(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0011571
(43) 공개일자 2018년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/564 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/564 (2013.01)
G01N 30/88 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0094096
(22) 출원일자 2016년07월25일
심사청구일자 2016년07월25일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
황신
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 6동 1407호 (신천동, 장미아파트)
김나영
서울특별시 광진구 아차산로78길 10, 102동 504호 (광장동, 워커힐푸르지오)
유현주
서울특별시 송파구 올림픽로47길 12, 102동 1607호 (쌍용아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

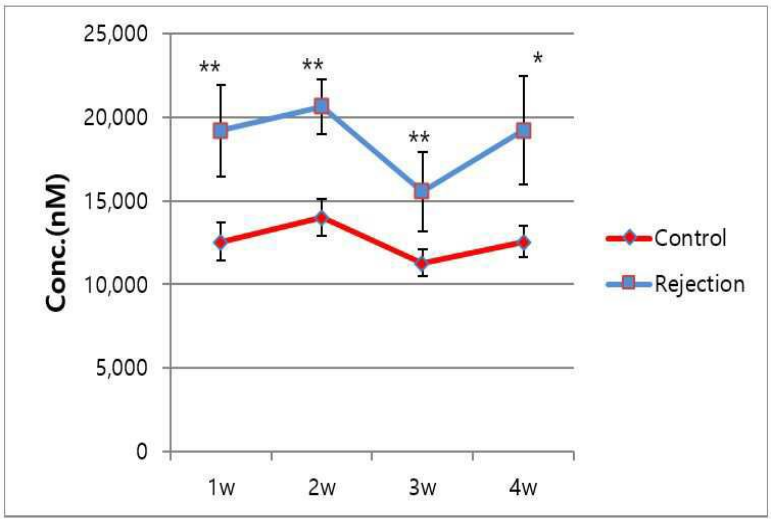
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **숙신산을 포함하는 장기이식 급성거부반응 진단용 조성물 및 이를 이용한 진단방법**

(57) 요 약

본 발명은 숙신산(Succinic acid)을 유효성분으로 함유하는 장기이식 급성거부반응 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 장기이식 수술 후 1 내지 3주차 환자의 혈청에서 숙신산의 농도 수준이 증가한 경우 급성이식거부반응이 나타나는 것을 확인함에 따라, 장기이식 수술을 받은 환자의 혈청 내 숙신산의 수준 변화를 급성이식거부반응 진단용 바이오마커로 제공할 수 있으며, 이를 이용한 비침습적 체외진단을 통하여 장기이식 환자의 급성이식거부반응을 3주 이내에 조기진단하여 급성이식거부반응 고위험군을 사전에 판별할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 2030/8822 (2013.01)
G01N 2800/245 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A2A04007141
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업 개인지원사업 중견연구 융합공동
연구과제명 장기이식 급/만성 거부반응의 원인에 따른 진단 대사체 마커 발굴과 기작규명
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

숙신산(Succinic acid)을 유효성분으로 함유하는 장기이식 급성거부반응 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 장기이식은 간, 심장, 신장, 폐, 각막, 장, 피부 및 골수로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상의 장기가 이식되는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 급성거부반응은 장기이식 수술 후 3개월 이내 이식거부반응이 나타나는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 4

체액 중 숙신산을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 장기이식 급성거부반응 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 체액은 소변, 혈액, 혈청 및 점액으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 제제는 숙신산 생성 효소, 숙신산을 기질로 사용하는 효소 및 방사선 동위원소로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 7

장기 이식된 포유류로부터 분리된 체액 내 숙신산 수준을 측정하는 단계;

상기 숙신산 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계; 및

상기 장기 이식된 포유류의 숙신산 수준이 정상 대조군보다 높을 경우 장기이식 급성거부반응 위험군으로 진단하는 단계를 포함하는 장기이식 급성거부반응 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 체액 내 숙신산 수준을 측정하는 단계는 장기이식 수술 후 3주 이내 혈청으로부터 숙신산을 검출하여 확인하는 단계인 것을 특징으로 하는 급성거부반응 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 혈청으로부터 숙신산을 검출하는 것은 액체크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry; LC-MS/MS), 방사선 동위원소를 이용한 검출법 및 숙신산 생성 효소 또는 숙신산을 기질로 이용하는 효소의 활성 측정법으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 급성거부반응 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 숙신산(Succinic acid)을 유효성분으로 함유하는 장기이식 급성거부반응 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 장기이식 거부반응은 이식된 장기가 수혜자의 몸속에서 자리를 잡지 못하고 남의 것으로 인식되어 수혜자의 면역체계에 의해 거부되는 과정으로, 처음 이식한 장기는 수혜자의 면역세포가 이식 장기의 항원을 자기 것이 아니라고 인식하는 데까지 시간이 걸리지만, 같은 기증자로부터 두 번째 이식 시에는 과거에 인식했던 항원이기 때문이 항원인식 기간이 짧아진다. 만일 수혜자의 체내에 이미 같은 항원에 대해 항체가 생겨있는 경우라면 항원-항체 반응이 신속히 일어나 초급성 거부반응을 일으킨다.

