


| | | |
|---|------------------------------------|--|
|  | (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2017-0026710 (43) 공개일자 2017년03월09일 |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>C07K 14/47</i> (2006.01) <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>G01N 33/6893</i> (2013.01) <i>C07K 14/472</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0120473 (22) 출원일자 2015년08월26일 심사청구일자 2015년08월26일 | | (71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교) (72) 발명자 이광훈 서울특별시 영등포구 국제금융로7길 1 A동 1106호 (여의도동, 수정아파트) 신정우 서울특별시 서대문구 연희로32길 48, 104동 1903호(연희동, 성원아파트) (74) 대리인 윤대웅, 공병욱 |

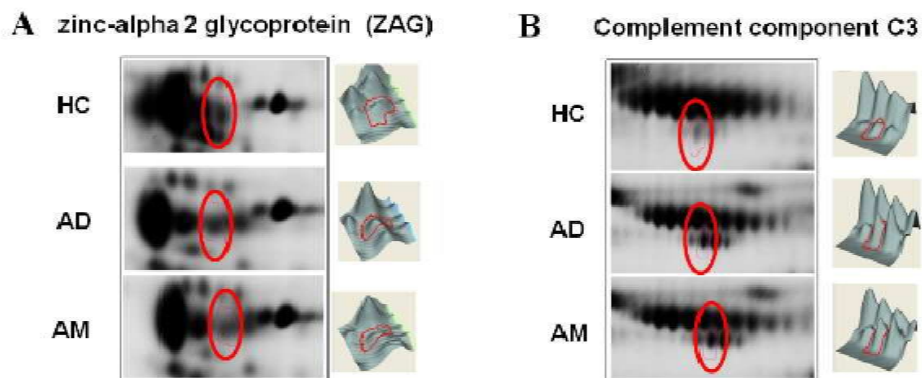
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 알레르기 행진에 대한 신규 바이오마커 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 알레르기 행진에 대한 신규한 분자 마커 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명의 마커인 ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein)는 정상인에 비하여 아토피 피부염을 동반한 알레르기성 천식 또는 비염 환자의 혈액에서 발현이 감소되어 있고, C3(complement component 3)은 정상인에 비하여 아토피 피부염을 동반한 알레르기성 천식 또는 비염 환자의 혈액에서 발현이 증가되어 있다. 본 발명의 마커를 이용하여 알레르기 행진을 조기에 예측함으로써, 생애주기별 알레르기 질환에 대한 적정 예방, 치료 및 관리가 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/473 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2013.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

G01N 2800/12 (2013.01)

G01N 2800/14 (2013.01)

G01N 2800/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0010

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 중개연구단

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 환경성 알레르기 질환의 원인, 예후 예측 인자 탐색과 이를 이용한 조기 진단 키트 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein) 또는 C3(complement component 3) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 알레르기 행진(Allergic march) 예측용 키트.

청구항 2

ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein) 또는 C3(complement component 3) 단백질을 코딩하는 핵산분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 알레르기 행진(Allergic march) 예측용 키트.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 알레르기 행진 예측은 알레르기 소인을 갖는 개체에서 아토피 피부염, 알레르기성 천식 또는 알레르기성 비염의 발생 가능성에 대한 예측인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 알레르기 행진 예측은 아토피 피부염을 갖는 개체에서 알레르기성 천식 또는 알레르기성 비염의 발생 가능성에 대한 예측인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트, 마이크로어레이 또는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6

알레르기 행진(Allergic march)의 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 생물학적 시료 내에 있는 ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein) 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자; 또는 C3(complement component 3) 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 검출하는 단계를 통하여 알레르기 행진 예측용 마커를 검출하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 알레르기 행진의 예측은 알레르기 소인을 갖는 개체에서 아토피 피부염, 알레르기성 천식 또는 알레르기성 비염의 발생 가능성에 대한 예측인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 알레르기 행진 예측은 아토피 피부염을 갖는 개체에서 알레르기성 천식 또는 알레르기성 비염의 발생 가능성에 대한 예측인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 혈액, 혈청 및 혈장은 아토피 피부염 환자로부터 분리된 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알레르기 행진 예측용 키트 및 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아토피 피부염은 심한 가려움증과 전체적인 건조피부를 동반하며, 습진 병변이 특정 부위에 반복하여 재발하는 만성 염증성 피부질환이다. 아토피 피부염은 기관지 천식 및 알레르기 비염과 함께 3대 알레르기 질환으로 여겨지고 있으며, 이들 알레르기 질환은 어린 나이부터 순차적으로 발병하는 경향이 있는데 이러한 일련의 발병을 '알레르기 행진(Allergic march)'이라 한다.

