

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 3월 10일 (10.03.2022) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2022/050763 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/68* (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/011940
- (22) 국제출원일: 2021년 9월 3일 (03.09.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0113421 2020년 9월 4일 (04.09.2020) KR
- (71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (**THE ASAN FOUNDATION**) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR IN-**
- DUSTRY COOPERATION**) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 이주용 (**LEE, Joo Yong**); 06523 서울시 서초구 신반포로 267, 340동 702호, Seoul (KR). 김경곤 (**KIM, Kyung Gon**); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호, Seoul (KR). 염정훈 (**YEOM, Jeong Hun**); 05325 서울시 강동구 천중로16길 37, 105동 301호, Seoul (KR). 오유미 (**OH, Yu Mi**); 05332 서울시 강동구 성안로27길 4-15, 602호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OF PRIMARY INTRAOCULAR LYMPHOMA AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 원발성 안구내 림프종의 진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도

Total: 3,425 proteins

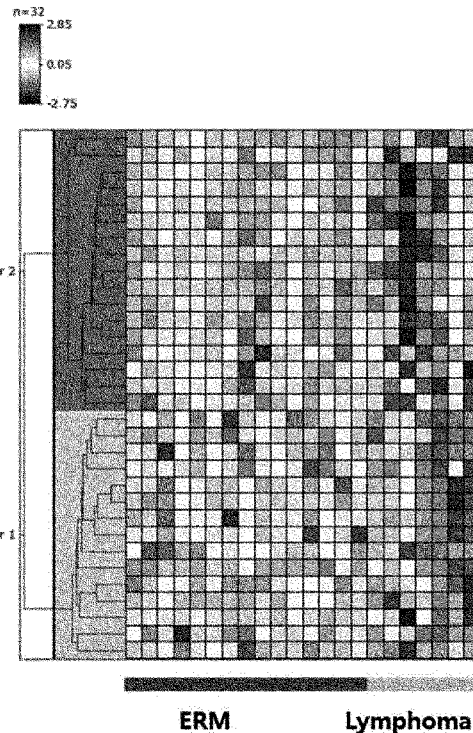
Filtering

3,421 proteins

T-test
{Benjamini-Hochberg FDR ≤ 0.05}

32 proteins

Z score



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker for the diagnosis of primary intraocular lymphoma and use thereof and, more specifically, to: a composition for diagnosing primary intraocular lymphoma, using as biomarker(s): MOS, COQ6, H4C8, ACT-BL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, or C8G, the expression of which specifically increases in primary intraocular lymphoma; and/or GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPPI, PI4KA, VCAN, USP9X, or APLP2, the expression of which specifically decreases in primary intraocular lymphoma; a kit; a method for providing information needed for the diagnosis of primary intraocular lymphoma by using the biomarker(s); and a method for treating primary intraocular lymphoma.

[다음 쪽 계속]

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (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, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(57) 요약서: 본 발명은 원발성 안구내 림프종의 진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 원발성 안구내 림프종에서 특이적으로 발현이 증가하는 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 또는 C8G; 및/또는 원발성 안구내 림프종에서 특이적으로 발현이 감소하는 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 또는 APLP2를 바이오마커로 하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물, 키트, 상기 바이오마커를 이용한 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 원발성 안구내 림프종 치료방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 원발성 안구내 림프종의 진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 원발성 안구내 림프종의 진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 원발성 안구내 림프종에서 특이적으로 발현이 증가하는 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 또는 C8G; 및/또는 원발성 안구내 림프종에서 특이적으로 발현이 감소하는 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 또는 APLP2를 바이오마커로 하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물, 키트, 상기 바이오마커를 이용한 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 원발성 안구내 림프종 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 원발성 중추신경계 림프종 (primary central nervous system lymphoma, PCNSL)은 일반적으로 뇌, 척수, 연수막 또는 눈에서 유래하는 미만성 거대 B 세포 비호지킨 림프종이다. PCNSL은 원발성 뇌종양의 4~6%, 림프절외 림프종 (extranodal lymphomas)의 1~2%를 차지한다.
- [3] 원발성 안구내 림프종 (primary intraocular lymphoma, PIOL)은 PCNSL의 한 종류 (subset)로 악성 림프구 세포가 동반 CNS 침범 (concomitant CNS involvement)을 나타내거나 또는 나타내지 않으면서 망막, 유리체 또는 시신경 두부를 침범한다. 이 질환 존재는 문헌 [Appen RE. Posterior uveitis and primary cerebral reticulum cell sarcoma. Arch Ophthalmol 1975;93:123-124] 등에서 안구 세망세포육종으로 언급되어 왔다. 드문 경우 PCNSL과 PIOL은 T 세포 림프종의 발현일 수 있다. PIOL은 신경 구조에 국한된 상태로 있기 때문에, 안와 (orbit), 눈물샘 및 결막의 포도막 및 눈부속기관 (ocular adnexa)의 순환을 통해 침범하거나 전이하는 안와 림프종 및 전신성 비호지킨 림프종과 구분된다.
- [4] PIOL은 희귀 질환이지만 지난 15년 동안 발병률이 높아졌으며, 대부분 PCNSL에서 동반 증가로 인한 것이다. PCNSL은 1973년에 0.027/100,000에서 1990년대 초에 1/100,000로 면역능력이 있는 (immunocompetent) 사람과 면역이 약화된 (immunocompromised) 사람들 모두에서 발생률이 증가했다 (Schabet M. Epidemiology of primary CNS lymphoma. J Neurooncol 1999;43:199-201). 이러한 증가의 대부분은 면역결핍 환자의 수의 증가로 설명할 수 있지만, 이를 완전히 설명할 수는 없다. 면역능력이 있는 환자에서 발생률이 증가하는 원인은 알려져 있지 않다.
- [5] 또한, 안구내 림프종은 비감염성 포도막염 양상으로 발현하여 최종 진단까지

오랜 시간을 필요로 하기 때문에 진단이 어려운 질환으로 알려져 있으며, 유리체 검체를 이용하여 종양세포를 확인하기 위한 조직병리검사가 표준 진단법이지만 양성 진단률이 20% 내외로 극히 낮다. 최근에는 이와 같은 진단 오류를 보완하기 위한 면역조직화학검사, 분자 분석, PCR, 유세포 분석 등의 기법들이 시도되고 있다.

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 비감염성 포도막염과 구분하여 안구내 림프종을 조기에 진단할 수 있는 단백질 바이오마커를 발굴하고자 하였으며, 포도막염 환자군과 비교하였을 때, 원발성 안구내 림프종 환자군에서 유의적으로 발현 수준이 증가하는 16종의 유전자 및/또는 단백질 바이오마커와 원발성 안구내 림프종 환자군에서 유의적으로 발현 수준이 감소하는 17종의 유전자 및/또는 단백질 바이오마커를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 원발성 안구내 림프종을 진단하기 위한 바이오마커 조성물, 이를 이용한 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물, 키트 및 원발성 안구내 림프종 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 추가로, 본 발명은 전술한 바이오마커 조성물을 이용한 원발성 안구내 림프종 치료 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] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [11] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 바이오마커 조성물은:
- [12] i) B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함하고,
- [13] ii) MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로

코딩되는 하나 이상의 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

- [14] 본 발명은 또한, MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물을 제공한다.
- [15] 이와 관련하여, 본 발명은 추가로 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물의 용도를 제공한다.
- [16] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 진단용 조성물은:
- [17] i) B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하고,
- [18] ii) MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [19] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [20] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드일 수 있다.
- [21] 본 발명은 또한, 전술한 진단용 조성물을 포함하는 원발성 안구내 림프종 진단용 키트를 제공한다.
- [22] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [23] 나아가, 본 발명은 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14,

C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [24] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나/증가하고, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [25] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 다음의 a) 단계만 수행하거나, 다음의 a) 및 b) 단계를 모두 수행하는 것일 수 있다.
- [26] a) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [27] b) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.
- [28] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은:
- [29] 상기 a) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [30] 상기 b) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의

유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,

- [31] 상기 b) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [32] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 시료는 유리체 또는 방수일 수 있다.
- [33] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 방법은 포도막염과 구분하여 원발성 안구내 림프종을 진단할 수 있다.
- [34] 추가로, 본 발명은 a) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [35] b) 상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나/증가하고, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계; 및
- [36] c) 상기 b) 단계에서 원발성 안구내 림프종으로 진단된 개체에게 방사선 치료, 항암요법, 항암제 주사 및 유리체절제술(vitreectomy)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 치료를 적용하는 단계;를 포함하는 원발성 안구내 림프종 치료방법을 제공한다.
- [37] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종 치료방법의 a) 단계는 다음의 a-1) 단계만 수행하거나, 다음의 a-1) 및 a-2) 단계를 모두 수행하는 것일 수 있다.
- [38] a-1) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는

