

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2021년 7월 8일 (08.07.2021)



(10) 국제공개번호

WO 2021/137553 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/019201
- (22) 국제출원일: 2020년 12월 28일 (28.12.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0179979 2019년 12월 31일 (31.12.2019) KR
- (71) 출원인: 의료법인 성광의료재단 (SUNGKWANG MEDICAL FOUNDATION) [KR/KR]; 06135 서울시 강남구 논현로 566, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 류현미 (RYU, Hyun Mee); 13497 경기도 성남시 분당구 야탑로65번길 16, Gyeonggi-do (KR). 임지혜 (LIM, Ji Hyae); 13488 경기도 성남시 분당구 판교로 335, Gyeonggi-do (KR). 김광표 (KIM, Kwang Pyo); 01750 서울시 노원구 한글비석로 151, 3동 602호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13, 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

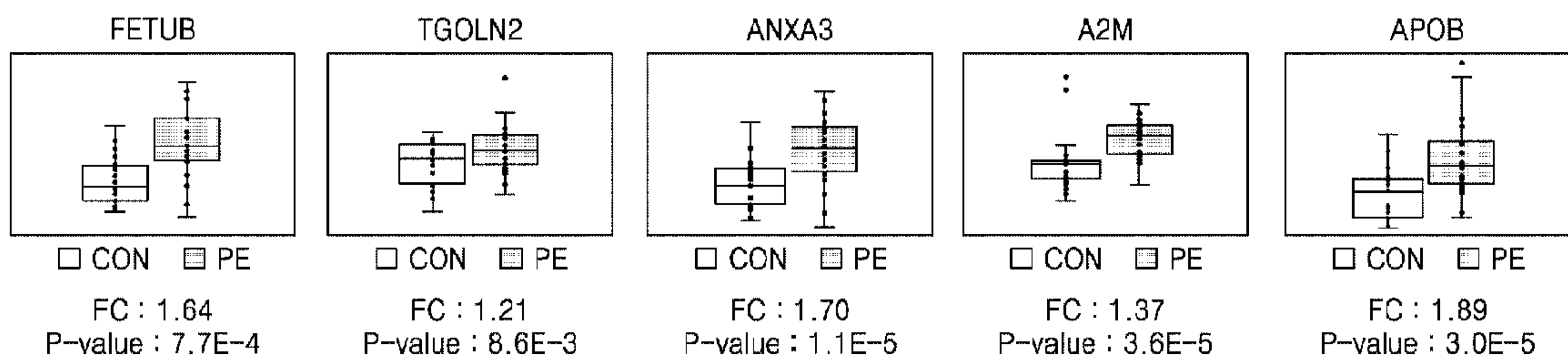
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: BIOMARKER COMPOSITION FOR DIAGNOSING PRE-ECLAMPSIA, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 임신중독증 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: Provided are: a composition for diagnosing pre-eclampsia; a kit; a method for diagnosing pre-eclampsia by using same; and a method for acquiring information necessary for the diagnosis. The composition, the kit, and the methods provide the effect of enabling the accurate and sensitive diagnosis of pre-eclampsia in an individual.

(57) 요약서: 임신중독증 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 임신중독증 진단방법 및 진단에 필요한 정보를 얻는 방법으로써, 상기 조성물, 키트 및 방법에 따를시, 개체의 임신중독증을 정확하고 민감하게 진단하는 효과를 제공한다.

WO 2021/137553 A1

명세서

발명의 명칭: 임신중독증 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 출원은 2019년 12월 31일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2019-0179979호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 임신중독증 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 발명이다.
- [3]

