



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0109214
(43) 공개일자 2017년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/6854 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0034745
(22) 출원일자 2017년03월20일
심사청구일자 2017년03월20일
(30) 우선권주장
1020160032803 2016년03월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
유한옥
서울특별시 강남구 압구정로29길 57 204동 1002호
(압구정동, 현대아파트)
이범희
서울특별시 송파구 올림픽로 525 104동 1605호 (풍납동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

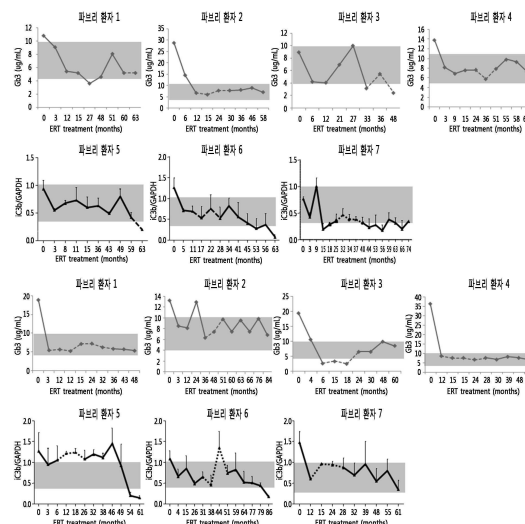
(54) 발명의 명칭 파브리병 진단용 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물 및 파브리병 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 및 상기 조성물을 이용하여 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하거나 파브리병을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에서는 파브리병의 진단 및 치료 효과 평가와 관련된 신규 바이오 마커로서 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)를 발굴하였다. 상기 iC3b는 정상 대조군에 비해 파브리병 환자에서 발현 수준이 높아 이를 이용해 파브리병을 진단할 수 있으며, 나아가 효소 치료 후 장기적으로 상기 마커의 발현 양상이 점진적으로 변하므로, 파브리병 치료 과정에서 질환의 자연경과와 치료 효과를 판명하는데 중요한 바이오 마커로 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

G01N 2333/4712 (2013.01)
G01N 2333/4716 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)
G01N 2800/00 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

허선희

서울특별시 송파구 풍성로15길 10 (대동아파트)
101동 506호

(72) 발명자

김구환

서울특별시 중랑구 망우로75길 19 (중랑숲리가아파트) 105동 803호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016M3A9B4915706
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발
연구과제명	희귀유전질환의 새로운 발병기전의 이해를 통한 치료법 발굴 및 임상적 응용성 평가
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 iC3b를 검출할 수 있는 제제는 각각 iC3b에 특이적으로 결합하는 항체인, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효소 치료는 α -갈락토시다아제 A (α -galactosidase A)를 이용한 효소 치료인 것인, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 키트.

청구항 5

개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 정보의 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 효소 치료 후의 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 iC3b의 단백질 발현 수준을 효소 치료 전의 대조군 내의 iC3b의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과 평가를 위한 정보의 제공 방법.

청구항 7

불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병의 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 검출할 수 있는 제제는 iC3b에 특이적으로 결합하는 항체인, 진단용 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 따른 조성물을 포함하는, 파브리병의 진단용 키트.

청구항 10

개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 효소 치료 후의 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 iC3b의 단백질 발현 수준을 효소 치료 전의 대조군 내의 iC3b의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 파브리병의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 12

(a) 파브리병 효소 치료제의 후보 물질을 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)를 발현하는 분리된 세포에 처리하여 상기 iC3b 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 측정한 단백질 발현 수준이 상기 후보 물질을 처리하지 않은 대조군의 iC3b의 단백질 발현 수준보다 낮은 경우 파브리병의 효소 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 파브리병의 효소 치료제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물 및 파브리병 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 조성물을 이용하여 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하거나 파브리병을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법 및 파브리병에 대한 효소 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 파브리병 (Fabry disease)은 X-염색체 연관 열성 유전 질환의 하나로 대표적인 리소좀 저장 질환 (Lysosomal Storage Disease; LSD)에 해당한다. 상기 파브리 질환은 리소좀 효소인 알파-갈락토시다아제 A (α -Galactosidase A)의 결핍으로 야기되는 것으로 알려져 있다. 알파-갈락토시다아제 A는 당지질의 말단 부위에 존재하는 알파-갈락토스 (α -Galactose) 결합 부위를 가수분해시키는 작용을 하는 효소로서, 상기 효소가 결핍되는 경우 체내에 말단 알파-갈락토스 잔기를 포함하는 당지질이 축적되어 파브리병이 발병되게 된다.

[0004] 상기 효소의 결핍으로 축적되는 주요 당지질은 관용명으로 트리헥소실라미드 (Trihexosylceramide)라고 불리는 글로보트리아오실세라미드 (Globotriaosylceramide; Gb3 또는 GL3)로, 이 물질은 환자의 혈장 내에 다량 분포하고 신장, 간, 심장, 비장 등 신체 각 장기에 축적되어 이들 장기들의 기능부전을 유발하고 만성 통증, 각막 혼탁, 자율 신경 기능 이상, 피부 상해 등을 다양한 증상을 일으킬 수 있으며 급기야는 사망에까지 이르게 한다. 특히 혈장과 직접 접촉하는 혈관내피세포는 Gb3가 축적되는 가장 대표적인 세포로 혈관내피세포 기능부전은 혈관기능 부전에 의한 혈관질환과 파브리병의 특징적인 신장 질환을 유발한다고 알려져 있다 (R.J. Desnick et al., α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease, in: C.R. Scriver et al., The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3733-3774). 따라서 파

브리병을 조기에 진단하는 것과 파브리병의 치료 과정에서 치료 효과를 평가하는 것이 매우 중요하다.

[0005] 현재 파브리병을 진단하기 위한 방법으로 상기 Gb3의 혈장 내 수준을 측정하는 것이 가장 많이 사용되고 있으나, Gb3는 실제로 혈장 내에서 측정 시기 및 환자의 상태에 따라 그 수준이 유동적으로 변할 수 있어, Gb3만을 측정하여 파브리병 진단이나 치료 효과를 평가하는 것은 다소 부족한 측면이 있다. 따라서 파브리병을 진단하거나 치료 효과를 평가할 수 있는 새로운 바이오 마커의 개발이 시급한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 파브리병과 상관관계를 가지는 신규한 바이오 마커를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 및 베타 액틴 (beta actin)이 파브리병의 진단 및 치료 과정에서 치료 효과를 평가하기 위한 마커로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물을 포함하는, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 파브리병의 진단용 조성물을 포함하는, 파브리병의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 (a) 파브리병 효소 치료제의 후보 물질을 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)을 발현하는 분리된 세포에 처리하여 상기 iC3b 또는 베타 액틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 측정한 단백질 발현 수준이 상기 후보 물질을 처리하지 않은 대조군의 iC3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준보다 낮은 경우 파브리병의 효소 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 파브리병의 효소 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명에서는 파브리병 환자에서 특이적으로 발현되거나 파브리병의 장기간 효소 치료에 따라 발현이 변하는 단백질을 찾아, 파브리병을 진단하고 파브리병에 대한 효소 치료에 있어서 장기간의 효과를 관명할 수 있는 새로운 바이오 마커를 발굴하고자 하였다.

