

정설

폐질환 치료제의 효율적인 신약개발을 위한 생체표지자 및 대리결과 변수

서정원 · 이병요 · 채정우 · 손추영 · 강원구* · 채한정** · 권광일#
충남대학교 약학대학, *대구카톨릭 대학교 약학대학, **전북대학교 의과대학
(Received December 24, 2009; Accepted December 27, 2009)

Biomarkers and Surrogate Endpoints for Development of New Drug on Pulmonary Disease

Jeong-Won Seo, Byung-Yo Lee, Jung-Woo Chae, Chu-Young Son, Wonku Kang*,
Han-Jung Chae** and Kwang-il Kwon#

College of Pharmacy, Chungnam University, Daejeon 305-764, Korea

*College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Korea

**Departments of pharmacology, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, 560-182, Korea

Abstract — Biomarkers are likely to be important in the study of various pulmonary diseases for many reasons. Research efforts in developing biomarkers and surrogate endpoints of lung diseases have resulted in the identification of new risk factors and novel drug targets, as well as the establishment of treatment guidelines. Government agencies, academic research institutions, diagnostic industries, and pharmaceutical companies all recognize the importance of biomarkers in new drug development and advancing therapies to improve public health. In drug development, biomarkers are used to evaluate early signals of efficacy and safety, to select dose, and to identify the target population. Identification of suitable end points not only would help investigators design appropriate clinical trials but would assist clinicians in caring for this patient population. Though the area of pulmonology has received much attention in the past decades, it still lags behind with regard to the development of biomarkers, particularly those of health effects and susceptibility. This review critically summarized several biomarker researches such as Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE) study with objectives of identifying the parameters that predict disease progression of COPD, as well as biomarkers that may serve as surrogate end-points.

Keywords □ pulmonary disease, biomarker, surrogate endpoint, critical path

노년층에서 병원을 찾는 가장 흔한 이유 중 하나는 급성 호흡기 증상이며 이와 더불어 만성호흡기 질환이 노년층에서 신체기능의 저하, 입원 및 사망률 증가에 중요한 역할을 한다. 국내의 경우 60세 이상의 사망자 사인 중 사망률이 최고인 폐암을 제외하고도 만성 호흡기계 질환이 5위를 차지하고 있어 노인의 호흡기계질환에 대한 특성의 이해 및 관리가 향후 의료영역에서 중요한 위치를 차지하리라는 것은 쉽게 예측할 수 있으며, 이상기온, 기후변화, 흡연 등으로 인하여 폐렴과 만성폐쇄성폐질환 등의 폐질환 환자가 지속적으로 증가하고 있다는 보도자료도 있다. 통계청에 따르면 2009년 4월을 기준으로 호흡기계통 질환으로

인한 사망자수는 최근 5년간 7만여 명에 이르며, 특히 0~4세 영유아는 매년 80여명 정도가 호흡기계통 질환으로 사망했다. 65세 이상 노인의 경우 최근 5년간 6만 3천여 명이 사망한 가운데 이는 전체 호흡기질환으로 인한 사망자 중 87.5%를 차지하는 것으로 파악되었다. 이처럼 호흡기 질환이 인구 전체의 사망률에 있어 중요한 위치를 차지하고 있으며, 다양한 폐질환의 진단과 질병진행에 따른 적절한 치료방법 선택 및 기존의 또는 새로운 치료적 간섭 행위의 총체적 영향력 평가를 위하여 이를 정량적으로 평가할 수 있는 생체표지자 및 대리결과변수의 개발이 필요하다.

기존의 치료제 및 치료적 간섭행위에 대한 영향력 평가와 함께, 새로운 신약 개발 단계에서 신약 후보물질의 질병에 대한 영향력 평가 방법을 확립하기 위하여 국가적 또는 기업적 차원에서 다양한 질병에 대한 생체표지자의 개발이 활발하게 이루어지

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-7310 (팩스) 042-823-6781
(E-mail) kwon@cnu.ac.kr

고 있다. 최근 신약개발 추세는 적어도 10,000개 이상의 후보 물질 중 검색을 통해 하나의 신약으로 승인 받기 위해 최소 15년 이상의 긴 시간이 필요하며, 개발 비용 역시 10억 달러에 달하는 천문학적으로 많은 비용이 소요된다. 이처럼 많은 비용으로 전임상 시험을 진행하지만 FDA의 IND(investigational new drug) 승인에 통과되는 약물은 후보 물질 중 10%에 불과하다.¹⁾ 매년 신약개발을 위해 투자하는 비용은 증가하는 반면 신약의 허가는 감소 또는 정체하는 추세를 보이고 있으며, 임상시험 진행을 위해 연구목적으로 허가 받은 IND 약물의 경우, 50% 이상이 임상 3상에서 시험에 실패하여 드롭 아웃(drop out)되는 실정이다. 이러한 현상은 신약 개발 사업이 저효율, 고비용 산업이라는 평가를 받는 데 결정적인 역할을 하고 있다.²⁾ 그리하여 전 세계의 제약회사는 신약개발을 위한 R&D 생산성 제고의 필요성을 절실히 느끼고 있으며, 이러한 필요성에 따라 제약회사는 biomarker의 개발 및 선정에 많은 노력을 기울이고 있다. 또 미국 FDA에서도 critical path라는 개념을 도입하여 근거에 기반한 보다 과학적이고 효율적이며 생산적인 신약의 평가방법 개발에 주력하고 있으며, 2006년 'Critical Path-Opportunities Report'에서 신약개발기간 단축을 위한 주요 전략으로 바이오마커 개발을 제시한 후 투자를 확대하고 있다.¹⁾ FDA와 NIH는 암환자의 혈액 샘플에서 바이오마커를 탐색하는 공동연구를 진행하고 있고, NIH는 'medical research roadmap'의 발표와 함께 기초과학 및 임상의학 양방향에서 바이오마커 분야 연구에 적극 나서고 있다. 이처럼 바이오마커 개발은 세계적인 추세로 특히 발리테이션(validation)이 용이한 생체표지자의 개발은 효과적인 신약개발에 중추적인 역할을 할 수 있다.

미국 NIH의 후원 하에 있는 Biomarkers Definitions Working Groups(BDWG)은 생체표지자(biomarker)를 정상적인 생리과정, 병태생리과정 또는 치료적 간섭(medical intervention)에 대하여 임상결과변수를 대체할 수 있는 가능성이 있는 약리학적 반응의 지표로 정의하며, 이 바이오마커는 객관적으로 측정되고 평가될 수 있는 특성을 가지고 있다. 바이오마커는 환자의 질병상태 및 비정상적인 생리상태를 진단하는 데 사용할 수 있으며 질병의 단계를 분류하거나 예후의 표식자로 사용할 수 있고, 임상적인 변화의 예측 및 모니터링에 적용할 수 있다. 또 적합한 생체표지자의 개발 및 선정은 제약회사의 R&D 기간 중 모험 최적화에 있어서 구조-활성 상관관계나 독성 예측을 용이하게 하며, 임상시험에서 약물 반응을 미리 파악함으로써 피험자 수를 줄이고 조기에 보다 정확한 가설을 검증하고 용량 설정 연구를 가능하게 하는 등의 장점을 제공할 수 있다.³⁾ 2005년에는 15%의 의약품 연구개발에 바이오마커가 관여한 것으로 조사되었으며, 2010년까지 65%로 늘어날 것으로 예상된다. 현재 바이오마커 시장은 초기 성장단계로 임상개발을 위한 바이오마커 발굴 및 검증에 대한 투자는 2009년까지 지속적으로 필요하며 초기에는 오히려 바

이오마커가 기존의 임상개발 과정을 보다 복잡하게 하여 그 기간과 비용이 다소 증가하는 경향을 보이지만 그 이후 정립된 바이오마커 발굴기술 플랫폼과 검증되고 강력한 바이오마커에 의해서 임상 개발 비용 및 기간 감소 등으로 그 효율이 현저하게 증가할 것으로 기대되며, 2010~2015년 사이에는 중앙에, 2015년 이후에는 뇌 신경질환 관련 의약품 및 진단제 개발에 가장 많이 응용될 것으로 기대된다.⁴⁾ 대리결과변수(surrogate endpoint)는 역학적, 치료학적, 병태생리학적 또는 과학적인 근거에 의하여 임상적인 이로운 또는 해로움을 예측할 수 있을 만한 생체표지자로 임상결과변수를 대체하여 쓰일 수 있는 생화학적 표지자로 정의할 수 있으며, 임상시험에서 efficacy와 toxicity에 대한 정보를 제공할 수 있고, 이러한 정보를 바탕으로 하여 환자군에 대한 임상적 호전 또는 악화에 대한 평가를 할 수 있다.³⁾

또 맞춤형요법을 앞당기기 위해서는 임상치료적으로 일괄적으로 적용하던 지표보다는 개별 환자의 질병 상황과 유전적 특성을 반영한 지표로서 생체표지자를 활용하는 것이 매우 유용하며, 약물요법의 최적화를 위해 질병상태와 연계되어 약물반응의 개인차를 반영할 수 있는 평가인자의 연구와 응용이 필요하다. 그러나 현재까지 밝혀진 생체표지자 중 대리결과변수로 인정받고 있는 생체표지자는 약 30여 종으로 극소수이며, 앞으로 연구가 계속적으로 이루어져 대리결과변수로 인정받을 수 있는 생체표지자가 많이 개발되어야 한다.

