

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 3일 (03.11.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/175393 A1

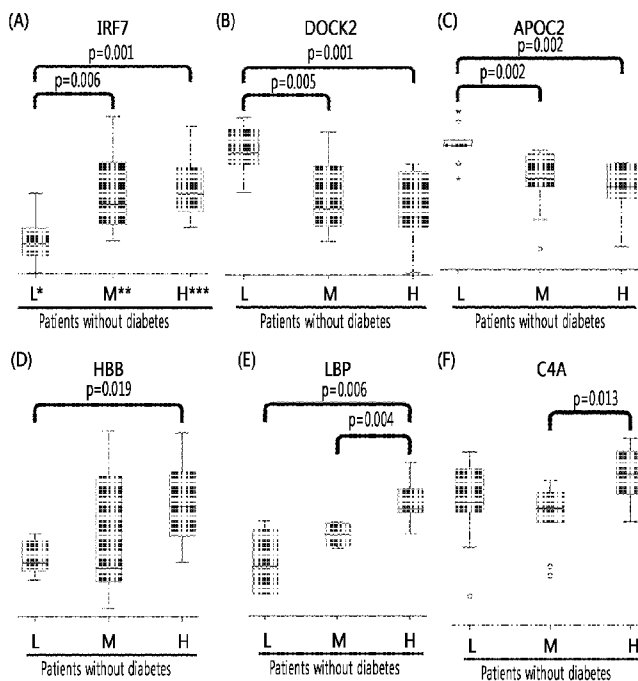
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/008642
- (22) 국제출원일: 2015년 8월 19일 (19.08.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0061981 2015년 4월 30일 (30.04.2015) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 가천대학교 산학협력단 (GACHON UNIVERSITY OF INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 13120 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, Gyeonggi-do (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).

- (72) 발명자: 김광표 (KIM, Kwang Pyo); 01868 서울시 노원구 초안산로 5길 22, 106동 402호, Seoul (KR). 최성희 (CHOI, Sung Hee); 13620 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82, Gyeonggi-do (KR). 이후근 (LEE, Hoo Keun); 22000 인천시 연수구 해송로 143, 116동 301호, Incheon (KR). 이상원 (LEE, Sang Won); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 STX R&D 센터 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MARKERS FOR DIAGNOSING ANGIOSTENOSIS AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 혈관 협착 질환 진단용 마커 및 이의 용도



(57) Abstract: Provided are: a composition for diagnosing non-diabetic angiostenosis, containing a preparation measuring the level of one or more proteins selected from the group consisting of poly (ADP-ribose) polymerase 4 (PARP4), vitamin D-binding protein (VDB), and laminin subunit beta-1 (LAMB1); a composition for diagnosing diabetic angiostenosis, containing a preparation measuring the level of one or more proteins selected from the group consisting of interferon regulatory factor 7 (IRF7), a dedicator of cytokinesis protein 2 (DOCK2), and a hemoglobin subunit beta (HBB); a kit for diagnosing angiostenosis, containing the composition for diagnosing diabetic angiostenosis; a method for providing information for diagnosing non-diabetic angiostenosis; and a method for providing information for diagnosing non-diabetic angiostenosis. The present invention provides a composition for diagnosing angiostenosis, so as to measure and compare the changing protein expression levels in non-diabetic or diabetic angiostenosis patients, thereby enabling early diagnosis of angiostenosis and a meaningful prediction or an identification of the degree of the disease. In addition, the diagnostic composition of the present invention enables non-invasive diagnosis, thereby enabling simple and valid early stage diagnosis of angiostenosis by using blood and urine testing and the like.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트, 상기 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 상기 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다. 본 발명은, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공함으로써, 비당뇨병성 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환 환자에게서 발현이 변화하는 단백질의 발현 수준을 측정 및 비교함으로써, 혈관 협착 질환의 조기 진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있다. 아울러, 본 발명의 진단용 조성물은 비침습성 진단을 가능하게 하여 혈액, 뇨 검사 등으로 간단하고 유효성 있는, 혈관 협착 질환의 초기 진단을 할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 혈관 협착 질환 진단용 마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 들어 생활환경의 도시화, 과도한 영양섭취 등으로 인해 여러 질환이 복합적으로 나타나는 대사성 증후군 환자가 급증하고 있는 추세이다. 전 세계적으로 대사성 질환인 당뇨와 비만의 위험도가 증가하고 있는데, 당뇨병의 유병률이 인구의 10%를 넘어서기 시작했다.
- [4] 우리나라에서도 2005-2007년 국민건강영양조사의 결과에 따르면 성인 인구의 10%가 당뇨병 환자이고, 30% 이상이 비만 환자로, 이러한 당뇨병의 폭발적인 증가는 전 세계적인 추세이다. 또한 대사성 증후군에 속한 뇌혈관 질환, 심장병, 당뇨병, 고혈압 질환으로 인한 사망자수는 암에 의한 사망자수를 넘어 서고 있다.
- [5] 당뇨병 환자의 주요 사망원인은 심혈관계 질환으로 전체 당뇨병 환자의 사망원인의 40%를 심근경색 및 뇌경색이 차지하고 있다. 특히나 당뇨병성 심혈관 질환의 경우, 무증상인 경우가 많아 흉통, 어지러움, 두통, 마비 등의 증상을 느끼는 경우에는 이미 혈관협착이 많이 진행된 상태이기 때문에 발견시 중증질환으로 사망할 가능성이 크다. 그렇기 때문에 혈관협착을 조기 발견하는 것과, 질환에 대한 예방이 매우 중요하다고 할 수 있다.
- [6] 현재 사용되는 혈관협착을 조기 발견하는 방법은 간접적으로 동맥경화 정도를 예상하는 진단방법들로, 경동맥 초음파검사 (carotid artery Doppler ultrasound), 맥파 전달속도 측정 (pulse wave velocity), 혈류의존성 혈관확장반응 (flow mediated dilatation) 등이 있다. 최근 개발되어 임상에 적용되고 있는 다중채널 관상동맥 단층촬영 (multi-detector coronary computed tomography; MDCT) 은 아직은 고가 조영제를 사용하고, 기능 검사를 수반하는 등의 한계를 가지고 있다.
- [7] 한국인의 가장 중요한 만성질환인 당뇨병과 당뇨병 환자에서 제1의 사망원인으로 밝혀진 심혈관계 질환은 조기에 진단할 수 있는 바이오 마커의 개발이 무엇보다도 시급하다. 현재까지 지방세포에서 분비되는 아디포넥틴 (adiponectin)의 저하와 동맥경화증 등 전신적인 염증반응 (system inflammation)에 관여하는 CRP, TNF- α , IL-6 등의 증가 등 일부 혈청 단백질의 변화가 알려져

