



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0053426
(43) 공개일자 2023년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2333/96413 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0136916

(22) 출원일자 2021년10월14일
심사청구일자 2021년10월14일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

손창남

대구광역시 수성구 동대구로 376(범어동, 범어숲
화성파크드림S)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **혈청 시료를 이용하여 류마티스성 질환과 강직성 척추염을 구분하여 진단하기 위한 조성물 및 키트**

(57) 요약

본 발명은 혈청시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현을 확인함으로써 류마티스성 질환 환자 중, 강직성 척추염을 앓고 있는 환자를 구분할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 혈청에서 카스파제-1의 발현 수준을 확인함으로써, 류마티스성 질환 중, 강직성 척추염을 구분할 수 있다. 강직성 척추염만을 유의적으로 진단해낼 수 있으므로, 본 발명은 강직성 척추염에 대한 치료 전략을 조기에 수립하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

G01N 2800/102 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135616
과제번호	2021R1F1A1060970
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	강직성척추염에서 골 재형성, 염증에 대한 CFHR5의 역할규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

분리된 혈청 시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 류마티스성 질환(rheumatic disease)은 통풍(gout) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈청시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현을 확인함으로써 류마티스성 질환 환자 중, 강직성 척추염을 앓고 있는 환자를 구분할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 분리된 혈청 시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 조성물 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis, AS)는 척 골격 및 말초 관절에 영향을 미치는 만성 자가면역 질환이다. 강직성 척추염에 대한 몇몇 병인이 제안되었지만, 지금까지 명백한 원인은 확인되지 않은 상태이다. 뉴클레오타이드-결합 올리고머화 도메인-유사 수용체 피린 도메인-함유-3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3, NLRP3) 인플라마솜 내의 활성화된 카스파제-1(caspase-1)은 프로-인터루킨(pro-interleukin)((IL)-1 β) 및 프로-IL-18(pro-IL-18)을 각각 그의 생물학적 활성 형태인 IL-1 β 및 IL-18로 전환시킨다. 강직성 척추염이 염증성 질환이라고 가정했을 때, 면역 반응 동안 활성화된 인플라마솜, 그 중에서도 NLRP3 인플라마솜의 일부는 강직성 척추염의 질환 발생 및 진행에 기여한다고 보인다. 다만, 류마티스성 질환이 발병했을 때, 상기 인플라마솜 관련 마커를 활용하여 강직성 척추염만을 유의적으로 진단할 수 있는 기술에 대해서는 연구가 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 여러 류마티스성 질환 중, 강직성 척추염만을 특이적으로 진단할 수 있는 방법에 대해서 연구 노력한 결과, 혈청에서 카스파제-1의 발현 수준이 강직성 척추염에서 매우 높게 나타나고, 이를 통해 류마티스성 질환 중 강직성 척추염만을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0004] 이에, 본 발명은 분리된 혈청 시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0005] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 분리된 혈청 시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 류마티스성 질환(rheumatic disease)은 통풍(gout) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 조성물은 혈청에서 카스파제-1의 발현수준을 확인함으로써, 류마티스성 질환 중, 강직성 척추염을 구분할 수 있다. 강직성 척추염만을 유의적으로 진단해낼 수 있으므로, 본 발명의 조성물은 강직성 척추염에 대한 치료 전략을 조기에 수립하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

[0012] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명자들은 혈청에서 카스파제-1의 발현 수준이 강직성 척추염에서 매우 높게 나타나고, 이를 통해 류마티스성 질환 중 강직성 척추염만을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 이에, 본 발명은 분리된 혈청 시료에서 카스파제-1(caspase-1)의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 류마티스성 질환(rheumatic disease)은 이에 제한되는 것은 아니지만, 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 건초염(tenosynovitis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus), 통풍(gout) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있으며, 바람직하게는 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 통풍(gout) 또는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 본 발명의 조성물은 상기 강직성 척추염을 제외한 류마티스성 질환과 강직성 척추염을 구분하여 진단할 수 있다.

[0017] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통하여, 혈청의 카스파제-1 발현 수준을 확인하는 방법을 통하여 류마티스성 질환과 강직성 척추염을 구분하여 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 류마티스성 질환을 앓고 있는 환자(통풍 및 류마티스 관절염)보다 강직성 척추염 환자의 혈청 카스파제-1 발현 수준이 현저히 높음을 확인하였다. 또한, 이러한 결과는 별도의 샘플을 통해 CRP 수준이 높게 나타난 환자(류마티스성 질환 앓고 있는 그룹)에서 카스파제-1의 발현이 높게 나타난 것에 미루어 볼 때, 류마티스성 질환을 앓는 환자의 경우, 카스파제-1의 발현이 증가하나, 강직성 척추염 환자의 혈청 카스파제-1 발현 수준은 그보다 현저하게 증가하므로, 강직성 척추염을 제외한 류마티스성 질환과 강직성 척추염을 구분하여 진단할 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0019] 본 발명자들은 상기와 같은 결과를 통하여, 일상 진료에서 가장 흔히 채혈하여 검사하는 혈청의 카스파제-1 발현 수준을 확인하는 것을 통해서도 유사한 증상을 보이는 류마티스성 질환 중, 강직성 척추염만을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 이를 포함하는 키트는 강직성 척추염의 진단에 유

용하게 활용될 수 있으며, 이를 통해 강직성 척추염 치료전략을 조기에 수립할 수 있을 것으로 기대된다.