[0019] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

- [0021] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병 (Fabry disease)에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물이다.
- [0022] 다른 하나의 양태는, 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 파브리병의 진단용 조성물이다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "파브리병 (Fabry disease, OMIM #301500)"은 α -갈락토시다아제 (α -galactosidase, GLA, EC 3.2.1.22)라는 세포 내 라이소좀의 가수분해 효소의 이상에 의해서 발생하는 희귀 대사성 유전질환이다. GLA의 결핍은 라이소좀 내에 Gb3 (globotriaosylceramide)의 축적을 야기하며, 이로 인해 말초 신경병증, 피부, 신장 질환, 심근병증, 뇌졸중의 심각한 합병증을 야기 한다. 2001년 재조합 효소제제의 개발 이후 파브리병의 치료가 가능해졌으나 질환의 초기에 치료를 해야 임상적인 효능을 예상할 수 있다.
- [0025] 한편, 현재 알려진 파브리병 치료방법으로는 효소 대체 치료 (Enzyme Replacement Therapy; ERT) 방법이 있다. 효소 대체 치료는 재조합된 α -갈락토시다아제 A를 파브리병 환자에게 투여하여 결핍된 라이소좀 효소를 보충해주는 치료법으로서, 2003 년 미국에서 승인된바 있다. 효소 대체 치료에 이용되는 재조합 α -갈락토시다아제 A로 시판되는 것으로는 미국 젠자임사 (Genzyme)의 파브라자임 (Fabrazyme), 유럽 TKT사 (TransKaryotic Therapeutics, Inc.)의 레플라갈 (Replagal)이 있다. 최근 국내 제약회사 이수앱시스에서도 파바갈 (Fabagal)을 시판하여 치료제로 사용되고 있다. 효소 대체 치료는 혈장과 소변의 Gb3 농도를 낮추고, 신경통증을 완화하고 심장질환 발생을 완화하고 콩팥 기능을 안정화 시키는 등 파브리병에 대한 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0026] 그러나 효소 대체 치료가 현재 파브리병을 치료하기 위한 가장 널리 알려진 치료법임에도 불구하고 중간 혹은 심한 정도의 콩팥 기능 손상 증상을 보이는 파브리병에서는 효소 대체 치료가 제한적이거나 효과가 없는 경우도 보고되고 있다 (Tondel C. et al., Agalsidase benefits renal histology in young patients with Fabry disease, J Am Soc Nephrol., 2013, 24(1):137-48).
- [0027] 따라서, 파브리병을 조기에 진단하는 것과 파브리병을 효소 치료하는 과정에서 그 치료 효과를 평가하는 것은 매우 중요하나, 현재까지 파브리병의 진단 및 파브리병에 대한 효소 치료제제의 장기간의 효과 및 반응성을 예측할 수 있는 확실한 지표가 없는 실정이다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "마커", "생물학적 마커", "바이오 마커"는 상호 교환적으로 사용된다. 상기 마커는 일반적으로 생물학적 시료에서 검출 가능한 분자들 또는 화합물로서, 생체의 변화를 알아낼 수 있는 지표를 말한다. 본 발명에서 상기 마커는 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)이며, 이들의 대사산물 역시 본 발명의 범주에 포함된다. 이들의 수준을 측정함으로써 파브리병을 진단하거나, 파브리병의 효소 치료에서 효과를 평가할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "효소 치료의 효과 평가"는 파브리병에 대한 효소 치료를 수행하면서 파브리병에 대한 치료가 효과적으로 이루어졌는지 여부를 판단하는 것을 말한다. 즉, 효소 치료 과정을 통해 파브리병의 증세가 완화되거나 호전되는 등 치료가 효과적으로 이루어졌거나 또는 파브리병의 증세가 더욱 심화 혹은 악화되었는지를 평가하는 것으로, 본 발명에 개시된 내용에 따를 때, 구체적으로 의사의 임상적 판단이 아닌 본 발명의 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴을 마커로 사용하여 객관적으로 효소 치료의 효과를 평가할 수 있다.
- [0031] 상기 효소 치료는 예컨대 상술한 α -갈락토시다아제 A를 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 파브리병을 치료 또는 완화시킬 수 있는 공지된 효소 치료 방법을 모두 포함한다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 대상 개체가 파브리병을 앓고 있는지 여부 또는 파브리병의 정도를 확인하는 것이다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b)"는 혈청 내에 존재하는 42 kDa의 항원으로, 보체 요소 3b (complement component 3b)가 프로테아제 인자 I (protease factor I)에 의해

분할되어 생성되는 단백질을 말한다. iC3b는 보체 신호경로의 진행을 막고, B-세포를 자극하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 전신성 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus) 및 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis)에서 혈액 내 수준이 증가되는 것으로 보고된바 있으나, 파브리병과의 관련성은 현재까지 전혀 알려지지 않았다.

