



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0020417  
(43) 공개일자 2021년02월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/574 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/57423 (2019.01)  
C12Q 1/6886 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0099693  
(22) 출원일자 2019년08월14일  
심사청구일자 2020년07월23일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
재단법인 의약바이오컨버전스연구단  
인천광역시 연수구 송도과학로 85, 4층(송도동, 연세대학교 국제캠퍼스 포스코그린빌딩)  
(72) 발명자  
이동기  
서울특별시 강남구 언주로63길 20, 미래의학연구센터 (역삼동)  
장윤수  
서울특별시 강남구 언주로63길 20, 미래의학연구센터 (역삼동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 20 항

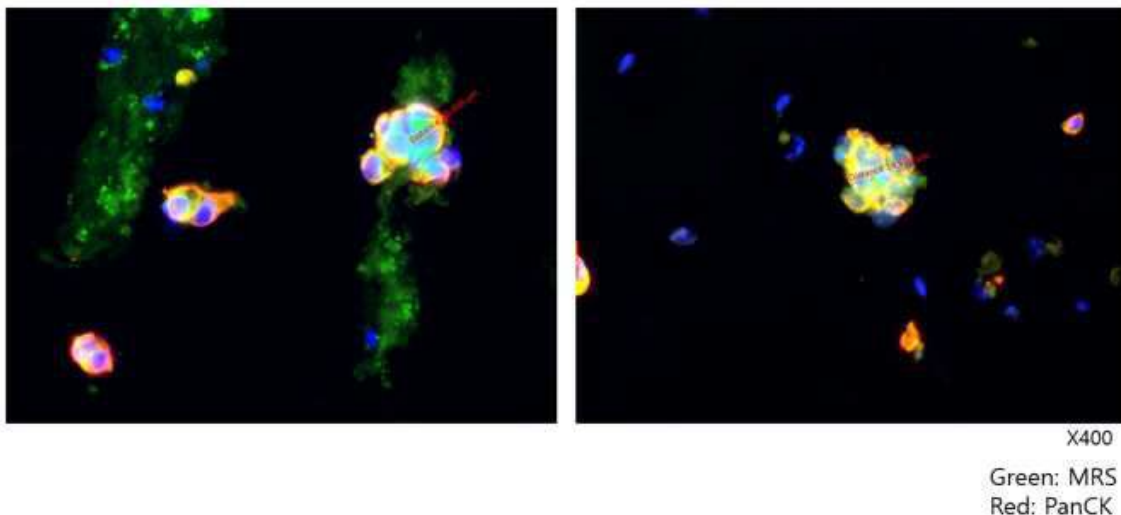
(54) 발명의 명칭 메티오닐-티알엔에이 합성효소 및 판사이토케라틴을 이용한 폐암 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 메티오닐-티알엔에이 합성효소, AIMP2-DX2 및 사이토케라틴-19을 이용한 폐암 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS), AIMP2-DX2 및 사이토케라틴-19(cytokeratin-19)으로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이들 단백질 마커의 조합을 사용하여 폐암 진단의 정확도를 높이는 방법에 관한 것이다.

본원발명이 제공하는 마커의 조합에 의한 경우, 폐암 진단의 정확도가 향상되며, 특히 세포진 검사에 있어서 비정형 세포로 판정된 세포의 폐암 여부를 정확하게 판별할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)  
G01N 2333/4742 (2013.01)  
G01N 2333/90 (2013.01)

(72) 발명자

**김은영**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 내과학교실 (신촌동)

**장성일**

서울특별시 강남구 언주로63길 20, 미래의학연구센터 (역삼동)

**김성훈**

서울특별시 강남구 남부순환로365길 42, 역삼한신아파트 4-1005 (도곡동)

**권남훈**

경기도 수원시 영통구 광교로 145, 차세대융합기술원내 B동 8층 (이의동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091178
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어지원(R&D)
연구과제명	폐암 및 췌장암 환자의 혈청과 조직에서 AIMP2-DX2와 ARS들의 분석을 통한 진단과
치료의 표지자 개발	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082222
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어지원(R&D)
연구과제명	중앙연계사업
기 여 율	25/100
과제수행기관명	(재) 의약바이오컨버전스연구단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081874
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어지원(R&D)
연구과제명	실용화개발사업
기 여 율	25/100
과제수행기관명	(재) 의약바이오컨버전스연구단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.08.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 MRS 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 사이토케라틴은 산성(Type 1) 사이토케라틴, 염기성(Type 2) 사이토케라틴 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 사이토케라틴은 사이토케라틴 1 내지 20으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사이토케라틴인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제제는 MRS 및 사이토케라틴 단백질 각각에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제제는 MRS 및 사이토케라틴 단백질을 코딩하는 각각의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 7

메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 키트.

#### 청구항 8

폐암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료로부터 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 정성 또는 정량 분석하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은

- (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 시료에서 측정된 단백질이 모두 발현이 된 경우 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 시료는 폐 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 폐 세포는 미세바늘흡인법(Fine needle aspiration), 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 폐생검(EBUS-TBLB), 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 바늘 흡인법(EBUS-TBNA) 및 경피적 폐생검으로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 분리하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 상기 방법은 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준을 측정하기 이전에, 동시에 또는 이후에 하기 단계를 추가적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 잠재 환자로부터 채취한 폐 세포를

세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 및 헤chst(Hoechst)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색용액, 및

세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 및 오렌지 G(orange G)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색 용액으로 염색하는 단계; 및

- (ii) 상기 세포염색에 의해 폐 세포를 악성종양세포, 비정형세포(atypical cell) 또는 정상세포로 판단하는 단계.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 (ii) 단계는

상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터

세포가 3차원으로 도말됨; 세포핵/세포질 비율(N/c ratio)이 높음; 염색질의 뭉침 현상 출현; 거친 모양의 핵막; 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택된 두 가지 이상의 형태학적 이상을 보이는 경우에 악성 종양세포로 판정하며,

세포가 한 겹으로 도말되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양일 경우에는 정상 세포로 판정하고,

세포의 변화가 악성 종양세포에는 미치지 못하나 정상으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정

하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

제9항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, 효소면역분석법(ELISA), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트면역전기영동, 면역염색법(면역조직화학염색, 면역세포화학염색 및 면역형광염색 등 포함), 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS(Fluorescence activated cell sorter), SPR(surface plasmon resonance) 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 검사의 민감도 또는 특이도를 향상시키는 방법:

- (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종 이상의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 방법은 민감도, 특이도 또는 이들 모두가 70% 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 17

폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

- (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종 이상의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 폐암 세포 판별법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 판별법은 형태학적 검사와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행되는 것을 특징으로 하는 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 상기 형태학적 검사는

세포 군집성; 세포핵/세포질 비율(N/C ratio); 핵막의 모양; 염색질의 뭉침현상; 핵 내 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 검사하는 것을 특징으로 하는, 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형태학적 검사는 상기 폐 시료에 대하여 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 및 웨스트(Hoechst)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색용액을 이용한 세포핵 염색, 및

에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 및 오렌지 G(orange G)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색용액을 이용한 세포질 염색을 수행함으로써 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 메티오닐-티알엔에이 합성효소와 사이토케라틴(cytokeratin)을 이용한 폐암 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 폐암 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이들 단백질 마커의 조합을 사용하여 폐암 진단의 정확도를 높이는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 암이란 주로 통제되지 않는 세포의 증식에서 시작되어 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장 장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환 군을 총칭한다. 지난 10 여년 동안 암을 정복하기 위해 세포 주기나 세포사멸(apoptosis)의 조절과 발암유전자나 암 억제 유전자들을 포함한 새로운 표적을 모색함에 있어서 눈에 띄는 발전을 거듭해 왔음에도 불구하고 암의 발생률은 문명이 발달됨에 따라 증가되고 있다.

[0005] 이 중 폐암은 흡연인구의 증가와 대기 오염 등의 원인으로 우리나라에서도 급속히 증가하고 있는 종양으로 그 발생 빈도는 남자에서 위암, 대장암 다음으로 3위를 차지하며, 여자에서는 갑상선암, 유방암, 대장암, 위암에 이어 5위를 차지하고 있다(2011년, 국립암센터). 폐암은 전체 암발생의 10%를 차지하나, 암 사망률에서는 폐암이 남녀 모두에서 1위를 차지하며, 폐암 사망률은 전체 암으로 인한 사망자 중 22.6%를 차지하고 있다(2012.국립암센터).

[0007] 이러한 높은 사망률은 대부분의 폐암이 진단 당시에 이미 제3기 이상으로 진행된 상태로 진단되므로 완치가 어려운 경우들이 대부분이라는 점에 원인이 있다. 따라서 폐암을 조기에 진단하여 폐암으로 인한 사망률을 줄이는 것이 시급한 문제이다 (Wulfkuhle et al., Nat. Rev. Cancer 3, 267-275.(2003)). 폐암을 진단하기 위해서 여러 가지 방법이 복합적으로 사용되고 있는데, 현재까지는 종양의 크기, 림프절 전이 유무 등을 조사하거나, 폐종양 조직 또는 림프절 등을 생검하여 면역조직화학방법으로 분석하거나 흉부 X-선 촬영, 흉부 전산화 단층 촬영, 기관지 내시경을 이용하여 진단하고 있다 (Manser et al., Curr. Opin. Pulm. Med. 10, 266-271. (2004)).

[0009] 그러나, 흉부전산화 단층 촬영의 경우 폐암의 크기가 약 0.1 cm 이상 되어야 측정가능한데, 이 시기는 이미 암이 다른 조직으로 전이되었을 가능성이 높다는 문제가 있고, 기관지 내시경을 이용한 방법은 내시경이 기관지로 삽입되어 폐 내부를 직접 관찰할 수 있으나 폐 말단에 있는 종양을 관찰하기 어렵다는 공간적 한계의 문제를 가지고 있다.

[0011] 한편, 병리검사(pathological examination)란 적출한 세포, 조직 또는 장기를 이용해 주로 형태학적 입장에서 질병의 근원을 해명하려 하는 검사를 의미하며, 육안적 소견의 파악, 광학, 전자현미경 검색 등의 방법으로 질병의 진단에 응용되는 중요한 검사다. 이러한 병리검사에는 조직병리검사와 세포병리검사가 있다. 한편, 조직검사와 세포진(cytodiagnosis) 검사는 많은 차이를 지니며, 잘 알려진 암 마커들을 이용한 분석 실험에서 조직검사와 세포진검사 사이에는 진단 민감도, 특이도 등 그 예측 정확도에서 많은 차이를 보이는 것으로 알려졌다. 따라서 기존에 알려진 암 마커라고 하더라도 구체적인 검체(조직 또는 세포)에 따라서 실질적으로 진단 실효성을 거둘 수 있는지는 별개의 문제로 여겨진다.

