



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0130041
(43) 공개일자 2016년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0061981
(22) 출원일자 2015년04월30일
심사청구일자 2015년04월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김광표
서울특별시 노원구 초안산로5길 22 106동 402호
(월계동, 대우아파트)
최성희
경기도 성남시 분당구 구미로173번길 82 (구미동, 분당서울대학교병원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

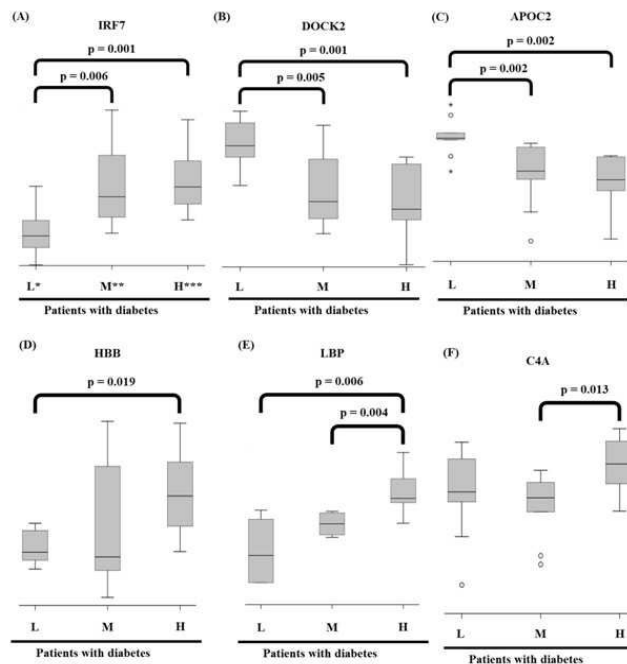
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 혈관 협착 질환 진단용 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비당뇨병성 (뒷면에 계속)

대표도 - 도2



혈관 협착 질환 진단용 조성물, 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트, 상기 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 상기 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

본 발명은, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공함으로써, 비당뇨병성 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환 환자에게서 발현이 변화하는 단백질 또는 그 유전자의 발현 수준을 측정 및 비교함으로써, 혈관 협착 질환의 조기진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있다.

아울러, 본 발명의 진단용 조성물은 비침습성 진단을 가능하게 하여 혈액, 뇨 검사 등으로 간단하고 유효성 있는, 혈관 협착 질환의 초기 진단을 할 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 2800/2871 (2013.01)

G01N 2800/32 (2013.01)

G01N 2800/323 (2013.01)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

이후근

인천광역시 연수구 해송로 143,116동 301호

이상원

서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가,고려대학교안암캠퍼스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111218

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 유전체자원통합분석지원센터

연구사업명 차세대 맞춤의료 유전체 사업

연구과제명 대사성질환 단백질체 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물.

청구항 2

인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HB B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것인, 혈관 협착 질환 진단용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인, 혈관 협착 질환 진단용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증인 것인, 혈관 협착 질환 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인, 혈관 협착 질환 진단용 키트.

청구항 8

(a) 생물학적 시료로부터 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민

D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB), 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 9

(a) 생물학적 시료로부터 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 혈관 협착 질환 의심 개체의 분리된 시료의 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준보다 높거나 낮을 경우, 혈관 협착 질환으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 11

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증인 것인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 12

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준은 상기 유전자의 mRNA 발현 수준인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 mRNA 수준 측정은 역전사 증합효소반응, 경쟁적 역전사 증합효소반응, 실시간 역전사 증합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의한 것인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 14

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것인, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 15

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분

석, 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 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 및 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

