

특 허 법 원

제 4 부

판 결

사 건 2018허3260 등록무효(특)

원 고 외국회사원고

텐마크

대표자 A

B

소송대리인 변리사 송경이, 박장원, 김성택

피 고 주식회사 피고

대표이사 C

소송대리인 변리사 진현정

변 론 종 결 2019. 1. 23.

판 결 선 고 2019. 3. 15.

주 문

1. 원고의 청구를 기각한다.
2. 소송비용은 원고가 부담한다.

청 구 취 지

특허심판원이 2018. 1. 31. 2016당422호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

이 유

1. 기초적 사실관계

가. 특허발명

1) 발명의 명칭: 신장 질환용 진단 표지로서의 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL)의 측정

2) 국제출원일/ 우선권 주장일/ 번역문제출일/ 등록일/ 등록번호: 2005. 12. 20./ 2004. 12. 20. 및 2005. 9. 21./ 2007. 7. 20./ 2010. 7. 13./ 제971305호

3) 특허권자: 원고

4) 청구범위 (2016. 6. 9.자 정정청구에 의한 것)

【청구항 1】 i) 인간 소변, 혈청 또는 혈장 시료 중 인간 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL)의 농도를 측정하는 단계와, ii) 상기 단계 i)에서 측정한 NGAL 농도와 미리 결정된 컷오프(cutoff) 값의 차이를 표시하는 단계를 포함하고,

상기 컷오프 값은 신장 질환과 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 선택된 값으로서 250ng/ml ~ 525ng/ml 범위인 인간의 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법.

(이하 '제1항 발명'이라 하고, 나머지 청구항도 같은 방식으로 부른다. 전체 청구항은 별지 1. 기재와 같다).

5) 발명의 설명 및 도면 중 주요 내용

별지 2. 기재와 같다.

나. 선행발명들¹⁾

1) 선행발명 1 (을 제1호증의 1)

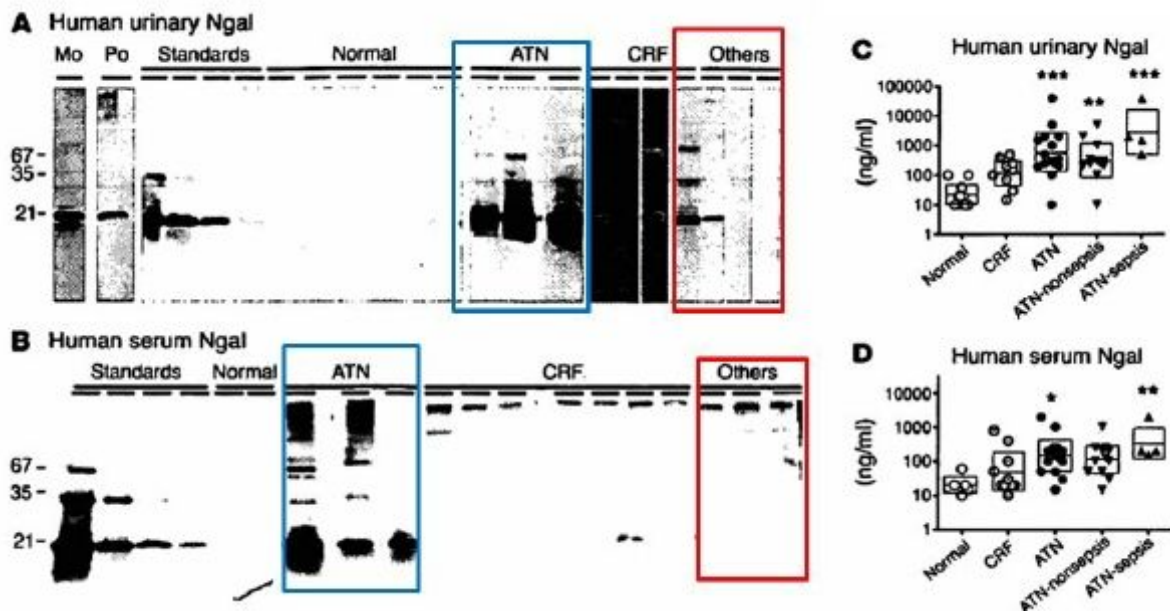
2005. 3. 공개된 The Journal of Clinical Investigation에 게재된 "리포칼린-시데로포어-Fe 복합체의 세포 내 이입전달은 허혈-재관류 손상을 입은 신장을 회복시킨다 (Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury)"라는 제목의 논문(Mori K, et al. J Clin Invest. 2005, Vol 115. NO,3, pp.610~621)에서 파악되는 것으로서, 그 주요 내용 및 도면은 다음과 같다.

시데로칼린(siderocalin)으로도 알려져 있는 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린(Ngal)은 Fe-시데로포어와 결합하여 복합체를 형성한다(NGAL:siderophore:Fe). 이 복합체는 신장 전구 세포를 상피 세포로 전환시킨다. ... 실제로 NGAL은 신세포독성 및 허혈성 손상 이후 인간의 신장 피질 세뇨관 및 혈액 그리고 소변에서 많이 축적된다. 우리는 인간 및 마우스 신장 질환에서 활성화되는 Fe 교류의 새로운 경로라고 믿는 것을 밝혀내고 그것은 신장질환 치료의 독특한 치료 방법을 제공한다(610면, 초록).

인간의 급성 세뇨관 괴사(ATN)에서 NGAL의 발현. 사람의 급성신부전은 혈청과 소변 Ngal 단백질 농도의 로그적 증가로 특징지어진다. 정상 혈청 Ngal(21ng/ml 기하 평균; n=5)과 정상 소변(22ng/ml; n=10)의 Ngal 농도와 가장 전형적인 급성 신장 기능 저하 질병인 ATN 환자에서 Ngal 농도를 비교하면 혈청에서는 7.3배(146ng/ml; P<0.05, 도 1) 증가하였으며, 소변 Ngal이 25배(557ng/ml, P<0.001) 증가했다. 세균 감염과 관련된 ATN 환자는 혈청 Ngal(331ng/ml)과 소변 Ngal(2,786ng/ml)이 가장 높은 경향을 보였으나 감염되지 않은

1) 특허발명은 미국출원 60/637,503(출원일: 2004. 12. 20.) 및 60/719,307(출원일: 2005. 9. 21.)을 기초로 하는 우선권 주장을 수반하나, 우선권 주장의 기초가 되는 위 미국출원 60/637,503 및 60/719,307에는 특허발명의 컷오프 값의 수치범위(250ng/ml ~ 525ng/ml)를 포함하고 있지 않으므로, 특허발명의 진보성 판단시점은 위 각 출원일의 우선권 주장일로 소급되지 않고 특허발명의 국제출원일인 2005. 12. 20.로 된다. 따라서 선행발명 1, 2는 특허발명의 진보성 판단을 위한 선행기술로 사용될 수 있다. 이러한 점에 관하여 당사자들 사이에 다툼이 없다[제1차 변론조서 및 갑 제1호증(심결문) 참조].

ATN환자에서와 통계적으로 다르지는 않았다. Ngal 발현이 급성신부전의 정도와 관련이 있는지를 결정하기 위해 우리는 Ngal 레벨의 로그 변형 후 간단한 회귀분석을 사용했다. 우리는 혈청 Ngal($r=0.64$, $n=32$)과 소변 Ngal($r=0.68$, $n=38$)뿐만 아니라 소변 크레아티닌에 대해 정상화 된 소변 Ngal($r=0.67$, $n=36$)은 혈청 크레아티닌 수치와 높은 상관관계를 보였다(각각 $P<0.0001$). 반면 만성 신부전 환자는 혈청 Ngal(49ng/ml; $n=10$)과 소변 Ngal(119ng/ml, $n=9$)의 현저한 상승이 없었으며, 이들 값은 혈청 크레아티닌에 비례하지 않았다. 이 데이터는 Ngal 발현과 급성 신장 손상을 연관시키며 신장이 혈청 및 소변 Ngal의 주요 공급원임을 의미하고 있다. 실제로 여러 가지 중증 신부전의 경우에서, Ngal의 부분적 분비(크레아티닌 제거에 대해 정상화 된 Ngal의 제거)는 100% 이상이었고, 이는 소변 Ngal은 혈액에서 여과되어 생성되는 것보다 지역합성에서 유래된 것임을 증명하고 있다(611면, 좌열 아래에서 4행~612면 좌열 3행).



