(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0049223
(43) 공개일자 2025년04월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
G01N 30/02 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2025-0025068(분할)
(22) 출원일자 2025년02월26일
심사청구일자 2025년02월26일
(62) 원출원 특허 10-2022-0164274
원출원일자 2022년11월30일
심사청구일자 2022년11월30일
(30) 우선권주장
1020210170153 2021년12월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호
김민정
서울특별시 강남구 도곡로 404, 101동 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

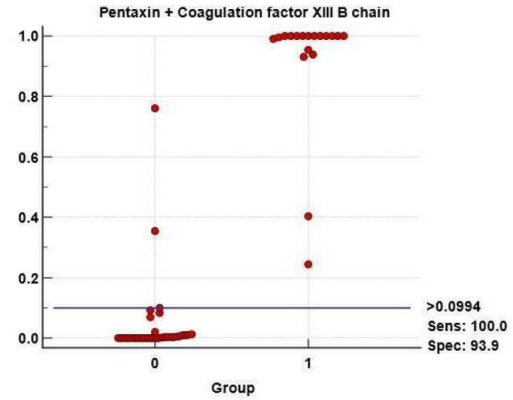
전체 청구항 수 : 총 12 항

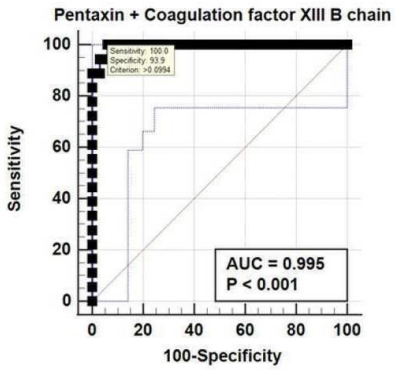
(54) 발명의 명칭 **반려견의 림프종 진단용 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 개의 림프종 진단을 위한 조성물 등에 관한 것으로서, 개의 혈장 단백질에 대한 정성적, 정량적 분석을 통해 높은 정확도와 민감도로 림프종을 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 림프종을 앓고 있는 개의 혈장 단백질에 대해 고분해능 질량분석기를 이용한 단백체 분석을 수행하였으며, 정상 대조군과 비교하여 유의한 발현 차이를 보이는 바이오마커들을 선별하였다. 선별된 바이오마커를 이용하여 확립한 림프종 진단 모델은 높은 특이도, 민감도, 및 정확도로 림프종을 진단할 수 있음이 확인되었다. 따라서 본 발명은 소량의 혈액을 이용한 비침습적 방법으로서 통해 반려견의 림프종의 위험도 예측 및 조기 진단을 가능케하는 바, 반려견의 건강 보존과 보호자의 의료비 부담 감소뿐만 아니라, 수의학적 컨설팅의 질적 향상에도 기여할 것으로 기대된다.

대 표 도





Classification table (cut-off value p=0.5)

Actual group	Predicted group		Percent correct
	Heathy control	Lymphoma	
Heathy control	32	1	96.97%
Lymphoma	2	16	88.89%
Percent of cases correctly classified			94.12%

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0.995
Standard Error [a]	0.00523
95% Confidence interval [b]	0.921 to 1.000
z statistic	94.692
Significance level P (Area=0.5)	<0.0001

(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2030/027 (2013.01)
(72) 발명자
염정훈
서울특별시 강동구 천중로16길 37, 105동
안희성
서울특별시 영등포구 당산로 95, 104동 202호
유지영
경기도 하남시 미사강변서로 65

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067458
과제번호	PJ015336012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	반려동물산업활성화핵심기반기술개발(R&D)
연구과제명	개 유래 엑소좀을 이용한 췌장염 치료 및 림프종 진단 바이오마커 개발(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(재)아산사회복지재단
연구기간	2020.05.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Pentaxin, 및 ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준은 정상 개체 대비 림프종 개체에서 증가되어 있는 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앱타머인 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단백질 또는 mRNA 수준은 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 및 림프액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서의 수준인, 개의 림프종 진단용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 개의 림프종 진단용 키트.

청구항 8

하기 단계를 포함하는, 개의 림프종 진단 방법:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Pentaxin, 및 ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

(S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가한 경우, 림프종으로 진단하거나 림프종이 발병할 위험이 있는 것으로 판단하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 방법은 상기 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것인, 개의 림프종 진단 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 및 림프액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 개의 림프종 진단 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 단백질 수준은 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF (Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS), LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅, ELISA (enzyme linked immunosorbentassay), 및 FACS으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 mRNA 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 (northern blotting), 서던 블랏팅 (southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되

는 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 진단 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 반려견의 림프종 진단을 위한 바이오마커 및 이를 이용한 개의 림프종 진단 방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2019년 기준 대한민국의 반려동물 양육 가구 중 6세 이상 노령견을 양육하는 가구는 39.3%, 10세 이상의 노령견을 키우는 가구는 18%를 차지하며, 노령견 수의 증가와 함께 보호자들의 개의 질병에 대한 진단과 치료법에 관한 관심이 급증하고 있다. 특히, 난치성 질병은 질병의 초기 진단이 반려동물의 건강 수명 연장에 중요할 뿐 아니라 보호자의 의료비 지출을 감소시키기 위해서도 필요하다. 또한, 반려동물의 건강 수명 연장을 위해서는 무엇보다 난치성 질병의 치료 또는 진행정도를 완화시키기 위한 기술 개발이 지속적으로 필요하다.

[0003] 개의 림프종 (Malignant lymphoma, lymphosarcoma)은 개에서 가장 흔한 조혈성 종양으로, 일반적으로 동물병원의 진단 케이스 중 85% 이상에서 국소적 또는 전신적 임파선염이 관찰된다. 림프종은 치료하지 않을 경우 대부분 진단 후 4-6주 이내 사망할 정도로 사망률이 높지만, 초기에 적절한 치료가 이루어지는 경우 6개월 이상으로 생존기간을 연장할 수 있다. 따라서, 반려견의 림프종 발병 위험을 미리 파악하거나 조기에 진단하는 것이 중요하다. 이처럼, 반려동물의 건강 수명 연장과 보호자의 의료비 부담 감소를 위해 반려견의 난치성 질병의 조기 진단 및 치료 기술 개발이 반드시 필요하다.

[0004] 반려견 림프종 진단은 주로 비대해진 림프절을 세침흡인한 후 이 시료를 현미경적으로 검경하는 방법으로 이루어지고 있으며, 림프종 치료를 위해서는 상기 시료를 면역염색하여 정확한 유래를 확인하여야 한다. 또한, 적절한 치료를 위해 림프종의 Stage를 확인하기 위해서는 추가적인 혈액검사와 영상검사가 필요하다. 그러나, 대부분의 동물은 간 또는 비장에 전이된 Stage 4상태에서 내원하여 일반적으로 3-4주 이내에 질병으로 사망한다.

[0005] 따라서, 보다 간편하고 비침습적인 방법으로 반려견의 림프종 유무 혹은 위험도를 예측할 수 있게 하는 방법에 대한 요구가 절실하나, 아직까지 높은 정확도를 가지고 반려견의 림프종을 진단할 수 있는 비침습적인 방법은 개발되지 않고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2021-0066725호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 개의 혈장 단백질에 대한 정성적, 정량적 분석을 통해 높은 정확도와 민감도로 개에서의 림프종을 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하여 완성된 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 바이오마커들의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 개의 림프종 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커들의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 개의 림프종 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오마커들의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하여 개의 림프종을 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될

수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 Pentaxin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 개의 림프종 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준은 정상 개체 대비 림프종 개체에서 증가되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 F13B의 단백질 또는 mRNA 수준은 정상 개체 대비 림프종 개체에서 감소되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 또는 mRNA 수준은 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 및 림프액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서의 수준일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 또한, 본 발명은 Pentaxin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제; 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는, 개의 림프종 진단용 키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 개의 림프종 진단 방법을 제공한다:

[0021] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Pentaxin, ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

[0022] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가하거나, F13B의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 감소한 경우, 림프종으로 진단하거나 림프종이 발병할 위험이 있는 것으로 판단하는 단계.

