(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0173248
(43) 공개일자 2024년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0070929
(22) 출원일자 2023년06월01일
심사청구일자 2023년06월01일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
차의과학대학교 산학협력단
경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍수종
서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 24동 902호
김정현
서울특별시 강남구 헌릉로590길 63, 507동 1103호
신윤호
서울특별시 강남구 개포로109길 9, 211동 608호
(74) 대리인
특허법인더웨이브

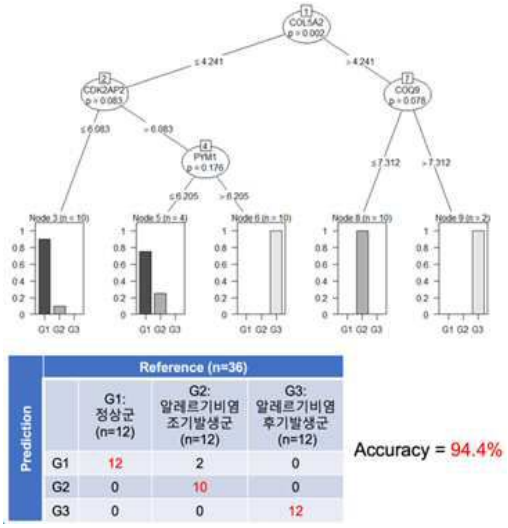
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기 예측 또는 진단용 조성물, 진단 키트, 정보제공방법 및 알레르기비염 예방 또는 치료제 선별방법**

(57) 요 약

알레르기 비염 발생 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 알레르기 비염의 진단 방법에 관한 발명으로서, 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1 단백질 또는 유전자를 확인하고, 이를 사용한 Decision tree 예측모델 분석을 통해 알레르기비염의 조기 및 후기 발생을 예측할 수 있고, 알레르기비염의 표현형 및 예후예측의 조기진단에 활용될 수 있을 뿐 아니라, 향후 신약개발 타겟 및 치료 분야에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/136 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711179661
과제번호 2021R1A2C2095664
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 혈중 다중오믹스 기반 소아 천식 기전 규명을 통한 내재형 지표 및 개인 맞춤형 치료 타겟 발굴
기 여 율 90/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711172411
과제번호 2022R1F1A1075231
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 혈액 전사체 기반 한국 소아 알레르기비염 표현형 기전 규명과 내재형 발굴, 조기 진단 및 치료적 표적 발굴
기 여 율 10/100
과제수행기관명 차의과학대학교
연구기간 2022.06.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

COL5A2, CDK2AP2, COQ9 및 PYM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 진단용 키트.

청구항 5

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알레르기 비염 발생 여부 및 시기 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 높게 나타나고, 상기 COQ9의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 낮게 나타나면 대상체가 알레르기비염 조기발생군일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 높게 나타나고, 상기 COQ9의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 높게 나타나면 대상체가 알레르기비염 후기발생군일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 낮게 나타나고, 상기 CDK2AP2의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 낮게 나타나면 대상체가 정상군 또는 알레르기비염 조기발생군일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 5에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 낮게 나타나고, 상기 CDK2AP2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 높게 나타나며, PYM1의 활성 또는 발현 수준이 정상군보다 낮게 나타나면 대상체가 정상군 또는 알레르기비염 조기발생군일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 5에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 낮게 나타나고, 상기 CDK2AP2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 높게 나타나며, PYM1의 활성 또는 발현 수준이 정상군보다 높게 나타나면 대상체가 알레르기비염 후기발생군일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 5에 있어서, 생물학적 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

청구항 5에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 단계는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA:RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

청구항 13

청구항 5에 있어서, 상기 단백질 활성 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블럿팅(Western Blotting), 효소면역분석법(ELISA; enzyme linked immunosorbent asay), 방사능면역분석법(RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역 전기영동, 면역조직화학, 면역침전분석법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

청구항 14

알레르기비염 예방 또는 치료제의 스크리닝방법으로서, 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 및 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 생물학적 시료에서 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준이 증가 또는 감소한 경우, 상기 후보물질을 알레르기비염 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 스크리닝방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기 예측 또는 진단용 조성물, 진단 키트, 정보제공방법 및 알레르기비염 예방 또는 치료제 선별방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비염은 바이러스, 세균 또는 자극물에 의한 코의 점막에서의 만성 또는 급성 염증에 의해 발생한다. 염증은 일반적으로 콧물, 코막힘(nasal congestion) 및 후비루(postnasal drip)를 일으키면서, 과도한 양의 점액질 생산을 야기한다.

