



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0015147
(43) 공개일자 2025년02월03일

(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 10-2023-0096178
(22) 출원일자 2023년07월24일
심사청구일자 2023년07월24일

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김민식
대구광역시 달성군 유가읍 테크노대로 195, 110동
1104호 (대구테크노폴리스 반도유보라
아이비파크)
박지환
경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 304동 1304호
(평촌동, 꿈마을아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 8 항

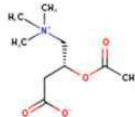
(54) 발명의 명칭 자폐증 장애 진단용 조성물 및 키트

(57) 요약

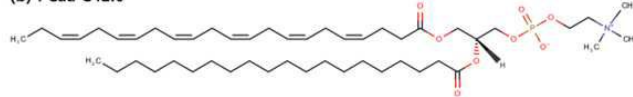
본 발명은 자폐증 장애 진단용 조성물 및 키트에 관한 것으로, 본 발명의 조성물, 키트 및 정보제공방법은 자폐증 장애 진단을 위하여 단백질 및 대사물질이 조합된 다중 바이오 마커를 이용하여 소량의 혈액에서 자폐증 장애를 간편하고 효과적으로 진단할 수 있다.

대표도 - 도1

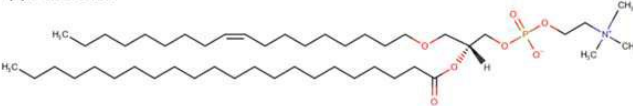
(a) Acetylcarnitine



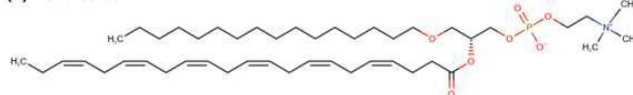
(b) PCaa C42:6



(c) PCae C40:1



(d) PCae C38:6



(52) CPC특허분류

G01N 2800/28 (2013.01)

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

모하메드 하자라 베검

경기도 수원시 영통구 청명북로7번길 16-7

민형부

대구광역시 달성군 유가읍 테크노중앙대로6길 920 1호

유희정

경기도 성남시 판교역로 102, 502동 703호

이용석

서울특별시 서초구 서초대로 1길 30, 101동 1603호

안준용

서울특별시 성북구 서경로 60, 길음뉴타운 11단지 1103동404호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711129560

과제번호

2017M3C7A1027472

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

뇌과학원천기술개발(R&D)

연구과제명

단백체 분석을 이용한 자폐증 관련 분자표적 발굴 및검증

기 여 율

1/1

과제수행기관명

(재)대구경북과학기술원

연구기간

2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 또는 Peptidase inhibitor 16의 mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질 및 Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6에 특이적으로 결합하거나 반응하는 물질 중 1종 이상을 포함하는 자폐증 장애 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1항에 있어서, 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 조성물.

청구항 3

청구항 1의 조성물을 포함하는 자폐증 장애 진단용 키트.

청구항 4

청구항 3에 있어서, Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 정량수단을 포함하는 자폐증 장애 진단용 키트.

청구항 5

진단대상으로부터 분리된 시료 내 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 자폐증 장애 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 조직, 세포, 타액 또는 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 질량 정량수단에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 발현 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 자폐증 장애 발병 가능성이 더 높다고 판단하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자폐증 장애 진단용 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 자폐증(Autism)이란, 의사소통과 사회적 상호작용 이해 능력에 저하를 일으키는 신경 발달 장애를 뜻한다. 이 증상의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 몇몇 연구자들은 정서적인 원인이 아닌 유전적 발달 장애로 추측하고 있다. 발생확률은 1000명에 한 명꼴이며 남녀의 비율은 미국 기준으로 4:1정도이다. 2011년의 조사에 의하면 국내에서의 자폐증 유병률은 2% 이상으로 나타나서 주목을 받고 있다. 자폐증은 전반적으로 '자폐 스펙트럼 장애' 혹은 '자폐 범주성 장애'(Autism Spectrum Disorder)라고 부르며, 이 장애는 학계에서 3가지 정도로 나뉘어 논의된다. 첫째로는 레오 카너가 정의한 아동을 부르는 자폐증(Autism; Kanner's Syndrome), 둘째로는 한스 아스퍼거가 논의한 아스퍼거 증후군(Asperger's Syndrome), 그리고 마지막으로 서번트 증후군(Savant Syndrome)을 포함한 고기능성 자폐증(High Functional Autism)이다.

[0004] 전 세계적으로 자폐증의 유병률은 계속적으로 증가하고 있으며, 병리 생리학적인 원인 규명이 확실히 되지 않은 질병 중 하나로 이에 진단 및 치료 약물이 개발되지 못하고 있는 실정이다. 자폐증의 병리 생리학적인 원인이 확실하지 않기 때문에, 이에 대한 연구는 보통 임상이나 질환의 특징적이고 다양한 형질을 가진 실험동물모델로 진행된다. 현재, 자폐증의 진단은 제한적인 행동이나 사회적 상호작용에 장애가 있는 경우, 행동 패턴 분석과 질문지를 기반으로 이루어지고 있고, 임상에서 자폐증 분자 진단 기술은 없는 상황이다. 행동 패턴 분석과 질문지 기반의 진단은 주관적인 진단이기 때문에 복합적인 증세 및 증세의 정도를 파악하기에 어려운 측면이 존재한다.

