



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0045841
(43) 공개일자 2019년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/493 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/493 (2013.01)
G01N 30/7206 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0123343
(22) 출원일자 2018년10월16일
심사청구일자 2018년10월16일
(30) 우선권주장
1020170138535 2017년10월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 80
5호
차훈석
서울특별시 강남구 일원동 50 삼성서울병원 류머
티스내과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

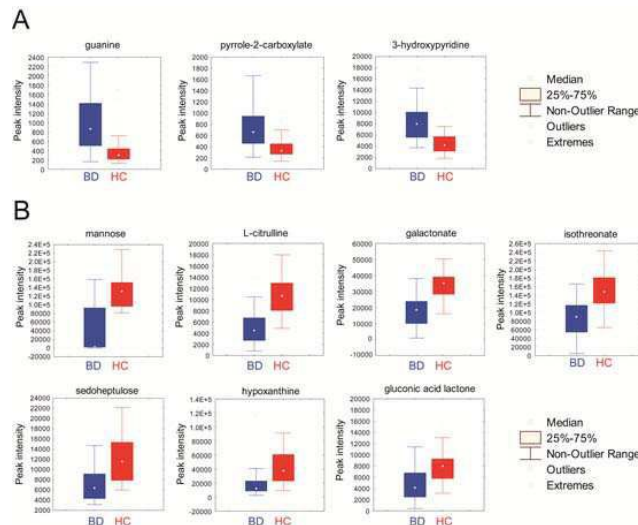
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 소변 대사체 분석을 이용한 베체트병의 진단방법

(57) 요약

본 발명은 소변 대사체 분석을 이용한 베체트병 진단방법에 관한 것으로, 대사체학을 이용하여 베체트병을 효과적으로 진단할 수 있는 바이오마커를 제공하며, 이는 베체트병 치료제 개발에도 적용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2030/8813 (2013.01)

G01N 2570/00 (2013.01)

G01N 2800/328 (2013.01)

(72) 발명자

안중경

서울특별시 종로구 평동 108 강북삼성병원 류마티스내과

김정연

서울특별시 동대문구 이문2동 256-142호 2층

명세서

청구범위

청구항 1

구아닌(guanine), 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine), 하이폭산틴(hypoxanthine), L-시틀린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소변 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 베체트병 진단 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 소변 대사체 중 만노오스(mannose), 시틀린(L-citrulline), 하이폭산틴(hypoxanthine), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 구아닌(guanine) 및 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine)으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 베체트병 진단 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기인 베체트병 진단 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

구아닌(guanine), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate) 및 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가되는 경우, 베체트병을 나타내는 것인 베체트병 진단 키트.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

하이폭산틴(hypoxanthine), L-시틀린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소하는 경우, 베체트병을 나타내는 것인 베체트병 진단 키트.

청구항 6

정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성을 검출하는 방법으로,

(1) GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry)를 이용한 대사체 분석 단계;

(2) GC/TOF MS에서 동정된 대사체에 대해 부분최소자승판별분석(PLS-DA)를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 확인하는 단계;

(3) PLS-DA에서 도출된 대사체의 VIP(Variable Importance for Projection) 값이 1.0 이상인 값을 대사체 바이오마커 후보물질로 선정하고, PLS-DA의 로딩 값을 통해 대사체 바이오마커 후보물질의 증감 확인하는 단계; 및

(4) ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic curve)을 이용하여 대사체 바이오마커를 검증하는 단계;

를 순차적으로 적용하여, 혈액으로부터 대사체 바이오마커를 분석하는 것을 포함하는 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성 분석 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

GC/TOF MS를 이용한 대사체 분석 방법은 소변 시료를 GC/TOF MS 기기로 분석하고, 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환한 다음, 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체의 차별성을 검증하는 것인 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 것은 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정하는 것인 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

PLS-DA의 로딩 값이 양수인 것은 대사체의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체의 감소 경향을 나타내는 것인 방법.

청구항 10

제 6 항에 있어서,

대사체 바이오마커는 구아닌(guanine), 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine), 하이포산틴(hypoxanthine), L-시틀린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소변 대사체 분석을 통해 베체트병을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 베체트병은 전신적인 혈관염으로, 구강이나 성기 등의 피부점막 부위의 궤양, 관절염부터 혈관 및 중추 신경계 등의 중요 장기 침범 등의 증상을 특징으로 하는 원인미상의 질병이다. 즉, 혈액이 흐르는 어디든 발생할 수 있는 전신성 혈관염으로, 다양한 임상 증상 및 중증도의 증상을 보인다. 베체트병은 한국, 중국, 일본, 터키 등 지중해 연안부터 극동 아시아에 이르는 지역에 그 발병 빈도가 매우 높다. 베체트병은 다양한 임상 양상을 보이

