



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0104905
(43) 공개일자 2016년09월06일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>C07K 14/46</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/54</i> (2006.01) <i>C12N 9/08</i> (2006.01)
 <i>C40B 40/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/53</i> (2013.01)
 <i>C07K 14/46</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0027764
 (22) 출원일자 2015년02월27일
 심사청구일자 2015년02월27일</p> | <p>(71) 출원인
 조선대학교산학협력단
 광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)</p> <p>(72) 발명자
 이준식
 광주광역시 서구 풍암1로 53 105동206호</p> <p>(74) 대리인
 특허법인아이엠</p> |
|--|--|

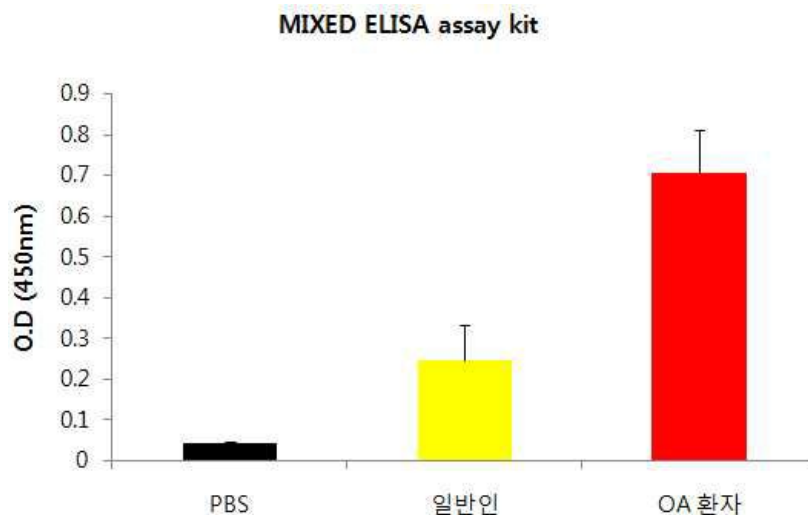
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성관절염에 대한 바이오마커 및 상기 바이오마커를 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트

(57) 요약

본 발명은 관절염 진단을 위한 바이오마커 및 진단키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 퇴행성관절염에 특이적인 바이오마커 및 상기 바이오마커를 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C07K 14/5443 (2013.01)

C12N 9/0065 (2013.01)

C12Y 111/02002 (2013.01)

C40B 40/04 (2013.01)

G01N 2800/102 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

연골올리고머기질단백질(Cartilage oligomeric matrix protein : COMP)에 특이적으로 결합하는 결합제, COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 상기 COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상;

미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase : MPO)에 특이적으로 결합하는 결합제, MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상; 및

인터루킨-15(Interleukin-15 : IL-15)에 특이적으로 결합하는 결합제, IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 상기 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상;을 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 면역분석(immunoassay)용 조성물인 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 결합제는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 마이크로어레이용 조성물인 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 키트는 정상대조군과 비교하여 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현양의 증가를 측정하여 퇴행성관절염을 진단하거나 예후를 분석하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현양이 정상대조군의 발현양보다 1.5배 이상이면 퇴행성관절염으로 진단되는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 키트는 마이크로어레이인 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트.

청구항 10

인간의 생물학적 시료에 있는 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 검출하는 방법을 통해 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석 마커를 검출하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석 마커를 검출하는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 방법은 마이크로어레이방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석 마커를 검출하는 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 방법은 유전자증폭방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석 마커를 검출하는 방법.

청구항 14

COMP, MPO 및 IL-15에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및

상기 분석시료가 상기 COMP, MPO 및 IL-15의 작용을 억제하는지를 확인하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 예방 및 치료용 물질의 스크리닝방법.

청구항 15

COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및

상기 뉴클레오타이드 서열의 발현양이 억제되는지를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 예방 및 치료용 물질의 스크리닝방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 관절염 진단을 위한 바이오마커 및 진단키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 퇴행성관절염에 특이적인 바이오마커 및 상기 바이오마커를 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성관절염은 숨길 수 없는 노화의 징표로 우리나라 55세 이상 인구의 80%가 앓고 있으므로, 인체 내 200여 개의 크고 작은 뼈 사이에서 이음매 역할을 하며 하루에도 10만여 회나 움직이는 중요한 인체의 일부인 관절연골의 노화를 예방하고 늦출 수 있는 방법은 고령화 시대 초미의 관심사일 수밖에 없다.

[0003] 먼저, 관절연골 결손의 원인을 살펴보면, 외상(trauma), 관절 인대손상(ligament injuries), 반월상 연골판 손상(meniscus injuries), 박리성 골연골염(osteochondritis dissecans), 퇴행성관절염(degenerative joint disease), 관절의 부정정렬(malalignment of joint), 무혈성 괴사증(osteonecrosis), 염증성 관절염(inflammatory arthritis), 감염(infection) 등이 원인이 될 수 있다.

[0004] 이러한 관절연골의 손상은 동통, 운동제한 등을 동반하면서 결국 전형적인 퇴행성관절염으로 진행하게 된다. 연골조직 퇴행의 원인으로 세포외기질분해효소에 의한 연골조직 분해, 연골세포로서의 특성을 잃는 탈분화, 염증반응, 세포사멸 등이 있다. 연골세포에서 생성되는 세포외기질분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)는 MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13, 아그리카나아제(aggrecanase), MT1-MMP (MMP-14), TIMP-1, -2, -3이며 연골조직의 퇴행은 대사적 불균형으로 인한 MMP의 과도한 발현(활성)과 TIMP의 불충분한 합성(불활성화)로 일어나는 비가역적인 연골조직의 파괴과정이다. 연골세포에서 생성된 다양한 MMP는 연골세포로부터 합성된 다양한 ECM 분자들 즉 콜라겐(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycan), 링크 프로틴(link protein) 등을 분해하고 결과적으로 연골조직의 파괴와 연골조직 ECM (Extracellular matrix) 분자 구성을 변화시킨다.

[0005] 연골조직의 파괴는 점진적이고 비가역적으로 일어나 삶의 질을 떨어뜨리는 난치성 질환인 관절염의 직접적인 원인이다. 여가 활동의 증가와 고령 인구의 증가로 인해 관절염의 치료법에 대한 중요성이 부각되고 있으나 아직 그 병리적 원인이나 근본적인 치료방법이 개발되지 않고 있다. 수술적 방법 이외에는 항염증제 등을 통한 통증 완화 등에 그치고 있으며 연골보호제(히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴) 등이 개발되었으나 이 역시 연골 퇴행과 연골생성 촉진 및 재생유도 등에는 그 효과가 확립되지 않았다.