[0005] 이러한 문제를 극복하기 위해 자폐증의 진단을 위한 분자 진단 기술이 연구되고 있으나 아직 미미한 수준이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1167934호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 간편하고 정확하게 자폐증을 진단할 수 있는 자폐증 장애 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 특정 단백질 및 대사체의 발현 정도를 측정하여 자폐증 장애 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 또는 Peptidase inhibitor 16의 mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질 및 Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6에 특이적으로 결합하거나 반응하는 물질 중 1종 이상을 포함하는 자폐증 장애 진단용 조성물.

[0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 물질은 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나인 조성물.

[0013] 3. 위 1의 조성물을 포함하는 자폐증 장애 진단용 키트.

[0014] 4. 위 3에 있어서, Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 정량수단을 포함하는 자폐증 장애 진단용 키트.

- [0015] 5. 진단대상으로부터 분리된 시료 내 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 자폐증 장애 진단을 위한 정보제공방법.
- [0016] 6. 위 5에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 조직, 세포, 타액 또는 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0017] 7. 위 5에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 질량 정량수단에 의해 수행되는 것인, 방법.
- [0018] 8. 위 5에 있어서, 상기 발현 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 자폐증 장애 발병 가능성이 더 높다고 판단하는, 방법.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 자폐증 장애 진단용 조성물 및 키트에 관한 것으로, 본 발명의 조성물, 키트 및 정보제공방법은 자폐증 장애 진단을 위하여 단백질 및 대사물질이 조합된 다중 바이오 마커를 이용하여 소량의 혈액에서 자폐증 장애를 간편하고 효과적으로 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 (a) Acetylcarnitine, (b) PCaa C42:6, (c) PCae C40:1 및 (d) PCae C38:6의 화학구조이다.
- 도 2는 상기 단백질 분석을 통해 동정된 단백질/펩타이드 결과이다.
- 도 3는 자폐증 장애 대사체 마커 발굴을 위해서 자폐증 환자 및 환자의 가족의 혈액에서 대사체 분석을 한 결과이다.
- 도 4는 상기 대사체 분석 결과에서 환자에서 발현이 증가한 대사물질의 분석결과이다.
- 도 5는 자폐증 환자 및 환자의 혈액 샘플에서 단백질 및 대사체 분석을 위한 실험 과정 모식도이다.
- 도 6은 도 5의 실험을 위한 시료 준비 과정 모식도이다.
- 도 7은 자폐증 환자 및 환자의 혈액 샘플에서 분석한 단백질 및 대사체의 상관관계를 분석한 결과이다.
- 도 8은 도 7의 상관관계 분석 결과로부터 단백질과 대사물질 중 상호 독립적인 물질 후보군을 선택하여 ASD 모델을 생성하여 평가한 멀티패널 ROC 곡선이다.
- 도 9는 발굴한 단백질 및 대사체 다중마커의 ROC 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 또는 Peptidase inhibitor 16의 mRNA 또는 그 단백질에 특이적으로 결합하는 물질 및 Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6에 특이적으로 결합하거나 반응하는 물질 중 1종 이상을 포함하는 자폐증 장애 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16은 각각 MBL2, PTPRG 및 PI16 유전자에 의해 코딩되는 단백질이고, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6는 대사물질로 구조는 도 1과 같다. 상기 대사물질의 구체적인 정보는 Acetylcarnitine(<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000201>), PCaa C42:6 (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0008734>), PCae C40:1 (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0013433>), PCae C38:6 (<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0013409>)에서 확인가능하다.
- [0027] Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16은 진단대상으로부터 분리된 시료 내에 존재하는 것으로서, 그 mRNA 또는 단백질 서열은 NCBI 등에 공지된 서열을 활용할 수 있다. 상기 서열은 이에 제한되지 않으나, 진단 대상이 되는 개체 종의 서열을 사용할 수 있다.
- [0028] Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6은 진단대상으로부터 분리된 시료 내에 존재하는 대사

체이다.

