



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월17일

(11) 등록번호 10-1578526

(24) 등록일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6869 (2013.01)

G01N 33/53 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0099995

(22) 출원일자 2015년07월14일

심사청구일자 2015년07월14일

(56) 선행기술조사문헌

US20120238469 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김영주

서울특별시 양천구 목동서로 38, 120동 902호 (목동, 목동신시가지아파트1단지)

이근영

서울특별시 서초구 서초대로34길 34, 102동 1401호 (방배동, 방배이편한세상)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김지윤

(54) 발명의 명칭 32주 미만의 조산 위험성을 예측하기 위한 마커 IL-13 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 산모의 32주 미만 조산 위험성과 유의적인 상관관계를 가지는 IL-13 (Interleukin-13)의 농도를 측정하여 산모의 32주 미만 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 2333/5437 (2013.01)

G01N 2800/368 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0306

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-질환극복기술개발

연구과제명 조산과 태아손상 조기 진단용 바이오마커 및 맞춤형 조산방지 약물 치료법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

산모의 양수 시료로부터 IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하는 단계, 및

상기 IL-13의 농도가 정상 산모보다 높거나 임계값(cut-off)보다 높을 경우 32주 미만 조산 위험성이 있다고 예측하는 단계를 포함하는,

산모의 32주 미만 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 IL-13의 농도의 측정은 IL-13에 특이적인 항체를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체는 단클론항체 또는 다클론항체인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 산모의 양수 시료로부터 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및 MIP1 β 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 농도를 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 산모의 32주 미만 조산 위험성과 유의적인 상관관계를 가지는 IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하여 산모의 32주 미만 조산 위험성을 진단하기 위한 조성물, 진단 키트 및 진단 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 조산(preterm birth)은 일반적으로 20주를 지나 37주 이전에 분만하는 것을 의미한다. 조산으로 태어난 신생아는 전체 영아 사망자의 약 60%를 차지할 정도로 사망의 위험이 높고, 생존아의 경우에도 신경계 발달장애, 호흡기계 합병증, 출생 후 성장지연 등으로 신생아 집중치료가 필요하며, 더 나아가 심각한 장기적 또는 단기적 질환에 이환율이 높다. 또한, 조산의 약 75%는 조기진통과 양막파수, 그리고 이와 관련된 자궁경관 무력증과 융모막염 등을 수반하여 발생하게 된다. 하지만 조산과 관련된 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 자연적 진통과 흔히 연관된 위험인자는 생식기계감염, 다태 임신, 2,3 삼분기 출혈, 이전의 조산기왕력 등이 있다.
- [0003] 조산아의 생존율을 향상시키기 위한 최소한의 임신주수는 27주, 출생체중은 0.9 kg이고, 출생 신생아의 이환과 사망은 출생체중보다는 일차적으로 임신주수, 즉 성숙도에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에는 조산을 28주 미만(Extremely preterm), 28~32주(Very preterm) 및 32~37주 미만(Moderate to Late preterm)으로 분류하여 연구하고 있으며, 특히 32주 미만에 조산이 되는 경우에 조산아의 생존과 건강에 치명적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 이른 주수에 조산의 징후가 왔을 때, 적절한 치료를 통하여 분만 주수를 지연시켜 신생아를 성숙도를 높이는 것은 산모와 신생아의 건강과 삶의 질과 비용에 중대한 관건이 된다.
- [0004] 현재까지 조산의 치료를 위하여 조기진통의 산모에게 자궁수축 억제제 투여, 항생제 치료, 스테로이드제 및 프로게스테론 투여를 통해 진통을 억제하고 분만을 지연시켜왔다. 그러나, 이미 조기진통 및 조기양막파수가 발생한 경우에는 자궁 내 감염 및 염증에 대한 항생제의 치료 효과는 매우 제한적이며 조산을 막을 수는 없는 것으로 알려져 있다. 또한 자궁경관 무력증의 산모인 경우 감염과 유산에 대한 상당한 위험이 있기 때문에 조기분만의 치료와 예방으로서 자궁경부봉축술을 시행하여 왔으나, 이것이 근본적인 치료는 될 수 없으며 단기간의 임신연장에 도움이 되는 정도로 알려져 있다.
- [0005] 따라서, 조기 양막파수나 조산의 증상이 나타난 이후에 치료를 수행하는 것보다는, 조산의 위험성을 미리 예측함으로써 조산위험 산모군을 선별하고, 이들에 대한 적절한 관리를 통하여 조산을 방지하거나 효과적인 치료방법을 개발하는 것이 필요하다. 또한, 조산의 시기가 빠를수록 신생아에게 후유증을 남길 가능성이 높고 후유증의 정도도 심하기 때문에 조산을 예측할 수 있다면 미숙아와 그로 인한 장애아의 발생률을 현저하게 줄일 수 있을 것으로 기대된다.
- [0006] 조산을 예측하기 위한 일반적인 접근 방법은, 산부인과학적으로, 인구통계학적으로 및 여러가지 증후군에 따라 특별한 주의를 기울여야 하는 여성군을 확인하는 것이었으나(Main et al., Am. J. Obste. Gynecol., 151:892-898, 1985), 이러한 접근 방법은 그 방식이 민감하거나 특이적이지 않다는 문제가 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 갑작스런 조산이나 양막파수를 예견하기 위한 생화학적인 표지자를 발견하기 위하여 많은 연구가 시행되어 왔고, 플라즈마 에스트라디올-17 베타(plasma estradiol-17 beta), 프로게스테론(progesterone), C-반응성 단백질(C-reactive protein)과 같은 물질들이 후보로 지명되었으나, 이 역시 그 정확도가 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서, 보다 검출이 용이하고 민감도와 특이도가 높은 표지자의 개발이 필요하다.
