(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월09일
(11) 등록번호 10-1825647
(24) 등록일자 2018년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0008409(분할)
(22) 출원일자 2017년01월18일
심사청구일자 2017년01월18일
(62) 원출원 특허 10-2016-0099406
원출원일자 2016년08월04일
심사청구일자 2016년08월04일
(56) 선행기술조사문헌
WO2015126030 A1*
2013 Thermo Scientific_Guide to Glycan Analysis*
Scott Mack et al., 'High Resolution Intact Glycoprotein Analysis by CESI-MS', Beckman Coulter, 2012, 11-0809-P.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(주)글라이칸
경기도 성남시 분당구 돌마로 172, 408호,409호(정자동, 분당서울대학교병원 헬스케어혁신파크)
(72) 발명자
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
김재한
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 차명훈

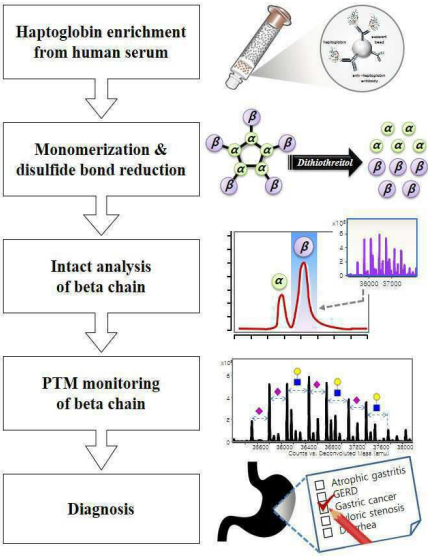
(54) 발명의 명칭 **당단백질의 전분자량 측정을 통한 당사슬 모니터링에 의한 암 진단마커 분석방법**

(57) 요 약

과제: 단백질의 당쇄화는 체내외 환경변화에 매우 민감하여 암을 포함한 다양한 질병에 직접적으로 관련되어 진단시스템에 활용하려는 연구가 진행되고 있다. 당사슬을 이용한 질병진단 방법은 매우 효율적이나, 당사슬을 분리하여 진단에 사용할 경우 시료 전처리, 질량분석 및 데이터 처리에 많은 시간과 노력이 요구되고 원하지 않는

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



인공조성물이 생성될 수 있다.

해결수단: 이를 최소화하고자 당쇄화된 단백질을 있는 그대로 분석하여 암진단에 적용하는 새로운 암진단 분석방법을 발명하였다. 본 발명에서는 다량체 구조의 햅토글로빈의 이황화 결합을 절단하여 알파 사슬과 베타 사슬로 분리한 후 전분자량을 측정함으로써 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 분석하였다. 당사슬을 분리하지 않고 이황화 결합 절단이라는 최소한의 전처리만 수행한 후 10분 이내의 짧은 질량분석시간 소요 및 신속한 데이터 처리를 통해 단백질의 당쇄화 패턴을 인식함으로써 질병진단시 빠르고 정확한 진단방법으로 활용할 수 있다.

(52) CPC특허분류
G01N 2560/00 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자
오명진
대전광역시 유성구 도안동로 523, 206동 1904호 (봉명동, 호반베르디움)
김운용
경기도 안산시 상록구 충장로 565, 110동 506호 (월피동, 주공1단지아파트)
이주아
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 102동 1102호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
백학선
서울특별시 서초구 사임당로17길 116, 101동 905호 (서초동, 서초삼성래미안아파트)
이성현
서울특별시 서초구 방배로18길 67, 102-601 (방배동, 방배자이아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 없음
부처명 (주)글라이칸
연구관리전문기관 없음
연구사업명 산학협력연구과제
연구과제명 위암진단을 위한 햅토글로빈 당사슬 프로파일링
기 여 율 1/2
주관기관 (주)글라이칸
연구기간 2015.10.01 ~ 2016.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015M3A9B5053960
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 고효율 단백질의약품 생산을 위한 다각적 분석기술
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(가) 정상인 대조군 및 암 환자군 피검체 유래 햅토글로빈에 이황화결합 환원제를 처리하고 열처리하여 햅토글로빈 다량체를 단량체로 만들고, 단백질을 변성하고, 알파 사슬과 베타 사슬로 분리하는 단계;

(나) 상기 변성된 단량체 베타 사슬을 정제하는 단계;

(다) 상기 정제된 베타 사슬을 질량분석 하여 전분자량 프로파일을 얻는 단계; 및

(라) 정상인 대조군과 암 환자군 간에 상기 전분자량 프로파일에 나타난 각 전분자량 피크의 발현 빈도와 발현량 중 한 가지 이상을 비교하여 유의한 차이가 있는 경우 그 전분자량 피크를 암 진단마커로 선정하는 단계;를 포함하는 당단백질의 전분자량 측정을 통한 고민감도 암 진단마커 분석방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (다) 단계 이후 (라) 단계 이전

상기 베타 사슬의 전분자량 프로파일로부터 당사슬 조성을 결정하는 단계;를 부가하는 것을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법.

청구항 3

피검자 시료에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬을 전분자량 질량분석하여 정상인 대조군에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬의 전분자량 질량분석 결과와 비교하여

이론적 분자량 36309.3 Da,

이론적 분자량 36454.4 Da,

이론적 분자량 36600.6 Da,

이론적 분자량 36819.8 Da,

이론적 분자량 36891.8 Da,

이론적 분자량 36893.9 Da,

이론적 분자량 36965.9 Da,

이론적 분자량 37111.0 Da,

이론적 분자량 37184.9 Da,

이론적 분자량 37257.2 Da,

이론적 분자량 37259.2 Da,

이론적 분자량 37402.3 Da,

이론적 분자량 37476.4 Da,

이론적 분자량 37548.4 Da,

이론적 분자량 37550.4 Da,

이론적 분자량 37694.6 Da,

이론적 분자량 37768.7 Da,

이론적 분자량 37770.7 Da,

이론적 분자량 38424.2 Da 및

이론적 분자량 38425.3 Da 중 선택된 한 가지 이상의 전분자량 피크가 유의한 차이가 있는 경우 위암일 가능성이 큰 것으로 판단함을 특징으로 하는 고민감도 위암 진단마커 분석방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 전분자량 피크는

이론적 분자량 36309.3 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc7,

이론적 분자량 36454.4 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-NeuAc8,

이론적 분자량 36600.6 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc8,

이론적 분자량 36819.8 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc8,

이론적 분자량 36891.8 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc9,

이론적 분자량 36893.9 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc7,

이론적 분자량 36965.9 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc8,

이론적 분자량 37111.0 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc9,

이론적 분자량 37184.9 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc8,

이론적 분자량 37257.2 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc9,

이론적 분자량 37259.2 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc7,

이론적 분자량 37402.3 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc10,

이론적 분자량 37476.4 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc9,

이론적 분자량 37548.4 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc10,

이론적 분자량 37550.4 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc8,

이론적 분자량 37694.6 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc2-NeuAc10,

이론적 분자량 37768.7 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-Fuc2-NeuAc9,

이론적 분자량 37770.7 Da, 당사슬 조성 Hex25-HexNAc21-Fuc1-NeuAc7,

이론적 분자량 38424.2 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc11 및

이론적 분자량 38425.3 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-Fuc2-NeuAc10 중 선택된 한 가지 이상임을 특징으로 하는 고민감도 위암 진단마커 분석방법.

청구항 5

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서,

피검자 시료의 상기 전분자량 피크가 정상인 대조군에 비하여 10% 이상 발현량이 적거나 많은 시료의 경우 위암일 가능성이 큰 것으로 판단하는 고민감도 위암 진단마커 분석방법.

청구항 6

정상인 대조군 또는 위암 환자군 중 하나 이상의 군의 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 위암 환자군에서 빈도가 25% 이상 높은

이론적 분자량 35138.4 Da,

이론적 분자량 35142.4 Da,

이론적 분자량 36250.4 Da,

이론적 분자량 36308.5 Da,

이론적 분자량 36541.3 Da,

이론적 분자량 37913.3 Da,

이론적 분자량 37922.4 Da,

이론적 분자량 38351.1 Da 및

이론적 분자량 38569.4 Da 중 선택된 한 가지 이상을 위암 진단마커로 선정하고,

정상인 대조군에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬의 전분자량 질량분석 결과와 비교하여 피검자 시료에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬 전분자량 질량분석 결과, 상기 위암 진단마커가 유의하게 높게 나타나는 경우 위암일 가능성이 큰 것으로 판단함을 특징으로 하는 고민감도 위암 진단마커 분석방법.

