



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월31일

(11) 등록번호 10-2197524

(24) 등록일자 2020년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/50 (2017.01) A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7029554

(22) 출원일자(국제) 2013년03월14일

심사청구일자 2018년03월14일

(85) 번역문제출일자 2014년10월22일

(65) 공개번호 10-2014-0143196

(43) 공개일자 2014년12월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/031178

(87) 국제공개번호 WO 2013/148232

국제공개일자 2013년10월03일

(30) 우선권주장

61/616,394 2012년03월27일 미국(US)

61/707,411 2012년09월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20090214523 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

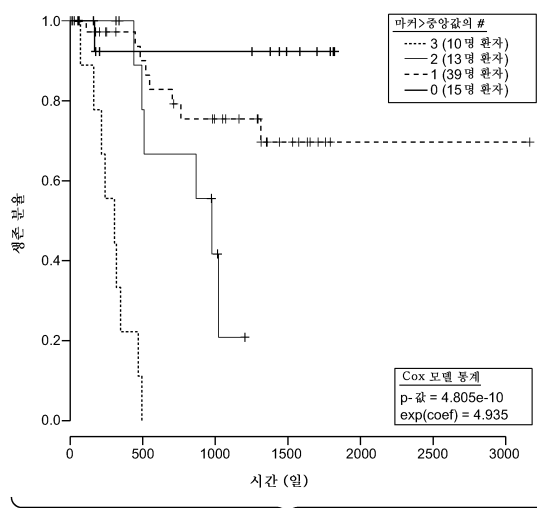
심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 특발성 폐 섬유증의 예후, 진단 및 치료 방법

(57) 요약

환자에서 특발성 폐 섬유증의 예후를 평가하기 위한 조성물, 키트 및 방법이 제공된다. 또한, 특발성 폐 섬유증의 하위유형을 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법이 제공된다. 또한, 특발성 폐 섬유증을 치료하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

찬드리아니, 산제이

미국 94110 캘리포니아 샌프란시스코 28번 스트리트 55

지아, 구이완

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

르원-코, 니콜라스 제이.아이.

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

데피안토, 대릴

미국 94080 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

(56) 선행기술조사문헌

US20120035067 A1*

Korthagen et al., Respiratory Medicine, Vol. 105, 2011, pp. 106-113.*

A. Belperio et al., The Journal of Immunology, Vol. 173, 2004, pp. 4692-4698.*

M. Korthagen et al., Respiratory Medicine, Vol. 105, 2011, pp. 106-113.*

M. Okamoto et al., European Respiratory Journal, Vol. 37, No. 5, 2011, pp. 1119-1127.*

Pardo et al., PLOS Medicine, Vol. 2, Iss. 9, 2005, pp. 891-903.*

Prasse et al., ARTHRITIS & RHEUMATISM, Vol. 56, No. 5, 2007, pp. 1685-1693.*

S. Bridges et al., The American Journal of Pathology, Vol. 175, No. 6, 2009, pp. 2351-2361.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 유전자의 발현, 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 유전자는 CXCL13이고, 유전자의 상승된 발현 수준, 또는 단백질의 상승된 발현 수준은 중앙 생존기간에 비해 단축된 생존기간에 대한 예후를 나타내고, 유전자의 감소된 발현 수준, 또는 단백질의 감소된 발현 수준은 중앙 생존기간에 비해 증가된 생존기간에 대한 예후를 나타내는 것인, 환자에서 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 예후하거나 또는 예후를 돕는 데 사용되는 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 환자가 면역조절 요법을 받고 있는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 생물학적 샘플이 폐 조직, 혈청 및 혈장으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2012년 3월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 61/616,394 및 2012년 9월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 61/707,411을 우선권 주장하며, 이들은 둘 다 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그의 전체내용이 본원에 참조로 포함된다. 2013년 3월 6일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P4841R1_SequenceListing.txt로 명명되고, 크기는 22,866 바이트이다.

[0005] 기술분야

[0006] 환자에서 특발성 폐 섬유증의 예후를 평가하기 위한 조성물, 키트 및 방법이 제공된다. 또한, 특발성 폐 섬유증의 하위유형을 진단하기 위한 조성물, 키트 및 방법이 제공된다. 또한, 특발성 폐 섬유증을 치료하는 방법이 제공된다.

배경 기술

[0007] 특발성 폐 섬유증 (IPF)은 폐 유조직의 진행성 간질성 섬유증을 특징으로 하는 제한성 폐 질환으로, 미국에서 대략 100,000명의 환자가 발생하였다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 174:810-816 (2006)]). IPF와 연관된 이 간질성 섬유증은 폐 기능의 진행성 손실로 이어져, 대부분의 환자에서 호흡 부전으로 인한 사망이 발생한다. 진단 시점으로부터의 중앙 생존기간은 2-3년이다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011)]). IPF의 병인 및 핵심 분자 및 병리생리학적 구동인자는 알려져 있지 않다. IPF 환자에서 생존을 연장시키는 것으로 밝혀진 유일한 치료는 폐 이식이다 (문헌 [Thabut et al., Annals of internal medicine 151:767-774 (2009)]). 그러나, 폐 이식은 상당한 이환율과 연관되고, 모든 IPF 환자는 이를 위한 적절한 후보가 아니며, 적합한 공여자 폐가 상대적으로 부족하다. 수많은 시도에도 불구하고, 일부 개입은 일부 환자의 폐 기능 감퇴의 속도를 늦춘 것으로 나타났으나, 어떠한 약물 요법도 현재까지 IPF 환자에서의 무작위화 위약-제어된 개입 시험에서 생존을 실질적으로 연장시키는 것으로 밝혀지지 않았다 (문헌 [Raghu

et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011); Richeldi et al., The New England J. of Med. 365:1079-1087 (2011); Rafii et al., J. Thorac. Dis. 5(1):48-73 (2013)]).

[0008] 모든 IPF 환자에 대한 예후가 심각할지라도, 질환 경로에 있어 상당한 이질성이 존재한다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011)]). 일부 환자는 10년 이상만큼 오랜 기간에 걸쳐 상대적으로 일정한 비율로 폐 기능을 잃어가면서 상대적으로 무통성 과정을 나타낸 반면, 다른 환자들은 보다 급속한 폐 기능의 감퇴를 경험하였으며 진단으로부터 1년 또는 2년 내에 사망에 이르렀다. 또한, 일부 환자는 전형적으로 폐 기능의 갑작스러운 현저한 감소를 특징으로 하는 질환의 급성 악화를 앓고 있다. 일반적으로, 이러한 환자는 급성 사건 후에 완전히 회복되지 않고, 종종 악화 동안 또는 그 직후에 사망한다. 질환 경로에 있어 이러한 이질성은 다양한 IPF 환자가 그의 질환의 원인이 되는 상이한 병리생리학적 인자를 가질 수 있으며, 이는 분자 표적화된 치료제에 차등적으로 영향을 받기 쉬울 수 있다.

[0009] 오직 몇 가지 임상적 또는 생물학적 마커만이 단일 시점으로부터 IPF 환자의 질환 경로를 예측하기 위한 후보로서 제안되었다 (문헌 [Ley et al., Am J Respir Crit Care Med 183:431-440 (2011); Ley et al., Am J Respir Crit Care Med 185:6-7 (2012)]). 감소된 생존기간은 시간 경과에 따른 폐 기능 손실의 비율과 가장 설득력있게 연관되었으며, 이 때 6개월 기간 내에 > 10%의 강제 폐활량 (FVC) 손실을 갖는 환자는 보다 안정한 FVC를 갖는 환자보다 훨씬 더 짧은 후속 생존 기간을 가졌다 (문헌 [Collard et al., Am J Respir Crit Care Med 168:538-542 (2003)]). 무작위 임상 시험에 등록된 1100명 초과 환자의 보다 큰 연구는 5-10%의 24-주 FVC 감축이 다음 해의 사망률의 2배 초과 증가된 위험과 연관되는 반면 >10%의 감축은 다음 해의 사망률의 거의 5배의 증가된 위험과 연관된다는 것을 발견하였다 (문헌 [du Bois et al., Am J Respir Crit Care Med 184:1382-1389 (2011)]). 그러나, 임상 시험에서 환자 등록을 계층화하기 위한 이러한 평가를 이용하는 것의 단점은 6개월의 진행 기간이다. MMP7, IL-8, ICAM1, VCAM1, S100A12 (문헌 [Richards et al., Am J Respir Crit Care Med, doi:10.1164/rccm.201101-00580C (2011)]), KL-6 (문헌 [Yokoyama et al., Respiriology 11:164-168 (2006)]), CCL18 (문헌 [Prasse et al., Am J Respir Crit Care Med 179:717-723 (2009)]), YKL-40 (문헌 [Korthagen et al., Respiratory medicine 105:106-113 (2011)]), 및 계면활성제 단백질 (문헌 [Kinder et al., Chest 135:1557-1563 (2009)])을 비롯하여, 단일 시점에 측정된 특정 말초 혈액 바이오마커가 생존 또는 질환 진행에 대한 예후인 것으로 보고되었다. 그러나 다수의 이들 바이오마커 연구는 재현없이 작은 코호트에서 수행하였으며, 준최적, 비일관적 및/또는 비검증 바이오마커 검출 기술을 이용하였다.

[0010] 표적화가능한 분자 메카니즘의 제한된 이해, 질환 경로의 가변성, 및 IPF 환자의 비선택된 집단에서 생존 연구를 수행하는 시간 및 비용을 고려하면, 후보 치료제가 IPF에서 생존을 연장시킬 잠재성을 평가하기 위해 적절하게 작동하는 임상 연구를 설계하는 것은 매우 도전할만하다. 잠재적으로 표적화가능한 경로의 활성을 평가하고 이후의 질환 진행의 정확한 예후를 제공하는 바이오마커는 임상시험용 약물 후보의 치료 가치를 보다 잘 평가하기 위해 중재 시행에서 등록을 적절하게 계층화하는 것을 도울 것이다.

[0011] 따라서, 환자가 다른 사람들보다 더 빠르게 진행될 것인지 또는 환자가 중앙값에 비해 단축된 생존 기간을 가질 것인지 결정하기 위한 것이며, 이러한 결정을 IPF 환자에 대해 보다 효과적인 임상 시험 설계 및 치료에 혼입시키기 위한 보다 효과적인 수단이 필요하다.

[0012] 따라서, 환자에서 질환의 존재를 객관적으로 확인하고/거나 질환을 분류하고, IPF에 대한 병리생리학적 측면, 임상 활성 및 예후 (생존에 대한 예후 포함)를 규정하는데 사용될 수 있는 분자-기반 예후 및 진단 방법을 비롯한 추가의 예후 및 진단 방법을 갖는 것이 매우 유리할 것이다. 또한, 질환의 다양한 임상 및/또는 병리생리학적 및/또는 다른 생물학적 지표와 연관된 분자-기반 진단 및 예후 마커를 갖는 것이 유리할 것이다. 따라서, IPF 뿐만 아니라 다른 제한성 폐 장애와 연관된 새로운 분자 바이오마커를 확인할 필요가 계속 존재한다.

[0013] 본원에 기재된 본 발명은 상기 기재된 필요를 충족시키며, 다른 이익을 제공한다.

[0014] 인터류킨 (IL)-13은 다면발현성 T 헬퍼 세포 하위부류 2 (Th2) 시토카인이다. IL4와 같이, IL13은 4 α -나선형 소수성 다발 코어에 의해 규정된 3차 구조를 공유하는 유형 I 시토카인의 패밀리에 속한다. IL13은 IL4와 대략 30% 아미노산 서열 상동성을 가지며, IL4의 다수의 특성을 공유한다 (문헌 [Wynn, Ann. Rev. Immunol., 21: 425 (2003)]). IL4 및 IL13의 기능적 유사성은 IL13이 IL4 수용체 알파쇄 (IL4R- α)에 결합할 수 있다는 사실, 및 이후의 IL13 수용체 알파쇄-1 (IL13R α 1)에 대한 그의 결합에 기인한다 (문헌 [Hershey, J. Allergy Clin. Immunol., 111: 677 (2003)]). IL4R α 는 Jak1-의존성 STAT6 인산화를 발생시키는 IL4 및 IL13에 의해 활성화된다. IL4 및 IL13은 둘 다 B-세포 증식을 촉진하고, CD40/CD40L 동시자극과 조합하여 IgG4 및 IgE의 부류 전환을 유도한다 (문헌 [Punnonen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3730 (1993), Oettgen et

al., J. Allergy Clin. Immunol., 107: 429 (2001)]).

[0015] 그러나, IL4와 달리, IL13은 나이브 T 세포의 Th2 세포로의 분화에 관여하지 않는다 (문헌 [Zurawski et al., Immunol. Today, 15: 19 (1994)]). IL13은 FcεRI를 상향조절하고, 이에 따라 비만 세포의 IgE 프라이밍을 돕는다 (문헌 [de Vries, Allergy Clin. Immunol. 102: 165 (1998)]). 단핵구/대식세포에서, IL13은 CD23 및 MHC 부류 I 및 부류 II 항원의 발현을 상향조절하고, Fcγ 및 CD14의 발현을 하향조절하며, 항체-의존성 세포독성을 억제한다 (문헌 [de Waal Malefyt et al., J. Immunol., 151: 6370 (1993), Chomarat et al., Int. Rev. Immunol., 17: 1 (1998)]). IL13은 에오시노필 생존, 활성화 및 동원을 촉진하나 IL4는 그렇지 않다 (문헌 [Horie et al., Intern. Med., 36: 179 (1997), Luttmann et al., J. Immunol. 157: 1678 (1996), Pope et al., J. Allergy Clin. Immunol., 108: 594 (2001)]). IL13은 또한 비조혈 세포, 예컨대 평활근 세포, 상피 세포, 내피 세포 및 섬유모세포에 대한 중요한 기능을 나타낸다. IL13은 평활근의 증식 및 콜린성-유도된 수축을 증진시킨다 (문헌 [Wills-Karp, J. Allergy Clin. Immunol., 107: 9 (2001)]). 상피 세포에서 IL13은 케모카인 생산의 강력한 유도제이고 (문헌 [Li et al., J. Immunol., 162: 2477 (1999)]), 점액섬모 분화를 변경하고 (문헌 [Laoukili et al., J. Clin. Invest., 108: 1817 (2001)]), 섬모 상피 세포의 섬모 진동 횟수를 감소시키고 (문헌 [Laoukili et al., J. Clin. Invest., 108: 1817 (2001)]), 배상 세포 화생을 발생시킨다 (문헌 [Zhu et al., J. Clin. Invest., 103: 779 (1999), Grunig et al., Science, 282: 2261 (1998)]). 내피 세포에서 IL13은 에오시노필의 동원에 중요한 혈관 세포 부착 분자 1 (VCAM-1)의 강력한 유도제이다 (문헌 [Bochner et al., J. Immunol., 154: 799 (1995)]). 인간 피부 섬유모세포에서 IL13은 인간 피부 섬유모세포에서의 유형 1 콜라겐 합성을 유도한다 (문헌 [Roux et al., J. Invest. Dermatol., 103: 444 (1994)]).

[0016] 항-IL-13 항체를 비롯하여 IL-13 길항제가 이전에 기재되었다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2005/062967을 참조한다. 이러한 항체는 또한 인간 치료제로서 개발되었다. 한 항-IL-13 항체인 레브리키주맵을 사용하는 한 임상 연구의 결과가 문헌 [Corren et al., New Engl. J. Med. 365:1088-1098 (2011)]에 기재되었다.

[0017] 특허 출원 및 공개를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 임의의 목적을 위해 그의 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0018] 본 발명의 조성물 및 방법은 적어도 부분적으로 특발성 폐 섬유증 (IPF)의 3개 이상의 새로운 특징적인 분자 표현형 (또한, 본원에서 분자 하위유형으로 지칭됨)의 정의에 기초한다. 본원에 기재된 IPF 분자 하위유형은 하위유형 사이의 차등 유전자 발현에 기초하여 규정하였다. 또한, 본 발명의 조성물 및 방법은 적어도 부분적으로 IPF 환자의 생존에 대한 예후인 혈청 또는 혈액 바이오마커의 확인에 기초한다. 이러한 바이오마커는 특히 본 발명의 방법에 따라 치유적 치료를 위한 IPF 환자를 확인 및 선택하는데 유용하다. 용어 "분자 표현형" 및 "분자 하위유형"은 본원에서 교환가능하게 사용된다.

[0019] 따라서, 한 측면에서, 특발성 폐 섬유증 (IPF)을 예후하거나 또는 예후를 돕는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 환자로부터 수득되고, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 발현, 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 발현이 측정된다. 특정 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현 수준 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현은 중앙 생존기간에 비해 단축된 생존기간에 대한 예후를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 감소된 발현 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 감소된 발현은 중앙 생존기간에 비해 증가된 생존기간에 대한 예후를 나타낸다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 표 2, 표 3, 표 4 또는 표 5 중 어느 것로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 MUC1, MUC4, MUC20, PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D, KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13, CLCA2, TRPV4, BBS5, MMP3 및 SAA4로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 CXCR3, CXCR5, CXCL13, CCR6, CCR7, CD19, MS4A1 (CD20), BLK, BLNK, FCRLA, FCRL2, FCRL5, CD79A, CD79B, CD27, CD28, CD1A, CD1B, CD1C, CD1E, IGHV1-69, IGLJ3, IGJ, IGHV3-48, IGLV3-21, IGKV1-5, IGHG1, IGKC, IGLV6-57, IGK@, IGHA1, IGKV2-24, IGKV1D-8, IGHM으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1, HGF, IGFBP7, SCGF (CLEC11A); LOXL1, LOXL2; GLI1, GLI2, SMO; SFRP2, DIO2, CDH11, POSTN 및 TGFB3으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 유전자 발현 수준은 mRNA 수준에 대한 검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 검정은 PCR 방법 및/또는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양

태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 특정 실시양태에서, 키트는 뉴클레아제, 리가제 및 폴리머라제로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 상기 정의된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0020] 상기 방법의 다른 추가 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 CHI3L1 (YKL-40), CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, COMP, CXCL13, MMP3, MMP7, SAA4 (구성적 SAA), POSTN, AND SPP1 (OPN)로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 YKL-40, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, MMP7, CXCL13, COMP, SAA 및 OPN으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 SAA, MMP3, CXCL13, OPN, COMP 및 YKL-40으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 POSTN, MMP3 및 CXCL13으로부터 선택된다. 다른 추가 실시양태에서, YKL-40의 발현 수준 또는 CCL18의 발현 수준 및/또는 CXCL13의 발현 수준이 측정된다. 또 다른 실시양태에서, MMP3의 발현 수준 및/또는 SAA의 발현 수준이 측정된다. 특정 실시양태에서, 유전자 발현 수준은 mRNA 수준에 대한 검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 검정은 PCR 방법 및/또는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 특정 실시양태에서, 키트는 뉴클레아제, 리가제 및 폴리머라제로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 상기 정의된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0021] 상기 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 환자는 면역조절 요법을 받고 있다. 또 다른 실시양태에서, 생물학적 샘플은 폐 조직, 혈청 및 혈장으로부터 선택된다.

[0022] 한 측면에서, 상기 기재된 방법에 따른 유전자 발현은 마이크로어레이에 의해 측정된다. 또 다른 측면에서 유전자 발현은 실시간 정량적 폴리머라제 연쇄 반응 (qPCR)에 의해 측정된다. 또 다른 측면에서, 유전자 발현은 멀티플렉스-PCR에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에 따르면, 유전자 발현은 상기 기재된 유전자 중 하나 이상의 단백질 발현 수준을 관찰함으로써 측정된다. 또 다른 실시양태에 따르면, 관심 유전자의 발현은 건강한 대조군 또는 참조 대상체와 비교하였을 때 관심 유전자의 상대 mRNA 수준이 대조군 또는 참조 유전자 mRNA의 수준의 2배 초과라면 상승된 것으로 간주한다. 또 다른 실시양태에 따르면, 관심 유전자의 상대 mRNA 수준은 건강한 대조군 또는 참조 유전자 발현 수준에 비해 3배, 배, 10배, 15배, 20배, 25배 또는 30배 초과이다. 한 측면에서, 유전자 발현 수준은 PCR 방법, 마이크로어레이 방법 또는 면역검정 방법으로부터 선택된 방법에 의해 측정된다. 한 실시양태에서, 마이크로어레이 방법은 엄격한 조건 하에 상기 언급된 유전자를 코딩하는 핵산 분자에 혼성화할 수 있는 하나 이상의 핵산 분자를 갖거나 또는 상기 언급된 유전자에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 이상에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드 (예컨대, 펩티드 또는 항체)를 갖는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 한 실시양태에 따라, 면역검정 방법은 환자 샘플에서 상기 언급된 유전자로부터 발현된 단백질에 항체를 결합시키는 것 및 환자 샘플로부터의 단백질 수준이 상승하는지 결정하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역검정 방법은 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)이다.

[0023] 또 다른 측면에서, 환자에서 IPF를 예후하거나 또는 예후를 돕는 방법이 제공되며, 여기서 생물학적 샘플은 환자로부터 취득되고, 총 기준선 바이오마커 스코어가 결정된다. 특정 실시양태에서, 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 CXCL13, OPN 및 COMP 중 하나 이상의 단백질 발현 수준을 측정하는 것, 및 발현 수준이 각각 CXCL13, OPN 및 COMP에 대한 중앙값 미만인 경우에는 0의 스코어를 할당하고, 발현 수준이 각각 CXCL13, OPN 및 COMP에 대한 중앙값 초과인 경우에는 1의 스코어를 할당하는 것을 포함하고, 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 YKL-40의 단백질 발현 수준을 측정하는 것, 및 발현 수준이 YKL-40에 대한 중앙값 미만인 경우에는 0의 스코어를 할당하고, 발현 수준이 YKL-40에 대한 중앙값 초과인 경우에는 1의 스코어를 할당하는 것을 추가로 포함하고, 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 각각의 개별 스코어를 부가하여 총 기준선 바이오마커 스코어를 취득하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 2 이상의 총 기준선 바이오마커 스코어는 중앙 생존기간에 비해 단축된 생존기간의 예후를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 0 또는 1의 총 기준선 바이오마커 스코어는 중앙 생존기간에 비해 증가된 생존기간의 예후를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, CXCL13, OPN, COMP 및/또는 YKL-40에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 환자의 총 기준선 바이오마커 스코어가 상기 기재된 바와 같이 결정시에 2 이상인 경우에, 환자가 임상 연구에서 후보 치료제를 사용하는 치료를 위해 선택된다. 특정 실시양태에서, 후보 치료제는 항-

IL-13 작용제, 항-IL-4 작용제, 항-IL-13/항-IL-4 작용제의 조합, 피르페니돈, 항-LOXL2 항체 (GS-6624), N-아세틸시스테인, 항-TGF- β 항체 (GC1008), 항- $\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린 항체 (STX-100), 항-CTGF 항체 (FG-3019), 항-CCL2 항체 (CNTO 888), 소마토스타틴 유사체 (SOM230, 옥트레오티드), 안티오텐신 II 억제제 (로사르탄), 일산화탄소, 탈리도미드, 테트라티오몰리브데이트, 독시시클린, 미노시클린 및 티로신 키나제 억제제 (BIBF1120)로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 레브리키주맵이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13/항-IL-4 작용제는 이중특이적 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함하는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 유효량의 상기 제공된 바와 같은 IPF 치료제를 투여하며, 단 IPF 환자가 상기 기재된 방법에 따라 결정된 2 이상의 기준선 스코어를 갖는 것인, 상기 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

[0025] 또 다른 측면에서, 환자에서 IPF를 예후하거나 또는 예후를 돕는 방법이 제공되며, 여기서 생물학적 샘플은 환자로부터 취득되고, 총 기준선 바이오마커 스코어가 결정되며, 여기서 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 MMP3 및 COMP 중 하나 이상의 단백질 발현 수준을 측정하는 것, 및 발현 수준이 각각 MMP3 및 COMP에 대한 중앙값 미만인 경우에는 0의 스코어를 할당하고, 발현 수준이 각각 MMP3 및 COMP에 대한 중앙값 초과인 경우에는 1의 스코어를 할당하는 것을 포함하고, 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 YKL-40의 단백질 발현 수준을 측정하는 것, 및 발현 수준이 YKL-40에 대한 중앙값 미만인 경우에는 0의 스코어를 할당하고, 발현 수준이 YKL-40에 대한 중앙값 초과인 경우에는 1의 스코어를 할당하는 것을 추가로 포함하고, 총 기준선 바이오마커 스코어를 결정하는 것은 각각의 개별 스코어를 부가하여 총 기준선 바이오마커 스코어를 취득하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 1 이상의 총 기준선 바이오마커 스코어는 중앙 생존기간에 비해 단축된 생존기간의 예후를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 0의 총 기준선 바이오마커 스코어는 중앙 생존기간에 비해 증가된 생존기간의 예후를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, MMP3, COMP 및/또는 YKL-40에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0026] 또 다른 측면에서, 환자의 총 기준선 바이오마커 스코어가 MMP3, COMP 및/또는 YKL-40의 발현에 대해 상기 기재된 바와 같이 결정시에 1 이상인 경우에, 환자가 임상 연구에서 후보 치료제를 사용하는 치료를 위해 선택된다. 특정 실시양태에서, 후보 치료제는 항-IL-13 작용제, 항-IL-4 작용제, 항-IL-13/항-IL-4 작용제의 조합, 피르페니돈, 항-LOXL2 항체 (GS-6624), N-아세틸시스테인, 항-TGF- β 항체 (GC1008), 항- $\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린 항체 (STX-100), 항-CTGF 항체 (FG-3019), 항-CCL2 항체 (CNTO 888), 소마토스타틴 유사체 (SOM230, 옥트레오티드), 안티오텐신 II 억제제 (로사르탄), 일산화탄소, 탈리도미드, 테트라티오몰리브데이트, 독시시클린, 미노시클린 및 티로신 키나제 억제제 (BIBF1120)로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 레브리키주맵이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13/항-IL-4 작용제는 이중특이적 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함하는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 유효량의 상기 제공된 바와 같은 IPF 치료제를 투여하며, 단 IPF 환자가 상기 기재된 방법에 따라 결정된 1 이상의 기준선 스코어를 갖는 것인, 상기 환자를 치료하는 방법이 제공된다.

[0027] 또 다른 측면에서, 대상체에서 IPF의 분자 하위유형을 진단하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 취득한 생물학적 샘플에서 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 발현, 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 발현을 측정하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 MUCL1, MUC4, MUC20, PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D, KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13, CLCA2, TRPV4, BBS5, MMP3 및 SAA4로부터 선택되고, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현은 IPF 분자 하위유형을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 CXCR3, CXCR5, CXCL13, CCR6, CCR7, CD19, MS4A1 (CD20), TNFRSF17 (BCMA), BLK, BLNK, FCRLA, FCRL2, FCRL5, CD79A,

CD79B, CD27, CD28, CD1A, CD1B, CD1C, CD1E, IGHV1-69, IGLJ3, IGJ, IGHV3-48, IGLV3-21, IGKV1-5, IGHG1, IGKC, IGLV6-57, IGK@ (이뮤노글로불린 카파 로커스), IGHA1, IGKV2-24, IGKV1D-8, IGHM으로부터 선택되고, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현은 IPF 분자 하위유형을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1, HGF, IGFBP7, SCGF (CLEC11A); LOXL1, LOXL2; GLI1, GLI2, SMO; SFRP2, DIO2, CDH11, POSTN 및 TGFB3으로부터 선택되고, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현은 IPF 분자 하위유형을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 유전자 발현 수준은 mRNA 수준에 대한 검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 검정은 PCR 방법 및/또는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 특정 실시양태에서, 키트는 뉴클레아제, 리가제 및 폴리머라제로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 상기 정의된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0028] 또 다른 측면에서, 임의의 상기 방법에 따라 사용하기 위한 생물학적 샘플은 폐 조직, 전혈 또는 혈청이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 폐 조직 또는 전혈이고, 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 발현은 PCR 방법 또는 마이크로어레이 칩을 이용하여 측정된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈청이고, 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 발현은 면역검정을 이용하여 측정된다.

[0029] 또 다른 측면에서, 환자에서 IPF를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 유효량의 IPF 치료제를 환자에게 투여하여 IPF를 치료하는 것을 포함하며, 단 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현, 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 상승된 발현이 환자로부터 수득한 생물학적 샘플에서 검출된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 MUCL1, MUC4, MUC20, PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D, KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13, CLCA2, TRPV4, BBS5, MMP3 및 SAA4로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 CXCR3, CXCR5, CXCL13, CCR6, CCR7, CD19, MS4A1 (CD20), TNFRSF17 (BCMA), BLK, BLNK, FCRLA, FCRL2, FCRL5, CD79A, CD79B, CD27, CD28, CD1A, CD1B, CD1C, CD1E, IGHV1-69, IGLJ3, IGJ, IGHV3-48, IGLV3-21, IGKV1-5, IGHG1, IGKC, IGLV6-57, IGK@ (이뮤노글로불린 카파 로커스), IGHA1, IGKV2-24, IGKV1D-8, IGHM으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1, HGF, IGFBP7, SCGF (CLEC11A); LOXL1, LOXL2; GLI1, GLI2, SMO; SFRP2, DIO2, CDH11, POSTN 및 TGFB3으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 CHI3L1 (YKL-40), CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, COMP, CXCL13, MMP3, MMP7, SAA4 (구성적 SAA), POSTN, AND SPP1 (OPN)로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 YKL-40, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, MMP7, CXCL13, COMP, SAA 및 OPN으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 SAA, MMP3, CXCL13, OPN, COMP 및 YKL-40으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 POSTN, MMP3 및 CXCL13으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, YKL-40의 발현 수준 또는 CCL18의 발현 수준 및/또는 CXCL13의 발현 수준이 측정된다. 또 다른 실시양태에서, MMP3의 발현 수준 및/또는 SAA의 발현 수준이 측정된다. 특정 실시양태에서, 유전자 발현 수준은 mRNA 수준에 대한 검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 검정은 PCR 방법 및/또는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 특정 실시양태에서, 키트는 뉴클레아제, 리가제 및 폴리머라제로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 상기 정의된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다. 특정 실시양태에서, IPF 치료제는 항-IL-13 작용제, 항-IL-4 작용제, 항-IL-13/항-IL-4 작용제의 조합, 피르페니돈, 항-LOXL2 항체 (GS-6624), N-아세틸시스테인, 항-TGF- β 항체 (GC1008), 항- $\alpha v \beta 6$ 인테그린 항체 (STX-100), 항-CTGF 항체 (FG-3019), 항-CCL2 항체 (CNT0 888), 소마토스타틴 유사체 (SOM230, 옥트레오티드), 안티오텐신 II 억제제 (로사르탄), 일산화탄소, 탈리도미드, 테트라티오몰리브데이트, 독시시클린, 미노시클린 및 티로신 키나제 억제제 (BIBF1120)이다. 특정 실시양태에서, IPF 치료제는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함하는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖

는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체 (레브리키주맵)는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 레브리키주맵은 125 mg, 250 mg 및 500 mg으로부터 선택된 균일 용량으로 4주마다 1회 피하로 투여된다. 한 실시양태에서, 레브리키주맵은 250 mg의 균일 용량으로 4주마다 1회 피하로 투여된다.

[0030] 추가 측면에서, 상기 방법에 따라 단축된 생존기간의 예후를 갖는 것으로 이전에 결정된 IPF 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 유효량의 IPF 치료제가 투여된다. 한 실시양태에서, IPF 치료제는 항-IL-13 작용제, 항-IL-4 작용제, 항-IL-13/항-IL-4 작용제의 조합, 피르페니돈, 항-LOXL2 항체 (GS-6624), N-아세틸시스테인, 항-TGF- β 항체 (GC1008), 항- $\alpha v \beta 6$ 인테그린 항체 (STX-100), 항-CTGF 항체 (FG-3019), 항-CCL2 항체 (CNT0 888), 소마토스타틴 유사체 (SOM230, 옥트레오티드), 안티오텐신 II 억제제 (로사르탄), 일산화탄소, 탈리도미드, 테트라티오몰리브데이트, 독시시클린, 미노시클린 및 티로신 키나제 억제제 (BIBF1120)로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함하는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체 (레브리키주맵)는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 125 mg, 250 mg 및 500 mg으로부터 선택된 균일 용량으로 4주마다 1회 피하로 투여된다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 250 mg의 균일 용량으로 4주마다 1회 피하로 투여된다.

[0031] 추가 측면에서, 상기 기재된 항-IL-13 항체 또는 레브리키주맵을 사용하여 IPF 환자를 치료하는 방법은 질환 진행까지의 시간을 치료하지 않은 경우에 비해 연장시키며, 여기서 질환 진행은 다음: (i) 사망; (ii) 비-선택적 입원; (iii) FVC의 기준선으로부터의 10% 이상의 감소 중 하나 이상의 첫번째 발생에 의해 나타내어진다. 한 실시양태에서, 질환 진행은 52주에 DL_{CO}의 기준선으로부터의 $\geq 15\%$ 의 감소에 의해 추가로 나타내어진다. 한 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 항-IL-13 항체 또는 레브리키주맵을 사용하는 치료는 치료 52주 후에 DL_{CO}의 기준선으로부터의 감소가 15% 미만인 되도록 한다. 한 실시양태에서, 이러한 치료는 치료 52주 후에 6-분 보행 시험에서 환자에 의한 보행 거리의 기준선으로부터의 감축을 치료하지 않은 경우에 비해 적게 감소시킨다. 한 실시양태에서, 보행 거리의 기준선으로부터의 감축의 감소는 50 미터 초과, 또는 30 미터 초과, 또는 10 미터 초과이다. 특정 실시양태에서, 치료는 급성 IPF 악화의 첫번째 사건까지 또는 IPF 심화의 첫번째 사건까지의 시간을 치료하지 않은 경우에 비해 연장시킨다.

[0032] 한 측면에서, 항-IL-13 항체 또는 레브리키주맵을 투여함으로써 IPF 환자에서 질환 진행까지의 시간을 연장시키는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료된 환자에서 질환 진행까지의 시간은 치료하지 않은 경우에 비교된다. 특정 실시양태에서, 질환 진행은 다음: (i) 사망; (ii) 비-선택적 입원; (iii) FVC의 기준선으로부터의 10% 이상의 감소 중 하나 이상의 첫번째 발생에 의해 나타내어진다. 한 실시양태에서, 질환 진행은 52주에 DL_{CO}의 기준선으로부터의 $\geq 15\%$ 의 감소에 의해 추가로 나타내어진다. 한 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같은 항-IL-13 항체 또는 레브리키주맵을 사용하는 치료는 치료 52주 후에 DL_{CO}의 기준선으로부터의 감소가 15% 미만인 되도록 한다. 한 실시양태에서, 이러한 치료는 치료 52주 후에 6-분 보행 시험에서 환자에 의한 보행 거리의 기준선으로부터의 감축을 치료하지 않은 경우에 비해 적게 감소시킨다. 한 실시양태에서, 보행 거리의 기준선으로부터의 감축의 감소는 50 미터 초과, 또는 30 미터 초과, 또는 10 미터 초과이다. 특정 실시양태에서, 치료는 급성 IPF 악화의 첫번째 사건까지 또는 IPF 심화의 첫번째 사건까지의 시간을 치료하지 않은 경우에 비해 연장시킨다.

[0033] 또 다른 측면에서, IPF 환자에서 질환 진행을 모니터링하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 환자로부터 생물학적 샘플을 제1 시점 및 하나 이상의 추가의 시점에 획득하는 것, 상기 생물학적 샘플에서 유전자 중 하나 또는 그의 조합의 발현, 또는 유전자 중 하나 또는 그의 조합에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 발현을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 유전자 중 하나 또는 그의 조합은 표 2, 표 3, 표 4 또는 표 5 중 어느 것으로부터 선택되고, 제1 시점으로부터 하나 이상의 추가의 시점까지의 발현 수준의 변화가 질환 진행을 나타낸다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합은 MUC1, MUC4, MUC20, PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D, KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13, CLCA2, TRPV4, BBS5, MMP3 및 SAA4로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전

자 중 하나 또는 그의 조합은 CXCR3, CXCR5, CXCL13, CCR6, CCR7, CD19, MS4A1 (CD20), BLK, BLNK, FCRLA, FCRL2, FCRL5, CD79A, CD79B, CD27, CD28, CD1A, CD1B, CD1C, CD1E, IGHV1-69, IGLJ3, IGJ, IGHV3-48, IGLV3-21, IGHV1-5, IGHG1, IGKC, IGLV6-57, IGK@, IGHA1, IGKV2-24, IGKV1D-8, IGHM으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합은 COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1, HGF, IGFBP7, SCGF (CLEC11A); LOXL1, LOXL2; GLI1, GLI2, SMO; SFRP2, DIO2, CDH11, POSTN 및 TGFβ3으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 유전자 중 하나 또는 그의 조합, 또는 단백질 중 하나 또는 그의 조합은 CHI3L1 (YKL-40), CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, COMP, CXCL13, MMP3, MMP7, SAA4 (구성적 SAA), POSTN, AND SPP1 (OPN)로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 폐 조직, 혈청 및 혈장으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 유전자 발현 수준은 mRNA 수준에 대한 검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 검정은 PCR 방법 및/또는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qPCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 특정 실시양태에서, 키트는 뉴클레아제, 리가제 및 폴리머라제로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질 발현 수준은 면역검정에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 상기 정의된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 하나 이상의 단백질에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 면역검정 키트가 제공된다.