[0003] 소아에서의 알레르기 질환은 특징적으로 알레르기 행진을 보이는 것으로 성인의 알레르기 질환과 차별화된다. 아토피 소인을 갖고 태어난 신생아가 영유아기 초기에 피부 증상(영아 습진 또는 아토피 피부염)을 보이다가 생후 6개월쯤 되면 호흡곤란을 보이는 영아 천식, 기관지 천식 증상을 보인다. 기관지 천식 증상은 이후 반복되면서 호흡기의 성장에 따라 일부는 6-7세경에 소실되기도 하나 학령기 동안 악화와 호전을 반복하게 된다. 일부 환자는 사춘기가 되면서 천식 증상이 호전되지만 알레르기 비염 증상을 보이게 된다. 이런 호흡기 알레르기 증상은 사춘기를 지나면서 50-70%에서는 호전되지만 20-30%는 성인이 되어서도 증상을 동반하거나 폐 기능의 감소를 보이게 된다. 이렇듯 소아가 성장함에 따라 알레르기 증상도 변하여 나타나는 과정이 마치 군대가 대열을 이루어 차례차례로 행진하는 모습과 비슷하다 하여 알레르기 행진이라 일컫고 있다.

[0004] 소아 알레르기 질환의 경우에는 특징적으로 영유아기에 아토피 피부염을 보이던 환자가 후에 알레르기 천식 또는 알레르기 비염으로 이행하는 알레르기 행진 의 양상을 보이는 경우가 많기 때문에 이를 미리 예측하는 것이 중요하다. 알레르기 천식이나 알레르기 비염으로의 진행을 미리 예측할 수 있는 객관적인 지표들이 있다면, 이들 알레르기 질환의 효과적인 예방, 치료 및 관리에 매우 유용할 것이다. 이에 따라, 알레르기 소인을 갖는 개체가 알레르기 행진을 겪게 될 가능성을 예측할 수 있는 예측 인자에 대한 요구가 대두되고 있다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0034297호 (2011.04.05 공개)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1512121 (2014.09.26 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 알레르기 소인을 갖는 개체에서 알레르기 행진의 진행 가능성을 신속하고 정확하게 분자진단 할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 정상인에 비하여 알레르기 행진 환자군에서 차별

적으로 발현되는 단백질을 동정함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 알레르기 행진 예측용 키트를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 알레르기 행진의 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein) 또는 C3(complement component 3) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 알레르기 행진 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 ZAG 또는 C3 단백질을 코딩하는 핵산분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 알레르기 행진 예측용 키트를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 알레르기 소인을 갖는 개체에서 알레르기 행진의 진행 가능성을 신속하고 정확하게 분자진단 할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 정상인에 비하여 알레르기 행진 환자군에서 차별적으로 발현되는 단백질을 동정하였다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 표현, "알레르기 행진 예측용 키트"는 "알레르기 행진 예측용 조성물"이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 "알레르기 행진 예측용 키트"는 "알레르기 행진 예측용 조성물"과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다.

[0015] 본 명세서에서 사용된 용어, "알레르기 행진 예측"은 알레르기 소인을 갖는 개체(subject)에서 시간이 지남에 따른 아토피 피부염, 알레르기성 천식 및 알레르기성 비염과 같은 알레르기 질환의 발생할 가능성을 예측하는 것을 의미한다. 상기 알레르기 질환은 알레르기 소인을 갖는 영유아에서 성인이 되는 과정 중에 순차적 또는 복합적으로 나타날 수 있다.