청구항 7

정상인 대조군 또는 위암 환자군 중 하나 이상의 군의 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 위암 환자군에서 빈도가 25% 이상 낮게 나타나는

이론적 분자량 37530.2 Da,

이론적 분자량 37535.7 Da,

이론적 분자량 37913.9 Da,

이론적 분자량 37919.4 Da,

이론적 분자량 37923.5 Da,

이론적 분자량 37928.4 Da,

이론적 분자량 37972.6 Da,

이론적 분자량 37977.6 Da,

이론적 분자량 39035.3 Da,

이론적 분자량 39039.5 Da 및

이론적 분자량 39520.9 Da 중 선택된 한 가지 이상을 위암 진단마커로 선택하고,

피검자 시료에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬을 전분자량 질량분석하여 정상인 대조군에서 분리, 정제한 변성된 단량체 햅토글로빈 베타 사슬의 전분자량 질량분석 결과와 비교하여 상기 위암 진단마커 중 한 가지 이상이 나타나지 않는 경우 위암일 가능성이 큰 것으로 판단함을 특징으로 하는 고민감도 위암 진단마커 분석방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고감도, 고분해능 질량분석기를 이용하여 당단백질의 전분자량을 측정함으로써 온전한 당쇄화 패턴 분석을 통해 위암 진단용 당사슬 빈도 마커 (frequency marker) 및 정량 마커 (abundance marker)를 이용하여 고속으로 암을 탐지하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 세계적으로 제1의 사망원인이며, 이 상황은 국내에도 마찬가지이다. 암은 유전적, 환경적 요인에 의해서 형성, 발전하며 식생활의 변화, 환경오염의 심화, 환경 및 정신적 스트레스의 노출 심화 등으로 인하여 암 발생 및 암으로 인한 사망자가 해마다 증가하는 추세이다. 다른 질병과 비교해 볼 때 암의 특징은 완치가 비교적 어렵다는 것과 치료 후 생존율이 평균적으로 낮다는데 있다. 생존율과 관련하여 암이 갖는 특징은 암의 진행 정도에 따라 환자의 예후와 생존율이 큰 차이를 보인다는 것인데 약 100여 년에 가까운 암치료기술의 발전에도 불구하고 암종마다 약간의 차이는 있지만 말기 암이나 전이가 이루어진 암의 경우는 완치율이 매우 낮다 (Etzioni R. et al., Nature Reviews Cancer 3, 243-252, 2003). 더욱이 암은 초기에 자각증상이 별로 없는 것이 일반적이며 자각증상에 의한 진단의 경우는 이미 치료가 불가능한 말기 상태로 발전한 경우가 많다. 즉, 암의 치료법 개발 필요성과 함께 치료가 가능한 초기에 암을 진단할 수 있는 방법이 암의 효과적인 치료와 생존율 제고라는 목표에 가장 부합하는 전략이라고 할 수 있다. 이러한 목적으로 암의 조기진단을 도울 수 있는 생체인자, 즉 바이오마커의 연구, 개발이 현재 프로테오믹스 기법을 중심으로 해서 세계적으로 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 종양 바이오마커는 다양한 용도가 있는데, 암의 조기진단을 도울 수 있고, 암의 진행시기를 측정하고, 치료에 따른 암의 진행상황을 모니터할 수 있게 하며 수술 후의 예후를 판단할 수 있게 하는 기능도 있다 (Rifai N. et al.,Nature Biotech. 24, 971-983, 2006). 이런 목적과 기능을 가진 바이오마커를 통하여 암의 발견 및 진행상황을 추적하기 위해서는 비파괴적인 방법이 요구되며, 따라서 검사시 위험부담이 적은 혈액 등의 체액이 바이오마커 개발과 연구에 있어 최적의 생체시료로 인식되고 있다. 즉, 소변이나 타액, 혈액 등을 통하여 탐지할 수 있는 바이오마커 개발이 가장 표준화된 방식의 접근법이며, 그 중에서도 혈액은 모든 조직 유래의 단백질이 모이는 가장 포괄적인 생체시료라고 할 수 있다. 또한, 생체물질의 형태로 볼 때 가장 선호되는 종양 바이오마커의 형태는 단백질이라고 할 수 있다.

[0004] 국내 암발생률 1위인 위암 환자의 진단을 위한 방법 중 가장 많이 이용되는 검사는 위내시경 검사와 초음파 검사 등이 있다. 그러나, 이러한 위암 진단방법은 고가의 의료장비를 이용하기 때문에 비용이 많이 소요되며, 내시경 검사는 환자의 입장에서 거부감이 있다. 이러한 문제로 인하여 소량의 체액, 특히 혈액을 이용하여 높은 진단율과 짧은 시간, 적은 비용으로 암을 검사할 수 있는 체외 진단 기술에 응용 가능한 종양 바이오마커의 개발이 필요하다. 실제 지금까지는 FDA의 승인을 받은 위암 관련 혈액 유래 바이오마커는 없는 실정이다.

[0005] 체내 단백질의 약 50% 이상은 당쇄화된 단백질인 당단백질로 당쇄화는 가장 널리 알려진 번역 후 변형 (PTM, post-translational modification) 과정으로 단백질의 기능에 크게 관여하고 있다. 혈액, 침, 눈물 등의 체액은 물론 대부분의 생체 조직에도 당단백질이 존재한다. N-당쇄화 (N-Glycosylation)는 펩타이드 골격의 아스파라긴에 올리고당이 부가되는 것이다. 이것은 그 위치와 구조적 다양성을 결정하는 생물학적 원칙에 의해 지배된다. N-당쇄화의 변화는 종양과 같은 질환에서 정상적인 당쇄화 장치에 오류가 생긴 것으로서, N-당쇄를 질병 마커로 사용하려는 시도가 있어왔다. 따라서 당쇄화의 결과물인 당사슬은 체내외의 환경 변화에 매우 민감하여 암을 포함한 여러 종류의 질병에 대한 바이오마커로 활용 가능성이 모색되고 있다. 또한, 바이오 의약품에서 당사슬은 의약품의 체내 지속시간 및 약효에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 당사슬의 한 종류인 N-당사슬은 2개의 N-아세틸글루코사민 (Nacetylglucosamine)과 세 개의 만노스로 이루어진 구조가 기본 코어가 되어 이 코어를 바탕으로 어떤 종류의 단당류가 몇 개 결합하는가에 따라서 크게 세 가지 클래스로 분류된다. 고만노스형 (High mannose) N-당사슬은 코어에 만노스만 더해진 구조이며, 복합형 (complex) N-당사슬은 만노스 외의 단당류들 즉, N-아세틸헥소사민 (N-acetyl hexosamine), 퓨코스, 갈락토스 및 시알산 (sialic acid) 중 1종 이상이 결합한 구조이다. 하이브리드형은 코어를 중심으로 한쪽 가지는 만노스가, 다른 한쪽 가지는 복합형에 해당하는 단당류가 붙어있는 구조를 말한다.

[0007] N-당사슬 분석을 위해서는 단백질에서 당사슬만을 잘라내어 분리하는 당사슬 분리 단계와 분리된 당사슬을 추출 및 농축하는 당사슬 정제의 전처리 과정을 거치게 된다. 또한, 당펩타이드 분석을 통해 각 당자리에 따른 당사슬의 변화를 분석하는 경우 당펩타이드를 생성하고 당펩타이드만을 농축하는 정제과정이 필요하며 데이터 해석에 많은 시간과 기술을 요하게 된다. 본 발명의 전분자량 측정 방법은 전처리 과정 없이 또는 구조에 따라 환원

제 처리를 통한 간단한 변성과정만을 거쳐 온전한 당쇄화 패턴을 분석함으로써 정상인과 암환자 간의 당쇄화 변화를 확인할 수 있다.

[0008] 현재 단백질의 당쇄화 패턴을 이용하여 암을 진단하는 방법은 첫째, 당단백질에서 당사슬을 분리하여 당사슬 진단 마커로 암진단하는 방법, 둘째, 당펩타이드 분석을 통해 각 당자리에 특이적인 당쇄화 패턴을 분석하여 암진단하는 방법 등이 보고되어 있다. 반면, 온전한 단백질의 당쇄화 패턴을 이용하여 암을 진단하는 방법은 보고된 바가 없다. 본 발명은 최소한의 전처리 과정 이후 당쇄화를 모니터함으로써 실제 진단시장에서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 민감도와 특이도가 높은 질병 당사슬 마커를 좀 더 간단하고 빠르고 경제적으로 탐지하는 방법을 제공하는 것을 목표로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 온전한 단백질을 질량분석하여 질병 당사슬 마커를 탐지하는 방법을 제공하는 것을 목표로 한다.

[0011] 그뿐만 아니라, 본 발명은 본 발명의 방법을 이용하여 탐지한 위암의 빈도 마커와 정량 마커를 제공하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 단백질의 당쇄화는 체내·외의 환경변화에 매우 민감하여 암을 포함한 다양한 질병에 직접적으로 관련되어 당사슬 변화를 진단시스템에 활용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 그중 당사슬을 이용한 질병진단 방법은 매우 효율적인 진단방법이나, 당사슬을 분리하여 진단에 사용할 경우 시료 전처리, 질량분석 및 데이터 처리에 많은 시간과 노력이 요구되며 이는 예상치 못한 인공조성물을 발생시킬 수 있다. 또한, 당펩타이드를 이용한 진단 시스템은 당사슬 분석법에 비해 고민감도 고특이도를 높일 수 있으나 당펩타이드 시료 전처리에 시간이 소요되며, 당펩타이드만의 선택적인 농축과 데이터 처리 및 해석에 많은 시간과 노력이 요구된다.