[0003] 알레르기성 비염은 전 세계 사람들의 20 % 이상에서 발생하는데 유병률은 매년 증가하고 있다. 알레르기성 비염은 먼지나 꽃가루와 같은 실내외의 알레르기 항원(allergen)에 대응한 전염증성 (proinflammatory) 면역 반응으로, 사회 생활, 수면, 학교 및 직장에서 문제를 야기하여 환자의 삶의 질은 비염의 정도와 지속 시간에 의해 달라질 수 있다. 따라서 비염의 조기 진단 및 예방이 중요하다.

[0004] 최근 비염의 자연경과를 분석한 결과 다양한 표현형이 존재함을 확인되었고, 피검자에게 알레르기 항원 반응에 대한 민감도와 특이도가 떨어지는 경우 등이 있어 비염 여부를 진단함에 어려움이 있다. 또한 소아 알레르기비염은 한국 소아에서 40~50% 유병률을 나타내고 있는 가장 흔한 호흡기질환 중의 하나이지만 어린 나이에 발생하는 콧물, 코막힘(nasal congestion) 또는 후비루(postnasal drip)등의 증상이 비염인지 확진하는 것은 더욱 어렵다.

[0005] 따라서, 알레르기비염의 표현형(phenotype)과 내재형(endotype)에 따른 새로운 예후예측 바이오마커 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 및 PYM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 상기 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 진단용 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알레르기 비염 발생 여부 및 시기 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 알레르기비염 예방 또는 치료제의 스크리닝방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 및 PYM1으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 명세서의 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 진단은 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측하는 것이다. 상기 예측은 병세의 진행, 회복에 관한 전망 내지는 예비적 평가를 의미한다. 구체적으로 상기 예측은 알레르기비염 발생 위험 개체에서 알레르기비염 발생 여부, 발생시기 등을 판단하는 것이다.

[0012] 본 명세서의 용어, "알레르기비염"은 먼지나 꽃가루와 같은 실내외의 알레르기 항원(allergen)에 대응한 전염증성(proinflammatory) 면역 반응으로 코의 점막에서의 만성 또는 급성 염증에 의해 발생한다. 상기 염증은 일반적으로 콧물, 코막힘(nasal congestion) 및 후비루(postnasal drip)를 일으키면서, 과도한 양의 점액질 생산을 야기한다.

[0013] 본 명세서의 용어 "알레르기비염 발생시기"는 알레르기비염의 증상이 처음 발생하는 시기를 의미한다. 상기 발생시기는 조기발생과 후기발생으로 나눌 수 있다. 상기 조기발생은 2-3세 이전에 증상이 발생하여 4-5세에 피크에 이르는 것을 의미하고, 상기 후기 발생은 4-5세 이후에 증상이 발생하여 6-8세에 피크에 이르는 것을 의미한다.

[0014] 본 명세서에서 용어 정상군(G1)은 알레르기비염이 발생하지 않은 피험자군을 의미한다.

[0015] 본 명세서에서 용어 알레르기비염 조기발생군(G2)은 2-3세 이전에 알레르기비염 증상이 시작된 군을 의미한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 알레르기비염 후기발기발생군(G2)은 4-5세 이후에 알레르기비염 증상이 시작된 군을 의미한다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "바이오마커 (biomarker) 또는 마커(marker)"는 정상군 개체와 알레르기 비염 발생 위험이 있는 개체를 구분하여 알레르기비염 발생 여부 진단 또는 알레르기비염 발생 시기를 예측할 수 있는 물질로, 알레르기비염 발생 위험이 있는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 등과 같은 유기 생체분자들을 모두 포함할 수 있다. 일 구체예에서는, 알레르기 비염 발생 위험이 있는 개체에서 그 발현 수준이 변화되는 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 명세서의 용어, "COL5A2 (NCBI GenBank accession number, NM_000393), CDK2AP2 (NM_001271849), COQ9 (NM_020312) 및 PYM1 (NM_001143853)"는 정상군(G1), 알레르기비염 조기발생군(G2) 및 후기발생군(G3)의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 유전자 또는 단백질이다.

[0019] 상기 유전자는 NCBI GenBank 등 공지의 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니

나, 상기 COL5A2은 인간에서 NCBI Gene ID: 0000의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 또는 EnsEMBL ID: ENSG00000129988의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 의미하는 것일 수 있다. 또한 상기 유전자가 발현된 단백질인 "COL5A2 (NCBI accession number, NP_000384), CDK2AP2 (NP_001258778), COQ9 (NP_064708) 및 PYM1 (NP_001137325)"을 의미한다.

[0020] 본 명세서에서 용어, "유전자 발현 수준 측정"은 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 마커 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 수행될 수 있다. 상기 mRNA 수준 측정을 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응 (RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응 (Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응 (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (Rnase protection assay), 노던 블롯팅 (Northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 칩(DNA 칩) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 명세서의 용어 "유전자의 발현 수준을 측정하는 제제"란 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기에 따라 발현 수준이 증가 또는 감소하는 마커인 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 상기 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.