[0013] 체내에서 분리된 세포를 병리학적으로 검사함에 있어서 장애가 되는 것 중에 비정형 세포(atypical cell)에 대한 판단의 어려움도 한몫하고 있는 실정이다. 1976년 Melamed 등이 염색성 변화는 아니면서 이형성으로 진단하기에는 미흡한 세포변화를 편평세포 비정형성으로 발표한 후, 비정형적 세포에 대한 진단, 해석 및 치료방침결

정에 많은 논란이 있어왔다. 따라서 이의 개선을 위하여 The bethesda system(TBS)이 제정되었고, TBS에서는 비정형적 세포(atypical cell)라는 용어의 사용을 염증성, 전암성 또는 종양성 세포변화로 진단할 수 없는, 본질을 알 수 없는 경우(undetermined significance)에만 극히 제한하여 사용하고 있다. 비정형 세포에 대한 치료적 방침과 관련하여 다른 견해가 있을 수 있기 때문에, 문제가 된다. 특히, 실제로 암이 진행되고 있는 상태임에도 불구하고 조직 또는 세포 수준의 검사에서 비정형 세포로 진단되거나 또는 조직 검체에서만 결과가 판정되어 나오는 경우가 상당하다는 데에 문제가 있다. 부정형의 조직 구조나 세포 형태가 염증성 병변인지 신생물인지 구분이 명확하지 않은 경우 atypism 또는 cellular atypia라고 진단하는 경우가 많다. 따라서 다른 검사수단 등에 의하여 여러번 반복적인 재검사의 필요성이 따르며 이에 따른 시간적 경제적 비용이 상당히 소모되고 있는 실정이다.

[0015] 폐는 신체 깊숙이 위치하므로, 암이 폐에 존재하는 경우 이를 검출하기가 매우 어렵다. 영상학적 검사들을 통해 수술이 가능한 폐암일 경우 수술을 시행 받기 전 종괴에 대한 조직검사나 내시경조음과하 세포진 검사를 통해 폐암의 확정 진단이 필요하다. 또한 수술을 할 수 없는 경우에도 항암치료나 방사선 치료를 위한 조직학적 진단을 위해 조직검사나 세포진 검사가 필요하다.

[0017] 폐암의 조직검사나 세포진 검사는 주로 H&E 염색 또는 pap 염색 등 일반염색을 기반으로 하는 병리학적 진단에 의존하고 있다. 그러나 상기 기존 염색방법에 의해 폐암을 확진하는 것은 의료진의 경험과 해석기술에 따라 다른 진단이 내려지기도 하며, 특히 H&E염색 또는 pap 염색을 통한 폐 세포 관찰에서 비정형(atypical) 세포로 판정된 경우 폐암인지 다른 양성(benign)질환인지 여부에 대한 구별이 매우 어려워 환자의 질환에 대한 정확한 진단 및 치료가 빠르게 이루어지지 못하고 있다. 세포진에 대한 진단이 정확하지 않아 수술을 받을 수 있는 폐암 환자에게 적절한 치료를 할 수 없으며, 반대로 불필요한 수술을 방지하기도 어려운 문제점이 있다. 따라서 임상적으로 폐암의 치료 효과를 증대시키기 위해서는 세포진에 대한 정확한 진단법이 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0019] 이에 본 발명자들은 폐암 임상 환자들로부터 수득된 폐 시료를 이용하여 세포 수준에서 보다 정확하게 폐암을 진단할 수 있는 마커를 찾기 위해 세포학적 분석(cytological analysis)을 면밀히 수행한 결과, MRS(methionyl-tRNA synthetase)와 사이토케라틴(cytokeratin)의 마커 발현여부(증가)를 통해 악성종양세포를 상당히 높은 정확도로 명확히 구분할 수 있음을 확인하였으며, 특히 이러한 구분은 H&E 염색 또는 pap 염색을 이용하는 기존 세포 병리학적 검사법에 의해 비정형 세포(atypical cell)로 판정되어 종양인지 여부에 대한 확신이 불가능하였던 세포 시료에서도 가능하다는 것을 최초로 규명하였으며, 이와 같은 마커 조합을 통한 세포진 검사법을 통상의 염색방법과 병용하여 사용하면 폐암 진단의 정확도가 더욱 현저히 상승함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0021] 따라서, 본 발명의 목적은 메티오닐 티알렌에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 다른 목적은 메티오닐 티알렌에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 검사의 민감도 또는 특이도를 향상시키는 방법을 제공하는 것이다:

[0026] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단

계; 및

[0027] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계.

[0029] 본 발명의 다른 목적은 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

[0030] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0031] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 폐암 세포 판별법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0033] 상기한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메티오닐 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.

[0037] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 검사의 민감도 또는 특이도를 향상시키는 방법을 제공한다:

[0038] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0039] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계.

[0041] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여

[0042] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0043] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 폐암 세포 판별법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0045] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0047] 본 명세서에 개시된 내용 전반에 걸쳐서, 본 발명과 관련된 다양한 양상 또는 조건들이 범위 형식으로 제안될 수 있다. 본 명세서에서 범위값의 기재는, 별다른 언급이 없는 한 해당 경계값을 포함하는 것으로서 즉, 하한값 이상 내지 상한값 이하의 값들을 모두 포함하는 의미이다. 범위 형식의 서술은 단순히 편의성 및 간략성을 위한 것이며, 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한 (inflexible limitation)으로서 해석되지 않아야 하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서 범위의 서술은 상기 범위 내의 개별적인 수치값들 뿐만 아니라 모든 가능한 하부범위

(subrange)를 구체적으로 개시한 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 5와 같은 범위의 서술은 상기 범위 내의 개별적 수치들, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 3.5, 4.3 및 5 뿐만 아니라, 1 내지 3, 1 내지 4, 2 내지 5, 2 내지 3, 2 내지 4, 3 내지 4 등과 같은 하부범위들을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

- [0049] 본 발명에서 용어 '폐암(lung cancer)'란 폐에 발생한 악성(malignant) 종양 또는 암을 의미하는 것으로서, 증식속도가 빠르고 주위조직으로 침투 및 다른 기관으로 전이하는 특징을 가진 악성(malignant) 신생물을 의미한다. 상기 악성 종양 또는 암은, 성장속도가 느리고 전이되지 않는 특성을 지니는 양성 종양(benign tumor)과 구분된다.
- [0050] 본 발명의 폐암은 비소세포폐암(NSCLC, non small cell lung cancer) 및 소세포폐암(SCLC, small cell lung cancer)을 모두 포함하며, 바람직하게는 본 발명의 폐암은 비소세포폐암일 수 있다
- [0051] 본 발명에서 진단의 목적으로 하는 폐암은, 이것이 원발암이건 전이에 의하여 폐에 2차 적으로 암이 생긴 것이건 그 발생원인이 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게 원발암을 대상으로 하는 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 용어 '정상'은 악성 종양 또는 암이 아닌 상태(Negative for malignancy, 악성종양세포 음성)를 의미하는 것으로서, 아무런 질환이 없는 완전 정상 상태, 악성 종양(암)이 아닌 다른 질병 상태, 또는/및 'Benign(양성)'에 해당하는 관정 상태를 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 임상적인 (최종)질환 상태 관정에 있어서 'Benign'으로 기재되는 양성 표시는 'positive'로 표시되는 해당 검사법 상에서의 양성 표시와 구분되는 것으로, 상기 'positive'로 표시되는 양성은 해당 검사법에서 반응이 있는 것으로 나옴 또는 해당 검사법에서 암의 가능성을 의미하는 결과가 나옴을 의미한다.
- [0055] 폐암에 대한 현재의 진단 방법은 암성 세포(cancerous cell)에 대한 객담 검사, 흉부 X-레이, 기도의 광섬유 평가 및 저선량 나선 컴퓨터 단층촬영(low dose spiral computed tomography(CT)이 가장 일반적이다. 객담 세포 검사(sputum cytology)는 매우 낮은 민감도를 가진다. 흉부 X-레이 또한 비교적 둔감하며, 눈으로 볼 수 있게 1cm 보다 큰 크기의 병변을 필요로 한다. 기관지경 검사(bronchoscopy)는 종양이 기관지경이 접근하기 쉬운 기도 내에서 눈에 보일 필요가 있다. 가장 널리 알려져 있는 진단 방법은 CT지만, X-레이와 마찬가지로 CT의 사용은 그 자체가 암을 유발할 수 있는 전리 방사선(ionizing radiation)을 수반한다. CT는 또한 현저한 제한을 가진다: 스캔(scan)은 해석하는데 매우 높은 수준의 기술 능력을 필요로 하며, 발견된 많은 이상들은 사실 폐암이 아니며, CT 소견을 받는데 상당한 건강관리 비용을 야기한다. 가장 흔한 우발적 소견(incidental finding)은 양성 폐 결절(benign lung nodule)이다.
- [0057] 폐 결절(lung nodule)은 폐 내에 위치하고 있는 비교적 동그란 병변 또는 비정상적인 조직의 부위이며, 크기가 다양할 수 있다. 폐 결절은 양성 또는 암성일 수 있으나, 대부분은 양성이다. 결절이 4mm 미만이면 유병율은 단지 1.5%이고, 결절이 4-8mm이면 유병율은 대략 6%이고, 결절이 20mm 이상이면 발생률은 대략 20%이다. 작은 그리고 중간 크기의 결절에 대하여 환자는 1년간 3개월 안에 반복 촬영을 받을 것을 권유받는다. 많은 커다란 결절들에 대하여, 환자는 이것들의 대부분이 양성이라 할지라도 (외과적이며 합병증을 야기할 수 있는) 생검(biopsy)을 받는다.
- [0059] 이러한 폐 결절의 악성 또는 양성 여부를 판단함에 있어서 폐 검체를 수득하기 위한 미세바늘흡인법(fine needle aspiration)이 가장 일반적으로 수행되는 방법이며, 얻어진 폐 검체를 이용하여 종래 통상적인 염색방법으로 확인하면 폐암의 진단율은 결절의 크기가 1.5cm 이상인 경우 95%에 달하나, 크기가 작아 1.5cm 미만인 경우 74% 정도이고, 결절의 크기가 작아질수록 진단율 또한 낮아진다는 한계가 있다.
- [0061] 이에 반해, 본 발명자들은 MRS 및 사이토케라틴(CK)의 마커 조합을 이용할 경우, 세포진(cytodiagnosis)에서 높은 정확도의 폐암 진단결과를 수득할 수 있음을 발견하였다. 즉, 정상 폐 세포(즉, 비-종양성 폐 세포)와 대비

적으로 전술한 마커들이 폐암 세포에서 특이적으로 고발현되며, 이들 마커의 조합은 각각의 마커 단독과 비교하여 향상된 폐암 진단율을 나타내며, 특히 세포진 진단에서 기존 세포염색 방법(예를 들어 H&E 염색 또는 pap 염색 등)으로 확정진단이 어려운 비정형(atypical) 세포에 대해서도 높은 정확도로 폐암 세포의 구별을 가능하게 한다는 현저한 효과를 밝힌 바 있다. 특히 이러한 폐암 진단 정확도는, 종래 사용되던 통상적인 세포염색 방법과 병용하여 진단하였을 때 진단의 민감도 및 특이도가 현저하게 상승된 것을 확인하였다.