배경 기술

- [0002] 최근 들어 생활환경의 도시화, 과도한 영양섭취 등으로 인해 여러 질환이 복합적으로 나타나는 대사성 증후군 환자가 급증하고 있는 추세이다. 전세계적으로 대사성 질환인 당뇨와 비만의 위험도가 증가하고 있는데, 당뇨병의 유병률이 인구의 10%를 넘어서기 시작했다.
- [0003] 우리나라에서도 2005-2007년 국민건강영양조사의 결과에 따르면 성인 인구의 10%가 당뇨병 환자이고, 30% 이상이 비만 환자로, 이러한 당뇨병의 폭발적인 증가는 전세계적인 추세이다. 또한 대사성 증후군에 속한 뇌혈관 질환, 심장병, 당뇨병, 고혈압 질환으로 인한 사망자수는 암에 의한 사망자수를 넘어 서고 있다.
- [0004] 당뇨병 환자의 주요 사망원인은 심혈관계 질환으로 전체 당뇨병 환자의 사망원인의 40%를 심근경색 및 뇌경색이 차지하고 있다. 특히나 당뇨병성 심혈관 질환의 경우, 무증상인 경우가 많아 흉통, 어지러움, 두통, 마비 등의 증상을 느끼는 경우에는 이미 혈관협착이 많이 진행된 상태이기 때문에 발견시 중증질환으로 사망할 가능성이 크다. 그렇기 때문에 혈관협착을 조기 발견하는 방법과, 질환에 대한 예방이 매우 중요하다고 할 수 있다.
- [0005] 현재 사용되는 혈관협착을 조기 발견하는 방법은 간접적으로 동맥경화 정도를 예상하는 진단방법들로, 경동맥 초음파검사(carotid artery Doppler ultrasound), 맥파 전달속도 측정(pulse wave velocity), 혈류의존성 혈관확장반응(flow mediated dilatation) 등이 있다. 최근 개발되어 임상에 적용되고 있는 다중채널 관상동맥 단층촬영(multi-detector coronary computed tomography; MDCT)은 아직은 고가 조영제를 사용하고, 기능 검사를 수반하는 등의 한계를 가지고 있다.
- [0006] 한국인의 가장 중요한 만성질환인 당뇨병과 당뇨병 환자에서 제1의 사망원인으로 밝혀진 심혈관계 질환은 조기에 진단할 수 있는 바이오 마커의 개발이 무엇보다도 시급하다. 현재까지 지방세포에서 분비되는 아디포넥틴(adiponectin)의 저하와 동맥경화증 등 전신적인 염증반응(system inflammation)에 관여하는 CRP, TNF- α , IL-6 등의 증가 등 일부 혈청 단백질의 변화가 알려져 있으나, 아직까지 확실하게 당뇨병 환자에서의 심혈관계 질환, 특히 혈관 협착 질환의 정도 및 질환 상태를 예측할 수 있는 확립된 바이오 마커는 없는 상황이다.
- [0007] 우리나라에서도 폭발적으로 증가하고 있는 비만, 당뇨병, 대사증후군 등의 대사성 질환의 유병률을 고려하고, 상기 질환군은 모두 허혈성 심혈관계 합병증이 주요 사망원인인 만큼 혈관협착의 진행 정도를 예측할 수 있는 단백질 바이오 마커의 발굴이 시급한 실정이다.
- [0008] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 혈관협착 진행을 조기 진단하기 위하여, 프로테오믹스 기법을 도입하여 바이오 마커를 발굴하였다. 특히 혈관협착의 고위험군인 당뇨와 관련한 염증단백질의 변화에 대한 보고는 많이 있지만 당뇨와 혈관협착간의 전체 혈액 단백질의 변화는 보고된 바가 없는 바, 본 발명에서는 당뇨의 존재 유무, 혈관 협착의 진행 정도에 따른 환자 그룹에서의 혈액 전체 단백질을 프로테오믹스 기법으로 분석하여, 당뇨의 유무, 혈관협착 정도에 의해 변화하는 단백질들을 바이오 마커로 사용할 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 당뇨 환자 또는 비당뇨 환자에서의 혈관협착 진행 상황을 모니터링 할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0015] 일 양태에서, 상기 혈관 협착 질환 진단용 조성물은 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB) 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "혈관 협착 질환"은 혈관이 좁아지는 질환으로서, 협착이 되면, 혈류량이 감소되어 협착이 발생한 혈관이 분포하는 부위에 허혈이 일어나게 되거나 표면이 거친 동맥경화에서 혈전이나 경화 조각들이 떨어져 나가는 색전이 발생하여 증상을 일으키는 질환을 제한없이 포함한다. 본 발명의 혈관 협착 질환에 해당할 경우, 상기한 혈관 내막 비후가 진행됨에 따라 혈관의 협착이 일어날 수 있고, 혈관벽의 탄력이 줄어들어 혈관 파열에 의한 출혈이 발생할 수 있다. 본 발명에서 혈관 협착 질환은 뇌졸중, 죽상 경화증, 혈관재협착(in-stent restenosis), 심근 경색, 또는 동맥경화증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 혈관 협착 질환 발병 여부를 확인하는 것으로서, 당뇨병 환자에서 혈관 협착 질환 발병 여부를 조기에 확인 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4)는 poly(ADP-ribosyl)ation 반응을 촉매하는 poly(ADP-ribosyl)transferase-like 1 protein을 코딩하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [0019] 상기 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB)은 VDB-globulin (group-specific component)로 알려져 있으며, 알부민 유전자 패밀리에 속하며, 비타민 D에 결합하여 비타민 D를 타겟 조직에 전달하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [0020] 상기 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)은 세포외 기질 구성 성분으로 다른 세포외 매트릭스 성분과 상호작용하여, 세포의 부착, 이동 등에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [0021] 또한, 다른 일 양태로, 본 발명의 혈관 협착 질환 진단용 조성물은 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 mRNA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단용 조성물일 수 있다.
- [0022] 상기 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7)는 인터페론 조절 전사 인자 패밀리에 속하며, 바이러스 유도된 세포 유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착

질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.