[도 1] (A) 단일 클론 항 인간 Ngal (Mo) 및 다클론 항 마우스 Ngal (Po) 항체는 재조합(21-kDa) 및 천연 (25-kDa) 인간 및 마우스 Ngal을 인식한다. 때로는 고 분자량 종류(대략 35 kDa 및 66 kDa)가 재조합 및 천연 Ngal에서 확인된다. 이것은 Ngal의 이량체와 삼량체로 추측할 수 있다. 표준곡선은 비환원 겔에 25, 5, 1 및 0.2ng의 재조합 단백질로 제작하였다. ATN 환자의 인간 소변 샘플(0.1–20 μ l)에서는 Ngal이 높게 확인된 반면에, 만성 신부전(CRF) 환

자, 간경변 환자, 혈색소 침착증 환자, 췌장암, 신장 진단(기타)이 없는 환자나 정상인(정상)은 Ngal 수준이 ATN 환자보다 낮게 확인된다. (B) 인간 혈청에서도 유사한 데이터가 얻어졌다. 인간 혈청으로부터(C 및 D) 정상, CRF 및 ATN 그룹에서 소변(C)₂과 혈청(D) Ngal의 기하평균(막대 ± 표준 편차)을 비교했다. ATN은 패혈증과 비패혈증으로 더 나뉘었다. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 대 정상. (E) 마우스 ATN은 또한 상승된 소변 Ngal과 관련되어있다. 신장경엽을 30분간 교차 고정시키고, 재관류 24시간 후에 소변을 수집하고 면역블로팅법으로 분석하였다(5µl/lane)(610면, 도1).

재관류 6시간 또는 24시간 후, 면역블롯방법으로 Ngal (polyclonal, 1:500), HO-1 (stress - Gen Biotechnologies Corp.; 1:2,000), E-캐드헤린 (BD Transduction Laboratories; BD Biosciences-Pharmingen; 1:2,000), N-캐드헤린(BD Transduction Laboratories; BD Biosciences-Pharmingen; 1:3,000), 및 GAPDH(Chemicon International Inc., 1:3,000)을 측정하기 위하여 해파린화된 혈장, 소변 및 신장을 채취하였다(619면, 우열 28~33행).

2) 선행발명 2 (을 제2호증의 1)

2004. 10. 14. 공개된 국제공개특허공보(국제공개번호 WO 2004/088276 A2)에 게재된 "신장 요세관 세포 장애의 초기 증상을 진단하는 방법 및 장치(A method and kit for detecting the early onset of renal tubular cell injury)"라는 명칭의 발명으로서, 그 주요 내용은 다음과 같다.

허혈성 손상 또는 신장 독성 손상을 포함하는 신장 세뇨관세포 손상에 이차적인 급성신부전(ARF)은 지지적 치료에도 불구하고 임상의학 및 신장학에서 지속적으로 높은 사망률 및 이환율을 보이며, 잠재적으로 치명적인 문제로 남아 있다. ... 그 이유는 허혈성 손상 및 신독소에 대한 신장의 다양한 반응과 ARF에 대한 초기 바이오마커의 부족으로 인해 치료 시작에 지연이 생길 수 있기 때문이다(식별번호 [1]).

본 발명은 포유 동물에서 신장 세뇨관세포 손상을 검출하는 방법에 관한 것으로, 1) 포유

2) 급성 세뇨관 괴사(ATN) 환자들의 평균 소변 NGAL 농도는 약 310ng/ml로 관찰된다[을 제3호증(선행 발명 1의 도 1의 확대도) 참조].

동물 대상에서 소변 샘플을 얻는 단계; 2) 소변 샘플을 신장 세뇨관세포 손상 생체지표에 대한 항체와 접촉시키는 단계, 상기 신장 세뇨관세포 손상 생체표지 물질은 NGAL 을 포함하여 상기 항체 및 신장 세뇨관 세포손상 생체표지 물질의 복합체를 형성시키는 단계; 및 3)항체- 바이오마커 복합체를 검출하는 단계로 구성된다(식별번호 [8]).

본 발명은 다음 단계를 포함하는 신장 세뇨관 세포손상의 치료 유효성을 관찰하는 방법에 관한 것이다. 1) 허혈성 신장 손상을 경험하는 포유 동물 대상에게 치료를 제공하는 단계; 2) 피험자로부터 적어도 하나의 치료 후 소변 샘플을 취득하는 단계; 및 3) 치료 후 소변 샘플에서 신장 세뇨관 세포손상에 대한 바이오마커의 존재를 검출하는 단계를 포함한다(식별번호 [9]).

본 발명은 또한 대상의 소변에서 신장 세뇨관세포 손상에 대한 즉각 또는 초기에 증가하는 바이오마커의 존재를 검출하는데 사용하기 위한 키트에 관한 것으로서, 1) 소변 샘플의 양을 얻는 수단; 2) NGAL인 신장 세뇨관 세포손상 바이오마커와 복합체를 형성할 수 있는 포획 항체가 부착된 배지; 및 3) 신장 세뇨관 세포손상 바이오마커와 포획 항체의 복합체 검출을 위한 분석 키트를 포함한다(식별번호 [10]).

본 발명은 신장 세뇨관 세포손상의 조기 발병 시 피검자의 소변에 존재하는 신장 세뇨관 세포 손상 생체 지표의 존재를 검정하는 방법 및 키트를 제공한다. 질환의 조기 발견은 상해 치료 시간을 단축시킬 수 있고 임상적으로 급성신부전(ARF)을 일으킬 위험을 줄일 수 있다. 신장 세뇨관 세포 손상은 허혈성 신장질환(IRI) 또는 신세포독성 신장 손상(NRI)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다(식별번호 [35]).

본 발명은 신장 요세관 세포 장애의 발병 초기부터 임상 급성신부전증(ARF)까지 장애 정도와 피검체의 소변에 존재하는 NGAL 양 사이의 비례 관계에 기초하여 신장 장애의 정도를 평가하기 위한 방법 및 키트를 제공한다. 본 발명은 임상이가 최초의 평가 단계에서 신장 장애의 정도를 추정해, 소변 중 검출된 NGAL 양에 기초하여 상기 장애 상태의 변화(악화, 개선, 또는 그대로)를 관찰하기 위한 수단을 제공한다(식별번호 [41]).

본원에 서술된 방법 및 기술을 사용하여, 소변에 존재하는 RTCI 바이오마커가 정성적으로 분석 및 측정될 수 있고, 소변에 존재하는 RTCI 바이오마커가 정량적으로 분석되고 측정될 수 있다. 임상가는 환자의 상태에 따라 정성방법, 정량방법 또는 둘 다를 선택한다(식별번호 [43]).

NGAL 발현은 자극된 상피세포에서 현저하게 유도된다. 예를 들어, 염증이나 종양 부위의 결장 상피 세포에서 상향 조절되지만, 사이에 낀 무관한 부위나 전이성 병변 내에서는 존재하지 않는다. NGAL의 농도는 급성 세균 감염 환자의 혈청³⁾, 천식이나 만성 폐색성 폐질환 환자의 가래, 기종성 폐의 기관지액에서 상승한다. 이 모든 경우에 있어서, NGAL 유도는 염증 세포와 상피 내층 사이의 상호 작용의 결과로 가정되며, NGAL 발현의 상향조절은 호중구와 상피 모두에서 명백하다. 검출된 NGAL 유도는 허혈성 및 신세포독성 손상 둘 다를 포함하여 신장 세뇨관 세포손상에 대한 신장 근위 세뇨관 세포의 신규한 고유 반응을 나타내는 것으로 믿어지고 단지 활성화된 호중구에서 유래되지 않는다(식별번호 [53], [54]).

소변 샘플은 신장이식 2시간 후 환자로부터 취득되었으며, 이는 도 15에 도시된 허혈성 신장 손상의 예측 가능한 인간 모델이다. 이식 전 일정기간 동안 얼음에 저장되어있는 사체 신장을 투여받은 환자(n=4)는 생체내 신장을 투여받은 환자(n=6)와 비교하여 웨스턴 블랏팅과 ELISA로 쉽게 정량화된 소변 NGAL을 증가시켰다(패널 A). 소변 NGAL과 저온 허혈 시간 사이에는 유의한 상관관계가 있었고, 이는 NGAL 배출이 신장 손상 정도에 비례함을 나타낸다(패널 B) ($r=0.98$, Spearman 분석). 또한 소변 NGAL과 최대 혈청 크레아티닌(패널 C) 사이에는 유의한 상관 관계가 있었다($r=0.96$, Spearman 분석). 이식 후 2시간 이내에 측정된 소변 NGAL은 며칠 후 혈청 크레아티닌 피크에 의해 반영된 ARF를 예측할 수 있다는 점을 강조하는 것이 중요하다. 정상적인 사람 대조군 또는 만성 신부전 환자의 소변에는 거의 검출할 수 없는 양의 NGAL이 포함되어 있었으며, 이는 소변 NGAL의 상향 조절이 급성신부전에만 해당한다는 것을 나타낸다(표시되지 않음). 또한, 요로 감염과 신장이식 거부(두 개의 호중구 관련 장애) 환자의 소변은 사체 신장이식(>100ng/ml)에서 유의하게 많은 양과 쉽게 구별할 수 있는 소량의 NGAL을 포함하고 있었다(표시되지 않음). 이 데이터는 NGAL이 신장이식 후 급성신부전증에 대한 새로운 초기 소변 생체 표지 물질임이 입증되었다(식별번호 [98]).

