

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 6월 18일 (18.06.2020) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2020/122406 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/013765
- (22) 국제출원일: 2019년 10월 18일 (18.10.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0162413 2018년 12월 14일 (14.12.2018) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06591 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 양철우 (YANG, Chul-Woo); 06547 서울시 서초구 반포대로 275, 118동 603호, Seoul (KR). 정병하 (CHUNG, Byung-Ha); 06668 서울시 서초구 명달로 20

길 39, 601호, Seoul (KR). 김경운 (KIM, Kyoung-Woon); 05267 서울시 강동구 고덕로 210, 508동 505호, Seoul (KR). 고은정 (KO, Eun Jeong); 04154 서울시 마포구 독막로42길 2, 109동 1401호, Seoul (KR). 김보미 (KIM, Bo-Mi); 08759 서울시 관악구 신림동5나길 42, 201호, Seoul (KR).

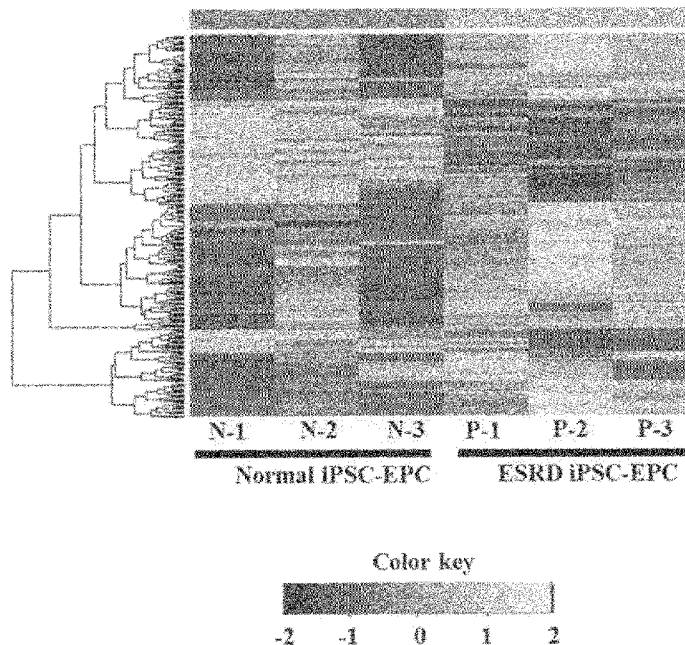
(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

(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, 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR DETECTING CARDIOVASCULAR DISEASES, AND KIT COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 심혈관계 질환의 검출용 조성물 및 이를 포함하는 키트

【도 4a】



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for predicting the onset or prognosis of cardiovascular diseases in a renal failure patient, especially, in an end-stage renal failure patient, by discovering a cardiovascular disease-associated gene marker specific to a renal failure patient, and a kit comprising same. By using, in a renal failure patient at high risk of cardiovascular diseases, a composition or a kit using a gene marker, provided in the present invention, the onset of cardiovascular diseases or prognosis in the early stages of cardiovascular diseases can be predicted, and appropriate therapy or treatment is possible before entering a stage of irreversible disease such as atherosclerosis.

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (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))

(57) 요약서: 본 발명은 신부전 환자 특이적 심혈관계 질환 관련 유전자 마커를 발굴함으로써 신부전 환자, 특히 말기 신부전증 환자의 심혈관계 질환 발병 또는 예후를 예측하기 위한 조성물과 이를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 유전자 마커를 이용한 조성물 또는 키트를 이용해서 심혈관계 질환의 위험이 높은 신부전 환자에게서 심혈관계 질환의 발병을 예측하거나 심혈관계 질환의 조기 발병 단계에서의 예후를 예측할 수 있으며, 비가역적인 동맥경화증과 같은 질환의 단계로 진입하기 전에 적절한 치료 또는 처치가 가능하다.

【명세서】

【발명의 명칭】

심혈관계 질환의 검출용 조성물 및 이를 포함하는 키트

【기술분야】

- 5 본 발명은 심혈관계 질환을 검출하는 바이오마커, 상기 바이오마커를 이용한 심혈관계 질환의 검출용 조성물 또는 키트, 및 상기 바이오마커를 이용하여 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

- 10 신장은 체내에서 대사되어 혈액 속에 존재하는 다양한 물질들을 배출하는 장기로서, 혈액을 사구체 여과, 신세뇨관 흡수 및 재흡수 과정을 통하여 여과함으로써 체내의 불필요한 물질들을 뇨(尿)의 형태로 배출한다. 신장 무게는 몸무게의 0.5%에 불과하지만, 신장으로 흐르는 혈액량은 총 심박출량의 20-25%에 달하므로 혈액에 포함되어 있는 각종 독성물질(toxic xenobiotics)로 인해 손상 받기 쉽다. 예를 들어, 체내에 과다한 약물을
- 15 주사하거나 각종 질환이 발생할 경우 신장이 손상될 수 있는데, 신장이 손상되면 체내에 존재하는 불필요한 물질이 배출되지 않아, 추가적인 신체손상이 발생하게 된다.

- 신부전은 신장의 혈류장애, 기능 네프론의 감소, 요로 폐색 등에
- 20 의해 질소 대사물이나 물, 전해질의 배설이 충분히 행해지지 않게 되어 체액의 양적, 질적 항상성을 유지할 수 없게 된 상태를 말한다. 신부전은 경과가 가역적인 급성 신부전, 신손상이 비가역적인 만성 신부전으로 나뉘며, 특히 신대체요법이 필요한 경우, 신부전으로 진단된다.

- 국내 말기 신장 질환 환자 수는 매년 5% 정도의 빠른 증가율을
- 25 보이고 있으며, 합병증에 의한 심혈관계 질환은 투석환자를 포함한 만성신부전 환자에서 가장 흔한 사망 원인으로 (American Journal of Kidney Diseases, 32 (Suppl 1):S81-S88, 1998), 이들 환자에서 심혈관계 질환에 의한 사망률은 정상인에 비해 20-30배 정도 높은 것으로 보고되고 있다 (American Journal of Kidney Diseases, 32 (Suppl 3):S112-S119,
- 30 1998). 따라서 말기 신부전증 환자에서 심혈관계 질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 위험 인자에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

한편, 혈관내피세포는 혈관벽을 안쪽에서 둘러싸고 있는 장벽으로서의 기능뿐 아니라 혈관의 긴장도 조절, 혈관의 구조 유지, 혈관벽과 접촉하는 혈액 성분들과 상호작용하는 기능을 포함하는 생리적으로 중요한 역할을 담당하는 내분비 기관으로 알려져 왔다 (Nature 5 362:801-809, 1993). 혈관내피세포의 기능이상은 동맥경화증 발생에서 가장 초기 단계에 관찰되는 과정으로, 비가역적 변화인 동맥경화증과는 달리 회복이 가능한 가역적인 변화이므로, 이 단계에서의 진단과 치료가 가능하다면 신부전 환자의 심혈관계 질환의 예후 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

10

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 심혈관계 질환을 검출하는 바이오마커, 상기 바이오마커를 이용한 심혈관계 질환의 검출용 조성물 또는 키트, 및 상기 15 바이오마커를 이용하여 심혈관계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 시험 대상(subject)에서 배출 또는 얻은 생물학적 시료에 대해, 상기 바이오마커 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하여 대상의 심혈관계 질환의 발병 20 예측 또는 진단하는 단계, 및 상기 심혈관계 질환을 갖는 것으로 예측 또는 진단된 대상에게 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 약물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환의 진단 및 치료방법에 관한 것이다.

상기 대상은 신부전증 환자일 수 있다. 상기 예측 또는 진단단계는, 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준을, 정상 대조군과 시험 대상 25 시료에서 비교하여, 대상의 심혈관계 질환 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

【기술적 해결방법】

30 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 말초혈액에서 유래된 단핵구세포를 이용하여 유도만능줄기세포를 유도하고, 상기

유도만능줄기세포에서 유래된 혈관내피세포 특이적 발현 양상을 나타내는 바이오마커를 발굴하여, 상기 바이오마커를 이용하여 심혈관계 질환의 검출, 진단 또는 예후 예측을 수행할 수 있다.

본 발명은 신부전 환자에 특이적 마커의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 상기 심혈관계 질환 예후 예측용 조성물을 포함하는 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 키트를 제공한다.

본 발명은 또한 시료로부터 신부전 환자 특이적 유전자 마커의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 정상 대조군의 발현 수준과 비교하는 단계; 상기 발현 수준이 T1H(metallothionein 1H) 유전자, NLRP7(NLR family, pyrin domain containing 7) 유전자, MIR302C(microRNA 302c) 유전자, DPPA3(developmental pluripotency associated 3) 유전자, MT1G(metallothionein 1G) 유전자, ESRG(embryonic stem cell related (non-protein coding)) 유전자, L1TD1(LINE-1 type transposase domain containing 1) 유전자, SLC7A3(solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y⁺ system), member 3) 유전자, ZNF729(zinc finger protein 728) 유전자 및 PRDM14(PR domain containing 14) 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 수준이 정상 대조군보다 높게 나타나는 경우 및/또는 CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 수준이 정상 대조군보다 낮게 나타나는 경우에 해당하는 경우, 상기 개체의 심혈관계 질환의 발생 또는 악화 가능성이 높은 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

본 발명에서 사용되는 용어 "예후"는 심혈관계 질환을 비롯한 질병의, 예를 들어 발병을 비롯한 심혈관계 질환 기인성 사망 또는 진행의 가능성 등의 병의 경과 및 완치 여부를 의미한다. 본 발명의 목적상 "예후가 나빠진다"는 의미는 예를 들어, 신부전을 비롯한 신장질환의 진단 후

합병증으로서 심혈관계질환의 발병, 심혈관계 질환의 진행으로 인한 심혈관 기능의 저하, 심혈관계질환으로 인한 사망 가능성의 증가일 수 있다.

본 발명의 명세서에서 기재된 "정상"또는 "정상인"이란 말기 신장 질환을 비롯한 신장 질환을 가지지 않은, 건강한 신장을 가진 개체를 의미한다.

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

본 발명은 심혈관계 질환 특이적 유전자 마커의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 바이오마커는 MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자, PRDM14 유전자, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자일 수 있다.

본 발명의 일 실시예에서, 말기 신장질환 (ESRD) 환자의 단핵구를 분리하여 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPS)를 제작하여 그로부터 역분화줄기세포 유래 혈관내피세포(iPS-ECs)를 제작하였다. 상기 iPS-EC는 정상인 유래 iPS-EC에 비해 관 형성 면적(tube formation area)이 80% 이상 감소하였다 (실시예 3). 이는 말기 신장질환 환자의 혈관 생성능이 정상인에 비해 저해되어 있음을 의미한다.