[0022] 일 구체예에 있어서 상기 유전자 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 명세서의 용어 "프라이머"는 타겟 유전자 서열을 인지하는 정방향 및 역방향의 프라이머로 이루어진 모든 조합의 프라이머 쌍을 포함하며, 바람직하게는 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍을 의미하는 것일 수 있다. 상기 프라이머는 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트, 중합반응 효소 존재, 온도, 완충액 등)하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15~30 뉴클레오타이드이다.

[0024] 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한 상기 프라이머는 표적 유전자의 mRNA(즉, cDNA) 서열에 상보적인 서열로 제조될 수 있다. 이러한 프라이머의 디자인은 표적 유전자의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있다.

[0025] 본 명세서의 용어 "프로브"는 생물학적 시료 내의 검출하고자 하는 타겟 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 타겟 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 구체적으로, 상기 프로브는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 구체적으로 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편일 수 있고, 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현 양을 확인할 수 있다.

[0026] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 상기 프라이머 또는 프로브는 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0027] 본 명세서의 용어, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체로서, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 유전자들의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 이는 상기 유전자 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드의 길이는 6 내지 100 염기, 바람직하게는 8 내지 60 염기, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 통상의 방법으로 시험관 내에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오티드가 합성되도록 할 수 있다.

[0028] 일 구체예에 있어서, 상기 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앱타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을

포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 명세서의 용어, "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')2 또는 Fv 등일 수 있다. 또한 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 상기 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 상기 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976)European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58,1-597, 1991 참조) 등을 이용하여 제조될 수 있다.

[0030] 본 명세서의 용어, "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 의미한다. 구체적으로 인산-리보스당 골격을 갖는 DNA와는 달리, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가될 수 있다.

[0031] 본 명세서의 용어, "앱타머"는 표적분자에 친화적, 특이적으로 결합할 수 있는 핵산(DNA, RNA) 또는 펩타이드(peptide)를 의미한다.

[0032] 상기 단백질의 활성 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블럿팅(Western Blotting), 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent asay;ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay;RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 면역조직화학, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포 분석법(FACS) 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하여 측정하는 것일 수 있다.

[0034] 다른 양상은 상기 알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 조성물을 포함하는 알레르기비염 진단용 키트를 제공한다.

[0035] 상기 알레르기비염, 유전자 발현의 수준 측정 및 단백질 활성 수준 측정은 전술한 바와 같다.

[0036] 상기 키트는 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드 (rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 키트는 분석방법에 적합한 하나 이상의 다른 구성성분, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0037] 예를 들어, 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함할 수 있으며, 그 외 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNAse, RNAse 억제제 DEPC-수 (DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 상기 DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판 및 형광 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있으며, 상기 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출 할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체 와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다. 상기 단백질 칩 키트는 마커에 대한 하나 이상의 항체가 기판 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되 어 있는 키트일 수 있다. 상기 단백질 칩은 생물학적 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화시켜 항원-항체 복합체를 형성하고, 이를 판독하여 단백질의 존재 또는 발현수준을 확인하는 방식으로 사용할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다. 상기 래피드 키트는 단백질에 대한 특이적인 항체 및/또는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 또한, 래피드 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 특이항체와 2차 항체

가 고정된 니트로셀 룰로오스 멤브레인, 항체가 결합된 비드에 결합된 멤브레인, 흡수패드와 샘플 패드 등의 다른 물질을 포함할 수 있다.

[0038] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 통합 자기-전기화학 센서(integrated magneto-electrochemical sensor) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 통합 자기-전기화학 센서는 자성 비드(magnetic bead)를 사용하여 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭한다. 구체적으로는, 자성 비드에 표적 물질을 검출할 수 있는 물질(예를 들면 항체)을 부착시키고, 상기 표적 물질을 검출할 수 있는 발색 물질(예를 들면 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase: HRP), 알칼리 포스파타제(Alkaline Phosphatase: ALP), α-D-갈락토시다제(α-D-galactosidase, α-Gal)에 의해서 발생되는 효소적 신호 증폭에 의한 전기적 신호를 검출하는 시스템을 지칭할 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 상기 알레르기비염 유전자 발현 수준을 측정하기 위한 제제, 장치, 및 알고리즘이 내장된 컴퓨터를 포함할 수 있고, 상기 알고리즘을 통해 상기 마커의 수준 측정 결과를 알레르기 비염과 연관시키는 키트에 관한 것일 수 있다.

[0041] 또 다른 양상은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알레르기비염 발생 여부 및 시기 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0042] 상기 알레르기비염, 단백질 또는 유전자의 활성 또는 발현의 수준 측정은 전술한 바와 같다.

