(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0037910
(43) 공개일자 2025년03월19일

(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 10-2023-0120302
(22) 출원일자 2023년09월11일
심사청구일자 2023년09월11일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이현승
대전광역시 중구 서문로 96, 206동 1404호
심병창
대전광역시 중구 유천로48번길 38, 302호
(74) 대리인
특허법인주원

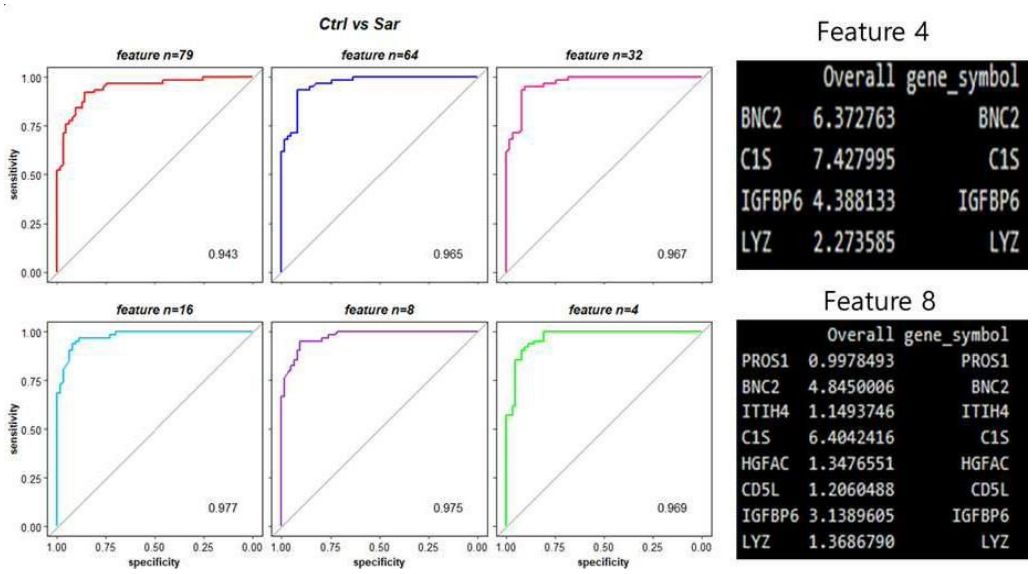
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **혈장 단백질 기반 근감소증 진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 혈장 단백질 기반 근감소증 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137737
과제번호	2021R1A5A8029876
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역혁신 선도연구센터
연구과제명	근감소증 3단계 토탈솔루션 선도연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2028.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ을 포함하는 근감소증 진단용 바이오마커 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 바이오마커 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ은 혈장 단백질인 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 바이오마커 조성물

청구항 4

BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 제제를 포함하는 근감소증 진단용 조성물

청구항 5

제4항에 있어서, PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 조성물

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ은 혈장 단백질인 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 조성물

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 제제는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 압타머 또는 항체인 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 조성물

청구항 8

BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 제제를 포함하는 근감소증 진단용 조성물; 및 사용설명서를 포함하는 근감소증 진단용 키트

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트 및 래피드(rapid) 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 근감소증 진단용 키트

청구항 10

1) 분리된 시료에서 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 단계;

2) 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 수준을 기준치와 비교하는 단계; 및

3) 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 수준이 기준치보다 높으면 근감소증으로 판정하는 단계;를 포함하는 근감소증 진단정보 제공방법

청구항 11

제10항에 있어서, PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 근감소증 진단정보 제공방법

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 분리된 시료는 혈장인 것을 특징으로 하는 근감소증 진단정보 제공방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈장 단백질 기반 근감소증 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전세계적으로 초고령사회에 진입에 의한 노화 매개 근감소증의 확산이 예측되고 있다. 근감소증(sarcopenia)은 노화현상의 일종으로 사망률과 깊은 연관을 보이는 질병현상으로 인식이 전환되고 있다.