상기 iPS-EC 중 CD31 양성 세포를 선별하여 이에 대해 RNA 마이크로어레이 분석을 수행하여, 말기 신장질환 환자 유래 iPS-EC와 정상인 유래 iPS-EC의 유전자 발현 양상을 비교한 결과, 환자 샘플에서 유전자 발현이 1.5배 이상 증가한 유전자 148개, 유전자 발현이 1.5배 이상 감소한 유전자 78개가 동정되었다. 그 중 발현이 증가한 유전자 상위 10개는 MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자, 및 PRDM14 유전자로 나타났다. 발현이 감소한 유전자 상위 10개는 CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자,

IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자였다. 상기 발현이 증가한 유전자는 염증 또는 산화 스트레스 관련 유전자와 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자로 나타났으며, 발현량이 감소한 유전자는 혈관 발달과 세포막의 세포외
 5 기질(Extracellular matrix, ECM) 성분 관련 유전자, 혈관 내피세포 및 세포 이동과 관련된 유전자로 나타났다.

상기 발현이 증가 또는 감소한 20개의 유전자는 혈관 형성능이 정상인에 비해 80% 감소한 말기 신장질환 특이적 발현을 나타내, 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 유전자 마커로 사용될 수 있다.

10 말기신장질환 환자는 정상인과 비교해 임상적으로 혈관내피세포 기능이상이 가장 특징적인데 그에 관한 연구로 정상인과 말기신장질환에서 혈액단핵세포 iPS유래 혈관내피세포로의 분화능과 혈관형성이 정상인에 비해 감소되어있으며 그 원인이 유전자 분석한 결과 혈관 발달과 세포막의 extracellular matrix (ECM) 성분, 세포이동과 관련된 유전자 감소, 염증
 15 (inflammation)이나 산화스트레스 (oxidative stress), 혈관 내피세포의 이동과 증식억제 관련 유전자는 증가되어 있어서 임을 확인한 결과이다. 결국, 혈관형성에 중요한 유전자들이 말기신장질환 환자의 iPS 유래 혈관내피세포에서 감소되어있고 염증이거나 산화스트레스 관련 유전자는 증가되어 기능이상이 발생하는 것이다.

20 본 발명에 따른 바이오마커는 혈관내피세포의 기능 이상을 검출하는 바이오마커일 수 있으며, 즉, 심혈관계 질환의 탐지용, 더욱 자세하게는 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환의 탐지용으로 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능 이상을 검출하는 바이오마커는, 혈관 내피세포의 혈관 발달과 세포외 기질 성분과 관련된 유전자 또는 이의
 25 단편이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서 감소하는 것일 수 있다. 상기 바이오마커의 예는, COL12A1 (collagen, type XII, alpha 1), PCDH10 (protocadherin 10), VTN (vitronectin), CALB2 (calbindin 2), ITGA11 (integrin alpha 11), EFEMP1 (EGF containing fibulin-like
 30 extracellular matrix protein 1), PCDHB14 (protocadherin beta 14), FBN1 (fibrillin 1), CDH5 (cadherin 5, type 2 (vascular endothelium), FBLN5

(fibulin 5) 및 FBN2 (fibrillin 2)을 포함한다. 상기 바이오마커는, 정상 iPS-EC에 비해 발현량의 감소 배수가, 1.5배 이상(Fold change 1.5 이상) 감소한 유전자, 바람직하게는 2.0배 감소, 2.5배 감소, 3.0배 감소, 4.0배 감소 또는 4.5배 감소한 유전자일 수 있으며, 하기 표 1에 구체적 사항을 기재하였다.

【표 1】

	Gene Accession	Gene Symbol	Gene description
1	NM_001293298	CEMIP	cell migration inducing protein, hyaluronan binding
2	NM_004370	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1
3	XR_171398	LOC151760	putative uncharacterized protein LOC151760
4	NM_000550	TYRP1	tyrosinase-related protein 1
5	NM_001313972	TXNIP	thioredoxin interacting protein
6	NM_001243211	IL18	interleukin 18
7	NM_020815	PCDH10	protocadherin 10
8	NM_001001557	GDF6	growth differentiation factor 6
9	NR_033957	LINC00842	long intergenic non-protein coding RNA 842
10	NM_002009	FGF7	fibroblast growth factor 7

본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커는, 혈관내피 세포 및 세포이동과 관련된 유전자 또는 이의 단편이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서 감소하는 것일 수 있다. 상기 바이오마커의 예는, EDN1, ANGPT2 (angiopoietin 2), MXRA5 (matrix-remodelling associated 5), MME (membrane metallo-endopeptidase), CEMIP (Cell Migration Inducing Hyaluronan Binding Protein)을 포함한다.

본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커는, 혈관내피 세포의 염증 (inflammation)이나 산화스트레스 (oxidative

stress)와 관련된 유전자 또는 이의 단편이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서 증가하는 것일 수 있다. 상기 바이오마커의 예는

5 MT1H (metallothionein 1H) , MT1G(metallothionein 1G), NLRP7(NLR family, pyrin domain containing 7), NLRP2 (NLR family, pyrin domain containing 2), SOX2 (SRY box 2), IFIT1(interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1), IFIT2 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2), IFIT3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3), CXCL10(chemokine (C-X-C motif) ligand

10 10), IFI6(interferon, alpha-inducible protein 6), IFIH1(interferon induced, with helicase C domain 1), IFI44(interferon-induced protein 44), FOXI3 (forkhead box I3) and IFI44L (interferon-induced protein 44-like)을 포함한다. 정상 iPS-EC에 비해 발현량의 증가 배수가, 1.5배 이상(Fold change 1.5 이상), 바람직하게는 2.0배 증가, 5.0 배 증가,

15 7.0배 증가, 9.0배 증가, 10배 증가 또는 11.0배 증가한 유전자일 수 있으며, 하기 표 2에 구체적 사항을 기재하였다.

【표 2】

	Gene Accession	Gene Symbol	Gene description
1	NM_005951	MT1H	metallothionein 1H
2	NM_001127255	NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7
3	NM_029858	MIR302C	microRNA 302c
4	NM_199286	DPPA3	developmental pluripotency associated 3
5	NM_001301267	MT1G	metallothionein 1G
6	NM_027122	ESRG	embryonic stem cell related (non-protein coding)
7	NM_001164835	L1TD1	LINE-1 type transposase domain containing 1
8	NM_001048164	SLC7A3	solute carrier family 7 (cationic

			amino acid transporter, y ⁺ system), member 3
9	NM_001242680	ZNF729	zinc finger protein 728
10	NM_024504	PRDM14	PR domain containing 14

본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커는, 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자 또는 이의 단편이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장
5 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서 증가하는 것일 수 있다. 상기 바이오마커의 예는 MIR302C, MIR302B, MIR302D 및 MIR302A를 포함한다.

본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커는, 시험 대상과 정상 대조군의 시료에서 측정된 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 구별이 되어야 하며, 이를 구별하는 기준으로서 cut-
10 off 수치는 말기신장질환 환자의 iPS 유래 혈관내피세포(n=3)에서 정상인의 iPS 유래 혈관내피세포(n=3)와 비교하여, $p < 0.05$ 이하이면서 유전자 ratio값이 1.5이상, 더욱 바람직하게는 5이상으로 증가하는 것일 수 있다.

상기 바이오마커는 예를 들어 MT1H(metallothionein 1H), NLRP7(NLR family, pyrin domain containing 7), MIR302C(microRNA 302c),
15 DPPA3(developmental pluripotency associated 3), MT1G(metallothionein 1G), ESRG(embryonic stem cell related (non-protein coding)), L1TD1(LINE-1 type transposase domain containing 1), SLC7A3(solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y⁺ system), ZNF729(zinc finger protein 729), PRDM14(PR domain containing 14),
20 LIN28A(lin-28 homolog A (C. elegans)), SLC04C1(solute carrier organic anion transporter family, member 4C1), TUBB4A(tubulin, beta 4A class Iva), GDF3(growth differentiation factor 3), HRASLS5(HRAS-like suppressor family, member 5), DNMT3L(DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like), ERVH48-1(endogenous retrovirus group 48, member 1), ESRP1(epithelial splicing regulatory protein 1),
25 NTS(neurotensin), EPCAM(epithelial cell adhesion molecule),

HIST1H1A(histone cluster 1, H1a), HERC5(HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5), GLDC(glycine dehydrogenase (decarboxylating)), SCGB3A2(secretoglobin, family 3A, member 2), POU5F1P3(POU class 5 homeobox 1 pseudogene 3), TRIM71(tripartite motif
 5 containing 71, E3 ubiquitin protein ligase), ZNF208(zinc finger protein 208), ZFP42(ZFP42 zinc finger protein), RNF125(ring finger protein 125, E3 ubiquitin protein ligase), APELA(apelin receptor early endogenous ligand), DPPA4(developmental pluripotency associated 4), ZNF257(zinc finger protein 257), CDH1(cadherin 1, type),
 10 MIR302B(microRNA 302b), CALB1 (calbindin 1), SOX2(SRY box 2), 및 MIR302D(microRNA 302d)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함한다.

또한, 본 발명에 따른 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커는, 시험 대상과 정상 대조군의 시료에서 측정된 바이오마커의
 15 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 구별 되어야 하며, 이를 구별하는 기준으로서 cut-off 수치는 말기 신장질환 환자의 iPS 유래 혈관내피세포(n=3)에서 정상인의 IPS 유래 혈관내피세포(n=3)와 비교하여, $p < 0.05$ 이하이면서 유전자 ratio값이 -1.5이하, 바람직하게는 -11.9 이하까지 감소하는 것으로 결정할 수 있다. 상기 바이오마커는 예를들어
 20 CEMIP(cell migration inducing protein, hyaluronan binding), COL12A1(collagen, type XII, alpha 1), TYRP1(tyrosinase-related protein 1), TXNIP(thioredoxin interacting protein), IL18 (interleukin 18), PCDH10(protocadherin 10), 및 GDF6(growth differentiation factor 6)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함한다.

25

본 발명의 일 예에서 상기 심혈관계 질환 특이적 유전자 마커의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 각 유전자에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머쌍 또는 프로브일 수 있으며, 상기 각 마커 유전자의 염기서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을
 30 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 고안할 수 있다.

본 발명의 일 예에서 상기 심혈관계 질환 특이적 마커 유전자에 의해

코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 각 마커 유전자로부터 발현되는 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머일 수 있다.

본 발명의 일 예에서 상기 신부전 환자는 급성 신부전 환자, 만성 신부전 환자 또는 말기 신부전 환자일 수 있으며, 바람직하게는 말기 신부전 환자일 수 있다.