- [0007] 이에, 본 발명에서는 조기진통이나 조기 양막파수 등 조산의 위험증상이 발생되기 이전의 무증상 산모에게서 미리 이후의 조산 위험성을 시사하는 조산의 예측 표지자를 발굴하여 조산의 예방에 기여하고자 하였다. 특히, 본 발명에서는 조산아의 생존과 건강에 치명적인 영향을 주는 것으로 알려진 32주 미만의 조산의 위험성을 미리 예측할 수 있는 새로운 표지자를 발굴하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 국내특허공개 특2002-0039458 (2002. 5. 27)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은, IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하는 제제를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0010] 본 발명의 또 하나의 목적은, 상기 조성물을 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 하나의 목적은, 산모의 시료로부터 IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 하나의 목적은, 산모의 시료로부터 IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성을 진단하는 방법을 제공하는 것이다.
- 과제의 해결 수단**
- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일례로, 본 발명은 IL-13(Interleukin-13)의 농도를 측정하는 제제를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 바람직한 일례로, 본 발명은 상기 조성물에서 백혈구, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α (tumor necrosis factor α), G-CSF(Granulocyte-colony stimulating factor), MMP8(matrix metalloproteinase 8), MMP9(matrix metalloproteinase 9), MIP1 α (macrophage inflammatory protein 1 α) 및 MIP1 β (macrophage inflammatory protein 1 β)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 농도를 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "진단" 또는 "예측"이란, 산모에 대하여 임신주수 32주 미만에서 조산을 할 가능성이 있는지, 32주 미만에서 조산의 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 32주 미만에서 조산의 징후를 나타낼 가능성이 있는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명은 산모들에 대하여 32주 미만의 조산 위험성이 높은 산모들을 특별하고 적절한 관리를 통하여 조산을 지연시키거나 방지하는 데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 32주 미만의 조산을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "진단용 마커, 진단하기 위한 마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)" 또는 "표지자"란 32주 미만의 조산 산모를 미리 예측와 32주 이상에서 분만하는 산모를 미리 예측하여 구분할 수 있는 물질로, 정상 분만 산모의 시료에 비하여 32주 미만의 조산으로 예측되는 산모의 시료에서 유의적인 농도의 증가 또는 감소를 보이는 생체 유기 분자들을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단 32주 미만의 조산으로 예측되는 산모의 시료에서 특이적으로 증가된 농도를 나타내는 백혈구, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 를 의미할 수 있다.
- [0017] 보다 구체적으로, 본 발명은 32주 미만 조산 위험성의 진단 마커로서 IL-13을 제공한다. 또한, 32주 미만 조산 위험성의 진단 마커로서 백혈구, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 임신 16주에서 24주 사이에 시행한 초음파 검사 또는 이학적 검사에서 1 cm 이상의 자궁경부개대가 있는 경우 이학적 검사에 근거한 자궁경부봉축술을 시행받는 산모(n=71)와 정상 분만 산모(n=41)의 양수샘플에서, Membrane 방식으로 사이토카인을 스크리닝하여 그 중 두 군에서 유의하게 차이가 나타난 15개의 사이토카인을 선발하였다. 또한, 이들 15종의 사이토카인에 대하여, 자궁경부봉축술을 시술한 산모를 분만 주수에 따라서 32주 미만 조산(Early preterm birth), 32~37주 미만 조산(Late preterm birth), 및 37주 이상 분만 그룹(Term deliveries)으로 분류하고, 이 산모들의 양수 샘플을 이용하여 상기 15종 사이토카인에 대하여 multiplex bead array로 정량분석을 하였다.
- [0019] 또한, 32주 미만의 조산을 예측할 수 있는 지표를 정하기 위하여 15종의 사이토카인과 임상적 특징에 대하여 민감도와 특이도를 리시버-작동 특징 커브(receiver-operation characteristic curve)를 구하였다. 그 결과, 혈액 내 백혈구 및 양수 내 IL-13, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및 MIP1 β 이 각각 32주 미만의 조산 위험성과 유의적인 관련성이 있는 것으로 확인되었고, ROC 커브에 의하여 민감도와 특이도 및 임계값(cut-off)을 확인할 수 있었다. 단순 로지스틱 회귀 분석에서도, 상기 마커들이 32주 미만의 조산 위험성을 예측하는데 유의한 결과를 나타냄을 다시 확인할 수 있었다.
- [0020] 따라서, 산모의 시료 내 IL-13의 농도를 측정함으로써 32주 미만의 조산 위험성을 예측 및 진단할 수 있으며, 나아가 백혈구, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 를 함께 32주 미만의 조산 위험성을 예측을 위한 지표로 활용할 수 있다.

