(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0078181
(43) 공개일자 2022년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2800/2871 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0167431
(22) 출원일자 2020년12월03일
심사청구일자 2020년12월03일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)
김봉준
강원도 춘천시 교동길 50
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

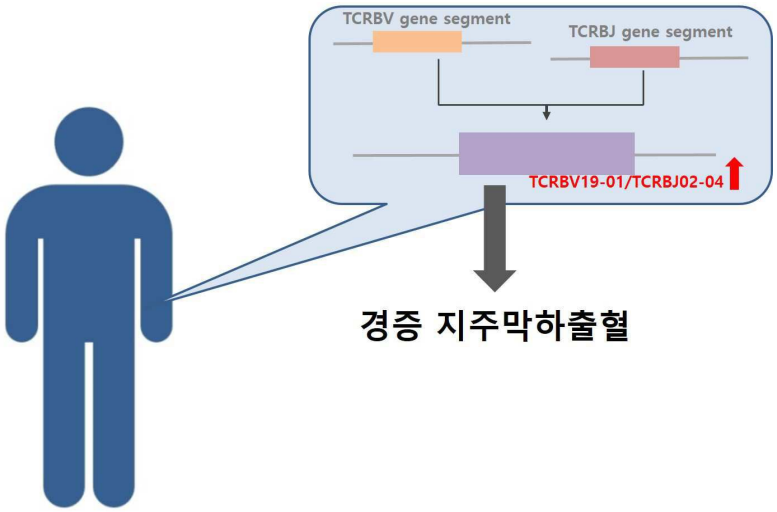
(54) 발명의 명칭 **TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지주막하 출혈 진단용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지주막하 출혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지주막하출혈 진단용 키트 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지주막하출혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명의 지주막하출혈 진단용 조성물, 지주막하출혈 진단용 키트 및 지주막하출혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, TCRB CDR3 레퍼토리의 V-J 재조합의 발현 수준을 측정하여, 지주막하출혈의 중증도가 경증 또는 중증인지의 예측 또는 진단에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345322048
과제번호	2020R1I1A3070726
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	학문균형발전
연구과제명	마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것인, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 지주막하출혈은 경증 지주막하출혈인 것인, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 경증 지주막하출혈은 헌트-헤스 등급(Hunt-Hess grade)이 Ⅲ 등급 이하인 것인, 지주막하출혈 진단용 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 지주막하출혈 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 상기 대조군의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 비교하는 단계

를 추가로 포함하는 것인, 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 방법은 상기 개체의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준이 상기 대조군의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 경증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 11

TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는, 지주막하출혈 진단용 마커 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 지주막하 출혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지주막하출혈 진단용 키트 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지주막하출혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 지주막하출혈(Subarachnoid hemorrhage: SAH)은 두개강내 출혈의 아형(subtype)으로 혈관내의 혈액이 밖으로 유출(extravasation)되면서 지주막하공간(subarachnoid space)으로 들어가서 뇌실질(Brain parenchyma)의 주변부에 위치하는 뇌 조직에 다양한 염증 반응과 뇌세포 손상을 일으키는 질병이다.

[0004] 지주막하출혈은 뇌 주변을 전반적으로 감싸고 있는 지주막하공간에서 발생하는 출혈이기 때문에 뇌 전반에 걸쳐 손상을 일으키고, 이로 인해 발생 즉시 사망을 일으키거나 심각한 영구적 뇌손상을 초래하게 된다. 지주막하출혈의 원인으로는 두부의 외부적 충격으로 인한 외상(trauma), 뇌의 혈관벽의 변화로 인해 발생하는 뇌동맥류(aneurysm) 등을 들 수 있다. 또한, 예후 측면에 있어서 현대의학에서조차도 지주막하출혈은 여전히 사망률이 높고 예후가 나쁜 질환이다. 지주막하출혈 환자 중 10~15%는 병원에 도착하기도 전에 사망하며, 25%의 환자는 출혈이 발생한지 24시간 이내에 사망하게 된다. 또한, 발병 초기에 사망하지 않고 병원에 입원하더라도 1개월 이내에 평균 40%의 환자가 사망하며, 지주막하출혈 중 50%의 환자는 6개월 내에 사망하고, 종합적으로 환자 중 51~80%가 결국 사망하게 된다. 생존을 하게 되더라도 2주 이내에 재출혈(rebleeding), 뇌수종(hydrocephalus), 혈관연축(vasospasm)으로 인해 신경학적 합병증을 일으키고 대다수가 영구적인 뇌손상으로 인해 인지능력이 떨어져서 일상 생활이 불가능하고, 평생 침상 생활을 하게 되거나, 마비가 발생하여 걷지 못하게 된다.

[0005] 지주막하출혈의 진단은 파열된 뇌동맥류에 대하여 ct-혈관조영술 및 뇌혈관조영술을 시행한다. 뇌동맥류 파열에 의한 지주막하출혈을 진단하기 위해서는 뇌 전산화단층촬영(brain ct)이 가장 먼저 시행하는 검사방법이다. 지주막하출혈 후 48시간이내에 전산화단층촬영을 하면 95% 이상에서 진단을 할 수 있으며, 만약에 지주막하출혈이 강력하게 의심되면서 전산화단층촬영상 음성으로 나오면 요추 천자를 시행하게 된다. 다만 이러한 진단 방법은 값비싼 검사 장비가 필요하여, 그 과정 또한 복잡할 수 있어, 신속하게 지주막하출혈의 상태를 진단하는 데에는 불편하다는 단점이 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 지주막하출혈의 진단, 구체적으로 지주막하출혈의 중증도를 진단하여 예후 예측을 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, T 세포 수용체 베타 사슬의 V-J 재조합 형태의 발현 수준을 측정 및 비교하여 지주막하출혈의 중증도를 진단 또는 예측할 수 있는 진단용 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2002-0064396호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원의 제 1 측면은, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지주막하출혈 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본원의 제 2 측면은, 상기 지주막하출혈 진단용 조성물을 포함하는 지주막하출혈 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본원의 제 3 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본원의 제 4 측면은, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는, 지주막하출혈 진단용 마커 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 본원의 제 1 측면은, TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 지주막하출혈 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "진단"은, 특정 개인에 대하여 지주막하출혈의 발병 여부, 보다 구체적으로 지주막하출혈의 중증도를 판별하는 것을 의미한다.

[0019] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "지주막하출혈(Subarachnoid hemorrhage, SAH)"은 뇌 표면의 동맥이 손상되어 출혈이 발생하는 것으로 뇌졸중의 일종이다. 지주막하출혈에 의해 혈액은 뇌와 두개골 사이의 공간으로 흘러 들어가고, 이는 뇌와 뇌척수 사이에서 완충 역할을 하는 뇌척수액과 혼합되며, 뇌 주위의 압력이 증가하고(뇌압 상승), 뇌의 기능을 방해하며, 뇌손상을 유발할 가능성이 있다. 지주막하출혈은 대부분 뇌 표면의 돌출된 동맥벽이 파열되어 발생한다. 동맥의 돌출부위를 동맥류라고 하는데, 대개 이 동맥류가 파열이 원인이 되며, 또는 비정상적인 혈관들이 얽혀서 만들어진 동정맥기형에서 혈액이 누출되어 지주막하 출혈이 발생하기도 한다.

