



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133399
(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0038441
(22) 출원일자 2021년03월25일
심사청구일자 2021년03월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 베르티스
경기도 성남시 분당구 돌마로 172, 4층 403호(정자동, 분당서울대학교병원 헬스케어혁신파크)
(72) 발명자
함병주
서울특별시 중구 소공로 35, 102동 1503호 (회현동1가, 남산 롯데캐슬)
한성희
서울특별시 성북구 고려대로 73 (안암동5가)
(74) 대리인
특허법인 무한

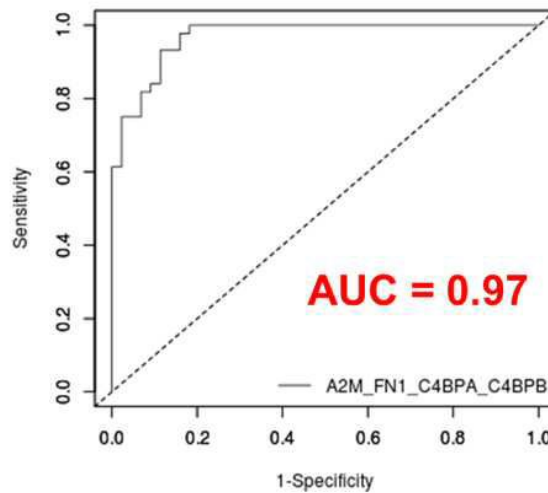
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 우울증 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 상기 바이오마커 조성물을 포함한 우울증 진단용 조성물 및 키트와, 이를 이용한 우울증을 진단하기 위한 정보제공방법 등을 제공할 수 있으며, 본 발명의 바이오마커 조성물을 이용하여 우울증을 조기에 정확하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/304 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

한승만

서울특별시 강남구 선릉로130길 20, 107동 704호
(삼성동, 래미안삼성2차아파트)

강운범

경기도 용인시 수지구 풍덕천로 75, 705동 2004호
(풍덕천동, 신정마을7단지아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 조성물은 ALAD, ANXA1, ANXA3, APOA1, BLVRB, BPGM, CA1, CA2, CALM1, CAST, CAT, DDT, HBA1, HBB, HBD, HSPA1B, KNG1, KRT7, LRG1, MAN2A2, MDH1, MMRN2, SIRT3, NME2, PGK1, PRDX1, PRDX2, PRDX6, PRODH2, RAB6B, RAD23A, S100A4, S100A8, S100A9, SELENBP1, SNCA, TF, TPI1, VCP, 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가적으로 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 우울증 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고 펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 aptamer(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 우울증 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인, 우울증 진단용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 조성물은 ALAD, ANXA1, ANXA3, APOA1, BLVRB, BPGM, CA1, CA2, CALM1, CAST, CAT, DDT, HBA1, HBB, HBD, HSPA1B, KNG1, KRT7, LRG1, MAN2A2, MDH1, MMRN2, SIRT3, NME2, PGK1, PRDX1, PRDX2, PRDX6, PRODH2, RAB6B, RAD23A, S100A4, S100A8, S100A9, SELENBP1, SNCA, TF, TPI1, VCP, 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가적으로 포함하는, 우울증 진단용 조성물.

청구항 7

제3항의 구성물을 포함하는, 우울증 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 키트는 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 캡티드화하기 위한 시약 및 단백질 가수분해 효소를 포함하는, 우울증 진단용 키트.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 키트는 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 암호화하는 유전자 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트, 및 핵산 증폭용 시약을 포함하는, 우울증 진단용 키트.

청구항 10

(a) 우울증이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 우울증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 발현 수준을 측정하는 단계는 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 질량분석(mass spectrometry analysis), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 (b)단계 이후, 상기 A2M 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 (b)단계 이후, 상기 FN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 감소한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 (b)단계 이후, 상기 C4BPA 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 (b)단계 이후, 상기 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 17

하기 단계를 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법:

(a) 우울증이 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 A2M의 발현 수준을 감소시키거나, 상기 FN1의 발현 수준을 증가시키거나, 상기 C4BPA의 발현 수준을 감소시키거나, 상기 C4BPB의 발현 수준을 감소시키는 경우, 상기 후보물질을 우울증 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 우울증은 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상 기능의 저하를 가져오는 질환이다. 주요 증상으로는 우울감, 무기력감, 불안, 흥미의 저하, 식욕장애, 수면장애, 자살 충동, 무가치감, 부적절한 죄책감, 집중력, 및 기억력 감퇴 등이 있다. 또한, 우울증은 비만, 심혈관질환, 퇴행성 신경질환 등 많은 합병증을 수반하는 매우 복잡한 장애로서, 근본적인 발병 메커니즘은 여전히 불분명하다.