있으나, 아직까지 확실하게 당뇨병 환자에서의 심혈관계 질환, 특히 혈관 협착 질환의 정도 및 질환 상태를 예측할 수 있는 확립된 바이오 마커는 없는 상황이다.

- [8] 우리나라에서도 폭발적으로 증가하고 있는 비만, 당뇨병, 대사증후군 등의 대사성 질환의 유병률을 고려하고, 상기 질환군은 모두 허혈성 심혈관계 합병증이 주요 사망원인인 만큼 혈관협착의 진행 정도를 예측할 수 있는 단백질 바이오 마커의 발굴이 시급한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 혈관협착 진행을 조기 진단하기 위하여, 프로테오믹스 기법을 도입하여 바이오 마커를 발굴하였다. 특히 혈관협착의 고위험군인 당뇨와 관련한 염증단백질의 변화에 대한 보고는 많이 있지만 당뇨와 혈관협착간의 전체 혈액 단백질의 변화는 보고된 바가 없는 바, 본 발명에서는 당뇨의 존재 유무, 혈관 협착의 진행 정도에 따른 환자 그룹에서의 혈액 전체 단백질을 프로테오믹스 기법으로 분석하여, 당뇨의 유무, 혈관협착 정도에 의해 변화하는 단백질들을 바이오 마커로 사용할 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 당뇨 환자 또는 비당뇨 환자에서의 혈관협착 진행 상황을 모니터링 할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 하나의 목적은, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 목적은, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[17]

발명의 효과

- [18] 본 발명은, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공함으로써, 비당뇨병성 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환 환자에게서 발현이 변화하는 단백질의 발현 수준을 측정 및 비교함으로써, 혈관 협착 질환의 조기진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있다.

[19] 아울러, 본 발명의 진단용 조성물은 비침습성 진단을 가능하게 하여 혈액, 뇨 검사 등으로 간단하고 유효성 있는, 혈관 협착 질환의 초기 진단을 할 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 비당뇨 환자들에서 혈관협착에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 나는 단백질을 나타낸 것이다.

[22] 도 2는 당뇨 환자들에서 혈관협착에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 나는 단백질을 나타낸 것이다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[25]

[26] 일 양태에서, 상기 혈관 협착 질환 진단용 조성물은 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물일 수 있다.

[27]

[28] 본 발명에서 용어, "혈관 협착 질환"은 혈관이 좁아지는 질환으로서, 협착이 되면, 혈류량이 감소되어 협착이 발생한 혈관이 분포하는 부위에 허혈이 일어나게 되거나 표면이 거친 동맥경화에서 혈전이나 경화 조각들이 떨어져 나가는 색전이 발생하여 증상을 일으키는 질환을 제한없이 포함한다. 본 발명의 혈관 협착 질환에 해당할 경우, 상기한 혈관 내막 비후가 진행됨에 따라 혈관의 협착이 일어날 수 있고, 혈관벽의 탄력이 줄어들어 혈관 파열에 의한 출혈이 발생할 수 있다. 본 발명에서 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[29] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 혈관 협착 질환 발병 여부를 확인하는 것으로서, 당뇨병 환자에서 혈관 협착 질환 발병 여부를 조기에 확인 할 수 있다.

[30]

본 발명에서 상기 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4)는 poly(ADP-ribosyl)ation 반응을 촉매하는 poly(ADP-ribosyl)transferase-like 1 protein을 코딩하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

[31]

상기 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB)은 VDB-globulin

(group-specific component)로 알려져 있으며, 알부민 유전자 패밀리에 속하며, 비타민 D에 결합하여 비타민 D를 타겟 조직에 전달하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

- [32] 상기 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)은 세포외 기질 구성 성분으로 다른 세포외 매트릭스 성분과 상호작용하여, 세포의 부착, 이동 등에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [33] 또한, 다른 일 양태로, 본 발명의 혈관 협착 질환 진단용 조성물은 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물일 수 있다.
- [34] 상기 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7)는 인터페론 조절 전사 인자 패밀리에 속하며, 바이러스 유도된 세포 유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [35] 상기 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2)는 G 단백질인 Rac을 활성화시켜 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [36] 상기 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)는 헤모글로빈 A를 형성하는 헤모글로빈 알파 1(HBA1)과 상호작용하는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [37] 본 발명의 일 실시예에서, 비당뇨 환자들을 혈관협착 정도에 따라 저 위험군(0 %), 중 위험군 (0~50 %), 고 위험군 (50% 이상)으로 분류하였고 당뇨 환자들을 혈관협착 정도에 따라 저 위험군, 중 위험군, 고 위험군 환자들로 분류하였다. 이후 이들 환자의 혈액시료를 채취하여 혈관 협착 정도에 따라 차이가 나는 단백질들을 TMT(Tandem Mass Tag)를 통한 상대정량법을 이용하여 혈관 협착 위험군 그룹간의 단백질의 발현 양상을 관찰하였으며, 그 중에서 그 차이가 유의미한(p value<0.05) 단백질 100개들을 1차 바이오 마커 후보군으로 선정하였다. 상기 선정된 1차 바이오 마커 후보군을 검증하기 위하여, 각 그룹당 10명의 환자 시료를 이용하여 1차 바이오 마커 후보군들에 대한 검증을 수행하여, 최종적으로 비당뇨 환자군에서는 6종의 단백질들인 PARP4, VDB, LAMB1, C4A, LBP, APOC2가 혈관 협착의 위험도에 따라 유의성 있게 변화하는 양상을 확인하여, 이들 단백질이 혈관 협착 질환 진단용 마커로 활용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 당뇨 환자에서도 6종의 단백질들인 IRF7, DOCK2,

HBB, C4A, LBP, APOC2이 혈관 협착의 위험도에 따라 유의성 있게 변화하는 양상을 확인하여, 이들 단백질들이 당뇨 환자에서 혈관 협착 질환을 조기에 진단할 수 있는 마커로 활용할 수 있음을 확인하였다.