많은 연구결과들과 임상시험들에서 다양한 폐질환과 생체표지자 발굴에 주목하고 있지만 임상결과변수를 대리할 수 있는 폐질환의 바이오마커는 극소수로, FDA는 Forced expiratory volume in one second(FEV₁)을 COPD의 mortality에 대한 surrogate endpoint로 인정하고 있으며, cystic fibrosis lung disease에서 HRCT가 outcome surrogate가 될 수 있다고 알려져 있다.⁵⁾ 그러나 COPD와 lung fibrosis를 제외한 다른 폐질환에 대해서는 대리결과변수가 아직까지 제시되고 있지 않으며, 또 이미 알려진 COPD의 대리결과변수인 FEV₁의 경우, 질환의 단편적인 양상만을 반영하며, 질병의 진행, 특히 초기단계에서 질병 진행을 예측할 수 없다는 한계가 있다. 또 서로 다른 병을 가지고 있거나 질병 진행이 서로 다른 환자에서도 유사한 FEV₁ 값을 가질 수 있으며, 이 때문에 단순히 spirometry를 이용한 진단은 COPD의 characterization에 불충분하고 부족하며 COPD의 특성을 더 잘 이해하기 위해서는 새로운 biomarker의 개발이 필요하다.⁶⁾

본 논문에서는 위에서 언급한 생체표지자와 대리결과변수의 개념을 대표적인 폐질환에 적용하여 현재까지 발견된 폐질환의 생체표지자와 대리결과변수에 대하여 정리하고, 현재까지 연구, 개발 상황을 평가하고자 한다. 또 생체표지자와 대리결과변수가 다양한 폐질환의 진단과 질병진행에 따른 적절한 치료방법 선택 및 치료적 간섭 행위의 총체적 영향력 평가를 위하여 사용될 수

있도록 하고, 앞으로 폐질환 치료제 개발의 연구방향을 설정하는 데 도움이 되고자 하며, 나아가 폐질환의 생체표지자 및 대리결과변수의 연구, 개발이 더 진행되어야 함을 인지시키고자 한다.

Biomarker 의 발굴

생체표지자(Biomarker)와 대리결과변수(surrogate endpoint)의 발굴 및 연구의 의의

Biomarkers Definition Working Group(BDWD)에서는 생체표지자와 대리결과변수의 총체적인 영향력 평가(global intervention assessment)를 위한 개념적인 모델을 제시함으로써 생체표지자 및 대리결과변수를 통한 임상시험 시 고려해야 할 사항에 대한 정보를 주고 있다(Fig. 1).³⁾ Fig. 1에 의하면 임상결과변수와 역학적, 병태생리학적, 치료학적으로 연관성을 가진 생체표지자는 임상시험에서 효능(efficacy)과 독성(toxicity)에 대한 정보를 제공할 수 있고, 이러한 정보를 바탕으로 하여 환자군에 대한 임상적 호전 또는 악화에 대한 평가를 할 수 있다. 이렇게 얻은 데이터를 바탕으로 하여 총체적인 영향력 평가를 할 수 있다.³⁾

FDA 및 선진국의 최근 신약개발의 critical path와 model-based drug development

Critical path – 매년 신약개발을 위한 투자비용은 증가하는 반면 신약의 허가는 감소 또는 정체하는 추세로, 2000년을 전후로 이러한 현상은 더욱 가속화되었으며 신약물 후보군 발굴단계

에 비하여 신약개발의 속도를 결정하는 단계인 전임상 및 임상시험을 위한 비용 및 기간은 더욱더 늘어나고 있다. 그러므로 FDA는 신약개발 방법의 효율성 향상을 위해 기존의 경험에 의존한 신약개발 방식을 탈피하여 근거에 기반한 과학적이고 효율적인 신약의 개발(model-based drug development)을 위한 모든 방법 및 도구를 **critical path**라 명명하고 이에 대한 정보를 제공하고 있다. ‘생체표지자 및 질병 모델의 개발을 통한 진보된 유효성, 안전성 평가 기술의 개발 및 적용’을 위한 **critical path**의 도구로써 biomarker, PK/PD modeling 및 임상시험 설계 등이 명시되어 있다.⁷⁾

Model-based drug development – 앞으로의 신약개발 과정에서 효율성 확보를 위해서는 성공적인 임상시험 수행 및 각 개발 단계에서의 시험 성공률 예측력 확보가 반드시 필요하며, 이를 위해서 기존의 신약개발 방식과는 다른 새로운 관점의 신약개발 접근이 필요하다. 이러한 새로운 관점의 신약개발과정 중 중요한 부분이 모델 기반학적 신약개발(model-based drug development)이다. 모델 기반학적 신약개발은 전임상 및 임상시험 수행을 위해 수학적인 모델을 설정하고 설정된 모델을 바탕으로 시뮬레이션을 통해 예측력을 확보함으로써 신약개발의 결정과정을 보다 객관적으로 만들어준다. Fig. 2는 모델기반학적 신약개발의 연구흐름도로서 기존의 신약 개발 방식과는 다르게 설정된 모델을 적극적으로 활용하여 예측력 확보 및 시험디자인의 개발, 시험 결과의 해석 등에 사용하고, 얻어진 결과를 사용하여 보다 견고한 모델을 확보함으로써 재임상시험 또는 다른 임

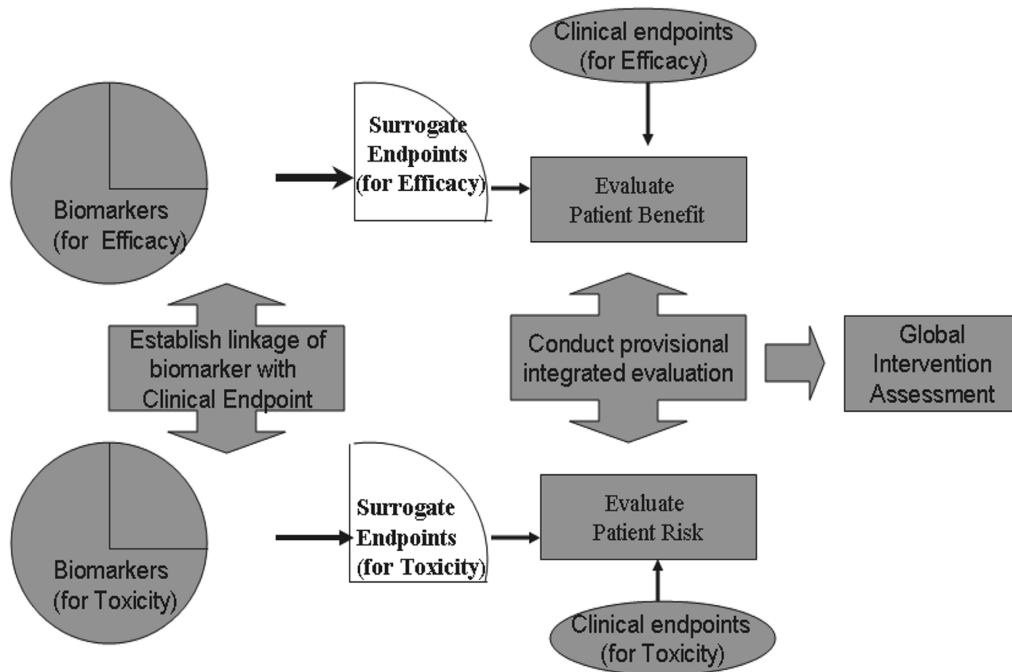


Fig. 1 – Relationship of biomarkers and surrogate endpoints and conceptual model for therapeutic intervention (BDWG).³⁾

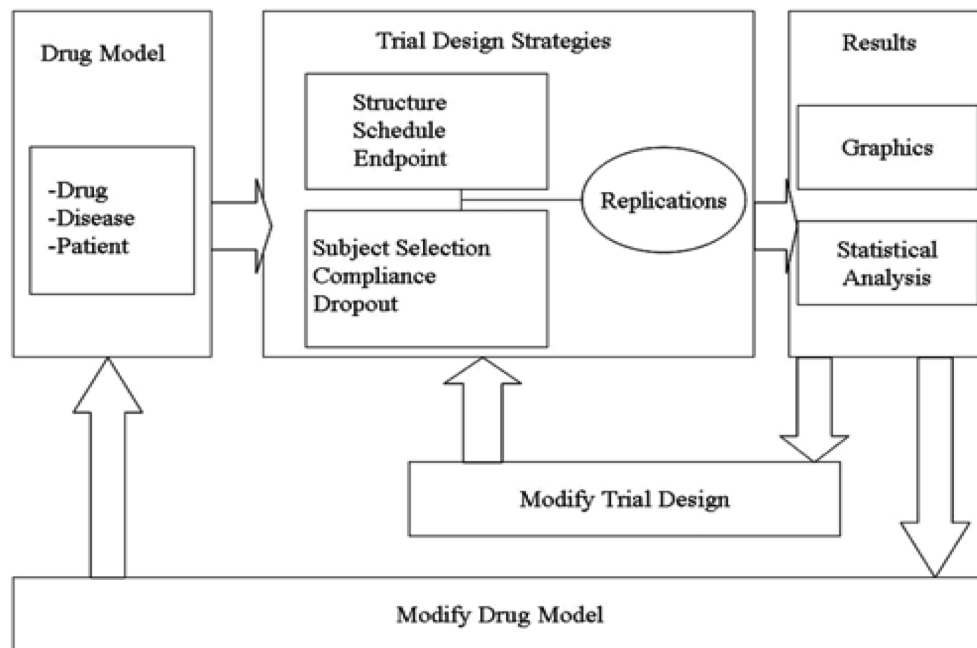


Fig. 2 – Research sequence model-based drug development.⁸⁾

상시험에 보다 많은 사전 정보를 제공할 수 있다.⁸⁾

Biomarker 및 surrogate endpoint의 적절한 사용 및 modeling과 simulation 기술 사용을 통해 얻을 수 있는 효과