[0004] 우울증의 유병률은 현재 날로 증가하는 추세이며, 세계보건기구(WHO)는 21세기에 인류를 괴롭히는 10대 질병 중

하나로 우울증을 언급했으며, 2020년 세계 5대 부담 질병에 우울증을 포함시켰다. 전 세계적으로 1억명 이상의 환자들이 우울증을 앓고 있다는 보고가 있으며, 우울증은 막대한 사회경제적 비용을 초래하는 정신질환으로서, 특히 장애와 자살을 유발하는 주요 원인인바 향후에는 암, 치매 등보다도 높은 사회경제적 비용을 초래하는 질환이 될 것으로 예측된다.

[0005] 우리나라의 자살률은 2014년도 기준인구 10만명당 27.3명으로 OECD 회원 국가의 평균 자살률의 약 2.5배로 압도적인 1위이며, 자살 증가율 역시 최고 수준으로, 자살의 주요한 원인인 우울증에 대한 진단 및 치료가 중요한 실정이다. 그러나, 이러한 현실에도 불구하고 우울증과 관련된 정신건강검진은 객관적인 진단 기술의 부재로 체계화되지 못하고 있다.

[0006] 기존의 우울증 진단은 임상가에 의한 정신과적 면담, 병력 청취 및 정신상태검사(mental status examination)에 의존하였으며, 이로 인해 임상가 간의 우울증 진단이 상이하거나 진단의 신뢰성 및 타당성에 의구심을 가지는 경우가 많았다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 객관적이고 정확성이 높은 우울증 진단방법에 대해 연구하여 우울증 환자에서 정상 대조군과 비교하여 발현량에 유의미한 차이가 있는 단백질 바이오마커를 선별함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Anderson NL. et al., Mol. Cell. Proteomics, 1: 845-867, 2002

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 우울증 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 우울증 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 우울증 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 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

[0016] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 모두 포함하거나 상기 단백질 각각을 암호화하는 유전자를 모두 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 바이오마커 조성물은 ALAD, ANXA1, ANXA3, APOA1, BLVRB, BPGM, CA1, CA2, CALM1, CAST, CAT, DDT, HBA1, HBB, HBD, HSPA1B, KNG1, KRT7, LRG1, MAN2A2, MDH1, MMRN2, SIRT3, NME2, PGK1, PRDX1, PRDX2, PRDX6, PRODH2, RAB6B, RAD23A, S100A4, S100A8, S100A9, SELENBP1, SNCA, TF, TPI1, VCP, 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 우울증 진단용 조성물을 제공한다.

