(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0010106
(43) 공개일자 2013년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/536* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7007241
(22) 출원일자(국제) 2010년08월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/045957
(87) 국제공개번호 WO 2011/022526
국제공개일자 2011년02월24일
(30) 우선권주장
61/235,503 2009년08월20일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 유타 리서치 파운데이션
미국 유타주 84108, 솔트레이크 씨티, 스위트 310, 아라핀 드라이브 615
아이에이치씨 헬쓰 서비스즈, 인크.
미국 유타 (우편번호 84111) 솔트 레이크 시티 사우쓰 스테이트 스트리트 36 스위트 2200
브라이엄 영 유니버시티
미국 84602 유타주 프로보 3760 에이치비엘엘 테크놀로지 트랜스퍼 오피스
(72) 발명자
그레이브스, 스티븐, 더블유
미국 유타 84003 하이랜드 5401 웨스트 10480
에스플린, 마이클, 신
미국 유타 84109 솔트레이크시티 피치 스트리트 3712 사우스
(74) 대리인
윤동열

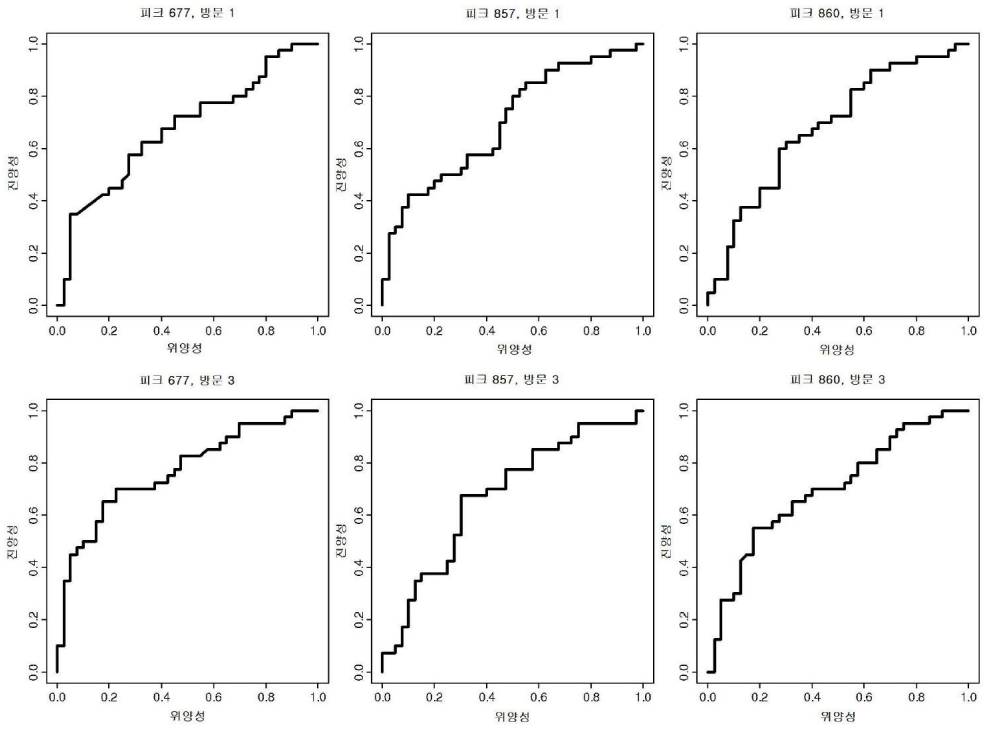
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **조산의 위험을 평가하기 위한 바이오마커의 확인 및 정량화**

(57) 요 약

임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 상기 방법은 개체로부터의 생물학적 샘플에서 조산과 관련된 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 검출하는 단계 및 정량화하는 단계를 포함한다. 또한 조산의 위험을 예측하는데 유용한 분리된 바이오마커 및 키트가 본원에 기재되어 있다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 개체로부터 생물학적 샘플에 존재하는 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 조합을 검출하며, 여기에서 제1 바이오마커는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 이의 임의의 조합을 포함하고, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 단백질인 단계; 및

(b) 상기 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 양을 정량화하는 단계;

를 포함하는, 임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (b)는 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함을 조산을 겪지 않은 개체로부터 유래한 대조군 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 대조군 농도와 비교하여 증가된 조산에 대한 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 조산에 대한 증가된 위험을 확인하는 단계는 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 펩티드의 풍부함이 대조군 생물학적 샘플에서 적어도 하나의 펩티드의 대조군 농도보다 유의하게 더 낮은 것을 측정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함을 개체로부터의 생물학적 샘플에서 참조 분자의 대조군 농도와 비교하여 증가된 조산에 대한 위험을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 바이오마커는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 가지는 적어도 2종의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 제1 바이오마커는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3을 가지는 적어도 3종의 펩티드를 포함하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 2종의 단백질인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 3종의 단백질인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 4종의 단백질인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항에 있어서, 제1 바이오마커는 서열번호 1인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 검출 단계 (a)는 프로테오믹스 기술을 포함하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 검출 단계 (a)는 (1) 항체-항원 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서 생물학적 샘플을 항체와 접촉시키며, 상기 항체는 제1 또는 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 단계; 및 (2) 항체-항원 복합체의 형성에 대하여 분석하여 생물학적 샘플에서 제1 또는 제2 바이오마커를 검출하는 단계;를 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체는 단일클론 항체를 포함하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 항체는 담체 분자에 결합 또는 컨쥬게이트되는 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 항체는 고체 지지체에 결합 또는 컨쥬게이트되는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 항체-항원 복합체의 형성 후, 고체 지지체 상에서 항체에 결합하지 않은 생물학적 샘플의 임의의 성분은 제거되는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플은 혈청, 혈장, 혈액, 소변, 뇌척수액, 양수, 활액(synovial fluid), 자궁 경부 질액, 세척액(lavage fluid), 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플은 혈청인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플은 혈액인 방법.

청구항 22

(a) 개체로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계;

(b) 생물학적 샘플을 제1 항체 및 제2 항체와 접촉시키며, 여기에서 샘플과 제1 항체 및 제2 항체의 접촉시 제1 항체는 제1 바이오마커에 결합하여 제1 항체-항원 복합체를 형성하고 제2 항체는 제2 바이오마커에 결합하여 제2 항체-항원 복합체를 형성하고, 여기에서 제1 바이오마커는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 이의 임의의 조합을 포함하며 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 단백질인 단계;

(c) 제1 항체-항원 복합체 및 제2 항체-항원 복합체의 형성을 분석하여 생물학적 샘플에서 이의 제1 바이오마커

및 제2 바이오마커의 양을 정량화하는 단계; 및

(d) 생물학적 샘플에서 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 양을 조산을 겪지 않은 개체에서의 동일한 바이오마커의 양과 비교하여 조산의 위험을 평가하는 단계;

를 포함하는, 임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 항체 및 제2 항체는 독립적으로 단일클론 항체를 포함하는 방법.

청구항 24

(a) 적어도 제1 항체 및 제2 항체(여기에서 제1 항체는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3을 포함하는 아미노산 서열을 가지는 제1 바이오마커에 선택적으로 결합하여 제1 항체-항원 복합체를 형성할 수 있고, 제2 항체는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 제2 바이오마커에 선택적으로 결합하여 제2 항체-항원 복합체를 형성할 수 있음); 및

(b) 상기 제1 항체-항원 복합체 및 제2 항체-항원 복합체의 형성을 분석하는 상기 제1 항체 및 제2 항체와 기능적으로 관련된 지표;

를 포함하는, 임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하는 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 생물학적 샘플에서 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 양을 정량화하도록 구성된 지표를 추가로 포함하는 키트.

청구항 26

제24항에 있어서, 제1 항체 및 제2 항체는 독립적으로 단일클론 항체를 포함하는 키트.

명 세 서

배 경 기 술

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2009년 8월 20일자로 출원된 미국 가출원 제61/253,503호에 대하여 우선권을 주장한다. 이 출원은 모든 교시 내용이 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0003] <승인>

[0004] 본 발명에 이른 연구는 미국국립보건원(National Institutes of Health)이 승인 번호 R21HD047319 및 U01HD050080으로 일부분 투자하였다. 미국 정부는 본 발명에 있어서 일정 권리를 가진다.

[0005] <서열목록에 대한 상호 참조>

[0006] 본원에 기재된 펩티드는 서열 식별 번호(서열번호)로 지칭된다. 서열번호는 숫자상으로 서열 식별자 <400>1, <400>2 등에 해당한다. 컴퓨터로 판독가능한 형식(CFR)으로 기재된 서열목록은 전체적으로 참조로 포함된다.

[0007] <배경기술>

[0008] 조기분만은 모든 임부의 10% 초과에서 일어난다. 이는 또한 신생아와 관련된 질환 및 사망의 주된 원인 중의 하나이다. 달이 차서 출생한 아기들과 비교하여, 미숙아로 태어난 아기들은 신생아 사망이 40배 증가하고, 뇌성마비, 만성 호흡기 질환, 실명 및 귀먹음과 같은 주요한 의학적 합병증에 대한 위험이 유의하게 증가할 수 있다.

또한, 출생시의 체중이 1.5 lbs 미만인 어린이의 무려 70%에서 장기적인 신경학적 및 발달상의 문제가 확인되었다. 이들 합병증은 미국에서만 매년 수십억 달러의 직접 경비 및 미실현 잠재력과 관련된 것으로 추산되었다.

[0009] 이 문제의 중요성에도 불구하고, 조기 진통(preterm labor) 및 분만을 일으키는 신체에서 일어나는 것에 대하여 불확실성이 있었다. 조산(preterm birth, PTB)의 원인에 대하여 존재하는 불확실성 때문에 이들 문제를 효과적으로 처치하는 능력이 제한되어 있더라도, 적절한 사전 경고가 주어진다면 의학적 측정이 의학 전문가에 의하여 이루어질 수 있다. 만약 임부가 조산을 겪을 가능성이 있음을 예측할 수 있다면, 조산을 늦출 수 있거나 심지어 예방할 수 있는 약제를 투여할 수 있다. 추가적으로, 만약 조산의 위험이 더 늦기 전에 발견된다면 모체를 통해 태아로 투여될 경우 호르몬 유도체는 태아 폐 성숙도를 향상시키고 따라서 조산과 관련된 주요한 합병증 중의 하나를 감소시킬 수 있다고 공지되어 있다. 그러나, 현재는 임부가 이러한 임신의 합병증을 발전시킬 위험이 있는지 알 수 있는 방법이 없는 것으로 보인다. 따라서, 중요한 미충족 수요는 조산에 대한 위험이 있는 모체의 조기 발견을 위한 테스트 절차를 공식화하는 것이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0010] 임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 상기 방법은 개체로부터의 생물학적 샘플에서 조산과 관련된 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 검출하는 단계 및 정량화하는 단계를 포함한다. 또한 조산을 예측하는데 유용한 바이오마커가 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 이점은 하기 기재에서 부분적으로 설명될 것이고, 부분적으로는 하기 기재로부터 명백할 것이며, 또는 하기 기재된 양태의 실시에 의해 알 수 있다. 하기 기재된 이점은 특히 첨부된 청구항에서 지적한 요소 및 조합에 의하여 실현되고 성취될 것이다. 상기 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명은 모두 단지 예시적이고 설명하기 위한 것이며 이들이 제한되지 않는 것이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 본 명세서에 포함되고 본 명세서의 부분을 구성하는 첨부된 도면은 하기 기재된 몇몇 양태를 예시한다.

도 1은 제1 바이오마커에 대하여 스크리닝된 수신자 조작 특성 곡선 (receiver operator curve, ROC)을 나타낸다.

도 2는 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커에 대하여 스크리닝된 생물학적 샘플의 수신자 조작 특성 곡선(ROC)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 화합물, 조성물, 및/또는 방법이 개시되고 기재되기 전에, 하기 기재된 양태는 특정 화합물, 합성 방법, 또는 사용으로 제한되지 않고, 물론 다양화할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는 특정 양태를 기재하기 위한 목적으로만 사용된 것이고 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0013] 하기의 본 명세서 및 청구항에서, 정의될 많은 용어들은 하기 의미를 가지는 것으로 언급될 것이다.

[0014] 명세서 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 문맥이 명확하게 다르게 나타내지 않으면, 단수 형태(“a”, “an” 및 “the”)는 복수 지시물을 포함하는 것임을 주의해야 한다. 따라서, 예를 들어 “바이오마커”에 대한 언급은 둘 이상의 상기 바이오마커들의 혼합물 등을 포함한다.

[0015] “선택적” 또는 “선택적으로”는 나중에 기재된 사건 또는 상황이 일어날 수 있거나 또는 일어날 수 없는 것, 및 기재가 사건 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0016] 본원에 사용된 바와 같이, “개체”는 조산에 대한 위험이 있는 임신한 여성을 지칭하며 본원에 기재된 방법으로부터 이익을 얻는다.

[0017] 본원에 사용된 바와 같이, “조산(preterm birth)”은 전 임신 기간(full gestation) 전의 아기의 분만을 포함

한다. 예를 들어, 임신 기간 37주 미만의 아기의 분만은 조산으로 여겨진다. 용어 조산은 조기분만(preterm delivery) 및 미숙분만(premature delivery)과 동의어이다.

[0018] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "바이오마커"는 조산의 위험을 예측하는데 유용한 다양한 농도로 임신한 여성에 존재하는 자연 발생적인 생물학적 분자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 바이오마커는 조산을 겪지 않은 개체에서의 동일한 바이오마커의 양에 비하여 조산의 위험이 있는 개체에서 더 높은 또는 더 낮은 양으로 존재하는 펩티드일 수 있다. 바이오마커는 이에 제한되지 않지만 생물학적 아민 및 스테로이드와 같은 소분자를 포함하여 펩티드 이외에 다른 분자를 포함할 수 있다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드"는 하나의 아미노산의 카르복시기에 의해 다른 아미노산의 알파 아미노기와 연결된 둘 이상의 아미노산을 포함하는 천연 또는 합성 분자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 펩티드는 길이로 제한되지 않으며, 따라서 "펩티드"는 폴리펩티드 및 단백질을 포함할 수 있다.

[0020] 본원에 사용된 바와 같이, 펩티드에 대하여 용어 "분리된"은 물질이 자연 발생적인 것이라면 물질의 원래의 환경에서 제거된 물질을 지칭한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연 발생적인 펩티드는 분리되지 않은 것이지만, 자연계(natural system)에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 떼어 놓은 동일한 펩티드는 분리된 것이다. 이러한 분리된 펩티드는 조성물의 일부일 수 있고 또한 조성물이 자연 환경의 일부가 아니므로 분리될 수 있다. "분리된" 펩티드는 또한 재조합 DNA 기술로 합성된 또는 생성된 물질을 포함한다.