2002년 미국 제약협회(PhRMA) 회원사의 R&D 비용은 321억 달러였으며, 2008년까지 매년 8%씩 비용이 증가한다고 발표하였다. 그리고 2004년도 신약개발 프로젝트 중 10%가 생체표지자에 의하여 영향을 받을 것으로 예측하였고, 2008년에는 50%로 예측하였다. 비용 면에서는 생체표지자로 인해 2004년 15%가 비용을 절감할 수 있으며, 2008년에는 45%까지 비용절감에 도움을 받을 것으로 예상하였다. 이러한 계산으로 예측할 경우 생체표지자의 적극적인 활용을 통해 비용을 23%(321억 달러 기준으로 하여 115억 달러 절감) 이상 절감하는 경제적 효과를 얻을 수 있다.⁹⁾ 위와 같은 경제적 측면 뿐 아니라 임상 가설의 조기 검증과 조기에 임상용량 범위 설정이 가능하도록 함으로써 제 1상 및 제 2상 임상시험에서의 안전성 및 유효성을 과학적으로 확보할 수 있는 등 시험 기술적인 측면에서 긍정적인 영향을 줄 수 있으며 환자의 반응성을 정밀하게 예측할 수 있어 피험자 수를 줄일 수 있는 효과가 있어 임상시험에서 가장 큰 문제로 인식되고 있는 피험자 윤리에 대한 문제를 부분적으로 극복함으로써 임상시험의 활성화를 도모할 수 있다.¹⁰⁾

생체표지자 및 대리결과변수의 validation

Surrogate endpoint validity – 임상시험에 일반적으로 사용되기 위해서는 대리결과변수에 사용하기 위한 생체표지자의 테

이터의 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 확보하여야 한다. 또 대리결과변수로 인정받기 위해서는 데이터의 정확성과 정밀성 뿐 아니라 대리결과변수와 임상결과변수 사이에 나타나는 현상이 비슷한 정도를 의미하는 face validity와 임상결과에 영향을 줄 수 있는 변수들의 안정적인 상태에서와 임상적 치료(intervention)에 따른 변화도 간의 상관성 정도를 의미하는 criterion validity, 대리 결과변수와 임상적 결과 사이에 메커니즘적인 공통점을 가지고 있어야 한다는 construct validity를 가지고 있는 지 평가하는 validation이 필요하다.¹¹⁾

Fit-for-purpose validation – 연구 또는 실험 목적에 적합한 생체표지자를 선정하기 위해 정성 및 정량법을 표준화하고 평가하는 과정을 Fit-for-purpose validation이라고 한다(Fig. 3).¹²⁻¹⁵⁾ Fig. 3에서 exploratory method validation은 빠른 시간에 생체표지자를 검색하기 위해 실험목적에 적합한 최소한의 기준에 근거한 validation을 의미한다. Advanced method validation은 추후 약물 개발과정에서 결정적인 개발방향을 제시하기 위한 validation 방법으로 exploratory method validation에 비하여 엄격한 기준에 근거하여 평가하는 방법이다.

Fit-for-purpose validation 확보를 위한 구성요소에는 표준액 및 시약에 대한 validation(안정성 및 시약 교체에 따른 효과 등), 생체표지자 분석을 위한 target range에서의 validation, sensitivity, 검량선 fitting 방법(linear, non-linear method 등), 희석 효과의 측정, 분석법의 정확성 및 정밀성 확보, 분석법의 robustness와 reproducibility, 샘플의 조작법과 채취과정 및 방법, 저장법에 대한 validation, 전 과정의 문서화 과정 등이 포함된다.

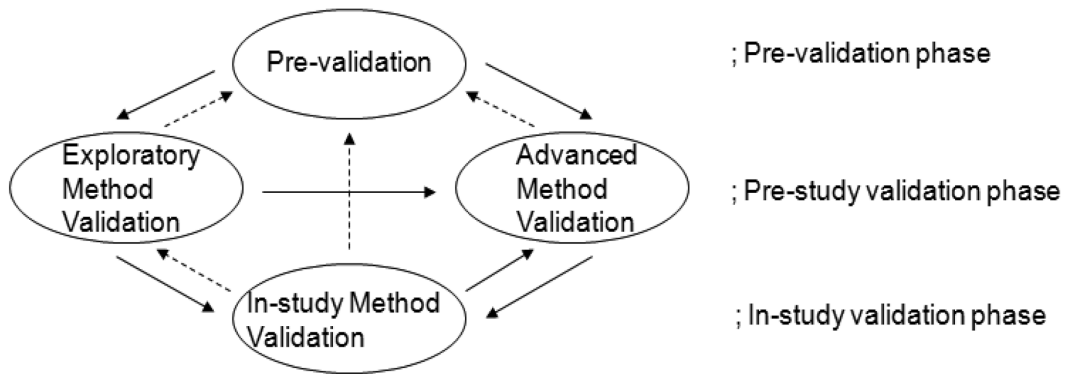


Fig. 3 – Research sequence of fit-for-purpose validation.¹²⁾

Fit-for-purpose qualification은 임상적으로 가치 있는 생체표지자 개발을 위하여 생체표지자, 대리결과변수, 임상결과변수 간의 연관성을 해석하는 과정으로 기존의 생체표지자의 단계를 분석법의 validation 정도와 임상결과변수와의 연관성 등을 고려하여 exploration, demonstration, characterization, surrogacy 단계로 세분화하여 설명할 수 있다.¹⁶⁾ Exploration 단계의 생체표지자는 연구 및 개발을 위한 biomarker로 in vitro/pre-clinical 시험에서 정보를 주지만 임상적인 연관성은 부족한 경우를 의미하며 가설의 생성 및 검증에 이용할 수 있고, gene expression이 이 단계에 해당한다고 할 수 있다. Demonstration 단계의 생체표지자는 preclinical study에 사용하기에 충분한 감도와 특이성을 가지고 있으며 임상과의 연계성이 관련되어 있으나 임상시험을 통한 재현성을 확보하지는 못한 biomarker로 일차적인 clinical evidence로 약물개발단계에서 decision-making의 수단으로 이용될 수 있다. Characterization 단계의 생체표지자는 충분한 preclinical 감도와 특이성, 임상과의 연계성이 관련되어 있고, 1회 이상의 임상시험을 통해 재현성이 확보된 생체표지자로 약물의 치료용량 및 부작용에 대한 관정과 예방효과 검토에 모두 적용이 가능한 단계의 biomarker이다. Surrogacy 단계의 biomarker는 얻어진 데이터를 통해 임상결과변수와 생체표지자 또는 대리결과변수 간의 관계를 규명하여 임상결과변수 대신 치환하여 사용할 수 있는 생체표지자로 신약의 허가단계에서 유용하게 이용될 수 있다.

Biomarker를 메커니즘적으로 분류하면 Table I과 같이 분류할

Table I – Classification of biomarkers¹⁸⁾

Type 0	Genotype or phenotype	Distal
Type 1	Concentration of drug and/or metabolite	↓
Type 2	Target occupancy	
Type 3	Target activation	
Type 4	Physiological measures or laboratory tests	
Type 5	Disease processes	
Type 6	Clinical scales	

수 있으며, validation이 확보될 수 있는 후보 surrogate marker의 경우 임상적인 상황에 더욱 근접할 수록(proximal) surrogacy를 인정받기 수월하며, 후보 surrogate marker로는 최대한 임상에 근접한 biomarker를 선정하여야 한다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 특정약물 및 특정 intervention에 의하여 영향을 받는 biomarker는 특정약물 및 intervention에 대한 validation을 확보할 수 있으며, 임상적으로 근접한 surrogate marker가 선정되더라도 선정된 surrogate marker는 그 약물 및 intervention에만 specificity가 인정된다. (surrogate endpoint specificity) 다시 말하면, 다른 약물 또는 intervention에 의한 biomarker의 변화가 surrogacy를 인정받기 위해서는 다시 validation 하여 specificity를 확보하여야 한다.

위에 언급된 선행적 문제 및 개념적 모델을 종합적으로 고려할 경우 해당 질환 및 해당 약물군에 대한 생화학적 표지자 및 대리결과변수 선정을 위한 연구방법은 Fig. 4와 같은 흐름도를

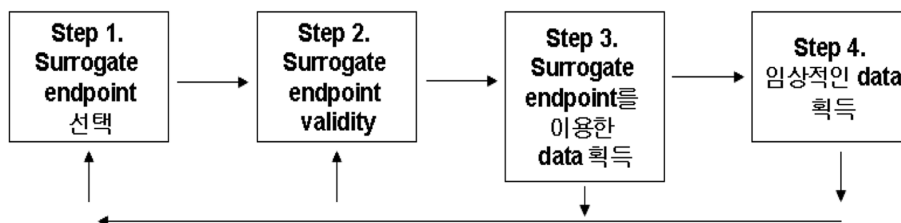


Fig. 4 – Research sequence of surrogate endpoint.¹⁹⁾

통해 진행되어야 한다.¹⁹⁾

폐질환의 surrogate endpoint 설정 및 clinical validation – 폐질환 약물의 경우 기전에 근거한 PK/PD model이 제시된 임상결과 변수와 연관성이 큰(proximal) 생체표지자는 아직 개발단계에 있다. 특히 FDA에서 surrogacy를 인정받은 바이오마커는 COPD의 대리결과변수로 임상결과변수와 가장 연관성이 큰 FEV₁이며, 질병진행과 직접 연관성이 적고 질병 진단 및 진행을 평가하는 데 있어 민감도가 낮아 다른 생체표지자 개발에 주력하고 있는 실정이다.

폐질환의 생체표지자(Biomarker) 개요

폐질환의 생체표지자로는 mRNA level에서와 protein level 및 임상평가단계에서 다양한 marker가 제시되고 있다. 또 폐질환의 특성상 호기증의 생체표지자도 다양하게 제시되고 있으며 기도와 폐의 염증의 평가 및 산화적 손상 기전은 asthma와 COPD 등의 질환에 있어 중요한 mechanism으로 염증에 대한 호기증 biomarker와 혈중 biomarker 연구가 활발하게 진행되고 있다.

폐질환의 임상결과변수 – 폐질환의 임상결과변수는 폐기능 측정(pulmonary function measurement), 흉부 방사선사진 스코어

(chest radiography score), 호흡곤란(respiratory distress), 기관지 과민반응(bronchial hyperresponsiveness)의 경감, 삶의 질(Quality of life) 개선, 질환 중증도 스코어(illness severity score)로 설명할 수 있다.

