 결과이다.
- [26] 도 5는, 계절별로 실내 먼지에서 분리한 세균 및 세포밖 소포체의 분포를 메타게놈 분석을 통해 속(*genus*) 수준에서 분석한 결과이다.
- [27] 도 6은, 정상인(Control), 천식환자(Asthma), 만성폐쇄성폐질환자(COPD),

폐암환자(Lung cancer)의 혈액 및 객담 샘플에서 측정된 실내 먼지 내 세포막 소포체 특이 IgG 항체의 분포와 양성률을 나타낸 결과이다.

- [28] 도 7은, 세포막 소포체 특이 IgG 항체가 양성을 나타낸 정상인(Control), 천식환자(Asthma), 만성폐쇄성폐질환자(COPD), 폐암환자(Lung cancer)에서 각 세균 유래 세포막 소포체에 감작된 개수의 분포를 나타낸 그림이다.
- [29] 도 8은, 세포막 소포체 특이 IgG1 항체가 양성을 나타낸 정상인(Control), 천식환자(Asthma), 만성폐쇄성폐질환자(COPD), 폐암환자(Lung cancer)에서 세균 유래 세포막 소포체에 감작된 개수의 분포를 나타낸 그림이다.
- [30] 도 9는, 세포막 소포체 특이 IgG4 항체가 양성을 나타낸 정상인(Control), 천식환자(Asthma), 만성폐쇄성폐질환자(COPD), 폐암환자(Lung cancer)에서 세균 유래 세포막 소포체에 감작된 개수의 분포를 나타낸 그림이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명은 실내 먼지에 존재하여 호흡기 염증성 질환을 유발하는 세균 유래 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질을 이용하여 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [32] 본 발명에서는 실내 먼지에 존재하여 염증성 호흡기질환을 유발하는 세균 유래 세포막 소포체의 특성을 평가하고 세포막 소포체의 원인인자(세균)를 동정하였다.
- [33] 본 발명의 일 실시예에서는, 실내 먼지에서 분리한 세포막 소포체의 DNA를 분리한 후 메타게놈 분석을 수행하여 세균 및 세균 유래 세포막 소포체의 분포를 분석하였다. 세균 문(phylum level) 수준에서 분석한 결과, 사계절 모든 경우 실내 먼지에는 그람 음성균인 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문 세균과 그람 양성균인 후벽균(*Firmicutes*) 문 세균이 대부분을 차지하였다. 좀 더 구체적으로 속(genus level) 수준에서는 실내 먼지 속에 그람 음성균인 경우 프로테오박테리아(*proteobacteria*) 문에 속하는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 속, 엔테로박터(*Enterobacter*) 속, 레클레르시아(*Leclercia*) 속 세균, 그람 양성균인 경우 후벽균(*Firmicutes*) 문에 속하는 포도상구균(*Staphylococcus*) 속 세균이 사계절 모두에서 주를 이루는 것으로 분석되었다(실시예 3 참조).
- [34] 본 발명의 다른 실시예에서는, 실내 먼지 내에 존재하는 세균 유래 세포막 소포체의 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 평가하기 위해 상기 질병을 앓고 있는 3가지 환자 그룹과 정상인 그룹에서 샘플을 얻어 세포막 소포체 특이 IgG 항체의 양을 측정하였다. 연관성 분석 결과, 정상인인 경우 4.4%, 천식환자인 경우 13.6%, 만성폐쇄성폐질환 환자인 경우 29.3%, 폐암환자인 경우 54.9%에서 세포막 소포체에 감작되어 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [35] 또한 multiple logistic regression analysis을 통하여 세포막 소포체에서의 감작 또는

흡연과 상기 질환들과의 연관성을 평가한 결과, 천식의 경우에는 세포막 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 사람에 비하여 발생위험이 3.3배 증가하였으며, 흡연자의 경우 비흡연자에 비하여 오히려 발생위험이 감소하였다. 만성폐쇄성폐질환의 경우, 세포막 소포체에 감작된 경우 그렇지 않은 경우에 비하여 발생위험이 8.0배 증가하였고, 흡연자의 경우 3.7배 증가하였다. 폐암의 경우에는 세포막 소포체에 감작된 경우 발생위험이 감작되지 않은 경우에 비하여 38.7배 증가하였고, 흡연을 하는 경우에는 2.7배 증가함을 확인하였다. 따라서 세포막 소포체에 대한 감작이 흡연의 경우보다 현저히 높은 위험성을 가지며 질환의 발병을 유도할 수 있음을 확인하였다(실시예 5 참조).

- [36] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 실시예 3에서 동정한 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 엔테로박터(*Enterobacter*) 속 세균에 해당하는 각각의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)에서 세포막 소포체를 분리하여 이에 대한 상기 각 그룹의 세포막 소포체 특이 IgG, IgG1, IgG4 항체를 측정하였다. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성을 평가한 결과, 각각 3.0배, 12.6배, 11.2배 발생위험이 증가하는 것으로 나타났다. 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 유래 세포막 소포체에의 감작하는 경우, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 발생위험은 각각 2.2배, 6.3배, 8.0배 증가하였다. 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 세포막 소포체에 감작하는 경우에는 각각 6.2배, 4.5배, 17.5배로 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 발생위험이 증가하였으며, 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*) 유래 세포막 소포체에 감작하는 경우에는 2.4배, 2.8배, 8.3배로 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 발생위험이 증가하는 것으로 나타났다(실시예 6 참조).

- [37] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 네 가지 세균 유래 세포막 소포체에 감작 개수와 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성을 분석하였다. 소포체 특이 IgG 항체를 측정한 경우 천식, 만성폐쇄성폐질환, 그리고 폐암환자에서 모두 3가지 이상 세균 유래 소포체에 대해 증가하였고, IgG1의 경우에는 만성폐쇄성폐질환과 폐암환자에서만 4가지 세균 유래 소포체 모두에 대해서 증가하였다. IgG4의 경우에는 폐암 환자에서 2가지 혹은 3가지 세균 유래 소포체에 대해 증가함을 확인하였다(실시예 7 참조).

- [38] 본 발명에서 사용되는 용어, '메타게놈'이란 '균유전체'라고도 하며, 흙, 동물의 장 등 고립된 지역 내의 모든 바이러스, 세균, 곰팡이 등을 포함하는 유전체의 총합을 의미하는 것으로, 주로 배양이 되지 않는 미생물을 분석하기 위해서 서열분석기를 사용하여 한꺼번에 많은 미생물을 동정하는 것을 설명하는 유전체의 개념으로 쓰인다. 특히, 메타게놈은 한 종의 게놈, 유전체를 말하는

것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체로서 일종의 혼합유전체를 말한다. 이는 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열분석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 분석하여, 한 환경 내에서의 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사작용을 규명하는 기법의 대상이다.

- [39] 본 발명은 환자샘플을 실내먼지 세균 유래의 세포밖 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질과 반응시키는 단계; 상기 반응물에 항-인간 IgG 항체를 반응시켜 샘플내 IgG 항체의 양을 측정하는 단계; 및 상기 샘플내 IgG 항체의 양이 정상인에 비하여 2배 이상 증가되어 있을 경우 호흡기 염증성 질환으로 판정하는 단계를 포함하는 호흡기 염증성 질환의 진단방법을 제공한다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 용어, “세포밖 소포체”는 다양한 세균에서 분비되는 나노크기의 나노소포체를 의미한다. 실내 먼지에 존재하는 세포밖 소포체는 실내에 서식하고 있는 세균, 집먼지 진드기, 바퀴, 애완동물, 인간 등을 포함한 다양한 생명체에 서식하거나 건축물을 포함한 구조물의 내부와 주변에 서식하는 여러 종류의 세균에 의해 생성될 수 있으며, 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 10-300 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 본 발명에서는 상기 세포밖 소포체를 대신해 항원으로써 세포밖 소포체에 포함된 단백질을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 본 발명의 상기 세포밖 소포체 및 이 소포체 유래 단백질은 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 엔테로박터(*Enterobacter*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 군에서 유래될 수 있고, 바람직하게는 포도상구균은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이고, 상기 아시네토박터는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)이고, 상기 슈도모나스는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이고, 상기 엔테로박터는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [43] 본 발명의 상기 환자샘플은 혈액 및 객담으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 본 발명의 상기 항체는 IgG, IgA, 또는 IgE일 수 있으며, IgG 항체는 IgG1 또는 IgG4일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 본 발명의 상기 호흡기 염증성 질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 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.
- [47]
- [48] [실시예]

[49] 실시예 1. 세포밖 소포체 추출

[50] 실내 공기에 존재하는 세포밖 소포체의 특성, 농도, 메타게놈 분석을 위해 봄(Spring), 여름(Summer), 가을(Fall), 겨울(Winter) 계절별로 서울에 있는 두 개의 아파트에 있는 침대 매트리스에서 먼지를 포집하여 세포밖 소포체를 분리, 동정하는 실험을 수행하였다.