배경기술

- [4] 임신중독증은 임신 20주 이후에 염증, 저산소증, 산화적 스트레스와 같은 다양한 원인에 의해 단백뇨(>300 mg/day)를 동반하는 고혈압(>140/90 mmHg) 질환으로 임산부와 태아의 생명까지 위협한다. 그러나 아직까지 별다른 치료제는 없고 예방이 최선의 방안인 것으로 알려져 있다.
- [5] 임신중독증을 예방 및 진단하기 위한 방편으로, 퍼킨엘머(PerkinElmer) DELFIA® Xpress PLGF 키트가 출시되어 있으나 5% 위양성률에서, 44%의 낮은 검출율을 나타내 실제 진단에 유용하게 쓰이지 못하며, 엘리어(Alere) Triage® PLGF 검사 또한 임상적 진단의 효용성을 입증하기에는 부족하다.
- [6] 이러한 기술적 배경 하에서, 상기 언급한 질병에 대하여 유전자 분석을 통해 미리 질병의 여부를 알아낼 수 있는 분석방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나(한국 공개특허 10-2019-0003987), 아직은 미비한 실정이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 일 양상은 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB 및 SERPINA4, VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 임신중독증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 임신중독증 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 양상은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [11] (b) 상기 측정된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 대조군 시료의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 임신중독증 진단을

위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[12]

기술적 해결방법

[13]

일 양상은 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 임신중독증 진단용 조성물을 제공한다.

[14]

상기 ANXA3은 Annexin A3이라고도 한다. 상기 A2M은 alpha-2-Macroglobulin 또는 α 2M이라고도 한다. 상기 APOB는 Apolipoprotein B라고도 한다. 상기 PZP는 PZP alpha-2-macroglobulin like 또는 pregnancy zone protein라고도 한다. 상기 FETUB은 Fetuin B 라고도 한다. 상기 FN1은 Fibronectin 1이라고도 한다. 상기 LCN2는 Lipocalin 2라고도 하며, oncogene 24p3 또는 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)로도 알려져 있다. 상기 APOM은 Apolipoprotein M라고도 한다. 상기 QSOX1는 Quiescin sulfhydryl oxidase 1 또는 Quiescin Q6이라고도 한다. 상기 TGOLN2는 Trans-golgi network protein 2라고도 한다. 상기 F10은 coagulation factor X라고도 한다. 상기 SERPINA11은 Serpin Family A Member 11라고도 한다. 상기 PRG2는 Proteoglycan 2, pro eosinophil major basic protein이라고도 한다. 상기 SHBG는 Sex hormone binding globulin라고도 한다. 상기 TNC는 Tenascin C라고도 한다. 상기 HBD는 Hemoglobin subunit delta이라고도 한다. 상기 AGT는 Angiotensinogen라고도 한다. 상기 CP는 ceruloplasmin이라고도 한다. 상기 HEXB는 Hexosaminidase subunit beta라고도 한다. 상기 SERPINA4는 Serpin Family A Member 4 또는 Kallistatin라고도 한다. 상기 VWF는 von Willebrand factor라고도 한다. 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 서열은 Ensembl Genome Browser 또는 BLAST와 같은 공지의 데이터베이스로부터 확인할 수 있다.

[15]

용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 임신중독증 관련 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성 여부를 확인하는 것을 포함하는 의미일 수 있다.

[16]

용어, "수준 측정"은 임신중독증 관련 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 임신중독증 관련 질환에 대한 마커의 발현 또는 활성의 정도를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 마커는 대사물질, 유전물질인 DNA 또는 RNA 등일 수 있으며, 상기 유전물질로부터 발현되는 단백질 또는 이의 단편인 펩티드일 수 있다.

[17]

용어, "임신중독증"이란 임신과 합병된 고혈압성 질환을 의미한다. 또한, 상기 임신중독증은 고혈압과 동시에 단백뇨가 발생하는 질환일 수 있다. 구체적으로 상기 임신중독증은 만성 고혈압, 임신성 고혈압, 병태가 더 진행된 형태인

전자간증 및 자간증을 포함하는 개념일 수 있다. 상기 임신중독증의 증상으로는 두통, 부종, 구역, 구토, 거품뇨 등이 있다.