[0004] 근감소증은 골격근의 양 및 기능이 저하된 상태를 말한다. 근감소증은 노화, 호르몬 이상, 영양 부족, 신체 활동 부족, 염증 및 퇴행성 질환 등 다양한 원인에 의해 발생되는데, 그 중 노화 및 성호르몬 부족이 주요 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있다. 의료기술의 발전 및 다양한 치료제 개발로 인해 전 세계적으로 평균 수명이 증가함에 따라 고령화 인구가 증가하고 있으며, 이에 따라 근감소증에 대한 진단 및 치료의 요구 또한 지속적으로 증가할 것으로 예상되고 있다.

[0005] 근감소증을 진단하기 위하여 현재 전문가에 의해서 고가의 장비를 이용한 근육 상태를 측정하고 있는 실정이다. 또한, 여러 연구에서 근감소증을 정의하기 위한 다양한 기준을 제안해왔다. 근육량(Muscle mass)은 근감소증 진단에 중요한 요소이며, 근육량의 유전 가능성은 50% 이상으로 추정된다. 근육량과 관련된 매개변수 중 제지방량(lean body mass, LBM)은 근감소증을 예측하는 데 자주 사용되었다. 또한, 최근 골격근량 지수(skeletal muscle index, SMI)와 사지 근육량(appendicular skeletal muscle mass, ASM)도 신뢰할 수 있는 매개변수가 될 수 있다는 연구가 있었다. 생물학적 근감소증과 연관성이 높은 바이오마커 발굴의 필요성이 제기되고 있다.

[0006] 단백체 데이터는 건강한 코호트와 근감소증 코호트 간의 단백질 발현 수준을 비교하는 강력한 통계 분석을 거친다. 생물 정보학 도구를 사용하여 근감소증 위험과 크게 관련된 특정 혈장 단백질 마커를 식별한다. 예측 정확도를 최적화하기 위해 여러 바이오마커를 기계 학습 모델에 통합하여 근감소증 위험 평가를 위한 예측 알고리즘을 만든다.

[0007] 그러나, 본 발명에서 사용한 다양한 혈장 단백질을 분석하여 근감소증을 진단하고자 하는 시도에 관하여 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2022-0097103호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제2534421호

(특허문헌 0003) 한국공개특허 제2023-0036504호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 혈장 단백질 기반 근감소증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ을 포함하는 근감소증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 근감소증의 발병 여부를 확인하는 것을 의미하며, 근감소증의 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함한다.

[0014] BNC2 (Zinc finger protein basonuclin-2)는 최근에 발견된 기능이 알려지지 않은 Zinc finger 단백질이다. 그것의 paralog인 BNC1은 각질 세포의 증식 능력과 관련이 있다. BNC2 KO 생쥐는 출생 후 24시간 이내에 구개열과 두개골과 혀의 이상을 가지고 사망에 이르므로, BNC2 유전자의 발현은 입천장, 혀의 주변부, 그리고 뇌와 골관절염 구조를 둘러싸고 있는 중간엽 외피에서 중간엽 세포와 관련된 것일 수 있다. 피부의 색소침착과 관련된 기능이 보고되어 있다.

[0015] C1S (Complement component 1s)는 보체계에 포함된 단백질의 일종이다. C1S는 C1 복합체(C1qr2s2)의 일종으로, C4 및 C2를 절단하고, 전통적인 C3 전환효소 경로의 생산을 유도하는 것으로 알려져 있다. C1S 결핍은 조기 발병 전신성 홍반성 루프스 및 박테리아 감염에 대한 감수성 증가와 관련되어 있고, 자가면역 및 암 발 생과 연관되어 다양한 질병의 진단 및 치료에 유용한 바이오마커로 알려져 있다.

[0016] IGFBP6 (Insulin-like growth factor-binding protein 6)는 다양한 세포활동과 관련되어 있고, 섬유화, 암 및 면역반응의 바이오마커로 알려져 있다.

[0017] LYZ (Lysozyme)은 항균효소의 일종으로 눈물샘에서 분비되므로, 안구건조증과 깊은 관련이 있다. 또한, 아밀로이드증을 포함하는 다양한 질환의 바이오마커로 알려져 있다.