[0016] 본 발명자들은 본 발명의 예측용 마커를 사용하면, 개체로부터 채취한 생물학적 시료로부터 알레르기 행진을 신속하고 정확하게 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0017] 본 명세서에서 사용된 용어, "예측용 마커"란 알레르기 행진을 예측할 수 있는 물질로, 알레르기 행진이 발생한 개체에서 감소(zinc-alpha 2 glycoprotein, ZAG) 또는 증가(complement component 3, C3) 양상을 보이는 유기 생체 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 알레르기 행진 예측용 마커는 zinc-alpha 2 glycoprotein 또는 이를 코딩하는 핵산분자(DNA 또는 mRNA); 또는 complement component 3 단백질을 또는 이를 코딩하는 핵산분자(DNA 또는 mRNA)를 포함한다.

[0018] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 알레르기 행진 예측은 아토피 피부염을 갖는 개체에서 알레르기성 천식 또는 알레르기성 비염이 발생할 가능성을 예측하는 것이다.

[0019] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트, 즉 면역분석 방식(항원-항체 반응)으로 ZAG 또는 C3 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인할 수 있는 키트이며, 예를 들어, 상기 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트이다.

[0020] 하나의 특정예에서, 본 발명의 키트는 ZAG 또는 C3 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 측정하기 위한, ZAG 또는 C3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

[0021] 본 발명에서 항체란, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[0022] 상기한 바와 같이 새로운 알레르기 행진 예측용 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다.

[0023] 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(Clackson et al, *Nature*,

352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

- [0024] 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0025] 본 발명의 키트는 통상적인 면역분석 방법을 통하여 알레르기 행진을 예측하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0026] 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0027] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵)로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0028] 예를 들어, 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 시료를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 이차항체로서의 마커에 대한 항체와 상기 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0029] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스라디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스라디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0030] ELISA 방법을 포함한 면역분석 방법에서, 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 본 발명의 마커의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0031] 다른 한편으로, 본 발명의 키트는 마커 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏에 이용될 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동 하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 알레르기 행진의 진행 가능성을 예측할 수 있다.
- [0032] 또 다른 한편으로, 본 발명의 키트는 상기 마커 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직 염색에 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 키트에는, 항체 대신에 본 발명의 마커 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함할 수 있다. 앵타머는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular

medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

- [0034] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 마이크로어레이 또는 유전자 증폭 키트이다. 본 발명의 키트가 마이크로어레이인 경우에는, 마이크로어레이의 고상 표면에 프로브가 고정화 되어 있으며, 본 발명의 키트가 유전자 증폭 키트인 경우에는 프라이머를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 진단용 키트에 포함된 프로브 또는 프라이머는 ZAG 또는 C3을 코딩하는 핵산분자(뉴클레오티드 서열)에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 사용된 용어, "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "상보적"은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 상술한 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만, 전형적으로 15-30 뉴클레오티드이다. 이러한 프라이머의 디자인은 TAGLN2의 뉴클레오티드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브"는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하고, 타겟 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0039] 프라이머 또는 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명 마커의 뉴클레오티드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있으며, 이 서열을 참조하여 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다.
- [0041] 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA 또는 mRNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0042] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 피옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0043] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기

생시료는 예를 들어, 혈액, 혈청 및 혈장이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0044] 상기 "유전자 증폭 키트"를 언급하면서 사용한 용어, "증폭"은 핵산분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification; TMA, WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication, WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences, 미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction(CP-PCR), 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR), 미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification(NASBA), 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)와 같은 다양한 증폭 반응들이 당업계에 알려져 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 알레르기 행진의 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 생물학적 시료 내에 있는 ZAG 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자; 또는 C3 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 검출하는 단계를 통하여 알레르기 행진 예측용 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0046] 상기 알레르기 행진 예측용 마커를 검출하는 방법과 상기 알레르기 행진 예측용 키트는 동일한 마커를 사용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0047] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 방법은 상술한 항원-항체 반응 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시된다. 상기 검출 방법들을 통하여, 대조군에서의 마커 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 발현량과 분석대상 생물학적 시료에서의 마커 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 발현량을 비교할 수 있으며, 상기 발현량의 유의한 변화 여부를 판단하여 알레르기 행진의 발생 가능성을 예측할 수 있다.

