



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0126900
(43) 공개일자 2022년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
G01N 33/564 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0031196
(22) 출원일자 2021년03월10일
심사청구일자 2021년03월10일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김용길
서울특별시 강남구 선릉로126길 22, 106동 402호
(삼성동, 롯데캐슬프리미어아파트)
이은주
서울특별시 송파구 중대로 24, 201동 501호(문정
동, 올림픽힐리타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

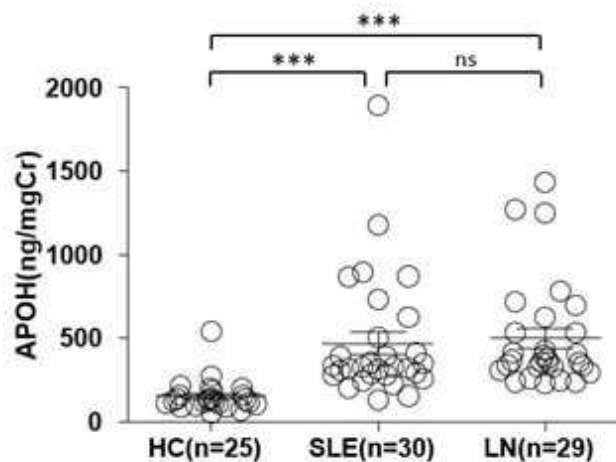
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법

(57) 요약

전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 전신 홍반성 루푸스가 의심되는 개체의 소변 샘플에서 측정된 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 건강한 대조군과 비교한다는 간단하고 편리한 방법을 통하여 정확한 전신 홍반성 루푸스의 진단이 가능하므로, 전신 홍반성 루푸스의 진단 및 치료에 있어서 널리 활용될 것이다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

G01N 33/564 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김경곤

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호(신천동, 파크리오)

염정훈

서울특별시 강동구 천중로16길 37, 105동 301호(천호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345312438

과제번호 2019R1I1A1A01060441

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 루푸스 신염 특이 소변 단백질의 번역 후 조절체에 대한 항체 개발 및 이를 이용한 루푸스 신염 조기 진단 도구 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산대학교 산학협력단

연구기간 2019.06.01 ~ 2022.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

ApoH(Apolipoprotein H) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus) 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 개체의 소변 샘플에서 측정하는 것인, 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 ApoH 단백질은 전장 ApoH 단백질 중에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 제거된 것인, 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 ApoH 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것인, 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 ApoH 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 또는 나노파티클인, 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 ApoH 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인, 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 바이오마커 조성물을 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정한 발현 수준보다 증가한 경우에 전신 홍반성 루푸스로 진단하는 단계를 추가로 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 진단

단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변인, 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus; SLE)는 자가 항체의 생성을 특징으로 하는 만성 염증성 자가 면역질환으로, 피부 증상이 가장 일반적이나, 이 외에도 관절, 폐, 심장, 신장, 골수, 혈관 등 신체의 다양한 기관을 침범하는 전신성 질환이다.

[0003] 이러한 전신 홍반성 루푸스 치료 약물은 조직이나 장기의 손상된 정도에 따라 처방되며 흔히 사용되는 약물은 비스테로이드성 소염제(NSAID), 저용량 글루코코르티코이드(부신피질호르몬), 항말라리아제 등이고, 중증(생명 위협 수준)일 경우 고용량 스테로이드제 및 면역 억제제 등을 사용한다. 그러나, 상기 글루코코르티코이드 및 스테로이드 제제를 장기간 투여하는 경우 근병증, 골다공증, 고혈압, 당뇨, 동맥경화성 혈관 질환 및 감염 위험의 증가 등과 같은 부작용이 발생한다. 따라서 전신 홍반성 루푸스의 첫 증상 발병으로부터 조기 진단이 중요한 상황이다.

[0004] 그러나, 전신 홍반성 루푸스는 다양한 임상 양상, 중증도, 자가 항체가 존재하기 때문에 진단이 어려운 편이며, 실제로 첫 번째 증상 발병에서 전신 홍반성 루푸스 진단까지의 소요되는 시간이 길다.

