



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0155128
(43) 공개일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/689 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0054612
(22) 출원일자 2022년05월03일
심사청구일자 2022년05월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
조금준
서울특별시 양천구 목동서로 234, 102동 1107호(
목동, 목동성원아파트)
장웅식
서울특별시 동작구 여의대방로 28, 102동 108호(
신대방동, 현대아파트)
이소영
경기도 광명시 범안로 1002, 6층 42호 (하안동,
대광프라자)
(74) 대리인
특허법인태백

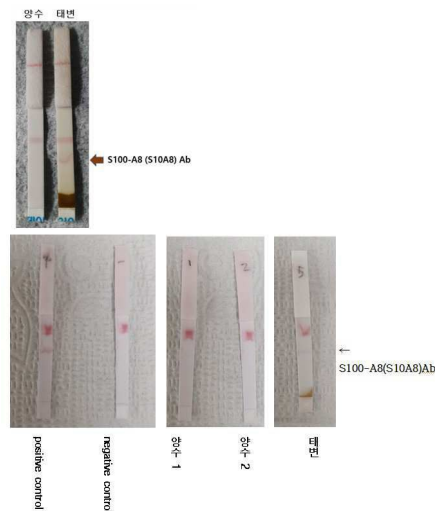
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 양수 내 태변 유무 진단용 조성물 및 진단 키트

(57) 요약

본 발명은 양수 내 태변 유무 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것으로서, 구체적으로, 주산기 때 양수 내 태변 유무를 빠르게 진단할 수 있는 표지(marker) 기술에 대한 것이다. 양수 내 태변을 진단하는 신속 키트(Rapid kit) 최적화를 위해, 수집된 양수와 태변에서 MALDI-TOF를 통해 동정된 단백질 S100-A8(S10A8; MRP8)을 기반한 LFIA(Lateral Flow Immunochromatographic Assay) strip을 이용하여 진단 키트를 제작하였다. 이에, 본 발명은 산모와 태아의 진단을 위한 연관성 연구 등, 양수 내 태변 유무를 진단하는 것에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

S100-A8 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

S100-A8의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 S100-A8의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 S100-A8 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 S100-A8 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 양수 내 태변 유무 진단용 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 조성물을 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 측면유동면역발색분석(Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) 키트인 것을 특징으로 하는 양수 내 태변 유무 진단용 키트.

청구항 6

- (1) 분리된 양수로부터 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 양수 내 태변이 존재한다고 판단하는 단계를 포함하는 양수 내 태변 유무 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 S100-A8 단백질의 발현 수준은 상기 S100-A8 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와의 항원-항체 반응을 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 양수 내 태변 유무 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항원-항체 반응은 측면유동면역발색분석(Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA)으로 확인하는 것을 특징으로 하는 양수 내 태변 유무 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양수 내 태변 유무를 임상 현장에서 빠르게 진단할 수 있는 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양수는 자궁 내에서 태아의 성장과 발달에 중요한 역할을 한다. 양수는 외부의 충격으로부터 태아를 보호하는 완충 역할을 하며, 근골격계의 발달을 가능하게 하고, 감염으로부터 항균 역할, 태아 체온의 유지, 위장관과 호

흡계의 발달 및 태아의 성장과 발달에 필요한 수분과 영양소의 공급원으로서의 역할 등을 한다.

[0003] 태변은 재태 연령 14-16주에서 태아 위장관 내에 처음으로 발견된다. 태변이 염색된 양수는 태아의 대장 내용물이 자궁 내로 유출된 결과로, 태변 배출은 다양한 원인에 의해서 발생할 수 있는데, 만산아 및 과숙아에서 생리적 태변 배출 또는 자궁 내 분만 중 태아 혹은 모체의 스트레스 요인, 즉 저산소증, 산혈증, 감염 등에 의하여 장 운동의 항진과 항문괄약근의 이완으로 태변이 양수 내로 배출된다.

[0004] 자궁 내로의 태변의 유출은 재태 주수 32주 이전에는 거의 없으며, 대부분의 경우 재태 연령 37주 이상에 발생된다. 태변 착색은 전 출생아의 10-15%의 빈도로 발생하며, 이중 2-22% 정도가 태변이 기도 내로 흡입되어 태변 흡입증후군으로 이행한다. 태변 흡입증후군은 이러한 신생아의 5%에서 보이고, 이러한 태변 흡입증후군을 보이는 경우의 4% 이상에서 사망하게 되는데, 이는 전체 주산기 사망의 약 2%를 차지한다. 태변 흡입증후군은 기도 폐쇄에 의한 호흡 장애를 일으켜 주산기 이환과 사망을 초래할 수 있는 중요한 원인이 되기 때문에 예측 불가능하며, 예방할 수 없는 것으로 알려져 있어 예방과 치료에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다.

[0005] 기존의 태변 흡입증후군의 예방을 위해 태변 착색아에서 기관 내 삽관을 통한 태변 흡인이 널리 시행되어 왔으나, 많은 논란이 되어왔다. 태변 흡입증후군의 예방을 위해 산전 중재로 양수주입요법이 태변을 희석하여 태변 흡인 증후군의 빈도를 감소시킨다고 보고하였다. 그밖에 제왕 절개와 산모의 진정(sedation)이 태변 흡인 증후군의 예방을 위해 제안되었으나 이에 대한 연구는 부족하다.