심혈관계 질환은 투석환자를 포함한 말기신장질환 환자에서 가장 흔한 사망 원인으로, 이들 환자에서 심혈관계 질환에 의한 사망률은 정상인에 비해 20-30배 정도 높은 것으로 보고되고 있다. 혈관내피세포의 기능이상은 동맥경화증, 고혈압, 심부전 등의 심혈관계 질환의 발생에 공통적으로 관여하는 중요한 초기 변화로 간주된다. 혈관내피세포는 혈관벽을 안쪽에서 둘러싸고 있는 장벽으로서의 기능뿐 아니라 혈관의 긴장도 조절, 혈관의 구조 유지, 혈관벽과 접촉하는 혈액 성분들과 상호작용하는 기능을 포함하는 생리적으로 중요한 역할을 담당하는 내분비 기관으로 알려져 왔다. 혈관내피세포의 기능이상은 동맥경화증 발생에서 가장 초기 단계에 관찰되는 과정으로, 비가역적 변화인 동맥경화증과는 달리 회복이 가능한 가역적인 변화이므로, 이 단계에서의 진단과 치료가 가능하다면 말기신장질환 환자의 심혈관계 질환의 예후 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

본 발명의 일 예에서 상기 심혈관계 질환은 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화증, 협심증, 및 심부전으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

본 발명의 일 예는, 상기 조성물을 포함하는, 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 신부전 환자 특이적 마커 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 신부전 환자에서의 심혈관계 질환 예후를 예측할 수 있다.

본 발명이 제공하는 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 예측용 키트는 상기 조성물 외에도 분석에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

일 예로, 본 발명에서 제공하는 키트는 RT-PCR을 수행하는 데 요구되는 필수요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른

적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

일 예로, 본 발명에서 제공하는 키트는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 5 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드 프로브를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 본 발명에 따른 신부전 환자의 심혈관계 질환 예후 마커 유전자의 염기서열에 특이적인 프로브를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이의 구성을 포함한다.

일 예로, 본 발명에서 제공하는 키트는 단백질 칩 키트일 수 있다. 10 상기 단백질 칩은 상기 마커 유전자로부터 코딩된 단백질의 발현 수준을 측정하기 위해 면역학적 검출을 위해 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광 물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다.

본 발명은 또한 시험 대상 시료에서 상기 신부전 환자 특이적 마커 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 15 측정하는 단계를 포함하는, 신부전증 환자에서 심혈관계 질환의 예후를 예측하는 데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 시험 대상(subject)에서 배출 또는 얻은 생물학적 시료, 예를 들면 혈액, 혈장, 혈관내피세포 등에 대해 신부전 환자의 심혈관계 질환 특이적 마커 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 20 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하여 대상의 심혈관계 질환의 발병 예측 또는 진단하는 단계, 및 상기 심혈관계 질환을 갖는 것으로 예측 또는 진단된 대상에게 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 약물을 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환의 진단 및 치료방법에 관한 것이다. 상기 대상은 신부전증 환자일 수 있다. 상기 예측 또는 진단단계는, 바이오마커의 mRNA 25 또는 단백질 발현 수준을, 정상 대조군과 시험 대상 시료에서 비교하여, 대상의 심혈관계 질환 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

상기 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 약물은, 만성정맥폐색증, 원발성 고혈압 등에 쓰이는 약 Beraprost (Prostacyclin analog) 일 수 있으며, 바람직하게는 만성신부전 환자들에게서 쓰는 약 중에 endothelial 30 dysfunction 에 효과가 있다고 알려진 약인 ACE inhibitor (captopril, ramipril 등), beta-blocker (nebivolol 등), statin 계열 (atorvastatin,

pravastatin 등), PDE5 inhibitor (viagra 등)일 수 있다.

질병의 투약 단계는 만성신부전 (Chronic kidney disease)를 진단받은 1~5 단계 중 어느 단계에서도 가능하나. 보통 3단계 이후 (3, 4, 5단계)부터 약물치료를 하게 되기 때문에, 넓게는 CKD 1-5단계, 집중해서는 3~5단계로 포함될 수 있다.

본 발명에 따른 신부전증 환자의 심혈관계 질환의 예후를 예측하는 데 필요한 정보를 제공하는 방법은,

정상 대조군과 시험 대상에서 분리된 시료로부터, MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자, PRDM14 유전자, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준을, 정상 대조군과 시험 대상 시료에서 비교하는 단계를 포함하는 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

상기 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법은, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 혈관 발달과 세포의 기질 성분과 관련된 유전자, 또는 혈관내피 세포 또는 세포 이동과 관련된 유전자이며, 상기 시험 대상 시료에서 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료에 비해 낮은 경우, 상기 시험 대상은 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 정상 대조군에 비해 심혈관계 질환 대상에서 발현 수준이 감소하는 바이오마커는, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

또는, 상기 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법은, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 염증 또는

산화 스트레스와 관련된 유전자, 또는 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자이며, 상기 시험 대상 시료에서 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료에 비해 높은 경우, 상기 시험 대상은 신장 질환 관련 심혈관계 질환을 갖는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 정상 대조군에 비해 심혈관계 질환 대상에서 발현 수준이 증가하는 바이오마커는, MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자 및 PRDM14 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

10 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계는 당업계에 mRNA의 발현 수준을 측정하는 방법으로 알려진 것이면 제한 없이 선택하여 사용될 수 있으며, 예를 들어, 역전사효소중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 마이크로어레이 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나
15 이상의 분석법에 의해 수행될 수 있다.

 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 당업계에 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법으로 알려진 것이면 제한 없이 선택하여 사용될 수 있으며, 예를 들어, 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트
20 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정 분석, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 분석법에 의해 수행될 수 있다.

【발명의 효과】

25 본 발명이 제공하는 신부전 환자 특이적 마커 유전자에 기초하여 상기 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 분석하여 신장 질환 환자의 심혈관계 질환의 발병 예측 또는 조기 진단이 가능하며, 신부전 환자의 생존률을 향상시킬 수 있다.

30 【도면의 간단한 설명】

 도 1a는 정상인 유래 iPS 및 ESRD 환자 유래 iPS 현미경 사진이다.

도 1b는 정상인 유래 iPS 및 ESRD 환자 유래 iPS의 면역형광 염색 결과를 형광 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 1c는 유도줄기세포 특이적 마커인 NANOG, SSEA-4 및 TRA-1-81의 형광 신호를 그래프로 나타낸 것이다.

5 도 1d는 정상인 유래 또는 ESRD 환자 유래의 iPS에 대한 AP 염색을 수행한 결과를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 2a는 iPS로부터 혈관내피세포를 유도하는 실험 과정을 간략히 나타낸 것이다.

10 도 2b는 정상 또는 ESRD 환자 유래의 iPS-EC의 혈관내피세포 특이적 마커들에 대한 면역염색 수행 결과를 나타낸 사진이다.

도 2c는 iPS-EC 유도 후 FACS를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 정상인 유래 iPS-EC 및 ESRD 환자 유래 iPS-EC에 대한 혈관 형성 분석(tube formation assay) 결과를 나타낸 사진이다.

15 도 4a는 정상 유래 iPS 샘플 3종(N-1 내지 N-3) 및 ESRD 환자 유래 iPS-EC 3종(P-1 내지 P-3)에 대한 RNA 마이크로 어레이 결과 mRNA 양 차이(fold change)를 나타낸 히트맵이다.

도 4b는 정상인 유래 iPS-EC에서의 발현량을 x축으로, ESRD 환자 유래 iPS-EC에서의 발현량을 y축으로 두고 각 유전자의 발현량을 나타낸 산포도이다.

20

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 권리범위를 제한하지 않는다.

25 실시예 1. 역분화줄기세포(iPS)의 제작

1-1. 단핵세포로부터 iPS의 제조

정상인 및 말기 신장질환(ESRD) 환자의 혈액은 기관 IRB를 승인받아 질환이 없는 정상인 기부자와 말기 신장 질환으로 진단받은 환자로부터 얻어 사용되었다. 혈액을 2,000rpm, 30분간 Ficoll Paque™ PLUS (GE
30 Healthcare)를 사용하여 원심 분리하여 단핵세포를 분리하였다.

분리된 정상인과 ESRD환자의 단핵세포는 StemSpan cc110이 보충된

StemSpan™ ACF (Stem Cell Technologies)에서 4 일 동안 배양되었다. 이후, 단핵구 세포를 24-well plate에 vitronectin으로 코팅후 (BD BioCoat™) 및 Sendai virus (SeV) (CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit, Life Technologies, Invitrogen)를 통해 역분화줄기세포 (iPS)를 제조하였다.

5 배지는 iPS 콜로니가 형성 될 때까지 매일 바꾸었다. 수동 피킹 후, iPS 라인은 TeSR-E8 배지 (Stem Cell Technologies)에서 vitronectin (Life Technologies, Invitrogen)으로 코팅 된 플레이트에서 유지되었다. 형질 도입 후 12 일에 신생 iPS 콜로니를 개별적으로 골라 특성화를 위해 확대시켰다. 형질 도입 후 3 일부터 21 일까지 세포를 37℃, 5% CO₂

10 조건에서 배양하였다.

1-2. iPS의 줄기세포 콜로니의 형성 특성 확인

상기 실시예 1-1에서 얻어진 iPS를 현미경으로 50배 확대하여 세포 모양을 관찰한 결과를 도 1a에 나타냈다.

15 도 1a에 나타낸 바와 같이, 말기 신장질환 환자(ESRD) 유래 iPS 및 정상 혈액으로부터 얻은 iPS 모두에서 줄기세포 콜로니가 나타남을 확인할 수 있었다.

1-3. iPS의 iPS 마커 발현 확인

20 정상 iPS 및 ESRD iPS에 대해서, 각각 iPS 마커로 알려져 있는 NANOG, SSEA-4 및 TRA-1-81에 대해 면역 형광 염색은 구체적으로, iPS를 플라스틱 커버 슬라이드 챔버에서 성장시키고 4 %(w/v) 파라 포름 알데히드로 고정시켰다. 면역형광염색을 위해 다음 항체를 사용하였다: NANOG (1E6C4, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology), 단계 특이성 배아 항원 SSEA-4 (813-70, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology) TRA-1-81 (TRA- 80, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology). 염색된 슬라이드를 200 배 및 400 배 배율로

25 Zeiss 현미경 (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 시각화하는 방법으로 수행하였다.

또한, 도 1d의 결과는 배양 5 일 후, 제조자의 지시에 따라 정상 iPS

30 및 ESRD iPS에 대해서 Alkaline Phosphatase Detection Kit (Merck-Millipore)를 사용하여 Alkaline Phosphatase 효소 활성화에 대해 분석하여

수행하였다.

정상 iPS 및 ESRD iPS에 대해서, 각각 iPS 마커로 알려져 있는 NANOG, SSEA-4 및 TRA-1-81에 대해 면역 형광 염색을 수행한 결과를 도 1b 및 1c
5 에 나타내었다. 정상 iPS 및 ESRD iPS 모두에서 iPS 마커인 NANOG, SSEA-4, 및 TRA-1-81이 발현되는 것을 확인하였다 (도 1b, 1c).

1-4. iPS의 다세포 분화능 확인

정상 및 말기 신장질환 환자의 iPS가 다세포 분화능을 가지는 지
10 여부를 확인하기 위해 AP 염색(alkaline phosphatase staining)을 진행하였다. 구체적으로 정상 iPS 및 ESRD iPS에 대해서 Alkaline Phosphatase Detection Kit (Merck-Millipore)를 사용하여 Alkaline Phosphatase 효소 활성화에 대해 분석하여 AP염색을 수행하였다.