[0063] 따라서 본 발명은 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 폐암 진단용 조성물, 및 이를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.

[0065] 본 명세서에서 용어 '진단'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인(판별)하는 것을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에 있어서 상기 진단은 MRS 단백질의 발현 여부 또는 발현 수준을 측정하여 폐암의 존재 또는 발병 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0067] 본 발명에서 'MRS'는 메티오닐 티알엔에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase)를 의미하는 것으로서, 상기 MRS는 아미노산 메티오닌과 tRNA의 아미노아실레이션(aminoacylation) 반응을 매개하는 효소이다. 본 발명의 MRS 단백질은 당업계에 공지된 MRS 아미노산 서열을 포함하는 것이라면 그 구체적 서열 및 이의 생물 기원이 특별히 제한되지 않는다. 일례로 인간에서는 MARS 유전자에 암호화되어 있으며, MRS의 서열 정보는 NM\_004990(mRNA), NP\_004981.2, P56192.2(단백질) 등의 Genbank(NCBI) accession number로 공지되어 있다. 바람직하게 본 발명의 MRS는 서열번호 1로 표시되는 인간의 MRS 단백질 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 더욱 바람직하게 본 발명의 MRS 단백질은 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다. 상기 MRS는 cytoplasmic form(cytoplasmic methionyl-tRNA synthetase)과 mitochondrial form(mitochondrial methionyl-tRNA synthetase)의 두 가지 아형(isoform)이 있다. 본 발명에서의 MRS는 바람직하게는 cytoplasmic form일 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 '사이토케라틴(cytokeratin)'은 변화하는 정도에 대한 많은 유형의 상피 세포에 의해 발현되는 중간 섬유 단백질의 패밀리이다. 상피 세포에 의해 발현되는 사이토케라틴의 서브세트는 상피의 유형에 의존한다. 본 발명에서 상기 사이토케라틴은 산성(Type 1) 사이토케라틴, 염기성(Type 2) 사이토케라틴 및 이들의 아형을 모두 포함한다. 상기 산성 사이토케라틴은 사이토케라틴 9, 사이토케라틴 10, 사이토케라틴 11, 사이토케라틴 12, 사이토케라틴 13, 사이토케라틴 14, 사이토케라틴 15, 사이토케라틴 16, 사이토케라틴 17, 사이토케라틴 18, 사이토케라틴 19 및 사이토케라틴 20을 포함하며, 상기 염기성 사이토케라틴은 사이토케라틴 1, 사이토케라틴 2, 사이토케라틴 3, 사이토케라틴 4, 사이토케라틴 5, 사이토케라틴 6, 사이토케라틴 7 및 사이토케라틴 8을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서 상기 사이토케라틴은 사이토케라틴 1 내지 20으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0071] 본 발명에서 상기 각 사이토케라틴 단백질은 당업계에 공지된 아미노산 서열을 포함하는 것이라면 그 구체적 서열 및 이의 생물 기원이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 인간 유래의 사이토케라틴일 수 있다.

[0073] 본 발명에서 용어 '발현(expression)'은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다.

[0075] 본 발명에서 용어 '단백질'은 '폴리펩타이드(polypeptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0077] 상기 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 당업계에 단백질의 발현수준 측정에 사용가

능한 것으로 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 MRS 단백질 및 사이토케라틴 단백질 각각에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.

[0079] 본 발명에서 용어 '항체(antibody)'는 항원성 부위에 특이적으로 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin)을 의미한다. 더욱 구체적으로, 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 당단백질을 가리킨다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(이하, HCVR 또는 VH로 약기) 및 중쇄불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(이하 LCVR 또는 VL로 약기) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라 일컬어지는 더욱 보존된 영역이 산재된 초가변성 영역(상보성 결정 영역(CDR)이라 일컬어짐)으로 더욱 세분될 수 있다. VH 및 VL의 각각은 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은, 면역 체계의 다양한 세포(예, 효과기 세포) 및 전통적인 상보 체계의 첫 번째 성분(C1q)을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0081] 본 발명에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질(MRS) 또는 당업계에 공지된 아미노산 서열을 포함하는 사이토케라틴 단백질 각각에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 상기 각 항체는 MRS 또는 사이토케라틴 유전자를 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 수득하고, 수득한 단백질을 동물에 주입하여 생성되는 항체를 수득하는 등의 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다. 상기 각 항체는 각 단백질의 전장 서열 단백질을 통해 제작되는 것일 수도 있고, 또는 각 단백질의 항원성 부위를 포함하는 단백질의 단편을 이용하여 각 단백질에 특이적인 항체를 제조할 수도 있다. 본 발명의 항체의 구체적 서열과 그 형태는 특별히 제한되지 않으며, 다클론항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 포함한다. 또한 상기 항체는 제공되는 면역글로불린으로서의 종류가 특별히 제한되지 않으며, 일례로 IgG, IgA, IgM, IgE 및 IgD로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 IgG 항체일 수 있다. 나아가 본 발명의 항체에는 상기 각 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다. 또한 항원-항체 결합성(반응)을 갖는 것이라면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 각 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 디아바디(diabody), scFv 등의 형태일 수 있다.

[0083] Fab(fragment antigen-binding)는 항체의 항원 결합 단편으로, 중쇄와 경쇄 각각의 하나의 가변 도메인과 불변 도메인으로 구성되어 있다. F(ab')<sub>2</sub>는 항체를 펩신으로 가수분해시켜서 생성되는 단편으로, 두 개의 Fab가 중쇄 경첩(hinge)에서 이황결합(disulfide bond)으로 연결된 형태를 하고 있다. F(ab')는 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 이황결합을 환원하여 분리시킨 Fab에 중쇄 경첩이 부가된 형태의 단량체 항체 단편이다. Fv(variable fragment)는 중쇄와 경쇄 각각의 가변영역으로만 구성된 항체 단편이다. scFv(single chain variable fragment)는 중쇄가변영역(VH)과 경쇄가변영역(VL)이 유연한 펩티드 링커로 연결되어 있는 재조합 항체 단편이다. 디아바디(diabody)는 scFv의 VH와 VL가 매우 짧은 링커로 연결되어 서로 결합하지 못하고, 동일한 형태의 다른 scFv의 VL와 VH와 각각 결합하여 이량체를 형성하고 있는 형태의 단편을 의미하며, 본 발명의 목적상 항체의 단편은 상기 각 단백질에 대한 결합특이성을 유지하고 있는 것이라면 구조나 형태의 제한을 받지 않는다.

[0085] 본 발명에서 검출 제제들(대표적으로 항체 및 이의 기능적 단편 등)은 이의 '검출'을 위하여, 일반적으로 검출 가능 모이어티(moiety)로 표시될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen 등, Ed. Wiley- Interscience, New York, N. Y., Pubs]에 기술된 기술을 이용하여, 방사성 동위원소 또는 형광표지로 표시될 수 있다. 또는 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하며, 상기 효소적 표지의 예는 초파리 루시페라제 및 세균 루시페라제(미국 특허 제4,737,456호)와 같은 루시페라제, 루시페린(luciferin), 2,3-다이하이드로프탈라진디옥세스, 말레이트 디하이드로게나제, 유라제(urase), 호스래디쉬 퍼

옥시다제(HRPO)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어 글루코스옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제(예를 들어 유리카제 및 잔틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 항체에 효소를 접합시키는 기술은 예를 들어, 문헌 [O'Sullivan 등, 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N. Y., 73: 147-166]에 기술되어 있다. 표지는 다양한 공지된 기술을 이용하여 항체에 직접 또는 간접적으로 접합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 바이오틴(biotin)에 접합될 수 있고 상기에 언급된 3종의 광범위한 카테고리에 속하는 임의의 표지들이 아비딘과, 또는 그 반대로 접합될 수 있다. 바이오틴은 아비딘(avidin)에 선택적으로 결합하고, 따라서 이 표지는 이러한 간접적 방식으로 항체에 접합될 수 있다. 또는, 항체에 표지의 간접적 접합을 달성하기 위하여, 항체는 작은 합텐 (hapten) (예를 들어, 디옥신 [digoxin])과 접합될 수 있고 상기에 언급된 서로 다른 유형의 표지들의 하나가 항-합텐 항체에 접합될 수 있다 (예컨대, 항-디옥신 항체). 따라서, 항체에 대한 표지의 간접적 접합이 달성될 수 있다.

[0087] 본 발명에서 용어 '애타머'는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 애타머의 제조는 일반적인 애타머의 제조 방법예 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 애타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH<sub>2</sub>로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0089] 본 발명의 폐암 진단용 키트에는 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하기 위하여, 선택적으로 상기 단백질을 각각 특이적으로 인식하는 항체 또는 애타머뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0091] 구체적인 양태로서 상기 키트는 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역염색법(면역조직화학염색, 면역세포화학염색 및 면역형광염색 등 포함), 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, SPR 또는 단백질 칩 방법을 수행하기 위해 필요한 공지의 필수요소 및 부수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 일례로, 상기 키트는 MRS 및 사이토케라틴 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 목적 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차반응성이 거의 없는(실질적으로 없는) 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 상기 키트는 추가적으로 임의의 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 키트에 제공되는 항체는 그 자체로서 검출가능한 모이어티로 표지될 수 있으며, 이는 전술한 바와 같다. 그 외 상기 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 별도의 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(항체와 컨주게이트된 형태로서) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 잉여의 발색 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 항체와 결합된 단백질 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다.

[0095] 상기 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 또한 상기 각 단백질을 암호화하는 유전자의 발현수준을 검출하는 제제를 포함하는 의미일 수 있다. 단백질 발현 수준의 증가는 상기 단백질을 암호화하는 유전자로부터의 전사물(예를 들어 mRNA)의 증가가 동반되는 것이므로, 당업자라면 전술한 것과 같이 MRS, AIMP2-DX2 및 CK19로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상의 단백질 자체를 검출하는 수단뿐만 아니라 간접적으로 각 단백질 발현과 직접적으로 관계된 전사물들을 검출하는 수단을 사용 가능함이 자명하게 이해 가능하다.