[0034]

또 다른 측면에서, 상기 기재된 바와 같은 질환 진행을 모니터링하는 방법은 환자를 임상 연구에서 후보 치료제를 사용하여 치료하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 치료제는 항-IL-13 작용제, 항-IL-4 작용제, 항-IL-13/항-IL-4 작용제의 조합, 피르페니돈, 항-LOXL2 항체 (GS-6624), N-아세틸시스테인, 항-TGF-β 항체 (GC1008), 항-αvβ6 인테그린 항체 (STX-100), 항-CTGF 항체 (FG-3019), 항-CCL2 항체 (CNTO 888), 소마토스타틴 유사체 (SOM230, 옥트레오티드), 안티오텐신 II 억제제 (로사르탄), 일산화탄소, 탈리도미드, 테트라티오몰리브데이트, 독시시클린, 미노시클린 및 티로신 키나제 억제제 (BIBF1120)로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 작용제는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함하는 항-IL-13 항체이다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035]

도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같이 IPF 환자에서의 유전자 발현 이질성을 보여준다. (a) IPF 및 대조군 사이의 2490 DE 마이크로어레이 프로브의 비지도 2-원 계층적 클러스터링은 IPF의 진단에 의해 주로 규정되는 3개의 주요 클러스터 (군 1 클러스터, 군 2 클러스터, 및 군 3 클러스터)를 입증하였다; (b) 군 1 클러스터의 재클러스터링은 대부분의 IPF 환자 (및 몇몇 대조군)가 높은 수준의 기관지 상피의 유전자 특성을 나타내는 이중 유전자 발현 시그니처 ("세기관지 시그니처")를 확인하였다; (c) 군 2 클러스터의 재클러스터링은 대부분의 IPF 환자 (및 대조군은 없음)가 높은 수준의 림프성 여포의 유전자 특성을 나타내는 이중 유전자 발현 시그니처 ("림프성 시그니처")를 확인하였다; (d) 군 3 클러스터의 재클러스터링은 IPF 환자가 중간 및 높은 수준의 근섬유모세포로의 섬유모세포 분화의 유전자 특성을 나타내는 반면 대조군 대상체는 낮은 수준을 나타내는 이중 유전자 발현 시그니처 ("섬유모세포 시그니처", 또한 본원에서 "근섬유모세포 시그니처"로 지칭됨)를 확인하였다; (e) 세기관지, 림프성, 및 근섬유모세포 유전자 발현 시그니처가 서로 함께 달라지지 않는다는 것을 보여주는 플롯.

도 2는 실시예 1에 기재된 바와 같이 IPF 폐 체외이식편으로부터 수득한 생검 조직의 인접한 동결 절편 상에서의 면역조직화학 (IHC)을 보여준다. (a) 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색; (b) 3색 염색 염색; (c) 항-케라틴 14 염색; (d) 과요오드산-슈프 (PAS) 염색; (e) 어두운 염색 핵 (화살촉)을 갖는 세포의 응집체를 보여주는 H&E 염색; (f) 응집체 (화살촉) 주변에 있으나 내부에는 존재하지 않는 콜라겐 침착을 보여주는 3색 염색; (g) 응집체가 큰 농도의 CD20 양성 B 세포를 갖는다는 것을 보여주는 항-CD20 염색; (h) (g)에서 (*)로 표시된 영역의 보다 높은 확대도; (i) 세기관지화 낭포의 항-케라틴 14 염색; (j) 림프성 응집체의 항-CD20 염색.

도 3은 실시예 1에 기재된 바와 같이 qPCR에 의해 측정시에 IPF 환자 및 대조군으로부터 수득한 폐 조직에서의 후보 바이오마커 유전자의 유전자 발현을 보여준다. (a) 페리오스틴 유전자 발현; (b) CCL13 유전자 발현; (c) CCL18 유전자 발현; (d) 오스테오펀틴 유전자 발현; (e) COMP 유전자 발현; (f) YKL-40 유전자 발현; (g) MMP7 유전자 발현.

도 4는 실시예 1에 기재된 바와 같이 중간 수준 (69%)에서 예측된 FVC 퍼센트에 의해 계층화된 IPF 생존기간을

보여준다.

도 5는 실시예 1에 기재된 바와 같이 개별 및 조합 예후 바이오마커에 대한 IPF 생존기간의 Cox 모델을 보여준다. (a) 혈청 CXCL13 수준에 의한 IPF 생존기간의 Cox 모델; (b) 혈청 YKL-40 수준에 의한 IPF 생존기간의 Cox 모델; (c) 혈청 COMP 수준에 의한 IPF 생존기간의 Cox 모델; (d) 혈장 OPN 수준에 의한 IPF 생존기간의 Cox 모델.

도 6은 실시예 1에 기재된 바와 같이 6개의 바이오마커 (SAA, MMP3, CXCL13, OPN, COMP 및 YKL-40)의 가능한 조합의 수용자 작동 특성 (ROC) 분석을 보여준다. (a) 샘플 수집후 1, 2 및 3년에 걸쳐 사망률을 예측하기 위해 나타난 6개의 바이오마커의 각각의 가능한 조합의 ROC 분석; (b) 6개의 바이오마커 (SAA, MMP3, CXCL13, OPN, COMP 및 YKL-40)의 모든 가능한 조합의 2년째 ROC 분석의 곡선하 면적 및 기간 유의성.

도 7은 실시예 1에 기재된 바와 같이 YKL-40 플러스 OPN 플러스 COMP 플러스 CXCL13의 조합에 대한 기준선 바이오마커 스코어에 의한 IPF 생존기간의 조합 Cox 모델을 보여준다.

도 8은 실시예 1에 기재된 바와 같이 바이오마커 MMP3, COMP 및 YKL-40 중 0, 1, 2 또는 모든 3개를 중간 수준 보다 높게 발현하는 IPF 환자의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존기간 플롯을 보여준다.

도 9는 실시예 2에 기재된 바와 같이 대조군 환자 (좌측) 및 IPF 환자 (우측)로부터의 폐 조직에서의 IL-13Ra2 발현에 대한 정량적 PCR 결과를 보여준다.

도 10은 실시예 2에 기재된 바와 같이 IMR90 1차 폐 섬유모세포에서의 IL-4 또는 IL-13에 의한 IL13R α 2 발현의 유도를 보여준다.

도 11은 실시예 2에 기재된 바와 같이 IL13R α 2 발현 (a) 및 IL-13의 존재 또는 부재 하의 CCL26 및 페리오스틴 발현 (b)에 대한 TNF α 의 효과를 보여준다.

도 12는 도면에 나타내고 실시예 2에 기재된 바와 같이 TNF α 로 예비처리한 후에 다양한 IL-13 및/또는 IL-4 시토크인 및 차단 항-IL-13 mAb1 및/또는 mAb2 항체 처리에 적용된 IMR90 세포에서의 CCL26 및 페리오스틴 (POSTN)의 유전자 발현 수준을 보여준다.

도 13은 실시예 2에 기재된 바와 같이 IL-13 (a) 또는 IL-13 및 IL-4 (b)로 처리된 후에 항-IL-13 mAb2 또는 항-IL-13 mAb2로 추가로 처리된 IMR90 세포로부터의 마이크로어레이 데이터를 보여준다.

도 14는 실시예 2에 기재된 바와 같이 IPF 코호트에서의 GLI1 발현을 보여준다.

도 15는 실시예 2에 기재된 바와 같이 부가된 다양한 인자에 반응한 1차 폐 섬유모세포 (매트릭셀 상에서 배양됨)에서의 GLI1 유전자 발현의 보여준다.

도 16은 도면에 나타내고 실시예 2에 기재된 바와 같이 부가된 다양한 인자에 반응한 1차 폐 섬유모세포 (매트릭셀 상에서 배양됨)에서의 TGF β 1 유전자 발현 (a) 및 GLI1 유전자 발현 (b)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 특정 정의

[0037] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 업계 용어, 표기 및 다른 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 갖는다. 일부 경우에, 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 용어가 그 의미를 명료하게 하고/하거나 용이하게 참조하기 위해 본원에 정의되고, 이러한 정의를 본원에 포함시키는 것이 반드시 당업계에서 일반적으로 이해되고 있는 것과 비교하여 실질적인 차이를 나타내는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는 일반적으로 당업자에게 널리 이해되고, 종래의 방법, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]에 기재된 널리 사용되는 분자 클로닝 방법을 이용하여 통상적으로 이용된다. 적절한 경우에, 상업적으로 입수가능한 키트 및 시약의 사용을 포함하는 절차는 일반적으로 달리 나타내지 않는 한 제조업체가 규정한 프로토콜 및/또는 파라미터에 따라 수행한다.

[0038] "세기관지 유전자 시그너처", "세기관지 시그너처" 및 "세기관지 유전자 발현 시그너처"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 표 2에 열거된 유전자의 조합 또는 하위조합을 지칭하며, 그의 유전자 발현 패턴은 특정 IPF 환자와 상관된다. 유전자는 MUC1, MUC4, MUC20, PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D, KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13, CLCA2, TRPV4, BBS5, MMP3, SAA4 (구성적 SAA

코딩)를 포함한다. 세기관지 유전자 시그너처의 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 "표적화된 폴리펩티드"이다.

[0039] "림프성 유전자 시그너처", "림프성 시그너처" 및 "림프성 유전자 발현 시그너처", "림프성 여포 유전자 시그너처", "림프성 여포 시그너처" 및 "림프성 여포 유전자 발현 시그너처"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 표 3에 열거된 유전자의 조합 또는 하위조합을 지칭하며, 그의 유전자 발현 패턴은 특정 IPF 환자와 상관된다. 유전자는 CXCR3, CXCR5, CXCL13, CCR6, CCR7, CD19, MS4A1 (CD20), TNFRSF17 (BCMA), BLK, BLNK, FCRLA, FCRL2, FCRL5, CD79A, CD79B, CD27, CD28, CD1A, CD1B, CD1C, CD1E, IGHV1-69, IGLJ3, IGJ, IGHV3-48, IGLV3-21, IGHV1-5, IGHG1, IGKC, IGLV6-57, IGK@ (이뮤노글로불린 카파 로커스), IGHA1, IGKV2-24, IGKV1D-8, IGHM을 포함한다. 림프성 여포 유전자 시그너처의 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 "표적화된 폴리펩티드"이다.

[0040] "근섬유모세포 유전자 시그너처", "근섬유모세포 시그너처" 및 "근섬유모세포 유전자 발현 시그너처", "섬유모세포 유전자 시그너처", "섬유모세포 시그너처" 및 "섬유모세포 유전자 발현 시그너처"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 표 4에 열거된 유전자의 조합 또는 하위조합을 지칭하며, 그의 유전자 발현 패턴은 특정 IPF 환자와 상관된다. 유전자는 COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1, HGF, IGFBP7, SCGF (CLEC11A); LOXL1, LOXL2; GLI1, GLI2, SMO; SFRP2, DIO2, CDH11, POSTN 및 TGFB3을 포함한다. 근섬유모세포 유전자 시그너처의 폴리펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 "표적화된 폴리펩티드"이다.

[0041] 본원에 사용된 경우에 용어 "표적화된 폴리펩티드"는 "천연 서열" 폴리펩티드 및 변이체 (본원에 추가로 정의됨)를 지칭한다.

[0042] "천연 서열" 폴리펩티드는 천연으로부터 유래된 상응하는 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 용어 "천연 서열 폴리펩티드"는 폴리펩티드의 자연 발생 절단된, 증가된 및 프레임시프트된 형태를 포함하고, 이는 대안적으로 스플라이싱된 형태, 이소형 및 다형성을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0043] "자연 발생 변이체"는 기준 폴리펩티드와의 아미노산 서열 동일성이 약 60% 이상이고 자연 발생 참조 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 보유하고 있는 폴리펩티드를 의미한다. 자연 발생 변이체는 참조 폴리펩티드에 대해 약 65% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 70% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 75% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 80% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 85% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 90% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 95% 이상의 아미노산 서열 동일성, 약 98% 이상의 아미노산 서열 동일성 또는 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 변이체 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0044] 본원에서 교환가능하게 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 의미하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 중합체로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 존재하는 경우에 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해, 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형은 예를 들어 하나 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예컨대 예를 들어 비하전된 연결부 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전된 연결부 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)를 갖는 것, 펜던트 모이어티, 예컨대 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입체 (예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)를 갖는 것, 킬레이트화체 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등)을 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형 연결부 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)를 갖는 것 뿐만 아니라, 폴리뉴클레오티드(들)의 비변형된 형태를 포함한다. 추가로, 당에 본래 존재하는 임의의 히드록실 기는, 예를 들어 포스포네이트 기, 포스포에이트 기에 의해 대체되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 또는 추가의 뉴클레오티드에 대한 추가의 연결을 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실기 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사한 형태, 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α -아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비-시클릭 유사체 및 무염기성 뉴클레오시드 유사체,

예컨대 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 1개 이상의 포스포디에스테르 연결이 대안적인 연결 기로 대체될 수 있다. 이들 대안적 연결 기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), "(O)NR2 ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH2 ("포름아세탈")로 대체된 실시양태를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 여기서 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 에테르 (-O-) 연결을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아랄릴이다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 기제는 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0045] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드"는 길이가 약 7개 이상의 뉴클레오티드 및 약 250개 미만의 뉴클레오티드인 짧은 단일 가닥 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 합성된 것일 수 있다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기제는 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0046] 용어 "프라이머"는 핵산에 혼성화하고, 일반적으로 유리 3'-OH 기를 제공함으로써 상보성 핵산의 중합을 허용할 수 있는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드를 의미한다.

[0047] 용어 "어레이" 또는 "마이크로어레이"는 기관 상의 혼성화가능한 어레이 요소, 바람직하게는 폴리뉴클레오티드 프로브 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)의 정렬된 배열을 의미한다. 상기 기관은 고체 기관, 예컨대 유리 슬라이드, 또는 반-고체 기관, 예컨대 니트로셀룰로스 막일 수 있다.

[0048] 용어 "증폭"은 하나 이상의 카피의 참조 핵산 서열 또는 그의 상보체의 생산 과정을 의미한다. 증폭은 선형 증폭 또는 지수 증폭 (예를 들어, PCR)일 수 있다. "카피"가 반드시 주형 서열에 대해 완전한 서열 상보성 또는 동일성을 의미하는 것인 아니다. 예를 들어, 카피는 뉴클레오티드 유사체, 예를 들어 테옥시이노신, 인위적인 서열 변경 (예컨대, 주형에 혼성화가능하지만 완전히 상보성이지는 않은 서열을 포함하는 프라이머를 통해 도입된 서열 변경), 및/또는 증폭 동안 발생하는 서열 오류를 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "검출"은 직접 및 간접 검출을 비롯한 임의의 검출 수단을 포함한다.

[0050] 용어 "분자 하위유형"은 "분자 표현형"과 교환가능하게 사용되고, 하나 이상의 특정한 유전자 또는 하나 이상의 특정한 단백질의 발현, 또는 유전자의 조합 또는 단백질의 조합의 발현의 특정한 패턴을 특징으로 하는 IPF의 하위유형 또는 표현형을 지칭한다. 특정한 유전자, 단백질, 또는 유전자 또는 단백질의 조합의 발현은 추가로 IPF의 특정 병리학적, 조직학적 및/또는 임상적 특징과 연관될 수 있다.

[0051] 용어 "멀티플렉스-PCR"은 단일 반응에서 2개 이상의 DNA 서열을 증폭시키는 목적을 위해 하나 초과와 프라이머 세트를 사용하여 단일 공급원 (예를 들어, 환자)으로부터 수득한 핵산에 대해 수행되는 단일 PCR 반응을 지칭한다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "바이오마커"는 예를 들어 환자의 생물학적 샘플에서 검출될 수 있는 환자의 병리학적 상태의 지시자를 지칭한다. 바이오마커는 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물 또는 당지질-기체 분자 마커를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 용어 "진단"은 분자 또는 병리학적 상태, 질환 또는 상태의 확인 또는 분류를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들어, "진단"은 특정한 유형의 IPF 또는 UIP의 확인을 지칭할 수 있다. "진단"은 또한 예를 들어 조직병리학적 또는 방사선학적 기준, 또는 분자 특징 (예를 들어, 특정한 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 중 하나 또는 그의 조합의 발현을 특징으로 하는 하위유형)에 의한 특정한 유형의 IPF의 분류를 지칭할 수 있다.

[0054] 용어 "진단을 돕는 것"은 IPF의 특정한 유형의 증상 또는 상태의 존재, 또는 특성에 대한 임상적 결정을 돕는 방법을 지칭하도록 본원에 사용된다. 예를 들어, IPF의 진단을 돕는 방법은 개체로부터 생물학적 샘플에서 특정 유전자의 발현을 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0055] 용어 "예후"는 시간 경과에 따른 생존 뿐만 아니라 시간 경과에 따른 하나 이상 IPF-기인성 질환 증상 악화의 가능성을 예측하는 것을 지칭하도록 본원에 사용된다.

[0056] "대조 대상체"는 IPF를 갖는 것으로서 진단되지 않았으며 IPF와 연관된 임의의 징후 또는 증상을 앓고 있지 않은 건강한 대상체를 지칭한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "샘플"은 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특성에 기초하여 특성화 및/또는 확인되는 세포성 및/또는 다른 분자 엔티티를 함유하는 관심 대상체로부터 수득하거나 또는 이로부터

유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "질환 샘플" 및 그의 변형 표현은 특성화되는 세포성 및/또는 분자 엔티티를 함유하는 것으로 예상되거나 공지된 관심 대상으로부터 얻은 임의의 샘플을 의미한다.

- [0058] "조직" 또는 "세포 샘플"은 대상체 또는 환자의 조직으로부터 수득한 유사한 세포의 집합을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결 및/또는 보존된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분; 체액, 예를 들어 예컨대 뇌척수액, 양수, 복막액 또는 간질액; 대상체의 임신 또는 발생 중의 임의의 시점으로부터의 세포일 수 있다. 또한, 조직 샘플은 일차 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 임의로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/기관으로부터 수득한다. 조직 샘플은 자연에서 조직과 자연적으로 서로 혼합되지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다. "참조 샘플", "참조 세포", "참조 조직", "대조 샘플", "대조 세포", 또는 "대조 조직"은 본원에서 사용되는 바와 같이, 그를 확인하기 위해 본 발명의 방법 또는 조성물이 사용되는 질환 또는 상태로 고통받지 않는 것으로 알려지거나 생각되는 공급원으로부터 얻은 샘플, 세포 또는 조직을 의미한다. 한 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포, 또는 대조 조직은 질환 또는 상태가 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 확인되는 동일한 대상체 또는 환자의 신체의 건강한 부분으로부터 수득하였다. 한 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조 샘플, 대조 세포, 또는 대조 조직은 질환 또는 상태가 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 확인되는 대상체 또는 환자가 아닌 개체의 신체의 건강한 부분으로부터 수득하였다.
- [0059] 본원에서의 목적을 위해, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단한 조직의 박편 또는 세포를 의미한다. 조직 샘플의 동일한 절편이 형태 및 분자 수준 둘 다에서 분석되거나, 또는 단백질과 핵산 모두에 대해 분석되는 방법을 본 발명이 포함함을 이해한다면, 조직 샘플의 다수의 절편을 채취하여 본 발명에 따른 분석에 적용할 수 있음이 이해된다.
- [0060] "상관시키다" 또는 "상관시키는"은 임의의 방식으로 제1 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과를 제2 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과와 비교하는 것을 의미한다. 예를 들어, 제2 프로토콜의 수행시에 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용할 수 있고/거나 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 제2 분석 또는 프로토콜을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 유전자 발현 분석 또는 프로토콜의 실시양태와 관련하여, 유전자 발현 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 특정 치료 요법을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다.
- [0061] 용어 "유전자 시그너처"는 "유전자 발현 시그너처"와 교환가능하게 사용되고, 그의 발현이 특정 분자, 병리학적, 조직학적, 방사선학적 및/또는 임상적 특징에 의해 특성화된 IPF의 특정한 하위유형을 나타내는 유전자 중 하나 또는 그의 조합을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 유전자 시그너처를 포함하는 하나 이상의 유전자의 발현은 대조군 대상체에서의 발현과 비교하여 상승된다.
- [0062] 용어 "단백질 시그너처"는 "단백질 발현 시그너처"와 교환가능하게 사용되고, 그의 발현이 특정 분자, 병리학적, 조직학적, 방사선학적 및/또는 임상적 특징에 의해 특성화된 IPF의 특정한 하위유형을 나타내는 단백질 중 하나 또는 그의 조합을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 단백질 시그너처를 포함하는 하나 이상의 단백질의 발현은 대조군 대상체에서의 발현과 비교하여 상승된다.
- [0063] 본원에 사용된 "IPF 치료제", "IPF를 치료하기에 효과적인 치료제" 및 그의 문법적 변형은 유효량으로 제공되는 경우에 IPF를 갖는 대상체에서 치료 이익을 제공하는 것으로 알려졌거나, 임상적으로 밝혀졌거나, 또는 임상적에 의해 예상되는 작용제를 지칭한다.
- [0064] "후보 치료제"는 작용제가 이전에 시장 승인을 받은 적이 없는 조건 (예를 들어, 특정한 용량, 투여 요법, 지시) 하에 임상 시험에서 시험 중이거나 또는 시험될 작용제를 지칭한다.
- [0065] "항-IL13/IL4 경로 억제제"는 IL-13 및/또는 IL-4 신호전달을 차단하는 작용제를 지칭한다. 항-IL13, 항-IL4 또는 항-IL13/IL4 억제제의 예는 항-IL13 결합제, 항-IL4 결합제, 항-IL4 수용체알파 결합제, 항-IL13 수용체알파1 결합제 및 항-IL13 수용체알파2 결합제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. IL-13, IL-4, IL-13R알파1, IL-13R알파2 또는 IL-4R알파에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체는 억제제로서 구체적으로 포함된다. 하나 초과개의 표적에 결합할 수 있는 분자가 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0066] "항-IL4 결합제"는 인간 IL-4에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 이러한 결합제는 소분자, 압타머 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 이뮤노어드레신, 항체, 펩티마이드 및 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드(들)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 결합제는 1 μ M - 1 pM의 친화도로 인간 IL-4 서열에 결합한다. 항-IL4 결합제의 구체적 예는 가용성 IL4수용체 알

파 (예를 들어, 인간 Fc 영역에 융합된 IL4수용체의 세포외 도메인), 항-IL4 항체 및 가용성 IL13수용체알파1 (예를 들어, 인간 Fc 영역에 융합된 IL13수용체알파1의 세포외 도메인)을 포함할 수 있다.

[0067] "항-IL4 수용체알파 결합제"는 인간 IL4 수용체알파에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 이러한 결합제는 소분자, 압타머 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 이뮤노어드헤신, 항체, 펩티바디 및 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드(들)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 결합제는 1 μ M - 1 pM의 친화도로 인간 IL-4 수용체 알파 서열에 결합한다. 항-IL4 수용체알파 결합제의 구체적인 예는 항-IL4 수용체 알파 항체를 포함할 수 있다.

[0068] "항-IL13 결합제"는 인간 IL-13에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 이러한 결합제는 소분자, 압타머 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 이뮤노어드헤신, 항체, 펩티바디 및 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드(들)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 결합제는 1 μ M - 1 pM의 친화도로 인간 IL-13 서열에 결합한다. 항-IL13 결합제의 구체적 예는 항-IL13 항체, 인간 Fc에 융합된 가용성 IL13수용체알파2, 인간 Fc에 융합된 가용성 IL4수용체알파, 인간 Fc에 융합된 가용성 IL13 수용체알파를 포함할 수 있다. 예시적인 항-IL13 항체는 국제 공개 번호 2005/062967에 기재되어 있다. 항-IL13 항체의 다른 예는 WO2008/083695 (예를 들어, IMA-638 및 IMA-026), US2008/0267959, US2008/0044420 및 US2008/0248048에 기재되어 있다.

[0069] 레브리키주맵으로 지칭되는 예시적인 "항-IL13 항체"는 인간 IL13에 결합하는 인간화 IgG4 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2) 및 CDR-H3 (서열 3)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 경쇄 CDR, CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5) 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), CDR-H3 (서열 3), CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5) 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH, 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10 또는 서열 11 또는 서열 12 또는 서열 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10, 서열 11, 서열 12 및 서열 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0070] "항-IL13수용체알파1 결합제"는 인간 IL13 수용체알파1에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 이러한 결합제는 소분자, 압타머 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 이뮤노어드헤신, 항체, 펩티바디 및 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드(들)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 결합제는 1 μ M - 1 pM의 친화도로 인간 IL-13 수용체 알파1 서열에 결합한다. 항-IL13 수용체알파1 결합제의 구체적 예는 항-IL13 수용체 알파1 항체를 포함할 수 있다.

[0071] "항-IL13수용체알파2 결합제"는 인간 IL13 수용체알파2에 특이적으로 결합하는 작용제를 지칭한다. 이러한 결합제는 소분자, 압타머 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 이뮤노어드헤신, 항체, 펩티바디 및 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩티드(들)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 결합제는 1 μ M - 1 pM의 친화도로 인간 IL-13 수용체 알파2 서열에 결합한다. 항-IL13 수용체알파2 결합제의 구체적 예는 항-IL13 수용체 알파2 항체를 포함될 수 있다.

[0072] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 예를 들어 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체, 단일 쇄 항체, 다중-특이적 항체 및 항체의 단편을 포괄한다. 이러한 항체는 키메라, 인간화, 인간 및 합성일 수 있다. 이러한 항체 및 이를 생성하는 방법은 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0073] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 영역은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정한 항원에 대한 특정한 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신에, V 도메인은 "초가변 영역"이라 불리는 극단적인 가변성의 보다 짧은 영역 (각각 9-12개 아미노산 길이)으로 분리된 프레임워크 영역 (FR) (15-30개 아미노산)이라 불리는 비교적 불변성의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, 베타-시트 배위를 주로 채택하는 4개의 FR을 포함하고, 이들은 상기 베타-시트 구조를 연결하며 일부 경

우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된다. 각 쇠에서의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0074] 본원에 사용되는 경우에 용어 "초가변 영역" (또는 "HVR")은 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, VL에서는 대략적으로 약 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서는 대략적으로 약 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3) (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, VL에서는 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 VH에서는 26-32 (H1), 52A-55 (H2) 및 96-101 (H3) (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다.

[0075] 초가변 영역은 다음과 같이 "확장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서는 24-36 (L1), 46-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서는 26-35B (H1), 47-65 (H2) 및 93-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0076] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 예를 들어, 경쇄 프레임워크 1 (LC-FR1), 프레임워크 2 (LC-FR2), 프레임워크 3 (LC-FR3) 및 프레임워크 4 (LC-FR4) 영역은 항체의 잔기 1-23, 35-49, 57-88 및 98-107 (카바트 넘버링 시스템)을 각각 포함한다. 또 다른 예에서, 중쇄 프레임워크 1 (HC-FR1), 중쇄 프레임워크 2 (HC-FR2), 중쇄 프레임워크 3 (HC-FR3) 및 중쇄 프레임워크 4 (HC-FR4) 영역은 항체의 잔기 1-25, 36-48, 66-92 및 103-113 (카바트 넘버링 시스템)을 각각 포함한다.

[0077] 본원에 지칭된 바와 같은 "컨센서스 서열" 또는 컨센서스 V 도메인 서열은 공지된 인간 이뮤노글로불린 가변 영역 서열의 아미노산 서열들을 비교함으로써 유래된 인공 서열이다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 모노클로날 항체의 생성 동안 유발될 수 있는 가능한 변이체 (이러한 변이체는 일반적으로 미량으로 존재함)를 제외하고는 동일하고/하거나 동일한 에피토프(들)와 결합하는 집단으로부터 수득한 항체를 나타낸다. 전형적으로, 이러한 모노클로날 항체는 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서 표적-결합 폴리펩티드 서열은 복수 개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 방법에 의해 수득된 것이다. 예를 들어, 선택 방법은 복수 개의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특유한 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열을 추가로 변경시켜서 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고 표적 결합 서열을 인간화하고 세포 배양물 중에서의 그의 생성을 개선시키며 생체내 그의 면역원성을 저하시키고 다중특이적 항체를 생성할 수 있으며, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체 또한 본 발명의 모노클로날 항체라는 것을 이해해야 한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 모노클로날 항체 제제는 그의 특이성 이외에도 다른 이뮤노글로불린에 의해 전형적으로 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지 디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J.Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 및 Lee et al. J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)] 참조) 및 인간 이뮤노글로불린 로커스 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물로부터 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO98/24893, WO/9634096,

WO/9633735, 및 WO/91 10741, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (모두 젠팜(GenPharm)); 5,545,807; WO 97/17852, 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016, 및 [Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995)] 참조)에 의해 제조될 수 있다.

[0079] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고,쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린) 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]). 키메라 항체의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0080] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 기타 항원-결합 하위서열)이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는, 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체시킨 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 일반적으로, 항체 성능을 추가로 정밀화시키고 최적화하기 위해 만들어진다. 전형적으로, 인간화 항체는 1개 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래되고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열로부터 유래되지만, FR 영역에는, 예를 들어 결합 친화도를 개선시키기 위한 하나 이상의 아미노산 치환이 포함될 수도 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역 또는 인간 컨센서스 불변 서열의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세사항은, 문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 인간화 항체는 항체의 항원-결합 영역이, 예를 들어 마카크 원숭이를 관심 항원으로 면역화시켜 생성된 항체로부터 유래된 프리마티즈드(PRIMATIZED)® 항체를 포함한다. 인간화 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0081] 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함한, 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한, 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 콜(Cole) 등 및 보르너(Boerner) 등의 기술이 이용가능하다. 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. 또한, 문헌 [Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]. PCT 공개 WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 유럽 특허 번호 0 598 877; 미국 특허 번호 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; 및 5,939,598을 참조한다.

[0082] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로는 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다.

[0083] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비공유 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 추가변 루프 (H 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화도이긴 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 특정 항원에 대해 특이적인 3개의 CDR 만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 지닐 수 있다.

- [0084] 본 발명의 항체의 "기능적 단편"은 이들이 유래되는 무손상 완전한쇄 분자와 실질적으로 동일한 친화도로 폴리펩티드에 대한 결합을 유지하고, 하나 이상의 검정에서 활성인 (예를 들어, 마우스 모델에서와 같은 섬유증의 억제 또는 시험관내에서 항체 단편에 결합하는 항원의 생물학적 활성의 억제) 단편이다.
- [0085] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체)의 하향 조절; 및 B-세포 활성화를 포함한다. "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0086] 본원에서 확인된 폴리펩티드 및 항체 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트 (%)" 또는 "상동성"은 서열 동일성의 일부로서의 모든 보존적 치환을 고려하여 서열을 정렬시킨 후, 비교되는 폴리펩티드 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방식, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 측정에 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네펜테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 위싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네펜테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 달라지지 않는다.
- [0087] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 이뮤노어드레신 (하기 정의 참조)을 지칭한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따르는 잔기 447)은, 예를 들어 폴리펩티드의 정제 동안 또는 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 공학 처리함으로써 제거할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르는 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드 (항체 포함)를 포함하는 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드 집단, K447 잔기가 전혀 제거되지 않은 폴리펩티드 집단, 또는 K447 잔기를 수반한 폴리펩티드와 K447 잔기를 수반하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 갖는 폴리펩티드 집단을 포함할 수 있다.
- [0088] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급하기 위해 카바트 넘버링 시스템이 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 언급할 때 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 명백하게 본원에 참조로 포함된 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 보고된 EU 인덱스 참조). 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의해 넘버링된 잔기를 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 가출원 번호 60/640,323에서 EU 넘버링에 대한 도면 참조).
- [0089] 혼성화 반응의 "엄격도"는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 융점 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 따라 결정된다. 프로브와 혼성화 가능 서열 사이의 바람직한 상동성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격도에 대한 추가의 상세한 내용 및 설명에 대해 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0090] 본원에 규정된 바와 같은 "엄격한 조건" 또는 "고엄격도 조건"은 다음에 의해 확인될 수 있다: (1) 예를 들어 50°C에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트를 세척하기 위한 낮은 이온 강도 및 높은 온도의 사용; (2) 혼성화 동안 변성제, 예컨대 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 +

0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충제 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨 (42°C)의 사용; 또는 (3) 42°C의 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)에서의 10분 세척, 이어서 55°C의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 구성된 10분 동안의 고염격도 세척과 함께, 42°C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용한 용액 중의 밤새 혼성화에 의해 확인될 수 있다.

[0091] "중간 정도의 엄격한 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있고, 상기한 것보다 엄격성이 낮은 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 강도 및 %SDS)의 사용을 포함한다. 중간 정도의 엄격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트 및 20 mg/ml의 변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 필터를 약 37-50°C에서 1 x SSC로 세척하는 것이다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 알 것이다.

[0092] 본원에 사용된 치료할 대상체는 포유동물 (예를 들어, 인간, 비-인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 대상체는 임상 환자, 임상 시험 지원자, 실험용 동물 등일 수 있다. 대상체는 특발성 폐 섬유증을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것으로 의심되거나 또는 특발성 폐 섬유증으로 진단될 수 있다. 한 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따라 치료할 대상체는 인간이다.

[0093] "치료하는", "치료" 또는 "완화"는 그의 목적이 표적화된 병리학적 상태 또는 장애를 예방하거나 지연 (경감)시키거나, 또는 장애의 증상 중 일부를 경감시키는 것인 조치를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 장애를 갖는 대상체 뿐만 아니라 장애를 갖기 쉬운 대상체, 또는 장애를 예방하고자 하는 대상체를 포함될 수 있다. 대상체 또는 포유동물은 본 발명의 치료제를 제공받은 후에, 환자가 다음: 강제 폐활량 (FVC), 일산화탄소에 대한 폐의 확산능 (DL_{CO}), 환자 보고된 결과 도구, 예컨대 IPF에서의 삶의 질 평가 도구 (ATAQ-IPF) 또는 EuroQoL 5-차원 설문지 (EQ-5D), 6-분 보행 거리 (6MWD), 안정시 산소 유량, 폐 고해상도 컴퓨터 단층촬영 (HRCT) 상에서의 방사선학적 발견, 예를 들어 정량적 폐 섬유증 (QLF) 스코어, 혈청 바이오마커, 예를 들어 비제한적으로 페리오스틴, CCL18, YKL40, COMP, OPN, CCL13 중 하나 이상에서 기준선으로부터 관찰가능한 및/또는 측정가능한 감소 또는 변화 및/또는 시간에 걸쳐 (예를 들어, 3개월 [12주], 또는 6개월 [24주], 또는 9개월 [36주], 또는 12개월 [1년, 52주]에 걸쳐) 기준선으로부터 측정가능한 변화율을 나타낸다면 특발성 폐 섬유증에 대해 성공적으로 "치료된다".

[0094] 본원에 사용된 "IPF 악화"는 다음 기준: 이전 30일 내의 호흡곤란의 설명되지 않은 악화 또는 발생; 통상의 간질성 폐렴 (UIP)과 일치하는 망상 또는 벌집형 배경 패턴 상에 중첩된 새로운 양측 간유리 이상 및/또는 강화의 방사선학적 증거; 및 대안적 원인, 예컨대 좌심부전, 폐 색전증, 폐 감염 (이용가능한 경우에 기관내 흡인 또는 기관지폐포 세척, 또는 연구자 판단을 기반으로 함), 또는 급성 폐 손상으로 이어지는 다른 사건 (예를 들어, 패혈증, 흡인, 외상, 재관류 폐 부종)의 부재를 만족시키는 사건을 의미한다.

[0095] 본원에 사용된 "IPF 심화" 또는 "질환의 IPF 심화"는 다음 (i), (ii) 및 (iii)을 만족시키는 사건을 의미한다: (i) 이전 30일 내의 호흡곤란의 설명되지 않은 악화 또는 발생 및 (ii) 다음 중 임의의 2개: (a) UIP와 일치하는 망상 또는 벌집형 배경 패턴 상에 중첩된 새로운 양측 간유리 이상 및/또는 강화의 방사선학적 증거; (b) 하기 기준 중 1개 이상을 만족시키는 폐 기능의 악화: (I) FVC (L), 10% 이상; (II) DL_{CO} (mL CO/분-1/mmHg-1), 15% 이상; (III) 산소 포화 (SpO₂), 4% 이상; 및 (iii) 대안적 원인의 부재.

[0096] "유효량"은 목적하는 치료 또는 예방 결과 달성에 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다.

[0097] 용어 "치료 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 "완화" 또는 "치료"하는데 유효한 본 발명의 폴리펩티드의 양을 지칭한다. 치료제의 치료 유효량은 개인의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 개체에서 요구되는 반응을 유도하기 위한 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 치료제의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료상 유의한 효과가 더 큰 양이다. "예방 유효량"은 목적하는 예방 결과 달성에 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 전형적으로, 만드시는 아니지만, 예방 용량은 질환의 보다 초기 단계 전에 또는 보다 초기 단계에서 대상체에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0098] "장기" 투여는 단기 방식과는 반대로 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)를 유지하기 위해 연속 방식으로

작용제(들)를 투여하는 것을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단 없이 연속적으로 수행되지는 않지만, 오히려 특성상 주기적인 치료이다.

