



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월20일
(11) 등록번호 10-2314642
(24) 등록일자 2021년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2333/4716 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0046703

(22) 출원일자 2020년04월17일

심사청구일자 2020년04월17일

(56) 선행기술조사문헌

Sun Hee Heo et al., 'Fabry disease: characterisation of the plasma proteome pre- and post-enzyme replacement therapy', J Med Genet., 2017, Vol. 54, pp 771-780. 1부.*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

이범희

서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호(풍납동, 현대아파트)

고현정

서울특별시 광진구 아차산로 262, A동 4306호(자양동, 더샵스타시티)

허선희

서울특별시 송파구 풍성로15길 10, 101동 506호(풍납동, 대동아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 파브리 병 진단용 바이오 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 파브리 병 진단용 바이오 마커 및 이의 용도에 대한 것으로, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병 환자 남녀 모두에게 높은 수준으로 나타나며, 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 높은 수준으로 유지되는 것을 확인함으로써, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커로 제공한다.

대표도 - 도1

C3a (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 남자 (31명)	11.3843	4.21827 P=0.00
파브리병 남자(19명)	20.0263	8.16033
C3a (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 여자(28명)	11.7825	4.21164 P=0.00
파브리병 여자(11명)	25.1182	6.34268
C3b (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 남자 (31명)	207.84	140.89 P>0.05
파브리병 남자(19명)	114.9	84.7
C3b (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 여자(28명)	162	83.1 P>0.05
파브리병 여자(11명)	201.5	134.7
C4b (ug/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 남자 (31명)	10.3967	7.72496 P>0.05
파브리병 남자(19명)	8.4514	11.90345
C4b (ug/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 여자(28명)	8.2289	7.59207 P>0.05
파브리병 여자(11명)	10.8	8.72621
C5a (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 남자 (31명)	1.422	0.77826 P>0.05
파브리병 남자(19명)	2.0148	3.61513
C5a (ng/ml)		
	평균	표준 편차
정상인 여자(28명)	1.0725	0.78547 P>0.05
파브리병 여자(11명)	1.7828	1.52388

(52) CPC특허분류

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170109214 A

JP2019516719 A

US20120065095 A1

KR1020170034941 A

KR1020160033230 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711105758

과제번호 2018M3A9H1078335

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발(R&D)

연구과제명 희귀유전질환의 치료적 한계 극복을 위한 생화학적 및 임상적 분석 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 유효성분으로 포함하는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오 마커 조성물은 효소 대체 요법으로 치료받은 파브리 병 환자의 진단 또는 예후 예측을 위한 것을 특징으로 하는 바이오 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병 환자에서 높은 수준으로 유지되는 것을 특징으로 하는 바이오 마커 조성물.

청구항 4

보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 검출할 수 있는 제제는 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 키트.