[0020] 지주막하출혈이 의심되는 환자에 있어, 정확한 진단 기법을 통한 보다 빠른 동맥류성 지주막하출혈의 진단이 필요하며, 동맥류를 제거함으로써 재출혈을 예방해야 하고, 수액치료 및 뇌압조절 치료를 해야 한다. 또한, 치료의 각 단계에서 지주막하 출혈의 특이적 합병증(재출혈, 수두증, 뇌혈관 연축, 간질) 및 내과적 합병증(신경인성 폐부종, 정맥혈전증, 심혈관계 합병증, 전해질 이상, 위장관계 합병증)에 대한 평가와 치료가 이루어져야 한다. 따라서, 지주막하출혈의 중증도 등 정확한 상태를 신속하게 진단하는 것은 이를 치료하고 합병증을 예방하는 데에 중요한 부분이다.

[0021] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "T세포 수용체(T-Cell Receptor, TCR)"는 한 개의 α사슬과 한 개의 β사슬이 한 개의 다이설파이드 결합으로 서로 연결되어 있으며, 불변부 끝 부분에 세포막관통영역이 있어 T세포에

고정되며, α 및 β사슬 끝에 변이영역(V)이 단일 항원 부착부위를 형성한다. 또한, T세포 수용체 맨 끝부분에 있는 결합부위는 항원결정기 혹은 에피톱(epitope)이라 불리는 항원 부위와 결합한다. 이때, 결합방식은 효소와 기질 사이의 결합과 유사하며 결합은 비공유적으로 일어난다. 또한, T세포 수용체는 B세포 수용체와는 다르게 주조직 적합 복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC)이라는 단백질의 도움을 받아 숙주세포 표면에 제시된 항원 조작에만 결합한다.

[0022] 상기 T 세포는 발달 단계에서는 예정된 DSB가 발생하며, 구체적으로 기능적인 항원 수용체 유전자를 V(D)J 재조합이라는 반응을 통해, 구성 유전자 단편인 V (Variable), D (Diversity), 그리고 J (Joining) 유전자를 순서대로 재배열하여 완성하는 것으로 알려져 있으며, T세포 수용체의 α사슬과 β사슬은 상기 과정을 통해 다양성을 획득할 수 있다. 구체적으로, T세포 수용체 β사슬의 CDR3는 V-J 재조합을 통해 다양한 레파토리를 가질 수 있으며, 상기 V-J 재조합은 다양한 종류의 TCRBV(TCR beta variable genes) 및 TCRBJ(TCR beta joining genes)의 조합을 생성할 수 있다.

[0023] 다양한 TCRBV 및 TCRBJ의 종류 및 이의 아미노산 서열 정보는 공지된 문헌에서 확인할 수 있으며, 구체적으로 TCRBV로서, TCRBV19-01, TCRBV28-01 또는 TCRBV30-01 등이 있을 수 있으며, TCRBJ로서, TCRBJ02-04 또는 TCRBJ02-06 등이 있을 수 있다. 또한, T세포 수용체 β사슬의 V-J 재조합 형태는 다양한 TCRBV 및 TCRBJ의 조합으로 표현할 수 있고, 이는 공지된 문헌에서 확인할 수 있으며, 구체적으로 TCRBV19-01/TCRBJ02-04, TCRBV28-01/TCRBJ02-04, TCRBV28-01/TCRBJ02-06 또는 TCRBV30-01/TCRBJ02-04 등이 있을 수 있다.

[0024] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1 의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 상기 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 상기 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 상기 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06을 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0030] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열은 상기 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 것일 수 있다.

[0031] 본원의 일 구현예에 있어서, 본원의 지주막하출혈의 진단은 지주막하출혈의 중증도를 진단하거나 발병 위험을 예측하거나 또는 지주막하출혈의 예후를 진단하는 것일 수 있으며, 구체적으로 지주막하출혈이 경증 또는 중증인 지 진단하는 것일 수 있다.

[0032] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "헌트-헤스 분류 또는 헌트-헤스 등급(Hunt-Hess grade)"은 뇌지주막하출혈 환자에 대한 대표적 평가 방법으로서, 각 등급은 하기와 같은 기준으로 분류될 수 있다.

[0033] - 0 등급(Grade 0): 파열되지 않은 동맥류

[0034] - Ⅰ 등급(Grade Ⅰ): 무증상 또는 최소한의 두통 및 약간의 목덜미 경직

[0035] - Ⅱ 등급(Grade Ⅱ): 중등도에서 중증의 두통, 목덜미 강직, 뇌신경 마비 이외의 신경 학적 결손 없음

[0036] - Ⅲ 등급(Grade Ⅲ): 졸음, 혼란 또는 경미한 초점 결핍

[0037] - Ⅳ 등급(Grade Ⅳ): 지각마비(Stupor), 중등도에서 중증의 반신부전마비(hemiparesis), 조기 제뇌경축 및 식

물 인간 상태의 장애

[0038] - V 등급(Grade V): 깊은 혼수 상태, 제뇌경축, 빈사 상태의 외형

[0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 경증 지주막하출혈은 헌트-헤스 등급(Hunt-Hess grade)이 Ⅲ 등급 이하인 것일 수 있으며, 구체적으로 Ⅰ 등급, Ⅱ 등급 또는 Ⅲ 등급인 것일 수 있다.

[0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 중증 지주막하출혈은 헌트-헤스 등급(Hunt-Hess grade)이 Ⅳ 등급 이상인 것일 수 있으며, 구체적으로 Ⅳ 등급 또는 V 등급인 것일 수 있다.

[0041] 본원의 일 구현예에 있어서, TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 펩타이드의 발현 수준이 증가한 경우, 또는 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 펩타이드의 발현 수준이 감소한 경우, 대상 개체를 경증 지주막하출혈이 발병하거나 발병할 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0042] 본원의 일 구현예에 있어서, TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06을 포함하는 펩타이드의 발현 수준이 증가한 경우, 또는 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 펩타이드의 발현 수준이 감소한 경우, 대상 개체를 중증 지주막하출혈이 발병하거나 발병할 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0043] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "발현수준의 측정"은 특정 단백질(펩타이드) 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것으로서, 구체적으로 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04를 포함하는 펩타이드 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있으며, 추가적으로 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04를 포함하는 펩타이드 또는 이를 암호화하는 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radical immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoeletrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complenent Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology)인 것일 수 있다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 mRNA 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사 효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Nothern blotting) 또는 DNA 칩 방법(DNA chip technology)인 것일 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, "발현 수준을 측정할 수 있는 제제"는 특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 구체적으로 상기 단백질 또는 상기 유전자를 검출 및/또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "특정 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 검출할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나, 검출하여 증폭시킬 수 있는 제제를 의미하고, "특정 유전자 또는 단백질을 증폭할 수 있는 제제"는 상기 특정 유전자 또는 단백질의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 제제를 의미하며, 예를 들어 상기 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04를 포함하는 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 암호화하는 유전자, 또는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 뉴클레오티드, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 리간드, 수용체, 단백질 또는 그 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[0049] 본 명세서 전체에서 사용되는 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 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 암호화하는 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을

실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 암 치료제에 대한 내성을 예측할 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.

[0050] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프로브(probe)"란 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 들면 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04를 암호화하는 유전자의 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 암 치료제에 대한 내성을 예측할 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.

[0051] 또한, 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.

[0052] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "항체"란 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 상기 항체는 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질 또는 이의 단편에 대해 특이적으로 결합할 수 있다. TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질의 단편은 예를 들면 면역원성 단편일 수 있다. 상기 단편은 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프 (epitope)를 가지고 있는 단백질 단편을 의미한다. TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질을 암호화하는 유전자를 발현벡터에 클로닝하고 그 유전자에 의해 코딩되는 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질을 수득하고, 수득된 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다.

[0053] 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 재조합 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 폴리클론 항체는 당업자에 알려진 종래 방법에 따라 면역원인 바이오 마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유 동물을 사용할 수 있다. 상기 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사 방법으로 주사되는 경우, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 아주반트(adjuvant)와 함께 투여될 수 있다. 이후, 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리, 정제할 수 있다.