[0023] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 및 림프액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 수준은 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-

TOF (Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS), LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅, ELISA (enzyme linked immunosorbentassay), 및 FACS으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 mRNA 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 (northern blotting), 서던 블랏팅 (southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 또한, 본 발명은 개의 림프종 진단용 제제 또는 키트를 제조하기 위한, Pentaxin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 개의 림프종 진단을 위한, Pentaxin, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 개의 림프종 진단을 위한 조성물 등에 관한 것으로서, 개의 혈장 단백질에 대한 정성적, 정량적 분석을 통해 높은 정확도와 민감도로 림프종을 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 림프종을 앓고 있는 개의 혈장 단백질에 대해 고분해능 질량분석기를 이용한 단백체 분석을 수행하였으며, 정상 대조군과 비교하여 유의한 발현 차이를 보이는 바이오마커들을 선별하였다. 선별된 바이오마커를 이용하여 확립한 림프종 진단 모델은 높은 특이도, 민감도, 및 정확도로 림프종을 진단할 수 있음이 확인되었다. 따라서 본 발명은 소량의 혈액을 이용한 비침습적 방법으로서 반려견의 림프종의 위험도 예측 및 조기 진단을 가능케하는 바, 반려견의 건강을 보존하고 보호자의 의료비 부담을 절감할 뿐만 아니라, 수의학적 컨설팅의 질적 향상에도 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a는 MARS14 컬럼을 이용하여 상위 14개의 풍부한 혈장 단백질을 제거한 원리를 도식화한 도면이다.

도 1b는 상위 14개의 풍부한 혈장 단백질 및 미량 단백질을 전처리하고 UV 스펙트럼을 확인한 결과이다.

도 1c는 Suspension trap 방법으로 혈장 단백질을 펩티드로 제조한 과정을 나타낸 흐름도이다.

도 1d는 SWATCH LC-MS 분석에 사용된 파라미터를 나타낸 그림이다.

도 2는 반려견들의 혈장 시료로부터 분리한 혈장 시료에 대해 Nano drop을 이용하여 정량적 분석을 수행한 결과이다.

도 3은 반려견 혈장 시료에서 정량된 단백질의 수를 나타낸 그래프이다.

도 4는 정상 대조군 대비 림프종 개체에서 증가 또는 감소한 단백질들을 나타낸 Volcano plot이다.

도 5는 정상 대조군 대비 림프종 개체에서 증감된 29개 단백질들에 대한 정보를 나타낸 표이다.

도 6a 및 6b는 정상 대조군 대비 림프종 개체에서 감소된 단백질인 F13B (도 6a) 및 정상 대조군 대비 림프종 개체에서 증가된 단백질인 ITIH4 (도 6b)의 Box plot 및 ROC 커브를 나타낸 그림이다.

도 7은 정상 대조군 대비 림프종 개체에서 차별적인 수준을 보이는 15개 단백질들을 이용한 PLS-DA 결과를 나타낸다.

도 8은 Pentaxin 및 F13B를 결합한 림프종 진단 모델의 변별력 (AUC, 특이도, 민감도, P-value 등)을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 개의 림프종 진단을 위한 조성물 등에 관한 것으로서, 개의 혈장 단백질에 대한 정성적, 정량적 분석

을 통해 높은 정확도와 민감도로 개에서의 림프종을 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 정상 및 질병을 앓고 있는 개들의 혈장 단백질에 대해 고분해능 질량분석기를 통해 정량적, 정성적 분석을 수행하였으며, 이를 통해 개체간에 유의한 차이를 보이는 바이오마커들을 선별하였다. 또한, 상기 바이오마커들을 조합하여 확립된 진단 모델은 높은 특이도, 민감도, 및 정확도로 질병 개체와 정상 개체를 구별할 수 있음이 확인되었다. 따라서 상기 바이오마커들 및 이들의 조합을 통해 개의 림프종의 정확한 진단이 가능할 뿐만 아니라, 평상시에도 림프종의 위험도를 손쉽게 스크리닝할 수 있으므로, 반려견의 림프종 조기 진단을 통해 수명을 연장시키고, 보호자의 의료비를 절감할 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 본 발명에 따른 진단방법은 기존의 침습적인 진단 및 검사방법의 대안으로서, 채혈이라는 비교적 간단하고 경제적인 방법을 통해 질병의 진단이 가능한 이점이 있다.

[0032] 따라서, 본 발명의 주요 목적은, Pentaxin, ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 개체의 림프종 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0033] 본 발명에서 "개체"란 질병의 위험도 예측, 진단, 예후 예측, 또는 치료 등을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미할 수 있으나, 바람직하게는 개 (dogs; 학명, Canis lupus familiaris)를 의미할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, “림프종 (Lymphoma, Malignant lymphoma, 또는 Lymphosarcoma)”이란 혈액세포의 하나인 림프구가 악성으로 과다증식하여 생기는 종양으로, 개에서 가장 흔한 조혈성 종양 중 하나이다. 림프계는 전신적으로 연결되어 있으므로, 림프구의 과다증식이 일어나면 하나의 장기가 아닌 전신에서 림프종이 발생할 수 있다. 개의 림프종은 체표 림프절이 커지면서 발견되는 경우가 많은데, 이 때 적절한 치료가 이루어지지 않으면 예후가 최대 50일 이내에 불과하다. 개에서의 림프종은 해부학적 위치를 기준으로 다중심형 림프종, 소화기형 림프종, 피부형 림프종 등으로 나뉘거나, 관련 세포의 종류에 따라 B 세포 림프종, T 세포 림프종, 및 NK 세포 림프종 등으로 구별되는데, 본 발명에 따른 림프종은 상기 세부 유형을 모두 포함한다. 다중심형 림프종은 개에서 가장 흔한 림프종으서, 아래턱, 겨드랑이, 무릎 뒤쪽, 사타구니 등에서 림프절이 부어오르는 것을 특징으로 하며, 무기력증, 식욕부진, 체중감소, 구토, 설사 등을 동반한다. 소화기형 림프종은 소화기관의 림프조직 및 림프절이 붓는 것을 특징으로 하며, 피부형 림프종은 다양한 피부과적 증상 (궤양, 습진, 붉어짐 등)을 동반한다. 림프종은 명확히 밝혀진 원인이 없기 때문에 평상시에 발병 위험도를 스크리닝하거나 조기에 진단하는 것이 중요하다.

[0035] 본 발명에 있어서, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 림프종의 존재 여부, 림프종의 발병 여부, 림프종의 발병 가능성 여부 (발병 위험도), 림프종의 예후 등을 확인하는 것을 포함하는 의미일 수 있다.

[0036] 보다 구체적으로, 본 발명서에서 사용된 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후 (prognosis) (예컨대, 종양 상태의 동정, 종양의 단계 결정 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 “Pentaxin”은 “Pentraxin”으로도 지칭되는 단백질로, 펜트락신 단백질 도메인 (Pentraxin protein domain)을 포함하며 급성 면역학적 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. Pentaxin은 감염이나 염증 부위에서 조직세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포 등에 의해 생성되며 균, 박테리아, 바이러스 등의 감염을 억제하는 역할을 한다. 그러나 개의 림프종과 Pentaxin의 연관성에 대해서는 알려진 바가 없는데, 본 발명자들은 개의 혈장 단백체 분석을 통해 정상 개체 대비 림프종 개체에서 Pentaxin 수준이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다. Pentaxin에 대한 구체적인 정보는 Uniprot과 같은 공공 데이터베이스에서 확인할 수 있다 (Uniprot 등록번호: A0A8C0T016).

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 “Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4)”는 혈장 프로테아제 억제 단백질로, 면역과 염증의 조절에 관여하며, 특히 항염 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 개의 혈장 단백체 분석을 통해 정상 개체 대비 림프종 개체에서 ITIH4의 수준이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다. ITIH4에 대한 구체적인 정보는 Uniprot 등에서 확인할 수 있다 (Uniprot 등록번호: A0A8C0M760).

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 “Coagulation factor XIII B chain (F13B)”은 혈액 응고의 마지막 단계에 관여하여 fibrin의 응고물 (혈전; clot)을 안정화시키는 기능을 하는 자이모겐 (zymogen)이다. 상기 단백질의 결핍 혹은 기능 이상은 혈전의 불안정화로 이어지며, 상처 치유의 결함, 계속적인 출혈 등을 초래할 수 있다. 본 발명자들은 개의 혈장 단백체 분석을 통해 정상 개체 대비 림프종 개체에서 F13B의 수준이 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다. F13B에 대한 구체적인 정보는 Uniprot 등에서 확인할 수 있다 (Uniprot 등록번호: A0A8C0P1H6).

[0040] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다. 상기 단백질 (유전자)들은 정상 개체 대비 림프종을 앓는 개에서 통계적으로 유의하게 증가 또는 감소한 것으로 확인된 마커들이다.