하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

- [39] a-2) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.
- [40] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종 치료방법에 있어서, 상기 a-1) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [41] 상기 a-2) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [42] 상기 a-2) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단할 수 있다.
- [43] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종 치료방법의 c) 단계에서 상기 항암제 주사는 메토평렉세이트(methotrexate), 리툽시맙(rituximab) 및 멜팔란(melphalan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 안구내로 주사하는 것을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [44] 본 발명에 따른 원발성 안구내 림프종 진단을 위한 바이오마커는 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염과 비교하여 원발성 안구내 림프종에서 발현 수준이 유의적으로 증가하거나 감소하므로, 이를 이용하여 원발성 안구내 림프종을 정확하게 진단하는 것이 가능하며, 발현 양상이 유사한 비감염성 포도막염과 구분하여 조기에 원발성 안구내 림프종을 진단할 수 있다는 점에서 진단 결과에 따라 환자 맞춤형 치료방법을 제공하는데 유용하다. 특히, B2M, C1QC 및 CD14의 3종의 바이오마커는 원발성 안구내 림프종 환자의 유리체 및 방수에서 공통적으로 발현 수준이 증가하므로, 이들 3종 중 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준을 검출함으로써 원발성 안구내 림프종 진단의 정확도를 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [45] 도 1은 원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커 발굴을 위한 단백질 분석에 있어서, 시료의 전처리 과정을 도식화한 것이다.
- [46] 도 2는 대조군 (ERM)과 림프종 그룹의 유리체 시료에 대해 단백질 주성분분석 (Principal component analysis)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [47] 도 3은 유리체 시료에서 대조군 (ERM) 대비 림프종 그룹 단백질들의 비율 (ratio) 및 p 값을 이용하여 볼케이노 플롯을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 4는 유리체 시료에서 정량된 단백질 중 32개의 바이오마커를 선별하는 과정 및 이를 Z 점수화 (Z score)하여 계층적 군집 분석 (Hierarchical clustering analysis)을 수행한 결과를 도식화하여 나타낸 것이다.
- [49] 도 5는 계층적 군집 분석으로 림프종 그룹의 유리체 시료에서 증가되는 단백질 클러스터인 Cluster 1과 림프종 그룹의 유리체 시료에서 감소되는 단백질 클러스터인 Cluster 2를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 6은 방수 시료에서 대조군 (ERM) 대비 림프종 그룹 단백질들의 비율 (ratio) 및 p 값을 이용하여 볼케이노 플롯을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [51] 도 7은 방수 시료에서 정량된 단백질 중 4개의 바이오마커를 선별하는 과정 및 이를 Z 점수화 (Z score)하여 계층적 군집 분석 (Hierarchical clustering analysis)을 수행한 결과를 도식화하여 나타낸 것이다.
- [52] 도 8은 계층적 군집 분석으로 림프종 그룹의 방수 시료에서 증가되는 두 개의 단백질 클러스터인 Cluster 1과 Cluster 2를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [53] 도 9는 림프종 그룹의 유리체와 방수에서 공통적으로 증가되는 B2M (A), C1QC (B) 및 CD14 (C)의 세포내 위치 (cellular localization)를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [54] 상술한 바와 같이, 원발성 안구내 림프종은 비감염성 포도막염 양상으로 발현하여 조기 진단이 어렵고, 조직병리검사가 표준 진단법이지만 양성 진단률이 20% 내외로 극히 낮은 문제점이 있었다. 이에, 본 발명자들은 포도막염 환자군과 비교하였을 때, 원발성 안구내 림프종 환자군에서 유의적으로 발현 수준이 증가하는 16종의 유전자 및/또는 단백질 바이오마커와 원발성 안구내 림프종 환자군에서 유의적으로 발현 수준이 감소하는 17종의 유전자 및/또는 단백질 바이오마커를 확인하고, 이를 이용한 원발성 안구내 림프종 진단 키트 및 진단방법을 제시함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.
- [55] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커 조성물에 관한

것이다.

- [56] 본 발명자들은 원발성 안구내 림프종의 진단을 위한 바이오마커를 발굴하기 위해, 유리체 절제술을 시행 받을 예정인 환자를 원발성 안구내 림프종 환자군과 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군으로 나누고, 후자의 환자군을 대조군으로 하여 이들로부터 수득된 유리체 및 방수 시료를 이용하여 SWATH 기법을 이용한 분석, 데이터베이스 분석, 생물정보학 분석 및 통계 분석 과정을 거쳐 원발성 안구내 림프종 환자군에서 발현 수준이 유의적으로 증가하는 16종의 바이오마커 및 원발성 안구내 림프종 환자군에서 발현 수준이 유의적으로 감소하는 17종의 바이오마커를 발굴하였다. 원발성 안구내 림프종에서 증가하는 16종의 바이오마커의 Accession Number는 표 2 및 4에 나타내었고, 원발성 안구내 림프종에서 감소하는 17종의 바이오마커의 Accession Number는 표 3에 나타내었다.
- [57] 원발성 안구내 림프종 환자에서 증가된 16종의 바이오마커 중 유리체에서 증가된 단백질은 15종으로, MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN 및 CD14였고, 방수에서 증가된 단백질은 4종으로 C8G, CD14, B2M 및 C1QC였다. 이때, 유리체와 방수에서 공통적으로 모두 증가된 단백질은 총 3종으로, B2M, C1QC 및 CD14임을 확인하였다.
- [58] 원발성 안구내 림프종 환자에서 감소된 17종의 바이오마커는 모두 유리체에서 확인되었으며, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2였다.
- [59] 따라서, 본 발명의 바이오마커 조성물은 상기 총 33종의 바이오마커 중 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함할 수 있고, 구체적인 일 양태로서, 유리체와 방수에서 공통적으로 증가된 B2M, C1QC 및 CD14 중 하나 이상을 필수적으로 포함하고, MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 추가로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 용어 '바이오마커'는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 본 발명의 마커는 원발성 안구내 림프종의 발병 여부를 확인할 수 있는 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 지칭한다. 마커는 게놈 뉴클레오티드 서열로부터 또는 발현된 뉴클레오티드 서열로부터(예를 들어, RNA, nRNA, mRNA, cDNA 등으로부터), 또는 코딩된 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 이 용어는 마커 서열에 상보적이거나 이 용어는 마커 서열에 상보적이거나 이에 플랭킹된 핵산 서열, 예컨대 마커 서열을

증폭시킬 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍으로 사용된 핵산을 포함한다.

- [61] 본 발명에서 상기 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다. '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)' 또는 '핵산'은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 'mRNA'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.
- [62] 본 발명에 있어서, 용어 '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하여 원발성 안구내 림프종의 존재 또는 발생 여부를 확인하는 것이다.
- [63] 따라서, 본 발명의 제2 측면은 본 발명의 바이오마커의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 원발성 안구내 림프종의 진단용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.
- [64] 본 발명자들은 원발성 안구내 림프종 환자군에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및/또는 C8G의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군보다 유의적으로 증가하는 것을 확인하였고, 이들 16종의 바이오마커 중 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN 및 CD14의 15종은 유리체에서 증가되었고, C8G, CD14, B2M 및 C1QC의 4종은 방수에서 증가되었으며, B2M, C1QC 및 CD14의 3종은 유리체와 방수에서 공통적으로 모두 증가되었음을 확인하였는바, 이들 16종의 바이오마커를 다양한 조합으로 구성하여 원발성 안구내 림프종을 진단하는데 활용할 수 있다.
- [65] 또한, 원발성 안구내 림프종 환자군에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및/또는 APLP2의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군보다 유의적으로 감소하는 것을 확인하였는바, 이들 17종의 바이오마커를 다양한 조합으로 구성하여 원발성 안구내 림프종을 진단하는데 활용할 수 있다.
- [66] 나아가, 원발성 안구내 림프종 환자군에서 증가하는 16종의 바이오마커 및

감소하는 바이오마커 17종을 다양한 조합으로 구성하여 원발성 안구내 림프종을 진단하는데 활용할 수 있다.

- [67] 구체적으로, 본 발명의 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물은 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함할 수 있다.
- [68] 일 양태로서, 본 발명의 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물은 유리체와 방수에서 공통적으로 모두 증가되는 B2M, C1QC 및 CD14 중 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 필수적으로 포함할 수 있고, MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2 중 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [69] 본 발명의 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [70] 상기 '항체'는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 바이오마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개의 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 이러한 본 발명의 바이오마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 원발성 안구내 림프종 진단용 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을

뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [71] 본 발명에서 용어, '애타머'란 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 항체와 유사한 기능을 가져 화학적 항체 (chemical antibody)로도 불리며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 애타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 애타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.
- [72] 본 발명의 애타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상일 수 있으나 이들에 한정되지 아니한다. 상기 16종의 바이오마커 단백질 각각에 결합 활성을 갖는 애타머는 각 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [73] 본 발명에서 '프라이머'는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)을 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명에서는 전술한 바이오마커의 폴리뉴클레오티드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 생성물의 정량 분석 (발현 수준 분석)을 통해 원발성 안구내 림프종을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [74] 본 발명에서 용어, '프로브(probe)'란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단일 사슬 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중사슬 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [75] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 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)로의 변형이 있다.
- [76] 본 발명의 제3 측면은 전술한 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [77] 본 발명의 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트,

DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

- [78] 본 발명의 키트에는 상기 33종의 바이오마커 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머와 프로브 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [79] 구체적인 양태로서, 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [80] 또 다른 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [81] 또 다른 양태에 따르면, 본 발명에서 33종의 바이오마커의 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있으며, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [82] 본 발명의 제4 측면은 전술한 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물 및/또는 키트를 이용한, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [83] 본 발명의 33종의 바이오마커 중 16종은 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군과 비교하여 원발성 안구내 림프종 환자군에서 발현 수준이 특이적으로 증가하고 17종은 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군과 비교하여 원발성 안구내 림프종 환자군에서 발현 수준이 특이적으로 감소하므로, 이를 이용하여

원발성 안구내 림프종을 진단할 수 있다.

- [84] 일 양태로, 본 발명은 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [85] 구체적으로, 본 발명의 방법은 원발성 안구내 림프종의 발병 여부를 확인하고자 하는 개체 또는 포도막염으로 오진되었는지의 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 분리한 시료와 대조군으로부터 분리한 시료에서 상기 33종의 바이오마커 중 하나 이상의 바이오마커의 발현 수준을 비교하였을 때, 상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 대조군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나/증가하고, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 대조군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [86] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 대조군은 안구내 염증을 동반하지 않는 유리체 절제술 대상 질환의 환자군으로, 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군일 수 있다. 본 발명의 방법은 포도막염 환자군을 비교 대조군으로 하여 원발성 안구내 림프종에서 유의적으로 증가하는 16종의 바이오마커 및 유의적으로 감소하는 17종의 바이오마커 중 하나 이상의 발현 수준을 확인하므로, 포도막염과 발현 양상이 유사한 원발성 안구내 림프종을, 포도막염과 구분하여 조기에 정확하게 진단함으로써 원발성 안구내 림프종을 보다 효과적으로 치료하는데 기여할 수 있다.
- [87] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 유의적으로 증가하는 16종의 바이오마커의 발현 수준은, 예를 들어 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군에 비해 원발성 안구내 림프종 환자군에서 고발현 또는 고활성을 나타내는 것을 의미하며, 상기 용어 "고발현" 또는 "고활성"은 바이오마커가 비정상 프로세스, 질환 혹은 개체 내 기타 병태를 나타내거나 이의 징후인 경우, 비교 대상인 개체로부터 획득된 시료에서 검출되는 바이오마커의 값 혹은 수준 범위 보다 높은 시료 내의 바이오마커의 값 혹은 수준을 지칭한다.

