(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0104676
(43) 공개일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0197325
(22) 출원일자 2023년12월29일
심사청구일자 2023년12월29일

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이지은
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
백지현
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

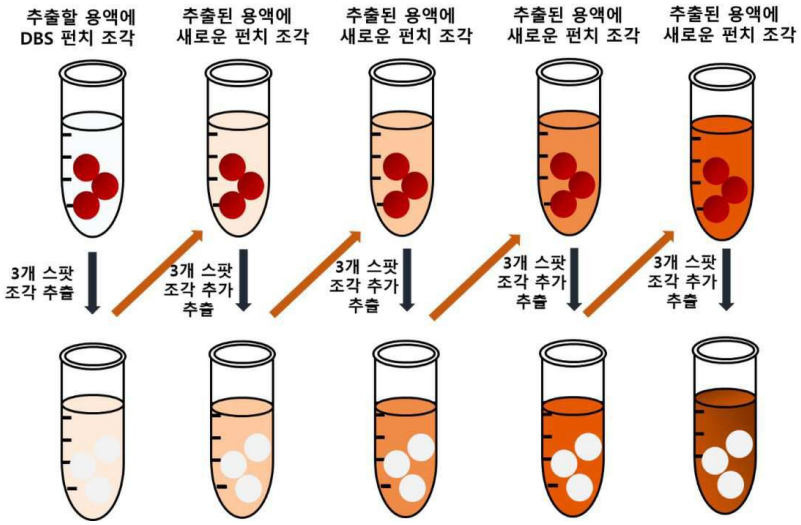
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **자궁선근증 진단을 위한 신규한 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2로 구성되는 군으로부터 선택되는 자궁선근증의 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면, 월경혈과 같이 비침습적이고 접근성이 높은 시료를 토대로 자궁선근증을 신속하고 정확하게 진단이 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/36 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자
박현미
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
문지영
서울특별시 송파구 위례광장로 163 (장지동, 송파더센트레)
박현태
서울특별시 강남구 선릉로 221, 306동 702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711195959
과제번호	00223559
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	대마오일 노출에 의한 생체 바이오마커 확립 및 인체 유해성 기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	아주대학교산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

PUDP(Pseudouridine 5'-phosphatase, UniProt Accession No. Q08623), HACD2(Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2, UniProt Accession No. Q6Y1H2), CEACAM7(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7, UniProt Accession No. Q14002), GGACT(Gamma-glutamylaminecyclotransferase, UniProt Accession No. Q9BVM4), TBCC(Tubulin-specific chaperone C, UniProt Accession No. Q15814), SLURP2(Secreted Ly-6/uPAR domain-containing protein 2, UniProt Accession No. P0DP57) 및 NDRG2(Protein NDRG2, UniProt Accession No. Q9UN36)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 자궁선근증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 자궁선근증 진단용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머인, 자궁선근증 진단용 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인, 자궁선근증 진단용 조성물.

청구항 5

대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁선근증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함하는 것인, 정보제공방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 대상체의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 자궁선근증이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것인, 정보

제공방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 생물학적시료는 월경혈인, 정보제공방법.

청구항 9

제 2항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는, 자궁선근증의 진단키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자궁선근증 진단을 위한 신규한 바이오마커와 이를 이용한 자궁선근증 진단을 위한 정보제공방법 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 자궁선근증은 자궁의 근육인 자궁근층에 발생하는 질환으로, 자궁내막이 자궁근층으로 침윤하여 비정상적으로 증식하는 상태이다. 증상은 월경과다, 월경통, 복부 또는 골반 통증 등이 있으며 난임을 유발할 수 있다. 치료 방법에는 약물 치료로 증상을 경감시킬 수 있으나 병의 진행을 막는 효과적인 약제는 아직 없으며 수술적으로 자궁을 절제하는 것이 표준 치료이다. 따라서 선근증이 진행되기전에 조기 발견할 수 있다면 가임력에 대한 계획이나 증상의 완화에 큰 도움이 될 수 있다.