- [0029] 진단대상은 현재 자폐증을 보유하고 있거나, 자폐증 보유가 의심되거나, 자폐증 진단을 위한 정보를 제공받고자 하는 동물 등으로서, 상기 동물은 인간을 포함한 포유류일 수 있다.
- [0030] 시료는 진단대상으로부터 분리된 것으로서, 그 예로는 혈액, 혈청, 혈장, 조직, 세포, 타액 또는 뇨일 수 있고, 구체적으로는 진단대상으로부터 분리된 혈액, 혈청 또는 혈장일 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 물질은 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16의 mRNA 및 그 단백질 중 어느 하나에 특이적으로 결합하여 이를 검출할 수 있다면 제한되지 않고, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6 중 어느 하나에 특이적으로 결합하거나 반응하여 이들 대사체를 검출할 수 있다면 제한되지 않으나, 예를 들면, 항체, 압타머, DNA, RNA, 단백질, 폴리펩티드로 이루어진 군에서 하나일 수 있다.
- [0032] 본원에서, "항체"란 항원성 부위에 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본원의 목적상, 항체는 상기 마커 단백질인 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 및 재조합 항체를 모두 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 폴리클로날 항체는 상기한 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 것을 포함하는, 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 폴리클로날 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0034] 또한, 본원의 항체에는 키메라 항체, 인간화 항체 등의 특수항체도 포함될 수 있다.
- [0035] 상기 "펩티드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0036] 상기 "압타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 압타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0037] 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 물질은 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서 "프라이머"란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 "프로브"란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0040] Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열, 상기 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열 또는 상기 뉴클레오티드의 단편에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머는 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열이 알려져 있으므로, 통상의 기술자는 상기 서열을 바탕으로 상기 프라이머 또는 프로브를 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 디자인할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 자폐증 장애 의심 환자를 대상으로 자폐증 장애 여부를 진단하는데 사용하기 위한 물질로서, 진단 대상으로부터 분리된 시료에 처리하여 시료내의 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또

는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하여 자폐증 장애 여부를 판단할 수 있다.

[0042] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 자폐증 장애 진단용 키트에 관한 것이다.

[0043] 상기 키트는 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.

[0044] 본원의 키트는 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 발현 수준 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 단백질 및 대사체의 농도 정량을 위하여 정량수단을 포함할 수 있다. 상기 농도 정량 수단은 고속액체크로마토그래피(HPLC) 또는 질량분석 수단인 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS), 가스 크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 모세관 전기영동-질량분석(CE-MS), 직접 분사(direct infusion) 질량분석(DIMS), 액체 크로마토그래피-이온트랩 질량분석, 적외선 분광분석(FT-IR), 핵자기공명분광분석(NMR), 라만 분광분석, 말디토프 질량분석(MALDI-TOF MS), Triple-토프 질량분석(Triple TOF MS), Quadrupole-토프 질량분석(Q-TOF MS) 또는 이들의 조합을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 통상적으로 사용되는 분석 방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 질량분석 수단을 포함할 수 있다.

[0045] 상기 키트는 단백질 및 대사체를 동일한 방법으로 분석하기 위해서 질량분석법이나 ELISA 방법을 사용할 수 있다. 질량분석법은 상기에 나열한 질량 정량수단을 사용할 수 있다. ELISA 방법은 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6에 각각 특이적으로 결합하는 항체를 이용할 수 있다.

[0046] 또한, 단백질 및 대사체를 서로 다른 방법으로 분석할 수 있다. 예를 들면, 단백질인 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16의 발현정도를 mRNA로 측정할 수 있고, 대사체인 Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6의 발현정도를 질량분석법을 통해 측정할 수 있다.

[0047] 상기 단백질들의 mRNA는 RT-PCR 방법이나 마이크로어레이(microarray) 방법으로 분석할 수 있다.

[0048] 따라서, 상기 키트는 RT-PCR 방법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들면, Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 세트와 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시리보뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(dePC water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0049] 상기 마이크로어레이 방법은 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질들을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 그의 단편에 해당하는 서열의 cDNA가 프로브로서 기판에 부착되어 있는 마이크로어레이일 수 있다.

[0051] 본 발명은 진단 대상으로부터 분리된 시료 내 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 자폐증 장애 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0052] 상기 시료 및 진단대상은 전술한 바와 같다.

[0053] 상기 Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma, Peptidase inhibitor 16, Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 또는 PCae C38:6의 발현 수준을 측정하는 방법은 시료 내 단백질, 단백질의 mRNA 및 대사체의 농도를 측정할 수 있는 통상적으로 사용되는 방법을 택하여 수행할 수 있다.

[0054] 예를 들면, 상기 시료 내 단백질의 농도를 측정하는 방법으로서 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 면역탁분검사, 샌드위치 측정법(sandwich assay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색(immunohistochemistry), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(fluorescence-activated cell sorting), 웨스턴 블롯팅, 유체 세포 측정법

(flow cytometry), 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있고, 바람직하게는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 시료 내 단백질의 mRNA 농도를 측정하는 방법으로서 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 시료 내 대사체의 농도를 측정하는 방법으로서 고속액체크로마토그래피(HPLC), 액체 크로마토그래피-질량 분석(LC-MS), 가스 크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 모세관 전기영동-질량분석(CE-MS), 직접 분사(direct infusion) 질량분석(DIMS), 액체 크로마토그래피-이온트랩 질량분석, 적외선 분광분석(FT-IR), 핵자기공명분광 분석(NMR), 라만 분광분석, 말디토프 질량분석(MALDI-TOF MS), Triple-토프 질량분석(Triple TOF MS), Quadrupole-토프 질량분석(Q-TOF MS) 또는 이들의 조합을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 통상적으로 사용되는 대사체 분석 방법을 사용할 수 있다.