- [88] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 유의적으로 감소하는 17종의 바이오마커의 발현 수준은, 예를 들어 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군에 비해 원발성 안구내 림프종 환자군에서 저발현 또는 저활성을 나타내는 것을 의미하며, 상기 용어 "저발현" 또는 "저활성"은 바이오마커가 비정상 프로세스, 질환 혹은 개체 내 기타 병태를 나타내거나 이의 징후인 경우, 비교 대상인 개체로부터 획득된 시료에서 검출되는 바이오마커의 값 혹은 수준 범위 보다 낮은 시료 내의 바이오마커의 값 혹은 수준을 지칭한다.
- [89] 또한, 바이오마커의 "정상" 발현 수준 혹은 값과 비교해서 "차동(differential) 수준" 또는 "차동값"을 지니거나 "상이하게 발현된" 것으로서 지칭될 수 있으며, 발현에 있어서 정량적 차이뿐만 아니라 정성적 차이의 둘 모두를 포함한다.
- [90] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 유의적으로 증가하는 16종의 바이오마커의 발현 수준은, 예를 들어 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군에 비해 원발성 안구내 림프종 환자군에서 약 1.7배 이상 증가할 수 있고, 상기 유의적으로 감소하는 17종의 바이오마커의 발현 수준은, 예를 들어 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군에 비해 원발성 안구내 림프종 환자군에서 약 1.7배 이상 감소할 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [91] 나아가, 본 발명의 33종의 바이오마커는 다양한 조합으로 구성되어 원발성 안구내 림프종을 진단하는데 활용할 수 있는바, 또 다른 양태로서, 본 발명의 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 다음의 a) 단계만 수행하거나, 다음의 a) 및 b) 단계를 모두 수행하는 것을 포함한다:
- [92] a) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [93] b) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGR1, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.
- [94] 이에 따라, 본 발명의 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은:
- [95] 상기 a) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [96] 상기 b) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염

환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,

- [97] 상기 b) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [98] 예를 들어, 상기 a) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가한 경우, 추가의 다른 바이오마커의 발현 수준을 확인하지 않고 원발성 안구내 림프종으로 진단할 수 있다.
- [99] 다르게는 a) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가한 경우에도, 추가적으로 상기 b) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준의 증가 여부 및/또는 상기 b) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준의 감소 여부를 확인함으로써 원발성 안구내 림프종을 진단할 수 있다.
- [100] 본 발명에서 용어, '시료'란, 원발성 안구내 림프종에서 특이적으로 증가하거나 감소하는 바이오마커 유전자 및/또는 단백질을 확인할 수 있는 생체 시료를 포함하며, 바람직하게는 유리체 및/또는 방수일 수 있다. 상기 시료는 단백질 바이오마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 개체로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 겔 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [101] 본 발명의 용어 '개체'란, 원발성 안구내 림프종이 발병되었거나 발병할 가능성이 있거나 포도막염으로 오진되었을 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [102] 본 발명의 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에

있어서, 상기 33종의 바이오마커 유전자의 발현수준은 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정할 수 있고, 시료에서 mRNA 또는 단백질의 분리는 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법 및 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법은 상기에서 설명한 바와 같다.

- [103] 본 발명에 있어서, 용어, 'mRNA 발현 수준 측정'이란 시료에서 본 발명의 16종의 바이오마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 칩(DNA chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [104] 본 발명에 있어서, 용어, '단백질 발현 수준 측정'이란 시료에서 상기 16종의 바이오마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에서 발현된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 등을 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 본 발명의 제5 측면은 전술한 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물 및/또는 키트를 이용한, 원발성 안구내 림프종의 치료방법에 관한 것이다.
- [106] 본 발명의 원발성 안구내 림프종 치료방법은 전술한 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 따라 원발성 안구내 림프종으로 진단된 개체에게 적절한 치료제를 투여함으로써 수행된다.
- [107] 예를 들어, 본 발명의 원발성 안구내 림프종의 치료방법은 다음을 포함한다:
- [108] a) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [109] b) 상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM,

- PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나/증가하고, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계; 및
- [110] c) 상기 b) 단계에서 원발성 안구내 림프종으로 진단된 개체에게 방사선 치료, 항암요법, 항암제 주사 및 유리체절제술로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 치료를 적용하는 단계.
- [111] 본 발명의 원발성 안구내 림프종 치료방법에 있어서, 상기 a) 및 b) 단계는 원발성 안구내 림프종을 진단하는 과정으로, 전술한 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법과 동일하다.
- [112] 따라서, 상기 원발성 안구내 림프종 치료방법의 a) 단계는 다음의 a-1) 단계만 수행하거나, 다음의 a-1) 및 a-2) 단계를 모두 수행하는 것일 수 있다.
- [113] a-1) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [114] a-2) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.
- [115] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 원발성 안구내 림프종 치료방법에 있어서, 상기 a-1) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [116] 상기 a-2) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하고/증가하거나,
- [117] 상기 a-2) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및

APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단할 수 있다.

- [118] 본 발명의 원발성 안구내 림프종 치료방법에 있어서, 상기 c) 단계는 상기 b) 단계에서 원발성 안구내 림프종으로 진단된 개체에게 적절한 치료를 적용하는 단계로, 여기서 적절한 치료는 방사선 치료, 항암요법, 항암제 주사 및 유리체절제술로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 치료를 포함할 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.
- [119] 예를 들어, 상기 방사선 치료는 전신 또는 안구 방사선 치료를 포함하고, 상기 항암요법은 전신 항암요법으로서 독소루비신(doxorubicin), 빈크리스틴(vincristine), 프레드니솔론(prednisolone) 및 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide)를 포함하는 병용화학요법을 포함하며, 상기 항암제 주사는 안구내 또는 전신 주사를 포함하고, 사용 가능한 항암제로는 메토트렉세이트(methotrexate), 리툭시맙(rituximab) 및 멜팔란(melphalan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있으나 (Hashida N, Ohguro N, Nishida K. Efficacy and complications of intravitreal rituximab injection for treating primary vitreoretinal lymphoma. Transl Vis Sci Technol. 2012;1(3):1.; Larkin KL, Saboo US, Comer GM, et al. Use of intravitreal rituximab for treatment of vitreoretinal lymphoma. Br J Ophthalmol. 2014;98(1):99-103.; Shields CL, Sioufi K, Mashayekhi A, Shields JA. Intravitreal melphalan for treatment of primary vitreoretinal lymphoma: a new indication for an old drug. JAMA Ophthalmol. 2017;135(7):815-818.), 이로 한정되지 않으며, 환자의 상태에 따라 임상의의 판단으로 공지된 다양한 치료를 적용할 수 있다.
- [120] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 상기 c) 단계의 치료를 개체에게 적용한 후 원발성 안구내 림프종에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [121] 이하 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 단, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [122] [실시예 1]
- [123] 시료의 준비
- [124] 1-1. 환자군 및 대조군의 설정

- [125] 2019년 2월 서울아산병원 IRB에서 본 전향적 연구에 대한 승인을 받은 후, 아래 조건에 해당되어 유리체 절제술을 시행하는 환자를 대상으로 동의를 얻은 후 환자 시료를 수득하였다.
- [126] 1) 포함 기준
- [127] ① 18세 이상 80세 미만의 환자
- [128] ② 안구내 림프종 또는 중추신경계 림프종으로 진단되거나 의심되어 유리체 절제술 수술을 시행 받는 환자
- [129] ③ 대조군으로 당뇨를 진단 받지 않은 망막전막, 황반 원공, 포도막염으로 유리체 절제술을 시행 받는 환자
- [130] 2) 제외 기준
- [131] ① 18세 미만 80세 이상의 환자
- [132] ② 유리체 절제술의 기왕력
- [133] ③ 유리체강내 약물 (예를 들어, 아바스틴, 아일리아, 루센티드) 주입술의 기왕력
- [134] ④ 연구에 동의하지 않은 환자
- [135] 임상적으로 드문 질환인 점을 고려하여, 분당서울대병원 및 세브란스병원과 공동 연구를 통하여 안구내 림프종 진단 환자의 시료를 추가로 확보하였다.
- [136] 1-2. 시료의 획득
- [137] 안구내 림프종으로 진단되거나 또는 의심되어 유리체절제술을 시행 받는 환자와 대조군 조건에 포함되어 유리체 절제술을 시행 받는 환자를 대상으로 기존의 진단적 검사를 위해 다음과 같은 방법으로 방수와 유리체 조직을 획득하였다.
- [138] 방수는 전방 천자를 통해 1cc 주사기를 이용하여 획득 가능한 최대 용량을 획득하였고, 유리체는 유리체절제술 시행을 위한 공막 절개를 통해 포트 (port)를 형성하고 유리체 절제기 (cutter)를 이용하여 유리체액을 채취하였다. 이때, 인퓨전 (infusion)을 열지 않은 상태에서 채취하여 희석되지 않은 유리체액을 0.5~1mL 채취하였으며, 상기 양으로 채취할 수 없는 경우, 최소 0.1mL를 채취하였다.
- [139] 상기 환자의 임상 정보는 표 1과 같다.

[140] [표1]

No	진단명	나이	성별	우안/좌안	기관명
1	PCNSL	61	F	Rt	세브란스병원
2	PCNSL	49	F	Lt	세브란스병원
3	PCNSL	39	F	Rt	서울아산병원
4	PCNSL	81	F	Rt	서울아산병원
5	PCNSL	59	M	Rt	서울아산병원
6	PCNSL	70	M	Rt	서울아산병원
7	PCNSL				분당서울대병원
8	PCNSL				분당서울대병원
9	PCNSL				분당서울대병원
10	MH	63	F	Rt	서울아산병원
11	ERM	68	M	Rt	서울아산병원
12	ERM	74	F	Lt	서울아산병원
13	ERM	69	F	Lt	서울아산병원
14	ERM	69	F	Rt	서울아산병원
15	ERM	89	F	Rt	서울아산병원
16	ERM	69	F	Rt	서울아산병원
17	ERM	70	F	Rt	서울아산병원
18	ERM	58	F	Lt	서울아산병원
19	ERM	76	M	Lt	서울아산병원
20	ERM	62	F	Lt	서울아산병원

[141] [실시에 2]

[142] 단백질 분석

[143] 2-1. 단백질 분석을 위한 시료의 전처리

[144] 단백질 분석을 위한 유리체 및 방수 시료의 전처리는 도 1에 나타난 바와 같이 수행하였다.

[145] 구체적으로, 유리체와 방수 시료 총 48개에 대해 단백질 분석 키트인 BCA 단백질 분석 키트 (Cat no. #23227)를 통해 단백질을 정량 하였다. BCA 결과에 따라 유리체는 300 ug, 방수체는 50ug을 단백질 로바인드 튜브 (protein Lobind tube)에 옮긴 후 동결건조 하였다.