[51] 구체적으로, 진공청소기를 사용해 침대 매트리스에 존재하는 먼지를 수거한 후 진공청소기의 필터 내에 존재하는 먼지를 깨끗한 유리병에 옮겨 담고 질량을 측정하였다. 실내 먼지 5 g을 200 ml의 PBS(phosphate-buffered saline)가 들어있는 비커에 넣고 4°C에서 12시간 동안 녹여내었다. 이후 일차적으로 거즈를 이용하여 큰 이물질들을 걸러내고, 걸러져 나온 용액을 고속원심분리 튜브(high speed centrifuge tube)에 나눠 담은 후, 4°C, 10,000 x g에서 15분 동안 고속원심분리(high speed centrifugation)를 연속으로 2번 수행하였다. 180 ml 가량의 상층액을 구멍 직경이 0.45 μm 인 멤브레인 필터(membrane filter)에 1회 통과시킨 후, 걸러진 상층액을 70 ml 용량의 초원심분리 튜브(ultracentrifuge tube)에 나눠 담고 4°C, 100,000 x g에서 4시간 동안 초원심분리(ultracentrifugation)를 수행하였다. 상층액은 버리고 튜브 아래에 존재하는 침전물을 PBS로 녹여 세포밖 소포체를 추출하였다.

[52] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 봄, 여름, 가을, 겨울에 두 아파트 침대 매트리스에서 분리한 먼지에는 각각 115.6, 83.8, 71.3, 96.1 $\mu\text{g}(\text{protein/g dust})$ 의 세포밖 소포체가 포함되어 있음을 확인하였다.

[53]

[54] 실시예 2. 실내 먼지에서 분리한 세포밖 소포체의 특성 평가

[55] 실시예 1의 방법으로 분리한 세포밖 소포체의 특성을 평가하기 위하여 투과전자현미경(transmission electron microscopy; TEM)을 통해 세포밖 소포체를 관찰하였다. 침대 매트리스 먼지에서 분리한 세포밖 소포체를 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 후, 10 μl 를 400-메쉬 구리 그리드(mesh copper grids)에 안착시켰다. 이후 2% 우라닐아세테이트(uranyl acetate)로 염색하고 수분을 날린 후 JEM1011 현미경(JEOL, Peabody, MA, USA)을 이용하여 100 kV 조건하에서 관찰하였다.

[56] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 봄, 여름, 가을, 겨울에 분리한 먼지 내에 동그란 모양의 소포체가 함유되어 있음을 확인하였다.

[57] 다음으로 동적 광산란법(dynamic light scattering)을 통하여 침대 매트리스 먼지에서 분리한 세포밖 소포체의 크기를 측정하였다. 상기 세포밖 소포체를 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 후, 1 ml을 큐벳(cuvette)에 넣고 Zetasizer Nano S(Malvern Instrument Ltd. Worcestershire, UK)를 이용하여 633 nm 파장에서 광산란 정도를 측정하였다(30초 x 10회/sample).

[58] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 봄, 여름, 가을 및 겨울에 침대 매트리스 먼지에서 분리한 세포밖 소포체의 크기는 각각 30-220, 20-100, 30-220 그리고 50-250 nm로 나타났다.

[59]

[60] 실시예 3. 실내 먼지에 존재하는 세균 및 세균 유래 세포막 소포체 메타게놈(metagenome) 분석

[61] 실내 먼지에 존재하는 세균 및 세포막 소포체로부터 DNA를 추출하여 메타게놈분석을 수행하여 세균 및 세균 유래 세포막 소포체의 분포를 문 수준(phylum level) 및 속 수준(genus level)으로 분석하였다.

[62] 구체적으로, 실내 먼지에 존재하는 세균 및 세포막 소포체에서 DNA 추출 kit (Bioneer Inc., Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하여 얻었으며, DNA 라이브러리는 GS FLX titanium library prep guide에 따라 제작하였다. 이후 제작 라이브러리는 Picogreen assay(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 정량하였으며, 제작 라이브러리 증폭을 위해 에멀전 PCR(emulsion PCR; emPCR)을 GSFLX titanium emPCR Kit(454 Life Sciences, Basel, Switzerland)를 이용하여 수행하였다. 제작 라이브러리를 비드(bead) 위에 고정한 후, amplification mix 및 오일과 섞어 Tissue Lyser II(Qiagen, Limburg, Netherlands)에서 격렬하게 섞은 후 “micro-reactors”를 형성하고, 유액은 96-well plate에 분주 후 PCR 증폭반응을 수행하였다. 분리한 DNA의 유전자 염기서열 분석을 위해 상기의 방법으로 분리한 DNA를 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭한 후, 화학적으로 에멀전 상태를 깨고 필터를 통해 증폭된 라이브러리가 붙어있는 bead를 분리하였다. 이후 스트렙타비딘이 코팅된 마그네틱 비드(streptavidin-coated magnetic beads)에 붙을 수 있는 biotinylated primer A(complementary to adaptor A)를 이용하여 증폭된 라이브러리가 붙어있는 비드만을 정제하였다. 다음으로 열에 의한 DNA 이중나선 분리를 통해 비드에 붙어있는 단일 가닥의 주형 DNA 단편들로 만들었다. 이후, 분리한 주형 단일가닥 DNA에 시퀀싱(sequencing)용 프라이머를 붙이고, particle counter(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 비드의 수를 측정하였다. Genome Sequencer FLX titanium sequencer(454 Life Sciences)를 이용하여 시퀀싱을 수행하였으며, 각 샘플은 8 레인 개스킷이 장착된 70-75-mm PicoTiter plate(454 Life Sciences)의 한 부분에 넣어주었다.

[63] 모든 시퀀스는 BLASTN 및 EzTaxon 데이터베이스를 이용하여 비교하였다. 시퀀스 중 유사하거나, 100 bit score 이상, 1.0 E-value 이하의 값을 가지는 것은 부분적인 16s rRNA로 간주하였다. 비 16S rRNA 시퀀스는 1% 미만으로 나타났다. 판독한 시퀀스는 EzTaxon 데이터베이스를 이용하여 분류학적으로 분류하였다. 각 시퀀스 판독을 위해 데이터베이스에서 가장 유사한 다섯 시퀀스를 bit score에 따라 BLASTN 프로그램에서 추출하였다. 이 다섯 시퀀스에서, ClustalW 프로그램을 사용하여 유사도를 측정하였으며, 읽어들이 시퀀스와 가장 높은 유사도를 보이는 시퀀스를 분류를 위해 사용하였다. 분류상, 속의 경우 94%, 문의 경우 75% 이상의 유사도 기준으로 분류하였다.

[64] 각 샘플별 세균 및 세균 유래 세포막 소포체의 분포를 문 수준(phylum

level)에서 분석한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 세균(Bacteria) 유래의 경우, 사계절 모두에서 그람 음성균인 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문 세균이 95% 이상으로 나타났고, 그람 양성균으로 후벽균(*Firmicutes*), 방선균(*Actinobacteria*) 문 세균이 그 다음을 차지하였다. 먼지 내 세포막 소포체(EV)인 경우, 사계절 모두 그람 음성균인 프로테오박테리아(*Proteobacteria*) 문 세균에서 유래하는 세포막 소포체가 90% 이상을 차지하였고, 그람 양성균인 후벽균(*Firmicutes*) 문 세균 유래 세포막 소포체가 그 다음을 차지하였다.

- [65] 또한, 먼지 내에 존재하는 세균 및 세균 유래 세포막 소포체의 분포를 속 수준(genus level)에서 분석하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 세균(Bacteria) 유래의 경우 그람 음성균인 경우에 *Proteobacteria* 문에 속하는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 속, 엔테로박터(*Enterobacter*) 속, 레클레르시아(*Leclercia*) 속 세균이 사계절 모두에서 주를 이루었고, 그람 양성균인 경우, *Firmicutes* 문에 속하는 포도상구균(*Staphylococcus*) 속 세균이 사계절 모두에서 주를 이루었다. 먼지 속 세균 유래 세포막 소포체 분포를 평가하였을 때, 그람 음성균인 경우에 역시 *Proteobacteria* 문에 속하는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속, 아시네토박터(*Acinetobacter*) 속, 엔테로박터(*Enterobacter*) 속, 레클레르시아(*Leclercia*) 속 세균이 사계절 모두에서 주를 이루었고, 그람 양성균인 경우, *Firmicutes* 문에 속하는 포도상구균(*Staphylococcus*) 속 세균이 사계절 모두에서 주를 이루는 것으로 나타났다.

[66]

- [67] 실시예 4. 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암 환자 샘플에서 실내 먼지 내 소포체 특이 IgG 항체 측정

- [68] 실내 먼지 내에 존재하는 세균 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 평가하기 위하여, 4가지 그룹에서 혈액 및 객담에서 샘플을 준비하여 평가를 수행하였다. 첫 번째 그룹은 가역적 기도 폐색에 근거한 내과진단을 받은 294명의 천식(Asthma) 환자로 구성되었고, 두 번째 그룹은 흡연 이력에 관계없이 기관지 확장제 사용 후, 1초간 호기량/총폐활량(FEV1/FVC)이 0.7을 넘는 242명의 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD) 환자로 이루어졌다. 세 번째 그룹은 2003년 11월부터 2011년 3월까지 단국대학교 병원에 폐암(Lung cancer)으로 진단받은 환자들로 구성되었으며, 네 번째 그룹은 대조군(Control)으로써 내과 건강진단 결과, 호흡기 질환이 없는 90명의 일반인으로 구성되었다. 상기 4가지 그룹을 하기 표 1에 자세히 나타내었다.