[0057] 바람직하게는 상기 시료 내 단백질 및 대사체의 농도를 동시에 측정가능한 질량 정량 수단인 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS), 가스 크로마토그래피-질량분석(GC-MS), 모세관 전기영동-질량분석(CE-MS), 직접 분사(direct infusion) 질량분석(DIMS), 액체 크로마토그래피-이온트랩 질량분석, 적외선 분광분석(FT-IR), 핵자기공명분광분석(NMR), 라만 분광분석, 말디토프 질량분석(MALDI-TOF MS), Triple-토프 질량분석(Triple TOF MS), Quadrupole-토프 질량분석(Q-TOF MS) 또는 이들의 조합을 이용하여 수행될 수 있다.

[0058] 본 발명의 방법은 상기 발현 수준을 대조군의 발현 수준과 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0059] 예를 들어, 자폐증 의심 환자의 시료 내의 상기 단백질 및 대사체의 발현 수준과 정상인(대조군)의 발현 수준을 비교하여 자폐증 의심 환자의 발현 수준이 대조군 대비 높은 경우, 자폐증 발병 가능성이 대조군에 비해 높다고 판단할 수 있다.

[0060] 또한, 자폐증 의심환자의 시료 내의 상기 단백질 및 대사체의 발현 수준이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없거나(ex. $p < 0.05$), 낮게 측정되는 경우 자폐증 발병 가능성이 낮다고 판단할 수 있다.

[0061] 또한, 2명의 자폐증 의심 환자의 시료 내의 상기 단백질 및 대사체의 발현 수준을 비교하여 발현 수준이 더 높은 환자의 경우, 발현 수준이 더 낮은 환자보다 자폐증 발병 가능성이 더 높다고 판단할 수 있다.

[0063] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0067] 단백질 및 대사체 조합의 다중 바이오마커 발굴

[0068] 1. 단백질 바이오마커 후보군 발굴

[0069] 단백질 바이오마커 후보군 발굴을 위하여 유전적/환경적 요인이 매우 유사할것으로 생각되는 환자 및 환자의 가족의 혈액을 대상으로 단백질 분석을 진행하였다.

[0070] 단백질 분석은 라벨 프리 기반 질량분석 기술과 새롭게 개발된 16-플렉스 TMT 기술을 활용하였다. 세트 당 5 fraction으로 16개의 세트로 실험을 하였으며, 그 결과 세트별로 동정된 단백질 수는 기존의 기존 라벨 프리 분석에 비해 TMT 기술에서 약 2배 가까이 증가하여 평균 ~600 여개의 단백질이 동정되었으며, 총 11,861 펩티드와 2,241 단백질이 동정되었다. 세트별로 동정된 혈액의 단백질 수와 펩티드/단백질 누적 수를 분석한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0072] 2. 대사체 바이오마커 후보군 발굴

[0073] 단백질 분석 샘플과 동일한 혈액 샘플을 이용하여 대사체 분석을 진행하였다. 대사체 분석은 Targeted MRM-MS를 이용하여 180종류의 대사체에 대한 분석을 진행하였다. 그 결과 정상인 가족과 비교하여 환자에서 변화된 대사물질을 확인할 수 있었다. 혈액 대사체 분석 결과는 도 3에 나타내었고, 변화된 대사물질은 도 4에 나타내었다. 변화된 대사물질은 부모 모두와 비교하여 자폐증 환자에서 증가되는 것을 발견할 수 있었다. 변화된 대사물질은 바이오마커 후보군으로 선정하였다.

