



등록특허 10-2127903



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월29일

(11) 등록번호 10-2127903

(24) 등록일자 2020년06월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0011321
- (22) 출원일자 2019년01월29일
 심사청구일자 2019년01월29일
- (56) 선행기술조사문헌
 American Journal of Respiratory and Critical
 Care Medicine (2010) 182(10):1228-1238*
 (뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대
 학교)
- (72) 발명자
 윤주현
 서울특별시 강남구 삼성로 150, 209동 1302호
- 유지환
 서울특별시 서대문구 연희로32길 48
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 이재영

전체 청구항 수 : 총 10 항

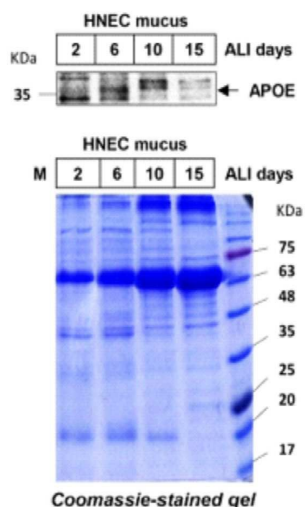
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **염증성 호흡기 질환의 진단용 바이오마커**

(57) 요약

본 발명은 염증성 호흡기 질환의 진단용 바이오마커 및 이를 이용하여 염증성 호흡기 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 아포리포단백질 E(apolipoprotein E; ApoE) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 염증성 호흡기 질환을 진단할 수 있는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/775 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/12 (2013.01)

(72) 발명자

정연욱

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 119-1501(장안동, 장안현대홈타운)

차지민

서울특별시 서대문구 연세로9길 40, 303호

(56) 선행기술조사문헌

US20180172699 A1*
JP2010524432 A
KR1020110063453 A
US20100286025 A1
Laryngoscope (2015) 125(7):E225-E230
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016K1A1A2910779
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 글로벌연구실사업
연구과제명 난치성 알레르기 호흡기질환의 바이오마커 개발
기 여 율 1/2
주관기관 연세대학교
연구기간 2016.09.01 ~ 2022.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9D5A01952415
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국가마우스표현형분석사업
연구과제명 호흡기 질환 마우스 표현형 분석 기반 구축 및 병인 유전자 기능 규명
기 여 율 1/2
주관기관 연세대학교
연구기간 2016.11.20 ~ 2023.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

아포리포단백질 E(apolipoprotein E; ApoE) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단용 조성물로서,

상기 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환은 비충혈; 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 부비동염; 코 및 코를 둘러싸는 조직의 구조물의 급성 염증성 질환; 출혈; 소 출혈; 만성 변성 질환; 급성 변성 질환; 점막의 부종; 하나 이상의 비갑개의 부종; 비후성 비염(turbinate hypertrophy)(확대된 비갑개); 스트레스로 인해 유도되는 비염; 침투성 약물의 2차 반응 또는 부작용; 후비루; 안면 압력 및 통증(facial pressure and pain); 점막 분비물이 목으로 흘러내림(dripping of mucous membrane secretions down the throat); 후비루(post nasal drip); 코안(콧구멍)에서 콧물; 상기도의 건조한 느낌; 비강 자극(nasal irritation); 후각 상실; 코 내의 작열감; 코 가려움(itchy nose); 재채기(sneezing); 막힌 코(a stuffed nose); 코골이(snoring); 수면성 무호흡(sleep apnea); 비용종(nasal polyps) (비강 용종증(nasal polyposis)); 및 환경 자극물질 또는 알레르겐에 대한 노출로 이루어진 군에서 선택되는 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아포리포단백질 E의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 아포리포단백질 E에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단용 키트.

청구항 7

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법으로서,

상기 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환은 비충혈; 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 부비동염; 코 및 코를 둘러싸는 조직의 구조물의 급성 염증성 질환; 출혈; 소 출혈; 만성 변성 질환; 급성 변성 질환; 점막의 부종; 하나 이상의 비갑개의 부종; 비후성 비염(turbinate hypertrophy)(확대된 비갑개); 스트레스로 인해 유도되는 비염; 침투성 약물의 2차 반응 또는 부작용; 후비루; 안면 압력 및 통증

(facial pressure and pain); 점막 분비물이 목으로 흘러내림(dripping of mucous membrane secretions down the throat); 후비루(post nasal drip); 코안(콧구멍)에서 콧물; 상기도의 건조한 느낌; 비강 자극(nasal irritation); 후각 상실; 코 내의 작열감; 코 가려움(itchy nose); 재채기(sneezing); 막힌 코(a stuffed nose); 코골이(snoring); 수면성 무호흡(sleep apnea); 비용종(nasal polyps) (비강 용종증(nasal polyposis)); 및 환경 자극물질 또는 알레르겐에 대한 노출로 이루어진 군에서 선택되는 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 비강 세척액, 비인두 세척액, 비강 내 조직, 비강 도말, 비강 흡인액, 비인두 도말 또는 비인두 흡인액인, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 비강 세척액, 비인두 세척액, 비강 내 조직, 비강 도말, 비강 흡인액, 비인두 도말 또는 비인두 흡인액 유래 분비 단백질(secretome)인, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 상기 아포리포단백질 E 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용하여 측정되는, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용하여 측정되는, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 염증성 호흡기 질환의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 비점막 또는 부비점막의 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증성 호흡기 질환의 진단용 바이오마커 및 이를 이용하여 염증성 호흡기 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비염은 바이러스, 세균 또는 자극물에 의한 코의 점막에서의 만성 또는 급성 염증에 의해 발생한다. 염증은 일반적으로 콧물, 코막힘(nasal congestion) 및 후비루(post-nasal drip)를 일으키면서, 과도한 양의 점액질 생산을 야기한다. 비염은 미국에서만 5000 만명 이상의 사람들에게 영향을 주는 것으로 보고된다.

[0003] 비염에는 감염성 비염, 알레르기성 비염 및 비알레르기성 비염을 포함하여 여러 종류가 있다. 감염성 비염은 바이러스나 세균 감염에 의해 발생한다. 감염성 비염의 종류로써 감기와 축농증이 있다.

[0004] 알레르기성 비염은 전 세계 사람들의 20 % 이상에서 발생하는데 유병률은 매년 증가하고 있다. 알레르기성 비염은 사회 생활, 수면, 학교 및 직장에서의 문제를 야기한다. 환자의 삶의 질은 비염의 정도와 지속 시간에 의해 달라질 수 있다. 알레르기성 비염은 먼지나 꽃가루와 같은 실내외의 알레르기 항원(allergen)에 대응한 전염증성(proinflammatory) 면역 반응이다. 증상은 일년 내내 발생하거나 그 해의 특정한 시기, 보통 봄, 여름 또는 가을에 나타날 수 있다. ARIA(Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) 가이드라인은 알레르기 항원 회피, 환자 교육, 약물 요법 및 알레르기 항원 특이적 면역 요법으로써 알레르기성 비염의 관리를 설명하고 있다. 약물 요법의 경우, ARIA는 현재 중등도 이상의 고질적질환에 대해 비강내 2 세대 H1-항히스타민 및 비강내 코르티코스테로이드(corticosteroid)의 처치를 권장한다. Bousquet등의 2001년 논문(Bousquet et al., J. Allergy Clin.Immunol., 108(Suppl 5):S147-334, 2001) 및 2008년 논문(Bousquet et al., Allergy, 63(Suppl. 86):8-160, 2008)을 참조한다.

[0005] 비알레르기성 비염은 알레르기 항원이나 감염원(infectious agent)에 의해서 촉발되는 것이 아닌 비염이다. 이러한 비알레르기성 비염에 대해서는 여전히 밝혀야 할 많은 것이 있지만, 그것의 트리거(trigger)는 코의 내벽에서 혈관의 확장을 일으켜 부기 및 드레인리지(drainage)를 야기하는 것으로 생각된다. 비알레르기성 비염의 종류로는 혈관운동성, 자율신경성, 호르몬성, 약물유발성, 위축성 및 미각성비염 그리고 약물성 비염 등이 있다. 혈관운동성 비염의 트리거로는 냄새, 연기(fume), 연기(smoke), 먼지, 온도 변화등이 있으며, 혈관운동성 비염은 알레르기성 비염과 함께 나타날 수 있다. 약물성 비염은 국소소염제의 장시간 사용으로 인해 다시 코막힘이 야기된 상태이다.

[0006] 한편, 만성 부비동염(CRS)의 주요 병인은 지속적인 염증이며, 만성 부비동염은 콧물, 안면통, 후각 감퇴와 질병의 내시경적 신호 또는 CT 스캔 변화 중 어느 하나와 같은 증상 중 둘 이상이 최소 8~12주로 야기되는 비강 및 부비강의 염증으로 정의된다.

[0007] 만성 부비동염은 비용종의 유무에 따라 비용종을 갖는 만성 부비동염(CRSwNP)과 비용종을 갖지 않는 만성 부비동염(CRSsNP)으로 분류되며, 비용종은 울퉁불퉁한 점막과 내시경을 통한 중비도 또는 양측 유경성 병소를 통해 확인할 수 있다. 조직 분석에 따르면, CRSwNP에서는 약 80% 코카시안 용종에서 주로 호산구로 이루어진 염증세포의 과도한 침윤을 나타내는 반면, CRSsNP에서는 전형적으로 보다 많은 호중구성 염증을 나타낸다. 만성 부비동염에서 호산구 염증은 자주 약물 치료에 저항성을 나타내며, 수술과 같은 외과적 치료를 필요로 하게 된다.

[0008] 이러한 비염 및 부비동염을 진단하기 위한 방법은 여러 가지가 있는데 환자에 따라 혹은 진료 환경에 따라 다양하게 적용될 수 있으며 항상 모든 검사를 시행하는 것은 아니다. 예를 들어 병력으로 연령, 직업, 증상의 종류 및 정도, 발생 연령, 유발요인, 주거환경, 알레르기 원인 물질에의 노출 여부, 합병증, 알레르기 과거력, 가족력, 치료 경력과 경과를 조사하거나, 실험실 검사로서 혈청 총 IgE 검사, 특히 IgE 검사, 혈액 호산구와 호산구 양이온단백, 비즙 도말 검사 등을 시행할 수 있고, 그 외에 생체검사로 피부반응검사, 항원유발검사 등이 있으며, 이학적 검사로 주로 비경을 이용하여 비강 내부를 관찰하게 된다.

