

명세서

발명의 명칭: 당뇨망막병증 진단용 복합 마커 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 당뇨망막병증(diabetic retinopathy) 진단용 복합 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 당뇨망막병증 진단에 특이적인 2개 이상의 혈액 마커로 구성되어, 진단 성능이 증가된 당뇨망막병증 진단용 복합 마커에 관한 것이다. 또한, 상기 복합 마커를 이용한 당뇨망막병증 진단용 조성물, 진단 키트 및 당뇨망막병증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 당뇨망막병증(diabetic retinopathy, DR 또는 DMR)은 망막의 미세혈관이 손상되었을 때에 나타나는, 당뇨병의 대표적인 합병증으로, 나이관련 황반변성, 녹내장과 함께 안과 3대 실명질환 중 하나이다. 건강 보험심사평가원에 따르면 당뇨병 환자는 2012년 약 200만 명에서 2016년 약 245 만명으로 21% 정도 증가했지만, 당뇨망막병증 환자수는 2012년 약 26만 명에서 2016년 33만 6000명으로 38%로 증가해, 당뇨병보다 증가폭이 컸다.
- [4] 당뇨로 인해 혈당이 높아지면서, 지속적인 고혈당으로 인해 망막혈관의 미세순환에 장애가 일어나 안구의 후반부 망막에 영양을 공급하는 혈관이 좁아지거나 막혀서 노폐물이 축적됨 되어 출혈이 발생한다. 이 부위에 비정상적으로 신생 혈관이 생기면서 정상적인 혈관기능을 못하고 출혈을 일으킴으로써 당뇨망막병증이 발생하게 된다.
- [5] 당뇨망막병증은 심화정도에 따라 비증식성 당뇨망막병증(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)과 증식성 당뇨망막병증(proliferative diabetic retinopathy, PDR)로 구분한다. 또한 NPDR을 경우는 정도에 따라 경증(mild), 중등도(moderate) 및 중증(severe) NPDR로 분류된다. 비증식성 당뇨망막병증은 망막의 출혈, 미세혈관류, 먼화반등의 소견을 보이지만 늦게까지 좋은 시력을 유지한다. 증식성 당뇨망막병증은 망막에 신생혈관이 생성되고, 이 혈관이 파열하면 유리체강 내 심각한 출혈을 야기, 시간이 지나면 흡수되지만 섬유성 조직으로 변해 나중에는 건인성 망막박리 및 재출혈이 발생해 영구적인 실명을 일으키게 된다.
- [6] 당뇨망막병증은 초기증상이 거의 없어 조기 진단이 어렵고, 증상(시력저하, 초점상실, 눈부심)을 보일 땐, 이미 병이 진행된 상태이며, 치료(레이저, 유리체 수술)에도 불구하고 심화되어 실명에 이르는 환자가 많다. 다만 발병 초기에 적절한 치료를 받고, 혈당관리를 철저히 하면 시력 유지가 가능하기에, 당뇨망막병증의 조기발견과 억제 및 고위험군에 대한 조기 치료에 대한 필요성이 대두되고 있다. 하지만 아직까지 정확한 병인은 밝혀지지 않았으며,

- [7] 망막증의 진행정도를 판단하는 바이오마커도 매우 한정적인 문제점이 있다. 이에, 본 발명자들은 민감도 및 특이성이 높은 혈액 단백질 마커를 발굴하고, 이를 복합적으로 사용하여 당뇨병망막병증 조기 진단능을 높이고자 노력한 결과, MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 복합 마커의 당뇨병망막병증 진단 효율이 우수한 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 당뇨병망막병증 진단에 특이적인 혈액 마커를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커를 제공하는 데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커를 이용한 당뇨병망막병증 진단용 조성물 또는 진단 키트를 제공하는 데 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커를 이용한 당뇨병망막병증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위해,
- [14] 본 발명은 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커를 제공한다.
- [15] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 복합마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함할 수 있다.
- [16]
- [17] 또한, 본 발명은 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 복합 마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin),

SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함할 수 있다.

- [19] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 복합 마커의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [20] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 복합 마커의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 포함할 수 있다.
- [21]
- [22] 또한, 본 발명은 상기 당뇨병망막병증 진단용 조성물을 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 키트를 제공한다.
- [23] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [24]
- [25] 또한, 본 발명은 (a) 환자의 생물학적 시료로부터 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- [26] (b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [27] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 복합 마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 환자의 나이, BMI(body mass index), 흡연 여부, Hb1Ac 검사결과, 인슐린 치료 여부, 고혈압 여부, 고지혈증 여부 및 심혈관 질환 여부로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 임상정보를 추가로 포함하여 대조군과 비교할 수 있다.
- [29] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 복합 마커의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 증가하면 당뇨병망막병증이라고 판정하는 단계를 추가로 포함할

수 있다.