[0006] 따라서, 퇴행성관절염의 진행을 막거나 늦추기 위해서는 퇴행성관절염을 조기에 진단할 필요가 있으나, 현재까지는 퇴행성관절염을 진단하는 방법으로 정형외과의 병원내진 또는 X-ray와 같은 방법 등 만이 알려져 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상술된 문제점을 해결하고자 본 발명자들은 퇴행성관절염을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기술을 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과 발굴된 바이오마커들이 퇴행성관절염을 진단할 수 있고 예후를 분석할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 퇴행성관절염의 진단 또는 예후를 분석할 수 있는 조성물 및 그 조성물을 포함하는

진단키트를 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명의 다른 목적은 퇴행성관절염의 진단 또는 예후를 분석하는데 필요한 정보를 제공하기 위하여 퇴행성관절염마커를 검출하는 검출방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 퇴행성관절염 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상술된 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 연골올리고머기질단백질(Cartilag oligomeric matrix protein : COMP)에 특이적으로 결합하는 결합제, COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 상기 COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상; 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase : MPO)에 특이적으로 결합하는 결합제, MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상; 및 인터루킨-15(Interleukin-15 : IL-15)에 특이적으로 결합하는 결합제, IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 상기 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상;을 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물을 제공한다.
- [0013] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 조성물은 면역분석(immunoassay)용 조성물이다.
- [0014] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 결합제는 항체 또는 앵타머이다.
- [0015] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 조성물은 마이크로어레이용 조성물이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 조성물을 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트를 제공한다.
- [0017] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 키트는 정상대조군과 비교하여 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현양의 증가를 측정하여 퇴행성관절염을 진단하거나 예후를 분석한다.
- [0018] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현양이 정상대조군의 발현양보다 1.5배 이상이면 퇴행성관절염으로 진단된다.
- [0019] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트이다.
- [0020] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 인간의 생물학적 시료에 있는 COMP, MPO 및 IL-15 또는 상기 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 검출하는 방법을 통해 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0022] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시된다.
- [0023] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 마이크로어레이방식으로 실시된다.
- [0024] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 유전자증폭방식으로 실시된다.
- [0025] 또한, 본 발명은 COMP, MPO 및 IL-15에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 분석시료가 상기 COMP, MPO 및 IL-15의 작용을 억제하는지를 확인하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 예방 및 치료용 물질의 스크리닝방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현양이 억제되는지를 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성관절염 예방 및 치료용 물질의 스크리닝방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 효과는 다음과 같다.
- [0028] 먼저, 본 발명에 의하면 퇴행성관절염 진단 또는 예후 분석용 조성물 및 그 조성물을 포함하는 진단키트를 제공할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 바이오마커들은 퇴행성관절염에 대한 마커로서의 정확성 및 신뢰도가 크게 개선된 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명은 퇴행성관절염 환자의 조직, 세포 또는 혈액에서 특이적으로 발현이 증가되는 바이오마커들을 이용하여 생물학적 시료로부터 매우 특이적으로 퇴행성 관절염을 조기에 진단하거나 예후를 분석할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1a 내지 도 1c는 각각 본 발명에서 사용되는 바이오마커인 COMP, MPO 및 IL-15의 아미노산서열이다.
- 도 2는 정상대조군(일반인)과 퇴행성관절염(Osteoarthritis :OA)환자군의 혈액을SDS-PAGE한 결과 사진이다.
- 도 3a 내지 도 3f는 각각 OA환자 혈액에서 COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2, FGF-21 발현양 확인그래프이다.
- 도 4a 내지 도 4c는 각각 일반인 및 OA 환자의 혈액에서의 COMP, MPO, IL-15의 발현양 비교결과그래프이고, 도 4d는 일반인 및 OA 환자의 혈액에서의 CCR13, MPP-2, FGF-21 발현량 비교 결과그래프이다.
- 도 5는 일반인 및 OA 환자의 혈액에서의 COMP, MPO, IL-15를 Mixed된 것으로 측정한 발현양 결과그래프이다.
- 도 6은 본 발명에서 사용된 ELISA 키트의 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0034] 먼저, 본 발명에서 사용되는 용어 "생물학적 시료"는 인체로부터 얻어지는 모든 시료, 예컨대, 연골(특히, 관절 연골)의 세포 또는 조직, 오줌, 타액, 혈액, 혈장 또는 혈청 시료를 의미하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 퇴행성관절염 상태의 동정, 관절염의 단계 결정 또는 치료에 대한 퇴행성관절염의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "예후"는 질병의 진행 가능성 과정, 특히, 질병의 차도, 질병의 재생, 관절염 재발 측면에서의 예측을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서의 예후는 퇴행성관절염 환자의 질병이 완치될 가능성을 의미한다.
- [0037] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다. 다른 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) 부 또는 %, 고체/액체는 (중량/부피) 부 또는 %, 및 액체/액체는 (부피/부피) 부 또는 %이다.
- [0038] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.
- [0039] 본 발명자들은 퇴행성관절염을 신속하고 정확하게 분자 진단할 수 있는 신규한 분자 마커를 발굴하고자 노력하였다. 그 결과 퇴행성관절염을 조기 진단할 수 있고, 예후를 판정할 수 있는 바이오마커들로서 COMP, MPO 및

IL-15를 발견하였으며, 상기 바이오마커들이 퇴행성관절염에 대한 마커로서의 정확성과 신뢰도가 크게 개선되었음을 규명하였다. 그 결과 본 발명의 바이오마커들은 퇴행성관절염의 발생 및 발전에 대한 지표가 될 수 있으며, 퇴행성 관절염의 발생 및 발전의 진단에 이용될 수 있다.

[0040] 먼저, COMP 즉 연골올리고머기질단백질(Cartilage oligomeric matrix protein)은 연골에 포함되어 있는 단백질 성분 중 하나로서, 757개의 아미노산으로 구성된 단백질인데 그 아미노산서열은 도 1a에 나타내었다. COMP는 인간 COMP유전자에 의해 코딩되는 noncollagenous extracellular matrix (ECM)단백질로서, cartilage turnover 마커이며, 연골이 손상되면 이 성분이 연골에서 떨어져 나가 혈액 속을 돌게 되므로 혈액 속의 COMP의 양을 측정하면 연골손상의 정도를 알 수 있다고 알려져 있다.