[0048] 이와 같이, 본 발명은 알레르기 행진을 분자 진단 방법으로 판단한다. 본 발명의 마커는 알레르기 행진 환자(아토피 피부염을 동반한 천식 또는 비염 환자)에서 저농도(ZAG)로 존재하거나, 고농도(C3)로 존재하는 것으로 확인된 생체 분자이다(도 1 내지 3 참조). 예를 들어, 조사 대상인 생물학적 시료 내의 ZAG의 양이 대조군 시료(예컨대, 정상인 유래의 시료)와 비교하여 적은 경우 알레르기 행진의 발생 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다. 상기 조사 대상인 생물학적 시료가 아토피 피부염 환자 유래의 시료라면, 이 아토피 피부염 환자가 추후 알레르기성 천식이나 비염을 겪을 가능성이 높은 것으로 판단하고 이에 따른 적절한 치료와 관리를 할 수 있다.

[0049] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈청 및 혈장으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0050] 하나의 특정예에서, 상기 혈액, 혈청 및 혈장은 아토피 피부염 환자로부터 분리된 것이다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0052] (i) 본 발명은 알레르기 행진에 대한 신규한 분자 마커 및 이의 용도를 제공한다.

[0053] (ii) 본 발명의 마커인 ZAG(zinc-alpha 2 glycoprotein)는 정상인에 비하여 아토피 피부염을 동반한 알레르기성 천식 또는 비염 환자의 혈액에서 발현이 감소되어 있고, C3(complement component 3)은 정상인에 비하여 아토피 피부염을 동반한 알레르기성 천식 또는 비염 환자의 혈액에서 발현이 증가되어 있다.

[0054] (iii) 본 발명의 마커를 이용하여 알레르기 행진을 조기에 예측함으로써, 생애주기별 알레르기 질환에 대한 적정 예방, 치료 및 관리가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청에서 차별적으로(differentially) 발현된 단백질(ZAG 및 C3)을 보여주는 2D-DIGE(2-dimensional Difference Gel

Electrophoresis) 분석 결과를 보여준다. ZAG(A) 및 C3(B)의 단백질 스팟 이미지 및 3D 이미지를 보여준다.

도 2는 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청 내 ZAG 및 C3 수준을 보여주는 웨스턴 블랏 분석결과이다.

도 3은 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청 내 ZAG 수준을 보여준다. 값은 세 번의 독립적인 실험의 평균 \pm SD이다. *** $P < 0.001$

도 4는 정상인(HC, 패널 A 및 B), 아토피 피부염 환자(AD, 패널 C 및 D) 및 알레르기 행진 환자(AM, 패널 E 및 F)의 표피 내 ZAG에 대한 면역학적 방법(immunolocalization) 결과를 보여준다. 스케일 바: 100 μ m

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

실험 참가자 및 환자 검색 수집

정상인, 아토피 피부염 환자 및 알레르기 행진 관련 환자(아토피 피부염을 동반한 천식 또는 비염 환자)의 혈청과 피부조직을 수집하였다. 아토피 피부염 환자는 과거력 등의 임상적 특징과 천식이나 비염과 같은 대기형 호흡기 알레르기 질환 유무 등의 정보에 관한 서면 질문지에 대한 작성을 시행하고, 환자의 동의하에 혈액과 피부병변 편지 생검 조직을 채취하였다.

세브란스 병원 알레르기 특수 진료소 및 피부과에 내원하여 임상적으로 Hanifin & Rajka의 기준에 의해 아토피 피부염으로 진단된 환자들을 대상으로 실험을 진행하였다. EASI 스코어를 기준으로 활성도를 경도, 중등도 및 중증으로 판단하였다. 오염 접촉형 알레르기성 아토피 피부염 환자 중 천식/비염/혼합형 양상의 대기형 호흡기 알레르기 질환 동반에 따른 데이터베이스 구축과 통계적 분석을 시행하였다. 시료의 데이터베이스에 따른 분류로 검체를 재분류한 후 검체은행에 관리 및 보관하였다.

실험 참가자의 정보를 표 1에 나타내었다.