- [38] 특히 비당뇨 환자에서 확인된 바이오 마커 중에서, PARP4는 혈관 협착 저 위험군에 비해 중 위험군에서 PARP4 단백질의 발현이 감소하였으며, C4A는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 감소하였으며, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 증가하였으며, VDB는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 VDB 단백질의 발현이 감소하였으며, LAMB1은 저 위험군에 비해서 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LAMB1 단백질의 발현이 감소하였으며, LBP는 중 위험군에 비해서 고 위험군에서 LBP 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [39] 또한, 당뇨 환자에서 확인된 바이오 마커 중에서, IRF7은 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 IRF7 단백질의 발현이 증가하였고, DOCK2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 DOCK2 단백질의 발현이 감소하였고, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 감소하였고, HBB는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 HBB 단백질의 발현이 증가하였고, LBP는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LBP 단백질의 발현이 증가하였고, C4A는 중 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [40] 따라서, 상기 PARP4, VDB, LAMB1, C4A, LBP, APOC2는 모두 정상 대조군(당뇨병과 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병은 없으나 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 마커로 사용될 수 있다.
- [41] 또한, 상기 IRF7, DOCK2, HBB, C4A, LBP, APOC2는 모두 대조군(당뇨병은 있으나, 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 마커로 사용될 수 있다.
- [42] 본 발명에서 용어 "마커(marker)"란 정상군 개체와 혈관 협착 질환을 가진 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 본 발명의 혈관 협착 질환을 가지는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자들을 모두 포함한다. 특히 본 발명에서는 본 발명의 비당뇨병성 혈관 협착 질환을 가지는 개체 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환을 가지는 개체에서 변화되는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [43]
- [44] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 수준 측정"이란 혈관 협착 질환 진단을 위하여 생물학적 시료에서 혈관 협착 질환 진단용 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 마커 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 또는 항체를 이용하지 않고

단백질 발현 수준 자체를 측정할 수도 있다.

- [45] 상기 단백질 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 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 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [46] 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 PARP4, VDB, 및 LAMB1으로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [47] 또한, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 IRF7, DOCK2, 및 HBB로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 PARP4, VDB, LAMB1, IRF7, DOCK2, 및 HBB 중에서 선택되는 1 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 항체를 생성하는 것은 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [49] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [50]
- [51] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 키트는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [52]
- [53] 또한, 바람직하게, 상기 혈관 협착 질환 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [54]
- [55] 또한 바람직하게는, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 각 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.

[56]

[57] 또한, 바람직하게는, 5분내 분석결과를 알 수 있는 신속한 테스트를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 래피드(rapid) 키트 일 수 있다. 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 상기 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이 항체와 2차 항체가 고정된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[58]

[59] 또한 바람직하게는, 질량 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 MS/MS 모드인 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. SIM(Selected Ion Monitoring)이 질량분석기의 소스 부분에서 한 번 충돌하여 생긴 이온을 이용하는 방법인 반면, MRM은 상기 한 번 깨진 이온 중에서 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 또 다른 MS의 소스를 한 번 더 통과시켜 충돌시킨 후 이 중에서 얻은 이온들을 이용하는 방법이다. 보다 구체적으로 SIM에서는 선택한 정량이온이 혈장에서도 검출되는 이온인 경우에 정량에 방해가 될 수 있다는 문제점이 있다. 반면, MRM을 이용하는 경우, 같은 질량을 가진 이온이라도 한 번 더 깨지면 분자구조가 달라지면서 차별화된 경향을 나타내므로, 이를 정량이온으로 사용하게 되면 백그라운드에서 방해되는 피크가 제거되어 한 층 더 깨끗한 베이스 라인을 얻을 수 있다. 따라서, 질량 분석시에 MRM 모드를 사용함으로써 보다 우수한 분석 감도에서 원하는 물질들을 동시에 분석할 수 있다. 상기 MRM(Multiple reaction monitoring) 분석 방법들을 통하여, 비당뇨 환자에서 정상 대조군에서의 단백질 발현 수준과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 또한, 당뇨 환자에서 혈관 협착이 없는 개체의 단백질 발현 수준과 혈관 협착이 있는 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교하여, 혈관 협착 질환 발병 여부를 진단할 수 있다.

[60]

[61] 본 발명은 다른 양태로서, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

[62]

[63] 바람직하게, 본 발명의 방법은 상기 (a) 생물학적 시료로부터 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB), 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[64] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법일 수 있다.

[65] 또는 바람직하게, 본 발명의 방법은 (a) 생물학적 시료로부터 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[66] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법일 수 있다.

[67] 본 발명에서 사용된 용어 "생물학적 시료"란 혈관 협착 질환 발병에 의해 단백질 발현 수준이 차이가 나는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[68] 상기 PARP4, VDB, 및 LAMB1은 모두 정상 대조군(당뇨병과 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병은 없으나 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 수준이 변화하면 비당뇨성 혈관 협착 질환으로 진단할 수 있다.

[69] 상기 IRF7, DOCK2, 및 HBB는 모두 대조군(당뇨병은 있으나, 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 수준이 변화하면 당뇨병성 혈관 협착 질환으로 진단할 수 있다.

[70] 따라서, 혈관 협착 질환 의심 개체의 분리된 시료의 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 단백질의 발현 수준보다 높거나 낮을 경우, 혈관 협착 질환으로 판단할 수 있다.

[71]

[72] 바람직하게 본 발명의 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료 내의 해당 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을 이용한다.