[0021] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 면역반응성"은 생물학적 샘플 또는 펩티드와 다른 생물제제(biologic)의 이종 집단에서 펩티드 존재의 결정요인인, 펩티드와 항체 사이의 결합과 같은 측정가능하고 재생가능한 특정 면역반응을 지칭한다. 용어 "특이적으로 면역반응성"은 구조적 모양과 표면 특징의 특이적 인식을 포함할 수 있다. 따라서, 지정된 조건 하에서, 특정 펩티드에 특이적으로 면역반응성인 항체는 샘플 내에 존재하는 다른 펩티드에 유의한 양으로 결합하지 않는다. 다양한 면역분석 포맷(immunoassay format)이 특정 펩티드에 특이적으로 면역반응성인 항체를 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 고체상 ELISA 면역분석(solid-phase ELISA immunoassay)은 펩티드와 특이적으로 면역반응성인 단일클론 항체를 선택하는데 일상적으로 사용된다. 특이적인 면역반응성을 결정하는데 사용될 수 있는 면역분석 포맷 및 조건의 기재에 대하여, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 [Harlow 및 Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York]을 참고한다.

[0022] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 주어진 항원에 특이적으로 면역반응성인 면역글로불린을 지칭한다. 용어 "항체"는 임의의 이소타입(IgG, IgA, IgM, IgE 등)의 전체 항체, 및 이의 절편을 포함하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 "항체"는 또한 항체 제조물을 포함한다. 항체는 당업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 검출가능한 표지로 표지될 수 있다. 표지는 방사성 동위원소, 형광 화합물, 화학발광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 표지일 수 있다. 일부 양태에서, 관심의 펩티드에 결합하는 항체는 표지되지 않을 수 있으나, 대신에 1차 항체에 특이적으로 결합하는 표지된 2차 항체의 결합으로 검출될 수 있다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "검출하다"는 예를 들어 펩티드 및 다른 생물학적 분자와 같은 하나 이상의 바이오마커의 검출할 수 없는, 낮은, 보통의, 또는 높은 혈청 농도의 정량적인 측정을 지칭한다.

[0024] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "정량화하다(quantify)" 및 "정량화(quantification)"는 상호교환적으로 사용될 수 있고, 상대적이든지 또는 절대적이든지, 샘플 내 물질(예, 바이오마커)의 정량 또는 풍부함(abundance)을 측정하는 과정을 지칭한다.

[0025] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 주어진 값이 원하는 결과에 영향을 주지 않으면서 종점의 "약간 초과" 또는 "약간 미만"일 수 있도록 함으로써 수적 범위 종점(numerical range endpoint)에 융통성을 제공하는데 사용된다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 항목들(items), 구조 요소들, 구성 요소들 및/또는 물질들의 복수형은 편의를 위해 일반적인 목록에서 표시될 수 있다. 그러나, 이들 목록은 목록의 각 구성원이 별개이고 유일한 구성원으로서 개별적으로 확인되는 것처럼 해석되어야만 한다. 그러므로 이러한 목록의 어떠한 개별적인 구성원도 반대 지시가 없다면 일반적인 그룹에서 단지 그것들의 표시에 기초한 동일한 목록의 임의의 다른 구성원과 사실상 동등한 것처럼 해석되어서는 안된다.

[0027] 농도, 양 및 다른 숫자 데이터는 본원에 범위 형식으로 표현 또는 제시될 수 있다. 이러한 범위 형식은 단지 편의 및 간결성을 위해 사용된 것이며 따라서 그 범위의 한계로서 명백하게 열거된 수치를 포함할 뿐만 아니라,

각 수치 및 종속범위(sub-range)가 명백하게 열거된 것처럼 범위 내에 포함된 모든 개별적인 수치 또는 종속범위도 포함하는 것으로 융통적으로 해석되어야 한다는 것이 이해되어야 한다. 예시로서, "약 1 내지 약 5"의 숫자 범위는 약 1 내지 약 5의 명백하게 열거된 값을 포함할 뿐만 아니라, 지시된 범위 내의 개별적인 값 및 종속범위도 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 그러므로, 이 숫자 범위에는 개별적으로 1, 2, 3, 4 및 5뿐만 아니라 2, 3 및 4와 같은 개별적인 값 및 1~3, 2~4 및 3~5 등과 같은 종속범위가 포함된다. 이러한 동일한 원칙이 최소값 또는 최대값으로서 하나의 수치만을 나타낸 범위에 적용된다. 또한, 이러한 해석은 기재된 범위 또는 특성의 폭에 관계없이 적용되어야 한다.

[0028] 조산에 대한 위험이 있는 임신한 개체를 확인하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 임신 초기에서 중기 동안 조산에 대한 위험이 있을 수 있는 임신한 개체를 확인하는데 이용될 수 있는 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커가 확인되었다. 이러한 마커는 유사한 증상을 나타내는 조산 및 다른 이상 사이의 진단상 구별을 가능하게 할 수 있다. 조산에 대한 더 큰 위험이 있는 개체의 조기 확인은 상기 개체를 보다 접근하여 모니터링할 수 있으므로 가치가 상당할 것이다.

[0029] 본원에 기재된 방법을 사용하여 임신한 개체를 테스트하는 것은 조산을 나타내는 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커가 개체에서 정량화할 수 있는 경우 임신 동안 언제라도 일어날 수 있다. 예를 들어, 하나의 양태에서 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커는 임신 약 20주 내지 약 34주에서 테스트될 수 있다. 다른 양태에서, 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커는 임신 약 24주 내지 약 32주에서 테스트될 수 있다. 상기 테스트는 임신 동안에 어느 시점에서도 실행될 수 있으므로 이들 범위는 제한적으로 이해되어서는 안된다는 것을 주목해야 한다. 오히려 이들 범위는 대다수의 개체에서 상기 테스트가 가장 일어날 수 있는 임신 기간 사이클의 기간을 설명하는데 제공된다.

[0030] 조산에 대한 위험이 있는 개체를 확인하는데 유용한 바이오마커는 다양한 펩티드 및 다른 생물학적 분자를 포함한다. 조산의 발생과 상관된 본원에 기재된 기술 및 방법을 사용하여 특정 펩티드 및 다른 생물학적 분자가 확인되었다. 하나 이상의 이들 펩티드 및 다른 생물학적 분자의 정량화는 개체에 대한 조산의 위험의 일부 지시를 제공하고, 따라서 예방적인 처치의 기회를 제공할 수 있다. 조산 합병증의 전조가 되는 임의의 바이오마커는 본 발명의 청구항의 범위 내인 것으로 고려되어야 함을 주목해야 한다. 그러나 하나의 양태에서, 조산 합병증과 관련된 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 비제한적인 예는 대조군 개체(즉, 조산 합병증을 겪지 않은 임신한 여성)와 통계적으로 상이한 것으로($p \leq 0.01$) 발견되는 생물학적 분자 및 펩티드를 포함할 수 있고, p(확률) 값이 0.02 미만인 것은 컷오프로서 작용하였다.

[0031] 하나의 양태에서, 바이오마커는 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 포함한다. 이 양태에서, 제1 바이오마커는 qlglpgppdvpdhaayhpf (서열번호 1), nvhsagaagsrmnfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf(서열번호 2), nvhsagaagsrm$^{(0)}$nfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf(서열번호 3), 또는 이의 임의의 조합의 아미노산 서열을 가지는 펩티드와 같은 조산과 관련된 펩티드를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 제2 바이오마커는 조산과 관련된 전장 단백질 또는 단백질의 펩티드 절편을 포함할 수 있다. 이러한 제2 바이오마커는 이에 제한되지 않지만 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 이들 전장 단백질의 서열은 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 입수가능하다.

[0032] 본 출원 내에 모든 목적을 위해서 전체적으로 본원에 참조로 포함된 국제공개 WO 2008/079407호에 개시된 바와 같은 바이오마커를 확인하는데 사용된 프로테오믹스 기술은 임신한 개체에서 조산의 위험을 평가하기 위한 바이오마커를 확인하고 정량화하는데 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 잠재적인 조산에 대하여 임신한 개체를 테스트하는 방법은 대조군(즉, 조산을 겪지 않은 임신한 여성에서의 바이오마커(들)의 상대적인 농도 또는 양)과 비교하여 생물학적 샘플에 존재하는 조산과 관련된 제1 및 제2 바이오마커의 조합의 농도 또는 양에서의 차이점을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 프로테오믹스 시스템 및 방법은 제1 및 제2 바이오마커를 확인하고 정량화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상이한 생물학적 샘플들로부터의 다수의 질량 스펙트럼을 비교하는 단계, 비생물학적 변이성에 대해 보상하는 접근법을 사용한 후에 정량적으로 다른 질량 이온(mass ion)을 위치시키는 단계, 관심의 바이오마커를 분리하고 특성화하는 단계가 본원에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 다수의 생물학적 샘플의 각각을 분별하여 다수의 용리물을 형성하는 단계, 다수의 용리 시간에 다수의 용리물의 각각으로부터 다수의 질량 스펙트럼을 얻는 단계, 및 생물학적 샘플 사이에서 정량적으로 다르게 나타나는 관심의 분자 이온 피크를 찾아내는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 추가적으로 관심의 피크와 실질적으

로 유사한 용리 시간 및 질량 대 전하비(mass to charge ratio)를 가지는, 생물학적 샘플 사이에서 실질적으로 일관된 내재성의(endogenous) 참조 분자에 상응하는 질량 스펙트럼 참조 피크를 확인하는 단계, 및 상기 내재성의 참조 분자의 질량 스펙트럼 피크에 대하여 관심의 피크를 표준화함으로써 다수의 용리물에 걸쳐서 각각의 생물학적 샘플에 대하여 비생물학적 변이에 대해 보상하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 한 번에 한 번의 실행(run)에서 다수의 충돌 에너지의 각각을 사용하는 충돌 유도성 분열(fragmentation) 연구를 수행하는 단계 및 평균화없이 결과로서 생긴 다수의 절편 이온 질량 스펙트럼을 합하여 하나의 누적 딸 절편(daughter fragment) 질량 스펙트럼을 형성하고, 딸 절편 질량 스펙트럼을 사용하여 그 다음에 하나의 정렬된 질량 스펙트럼에서 관심의 피크에 상응하는 펩티드를 확인하는데 사용되는 아미노산 서열 데이터를 확립하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 다른 양태에서, 제1 및 제2 바이오마커를 함유하는 생물학적 샘플을 분별하여 다수의 용리물을 형성하고, 다수의 용리 시간에 상기 다수의 용리물의 각각으로부터 다수의 질량 스펙트럼을 얻고, 다수의 용리물의 각각에서 용리한 내재성의 정렬 분자(alignment molecule)에 상응하는 질량 스펙트럼 정렬 피크를 확인한다. 상기 방법은 다수의 용리물의 각각으로부터 질량 스펙트럼 정렬 피크를 정렬함으로써 각각의 용리물로부터 다수의 질량 스펙트럼을 정렬하는 단계, 다수의 정렬된 질량 스펙트럼을 합하여 하나의 정렬된 질량 스펙트럼을 형성하는 단계, 및 하나의 정렬된 질량 스펙트럼에서 관심의 피크에 상응하는 펩티드를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 기술이 고려되지만, 하나의 양태에서 다수의 질량 스펙트럼을 정렬하는 단계는 다수의 질량 스펙트럼을 시각적으로 정렬하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 추가적으로, 다수의 생물학적 샘플 내에 존재하는 다수의 생물학적 분자의 각각을 분별하는 단계가 많은 방법에 의하여, 예를 들어 모세관 액체 크로마토그래피(capillary liquid chromatography, cLC)에 의하여 성취될 수 있다. 본원에 기재된 제1 및 제2 바이오마커를 검출하고 정량화하는 특정 방법 및 파라미터는 실시예에 제공된다.

[0034] 본원에 기재된 제1 및 제2 바이오마커를 검출하고 정량화하는데 사용되는 프로테오믹 기술은 표본 로딩(specimen loading), 이온화 효율 및 질량 분석기 민감도에서 차이를 정정하는데 사용될 수 있는 내부 통제(internal control)로서의 역할을 하는 모든 혈청에 고유한 분자를 사용한다. 상기 논의에 더하여, 피크는 비교 그룹 사이에서 정량적으로 유사하게 나타날 수 있으면 참조로서 선택되고, 후보 바이오마커로서 동일한 용리 창(elution window)에서 컬럼으로부터 용리하며, 질량 대 전하비가 후보 바이오마커의 질량 대 전하비와 유사하고, 모든 표본이 노이즈의 수준이 3배 초과인 양을 가질 정도로 충분히 풍부하다. 여기에 기재된 참조 피크는 피크 양에서 생물학적 차이 때문이 아니라, 표본 처리, 크로마토그래피 로딩(chromatographic loading), 이온화 효율 또는 기기 민감도 변동(instrumental sensitivity fluctuation)과 관련된 피크 높이 또는 면적의 정량적인 정정을 위한 것이다. 이 참조는 내부 정량 통제로 불려진다. 다른 양태에서, 외부 통제는 바이오마커의 정량화를 용이하게 하는데 사용될 수 있다. 이 양태에서, 통제할 바이오마커의 비율이 계산될 수 있도록 공지된 양의 화합물이 생물학적 샘플에 첨가될 수 있다. 그 다음 그 비율은 조산의 위험을 평가하기 위하여 대조 샘플에서의 비율과 비교될 수 있다.

[0035] 상기한 바와 같이, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 제1 바이오마커가 조산의 예측자로서 확인되었다. 내부 정량 통제가 서열번호 1~3을 정량화하는데 사용되었다. 서열번호 1(m/z 677)에 사용된 참조(즉, 내부 통제)는 모노이소토픽 피크의 +3 전하 상태에 대하여 673.36의 m/z를 가졌다. 중성 부모 질량은 2017.07 질량 단위이었고, 크로마토그래피 용리 시간은 15.5분이었다. 그러나, 용리 시간이 다른 날에 또는 대체 컬럼에 따라 다소 달라질 것이라는 것을 고려하면, 용리 시간이 내부 시간 통제(0.9968, 즉 내부 시간 통제보다 자신의 보존 시간(retention time)의 0.0032배 더 일찍 용리한다)에 비하여 용리 시간의 부분으로서 및 서열번호 1(m/z 677)(1.0558, 즉 바이오마커보다 자신의 용리 시간의 0.05286배 더 빨리 용리한다)과 비교하여 용리 시간의 부분으로서 제공된다.