[0018] 상기 바이오마커 조성물은 PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0019] PROS1 (protein S)은 혈액 응고를 억제하는 활성화된 단백질 C(APC)인 항응고 프로테아제의 보조인자 역할을 하는 비타민 K 의존성 혈장 단백질이다. PROS1에는 기능적으로 자유로운 자유 형태와 C4b 결합 단백질과 복합체를 이루는 비활성 형태라는 두 가지 이소형이 있다. 항응고제 기능 외에도 PROS1은 티로신 키나제 수용체 Tyro3, Axl 및 Mer에 대한 작용제로도 작용한다. 내피는 Tyro3, Axl 및 Mer을 발현하고 단백질 S를 생성한다. 동맥색전증, 혈전증(thrombosis) 등의 바이오마커로 알려져 있다.

[0020] ITIH4 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4)는 주로 간에서 발현되고 여러 종에서 급성기 단백질로 작용하는 상대 분자량 120,000의 혈장 당단백질이다. 난소암, 간암, 위암을 포함하는 다양한 암의 바이오마커로 알려져 있다.

[0021] HGFAC (Hepatocyte growth factor activator)는 HGF를 활성화형으로 전환하는 단백질로 알려져 있다. 조직손상의 회복, 암, 염증 등의 바이오마커로 알려져 있다.

[0022] CD5L (CD5 antigen-like)은 지질대사 및 염증반응과 관련된 다양한 기능을 가지고 있다. 간세포암, 급성거부반응 등의 바이오마커로 알려져 있다.

[0023] 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ는 혈장 단백질의 일종이고, PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L도 혈장 단백질의 일종이며, 대상 환자의 분리된 혈장에서 증가된 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 예에서, 본 발명은 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 제제를 포함하는 근감소증 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 제제는 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 또는 PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 측정할 수 있는 모든 제제를 포함하고, 구체적으로 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 압타머 또는 항체인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사을 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 염기서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 본 발명이 속하는 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0027] 상기 용어, "프로브"는 유전자에 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 표지되어 있어 특정 유전자의 존재 유무 및 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 본 발명이 속하는 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0028] 상기 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다.

[0029] 상기 용어, "압타머"는 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. 압타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다. 압타머 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.

[0030] 상기 용어, "항체"는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합을 모두 포함한다. 또한, 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')2및 Fv를 모두 포함한다. 항체 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 예에서, 본 발명은 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 제제를 포함하는 근감소증 진단용 조성물; 및 사용설명서를 포함하는 근감소증 진단용 키트를 제공한다.

[0032] 상기 키트는 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 또는 PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 측정할 수 있는 모든 제제를 포함하는 키트를 의미하고, 구체적으로 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트 및 래피드(rapid) 키트로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 용어, "RT-PCR 키트"는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 프라이머, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 또는 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0034] 상기 용어, "DNA 칩 키트"는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0035] 상기 용어, "ELISA 키트"는 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한, ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트 됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 용어, "래피드(rapid) 키트"는 5분 이내 분석결과를 알 수 있는 신속한 테스트를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트로서, 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한, 래피드 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체가 고정된 나이트로 셀룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 예에서, 본 발명은 1) 분리된 시료에서 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ를 측정하는 단계; 2) 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 수준을 기준치와 비교하는 단계; 및 3) 상기 BNC2, C1S, IGFBP6 및 LYZ 수준이 기준치보다 높으면 근감소증으로 판정하는 단계;를 포함하는 근감소증 진단정보 제공방법을 제공한다.

[0038] 상기 방법은 PROS1, ITIH4, HGFAC 및 CD5L을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0039] 상기 분리된 시료는 혈장인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 혈장 단백질 기반 근감소증 진단용 바이오마커 조성물은 근감소증 위험을 예측함으로써 조기 감지를 용이하게 하여 근감소증의 진행을 예방하거나 늦추기 위한 시기적절한 개입 및 개인화된 치료 전략을 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 근감소증 환자의 혈장 단백질의 변화를 나타낸 것이다.

도 2는 근감소증 그룹에서 주로 증가하는 단백질의 특징을 나타낸 것이다.

도 3은 근감소증 환자의 혈장에서 유의하게 증가/감소하는 단백질 현황을 나타낸 것이다.