상기 두 가지 iPS의 AP 염색 결과를 도 1d에 나타내었다. 정상 iPS와
15 ESRD iPS 모두에서 강하게 염색되어 다분화능을 가짐을 확인할 수 있다(도 1d).

실시에 2. iPS 유래 혈관내피세포 (Induced Pluripotent Stem Cells derived Endothelial Cells; iPS-ECs) 제작

2-1 iPS-EC의 제작

실시에 1-1에서 제작된 iPS로부터 혈관내피세포(EC)를 도 2a에
나타낸 방법으로 제작하였다. 구체적으로, 실시에 1-1에서 제작된 iPS에 VEGF-A 50ng/ml, BMP4 50ng/ml가 되도록 첨가하여, 배상체(Embryoid body, EB)를 생성하였고, 4일 후 VEGF-A 50ng/ml 첨가 배지에서 배상체를
25 증식시킨 후 hiPS-Endothelial cells (iPS-ECs)의 생성을 위해, VEGF-A의 존재하에 젤라틴 코팅 접시에 4 일째 배상체(Embryoid body, EB)를 부착하였다. 14일까지 젤라틴 코팅 접시에서 키운 후 혈관내피세포 특이적 마커인 CD31 항체가 붙은 microbead를 이용하여 혈관내피세포만을 분리후 확인하였다.

30

2-2 iPS-EC의 혈관내피세포 특이적 마커 발현 확인

실시에 2-1에서 제작된 iPS-EC의 특성을 확인하기 위해, 혈관내피세포 마커인 CD31, CD34, CD133, vWF, Flk, 및 Flt의 면역형광염색을 수행하여 공초점 현미경(confocal microscopy)을 이용해 관찰한 결과를 도 2b에 나타내었다. 도 2b는 정상 또는 ESRD 환자 유래의 iPS-EC의 혈관내피세포 특이적 마커들에 대한 면역염색 수행 결과를 나타낸 사진이다.

구체적으로, 면역형광염색 및 공초점 현미경 관찰은, 정상인과 ESRD iPS-EC를 플라스틱 커버 슬라이드 챔버에서 성장시키고 4 %(w/v) 파라 포름 알데히드로 고정시켰다. 면역형광염색을 위해 다음 항체를 사용하였다:

CD31 (WM-59 (WM59), eBioscience); CD34 (4H11, eBioscience); CD133 (TMP4, eBioscience); vWF (sc-53466, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology); Flk (sc-6251, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology); Flt (sc-271789, 1 : 100, Santa Cruz Biotechnology). Alexa Fluor 488- 또는 647- 접합 streptavidin (Molecular Probes)을 제조자의 지시에 따라 사용하였다. 염색된 슬라이드를 200 배 및 400 배 배율로 Zeiss 현미경 (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 시각화하는 방법으로 수행하였다.

2-3 iPS-EC의 혈관내피세포 분화능 분석

도 2c는 iPS-EC 유도 후 FACS를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. ESRD 샘플이, 정상 샘플에 비해 형광 신호가 크게 약해지는 현상이 나타나, ESRD 환자 유래의 iPS의 혈관내피세포 분화능이 감소하였음을 알 수 있다. 도 2c에 isotype control, 정상 iPS-EC, 및 ESRD iPS-EC의 FACS 분석 결과 그래프를 나타내었다. ($P < 0.01$, ESRD iPS-EC (4.1 ± 2.7) vs 정상 iPS-EC (33.6 ± 7.3)).

도 2c에 나타난 바와 같이, 정상 iPS-EC에 비해 ESRD 환자 유래 iPS-EC에서 혈관 내피세포 특이적 마커인 CD31 양성 세포가 약 6배 감소하였다. 정상 iPS-EC에서는 혈관내피세포 특이적 마커인 CD31 양성 세포 평균값 비율이 $33.6 \pm 7.3\%$ 로 나타났으나, ESRD 유래 iPS-EC의 CD31 양성세포 평균값 비율은 $4.1 \pm 2.7\%$ 에 불과하여 정상 샘플에 비해 약 8배 가량 낮은 혈관내피세포 분화능을 보였다.

실시예 3. iPS-EC의 혈관 형성 능력 확인

정상인과 ESRD 환자 유래 iPS-EC에 대해 혈관 형성 분석(tube formation assay) 방법을 이용하여 혈관 생성 능력을 비교하였다.

- 5 구체적으로 혈관 형성 분석은 재구성된 기저막 매트릭스 인 Matrigel (354230, Becton Dickinson)으로 코팅 된 96-well plate에서 수행되었다. 대략 2×10^4 iPS-EC를 200ul EGM-2MV + 20 % 인간 혈청 배지로 각 well에 seeding 하였다. 그런 다음 모세 혈관 형성 네트워크를 모니터링하고 4-6시간 후 촬영했다. 상기 혈관 형성 분석 결과를 도 3에 나타내었다. 도 10 3은 정상인 유래 iPS-EC 및 ESRD 환자 유래 iPS-EC에 대한 혈관 형성 분석(tube formation assay) 결과를 나타낸 사진이다.

- 도 3에 나타낸 바와 같이, ESRD iPS-EC에서는 4시간 경과 후 정상 iPS-EC에 비해 혈관이 형성된 면적이 현저히 적음을 확인할 수 있다. 정상 iPS-EC에 비해 ESRD 환자 유래 iPS-EC에서 관 형성 면적(tube formation area)이 현저히 감소하였음을 알 수 있다. 이를 혈관 형성 면적(tube formation area, %)으로 나타낸 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

【표 3】

구분	정상 iPS-EC	ESRD iPS-EC	p value
Area (%)	52.1 ± 5.2	11.3 ± 1.4	0.0035

- ESRD 환자 유래의 iPS-EC는 정상 iPS-EC에 비해 관 형성 면적이 20 80%가량 감소하였다. 이러한 결과는 말기 신장질환 환자의 단핵세포에서 유도된 유도줄기세포 유래의 혈관내피세포의 혈관 생성능이 정상인에 비해 저해되어 있음을 의미한다.

실시예 4. 말기 신장질환 특이적 마커 발굴

- 25 말기 신장질환 환자 특이적인 유전자 발현 양상 분석을 위해, RNA 마이크로어레이를 수행하였다.

구체적으로, 실시예 2-1의 방법으로 제작되어 CD31 양성을 보이는 정상 iPS-EC 및 ESRD iPS-EC로부터 ReliaPrep RNA Miniprep system

(Promega Corporation) 를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 전체 RNA는 Affymetrix 전체 전사 발현 어레이 프로세스를 제조자의 프로토콜 (GeneChip WT Pico reagent Kit)에 따라 수행하였다. cDNA는 GeneChip WT Pico Amplification kit를 사용하여 제조사의 설명대로 합성하였다. 이후,
 5 센스 cDNA를 단편화하고 GeneChip WT Terminal 라벨링 키트를 사용하여 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)로 바이오틴을 표지하였다. 약 5.5 ug의 표지 된 DNA 표적을 45 °C에서 16 시간 동안 Affymetrix GeneChip Human 2.0 ST 어레이에 하이브리드시켰다. Hybridized arrays된 어레이를 세척하고 GeneChip Fluidics Station 450에서 염색하고 GCS3000 스캐너
 10 (Affymetrix)상에서 스캐닝 하였다.

RNA 마이크로어레이 결과는 신호값은 Affymetrix® GeneChip 쉘 Command Console 소프트웨어 프로그램을 이용하여 Gene Ontology (www.geneontology.org/) 및 KEGG (www.genome.jp/kegg/)를 사용하여 중요한 프로브 목록에 대한 Gene-Enrichment 및 Functional Annotation
 15 조건으로 유전자 발현의 계층적 클러스터링을 수행하였다. 그 결과 히트맵을 도 4a에 나타내었다. 도 4a는 정상 유래 iPS 샘플 3종(N-1 내지 N-3) 및 ESRD 환자 유래 iPS-EC 3종(P-1 내지 P-3)에 대한 RNA 마이크로 어레이 결과 mRNA 양 차이(fold change)를 나타낸 히트맵이다.

도 4a를 통해 알 수 있는 바와 같이, 정상 iPS-EC와 ESRD iPS-EC의
 20 유전자 발현 양상이 확연히 다르게 나타났다. 이러한 유전자 발현 양상을 분석하기 위해 x축을 정상 iPS-EC, y축을 ESRD iPS-EC의 유전자 발현 수준으로 하여 각 유전자를 점으로 표시한 산포도를 그린 결과를 도 4b에 나타내었다. 회색 점은 변화가 없는 그룹, 노란색 점은 발현량 차이(Fold change, FC) 1.5배 미만인 경우, 붉은색 점은 발현량 차이가 1.5배 이상인
 25 유전자를 나타낸다.

하기 표 4에 ESRD iPS-EC에서 정상 iPS-EC에 비해 발현량이 1.5배 이상 증가한 유전자 148개 중 그 증가폭이 가장 큰 상위 10개 유전자를 표시하였다.

【표 4】

	Gene Accession	Gene Symbol	Gene description	Fold
--	----------------	-------------	------------------	------

				change
1	NM_005951	MT1H	metallothionein 1H	27
2	NM_001127255	NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7	25.2
3	NM_029858	MIR302C	microRNA 302c	23.3
4	NM_199286	DPPA3	developmental pluripotency associated 3	20.5
5	NM_001301267	MT1G	metallothionein 1G	20.4
6	NM_027122	ESRG	embryonic stem cell related (non-protein coding)	18.9
7	NM_001164835	L1TD1	LINE-1 type transposase domain containing 1	14.5
8	NM_001048164	SLC7A3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 3	14.4
9	NM_001242680	ZNF729	zinc finger protein 728	12.5
10	NM_024504	PRDM14	PR domain containing 14	11.2

상기 표 4에 나타난 유전자들의 특징을 살펴본 결과, 염증(inflammation)이나 산화스트레스(oxidative stress) 관련 유전자 MT1H (metallothionein 1H) , MT1G(metallothionein 1G), NLRP7(NLR family, pyrin domain containing 7), NLRP2 (NLR family, pyrin domain containing 2), SOX2 (SRY box 2), IFIT1(interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1), IFIT2 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2), IFIT3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3), CXCL10(chemokine (C-X-C motif) ligand 10), IFI6(interferon, alpha-inducible protein 6), IFIH1(interferon induced, with helicase C domain 1), IFI44(interferon-induced protein 44), FOXI3 (forkhead box I3) 및 IFI44L (interferon-induced protein 44-

like))와, 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자 (MIR302C, MIR302B, MIR302D 및 MIR302A)의 발현이 증가하는 특징을 보였다.

특히 혈관 발달과 세포막의 세포외 기질(ECM) 성분 관련 유전자인 COL12A1 및 VTN의 발현이 정상인에 비해 감소되는 것에 특징이 있다.