[0036] 제2 내부 정량 통제는 서열번호 2(m/z 857) 및 서열번호 3(m/z 860)에 대한 참조로서의 역할을 하였다. 참조 분자의 m/z는 4206.07 질량 단위의 중성 부모 질량으로 +5 전하 상태에서 842.39이었다. 크로마토그래피 용리 시간은 대략 15.8분이었다. 그러나, 용리 시간 변이성을 고려해 볼 때 내부 시간 통제의 용리 시간 및 서열번호 2(m/z 857)와 비교하여 용리 시간은 더 적절하게 기재되어 있다. 내부 시간 통제와 비교하여, 내부 정량 통제는 내부 시간 통제의 용리 후에 그 자신의 용리 시간의 0.0159배 용리 시간의 요소(또는 시간 통제 마커의 1.0161의 비율)를 용리하였다. 서열번호 2(m/z 857)와 비교하여, 내부 정량 마커는 바이오마커 후 그 자신의 용리 시간의 0.0539배의 요소(또는 바이오마커의 용리 시간의 1.0700의 요소)로 일어났다.

[0037] 개별적인 질량들이 용리 시간(보존 시간)으로 정의될 수 있더라도, 용리 시간(보존 시간)은 또한 내부 시간 통제의 함수로서 표현될 수 있다. 이는 바이오마커를 앞서는 시간 마커와 관심의 피크를 따르는 시간 마커 사이에

서 관심의 피크의 상대적인 위치로 결정된다. 이 결정은 R_f 값으로 간주된다. R_f 값은 하기와 같이 계산된다:

[0038] R_f = (바이오마커의 용리 시간 - 앞서는 시간 마커의 용리 시간)/(뒤따르는 시간 마커의 용리 시간 - 앞서는 시간 마커의 용리 시간).

[0039] 상기한 기술을 사용하여, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 제1 바이오마커는 조산에 대한 지표로서 확인되었다. 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합)의 확인 및 정량화에 관한 특정 세부사항은 실시예에 제공된다. 서열번호 1~3에 대한 추가적인 구조적 특성은 하기에 제공된다. 펩티드인 서열번호 1은 677에서의 질량 이온 피크(m/z), 평균 질량 2026.98달톤, 평균 용리 시간 14.30 ± 0.47분, 및 R_f 값 0.535 ± 0.052를 가진다.

[0040] 펩티드인 서열번호 2는 857에서의 질량 이온 피크(m/z), 평균 질량 4279.25달톤, 평균 용리 시간 17.20 ± 2.04분, 및 R_f 값 0.781 ± 0.086을 가진다.

[0041] 펩티드인 서열번호 3은 860에서의 질량 이온 피크(m/z), 평균 질량 4295.25달톤, 평균 용리 시간 16.13 ± 1.97분, 및 R_f 값 0.695 ± 0.134를 가진다.

[0042] 상기 및 실시예에 기재된 기술을 사용하여, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 제2 바이오마커는 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합)와 조합될 때 조산에 대한 지표로서 확인되었다.

[0043] 따라서, 잠재적인 조산에 대하여 임신한 개체를 평가하는 방법이 제공된다. 하나의 양태에서, 상기 방법은 개체로부터의 생물학적 샘플에서 조산과 관련된 본원에 기재된 제1 및 제2 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하며, 여기에서 제1 바이오마커는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호3으로 나타내어지는 서열과 동일한 또는 상동의 아미노산 서열을 가지고, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 그 다음에, 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함을 정량화한다. 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함은 내부 통제로서의 역할을 하는 생물학적 샘플에도 존재하는 참조 분자의 함수로서 처리 및 분리에 따라 측정된다. 본원에 사용되는 용어 "풍부함"은 주어진 질량 스펙트럼에서 질량 분석기로 측정된 특정 질량의 이온의 수 또는 전체 용리 간격을 나타내는 여러 개의 질량 스펙트럼에서 관찰된 특정 질량의 이온의 수의 합계를 나타낸다. 바이오마커 풍부함의 이러한 내부 통제로의 표준화는 비생물학적 변이를 감소시키고 위험 예측에서 바이오마커를 이용할 수 있는 능력을 개선시킨다. 다른 방법을 언급하면, 하나의 개체에서부터 다른 개체까지 상대적으로 일정한 풍부함에 있어서 생물학적 샘플에 존재하는 참조를 위한 분자를 선택함으로써, 특히 오랜 기간 동안에 걸쳐질 수 있는 상이한 날에 수행된 실행과 비교할 때 생물학적 샘플의 처리에서의 변이성이 정정될 수 있다. 이와 같이, 바이오마커의 상대적인 풍부함은 포함된 특정 바이오마커에 따라 달라질 수 있다. 그러므로 특정 컷오프 값은 각각의 바이오마커/참조 비율에 대하여 성립될 수 있어 임의의 값 초과 또는 미만의 참조 피크 풍부함에 대한 바이오마커 피크 풍부함의 비율이 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다.

[0044] 또한 개체로부터의 생물학적 샘플에서 제1 및 제2 바이오마커의 풍부함을 정상 분만을 나타내는 동일한 바이오마커의 공지된 풍부함과 비교함으로써 잠재적인 조산에 대한 테스트가 이루어질 수 있다. 하나의 양태에서, 만약 제1 바이오마커가 서열번호 1 단독이거나 또는 서열번호 2 및 서열번호 3과의 임의의 조합이라면, 개체가 서열번호 1의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 50% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다. 다른 양태에서, 개체가 서열번호 1 단독 또는 서열번호 2 및 서열번호 3과의 조합의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 30% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다. 또 다른 양태에서, 개체가 서열번호 1 단독 또는 서열번호 2 및 서열번호 3과의 조합의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 10% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다.

[0045] 다른 양태에서, 만약 제1 바이오마커가 서열번호 2라면, 개체가 서열번호 2의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 50% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다. 다른 양태에서, 개체가 서열번호 2의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 30% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다. 또 다른 양태에서, 개체가 서열번호 2의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 10% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다.

[0046] 추가적인 양태에서, 만약 제3 바이오마커가 서열번호 3이라면, 개체가 서열번호 3의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 55% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다. 다른 양태에서, 개

체가 서열번호 3의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 35% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 시사될 수 있다. 또 다른 양태에서, 개체가 서열번호 3의 풍부함이 임신 기간이 적어도 22주인 대조군의 풍부함의 약 15% 미만인 것으로 측정되는 경우 조산이 일어날 수 있다.

[0047] 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 함유할 수 있는 생물학적 샘플의 임의의 유형은 스크리닝될 수 있으며, 이의 비제한적인 예로서 혈청, 혈장, 혈액, 소변, 뇌척수액, 양수, 활액(synovial fluid), 자궁 경부 질액, 세척액(lavage fluid), 조직, 및 이의 조합을 포함한다.

[0048] 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합) 및 제2 바이오마커가 대부분의 임신한 여성에 존재하더라도, 조산을 겪게 되는 많은 임신한 여성은 정상 분만을 한 여성과 비교하여 임신 동안 제1 바이오마커의 더 낮은 혈청 농도를 가졌다. 그러나, 스크리닝된 특정 단백질 또는 펩티드에 따라서 제2 바이오마커(즉, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합)는 조산을 겪게 되는 여성이 정상 분만을 한 여성과 비교하여 혈청 농도가 더 낮거나 또는 더 높았다. 제2 바이오마커의 혈청 농도에 대하여 보다 상세하게는 실시예 부분의 표 16을 참고한다. 제2 바이오마커가 조산의 예측가능성에 대하여 이전에 평가되었음은 주목할 가치가 있다. 문헌 [Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis PJ, Moawad A, Das A, Miodovnik M, Vandorsten PJ, Caritis SN, Thurnau G, Dombrowski MP; Maternal-Fetal Medicine Units Network. The Preterm Prediction Study: toward a multiple-marker test for spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol 2001;185(3):643-51]을 참고한다. 그러나, 상기 언급된 참조문헌으로서 지시된 바와 같이, 제1 바이오마커의 부재시 검출되고 정량화될 때 제2 바이오마커(즉, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합)는 PTB에 대한 임상 예측에서 사용되는 적절한 특이성 또는 민감도를 제공하지 않았다.

[0049] 하나의 양태에서, 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합)는 대조군에서보다 PTB 경우에서 덜 풍부하였다. 그러므로 조산을 겪지 않은 개체로부터의 공지된 대조군 농도에 반하여, 또는 테스트된 개체로부터의 공지된 바이오마커 농도에 반하여 개체로부터의 생물학적 샘플에 하나 이상의 제1 바이오마커의 풍부함을 비교하는 것은 조산의 전조가 될 수 있다. 제1 바이오마커의 더 높은 또는 더 낮은 풍부함을 가지는 개체는 조산의 위험이 증가될 수 있고, 따라서 충분히 일찍 확인하여 적절한 처치를 할 수 있다. 조산을 예측하는 데 있어서 특정 바이오마커의 풍부함은 하기에 상세히 기재된다.

[0050] 하나의 양태에서, 조산 개체 및 대조군 개체의 바이오마커 풍부함을 계산하기 위하여 임신 28주에서 제1 바이오마커에 대하여 로그 비(log ratio)를 취하였다. 예를 들어, log 676.7/673.36(서열번호 1/참조 피크)의 로그 비는 평균 대조군이 0.579±0.101이고 평균 PTB가 -0.015±0.090이었다. log 856.8/842.8(서열번호 2/참조 피크)의 로그 비는 평균 대조군(조산을 겪지 않은 개체)이 0.231±0.102이고 평균 PTB(조산에 대한 위험이 있는 개체)가 -0.149±0.095이었다(실시예의 표 12). 실시예의 표 12를 참조하여, 다른 바이오마커의 로그 비를 계산하였다. log 860.0/842.8(서열번호 3/참조 피크)의 로그 비는 평균 대조군이 0.201±0.096이고 평균 PTB가 -0.204±0.088이었다. 다른 방법을 언급하면, 조산에 대한 위험이 있는 개체는 아마도 서열번호 1의 감소, 서열번호 2의 감소, 서열번호 3의 감소를 개별적으로 또는 집합적으로 가장 잘 나타낼 것이다.

[0051] 하나의 양태에서, 상기 기재를 염두에 두고, m/z 673에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 1(m/z 677)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 1.0 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 다른 양태에서, m/z 673에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 1(m/z 677)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.8 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 또 다른 양태에서, m/z 673에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 1(m/z 677)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.6 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다.

[0052] 또한, 하나의 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 2(m/z 857)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.6 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 다른 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 2(m/z 857)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.5 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 또 다른 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 2(m/z 857)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.44 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다.

[0053] 추가적으로, 하나의 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 3(m/z 860)의 풍부함의 비율이

임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.6 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 다른 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 3(m/z 860)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.4 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다. 또 다른 양태에서, m/z 843에서 참조 분자의 풍부함에 대한 서열번호 3(m/z 860)의 풍부함의 비율이 임신 기간이 적어도 22주일 때 약 0.2 미만으로 측정되면 이는 실질적으로 증가된 조산의 위험의 전조가 될 수 있다.

[0054] 임의의 양태에서, 상기 계산된 로그 비는 조산을 겪을 위험이 있는 임신한 여성의 위험을 통계적으로 예측하는데 사용될 수 있다. 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 예측력(predictive power)의 하나의 공통적인 측정은 민감도와 특이성이다. 본원에 사용된 바와 같이 "민감도"는 진양성 비율(true positive rate)(예, 바이오마커로 정확하게 확인된, 후에 조산을 겪는 임신한 여성의 백분율)로서 정의된 통계적인 용어이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "특이성"은 진음성 비율(true negative rate)(예, 정확하게 확인된 합병증이 없는 임신 상태의 임신한 여성의 백분율)로서 정의된다. 조산을 예측하는데 본원에 기재된 바와 같은 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 사용하기 위하여 수치 임계값(numeric threshold)을 확립하였다. 수치 임계값을 확립하기 위하여, 특정 바이오마커에 대한 값의 범위는 가장 낮은 값에서 가장 높은 값까지 그리고 각 지점에서 양성으로 정확하게 확인된 개체의 백분율 및 동일한 지점에서 양성으로 부정확하게 확인된 대조군의 백분율이 고려된다. 특정 바이오마커에 대한 값의 범위는 특정 데이터 세트에 대하여 가장 낮은 값에서 가장 높은 값까지 실제 양의(actual quantitative) 값을 취함으로써 계산될 수 있다. 이는 수신자 조작 특성 곡선(receiver operator curve, ROC)으로 일컬어진다. 하나의 양태에서, 위양성 비율은 20%로 제한될 수 있으며, 이는 임상 테스트에서 내성이 있는 최대값을 일반적으로 고려한 것이다. 위양성 비율(즉, 조산을 겪을 위험이 있는, 바이오마커에 의해 확인된 합병증이 없는 임신상태의 여성의 백분율)은 100%에서 진음성 비율을 빼서 계산된다. 특이성이 80% 이상인 것과 동등한, 위양성 비율이 20% 이하에서의 임계값은 어떤 사람이 위험이 있는지 또는 위험이 없는지를 결정하는데 사용되는 임계값을 결정한다.

[0055] 실시예의 표 13 및 표 14를 참고하여, 조산에 대한 위험이 있는 개체의 확인을 위하여 네 가지 로그 비(즉, 제1 바이오마커)의 각각에 대한 임계값을 결정하였다. 특이성(진음성)이 80% 이상인 것으로 각각에 대한 임계값이 계산되었으며, 이는 위양성 비율이 20% 이하인 것과 동일하다. 수학적으로 결정된 임계값을 사용하여, 4가지 비율이 민감도(진양성) 및 특이성(진음성) 비율을 독립적으로 제공하였다(표 13 및 표 14). 표 14를 참조하여, 서열번호 1(즉, log 677/ 673)의 비율은 조산을 예측하는 것에 대하여 최대 민감도(65%) 및 특이성(85%)을 제공하였다. 따라서, 이러한 양태에서, 임신한 여성에 존재하는 서열번호 1(즉, log 677/ 673)의 확인 및 정량화는 조산을 겪을 가능성의 정확한 예측자이다. 서열번호 1(즉, log 677/ 673)의 비율이 유용하더라도, 또한 로그 비의 조합이 조산의 위험을 예측하는데 사용될 수 있음이 고려된다. 따라서, 본원에서 확인된 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3)는 조산의 위험을 예측하는데 강력한 도구이다.