[0054] 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술에 의해 제조될 수 있다. 단일클론 항체의 제조 방법에 대해 간단히 설명하면, 상기 단백질을 정제하여 약 10 ㎍의 적당량을 Balb/C 마우스에 면역화를 시키거나, 상기 단백질의 폴리펩티드 단편을 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역화시킨 다음, 마우스에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, ELISA 방법을 사용하여 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 단일클론 항체를 분리, 정제할 수 있다. 또한 단일클론 항체는 상업적으로 판매되는 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 단백질에 대한 항체를 입수하여 사용할 수 있다.

[0055] 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.

[0056] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "단편"은 예를 들면 온전한 항체, 펩티드 또는 단백질의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 또는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 단편은 2개의 경쇄 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.

[0058] 본원의 제 2 측면은 상기 지주막하출혈 진단용 조성물을 포함하는, 지주막하출혈 진단용 키트를 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 키트에도 공히 적용된다.

[0059] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 키트는 TCRBV 19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정함으로써, 지주막하출혈의 중증도를 진단 또는 예측할 수 있는 효과가 있다. 상기 키트에는 지주막하출혈의 진단을 위한 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 등뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액, 또는 장치가 더 포함될 수 있으며, PCR 키트, RT-PCR 키트, qRT-PCR 키트, 메틸화-특이적 PCR 키트, DNA 칩 키트, 웨스턴 블랏 키트, 또는 ELISA 키트 등을 포함할 수 있다.

[0060] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 본원의 폴리뉴클레오티드, cDNA, mRNA, 펩타이드 등뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0061] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, RT-PCR 키트는, 상기 유전자들 또는 메틸화 영역에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 칩 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 유전자들 또는 메틸화 영역에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 마이크로어레이 키트는 마이크로어레이를수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, DNA 마이크로어레이 키트는 마이크로어레이 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있으며, 상기 유전자를 이용하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로어레이를 제작하기 위해서, 상기 탐색된 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용할 수 있다. 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 및 알데히드 (aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것일 수 있다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0065] 본원의 제 3 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지주막하출혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 정보제공 방법에도 공히 적용된다.

[0066] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"는 지주막하출혈이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식 어류 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "시료"는 지주막하출혈이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할

수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 및/또는 단백질 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 특정 유전자/단백질의 발현 수준을 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0069] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "대조군"은 지주막하출혈이 발병되지 않은 일반 개체, 비-지주막하출혈 환자군, 비환자군 등을 의미하는 것일 수 있다.

[0070] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 개체의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준이 상기 대조군의 TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 경증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0071] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예측"은, 특정 개인에 대하여 경증 또는 중증 지주막하출혈이 발병할 가능성이 있는지, 발병할 가능성이 있다면 경증 또는 중증 지주막하출혈이 발병할 가능성이 불특정 다수인에 비하여 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 의미한다.

[0072] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0073] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0074] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 방법은 상기 개체의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준이 상기 대조군의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준보다 낮은 경우, 상기 개체를 경증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0075] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06의 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0076] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 방법은 상기 개체의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06의 발현 수준이 상기 대조군의 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06의 발현 수준보다 높은 경우, 상기 개체를 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0077] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0078] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 방법은 상기 개체의 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준이 상기 대조군의 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04의 발현 수준보다 낮은 경우, 상기 개체를 중증 지주막하출혈이 발병한 것으로 판정하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0080] 본원의 제 4 측면은, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는, 지주막하출혈 진단용 마커 조성물을 제공한다. 제1 측면 내지 제2측면과 중복되는 내용은 제4측면의 조성물에도 공히 적용된다.

[0081] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "마커(marker)"는 바이오마커를 의미하며 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있다.

[0082] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 마커 조성물은 지주막하출혈의 중증도를 진단할 수 있는 것으로서, 구체적으로 지주막하출혈이 경증인지 또는 중증인지 판단하는 것일 수 있다.

[0083] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 마커 조성물은 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0084] 본원의 일 구현예에 있어서, TCRBV19-01 및 TCRBJ02-04을 포함하거나 및/또는 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-04을 포

함하는 마커 조성물은 경증 지주막하출혈을 진단하거나 예측할 수 있다.

[0085] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 마커 조성물은 TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0086] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 마커 조성물은 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0087] 본원의 일 구현예에 있어서, TCRBV28-01 및 TCRBJ02-06을 포함하거나 및/또는 TCRBV30-01 및 TCRBJ02-04을 포함하는 마커 조성물은 중증 지주막하출혈을 진단하거나 예측할 수 있다.

발명의 효과

[0089] 본 발명의 지주막하출혈 진단용 조성물, 지주막하출혈 진단용 키트 및 지주막하출혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, TCRB CDR3 레퍼토리의 V-J 재조합의 발현 수준을 측정하여, 지주막하출혈의 중증도가 경증 또는 중증인지의 예측 또는 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1은 T 세포 수용체 베타 사슬의 V-J 재조합을 이용하여 지주막하출혈을 진단하는 것을 대략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 지주막하출혈 (SAH) 중증도, 좋은 등급 vs 나쁜 등급에 따른 TCRB 클론형성능의 비교 결과를 나타낸 도면이다. 좋은 등급의 SAH 환자는 나쁜 등급의 SAH 환자보다 높은 클론형성능을 갖는 것을 확인하였다.

도 3은 입원 및 추적 관찰 시 레퍼토리 다양성을 나타낸 도면으로서, TCRB CDR3 클론형은 점으로 표시되고 클론형 빈도에 따라 순위를 매겼다.

도 4 지주막하출혈 (SAH) 중증도, 좋은 등급 vs 나쁜 등급에 따른 CDR3 길이 레퍼토리의 비교 결과를 나타낸 도면이다. 좋은 등급의 SAH 환자는 나쁜 등급의 SAH 환자보다 짧은 CDR 길이를 갖는 것을 확인하였다.

도 5는 입원일과 7일 추적 관찰 사이에 각 환자에서 TCRB CDR3 서열의 정량화 결과를 나타낸 도면이다. 10개의 가장 일반적인 서열은 서로 다른 색상으로 표시하였다. 나쁜 등급의 SAH 환자는 입원 시 좋은 등급의 SAH 환자에 비해 가장 일반적인 상위 10개 서열 중 낮은 비율을 보이는 경향이 있는 것을 확인하였다.

도 6은 SAH 환자에서 TCRBV 및 TCRBJ 유전자의 고유한 클론형의 분포 및 변화를 나타낸 도면이다. TCRBJ와 비교하여, TCRBV는 입원일과 7일 추적 관찰 사이에 상이한 분포를 보이는 것을 확인하였다. 각 환자의 유전자 빈도를 나타내는데 다른 색상을 사용하였다.

도 7은 SAH 중증도에 따른 평균 TCRB V-J 유전자 활용 비교 결과를 나타낸 도면이다. V 유전자와 J 유전자 절편은 x 축과 y 축에 배열하였다. 다양한 색상은 좋은 등급의 SAH 환자와 비교하여 나쁜 등급의 SAH 환자의 유전자 빈도의 차이를 나타낸다.