급성신부전을 일으키지 않은 10 명의 환자에서 작은 증가가 있었으나 수술 후 12시간 이내 거의 감지할 수 없는 수준으로 급속히 정상화 되었다(6.0 ± 2.0 ng/mg 크레아티닌 2시간 값) (패널 A). 현저하게 대조적으로, 급성신부전은 소변 NGAL(75 ± 10 ng/mg 크레아티닌)의 2시간 후 10배 이상 증가하였고, 4시간 이후에 소변 NGAL(120 ± 12 ng/mg 크레아티닌)의 값은 20배 이상 증가했다. 소변 NGAL의 양과 심폐우회술 시간과의 상관 관계는 NGAL 배설

이 신장 손상 정도에 비례함을 나타낸다(패널 B)($r=0.76$, Spearman 분석). 또한, 소변 NGAL 과 최대 혈청 크레아티닌(패널 C) 사이에는 유의한 상관 관계가 있었다($r=0.66$, Spearman 분석). 수 시간 또는 심지어 며칠 후에 발생하는 혈청 크레아틴 피크에 의해서 예측되는 급성신부전(ARF)이 심장 수술의 2시간 이내에 측정된 소변 NGAL 에 의해서 예측된다는 것은 매우 중요하다. 상기 데이터 결과는 NGAL 이 개심 수술에 따른 급성 신장 장애에 대한 신규한 조기 소변 바이오마커인 것을 나타내며, NGAL 의 관측은 급성신부전 일 가능성이 매우 높은 집단임을 예고한다(식별번호 [99]).

3) 선행발명 34) (을 제5호증)

1995년경 발행된 "Scand J Clin Lab Invest." 제55호 125~131면에 게재된 "인간 호중구 리포칼린(HNL)의 혈청 측정은 급성 박테리아와 바이러스 감염을 구별한다(Serum measurements of human neutrophil lipocalin(HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections)"라는 제목의 논문(Xu SY, Pauksen K, Venge P, Scand J Clin Lab Invest. 1995, 55, pp.125~131)에서 파악되는 것으로서, 그 주요 내용은 다음과 같다.

인간 호중구 리포칼린(human neutrophil lipocalin, HNL)은 최근에 인간 호중구 과립에서 발견된 단백질이다. 급성 감염 환자 군에서 HNL의 농도가 방사면역측정법을 사용하여 측정되었다. 바이러스와 박테리아에 감염된 환자의 HNL 농도는 혈청 내에서 각각 $93.78 \pm 45.30 \text{ pg l}^{-1}$ (SD), $404.14 \pm 355.02 \text{ pg l}^{-1}$ (SD)이고, 혈장에서 각각 (SD) $47.81 \pm 18.18 \text{ pg l}^{-1}$, $145.46 \pm 194.32 \text{ pg l}^{-1}$ (SD) 이었다. 두 환자 그룹의 차이는 매우 유의미했다. 박테리아 감염 시 혈청 HNL과 혈장 HNL 농도 간에는 유의한 상관관계가 있었다 ($r=0.73$, $p<0.0001$). 또한, HNL 혈청 농도는 C- 반응성 단백질(CRP)의 혈청 농도와 연관성이 있다($r = 0.59$, $p < 0.0001$). 혈청 내 HNL의 측정은 바이러스 감염과 박테리아 감염의 구분에서 CRP보다 더 특이적이고 민감했다. 혈청 HNL이 155pg을 기준으로 박테리아 감염

3) 위 '급성 세균 감염 환자의 혈청'의 원문은 'serum of patients with acute bacterial infections'인데, 해당 부분에 관한 피고 제출 번역문의 '급성 세균 감염 환자'는 위 '급성 세균 감염 환자의 혈청'의 오기로 보인다.

4) 이 법원에 새로이 제출된 선행기술이다.

진단에 대한 양성 예측도와 음성 예측도는 각각 92%와 96%로 CRP의 최적 예측치보다 우수했다. 따라서, HNL 측정은 급성 세균 감염의 진단에 유용하다(125면, 초록).

CRP와 HNL의 개별적인 측정에 대한 양성 및 음성 검사에 대한 민감도, 특이도 및 예측도는 표 1에 나와 있다. CRP의 최적 컷 오프 레벨은 50mg인 것으로 보였다. 이 수준에서 예측도는 약 80%이다. HNL의 경우 최적 수준은 155pg이었으며 양성 예측도는 92%였고 음성 예측도는 96%였다(128면 좌열 아래에서 1~6행).

혈청과 혈장의 HNL 수치는 바이러스 감염 중에 증가하지 않았다. 따라서 HNL 수준은 바이러스 감염과 세균 감염의 구분에 유용 할 수 있다. 바이러스 감염과 세균 감염이 있는 환자를 구별하기 위해 HNL의 세가지 cut-off 값(190, 155 및 100 μ g l⁻¹)을 검사했다. 정상혈청 HNL수준의 상한인 190 μ g l⁻¹ 값은 가장 높은 특이성을 갖지만 가장 낮은 민감도를 나타내었고, 100 μ g l⁻¹ 평균 정상 혈청 HNL 수준은 특이성이 가장 낮았다. 155 μ g l⁻¹의 컷오프 값을 설정할 때, 평균 정상혈청 HNL 수준의 3SD 에서 97%의 민감도 및 96%의 특이성을 얻었다(129면 우열 8~23행).

우리는 이 연구를 통하여 인간 호중구 리포 칼린 (HNL)의 혈청 수준을 측정하는 것이 세균 감염의 존재를 확인하고 급성 바이러스 감염과 구별하는 임상적으로 유용한 수단이 될 수 있다고 확인하였다(130면 우열 아래에서 1~5행).

다. 심결의 경위

1) 피고는 2016. 2. 19. 원고를 상대로 특허발명에 대한 무효심판청구를 하였고(2016 당422호), 위 무효심판 절차에서 원고는 2016. 6. 9. 정정청구를 하였으며, 피고는 위 정정청구에 따른 특허발명은 기재불비의 무효 사유가 있고 선행발명 1, 2에 의해서 진보성이 부정되어 그 특허가 무효로 되어야 한다고 주장하였다.

2) 특허심판원은 2018. 1. 31. ① 원고의 위 정정청구를 인정하되, ② 특허발명은 선행발명 1 또는 선행발명 1, 2의 결합에 의해 진보성이 부정되므로 그 특허를 무효로 한다는 심결을 하였다(이하 위 ② 부분을 '이 사건 심결'이라 한다).

【인정근거】 다툼 없는 사실, 갑 제1~3호증, 을 제1호증의 1, 제2호증의 1, 제3, 5호증,

변론 전체의 취지

2. 이 사건 심결의 적법 여부에 관한 판단

가. 당사자 주장의 요지

1) 원고 주장의 요지

다음과 같은 이유로 제1항 발명과 그 종속항 발명인 제7~13, 15항 발명은 모두 선행 발명들에 의하여 진보성이 부정되지 않는다. 이와 결론을 달리한 이 사건 심결은 취소되어야 한다.

가) 특허발명은 급성 신장 질환과 NGAL⁵⁾ 농도 상승이 수반되는 비신장 질환(고농도 비신장 질환)과 구별함으로써 급성 신장 질환의 가능성을 관찰 또는 결정하는 것에 그 기술적 특징이 있는데, 선행발명들은 위와 같은 목적을 도출하기 위한 동기를 부여하지 못하고 오히려 반대 방향의 교시를 하고 있다. 따라서 선행발명들로부터 특허발명의 위 기술적 특징을 쉽게 도출할 수 없다.

나) 이처럼 특허발명은 선행발명들로부터 예상할 수 없는 상이한 과제를 달성하기 위한 기술수단으로 이질적 효과를 가지는 것이므로, 컷오프 값의 임계적 의의에 관계없이 그 진보성이 부정될 수 없다.

다) 특허발명은 급성 신장 질환을 구별하기 위한 컷오프 값의 범위를 특정하고 있고, 이러한 컷오프 값은 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정하기 위한 정보제공적 컷오프 값으로 탁월한 구별능을 가지므로 그 진보성이 인정되어야 한다.

2) 피고 주장의 요지

5) 특허발명의 명세서에는 '호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL)', '인간 호중구 리포칼린(HNL)' 및 'NGAL' 등으로, 선행발명 1에는 '호중구 젤라티나제-결합 리포칼린(Ngal)', 'Ngal' 등으로, 선행발명 2에는 '호중구 젤라티나제 관련 리포칼린(NGAL)', 'NGAL' 등으로, 선행발명 3에는 '인간 호중구 리포칼린(HNL)', 'HNL' 등으로 각 기재되어 있으나, 이는 모두 동일한 리포칼린 수퍼패밀리에 속하는 β -배럴 칼릭스(꽃받침) 형태의 단백질을 지칭하는 것이다. 이하에서는 'NGAL'로 통일하여 기재한다.