[69] [표1]

	Subjects			
	Control	Asthma	COPD	Lung cancer
Number of subjects	90	294	242	325
Age (years)*	51±10	55±15	66±7	66±9
Male, %	57	42	88	84
Cigarette smoker, %	50	27	85	75

[70] *Mean±standard deviation

[71]

[72] 실내 먼지에 존재하는 세포막 소포체에 대한 감작유무를 평가하기 위하여 상기 환자 및 대조군에서 얻은 샘플에서 소포체 특이 IgG 항체를 측정하였다. 세포막 소포체 특이 IgG 항체의 양을 측정하기 위해 50 ng의 세포막 소포체를 96-well plate의 각 well에 하루 동안 안착시켰다. 세포막 소포체 특이 IgG 항체의 정량을 위해 anti-human IgG 항체를 세포막 소포체 대신 안착하였다. 다음날, 5% 탈지분유로 항체 및 세포막 소포체 안착 간극을 메우고, 확보한 샘플을 5% 탈지분유에 1000배 희석하여 반응시켰다. 다음으로 홀스레디쉬 페록시다아제가 접합된 2차 항체(Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG)(abcam, Cambridge, UK)를 5% 탈지분유액에 희석하여 반응시킨 후, microplate reader를 통해 IgG 항체의 양을 측정하였다. 먼지 내 세포막 소포체에 대한 감작은 정상인 샘플에 존재하는 소포체 특이 IgG 항체 값의 95% 이상을 보이는 경우에 양성으로 정의하였다.

[73] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 정상인인 경우 4.4%, 천식환자인 경우 13.6%, 만성폐쇄성폐질환 환자인 경우 29.3%, 폐암환자인 경우 54.9%에서 감작되어 있었다.

[74]

[75] 실시예 5. 실내 먼지 내 세포막 소포체에 대한 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석

[76] 실내 먼지내 세균 유래 세포막 소포체에 대한 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 multiple logistic regression analysis로 분석하였다. 흡연 혹은 실내 먼지 내 세포막 소포체에서의 감작과 천식과의 연관성을 평가한 결과, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 실내 먼지내 세포막 소포체에 감작된 경우 천식의 발생 위험은 감작되지 않은 사람에 비하여 3.3배 증가한 반면, 흡연을 하는 경우에는 비흡연자에 비하여 천식 발생이 오히려 감소하였다.

[77] [표2]

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	odds ratio	95% confidence interval	p-value†	odds ratio	95% confidence interval	p-value†
Aging	1.02	1.00-1.04	0.023	1.03	1.01-1.05	0.002
Female gender	1.8	1.12-2.92	0.015	0.7	0.3-1.5	0.352
Cigarette smoking	0.4	0.2-0.6	<0.001	0.3	0.1-0.6	0.001
Anti-dust EV IgG (+)*	3.4	1.2-9.7	0.024	3.3	1.1-10.0	0.039

[78] *High serum IgG against dust EVs (extracellular vesicles)

[79] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[80]

[81] 또한, 흡연 혹은 실내 먼지 내 소포체에의 감작과 만성폐쇄성폐질환과의 연관성을 분석하였을 때, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 먼지 내 세포밖 소포체에 감작된 경우에 질환의 발생이 감작되지 않은 사람에 비하여 8.0배 증가하였고, 흡연을 하는 경우에도 비흡연자에 비하여 3.7배 증가하였다.

[82] [표3]

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	odds ratio	95% confidence interval	p-value†	odds ratio	95% confidence interval	p-value†
Aging	1.2	1.2-1.3	<0.001	1.2	1.1-1.2	<0.001
Female gender	0.2	0.1-0.3	<0.001	1.0	0.3-2.8	0.93
Cigarette smoking	5.5	3.2-9.5	<0.001	3.7	1.4-10.1	0.01
Anti-dust EV IgG (+)*	8.9	3.2-25.3	<0.001	8.0	2.0-32.5	0.003

[83] *High serum IgG against dust EVs (extracellular vesicles)

[84] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[85]

[86] 또한, 흡연 혹은 실내 먼지 내 소포체에의 감작과 폐암 발생과의 연관성을 평가하였을 때, 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 먼지 내 세포밖 소포체에 감작된 경우 폐암 발생의 위험이 감작되지 않은 사람에 비하여 38.7배 증가하였고, 흡연을 하는 경우에 비흡연자에 비하여 2.7배 증가하였다.

[87] [표4]

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	odds ratio	95% confidence interval	p-value†	odds ratio	95% confidence interval	p-value†
Aging	1.2	1.1-1.2	<0.001	1.2	1.1-1.2	<0.001
Female gender	0.2	0.1-0.4	<0.001	0.7	0.3-1.8	0.45
Cigarette smoking	3.1	1.9-5.0	<0.001	2.7	1.1-7.0	0.03
Anti-dust EV IgG (+)*	26.0	9.3-72.6	<0.001	38.7	10.4-144.3	<0.001

[88] *High serum IgG against dust EVs (extracellular vesicles)

[89] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[90]

[91] 실시예 6. 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암 환자 샘플에서 *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* 속 세균 유래 세포막 소포체 특이 IgG, IgG1, IgG4 항체 측정

[92] **6-1. 각 세균 유래 세포막 소포체 분리 및 세포막 소포체 특이 IgG, IgG1, IgG4 항체 측정**

[93] 실시예 3의 메타게놈분석 결과에서 실내 먼지 내 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 엔테로박터(*Enterobacter*) 속 세균 유래 세포막 소포체가 다량 존재한다는 연구결과를 토대로 하여, 상기 실시예 4에서 기술한 4가지 그룹, 즉, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암, 및 정상인의 혈액 및 객담에서 상기 세균에서 유래하는 세포막 소포체에 대한 특이 IgG, IgG1, IgG4 항체를 측정하였다.

[94] 각 속에 해당하는 세균 즉, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)를 액체 영양배지에 접종하고 교반/항온 배양기 내 37°C 하에서 흡광도 1.5가 될 때까지 배양하였다. 이후 고속원심분리기를 이용하여 4°C, 10,000 x g에서 20분 동안 원심분리를 수행하여 세균 및 상층액으로 분리하고, 상층액 부분만을 취하여 0.45 µm인 멤브레인 필터(membrane filter)에 1회 통과시켰다. 다음으로 고속원심분리를 위한 농축을 위해 농축기(quickstand, GE healthcare)로 상층액을 300 ml까지 농축 후, 다시 0.22 µm인 멤브레인 필터(membrane filter)에 1회 통과시켰다. 이를 초고속원심분리용 튜브(45 Ti, 70 ml, Beckman coulter)에 나눠 담고 4°C, 100,000 x g에서 3시간 동안 초고속 원심분리를 수행하였으며, 상층액 부분은 버리고 튜브 하단의 침전물을 PBS로 현탁하여 세포막 소포체를 분리하였다.

[95] 환자 샘플내 세포막 소포체 특이 항체 즉, IgG, IgG1, IgG4의 양을 측정하기

위해 상기 세균들에서 분리한 세포막 소포체 50 ng을 96-well plate의 각 well에 하루 동안 안착시켰다. 세포막 소포체 특이 IgG, IgG1, IgG4 정량을 위해 각각 anti-human IgG 항체, anti-human IgG1 항체, anti-human IgG4 항체를 세포막 소포체 대신 안착하였다. 다음날, 5% 탈지분유로 항체 및 세포막 소포체 안착 간극을 메우고, 확보한 샘플을 5% 탈지분유에 1000배 희석하여 반응시켰다. 다음으로 홀스레디쉬 페록시다아제가 접합된 각 2차 항체(Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG4)(abcam, Cambridge, UK)를 5% 탈지분유액에 희석하여 반응시킨 후, microplate reader를 통해 각 IgG 항체의 양을 측정하였다. 각각의 세균 유래 세포막 소포체에의 감작은 정상인의 혈액 및 객담에 존재하는 소포체 특이 IgG, IgG1, IgG4 항체 값의 95% 이상을 보이는 경우에 양성으로 정의하였다.

[96]

[97] **6-2. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석**

[98] 황색포도상구균 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 multiple logistic regression analysis로 분석하였다.

[99] 그 결과, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에의 감작과 천식과의 연관성을 평가한 경우, 소포체에 감작된 경우 천식의 발생 위험은 감작되지 않은 사람에 비하여 3.0배 증가하였다. 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에의 감작과 만성폐쇄성폐질환의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 사람에 비하여 12.6배 발생률이 증가하였다. 또한, 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에의 감작과 폐암과의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 경우에 비하여 폐암 발생률이 11.2배 증가하는 것으로 나타났다.