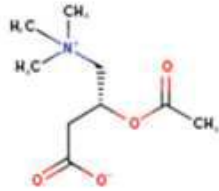
[0075] 3. 단백질 및 대사체 분석 및 다중 바이오마커 패널 발굴

- [0076] 54 가족의 혈액 샘플 중 용혈 현상이 심한 샘플은 제외하고 부 53명, 모 53, 환자 54, 형제 10의 혈액 샘플 및 정상인 57명의 혈액 샘플을 이용하여 단백질 및 대사체 분석을 진행하였다.
- [0077] 단백질 실험의 모식도는 도 5에 나타내었고, 단백질 시료의 준비 과정 모식도는 도 6에 나타내었다.
- [0078] 고분해능 QE Orbitrap 질량분석기를 이용하여 데이터를 수집하였으며, online nano liquid chromatography 시스템을 이용하여 수 μ l 시료를 online capillary C18 column으로 trapping 후 C18 analytical column (50 cm long, 75 μ m inner diameter)을 이용하여 nanoliter flow에서 펩티드 시료를 분리하여 질량분석 크로마토그램을 수행하였다.
- [0079] 자폐증 혈장 진단모델에 사용될 다중 오믹스 통합을 위해, 상기 개별 분석에서 선정되었던 단백질 바이오마커 후보군과 대사물질 바이오마커 후보군을 대상으로 단백질(펩타이드) 및 대사물질 상관관계 분석을 진행하였다. 각각 55개의 펩타이드와 21개의 대사물질이 unique pattern variable로 사용되어 1,155 쌍의 상관관계 분석이 수행되었으며, 이들 중 577 peptides-metabolites 쌍이 유의미한 상관관계 ($P < 0.10$)를 보이는 것으로 나타났다. 상관관계 분석 결과는 도 7에 나타내었다. 상기 상관관계 분석에서 단백질과 대사물질 중 상호 독립적인 물질 후보군을 선택하여 ASD 분류 모델을 생성하였고, 이들 모델을 평가하였을 때, 민감도와 특이도 합이 최대가 되는 절사점을 0.068이며, 이를 기반으로 ROC 곡선을 구하였을 때 AUC 값이 0.819임을 확인하였다(도 8).
- [0081] **4. 단백질 및 대사물질 다중마커 검증**
- [0082] 상기 발굴한 단백질 및 대사물질 조합의 다중마커를 검증하기 위한 실험을 수행하였다. 총 75가족에서 부 72명, 모 74명, 환자 75명, 자매 37명의 혈액 샘플 및 42 정상인 혈액샘플을 분석하였다. PRM-MS 기술로 단백질 및 대사체 분석을 진행하였다.
- [0083] 그 결과, 단백질 마커(Mannose-binding protein C, Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma 및 Peptidase inhibitor 16) 및 대사물질 마커(Acetylcarnitine, PCaa C42:6, PCae C40:1 및 PCae C38:6)를 활용하여 Random Forest 모델 training 시 curve의 AUC 값이 0.807 임을 확인하였다. 단일 omics 다중마커 패널에 대한 optimal logistic-regression model variable을 조합하여 model을 만들 경우, 다중오믹스 다중마커 패널에서 단일오믹스 다중마커 패널 대비 training/test set에 대한 성능 향상을 확인하였다. 놀랍게도 training set에서 0.926, test set에서 0.885의 AUC 값을 얻었다. 이 결과는 도 9에 나타내었다.