[0009] 그러나 이러한 진단 및 검사 방법들은 피검자에게 부담이 되거나 고통을 초래하는 경우가 있고, 알레르기 항원 반응에 대한 민감도와 특이도가 떨어지는 경우가 있으므로, 이러한 점을 보완한 진단 방법이 요구되는

실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 일 목적은 염증성 호흡기 질환을 진단할 수 있는 바이오마커를 제공하고자 한다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 염증성 호흡기 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 염증성 호흡기 질환을 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 아포리포단백질 E(apolipoprotein E; ApoE) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 염증성 호흡기 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)(예컨대, 전-전이성 또는 전이성 암 상태의 동정, 암의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 염증성 호흡기 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "아포리포단백질 E(apolipoprotein E; ApoE)"는 신체에서 지방의 대사에 관여하는 단백질로, 알츠하이머 또는 심혈관 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 바 있다. 리포단백질은 지방과 단백질로 이루어지는 분자로, 아포리포단백질 E는 트리글리세라이드-풍부 지단백질의 이화 작용에 필수적인 역할을 하는 킬로미크론(chylomicron) 및 중간밀도 지단백질(intermediate-density lipoprotein; IDLs)의 부분에 해당하는 지방-결합 단백질에 해당한다. 주변 조직에서 아포리포단백질 E는 간과 대식 세포에서 주로 생성되어 콜레스테롤 대사를 조절하는 역할을 한다. 신경계에서는 상기 아포리포단백질 E는 성상교세포(astrocyte)에 의해 주로 생성되어 아포리포단백질 E 수용체를 통해 콜레스테롤을 뉴런에 전달시켜주는 역할을 한다. 또한, 상기 아포리포단백질 E는 뇌에서도 콜레스테롤 전달체로 기능을 한다. 본 발명에서 염증성 호흡기 질환을 진단하기 위한 바이오마커로서 상기 아포리포단백질 E는 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서 상기 아포리포단백질 E의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 아포리포단백질 E에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 아포리포단백질 E에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 아포리포단백질 E의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0019] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었

다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 "애포타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애포타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오타이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 아포리포단백질 E이나, 이들을 암호화하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[0027] 본 발명에서 상기 염증성 호흡기 질환은 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환, 기관지염, 인후염, 편도염, 폐쇄성 세기관지염, 후두염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 급성 폐손상(acute lung injury), 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침 및 가래로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 "비점막 또는 부비점막의 염증성 질환"은 코안 및 부비강의 점막에 영향을 미칠 수 있는 임의의 질병, 질환, 또는 질병 상태를 말한다. 비점막 또는 부비 점막은 코안에 붙은(lines) 일반적인 유형의 습윤한 조직이다. 부비강은 코안을 둘러싸는 4개쌍의 공기로 충전된 공간의 그룹이다. 비점막 또는 부비점막은 부비강에 붙은 조직의 유형이다. 또한, 비점막/부비점막의 질환은 이에 한정되지 않지만 코 연골(nasal cartilage) 및 서골(vomer)을 포함하는 코안 및 부비강을 둘러싸는 코안의 다른 부분 및 영역에 영향을 줄 수 있다. 서골은 비중격의 내부를 형성하는 두개골의 짝지어지지 않은 얼굴 뼈이다. 따라서, 비점막 또는 부비점막은 코 연골 및

서굴과 같은 코안 및 부비강을 둘러싸는 영역 및 코안의 다른 부분에 영향을 줄 수 있는 질병 및 질환을 포함한다.

- [0029] 본 발명에서 상기 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환으로는 비충혈; 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 부비동염; 코 및 코를 둘러싸는 조직의 구조물의 급성 염증성 질환; 출혈; 소 출혈; 만성 변성 질환; 급성 변성 질환; 점막의 부종; 하나 이상의 비갑개의 부종; 비후성 비염(turbinate hypertrophy)(확대된 비갑개); 쇼그렌 증후군(비점막의 건조 증후군); 스트레스로 인해 유도되는 비염; 침투성 약물의 2차 반응 또는 부작용; 후비루; 안면 압력 및 통증(facial pressure and pain); 두통; 점막 분비물이 목으로 흘러내림(dripping of mucous membrane secretions down the throat); 후비루(post nasal drip); 코안(콧구멍)에서 콧물; 비정상적 미각; 상기도의 건조한 느낌; 졸림; 비강 자극(nasal irritation); 후각 상실; 코 내의 작열감; 귀 또는 청각 문제; 코 가려움(itchy nose); 눈 가려움(itchy eyes); 눈물나는 눈(watering eyes); 재채기(sneezing); 막힌 코(a stuffed nose); 코골이(snoring); 수면성 무호흡(sleep apnea); 천식; 비용종(nasal polyps) (비강 용종증(nasal polyposis)); 및 환경 자극물질 또는 알레르겐에 대한 노출로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 염증성 호흡기 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 염증성 호흡기 질환의 발병 여부, 발병 가능성 및 예후 등을 진단할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 진단의 대상이 되는 염증성 호흡기 질환은 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환, 기관지염, 인후염, 편도염, 폐쇄성 세기관지염, 후두염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 급성 폐손상(acute lung injury), 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침 및 가래로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 상기 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환으로는 비충혈; 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 부비동염; 코 및 코를 둘러싸는 조직의 구조물의 급성 염증성 질환; 출혈; 소 출혈; 만성 변성 질환; 급성 변성 질환; 점막의 부종; 하나 이상의 비갑개의 부종; 비후성 비염(turbinate hypertrophy)(확대된 비갑개); 쇼그렌 증후군(비점막의 건조 증후군); 스트레스로 인해 유도되는 비염; 침투성 약물의 2차 반응 또는 부작용; 후비루; 안면 압력 및 통증(facial pressure and pain); 두통; 점막 분비물이 목으로 흘러내림(dripping of mucous membrane secretions down the throat); 후비루(post nasal drip); 코안(콧구멍)에서 콧물; 비정상적 미각; 상기도의 건조한 느낌; 졸림; 비강 자극(nasal irritation); 후각 상실; 코 내의 작열감; 귀 또는 청각 문제; 코 가려움(itchy nose); 눈 가려움(itchy eyes); 눈물나는 눈(watering eyes); 재채기(sneezing); 막힌 코(a stuffed nose); 코골이(snoring); 수면성 무호흡(sleep apnea); 천식; 비용종(nasal polyps) (비강 용종증(nasal polyposis)); 및 환경 자극물질 또는 알레르겐에 대한 노출로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 또는 부비동염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 예를 들면, 본 발명의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의

단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0039] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 염증성 호흡기 질환의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 염증성 호흡기 질환의 발병 여부가 불확실한 개체로, 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0043] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 기관지 생검, 폐 생검, 비강 생검, 부비동 생검, 객담(sputum), 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF), 비강 세척액(nasal lavage fluid), 비강 도말(nasal swap), 비강 흡인액 (nasal aspirate), 비인두 도말(nasopharyngeal swab), 비인두 흡인액(nasopharyngeal aspirate), 비인두 세척액(nasopharyngeal lavage fluid), 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 눈물(tears), 점액(mucus), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있지만, 바람직하게는 발병 가능성이 높은 개체로부터 병리조직학적 검사용으로 용이하게 채취 가능한 비강 세척액, 비인두 세척액, 기관지 폐포세척액, 비강 도말, 비강 흡인액, 비인두 도말 또는 비인두 흡인액일 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 열거한 비강 세척액, 비인두 세척액, 기관지 폐포세척액, 비강 도말, 비강 흡인액, 비인두 도말 또는 비인두 흡인액 내 세포로부터 유래된 분비 단백질(secretome)일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서는 상기와 같이 분리된 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 아포리포단백질 E의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 바람직하게는 상기 아포리포단백질 E 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 상기 아포리포단백질 E의 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 상기 아포리포단백질 E를 암호화하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 양을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의

발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 염증성 호흡기 질환의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 상기 염증성 호흡기 질환은 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환, 기관지염, 인후염, 편도염, 폐쇄성 세기관지염, 후두염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 급성 폐손상(acute lung injury), 농흉, 폐농양, 폐렴, 폐결핵, 기침 및 가래로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 또한, 본 발명에서 상기 비점막 또는 부비점막의 염증성 질환으로는 비충혈; 비염; 알러지 비염; 급성 비염; 아토피 비염; 혈관 운동성 비염; 부비동염; 염증, 만성 염증성 질환, 또는 코 및 코를 둘러싸는 조직의 구조물의 급성 염증성 질환; 출혈; 소 출혈; 만성 변성 질환; 급성 변성 질환; 점막의 부종; 하나 이상의 비갑개의 부종; 비후성 비염(turbinate hypertrophy)(확대된 비갑개); 쇼그렌 증후군(비점막의 건조 증후군); 스트레스로 인해 유도되는 비염; 침투성 약물의 2차 반응 또는 부작용; 후비루; 안면 압력 및 통증(facial pressure and pain); 두통; 점막 분비물이 목으로 흘러내림(dripping of mucous membrane secretions down the throat); 후비루(post nasal drip); 코안(콧구멍)에서 콧물; 비정상적 미각; 상기도의 건조한 느낌; 졸림; 비강 자극(nasal irritation); 후각 상실; 코 내의 작열감; 귀 또는 청각 문제; 코 가려움(itchy nose); 눈 가려움(itchy eyes); 눈물나는 눈(watering eyes); 재채기(sneezing); 막힌 코(a stuffed nose); 코골이(snoring); 수면성 무호흡(sleep apnea); 천식; 비용종(nasal polyps) (비강 용종증(nasal polyposis)); 및 환경 자극물질 또는 알레르겐에 대한 노출로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 염증성 호흡기 질환 환자로부터 분리한 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0054] 상기 생물학적 시료에 피검 물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0055] 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 염증성 호흡기 질환의 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에서 상기 생물학적 시료와 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 상기 본 발명의 정보 제공 방법에 기재된 바와 중복되어 이하 자세한 기재를 생략한다.
- [0057] 본 발명에서 상기 피검 물질은 염증성 호흡기 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 것으로 예측되는 물질로, 예를 들면, 약물 후보 물질, 피검 화합물 또는 피검 조성물은 저분자 화합물, 항체, 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA), 핵산, 단백질, 펩티드, 기타 추출물 또는 천연물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에서 상기 피검 물질의 접촉 후 상기 생물학적 시료에서 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 접촉 전에 비하여 감소된 경우 상기 피검 물질을 염증성 호흡기 질환의 치료제로 판별하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명에서는 비강 세척액, 비인두 세척액, 기관지 폐포세척액, 비강 도말, 비강 흡인액, 비인두 도말 또는 비인두 흡인액 등과 같은 생물학적 시료에 대하여 아포리포단백질 E 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 염증성 호흡기 질환의 발병 가능성을 정확하지만 용이한 방법으로 진단할 수 있고, 그에 따라 환자가 향후 적절한 치료를 계획할 수 있어 국민 건강 수준을 보다 드높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1 내지 3은 분화 동안 인간 초기 비강 상피 세포(human primary nasal epithelial cells; HNEC) 조성물에서의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 HNECs의 분화를 위하여 공기-액체 접면 배양(air-liquid interface culture; ALI)의 실험 설계도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 마커 단백질에 대한 항체를 사용하여 사이토스핀(cytospin) 슬라이드의 면역형광 염색을 통해 HNECs의 분화의 각 단계에서 상기 HNECs의 모습을 촬영한 사진을 나타낸 것이다. 여기서, 섬모 세포는 AC- α -튜블린-양성 세포(노란색)으로 나타내었고, 분비 세포는 MUC5AC-양성 세포(녹색)으로 나타내었으며, 기저 세포는 p63-양성 세포(적색)으로 나타내었다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 HNECs의 분화 동안 섬모 세포, 분비 세포, 중간 세포(총 세포 수에서 섬모 세포, 분비 세포 및 기저 세포 제외한 수) 및 기저 세포의 비율을 그래프로 나타낸 것이다. 각 결과는 평균 \pm SEM으로 나타낸 것이고; $n = 4$; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; 본페로니 사후 호크 교정(Bonferroni post hoc correction)을 이용한 일원 변량 분석(one-way analysis of variance)에 의한 것이다.