[0041] 다음으로, MPO 즉 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase)는 골수구계세포의 1차과립에 존재하고, 중쇄(분자량 55,000~60,000)와 경쇄(輕鎖)(10,000~15,000)의 4합체($\alpha_2\beta_2$)를 형성하는 효소이다. 유전자는 17번 염색체 단완 21.3~23영역에 존재하여, 12개의 활성부위(exon)로 구성되어 있다. 도 1b에 도시된 745개의 아미노산 서열에서 중쇄와 경쇄가 형성된다. 세균 등의 탐식 후, 산소의존성 살균에 중요하다. 이 효소는 림프구계 세포에는 존재하지 않기 때문에 골수구계의 백혈병 등의 진단에 사용한다. 이와 같이 MPO는 골수구성 계열의 세포들에 존재하는 특징적인 효소로서 급성 골수구성 백혈병의 진단에 중요한 것으로 생각되었다. 이전의 연구들에서는 백혈구의 핵형이 급성 골수구성 백혈병의 예후에 가장 중요한 요소라고 생각했음에도 불구하고 미엘로퍼옥시다제도 예후적 가치를 가지고 있다는 것을 보여준 바 있었다.

[0042] 또한, IL-15 즉 인터루킨-15는 상피세포에서 생성되는 시토카인(분자량 14,000)으로 도 1c에 도시된 136개의 아미노산서열을 갖는다. IL-15는 IL-2의 생물학적 활성의 대부분을 나타내며, 세포상해성 T세포의 증식, 알로항원 특이적 세포상해성 T세포 및 항원 비특이적 림포카인활성살생세포(LAK)의 시험관 내 작성을 촉진한다. IL-2와 IL-15의 1차구조상의 상동성은 없지만, 양자의 3차구조는 4개의 α -나선의 다발로 이루어지는 질(質)이 촘촘한 구형 구조를 하는 시토카인족에 속한다. IL-15는 IL-2수용체 β 사슬, γ 사슬과 결합하지만, IL-2수용체의 α 사슬과는 결합하지 않는 것으로 알려져 있다.

[0043] 이와 같이 COMP, MPO 및 IL-15는 퇴행성관절염에 특이적인 마커로 알려진 바 없지만, 본 발명자들은 후술하는 바와 같이 퇴행성관절염 환자들의 생물학적 시료 중 특히 혈액을 분석한 결과 상기 바이오마커들의 발현양이 정상대조군과 비교하여 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 보다 바람직하게는 3배 이상 많아지면 퇴행성관절염으로 진단할 수 있음을 규명하였다. 이와 같이 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 바이오마커들인 COMP, MPO 및 IL-15는 혈액에 포함되어 있다.

[0044] 따라서, 본 발명은 연골올리고머기질단백질(Cartilage oligomeric matrix protein : COMP)에 특이적으로 결합하는 결합제, COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 상기 COMP를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상; 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase : MPO)에 특이적으로 결합하는 결합제, MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 및 MPO를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상; 및 인터루킨-15(Interleukin-15 : IL-15)에 특이적으로 결합하는 결합제, IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 상기 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열 중 어느 하나 이상;을 포함하는 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물 및 그 조성물을 포함하는 진단 또는 예후분석용 키트를 제공한다.

[0045] 본 발명의 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 조성물 및 그 조성물을 포함하는 진단 또는 예후분석용 키트는 면역분석(immunoassay) 방식, 즉 항원-항체 반응 방식으로 실시될 수 있다. 이 경우, 본 발명의 퇴행성관절염 마커인 COMP, MPO 및 IL-15에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시된다.

[0046] 본 발명에서 이용되는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법, 재조합 DNA 방법 또는 파아지 항체 라이브러리 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 공지되어 있으므로 자세한 설명은 생략하지만, 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어질 수 있다. 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0047] 본 발명을 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 퇴행성관절염을 진단하는 데 이용될 수 있다.

[0048] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 이러한 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA (enzyme-linked

immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C14, I125, P32 및 S35)로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시 예는 분석하고자 하는 미지의 생물학적 시료의 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 1단계; 일차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 분해물을 반응시키는 2단계; 상기 2단계의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 3단계; 및 상기 효소의 활성을 측정하는 4단계를 포함할 수 있다.

[0051] 여기서, 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다. 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0052] 본 발명이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시 예는 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 1단계; 포획항체와 시료를 반응시키는 2단계; 상기 2단계의 결과물의 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, COMP, MPO 및 IL-15에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 각각 반응시키는 3단계; 및 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 4단계를 포함할 수 있을 것이다.

[0053] 여기서, 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능물질(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 이러한 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 본 발명의 마커의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 변형 예에 따르면, 항체 대신에 본 발명의 마커에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수 있다. 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 공지되어 있으므로 상세한 설명은 생략한다.

[0056] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 퇴행성관절염을 진단할 수 있다. 즉, 생물학적 시료에서 본 발명의 마커의 단백질이 고발현되어 시그널이 정상 생물학적 시료(예컨대, 관절연골 세포 또는 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청)보다 강하게 나오는 경우, 특히 1.5배 이상, 바람직하게는 2배 이상, 보다 바람직하게는 3배 이상 강하게 나오는 경우에는 퇴행성관절염으로 진단될 수 있다.

[0057] 본 발명의 조성물은 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물이 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 조성물은 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물이 포함된 키트를 제작하는 경우 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

- [0058] 본 발명의 조성물이 마이크로어레이용 조성물인 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다. 본 발명의 조성물이 유전자 증폭용 조성물인 경우에는 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 COMP 뉴클레오티드 서열, MPO 뉴클레오티드 서열 및 IL-15 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 발명에서 사용되는 용어 "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 "상보적"은 용어 완전 상보적 (perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0060] 본 발명의 조성물이 포함된 마이크로어레이에 있어서, 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체 (substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다. 한편, 본 발명의 조성물이 포함된 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로 어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 퇴행성관절염 진단 또는 예후부석용 조성물이 포함된 키트는 혼성화에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 상술한 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다.
- [0062] 상술한 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 퇴행성관절염 여부를 판단할 수 있다. 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단 (예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0063] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생물학적 시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있으며, 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0064] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 예를 들어, 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [0065] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제 (예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌 (비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약 (10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol),

TMB(tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethyl benzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트 (naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS (phenazine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

[0066] 따라서 본 발명의 퇴행성관절염 마커를 검출하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 1단계; 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 퇴행성 관절염 여부를 판단할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료(예컨대, 관절연골의 조직 또는 세포)보다 강하게 나오는 경우에는 퇴행성 관절염으로 진단된다.