[0041] 예컨대, 상기 ITIH3 또는 SERPINA3는 정상 개체 대비 림프종 개체에서 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 또는 Fibrinogen gamma chain은 정상 개체 대비 림프종 개체에서 감소되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0042] 본 명세서에 있어서, "수준이 증가되어 있다"는 것은, 검출되지 않던 것이 검출된 것, 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 검출량이 많아지는 것을 의미한다. 예를 들어, 수준이 "증가"되어 있다는 것은, 실험군의 수준이 대조군의 그것에 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 그 이상, 예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 높은, 및/또는 0.5배, 1.1배, 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배 또는 그 이상 높은 것을 의미한다. 구체적으로는, 대조군의 그것에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 증가한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 용어, "측정"은 목적하는 물질 (본 발명의 경우 림프종 바이오마커 유전자의 mRNA 또는 단백질)의 존재 (발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준 (발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것 (즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법 (분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 콜라겐 단백질의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 수준의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어, "분석"은 바람직하게는 "측정"을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.

[0045] 상기 조성물이 mRNA의 수준을 측정하기 위한 것인 경우, 상기 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있다. 본 발명에 따른 바이오마커 유전자들의 mRNA에 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용함으로써 피검체에서 상기 바이오마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당 업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 바이오마커 (단백질 또는 유전자)의 정보 (아미노산 서열, 핵산 서열 등)는 공지되어 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 뉴클레오티드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다. 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 모든 기능적 등가물을 포함한다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0049] 본 발명의 조성물이 단백질의 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앱타머일 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 본 발명 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메릭 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 용어, "앱타머 (aptamer)"는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앱타머의 제조는 일반적인 앱타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오티드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이나 3' 말단을 앱타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH_2로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명의 조성물은 상기 바이오마커 단백질을 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체 (또는 피검체로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 조성물은 진단을 필요로 하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료의 분석을 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 있어서 "생물학적 시료"란 림프종을 진단하거나 이의 발병 위험도 등을 예측하고자 하는 피검체로부터 채취된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체, 및 진공흡입생검 검체 등으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 조성물은 비침습적 진단을 위한 것으로서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 혈청, 및 림프액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0054] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 피험체로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출 (sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는, 개의 림프종 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서, "키트 (kit)"란 특히 시료 내에 포함되어 있는, 본 발명에 따른 바이오마커들의 mRNA 또는 단백질의 양을 측정하여 림프종을 진단할 수 있는 검진용 기기 또는 세트 등을 의미하며, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 상기 유전자들의 발현량을 측정할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 예컨대, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (Rapid) 키트, 질량분석 키트, 마이크로어레이 키트, 또는 MRM (Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머 세트, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 이때, 상기 유전자, mRNA, 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 물질은 1회 이상 횟수에 제한 없이 작용시킬 수 있으며, 각 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있고 미시에 진행될 수도 있다.

[0057] 또한, 본 발명에 따른 키트는, 본 발명에 따른 진단방법 등이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 목적은, 하기 단계를 포함하는, 개체의 림프종 진단 방법 또는 개의 림프종 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다:

[0059] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Pentaxin, ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

[0060] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 Pentaxin 및/또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가하거나, F13B의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 감소한 경우, 림프종으로 진단하거나 림프종이 발병할 위험이 있는 것 (발병할 가능성이 높은 것)으로 판단하는 단계.

[0061] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ITIH3, SERPINA3, Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및 Fibrinogen gamma chain로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0062] 또한, 상기 방법은 상기 피검체의 ITIH3 및/또는 SERPINA3의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가한 경우 림프종으로 진단하거나 림프종이 발병할 위험이 있는 것 (발병할 가능성이 높은 것)으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0063] 또한, 상기 방법은 상기 피검체의 Apolipoprotein D, CD5 molecule-like (CD5L), Attractin, Complement C9, Vitronectin (VTN), Complement C7, Lecithin-cholesterol acyltransferase, Peptidase D, Transferrin (TF), Factor XI, Apolipoprotein A-I, Kallikrein B1, Adiponectin (C1Q and collagen domain containing; ADIPOQ), Complement C3 (LOC484960), C-type lectin domain family 3 member B, Phosphodiesterase 4D Interacting Protein (PDE4DIP), Coagulation factor X, Complement factor I, Apolipoprotein C-III, 및/또는 Fibrinogen gamma chain의 수준이 대조군에 비해 감소한 경우 림프종으로 진단하거나 림프종이 발병할 위험이 있는 것 (발병할 가능성이 높은 것)으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 진단방법은 Receiver operating characteristics 분석시 Area under curve가 0.7 이상, 0.75 이상, 0.8 이상, 0.85 이상, 0.9 이상, 0.93 이상, 0.95 이상, 0.96 이상, 0.97 이상, 0.98 이상, 또는 0.99

이상일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 진단방법은 특이도 및/또는 민감도가 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상일 수 있다.

[0065] 예컨대, 본 발명에 따른 진단방법이 상기 Coagulation factor XIII B chain의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 포함하는 경우, 진단 특이도는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상일 수 있고, 진단 민감도는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상일 수 있으며, ROC AUC는 0.8 이상, 0.85 이상, 0.9 이상, 0.93 이상, 0.95 이상, 또는 0.96 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 또한, 본 발명에 따른 진단방법이 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계를 포함하는 경우, 진단 특이도는 70% 이상, 75% 이상, 또는 80% 이상일 수 있고, 진단 민감도는 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상일 수 있으며, ROC AUC는 0.7 이상, 0.75 이상, 0.8 이상, 또는 0.85 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 특히, 본 발명에 따른 바이오마커의 조합의 수준을 측정하는 경우, 진단 정확도는 더욱 높아질 수 있다.

[0068] 예컨대, 본 발명에 따른 진단방법이 Pentaxin, ITIH4, 및 Coagulation factor XIII B로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 경우, 진단 특이도는 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 93% 이상일 수 있고, 진단 민감도는 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상일 수 있으며, ROC AUC는 0.8 이상, 0.85 이상, 0.9 이상, 0.93 이상, 0.95 이상, 0.96 이상, 0.97 이상, 0.98 이상, 또는 0.99 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 또한, 본 발명에 따른 진단방법이 Pentaxin 및 Coagulation factor XIII B chain의 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 경우, ROC AUC는 0.8 이상, 0.85 이상, 0.9 이상, 0.93 이상, 0.95 이상, 0.96 이상, 0.97 이상, 0.98 이상, 또는 0.99 이상일 수 있고, P-value는 0.001 이하 또는 0.0001 이하일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 본 발명에 따른 바이오마커, 생물학적 시료, 피검체 등과 관련된 구체적인 설명은 전술하였으므로 생략한다.

[0071] 본 발명에서 사용된 용어, "정보제공방법(method for providing information)"이란, 질환의 진단에 관한 정보를 제공하는 방법으로서, 개체의 생물학적 시료를 분석하거나, 본 발명에 따른 바이오마커들의 수준의 증감을 확인하여 질환의 발병이나 발병 가능성(위험성)에 대한 정보를 획득하는 방법을 의미한다. 예컨대, 본 발명에 따른 바이오마커의 수준을 측정하고 대조군과 비교하여 개체에서 림프종이 발병할 가능성이 있는지, 또는 림프종이 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 림프종이 이미 발병하였는지에 대한 정보를 제공하는 방법으로서, 상기 방법을 통하여 림프종 발병 위험성, 즉, 고위험군에 대해서도 예측할 수 있으며, 이를 림프종의 예방 및 치료에 관한 정보를 제공하는 방법으로서도 사용할 수도 있다.

[0072] 본 발명에 있어서, "대조군 (control)"은 정상 개체 또는 림프종을 앓는 개체로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있다.

[0073] 본 발명에 있어서, 단백질 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 단백질 측정 방법에 의한 것이라면 특별한 제한은 없으나, 단백질 칩 분석, 면역 측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF (Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS), LC-MS/MS (liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅, ELISA (enzyme linked immunosorbentassay), 및 FACS 등의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서, mRNA 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 mRNA 측정 방법에 의한 것이라면 특별한 제한은 없으나, PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및/또는 RNA 칩 등의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명은 개체 (예컨대, 개)의 림프종 진단기기를 제공할 수 있다.

[0076] 본 발명의 상기 진단기기의 측정부는 목적하는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료에 대하여 본 발명에 따른 바이오마커, 예컨대, Pentaxin, ITIH4, 및, F13B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하여 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있다. 상기 측정부에서 상기 제제를 이용하여 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도를 확인함으로써 림프종을 진단하거나,

림프종의 발병 위험이 높은 것으로 진단할 수 있다.

[0077] 본 발명의 상기 진단기기는, 상기 측정부에서 얻어진 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도로부터 개체의 림프종의 유무, 병기, 또는 유형 등을 예측하여 출력하는 검출부를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 검출부는, 상기 측정부에서 얻어진 상기 단백질 또는 유전자의 발현 정도의 범주에 따라 림프종에 관한 정보를 생성하여 분류함으로써 림프종을 진단할 수 있다.