- [0021] 일 구현예로, 본 발명에서 IL-13, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 의 농도를 측정하는 제제는 이들 각각에 특이적인 항체일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 단클론항체, 다클론항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [0023] 단클론항체는 당해 분야에 널리 공지된 하이브리도마 방법(Kohler 및 Milstein(1976)European journal of Immunology 6:511-519), 또는 파지 항체 라이브러리(Clarkson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991)기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0024] 다클론항체는 상기한 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 또한, 본 발명의 항체에는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간항체 등의 특수항체도 포함된다.
- [0025] 나아가, 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 예시할 수 있다.
- [0026] 이러한 항체를 이용하여 시료 내 IL-13 등의 농도를 측정하기 위한 방법으로는, 시료에 상기 항체를 처리하여 항원-항체 복합체의 생성 정도를 확인할 수 있는 방법이라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 "항원-항체 복합체"란 IL-13 및 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.
- [0027] 예를 들어, 웨스턴 블랏(Western blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역침전분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip), 방사면역측정(radioimmunoassay, RIA), 효소면역분석(enzyme immunoassays, EIA), 형광 면역분석(fluorescence immunoassays, FIA), 형광 편광 면역분석(fluorescence polarization immunoassays, FPIA), 비탁 억제 면역분석(nephelometric inhibition immunoassays, NIA), 미립자 효소 면역분석(microparticle enzyme immunoassays, MEIA), 화학발광 자기 면역분석(chemiluminescent magnetic immunoassay, CMIA) 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 다른 구현예로, 본 발명에서 혈액 내 백혈구의 농도는 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 자동혈구분석, 수동혈구측정, 유세포분석, PCR, microfluorometry 등을 이용한 방법으로 정량할 수 있다.
- [0029] 다른 예로, 본 발명은 상기 32주 미만 조산 위험성 진단용 조성물을 포함하는 진단 키트에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 키트는 산모의 시료 내 IL-13 등의 농도를 측정할 수 있는 제제뿐만 아니라, 농도 분석에 적합한 한 종류 이상의 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 지지체 또는 적합한 담체, 기질, 검출 라벨(또는 검출 라벨로 표지된 2차 항체), 완충용액, 반응 정지제, 용해제, 세척액 및/또는 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- [0031] 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 고분자, 유리, 금속, 실리콘 또는 생체막(membrane) 등을 예시할 수 있다. 구체적으로는, 폴리부틸렌옥시네이트, 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 금속, 유리, 글래스비드, 또는 자성 입자 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.
- [0032] 구체적인 일례로, 상기 32주 미만 조산 위험성 진단용 키트는 ELISA 키트, 샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 구현하기 위하여, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질들에 대한 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 각 마커에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론항체, 다클론항체 또는 재조합 항체일 수 있다. 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(chromopores), 효소 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[0033] 이 외에도, 상기 키트는 웨스턴 블랏, 면역침전분석법, 보체 고정 분석법, 유세포분석, 또는 단백질 칩 등을 구현하기 위한 키트일 수 있으며, 각 분석 방법에 적합한 부가적인 구성을 추가로 포함할 수 있다. 이 분석 방법들을 통하여, 항원-항체 복합체 형성량을 정량화함으로써 32주 미만 조산 위험성을 진단할 수 있으며, 이에 따라 32주 미만 조산을 방지하여 신생아의 이환, 뇌성마비와 같은 신생아의 심각한 합병증과 후유증을 예방하는데 사용할 수 있다.