[0005] 현재 전신 홍반성 루푸스 진단을 위한 혈청학적 바이오마커는 항핵항체(antinuclear antibodies; ANA)와 항이중 가닥 DNA 항체(anti-dsDNA)이다. anti-dsDNA의 경우 전신 홍반성 루푸스의 매우 특이적인 마커로 간주되지만, 전신 홍반성 루푸스 진단에 대한 민감도가 낮고 양성 예측 값이 낮은 것으로 보고되었다. 따라서, 강력한 민감도와 특이성을 가진 새로운 전신 홍반성 루푸스의 진단용 바이오마커의 개발이 시급한 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 간단하고 편리한 방법으로 전신 홍반성 루푸스를 정확하게 진단할 수 있는 바이오마커를 개발하기 위하여, 전신 홍반성 루푸스 환자와 건강한 대조군의 소변 샘플의 다양한 단백질을 분석한 결과, 건강한 대조군과 비교하여 유의하게 발현이 증가한 ApoH(Apolipoprotein H)를 확인 및 선별함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 간단하고 편리한 방법으로 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus; SLE)를 정확하게 진단할 수 있는 전신 홍반성 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0008] 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 전신 홍반성 루푸스 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 또 다른 목적은, 상기 바이오마커 조성물을 이용하여 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 ApoH(Apolipoprotein H) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus) 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 용어 "ApoH(Apolipoprotein H)"는 beta-2 glycoprotein 1 또는 β 2GPI라고도 불리우며, 리포단백질과 유리되거

나 연결된 상태 둘 다로 발견되는 풍부한 혈장(혈청) 당단백질을 의미한다. 마우스, 쥐, 개, 소, 침팬지 및 인간을 포함하여 다양한 포유류 종으로부터의 ApoH의 DNA 및 아미노산 서열이 알려져 있다. ApoH의 기능 중 하나는 지질인 카디올리핀(cardiolipin)과 결합하는 것이고, ApoH의 구조 내에는 양전하를 띠는 아미노산이 있으며, 이를 통해 인지질 결합에 관여한다.

- [0012] 용어 "전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus; SLE)"는 전신의 다양한 조직에 자가면역으로 인한 염증 반응이 발생하는 질환을 의미한다. 침범 조직에 따라 피부 발진, 광과민성, 관절염, 구강궤양, 신장염, 혈구 감소증, 혈관염, 장막염 등 다양한 증상을 나타낸다. 전신 홍반성 루푸스의 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나, 유전적 요인이 발병과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 유전적인 요인 외에도 특정 바이러스 감염, 자외선 노출, 과도한 스트레스, 항생제를 비롯한 일부 약물 또는 여러 호르몬에 의한 환경적인 요인 또한 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.
- [0013] 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.
- [0014] 용어 "바이오마커"는 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 샘플에서 전신 홍반성 루푸스 발병 여부를 진단할 수 있는 물질을 의미한다. 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에 비하여 전신 홍반성 루푸스 환자에서 채취한 생물학적 샘플에서 ApoH의 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예를 들어, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(예를 들어, 단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준은 개체의 소변 샘플에서 측정할 수 있다.
- [0016] 일 구현예에서, 신장염을 동반하지 않은 SLE 환자 및 신장염을 동반한 SLE 환자와 건강한 대조군의 소변 샘플에서 ApoH의 발현 수준을 비교한 결과, 신장염 동반 여부와 무관하게 SLE 환자의 소변 샘플에서 ApoH의 발현 수준이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0017] 다른 구현예에서, SLE 진단에 대한 ROC 분석을 수행한 결과, 소변 ApoH의 발현 수준은 민감도 91.5% 및 특이도 92.0%를 나타내는 것을 확인할 수 있다.
- [0018] 상기 ApoH 단백질은 전장 ApoH 단백질 중에서 N-말단의 시그널 펩타이드가 제거된 성숙한 형태(mature form)일 수 있다.
- [0019] 상기 ApoH 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0020] 상기 성숙한 형태의 ApoH 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0021] 상기 ApoH 단백질의 발현 수준의 측정은 전신 홍반성 루푸스를 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 ApoH 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.
- [0022] 상기 ApoH 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 또는 나노파티클일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter) 또는 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 ApoH 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준의 측정은 전신 홍반성 루푸스를 진단하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 ApoH 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 유전자의 양을 확인하는 것이다.
- [0025] 상기 ApoH 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), RNase 보호 분석법(RNase 보호 분석