며, 일부에서는 심각한 합병증과 장애를 유발할 수 있으므로, 베체트병을 조기에 진단하는 것은 매우 중요하다. 베체트병의 발병률이 높은 것으로 알려진 터키를 기준으로, 매년 환자 1인당 일반적인 베체트병의 치료에 약 3,300 달러의 경비가 소요되며, 신경학적 증상을 보이는 베체트병 환자는 약 5,000 달러의 경비가 소요되는 것으로 보고되었다. 특히 20대에서 40대에서 가장 높은 질병의 활성도를 보이기 때문에, 젊은 연령에서 심각한 합병증의 발생으로 인한 경제적, 사회적 손실이 매우 클 수 있다. 또한, 베체트병 환자의 약 42%는 연중 120일 가량을 일을 하지 못하는 것으로 추산된다. 우리나라에서도 베체트병은 매우 흔한 질환이기에, 베체트병을 인한 직간접적인 의료비로 인해 지출해야 하는 경비가 매우 클 것으로 예상된다.

[0004] 따라서 베체트병을 신속, 정확하게 감별 진단할 수 있는 생체표지자의 발굴은 의학뿐만 아니라, 사회경제적으로 매우 중요할 것으로 생각된다.

[0005] 현재 베체트병 환자와 건강한 사람을 구분할 수 있는 객관적인 진단용 생체표지자가 없으므로, 베체트병의 진단은 주로 임상적인 증상에 의존한다. 그러나 베체트병은 다양한 임상 증상을 보이기에, 임상적 증상에 기반한 진단은 낮은 민감도 및 특이성을 보인다. 또한, 발병 후 베체트병의 확진까지 오랜 시간이 걸리는 문제점이 있다. 이를 극복하기 위해서, 객관적인 진단적 생체표지자를 발명하는 것은 매우 중요하다. 그러므로 베체트병을 진단할 수 있는 객관적인 진단적 생체표지자를 발굴할 수 있으면, 베체트병을 조기에 진단함으로써, 확진에 걸리는 시간을 줄이고, 질병 수준에 적절한 맞춤형 치료를 가능하게 하여, 증상 악화 및 고가의 불필요한 치료를 피할 수 있다. 또한, 질환 관련 예후에 정확한 정보를 제공하여 더 좋은 치료 성적을 거둘 수 있다.

[0006] 최근 다양한 질환에서 생체표지자 발굴을 위해서 대사체학적 접근 방법은 많은 각광을 받고 있다. 현재까지 문헌 보고에 따르면 베체트병을 진단하기 위한 생체표지자를 찾기 위해 단백질체학을 이용한 시도가 있었으나, 단백질 생체표지자는 대사물질 생체표지자 보다 검출의 신속성 및 편리성이 떨어져 실제 진단에 이용되기는 어렵다는 문제점이 있다. 또한, 베체트병을 진단하기 위해 혈액에서 대사체학적 접근 방법을 이용하여 생체표지자를 발굴한 바 있다. 소변에서 대사체학적 접근법에 의해 발굴된 생체표지자를 동시에 이용한다면, 더욱 적절한 진단을 할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 소변은 비침습적 방법을 통해 보다 쉽고 용이하게 채취할 수 있으므로, 베체트병의 진단을 위해 적절한 검체로 이용할 수 있을 것으로 예상된다.

[0007] 베체트병은 유전적, 환경적 요인을 포함한 다양한 원인에 의해 면역계가 활성화되어 다양한 임상을 보이는 매우 복합적인 질환이므로, 대사체학적 접근은 베체트병에서 생체표지자를 발굴하는 데 유용하고 적합한 방법이라 생각되며 연구자들이 아는 한 베체트병의 감별 진단을 위해 소변을 이용하여 대사체학적 접근법을 시도한 연구는 없었다. 베체트병 진단과 관련된 선행기술은 다음과 같다.

[0008] 베체트병에서 생체표지자 발굴을 위해 현재까지 보고된 기술들은 주로 단백질체학적 접근이었지만, 그 결과가 뚜렷하지 못하거나 실제 베체트병 진단에 사용되기는 어려웠다[비특허문헌 1].

[0009] 비특허문헌 2는 베체트병에 의한 관절염과 다른 혈청음성 염증관절염의 활막액의 대사체 차이를 통해 감별 진단하고자 하는 연구로, 베체트병 환자와 일반인을 구분하여 진단하는 것이 아니라 관절염 환자 들 중 베체트병 관절염을 진단해 내기 위한 것이었다. 또한, 비특허문헌 3은 혈청양성 류마티스관절염과 베체트병을 포함한 다른 염증관절염의 활막액의 대사체 비교를 통해 혈청양성 류마티스관절염의 진단을 위한 생체표지자를 발굴하고자 하였으며, 베체트병 진단이 아닌 류마티스 관절염 환자 들 중 베체트병 관절염을 진단해 내기 위한 것이었다.