제1항 발명은 선행발명들로부터 쉽게 발명될 수 있으므로 그 진보성이 부정되고, 그 종속항 발명인 제7~13, 15항 발명도 마찬가지로 무효사유가 존재하므로,6) 특허발명은 모두 그 특허가 무효로 되어야 한다. 이와 결론을 같이한 이 사건 심결은 적법하다. (피고는 특허심판원이 원고의 정정청구를 받아들인 조치에 대하여는 다투지 아니하므로, 이 부분은 따로 살피지 않는다.)

나. 제1항 발명의 진보성이 부정되는지 여부

1) 제1항 발명과 선행발명 1의 차이

제1항 발명	선행발명 1
<p>i) 인간 소변, 혈청 또는 혈장 시료 재</p> <p>중 인간 호중구 젤라티나제 결합 리</p> <p>포칼린(NGAL)의 농도를 측정하는 단 위</p> <p>계와,</p> <p>ii) 상기 단계 i)에서 측정한 NGAL 정상 혈청 Ngal(21ng/ml 기하 평균; n=5)과 정</p> <p>농도와 미리 결정된 컷오프(cutoff) 상 소변(22ng/ml; n=10)의 Ngal 농도와 가장</p> <p>값의 차이를 표시하는 단계를 포함하 전형적인 급성 신장 기능 저하 질병인 ATN 환</p> <p>고,</p> <p>상기 컷오프 값은 신장 질환과 관련 (146ng/ml; P<0.05, 도 1) 증가하였으며, 소변</p> <p>이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하 Ngal이 25배(557ng/ml, P<0.001) 증가했다. 세</p> <p>도록 선택된 값으로서 250ng/ml ~ 균 감염과 관련된 ATN 환자는 혈청</p> <p>525ng/ml 범위인 인간의 급성 신장 Ngal(331ng/ml)과 소변 Ngal(2,786ng/ml)이 가</p> <p>질환 가능성을 관찰 또는 결정하기 장 높은 경향을 보였으나 감염되지 않은 ATN환</p> <p>위한 정보를 제공하는 방법.</p>	<p>관류 6시간 또는 24시간 후, 면역블롯방법으</p> <p>Ngal (polyclonal, 1:500), ... 을 측정하기</p> <p>하여 헤파린화된 혈장, 소변 및 신장을 채취</p> <p>하였다.(619면, 우열 28~33행)</p> <p>자에서 Ngal 농도를 비교하면 혈청에서는 7.3배</p> <p>감염과 관련된 ATN 환자는 혈청</p> <p>이 터는 Ngal 발현과 급성 신장 손상을 연관시키</p> <p>며 신장이 혈청 및 소변 Ngal의 주요 공급원임</p> <p>을 의미하고 있다.(제611면, 좌열 아래에서 2</p>

6) 피고는 기재불비 무효사유에 관한 주장을 철회하였다(제1차 변론조서 참조).

	<p>행~우열 18행)</p> <p>급성 세뇨관 괴사(ATN) 환자의 인간 소변 샘플 (0.1-20μl)에서는 Ngal이 높게 확인된 반면에, 만성 신부전(CRF) 환자, 간경변 환자, 혈액소 침착증 환자, 체장암, 신장 진단(기타)이 없는 환자나 정상인(정상)은 Ngal 수준이 ATN 환자 보다 낮게 확인된다.[611면, 도 1(A, B)]</p> <p>급성 세뇨관 괴사(ATN) 환자들의 평균 소변 NGAL 농도는 약 310ng/ml로 관찰됨(도 1)</p>
--	--

가) 제1항 발명과 선행발명 1은 모두 혈장 또는 소변 중의 NGAL 농도를 측정한다는 점에서 동일하다.

나) 다만 제1항 발명과 선행발명 1은 다음의 점에서 차이가 있다(이하 '쟁점차이'라고 한다).

즉 제1항 발명은 측정된 NGAL 농도와 신장질환과 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 미리 결정된 250ng/ml~ 525ng/ml 범위의 컷오프(cutoff) 값의 차이를 표시하는 단계를 통해 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정하는 방법에 관한 것이다. 그런데 선행발명 1에는 급성 세뇨관 괴사(ATN) 환자의 혈액 및 소변 NGAL 농도들의 평균값과 위 평균값들은 만성 신부전 등 기타 질환 환자들의 NGAL 농도에 비해 높은 수준이라는 것만이 개시되어 있을 뿐이고, '250ng/ml~ 525ng/ml 범위의 컷오프 값과 측정된 NGAL 농도를 비교함으로써 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정할 수 있다는 것'이 명시적으로 개시되어 있지 않은 점에서 차이가 있다.

2) 통상의 기술자가 쟁점차이를 쉽게 극복할 수 있는지 여부

가) 먼저 앞서 본 증거들에 의하여 알 수 있는 다음의 사정들을 종합하여 보면, 통

상의 기술자가 선행발명들로부터 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정하기 위한 정보를 제공하기 위하여 신장 질환과 관련이 없는 NGAL 농도를 지표(바이오마커)로 도출하는 데에 특별한 기술적 어려움이 없다.

(1) 신장의 허혈 손상 또는 독성 손상에 의한 신장 세뇨관 세포 손상, 급성 세뇨관 괴사(ATN), 급성 세뇨관 간질성 신증(ATIN), 급성신부전(ARF) 등 다양한 원인에 의해 유발된 급성 신장 손상은 조기에 발견하여 치료하는 것이 중요하나, 특허발명 출원 당시 알려진 지표들[혈중 크레아티닌 농도, 크레아티닌 청소율, 요중 전해질, 신장손상분자-1(KIM-1), 시스테인 풍부 단백질 61(Cyr61) 등]만으로는 조기 발견이 어려운 문제가 있었다.

(2) 선행발명 1에는 '실제로 NGAL은 신세포독성 및 허혈성 손상 이후 인간의 신장 피질 세뇨관 및 혈액 그리고 소변에서 많이 축적된다.'라는 기재(610면 초록)와 함께, 위 대비 표에서 보는 '사람의 급성신부전은 혈청과 소변 Ngal 단백질 농도의 로그적 증가로 특징지어진다. ... 이 데이터는 Ngal 발현과 급성 신장 손상을 연관시키며 신장이 혈청 및 소변 Ngal의 주요 공급원임을 의미하고 있다.'라는 기재(611면 좌열 아래에서 4행 ~ 612면 좌열 3행) 및 '급성 세뇨관 괴사(ATN) 환자의 인간 소변 샘플(0.1-20 μ l)에서는 Ngal이 높게 확인된 반면에, 만성 신부전(CRF) 환자, 간경변 환자, 혈색소 침착증 환자, 체장암, 신장 진단(기타)이 없는 환자나 정상인(정상)은 Ngal 수준이 ATN 환자보다 낮게 확인된다.'라는 기재(611면 도1) 등이 있다.

위와 같은 기재들에서 보는 것처럼, 선행발명 1은 만성 신부전 환자, 간경변 환자, 혈색소 침착증 환자, 체장암 등과 같은 질환은 있으나 신장 질환은 없는 환자에 비하여 급성 세뇨관 괴사를 포함하는 급성 신장 질환 환자의 혈청 또는 소변에서 NGAL

농도 수준이 높게 나타남을 개시하고 있다.

(3)선행발명 2는 소변 중 NGAL을 바이오마커로 하여 허혈성 신장 질환(IRI), 신 세포독성 신장 손상(NRI)를 포함하는 신장 세뇨관 세포 손상을 검출하는 방법에 관한 것으로, 앞서 본 것처럼 신장 세뇨관 손상에 의해 급성신부전(ARF)이 수반될 수 있다는 점을 전제로(식별번호 [1], [35]), NGAL을 이용하여 조기에 이를 검출함으로써 신장이식 후 급성 신부전증, 개심 수술에 따른 급성 신장 장애의 판단에 이용할 수 있다는 기술내용을 개시하고 있다(식별번호 [98], [99]). 또한 선행발명 3에는 통계적으로 유의한 차이가 존재하는 바이러스 감염과 세균 감염환자 혈청에서의 NGAL 농도를 컷오프 값으로 이용하여 위 감염들을 구별하는 기술내용이 개시되어 있다(129면 우열 8~23 행).

(4) 이상과 같은 선행발명들의 개시내용을 접하는 통상의 기술자로서는, 특허발명 출원 당시에 이미 급성 신장 손상을 조기에 발견할 수 있는 지표를 발견하는 것이 해당 기술분야의 기술적 과제로 인식되고 있고, 급성 신장 질환을 유발할 수 있는 신장 세뇨관 세포 손상을 조기에 검출하는 바이오마커로 NGAL이 공지되어 있으며, NGAL 농도를 컷오프 값으로 이용하여 상이한 질환들을 구별할 수 있다는 기술내용을 넉넉히 파악할 수 있다고 할 것이다.