도 4 내지 10은 본 발명의 일 실시예에서 iTRAQ를 이용하여 HNECs 유래 분비 단백질체의 단백질 특성을 분석한 것이다.

도 4는 iTRAQ-ALI-4Ds 데이터 세트에서 확인된 3,506 단백질의 상대적 풍부도를 나타낸 히트맵이다. 각 색깔은 iTRAQ-ALI-4Ds 데이터 세트에서 8개의 시료에 대하여 각 단백질의 상대적 풍부도를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 ALI 2D 및 ALI 6D에서 단백질 풍부도를 배수 변화로 나타낸 화산 도표를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 ALI 2D 및 ALI 10D에서 단백질 풍부도를 배수 변화로 나타낸 화산 도표를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 ALI 2D 및 ALI 15D에서 단백질 풍부도를 배수 변화로 나타낸 화산 도표를 나타낸 것이다.

상기 도 5 내지 7에서 x 축은 \log_2 비율로 나타낸 것이고, y 축은 유의차($-\log_{10}$ of p value, $n = 2$)로 나타낸 것이다. 총 269개 단백질은 적어도 2배 이상 변화하였고($p < 0.01$, $n = 2$), 상세하게는 ALI 2D와 ALI 6D를 비교하면 37개 단백질이, ALI 2D와 ALI 10D를 비교하면 112개 단백질이, 그리고 ALI 2D와 ALI 15D를 비교하면 120개 단백질이 변화하였다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 ALI 배양 시간에 따라 테터 뮤신인 MUC1, MUC4 및 MUC16의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 ALI 배양 시간에 따라 겔-형성 뮤신인 MUC5A 및 MUC5B의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 ALI 배양 시간에 따라 MUC18, MUC20 및 MUC21의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

상기 도 8 내지 10에서 괄호 내 숫자는 단백질에 대하여 확인된 펩타이드 서열의 총수(Σ # PSMs)를 의미한다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 HNEC 분비 단백질체에서 단백질의 특성을 나타낸 것으로, 도 11A는 iTRAQ에 의해 확인된 3,506개의 단백질에서 활성화된 중요한 생물학적 경로를 나타낸 것이다. 도 11B는 GO 분석을 통해 기능 주석(functional annotation)에서 상위 10개의 세포 구간(CC)으로 분류된 HNEC 분비 단백질체의 세포 위치를 파이 그래프로 나타낸 것이다.

도 12 내지 14는 본 발명의 일 실시예에서 내시경 부비동염 수술 후 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질체의 특성을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에서 iTRAQ-H9 데이터 세트에서 확인된 660개의 단백질의 상대적 풍부도를 나타낸 히트맵이다. 각 색깔은 iTRAQ-H9 데이터 세트에서 9개의 시료에 대하여 각 단백질의 상대적 풍부도(-3 to 3)를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서 HNECs 분비 단백질체(인-비트로)와 환자 유래 분비 단백질체(인-비보)에서 중복되는 단백질(492개)를 나타내는 벤 도표이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에서 660개 분비 단백질체 단백질에서 활성화된 중요한 생물학적 경로를 나타낸 것이다.

도 15 내지 20은 본 발명의 일 실시예에서 인-비트로 분비 단백질체와 인-비보 분비 단백질체를 비교한 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에서 ALI 배양 시간에 따른 프로파일에 근거하여 인-비트로 분비 단백질체 단백질을 4가지 클러스터로 분류하는 히트맵에 관한 것이다. 클러스터 A는 ALI 2D일 때 높게 분비되는 84개의 단백질이고, 클러스터 B는 ALI 6D일 때 높게 분비되는 246개의 단백질이며, 클러스터 C는 ALI 10D일 때 높게 분비되는 664개의 단백질이고, 클러스터 D는 ALI 15D일 때 높게 분비되는 76개의 단백질에 해당한다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에서 환자 유래 인-비보 분비 단백체에서 높게 발현되는 86개의 단백질을 나타내는 히트맵이다($FC > 2$, $p < 0.05$).

도 17은 본 발명의 일 실시예에서 환자 유래 인-비보 분비 단백체에서 ALI 배양 시간에 따른 아포리포단백질 E(APOE), 클러스테린(CLS), 혹은 아포리포단백질 J) 및 프로로우-밀도 리포단백질 수용체-관련 단백질 1(LRP1, 혹은 ApoE 수용체)의 양의 변화를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에서 환자와 정상 대조군 유래 비강 세척액에서 유래된 인-비보 분비 단백체에서 아포리포단백질과 페리오스틴(POSTN)의 상대적인 양을 비교한 그래프이다.

도 19의 본 발명의 일 실시예에서 위 패널은 HNECs 분화 동안 분리한 인-비트로 분비 단백체 시료에서 ApoE의 양을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이고, 아래 패널은 쿠마시 블루로 염색한 겔을 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에서 웨스턴 블롯을 통해 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백체에서 POSTN의 양을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에서 웨스턴 블롯을 통해 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백체에서 ApoE의 양을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예

[0065] 환자로부터 유래된 비강 세척액의 분비 단백체 준비

[0066] 대조군 시료로는 비중격 환자 5명으로부터 비중격 성형술을 받기 직전에 마취 상태에서 비강 세척액을 확보하였고, 시험군 시료로는 만성 부비동염으로 인하여 수술받은 환자 13명에 대하여 수술 후 2주가 경과하였을 때에 비강 세척액을 확보하였다. 부비동 내시경 수술(endoscopic sinus surgery, ESS) 후 완전한 점액 재생을 위해서는 대략 3 ~ 4개월이 필요하므로, 상기 수술 후 2주가 경과하였을 때 점액 상태는 전형적으로 가장 활성화된 재생 상태에 해당한다. 모든 개체군에 대하여 피부 반응 검사(skin prick test) 및 MAST를 이용한 혈청 항원-특이적 IgE의 실험을 수행한 결과 알러지성 비염은 없는 것으로 확인되었다. 또한, 본 실험을 위한 개체군에서 악성 종양, 자가면역질환 또는 알러지성 천식과 같은 면역 질환을 가진 환자는 제외하였다. 각 개체군으로부터 비강 세척액을 얻기 위한 방법으로는 환자를 의자에 경부가 굴곡지도록 앉힌 자세에서 비점막의 손상을 방지하기 위하여 컷-다운 니들(cut-down needle)을 이용해 시린지(syringe)를 통해서 비강의 중비도에 10 ml 생리 식염수를 주입하였다. 이후 멸균된 15 ml 코니칼 튜브(conical tube)를 이용하여 세척액을 회수하였다. 모든 실험은 중비도로부터 세척액을 얻기 위하여 내시경 검사 아래 수행되었다. 수술을 받은 환자의 경우 상처 회복 동안 분비되는 단백질을 검출하기 위하여, 수술 후 2주가 경과하였을 때 동일한 방법을 이용하여 사골동(ethmoid sinus)으로부터 세척액을 회수하였다. 분비 단백체(secretome)의 준비를 위하여 비강 세척액을 18,506 xg로 3분 동안 원심 분리하여 세포 및 세포 잔해를 제거하고 상층액을 회수하여 예냉시킨 아세톤을 6배 부피 양으로 혼합하고 -20 °C에서 밤새 배양하였다. 4 °C에서 8,000 xg로 10분 동안 원심 분리하여 분비 단백체를 침전시켰다.

[0068] 상대적 및 절대적 정량화를 위한 등압 태그(iTRAQ)

[0069] 환자로부터 유래된 비강 세척액과 분화 동안 HNECs 점액층에서의 단백질 발현의 차이를 확인하기 위하여 8plex 태그 (SCIEX, Framingham, MA, USA)를 이용한 iTRAQ 프로테오믹 방법을 사용하였다. iTRAQ 라벨링(labeling), 강한 양이온 교환 분리(strong cation exchange fractionation) 및 LC-MS를 포함하는 모든 공정은 이미 알려진 방법에 따라 수행되었고, 데이터베이스 조사 및 정량적 데이터 분석은 Poochon Scientific (Frederick, MD)에 의해 수행되었다. MS 로우 데이터 파일은 SEQUEST 및 퍼컬레이터 알고리즘 각각에 기반하여 Proteome Discoverer 1.4 소프트웨어 (Thermo, San Jose, CA)를 사용해 NCBI 웹사이트로부터 인간 단백질 서열 데이터베이스로부터 조사하였다. 거짓-양성 검출 비율(false-positive discovery rate)은 1%로 설정하였다. 결과로 나온 Proteome Discoverer Report는 펩타이드 서열과 펩타이드 스펙트럼 매치 카운트(peptide spectrum match counts; PSM#) 및 iTRAQ-태그 기반 정량 비율을 포함한다. iTRAQ-ALI-4Ds 데이터 세트에서 확인된 단백질의 상대적 풍부도를 결정하기 위하여 iTRAQ-태그 기반 정량화를 사용하였다. ALI 배양에서 시간의 흐름에 따라 다르게 분비되는 단백질을 규명하기 위하여 일원분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였고, 본페로니 다중 비교법

(Bonferroni's Multiple Comparison Test)을 이용하여 교정하였다. K-평균 클러스터링(k-means clustering)을 수행하고, R's gplots 패키지의 히트맵.2 기능을 이용하여 히트맵을 작성하였다. ALI 배양에서 시간에 따른 발현 프로파일의 형상에 근거하여 그룹을 분류하기 위해 피어슨 상관 계수(Pearson correlation coefficient)를 사용하였다. R's ggplot2 패키지를 사용하여 화산 도표(volcano plots)를 작성하였다.