[0043] 본 명세서의 용어, "목적하는 개체"란 알레르기비염 발생 여부가 불확실한 개체를 의미한다.

[0044] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"는 알레르기비염 관련 질병에 걸리거나 걸릴 위험이 있는 개체로부터 분리된 시료, 배양된 세포 또는 분변일 수 있다. 구체적으로, 상기 생물학적 시료는 기관지 생검, 폐 생검, 비강 생검, 부비동 생검, 객담(sputum), 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid; BALF), 비강 세척액(nasallavage fluid), 비강 도말(nasal swap), 비강 흡인액 (nasal aspirate), 비인두 도말(nasopharyngeal swab), 비인두 흡인액(nasopharyngeal aspirate), 비인두 세척액(nasopharyngeal lavage fluid), 전혈(whole blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 눈물(tears), 점액(mucus), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract), 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 또는 이들의 조합일 수 있고, 바람직하게는 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 일 구체예에 있어서, 상기 알레르기 비염 발생 여부 및 시기 예측을 위한 정보 제공 방법은 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군(G1)에 비해 높게 나타나고, 상기 COQ9의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 낮게 나타나면 대상체가 알레르기비염 조기발생군(G2)일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법일 수 있다.

[0046] 또한 일 구체예에 있어서, 상기 알레르기 비염 발생 여부 및 시기 예측을 위한 정보 제공 방법은 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군(G1)에 비해 높게 나타나고, 상기 COQ9의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 높게 나타나면 대상체가 알레르기비염 후기발생군(G3)일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법일 수 있다.

[0047] 또한 일 구체예에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군(G1)에 비해 낮게 나타나고, 상기 CDK2AP2의 활성 또는 발현 수준이 대조군에 비해 낮게 나타나면 대상체가 정상군 또는 알레르기비염 조기발생군(G2)일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법일 수 있다.

[0048] 또한 일 구체예에 있어서, 상기 COL5A2의 활성 또는 발현 수준이 정상군(G1)에 비해 낮게 나타나고, 상기 CDK2AP2의 활성 또는 발현 수준이 정상군에 비해 높게 나타나며, PYM1의 활성 또는 발현 수준이 정상군(G1)보다 낮게 나타나면 대상체가 정상군(G1) 또는 알레르기비염 조기발생군(G2)일 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법일 수 있다.

[0049] 상기 정상군(G1), 알레르기비염 조기발생군(G2), 알레르기비염 후기발생군(G3)은 전술한 바와 같다.

[0050] 본 명세서에서 용어 "유전자 발현의 수준 증가"는 정상군(G1)에 비해 개체의 시료 내 mRNA의 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 증가된 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배, 1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배 또는 2.5배 증가된 경우를 의미할 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "유전자 발현의 수준 감소"는 정상군(G1)에 비해 개체의 시료 내 mRNA의 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 의미하며, 예를 들어 0.1배 이하로 감소된 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 0.1배 내지 0.9배, 구체적으로, 0.1배, 0.2배,0.3 배, 0.4배, 0.5배, 0.6배, 0.7배, 0.8배 또는 0.9배 감소된 경우를 의미할 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 용어 "단백질 활성의 수준 증가"는 정상군(G1)에 비해 개체의 시료 내 단백질의 활성이 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 예를 들어 1.1배 이상 증가된 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 1.1배 내지 2.5배, 구체적으로, 1.1배, 1.2배,1.3 배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배,1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배 또는 2.5배 증가된 경우를 의미할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어 "단백질 활성의 수준 감소"는 정상군(G1)에 비해 개체의 시료 내 단백질의 활성이 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 의미하며, 예를 들어 0.1배 이하로 감소된 경우를 의미할 수 있다. 예를 들어, 0.1배 내지 0.9배, 구체적으로, 0.1배, 0.2배,0.3 배, 0.4배, 0.5배, 0.6배, 0.7배, 0.8배 또는 0.9배 감소된 경우를 의미할 수 있다.

[0054] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 알레르기 비염 발생 여부 또는 발생 시기의 예측을 위한 정보를 제공하기 위해, 상기 유전자의 수준을 측정 및 분석한 결과에 추가하여, 개체의 상기 마커 이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 임상정보란, 예를 들면 환자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 초음파, 전산화 단층촬영(CT), 자기공명영상(MRI), 혈관조영술 등을 포함한다.

[0055] 또 다른 양상은 알레르기비염 예방 또는 치료제의 스크리닝방법으로서, 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계; 및 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 상기 생물학적 시료에서 COL5A2, CDK2AP2, COQ9 또는 PYM1 유전자의 발현 수준이 증가 또는 감소한 경우, 상기 후보물질을 알레르기비염 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 스크리닝방법을 제공한다.