[0004] 따라서, 자궁선근증에 대한 빠르고 정확하며 비침습적인 진단방법의 필요가 당업계에 존재하는 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 자궁선근증에 대한 차등발현 단백질을 찾기 위해, 월경혈 시료를 종이카드 (protein saver card)에 수집하였다. 월경혈 시료를 종이카드에 수집한 이유는 비침습적으로 신속하고 간편하게 검사를 가능하게 하고 또한 환자들에게 접근성이 높아 기존의 자궁의 근조직에서 샘플을 채취하던 침습적인 방법과 비교하여 이점이 있다기 때문이다. 월경혈은 자궁내막의 조직, 혈액, 생식기의 삼출액 등이 섞여서 방출되어 자궁내막의 질환을 반영할 수 있는 요소가 많다. 또한 기존의 월경혈을 채취할 때 사용되는 월경컵으로부터 월경혈을 받는 방식 보다, 종이카드를 이용하면 수집과 보관 그리고 이송에 더 이점이 있다. 이를 통해 본 발명자들은 월경혈로부터 파악이 가능한 자궁선근증의 바이오마커를 확인하여 이를 발명으로 완성해 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 PUDP(Pseudouridine 5'-phosphatase, UniProt Accession No. Q08623), HACD2(Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2, UniProt Accession No. Q6Y1H2), CEACAM7(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7, UniProt Accession No. Q14002), GGACT(Gamma-glutamylaminecyclotransferase, UniProt Accession No. Q9BVM4), TBCC(Tubulin-specific chaperone C, UniProt Accession No. Q15814), SLURP2(Secreted Ly-6/uPAR domain-containing protein 2, UniProt Accession No. P0DP57) 및 NDRG2(Protein NDRG2, UniProt Accession No. Q9UN36)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 자궁선근증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 자궁선근증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁선근증 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 PUDP(Pseudouridine 5'-phosphatase, UniProt Accession No. Q08623), HACD2(Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2, UniProt Accession No. Q6Y1H2), CEACAM7(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7, UniProt Accession No. Q14002), GGACT(Gamma-glutamylaminecyclotransferase, UniProt Accession No. Q9BVM4), TBCC(Tubulin-specific chaperone C, UniProt Accession No. Q15814), SLURP2(Secreted Ly-6/uPAR domain-containing protein 2, UniProt Accession No. P0DP57) 및 NDRG2(Protein NDRG2, UniProt Accession No. Q9UN36)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 자궁선근증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 자궁선근증 진단용 조성물이 제공된다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 상기 진단용 조성물 중 어느 하나의 진단용 조성물을 포함하는, 자궁선근증의 진단키트가 제공된다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁선근증 진단을 위한 정보제공방법이 제공된다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 자궁선근증이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 생물학적시료는 월경혈일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면 월경혈이라는 비침습적으로 채취가능하며 접근성이 뛰어난 시료를 이용해 신속하고 정확하게 자궁선근증을 진단가능하다.

[0023] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 아니한 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에서의 시료수집방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 TMT 라벨링 한 시료의 고 pH 분획 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명자들은 자궁선근증을 갖는 대상체로부터 월경혈 시료를 채취하고, 이를 대조군의 월경혈 시료와 동일한 분석을 수행하여, 대조군의 시료 대비 자궁선근증 환자군 시료에서 유의하게 높게 발현되는 7개의 단백질을 확인하고 이를 바이오마커 및 자궁선근증 진단용 조성물 발명으로 완성하여 제공하고자 한다.

[0027] 본 발명자들은 PUDP(Pseudouridine 5'-phosphatase, UniProt Accession No. Q08623), HACD2(Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2, UniProt Accession No. Q6Y1H2), CEACAM7(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7, UniProt Accession No. Q14002), GGACT(Gamma-glutamylamine-cyclotransferase, UniProt Accession No. Q9BVM4), TBCC(Tubulin-specific chaperone C, UniProt Accession No. Q15814), SLURP2(Secreted Ly-6/uPAR domain-containing protein 2, UniProt Accession No. P0DP57) 및 NDRG2(Protein NDRG2, UniProt Accession No. Q9UN36)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 자궁선근증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다. 상기 UniProt Accession Number에 따른 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 정보는 https://www.uniprot.org 에서 확인할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 '진단'은 질병 발생의 예측 및 발병 위험도 (risk) 또는 발병 감수성(susceptibility)를 결정하거나 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명의 목적상, 상기 진단은 자궁선근증의 진단을 의미한다. 본 발명에서의 자궁선근증 또는 자궁샘근증(adenomyosis)은 자궁 근층으로 자궁내막층이 침범하여 전반적으로 자궁이 커지는 양성 질환을 의미한다.