[100] [표5]

	Asthma		COPD		Lung cancer	
	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†
Aging	1.0 (1.0-1.0)	0.003	1.2 (1.1-1.3)	<0.001	1.2 (1.1-1.2)	<0.001
Female gender	0.8 (0.4-1.6)	0.497	0.9 (0.3-2.8)	0.90	0.5 (0.2-1.2)	0.11
Cigarette smoking	0.3 (0.2-0.7)	0.005	5.6 (2.0-15.8)	0.001	2.0 (0.9-4.5)	0.11
Anti-staphylococcal EV IgG (+)*	3.0 (1.0-8.9)	0.048	12.6 (2.7-59.4)	0.001	11.2 (3.1-40.2)	<0.001

[101] *High serum IgG against dust EVs (extracellular vesicles)

[102] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[103]

[104] **6-3.** 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 유래 세포밖 소포체
감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석[105] 아시네토박터 바우마니균 유래 세포밖 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환,
폐암과의 연관성을 multiple logistic regression analysis로 분석하였다.[106] 그 결과, 하기 표 6에 나타낸 바와 같이, 아시네토박터 바우마니균 유래 세포밖
소포체에의 감작과 천식과의 연관성을 평가한 결과, 소포체에 감작된 경우
천식의 발생 위험은 감작되지 않은 사람에 비하여 2.2배 증가하였다.
아시네토박터균 바우마니균 유래 세포밖 소포체에의 감작과
만성폐쇄성폐질환의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지
않은 사람에 비하여 6.3배 발생률이 증가하였다. 또한, 아시네토박터 바우마니균
유래 세포밖 소포체에의 감작과 폐암과의 연관성을 분석한 결과, 소포체에
감작된 경우 감작되지 않은 경우에 비하여 폐암 발생률이 8.0배 증가하는 것으로
나타났다.

[107] [표6]

	Asthma		COPD		Lung cancer	
	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†
Aging	1.0 (1.0-1.0)	0.004	1.2 (1.1-1.2)	<0.001	1.1 (1.1-1.2)	<0.001
Female gender	0.7 (0.3-1.5)	0.375	0.7 (0.2-2.1)	0.541	0.5 (0.2-1.2)	0.099
Cigarette smoking	0.3 (0.1-0.6)	0.001	3.3 (1.2-9.2)	0.021	2.0 (0.9-4.6)	0.108
Anti-Acinetobacter EV IgG (+)*	2.2 (0.7-6.7)	0.158	6.3 (1.5-26.7)	0.013	8.0 (2.1-30.2)	0.002

[108] *High serum IgG against Acinetobacter EVs (extracellular vesicles)

[109] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[110]

[111] **6-4. 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석**

[112] 녹농균 유래 세포막 소포체 감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 multiple logistic regression analysis로 분석하였다.

[113] 그 결과, 하기 표 7에 나타낸 바와 같이, 녹농균 유래 세포막 소포체에의 감작과 천식과의 연관성을 평가한 결과, 소포체에 감작된 경우 천식의 발생 위험은 감작되지 않은 사람에 비하여 6.2배 증가하였다. 녹농균 유래 세포막 소포체에의 감작과 만성폐쇄성폐질환의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 사람에 비하여 4.5배 발생률이 증가하였다. 또한, 녹농균 유래 세포막 소포체에의 감작과 폐암과의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 경우에 비하여 폐암 발생률이 17.5배 증가하는 것으로 나타났다.

[114] [표7]

	Asthma		COPD		Lung cancer	
	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†
Aging	1.0 (1.0-1.1)	0.003	1.2 (1.1-1.2)	<0.001	1.2 (1.1-1.2)	<0.001
Female gender	0.8 (0.4-1.7)	0.594	1.0 (0.3-3.0)	0.997	0.5 (0.2-1.3)	0.168
Cigarette smoking	0.3 (0.2-0.7)	0.005	4.3 (1.6-11.8)	0.005	2.0 (0.8-4.7)	0.133
Anti-Pseudomonas EV IgG (+)*	6.2 (2.1-18.0)	0.001	4.5 (1.2-16.6)	0.024	17.5 (4.7-64.5)	<0.001

[115] *High serum IgG against Pseudomonas EVs (extracellular vesicles)

[116] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[117]

[118] **6-5. 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*) 유래 세포막 소포체**
감작과 천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석[119] 엔테로박터 에어로게네스균 유래 세포막 소포체 감작과 천식,
만성폐쇄성폐질환, 폐암과의 연관성을 multiple logistic regression analysis로
분석하였다.[120] 그 결과, 하기 표 8에 나타낸 바와 같이, 엔테로박터 에어로게네스균 유래
세포막 소포체에의 감작과 천식과의 연관성을 평가한 결과, 소포체에 감작된
경우 천식의 발생 위험은 감작되지 않은 사람에 비하여 2.4배 증가하였다.
엔테로박터 에어로게네스균 유래 세포막 소포체에의 감작과
만성폐쇄성폐질환의 연관성을 분석한 결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지
않은 사람에 비하여 2.8배 발생률이 증가하였다. 또한, 엔테로박터
에어로게네스균 유래 세포막 소포체에의 감작과 폐암과의 연관성을 분석한
결과, 소포체에 감작된 경우 감작되지 않은 경우에 비하여 폐암 발생률이 8.3배
증가하는 것으로 나타났다.

[121] [표8]

	Asthma		COPD		Lung cancer	
	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†	odds ratio (95% CI)	p- value†
Aging	1.0 (1.0-1.0)	0.005	1.2 (1.1-1.2)	<0.001	1.2 (1.1-1.2)	<0.001
Female gender	0.8 (0.4-1.7)	0.564	1.0 (0.3-3.1)	0.954	0.6 (0.3-1.6)	0.358
Cigarette smoking	0.3 (0.1-0.7)	0.004	4.6 (1.7-12.7)	0.003	2.3 (1.0-5.4)	0.058
Anti-Enterovacter EV IgG (+)*	2.4 (0.8-7.2)	0.122	2.8 (0.8-10.1)	0.112	8.3 (2.3-30.0)	0.001

[122] *High serum IgG against Enterovacter EVs (extracellular vesicles)

[123] †Linear logistic regression analysis vs. control subjects

[124]

[125] 실시예 7. 상기 네 가지 세균 유래 세포막 소포체에 감작 개수와 천식, 만성 폐쇄성폐질환, 폐암의 연관성 분석[126] 실시예 6의 4가지 세균 즉, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*) 유래 세포막 소포체에 대해 질환별 감작개수와 연관성을 확인해보고자 하였다.

[127] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, IgG 항체를 측정하였을 때 상기 네 가지 세균유래 세포막 소포체 중에서 3가지 이상의 세균 유래 소포체에 IgG 항체가 증가된 경우는 정상인에는 없었고, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 그리고 폐암환자에서만 관찰되었다. 상기 4가지 세균 유래 소포체 모두에 IgG1 항체가 증가된 경우에는 도 8에 나타낸 바와 같이, 정상인과 천식환자에선 관찰되지 않았고, 만성폐쇄성폐질환과 폐암환자에서만 관찰되었다. 또한, 상기 4가지 세균 유래 소포체 중에서 2가지 혹은 3가지의 소포체에 특이 IgG4가 증가된 경우는 폐암환자에서 두드러지게 관찰됨을 도 9에 나타내었다.

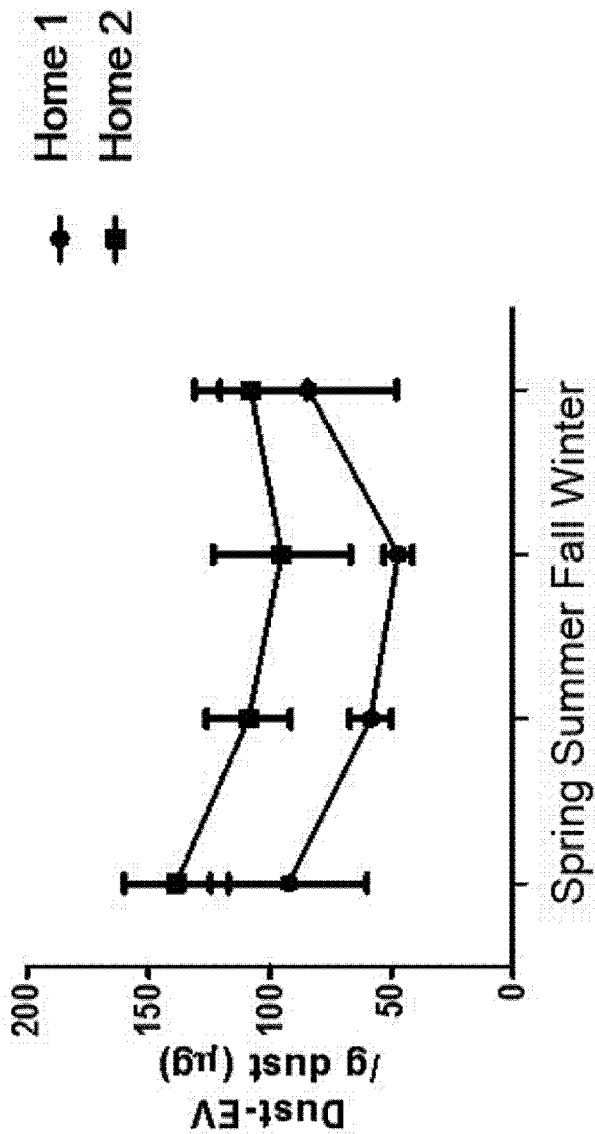
[128]