[0013] 이러한 문제점을 최소화하고자 본 발명자들은 당쇄화된 단백질을 있는 그대로 분석하여 암진단에 적용하는 새로운 암진단용 당사슬 분석방법을 개발하였다.

[0014] 햅토글로빈은 혈청 내에 풍부한 당단백질 중 하나이며, 염증 및 종양과 같은 다양한 질병 단계에서 증가하는 주요한 급성기 단백질 (acute phase protein)이다. 햅토글로빈은 2개의 소단위로 알파 사슬과 베타 사슬로 나뉘며 베타 사슬의 184, 207, 211 및 241번 아미노산에 4개의 N-당쇄화 자리를 포함하고 있으며, 중합되기 쉬워 다량체를 형성한다. 주로 4량체가 많은 양 형성되며 이량체에서 20량체까지 보고된 바 있다 (ref. Cheng, Tsai-Mu, et al. 'Unique Assembly Structure Of Human Haptoglobin Phenotypes 1-1, 2-1, And 2-2 And A Predominant Hp1 Allele Hypothesis'. *Biophysical Journal*, 2009, 96.3:586a). 다양한 암종과 관련한 햅토글로빈 당쇄화의 변화가 종래에 보고되어 왔지만, 위암 환자와 정상인 대조군 간에 구별되는 당사슬 변화를 효율적으로 모니터링할 수 있는 플랫폼은 아직 없는 상황이다.

[0015] 본 발명자들은 전분자량 측정을 통하여 고속으로 당쇄화 패턴을 확인할 수 있는 방법을 발명한 바 있다. 그러나 햅토글로빈의 구조적 특성으로 인해 전분자량 측정이 어렵다. 따라서, 본 발명에서는 다량체 구조 또는 여러 개의 서브유닛 예컨대 알파 사슬, 베타 사슬과 같은 서브유닛으로 이루어진 햅토글로빈의 이황화 결합을 절단하여 최소 서브유닛인 알파 사슬과 베타 사슬로 분리, 정제한 후 전분자량을 측정함으로써 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 분석하였다.

[0017] 본 발명은

[0018] (가) 정상인 대조군 및 암 환자군 피검체 유래 당단백질에 환원제를 처리하고 정제하는 단계;

[0019] (나) 상기 환원 및 정제된 당단백질을 질량분석하여 전분자량을 측정하는 단계; 및

[0020] (다) 정상인 대조군과 암 환자군 간에 상기 측정한 당단백질의 전분자량을 비교하여 유의한 차이가 있는 당단백질을 암 진단마커로 선정하는 단계;를 포함하는 당단백질의 전분자량 측정을 통한 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은

[0022] (가) 정상인 대조군 및 암 환자군 피검체 유래 당단백질에 환원제를 처리하여 최소 단위 서브유닛으로 분리하는 단계;

[0023] (나) 상기 최소 단위 서브유닛을 정제하는 단계;

[0024] (다) 상기 정제된 최소 단위 서브유닛 중 당단백질의 전분자량을 질량분석하는 단계;

[0025] (라) 상기 최소 단위 서브유닛 당단백질의 질량분석 데이터로부터 당사슬 조성을 결정하는 단계; 및

[0026] (마) 정상인 대조군과 암 환자군 간에 상기 결정된 최소 단위 서브유닛의 당사슬 조성의 발현 빈도와 발현량 중 한 가지 이상을 비교하여 유의한 차이가 있는 당사슬 조성을 암 진단마커로 선정하는 단계;를 포함하는 당단백질의 전분자량 측정 및 당사슬 모니터링을 이용한 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 최소 단위 서브유닛이 단량체 또는 단량체를 구성하는 서브유닛임을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 환원제에 특별한 제한은 없으나, 바람직하게는 머캡토에탄올 또는 다이티오트레이톨임을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 피검체 유래 당단백질이 햅토글로빈임을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 (마) 단계의 암 진단마커가 전체 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 암 환자군에서 발현량이 10% 이상의 차이를 나타내는 경우 암 정량마커로 선정함을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 (마) 단계 이후 (바) 상기 (마) 단계에서 선정된 암 정량마커의 발현량이 정상인 대조군과 암 환자군 간에 10% 이상 차이를 나타내는 경우 암일 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 (마) 단계의 암 진단마커가 정상인 대조군 또는 암 환자군 중 하나 이상의 군의 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 암 환자군에서 빈도가 25% 이상 차이를 나타내도록 발현되는 경우 암 빈도마커로 선정함을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 (마) 단계 이후 (바) 상기 (마) 단계에서 선정된 암 빈도마커의 발현 빈도가 정상인 대조군과 암 환자군 간에 25% 이상 차이를 나타내는 경우 암일 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0034] 또한, 본 발명은

[0035] (가) 정상인 대조군 및 암 환자군 피검체 유래 햅토글로빈에 이황화결합 환원제를 처리하여 햅토글로빈 다량체를 단량체로 만들고, 알파 사슬과 베타 사슬로 분리하는 단계;

[0036] (나) 상기 알파 사슬과 베타 사슬을 정제하는 단계;

[0037] (다) 상기 정제된 베타 사슬을 질량분석하여 전분자량을 얻는 단계; 및

[0038] (라) 정상인 대조군과 암 환자군 간에 상기 결정된 전분자량의 발현 빈도와 발현량 중 한 가지 이상을 비교하여 유의한 차이가 있는 경우 암 진단마커로 선정하는 단계;를 포함하는 당단백질의 전분자량 측정을 통한 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0039] 또한, 본 발명은

[0040] (가) 정상인 대조군 및 암 환자군 피검체 유래 햅토글로빈에 이황화결합 환원제를 처리하여 햅토글로빈 다량체를 단량체로 만들고, 알파 사슬과 베타 사슬로 분리하는 단계;

[0041] (나) 상기 알파 사슬과 베타 사슬을 정제하는 단계;

[0042] (다) 상기 정제된 베타 사슬의 전분자량을 질량분석하는 단계;

[0043] (라) 상기 베타 사슬의 질량분석 데이터로부터 당사슬 조성을 결정하는 단계; 및

[0044] (마) 정상인 대조군과 암 환자군 간에 상기 결정된 당사슬 조성의 발현 빈도와 발현량 중 한 가지 이상을 비교하여 유의한 차이가 있는 경우 암 진단마커로 선정하는 단계;를 포함하는 당단백질의 전분자량 측정 및 당사슬 모니터링을 이용한 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 (가)의 암이 위암이고, 상기 (마) 단계의 암 진단마커는

[0046] 이론적 분자량 36309.3 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc7,

[0047] 이론적 분자량 36454.4 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-NeuAc8,

[0048] 이론적 분자량 36600.6 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc8,

[0049] 이론적 분자량 36819.8 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc8,

[0050] 이론적 분자량 36891.8 Da, 당사슬 조성 Hex21-HexNAc17-Fuc1-NeuAc9,

[0051] 이론적 분자량 36893.9 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc7,

[0052] 이론적 분자량 36965.9 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc8,

[0053] 이론적 분자량 37111.0 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc9,

[0054] 이론적 분자량 37184.9 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc8,

[0055] 이론적 분자량 37257.2 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc9,

[0056] 이론적 분자량 37259.2 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc7,

[0057] 이론적 분자량 37402.3 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-NeuAc10,

[0058] 이론적 분자량 37476.4 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-NeuAc9,

[0059] 이론적 분자량 37548.4 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc1-NeuAc10,

[0061] *이론적 분자량 37550.4 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc8,

[0062] 이론적 분자량 37694.6 Da, 당사슬 조성 Hex22-HexNAc18-Fuc2-NeuAc10,

[0063] 이론적 분자량 37768.7 Da, 당사슬 조성 Hex23-HexNAc19-Fuc2-NeuAc9,

[0064] 이론적 분자량 37770.7 Da, 당사슬 조성 Hex25-HexNAc21-Fuc1-NeuAc7,

[0065] 이론적 분자량 38424.2 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-NeuAc11 및

[0066] 이론적 분자량 38425.3 Da, 당사슬 조성 Hex24-HexNAc20-Fuc2-NeuAc10 중 선택된 한 가지 이상의 정량마커임을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0068] *또한, 본 발명은 상기 (가)의 암이 위암이고, 상기 (마) 단계의 암 진단마커는

[0069] 이론적 분자량 35138.4 Da,

[0070] 이론적 분자량 35142.4 Da,

[0071] 이론적 분자량 36250.4 Da,

[0072] 이론적 분자량 36308.5 Da,

[0073] 이론적 분자량 36541.3 Da,

[0074] 이론적 분자량 37913.3 Da,

[0075] 이론적 분자량 37922.4 Da,

[0076] 이론적 분자량 38351.1 Da 및

[0077] 이론적 분자량 38569.4 Da 중 선택된 한 가지 이상의 빈도마커이며 정상인 대조군 또는 위암 환자군 중 하나 이상의 군의 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 위암 환자군에서 빈도가 25% 이상 높음을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