[73] 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체

복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

- [74] 본 발명의 목적상, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, PARP4, VDB, LAMB1, IRF7, DOCK2, HBB, C4A, LBP, 및 APOC2의 단백질 발현 수준 자체를 측정 및 비교하기 위해서, LC-MS/MS 방법을 사용하였다.

[76]

발명의 실시를 위한 형태

- [77] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78]

- [79] 실시예 1: 환자의 혈액 시료 준비

[80]

- [81] 비당뇨 환자들 중에서 혈관협착 막힘 정도에 따라 저 위험군(0 %), 중 위험군 (0~50 %), 고 위험군 (50% 이상)으로 분류하고, 당뇨 환자들 중에서 혈관협착 막힘 정도에 따라 저 위험군, 중 위험군, 고 위험군 환자들로 분류하였다. 이 후 이들 환자들로부터 혈액시료를 채취하였다.

[82]

- [83] 실시예 2: 환자 혈액 시료의 abundant 단백질의 제거

[84]

- [85] 상기 실시예 1에서 채취한 혈액 시료내의 단백질 중 14개의 high-abundant 단백질(Albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, alpha2-macroglobulin, alpha1-acid glycoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, complement C3, transthyretin)이 차지하는 비중은 전체 단백질의 95 %에 달한다. 따라서, 이들 14개의 high-abundant 단백질로 인하여 관심 있는 low-abundant 단백질을 분석함에 있어서 민감도 감소가 상당하기 때문에 상기 14개의 단백질을 MARS(Multiple Affinity Removal System)

column(P/N 5188-6558, Agilent)을 통하여 제거하였으며, 남은 단백질을 이후 분석에 사용하였다.

[86] 구체적으로, MARS(Multiple Affinity Removal System) column(P/N 5188-6558, Agilent)을 이용하여, high-abundant 단백질을 제거하는 과정은 다음과 같다.

[87] 실시예 1에서 준비된 혈액 시료 40 μ l에 50x protease inhibitor(Roche) 2 μ l를 넣고 Buffer A 60 μ l를 넣어 섞어 주었다. 이후, 0.22 μ m filter(Agilent, P/N 5185-5990)에 상기 protease inhibitor와 Buffer A를 섞어준 시료를 넣고 원심분리기를 이용하여(14400 g, 1min, 4°C), 사이즈가 큰 파티클을 제거하였다. 이후, HPLC에 MARS column을 연결하여 주고 mobile phase A(Buffer A), B(Buffer B)를 흘려 보내주었다.

[88] Mobile phase A를 이용하여 30분 가량 컬럼 안정화를 시킨 후 아래의 표 1과 같은 조건의 mobile phase gradient를 이용하여 시료를 분리하였으며, flow-through(9~17 min), elution(21~23 min) 시간 대의 시료를 2 ml tube에 옮겨 담았다. 상기 Flow-through에서 얻어진 시료는 10 K filter tube에 넣고 원심분리기를 이용하여(14400 g, 30min, 4°C), 2 ml의 시료 양을 50 μ l까지 농축을 수행하였다.

[89] [Table 1]

HPLC 사용의 mobile phase gradient**LC Timetable**

	Time	%B	Flow rate	Max. pressure
1	0.00	0.00	0.125	60
2	18.00	0.00	0.125	60
3	18.01	0.00	1.000	60
4	20.00	0.00	1.000	60
5	20.01	100.00	1.000	60
6	27.00	100.00	1.000	60
7	27.01	0.00	1.000	60
8	38.00	0.00	1.000	60

[90]

[91] 실시예 3: 단백질 시료의 펩타이드화

[92]

[93] 질량분석기를 통한 분석을 위하여 단백질을 enzyme (trypsin)을 이용하여 펩타이드 단위로 절편화하는 과정이 선행되어야 하므로 다음과 같은 과정을 이용하여 단백질의 펩타이드 절편화를 실시화하였다.

[94] abundant 단백질이 제거된 60 μ g의 농도에 해당하는 혈액시료 50 μ l에 150 μ l의 DTT 용액(최종 농도 6M urea, 10mM DTT, 50mM tris)을 넣어주고 37 °C에서 1시간 동안 반응 (Reduction)하였다. 상기 200 μ l의 반응된(reduced) 샘플에 20 μ l의 IAA 용액(최종 농도 : 5.45M urea, 50 M IAA, 50 mM tris)을 처리한 후, 어두운 곳에서 30분간 실온에서 반응(알킬레이션)시킨 후, 1 ml Tris 용액 (50mM pH 8) (최종 농도 ; 1M urea, 50mM tris 최종 volume 1.2 ml)을 시료에 넣어주었다. 이후, 트립신 용액 5 μ l씩 분주하여 37 °C에서 12시간 반응시켰다.

[95]

[96] 실시예 4: 펩타이드 시료의 TMT(Tandem Mass Tag) 6plex 시약을 이용한 표지

[97]

[98] 질량분석기에서 상대적 정량을 위하여 일반적으로 사용되는 TMT-6plex 시약을 사용하여, 총 6개의 시료 그룹에 각기 다른 질량의 리포터 이온(reporter ion)을 가진 TMT reagent를 반응시켰다(표. 2). 표 2는 그룹 별로 표지한 리포터 이온의 종류를 나타낸 것이다.

[99] [Table 2]

혈관협착 (%)	정상	당뇨
저 위험군 0%	126	127
중 위험군 0-50 %	128	129
고 위험군 50% 이상	130	131

[100] 실시예 3에서 펩타이드화 된 시료에 200mM TEAB 50 μ L를 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down)을 실시하였다. TMT 시약 tube에 시료 이름을 적어놓고, TMT 시약에 100% ACN 41 μ L를 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down)을 실시하였다(kit 마다 들어가는 ACN 양이 정해져 있으며, peptide 25-100 μ g에 ACN 41 μ L가 들어감). 이후 TMT 시약 41 μ L을 sample tube(Peptide)에 넣은 후, 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down) 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 5% Hydroxylamine을 sample tube에 각각 8 μ L씩 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down) 후, 15분 동안 실온에서 켄칭(quenching)하였다. 이 후, 정량, 동량의 labeled sample 99 μ L를 각각 따서 하나의 새 e-tube에 모았다.

