(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 4 월 16 일 (16.04.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/076006 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/012892

(22) 국제출원일: 2019 년 10 월 2 일 (02.10.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0119823 2018 년 10 월 8 일 (08.10.2018) KR

(71) 출원인: 차의과학대학교 산학협력단 (**CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내, Gyeonggi-do (KR). 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: 백광현 (**BAEK, Kwang-Hyun**); 06291 서울시 강남구 삼성로 151, 11-1201, Seoul (KR). 이다혜 (**LEE, Da-Hye**); 04703 서울시 성동구 무학로 50, 106-1104, Seoul (KR). 송재윤 (**SONG, Jae-Yun**); 06279 서울시 강남구 도곡로78길 22, 103-504, Seoul (KR).

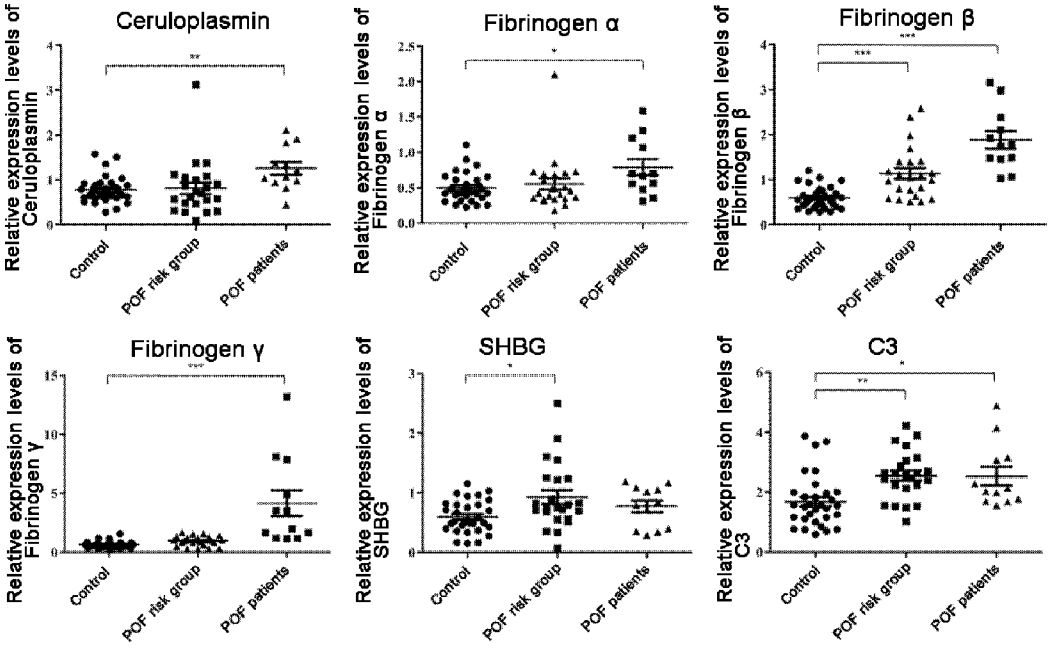
(74) 대리인: 오국진 (**OH, Kook-Jin**); 06595 서울시 서초구 법원로3길 24 두언빌딩 302호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

WO 2020/076006 A1

(54) **Title:** ANALYSIS METHOD AND KIT FOR DIAGNOSING PREMATURE MENOPAUSE

(54) **발명의 명칭:** 조기폐경 진단을 위한 분석방법 및 키트



(57) **Abstract:** The present invention provides an analysis method comprising a step of measuring, in blood of a subject, the overexpression of a gene encoding one or more proteins selected from the group consisting of compliment component 3, fibrinogen α, fibrinogen β, fibrinogen γ, ceruloplasmin, and sex hormone-binding globulin, in order to provide information about the diagnosis of premature menopause. Also, the present invention provides a kit for diagnosing premature menopause, comprising a molecule capable of measuring the overexpression of a gene encoding the protein(s).

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 대상자의 혈액 중 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 조기폐경 진단용 키트를 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 조기폐경 진단을 위한 분석방법 및 키트

기술분야

[1] 본 발명은 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 분석방법 및 조기폐경 진단용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 여성은 50대 이후가 되면 폐경을 겪게 된다. 하지만, 조기폐경(premature ovarian failure, POF)은 40대 이전에 폐경이 일어나는 병적인 상태를 말한다. 조기폐경은 난포가 완전히 고갈된 상태를 의미한다. 조기폐경의 원인으로는 감염, 수술, 항암치료나 방사선 치료에 의한 난소 손상, 자가면역성 질환, 유전적 질환 등으로 알려져 있지만 정확한 원인은 아직 불분명하다(Jankowska, K. (2017). Premature ovarian failure. *Prz* Menopauzalny, 16(2), 51-56. doi:10.5114/pm.2017.68592).

[3] 40세 이전에 6개월 이상 생리가 없고, 혈중 난포자극호르몬(FSH)이 40 IU/liter 이상일 경우 통상 조기폐경으로 진단한다. 그러나, 조기폐경의 진단은 난포자극호르몬(FSH) 수준에만 의존하는 것이 아니며, 다양한 인자가 고려되어야 한다(K. Jankowska, Premature ovarian failure, Prz Menopauzalny, 16 (2017) 51-56; M.B. Bhongade, et al., Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples, Andrologia, 47 (2015) 336-342). 예를 들어, 감소된 에스트라디올(estradiol, E2)은 피드백 메커니즘을 작동시켜 뇌하수체 전엽(anterior pituitary gland)을 자극하게 되고, 그 결과 난포자극호르몬(FSH)을 증가시킨다. 또한, 조기폐경 환자에서 항-뮬러관 호르몬(anti-Mullerian hormone, AMH) 수준은 매우 낮은 것으로 알려져 있으며, 따라서 조기폐경의 진단 마커로서 사용되고 있다(K. Jankowska, Premature ovarian failure, Prz Menopauzalny, 16 (2017) 51-56; A. Kruszynska, et al., Anti-Mullerian hormone (AMH) as a good predictor of time of menopause, Prz Menopauzalny, 16 (2017) 47-50; Y. Tokura, et al. The significance of serum anti-Mullerian hormone (AMH) levels in patients over age 40 in first IVF treatment, J Assist Reprod Genet, 30 (2013) 821-825). AMH는 전구 난포(preantral follicle) 및 난포(antral follicle)에 의해 생성되어, 조기폐경 진단을 위한 혈액 바이오마커로서의 활용된다.

[4] 프로테오믹스(Proteomics)는 질병의 바이오마커를 동정하는데 사용될 수 있다. 프로테오믹스 분석법은 2차원 전기영동(two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 및 액체 크로마토그래피-질량 분석(liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)을 통하여 바이오마커를 발굴하기 위하여 사용된다. 이러한 프로테오믹스 방법이 많은 생식 질환의 바이오마커를 동정하기 위하여 사용된

바 있으나(Y.S. Kim, et al., Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: Identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid, Proteomics, 6 (2006) 3445-3454; M.S. Kim, et al., ITI-H4, as a biomarker in the serum of recurrent pregnancy loss (RPL) patients, Mol Biosyst, 7 (2011) 1430-1440; S. Angelucci, et al., Proteome analysis of human follicular fluid, Biochim Biophys Acta, 1764 (2006) 1775-1785), 현재까지 조기폐경에 대한 바이오마커가 구체적으로 동정된 바 없다. 나아가, 적은 양의 혈액으로도 조기폐경의 진단이 가능한 혈액 바이오마커에 대한 동정이 당업계에 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명자들은 조기폐경을 진단할 수 있는 바이오마커, 특히 시료로서 적은 양의 혈액을 사용하여 조기폐경을 진단할 수 있는 바이오마커를 동정하기 위하여, 2-DE-MS/MS를 통한 프로테오믹스 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명자들은 조기폐경과 관련하여 이전에 알려진 바 없는 6종의 특정 단백질들이 조기폐경 환자의 혈액에서 과발현된다는 것을 밝혀냈다. 따라서 이들 단백질의 과발현 검출은 조기폐경을 진단하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 이들 단백질들은 조기폐경 진단을 위한 바이오마커로서 사용될 수 있다.