- [18] 상기 만성 고혈압은 임신 전 혹은 임신 20 주 이전에 발생한 고혈압을 의미한다. 상기 임신성 고혈압은 임신 20 주 이후에 새롭게 고혈압이 발생하고 출산 12 주 안에 혈압이 정상화되는 질환을 의미한다. 상기 "혈압이 정상"이란 수축기 혈압이 140 mmHg 미만 및 이완기 혈압이 90 mmHg 미만인 것을 의미한다. 상기 전자간증은 고혈압 및 단백뇨가 동시에 발생하는 질환을 의미한다. 상기 자간증은 고혈압, 단백뇨 및 경련이 동시에 발생하는 질환을 의미한다.
- [19] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 단편의 수준을 측정하는 제제는 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것일 수 있다.
- [20] 상기 단백질 또는 이의 단편의 수준을 측정하는 제제는 단백질과 특이적으로 결합하는 올리고펩티드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체, 리간드, PNA 또는 앵타머일 수 있다. 또한 상기 단백질 또는 이의 단편의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편을 발현케 하는 대사물질 또는 유전물질인 DNA, RNA 등의 수준을 측정하는 제제로도 대체될 수 있다.
- [21] 상기 항체는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 또는 키메릭 항체일 수 있고, 선택적으로, 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함될 수 있다.
- [22] 상기 앵타머란, 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.
- [23] 일 구체예에 있어서, 상기 임신중독증은 만성 고혈압, 임신성 고혈압, 전자간증, 자간증 및 복합 자간전증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [24]
- [25] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 임신중독증 진단용 키트를 제공한다.
- [26] 상기 용어 "임신중독증", "진단" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [27] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인 임신중독증 진단용 키트일 수 있다.
- [28] 상기 키트는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 수준을 측정하기 위한 단백질 칩 키트일 수 있다. 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을

포함할 수 있다. 상기 기재는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 또는 유리로 된 슬라이드글라스일 수 있다. 상기 발색효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase) 또는 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)일 수 있다. 상기 형광물질은 FITC 또는 RITC일 수 있다. 상기 발색 기질은 BTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)일 수 있다.

[29]

[30] 또 다른 양상은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FNI, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[31] (b) 상기 측정된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 대조군 시료의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 것인 임신중독증 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[32] 상기 용어 "임신중독증", "진단", "키트" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[33] 용어, "개체"는 임신중독증의 발병 여부 또는 발병 가능성을 확인하거나 발병 위험도를 예측하고자 하는 개체를 의미한다. 상기 개체는 척추동물일 수 있고, 구체적으로 포유류, 양서류, 파충류, 조류 등일 수 있고, 보다 구체적으로 포유동물일 수 있으며, 예를 들면, 인간 (Homo sapiens)일 수 있다.

[34] 용어, "생물학적 시료"는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액, 세포, 조직 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 생체로부터 분리되는 시료, 보다 구체적으로, 개체로부터 분리된 콧물, 타액, 뇨, 객담, 또는 림프액일 수 있다.

[35] 용어, "대조군"은 임신중독증 환자가 아닌 개체를 의미할 수 있다.

[36] 일 구체예에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FNI, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 증가된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[37] 일 구체예에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[38] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준은 웨스턴

블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 측정되는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.

[39] 일 실시예에 따르면, 상기 임신중독증이 진단되는 개체는 생물학적 시료로부터 측정된 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비하여 유의하게 높게 나타난다.

[40] 일 실시예에 따르면, 상기 임신중독증이 진단되는 개체는 생물학적 시료로부터 측정된 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF의 단백질 또는 이의 단편 발현 수준이 대조군에 비하여 유의하게 감소되어 나타난다.

[41]

[42] 또 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 임신중독증을 진단하는 데 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[43]

[44] 또 다른 양상은 임신중독증을 진단하기 위한 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

[45]

[46] 또 다른 양상은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[47] (b) 상기 측정된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 대조군 시료의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 것인 임신중독증을 진단하기 위한 방법을 제공한다.

[48]

발명의 효과

- [49] 임신중독증 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 임신중독증 진단방법 및 진단에 필요한 정보를 얻는 방법에 따르면, 개체의 임신중독증을 정확하고 민감하게 진단하는 데 이용할 수 있다.

[50]

도면의 간단한 설명

- [51] 도 1a 내지 도 1c는 임신중독증에 해당되는 개체에서 15종의 단백질인 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC의 발현이 상향 조절된 것을 나타낸 결과이다.
- [52] 도 2는 임신중독증에 해당되는 개체에서 6종의 단백질인 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF의 발현이 상향 조절된 것을 나타낸 결과이다.

[53]

발명의 실시를 위한 형태

- [54] 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.