[0056] 본원에 기재된 제1 바이오마커는 조산의 전조가 될 수 있다. 그러나, 일부 경우에서 조산에 대한 테스트의 예측값은 제2 바이오마커에 대하여 스크리닝하고 제2 바이오마커를 정량화함으로써 개선될 수 있다. 하나의 양태에서, 개체로부터의 생물학적 샘플은 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커에 대하여 스크리닝될 수 있으며, 상기 제1 바이오마커는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 이의 임의의 조합으로 나타내어지는 서열과 동일한 또는 상동인 아미노산 서열이고, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합이다. 이러한 양태에서, 제2 바이오마커가 단독으로 스크리닝될 때, 이는 PTB에 대하여 지시하지 않는다. 그러나, 제2 바이오마커가 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합)와 조합하여 스크리닝될 때, PTB를 예측하는 민감도는 제1 바이오마커 단독에 대하여 스크링한 것과 비교하여 증가한다. 하나의 양태에서, 제1 및 제2 바이오마커가 PTB에 대하여 함께 스크리닝될 때, 민감도는 80% 초과 또는 80% 내지 90%이다. 임의의 양태에서, 민감도는 90% 이상이다. 다른 양태에서, 제1 및 제2 바이오마커가 PTB에 대하여 함께 스크리닝될 때, 특이성은 적어도 80%이다. 비교를 위하여, 제1 바이오마커만을 검출하고 정량화할 때, 민감도는 약 65%이다.

[0057] 하나의 양태에서, 제2 바이오마커가 생물학적 샘플에 대하여 스크리닝될 때, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로부터 선택된 적어도 2종의 단백질이다.

[0058] 다른 양태에서, 제2 바이오마커가 생물학적 샘플에 대하여 스크리닝될 때, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로부터 선택된 적어도 3종의 단백질이다.

[0059] 추가적인 양태에서, 제2 바이오마커가 생물학적 샘플에 대하여 스크리닝될 때, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로부터 선택된 적어도 4종의 단백질이다.

[0060] 또 다른 양태에서, 제2 바이오마커가 생물학적 샘플에 대하여 스크리닝될 때, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1로부터 선택된 5종의 단백질이다.

[0061] 표 1~6은 이에 제한되지 않지만 PTB를 예측하기 위하여 스크리닝될 수 있는 제1 및 제2 바이오마커의 가능한 조합을 포함한다. 이들 표 내에서, 제1 바이오마커는 서열번호 1(단독 또는 서열번호 2 및 서열번호 3과의 조합), 서열번호 2(단독 또는 서열번호 1 및 서열번호 3과의 조합), 및 서열번호 3(단독 또는 서열번호 1 및 2와의 조합)을 포함하고, 제2 바이오마커는 단백질(즉, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합)의 다양한 조합을 포함한다. 예를 들어, 표 1에서 제1 바이오마커는 서열번호 1이고, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 목록에서 선택된다. 따라서, 하나의 양태에서, 제1 바이오마커는 서열번호 1을 포함할 수 있고 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 제1 바이오마커는 서열번호 1을 포함할 수 있고 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자 및 트롬빈-항트롬빈 복합체를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 제1 바이오마커는 서열번호 1을 포함할 수 있고 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 페리틴을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 제1 바이오마커는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3을 포함할 수 있고 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1을 포함할 수 있다. 표 1~6은 각각 이러한 방법론을 통해 해석될 수 있다.

표 1

제 1 바이오마커				제 2 바이오마커						
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	부신피질자극 호르몬	트롬빈-황트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1			
X			X							
X			X	X						
X			X	X	X					
X			X	X	X	X				
X			X	X	X	X	X			
X			X		X		X			
X			X		X	X				
X			X		X	X	X			
X			X			X				
X			X			X	X			
X			X			X	X			
X			X	X						
X			X	X	X					
X			X	X	X	X				
X			X	X	X	X	X			
X			X	X	X	X				
X			X	X			X			
X			X	X	X					
X			X	X	X	X				
X			X	X	X	X	X			
X			X	X	X		X			
X			X	X		X	X			
X			X	X			X			

[0062]

표 2

제 1 바이오마커			제 2 바이오마커				
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	부신피질 자극 호르몬	트롬빈-항트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1
X	X		X				
X	X		X	X			
X	X		X	X	X		
X	X		X	X	X	X	
X	X		X	X	X	X	X
X	X		X		X	X	
X	X		X		X	X	X
X	X		X		X	X	X
X	X		X		X		
X	X		X			X	
X	X		X			X	X
X	X		X				
X	X		X	X	X	X	
X	X		X	X	X	X	
X	X		X	X	X	X	
X	X		X	X		X	X
X	X		X	X			
X	X		X	X	X	X	
X	X		X	X	X	X	X
X	X		X	X	X	X	X
X	X		X	X	X		
X	X		X	X		X	
X	X		X	X		X	X
X	X		X	X			X

[0063]

표 3

제 1 바이오마커				제 2 바이오마커				
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3		부신 피질 자극 호르몬	트롬빈-항트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1
X		X		X				
X		X		X	X			
X		X		X	X	X		
X		X		X	X	X	X	
X		X		X	X	X	X	X
X		X		X		X	X	
X		X		X		X	X	X
X		X		X		X	X	X
X		X		X			X	
X		X		X			X	X
X		X		X	X			
X		X		X	X	X		
X		X		X	X	X	X	
X		X		X	X	X	X	X
X		X		X	X	X	X	
X		X		X	X	X		X
X		X		X		X		
X		X		X		X	X	
X		X		X		X	X	X
X		X		X		X		
X		X		X		X		X
X		X		X				
X		X		X			X	
X		X		X			X	X
X		X		X				X
X		X		X				X

[0064]

표 4

제 1 바이오마커			제 2 바이오마커				
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	부신 피질 자극 호르몬	트롬빈-항트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1
	X		X	X			
	X		X	X			
	X		X	X	X		
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X	X	X		
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X			X	
	X		X			X	X
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X	X	X		X
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X
	X		X	X	X	X	
	X		X	X	X	X	X

[0065]

표 5

제 1 바이오마커			제 2 바이오마커				
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	부신 피질 자극 호르몬	트롬빈-항트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1
		X	X				
		X	X	X			
		X	X	X	X		
		X	X	X	X	X	
		X	X	X	X	X	X
		X	X		X	X	
		X	X			X	X
		X	X	X			
		X	X	X	X		
		X	X	X	X	X	
		X	X	X	X	X	X

표 6

제 1 바이오마커				제 2 바이오마커				
서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3		부신 피질 자극 호르몬	트롬빈-항트롬빈 복합체	페리틴	락토페린	종양괴사인자 α 수용체 유형 1
	X	X		X				
	X	X		X	X			
	X	X		X	X	X		
	X	X		X	X	X	X	
	X	X		X	X		X	X
	X	X		X		X	X	
	X	X		X		X	X	X
	X	X		X		X	X	
	X	X		X			X	
	X	X		X	X		X	
	X	X		X	X	X	X	
	X	X		X	X	X	X	
	X	X		X	X		X	X
	X	X		X	X			
	X	X		X	X	X	X	
	X	X		X	X	X	X	
	X	X		X	X			
	X	X		X	X	X	X	X
	X	X		X	X	X	X	X
	X	X		X	X			
	X	X		X	X	X	X	X
	X	X		X	X	X	X	X

[0067]

[0068] 예측값은 또한 사용될 테스트 또는 분석의 유형에 따라 달라질 수 있으며, 이들 중 일부는 본원에서 보다 상세히 논의된다. 다수의 바이오마커(즉, 제1 및 제2 바이오마커)의 존재 및 양을 평가함으로써, 조산을 예측하는데 유용한 지문(fingerprint)을 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어, 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 결정 및 정량화는 본원에 기재된 방법의 예측값을 증가시킬 수 있다(실시예 부분을 참고). PTB를 발전시키는 더 적은 여성이 포함될 수 있더라도, 그것은 더 많은 조산을 겪을 위험을 나타낸다. 관심의 펩티드를 함유할 수 있는 생물학적 샘플의 임의의 유형이 스크리닝될 수 있으며, 이의 비제한적인 예로서 혈청, 혈장, 혈액, 소변, 뇌척수액, 양수, 활액, 자궁 경부 질액, 세척액, 조직, 및 이의 조합을 포함한다. 그러나, 하나의 양태에서, 개체로부터 얻은 혈청 샘플에서 펩티드에 대하여 스크리닝하는 것이 편리할 수 있다. 다른 양태에서, 개체로부터 얻은 혈액 샘플에서 펩티드에 대하여 스크리닝하는 것이 편리할 수 있다.

[0069] 또한 임신한 개체가 조산을 겪을 가능성을 예측하는데 이용될 수 있는 분리된 펩티드(즉, 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커) 및 분리된 펩티드의 혼합물이 본원에 기재되어 있다. 상기 단백질 및 펩티드는 많은 테스트 분석에서 양성 대조군으로뿐만 아니라, 항체의 생성에 대하여 유용할 수 있다. 하나의 양태에서, 예를 들어 분리된 단백질 또는 펩티드는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 나타내어지는 서열과 동일한 또는 상동의 아미노산 서열을 가지는 제1 바이오마커이다. 다른 양태에서, 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 조합을 포함하는 분리된 단백질 또는 펩티드이다. 펩티드 합성은 당업계에 잘 공지되어 있고, 당업자는 일단 상기 펩티드 서열을 가지면 본원에 개시된 펩티드를 합성하는 다양한 기술을 사용할 수 있을 것임을 이해한다. 상기 기술은 제한없이, 액상 합성 및 고상 합성 방법뿐만 아니라, 예를 들자면 이전의 티올 포획(prior thiol capture), 고유한 화학 결찰(native chemical ligation), 발현된 단백질 결찰(expressed protein ligation), 아실 개시된 포획(acyl initiated capture), 및 슈타우딩거 결찰(Staudinger ligation) 방법과 같은 다양한 화학 결찰의 방법을 포함할 수 있다. 추가적으로, 펩티드는 또한 재조합 DNA 기술을 사용하여 합성될 수 있다.

[0070] 임의의 양태에서, 상기 기재된 프로테오믹스 기술은 바이오마커를 확인하고 정량화하는데 사용될 수 있지만, 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출 및/또는 정량화할 수 있는 다른 방법이 본원에서 사용될 수 있다. 펩티드 분석의 하나의 잠재적인 유형은 면역분석을 포함한다. 상동, 및 비상동 펩티드를 포함하여 특이적 펩티드에 대한 생물학적 샘플을 스크리닝하는 항체를 이용하는 다수의 면역분석 프로토콜뿐만 아니라 경쟁 및 비경쟁 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 기술은 고체 지지체, 면역 침강 등의 사용을 포함할 수 있다. 그러나, 일반적으로 펩티드의 검출을 위한 면역분석은 종종 표지된 항체를 사용하는 것을 포함한다. 상기 표지는 형광 표지, 화학발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지 등을 포함하여, 공지된 임의의 유형의 물질을 포함할 수 있다. 이와 같이, 상기 면역분석 테스트는 당업계에 잘 공지되어 있음을 이해하여야 하고, 생물학적 샘플에서 펩티드를 검출하는데 이용되는 특정 방법은 본 발명의 청구항의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다. 면역분석은 하기에서 보다 충분히 논의된다.

[0071] 다른 양태에서, 본원에 기재된 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커에 특이적으로 면역반응성인 항체가 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 예를 들어 서열번호 1로 이루어진 아미노산 서열을 가지는 제1 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 서열번호 2로 이루어진 아미노산 서열을 가지는 제1 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 또 다른 양태에서, 서열번호 3으로 이루어진 아미노산 서열을 가지는 제1 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다.

[0072] 하나의 양태에서, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 디펜신인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 페리틴인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 락토페린인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 트롬빈-항트롬빈 복합체인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다. 다른 양태에서, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1인 제2 바이오마커에 면역학적으로 특이적인 항체가 제공된다.

[0073] 항체는 다클론, 단일클론, 또는 재조합일 수 있고, 당업계에 공지된 임의의 방법으로 생산될 수 있다. 또한 항체 절편은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다. 본 발명의 양태에 따른 항체는 조류(birds) 및 포유류를 포함하여 임의의 동물 기원으로부터의 것일 수 있다. 하나의 양태에서, 예를 들어 항체는 인간, 쥣과 동물(예, 마우스 및 래트), 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피크, 낙타, 말, 닭 등으로부터 유래한 것일 수 있다.

[0074] 하나의 측면에서, 다클론 항체는 생물학적 샘플에서 본원에 기재된 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 검출하고 정량화하는데 독립적으로 이용되어 조산의 위험을 평가할 수 있다. 다클론 항체는 당업자에게 잘 공지된 다양한 절차로 생산될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 토끼, 래트, 마우스, 양, 염소 등과 같은 생체내(*in vivo*) 숙주 동물에서 생산될 수 있다. 숙주 동물은 예를 들어 복강내 및/또는 피내 주사에 의하여, 자유 또는 담체 결합 펩티드로 면역된다. 주입 물질은 통상적으로 약 100㎍의 펩티드 또는 담체 단백질을 함유하는 에멀션이다. 숙주 종에 따라서, 다양한 보조제(adjuvant)가 면역학적 반응을 증가시키는데 사용될 수 있다. 보조제의 예는 제한없이 프로인트 보조제(Freund's adjuvant)(완전 및 불완전), 수산화알루미늄과 같은 미네랄 겔, 리솔레시틴과 같은 표면 활성 물질, 플루로닉 폴리올(pluronic polyol), 폴리음이온(polyanion), 펩티드, 오일 에멀션, 키홀 림펫트 헤모시아닌, 디니트로페놀, 및 바실 칼메트-게랭(bacille Calmette-Guerin, BCG) 및 코리네박테리움 파르붐(corynebacterium parvum)과 같은 잠재적으로 유용한 인간 보조제를 포함할 수 있다. 이들 및 다른 보조제는 당업계에 잘 공지되어 있다. 일부 경우에서는 약 2주의 간격으로 수 개의 보강 주사(booster injection)를 필요로 하여 검출될 수 있는 항체의 유용한 역가(titer)를 제공할 수 있다. 면역된 동물로부터의

혈청에서 항체의 역가는 항체의 선택으로, 예를 들어 당업계에 잘 공지된 방법에 따라 고체 지지체 상으로 펩티드의 흡착 및 선택된 항체의 용리에 의해서 증가될 수 있다.