- [0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 aptamer(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 ALAD, ANXA1, ANXA3, APOA1, BLVRB, BPGM, CA1, CA2, CALM1, CAST, CAT, DDT, HBA1, HBB, HBD, HSPA1B, KNG1, KRT7, LRG1, MAN2A2, MDH1, MMRN2, SIRT3, NME2, PGK1, PRDX1, PRDX2, PRDX6, PRODH2, RAB6B, RAD23A, S100A4, S100A8, S100A9, SELENBP1, SNCA, TF, TPI1, VCP, 및 VIM으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 우울증 진단용 조성물을 포함하는 우울증 진단용 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 키트는 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 펩티드화하기 위한 시약 및 단백질 가수분해 효소를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 키트는 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 암호화하는 유전자 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트, 및 핵산 증폭용 시약을 포함할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 우울증 진단방법 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0029] (a) 우울증이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0030] (b) 상기 측정된 발현 수준을 정상 대조군의 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계.
- [0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 질량분석(mass spectrometry analysis), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b)단계 이후, 상기 A2M 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b)단계 이후, 상기 FN1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 감소한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b)단계 이후, 상기 C4BPA 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b)단계 이후, 상기 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자에서 측정된 발현 수준이 정상 대조군에서 측정된 발현 수준에 비해 증가한 경우, 상기 개체는 우울증에 걸리거나 우울증에 걸릴 확률이 높은 것으로 결정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0038] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] (a) 우울증이 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, A2M, FN1, C4BPA, 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0040] (b) 상기 A2M의 발현 수준을 감소시키거나, 상기 FN1의 발현 수준을 증가시키거나, 상기 C4BPA의 발현 수준을 감소시키거나, 상기 C4BPB의 발현 수준을 감소시키는 경우, 상기 후보물질을 우울증 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.
- [0042] 또한, 본 발명은 A2M의 발현을 감소시키는 제제를 포함하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 FN1의 발현을 증가시키는 제제를 포함하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 C4BPA의 발현을 감소시키는 제제를 포함하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 C4BPB의 발현을 감소시키는 제제를 포함하는, 우울증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명은 A2M, FN1, C4BPA, 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는, 우울증 진단용 바이오마커 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 상기 바이오마커 조성물을 포함한 우울증 진단용 조성물 및 키트와, 이를 이용한 우울증을 진단하기 위한 정보제공방법 등을 제공할 수 있으며, 본 발명의 바이오마커 조성물을 이용하여 우울증을 조기에 정확하게 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 우울증 환자군 44명과 정상 대조군 44명의 혈액 시료에 대해 주성분 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈액 시료에서 Alpha-2-macroglobulin(A2M) 단백질의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (a)는 박스-플롯으로, (b)는 수용자 조직 특성(receiver operating characteristics, ROC) 곡선으로 도시한 것이다.
- 도 3은 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈액 시료에서 Fibronectin(FN1) 단백질의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (a)는 박스-플롯으로, (b)는 ROC 곡선으로 도시한 것이다.
- 도 4는 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈액 시료에서 C4b-binding protein alpha chain(C4BPA) 단백질의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (a)는 박스-플롯으로, (b)는 ROC 곡선으로 도시한 것이다.
- 도 5는 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈액 시료에서 C4b-binding protein beta chain(C4BPB) 단백질의 발현량을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (a)는 박스-플롯으로, (b)는 ROC 곡선으로 도시한 것이다.
- 도 6은 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈액 시료에서 A2M, FN1, C4BPA, 및 C4BPB의 조합을 다표지 바이오마커로 하여 ROC 곡선을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 본 발명자들은 우울증 진단용 바이오마커에 대해 예의 연구한 결과, 우울증 환자군에서 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질이 정상 대조군에 비해 발현량에서 큰 차이를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0051] 이에, 본 발명은 우울증 진단용 바이오마커로서 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자

를 제공한다.

- [0052] 또한, 본 발명은 우울증이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질을 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하여 우울증을 진단할 수 있는 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명에서, 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 “발현 수준을 측정할 수 있는 제제”는 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 본 발명의 바이오마커 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다. 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), aptamer 등일 수 있으며, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오타이드 등일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에서 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체는 물론 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무인 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다. “aptamer”는 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA를 의미하며, 비교적 단순한 방법으로 합성이 가능하고 세포, 단백질, 그리고 작은 유기 물질까지도 표적물질이 될 수 있으며, 특이성 및 안정성이 매우 우수하다. “리간드”는 유기물질, 단백질, 펩타이드 등을 포함하는 표적물질에 결합하는 물질로 하는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에서 용어, “프라이머”는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 표적서열(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 표적서열 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. “프로브”는 유전자와 특이적 결합할 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데 올리고뉴클레오타이드 브로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다. “안티센스 뉴클레오타이드”는 상기 유전자에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서 이에 제한되지는 않으나 antisenseRNA, antagonist miRNA를 포함한다.
- [0058] 또한, 본 발명은 상기 우울증 진단용 조성물을 포함하는 우울증 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 예를 들어, 상기 단백질을 펩티드화하기 위한 키트일 수 있다. 펩티드화는 단백질의 질량분석 전처리를 위하여 알려진 방법이면 제한되지 않는다. 상기 키트는 단백질의 펩티드화에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 디티오프레이톨(Dithiothreitol: DTT), 요오드아세트아마이드(Iodoacetamide: IAA), 트리스 (2-클로로에틸) 인산(Tris(2-carboxyethyl)phosphine: TCEP), 메틸메타노티오설포네이트(Methyl methanethiosulfonate: MMTS), 단백질 가수분해 효소(protease), 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 단백질 가수분해 효소는 트립신(trypsin), 엔도 프로테이나제 Lys-C(Endoproteinase Lys-C), 엔도 프로테이나제 Glu-C(Endoproteinase Glu-C) 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0059] 또한 상기 키트는 상기 유전자를 증폭하기 위한 키트일 수 있다. 증폭방법은 핵산증폭을 위하여 알려진 방법이면 제한되지 않으며, 열순환(thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온(isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 증폭방법은 폴리머라제 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR), 핵산서열-기초증폭(nucleic acid sequence-based amplification: NASBA), 리가제연쇄반응(ligase chain reaction: LCR), 가닥치환증폭(strand displacement amplification: SDA), 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification: RCA) 등을 포함할 수 있다. 증폭 방법은 또한, 역전사(reverse transcription: RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 표적핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 핵산폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다.