[146] FSAP (Filter-aided sample preparation) 기법 중의 하나인 S-트랩 미니 키트

(Profitti, USA, Cat: K02-mini-10)를 이용하여 해교 (peptization)를 수행하였다. 구체적으로, 5 % SDS, 50 mM TEAB (pH 7.55)를 건조한 유리체와 방수체 샘플 튜브에 넣고 프로브 초음파 분해를 각 30초 진행하고, DTT (Dithiothreitol, 최종 농도 20 mM)를 넣은 후 95 °C에서 10분 동안 가열하여 환원 반응을 일으킨 다음 실온에서 냉각시켰다. 40mM 요오드아세트아미드 (Iodoacetamide)를 이용하여 30분 동안 어두운 조건에서 알킬화 반응시킨 후 샘플 부피의 10%에 해당하는 양의 12% 인산을 추가하고 샘플 부피의 7배의 S-트랩 결합 버퍼 (90% MeOH, 100 mM TEAB, pH 7.1)를 혼합하였다. 산성화된 샘플은 스핀 컬럼 (spin column)에 옮겨 담은 후 4,000 g의 원심분리기로 회전시켜 모든 용액을 통과시켰다. 샘플의 6배 부피의 S-트랩 결합 버퍼로 4,000g의 원심분리기를 이용하여 3번 반복 세척하였다.

- [147] 컬럼에 트립신:단백질이 1:25의 비율 되도록 트립신 50 mM TEAB, pH 8에 녹인 트립신/LysC를 혼합하여 37 °C에서 16시간 동안 분해시켰다. S-트랩 스핀 컬럼에 분해 버퍼 (digestion buffer) (50 mM TEAB) 80 μ L를 넣고 60초 동안 1,000g로 원심분리하여 1차 펩타이드를 용출하고 80 μ L의 0.2% 수용성 포름산을 넣고 60초 동안 1,000g로 원심 분리하여 펩타이드를 2차 용출시킨 후 80 μ L의 50% 수용성 ACN (0.2% 포름산 함유)을 넣고 60초 동안 4,000g로 원심 분리하여 펩타이드를 3차 용출시키고 1차, 2차 및 3차 용출된 펩타이드를 혼합 후 건조시켰다. iRT 펩타이드 13종이 포함된 0.1% 포름산에 재현탁하여 나노드롭(nano drop)을 이용하여 펩타이드의 양을 측정 후 MS 분석을 수행하였다.

[148] 2-2. 비표지 정량적 단백질 분석

- [149] 재현탁한 시료는 마이크로플로우 LC (microflow LC)와 Q-TOF 질량분석기 (Quadrupole Time of Flight mass spectrometry)를 이용하여 DIA (Data Independent Acquisition) 방법 중의 하나인 SWATH (Sequential window acquisition of all theoretical spectra)를 이용하여 정량적 분석을 수행하였다. 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography, LC)의 조건은 다수의 시료를 재현성 있고 효율적으로 분석하기 위해 ABsciex 사의 NanoLC 400을 이용하여 5 μ L/분의 유속을 사용하였으며 총 분석 시간은 시료당 57분으로 수행하였다. 질량분석은 ABsciex 사의 Q-TOF 5600 + MS 시스템을 연동하여 분석하였으며 질량 범위 400-1250 m/z에서 100개의 윈도우 (window)를 채택하여 수행하였다.

- [150] Q-TOF 질량 분석을 통해서 얻어진 미가공 데이터 (raw data)는 Spectronaut (Biognosys, Switzerland) 및 PeakView (ABsciex) 소프트웨어를 이용하여 단백질의 정성 및 정량 정보를 수집하는데 활용하였다. 각 플랫폼은 스펙트라 라이브러리 (Spectra library)를 이용하여 SWATH-MS에서 획득된 스펙트럼에서의 표준 펩타이드들의 용출 시간을 기반으로 MS/MS 스펙트럼의 패턴 분석을 통해서 단백질의 정성 및 정량 정보를 얻는 과정으로 진행하였다. 본 연구에서 사용된 스펙트라 라이브러리는 Pan-Human library (10,524개의 단백질 그룹, Rosenberger

et al 2014)이다.

- [151] 유리체와 방수 시료에 대해서 각각 단백질의 동정과 각 단백질들의 상대적인 정량 정보를 추출하고 이를 이용하여 통계 분석을 수행하였다.
- [152] 2-3. 유리체 시료에서의 후보 마커 발굴
- [153] 대조군 (ERM)과 림프종 두 그룹의 유리체 시료에 대한 단백질들의 정량적 정보에 대해 주성분분석 (Principal component analysis)을 수행한 결과, 도 2와 같이 대조군인 ERM 그룹과 림프종 그룹이 구분됨을 확인하였다.
- [154] 대조군 대비 림프종 그룹의 단백질들의 비율 (ratio)과 p 값을 이용하여 볼케이노 플랏 (volcano plot)을 분석한 결과, 도 3과 같이 림프종 그룹에서 증가된 15개의 단백질 및 감소된 17개의 단백질들을 발굴하였다.
- [155] 유리체 시료 중 림프종 그룹에서 증가된 15개의 단백질 및 감소된 17개의 단백질의 p 값 (p value)과 비율 (ratio)에 대한 Log₂ 값을 표 2 및 3에 나타내었다.

[156] [표2]

림프종 그룹의 유리체 시료에서 증가된 15개의 단백질

Accession	설명	유전자 이름	p 값	Log ₂
P00540	MOS proto-oncogene serine/threonine kinase	MOS	4.7734	4.4726
Q9Y2Z9	coenzyme Q6, monooxygenase	COQ6	5.9109	4.0078
P62805	H4 clustered histone 8	H4C8	6.2523	3.3638
Q562R1	actin beta like 2	ACTBL2	5.8597	2.7400
P01871	immunoglobulin heavy constant mu	IGHM	3.9559	2.4023
P07737	profilin 1	PFN1	3.5122	2.3393
Q86VB7	CD163 molecule	CD163	5.0567	2.1391
P08637	Fc fragment of IgG receptor IIIa	FCGR3A	3.7177	1.9834
P61769	beta-2-microglobulin	B2M	5.0224	1.8312
P19827	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 1	ITIH1	3.8489	1.7052
P02747	complement C1q C chain	C1QC	4.5522	1.6514
P02746	complement C1q B chain	C1QB	5.3214	1.5539
P02792	ferritin light chain	FTL	6.1199	1.4884
P10599	thioredoxin	TXN	4.7246	1.3458
P08571	CD14 molecule	CD14	5.1666	0.8245

[157] [표3]

림프종 그룹의 유리체 시료에서 감소된 17개의 단백질

Accession	설명	유전자 이름	p 값	Log ₂
P15586	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	GNS	3.6015	-0.9970
O75438	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B1	NDUFB1	3.4773	-1.0080
Q13510	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	ASAH1	4.0642	-1.0911
O75368	SH3 domain binding glutamate rich protein like	SH3BGR L	3.8147	-1.1223
Q8NHP8	phospholipase B domain containing 2	PLBD2	4.1349	-1.2005
P16870	carboxypeptidase E	CPE	4.5843	-1.2045
Q99519	neuraminidase 1	NEU1	3.7639	-1.3339
P05067	amyloid beta precursor protein	APP	4.2473	-1.3488
Q14515	SPARC like 1	SPARCL 1	3.6663	-1.3912
P39060	collagen type XVIII alpha 1 chain	COL18A 1	4.6933	-1.4206
Q9UHL4	dipeptidyl peptidase 7	DPP7	3.4147	-1.4222
Q7Z7G0	ABI family member 3 binding protein	ABI3BP	3.7913	-1.4787
O14773	tripeptidyl peptidase 1	TPP1	6.2823	-1.4981
P42356	phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA	3.4881	-1.6954
P13611	versican	VCAN	3.6083	-1.7040
Q93008	ubiquitin specific peptidase 9 X-linked	USP9X	3.5140	-1.7326
Q06481	amyloid beta precursor like protein 2	APLP2	5.5711	-2.7949

[158] 도 4에 나타낸 바와 같이, 정량된 3,425개의 유리체 단백질들 중에서 모든 시료에서 정량이 된 3,421개의 단백질을 선별하고 다시 T-test를 통해 대조군 대비 림프종에서 변화된 단백질 32개를 선별하였다. 선별된 32개의 단백질을 Z

점수화 (Z score)하여 계층적 군집 분석 (Hierarchical clustering analysis)을 수행한 결과 총 2개의 클러스터를 도출하였으며, 도 5에서 확인되는 바와 같이 림프종에서 증가된 단백질 클러스터인 Cluster 1은 15개의 단백질로 구성되었고, 림프종에서 감소된 단백질 클러스터인 Cluster 2는 17개의 단백질로 구성되었다.

[159] 2-4. 방수 시료에서의 후보 마커 발굴

[160] 방수에서 정량된 단백질들에 대해서 대조군 대비 림프종 그룹의 단백질들의 비율 (ratio)과 p 값을 이용하여 볼케이노 플롯 (volcano plot)을 분석한 결과, 도 6과 같이 림프종에서 증가된 4개의 단백질들을 발굴하였다. 방수 시료 중 림프종 그룹에서 증가된 4개의 단백질들의 p 값과 비율에 대한 Log₂ 값은 표 4에 나타내었다.

[161] [표4]

림프종 그룹의 방수 시료에서 증가된 4개의 단백질

Accession	설명	유전자 이름	p 값	Log ₂
P61769	beta-2-microglobulin	B2M	5.6331	2.1857
P02747	complement C1q C chain	C1QC	5.3756	1.8643
P08571	CD14 molecule	CD14	4.8493	1.3436
P07360	complement C8 gamma chain	C8G	4.4871	1.2664

[162] 도 7에 나타낸 바와 같이, 정량된 3,425개의 방수 단백질들 중에서 모든 시료에서 정량이 된 3,422개의 단백질들을 선별하고 다시 T-test를 통해 대조군 대비 림프종에서 변화된 단백질 4개를 선별하였다. 선별된 4개의 단백질을 Z 점수화 (Z score)하여 계층적 군집 분석 (Hierarchical clustering analysis)을 수행한 결과 총 2개의 클러스터를 도출하였으며 도 8에서 확인되는 바와 같이 림프종에서 증가된 단백질 클러스터인 Cluster 1은 1개, Cluster 2는 4개의 단백질로 구성되었다. Cluster 1과 2의 각 단백질 정보는 표 5에 나타내었다.

[163] [표5]

Cluster	Accession	유전자 이름	설명
Cluster 1	P07360	C8G	complement C8 gamma chain
	P08571	CD14	CD14 molecule
	P61769	B2M	beta-2-microglobulin
Cluster 2	P02747	C1QC	complement C1q C chain

[164] 2-5. 최종 마커 선정

[165] 상기 결과를 통해 유리체와 방수 시료에서 공통적으로 림프종 그룹에서

증가되는 단백질은 B2M, C1QC 및 CD14로 3 종의 단백질을 확인하였다.