[0020] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 류마티스성 질환(rheumatic disease)과 강직성 척추염(ankylosing spondylitis)을 구분하여 진단하기 위한 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명의 키트는 혈청 시료에서 카스파제-1의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 발현 수준 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 검출 라벨로 표시된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다.

[0022] 아울러, 상기 항체 또는 앵타머를 검출할 수 있는 2차 항체를 추가로 포함할 수도 있는데, 상기 2차 항체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 단백질 칩에 결합할 수 있는 카스파제-1 단백질과 결합할 수 있고 형광물질, 방사선 동위원소 등으로 표시되어 사용될 수 있다.

[0023] 구체적으로, 키트는 ELISA 키트, 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 구현하기 위하여, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질들에 대한 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 항체는 카스파제-1 단백질에 대해 특이성 및 친화성이 높고 이외 다른 단백질에는 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단일클론항체, 다클론항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표시된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0024] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴블롯(Western blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 또는 단백질 칩(protein chip) 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다. 이 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체 형성량을 비교함으로써 류마티스성 질환 중에서 강직성 척추염 질환만을 정확하게 진단할 수 있으며, 이에 따라 강직성 척추염 환자 맞춤형 치료방법을 제공할 수 있다.

[0026] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 실험준비 및 방법

[0030] 실험을 위하여 대구에 있는 계명대 동산 병원(Keimyung University Dongsan Hospital)에서 2017년 6월부터 2018년 8월 사이에, 126명의 연구 참가자(20명의 강직성 척추염 환자, 23명의 통풍 환자(gout), 62 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자 및 21명의 건강한 대조군으로 구성)를 등록하고 연구를 진행하였다. 연구는 기관 리뷰 보드(institutional review board)(IRB; 2017-06-021)에 의해 승인되었고, 헬싱키(Helsinki)의 선언에 따라 수행되었다. 실험과 관련된 동의는 모든 참여자들로부터 획득되었다. 의학적 치료를 개시하기 전에 각각의 환자로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 류마티스성 질환을 가진 환자는 강직성 척추염에 대한 1984 뉴욕 기준(Arthritis Rheum 1984; 27:361-8)을 충족하는 환자로 구성하였다. 류마티스 관절염 환자의 경우 이에 대한 2010 류마티스 관절염 분류 기준(Arthritis Rheum 2010; 62:2569-81)을 충족하는 환자로 구성하였다. 통풍 환자는 분류에 따른 급성 통풍(acute gout)을 앓고 있는 환자로 구성하였다(Arthritis Rheum 1977; 20:895-900). 대조군은 건강한 헬스케어 관련업종 종사자로 구성되었다. 본 발명자들은 모든 참여자들로부터 연령, 성별, 질병 기간, 및 혈액 화학 데이터를 수집하였다.

[0031] 22명의 강직성 척추염 환자들의 제2 코호트(cohort)를 한국 대학 병원에서 류마티스 질환에 대한 외래 환자 류마티스학 클리닉으로부터 제공받았으며, 그들의 혈청 카스파제-1(caspase-1) 수준을 강직성 척추염 질환 활성의 지표와 비교하였다. 연구는 한국 대학 병원의 IRB (2008-09-001)에 의해 승인되었다. 기록된 통지된 동의가 모든 환자로부터 얻어졌다. 강직성 척추염 환자로부터 2017년 9월과 2019년 3월 사이에 혈액 샘플을 수집하였다.

[0033] **실시예 2. 류마티스성 질환의 혈청 카스파제-1 발현 수준 확인**

[0034] 본 발명자들은 혈청 카스파제-1 수준, 혈청 적혈구 침강 속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), C-반응성 단백질(C-reactive protein, CRP), 기저 유행성 척추염 질환 활성 지수(the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) 및 척추염 질병 활성 점수(Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score) 간의 관계를 분석하였다. 카스파제-1, IL-1 β , IL-18, 및 NLRP3 수준을 ELISA 키트(Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 상기 방법을 통해 얻어진 결과를 통계학적 분석을 사용하여 수행하였다.