- [30] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준 측정은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩을 이용하여 수행할 수 있다.
- [31] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정은 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM), 병행 반응 모니터링(parallel reaction monitoring: PRM), sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution(SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 또는 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)을 이용하여 수행할 수 있다.
- [32] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계의 분석은 통계적 분석 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [33] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 통계적 분석 방법은 선형 또는 비선형 회귀 분석방법, 선형 또는 비선형 분류(classification) 분석방법, 로지스틱 회귀 분석방법(logistic regression), 분산분석(Analysis of Variance; ANOVA), 신경망 분석방법, 유전적 분석방법, 서포트 벡터 머신 분석방법, 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법, 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘 또는 커널 주성분(Kernel principal component) 분석방법, 마르코프 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법, 회귀 특성 소거(recursive feature elimination) 또는 엔트로피-기반 회귀 특성 소거 분석방법, 전방 플로팅 서치(floating search) 또는 후방 플로팅 서치(floating search) 분석방법, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[34]

발명의 효과

- [35] 본 발명의 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커는 다른 마커의 조합에 비해 민감도 및 진단 성능이 우수한 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 복합 마커의 단백질 정량값과 기본적인 임상정보를 결합하여 분석하면 초기 당뇨병망막병증에서 높은 진단능을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 복합마커는 혈액 단백질로 생검을 이용하지 않고 환자 혈장을 이용하여 간편하게 분석할 수 있어 당뇨병망막병증의 조기 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

[36]

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 복합 마커의 단백질 정량값 및 전체 당뇨병망막병증 환자의 기본적인 임상정보를 결합하여 로지스틱 회귀 모델(A) 및 T-검정(B)으로 통계처리 하여 분석한 데이터이다 (DMR: 당뇨병망막병증, Non DMR: 비당뇨망막병증).
- [38] 도 2는 복합 마커의 단백질 정량값 및 비증식성 당뇨병망막병증 환자의 기본적인

- 임상정보를 결합하여 로지스틱 회기 모델(A) 및 T-검정(B)으로 통계처리 하여 분석한 데이터이다 (NPDR: 비증식성 당뇨병망막병증 Non DMR: 비당뇨망막병증).
- [39] 도 3은 복합 마커의 단백질 정량값 및 증식성 당뇨병망막병증 환자의 기본적인 임상정보를 결합하여 로지스틱 회기 모델(A) 및 T-검정(B)으로 통계처리 하여 분석한 데이터이다 (PDR: 증식성 당뇨병망막병증 Non DMR: 비당뇨망막병증).
- [40] 도 4은 복합 마커의 단백질 정량값 및 단계별 비증식성 당뇨병망막병증 환자의 기본적인 임상정보를 결합하여 T-검정으로 통계처리 하여 분석한 데이터이다.
- [41] A는 비당뇨망막병증(Non DMR) 및 경증 비증식성 당뇨병망막병증(mild NPDR)를 비교한 데이터이며, B는 비당뇨망막병증(Non DMR) 및 중등도 당뇨병망막병증(moderate NPDR)를 비교한 데이터이고, C는 비당뇨망막병증(Non DMR) 및 중증 당뇨병망막병증(sever NPDR)를 비교한 데이터이다.
- [42] 도 5는 본 발명에서 확인한 13개의 마커 중, MLB2, IGFBP2, LGALS3BP 및 PNLIP 조합(조합 1) 및 ADAMTSL2, CP, DDI, FCN2, SIGLEC14, SELE, THBS1, ZG16B 및 CFH 조합(조합 2)에 따른 단백질 정량값 및 전체 당뇨병망막병증 환자의 기본적인 임상정보를 결합하여 로지스틱 회기모델로 통계처리 하여 분석한 데이터이다.

[43]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [45]
- [46] 본 발명은 일 관점에서 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커에 관한 것이다.
- [47] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 당뇨병망막병증 발병 여부를 확인하는 것이다.
- [48] 본 발명에서 사용된 용어 "진단용 마커"란 정상 대조군(당뇨망막병증이 아닌 개체)에 비하여 당뇨병망막병증을 가진 개체에서 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준의 유의적인 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩티드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [49] 당뇨병망막병증은 진행 정도에 따라 초기의 비증식성 당뇨병망막병증(NPDR)과 후기의 증식성 당뇨병망막병증(PDR)로 구분한다. 비증식성 당뇨병망막병증은 혈관이 발달하지 않는 특징이 있다. 증식성 당뇨병망막병증은 혈관이 발달하는 등 그 이전에 있어서 상이하며, 비증식성 당뇨병망막병증이 반드시 증식성 당뇨병망막병증으로 진행되는 것이 아니어서, 증식성 당뇨병망막병증의 진단용

마커로 알려진 마커라도 반드시 비증식성 당뇨병망막병증의 진단용 마커로 사용될 수는 없다.

- [50] 본 발명의 복합 마커는 비증식성 당뇨병망막병증 및 증식성 당뇨병망막병증을 모두 특이적으로 진단할 수 있으며, 특히, 비증식성 당뇨병망막병증 초기 단계를 진단할 수 있다.
- [51] 본 발명에 있어서, 상기 복합 마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [52]
- [53] ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2)는 ADAMTS(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) 유사 단백질 서브 패밀리 구성원으로, 세포 표면과 세포외 기질을 바인딩하는 당단백질이다. ADAMTSL2는 LTBP1(latent transforming growth factor beta binding protein 1)과 상호작용하며, LTBP1 단백질은 세포의 성장 및 분열을 조절하는 중요한 성장인자인 TGF- β 1의 저장에 관여하므로, ADAMTSL2는 TGF- β 1의 이용가능성을 조절한다. 또한, ADAMTSL2는 암 조직에서 발현되므로 암 진단을 위한 마커로 사용된다.
- [54] 본 발명에 있어서, 상기 ADAMTSL2는 바람직하게 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [55] Cp(Ceruloplasmin)는 혈액에서 구리를 운반하는 주단백질로서 철 대사에서의 중요한 역할을 한다. 건강한 사람의 혈장에서 약 95% 이상의 구리가 세룰로플라스민(Ceruloplasmin) 형태로 존재한다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 Cp는 바람직하게 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 3의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [57] CFH(complement factor H)는 보체 활성화를 조절하여 면역반응을 유지하는데 필수적인 역할을 하는 당단백질이다. 세포표면의 같은 당사슬구조와 결합하여 보체 활성화 및 증폭을 막는 보체 억제제 역할을 한다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 CFH는 바람직하게 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 3의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.