[0079] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 개에서의 림프종 예방 또는 치료방법을 제공한다:

[0080] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Pentaxin, ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계;

[0081] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가하거나, F13B의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 감소한 경우, 상기 피검체를 림프종을 앓고 있는 것으로 진단하는 단계; 및

[0082] (S3) 림프종을 앓는 것으로 진단된 피검체에서 림프종을 치료하는 단계.

[0083] 또한, 본 발명은 개의 림프종 치료제에 대한 반응개체 (즉, 개)의 특성화 방법 (즉, 동반진단 방법)으로서, 하기 단계를 포함하고:

[0084] (a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Pentaxin, ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4), 및 Coagulation factor XIII B chain (F13B)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

[0085] (b) 상기 단계 (a)에서 측정된 Pentaxin 또는 ITIH4의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 증가하거나, F13B의 단백질 또는 mRNA 수준이 대조군에 비해 감소한 경우, 상기 피검체를 개의 림프종 치료제에 대한 반응자로 판단하는 단계,

[0086] 상기 개의 림프종 치료제는 Laverdia-CA1, Rabacfosadine, Prednisone, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin (doxorubicin), 및 Oncovin (vincristine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 개의 림프종 치료제에 대한 반응개체의 특성화 방법을 제공한다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 “치료”는 목적하는 질병과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, 화학 요법, 방사선 요법, 외과적 수술, 생물학적 요법, 또는 항생제 투여 등의 방법을 사용할 수 있다. 예컨대, 상기 치료는 수액처치, 약물, 혈장수혈, 및 식이조절 등을 통해 이루어질 수 있다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 화학 요법(Chemotherapy)은 특정 질병의 치료를 위해 화학물질을 사용하는 행위와 그때 사용되는 약물 전체를 의미한다.

[0089] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 예컨대, Laverdia-CA1, Rabacfosadine, Prednisone, Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin (doxorubicin), 및 Oncovin (vincristine) 등을 예로 들 수 있다.

[0090] 본 발명에 있어서, 상기 방사선 요법은 x-선, 감마선 및 중성자를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 고에너지 방사선을 환자에게 쪼이는 것을 의미한다. 이런 유형의 요법으로는 외부광선 요법, 내부 방사선 요법, 삽입 방사선, 근접 치료, 및 전신 방사선 요법을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본 발명에 있어서, 상기 외과적 수술은 치유, 치료 또는 진단 효과를 얻기 위해 개체의 신체에 대하여 손(hand) 혹은 기기와 함께 손의 방법적 작용을 포함하는 어떠한 치료상 또는 진단 처치를 모두 포함한다.

[0092] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 요법은 생물체에서 유래된 물질이나 생물체를 이용하여 생성시킨 물질을 함유한 생물학적 제제를 이용하여 직, 간접적으로 인체의 면역체계를 이용하는 치료법을 의미하며, 상기 생물학적 제제는 물리적, 화학적 시험만으로는 그 역가와 안정성을 평가할 수 없는 백신, 알레르겐, 항원, 호르몬, 사이토카인, 효소, 혈액 및 혈장, 면역 혈청, 단클론 항체, 발효 제품, 항독소, 및 실험실 진단제 등을 포함한다.

[0093] 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.

[0095] [실시예]

[0096] 실시예 1. 반려견의 혈액 수집

[0097] 수의사가 각 개체로부터 혈액을 채취하고 혈청분리 후 혈청을 별도의 tube에 채취하여 분석 전까지 -80℃에 보관하였다. 총 114두의 반려견으로부터 혈액 시료를 수집하였다.

[0099] 실시예 2. 반려견 혈액 시료의 전처리

[0100] 고성능 액체 크로마토그래피 (High-performance liquid chromatography, HPLC)에 연결한 고농도 혈장 단백질 제거 컬럼 MARS14 컬럼 (100×4.6 mm; Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 혈장 시료에서 14종의 고농도 (high abundant) 혈장 단백질을 제거하고 저농도 (low abundant) 단백질을 분리하였다. 분리된 저농도 단백질은 자동화된 액체 분주 시스템 (Bravo Automated Liquid Handling Platform; Agilent사)을 이용하여 펩티드를 제조하는 전처리 과정을 수행하였다 (도 1a).

[0101] 즉, 40 μL의 혈장시료를 MARS14 컬럼에 주입하여 상위 14 개의 풍부한 단백질 (albumin, IgA, IgG, IgM, α1-antitrypsin, α1-acid glycoprotein, apolipoprotein A1, apolipoprotein A2, Complement C3, transferrin, α2-macroglobulin, transthyretin, haptoglobin, 및 fibrinogen)을 제거하였다 (도 1b). 이를 위해, 혼합물을 Agilent사의 buffer A (#5185-5987)로 4배 희석하고 Shimadzu HPLC LC20AT 시스템의 MARS14 컬럼에 로딩하였다. 결합되지 않은 저농도 혈장 단백질의 분획을 동결건조한 후, 재흡수하여 Suspension trap 방법을 이용해 펩티드로 제조했다 (도 1c). 5% SDS (50mM TEAB) 버퍼로 재흡수하여 10 mM이 되도록 1,4-디티오트레이톨 (1,4-Dithiothreitol)을 첨가하고 95℃에서 10분 동안 반응시켜 이황화결합을 환원시켰다. 그 후, 알킬화를 위해 20 mM이 되도록 아이오도아세트아미드 (iodoacetamide)를 첨가하여 암조건하에 실온에서 30분 동안 반응시키고, 6 μg의 트립신/라이스씨 혼합물로 37℃에서 18시간 동안 분해시켰다. 용출된 페티드는 콜드 트랩 (CentriVap Cold Traps, LABCONCO)으로 동결 건조하고 사용할 때까지 영하 80℃에서 보관했다.

[0103] 실시예 3. LC-MS 분석

[0104] 상기 실시예를 통해 확보된 펩티드들에 대해 SWATCH LC-MS 분석을 수행하였다. 이를 위해, 도 1d에 나타낸 파라미터를 이용하여 LC-MS 분석을 수행하여 스펙트럼을 확보했다.

[0105] 구체적으로, 제조된 Peptide 시료에 iRT-Kit (Biognosys AG, Schlieren, Switzerland)에서 제공하는 iRT 표준을 1/10 부피로 샘플에 추가하여 공급 업체 지침 (참고논문: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22577012/)에 따라 머무름 시간을 보정하였다. 각 샘플의 총량은 40 μg이며 40 μL의 용액에 용해시켰다.

[0106] 주입된 4 μL의 샘플은 다음 LC-MS/MS 설정과 함께 SCIEX TripleTOF 5600+ 시스템 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. LC 분리를 위해 nanoLC 425 (Eksigent, Dublin, CA, USA)를 Eksigent 마이크로 트랩 C18컬럼 (ChromXP C18CL, 5 μm, 120 Å)과 분석 컬럼으로서 Eksigent 컬럼 (C18-CL, 0.3 × 150 mm, 입자 크기 3 μm, 기공 크기 120 Å)을 함께 컬럼 온도가 40℃로 유지되도록 하고 샘플을 버퍼 A를 사용하여 10 μL/min의 유속으로 트랩 컬럼에 로딩하였다. 10분 후, 펩티드 혼합물은 버퍼 A와 버퍼 B (0.1 % formic acid in HPLC acetonitrile)을 사용하여 57분에 의해 5 μL/분으로 유속으로 농도구배를 통한 분리를 수행하였다. 버퍼 B를 38분 동안 3-25% 변경하고, 5분 동안 25-32% 변경하고, 2분 동안 32-80% 변경하고, 3분 동안, 80%로 유지하고, 3분 동안 80-3% 변경하고, 8분 동안 3%로 유지하였다.

[0107] 개별 샘플의 경우 모든 질량 분석 실행은 100개의 가변 창을 사용하여 모든 이론적 질량 스펙트럼 (SWATH) 모드의 순차 창 수집에서 작동시켜 수행했다. SWATH 매개 변수는 다음과 같이 설정하였다: Lower m/z limit 400; m/z 상한선 1250; 윈도우 오버랩 (Da) 1.0; CES는 작은 창에 대해 5, 큰 창에 대해 8, 가장 큰 창에 대해 10. MS2 스펙트럼은 고감도 모드에서 2.5ms 동안 100-1500m/z 범위에서 수집되었으며 총 사이클 시간은 2.8초였다. 다른 MS 파라미터는 다음과 같이 설정하였다: 이온 소스 가스 1 (GS1) 15 psi; 이온 소스 가스 2 (GS2) 20 psi; 커튼 가스 (CUR) 30 psi; 온도 (TEM) 250 ℃; 이온 스프레이 전압 부동 (ISVF) 5500V.