[101]

[102] 실시예 5: 펩타이드 분획화, LC-MS/MS 분석 및 데이터 분석 수행

[103]

[104] 펩타이드 시료가 가지고 있는 높은 수준의 복잡성 (complexity)을 줄이기 위하여 펩타이드가 가지고 있는 고유한 PI 값을 이용하여 분획화를 수행하였다.

[105] 먼저, TMT reagent가 표지된 펩타이드를 오프젤 희석 버퍼(offgel dilution buffer)에 녹였다. 오프젤 프랙셔네이터(Offgel fractionators) (3100 offgel fractionator, Agilent)에 IPG strip과 comb을 결합한 후 상기 buffer에 녹아있는 샘플을 분주하여, 4000 V에서 24시간 러닝(running)하였다. 각 분획 구간에서의 시료를 tube에 옮긴 후 건조하였으며, 시료에 남아 있는 reagent 제거를 위하여 탈염(desalting) 과정을 수행하였다.

[106] 얻어진 peptide들은 높은 분리능과 높은 재현성을 가지는 UPLC system인 Easy-nLC (Thermo)에 RP(reverse-phase) column을 이용하여 peptide가 가지는

소수성(hydrophobicity)에 의해 분리하였다. UPLC에 의해 분리된 peptide들은 고해상도, 높은 정확성(High resolution/high accuracy)을 가지는 질량 분석기인 Q-exactive (Thermo)에 의해 실시간으로 분석 수행하였다. Q-exactive에 의해 얻어진 raw data들은 Proteome Discoverer software (Thermo)의 SEQUEST 알고리즘을 통해 스펙트럼을 분석하여, peptide와 단백질을 동정하였다. Scaffold Q+ (Proteome software)를 이용하여 동정된 단백질에 대한 validation을 수행하였으며, 또한 TMT에서 얻어진 정량 정보를 추출하였다. R package 중 하나인 Isobar를 이용하여 통계적인 분석을 수행하였으며, 각 그룹간에 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질을 선정하였다. ($p \text{ value} < 0.05$)

- [107] 표 3은 비당뇨 환자군/당뇨 환자군 그룹에서 혈관협착의 차이에 의해 발현양이 유의성 있게 차이가 나는 단백질 100개의 후보군을 나타낸 것이다.

[108] [Table 3]

No.	Gene name	Protein name
1	C4A	Complement C4-A
2	APOC2	Apolipoprotein C-II
3	LAMB1	Laminin subunit beta-1
4	PPBP	Platelet basic protein
5	LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
6	IRF7	Interferon regulatory factor 7
7	CA1	Carbonic anhydrase 1
8	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin
9	HBB	Hemoglobin subunit beta
10	HP	Haptoglobin
11	DNAH9	Dynein heavy chain 9, axonemal
12	FLNA	Filamin-A
13	HBA1	Hemoglobin subunit alpha
14	HPR	Haptoglobin-related protein
15	JHDM1D	Lysine-specific demethylase 7
16	SYNE1	Nesprin-1
17	DNAH6	Dynein heavy chain 6, axonemal
18	FGA	Fibrinogen alpha chain
19	FGB	Fibrinogen beta chain
20	FGG	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain
21	CRP	C-reactive protein
22	CCDC164	Coiled-coil domain-containing protein 164
23	COG6	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6
24	FAM179A	family with sequence similarity 179, member A
25	ICA1L	Islet cell autoantigen 1-like protein
26	TTC40	Tetratricopeptide repeat protein 40
27	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4
28	S100A9	Protein S100-A9
29	S100A8	Protein S100-A8
30	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2

[109]

31	TF	Serotransferrin
32	ZG16B	zymogen granule protein 16B
33	JARID2	Protein Jumonji
34	ATP2B3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3
35	CCDC88B	Isoform 4 of Coiled-coil domain-containing protein 88B
36	SPRR1A	small proline-rich protein 1A
37	HRNR	Hornerin
38	DCD	Dermcidin
39	NRP1	Neuropilin-1
40	CNTRL	Isoform 5 of Centriolin
41	LYZ	Lysozyme C
42	IGHG3	immunoglobulin heavy constant gamma 3
43	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
44	KIAA0196	WASH complex subunit strumpellin
45	MMP9	matrix metalloproteinase 9
46	PIP	prolactin-induced protein
47	PPFIA2	Liprin-alpha-2
48	URB2	Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog
49	SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1
50	FAH	Fumarylacetoacetase
51	FSIP2	Fibrous sheath-interacting protein 2
52	MYOM2	Myomesin-2
53	PARP4	Poly [ADP-ribose] polymerase 4
54	PLEKHA6	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6
55	PPIG	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
56	WAC	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil
57	CNGA3	Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-3
58	ARID5B	AT-rich interactive domain-containing protein 5B
59	MED23	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
60	CUL5	Cullin-5
61	KANK1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1
62	RAB3A	Ras-related protein Rab-3A

[110]

63	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta
64	ZAR1L	ZAR1-like protein
65	DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2
66	PZP	Pregnancy zone protein
67	BPIFA1	BPI fold-containing family A member 1
68	CEP250	Centrosome-associated protein CEP250
69	ATP13A3	Probable cation-transporting ATPase 13A3
70	DENND6A	DENN/MADD domain containing 6A
71	TOP2A	Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha
72	CACNA1C	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C
73	KIAA1551	Uncharacterized protein KIAA1551
74	NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
75	C18orf8	Uncharacterized protein C18orf8
76	MOSPD2	Motile sperm domain-containing protein 2
77	LTF	Kaliocin-1 (Fragment)
78	MBL2	Mannose-binding protein C
79	TPM4	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-4 chain
80	TSC1	Hamartin
81	RHOBTB1	Rho-related BTB domain-containing protein 1
82	SAA1	Serum amyloid A-1 protein
83	PHEX	Phosphate-regulating neutral endopeptidase
84	DSP	Desmoplakin
85	NINL	Ninein-like protein
86	ARL6IP4	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4
87	KIAA1522	Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA1522
88	SAA2	serum amyloid A2
89	HEG1	Protein HEG homolog 1
90	ABCA13	ATP-binding cassette sub-family A member 13
91	AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2
92	GTF3C1	General transcription factor 3C polypeptide 1
93	SUMF2	Sulfatase-modifying factor 2
94	ABCC1	Multidrug resistance-associated protein 1