대표적인 폐질환의 biomarker – 대표적인 폐질환의 biomarker 들을 Table II에 정리하였다.

만성폐쇄성폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease: COPD) – 만성폐쇄성폐질환은 원인과 병리가 아직까지 잘 이해되지 않는 질환으로 forced expiratory volume in one second (FEV₁)이 진단과 질병 단계 평가에 사용된다.^{5,6)} 미국 FDA는 COPD의 mortality에 대한 surrogate endpoint로 FEV₁을 제시하고 있으나,⁵⁾ 이 생체표지자는 질환의 진단에 있어서 단편적인 특성만을 반영하며, 특히 초기단계에서 질병의 진행을 예측할 수 없는 한계점을 가지고 있다.⁶⁾ 또 서로 다른 병인을 가지고 있거나 질병의 진행이 서로 다른 환자에서도 유사한 FEV₁값을 보일 수 있으며, 이 때문에 단순히 spirometry를 이용해서는 이 질환의 특성을 잘 규명할 수 없다.⁶⁾ 이런 이유로 장기적인 COPD의 surrogate endpoint 설정을 위한 대규모 연구로 Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-

Table II – Biomarkers of various pulmonary diseases

Disease	Biomarker	Surrogate endpoint	References
For diagnosis	forced expiratory volume in on second (FEV ₁)	FEV ₁	5, 6
	imaging (chest CT)		6
Bronchial biopsy	Structural changes		20, 21
	Increased infiltration of macrophages		20, 22
	CD8+ T lymphocyte activation (interferon- γ , inducible protein-10, IL-9)		20, 22, 23, 24, 25, 26
	chemokine receptor(CXC chemokine receptor 3) expression		20, 27
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	Increased recruitment of eosinophil and neutrophil at exacerbation		20
	reduced CD4+ T cell		22
	increased neutrophilic and eosinophilic inflammation (IL-8, IL-6, TNF α , MPO, eotaxin-1, ECP)		22
	Increased numbers of neutrophil, lymphocyte, eosinophil		20
	Increased inflammatory proteins (TNF α , IL-8, MMP-9) in macrophage		20, 28, 29
Sputum biomarkers	Increased expressions of eosinophil cationic protein, myeloperoxidase, and IL-8 as inflammatory mediators		20
	Increased levels of tryptase and histamine		20, 30, 31
	Increased numbers of neutrophil and eosionophil		20, 22, 32, 33
	inflammatory mediator (IL-8, Gro α , LT-B4, NE, MCP-1, HNL)		22
	MMP-8, 9, 12		22
	TNF α		22
Exhaled gases	IL-8, IL-6		20, 22, 35, 36, 37
	Increased numbers of CD8+T cell		22, 34
	Decreased CD4+ T cell		22
	Exhaled nitric oxide (eNO)		20, 22, 38, 39
Exhaled gases	Exhaled carbon oxide (eCO)		20, 40
	hydrocarbons (ethane, pentane)		20, 41

Table II – Continued

Disease	Biomarker	Surrogate endpoint	References	
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	hydroxyl peroxide in EBC		20, 38, 42, 43, 44	
	8-isoprostane		20, 22, 38, 42, 45, 46, 47	
	Exhaled breath condensate (EBC)	aldehydes		20, 48
		malonaldehyde		20
		nitrite		20, 42
		nitrosothiol		20, 42, 49
		pH		20, 50, 51
		leukotriene B4		20, 22, 38, 42, 47, 52, 53
		prostaglandin E2		20, 22, 38, 42, 52, 54
	prostaglandin F2 α		38	
	IL-6		20, 22, 46	
	Blood biomarker	C-reactive protein (CRP)		6, 20, 55, 56, 57, 58, 59, 60
		fibrinogen		20, 55, 58
		leukocytes		20, 58
platelet			20	
TNF α			20, 58, 61, 62	
Interleukin-6			20, 55, 59, 60, 63	
Interleukin-8			20, 60	
myeloperoxidase		60		
Asthma	Sputum biomarkers	eosinophil	22, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71	
		eosinophil cationic protein	22, 70, 64, 65, 66, 71	
		eosinophil recruitment mediators (IL-5, eotaxin)	22, 73	
		neutrophil (MPO)	22, 72	
	BAL or biopsy	TNF α	22, 71	
		eotaxin	22, 74	
		monocyte-derived chemokine (MDC): CCL12	22, 27, 75, 76, 77	
		thymus- and activation-regulated chemokine (TARC): CCL17	22, 76, 77	
		IL-5, IL-3 as Th2 cytokine	22, 76, 77	
		neutrophil elastase (NE)	22, 78, 79	
		proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-5, IL-6, TNF α)	22, 78, 79	
	anti-inflammatory cytokine (IL-10, IL-1ra, sTNF and MCP-1, MIP-1 α , RANTES)	22, 78, 79		
	Exhaled breath biomarker	exhaled NO		22, 38, 80, 81, 82
		exhaled CO		38
Hydroxyl peroxide in EBC			38, 42	
Thromboxane B2 (TxB ₂)			38, 42	
Leukotrienes (LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , LTF ₄)			38, 42	
cysteinyl leukotrienes			86	
8-isoprostane			38, 42, 86	
pH			42	
S-nitrosothiol			42	
nitrite			42	
3-nitrosotyrosine		42		
Blood biomarker	eotaxin		22, 83	
	IL-4		22	
	IL-5		22	
	thymus- and activation-regulated chemokine (TARC): CCL17		22	
	monocyte-derived chemokine (MDC): CCL12		22, 84	
	Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4): CCL13		22, 85	
total serum IgE		22, 80		

Table II – Continued

Disease		Biomarker	Surrogate endpoint	References
Asthma	Diagnosis and management	exhaled NO		80, 87
		vascular endothelial growth factor (VEGF)		88
		angiogenin		88
		monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4)		85
		Toll-like-receptor genes		89
Pulmonary fibrosis	Diagnosis and management	forced expiratory volume in on second (FEV ₁)	FEV ₁	91
		exhaled NO		38
		high resolution computed tomography (HRCT)		92, 93
	Sputum biomarkers	neutrophil		90
		IL-8		90
		elastase		90
		MMP-9		90
	Exhaled breath condensate (EBC)	myeloperoxidase		90
		8-isoprostane		42
		leukotriene B ₄ (LTB ₄)		42
		S-nitrosothiol		42
		nitrite		42
Administration of IFN- γ	3-nitrosotyrosine		42	
	Type I procollagen		98	
	epithelial neutrophil-activating protein-78/CXCL5		98	
	platelet-derived growth factor A		98	
	platelet-derived growth factor B		98	
	IFN inducible T cell- α chemoattractant/CXCL11		98	
	Type III procollagen		98	
EMT biomarkers	elastin		98	
	N-cadherin		94, 95	
	β -catenin		94, 95	
	nuclear Snail		94, 95	
	Vimentin		94, 95	
	MMP-9		94, 95	
	integrin α V β 6		94, 95	
	Loss of E-cadherin		94, 95	
Pulmonary embolism	Diagnosis and management	transforming growth factor- β (TGF- β)		96, 97
		Cardiac troponin I and T		99, 100, 101, 102, 103
		serum myoglobin level		100
		brain natriuretic peptides (BNP), N-terminal pro BNP		99, 100, 101, 102, 103, 104, 105
		echocardiography		101, 103, 106
		systolic arterial pressure		103
	Administration of anti-coagulants	Electrocardiography		103
		sensitive D-dimer (degradation product of cross-linked fibrin)		102
		embolism volume measurement using MRI		107
		intravascular thrombos measurement using CT		103
		prothrombin fragment 1+2		108
		thrombin-antithrombin complexes		108
		thrombin-antithrombin D-dimer		108
Allergic rhinitis	Diagnosis and management	tryptase in nasal fluid		109
		vasoactive intestinal peptide		110
		substance P		110
		C-C chemokine receptor type 3 (CCR3)		111
		Toxocara seropositivity		112
		exhaled and nasal NO level		80, 113
		total serum IgE		80

Table II – Continued

Disease	Biomarker	Surrogate endpoint	References
bronchiectasis	Exhaled CO level		38
	Exhaled NO level		38
	Diagnosis and management	hydroxyl peroxide in EBC	38, 42
		LTB ₄ in EBC	42
		High resolution CT (HRCT)	114
	serum amyloid-A (SAA)		115
Lung cancer	Diagnosis	High resolution CT (HRCT)	116
	serological and prognostic	Dkkopf-1 gene	117
	phase II trial	progressive disease rate (response rate, RR)	118

points(ECLIPSE)가 3년 동안 진행되고 있으며, 이 연구의 목적은 1) 임상적으로 의미 있는 COPD의 subtype을 정의하고, 2) 이 subtype 내에서 질병의 진행을 예측할 수 있는 parameter를 증명하며, 3) subtype COPD와 관련되며, 질병의 진행을 예측할 수 있는 biomarker에 대한 시험을 실시하고 4) 임상적으로 유의한 COPD subtype과 둘 다 관련 있으며 질병 진행을 예측할 수 있는 새로운 genetic factor 및 biomarker를 발굴하는 것이다. ECLIPSE는 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease categories II-IV에 포함된 2,180명의 COPD 환자와 343명의 흡연자와 223명의 비흡연자로 구성된 대조군을 포함한 대규모 연구로 연구과정은 baseline과 3개월, 6개월 그리고 이후 매 6개월마다 폐기능 측정(spirometry, impulse oscillometry, plethysmography)과 흉부 CT 촬영, 혈중·객담·노출·exhaled breath condensate의 biomarker 측정, health outcome, body impedance, resting oxygen saturation, 그리고 6-min walking distance를 측정하도록 한다. 현재까지는 FEV₁의 감소가 gold standard로 되어있지만, COPD의 clinical subtype에 있어서 disease activity와 progression의 명확한 평가를 제공할 수 있을 만한 다른 biomarker들에 관한 연구도 이루어지고 있다. 또 FEV₁은 질병 진행에 따라 매우 오랜 시간이 지나야 변화하기 때문에 이보다 짧은 시간 내에 변할만한 biomarker를 탐색하고 있다. ECLIPSE 연구에서 end-point candidate로는 폐의 생리학적 변화(pulmonary function; FEV₁, FVC, FEV₁/FVC, FEV₆, SVC), imaging(chest computed tomography), 다양한 biomarker (CRP, TNF α , IL-6, Carla cell protein, IL-8, surfactant protein D, inflammatory cell contents, soluble markers, cellular expression of mRNA, exhaled breath condensate), health outcome(exacerbation assessment, ATS respiratory questionnaire, Depression questionnaire, Fatigue questionnaire, Health status and MRC dyspnoea assessment), genetic marker (DNA)를 포함한다.⁶⁾