[55]

[56] 실시예 1: 환자의 혈액 시료에서의 단백질 분리 및 펩티드화

- [57] 환자 선정 기준은 다음과 같다. 임신중독증 대표 증상인 임신 20주 이후에 단백뇨(≥ 300 mg/day)를 동반한 고혈압($\geq 140/90$ mmHg) 증상을 보이는 산모 25명을 질환군으로 선정하였고, 임신 전과정에서 태아와 산모 모두에게 임상적 특이증상 없이 말기에 정상적으로 분만한 산모 29명을 정상군으로 선정하였다.
- [58] 산모로부터의 생물학적 시료인 혈액 시료의 채취과정은 다음과 같다. 10cc EDTA tube에 채혈 된 산모 혈액을 1차 원심분리 과정(8000rpm, 15분)을 거친 후 분리된 상층액(혈장)을 다시 2차 원심분리 과정(13,000rpm, 10분)을 거쳐 최종적으로 실험에 쓰일 혈장을 확보하였다.
- [59] 단백질 분리와 펩티드 실험 과정은 하기와 같이 이루어졌다. LC-MS /MS 분석의 민감도 감소를 가져오는 14개의 high-abundant 단백질(Albumin, [0075] IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, alpha2-macroglobulin, alpha1-acid glycoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, complement C3, transthyretin)을 IGY Column(P/N SEP030-1KT, Sigma) 이용하여 제거하였다. 제거 후 전체 혈액 단백질의 5% 미만으로 존재하는 단백질만을 이용하여 분석하였다.
- [60] 질량분석기를 이용한 검증 방법인 MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 위해 단백질을 펩타이드 단위로 자르는 과정이 필요하며, 효소(트립신, trypsin)을 이용하여 절편화를 실시하였다. Abundant Protein을 제거한 후 남은 50 μ g의 단백질에 50 μ l의 6 M 유레아 버퍼(Urea buffer, 0.1 M DTT, 50 mM ABC)를 넣어주고 1 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 상기 50 μ l의 샘플에 5 μ l의 0.5 M

IAA를 처리한 후, 암실에서 30분간 반응하였다. 반응 후, 50 mM ABC 400 μ l를 이용하여 유레아 농도를 1 M 이하로 만들어 준 후, 트립신 2 μ g을 넣고 12 시간 동안 37 °C에서 배양하였다. 인큐베이션 후, 반응에 사용된 염 제거 및 펩타이드만을 확보하기 위해 pierce c-18 spin columns(P/N: 89870, Theromo)를 이용하여 염을 제거하였다.

[61]

[62] **실시예 2: MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 사용한 바이오마커의 확인**

[63] 바이오 마커 후보의 검증은 하기와 같이 이루어졌다. 바이오 마커 후보 검증을 위한 후보군의 MRM transition을 선정하였다. MRM transition의 선정은 모든 펩타이드에 대하여 MS 기반의 검증 데이터를 보유한 SRM Atlas(www.srmatlas.org)를 이용하였다. 이 때 선정 기준은 다음과 같다.

[64] 1. 메티오닌(Methionine, M) 및 히스티딘(Histidine, H) 포함 펩타이드 제외

[65] 2. Miscalculation이 포함된 펩타이드 제외

[66] 3. Protein(P) 앞 시퀀스가 R(Arginine) 또는 K(Lysine)을 가지는 펩타이드 제외

[67] 4. 펩티드 길이(Pepetide Legnth) $5 < x < 20$

[68] 선정된 후보 Transition을 이용하여 1차 타겟 선별을 선행하고 transition의 적합성을 확인하였다. Transition의 확인 조건은 다음과 같다.