[0078] 또한, 본 발명은 상기 (가)의 암이 위암이고, 상기 (마) 단계의 암 진단마커는

[0079] 이론적 분자량 37530.2 Da,

[0080] 이론적 분자량 37535.7 Da,

[0081] 이론적 분자량 37913.9 Da,

[0082] 이론적 분자량 37919.4 Da,

[0083] 이론적 분자량 37923.5 Da,

[0084] 이론적 분자량 37928.4 Da,

[0085] 이론적 분자량 37972.6 Da,

[0086] 이론적 분자량 37977.6 Da,

[0087] 이론적 분자량 39035.3 Da,

[0088] 이론적 분자량 39039.5 Da 및

[0089] 이론적 분자량 39520.9 Da 중 선택된 한 가지 이상의 빈도마커이며 정상인 대조군 또는 위암 환자군 중 하나 이상의 군의 피검체 시료 중 80% 이상의 시료에서 관찰되며, 정상인 대조군에 비하여 암 환자군에서 빈도가 25% 이상 낮게 나타남을 특징으로 하는 고민감도 암 진단마커 분석방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0090] 당단백질의 당쇄화 패턴을 확인하기 위해서 현재는 당사슬을 분석하는 방법과 당펩타이드를 분석하는 방법이 사용되고 있다. 첫 번째, 당사슬의 조성 및 정량은 당단백질에 효소처리를 진행하여 N-당사슬을 분리한 후 정제 및 농축하여 분석함으로써 확인한다. 일반적으로 N-당사슬 시료처리는 효소 반응시간 및 당사슬 정제, 추출과정을 고려하여 하루 이상의 시간이 필요하다. 당자리 특이적 당사슬 특성 분석은 당펩타이드 시료 분석을 통해 진행한다. 당사슬의 위치뿐만 아니라 당사슬 다양성까지 다각적으로 확인할 수 있는 분석법이지만, 당펩타이드 생성 및 정제 등 시료 전처리과정에 하루 이상의 시간이 필요하다. 특히 당펩타이드의 데이터 해석을 위해 상당한 시간 및 기술력이 필요하다.

[0091] 이와 대비하여 본 발명 방법은 단일한 분석과정으로 한 시간 내에 당사슬 특성을 다각적으로 확인할 수 있는 분석법이다. 기존 분석법과 달리, 단백질로부터 각 당사슬을 분리하는 시료 전처리과정 없이 당단백질의 전분자량을 측정할 수 있고, 질량분석기를 이용한 당단백질 측정시간 및 데이터 해석시간을 모두 고려할 경우, 통상 한 시간 안에 당쇄화 패턴 정보를 얻을 수 있다. 본 발명의 분석방법을 이용하면 분석시간이 상당히 단축될 뿐만 아니라, 시료손상 및 손실 없이 당사슬 특성분석이 가능하다 (표 7).

[0092] 본 발명의 방법은 당단백질로부터 당사슬을 분리하지 않고 이황화 결합 환원이라는 최소한의 전처리만 수행한 후 10분 이내의 짧은 질량분석시간 소요 및 신속한 데이터 처리를 통해 단백질의 당쇄화 패턴을 인식함으로써 암 등의 질병진단시 빠르고 정확한 진단방법으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 손상되지 않은 혈액 내 당단백질 (intact glycoprotein)의 질량분석을 통하여 암을 비롯한 질병을 진단하는 방법을 도식화한 개요도이다.

도 2는 본 발명의 방법의 재현성 확인을 위해 표준물질 (Haptoglobin pooled human plasma, Sigma)을 다른 날 총 7회 (1일차 3회, 2일차 4회) 분석한 결과이다.

도 3은 본 발명의 방법을 이용하여 비위암 정상인 44인의 햅토글로빈에서 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 모니터링한 결과이다.

도 4는 본 발명의 방법을 이용하여 암환자 44인의 햅토글로빈 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 모니터링한 결과이다.

도 5는 본 발명의 방법을 이용하여 비위암 대조군과 위암의 베타 사슬 당쇄화를 모니터링한 대표적인 결과이다. 위암과 비위암 대조군 시료의 베타 사슬을 분석한 스펙트럼을 미러 이미지로 나타내었다. 또한, 각 마커를 A~T로 표시하였다.

도 6은 본 발명의 방법으로 분석하여 탐지한 정상인 대조군과 위암 환자군 간에 빈도에서 차이를 보이는 위암 빈도 마커에 대한 민감도 및 특이도 그래프와 빈도마커 A, 빈도마커 B의 빈도를 나타낸 그래프, 그리고 빈도마커 A와 빈도마커 B의 AUC 값을 나타낸 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 특히, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 암으로서 위암의 예를 들었고, 당단백질로서 햅토글로빈을 들었으나, 본 발명의 범위는 여타 다른 암에도 적용 가능하고, 당단백질로서도 햅토글로빈이 아닌 다른 당단백질을 선정할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0096] **<인간 혈청으로부터 햅토글로빈 정제>**

[0097] 항-햅토글로빈 항체를 이용하여 항-햅토글로빈 친화 컬럼을 제조하고 햅토글로빈 정제를 수행하였다. 44명의 위암환자 및 44명의 정상인으로부터 각각 500 ㎕의 혈청을 얻어 4 ㎖의 PBS (phosphate-buffered saline, 10 mM 인산 완충액/2.7 mM KCl/ 137 mM NaCl, pH 7.4)에 희석하여 항-햅토글로빈 친화 컬럼에 적용하고 회전 교반기 상에서 상온으로 두 시간 동안 배양하였다. 결합되지 않은 물질들은 30 ㎖의 PBS로 컬럼을 세척하여 제거하였고, 햅토글로빈은 용출 완충액 (0.1 M 글라이신/ 0.5 M NaCl, pH 2.8)으로 용출한 후 중화 완충액 (1.0 M Tris-HCl, pH 9.0)을 함유한 튜브에 분획하였다. 용출액은 농축한 후 원심분리 필터 (분자량 한계 10,000, Amicon Ultra, Millipore)로 계면활성제를 제거한 다음 Quant-iT Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 햅토글로빈을 분석하였고, 12.5% SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 수행하였다 (도 2A). 시료는 동결건조하여 분석 시까지 -80℃에 보관하였다.

[0099] **<햅토글로빈의 알파 사슬과 베타 사슬 분리>**

[0100] 햅토글로빈의 변성과 이황화 결합의 효율적인 분리를 위해 20 ㎍의 햅토글로빈 시료를 50 mM NH_4HCO_3 100 ㎕에 녹인 후 550 mM DTT (in 50 mM NH_4HCO_3)를 2 ㎕ 첨가하여 80℃에서 10분 동안 열처리하였다. DTT 반응이 충분히 이루어짐으로써 알파 사슬과 베타 사슬 분리가 효율적으로 이루어지도록 하였다. 반응 완료 후 반응물을 완전히 건조한 다음 완충액 (이동상 A 용액: 3% 아세토나이트릴+0.1% 포름산 수용액)에 재용해하여 분석에 적절한 농도로 희석하였다. 본 실시예에서는 0.05 ㎍/㎕를 사용하였으나 이 농도는 사용하는 장비에 따라 달라질 수 있다.

[0102] **<질량분석>**

[0103] 위와 같이 얻어진 당단백질은 UHPLC/Q-TOF MS로 분석을 진행하였다. 좀 더 자세히는 희석된 당단백질이 오토샘플러 (4 ℃로 유지됨), 세관 펌프, 나노펌프, HPLC-Chip/MS 인터페이스 및 6550 Q-TOF MS 탐지기를 갖춘 HPLC Chip/Q-TOF (Chip Quadrupole Time-of-Flight) MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 분석하였다. 9×0.75㎜ 농축 컬럼 및 43×0.075 ㎜ 분석 컬럼의 정지상 (stationary phase)으로 통합된 나노-ESI 스프레이 팁과 함께 C8 탄소사슬이 패킹된 칩을 사용하였다. 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 최적화된 분리 조건에 따라 수행되었다. 간단히 설명하면, 시료를 로딩한 후, 온전한 당단백질 용출 농도구배 용액을 분당 0.3 ㎕씩 흘려주었다. 농도구배 용액은 (A) 99.9% 물 및 0.1% 포름산(v/v) 수액, 및 (B) 99.9% 아세토나이트릴 및 0.1% 포름산(v/v) 수액이고, 각각 아래 시각에 아래 농도로 처리하였다: 3% B, 0~1min; 3~25% B, 1~4min; 25~60% B, 4~8min; 60~80% B, 8~12min; 80~95% B, 12~15min; 95~5% B. 15~20min; 5~3%. 최종적으로 분석 컬럼은 3% B로 5분간 재평형화하였다.

[0104] 질량분석 후, LC/MS의 원래 데이터는 Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.06.00 SP2, Agilent Technologies) & Bioconfirm software (version B.06.00, Agilent Technologies)에 포함된 디콘볼루션 (Deconvolution) 알고리즘 (Maximum Entropy)을 이용하여 처리하였다.