청구항 6

대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 대상체는 효소 대체 요법으로 치료받은 파브리 병 환자인 것을 특징으로 하는 효소 대체 요법으로 치료되지 않은 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 파브리 병 진단용 바이오 마커 및 이의 용도에 대한 것으로, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 파브리 병 (Fabry disease)은 X-염색체 연관 열성 유전 질환의 하나로 대표적인 리소좀 저장 질환 (Lysosomal Storage Disease; LSD)에 해당한다. 상기 파브리 병은 리소좀 효소인 알파-갈락토시다아제 A (α -Galactosidase A)의 결핍으로 야기되는 것으로 알려져 있다. 알파-갈락토시다아제 A는 당지질의 말단 부위에 존재하는 알파-갈락토스 (α -Galactose) 결합 부위를 가수분해시키는 작용을 하는 효소로서, 상기 효소가 결핍되는 경우 체내에 말단 알파-갈락토스 잔기를 포함하는 당지질이 축적되어 파브리 병이 발병되게 된다.
- [0003] 상기 효소의 결핍으로 축적되는 주요 당지질은 관용명으로 트리헥소실라미드 (Trihexosylceramide)라고 불리는 글로보트리아오실세라미드 (Globotriaosylceramide; Gb3 또는 GL3)로, 이 물질은 환자의 혈장 내에 다량 분포하고 신장, 간, 심장, 비장 등 신체 각 장기에 축적되어 이들 장기들의 기능부전을 유발하고 만성 통증, 각막 혼탁, 자율 신경 기능 이상, 피부 상해 등을 다양한 증상을 일으킬 수 있으며 급기야는 사망에까지 이르게 한다. 특히 혈장과 직접 접촉하는 혈관내피세포는 Gb3가 축적되는 가장 대표적인 세포로 혈관내피세포 기능부전은 혈관기능 부전에 의한 혈관질환과 파브리 병의 특징적인 신장 질환을 유발한다고 알려져 있다. 따라서 파브리 병을 조기에 진단하는 것과 파브리 병의 치료 과정에서 치료 효과를 평가하는 것이 매우 중요하다.
- [0004] 현재 파브리 병의 치료는 효소대체요법과 사프론제제가 치료제로 사용되고 있다. 이 치료 요법은 환자의 생존률 증가, 삶의 질 향상, 증상의 중등도 감소의 효과가 있으나, 이들 치료에도 불구하고 환자의 질환은 뚜렷하거나 완전한 회복은 어렵고, 일부 환자는 질환이 악화되는 경과를 보인다. 따라서, 본 질환의 증상의 진행을 호전시키기 위하여 새로운 치료 표적의 발굴을 통한 새로운 치료법 개발이 필요하다.
- [0005] 현재 파브리 병을 진단하기 위한 방법으로 상기 Gb3의 혈장 내 수준을 측정하는 것이 가장 많이 사용되고 있으나, Gb3는 실제로 혈장 내에서 측정 시기 및 환자의 상태에 따라 그 수준이 유동적으로 변할 수 있어, Gb3만을 측정하여 파브리 병 진단이나 치료 효과를 평가하는 것은 다소 부족한 측면이 있다. 따라서 파브리 병을 진단하거나 치료 효과를 평가할 수 있는 새로운 바이오 마커의 개발이 시급한 실정이다.
- [0006] 이에, 본 발명자들은 파브리 병과 상관관계를 가지는 신규한 바이오 마커를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병의 진단 및 예후 예측을 위한 바이오 마커로 활용될 수 있음을 확인하고, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 통해 파브리 병의 치료 효과를 검증할 수 있는 마커로 사용 될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 파브리 병 진단용 바이오 마커 및 이의 용도에 대한 것으로, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병 환자 남녀 모두에게 높은 수준으로 나타나며, 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 높은 수준으로 유지되는 것을 확인함으로써, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커로 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 키트를 제공한다.

- [0010] 또한, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 측정하는 제1단계; 및 시험물질을 처리한 후 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에 비해 감소하면 파브리 병의 예방 또는 치료용 약제로 판단하는 제2단계;를 포함하는 파브리 병의 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따르면, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병 환자 남녀 모두에게 높은 수준으로 나타나며, 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 높은 수준으로 유지되는 것을 확인함으로써, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 파브리 병 환자 및 정상 지원자에서 혈장 보체계인 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a), 보체 요소 4b(complement component 4b, C4b), 보체 요소 5a(complement component 5a, C5a)의 수준을 측정한 통계 자료이다.
- 도 2는 파브리 병 환자 및 정상 지원자에서 혈장 보체계인 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a), 보체 요소 4b(complement component 4b, C4b), 보체 요소 5a(complement component 5a, C5a)의 수준을 측정한 그래프이다.
- 도 3은 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자에서 효소 대체 요법으로 치료한 기간에 따른 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준 변화를 측정한 그래프이다.
- 도 4는 파브리 병 환자 및 정상 지원자의 신조직에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a), 보체 요소 4b(complement component 4b, C4b), 보체 요소 5a(complement component 5a, C5a)의 수준을 형광 염색으로 확인한 사진이다.
- 도 5는 파브리 병 환자 및 정상 지원자의 신조직에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 형광 염색으로 확인한 사진이다.
- 도 6은 파브리 병 환자 및 정상 지원자의 신조직에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 형광 염색의 수치화로 측정한 그래프이다.
- 도 7은 파브리 병 환자 및 정상 지원자에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)와 혈장 글로보트리아 오실세라미드(Globotriaosylceramide, Gb3)의 상관 관계를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0016] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0017] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수