- [0099] "강제 호기 용적 (FEV1)"은 강제 호기 처음 1초 내에 배출된 공기의 용적을 측정하는 표준 시험을 지칭한다. FEV1은 결과를 기록하고 이러한 결과를 그래프 상에 표시해 주는 기계와 접속한 1회용 튜빙과 마우스피스로 이루어진 폐활량계에 의해 측정한다. 폐활량측정법을 수행하기 위해, 깊게 호흡하고, 튜브 주변에 입을 밀착해서 붙인 다음, 튜빙을 통하여 숨을 내쉬어 측정치를 취한다. 배출된 공기 용적, 및 매번 한숨 간격을 기록하고 분석한다. 폐활량 측정 결과를 백분율로서 표현한다. 정상적 폐활량측정법 결과의 예는 1초 후 폐활량의 75 퍼센트 FEV1을 포함한다. 비정상적 폐활량측정법 결과의 예는 정상적 예측값의 80 퍼센트 미만 판독치가 포함된다. 비정상적 결과는 통상적으로, 어느 정도의 폐쇄성 폐 질환, 예를 들어 천식, 기종 또는 만성 기관지염이 존재하거나, 또는 제한성 폐 질환, 예를 들어 폐 섬유증이 존재한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, FEV1 값 (예측된 백분율)은 천식 및 기종 또는 만성 기관지염과 같이 다른 폐쇄성 폐 질환과 함께 일어날 수 있는 폐색을 분류하는데 사용될 수 있다: 예측된 FEV1 65 퍼센트 내지 79 퍼센트 = 경미한 폐색, 예측된 FEV1 40 퍼센트 내지 59 퍼센트 = 중간 폐색, 및 예측된 FEV1 40 미만 퍼센트 = 중증 폐색. 또한, 폐쇄성 및 제한성 폐 질환은 적어도 하기 방식에서 상이하다. 폐쇄성 질환에서, FEV1/FVC 비는 정상보다 낮을 수 있고, FVC는 정상일 수 있는 반면, 제한성 질환에서, FEV1 및 FVC는 둘 다 정상보다 낮을 수 있으나 FEV1/FVC 비는 정상일 수 있다. 이러한 경우에, FEV1은 단지 FVC가 감소되기 때문에 감소한다.
- [0100] 본원에 사용된 "FVC"는 (FEV1에서와 같이 1초에 배출된 공기의 용적과 대조적으로) 완전한 흡기 및 잔기량까지의 최대 호기 사이의 폐 공기 용적의 변화를 측정하는 표준 시험을 지칭하는 "강제 폐활량"을 지칭한다. 이는 기능적 폐 용량의 척도이다. 제한성 폐 질환, 예컨대 간질성 폐 질환, 예를 들어 IPF, 과민성 폐장염, 사르코이드증 및 전신 경화증을 갖는 환자에서, FVC는 전형적으로 폐 유조직의 반응형성으로 인해 감소된다.
- [0101] 본원에 기재된 유전자 (및 유전자에 의해 코딩되는 단백질)를 확인하기 위해 사용될 수 있는 (예를 들어, 마이크로어레이 분석에 의함) 핵산 프로브의 예에는 표 2, 3 및 4에 기재된 프로브를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0102] "상승된 발현 수준" 또는 "상승된 수준"은 대조군, 예컨대 IPF를 앓고 있지 않은 개체 또는 개체들에 비해 환자 (예를 들어, IPF를 갖는 것으로 의심되거나 또는 진단된 환자)에서 mRNA 또는 단백질의 증가된 발현을 지칭한다.
- [0103] 일반적 기술
- [0104] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명의 실시는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상의 기술을 이용할 것이며, 이들은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 이러한 기술은 문헌, 예를 들어 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994)]에 자세하게 설명되어 있다.
- [0105] 본 발명에서 사용되는 프라이머, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0106] IPF 및 IPF의 특정 하위유형과 연관된 유전자 발현 시그니처가 본원에 제공된다. 이러한 시그니처는 IPF 및/또는 IPF의 하위유형, 및/또는 IPF의 발생, 지속 및/또는 진행에 대한 경향 또는 기여에 대한 바이오마커를 구성하며, 또한 IPF 환자의 생존의 예후이다. 따라서, 본원에 개시된 본 발명은 다양한 상황에서, 예를 들어 IPF 예후, 진단 및 치료에 관련된 방법 및 조성물에서 유용하다.
- [0107] 유전자 발현 수준의 검출
- [0108] 본원에 기재된 임의의 방법에 따라, 핵산은 게놈 DNA로부터 전사된 RNA 또는 RNA로부터 생성된 cDNA일 수 있다. 핵산은 척추동물, 예를 들어, 포유동물로부터 유도될 수 있다. 핵산은 특정한 공급원으로부터 직접 얻거나 공급원에서 발견되는 핵산의 카피일 경우 상기 공급원으로부터 "유래된" 것으로 언급된다.
- [0109] 핵산은 핵산의 카피, 예를 들어 증폭에 의해 생성된 카피를 포함한다. 증폭은 특정 경우에, 예를 들어 변이를 검출하기 위한 물질의 요구되는 양을 얻기 위해 바람직할 수 있다. 이어서, 애플리콘은 특정 유전자의 발현을

결정하기 위해 하기 기재된 것과 같은 변이 검출 방법에 적용될 수 있다.

[0110] 마이크로어레이는 전형적으로 고-엄격도 조건 하에, 예를 들어 cDNA 또는 cRNA 샘플과 혼성화하기 위해 수천 개의 핵산 프로브의 어레이 시리즈를 사용하는 멀티플렉스 기술이다. 전형적으로 형광단-, 은- 또는 화학발광-표지된 표적을 검출함으로써 프로브-표적 혼성화를 검출하고 정량화하여, 표적에서 핵산 서열의 상대 존재비를 결정한다. 전형적인 마이크로어레이에서, 프로브는 (에폭시-실란, 아미노-실란, 리신, 폴리아크릴아미드 또는 기타를 통해) 화학적 매트릭스에 대한 공유 결합에 의해 고체 표면에 부착된다. 고체 표면은, 예를 들어 유리, 규소 칩 또는 미세 비드이다. 예를 들어 아피메트릭스, 인크.(Affymetrix, Inc.) 및 일루미나, 인크.(Illumina, Inc.)에 의해 제조된 것을 비롯하여, 다양한 마이크로어레이가 상업적으로 입수가능하다.

[0111] 단백질 발현 수준의 검출

[0112] 단백질의 발현 수준은 전혈, 혈장 또는 혈청의 샘플에서 검출될 수 있다. 다양한 면역검정 방법을 비롯하여 이러한 생물학적 샘플에서 단백질 발현 수준을 검출하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 광범위한 면역검정 기술이 이전에 기재되었으며, 예를 들어 미국 특허 번호 4,016,043, 4,424,279 및 4,018,653에 기재되어 있다. 이들은 비-경쟁적 유형의 단일-부위 및 2-부위 또는 "샌드위치" 검정 뿐만 아니라, 통상적인 경쟁적 결합 검정을 둘 다 포함한다. 또한, 이러한 검정은 표적 바이오마커에 대한 표지된 항체의 직접 결합을 포함한다.

[0113] 샌드위치 검정은 가장 유용하고 일반적으로 이용되는 검정 중 하나이다. 샌드위치 검정 기술의 수많은 변형이 존재하고, 모두가 본 발명에 포함된다. 간략하게, 전형적인 전방향 검정에서, 비표지된 항체를 고체 기질에 고정시키고, 시험할 샘플을 결합된 분자와 접촉시킨다. 항체-항원 복합체 형성에 충분한 기간 동안의 적합한 인큐베이션 기간 후, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 리포터 분자로 표지되고 항원에 특이적인 제2 항체를 첨가하고, 항체-항원-표지된 항체의 또 다른 복합체 형성에 충분한 시간 동안 인큐베이션한다. 임의의 미반응 물질을 세척하고, 항원의 존재를 리포터 분자에 의해 생성된 신호를 관찰하여 결정한다. 결과는 시각적인 신호의 단순 관찰에 의해 정성적일 수도 있고, 또는 공지된 양의 바이오마커를 함유하는 대조군 샘플과의 비교로 정량화할 수도 있다.

[0114] 정방향 검정의 변형은 결합된 항체에 샘플 및 표지된 항체 둘 다를 동시에 첨가하는 동시 검정을 포함한다. 이러한 기술은 용이하게 명백해질 임의의 근소한 변형을 포함하여 당업자에게 공지되어 있다. 전형적인 정방향 샌드위치 검정에서, 바이오마커에 특이성을 갖는 제1 항체는 고체 표면에 공유 또는 수동 결합된다. 고체 표면은 전형적으로 유리 또는 중합체이고, 가장 일반적으로 사용되는 중합체는 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌이다. 고체 지지체는 튜브, 비드, 마이크로플레이트의 디스크의 형태, 또는 면역검정 수행에 적합한 임의의 다른 표면일 수 있다. 결합 과정은 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 가교 공유 결합 또는 물리적 흡착으로 이루어지고, 중합체-항체 복합체는 시험 샘플 제조시에 세척하였다. 이어서, 시험할 샘플의 분취액을 고체 상 복합체에 첨가하고, 항체에 존재하는 임의의 서브유닛의 결합을 허용하기에 적합한 조건 (예를 들어, 실온 내지 40℃, 예컨대 25℃ 내지 32℃ 포함) 하에 충분한 기간 동안 (예를 들어, 2-40분 또는 보다 편리하게는 밤새) 인큐베이션한다. 인큐베이션 기간 후, 항체 서브유닛 고체 상을 세척하여 건조시키고, 바이오마커의 일부에 특이적인 제2 항체와 함께 인큐베이션한다. 제2 항체는 분자 마커에 대한 제2 항체의 결합을 표시하는데 사용되는 리포터 분자에 연결된다.

[0115] 대안적 방법은 샘플 중의 표적 바이오마커를 고정시킨 후, 상기 고정된 표적을 리포터 분자로 표지될 수도 있고 표지되지 않을 수도 있는 특이적 항체에 노출시키는 것을 포함한다. 표적의 양 및 리포터 분자 신호의 강도에 따라, 결합된 표적은 항체로 직접 표지함으로써 검출할 수 있다. 대안적으로, 제1 항체에 특이적인 제2 표지된 항체를 표적-제1 항체 복합체에 노출시켜 표적-제1 항체-제2 항체의 3원 복합체를 형성시킨다. 상기 복합체는 리포터 분자에 의해 방출되는 신호에 의해 검출된다. 본 명세서에서 사용된 "리포터 분자"는 그의 화학적 성질에 의해 항원 결합된 항체의 검출을 허용하는 분석적으로 확인가능한 신호를 제공하는 분자를 나타낸다. 이러한 유형의 검정에서 가장 일반적으로 사용되는 리포터 분자는 효소, 형광단 또는 방사선헤중 함유 분자 (즉, 방사성동위원소) 및 화학발광 분자이다.

[0116] 효소 면역검정의 경우에, 효소는 일반적으로 글루타르알데히드 또는 피아이오테이트에 의해 제2 항체에 접합된다. 그러나, 용이하게 인지되는 바와 같이, 당업자가 용이하게 이용가능한 다양한 여러가지 접합 기술이 존재한다. 통상적으로 사용되는 효소는 특히 양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코스 옥시다제, -갈락토시다제 및 알칼리성 포스파타제를 포함한다. 특이적 효소와 함께 사용될 기질은 일반적으로 상응하는 효소에 의한 가수분해시에 검출가능한 색상 변화가 생성되는 것으로서 선택된다. 적합한 효소의 예는 알칼리성 포스파타제 및 퍼옥시다제

를 포함한다. 상기 언급된 발색 기질보다는 형광 생성물을 생성하는 형광 기질을 사용하는 것이 또한 가능하다. 모든 경우에서, 효소-표지된 항체를 제1 항체-분자 마커 복합체에 첨가하여 결합시킨 후에 과잉 시약을 세척한다. 이어서, 적절한 기질을 함유하는 용액을 상기 항체-항원-항체의 복합체에 첨가한다. 기질은 2차 항체에 연결된 효소와 반응하여 정성적인 가시적 신호를 생성할 것이고, 이는 샘플 내에 존재하는 바이오마커의 양을 표시하도록 일반적으로 분광학적으로 추가로 정량화될 수 있다. 대안적으로, 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 화합물이 이들의 결합 능력을 변경시키지 않으면서 항체에 화학적으로 커플링될 수 있다. 특정한 파장의 광을 사용한 조명으로 활성화될 때, 형광색소-표지된 항체는 광 에너지를 흡수하여 분자를 여기가능 상태로 유도한 후, 광학 현미경으로 시각적으로 검출가능한 특징적인 색상의 광을 방출한다. EIA에서와 같이, 형광 표지된 항체는 제1 항체-분자 마커 복합체에 결합하게 된다. 결합되지 않은 시약을 세척한 후에, 남아있는 3원 복합체를 적절한 파장의 광에 노출시키고, 관찰된 형광은 관심 분자 마커의 존재를 나타낸다. 면역형광 및 EIA 기술 둘 다 당업계에 널리 확립되어 있다. 그러나, 다른 리포터 분자, 예를 들어 방사성동위원소, 화학발광 또는 생물발광 분자를 사용할 수도 있다.

[0117] 생물학적 샘플은 당업자에게 공지된 특정 방법을 이용하여 획득할 수 있다. 생물학적 샘플은 척추동물, 특히 포유동물로부터 획득할 수 있다. 특정 경우에서, 생물학적 샘플은 폐 조직, 전혈, 혈장, 혈청 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 이러한 신체 샘플의 스크리닝에 의해, 단순 조기 예후 (예를 들어, 생존의 예후) 또는 진단 (예를 들어, 분자 하위유형의 진단)인 달성된 IPF일 수 있다. 또한, 요법의 진행은 표적 핵산 (또는 코딩된 폴리펩티드)의 발현 수준의 변화에 대해 상기 신체 샘플을 시험함으로써 보다 용이하게 모니터링할 수 있다.

[0118] 대상체, 또는 조직 또는 세포 샘플이 본원에 개시된 유전자 발현 시그니처를 포함하는지 결정된 후에, 유효량의 적절한 IPF 치료제가 대상체에서 IPF를 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있음이 고려된다. 본원에 기재된 다양한 병리학적 상태의 포유동물에서 임상적 진단이 숙련된 진료의에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어 포유동물에서 IPF의 진단 또는 검출을 허용하는 임상적 진단 기술이 당업계에서 이용가능하다.

[0119] IPF 치료제는 공지의 방법에 따라, 예컨대 볼루스로서 정맥내 투여 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있다. 임의로, 투여는 다양한 상업적으로 입수가 가능한 장치를 이용하여 미니-펌프 주입을 통해 수행될 수 있다.

[0120] 특정 치료제

[0121] 특정 치료제가 IPF의 치료를 위한 후보 또는 작용제로서 이전에 기재되었다. 이들은 공개 문헌에 기재되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Rafii et al., J. Thorac. Dis (2013) 5(1):48-73]에서 검토되었다. 이러한 작용제는 항산화제, 면역억제제 및/또는 항염증 활성을 갖는 작용제, 예컨대 N-아세틸시스테인; 항섬유증, 항염증 및/또는 항산화제 활성을 갖는 작용제, 예컨대 피르페니돈, IPF의 치료에서 임상 용도를 승인받은 경구 투여 피리딘; 형질전환 성장 인자- β (TGF- β)를 억제하는 작용제, 예컨대 모든 TGF- β 이소형을 표적으로 하는 항-TGF- β 항체 (예를 들어, GC1008), 또는 $\alpha v \beta 6$ 인테그린에 대한 항체 (예를 들어, STX-100); 결합 조직 성장 인자 (CTGF)를 억제하는 작용제, 예컨대 항-CTGF 항체 (예를 들어, FG-3019); 소마토스타틴 수용체를 억제하는 작용제, 예컨대 소마토스타틴 유사체 (예를 들어, SOM230, 옥트레오티드); IL-13, IL-4 및 CCL2를 억제하는 작용제, 예컨대 항-IL13 항체 (예를 들어, QAX576, 트랄로키누맙, 레브리키주맙 [하기 추가로 기재됨]), 항-IL4 항체, 항-IL13/항-IL4 작용제의 조합 (예를 들어, 이중특이적 항-IL13/항-IL4 항체, 예컨대 SAR156597), 항-CCL2 항체 (예를 들어, CNT0888); 항혈관신생, 면역조절 및/또는 항염증성 활성을 갖는 작용제, 예컨대 탈리도미드 또는 미노시클린; 효소 리실 옥시다제-유사 2 (LOXL2)를 억제하는 작용제, 예컨대 항-LOXL2 항체 (예를 들어, GS-6624 [심투주맙]); 혈관신생을 억제하는 작용제, 예컨대 티로신 키나제 억제제, BIBF 1120, 테트라티오몰리브데이트; 세포의 매트릭스의 침착을 억제하고/거나 콜라겐 침착을 파괴하는 작용제, 예컨대 독시시클린; 레닌-안지오텐신 시스템을 표적으로 하는 작용제, 예컨대 로사르탄; 및 항증식성 및/또는 항섬유증 활성을 갖는 다른 작용제, 예컨대 일산화탄소를 포함한다.

[0122] 특발성 폐 섬유증의 치료를 위한 특정 치료제가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 치료제는 항-IL13 항체이며, 이는 또한 레브리키주맙으로 지칭된다. 레브리키주맙은 IgG4 항체로도 지칭된다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2) 및 CDR-H3 (서열 3)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 경쇄 CDR, CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5) 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), CDR-H3 (서열 3), CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5) 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH를 포함한다. 한 실시양태에

서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10 또는 서열 11 또는 서열 12 또는 서열 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10, 서열 11, 서열 12 및 서열 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 항-IL13 항체는 국제 공개 번호 2005/062967에 추가로 기재된다.

[0123] 또 다른 측면에서, 항-IL-13 항체는 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-IL-13 항체는 인간 IL-13에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 8에서 치환, 변경, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-IL13 항체는 서열 8의 VH 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).

[0124] 또 다른 측면에서, 서열 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-IL-13 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-IL-13 항체는 IL-13에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 9에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-IL-13 항체는 서열 9의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함)

[0125] 또 다른 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 영역 및 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 영역을 포함한다.

[0126] 키트

[0127] 본원에 기재되거나 제안된 용도에서 사용하기 위해, 키트 또는 제조품이 또한 제공된다. 상기 키트는 긴밀하게 닫힌 하나 이상의 용기 수단, 예컨대 바이알, 튜브 등을 수용하도록 구획화되는 운반체 수단을 포함할 수 있고, 여기서 각각의 용기 수단은 방법에서 사용될 개별 요소 중 하나를 포함한다. 예를 들어, 용기 수단 중 하나는 검출가능하게 표시된 것이거나 검출가능하게 표시될 수 있는 프로브를 포함할 수 있다. 이러한 프로브는 유전자 발현 시그너처의 하나 이상의 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 특이적인 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 키트가 표적 핵산을 검출하기 위해 핵산 혼성화를 이용하는 경우에, 키트는 또한 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 뉴클레오티드(들)를 함유하는 용기, 및/또는 효소, 형광 또는 방사성동위원소 표시와 같은 리포터 분자에 결합된, 아비딘 또는 스트렙타비딘과 같은 비오틴-결합 단백질과 같은 리포터 수단을 포함하는 용기를 가질 수 있다.

[0128] 키트는 전형적으로 상기 기재된 용기, 및 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 사용 지침서를 갖는 포장 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 물질을 포함하는 1개 이상의 다른 용기를 포함할 것이다. 조성물이 특정한 요법을 위해 또는 비-치료 용도로 사용되는지 나타내도록 라벨이 용기 상에 존재할 수 있고, 또한 상기 기재된 것과 같은 생체내 또는 시험관내 용도를 위한 지시를 나타낼 것이다. 키트 중의 다른 임의의 성분은 하나 이상의 완충제 (예를 들어, 차단 완충제, 세척 완충제, 기질 완충제 등), 다른 시약, 예를 들어 효소 표지에 의해 화학적으로 변경되는 기질 (예를 들어, 발색제), 에피토프 복구 용액, 대조군 샘플 (양성 및/또는 음성 대조군), 대조군 슬라이드(들) 등을 포함한다.

[0129] 마케팅 방법

[0130] 본 발명은 또한 본원에 개시된 유전자 또는 단백질 또는 유전자 및 단백질의 조합의 발현 수준을 보여주는 샘플을 수득한 IPF를 갖는 환자 또는 환자 집단을 치료하기 위한 작용제 또는 그의 제약 조성물의 사용을 표적 청중에게 판촉하고/하거나 지시하고/하거나 명시하는 것을 포함하는, IPF 치료제 또는 그의 제약상 허용되는 조성물을 마케팅하는 방법을 포괄한다.

[0131] 마케팅은 일반적으로 후원자가 확인되고 메시지가 제어되는 비-인적 매체를 통한 유료 커뮤니케이션이다. 본원

의 목적에서 마케팅은 선전, 홍보, 작품 속 광고, 후원, 보증 및 판촉을 포함한다. 이러한 용어는 또한 본원에서 본 발명을 구입하거나 지지하거나 승인하는 유리한 패턴으로 설득하거나 정보를 제공하거나 프로모션하거나 동기부여하거나 또는 다르게는 행동을 변형시키기 위해 대중에게 호소하도록 고안된 인쇄 커뮤니케이션 매체들 중 임의의 것으로 나타나는, 후원받은 정보성 공시를 또한 포함한다.

[0132] 본원에서 진단 방법의 마케팅은 임의의 수단에 의해 달성할 수 있다. 이들 메시지를 전달하기 위해 사용되는 마케팅 매체의 예는 텔레비전, 라디오, 영화, 잡지, 신문, 인터넷, 및 전파 매체에서 나타나는 메시지인 광고방송을 포함한 광고게시판을 포함한다.

[0133] 사용된 마케팅의 유형은 많은 인자, 예를 들어, 도달할 표적 청중의 특성, 예를 들어, 병원, 보험 회사, 클리닉, 의사, 간호사 및 환자, 뿐만 아니라 비용 고려사항 및 의약 및 진단의 마케팅을 규제하는 관련 관할 법률 및 규정에 따라 달라질 수 있다. 마케팅은 서비스 상호작용 및/또는 다른 데이터, 예를 들어 사용자 인구학 및 지리학상 위치에 의해 규정되는 사용자 특성화에 기초하여 개별화되거나 주문제작될 수 있다.

[0134] 본원에서 인용된 모든 공개 (특허 및 특허 출원 포함)은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0135] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, 용어 "포함하다", 또는 "포함한다" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급한 정수 또는 정수 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수 군을 배제하지는 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0136] 상기 기재된 설명은 당업자가 본 발명을 실시할 수 있을 만큼 충분한 것으로 간주된다. 하기 실시예는 단지 예시적 목적으로만 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형은 상기 기재로부터 당업자에게 명백해질 것이고, 첨부된 특허청구범위 내에 속할 것이다.

[0137] 특허 출원 및 공개를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 임의의 목적을 위해 그의 전문이 참조로 포함된다.

[0138] 실시예

[0139] 실시예 1: IPF에서 생존 예후에 대한 전신 바이오마커의 확인

[0140] IPF 생존을 예후하는데 유용할 수 있는 분자 바이오마커를 확인하기 위해, 본 발명자들은 우선 40명의 IPF 환자 및 8명의 미사용 공여자 대조군 ("코호트 1")로부터의 폐 조직에서 마이크로어레이 및 qPCR 방법을 이용하여 유전자 발현 분석을 수행하였다. 이어서, 유전자 발현 결과로부터, 본 발명자들은 후보 예후 혈청 바이오마커를 확인하였다. 각각의 후보 예후 혈청 바이오마커의 혈청 수준 및 폐 기능을 캘리포니아, 샌 프란시스코 대학에서 간질성 폐 질환 클리닉에 대한 프리젠테이션의 시점에 수집된 80명의 IPF 환자의 개별 코호트 ("코호트 2")에서 평가하였다. 활력 상태는 샘플 수집 후에 2-8년 동안 추적하였다.

[0141] 방법

[0142] 인간 폐 조직

[0143] 조직은 생검 또는 폐 이식 시점에 IPF 환자로부터 캘리포니아, 샌 프란시스코 대학 폐 센터에서 수확하였다. 비-IPF 대조군을 공여자 폐로부터 수확하였다. 추가의 세부내용은 결과 섹션에 제공된다.

[0144] 조직 배양

[0145] IMR-90 세포 (ATCC, 버지니아주 마나사스; 카탈로그 번호 CCL-186)를 10% FBS (시그마(Sigma), 미주리주 세인트 루이스; 카탈로그 번호 F2442) 및 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드; 카탈로그 번호 15140)이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포를 성장 인자 감소된 매트릭셀(Matrigel)TM (GFR 매트릭셀TM; BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 매사추세츠주 베드포드; 카탈로그 번호 354230)의 베드 상에 플레이팅하였다. 매트릭셀TM을 얼음 상에서 밤새 해동시키고, 매트릭셀TM을 37°C에서 30분 동안 경화시킴으로써 12-웰 플레이트에서 450ul/웰의 베드 부피를 생성하였다. 이어서, 세포 (1E5-2E5)를 매트릭셀TM 베드 상에 플레이팅하였다. 달리 나타내지 않는 한, IL-13 자극을 10 ng/ml (IL-13 및 TNF α) 및 3 ng/ml (IL-4)로 수행하였다.

[0146] RNA 제조

[0147] 급속 냉동된 폐 생검 샘플을 미리 냉각시킨 (액체 질소 중) 베스만(Bessman) 조직 분쇄기 (스펙트럼 레보러토리즈(Spectrum Laboratories) 캘리포니아주 란초 도밍게즈; 카탈로그 번호 189475)에서 분쇄하였다. 트리졸

(Trizol)®을 분쇄된 물질에 첨가하고, 수회 피펫팅하였다. 용해물을 얼음 상에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. 용해물을 추가 처리시까지 -80℃에 저장하였다. RNA를 트리졸® 용해물로부터 제조업체의 프로토콜에 따라 분리하였다. 이어서, 트리졸®-단리된 RNA를 퀴아젠(Qiagen) RNeasy 칼럼을 제조업체의 프로토콜에 따라 이용하여 또 다른 정제 단계에 적용하였다.

[0148] 1ml (12-웰 플레이트에서 웰당) 트리졸®을 첨가하고 혼합물을 수회 피펫팅함으로써 조직 배양된 세포를 수확하였다. 트리졸® 용해물을 퀴아젠 RNeasy 프로토콜에 지시된 바와 같이 스틸 비드/티슈라이저(TissueLyser) (퀴아젠) 방법 (20 s^{-1} , 4분)를 이용하여 균질화시켰다. 균질화시에 RNA를 트리졸® 제조업체의 프로토콜에 따라 분리하였다. 이어서, 트리졸®-단리된 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 퀴아젠 RNeasy 칼럼을 이용하여 또 다른 정제 단계에 적용하였다.

[0149] RNA 농도를 분광광도측정법 (나노드롭(Nanodrop), 써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 의해 결정하고, 모든 마이크로어레이 샘플을 바이오어날라이저(Bioanalyzer) (애질런트(Agilent))에 의해 분석하였다.

[0150] RT-qPCR

[0151] 100-300ng의 전체 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 고용량 cDNA 역전사 키트 (ABI, 카탈로그 번호 4368814)로 무작위 프라이머를 사용하여 역전사에 적용하였다. 실시간 qPCR을 택맨(Taqman) 검정을 이용하여 수행하였다. 모든 반응은 ABI 7900HT 기기 또는 플루이다임(Fluidigm) 플랫폼 (48.48 또는 96.96 포맷) 상에서 진행하였다.

[0152] IL-13 리포터 검정

[0153] L-Luc-BEAS-2B (제넨테크에 의해 구축된 세포주; BEAS-2B (ATCC, 버지니아주 마나사스)로부터 유래됨; 카탈로그 번호 CRL-9609)를 지시된 바와 같이 다음 시약: 12ng/ml IL-13 (R&D 시스템스(R&D Systems), 카탈로그 번호 213-IL) 및 항-IL-13 차단 항체 (제넨테크)로 포매시킨 GFR 매트릭셀™에서 성장시켰다. 반딧불이 루시페라제 활성을 제조업체의 프로토콜에 따라 오직 반딧불이 루시페라제가 측정되도록 변형된 듀얼-글로(Dual-Glo) 루시페라제 검정 시스템 (프로메가(Promega), 카탈로그 번호 E2920)을 이용하여 측정하였다.

[0154] 마이크로어레이 분석

[0155] RNA를 증폭시키고, 퀵 앰프(Quick Amp) 표지 키트 (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 카탈로그 번호 5190-0444)를 이용하여 표지하여 1ug의 전체 RNA로부터 표지된 cRNA를 생성하였다. 실험 샘플을 Cy5로 표지하고; 유니버설 인간 참조 RNA (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라 줄라)를 참조 채널을 위해 사용하고, Cy3으로 표지하였다. Cy5 및 Cy3 표지된 cRNA를 2-색 전체 인간 게놈 4 x 44K 유전자 발현 마이크로어레이 플랫폼 (애질런트 테크놀로지스, 카탈로그 번호 G4112F)에 경쟁적으로 혼성화시켰다. 혼성화된 마이크로어레이를 제조업체 (애질런트)의 프로토콜에 따라 세척하고, 모든 특징적 강도를 애질런트 마이크로어레이 스캐너를 이용하여 수집하였다. 스캐닝된 슬라이드의 TIFF 영상을 특징 추출 소프트웨어 버전 7.5 (애질런트), 프로토콜 GE2-v5_95 (애질런트)를 이용하여 분석하였다. 표시된 이상치는 임의의 후속 분석에 포함되지 않았다. 모든 데이터를 염료-정규화 Cy5/Cy3 비의 \log_2 값으로 보고하였다. 모든 샘플의 \log_2 비를 상응하는 모의-처리된 샘플 (또는 비-IPF 대조군)의 평균 \log_2 비에 대해 정규화하였다.

[0156] 다양한 발현 프로파일링 데이터세트를 비교한 경우에, 공개적으로 이용가능한 데이터세트를 우선 여과하고, 정규화하고, 본래 연구에서와 같이 집중시켰다. 카민스키(Kaminski) 데이터세트 (GSE10667) (문헌 [Konishi et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180(2):167-75 (2009)])를 전체 인간 게놈 애질런트 마이크로어레이 플랫폼 상에서 진행시켰으며, 이에 따라 플랫폼 특이적 프로브 식별자를 이용하여 데이터세트를 연결하였다. 자바 트리뷰(Java Treeview)로 열지도가 생성되었다.

[0157] R (LIMMA)에 3가지 인자: 진단, 조직 공급원 및 성별 (Y-연결된 유전자의 발현 분석으로부터 추정됨)을 혼입시키는 선형 모델을 구축함으로써 차등 발현된 유전자를 확인하였다.

[0158] 혈액 바이오마커 검정

[0159] 하기 마커의 수준을 제조업체의 지침에 따라 상업적으로 입수가능한 검정을 이용하여 혈청에서 평가하였다: COMP (아브노바(Abnova), 대만 타이페이, 카탈로그 번호 KA0021); MMP7 (R&D 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스, 카탈로그 번호 DMP700); CXCL13 (R&D 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스, 카탈로그 번호 DCX130); CCL13 (R&D 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스, 카탈로그 번호 DY327); YKL-40 (R&D 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스, 카탈로그 번호 DY2599); MMP3 (메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery), 메릴랜드주 게이터스버

그, 카탈로그 번호 K15034C); SAA (메조 스케일 디스커버리, 메릴랜드주 게이더스버그, 카탈로그 번호 K151EOC-1); CCL11 (에오타신) 및 CCL17 (TARC) (메조 스케일 디스커버리, 메릴랜드주 게이더스버그, 카탈로그 번호 15031C). OPN의 수준을 혈장에서 제조업체의 지침에 따라 상업적으로 입수가 가능한 검정 (R&D 시스템스, 카탈로그 번호 DOST00)을 이용하여 평가하였다. 혈청 페리오스틴을 이전에 기재된 바와 같이 독점적 검정을 이용하여 분석하였다 (예를 들어, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2011/065410 참조). 혈청 CCL18에 대해 제조업체의 프로토콜을 변형시킨 상업적으로 입수가 가능한 검정 (R&D 시스템스, 카탈로그 번호 DY394)을 이용하여 다음과 같이 매트릭스 간섭을 개선하였다: 96-웰 플레이트를 밤새 4℃에서 마우스 항-인간 CCL18 모노클로날 항체로 코팅한 후에 1X PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 0.05% 트윈 20, 0.25% CHAPS, 5mM EDTA, 0.35M NaCl 및 15PPM 프로클린을 함유하는 완충제로 차단하였다. 5% FBS를 함유하는 검정 희석제로 1:1000 희석된 혈청 샘플을 이중으로 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온 (20℃)에서 인큐베이션하였다. 세척 후에, 5% 염소 혈청을 함유하는 검정 희석제 중 비오틴화 염소 항-인간 CCL18 모노클로날 항체를 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안 실온 (20℃)에서 인큐베이션하였다. 세척 후에 스트렙타비딘-퍼옥시다제 및 기질 TMB로 색을 발현시켰다. 본 검정의 검출 한계는 ~7.8 pg/ml였다.

[0160] 결과

[0161] 연구 코호트의 특성

[0162] 코호트 1로부터 수득한 샘플의 경우에, 40명의 IPF 환자 및 8명의 대조군으로부터의 생검 조직을 마이크로어레이 및 qPCR 연구에 사용하였다. 11개의 IPF 샘플은 흉강경검사 생검으로부터 수득하고, 29개의 샘플은 폐 이식 시점에 얻은 체외이식편으로부터 수득하였다. 모든 대조군 조직은 미사용 공여자 폐로부터 체외이식되었다. 공여자 폐는 일반적으로 폐로 인한 것이 아닌 원인 (예를 들어, 외상)으로 사망한 간질성 폐 질환의 증거가 없는 대상체로부터 얻었으나, 사망 이후에 과도하게 지난 시간, 또는 혈액형, 혈관 또는 HLA 불일치로 인한 적합한 수용자의 비이용가능성과 같은 이유로 이식에 사용될 수 없었다. 모든 IPF 생검 시편으로부터 인접한 조직은 통상적인 간질성 폐렴 (UIP) 패턴을 갖는 것으로 확인되었다. 31개 IPF 및 15개 대조군 샘플로 이루어진 공용 다운로드에 이용가능한 복제 데이터세트는 이전에 기재되었다 (문헌 [Konishi et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180(2):167-75 (2009)]).

[0163] 코호트 2로부터 수득한 샘플의 경우에, 혈청 및 혈장을 둘 다 캘리포니아, 샌 프란시스코 대학에서 간질성 폐 질환 클리닉에 대한 프리젠테이션 시점에 80명의 IPF 환자 각각으로부터 수집하였다. 이러한 코호트의 임상적 및 인구통계학적 특성은 하기 표 1에 기재된다. 건강한 대조군으로부터의 혈청 (N=29) 또는 혈장 (N=10)을 사용하여 바이오마커 수준에 대한 정상 범위를 확립하였다.

표 1

코호트 2의 임상적 및 인구통계학적 특성.

변수	달리 지시되지 않는 한, 중앙값 (IQR)
성별 (M:F)	62:16
최초 방문시 나이, 중앙값 (범위)	70 (50-87)
후속 폐 이식 (Y:N)	7:63
흡연 경험 있음 (Y:N)	58:16
현재 흡연 중임 (Y:N)	1:73
전신 스테로이드 ± 아자티오프린 (Y:N)	21:59
예측된 FVC %	69 (57-81)
예측된 TLC %	70 (59-78)
예측된 DL _{CO} %	48 (36-60)
호흡곤란 스코어 ¹	10 (5.5-16)
방사선촬영 스코어 ²	12 (7.7-20.4)

FVC = 강제 폐활량; TLC = 총 폐용량; DL_{CO} = 확산능 (일산화탄소로 측정됨); IQR = 사분위수간 범위, 25th-75th 백분위수; ¹ = 문헌 [Watters et al., Ann. Rev. Resp. Dis. 133:97 (1986)]에 따른 1-20의 스케일 상의 호흡곤란 스코어; ² = 문헌 [Best et al., Radiology 246:935 (2008)]에 기재된 방법에 따른 섬유화 폐의 퍼센트의 방사선촬영 스코어 추정치.