[0003] 일반적으로 거부반응을 초급성, 급성 및 만성 거부반응의 세 가지로 분류하는데, 그 진단은 발생시기에 따른 것이 아니고, 이식한 조직에 어떤 세포가 작용하여 어떤 면역기전으로 어떤 조직변화를 일으켰는지에 따라 결정된다.

[0004] 초급성 거부반응은 수혜자의 체내에 기증자의 항원에 대한 항체가 형성되어 있었던 경우 수혜자의 항체가 이식된 장기를 공격하여 발생하는 거부반응으로 빠르게 진행되고 특별한 치료제가 없기 때문에 이식된 장기를 절제해야 하는 경우가 대부분이며, 급성거부반응은 이식 장기의 항원을 수혜자의 면역세포가 인지하면서 공격함으로써 이식 후 3달 이내 발생하는 거부반응으로 다양한 면역억제제를 사용하여 예방하거나 치료한다. 또한, 만성거부반응은 반복적인 급성 거부반응으로 인한 면역학적 기전 외에도 허혈 손상, 감염 등 다양한 원인에 의해 이식된 장기가 서서히 망가지는 것을 의미한다.

[0005] 각각의 거부반응은 장기 결과에 서로 다른 영향을 주는데, 이들 중 약 4%에 해당하는 이식 소실의 주된 원인인 급성거부반응이 매우 중요하다. 이러한 급성거부반응을 조기에 진단하는 것은 이식된 장기의 생존율을 높이는 것으로 임상적으로 대단히 중요함에 따라, 급성거부반응을 조기에 진단할 수 있는 방법에 대한 연구가 매우 중요하다.

[0006] 현재까지 거부반응의 진단은 임상적인 소견이나 검사소견에 따라 의심할 수는 있으나, 임상 소견만으로 거부반응을 진단할 수 없어 이식된 장기에 대한 조직검사를 실시하여 확인하였다. 간이식 거부반응의 경우, 종래에는 간 기능 및 간 조직 검사 또는 생체검사(Biopsy)를 통하여 간이식 수술에 따른 이식거부반응을 진단하였으나, 간 조직검사를 이용한 진단결과는 이식된 간이 더 이상 기능을 못하는 수준일 때 거부반응을 진단할 수 있다는 한계가 있으며, 생체검사 역시 간 기능이 많이 저하된 이후에 진행되어야 하므로 검사 자체가 간이식 수혜자에게 위험한 문제가 있다.

[0007] 따라서 급성거부반응으로 이식된 장기가 손상되기 전에 환자의 소변이나 혈액 등의 체액을 이용하는 비침습적 체외진단방법으로 조직이식 수술의 예후를 진단함으로써, 급성거부반응의 위험군을 사전에 예측하여 이식된 장기의 급성거부반응을 예방하거나 적절한 치료를 진행하기 위해 급성거부반응의 조기 진단방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2011-0005708호(2011.01.18 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 장기이식 후 비침습적 체외진단을 통하여 급성이식거부반응을 조기에 진단하기 위한 바이오마커 및 이를 이용한 진단방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 숙신산을 유효성분으로 함유하는 장기이식 급성거부반응 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 체액 중 숙신산의 농도를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 장기이식 급성거부반응 진단용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 장기 이식된 포유류로부터 분리된 체액 내 숙신산 수준을 측정하는 단계; 상기 숙신산의 농도 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계; 및 상기 장기 이식된 포유류의 숙신산 수준이 정상 대조군보다 높을 경우 장기이식 급성거부반응 위험군으로 진단하는 단계를 포함하는 장기이식 급성거부반응 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 장기이식 수술 후 1 내지 3주차 환자의 혈청에서 숙신산의 농도 수준이 증가한 경우 급성이식거부반응이 나타나는 것을 확인함에 따라, 장기이식 수술을 받은 환자의 혈청 내 숙신산의 수준 변화를 급성이식거부반응 진단용 바이오마커로 제공할 수 있으며, 상기 바이오마커를 이용한 비침습적 체외진단방법은 장기이식 환자의 급성이식거부반응을 3주 이내에 조기진단할 수 있으며, 장기이식 수술 후 예후 또는 급성이식거부반응 고위험군을 사전에 예측할 수 있다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 간 이식 환자의 이식 수술 후 1, 2, 3 및 4주차 혈청에서 숙신산의 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 숙신산을 유효성분으로 함유하는 장기이식 급성거부반응 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 장기이식은 간, 심장, 신장, 폐, 각막, 장, 피부 및 골수로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상의 장기가 이식될 수 있다.