[6] 따라서, 본 발명은 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 상기 특정 단백질을 이용한 분석방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[7] 또한, 본 발명은 상기 특정 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 조기폐경의 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[8] 본 발명의 일 태양에 따라, 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 대상자의 혈액 중 컴플리멘트 컴포넌트 3(Complement component 3), 피브리노오겐 α(Fibrinogen α), 피브리노오겐 β(Fibrinogen β), 피브리노오겐 γ(Fibrinogen γ), 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin), 및 성 호르몬-결합 글로불린(Sex hormone-binding globulin)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법이 제공된다.

[9] 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 분석방법은 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정함으로써 수행될 수 있다.

[10] 상기 유전자의 과발현 측정은 mRNA 또는 단백질의 양을 측정함으로써 수행될

수 있다. 일 구현예에서, 상기 단백질의 양의 측정은 웨스턴 블럿팅에 의하여 수행될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 mRNA 양의 측정은 RT-PCR 또는 실시간-PCR을 통하여 수행될 수 있다.

[11] 본 발명의 다른 태양에 따라, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 조기폐경 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인 조기폐경 진단용 키트가 제공된다.

[12] 본 발명의 조기폐경 진단용 키트에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 예를 들어 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택될 수 있다.

[13] 일 구현예에서, 본 발명의 조기폐경 진단용 키트는 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함할 수 있다.

[14] 본 발명의 조기폐경 진단용 키트에 있어서, 상기 분자는 검출가능한 표지로 표지될 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 기판상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다.

발명의 효과

[15] 특정 단백질들, 즉 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린이 조기폐경 환자의 혈액에서 과발현된다는 것이 본 발명에 의해 밝혀졌다. 따라서, 이들 단백질들을 바이오마커로서 사용하는 본 발명에 따른 분석방법 및 키트는 조기폐경을 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 정상인 대조군(A) 및 3명의 조기폐경 환자(B-D)의 혈장 샘플에 대하여 2-DE 분석을 수행하여 얻어진 결과를 나타낸다. 도 1에서 녹색은 대조군 및 조기폐경 환자 모두에서 발현되는 단백질 스팟을 나타내고, 적색은 대조군 또는 조기폐경 환자에서만 발현되는 단백질을 나타낸다.

[17] 도 2는 31명의 대조군 샘플에 대한 웨스턴 블럿팅 분석 결과를 나타내고, 도 3은 23명의 위험군(POF risk group) 샘플에 대한 웨스턴 블럿팅 결과를 나타내고, 도 4는 12명의 환자군에 대한 웨스턴 블럿팅 결과를 나타내고, 도 5는 도 2 내지 도 4의 결과를 근거로, 각 단백질의 상대적인 발현비율을 계산하여 얻어진 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[18] 본 발명자들은 조기폐경 환자의 혈액에서 혈장을 분리하여 2-DE-LC-MS/MS(two-dimensional electrophoresis-liquid chromatography-mass spectrometry) 분석을 수행하였으며, 조기폐경 환자와 대조군에서 발현차이를 나타내는 단백질들을 분석하였다. 분석된 조기폐경 환자에게서 특이적으로 발현하는 단백질의 발현 양상을 웨스턴 블롯(Western blot) 기법을 통해 재검증하여 6종의 단백질들, 즉 컴플리멘트 컴포넌트 3(Complement component 3), 피브리노오겐 α(Fibrinogen α), 피브리노오겐 β(Fibrinogen β), 피브리노오겐 γ(Fibrinogen γ), 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin), 및 성 호르몬-결합 글로불린(Sex hormone-binding globulin)을 동정하였다. 이들 6종의 단백질은 적은 양의 혈액을 사용하여 조기폐경을 진단하기 위한 바이오마커로서 활용할 수 있으며, 나아가 조기폐경의 분자생물학적 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[19] 본 발명은 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 대상자의 혈액 중 컴플리멘트 컴포넌트 3(Complement component 3), 피브리노오겐 α(Fibrinogen α), 피브리노오겐 β(Fibrinogen β), 피브리노오겐 γ(Fibrinogen γ), 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin), 및 성 호르몬-결합 글로불린(Sex hormone-binding globulin)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법을 제공한다.

[20] 본 명세서에서, 상기 "과발현(overexpression)"이라 함은 정상인에 비하여 조기폐경 환자에서 해당 단백질을 코딩하는 유전자가 적어도 약 1.5배 이상 발현되는 것을 말한다. 따라서, 본 발명의 분석방법에 있어서, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린을 코딩하는 유전자가 정상인에 비하여 약 1.5배 이상 발현될 경우, 조기폐경 환자로 진단될 수 있다.

[21] 본 발명의 분석방법에 바이오마커로 사용되는 상기 단백질 및 이를 코딩하는 유전자는 모두 공지되어 있으며, 따라서 공지된 단백질 및 유전자 서열을 본 발명의 분석방법에 이용될 수 있다. 컴플리멘트 컴포넌트 3(Complement component 3)의 단백질 서열 및 유전자 서열은 각각 서열번호 1 및 16과 같다. 피브리노오겐 α(Fibrinogen α)는 2개의 동형체가 알려져 있으며, 단백질 서열은 각각 서열번호 2 및 3과 같고, 이의 유전자 서열은 각각 서열번호 17 및 18과 같다. 피브리노오겐 β(Fibrinogen β)도 2개의 동형체가 알려져 있으며, 단백질 서열은 각각 서열번호 4 및 5와 같고, 이의 유전자 서열은 각각 서열번호 19 및 20과 같다. 피브리노오겐 γ(Fibrinogen γ)도 2개의 동형체가 알려져 있으며, 단백질 서열은 각각 서열번호 6 및 7과 같고, 이의 유전자 서열은 각각 서열번호 21 및 22와 같다. 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin)의 단백질 서열 및 유전자 서열은 각각 서열번호 8 및 23과 같다. 성 호르몬-결합 글로불린(Sex

hormone-binding globulin)은 7개의 동형체가 알려져 있으며, 단백질 서열은 각각 서열번호 9 내지 15와 같고, 이의 유전자 서열은 각각 서열번호 24 내지 30과 같다. 이를 요약하면 하기 표 1과 같다.

[22] [표1]

		단백질	유전자
컴플리멘트 컴포넌트 3	Complement component 3	서열번호 1	서열번호 16
피브리노오겐 α	fibrinogen alpha chain isoform alpha-E preproprotein	서열번호 2	서열번호 17
	fibrinogen alpha chain isoform alpha precursor	서열번호 3	서열번호 18
피브리노오겐 β	fibrinogen beta chain isoform 2 preproprotein	서열번호 4	서열번호 19
	fibrinogen beta chain isoform 1 preproprotein	서열번호 5	서열번호 20
피브리노오겐 γ	fibrinogen gamma chain isoform gamma-A precursor	서열번호 6	서열번호 21
	fibrinogen gamma chain isoform gamma-B precursor	서열번호 7	서열번호 22
셀룰로플라스민	Ceruloplasmin	서열번호 8	서열번호 23
성 호르몬-결합 글로불린	Sex hormone-binding globulin isoform 1 precursor	서열번호 9	서열번호 24
	Sex hormone-binding globulin isoform 2 precursor	서열번호 10	서열번호 25
	Sex hormone-binding globulin isoform 3 precursor	서열번호 11	서열번호 26
	Sex hormone-binding globulin isoform 4 precursor	서열번호 12	서열번호 27
	Sex hormone-binding globulin isoform 5 precursor	서열번호 13	서열번호 28
	Sex hormone-binding globulin isoform 6 precursor	서열번호 14	서열번호 29
	Sex hormone-binding globulin isoform 7 precursor	서열번호 15	서열번호 30

[23] 따라서, 본 발명의 분석방법에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 분석방법은 상기 6종의 바이오마커의 2종 이상의 조합을 사용함으로써, 조기폐경의 진단 효율을 더욱 높일 수 있다. 즉, 일 구현예에서, 본 발명의 분석방법은 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질, 바람직하게는 6종의 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정함으로써 수행될 수 있다.