COPD의 biomarker는 크게 6가지 정도로 구분할 수 있다.²⁰⁾

첫째로 bronchial biopsy로 구조변화^{20,21)}와 세포의 패턴, 염증단백질 발현을 관찰할 수 있으며 이러한 마커들은 항염증약물의 효과 평가에도 쓰일 수 있다. 조직에서의 macrophage의 침윤이 증가하고^{20,22)} CD8+ T-lymphocyte의 활성화로 interferon- γ , inducible protein-10, IL-9가 발현하며,^{20,22-26)} type 1 response에 연관된 chemokine receptor(CXC chemokine receptor 3)가 발현하고,^{20,27)} exacerbation이 있을 때는 eosinophil과 neutrophil의 recruitment가 증가한다.²⁰⁾ 두번째로 bronchoalveolar lavage (BAL)에서의 biomarker 측정은 말초에서 염증 관련한 marker들을 sampling 할 수 있다는 장점이 있으며, 흡연자에서 neutrophil이 증가하고, 과거 흡연자와 흡연자이면서 COPD 환자에서는 각각 lymphocyte, eosinophil이 증가한다.²⁰⁾ 또 COPD 환자의 macrophage에서 염증 protein(TNF α 와 IL-8, MMP-9)이 증가한다.^{20,28,29)} 염증 mediator로는 eosinophil cationic protein, myeloperoxidase, IL-8이 종종 증가하며,²⁰⁾ tryptase와 histamine level도 증가한다.^{20,30,31)} 세번째로 객담(Sputum)에서는 염증세포인 neutrophil이 증가하며 일부 환자에서는 eosinophil도 증가하는 경향을 보이고,^{20,22,32,33)} induced sputum에서는 CD8+ T-cell도 증가한다.^{22,34)} 또 염증매개물질인 IL-8도 증가하며^{20,22,35-37)} protease인 neutrophil elastase, MMP-8, MMP-9도 증가한다.²²⁾ 객담의 biomarker 측정은 특정 marker가 시료 처리과정에 의해 소실되거나 분해되어 민감도가 떨어질 수 있다는 단점이 있다. 넷째로 exhaled gas를 측정함으로써 COPD의 biomarker를 얻을 수 있는데, exhaled nitric oxide(eNO)는 천식에서 많이 연구되었으며,^{20,22,38,39)} eosinophilic airway inflammation과 관련성을 보인다고 한다. COPD에서의 측정은 덜 유용하며 exacerbation 때는 많이 상승하지만 이때를 제외하고는 약간만 상승할 뿐이다. 염증과 관련하여 산화적 손상기전에서 peroxynitrite와 nitrite가 형성되며 NO는 제거되므로 최근 eNO를 측정하는데 COPD 환자에서는 airway NO는 정상이거나 혹은 낮게 측정되는 데 비해 말초 기관지의 NO는 증가하며 이는 질병의 중증도와 관련이 있을 것으로 사료된다. Exhaled CO는 eNO보다는 덜 유용하며,

COPD에서도 증가하지만 담배를 피워도 증가한다.^{20,40} 호기증의 hydrocarbon 측정도 유용한데, ethane, pentane 등 oxidative stress의 결과로 생성되는 lipid peroxidation의 biomarker로 사용할 수 있다.^{20,41} 다섯번째로 Exhaled breath condensate(EBC)를 측정하는 방법이 있는데, 이는 oxidative/natrative stress를 측정하는 biomarker로 EBC 중의 hydroxyl peroxide^{20,38,42-44}와 질병의 중증도와도 연관성이 있는 8-isoprostane,^{20,22,38,42,45-47} aldehydes,^{20,48} malonaldehyde,²⁰ nitrite,^{20,42} nitrosothiol^{20,42,49} 등을 측정할 수 있으며 inflammatory mediator로 EBC의 pH,^{20,50,51} leukotriene B₄(LTB₄),^{20,22,38,42,47,52,53} prostaglandin E₂,^{20,22,38,42,52,54} prostaglandin F₂- α ,³⁸ IL-6^{20,22,46} 등의 biomarker가 포함되어 있다. 마지막으로 blood biomarker로 C-reactive protein(CRP),^{6,20,55-60} fibrinogen,^{20,55,57} leukocytes,^{20,58} platelet²⁰과 TNF α ,^{20,58,61,62} IL-6,^{20,55,59,60,63} IL-8^{20,60} 등 염증 매개 cytokine 등이 있다.

결론적으로 많은 pulmonary biomarker가 제시되고 있으나 재현성에 대한 의문점과 호흡장애(dyspnoea), 건강 관련 삶의 질(Health-related quality of life, HRQoL), 악화 빈도(exacerbation frequency), 사망률(mortality) 등 COPD의 outcome과의 상관성에 대한 정보는 많이 부족한 상태이다. 앞으로 normal smoker와 age-matched normal subject에 대한 연구와 disease stage와 FEV₁ 감소율과의 연관성, 폐기증(emphysema)과 그 외 clinical phenotype 연구, 현재 또는 과거 흡연과 clinical status(stable vs. exacerbation)과 질병과의 상관관계에 대한 연구 및 treatment에 따라 많은 연구 접근이 필요하다고 생각된다.²⁰

천식(Asthma) – 1989년 peak flow를 FEV₁의 surrogate measurement로 접근한 이후로 오랜 기간 동안 천식의 biomarker 연구는 활발하게 이루어져 왔다. Snell은 2008년 발표한 논문에서 천식의 바이오마커로 객담의 eosinophil,^{22,64-71} eosinophil cationic protein,^{22,64-66,70,71} neutrophil^{22,72}과 그로 인해 분비되는 MPO, TNF α ^{22,71} 등과 BAL 또는 생김을 통하여 eotaxin,^{22,74} type 2 response와 관련하여 C-C chemokine receptor(CCR4 chemokine receptor) ligand인 monocyte-derived chemokine(MDC),^{22,27,75-77} Thymus- and activation-regulated chemokine(TARC: CCL17),^{22,76,77} Th2 cytokine으로 IL-5와 IL-3,^{22,76,77} neutrophil elastase(NE),^{22,78,79} proinflammatory cytokine으로 IL-1 β , IL-5, IL-6, TNF α ^{22,78,79}와 anti-inflammatory cytokine인 IL-10, IL-1ra, sTNF 및 MCP-1, MIP-1 α , RANTES 등이 있으며,^{22,78,79} Exhaled breath biomarker로 exhaled NO,^{22,38,80-82} 혈중 biomarker로 eotaxin,^{22,83} IL-4,²² IL-5,²² CCR4 ligand TARC,^{22,84} MCP-4,^{22,85} IgE^{22,80} 등을 제시하였다. 그 외 exhaled breath biomarker로 exhaled CO,³⁸ EBC 중의 hydroxyl peroxidethromboxane B₂(TxB₂), leukotrienes(LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄, LTF₄),^{38,42} cysteinyl leukotrienes,⁸⁶ 8-isopro-

stane,^{38,86} pH,⁴² S-nitrosothiol,⁴² nitrite,⁴² 3-nitrosotyrosine⁴² 등이 있다. 또 천식의 진단과 관리에 있어 exhaled NO,^{80,87} 어린이 천식에서 갑작스런 발작으로부터 induced sputum의 biomarker로 vascular endothelial growth factor(VEGF)와 angiogenin,⁸⁸ 단핵구 키모탁틱 단백질(Monocyte chemotactic protein-4: MCP-4),⁸⁵ 천식 악화 어린이의 exhaled breath condensate(EBC)에서 cysteinyl leukotrienes, 8-isoprostane⁸⁶ 등이 천식의 biomarker로 제시되고 있다.