- [0023] 상기 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2)는 G 단백질인 Rac을 활성화시켜 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [0024] 상기 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)는 헤모글로빈 A를 형성하는 헤모글로빈 알파 1(HBA1)과 상호작용하는 것으로 알려져 있으며, 당뇨 환자에서의 혈관 협착 질환과의 관련성에 대하여 본 발명자들이 최초로 규명하였다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서, 비당뇨 환자들을 혈관협착 정도에 따라 저 위험군(0 %), 중 위험군 (0~50 %), 고 위험군 (50% 이상)으로 분류하였고 당뇨 환자들을 혈관협착 정도에 따라 저 위험군, 중 위험군, 고 위험군 환자들로 분류하였다. 이후 이들 환자의 혈액시료를 채취하여 혈관 협착 정도에 따라 차이가 나는 단백질들을 TMT(Tandem Mass Tag)를 통한 상대정량법을 이용하여 혈관 협착 위험군 그룹간의 단백질의 발현 양상을 관찰하였으며, 그 중에서 그 차이가 유의미한(p value<0.05) 단백질 100개들을 1차 바이오 마커 후보군으로 선정하였다. 상기 선정된 1차 바이오 마커 후보군을 검증하기 위하여, 각 그룹당 10명의 환자 시료(비당뇨 환자군 중 혈관협착 고 위험군 환자는 3명)를 이용하여 1차 바이오 마커 후보군들에 대한 검증을 수행하여, 최종적으로 비당뇨 환자군에서는 6종의 단백질들인 PARP4, VDB, LAMB1, C4A, LBP, APOC2가 혈관 협착의 위험도에 따라 유의성 있게 변화하는 양상을 확인하여, 이들 단백질이 혈관 협착 질환 진단용 마커로 활용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 당뇨 환자에서도 6종의 단백질들인 IRF7, DOCK2, HBB, C4A, LBP, APOC2이 혈관 협착의 위험도에 따라 유의성 있게 변화하는 양상을 확인하여, 이들 단백질들이 당뇨 환자에서 혈관 협착 질환을 조기에 진단할 수 있는 마커로 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [0026] 특히 비당뇨 환자에서 확인된 바이오 마커 중에서, PARP4는 혈관 협착 저 위험군에 비해 중 위험군에서 PARP4 단백질의 발현이 감소하였으며, C4A는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 감소하였으며, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 증가하였으며, VDB는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 VDB 단백질의 발현이 감소하였으며, LAMB1은 저 위험군에 비해서 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LAMB1 단백질의 발현이 감소하였으며, LBP는 중 위험군에 비해서 고 위험군에서 LBP 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [0027] 또한, 당뇨 환자에서 확인된 바이오 마커 중에서, IRF7은 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 IRF7 단백질의 발현이 증가하였고, DOCK2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 DOCK2 단백질의 발현이 감소하였고, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 감소하였고, HBB는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 HBB 단백질의 발현이 증가하였고, LBP는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LBP 단백질의 발현이 증가하였고, C4A는 중 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.
- [0028] 따라서, 상기 PARP4, VDB, LAMB1, C4A, LBP, APOC2는 모두 정상 대조군(당뇨병과 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병은 없으나 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 마커로 사용될 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 IRF7, DOCK2, HBB, C4A, LBP, APOC2는 모두 대조군(당뇨병은 있으나, 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 마커로 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "마커(marker)"란 정상군 개체와 혈관 협착 질환을 가진 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 본 발명의 혈관 협착 질환을 가지는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체 분자들을 모두 포함한다. 특히 본 발명에서는 본 발명의 비당뇨병성 혈관 협착 질환을 가지는 개체 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환을 가지는 개체에서 변화되는 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 사용된 용어 "mRNA 수준 측정"이란 혈관 협착 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 혈관 협착 질환 진단용 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0032] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0033] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0034] 바람직하게 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 PARP4, VDB, 및 LAMB1으로부터 선택되는 단백질의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여, 바람직하게 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 IRF7, DOCK2, 및 HBB로부터 선택되는 단백질의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머 쌍"은 표적 유전자 서열을 인지하는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성을 부여할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용된 용어 "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. 프로브 분자의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체외에서 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.
- [0038] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 유전자 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드를 합성하는 한가지 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 다중클로닝부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 상기 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 수준 측정"이란 혈관 협착 질환 진단을 위하여 생물학적 시료에서 혈관 협착 질환 진단용 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 마커 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 바람직하게는 항체를 이용하지 않고 단백질 발현 수준 자체를 측정한다.
- [0040] 상기 단백질 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 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 블랏, 및 ELISA(enzyme linked

immunosorbent assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

- [0041] 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여 바람직하게 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 PARP4, VDB, 및 LAMB1으로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위하여 바람직하게 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 IRF7, DOCK2, 및 HBB로부터 선택되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 PARP4, VDB, LAMB1, IRF7, DOCK2, 및 HBB 중에서 선택되는 1 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0045] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 포함하는, 혈관 협착 질환 진단용 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [0046] 또한, 바람직하게, 상기 혈관 협착 질환 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [0047] 바람직하게, 상기 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 각 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수등을 포함할 수 있다.
- [0048] 바람직하게 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0049] 또한 바람직하게는, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된
- [0050] 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0051] 또한, 바람직하게는, 5분내 분석결과를 알 수 있는 신속한 테스트를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 래피드(rapid) 키트 일 수 있다. 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 래피드 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등 다른 물

질 등을 포함할 수 있다.