[111]	95	GTF3C3	General transcription factor 3C polypeptide 3
	96	SCUBE2	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2
	97	FNIP1	Folliculin-interacting protein 1
	98	OSBPL6	Isoform 3 of Oxysterol-binding protein-related protein 6
	99	RUSC2	Iporin
	100	GC	Vitamin D-binding protein

[112]

[113] 실시예 6: MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 통한 바이오 마커 후보 검증

[114]

[115] 바이오 마커 후보 검증을 위하여 1차 바이오 마커 후보군의 MRM transition을 선정하였다. 단백질 하나당 최대 3개의 peptide를 선정하였고 펩타이드당 3개의 transition list를 선정하였다. MRM transition의 선정은 skyline software (<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>)를 사용하였고, NIST에서 제공하는 MRM transition database를 사용하여 transition을 선정하였다. 이 때 선정 기준은 다음과 같다.

[116] 1. $6 \leq \text{Length} \leq 20$

[117] 2. Charge state = +2 or +3

[118] 3. No M, W (Oxidation)

[119] 4. NTT = 2

[120] 5. NMC = 0

[121] 6. Neighboring KR = 0

[122] 선정된 peptide transition은 혈액 시료를 이용하여 MRM 분석을 선행하여 수행하였으며, 그 transition의 적합성을 확인하였다. Transition의 확인 조건은 다음과 같다.

[123] 1. skyline에서 제공하는 dot-product score가 0.8 이상.

[124] 2. 동일한 MS1에서 파생되는 3종의 transition peak이 동일한 retention time에서 co-elution 여부.

[125] 3. 3회 반복을 통하여 재현성 있는 retention time을 가지는지 여부.

[126] 4. $S/N > 10$ 이상의 peak area intensity를 가지는지 여부.

[127]

[128] 상기 후보 단백질 100개 중에서, 비당뇨 환자들에서 혈관협착 유무에 따라 유의성 있게 발현량의 차이가 있는 단백질로 검증된 것은 PARP4, C4A, APOC2, LBP, VDB, LAMB1에 해당하는 6개의 단백질이었다(도 1 참조). 구체적으로, 검증된 단백질 중에서, PARP4는 혈관 협착 저 위험군에 비해 중 위험군에서 PARP4 단백질의 발현이 감소하였으며, C4A는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 감소하였으며, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 증가하였으며, VDB는 저 위험군에

비해 중 위험군, 고 위험군 모두 VDB 단백질의 발현이 감소하였으며, LAMB1은 저 위험군에 비해서 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LAMB1 단백질의 발현이 감소하였으며, LBP는 중 위험군에 비해서 고 위험군에서 LBP 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.

- [129] 또한, 상기 후보 단백질 100개 중에서, 당뇨 환자들에서 혈관협착 유무에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질로 검증된 것은 DOCK2, C4A, APOC2, IRF7, HBB, LBP에 해당하는 6개의 단백질이었다(도 2 참조). 구체적으로, 검증된 단백질 중에서 IRF7은 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 IRF7 단백질의 발현이 증가하였고, DOCK2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 DOCK2 단백질의 발현이 감소하였고, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 감소하였고, HBB는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 HBB 단백질의 발현이 증가하였고, LBP는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LBP 단백질의 발현이 증가하였고, C4A는 중 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [130] 표 4는 MRM (Multiple Reaction Monitoring)에 사용된 펩티드 서열을 나타낸 것으로, 비당뇨성/당뇨성 혈관 협착을 진단할 수 있는 단백질의 펩티드 서열을 나타낸 것이다.

[131] [Table 4]

비당뇨성 혈관협착 진단 마커 단백질					
Index	Accession No.	Protein name	Peptide sequence	Target ion	Q1/Q3
1	Q9UKK3	PARP4	NGETAQLQK	y7	559.6/818.0
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	P02774	VDB	VLEPTLK	y5	400.5/587.7
5	G3XAI2	LAMB1	ISGVIGPYR	y5	481.6/605.7
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

당뇨성 혈관협착 진단 마커					
Index	Accession No.	Protein name	Peptide sequence	Target ion	Q1/Q3
1	Q92608	DOCK2	DILLPVITK	y5	506.6/557.7
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	Q92985	IRF7	ATDPQQVAFPSAELPDQK	y9	680.3/984.5
5	P68871	HBB	EFTPPVQAAYQK	y9	690.2/501.6
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

[132]

청구범위

- [청구항 1] 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물.
- [청구항 2] 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인, 혈관 협착 질환 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증인 것인, 혈관 협착 질환 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인, 혈관 협착 질환 진단용 키트.
- [청구항 7] (a) 생물학적 시료로부터 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB), 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.
- [청구항 8] (a) 생물학적 시료로부터 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

[청구항 9]

제7항 또는 제8항에 있어서, 혈관 협착 질환 의심 개체의 분리된 시료의 상기 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 단백질의 발현 수준보다 높거나 낮을 경우, 혈관 협착 질환으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

[청구항 10]

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증인 것인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