[0030] 본 발명에서 용어, '진단용 (바이오) 마커, 진단하기 위한 (바이오) 마커 또는 진단 마커'는 자궁선근증을 정상 자궁과 구분하여 진단할 수 있는 것으로, 정상 세포에 비하여 자궁선근증을 가진 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등의 수준을 정상 세포와 구분할 수 있거나 그 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 마커 또는 이에 포함되는 조성물을 의미한다.

[0031] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 자궁선근증 진단용 조성물이 제공된다.

[0032] 본 명세서에서의 용어 "발현 수준을 측정"은 특정 단백질(펩타이드) 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 존재 여부, 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것으로서, 구체적으로 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0033] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서의 용어 "항체 (antibody)"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 예를 들어 상기 항체는 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편에 대해 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 단편은 상기 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프 (epitope)를 가지고 있는 단백질 단편을 의미하며, 예를 들어 면역원성 단편일 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 재조합 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0035] 이러한 항체들을 이용하여 당해 기술분야에 공지된 효소 면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역 측정법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법 (sandwich assay), 폴리아크릴 겔상의 웨스턴 블롯팅 또는 면역 블롯팅 등의 방법에 의해 생물학적 샘플 중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서의 용어 "항체 단편"은 온전한 항체, 펩티드 또는 단백질의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 또는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 단편은 2개의 경

쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')2 또는 Fv일 수 있다. 상기 결합 단편은 최소한 7개 이상의 아미노산, 예를 들면 9 개 이상의 아미노산, 12개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0037] 상기 단백질을 검출하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역분석(Immunoassay), 면역화학염색분석(Immunohistochemistry Assay), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0038] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다. 분석방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 이용한 방식이 사용될 수 있다.

[0039] 본 명세서에서의 용어 "프라이머(primer)"는 자유 3-말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 특정 염기 서열에 대해 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 자궁선근증 발병 여부 등을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0040] 본 명세서에서의 용어 "프로브(probe)"는 표적 핵산 예를 들면, mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 mRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 라벨링(labeling)되어 있을 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들어 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 자궁선근증 발병 여부 등을 진단할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0041] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 또는 바이오틴을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 자궁선근증의 진단 키트가 제공된다.

[0044] 예를 들어, 자궁선근증이 발생이 예상되거나 의심되는 자궁조직을 포함하는 검체로부터 생물학적 시료로부터 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 검출 제제를 포함하는 조성물을 활용해 시료 내의 해당 단백질의 발현 정도를 확인하여 자궁선근증 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 상기 키트는 면역분석키트(Immunoassay)일 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 자궁선근증 진단용 키트는 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함하여 자궁선근증 진단에 활용되는 정보를 제공한다. 예를 들어, 자궁선근증이 발생이 예상되거나 의심되는 자궁조직을 포함하는 검체로부터 생물학적 시료로부터 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 암호화하는 핵산을 추출하고 이를 검출하는 제제를 포함하는 조성물을 활용해 시료 내의 해당 단백질을 암호화하는 핵산의 발현 정도(mRNA 를 역전사한 시료를 활용하는 경우에는 cDNA와 cDNA를 검출하는 제제를 적용함)를 확인하여 자궁선근증 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다. 상기 키트는 DNA 칩일 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁선근증 진단을 위한 정보제공방법이 제공된다.

[0047] 본 명세서에서의 용어 "대상체"는 자궁선근증이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 개, 고양이, 마우스, 래트, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등의 포유동물을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 명세서에서의 용어 "시료"는 상기 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 자궁조직생검, 질도말, 월경혈, 질분비액 등 자궁조직이 포함될 수 있는 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 월경혈일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 일 측에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, PUDP, HACD2, CEACAM7, GGACT, TBCC, SLURP2 및 NDRG2으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 대상체 및 상기 대조군의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 비교하는 단계; 를 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 본 명세서에서의 용어 "대조군"은 자궁선근증이 발병되지 않은 일반 개체, 비-자궁선근증 환자군, 비환자군 등을 의미하는 것일 수 있다.

[0051] 일 측에 따르면, 상기 대상체의 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 대상체를 자궁선근증이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 단백질의 발현수준이 상기 대조군에 비하여 1.5배이상 높은 경우, 상기 대상체를 자궁선근증이 발병한 것으로 판정하거나 발병위험이 높은 것으로 예측하는 것일 수 있다.