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

청구범위

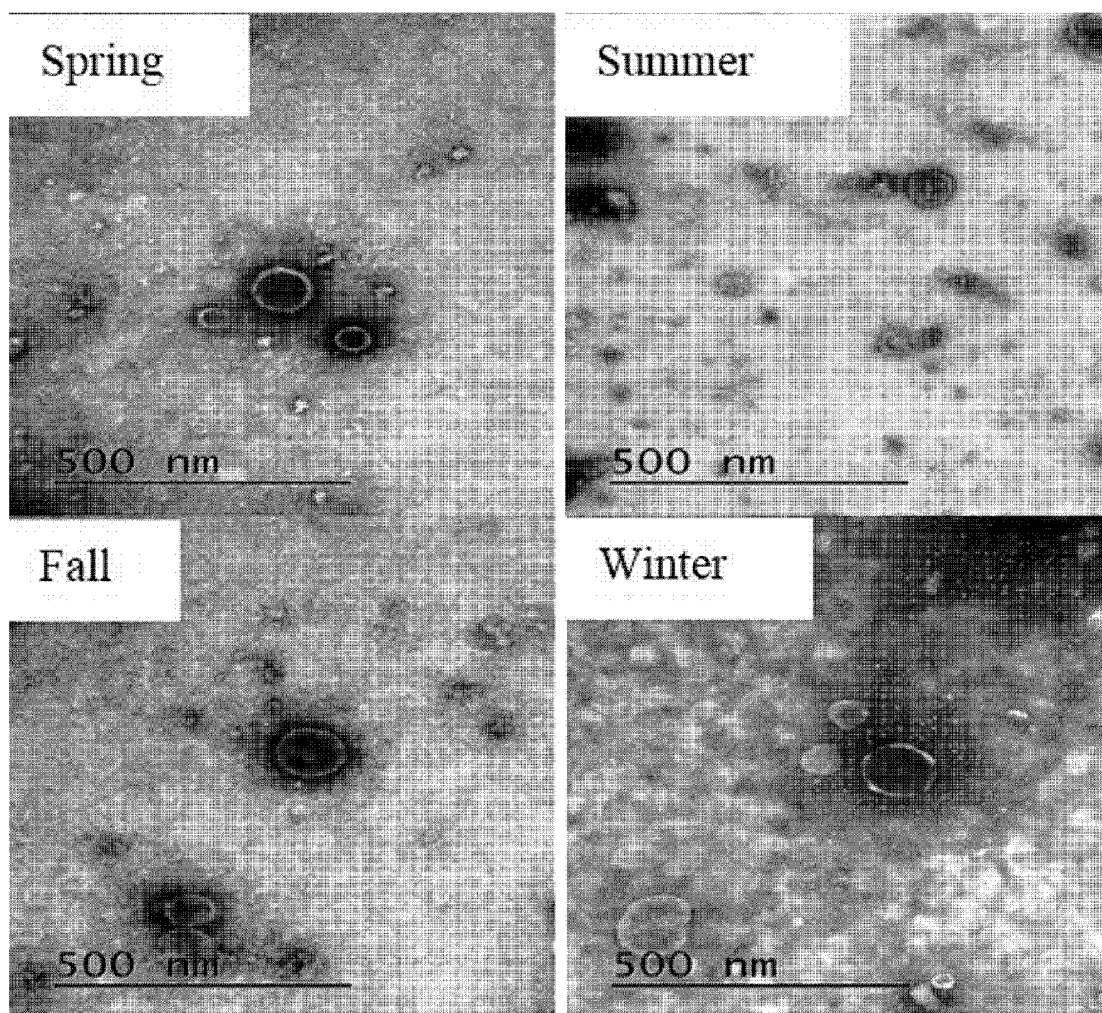
- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 호흡기 염증성 질환의 진단방법:
(A) 환자샘플을 실내먼지 세균 유래의 세포막 소포체 또는 이 소포체 유래 단백질과 반응시키는 단계;
(B) 상기 반응물에 항-인간 IgG 항체를 반응시켜 샘플내 IgG 항체의 양을 측정하는 단계; 및
(C) 상기 샘플내 IgG 항체의 양이 정상인에 비하여 2배 이상 증가되어 있을 경우 호흡기 염증성 질환으로 판정하는 단계.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 세포막 소포체 및 단백질은 포도상구균(*Staphylococcus*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 엔테로박터(*Enterobacter*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 군에서 유래되는 것임을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 포도상구균은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이고, 상기 아시네토박터는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*)이고, 상기 슈도모나스는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이고, 상기 엔테로박터는 엔테로박터 에어로게네스(*Enterobacter aerogenes*)인 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 환자샘플은 혈액 및 객담으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 IgG 항체는 IgG1 또는 IgG4인 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 세포막 소포체는 평균 직경이 10-300 nm인 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 호흡기 염증성 질환은 천식, 만성폐쇄성폐질환, 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 진단방법.
- [청구항 8] 실내먼지 세균 유래 세포막 소포체의 호흡기 염증성 질환 진단용도.

[도1]