[0109] 실시예 4. 통계 분석

[0110] 상기 실시예를 통해 각 시료에 대해 SWATH LC-MS 분석을 수행하여 스펙트럼 (spectrum) 결과를 획득하고, DIA-NN software와 Pan-human proteome library를 이용하여 상기 스펙트럼들로부터 단백질들에 대한 정량적, 정성적 정보를 추출하였다. 정상대조군과 림프종군의 시료별로 중간값 기반의 정규화된 단백질들의 양 정보를 로그 스케일 (Log scale)로 분석한 결과 재현성을 보이는 것을 확인하고 단백질들의 정량 정보를 이용하여 통계분석을 수행하였다.

[0112] **[실험예]**

[0113] **실험예 1. 혈액 시료의 채취**

[0114] 동물병원에서 보호자 동의서를 받은 뒤, 수의사에 의해 혈액을 채취하고 혈청분리 후 혈청을 별도의 tube에 채취하여 분석 전까지 -80℃에 보관하였으며 총 116두의 반려견으로부터 혈액 시료를 수집하였다. 수집된 반려견들의 그룹 정보는 아래 표 1에 나타냈다.

표 1

[0115]

그룹	수
피부질환	1
비만	6
만성췌장염	17
림포마	18
당뇨	4
급성췌장염	19
과체중	2
건강 대조군	33

[0116] **실험예 2. 혈장 시료로부터 분리한 단백질들의 총량 분석**

[0117] 실시예 2에 따라 S-trap를 기반으로 trypsin/LysC로 116개의 혈장 시료들을 peptide로 제조하고, Nanodrop을 이용하여 펩티드의 양을 정량하였다 (도 2). 그 결과, 최고 1,023 μg에서 최소 214 μg의 펩티드가 수득되었음을 확인하였다. 통상적으로 단백질 분석시 8 μg 정도의 펩티드만 분석하는 것을 감안하면, 연구에 충분한 양의 펩티드가 제조되었음을 알 수 있었다.

[0119] **실험예 3. 정상 그룹 대비 림프종 개체에서 차별적인 수준을 보이는 단백질들의 선별**

[0120] 반려견들의 혈장으로부터 분리한 펩티드 시료들에 대해 Sciex사의 Quadupole Time of Flight (Q-TOF) mass spectrometry를 수행하여 Data-independent acquisition (DIA) 방식으로 스펙트럼을 확보하였다. 확보된 스펙트럼은, 기확보된 개의 pooling된 단백질 시료들로부터 Data dependent acqusition (DDA) 방식으로 확보한 스펙트럼 라이브러리를 활용하여 비교분석하였으며, DIA-NN 알고리즘으로 단백질의 정성 및 정량적 정보를 추출하였다.

[0121] SWATH LC-MS 분석 결과 114개 시료에서 총 701개의 단백질들을 정량분석할 수 있었으며, 시료별 정량 가능한 단백질들의 수는 도 3에 나타냈다. 정량된 단백질의 수는 그룹별로 차이가 없었으며 missing value가 있는 경우 80%의 frequency를 기준으로 random normal distribution으로 imputation 하여 분석을 진행하였다.

[0122] 정상대조군 대비 림프종 혈액 혈장에서 차별적으로 존재하는 단백질들 (Diffrentially expressed proteins, DEPs)은 총 29개로서, 통계적으로 유의하게 정상 대조군 대비 림프종 혈액 혈장에서 증가한 단백질들은 총 4개, 감소한 단백질들은 25개로 확인됐다 (도 4). 29개 DEP들에 대한 p value와 fold change는 도 5에 나타냈다.

[0124] **실험예 4. 반려견의 림프종 진단을 위한 단백질 마커 조합의 선별**

[0125] 정상 그룹 대비 림프종 그룹에서 차별적인 수준을 보이는 29개 DEP 중 Pentaxin은 C-Reactive protein으로 염증 수준을 반영하는 마커로 알려진 단백질이다. 또한, Coagulation factor XIII B chain (F13B)은 림프종 그룹에서 통계적으로 유의하게 감소한 단백질인데, Receiver operating characterictics 분석 결과 Area under curve

(AUC)가 0.966으로, 특이도 및 민감도는 각각 90%에 해당되는 것으로 나타났다 (도 6a). 또한, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4 (ITIH4)는 정상 대조군 대비 림프종 그룹에서 증가하는 것으로 나타났으며, 특이도 80%, 민감도 90%, 그리고 ROC AUC가 0.855로 나타났다 (도 6b).

[0126] 이어서, 정상 대조군과 림프종 그룹 간에 차이를 보이는 15개 단백질들을 조합하여 Partial least squre discriminant analysis를 수행한 결과, 18개 림프종 그룹 모두 정상 대조군과 명확히 구별되어 민감도 100%를 나타내는 것을 확인하였다 (도 7).

[0127] Logistic regression 분석을 통한 panel로 분석한 결과, Pentaxin과 Coagulation factor XIII B chain을 결합한 모델의 경우, 33개의 정상 대조군 중 32개를 정확하게 구별할 수 있었으며, 18개의 림프종 중 16개를 정확하게 구별하는 것으로 나타났다 (도 8). ROC 분석 결과 AUC는 0.995로서 특이도는 93.9%, 민감도는 100%를 나타냈다. 또한, 이 regression 모델에 대한 통계적 유의성 p value는 <0.0001로 매우 유의적인 것으로 나타났다.

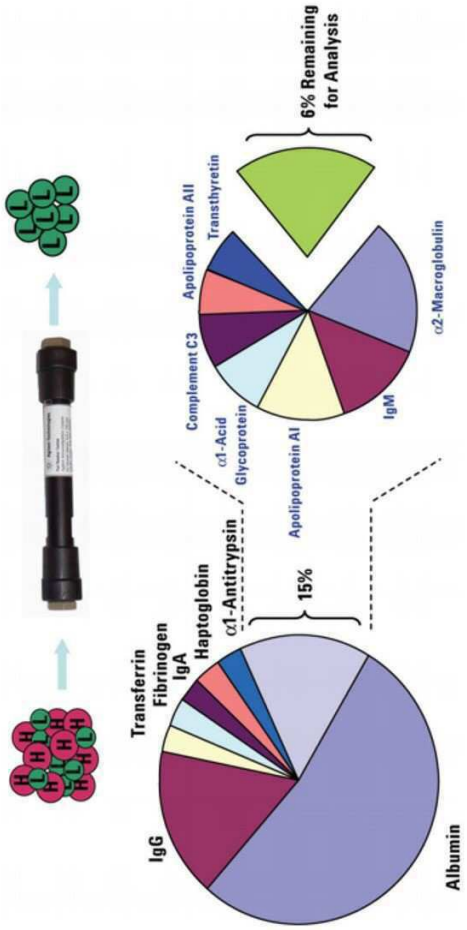
[0128] 따라서, 본 발명자들은 상기 결과로부터 반려견 혈액 100 μL을 이용하여 본 발명에 따른 마커 단백질들을 정량하면 100%의 민감도로 림프종을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0130] 전술한 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 이해해야 한다.