[0071] 시간의 경과에 따른 배양된 인간 초기 비강 상피 세포(human primary nasal epithelial cells)의 분화 정도

[0072] 상피 세포의 분화 동안에 분비 단백질의 변화를 확인하기 위하여, HNECs의 인-비트로 초기 세포 배양 시스템을 사용하였다. 용종으로부터 HNECs를 분리하고, 도 1에 나타난 바와 같이 정단 극성화(apical polarization)로 접막 섬모 상피 세포(mucociliary epithelium)로 분화되었다. 분화의 정도는 면역 형광 현미경 검사법을 이용하여 Ac- α -튜불린(Ac- α -tubulin)에 대한 양성의 섬모 세포의 수, MUC5AC에 대하여 양성인 분비 세포의 수, 모든 3가지 항체에 대하여 음성인 중간 세포의 수 및 p63에 대하여 양성인 기저 세포의 수를 측정하여 결정하였다(도 2). 공기-액체 접면 배양(air-liquid interface culture)의 2일째 초기 단계(ALI 2D)에서, 배양물의 대부분은 기저 세포의 분화 마커인 p63을 발현하는 기저 세포($38.10 \pm 2.10\%$)로 구성되는 것을 확인할 수 있었다(도 3). 그런데 상기 기저 세포의 수는 HNECs 분화 동안에 반 이하로 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(ALI 15D일 때 $18.15 \pm 2.87\%$)(도 3). 반면에 MUC5AC-양성의 분비 세포의 수는 ALI 6D, ALI 10D 및 ALI 15D에서 각각 2.74%, 6.14%, 및 15.57%로, 그 비율이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Ac- α -튜불린 양성 섬모 세포는 ALI 6D일 때까지 거의 관찰되지 않다가, ALI 15D에서 최대치($12.61 \pm 1.25\%$)를 보였다. 중간 세포의 수는 전체 세포의 수에서 섬모 세포, 분비 세포 및 기저 세포의 수를 제외하여 계산하였다. 배양 시간이 경과할수록 분비 세포 및 섬모 세포의 수가 증가하였지만, HNECs 분화의 ALI 10D까지 상기 중간 세포 수는 55 ~ 70%를 유지하면서 큰 변화를 보이지는 않았다. 이러한 결과로부터 본 초기 배양 시스템에서 기저 세포로부터 중간 세포로 분화가 발생하는 것을 알 수 있었다.

[0074] HNECs 유래 뮤신의 프로파일링

[0075] ALI 2D, ALI 6D, ALI 10D, 및 ALI 15D 각각의 단계에서 HNECs의 정단면(apical surface)으로부터 점막층을 회수하였다. 단백질 분석을 위해 정점 분비의 두 세트를 준비한 뒤 8plex iTRAQ 시약으로 라벨링하였다(도 4). iTRAQ를 사용하여서 HNECs 분화 동안 분비 단백질에서의 변화를 조사하였다. 단백질 동정 및 iTRAQ-기반 정량화를 위하여 Proteome Discoverer 1.4를 이용해 iTRAQ (8plex) 로우 MS 데이터 파일을 분석하였다. iTRAQ-ALI-4Ds 데이터 세트에서 8가지 시료의 4 그룹에 대하여 3,506개의 인간 단백질 전체를 정량적으로 분석하였다. ALI 2D와 ALI 6D일 때, ALI 2D와 ALI 10D일 때, 또는 ALI 2D와 ALI 15D일 때, 상대적 단백질 풍부와 관련하여 단백질 프로파일을 분석하였다(도 5 내지 7). 정규화 후 8개의 시료에서 대부분의 215 항종 단백질의 변화는 관찰되지 않았는 바, 데이터 세트가 신뢰할 수 있는 것임을 알 수 있었다. 3개의 비교 그룹에서 총 269개의 단백질의 발현 수준은 2배 이상 변화하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$, $n = 2$). 구체적으로, ALI 2D와 ALI 6D에서는 37개의 단백질의 발현 수준이(도 5), ALI 2D와 ALI 10D에서는 112개의 단백질의 발현 수준이(도 6), ALI 2D와 ALI 15D에서는 120개의 단백질의 발현 수준이 변화하였는 바(도 7), 이를 통하여 HNEC 분화 시 다양한 단백질의 수가 변화하는 것을 알 수 있었다. HNECs 분비 단백체를 위한 iTRAQ 분석 결과 증명하기 위하여, 뮤신에 대한 로우 MS 데이터를 분석하고, 점액 내 가장 풍부한 단백질을 확인하였다. 뮤신은 인간 기도 상피 세포에서 막하 점액선(submucosal glands)과 술잔 세포에 의해 합성되는 고분자량 글리코단백질에 해당한다. MUC5AC 및 MUC5B는 겔-형성 뮤신에 속하고, MUC1, MUC4, MUC16, 및 MUC20는 테터 뮤신(tethered mucins)에 속한다. 동정된 펩타이드 서열의 총 수(Σ PSMs)를 비교한 결과, 대부분이 테터 뮤신인 MUC16에 속하였고(785 펩타이드), 일부 MUC1(574 펩타이드) 및 MUC4(322 펩타이드)가 관찰되었다(도 8). 겔-형성 뮤신에 있어서는, 대부분의 뮤신이 MUC5B로 관찰되었고(273 펩타이드), 일부 MUC5AC가 관찰되었다(66 펩타이드)(도 9). 그런데 HNECs 분비 단백질에서 MUC18 (9 펩타이드), MUC20 (9 펩타이드), 및 MUC21 (12 펩타이드)는 매우 낮은 수준으로 관찰되었다(도 10). 추가의 증명을 위하여 HNEC 분화 동안 뮤신의 일시적 분비 프로파일을 분석하였다. MUC1 및 MUC4은 분화 초기 단계에서 약간씩 증가하면서 분비되었지만, 겔-형성 뮤신인 MUC5AC 및 MUC5B의 분비와 테터 뮤신 MUC16의 분비가 지속적으로 증가하였다(도 8 및 9). MUC18은 HNEC 분화 동안 유일하게 분비가 감소하는 뮤신에 해당되었다. 그 외에 적게 발현되는 뮤신인 MUC20 및 MUC21의 경우 분비량에 큰 변화를 보이지 않았다(도 10). 이로부터 HNEC의 경우 시간이 경과할수록 분비 세포 또는 섬모 세포로 분화가 이루어지는 것을 알 수 있었고, 그 결과, 겔-형성 뮤신의 발현 수준이 증가하였으며, MUC16을 제외하고는 테터 뮤신의 경우 발현 수준에 변화가 없거나 변화량이 미미한 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 인-비트로 HNECs 분비 단백질에서 경로 분석 및 정량적 단백질 특성

[0078] HNECs 분비 단백체에 관여되는 가능한 생물학적 경로를 규명하기 위하여, DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (version 6.8))를 사용하였다. KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로 분석 결과, HNECs 분비 단백체에서 84개의 중요한 경로가 활성화 되어 있었고($p < 0.05$), 그 중에서도 특히 상위 10개 경로는 엔도시토시스(148개 단백질), 탄소 대사(77개 단백질), 항생제 생합성(118개 단백질), 프로테아좀(39개 단백질), 리소좀(72개 단백질), 상피 세포의 박테리아 침윤(52개 단백질), 해당 과정/당 생성(45개 단백질), 소포체에서 단백질 과정(86개 단백질), 아미노산 생합성(45개 단백질) 및 대사 경로(409개 단백질)에 해당하였다(도 11A). 그 후 단백질을 유전자 온톨로지(gene ontology, GE) 분석을 통해 기능 주석(functional annotation)에 근거하여 세포 구간(cellular compartment; CC)으로 분류하였다. 상위 10개의 CC 카테고리 중에서, 64.16%가 세포 외 영역, 세포 외 기관, 세포 외 소포체, 세포 외 엑소좀에 관련되어 있었다. 일부 단백질은 세포의 다른 구간으로 예를 들어, 막-결합 소포체(membrane-bounded vesicle), 시토솔(cytosol) 또는 연결(junction)으로부터 유래된 것이지만, HNEC 분비 단백질의 대다수는 분비된 단백질로 구성된 것을 알 수 있었다(도 11B). HNEC 분비 단백질의 특성을 분석하기 위하여, Σ # PSMs에 근거하여 가장 풍부하게 분비되는 단백질과 상위 50개 단백질을 하기 표 1에 열거하였다.

표 1

[0080]

Uniprot ID	GeneSymbol	확인된 단백질	Σ # PSMs*
P01024	CO3	Complement C3**	3540
P29508	SPB3	Serpin B3**	1964
P15311	EZRI	Ezrin	1115
Q9NP55	BPIA1	BPI fold-containing family A member 1**	1112
P48594	SPB4	Serpin B4**	1103
Q8TDL5	BPIB1	BPI fold-containing family B member 1**	1097
P98160	PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	1064
P06702	S10A9	Protein S100-A9**	1037
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1**	881
Q8WXI7	MUC16	Mucin-16	785
P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1**	783
P06396	GELS	Gelsolin**	774
P80188	NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin**	748
P26038	MOES	Moesin**	724
P02787	TRFE	Serotransferrin**	667
P00751	CFAB	Complement factor B**	655
P00450	CERU	Ceruloplasmin**	608
P15941	MUC1	Mucin-1	574
P35241	RADI	Radixin	566
Q43707	ACTN4	Alpha-actinin-4	547
Q562R1	ACTBL	Beta-actin-like protein 2	540
P07355	ANXA2	Annexin A2	531
P08727	K1C19	Keratin, type I cytoskeletal 19	529
Q15149	PLEC	Plectin	526
P13647	K2C5	Keratin, type II cytoskeletal 5	508
Q9NYQ8	FAT2	Procadherin Fat 2	504
P24821	TENA	Tenascin	501
P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein**	482
P04083	ANXA1	Annexin A1**	478
P01011	AACT	Alpha-1-antichymotrypsin**	472
Q16787	LAMA3	Laminin subunit alpha-3	453
P11021	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	434
Q14745	NHRF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	420
P35579	MYH9	Myosin-9**	416
P06733	ENOA	Alpha-enolase**	416
Q09666	AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	412
Q95436	NPT2B	Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	404
Q04695	K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	402
P02538	K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	394

P07339	CATD	Cathepsin D	390
Q13813	SPTN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	387
P01833	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor**	385
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1	366
P04259	K2C6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B	360
P05109	S10A8	Protein S100-A8**	360
Q13751	LAMB3	Laminin subunit beta-3	357
Q08380	LG3BP	Galectin-3-binding protein	353
P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	352
Q13753	LAMC2	Laminin subunit gamma-2	347
P02768	ALBU	Serum albumin**	334
*는 확인된 펩타이드 서열의 총 수			
**는 인-비트로 및 인-비보 분비 단백질체 모두에서 발현되는 것			