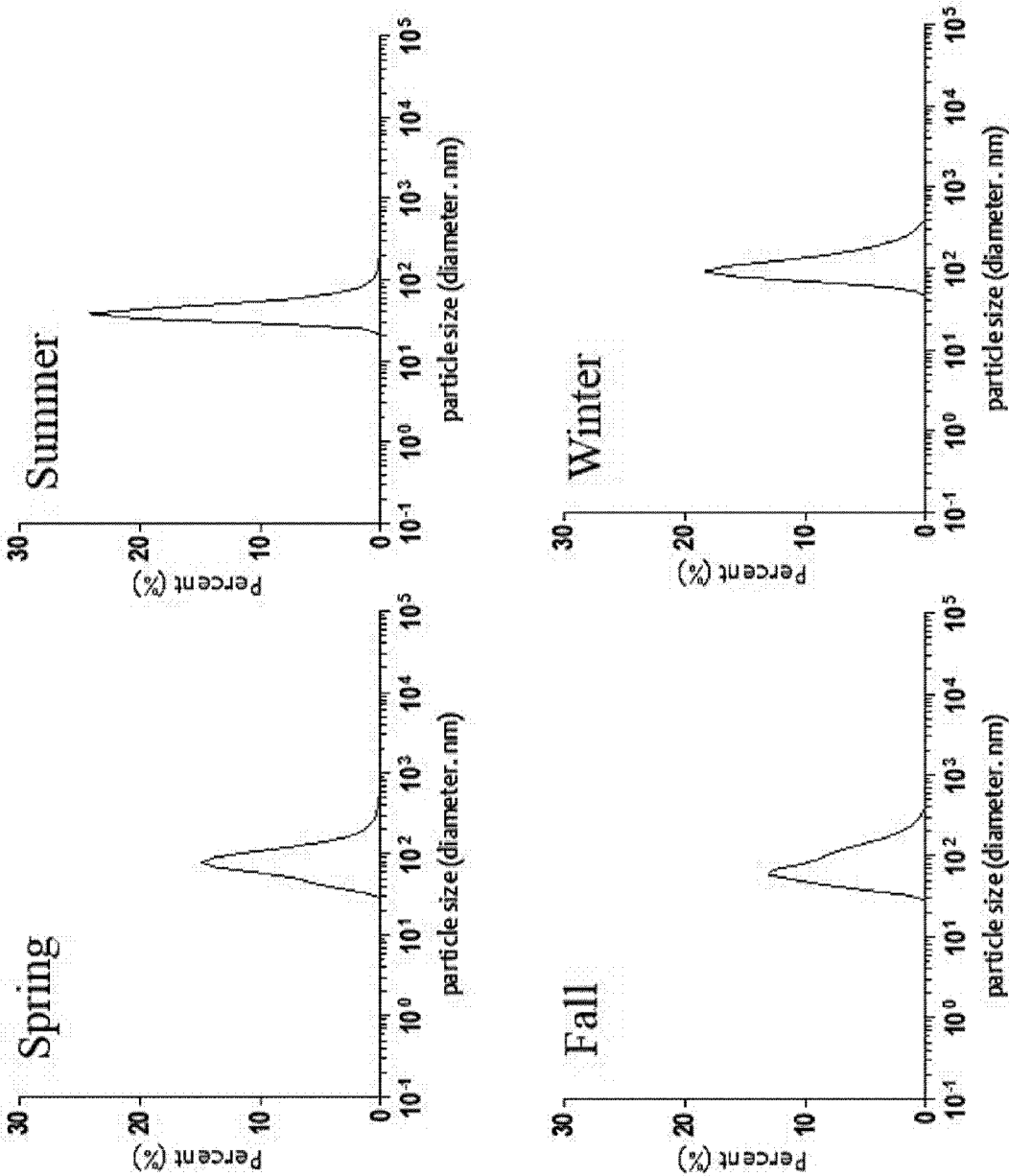


	Spring	Summer	Fall	Winter
EV amounts (mean) (µg /g of dust)	115.6	83.8	71.3	96.1

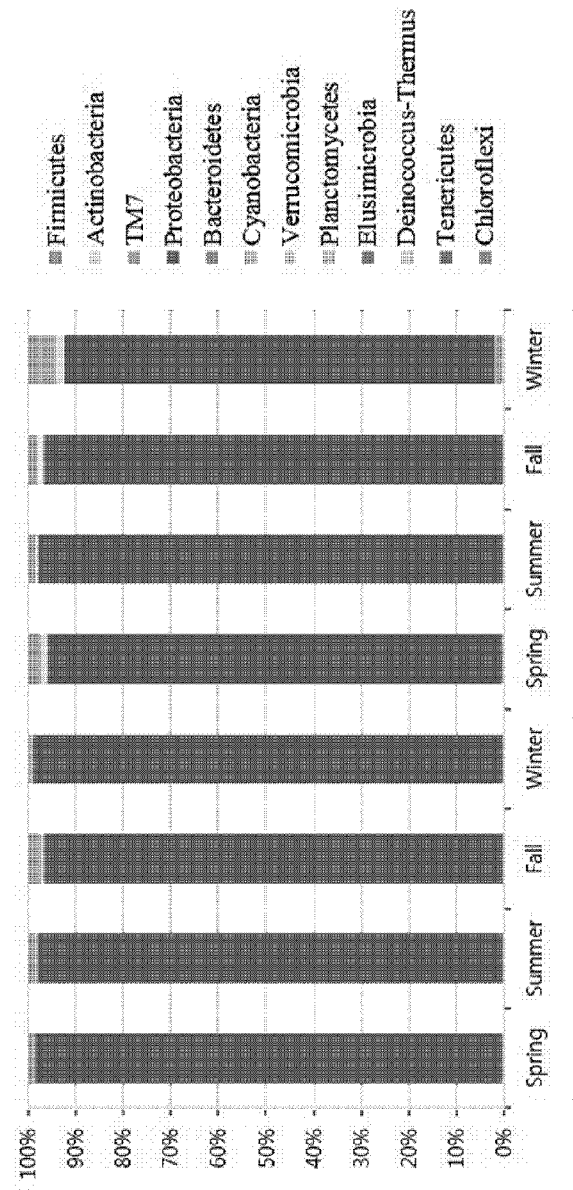
[도2]



[도3]



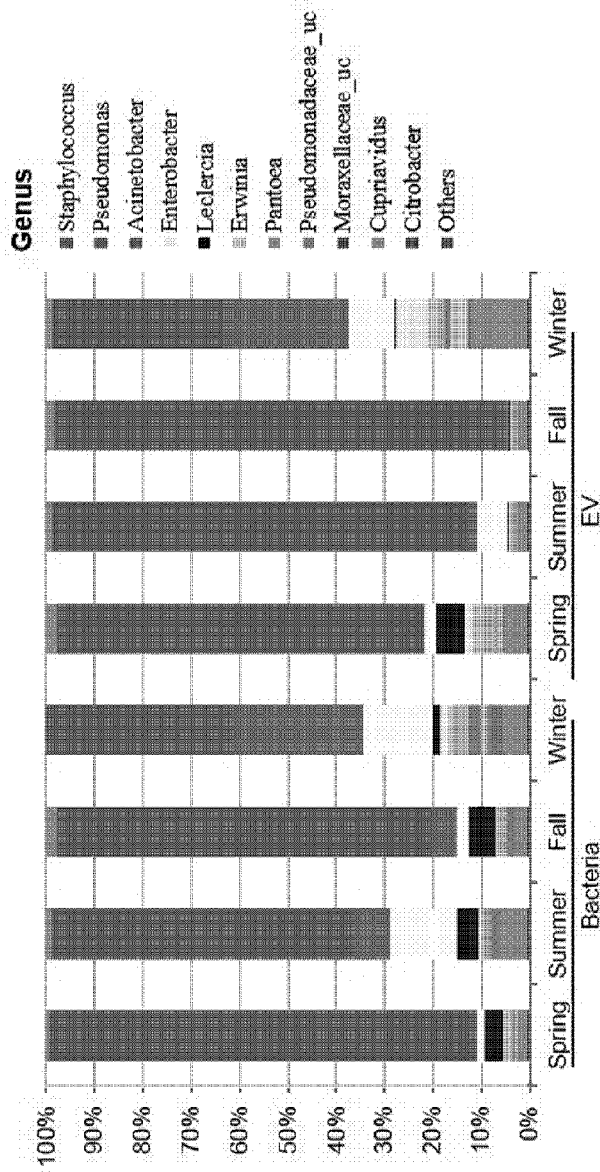
[도4]



EV

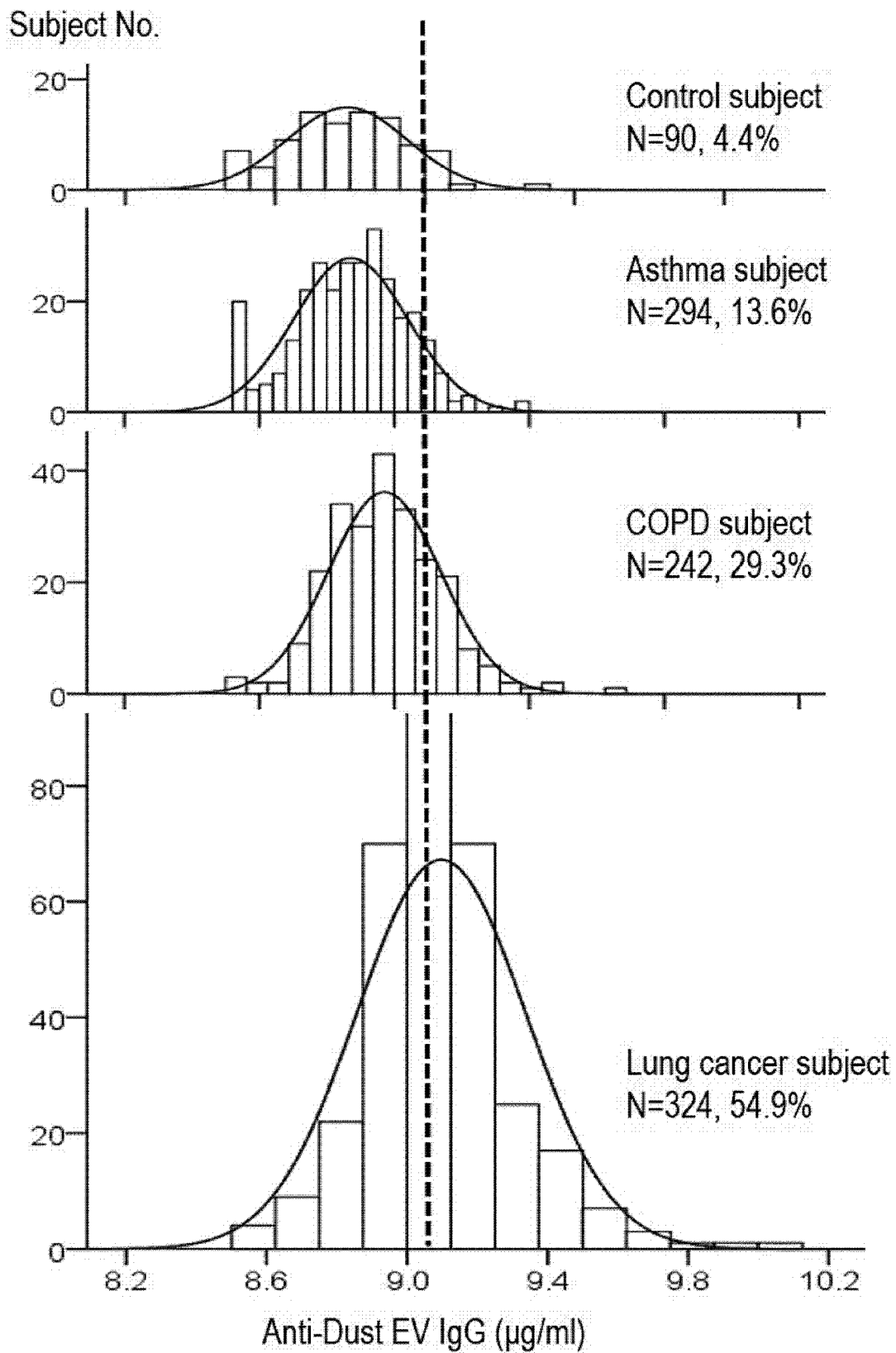
Phylum		Bacteria (%)				EV (%)			
		Spring		Fall		Spring		Summer	
		Spring	Summer	Fall	Winter	Spring	Summer	Fall	Winter
Gram (+)	Firmicutes	1.1	1.4	2.7	0.2	2.6	1.6	1.9	5.8
	Actinobacteria	0.3	0.4	0.6	0.8	1.1	0.5	1.3	1.7
	TM7	0.1	0.1	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0
	Proteobacteria	98.0	97.8	96.6	99.0	95.3	97.8	96.7	90.6
	Bacteroidetes	0.4	0.2	0.1	0.0	0.5	0.1	0.0	1.6
Gram (-)	Cyanobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	Verrucomicrobia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	Planctomycetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	Elusimicrobia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	Deinococcus-Thermus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Tenericutes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Chloroflexi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[도5]