폐섬유화(Pulmonary fibrosis, cystic fibrosis lung disease) – Cystic fibrosis의 임상결과 변수로 질병의 상태를 평가는 폐기능 측정(pulmonary function measurement), 흉부 방사선촬영 스코어(chest radiograph score), 삶의 질 측정(Quality of Life measure), 질병 악화 정도(illness severity score) 평가로 이루어진다.⁹⁰ 이러한 clinical endpoint를 대리하여 평가할 수 있는 지표로서 US FDA에서 outcome surrogate로 인정받는 endpoint로는 FEV₁이 유일하며,⁹¹ 임상시험에서 폐질환을 monitoring하는 데 있어서 primary endpoint로 exhaled NO와³⁸ CT(computed tomography)가 biomarker로 제시되고 있다.^{92, 93} 기존에 질병 진단 및 약효 평가에 사용해오던 폐기능 측정법(Pulmonary function test)이 질병상태에 대한 underestimation하는 경향이 있으며, high resolution CT는 보다 새로운 치료방법에 더 예민한 결과 관찰방법으로, 초기의 CF lung disease의 예민한 표지자로서 어린이에서 bronchiectasis, peribronchial thickening, mosaic perfusion과 mucus plugging의 증거를 제시하고 있다.⁹³ 그 외에도 객담에서의 neutrophil, interleukin-8, elastase, MMP-9, myeloperoxidase 등이 biomarker로서 가능성이 제시되고 있다.⁹⁰ 또한 exhaled breath condensate(EBC)에서 8-isoprostane, leukotriene B₄(LTB₄), S-nitrosothiol, nitrite, 3-nitrosotyrosine 등이 pulmonary fibrosis의 biomarker로의 연구가 활발히 진행되고 있다.⁴²

Fibrosis와 관련된 mechanism으로 최근 EMT에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. EMT marker로 여러 biomarker들이 제시되고 있는데, 이들 중 cell-surface protein으로 N-cadherin, Cytoskeletal marker로 Vimentin, β -catenin, Transcription factor로 Snail, 그리고 MMP-9, Transforming growth factor- β (TGF- β), Fibronectin, P-Erk 등이 대표적으로 알려져 있다.⁹⁴⁻⁹⁷

이들 중 idiopathic pulmonary fibrosis의 biomarker로 interferon- γ 1b 투여 후 mRNA expression level에서 elastin, ITAC/CXCL11, PDGF-B, Type III procollagen의 변화가 관찰되며, protein level에서는 ENA-78/CXCL-5, PDGF-A, Type I collagen, IFN- γ level, BALF에서 ITAC/CXCL11 등이 제시되고 있어⁹⁸ EMT 기전과 fibrosis와의 연관성을 암시하고 있다.

폐색전(Pulmonary embolism) – 폐색전의 진단용 생체표지자에는 심근 트로포닌(Cardiac troponin I and T),⁹⁹⁻¹⁰³ 혈청 미

오글로빈 농도(serum myoglobin levels),¹⁰⁰ 뇌 나트륨이뇨 펩티드(brain natriuretic peptides),⁹⁹⁻¹⁰⁵ 심장초음파(echocardiography),^{101,103,106} sensitive D-dimer(degradation product of cross-linked fibrin),¹⁰² MRI를 통한 색전량 측정(embolism volume-MRI),¹⁰⁷ CT를 이용한 혈관내 혈전(intravascular thrombus-CT)¹⁰³ 등이 있으며, 항혈전제(anticoagulant agents) 투여 시 프로트롬빈(prothrombin fragments 1+2), 트롬빈-항트롬빈 복합체(thrombin-antithrombin complexes), 트롬빈-항트롬빈 D이성체(thrombin-antithrombin D-dimer) 등이 생체표지자로 쓰일 수 있다.¹⁰⁸

알레르기성 비염(Allergic rhinitis) - 진단용 바이오마커로 비액속 트립타아제(trypsin in nasal fluid),¹⁰⁹ 혈관활성 장관펩티드(vasoactive intestinal peptide)과 말초성 통증 전달물질(substance P),¹¹⁰ 케모카인 수용체-3(C-C chemokine receptor type 3),¹¹¹ 개회충 혈청반응 양성(Toxocara seropositivity),¹¹² 호기중 또는 코의 일산화질소 농도(exhaled and nasal NO level),^{80,113} total serum immunoglobulin E(IgE)⁸⁰ 등이 있다.

기관지 확장증 - 호기중이나 비강의 NO 농도 및 CO 농도,³⁸ EBC 중의 hydroxyl peroxide^{38,42}와 LTB₄,⁴² HRCT(high-resolution CT),¹¹⁴ SAA(serum amyloid-A)¹¹⁵ 등이 생체표지자로 사용된다.

폐암 Lung cancer - 폐암의 진단용 biomarker로는 HRCT가 대표적이며,¹¹⁶ 폐와 식도암의 새로운 serological & prognostic biomarker로 Dkkopf-1 gene이 알려져 있다.¹¹⁷ 또 항암제 개발의 phase II trial에서 progressive disease rate를 response rate(RR)과 함께 primary endpoint로 설정할 수 있다.¹¹⁸

결론

생체표지자와 대리결과 변수의 발굴은 신약개발과정에서 임상 시험에서 efficacy와 toxicity에 대한 정보를 제공하고, 이러한 정보를 바탕으로 개발된 model을 통하여 신약후보물질의 약효와 독성의 평가를 더욱 객관화함으로써 개발에 소요되는 경제적 비용 절감과 연구기간을 줄일 수 있다. 그리하여 선진국의 여러 제약회사에서는 이미 적극적으로 생체표지자와 대리결과변수 개발 및 이를 이용한 conceptual modeling 과정을 신약개발 연구에 도입하여 사용하고 있다. 또한 이러한 모델링을 바탕으로 하여 얻어진 정보를 적용하여 환자군에 대한 임상적 호전 및 악화에 대해 평가하고, 더 나아가 이 모델을 사용하여 개체간 또는 개체 내 변이를 예측하고 효과적인 약물 용량 및 투여 방법 결정에 응용할 수 있다. 그러나 biomarker와 대리결과변수에 대한 개념이 아직 명확하게 확립되지 않았으며, 많은 생체표지자가 약물의 효과 및 질병의 진행을 평가하는 데 있어서 유용한 정보를 제공한다는 과학적 근거들이 제시되고 있어 비록 몇몇 biomarker들이

임상시험에 활용되고 있다고 하더라도 실제 임상결과변수를 반영할 수 있는 대리결과변수에 대한 정보는 상대적으로 부족한 상태이다. 특히 당뇨 및 심혈관 질환 등의 일부 질환을 제외하고는 대리결과변수의 validation이 이루어지지 않아, 앞으로 기존에 개발된 생체표지자와 새로 발굴된 생체표지자에 대해 임상결과변수와의 상관성을 밝혀내는 clinical evaluation이 이루어지는 방향으로 연구가 필요하다. 근래 ECLIPSE 연구로 COPD의 surrogate endpoint 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있는 상태로 그 연구 결과가 매우 기대되며, 여기서 개발된 surrogate endpoint는 이후에 다른 호흡기질환이나 intervention에 의해 영향을 받을 수 있는 후보 biomarker로 나아가서 후보 surrogate marker로 큰 가능성을 가지게 될 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 2009년도 보건복지부의 보건의료연구개발 과제인 병원특성화 연구센터 사업(A084144)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

- 1) Woosley, R. L. and Cossman, J. : Drug development and the FDA's critical path initiative. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**(1), 129 (2007).
- 2) Revision of Committee : Challenge and Opportunity on the critical path to new medical product. FDA (2004).
- 3) Biomarkers Definition Working Group (BDWG) : Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**(3), 89 (2001).
- 4) 이철주 : 바이오마커 연구개발 동향 한국생화학분자생물학회 (KSMBB) *Webzine* 2008년 5월호 http://www.biochem.or.kr/sub/popup_letter.php?CatNo=642.
- 5) Twaddell, S. : Surrogate outcome markers in research and clinical practice. *Aust. Prescr.* **32**, 47 (2009)
- 6) Vestbo, J., Anderson, W., Coxson, H. O., Crim, C., Dawber, E., Edwards, L., Hagan, G., Knobil, K., Lomas, D. A., MacNee, W., Silverman, E. K. and Tal-Singer, R. : Evaluation of COPD longitudinally to identify predictive surrogate end-points (ECLIPSE). *Eur Respir. J.* **31**, 869 (2008)
- 7) Revision of Committee: Critical path opportunities reports. FDA (2006): Online service.
- 8) Stanski, D. R. : Model-based drug development: A critical path opportunity. FDA (2006).
- 9) Revision Committee: Post-genomic biomarker. *Bioview* **12**(3), (2004).
- 10) 성수현, 윤휘열, 백인환, 강원구, 장정운, 서경원, 권광일 : 당뇨 병 및 골다공증 치료제의 효율적인 신약개발을 위한 생체표지자