[0082] 인-비보 비강 세척액 분비 단백질체의 정량적 단백질체 프로파일링 및 경로 분석

[0083] 비강 점막 유래 분비 단백질체에 대하여 생리적 그리고 포괄적 분석을 위하여 인-비보 비강 세척액 유래 분비 단백체를 인-비트로 HNECs 분비 단백질체와 비교하였다. iTRAQ-기반 정량화를 위하여, 대조군(n = 5)과 ESS를 수행한 CRS 환자군(n = 4)으로부터 비강 세척액 분비 단백체를 분석하였다. ESS 수행 후 2주가 경과하였을 때 CRS 환자로부터 비강 세척액을 회수하였으므로, 이러한 환자들의 점막은 모두 재생의 특정 시기에 있는 것으로 가정하였다. 또한, CRS 비강 세척액 분비 단백질체가 재생의 진행으로 예를 들면, 염증 등을 반영하는 것으로 가정하였고, HNECs 분비 단백질체와의 비교를 통해 점막에서 분화의 정도를 평가하였다. 9 iTRAQ 라벨링 태그(iTRAQ-H9 dataset)를 이용한 Proteome Discoverer 1.4를 통해 NCBI 웹사이트로부터 인간 단백질 서열 데이터베이스로부터 검색하여 9개의 시료의 2가지 그룹(5명의 대조군 시료 vs. 4명의 환자 시료)에 대하여 총 660개의 인간 단백질을 모두 정량적으로 동정하였다(도 12). 그 결과, 비강 세척액 분비 단백질체와 HNECs 분비 단백질체에서 총 492개의 단백질이 중복되어 발현되었다(인-비보 분비 단백질체에서 660개의 단백질 중 74.55%; 인-비트로 분비 단백질체의 3,506개의 단백질 중 14.03%)(도 13). 이들에서 공통되는 염증성 바이오마커로 예를 들어 호산구 양이온 단백질(p = 0.030), 혈청 알부민(p = 0.004) 및 골수세포형과산화효소(p = 0.052)의 경우 정상 대조군의 비강 세척액 분비 단백질체와 비교하여 환자의 비강 세척액 분비 단백질체에서 2배 이상 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 게다가 KEGG 경로 분석 결과, 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질체에서 활성화된 39개의 경로 중 28개(71.80%)가 HNEC 분비 단백질체와 겹치는 것을 확인할 수 있었다(도 14). 비강 세척액 유래 분비 단백질체에서만 활성화된 경로는 보체 응고 연쇄반응(35개 단백질), 전신 홍반 루푸스(20개 단백질), 황색포도상구균 감염(14개 단백질), 침 분비(14개 단백질), 항원 처리 및 제시(13개 단백질), 난모세포 감수분열(12개 단백질), 프리온병(10개 단백질), 세포 외 기질-수용체 상호작용(10개 단백질), 화학적 암화 과정(9개 단백질), 티로신 대사(7개 단백질), 및 알기닌 및 프롤린 대사(7개 단백질)로, 인-비트로 세포 배양 시료에서보다 인-비보 생물학적 시료에서 더 생리적 특성을 갖는 것을 볼 수 있었다(도 14). HNEC 분비 단백질체의 CC와 비교해 보면, GO 기능 분석 결과 비강 세척액 유래 분비 단백질체가 HNEC 분비 단백질체에 비하여 분비된 단백질로 구성되는 것을 확인할 수 있었다(상위 10개의 CC 카테고리에서 GO item의 74.59% 해당). 혈액 유래 단백질을 제거한 뒤, 비강 세척액 유래 분비 단백질체에서 풍부하게 발현되는 단백질 50 종을 하기 표 2에 열거하였다. 열거된 50종의 단백질 중 22개는 상기 표 1에 열거된 HNEC 분비 단백질체에서 발현되는 단백질과 중복되는 것을 볼 수 있었다. 비록 본 실험의 환자 중에는 알러지성 비염을 가진 환자 군은 없었지만, 비강 세척액 유래 분비 단백질체에서 알러지성 비염 환자에게서 풍부하게 발현되는 보체 C3, 알파-1-항트립신 및 APOA1이 높게 발현되었는 바, 이들 단백질은 알러지성 그리고 비알러지성 염증 조건에서 모두 높게 발현되는 것임을 알 수 있었다.

표 2

[0084]

Uniprot ID	GeneSymbol	확인된 단백질	Σ# PSMs*
P02768	ALBU	Serum albumin**	6949
P02788	TRFL	Lactotransferrin	1420
P01024	CO3	Complement C3**	1314
P31025	LCN1	Lipocalin-1	966
P61626	LYSC	Lysozyme C	956
P02787	TRFE	Serotransferrin**	858
P06702	S10A9	Protein S100-A9**	846

P25311	ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	606
P60709	ACTB	Actin, cytoplasmic 1**	589
P01009	A1AT	Alpha-1-antitrypsin	585
P05109	S10A8	Protein S100-A8**	574
Q9NP55	BPIA1	BPI fold-containing family A member 1**	545
P12273	PIP	Prolactin-inducible protein	538
P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I	462
P68032	ACTC	Actin, alpha cardiac muscle 1**	436
P0COL5	C04B	Complement C4-B	431
Q8TDL5	BPIB1	BPI fold-containing family B member 1**	419
P0COL4	C04A	Complement C4-A	403
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	387
P05164	PERM	Myeloperoxidase	364
P01833	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor**	363
P02751	FINC	Fibronectin	315
P00450	CERU	Ceruloplasmin**	308
P06733	ENOA	Alpha-enolase**	285
Q9GZZ8	LACRT	Extracellular glycoprotein lacritin	259
Q16378	PROL4	Proline-rich protein 4	238
P04406	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	235
P04264	K2C1	Keratin, type II cytoskeletal 1	230
P01011	AACT	Alpha-1-antichymotrypsin**	223
Q96DA0	ZG1B	Zymogen granule protein 16 homolog B	209
P29508	SPB3	Serpin B3**	207
P0CG48	UBC	Polyubiquitin-C	204
P13796	PLSL	Plastin-2	199
Q9HC84	MUC5B	Mucin-5B	196
P00751	CFAB	Complement factor B**	193
Q9UGM3	DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	184
P06396	GELS	Gelsolin**	180
P35527	K1C9	Keratin, type I cytoskeletal 9	165
P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	156
P02763	A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	149
P04083	ANXA1	Annexin A1**	142
P11142	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein**	140
P29401	TKT	Transketolase	136
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	134
P80188	NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin**	132
P10909	CLUS	Clusterin	132
P48594	SPB4	Serpin B4**	131
P35579	MYH9	Myosin-9**	125
P01040	CYTA	Cystatin-A	124
P26038	MOES	Moesin**	122
*는 확인된 펩타이드 서열의 총 수			
**는 인-비트로 및 인-비보 분비 단백질체 모두에서 발현되는 것			

[0086] 인-비보 인간 비강 세척액 유래 분비 단백질체와 인-비트로 분비 단백질체의 비교 분석

[0087] HNECs는 비강 점막을 포함하는 다양한 세포 타입 중에서 유일하게 배양 가능한 세포에 해당하고, 기저 세포가 점막 섬모 상피 세포로 분화되는 초기 HNECs의 재생은 수술(기계적 스트레스) 후 비강 점막의 재생 과정을 나타내므로, 인-비트로 HNECs는 인-비보 비강 세척액 분비 단백질체와 비교함으로써 비강 점막 염증의 특정 바이오마커를 동정할 수 있다. 본 실험의 주된 목적은 세포 분화 과정에서 변화하는 분비 단백질을 비교하는 것이므로, 시간적 프로파일에 근거하여 HNECs 분비 단백질체의 단백질을 재배열 및 분석하였다. 총 1,070 단백질을 ALI 일수에 근거하여 4가지 군으로 분류하였다. 클러스터 A는 ALI 2D에 높게 분비되는 84 종의 단백질을 포함하고, 클러스터 B는 ALI 6D에 분비되는 246 종의 단백질을 포함하며, 클러스터 C는 ALI 10D에 분비되는 664 종의 단백질을 포함하고, 클러스터 D는 ALI 15D에 분비되는 76 종의 단백질을 포함한다(도 15). 각 클러스터에서 KEGG 경로 분

석 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 또한, iTRAQ-H9 로우 데이터 세트를 재분석한 결과, 정상 대조군(n = 3)과 비교하여 환자군(p < 0.05, n = 4)에서 86 종의 단백질이 2배 이상 현저히 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었으며(도 16), 단백질의 종류는 하기 표 4에 나타내었다. 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 활성화되는 생물학적 경로를 HNECs 분비 단백질의 각 클러스터에서 활성화되는 경로와 비교하면, 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 활성화되는 생물학적 경로 중 3가지 경로(50.00%)가 클러스터 A(ALI 2D)와 중복되고, 클러스터 B(ALI 6D)와는 2가지 경로(14.29%), 그리고 클러스터 C(ALI 10D)와는 1가지 경로(3.33%)가 중복되었으며, 클러스터 D(ALI 15D)와는 중복되지 않았다. 이러한 결과로부터 수술 후 2주가 경과하였을 때 환자들의 비강 점막의 재생 상태는 HNEC 분화의 초기 단계와 유사한 것을 알 수 있었다 (ALI 2D 및 6D)(표 4 및 5). 비강 점액 염증의 바이오마커를 확인하기 위하여, 평행 접근법을 사용하였다. 가장 먼저, 클러스터-특이적 HNEC 분비 단백질로부터 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질과 비교하기 위하여 후보 단백질 군을 선별하였다. 그 결과, 아포리포단백질 E(apolipoprotein E; APOE), 클러스테린(clusterin; CLUS) 및 프로-로우 밀도 리포단백질 수용체-관련 단백질 1(prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1; LRP1)이 ALI 6D에서 높은 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 17). 또한, 몇몇의 아포리포단백질로, APOA1, POA2, APOB, APOC1, APOE, 및 APOM 역시 정상 대조군의 비강 세척액 유래 분비 단백질과 비교할 때 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 18). 웨스턴 블롯 결과, NHNE 분비물과 인간 비강 세척액에서 유일하게 중복되어 발현되는 단백질은 APOE에 해당함을 확인할 수 있었다(도 19 및 21). 이에 따라 GeneVisible 툴(<https://genevisible.com>)을 이용하여 공적으로 축적된 마이크로어레이 데이터로부터 인-비보 분비 단백질에서 그 발현이 증가된 단백질을 분석하여 19개의 후보 단백질로, POSTN, GTP-결합 단백질 RAD(GTP-binding protein RAD), 아미노펩티다제 B(aminopeptidase B), C4b-결합 단백질 알파 사슬(C4b-binding protein alpha chain), 알파-2-마크로글로불린(alpha-2-macroglobulin), 클로라이드 세포 내 채널 단백질 6(chloride intracellular channel protein 6), 질소 산화물 합성 효소(nitric oxide synthase), 유도된 (NOS2), 포스포만노뮤타제 2(phosphomannomutase 2), 티오레독신 도메인-함유 단백질 17(thioredoxin domain-containing protein 17), 세린/트레오닌-단백질 포스포타제 2A 65 kDa 조절 서브유닛 A 알파 이소폼(serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform), 혈청 아밀로이드 A-4 단백질(serum amyloid A-4 protein), 소르신(sorcin), 임신 존 단백질(pregnancy zone protein), 튜블린 베타 사슬(tubulin beta chain), 항트롬빈-III(antithrombin-III), 프로테아솜 서브유닛 베타 타입-2(proteasome subunit beta type-2), 인터-알파-트립신 억제제 중쇄 H1(inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1), 췌장 분비 과립 막 주 글리코단백질(pancreatic ecretory granule membrane major glycoprotein; GP2), 및 레티노산 수용체 반응자 단백질 1(retinoic acid receptor responder protein 1)를 선별하였다. 이러한 단백질의 생리학적 기능을 분석하기 위하여 UniProt 데이터베이스를 조사하였고, 그 결과 POSTN 및 NOS2 만이 염증과 관련이 있는 것으로 확인할 수 있었다. 점액 분비, 기도 섬유화 및 재배치에 있어서, POSTN의 풍부도(75개 펩타이드)가 NOS2(8개 펩타이드) 보다 높으므로, 추가의 실험을 위해 POSTN을 선별하였다. 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 POSTN이 높게 발현된다는 iTRAQ 분석 결과와 일치하게, 웨스턴 블롯 분석 결과 정상 대조군의 비강 세척액 유래 분비 단백질 보다 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 POSTN의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 20). 하지만, HNEC 분비 단백질에서는 POSTN이 발견되지 않았다. 이러한 결과는 환자의 비강 세척액 유래 분비 단백질에서 POSTN은, 수술 후 점막 상처 재생 동안에 다양한 염증 조절자에 의해 유도됨에 기인하는 것인데, HNEC 분비 단백질의 경우 염증성 자극이 존재하지 않으므로 상기 POSTN이 발현되지 않는 것이다.