[0106] **<결과>**

[0107] 도 1은 햅토글로빈의 베타 사슬 분석을 통한 당쇄화 패턴 분석과정의 일례를 도식화한 것이다. 위암 환자와 정상인으로부터 채취한 혈액시료에서 햅토글로빈 항체를 이용한 면역친화크로마토그래피 방법으로 햅토글로빈을 선택적으로 분리하였다. 정제된 햅토글로빈에 환원제로서 DTT를 처리함으로써 다량체 (multimer) 구조를 분리하여 단량체 구조로 만들고 알파 사슬과 베타 사슬로 분리하였다.

[0108] 고감도 질량분석기를 이용하여 위와 같이 준비한 햅토글로빈의 알파 사슬과 베타 사슬의 전분자량을

측정하였다. 또한, 전분자량 측정 데이터를 통해 베타 사슬에 결합된 당사슬 패턴을 모니터링하였다.

[0110] *위암 환자와 정상인 사이의 당사슬 차이를 확인함으로써 위암 진단마커 당사슬을 찾았다. 본 발명을 통하여 찾은 위암 진단 마커를 이용하여 위암의심 환자를 진단하였다.

[0111] 그러나, 이 방법은 위암에만 한정되는 것이 아니고, 간암, 폐암, 유방암, 난소암, 대장암 등 여타의 종양 진단 등에 이용할 수 있다.

[0113] 도 2는 본 발명의 재현성 확인을 위해 표준물질을 다른 날 총 7회 (1일차 3회, 2일차 4회) 분석한 결과로서, 햅토글로빈 표준품을 구입하여 동일한 방법으로 시료 전처리 및 질량분석을 수행한 후 본 발명의 재현성 및 안전성을 검증한 결과이다.

[0114] Group 1은 동일한 날짜에 세 번 분석하였으며 Group 2는 동일한 날짜에 네 번 분석하였고, 이들의 질량 값과 강도를 이용하여 상관관계를 분석한 결과, 상관계수 r = 0940~0.998로 높은 상관계수를 보여 각기 다른 날 분석을 하더라도 높은 재현성을 보임을 확인하였다.

[0116] 표 1과 표 2는 본 발명에 사용된 위암 환자와 비위암 혈청시료에 대한 정보이다. 총 88인 (비위암 시료 44인, 위암 44인) 시료를 본 발명에 적용하여 암진단 마커를 발굴하였다. 위암 환자는 진행단계별로 분류하였고, 33세에서 74세까지 다양한 연령대의 시료를 대상으로 하였다. 비위암 시료 역시 31에서 77세까지 44인의 혈청을 대상으로 분석을 진행하였다. "Median Age"는 환자 연령 중간값을 나타내며, "Mean Age(SD)"는 평균연령(표준편차)을 나타낸다.

[0118] 도 3은 비위암 정상인 44인의 햅토글로빈에서 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 모니터링한 결과이다. 비위암 정상인 44인의 시료에 본 발명 방법을 적용하여 분석한 결과를 오버레이 (overlay)하였다. 혈청시료로부터 햅토글로빈을 농축한 후 DTT를 처리하여 단량체 형태로 만들고 알파 사슬과 베타 사슬로 분리하였다. 고감도 질량분석을 하여 알파 사슬과 베타 사슬의 전분자량을 측정하였으며 특히 당쇄화가 이루어진 베타 사슬의 당쇄화 패턴을 모니터링하였다.

[0119] 햅토글로빈 베타 사슬에는 네 개의 N-당쇄화 자리가 있으므로 분석 스펙트럼에서 보이는 질량값은 베타 사슬의 N-당자리 네 개에 모두 당쇄화된 질량값이다.

[0120] 햅토글로빈 베타 사슬 아미노산의 이론적 분자량은 27265.0679 Da이며 질량분석 스펙트럼에서 기본 피크의 질량값은 35797.84 Da이다. 두 질량값 차이 (8532.78 Da)는 네 개의 N-당자리에 결합된 당사슬의 차이이며, 당사슬 조성을 확인한 결과 Hex20HexNAc16NeuAc7임을 확인하였다.

[0121] 위와 같이 기본 피크의 당사슬 조성을 확인한 후 주변 피크와의 질량값 차이를 이용하여 당사슬 연계성을 확인하였다. 즉 피크들 간의 질량값 차이와 단당류의 분자량 162.14 (Hexose), 203.19 (HexNAc), 146.14 (fucose), 및 291.25 (NeuAc) 등을 고려하여 존재하는 당사슬을 추가로 확인하였다.

[0123] 도 4는 암환자 44인의 햅토글로빈 베타 사슬의 당쇄화 패턴 모니터링 결과이다. 위암환자 44인 시료에 대해 본 발명법을 적용하여 분석한 결과를 오버레이하였다.

[0124] 질량분석 스펙트럼에서 기본 피크의 질량값은 35797.84 Da이며 햅토글로빈 베타 사슬 아미노산의 이론적 분자량은 27265.0679 Da이다. 두 질량값 차이(8532.78 Da)는 네 개의 N-당자리에 결합된 당사슬의 차이이며, 당사슬 조성을 확인한 결과 Hex20HexNAc16NeuAc7임을 확인하였다.

[0125] 기본 피크의 당사슬 조성을 확인한 후, 주변 피크와의 질량값 차이를 이용하여 당사슬 연계성을 확인하였다. 즉 피크들 간의 질량값 차이와 단당류의 분자량 162.14 (Hexose), 203.19 (HexNAc), 146.14 (fucose), 및 291.25 (NeuAc) 등을 고려하여 존재하는 당사슬을 추가로 확인하였다.

[0127] *

[0128] 도 5는 비위암 대조군과 위암의 베타 사슬 당쇄화를 모니터링한 대표적인 결과이다. 위암과 비위암 대조군 시료의 베타 사슬을 분석한 스펙트럼을 미러 이미지로 나타내었다. 각 스펙트럼에는 본 발명의 방법으로 탐색된 위암환자의 정량 바이오마커, 좀 더 자세히는 A에서 T까지 총 20개의 정량 바이오마커를 표시하였으며 자세한 정보는 표 5에 표시하였다.

[0130] 표 3과 표 4는 햅토글로빈 베타 사슬의 당쇄화 모니터링 결과이다 (주: 표 3과 표 4는 원래 하나의 표이지만, 편의상 두 개의 표로 기재하였다). 단백질의 아미노산 서열과 당사슬의 조합을 이용하여 스팩트럼에서 보여지는

질량값의 당사슬 조성을 계산하였다.

[0131] 이 표에 기재된 것은 햅토글로빈 베타 사슬의 N-당사슬 조성을 나타내며, 네 개의 숫자는 각각 순서대로 헥소스 (Hexose; Hex), N-아세틸헥소사민 (N-acetylhexosamine; HexNAc), 퓨코스(Fucose; Fuc), N-아세틸뉴라민산 (N-acetylneuraminic acid; NeuAc)을 나타낸다. 예를 들어 "20_16_0_6"으로 표시된 것은 헥소스 잔기 20 개, N-아세틸헥소사민 16 개, 퓨코스 0개, N-아세틸뉴라민산 6개로 이루어진 N-당사슬 조성을 의미한다.

[0133] 표 5는 본 발명 시스템으로 확인된 인간 위암환자의 정량 바이오마커 목록으로서, 액체 크로마토그래피 질량분석으로 얻은 상대적 정량을 통한 정량마커 (abundance marker) 목록이다. 모든 위암 환자 및 대조군 시료 중 빈도가 80% 이상인 당사슬 조성에서 위암 환자와 정상인 대조군 간의 상대적 함량이 10% 이상 차이가 나는 당사슬을 정량 마커로 선정하였다. 질병을 탐지할 때 바이오마커의 시험 수행을 평가하기 위한 전략적 도구는 ROC (receiver operating characteristic) 커브이다. 일반적으로 AUC (area under thecurve) 값이 0.50-0.75인 ROC 커브는 타당한 구별 (fair discrimination)을 가진 것으로 판단한다. 당사슬 정량마커에 대하여 각각 ROC 커브에서 AUC를 계산하였으며 각 당사슬 정량마커 중 Hex_{22}_$HexNAc_{18}$_Fuc_2_$NeuAc_{10}$에 대응하는 m/z 37694.6은 가장 높은 AUC 값인 0.93을 나타내었다.

[0135] 표 6은 본 발명 시스템으로 확인된 인간 위암환자의 빈도 바이오마커 목록으로서, 액체 크로마토그래피 질량분석으로 얻은 인간 위암 빈도마커 (frequency marker) 목록이다. 환자와 정상인 대조군 둘 중 하나의 군에서 80% 이상의 빈도를 나타내며, 환자와 정상인 대조군 간의 빈도가 25% 이상 차이가 나는 당사슬을 이용하여 다중 패널 (multi panel) 형태의 빈도마커를 선정하였다. 빈도마커에 대하여는 각 빈도마커들을 조합하여 다중패널 마커를 확보할 수 있었고, 하나의 ROC 커브는 같은 컷오프 값에 의해 만들어졌다. ROC 커브는 각 빈도마커에 가중치를 부여함으로써 최적화된다. 패널 A는 위암 환자군에서 높은 빈도를 보이며 패널 B는 비위암 정상인 대조군 시료에서 높은 빈도를 보이는 마커이다. 빈도마커 중 질량값 36308.5, 37913.3, 37919.4 는 당사슬 조성이 확인되는 마커이며 다른 마커 패널은 당조성에 다른 PTM (Post-translational modification)이 결합된 질량값을 보인다.