도 4는 4가지 혹은 8가지 단백질 조합에 의한 근감소증 예측 정도 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **<실시예 1> 단백체 분석 방법론: Study design**

[0047] 28명의 근감소증 환자와 28명의 나이 성별 매칭 정상 대조군의 혈액을 채취한 뒤에, 혈장을 분리하여 단백체 분석에 활용하였다. 근감소증의 진단은 남자 < 28kg, 여자 < 18kg인 경우, 하지 근육의 수행능력 평가로 5회 의자 일어서기 검사를 통해 12초 이상인 경우, 6 m 보행속도 < 1.0 m/s 인 경우로 진단하였다. 또한 바이오임피던스 검사를 통해서 남자 < 7.0 kg/m^2, 여자 < 5.7 kg/m^2 경유에 근감소증으로 진단하였다.

[0049] **<실시예 2> LC-MS/MS 및 MS 데이터 분석**

[0050] 모든 혈장 LC-MS/MS 분석은 앞서 설명한 바와 같이 나노 일렉트로스프레이 소스를 통해 Ultimate 3000 RSLC 시스템(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)에 결합된 Quadrupole Obitrap 질량 분석기, Q-Exactive HF-X(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행되었다. 펩타이드 샘플은 트랩 컬럼(PepMap 100, 0.3mm I.D x 5mm, C18 5㎛, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 분석 컬럼(EASY-Spray™ PepMap RSLC C18, 50㎛ I.D x 50cm, C18 1.9㎛, 100Å, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 2-컬럼 상에서 분리하여 300nL/min에서 8~26% 아세토니트릴의 90분 기울기로 분리하여 질량분석법으로 분석하였다. 컬럼 온도는 컬럼 히터를 사용하여 60℃로 유지되었다. 데이터 의존적 획득(DDA)을 수행하기 위해 MaxQuant.Live(버전 1.2; Max-Plank-Institute of Biochemistry, Plang, Germany)가 사용되었다. 조사 스캔(350~1650m/z)은 m/z 200에서 70,000의 해상도로 획득되었다. 분리 윈도우가 1.2m/z인 전구체 이온을 선택하기 위해 상위 15개의 방법이 사용되었다. MS/MS 스펙트럼은 m/z 200에서 17,500의 해상도로 28 HCD 정규화된 충돌 에너지에서 획득되었다. 전체 스캔과 MS/MS 스캔의 최대 이온 주입 시간은 각각 20과 100ms였다.

[0051] 질량 스펙트럼은 MaxQuant 버전 1.6.1.0을 사용하여 처리되었다. MS/MS 스펙트럼은 안드로메다 검색 엔진을 사용하여 인간 유니프로트 단백질 서열 데이터베이스 (2014년 12월, 88,657 엔트리)에 대해 검색되었다. 총 단백질 수준을 분석하기 위해 6 ppm 전구체 이온 허용오차를 사용하여 1차 검색을 수행하였다. MS/MS 이온 허용오차는 20 ppm으로 설정하였다. 시스테인 카바마이드 메틸화는 고정 수정으로 설정하였다. 단백질의 n-말단 아세틸화 및 메티오닌의 산화가 가변 수정으로 설정되었다. 효소 특이성은 트립틱 소화를 완료하도록 설정되었다. 최

소 길이가 6개의 아미노산과 최대 2개의 누락된 절단을 가진 펩티드가 고려되었다. 비변형 및 변형 펩티드에 대한 최소 점수는 각각 0과 40이었다. 비변형 및 변형 펩티드에 대한 최소 델타 점수는 각각 0과 6이었다. 식별을 위한 고유 및 면도기 펩티드의 최소 값은 1로 설정되었다. 서로 다른 LC-MS 실행에 걸친 펩티드 식별 및 스펙트럼 라이브러리는 MaxQuant에서 "실행 간 일치" 기능을 활성화하여 일치시켰다. 필요한 잘못된 발견율(FD)은 펩티드, 단백질 및 수정 수준에서 1%로 설정되었다. 질량 분석 프로테오믹스 데이터는 데이터 세트 식별자 PXD027404와 함께 PRIDE 파트너 저장소를 통해 ProteomeXchange Consortium에 저장되었다.