- 및 대리 결과 변수의 역할 및 활용. 약학회지 **52**(5), 314 (2008).
- 11) Colburn, W. A. : Biomarkers in drug discovery and development: From target identification through drug marketing. *J. Clin. Pharmacol.* **43**, 329 (2003).
 - 12) Lee, J. W., Devanarayan, V., Barrett, Y. C., Weiner, R., Allinson, J., Fountain, S., Keller, S., Weinryb, I., Green, M., Duan, L., Rogers, J. A., Millham, R., O'Brien, P. J., Sailstad, J., Khan, M., Ray, C. and Wagner, J. A. : Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm. Res.* **23**(2), 312 (2006).
 - 13) Lee, J. W., Smith, W. C., Nordblom, G. D. and Bowsher, R. R. : Validation of assays for the bioanalysis of novel biomarkers: Practical recommendations for clinical investigation of new drug entities. *Biomarkers in Clinical Drug Development* **132**, 119 (2003).
 - 14) Colburn, W. A. : Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development. *J. Clin. Pharmacol.* **40**, 1419 (2000).
 - 15) Lesko, L. J. and Atkinson, A. J. : Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu. Rev. Pharmacol.* **41**, 347 (2001).
 - 16) Wagner, J. A. : Biomarker validation and qualification: Fitness for use. Biomarker World Congress (2007).
 - 17) Rolan, P., Atkinson, A. J. and Lesko, L. J. : Use of biomarkers from drug discovery through clinical practice: Report of the ninth European federation of pharmaceutical sciences conference on optimizing drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **73**(4), 284 (2003).
 - 18) Danhof, M., Alvan, G., Dahl, S. G., Kuhlmann, J. and Paintaud, G. : Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling-a new classification of biomarkers. *Pharm. Res.* **22**(9), 1432 (2005).
 - 19) Rolan, P. : The contribution of clinical pharmacology surrogates and models to drug development-a critical appraisal. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **44**, 219 (1997).
 - 20) Cazzola, M., MacNee, W., Martinez, F. J., Rabe, K. F., Franciosi, L. G., Barnes, P. J., Brusasco, V., Burge, P. S., Calverley, P. M. A., Celli, B. R., Jones, P. W., Mahler, D. A., Make, B., Miravittles, M., Page, C. P., Palange, P., Parr, D., Pistolesi, M., Rennard, S. I., Rutten-van Moelken, M. P., Stockley, R., Sullivan, S. D., Wedzicha, J. A. and Wouters, E. F. on behalf of the American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on outcomes of COPD : Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur. Respir. J.* **31**, 416 (2008).
 - 21) Saetta, M., Turato, G., Maestrelli, P., Mapp, C. E. and Fabbri, L. M. : Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **163**, 1304 (2001).
 - 22) Snell, N. and Newbold, P. : The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 222 (2008).
 - 23) O'Shaughnessy, T. C., Ansari, T. W., Barnes, N. C. and Jeffery, P. K. : Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV₁. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **155**, 852 (1997).
 - 24) Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Ferraresso, A., Drigo, R., Potena, A., Ciaccia, A. and Fabbri, L. M. : Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 301 (1993).
 - 25) Panzner, P., Lafitte, J. J., Tscopoulos, A., Hamid, Q. and Tulic, M. K. : Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsies from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest* **124**, 1909 (2003).
 - 26) Grumelli, S., Corry, D. B., Song, L. Z., Song, L., Green, L., Huh, J., Hacken, J., Espada, R., Bag, R., Lewis, D. E. and Kheradmand, F. : An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* **1**, e8 (2004).
 - 27) Saetta, M., Mariani, M., Panina-Bordignon, P., Turato, G., Buonsanti, C., Baraldo, S., Bellettato, C. M., Papi, A., Corbetta, L., Zuin, R., Sinigaglia, F. and Fabbri, L. M. : Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **165**, 1404 (2002).
 - 28) Culpitt, S. V., Rogers, D. E., Shah, P., De Matos, C., Russell, R. E. K., Donnelly, L. E. and Barnes, P. J. : Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **167**, 24 (2003).
 - 29) Russell, R. E., Culpitt, S. V., De Matos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J. and Barnes, P. J. : Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **26**, 602 (2002).
 - 30) Kalenderian, R., Raju, L., Roth, W., Schwartz, L. B., Gruber, B. and Janoff, A. : Elevated histamine and tryptase levels in smokers' bronchoalveolar lavage fluid. Do lung mast cells contribute to smokers' emphysema? *Chest* **94**, 119 (1988).
 - 31) Pesci, A., Balbi, B., Majori, M., Cacciani, G., Bertacco, S., Alciato, P. and Donner, C. F. : Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **12**, 380 (1998).
 - 32) Brightling, C. E., Monteiro, W., Ward, R., Parker, D., Monrgan, M., Wardlaw, A. J. and Pavord, I. D. : Sputum eosinophilia and

- short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, **356**, 1480 (2000).
- 33) Brightling, C. E., McKenna, S., Hargadon, B., Biring, S., Green, R., Siva, R., Berry, M., Parker, D., Monteiro, W., Pavord, I. D. and Bradding, P. : Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **60**, 193 (2005).
- 34) Tzanakis, N., Chrysafakis, G., Tsoumakidou, M., Kyriakou, D., Tsiligianni, J., Bouros, D. and Siafakas, N. M. : Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. **98**, 57 (2004).
- 35) Aaron, S. E., Angel, J. B., Lunau, M., Wright, K., Fex, C., Le Saux, N. and Dales, R. E. : Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **163**, 349 (2001).
- 36) Yamamoto, C., Yoneda, T., Yoshikawa, M., Fu, A., Tokuyama, T., Tsukaguchik, K. and Narita, N. : Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* **112**, 505 (1997).
- 37) Keatings, V. M., Collins, P. D., Scott, D. M. and Barnes, P. J. : Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **153**, 530 (1996).
- 38) Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. : Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers*, **7**, 1 (2002).
- 39) ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide, 2005. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **171**, 912 (2005).
- 40) Montuschi, P., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. : Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* **120**, 496 (2001).
- 41) Paredi, P., Kharitonov, S. A., Leak, D., Ward, S., Cramer, D. and Barnes, P. J. : Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **162**, 369 (2000).
- 42) Montuschi, P. and Barnes, P. J. : Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends. Pharmacol. Sci.* **23**, 232 (2002).
- 43) Dekhuijzen, P. N., Aben, K. K., Dekker, I., Aarts, L., Wielders, P., van Herwaarden, C. and Bast, A. : Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **154**, 813 (1996).
- 44) Kostikas, K., Papatheodorou, G., Psathakis, K., Panagou, P. and Loukides, S. : Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest* **124**, 1373 (2003).
- 45) Montuschi, P., Collins, J. V., Ciabattini, G., Lazzeri, N., Corradi, M., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. : Exhaled 8-isoprostane an *in vivo* biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **162**, 1175 (2000).
- 46) Carpagnano, G. E., Resta, O., Foschino-Barnaro, M. P., Spanevello, A., Stefano, A., Di Gioia, G., Serviddio, G. and Gramiccioni, E. : Exhaled interleukin-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *Eur. J. Pharmacol.* **505**, 169 (2004).
- 47) Biernacki, W. A., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. : Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* **58**, 294 (2003).
- 48) Corradi, M., Rubinstein, I., Andreoli, R., Manini, P., Caglieri, A., Poli, D., Alinovi, R. and Mutti, A. : Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **167**, 1380 (2003).
- 49) Corradi, M., Montuschi, P., Donnelly, L. E., Pesci, A., Kharitonov, S. A. and Barnes, P. J. : Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **163**, 854 (2001).
- 50) Kostikas, K., Papatheodorou, G., Ganas, K., Psathakis, K., Panagou, P. and Loukides, S. : pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **165**, 1364 (2002).
- 51) Borrill, Z., Starkey, C., Vestbo, J. and Singh, D. : Reproducibility of exhaled breath condensate pH in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **25**, 269 (2005).
- 52) Montuschi, P. and Barnes, P. J. : Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **109**, 615 (2002).
- 53) Kostikas, K., Gaga, M., Papatheodorou, G., Karamanis, T., Orphanidou, D. and Loukides, S. : Leukotriene B4 in exhaled breath condensate and sputum supernatant in patients with COPD and asthma. *Chest* **127**, 1553 (2005).
- 54) Bucchioni, E., Kharitonov, S. A., Allegra, L. and Barnes, P. J. : High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir. Med.* **97**, 1299 (2003).
- 55) Donaldson, G. C., Seemungal, T. A., Patel, I. S., Bhowmik, A., Wilkinson, T., Hurst, J. R., MacCallum, P. K. and Wedzicha, J. A. : Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* **128**, 1995 (2005).
- 56) Pinto-Plata, V.M., Muellerova, H., Toso, J. F., Feudjo-Tepie, M., Soriano, J. B., Vessey, R. S. and Celli, B. R. : C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* **61**, 23 (2006).

- 57) Broekhuizen, R., Wouters, E. F. M., Creutzberg, E. C. and Schols, A. M. W. J. : Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* **61**, 17 (2006).
- 58) Gan, W. Q., Man, S. F., Senthilselvan, A. and Sin, D. D. : Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* **59**, 574 (2004).
- 59) Malo, O., Sauleda, J., Busquets, X., Miralles, C., Agusti, A. G. and Noguera, A. : Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Bronconeumol.* **38**, 172 (2002).
- 60) Hurst, J. R., Perera, W. R., Wilkinson, T. M., Donaldson, G. C. and Wedzicha, J. A. : Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **173**, 71 (2006).
- 61) Vernooy, J. H., Kucukaycan, M., Jacobs, J. A., Chavannes, N. H., Buurman, W. A., Dentener, M. A. and Wouters, E. F. : Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **166**, 1218 (2002).
- 62) Nguyen, L. T., Bedu, M., Caillaud, D., Beaufre, B., Beaujon, G., Vasson, M.-P., Coudert, J. and Ritz, P. : Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF-alpha concentration in stable COPD patients. *Clin. Nutr.* **18**, 269 (1999).
- 63) Vila, S., Miravittles, M., Compos, F., de la Roza, C., Segura, R., Morell, F. and Vidal, R. : Importance of serum interleukin-6 as a mediator of systemic inflammation in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Arch. Bronconeumol.* **38**, 263 (2002).
- 64) Boot, J., Panzer, P. and Diamant, Z. : A critical appraisal of methods used in early clinical development of novel drugs for the treatment of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **20**, 201 (2007).
- 65) Wark, P. and Gibson, P. : Clinical usefulness of inflammatory markers in asthma. *Am. J. Respir. Med.* **2**, 11 (2003).
- 66) Gutierrez, V., Prieto, L., Torres, V., Trenor, R., Perez, C., Berto, J. and Marin, J. : Relationship between induced sputum cell counts and fluid-phase eosinophil cationic protein and clinical of physiologic profiles in mild asthma. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **82**, 559 (1999).
- 67) Pin, I., Freitag, A. and O'Byrne, P. : Changes in the cellular profile of induced sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **145**, 1265 (1992).
- 68) in't Veen, J., Smits, H., Hiemstra, P., Zwinderman, A., Sterk, P. and Bel, E. : Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **160**, 93 (1999).
- 69) Di Franco, A., Bartoli, M., Carnevali, S., Cianchetti, S., Bacci, E., Dente, F., Giannini, D., Taccola, M., Vagaggini, B. and Paggiaro, P. : Analysis of sputum cell counts during spontaneous moderate exacerbations of asthma in comparison to the stable phase. *J. Asthma.* **20**, 155 (2003).
- 70) Gibson, P., Simpson, J., Hankin, R., Powell, H. and Henry, R. : Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax* **58**, 116 (2003).
- 71) Obase, Y., Shimoda, T., Mitsuta, K., Matsuo, N., Matsuse, H. and Kohno, S. : Correlation between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a young adult population: eosinophil, ECP, and cytokine levels in induced sputum. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **86**, 304 (2001).
- 72) Jatakanon, A., Uasuf, C., Maziak, W., Lim, S., Chung, K. and Barnes, P. : Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **160**, 1532 (1999).
- 73) Park, S., Kim, J., Chang, H., Park, S., Lee, Y., Park, J., Chun, I., Lee, J. and Park, C. : Association of interleukin-5 and eotaxin with acute exacerbation of asthma. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **131**, 283 (2003).
- 74) Lamkhioued, B., Renzi, P., Abi-Younes, S., Garcia-zepada, E., Allakhverdi, Z., Ghaffar, O., Rothenburg, M., Luster, A. and Hamid, Q. : Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J. Immunol.* **159**, 4593 (1997).
- 75) Lezcano-Meza, D., Negrete-Garcia, M., Dante-Escobedo, M. and Teran, L. : The monocyte-derived chemokine is released in the bronchoalveolar lavage fluid of steady-state asthmatics. *Allergy* **58**, 1125 (2003).
- 76) Pilette, C., Francis, J., Till, S. and Durham, S. : CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur. Respir. J.* **23**, 876 (2004).
- 77) Liu, L., Jarjour, N., Busse, W. and Kelly, E. : Enhanced generation of helper T type 1 and 2 chemokines in allergen-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **169**, 1118 (2004).
- 78) Itillie-Leblond, I., Hammad, H., Desurmont, S., Pugin, J., Wallaert, B., Tonnel, A. and Gosset, P. : CC chemokines and interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potential implication in eosinophil recruitment. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **162**, 586 (2000).
- 79) Tonnel, A., Gosset, P. and Tillie-Leblond, I. : Characteristics of the inflammatory response in bronchial lavage fluids from patients with status asthmaticus. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **124**, 267 (2001).
- 80) Cardinale, F., de Benedictis, F. M., Muggeo, V., Giordano, P., Loffredo, M. S., Iacoviello, G. and Armenio, L. : Exhaled nitric oxide, total serum IgE and allergic sensitization in childhood asthma and allergic rhinitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* **16**, 236 (2005).
- 81) Kharitonov, S. A., Gonio, F., Kelly, C., Meah, S. and Barnes, P. J. : Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in