치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

- [0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0019] 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 “보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)”는 보체 요소 3(complement component 3, C3)의 절단에 의해 형성되는 단백질 중 하나로, 보체 요소 3(complement component 3, C3)의 절단으로 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)와 보체 요소 3b(complement component 3b, C3b)가 형성된다. 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 클래스 A G 단백질-커플 수용체(G protein-coupled receptor)에 결합하는 77 잔기를 가진 아나필락톡신(anaphylatoxin)이다.
- [0021] 상기 “바이오 마커”는 일반적으로 생물학적 시료에서 검출 가능한 분자들 또는 화합물로서, 생체의 변화를 알아낼 수 있는 지표를 말한다. 상기 바이오 마커는 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a) 또는 이의 대사산물을 포함할 수 있으며, 이들의 수준을 측정함으로써 파브리 병을 진단하거나, 파브리 병을 가진 환자의 예후를 예측할 수 있다.
- [0022] 상기 바이오 마커 조성물은 효소 대체 요법으로 치료받은 파브리 병 환자의 진단 또는 예후 예측을 위한 것일 수 있다.
- [0023] 상기 “효소 대체 요법”은 α -갈락토시다아제 A를 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 파브리 병을 치료 또는 완화시킬 수 있는 공지된 효소 치료 방법을 모두 포함한다.
- [0024] 상기 “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 대상 개체가 파브리 병을 앓고 있는지 여부 또는 파브리 병의 정도를 확인하는 것이다.
- [0025] 상기 “예후 예측”은 파브리 병의 증세가 더욱 심화 또는 악화되는지 평가하는 것으로, 구체적으로 의사의 임상적 판단이 아닌 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a) 또는 이의 대사산물을 마커로 사용하여 환자의 증세가 개선되는지 악화되는지를 객관적으로 평가할 수 있는 정보를 제공하는 것이다.
- [0026] 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자에서 높은 수준으로 유지된다. 따라서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자를 구분하는 바이오 마커로 사용될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 키트를 제공한다.
- [0028] 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 검출할 수 있는 제제는 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으며, 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제일 수 있다. 상기 ‘단백질의 발현 수준’은 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드 또는 뉴클레오티드를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0029] 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv를 모두 포함한다. 항체 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.
- [0030] 또한, 단백질의 수준은 면역분석법 또는 면역염색법에 의해 측정될 수 있다. 상기 방법은 시료에서 상기 바이오 마커 단백질 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 마이크로칩 또는 자동화된 마이크로어레이 시스템의 형태로 실시될 수 있다.
- [0031] 상기 면역분석법 또는 면역염색법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석, 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 단백질 수준은 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM), 병행 반응 모니터링(parallel

reaction monitoring: PRM), sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution(SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 또는 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)을 이용하여 측정될 수도 있다. MRM은 물질의 정확한 단편을 결정하여 이를 질량분석기에서 갠 후, 한 번 깨진 이온 중 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 검출기를 이용하여 그 수를 얻는 방법이다.

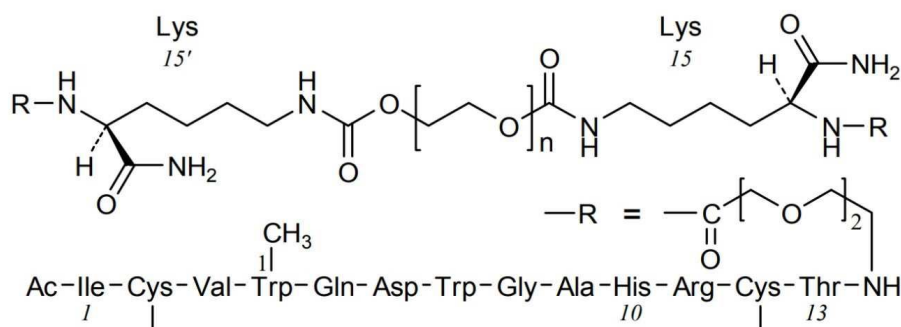
[0033] 또한, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 상기 대상체는 효소 대체 요법으로 치료받은 파브리 병 환자일 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 파브리 병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 발현 억제제는 보체 요소 3(complement component 3, C3)에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 화합물, 항체 또는 결합 단편일 수 있고, 구체적으로 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 발현 억제제는 페그세타코플란(pegcetacoplan, APL-2) 또는 콤프스타틴 유사체(Derivative of compstatin, AMY101)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 상기 페그세타코플란(pegcetacoplan, APL-2)은 보체 요소 3(complement component 3, C3)에 특이적으로 결합하는 억제제로, 화학식으로는 $C_{170}H_{248}N_{50}O_{47}S_4(C_2H_4O)_n$ ($n \sim 800-1100$)로 나타내며, 하기 화학식 1로 표시된다.