법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 다른 양상은, 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 전신 홍반성 루푸스 진단용 키트를 제공한다.
- [0028] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 이용하여 전신 홍반성 루푸스를 진단할 수 있다. 구체적으로는, 상기 키트는 개체로부터 채취한 소변 샘플을 이용하여 전신 홍반성 루푸스를 진단할 수 있다. 개체로부터 용이하게 채취할 수 있는 소변 샘플을 이용함에 따라 보다 간단하고 편리한 방법으로 전신 홍반성 루푸스의 조기진단이 가능할 수 있다.
- [0029] 상기 키트에는 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0030] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스 트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0031] 상기 바이오마커 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0032] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 전신 홍반성 루푸스 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0033] 용어 "생물학적 샘플"은 일 양상에 따른 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 개체로부터 수득한 모든 샘플을 의미한다. 구체적으로는, 상기 생물학적 샘플은 소변일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.
- [0034] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

- [0035] 일 양상에 따른 전신 홍반성 루푸스 진단용 바이오마커 조성물을 이용하면, 전신 홍반성 루푸스가 의심되는 개체의 소변 샘플에서 ApoH 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하고 정상 개체의 발현 수준과 비교하여 전신 홍반성 루푸스를 진단함으로써, 편리하고 간단한 방법을 통하여 전신 홍반성 루푸스의 조기 진단이 가능하다. 조기 진단이 가능함에 따라, 조직 또는 기관의 손상이 심해지기 전에 부작용이 적은 약물의 사용을 통하여 치료가 가능하므로, 전신 홍반성 루푸스 진단 및 치료에 있어서 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a는 일 양상에 의한 SWATH 분석을 통하여 전신 홍반성 루푸스(SLE) 환자와 건강한 대조군(HC)의 소변 샘플에서 차별적으로 발현되는 단백질(DEP)를 확인한 결과이다.
- 도 1b는 일 양상에 의한 SWATH 데이터 분석을 통하여 SLE 환자 및 HC의 소변 샘플에서 기존에 SLE 마커로 알려진 ORM1, AHSR, CP 및 PTGDS의 발현 강도를 비교한 결과이다.
- 도 1c는 일 양상에 의한 SWATH 데이터 분석을 통하여 SLE 환자 및 HC의 소변 샘플에서 ApoH의 발현 강도를 비교한 결과이다.
- 도 2a는 일 양상에 의한 ELISA 방법을 통하여 건강한 대조군(HC), 신염을 동반하지 않은 전신 홍반성 루푸스 환자(SLE) 및 신염을 동반한 전신 홍반성 루푸스 환자(LN)의 소변 샘플에서 ApoH의 발현 강도를 비교한 결과이다.
- 도 2b는 일 양상에 의한 ROC 분석을 통하여 SLE 진단에 대한 ApoH의 정확도를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기

위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 실험 대상 선별

[0039] 실험 대상으로 2019년 대한민국 서울에 있는 3차 대학 병원인 서울아산병원의 류마티스 클리닉을 방문한 환자 중에서 1998년 American College of Rheumatology에서 정의한 SLE 분류 기준을 충족한 SLE 환자 76명을 선별하였다. 여성 환자 63명, 남성 환자 13명이며, 환자의 평균 연령은 43세(23세-53세)였다. 또한, 건강한 대조군으로 환자군과 성별, 나이를 맞춘 25명의 피험자를 선별하였다. 실험을 진행하기 전에 모든 환자 및 대조군 피험자로부터 서면 동의를 얻었으며, 소변 샘플은 사전 동의를 얻은 후 서울아산병원 방문 일에 채취하였다. 이 실험은 서울아산병원 기관 심의위원회(제 2014-0568호)의 승인을 받았다.

[0040] 실시예 2. 프로테오믹 분석을 위한 샘플 준비

[0041] 먼저, 500 μ L의 소변 샘플을 원심 진공 농축기(LABCONCO, CentriVap, Kansas City, MO, USA)에서 동결 건조하여 부피를 줄였다. 건조된 샘플과 5% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 및 50 mM 트리에틸암모늄 중탄산염(triethylammonium bicarbonate; pH 7.55, Thermo Fisher Scientific)을 혼합하여 100 μ L 용해 완충으로 재구성하였다. trypsin/LysC mixture(Promega, Madison, WI, USA)을 제외하고는 이전에 기재된 방법에 따라 샘플을 S trap-기반 트립신 분해로 처리하였다. 건조된 펩타이드는 0.1% 포름산으로 재구성하였고, 펩타이드 농도를 측정하기 위하여 NanoDrop One 분광 광도계(ThermoFisher Scientific)에서 205 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 각 샘플의 40 μ g 펩타이드를 개별 분석에 할당하고 건조하였다. 모든 남아있는 펩타이드는 분광 라이브러리 생성을 위해 조합하였다