- 5 하기 표 5에는 ESRD iPS-EC에서 정상 iPS-EC보다 발현량의 감소 정도가 1.5배 이상(FC -1.5 이상) 감소한 유전자 78개 중 상위 10가지 유전자를 나타내었다.

【표 5】

	Gene Accession	Gene Symbol	Gene description	Fold change
1	NM_001293298	CEMIP	cell migration inducing protein, hyaluronan binding	-11.9
2	NM_004370	COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	-8.5
3	XR_171398	LOC151760	putative uncharacterized protein LOC151760	-6.9
4	NM_000550	TYRP1	tyrosinase-related protein 1	-6.6
5	NM_001313972	TXNIP	thioredoxin interacting protein	-5.8
6	NM_001243211	IL18	interleukin 18	-5.6
7	NM_020815	PCDH10	protocadherin 10	-5.3
8	NM_001001557	GDF6	growth differentiation factor 6	-5
9	NR_033957	LINC00842	long intergenic non-protein coding RNA 842	-4.9
10	NM_002009	FGF7	fibroblast growth factor 7	-4.8

- 10 정상인에 비해 말기 신장질환 환자의 역분화줄기세포 유래 혈관내피세포에서 감소한 유전자들이 특징을 살펴본 결과, 혈관 발달과 세포막의 세포외기질(Extracellular matrix, ECM) 성분 관련 유전자(COL12A1 (collagen, type XII, alpha 1), PCDH10 (protocadherin 10), VTN (vitronectin), CALB2 (calbindin 2), ITGA11 (integrin alpha

11), EFEMP1 (EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1), PCDHB14 (protocadherin beta 14), FBN1 (fibrillin 1), CDH5 (cadherin 5, type 2 (vascular endothelium), FBLN5 (fibulin 5) 및 FBN2 (fibrillin 2))과, 혈관 내피세포 및 세포 이동과 관련된 유전자(EDN1, 5 ANGPT2 (angiopoietin 2), MXRA5 (matrix-remodelling associated 5), MME (membrane metallo-endopeptidase), CEMIP (Cell Migration Inducing Hyaluronan Binding Protein))의 발현이 감소된 특징을 나타냈다.

즉, 혈관 형성에 중요한 유전자들이 ESRD 환자 유래 iPS-EC에서 감소되어 있었으며, 염증이나 산화 스트레스 관련 유전자는 증가하여 10 신장의 기능 이상이 발생하는 것으로 판단된다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자, PRDM14 유전자, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환의 탐지용 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 제제를 이용하여, 시험 대상과 정상 대조군의 시료에서 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 측정하고, 정상 대조군과 시험 대상 시료에서 발현수준을 비교하여, 시험 대상의 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 결정하는 것인, 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 혈관 발달과 세포외 기질 성분과 관련된 유전자, 또는 혈관내피 세포 또는 세포 이동과 관련된 유전자이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서 감소하는 것인, 조성물.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 바이오마커는, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 조성물.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 염증 또는 산화 스트레스와 관련된 유전자, 또는 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자이며, 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군에 비해 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 환자에서

증가하는 것인, 조성물.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 바이오마커는 MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자,
5 SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자 및 PRDM14 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화증, 협심증, 및 심부전으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인,
10 조성물.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 신장 질환은 말기 신부전(End stage renal disease, ESRD)인, 조성물.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머쌍 또는 프로브인 것인, 조성물.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 바이오마커에 특이적인 항체 또는 압타머인 것인, 조성물.

【청구항 11】

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 신장 질환 관련 심혈관계 질환의 탐지용 키트.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR키트, 마이크로어레이칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 키트.

【청구항 13】

정상 대조군과 시험 대상에서 분리된 시료로부터, MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자,
30 L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자, PRDM14 유전자, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자,

IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 혈관내피세포의 기능이상을 검출하는 바이오마커의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

- 5 상기 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준을, 정상 대조군과 시험 대상 시료에서 비교하는 단계를 포함하는 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

【청구항 14】

- 10 제13항에 있어서, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 혈관 발달과 세포외 기질 성분과 관련된 유전자, 또는 혈관내피 세포 또는 세포 이동과 관련된 유전자이며, 상기 시험 대상 시료에서 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료에 비해 낮은 경우, 상기 시험 대상은 신장 질환과 관련된 심혈관계 질환을 갖는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

15 **【청구항 15】**

 제14항에 있어서, 상기 바이오마커는, CEMIP 유전자, COL12A1 유전자, LOC151760 유전자, TYRP1 유전자, TXNIP 유전자, IL18 유전자, PCDH10 유전자, GDF6 유전자, LINC00842 유전자, 및 FGF7 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

20 **【청구항 16】**

- 제13항에 있어서, 상기 바이오마커는 혈관 내피세포의 염증 또는 산화 스트레스와 관련된 유전자, 또는 혈관 내피세포의 이동이나 증식을 억제하는 유전자이며, 상기 시험 대상 시료에서 바이오마커의 mRNA 또는 단백질 발현 수준이 정상 대조군 시료에 비해 높은 경우, 상기 시험 대상은 신장 질환 관련 심혈관계 질환을 갖는 것으로 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

【청구항 17】

- 제16항에 있어서, 상기 바이오마커는 MT1H 유전자, NLRP7 유전자, MIR302C 유전자, DPPA3 유전자, MT1G 유전자, ESRG 유전자, L1TD1 유전자, SLC7A3 유전자, ZNF729 유전자 및 PRDM14 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

【청구항 18】

제13항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화증, 협심증, 및 심부전으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, 방법.

5 **【청구항 19】**

제13항에 있어서, 상기 신장 질환은 말기 신부전(End stage renal disease, ESRD)인, 방법.

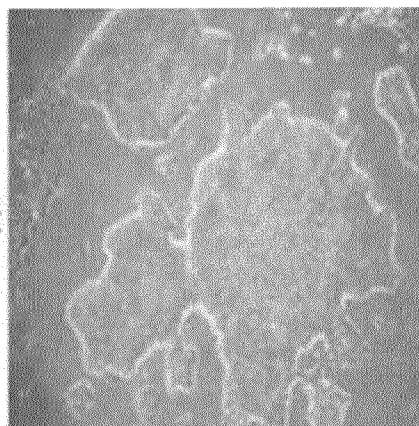
【청구항 20】

제13항에 있어서, 상기 시험대상이 심혈관계 질환을 갖는 환자로
10 진단된 경우 심혈관계 질환의 예방 또는 치료 약물을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