[0067] 본 발명의 퇴행성관절염 진단 또는 예후분석용 키트는 유전자 증폭 키트일 수 있는데, 용어"증폭"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication, WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction(CP-PCR), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification(NASBA), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0068] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다.

[0069] 본 발명의 진단 또는 예후 분석용 키트가 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 생물학적 시료(예컨대, 관절 연골 조직 또는 세포, 혈액, 혈장, 혈청 또는 소변)에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 mRNA 양을 조사하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열의 발현 정도를 결정한다.

[0070] 따라서 본 발명은 원칙적으로 생물학적 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

[0071] mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다. 예컨대, TRIzol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다. 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.

[0072] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한 것 일 수 있다. 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소일 수 있다. 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 원하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될

수도 있다. 본 발명에서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[0073] 이렇게 증폭된 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, 생물학적 시료에서 본 발명 마커의 뉴클레오타이드 서열의 발현이 정상 시료(예컨대, 정상 관절 연골 세포 또는 조직, 혈액, 혈장 또는 혈청)보다 높게 나오는 경우에는 퇴행성 관절염으로 진단된다.

[0074] 따라서 본 발명의 관절염 마커의 검출 방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 1단계; 및 상기 증폭 반응의 산물을 분석하여 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열의 발현정도를 결정하는 단계를 포함한다. 본 발명의 마커는 퇴행성관절염에서 고발현 되는 생체 분자이다. 이러한 마커의 고발현은 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "고발현"은 조사 대상의 시료에서의 대상이 되는 뉴클레오타이드 서열의 발현 정도가 정상 시료와 비교하여 높은 경우를 의미한다. 예컨대, 당업계에서 통상적으로 이용되는 발현 분석 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 또는 ELISA 방법에 따라 발현 분석을 한 경우, 발현이 높은 것으로 분석되는 경우를 의미한다. 예를 들어, 상술한 분석 방법에 따라 분석한 결과, 본 발명의 마커가 정상세포 또는 조직과 비교하여 1.5-10 배 정도 고발현 되는 경우, 본 발명에서 퇴행성관절염으로 판정할 수 있다.

[0075] 본 발명의 퇴행성관절염 예방 및 치료용 물질의 스크리닝방법은 COMP, MPO 및 IL-15에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및 분석시료가 COMP, MPO 및 IL-15의 작용을 억제하는지를 확인하는 단계;를 포함하거나, COMP, MPO 및 IL-15를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 분석시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현량이 억제되는지를 측정하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명의 스크리닝 방법에서 사용되는 용어 "분석시료"는 본 발명의 마커의 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 분석시료는 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그 후 분석시료가 처리된 세포에서 본 발명의 마커의 발현량을 측정한다. 발현량의 측정은 상기 기재한 바와 같이 실시할 수 있으며, 측정 결과, 본 발명의 마커의 뉴클레오타이드 서열의 고발현이 억제되는 경우에는 분석시료는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 후보물질로 판정될 수 있다.

[0077] 실시예

[0078] <정상대조군과 Osteoarthritis(OS)환자군 혈액 단백질 비교>

[0079] 정상대조군(일반인)과 퇴행성관절염 환자군(OA환자)의 혈액 profiling을 위하여 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 다음과 같이 실시하고 그 결과사진을 도 2에 나타내었다.

[0080] 일반인과 OA환자로부터 분리한 혈청 3 μ l를 western blot sample buffer와 섞은 후 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행한다. 전기영동이 끝난 gel을 fix 용액(40% methanol/10% acetic acid)을 이용하여 실온에서 1시간 동안 shaking하며 고정한다. 고정된 gel을 0.1% Coomassie Brilliant Blue G250 (10% Glacial acetic acid, 40% Methanol)용액을 이용하여 실온에서 24시간 동안 shaking하며 염색한다. 염색이 끝난 gel을 10% acetic acid 용액을 이용하여 destaining을 한 후 관찰하였다.

[0081] 도 2에 도시된 바와 같이, 일반인 혈액과 OA환자 혈액을 SDS-PAGE로 관찰 한 결과 OA환자에서는 대조군인 일반인보다 특이적인 단백질의 발현량이 증가됨을 관찰 할 수 있었으며, 이들 단백질을 동정하고 그 서열을 후술한 바와 같이 분석한 결과 COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2, FGF21 등이 고발현 됨을 알 수 있었다.

[0082] <단백질 동정 및 Bioinformatics>

[0083] SDS-PAGE로부터 확인된 단백질들의 각각의 spot들을 활용하여 Trypsin으로 처리된 단백질이 여러 개의 펩타이드 조각으로 분해되면 이를 matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry(Applied Biosystems, Forster city, USA)를 사용하여 질량분석 후 등 전점(isoelectric point)과 분자량(molecular weight)에 적합한 단백질을 탐색하기 위해 Matrix Science(<http://www.matrixscience.com>)에

서 monoisotopic peak값을 이용해서 SWISS-PROT(<http://kr.expasy.org/>)와 Nation Center for Biotechnology Information(NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 단백질 데이터베이스를 검색하였다.

[0084] <ELISA 방법을 활용한 OA환자에서의 특이적 단백질 발현 검토>

[0085] Enzyme immunoassay (EIA) plate에 1X coating buffer에 1:200으로 희석한 capture 항체 (COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2, FGF21)를 각각의 plate에 100 μ l씩 넣고 4℃에서 하루 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 plate는 washing buffer (0.05% tween-20이 포함된 PBS, pH7.4)를 이용하여 4회 washing을 하고 1X Assay Diluent A용액을 각각 100 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 반응시킨다. 4회 washing을 한 후 OA환자의 serum sample을 각각 10, 50, 100, 200 μ l씩 넣어 하루동안 4℃에서 반응시킨다. 반응이 끝난 sample을 제거하고 washing buffer를 이용하여 4회 washing을 한다. 1X Assay Diluent A (PBS (pH 7.4), 0.1 % BSA, 0.1% NaN₃)에 1:200으로 희석된 detection 항체를 각각 100 μ l씩 넣고 2시간 실온에서 반응시킨 후, washing buffer를 이용해 4회 washing을 한다. Washing이 끝난 plate에 1X Assay Diluent A에 1:1000으로 희석된 Avidin-HRP을 넣고 30분간 실온에서 반응시킨 후 5회 washing을 한다. Substrate solution을 각각 100 μ l씩 plate에 넣은 후 15분간 실온에서 반응시키고 stop solution (2N sulfuric acid)를 100 μ l씩 넣은 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 3a 내지 도 3f에 도시하였다.