표 1

| | 정상인군(HC) | 아토피 피부염 환자군(AD) | 알레르기 행진 환자군(AM) |
|-------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 환자수(M/F) | 15 (9/6) | 40 (20/20) | 30 (14/16) |
| 나이(세) | 26.28.1 \pm 0.79 | 27.83 \pm 7.49 | 23.76 \pm 7.2 |
| 총 IgE(kU/L) | | 2394.64 \pm 2128.26 | 1902.85 \pm 1825.62 |
| EASI 점수 | | 24.90 \pm 12.87 | 20.10 \pm 12.41 |

오염 접촉형 알레르기성 아토피 피부염에서 알레르기 행진 관련 바이오마커 탐색 - 2D-DIGE(2-dimensional Difference Gel Electrophoresis) 프로테옴 분석

혈청 내에 존재하는 14개의 다량으로 존재하는(high abundance) 단백질(albumin, transferrin, IgG, IgA, haptoglobin, antitrypsin, alpha 2-macroglobulin, fibrinogen, alpha 1-acid glycoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, complement C3, transthyretin)을 제거하기 위하여, multiple affinity removal column system (MARS, Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. 혈청 30 μ l를 120 μ l의 버퍼 A(Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 희석하고, 단백질분해효소 억제제 각테일 용액(GE healthcare)을 첨가하여, 0.25 ml/분의 유속(flow rate)으로 Agilent HP100 LC 시스템에 통과시켰다.

MARC를 통과시킨 각 그룹의 혈청 단백질 50 μ g을 세 개의 CyDye DIGE 형광(Cy2, Cy3, Cy5; GE Healthcare)으로 표지(labeling)하였다. 내부 표준(Internal standard)으로 이용하기 위하여, 세 그룹 단백질 샘플의 동일 양을 섞은 샘플 50 μ g도 표지하여 준비하였다. 표지된 시료들을 재수화시킨 후 24 cm Immobiline DryStrip pH 3-10NL로 등전점 전기영동(isoelectric focusing)을 실시하였다. 2차 전기영동은 9-16% SDS-PAGE로 진행하였

다. CyDye로 표지된 겔을 Typhoon 9400 스캐너(GE Healthcare)로 스캔하고, DeCyder 2-D 분석 소프트웨어 버전 6.5.11(GE Healthcare)로 분석하였다.

[0067] 각 그룹별로 2배 이상 차이 나는 스팟(Spot)들에 대해 트립신(Promega, Madison, WI, USA)을 처리하여 MALDI-TOF MS/MS를 진행하였다. 스팟 단백질들을 70% 아세트나이트릴, 100% 아세트나이트릴, 50 mM 탄산수소암모늄(ammonium bicarbonate)으로 각각 세척한 후 R2와 R3 컬럼을 통과시키고, cyano-4-hydroxycinamic acid(CHCA; Sigma, St. Louis, MO)로 MALDI 플레이트(Opti-TOF™ 384-well Insert, Applied Biosystems) 위에 용출(elution)시켰다. MALDI-TOF MS는 355-nm Nd:YAG 레이저가 장착된 4800 MALDI-TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems)로 분석하였다.

[0068] 질량 스펙트럼 단동위질량(Mass spectra monoisotopic masses)의 데이터 수집과 추출은 Data Explorer 4.4(PerSeptive Biosystems)를 사용하여 실시하였다. Mascot 데이터베이스 조사를 위해 Database search criteria - taxonomy; homo sapiens (NCBI database downloaded on Jun 30, 2014), fixed modification; carboxyamidomethylated(+57) at cysteine residues; variable modification; oxidized(+16) at methionine residues, maximum allowed missed cleavage, 1, MS tolerance, 100 ppm을 사용하였다.

[0069] **알레르기 행진 관련 바이오마커의 검증**

[0070] *Western blot*

[0071] 정상인(n=6), 아토피 피부염 환자(n=6) 및 알레르기 행진 환자(n=6)의 혈청을 1:10으로 희석한 후 12% SDS-PAGE 겔에서 전기영동한 후 니트로셀룰로오스 막에 단백질을 전이시켰다. 일차 항체 anti-ZAG(Abcam Inc. Cambridge, MA, USA)를 넣어 4℃에서 하룻밤 동안 반응시키고, 호스래디시 페록시다아제(horseradish peroxidase) 결합 이차 항체(Santa cruz Biotechnology, Santa cruz CA, USA)를 1:2000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 ECL kit(Amersham Life science, London, UK)로 검출하여 43 KDa의 ZAG 단백질 밴드를 비교하였다.