- [0035] 본 발명에서 용어 "베타 액틴 (beta actin)"은 액틴의 6 종의 아형 (isoform) 중 하나로, 비근육 세포 골격 액틴 (nonmuscle cytoskeletal actin)을 의미한다. 베타 액틴은 세포 이동, 구조 등에 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 파브리병과의 관련성은 현재까지 전혀 보고된 바 없다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 정상 대조군에 비해 파브리병 환자의 혈장에서 iC3b 및 베타 액틴의 수준이 유의적으로 높은 것을 확인하였으며 (도 5), 효소 치료 전과 효소 치료 후의 파브리병 환자의 혈장을 2-DE (2-dimentional gel electrophoresis)로 분석하여 iC3b 및 베타 액틴의 발현 수준이 치료 전에 비해 치료 후 유의적으로 2 배 이상 감소하는 것을 확인하였다 (도 1 및 도 2).
- [0037] 또한, 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 파브리병 환자를 장기간 효소 치료하는 과정에서 iC3b 및 베타 액틴의 수준을 측정하여, 상기 두 단백질 모두 치료 기간이 경과함에 따라 발현 수준이 유의적으로 점차 감소하는 것을 확인하였다 (도 3 내지 도 5).
- [0038] 추가로, 본 발명의 일 실시예에서는 파브리 마우스 모델에서도 정상 마우스에 비해 혈장 iC3b 레벨이 증가된 것을 확인하였다(도 7).
- [0039] 따라서, 본 발명의 iC3b 및 베타 액틴은 파브리병을 진단하거나, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 바이오 마커로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0041] 본 발명의 파브리병에 대한 진단용 조성물 및 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물은 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴을 검출할 수 있는 제제를 포함한다. 본 발명에서 용어 "검출할 수 있는 제제"는 검출하고자 하는 바이오 마커의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 의미한다. 상기 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴을 검출할 수 있는 제제는 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 특히 본 발명에서 용어 "단백질 발현 수준 측정"이란 파브리병을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 바이오 마커 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 예컨대 상기 마커 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것일 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯 (western blotting), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement fixation assay), FACS 및 단백질 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서 용어 "특이적으로 결합하는"이란 결합에 의해 타겟 물질의 존재 여부를 검출할 수 있을 정도로, 다른 물질에 비하여 타겟 물질에 대한 결합력이 뛰어난을 의미한다.
- [0044] 본 발명에서 용어 "항체"는 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자들, 또는 이것의 단편으로부터 유래되거나 이를 본떠서 만든 실질적으로 이에 의해 암호화된 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 본 발명에서 항체는 전체 항체 및 항체 단편을 포함하며 이에 제한되지 않는 다양한 형태의 항체 구조를 포함할 수 있다. 항체 단편은 전체 길이의 항체의 일부분, 항체의 가변 도메인, 또는 적어도 항체의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 항체 단편의 예는 디아바디 (diabody), 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0045] 한 구체 예에서, 상기 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예컨대 융합 방법, 재조합 DNA 방법 또는 파아지 항체 라이브러리 방법에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991 등에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에

필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 당업자가 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 보체인자 B 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성 (affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

- [0046] 본 발명의 파브리병에 대한 진단용 조성물 및 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 조성물은 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴 검출할 수 있는 제제를 포함할 수 있고, 나아가 파브리병을 진단하거나 효소 치료의 효과를 평가할 수 있는 다른 단백질, 예컨대 Gb3 등을 검출할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 다른 양태는, 상기 조성물을 포함하는 파브리병에 대한 효소 치료의 효과 평가용 키트이다.
- [0049] 본 발명의 다른 양태는, 상기 조성물을 포함하는 파브리병의 진단용 키트이다.
- [0050] 파브리병 및 상기 조성물에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0051] 상기 키트는 구체적으로 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 LC-MS/MS용 정량 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 또한, 상기 파브리병에 대한 효소 치료의 효과 평가용 키트 또는 파브리병의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태는 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 정보의 제공 방법이다.
- [0055] 본 발명의 다른 양태는 개체로부터 분리된 혈액 시료 내의 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파브리병의 진단을 위한 정보의 제공 방법이다. 상기 진단을 위한 정보의 제공 방법은 진단방법일 수 있다.
- [0056] 불활성 보체 요소 3b, 베타 액틴 및 파브리병에 대하여는 상술한 바와 같다.
- [0057] 본 발명에서는 개체로부터 분리된 혈액 시료를 사용하여 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴의 수준을 측정함으로써, 비침습적이며 편리한 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하기 위한 정보의 제공 방법 및 파브리병의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0058] 상기 혈액 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청 시료일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 구체적으로 상기 정보 제공 방법은 파브리병에 대해 효소 치료를 진행 중인 개체 또는 파브리병 의심 개체로부터 분리된 혈액 시료로부터 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴의 수준을 측정하고, 효소 치료 수행 전 개체의 분리된 혈액 시료 또는 정상 대조군의 분리된 혈액 시료로부터 측정된 것과의 수준을 비교함으로써, 효소 치료의 효과를 평가하거나 파브리병을 진단하는데 필요한 정보를 제공할 수 있다.
- [0060] 이때, 파브리병에 대한 효소 치료의 효과를 평가하는 경우 효소 치료 후의 혈액 시료에서 측정된 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴의 수준이 치료 전 혈액 시료에서의 수준보다 통계학적으로 유의적으로 감소한 경우 치료가 효과적인 것으로 평가할 수 있고, 증가하거나 유사한 수준인 경우 치료가 효과적이지 않은 것으로 평가할 수 있다.
- [0061] 또한, 파브리병을 진단하는 경우 파브리병 의심 개체의 혈액 시료에서 측정된 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴의 수준이 정상 대조군의 혈액 시료에서의 수준보다 통계학적으로 유의적으로 높은 경우 파브리병으로 판정할 수 있다.
- [0062] 상기 불활성 보체 요소 3b 또는/및 베타 액틴의 수준을 측정하는 것은, 구체적으로 해당 불활성 보체 요소 3b 또는 베타 액틴에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF (matrix desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) 분석, SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry), 또는 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)로