도 8은 SAH 중증도에 따른 좋은 등급 (A) 및 나쁜 등급 (B) 에 따른 입원 시 및 7일 추적 관찰 동안 평균 TCRB V-J 유전자 활용 비교 결과를 나타낸 도면이다. V 유전자와 J 유전자 절편은 x 축과 y 축에 배열하였다. 다양한 색상은 좋은 등급의 SAH 환자와 비교하여 나쁜 등급의 SAH 환자의 유전자 빈도의 차이를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0094] **실시예 1: 코호트(cohort) 수집**

[0096] 본 발명을 수행하기 위한 코호트(cohort)는 참여 병원의 뇌졸중 데이터베이스에서 파생되었으며, 이 데이터베이스는 지역 의료 센터에서 진행중인 전향적 관찰 프로젝트의 일부이다. 모든 환자는 2016년 3월부터 2019년 12월

까지 병원에 입원하였다. 본원의 실시예 및 실험예를 위한 지주막하 출혈 환자는 하기의 조건을 만족하였다: 1) 18세 초과의 성인, 2) 낭상형(saccular appearance)과 연관된 동맥류 파열로 인한 자발적 지주막하 출혈. 및 3) 코일 색전술을 받은 환자. 또한, 하기 조건을 갖는 환자는 제외하였다: 1) 추형, 해부학, 및 전염성 동맥류, 2) 혈관촬영도-네거티브(angiogram-negative) 지주막하 출혈 및 3) 동정맥 기형(arteriovenous malformation, AVM) 또는 경막 동정맥루(dural arteriovenous fistula)를 포함하는 다른 뇌혈관 질환이 동반된 지주막하 출혈 환자.

[0097] 입원 시점(입원일, admission)과 7일 후 추적 관찰(follow-up) 시점 사이에 TCRB (T cell receptor β-chain) CDR3 레퍼토리의 구성과 변이를 비교하고자 하였다. 또한, SAH 심각도, 좋은 및 나쁜 등급에 따라 환자를 두 그룹으로 나누고, 이들 그룹 간의 TCRB 레퍼토리를 추가로 비교했다. 좋은 등급의 SAH는 초기 Hunt 및 Hess 등급이 III 이하로 정의되었다. 임상 및 방사선 의료 정보를 검토하였고, 임상 결과는 SAH 6개월 후 변형된 Rankin 척도 (modified Rankin scale, mRS) 점수를 사용하여 평가되었다. 상기 실험은 참여 병원 기관 심사위원회 (No. 2016-3, 2017-9, 2018-6)의 승인을 받았으며, 모든 환자 또는 그 친척으로부터 사전 동의를 받았다.

[0099] **실시예 2: DNA 추출 및 고-처리 시퀀싱(high-throughput sequencing)**

[0101] 상기 환자들의 입원 및 추적 관찰 당일 말초 혈액 샘플을 준비하였다. QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 전혈에서 게놈 DNA를 추출하고 DropSense96으로 정량화하고 표준에 따라 버퍼에서 라이브러리 준비를 위해 희석했다. 그런 다음, immunoSEQ assay (Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA)을 사용하여 샘플 데이터를 생성했다. 체세포 재배열된 유전자좌 CDR3 영역은 편향-조절된 멀티플렉스 PCR(bias-controlled multiplex polymerase chain)을 사용하여 증폭되었다. 구체적으로 정방향 및 역방향 증폭 프라이머를 사용하여 모든 V 및 J 유전자 절편에 대해 첫 번째 PCR을 수행하고 초가변(hypervariable) CDR3을 증폭했다. 그런 다음 두 번째 PCR에서 독점 바코드 시퀀스와 Illumina 어댑터 시퀀스 (https://support.illumina.com)를 수행했다. CDR3 라이브러리는 제조업체의 지침에 따라 Illumina 기기에서 시퀀싱하였다.

[0103] **실시예 3: TCRB 레퍼토리 분석**

[0105] 원시 Illumina 시퀀스 리드(read)는 역다중화되고 다음의 단계로 추가 처리되었다: 어댑터 및 프라이머 서열 제거, 기술적 오류의 식별 및 수정, 프라이머 이량체, 생식계열 및 기타 오염 서열 제거. 그런 다음, 상대적 빈도 비율(relative frequency ratio) 및 변형된 최근방 알고리즘(modified nearest-neighbor algorithm)을 이용하여 상기 데이터를 필터링하고 클러스터링하여 밀접하게 관련된 서열을 병합하였다. 항체 사슬의 가변 영역의 경우, 항체는 유전자 단편, V, D 및 J 유전자의 조합에 의해 생성된다. 상기 V, D 및 J 영역은 단일 또는 다중 엑손으로 분리 및 인코딩된다. 이에 따라, 상기 V, D, J 유전자는 IMGT 데이터베이스 (www.imgt.org)에 따라 주석을 기반으로 정의되었다. 생물학적 CDR3 유전자좌 서열을 정규화하고 정량화했다. immunoSEQ Analyzer 도구 세트는 데이터 분석에 사용되었다. 비교 결과는 Mann-Whitney U 검정을 사용하여 중앙값 (25-75번째 백분위 수)으로 기재하였다. 0.05 미만의 P 값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였으며, 분석은 SPSS V.19 (SPSS, Illinois, USA)로 수행되었다.

[0107] **실험예 1: 코호트의 기본적 특성 확인**

[0109] 실시예 1에서 수집한 코호트에서 6명의 지주막하출혈(subarachnoid hemorrhage, SAH) 환자의 TCRB CDR3 레퍼토리를 분석하고 두 개의 다른 시점 (입원 및 7 일 추적 조사)에서 비교했다. 상기 6명의 환자 중, 3명의 환자는 좋은 등급(Hunt-Hess 등급 Ⅲ 이하)의 SAH를 보였고 나머지 3명은 나쁜 등급의 SAH(Hunt-Hess 등급 Ⅳ 이상)를 보였다. 평균 연령은 53.5세 (범위, 41-77 세)였다. 4명은 여성 (66.7 %)이었다. 대부분의 동맥류 (n = 5, 83.3 %)는 전방 순환에 위치했다. 2명의 환자는 중증의 지연성 뇌허혈을 경험했으며 화학적 혈관 성형술 후 잘 회복되었다. 3명은 좋은 등급 SAH 환자는 심각한 장애없이 잘 회복되었다. 그러나, 3명의 환자 중 1명 (33.3%)

은 3점의 mRS (Modified Rankin Scale) 점수로 나타낸 바와 같이 신경학적으로 나쁜 결과를 나타냈다. 상기 서술한 코호트의 기본적 특성은 하기 표 1에 정리하여 기재하였다.

표 1

[0111]

환자 No.	나이	성별	Hunt-Hess 등급	Fisher 등급	동맥류(Aneurysm) 부위	DCI	6-개월 mRS
1	61	F	II	2	MCA	No	0
2	50	F	II	3	MCA	Yes	0
3	77	F	III	3	A-com	No	0
4	47	M	IV	4	PICA	No	3
5	57	M	IV	4	A-com	No	0
6	41	F	IV	3	MCA	Yes	1

[0112] * A-com - 전교통동맥(anterior communicating artery); DCI - 지연성 뇌허혈(delayed cerebral ischemia); MCA - 중간대뇌동맥 (middle cerebral artery); mRS - modified Rankin scale; PICA - 후하소뇌동맥(posterior inferior cerebellar artery)

[0114] **실험예 2: TCRB의 서열, 클론형성능 및 CDR3 길이 분석**

[0116] 상기 실험예 1에서 확인한 코호트에서 TCRB CDR3 레퍼토리의 전체 및 고유 서열, 클론형성능(clonality) 및 빈도와 같은 변수를 측정했다.

[0117] 먼저, 입원 및 추적 관찰 (follow-up) 시 Shannon 지수를 사용하여 클론형성능을 확인한 결과 각각 0.059 (0.037-0.038) 및 0.027 (0.014-0.082) (p = 0.699)이었다. 나쁜 등급의 SAH[0.025 (0.011-0.038)]의 클론형성능은 좋은 등급의 SAH [0.095 (0.079-0.101); p = 0.026]보다 현저히 낮았다. (도 2). 또한, 0.005% A < 0.05 %의 리드(read) 빈도가 클론 확장에 우세했지만, 입원과 추적 관찰 사이의 변화는 명확한 연관성을 보여주지 않았다 (표 2).