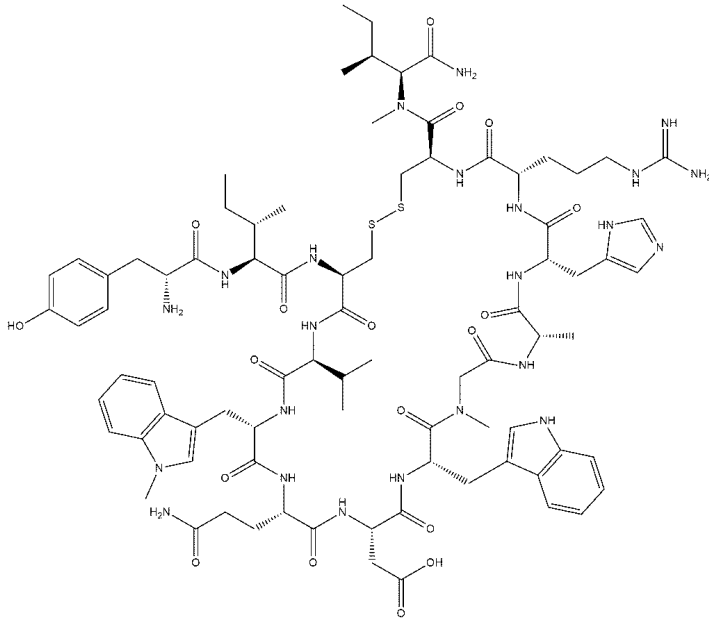
[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 콤프스타틴 유사체(Derivative of compstatin, AMY101)는 보체 요소 3(complement component 3, C3)에 특이적으로 결합하는 억제제로, 화학식으로는 $C_{83}H_{117}N_{23}O_{18}S_2$ 로 나타내며, IUPAC 명으로는 2-[(4R,7S,10S,13S,19S,22S,25S,28S,31S,34R)-34-[(2S,3S)-2-[(2R)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido]-3-methylpentanamido]-7-(3-carbamimidamidopropyl)-4-{[(1S,2S)-1-carbamoyl-2-methylbutyl](methyl)carbamoyl}-25-(2-carbamoylethyl)-10-[(1H-imidazol-5-yl)methyl]-19-[(1H-indol-3-yl)methyl]-13,17-dimethyl-28-[(1-methyl-1H-indol-3-yl)methyl]-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-decaoxo-31-(propan-2-yl)-1,2-dithia-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-decaazacyclopentatriacontan-22-yl]acetic acid로 명명되며, 하기 화학식 2로 표시된다.

[0040] [화학식 2]



[0041]

[0042] 상기 약학적 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[0043]

본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044]

본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여된다. 또한 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 대상체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045]

본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0046]

또한, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준을 측정하는 제1단계; 및 시험물질을 처리한 후 상기 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에 비해 감소하면 파브리 병의 예방 또는 치료용 약제로 판단하는 제2단계;를 포함하는 파브리 병의 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0047]

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

[0048]

<실험예> 실험 재료 및 방법

[0049]

하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0050]