수행하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0064] 본 발명의 다른 양태는, (a) 파브리병 효소 치료제의 후보 물질을 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)을 발현하는 분리된 세포에 처리하여 상기 iC3b 또는 베타 액틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 측정한 단백질 발현 수준이 상기 후보 물질을 처리하지 않은 대조군의 iC3b 또는 베타 액틴의 단백질 발현 수준보다 낮은 경우 파브리병의 효소 치료제로 선택하는 단계를 포함하는, 파브리병의 효소 치료제를 스크리닝하는 방법이다.
- [0065] 불활성 보체 요소 3b, 베타 액틴 및 파브리병에 대하여는 상술한 바와 같다.
- [0066] 상기 iC3b 또는 베타 액틴은 파브리병 환자의 효소 치료 과정에서 그 수준이 감소하므로, 파브리병 환자에 대한 효소 치료를 위한 후보 물질을 분리된 세포에 처리하여 처리 전/후의 iC3b 또는 베타 액틴의 수준을 측정함으로써 그 후보 물질이 파브리병의 효소 치료에 효과가 있는지를 확인할 수 있으며, 이를 통해 파브리병에 대한 효소 치료의 후보 물질을 스크리닝할 수 있다.
- [0067] 구체적으로, 상기 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 또는 베타 액틴 (beta actin)을 발현하는 세포는, 파브리병 환자로부터 분리된 세포 또는 인위적으로 제조된 파브리병 모델 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0069] 본 발명에서는 파브리병의 진단 및 치료 효과 평가와 관련된 신규 바이오 마커로서 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b) 및 베타 액틴 (beta actin)을 발굴하였다. 상기 iC3b 및 베타 액틴은 정상 대조군에 비해 파브리병 환자에서 발현 수준이 높아 이를 이용해 파브리병을 진단할 수 있으며, 나아가 효소 치료 후 장기적으로 상기 마커의 발현 양상이 점진적으로 변하므로, 파브리병 치료 과정에서 질환의 자연 경과와 치료 효과를 판명하는데 중요한 바이오 마커로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은 8 명의 파브리병 환자에서 효소 치료 전 혈장과 효소 치료 후 7.5 ± 2.7 (4 - 12) 개월에 채집한 혈장을 프로테오믹스 (proteomics)로 분석하여 얻은 2DE 사진이다. 효소 치료 전후에 2 배 이상 발현 양상이 변한 스팟 (spot) 중 iC3b (spot 409)에 해당하는 스팟을 각각의 환자별로 화살표로 표시하였다.
- 도 2는 8 명의 파브리병 환자에서 효소 치료 전 혈장과 효소 치료 후 7.5 ± 2.7 (4 - 12) 개월에 채집한 혈장을 프로테오믹스 (proteomics)로 분석하여 얻은 2DE 사진이다. 효소 치료 전후에 2 배 이상 발현 양상이 변한 스팟 (spot) 중 베타 액틴 (beta actin) (spot 654)에 해당하는 스팟을 각각의 환자별로 화살표로 표시하였다.
- 도 3은 7 명의 파브리병 환자의 혈장을 효소 치료 전과 효소 치료 후 3 - 12 개월 마다 채집하여, 치료 후 64.5 ± 15.2 (46 - 96) 개월까지 혈장에서 베타 액틴의 발현 양상을 조사한 것이다.
- 도 4는 7 명의 파브리병 환자의 혈장을 효소 치료 전과 효소 치료 후 3 - 12개월 마다 채집하여, 치료 후 64.5 ± 15.2 (46 - 96) 개월까지 혈장에서 iC3b의 발현 양상을 조사한 것이다.
- 도 5는 8 명의 파브리병 환자에서 효소 치료 전, 치료 후 7.5 ± 2.7 (4 - 12) 개월, 및 64.5 ± 15.2 (46 - 96) 개월에 채집한 혈장에서 iC3b와 베타 액틴의 발현 양상을 확인한 것이다. 발현 양상의 평균을 막대그래프로 표시하였고, 이를 연령과 성별을 맞춘 8 명의 정상인의 평균 막대그래프와 비교하였다.
- 도 6은 7 명의 파브리병 환자에서 효소 치료 전과 효소 치료 후 3 - 12개월 마다 혈장을 채집하여, 치료 후 64.5 ± 15.2 (46 - 96) 개월까지 혈장에서 iC3b의 발현 양상을 조사하고, 이를 파브리병에서 이미 바이오마커로 알려진 Gb3의 수치 변화와 비교한 것이다.
- 도 7은 파브리 마우스와 정상 마우스의 혈장에서 iC3b 레벨을 비교한 것이다.
- 도 8은 11명의 파브리 남성 환자의 신조직 소견을 정리한 표를 기재한 것이다.

도 9는 파브리 환자에서 Gb3를 함유하는 침전물(A 및 B), C3 면역 침전물(C 및 D)을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.
- [0074] **실시예 1: 파브리병 환자의 효소 치료 전후에 단백질 발현 양상 비교**
- [0076] 8 명의 파브리병 환자를 대상으로 효소 치료 전과 효소 치료 후 7.5 ± 2.7 (4 - 12) 개월에 혈장을 분리하고, 프로테오믹스 분석을 수행하여 단백질 발현 양상을 비교하고자 하였다. 대상 개체의 혈장에서 알부민, 면역글로불린 등 발현이 높은 단백질을 MARC (multiple affinity removal column)를 이용하여 제거 후, 2-DE (2-dimensional gel electrophoresis) 이미지 분석을 수행하였다.
- [0077] 구체적으로 MARC로 필터링한 혈장을 2-DE 이미지 분석을 이용하여 2 배 이상의 발현 차이가 나는 단백 스팟을 선별한 후, MALD-TOF MS 분석 및 MALD-TOF MS/MS 분석 모두에서 P 값이 < 0.05 으로 유의한 차이를 보이는 단백질을 선택하였다. 그 결과, 효소 치료 후 발현 양상이 변화하는 총 15 개의 단백질을 선택할 수 있었다. 이들 15 개의 단백질은 모두 발현이 감소하는 양상으로 나타났다.
- [0079] **실시예 2: 효소 치료 후 유의적 차이가 나는 단백질의 동정**
- [0081] 상기 2-DE 이미지 분석을 통해 2 배 이상 발현 양상이 차이가 나는 15 개의 단백질에 대해 MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight) 분석 및 Mascot Database를 이용하여 단백질을 동정하였다.
- [0082] 구체적으로, MALD-TOF MS (mass spectrometry) 분석과 MALD-TOF MS/MS 분석 모두에서 P 값이 < 0.05 로 유의한 차이를 보이는 단백질을 Mascot 알고리즘 (Matrixscience, USA)을 이용해 펩타이드 서열을 분석하였다.
- [0083] 다음으로, 효소 치료 전후에 유의하게 발현 양상이 변하는 단백질을 UniProt (www.uniprot.org), PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) 및 GeneCards (www.genecards.org) 등을 이용하여 기능 분석을 시행하였다.
- [0084] 이들 단백질의 기능을 분석한 결과, 상기 15 개의 단백질은 각각 파브리병에서 혈관 내 염증 반응과 관련된 단백질, 불활성 보체 요소 3b (inactive complement component 3b, iC3b), 베타 액틴 (beta actin, ACTB)과 이 단백질과 결합하는 PFN1 (Profilin-1) 및 VCL (vinculin), 및 보체계 활성화에 관여하는 C1QC, C3, C4 단백질임을 확인하였다.
- [0085] 본 발명자들은 이 중 특히 유의적인 차이를 나타내는 iC3b 및 베타 액틴 (beta actin)에 주목하여 다음 실험을 진행하였다. 상기 두 단백질의 2-DE 사진을 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0087] **실시예 3: 효소 치료 전후의 iC3b 및 베타 액틴의 발현 수준 확인**
- [0089] 다음으로, 상기 기능 분석을 통하여 파브리병의 병인에 유의한 연관관계가 있을 것으로 예상되는 iC3b 및 베타 액틴에 대하여 웨스턴 블롯 (Western blot) 방법으로 발현을 검증하였다.
- [0090] 구체적으로, 연령과 성별을 맞춘 7 명의 파브리병 환자에서 효소 치료 후 3 - 12 개월 마다 혈장을 채집하였으며, 효소 치료 후 64.5 ± 15.2 (46 - 96)개월까지 혈장에서 iC3b 및 베타 액틴 단백질의 장기간 발현 양상을 웨스턴 블롯으로 조사하였다.
- [0091] 그 결과 iC3b 및 베타 액틴이 효소 치료를 함에 따라서 장기적으로 발현 양상이 점차 감소함을 알 수 있었다 (도 3 내지 도 5). 따라서, 본 발명의 iC3b 및 베타 액틴은 파브리병의 효소 치료가 효과적으로 이루어졌는지

확인할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었으며, 정상인에서 상기 마커들이 파브리병 환자에 비해 유의적으로 낮은 수준으로 발현될 것임을 예측할 수 있었다.