[0053] **<실시예 3> Label-Free Quantification and Bioinformatics Analysis**

[0054] 레이블 없는 정량화를 위해 강도 기반 절대 정량화(intensity-based absolute quantification, iBAQ) 알고리즘이 MaxQuant 플랫폼의 일부로 사용되었다. 쌍별 비교는 Perseus 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. iBAQ 데이터의 정량적 분석을 위해, 본 발명에서는 iBAQ 값의 log2 변환을 수행했다. 각 그룹에서 최소 70%의 유효한 값을 가진 단백질을 필터링한 후, 저부량 단백질의 신호를 시뮬레이션하기 위해 0.5 폭과 1.8 다운시프트의 정규 분포를 가정하여 결측치를 귀속시켰다. 마지막으로, 데이터는 Perseus 소프트웨어의 폭 조정 기능을 사용하여 정규화되었다. 중요한 필터링 기준(p-value < 0.05, |fold-change|> 2)을 가진 DEP를 검출하기 위해 프로테옴의 쌍별 비교를 위해 스튜던트 t-테스트를 수행했다.

[0056] **<실험예>**

[0057] 나이와 성별에 따라서 근감소증 지표의 변동성을 감안하여 나이와 성별을 매칭한 코호트를 구성하여 혈액을 채취하였다.

[0058] 도 1은 근감소증 그룹에서 단백질의 변화를 나타낸 것으로, Ly6D 등의 단백질이 감소(파란색)되는 것이 관찰되었고, TXNDC5 등의 단백질이 증가(빨간색)하는 경향을 나타내었다.

[0059] 근감소증 그룹에서 주로 증가하는 단백질의 특징들을 그룹핑해보면 주로 hemopexin 관련 단백질, 면역반응 관련 단백질, vesicle-매개 전달체 단백질 등이 나타났다. 이들은 주로 산화스트레스, 만성염증과 관련된 단백질로 근감소증의 병태생리와 밀접한 연관을 나타내는 것은 적절한 결과라고 판단된다(도 2).

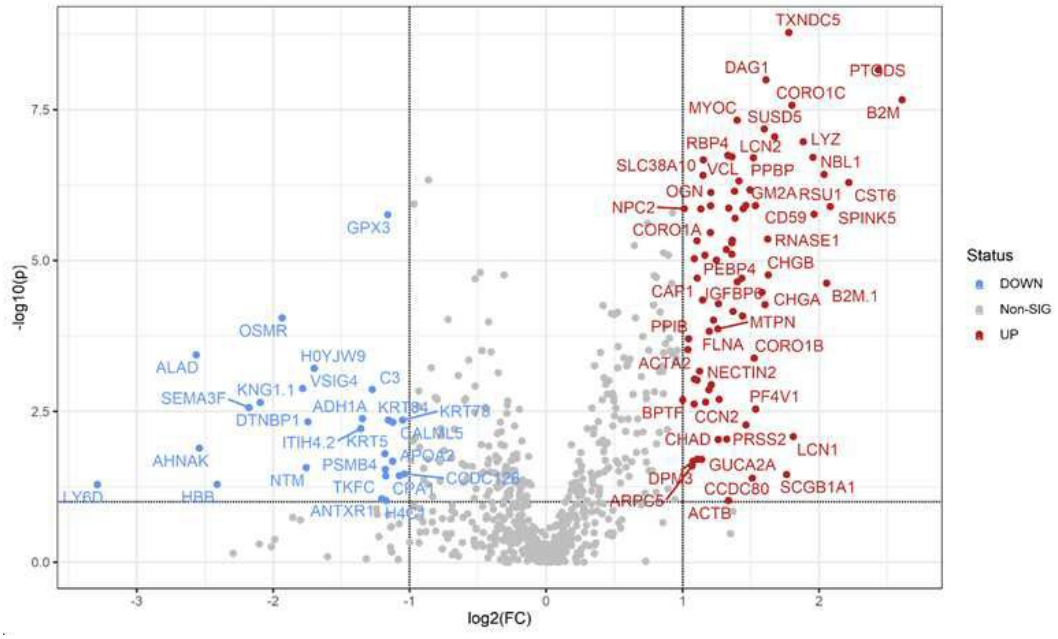
[0060] 도 3은 근감소증 환자의 혈장에서 유의하게 증가/감소하는 단백질 현황을 나타낸 것이다. 주로 증가하는 단백질은 만성염증 (LYZ, CD5L, C1R, AHSG 등) 및 인슐린 저항성 (IGFBP 2, 4, 6, RBP4 등)과 연관되는 것들이고, 근감소증 환자 혈장에서 유의한 감소를 보이는 SOD2는 활성산소 제어에 중요한 단백질이다. 유의한 차이를 보이는 혈장 단백질은 개별적으로 근감소증의 바이오마커로 작용할 수도 있지만 핵심적인 차이를 나타내는 단백질의 조합은 근감소증 예측력을 더욱 높일 수 있기 때문에 4가지 혹은 8가지 단백질의 조합으로 근감소증 예측 테스트를 진행하였다.