- [0061] 또한, 본 발명은 우울증이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 우울증을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명에서, 용어 “생물학적 시료”는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 및 이들의 조합 등일 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 또는 혈청일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. “개체”는 쥐, 가축, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0063] 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준 측정은 전기영동, 면역블로팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), 면역 조직 화학 염색, 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이, 노던 블로팅, 폴리머라제 증폭 반응(polymerase chain reaction: PCR), 질량분석(mass spectrometry analysis), 및 이들의 조합 등으로 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 또한, 본 발명은 우울증이 의심되는 개체에 후보물질을 처리하고, A2M, FN1, C4BPA 및 C4BPB 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 우울증 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공하며, 상기 후보물질이 A2M 발현 수준을 감소시키거나, FN1 발현 수준을 증가시키거나, C4BPA 발현 수준을 감소시키거나, C4BPB 발현을 감소시키는 경우, 상기 후보물질을 우울증 예방 또는 치료용 약제로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 A2M 발현 억제제, C4BPA 발현 억제제 또는 C4BPB 발현 억제제는 A2M, C4BPA, 또는 C4BPB 발현량을 감소시키거나 분해를 촉진함으로써 세포 내 A2M, C4BPA, 또는 C4BPB의 수준을 감소시키거나 A2M, C4BPA, 또는 C4BPB와 특이적으로 결합하여 그 활성을 감소시키는 것일 수 있으며, siRNA, 압타머, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 화합물 등일 수 있다. 상기 화합물은 항산화제, 세포 성장에 영향을 미치는 물질 및 세포 신호 전달 물질 중 A2M, C4BPA, 또는 C4BPB의 발현을 억제시키는 화합물이라면 어느 것이든 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에서 FN1 발현 활성화제는 FN1 발현량을 증가시키거나 분해를 억제함으로써 세포 내 FN1의 수준을 증가시키거나 FN1과 특이적으로 결합하여 그 활성을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0069] 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 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0071] **[실시예 1] 시료의 준비**
- [0072] 우울증 환자의 혈액에서 특이적으로 그 양이 변화하여 우울증의 진단에 유용하게 사용될 수 있는 바이오마커를 선별하기 위하여 우울증 환자 44명의 혈장과 정상 대조군 44명의 혈장 시료에서의 단백질 발현 정도를 확인하고, 통계 처리하여 바이오마커의 우울증 진단 효율을 확인하였다.
- [0073] 사람의 혈장에는 소수의 단백질이 혈장 내 단백질 농도의 대부분을 차지하기 때문에, 소량으로 존재하는 대다수 단백질을 동정하기 위해 먼저 상대적으로 양이 많은 단백질을 제거하였다(Anderson NL. et al., Mol. Cell. Proteomics, 1: 845-867, 2002; Somiari RI. et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 815: 215-225, 2005). 즉, 준비된 우울증 환자군과 정상 대조군의 혈장 시료로부터 상대적으로 양이 많은 단백질, 예컨대 알부민, 면역글로불린 A, 면역글로불린 G, 면역글로불린 M, 헵토글로빈(heptoglobin), 트랜스페린(transferrin), 안티트립신(antitrypsin), 피브리노겐(fibrinogen), 알파-2-마크로글로불린(alpha-2-macroglobulin), 알파 1-산 당단백질(alpha 1-acid glycoprotein), 아포지단백 A1(apolipoprotein A1), 아포지단백 A2(apolipoprotein A2), 보체 구성성분 C3(complement C3), 트란스타이레틴(transthyretin) 등을 제거하기 위해 다중 친화 컬럼(multiple affinity column)을 이용하여 액체 크로마토그래피를 수행하였다. 상기 컬럼에 결합하지 않은 단백질 구획을 자외선 흡광도 280 nm로 추적하여 모으고 컬럼에 결합한 단백질들을 제거