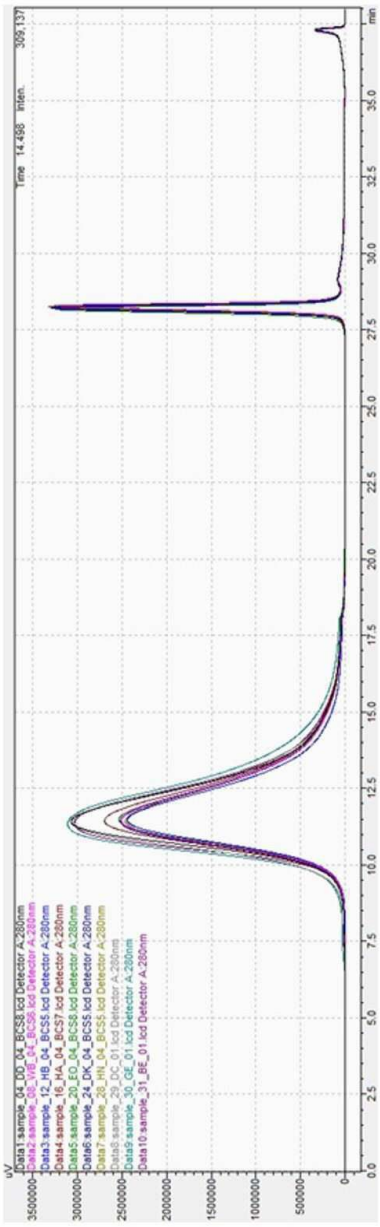
도면

도면1a

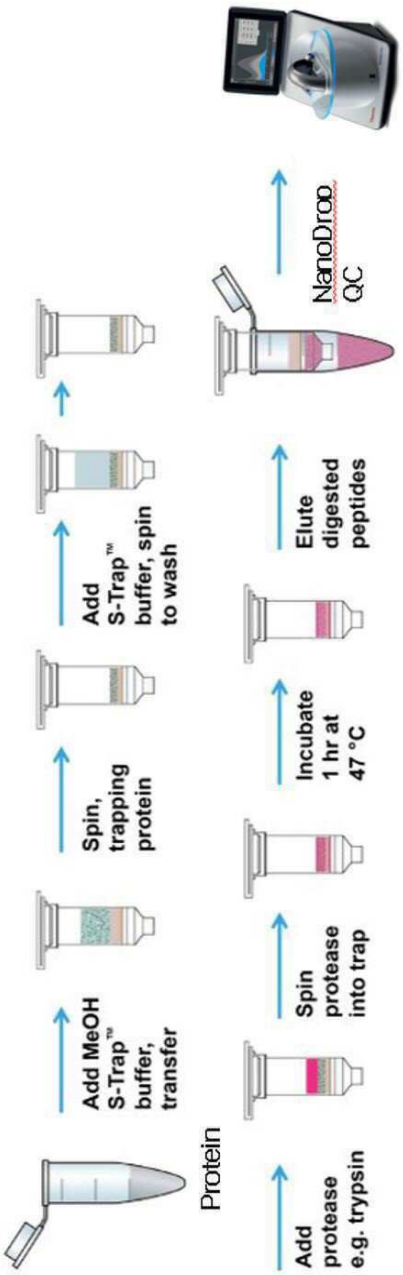



6% Remaining for Analysis
Apolipoprotein AII
Transthyretin
Complement C3
α1-Acid Glycoprotein
IgM
α2-Macroglobulin
Apolipoprotein AI
15%
α1-Antitrypsin
Haptoglobin
IgA
Fibrinogen
Transferrin
IgG
Albumin

도면1b


uV
Time 14.488 inten. 309,137
min
data1:sample_04_D0_04_BC58.lcd Detector A:280nm
data2:sample_08_V8_04_BC58.lcd Detector A:280nm
data3:sample_12_H8_04_BC56.lcd Detector A:280nm
data4:sample_16_H4_04_BC57.lcd Detector A:280nm
data5:sample_20_E0_04_BC58.lcd Detector A:280nm
data6:sample_24_D4_04_BC55.lcd Detector A:280nm
data7:sample_28_H1_04_BC55.lcd Detector A:280nm
data8:sample_29_D0_01.lcd Detector A:280nm
data9:sample_30_G8_01.lcd Detector A:280nm
data10:sample_31_B8_01.lcd Detector A:280nm

도면1c


Protein
Add protease e.g. trypsin
Spin protease into trap
Incubate 1 hr at 47 °C
Elute digested peptides
NanoDrop QC
Add MeOH S-Trap™ buffer, transfer
Spin, trapping protein
Add S-Trap™ buffer, spin to wash

도면1d



Sciex NanoLC 425

Liquid chromatography

- Analytical Column: 150 X 0.3 mm I.D, 3um, 120 Å ChromXP C18, (P/N 5022436), Trap Column : ChromXP C18, MicroTrap Cartridge: 10 x 0.3 mm, 5um, 120 Å
- LC rum time: 55 min
- Flow rate: 5 ul/min
- Gradient: 3% SolB to 25% SolB during 38 min gradient
- SolA: 0.1% formic acid in HPLC water
- SolB: 0.1% formic acid in Acetonitrile



Sciex QTOF MS 5600+

Mass spectrometry

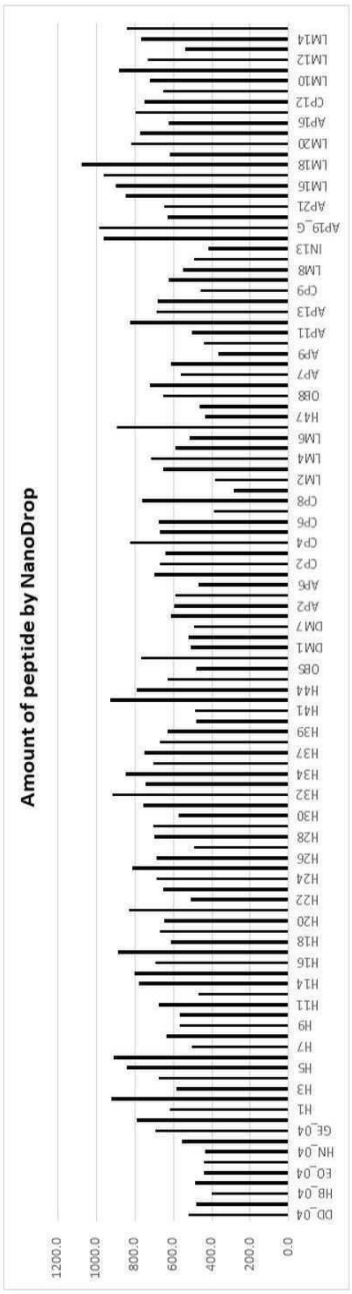
Time of Flight MS

- MS range: 400-1,250 m/z
- Accumulation speed: 250 msec

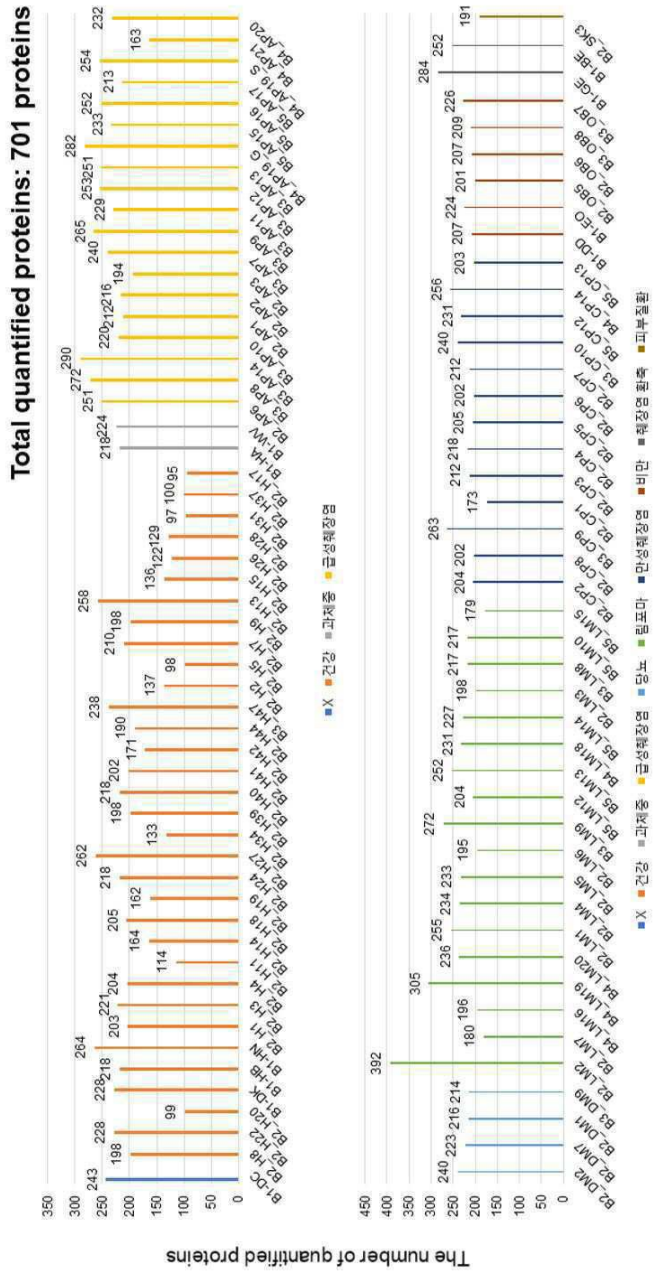
Time of Flight MS/MS

- MS range: 100-1,500
- Accumulation speed: 25 msec
- SWATH window: 34 windows (25 m/z)
- MS/MS type: High Sensitivity
- Collision Energy: Rolling CE^2, 2+ selected
- Cycle time: 3.2 sec