따라서 통상의 기술자가 급성 신장 질환 환자의 소변 및 혈청에서 NGAL 농도가 현저히 증가하여 통계적으로 유의한 차이가 존재한다는 내용이 개시된 선행발명 1의 개시내용을 기초로 하여 선행발명 2, 3의 개시내용까지 함께 고려함으로써, NGAL 농도를 컷오프 값으로 급성 신장 질환 환자를 구별하는 것에 쉽게 채용할 수 있다고 봄이 타당하고, 통상의 기술자가 기본적 과제의 점에서 공통되는 선행발명들을 결합하여

위와 같은 기술내용을 도출하는 데에 특별한 기술적 어려움이 있다고 볼 수도 없다.

(5) 이에 대하여 원고는, ① 선행발명들은 NGAL 농도 값을 지표로 하여 급성 신장 질환을 구별할 수 있다는 것에 대해 전혀 암시하고 있지 않고, ② 제1항 발명은 급성 신장 질환과 NGAL 농도 상승을 동반하는 염증성 비신장 질환(고농도 비신장 질환)을 구별하기 위한 NGAL 농도의 컷오프 값을 제공하는 것에 기술적 특징이 있는 것으로서, 선행발명들과 상이한 과제를 해결하고 이질적인 효과를 달성하는 것이라고 주장한다.

(가) 먼저 원고의 ① 주장부분에 관하여 살펴본다. 선행발명 2는 NGAL 존재를 확인하여 신장 세뇨관 세포 손상을 검출하는 방법에 관한 것이기는 하나, 단지 활성화된 호중구가 아닌 신장 세뇨관 세포 손상에 대한 신장 근위 세뇨관 세포의 고유 반응에 의해 NGAL이 유도된다는 내용(식별번호 [54])과 요로 감염과 신장이식 거부와 같은 호중구 관련 장애 환자보다 허혈성 신장 손상이 수반된 사체 신장이식 환자에서 유의하게 높은 소변 NGAL 농도가 관찰된다는 내용(식별번호 [98]) 등을 개시하고 있으므로, 적어도 선행발명 2에는 NGAL 농도가 질환에 따라 달라질 수 있고 급성 신장 손상에서 NGAL 농도가 높게 나타난다는 기술내용이 개시 또는 암시되어 있다고 할 것이다. 그리고 앞서 살펴본 바와 같이 선행발명 1에는 암을 포함하는 다른 질환은 있으나 급성 신장 질환은 없는 환자에 비해 급성 신장 질환 환자에서 높은 수준의 NGAL이 발현되었고 급성 신장 환자의 경우 염증 여부에 따라 통계적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다는 기재(611면 우열 4~7행)가 있다. 그렇다면 통상의 기술자는 종래에 급성 신장 질환의 지표(바이오마커)로 사용되던 NGAL이 급성 신장 질환의 환자에서 고농도로 나타난다는 것을 이용하면 급성 신장 질환을 구별할 수 있다는 점을 위 선행

발명들로부터 쉽게 인식할 수 있을 것으로 보이고, 이와 달리 선행발명들에는 NGAL 농도 값을 지표로 하여 급성 신장 질환을 구별할 수 있다는 것에 관한 암시가 전혀 없다는 원고의 ① 주장부분은 받아들일 수 없다.

(나) 원고의 ② 주장부분에 관하여 살펴본다. 특허발명의 명세서 중 '컷오프 값 아래의 소변 NGAL 수치는 건강한 개체 또는 염증, 감염 또는 암 증상이 있는 개체에게서 발견될 수 있기 때문에, 수용가능한 정도의 특이성으로는 신장 손상을 진단할 수 없는 컷오프 값은 250ng/ml 이상, 250ng/ml ~ 525ng/ml 범위의 값(이) ... 좋다.'라는 기재(식별번호 [20]), '또 하나의 실시 상태로서, 본 발명은 진단할 개체의 혈장 또는 혈청 시료 중의 인간 NGAL의 농도를 측정하는 단계, 및 이렇게 측정된 농도를 외관상 건강하거나 염증 증상, 박테리아 감염 또는 암을 포함하는 기타 질환이 있을 수는 있으나 신장 질환은 없는 사람에게서 발견되는 혈장 또는 혈청 농도를 초과하도록 결정된 컷오프 값을 선택하여 이와 비교하는 단계를 포함한다. ... 혈장 또는 혈청 중 NGAL 농도의 컷오프 값은 신장에서의 컷오프 값과 유사하여, 250ng/ml 이상, 예를 들면 300ng/ml 이상 또는 250ng/ml ~ 525ng/ml의 범위의 값(이) ... 좋다.'라는 기재(식별번호 [21], [22]) 등을 참작하여 보면, 제1항 발명의 컷오프 값은 정상인 또는 NGAL 농도 상승을 동반하는 질환을 포함하는 비신장 질환은 있으나 신장 질환은 없는 환자와 급성 신장 질환 환자를 구별하는 기준으로 해석된다. 더욱이 제1항 발명의 청구범위 문언 중 "신장 질환과 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 선택된 값"이라는 기재도 신장 질환과 관련이 없는 '염증성 질환의' NGAL 농도를 배제하도록 선택된 값을 의미하는 것으로 제한하여 해석되기 어려운 내용이다. 따라서 제1항 발명은 급성 신장 질환 환자를 정상 또는 다른 질환이 있는 환자와 구별할 수 있도록 하는 데에 기술적 특징이 있다고 할 것

이고, 이와 달리 원고 주장처럼 급성 신장 질환과 NGAL 농도 상승을 동반하는 염증성 비신장 질환(고농도 비신장 질환)을 구별할 수 있도록 하는 데에 제1항 발명의 기술적 특징이 있다거나, 제1항 발명이 위와 같은 내용의 상이한 과제를 해결하고 이질적인 효과를 달성한다고 볼 수는 없다.

나) 그리고 앞서 본 증거들에 의하여 알 수 있는 다음의 사정들을 종합하여 보면, 통상의 기술자가 신장 질환과 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 컷오프 값을 $250\text{ng/ml} \sim 525\text{ng/ml}$ 범위로 한정된 구성을 선행발명들로부터 도출하는 데에 특별한 기술적 어려움이 없다.

(1) 먼저 수신자 특성 곡선(ROC 곡선) 분석을 통해 진단에 필요한 컷오프 값을 찾는 것은 특허발명과 같은 질병진단에 관한 기술분야에서 널리 알려진 기술상식이고(이러한 점에 관하여 당사자 사이에 별다른 다툼도 없다), 통상의 기술자가 필요에 따라 민감도 및 특이도를 설정하여 통계적 분석을 통해 컷오프 값을 결정하는 것은 통상적인 창작능력 발휘의 범위 내에 있는 것이다. 그리고 통계적 분석을 통해 결정된 컷오프 값을 진단에 활용하는 경우, 통계적 분석을 통해 얻은 컷오프 값을 기준으로 삼아 질환의 위험성, 발병률, 진단 대상 환자의 상태에 따라 통상의 기술자는 적절한 기준을 선택하여 진단에 이용하는 데에도 특별한 기술적 어려움이 없다.

(2) 그런데 특허발명 명세서에는 컷오프 값에 관하여 제1항 발명에 한정된 위 수치범위 내외에서 현저한 효과의 차이가 생긴다고 볼 만한 아무런 기재가 없다. [오히려 제1항 발명을 이용한 실제 제품의 설명서(갑 제7호증, 16~17면) 기재에 의하면, 위 수치범위인 ' $250\text{ng/ml} \sim 525\text{ng/ml}$ '를 벗어나는 컷오프 값을 선택하는 경우에도 민감도와 특이도에 현저한 차이가 없는 것으로 나타나는데, 이는 제1항 발명의 위 수치범위에

임계적 의의가 있다고 볼 수 없다는 점을 뒷받침한다.]

(3) 또한 앞서 살펴본 것처럼 ① 선행발명 1은 만성 신부전 환자, 간경변 환자, 혈액소 침착증 환자, 췌장암 등과 같은 질환은 있으나 신장 질환은 없는 환자에 비하여 급성 세뇨관 괴사를 포함하는 급성 신장 질환 환자의 혈청 또는 소변에서 NGAL 농도 수준이 높게 나타남을 개시하고 있고, 선행발명 2도 NGAL을 이용하여 조기에 이를 검출함으로써 신장이식 후 급성 신부전증, 개심 수술에 따른 급성 신장 장애의 판단에 이용할 수 있다는 기술내용을 개시하고 있어서, 그로부터 NGAL이 급성 신장 질환의 환자에서 고농도로 나타난다는 것을 이용하여 급성 신장 질환을 구별할 수 있다는 기술내용이 파악되는 점과 ② 제1항 발명도 급성 신장 질환 환자를 정상 또는 다른 질환이 있는 환자와 구별할 수 있도록 한다는 기술적 특징에서 위 선행발명들과 차이가 없다고 할 것인 점 등에 비추어 볼 때, 제1항 발명의 위 수치한정이 선행발명들과는 상이한 과제를 달성하기 위한 기술수단으로서의 의의를 가진다거나 그 효과가 이질적이라고 보기도 어렵다.