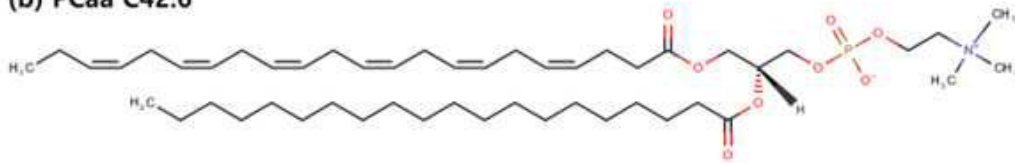
도면

도면1

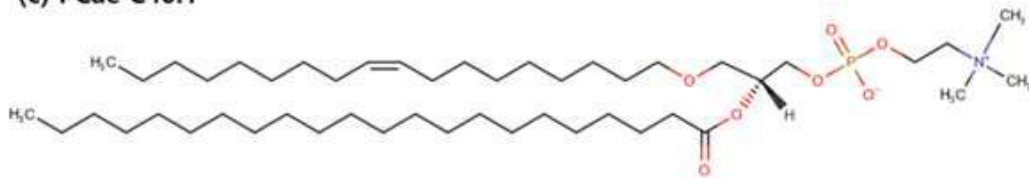
(a) Acetylcarnitine



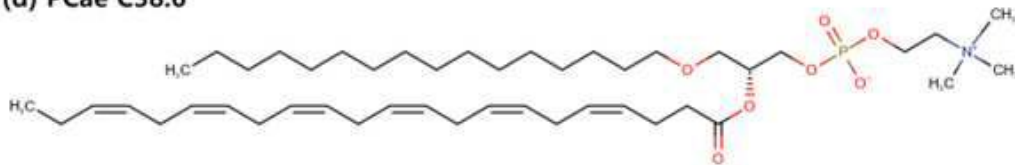
(b) PCaa C42:6



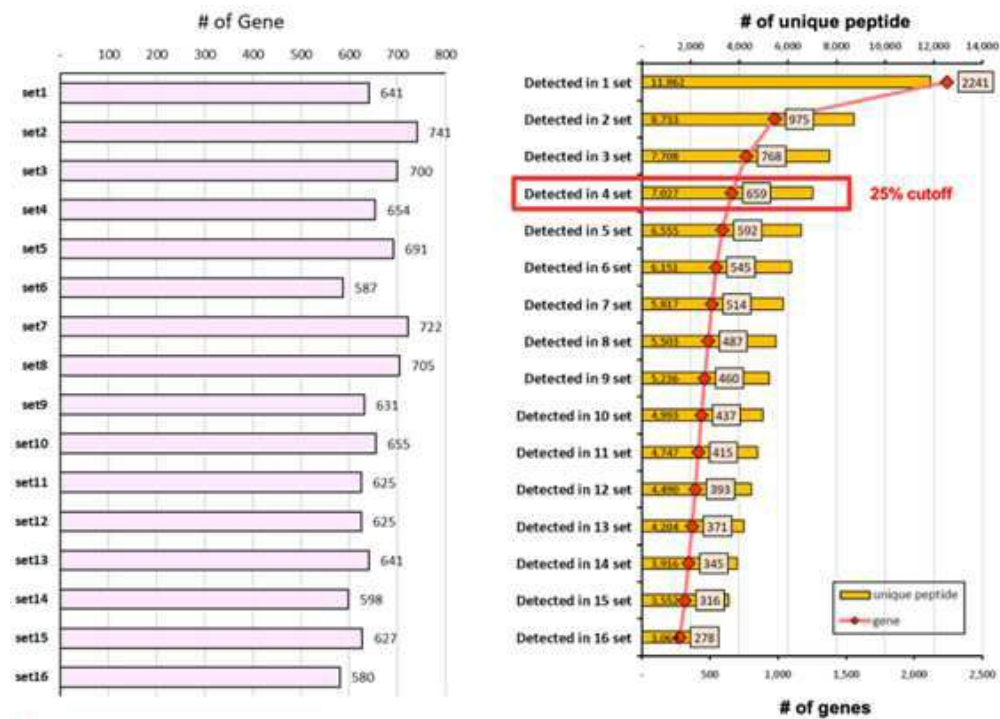
(c) PCae C40:1



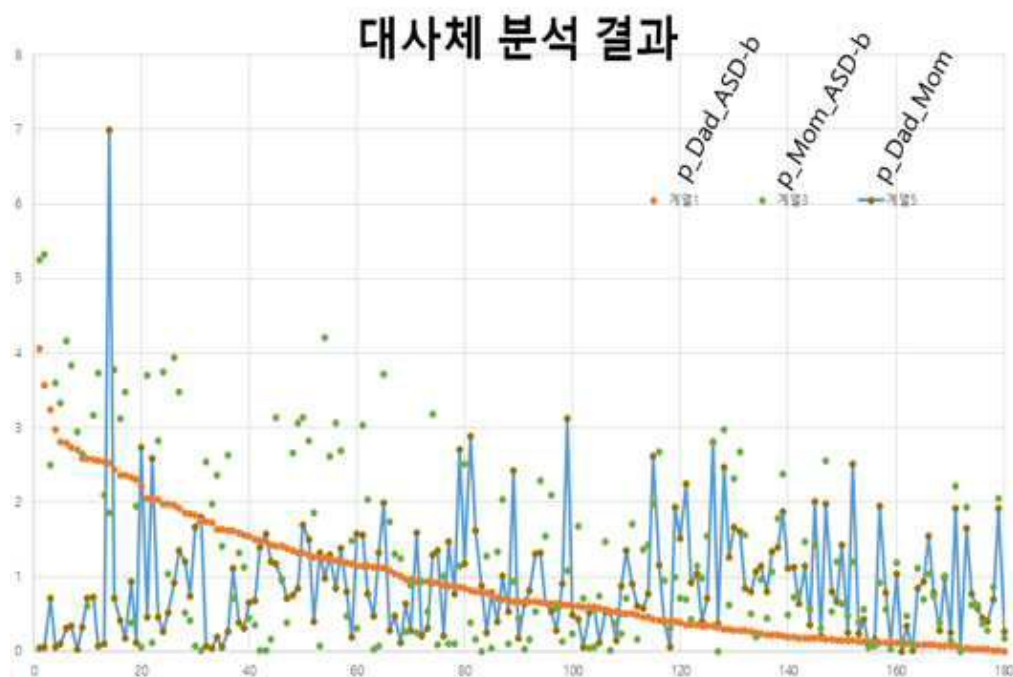
(d) PCae C38:6



도면2



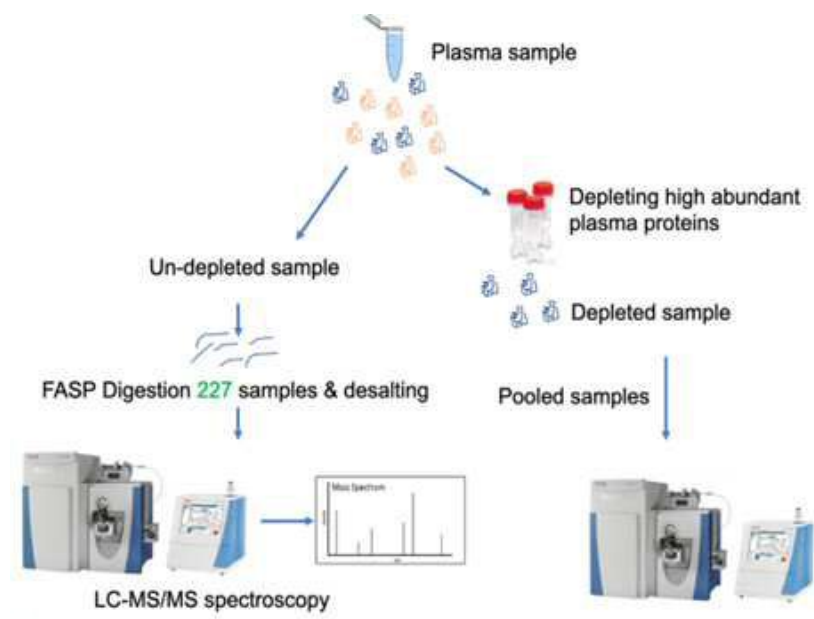
도면3



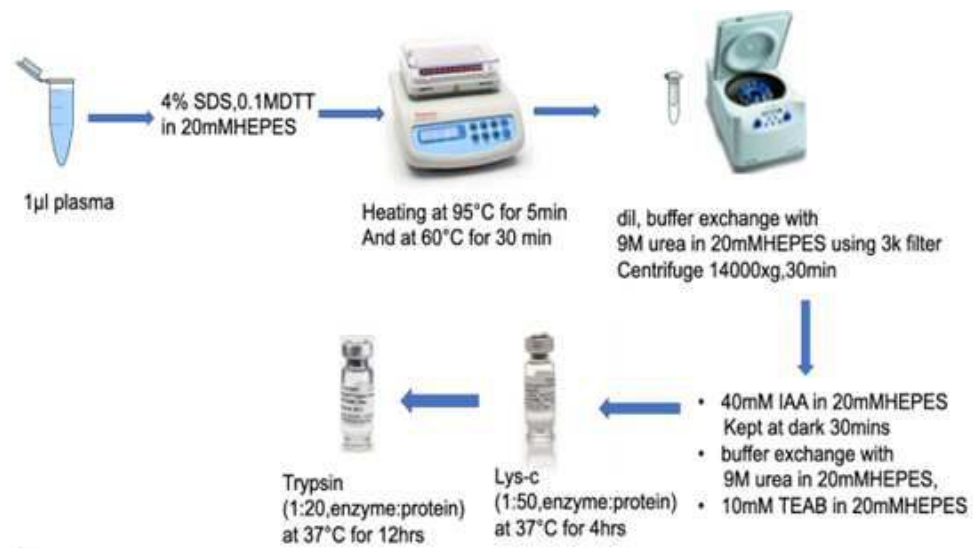
도면4

Analytes	p_Dad_ASD-b	p_Dad_ASD-g	p_Mom_ASD-b	p_Mom_ASD-g	p_Dad_Mom
PC ae C42.0	4.052749	1.158643	5.255012	1.178926	0.042926
PC aa C38.6	3.568592	2.694159	5.329733	2.854837	0.05717
PC aa C36.5	3.239835	3.41397	2.504406	2.54757	0.705415
PC ae C36.0	2.97776	1.135314	3.602712	1.173766	0.050883
PC aa C42.2	2.812258	1.97849	3.326386	1.810262	0.108923
PC ae C38.0	2.788258	1.068322	4.166484	1.255413	0.304562
PC aa C36.6	2.736292	0.573883	3.839927	0.74924	0.34496
PC aa C40.2	2.709614	1.81054	2.948786	1.847438	0.032077