[0035] 분석 결과는 중앙값(상호수 범위(interquartile range)) 또는 빈도(frequency, %)로서 나타내었다. 연속 변수에 대해, Mann-Whitney U 테스트는 높은 CRP 그룹(류마티스성 질환에서 CRP가 높게 발현됨)을 정상 CRP 그룹과 비교하기 위해 사용되었고, Kruskal-Wallis 테스트는 강직성 척추염, 통풍, 류마티스 관절염 및 건강한 대조군의 그룹간 비교를 위해 사용되었다. 카테고리 변수에 대해, Fisher's exact test를 사용하여 그룹 사이의 높은 수준으로 발현하는 카스파제-1(125 pg/mL 초과)의 빈도를 비교하였다. $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0037] **실시예 3. 혈청 카스파제-1 발현 수준에 따른 강직성 척추염 진단**

[0038] 상기 실시예 2를 통해 얻어진 결과는 표 1에 나타내었다. 통계적으로 유의한 수치를 보이는 P값은 볼드체로 나타내었으며, ψP 값은 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis) 시험을 사용하여 결정하였다.

표 1

[0039]

Feature	Ankylosing spondylitis (N=20)	Gout (N=23)	Rheumatoid arthritis (N=62)	Healthy controls (N=21)	P
Age (yr)	35.5 (21.0)	56.0 (25.0)	61.5 (9.0)	41.0 (23.0)	<0.001
Sex (M/F)	18/2	20/3	24/38	1/20	Sex (M/F)
ESR (mm/hr)	20.0 (41.5)	43.5 (30.0) (N=10)	40.5 (56.0)	NA	0.316
CRP (mg/dL)	0.2 (1.6)	2.41 (8.14) (N=10)	0.32 (1.75)	NA	0.020
WBC ($\times 10^9/L$)	7.1 (2.6)	8.2 (6.0) (N=11)	7.6 (3.8)	NA	0.460
Caspase-1 (pg/mL)	201.1 (109.8)	137.3 (91.7)	144.6 (150.8)	71.5 (72.9)	<0.001
IL-1 (pg/mL)	2.39 (3.95)	4.1 (1.9)	2.1 (3.5)	6.1 (2.5)	<0.001
IL-18 (pg/mL)	1,585 (127)	1,520 (176)	1,572 (118)	1,695 (199)	0.014
NLRP3 (pg/mL)	0.2 (0.3)	0.5 (1.0)	0.6 (1.3)	0.0 (0.1)	<0.001
Caspase-1 >125 pg/mL $\pm$	16 (80.0 %)	15 (65.2 %)	39 (62.9 %)	3 (14.3 %)	<0.001

[0041] 평균 혈청 카스파제-1 수준은 다른 그룹에서보다 강직성 척추염 환자군에서 유의한 수준으로 높게 나타남을 확인할 수 있었다($P < 0.001$). 카스파제-1 수준 ≥ 125 pg/mL의 빈도 또한 통풍, 류마티스 관절염 및 건강한 대조군에서보다 AS 군에서 더 높았다.

[0042] 본 발명자들은 독립적인 샘플 세트에서 높은 CRP 수준 및 정상 CRP 수준에 따라 혈청 카스파제-1 수준을 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0043]

Feature*	High CRP (≥ 0.8 mg/L) (N=12)	Normal CRP (<0.8 mg/L) (N=10)	P
Age (yr)	29.5 (4.0)	30.0 (9.0)	0.205
Sex (M/F)	11/1	10/0	Sex (M/F)

Disease duration (months)	21.0 (85.5)	33.5 (86.0)	0.865
ESR (mm/hr)	42.5 (34.5)	4.5 (7.0)	<0.001
Caspase-1 (pg/mL)	86.7 (130.1)	32.1 (56.2)	0.041
BASDAI	5.1 (2.1)	1.9 (3.4)	0.021
ASDAS-CRP	3.8 (1.0)	1.8 (1.8)	0.002
Peripheral arthritis	4 (33%)	5 (50%)	

[0045] 혈청 카스파제-1 수준은 정상적인 CRP 수준을 보여주는 그룹보다 높은 CRP를 보여주는 그룹에서 유의하게 더 높았다(P = 0.041).

[0046] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 다른 질환을 보유한 환자 및 건강한 대조군에서 보다 염증이 발생하여 높은 CRP 수치를 보여주는 그룹에서 높은 카스파제-1 발현 수준을 보여주는 것을 확인하였고, 이와 관련된 여러 질환 중, 강직성 척추염 환자의 혈청에서 가장 높은 카스파제-1의 발현수준을 확인하였다. 이를 통해 혈청에서 카스파제-1 수준을 측정함으로써, 강직성 척추염과 그 외 류마티스성 질환을 구분해낼 수 있음을 확인하였다.

[0048] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.