- [166] 3종의 단백질에 대한 생물 처리 (biological process) 및 분자 기능은 각각 표 6 내지 8에 나타내었고, 세포 위치 (cellular localization)는 도 9에 나타내었다.

[167] [표6]

B2M의 분자 기능 및 생물 처리

유전자 이름	GO 분자 기능
B2M	동일한 단백질 결합 단백질 동종이합체화 활성
	생물 처리 아밀로이드 피브릴 형성항균성 체액 반응MHC Class I을 통한 내인성 펩타이드 항원의 항원 처리 및 제시 MHC Class I을 통한, TAP 의존적, 외인성 펩타이드 항원의 항원 처리 및 제시 MHC Class I을 통한, TAP 독립적, 외인성 펩타이드 항원의 항원 처리 및 제시 MHC Class Ib를 통한, TAP 의존적, 외인성 단백질 항원의 항원 처리 및 제시 MHC Class I을 통한 펩타이드 항원의 항원 처리 및 제시 항균 펩타이드로 매개되는 항균성 체액 면역반응 세포 단백질 대사 과정 철(III) 이온에 대한 세포 반응 철 이온에 대한 세포 반응 지질다당류에 대한 세포 반응 니코틴에 대한 세포 반응 그람 음성균에 대한 방어 반응 그람 양성균에 대한 방어 반응 선천성 면역 반응 인터페론 감마 매개 신호전달 경로 철 이온 항상성 철 이온 수송 학습 또는 기억 나이 관련 행동 쇠퇴의 조절 상피세포 증식의 음성 조절 전뇌 뉴런 분화의 음성 조절 신경발생의 음성 조절 뉴런 돌기 발달의 음성 조절 수용체 결합의 음성 조절 호중성 탈과립 세포 노화의 양성 조절

[168] [표7]

C1QC의 분자 기능 및 생물 처리

유전자 이름	GO 분자 기능
C1QC	혈액 내 보체 보체시스템에서 작용하는 첫 번째 요소로서 면역체계에서 IgG나 IgM 항체의 Fc 부위에 C1QC의 구형 머리 부분이 일어나 보체 활성화가 일어나게 하는 기능
	GO 생물 처리
	보체 활성화 보체 활성화, 고전적 경로 면역 반응 선천성 면역 반응 과립구 분화의 음성 조절 대식세포 분화의 음성 조절 보체 활성화의 조절 시냅스 전지 (synapse pruning)

[169] [표8]

CD14의 분자 기능 및 생물 처리

유전자 이름	GO 분자 기능
CD14	지질펩타이드 결합 지질다당류 결합 리포테이코산 결합 옵소닌 수용체 활성화 펩티도글리칸 면역 수용체 활성화
	생물 처리
	세포사멸 과정 세포사멸 신호전달 경로 세포 표면 수용체 신호전달 경로 디아실 박테리아 지질펩타이드에 대한 세포 반응 지질다당류에 대한 세포 반응 리포테이코산에 대한 세포 반응 박테리아 유래의 분자에 대한 세포 반응 트리아실 박테리아 지질펩타이드에 대한 세포 반응 I-KappaB 키나아제/NF-kappaB 신호전달 염증 반응 선천성 면역 반응 지질다당류 매개 신호전달 경로 MyD88 의존적 톨(toll)-유사 수용체 신호전달 경로 MyD89 독립적 톨(toll)-유사 수용체 신호전달 경로 프로그래밍된 세포괴사 과정 (necroptotic process) MyD89 독립적 톨(toll)-유사 수용체 신호전달 경로의 음성 조절 호중성 탈과립 식균작용 사이토카인 분비의 양성 조절 세포내 섭취의 양성 조절 인터페론-감마 생성의 양성 조절

[170] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 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 이해되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 i) B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 포함하고,
 ii) MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질을 추가로 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커 조성물.
- [청구항 3] MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 i) B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하고,
 ii) MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질을 추가로 포함하는, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물.

- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드인, 원발성 안구내 림프종 진단용 조성물.
- [청구항 7] 제3항 또는 제4항의 조성물을 포함하는 원발성 안구내 림프종 진단용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 경쟁적 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인, 원발성 안구내 림프종 진단용 키트.
- [청구항 9] 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 다음의 a) 및 b) 단계 중 a) 단계만 포함하거나, a) 및 b) 단계를 모두 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법:
- a) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- b) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나, 또는
상기 개체로부터 분리한 시료에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1,

PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서,

상기 a) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나,

상기 b) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나, 또는
상기 b) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계를 추가로 포함하는, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 13] 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 유리체 또는 방수인, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 14] 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 포도막염과 구분하여 원발성 안구내 림프종을 진단하는 것인, 원발성 안구내 림프종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 15] a) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
b) 상기 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, B2M, ITIH1, C1QC, C1QB, FTL, TXN, CD14 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의

mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나, 또는 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서 원발성 안구내 림프종으로 진단된 개체에게 방사선 치료, 항암요법, 항암제 주사 및 유리체절제술(vitrectomy)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 치료를 적용하는 단계;를 포함하는 원발성 안구내 림프종 치료방법.

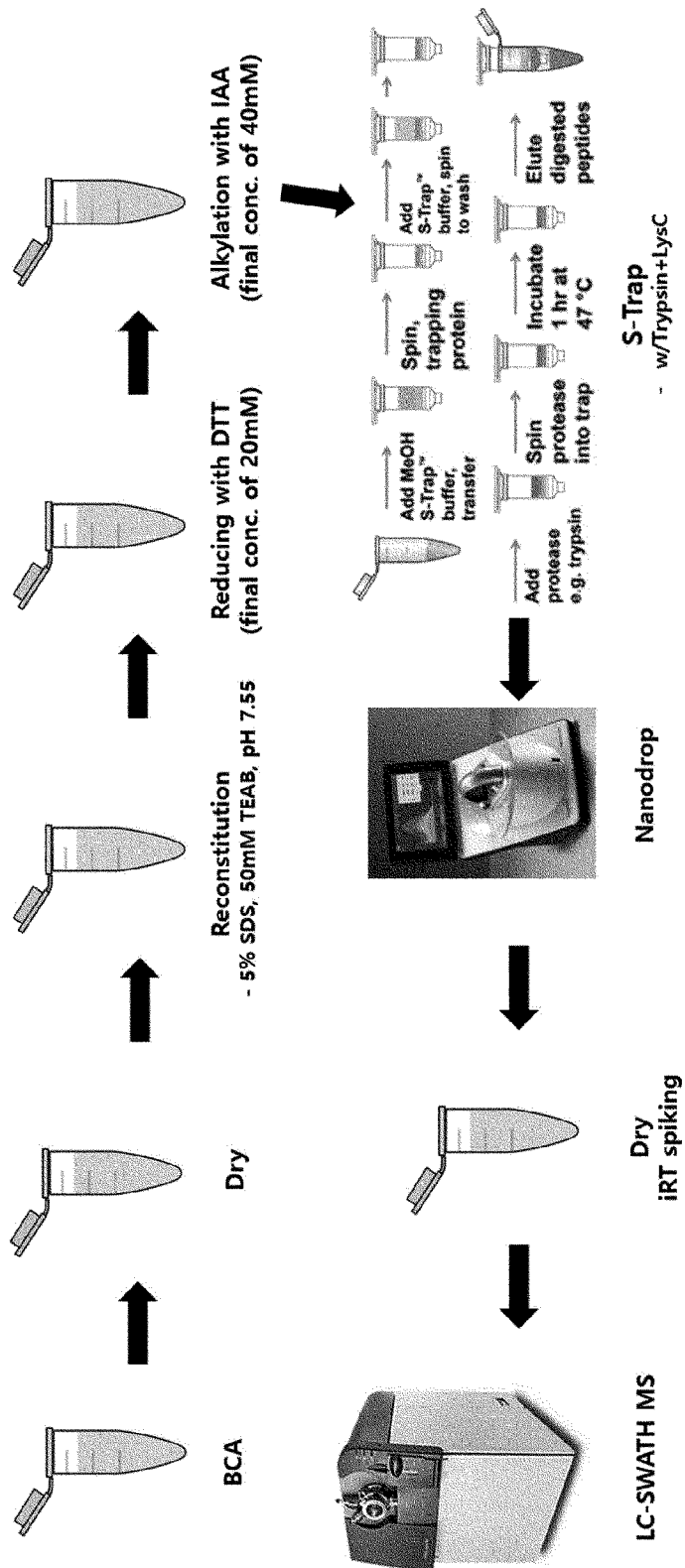
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 a) 단계는 다음의 a-1) 및 a-2) 단계 중 a-1) 단계를 포함하거나, a-1) 및 a-2) 단계를 모두 포함하는, 원발성 안구내 림프종 치료방법:
- a-1) 개체로부터 분리한 시료에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 a-2) 개체로부터 분리한 시료에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN, C8G, GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자로 코딩되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 추가로 측정하는 단계.

- [청구항 17] 제16항에 있어서,
- 상기 a-1) 단계에서 B2M, C1QC 및 CD14로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나,
- 상기 a-2) 단계에서 MOS, COQ6, H4C8, ACTBL2, IGHM, PFN1, CD163, FCGR3A, ITIH1, C1QB, FTL, TXN 및 C8G로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 시료에서 측정한 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 증가하거나, 또는
- 상기 a-2) 단계에서 GNS, NDUFB1, ASAH1, SH3BGRL, PLBD2, CPE, NEU1, APP, SPARCL1, COL18A1, DPP7, ABI3BP, TPP1, PI4KA, VCAN, USP9X 및 APLP2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의

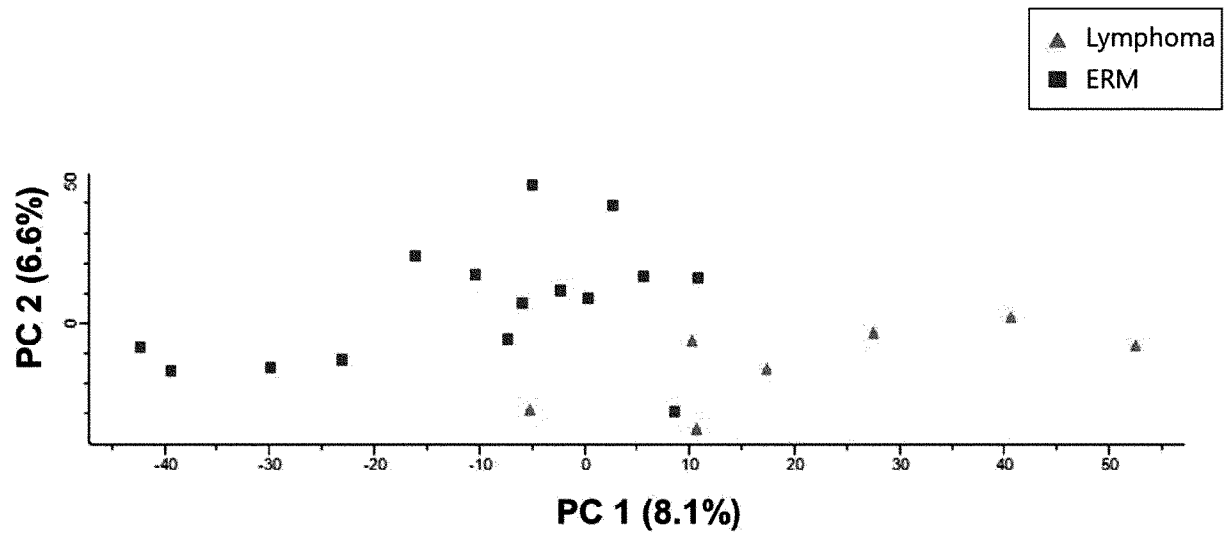
유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 망막전막, 황반 원공 또는 포도막염 환자군 치료에서 측정된 동일한 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준보다 감소하는 경우, 원발성 안구내 림프종으로 진단하는, 원발성 안구내 림프종 치료방법.

- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 c) 단계의 항암제 주사는 메토트렉세이트(methotrexate), 리툭시맙(rituximab) 및 멜팔란(melphalan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 안구내로 주사하는 것을 포함하는, 원발성 안구내 림프종 치료방법.
- [청구항 19] 제15항에 있어서, 상기 치료는 유리체 또는 방수인, 원발성 안구내 림프종 치료방법.
- [청구항 20] 제15항에 있어서, 상기 b) 단계는 포도막염과 구분하여 원발성 안구내 림프종을 진단하는 것인, 원발성 안구내 림프종 치료방법.

[51]

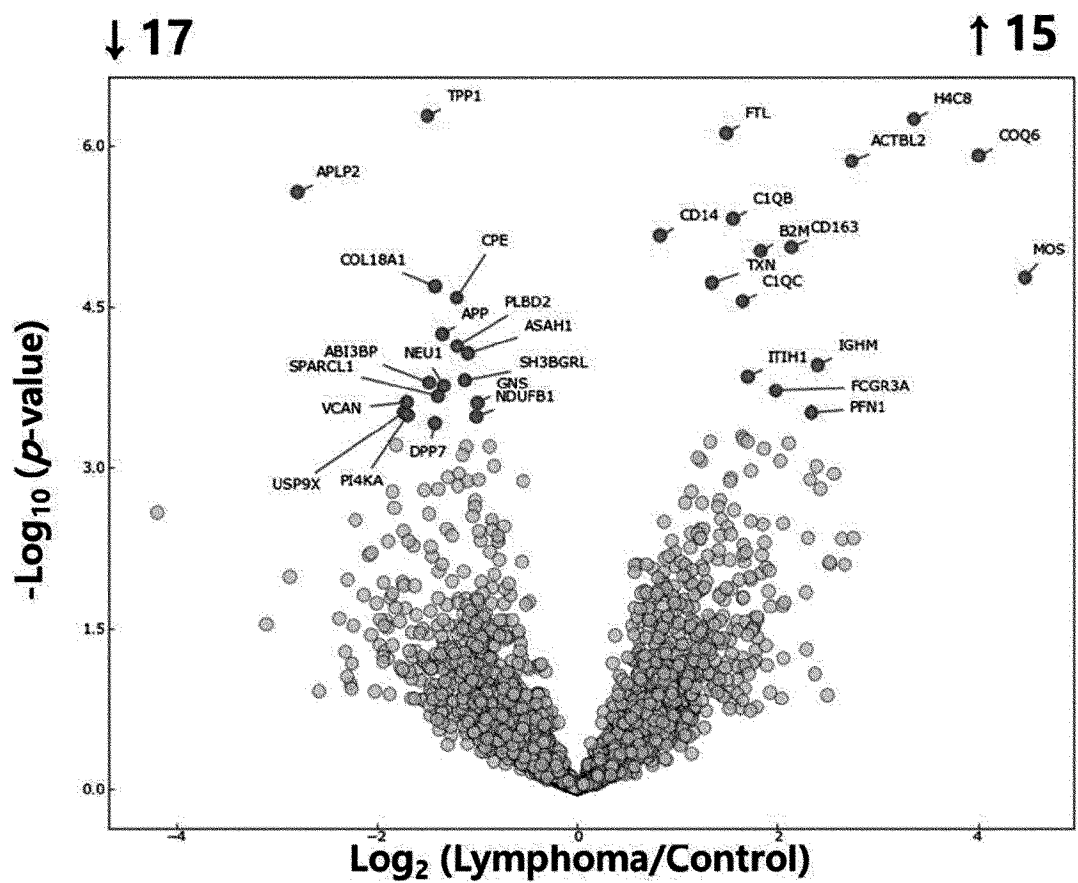


[도2]

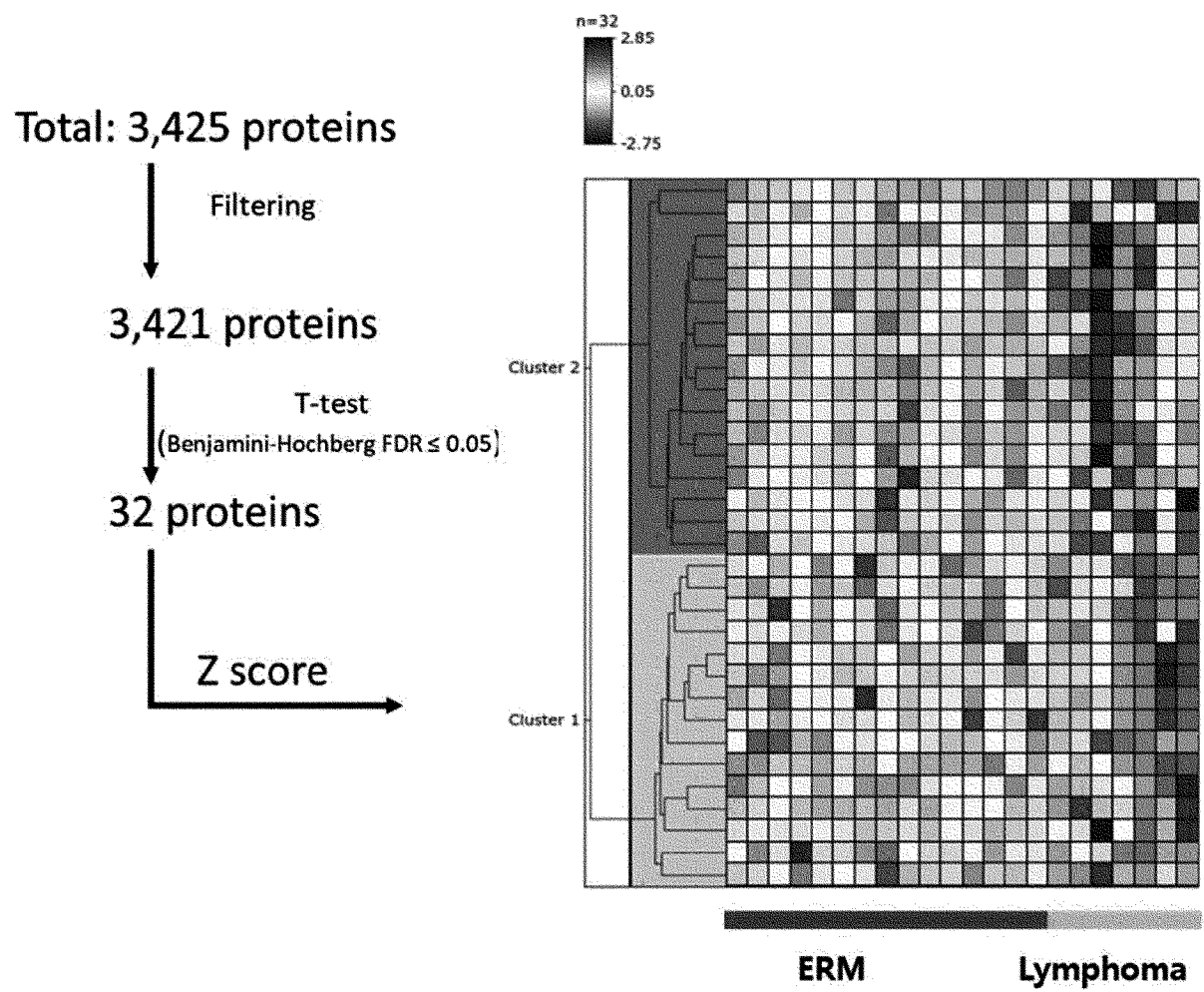


[도3]