[0061] 도 4는 4가지 혹은 8가지 단백질 조합에 의한 근감소증 예측 정도 분석 결과에 관한 것으로, 4가지 단백질 조합(feature 4 또는 feature=4)은 R2 값이 0.969로 진단 특이성이 높은 것을 알 수 있고, 추가 지표를 사용한 8가지 단백질 조합(feature 8 또는 feature=8)에서도 유사한 수준(R2 = 0.975)을 확인할 수 있었다. 보다 많은 지표가 추가된 16종 이상의 feature를 포함하는 경우에 R2 값이 더 상승되지 않는 점을 고려하면, 4가지 또는 8가지 단백질 조합의 지표만으로도 근감소증을 진단하기에 충분한 수준이고, 추가 단백질을 조합하는 것은 해당 단백질의 검출 등의 불필요한 절차를 포함하는 것일 수 있어 비용 대비 효율 측면에서 상기 4가지 또는 8가지 단백질 조합이 가장 우수한 것으로 판단된다.

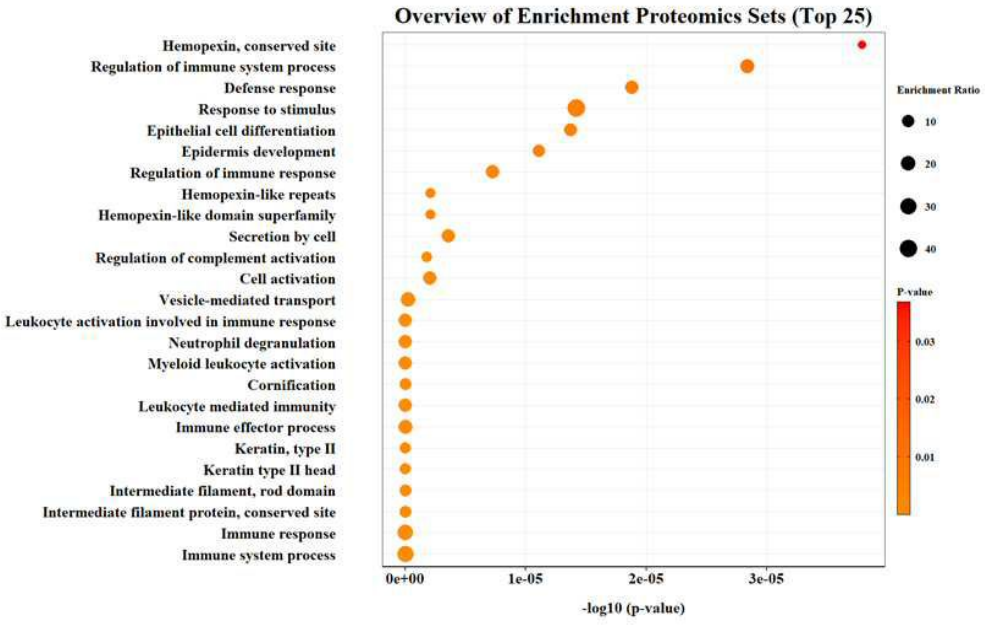
[0063] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