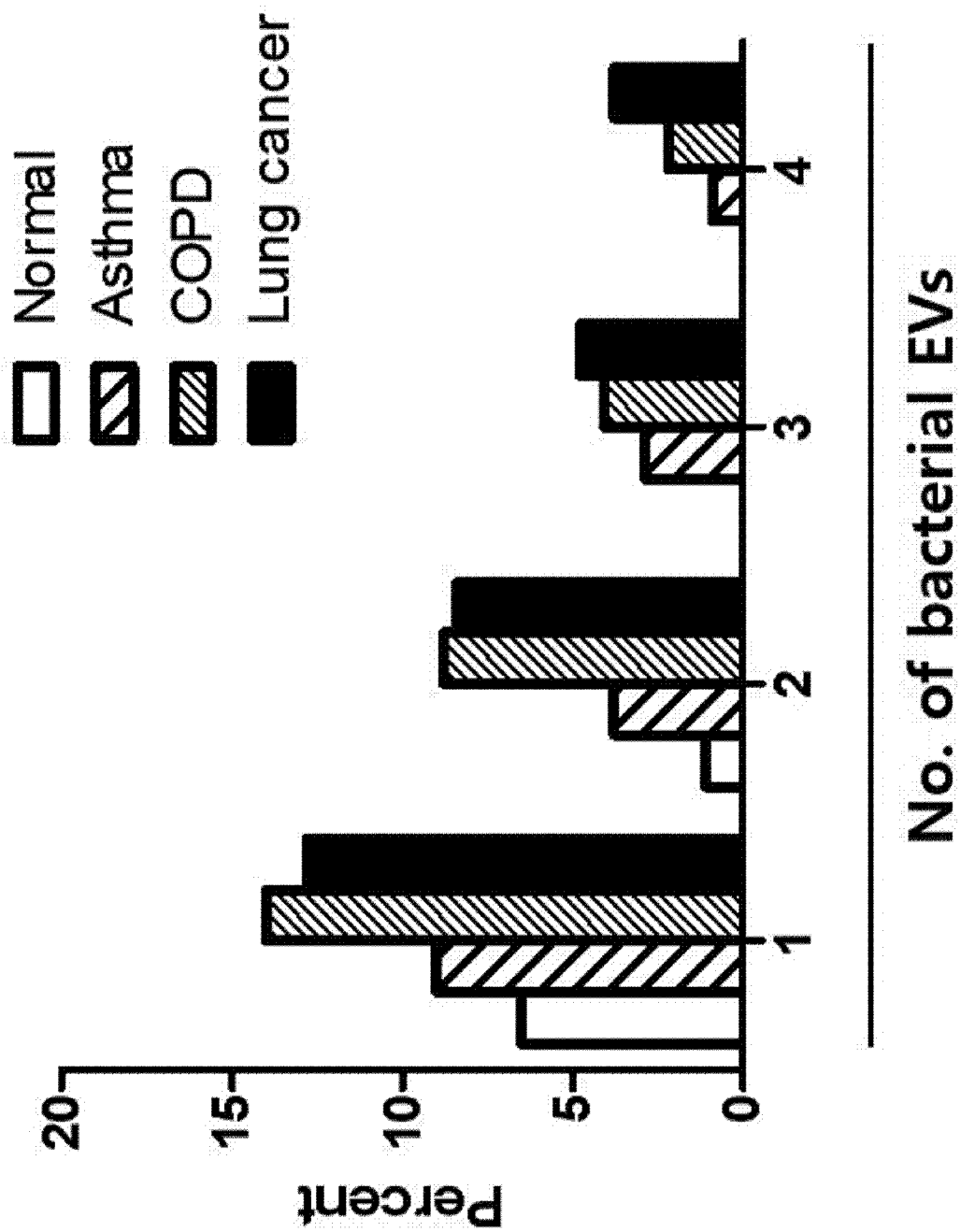


Genus	Bacteria (%)				EV (%)			
	Spring	Summer	Fall	Winter	Spring	Summer	Fall	Winter
Gram +								
Staphylococcus	0.8	1.0	2.2	0.2	2.2	1.4	1.6	1.4
Pseudomonas	88.2	62.9	77.6	38.4	75.8	85.8	93.5	35.0
Acinetobacter	0.3	7.2	5.3	27.0	0.4	2.0	0.6	26.1
Enterobacter	1.5	13.9	2.4	14.5	2.4	6.2	0.2	9.3
Leclercia	3.9	4.6	5.6	1.4	5.8	0.3	0.1	0.6
Erwinia	0.3	0.3	0.1	1.9	1.8	0.1	0.0	6.6
Pantoea	1.0	0.7	0.8	1.0	3.9	0.5	0.5	2.0
Pseudomonadaceae_uc	0.7	1.5	1.3	3.1	0.6	0.9	0.5	1.3
Moraxellaceae_uc	0.1	1.2	1.4	2.8	0.3	0.4	0.4	1.1
Cupriavidus	0.7	0.1	0.0	1.2	1.2	0.1	0.0	3.7
Citrobacter	0.1	0.2	0.0	3.3	0.2	0.0	0.0	0.9
Gram -								

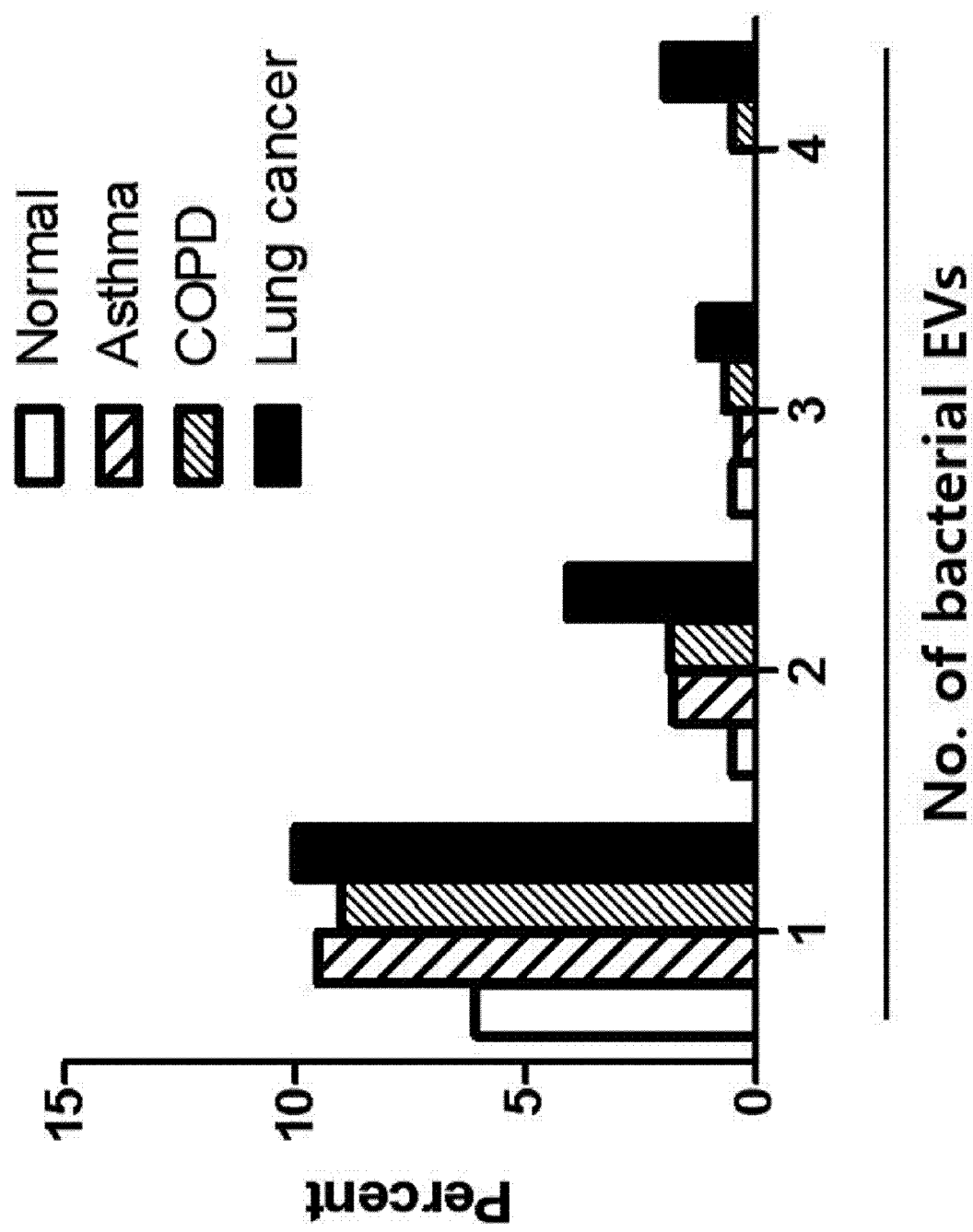
[도6]