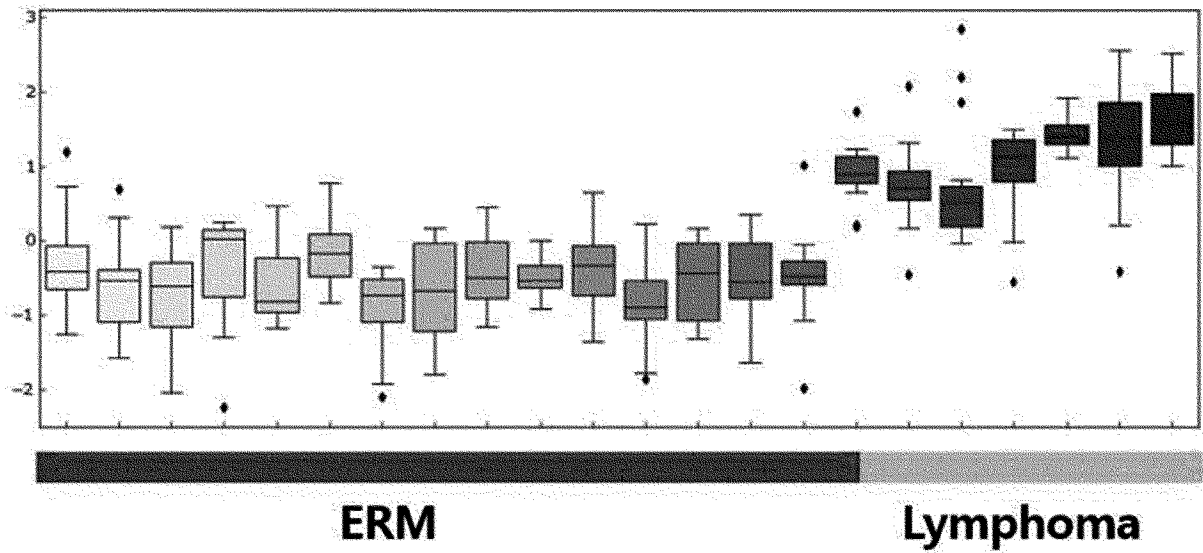
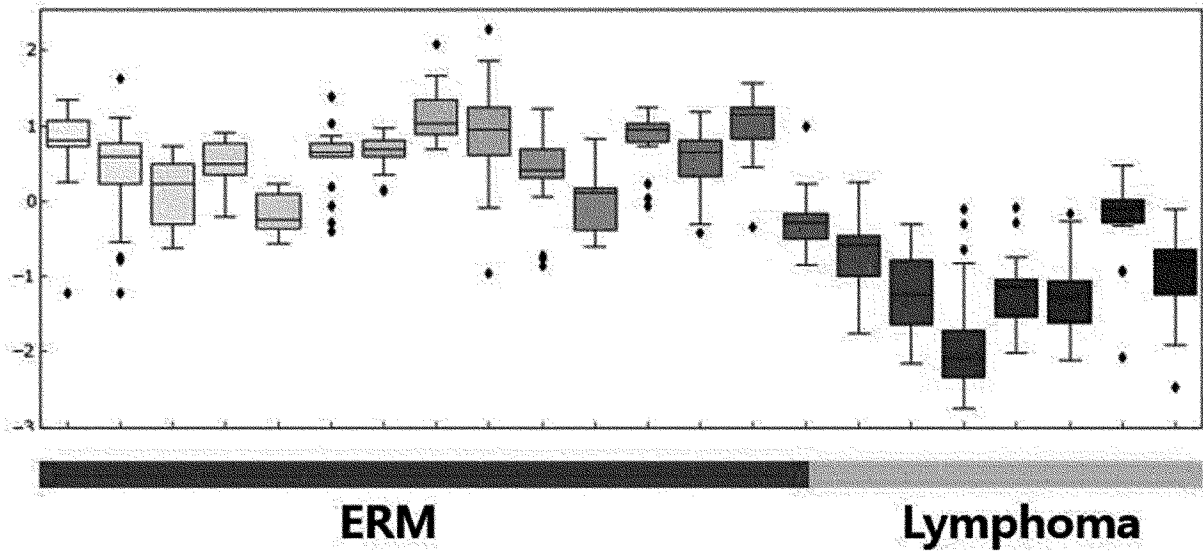
DEPs: Differential expressed proteins

→ Ratio ≥ 2 , ≤ 0.5 → Benjamini-Hochberg FDR ≤ 0.05 

[도4]

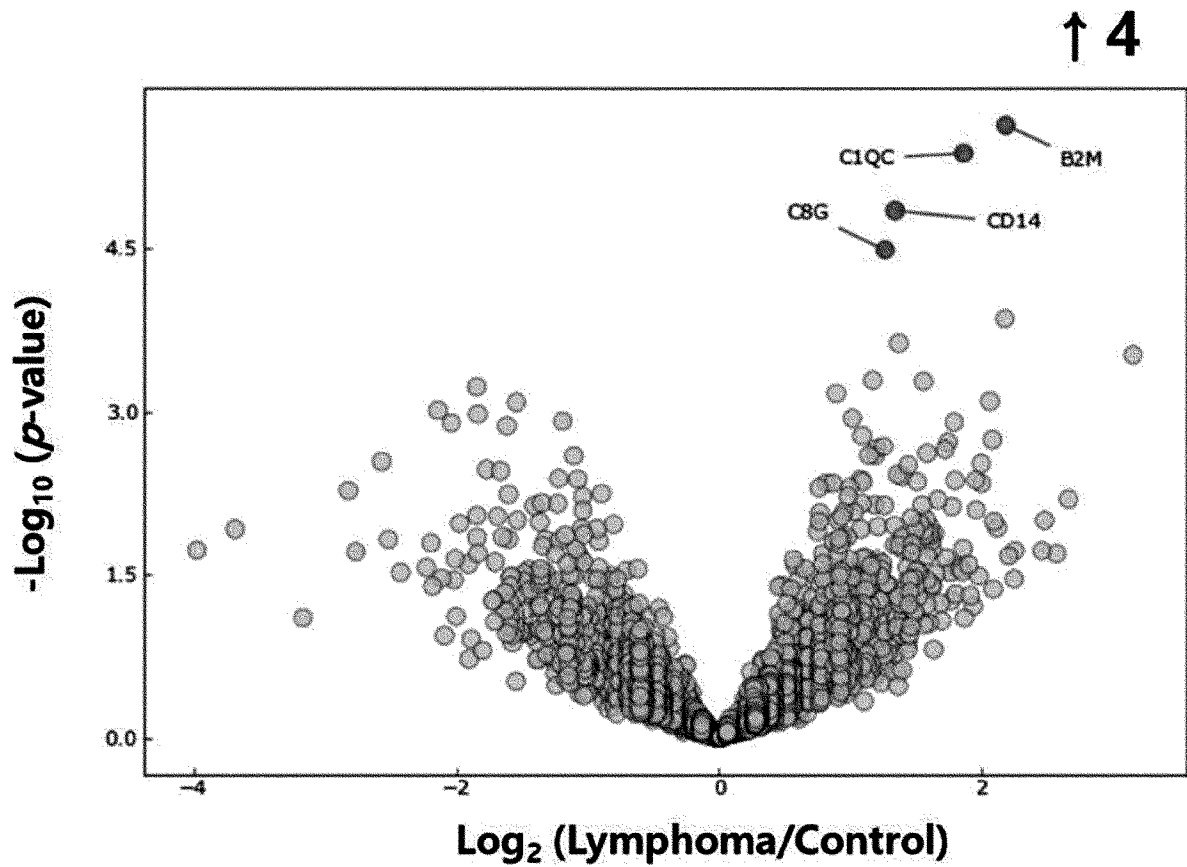


[도5]

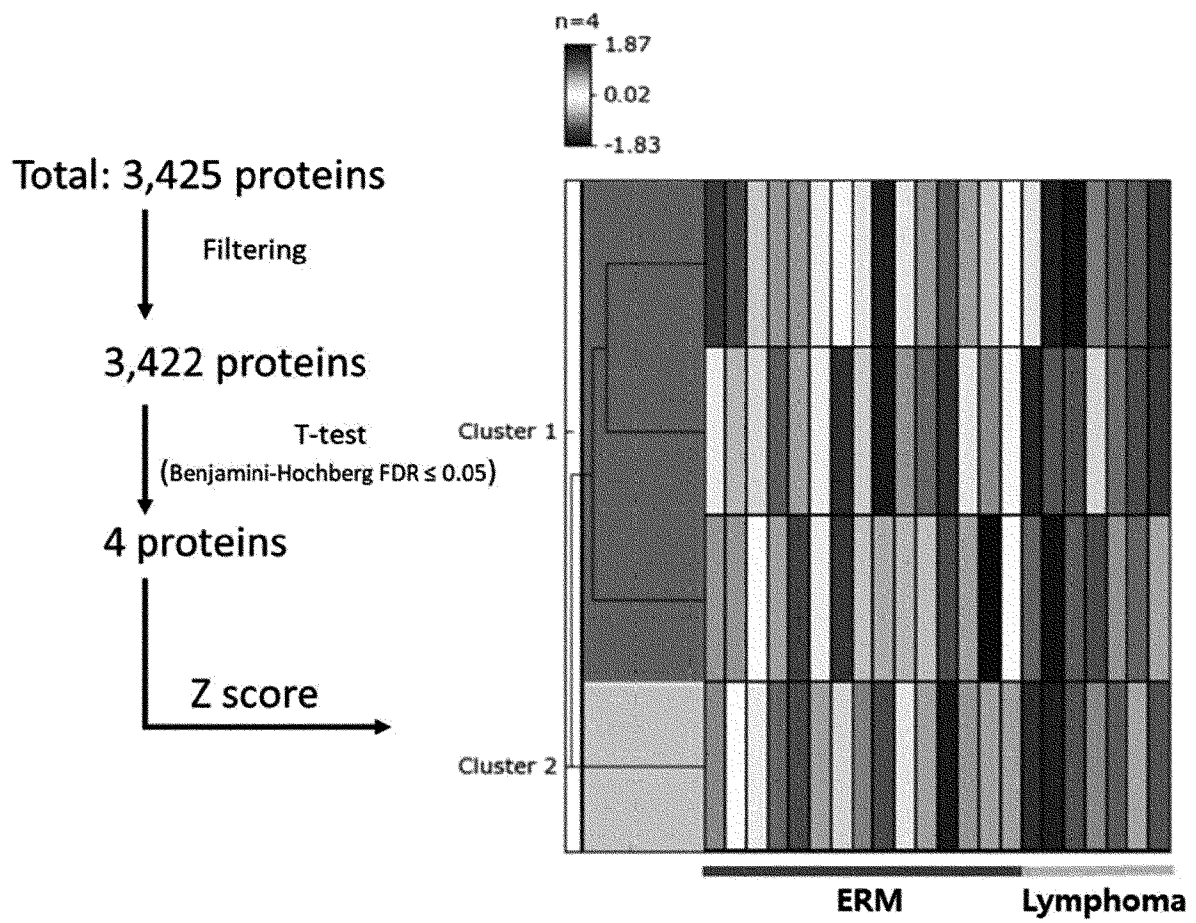
Cluster 1 (15)**Cluster 2 (17)**

[도6]