- [0052] 또한 바람직하게는, 질량 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 MS/MS 모드인 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. SIM(Selected Ion Monitoring)이 질량분석기의 소스 부분에서 한 번 충돌하여 생긴 이온을 이용하는 방법인 반면, MRM은 상기 한 번 깨진 이온 중에서 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 또 다른 MS의 소스를 한 번 더 통과시켜 충돌시킨 후 이 중에서 얻은 이온들을 이용하는 방법이다. 보다 구체적으로 SIM에서는 선택한 정량이온이 혈장에서도 검출되는 이온인 경우에 정량에 방해가 될 수 있다는 문제점이 있다. 반면, MRM을 이용하는 경우, 같은 질량을 가진 이온이라도 한 번 더 깨지면 분자구조가 달라지면서 차별화된 경향을 나타내므로, 이를 정량이온으로 사용하게 되면 백그라운드에서 방해되는 피크가 제거되어 한 층 더 깨끗한 베이스 라인을 얻을 수 있다. 따라서, 질량 분석시에 MRM 모드를 사용함으로써 보다 우수한 분석 감도에서 원하는 물질들을 동시에 분석할 수 있다. 상기 MRM(Multiple reaction monitoring) 분석 방법들을 통하여, 비당뇨 환자에서 정상 대조군에서의 단백질 발현 수준과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 또한, 당뇨 환자에서 혈관 협착이 없는 개체의 단백질 발현 수준과 혈관 협착이 있는 개체에서의 단백질 발현 수준을 비교할 수 있고, 혈관 협착 질환 마커 유전자에서 단백질로의 유의한 발현량 증감여부를 판단하여, 혈관 협착 질환 발병 여부를 진단할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 다른 양태로서, 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0054] 바람직하게, 본 발명의 방법은 상기 (a) 생물학적 시료로부터 폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 4 (Poly (ADP-ribose) polymerase 4, PARP4), 비타민 D-결합 단백질 (Vitamin D-binding protein, VDB), 및 라미닌 서브유닛 베타-1 (Laminin subunit beta-1, LAMB1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0055] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 비당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 일 수 있다.
- [0056] 또는 바람직하게, 본 발명의 방법은 (a) 생물학적 시료로부터 인터페론 조절 인자 7 (Interferon regulatory factor 7, IRF7), 세포질 분열 단백질의 데디케이터 2 (Dedicator of cytokinesis protein 2, DOCK2), 및 헤모글로빈 서브유닛 베타 (Hemoglobin subunit beta, HBB)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0057] (b) 상기 (a) 단계에서 측정된 단백질의 발현 수준 또는 유전자의 발현 수준을 정상 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병성 혈관 협착 질환 진단을 위한 정보의 제공 방법 일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 사용된 용어 "생물학적 시료"란 혈관 협착 질환 발병에 의해 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 상기 PARP4, VDB, 및 LAMB1은 모두 정상 대조군(당뇨병과 혈관 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병은 없으나 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 수준이 변화하면 비당뇨성 혈관 협착 질환으로 진단할 수 있다.
- [0060] 상기 IRF7, DOCK2, 및 HBB는 모두 대조군(당뇨병은 있으나, 협착 질환이 없는 개체)과 비교하여, 당뇨병과 혈관 협착 질환이 있는 개체에서 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 변화하는 특징을 가지므로, 상기 수준이 변화하면 당뇨병 혈관 협착 질환으로 진단할 수 있다.
- [0061] 따라서, 혈관 협착 질환 의심 개체의 분리된 시료의 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준보다 높거나 낮을 경우, 혈관 협착 질환으로 판단할 수 있다.
- [0062] 바람직하게, 본 발명의 상기 유전자의 발현 수준은 mRNA 발현 수준을 측정하거나 비교할 수 있다.
- [0063] 상기 mRNA 발현 수준 측정 또는 비교는 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합

효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 본 발명은 이들에 제한되는 것이 아니다. 상기 측정 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 혈관 협착 질환 환자의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량 정도를 비교함으로써 혈관 협착 질환 발병 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.

[0064] 바람직하게 본 발명의 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료 내의 해당 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을 이용한다.

[0065] 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

[0066] 본 발명의 목적상, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, PARP4, VDB, LAMB1, IRF7, DOCK2, HBB, C4A, LBP, 및 APOC2의 단백질 발현 수준 자체를 측정 및 비교하기 위해서, LC-MS/MS 방법을 사용하였다.

발명의 효과

[0068] 상기에서 기술한 바와 같이, 본 발명은, 혈관 협착 질환 진단용 조성물을 제공함으로써, 비당뇨병성 또는 당뇨병성 혈관 협착 질환 환자에게서 발현이 변화하는 단백질 또는 그 유전자의 발현 수준을 측정 및 비교함으로써, 혈관 협착 질환의 조기진단 및 질병 정도를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있다.

[0069] 아울러, 본 발명의 진단용 조성물은 비침습성 진단을 가능하게 하여 혈액, 뇨 검사 등으로 간단하고 유효성 있는, 혈관 협착 질환의 초기 진단을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 비당뇨 환자들에서 혈관협착에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 나는 단백질을 나타낸 것이다.