[0042] 실시예 3. in-house 소변 프로테오믹 분광 라이브러리를 위한 middle-pH 역상 분획

[0043] 조합된 샘플의 분획은 Shimadzu Prominence HPLC 기기(Shimadzu, Japan)를 사용하여 XBridge C18 컬럼(4.6 mm i.d. X 250 mm 길이; 구멍 크기 130 Å 및 입자 크기 5 μ m; Waters Corporation, USA)에서 0.5 mL/min의 유속으로 수행하였다. 이동상 A로서 10mM triethylammonium bicarbonate(TEAB, pH 8.5) 및 이동상 B로서 90% 아세토니트릴(acetonitrile; pH 10) 중 10mM TEAB를 사용 하였다. 샘플을 200 μ L 이동상 A에 용해시킨 다음, 2,100 μ L의 샘플 루프에 주입하였다. 5-5% B 15분, 5-45% B 62.5분, 45-60% B 5분, 60-60% B 12.5분, 60-5% B 7.5분, 5-5% B 20분의 구배를 적용한 다음 컬럼을 100% 및 50% 이동상 B로 각각 30분 동안 세척하였다. 분획 과정에서 Shimadzu Prominence(Shimadzu, Tokyo, Japan)의 fraction collector를 사용하여, 30초 마다 용리액을 수집하였다. 생성된 168개의 분획을 24개의 분획이 되도록 결합(concatenate) 방식으로 혼합하였다. 각 분획을 건조하고 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 액체 크로마토 그래피-탠덤 질량 분석법(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS / MS) 분석 전에, iRT Kit(Biognosys AG, Schlieren, Switzerland)의 펩타이드(라이브러리 샘플 및 개별 샘플)를 제조업체의 지침에 따라 모든 샘플에 추가하였다.

[0044] 실시예 3. 정량적 프로테오믹스를 위한 질량 분석법 분석

[0045] in-house 소변 프로테오믹 분광 라이브러리 생성의 경우, 샘플은 다음과 같은 LC-MS/MS 설정으로 SCIEX TripleTOF 5600+ 시스템 질량 분석기를 사용하여 분석하였다: LC 분리를 위해, 트랩 칼럼으로 Eksigent 마이크로 트랩 카트리지(ChromXP C18CL, 5 μ m, 120 Å)를, 분석 칼럼으로 Eksigent 컬럼(C18-CL, 0.3 x 150 mm, 입자 크기 3 μ m, 구멍 크기 120 Å)으로 하고 컬럼 온도는 40 °C로 유지한 상태에서 ekspert™ nanoLC 425(Eksigent, Dublin, CA)를 사용하였다. 샘플을 100% 용리액 A : 0.1% 포름산을 사용하여 10 μ L/min의 유속으로 트랩 컬럼에 로딩하였다. 10분 후, 펩타이드는 용리액 A 및 용리액 B : 100% acetonitrile 중 0.1% 포름산을 사용하여 5 μ L/min에서 87분 단위(용리액 B는 68분에 걸쳐 3 내지 25%, 5분에 걸쳐 25 내지 35%, 2분에 걸쳐 35 내지 80%, 3분 동안 80% 유지, 1분 동안 80 내지 3% 유지, 8분 동안 3% 유지)로 분리하였다. 질량 분석기는 MS1(400 ~ 1250 m/z) 및 MS2(100 ~ 1500 m/z) 스캔에 대해 각각 250 ms 및 50 ms 수집 시간, 및 15초 동적 제외로 데이터 의존 수집(data dependent acquisition; DDA) top30 모드에서 작동하였다. 풀링 충돌 에너지는 +2에서 +5까지의 전하 상태로 분획에 사용되었다. 다른 매개변수는 다음과 같이 설정하였다: 이온 소스 가스 1(GS1) 15; 이온 소스 가스 2(GS2) 20; 커튼 가스(CUR) 30; 온도 (TEM) 250 °C; 이온 스프레이 전압 플로팅(ISVF) 5500.