[0097] 일례로 MRS 및 사이토케라틴의 mRNA를 검출하는 제제를 사용 가능하며, 이들 mRNA에 특이적으로 부착 또는 혼성화(hybridization)하는 리간드라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 프라이머(쌍) 또는 프로브 일

수 있다.

- [0099] 상기 “프라이머”는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0101] 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 목적 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 대상으로하는 단백질을 코딩 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 목적 mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 목적하는 단백질을 코딩하는 mRNA 또는 cDNA 염기 서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.
- [0103] '프로브(probe)'는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧게는 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오타이드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 목적 mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 목적 mRNA의 발현량을 측정함으로써 진단에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 MRS mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0107] 본 발명의 진단용 키트에는 메티오닐 티알렌에이 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하기 위하여 각각에 대한 mRNA를 인식하는 프라이머 또는 프로브 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 선택적으로 포함될 수 있다. 상기 키트는 당업계에 프라이머(프라이머쌍) 또는 프로브를 구성품으로 제공하는 분석 키트로서 알려진 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 PCR(polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응), qRT-PCR (quantitative real-time PCR), RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, 서던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이 칩용 키트 등을 포함한다.
- [0109] 일례로, 상기 진단 키트는 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 중합효소반응 키트는 마커 유전자(mRNA)에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자(mRNA)의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), DNA 폴리머라아제(예를 들어 Taq-폴리머라아

제) 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0111] 또한 본 발명은 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료로부터 메티오닐 티알라제 합성효소(methionyl-tRNA synthetase, MRS) 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 정성 또는 정량 분석하는 방법을 제공한다. 구체적으로 상기 방법은 (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 시료에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 된 경우 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0113] 본 발명에서 용어 '분석'은 바람직하게 '측정'을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 따라서 MRS 및 사이토케라틴 단백질 검출은 각 단백질의 존재 여부 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0115] 이하, 상기 방법을 각 단계에 따라 설명한다.

[0117] 상기 (a) 단계는 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료를 제공하고 상기 시료에서 MRS와 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계이다.

[0119] 본 발명에서 용어 '잠재 환자'는 폐암으로 의심되는 환자를 의미하는 것으로서, 임상 증상, 혈액학적 검사 또는 영상학적 검사상 등 다양한 검사들을 통해 폐암이 있는 것으로 의심되는 환자를 의미한다.

[0120] 즉, 상기 잠재 환자는 영상학적 검사상으로 폐암 판정 가능한 환자 및 판정 불가능 환자를 포함하며, 영상학적 검사상으로 폐암 판정이 불가능하다고 하더라도 임상 증상, 혈액학적 검사, 조직학적 검사, 영상학적 검사 등에서 폐암이 의심되는 환자를 의미한다. 영상학적 검사는 복부 초음파, 복부 CT, 복부 MRI, PET-CT를 시행할 수 있으며 이러한 영상학적 검사에서 폐의 결절이 있을 시 폐암을 의심하게 된다. 이러한 영상학적 검사들로서는 폐암을 의심할 수는 있으나 확진할 수는 없다. 폐암의 최종적인 확진은 병리학적 검사로 진행되며, 수술이 가능한 환자에서는 수술 후 얻어진 조직을 통해 확진되고 수술이 가능하지 않는 환자에서는 세포진 검사를 이용해 확진하게 된다.

[0122] 바람직하게 본 발명의 상기 잠재 환자(폐암 의심환자)는 폐암에서 일반적으로 관찰되는 증상인 기침, 객혈, 가래, 호흡곤란, 흉부통, 쉼 목소리, 오심 구토 등의 일반증상이 있고, CT, 초음파, MRI 등과 같은 진단 장비를 통해 폐암으로 확진할 수 없는 환자를 의미하는 것일 수 있다. 더욱 바람직하게, 상기 잠재 환자는 넓은 부위의 침습적 조직 검사가 불가능 또는 불필요한 환자(즉, 수술에 의한 폐 조직검사가 불가능 또는 불필요하기 때문에)로서 세포검사(세포진)에 의존적으로 폐암을 명확히 진단할 필요성이 있는 환자일 수 있다. 즉, 세포 수준의 분석에 의해 폐암을 명확히 진단할 필요성이 있는 환자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0124] 상기 시료는 폐암의 존재 여부를 진단하고자 하는 개체(환자) 또는 피검체로부터 채취된 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 폐 조직 또는 폐 세포일 수 있다. 상기 폐 조직은 폐 결절을 포함하는 폐의 모든 부위(특히, 특히, 병변 의심부위)로부터 수득될 수 있다. 상기 폐 조직은 일반적으로 폐에서 생검(biopsy) 또는 수술에 의하여 수득되는 것일 수 있다. 상기 폐 세포를 분리하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당업계에서 현재 인체 조직의 세포를 분리하기 위해 사용되고 있는 방법뿐만 아니라, 장래에 동일한 목적으로 개발될 새로운 방법도 포함되는 개념으로 이해된다. 바람직하게는 솔세포진(brushing cytology), 미세바늘흡인법(Fine needle aspiration), 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 폐생검(EBUS-TBLB), 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 바늘

흡인법(EBUS-TBNA) 또는 경피적 폐생검일 수 있으며, 가장 바람직하게는 미세바늘흡인법(Fine needle aspiration), 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 폐생검(EBUS-TBLB) 또는 기관지경 초음파 유도 하 경기관지 바늘 흡인법(EBUS-TBNA)일 수 있다.

[0126] 수득된 폐 세포 또는 조직은 당업계에 공지된 통상의 시료 전처리(예를 들어 고정, 원심분리, 슬라이드에 도말 등) 방식에 따라 전처리되어 제공될 수 있다.

[0128] 바람직한 하나의 실시 양태로서, 상기 폐 세포 또는 조직 시료는 통상의 파라핀 블록(paraffin block) 또는 파라핀 절편(paraffin section) 제작법에 의해 전처리되어 실험용 슬라이드(slide) 상에 제공되는 것일 수 있다.

[0130] 또한 바람직한 하나의 실시 양태로서, 상기 폐 세포 또는 조직 시료는 통상의 액상 단층세포 슬라이드 제작법(액상세포검사용 슬라이드 제작법)에 의해 전처리되어 준비되는 것일 수 있으며, 일례로 ThinPrep, SurePath, CellPrep, 슬라이드 도말 등을 사용하여 액상 기반 단층 부착 방법에 의해 실험용 슬라이드(slide) 상에 제공되는 것일 수 있다.

[0132] 본 발명의 상기 폐암 진단방법은 바람직하게 폐 세포를 분석하는 것일 수 있다. 폐 세포를 직접 분석하는 세포학적 분석(Cytological analysis)방법은 조직 검사와는 많은 차이가 있고, 때문에 본 명세서에서 전술한 선행기술문헌들에서 보고하고 있는 폐암 진단방법과는 많은 차이가 있다. 또한 폐 세포 자체를 이용하기 때문에 타 장기의 종양과 혼동될 여지가 없다.

[0134] 기존의 조직검사는 목적 부위를 내시경적으로 관찰하거나 암으로의 형질전환이 의심되는 조직으로부터 1g 내지  $10^9$  cells 정도의 일정 영역의 조직을 채취한 후 염색 등과 같은 생화학적 방식을 통하여 암진단을 수행한다. 이러한 조직검사는 주변의 구조나 세포와 비교를 통해 특정 영역에 암이 있는 것으로 확인하기가 비교적 용이한 것으로 알려져 있다. 또한 조직 수준에서의 마커 발현형태는 주변의 정상 조직들과 전체적으로 경향성들의 비교를 통해 확인이 더 용이하다. 하지만 세포진 검사의 경우에는 낱개의 세포를 뽑아내어 도말한 것이므로 주변 조직과의 관계를 증명할 수 없어 진단에 상당한 어려움이 따르기 때문에, 세포 수준에서의 질한 진단이 큰 의미를 지닌다.

[0136] 상기 '단백질의 발현수준을 측정'하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0138] 본 발명에서 용어 '검출'은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질, 즉, MRS 및 사이토케라틴 단백질의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 따라서 본 발명에서 용어 '단백질 검출'은 목적 단백질의 존재 여부 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0140] 본 발명에서 단백질의 '발현 증가(또는 고발현)'라는 의미는 발현되지 않던 것이 발현된 것(즉, 검출되지 않던 것이 검출된 것) 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 과발현된 것(즉, 검출량이 많아지는 것)을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

- [0142] 본 발명에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 검출은 당업계에서 공지된 단백질 발현 수준 측정법에 의한 것이라면 그 방법이 특별히 제한되지 않으나, 일례로 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 검출하거나 측정할 수 있다. 본 발명에서 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 대해서는 전술한 바와 같다. 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 공지되어있는 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme-linked immunospecific assay, 효소면역분석법), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역염색법(면역조직화학염색, 면역세포화학염색 및 면역형광염색 등 포함), 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS(Fluorescence activated cell sorter), SPR(surface plasmon resonance) 또는 단백질 칩 방법 중 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다. 이외에도 상기 측정 방법은, 본원 발명에서 제공하는 각 마커 단백질 발현수준 측정 체계 및 이를 포함하는 키트에 대하여 기술된 바에 준하여 그 측정 방법이 이해된다.
- [0144] 기존 세포진 검사들의 경우에는 폐암인지 또는 정상세포(비-폐암 세포를 포괄적으로 의미하는 것으로 예를 들어 폐암 세포 등을 포함)인지 여부가 명확하지 않은 비정형 세포(atypical cell)로서 병리소견을 내는 경우가 많으며, 이러한 경우 추가적이고 다수의 반복적인 재검을 필요로 한다.
- [0146] 종래 보고된 폐암 진단 마커들의 경우 세포진 검사의 적용에 있어서, 조직 검사에서와는 다르게 세포 수준의 진단에서는 민감도 및 특이도가 좋지 못하여 실효성을 거두고 있지 못하는 실정이다. 이는 본 발명의 명세서 일실시예에서 잘 나타나 있다. 기존의 폐암의 진단에 유용하다고 알려진 MRS 또는 사이토케라틴 각각은, H&E 염색결과 비정형 세포로 판단되었고 추후 최종적으로 폐암으로 확진된 환자의 폐 세포진 시료에 대하여 검출되지 않는 경우들이 있다는 것을 통해서도 나타난다. 즉, 종래 보고된 폐암 진단 마커들의 경우, 기존 H&E 염색 등을 이용한 병리학적 세포진단 방법으로는 폐암인지 또는 정상세포인지 여부가 명확하지 않은 비정형 세포에서 일관성 있는 발현이 나타나지 않아 명확한 진단이 불가능하지만, 본 발명에 따른 마커의 조합의 경우에는 비정형으로 판정되는 폐세포에서도 종양인지 여부에 대한 명확한 판단이 가능하기 때문에 보다 정확하게 폐암을 진단할 수 있는 현저한 효과를 나타낸다. 즉, 본 발명에 따른 마커 조합의 경우에는 세포진 검사에 적용하여도 그 정확도가 매우 높으며, 위양성 판단오류를 현저히 감소시키기 때문에 폐암 진단 정확도가 현저히 상승되는 효과를 가진다.
- [0148] 이에, 본 발명은 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준을 측정하기 이전에, 동시에 또는 이후에 하기 단계를 추가적으로 수행하여 폐암 진단 효과를 더욱 높일 수 있다:
- [0149] (i) 잠재 환자로부터 채취한 폐 세포를
- [0150] 세포핵을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole), 메틸렌블루(methylene blue), 아세트산카민(acetocarmine), 톨루이딘블루(toluidine blue), 헤마톡실린(hematoxylin) 및 핵스트(Hoechst)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색용액, 및
- [0151] 세포질을 염색하는 에오신(eosin), 크리스탈바이올렛(crystal violet) 및 오렌지 G(orange G)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염색 용액으로 염색하는 단계; 및
- [0152] (ii) 상기 세포염색에 의해 폐 세포를 악성종양세포, 비정형세포(atypical cell) 또는 정상세포로 판단하는 단계.
- [0154] 상기 (ii) 단계에서 판별되는 비정형세포는 미확진 및 확진 불가 세포로 이해되며, 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 상기 형태학적 진단 방식의 병리검사서 Suspicious of malignancy(악성 종양세포 의심) 판정도 모두 포함하는 의미일 수 있다.
- [0156] 상기 (i) 및 (ii) 단계는 형태학적 진단 방식의 기존 병리검사에 따른 세포진(cytodiagnosis) 방법으로서, 본 발명의 일실시예에서 사용하고 있는 H&E 또는 pap 염색에 준하는 것들이다. 본 발명에서, 용어 '형태학적 진단 방식의 병리검사' 또는 '형태학적 검사'란, 정상 세포가 암으로 변화될 때의 비정상적인 형태학적 변화를 검사