[0034] 상기 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 검출 라벨은 IL-13 등에 특이적으로 결합하는 항체에 표지하거나, 상기 항체를 인지할 수 있으며 검출 라벨로 표지된 2차 항체를 반응시켜 측정할 수 있다. 예를 들어, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨의 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통하여 측정할 수 있다. 이를 위하여, 상기 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 콜로이드, 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 검출 라벨의 정량적 측정 방법으로, 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용할 수 있다. 여기에는 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법, 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법, 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법 등을 이용하는 것이 가능하나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 다른 예로, 본 발명은 산모의 시료로부터 IL-13 의 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0037] 바람직한 일례로, 본 발명은 산모의 시료로부터 IL-13 의 농도를 측정하는 단계, 및 상기 IL-13의 농도가 정상 산모보다 높거나 임계값(cut-off)보다 높을 경우 32주 미만 조산 위험성이 있다고 예측하는 단계를 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0038] 바람직한 다른 예로, 본 발명은 상기 방법에서 산모의 시료로부터 백혈구, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 농도를 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 산모의 32주 미만 조산 위험성의 진단 방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에서, 바람직한 예시로, 상기 IL-13, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및/또는 MIP1 β 는 산모의 양수 시료로부터 농도를 측정할 수 있으며, 백혈구는 산모의 혈액 시료로부터 농도를 측정할 수 있다. 임신 중기 양수검사는 산전에 태아의 염색체 이상을 확인하기 위해 광범위하게 사용되는 기술이나, 향후 조산 등의 고위험임신 예측을 위해 현재 널리 사용되고 있지는 않다. 본 발명의 마커들은 임신 중기의 양수검사서서 수득한 양수 시료에서 그 농도를 측정할 수 있다. 또는, 자궁경부를 통하여 질로 누출되는 양수를 양수포집기구에 의해 채취하여 수득한 양수 시료에서 그 농도를 측정할 수 있다.

[0040] 또한, 시료는 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 산모로부터 추출한 양수 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 산모의 시료에서 상기 마커들의 농도를 측정하는 과정은 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있으며, 예컨대, 앞서 언급한 다양한 항원-항체 복합체 측정 방법으로 측정할 수 있다.

[0042] 일구현예로, 본 발명은 상기 마커들의 농도의 측정은 각 마커에 특이적인 항체를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 항체는 각 마커에 특이적인 단클론항체 또는 다클론항체일 수 있으나, 나아가 항원결합활성을 보유하는 항체의 기능적 단편일 수 있다.

[0043] 또한, 조산을 예측하는 민감도와 특이도를 모두 고려할 때, 32주 미만의 조산 위험성을 예측하기 위한 IL-13 의 임계값은 약 50 pg/ml 이상(민감도 78%, 특이도 65%), IL-7의 농도의 임계값은 약 82 pg/ml 이상(민감도 78%, 특이도 71%), IL-1 β 의 임계값은 약 22 pg/ml 이상(민감도 65%, 특이도 87%), IL-6의 임계값은 약 6918 pg/ml 이상(민감도 78%, 특이도 84%), IL-8 의 임계값은 약 854 pg/ml 이상(민감도 83%, 특이도 71%), IL-10 의 임계값은 약 110 ng/ml 이상(민감도 78%, 특이도 71%), IL-15 의 임계값은 약 25 pg/ml 이상(민감도 83%, 특이도