하였다.

[0074] 우울증 환자 44명의 혈장과 정상 대조군 44명의 혈장에서 상대적으로 양이 많은 14종의 단백질들이 대부분 제거된 단백질 구획을 모아 농축하여 100 μ g의 단백질 시료를 준비하였다. 준비된 각 시료에 10 mM의 Dithiothreitol을 처리하고 30분간 반응시켜, 단백질을 펩티드 절편으로 만드는 과정을 방해할 수 있는 단백질 내 아미노산 중 시스테인(cysteine)의 티올(thiol-) 잔기간의 결합을 끊어 주었다. 이렇게 끊어준 티올 결합은 25 mM의 Iodoacetamide를 처리한 후 빛이 들어오지 않는 곳에서 30분간 동안 반응시켜 티올 잔기간의 재결합을 막았다. 준비된 각 단백질 시료에 전체 단백질 100 μ g의 1/25에 해당하는 양인 4 μ g의 트립신(Promega, USA)을 첨가하고 37°C에서 16시간 동안 처리하여 다수의 펩티드 절편으로 분리하였다. 생성된 펩티드는 고체상 추출법(solid phase extraction)을 통해 탈염하여 질량분석을 위한 최종 시료로 준비하였다.

[0076] [실시예 2] 혈장 단백질체 정량분석을 통한 우울증 바이오마커 단백질 선별

[0077] 상기 준비된 펩티드 절편을 역상 수지 크로마토그래피를 통해 분리하고 Orbitrap Exploris 480 질량분석기(Thermo Scientific, USA)를 사용해 텐덤질량 스펙트럼을 획득하였다. 이때, 역상 수지 크로마토그래피는 150 μ m X 150 mm의 EASY-Spray C18 reverse phase HPLC column(Thermo Scientific)에 40분간 5%~40%의 아세토니트릴 농도 구배를 이용하여 실시하였다. 다수의 시료에 대한 빠르고 정확한 질량분석을 위해 데이터-비의존적 질량분석법(Data-Independent Acquisition, DIA)을 사용하였다. 상기 방법은 액체크로마토그래피 분리로부터 용출되어 나오는 펩티드를 따라가며 텐덤 스펙트럼을 얻어내는 기존의 질량분석 방식(Data Dependent Acquisition: DDA)이 아닌 고정된 질량 구간을 옮겨가며 다수의 텐덤스펙트럼을 얻어내는 질량분석 방식으로 다중처리 능력이 뛰어나 임상적 바이오마커 연구에 특히 적합하다(Nature Methods. 2014, 12, 35-35; Expert Review of Proteomics. 2014, 10, 551-566). 질량분석으로 얻은 펩티드군의 텐덤질량 분석 정보를 DIA-NN 컴퓨터 분석 프로그램으로 미리 생성해 놓은 혈액 단백질 스펙트럼 라이브러리와 비교 검색하여 단백질을 동정하고(Nat Methods. 2020, 17:41-44), 이로부터 우울증 환자군과 정상 대조군 시료 사이의 양적 차이를 분석하였다.