하는 것을 의미한다.

- [0157] 상기 비정상적인 형태학적 변화에 관한 구체적 검사 항목 또는 기준은, 당업계에 암세포가 가지는 형태학적 변화의 종류라면 그 구체적 내용이 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게 세포 균집성; 세포핵/세포질 비율(N/C ratio); 핵막의 모양(핵막 모양의 불규칙성); 염색질의 뭉침 현상; 핵 내 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 검사하는 것일 수 있다. 상기 형태학적 검사는 본 발명에서 제공하는 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 정성 또는 정량 분석하는 것에 의해 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행될 수 있다.
- [0159] 이에, 상기 (ii) 단계에서 상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터 폐 세포 시료를 악성종양세포, 비정형 세포 또는 정상세포로 판별하는 것은 정상 세포가 암으로 변화될 때의 비정상적인 형태학적 변화에 근거하여 판별되는 것일 수 있으며, 그 구체적 판별 기준은 당업계에 잘 알려져 있다. 이때 비정형 세포란 형태학적 변화로는 악성 종양세포(암세포) 또는 정상세포로 명확한 판정이 불가한 세포를 의미한다.
- [0160] ,
- [0161] 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 상기 (ii) 단계에서 상기 (i) 단계의 세포 염색결과로부터 폐 세포 시료를 악성종양세포, 비정형 세포 또는 정상세포로 판별하는 것은 바람직하게 하기와 같은 기준에 의해 수행되는 것일 수 있다:
- [0162] 세포가 3차원으로 도말됨; 세포핵/세포질 비율(N/c ratio, Nuclear to cytoplasmic ratio)이 높음; 염색질의 뭉침 현상 출현; 거친 모양의 핵막(핵막의 불규칙 정도가 커짐); 핵소체의 출현; 및 유사분열의 출현으로 이루어지는 군에서선택된 두 가지 이상의 형태학적 이상을 보이는 경우에 악성 종양세포로 판정하며,
- [0163] 세포가 한 겹으로 도말되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양일 경우에는 정상 세포로 판정하고,
- [0164] 세포의 변화가 악성 세포에는 미치지 못하나 정상(benign 포함)으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정한다.
- [0166] 상기 (i) 및 (ii) 단계를 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 검출(발현수준 측정) 단계 이전에, 동시에 또는 이후에 병행하여 추가적으로 수행하게 되면, 세포수준의 검사(즉, 세포진 검사)만으로도 매우 높은 정확도의 진단결과를 얻을 수 있는 것이 특징이다. 일례로 MRS 및 사이토케라틴 단백질 검출 이전에 (i) 및 (ii) 단계를 수행하는 경우에 있어서, 세포염색을 통해 악성종양세포 또는 정상세포로 판단이 된 폐 세포의 경우에는 후속적으로 수행되는 단계에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준(또는 여부)을 추가적으로 재분석함으로써 보다 확실하게 폐암인지 정상인지 여부를 판단할 수 있어 진단오류를 현저히 줄일 수 있으며,
- [0167] 상기 세포염색을 통해 비정형 세포로 판단이 된 경우에는 후속적으로 수행되는 단계에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질 발현수준(여부)을 분석함으로써 종양인지 여부에 대한 명확한 판단이 가능하다.
- [0169] 상기 본 발명은 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 이중 또는 삼중 염색법을 통해 조직뿐만 아니라 세포수준의 검사에서 정확도 높은 확정 진단이 가능하다는 것이 그 특징이다. 기존에 비정형 세포로 검진결과가 나왔을 때 조직 생검을 다시 수행하여 재진단하여야 하는 번거로움이 있고, 다량의 생검을 필요로 하는 조직검사의 경우 세포진 검사 보다 시료 취득에 있어서 환자에 신체적 부담이 가중되고 뿐만 아니라 폐암 진행 정도에 따라 다량의 조직 시료를 얻기 어려운 경우가 있는 문제점이 것을 고려하였을 때, 세포 수준에서 정확한 진단을 제공하는 본원발명은 더욱 큰 장점을 지닌다고 할 수 있다.
- [0171] 이후 상기 단계의 측정 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질이 모두 발현되면 폐암 세포인 것으로 판단한다.
- [0173] 본 발명의 일실시예에 따르면, Pap 염색을 통해 비정형 세포(atypical)로 판정이 되었으나 향후 환자를 추적 관찰하여 본 결과 최종적으로 폐암으로 진단이 확정된 환자의 폐 세포에서, MRS 및 사이토케라틴 단백질이 발현되

어 검출되는 것으로 확인되었다.

- [0175] 상기 (b) 단계는 다른 대조군(시료)과 비교 없이도 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 검출을 통해서 바로 폐암의 검출이 가능한 것을 장점으로 한다. 이는 본 발명의 명세서 실시예에 잘 나타나 있다.
- [0177] 폐암 진단의 기준이 되는 각 단백질의 검출 수준(발현 수준, 특히 증가 수준)에 대해서는, 당업자가 선택한 측정 방법에 따라 검출(발현)의 유무로, 혹은 검출(발현) 정도의 등급을 나누어 결정할 수 있다. 예를 들어, 다수의 정상인과 환자의 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현 수준을 측정하여 데이터를 축적하고 분석함으로써 MRS 검출(발현) 수준의 정도에 따라 정상 범주, 폐암 발병 범주 등으로 구분하여 적절한 진단의 기준을 제공할 수 있다.
- [0179] 또한 상기 (b) 단계는 음성 대조군(특히, 정상 대조군) 시료와 비교적으로 수행될 수도 있다. 따라서 상기 방법은 (b) 단계에서 또는 (b) 단계 이후에 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료로부터 검출된 MRS 및 사이토케라틴 단백질 수준을 음성 대조군 시료와 비교하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어 정상 대조군은 검사 대상인 잠재 환자(즉, 상기 (a) 단계에서 검사 대상이 된 환자와 동일 개체)의 폐에서 정상인 부위로부터 채취된 폐 시료 또는 다른 정상 개체(폐암이 없는 개체)로부터 채취된 폐 시료를 모두 포함하는 의미이다. 이때 상기 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 검출된 MRS 및 사이토케라틴 단백질 수준이 음성 대조군(특히, 정상 대조군) 수준보다 높으면 폐암 환자인 것으로 판단할 수 있다.
- [0180] 이러한 대조군에 대한 정보(예를 들어 검출강도 또는 발현강도)는 전술한 본원 발명에서 제공하는 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준 측정 제제 및 이를 포함하는 키트에 명시되는 형태로 제공될 수 있고, 혹은 다른 형태로 부수적으로 제공될 수 있다. 이러한 대조군에 비해 검사 대상 시료에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질의 발현수준이 높으면 폐암 환자인 것으로 판단할 수 있다.
- [0182] 본 발명에서 용어 '정상 폐 세포' 또는 '정상 대조군'이란 비-종양(암)성 폐 세포를 의미하는 것으로, 종양(암)이 아닌 다른 질병(예를 들어, 폐 결핵 등) 상태에 있는 폐 세포, Benign(양성) 상태의 세포 및 완전히 건강한 폐 세포(무질병 폐 세포)를 모두 포함하는 의미이다.
- [0184] 또한 본원 발명은 전술한 (a) 및 (b) 단계를 포함하여, 비정형 세포를 암세포(악성 종양세포)와 정상세포(비-암 세포)로 구분하는 방법을 제공한다고 할 수 있다.
- [0186] 기존에 폐암 진단을 위해서 컴퓨터 단층촬영술(CT), 초음파내시경검사법(EUS), 혈관조영술과 같은 고가의 철저한 검사가 요구되고 있으나, 이를 통해서도 폐암을 정확하게 진단하는 것이 매우 어려운 실정이다. 결국 폐암의 확진을 위해서는 병리학적인 방법인 조직검사나 세포진 검사를 수행하여야 한다. 한편, 폐암은 진단 당시 이미 절제가 불가능한 진행암일 경우가 많고, 수술을 할 수 없는 환자에서 폐암의 진단은 내시경 초음파 미세바늘 흡인술 검사를 통해 실시하고 있다. 그런데 이러한 내시경초음파 미세바늘 흡인술 검사를 통한 세포진단의 경우 수술 후 폐암 조직에 비해 주변 구조나 세포와의 비교가 어려워 진단을 확진하는데 한계점이 있다.
- [0188] 기존 세포 병리학적 진단은 폐암세포와 다른 질환(예를 들어 폐 결핵)의 세포를 감별하는데에 주로 H&E 염색 또는 pap 염색 등 일반염색에 의존하고 하고 있다. 그러나 이러한 전통적인 일반 염색에 근거한 기존 세포병리학 적 진단 방식에 의해 폐암을 확진하는 것은 의료진의 경험과 해석기술에 따라 다른 진단이 내려지기도 하며, 또한 이러한 기존 검사들의 경우 폐암인지 또는 정상세포(비폐암 세포를 포괄적으로 의미하는 것으로 예를 들어 폐 결핵 환자의 폐 세포 등을 포함)인지 여부가 명확하지 않은 비정형 세포(atypical cell)로서 병리소견을 내는 경우가 많으며, 이러한 경우 추가적이고 다수의 반복적인 재검을 필요로 한다.