[0017] 상기 급성거부반응은 장기이식 수술 후 3개월 이내 이식거부반응이 나타나는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명은 체액 중 숙신산을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 장기이식 급성거부반응 진단용 키트를 제공한다.

[0019] 상기 체액은 소변, 혈액, 혈청 및 점액으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈청일 수 있다.

[0020] 상기 제제는 숙신산 생성 효소, 숙신산을 기질로 사용하는 효소 및 방사선 동위원소로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 장기 이식된 포유류로부터 분리된 체액 내 숙신산 수준을 측정하는 단계; 상기 숙신산 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계; 및 상기 장기 이식된 포유류의 숙신산 수준이 정상 대조군보다 높을 경우 장기이식 급성거부반응위험군으로 진단하는 단계를 포함하는 장기이식 급성거부반응 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[0022] 상기 체액 내 숙신산 수준을 측정하는 단계는 장기이식 수술 후 3주 이내 혈청으로부터 숙신산을 검출하여 확인하는 단계일 수 있으며, 보다 상세하게는 장기이식 수술 후 1 내지 3주차 혈청으로부터 숙신산을 검출하는 단계일 수 있다.

[0023] 상기 포유류는 사람, 돼지, 말, 양, 소, 생쥐 및 원숭이로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0024] 상기 숙신산을 검출하는 방법은 공지된 다양한 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0025] 보다 상세하게는 효소결합면역분석법(ELISA), 방사면역측정법(RIA), 웨스턴블로팅(western blotting), 면역형광법, 마이크로어레이, 전기영동, 고성능액체크로마토그래피(HPLC), 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS), 액체크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS), 신속단백질액체크로마토그래피(FPLC), 친화성 크로마토그래피, 이온교환크로마토그래피, 가스크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 모세관 전기영동-질량분석(CE-MS) 및 질량 스펙트럼으로 이루어진 군에서 단독 또는 조합되어 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는 액체크로마토그래피-탠덤 질량 분석법, 방사선 동위원소를 이용한 검출법 및 숙신산 생성 효소 또는 숙신산을 기질로 이용하는 효소의 활성 측정법으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0026] 상기 액체크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry; LC-MS/MS)은 액체크로마토그래프의 검출부에 질량분석기를 사용하는 분석 시스템으로, 이동상을 액체로 사용하여 GC/MS 보다 비교적 분자량이 크고 극성기를 갖는 비휘발성 성분의 분석이 가능하여 복잡한 조성을 갖는 식품과 생체성분 시료의 분석에 적합한 분석법이다.

[0027] 상기 방사선 동위원소를 이용한 검출법은 혈액, 체액 및 소변 등을 채취하여 측정 시료와 방사성 동위원소의 항원항체 반응을 이용하여 질병 유무를 진단하는 방법이다.

[0028] 상기 효소의 활성 측정은 효소결합면역분석법(Enzyme-linked Immunospecific assay, Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)으로 측정될 수 있다. 상기 효소면역측정법은 항원 및 항체에 대한 정량적 분석기법을 의미하며, 항원 및 항체 반응의 결과를 효소 및 기질의 반응 결과로 나타나는 물질의 변색 정도를 이용하여 측정하는 방법을 의미한다. 페르옥시데이즈, 알칼리-포스포테이즈, 베타-갈락토시데이즈 등의 효소를 화학적으로 항원 또는 항체와 결합시켜, 특이적인 항원항체 반응 후에 효소염색을 시행함으로써, 그 변색 정도를 측정하는 방법이다. 상기 효소면역분석법은 효소를 표식자로 이용하여 항원-항체 반응을 이용한 항원 또는 항체량을 측정하는 방법이다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 간 이식 수술 후 1, 2, 3 및 4주차 마다 환자의 혈청을 수집한 후 액체크로마토그래피-탠덤 질량 분석을 수행하여 혈청 내 숙신산 수준을 확인하였다.

