



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0086200
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/689 (2013.01)

G01N 33/53 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0179979

(22) 출원일자 2019년12월31일

심사청구일자 2019년12월31일

(71) 출원인

의료법인 성광의료재단

서울특별시 강남구 논현로 566 (역삼동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

류현미

경기도 성남시 분당구 야탑로65번길 16(야탑동)

임지혜

경기도 성남시 분당구 판교로 335(삼평동)

김광표

서울특별시 노원구 한글비석로 151, 3동 602호(하계동, 한신동성아파트)

(74) 대리인

리앤목특허법인

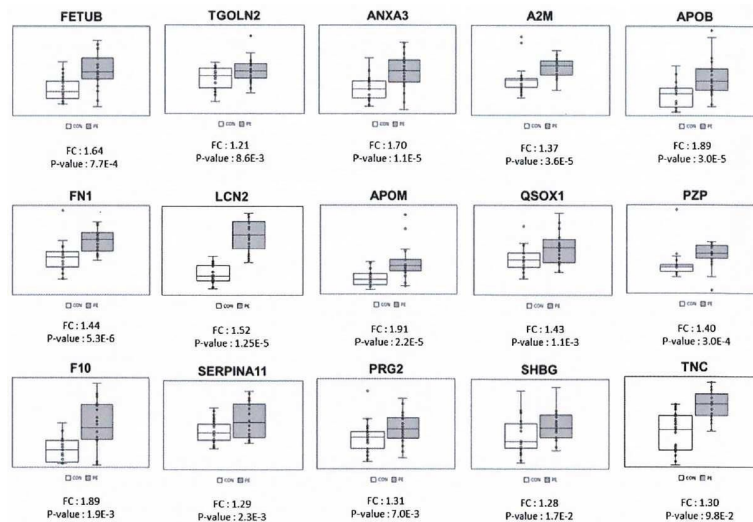
전체 청구항 수 : 총 9 항

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

(57) 요약

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.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 2800/368 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI17C0778
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발
연구과제명	임신중독증 조기 예측 및 진단에 유용한 선별검사법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	분당차병원
연구기간	2017.04.10 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 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 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 임신중독증은 만성 고혈압, 임신성 고혈압, 전자간증, 자간증 또는 복합 자간전증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 것인 임신중독증 진단용 조성물 키트.

청구항 5

청구항 5에 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, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 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, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC로 이루어진 군에서 선택된 1 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 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 9

청구항 6 내지 8에 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), 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 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 임신중독증 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 발명이다.

배경 기술

[0003] 임신중독증은 임신 20주 이후에 염증, 저산소증, 산화적 스트레스와 같은 다양한 원인에 의해 단백뇨(>300 mg/day)를 동반하는 고혈압(>140/90 mmHg) 질환으로 임신부와 태아의 생명까지 위협한다. 그러나 아직까지 별다른 치료제는 없고 예방이 최선의 방안인 것으로 알려져 있다.

[0004] 임신중독증을 예방 및 진단하기 위한 방편으로, 퍼킨엘머(PerkinElmer) DELFIA® Xpress PIGF 키트가 출시되어 있으나 5% 위양성률에서, 44%의 낮은 검출율을 나타내 실제 진단에 유용하게 쓰이지 못하며, 엘리어(Alere)Triage® PIGF 검사 또한 임상적 진단의 효용성을 입증하기에는 부족하다.

[0005] 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 임신중독증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 임신중독증 진단용 조성물 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0010] (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 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 일 양상은 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 임신중독증 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 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.

[0014] 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 펩타이드일 수 있다.

- [0015] 용어, “임신중독증”이란 임신과 합병된 고혈압성 질환을 의미하며, 구체적으로 임신성 고혈압, 병태가 더 진행된 형태인 전자간증 및 자간증을 포함하는 개념일 수 있다. 임신중독증의 증상으로는 두통, 부종, 구역, 구토, 거품뇨 등이 있다.
- [0016] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 단편의 수준을 측정하는 제제는 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것인 조성물일 수 있다.
- [0017] 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.
- [0018] 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.
- [0019] 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.
- [0020] 일 구체예에 있어서, 상기 임신중독증은 만성 고혈압, 임신성 고혈압, 전자간증, 자간증 또는 복합 자간전증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것인 조성물일 수 있다.
- [0021] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 임신중독증 진단용 조성물 키트를 제공한다.
- [0022] 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.
- [0023] 또 다른 양상은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC, HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0024] (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.
- [0025] 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.
- [0026] 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.
- [0027] 용어, “대조군”은 임신중독증 환자가 아닌 개체를 의미할 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 증가된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 (b)단계에서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우, 임신중독증으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것인, 임신중독증 진단을 위한 정보제공방법일 수 있다.
- [0030] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 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 정보제공방법일 수 있다.

[0031] 일 실시예에 따르면, 상기 임신중독증이 진단되는 개체는 생물학적 시료로부터 측정된 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC의 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준이 대조군에 비하여 유의하게 높게 나타난다.

[0032] 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.

발명의 효과

[0034] 임신중독증 진단용 조성물, 키트, 이를 이용한 임신중독증 진단방법 및 진단에 필요한 정보를 얻는 방법에 따르면, 개체의 임신중독증을 정확하고 민감하게 진단하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 임신중독증에 해당되는 개체에서 15종의 단백질인 ANXA3, A2M, APOB, PZP, FETUB, FN1, LCN2, APOM, QSOX1, TGOLN2, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG, TNC의 발현이 상향 조절된 것을 나타낸 결과이다.