[0046] 개별 샘플의 경우, 모든 질량 분석 실험은 Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra(SWATH) 모드에서 SCIEX 기술 노트에 따라, 100개의 variable windows를 사용하여 작동하였다. LC 설정은 상기에 기재된 구배 시간을 제외하고 동일한 조건에서 수행하였다. 용리액 B의 구배는 38분에 걸쳐 3 내지

25%, 5분에 걸쳐 25 내지 32%, 2분에 걸쳐 32 내지 80%, 3분 동안 80% 유지, 1분 걸쳐 80 내지 3%, 3분 동안 80% 유지가 적용되었다. SWATH 매개변수는 다음과 같이 설정하였다: 하한 m/z 400; 상한 m/z 1250; window overlap(Da) 1.0; CES는 작은 windows에 대해 5, 큰 windows에 대해 8, 가장 큰 windows에 대해 10으로 설정하였다. MS2 스펙트럼은 고감도 모드에서 2.5 ms 동안 100-1500 m/z 범위에서 수집되었으며, 총 사이클 시간은 2.8초였다.

[0047] 실시예 4. *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리 생성

[0048] 모든 DDA 로우(raw) 파일은 인간 UniProt 데이터베이스(released in January 2020; <http://www.uniprot.org>)에 대해 Andromeda Search 엔진(PMID: 21254760)을 사용하여 MaxQuant(PMID: 27809316) v1.6.7.0으로 처리하였으며, 다음과 같은 검색 매개변수를 사용하였다: 특정 트립신을 효소로 선택하고, 시스테인의 carbamidomethylation을 고정 변형으로 설정하며, N-말단 단백질을 아세틸화 및 산화(M)를 가변 변형으로 설정하였다. 또한, FDR(false discovery rate)은 단백질 및 PSM(Peptide Spectrum Match) 수준 모두에서 0.01로 설정하고, 하나 이상의 고유한 펩타이드로 확인된 단백질을 사용하였으며, 다른 설정은 기본 값으로 유지하였다. 분광 라이브러리는 기본 설정으로 Spectronaut Enterprise + x64(13.12.200217)를 사용하여 MaxQuant DDA 검색 결과로부터 구축하였다.

[0049] 실시예 5. SWATH Data 분석

[0050] 개별 샘플에 대한 SWATH-MS 데이터는 *in-house* 소변 프로테옴 분광 라이브러리와 함께 DIA-NN 1.7.10을 사용하여 처리하였다. 스펙트럼은 기본 설정으로 검색하였으나, m/z 범위는 전구체의 경우 400-1250이고 조각 이온(fragment ion)의 경우 100-1500이었다. diann R 패키지 (<https://github.com/vdemichev/diann-rpackage>)에 구현된 MaxLFQ 알고리즘(PMID: 24942700)을 사용하여 단백질 정량 값을 획득하였다. 단백질 강도 값은 0.01 이상의 q-값을 통과하는 전구체 및 단백질 그룹에 대하여 필터링하였다. 단백질 강도 값의 정규화는 다음과 같은 식으로 수행하였다:

$$[0051] \text{Normalized protein intensity} = \frac{\text{Protein intensity of MaxLFQ} \times (\text{Total peptide amount} / 40)}{\text{Creatine concentration}}$$

[0052] MaxLFQ 알고리즘으로 얻은 단백질 강도 값에 단백질 비율 값을 곱하고, 이 값을 나누어 크레아틴 농도를 계산하였다. 단백질 비율은 나노 드롭을 사용하여 정량화된 총 펩타이드 양을 MS 분석을 위해 준비한 펩타이드의 양으로 나눈 값이다.

[0053] 실시예 6. 소변 ApoH 수준의 측정

[0054] 소변 크레아티닌 농도(ENZO, ADI-907-030A)로 조정된 소변 ApoH의 농도는 시판되는 ELISA 키트(abcam, ab108814)를 사용하여 SLE 환자 59명 및 건강한 피험자 25명에서 측정하였다.