77%), IL-17 α 의 임계값은 약 6 pg/ml 이상(민감도 61%, 특이도 94%), TNF α 의 임계값은 약 79 pg/ml 이상(민감도 74%, 특이도 84%), G-CSF의 임계값은 약 3246 pg/ml 이상(민감도 70%, 특이도 87%), MMP8의 임계값은 약 214 pg/ml 이상(민감도 96%, 특이도 61%), MMP9의 임계값은 약 3 pg/ml 이상(민감도 52%, 특이도 90%), MIP1 α 의 임계값은 약 411 pg/ml 이상(민감도 70%, 특이도 94%), 그리고 MIP1 β 의 임계값은 약 214 pg/ml 이상(민감도 74%, 특이도 90%)을 예시할 수 있다. 그러나, 상기 임계값은 민감도와 특이도를 크게 손상시키지 않는 범위 내에서 적절히 변경될 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명을 이용하여 32주 미만 조산의 위험성을 조기에 진단하고 조산을 방지하여 신생아의 이환, 뇌성마비와 같은 신생아의 심각한 합병증과 후유증을 예방하는데 사용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1. 연구대상

[0047] 자궁경부의 길이가 짧은 산모와 양막이 자궁경부 바깥으로 돌출한 산모는 감염의 위험이 높은 것으로 알려져 있으며 이것은 조산의 원인이 될 수 있으므로, 이러한 산모들에 대해서는 자궁경부봉축술(cerclage)을 시행하게 된다. 따라서, 본 실시예에서는 임신 16주에서 24주 사이에 시행한 초음파 검사 또는 이학적 검사에서 1 cm 이상의 자궁경부개대(dilatation)가 있는 경우 이학적 검사에 근거한 자궁경부봉축술을 시술받는 산모(n=71)를 연구대상으로 하였다. 자궁경부봉축술을 시행하기 전 질출혈이 있거나, 규칙적인 자궁수축이 있는 경우, 또한 임상적인 용모양막염이 의심되는 경우에는 자궁경부봉축술을 시행하지 않았다. 이학적 검사에 근거한 자궁경부봉축술을 시술하기 전에 감염 및 양수 내 감염여부를 확인하기 위하여 양수천자(amniocentesis)를 시행하였다. 이후의 Membrane 방식의 사이토카인 분석(cytokine array)에서는, 양수 내 사이토카인을 비교하기 위하여 16주에서 20주 사이 염색체 이상유무를 판별하기 위해 양수천자를 시행하고 만삭 분만한 정상 산모(n=41)의 양수 시료도 포함하였다.

[0048] 실시예 2. 양수 cytokine array 및 정량분석

[0049] 정상 진통 산모(n=41)와 자궁경부봉축술을 시행한 조산산모(n=71)의 양수에서 차이를 나타내는 사이토카인을 스크리닝하기 위하여, 양수에서 39종의 사이토카인, 케모카인 및 성장인자들에 대하여 RayBio® Membrane-Based Antibody Arrays (C-Series) (RayBiotech, USA)를 이용하여, Membrane 방식의 사이토카인 분석(cytokine array)을 실시하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 사이토카인 분석 멤브레인(cytokine array membrane)을 blocking 시키고 양수 1ml을 넣고 4℃에서 밤새 배양(overnight incubation) 하였다. 다음날 실온에서 세척한 후 비오틴이 결합된 항체와 1시간 배양하고 1:40,000배로 희석한 스트렙타비딘-결합 퍼옥시다아제에서 배양한 후 세척하였다. Membrane을 blotting paper로 transfer 한 후 LAS-3000 (FUJIFILM Life Sci.Tokyo,Japan)으로 detection을 하였다. 시그널의 intensity 분석은 Multi Gauge V 3.0 (FUJIFILM Life Sci.Tokyo,Japan)이미지 분석기 소프트웨어를 이용하였고, 두 군의 이미지 강도 차이는 fold change 가 높은 순서에 따라, 3배 이상 발현 차이를 나타낸 사이토카인 11종을 선별하였고, 그 외에 약 2배 정도의 발현 차이를 나타내는 사이토카인들 중에서 관심 있는 4종의 사이토카인을 추가로 선별하여, 총 15종의 사이토카인을 선별하였다.

[0050] 이들 15종의 사이토카인에 대하여, 자궁경부봉축술을 시술한 산모의 양수 샘플을 이용하여 multiplex bead array로 정량분석을 하였다. Multiplex bead array는 한 well에서 여러 개의 bead를 이용하여 다양한 사이토카인을 면역반응을 일으켜 분석하는 것이다. 한 well에서 여러가지 cytokine을 정량분석을 가능하며 이 방법을 이용하여 32주 미만 조산 산모의 사이토카인의 농도 특징을 조사하였다.