[0093] 실시예 4: 정상인과의 비교

[0095] 정상인에서 iC3b 및 베타 액틴이 파브리병 환자에 비해 유의적으로 낮은 수준으로 발현되는지 확인하기 위해, 정상인 및 파브리병 환자에서 iC3b 및 베타 액틴 단백질의 발현 수준을 비교하였다.

[0096] 구체적으로, 연령과 성별을 맞춘 8 명의 정상인 및 8 명의 효소 치료 전 파브리병 환자에서 채집한 혈장에서 iC3b 및 베타 액틴의 발현 양상을 웨스턴 블롯으로 비교하였다. 상기 8 명의 정상인 및 8 명의 효소 치료 전 파브리병 환자에서 확인된 결과를 정상인 평균 및 파브리병 환자 평균으로 나타내었으며, 이를 Wilcoxon signed rank test로 통계 분석을 수행하였다.

[0097] 그 결과 iC3b 및 베타 액틴 모두 파브리병 환자의 혈장에서 정상인 보다 통계적으로 유의한 수준으로 높은 값을 보이는 것을 알 수 있었다 (도 5). 따라서 예상한 바와 같이 본 발명의 마커인 iC3b 및 베타 액틴은 파브리병의 효소 치료 과정에서의 효과를 평가할 수 있을 뿐만 아니라, 파브리병의 진단 마커로도 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0099] 실시예 5: 기존 마커와의 비교

[0101] 본 발명에서 확인된 마커의 효과를 더 확인하기 위하여, 기존에 알려진 파브리병 진단 마커와 함께 발현 수준을 비교하였다. 구체적으로, iC3b의 효소 치료 후 장기간의 변화 양상을 기존에 파브리병에서 진단적 바이오 마커로 사용되어 왔던 Gb3의 발현 양상과 비교하였을 때, 유사한 패턴을 보이는 것을 확인하였다 (도 6). 한편, Gb3의 변화 양상은 치료 후 단기간 내에 정상화되어 치료 효과를 정확히 판단하기에는 부족하였으나, iC3b의 경우 효소 치료에 따라 그 수준이 점진적으로 감소함을 알 수 있었다. 또한 효소 치료제의 공급이 원활하지 않았던 시기 동안 Gb3는 대부분의 환자에서 수치의 큰 변화가 없었으나, iC3b는 일부 환자에서 수치가 증가함을 확인할 수 있어서, iC3b가 Gb3 보다 더욱 유용하게 효소 치료의 적절성 및 장기적 치료 효과를 판명하는데 도움이 되는 바이오 마커로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0103] 실시예 6: 파브리병 마우스 모델에서의 혈장 iC3b 측정

[0105] 본 발명에서 확인된 마커의 유의성을 파브리병 마우스 모델을 통하여 확인하고자 하였다. 10주령의 파브리 마우스 모델 (kindly provided by Dr. Roscoe O. Brady of the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)) 4마리, 및 연령과 성별을 맞춘 3마리의 정상 마우스에서, 혈장 iC3b 레벨을 측정하였다.

[0106] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 파브리 마우스의 혈장에서 iC3b 레벨이 증가된 것을 확인할 수 있었다 ($P=0.006$, Student t test).

[0108] 실시예 7: 파브리 환자의 신조직에서의 보체계 활성화도 조사

[0110] 추가로 파브리 환자의 신조직 소견을 통하여, iC3b를 포함한 보체계의 활성화도를 조사하여, 본 발명에서 확인된 마커의 유의성을 확인하고자 하였다.

[0111] 구체적으로, 11명의 classical Fabry disease를 보인 남성 환자의 신조직 소견을 조사하였다.

[0112] 그 결과, 도 8의 표에 나타난 바와 같이, 사구체의 전체적 경화가 5명, 분절성 초점성 경화가 1명, 세뇨관의 경화가 5명, 간질 염증이 5명에서 보였다.

[0113] 특히, 면역형광검사에서 면역글로불린 IgM 및 C3 보체가 각각 7명 및 8명에서 보이는 소견을 확인할 수 있었다. 이러한 면역 침전물은 다양한 정도로 사구체 혹은 메산지움에 축적된 것을 확인할 수 있었다(도 9의 C 및 D).

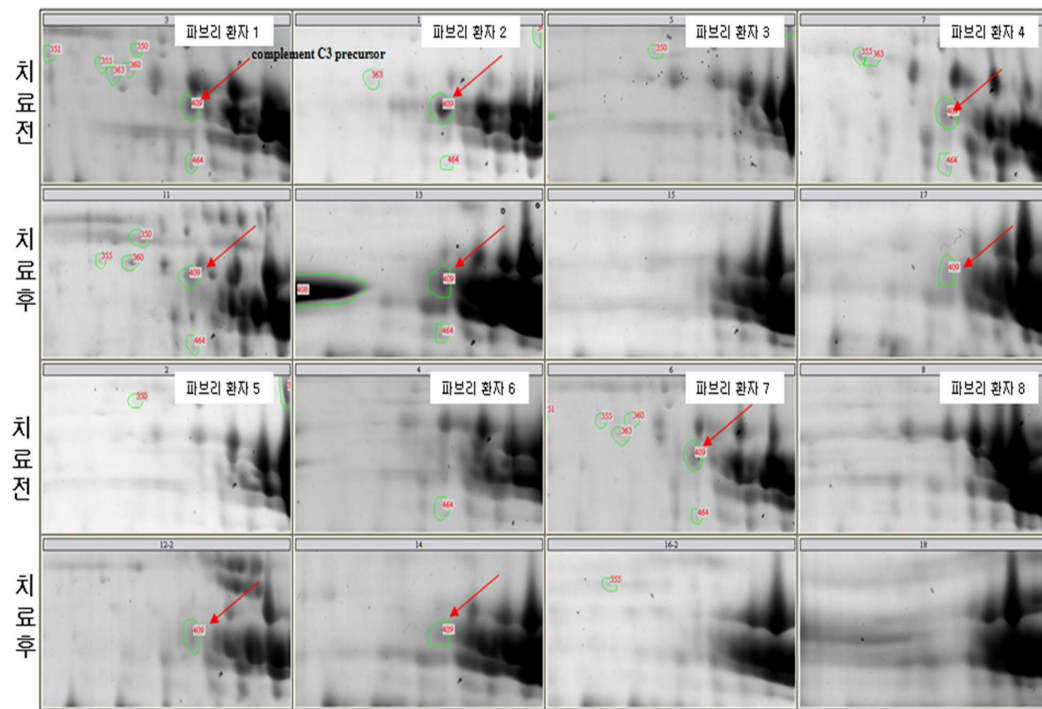
[0114] 한편, 기존의 마커인 Gb3를 함유하는 침전물은 모든 환자의 사구체 혹은 세뇨관에서 발견되었다(도 9의 A 및 B).