[0164]

[0165] IPF에서 차등 발현된 유전자의 확인

[0166] 본 발명자들은 전체 인간 게놈 마이크로어레이 (애질런트 테크놀로지스, 카탈로그 번호 G4112F)를 사용하여 코호트 1 (40명의 IPF 환자 및 8명의 미사용 공여자 대조군 대상체)로부터의 폐 조직으로부터 단리된 RNA의 게놈 광범위 트랜스크립토 분석을 수행하였다. 제한된 이용가능한 메타데이터 (성별, 조직 공급원 (폐 이식 시점에

수확된 생검 또는 조직), 진단)를 사용된 선형 모델에 포함시켜 IPF 환자 및 대조군 사이에서 차등 발현된 (DE) 유전자를 확인하였다. 본 발명자들은 대조군 조직에 비해 IPF 조직에서 차등 발현 ($q < 0.05$, 배수-변화 > 1.5) 된 것으로 2940개의 마이크로어레이 프로브를 확인하였다 (부분 목록이 표 2에 제시됨). 관찰된 전반적인 IPF 발현 프로파일이 샘플 수집 방법 또는 다른 혼동 요인에 의해 발생하는 체계적 편파성에 의해 영향을 받을 가능성을 감소시키기 위해, 본 발명자들은 발현 프로파일을 유사하지만 독립적으로 생성된 IPF 데이터세트에 비교하였다 (문헌 [Konishi et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180(2):167-75 (2009)]). 이러한 데이터세트 (GSE10667)는 폐 종양 절제 후에 주변의 비-악성 영역으로부터 수확한 31명의 IPF 환자 및 15명의 대조군 폐 조직으로부터의 폐 생검의 발현 프로파일을 기재하였다. 본 발명자들은 각각의 유전자에 대해 대조군 샘플과 비교한 IPF 샘플의 발현 수준의 편차를 기재하는 T-통계치를 계산하였다. 서로에 대해 플롯팅된 경우에, 본 발명자들은 고도의 유사성을 발견하였다 (데이터는 나타내지 않음). 2개의 데이터세트가 독립적으로 생성되었기 때문에, 유사한 t-통계가 각 연구의 타당성을 뒷받침하고, 트랜스크립토-광범위 효과가 연구-특이적 요인 또는 기술적 인공물로 인한 것일 가능성을 감소시킨다.

[0167] IPF에서의 세기관지, 림프성 및 섬유모세포/근섬유모세포 유전자 발현 시그니처

[0168] IPF 및 대조군 사이의 2490개의 DE 마이크로어레이 프로브의 비지도 2-원 계층적 클러스터링 (상기 논의된 바와 같음)은 도 1a에 나타난 바와 같이 진단 (예를 들어, IPF 또는 대조군)에 의해 주로 규정되는 3개의 주요 클러스터를 입증하였다; 군 1 클러스터, 군 2 클러스터, 및 군 3 클러스터. 본 발명자들은 군 1 (도 1b에 나타난 열지도), 군 2 (도 1c에 나타난 열지도) 및 군 3 (도 1d에 나타난 열지도)을 재클러스터링하였다. 도 1b-d에 나타난 열지도에서, 본 발명자들은 IPF 환자 내에서 이질적인 것으로 나타난 공동조절된 유전자의 여러 군을 관찰하였다. 이러한 공동조절된 유전자의 군 중 3개는 각각 기관지 상피 (표 2 참조; 또한 군 1 클러스터로 지칭됨), 림프성 응집체 (또한, 여포로 지칭됨) (표 3 참조, 또한 군 2 클러스터로 지칭됨) 및 근섬유모세포 (표 4 참조, 또한 군 3 클러스터로 지칭됨)에서 발현되는 유전자가 풍부하였다.

[0169] 군 1 클러스터 또는 세기관지 군은 뮤신 (MUCL1, MUC4, MUC20); 프롤린-풍부 분비된 인자 (PRR7, PRR15, SPRR1B, SPRR2D); 케라틴 (KRT5, KRT6B, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17), 세린 프로테아제 억제제 (SERPINB3, SERPINB4, SERPINB5, SERPINB13), 이온 채널 및 관련 인자 (CLCA2, TRPV4) 및 섬모 성분 (BBS5) 뿐만 아니라 MMP3 및 SAA4를 함유하였다. 이러한 유전자는 정상 폐 유조직에서 예상될 수 있는 폐포 상피 보다는 오히려 분화된 기관지 상피에서 전형적이며, 이러한 유전자의 발현은 깊은 반흔형성과 관련된 별집형 낭포 공간의 상피화를 나타낼 가능성이 있는 IPF에서의 폐포 공간의 비정상적인 "세기관지화"에 대한 이전의 보고와 일치한다 (문헌 [Chilosi et al., Lab Invest. 82(10):1335-45 (2002)]). 세기관지 시그니처는 놀랍게도 TP63, CLCA2, FGF14, PTPRZ1, SOX2, DSC3, CP, MMP1, MUC4, SERPINB3, SERPINB13, 및 다중 케라틴을 비롯한, 동반된 폐 섬유증 및 폐동맥 고혈압을 갖는 환자로부터의 폐 조직에서 상향조절되는 것으로 보고된 유전자 시그니처와 유사하다 (문헌 [Mura et al., Chest 141:661-673 (2012)]). 따라서, 반흔형성과 관련된 감소된 조직 순응도 및 손상된 기체 교환이 증가된 폐 혈관 저항 및 후속 폐고혈압에 기여할 가능성이 있다. 본 발명자들은 또한 특정 유전자가 이러한 클러스터 내에서 하향조절되며, 이들이 Notch4, 카드헤린, Wnt7A 및 DKK2를 포함한다는 것에 주목하였다.

표 2

세기판지 유전자 발현 시그니처와 연관된 차등 발현된 유전자 (>1.5배 상향조절됨, q<0.05)의 부분 목록.

프로브 ID	유전자 기호	유전자명	엔트레즈 ID	LogFC	p-값	adj. p-값
A_23_P150979	MUC11	뮤신-유사 1	118430	1.61921533	0.00665823	2.60E-02
A_24_P208825	MUC4	뮤신4, 세포 표면 연관	4585	2.11873294	2.50E-05	2.72E-04
A_23_P92222	MUC20	뮤신 20, 세포 표면 연관	200958	1.23642525	0.00022861	1.70E-03
A_23_P30464	PRR7	프롤린 풍부 7 (시냅스)	80758	1.04150995	3.35E-06	5.34E-05
A_32_P154911	PRR15	프롤린 풍부 15	222171	1.58791565	0.00882268	3.23E-02
A_23_P159406	SPRR1B	작은 프롤린-풍부 단백질 1B	6699	1.76462785	5.26E-05	5.02E-04
A_23_P11644	SPRR2D	작은 프롤린-풍부 단백질 2D	6703	1.15788562	0.00025497	1.86E-03
A_23_P218047	KRT5	케라틴 5	3852	2.52682152	5.44E-06	7.87E-05
A_23_P76249	KRT6B	케라틴 6B	3854	2.90550487	9.76E-05	8.39E-04
A_24_P228149	KRT13	케라틴 13	3860	1.22487349	0.00497946	2.06E-02
A_24_P265346	KRT14	케라틴 14	3861	3.71369769	1.31E-10	1.53E-08
A_23_P27133	KRT15	케라틴 15	3866	1.8933655	0.00097625	5.56E-03
A_23_P96158	KRT17	케라틴 17	3872	4.14444061	1.20E-11	2.15E-09
A_23_P55632	SERPINB3	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 B (오브알부민), 구성원 3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_23_P502413	SERPINB4	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 B (오브알부민), 구성원 4	6318	3.54380018	0.00032106	2.25E-03
A_23_P208126	SERPINB5	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 B (오브알부민), 구성원 5	5268	2.18225921	9.31E-05	8.03E-04
A_23_P432978	SERPINB13	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 B (오브알부민), 구성원 13	5275	1.33876843	0.01364005	4.56E-02
A_23_P397248	CLCA2	클로라이드 채널 부속물 2	9635	2.34309417	7.25E-05	6.52E-04
A_24_P13381	TRPV4	일시적 수용체 전위 양이온 채널, 서브패밀리 V, 구성원 4	59341	1.144662	0.00052144	3.34E-03
A_23_P5785	BBS5	바벳-비들 증후군 5	129880	0.60446077	0.00254271	1.20E-02
A_23_P161698	MMP3	매트릭스 메탈로펩티다제 3 (스트로멜리신 1, 프로켈라티나제)	4314	2.33843742	3.32E-06	2.09E-05
A_23_P87238	SAA4	혈청 아밀로이드 A4, 구성적	6291	1.73735951	0.01243724	0.0131173

프로브ID = 애절런트 전체 인간 게놈 마이크로레이 상의 프로브의 식별 번호; 유전자 기호 = NCBI 엔트레즈 유전자 기호; 유전자명 = NCBI 엔트레즈 유전자명; 엔트레즈 ID = NCBI 엔트레즈 유전자 ID; logFC = IPF 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균 마이너스 건강한 대조 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균; p-값 = 프로브당 IPF 및 대조군 사이의 차등 발현에 대한 t-검정을 이용하여 계산됨; adj. p-값 = 본페로니 방법을 이용하여 다중 시험에 대해 조정됨.

[0170]

[0171]

IPF에서 이질성을 나타내는 고도로 공동조절된 유전자의 제2 클러스터 (군 2 클러스터; 도 1a)는 림프성 여포에 관련된 유전자 (또한, 응집체로 지칭됨)를 포함하였다. 하기 유전자 군은 IPF 환자의 군 2 클러스터에서 상향 조절되었다: B 세포-특이적 유전자 (CD19, CD20 [MS4A1], BCMA [TNFRSF17], BLK 및 BLNK); 다중 이뮤노글로불린 유전자 및 CD79A 및 CD79B; T 세포 및 APC 유전자 (CD27, CD28, CD1); Fc 수용체 유전자 (FCRLA, FCRL2, FCRL5); 및 케모카인 및 그의 수용체 (CXCL13, CXCR3, CXCR5, CCR6, CCR7). 유전자 발현의 이러한 패턴은 IPF 생검에서 활성 섬유증 영역에서의 증가된 림프구 수를 보여주는 이전의 보고와 일치한다 (문헌 [Nuovo et al., Mod. Pathol. (2011) 1-18]). 본 발명자들은 이러한 고도로 공동조절된 유전자 군을 선택하고, 이들 "림프성" 유전자의 발현 패턴에 한정된 데이터셋을 재클러스터링하였다 (도 1c). 이러한 분석은 림프성 유전자의 낮은, 중간 또는 높은 등위 발현을 특징으로 하는 3개의 주요 하위셋을 생성한다. 낮은 발현 군은 모든 대조군 및 몇몇 IPF 대상체를 포함하는 반면, 중간 및 높은 발현 군은 나머지 IPF 대상체를 포함하였다.

표 3

림프성 여포 유전자 발현 시그니처와 연관된 차등 발현된 유전자 (>1.5배 상향조절됨, q<0.05)의 부분 목록.

프로브 ID	유전자 기호	유전자명	엔트레즈 ID	LogFC	p- 값	adj. p-값
A_23_P114299	CXCR3	케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 3	2833	1.46371763	6.45E-09	3.29E-07
A_24_P252945	CXCR5	케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 5	643	2.37673236	2.81E-05	2.99E-04
A_23_P121695	CXCL13	케모카인 (C-X-C 모티프) 리간드 13	10563	3.4378017	0.00012013	9.96E-04
A_24_P234921	CCR6	케모카인 (C-C 모티프) 수용체 6	1235	2.56106982	1.49E-10	1.65E-08
A_23_P343398	CCR7	케모카인 (C-C 모티프) 수용체 7	1236	3.29053652	2.33E-12	5.59E-10
A_23_P113572	CD19	CD19 분자	930	2.01576251	3.16E-05	3.30E-04
A_23_P116371	MS4A1 (CD20)	막-스패닝 4-도메인, 서브패밀리 A, 구성원 1	931	2.39890071	1.31E-05	2.86E-05
A_23_P37736	TNFRSF17 (BCMA)	종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 17	608	2.44042243	2.62E-05	5.09E-05
A_23_P31725	BLK	B 림프성 티로신 키나제	640	1.58760468	0.0035697	1.58E-02
A_24_P64344	BLNK	B-세포 덩커	29760	0.90832362	0.00025269	1.84E-03
A_23_P46039	FCRLA	Fc 수용체-유사 A	84824	1.64791428	0.00036031	2.47E-03
A_23_P160751	FCRL2	Fc 수용체-유사 2	79368	1.44435616	0.00408379	1.75E-02
A_23_P201211	FCRL5	Fc 수용체-유사 5	83416	2.47293587	2.31E-06	3.96E-05
A_23_P107735	CD79A	CD79a 분자, 이뮤노글로불린	973	1.45014719	0.0006872	4.19E-03

[0172]

		-연관 알파				
A_23_P207201	CD79B	CD79b 분자, 이뮤노글로불린- 연관 베타	974	1.13800823	0.00031683	2.22E-03
A_23_P48088	CD27	CD27 분자	939	1.4445514	1.87E-06	3.38E-05
A_23_P91095	CD28	CD28 분자	940	3.18508221	1.28E-13	5.59E-11
A_23_P63167	CD1A	CD1a 분자	909	2.71941185	1.34E-08	6.07E-07
A_23_P351844	CD1B	CD1b 분자	910	1.13359253	0.00323118	1.45E-02
A_23_P51767	CD1C	CD1c 분자	911	2.00435627	4.79E-09	2.57E-07
A_23_P201160	CD1E	CD1e 분자	913	1.75899432	0.00031177	2.20E-03
A_24_P367432	IGHV1-69	이뮤노 글로불린 중쇄 가변 1-69	28461	3.31557265	6.44E-10	5.39E-08
A_24_P605563	IGLJ3	이뮤노 글로불린 람다 연결 3	28831	3.1763507	2.66E-08	1.07E-06
A_23_P167168	IGJ	이뮤노 글로불린 J 폴리펩티드, 이뮤노 글로불린 알파 및 뮤 폴리 펩티드에 대한 링커 단백질	3512	2.99945067	2.33E-06	3.98E-05
A_24_P204727	IGHV3-48	이뮤노글로불린 중쇄 가변 3-48	28424	2.68775596	1.20E-07	3.66E-06
A_24_P465799	IGLV3-21	이뮤노글로불린 람다 변수 3-21	28796	2.40390705	5.16E-08	1.87E-06
A_32_P722809	IGKV1-5	이뮤노글로불린 카파 가변 1-5	28299	2.25836578	1.69E-05	1.97E-04
A_23_P390209	IGHG1	이뮤노글로불린 중쇄 불변 감마 1 (G1m 마커)	3500	2.23089237	0.00120748	6.60E-03
A_24_P263786	IGKC	이뮤노글로불린 카파 불변	3514	2.17465687	0.00103502	5.84E-03
A_24_P361816	IGLV6-57	이뮤노글로불린 람다 변수 6-57	28778	2.15352717	1.79E-06	3.25E-05
A_24_P677559	IGK@	이뮤노글로불린 카파 로커스	50802	2.02637845	8.18E-08	2.70E-06
A_24_P395415	IGHA1	이뮤노글로불린 중쇄 불변 알파 1	3493	1.93646716	0.00186451	9.26E-03
A_24_P306905	IGKV2-24	이뮤노글로불린 카파 가변 2-24	28923	1.89765893	4.50E-06	6.74E-05
A_24_P93523	IGKV1D-8	이뮤노글로불린 카파 가변 1D-8	28904	1.82178807	4.23E-05	4.21E-04
A_24_P417352	IGHM	이뮤노글로 불린 중쇄 불변 뮤	3507	0.71477012	0.00015195	1.21E-03

프로브ID = 애절린트 전체 인간 게놈 마이크로어레이 상의 프로브의 식별 번호; 유전자 기호 = NCBI
엔트레즈 유전자 기호; 유전자명 = NCBI 엔트레즈 유전자명; 엔트레즈 ID = NCBI 엔트레즈 유전자
ID; logFC = IPF 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균 마이너스 건강한 대조 샘플에서의 로그 베이스 2
발현 수준의 평균; p-값 = 프로브당 IPF 및 대조군 사이의 차등 발현에 대한 t-검정을 이용하여 계산됨;
adj. p-값 = 본페로니 방법을 이용하여 다중 시험에 대해 조정됨.

[0173]

[0174]

IPF에서 이질성을 나타내는 고도로 공동조절된 유전자의 제3 클러스터는 근섬유모세포로의 섬유모세포 분화 및 상처 치유와 관련된 유전자를 포함하였다. 이러한 클러스터는 콜라겐 (COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL12A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL18A1, CTHRC1); 성장 인자 (HGF, IGFBP7, SCGF); 리실 옥시다제 (LOXL1, LOXL2); 헷지호그 신호전달의 매개자 (GLI1, GLI2, SMO); Wnt 신호전달의 매개자 (SFRP2, DIO2), CDH11, 페리 오스틴 및 TGFβ3을 코딩하는 다중 유전자를 포함하였다. 이러한 패턴은 IPF에서 근섬유모세포 및/또는 섬유모 세포성 초점과 연관된 다수의 이들 매개자의 상승된 발현을 보여주는 이전의 보고와 일치한다 (문헌 [Elliott et al., J. Cell Science 125:121-132 (2012); Barry-Hamilton et al., Nature Med. 16:1009-1017 (2010); Schneider et al., FASEB 26:503-512 (2012); Okamoto et al., The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127 (2011); Guy et al., Hepatology doi: 10.1002/hep.25559 (2011), Lam et al., Curr. Op. in Rheum. 23:562-567 (2011); Lomas et al., Intn'l J. Clin. and Exp. Pathol. 5:58-71 (2102)]). 본 발명자들은 이러한 고도로 공동조절된 유전자 군을 선택하고, 이들 "근섬유모세포" 유전자의 발현 패턴에 한정된 데이터세트를 재클러스터링하였다 (도 1d). 이러한 분석은 근섬유모세포-관련 유전자의 낮은, 중간 또는 높은 등위 발현을 특징으로 하는 3개의 주요 하위

세트를 생성하였다. 낮은 발현 군은 모든 대조군 및 몇몇 IPF 대상체를 포함하는 반면, 중간 및 높은 발현 군은 나머지 IPF 대상체를 포함하였다.

표 4

근섬유모세포 유전자 발현 시그니처와 연관된 차등 발현된 유전자 (>1.5배 상향조절됨, q<0.05)의 부분 목록.

프로브 ID	유전자 기호	유전자명	엔트레즈 ID	LogFC	p-값	adj. p-값
A_24_P254789	COL14A1	콜라겐, 유형 XIV, 알파 1	7373	3.41189889	2.34E-16	2.58E-14
A_23_P112554	COL15A1	콜라겐, 유형 XV, 알파 1	1306	2.26212501	2.40E-10	1.65E-09
A_23_P207520	COL1A1	콜라겐, 유형 I, 알파 1	1277	2.12583648	3.83E-08	1.56E-07
A_24_P277934	COL1A2	콜라겐, 유형 I, 알파 2	1278	1.10628708	0.00034794	0.00045028
A_23_P33196	COL5A2	콜라겐, 유형 V, 알파 2	1290	1.05662729	0.00154581	0.00171757
A_24_P291814	COL12A1	콜라겐, 유형 XII, 알파 1	1303	0.97095129	0.00038437	0.00048047
A_23_P211212	COL18A1	콜라겐, 유형 XVIII, 알파 1	80781	0.96802064	7.89E-06	1.58E-05
A_23_P160318	COL16A1	콜라겐, 유형 XVI, 알파 1	1307	0.7694129	0.00031612	0.00042374
A_23_P111888	CTHRC1	콜라겐 3중 나선 반복부 함유 1	115908	2.96408731	5.87E-10	3.80E-09
A_23_P153489	CLEC11A	C-유형 렉틴 도메인 패밀리 11, 구성원 A	6320	0.63080724	0.00020336	0.00028316
A_23_P93787	HGF	간세포 성장 인자 (헤파로이엔틴 A; 스캐터 인자)	3082	0.82101019	8.11E-05	0.00012564
A_23_P353035	IGFBP7	인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 7	3490	0.96418065	3.14E-06	6.91E-06
A_23_P124084	LOXL1	리실 옥시다제- 유사 1	4016	1.19477688	7.34E-07	2.02E-06
A_23_P111995	LOXL2	리실 옥시다제- 유사 2	4017	0.71925849	0.00080392	0.00094075
A_23_P105251	GLI1	GLI 패밀리 아연 핑거 1	2735	2.08216778	4.61E-11	3.84E-10
A_23_P500034	GLI2	GLI 패밀리 아연 핑거 2	2736	1.53294083	7.06E-09	3.24E-08
A_23_P70818	SMO	편평화된, 프리즐드 패밀리 수용체	6608	1.50997486	6.02E-12	8.28E-11
A_24_P137501	SFRP2	분비된 프리즐드- 관련 단백질 2	6423	4.337804	1.89E-14	6.94E-13
A_23_P48740	DIO2	데아이오디나제, 아이오도티로닌, 유형 II	1734	3.33676014	5.27E-15	2.90E-13
A_23_P152305	CDH11	카드헤린 11, 유형 2, OB- 카드헤린 (골모세포)	1009	0.7647008	0.00102531	0.00115274
A_24_P347411	POSTN	페리오스틴, 골모세포 특이적 인자	10631	2.13051858	1.37E-07	4.85E-07
A_24_P373096	TGFB3	형질전환 성장 인자, 베타 3	7043	1.91410548	0.00011172	0.0001617

프로브ID = 애질런트 전체 인간 게놈 마이크로레이 상의 프로브의 식별 번호; 유전자 기호 = NCBI 엔트레즈 유전자 기호; 유전자명 = NCBI 엔트레즈 유전자명; 엔트레즈 ID = NCBI 엔트레즈 유전자 ID; logFC = IPF 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균 마이너스 건강한 대조 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균; p-값 = 프로브당 IPF 및 대조군 사이의 차등 발현에 대한 t-검정을 이용하여 계산됨; adj. p-값 = 본페로니 방법을 이용하여 다중 시험에 대해 조정됨.

세기관지, 림프성 및 근섬유모세포 시그니처가 개별 대상체에서 서로 관련되는지 결정하기 위해, 본 발명자들은 각각의 클러스터에서 모든 유전자의 정규화된 평균 발현을 구함으로써 각각의 시그니처에 대한 발현의 인덱스를 생성하였다. 이는 본 발명자들이 각각의 시그니처의 강도를 개별 환자 기반 상에서 비교하도록 허용하였다. 대부분의 IPF 대상체는 대조군보다 높은 세기관지, 림프성 또는 근섬유모세포 시그니처 스코어를 갖는 반면, 각각의 스코어 및 2개의 시그니처가 개별 대상체 내에서 IPF와 어떠한 유의한 상관관계 패턴도 나타내지 않는 광범위한 가변성이 존재하였다 (도 1e). 이러한 결과는 3개의 시그니처가 IPF 환자에 걸쳐 이질적으로 발현되는 직교 과정 및/또는 IPF 조직에 반영된 이질적 과정의 차등 샘플링을 반영할 수 있다는 것을 시사한다.

각각의 3개의 시그니처에 포함된 선택된 유전자가 IPF 폐 조직의 공간적으로 구별되는 영역에서 발현되는지 여

부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 IPF 폐 체외이식편으로부터 얻은 생검 조직의 동결된 절편 (N=5) 상에서 면역조직화학 (IHC)을 수행하였다. 본 발명자들은 벌집형 낭포에 의해 특성화된 바와 같은 세기관지화의 영역이 풍부한 세포질을 갖는 원주형 상피 세포로 연결되어 있다는 것을 발견하였으며 (도 2a), 이는 콜라겐 침착 영역에 가까우나 이와 구별되었다 (도 2b). 이러한 상피 세포는 세기관지 시그너처에 포함되는 유전자에 의해 코딩되는 단백질인 케라틴 14에 대해 양성으로 염색되었으며 (도 2c), PAS 염색에 의해 검출된 바와 같이 뮤신을 발현하였다 (도 2d). 공간적으로 구별되는 구역에서, 본 발명자들은 H&E에 의해 어둡게 염색된 핵을 갖는 세포의 응집체를 관찰하였으며 (도 2e), 이는 높은 콜라겐 침착 영역에 가까우나 이와 구별되었다 (도 2f). 이러한 응집체는 림프성 시그너처에 포함되는 유전자에 의해 코딩되는 B 세포 표면 마커인 CD20에 대해 양성으로 염색되었다 (도 2 g-h). 세기관지화된 영역은 림프성 응집체와 공간적으로 구별되고 (도 2i 및 j), 세기관지화된 영역 및 림프성 응집체는 둘 다 종종 높은 콜라겐 침착의 영역에 가까우나 이와 공간적으로 구별되는 곳에서 발생하였으며 (도 2 b 및 f); 다중 콜라겐 유전자는 섬유모세포 시그너처에 포함된다.

[0178] 후보 혈청 바이오마커를 코딩하는 차등 발현된 유전자의 확인

[0179] 후보 혈청 바이오마커를 코딩하는 것으로 평가하기 위한 것일 뿐만 아니라 다르게는 바이오마커로서 평가하기 위한 후보 혈액 단백질을 확인하기 위한 후보 유전자의 목록을 좁히기 위해, 본 발명자들은 UCSF 코호트 1 데이터세트 및 GSE10667 데이터세트 둘 다에서 IPF에서의 > 2배 상향조절 ($q < 0.05$)의 보다 엄격한 컷오프를 적용하였다 (문헌 [Konishi et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180(2):167-75 (2009)]). 이러한 분석은 양쪽 데이터세트에서 통상적으로 상향조절되는 291개의 유전자를 생성하였다 (표 5 참조). 이들 중에서 말초 혈액에서 검출가능할 수 있는 세포의 및/또는 분비 단백질을 코딩하는 통상적인 유전자가 몇 개 있었으며, 따라서 이들은 가능한 혈청 또는 다른 바이오마커로서 추가의 평가를 위해 우수한 후보일 것이다. 이들 결과 및 이전에 공개된 데이터, 및 혈청 바이오마커 검출을 위해 용이하게 이용가능한 검정에 기초하여, 본 발명자들은 YKL-40, COMP, OPN, MMP7, 페리오스틴, CXCL13, CCL11 (에오타신), CCL13, CCL17 (TARC), CCL18, MMP3 및 혈청 아밀로이드 A (SAA), 특히 구성적 SAA, SAA4를 IPF에서의 후보 예후 혈액 바이오마커로서 선택하였다. (예를 들어, 문헌 [Korthagen et al., Resp. Med. 105:106-113 (2011), Pardo et al., PLoS Med. 2(9):891-903 (2005), Richards et al., Am J Respir Crit Care Med, doi:10.1164/rccm.201101-00580C (2011), Yokoyama et al., Respirology 11:164-168 (2006), Kinder et al., Chest 135:1557-1563 (2009)] 참조). 또한, CCL18은 본 발명자들의 마이크로어레이 실험에서 유의하게 DE로서 검출되지는 않았으나 IPF에서의 생존에 대한 예후 바이오마커인 것으로 이전에 보고되었다 (문헌 [Prasse et al., Am J. Respir. Crit. Care Med. 179:717-723 (2009)]).

[0180] 혈액 바이오마커를 그의 예측되는 생물학과 관련된 다양한 카테고리에 따라 선택하였다. CCL11, CCL13, CCL17 및 CCL18은 유형 2 염증과 연관된 케모카인이다. 본 발명자들은 CCL13 및 CCL17이 천식에서 IL13 차단에 반응하여 약역학적으로 조정된다는 것을 이전에 밝혀내었다 (문헌 [Corren The New England journal of medicine 365:1088-1098 (2011)]). 페리오스틴은 IL13 생물학과 관련되고 (문헌 [Corren The New England journal of medicine 365:1088-1098 (2011); Woodruff et al., Proc Natl Acad Sci U S A 104:15858-15863 (2007); Woodruff et al., Am J Respir Crit Care Med 180:388-395 (2009); Jia et al., The Journal of allergy and Clinical immunology 130(3):647-654.e10 (2012)]), 또한 상기 기재된 섬유모세포 유전자 시그너처에서 대표적인 유전자이다. CXCL13은 림프성 응집체에서 고도로 발현되는 B 세포 화학유인물질이고, 상기 기재된 림프성 유전자 시그너처에서 대표적인 유전자이다. MMP3 및 SAA4는 상기 기재된 세기관지 유전자 시그너처에서 대표적인 유전자이다. YKL-40은 골수 세포 활성화와 연관된 키티나제-유사 단백질이고, 전신 수준은 다발성 질환 상태에서 상승된다. 이전에 공개된 연구는 YKL-40이 IPF에서 고도로 발현되며, YKL-40의 혈청 수준이 생존에 대한 예후임을 밝혀내었다 (문헌 [Korthagen et al., Respiratory medicine 105:106-113 (2011)]). COMP는 TGF β 에 의해 유도되고, 경피증에서 근섬유모세포에서 고도로 발현된다 (문헌 [Farina et al., Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 25:213-222 (2006); Farina et al., Annals of the rheumatic diseases 68:435-441 (2009)]). OPN 및 MMP7은 IPF 조직에서 고도로 발현되고; OPN의 혈액 수준은 IPF에서 폐 기능과 부정적인 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌으며 (문헌 [Kadota et al., Respiratory medicine 99:111-117 (2005)]), MMP7의 혈액 수준은 IPF에서 생존에 대한 예후인 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Richards et al., Am J Respir Crit Care Med 185(1):67-76 (2012)]).

[0181] IPF 폐에서 이들 후보 바이오마커 유전자의 차등 발현을 확인하기 위해, 본 발명자들은 마이크로어레이 실험에 사용된 동일한 RNA 샘플 상에서 정량적 RT-PCR (qPCR) (방법 참조)을 수행하였다. 표 6은 마이크로어레이 유전자 발현 데이터를 보여주고, 도 3a-g는 qPCR 데이터를 보여준다. 표 6 및 도 3a-g에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 대조군에 비해 IPF 환자에서 각각 선택된 후보 바이오마커 유전자의 유의하게 상승된 발현을 관찰하였

다.

표 5

2개의 독립적인 IPF 데이터세트에서의 차등 발현된 유전자 (>2.0배 상향조절됨, $q < 0.05$)의 부분 목록.

유전자 기호	GSE10667 adj. p-값	GSE10667 logFC	UCSF 코호트 1 adj. p-값	UCSF 코호트 1 logFC
CHI3L1 (YKL-40)	0.010960171	1.39622824	1.19997E-07	2.972810559
CCL13	0.000480298	1.650926419	0.029881609	1.104407622
COMP	1.64133E-10	4.382169308	2.0246E-06	2.52240034
CXCL13	0.005238542	2.637421496	0.000629905	3.437801699
MMP7	3.26412E-05	2.874722338	6.8955E-11	3.413531235
POSTN	8.94681E-05	2.473564333	8.46908E-06	2.103941264
SPP1 (OPN)	5.94635E-07	3.762235672	8.37419E-05	3.64564152

유전자 기호 = NCBI 엔트레즈 유전자 기호; logFC = IPF 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균
마이너스 건강한 대조 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균; adj. p-값 = 본페로니 방법을 이용하여
다중 시험에 대해 조정됨..

[0182]

표 6

마이크로어레이에 의해 결정된 바와 같은 IPF 생검에서의 후보 바이오마커 유전자의 유전자 발현

유전자 기호	변화 배수, 마이크로어레이 (log ₂)	q-값, 마이크로어레이
SPP1 (OPN)	3.65	8.4×10^{-5}
MMP7	3.41	6.9×10^{-11}
CXCL13	3.44	6×10^{-4}
CHI3L1 (YKL-40)	2.97	1.3×10^{-6}
COMP	2.52	2.0×10^{-6}
POSTN	2.10	8.5×10^{-6}
CCL13	1.10	0.03

[0183]

[0184]

대조군에 비해 IPF에서 선택된 유전자의 상승된 유전자 발현 수준이 말초 혈액에서 이들 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 상승된 수준에 상응하는지 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 코호트 2 IPF 샘플 (N = 80) 및 건강한 대조군으로부터의 샘플에서 혈장 (OPN) 또는 혈청 (모든 기타)에서의 그의 수준을 평가하였다. 혈장 대조군의 경우에, N = 10; 혈청 대조군의 경우에, N = 29. 각각의 혈액 바이오마커 검정을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0185]

모든 IPF 환자를 모든 대조군과 비교하였을 때, YKL-40, COMP, OPN, MMP7, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18, SAA 및 CXCL13의 말초 혈액 수준은 IPF에서 유의하게 상승하였다 (표 7). IPF 대 대조군에 대한 윌콕슨(Wilcoxon) 순위-합을 이용하여, 본 발명자들은 다음 p-값을 획득하였다: YKL-40, COMP, MMP7, CCL13, CCL18 및 CXCL13, $p < 10^{-4}$; OPN, $p = 0.04$. 일부 IPF 환자는 대조군에 비해 상승된 수준의 혈청 페리오스틴 또는 MMP3을 가졌으나, 전반적인 이러한 차이는 통계적 유의성에 도달하지 않았다. 이전의 보고는 상승된 수준의 페리오스틴이 IPF 폐 및 말초 혈액에서 검출될 수 있다는 것을 시사하였다 (문헌 [Okamoto et al., The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127 (2011)]). 면역조절 요법 (특히, 코르티코스테로이드)은 페리오스틴의 유전자 발현 수준을 감소시킬 수 있는 것으로 이전에 밝혀졌으며 (문헌 [Woodruff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 104(40):15858-63 (2007); Woodruff et al., Am J. Respir. Crit. Care Med. 180(5):388-95 (2009)]), 페리오스틴의 말초 혈액 수준은 이러한 요법의 존재 하에 유사하게 감소될 것으로 예상된다. 따라서, IPF 환자에서의 혈청 페리오스틴 수준의 변화 및 대조군에 대한 유의한 차이의 결여는 21명/80명의 IPF 환자가 샘플 수집 시점에 면역조절 요법 (IT, 전신 코르티코스테로이드 또는 아자티오프린)을 받고 있는 중이었다는 사실에 의해 설명될 수 있다.

[0186]

따라서, 본 발명자들은 페리오스틴을 포함하는 임의의 바이오마커의 말초 혈액 수준이 IT 상에 있는 IPF 환자 대 IT 상에 있지 않은 IPF 환자 사이에서 상이하였는지 여부를 조사하였다. IT 상에 있는 IPF 환자는 IT 상에 있지 않은 IPF 환자에 비해 COMP 및 페리오스틴의 보다 낮은 수준을 나타내는 경향을 나타내었다. 대조적으로, IT 상에 있는 IPF 환자는 IT 상에 있지 않은 IPF 환자에 비해 유의하게 상승된 수준의 CXCL13, MMP3 및 SAA를 가졌다 (표 7). IT 상태에 따른 임의의 다른 바이오마커의 수준에서 유의한 차이 또는 이러한 수준의 차이를

나타내는 경향은 없었다.

표 7

IPF 환자 및 대조군에서의 혈액 바이오마커 수준의 범위 및 분포.

바이오마커	대조군에서의 중앙값 수준 (IQR) ¹	IPF 환자에서의 중앙값 수준 (IQR) ¹	IT 상에 있지 않은 IPF 환자 (N=59)에서의 중앙값 수준 (IQR)	IT 상에 있는 IPF 환자 (N=21)에서의 중앙값 수준 (IQR)
POSTN (ng/ml)	26.6 (23.9-33.8)	28.6 (23.3-38.4)	30.0 (23.4-39.4)	25.0 (21.5-35.1) ³
CCL11 (pg/ml)	257 (188-292)	225 (259-447) ²	335 (259-440)	340 (255-456)
CCL13 (pg/ml)	159 (111-215)	299 (226-400) ²	300 (244-387)	297 (193-441)
CCL17 (pg/ml)	275 (228-411)	510 (304-823) ²	453 (298-760)	572 (353-1083)
CCL18 (ng/ml)	42 (29-51)	94 (76-122) ²	94 (77-119)	100 (74-124)
MMP3 (ng/ml)	20 (14-26)	22 (16-42)	20 (11-26)	45 (26-112) ²
SAA (ng/ml)	695 (286-1038)	1618 (773-4625) ²	1234 (630-2543)	4625 (2910-8815) ²
CXCL13 (pg/ml)	28 (22-39)	80 (55-136) ²	69 (50-125)	113 (82-221) ²
COMP (ng/ml)	540 (432-720)	901 (706-1163) ²	943 (756-1191)	749 (576-1101) ³
OPN (ng/ml)	51 (41-68)	69 (53-85) ²	68 (53-83)	70 (47-89)
YKL-40 (ng/ml)	41 (23-54)	105 (76-170) ²	104 (74-158)	110 (77-195)
MMP7 (ng/ml)	2.7 (2.4-3.5)	7.4 (5.9-9.4) ²	7.5 (6.2-9.4)	6.6 (5.0-9.8)

¹ = 오스테오폰틴 및 MMP3을 제외한 모든 바이오마커의 경우, N = 29 대조군 및 N = 80 IPF 환자, 값은 혈청 수준임; 오스테오폰틴의 경우, N = 10 대조군 및 N = 80 IPF 환자, 값은 혈장 수준임; MMP3의 경우, N = 29 대조군 및 N = 78 IPF 환자; IQR = 사분위수간 범위, 25th-75th 백분위수.

² = 대조군보다 IPF에서 유의하게 더 높음, 윌콕슨 순위-합 검정에 의해 $p < 0.05$.

³ = 면역조절 요법 (IT) 상태에 의해 IPF 환자 사이에 유의하게 상이한 경향이 있음, 윌콕슨 순위-합 검정에 의해 $p < 0.1$.