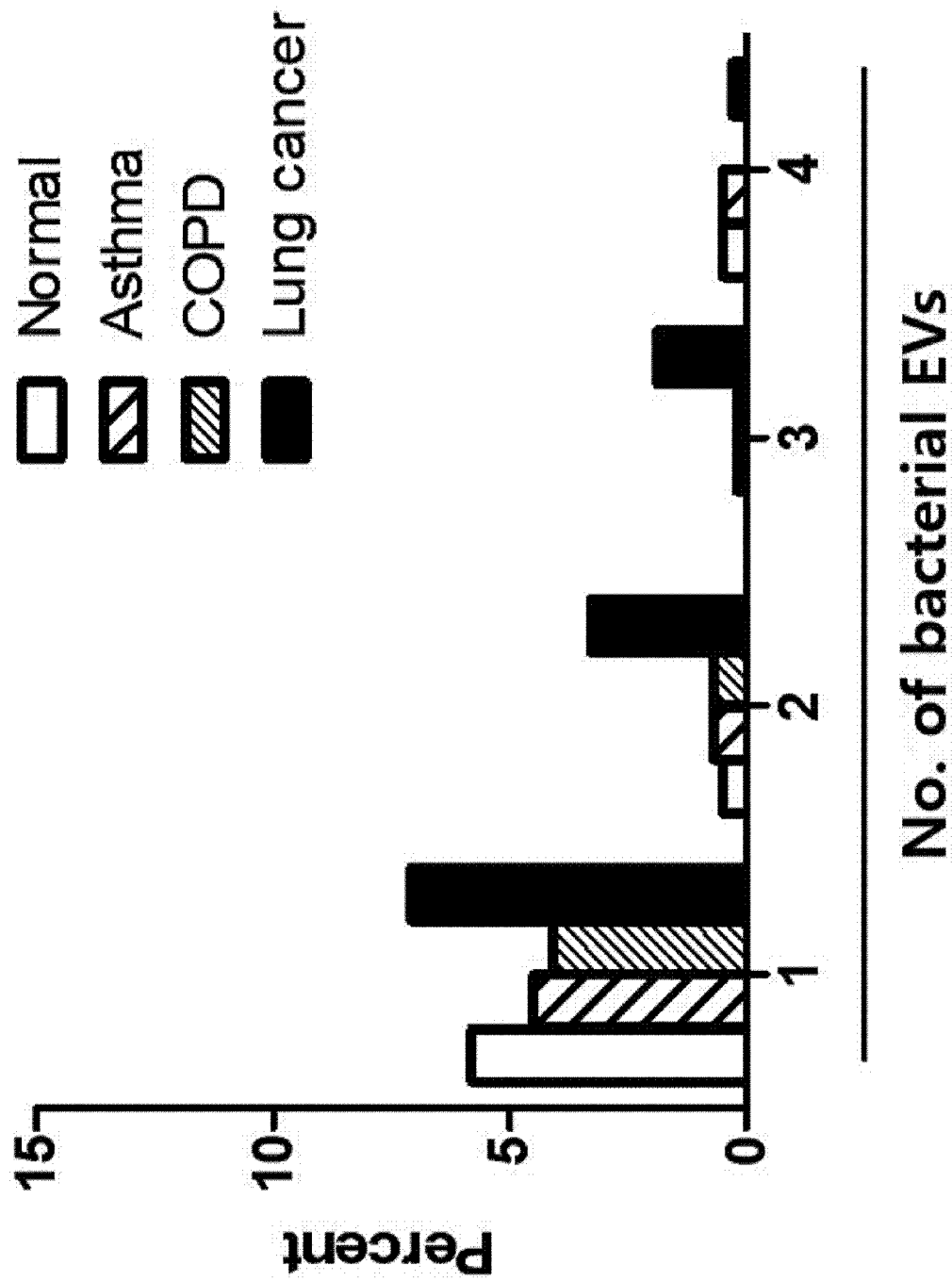
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/53; C12N 1/00; C12N 15/01; A01K 67/027; A61K 9/133; G01N 33/68; G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: extracellular vesicles, IgG, respiratory inflammatory diseases

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Y. -S et al., "Extracellular Vesicles, Especially derived from Gram-Negative Bacteria, in Indoor Dust Induce Neutrophilic Pulmonary Inflammation Associated with both Th1 and Th17 Cell Responses", Clinical Experimental Allergy, April 2013, vol. 43, no. 4, pages 443-454 See pages 444, 446 and 452; figure 7.	1-8
X	KR 10-2011-0038575 A (AEON MEDIX INC.) 14 April 2011 See claims 1, 3 and 7; paragraphs [0006], [0016], [0093] and [0158]-[0159].	1-8
A	KR 10-2012-0114872 A (AEON MEDIX INC.) 17 October 2012 See abstract.	1-8
A	WO 2005-035733 A2 (HEALTH PROTECTION AGENCY) 21 April 2005 See abstract.	1-8
A	LEE, Eun - Young et al., "Gram-Positive Bacteria Produce Membrane Vesicles: Proteomics-based Characterization of Staphylococcus Aureus-derived Membrane Vesicles", Proteomics, December 2009, vol. 9, no. 24, pages 5425-5436 See abstract.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 MAY 2016 (20.05.2016)

Date of mailing of the international search report

20 MAY 2016 (20.05.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/001502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0038575 A	14/04/2011	CN 102573904 A	11/07/2012
		EP 2486940 A2	15/08/2012
		JP 2013-507354 A	04/03/2013
		JP 2015-091241 A	14/05/2015
		US 2012-0192295 A1	26/07/2012
		US 8691522 B2	08/04/2014
		WO 2011-043538 A2	14/04/2011
		WO 2011-043538 A3	14/04/2011
KR 10-2012-0114872 A	17/10/2012	KR 10-1421779 B1	28/07/2014
WO 2005-035733 A2	21/04/2005	AT 401091 T	15/08/2008
		AU 2005-279990 A1	21/04/2005
		AU 279990 B2	01/04/2010
		CA 2541834 A1	21/04/2005
		CA 2541834 C	04/09/2012
		DK 1687011 T3	10/11/2008
		EP 1687011 A2	09/08/2006
		EP 1687011 B1	16/07/2008
		ES 2310753 T3	16/01/2009
		JP 2007-508537 A	05/04/2007
		PT 1687011 E	28/10/2008
		US 2007-0154495 A1	05/07/2007
		WO 2005-035733 A3	29/12/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/53; C12N 1/00; C12N 15/01; A01K 67/027; A61K 9/133; G01N 33/68; G01N 33/574

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 세포밖 소포체, IgG, 호흡기 염증성 질환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, Y.-S 등, 'Extracellular vesicles, especially derived from Gram-negative bacteria, in indoor dust induce neutrophilic pulmonary inflammation associated with both Th1 and Th17 cell responses', Clinical Experimental Allergy, 2013.04, 43권, 4호, 페이지 443-454 페이지 444, 446 및 452; 도면 7 참조.	1-8
X	KR 10-2011-0038575 A (주식회사이엔메딕스) 2011.04.14 청구항 1, 3 및 7; 단락 [0006], [0016], [0093] 및 [0158]-[0159] 참조.	1-8
A	KR 10-2012-0114872 A (주식회사이엔메딕스) 2012.10.17 요약 참조.	1-8
A	WO 2005-035733 A2 (HEALTH PROTECTION AGENCY) 2005.04.21 요약 참조.	1-8
A	LEE, EUN-YOUNG 등, 'Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles', Proteomics, 2009.12, 9권, 24호, 페이지 5425-5436 요약 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 05월 20일 (20.05.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 05월 20일 (20.05.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

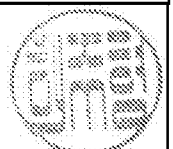
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2011-0038575 A	2011/04/14	CN 102573904 A	2012/07/11
		EP 2486940 A2	2012/08/15
		JP 2013-507354 A	2013/03/04
		JP 2015-091241 A	2015/05/14
		US 2012-0192295 A1	2012/07/26
		US 8691522 B2	2014/04/08
		WO 2011-043538 A2	2011/04/14
		WO 2011-043538 A3	2011/04/14
KR 10-2012-0114872 A	2012/10/17	KR 10-1421779 B1	2014/07/28
WO 2005-035733 A2	2005/04/21	AT 401091 T	2008/08/15
		AU 2005-279990 A1	2005/04/21
		AU 279990 B2	2010/04/01
		CA 2541834 A1	2005/04/21
		CA 2541834 C	2012/09/04
		DK 1687011 T3	2008/11/10
		EP 1687011 A2	2006/08/09
		EP 1687011 B1	2008/07/16
		ES 2310753 T3	2009/01/16
		JP 2007-508537 A	2007/04/05
		PT 1687011 E	2008/10/28
		US 2007-0154495 A1	2007/07/05
		WO 2005-035733 A3	2005/12/29