PC aa C36.0	2.591962	0.28975	2.652758	0.418291	0.329873
C3	2.587358	1.066027	0.606069	0.383847	0.710454
PC aa C40.1	2.570717	1.407479	3.16817	2.113791	0.725846
PC aa C40.6	2.561702	0.609561	3.738866	0.56432	0.066823
PC aa C38.1	2.548097	1.566555	2.094767	1.720662	0.105761
Creatinine	2.533179	1.426679	1.853541	0.075562	6.982506
PC ae C40.1	2.439131	0.854994	3.783344	1.135846	0.706537
PC aa C38.5	2.364394	2.043478	3.119464	1.437657	0.414813
PC aa C40.3	2.360691	0.987536	3.485175	1.18921	0.179605
C7-DC	2.332721	0.127149	0.382391	0.216804	0.939199
SM C26.1	2.30298	1.234045	1.947278	1.092242	0.123573
total DMA	2.221718	0.945094	0.060668	0.011059	2.733917
PC aa C42.5	2.051495	0.454475	3.690975	0.753721	0.452995
SOMA	2.033847	0.385948	0.117642	0.097016	2.58824
PC ae C36.1	2.03142	0.03901	2.818755	0.031766	0.459685
PC aa C42.6	1.983746	0.756567	3.747311	0.91188	0.265531
lysoPC a C16.0	1.978233	0.688399	1.037815	0.447162	0.514869