표 2

[0119]

	NO. 1		NO. 2		NO. 3		NO. 4		NO. 5		NO. 6	
Read frequency (%)	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U	Adm	F/U
≥5	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0.5≤- < 5	8	9	14	3	10	6	0	2	5	3	8	1
0.05≤- <0.5	65	45	56	217	1071	284	44	278	259	94	1372	265
0.005≤- <0.05	3995	4748	10787	2256	0	2000	3744	2557	1965	4646	0	3005

[0120] * Adm(admission) - 입원시점; F/U(follow-up) - 추적 관찰 시점(입원 7일 후)

[0122] 다음으로 TCRB 클론형 빈도의 순위를 매기고 Simpson 다양성 지수 (Simpson diversity index, D)를 사용하여 레퍼토리 다양성을 비교했다. 여기서 1에 가까운 점수는 높은 다양성을 나타낸다 (도 3). 전반적으로 다양성 지수는 입원 시 0.993 ~ 0.999, 추적 관찰 시 0.987 ~ 0.999 였다. 나쁜 등급 SAH 환자의 다양성 점수는 0.998과 0.999로 좋은 등급의 SAH 환자의 점수보다 높았다.

[0123] CDR3 길이는 15 ~ 78개 뉴클레오티드 범위였으며, 좋은 등급 SAH 환자에서는 42개, 나쁜 등급 SAH 환자에서는 45개에서 피크를 나타냈다. 5개의 가장 일반적인 CDR3 길이는 36, 39, 42, 45 및 48개 뉴클레오티드였다. 결과는 5명의 평균으로 계산하였다. 좋은 등급의 SAH 사례는 낮은 등급의 SAH에 비해 CDR 길이가 더 짧은 경향이 있

었다 (도 4).

[0124] 다음으로, 상기 서열들 중 10 개의 가장 확장된 서열이 제시되고 아미노산 수준 측면에서 비교하였다 (도 5). 상위 10개의 가장 일반적인 서열의 분포는 각 환자마다 달랐다. 전반적으로, 나쁜 등급의 SAH 환자는 좋은 등급의 SAH 환자보다 상위 10개의 가장 일반적인 서열의 낮은 비율을 보이는 것을 확인하였다.

[0126] **실험예 3: TCRBV 및 TCRBJ의 분포 확인**

[0128] 상기 실험예 1에서 확인한 코호트에서 TCRBV 및 TCRBJ 유전자 세그먼트 둘 다에서 고유한 클론형의 분포를 분석했다. 전반적으로, 추적 관찰로부터의 TCRBV 유전자 절편은 입원일의 경우와 다른 클론형을 가졌지만, TCRBJ 유전자 절편의 분포는 유사했다. 좋은 등급의 SAH와 비교할 때, 나쁜 등급의 SAH는 TCRBV 유전자 세그멘트의 많은 수의 상이한 클론형을 나타내는 경향이 있음을 확인하였다 (도 6).

[0129] 또한, 질병 중증도를 나타내는 다양한 색상을 사용하여 V-J 조합의 상대적 빈도를 분석하였고, 주석이 달린 754개의 V-J 쌍을 확인하였다. 이 중, 좋은 등급 SAH 환자에 비해 나쁜 등급의 SAH 환자에서 가장 일반적으로 증가한 상위 3개의 V-J 쌍은 TCRBV21-01/TCRBJ01-05, TCRBV21-01/TCRBJ01-04, 및 TCRBV21-01/TCRBJ02-04임을 확인하였다 (도 7).

[0130] 다음으로, 각각 좋은 등급의 SAH 환자와 나쁜 등급의 SAH 환자에서 두 가지 시점, 입원 및 7 일 추적 관찰에서의 V-J 조합을 비교했다. 그 결과 좋은 등급의 SAH에서 가장 많이 증가한 V-J 쌍은 TCRBV19-01/TCRBJ02-04이고, 가장 감소된 V-J 쌍은 TCRBV28-01/TCRBJ02-04 임을 확인하였다. 또한, 나쁜 등급의 SAH 환자와 관련하여, 가장 많이 증가한 V-J 쌍은 TCRBV28-01/TCRBJ02-06이고, 가장 많이 감소한 V-J 쌍은 TCRBV30-01/TCRBJ02-04 임을 확인하였다 (도 8).

[0131] 상기의 V-J 조합의 구체적인 아미노산 서열은 하기 표 3에 상세히 기재하였다.

표 3

[0133]

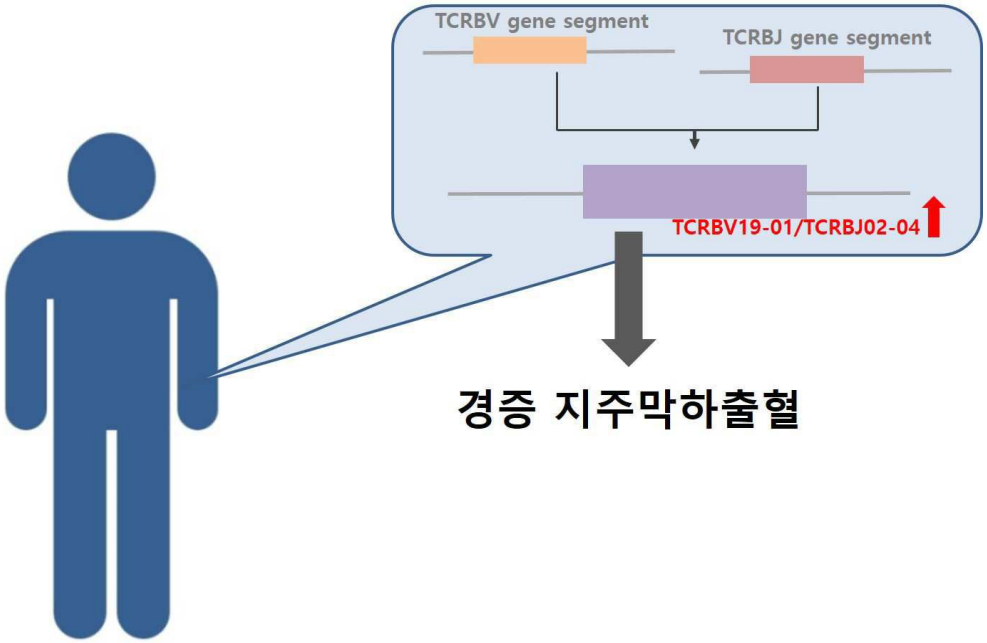
V-J 조합	아미노산 서열	서열번호
TCRBV19-01/TCRBJ02-04	CASSPGTGEFESKNIQYF	1
TCRBV28-01/TCRBJ02-04	CASSATGGGLNIQYF	2
TCRBV28-01/TCRBJ02-06	CASGRGTGANVLTF	3
TCRBV30-01/TCRBJ02-04	CAWSNPSEAKNIQYF	4

[0134] 따라서, 상기 결과를 토대로 TCRB의 특정 V-J 쌍, 구체적으로 TCRBV19-01/TCRBJ02-04, TCRBV28-01/TCRBJ02-04, TCRBV28-01/TCRBJ02-06 또는 TCRBV30-01/TCRBJ02-04의 발현수준을 확인함으로서 경증 및 중증의 지주막하출혈 환자의 진단, 예후 및 면역치료 진행 여부 등을 확인할 수 있다.