도 2는 당뇨 환자들에서 혈관협착에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 나는 단백질을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예 1: 환자의 혈액 시료 준비

[0073] 비당뇨 환자들 중에서 혈관협착 막힘 정도에 따라 저 위험군(0 %), 중 위험군 (0~50 %), 고 위험군 (50% 이상)으로 분류하고, 당뇨 환자들 중에서 혈관협착 막힘 정도에 따라 저 위험군, 중 위험군, 고 위험군 환자들로 분류하였다. 이 후 이들 환자들로부터 혈액시료를 채취하였다.

[0074] 실시예 2: 환자 혈액 시료의 abundant 한 단백질의 제거

- [0075] 상기 실시예 1에서 채취한 혈액 시료내의 단백질 중 14개의 high-abundant 단백질(Albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, alpha2-macroglobulin, alpha1-acid glycoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, complement C3, transthyretin)이 차지하는 비중은 전체 단백질의 95%에 달한다. 따라서, 이들 14개의 high-abundant 단백질로 인하여 관심 있는 low-abundant 단백질을 분석함에 있어서 민감도 감소가 상당하기 때문에 상기 14개의 단백질을 MARS(Multiple Affinity Removal System) column(P/N 5188-6558, Agilent)을 통하여 제거하였으며, 남은 단백질만을 이후 분석에 사용하였다.
- [0076] 구체적으로, MARS(Multiple Affinity Removal System) column(P/N 5188-6558, Agilent)을 이용하여, high-abundant 단백질을 제거하는 과정은 다음과 같다.
- [0077] 실시예 1에서 준비된 혈액 시료 40 μ l에 50x protease inhibitor(Roche) 2 μ l를 넣고 Buffer A 60 μ l를 넣어 섞어 주었다. 이후, 0.22 μ m filter(Agilent, P/N 5185-5990)에 상기 protease inhibitor와 Buffer A를 섞어준 시료를 넣고 원심분리기를 이용하여(14400 g, 1min, 4 $^{\circ}$ C), 사이즈가 큰 파티클을 제거하였다. 이후, HPLC에 MARS column을 연결하여 주고 mobile phase A(Buffer A), B(Buffer B)를 흘려 보내주었다.
- [0078] Mobile phase A를 이용하여 30분 가량 컬럼 안정화를 시킨 후 아래의 표 1과 같은 조건의 mobile phase gradient를 이용하여 시료를 분리하였으며, flow-through(9~17 min), elution(21~23 min) 시간 대의 시료를 2 ml tube에 옮겨 담았다. 상기 Flow-through에서 얻어진 시료는 10 K filter tube에 넣고 원심분리기를 이용하여(14400 g, 30min, 4 $^{\circ}$ C), 2 ml의 시료 양을 50 μ l까지 농축을 수행하였다.

표 1

HPLC 사용의 mobile phase gradient

LC Timetable				
	Time	%B	Flow rate	Max. pressure
1	0.00	0.00	0.125	60
2	18.00	0.00	0.125	60
3	18.01	0.00	1.000	60
4	20.00	0.00	1.000	60
5	20.01	100.00	1.000	60
6	27.00	100.00	1.000	60
7	27.01	0.00	1.000	60
8	38.00	0.00	1.000	60

[0079]

[0080] 실시예 3: 단백질시료의 펩타이드화

[0081] 질량분석기를 통한 분석을 위하여 단백질을 enzyme (trypsin)을 이용하여 펩타이드 단위로 절편화하는 과정이 선행되어야 하므로 다음과 같은 과정을 이용하여 단백질의 펩타이드 절편화를 실시화하였다.

[0082] abundant 단백질이 제거된 60 μ g의 농도에 해당하는 혈액시료 50 μ l에 150 μ l의 DTT 용액(최종 농도 6M urea, 10mM DTT, 50mM tris)을 넣어주고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응 (Reduction)하였다. 상기 200 μ l의 반응된

(reduced) 샘플에 20 μ l의 IAA 용액(최종 농도 : 5.45M urea, 50 M IAA, 50 mM tris)을 처리한 후, 어두운 곳에서 30분간 실온에서 반응(알킬레이션)시킨 후, 1 ml Tris 용액 (50mM pH 8) (최종 농도 ; 1M urea, 50mM tris 최종 volume 1,2 ml)을 시료에 넣어주었다. 이후, 트립신 용액 5 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다.

[0083] 실시예 4: 펩타이드 시료의 TMT(Tandem Mass Tag) 6plex 시약을 이용한 표지

[0084] 질량분석기에서 상대적 정량을 위하여 일반적으로 사용되는 TMT-6plex 시약을 사용하여, 총 6개의 시료 그룹에 각기 다른 질량의 리포터 이온(reporter ion) 을 가진 TMT reagent를 반응시켰다(표. 2). 표 2는 그룹 별로 표지한 리포터 이온의 종류를 나타낸 것이다.