1. 환자 및 조직 샘플

- [0051] 본 실험에 사용된 샘플들은 서울아산병원에서 2016년 10월 내지 2020년 01월 동안 모집된 지원자들로부터 수집되었으며, 구체적으로 파브리 병 남자 환자는 12-62 세의 총 19명이 모집되었으며, 평균 나이는 34.6 ± 16.0 세이고 평균 치료 기간은 5.0 ± 4.9 년이고, 여자 파브리 병 환자는 39-68 세의 총 11명이 모집되었으며, 평균 나이는 54.0 ± 8.4 세이고, 평균 치료 기간은 3.6 ± 4.4 년이다. 정상 남자는 1-79 세의 총 31명이 모집되었으며, 평균 나이는 31.4 ± 20.0 세이고, 정상 여자는 2-46 세의 28명이 모집되었으며, 평균 나이는 29.0 ± 12.0 세이다.
- [0052] 2. ELISA 방법
- [0053] 지원자로부터 수집된 샘플에서 혈장 보체 수준을 측정하기 위해 ELISA 방법을 이용하였다. 구체적으로 EDTA 혈액 검체 용기에 수집된 샘플은 채혈 후 30분 이내에 2℃ 내지 8℃의 원심분리기에서 1,000xg에서 15분 원심분리 후 위에 분리된 혈장만 분리하여 -20℃ 또는 -80℃에 보관 후 사용하였다.
- [0054] 지원자로부터 수집된 샘플에서 혈장 보체 (C3a, iC3b, C4b, C5a) 수준을 정량적으로 측정하기 위하여, 효소결합 면역 흡착 분석법 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) 중 Sandwich ELISA 방법을 이용한 코팅형 ELISA 키트를 사용하였다. 사용한 키트는 C3a (SEA387Hu, Cloud-Clone Corp.), iC3b (E-EL-H2368, Elabscience), C4b (SEB305Hu, Cloud-Clone Corp.), C5a (SEA388Hu Cloud-Clone Corp.)로 각각의 보체 항원에 대한 특이적인 항체가 코팅되어 있는 micro ELISA plate 에 각각 standard, 혈장을 결합시키고, 결합하지 않은 항원을 씻어낸다. 효소 부착된 검출 항체를 위에 뿌려 항원에 붙게 하고, TMB 기질용액을 첨가하여 효소발색반응을 유도한다. 흡광분석기를 이용하여 450nm에서 OD값을 측정하여, 포획 항체에 붙은 항원을 정량화 한다.
- [0055] 3. 오팔 수동 멀티 플렉스 IHC 분석(Opal manual multiplex IHC assay)
- [0056] 보체계의 활성도와 파브리 병의 상관 관계를 분석하기 위해 지원자들로부터 수집된 신장 조직을 오팔 수동 멀티 플렉스 IHC 분석을 실시하였다.
- [0057] 구체적으로 FFPE 슬라이드의 파라핀을 제거하기 위해 60℃ 오븐에 1시간 동안 넣어준 뒤, xylene에 10분간 3번씩 담가준다. 그 후, 100%, 95%, 70% ethanol을 각각 10분씩, 그리고 10% buffered formalin을 10분 처리하고 증류수로 세척한다. 그 다음, 슬라이드를 pH6.0의 citrate 용액에 담가 전자레인지 고출력(100%)에서 45초, 저출력(20%)에서 15분 돌려준 뒤, 15분 상온 보관한다. 슬라이드에 antibody blocking solution을 10분 처리한 후, C3a(1:100) 항체를 1시간 동안 처리하고 2X TBST로 3분간 3번씩 세척한다. 2차 항체를 1시간 동안 처리하고, 1X TBST로 3분간 3번씩 세척한다. 형광 반응을 위해 opal520(1:50) fluorophore를 10분간 처리하고 1X TBST로 5분간 2번씩 세척한다. 이 단계가 끝난 후 다음 항체를 붙이기 위해서 전자레인지 처리 단계부터 다시 시작한다. C5a(1:200)의 경우 opal570(1:50) fluorophore로, C4b(1:50)의 경우 opal650(1:50) fluorophore로 반응시킨다. 마지막 항체에서 fluorophore 붙이는 단계까지 끝났다면 DAPI를 5분간 처리해준다. 1X TBST 3분, DW 2분간 세척 후 mounting solution을 뿌리고 cover slip을 덮어준다. 매니큐어로 mounting solution이 새어 나오지 않도록 sealing 해 준 후, 현미경에서 관찰한다. 녹색은 C3a, 오렌지는 C5a, 적색은 C4b를 나타낸다.
- [0058] 4. 통계분석
- [0059] 모든 통계적 처리는 평균±표준편차(standard deviation; S.D.)로 표기하였고, 모수적 방법 student T test, 비모수적 통계 방법 Mann-Whitney test에서 유의한 차이가 나타나는지 평가하였다.
- [0060] **실시예 1. 통계적으로 파브리 병 환자에서 혈장 보체 인자의 수준**
- [0061] 파브리 병 진단을 받은 환자 남녀 및 정상 지원자에서 혈장 보체 인자의 수준을 측정하여 파브리 병의 진단을 위한 바이오 마커 후보를 선별하였다.
- [0062] 파브리 병 환자 및 정상 지원자로부터 혈액을 수집한 후 ELISA를 이용하여 보체 인자인 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a), 보체 요소 i3Cb (inactive complement component 3b, iC3b), 보체 요소 4b(complement component 4b, C4b), 및 보체 요소 5a(complement component 5a, C5a)의 수준을 측정하였다.
- [0063] 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 정상인 보다 파브리 병 환자에서 남녀 공통적으로 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)만 2배 이상 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 이전 연구에서 iC3b는 파브리병 환자에서 남자는 치료 후 5.0 ± 4.9 년에서 정상인보다 오히려 값이 감소되어 있었고, 여자 파브리병 환자는 치료 3.6 ± 4.4 년 후에 정상인과 차이가 없는 것과 대비되는 결과이다. 즉, 본원발명의 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 iC3b와는 다르게 남녀 모두에서 파브리 병을 진단할 수 있는 바이오 마커로 적용할 수 있

다는 것을 입증한다.