[0056] 상기 알레르기비염, 유전자 발현의 수준 측정 및 단백질 활성 수준 측정은 전술한 바와 같다.

[0057] 본 명세서에서 용어 "후보물질"은 통상적인 선정방식에 따라 알레르기비염 예방 또는 치료의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나, 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물, 또는 화합물 등일 수 있다. 본 명세서에서 용어 "대조군"은 상기 후보물질을 처리하지 않은 분리된 세포, 분리된 조직 또는 인간을 제외한 동물로, 상기 후보물질을 처리한 군과 병렬 관계에 속하는 분리된 세포, 분리된 조직 또는 인간을 제외한 동물을 의미한다.

발명의 효과

[0058] 일 양상에 따른 알레르기비염 발생 진단용 조성물, 키트 및 이를 이용한 알레르기 비염의 진단 방법에 따르면, 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1 단백질 또는 유전자를 확인하고, 이를 사용한 Decision tree 예측모델 분석을 통해 알레르기비염 발생 여부 또는 시기를 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 혈액의 전체 전사체에 대하여, numeric regression을 이용한 그룹별 비교분석을 실시하여 $P < 0.001$의 유의성 높게 발현의 차이를 보이는 유전자들을 각각 그룹 비교별로 181개, 687개, 349개, 463개 및 Decision tree 예측모델 분석을 위하여 선발된 후보 유전자 14개를 확인한 결과를 나타낸 모식도이다.

도 2는 정상군(G1), 알레르기비염 조기발생군(G2) 및 알레르기비염 후기발생군(G3)의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 유전자들(COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1)을 활용하여 Decision tree 프로그램을 이용해 알레르기비염 발생 여부 또는 시기에 대한 예측모델 분석을 진행한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] **실시예 1. 대상 피험자의 특성**

[0062] 실험에 참여한 피험자의 인구통계학적 및 임상적 특성은 다음과 같다.

[0063] 구체적으로, 호흡기 알레르기 전문의의 상세한 진료 진행 후, 진찰 내용은 증상기록지로 기록되었다. 알레르기 질환 여부는 최근 12개월 동안의 해당 질환과 관련된 증상, 진단, 치료 등에 대한 질문과 신체검사를 통해 정의하였다. 알레르기비염 증상의 경우 최근 12개월 동안 알레르기비염으로 진단 받은 적이 있고, 적어도 2개 이상의 증상(맑은 콧물, 비폐색, 재채기 또는 가려움)이 있었던 경우로 정의하였다.

[0064] 정상군(G1;Healthy controls) 12명, 알레르기비염 조기 발생군(G2) 12명 및 알레르기비염 후기 발생군(G3) 12명을 선별하였다.

[0066] **실시예 2. 각 대상군별 알레르기 증상 확인**

[0067] 소아 알레르기비염 조기발생군(G2), 후기발생군(G3) 및 정상군(G1)의 알레르기 증상을 확인하기 위해 가장 일반적으로 민감하게 반응하는 알레르겐에 대한 검사를 실시하였다.

[0068] 구체적으로, 유럽과 미국 집먼지진드기항원, 곰팡이 항원 2종(알테나리아, 아스페르길루스), 꽃가루 항원 3종(자작나무, 오리나무, 참나무), 개털 항원, 고양이털 항원, 쑥 항원, 환삼덩굴 항원, 잡초 항원, 바퀴벌레 항원 등을 검사하였다.

[0070] **실시예 3. 차별적으로 발현된 유전자(DEG)의 발현 변화 확인**

[0071] **3.1 차별적으로 발현된 유전자(DEG)의 확인**

[0072] 소아 알레르기비염 조기발생군(G2), 후기발생군(G3) 및 정상군(G1)의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 선별하기 위해, 각 대상군별 유전자의 mRNA양을 측정하였다. 구체적으로, RNA 보존제가 포함된 전용 PAXgene Blood RNA Tube(PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland)에 보관된 혈액조직에서 PAXgene Blood RNA kit(PreAnalytiX)로 추출한 total RNA로 GeneChip WT 증폭 키트(Affymetrix, Santa Clara, CA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 제조사의 지침에 따라 GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array(Affymetrix)로 혼성화하였다. GCS3000 스캐너(Affymetrix)를 사용하여 어레이를 스캔한 후, Affymetrix GeneChip Command Console 소프트웨어를 사용하여 데이터 품질 검사, 배경 보정 및 정화 등의 분석을 수행하였다.

[0073] 전체 전사체에 대하여, numeric regression을 이용한 그룹별 비교분석(1.조기발생군 vs. 후기발생군, 2.정상군 vs. 전체 비염군, 3.정상군 vs. 조기발생군, 4.정상군 vs. 후기발생군)을 실시하여 $P < 0.001$의 유의성 높게 발현의 차이를 보이는 유전자들을 각각 181개, 687개, 349개, 463개를 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0074] 도 1에 나타낸 바와 같이, 조기발생군과 후기발생군을 구분하면서 정상군을 포함하는 다른 그룹 비교에서도 중복되는 중요한 후보 유전자 14개를 선별하였다.