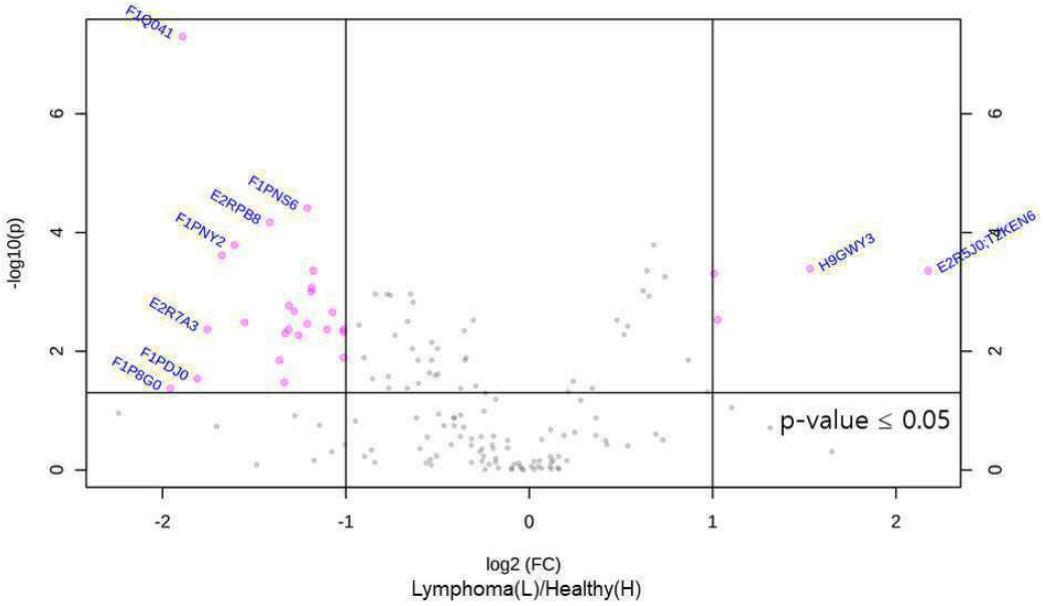
도면2


Amount of peptide by NanoDrop
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
DD_04
HB_04
EO_04
HN_04
GE_04
H1
H3
H5
H7
H9
H11
H14
H16
H18
H20
H22
H24
H26
H28
H30
H32
H34
H37
H39
H41
H44
OBS
DM1
DM7
AP2
AP6
CP2
CP4
CP6
CP8
LM2
LM4
LM6
H47
OB8
AP7
AP9
AP11
AP13
CP9
LM8
IN13
AP19_G
AP21
LM16
LM18
LM20
AP16
CP12
LM10
LM12
LM14

도면3


Total quantified proteins: 701 proteins
The number of quantified proteins
X
건강
과체중
급성췌장염
당뇨
림포마
만성췌장염
비만
췌장염 환축
피부질환

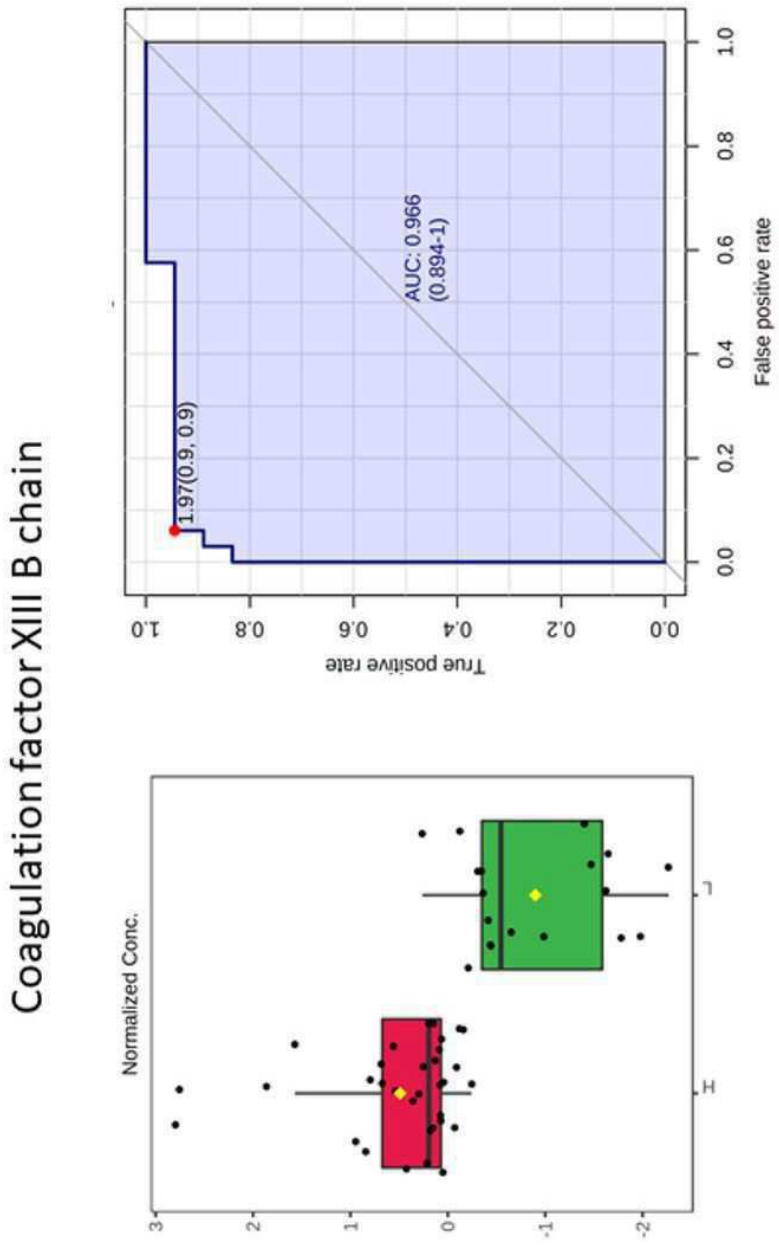
도면4


F1Q041
F1PNS6
E2RPB8
F1PNY2
E2R7A3
F1PDJ0
F1P8G0
H9GWY3
E2RKEN6
-log10(p)
p-value ≤ 0.05
log2 (FC)
Lymphoma(L)/Healthy(H)