[0086] 도 3a 내지 도 3f에 도시된 바와 같이 OA환자에서 FGF21을 제외하면 COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2는 모두 혈액량에 따라 유의적으로 단백질의 발현량이 높아짐을 관찰 할 수 있었다.

[0087] <일반인 및 OA 환자의 혈액에서의 COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2, FGF-21 발현량 비교>

[0088] Enzyme immunoassay (EIA) plate에 1X coating buffer에 1:200으로 희석한 capture 항체 (COMP, MPO, IL-15, CCR13, MPP-2, FGF21)를 각각의 plate에 100 μ l씩 넣고 4℃에서 하루 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 plate는 washing buffer (0.05% tween-20이 포함된 PBS, pH7.4)를 이용하여 4회 washing을 하고 1X Assay Diluent A용액을 각각 100 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 반응시킨다. 4회 washing을 한 후 정상군과 OA환자군의 serum sample을 각각 200 μ l씩 넣어 하루동안 4℃에서 반응시킨다. 반응이 끝난 sample을 제거하고 washing buffer를 이용하여 4회 washing을 한다. 1X Assay Diluent A에 1:200으로 희석된 detection 항체를 각각 100 μ l씩 넣고 2시간 실온에서 반응시킨 후, washing buffer를 이용해 4회 washing을 한다. Washing이 끝난 plate에 1X Assay Diluent A에 1:1000으로 희석된 Avidin-HRP을 넣고 30분간 실온에서 반응시킨 후 5회 washing을 한다. Substrate solution을 각각 100 μ l씩 plate에 넣은 후 15분간 실온에서 반응시키고 stop solution (2N sulfuric acid)를 100 μ l씩 넣은 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 도 4a 내지 도 4d에 도시하였다.

[0089] 도 4a 내지 도 4d에 도시된 바와 같이, COMP는 일반인에 비해 OA환자에서 2배 이상의 발현량이 관찰되고, MPO는 일반인에 비해 OA환자에서 1.5배 이상의 발현량이 관찰되며, IL-15는 일반인에 비해 OA환자에서 3배 이상의 발현량이 관찰됨을 알 수 있다. 하지만, CCR13, MPP2, 및 FGF21은 일반인에 비해서 OA환자에서 유의성 있는 발현량의 차이가 관찰되지 않았다.

[0090] <일반인 및 OA 환자의 혈액에서의 COMP, MPO, IL-15가 Mixed된 상태에서 발현량 비교>

[0091] Enzyme immunoassay (EIA) plate에 1X coating buffer에 1:200으로 희석한 capture 항체 (COMP:MPO:IL-15=1:1:1)를 사용한 것을 제외하면 상술된 방법과 동일한 방법을 수행하고, 그 결과를 측정하여 도 5에 도시하였다.

[0092] 도 5로부터, COMP, MPO, IL-15를 mixed된 것으로 사용하게 되면 일반인보다 OA환자에서 3배 이상의 뚜렷한 발현량의 차이를 보이는 것을 알 수 있으므로, 각각의 인자 1개로 된 키트 보다는 Mixed된 키트 즉 3개의 바이오마커를 사용하여 진단할 경우 각각의 인자들이 서로 상승작용을 일으켜 퇴행성관절염에 대한 진단 또는 예후분석 판단의 정확도가 높아지는 것을 알 수 있다.

[0093]

[0094] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본

발명의 권리범위에 속한다.

도면

도면1a

1 mvpdtacvll llaalgasg qgqsplgsdl gpqmlrelqe tnaalqdvre llrqqvreit
 61 flkntvmeed acgmqqsvrt glpsvrpllh capgfcfpgv aciqtesgar cgpcpagftg
 121 ngshctdvne cnahpcfprv rcintspgfr ceacppgyvg pthqgvglaf akankqvctd
 181 inecetgqhn cvpnsvcint rgsfqcgpcq pgfvgdqasg cqrraqrfcp dgspsech eh
 241 advclerdgs rscvcavgwa gngilcgrdt dldgfpdekl rcperqcrkd ncvtvpnsqg
 301 edvdrdgigd acdpdadgdg vpnekdnepv vmpdqmntd edkwgdacdn crsqknndqk
 361 dtdqdggrda cdddidgdri mqadncprv pnsdqkdsdg dgigdacdn pcksnpdqad
 421 vdhdvfgdac dsdqdqgdg hqdsrdncpt vpnsaqedsd hdgqgdacdd dddndgvps
 481 rdncrlvpnp ggedadrdiv gdvcdqddfa dkvvdkidvc penaevltld frafqtvvld
 541 pegdaqidpn wvvlnggrei vqtmnsdppl avgytafngv dfegtthvnt vtdddyagfi
 601 fgyqdsfsfy vvmwqmeqt ywqanpfrav aepgiqlkav ksstgpgqql malwhtgdt
 661 esqvrllwkd pmvgwkdkk syrwlqhrp qvgvirvrfy egpelvadsn vldttmrgg
 721 rlgvfcsq nniwanlryr cndtipedy thqlrqa