[0075] 선별된 14개 후보 유전자에 대하여 R 언어 3.6.0(http://www.r-project.org)의 조건부 추론 트리(Ctree) 기능을 사용하여 소아 알레르기비염 표현형 간의 유전자 발현에 따른 의사결정(DecisionTree)을 수행하였다.

[0076] 상기 결과에 따라, 소아 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1 유전자를 선별하였다.

[0077] **3.2 COL5A2 발현 변화 확인**

[0078] 실시예 3.1의 방법에 따라 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석하고, COL5A2 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 구체적으로, 본 발명에서 언급된 COL5A2의 경우, GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array에서 사용된 31개 probe를 이용하여 유전자발현을 측정하였다. 상기 COL5A2 유전자 발현 측정용 probe 정보는 표 1에 나타내었다.

표 1

[0079]

Probe_id	Probe_sequence	서열번호
2444768	AAGGACCGTCCATCGAATTTCTCAC	1
417593	CCGTGCGAACGGGTAGTATCTAGAA	2
2073982	AGGCCATATAGCAAGAAGTTCTGTG	3
220082	CGTTTGGGTAGGTCACATGGTGCAT	4
2523823	ATGTCGACGAGAACCCCTATAGTAC	5
535891	CGGGTCAACCAGGAAGTCCATTTCT	6
799696	GAGGTTACCAGGACATCCCCTTGGA	7
2391235	TTGCTGGCCCGTCTCTCCTTAACAA	8
567560	GAGGTCCAGAAGCACCCCTGGGACC	9
2460217	TAAAGGACCAAGACGCCCGTCTCAA	10
2468562	ACAAGGACCTGATTTTCCACCAGCT	11
2272560	CAAGAGCTCCACTTTTACCCGGTTG	12
2593136	GGAGCTCCAAATCAACCGGGAGGAC	13
2557752	CAGGCCGTCCAGGATGACCTCTTTT	14
2200019	GTCCAGAAGTTCCATACGGCCCTCT	15
1072589	TCGTCAACCGGGCAATCCTGGATCT	16
2034958	GAGGTCCGAGGTATCCTTAGTCTCC	17
1208455	CCACGAGGACCGTTAGCACCAAAAG	18
2366563	CGGTGTACCATAAGTCCCAGGCTAT	19
771243	AGAGGTCCTGGAGTCCCATCGTGAC	20
2305857	CAGGTCAACCGAGAGGTCCAGAAGG	21
451440	CAGGAGAACCCTATGGTCCGAGAAG	22
2258053	GGGTGACCAGGTTACCCACGGTACC	23
56652	GTGTTTCCAGAACTTCCGGGATTTC	24
2174682	CCCGAGGACCAGAAGGTCCAGACTT	25
794977	CAGGCTAACCAAGTGCACCTGGTCT	26
753002	AACCCTCAGTTCATCCTGATTACGG	27
2159269	CCCTCTTGGTCCTAATCACGGACAA	28
1914577	ACCTCGGTAAGAGACACTGTTCTAT	29
988701	TTTGACCCGCCTTCGTTCTGGAGAG	30
33353	AACGAACCGTCTGTGACCTACCAAT	31

[0080] **3.3 CDK2AP2 발현 변화 확인**

[0081] 실시예 3.1의 방법에 따라 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석하고, CDK2AP2 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 구체적으로, 본 발명에서 언급된 CDK2AP2의 경우, GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array에서 사용된 19개 probe를 이용하여 유전자발현을 측정하였다. 상기 CDK2AP2 유전자 발현 측정용 probe 정보는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0082]

Probe_id	Probe_sequence	서열번호
2204086	CCGGAGTCGCAGACCTGGATAGGCC	32
219279	CAGACCTGGATAGGCCGGTGACGTC	33
270309	GATCAGTCTCTCACGGACCGTCTCT	34
177874	GAGTCCTTTGGCTGTGACCTGATAG	35
1449890	CGGATCTCCTACAGGTCATAATGAT	36
2077190	AAGTTGTCCCGTTGGAACTCCTAAT	37
2508914	GACAGTCAGTATCTCCTCTACCCGT	38
45310	CTGGCGGAAGGTACCCGATGCACGT	39
462661	CCGCGAGGAAAGTCTGGCGACAAAT	40
1911838	ATTGCTGAAACCTGGCGGAAGGTAC	41
1334166	GGGCCAGGACCCGAACCTTTTCGAC	42
1278732	AGTCGTACCTTACTTCGTAGGAAAC	43
2037878	ACTGGAGAATGAGCGCGGACAACGA	44