[0072] *ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)*

[0073] Human Zinc-Alpha-2-Glycoprotein ELISA kit(BioVendor Laboratorni Medicina, Modrice, Czech Republic)를 사용하여 혈청 내의 ZAG 발현량을 측정하였다. 표준물(Standard), Quality Control 및 1:5000으로 희석한 각 그룹(정상군, 아토피 피부염 단독군, 알레르기 행진군)의 혈청을 100 μ l씩 ELISA 플레이트에 넣고 실온에서 1시간 동안 처리하고, 세척 용액으로 3회 세척한 후 결합 용액(conjugate solution)을 실온에서 1시간 동안 처리한 다음 세척 용액으로 3회 세척하였다. 기질 용액(Substrate solution) 100 μ l를 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 종결 용액(stop solution)을 넣고 반응을 중지시켰다. VersaMax ELISA 마이크로 플레이트 리더기(molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] *면역조직화학염색(Immunohistochemistry)*

[0075] 정상군(n=3), 아토피 피부염 단독군(n=3) 및 알레르기 행진군(n=3)의 인체 피부 조직의 파라핀 블록을 절단하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 3% 과산화수소를 15 분간 처리하고, 비특이적 결합을 억제하기 위하여 5% BSA로 1시간 동안 처리하였다. 일차 항체 anti-ZAG(Abcam Inc. Cambridge, MA, USA)를 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 슬라이드를 PBST로 3회 세척한 다음 페록시다아제 결합 토끼 항-양 IgG 항체(peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep IgG antibody; &D Biotechnology, Minneapolis, MN, USA)에 30분 동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척하여 DAB(3, 3'-diaminobenzidine, Sigma, St Louis, MO, USA) 용액으로 발색시킨 다음 80% 글리세롤을 떨어뜨린 후 밀봉하였다.

[0076]

[0077] **통계 처리, 실험결과의 분석**

[0078] 실험 결과는 Graphpad Prism 6(Graphpad Software, Inc, CA, La Jolla)을 이용하여 통계처리를 수행하였다. 각 실험은 3회 반복하여 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, t-test $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

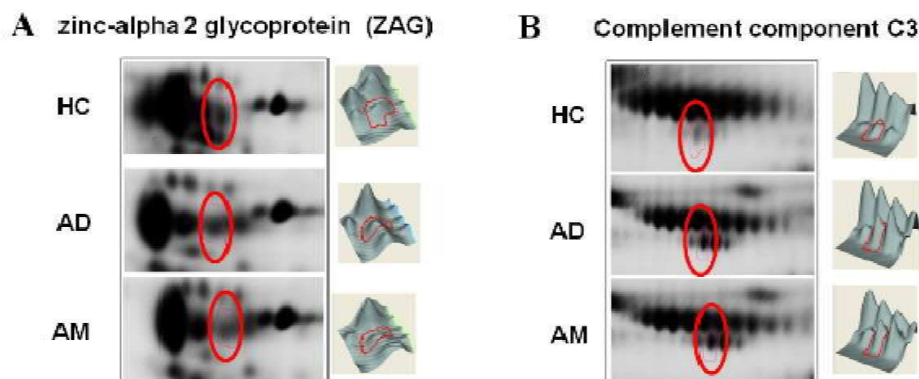
[0079] **실험결과**

[0080] 2D-DIGE(2-dimensional Difference Gel Electrophoresis) 분석을 통하여, 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청에서 차별적으로(differentially) 발현된 단백질인 Zinc alpha 2-glycoprotein(ZAG) 및 Complement component 3(C3)을 동정하였다(도 1).