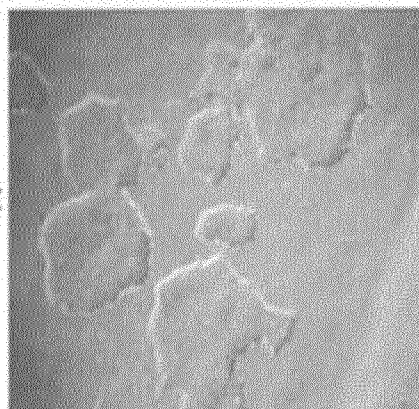
【도면】

【도 1a】

Normal iPSC

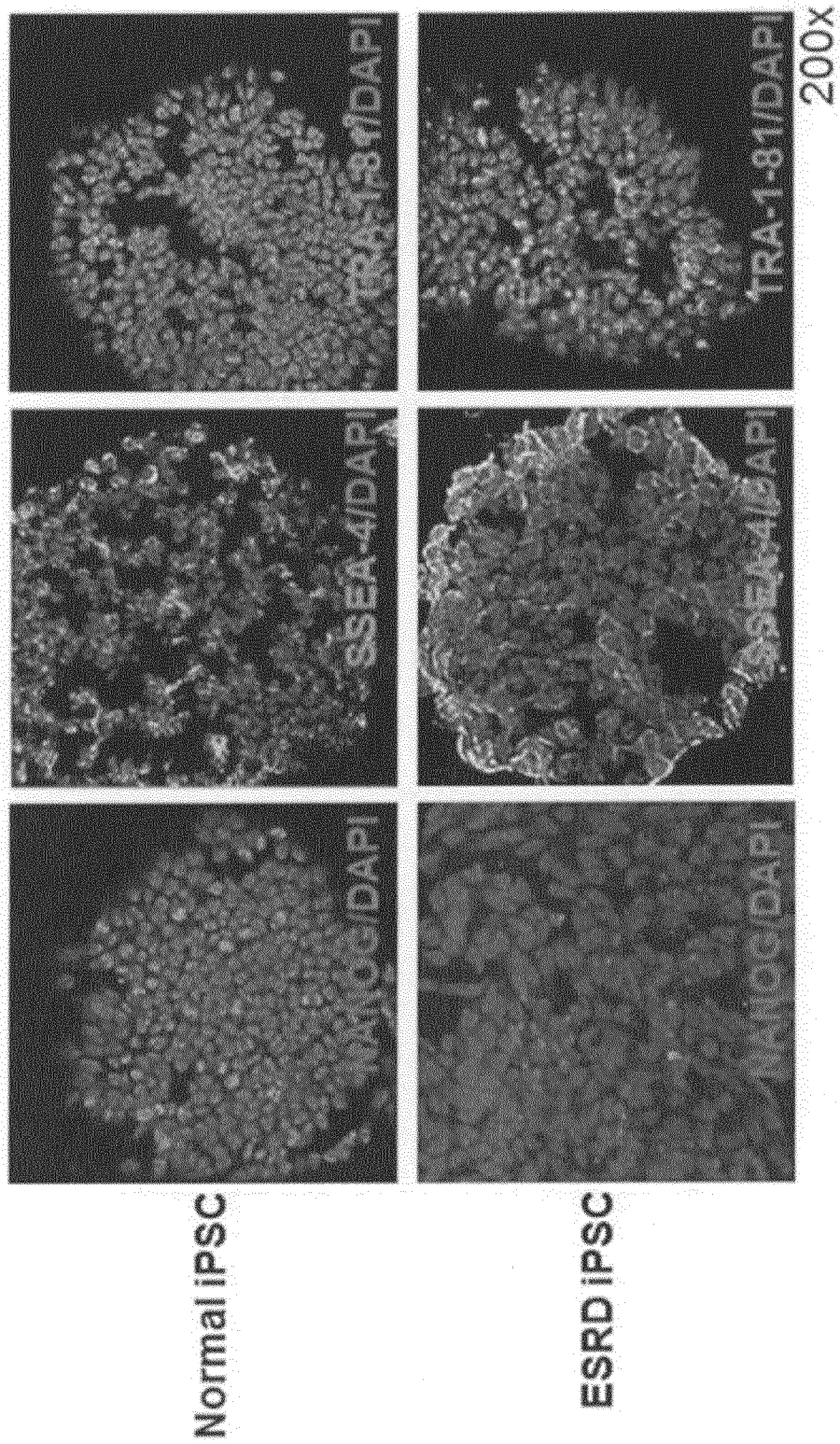


ESRD iPSC

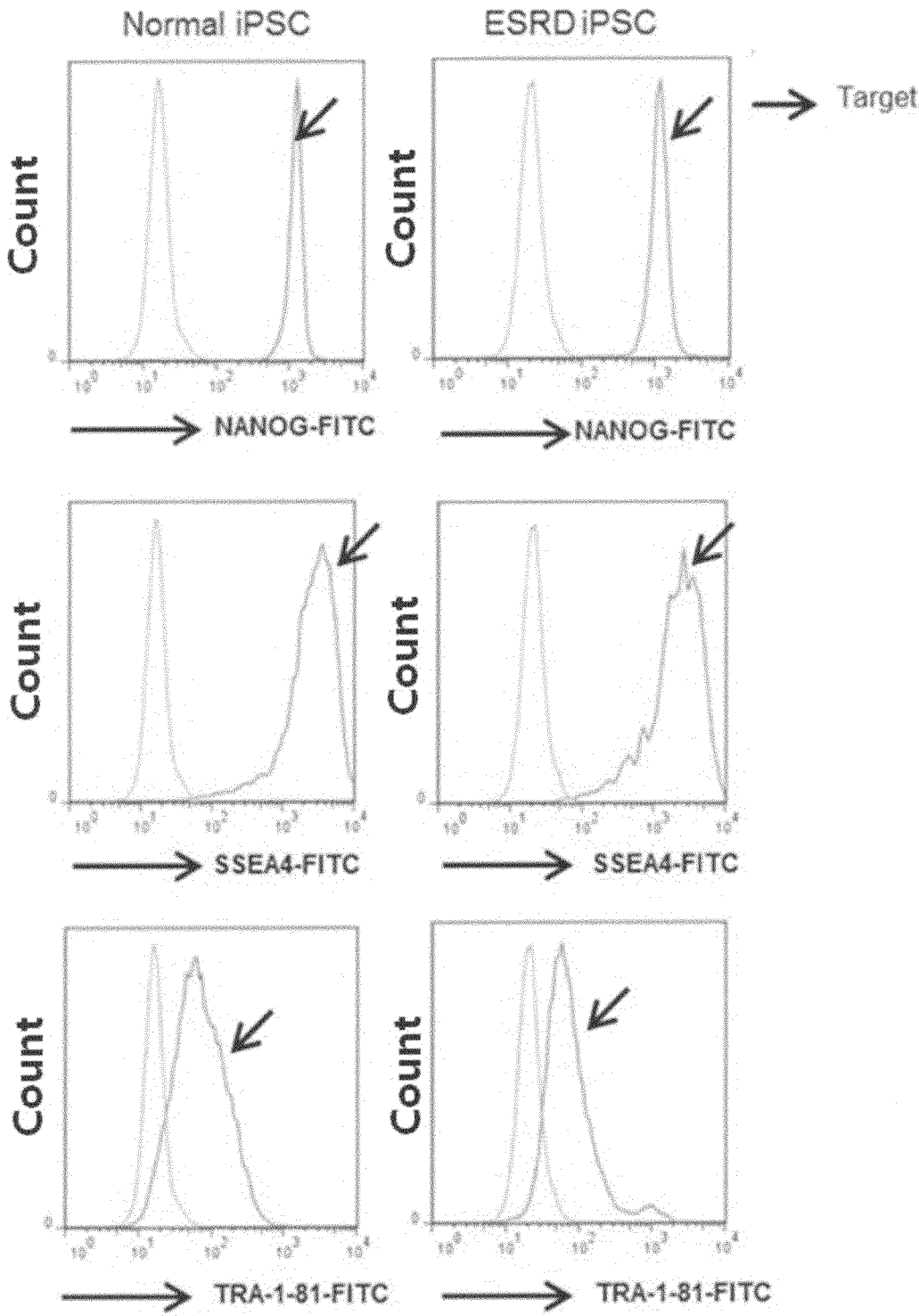


50x

【도 1b】

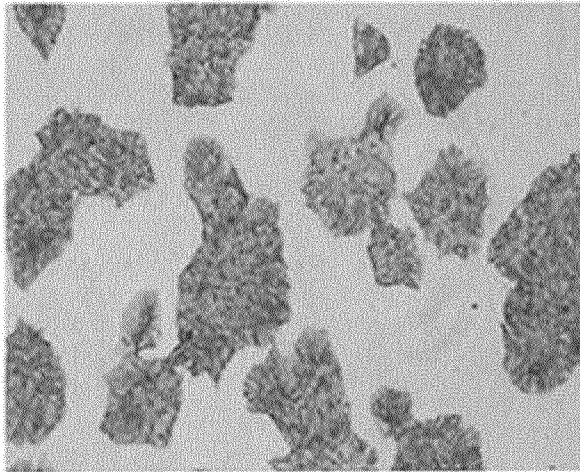


【도 1c】

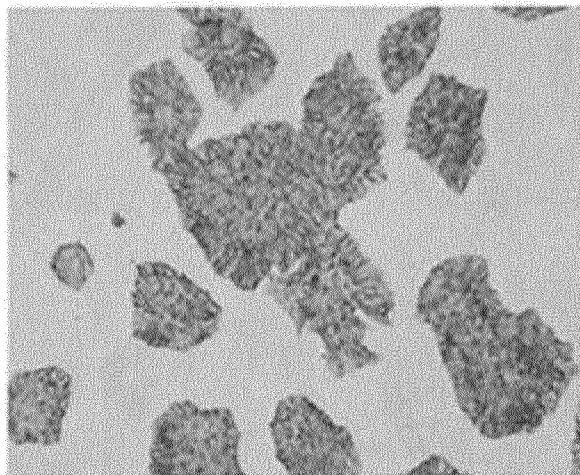


【도 1d】

Normal iPSC AP staining

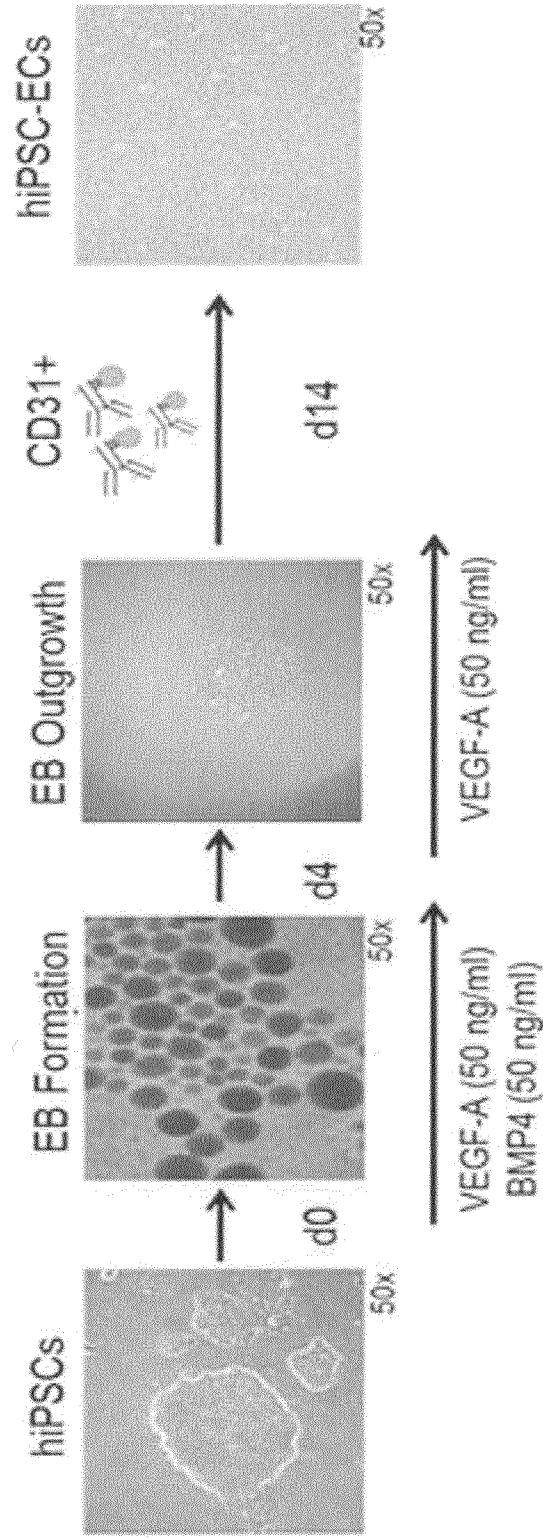


ESRD iPSC AP staining

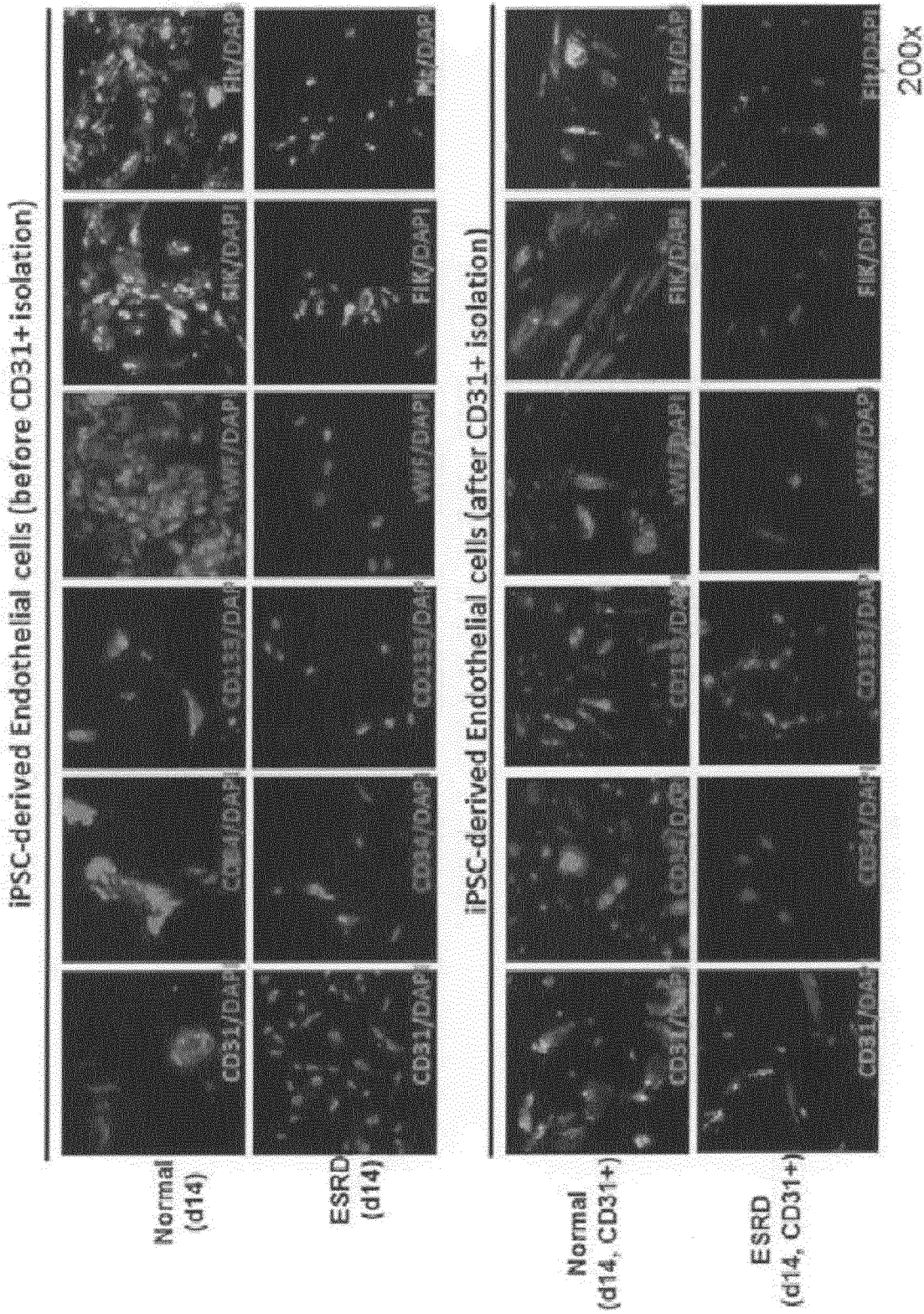


100x

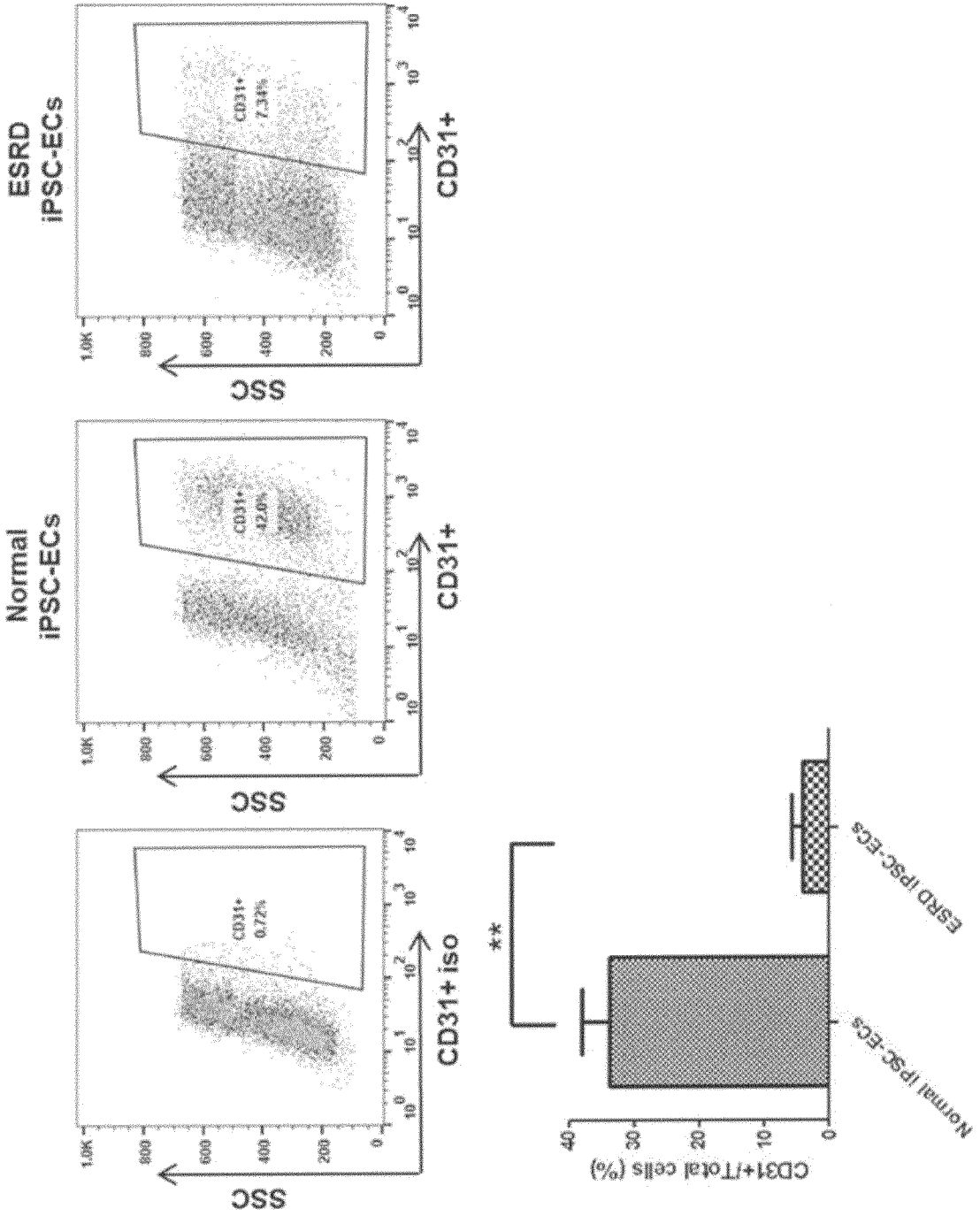
【도 2a】



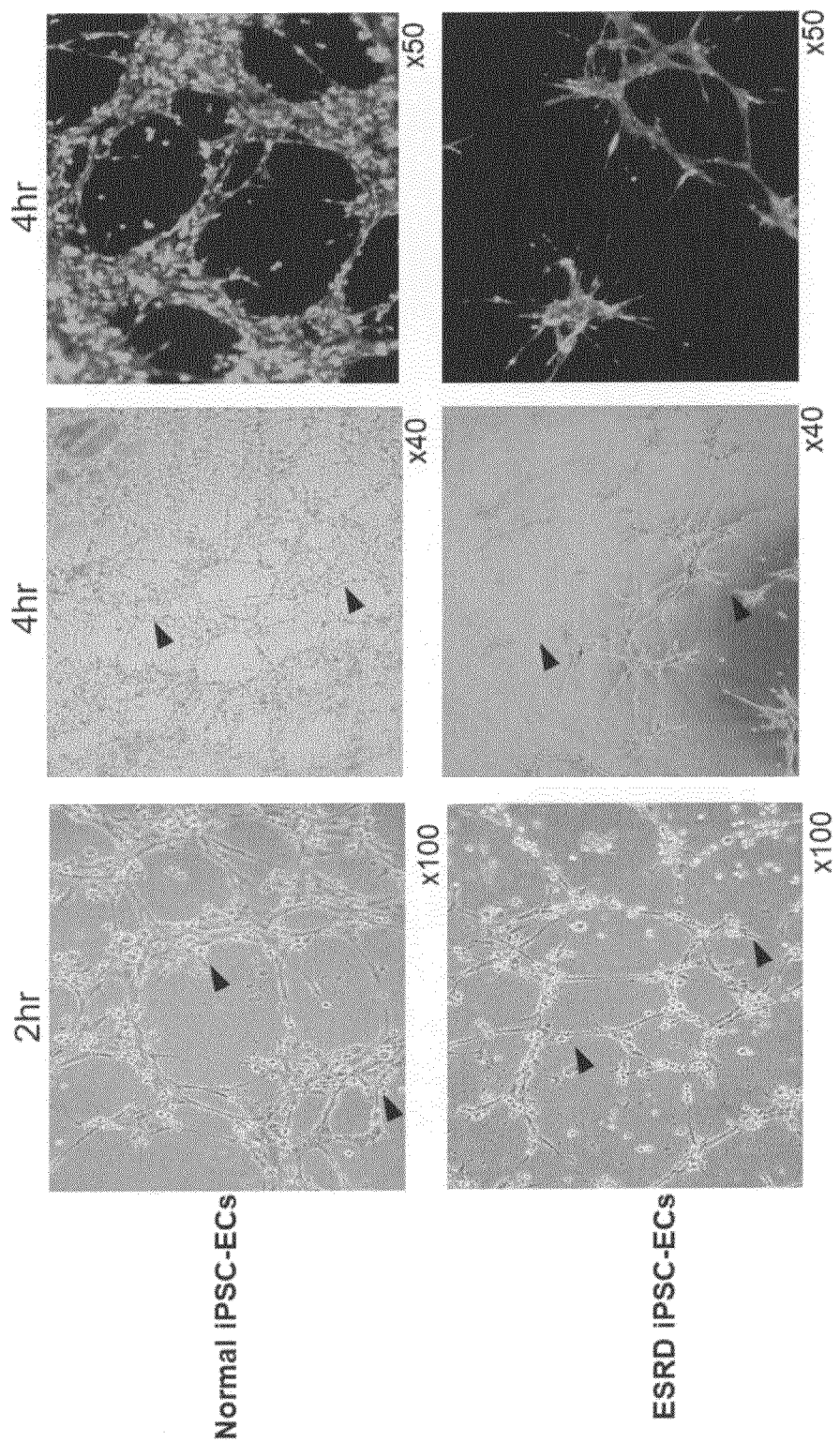
【도 2b】



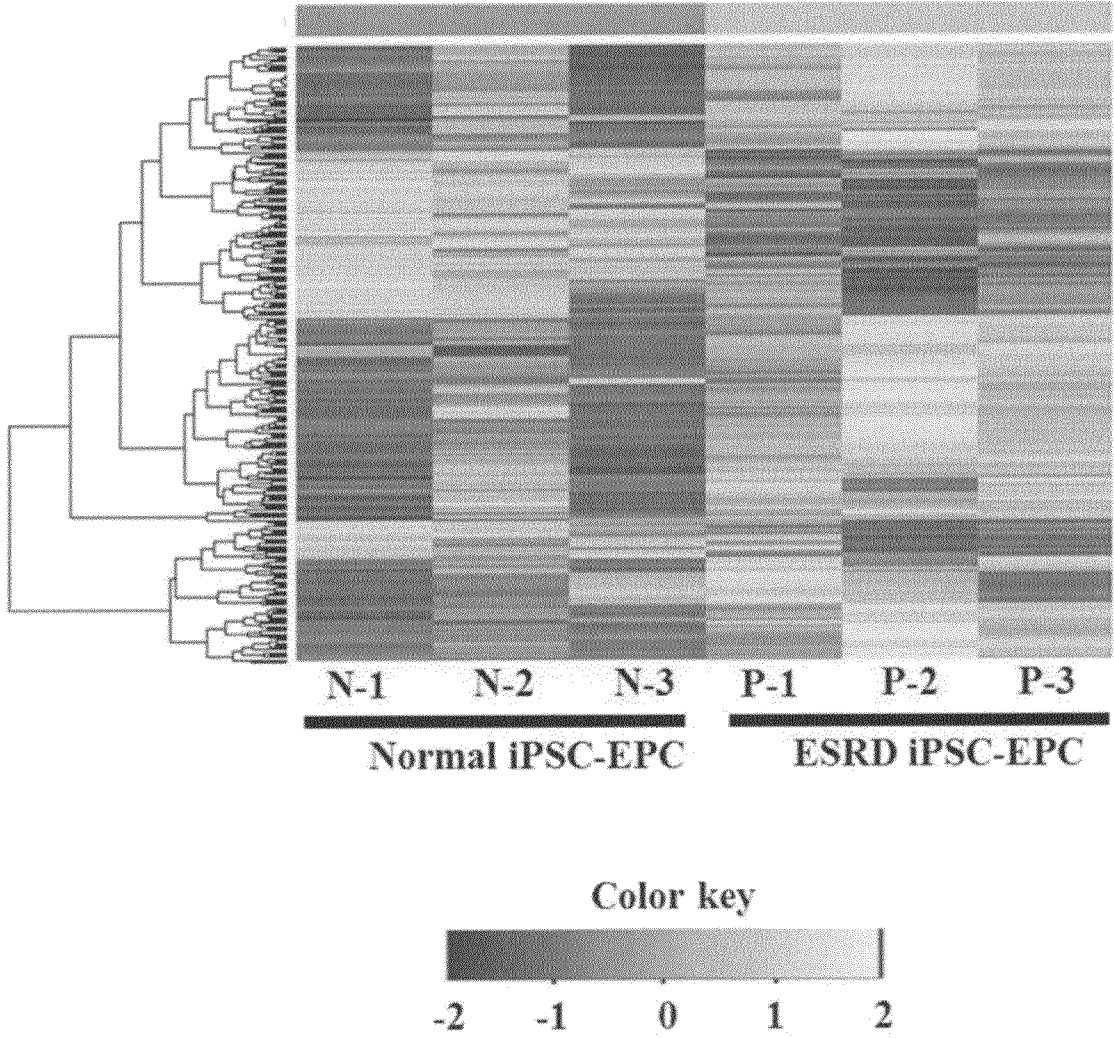
【도 2c】



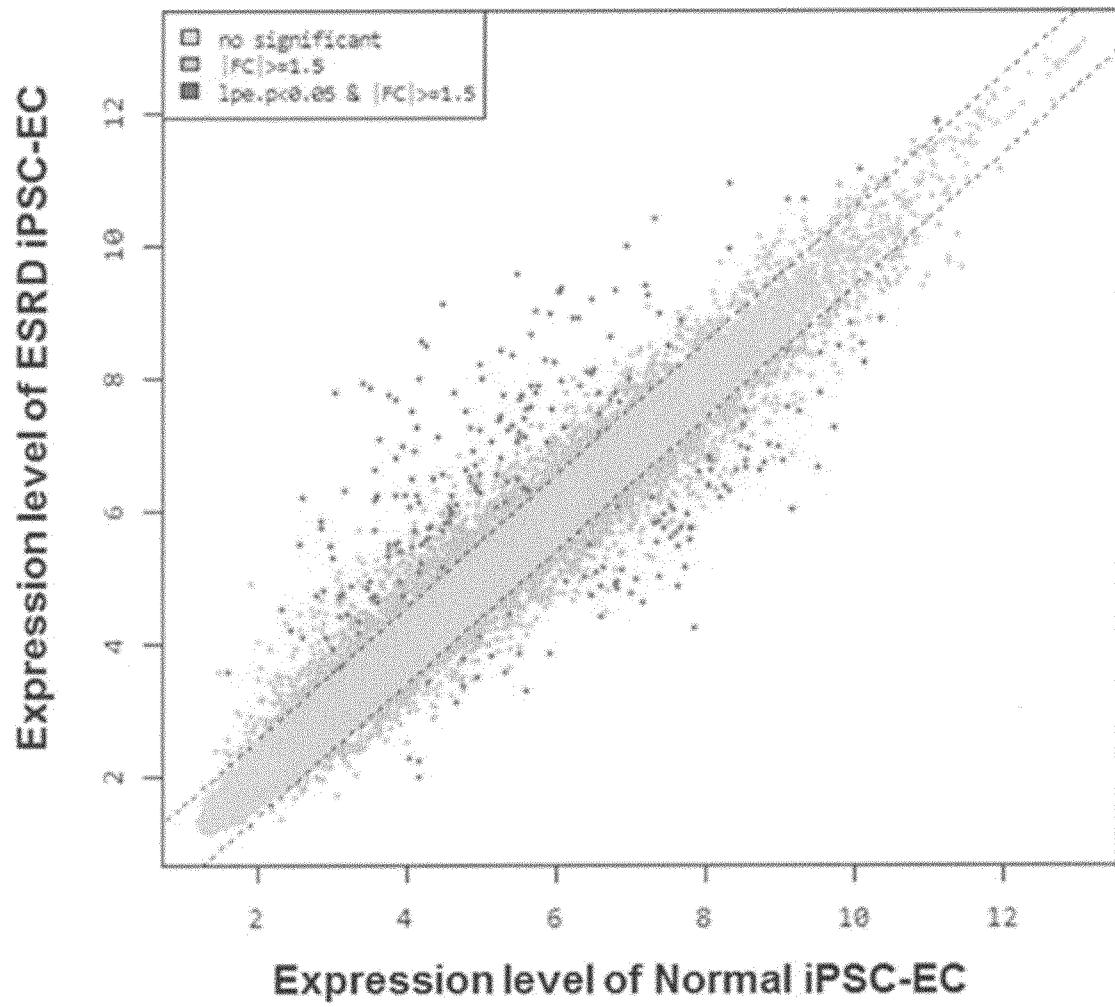
【도 3】



【도 4a】



【도 4b】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(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)

C12Q 1/6883; C07K 14/00; G01N 33/00; G01N 33/543; G01N 33/68

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: renal disorder, cardiovascular, biomarker, detecting, vascular endothelial cells

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PORAZKO, T. et al. IL-18 is involved in vascular injury in end-stage renal disease patients. Nephrol Dial Transplant. 2009, vol. 24, pages 589-596 See abstract; pages 589-590, 592-593; Conclusion.	1-2,5,7-13,16 ,18-19
A		3-4,6,14-15,17
A	US 2006-0286681 A1 (LEHMANN, H.-P. et al.) 21 December 2006 See abstract; claims 1-2, 16-21; paragraph [0023].	1-19
A	US 2015-0168423 A1 (SOMALOGIC, INC.) 18 June 2015 See the entire document.	1-19
A	KR 10-1864601 B1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 June 2018 See the entire document.	1-19
A	KR 10-1040321 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 10 June 2011 See the entire document.	1-19



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

"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