1247259	GGACTCAAGACGTTATGACCCGGAC	45
654701	GAGCTTCTCTTCTGCCGGACTCAAG	46
1304507	AGCTCCAGAGCTTCTCTTCTGCCGG	47
2543333	TAGAAGCGCGTGGTTAGCCCTCACT	48
108379	GTCCAGAGCCGGTTATTCCTCCGAG	49
1977478	AGGCCGGTCTGGAGATAAATGGTCC	50

[0083] **3.4 COQ9 발현 변화 확인**

[0084] 실시예 3.1의 방법에 따라 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석하고, COQ9 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 구체적으로, 본 발명에서 언급된 COQ9의 경우, GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array에서 사용된 26개 probe를 이용하여 유전자발현을 측정하였다. 상기 COQ9 유전자 발현 측정용 probe 정보는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0085]

Probe_id	Probe_sequence	서열번호
1573620	GCACCCGCTGCACGGGCGAAGGTTT	51
865902	ACCAGGGCATCGATGGCCAGCGCAG	52
2079033	CTCCGAGGACGTCGACGCTACGGAC	53
9223	CCTCCGAGGACGTCGACGCTACGGA	54
175807	GCGCACGGAAGGTACGAAGTCGACA	55
478285	CCCGTCTTTTTGGACTAGGTCTCAG	56
1685493	CCCGATTCCAGAAGTCTACTCGTCT	57
985210	GTCGTCGGTCGTACAAGCCCTTCCT	58
2406177	GGGCCGAGTGTGCACACGATCTTCT	59
1907010	GACGTAAAACACTGGGTCACGTTAT	60
216087	TTCTCCTTCTGTCTGGTCAAGGACT	61
91548	GGTCTGACTCTTACGACTAGGGTAT	62
1019845	ACTAGGGTATGTAACTCGTGACCGG	63
1221427	TGTACACCGTAATGCGACCCCTGGT	64
657228	CTGTACACCGTAATGCGACCCCTGG	65
644987	ACCGTAATGCGACCCCTGGTCAGGT	66
458013	GACCACTACTACGTCCTGAGGAGAG	67
2289253	CTGTGAACCGCGAAGGACCTTTTGG	68
712505	AAATTGACCATGTGGGCGGCTCGGT	69
989927	TTCCTGAGTACCCACGTCGTCACTG	70
1280131	CATTTCAGGTGTCCTCTCCGTGACC	71
1143639	CTGTCCAGATTTGGTCGCAGCCACT	72
1075284	ACTGTCCAGATTTGGTCGCAGCCAC	73
2310417	CCACGGTAGGTGTATTGGACCACAA	74
698911	ACCCGTGGAACTAGTACAGAATTGG	75
1451625	ACCCGACGAAGAAGTCAAGGATTAT	76

[0086] **3.5 PYM1 발현 변화 확인**

[0087] 실시예 3.1의 방법에 따라 알레르기비염 조기발생군, 후기발생군 및 정상군의 혈액 전사체 분석하고, PYM1 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 구체적으로, 본 발명에서 언급된 PYM1의 경우, GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array에서 사용된 29개 probe를 이용하여 유전자발현을 측정하였다. 상기 PYM1 유전자 발현 측정용 probe 정보는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0088]

Probe_id	Probe_sequence	서열번호
568195	GGGTCCATGGAAACGACGACTAAAC	77
1966937	GAACCAAGGACAAGCGCCACAAATA	78
172500	ACCTGACGTCTTGTTTGGCACCCCG	79

1096826	CGGTGGTGACTCTTTCGGTTCTTCT	80
630419	CCGGAGAGGTTCTGTCGGTTTGCAT	81
2097704	GTTGTGTCGCTGGACTGCCCTGGAC	82
279795	GTTCATATAGCGCAGTTGTGTCGCT	83
465988	CTTCGAAGACGAGACGGAAAGTAAT	84
2376114	ACACTAATGGTACACGGGATGGCAT	85
1355940	AAGGTGTGTCCTACCGGTAAGTTCT	86
233746	AAGAAAAACTGAAGTGGGAACCTAT	87
611981	AACTGAAGTGGGAACCTATGGTAGT	88
1179406	AAACTGAAGTGGGAACCTATGGTAG	89
1034550	TACCGCTGAGGGATACAATGACTGC	90
1525242	AGGGATACAATGACTGCTCTGGCCG	91
864858	ACCGCTGAGGGATACAATGACTGCT	92
1825593	GAGTGCGGCCTTCACCAAACGCAAA	93
267732	CCGAACGATGCTAGCCCTGAGGTGA	94
582715	CCACGTGAGAGGGAAATTCTGATTC	95
1017429	GACAAAATGTCCGTCGTTCGCGAGT	96
56852	CTGACACGGAGCCTTGAAGAGAACC	97
88994	TTGGCAGGGATCTTTGTGAACACGC	98
2368692	GTTCGGCGAGACTCTAGACCCACGT	99
2160226	CGCTCTTCGTTGATCCCGGGAGTAG	100
685704	CCGCTCTTCGTTGATCCCGGGAGTA	101
2589482	ACCCGCTCTTCGTTGATCCCGGGAG	102
1052976	GGATAGTTCCACTTTTCACTCTAAG	103
1208394	CCTTCCGAGTAAAGAGGATAGTTCC	104
8300	AGAAGGAGTCCTTCCGAGTAAAGAG	105