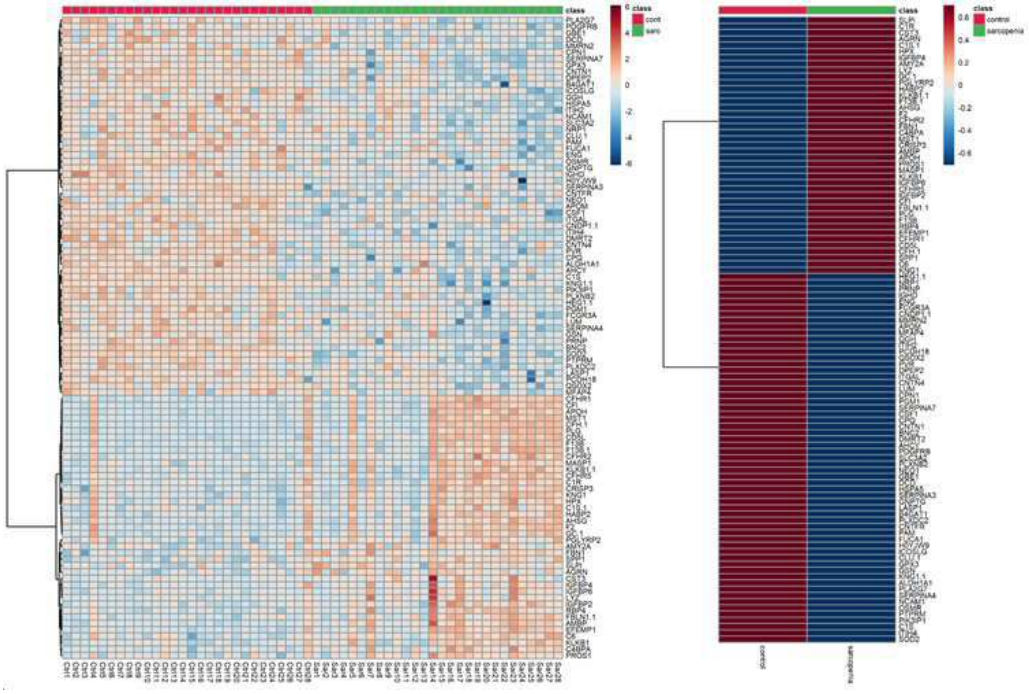
도면1


TXNDC5
DAG1
PTGDS
CORO1C
MYOC
SUSD5
B2M
RBP4
LCN2
LYZ
SLC38A10
VCL
PPBP
NBL1
OGN
GM2A
RSU1
CST6
NPC2
CD59
SPINK5
GPX3
CORO1A
RNASE1
PEBP4
CHGB
CAP1
IGFBP6
CHGA
B2M.1
PPIB
MTPN
FLNA
CORO1B
ACTA2
NECTIN2
PF4V1
BPTF
CCN2
CHAD
PRSS2
LCN1
GUCA2A
DPM3
CCDC80
SCGB1A1
ARPC5
ACTB
OSMR
ALAD
H0YJW9
VSIG4
C3
SEMA3F
KNG1.1
ADH1A
KRT81
KRT78
DTNBP1
CALML5
ITIH4.2
KRT5
AHNAK
PSMB4
APOC2
CCDC126
NTM
TKFC
CPA1
LY6D
HBB
ANTXR1
H4C3
Status
DOWN
Non-SIG
UP
-log10(p)
log2(FC)
7.5
5.0
2.5
0.0
-3
-2
-1
0
1
2