표 2

혈관협착 (%)	정상	당뇨
저 위험군 0%	126	127
중 위험군 0-50 %	128	129
고 위험군 50% 이상	130	131

[0085]

[0086] 실시예 3에서 펩타이드화 된 시료에 200mM TEAB 50 μ L를 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down)을 실시하였다. TMT 시약 tube에 시료 이음을 적어놓고, TMT 시약에 100% ACN 41 μ L를 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down)을 실시하였다(kit 마다 들어가는 ACN 양이 정해져 있으며, peptide 25-100 μ g에 ACN 41 μ L가 들어감). 이후 TMT 시약 41 μ L을 sample tube(Peptide)에 넣은 후, 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down) 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 5% Hydroxylamine을 sample tube에 각각 8 μ L씩 넣고 볼텍싱(vortexing)과 스핀 다운(spin down) 후, 15분 동안 실온에서 켄칭(quenching)하였다. 이 후, 정량, 동량의 labeled sample 99 μ L를 각각 따서 하나의 새 e-tube에 모았다.

[0087] 실시예 5: 펩타이드 분획화, LC-MS/MS 분석 및 데이터 분석 수행

[0088] 펩타이드 시료가 가지고 있는 높은 수준의 복잡성 (complexity)을 줄이기 위하여 펩타이드가 가지고 있는 고유한 PI 값을 이용하여 분획화를 수행하였다.

[0089] 먼저, TMT reagent가 표지된 펩타이드를 오프겔 희석 버퍼(offgel dilution buffer)에 녹였다. 오프겔 프랙셔네이터(Offgel fractionators) (3100 offgel fractionator, Agilent)에 IPG strip과 comb을 결합한 후 상기 buffer에 녹아있는 샘플을 분주하여, 4000 V에서 24시간 러닝(running)하였다. 각 분획 구간에서의 시료를 tube에 옮긴 후 건조하였으며, 시료에 남아 있는 reagent 제거를 위하여 탈염(desalting) 과정을 수행하였다.

[0090] 얻어진 peptide들은 높은 분리능과 높은 재현성을 가지는 UPLC system인 Easy-nLC (Thermo)에 RP(reverse-phase) column을 이용하여 peptide가 가지는 소수성(hydrophobicity)에 의해 분리하였다. UPLC에 의해 분리된 peptide들은 고해상도, 높은 정확성(High resolution/high accuracy)을 가지는 질량 분석기인 Q-exactive (Thermo)에 의해 실시간으로 분석 수행하였다. Q-exactive에 의해 얻어진 raw data들은 Proteome Discoverer software (Thermo)의 SEQUEST 알고리즘을 통해 스펙트럼을 분석하여, peptide와 단백질을 동정하였다. Scaffold Q+ (Proteome software)를 이용하여 동정된 단백질에 대한 validation을 수행하였으며, 또한 TMT에서 얻어진 정량 정보를 추출하였다. R package 중 하나인 Isobar를 이용하여 통계적인 분석을 수행하였으며, 각 그룹간에 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질을 선정하였다. (p value < 0.05)

[0091] 표 3은 비당뇨 환자군/당뇨 환자군 그룹에서 혈관협착의 차이에 의해 발현양이 유의성 있게 차이가 나는 단백질

100개의 후보군을 나타낸 것이다.

표 3

No.	Gene name	Protein name
1	C4A	Complement C4-A
2	APOC2	Apolipoprotein C-II
3	LAMB1	Laminin subunit beta-1
4	PPBP	Platelet basic protein
5	LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
6	IRF7	Interferon regulatory factor 7
7	CA1	Carbonic anhydrase 1
8	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin
9	HBB	Hemoglobin subunit beta
10	HP	Haptoglobin
11	DNAH9	Dynein heavy chain 9, axonemal
12	FLNA	Filamin-A
13	HBA1	Hemoglobin subunit alpha
14	HPR	Haptoglobin-related protein
15	JHDM1D	Lysine-specific demethylase 7
16	SYNE1	Nesprin-1
17	DNAH6	Dynein heavy chain 6, axonemal
18	FGA	Fibrinogen alpha chain
19	FGB	Fibrinogen beta chain
20	FGG	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain
21	CRP	C-reactive protein
22	CCDC164	Coiled-coil domain-containing protein 164
23	COG6	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 6
24	FAM179A	family with sequence similarity 179, member A
25	ICA1L	Islet cell autoantigen 1-like protein
26	TTC40	Tetratricopeptide repeat protein 40
27	HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4
28	S100A9	Protein S100-A9
29	S100A8	Protein S100-A8
30	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2
31	TF	Serotransferrin
32	ZG16B	zymogen granule protein 16B
33	JARID2	Protein Jumonji
34	ATP2B3	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3
35	CCDC88B	Isoform 4 of Coiled-coil domain-containing protein 88B
36	SPRR1A	small proline-rich protein 1A
37	HRNR	Hornerin

[0092]