[0089] **실시예 4. 조건부 추론 트리분석 및 통계분석**

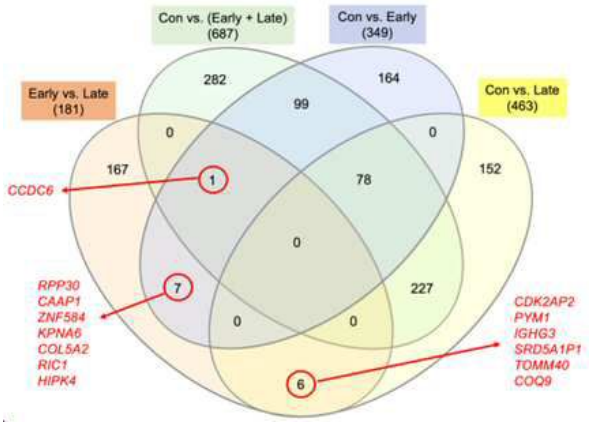
[0090] 조건부 추론 트리 기능을 사용하여 알레르기비염의 발생 시기에 따른 유전자 발현여부를 분석하였다. 구체적으로, R 패키지의 조건부 추론 트리(Ctree) 기능을 사용하여 아토피성 피부염 표현형 간의 유전자 발현 컷오프를 결정하기 위해 재귀 분할이 사용되었다. 모델의 매개 변수는 minsplit = 2, minbucket = 1, mincriterion = 0.95, testtype = "Teststatistic"및 maxdepth = 4로 설정하였다. Ctree 분석의 경우, 가장 작은 P-를 가진 각 분기점의 유전자 0.05 미만의 값이 내부 노드로 선택되었다. Ctree 모델은 R 언어 3.6.0 (http://www.r-project.org)에서 개발한 "파티"프로그램을 사용하여 구성되었다. 상기 조건부 추론 트리 기능을 사용하여 알레르기비염의 발생 시기에 따른 유전자 발현 분석결과를 도 2에 나타내었다.

[0091] 도 2는 정상군(G1), 알레르기비염 조기발생군(G2) 및 알레르기비염 후기발생군(G3)의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 유전자들(COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1)을 활용하여 Decision tree 프로그램을 이용해 알레르기비염 발생 여부 또는 시기에 대한 예측모델 분석을 진행한 결과를 나타낸 그래프이다.

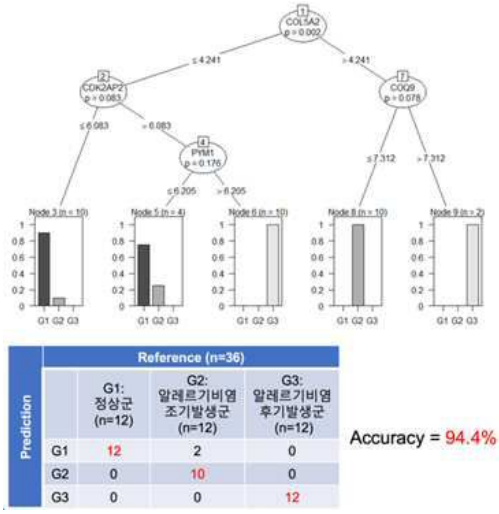
[0092] 상기 결과는 정상군(G1), 알레르기비염 조기발생군(G2) 및 후기발생군 (G3)의 혈액 전사체 분석에서 발현의 차이를 보이는 후보 유전자들 중 4개의 유전자 (COL5A2, CDK2AP2, COQ9, PYM1)로 구성된 조합이 알레르기비염 발생 여부 또는 발생 시기를 예측할 수 있는 유용한 바이오마커임을 의미한다.

도면

도면1



도면2



Prediction	Reference (n=36)		
	G1: 정상군 (n=12)	G2: 알레르기비염 조기발생군 (n=12)	G3: 알레르기비염 후기발생군 (n=12)
G1	12	2	0
G2	0	10	0
G3	0	0	12

Accuracy = 94.4%

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.