- [0190] 특히 H&E염색 또는 pap 염색을 통한 폐 세포 관찰에서 비정형(atypical) 세포로 판정된 경우 폐암인지 다른 양성질환인지 여부에 대한 구별이 매우 어려워 환자의 질환에 대한 정확한 진단 및 치료가 빠르게 이루어지지 못하고 있다. 세포진에 대한 정확한 진단이 늦어짐에 따라 수술을 받을 수 있는 폐암 환자에게 적절한 치료를 할 수 없으며, 반대로 불필요한 수술을 방지하기도 어려운 문제점이 있다. 따라서 임상적으로 폐암의 치료 효과를 증대시키기 위해서는 세포진에 대한 정확한 진단법이 필요한 실정이다.
- [0192] 이처럼 암을 진단하기 위해 일반적으로 사용되고 있는 H&E 염색, pap 염색을 통해서도 종양인지 또는 비종양인지 구분이 매우 어려운 비정형(atypical) 세포에서 종양여부의 판정이 임상적으로 매우 중요한데, 이러한 비정형 세포에서 MRS 및 사이토케라틴 단백질 발현이 확인되면 종양세포로 판정할 수 있다는 점에서 매우 의미가 있다고 할 수 있다. 또한 상대적으로 많은 양의 생검을 필요로 하는 조직검사의 경우 세포진 검사보다 시료 취득에 있어서 환자에 신체적 부담이 가중되며 어떠한 경우에는 암의 진행 상태에 따라 수술이 불가 및 조직의 채취가 불가한 문제점이 있는 것을 고려하였을 때, 세포 수준에서도 정확한 진단을 제공하는 본원 발명의 진단 방법은 더욱 큰 장점을 지닌다고 할 수 있다.
- [0194] 폐암 진단에 있어서, MRS 및 사이토케라틴 단백질을 동시에 마커로 사용하여 이들의 검출 패턴을 분석하는 본원 발명의 방식을 채용하는 경우, 조직 및 세포 수준의 검사에 있어서 진단의 민감도, 특이도가 현저히 향상되는 것이 특징이다.
- [0196] 이에, 본원 발명은 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직 검사에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 민감도 또는 특이도를 향상시키는 방법을 제공한다:
- [0197] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0198] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계.
- [0200] 본 발명에서 용어 '민감도(sensitivity)'란 최종 임상병리학적 진단이 폐암인 시료 또는 환자에 대하여, 대상 검사법(ex. 본원 발명의 검사법)을 통해 폐암 판정이 내려진 비율을 의미한다.
- [0202] 본 발명에서 용어 '특이도(specificity)'란 최종 임상병리학적 진단이 정상인 시료 또는 환자에 대하여, 대상 검사법(ex. 본원 발명의 검사법)을 통해 정상 판정이 내려진 비율을 의미한다.
- [0204] 구체적으로 상기 민감도 또는 특이도가 70% 이상의 수준(70% 내지 100%, 바람직하게는 75% 내지 99%, 더욱 바람직하게는 80 내지 98% 수준)을 나타내는 것이 특징이다. 상기 수준의 구체적 수치는 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%로 이루어지는 군에서 선택되는 두 개의 숫자를 경계값으로 하는 범위값을 모두 포함한다. 본원 발명의 하나의 실시양태(embodiment)에서, 상기 수치범위 중 구체적으로 70% 및 95%의 경계값이 선택될 수 있고, 이에 따라 70% 내지 95% 범위에 있는 모든 값들이 본 발명에서 의도됨은 당업자에 자명하다.
- [0206] 상기 민감도 또는 특이도의 향상이 진단의 정확도의 향상으로 이어지는 것임은 당업자에게 자명하다. 따라서 본 발명의 방법은 정확도를 향상시키는 방법으로 이해될 수 있으며, 바람직하게 정확도가 90% 내지 100%, 더욱 바람직하게 정확도가 90% 내지 99% 수준을 나타내는 것일 수 있다. 상기 수준의 구체적 수치는 90%, 90.5%, 91%, 91.5%, 92%, 92.5%, 93%, 93.5%, 94%, 94.5%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.5% 및 100%로 이루어지는 군에서 선택되는 두 개의 숫자를 경계값으로 하는 범위값을 모두 포함한다.

- [0208] 또한 본원 발명은, 폐암에 대한 세포진(cytodiagnosis) 검사 또는 조직검사에 있어서, 형태학적 검사와 병용하여,
- [0209] (a) 잠재 환자로부터 채취한 폐 시료에서 MRS 및 사이토케라틴(cytokeratin) 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0210] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 2종의 단백질이 모두 발현이 되었으면 폐암인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 폐암 세포 판별법을 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 폐암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0212] 상기 형태학적 검사란, 바람직한 일례로 전술한 (i) 및 (ii) 단계 과정을 포함하여 수행되는 검사를 포함하여, 이러한 방식에 준하는 다른 형태학적 검사 방식들도 모두 포함하는 의미이다. 이에 대한 설명은 전술한 바를 참조하여 당업자라면 그 방식을 적의 선택하여 사용 가능하다.
- [0214] 상기 (a) 및 (b) 단계에 대한 구체적 설명은 전술한 바와 같으며, 이러한 단계가 보조적으로(즉, 보조요법으로서) 수행되는 경우, 상기 형태학적 검사와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 판별법은 형태학적 검사 이전에, 동시에 또는 이후에 수행 가능하다.

### 발명의 효과

- [0216] 본원발명이 제공하는 마커의 조합에 의한 경우, 폐암 진단의 정확도가 향상되며, 특히 세포진 검사에 있어서 비정형 세포로 판정된 세포의 폐암 여부를 정확하게 판별할 수 있는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0218] 도 1은 fNAB(fine needle aspiration biopsy) 방법에 의해 폐암 환자로부터 수득한 폐 결절 세포를 MRS(녹색) 및 사이토케라틴(붉은색)으로 이중 면역형광염색한 후 형광현미경으로 관찰한 도면이다.
- 도 2는 통상적인 PAP 염색을 통한 세포진 진단에서 비정형(atypical) 세포 또는 진단불가(non-diagnostic)로 판정된 폐 결절 임상샘플에 대해 MRS와 사이토케라틴 이중 면역형광염색을 수행하여 세포진 진단을 수행한 후 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 fNAB 방법에 의해 폐암 환자로부터 수득한 폐 결절 세포에 MRS 및 사이토케라틴 이중 면역형광염색을 수행하여 악성(malignancy) 또는 양성(benign) 여부를 진단한 결과를 나타낸 ROC 곡선이다.
- 도 4는 fNAB 방법에 의해 폐암 환자로부터 수득한 폐 결절 세포에 MRS 및 사이토케라틴 이중 면역형광염색, 및 통상적인 pap 염색방법을 수행하여 악성(malignancy) 또는 양성(benign) 여부를 진단한 결과를 나타낸 ROC 곡선이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0219] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [0221] 실시예 1: 폐암의 세포진(cytodiagnosis) 검사법에서 MRS 및 사이토케라틴 조합의 유용성 확인

- [0223] 실험방법

- [0224] 1) 모든 fNAB(fine needle aspiration biopsy) 절차는 병변 위치에 따라서 환자가 엎드려 누워 있거나, 반듯이 누워 있거나 또는 측면으로 누워 있는 자세에서 수행되었다. 모든 절차를 위하여, 환자가 중재 절차에 적합하게 위치해 있는 상태에서 표적 영역에 한정된 예비 영상을 확보하였다. 바늘을 삽입할 영역을 선택한 이후에 피부 삽입 부위를 소독하고 삽입을 수행하였다. 흡인 샘플은 20 내지 22 게이지의 치바 바늘(Chiba needles)을 이용하여 수득하였으며, 수득된 샘플은 세포학적 검사를 위해 99% 에틸 알코올로 고정한 뒤 검사를 위해 사용되었다.
- [0226] 2) 본 발명자들은 폐암 세포에서 MRS 및 사이토케라틴의 발현도를 측정하기 위한 면역조직화학법(특히, 면역형광염색)을 하기와 같이 개발하였다. 구체적으로, 상기 파라핀 절편을 사용하는 경우, 다음과 같이 처리하였다.
- [0227] ① 파라핀 제거: 60℃ 오븐에서 파라핀을 녹임
- [0228] ② 수화(Hydration): 자일렌(Xylene)으로 5분씩 3번 세척, 100% 에탄올로 2분 세척, 95% 에탄올로 2분 세척, 90% 에탄올로 2분 세척, 70% 에탄올로 2분 세척, D.W로 2분 세척, PBS로 5분 세척
- [0229] ③ 투과성(permeabilize) 증가 처리: 0.2% Triton X-100 으로 30분간 처리하고 PBS로 5분 세척
- [0230] ④ 전처리: 2% goat serum 으로 1 시간 동안 블로킹(blocking)
- [0231] ⑤ 1차 항체 처리: 다음과 같은 항체의 조합으로 샘플을 overnight 처리하고, PBS로 5분씩 3회 세척하였다.
- [0232] (i) MRS mouse Ab (1:250) + Pan Cytokeratin rabbit Ab (1:200)
- [0233] MRS mouse Ab(온코테크), 사이토케라틴(AE1/AE3) Ab: LsBio #LS-C357999, pan-사이토케라틴-19(KRT777) rabbit Ab: Mybiosource #MSB4380427
- [0234] ⑥ 발색: 형광 물질이 결합되어 있는 2차 antibody로서 하기 항체들을 1차 항체와 결합할 수 있도록 하기 비율로 희석하여 상온의 어두운 곳에서 1 시간 동안 처리하고, PBS로 5분씩 3회 세척하였다.
- [0235] Cell signaling Tech, Cat No. #4412, Anti-Rabbit-AF488, 1 : 1000
- [0236] Cell signaling Tech, Cat No. #4409, Anti-Mouse-AF555 1 : 1000
- [0237] Cell signaling Tech, Cat No. #4413, Anti-Rabbit-AF555, 1 : 1000
- [0238] Cell signaling Tech, Cat No. #4408, Anti-Mouse-AF488 1 : 1000
- [0239] ⑦ DAPI가 첨가되어있는 마운팅 솔루션(ProLong Gold antifade reagent with DAPI/ Molecular probes, Cat. No. P36931)을 슬라이드 상의 조직에 20  $\mu$ l 처리 후 커버슬립(cover slip)을 덮었다.
- [0240] thinprep 슬라이드 시료의 경우에는, 파라핀 제거 과정 없이 상기 ③ 내지 ⑦의 과정을 포함하는 방법으로 처리되었으며, 상기 방법으로 준비된 표본 시료는 공초점 레이저 현미경(Zeiss: LSM780) 및 형광 현미경(Zeiss: imager M2)으로 관찰하였다.
- [0242] **실험결과**
- [0243] 상기 통상적인 염색방법에 따른 세포진 검사에서 폐암 세포인 것으로 판정된 샘플에 대하여 MRS와 사이토케라틴(CK)의 이중 면역형광염색의 유용성을 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0245] 도 1에 나타난 바와 같이, 폐암 세포로 판정이 된 세포주에서 MRS와 CK의 이중 면역형광염색이 뚜렷하게 관찰되는 것으로 확인되어, 이들 마커의 조합의 유용성을 검증하였다.
- [0247] **실시예 2: 임상 검체에서 통상적인 염색방법에 의한 세포진 검사법 및 MRS 및 CK 마커 조합에 따른 dual IF법에 의한 세포진 검사법의 비교 분석**