[0055] 실시예 7. 통계적 분석

[0056] 샘플 간 단백질 강도의 차등 분석을 위해 무료 소프트웨어 Perseus(version 1.6.14.0)를 사용하였다. 정규화된 단백질 강도의 값은 log2 스케일로 변환하였다. 각 샘플의 유형을 그룹화하였으며, 적어도 하나 그룹에서 최소 90%가 필요하였다. 결측 값은 기본 매개변수(width: 0.3, downshift: 1.8)를 사용하여 정규 분포에서 추출한 난수로 대체하였다. 샘플 간의 통계적으로 유의한 차이를 찾기 위하여, Benjamini-Hochberg FDR(0.05 컷오프)을 사용하여 T-검정을 수행하였다. 볼케이노 플롯(volcano plot)과 박스 플롯(box plot)의 시각화는 InstantClue 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0057] 연속 값은 매개변수 데이터의 경우 평균(표준 편차)으로, 비매개변수 데이터의 경우 중앙값(사분위수 범위)으로 표현하였다. ROC(Receiver operating characteristics) 분석을 사용하여 SLE 진단과 관련된 요인의 예측 값을 결정하였다. 컷오프 값은 Youden의 지수가 최대인 수준에서 결정하였다. 0.05 미만의 P-값은 모든 분석에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 분석은 IBM SPSS Version 20.0(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 수행하였다.

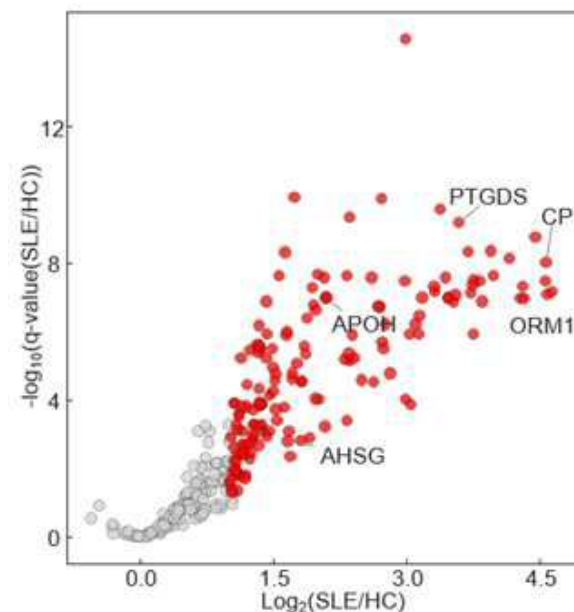
[0058] 실험예 1. SLE 바이오마커 발견을 위한 SWATH 분석

[0059] 바이오마커 후보를 선별하기 위하여 25명의 건강한 대조군(HC)과 76명의 전신 홍반성 루푸스(SLE) 환자의 소변 샘플을 선택하고 상기 실시예에 기재된 방법으로 단백질을 추출하고 SWATH-MS에 의한 단백질 정성 및 정량 분석을 수행하였다.