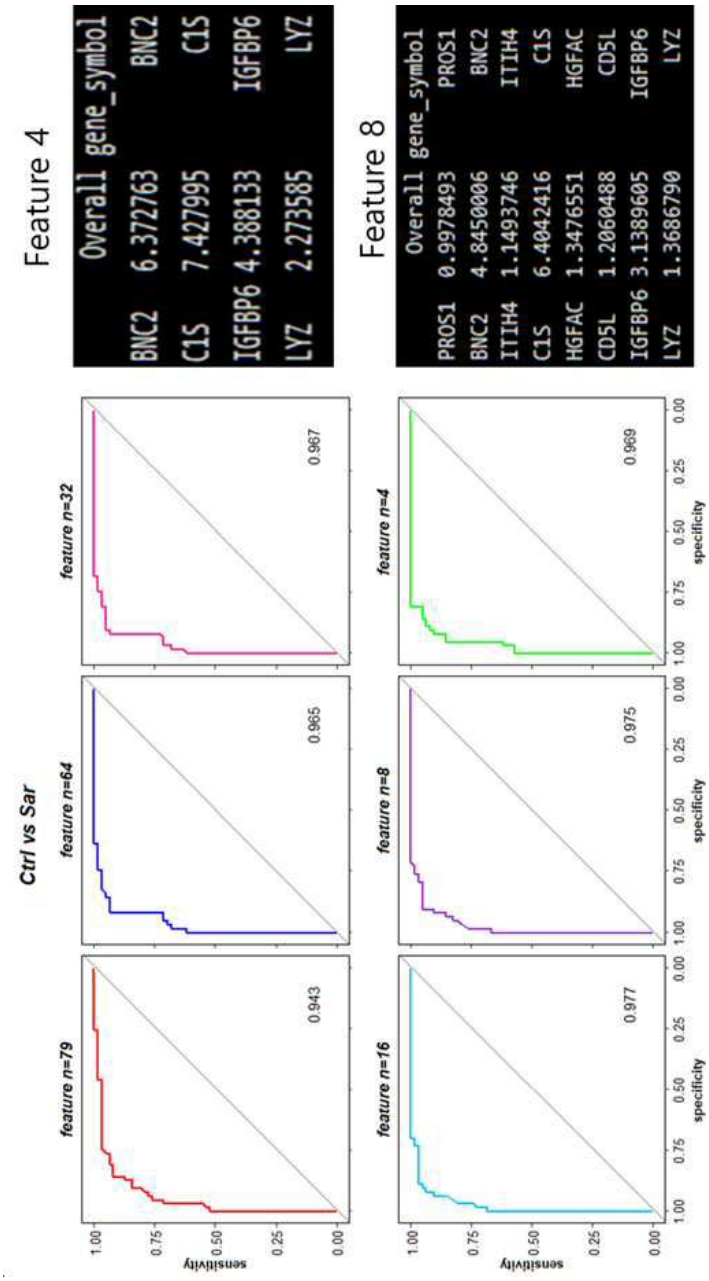
도면2


Overview of Enrichment Proteomics Sets (Top 25)
Hemopexin, conserved site
Regulation of immune system process
Defense response
Response to stimulus
Epithelial cell differentiation
Epidermis development
Regulation of immune response
Hemopexin-like repeats
Hemopexin-like domain superfamily
Secretion by cell
Regulation of complement activation
Cell activation
Vesicle-mediated transport
Leukocyte activation involved in immune response
Neutrophil degranulation
Myeloid leukocyte activation
Cornification
Leukocyte mediated immunity
Immune effector process
Keratin, type II
Keratin type II head
Intermediate filament, rod domain
Intermediate filament protein, conserved site
Immune response
Immune system process
Enrichment Ratio
10
20
30
40
P-value
0.03
0.02
0.01
0e+00
1e-05
2e-05
3e-05
-log10 (p-value)

도면3



도면4


Feature 4
Overall gene_symbol
BNC2 6.372763 BNC2
C1S 7.427995 C1S
IGFBP6 4.388133 IGFBP6
LYZ 2.273585 LYZ
Feature 8
Overall gene_symbol
PROS1 0.9978493 PROS1
BNC2 4.8450006 BNC2
ITIH4 1.1493746 ITIH4
C1S 6.4042416 C1S
HGFAC 1.3476551 HGFAC
CD5L 1.2060488 CD5L
IGFBP6 3.1389605 IGFBP6
LYZ 1.3686790 LYZ
Ctrl vs Sar
feature n=79
feature n=64
feature n=32
feature n=16
feature n=8
feature n=4
0.943
0.965
0.967
0.977
0.975
0.969
sensitivity
specificity
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00