[24] 상기 유전자의 과발현 측정은 해당 유전자의 mRNA 또는 단백질(즉, 서열번호 1 내지 15의 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질)의 수준(level)을 생명공학 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 측정함으로써 수행될 수 있다. 단백질 양의 측정은 웨스턴 블럿팅 등의 방법에 의해 측정할 수 있다. 웨스턴 블럿팅 방법으로 단백질의 양을 측정하는 경우, 측정된 단백질 발현량이

정상인의 단백질 발현량에 비하여 상기한 바와 같이 1.5배 또는 2배 이상 높은 경우 조기폐경 위험 환자로 판정할 수 있다. 또한, 상기 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들어, 서열번호 16 내지 30의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자)의 mRNA 양의 측정은 역전사-PCR(Reverse Transcription PCR) 또는 실시간-PCR(Real Time PCR) 등의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[25] 본 발명은 또한 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 조기폐경 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인 조기폐경 진단용 키트를 제공한다.

[26] 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및/또는 성 호르몬-결합 글로불린을 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자로는, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조기폐경 진단용 키트에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있으며, 예를 들어 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조기폐경 진단용 키트는 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질, 바람직하게는 6종의 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함할 수 있다.

[27] 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및/또는 성 호르몬-결합 글로불린은 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체를 제조할 수 있으며, 해당 항체를 포함하는 진단용 키트를 제조할 수 있다. 또한, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및/또는 성 호르몬-결합 글로불린은 기능이 밝혀져 있으므로, 이에 대한 기질, 리간드, 또는 보조인자를 포함하도록 본 발명의 키트를 제작할 수도 있다. 또한, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및/또는 성 호르몬-결합 글로불린을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머를 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 제조할 수 있으며, 해당 프라이머를 포함한 진단용 키트를 제조할 수도 있다. 또한, 상기 분자는 검출가능한 표지(예를 들어, 발색단 등)로 표지될 수 있다. 또한, 본 발명의 진단용 키트는 상기 프라이머가

기판상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태를 가짐으로써 DNA 칩 또는 단백질 칩 등의 칩(chip) 형태일 수도 있다.

[28] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[29] 실시예

[30] **1. 시험방법**

[31] (1) 환자모집

[32] 모든 혈액 샘플(조기폐경 환자 12명, 위험군 23명, 대조군 136명)은 2016년 10월부터 2017년 12월 사이에 대한민국 서울에 위치한 고려대학교 안암 병원(Korea University Anam Hospital)으로부터 제공되었다. AMH, FSH, 및 에스트로겐의 호르몬 검사에 근거하여 조기폐경 환자를 진단하였다. 모든 샘플은 0.01 ng/ml 미만의 AMH 수준을 기준으로 선택하였다. 2 ml의 혈액 샘플을 각각의 조기폐경 환자로부터 채취하였다. 채취된 혈액 샘플을 1,500 X g에서 15분 동안 원심분리하여 혈장 및 혈구로 분리하였다. 혈장은 시험을 위하여 -80℃에서 보관하였다.

[33] (2) 2차원 전기영동(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 분석

[34] 조기폐경 환자 3명의 혈장을 사용하여 2-DE 분석을 수행하였다. 비교를 위해 3명의 정상인 샘플을 무작위로 골라 섞어 대조군(Super control)으로 사용하였다. 혈장 샘플을 다중 친화 제거 컬럼(Multiple Affinity Removal Column, MARC)(Agilent, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 여과하여 혈장 내에서 많이 발현하는 12종의 단백질을 제거하였다. IEF(isoelectric focusing)은 80,000 V/hr로 3-10 비선형 고정 pH 구배(Nonlinear Immobilized pH Gradient, NLIPG)로 시행하고, 9-17% 구배 슬랩 겔(slab gel)을 사용하여 시각화하였다.

[35] (3) Q-TOF 펩타이드 분석을 위한 LC-MS/MS

[36] 나노 HPLC 시스템(nano HPLC system)(Agilent, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 나노 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. 펩타이드 분리를 위해, 나노 칩 컬럼(nano chip column)(150 mm × 0.075 mm, Agilent, Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. LC 분리를 위한 이동상 A는 탈이온수 중의 0.1% 포름산 용액이었으며, 이동상 B는 아세토니트릴 중의 0.1% 포름산 용액이었다. 크로마토그래피 구배는 70분 동안 3% B에서 45% B, 1분 동안 45% B에서 95% B, 9분 동안 95% B, 및 10분 동안 3% B로 선형 증가되도록 디자인하였다. 유속은 300 nL/min로 유지하였다. 생성물의 이온 스펙트럼은 IDA(information-dependent acquisition) 모드로 얻었으며, 300-2000 m/z (1.0 sec)로부터의 완전 스캔 TOF MS(one full scan TOF MS) 및 150-2000 m/z (1.5 sec each)로부터의 3개 산물 이온 스캔(three product ion scans)의 연속 사이클을 사용하여 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF로 분석하였다. 3 Da의 선택 쿼드러플 레졸루션(selection quadrupole resolution)을 사용하여, 가장 강한 이온으로부터 시작하여 프리커서

m/z 값을 선택하였다. 프리커서 값과 하전 상태에 근거하여 충동 에너지를 결정하는 롤링 충돌 에너지 시스템(rolling collision energy feature)을 사용하였다. 프리커서 이온 m/z 값에 대한 동적 익스클루션 시간(dynamic exclusion time)은 60초였다.

[37] (4) 데이터베이스 검색

[38] 단백질 서열 데이터베이스에서 펩타이드 서열을 동정하기 위하여 매스콧 알고리듬(http://www.matrixscience.com, Matrixscience, Boston, MA, USA)을 사용하였다. 검색의 기준은 다음과 같다: 1. 분류(taxonomy), 2. 마이키스 고정 변환(mykiss fixed modification), 3. 시스테인 잔기에서의 카르복시아미도메틸화(carboxyamidomethylated at cysteine residues), 4. 가변 변환(variable modification), 5. 메티오닌 잔기에서의 산화(oxidized at methionine residues), 6. 최대 허용가능 미스 절단(maximum allowed missed cleavage), 7. MS 톨러런스(MS tolerance): 100 ppm, 8. MS/MS 톨러런스: 0.1 Da. 트립신에 의한 소화에 의해 야기되는 단백질만을 고려하였다.

[39] (5) 웨스턴 블럿팅

[40] 1,500 X g로 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 희석된 혈장단백질을 2X SDS 단백질로딩버퍼와 함께 10분 동안 끓인 후, 샘플을 SDS-PAGE 겔에 로딩하고, 폴리비닐리덴 플루오라아드(polyvinylidene fluoride, PVDF) 미세다공성 막(Millipore, Billerica, MA, USA)에 옮겼다. 1차 항체를 상기 막과 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, 세척하고, 2차 항체를 가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. ECL 시약 용액(Young In Frontier, Seoul, Korea)을 사용하여 블롯을 검출하였다.

[41] (6) 항체

[42] 마우스 항-C3 (C-4) 단일클론항체(sc-25298) 및 항-피브리노오겐 γ(sc-133157), 래빗 항-셀룰로플라스민 (H-60) 다클론항체(sc-20957), 고우트 항-피브리노오겐 α(sc-18026), 및 항-피브리노오겐 β(sc-18029) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 래빗 항-SHBG 다클론항체(CSB-PA12289A0Rb)는 CUSABIO (Wuhan, China)로부터 구입하였다.

[43] (7) 통계분석

[44] 덴시토메터 분석(Densitometric analysis)은 Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 수행하였고, t-test는 GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)로 수행하였다. ANOVA는 유의성 있는 차이를 나타내기 위한 일원 분석(one-way analysis)으로 수행하였다.

[45] **2. 시험결과**

[46] (1) 혈액 샘플의 분류

[47] 프로테오믹스 분석을 사용한 조기폐경과 관련된 단백질을 조사하기 위하여, 조기 폐경으로 의심되는 환자를 스크리닝한 후 호르몬 검사를 실시하였다. 폐경은 혈액 내 호르몬 수준을 측정함으로써 진단하였으며, 생화학적으로는

높은 수준의 FSH 및 낮은 수준의 AMH를 특징으로 한다. AMH 수준에 근거하여, 피검자의 연령층의 중간값 이상의 사람을 대조군으로, 피검자의 연령층의 중간값보다 10% 이상 큰 값은 위험군(POF risk group)으로, 피검자의 연령층의 10% 이하의 값은 환자군으로 하였다. 총 136명의 대조군, 23명의 위험군, 및 12명의 환자군이 모집되었다. 혈액을 채취하고, 1,500 X g로 15분 동안 원심분리하여 혈장과 혈구로 분리하였다.