No.	Gene name	Protein name
38	DCD	Dermcidin
39	NRP1	Neuropilin-1
40	CNTRL	Isoform 5 of Centriolin
41	LYZ	Lysozyme C
42	IGHG3	immunoglobulin heavy constant gamma 3
43	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
44	KIAA0196	WASH complex subunit strumpellin
45	MMP9	matrix metalloproteinase 9
46	PIP	prolactin-induced protein
47	PPFIA2	Liprin-alpha-2
48	URB2	Unhealthy ribosome biogenesis protein 2 homolog
49	SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1
50	FAH	Fumarylacetoacetase
51	FSIP2	Fibrous sheath-interacting protein 2
52	MYOM2	Myomesin-2
53	PARP4	Poly [ADP-ribose] polymerase 4
54	PLEKHA6	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6
55	PPIG	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G
56	WAC	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil
57	CNGA3	Cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-3
58	ARID5B	AT-rich interactive domain-containing protein 5B
59	MED23	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23
60	CUL5	Cullin-5
61	KANK1	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1
62	RAB3A	Ras-related protein Rab-3A
63	GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta
64	ZAR1L	ZAR1-like protein
65	DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2
66	PZP	Pregnancy zone protein
67	BPIFA1	BPI fold-containing family A member 1
68	CEP250	Centrosome-associated protein CEP250
69	ATP13A3	Probable cation-transporting ATPase 13A3
70	DENND6A	DENN/MADD domain containing 6A
71	TOP2A	Isoform 4 of DNA topoisomerase 2-alpha
72	CACNA1C	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C
73	KIAA1551	Uncharacterized protein KIAA1551
74	NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1

[0093]

No.	Gene name	Protein name
75	C18orf8	Uncharacterized protein C18orf8
76	MOSPD2	Motile sperm domain-containing protein 2
77	LTF	Kaliocin-1 (Fragment)
78	MBL2	Mannose-binding protein C
79	TPM4	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-4 chain
80	TSC1	Hamartin
81	RHOBTB1	Rho-related BTB domain-containing protein 1
82	SAA1	Serum amyloid A-1 protein
83	PHEX	Phosphate-regulating neutral endopeptidase
84	DSP	Desmoplakin
85	NINL	Ninein-like protein
86	ARL6IP4	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4
87	KIAA1522	Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA1522
88	SAA2	serum amyloid A2
89	HEG1	Protein HEG homolog 1
90	ABCA13	ATP-binding cassette sub-family A member 13
91	AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2
92	GTF3C1	General transcription factor 3C polypeptide 1
93	SUMF2	Sulfatase-modifying factor 2
94	ABCC1	Multidrug resistance-associated protein 1
95	GTF3C3	General transcription factor 3C polypeptide 3
96	SCUBE2	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2
97	FNIP1	Folliculin-interacting protein 1
98	OSBPL6	Isoform 3 of Oxysterol-binding protein-related protein 6
99	RUSC2	Iporin
100	GC	Vitamin D-binding protein

[0094]

[0095] 실시예 6: MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 통한 바이오 마커 후보 검증

[0096] 바이오 마커 후보 검증을 위하여 1차 바이오 마커 후보군의 MRM transition 을 선정하였다. 단백질 하나당 최대 3개의 peptide를 선정하였고 펩타이드당 3개의 transition list를 선정하였다. MRM transition의 선정은 skyline software (<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>)를 사용하였고, NIST에서 제공하는 MRM transition database를 사용하여 transition 을 선정하였다. 이 때 선정 기준은 다음과 같다.

[0097] 1. $6 \leq \text{Length} \leq 20$

[0098] 2. Charge state = +2 or +3

[0099] 3. No M, W (Oxidation)

[0100] 4. NTT = 2

[0101] 5. NMC = 0

[0102] 6. Neighboring KR = 0

[0103] 선정된 peptide transition은 혈액 시료를 이용하여 MRM 분석을 선행하여 수행하였으며, 그 transition의 적합성을 확인하였다. Transition의 확인 조건은 다음과 같다.

[0104] 1. skyline 에서 제공하는 dot-product score가 0.8 이상.

[0105] 2. 동일한 MS1에서 파생되는 3 종의 transition peak이 동일한 retention time에서 co-elution 여부.

[0106] 3. 3회 반복을 통하여 재현성 있는 retention time을 가지는지 여부.

[0107] 4. S/N > 10 이상의 peak area intensity를 가지는지 여부.