- [0249] 본 발명자는 상기 실시예 1에 기재된 방법에 따라 총 106명의 환자로부터 fNAB 방법에 따라 폐 결절 세포 시료를 획득하였고, 획득된 세포 시료를 이용하여 상기 실시예 1에 기재된 방법에 따라 MRS 및 CK dual IF법, 및 통상적인 염색방법에 따른 세포학적 검사를 수행하였다.
- [0251] 기존 세포학적 검사 방식에 의한 병리소견(Conventional pathologic cytology)은 현재까지 흔히 사용되고 있는 Pap staining 방법을 통한 염색 결과에 의하여 내려질 수 있다. 상기 Pap staining은 hematoxylin, OG-6(Orange G-6), eosin azure를 통상적 프로토콜에 따라 사용하여 수행되었다. 파라핀 절편 시료를 이용하는 경우에는, 통상적인 방법으로 파라핀 제거 및 수화(hydration)를 진행한 후 염색 물질들을 처리하였다.
- [0252] 슬라이드 상에 세포가 한 겹으로 도말되어 있으며 세포핵/세포질 비율(N/C ratio)이 작고 핵막이 매끄러운 모양이거나, 세포막에 섬모(cilia)가 관찰되는 경우 양성(benign, 정상) 세포로 판정하였고, 세포가 3차원으로 도말되며 세포핵/세포질 비율이 높고 염색질의 뭉침 현상이 보이며 핵막이 거친 모양이고 핵소체 및 유사분열이 출현할 경우 악성종양 세포로 판정하였으며, 세포의 변화가 악성 세포에는 미치지 못하나 양성(benign)으로 판정할 수 없는 경우 비정형 세포(atypical cell)로 판정하였다.
- [0254] 106례의 임상 시료에 대해 통상적인 염색 방법 및 dual IF(MRS+CK)를 수행한 결과, 79례의 경우 통상적인 염색 방법 및 dual IF 방법 모두에서 양성 세포와 악성종양 세포의 구분이 명확하게 가능하였다(결과 미도시).
- [0255] 한편, 나머지 27례의 경우 통상적인 염색방법에서는 비정형(atypical) 세포로 판정되거나 또는 진단 불가(non-diagnostic)로 판정되었으며, 이를 본원발명에 따른 dual IF(MRS+CK)법으로 분석해 본 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0257] 도 2에 나타난 바와 같이, 통상적인 염색방법을 통해서도 양성 또는 악성의 구분이 불가능했던 27례의 임상 시료도 본원발명에 따른 dual IF(MRS+CK)법에 의한 경우 양성 및 악성의 구분이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [0259] 구체적인 분석 사례를 도 2에 나타내었다.
- [0260] 도 2에 나타난 바와 같이, 통상적인 염색방법(PAP staining)에 의한 세포진 검사에서는 비정형 세포로 판정된 폐암 환자의 샘플에서, MRS(녹색)와 CK(적색) 모두 발현이 되는 것으로 확인되었다. 즉, 본원발명에 따른 MRS+CK dual IF법은 통상적인 염색방법에 의해 폐암인지 여부를 판정하기 어려운 샘플(atypical 또는 non-diagnostic sample)에서도 폐암 여부를 정확하게 판정할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0262] **실시예 3: 임상 검체에서 통상적인 염색방법에 의한 세포진 검사법 및 MRS, AIMP2-DX2, CK19 마커 조합에 따른 dual IF법에 의한 세포진 검사법의 병용에 따른 진단율 향상능 평가**
- [0264] **실험방법**
- [0265] 상기 실시예 1에 기재한 방법에 따라 환자의 폐 조직으로부터 샘플을 획득한 후 MRS 및 CK 마커 조합에 따른 dual IF법에 의한 세포진 검사법 및 통상적인 염색방법과 dual IF법의 병용에 따른 진단능 분석을 위해, 각 진단방법의 ROC curve를 비교 분석하였다.

[0267] 실험에 사용된 임상 환자의 병리학적 정보는 다음과 같다:

성별	전체 검사 대상 (n=110)	
	남	71
	여	39
나이	67.1 ± 10.75	
최종 진단명*	양성 (benign lung disease)	27
	악성 (lung cancer)	82
	진단 안 됨 (non-diagnostic)**	1
초기 세침 흡인검사의 세포학적 진단결과	negative malignancy	19
	non-diagnostic/atypical	29
	lung cancer	62

\* 검체의 배양, 추적 관찰시 병소의 변화, 또는 수술로 최종 확인한 진단 결과임.

\*\* 추적 검사시 방문치 않고 소실된 증례임.

[0268]

## [0270] 실험결과

[0271] 이에 대한 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[0272] 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, MRS 및 사이토케라틴 마커 조합에 따른 dual IF법에 의한 세포진 검사법 및 통상적인 염색방법과 dual IF법의 병용에 따른 진단의 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 ROC curve의 AUC값을 각각 하기 표 1에 요약하여 나타내었다.

표 1

진단방법	민감도 (sensitivity)	특이도 (specificity)	ROC curve의 AUC
MRS + CK Dual IF법	83.1%	76.9%	0.846
MRS + CK Dual IF법 + 통상적인 염색법	90.6%	92.3%	0.944

[0274]

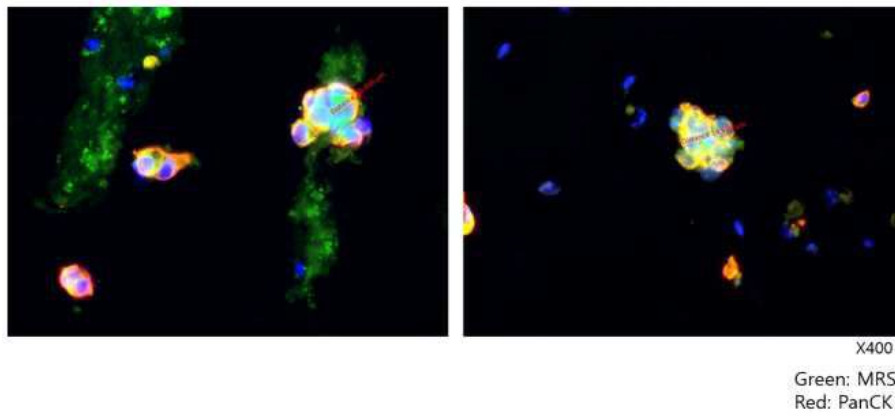
[0275] 도 3, 도 4 및 상기 표에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본원발명의 마커 조합에 따른 dual IF법에 통상적인 염색방법을 병용하여 세포진 검사를 수행한 결과, 진단의 민감도 및 특이도가 현저히 상승하였으며, ROC curve의 AUC값도 크게 상승하여 폐암 진단능이 향상되었음을 확인할 수 있었다.

## 산업상 이용가능성

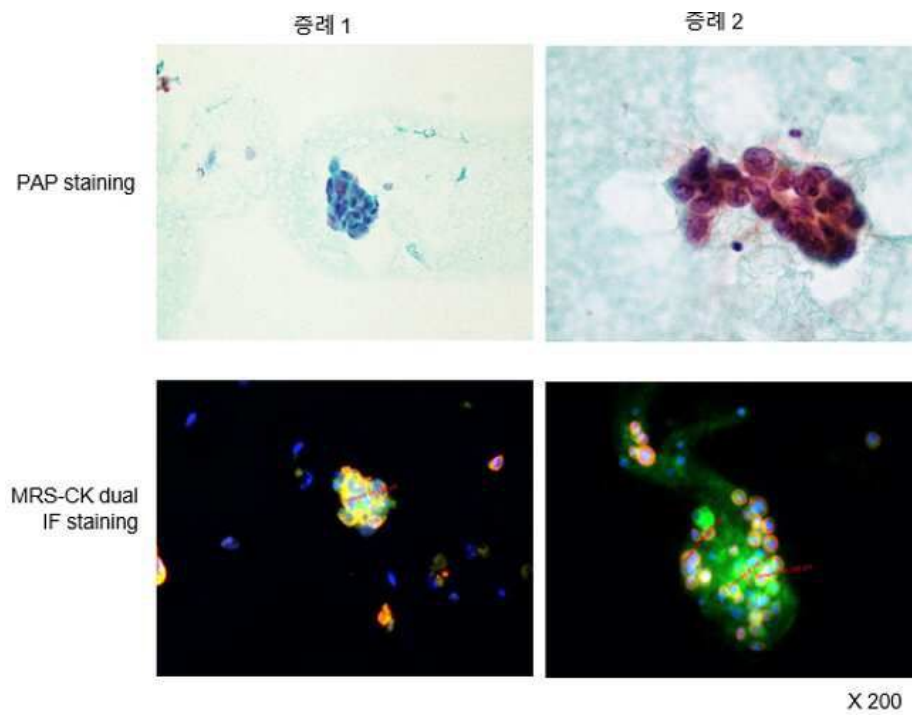
[0277] 본원발명이 제공하는 마커의 조합에 의한 경우, 폐암 진단의 정확도가 향상되며, 특히 세포진 검사에 있어서 비정형 세포로 판정된 세포의 폐암 여부를 정확하게 판별할 수 있는 효과가 있어 산업상 이용가능성이 매우 높다.