(4) 따라서 제1항 발명의 '250ng/ml ~ 525ng/ml'라는 수치범위는 NGAL 농도를 지표(바이오마커)로 하여 급성 신장 질환을 진단하고자 하는 통상의 기술자가 통상적이고 반복적인 실험을 통하여 필요에 따라 적절히 선택할 수 있는 정도의 단순한 수치한정에 불과하다고 할 것이다.

3) 대비결과의 정리

이상을 종합하면, 선행발명 1에 의하거나 선행발명 1을 기초로 선행발명 2, 3을 결합함으로써 제1항 발명에 이르는 것은 통상의 기술자에게 특별한 기술적 어려움이 없다고 할 것이므로, 제1항 발명은 그 구성의 곤란성이 있다고 볼 수 없고, 제1항 발명이

효과에 있어서도 통상의 기술자가 예측할 수 있는 범위를 벗어나는 현저한 차이가 발생한다고 보기도 어렵다. 따라서 제1항 발명은 통상의 기술자가 선행발명 1에 의하거나 선행발명 1을 기초로 선행발명 2, 3을 결합함으로써 쉽게 발명할 수 있는 것으로서 그 진보성이 부정된다.

다. 제7~13, 15항 발명의 진보성이 부정되는지 여부

1) 제7~13, 15항 발명은 제1항 발명의 종속항 발명으로서 부가구성과 한정구성을 더 두고 있다. 그런데 부가구성과 한정구성이 모두 진보성을 가지는 구성요소가 된다고 보기 어려운 것들이고, 이러한 점에 관하여 당사자 사이에 별다른 다툼도 없다.

2) 따라서 제7~13, 15항 발명도 제1항 발명과 마찬가지로 통상의 기술자가 선행발명 1에 의하거나 선행발명 1을 기초로 선행발명 2, 3을 결합함으로써 쉽게 발명할 수 있는 것으로서 그 진보성이 부정된다.

라. 소결

이상과 같이, 제1, 7~13, 15항 발명의 특허발명은 모두 진보성이 부정되므로 그 특허가 무효로 되어야 한다. 이와 결론을 같이한 이 사건 심결은 정당하다.

3. 결론

이 사건 심결의 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 없으므로 이를 받아들이지 아니하기로 하여 주문과 같이 판결한다.

재판장 판사 윤성식

판사 권순민

판사 정택수

별지 1.

특허발명의 청구범위

【청구항 1】 i) 인간 소변, 혈청 또는 혈장 시료 중 인간 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL)의 농도를 측정하는 단계와, ii) 상기 단계 i)에서 측정한 NGAL 농도와 미리 결정된 컷오프(cutoff) 값의 차이를 표시하는 단계를 포함하고,

상기 컷오프 값은 신장 질환과 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 선택된 값으로서 250ng/ml ~ 525ng/ml 범위인 인간의 급성 신장 질환 가능성을 관찰 또는 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법.

【청구항 2~6】 각 삭제

【청구항 7】 제1항에 있어서, 단계 i)과 ii)를 반복하는 단계를 더 포함하는 것인 관찰 방법.

【청구항 8】 제1항에 있어서, 24시간 내에 i) 및 ii) 단계를 반복하는 단계를 더 포함하는 것인 관찰 방법.

【청구항 9】 제1항에 있어서, 신장 질환의 치료를 시작하거나 끝낸 후에 i) 및 ii) 단계를 반복하는 단계를 더 포함하는 것인 관찰 방법.

【청구항 10】 제1항에 있어서, 상기 급성 신장 질환은 허혈 후 신장 손상인 것인 방법.

【청구항 11】 제1항에 있어서, 상기 급성 신장 질환은 급성 신부전증, 급성 세뇨관 괴사 또는 급성 세뇨관 간질성 신증을 일으킬 수 있는 질환인 것인 방법.

【청구항 12】 제1항에 있어서, 상기 급성 신장 질환은 신독성제에 의한 것인 방법.

【청구항 13】 제1항에 있어서, 상기 i)에서 측정한 NGAL의 농도를 제2 컷오프 값과 비교하는 단계를 더 포함하고, 상기 제2 컷오프 값은 투석에 의한 환자의 치료를 필요로 하는 신장 질환 정도와 관련이 없는 낮은 NGAL 농도를 배제하도록 선택된 값으로서 1000ng/ml ~ 3000ng/ml 범위인 방법.

【청구항 14】 삭제

【청구항 15】 제1항에 있어서, NGAL 농도는 7) NGAL에 특이적으로 결합하는 분자에 의하여 측정되는 것인 방법.

【청구항 16~22】 각 삭제

7) 명세서 기재 'NGAL은'은 위 'NGAL 농도는'의 오타라는 점에 관하여 당사자 사이에 다툼이 없다(제1차 변론조서 참조).

별지 2.

특허발명의 설명 및 도면 중 주요 내용

기술분야

본 발명은 신장 질환이 허혈 손상 (신장에 손상된 혈액 공급으로 인한) 또는 신독성제에의 노출에 의한 것 또는 이식된 신장의 거부를 포함하여 신장 기능의 약화를 초래하는 신장 질환의 경우에, 인간의 체액에서 이것의 이상 농도는 질환이나 질환군을 지시하는 것인 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린 (NGAL)을 측정하여, 인체 질환을 진단 및 관찰하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 특히 허혈 손상으로 인한 신장 반응의 초기 발견에 유용한데, 허혈 손상으로 인한 임상 또는 병적 결과는 전형적으로 급성 신부전 (ARF), 급성 세뇨관 괴사 (ATN) 또는 급성 세뇨관 간질성 신증 (ATIN)이고, 또한 이 방법은 치료 조치에 대한 반응을 포함하여 신장 질환 진행 과정을 관찰하는데 이용될 수 있다(식별번호 [2]).

배경기술

ARF, ATN 또는 ATIN을 초래할 수 있는 신장 허혈 손상의 발견은 지금까지 나트륨 분비 저하, 상승 및 상승 중인 혈액 중 크레아티닌 및 요소의 수치, 측정한다면 낮은 크레아티닌 청소를 보이는 혈액 및 소변에서의 화학적 검사 결과와 함께, 소변 감소증 및 액체 잔류 등의 임상 징후에 의존해왔다. ... 허혈이나 신독성제에 신장이 노출된 후에 소변에서 이들 표지 분자의 출현 경과 과정이 통상적으로 느리기 때문에, 이들은 이들 손상으로부터 초래하는 초기 또는 임박한 신장 질환을 진단하기 위한 통상적인 용도로는 도입되지 않아 왔다(식별번호 [3]).

호중구 젤라티나제 결합 리포칼린 (NGAL)은 또한 호중구 리포칼린 (NL; 인간 호중구 리포칼린의 경우에는 HNL), 리포칼린 2(LCN2), 25kDa 알파 2-마이크로글 로불린 관련 단백질 (랫트에 있어서) 또는 24P3 (마우스에 있어서)으로도 알려져 있다. ... 이들 복합체는 전립선암, 방광암, 신장암 및 유방암을 포함하는 각종 암 환자의 소변에서 확인되었다. NGAL은 처음에 미생물, 특히 호중구의 탈과립 및 과립 단백질의 엑소사이토시스의 원인이 되는 화농성 박테리아를 침입할 때, 혈액으로부터 방출되는 호중구 활성화 표지로서 공개되었다. ... 미국 특허 출원 제2004/0219603호에는 신세뇨관 세포 손상의 개시를 초기에 발견하기 위한 소변 생체 표지자로서의 NGAL의 용도가 기재되어 있다.

그러나 신세뇨관 세포 손상이 NGAL 수치 상승의 원인으로서는 전신 염증 또는 박테리아 감염과 구별될 수 있는지와 구별 방법을 기술하고 있지는 않다(식별번호 [4]~[6]).

발명의 요약

신장 손상으로 인한 NGAL의 수치가 신장 기능에 영향을 미치지 않는 염증, 감염 또는 암 증상에 의한 NGAL 수치보다 통상적으로 더 높다는 놀라운 사실이 알려지게 되었다. 이것은 신장에 영향을 미치지 않는 다른 질환과 신장 질환을 구별하는, 환자의 신장 질환을 진단 및/또는 관찰하는 방법을 확립하게 하였다. 신장 질환은 신장 전체 또는 신장을 구성하는 1개 이상의 세포 구조 변화의 구조적 및 초미세구조적 상호 관련을 포함하여, 정상 건강 상태를 유지하는 조절 기작을 벗어나는 어떠한 기능의 변화를 의미한다. 이러한 질환의 비배타적인 예로서 급성 세뇨관 괴사(ATN) 또는 급성 세뇨관 간질성 신증(ATIN) 등의 신장 허혈과 관련된 증상을 들 수 있고, 원인이 무엇이든 간에 급성 신부전증 (ARF) 또는 만성 신부전증 (CRF), 원인이 무엇이든 간에 급성 및 만성 사구체 신염, 요로 폐색에 의한 신장병, 고혈압으로 인한 신장병, 자간전증이나 임신 독혈증과 관련된 신장병, 이식된 신장의 거부 또는 재발성 질환 및 신장의 선천적 및 종양성 질환도 역시 들 수 있다(식별번호 [8]).