[69] 1. 같은 Precursor ion에서 파생되는 3 종의 Fragment ion이 동일한 용출 시간을 가지는지 여부

[70] 2. 3회 이상의 반복 실험을 통해 동일한 Retention Time(RT)를 가지는지 여부

[71] 3. LOQ(Limit of Quantification)의 조건에 부합하는 S/N(Signa to Noise) > 10을 만족하는지 여부

[72] MRM 분석 결과는 하기의 과정을 통하여 얻어졌다. 상기 조건에 만족하는

Transition을 선정한 후, 준비된 펩타이드 시료를 이용하여 개별

MRM분석하였다. 도 1a 내지 도 1c 및 2에 나타난 바와 같이, 정상 산모 혈액 대비 임신중독증 산모에서 유의성 있게 발현양의 차이가 있는 단백질로 검증된 것은

ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO,

SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF에

해당하는 단백질이다. 15종의 단백질은 유의미한 증가를 보인 단백질(ANXA3,

A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO,

SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC)이며 6종의 단백질은 유의미한 감소를 보인

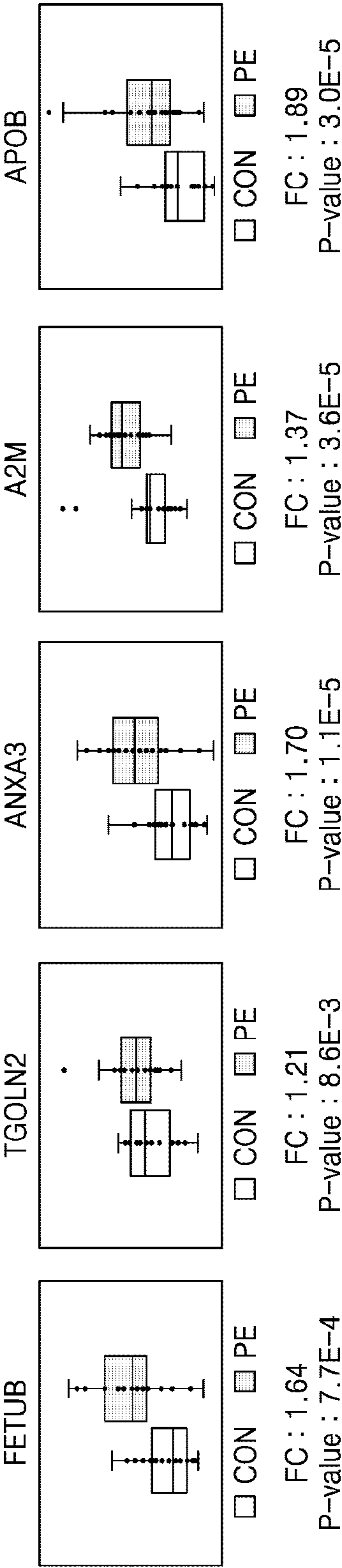
단백질(HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF)이다.

청구범위

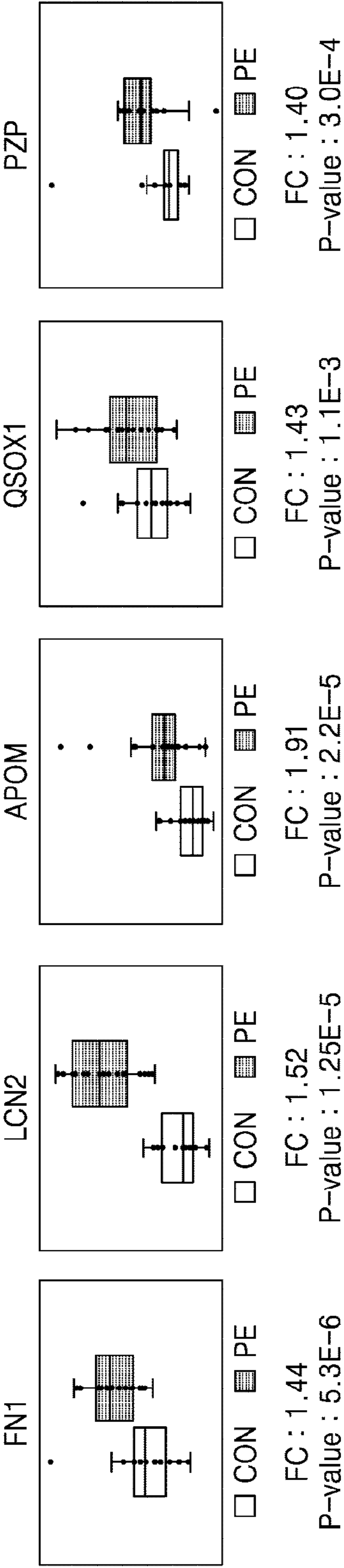
- [청구항 1] ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FNI, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 임신중독증 진단용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 단편의 수준을 측정하는 제제는 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인 임신중독증 진단용 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 임신중독증은 만성 고혈압, 임신성 고혈압, 전자간증, 자간증 및 복합 자간전증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 것인 임신중독증 진단용 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1의 조성물을 포함하는 임신중독증 진단용 키트.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인 임신중독증 진단용 키트.
- [청구항 6] (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FNI, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 측정된 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 대조군 시료의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 것인 임신중독증 진단을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FNI, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, FIO, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 증가된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 8] 청구항 6에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 9] 청구항 6에 있어서, 상기 단백질의 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA:

radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion),
오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓
면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis),
면역조직화학염색법(immunohistochemical staining),
면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement
Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence),
면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS
분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩
분석법(protein chip technology assay)으로 구성된 군으로부터 선택되는
어느 하나를 이용하여 측정되는 것인, 임신중독증 진단을 위한
정보제공방법.

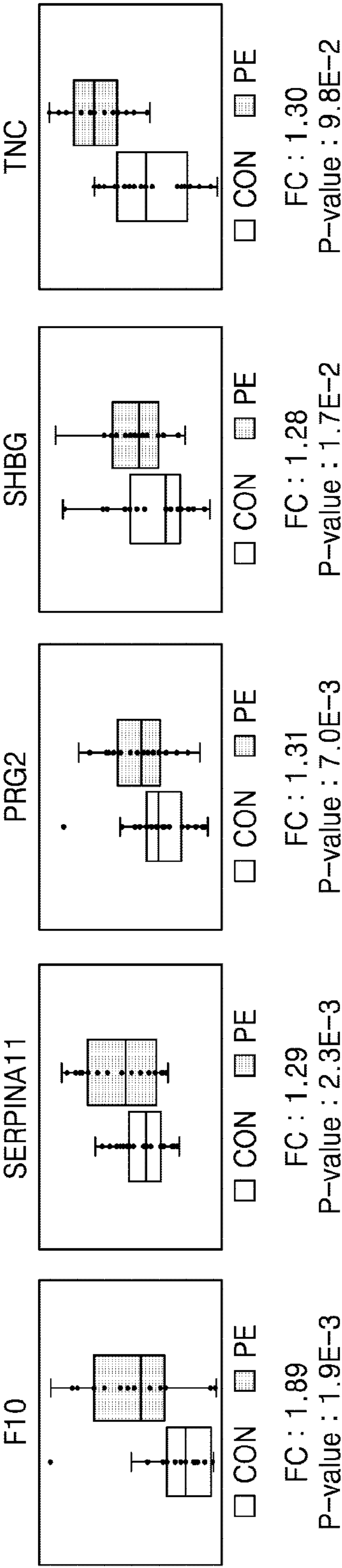
[Figure 1a]