[0187]

[0188]

본 발명자들은 다음에 개별 바이오마커 및 인구통계학적 및 임상적 변수 사이의 상관관계를 평가하였다. 시험된 8개의 바이오마커 중에서, 오직 OPN이 이전 흡연 상태에 의해 유의한 차이를 나타내었으며, 여기서 혈장 OPN 수준은 비흡연자에서보다 흡연 경험자에서 낮았다 ($p=0.01$, 테이터는 나타내지 않음). 임상적 변수의 비교에서, 본 발명자들은 예상된 바와 같이 예측된 전체 폐 용량 (TLC) % 및 예측된 강제 폐활량 (FVC) % 사이에서 뿐만 아니라 각각의 폐활량측정 변수 및 확산능 (예측된 DL_{CO} %) 사이에서 명목상 유의한 양성 상관관계를 관찰하였다. 본 발명자들은 또한 호흡곤란 스코어 (문헌 [Watters et al., Am. Rev. Respir. Dis. 133(1):97-103 (1986)]), 예측된 FVC % 및 예측된 DL_{CO} % 사이에서 부정적 상호상관관계를 관찰하였다 (표 8). 혈액 바이오마커 중에서, 본 발명자들은 일반적으로 MMP7, 페리오스틴 및 COMP 사이; 및 OPN, YKL-40, SAA, MMP3, CCL11 및 CXCL13 사이에서 약한 상호상관관계를 관찰하였으며; CCL13 및 CCL17 사이에서 강한 상호상관관계를 관찰하였다. 일반적으로 관찰된 낮은 상관관계 계수는, 전체적으로, 바이오마커의 수준이 주로 집단에 걸쳐 서로 직교한다는 것을 시사한다 (표 8). 본 발명자들은 또한 개별 바이오마커 및 임상적/인구통계학적 변수 사이에서 상대적으로 적은 유의한 상관관계를 관찰하였으며; 이들 중에서 CXCL13은 예측된 DL_{CO} %와 부정적으로 상관되고 호흡곤란 스코어와 긍정적으로 상관되었고; CCL11은 방사선험영 스코어와 긍정적으로 상관되었고; SAA는 예측된 TLC %와 부정적으로 상관되고 방사선험영 스코어 및 호흡곤란 스코어와 긍정적으로 상관되었고; MMP3은 예측된 FVC %와 부정적으로 상관되고 호흡곤란 스코어와 긍정적으로 상관되었으며; OPN 및 COMP는 연령과 약하게 상관되었다 (표 8).

표 8

바이오마커 및 임상적/인구통계학적 특징 사이의 상관관계.

변수	변수에 의함	r_s	p-값
예측된 TLC %	예측된 FVC %	0.83	0.0001
예측된 TLC %	예측된 DLCO %	0.34	0.0177
예측된 DLCO %	예측된 FVC %	0.34	0.0044
호흡곤란 스코어	예측된 DLCO %	-0.43	0.0004
호흡곤란 스코어	예측된 FVC %	-0.29	0.0118
방사선활영 스코어	예측된 FVC %	-0.37	0.0326
CXCL13 (pg/ml)	예측된 DLCO %	-0.35	0.0035
CXCL13 (pg/ml)	호흡곤란 스코어	0.40	0.0004
CCL11	방사선활영 스코어	0.44	0.0086
SAA	예측된 TLC %	-0.30	0.0427
SAA	방사선활영 스코어	0.43	0.0108
SAA	호흡곤란 스코어	0.35	0.0024
MMP3	예측된 FVC %	-0.25	0.0313
MMP3	호흡곤란 스코어	0.24	0.0427
OPN (ng/ml)	최초 방문시 나이	0.23	0.0395
COMP (ng/ml)	최초 방문시 나이	0.26	0.0239
MMP7 (ng/ml)	POSTN (ng/mL)	0.40	0.0002
MMP7	SAA	-0.29	0.0107
COMP (ng/ml)	POSTN (ng/mL)	0.24	0.0337
COMP (ng/ml)	MMP7 (ng/ml)	0.24	0.0342
OPN (ng/ml)	YKL40 (ng/mL)	0.23	0.0385
CXCL13 (pg/ml)	YKL40 (ng/ml)	0.26	0.0180
CXCL13 (pg/ml)	OPN (ng/ml)	0.27	0.0145
CXCL13	MMP3	0.37	0.0008
CXCL13	SAA	0.37	0.0009
CCL11	MMP3	0.23	0.0449
CCL11	YKL40	0.24	0.0333
CCL11	CCL13	0.25	0.0245
CCL11	CXCL13	0.29	0.0101
CCL13	CCL17	0.43	0.0001
SAA	MMP3	0.41	0.0002

r_s = 스피어만 순위 상관관계; p-값은 스피어만 상관관계를 참조함.

[0189]

[0190]

혈액 바이오마커의 예후 값 확립

[0191]

이전의 연구는 IPF 환자에서 폐 기능, 확산능, 흡연 상태 및 후속 생존 연령의 단일 시점 값에 대한 약한 예후 값을 나타내거나 또는 이러한 예후 값을 나타내지 않았다. 이러한 발견과 일치하게, 본 발명자들은 예측된 FVC %는 예외로 하고 개별적으로 얻은 이러한 임의의 변수에 대해 생존에 있어 임의의 현저한 차이를 관찰하지 못하였으며, 여기서 집단에 대해 예측된 중앙 FVC % 초과 (> 69%)를 나타내는 환자는 예측된 FVC% < 69%를 나타내는 환자보다 생존 이점을 가졌다 (HR = 0.37, p=0.02, 도 4).

[0192]

다양한 혈액 바이오마커의 후속 생존을 위한 예후 값을 평가하기 위해, 본 발명자들은 Cox 비례 위험 모델을 적용하여 각각의 혈액 바이오마커 (페리오스틴, CCL13, CCL18, 오스테오폰틴, COMP, YKL-40, MMP3, MMP7, SAA 및 CXCL13)의 예후 값을 개별적으로 평가하였다. 바이오마커 중에서, 본 발명자들은 기준선에서의 CXCL13, YKL-40, COMP, OPN, MMP3 및 SAA 수준이 후속 이식물-무함유 생존에 의해 IPF 환자를 유의하게 구별한다는 것을 발견하였다 (도 5a-d 및 표 9). 이전에 공개된 보고와는 대조적으로 (문헌 [Richards et al., Am J Respir Crit Care Med, doi:10.1164/rccm.201101-00580C (2011); Prasse et al., Am J Respir Crit Care Med 179:717-723 (2009)]), 본 발명자들은 이러한 코호트에서 MMP7 또는 CCL18의 수준에 대한 임의의 예후 값을 관찰하지 못하였으며, 본 발명자들은 이러한 코호트에서 시험된 임의의 다른 바이오마커 (CCL13 및 페리오스틴 포함)에 대해 통계적으로 유의한 예후 값을 관찰하지 못하였다.

표 9

IPF 환자에서 개별 바이오마커의 예후 값

바이오마커	Exp (계수)	p- 값
페리오스틴	1.017	0.2
CCL11	1.002	0.05
CCL13	1.000	0.7
CCL17	1.000	0.4
CCL18	0.994	0.3
MMP3	1.018	5.0×10^{-8}
SAA	1.000	3.0×10^{-4}
CXCL13	1.003	7.3×10^{-6}
COMP	1.000	0.030
OPN	1.026	0.004
YKL-40	1.006	0.010
MMP7	1.053	0.1

[0193]

[0194]

개별 예후 마커 CXCL13, YKL-40, OPN, COMP, MMP3 및 SAA의 수준이 IPF 환자 내에서 고도로 상호상관되지 않았기 때문에, 본 발명자들은 이들 마커의 조합이 예후 값에 대해 추가로 풍부화될 수 있는지 여부를 조사하였다. 본 발명자들은 수용자 작동 특성 (ROC) 분석을 이용하여 샘플 수집 후에 1, 2 및 3년에 걸쳐 사망률을 예측하기 위해 상기 나타난 6개의 바이오마커의 각각의 가능한 조합의 종합적 값을 평가하였다. 본 발명자들은 일반적으로 단일 바이오마커 또는 바이오마커의 쌍이 3개 이상의 바이오마커의 조합에 비해 불리하게 작동하였다는 것을 발견하였다 (도 6a). 조합하는 바이오마커의 최적의 최소 개수를 결정하기 위해, 본 발명자들은 6개의 바이오마커의 모든 가능한 조합의 2년째 ROC 분석의 곡선하 면적 (AUC) 및 기간 유의성을 평가하였으며, 3개의 바이오마커의 다수의 조합이 4개 이상의 바이오마커의 조합과 대등하게 작동하였다는 것을 발견하였다 (도 6b).

[0195]

카테고리에 걸쳐 IPF 환자 수의 상대적으로 대등한 분포를 달성하기 위해, 본 발명자들은 간단한 스코어링 시스템을 고안하였으며, 이에 의해 전체 코호트에 대한 중간 수준 초과와 기준선 바이오마커 수준은 각각 바이오마커에 대해 1의 스코어를 부여하였다. 따라서, 모든 4개의 바이오마커에 대해 중간 수준 미만의 바이오마커 수준을 갖는 환자는 0의 스코어를 할당하고, 1개의 바이오마커에 대해서는 중앙값 초과이고 다른 3개의 바이오마커에 대해서는 중앙값 미만인 경우에는 1의 스코어를 할당하는 등 하였다. 본 발명자들은 각각의 바이오마커에 대해 하기 값을 산출하였다. CXCL13에 대한 중간 수준은 80 pg/ml이고; YKL-40에 대한 중간 수준은 105 ng/ml이고; COMP에 대한 중간 수준은 901 ng/ml이고; OPN에 대한 중간 수준은 69 ng/ml이었다 (표 7 참조). 이러한 스코어링 시스템은 Cox 비례 위험 모델 ($p < 10^{-6}$, 도 7)을 이용하여 생존에 의해 환자의 군을 현저하게 구별하였다.

[0196]

ROC 분석에서 3개의 바이오마커의 조합 (MMP3, COMP 및 YKL40)을 수행하는 상단부를 이용하여, 카테고리에 걸쳐 IPF 환자 수의 상대적으로 대등한 분포를 달성하기 위해, 본 발명자들은 상기 기재된 스코어링 시스템을 적용하였으며, 여기서 모든 3개 바이오마커에 대해 중앙값 미만을 갖는 환자는 0의 스코어를 할당하고, 1개 바이오마커에 대해 중앙값 초과이고 다른 2개의 바이오마커에 대해 중앙값 미만인 경우에 1의 스코어를 할당하고, 임의의 2개의 바이오마커에 대해 중앙값 초과이나 제3 바이오마커에 대해 중앙값 미만인 경우에 2의 스코어를 할당하고, 모든 3개의 바이오마커에 대해 중앙값 초과인 경우에 3의 스코어를 할당하였다. 이러한 스코어링 시스템은 Cox 비례 위험 모델 ($p < 10^{-9}$, 도 8; 카플란-마이어 생존 데이터가 플롯팅됨)을 이용하여 생존에 의해 환자의 군을 현저하게 구별하였다. 0의 스코어를 15명의 환자 중에서, 단지 1명의 사망이 추적 기간 동안 기록된 반면, 3의 스코어를 갖는 모든 환자는 샘플 수집 500일 내에 사망하였다.

[0197]

따라서, 본 발명자들은 특정 바이오마커, CXCL13, YKL-40, COMP, OPN, MMP3 및 SAA의 혈액 수준을 측정하는 것 및 각각의 바이오마커의 값이 중간 수준 초과 또는 미만에 속하는지 여부를 결정하는 것을 이용하여 진단 시점에서 IPF 환자의 생존 예후를 평가할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 또한, 혈액 바이오마커 수준이 0, 1, 2, 3 또는 모든 4개의 바이오마커 CXCL13, YKL-40, COMP 및 OPN에 대해, 또는 0, 1, 2 또는 모든 3개의 바이오마커 MMP3, COMP 및 YKL-40에 대해 IPF 환자에 대한 중간 수준 초과인지 또는 그 미만인지 여부를 평가하기 위해 본원에 기재된 스코어링 시스템을 이용하는 것은 생존 예후의 정확도를 증가시킬 수 있다. 이러한 시스템은 공격성 치료적 개입 또는 폐 이식을 위한 환자를 확인하거나 또는 치료제의 임상 시험을 위한 환자를 계층화하는데

유용하다.

- [0198] IPF에서의 위험 예측은 치료 및 환자 관리 결정, 예컨대 폐 이식 결정을 내리는데 중요하고, 연구 치료제의 임상 시험에서 등록을 계층화하는데 유용하다. 폐의 직접적인 샘플링은 종종 IPF를 갖는 환자에서는 실시할 수 없거나 실행할 수 없으므로, 질환 활성 및 진행의 비침습적 평가가 유의한 값을 갖는다. 고해상도 컴퓨터 단층촬영 (HRCT), 폐활량측정법, 및 폐 기능, 예컨대 확산능 및 운동 허용성의 다른 측정을 통한 영상화는 시간 경과에 따라 반복된 측정을 통해 개별 환자의 질환의 진행을 모니터링하는데 일부 유용성을 가졌으나, 폐 기능의 단일 점 평가는 집단 기반 상에서 상대적으로 덜 알려져 있다 (문헌 [Ley et al., Am J. Respir. Crit. Care Med. 183:431-440 (2011)]). 본원에 기재된 바와 같은 혈액-기반 바이오마커는 여러 수준 상에서, 질환 활성의 예측성, 예후성, 약동학적 및 대용성 척도로서 IPF를 위한 약물 개발 및 그의 임상적 관리를 가능하게 할 잠재성을 갖는다.
- [0199] 예측된 바이오마커는 치료 전에 특정한 분자 경로의 활성의 증거를 제공하고, 표적화된 요법으로부터 이익을 얻을 가능성이 가장 큰 환자의 하위집단을 확인한다. 주어진 경로는 IPF 환자의 집단에 걸쳐 이질적으로 발현될 수 있으며, 그 경로를 표적화하는 작용제로부터의 임상적 이익을 확인하는 능력은 달리 미래에 확인될 수 없는 환자의 하위세트만이 이익을 나타낸다면 절충될 수 있다. 표적화된 요법으로부터 이익을 얻을 가능성이 가장 큰 IPF 환자를 확인하는 예측성 바이오마커는 치료 이론을 보다 엄격하게 시험하기 위해 임상 시험에서 등록을 계층화하는 것을 도울 수 있다.
- [0200] 예후 바이오마커는 미래의 질환 진행 또는 사망의 위험을 계층화한다. IPF에서의 높은 사망률을 고려하면, 성공적인 치료적 개입은 위약에 비해 수명을 유의하게 연장시킬 것으로 예상될 수 있다. 그러나, 질환 경로의 가변성을 고려하면, 여러 해 동안 다수의 환자를 치료하지 않고 조기 임상 시험에서 생존 이점을 평가하는 것은 도전할만한 것이다. 1-2년 기간 내에 유의한 질환 진행이 나타나거나 또는 사망할 가능성이 가장 큰 IPF 환자를 확인하는 예후 바이오마커는 시험 동안 진행할 가능성이 가장 큰 환자에서 단기 생존 이익이 존재하는지 여부를 평가하기 위한 임상 시험에서 등록을 계층화하는데 유용하다. 또한, 주어진 치료적 개입이 상대적으로 양호한 예후를 갖는 환자에게 이익을 주지만, 그의 질환이 비가역적 특정 시점을 지나 진행하는 환자에서는 비효과적일 수 있다. 예를 들어, BIBF1120의 최근 2상 연구의 하위군 분석은 폐 기능에 대한 대부분의 위약-조정된 이익이 기준선에서 70% 초과와 예측된 FVC를 갖는 환자에서 관찰된 반면, 70% 미만의 예측된 FVC를 갖는 환자는 많은 이익을 나타내지 않는다는 것을 보여주었다 (문헌 [Richeldi L et al., abstract, ERS 2011 Annual Congress]).
- [0201] 약동학적 바이오마커는 질환 과정에 관여하는 특정한 분자 경로의 근위 활성을 반영하여야 하며, 특정 치료적 개입에 반응하여 변화하여야 한다. 치료시의 약동학적 마커의 변화는 분자 개입이 그의 표적에 영향을 미치는지 여부 및 어느 정도 영향을 미치는지를 나타내며; 따라서 이러한 마커는 용량-범위 연구에서 적절한 용량을 선택할 수 있도록 도울 수 있다. 잘 규정되지 않은 단기 임상 결과 척도를 갖는 질환, 예컨대 IPF에서, 임의의 임상적 이익의 부재 하의 유의한 약동학적 효과는 시험 실패에 대한 이유로서 부적절한 표적 선택 및 부적절한 투여 사이를 구별하는 것을 도울 수 있다. 약동학적 마커와 같은 대용 바이오마커는 치료에 반응하여 변화하여야 하지만, 표적화된 경로에 먼 쪽일 수도 있고, 질환의 하류 징후 및 임상 결과에 보다 밀접하게 연결된다. 단기간에 걸친 대용 바이오마커의 변화는 아마도 예를 들어 생존 결과에 대한 지속적인 치료의 장기 효능을 나타낼 수 있을 것이다. 주어진 바이오마커는 임의의, 여러 개의 또는 모든 예측성, 예후성, 약동학적 및 대용 카테고리를 나타낼 수 있다.
- [0202] IL-13은 섬유증의 매개자이고, IPF에서 잠재적 치료 표적으로서 관련된다 (문헌 [Wynn, TA, J. Exp. Med. 208:1339-1350 (2011)]). 상기 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 IL-13 및 IL-13에 의해 잠재적으로 조절되는 유전자, 예컨대 IL13R α 2, CCL11, CCL13, CCL17, CCL18 및 페리오스틴이 IPF 환자로부터의 폐 생검에서 상승된 수준으로 발현된다는 것을 발견하였다. 한 II상 연구에서, 치료적 IL-13 차단은 천식에서 임상적 이익을 입증하였으며, 이익은 혈청 페리오스틴 수준에 의해 결정시에 그의 기도에서 상승된 IL-13 발현을 가질 것으로 예측되는 환자의 하위세트에서 증진되었다 (문헌 [Corren et al., New Engl. J. Med. 365:1088-1098 (2011)]). 상기 논의된 실험에서, 본 발명자들은 IPF 환자의 전체 코호트에 걸쳐, 혈청 페리오스틴 수준이 건강한 대조군에서 측정된 것보다 유의하게 높지 않다는 것을 발견하였다 (표 7). 그러나, 페리오스틴 수준은 IPF 환자의 하위 세트에서 분명하게 상승하였으며 (표 7), IPF에서 혈청 페리오스틴 수준의 분포는 중증의 천식에서 관찰된 것과 유사하다 (문헌 [Jia et al., The Journal of allergy and Clinical immunology 130(3):647-654.e10 (2012)]). 페리오스틴은 본원에 기재된 섬유모세포/근섬유모세포 시그너처에서 발현되고, IHC에 의해 IPF에서 섬유모세포성 초점에 국재화된다 (문헌 [Okamoto et al., The European respiratory journal : official

journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119-1127 (2011)). IL-13 차단이 IPF 환자에서 임상적 효능을 갖는다면, 이는 오직 상승된 예비처리 수준의 혈청 페리오스틴을 갖는 환자의 하위세트에서만 증명될 수 있다. 유사하게, 본 발명자들은 CCL13 및 CCL17 수준이 천식 환자에서 상승되고, 치료적 IL-13 차단에 반응하여 유의하게 감소한다는 것을 발견하였다 (문헌 [Corren et al., New Engl. J. Med. 365:1088-1098 (2011)]). CCL13 및 CCL17 수준이 IPF 환자에서 상승하므로, CCL13 및 CCL17은 또한 IPF에서 IL-13 경로 활성의 약동학적 마커로서 작용할 수 있다. CCL11은 IL-13에 반응하여 상향조절되는 기질 세포의 산물이다 (문헌 [Matsukura et al., Am. J. of Respir. Cell and Mol. Biol. 24:755-761 (2001)]). CCL18은 대안적으로 활성화된 대식세포의 산물이며 (문헌 [Prasse et al., Arthritis and Rheum. 56:1685-1693 (2007)]), 이들은 그 자체로 IL-13의 공급원일 수 있다 (문헌 [Kim et al., Nature Med. 14:633-640 (2008)]). 따라서, CCL11 및 CCL18은 또한 IPF에서의 IL-13 차단 치료 연구에서 예측성 및/또는 약동학적 바이오마커로 작용할 수 있다.

[0203] OPN, YKL-40, COMP, CXCL13, MMP3 및 SAA의 혈청 수준은 각각 IPF에서 후속 질환 진행을 유의하게 예측하였다. 그러나, 이들의 수준은 조사된 집단 사이의 환자 내에서 현저하게 상호상관되지 않았다. 각각의 마커는 상이한 세포 공급원에 의해 생성될 수 있고, IPF 병변 내의 상이한 병리학적 과정의 활성을 반영할 수 있다.

[0204] OPN은 IPF에서 상승된 수준으로 발현되고 (문헌 [Pardo et al., PLoS Med 2:e251 (2005)]), 그의 발현은 UIP 병변에서 섬유모세포성 초점 및 광형성 폐포 상피에 국재화된다 (문헌 [Kelly et al., Am J Respir Crit Care Med 174:557-565 (2006)]). OPN은 세포 부착, 이동, 염증 및 조직 재형성에서 역할을 수행할 것으로 생각되며 (문헌 [O'Regan, A., Cytokine & growth factor reviews 14:479-488 (2003)]), OPN-결핍성 마우스는 블레오마 이신-유도된 폐 섬유증으로부터 보호된다 (문헌 [Berman et al., American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 286:L1311-1318 (2004)]). 혈장 OPN 수준은 다른 연구자가 IPF 환자에서 상승되는 것으로 보고하였으며, IPF 내에서, OPN 수준은 산소 포화 및 부정적으로 상관된다 (문헌 [Kadota et al., Respiratory medicine 99:111-117 (2005)]).

[0205] YKL-40은 골수-유래 세포, 예컨대 활성화된 대식세포에 의해 주로 생성되는 키티나제-유사 단백질이다 (문헌 [Rehli et al., The Journal of Biological chemistry 278:44058-44067 (2003)]). 그의 전신 수준은 조직 재형성과 연관된 다수의 염증성 및 신생물성 상태에서 상승되며 (문헌 [Lee et al., Annual review of physiology 73:479-501 (2011)]), 본 발명자들의 발견은 기준선 혈청 YKL-40 수준이 IPF 환자에서 후속 사망률에 대한 예후라는 것을 보여주는 이전의 보고와 일치한다 (문헌 [Korthagen et al., Respiratory medicine 105:106-113 (2011)]).

[0206] COMP는 연골, 인대, 건 및 골에서 섬유모세포에 의해 주로 발현되는 세포외 매트릭스 단백질이다. 전신 경화증을 갖는 환자에서, 병변 피부 근섬유모세포는 상승된 수준의 COMP를 발현하는 것으로 밝혀졌으며, 그의 발현은 TGFβ에 의해 유도될 수 있다 (문헌 [Farina et al., Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology 25:213-222 (2006); Farina et al., Annals of the rheumatic diseases 68:435-441 (2009)]).

[0207] CXCL13은 여포성 수지상 세포에 의해 생성된 케모카인이다. 이는 그의 동족 수용체 CXCR5에 결합함으로써 B 세포를 2차 및 3차 림프성 구조에 동원하며, 둘 다 림프성 여포 형성에 요구된다 (문헌 [Ansel et al., Nature 406:309-314 (2000)]). 최근에, 림프성 응집체는 IPF 생검에서 UIP 병변과 연관되는 것으로 보고되었으며 (문헌 [Nuovo et al., Mod. Pathol. (2011) 1-18]), 높은 CXCL13 발현을 갖는 B 세포 침윤물이 신섬유증에서 보고되었다 (문헌 [Heller et al., The American journal of pathology 170:457-468 (2007)]). 혈청 CXCL13은 관절 미란의 중증도 (문헌 [Meeuwisse et al., Arthritis and rheumatism 63:1265-1273 (2011)]) 및 류마티스 관절염에서 리툭시맙 치료 후의 B 세포 재증식 (문헌 [Rosengren et al., Rheumatology (Oxford) 50:603-610 (2011)])의 바이오마커로서 기재되었다. CXCL13 발현은 본원에 기재된 림프성 시그니처와 클러스터링된다.

[0208] MMP3 및 SAA4는 본원에 기재된 세기관지 시그니처에서 발현된다. 상승된 MMP3 단백질 수준은 IPF 환자로부터의 BAL 유액에서 기재되었으나 (문헌 [Richter et al., Thorax 64:156-161 (2009)]), IPF에 대한 바이오마커로서의 MMP3의 전신 수준은 이전에 기재된 적이 없다. SAA는 다수의 염증성 상태에서 상승되는 급성-상 반응물이지만, IPF에 대한 바이오마커로서는 기재된 적이 없다.

[0209] 함께, IPF 환자에서 이들 6개의 바이오마커 (OPN, YKL-40, COMP, CXCL13, MMP3 및 SAA)의 각각의 전신 수준은 특징적인 병리학적 과정의 가변성 상대 기여를 반영할 수 있다.

- [0210] IPF 병리상태의 지리적 이질성 및 불균질 특성을 고려하여, 이들 바이오마커의 말초 혈액 수준은 단일의 작은 생검으로부터의 유전자 발현 수준보다 IPF에서 누적 질환 부담의 보다 포괄적인 그림을 제공할 수 있다. 6개의 바이오마커 (OPN, YKL-40, COMP, CXCL13, MMP3 및 SAA)의 대부분은 일반적으로 건강한 대조군에 비해 IPF 환자에서 상승되고, IPF 집단 내에서 이들 바이오마커의 각각의 상대 수준은 광범위하게 달라지며, 질환 진행에 대해 상이하게 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본원에 기재된 바와 같은 다양한 바이오마커의 조합 값은 심지어는 단일 마커보다 추가의 이익을 제공할 수 있다. 임상적 질환 진행과 관련하여 시간 경과에 따른 이들 마커의 역학을 평가하는 것이 흥미로운 것이다.
- [0211] 실시예 2 - IPF에서의 신호전달 경로의 특성화
- [0212] IL-13, TGF β , 및 헛지호그 (Hh) 경로를 포함하는 상피-중간엽 의사소통의 매개자는 특발성 폐 섬유증 (IPF)의 발병기전에 관련된다. 예를 들어, 마우스 폐에서의 트랜스제닉 IL-13 과다발현은 심각한 폐 섬유증을 유도하기에 충분한 것으로 밝혀졌으며 (문헌 [Zhu et al., J. Clin. Invest. 103(6):779-88 (1999)]), IL-13 결핍 마우스는 블레오마이신-유도된 섬유증 뿐만 아니라 주혈흉증-유도된 간 섬유증으로부터 부분적으로 보호된다. IL-13은 IL-13R α 1 및 IL-4R α 를 포함하는 헤테로머 수용체 복합체에 결합하며, 이 때 Jak 패밀리의 키나제는 IL-13 및 IL-4의 하류 신호전달을 매개하는 전사 인자인 STAT6을 인산화한다. 제2 IL13 수용체, IL13R α 2는 IL13R α 1/IL4R α 복합체에 대한 IL13 결합과 경쟁할 수 있는 비신호전달 디코이 수용체로서 관련되며, 이에 의해 STAT6 활성화를 감소시킨다. IL13R α 2는 STAT6-의존성 뿐만 아니라 STAT6-비의존성 신호에 의해 유도될 수 있으며, 섬유증 조직에서 상승된 수준으로 발현된다. 일부 보고 (문헌 [Fichtner-Feigl et al., Nat. Med. 12(1):99-106 (2006); Mandal et al., Inflamm Bowel Dis. 16(5):753-64 (2010)])는 이러한 연구가 세포주에서의 이소성 IL13R α 2 과다발현에 의존하며 IL13R α 2 신호전달에 대한 메커니즘이 불분명하게 남아있더라도 IL13R α 2가 섬유증에 기여할 수 있는 STAT6-비의존성 신호를 전환할 수 있다는 것을 시사하였다. IL13R α 2-결핍 동물은 증가된 조직 섬유증을 나타내는 반면 IL13R α 1-결핍 동물은 감소된 조직 섬유증을 나타낸다 (문헌 [Wilson et al., J. Clin. Invest. 117(10):2941-51 (2007); Mentink-Kane et al., Gastroenterology 141(6):2200-2209 (2011)]). 녹아웃 마우스에서 수행된 이러한 연구는 섬유증의 개시에 있어 IL13 및 그의 수용체에 대한 역할과 관련된 정보를 제공하는 반면, 인간 섬유화 질환에서와 같이 확립된 섬유증과 관련하여 해석하기는 더 어려웠다. 한 신체적 증거는 IL13R α 2가 리간드-수용체 연관성에 신호를 전달할 수 없는 디코이 수용체를 형성한다는 것을 시사하는 반면, 명백하게 상반되는 신체적 증거는 섬유증에서 IL13R α 2에 대한 긍정적 역할을 시사한다. 따라서, 인간 IPF에서 내인성 IL13 및 IL13R α 2의 역할은 잘 이해되지 않은 채로 남아있다.
- [0213] IPF에서의 분자 경로의 본 발명자들의 이해를 증진시키기 위해, 본 발명자들은 IPF 및 비-IPF, 대조군 조직에서 게놈-전반 전사 프로파일을 특성화하였다. 이러한 실험은 1차 폐 섬유모세포에서 IL13의 하류 신호전달 경로의 확인 및 특성화로 이어졌다.
- [0214] 물질 및 방법
- [0215] 인간 폐 조직 샘플
- [0216] 인간 폐 조직 샘플은 실시예 1에 상기 기재된 바와 같이 수득하였다.
- [0217] 조직 배양
- [0218] IMR-90 세포 (ATCC, 버지니아주 마나사스; 카탈로그 번호 CCL-186)를 10% FBS (시그마, 미주리주 세인트 루이스; 카탈로그 번호 F2442) 및 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드; 카탈로그 번호 15140)이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포를 성장 인자 감소된 매트릭셀 (GFR 매트릭셀) [BD 바이오 사이언시스, 매사추세츠주 베드포드; 카탈로그 번호 354230]의 베드 상에 플레이팅하였다. 매트릭셀을 밤새 얼음 상에서 해동시키고, 매트릭셀을 37°C에서 30분 동안 경화시켜 12-웰 플레이트에서 450 μ l/웰의 베드 부피를 생성하였다. 이어서, 세포 (1E5-2E5)를 매트릭셀 베드 상에 플레이팅하였다. 달리 나타내지 않는 한, IL-13 자극은 10 ng/ml (IL-13 및 TNF α) 및 3 ng/ml (IL4)로 수행하였다.
- [0219] RNA 제조
- [0220] 급속 동결된 폐 생검 샘플을 미리 냉각시킨 (액체 질소 중에) 베스만 조직 분쇄기 (스펙트럼 레보러토리즈, 캘리포니아주 란초 도밍게즈; 카탈로그 번호 189475)에서 분쇄하였다. 트리졸을 분쇄된 물질에 첨가하고, 수회 피펫팅하였다. 용해물을 얼음 상에서 10-15분 동안 인큐베이션하였다. 용해물을 추가의 처리시까지 -80°C에 저장하였다. RNA를 트리졸 용해물로부터 제조업체의 프로토콜에 따라 분리하였다. 이어서, 트리졸-단리된 RNA

를 제조업체의 프로토콜에 따라 퀴아젠 RNeasy 칼럼을 이용하여 또 다른 정제 단계에 적용하였다.

- [0221] 1ml (12-웰 플레이트에서 웰당) 트리졸을 첨가하고 혼합물을 수회 피펫팅함으로써 조직 배양된 세포를 수확하였다. 트리졸 용해물을 퀴아젠 RNeasy 프로토콜에 지시된 바와 같이 스틸 비드/티슈라이저 (퀴아젠) 방법 (20 s^{-1} , 4분)을 이용하여 균질화시켰다. 균질화시에, RNA를 트리졸 제조업체의 프로토콜에 따라 분리하였다. 이어서, 트리졸-단리된 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 퀴아젠 RNeasy 칼럼을 이용하여 또 다른 정제 단계에 적용하였다.
- [0222] RNA 농도를 나노드롭에 의해 결정하고, 모든 마이크로어레이 샘플을 바이오어날라이저 (애질런트)에 의해 분석하였다.
- [0223] RT-qPCR
- [0224] 100-300ng의 전체 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 고용량 cDNA 역전사 키트 (ABI, 카탈로그 번호 4368814)로 무작위 프라이머를 사용하여 역전사에 적용하였다. 실시간 qPCR을 택맨 검정을 이용하여 수행하였다. 모든 반응은 ABI 7900HT 기기 또는 플루이다임 플랫폼 (48.48 또는 96.96 포맷) 상에서 진행하였다.
- [0225] IL-13 리포터 검정
- [0226] L-Luc-Beas2B 세포 (ATCC, 카탈로그 번호 CRL-9609)를 다음 시약: 12ng/ml IL-13 (R&D 시스템스, 카탈로그 번호 213-IL) 및 항-IL13 차단 항체 (제넨테크)로 포매시킨 GFR 매트릭셀에서 성장시켰다. 반딧불이 루시페라제 활성을 제조업체의 프로토콜에 따라 오직 반딧불이 루시페라제가 측정되도록 변형된 듀얼-글로 루시페라제 검정 시스템 (프로메가, 카탈로그 번호 E2920)을 이용하여 측정하였다.
- [0227] 마이크로어레이 분석
- [0228] RNA를 증폭시키고, 퀵 앰프 표지 키트 (애질런트)를 이용하여 표지하여 1ug의 전체 RNA로부터 표지된 cRNA를 생성하였다. 실험 샘플을 Cy5로 표지하고; 유니버설 인간 참조 RNA (스트라타진, 캘리포니아주 라 줄라)를 참조 채널을 위해 사용하고, Cy3으로 표지하였다. Cy5 및 Cy3 표지된 cRNA를 2-색 전체 인간 게놈 4 x 44K 유전자 발현 마이크로어레이 플랫폼에 경쟁적으로 혼성화시켰다. 혼성화된 마이크로어레이를 제조업체 (애질런트)의 프로토콜에 따라 세척하고, 모든 특징적 강도를 애질런트 마이크로어레이 스캐너를 이용하여 수집하였다. 스캐닝된 슬라이드의 TIFF 영상을 특징 추출 소프트웨어 (애질런트), 프로토콜 GE2-v5_95 (애질런트)를 이용하여 분석하였다. 표시된 이상치는 임의의 후속 분석에 포함되지 않았다. 모든 데이터를 염료-정규화 Cy5/Cy3 비의 \log_2 값으로 보고하였다. 모든 샘플의 \log_2 비를 상응하는 모의-처리된 샘플 (또는 비-IPF 대조군)의 평균 \log_2 비에 대해 정규화하였다.
- [0229] 다양한 발현 프로파일링 데이터세트를 비교한 경우에, 공개적으로 이용가능한 데이터세트를 우선 여과하고, 정규화하고, 본래 연구에서와 같이 집중시켰다. 카민스키 데이터세트 (GSE10667)를 전체 인간 게놈 애질런트 마이크로어레이 플랫폼 상에서 진행시켰으며, 이에 따라 플랫폼 특이적 프로브 식별자를 이용하여 데이터세트를 연결하였다. 자바 트리뷰로 열지도가 생성되었다.
- [0230] R-코드 (LIMMA)에 3가지 인자: 진단, 조직 공급원 및 성별 (Y-연결된 유전자의 발현 분석으로부터 추정됨)를 혼입시키는 선형 모델을 구축함으로써 차등 발현된 유전자를 확인하였다.
- [0231] 결과
- [0232] IL13R α 2는 IPF 폐 조직에서 가장 차등 발현되는 유전자이다
- [0233] 본 발명자들은 40명의 IPF 환자 및 8명의 비-IPF 대조군 대상체로부터의 생검된 폐 조직의 게놈 광범위 트랜스크립톰 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 이러한 임상적 샘플로부터 RNA를 분리하고, 전체 인간 게놈 애질런트 마이크로어레이 (GEO 등록 ID)를 이용하여 전사체를 분석하였다. 제한된 이용가능한 메타데이터 [성별, 조직 공급원 (폐 이식 시점에 수확된 생검 또는 조직), 진단]를 사용된 선형 모델에 포함시켜 차등 발현된 유전자를 확인하였다.
- [0234] 본 발명자들은 대조군 조직에 비해 IPF 조직에서 차등 발현된 것으로 ($q < 0.05$, 배수-변화 $> |2|$) 1508개의 유전자를 확인하였다. 부분 목록이 표 10에 제시된다. 이 중에서 IPF에서 유의하게 상향조절되는 유전자는 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP1, 3, 7, 10, 11, 12, 13, 16), 콜라겐 (COL15A, 10A1, 8A2, 1A1, 24A1, 6A3, 7A1, 1A2, 5A2, 3A1, 17A1, 14A1) 및 IL-13 경로 유전자 (IL-13, IL13R α 2, POSTN, CCL13)이다. 실제로, IPF에서

가장 유의하게 상승되는 유전자는 IL13R α2였으며, 44-배 변화를 나타내었다 ($q = 3.4 \times 10^{-14}$). 본 발명자들은 정량적 RT-PCR을 수행함으로써 이러한 관찰을 검증하였다 (도 9).

표 10

IPF에서 IL-13 신호전달과 연관된 차등 발현된 유전자 (>1.5배 상향조절됨, $q < 0.05$)의 부분 목록.