[0006] 재태 연령 4개월에 다량의 담즙색소가 배설되면서 태변이 특유의 녹색을 띠게 되는데, 현재까지는 양수가 과박 되었을 때, 양수 색깔이나 또는 분만한 신생아에 피부색을 통해 육안적으로 태변 유무를 확인할 수 있을 뿐, 실제 양수 내 태변 유무를 진단하는 기술이 없는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본공개특허 JP 2011-500196 A (2011.01.06 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 S100-A8 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 S100-A8의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 조성물, 이를 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 분리된 양수로부터 S100-A8의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 양수 내 태변 유무 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 S100-A8 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 S100-A8의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 (1) 분리된 양수로부터 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 양수 내 태변이 존재한다고 판단하는 단계를 포함하는 양수 내 태변 유무 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 양수 내 태변 유무 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것으로서, 구체적으로, 주산기 때 양수 내 태변 유무를 빠르게 진단할 수 있는 표지(marker) 기술에 대한 것이다. 양수 내 태변을 진단하는 신속 키트(Rapid kit) 최적화를 위해, 수집된 양수와 태변에서 MALDI-TOF를 통해 동정된 단백질 S100-A8(S10A8; MRP8)을 기반한 LFIA(Lateral Flow Immunochromatographic Assay) strip을 이용하여 진단 키트를 제작하였다. 이에, 본 발명은 산모와 태아의 진단을 위한 연관성 연구 등, 양수 내 태변 유무를 진단하는 것에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 수집된 양수와 태변을 2-DE 샘플의 Match set 전체 이미지에서 표준화(Normalize)된 스팟 세기(spot intensity)를 기준으로 선정된 스팟(spot) 상세 이미지를 얻은 것이다.
- 도 2는 선정된 스팟(spot)에서 MALDI-TOF 분석을 하여 Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 시행하고, Matrixscience (<http://www.matrixscience.com/>)에서 개발한 MASCOT 프로그램을 이용하여 단백질을 동정한 결과이다.
- 도 3은 본 발명에 사용된 LFIA(Lateral Flow Immunochromatographic Assay) strip을 나타낸다.
- 도 4는 양수 내 태변을 진단하는 신속 키트(Rapid kit) 최적화를 위해, 수집된 양수와 태변에서 MALDI-TOF를 통해 동정된 단백질 S100-A8(S10A8; MRP8)을 기반한 LFIA(Lateral Flow Immunochromatographic Assay) strip을 이용하여 제작한 진단 키트를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은 S100-A8 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 "S100-A8"은 본 명세서 내에서 "S10A8" 또는 "MRP8"로도 명명하여 기재하였으며, NCBI accession no. P05109 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 또한, 본 발명은 S100-A8의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 조성물을 제공한다.
- [0020] 상세하게는, 상기 S100-A8의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 S100-A8 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 S100-A8 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현량을 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 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 S100-A8에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 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.
- [0024] 또한, 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액

등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

- [0025] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "애포머(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, 애포머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 양수 내 태변 유무 진단용 키트를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 진단 키트는 S100-A8 단백질을 타겟 항원으로 하여, 상기 S100-A8 단백질과 특이적으로 결합하는 항체와의 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 진단 키트에서 상기 항원-항체 반응은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay), 면역조직화학염색 방법(Immunohistochemical staining) 또는 표면증강라만분석법(Surface Enhanced Raman Spectroscopy assay)으로 측정할 수 있으나, 바람직하게는, 상기 진단 키트는 측면유동면역발색분석(Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA) 키트일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 진단 키트에서, 상기 S100-A8 단백질 등을 고정하기 위한 고정체; 상기 S100-A8에 대한 항체와 특이적으로 결합하는 발색 표지체가 컨쥬게이션된 2차 항체 접합체(Conjugate); 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액 세척액, 및 효소반응 정지용액을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 항원-항체 결합 반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오스 막, PVDF막, 폴리비닐 (Polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌 (Polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트 (Well plate) 및 유리로 된 슬라이드 글라스(Slide glass) 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 2차 항체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색체가 바람직하며, HRP(Horseradish peroxidase), 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase), 콜로이드 골드 (Colloid gold), FITC (Poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC (Rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질 (Fluorescein) 및 색소 (Dye) 등의 표지체가 사용될 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 (1) 분리된 양수로부터 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 S100-A8 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 S100-A8 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 양수 내 태변이 존재한다고 판단하는 단계를 포함하는 양수 내 태변 유무 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0034] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunoassay), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 보다 상세하게는, 상기 S100-A8 단백질의 발현 수준은 상기 S100-A8 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와의 항원-항체 반응을 이용하여 측정될 수 있으며, 측면유동면역발색분석(Lateral Flow Immunochromatographic Assay; LFIA)으로 확인할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명

의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0038] <실험예>

[0039] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0040] 샘플은 20주 산모의 양수와 태변을 무작위로 선택하여 분석하였다. 모든 샘플은 윤리적 허가를 받았다. 샘플은 37℃에서 1일 동안 10% FBS를 함유한 배양 배지에서 배양하였다. 배양된 시료를 Sonoplus(Bandelin electronic, Germany)로 초음파 처리하여 단백질을 분리하여 Bradford 방법으로 정량하였다.