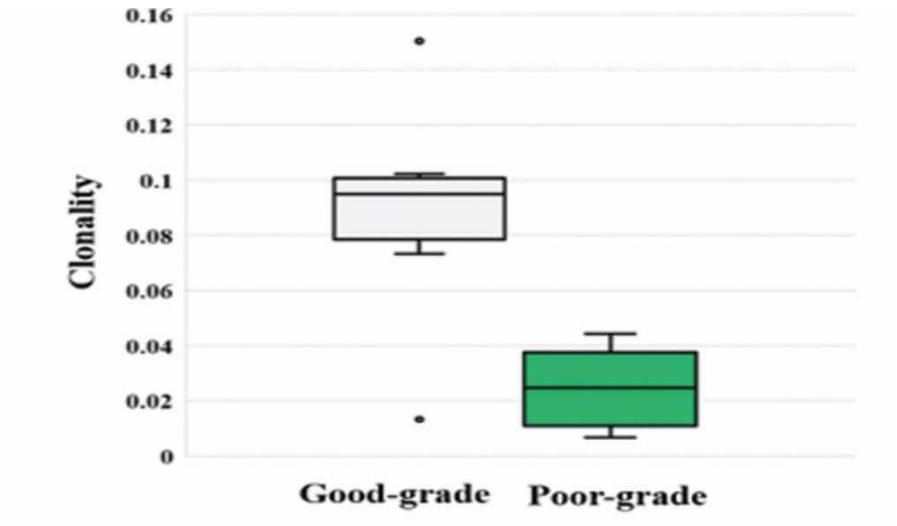
[0136] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

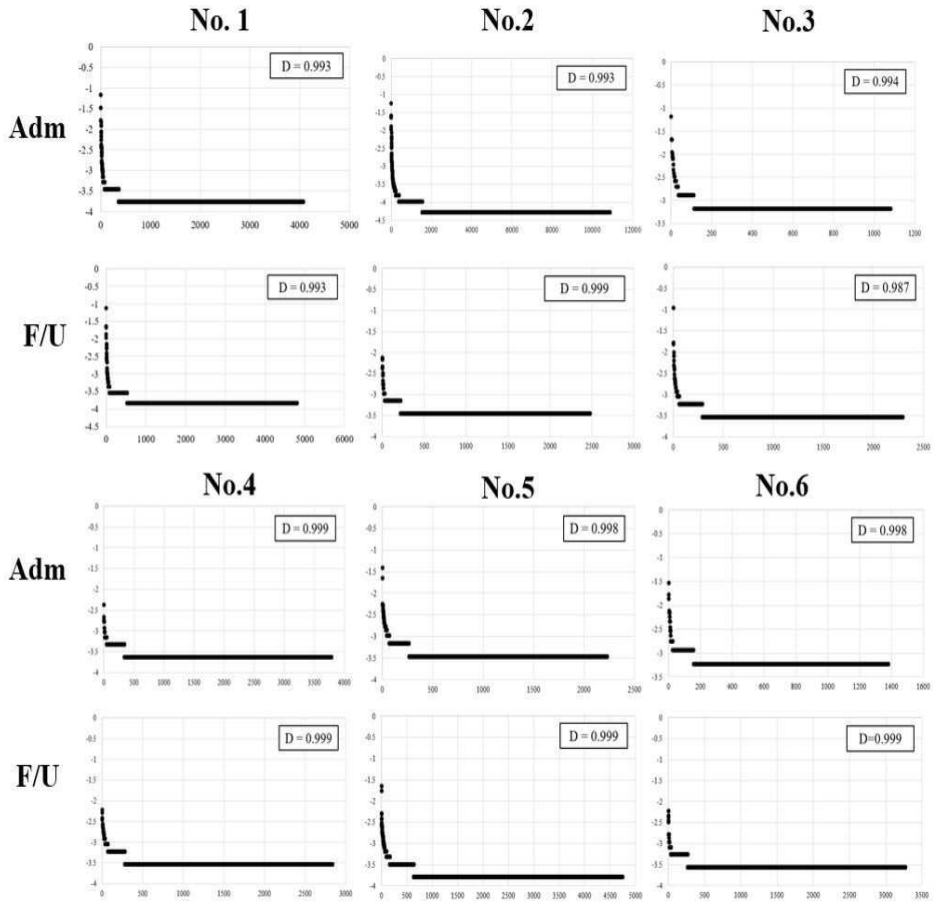
도면1


TCRBV gene segment
TCRBJ gene segment
TCRBV19-01/TCRBJ02-04
경증 지주막하출혈

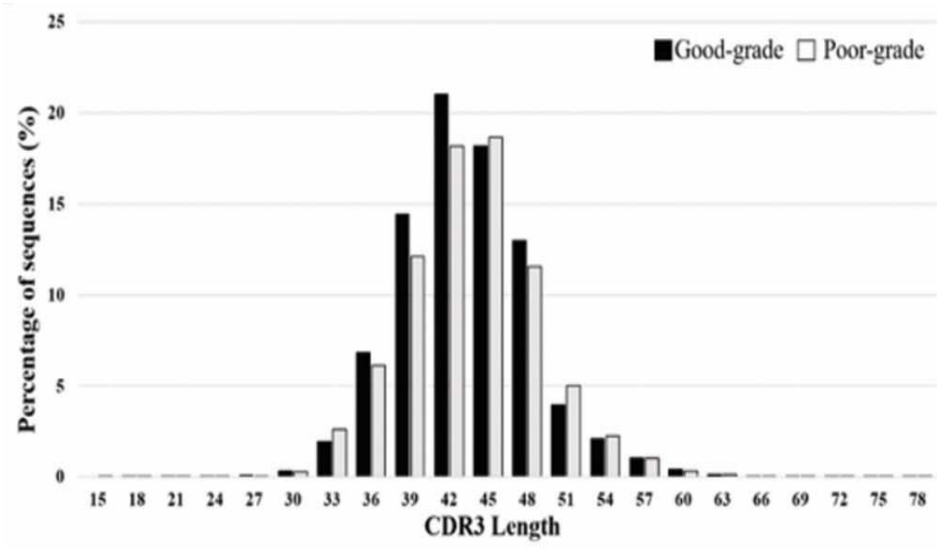
도면2


0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Clonality
Good-grade
Poor-grade

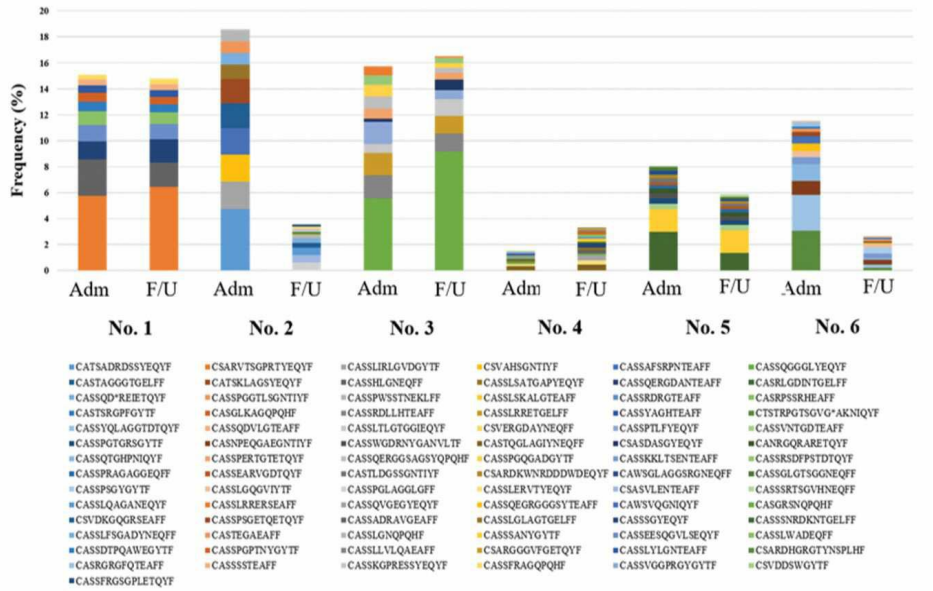
도면3


No. 1
No.2
No.3
Adm
D = 0.993
D = 0.993
D = 0.994
F/U
D = 0.993
D = 0.999
D = 0.987
No.4
No.5
No.6
Adm
D = 0.999
D = 0.998
D = 0.998
F/U
D = 0.999
D = 0.999
D=0.999