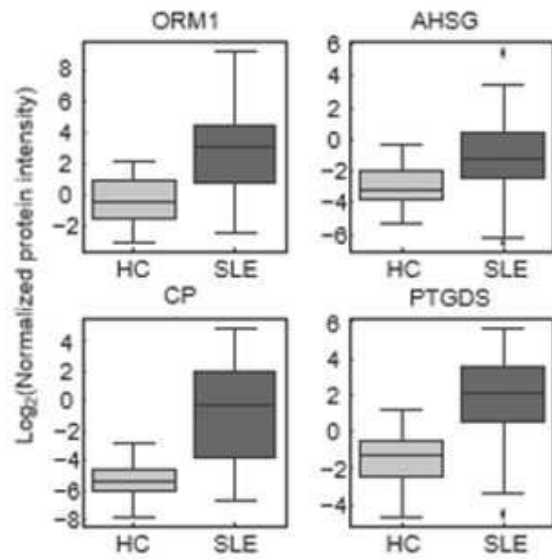
- [0060] 분광 라이브러리를 만들기 위하여, 소변 샘플을 모으고 DDA 분석을 통해 2,323개의 단백질과 8,371개의 펩타이드를 발견하였다. *in-house* 분광 라이브러리를 사용하여 개별 샘플에서 총 1,157개의 단백질 그룹(HC에서 581 ± 31 및 479 ± 16)을 정량화하였다.
- [0061] 정량화한 1,157개의 단백질 중에서 차별적으로 발현된 단백질(DEP)을 확인하기 위해, 두 그룹의 Benjamini-Hochberg FDR에 의해 fold-changes 및 p-값을 계산하였다. 그 결과, HC와 비교하여, SLE에서 발현이 증가된 153개의 단백질 ($FDR \leq 0.05$, $\log_2$ fold change ± 1)을 확인하였다(도 1a). 확인된 153개의 DEPs 중에서, 기존에 SLE 마커로 알려진 Alpha-1-acid glycoprotein 1(ORM1), Alpha-2-HS-glycoprotein(AHSG), Ceruloplasmin(CP) 및 Prostaglandin-H2 D-isomerase(PDGDS)도 발견되었으며, 기존에 알려진 결과와 유사하게 발현이 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 1b). 흥미롭게도, HC와 비교하여 SLE 환자의 소변에서 기존에 SLE 마커로 알려지지 않은 ApoH(beta-2 glycoprotein)의 발현이 증가한 것을 확인하였다(도 1c).
- [0062] **실험예 2. SLE 진단 마커로서 소변 ApoH의 확인 및 정확도 측정**
- [0063] ELISA 방법을 사용하여 건강한 대조군과 비교한 결과, 루푸스 신염(LN)을 동반한 SLE 환자 및 루푸스 신염을 동반하지 않은 SLE 환자에서 소변 ApoH 발현 수준이 증가한 것을 확인하였다(도 2a). SLE 환자는 건강한 대조군보다 더 높은 소변 ApoH 발현 수준을 나타냈다[352.674 (287.631-534.075) ng/mg vs 128.768 (107.969-172.821) ng/mg, $p < 0.001$]. 한편, SLE 환자 중에서 LN을 동반한 환자 또는 동반하지 않은 환자 사이의 소변 ApoH 발현 수준의 차이는 나타나지 않았다[378.351 (327.963-623.663) ng/mg vs 326.755 (263.835-406.932) ng/mg, $p = 0.066$].
- [0064] 또한, SLE 결과에 대한 ROC 분석은 도 2b에 나타낸 바와 같다. 소변 ApoH의 발현 수준은 228.53 ng/mg의 컷오프 값에서 0.946(95 % CI, 0.882-1.000)의 AUC를 가졌다(민감도 91.5%, 특이도 92.0%).
- [0065] 이를 통하여, 소변 ApoH의 발현 수준을 통하여 루푸스 신염 동반 여부와 무관하게, 전신 홍반 루푸스 환자를 정확하게 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

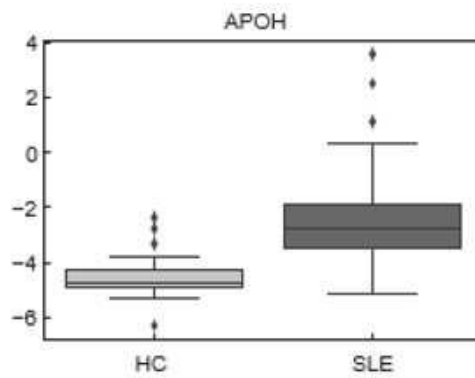
도면1a



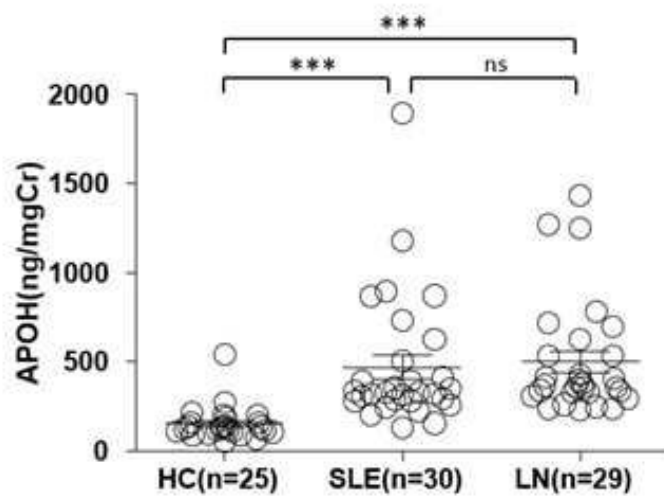
도면1b



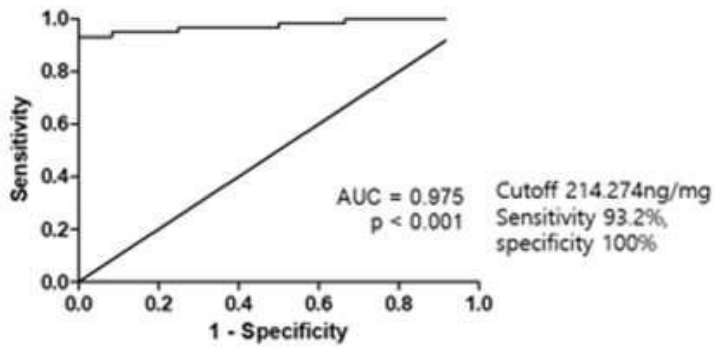
도면1c



도면2a



도면2b



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Biomarker Composition for Diagnosing Systemic lupus erythematosus
and Method of providing information for diagnosis of Systemic
lupus erythematosus using the same