[0053] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0054] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 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 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0055] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해

되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0057] **실시예 1. 시료의 수집**

[0058] 고려대학교 안암병원으로부터 자궁선근증 환자 5명으로부터 종이(Protein saver card)에 월경혈을 묻혀서 건조 혈반(dried blood spot, DBS)으로 시료를 수집하였고, 질환 없이 건강한 성인 5명으로부터의 종이에 묻힌 월경혈 시료를 동일한 방법으로, 음성대조군으로서 수득하였다 (IRB 번호: 2022AN0492).

[0060] **실시예 2. 시료로부터 단백질의 추출**

[0061] 월경혈을 묻힌 종이 시료에서 단백질을 추출하기 위해, 4 mm 펀치를 사용해서 한 개의 시료당 15개의 스팟을 뚫었다. 이하 펀칭된 시료들을 스팟이라 지칭한다. 3개의 펀칭된 스팟들을 250 μL 부피의 50 mM 탄산수소 암모늄(ammonium bicarbonate) - 2% 나트륨 데옥시클로산 (sodium deoxycholate)에 넣어 추출하였다. 이때 단백질 분해 또는 변형을 막기 위해, 스팟을 용액에 넣은 직후에 해당 용액에 단백질 분해효소 저해제로서 cOmplete, Mini EDTA-free 프로테아제 저해제 칵테일(Roche) 및 포스파타아제 저해제로서 PhosSTOP(Roche)을 첨가하였다. 상기 저해제는 제조자의 프로토콜에 따라 1개의 정제를 200 μL 의 인산완충식염수(phosphate buffered saline: PBS)에 녹여 50 X로 만든 후, 각 시료에 저해제의 최종 농도 1X가 되도록 첨가하였다. 스팟은 용액에 넣어진채로 37℃에서 1400 rpm의 속도로 1 시간동안 추출하였다. 이후 차등발현 단백질 발굴 및 이를 최대한 높은 농도로 추출하기 위해, 3개의 스팟을 추출한 용액에서 스팟을 빼내고 새로운 3개의 스팟을 첫번째 추출한 용액에 넣어서 누적하여 동일하게 37℃에서 1400 rpm의 속도로 1 시간 추출하는 방식으로 진행하였다. 이렇게 3개의 스팟을 5회에 걸쳐 위의 과정을 반복하여 총 15 개의 스팟을 누적해서 추출하여 단백질의 농도를 증가시켜 추출하였다. 단백질 농도를 높이기 위해 누적해서 추출한 상술한 과정에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0062] 상기 과정을 통해 추출된 월경혈 시료를 비신크로니닉산 (bicinchoninic acid: BCA) 분석법으로 정량 하였다. 각 시료는 추출된 색에 따라 농도를 대략적으로 판단하여, 1:10 내지 1:30의 비율로 희석하여 단백질 농도를 측정하였다.

[0064] **실시예 3. 질량 분석을 위한 시료 준비 및 용액 상태에서 분해(In-solution digestion)**

[0065] DBS에서 추출된 단백체 분석을 위해, 상기 실시예 2에서 수득 된 각 시료를 200 μg씩을 용액 상태에서 분해하였다. 200 μg의 시료를 준비하고 시료의 볼륨은 최종100 μL 가 되도록 25 mM 탄산수소 암모늄 (ammonium bicarbonate)를 사용하여 희석하였다. 우레아 (urea) 가루를 사용해서 8M 우레아가 되도록 시료에 가하였다. 0.5 μmol의 TCEP(tris(2-carboxyethyl)phosphine)를 사용해서 37℃에서 이황화 결합을 환원시킨후. 1 μmol의 IAA(2-Iodoacetamide)를 사용하여 25℃의 어두운 환경에서 알킬화시켰다. 그 후 8M 우레아 (urea) 에 25mM 탄산수소 암모늄(ammonium bicarbonate)을 더 넣어주어 1M 우레가 (urea) 가 되도록 만들었다. LysC를 넣어 30℃에서 2시간동안 분해 후, 트립신으로 37℃에서 밤새 분해하였다. 이어서 SepPak® tC18 카트리지 (Sep-Pak tC18 1cc Vac cartrige, 100mg, Waters)를 이용해 정제한 후 스페드백으로 진공건조하였다. 건조된 펩타이드를 100 mM 테트라에틸암모늄 브로마이드(tetraethylammonium bromide: TEAB)에 녹인 후 펩타이드를 정량하였다.