[0010] 비특허문헌 2와 3과 같이, 활막액 대사체를 사용하는 경우에는 활막액 시료의 채취에 특수한 침습적 접근이 필요하여 일반 검진에서 진단용으로 채취가 어렵고 특정 질병의 subgroup 구분에서만 유용하게 이용될 수 있어 일반적 진단에 사용되기 어려운 문제가 있다.

[0011] 비특허문헌 4는 베체트병 환자 및 건강한 사람의 혈액 검체 내의 대사체 차이를 이용하여 베체트병을 진단하고자 하였다. 혈액 시료의 경우에는 침습적 접근이 필요하여 채취에 허가된 전문 인력을 필요로 하며, 따라서 피시험자가 직접 샘플을 채취하여 자가 진단을 할 수 없는 문제가 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Seido et al. Proteomic surveillance of autoantigens in patients with Behcet's disease by a proteomic approach. (2010) Microbiol Immunol 54:354-361.

(비특허문헌 0002) Ahn J et al. A comparative metabolomic evaluation of Behcet's disease with

arthritis and seronegative arthritis using synovial fluid. (2015) PLOS ONE 10:e0135856

(비특허문헌 0003) Kim s et al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis. (2014) PLOS ONE 9:e97501

(비특허문헌 0004) Ahn J et al. Potential metabolomic biomarkers for reliable diagnosis of Behcet's disease using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. (2018) Joint Bone Spine 95:337-343

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 베체트병 환자를 특이적으로 감별 진단하기 위해 대사체학적 접근을 통하여 신속하고 정확하고 편리한 진단을 위한 비침습적 방법으로 채취가 가능한 소변 샘플을 통해 베체트병을 진단 할 수 있는 생체표지자를 발굴하였다. GC/TOF MS를 이용하여 베체트병 환자와 일반인의 소변 내 대사체 분석을 통해 110개의 대사체를 검출하였다. 이 중 urea를 제외한 109개의 대사물질에 대해서 직교부분최소제곱회귀법(OPLS-DA)과 variable importance for projection (VIP) 값, Receiver operating characteristic (ROC) curve의 area under the curve (AUC)의 값, fold change, *p*-value 등을 산출하여 10개의 강력한 베체트병 환자의 소변 내 대사물질 생체표지자(guanine, 3-hydroxypyridine, hypoxanthine, *L*-citrulline, isothreonate, pyrrole-2-carboxylate, galactonate, gluconic acid lactone, sedoheptulose, mannose) 를 제시하였다. 또한 10 개의 생체표지자를 동시에 이용한 강력한 베체트병 진단 panel을 만들었으며, 이를 외부 검체(validation set)를 이용하여 임상적 타당성을 검증하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 소변 대사체 분석을 통해 베체트병을 진단하기 위한 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 베체트병을 진단하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 구아닌(guanine), 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine), 하이폭산틴(hypoxanthine), *L*-시틀린(*L*-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소변 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 베체트병 진단 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성을 검출하는 방법으로,

[0020] (1) GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry)를 이용한 대사체 분석 단계;

[0021] (2) GC/TOF MS에서 동정된 대사체에 대해 부분최소자승관별분석(PLS-DA)를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 확인하는 단계;

[0022] (3) PLS-DA에서 도출된 대사체의 VIP(Variable Importance for Projection) 값이 1.0 이상인 값을 대사체 바이오마커 후보물질로 선정하고, PLS-DA의 로딩 값을 통해 대사체 바이오마커 후보물질의 증감 확인하는 단계;

[0023] (4) ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic curve)을 이용하여 대사체 바이오마커를 검증하는 단계

[0024] 를 순차적으로 적용하여, 소변으로부터 대사체 바이오마커를 분석하는 것을 포함하는 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명을 통하여 대사체학을 소변 분석에 이용해 베체트병을 특이적으로 진단할 수 있는 생체표지자를 최초로 규명하였다. 이는 아직까지 완전히 밝혀져 있지 않은 베체트병의 발병 기전을 밝히는 연구의 기반이 될 수 있다. 또한, 다양한 임상 증상에 최적화된 치료제 개발에 응용될 수 있다. 베체트병의 진단을 용이하게 하는 생체표지자의 발견은 베체트병 환자를 신속하고 정확하게 진단하고, 임상적 진단에 걸리는 긴 시간을 크게 줄여서 맞춤형 치료를 빠르게 제공하여 일상생활로 복귀를 빠르게 하는 등의 사회 경제적 파급 효과도 상당할 것으로 기대된다. 특히, 기존의 혈액 샘플을 이용하여 베체트병을 진단하는 경우와 달리 피시험자가 직접 소변 샘플을 비침습적으로 채취하여 자가진단이 가능하다. 또한, 혈액 샘플과 소변 샘플 모두를 이용하여 진단한다면 특이성을 보다 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 OPLS-DA를 이용하여 베체트병 환자와 건강한 대조군의 소변 내 대사체 프로파일링 차이 비교한 것으로, A는 OPLS-DA로 만들어진 다변량 통계 모델의 score plot으로, 베체트병 환자와 건강한 대조군의 대사체가 확연한 차이를 보임을 나타내며, B는 OPLS-DA로 만들어진 다변량 통계 모델의 loading plot으로 만들어진 모델(표 2)에 각 대사물질의 abundance가 어떻게 기여하는지 보여주고, C는 OPLS-DA 모델의 permutation 결과로, OPLS-DA 모델이 오버피팅 되지 않았으며, 분석에 사용된 샘플에 국한되지 않고 외부 샘플 분석에도 이용될 수 있음을 나타낸다[BD: 베체트병 환자; HC: 건강한 대조군].