[0030] 그 결과, 도 1과 같이 간 이식 거부반응이 일어난 환자의 이식 수술 후 1, 2, 3 및 4주차 혈청에서 숙신산의 농도가 조직이식 후 6개월 이상 거부반응이 나타나지 않은 대조군과 비교하여 유의한 수준으로 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0031] 상기 결과로부터 장기이식 환자의 혈청 내 숙신산 증가 여부는 장기 이식 후 급성이식거부반응을 조기에 진단하거나, 장기이식 수술 후 예후 또는 급성이식거부반응 고위험군을 사전에 예측하기 위한 비침습적 체외진단용 바이오마커로 사용할 수 있음이 확인되었다.

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] **<실시예 1> 간이식 급성이식거부반응 환자의 혈청 수집**

[0036] 1. 피험자 및 대조군 선정

[0037] 서울아산병원에서 수술받은 간이식 수혜자를 대상으로 혈청을 수집하였다.

[0038] 간이식 수혜자 중에 간 이외의 다른 장기의 감염, 염증 또는 자가면역질환이 있는 경우, 임신한 경우, 미성년자 및 60세 이상의 고령자는 대상에서 제외하였다.

[0039] 간 이식 수술 후 6개월 이상 경과 후 임상 정보로부터 하기 표 1과 같은 기준으로 급성거부반응 환자를 실험군으로 분류하였으며, 나이, 성별, 수술방법 등이 실험군과 유사하거나 거부반응이나 기타 후유증 및 부작용이 일어나지 않은 간이식 수혜자를 대조군(2배수)으로 선정하였다.

[0040] 실험대상자 수는 표 2와 같다.

표 1

REJECTION ACTIVITY INDEX (RAI)		
Criteria which can be used to score liver allograft biopsies with acute rejection, as defined by the World Gastroenterology Consensus Document.		
Category	Criteria	Score
Portal Inflammation	Mostly lymphocytic inflammation involving, but not noticeably expanding, a minority of the triads	1
	Expansion of most or all of the triads, by a mixed infiltrate containing lymphocytes with occasional blasts, neutrophils and eosinophils	2
	Marked expansion of most or all of the triads by a mixed infiltrate containing numerous blasts and eosinophils with inflammatory spillover into the periportal parenchyma	3
Bile Duct Inflammation Damage	A minority of the ducts are cuffed and infiltrated by inflammatory cells and show only mild reactive changes such as increased nuclear: cytoplasmic ratio of the epithelial cells	1
	Most or all of the ducts infiltrated by inflammatory cells. More than an occasional duct shows degenerative changes such as nuclear pleomorphism, disordered polarity and cytoplasmic vacuolization of the epithelium	2
	As above for 2, with most or all of the ducts showing degenerative changes or focal lumenal disruption	3
Venous Endothelial Inflammation	Subendothelial lymphocytic infiltration involving some, but not a majority of the portal and/or hepatic venules	1
	Subendothelial infiltration involving most or all of the portal and/or hepatic venules	2
	As above for 2, with moderate or severe perivenular inflammation that extends into the perivenular parenchyma and is associated with perivenular hepatocyte necrosis	3
Total RAI Score = _/9		
Reference Anonymous. Banff Schema for Grading Liver Allograft Rejection: An International Consensus Document. *Hepatology* 1997;25(3):658-63.		

[0041]

표 2

[0042]

	1주차	2주차	3주차	4주차
실험군 (이식거부반응군)	7	7	6	3
대조군	14	15	13	5

[0043] 2. 혈청 수집

[0044] 이식 후 1주일부터 한달 간 매주 1회 SST 튜브(BD)에 혈액을 채취하고 채취된 혈액으로부터 혈청을 수집하여 사용전까지 - 80℃에 보관하였다.

[0045] 상기 수집된 사람 혈청 100㎕에 클로로포름/메탄올(1/2, v/v) 375㎕와 내부표준 물질로 10 ㎛M $^{13}C_5$-글루타민(glutamine)이 포함된 용액 50㎕를 혈청에 넣어 잘 혼합하고, 클로로포름과 물을 각각 125㎕씩 첨가한 후 액체-액체 추출법으로 용액의 상을 분리하였다.

[0046] 분리 후 물 층(aqueous phase)을 모은 후 진공 아래에서 건조하고, 50% 메탄올 50㎕를 첨가하였다.

[0048] **<실시예 2> 숙신산(Succinic acid) 수준 확인**

[0049] 간 이식 수술 후 1, 2, 3 및 4주차 마다 환자의 혈청을 상기 실시예 1의 방법으로 수집 및 처리한 후 액체크로마토그래피-탠덤질량 분석(Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry; LC-MS/MS)을 수행하여 혈청 내 숙신산 수준을 확인하였다.

[0050] 1290 HPLC (Agilent)와 Qtrap 5500 (ABSciex)로 구성된 LC-MS/MS 시스템을 이용하여 숙신산의 수준을 확인하였다.