[0078] 전체 88개 혈액 시료에서 동정된 1455개 단백질 중 우울증 환자군과 정상 대조군 중 적어도 한쪽 군의 80% 이상의 시료(우울증 환자군 혹은 정상 대조군 시료중 35개 이상의 시료)에서 동정된 449개 단백질을 이용하여 우울증 환자군과 정상 대조군에서의 주성분 분석을 수행한 결과 제1주성분(34.6%)과 제2주성분(8.6%)이 두 군 간에 확실히 나뉘어 우울증 환자군과 정상 대조군이 효과적으로 구분됨을 알 수 있었다(도 1). 추가로 스튜던트 t 검정을 수행하여 우울증 환자군과 정상 대조군 사이에서 통계적으로 차이가 있는 단백질을 확인하였다. 그 결과, 하기 표 1과 같이 정상 대조군보다 우울증 환자군에서 특이적으로 발현량이 변화한 47개 단백질 리스트를 얻었다. 이 중 37개 단백질은 우울증 환자군의 혈액에서 발현량이 감소하였으며 10개 단백질은 우울증 환자군의 혈액에서 증가하였다.

표 1

[0080]

수탁번호	유전자	단백질	비율 (우울증/정상)	p-값
P01023	A2M	Alpha-2-macroglobulin	3.55	<0.001
P13716	ALAD	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	0.34	<0.001
P04083	ANXA1	Annexin A1	0.41	<0.001
P12429	ANXA3	Annexin A3	0.39	<0.001
P02647	APOA1	Apolipoprotein A-I	0.33	<0.001
P30043	BLVRB	Flavin reductase (NADPH)	0.36	<0.001
P07738	BPGM	Bisphosphoglycerate mutase	0.33	<0.001
P04003	C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	3.48	<0.001
P20851	C4BPB	C4b-binding protein beta chain	3.49	<0.001
P00915	CA1	Carbonic anhydrase 1	0.41	<0.001
P00918	CA2	Carbonic anhydrase 2	0.41	<0.001
P0DP23	CALM1	Calmodulin-1	0.46	<0.001
E7EQ12	CAST	Calpain inhibitor	0.42	<0.001
P04040	CAT	Catalase	0.40	<0.001

Q9UFE4	CCDC39	Coiled-coil domain-containing protein 39	0.42	<0.001
J3KRP0	CNDP1	Beta-Ala-His dipeptidase	2.42	<0.001
P30046	DDT	D-dopachrome decarboxylase	0.47	<0.001
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	0.15	<0.001
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta	0.14	<0.001
P02042	HBD	Hemoglobin subunit delta	0.14	<0.001
P0DMV9	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	0.49	0.001
P01042-3	KNG1	Isoform 3 of Kininogen-1	0.41	<0.001
P08729	KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	0.47	0.001
P02750	LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	0.25	<0.001
P49641	MAN2A2	Alpha-mannosidase 2x	2.50	0.011
P40925	MDH1	Malate dehydrogenase	0.38	<0.001
Q9H8L6	MMRN2	Multimerin-2	2.09	<0.001
E9PM52	SIRT3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3, mitochondrial	2.50	0.003
Q32Q12	NME2	Nucleoside diphosphate kinase	0.39	<0.001
P00558	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	0.45	<0.001
P00491	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	0.45	<0.001
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1	0.36	<0.001
P32119	PRDX2	Peroxiredoxin-2	0.42	<0.001
P30041	PRDX6	Peroxiredoxin-6	0.43	<0.001
Q9UF12	PRODH2	Hydroxyproline dehydrogenase	4.56	<0.001
Q9NRW1	RAB6B	Ras-related protein Rab-6B	3.00	<0.001
P54725	RAD23A	UV excision repair protein RAD23 homolog A	0.46	<0.001
P26447	S100A4	Protein S100-A4	0.44	<0.001
P05109	S100A8	Protein S100-A8	0.45	<0.001
P06702	S100A9	Protein S100-A9	0.35	<0.001
Q13228	SELENBP1	Methanethiol oxidase	0.47	<0.001
AOA669KB41	SNCA	Alpha-synuclein	0.39	<0.001
P00441	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.48	<0.001
P02787	TF	Serotransferrin	12.48	<0.001
P60174	TPI1	Triosephosphate isomerase	0.41	<0.001
P55072	VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	0.47	<0.001
P08670	VIM	Vimentin	0.42	0.002
P02751	FN1	Fibronectin	0.54	<0.001

[0082] 우울증 환자의 혈액에서 발현량의 증가 또는 감소를 보인 단백질 중 Alpha-2-macroglobulin(A2M), Fibronectin(FN1), C4b-binding protein alpha chain(C4BPA), C4b-binding protein beta chain(C4BPB) 단백질의 농도를 그래프로 도시하였다(도 2 내지 5).