[0051] 실시예 3. 통계적 분석

[0052] 심각한 신생아 이환율이 예상되는 32주 미만의 조산을 예측할 수 있는 지표를 정하기 위하여 자궁경부봉축술을 시술한 산모를 32주 미만 조산, 32주~37주 미만 조산, 만삭 분만으로 나누어 비모수 통계로 임상적 특징을 분석하였다. 임상적 특징 중 혈액의 백혈구와 15종의 사이토카인과 Spearman 상관관계를 분석하여 유의한 관계에 있는 사이토카인을 분석하였다. 또한 32주 미만의 조산에 대하여 백혈구와 사이토카인의 민감도와 특이도를 리시버-작동 특징 커브(receiver-operation characteristic curve)를 통하여 구하였고, 단순 로지스틱 회귀분석을

통하여 32주 미만과 유의적인 관련성을 분석하였다.

실험결과

1. 환자의 임상적 특성

16~25주 사이에 자궁경부봉축술을 시술받은 산모(n=71)를 대상으로 분만 주수에 따라서 32주 미만 조산(Early preterm birth, n=26), 32~37주 미만 조산(Late preterm birth, n=12), 및 37주 이상 분만 그룹(Term deliveries, n=29)으로 분류하고 그 임상적 특성을 조사하였다. 자궁봉축술을 시술받은 시기에는 세 그룹간에 차이는 없었으나, 백혈구(WBC), 신생아 체중, 아프가 점수에서 32주 미만 그룹은 다른 그룹과 유의하게 차이가 나타났다(표 1). 4명의 산모에서는 분만주수에 대한 데이터가 없어서 표 1에서 제외하였으나, 이들 산모의 양수 샘플도 이후의 Membrane 방식의 사이토카인 분석(cytokine array)에 포함하였다.

표 1

연구대상의 임상적 특성

	Early preterm birth (n=26)	Late preterm birth (n=12)	Term deliveries (n=29)	P-value		
				1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
연령 (세)	35 (28-41)	35.5 (31-39)	34 (25-39)	0.367	0.568	0.281
WBC 수 (cell/mL)	9830 (5760-16740)	8010 (6430-12980)	7600 (5400-14110)	0.043	0.012	0.989
자궁경부개대	4 (1-10)	1 (1-10)	1 (1-4)	0.116	0.001	0.259
자궁봉축술 시술시 임신주수(주)	22.2 (18.6-24.5)	22.3 (17.3-25.0)	21.4 (18.3-24.2)	0.329	0.283	0.666
양수천자 시행시 임 신주수(주)	22.2 (18.6-24.5)	22 (17.3-25)	22 (18.3-24.2)	0.281	0.829	0.500
양수WBC 수 (cell/mL)	8 (0-1120)	3.5 (0-100)	3.5 (0-150)	0.199	0.143	0.818
분만주수(주)	25.2 (19.3-30.5)	35.3 (32.1-36.4)	38.4 (37-41.2)	<0.001	<0.001	<0.001
신생아 체중(g)	780 (360-1570)	2235 (1690-3220)	3430 (2500-4100)	<0.001	<0.001	<0.001
1분 Apgar 점수	2 (1-10)	7.5 (6-8)	8.5 (6-10)	0.005	<0.001	0.106
5분 Apgar 점수	5.5 (1-8)	9 (7-9)	10 (8-10)	0.003	<0.001	0.052

위 표에서 표시된 값은 중앙값을 의미함 (inter-quartile range)

2. C-series membrane 분석 결과

자궁경부봉축술을 시술한 산모와 정상 산모 사이의 양수에서 차이를 나타내는 사이토카인을 스크리닝하기 위하여 C-series membrane을 이용하여 39종의 사이토카인, 케모카인 및 성장인자들의 상대적 발현 수준을 분석하였다. 정상 산모보다 자궁봉축술을 시술한 산모 (n=71)에게서 3배 이상 발현된 사이토카인 11종을 선별하였고, 그 외에 약 2배 정도의 발현 차이를 나타내는 사이토카인들 중에서 관심 있는 4종의 사이토카인을 추가로 선별하여, 총 15종의 사이토카인을 선별하였다(표 2).