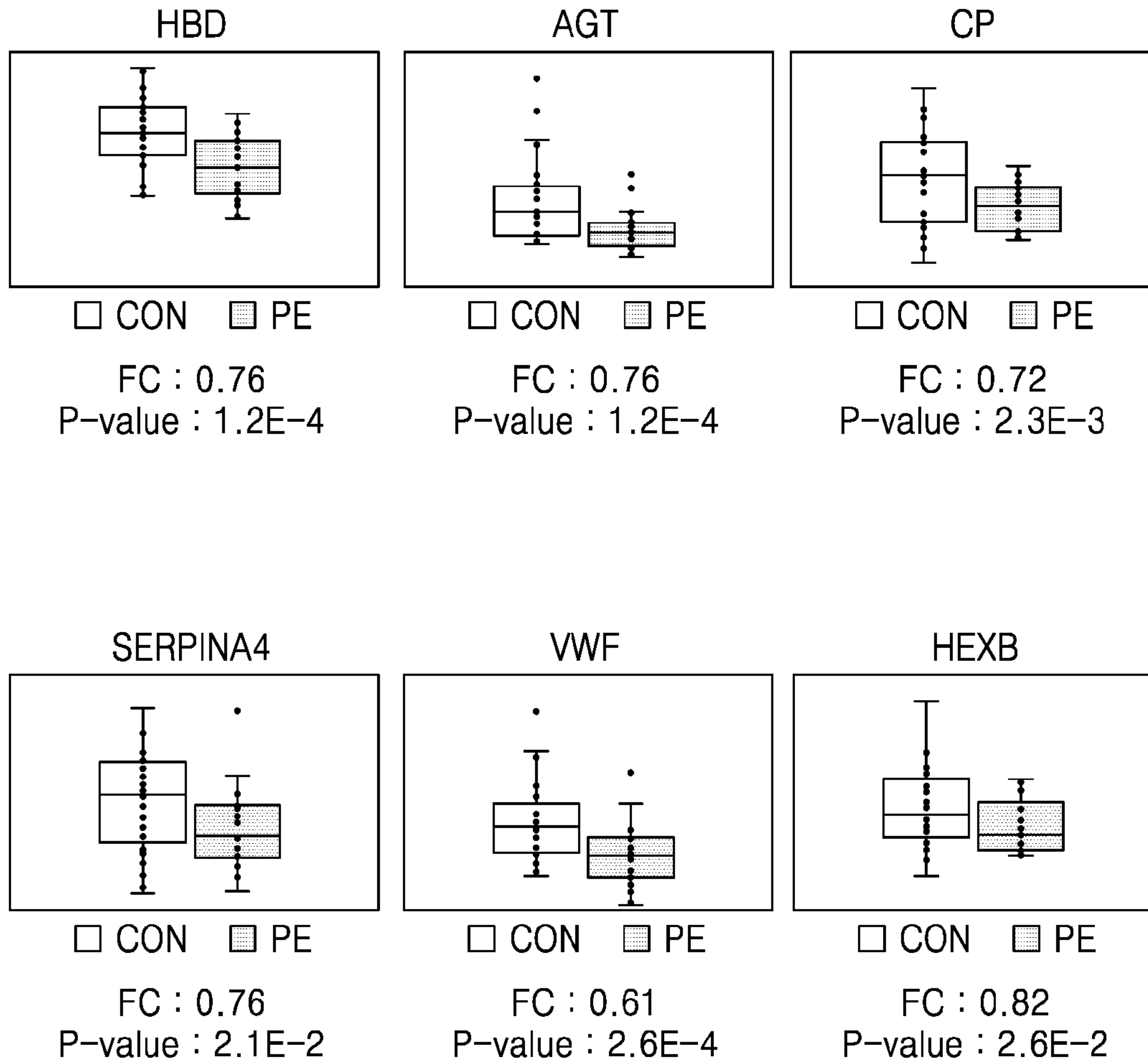
[Figure 1b]



[Figure 1c]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019201

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N 33/68(2006.01); A61K 33/06(2006.01); G06F 19/00(2011.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 임신중독증(toxemia of pregnancy), 전자간증(preeclampsia), 발현(expression), 바이오마커(biomarker), 항체(antibody)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2019-048927 A2 (IGENOMIX S.L.) 14 March 2019 (2019-03-14) See claims 69-92; and pages 60-61 and 83.	1-7,9 8
X	KIM. S. M. et al. Circulating levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlate with the presence and severity of preeclampsia. Reproductive Sciences. 2013, vol. 20, no. 9, pp. 1083-1089. See abstract; pages 1084-1085; and figure 1.	1-7,9
X	US 2016-0025739 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH et al.) 28 January 2016 (2016-01-28) See claims 1 and 6-16; paragraphs [0042]-[0049], [0142]-[0147], [0289] and [0295]-[0297]; and tables 1A, 2A and 3A.	1-6,9
X	US 2014-0349881 A1 (PRONOTA N.V.) 27 November 2014 (2014-11-27) See claims 1 and 14; and paragraphs [0311]-[0317].	1-6,9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 April 2021

Date of mailing of the international search report

07 April 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019201

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015-0099655 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 09 April 2015 (2015-04-09) See claims 1-22; and paragraphs [0069]-[0071].	1-6,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019201