[0083] 보다 구체적으로, A2M 단백질의 경우 박스-플롯으로 도시한 결과 정상 대조군에 비해 우울증 환자의 혈액에서 3.55배 증가함을 확인하였다(도 2a). 상기 단백질 바이오마커의 정확도를 나타내기 위해 관찰된 데이터의 전 범위에 걸친 판정 역치를 연속적으로 변화시켜 수득되는 모든 감수성(sensitivity)/특이성(specificity) 쌍의 그래프로 수용자 조직 특성(receiver operating characteristics, ROC) 곡선으로 도시한 결과, 상기 단백질 바이오마커의 AUC(area under the curve)는 0.82로 나타났다(도 2b).

[0084] FN1 단백질의 경우 박스-플롯으로 도시한 결과 정상 대조군에 비해 우울증 환자의 혈액에서 1.85배 감소함을 확인하였다(도 3a). 또한 ROC 곡선으로 도시한 결과, 상기 단백질 바이오마커의 AUC는 0.78으로 나타났다(도 3b).

[0085] C4BPA 단백질의 경우 박스-플롯으로 도시한 결과 정상 대조군에 비해 우울증 환자의 혈액에서 3.48배 증가함을 확인하였다(도 4a). 또한 ROC 곡선으로 도시한 결과, 상기 단백질 바이오마커의 AUC는 0.92으로 나타났다(도 4b).

[0086] 마지막으로, C4BPB 단백질의 경우 박스-플롯으로 도시한 결과 정상 대조군에 비해 우울증 환자의 혈액에서 3.49 배 증가함을 확인하였다(도 5a). 또한 ROC 곡선으로 도시한 결과, 상기 단백질 바이오마커의 AUC는 0.92으로 나타났다(도 5b).

[0088] 상기 결과로부터, 우울증 환자의 혈액에서 동정된 A2M, FN1, C4BPA, 및 C4BPB를 비롯한 상기 표 1의 단백질이 우울증을 진단하는 유용한 바이오마커로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[실시예 3] 다표지 마커를 통한 우울증 진단

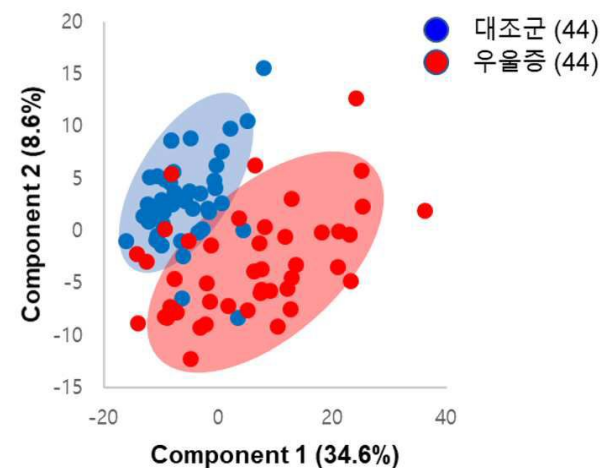
[0091] 실시예 2에서 선별된 A2M, FN1, C4BPA, 및 C4BPB 4개의 단백질 바이오마커의 정량 결과를 로지스틱 회귀분석을 통해 하나로 통합하여 다표지로 구성된 하나의 바이오마커로 만들어 우울증 진단 효율을 확인하였다.

[0092] 다표지 마커를 44명의 유방암 환자와 44명의 정상 대조군에 ROC 곡선으로 도시한 결과 AUC는 0.97로 나타나, 단일 바이오마커보다 훨씬 우수한 정확성을 확보한다는 점을 확인하였다(도 6).