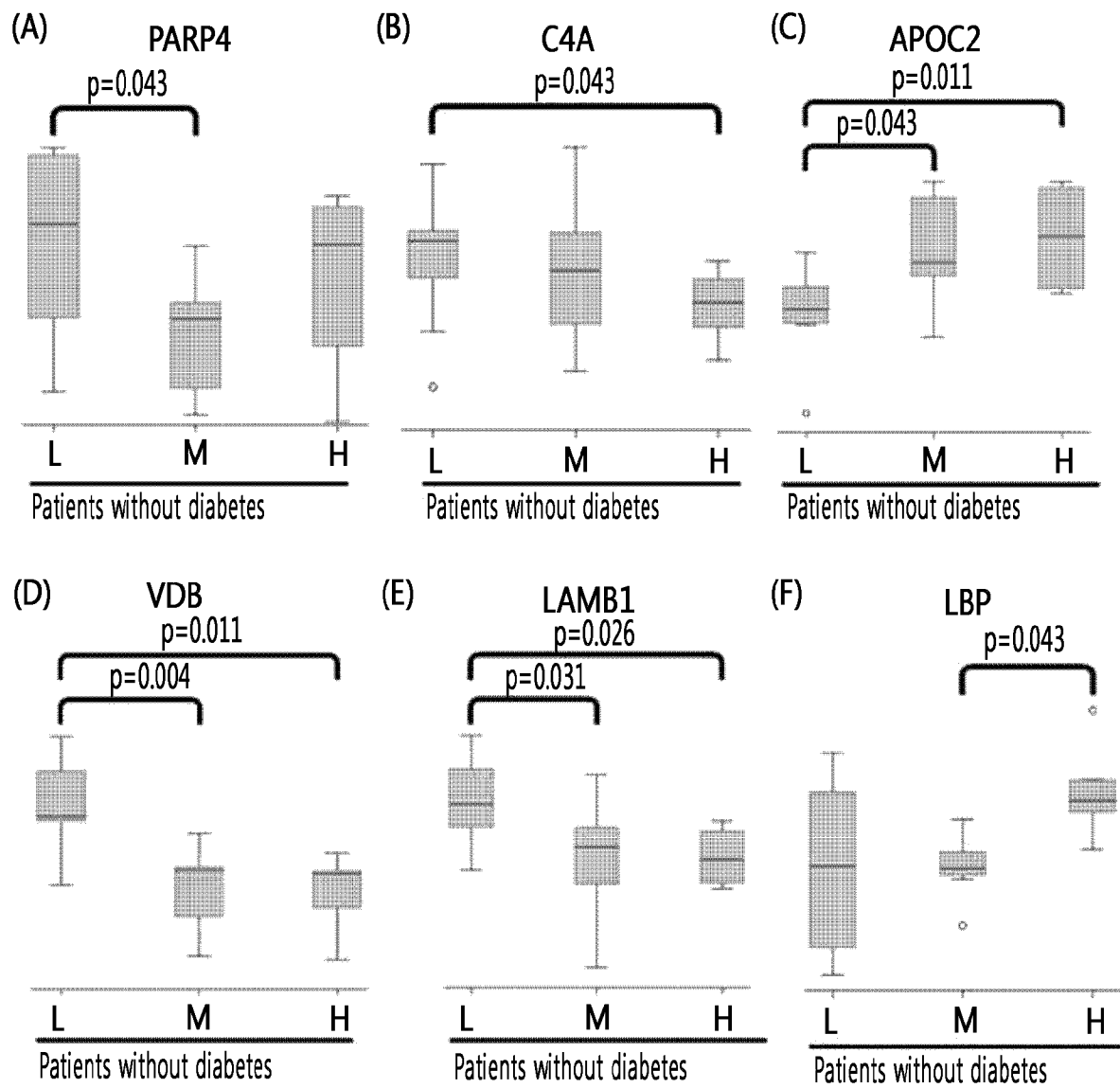
[청구항 11]

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

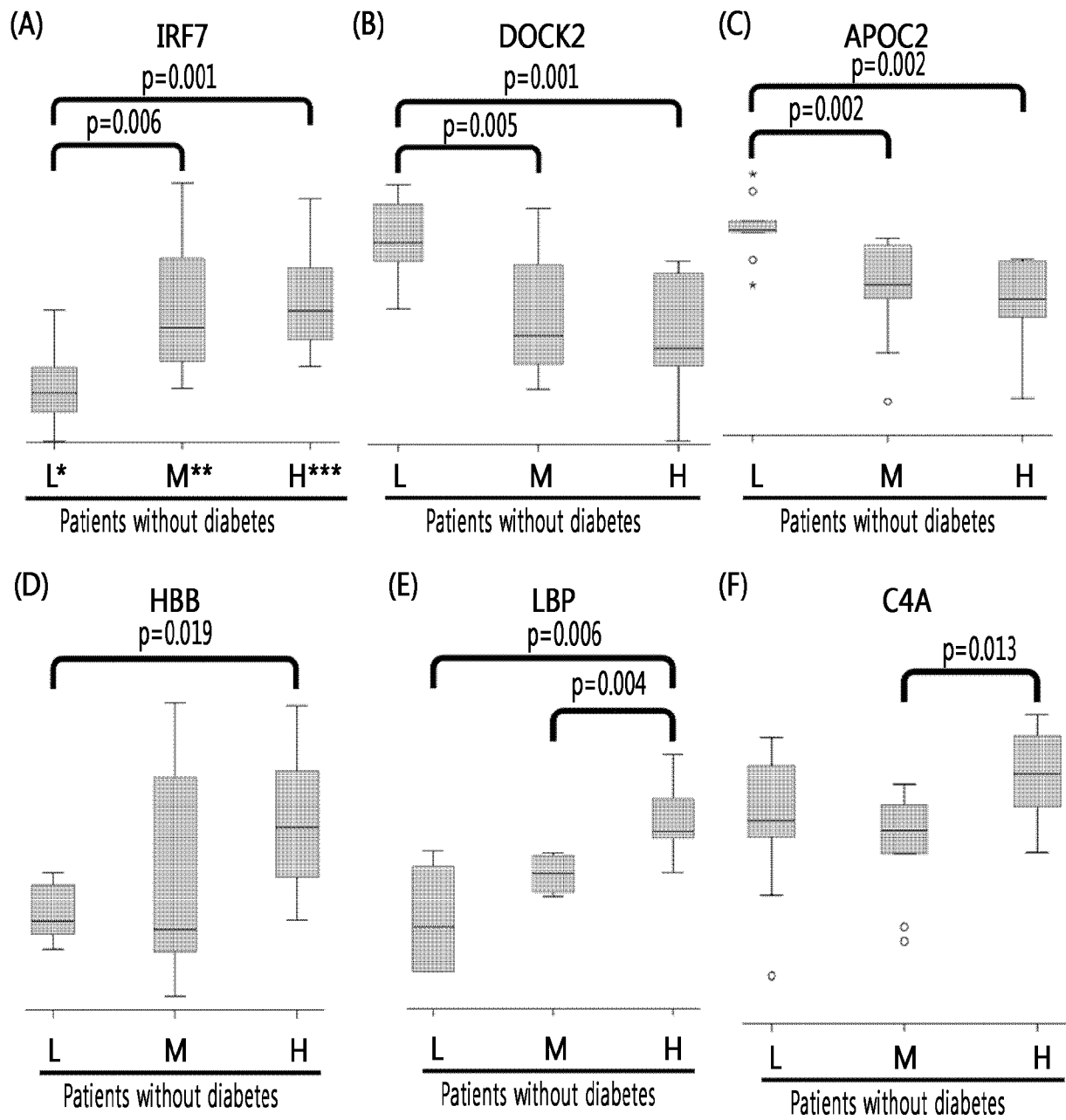
[청구항 12]