[48] (2) 2-DE-LC-MS/MS를 통해 발현차이를 나타내는 스팟 분석

[49] 조기폐경 환자에서 발현 차이를 나타내는 단백질을 동정하기 위하여, 조기폐경 환자의 혈장을 사용하여 2-DE 분석을 수행하였다. 정상인(대조군) 및 조기폐경 환자의 단백질 발현 수준을 비교하기 위하여 3명의 조기폐경 환자의 혈장 샘플 및 1개의 정상 혈장 샘플(3명의 대조군 샘플을 무작위로 골라 섞어 얻어진 Super control)을 사용하였다. MARC를 사용하여 혈장내에서 많이 발현하는 12종의 단백질을 제거하였다. 2-DE 분리를 수행한 결과, 대조군 샘플에서 301개(A), 조기폐경 환자 샘플에서 각각 340개(B), 375개(C), 339개(D)의 스팟이 검출되었다(도 1). 도 1에서 녹색은 대조군 및 조기폐경 환자 모두에서 발현되는 단백질 스팟을 나타내고, 적색은 대조군 또는 조기폐경 환자에서만 발현되는 단백질을 나타낸다.

[50] 대조군 스팟과의 비교를 통하여, 2배 이상 증가 또는 감소된 스팟을 분리하였다. MALD-TOF-MS/MS 분석을 사용하여 분석한 결과, 5개의 단백질이 대조군 또는 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 증가하였으며, 30개의 스팟은 정상인 또는 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 증가하거나 감소하였다. 이들 중, 총 11개의 단백질이 유의성을 갖는 것으로 판명되었고, 이중 5개의 단백질은 대조군에 비하여 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 증가하였고, 5개의 단백질은 대조군에 비하여 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 감소하였으며, 1개의 단백질은 조기폐경 환자에서 특이적으로 발현되었다(표 2).

[51] [표2]

Spot number	Access number	Protein name	Score	Peptide matched	emPAI	MW	pI	ppm	matched peptide number
70	gi|116117	Ceruloplasmin	44	K.NNEGTYYSPNYNPQSR.S	0.04	122,983	5.44	21.5	16/1065
92	gi|179665	complement component C3	71	K.SGSDEVQVGQQR.T	0.02	188,585	6.02	0.6	12/1663
110	gi|130316	Plasminogen	50	K.LSSPAVITDK.V	0.05	93,247	7.04	5.72	10/810
256	gi|223918	fibrinogen alphaA	223	R.GSESGIFTNTK.A	0.31	49,708	5.48	40.9	43/462
268	gi|177870	alpha-2-macroglobulin precursor	47	K.AIGYLNTGYQR.Q	0.03	164,600	6	-0.71	11/1474
276	gi|139641	Vitamin D-binding protein	99	R.TSALSAK.S	0.15	54,526	5.4	-0.41	18/474
295	gi|182430	beta-fibrinogen precursor, partial	99	R.QDGSVDFGR.K	0.17	55,545	8.31	4.62	19/483
381	gi|12232634	apolipoprotein L-1	64	R.VTEPISAESGEQVER.V	0.11	42,357	5.99	24.1	15/383
417	gi|36452	SHBG related protein (288 AA)	100	R.SGGGGGGGLGSGGSIR.S	0.16	62,320	5.19	5.86	29/623
494	gi|28547	alpha globin	117	M.VLSPADKTNVK.A	0.74	15,305	8.72	-2.12	26/142
499	gi|2560289+0	beta-globin	302	K.SAVTALWGK.V	3.93	16,101	7.86	9.39	60/147

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 31 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
Database: nr_Human Human_20160602_curated (1015452 sequences; 342936396 residues)

[52] 상기 2-DE-LC-MS/MS 분석 결과로부터, 대조군에 비하여 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 증가한 단백질은 컴플리멘트 컴포넌트 3(Complement component 3), 피브리노오겐 α(Fibrinogen α), 피브리노오겐 β(Fibrinogen β), 및 피브리노오겐 γ(Fibrinogen γ) 등이었으며, 대조군에 비하여 조기폐경 환자에서 2배 이상 발현이 감소한 단백질은 셀룰로플라스민(Ceruloplasmin) 등이었다. 또한, 조기폐경 환자에서 특이적으로 발현되는 단백질은 성 호르몬-결합 글로불린(Sex hormone-binding globulin)이었다.

[53] (3) 조기폐경 환자의 단백질 검정

[54] 2-DE-LC-MS/MS 분석을 통하여 얻어진 단백질을 검정하기 위하여, 웨스턴 블럿팅을 수행하였다. 대조군과 환자군의 비교를 위하여, 도 2는 31명의 대조군 샘플에 대한 웨스턴 블럿팅 결과이며, 도 3은 23명의 위험군(POF risk group) 샘플에 대한 웨스턴 블럿팅 결과이고, 도 4는 12명의 환자군에 대한 웨스턴 블럿팅 결과이다. 도 3 및 도 4에서 "C"는 대조군 샘플을 섞은 후 수행한 웨스턴 블럿팅 결과이다. 도 5는, 도 2 내지 도 4의 결과를 근거로, 각 단백질의 상대적인 발현비율을 계산하여 얻어진 결과이다.

[55] 도 2 내지 도 5의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 셀룰로플라스민은 대조군에 비하여 환자군에서 더 높게 발현되었다. 다른 단백질들 즉, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 및 피브리노오겐 γ는 각각 대조군에 비하여 환자군에서 더 높게 발현되었으며, 이는 2-DE-LC-MS/MS 분석 결과와 일치된다. 또한, 환자군에서 특이적으로 발현되는 단백질인 성 호르몬-결합 글로불린(Sex hormone-binding globulin, SHBG)은 모든 환자군 샘플에서 발현되는 것이 확인되었다. 따라서, 셀룰로플라스민, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 및 성 호르몬-결합 글로불린은 대조군에

비하여 환자군에서 더 높게 발현되므로, 이들 단백질들을 조기폐경 진단을 위한 바이오마커로서 사용하는 것이 가능하다.

[56] **3. 고찰**

[57] 본 발명자들은 2-DE-LC-MS/MS 분석을 통해 조기폐경 환자의 혈액에서 셀룰로플라스민, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 및 성 호르몬-결합 글로불린이 특이적으로 발현한다는 것을 확인하였으며, 웨스턴 블롯 분석을 통해 조기폐경 환자에게서 이들 단백질들의 특이적인 발현을 검증하였다. 아직까지 이들 단백질들과 조기폐경과 직접적인 연관성에 관한 연구결과는 알려진 바 없으나, 본 연구결과로 이들 단백질들이 조기폐경을 진단할 수 있는 혈청 바이오마커로서 사용 가능성을 가진다는 것을 확인할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 조기폐경 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 대상자의 혈액 중 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정하는 단계를 포함하는 분석방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 유전자가 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 측정이 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자의 과발현 측정이 mRNA 또는 단백질의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 단백질의 양의 측정이 웨스턴 블릿팅에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 mRNA 양의 측정이 RT-PCR 또는 실시간-PCR을 수행하여 측정하는 것을 특징으로 하는 분석방법.

[청구항 8] 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 조기폐경 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인 조기폐경 진단용 키트.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자가 서열번호 1 내지 15의 아미노산 서열로 구성된 단백질로부터 1종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 하는 조기폐경 진단용 키트.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 유전자가 서열번호 16 내지 30의 염기 서열로 구성된 유전자로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 조기폐경 진단용 키트.