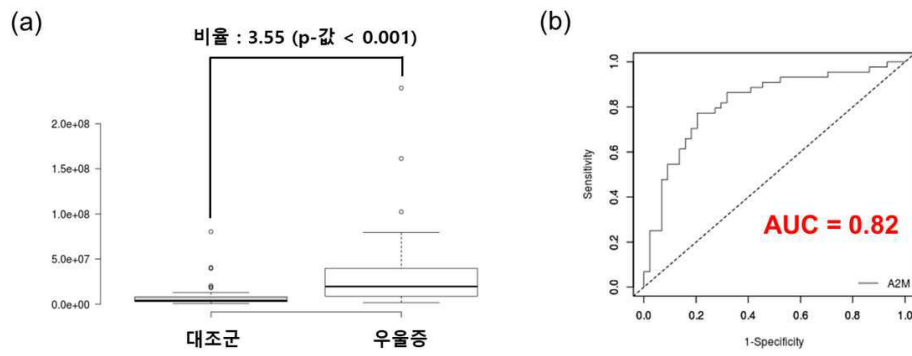
[0094] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

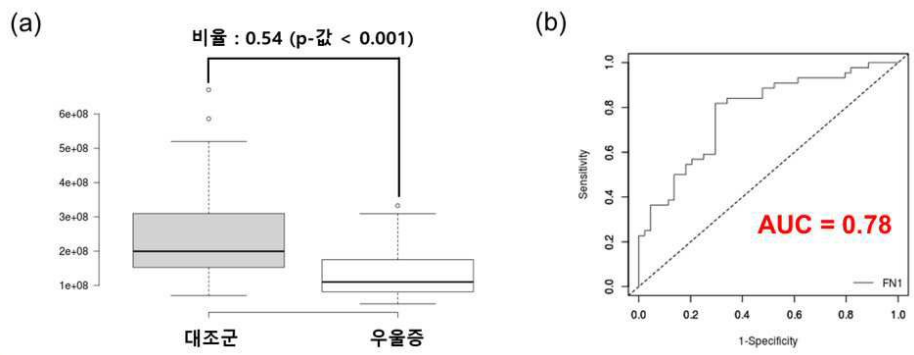
도면1



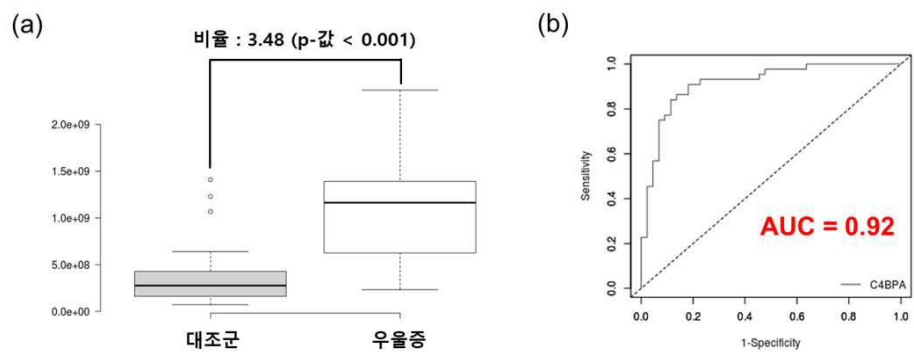
도면2



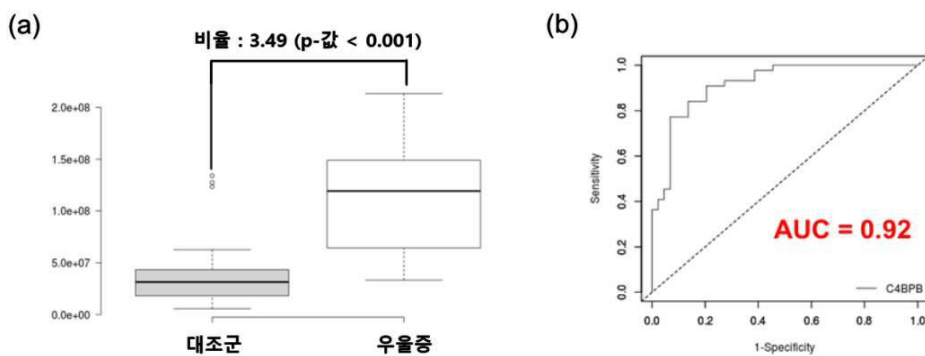
도면3



도면4



도면5



도면6