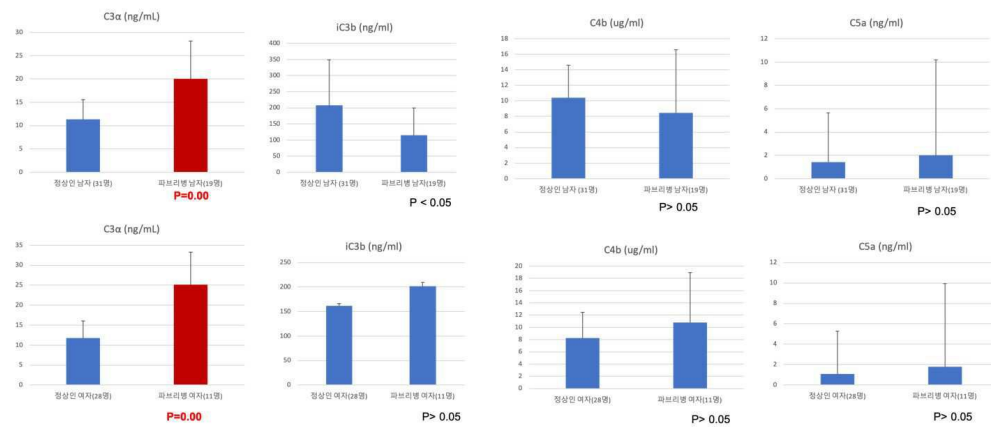
- [0064] 상기 결과는 혈장의 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a) 수준은 파브리 병을 진단할 수 있는 바이오 마커로 사용될 수 있음을 입증한다. 또한, 남자 환자는 5.0±4.9년 치료 후, 여자 파브리병 환자는 치료 3.6±4.4년 후에도 정상인에 비해서 유의하게 증가되어 있어서, 파브리병에서 새로운 치료 표적임을 제시하며, 파브리 병의 치료제를 개발하기 위해서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 파브리 병의 치료를 위한 제제의 효능을 검증하는 마커로도 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0065] **실시예 2. 파브리 병 환자의 효소 치료에 따른 보체 인자 수준 변화**
- [0066] 효소 대체 요법으로 치료받는 파브리 병 환자를 대상으로 치료 기간에 따라 혈장 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 변화하는지를 측정하였다.
- [0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 파브리 병 환자의 치료 기간에 따라 혈장 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준에서 변화가 나타나지 않았으며, 효소 대체 요법으로도 파브리 병이 치료되지 않는 환자에서는 혈장 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 높게 유지되는 것으로 나타났다.
- [0068] 상기 결과는 어떤 환자에게 혈장 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 높게 나타나는 경우 파브리 병이 효소 대체 요법으로 치료되지 않을 수 있다는 것을 예측할 수 있으며, 이는 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병 환자를 진단하는 바이오 마커로 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0069] 또한, 파브리 병의 치료제를 개발하기 위해서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 효소 대체 요법으로 치료되지 않는 파브리 병의 치료를 위한 제제의 효능을 검증하는 마커로도 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0070] **실시예 3. 파브리 병 환자의 신장 조직에서 보체 인자의 수준**
- [0071] 파브리 병 진단을 받은 환자 남녀 및 정상 지원자의 신장 조직에서 보체 인자의 수준을 측정하였다.
- [0072] 도 4 내지 6에 나타난 바와 같이, 적색 형광인 보체 요소 4b(complement component 4b, C4b)와 오렌지색 형광인 보체 요소 5a(complement component 5a, C5a)의 수준은 정상 지원자와 파브리 병 환자와 비슷한 수준으로 나타났다. 녹색 형광인 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준은 파브리 병 환자에서 높게 나타났다.
- [0073] 상기 결과는 신장 조직에서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a) 수준은 파브리 병을 진단할 수 있는 바이오 마커로 사용될 수 있음을 입증한다. 또한, 파브리 병의 치료제를 개발하기 위해서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)의 수준이 파브리 병의 치료를 위한 제제의 효능을 검증하는 마커로도 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0074] **실시예 4. 파브리 병의 임상 지표와 보체 인자와의 상관 관계 분석**
- [0075] 파브리 병의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오 마커로서 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병의 임상 증상 지표인 혈장 리소좀 내의 글로보트리아오실세라미드(Globotriaosylceramide, lyso-Gb3)와의 관련성이 있는 지 상관관계를 분석하였다.
- [0076] 도 7에 나타난 바와 같이, 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)는 혈장 리소좀 내의 글로보트리아오실세라미드(Globotriaosylceramide, lyso-Gb3)와 유의한 상관 관계가 있는 것으로 나타났으며, 상기 결과는 보체 요소 3a(complement component 3a, C3a)가 파브리 병의 진단을 위한 바이오 마커로서 가치가 있다는 것을 입증한다.
- [0077] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