- [59] DDI2(Protein DDI1 homolog2)는 내부펩타이드 절단효소로써 세포 성장 및 DNA 복제 조절에 관여하는 Nrf1(nuclear respiratory factor 1)를 활성화하여 프로테아좀 이상에 의한 단백질 분해(degradation)을 보완한다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 DDI2는 바람직하게 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 4의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [61] FCN2(Ficolin 2)는 올리고렉틴의 한 종류로서 짧은 N말단 부분-콜라겐(collagen) 유사 도메인과 피브리노겐(fibrinogen) 유사 도메인으로 구성되어 있다. 주로 간에서 발현되며 박테리아 세포벽의 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamin)과 결합하여, 만노오스 결합(mannose binding) 단백질처럼 옵소닌(opsonin) 역할을 함으로써 보체계의 렉틴 경로에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 FCN2는 바람직하게 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 5의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [63] IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)는 인슐린 유사생장인자(Insulin like growth factor; IGF)와 결합하여 세포 내 다양한 프로세스를 조절하며 그에 의해 혈관생성(angiogenesis)를 조절한다. 또한 다양한 암에서(전립선 및 유방암 등)에서 암세포의 성장을 촉진한다고 알려져 있다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 IGFBP2는 바람직하게 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 6의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [65] LGALS3BP(galectin-3-binding protein)는 LGALS3BP 유전자에 의해 암호화 되는 단백질로, Mac-2(human macrophage-associated lectin) 및 갈락틴 1(galectin 1)에 특이적으로 결합한다. LGALS3BP는 암 환자 및 HIV에 감염된 환자 혈청에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, NK(natural killer)세포 및 LAK(lymphokine-activated killer) 세포 독성과 연관된 면역반응에 관여한다.
- [66] 본 발명에 있어서, 상기 LGALS3B는 바람직하게 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 7의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [67] MBL2(mannose-binding protein C)는 만노오스 결합 렉틴(Mannose-binding lectin; MBL) 또는 만난 결합 단백질(mannan-binding protein; MBP)으로도 불리운다. MBL2는 올리고머구조(400 ~ 700 kDa)를 가지며, 대략 30kDa으로 구성된 3개의 동일한 펩타이드 사슬을 포함하는 서브 유닛으로 구성된다. 감염에 대한

반응으로 간에서 생성되며 급성 단계 단백질이라고 불리는 다른 많은 요인 중 일부에 해당한다.

- [68] 본 발명에 있어서, 상기 MBL2는 바람직하게 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 8의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [69] PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase)는 트리글리세라이드의 에스테르 결합을 가수분해하는 지방 분해 효소군으로, 췌장에서 분비되는 효소이다. PNLIP는 췌장 덕트 시스템을 통해 십이지장으로 분비되기 때문에 혈청 내 농도는 낮은 것으로 알려져 있으나, 췌장염이나 췌장 선암과 같은 췌장 기능이 극도로 파괴되면, PNLIP를 포함한 췌장 효소가 혈청으로 분비되기 때문에, PNLIP 혈청 농도를 측정하여 급성 췌장염을 진단할 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 PNLIP는 바람직하게 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 9의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [71] SELE(E-selectin)는 CD62E(CD62 antigen-like family member E), ELAM-1(endothelial-leukocyte adhesion molecule 1) 또는 LECAM2(leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 2)로 알려져 있으며, 인터류킨 1 β , 종양괴사인자, 리포다당류에 의해 활성화된 혈관내피세포에 4~12시간을 정점으로 하여 일과성으로 발현, 유도하는 세포접착분자이다. SELE는 염증 조직내 혈관내피세포에 강하게 발현하고, 호중구와 단구가 혈관내피세포 위를 구르는 현상을 매개함으로써 이들 세포의 염증부위로의 침윤을 촉진한다. 암세포의 혈관내피세포와의 접착에도 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 SELE는 바람직하게 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 10의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [73] SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14)는 SIGLEC(Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins)의 서브패밀리 중 하나로, SIGLEC는 시알산과 결합하는 세포 표면 단백질이며 주로 면역세포의 표면에서 발현된다. SIGLEC과 시알산의 단백질 상호작용은 면역 시스템을 온, 오프 시키는 스위치 역할을 하며, 암세포 역시 SIGLEC-시알산 반응을 이용하여 면역반응에 대한 저항성을 획득하는 것으로 알려져 있다.
- [74] 본 발명에 있어서, 상기 SIGLEC14는 바람직하게 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 11의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을

포함하는 것일 수 있다.