[0051] 역상 컬럼(reverse phased column; Synergi fusion RP 50 × 2 mm)에 3㎕의 시료를 주입하고, 물에 용해시킨 암모니윰 아세테이트 5mM과 메탄올에 용해시킨 암모니윰 아세테이트 5mM을 각각 이동상 A와 이동상 B로 사용하였으며, 사용된 이동상 분리구배는 하기와 같다.

[0052] 먼저, 0%의 이동상 B 조건에서 5분간 유지한 후 0-90%까지 이동상 B의 조성을 2분간 변화시키고, 90% 이동상 B 조건에서 8분간 유지하였다. 90-0%로 이동상 B의 조성을 1분간 변화시킨 후, 0%에서 9분간 유지하여 다음 분석을 준비하였다.

[0053] 이동상은 70㎕/분의 유속으로 흘려주었는데, 7-15분 사이에는 140㎕/분으로 유속을 변화시켜 주었다. 컬럼 온도는 23℃였으며, 다중반응모니터링 (Multiple reaction monitoring, MRM) 기법을 사용하여 음이온 모드에서 분석을 수행하였다.

[0054] 숙신산과 내부표준 물질인 $^{13}C_5$-글루타민(glutamine)에 해당하는 특이적인 MRM 조건에 해당하는 추출이온 크로마토크램(extracted ion chromatogram)을 얻고, 해당 피크의 면적(area under the curve, AUC)을 이용하여 정량하였다.

[0055] 검량선은 시판중인 숙신산을 사용하여 0.5~500 ㎛M 범위에서 작성하였으며, 이때 R^2 값은 0.99 이상이었다. 실험군과 대조군의 비교는 student t test를 통하여 각 시점마다 수행되었다. (*P<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.)

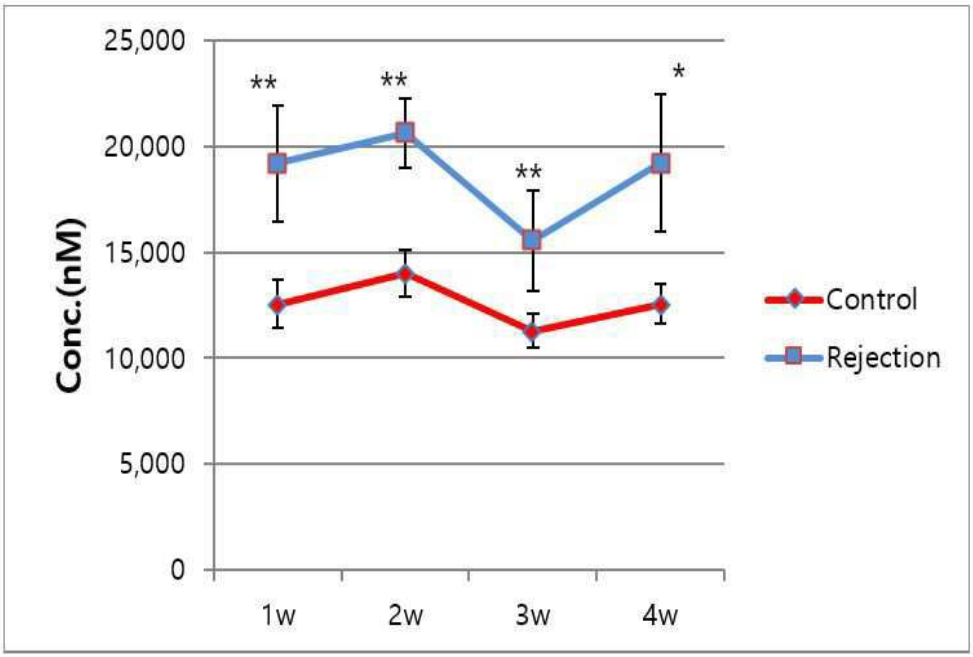
[0056] 그 결과, 도 1과 같이 환자의 간 이식 수술 후 간 이식 거부반응이 일어난 환자의 1, 2, 3 및 4주차 혈청에서 숙신산의 농도가 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 상기 결과로부터 장기이식 환자의 혈청 내 숙신산 증가 여부는 장기 이식 후 급성이식거부반응을 조기에 진단하거나, 장기이식 수술 후 예후 또는 급성이식거부반응 고위험군을 사전에 예측하기 위한 비침습적 체외진단용 바이오마커로 사용할 수 있음이 확인되었다.

[0059] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1


25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
Conc.(nM)
**
**
**
*
1w
2w
3w
4w
Control
Rejection