[0116] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

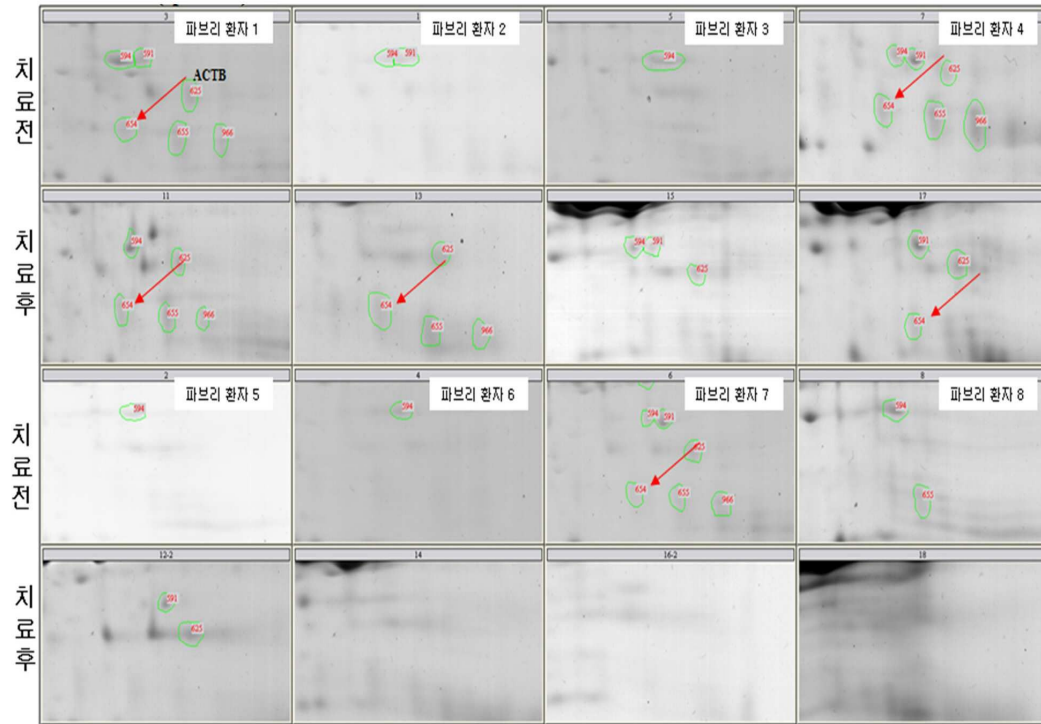
도면1

iC3b (spot 409)