[0075] 다른 측면에서, 단일클론 항체를 이용하여 생물학적 샘플에서 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커를 독립적으로 검출하고 정량화하여 조산의 위험을 평가할 수 있다. 단일클론 항체는 1종의 항원만을 인식하는 항체를 지칭한다. 이들 항체들은 하나의 항체 생산 하이브리도마의 딸 세포에 의해 생성된다. 단일클론 항체는 통상적으로 면역반응하는 임의의 에피토프에 대한 하나의 결합 친화도를 보인다. 단일클론 항체는 다른 에피토프에 대한 각각의 면역특이적인, 예를 들어 이중특이적 단일클론 항체인, 다수의 항체 결합 부위를 가지는 항체 분자를 포함할 수 있다. 단일클론 항체는 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 얻을 수 있다. 예를 들어, 각각 본원에 참조로 포함된 문헌[Kohler 및 Milstein, Nature 256:495 497 (1975); 미국 특허 제4,376,110호; Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); 및 Harlow 및 Lane ANTIBODIES: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)]을 참고한다.

[0076] 또한 본원에 유용한 항체는 단일특이적 또는 다중특이적(예, 이중특이적, 삼중특이적, 또는 그 이상의 다중특이성)일 수 있음을 주목해야 한다. 다중특이적 항체는 펩티드의 상이한 에피토프에 대하여 특이적일 수 있거나, 또는 다중특이적 항체는 관심의 펩티드, 및 이종의 펩티드 또는 고체 지지체 물질과 같은 이종의 에피토프 모두에 대하여 특이적일 수 있다. 게다가 항체는 또한 본원에 기재된 바이오마커의 임의의 영역으로부터 제조될 수 있다.

[0077] 예로서, 단일클론 항체는 잘 확립된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 하나의 양태에서, 단일클론 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여 제조된다. 이러한 방법에서, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 면역제(예, 본 발명의 양태에 따른 펩티드)로 면역되어 면역제와 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도해 낸다. 대안적으로, 림프구는 시험관내(*in vitro*)에서 면역될 수 있다. 그 다음 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 융제(fusing agent)를 사용하여 무한증식 세포주(immortalized cell line)와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다. 무한증식 세포주는 종종 형질전환된(transformed) 포유류 세포, 특히 설치류, 토끼, 소 및 인간 기원의 골수 세포이다. 종종 래트 또는 마우스 골수 세포가 이용된다. 하이브리도마 세포는 비융합된, 무한증식 세포의 생장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유할 수 있는 적당한 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 부모 세포가 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT 또는 HPRT)가 부족할 경우, 하이브리도마에 대한 배양 배지는 통상적으로 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함하여(“HAT 배지”) HGPRT 결핍 세포의 생장을 억제할 것이다.

[0078] 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지는 단일클론 항체의 존재에 대하여 분석될 수 있다. 바람직하게, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합 특이성은 면역침강(immunoprecipitation)으로 또는 방사면역측정(radioimmunoassay, RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA)과 같은 시험관내(*in vitro*) 결합 분석으로 결정된다. 상기 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 원하는 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후에, 상기 세포는 희석 절차를 제한함으로써 서브클로닝하고 공지된 방법으로 생장시킬 수 있다. 단일클론 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차로 배양 배지로부터 분리 또는 정제될 수 있다. 또한 단일클론 항체는 본원에 참조로 포함된 미국특허 제4,816,567호에 기재된 방법과 같은, 재조합 DNA 방법으로 제조될 수 있다. 당업자에게 공지된 항체를 생성하는 다른 방법은 본 발명의 범위 내임이 고려된다.

[0079] 따라서, 하나의 양태에서 잠재적인 조산에 대하여 임신한 개체를 테스트하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 개체로부터 생물학적 샘플을 얻는 단계, 생물학적 샘플을 제1 항체 및 제2 항체와 접촉시키는 단계(여기에서 샘플을 제1 항체 및 제2 항체와 접촉시, 제1 항체는 제1 바이오마커에 결합하여 제1 항체-항원 복합체를 형성하고 제2 항체는 제2 바이오마커에 결합하여 제2 항체-항원 복합체를 형성하며, 제1 바이오마커는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 또는 이의 임의의 조합을 포함하고 제2 바이오마커는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 단백질임), 및 제1 항체-항원 복합체 및 제2 항체-항원 복합체의 형성에 대하여 분석하여 생물학적 샘플에서 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 양을 정량화하는 단계를 포함할 수 있다. 그 다음에, 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 양을, 조산을 겪지 않은 생물학적 샘플로부터의 동일한 바이오마커의 양과

비교한다. 생물학적 샘플에서 관심의 바이오마커의 존재 및 양은 조산의 위험의 지시를 제공한다.

[0080] 기재된 바와 같이, 생물학적 샘플에서 펩티드를 검출 및/또는 정량화할 수 있는 다양한 면역분석이 공지되어 있다. 하나의 양태에서, 면역분석은 경쟁적 분석일 수 있다. 예를 들어, 테스트될 펩티드의 서열을 가지는 표지된 펩티드를 항체-항원(또는 펩티드) 복합체를 형성할 수 있는 펩티드 서열의 적어도 하나의 부분에 특이적인 항체와 접촉시킨다. 생물학적 샘플을 생물학적 샘플 내에 존재하는 관심의 임의의 펩티드가 표지된 펩티드와 경쟁할 수 있도록 펩티드/항체 혼합물에 첨가하여, 표지의 강도를 감소시킨다. 경쟁적인 분석은 한단계(one-step) 또는 두단계(two-step) 프로토콜을 포함할 수 있으며, 이들은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0081] 다른 양태에서, 면역분석은 비경쟁적, 또는 샌드위치 분석일 수 있다. 상기 분석은 일반적으로 더 높은 수준의 분석 민감도 및 특이성을 제공한다. 또한 비경쟁적 분석 포맷은 한단계 또는 두단계 프로토콜을 이용할 수 있다. 일반적으로 이러한 분석은 물리적인 지지체에 고정된 항체를 포함하며, 상기 고정된 항체는 관심의 바이오마커(즉, 제1 또는 제2 바이오마커)에 면역학적으로 특이적이다. 상기 생물학적 샘플은 또한 관심의 펩티드에 면역학적으로 특이적인 표지된 항체와 함께 지지체에 첨가된다. 생물학적 샘플에 존재하는 펩티드는 상기 지지체를 따라 고정된 항체에 결합할 것이다. 또한 표지된 항체는 관심의 펩티드에 결합하고, 따라서 또한 펩티드 및 고정된 항체를 통하여 물리적인 기질에 고정된다. 그 다음 표지된 항체 상의 표지를 검출하여 생물학적 샘플 내 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커의 양을 정량화하고 대조군(즉, 조산을 겪지 않는 임신한 개체)과 비교할 수 있다. 일부 프로토콜에서, 비고정된 표지된 항체는 표지의 검출 전에 씻어버릴 수 있다. 이 경우에, 표지의 강도는 생물학적 샘플 내에 존재하는 제1 바이오마커 및/또는 제2 바이오마커의 양과 비례한다.

[0082] 당업계에 잘 공지된 고체 지지체 기질의 다수의 배열이 고려된다. 이러한 기질은 항체 또는 항체 앵커(antibody anchor)와 같은, 검출 물질의 고정을 위하여 임의의 적당한 기질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적당한 기질은 유의하게 항체의 기능성에 영향을 주지 않고 검출 물질과 결합을 형성할 수 있는 임의의 고체 유기체, 생체고분자(biopolymer), 또는 무기 지지체 물질과 같은 임의의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 유기 고체 지지체 물질의 예는 제한없이 폴리스티렌과 같은 폴리머, 나일론, 페놀-포름알데히드 수지, 폴리아크릴아미드와 같은 아크릴 공중합체 등을 포함할 수 있다. 생체고분자 지지체 물질의 예는 제한없이 셀룰로오스, 폴리덱스트란, 아가로스, 콜라겐, 키틴 등을 포함할 수 있다. 무기 지지체 물질의 예는 제한없이 유리비드(다공성 및 비공성(nonporous)), 스테인리스 스틸, ZrO_2, TiO_2, Al_2O_3, 및 NiO와 같은 다공성 세라믹을 포함하는 금속 산화물, 모래 등을 포함할 수 있다.

[0083] 당업계에 공지된 다수의 특정 분석 방법이 본원에서 사용될 수 있다. 상기 특정 분석 방법은 방사면역측정(radioimmunoassay, RIA), 효소 면역분석(enzyme immunoassay, EIA), 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 형광 면역분석(fluorescence immunoassay, FIA), 형광 편광 면역분석(fluorescence polarization immunoassay, FPIA), 비탁 억제 면역분석(nephelometric inhibition immunoassay, NIA), 미량입자 효소 면역분석(microparticle enzyme immunoassay, MEIA), 화학발광 자기 면역분석(chemiluminescent magnetic immunoassay, CMIA) 등과 같은 프로토콜을 포함할 수 있다.

[0084] 다양한 검출가능한 표지(즉, 지표)는 본 발명의 양태에 따른 항체와 결합될 수 있다. 적절한 표지는 제한없이 방사성 핵종(radionuclide)(예, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{3}H, ^{32}P 등), 효소(예, 알칼리 포스파타아제, 호스래디쉬 페록시다아제, 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제 등), 형광 부분 또는 단백질(예, 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린, GFP, BFP 등), 또는 발광 부분(예, 캘리포니아주 팰러앨토에 위치한 QUANTUM DOT CORP.에 의해 공급된 Qdot®

나노입자)을 포함할 수 있다. 상기 언급한 다양한 면역분석을 실행하는데 사용되는 일반적인 기술은 당업자에게 공지되어 있다.

[0085] 하나의 양태에서, 면역분석은 항원(즉, 제1 바이오마커, 제2 바이오마커, 또는 이의 조합)이 이에 제한되지 않지만 96 웰 플레이트를 포함한 고체 표면에 결합할 수 있게 하고, 그 다음에 항원 특이적인 단일클론 항체를 적용하는 ELISA를 포함할 수 있다. 항온처리 기간 후에, 1차 항체는 씻어버리고 결합된 단일클론 항체를 인식하는 2차 항체(호스래디쉬 페록시다아제(HRP)로 개질됨)를 적용한다. 2차 항온처리 후에, 과량의 2차 항체는 씻어버리고 화학발광 생성물 또는 형광 생성물을 생성하는 첨가된 HRP에 대한 기질을 첨가하고 '색상' 또는 빛을 측정한다.

[0086] 면역분석에 더하여, 생물학적 샘플에서 펩티드의 검출을 위한 추가적인 방법이 고려되며, 모든 방법은 본 발명

의 범위 내인 것으로 여겨질 것이다. 하나의 양태에서, 예를 들어 질량 분석(mass spectrometry, MS) 기술이 이용될 수 있다. 하나의 특정 예는 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화(matrix assisted laser desorption ionization)와 같은 고속 MS 분석 기술을 포함할 수 있다. 이러한 기술에서, 샘플은 시간당 수백개의 생물학적 샘플을 빠르게 처리할 수 있는 특성화 시설로 보내질 수 있다.

[0087] 또한 임신한 개체로부터의 생물학적 샘플을 테스트하여 조산의 위험을 평가할 수 있는 키트가 본원에 기재되어 있다. 이러한 키트는 병원, 클리닉, 표준 실험실(reference laboratory), 의원(doctor's office) 등에서 이용되어 의학적 결정을 하고, 필요하다면 이용가능한 치료법 또는 개입(intervention)을 제공하는 것을 도와줄 수 있다. 추가적으로, 또한 상기 키트는 조산과 관련된 진단, 예후, 또는 다른 의학적 이상의 위험 평가를 할 수 있게 한다.

[0088] 따라서, 하나의 양태에서 잠재적인 조산에 대하여 임신한 개체를 테스트하는 키트가 제공된다. 이러한 키트는 제1 및 제2 항체; 및 제1 항체-항원 복합체 및 제2 항체-항원 복합체의 형성을 분석하는 제1 항체 및 제2 항체와 기능적으로 관련된 지표를 포함할 수 있으며, 여기에서 제1 항체는 아미노산 서열 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3을 가지는 제1 바이오마커에 선택적으로 결합할 수 있고 제1 항체-항원 복합체를 형성하며, 여기에서 제2 항체는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체, 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 제2 바이오마커에 선택적으로 결합할 수 있고 제2 항체-항원 복합체를 형성할 수 있다. 키트는 이용될 특정 테스트 분석에 필요하거나 유익한 임의의 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0089] 상기 키트는 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출하고 정량화하는 임의의 수단을 포함할 수 있고, 상기 키트의 내용물은 사용될 검출 분석의 유형에 따라 필수적으로 변할 수 있다. 필요한 시약에 더하여, 상기 키트는 제1 및 제2 바이오마커에 결합하기 위한 항체, 고체 기질, 항체-항원 복합체 검출용의 추가적인 항체 등을 포함할 수 있다. 제안된 바와 같이, 항체 또는 항체 절편은 자유 형태(free form) 또는 플라스틱 접시, 테스트 튜브, 테스트 막대, 비드 등과 같은 기질에 고정된 형태로 존재할 수 있다. 또한 상기 키트는 양성 또는 음성 대조군, 세척 용액, 희석 버퍼 등의 검출 및/또는 표지용의 적당한 시약뿐만 아니라 지시를 포함할 수 있다.

[0090] **실시예**

[0091] 하기 실시예들은 본원에 기재되고 주장된 화합물, 조성물 및 방법이 어떻게 만들어지고 평가되는지 당업자에게 완벽한 공개 및 기재를 제공하기 위하여 제안된 것이며, 순전히 예시적인 것으로 의도되고 본 발명자가 발명으로서 지칭한 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 숫자(예, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 확실하게 하기 위하여 노력을 기울였으나 일부 오차 및 편차가 있을 수 있다. 다르게 지시되지 않는다면, 부는 중량부이고, 온도는 ℃이거나 또는 주위 온도이며, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다. 반응 조건, 예를 들어 구성요소의 농도, 원하는 용매, 용매 혼합물, 온도, 압력, 및 기재된 과정으로부터 얻어지는 생산물 순도 및 수율을 최적화하는데 사용될 수 있는 다른 반응 범위 및 조건의 많은 변형 및 조합이 있다. 적당하고 통상적인 실험만이 상기 과정 조건을 최적화하는데 요구될 것이다.