[0067] **실시예 4. 펩타이드 시료의 Tandem Mass Tag (TMT) 라벨링**

[0068] TMT 라벨링 시약(Thermo Fisher Scientific)을 70 μL의 아세토니트릴에 용해시키고, 실시예 3에서 준비된 각 45 μg의 펩타이드 시료에 35 μL의 TMT 라벨링 시약을 가하였다. 반응물을 20℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 펩타이드를 라벨링한 후, 5μL의 5%(w/v) 히드록시아민(hydroxylamine)을 가하고 20℃에서 15분 동안 인큐베이션하여 라벨링 반응을 종결시켰다. TMT 라벨링한 시료들을 하나의 튜브로 합치고, SepPak® tC18 카트리지로 정제한 후 스피드백(speedvac)을 사용하여 진공건조 시켰다.

[0069] 건조된 시료는 10mM 포름산 암모늄(ammonium formate)에 녹였다. 시료를 액체 크로마토그래피(Agilent 1290 Infinity liquid chromatography)를 이용하여, X-Bridge peptide BEH C18 컬럼 (4.6 mm i.d. × 250 mm length; pore size 130 Å; article ize .5M, aters orporation, ilford, A, SA)에 480μg을 주입하여 고 pH

역상 펩타이드 분별(High pH Reversed-phase Peptide Fractionation)을 진행하였다. 상기 컬럼을 100%의 버퍼 A 10 mM 포름산 암모늄(pH 10)으로 평형화시켰다. 버퍼 B는 10mM 포름산 암모늄(pH 10)의 90%의 아세토니트릴이었다. 작업 유속은 다음의 구배 조건에서 0.5 mL/분으로 하였다

[0070] 0분: 100% 버퍼 A 및 0% 버퍼 B,

[0071] 0분 내지 10분: 0% 내지 5% 버퍼 B,

[0072] 10분 내지 48.5분: 5% 내지 40% 버퍼 B,

[0073] 48.5분 내지 62.5분: 40% 내지 70% 버퍼 B,

[0074] 62.5분 내지 72.5분: 70% 버퍼 B,

[0075] 72.5분 내지 82.5분: 70% 내지 5% 버퍼 B,

[0076] 82.5분 내지 92.5분: 5% 버퍼 B

[0077] 시료는 10분에서 82.5분 사이의 펩타이드를 96개의 분획으로 나눴다. 분획된 그래프는 도 2에 나타내었으며 x축은 시간(min), y축은 흡광도(normalized intensity)를 나타낸다. 96개의 분획을 24개의 분획으로 합친 후 분획물을 스피드백을 사용하여 진공건조시켰다.

[0079] **실시예 5. 질량 스펙트럼 분석**

[0080] 수득한 각각의 시료 3 μL를 Ultimate 3000 시스템상에서 역상 PepMap RSLC C18 컬럼(50cm X 75㎛)에 주입하였다. 상기 컬럼을 100%의 버퍼 A (0.1%(v/v)의 포름산을 함유하는 100%의 물)로 평형화시켰다. 버퍼 B는 0.1%(v/v)의 포름산을 함유하는 100%의 아세토니트릴이었다. 작업 유속은 다음의 구배 조건에서 300 nL/분으로 하였다:

[0081] 0분: 95% 버퍼 A 및 5% 버퍼 B,

[0082] 0분 내지 4분: 5% 버퍼 B,

[0083] 4분 내지 14분: 5% 내지 10% 버퍼 B,

[0084] 14분 내지 97분: 10% 내지 25% 버퍼 B,

[0085] 97분 내지 99분: 25% 내지 28% 버퍼 B,

[0086] 99분 내지 102분: 28% 내지 40% 버퍼 B,

[0087] 102분 내지 105분: 40% 내지 90% 버퍼 B,

[0088] 105분 내지 106분: 90% 버퍼 B,

[0089] 106분 내지 110분: 90% 내지 5% 버퍼 B,

[0090] 110분 내지 120분: 5% 버퍼 B

[0091] nanoLC 시스템을 Tribrid Orbitrap Eclipse에 장착하였다. 전체-스캔 MS 스펙트라(Survey full-scan MS spectra, 300 ~ 1,500 m/z)를 1 마이크로스캔(microscan) 및 120,000의 해상도(resolution)로 수득하여, 선도 물질(precursor)을 선별하고 전하 상태 측정을 위한 미리보기 모드를 설정하였다. 미리보기 조사 스캔으로부터 20 개의 가장 강력한 이온에 대한 MS/MS 스펙트라를 하기와 같은 옵션으로 전체 스캔에 대한 이온 트랩에서 수득하였다: 분리 간격 (isolation window), 1.4 m/z; CID 충돌 에너지(collision energy), 35%; 동적 배제 시간(dynamic exclusion duration), 30초(sec).

[0093] **실시예 6. 단백질 동정 및 라벨 기반의 정량 분석을 위한 데이터 프로세싱**

[0094] 각각의 LC-MS/MS 파일을 Proteome Discoverer 2.4의 SEQUEST 알고리즘을 이용하여 분석하였다. MS 및 MS/MS 데이터를 SwissProt 인간 데이터 베이스(20328개의 단백질 포함(2022년 5월 업데이트))와 비교 조사하였다. 조사는 두개의 미절단(missed cleavages) 트립신 분해된 펩티드(tryptic peptide)를 허용하는 것으로 제한하였다.

시스테인(cysteine)의 카르보아미도메틸화(carboamidomethylation, +57.021 Da)과 라이신(Lysine) 및 펩티드 N-말단의 TMT 라벨링(+304.207 Da) 고정된 수식화로, 메티오닌 산화를 유동형 수식화 (+15.995 Da)로 설정하였다. 질량 허용 범위(mass tolerance)를 MS/MS 데이터에 대하여 0.02 Da 및 MS 데이터에 대하여 10 ppm으로 설정하였다.

[0095] 건강한 환자의 음성대조군 시료 (5개), 자궁선근증 환자 시료 (5개)들의 각 그룹에 존재하는 단백질들의 상대적인 양을 각 시료들에 유래한 펩티드에 표지된 라벨의 리포터 이온(reporter ion)들의 신호 대 잡음값(signal to noise)값에 기초하여 산출하였다. Proteome Discoverer 2.4를 사용하여 각 펩타이드들의 리포터 이온들의 신호 대 잡음값들을 추출하였다. 통계적으로 유의한 단백질들을 찾아내기 위해서 신호 대 잡음값에 기반한 풍부도(abundance)값들에 대해서 2개의 군(자궁선근증, 정상 대조군)을 대상으로 Student's t test 분석을 Perseus 소프트웨어를 이용해서 수행하였다. P-값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0097] **실시예 7. 자궁선근증군에서 차등 발현되는 단백질의 동정**

[0098] 자궁선근증군과 정상 대조군 샘플에 존재하는 2그룹의 단백질들의 동정에 대한 결과로부터, 총 4329 개의 단백질들이 유니크 펩타이드(unique peptide) 1개 이상으로 동정된 것을 확인하였다. 동정된 단백질들 중에서, 4051 개의 단백질들이 레이블링 기반의 정량 분석이 가능한 신호 대 잡음값들을 가지고 있었다. 통계적으로 유의한 단백질들을 찾아내기 위해서 4051개의 단백질들에 신호 대 잡음값에 기반한 풍부도 값들에 대해서 2개의 군 (자궁선근증군, 정상 대조군)을 대상으로 통계분석을 수행한 결과, P -값이 0.05 미만인 204 개의 단백질을 얻을 수 있었다.

[0099] 통계적으로 유의미한 상기 도출된 204 개의 단백질에서 자궁선근증군에서 1.5 배이상 차등 발현을 나타내는 단백질을 선별하고자 하였으며, 자궁선근증 군에서 1.5배이상 차등 발현된 30개의 단백질을 확인하였다.