[0138] *도 6은 정상인과 암환자간 빈도에서 차이를 보이는 위암 빈도 마커이다. 마커 A는 대조군보다 위암에서 높은 빈도를 보이며 마커 B는 비위암 정상인 시료에서 높은 빈도를 보이는 마커이다.

표 1

[0140]

	Stage Ⅲ	Stage Ⅳ	Total
Patient Number of Subject	3	41	44
Median Age	70	54	55.5 (31-77)
Mean Age (SD)	69	54	56 (12.5)
Control (Normal)	-	-	44

표 2

Control			Patient		
Case no.	Age	Sex	Case no.	Age	Sex
n1	33	F	cc1	31	M
n2	33	F	cc2	32	M
n3	33	M	cc3	33	M
n4	33	F	cc4	33	M
n5	33	M	cc5	39	F
n6	33	F	cc6	41	F
n7	34	M	cc7	41	F
n8	34	M	cc8	42	F
n9	34	M	cc9	43	F
n10	34	F	cc10	46	M
n11	35	F	cc11	47	M
n12	35	F	cc12	47	F
n13	35	M	cc13	48	F
n14	35	F	cc14	49	M
n15	35	F	cc15	49	F
n16	36	M	cc16	50	M
n17	37	F	cc17	53	M
n18	37	F	cc18	53	F
n19	38	F	cc19	54	M
n20	39	F	cc20	54	M
n21	40	F	cc21	54	F
n22	40	F	cc22	55	M
n23	40	M	cc23	56	M
n24	42	F	cc24	56	F
n25	44	F	cc25	57	M
n26	49	M	cc26	57	F
n27	57	F	cc27	59	M
n28	61	F	cc28	60	F
n29	63	F	cc29	60	M
n30	64	F	cc30	60	F
n31	65	F	cc31	61	M
n32	65	F	cc32	62	M
n33	65	F	cc33	64	M
n34	65	F	cc34	65	M
n35	66	F	cc35	67	M
n36	66	F	cc36	67	M
n37	67	F	cc37	69	M
n38	67	F	cc38	70	M
n39	67	F	cc39	71	M
n40	67	M	cc40	73	M
n41	68	F	cc41	74	F
n42	68	F	cc42	75	M
n43	68	F	cc43	76	M
n44	74	M	cc44	77	F

[0141]

표 3

[0143]

Theor. Mass	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc
35506.6	20	16	0	6
35797.8	20	16	0	7
35944.0	20	16	1	7
36089.1	20	16	0	8
36163.2	21	17	0	7
36235.2	20	16	1	8
36309.3	21	17	1	7
36454.4	21	17	0	8
36528.5	22	18	0	7
36600.6	21	17	1	8

36674.7	22	18	1	7
36745.7	21	17	0	9
36819.8	22	18	0	8
36891.8	21	17	1	9
36893.9	23	19	0	7
36965.9	22	18	1	8
37111.0	22	18	0	9
37257.2	22	18	1	9
37259.2	24	20	0	7
37402.3	22	18	0	10
37476.4	23	19	0	9
37548.4	22	18	1	10
37550.4	24	20	0	8
37622.5	23	19	1	9
37624.5	25	21	0	7
37694.6	22	18	2	10
37696.6	24	20	1	8
37767.6	23	19	0	10

표 4

[0144]

Theor. Mass	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc
37768.7	23	19	2	9
37770.7	25	21	1	7
37840.7	22	18	3	10
37842.7	24	20	2	8
37913.8	23	19	1	10
37914.8	23	19	3	9
37915.8	25	21	0	8
37916.8	25	21	2	7
38058.9	23	19	0	11
38059.9	23	19	2	10
38060.9	23	19	4	9
38061.9	25	21	1	8
38133.0	24	20	0	10
38134.0	24	20	2	9
38136.0	26	22	1	7
38205.0	23	19	1	11
38206.1	23	19	3	10
38208.1	25	21	2	8
38279.1	24	20	1	10
38281.1	26	22	0	8
38424.2	24	20	0	11
38425.3	24	20	2	10
38427.3	26	22	1	8

표 5

[0145]

	Theor.Mass	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	p-value	AUC
A	36309.3	21	17	1	7	3.2E-05	0.83
B	36454.4	21	17	0	8	2.0E-06	0.78
C	36600.6	21	17	1	8	1.4E-07	0.81
D	36819.8	22	18	0	8	1.2E-08	0.83
E	36891.8	21	17	1	9	9.0E-06	0.76
F	36893.9	23	19	0	7	9.0E-06	0.76
G	36965.9	22	18	1	8	3.6E-07	0.84
H	37111.0	22	18	0	9	7.6E-09	0.85

I	37184.9	23	19	0	8	5.5E-05	0.76
J	37257.2	22	18	1	9	6.2E-04	0.70
K	37259.2	24	20	0	7	6.2E-04	0.70
L	37402.3	22	18	0	10	2.5E-04	0.74
M	37476.4	23	19	0	9	1.3E-07	0.84
N	37548.4	22	18	1	10	9.9E-05	0.71
O	37550.4	24	20	0	8	9.9E-05	0.71
P	37694.6	22	18	2	10	3.3E-07	0.93
Q	37768.7	23	19	2	9	3.0E-04	0.78
R	37770.7	25	21	1	7	3.0E-04	0.78
S	38424.2	24	20	0	11	1.6E-03	0.73
T	38425.3	24	20	2	10	1.6E-03	0.73

표 6

	Theor.mass	F(C)	F(P)	AVE(P)±STDEV	AVE(C)±STDEV	p-value	AUC
panel A	35138.4	26%	72%	5.4 ± 2.7	2.3 ± 1.8	7.81E-09	0.82
	35142.4	49%	88%				
	36250.4	23%	63%				
	36308.5*	49%	77%				
	36541.3	14%	56%				
	37913.3*	33%	70%				
	37922.4	7%	37%				
	38351.1	9%	33%				
	38569.4	16%	47%				
panel B	37530.2	79%	26%	3.6 ± 3.8	7.7 ± 3.1	6.31E-07	0.79
	37535.7	74%	44%				
	37913.9*	63%	26%				
	37919.4*	40%	7%				
	37923.5	86%	42%				
	37928.4	56%	28%				
	37972.6	86%	53%				
	37977.6	91%	53%				
	39035.3	60%	30%				
	39039.5	60%	23%				
	39520.9	72%	30%				

[0146]

[0147] 상기 표에서 F(C): 대조군에서의 빈도, F(P): 환자군에서의 빈도, AVE(P): 환자군에서의 평균값, AVE(C): 대조군에서의 평균값, STDEV: 표준편차를 의미한다.

[0148] *는 빈도마커 중 당사슬 조성이 확인되는 마커이며 다른 마커 패널은 당조성에 다른 PTM이 결합된 질량값을 보인다.