[0092] **혈청 수집**

[0093] 연구는 160명의 임신한 여성을 포함하였으며, 임신의 완료로 진행된 임신 24주 또는 28주째 혈액을 채취하였다. 이들 여성 중 80명은 조산(PTB)의 증거가 없는 단순한 임신이었다. 이들은 대조군을 구성하였다. 이들 여성의 80명은 PTB(임신 기간이 37주 미만)이었다. 이들 여성은 PTB의 사례를 구성하였다. 이들 160명의 여성의 혈청은 본원에 기재된 프로테오믹스 기술을 사용하여 연구하였다. 이 연구에 포함된 각각의 그룹의 통계 자료는 표 7에 열거되어 있다.

표 7

[0094] 통계 자료(* p<0.001)

	24주 대조군 N=40	24주 사례 N=40	28주 대조군 N=40	28주 사례 N=40
산모 연령(세)	23.2 + 0.83	23.6 + 0.81	24.3 + 0.9	24.2 + 0.94
분만시 임신 주수(주)	38.9 ± 0.19	31.4 ± 0.44*	38.9 ± 0.18	32.3 ± 0.28*

방문 1에서 분만까지의 시간(주)	15.1 ± 0.18	7.8 ± 0.45*	15.1 ± 0.18	8.6 ± 0.31*
패러티(% 비출산)	30.0	32.5	30.0	32.5
인종(% 아프리카계 미국인)	75.0	70.0	77.5	67.5

[0095] **아세토니트릴 침전**

[0096] 두 부피의 HPLC 등급 아세토니트릴(400 μL)을 200 μL의 혈청에 첨가하고, 5초 동안 격렬하게 와동(vortex)시키며 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 그 다음 상기 [혈청 수집]으로부터의 샘플을 10분 동안 12,000rpm으로 IEC Micromax RF 원심분리기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 이용하여 실온에서 원심분리하였다. 그 후 상청액의 분액(aliquot)을 300 μL HPLC 등급 물을 함유하는 미량원심분리기(microcentrifuge) 튜브로 옮겼다. 샘플을 잠시 와동시켜 용액을 혼합하고, 그 다음 Labconco CentriVap Concentrator(Labconco Corporation, Kansas City, MO)에서 약 200 μL로 동결건조시켰다. 동결건조 전에 첨가한 부피의 물은 상기 용액으로부터 아세토니트릴의 완전한 제거를 돕는다. 이는 아세토니트릴이 단백질 농도를 측정하는데 사용되는 분석과 호환성이 없기 때문에 필요하다. 제조자의 지시에 따라 실행된 Bio-Rad 마이크로타이터 플레이트 단백질 분석(Bio-Rad microtiter plate protein assay)을 사용하여 상청액 단백질 농도를 측정하였다. 4㎍의 단백질을 함유하는 분액을 새로운 미량원심분리기 튜브로 옮기고 거의 건조되도록 동결건조하였다. 샘플을 HPLC 물을 이용하여 20 μL로 하고 그 다음 20 μL 88% 포름산을 사용하여 산성화하였다.

[0097] 아세토니트릴 처리된(후 침전) 혈청 샘플(40 μL)을 격막(Dionex Corporation, Sunnyvale, CA)을 가지는 폴리프로필렌 스냅 뚜껑으로 덮인 250 μL 원뿔형 폴리프로필렌 바이알로 로딩하고, 4℃로 유지된 FAMOS®

오토샘플러 48웰 플레이트 내에 두었다. FAMOS®

오토샘플러는 0.1% 포름산으로 산성화된 HPLC 물을 사용하여 40 μL/분의 유량으로 액체 크로마토그래피 보호 컬럼(guard column)으로 각각의 혈청 샘플 5 μL를 주입하였다. 보호 컬럼의 염 및 다른 불순물을 산성화된 물로 세척하였다. FAMOS®

오토샘플러는 컬럼으로 로딩된 것의 부피의 3배까지 준비되므로, 샘플 부피가 제한될 때는 손으로 샘플을 주입할 필요가 있었다. 이는 보호 컬럼의 상류의 빈 루프 위로 10 μL 부피의 샘플을 주입 및 샘플 대신에 HPLC 물의 10 μL 샘플을 주입하는 FAMOS®

오토샘플러를 프로그래밍함으로써 이루어졌다. 혈청 샘플이 원뿔형 바이알로부터 로딩된 것처럼 혈청 샘플을 탈염된 보호 컬럼 위로 로딩하였다.

[0098] **질량 스펙트럼 분석을 위한 액체 크로마토그래피 분리**

[0099] 모세관 액체 크로마토그래피(capillary liquid chromatography, cCL)를 실행하여 샘플을 분별하였다. 모세관 LC는 1mm(16.2 μL) 소구경(microbore) 보호 컬럼(Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) 및 사내에 집합된 15cm x 250 ㎛ 내경의 모세관 컬럼을 사용한다. 보호 컬럼은 건조포장하였고(dry-packed) 모세관 컬럼은 POROS R1 역상 배지(reversed-phase media)(Applied Biosystems, Framingham, MA)를 사용하여 슬러리 포장하였다. 컬럼 평형 및 크로마토그래피 분리는 수상(aqueous phase)(98% HPLC 등급 H_2O, 2% 아세토니트릴, 0.1% 포름산) 및 유기상(organic phase)(2% HPLC H_2O, 98% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)을 사용하여 실행하였다. 분리는 95% 수용액에서 3분 컬럼 평형으로 시작하고, 그 후 60% 유기상까지 2.75%/분으로 구배 증가시켜 이루어졌으며, 그 다음 95% 유기상의 농도까지 7%/분으로 증가시켜 이루어졌다. 구배를 95% 유기상에서 7분 동안 유지시켜 샘플의 더 소수성인 성분을 용리시켰고, 그 후 구배를 5분 동안 95% 수상으로 되돌렸고 이 농도에서 2분 동안 유지시켜 컬럼을 재평형시켰다. 모든 분리는 5 μL/분의 유량으로 실행하였다. 크로마토그래피는 LC Packings 사의 Ultimate Capillary HPLC 펌프 시스템을 FAMOS®

오토샘플러(Dionex Corporation, Sunnyvale, CA)와 함께 사용하였고, Analyst QS®

(Applied Biosystems, Foster City, CA)로 제어하였다.

[0100] **MS 분석**

[0101] MS 교정(calibration)은 샘플을 실행하기 전에 매일 외부 통제를 이용하여 실행하였다. 필요시에는, 세팅을 조정하여 노이즈 비(noise ratio)에 대한 신호를 최적화하고 민감도를 극대화하였다.

[0102] cLC 시스템은 질량 분석기와 직접적으로 결합하였다. 모세관 컬럼으로부터의 유출물은 IonSpray 공급원(Applied Biosystems)을 통해 QSTAR Pulsar I 사중극자 직교 비행시간 질량 분석기(quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer)로 향하여졌다. 5분에서 시작하고 55분에 종결하여 m/z 500 내지 2500에 대하여 데이터를 수집하였다. 5μL/분의 유량으로, 샘플이 보호 컬럼에서 질량 분석기로 이르는데 5분 이상 걸리므로 시작 시간에서 지연이 프로그램되었고, 따라서 어떤 유용한 데이터도 5분 전에는 얻어질 수 없다. 데이터 수집, 처리 및 예비 포맷팅은 Analyst QS®

소프트웨어 패키지를 BioAnalyst add-ons(Applied Biosystems)와 함께 사용하여 이루어졌다.

[0103] 질량 분석은 전체 cLC 용리 기간 내내 5분에서 55분까지 각각의 표본에 대하여 매 1초에 얻어졌다. 각 개체의 혈청이 고갈되고 전체 이온 크로마토그램으로서 기록된 cLC 분별된 단백질의 용리 프로파일은 이전에 실행된 인간 혈청과 일치함을 보증하는 것으로 점검되었다. 전체 풍부함이 정상의 50% 미만 또는 정상의 200% 초과이거나 또는 특징적인 일련의 세 가지 이온이 강렬한 넓은 부위(broad ion intense region)가 없는 표본은 재실행되거나 또는 분석을 다시 하기에 부정당한 표본이 있다면 누락시켰다.

[0104] **피크 정렬**

[0105] 샘플을 다른 날에 실행하고 컬럼을 용리 시간에서 다양화할 수 있기 때문에, 유용한 크로마토그램(대략 15분 내지 35분의 유용한 크로마토그램)을 통해 대략 2분의 간격으로 용리하는 평균 풍부함의 10가지 내재성 분자 종(molecular species)을 결정하였다. 2분의 창(two-minute window)이 관심의 용리 영역에 걸쳐 확립되어 파일 크기를 관리할 수 있는 상태로 있도록 하였다. MS 컴퓨터의 추출 이온 크로마토그램(Extract Ion Chromatogram, XIC) 기능을 사용하여 각각의 용리 시간 마커에 대하여 원하는 m/z 범위의 용리를 시각화하였다. 그 후 각각의 정렬 피크의 용리 시간을 각각의 표본 실행에 대하여 결정하고 차례로 세트 선택 기능(Set Selection function)의 수단에 의하여 2분 창의 중앙으로서 사용하였다. 이는 모든 실행을 상기 창에 대한 동일한 중심점으로 정렬하였다. 그 후 Show Spectra 기능을 사용하여 모든 질량 스펙트럼으로부터 하나의 평균화된 질량 스펙트럼을 만들 수 있다.

[0106] **데이터 분석**

[0107] Q-Star(q-TOF) 질량 분석기를 지지하는 소프트웨어 프로그램인 Analyst®

는 16개의 개별적인 액체 크로마토그래피 실행의 모음 및 유사한 용리 시간에서 이들의 실행 내에 질량 스펙트럼의 비교를 참작한다. 유용한 용리의 20분 기간 동안 10개의 2분 창이 상기한 바와 같이 확립되어 데이터 파일 크기를 관리할 수 있는 상태로 있도록 하였다. 또한 2분 창은 상기한 바와 같이 정렬되었다. 통상적으로 더 많은 펩티드 종이 존재하였으므로 10개의 2분 용리 간격에서 선택되어, 분석된 제1의 것은 제2의 2분 창이었다. 펩티드는 복합적으로 하전된 상태의 특징적인 모습으로 확인하였고, 이는 1 질량/전하 단위로 분리된 하나의 피크 또는 피크들보다는 1 질량/전하 단위 미만으로 분리된 개별적인 피크와 함께 가우스 모양(Gaussian shape)을 가지는 피크의 잘 정의된 클러스터로서 나타난다. PTB를 겪는 8명 개체 그룹 및 대조군(PTB 아님)으로부터의 8명 개체는 색깔로 표시하고 덮어씌웠다. 그 후 데이터를 시각적으로 점검하고 하나의 색깔이 두드러지게 나타나는 분자 종을 기록하였다. 사용된 소프트웨어를 제한하여 16개의 샘플만을 시각화하였다. 16 보다 큰 크기의 샘플링을 위해 데이터 세트의 다수의 비교가 이루어졌다. 더 고려되는 화합물에 대하여, 두 개의 그룹 사이의 동일한 명백한 차이가 데이터 세트의 적어도 3분의 2에서 관찰될 필요가 있었다.

[0108] 그 후 두 개의 연구 그룹 사이에서 다른 것으로 나타난 분자는 개별적으로 점검되었다. 이들 후보 종은 모두 펩티드이었다. 정량적인 데이터를 추출하기 전에, 질량 스펙트럼을 시험하여 펩티드 피크가 동일한 m/z를 가지는 것을 보증하였고 또한 동일한 전하 상태를 나타내어 동일한 펩티드가 고려되는 것을 더 보증하였다. 추가적으로, 두 개의 그룹 사이의 풍부함에서 차이를 보이지 않은 제2의 인근 피크는 참조로서 선택되었다. 이 피크는 관심의 후보 피크를 표준화하고 표본 처리, 표본 로딩 및 이온화 효율에서 변이성을 정정하는데 사용되었다.

[0109] 그 후 분자 종은 Analyst®

소프트웨어로 '추출' 되어 각각의 개별적인 실행에서 개별적인 분자 종의 피크 최대값을 결정하였다. 이러한

특징은 특정 m/z의 검사를 2분 용리 창으로 제한하지 않았고 그 결과 cLC 용리 시간을 정렬하는데 사용된 피크를 사용하여 추가적으로 용리 프로파일에서의 위치는 동일함을 보증하고 따라서 동일한 분자 종이 각 시간에 선택되었음을 보증하였다.

[0110] 각 분자 종에 대한 피크 높이는 그 풍부함의 합리적인 평가로 고려되었다. 각 후보 화합물의 풍부함은 표로 만들었고 각 후보 종의 계산된 값은 근처 참조 종에 대하여 비율화하였다. 하나의 종이 고려되었으므로, 단변량(univariate) 통계 분석이 두 개의 그룹 사이의 이러한 펩티드의 풍부함에서 있을 수 있는 차이를 평가하는데 이용되었다.

[0111] **내재성 시간 정렬 분자**

[0112] 시간 정렬에 사용된 참조 피크의 질량 및 통상적인 용리 시간이 표 8에 요약되어 있다.

표 8

[0113] 시간 정렬 마커의 질량 및 용리 시간

내재성 시간 참조의 질량(달톤)	평균 용리 시간(분)
1464.65	14.68
1439.52	17.01
2009.95	18.83
5062.28	21.34
546.31	23.54
545.33	26.12
1046.67	27.60
636.31	32.44
779.52	34.59
1619.07	36.88

[0114] 또한 임신한 여성의 모든 혈청에 존재하는 이러한 내재성 분자 종의 위치에 대한 지식은 모세관 액체 크로마토그래피 용리 프로파일 내에서 PTB 바이오마커의 정렬 및 위치에 대한 시간 마커에 사용될 수 있도록 한다.

[0115] **바이오마커 특징**

[0116] 시간 정렬 후, 바이오마커 후보를 다수의 질량 스펙트럼을 PTB 사례로 덮어씌웠고 대조군 각각은 하나의 색깔이 할당된 초기 처리에서 시각적으로 확인하였다. 대부분 하나의 색깔을 나타내는 피크는 더 연구되었다. 그 후 QqTOF 질량 분석기(Applied Biosystems)에 대하여 작동하는 시스템인 Analyst®

소프트웨어(Applied Biosystems)가 장치된 컴퓨터에 의해 개별적인 스펙트럼이 피크 높이 결정에 대하여 제시되었다. 그 다음 바이오마커의 양을 표로 만들었다. 추가적으로, 사례 및 대조군 사이에서 정량적으로 다르지 않는, 동일한 시간 창에서 생기는 제2의 피크 또한 선택되었다. 이는 내재적 대조군을 나타내어 비생물학적 변이성의 감소를 감안하였다. 이는 후보 피크의 양을 내재적 대조군의 양으로 나눔으로써 이루어졌다. 각각의 표본에 대한 비율의 크기를 기록하였고 통계적인 차이는 Student's t 테스트를 사용하여 PTB 사례 및 대조군을 비교하여 찾았다.