[0100] 30개의 단백질들 중에서, 자궁선근증군에서 음성 대조군에 비해 1.5배 이상 높게 발현되는 7개의 바이오마커들을 확인하고, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0101]

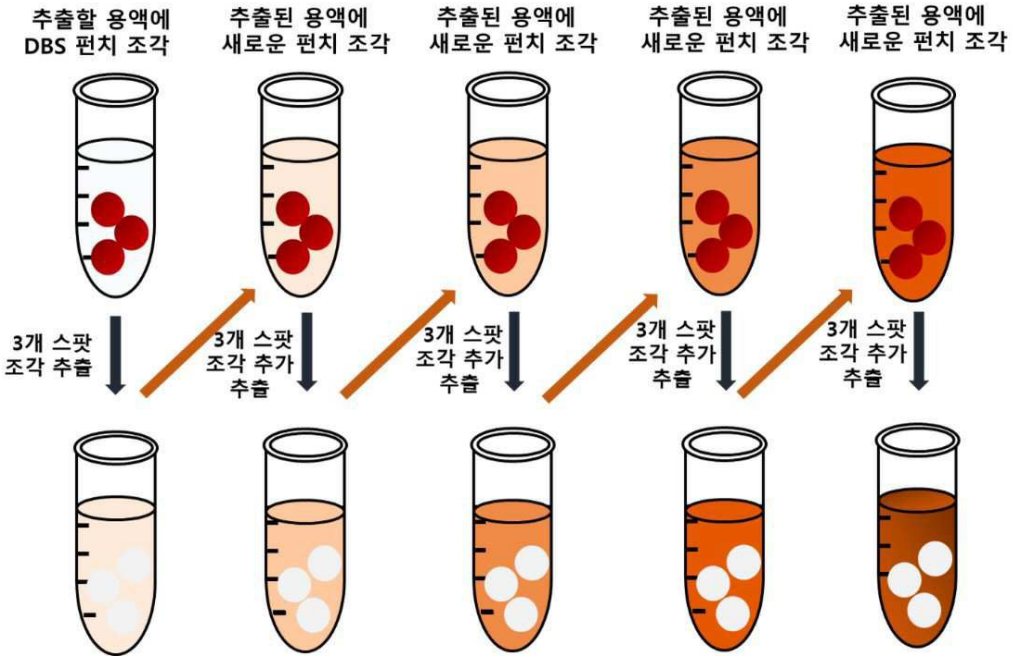
UniProt Accession No.	단백질 명칭	Abundance 변화 비율 (자궁선근증군/대조군)
Q08623	Pseudouridine-5'-phosphatase(PUDP)	2.21
Q6Y1H2	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 2(HACD2)	2.00
Q14002	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7(CEACAM7)	1.77
Q9BVM4	Gamma-glutamylaminecyclotransferase(GGACT)	1.69
Q15814	Tubulin-specific chaperone C(TBCC)	1.54
P0DP57	Secreted Ly-6/uPAR domain-containing protein 2(SLURP2)	1.53
Q9UN36	Protein NDRG2(NDRG2)	1.52

[0103] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

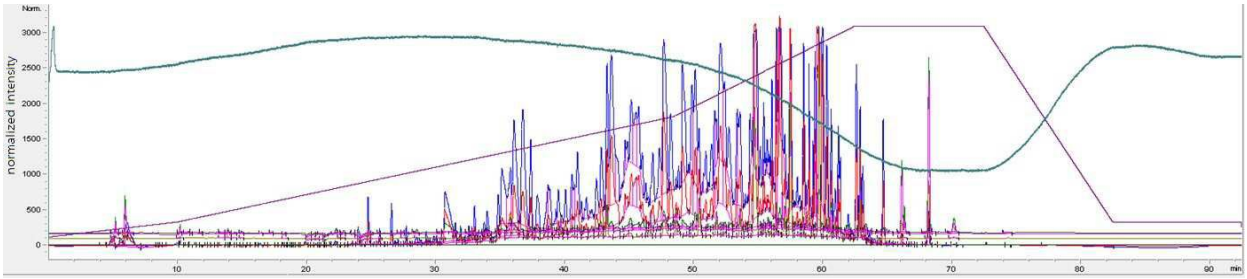
[0104] 그러므로, 다른 구현들, 다른 제조예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1


추출할 용액에
DBS 펀치 조각
추출된 용액에
새로운 펀치 조각
추출된 용액에
새로운 펀치 조각
추출된 용액에
새로운 펀치 조각
추출된 용액에
새로운 펀치 조각
3개 스팟
조각 추출
3개 스팟
조각 추가
추출
3개 스팟
조각 추가
추출
3개 스팟
조각 추가
추출
3개 스팟
조각 추가
추출

도면2


Norm.
normalized intensity
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
min