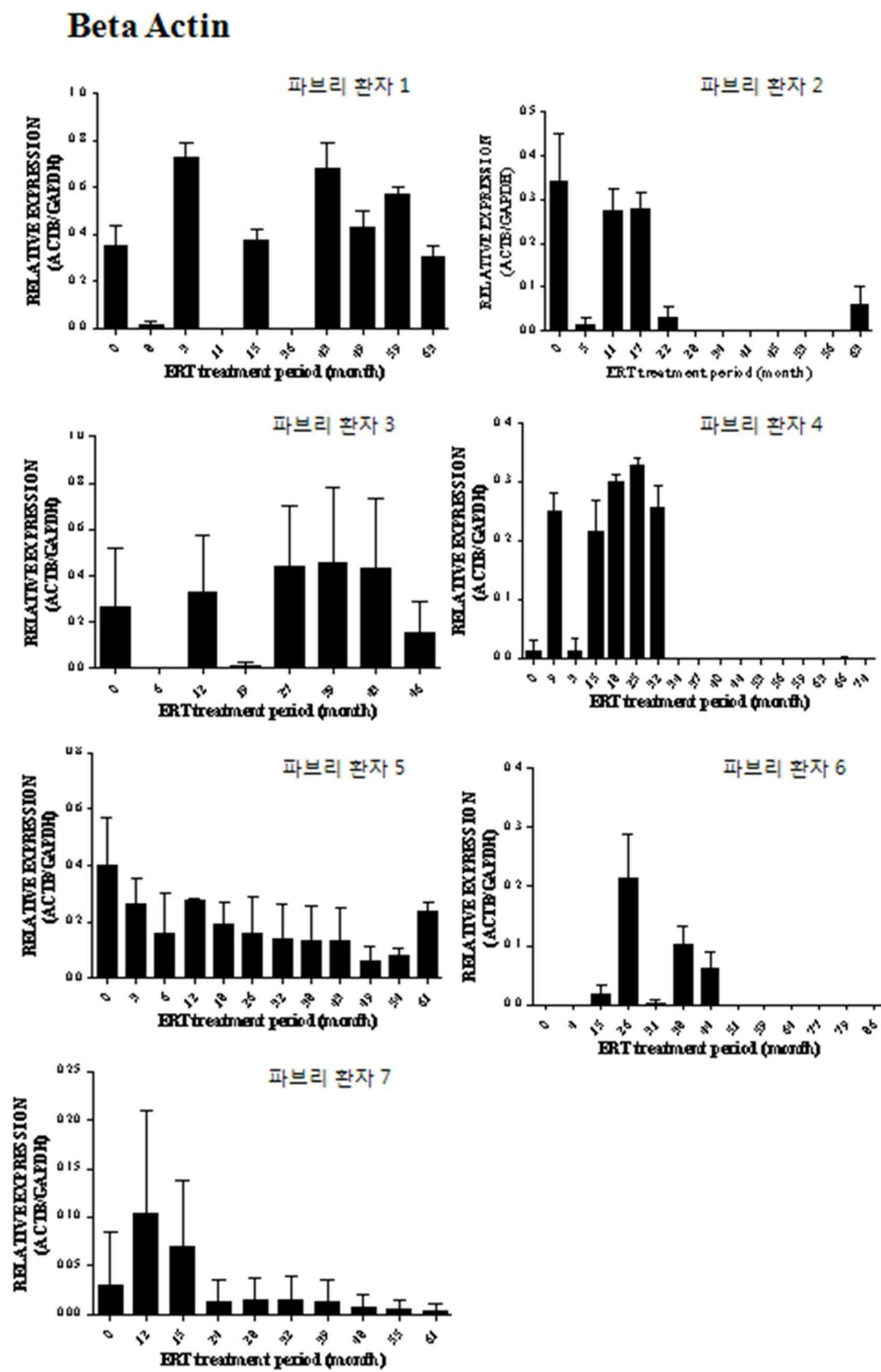


도면2

Beta Actin (spot 654)