[0117] 제1 바이오마커에 대하여, 3가지 종은 충분히 달라서($p \leq 0.0001$) 2 그룹의 우수한 분리를 감안할 수 있음을 시사하였다. 3가지 PTB 바이오마커를 포함하는 제1 바이오마커에 대한 개별적인 질량 및 용리 시간은 표 9에 요약되어 있다.

표 9

[0118] 제1 바이오마커의 질량 및 용리 시간

서열번호	피크(m/z)	평균 질량	평균 용리 시간
1	676.7	2026.98	14.30±0.47
2	856.8	4279.25	17.20±2.04
3	860.0	4295.25	16.13±1.97

[0119] 용리 시간(보존 시간)은 내부 시간 통제의 함수로서 표현하였다. 이것은 바이오마커를 앞서는 시간 마커와 관심의 피크를 뒤따르는 시간 마커 사이에서 관심의 피크의 상대적인 위치로 결정하였다. 이는 하기 식으로 계산하였다.

[0120] R_f = (바이오마커의 용리 시간 - 앞서는 시간 마커의 용리 시간) / (뒤따르는 시간 마커의 용리 시간 - 앞서는 시간 마커의 용리 시간)

[0121] R_f 값은 실제 용리 시간 보다 더 믿을 수 있었다. 용리 시간은 새로운 컬럼으로 또는 부착물이 있는 기존의 컬럼의 변경된 실행으로 바뀔 수 있지만, R_f는 이들 변화로 변경되지 않았다. 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3)의 R_f 값이 표 10에 제공되어 있다.

표 10

[0122] 내부의 시간 정렬 피크를 사용한 제1 바이오마커에 대한 R_f 값

서열번호	피크(m/z)	N	경계 시간 마커에 대한 R_f 값	
1	676.7	12	0.535±0.052	(시간 마커 2와 3 사이)
2	856.8	12	0.781±0.086	(시간 마커 2와 3 사이)
3	860.0	9	0.695±0.134	(시간 마커 2와 3 사이)

[0123] **내재성 동시용리(Coeluting) 통제에 대하여 참조에 의한 변이성의 감소**

[0124] 현재의 혈청 프로테오믹 접근의 하나의 특징은 모든 종에서 발견되고 사례 및 대조군 사이에 차이가 없는 내재성 분자의 사용이다. 이 내부 통제에 대한 바이오마커 풍부함의 표준화는 비생물학적 변이를 감소시켰고 위험 예측에서 바이오마커를 이용하는 능력을 개선시켰다. 표준화는 관심의 피크의 풍부함을 참조 피크로 수학적으로 나누는 단계를 포함하였다. 풍부함은 기계 유래(machine derived) 값이었다. 주어진 분자의 풍부함은 주어진 질량 스펙트럼에서 질량 분석기로 측정된 특정 질량의 이온 수 또는 전체 용리 간격을 나타내는 수 개의 질량 스펙트럼에서 관찰된 특정 질량의 이온 수의 합계를 나타낸다. 분자는 통상적으로 크로마토그래피 컬럼에서 벗어나는데 1.0~1.5 분이 필요하지만, 반면 질량 스펙트럼은 용리 간격 동안 매 1초를 요구한다.

[0125] 제1 바이오마커에 대하여, 3가지 내부 참조가 사용되었다. 피크 m/z 676.7(서열번호 1)에 대하여, m/z 673.3에서 동시용리하는 참조 피크가 사용되었다. m/z 856.8(서열번호 2) 및 피크 860.0(서열번호 3)에 대하여, m/z 843.8에서 동시용리하는 참조 피크가 선택되었다. 이들 비율을 사용하여 로그 비에 대한 평균값을 계산하였다(표 11 및 12).

[0126] 제1 바이오마커 중에서, 3가지(즉, 서열번호 1(m/z 676.7), 서열번호 2(m/z 856.8), 및 서열번호 3(m/z 860.0))가 사례 및 대조군 사이에서 정량적으로 유의하게 상이한 것으로 발견되었다. 표 11 및 12는 각각 임신 24주 및 28주에서 사례 및 대조군에서의 바이오마커 풍부함을 열거한다.

표 11

[0127] 사례 및 대조군에서 (표준화 후) 제1 바이오마커의 풍부함(임신 24주)

비율	평균 대조군	평균 PTB	P 값
log 676.7/673.3	0.503+0.094	0.198+0.076	0.007
log 856.8/842.8	0.284+0.092	-0.137+0.086	0.002
log 860.0/842.8	0.009+0.098	-0.376+0.088	0.005

표 12

[0128] 사례 및 대조군에서 (표준화 후) 제1 바이오마커의 풍부함(임신 28주)

비율	평균 대조군	평균 PTB	P 값
log 676.7/673.3	0.579+0.101	-0.015+0.090	<0.001
log 856.8/842.8	0.231+0.102	-0.149+0.095	0.007
log 860.0/842.8	0.201+0.096	-0.204+0.088	0.002

[0129] **조산을 겪을 위험이 있는 여성을 예측하기 위한 제1 바이오마커의 사용**

[0130] 상기한 바와 같이, 바이오마커의 예측력의 하나의 일반적인 측정은 그것의 민감도 및 특이성이었다. PTB로 발전할 위험이 있는 개체를 확인하기 위하여 표 13 및 표 14에 나타낸 바와 같이 제1 바이오마커에 대한 임계값을 결정하였다. 각각에 대한 임계값은 80% 이상의 특이성(진음성 비율)일 수 있도록 계산되었다. 언급한 바와 같이, 이는 20% 이하의 위양성 비율인 것과 동일하다. 이들 수학적으로 결정된 임계값을 사용하여 4가지 비율은 독립적으로 하기의 민감도(진양성) 및 특이성(진음성) 비율을 표 13 및 표 14에 요약한 바와 같이 제공하였다.

표 13

[0131] 24주에서 제1 바이오마커의 민감도 및 특이성 (표준화 후)

비율	임계값	민감도	특이성
log 677/673	<0.00	35%	92.5%
log 857/843	< -0.215	45.0%	82.5%
log 860/843	< -0.585	45.0%	80.0%

표 14

[0132] 28주에서 제1 바이오마커의 민감도 및 특이성 (표준화 후)

비율	임계값	민감도	특이성
log 677/673	<0.00	65%	85%
log 857/843	<-0.347	38%	82%
log 860/843	<-0.222	55%	80%

[0133] 민감도는 진양성 비율 또는 특히 이 경우에서는 후에 바이오마커로 정확하게 확인되는 PTB로 발전하는 임신한 여성의 백분율로서 정의되는 통계학적 용어이다. 특이성은 진음성 비율 또는 이 경우에서는 정확하게 확인되는 단순한 임신인 임신한 여성의 백분율로서 정의된다. 이 방법에서 예측을 위한 바이오마커를 사용하기 위하여 숫자 임계값이 확립되어야만 한다. 수치를 확립하기 위하여, 통상적으로 바이오마커에 대한 값의 범위가 가장 낮은 것에서 가장 높은 것까지 고려되고 각각의 지점에서 개체의 백분율이 양성으로서 정확하게 확인되며 동일한 지점에서 대조군의 백분율이 양성으로서 부정확하게 확인된다. 이는 수신자 조작 특성 곡선(receiver operator curve, ROC)이라고 칭하여진다. 위양성 비율은 20%로 제한된다. 이는 보통 임상 실험에 대하여 견디어지는 최대값으로 고려된다. 위양성 비율(단순히 임신한 여성인 대조군 그룹의 백분율, 후에 PTB에 대한 위험이 있는 것으로서 바이오마커로 확인함)은 100%에서 차감한 진음성 비율로부터 계산된다. 임계값이 20% 이하의 위양성 비율(80% 이상의 특이성과 동등함)에 있는 어떠한 것이든 누군가가 위험이 있는지 또는 위험이 있지 않은지를 결정하는데 사용되는 임계값을 결정한다. 4가지 비율의 각각에 대한 임계값은 후의 PTB의 위험에 있는 개체의 확인을 감안하여 결정하였다. 각각에 대한 임계값은 80% 이상의 특이성(진음성 비율)일 수 있도록 계산되었다. 언급한 바와 같이, 이는 20% 이하의 위양성 비율인 것과 동일하다. 이들 수학적으로 결정된 임계값을 사용하여 4가지 비율은 독립적으로 하기의 민감도(진양성) 및 특이성(진음성) 비율을 표 13 및 14에 요약한 바와 같이 제공하였다. 피크의 조합은 유의하게 후의 PTB를 예측하는 677(서열번호 1)에서 피크의 능력을 개선시키지 않았다.

[0134] 도 1은 24주 및 28주에서의 샘플링 후에 이후의 PTB를 예측하는 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3)의 예측 능력을 입증하는 ROC 곡선을 나타낸다. 곡선 아래 면적 및 95% 신뢰구간이 또한 각각의 방문에서 각각의 마커에 대하여 포함되어 있다.

[0135] **제1 바이오마커의 확인**

[0136] 부모 펩티드의 분열을 야기하도록 2개의 질량 분석기 사이에 충돌 세포(collision cell)와 함께 탠덤 MS(tandem MS)를 사용하여 아미노 서열을 검색가능한 데이터베이스(MASCOT)와 비교하여 제2의 MS 단계에서 관찰된 분열 패턴으로부터 결정하였다. 펩티드 중 3가지는 동일한 부모 단백질, 인터-알파 트립신 억제제(inter-alpha trypsin inhibitor), 중쇄 4(ITIH4)로부터 유래하였지만, 최종 펩티드는 제2 단백질, 인터-알파 트립신 억제제 중쇄 관련 단백질(inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain related protein, IHRP)로부터 얻어졌다. 표 15는 제1

바이오마커(각각 서열번호 1~3)의 아미노산 서열을 제공한다.

표 15

[0137] 제1 바이오마커(서열번호 1~4)에 대한 아미노산 서열

M/z	MW	서열	부모 단백질
677	2026.98	qlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2
857	4279.25	nvhsagaagsrmnfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2
860	4295.25	nvhsagaagsrm(O)nfrpgvlssrqlglpgppdvpdhaayhpf	ITIH4-2

[0138] 이들 펩티드는 인터-알파 트립신 억제제로 칭해지는 단백질 수퍼 패밀리로부터 생기는 것으로 보인다. 보다 구체적으로, 펩티드는 현재 고려되는 인터-알파 트립신 억제제 중쇄 4의 이소폼(isoform)인, 이소폼 1(ITIH4-1) 및 이소폼 2(ITIH4-2)인 2가지 다른 단백질로부터 유래한 것으로 보인다. 2가지 이소폼은 일부 서열의 상동 관계(homology)를 가지지만, 또한 다른 것에서는 발견되지 않는 아미노산의 부분을 가진다. 2가지 이소폼은 단순히 다른 것을 절단(truncation)한 것을 나타내지 않는다.

[0139] **" 제2 바이오마커" 의 분석**

[0140] 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1, 또는 이의 조합을 포함하는 6가지 추가적인 바이오마커("제2 바이오마커" 로서 정의됨)는 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3 또는 이의 임의의 조합)의 조합으로 분석하였다.

[0141] 로지스틱 회귀 분석을, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1을 포함한 제2 바이오마커와 조합한, 서열번호 1~3을 포함한 제1 바이오마커에 대하여 실행하였다. 제1 바이오마커(즉, 서열번호 1~3)를 수신자 조작 특성 곡선으로 분류 실행하는데 사용하였다. 모든 통계적인 테스트에 대하여 p 값이 0.05 미만인 것으로서 정의된 통계적인 유의성을 가지는 명목적인 양측 p 값(nominal two-sided p-value)을 기록하였다. SAS 버젼 8.2(SAS Institute, Cary, NC)를 이들 분석에 사용하였다.

[0142] **제2 바이오마커의 상대적인 풍부함**

[0143] 사례 및 대조군 사이의 풍부함에서 유의적인 차이를 가지는 제2 바이오마커(즉, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1)는 표 16에 열거되어 있다. 제2 바이오마커의 풍부함은 상기한 방법으로 측정하였다.

표 16

[0144] 사례 및 대조군의 혈청에서 제2 바이오마커의 상대적인 풍부함의 비교

	조산		**대조군**		
표지	**평균**	**표준오차**	**평균**	**표준오차**	**P 값**
태반성장인자	446.82	45.99	596.69	63.36	0.05
트롬빈- 항트롬빈	274.80	255.91	293.83	269.60	0.02
임신 24 주					
	조산		**대조군**		
표지	**평균**	**표준오차**	**평균**	**표준오차**	**P 값**
부신피질 자극 호르몬 방출 인자	0.3585	0.0189	0.2844	0.0122	0.0006
디펜신	612.0	106.6	427.4	92.1	0.039
페리틴	18.97	3.37	10.00	1.48	0.043
락토페린	245.0	42.0	484.6	100.7	0.046
트롬빈- 항트롬빈	546.8	366.3	835.5	453.7	0.044
TNF 수용체 유형 1	1114.1	119.0	880.4	33.7	0.018

[0145] **조산을 겪을 위험이 있는 여성을 예측하기 위한 제1 바이오마커 및 제2 바이오마커 조합의 사용**

[0146] 바로 앞에서 논의된 바와 같이, 제1 바이오마커는 부신 피질 자극 호르몬 방출 인자(CRF), 종양괴사인자 α 수

용체 유형 1(TNFar), 트롬빈-항트롬빈 III 복합체(TAT), 페리틴(FER) 및 락토페리틴(LACTO)을 포함하는 5가지 추가적인 단백질(즉, 제2 바이오마커)과 조합하여 89.8% 민감도 및 81.0% 특이성을 가지는 바이오마커 집단을 제공할 수 있다. 로지스틱 회귀 모델을 사용하여 이들 상이한 마커의 다양한 조합을 고려하였다. 이 모델은 환자에 대하여 예측된 확률을 제공하였다. 따라서, 마커 조합에 대한 컷오프 값은 예측된 확률을 기초로 한다. 80% 이상의 특이성을 제공한 확률이 각각의 분석에서 사용되었다.