표 3

클러스터	경로	p 값	단백질 수
클러스터 A	ECM-receptor interaction	1.64E-06	8
	Focal adhesion	0.01245	6
	Cell adhesion molecules (CAMs)	0.015391	5
	Small cell lung cancer	0.019743	4
	Amoebiasis	0.034946	4
	Toxoplasmosis	0.045715	4

[0089]

클러스터 B	Metabolic pathways	0.012517	37
	PI3K-Akt signaling pathway	0.048722	13
	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.007497	10
	Focal adhesion	0.024672	10
	ECM-receptor interaction	3.70E-04	9
	Lysosome	0.011613	8
	Axon guidance	0.014867	8
	Hematopoietic cell lineage	0.007578	7
	N-Glycan biosynthesis	0.003054	6
	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	0.001752	5
	Malaria	0.017308	5
	Viral myocarditis	0.028502	5
	Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	0.003161	4
	Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.024637	4
클러스터 C	Metabolic pathways	0.006676	81
	Biosynthesis of antibiotics	6.94E-07	30
	Protein processing in endoplasmic reticulum	6.92E-08	28
	Spliceosome	1.54E-09	27
	Carbon metabolism	3.16E-08	23
	Endocytosis	0.035186	21
	Regulation of actin cytoskeleton	0.019436	19
	RNA transport	0.026306	16
	Lysosome	0.002914	15
	Biosynthesis of amino acids	6.86E-05	14
	Bacterial invasion of epithelial cells	1.20E-04	14
	Shigellosis	6.74E-05	13
	mRNA surveillance pathway	0.001902	13
	Glycolysis / Gluconeogenesis	4.57E-04	12
	Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.003072	12
	Salmonella infection	0.008445	11
	Pathogenic Escherichia coli infection	8.73E-04	10
	Renal cell carcinoma	0.004937	10
	Pyruvate metabolism	7.11E-04	9
	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0.002455	9
	Adherens junction	0.025495	9
	Fatty acid degradation	0.005912	8
	Valine, leucine and isoleucine degradation	0.00853	8
	Glutathione metabolism	0.01323	8
	Pentose phosphate pathway	0.002768	7
	Citrate cycle (TCA cycle)	0.003317	7
	Tryptophan metabolism	0.048761	6
	2-Oxocarboxylic acid metabolism	0.008925	5
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.044383	5
	Butanoate metabolism	0.044383	5
클러스터 D	cGMP-PKG signaling pathway	0.006835	5
	Sphingolipid signaling pathway	0.017561	4
	Glutathione metabolism	0.023005	3
	Long-term depression	0.031125	3
	Drug metabolism - cytochrome P450	0.039154	3
	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.045638	3

표 4

[0090]

경로	p 값	단백질 수
Complement and coagulation cascades	2.65E-21	17
Systemic lupus erythematosus	1.88E-08	11
Staphylococcus aureus infection	2.41E-09	9
Pertussis	6.89E-07	8
Focal adhesion1, 2	0.013571	6
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.00567	5
Amoebiasis1	0.006064	5
Platelet activation	0.012285	5
Prion diseases	0.001483	4
ECM-receptor interaction1, 2	0.022188	4
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism3	0.04353	5
1은 인-비트로 클러스터 A와 인-비보 분비 단백질 경로 분석(11 경로 중 3개) 2는 인-비트로 클러스터 B와 인-비보 분비 단백질 경로 분석(11 경로 중 2개) 3은 인-비트로 클러스터 C와 인-비보 분비 단백질 경로 분석(11 경로 중 1개)		

표 5

[0091]

Uniprot ID	GeneSymbol	Identified Proteins*	배수 변화	p 값	Σ# PSMs
Q15582	BGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 ²	4.61	0.00964	6
P62805	H4	Histone H4	4.53	0.01428	120
Q16695	H31T	Histone H3.1t ³	4.32	0.03158	32
Q15063	POSTN	Periostin	3.81	0.00572	75
P55042	RAD	GTP-binding protein RAD	3.71	0.00397	3
P69891	HBG1	P02766 TTHY Transthyretin 2.95 0.00498 44P02461 CO3A1 Collagen alpha-1(III) chain	3.30	0.02914	68
P02675	FIBB	Fibrinogen beta chain	3.30	0.00583	803
P02679	FIBG	Fibrinogen gamma chain	3.21	0.00553	421
P04114	APOB	Apolipoprotein B-100	3.18	0.00040	387
Q9H4A4	AMPB	Aminopeptidase B	3.15	0.00806	15
P45974	UBP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	2.99	0.00124	4
P02766	TTHY	Transthyretin	2.95	0.00498	44
P02461	CO3A1	Collagen alpha-1(III) chain	2.93	0.00922	12
Q6UX06	OLFM4	Olfactomedin-4	2.88	0.04224	23
Q96FW1	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1	2.84	0.00666	10
P01859	IGHG2	Ig gamma-2 chain C region	2.84	0.00238	900
P04003	C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	2.80	0.00520	34
P0C0S5	H2AZ	Histone H2A.Z	2.76	0.01928	37
P12724	ECP	Eosinophil cationic protein	2.73	0.03042	6
P02768	ALBU	Serum albumin	2.68	0.00388	6946
P02654	APOC1	Apolipoprotein C-I	2.64	0.00171	23
P16930	FAAA	Fumarylacetoacetase ³	2.60	0.00199	4
P01023	A2MG	Alpha-2-macroglobulin	2.60	0.00153	785
P12111	CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	2.58	0.00731	7
P02652	APOA2	Apolipoprotein A-II	2.57	0.01350	54
P23142	FBLN1	Fibulin-1 ²	2.57	0.00016	21

P02763	A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	2.56	0.00729	149
P01857	IGHG1	Ig gamma-1 chain C region	2.55	0.01292	1463
P02649	APOE	Apolipoprotein E ²	2.50	0.00382	60
Q96NY7	CLIC6	Chloride intracellular channel protein 6 ⁴	2.50	0.00015	7
P43652	AFAM	Afamin	2.49	0.00211	65
P04196	HRG	Histidine-rich glycoprotein	2.49	0.00126	68
Q13630	FCL	GDP-L-fucose synthase	2.48	0.00177	4
P04217	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	2.48	0.00335	134
P27169	PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	2.47	0.00521	32
P02790	HEMO	Hemopexin	2.46	0.00227	212
P02671	FIBA	Fibrinogen alpha chain	2.44	0.00801	394
P02765	FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	2.41	0.00243	58
P35228	NOS2	Nitric oxide synthase, inducible	2.39	0.00012	8
P02751	FINC	Fibronectin ²	2.37	0.00672	315
P08123	CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	2.34	0.00873	16
P36405	ARL3	ADP-ribosylation factor-like protein 3	2.34	0.02232	2
P05546	HEP2	Heparin cofactor 2	2.33	0.00416	48
Q96PD5	PGRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2.33	0.00218	10
P15153	RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 ²	2.32	0.00112	12
O15305	PMM2	Phosphomannomutase 2	2.32	0.00075	3
O95445	APOM	Apolipoprotein M	2.32	0.00142	7
Q9BRA2	TXD17	Thioredoxin domain-containing protein 17 ³	2.29	0.00167	7
P01024	C03	Complement C3	2.27	0.00830	1314
P01621	KV303	Ig kappa chain V-III region NG9	2.24	0.00959	16
P05156	CFAI	Complement factor I	2.23	0.00716	26
P30153	2AAA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	2.22	0.00283	7
P35542	SAA4	Serum amyloid A-4 protein	2.22	0.00819	19
P30626	SORCN	Sorcin	2.22	0.00261	6
P01042	KNG1	Kininogen-1	2.21	0.00331	75
P02747	C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	2.19	0.02688	14
P02746	C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B	2.15	0.00497	16
P02774	VTDB	Vitamin D-binding protein	2.15	0.00516	92
P01880	IGHD	Ig delta chain C region	2.14	0.00605	8
O15144	ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 ³	2.14	0.00321	9
P51884	LUM	Lumican	2.14	0.00801	51
P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I	2.13	0.00891	462
P01031	C05	Complement C5	2.11	0.01227	91
P02787	TRFE	Serotransferrin ¹	2.10	0.00587	858
Q16851	UGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase ³	2.10	0.00110	17
P12814	ACTN1	Alpha-actinin-1 ³	2.09	0.01318	102
P20742	PZP	Pregnancy zone protein	2.09	0.00802	94
Q9UBQ0	VPS29	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	2.08	0.00803	4
Q9UGM5	FETUB	Fetuin-B	2.08	0.01963	8

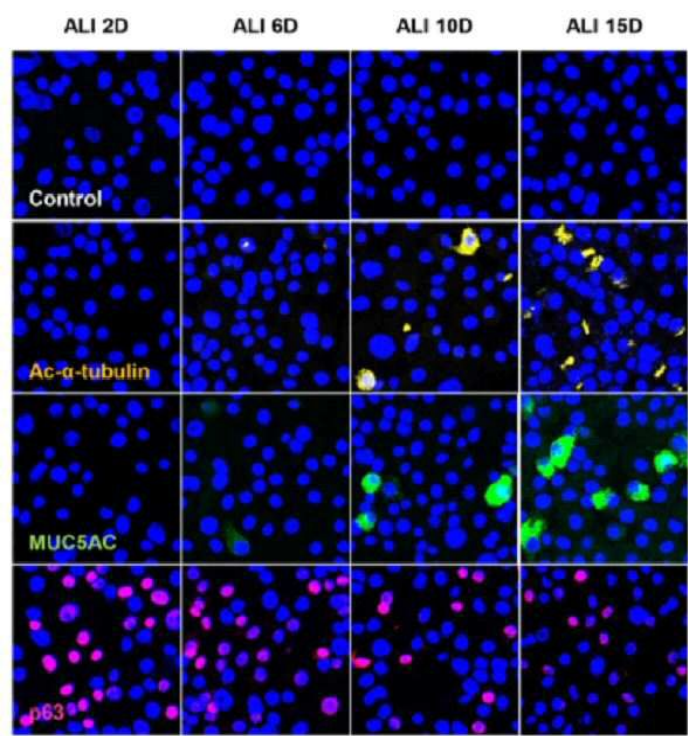
P07437	TBB5	Tubulin beta chain ¹	2.07	0.02863	50
P00736	C1R	Complement C1r subcomponent ²	2.06	0.03289	14
P08603	CFAH	Complement factor H	2.05	0.01716	118
P01008	ANT3	Antithrombin-III	2.04	0.00601	101
P01860	IGHG3	Ig gamma-3 chain C region	2.03	0.00225	771
P49721	PSB2	Proteasome subunit beta type-2	2.01	0.00371	6
P19827	ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	2.01	0.00229	90
P0COL4	CO4A	Complement C4-A	2.01	0.01324	403
P01019	ANGT	Angiotensinogen	2.00	0.00680	39
P10643	CO7	Complement component C7	2.00	0.01201	15
P01833	PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	0.49	0.00001	363
P55259	GP2	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2	0.47	0.00411	2
Q8TD33	SG1C1	Secretoglobin family 1C member 1	0.42	0.04330	26
P61626	LYSC	Lysozyme C	0.35	0.00230	956
P49788	TIG1	Retinoic acid receptor responder protein 1 ²	0.31	0.00019	17
P01037	CYTN	Cystatin-SN	0.23	0.03250	14
Q99538	LGMN	Legumain	0.20	0.00001	7
1은 인-비트로 클러스터 A와 인-비보 분비 단백질에서 존재(2개 단백질, 2.33%) 2는 인-비트로 클러스터 B와 인-비보 분비 단백질에서 존재(7개 단백질, 8.14%) 3은 인-비트로 클러스터 C와 인-비보 분비 단백질에서 존재(6개 단백질, 6.98%) 4는 인-비트로 클러스터 D와 인-비보 분비 단백질에서 존재(1개 단백질, 1.16%)					