[0150] *

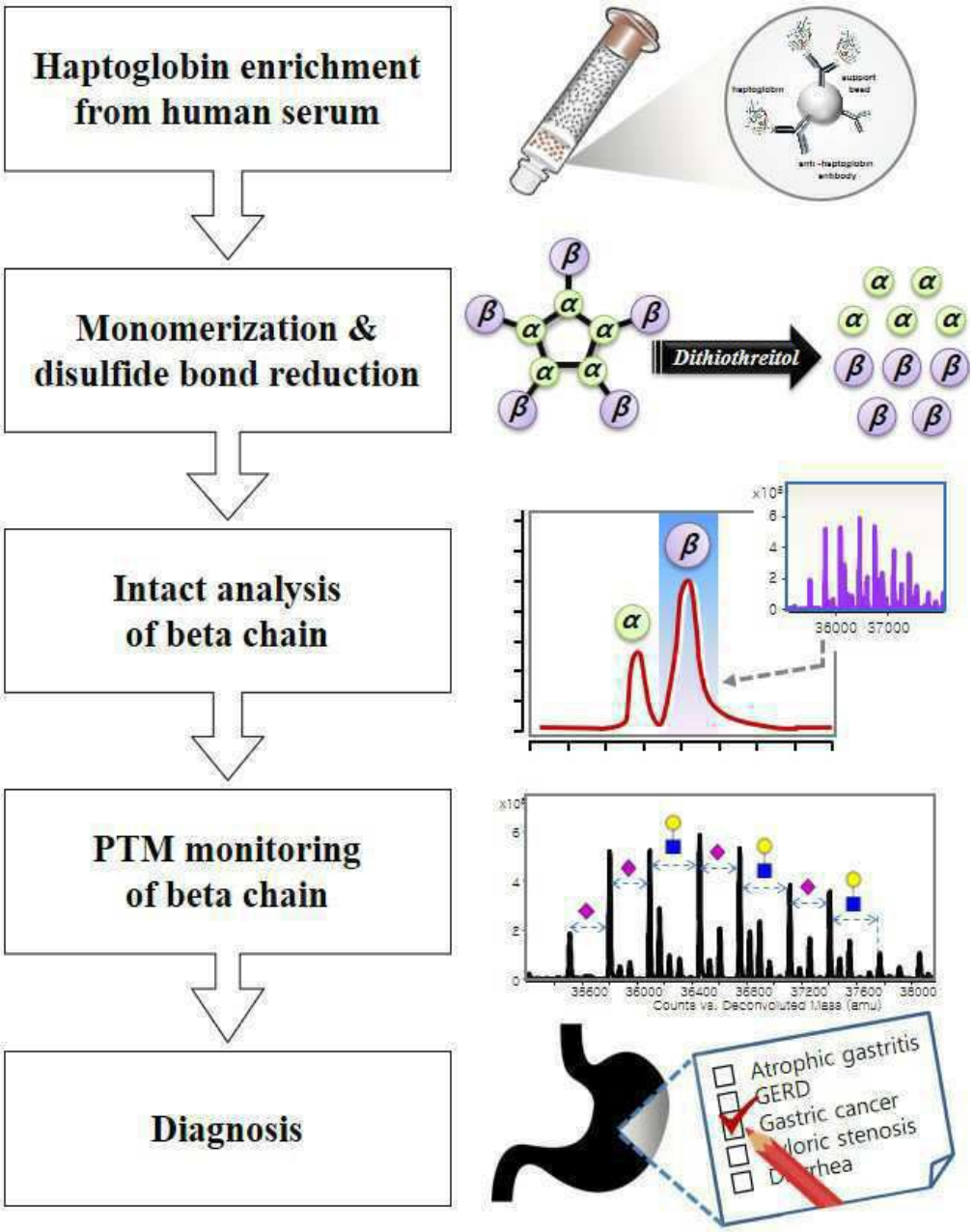
표 7

[0151]

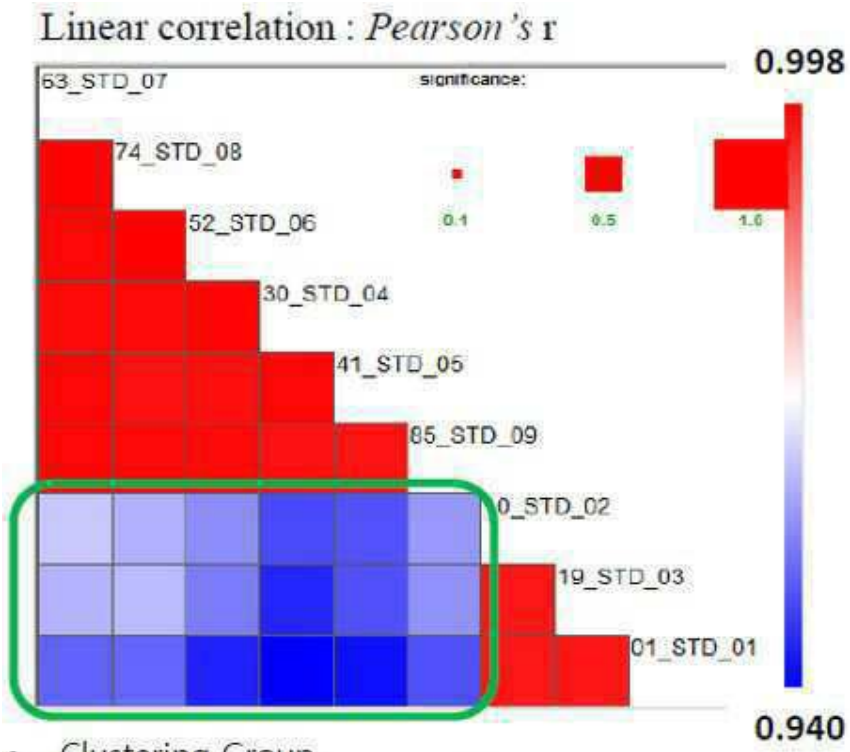
	당사슬 분석	당펩타이드 분석	당단백질 분석 (본 발명 방법)
기대결과	N-당사슬 프로파일링 당사슬 다양성 확인 당사슬 구조 확인	당자리에 따른 당사슬 프로파일링 당사슬 다양성 확인 당사슬 구조확인 당자리 정보확인	당쇄화 프로파일링 당사슬 다양성 확인 단백질 자체의 당쇄화 패턴
특이점	고민감도, 고특이도 상대적으로 데이터 해석 용이	고민감도, 고특이도 당사슬 분석에 비해 고민감도 고특이도 마커 확보 가능	고민감도, 고특이도 경제성 (전처리 최소화) 한 시간 안에 시료분석부터 데이터 분석까지 완료 가능
진단 용이성	당사슬 시료 전처리, 분석 및 데이터 해석에 많은 시간 및 비용이 소모되어 분석 및 진단 회전률이 낮아 질병 진단에 적용하기 어려움		시료 전처리, 분석 및 데이터 해석에 소요되는 비용 및 시간의 최소화로 분석 및 진단 회전률이 높아 질병 진단에 적용하기 적합함

도면

도면1

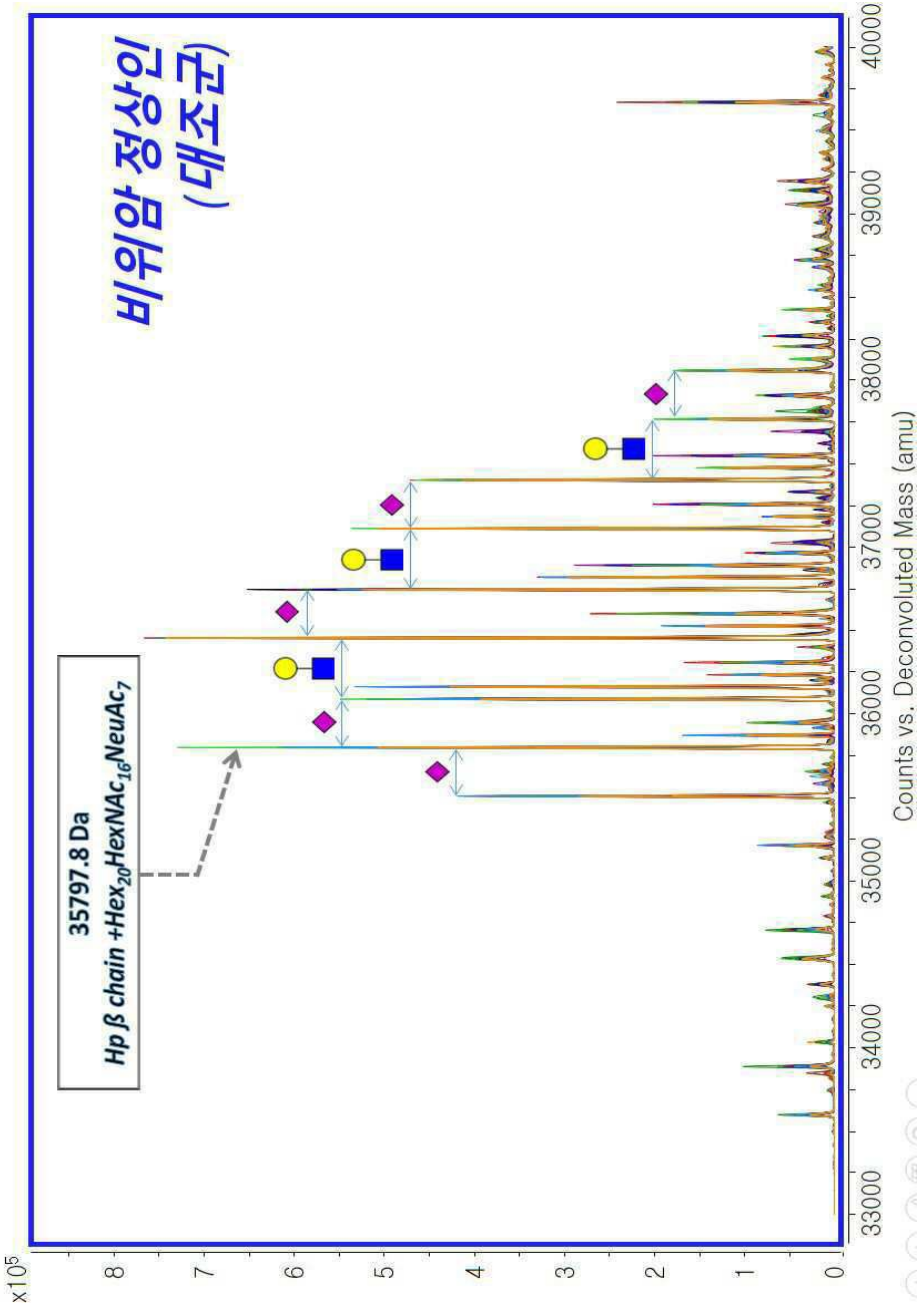

Haptoglobin enrichment from human serum
Monomerization & disulfide bond reduction
Dithiothreitol
Intact analysis of beta chain
PTM monitoring of beta chain
Diagnosis
Atrophic gastritis
GERD
Gastric cancer
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