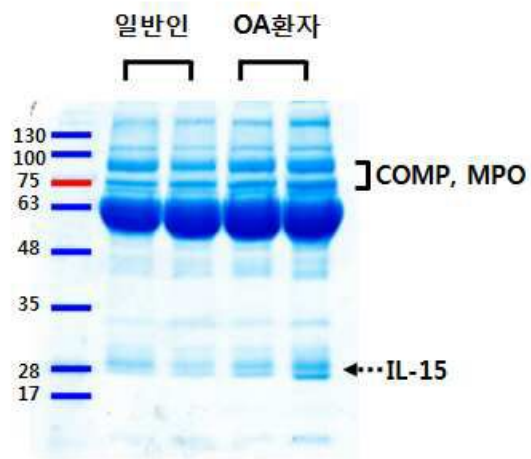
도면1b

1 mgvpffsslr cmvdlgpcwa gglaemkll lalagllail atpqpsegaa pavlgevdts
 61 lvssmeeak qlvdkeyker resikqlrs gsaspmells yfkqpvaatr tavraadylh
 121 valdllerkl rslwrpfinv tdvltpaqln vlkssgcay qdvgtcpeq dkyrtitgmc
 181 nmrspitga snrafvrlp aeyedgslp ygwtpgvkrn gfpvalarav sneivrfptd
 241 qltpdqersl mfmqwgqllld hlddftpepa arasvftgvn cetscvqppp cfpklippnd
 301 priknqadci pffrscpacp gsnitirni naltsfvdas mvygseepla mlrnmnsq
 361 gllavnqrfq dngallpfd nlhddpcllt nrsaripcl agdtrssemp eltsmhtlll
 421 rehnrlatel kslnrwdge rlyqearkiv gamvqiityr dylplvlgt amrkylptyr
 481 syndsvdpri anvftnafry ghtliqpfmf rldnryqpme pnpvrplsr ffaswrvvle
 541 ggidpirlgl matpaklnrq nqiavdeire rlfqvmrig ldlpalnmqr srdhglpgyn
 601 awrrfcglpq petvgqlgtv lmlklarkl meqygtpnni diwmggvsep lkrkgrvgpl
 661 laciigtqfr kldgdrfww enegvsmmq rqlaqislp riicdntgit tvsknnifms
 721 nsyprdfvnc stlpalnlas wreas

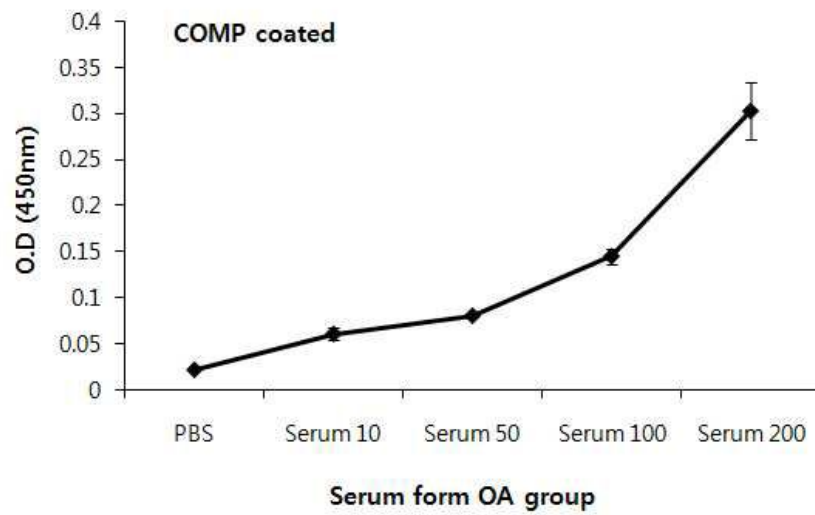
도면1c

1 mdfqvqifsf llisasvims ranwvnvisd lkkiedliqs mhidatlyte sdvhpsckvt
 61 amkcfllelq vislesgdas ihtvenlii lannslssng nvtesgckec eeleeeknike
 121 flqsfvhivq mfints