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 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 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008642**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; C07H 19/10; C12Q 1/60; C12Q 1/54; G01N 33/53; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: angiostenosis, stroke, arteriosclerosis, diabetes mellitus, nondiabetic, biomarker, diagnosis marker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009-143519 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 26 November 2009 See abstract; pages 3, 33, 56; and claims 1, 2 and 5.	1-12
A	LEE et al., "Senescence of Cultured Porcine Coronary Arterial Endothelial Cells is Associated with Accelerated Oxidative Stress and Activation of NF κ B", Journal of Vascular Research, vol. 47, no. 4, pages 287-298 (2010) See abstract; page 287; figure 3.	1-12
A	YAN et al., "A Pro-Atherogenic HDL Profile in Coronary Heart Disease Patients: An iTRAQ Labelling-based Proteomic Approach", PLoS One, vol. 9, no. 5, paper no. e98368, inner pages 1-10 (2014) See abstract; and pages 3-5.	1-12
A	WO 2012-009567 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 19 January 2012 See abstract; and claims 1-24.	1-12
A	WO 2009-014639 A2 (METABOLON, INC.) 29 January 2009 See abstract; and claims 27-34.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)

Date of mailing of the international search report

10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/008642

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2009-143519 A2	26/11/2009	EP 2294425 A2	16/03/2011
		EP 2294425 B1	22/05/2013
		US 2012-0009174 A1	12/01/2012
		US 2014-186852 A1	03/07/2014
		US 8497078 B2	30/07/2013
		US 9039994 B2	26/05/2015
		WO 2009-143519 A3	18/03/2010
WO 2012-009567 A2	19/01/2012	EP 2593567 A2	22/05/2013
		EP 2593567 A4	11/12/2013
		US 2012-065087 A1	15/03/2012
		WO 2012-009567 A3	09/08/2012
WO 2009-014639 A2	29/01/2009	EP 2164977 A2	24/03/2010
		EP 2164977 A4	27/07/2011
		EP 2164977 B1	30/10/2013
		JP 2010-537157 A	02/12/2010
		JP 2015-064362 A	09/04/2015
		JP 5701601 B2	15/04/2015
		US 2009-0155826 A1	18/06/2009
		US 2012-208215 A1	16/08/2012
		US 2013-338031 A1	19/12/2013
		US 2015-005195 A1	01/01/2015
		US 8187830 B2	29/05/2012
		US 8546098 B2	01/10/2013
		US 8809008 B2	19/08/2014
		WO 2009-014639 A3	19/03/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; C07H 19/10; C12Q 1/60; C12Q 1/54; G01N 33/53; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 혈관 협착, 뇌졸중, 동맥경화, 당뇨병, 비당뇨병, 바이오마커, 진단마커

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2009-143519 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 2009.11.26 요약; 페이지 3, 33, 56; 및 청구항 1, 2 및 5 참조.	1-12
A	LEE 등, 'Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFκB' Journal of Vascular Research, 47권, 4호, 페이지 287-298 (2010) 요약; 페이지 287; 도면 3 참조.	1-12
A	YAN 등, 'A pro-atherogenic HDL profile in coronary heart disease patients: an iTRAQ labelling-based proteomic approach' PLoS One, 9권, 5호, 논문번호 e98368, 내부페이지 1-10 (2014) 요약; 및 페이지 3-5 참조.	1-12
A	WO 2012-009567 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2012.01.19 요약; 및 청구항 1-24 참조.	1-12
A	WO 2009-014639 A2 (METABOLON, INC.) 2009.01.29 요약; 및 청구항 27-34 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 11월 10일 (10.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 10일 (10.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2009-143519 A2

2009/11/26

EP 2294425 A2

2011/03/16

EP 2294425 B1

2013/05/22

US 2012-0009174 A1

2012/01/12

US 2014-186852 A1

2014/07/03

US 8497078 B2

2013/07/30

US 9039994 B2

2015/05/26

WO 2009-143519 A3

2010/03/18

WO 2012-009567 A2

2012/01/19

EP 2593567 A2

2013/05/22

EP 2593567 A4

2013/12/11

US 2012-065087 A1

2012/03/15

WO 2012-009567 A3

2012/08/09

WO 2009-014639 A2

2009/01/29

EP 2164977 A2

2010/03/24

EP 2164977 A4

2011/07/27

EP 2164977 B1

2013/10/30

JP 2010-537157 A

2010/12/02

JP 2015-064362 A

2015/04/09

JP 5701601 B2

2015/04/15

US 2009-0155826 A1

2009/06/18

US 2012-208215 A1

2012/08/16

US 2013-338031 A1

2013/12/19

US 2015-005195 A1

2015/01/01

US 8187830 B2

2012/05/29

US 8546098 B2

2013/10/01

US 8809008 B2

2014/08/19

WO 2009-014639 A3

2009/03/19