- [75] THBS1(Thrombospondin-1)은 트롬보스폰딘 패밀리(thrombospondin family) 중 하나로 신혈관 생성과 종양생성을 억제하는 당단백질이다. 플라스미노겐(plasminogen), 우로키나제(urokinase), MMP, 트롬빈(thrombin) 및 카텝신(cathepsin) 등의 혈관생성과 관련 있는 프로테아제와 결합하여 내피세포의 유착, 이동, 성장을 조절한다고 알려져 있다.
- [76] 본 발명에 있어서, 상기 THBS1는 바람직하게 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 12의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [77] ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)는 PAUF(pancreatic adenocarcinoma upregulated factor)로, 탄수화물과 결합하고 내부상피세포, 혈관생성 및 침투(permeability)를 활성화 시킨다고 알려져 있다.
- [78] 본 발명에 있어서, 상기 ZG16B는 바람직하게 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 서열번호 13의 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [79]
- [80] 하지만, 상기 마커들은 당뇨병막변증 진단에 사용할 수 있음을 개시한 종래 기술은 알려진 바가 없으며, 특히, MBL2, PNLIP, LGALS3BP 및 IGFBP2의 복합 마커를 이용하여 당뇨병막변증의 진단 성능을 증가시킬 수 있음을 개시한 기술에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.
- [81]
- [82] 본 발명은 다른 관점에서 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)를 포함하는 당뇨병막변증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병막변증 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [83] 상기 복합 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [84] 본 발명에 있어서, 상기 복합 마커의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 프라이머쌍, 프로브

또는 안티센스 뉴클레오타이드를 디자인할 수 있다.

- [85] 본 발명에 사용된 용어 "mRNA 발현수준 측정"이란 당뇨병망막병증을 진단하기 위하여 당뇨병망막병증 의심 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 당뇨병망막병증 진단용 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다.
- [86] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.
- [87] 본 발명에서 사용된 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [88] 본 발명에서 사용된 용어 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [89]
- [90] 본 발명에 있어서, 상기 복합 마커의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 애포머(aptamer)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [91] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 발현수준 측정"이란 당뇨병망막병증을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 당뇨병망막병증 진단용 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다.
- [92] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의

당뇨망막병증 진단용 복합 바이오 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 제조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 당뇨망막병증 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에서 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에서 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology* 6:511-519, 1976 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)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다. 또한 본 발명의 항체는 상업적으로 입수한 것일 수 있다.

- [93] 본 발명에 사용된 용어 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리킨다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌(Nielsen PE *et al*, *Science*, 254(5037):1497-500, 1991)에 상세하게 개시되어 있다.
- [94] 본 발명에서 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애타머의 일반적인 내용은 문헌(Bock LC *et al*, *Nature*, 355(6360):5646, 1992; Hoppe-Seyler F and Butz K, *J Mol Med.*, 78(8):42630, 2000; Cohen BA *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(24):142727, 1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [95]
- [96] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 당뇨망막병증 진단용 조성물을 포함하는 당뇨망막병증 진단용 키트에 관한 것이다.
- [97] 상기 키트는 당업계에 알려져 있는 통상의 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 키트는 예를 들면, 동결 건조 형태의 항체와 완충액, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있다.
- [98] 상기 키트는 검출가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 용어 "검출가능한 표지"는 표지가 없는 동일한 종류의 분자들 중에서 표지를 포함하는 분자를 특이적으로 검출하도록 하는 원자 또는 분자를 의미한다. 상기 검출가능한 표지는 상기

- 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자, 또는 압타머에 부착된 것일 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 방사종(radionuclide), 형광원(fluorophore), 효소(enzyme)를 포함할 수 있다.
- [99] 상기 키트는 당업계에 알려진 다양한 면역분석법 또는 면역염색법에 따라 이용될 수 있다. 상기 면역분석법 또는 면역염색법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석, 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 키트는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(multiple reaction monitoring)인 것일 수 있다.
- [100] 또한, 상기 키트는 질량분석에 이용될 수 있다. 이 경우, 상기 단백질의 특정 아미노산 잔기는 미리스토일화(myristoylation), 이소프레닐화, 프레닐화, 글리피칸화(glypation), 리포일화(lipoylation), 아실화, 알킬화, 메틸화, 탈메틸화, 아미드화, 유비퀴틴화, 인산화, 탈아미드화, 글리코실화, 산화, 또는 아세틸화 등과 같은 변형을 가질 수 있다.
- [101]
- [102] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 환자의 생물학적 시료로부터 MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)로 구성된 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및
- [103] (b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [104] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 복합 마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [105] 상기 방법에서 "생물학적 시료(biological sample)"란 당뇨병망막병증 발병에 의해 단백질 발현 수준 또는 유전자 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 노와 같은 시료 등을 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청을 의미한다.
- [106] 상기 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 환자의 나이, BMI(body mass index), Hb1Ac 검사결과, 인슐린 치료 여부, 흡연 여부, 고혈압 여부, 고지혈증 여부 및 심혈관 질환 여부로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 임상정보를 추가로 포함할 수 있다.
- [107] 또한, 당뇨병망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 복합 마커의 유전자 발현

수준 또는 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 증가하면 당뇨병망막병증이라고 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

- [108] 상기 (a) 단계의 mRNA 발현 수준 측정은 상기 복합 마커의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다.
- [109] 상기 mRNA 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 본 발명은 이들에 제한되는 것이 아니다. 상기 측정 방법들을 통하여 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 당뇨병망막병증 환자의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량 정도를 비교함으로써 당뇨병망막병증 발병 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.
- [110] 상기 (a) 단계의 단백질 발현 수준 측정은 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 아타머(aptamer)를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다.
- [111] 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는, 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDITOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LCMS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다
- [112] 보다 바람직하게, 본 발명에서는 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM), 병행 반응 모니터링(parallel reaction monitoring: PRM), sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution(SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 또는 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)을 이용하여 측정될 수도 있다.
- [113] 상기 MRM은 물질의 정확한 단편을 결정하여 이를 질량분석기에서 갠 후, 한번 깨진 이온 중 특정 이온을 한 번 더 선택하여 연속적으로 연결된 검출기를 이용하여 그 수를 얻는 방법이다. MRM 방법을 이용하는 경우, 정상인 개체와 당뇨병망막병증이 의심되는 개체의 혈액 시료에서 해당 단백질 또는 그의 단편을 질량분석기를 이용하여 정량할 수 있다.
- [114] 상기 (b) 단계의 분석은 진단의 정확도를 향상시키기 위해 통계적 방법 또는 알고리즘을 사용하여 분석할 수 있으며, 선형 또는 비선형 회귀 분석방법, 선형