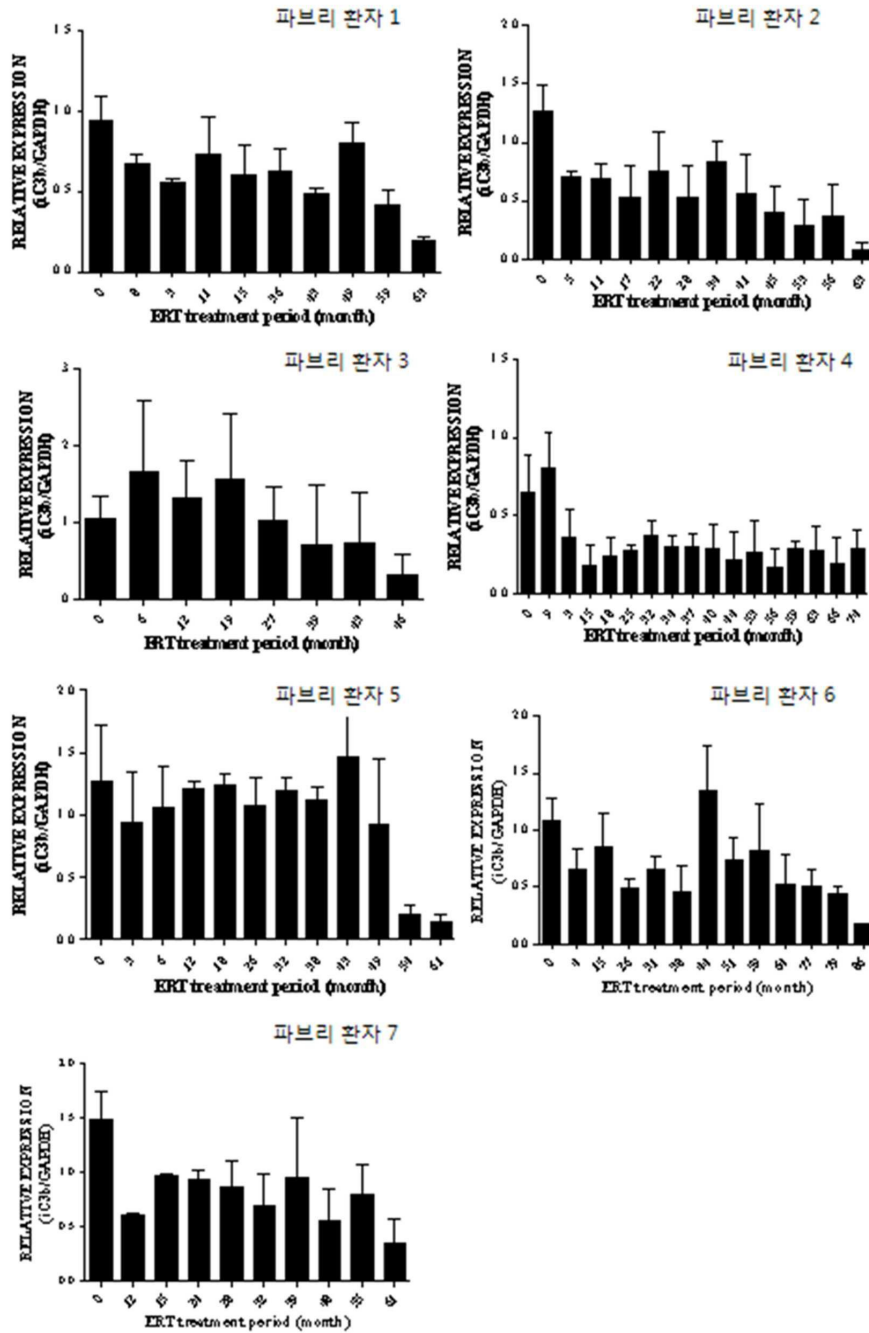


도면3

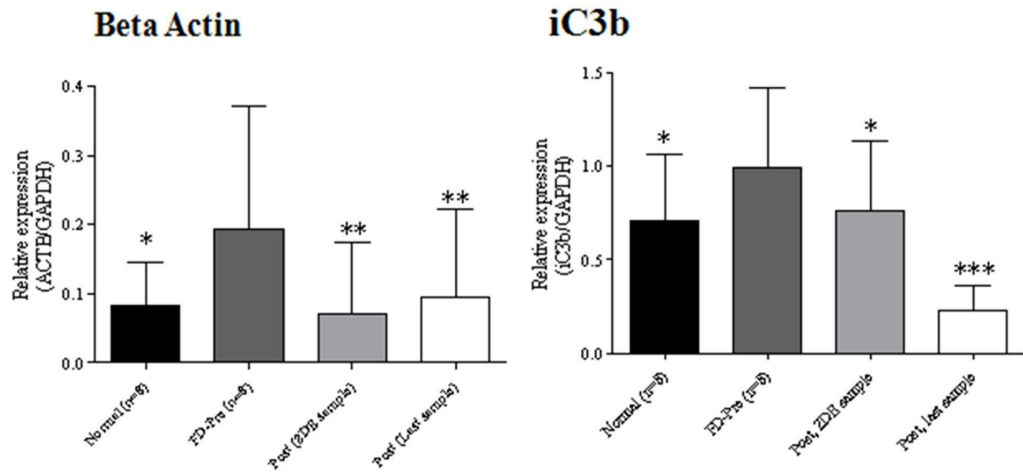


도면4

iC3b

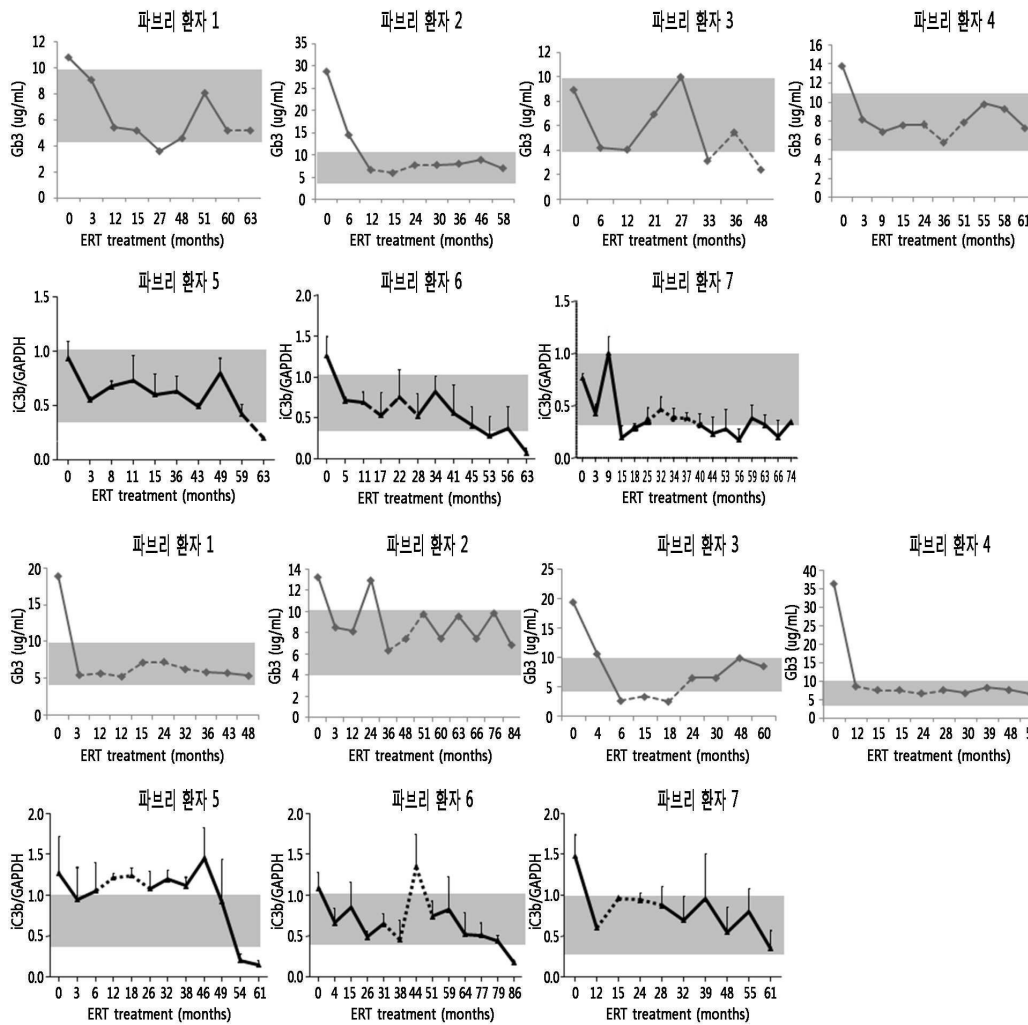


도면5

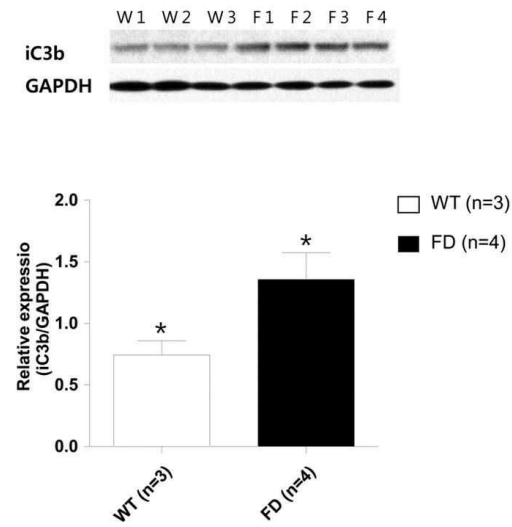


Wilcoxon signed rank test was done between each samples and FD-Pre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)

도면6



도면7



도면8

Gender	Fabry disease	GS (%)	FSGS (%)	Interstitial fibrosis	Tubular atrophy	Gb-containing deposits	Ig G	IgM	IgA	C3	C4	C1q
M/24	Classical	5%	0%	-	-	Gepi (4), Tepi (4), Pepi (4), Aendo (3), Awall (3), Gendo (3)	-	-	-	M (2)	-	-
M/31	Classical	0%	0%	+	±	Gepi (4), Tepi (3), Gendo (2)	-	M (2)	p (1)	M (2), p (2), T (2)	p (1)	M (1)
M/47	Classical	0%	0%	+	-	Gepi (3), Tepi (3), Gendo (2)	-	M (2)	M (1)	M (1)	-	-
M/16	Classical	0%	0%	-	+	Gepi (4), Tepi (4), Pepi (2), Awall (1), Gendo (2)	-	M (1)	-	-	-	-
M/13	Classical	0%	0%	-	-	Gepi (3), Tepi (2), Cendo (2)	-	M (2)	-	-	-	-
M/21	Classical	9%	5%	+	+	Gepi (3), Tepi (1)	-	-	-	M (2)	-	-
M/10	Classical	0%	0%	-	-	Gepi (4), Tepi (3), Gendo (2)	-	-	-	M (2)	-	-
M/36	Classical	9%	0%	+	+	Gepi (4), Tepi (4), Cendo (3), Gendo (3)	-	M (1)	-	M (1)	-	-
M/16	Classical	30%	0%	-	-	Gepi (4), Cendo (3), Gendo (2)	-	M (1)	-	-	-	M (1)
M/19	Classical	87%	0%	+	+	Gepi (4), Pepi (3), Gendo (3)	-	-	-	M (2)	-	-
M/43	Classical	0%	0%	-	-	Gepi (4), Tepi (4), Pepi (3), Cendo (2), Gendo (1)	-	M (1)	-	M (3)	-	-

A, artery; C, capillary; endo, endothelial cell; epi, epithelial cell; G, Glomerulus; GS, global sclerosis; FSGS, focal segmental glomerular sclerosis; M, mesangium; P, parietal; p, periphery; T, tubule Parenthesis, density (1, minimal; 2, small amount; 3, moderate amount; 4, large amount)

도면9