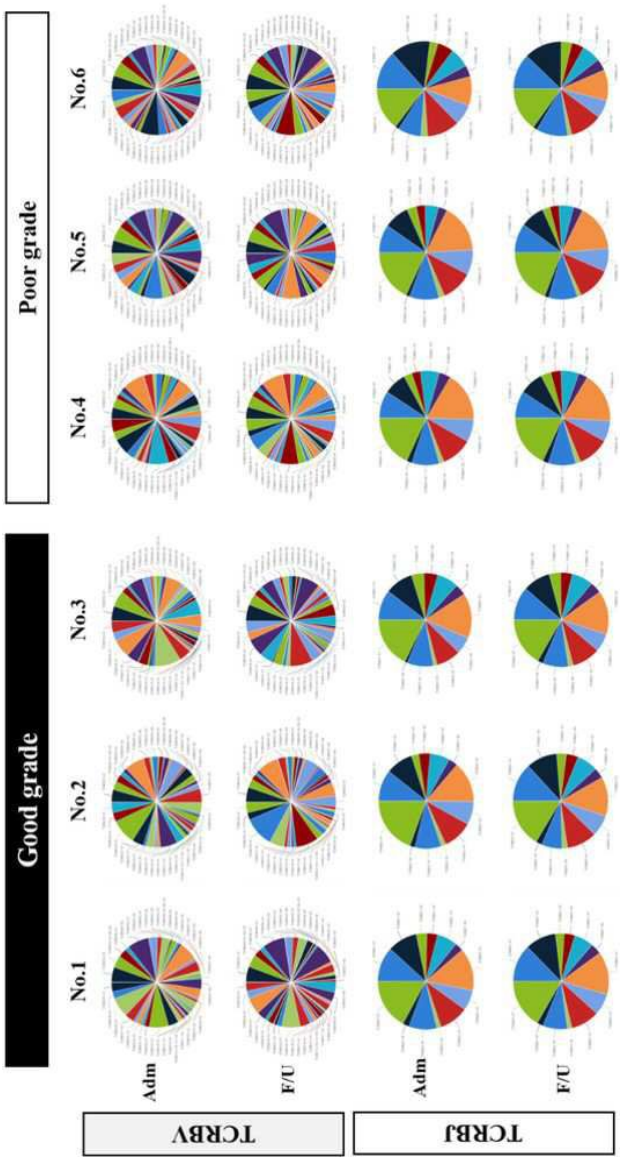
도면4


Good-grade
Poor-grade
Percentage of sequences (%)
CDR3 Length
0
5
10
15
20
25
15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60 63 66 69 72 75 78