도면2

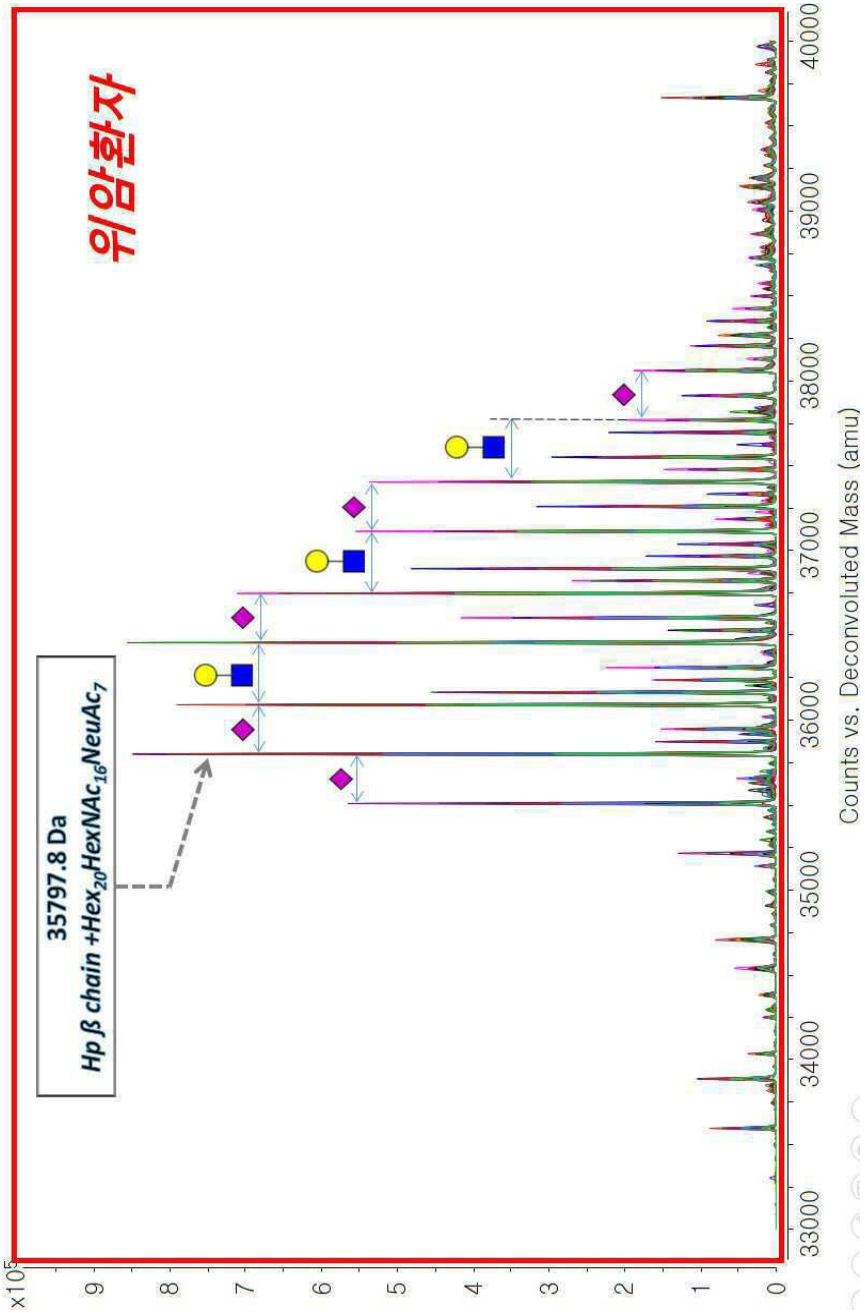


- Clustering Group
  Group 1: Std_01, Std_02, Std_03
  Group 2: Std_04, Std_05, Std_06, Std_07

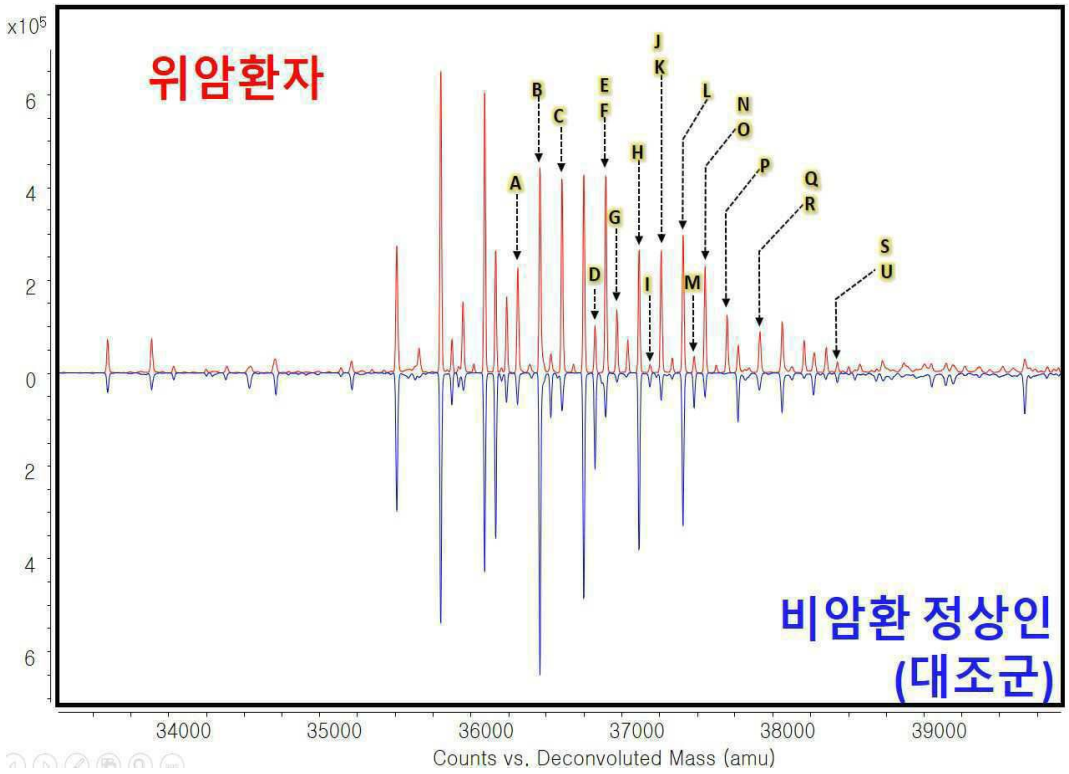
도면3


비위암 정상인
(대조군)
35797.8 Da
Hp β chain +Hex20HexNAc16NeuAc7
x10^5
8
7
6
5
4
3
2
1
0
33000
34000
35000
36000
37000
38000
39000
40000
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

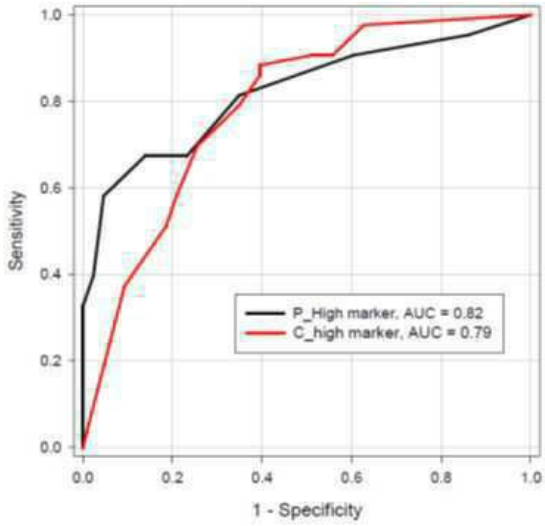
도면4

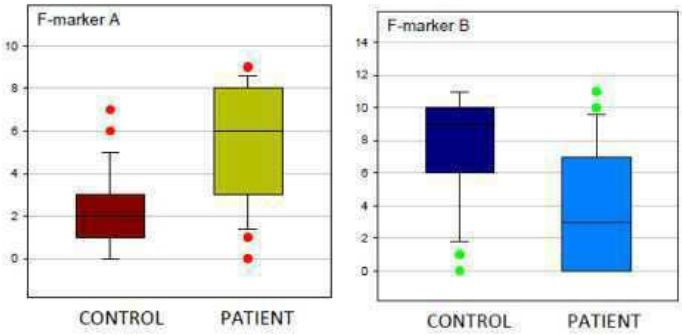

위암환자
35797.8 Da
Hp β chain +Hex20HexNAc16NeuAc7
x10^5
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
33000
34000
35000
36000
37000
38000
39000
40000
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

도면5


x10^5
6
4
2
0
2
4
6
위암환자
비암환 정상인
(대조군)
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
U
34000
35000
36000
37000
38000
39000
Counts vs. Deconvoluted Mass (amu)

도면6





	Marker A (Patient high marker)	Marker B (Control high marker)
AUC	0.82	0.79