따라서, 본 발명은 환자의 체액 시료, 줄기로는 소변 시료 중의 인간 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL) 수치를 측정하는 것을 포함하여, 인간의 신장 손상을 진단 및/또는 관찰하는 방법을 제공한다. 만일 필연적으로 신장 기능에 영향을 미치지 않는 염증 또는 감염 증상 또는 암 등의 다른 질환으로 인한 NGAL의 특이적 더 작은 상승 수치보다 NGAL의 상승 수치가 더 높다면, NGAL의 상승 수치는 신장 손상을 지시하는 것이다. 따라서 제1 측면에서, 본 발명은 인간에 있어서 신장 질환의 가능성을 진단, 관찰 또는 측정하는 방법에 관한 것으로서, 여기서 상기 방법은 신장 질환과 신장에 영향을 미치지 않는 다른 증상 사이의 차이를 구별하며, 상기 방법은

- i) 인간 체액 시료 중의 인간 NGAL 농도를 측정하는 단계와,
- ii) 상기 농도를 미리 측정된 컷오프(cutoff) 값과 비교하는 단계를 포함하고, 상기 컷오프 값은 신장에 영향을 미치지 않는 증상과 관련된 NGAL의 낮은 농도를 배제하도록 선택된 것으로, 컷오프 값보다 더 높은 농도는 신장 질환을 지시하는 것이다(식별번호 [9]~[11]).

더욱이, 하나의 실시 상태로서 본 발명은 신장 질환의 상이한 정도 사이를 구별 가능하게 한다. 따라서 예를 들어, 하나의 실시 상태로서, 본 발명의 방법은 상기 농도를 제2의 컷오프 값과 비교하는 단계를 더 포함하는데, 상기 제2의 컷오프 값은 투석에 의한 치료를 필요로 할 가능성이 없는, 신장 질환의 정도가 경미한 신장 질환과 관련된 NGAL의 낮은 농도를 배제하도록 선택되고, 상기 컷오프 값보다 더 높은 농도는 투석 치료를 요할 가능성이 있는 더 심각한 질환을 지시하는 것이다(식별번호 [12]).

ARF, ATN 또는 ATIN을 일으킬 수 있는 신장 손상에 대한 다른 표지 분자의 분석은 정례적인 임상 용도로는 도입되지 않아 왔는데, 이는 이들 다른 표지들이 신장 질환의 진행 과정 중 소변에서 너무 늦게 나타나서, 임상 의학자들이 질환의 진행을 깨닫는데 유용하지 않거나 예방 또는 치료 조치를 제시할 수 없기 때문이다. 이 문제는 신장 질환의 진행을 탐지하기 위하여 소변과 같은 인간 시료에서 NGAL을 분석하는 것을 이용하는 본 발명에 의하여 해결되었다. 이것이 손상의 개시 후 2 또는 3시간 내에 소변에서 상승하는 수치로서, 소변 중 나타나는 신장 손상의 최초의 표지라는 것이 동물에 대한 연구를 통하여 제시된다. 따라서 본 발명에 따른 소변 NGAL의 분석은 ARF, ATN 또는 ATIN을 일으킬 수 있는 신장 손상을 검출하고, 이를 다른 질환과 구별하며, 진행률이 허용하면 진행을 뒤바꾸기 위한 적절한 조치를 취하는 방법을 제공한다(식별번호 [13], [14]).

면역화학적 방법에 의하여 NGAL 수치를 측정하는 것이 좋다. 이러한 방법의 예로는 샌드위치 ELISA(효소 결합 면역 흡수 분석법), 측방 유동법 또는 딥스틱(dipstick)을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다(식별번호 [15]).

발명의 상세한 설명

우리는 인간의 소변 시료 중의 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린(NGAL)의 농도가 전염 또는 염증 상태에 단지 약하게 영향을 받는다는 것을 알게 되었다. 그러나 NGAL 수치는 허혈 손상으로 인한 신장 질환 시 뚜렷하게 증가하고 NGAL의 증가는 ATN에서 특히 높다. 더욱이 우리는 NGAL의 혈청 또는 혈장 수치가 필연적으로 전염성 또는 염증 상태를 반영하는 것이 아니고, 백혈병이나 백혈병 치료 결과로서 일어날 수 있는 것처럼 혈액 내의 호중구 개수가 극단적으로 낮아질 때조차 높아질 수 있다는 것을 알게 되었다. 무작위로 선출한 위독한 환자들의 혈액 및 소변의 점시료를 분석할 때, 인간 혈청 또는 혈장 중의 NGAL의 농도와 소변 중의 NGAL의 농도 사이에는 사실상 밀접한 관계가 있는

한편, 말초혈액 중의 호중구 개수 또는 대개 염증 표지로 이용되는 급성기 단백질인 C-반응성 단백질의 농도와 이들 수치 사이에는 거의 관계가 없다. 따라서, 특정 이론에 의한 뒷받침 없이, NGAL이 허혈 및 신장 NGAL 발현을 촉진시킬 수 있는 기타 영향에 응하여 신장에서 생성되어, 소변과 혈액으로 많은 양이 방출되므로, 미국 특허 제 6,136,526호에 기재되어 있는 것처럼 염증 또는 바이러스 감염의 표지로서 혈청 또는 혈장 중의 NGAL 측정의 용도를 혼동하게 된다는 가설을 세울 수 있다(식별번호 [17]).

따라서, 본 발명은 체액, 종기로는 호중구가 제거된 인간 소변 시료에서, 특히 신장 허혈이나 독성제로 인한 신장 질환용 진단 표지로서 NGAL을 측정하는 것에 관한 것이다. 본 발명에서 NGAL의 농도가 신장 질환을 특별히 지시하기 위해서는, 신장 손상을 일으키지 않는 암이나 감염 또는 염증 상태를 초래할 수 있는 NGAL의 낮은 농도를 배제하기 시작하는 컷오프 값을 넘어야 한다(식별번호 [18]).

하나의 실시 상태로 본 발명의 방법은 진단할 개체의 소변 시료, 종기로는 원심 분리하여 호중구를 제거한 소변 시료 중의 인간 NGAL의 농도를 측정하는 단계 및 이렇게 측정된 농도를 외관상 건강하거나 염증 증상, 박테리아 감염 또는 암을 포함하는 기타 질환이 있을 수는 있으나 신장 질환은 없는 사람에게서 발견되는 소변 농도를 초과하도록 결정된 컷오프 값을 선택하여 이와 비교하는 단계를 포함한다. 측정된 NGAL 농도가 컷오프 값을 넘는다면, 이는 그 사람은 신장이 손상되어 있고 ARN, ATN 또는 ATIN으로 발전하였거나 발전할 수 있다는 것을 의미한다. 컷오프 값 아래의 소변 NGAL 수치는 건강한 개체 또는 염증, 감염 또는 암 증상이 있는 개체에게서 발견될 수 있기 때문에, 수용 가능한 정도의 특이성으로는 신장 손상을 진단할 수 없는 컷오프 값은 250ng/ml 이상, 250ng/ml ~ 525ng/ml 범위의 값으로, 예를 들어 275ng/ml, 300ng/ml, 325ng/ml, 350ng/ml, 375ng/ml, 400ng/ml, 425ng/ml, 450ng/ml, 475ng/ml 또는 500ng/ml가 좋다. 또 다른 실시 형태로서, 사용된 컷오프 값은 1 μ g/ml 이상이다. 종기로는, 소변 컷오프 값의 양의 예측치는 80% 이상, 예컨대 85% 이상, 예를 들면 90% 이상이다. 대신에 또는 추가로, 소변 컷오프 값의 음의 예측치는 종기로는 80% 이상, 예컨대 85% 이상, 예를 들면 90% 이상이다(식별번호 [19], [20]).