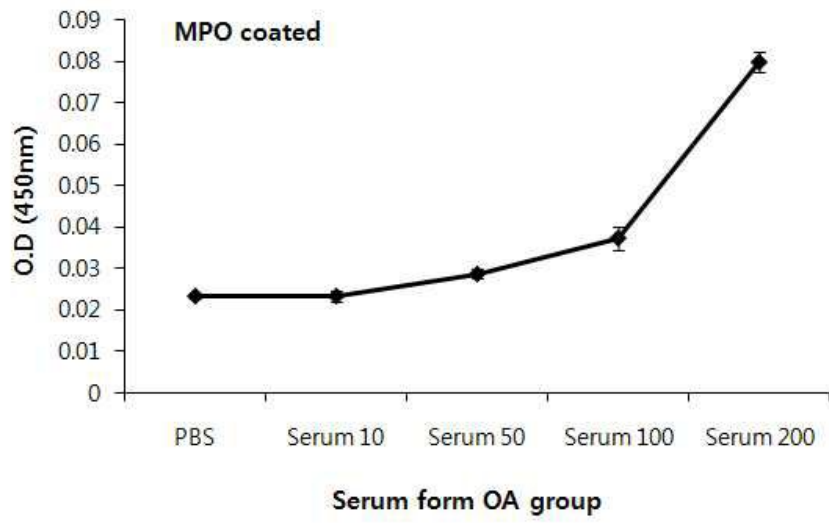
도면2



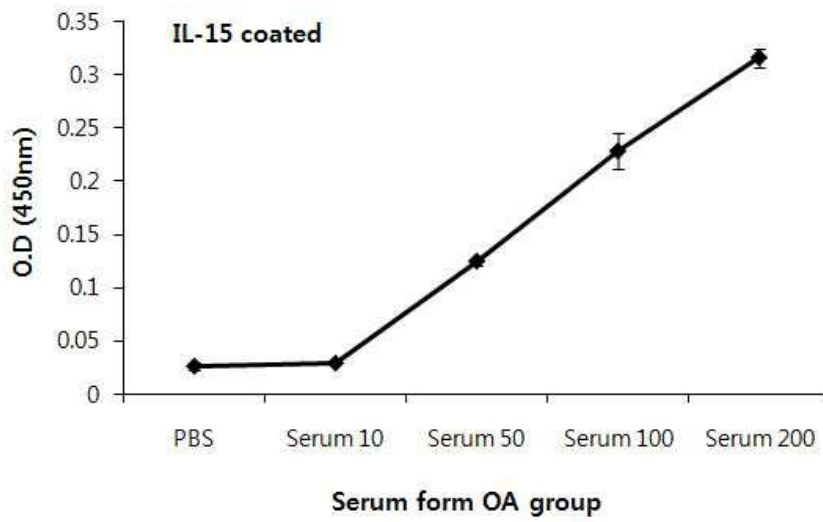
도면3a



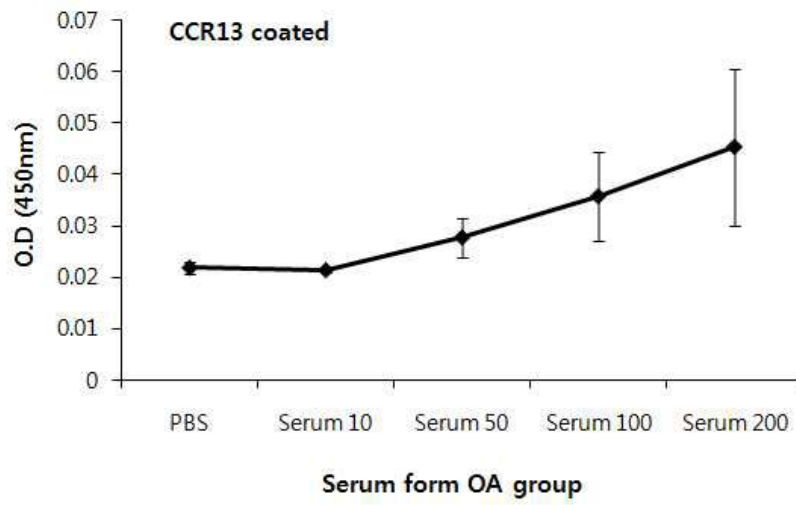
도면3b



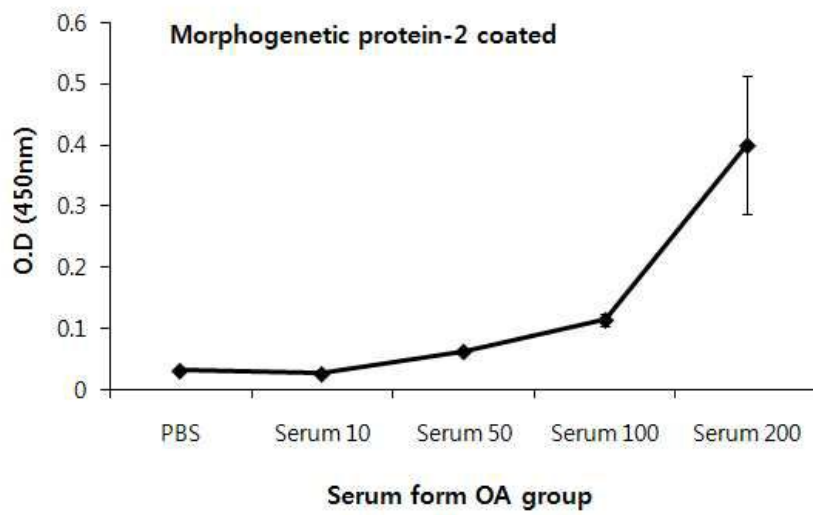
도면3c



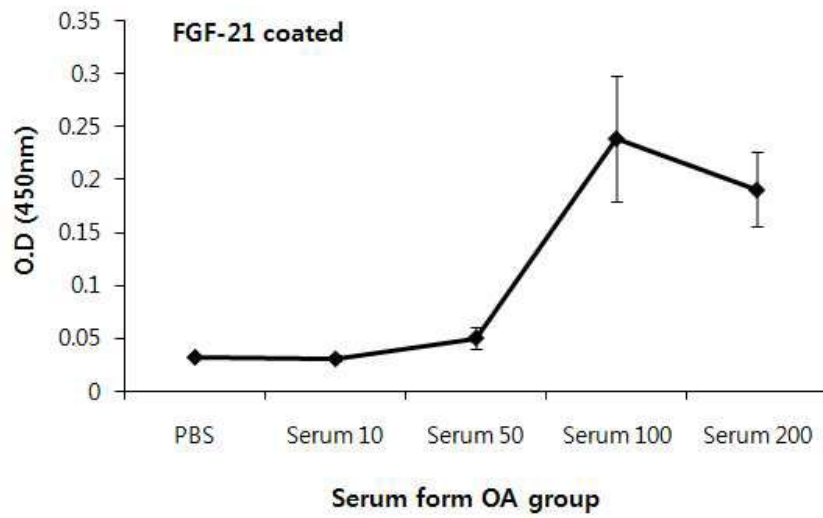
도면3d



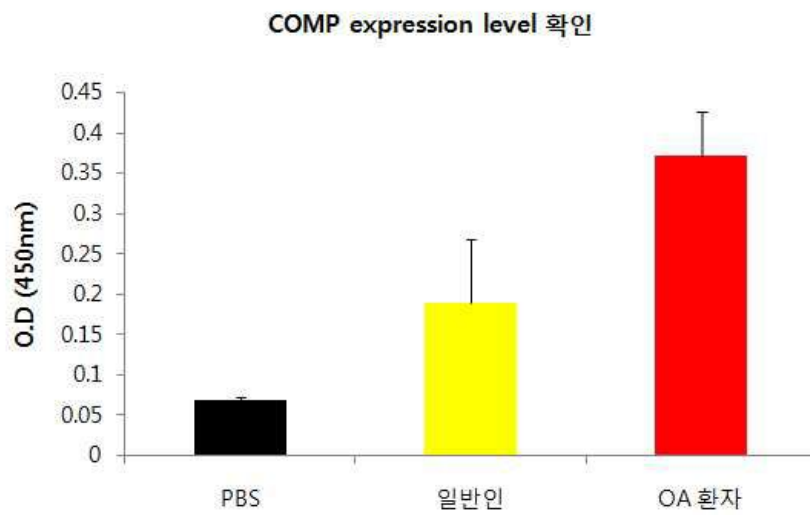