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2020 (05.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013765

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 20 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0286681 A1	21/12/2006	CA 2540544 A1 EP 1530047 A1 EP 1685409 A1 JP 2007-510892 A WO 2005-045440 A1	19/05/2005 11/05/2005 02/08/2006 26/04/2007 19/05/2005
US 2015-0168423 A1	18/06/2015	AU 2013-202112 A1 AU 2013-202112 B2 AU 2015-249162 A1 AU 2015-249162 B2 BR 112014007214 A2 CA 2847903 A1 CN 103959060 A CN 103959060 B CN 107102151 A CN 107422126 A EP 2761289 A1 IL 231387 A IL 231387 B JP 2014-528576 A JP 2018-159713 A JP 6546318 B2 KR 10-2014-0084106 A MX 2014003153 A NZ 622118 A RU 2014110508 A RU 2651708 C2 SG 10201607331 A SG 10201906900 A SG 11201400904 A US 2013-0085079 A1 WO 2013-049674 A1 ZA 201401778 B	02/05/2013 24/09/2015 19/11/2015 04/01/2018 04/04/2017 04/04/2013 30/07/2014 17/05/2017 29/08/2017 01/12/2017 06/08/2014 30/04/2014 31/12/2017 27/10/2014 11/10/2018 17/07/2019 04/07/2014 30/04/2014 29/01/2016 10/11/2015 23/04/2018 29/11/2016 27/09/2019 28/04/2014 04/04/2013 04/04/2013 25/08/2018
KR 10-1864601 B1	05/06/2018	KR 10-2018-0055319 A	25/05/2018
KR 10-1040321 B1	10/06/2011	KR 10-2009-0052483 A	26/05/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883; C07K 14/00; G01N 33/00; G01N 33/543; G01N 33/68

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: 신장질환(renal disorder), 심혈관(cardiovascular), 바이오마커(biomarker), 탐지(detecting), 혈관내피세포(vascular endothelial cell)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PORAZKO, T. 등, 'IL-18 is involved in vascular injury in end-stage renal disease patients', Nephrol Dial Transplant, 2009, 24권, 페이지 589-596 초록; 페이지 589-590, 592-593; 결론	1-2, 5, 7-13, 16, 18-19