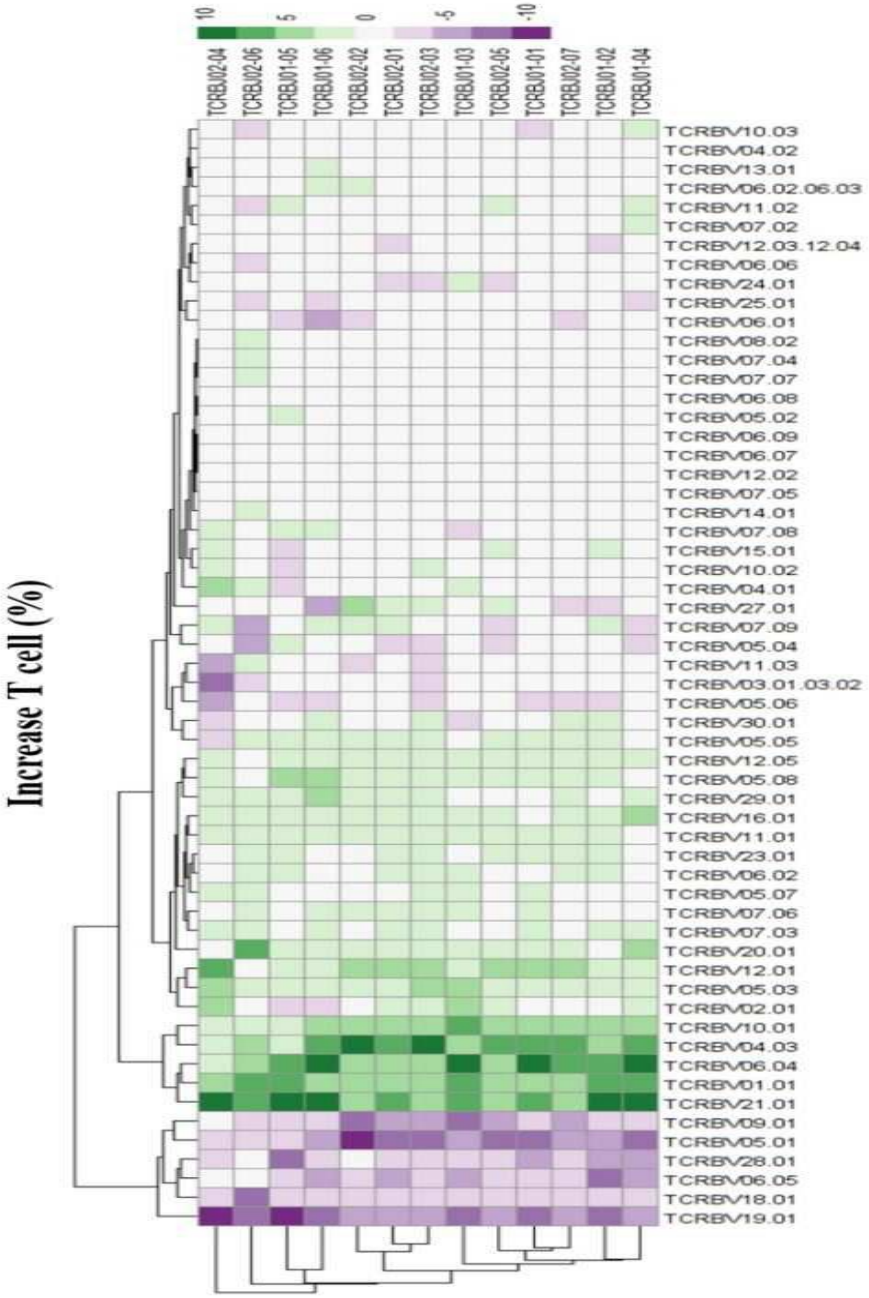
도면5


Frequency (%)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Adm
F/U
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6
CATSADRDSSYEQYF
CATSKLAGSYEQYF
CASSPGGTLSGNTIYF
CASGLKAGQPQHF
CASSQDVLGTEAFF
CASNPEQGAEGNTIYF
CASSPERTGTETQYF
CASSEARVGDTQYF
CASSLQGQVIYTF
CASSLRRERSEAFF
CASSPSGETQETQYF
CASTEGAEAFF
CASSPGPTNYGYTF
CASSSSTEAFF
CASSLIRLGVDGYTF
CASSHLGNEQFF
CASSPWSSTNEKLFF
CASSRDLLHTEAFF
CASSLTLGTGGIEQYF
CASSWGDRNYGANVLTF
CASSQERGGSAGSYQPQHF
CASTLDGSSGNTIYF
CASSPGLAGGLGFF
CASSQVGEGYEQYF
CASSADRAVGEAFF
CASSLGNQPQHF
CASSLLVLQAEAFF
CASSKGPRESSYEQYF
CSVAHSGNTIYF
CASSLSATGAPYEQYF
CASSLSKALGTEAFF
CASSLRRETGELFF
CSVERGDAYNEQFF
CASTQGLAGIYNEQFF
CASSPGQGADGYTF
CSARDKWNRDDDWDEQYF
CASSLERVTYEQYF
CASSQEGRGGGSYTEAFF
CASSLGLAGTGELFF
CASSSANYGYTF
CSARGGGVFGETQYF
CASSFRAGQPQHF
CASSAFSRPNTEAFF
CASSQERGDANTEAFF
CASSRDRGTEAFF
CASSYAGHTEAFF
CASSPTLFYEQYF
CSASDASGYEQYF
CASSKKLTSENTEAFF
CSASVLENTEAFF
CAWSVQGNIQYF
CASSSGYEQYF
CASSEESQGVLSEQYF
CASSLYLGNTEAFF
CASSVGGPRGYGYTF
CASSQGGGLYEQYF
CASRLGDINTGELFF
CASRPSSRHEAFF
CTSTRPGTSGVG*AKNIQYF
CASSVNTGDTEAFF
CANRGQRARETQYF
CASSRSDFPSTDTQYF
CASSGLGTSGGNEQFF
CASSSRTSGVHNEQFF
CASGRSNQPQHF
CASSSNRDKNTGELFF
CASSLWADEQFF
CSARDHGRGTYNSPLHF
CSVDDSWGYTF

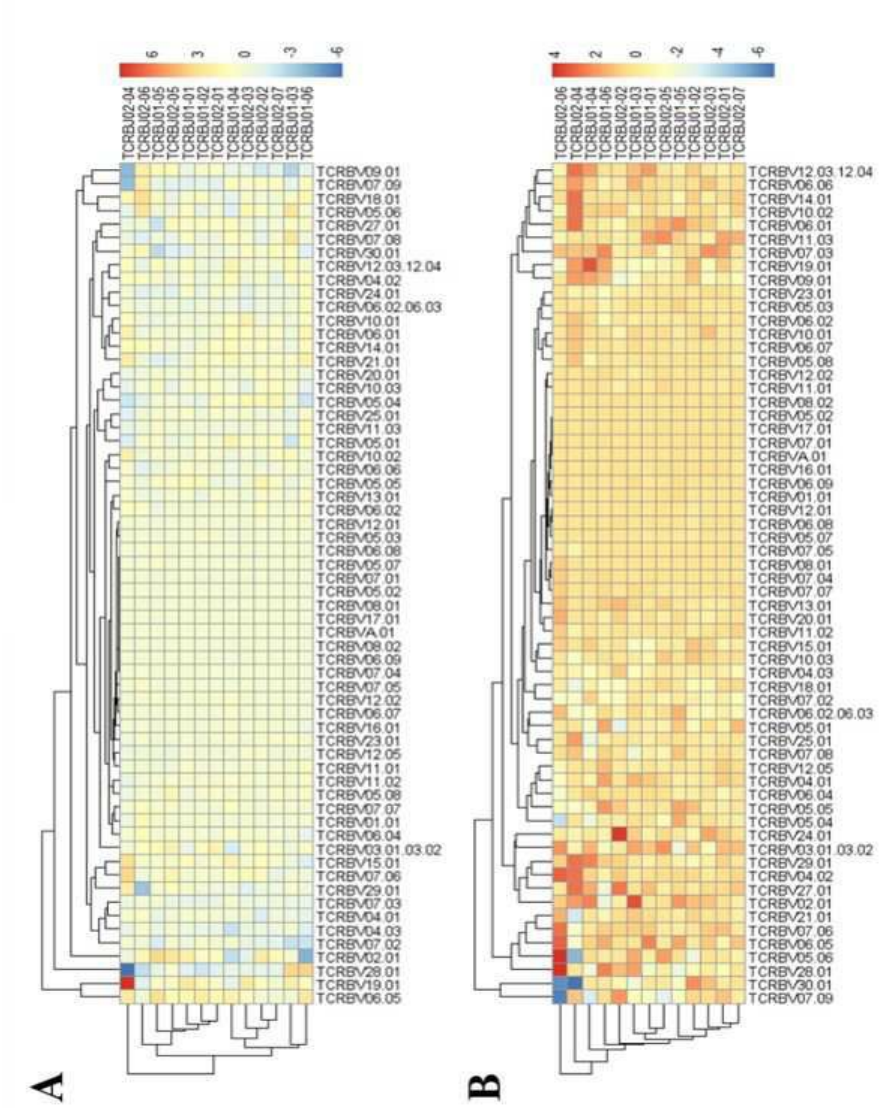
도면6


Poor grade
Good grade
No.6
No.5
No.4
No.3
No.2
No.1
Adm
F/U
Adm
F/U
TCRBV
TCRBJ

도면7


10
5
0
-5
-10
TCRBJ02-04
TCRBJ02-06
TCRBJ01-05
TCRBJ01-06
TCRBJ02-02
TCRBJ02-01
TCRBJ02-03
TCRBJ01-03
TCRBJ02-05
TCRBJ01-01
TCRBJ02-07
TCRBJ01-02
TCRBJ01-04
TCRBV10.03
TCRBV04.02
TCRBV13.01
TCRBV06.02.06.03
TCRBV11.02
TCRBV07.02
TCRBV12.03.12.04
TCRBV06.06
TCRBV24.01
TCRBV25.01
TCRBV06.01
TCRBV08.02
TCRBV07.04
TCRBV07.07
TCRBV06.08
TCRBV05.02
TCRBV06.09
TCRBV06.07
TCRBV12.02
TCRBV07.05
TCRBV14.01
TCRBV07.08
TCRBV15.01
TCRBV10.02
TCRBV04.01
TCRBV27.01
TCRBV07.09
TCRBV05.04
TCRBV11.03
TCRBV03.01.03.02
TCRBV05.06
TCRBV30.01
TCRBV05.05
TCRBV12.05
TCRBV05.08
TCRBV29.01
TCRBV16.01
TCRBV11.01
TCRBV23.01
TCRBV06.02
TCRBV05.07
TCRBV07.06
TCRBV07.03
TCRBV20.01
TCRBV12.01
TCRBV05.03
TCRBV02.01
TCRBV10.01
TCRBV04.03
TCRBV06.04
TCRBV01.01
TCRBV21.01
TCRBV09.01
TCRBV05.01
TCRBV28.01
TCRBV06.05
TCRBV18.01
TCRBV19.01
Increase T cell (%)

도면8



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> A composition for diagnosing subarachnoid hemorrhage comprising a formulation capable of measuring the expression level of TCRBV 19-01 and TCRBJ02-04

<130> P203010

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRBV19-01/TCRBJ02-04

<400> 1

Cys Ala Ser Ser Pro Gly Thr Gly Glu Phe Glu Ser Lys Asn Ile Gln

1 5 10 15

Tyr Phe

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRBV28-01/TCRBJ02-04

<400> 2

Cys Ala Ser Ser Ala Thr Gly Gly Gly Leu Asn Ile Gln Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRBV28-01/TCRBJ02-06

<400> 3

Cys Ala Ser Gly Arg Gly Thr Gly Ala Asn Val Leu Thr Phe

1 5 10

<210>

4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TCRBV30-01/TCRBJ02-04

<400> 4

Cys Ala Trp Ser Asn Pro Ser Glu Ala Lys Asn Ile Gln Tyr Phe

1 5 10 15