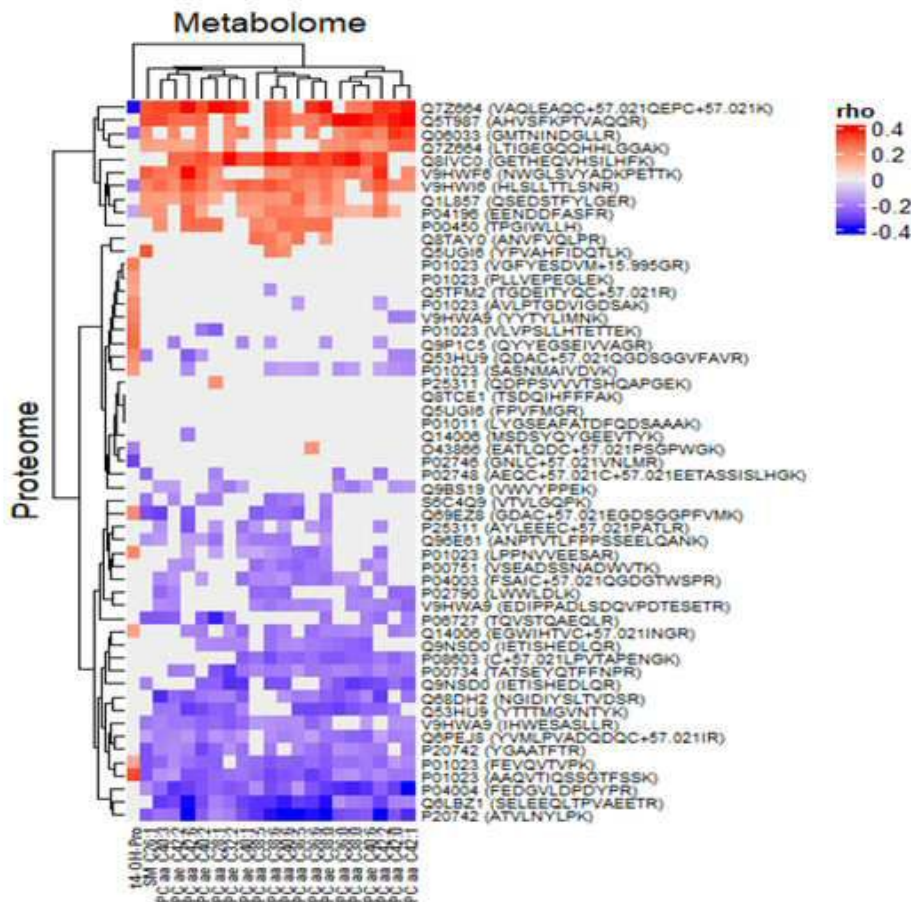
도면5



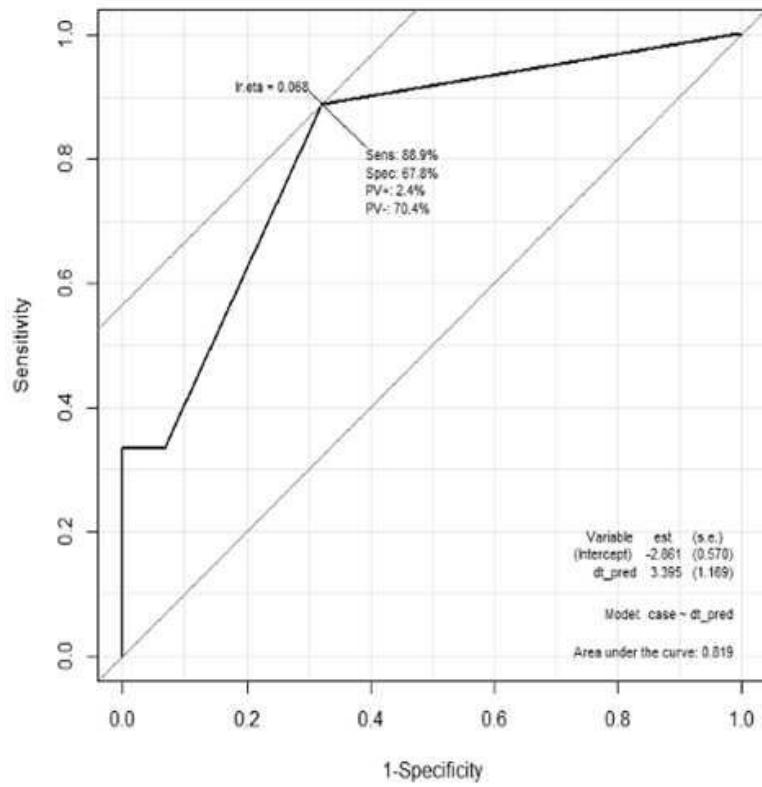
도면6



도면7



도면8



도면9