<130> PN210111KR

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Ser Pro Val Leu Ile Leu Phe Ser Ser Phe Leu Cys His Val

1 5 10 15

Ala Ile Ala Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser

20 25 30

Thr Val Val Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr

35 40 45

Tyr Ser Cys Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe

50 55 60

Ile Cys Pro Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr

65 70 75 80

Pro Arg Val Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg

85 90 95

Tyr Thr Thr Phe Glu Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr

100 105 110

Gly Phe Tyr Leu Asn Gly Ala Asp Ser Ala Lys Cys Thr Glu Glu Gly

115 120 125

Lys Trp Ser Pro Glu Leu Pro Val Cys Ala Pro Ile Ile Cys Pro Pro

130 135 140

Pro Ser Ile Pro Thr Phe Ala Thr Leu Arg Val Tyr Lys Pro Ser Ala

145 150 155 160

Gly Asn Asn Ser Leu Tyr Arg Asp Thr Ala Val Phe Glu Cys Leu Pro

165 170 175

Gln His Ala Met Phe Gly Asn Asp Thr Ile Thr Cys Thr Thr His Gly

180 185 190

Asn Trp Thr Lys Leu Pro Glu Cys Arg Glu Val Lys Cys Pro Phe Pro

195 200 205

Ser Arg Pro Asp Asn Gly Phe Val Asn Tyr Pro Ala Lys Pro Thr Leu

210 215 220

Tyr Tyr Lys Asp Lys Ala Thr Phe Gly Cys His Asp Gly Tyr Ser Leu

225 230 235 240

Asp Gly Pro Glu Glu Ile Glu Cys Thr Lys Leu Gly Asn Trp Ser Ala

245 250 255

Met Pro Ser Cys Lys Ala Ser Cys Lys Val Pro Val Lys Lys Ala Thr

260 265 270

Val Val Tyr Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn

275 280 285

Gly Met Leu His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu

290 295 300

Lys Lys Cys Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile

305 310 315 320

Glu Val Pro Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys

325 330 335
 Thr Asp Ala Ser Asp Val Lys Pro Cys
 340 345
 <210> 2
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mature apolipoprotein H
 <400> 2
 Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val

 1 5 10 15
 Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys
 20 25 30
 Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro
 35 40 45
 Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Pro Arg Val
 50 55 60
 Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg Tyr Thr Thr
 65 70 75 80

 Phe Glu Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr Gly Phe Tyr
 85 90 95
 Leu Asn Gly Ala Asp Ser Ala Lys Cys Thr Glu Glu Gly Lys Trp Ser
 100 105 110
 Pro Glu Leu Pro Val Cys Ala Pro Ile Ile Cys Pro Pro Pro Ser Ile
 115 120 125
 Pro Thr Phe Ala Thr Leu Arg Val Tyr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Asn
 130 135 140
 Ser Leu Tyr Arg Asp Thr Ala Val Phe Glu Cys Leu Pro Gln His Ala

 145 150 155 160
 Met Phe Gly Asn Asp Thr Ile Thr Cys Thr Thr His Gly Asn Trp Thr
 165 170 175
 Lys Leu Pro Glu Cys Arg Glu Val Lys Cys Pro Phe Pro Ser Arg Pro

180	185	190	
Asp Asn Gly Phe Val Asn Tyr Pro Ala Lys Pro Thr Leu Tyr Tyr Lys			
195	200	205	
Asp Lys Ala Thr Phe Gly Cys His Asp Gly Tyr Ser Leu Asp Gly Pro			
210	215	220	
Glu Glu Ile Glu Cys Thr Lys Leu Gly Asn Trp Ser Ala Met Pro Ser			
225	230	235	240
Cys Lys Ala Ser Cys Lys Val Pro Val Lys Lys Ala Thr Val Val Tyr			
245	250	255	
Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu			
260	265	270	
His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys			
275	280	285	
Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro			
290	295	300	
Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala			
305	310	315	320
Ser Asp Val Lys Pro Cys			
325			