프로브 ID	유전자 기호	유전자명	엔트레즈 ID	LogFC	p-값	adj. p-값
A_23_P85209	IL13RA2	인터류킨 13 수용체, 알파 2	3598	5.46608533	1.06E-17	5.45E-14
A_23_P251031	IL13	인터류킨 13	3596	3.60162356	8.56E-06	1.14E-04
A_23_P55632	SERPINB3	세르핀 팩타다제 억제제, 클레이드 B (오브알부민), 구성원 3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_24_P347411	POSTN	페리오스틴, 골모세포 특이적 인자	10631	2.10394126	5.96E-07	1.35E-05
A_24_P125335	CCL13	케모카인 (C-C motif) 리간드 13	6357	1.10440762	0.00986751	3.53E-02
A_23_P70818	SMO	편평화된 상동체 (트로소필라)	6608	1.44870366	1.65E-11	2.81E-09
A_23_P105251	GLI1	GLI 패밀리 아연 핑거 1	2735	2.08669039	1.87E-10	1.96E-08
A_23_P500034	GLI2	GLI 패밀리 아연 핑거 2	2736	1.57463899	8.12E-09	3.98E-07
A_24_P398572	IGF1	인슐린-유사 성장 인자 1 (소마토메딘 C)	3479	1.70343868	0.00081381	4.79E-03
A_23_P153571	IGFL2	IGF-유사 패밀리 구성원 2	147920	4.11862384	5.27E-08	1.90E-06
A_23_P102113	WNT10A	윙리스-유형 MMTV 통합 부위 패밀리, 구성원 10A	80326	2.83702687	1.14E-17	5.45E-14

프로브ID = 애절런트 전체 인간 게놈 마이크로레이 상의 프로브의 식별 번호; 유전자 기호 = NCBI 엔트레즈 유전자 기호; 유전자명 = NCBI 엔트레즈 유전자명; 엔트레즈 ID = NCBI 엔트레즈 유전자 ID; logFC = IPF 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균 마이너스 건강한 대조 샘플에서의 로그 베이스 2 발현 수준의 평균; p-값 = 리마 분석으로부터 선택 모델에서의 진단 기간의 효과 유의성의 공칭 p-값; adj. p-값 = 유전자가 통계학적으로 유의하게 될 최대 p-값에서 추정된 오류 발견율.

[0235]

[0236]

IL13R α2 발현은 배양된 1차 폐 섬유모세포에서 IL-13에 의해 유도된다

[0237]

상기 논의된 바와 같이, IL13R α2는 대조군, 비-IPF 샘플에 비해 IPF 샘플에서 대부분 고도로 차등 발현된 유전자이며, 대조군에서보다 IPF에서 평균 44배 더 큰 발현을 나타내었다. 본 발명자들은 IL13R α2의 역할을 보다 잘 이해하기 위해 다루기 쉽고 적절한 폐 조직 배양 시스템을 개발하기 위해 노력하였다. 1차 폐 섬유모세포 (IMR90)를 성장-인자 감소된 (GFR) 매트릭셀 상에서 성장시켜 플라스틱보다 많은 생리학적 성장 기질을 자극하였다. (달리 언급되지 않는 한, 본 실시예에서 모든 배양 실험은 GFR-매트릭셀 상에서 성장시킨 세포로 수행함.) IL-13 또는 IL-4로 자극된 IMR90 세포는 IL13R α2의 실질적인 (~8-10배) 유도로 이어진다 (도 10). 따라서, 이는 차단 항체 및 소분자 억제제를 사용하여 이소성 과다발현된 IL13R α2보다는 오히려 내재적으로 유도되는 기능을 연구하기 위한 실험 시스템을 제공한다.

[0238]

IL13R α2 유도는 1차 폐 섬유모세포에서 IL13R α1/IL4R α로부터의 신호를 감쇠시킨다

[0239]

IL13R α2는 정규 신호전달 도메인이 결여된 짧은 세포질 꼬리를 갖는다. 일부 증거는 IL-13에 결합할 수 있는 IL13R α2의 세포외 도메인이 IL13R α1/IL4R α 수용체 복합체에 대한 디코이로서 기능하며 STAT6-의존성 IL-13 신호를 감쇠시키는 모델을 뒷받침한다. 조직 배양 시스템의 개발 동안, 본 발명자들은 TNF α 자극이 IMR90 세포에서 IL13R α2 발현을 유도하였다는 것을 관찰하였다 (도 11a). TNF α는 IL-13 의존성 IL13R α2 유도를 강화시키는 것으로 밝혀졌으나, TNF α 단독 치료는 다른 시스템에서 IL13R α2를 상향조절하는 것으로 밝혀지지 않았다. 이러한 배양 시스템의 하나의 핵심적인 차이는 세포를 매트릭셀 상에서 성장시킨다는 것이다. IL-13이

GFR 매트릭셀에 존재할 가능성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 감수성 IL-13 생물검정을 수행하였으며, 이는 IL-13이 성장 인자 감소된 매트릭셀 상에서 배양된 세포에서 검출가능하지 않다는 것을 보여주었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0240] 상승된 IL13R α 2 발현을 나타내는 TNF α -자극된 IMR90 세포는 IL-13 자극의 하류 사건에 대한 상승된 IL13R α 2 발현의 영향을 조사하기 위한 기회를 제공하였다. 본 발명자들은 그의 발현이 TNF α 치료에 의해 영향을 받지 않는 기지의 STAT6 반응성 유전자 (CCL26 및 페리오스틴)의 전사체 수준을 측정함으로써 IL-13 및 IL-4에 대한 용량 반응성을 모니터링하였다 (도 11b). TNF α 로 미리 자극하여, 증가된 IL13R α 2 발현을 발생시킨 세포는 CCL26 및 페리오스틴 유전자 유도에 의해 평가시에 (도 11b) IL-13에 대해 감소된 감수성을 나타내었으나 IL-4에 대해서는 그렇지 않았으며 (데이터는 나타내지 않음), 이는 IL-13의 용량을 증가시킴으로써 극복될 수 있다. TNF α 로 미리 자극되어 상승된 IL13R α 2 발현을 나타내는 세포에서 IL-13에 의해 동일한 수준의 CCL26 또는 페리오스틴 유전자 유도를 달성하기 위해 거의 10배 더 높은 농도의 IL-13이 요구되는 반면, IL-4 자극에 대한 감수성 (데이터는 나타내지 않음)은 TNF α 예비처리에 의해 변경되지 않았다. 함께, 이들 데이터는 IL13R α 2의 디코이 수용체로서의 역할과 일치하게 TNF α -매개된 IL13R α 2 유도가 특히 IL13R α 1/IL4R α 수용체 복합체에 결합하여 이를 통해 신호를 전달하는 IL-13의 능력을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0241] 상이한 항-IL13 항체는 IL13R α 1/IL4R α 또는 IL13R α 2에 대한 결합을 선택적으로 차단한다

[0242] 상기 데이터는 IL13R α 2가 IL13R α 1/IL4R α 신호전달에 대한 디코이 수용체인 모델과 일치하나, 대안적인 하류 신호가 IL13R α 2로부터 유래될 가능성이 남아있다. 본 발명자들은 특정 IL13/IL4 수용체 복합체로부터의 신호 전달을 파괴하는 특정 차단 항체를 사용함으로써 잠재적 IL13R α 2 신호를 확인하기 위해 편향되지 않은 유전자 발현 프로파일링 접근법을 채택하였다. 한 항체 (항-IL-13 mAb1)는 IL-13이 IL4R α 를 IL13R α 1로 동원하는 능력을 차단하나, IL13R α 2에 대한 IL-13에는 영향을 미치지 않았고; 제2 항체 (항-IL-13 mAb2)는 IL-13이 IL13R α 1 및 IL13R α 2 둘 다에 결합하는 능력을 차단한다. 항체는 둘 다 IL13R α 1/IL4R α 수용체 복합체를 통한 IL-4 신호전달에 영향을 미치지 않고 IL13R α 1/IL4R α -의존성 STAT6 활성화를 방지할 수 있었으나, 항-IL-13 mAb2는 단지 IL13R α 2에 대한 IL-13 결합만을 방지할 수 있었다. 1차 섬유모세포 배양 시스템에서 이들 항체의 각각의 활성을 평가하기 위해, 세포를 mAb1 또는 mAb2 차단 항-IL-13 항체의 존재 또는 부재 하에 IL-13 및/또는 IL-4로 처리하였다. 하기 기재되는 바와 같이, 본 발명자들은 STAT6의 하류 IL-13/IL-4 신호전달의 마커인 CCL26 및 페리오스틴의 전사체 수준을 측정하였다.

[0243] 본 발명자들은 우선 1차 폐 섬유모세포 배양 시스템에서 IL-13 또는 IL-4 단독에 의해 유도된 유전자 발현 프로파일을 특성화하였다. 세포를 10 ng/ml IL-13 또는 3 ng/ml IL-4로 48시간 동안 자극하고, 그 후에 RNA를 추출하고, 게놈-전반 발현 프로파일링에 적용하였다. 각각의 시토키인에 의해 유도되는 프로파일은 모의 처리된 세포와 비교하여 거의 동일한 유전자 발현 변화를 나타내었다 (데이터는 나타내지 않음). 본 발명자들은 IL-4 및 IL-13 자극된 상태 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없다는 것을 확인하였으며, 이는 양쪽 시토키인이 IL13R α 1/IL4R α 수용체 복합체의 하류의 동일한 신호전달 경로(들)를 활성화시킨다는 것을 시사한다.

[0244] 본 발명자들은 다음에 항-IL-13 항체 mAb1 및/또는 mAb2를 차단하거나 또는 차단하지 않고 다양한 조건의 시토키인 처리 하에 IMR90 1차 폐 섬유모세포 배양 시스템 (TNF α 로 미리 자극됨)에서의 CCL26 및 페리오스틴 (POSTN)의 전사체 수준을 측정하였다. 도 14에서, 다양한 처리 조건을 각각의 조건에서의 유전자 발현 결과와 함께 도면에 나타내었다.

[0245] IL13R α 2가 이전 신호에 반응하여 내재적으로 상향조절되며, 이는 그의 역할이 후속 IL-13 신호전달을 조정하는 것임을 시사하므로, 도 12에 제시된 실험 결과를 위해, 본 발명자들은 세포를 TNF α 로 예비-처리한 후에 2차 자극에 적용함으로써 IL13R α 2 발현을 유도하였다. IL13R α 2의 음성 조절 효과를 극복하기 위해 IL-4 또는 충분히 높은 수준의 IL-13으로 자극시에, CCL26 및 페리오스틴 전사체가 유의하게 유도되었다 (즉, CCL26 ~ >100x; 페리오스틴 ~ >10x) (도 12). 세포를 IL-13 및 항-IL-13 mAb1 또는 항-IL-13 mAb2, 또는 mAb의 조합으로 처리한 경우에, CCL26 및 페리오스틴의 유도는 거의 완전하게 폐지되었다 (도 12). 그러나, 항-IL-13 mAb1 또는 항-IL-13 mAb2는 어느 것도 CCL26 또는 페리오스틴의 IL-4-매개된 유도를 차단하지 않았으며 (도 12), 이는 IL-4보다 IL-13에 대한 각 mAb의 선택성과 일치한다. CCL26 및 페리오스틴 발현 수준을 측정함으로써, IL13R α 1 차단 (항-IL-13 mAb1 사용) 대 IL13R α 1 및 IL13R α 2 둘 다의 차단 (항-IL-13 mAb2 사용)에 의해 구별가능한 차이는 검출되지 않았다.

[0246] 본 발명자들은 다음에 전반적인 유전자 발현 프로파일에 대한 IL13R α 2의 기여를 평가하기 위해 노력하였다. 이러한 실험을 구축할 때 본 발명자들이 가진 하나의 관심은 IL13R α 2 신호전달이 IL4R α /IL13R α 1 수용체 복합

체로부터 방출되는 동시 공동-신호를 요구할 가능성이었다. IMR90 세포는 통상의 감마 쇄 (IL2R γ , 데이터는 나타내지 않음)가 결여되어 있기 때문에, IL-4-매개된 신호전달은 오직 IL4R α /IL13R α 1 수용체 복합체의 활성화를 통해 일어난다. 따라서, IMR90 세포를 시토카인 IL-4로 처리하는 것은 IL-13으로의 처리와 유사한 방식으로 IL4R α /IL13R α 1을 통한 신호전달을 활성화시킬 것이며, 따라서 이들 세포의 IL-4 처리는 IL4R α /IL13R α 1 수용체 복합체를 통한 IL-13 신호전달에 대한 대안이다.

[0247] 도 13a는 IL-13 또는 IL-13 및 IL-4로 처리된 및 각각의 경우에 mAb1 또는 mAb2로 처리된 세포로부터의 마이크로어레이 데이터의 분석을 보여준다. 나타난 바와 같이, 이러한 분석은 IL-13 및 mAb1 또는 mAb2로의 세포 처리 사이에서 또는 IL-13 및 IL-4 및 mAb1 또는 mAb2로의 세포 처리 사이에서 (모든 경우에 세포는 TNF α 로 예비 처리됨) 유의하게 차등 발현된 유전자 (조정된 p -값 < 0.01)가 없다는 것을 밝혀내었다. IL-4의 부재 하에 IL-13-자극된 세포에서, mAb1 및 mAb2에 의한 억제 거의 동일한 반면 (도 13a); IL-4의 존재 하에서는 mAb1 또는 mAb2 어느 것도 유전자 발현에서 의미있는 결과를 나타내지 않았다 (도 13b). 함께, 이러한 데이터는 리간드-수용체 IL13-IL13R α 2 연관이 유전자 발현 변화를 발생시키는 신호전달 사건을 유도하지 않는다는 것을 시사한다.

[0248] IPF 및 IL13/IL4에서 상승된 GLI1 발현은 1차 폐 섬유모세포를 자극하였다

[0249] 그 중 IPF 코호트에서 가장 유의하게 발현되는 유전자는 발생 경로에서 결정적인 전사 인자인 GLI1이었다 (도 14). 헛지호그 (Hh) 및 TGF β 신호전달은 GLI1 발현을 유도하는 것으로 밝혀졌다. GLI1 및 IL13R α 2 발현 수준은 IPF 샘플 내에서 유의하게 상관되었다 (r_s = 0.69, q -값 < 0.01). 세포 배양 마이크로어레이 실험에서, 본 발명자들은 GLI1 발현이 IL13 자극에 의해 상향조절된다는 것을 발견하였다 (데이터는 나타내지 않음). 따라서, 본 발명자들은 GLI1이, IL13R α 2와 같이, IL13 신호전달에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 조절될 수 있다고 가정하였다. 이러한 관찰을 확인하기 위해, 본 발명자들은 1차 폐 섬유모세포 (매트리겔 상에서 배양됨)를 IL13으로 자극하고, GLI1 발현을 RT-qPCR에 의해 측정하였다. GLI1 발현은 IL13 자극에 의해 유도되었다 (~4x) (데이터는 나타내지 않음).

[0250] Hh 또는 TGF β 신호전달의 차단은 IL13 유도된 GLI1 발현을 폐지하지 않는다

[0251] Hh 경로 활성이 GLI1 발현을 유도할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 IL13 자극이 Hh 경로의 Hh-의존성 자가분비/주변분비 자극으로 이어진다고 가정하였다. 이러한 가능성을 시험하기 위해, 본 발명자들은 Hh 리간드가 패치드 결합을 통해 스무스드 탈억제를 유도하는 능력을 차단하는 소분자 Hh 경로 억제제 (본원에서 M1로 지칭됨)를 사용하였다 (문헌 [Yauch et al., Nature 455:406-410 (2008)], Cur-691 또는 HhAntag691로 언급). M1로의 예비처리는 SHH 매개된 GLI1 유도를 차단하였으나, IL13 의존성 GLI1 유도에는 영향을 미치지 않았다 (도 15).

[0252] TGF β 에 의한 세포의 자극은 GLI1 발현을 유도하는 것으로 밝혀졌으며, IL13은 일부 실험 시스템에서 TGF β 활성을 유도할 수 있다. GLI1의 IL13-의존성 유도가 TGF β 의존성 자가분비/주변분비 메커니즘을 통해 일어나는지 평가하기 위해, 세포를 2가지 TGF β 경로 억제제 (항체 1D11 (문헌 [Edwards et al., J. of Bone and Mineral Res. 25:2419-2426, 2010]) 및 TGFBIIRb-Fc [R&D 시스템스, 카탈로그 번호 1003-RT-050]로 예비처리하였다. TGF β 경로 억제제는 둘 다 TGF β 1 (기지의 TGF β 반응성 유전자)의 TGF β -매개된 유도를 차단하였으나 (도 16a), IL13 의존성 GLI1 유도는 영향을 받지 않았다 (도 16b).

[0253] 이러한 데이터는 이전에는 기재된 적이 없는 IL13 및 GLI1 유도 사이의 관계를 시사하며, 이는 이전에 특성화된 Hh 및 TGF β 신호전달 경로에 의해 매개되지 않는다.

[0254] 폐 조직의 유전자 발현 분석은 비-IPF 대조군과 대조하였을 때 IPF 환자에서 현저하게 변경된 트랜스크립토를 보여준다. 섬유증 소질과 일치하게, 본 발명자들은 세포와 매트릭스의 재형성에 관여하는 다수의 유전자가 IPF에서 상승된 수준으로 발현된다는 것을 발견하였다. 또한, 본 연구 및 유사한 규모의 연구로부터의 이전에 공개된 발현 마이크로어레이 데이터 사이의 주목할만한 정도의 트랜스크립토-전반 유사성은 이 연구에서 관찰된 유전자 발현 패턴이 광범위하게는 진단 오류 또는 기술적 또는 분석적 인공물로 인한 잘못된 신호보다는 오히려 인간 IPF에서 적합하게 활성인 과정을 나타낸다는 본 발명자들의 결론을 뒷받침한다.

[0255] IL13은 섬유증의 잠재적 구동자로서 전임상적 모델과 관련된다. IPF 생검에서, 본 발명자들은 페리오스틴, CCL13, CCL18 및 IL13R α 2를 포함하는 이전의 기재된 IL13 표적 유전자의 상승된 발현과 함께 IL13 경로 활성의 전사 증거를 관찰하였으며; 또한 IL13은 그 자체로 IPF에서 상승된 수준으로 발현되었다. IPF에서 가장 강력하고 일관되게 상향조절되는 유전자는 IL13R α 2였다. 이전의 연구는 IL13R α 2의 역할과 관련하여 상이한 결론에 도달하였으며, 즉 1) IL13R α 2가 증가된 섬유증을 뒷받침할 수 있는 신호를 전달할 수 있거나 또는 2) IL13R α 2

가 IL13에 대한 디코이 수용체이며, 신호전달 능력을 갖지 않는다는 것이다. 이러한 상반되는 가능성을 고려하면, 본 발명자들의 생검 마이크로어레이 데이터에서의 IL13-관련 유전자 발현 패턴이 IL13R α 2의 높은 발현이 IPF에서의 IL13 활성화에 대해 순긍정적 또는 순부정적 역할을 반영한다는 것을 나타내는지의 여부, 및 IL13R α 2의 가능한 기능이 무엇인지 결정하는 것은 도전할만한 것이다.

[0256] IPF에 적절한 다루기 쉬운 시스템에서 IL13R α 2의 역할을 밝히기 위해, 본 발명자들은 성장 인자 감소된 매트릭셀 상에서 성장시킨 IMR90 세포 (인간 1차 폐 섬유모세포 세포주)를 사용하는 시험관내 시스템을 개발하였다. IL13으로 자극되는 경우에, 이들 세포는 IL13R α 2의 증가된 발현을 나타내었다. 본 발명자들은 IL13R α 2가 또한 이 시스템에서 TNF α 에 의해 강하게 유도될 수 있다는 것을 관찰하였다. TNF α 는 STAT6을 통해 신호를 전달하는 것으로 알려지지 않았기 때문에, 본 발명자들은 IL13R α 2 수준을 이소적으로 조정하고 IL13 신호전달에 대한 IL13R α 2 발현의 영향을 결정하기 보다는 오히려 내재적으로 이러한 특징을 활용하였다. 세포를 TNF α 로 예비자극시켰을 때, 이들은 2가지 IL13 표적 유전자 (페리오스틴 및 CCL26)에 의해 평가시에 IL13 자극에 대해 감소된 감수성을 나타내었고; TNF α 로 예비자극시킨 세포는 TNF α 로 예비자극시키지 않은 세포에 비해 대등한 페리오스틴 및 CCL26 유도를 달성하기 위해 대략 10배의 IL13 농도를 요구하였다. 그러나, TNF α 예비자극은 세포가 TNF α 예비처리에 관계없이 IL4에 대해 유사한 감수성을 유지하였으므로 IL13R α 1/IL4R α 복합체의 본질적인 신호전달 능력에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다. 이러한 관찰은 IL13R α 2가 IL13-IL13R α 1/IL4R α 상호작용에 대한 디코이 수용체로서 작용하는 모델을 뒷받침하였으나; 이들 데이터는 IL13R α 2가 그 자신의 고유한 세포내 신호를 발생시킬 수 있는 가능성을 배제하지 않는다. 이 가능성을 보다 자세하게 연구하기 위해, 본 발명자들은 2개의 수용체 복합체와 IL13의 상호작용의 선택적 차단을 허용하는 시약을 이용하였다. MAb2는 IL13R α 1 및 IL13R α 2 둘 다에 결합하는 IL13의 능력을 파괴하는 차단 항체이다. 그러나, MAb1은 IL4R α 에 결합하여 이를 통해 신호를 전달하는 IL13의 능력을 차단하지만, IL13R α 2 결합은 차단하지 않는다. 본 발명자들은 이들 차단 항체 중 어느 하나의 존재 하에 IL13으로 처리된 세포의 발현 프로파일을 비교함으로써, 본 발명자들이 만약에 존재한다면 IL13R α 2-특이적 하류 전사 사건을 확인할 수 있을 것으로 예상하였다. 본 발명자들은 세포를 각 항체로 차단시키는 조건 사이에서 단일의 통계적으로 유의한 차이를 확인할 수 없었으며, 이는 이러한 세포 배양 시스템에서, IL13 단독에 의한 IL13R α 2 연관이 유전자 발현에 영향을 미치는 세포내 신호전달 캐스케이드를 발생시키지 않는다는 것을 강하게 시사한다. IL13-IL13R α 2 결합은 아마도 생체내에서 IL13R α 1/IL4R α 의 IL13 연관과 공동으로 일어날 것이므로, 본 발명자들은 IL13R α 2 신호가 IL13R α 1/IL4R α 복합체의 동시 연관에 의존성일 수 있는지 여부를 결정하기 위해 노력하였다. 그러나, IL13-IL13R α 1/IL4R α 신호전달에 영향을 미치지 않고 IL13-IL13R α 2 상호작용을 선택적으로 차단하는 시약은 확인되지 않았다. IL13 및 IL4는 둘 다 IL13R α 1/IL4R α 신호전달 복합체에 결합하여 이를 통해 신호를 전달하고, 동일한 발현 프로파일을 생성하기 때문에, 본 발명자들은 본 발명자들이 상기 기재된 바와 같은 MAb1 대 MAb2 차단 실험에 제시된 IL4를 도입함으로써 활성 IL13R α 1/IL4R α 신호를 모방할 수 있을 것으로 예상하였다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 여전히 어떠한 IL13R α 2-의존성 신호전달 사건도 확인할 수 없었다. 함께, 이러한 데이터는 IL13R α 2가 폐 섬유모세포에서 디코이 수용체인 모델을 강하게 뒷받침한다.

[0257] 본 발명자들은 또한 폐 발생, EMT, 종양발생 및 조직 복구에서 중요한 것으로 알려진 GLI1이 대조군 대상체에 비해 IPF 환자에서 상향조절된다는 것을 밝혀내었다. 본 발명자들은 또한 IL13이 배양된 섬유모세포에서 GLI1 발현의 증가로 이어진다는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 GLI1이 섬유모세포의 지속적인 성장 및 생존을 뒷받침할 수 있으며, 이것이 상처 치유 해결의 최종 단계를 차단하고 지속적인 섬유증을 지지할 수 있다는 것을 시사한다.

[0258] 실시예 3: II상 임상 연구

[0259] 연구 근거

[0260] IPF는 다양한 정도의 간질성 섬유증을 특징으로 한다. 유형 I, III 및 IV 콜라겐, 피브로넥틴 및 테나신-C를 비롯하여 여러 세포외 매트릭스 단백질이 중간엽 세포의 비정상적 증식, 폐 구조의 왜곡, 및 상피하 섬유모세포성 초점의 생성과 함께 IPF 환자에서의 섬유증의 과정에 연관된다. IL-13 및 IL-4는 조직 섬유증의 강한 유도제이다. 비임상 모델에서, 마우스의 폐에서 IL-13의 트랜스제닉 과다발현은 콜라겐 유전자 발현 및 심각한 상피하 섬유증을 유도하기에 충분하다 (문헌 [Lee et al. 2001, J Exp Med 194:809-22; Zhu et al. 1999, J Clin Invest 103:779-88]). 반대로, IL-13의 표적화된 파괴를 갖는 마우스 및 IL-13에 특이적인 차단 항체로 처리된 마우스는 블레오마이신- 및 플루오레세인 이소티오시아네이트-유도된 폐 섬유증 모델에서 감소된 세포외 매트릭스 침착을 보여준다 (문헌 [Belperio et al. 2002, Am J Respir Cell Mol Biol 27:419-27; Kolodtsick et al.

2004, J Immunol 172:4068-76; Liu et al. 2004, J Immunol 173:3425-31]).

[0261] 다중 연구는 IL-13의 발현 및 활성이 IPF 환자에서 상승된다고 결론내렸다. IL-13 및 IL-13 수용체 (IL-13R) IL-13R α 1 및 IL-13R α 2의 발현은 메신저 RNA 및 단백질 수준 둘 다에서 정상 대조군에 비해 IPF 환자로부터의 폐 생검 샘플에서 증가되는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Jakubzick et al. 2004, Am J Pathol 164:1989-2001]). IL-13은 또한 정상 대조군에 비해 IPF 환자로부터의 기관지폐포 세척 유액에서 상승되는 것으로 밝혀졌다. 중요하게는, 이러한 샘플에서 IL-13의 수준은 폐 기능의 핵심적 척도, 예측된 강제 폐활량 (FVC)의 백분율 및 일산화탄소에 대한 폐의 확산능 (DL_{CO})과 부정적으로 상관되며 (문헌 [Park et al. 2009, J Korean Med Sci 24:614-20]), 이는 IPF 환자에서 IL-13의 발병 기능을 제안한다.

[0262] IL-13 그 자체 뿐만 아니라, IL-13 신호전달로부터 하류에서 발현되는 것으로 알려진 혈청 바이오마커가 또한 IPF 환자에서 상승될 것으로 밝혀졌다. 천식 환자에서 레브리키주맵을 사용한 치료로부터의 이익과 상관되는 혈청 수준을 갖는 IL-13-유도성 단백질인 페리오스틴 (문헌 [Corren et al. 2011, N Engl J Med 365(12):1088-98])은 또한 IPF 환자의 혈청에서 상승하며, 이러한 수준은 6-개월 기간에 걸쳐 폐 기능 파라미터 (FVC 및 DL_{CO})와 부정적으로 상관되는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Okamoto et al. 2011, Eur Respir J 37:1119-27]). 페리오스틴은 페리오스틴-결핍 마우스에서 관찰된 감소된 블레오마이신-유도된 폐 섬유증에 기초하여 IPF에서 발병 인자인 것으로 제안되었으며 (문헌 [Uchida et al. 2012, Am J Respir Cell Mol Biol 46:677-86]), 이는 IL-13이 질환에 기여할 수 있는 추가의 메커니즘을 시사한다. IL-13 신호전달은 또한 시험관내에서 대식세포로부터 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 18 (CCL-18)의 강한 생성을 유도하고, IPF 환자로부터 단리된 폐포 대식세포는 CCL-18 단백질을 구성적으로 발현하나 정상 대조군으로부터의 것은 그렇지 않다 (문헌 [Prasse et al. 2006, Am J Respir Crit Care Med 173:781-92]). 페리오스틴과 같이, CCL-18은 IPF 환자의 혈청에서 증가하고, CCL-18 수준은 질환 진행 및 예후와 상관되는 것으로 보고되었으며, 이 때 보다 높은 수준의 기준선 CCL-18을 갖는 환자는 FVC에서 보다 큰 감축 및 보다 높은 사망률을 경험하였다 (문헌 [Prasse et al. 2007, Arthritis Rheum 56:1685-93; Prasse et al. 2009, Am J Respir Crit Care Med 179:717-23]). 함께, 이들 데이터는 IL-13 발현이 IPF 환자에서 상승되고, 이러한 시토카인으로부터 다발성 섬유증-관련 세포 유형으로의 신호가 질환 발병 기전을 구동하는데 핵심적인 역할을 수행한다는 것을 강하게 시사한다.

[0263] 항-IL13 항체 (레브리키주맵) 아미노산 서열

[0264] 하기 표는 레브리키주맵의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 영역의 아미노산 서열을 VH, VL, 중쇄 서열 및 경쇄 서열과 함께 나타낸다. 하기 표 11에 나타난 바와 같이, VH 및 중쇄는 N-말단 글루타민을 포함할 수 있고, 중쇄는 또한 C-말단 리신을 포함할 수 있다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, N-말단 글루타민 잔기는 피로글루타메이트를 형성할 수 있고, C-말단 리신 잔기는 제조 과정 동안 클리핑될 수 있다.

표 11

항-IL13 항체 (레브리키주맵) 아미노산 서열

CDR-H1 (서열 1)	Ala Tyr Ser Val Asn
CDR-H2 (서열 2)	Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
CDR-H3 (서열 3)	Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
CDR-L1 (서열 4)	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
CDR-L2 (서열 5)	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
CDR-L3 (서열 6)	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
VH (서열 7)	Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VH (서열 8)	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VL (서열 9)	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
H 체 (서열 10)	VTLRSGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDI ATYYCAGDGY YPYAMDNNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPCCPCCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPETVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLS LSLG

[0265]

H쇄 (서열 11)	QVTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDY ATYYCAGDGY YPYAMDNWQO GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLSLG
H쇄 (서열 12)	VTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDY ATYYCAGDGY YPYAMDNWQO GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLSLG
H쇄 (서열 13)	QVTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDY ATYYCAGDGY YPYAMDNWQO GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLSLG
L쇄 (서열 14)	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQNNEDPR TFGGGKTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCCL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

[0266]

[0267]

[0268]

용량, 투여 요법 및 근거

이는 IPF를 갖는 환자에서 레브리키주맙의 무작위화, 다중심, 이중-맹검, 위약-제어된, 병행-군 연구이다. 대략 250명의 환자 (치료군당 125명의 환자)가 전세계적으로 위치한 대략 100개의 사이트에서 연구에 등록할 것이다. 총 치료 지속기간은 맹검 치료의 적어도 13회의 용량 (q4wk)을 받은 모든 대상체 및 최대 2.5년의 기간에 걸친 1차 종점에 대한 적어도 75개 사건의 관찰에 기초할 것이다.

[0269]

사전 동의서를 제공한 환자는 가입 기준을 확립하기 위해 스크리닝 기간 (≤ 4 주)을 시작할 것이다. 스크리닝 기간의 종점에서, 적합한 환자는 각각 미리 충전된 시린지로부터 투여되는 피하로 주사된 (SC) 레브리키주맙 250 mg 또는 위약을 사용한 이중-맹검 치료에 1:1 비로 무작위화될 것이다. 블록 무작위화는 중앙에서 수행될 것이고, 폐 기능에 대해 (예측된 FVC $< 50\%$, 50% 내지 75% , $> 75\%$) 및 지역적으로 (북아메리카, 유럽 등) 계층화될 것이다.

[0270]

연구 약물은 4주마다 SC 주사에 의해 투여될 것이며, 첫번째 주사는 무작위 방문 (제1일)시에 수행한다. SC 주사는 팔, 대퇴부 또는 복부에 투여될 것이며, 모든 환자는 투여 방문당 총 2회 주사를 받을 것이다. 환자는 최소 투여 기간 (0 내지 48주) 동안 최소 13회 용량의 맹검 치료를 받을 것이다. 환자는 적어도 75개의 사건이 1차 종점 중인 일어날 때까지 연장된 치료 기간 동안 4주마다 맹검 연구 치료를 계속 받을 것이며, 마지막 등록 환자는 적어도 13회의 용량의 맹검 치료를 받을 기회를 갖는다. 이러한 사건이 발생하면, 모든 진행 중인 환자는 이들이 연구 약물을 마지막으로 투여받는지 대략 4주 후에 클리닉으로 복귀하여, 18주 안전성 추적 기간 동안 치료-종결 (EOT) 방문 및 2회의 후속 방문에서 추적 평가를 완료할 것이다. 등록 및 사건 빈도율에 따라, 치료의 전체 지속기간은 1년 내지 최대 2.5년의 범위일 것으로 예상된다. 치료 기간은 각각의 환자에 대해 2.5년 넘게 연장되지 않을 것이며, 최대 연구 지속기간은 2.8년으로 예상된다. 연구 약물을 조기에 중단하기를 선택한 환자는 연구에 남아 모든 나머지 평가를 완료하도록 장려할 것이다. 이것이 가능하지 않은 경우에, 환자는 동의서를 철회하지 않는 한 안전성 추적 기간에 들어가 이를 완료해야 한다.

[0271]

용량과 투여 요법 근거는 다음과 같다. 레브리키주맙은 IL-13 신호전달을 억제하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 비임상 및 임상 데이터는 둘 다 IL-13 신호전달이 IPF의 발병기전에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 시사한다 (상기 참조). 레브리키주맙의 작용 메카니즘은 IL-13 및 그의 수용체 사이의 상호작용을 차단하여 IL-13의 세포내 신호전달을 차단하는 것이다. 시토킨의 빠른 턴오버로 인해, 최적의 IL-13 차단이 폐에서 지속적인 농도의 레브리키주맙을 유지하는 것을 요구하는 것으로 가정된다. 폐에서의 IL-13 수준을 가정하는 것은 문헌에 보고된 범위 (200-2000 pg/mL; 문헌 [Hart 2001, Immunology and Cell Biology 79:149-53]) 및

1:500의 혈청:폐 분배 비 내에 있고, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 혈청 농도가 IL-13을 중화하기에 충분히 높은 폐내 약물 수준을 유지할 것으로 예상될 것이다. 이러한 표적 농도는 또한 II상 연구에서 관찰된 12주 최저 농도의 하단부 (평균 \pm SD: 28.8 \pm 11.9 $\mu\text{g/mL}$)와 일치하며, 여기서 레브리키주맵은 천식이 흡입용 코르티코스테로이드 요법에도 불구하고 제어되지 않는 환자에서 중증의 천식 악화의 비율을 감소시키는 효능을 보여주었다. 천식과 유사하게, IPF를 갖는 환자는 IL-13 생물학과 연관된 바이오마커의 상승된 수준을 나타낼 것이며, 이는 천식에서 임상적 이익을 생성하는 레브리키주맵의 농도가 또한 IPF에서 생물학적 활성을 생성할 수 있을 것임을 시사한다.

[0272] IPF 환자에서의 II상 연구의 경우에, 4주마다 (q4wk) 250 mg 용량을 선택하여 이러한 표적 농도 이상에서 정상 상태 혈청 최저 농도를 유지하였다. IPF 환자에서 레브리키주맵의 약동학을 가정하는 것은 천식에서와 유사하며, 이러한 용량/요법은 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 평균 정상 상태 최저 농도를 유지할 것으로 예상될 것이다. 표적보다 3배 높은 농도는 자가항체가 존재하는 경우에 보다 두꺼운 간질 및 레브리키주맵의 잠재적으로 보다 빠른 제거로 인해 IPF 환자에서 감소된 폐 분배를 허용한다 (문헌 [Papiris et al. 2012, Curr Opin Pulm Med 18:433-40]). 250 mg 용량 q4wk의 선택은 또한 천식에서 레브리키주맵의 이전의 임상 연구로부터의 안전성 데이터베이스에 의해 뒷받침된다.

[0273] 레브리키주맵 및 위약은 미리 충전된 시린지로 공급될 것이다. 각각의 시린지는 오직 단일-용량 SC 투여를 위한 것이고, 보존제를 함유하지 않는다. 활성 연구 약물의 각각의 미리 충전된 시린지는 125 mg/mL 레브리키주맵의 농도의 1 mL의 멸균 액체를 함유한다. 제제는 또한 히스티딘 아세테이트 (20 mM), 수크로스 (60 mg/mL), 폴리소르베이트 20 (대략 0.03%), 및 멸균 주사용수 USP, pH 5.4-6.0을 함유한다. 위약의 각 미리 충전된 시린지는 히스티딘 아세테이트 (20 mM)를 포함하는 멸균 주사용수, 수크로스 (75 mg/mL), 및 폴리소르베이트 20 (대략 0.03%), pH 5.4-6.0으로 이루어진 1 mL의 멸균 액체 위약 제제를 함유한다. 연구 약물 및 위약의 미리 충전된 시린지는 2°C-8°C에서 냉장되고, 과도한 빛과 열로부터 보호되어야 한다. 시린지는 동결되거나, 진탕되거나, 또는 실온에서 저장된다.