또 하나의 실시 상태로서, 본 발명은 진단할 개체의 혈장 또는 혈청 시료 중의 인간 NGAL의 농도를 측정하는 단계, 및 이렇게 측정된 농도를 외관상 건강하거나 염증 증상,

박테리아 감염 또는 암을 포함하는 기타 질환이 있을 수는 있으나 신장 질환은 없는 사람에게서 발견되는 혈장 또는 혈청 농도를 초과하도록 결정된 컷오프 값을 선택하여 이와 비교하는 단계를 포함한다. 측정된 NGAL 농도가 컷오프 값을 넘는다면, 이는 그 사람은 신장이 손상되어 있고 ARN, ATN 또는 ATIN으로 발전하였거나 발전할 수 있다는 것을 지시하는 것이다. 혈장 또는 혈청 중 NGAL 농도의 컷오프 값은 신장에서의 컷오프 값과 유사하여, 250ng/ml 이상, 예를 들면 300ng/ml 이상 또는 250ng/ml ~ 525ng/ml 의 범위의 값으로, 275ng/ml, 300ng/ml, 325ng/ml, 350ng/ml, 375ng/ml, 400ng/ml, 425ng/ml, 450ng/ml, 475ng/ml 또는 500ng/ml가 좋다. 좋기로는, 혈장의 컷오프 값의 양의 예측치는 80% 이상, 예컨대 85% 이상, 예를 들면 90% 이상이다. 대신에 또는 추가로, 선택된 혈장 컷오프 값의 음의 예측치는 좋기로는 80% 이상, 예컨대 85% 이상, 예를 들면 90% 이상이다(식별번호 [21], [22]).

본 발명의 또 다른 면에서, 상기 방법은 투석을 요하는 일이 매우 드물고 통상적으로 소변 NGAL 수치 상승이 더 낮은 덜 심각한 신장 손상과, 어떤 형태로든 투석을 필요로 하기 쉽고 통상적으로 소변 NGAL 수치를 매우 높이는 심각한 신장 손상을 구별하는데 이용될 수 있다. 따라서, 그 컷오프 값 아래에서의 소변 NGAL 수치는 투석의 필요성이 예견되지 않고 더 경미한 신장 손상으로 진단되는 것인 제2의 더 높은 컷오프 값은 1000ng/ml ~ 3000ng/ml 범위의 수치, 예컨대 1250ng/ml, 1500ng/ml, 1750ng/ml, 2000ng/ml, 2250ng/ml, 2500ng/ml 또는 2750ng/ml인 것이 좋다. 좋기로는, 더 높은 컷오프 값의 양의 예측치는 80% 이상, 예컨대 85% 이상, 예를 들면 90% 이상이다. 대신에 또는 추가로, 더 높은 컷오프 값의 음의 예측치는 70% 이상인 것이 좋다(식별번호 [23], [24]).

본 발명의 또 다른 면에서, 상기 방법은 체액에서의 NGAL 수치의 상승과 관련되거나 관련이 없는 또 다른 질환을 관찰 및/또는 치료 중인 환자에 있어서 신장 질환의 발병을 발견하는 데 이용될 수 있는데, 여기서 신장 질환은 합병증을 일으킬 수 있다. ... 본 발명의 또 다른 면에서, 상기 방법은 이들의 자연적 전개 및 치료 조치에 응하여 NGAL 수치 증가를 일으키는 신장 질환의 진행을 관찰하는데 이용될 수 있다(식별번호 [25], [26]).

소변 시료와 같은 체액 시료 중의 인간 NGAL은 분석적인 특이성, 민감성 및 정밀성이

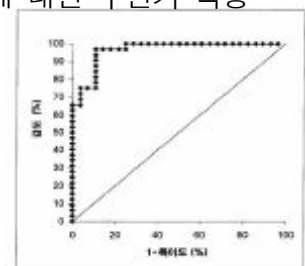
만족할만한 방법으로 측정될 수 있다. 양호한 방법은 인간 NGAL에 특이적으로 결합하는 1개 이상의 분자를 이용하는 결합 분석법이다. 이러한 결합 분자로는 NGAL에 대한 다(多)클론성(性) 또는 모노클로날 항체 또는 다른 수단에 의하여 생성되는 NGAL 특이 결합 분자를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 양호한 방법으로서, 재조합 인간 NGAL에 대항하여 생성된 모노클로날 항체가 이용된다. 하나의 항체는 소변 시료와 같은 시료로부터 NGAL을 포획하기 위하여 고체 지지부에 결합하는 한편, 다른 하나는 염료 복합체와 같은 표지나 비오틴 또는 당해 기술 분야의 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의하여 탐지될 수 있는 효소에 결합한다. 고체 지지부로는 예를 들어 효소 면역 측정법(ELISA)에 의한 폴리스티렌 또는 폴리비닐 클로라이드 표면, 또는 라텍스(폴리스티렌) 입자, 또는 압축 폴리에틸렌 입자로 구성된 여과 프리트, 또는 다공성 니트로셀룰로오스 매트릭스, 또는 면역 분석에 있어 이용되는 적절한 지지부를 들 수 있다(식별번호 [27], [28]).

실시에

실시에 6: 신장 질환에 있어서의 무작위로 선택된 중환자실 중의 성인 환자들의 소변 및 혈장 NGAL 측정의 진단학적 능력(식별번호 [65]~[73])

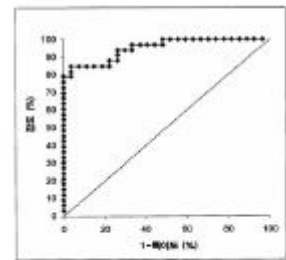
중환자실 중의 109명의 연속된 환자로부터 매일 아침에 채취한 소변 및 혈장 시료에서 NGAL을 측정하였다. 퇴원 요약지와 정례적인 혈액 검사 결과에 기초하여, 입원 기간 동안 신장 질환이 있었는지 없었는지에 따라 이들 환자들 중 60명을 분류(NGAL 자료에 따라 맹목적으로)하는 것이 가능하였다. 자료가 불충분하여 남아 있는 49명의 환자를 충분히 확실하게 분류할 수 없었기 때문에, 이들은 분석에서 배제하였다. 60명의 임상적으로 분류가능한 환자들로부터 채취한 소변 및 혈장 중의 NGAL 최대 농도를 표 2에 제시한다. 그리고 나서, 각각 분류된 환자로부터 채취한 소변 및 혈장 중에 도달된 NGAL 최대 농도의 신장 질환에 있어서의 진단학적 능력을 소변 및 혈장 값에 대한 수신기 작동 특성(ROC) 곡선을 작도하여 측정하였다. 매일 소변 및 혈장 NGAL 값의 시간 경과도 또한 각 환자에 대하여 작도하고 혈장 크레아티닌 값 등의 실험실 자료와 비교하였다.

도 1은 신장 질환의 진단에 대하여 최대 농도 소변 NGAL 값에 대한 ROC 곡선을 나타낸다. 곡선 아래 영역은 0.930이고, 그 값



도 1

아래에서는 소변 NGAL의 농도가 신장 질환을 진단하는 것이 아닌 것인 컷오프 값은 370ng/ml와 329ng/ml 사이에서 결정되었다. 이 범위 내의 컷오프 값에서 진단 감도는 96.9%이었고, 진단 특이도는 89.3%이었다. 긍정적인 예상치는 91.2%이고, 부정적인 예상치는 96.2%이었다.



도 2

도 2는 신장 질환의 진단에 대하여 혈장 NGAL 최대치에 대한 ROC 곡선을 나타낸다. 곡선 아래 영역은 0.914이고, 그 값 아래에서는 혈장 NGAL 농도가 신장 질환을 진단하는 것이 아닌 것인 컷오프 값은 436ng/ml와 355ng/ml 사이에서 결정되었다. 이 범위 내의 컷오프 값에서 진단 감도는 84.8%이었고, 진단 특이도는 96.3%이었다. 긍정적인 예상치는 93.1%이고, 부정적인 예상치는 83.9%이었다.

투석 필요의 진단

신장 질환이 있는 환자들을 관찰된 최대 농도 소변 NGAL 값에 따라 2개 군으로 나누었다. 제1군(환자 11명)은 소변 NGAL 값이 1337ng/ml 이하인 것이 특징이고 다른 임상학적 및 증세원적 자료에 의하여 판단할 때 신장 질환의 정도가 경미한 환자들을 포함하고 있었다. 이 군에서 3명의 환자들 어떤 형태로든 혈액 투석을 받았다. 제2군 (환자 21명)은 소변 NGAL 값이 2672ng/ml 이상인 것이 특징이고 임상학적으로 ATN 또는 ATIN이 있는 것으로 진단된 17명의 환자들을 포함하였다. 이 군에서 20명이 어떤 형태로든 혈액 투석을 필요로 하였다. 그러므로 그 값 아래에서는 소변 NGAL의 농도가 투석의 필요를 예측하는 것은 아니지만, 정도가 경미한 신장 질환의 진단일 수 있는 컷오프 값은 1338과 2672ng/ml 사이이다.

도 3은 투석을 요하는 신장 질환의 진단에 대하여 최대 농도 소변 NGAL 값에 대한 ROC곡선을 나타낸다. 곡선 아래 영역은 0.807이고, 그 값 아래에서는 소변 NGAL 농도가 투석의 필요를 진단하는 것이 아닌 것인 컷오프 값은 1338ng/ml와 2672ng/ml의 사이에서 확인되었다. 이 범위 내의 컷오프 값에서 진단 감도는 87.0%이고, 진단 특이도는 88.9%이었다. 양의 예상치는 95.2%이고, 음의 예상치는 72.7%이었다.