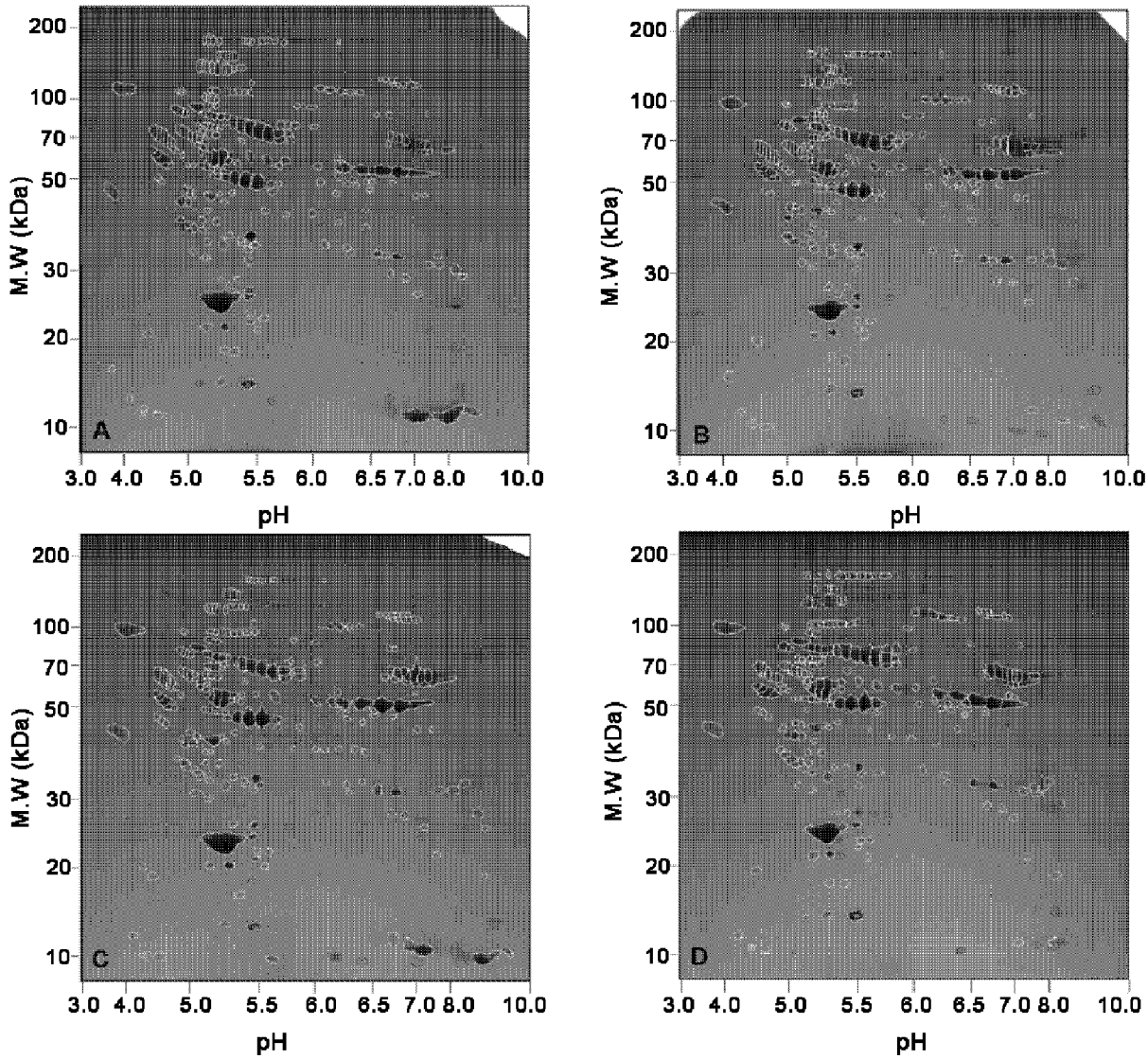
[청구항 11] 제8항에 있어서, 컴플리멘트 컴포넌트 3, 피브리노오겐 α, 피브리노오겐 β, 피브리노오겐 γ, 셀룰로플라스민, 및 성 호르몬-결합 글로불린으로

이루어진 군으로부터 2종 이상 선택된 단백질을 코딩하는 유전자의 과발현을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 조기폐경 진단용 키트.

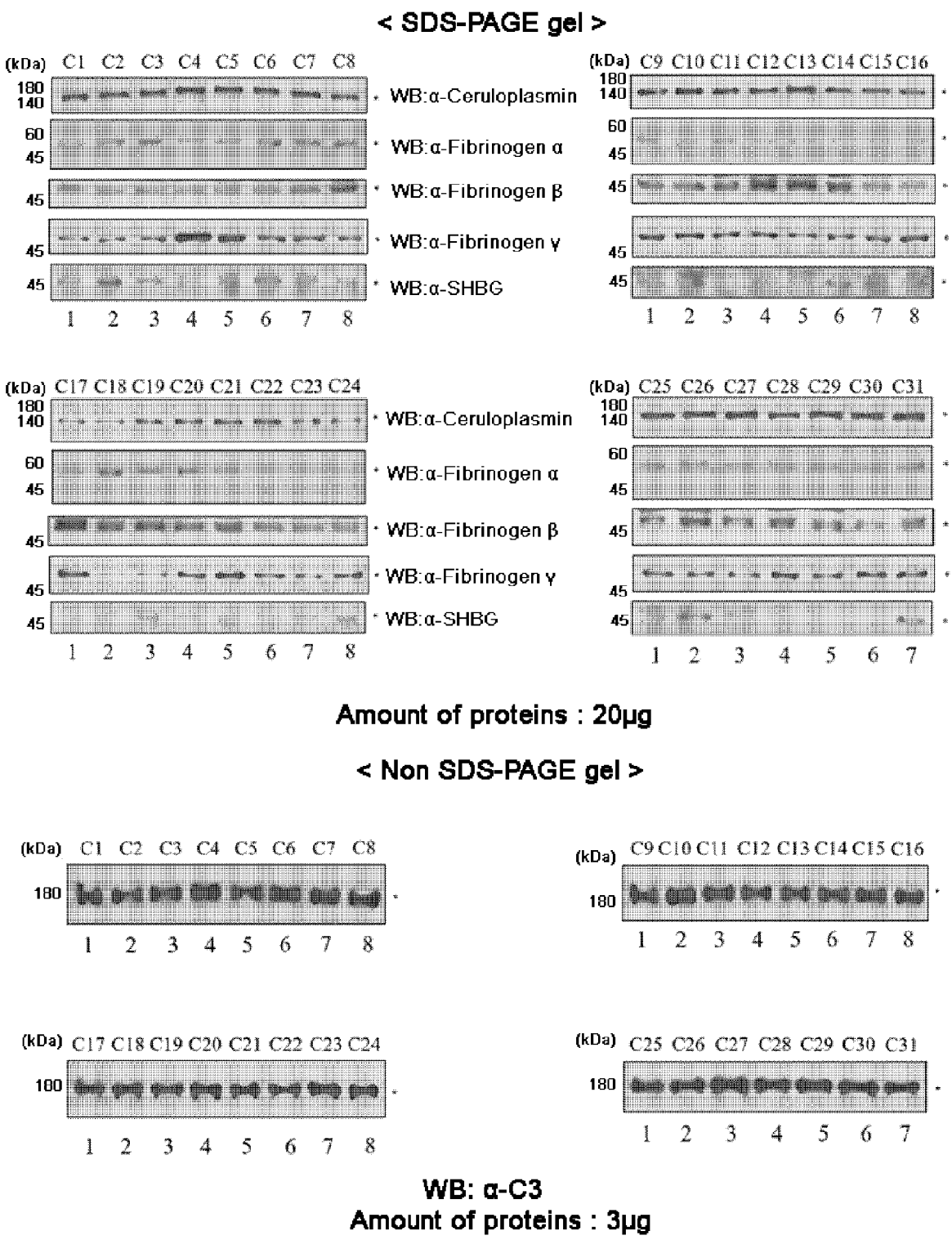
[청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 분자가 검출가능한 표지로 표지된 것임을 특징으로 하는 조기폐경 진단용 키트.

[청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 프라이머가 기판상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태인 것을 특징으로 하는 조기폐경 진단용 키트.