[0274] 포함 및 배제 기준

[0275] IPF를 갖는 35-80세 연령의 대략 250명의 환자가 이 연구에 등록할 것이다. 포함 기준을 다음을 포함한다: 스크리닝 시점으로부터 이전의 5년 내에서 2011 ATS/ERS 가이드라인에 기초하고 기준선에서 확인된 확정 또는 반 확정 IPF의 진단; 스크리닝시에 예측된 FVC > 40% 및 \leq 90%; 스크리닝시에 예측된 DL_{CO} > 25% 및 \leq 90%; 경구 코르티코스테로이드 요법을 받은 환자의 경우: 제1일 이전 \geq 4주 동안 안정한 용량 \leq 10 mg 프레드니손 (또는 등가물); 도움없이 \geq 100 미터를 보행하는 능력. 배제 기준은 다음을 포함한다: 생물학적 작용제에 대한 중증의 알레르기 반응 또는 아나필락시스성 반응 또는 레브리키주맵 주사의 임의의 성분에 대한 기지의 과민증의 병력; 간질성 폐 질환의 다른 기지의 원인의 증거; 6개월 내에 예상되는 폐 이식; IPF가 아닌 유의한 폐쇄성 폐 질환 또는 다른 임상적으로 유의한 폐 질환 또는 감염성 질환을 비롯한 다른 임상적으로 유의한 의학적 질환의 증거; 클래스 IV 뉴욕 심장 학회 만성 심부전 또는 좌심실 박출률 < 35%의 조직학적 증거; 스크리닝 이전 30일 내의 IPF의 악화로 인한 입원; 체중 < 40 kg.

[0276] 효능 결과 측정

[0277] 1차 효능 결과 척도는 무진행 생존 (PFS)이며, 이는 연구 치료 무작위화로부터 하기 사건: 임의의 원인으로 인한 사망; 임의의 원인으로 인한 비-선택적 입원; 및 FVC (L)의 기준선으로부터의 \geq 10%의 감소 중 어느 것의 첫번째 발생까지의 시간으로 정의된다. 2차 효능 결과 척도는 절대 FVC (L)의 1년에 걸친 변화 비율; 52주에 DL_{CO} (mL CO/분-1/mmHg-1)의 기준선으로부터의 \geq 15%의 감소; 무작위화로부터 임의의 원인으로 인한 사망 또는 비-선택적 입원까지의 시간; IPF에서의 삶의 질 평가 도구 (ATAQ-IPF)의 기준선으로부터 52주까지의 변화; 무작위화로부터의 FVC (L)의 기준선에 비한 \geq 10%의 첫번째 감소까지의 시간; 절대 DL_{CO} (mL CO/분-1/mmHg-1)의 1년에 걸친 변화 비율; 및 6-분 보행 거리 (6MWD)의 기준선으로부터 52주까지의 변화이다. 탐색적 결과 척도는 FVC의 기준선으로부터 52주까지의 변화 ([L] 및 예측된 퍼센트); FVC (L)의 기준선으로부터 52주까지의 변화 퍼센트; 절대 FVC (L)의 기준선으로부터 52주까지의 200 mL 또는 10%의 변화의 발생; DL_{CO} ([mL CO/분-1/mmHg-1] 및 예측된 퍼센트)의 기준선으로부터 52주까지의 변화; DL_{CO} (mL CO/분-1/mmHg-1)의 기준선으로부터 52주까지의 변화 퍼센트; 기준선에서 보충 산소 요법을 받은 환자에 대한 안정시 산소 유량의 기준선으로부터 52주까지의 변화; 무작위화로부터 기준선에서 보충 산소를 받지 환자에 대한 보충 산소 요법의 부가까지의 시간; 무작위화로부터 임의의 원인으로 인한 비-선택적 입원까지의 시간; 무작위화로부터 급성 IPF 악화의 첫번째 사건까지의

시간; 무작위화로부터 IPF 심화의 첫번째 사건까지의 시간; 정량적 폐 섬유증 (QLF) 스코어를 포함하는 폐 HRCT 상에서의 방사선학적 발견의 기준선으로부터 24주 및 52주까지의 변화; 6-분 보행 시험 (6MWT)에서 보행 거리의 기준선으로부터의 변화; 혈청 바이오마커 (예를 들어, 페리오스틴, CCL-18, YKL40, COMP, OPN, CCL-13)의 기준선으로부터의 변화; 및 EuroQol 5-차원 설문지 (EQ-5D)의 기준선으로부터 52주까지의 변화이다.

- [0278] 연구 평가
- [0279] 특발성 폐 섬유증 악화
- [0280] IPF 악화는 하기 기준을 만족시키는 사건으로 규정된다: 이전 30일 내의 호흡곤란의 설명되지 않은 악화 또는 발생; 통상의 간질성 폐렴 (UIP)과 일치하는 망상 또는 벌집형 배경 패턴 상에 중첩된 새로운 양측 간유리 이상 및/또는 강화의 방사선학적 증거; 및 대안적 원인, 예컨대 좌심부전, 폐 색전증, 폐 감염 (이용가능한 경우에 기관내 흡인 또는 기관지폐포 세척, 또는 연구자 판단을 기반으로 함), 또는 급성 폐 손상으로 이어지는 다른 사건 (예를 들어, 폐혈증, 흡인, 외상, 재관류 폐 부종)의 부재.
- [0281] 질환의 특발성 폐 섬유증 심화
- [0282] 질환의 IPF 심화는 하기를 만족시키는 사건에 의해 규정된다: (i) 이전 30일 내의 호흡곤란의 설명되지 않은 악화 또는 발생 및 (ii) 다음 중 임의의 2개:
 - [0283] · UIP와 일치하는 망상 또는 벌집형 배경 패턴 상에 중첩된 새로운 양측 간유리 이상 및/또는 강화의 방사선학적 증거;
 - [0284] · 하기 기준 중 1개 이상을 만족시키는 폐 기능의 악화:
 - [0285] - FVC (L), 10% 이상
 - [0286] - DL_{CO} (mL CO/분-1/mmHg-1), 15% 이상
 - [0287] - 산소 포화 (SpO_2), 4% 이상;
- [0288] 및 (iii) IPF 악화 하에 상기 열거된 것과 같은 대안적 원인의 부재.
- [0289] 폐활량측정법
- [0290] 기관지확장제 시험을 위한 절차를 포함하는 폐활량측정법은 ATS/ERS 컨센서스 스테이트먼트(Consensus Statement)를 기반으로 하는 연구 폐 기능 매뉴얼에 따라 수행될 것이다 (문헌 [Miller et al. 2005, Eur Respir J 26:319-38]). 매뉴얼은 장비, 절차, 환자 지시 및 예방조치에 대한 정보를 포함할 것이다. 수집될 폐활량측정 척도는 FEV₁ 및 FVC 값 및 최대 호기 유량 값 뿐만 아니라 유동-부피 및 부피-시간 곡선을 포함할 것이다. 예측된 FEV₁ 및 FVC의 백분율은 한킨슨(Hankinson) 및 동료에 의해 기재된 바와 같은 미국 국민건강영양조사 데이터세트로부터 유래된 식을 이용하여 이들 부피 측정값으로부터 유래될 것이다 (문헌 [Hankinson et al. 1999, Am J Respir Crit Care Med 159:179-87]).
- [0291] 폐활량측정법의 측정은 연구의 요구사항에 대해 구성되고 폐활량측정법의 ATS/ERS 표준화에 의해 공개된 가이드라인에 따른 전산화 폐활량측정법 시스템 상에서 수행될 것이다 (문헌 [Miller et al. 2005, Eur Respir J 26:319-38]).
- [0292] DL_{CO} 는 혈청 헤모글로빈 농도의 보정을 포함하여 ATS/ERS 가이드라인에 따라 수행될 것이며, 1차 및 2차 종점 평가의 일부로서 FVC와 함께 측정될 것이다. 조작의 그래픽 표시를 포함한 데이터의 수용성은 블라인드 오버-리더에 의해 결정될 것이다. 허용되는 조작의 재현성에 대한 계산은 프로그래밍될 것이다.
- [0293] 고해상도 컴퓨터 단층촬영
- [0294] 프론 폐 HRCT 스캔이 수행되고 기록될 것이다. 폐 HRCT 스캔에 의한 IPF의 진단은 양측기저, 말초, 또는 흉막하 소엽내 격벽 증점, 섬유화 변화, 벌집형 및 견인 기관지확장증 또는 세기관지확장증의 대칭 패턴을 입증하여야 한다. 폐의 연관된 간유리 음영이 존재할 수 있다.
- [0295] 6분 보행 시험
- [0296] 6MWT 시험은 집중적 ATS 가이드라인에 따라 수행될 것이다 (문헌 [ATS Statement 2002, Am J Respir Crit Care

Med 166:111-117])).

[0297] 환자-보고된 결과

[0298] 환자-보고된 결과 (PRO) 데이터는 레브리키주말의 임상적 프로파일을 보다 완전하게 특성화하기 위한 이러한 연구에서 환자로부터 도출될 것이다. PRO 기기 (필요에 따라 지역 언어로 번역됨)는 연구 동안 명시된 시점에서 환자에 의해 그의 전체가 완료될 것이다. 2개의 PRO 도구가 사용될 것이다:

[0299] 특발성 폐 섬유증에서의 삶의 질 평가 도구 (ATAQ-IPF)

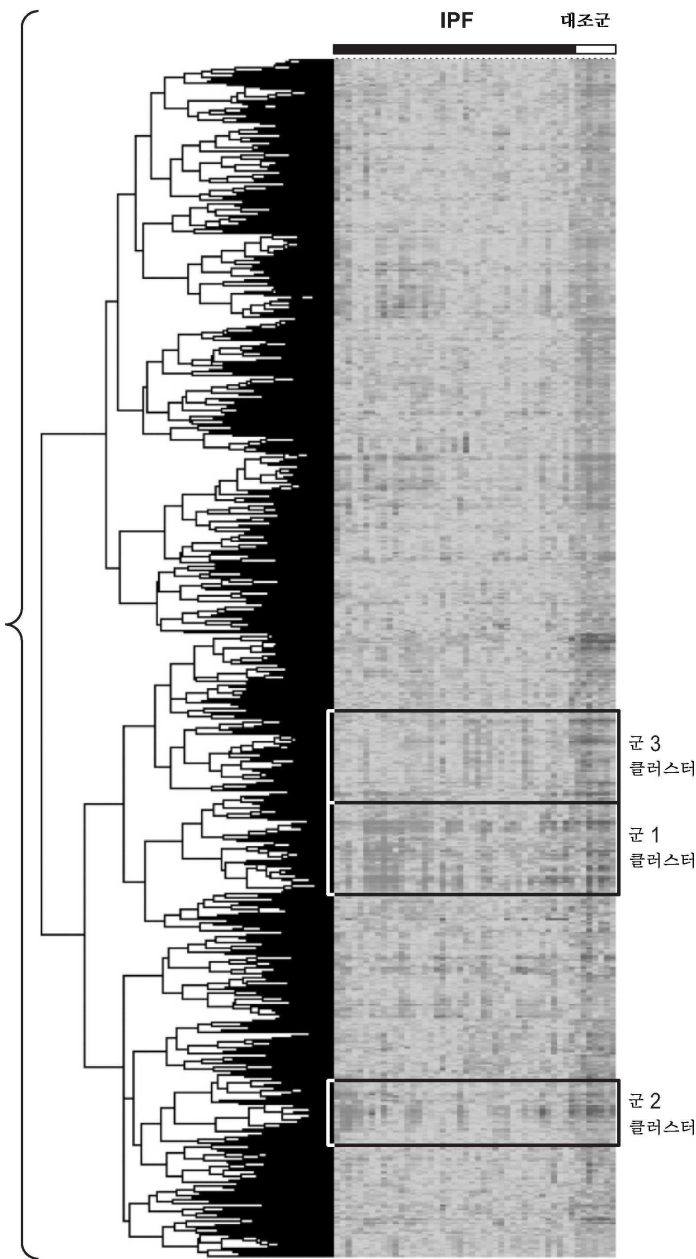
[0300] ATAQ-IPF는 74-항목 IPF-특이적 삶의 질 도구이다 (문헌 [Swigris et al. 2010, Health and Quality of Life Outcomes 8:77])). 삶의 질 평가 도구 (ATAQ)는 13개의 영역으로 구성된다: 기침 (6개 항목), 호흡곤란 (6개 항목), 사전숙고 (5개 항목), 수면 (6개 항목), 사망률 (6개 항목), 피로 (5개 항목), 감정적 웰빙 (7개 항목), 사회적 참여 (5개 항목), 재정 (6개 항목), 독립성 (5개 항목), 성 건강 (5개 항목), 관계 (6개 항목) 및 요법 (6개 항목). ATAQ의 각각의 항목은 1 (강한 부정) 내지 5 (강한 긍정) 범위의 스케일 상에서 평가하였다. ATAQ에는 어떠한 소환 기간도 명시되지 않았다. ATAQ-IPF 스코어 및 IPF에서 중요한 것으로 알려진 생리학적 변수 사이의 상관관계의 패턴은, 보충 산소를 사용하지 않은 경우에 대해 비교한 대상체 사이의 ATAQ-IPF 스코어의 유의한 차이와 함께, 그의 타당성을 뒷받침한다.

[0301] EuroQol 5-차원

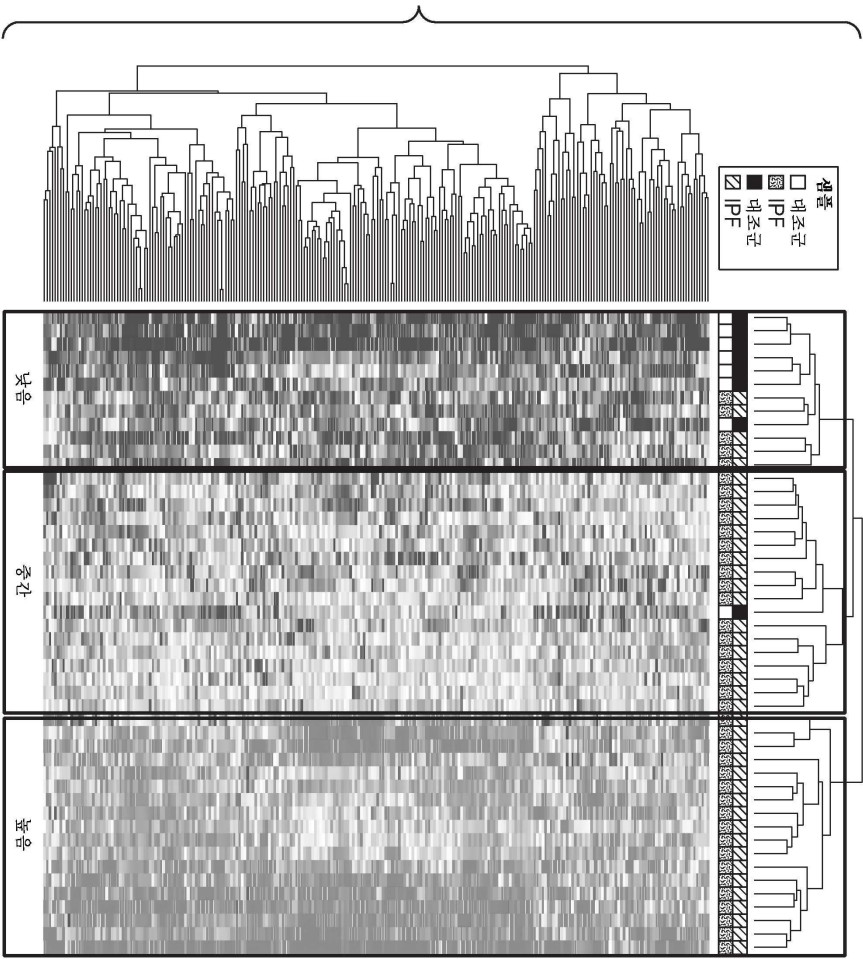
[0302] EQ-5D는 건강 상태에 대한 단일 인덱스 값을 제공하는 일반적 선호도-기반 건강-관련 삶의 질 설문지이다 (문헌 [Rabin and de Charro 2001, Ann Med 33:337-43])). 이러한 도구는 종합적인 환자의 건강 상태를 구축하는데 사용되는 이동성, 자기-관리, 일상적 활동, 통증/불편 및 불안/우울증에 대한 질문을 포함한다.