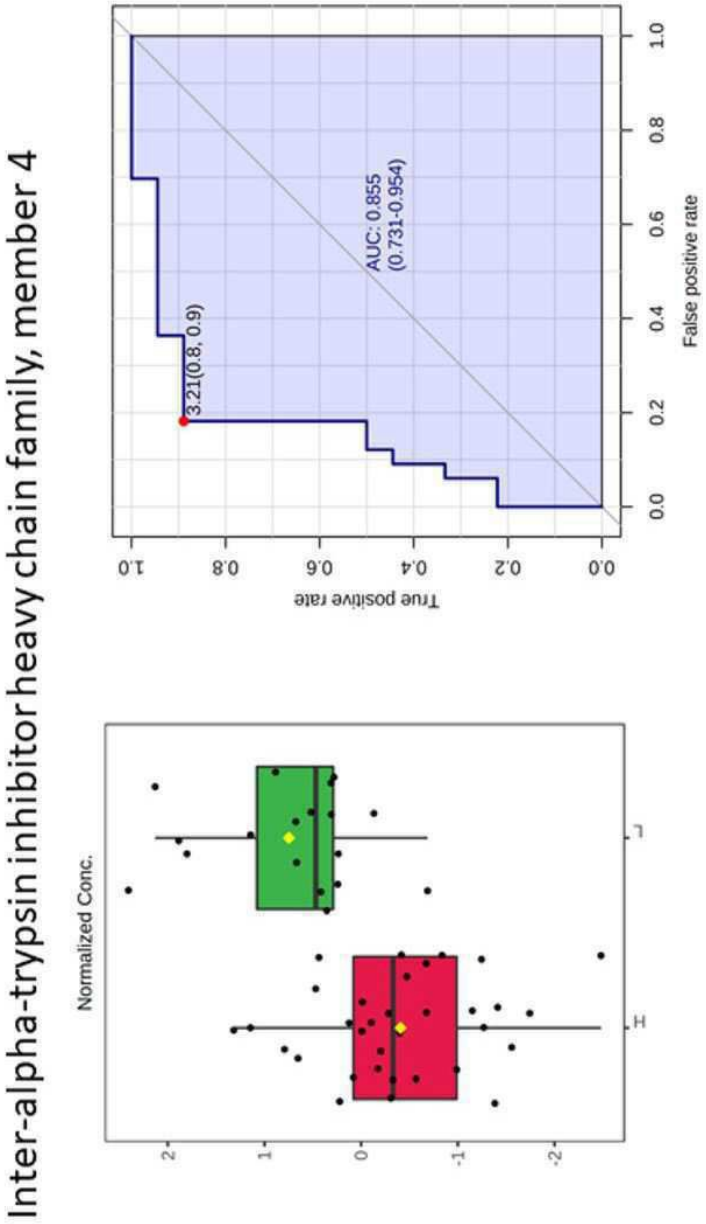
도면5

Accession No.	Ratio (Lymphoma/Control)	Log2(Ratio)	p.ajusted	`-LOG10(p)	Gene	Description
E2R5J0	4.5171	2.18	0.000441	3.3554	`CRP	Pentaxin
H9GWY3	2.8895	1.53	0.00041	3.3877	'ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family member 4
H9GWG4	2.038	1.03	0.002989	2.5245	'ITIH3	Uncharacterized protein
F1PH86	2.0112	1.01	0.000495	3.3055	'SERPINA3	Uncharacterized protein
J9P8P3	0.496	-1.01	0.012879	1.8901	`characterized	Uncharacterized protein
E2RNL8	0.49547	-1.01	0.00476	2.3224	'APOD	Apolipoprotein D
F1PG16	0.49541	-1.01	0.004302	2.3663	'CD5L	CD5 molecule like
F1Q117	0.47508	-1.07	0.002215	2.6546	'ATRN	Attractin
E2RFV9	0.46564	-1.10	0.004302	2.3663	'C9	Complement C9
F1PUM6	0.44162	-1.18	0.000441	3.3559	'VTN	Uncharacterized protein
E2RG01	0.43918	-1.19	0.000851	3.0699	'C7	Complement C7
F1PA63	0.43858	-1.19	0.000988	3.0051	'LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase
F1PNS6	0.432	-1.21	3.86E-05	4.4133	'PEPD	Peptidase D
E2QZQ1	0.43191	-1.21	0.003465	2.4603	'TF	Uncharacterized protein
B5LX43	0.41808	-1.26	0.005413	2.2666	'ctor	Factor XI
F1PDJ5	0.41118	-1.28	0.00212	2.6737	'APOA1	Apolipoprotein A-I
F1PNV5	0.40301	-1.31	0.001702	2.7692	'KLKB1	Kallikrein B1
A0A0B4J1Y8	0.40253	-1.31	0.004302	2.3663	'ADIPOQ	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing
F1P707	0.39746	-1.33	0.005008	2.3003	'LOC484960	Uncharacterized protein
E2RQF8	0.3961	-1.34	0.033527	1.4746	`characterized	Uncharacterized protein
J9NZT2	0.38878	-1.36	0.014258	1.8459	`characterized	Uncharacterized protein
E2RPB8	0.37516	-1.41	6.74E-05	4.1716	'CLEC3B	C-type lectin domain family 3 member B
F6XNI2	0.341	-1.55	0.003304	2.481	'PDE4DIP	Uncharacterized protein
F1PNY2	0.32815	-1.61	0.000162	3.7897	`characterized	Uncharacterized protein
F1Q4A3	0.31293	-1.68	0.000244	3.6134	'F10	Coagulation factor X
E2R7A3	0.29623	-1.76	0.004302	2.3663	'CFI	Complement factor I
F1PDJ0	0.28519	-1.81	0.029031	1.5371	'APOC3	Apolipoprotein C-III
F1Q041	0.2698	-1.89	5.03E-08	7.2988	'F13B	Coagulation factor XIII B chain
F1P8G0	0.25751	-1.96	0.042349	1.3732	'FGG	Fibrinogen gamma chain

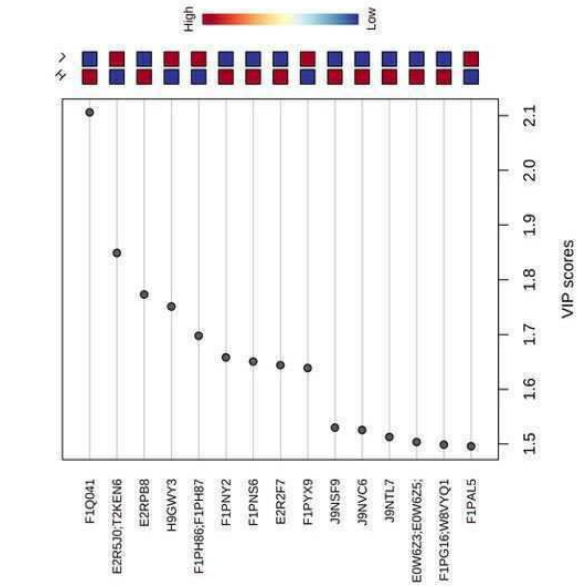
도면6a

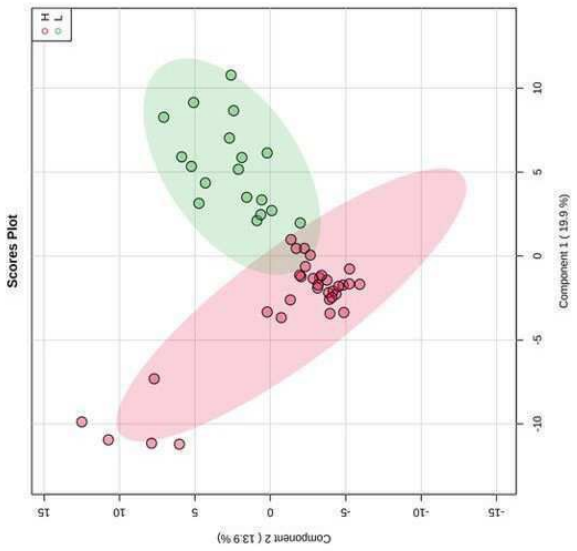

Coagulation factor XIII B chain
True positive rate
False positive rate
AUC: 0.966
(0.894-1)
1.97(0.9, 0.9)
Normalized Conc.
L
H

도면6b

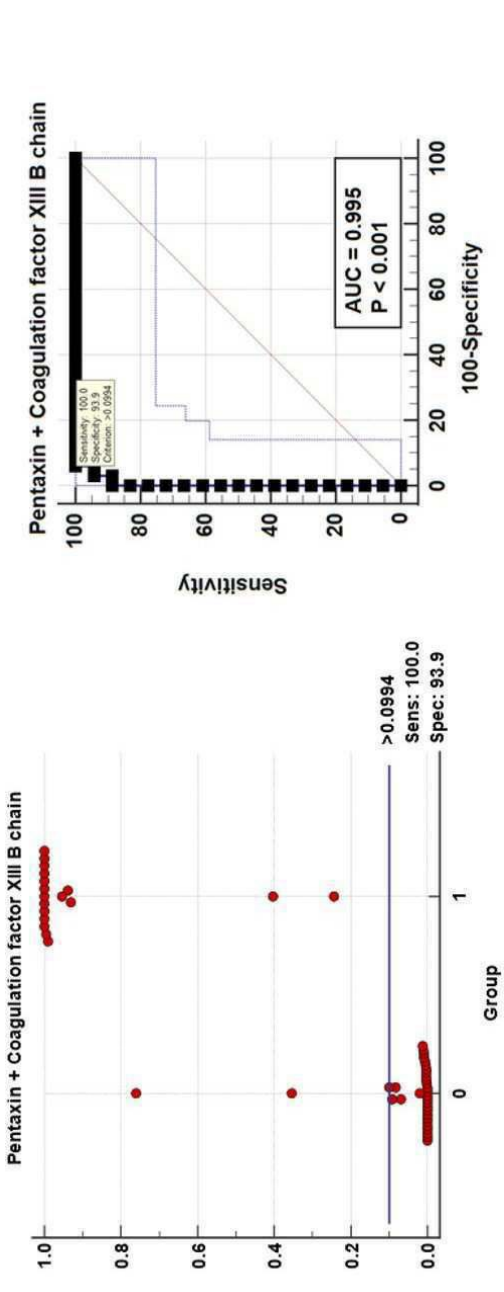

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4
True positive rate
False positive rate
AUC: 0.855
(0.731-0.954)
3.21(0.8, 0.9)
Normalized Conc.

도면7


High
Low
VIP scores
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2.0
2.1
F1Q041
E2R5J0;T2KEN6
E2RPB8
H9GWY3
F1PH86;F1PH87
F1PNY2
F1PNS6
E2R2F7
F1PYX9
J9NSP9
J9NVC6
J9NTL7
E0W6Z3;E0W6Z5;
F1PG16;W8VYQ1
F1PAL5


Scores Plot
H
L
Component 1 (19.9 %)
Component 2 (13.9 %)

도면8



Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0.995
Standard Error [a]	0.00523
95% Confidence interval [b]	0.921 to 1.000
z statistic	94.692
Significance level P (Area=0.5)	<0.0001

Classification table (cut-off value p=0.5)

Actual group	Predicted group		Percent correct
	Heathy control	Lymphoma	
Heathy control	32	1	96.97%
Lymphoma	2	16	88.89%
Percent of cases correctly classified			94.12%