또는 비선형 분류(classification) 분석방법, 로지스틱 회귀 분석방법(logistic regression), 분산분석(Analysis of Variance; ANOVA), 신경망 분석방법, 유전적 분석방법, 서포트 벡터 머신 분석방법, 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법, 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘 또는 커널 주성분(Kernel principal component) 분석방법, 마르코프 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법, 회귀 특성 소거(recursive feature elimination) 또는 엔트로피-기본 회귀 특성 소거 분석방법, 전방 플로팅 서치(floating search) 또는 후방 플로팅 서치(floating search) 분석방법, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 분석방법을 이용할 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게, 상기 통계적 방법은 로지스틱 회귀(logistic regression) 분석 방법을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[115]

[116] 본 발명의 구체적인 일구현예에서는, 혈장 단백질 중 당뇨병망막병증 진단을 위한 바이오 마커의 정량적 검증을 위하여 155개의 혈장 시료를 분석하였으며(표 1), IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2), ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), CFH(Complement factor H), Cp(Ceruloplasmin), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), LGALS3BP(galectin 3 binding protein), MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 13개의 마커를 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM)을 이용하여 분석하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, 정량분석을 위해 각 마커에 대한 펩타이드를 선별하여 SIS를 이용하여 MRM-MS 분석을 수행하였다.

[117] 본 발명의 구체적인 다른 일구현예에서는, 복합 바이오 마커군 결과 및 임상정보를 결합하였을 때, 진단능 향상효과를 확인하기 위해 로지스틱 회귀 모델을 이용하여 바이오마커 발현량 변환정보 및 임상정보 변환정보를 입력하여 당뇨병망막병증으로 분류되는 확률값을 추정하였다. 표 3에 나타난 바와 같이, 임상정보 + MBL2 + PNLIP + LGALS3BP + IGFBP2를 기본으로 ADAMTSL2, Cp, DDI2, FCN2, SELE, SIGLEC14, THBS1, ZG16B 및 CFH에 대한 발현 정도를 하나씩 추가하여 분석한 결과, 바이오마커의 수가 증가됨에 따라 당뇨병망막병증의 진단능이 증가함을 확인하였다.

[118] 또한, 도 1 내지 도 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 로지스틱 회귀 모델을 이용하여 상기 13개의 마커에 대한 단백질 정량값과 기본적인 임상정보를 결합하여 통계처리한 결과, 정상군과 당뇨병망막병증(STAGE1, AUC=0.863), 정상군과 비증식성 당뇨병망막병증(STAGE2, AUC=0.848) 및 정상군과 증식성 당뇨병망막병증(STAGE3, AUC=0.879)에 대한 진단능이 우수함을 확인하였다.

[119] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, T-검정을 통하여 비증식성 당뇨병망막병증 여러 단계에서도 정상군 대비 각 단계에서 진단능이 우수함을 확인하였다.

- [120] 본 발명의 구체적인 또 다른 일구현예에서는, 바이오마커의 조합에 따라 진단성능의 차이가 보이는지 확인하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 13개의 타겟 중 MBL2, PNLIP, LGALS3BP 및 IGFBP2의 조합(조합1, AUC= 0.783) 이 다른 9개의 단백질인 ADAMTSL2, Cp, FCN2 DDI2, SELE, SIGLEC14, THBS1 ZG16B 및 CFH 조합보다(조합2, AUC=0.713) 높은 진단능을 가짐을 확인 하였다.
- [121]
- [122] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [123] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [124]
- [125] 실시예 1: 당뇨병망막병증 환자 선정 및 혈장 채취
- [126] 당뇨병망막병증 환자의 혈장 시료는 분당서울대학교병원의 임상시험심사위원회의 승인을 받아 채취하였다. 혈장 단백질 이용하여 바이오마커의 정량적 검출을 위해 총155 개의 혈장 시료를 분석하였으며, 분석대상인 정상군(Non DMR) 및 당뇨병망막병증(DMR) 질환군의 임상적 특징은 하기 표 1에 나타내었다.
- [127]

[128] [표1]

시료 임상 정보

	시 료(n=155)					
	Non DMR(n=36)	DMR(n=1 19)	NPDR(n=60)			PDR(n=59)
			Mild(n=17)	Moderate(n=17)	Severe(n= 26)	
나이	64.1±8.3	57.5±9.5	57.4±10.9	58.9±12.1	60.0±7.6	56.1±9.0
성별(여/남)	29/7	29/90	12/5	3/14	5/21	9/50
Hb1Ac	7.4±1.3	7.6±1.4	7.5±0.9	7.6±1.4	7.5±1.4	7.6±1.5
당뇨치료(%)	32(88.9)	116(97.5)	17(100.0)	17(100.0)	25(96.2)	57(96.6)
Systemic risk factor						
BMI(%)						
저	4(11.1)	7(5.9)	0(0)	1(5.9)	3(11.5)	3(5.1)
정상	19(52.8)	64(53.8)	8(47.1)	8(47.1)	13(50.0)	35(59.3)
경도	12(33.3)	37(31.1)	8(47.1)	4(23.5)	9(34.6)	15(25.4)
고도	1(2.8)	11(9.2)	1(5.9)	4(23.5)	0(0)	6(10.2)
흡연(%)	12(33.3)	53(43.7)	10(58.5)	8(47.1)	10(38.5)	24(40.7)
고혈압(%)	19(52.8)	65(54.6)	6(35.3)	10(58.8)	14(53.8)	35(59.3)
고지혈증(%)	25(69.4)	50(42.0)	9(52.9)	8(47.1)	10(38.5)	23(39.0)
심혈관질환 (%)	5(13.9)	9(7.6)	1(5.9)	1(5.9)	2(7.7)	5(8.5)