[0041] <실시예>

[0042] 양수와 태변에서 얻은 단백질을 각각 2-DE PAGE로 이미지 비교 분석하였다. 도 1에서 7개 반점의 염색 강도는 태변과 양수에 따라 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 19개의 다른 단백질에 해당하는 7개 지점을 식별하기 위해 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화-비행 질량 분석법(MALDI TOF MS)을 사용하여 태변에서 차별적인 2개의 단백질을 동정하였다. 반점이 태변에서 차별적으로 제시되었다.

[0043] 동정된 단백질은 S10A8_HUMAN, Protein S100-A8과 A1AT_HUMAN, Alpha-1-antitrypsin 이었다(도 2).

[0044] 양수 내 태변을 진단하는 신속 키트(Rapid kit) 최적화를 위해, 수집된 양수와 태변에서 MALDI-TOF를 통해 동정된 단백질 S100-A8(S10A8; MRP8)을 기반으로 LFIA (Lateral Flow Immunochromatographic Assay) strip을 실험하였다(도 3). Anti-MRP8 antibody를 Gold Conjugation Kit를 사용하여 접합(conjugation)하였다. LFIA strip의 Control line에 Anti-MRP8 antibody와 결합할 수 있는 Recombinant Anti-Mouse IgG antibody를 점적하고 Test line에는 Anti-MRP8 antibody를 점적하였다.

[0045] 양수와 태변을 비교하였을 때 양수에는 control line만 발색되고, 태변에는 control line과 test line 모두 발색된 것을 알 수 있었다. 이 결과로 양수에는 없지만 태변에만 있는 human MRP 8 protein을 검출할 수 있는 strip을 만들 수 있게 되었다(도 4).

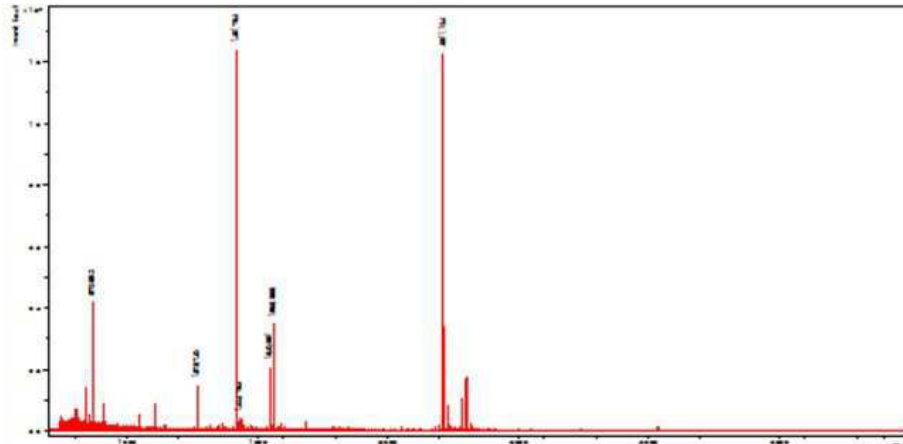
[0046] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

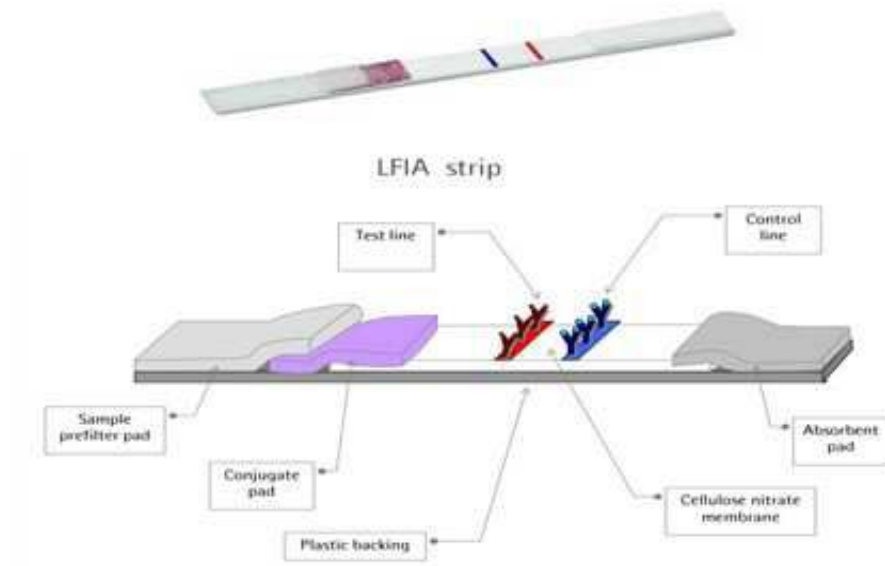
도면1



도면2



도면3



도면4