도 2는 임신중독증에 해당되는 개체에서 6종의 단백질인 HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4, VWF의 발현이 상향 조절된 것을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0039] 실시예 1: 환자의 혈액 시료에서의 단백질 분리 및 펩티드화

[0040] 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 전과정을 태아와 산모 모두에게 임상적 특이증상 없이 말기에 정상적으로 분만한 산모 29명을 정상군으로 선정하였다.

[0041] 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.

[0042] 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.

[0043] 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 6M 유레아 버퍼(Urea buffer, 0.1M DTT, 50mM ABC)를 넣어주고 1시간 동안 배양(37 $^{\circ}$ C) 하였다. 상기 50 μ l의 샘플에 5 μ l의 0.5M IAA를 처리한 후, 암실에서 30분간 반응하였다. 반응 후, 50mM ABC 400 μ l를 이용하여 유레아 농도를 1M 이하로 만들어 준 후, 트립신 2 μ g를 넣고 12시간 동안 배양(37 $^{\circ}$ C) 하였다. Incubation 후, 반응에 사용된 염 제거 및 펩타이드만을 확보하기 위해 pierce c-18 spin

columns(P/N: 89870, Theromo)를 이용하여 염을 제거하였다.

[0045] **실시예 2: MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 사용한 바이오마커의 확인**

[0046] 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.

[0047] 1. 메티오닌(Methionine, M) 및 히스티딘(Histidine, H) 포함 펩타이드 제외

[0048] 2. Miscleavage가 포함된 펩타이드 제외

[0049] 3. Protein(P) 앞 시퀀스가 R(Arginine) 또는 K(Lysine)을 가지는 펩타이드 제외

[0050] 4. 펩티드 길이(Pepetide Legnth) $5 < x < 20$

[0051] 선정된 후보 Transition을 이용하여 1차 타겟 선별을 진행하고 transition의 적합성을 확인하였다. Transition의 확인 조건은 다음과 같다.

[0052] 1. 같은 Precursor ion에서 파생되는 3 종의 Fragment ion이 동일한 용출 시간을 가지는지 여부

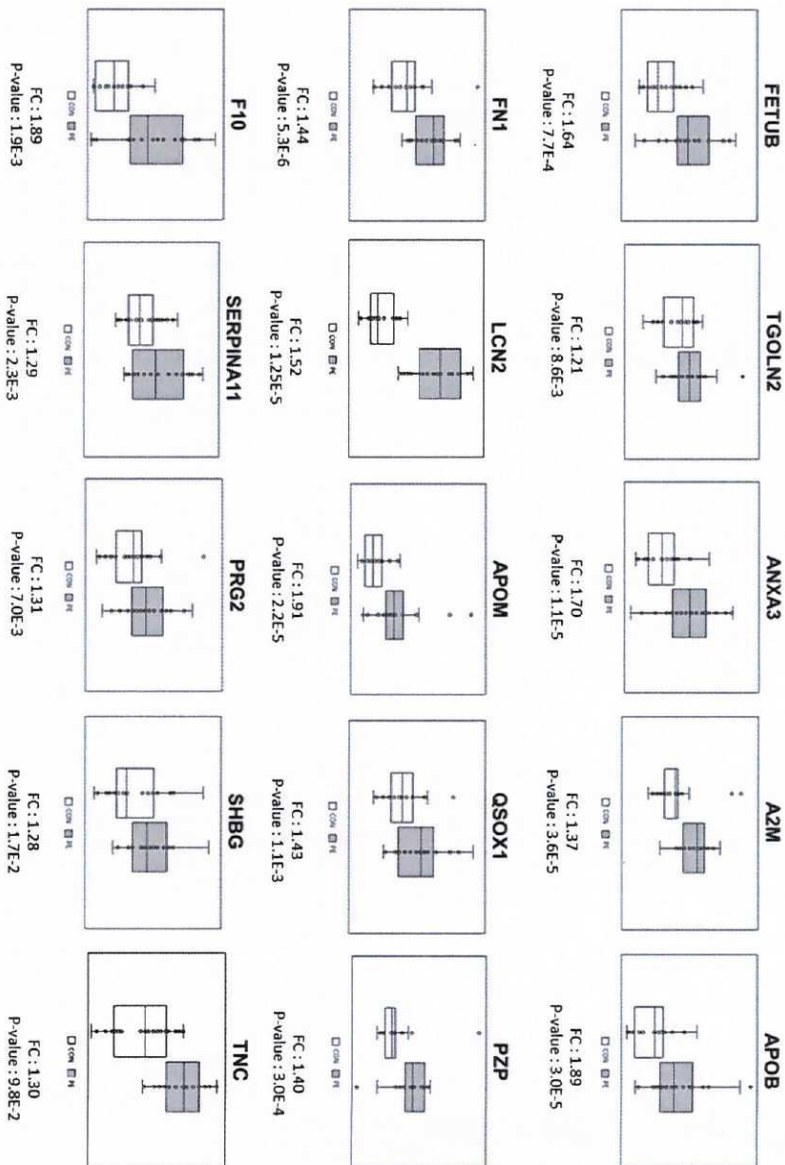
[0053] 2. 3회 이상의 반복 실험을 통해 동일한 Retention Time(RT)를 가지는지 여부

[0054] 3. LOQ(Limit of Quantification)의 조건에 부합하는 S/N(Signa to Noise) > 10을 만족하는지 여부

[0055] MRM 분석 결과는 하기의 과정을 통하여 얻어졌다. 상기 조건에 만족하는 Transition을 선정한 후, 준비된 펩타이드 시료를 이용하여 개별 MRM분석하였다. 도 1 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, F10, 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, F10, SERPINA11, PRG2, SHBG 및 TNC)이며 6종의 단백질은 유의미한 감소를 보인 단백질(HBD, AGT, CP, HEXB, SERPINA4 및 VWF)이다.

도면

도면1



도면2