[129]

[130] 실시예 2 : 펩타이드 선정 및 MRM-MS를 이용한 펩타이드 분석[131] 2-1 : 펩타이드 선정 및 합성 펩타이드 설계

[132] 본 발명에서는 당뇨병망막병증을 진단하기 위한 바이오 마커로 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2), ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), CFH(Complement factor H), Cp(Ceruloplasmin), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), LGALS3BP(galectin 3 binding protein), MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B) 의 13개를 선별하였다.

- [133] 상기 바이오마커에 대한 MRM 분석을 수행하기 위해 13개의 바이오마커의 단백질에 대해 특징적인 전하 대 질량비(m/z)를 갖는 대표 펩타이드를 선정하고(Q1), 이 펩타이드를 전기적인 충격으로 깨서 발생하는 단편화 이온(fragmentation ion)중 가장 강도가 높은 이온(Q3)를 선정하였다.
- [134] 단백질 당 감도 높은 1개 이상의 펩티드를 측정하고 이를 기초로 질량분석기에 주입하여 각 트랜지션 당 파편화 에너지 최적값을 얻고, 강도를 기준으로 3개 이상의 상위 단편화 이온을 선택하였다 (표 2).
- [135]

[136] [표2]

13개 바이오마커에 대한 상위단편화 이온

유전자명	트립신절편	서열번호	표적이온	표적 m/z
ADAMTSL2	NFNIAGTVVK	서열번호 14	+2y6	531.801/574.356
Cp	GEFYIGSK	서열번호 15	+2y6	450.728/714.382
	AEVGDTI	서열번호 16	+2y5	430.727/561.299
CFH	SLGNIIMVCR	서열번호 17	+2y5	581.807/678.343
	SLGNVIMVCR	서열번호 18	+2y5	574.799/678.343
	CYFPYLENGYNQNYG R	서열번호 19	+2y14+2	1029.444/867.897
	CYFPYLENGYNQNHG R	서열번호 20	+3y13+2	677.964/781.361
DDI2	DGDVVILR	서열번호 21	+2y4	443.753/500.355
	IDFSSIAVPGTSSPR	서열번호 22	+2y7	767.399/701.358
FCN2	LQAADTCPEVK	서열번호 23	+2y8	616.303/919.419
IGFBP2	LIQGAPTIR	서열번호 24	+2y6	484.798/614.362
LGALS3BP	SDLAVPSELALLK	서열번호 25	+2y8	678.393/870.529
MBL2	WLTFSLGK	서열번호 26	+2y6	476.269/652.366

PNLIP	TGYTQASQNIR	서열번호 27	+2y6	619.81/688.374
	GEENWLNVCK	서열번호 28	+2y5	660.306/591.292
	VTGHILVSLFGNK	서열번호 29	+3y4	462.270/465.246
SELE	NWAPGEPNNR	서열번호 30	+2y7	577.771/783.374
	QPQNGSVR	서열번호 31	+2y6	443.230/660.342
SIGLEC14	EGGEFTCR	서열번호 32	+2y3	478.201/436.197
THBS1	GGVNDNFQGV LQNV R	서열번호 33	+2y7	808.911/785.463
ZG16B	YFSTTEDYDHEITGLR	서열번호 34	+3y7	649.63/825.458

[137] 정량성을 확인하기 위하여 13개의 단백질에 해당하는 SIS(Stable-isotope labeled standard) 펩타이드를 이용하였으며, 칼리브레이션을 통하여 선형성을 확인하는 실험을 이용하여 spiked heavy peptide 농도를 정하였다. SIS 펩타이드는 펩타이드 C-말단의 라이신(Lys, K)이나 아르기닌(Arg, R) 아미노산에 있는 ^{12}C 와 ^{14}N 을 ^{13}C 와 ^{15}N 으로 치환한 펩타이드이다. 이는 혈액 내에 존재하는 내인성 펩타이드(endogenous peptide)와는 질량값이 차이가 나지만, 동일한 서열을 갖기 때문에 펩타이드 소수성(hydrophobicity)이 동일하므로, 크로마토그램 상에서 동일한 머무름 시간(retention time, RT)에 용출된다.