[0147] 어떤 종이 2가지 임상 그룹 사이에서 더 나은 차이를 제공하였는지를 결정하기 위한 노력에서, 제1 바이오마커(즉, m/z 677(서열번호 1), 857(서열번호 2), 860(서열번호 3))와 제2 바이오마커(즉, 5가지 단백질 바이오마커 중 4가지)를 5가지 추가적인 단백질 바이오마커 중 각각의 누락의 효과를 보기 위하여 조합으로 테스트하였다. 따라서, 전체 집단(8가지 바이오마커)에서 이하의 단백질을 뺀 결과의 민감도 및 특이성은 다음과 같다:

[0148]

	민감도	특이성
[0149] 전체 집단 - TAT	81%	81%
[0150] 전체 집단 - TNFar	68%	92%
[0151] 전체 집단 - LACTO	81%	80%
[0152] 전체 집단 - CRF	65%	84%
[0153] 전체 집단 - FER	76%	82%

[0154] 이들 데이터는 그룹 사이의 가장 우수한 추가적인 차이를 제공하는 2가지 단백질은 TNFar 및 CRF임을 시사한다.

[0155] 전체 집단 및 1가지 단백질을 누락시킨 다른 조합은 적정한 민감도 및 특이성(80%/80%)을 가지는 바이오마커 조합을 제공하는 반면, 더 적은 바이오마커를 사용하는 것이 상업적으로 바람직할 수 있다. 이를 위하여 다음과 같은 더 적은 조합은 다음과 같은 결과로 평가되었다:

[0156]

	민감도	특이성
[0157] 펩티드 m/z 677 + CRF + FER:	80%	80%
[0158] 펩티드 m/z 677 + CRF + LACTO:	64%	82%
[0159] 펩티드 m/z 677 + CRF + FER + LACTO:	75%	84%
[0160] 펩티드 m/z 677 + CRF + FER + TNFar:	83%	82%
[0161] 펩티드 m/z 677 + CRF + LACTO + TNFar:	79%	82%
[0162] 펩티드 m/z 677 + CRF + TNFar:	79%	~80%
[0163] 펩티드 m/z 677 + CRF + FER + LACTO + TNFar:	89%	~80%

[0164] 도 2는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 부신피질 자극 호르몬 방출 인자, 디펜신, 페리틴, 락토페린, 트롬빈-항트롬빈 복합체 및 종양괴사인자 α 수용체 유형 1과 같은 9가지 예측자의 조합을 포함하여 28주에 샘플링을 만들어 낸 후에 이후의 PTB를 예측하는 제1 및 제2 바이오마커의 예측 능력을 입증하는 ROC를 나타낸다. 곡선 아래 면적 및 95% 신뢰구간이 또한 기록되어 있다.

[0165] **ELISA 분석 I**

[0166] 하기 ELISA 분석이 생물학적 샘플에서 관심의 바이오마커를 검출하고 정량화하는데 이용될 수 있다. 관심의 펩티드(항원)에 면역학적으로 특이적인 제1 항체를 96웰 마이크로타이터 플레이트의 표면 위로 흡착시킨다. 혈청 또는 공지된 표준의 25마이크로리터, 관심의 펩티드의 단계적인 농도를 개별적인 웰로 첨가한다. 혈청을 30분 동안 제1 항체와 함께 항온처리한다. 웰 표면 위로 코팅된 제1 항체는 항원에 결합하여 항원을 고정화시킨다. 또한 항원에 면역학적으로 특이적인 제2 항체를 함유하는 제2 용액의 200마이크로리터를 각 웰에 첨가한다. 제2 항체를 호스래디쉬 페록시다아제 또는 화학발광 전구체와 같은 마커로 표지하였다. 웰을 30분 동안 항온처리하

여 항원-제1 항체 복합체로 제2 항체가 결합하게 하여 그 자체가 웰 표면에 결합되는 항체-항원-항체 '샌드위치'를 형성한다. 그 다음 웰을 주의하여 그리고 완전히 세척하여 임의의 결합하지 않은 제2 항체를 제거한다. 그 후, 제2 항체 표지에 대한 특이적인 기질을 함유하는 용액을 첨가한다. 호스래디쉬 페록시다아제의 경우에, 결합된 제2 항체의 양에 상응하여 웰 내에서 색깔 변화가 일어난다. 화학발광 마커의 경우에, 기질이 비화학발광 분자 종에서 빛을 내는 화학발광 생성물로 변환한다. 생성물에 의해 방사되는 빛은 웰 내에 존재하는 항원의 양에 비례하고 특정 파장에서 방사되는 빛을 측정하고 그 강도를 기록하는 전문화된 분광계인 '플레이트 리더'로 측정된다.

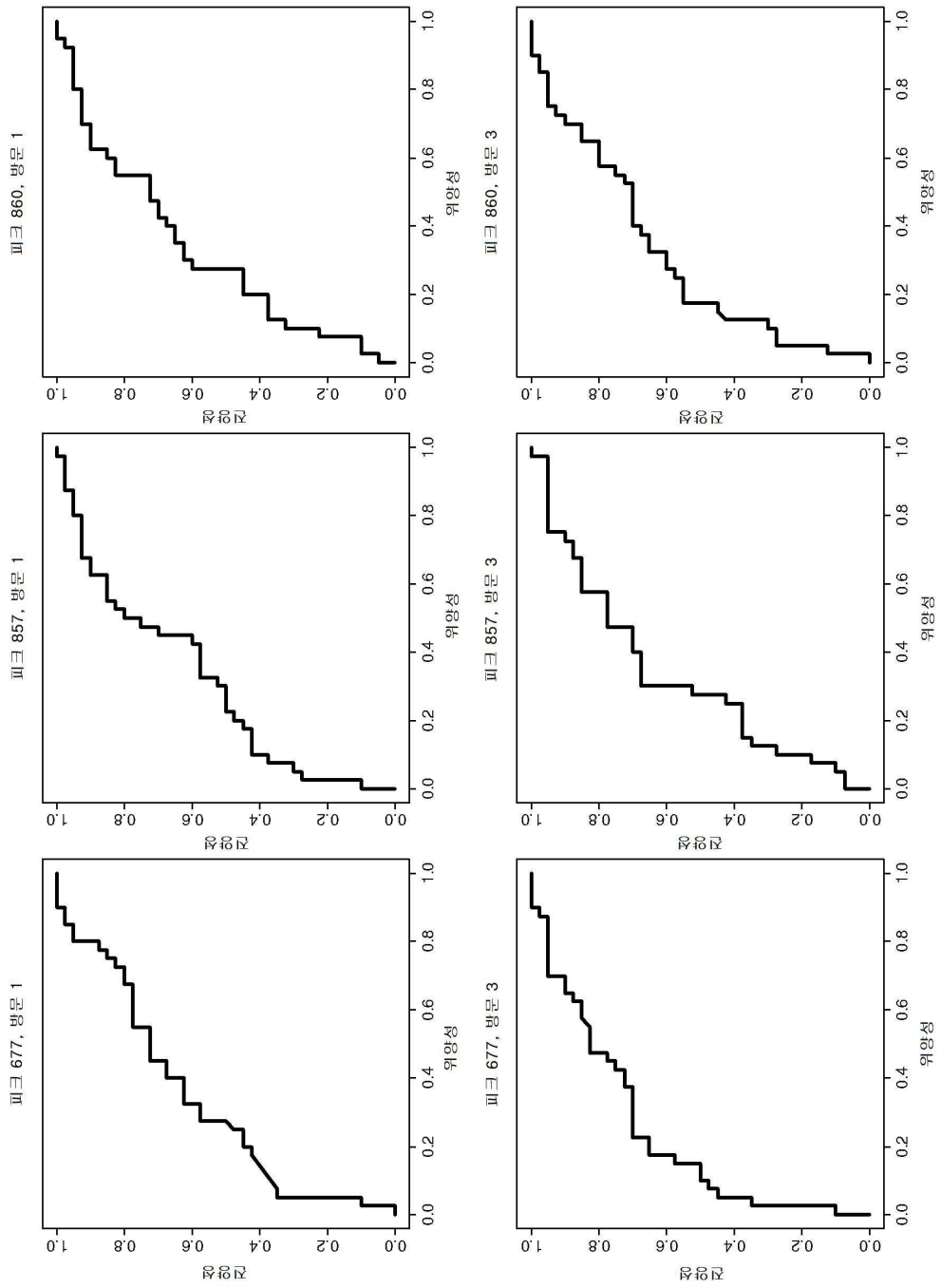
[0167] **ELISA 분석 II**

[0168] 하기 ELISA 분석이 생물학적 샘플에서 관심의 바이오마커를 검출하고 정량화하는데 이용될 수 있다. 제2 항체가 비오틴 분자로 표지된 것을 제외하고, 이 분석은 ELISA 분석 I과 유사하다. 항체-항원-항체 형성 후의 웰의 세척 후, 호스래디쉬 페록시다아제에 결합된 스트렙트아비딘(streptavidin)을 함유하는 용액을 웰에 첨가하여 비오틴 분자와 반응이 일어나도록 한다. 이러한 특정 분석에서 색이 없는 기질이 착색된 생성물로 변환한다. 특정 파장의 빛의 흡광도로서 측정된 색의 강도는 웰에 존재하는 항원의 양에 비례한다. 알려지지 않은 것의 농도는 그것의 흡광도를 흡광도 대 일련의 공지된 교정용 표준의 농도, 즉 항원의 단계적인 농도의 플롯에 대하여 비교함으로써 평가할 수 있다.

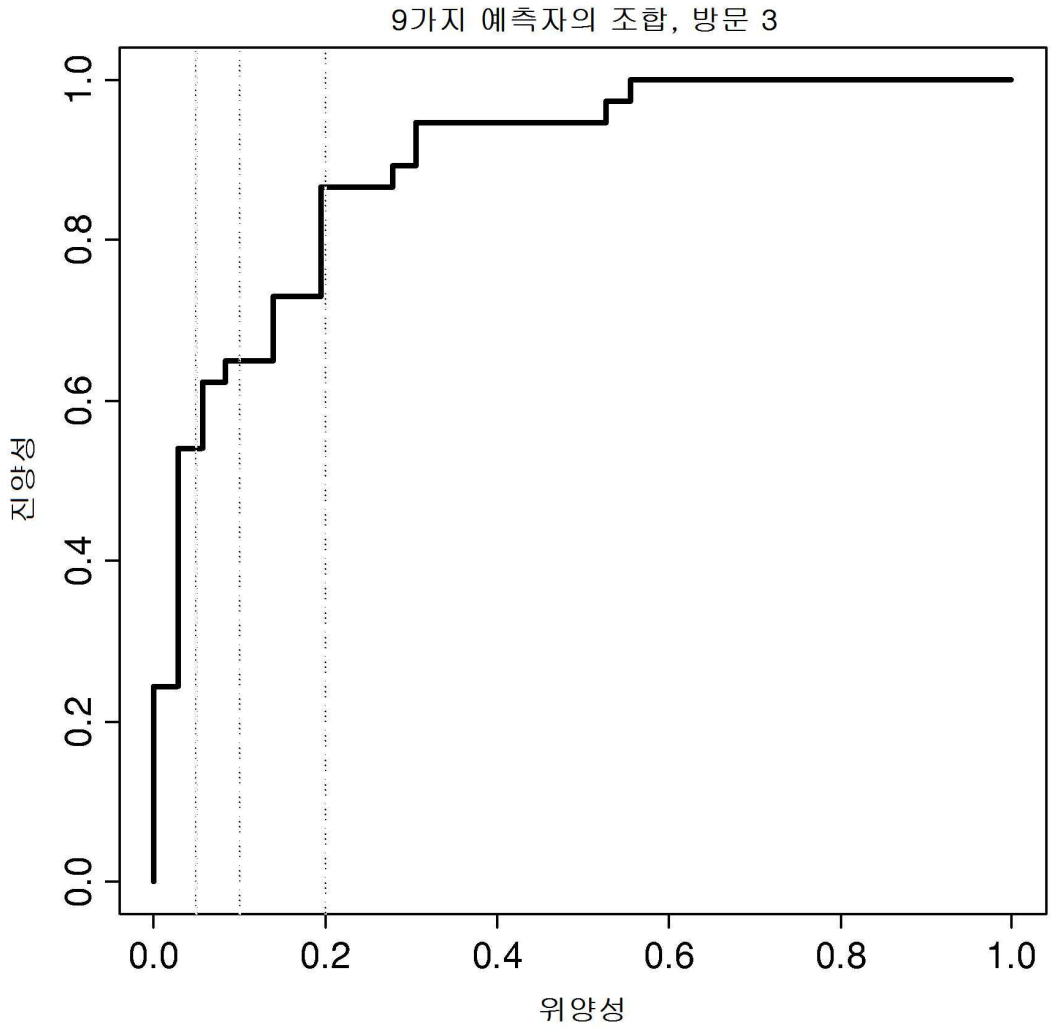
[0169] 본 출원의 상기한 조성물 및 방식은 본 발명의 바람직한 구체예의 단지 예시적인 것임이 이해되어야 한다. 본 발명의 정신 및 범위를 벗어남이 없이 당업자에 의해 다수의 변형 및 대안적인 정렬이 고안될 수 있고 첨부된 청구항은 상기 변형 및 정렬을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 가장 실용적이고 바람직한 구현예인 것으로 현재 여겨지는 것과 관련하여 특별하게 그리고 상세하게 본 발명이 상기에 기재되어 있는 반면, 이에 제한되지는 않지만 크기, 물질, 모양, 형상, 작동의 기능 및 방식, 조립 및 용도에서의 변화를 포함하여 다수의 변형이 본원에 설명된 원칙 및 개념을 벗어나지 않고 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다.

도면

도면1


피크 860, 방문 1
피크 860, 방문 3
피크 857, 방문 1
피크 857, 방문 3
피크 677, 방문 1
피크 677, 방문 3
민감성
위양성
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

도면2



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Graves, Steven W.

Esplin, Michael Sean

<120> Identification and Quantification of Biomarkers for Evaluating the Risk of Preterm Birth

<130> 24U03.2-390

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Leu Gly Leu Pro Gly Pro Pro Asp Val Pro Asp His Ala Ala Tyr
1 5 10 15

His Pro Phe

<210
> 2

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Val His Ser Ala Gly Ala Ala Gly Ser Arg Met Asn Phe Arg Pro
1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Ser Arg Gln Leu Gly Leu Pro Gly Pro Pro Asp Val
20 25 30

Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro Phe
35 40

<210> 3

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa at residue 12 represents oxidized methionine. Throughout the application it is referred to as M(O) .

<400> 3

Asn Val His Ser Ala Gly Ala Ala Gly Ser Arg Xaa Asn Phe Arg Pro
1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Ser Arg Gln Leu Gly Leu Pro Gly Pro Pro Asp Val
20 25 30

Pro Asp His Ala Ala Tyr His Pro Phe
35 40