[도1]

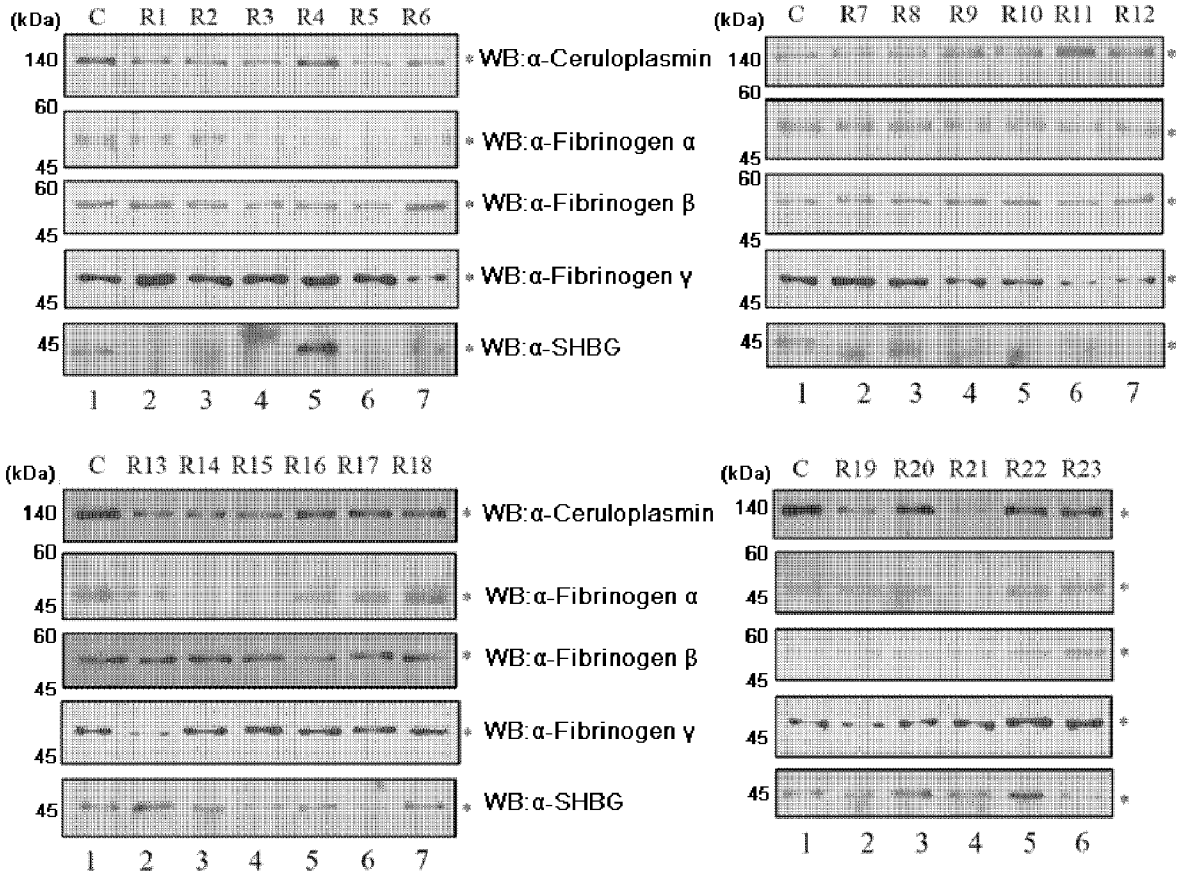


[도2]


< SDS-PAGE gel >
(kDa) C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8
180
140
60
45
45
45
45
WB:α-Ceruloplasmin
WB:α-Fibrinogen α
WB:α-Fibrinogen β
WB:α-Fibrinogen γ
WB:α-SHBG
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16
180
140
60
45
45
45
45
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C17 C18 C19 C20 C21 C22 C23 C24
180
140
60
45
45
45
45
WB:α-Ceruloplasmin
WB:α-Fibrinogen α
WB:α-Fibrinogen β
WB:α-Fibrinogen γ
WB:α-SHBG
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C25 C26 C27 C28 C29 C30 C31
180
140
60
45
45
45
45
1 2 3 4 5 6 7
Amount of proteins : 20μg
< Non SDS-PAGE gel >
(kDa) C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8
180
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C9 C10 C11 C12 C13 C14 C15 C16
180
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C17 C18 C19 C20 C21 C22 C23 C24
180
1 2 3 4 5 6 7 8
(kDa) C25 C26 C27 C28 C29 C30 C31
180
1 2 3 4 5 6 7
WB: α-C3
Amount of proteins : 3μg

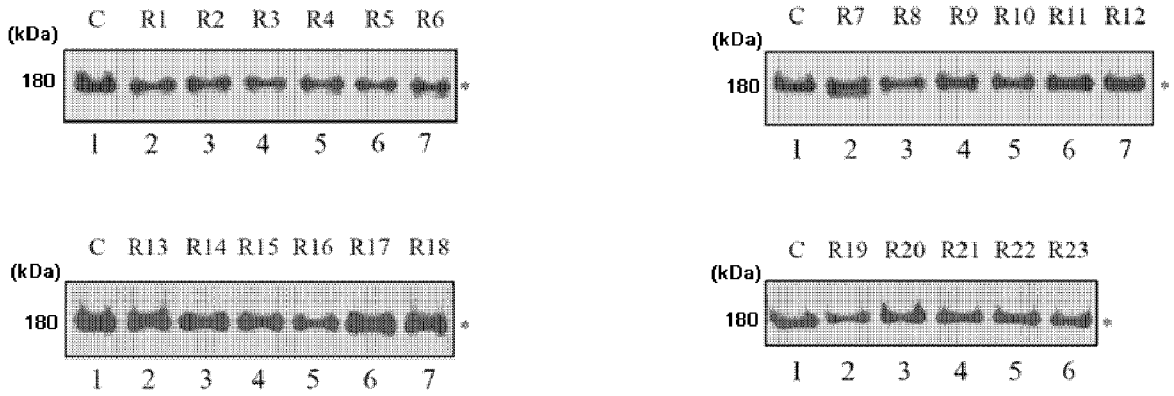
[도3]