[138]

[139] 2-2: 혈장시료의 전처리 및 MRM-MS 분석

[140] 상기 실시예 1에서 수득한 각 혈장을 그대로 사용하거나, 더 정확한 단백질 정량을 위하여 고량(high abundant)으로 존재하는 단백질 14종(Albumin, IgG, Antitrypsin, IgA, Transferrin, Haptoglobin, Fibrinogen, Alpha2-Macroglobulin, Alpha1-Acid glycoprotein, IgM, Apolipoprotein AI, Apolipoprotein AII, Complement C3, Transthyretin)을 제거하는 감손과정(depletion)을 실시하였다. 감손은 MARS(Multiple affinity removal system, Agilent, 미국) 컬럼을 제조사의 방법대로 이용하여 14종의 단백질을 제거하고, 나머지 소량으로 존재하는 단백질을 용출시켜 분석에 사용하였다. 이 용출된 감손시료에 8 M이 되도록 요소(urea)를 첨가한 후 80 mM이 되도록

2-카르보실에틸트리스포스파인(Tris(2-carboxyethyl)-phosphine, TECP) 및 320 mM이 되도록 2-클로로아세트아마이드(2-chloroacetamide)을 첨가하고 25°C에서 1시간 동안 반응시켜 이황화결합을 환원 및 알킬화를 하였다. 여기에 혈장 단백질과 라이스씨(wako) 효소의 질량 비율이 100:1이 되도록 라이스씨 효소를 넣고 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후, 50 mM 트리스(Tris, pH8.0) 용액으로 10배 희석하고 시퀀싱이 가능한 수준의 트립신(Promega)을 단백질과 트립신의 질량 비율이 50:1이 되도록 첨가하여 37°C에서 12시간 이상 반응시켜 펩티드 절편으로 분해하였다. 0.3%가 되도록 포름산(formic acid) 용액을 가하여 pH 2.0 이하로 산성화시키고 트립신 반응을 멈추게 하였다.

[141] 여기에 탈염화를 진행하고 상기 실시예 2-1에서 정한 내부 표준 물질(SIS 펩타이드)로 heavy-labeled 펩타이드를 첨가(spiking)하여 MRM 분석을 시행했다. Nano ultra 2D plus(Eksigent)에 결합되어 있고, 삼중 사극자 질량분석기인 QTarp 5500(SCIEX) 장비를 이용하여 각 선정 단백질의 트랜지션에 대한 scheduled MRM 모드로 모니터링 하였다.

[142] 구체적으로, 5500 볼트의 이온 전압을 사용하고 및 Q1(Quadruple 1)과 Q3(Quadruple 3)에서의 해상능을 유닛(unit)으로 설정하였다. 트랜지션에 총 사이클 시간이 1.5초가 되도록 설정하였다. 20 유닛(unit)의 분무 가스(nebulizing gas)를 사용하고 히터 온도를 350°C로 설정하였다. 배치(batch) 간 변이를 보정하기 위해 각 시료에 내부 표준 물질을 스파이킹 하고 동시에 모니터링 하였다.

[143]

[144] 2-3: 데이터 분석

[145] 스카이라인(Skyline; McCoss lab, University of Washington, 미국)를 이용하여 로우 데이터(raw data)를 프로세싱하여 트랜지션의 피크면적을 계산하였다. 내부표준물질 펩타이드(endogenous/heavy labeled peptide)에 대하여 피크면적을 사용하여 상대적 농도를 비교하였다. 이렇게 측정된 결과값을 이용하여 각 단백질 펩타이드의 질환 예측력(predictive ability)를 측정하고자 T-검정(T-test) 및 AUROC(Area under the receiver operating characteristic) 수치를 생성하였으며, 복합 바이오 마커군 결과와 임상정보가 결합된 예측력을 확인하고자, 로지스틱 회귀분석(logistic regression) 모델을 이용하여 상기 발현량 변환정보 및 상기 표 1의 임상정보 변환정도를 입력하여 당뇨병망막병증으로 분류되는 확률값을 추정하였다. MedCal ver 17.1(MedCalc)를 사용하여 모든 통계 분석을 수행하였다.

[146] 상기 임상정보에는 문진을 통하여 확보한 키와 체중에 의해 계산된 신체질량지수(Body Mass Index, BMI), 흡연유무, 고지혈증 유무, 고혈압 유무, 심혈관 질환 유무, 당화혈색소(Hb1Ac) 수치를 반영하였다. 이 중 유무를 사용하는 정보는 유=1, 무=0(금연=0.5)로 변환하여 반영하였다.

[147]

[148] 실시예 3: 복합 바이오 마커군 결과 및 임상정보 결합에 따른 진단능 향상 확인

[149] 본 발명에서는 13개의 복합 바이오 마커군 결과 및 임상정보를 결합하였을 때, 진단능 향상효과를 확인하기 위해 로지스틱회귀 모델을 이용하여 바이오마커 발현량 변환정보 및 임상정보 변환정도를 입력하여 당뇨병망막병증으로 분류되는 확률값을 추정하였다.

[150]

[151] [표3]

복합 바이오 마커 결합 수에 따른 당뇨병망막병증 진단 성능 확인

C1 (조합1)					C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	AUC
1	2	3	4	5										0.784
1	2	3	4	5	6									0.803
1	2	3	4	5	6	7								0.804
1	2	3	4	5	6	7	8							0.812
1	2	3	4	5	6	7	8	9						0.814
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					0.819
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				0.823
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			0.824
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		0.834
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	0.863

[152] 1. 임상정보, 2. LGALS3BP, 3. MBL2, 4. IGFBP2, 5. PNLIP, 6. ZG16B, 7. DDI2, 8. FCN2, 9. THBS1, 10. SIGLEC14, 11. CP, 12. ADAMTSL2, 13. SELC, 14. CFH

[153]

[154] [표4]