표 2

C-series membrane를 이용한 사이토카인 분석 결과

사이토카인	정상 산모와 자궁봉축술 시행 조산산모에서의 면역물 질비율		1차 선별 여부
	term(정상산모)	preterm(조산산모)	
IL-7	1	219.0	0

GCSF	1	166.0	0
IL-6	1	59.4	0
MMP9	1	6.1	0
MMP8	1	5.7	0
MIP-1 α	1	4.9	0
IL-13	1	4.7	0
MIP-1 β	1	4.4	0
IL-10	1	4.3	0
IL-1 β	1	4.1	0
IL-8	1	3.7	0
IL-5	1	2.7	
MCP3	1	2.5	
IL-17	1	2.3	0
IL1-ra	1	2.1	
IL-15	1	1.9	0
TNF α	1	1.9	0
IL-12	1	1.8	
IFN-gamma	1	1.7	
MMP3	1	1.7	0
MCP1	1	1.7	
IGF1	1	1.6	
IL-2	1	1.6	
TGFb3	1	1.6	
IL-18BPα	1	1.3	
Angiopoietin2	1	1.3	
Eotaxin	1	1.3	
IL-9	1	1.2	
IL-4	1	1.2	
TNFR1	1	1.2	
TNFR2	1	1.1	
IP-10	1	1.1	
MMP2	1	1.0	
VRGF	1	1.0	
IL-18Rb	1	1.0	
RANTES	1	1.0	
PDGF-BB	1	0.9	
FasL	1	0.8	
MMP1	1	0.8	

[0061]

3. 정량분석 결과

[0062]

상기 C-series membrane 분석에서 선발한 15종 사이토카인에 대하여 정량분석을 실시하여 농도를 분석한 내용을 표 3에 나타내었다. 그 결과, IL-1β IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17 α, TNF α, G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및 MIP1β이 각각 32주 미만 조산 그룹에서 가장 높은 농도로 검출되었고, 자궁경부봉축술을 시술한 산모들 중에서 만삭분만으로 분만하는 산모들의 양수 내 농도와 유의하게 차이를 나타내었다(p<0.05).

표 3

[0063]

자궁경부봉축술을 시술받은 산모의 양수에서 사이토카인의 농도(pg/ml)

	Early preterm birth (n=26)	Late preterm birth (n=12)	Term deliveries (n=29)	P-value		
				1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3
IL-1β	37.9 (0-1125.6)	10.19 (2.2-31.8)	8.9 (0.6-214.7)	0.008	<0.001	0.656
IL-6	28975.8 (500.1-110243.5)	1907.6 (345.7-55065.2)	1503.5 (293.3-109157.8)	0.026	<0.001	0.616
IL-7	132.6 (30.3-348.4)	70.7 (14.7-178.2)	65.2 (19.9-150.7)	0.028	0.001	0.749

IL-8	2187.2 (0-10629.8)	590.1 (135.9-5086.8)	364.1 (0-3232.9)	0.087	<0.001	0.191
IL-10	242.7 (38.9-3973.6)	78.6 (30.6-296.1)	72.6 (24.3-1481.1)	0.067	0.001	0.495
IL-13	86.6 (18.3-251.8)	38.4 (8.3-101.7)	35.4 (10.5-125.4)	0.064	0.006	0.770
IL-15	33.5 (5.1-136.4)	19.1 (1.1-47.1)	16.5 (1.1-63.2)	0.043	0.003	0.845
IL-17a	9.3 (1.5-55.7)	2.4 (0.1-6.6)	1.3 (0.0-20.8)	0.018	<0.001	0.707
TNF α	165.3 (30.5-2423.7)	55.9 (31.9-150.3)	59.16 (35.1-522.2)	0.014	0.003	0.824
G-CSF	5238.5 (837.9-32296.2)	1470.5 (262.6-32296.2)	933.7 (153.6-11682.5)	0.052	<0.001	0.221
MMP3	365.1 (133.6-1287.0)	324.6 (90.2-660.2)	244.6 (152.3-867.2)	0.522	0.115	0.360
MMP8	1213.3 (158.1-5434.2)	183.2 (27.0-2007.7)	138.1 (40.7-3251.9)	0.101	0.001	0.578
MMP9	3.9 (0.0-157.3)	1.2 (0.2-5.6)	0.5 (0.0-8.8)	0.222	0.028	0.531
MIP1 α	605.0 (78.1-2001.0)	136.4 (57.0-579.0)	136.2 (47.6-972.8)	0.014	<0.001	0.636
MIP1 β	445.1 (79.0-11610.2)	81.1 (63.4-280.8)	88.9 (40.4-2614.8)	0.005	<0.001	0.900