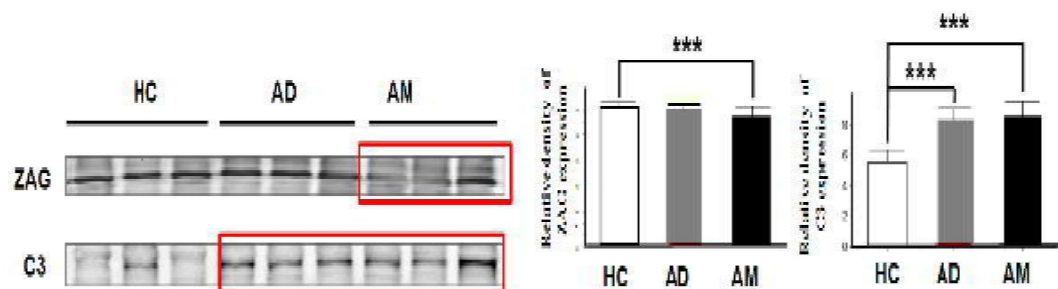
- [0081] 웨스턴 블랏, ELISA 및 면역조직화학염색을 통하여 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청 내 ZAG를 검증하였고, 웨스턴 블랏으로 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청 내 C3를 검증하였다(도 2 및 3).
- [0082] 도 2는 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 혈청 내 ZAG 및 C3 수준을 보여주는 웨스턴 블랏 분석결과이다. 도 2에 나타난 바와 같이, ZAG 단백질의 발현수준은 정상군(HC)에서 가장 높았고, 아토피 피부염 단독군(AD)에서는 중간 수준이었으며, 알레르기 행진군(AM)에서는 가장 낮았다. C3의 수준은 정상군(HC) 보다 아토피 피부염 단독군(AD)과 알레르기 행진군(AM)에서 증가되어 있었다(도 2).
- [0083] 도 3은 정상인(HC, n=6), 아토피 피부염 환자(AD, n=23) 및 알레르기 행진 환자(AM, n=21)의 혈청 내 ZAG 수준을 보여준다. 도 3에 나타난 바와 같이, ZAG의 혈청 내 수준은 정상군(HC, 41.88 ± 6.15) > 아토피 피부염 단독군(AD, 39.76 ± 6.88) > 알레르기 행진군(AM, 34.81 ± 8.14)순이었으며, 이러한 경향은 2D-DIGE의 결과와 유사하였다(도 3).
- [0084] 도 4는 정상인(HC), 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 표피 내 ZAG에 대한 면역학적 방법(immunolocalization) 결과를 보여준다. 도 4에 나타난 바와 같이, ZAG는 위쪽 과립층(granular layer)과 정상 표피 내 각질층 도처에 존재하였다. 반면, 아토피 피부염 환자(AD) 및 알레르기 행진 환자(AM)의 표피와 각질층에서는 ZAG의 발현이 감소되어 있었다(도 4).
- [0085] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

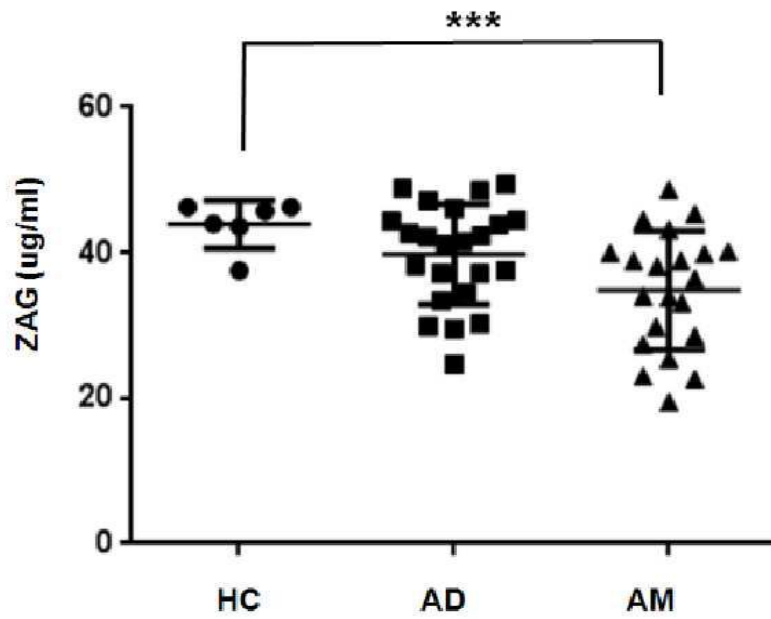
도면1



도면2



도면3



도면4