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-048927	A2	14 March 2019	BR	112020004390	A2	08 September 2020
				CA	3074808	A1	14 March 2019
				CN	111630387	A	04 September 2020
				EP	3679380	A2	15 July 2020
				JP	2020-532745	A	12 November 2020
				US	2020-0271660	A1	27 August 2020
				WO	2019-048927	A3	18 April 2019
US	2016-0025739	A1	28 January 2016	SG	11201506891	A	29 September 2015
				US	10054599	B2	21 August 2018
				WO	2014-142752	A1	18 September 2014
US	2014-0349881	A1	27 November 2014	AU	2012-351504	A1	07 August 2014
				AU	2012-351504	B2	04 January 2018
				BR	112014014456	A2	25 September 2018
				CA	2859295	A1	20 June 2013
				CN	104136924	A	05 November 2014
				CN	104136924	B	29 May 2018
				EP	2791683	A2	22 October 2014
				EP	2791683	B1	15 November 2017
				RU	2014128845	A	10 February 2016
				RU	2673074	C2	22 November 2018
				WO	2013-087887	A2	20 June 2013
				WO	2013-087887	A3	24 October 2013
				ZA	201404319	B	24 June 2015
US	2015-0099655	A1	09 April 2015	CN	104487593	A	01 April 2015
				EP	2847354	A1	18 March 2015
				GB	2515983	A	07 January 2015
				HK	1206071	A1	31 December 2015
				HK	1206790	A1	15 January 2016
				JP	2015-519564	A	09 July 2015
				WO	2013-169751	A1	14 November 2013

A.발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i

B.조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/68(2006.01); A61K 33/06(2006.01); G06F 19/00(2011.01)
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 임신중독증(toxemia of pregnancy), 전자간증(preeclampsia), 발현(expression), 바이오마커(biomarker), 항체(antibody)

C.관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	WO 2019-048927 A2 (IGENOMIX S.L.) 2019.03.14 청구항 69-92; 페이지 60-61, 83	1-7,9 8
X	KIM. S. M. 등, ‘Circulating levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlate with the presence and severity of preeclampsia’, Reproductive Sciences, 2013, 20권, 9호, 페이지 1083-1089 초록; 페이지 1084-1085; 도면 1	1-7,9
X	US 2016-0025739 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH 등) 2016.01.28 청구항 1, 6-16; 단락 [0042]-[0049], [0142]-[0147], [0289], [0295]-[0297]; 표 1A, 2A, 3A	1-6,9
X	US 2014-0349881 A1 (PRNOTA N.V.) 2014.11.27 청구항 1, 14; 단락 [0311]-[0317]	1-6,9
X	US 2015-0099655 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2015.04.09 청구항 1-22; 단락 [0069]-[0071]	1-6,9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일
2021년04월07일(07.04.2021)

국제조사보고서 발송일
2021년04월07일(07.04.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2019-048927 A2	2019/03/14	BR 112020004390 A2	2020/09/08
		CA 3074808 A1	2019/03/14
		CN 111630387 A	2020/09/04
		EP 3679380 A2	2020/07/15
		JP 2020-532745 A	2020/11/12
		US 2020-0271660 A1	2020/08/27
		WO 2019-048927 A3	2019/04/18
US 2016-0025739 A1	2016/01/28	SG 11201506891 A	2015/09/29
		US 10054599 B2	2018/08/21
		WO 2014-142752 A1	2014/09/18
US 2014-0349881 A1	2014/11/27	AU 2012-351504 A1	2014/08/07
		AU 2012-351504 B2	2018/01/04
		BR 112014014456 A2	2018/09/25
		CA 2859295 A1	2013/06/20
		CN 104136924 A	2014/11/05
		CN 104136924 B	2018/05/29
		EP 2791683 A2	2014/10/22
		EP 2791683 B1	2017/11/15
		RU 2014128845 A	2016/02/10
		RU 2673074 C2	2018/11/22
		WO 2013-087887 A2	2013/06/20
		WO 2013-087887 A3	2013/10/24
		ZA 201404319 B	2015/06/24
US 2015-0099655 A1	2015/04/09	CN 104487593 A	2015/04/01
		EP 2847354 A1	2015/03/18
		GB 2515983 A	2015/01/07
		HK 1206071 A1	2015/12/31
		HK 1206790 A1	2016/01/15
		JP 2015-519564 A	2015/07/09
		WO 2013-169751 A1	2013/11/14