DEPs: Differential expressed proteins

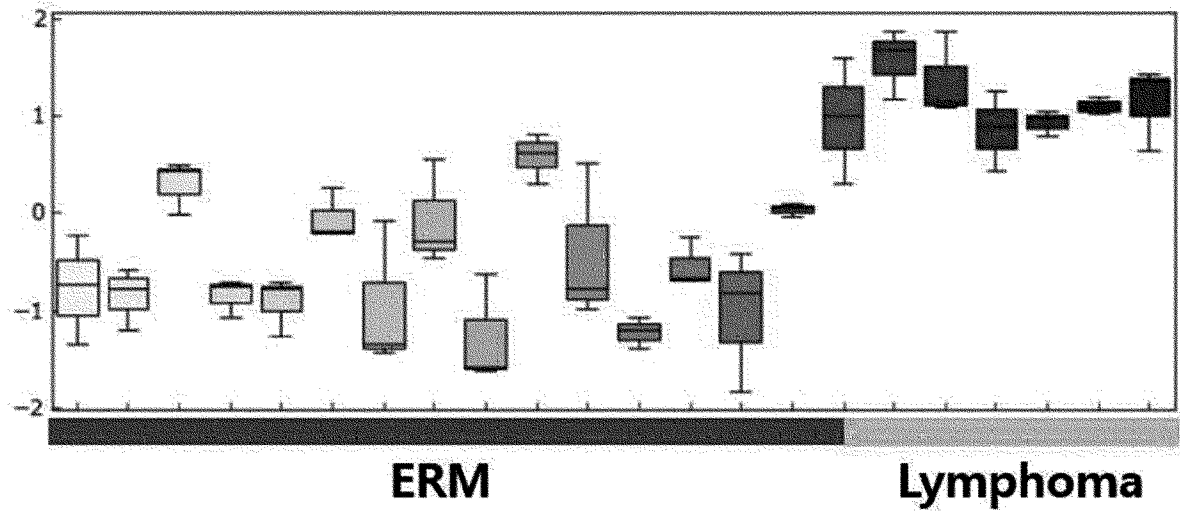
→ Ratio ≥ 2 , ≤ 0.5 → Benjamini-Hochberg FDR ≤ 0.05 

[도7]

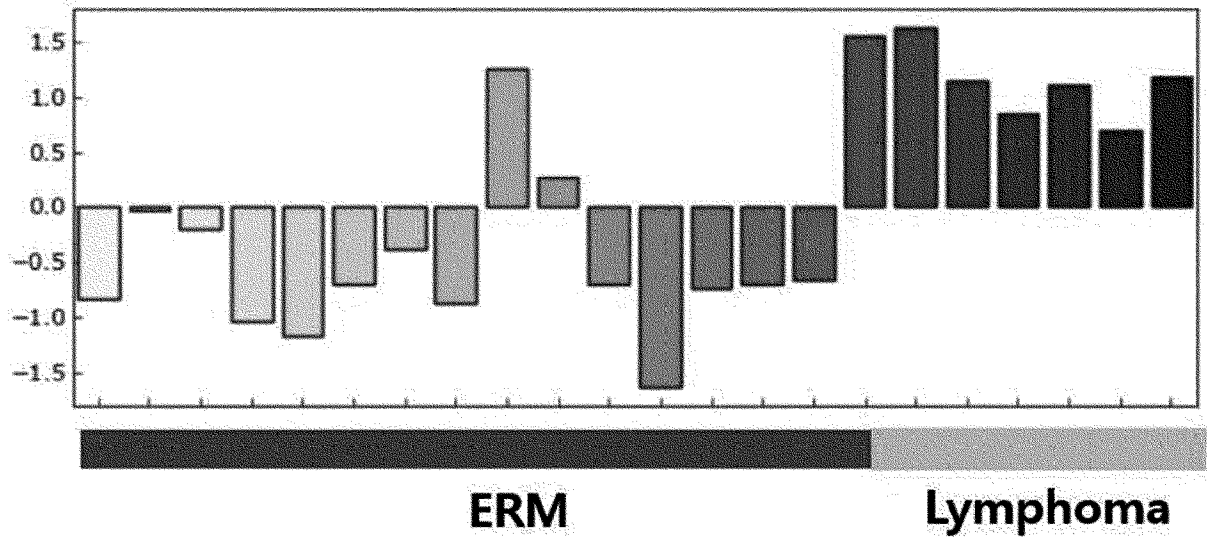


[도8]

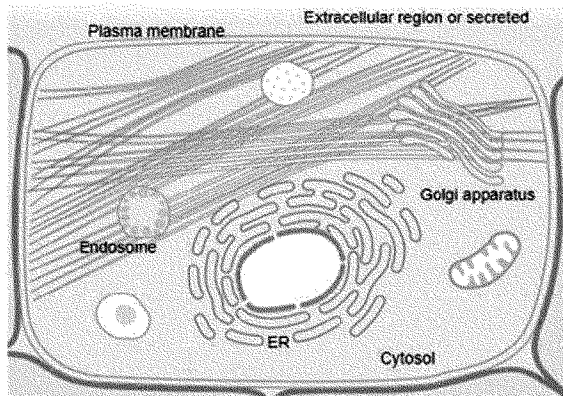
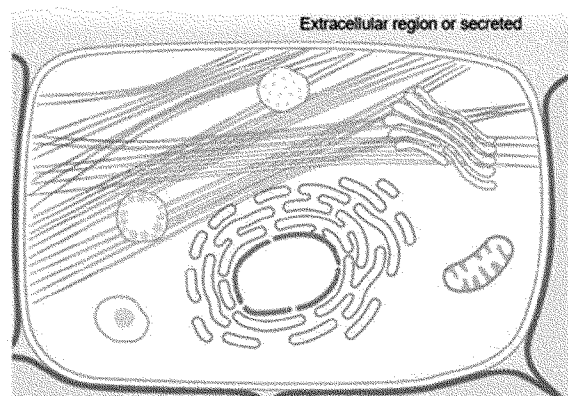
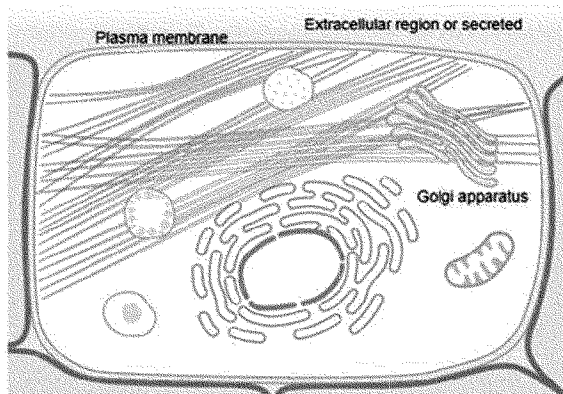
Cluster 1 (3)



Cluster 2 (1)



[도9]

(A) B2M**(B) C1QC****(C) CD14**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/011940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)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 33/68(2006.01); G01N 27/26(2006.01); G01N 33/48(2006.01) 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: 원발성 (primary), 안구내 림프종 (intraocular lymphoma), 진단 (diagnosis), 바이오마커 (biomarker), MOS (MOS proto-oncogene serine/threonine kinase)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WALDERA-LUPA, D. M. et al. Proteomic changes in cerebrospinal fluid from primary central nervous system lymphoma patients are associated with protein ectodomain shedding. Oncotarget. 2017, vol. 8, no. 66, pp. 110118-110132. See abstract; page 110118; and pages 110121-110122, table 2.	1-20
A	WANG, Y. et al. Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma. International journal of molecular sciences. 2011, vol. 12, pp. 5684-5697. See entire document.	1-20
A	VAN WESTRHENEN, A. et al. Diagnostic markers for CNS lymphoma in blood and cerebrospinal fluid: a systematic review. British journal of haematology. 2018, vol. 182, pp. 384-403. See entire document.	1-20
A	WO 2020-040696 A1 (A. MENARINI BIOMARKERS SINGAPORE PTE LTD et al.) 27 February 2020 (2020-02-27) See entire document.	1-20
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 24 January 2022		Date of mailing of the international search report 24 January 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/011940**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KALOGEROPOULOS, D. et al. Primary vitreoretinal lymphoma. Saudi Journal of Ophthalmology. 2019, vol. 33, pp. 66-80. See entire document.	1-20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1 (claims 1-20, partial) pertains to the diagnosis of primary intraocular lymphoma, including a MOS biomarker.

The invention of groups 2-33 (claims 1-20, partial) pertains to the diagnosis of primary intraocular lymphoma, including a biomarker other than MOS.

The technical feature shared by all of these claims pertains to a biomarker for diagnosing primary intraocular lymphoma. However, the biomarker for diagnosing primary intraocular lymphoma corresponds to a technology found in the prior art:

(1) WANG, Yujuan et al. Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma. *Int. J. Mol Sci.* 2011, vol. 12, pp. 5684-5697.

Therefore, these claims have no common special technical features which make a contribution over the prior art under PCT Rule 13.2, and thus lack unity of invention.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-20**

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/011940

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020-040696	A1	27 February 2020	SG	11202100478	A	25 February 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68(2006.01); G01N 27/26(2006.01); G01N 33/48(2006.01) 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: 원발성 (primary), 안구내 림프종 (intraocular lymphoma), 진단 (diagnosis), 바이오마커 (biomarker), MOS (MOS proto-oncogene serine/threonine kinase)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WALDERA-LUPA, D. M. 등, 'Proteomic changes in cerebrospinal fluid from primary central nervous system lymphoma patients are associated with protein ectodomain shedding', Oncotarget, 2017, 8권, 66호, 페이지 110118-110132 초록; 페이지 110118; 페이지 110121-110122, 표 2	1-20
A	WANG, Y. 등, 'Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma', International journal of molecular sciences, 2011, 12권, 페이지 5684-5697 전체 문헌	1-20
A	VAN WESTRHENEN, A. 등, 'Diagnostic markers for CNS lymphoma in blood and cerebrospinal fluid: a systematic review', British journal of haematology, 2018, 182권, 페이지 384-403 전체 문헌	1-20
A	WO 2020-040696 A1 (A. MENARINI BIOMARKERS SINGAPORE PTE LTD 등) 2020.02.27 전체 문헌	1-20
A	KALOGEROPOULOS, D. 등, 'Primary vitreoretinal lymphoma', Saudi Journal of Ophthalmology, 2019, 33권, 페이지 66-80 전체 문헌	1-20
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년01월24일(24.01.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년01월24일(24.01.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1군 발명은 (청구항 1-20, 부분적으로) MOS 바이오 마커를 포함하는 원발성 안구내 림프종 진단에 관한 것입니다.

2-33군 발명은 (청구항 1-20, 부분적으로) MOS 외 바이오 마커를 포함하는 원발성 안구내 림프종 진단에 관한 것입니다.

이들 청구항 모두에 공통된 기술적 특징은 “원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커”입니다. 그러나 이 “원발성 안구내 림프종 진단용 바이오마커”는 선행문헌에 공지된 기술에 해당합니다:

(1) Yujuan WANG et al., ‘Molecular biomarkers for the diagnosis of primary vitreoretinal lymphoma’, Int. J. Mol Sci., 2011, vol. 12, pp. 5684-5697

따라서 이들 청구항 간에는 PCT 규칙 13.2에서 규정된 선행기술에 대하여 기여한 공통되는 특별한 기술적 특징이 없으므로 발명의 단일성이 없습니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☒ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다. **1-20**

- 이의신청에 관한 기재 ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