- healthy and asthmatic adults and children. *Eur. Respir. J.* **21**, 433 (2003).
- 82) Zeidler, M., Kleerup, E. and Tashkin, D. : Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr. Opin. Pul. Med.* **10**, 31 (2003).
- 83) Tateno, H., Nakamura, H., Minematsu, N., Nakajima, T., Takahashi, S., Nakamura, M., Fukunaga, K., Asano, K., Lilly, C. and Yamaguchi, K. : Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Respir. Med.* **98**, 782 (2004).
- 84) Leung, T., Wong, G., Ko, F., Lam, C. and Fok, T. : Increased macrophage-derived chemokine in exhaled breath condensate and plasma from children with asthma. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 786 (2004).
- 85) Kalayci, O., Sonna, L., Woodruff, P., Camargo, C., Luster, A. and Lilly, C. : Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4; CCL-13): A biomarker of asthma. *J. Asthma.* **41**, 27 (2004).
- 86) Baraldi, E., Carraro, S., Alinovi, R., Pesci, A., Ghio, L., Bodini, A., Piacentini, G., Zacchello, F. and Zanconato, S. : Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax* **58**, 505 (2003).
- 87) Turner, S. : Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **8**, 70 (2008).
- 88) Abdel-Rahman, A., El-Sahrigy, S. and Bakr, S. : A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenin in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest* **129**, 266 (2006).
- 89) Lazarus, R., Raby, B. A., Lange, C., Silverman, E. K., Kwiatkowski, D. J., Vercelli, D., Klimecki, W. J., Martinez, F. E. and Weiss, S. T. : TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **170**, 594 (2004).
- 90) Sagel, S. D., Chmiel, J. F. and Konstan, M. W. : Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 406 (2007).
- 91) Kerem, E., Reisman, J., Corey, M., Canny, G. J. and Levison, H. : Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.* **326**, 1187 (1992).
- 92) Brody, A. S., Molina, P. L., Klein, J. S., Rothman, B. S., Ramagopal, M. and Swartz, D. R. : High-resolution computed tomography of the chest in children with cystic fibrosis: support for use as an outcome surrogate. *Pediatr. Radiol.* **29**, 731 (1999).
- 93) Brody, A. S., Tiddens, H. A. W. M., Gastile, R. G., Coxson, H. O., de Jong, P. A., Goldin, J., Huda, W., Long, F. R., McNitt-Gray, M., Rock, M., Robinson, T. E. and Sagel, S. G. for the CT Scanning in Cystic Fibrosis Special Interest Group : Computed tomography in the evaluation of cystic fibrosis lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **172**, 1246 (2005).
- 94) Zeisberg, M. and Neilson, E. G. : Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* **119**, 1429 (2009).
- 95) Suraokar, M. B., Lin, H., He, D., Llansa, N., Mendoza, G., Woods, D., Prudkin, L., Lee, J. J., Wistuba, I. I. and Tsao, A. S. : High expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers in malignant mesothelioma and possible therapeutic intervention using an N-cadherin antagonist. 2008 ASCO Annual Meeting abstr 8067 (2008).
- 96) Matsuzaki, K. and Okazaki, K. : Transforming growth factor-beta during carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *J. Gastroenterol.* **41**, 295 (2006).
- 97) Kinnula, V. L. and Myllarniemi, M. : Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Sign* **10**(4), 727 (2008).
- 98) Strieter, R. M., Starko, K. M., Enelow, R. I., Noth, I., Valentine, V. G. and the other members of the Idiopathic Pulmonary Fibrosis Biomarkers Study Group : Effects of interferon-gamma 1b on biomarker expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **170**, 133 (2004).
- 99) Kucher, N. and Goldhaber, S. Z. : Cardiac biomarkers for risk stratification of patients with acute pulmonary embolism. *Circulation* **108**, 2191 (2003).
- 100) Soehne, M., ten Wolde, M. and Bueller, H. R. : Biomarkers in pulmonary embolism. *Current Opinion in Cardiology* **19**, 558 (2004).
- 101) Torbicki, A., Pruszczyk, P. and Kurzyna, M. : Pulmonary embolism: role of echocardiography and of biological markers. *Ital. Heart. J.* **6**(10), 805 (2005).
- 102) Harrison, A. and Amundson, S. : Evaluation and management of the acutely dyspneic patient: the role of biomarkers. *Am. J. Emerg. Med.* **23**, 371 (2005).
- 103) Kucher, N. and Goldhaber, S. Z. : Risk stratification of acute pulmonary embolism. *Semin Thromb Hemost* **32**, 838 (2006).
- 104) Kucher, N., Printzen, G. and Goldhaber, S. Z. : Prognostic role of brain natriuretic peptide in acute pulmonary embolism. *Circulation* **107**, 2545 (2003).
- 105) Kucher, N., Printzen, G., Doernhoefer, T., Windecker, S., Meier, B. and Hess, O. M. : Low pro-brain natriuretic peptide levels predict benign clinical outcome in acute pulmonary embolism. *Circulation* **107**, 1576 (2003).
- 106) Kline, J. A., Hernandez-Nino, J., Rose, G., Norton, H. J. and Camargo, C. A. Jr. : Surrogate markers for adverse outcomes in normotensive patients with pulmonary embolism. *Crit. Care. Med.* **34**(11), 2773 (2006).
- 107) Jaffer, F. A., Libby, P. and Weissleder, R. : Molecular imaging of cardiovascular disease. *Circulation* **116**, 1052 (2007).
- 108) de Raucourt, E., Meyer, G., Landais, P., Gouaref, Z., Morinet,

- P, Monge, F, Sors, H. and Fischer, A. M. : Markers of hemostatic system activation in pulmonary embolism. Changes during and after cessation of anticoagulant treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis* **11**(3), 249 (2000).
- 109) Rasp, G. and Hochstarasser, K. : Tryptase in nasal fluid is a useful marker of allergic rhinitis. *Allergy* **48**(2), 72 (1993).
- 110) Fang, S.-Y. and Shen, C.-L. : Neuropeptide innervations and neuroendocrine cells in allergic rhinitis and chronic hypertrophic rhinitis. *Clin. Exper Allergy* **28**, 228 (1998).
- 111) Francis, J. N., Lloyd, C. M., Sabroe, I., Durham, S. R. and Till, S. J. : T lymphocytes expressing CCR3 are increased in allergic rhinitis compared with non-allergic controls and following allergen immunotherapy. *Allergy* **62**, 59 (2007).
- 112) Yariktas, M., Demirci, M., Aynali, G., Kaya, S. and Doner, F. : Relationship between Toxocara seropositivity and allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol.* **21**, 248 (2007).
- 113) Henriksen, A. H., Sue-Chu, M., Lingaas Holmen, T., Langhammer, A. and Bjermer, L. : Exhaled and nasal NO level in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* **13**, 301 (1999).
- 114) Santamaria, F, Montella, S., Camera, L., Palumbo, C., Greco, L. and Boner, A. L. : Lung structure abnormalities, but normal lung function in pediatric bronchiectasis. *Chest* **130**, 480 (2006).
- 115) Nel, A. E., Strachan, A. F, Welke, H. E. and de Beer, F. C. : Acute phase response in bronchiectasis and bronchus carcinoma. *Respiration* **47**, 196 (1985).
- 116) Frank, R. and Hargreaves, R. : Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2**, 566 (2003).
- 117) Yamabuki, T, Takano, A., Hayama, S., Ishikawa, N., Kato, T., Miyamoto, M., Ito, T., Ito, H., Miyagi, Y., Nakayama, H., Fujita, M., Hosokawa, M., Tsuchiya, E., Kohno, N., Kondo, S., Nakamura, Y. and Daigo, Y. : Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **67**(6), 2517 (2007).
- 118) Sekine, I., Tamura, T., Kunitoh, H., Kubota, K., Shinkai, T., Kamiya, Y. and Saijo, N. : Progressive disease rate as a surrogate endpoint of phase II trials for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* **10**, 731 (1999).