도면

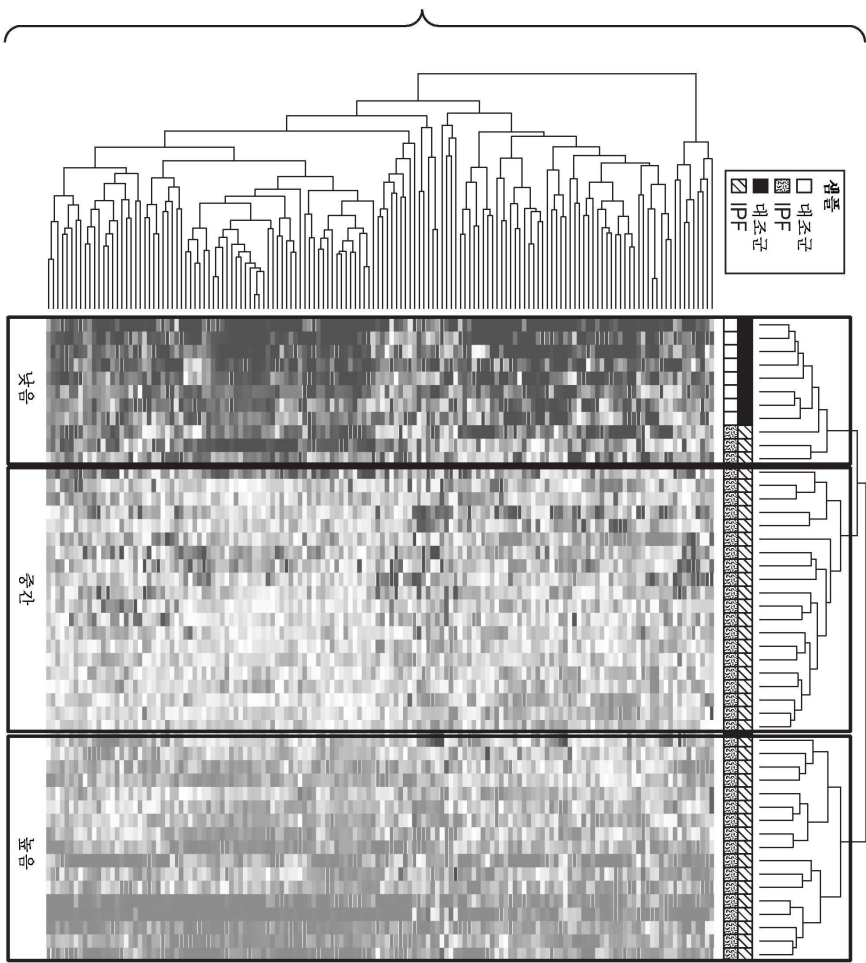
도면1a



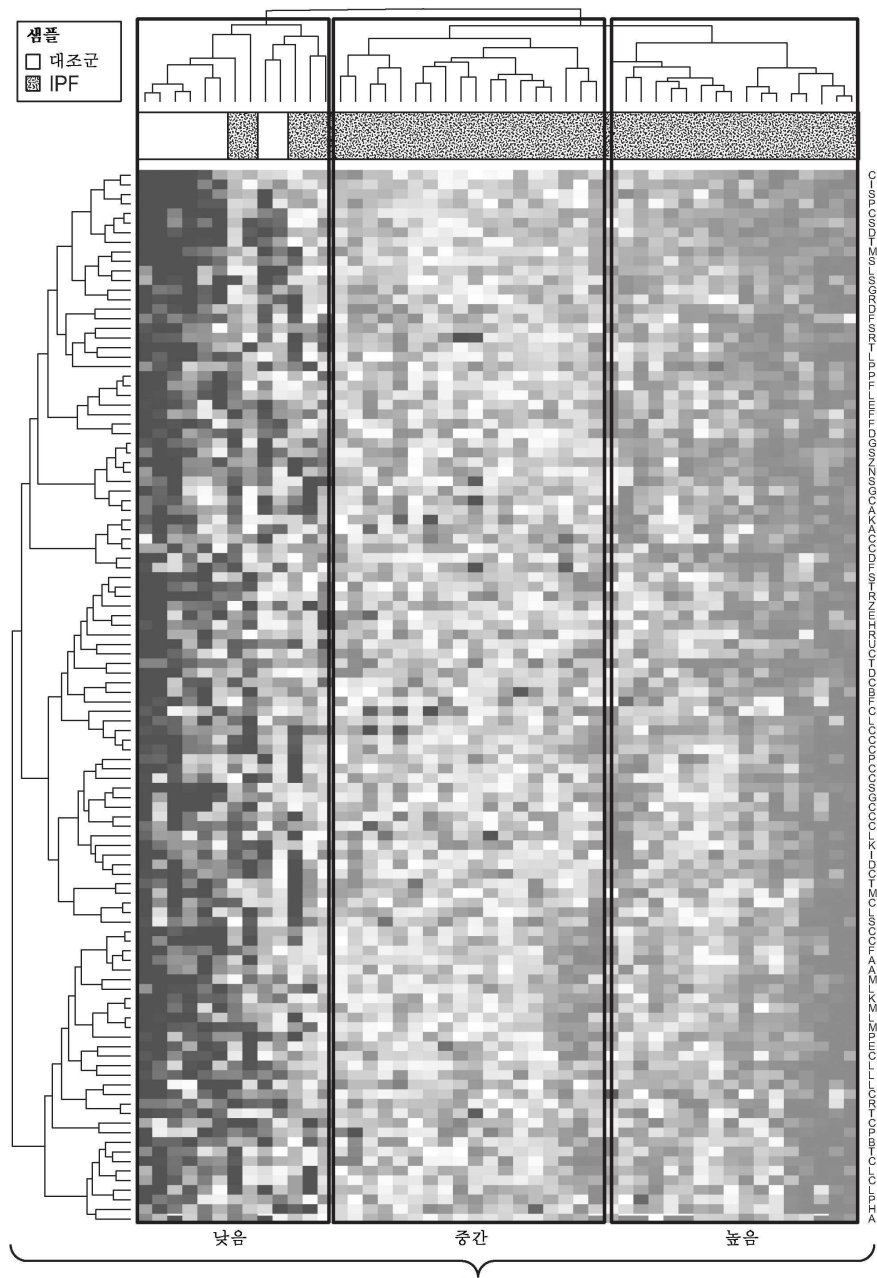
도면1b



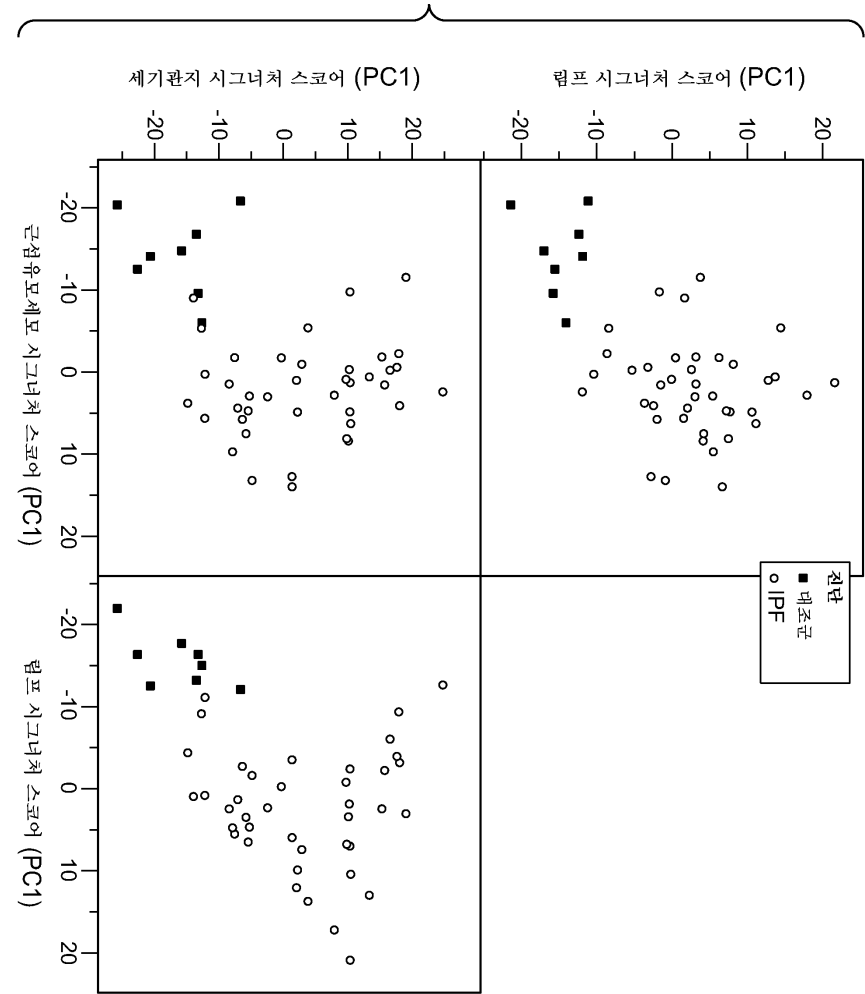
도면1c



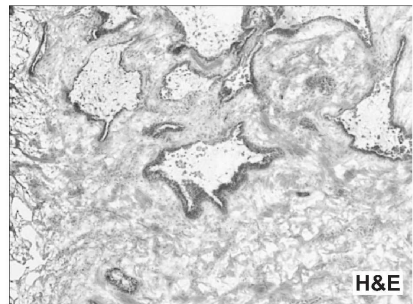
도면1d



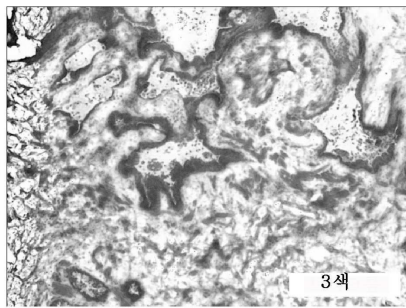
도면1e



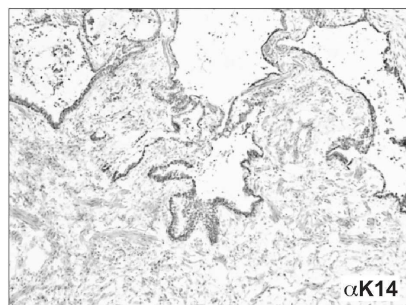
도면2a



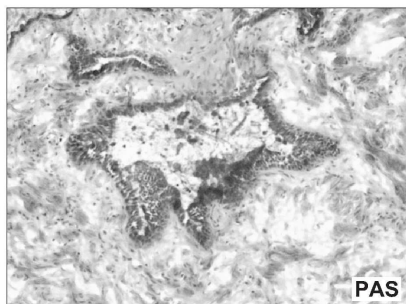
도면2b



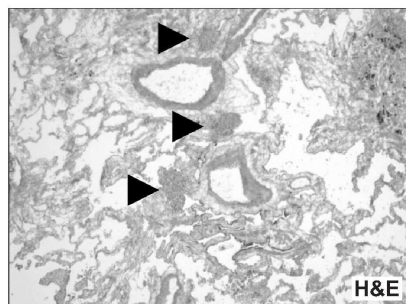
도면2c



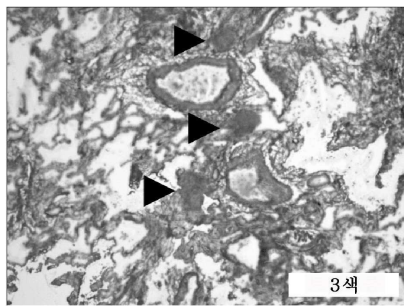
도면2d



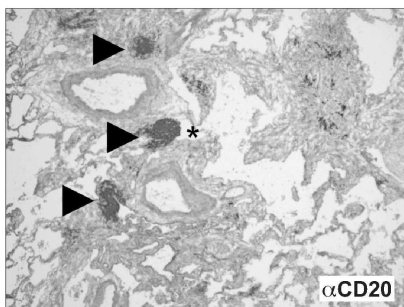
도면2e



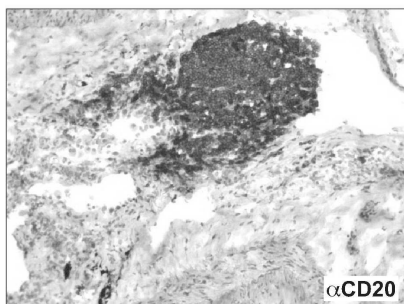
도면2f



도면2g



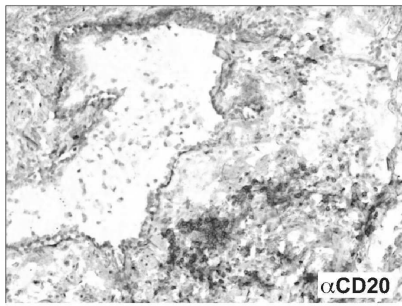
도면2h



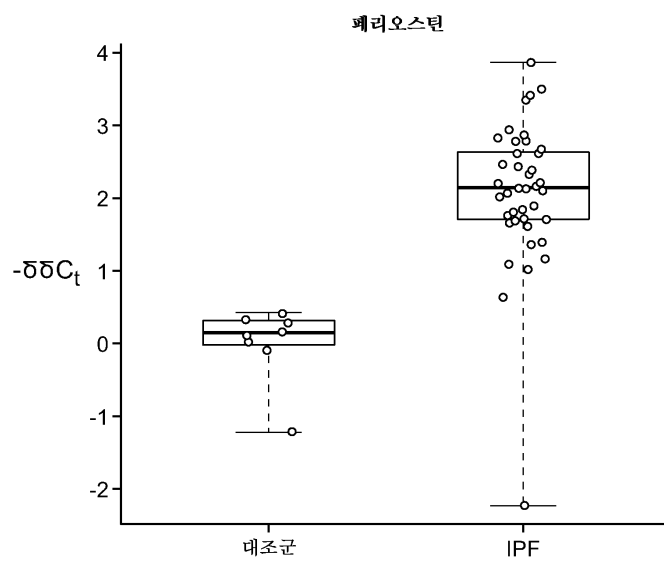
도면2i



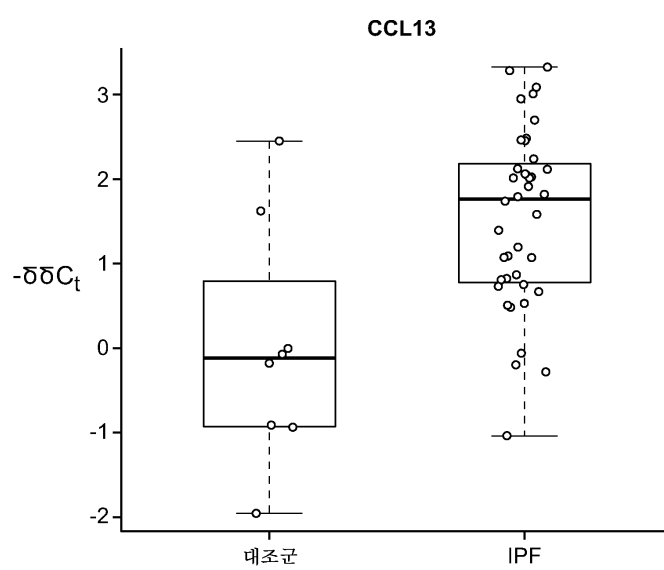
도면2j



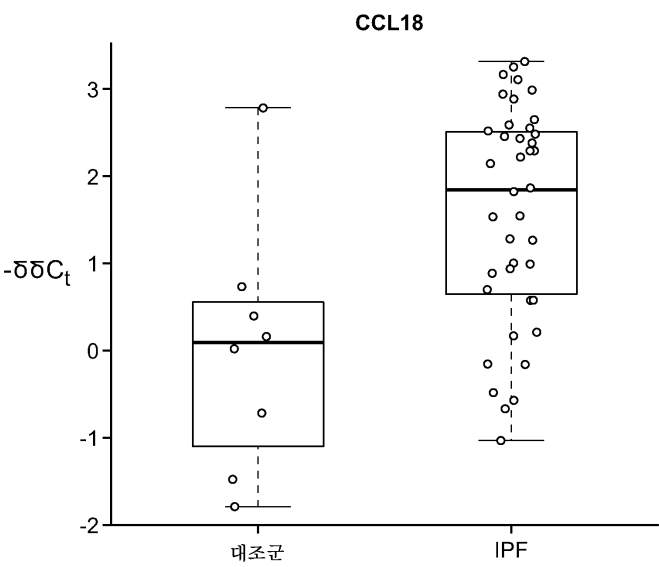
도면3a



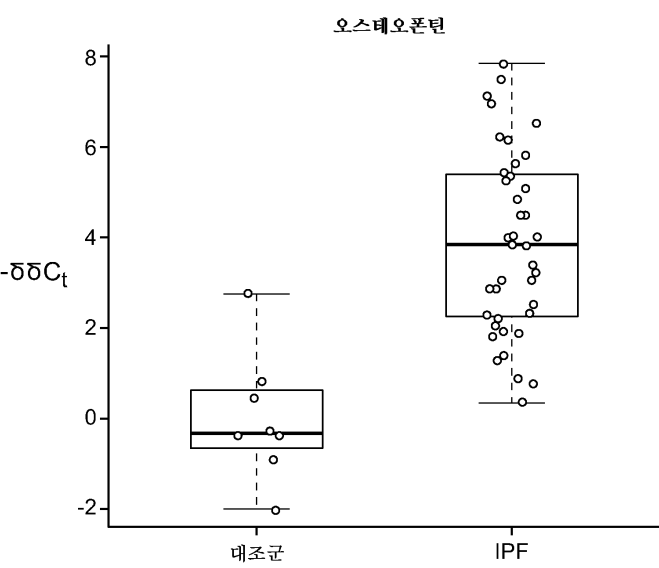
도면3b



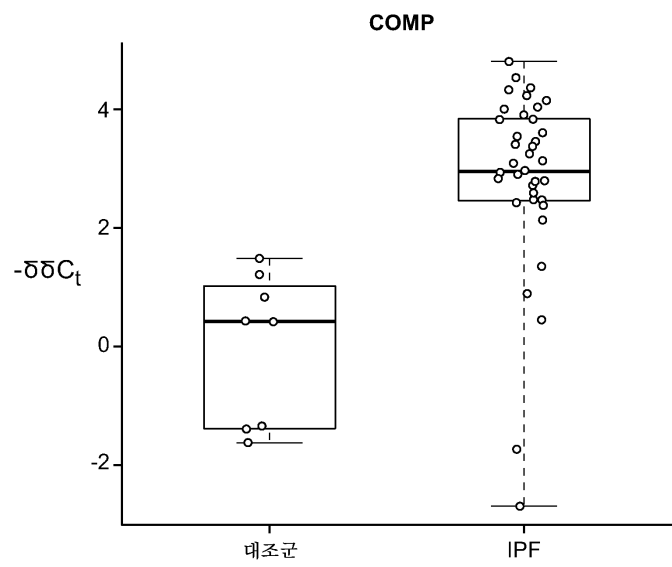
도면3c



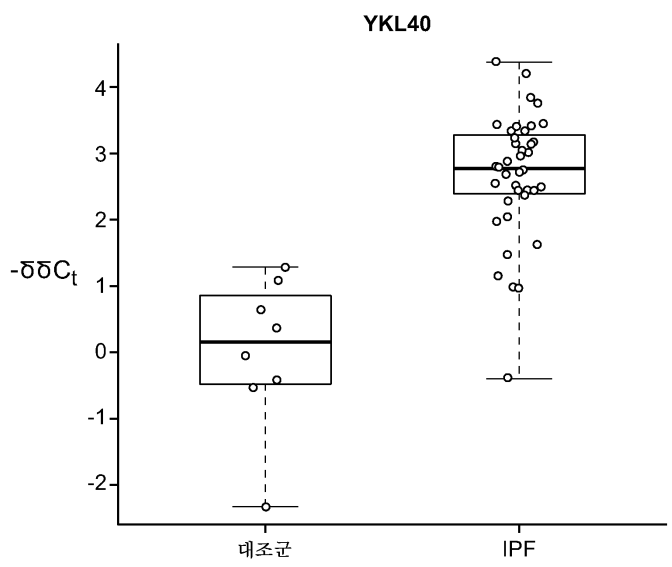
도면3d



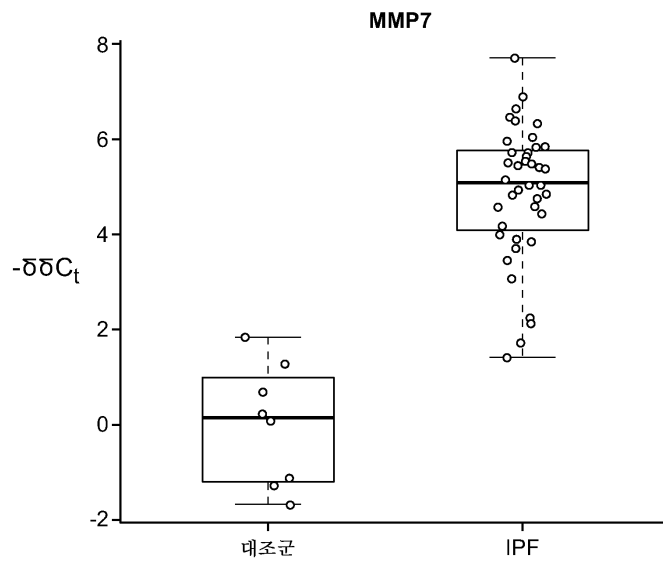
도면3e



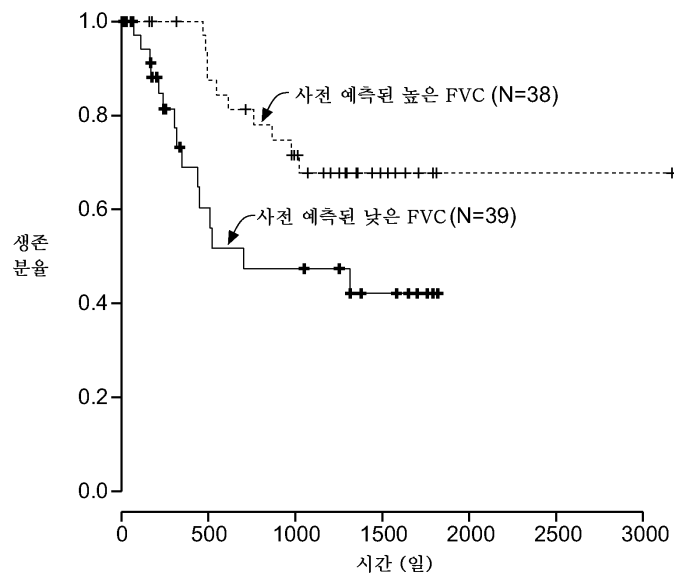
도면3f



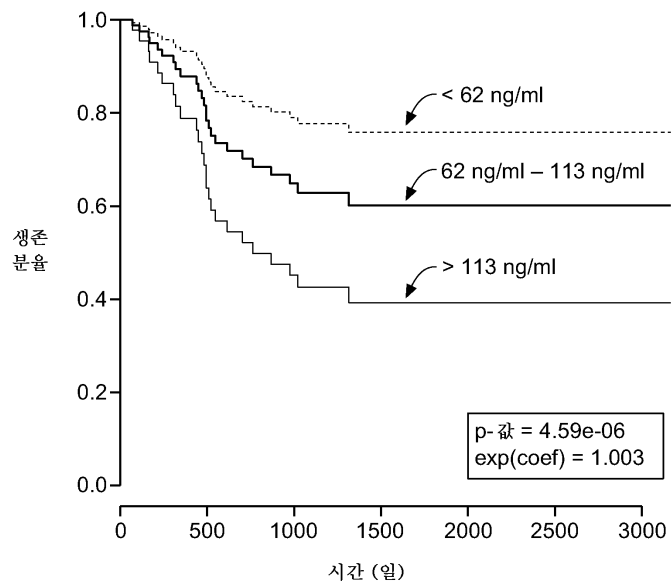
도면3g



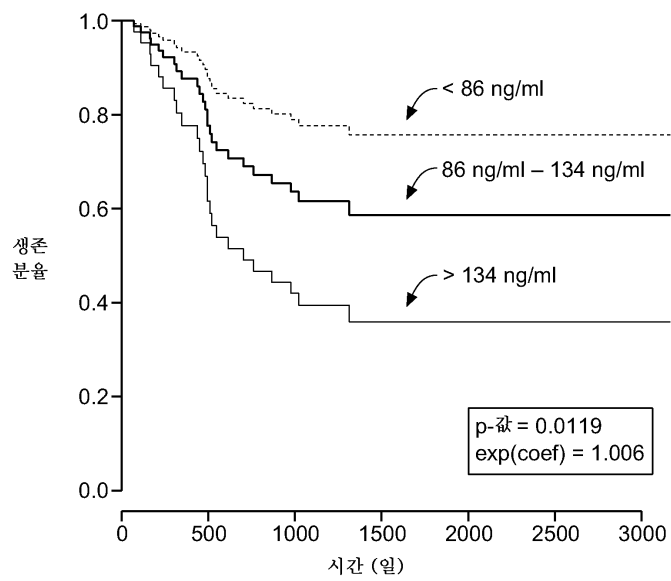
도면4



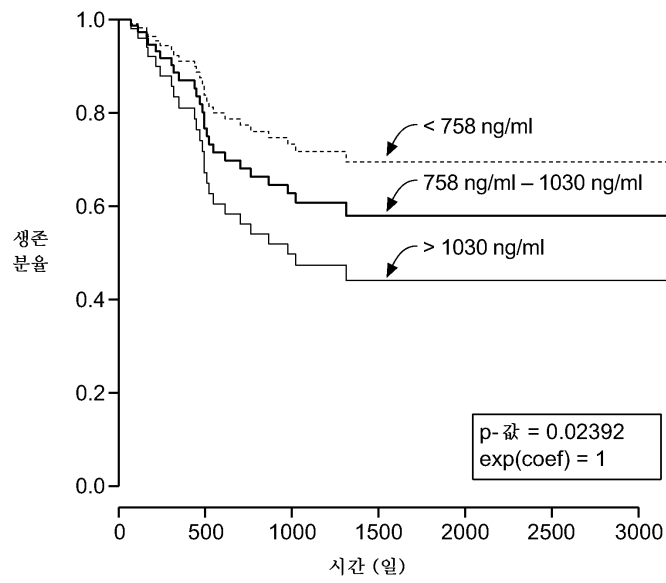
도면5a



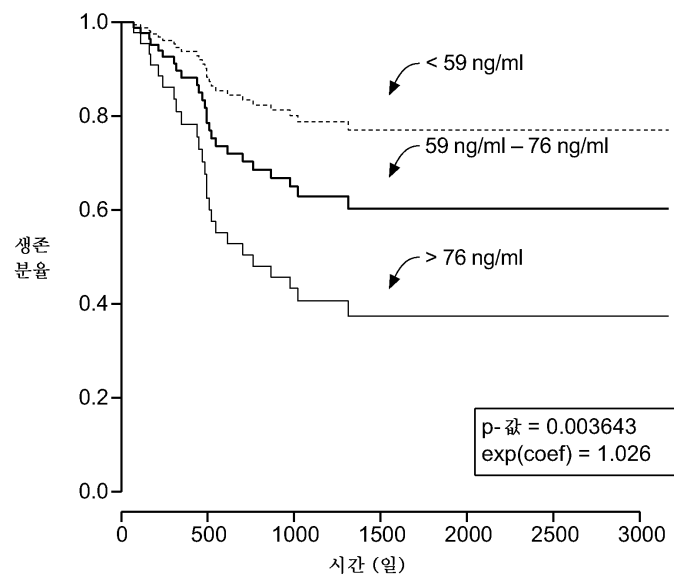
도면5b



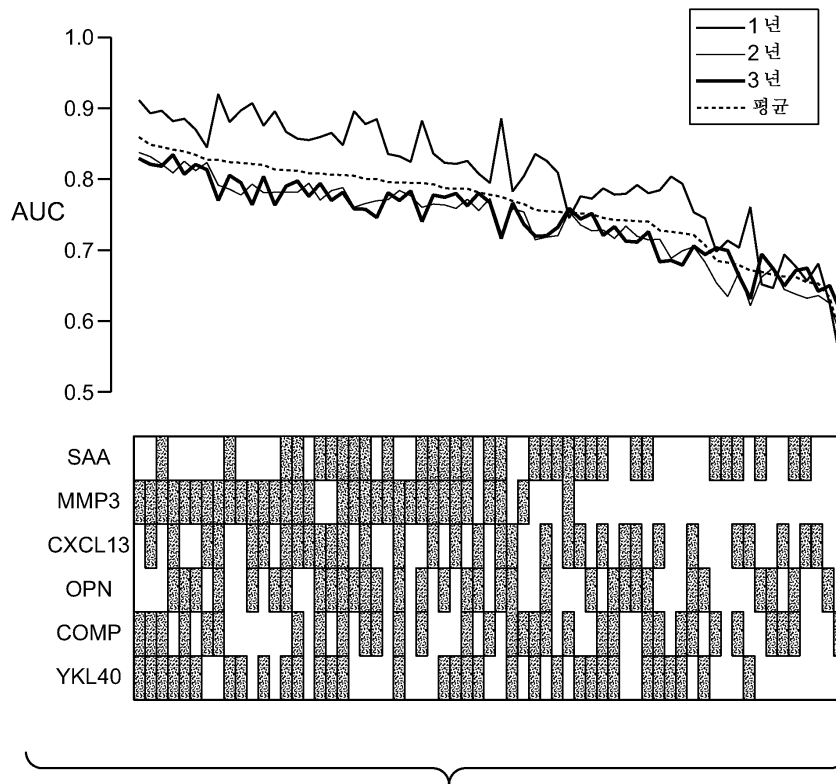
도면5c



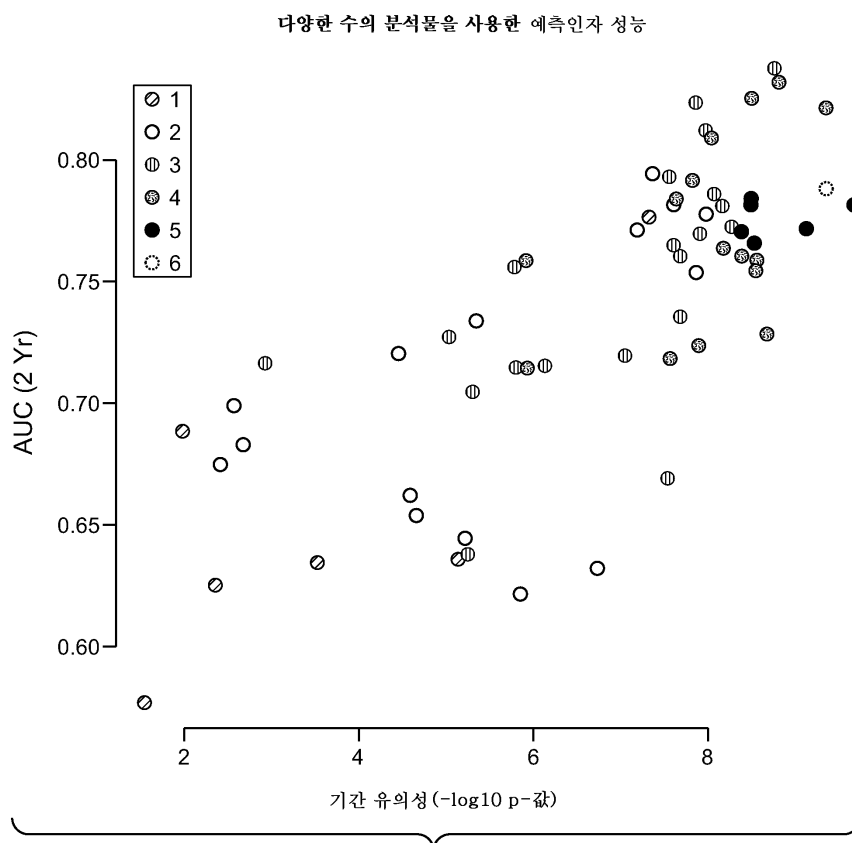
도면5d



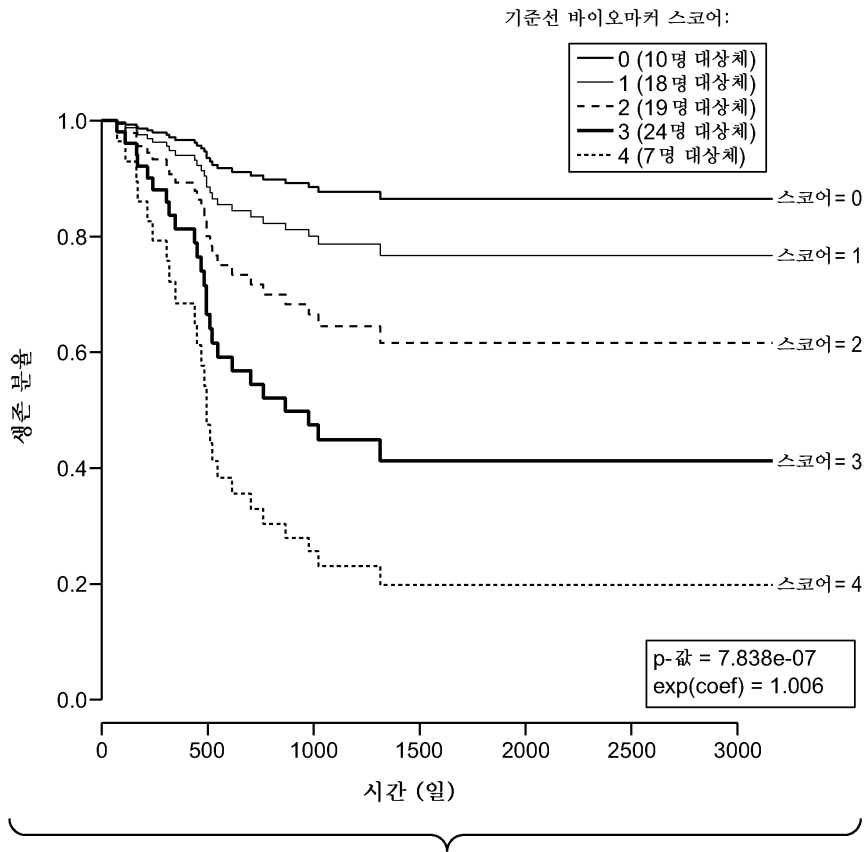
도면6a



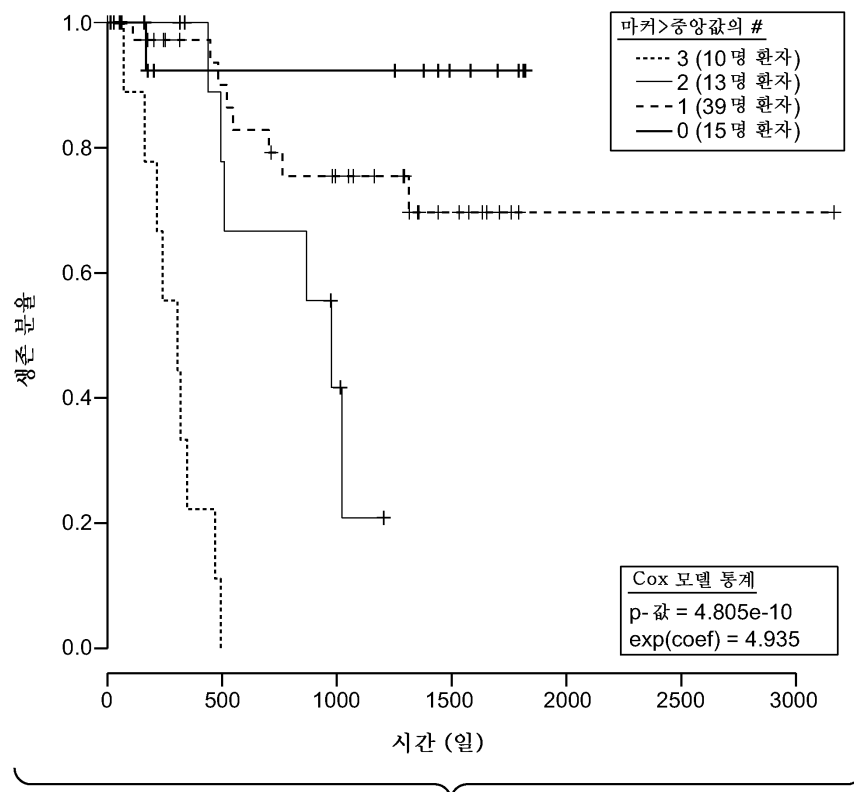
도면6b



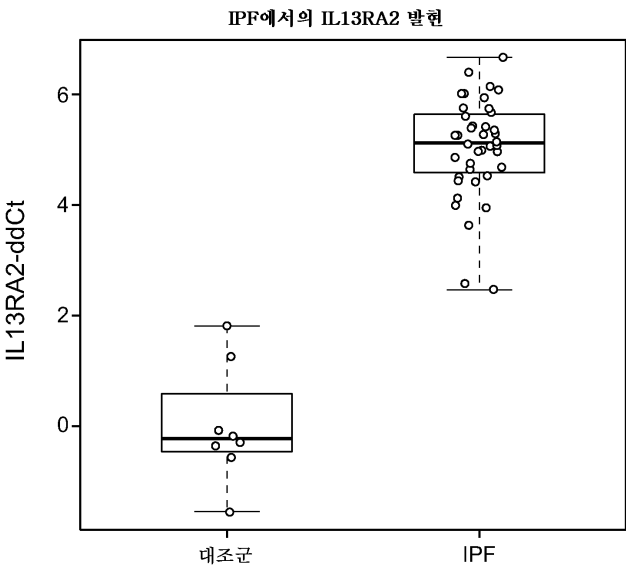
도면7



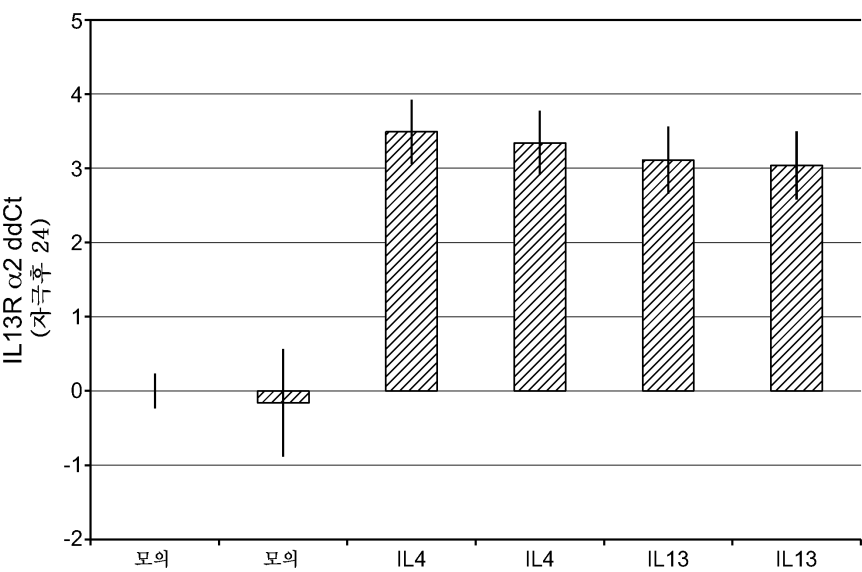
도면8



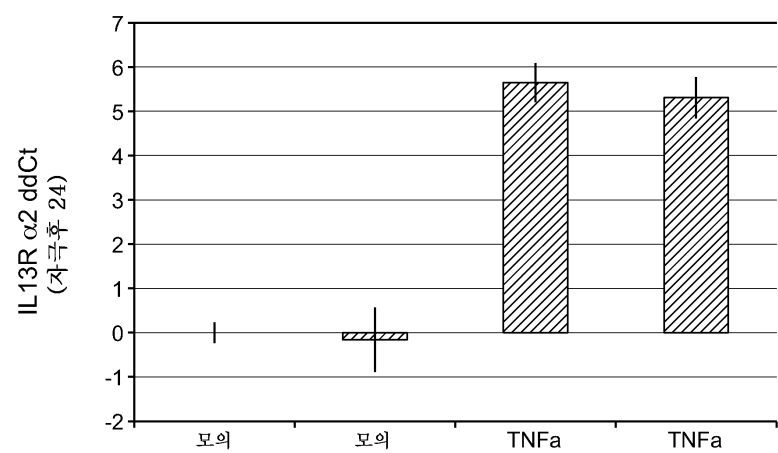
도면9



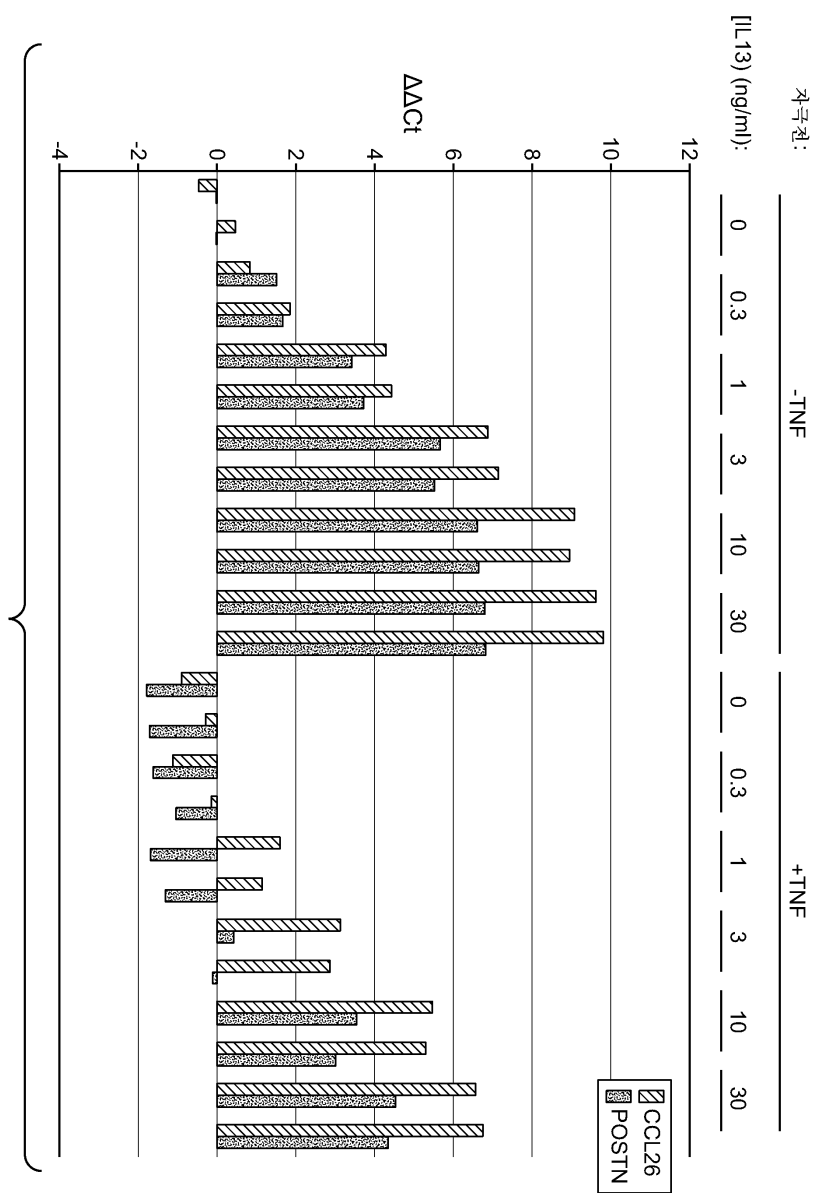
도면10



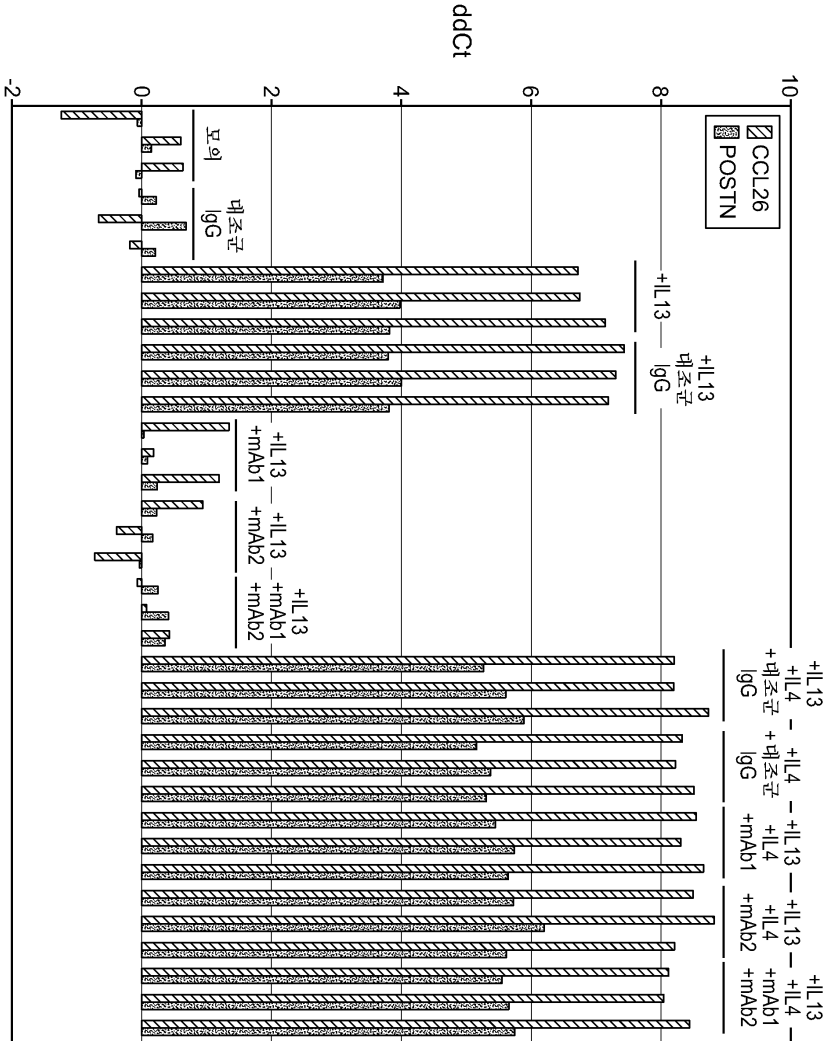
도면11a



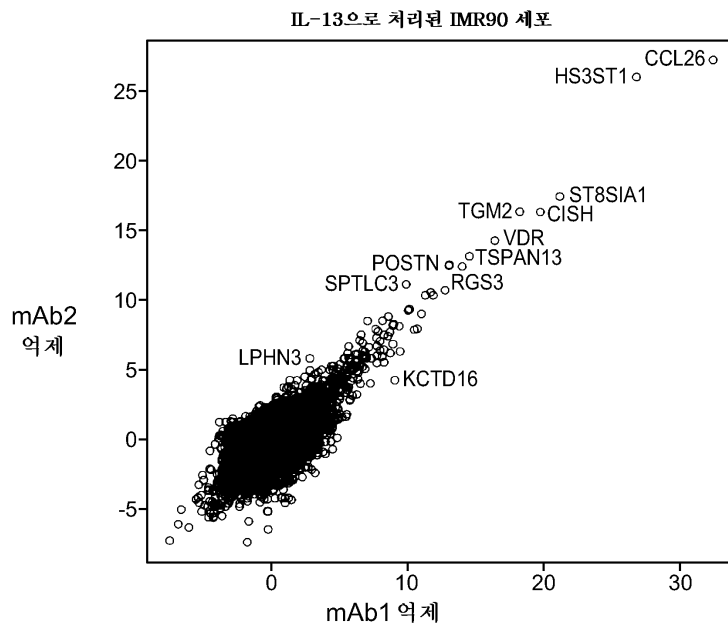
도면11b



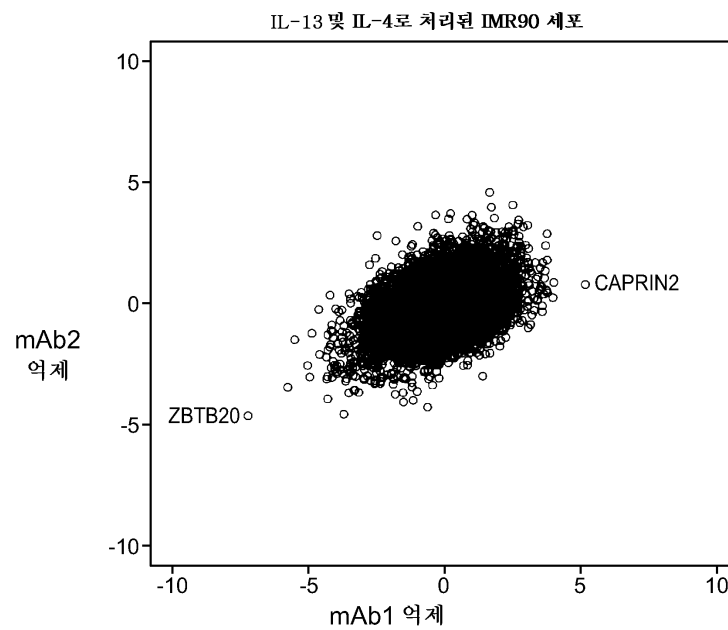
도면12



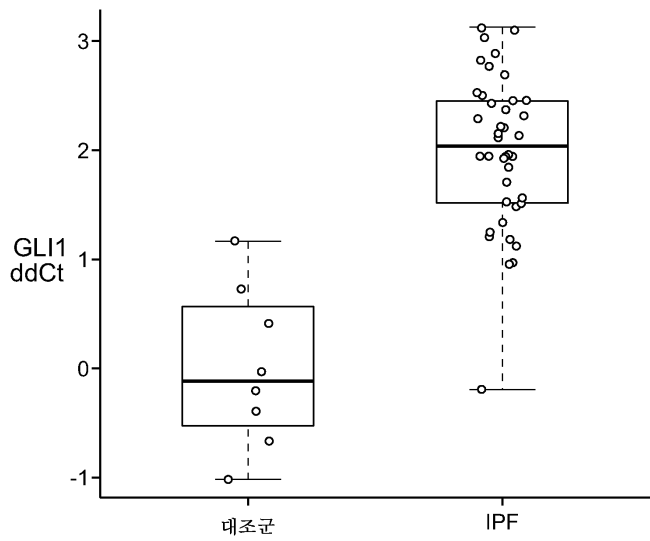
도면13a



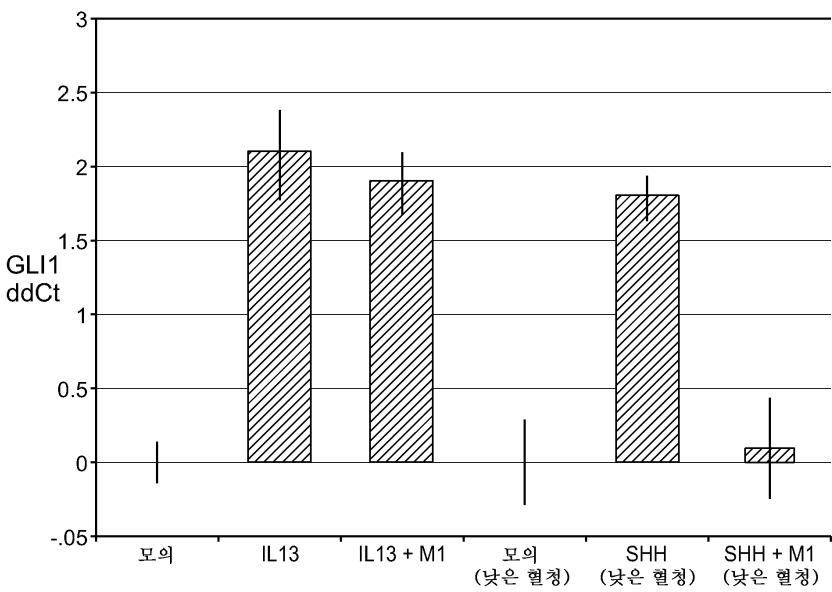
도면13b



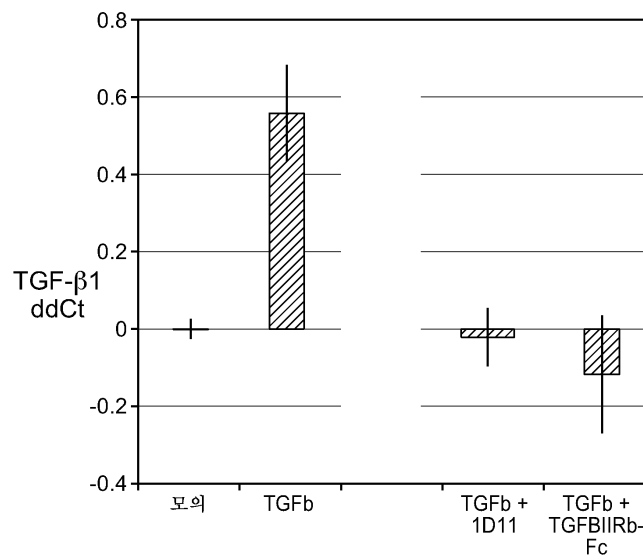
도면14



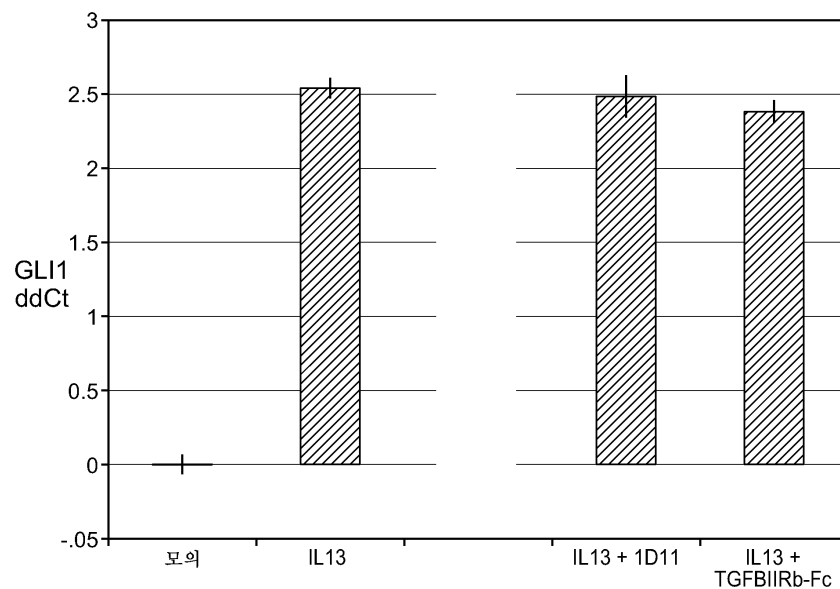
도면15



도면16a



도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> METHODS OF PROGNOSING, DIAGNOSING AND TREATING IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

<130> P4841R1

<140><141><150> 61/707,411

<151> 2012-09-28

<150> 61/616,394

<151> 2012-03-27

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 1

Ala Tyr Ser Val Asn

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 7

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser
20 25 30

Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
35 40 45

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
65 70 75 80

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
85 90 95

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 10

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 10

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser
20 25 30

Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
35 40 45

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
65 70 75 80

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
85 90 95

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 11

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 11

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1	5	10	15
Thr	Leu	Thr	Leu
Thr	Cys	Thr	Val
Ser	Gly	Phe	Ser
Leu	Ser	Ala	Tyr
20	25	30	
Ser	Val	Asn	Trp
Ile	Arg	Gln	Pro
Pro	Gly	Lys	Ala
Leu	Glu	Trp	Leu
35	40	45	
Ala	Met	Ile	Trp
Gly	Asp	Gly	Lys
Ile	Val	Tyr	Asn
Ser	Ala	Leu	Lys
50	55	60	
Ser	Arg	Leu	Thr
Ile	Ser	Lys	Asp
Thr	Ser	Lys	Asn
Gln	Val	Val	Leu

65	70	75	80
Thr	Met	Thr	Asn
Met	Asp	Pro	Val
Asp	Thr	Ala	Thr
Tyr	Tyr	Cys	Ala
85	90	95	
Gly	Asp	Gly	Tyr
Tyr	Pro	Tyr	Ala
Met	Asp	Asn	Trp
Gly	Gln	Gly	Ser
100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val
Ser	Ser	Ala	Ser
Thr	Lys	Gly	Pro
Ser	Val	Phe	Pro
115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Cys
Ser	Arg	Ser	Thr
Ser	Glu	Ser	Thr
Ala	Ala	Leu	Gly

130	135	140
Cys	Leu	Val
Lys	Asp	Tyr
Phe	Pro	Glu
Pro	Val	Thr
Val	Ser	Trp
Asn		
145	150	155
Ser	Gly	Ala
Leu	Thr	Ser
Gly	Val	His
Thr	Phe	Pro
Ala	Val	Leu
Gln		
165	170	175
Ser	Ser	Gly
Leu	Tyr	Ser
Leu	Ser	Ser
Val	Val	Thr
Val	Pro	Ser
Ser		
180	185	190
Ser	Leu	Gly
Thr	Lys	Thr
Tyr	Thr	Cys
Asn	Val	Asp
His	Lys	Pro
Ser		

195	200	205
Asn	Thr	Lys
Val	Asp	Lys
Arg	Val	Glu
Ser	Lys	Tyr
Gly	Pro	Pro
Cys		
210	215	220
Pro	Pro	Cys
Pro	Ala	Pro
Glu	Phe	Leu
Gly	Gly	Pro
Ser	Val	Phe
Leu		

225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440
 <210> 12
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 12

Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser
 20 25 30
Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 35 40 45
Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
65 70 75 80
Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
 85 90 95
Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
 100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 13

<211

> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 13

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr

20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215