< SDS-PAGE gel >



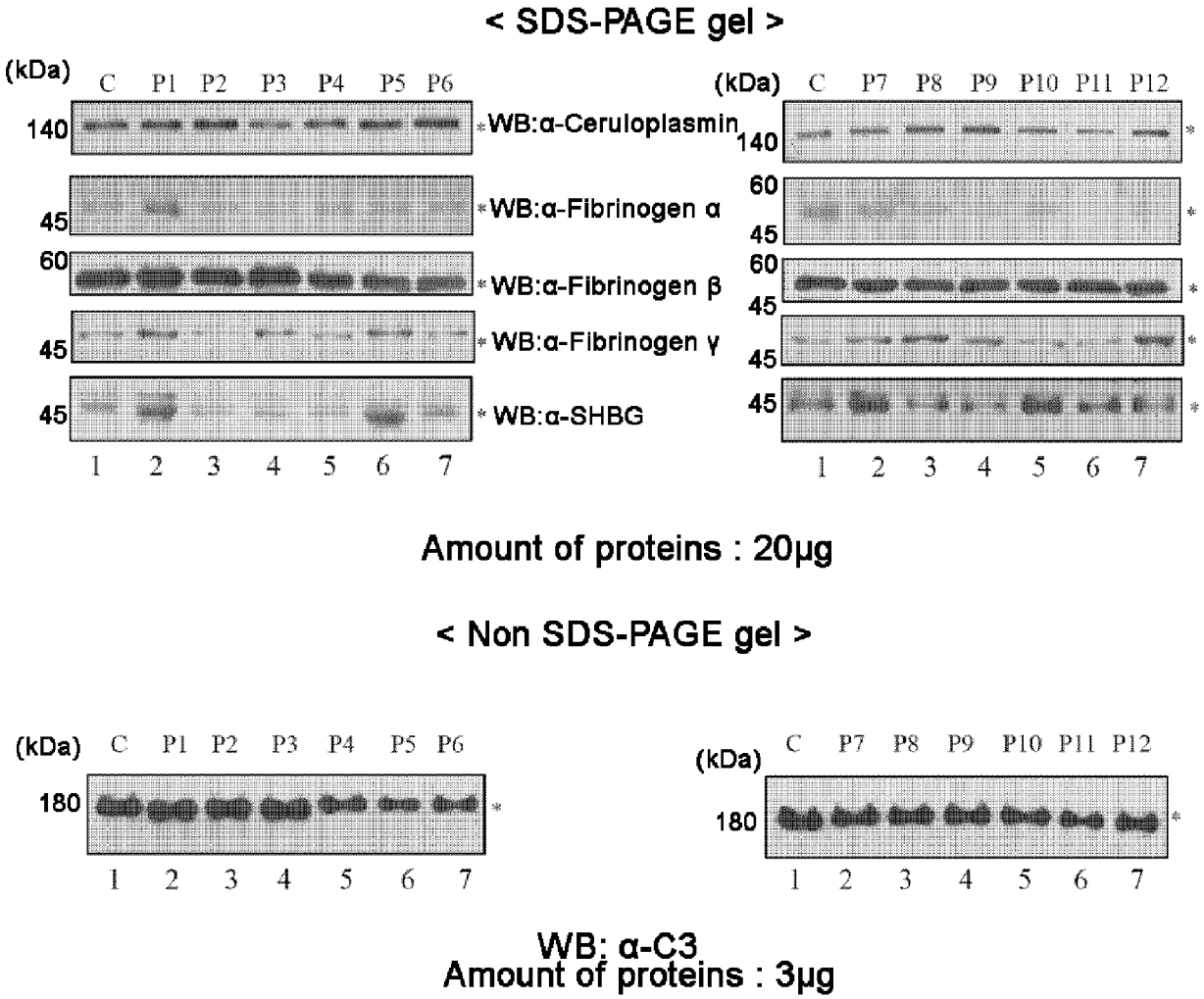
Amount of proteins : 20μg

< Non SDS-PAGE gel >

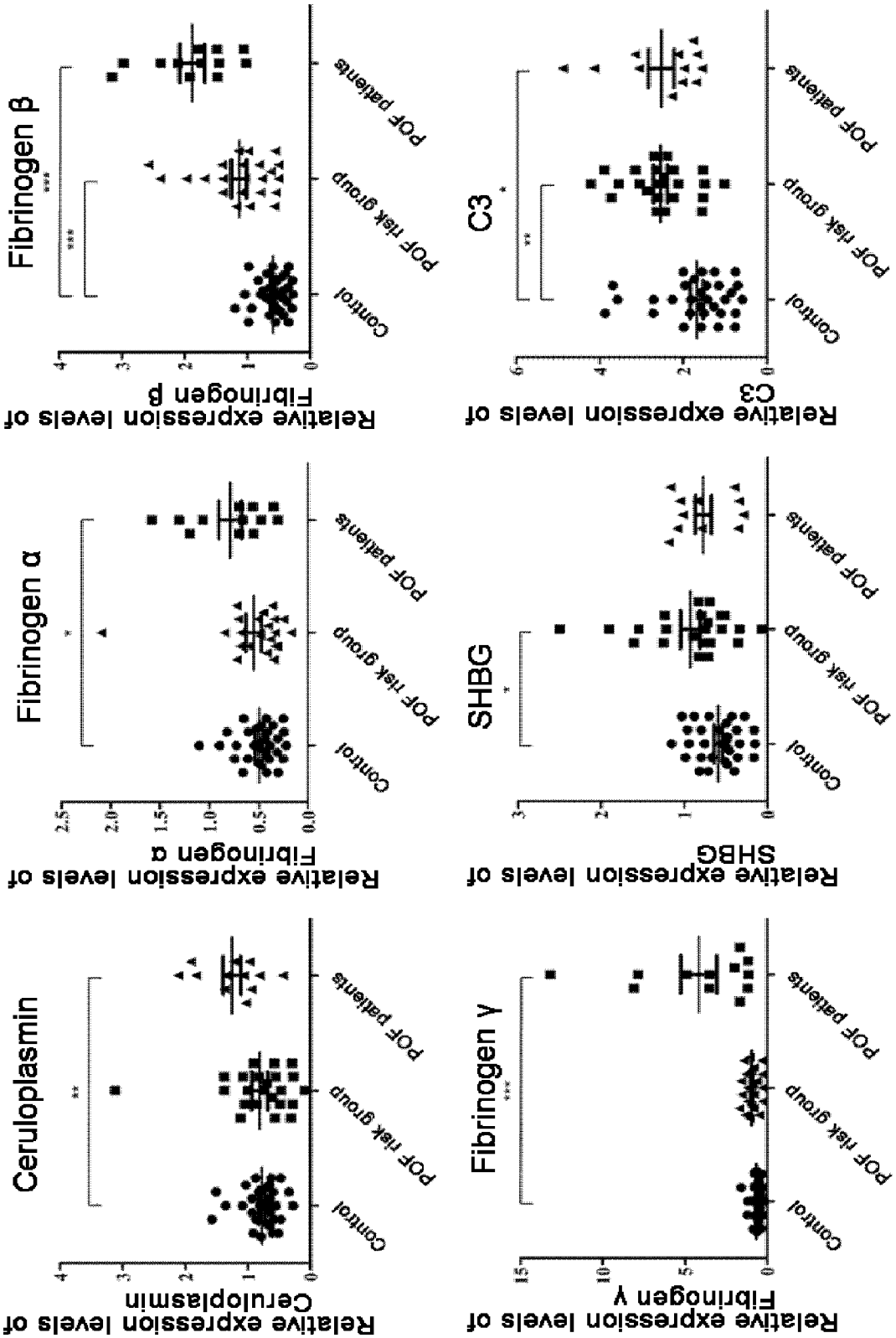


WB: α-C3
Amount of proteins : 3μg

[도4]


< SDS-PAGE gel >
(kDa)
C P1 P2 P3 P4 P5 P6
140
*WB:α-Ceruloplasmin
45
*WB:α-Fibrinogen α
60
*WB:α-Fibrinogen β
45
*WB:α-Fibrinogen γ
45
* WB:α-SHBG
1 2 3 4 5 6 7
(kDa)
C P7 P8 P9 P10 P11 P12
140
60
45
60
45
45
1 2 3 4 5 6 7
Amount of proteins : 20μg
< Non SDS-PAGE gel >
(kDa)
C P1 P2 P3 P4 P5 P6
180
1 2 3 4 5 6 7
(kDa)
C P7 P8 P9 P10 P11 P12
180
1 2 3 4 5 6 7
WB: α-C3
Amount of proteins : 3μg

[도5]


Relative expression levels of Fibrinogen β
Fibrinogen β
Control
POF risk group
POF patients
Relative expression levels of C3
C3
Relative expression levels of Fibrinogen α
Fibrinogen α
Relative expression levels of SHBG
SHBG
Relative expression levels of Fibrinogen γ
Fibrinogen γ
Relative expression levels of Ceruloplasmin
Ceruloplasmin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/012892