도면

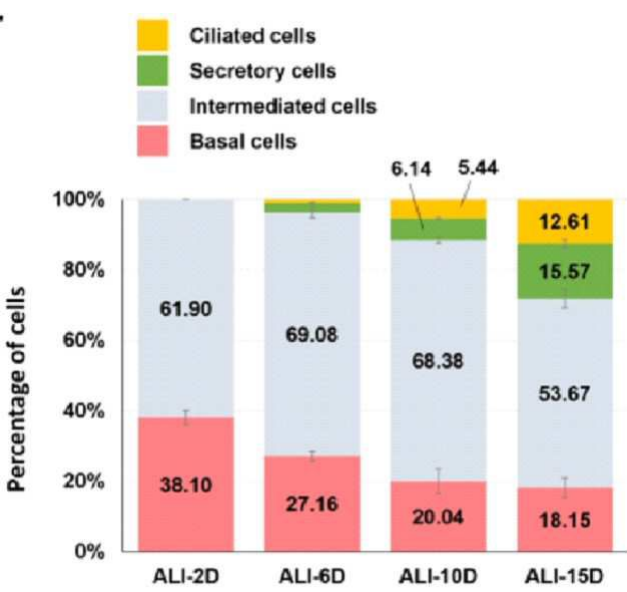
도면1



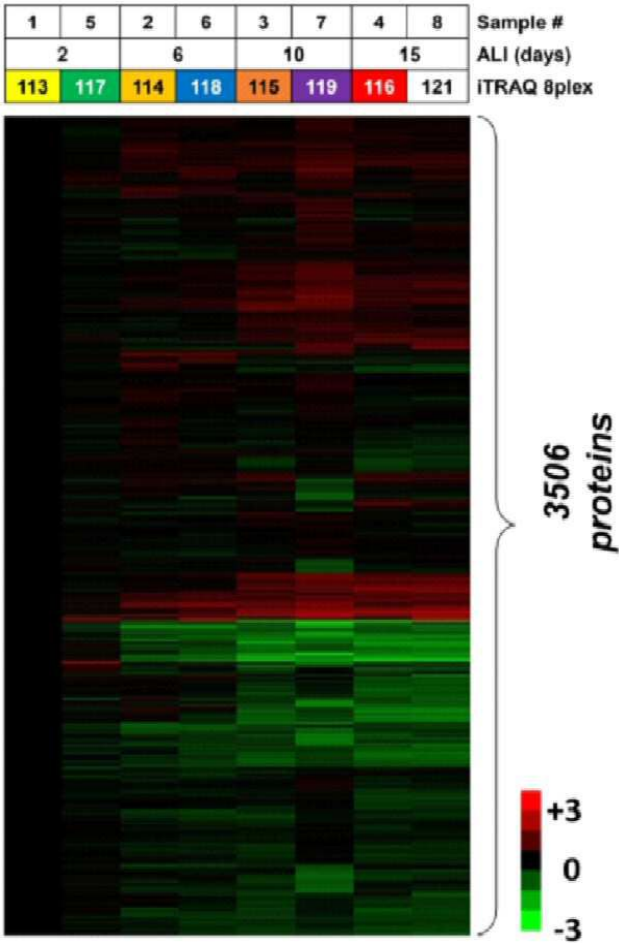
도면2



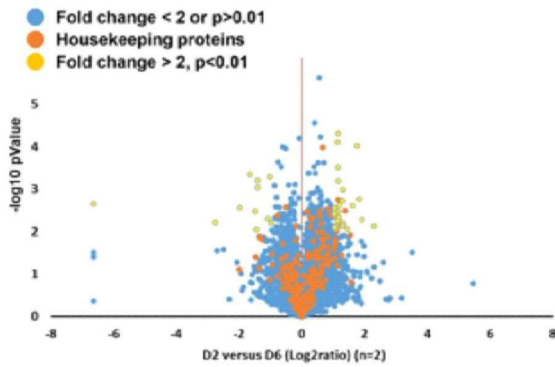
도면3



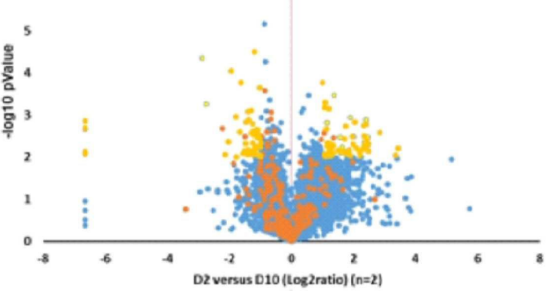
도면4



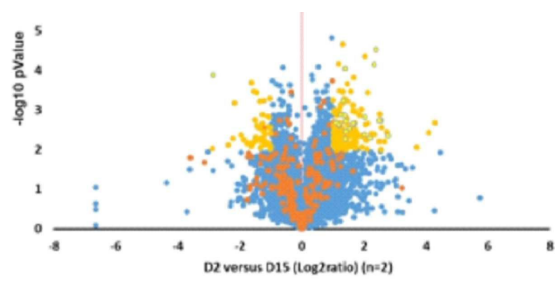
도면5



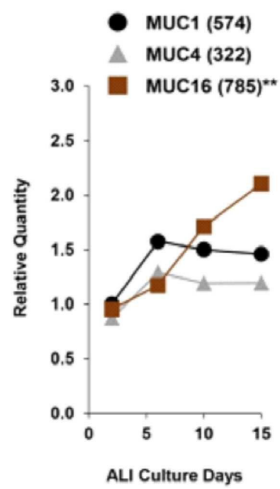
도면6



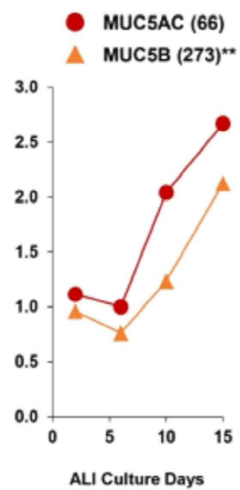
도면7



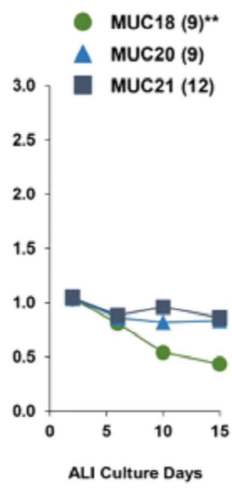
도면8



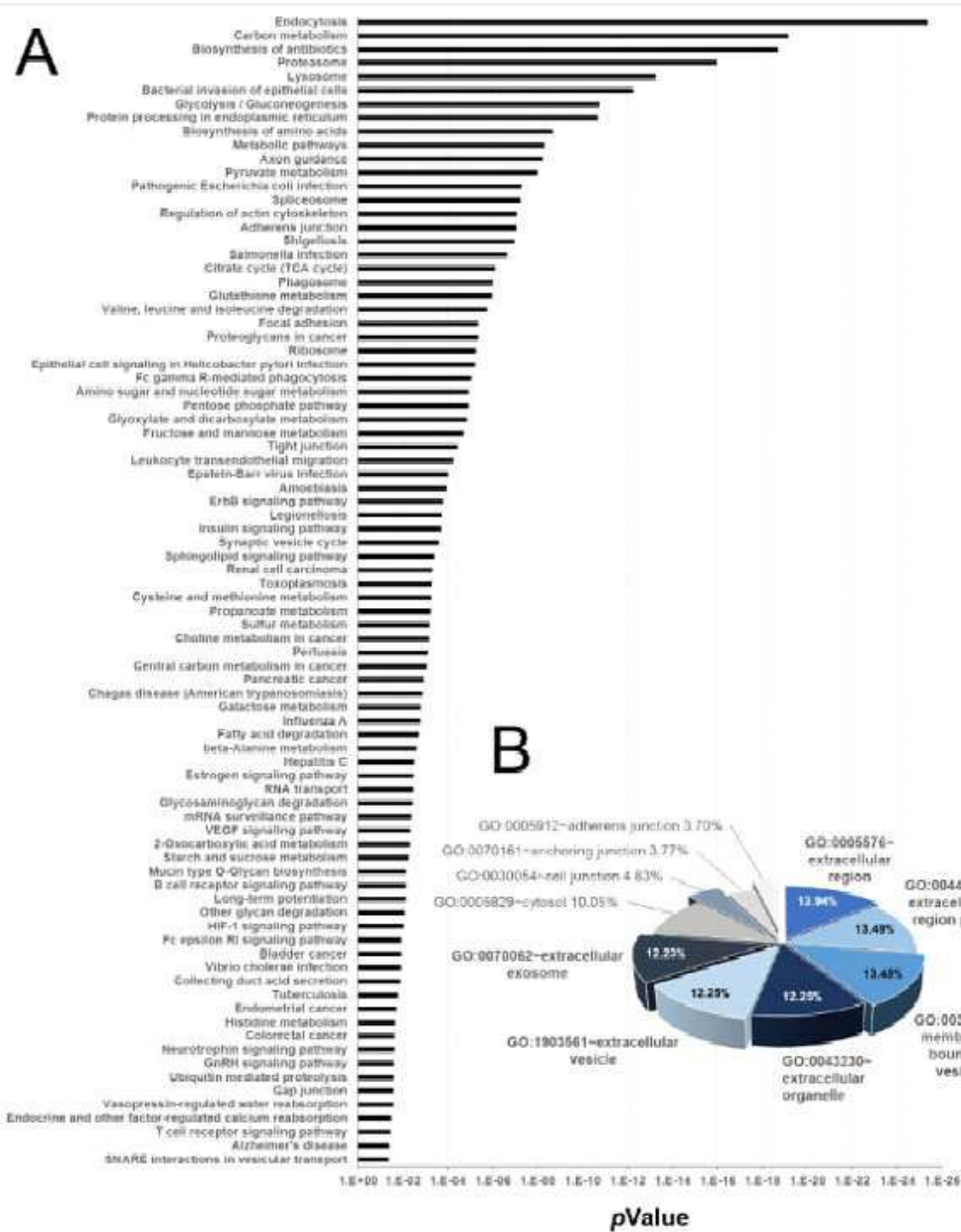
도면9



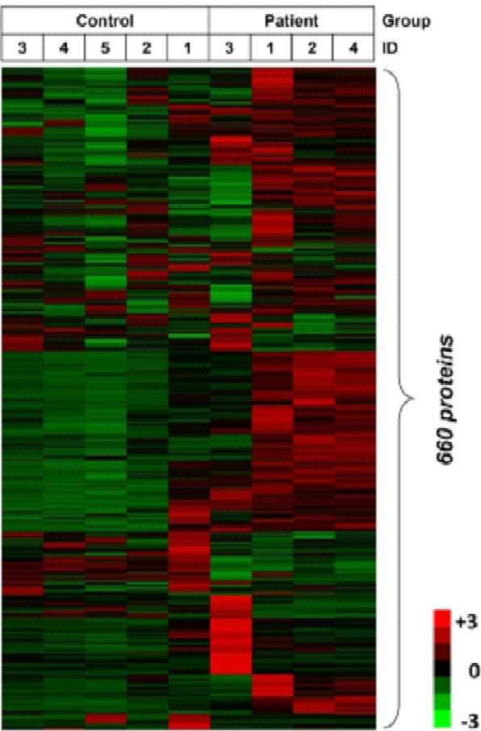
도면10



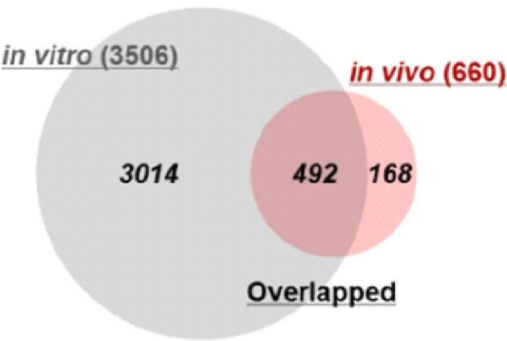
도면11



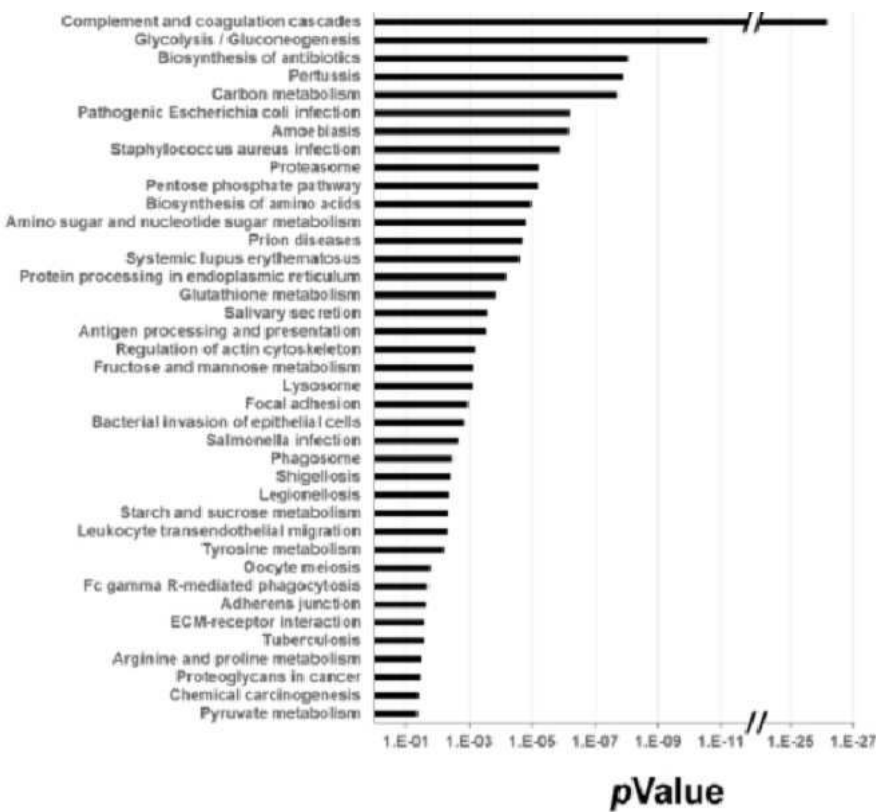
도면12



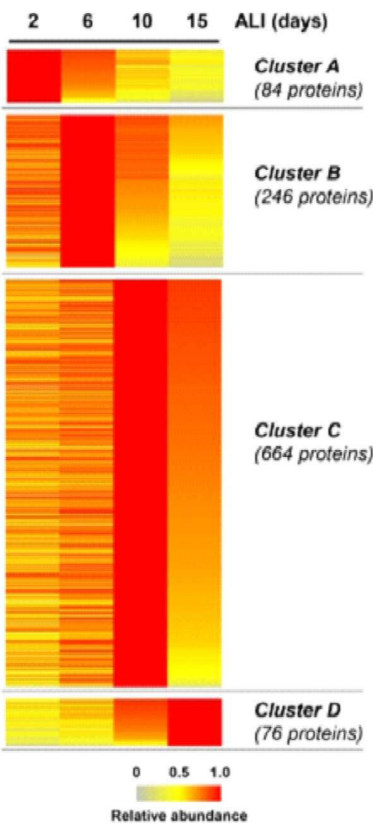
도면13



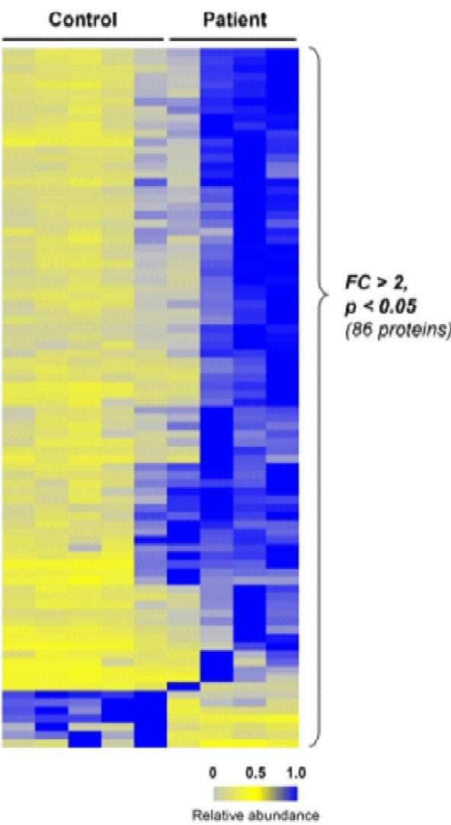
도면14



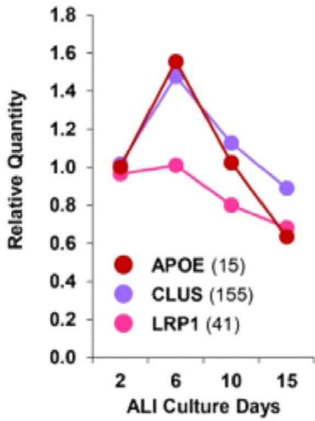
도면15



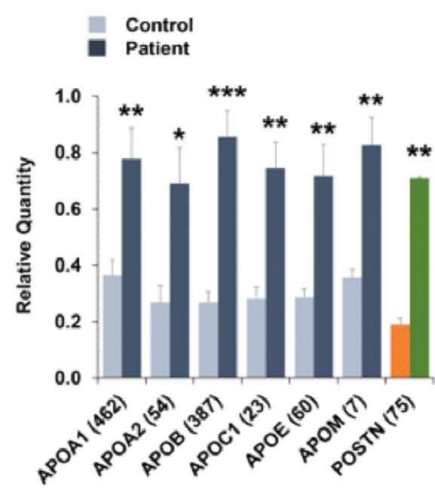
도면16



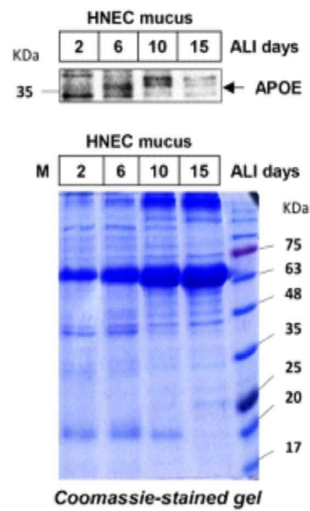
도면17



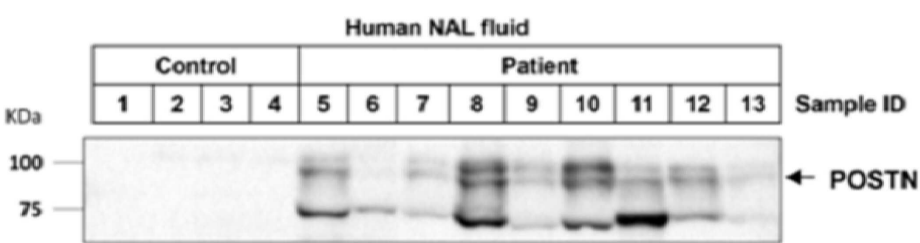
도면18



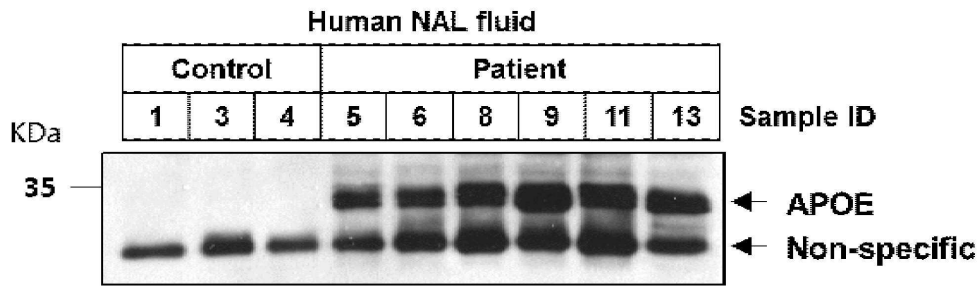
도면19



도면20



도면21



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Biomarker for diagnosing inflammatory respiratory disease
- <130> PDPB192020
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 317
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys

1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu

20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu

35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln

50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp

115	120	125	
Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu			
130	135	140	
Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg			
145	150	155	160
Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg			
165	170	175	
Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu			
180	185	190	
Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val			
195	200	205	
Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg			
210	215	220	
Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly			
225	230	235	240
Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu			
245	250	255	
Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala			
260	265	270	
Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu			
275	280	285	
Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala			
290	295	300	
Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His			
305	310	315	