복합 바이오 마커군 및 임상 정보 결합에 따른 진단능 확인

	Non DMR vs DMR (STAGE 1)			Non DMR vs NPDR (STAGE 2)			Non DMR vs PDR(STAGE 3)		
	AUC	SE	95% CI	AUC	SE	95% CI	AUC	SE	95% CI
C	0.628	0.0550	0.520 ~ 0.735	0.644	0.0611	0.524 ~ ~0.764	0.611	0.0602	0.493 ~0.729
P	0.813	0.0368	0.741 ~ 0.886	0.814	0.0434	0.729 ~ ~0.900	0.813	0.0439	0.727 ~0.899
C o m	0.863	0.0342	0.796 ~ 0.930	0.848	0.0401	0.769 ~ 0.927	0.879	0.0362	0.808 ~0.949

[155] C : 임상정보, P : 단백질 정량 정보, Com : 임상정보 및 단백질 정량 정보 통합, AUC : Area Under the Curve, SE : Standard Error(Delong *et al.*, 1988), 95% CI : 95% 신뢰구간(Confidence Interval)

[156]

[157] 표 3에 나타난 바와 같이, 임상정보 + MBL2 + PNLIP + LGALS3BP + IGFBP2를 기본으로 하여 ADAMTSL2, Cp, FCN2 DDI2, SELE, SIGLEC14, THBS1 ZG16B 및 CFH에 대한 발현 정도를 하나씩 추가하여 분석한 결과, 바이오마커의 수가 증가함에 따라 당뇨병망막병증의 진단능(AUC)이 증가하는 것을 확인하였다.

[158] 또한, 도 1 내지 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 로지스틱회기 모델을 이용하여 상기 13개의 마커에 대한 단백질 정량값과 기본적인 임상정보를 결합하여 통계처리한 결과, 정상군과 당뇨병망막병증(STAGE 1, AUC=0.863), 정상군과 비증식성 당뇨병망막병증(STAGE 2, AUC=0.848) 및 정상군과 증식성 당뇨병망막병증(STAGE 3, AUC=0.879)에 대한 진단능이 우수함을 확인하였다.

[159] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, T-검정을 통하여 비증식성 당뇨병망막병증 여러 단계에서도 정상군 대비 각 단계에서 진단능이 우수함을 확인하였다.

[160]

[161] 실시예 4 : 바이오마커의 조합에 따른 당뇨병망막병증 진단 성능 확인

[162] 본 발명에서는 13개의 바이오마커의 조합에 따라 당뇨병망막병증의 진단 성능의 차이가 보이는지 확인하였다. 13개의 바이오마커 중 MBL2, PNLIP, LGALS3BP 및 IGFBP2 조합 및 ADAMTSL2, Cp, FCN2 DDI2, SELE, SIGLEC14, THBS1 ZG16B 및 CFH 조합으로 나누어 분석을 수행하였으며, 상기 실시예 3의 STAGE 1과 동일하게 임상정보와 함께 분석을 수행하였다.

- [163] 도 5에 나타난 바와 같이, 13개의 바이오마커 중 MBL2, PNLIP, LGALS3BP 및 IGFBP2의 조합(조합 1, AUC= 0.784)이 다른 9개의 단백질인 ADAMTSL2, Cp, FCN2 DDI2, SELE, SIGLEC14, THBS1 ZG16B 및 CF 조합(조합 2, AUC=0.713)보다 높은 진단능을 보이는 것을 확인하였다.

[164]

산업상 이용가능성

- [165] 본 발명에서 제공하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커는 다른 마커의 조합에 비해 민감도 및 진단 성능이 우수할 뿐만 아니라, 복합 마커의 단백질 정량값과 기본적인 임상정보를 결합하여 분석하면 초기 당뇨병망막병증에서 높은 진단능을 보이므로, 당뇨병망막병증의 조기 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)을 포함하는, 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 복합 마커는 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커.
- [청구항 3] MBL2(mannose-binding protein C), PNLIP(pancreatic triacylglycerol lipase), LGALS3BP(galectin-3-binding protein) 및 IGFBP2(insulin like growth factor binding protein 2)을 포함하는 당뇨병망막병증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨병망막병증 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 조성물은 ADAMTSL2(ADAMTS-like protein 2), Cp(Ceruloplasmin), CFH(complement factor H), DDI2(Protein DDI1 homolog2), FCN2(Ficolin 2), SELE(E-selectin), SIGLEC14(Sialic acid-binding Ig-like lectin 14), THBS1(Thrombospondin-1) 및 ZG16B(Zymogen granule protein 16 homolog B)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 마커에 대한 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병망막병증 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 복합 마커의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는, 당뇨병망막병증 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 복합 마커의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 애포타머(aptamer)인 것을 특징으로 하는, 당뇨병망막병증 진단용 조성물.
- [청구항 7] 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 당뇨병망막병증 진단용 조성물을 포함하는, 당뇨병망막병증 진단용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 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) 키트인 것을 특징으로 하는, 당뇨병망막병증 진단용

키트.

- [청구항 9] (a) 환자의 생물학적 시료로부터 제1항 또는 제2항의 당뇨병성 망막병증 진단용 복합 마커의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는, 당뇨병성 망막병증 진단을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 당뇨병성 망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 환자의 나이, BMI(body mass index), 흡연 여부, Hb1Ac 검사결과, 인슐린 치료 여부, 고혈압 여부, 고지혈증 여부 및 심혈관 질환 여부로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 임상정보를 추가로 포함하여 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병성 망막병증 진단을 위한 정보제공 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 당뇨병성 망막병증 진단을 위한 정보제공 방법은 (c) 복합 마커의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 대조군에 비해 증가하면 당뇨병성 망막병증이라고 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병성 망막병증 진단을 위한 정보제공 방법.