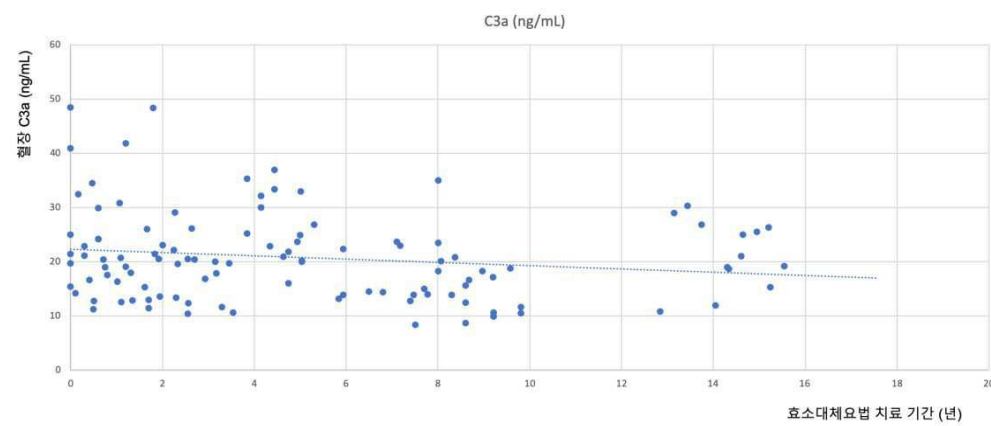
도면1

C3α (ng/mL)			
	평균	표준 편차	
정상인 남자 (31명)	11.3843	4.21827	P=0.00
파브리병 남자(19명)	20.0263	8.16033	
C3α (ng/mL)			
	평균	표준 편차	
정상인 여자(28명)	11.7825	4.21164	P=0.00
파브리병 여자(11명)	25.1182	6.34268	
iC3b (ng/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 남자 (31명)	207.84	140.89	P>0.05
파브리병 남자(19명)	114.9	84.7	
iC3b (ng/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 여자(28명)	162	83.1	P>0.05
파브리병 여자(11명)	201.5	134.7	
C4b (ug/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 남자 (31명)	10.3967	7.72496	P>0.05
파브리병 남자(19명)	8.4514	11.90345	
C4b (ug/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 여자(28명)	8.2289	7.59207	P>0.05
파브리병 여자(11명)	10.8	8.72621	
C5a (ng/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 남자 (31명)	1.422	0.77826	P>0.05
파브리병 남자(19명)	2.0148	3.61513	
C5a (ng/ml)			
	평균	표준 편차	
정상인 여자(28명)	1.0725	0.78547	P>0.05
파브리병 여자(11명)	1.7828	1.52388	