## 도면

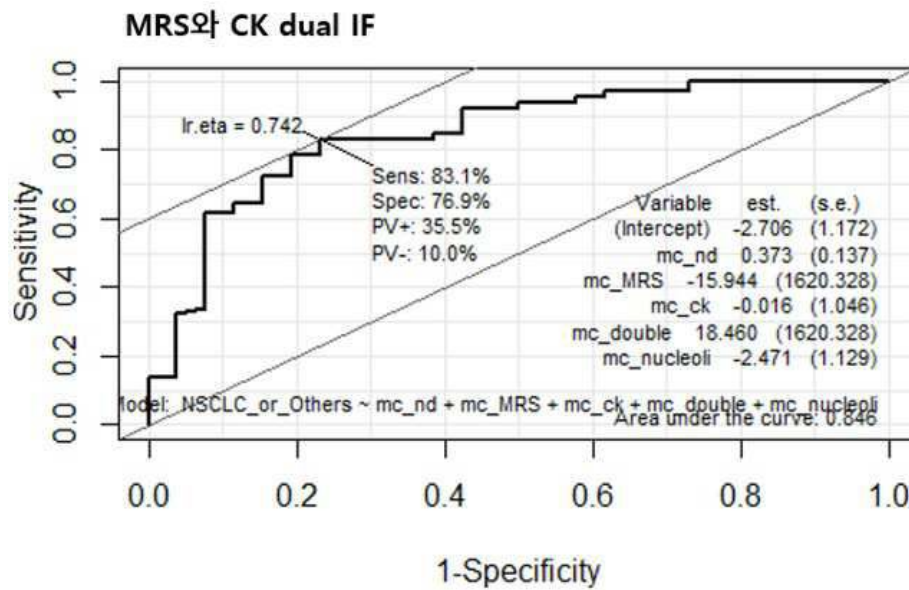
### 도면1



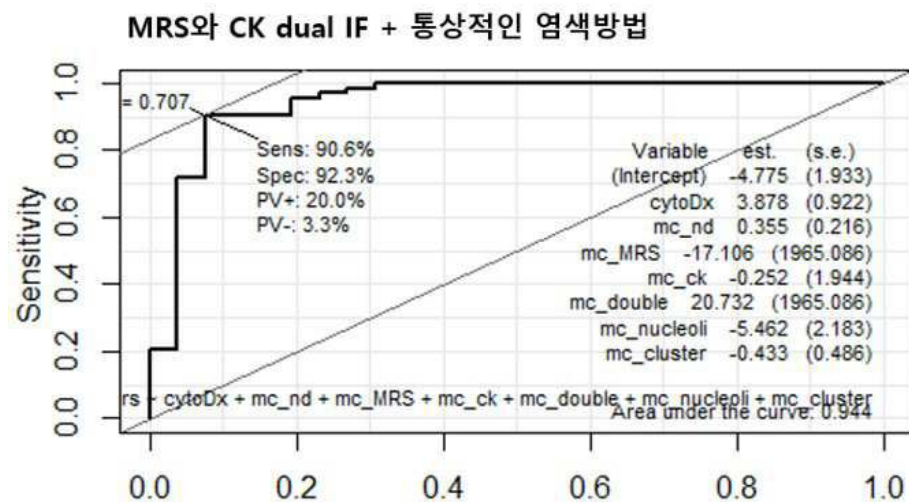
### 도면2



도면3



도면4



## 서열목록

- <110> Medicinal Bioconvergence Research Center  
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Method for diagnosing lung cancer using methionyl-tRNA synthetase  
and pan-cytokeratin
- <130> NP19-0081
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 900
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human MRS amino acid sequence

<400> 1

Met Arg Leu Phe Val Ser Asp Gly Val Pro Gly Cys Leu Pro Val Leu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Arg Ala Arg Gly Arg Ala Glu Val Leu Ile Ser Thr

20 25 30

Val Gly Pro Glu Asp Cys Val Val Pro Phe Leu Thr Arg Pro Lys Val

35 40 45

Pro Val Leu Gln Leu Asp Ser Gly Asn Tyr Leu Phe Ser Thr Ser Ala

50 55 60

Ile Cys Arg Tyr Phe Phe Leu Leu Ser Gly Trp Glu Gln Asp Asp Leu

65 70 75 80

Thr Asn Gln Trp Leu Glu Trp Glu Ala Thr Glu Leu Gln Pro Ala Leu

85 90 95

Ser Ala Ala Leu Tyr Tyr Leu Val Val Gln Gly Lys Lys Gly Glu Asp

100 105 110

Val Leu Gly Ser Val Arg Arg Ala Leu Thr His Ile Asp His Ser Leu

115 120 125

Ser Arg Gln Asn Cys Pro Phe Leu Ala Gly Glu Thr Glu Ser Leu Ala

130 135 140

Asp Ile Val Leu Trp Gly Ala Leu Tyr Pro Leu Leu Gln Asp Pro Ala

145 150 155 160

Tyr Leu Pro Glu Glu Leu Ser Ala Leu His Ser Trp Phe Gln Thr Leu

165 170 175

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

180 185 190

Gln Gly Val Leu Ala Leu Arg Pro Tyr Leu Gln Lys Gln Pro Gln Pro

195 200 205

Ser Pro Ala Glu Gly Arg Ala Val Thr Asn Glu Pro Glu Glu Glu Glu

210 215 220

Leu Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ile Ala Met Ala Val Thr Ala Trp

225 230 235 240

Glu Lys Gly Leu Glu Ser Leu Pro Pro Leu Arg Pro Gln Gln Asn Pro

245 250 255

Val Leu Pro Val Ala Gly Glu Arg Asn Val Leu Ile Thr Ser Ala Leu

260 265 270

Pro Tyr Val Asn Asn Val Pro His Leu Gly Asn Ile Ile Gly Cys Val

275 280 285

Leu Ser Ala Asp Val Phe Ala Arg Tyr Ser Arg Leu Arg Gln Trp Asn

290 295 300

Thr Leu Tyr Leu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr Gly Thr Ala Thr Glu Thr

305 310 315 320

Lys Ala Leu Glu Glu Gly Leu Thr Pro Gln Glu Ile Cys Asp Lys Tyr

325 330 335

His Ile Ile His Ala Asp Ile Tyr Arg Trp Phe Asn Ile Ser Phe Asp

340 345 350

Ile Phe Gly Arg Thr Thr Thr Pro Gln Gln Thr Lys Ile Thr Gln Asp

355 360 365

Ile Phe Gln Gln Leu Leu Lys Arg Gly Phe Val Leu Gln Asp Thr Val

370 375 380

Glu Gln Leu Arg Cys Glu His Cys Ala Arg Phe Leu Ala Asp Arg Phe

385 390 395 400

Val Glu Gly Val Cys Pro Phe Cys Gly Tyr Glu Glu Ala Arg Gly Asp

405 410 415

Gln Cys Asp Lys Cys Gly Lys Leu Ile Asn Ala Val Glu Leu Lys Lys

420 425 430

Pro Gln Cys Lys Val Cys Arg Ser Cys Pro Val Val Gln Ser Ser Gln

435 440 445

His Leu Phe Leu Asp Leu Pro Lys Leu Glu Lys Arg Leu Glu Glu Trp

450 455 460

Leu Gly Arg Thr Leu Pro Gly Ser Asp Trp Thr Pro Asn Ala Gln Phe

465                      470                      475                      480  
 Ile Thr Arg Ser Trp Leu Arg Asp Gly Leu Lys Pro Arg Cys Ile Thr  
                                  485                      490                      495  
 Arg Asp Leu Lys Trp Gly Thr Pro Val Pro Leu Glu Gly Phe Glu Asp  
                                  500                      505                      510  
 Lys Val Phe Tyr Val Trp Phe Asp Ala Thr Ile Gly Tyr Leu Ser Ile  
  
                                  515                      520                      525  
 Thr Ala Asn Tyr Thr Asp Gln Trp Glu Arg Trp Trp Lys Asn Pro Glu  
                                  530                      535                      540  
 Gln Val Asp Leu Tyr Gln Phe Met Ala Lys Asp Asn Val Pro Phe His  
 545                      550                      555                      560  
 Ser Leu Val Phe Pro Cys Ser Ala Leu Gly Ala Glu Asp Asn Tyr Thr  
                                  565                      570                      575  
 Leu Val Ser His Leu Ile Ala Thr Glu Tyr Leu Asn Tyr Glu Asp Gly  
                                  580                      585                      590  
  
 Lys Phe Ser Lys Ser Arg Gly Val Gly Val Phe Gly Asp Met Ala Gln  
                                  595                      600                      605  
 Asp Thr Gly Ile Pro Ala Asp Ile Trp Arg Phe Tyr Leu Leu Tyr Ile  
                                  610                      615                      620  
 Arg Pro Glu Gly Gln Asp Ser Ala Phe Ser Trp Thr Asp Leu Leu Leu  
 625                      630                      635                      640  
 Lys Asn Asn Ser Glu Leu Leu Asn Asn Leu Gly Asn Phe Ile Asn Arg  
                                  645                      650                      655  
 Ala Gly Met Phe Val Ser Lys Phe Phe Gly Gly Tyr Val Pro Glu Met  
  
                                  660                      665                      670  
 Val Leu Thr Pro Asp Asp Gln Arg Leu Leu Ala His Val Thr Leu Glu  
                                  675                      680                      685  
 Leu Gln His Tyr His Gln Leu Leu Glu Lys Val Arg Ile Arg Asp Ala  
                                  690                      695                      700  
 Leu Arg Ser Ile Leu Thr Ile Ser Arg His Gly Asn Gln Tyr Ile Gln  
 705                      710                      715                      720  
 Val Asn Glu Pro Trp Lys Arg Ile Lys Gly Ser Glu Ala Asp Arg Gln

725	730	735	
Arg Ala Gly Thr Val Thr Gly Leu Ala Val Asn Ile Ala Ala Leu Leu			
740	745	750	
Ser Val Met Leu Gln Pro Tyr Met Pro Thr Val Ser Ala Thr Ile Gln			
755	760	765	
Ala Gln Leu Gln Leu Pro Pro Pro Ala Cys Ser Ile Leu Leu Thr Asn			
770	775	780	
Phe Leu Cys Thr Leu Pro Ala Gly His Gln Ile Gly Thr Val Ser Pro			
785	790	795	800
Leu Phe Gln Lys Leu Glu Asn Asp Gln Ile Glu Ser Leu Arg Gln Arg			
805	810	815	
Phe Gly Gly Gly Gln Ala Lys Thr Ser Pro Lys Pro Ala Val Val Glu			
820	825	830	
Thr Val Thr Thr Ala Lys Pro Gln Gln Ile Gln Ala Leu Met Asp Glu			
835	840	845	
Val Thr Lys Gln Gly Asn Ile Val Arg Glu Leu Lys Ala Gln Lys Ala			
850	855	860	
Asp Lys Asn Glu Val Ala Ala Glu Val Ala Lys Leu Leu Asp Leu Lys			
865	870	875	880
Lys Gln Leu Ala Val Ala Glu Gly Lys Pro Pro Glu Ala Pro Lys Gly			
885	890	895	
Lys Lys Lys Lys			
900			