[0108] 상기 후보 단백질 100개 중에서, 비당뇨 환자들에서 혈관협착 유무에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질로 검증된 것은 PARP4, C4A, APOC2, LBP, VDB, LAMB1에 해당하는 6개의 단백질이었다(도 1 참조). 구체적으로, 검증된 단백질 중에서, PARP4는 혈관 협착 저 위험군에 비해 중 위험군에서 PARP4 단백질의 발현이 감소하였으며, C4A는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 감소하였으며, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 증가하였으며, VDB는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두 VDB 단백질의 발현이 감소하였으며, LAMB1은 저 위험군에 비해서 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LAMB1 단백질의 발현이 감소하였으며, LBP는 중 위험군에 비해서 고 위험군에서 LBP 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0109] 또한, 상기 후보 단백질 100개 중에서, 당뇨 환자들에서 혈관협착 유무에 따라 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질로 검증된 것은 DOCK2, C4A, APOC2, IRF7, HBB, LBP에 해당하는 6개의 단백질이었다(도 2 참조). 구체적으로, 검증된 단백질 중에서 IRF7은 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 IRF7 단백질의 발현이 증가하였고, DOCK2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 DOCK2 단백질의 발현이 감소하였고, APOC2는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 APOC2 단백질의 발현이 감소하였고, HBB는 저 위험군에 비해 고 위험군에서 HBB 단백질의 발현이 증가하였고, LBP는 저 위험군에 비해 중 위험군, 고 위험군 모두에서 LBP 단백질의 발현이 증가하였고, C4A는 중 위험군에 비해 고 위험군에서 C4A 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0110] 표 4는 MRM (Multiple Reaction Monitoring)에 사용된 펩티드 서열을 나타낸 것으로, 비당뇨성/당뇨성 혈관 협착을 진단할 수 있는 단백질의 펩티드 서열을 나타낸 것이다.

표 4

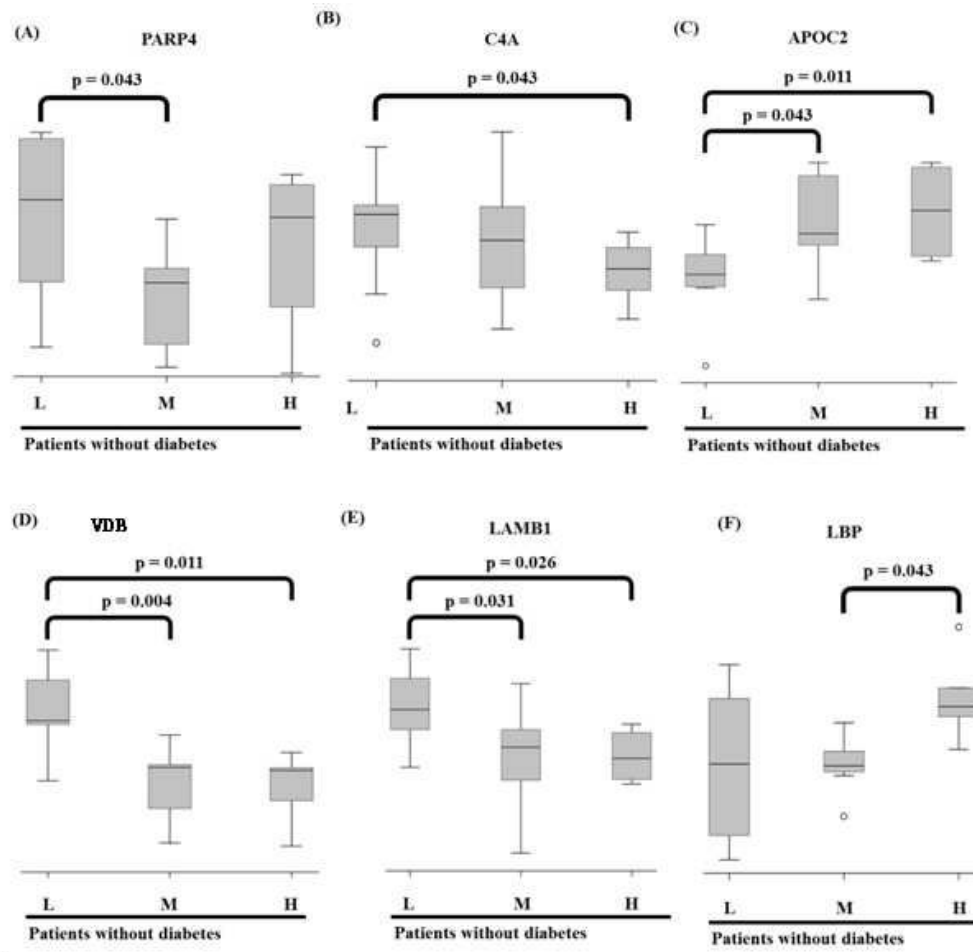
비당뇨성 혈관협착 진단 마커 단백질					
Index	Accession No.	Protein name	Peptide sequence	Target ion	Q1/Q3
1	Q9UUK3	PARP4	NGETAQLQK	y7	559.6/818.0
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	P02774	VDB	VLEPTLK	y5	400.5/587.7
5	G3XAI2	LAMB1	ISGVIGPYR	y5	481.6/605.7
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

당뇨성 혈관협착 진단 마커					
Index	Accession No.	Protein name	Peptide sequence	Target ion	Q1/Q3
1	Q92608	DOCK2	DILLPVITK	y5	506.6/557.7
2	B4DDH0	C4A	VDFTLSSER	y7	527.6/591.6
3	K7ER74	APOC2	TYLPAVDEK	y6	518.6/658.7
4	Q92985	IRF7	ATDPQQVAFPSAELPDQK	y9	680.3/984.5
5	P68871	HBB	EFTPPVQAAYQK	y9	690.2/501.6
6	P18428	LBP	ITLPDFTGDLR	y8	626.1/923.4

[0111]

도면

도면1



도면2