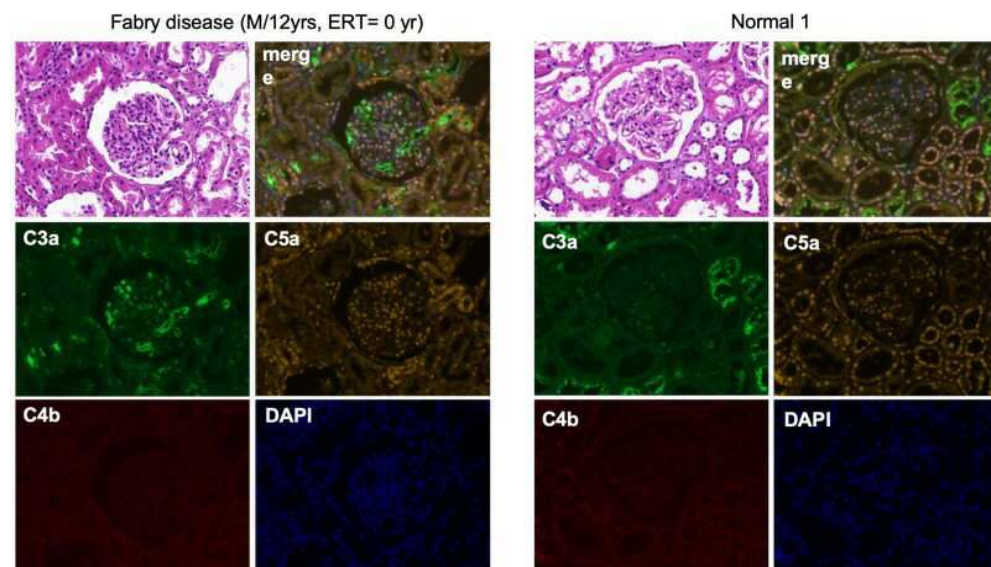
도면2



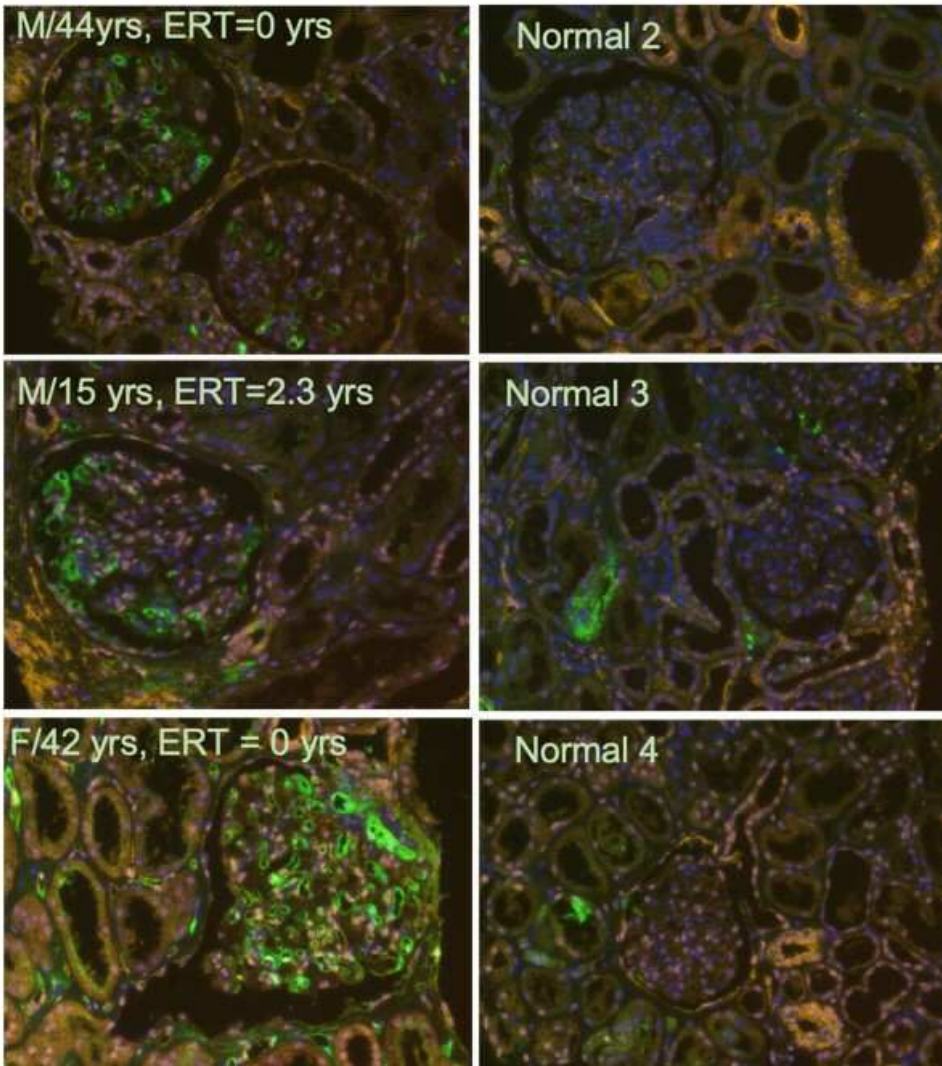
도면3



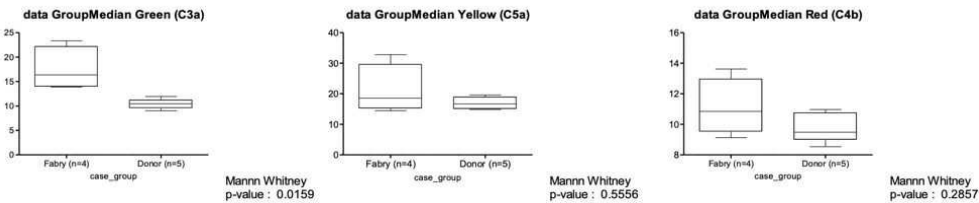
도면4



도면5



도면6



도면7