도면3e



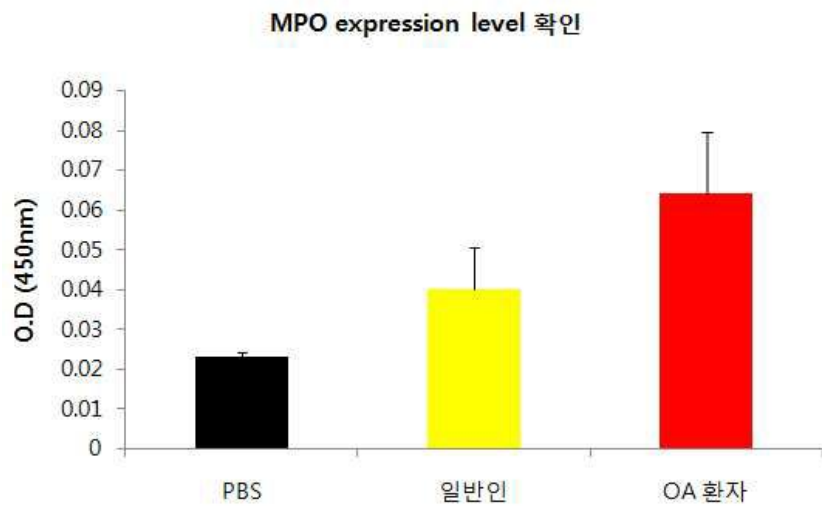
도면3f



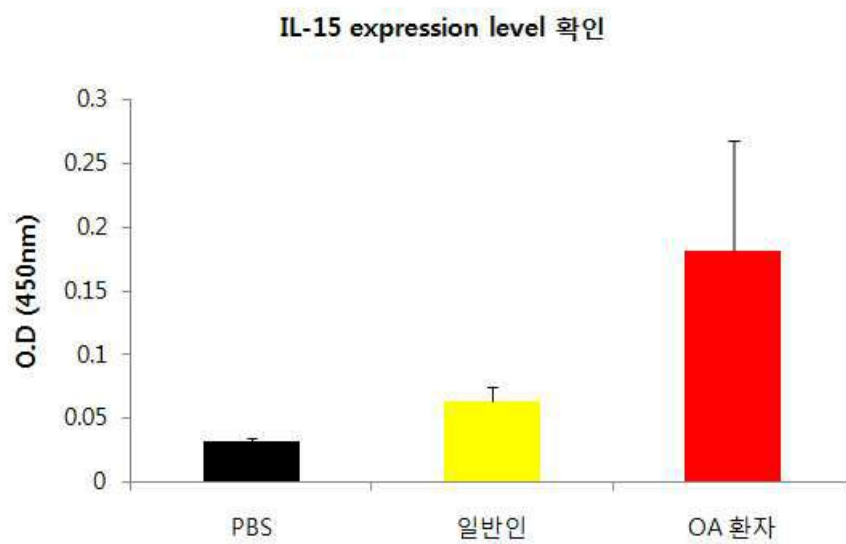
도면4a



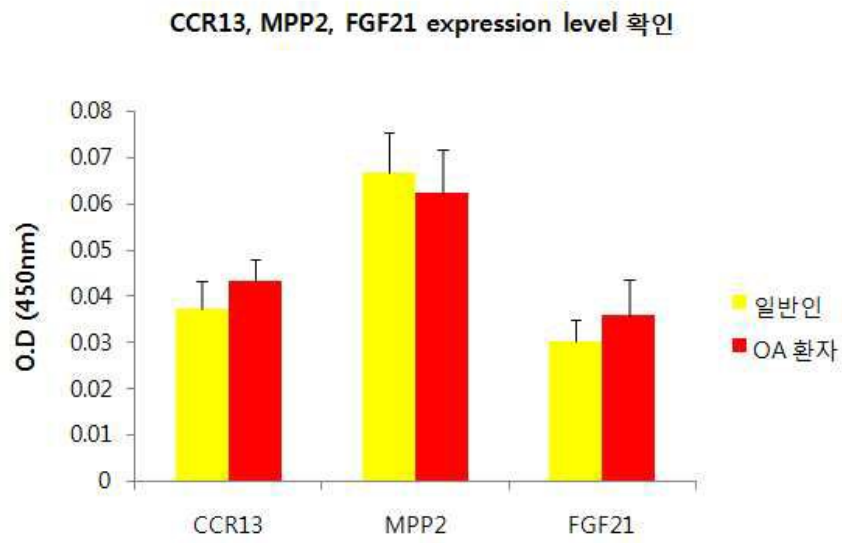
도면4b



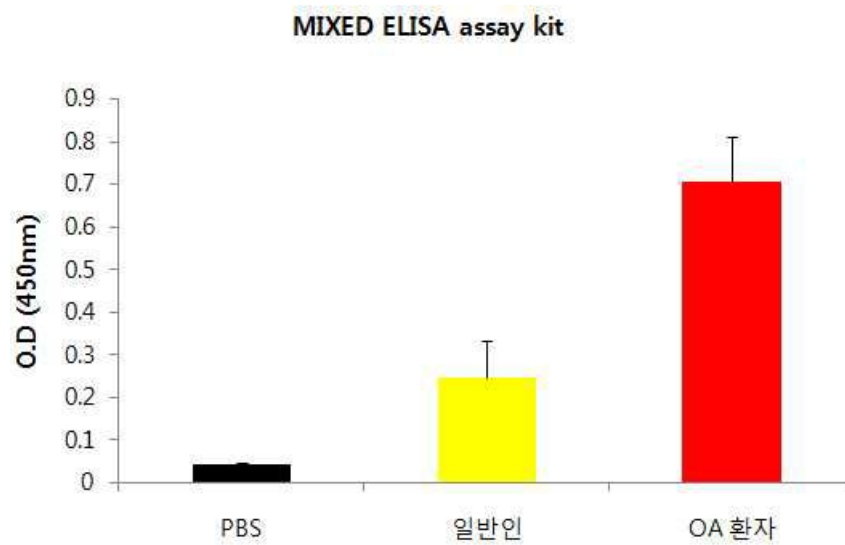
도면4c



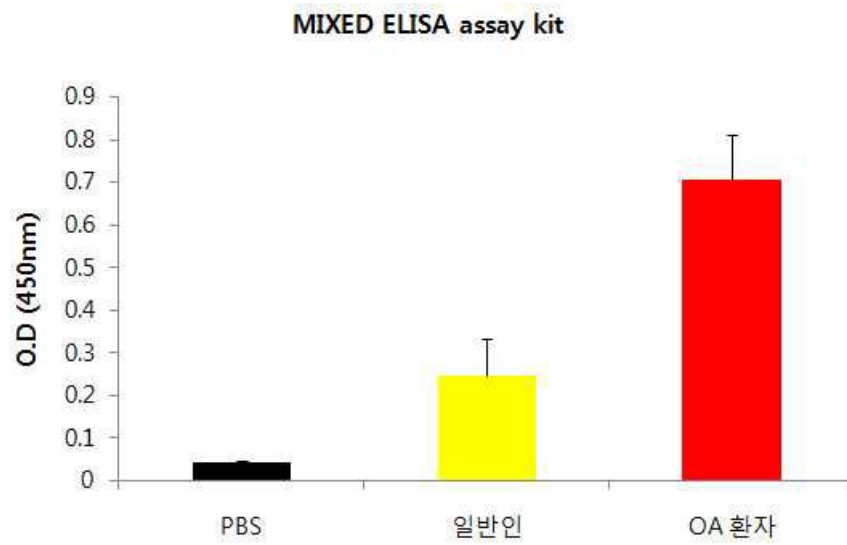
도면4d



도면4e



도면5



도면6