[0064] 위 표에서 표시된 값은 중앙값을 의미함 (inter-quartile range)

[0065] 4. ROC 커브(receiver- operation chracteristic curve) 분석 결과

[0066] 표 4는 32주 미만의 조산을 예측할 수 있는 지표를 정하기 위하여 15종의 사이토카인과 임상적 특징에 대하여 민감도와 특이도를 리시버-작동 특징 커브(receiver- operation chracteristic curve)를 구하였다. 특히, 임상적인 특성 중에 산모들의 혈액에서 검출된 백혈구(WBC)와 자궁경부개대의 경우 32주 미만 조산 간의 연관성이 나타나 ROC curve에 포함시켰다. 그 결과, 산모 혈액 내 백혈구, 자궁경부개대 및 양수 내 IL-1β IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17 α, TNF α, G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및 MIP1β이 32주 미만의 조산을 예측하는데 유의한 결과가 나타났다 (표 4, p<0.05).

표 4

[0067] ROC 커브 분석 결과

	AUC	95% CI	P-value	Cut-off (pg/ml)	민감도 (Sensitivity)	특이도 (Specificity)
Serum WBC	0.73	(0.59-0.87)	0.004	13155	44%	97%
자궁경부개대	0.79	(0.66-0.92)	<0.001	1.25	78%	77%
IL-1β	0.78	(0.65-0.92)	<0.001	22.22	65%	87%
IL-6	0.84	(0.72-0.95)	<0.001	6918.20	78%	84%
IL-7	0.80	(0.68-0.92)	<0.001	82.15	78%	71%
IL-8	0.82	(0.72-0.94)	<0.001	854.67	83%	71%
IL-10	0.79	(0.67-0.92)	<0.001	110.15	78%	71%
IL-13	0.75	(0.61-0.88)	0.002	50.39	78%	65%
IL-15	0.80	(0.68-0.92)	<0.001	25.67	83%	77%
IL-17 α	0.84	(0.73-0.94)	<0.001	6.32	61%	94%
TNF α	0.79	(0.66-0.93)	<0.001	79.94	74%	84%
G-CSF	0.83	(0.72-0.94)	<0.001	3246.73	70%	87%
MMP3	0.63	(0.47-0.78)	0.113	251.22	83%	52%
MMP8	0.82	(0.71-0.93)	<0.001	214.36	96%	61%
MMP9	0.72	(0.57-0.87)	0.06	3.69	52%	90%

MIP1 α	0.83	(0.71-0.95)	<0.001	411.50	70%	94%
MIP1 β	0.87	(0.78-0.97)	<0.001	214.93	74%	90%

[0068]

5. 단순 로지스틱 회귀분석 결과

[0069]

단순 로지스틱 회귀분석(Simple logistic regression)에서는 산모 혈액 내 백혈구(WBC), 자궁경부개대 및 양수 내 IL-1 β IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17 α , TNF α , G-CSF, MMP8, MMP9, MIP1 α 및 MIP1 β 이 32주 미만의 조산을 예측하는데 유의한 결과가 나타났다 (표 5, $p < 0.05$).

표 5

[0070]

단순 로지스틱 회귀분석 결과

	단순 로지스틱 회귀분석		p value
	Odd Ratio	95% 신뢰구간(CI)	
Serum WBC	24.38	(2.88-206.43)	0.003
자궁경부개대	7.18	(2.33-22.11)	0.001
IL-1 β	9.28	(2.98-28.90)	<0.001
IL-6	13.02	(3.89-43.58)	<0.001
IL-7	7.28	(2.27-23.32)	0.001
IL-8	10.61	(3.05-36.86)	<0.001
IL-10	6.43	(2.10-19.66)	0.001
IL-13	6.56	(2.06-20.93)	0.001
IL-15	10.15	(3.10-33.19)	<0.001
IL-17 α	11.52	(3.39-39.19)	<0.001
TNF α	10.33	(3.25-32.89)	<0.001
G-CSF	9.65	(3.09-30.15)	<0.001
MMP3	0.23	(0.0-0.72)	0.012
MMP8	28.94	(3.58-234.25)	0.002
MMP9	5.83	(1.73-18.57)	0.003
MIP1 α	20.81	(5.53-78.36)	<0.001
MIP1 β	13.18	(4.02-43.27)	<0.001