A		3-4, 6, 14-15, 17
A	US 2006-0286681 A1 (LEHMANN, H.-P. 등) 2006.12.21 요약; 청구항 1-2, 16-21; 단락 [0023]	1-19
A	US 2015-0168423 A1 (SOMALOGIC, INC.) 2015.06.18 전체 문헌	1-19
A	KR 10-1864601 B1 (한국과학기술연구원) 2018.06.05 전체 문헌	1-19
A	KR 10-1040321 B1 (고려대학교 산학협력단) 2011.06.10 전체 문헌	1-19

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 02월 05일 (05.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 05일 (05.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



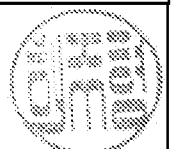
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 20
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 20은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0286681 A1	2006/12/21	CA 2540544 A1 EP 1530047 A1 EP 1685409 A1 JP 2007-510892 A WO 2005-045440 A1	2005/05/19 2005/05/11 2006/08/02 2007/04/26 2005/05/19
US 2015-0168423 A1	2015/06/18	AU 2013-202112 A1 AU 2013-202112 B2 AU 2015-249162 A1 AU 2015-249162 B2 BR 112014007214 A2 CA 2847903 A1 CN 103959060 A CN 103959060 B CN 107102151 A CN 107422126 A EP 2761289 A1 IL 231387 A IL 231387 B JP 2014-528576 A JP 2018-159713 A JP 6546318 B2 KR 10-2014-0084106 A MX 2014003153 A NZ 622118 A RU 2014110508 A RU 2651708 C2 SG 10201607331 A SG 10201906900 A SG 11201400904 A US 2013-0085079 A1 WO 2013-049674 A1 ZA 201401778 B	2013/05/02 2015/09/24 2015/11/19 2018/01/04 2017/04/04 2013/04/04 2014/07/30 2017/05/17 2017/08/29 2017/12/01 2014/08/06 2014/04/30 2017/12/31 2014/10/27 2018/10/11 2019/07/17 2014/07/04 2014/04/30 2016/01/29 2015/11/10 2018/04/23 2016/11/29 2019/09/27 2014/04/28 2013/04/04 2013/04/04 2018/08/25
KR 10-1864601 B1	2018/06/05	KR 10-2018-0055319 A	2018/05/25
KR 10-1040321 B1	2011/06/10	KR 10-2009-0052483 A	2009/05/26