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6883; A61K 051/00; C07H 021/04; C12N 15/11; C12Q 001/68; C12Q 1/68; C12Q 144; C12Q 168; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: premature ovarian failure, blood, complement component 3, fibrinogen α, β, γ, ceruloplasmin, sex hormone-binding globulin (SHBG), overexpression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KEZELE, P. R. et al. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. Biology of Reproduction. 2005, vol. 72, pages 241-255 See abstract; page 241, right column; page 242, right column-page 244; page 254, right column; table 4.	1-13
Y	US 2003-0211498 A1 (MORIN, Patrice J. et al.) 13 November 2003 See claims 30-32; paragraphs [0055], [0059], [0061]; sequence identifier no. 50.	1-13
A	US 2005-0064453 A1 (DUFF, Gordon et al.) 24 March 2005 See the entire document.	1-13
A	US 6787311 B1 (SHELLING, Andrew N.) 07 September 2004 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2012-0059757 A (CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 11 June 2012 See the entire document.	1-13
PX	LEE, D.-H. et al. Identification of serum biomarkers for premature ovarian failure. BBA-Proteins and Proteomics. 2019, vol. 1867, pages 219-226, (Electronic publication) 29 December 2018 See abstract; page 220, left column, second paragraph; page 222, right column; figures 2, 3; table 3.	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 JANUARY 2020 (10.01.2020)	**10 JANUARY 2020 (10.01.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/012892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2003-0211498 A1	13/11/2003	AU 5314001 A	15/10/2001
		US 2008-0253963 A1	16/10/2008
		US 2010-0183507 A1	22/07/2010
		US 7279294 B2	09/10/2007
		WO 01-075177 A3	22/05/2003
		WO 01-75177 A2	11/10/2001
US 2005-0064453 A1	24/03/2005	AR 016754 A1	01/08/2001
		AT 462800 T	15/04/2010
		AT 490341 T	15/12/2010
		AU 2002-359431 A1	10/06/2003
		AU 6067900 A	31/01/2001
		AU 7539898 A	30/12/1998
		AU 755107 B2	05/12/2002
		AU 784224 B2	23/02/2006
		BR 9809183 A	01/08/2000
		CA 2291731 A1	03/12/1998
		CA 2378221 A1	04/01/2001
		CA 2467717 A1	30/05/2003
		CA 2565562 A1	17/11/2005
		CN 101955943 A	26/01/2011
		CN 1177059 C	24/11/2004
		CN 1278868 A	03/01/2001
		CN 1753903 A	29/03/2006
		CN 1753903 B	12/05/2010
		CN 1753903 C	29/03/2006
		CN 1906384 A	31/01/2007
		CN 1906384 C	09/07/2008
		EA 199901097 A1	26/06/2000
		EP 0983385 A1	08/03/2000
		EP 0983385 B1	31/03/2010
		EP 1194590 A2	10/04/2002
		EP 1463745 A2	06/10/2004
		EP 1751304 A2	14/02/2007
		EP 1751304 B1	01/12/2010
		ES 2342992 T3	20/07/2010
		ES 2356167 T3	05/04/2011
		IL 147182 A	14/08/2002
		JP 2002-500513 A	08/01/2002
		JP 2003-508022 A	04/03/2003
		JP 2005-509432 A	14/04/2005
		JP 2006-070736 A	16/03/2006
		JP 2010-029220 A	12/02/2010
		JP 4026634 B2	26/12/2007
		JP 4492849 B2	30/06/2010
		KR 10-1019131 B1	07/03/2011
		KR 10-1059898 B1	29/08/2011
		KR 10-2004-0066832 A	27/07/2004
		KR 10-2010-0095652 A	31/08/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/012892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		NO 995803 A	18/01/2000
		PL 337080 A1	31/07/2000
		TW 236502 B	21/07/2005
		US 2002-0146700 A1	10/10/2002
		US 2003-0235890 A1	25/12/2003
		US 2004-0152124 A1	05/08/2004
		US 2005-0282198 A1	22/12/2005
		US 2007-0062472 A1	22/03/2007
		US 2008-0118920 A1	22/05/2008
		US 2008-0187920 A1	07/08/2008
		US 2008-0311581 A1	18/12/2008
		US 2009-0163460 A1	25/06/2009
		US 2010-0279280 A1	04/11/2010
		US 6268142 B1	31/07/2001
		US 6706478 B2	16/03/2004
		US 6730476 B1	04/05/2004
		US 7213551 B2	08/05/2007
		WO 01-00880 A2	04/01/2001
		WO 01-00880 A3	15/11/2001
		WO 03-044176 A2	30/05/2003
		WO 03-044176 A8	21/08/2003
		WO 03-044176 A9	16/10/2003
		WO 2003-044176 A3	29/07/2004
		WO 2005-108619 A2	17/11/2005
		WO 2005-108619 A3	27/04/2006
		WO 98-54359 A1	03/12/1998
		ZA 9804490 B	02/12/1998
US 6787311 B1	07/09/2004	AU 2000-27027 A1	14/09/2000
		AU 2000-27027 B2	27/01/2005
		EP 1163365 A1	19/12/2001
		JP 2002-537776 A	12/11/2002
		WO 00-50638 A1	31/08/2000
KR 10-2012-0059757 A	11/06/2012	KR 10-1216378 B1	28/12/2012

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/012892

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883; A61K 051/00; C07H 021/04; C12N 15/11; C12Q 001/68; C12Q 1/68; C12Q 144; C12Q 168; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:조기폐경(premature ovarian failure), 혈액(blood), 컴플리트 컴포넌트 3(complement component 3), 피브리노오겐 α, β, γ (fibrinogen α, β, γ), 셀룰로플라스민(ceruloplasmin), 성 호르몬-결합 글로불린(SHBG), 과발현(overexpression)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KEZELE, P. R. 등, 'Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development', Biology of Reproduction, 2005, 72권, 241-255 페이지 초록; 페이지 241, 우컬럼; 페이지 242, 우컬럼-페이지 244; 페이지 254, 우컬럼; 표 4	1-13
Y	US 2003-0211498 A1 (MORIN, PATRICE J. 등) 2003.11.13 청구항 30-32; 단락 [0055], [0059], [0061]; 서열번호 50	1-13
A	US 2005-0064453 A1 (DUFF, GORDON 등) 2005.03.24 전체 문헌	1-13
A	US 6787311 B1 (SHELLING, ANDREW N.) 2004.09.07 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2012-0059757 A (차의과학대학교 산학협력단) 2012.06.11 전체 문헌	1-13
PX	LEE, D.-H. 등, 'Identification of serum biomarkers for premature ovarian failure', BBA-Proteins and Proteomics, 2019, 1867권, 219-226 페이지, (전자공개)2018.12.29 초록; 페이지 220, 좌컬럼, 두번째 단락; 페이지 222, 우컬럼; 도면 2, 3; 표 3	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 01월 10일 (10.01.2020)	2020년 01월 10일 (10.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/012892

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0211498 A1	2003/11/13	AU 5314001 A	2001/10/15
		US 2008-0253963 A1	2008/10/16
		US 2010-0183507 A1	2010/07/22
		US 7279294 B2	2007/10/09
		WO 01-075177 A3	2003/05/22
		WO 01-75177 A2	2001/10/11
US 2005-0064453 A1	2005/03/24	AR 016754 A1	2001/08/01
		AT 462800 T	2010/04/15
		AT 490341 T	2010/12/15
		AU 2002-359431 A1	2003/06/10
		AU 6067900 A	2001/01/31
		AU 7539898 A	1998/12/30
		AU 755107 B2	2002/12/05
		AU 784224 B2	2006/02/23
		BR 9809183 A	2000/08/01
		CA 2291731 A1	1998/12/03
		CA 2378221 A1	2001/01/04
		CA 2467717 A1	2003/05/30
		CA 2565562 A1	2005/11/17
		CN 101955943 A	2011/01/26
		CN 1177059 C	2004/11/24
		CN 1278868 A	2001/01/03
		CN 1753903 A	2006/03/29
		CN 1753903 B	2010/05/12
		CN 1753903 C	2006/03/29
		CN 1906384 A	2007/01/31
		CN 1906384 C	2008/07/09
		EA 199901097 A1	2000/06/26
		EP 0983385 A1	2000/03/08
		EP 0983385 B1	2010/03/31
		EP 1194590 A2	2002/04/10
		EP 1463745 A2	2004/10/06
		EP 1751304 A2	2007/02/14
		EP 1751304 B1	2010/12/01
		ES 2342992 T3	2010/07/20
		ES 2356167 T3	2011/04/05
		IL 147182 A	2002/08/14
		JP 2002-500513 A	2002/01/08
		JP 2003-508022 A	2003/03/04
		JP 2005-509432 A	2005/04/14
		JP 2006-070736 A	2006/03/16
		JP 2010-029220 A	2010/02/12
		JP 4026634 B2	2007/12/26
		JP 4492849 B2	2010/06/30
		KR 10-1019131 B1	2011/03/07
		KR 10-1059898 B1	2011/08/29
		KR 10-2004-0066832 A	2004/07/27
		KR 10-2010-0095652 A	2010/08/31

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/012892

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		NO 995803 A	2000/01/18
		PL 337080 A1	2000/07/31
		TW 236502 B	2005/07/21
		US 2002-0146700 A1	2002/10/10
		US 2003-0235890 A1	2003/12/25
		US 2004-0152124 A1	2004/08/05
		US 2005-0282198 A1	2005/12/22
		US 2007-0062472 A1	2007/03/22
		US 2008-0118920 A1	2008/05/22
		US 2008-0187920 A1	2008/08/07
		US 2008-0311581 A1	2008/12/18
		US 2009-0163460 A1	2009/06/25
		US 2010-0279280 A1	2010/11/04
		US 6268142 B1	2001/07/31
		US 6706478 B2	2004/03/16
		US 6730476 B1	2004/05/04
		US 7213551 B2	2007/05/08
		WO 01-00880 A2	2001/01/04
		WO 01-00880 A3	2001/11/15
		WO 03-044176 A2	2003/05/30
		WO 03-044176 A8	2003/08/21
		WO 03-044176 A9	2003/10/16
		WO 2003-044176 A3	2004/07/29
		WO 2005-108619 A2	2005/11/17
		WO 2005-108619 A3	2006/04/27
		WO 98-54359 A1	1998/12/03
		ZA 9804490 B	1998/12/02
US 6787311 B1	2004/09/07	AU 2000-27027 A1	2000/09/14
		AU 2000-27027 B2	2005/01/27
		EP 1163365 A1	2001/12/19
		JP 2002-537776 A	2002/11/12
		WO 00-50638 A1	2000/08/31
KR 10-2012-0059757 A	2012/06/11	KR 10-1216378 B1	2012/12/28