도 2는 베체트병에서 유의미하게 증가한 3개 대사물질(A)과 유의미하게 감소한 7개 대사물질(B)의 수준 비교 그래프이다.

도 3은 베체트병 환자 내 steroid, colchicine, azathioprine 투여 그룹과 비투여 그룹 간의 대사체적 차이를 PLS-DA로 나타낸 결과이다[각각의 약물투여 그룹과 비투여 그룹 간의 차이가 Q^2 값이 매우 낮아 재현성이 없고, 통계학적으로 그룹 간의 대사체적 차이가 없음을 보임].

도 4는 베체트병에서 유의미하게 증가한 3개 대사물질 구아닌, 피롤-2-카르복실레이트, 3-하이드록시피리딘과 유의미하게 감소한 7개 대사물질(하이폭산틴(hypoxanthine), L-시톨린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose), 만노오스(mannose))을 이용해 베체트병을 진단하는 대사체적 생체표지자 panel을 OPLS-DA를 통해 분석한 결과이다[t[1] 하나의 축을 이용하였을 때, R^2Y 값이 0.650로 적절하게 구분됨을 보였으며, Q^2 값이 0.600로 모델이 재현성이 있음을 확인함].

도 5는 소변 검체를 이용한 베체트병 진단을 위한 대사체적 진단 panel의 ROC(receiver operating characteristic curve) 결과이다[10개의 대사체 조합을 이용한 생체표지자 panel이 베체트병의 진단에 있어 sensitivity 96.7%, specificity 93.3%, AUC 0.974의 결과를 보임].

도 6은 소변 검체를 이용한 베체트병 진단을 위한 대사체적 진단 panel의 외부 검체 검증 결과이다[주성분 분석에서 14개의 베체트병 환자 및 11개의 건강한 대조군의 소변 샘플 중 11개의 베체트병 환자 및 11개의 건강한 대조군을 정확하게 예측할 수 있음을 보임].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0030] 본 발명은 구아닌(guanine), 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine), 하이폭산틴(hypoxanthine), L-시톨린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 혈액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 베체트병 진단 키트에 관한 것이다.

[0031] 본 발명자들은 베체트병의 바이오마커를 찾기 위해 환자들의 소변으로부터 샘플을 채취하여 메탄올로 추출하고 GC/TOF MS를 이용하여 베체트병 환자와 정상인들의 대사체 프로파일 차이를 비교 분석하고, 이 차이를 이용한

여 베체트병 환자들을 진단할 수 있는 바이오마커 발굴 연구를 수행하였다.

- [0032] 그 결과, 총 110개의 대사체를 동정하였고, 이 중 유기산류가 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로 아미노산류, 당류, 지방산류, 아민류, 인산류 등의 순서로 검출되었다.
- [0033] Urea를 제외한 109개의 대사 물질을 통계분석에 이용하였으며, 30명의 베체트병 환자와 30명의 건강한 대조군의 소변을 비교하였을 때, 직교부분최소제곱회귀법(OPLS-DA)을 통해 베체트병 환자들과 건강한 대조군의 소변 내 대사체가 분명한 차이를 보임을 확인하였으며, VIP 값이 1.0 이상, fold change 1.5 이상, AUC 0.800 이상, *p*-value 0.01 미만의 10개의 대사물질을 신규 생체표지자 후보 물질로 선정하였다. 또한, 베체트병의 특이적 대사체 프로파일과 후보 생체표지자가 베체트병 치료를 위해 투여한 약물에 의한 영향이 아니라는 것을 확인하기 위해 베체트병에서 투여한 약물에 따라 그룹을 나누어 PLS-DA 분석을 시행하였다, 그 결과 베체트병에서 투여한 약물에 따른 대사체적 차이가 없음을 확인하였다.
- [0034] 또한, 보다 쉽고 강력한 진단을 위하여, 후보 생체표지자로 선정된 10개의 대사물질로 구성된 베체트병을 감별하는 대사체적 생체표지자 panel을 생성하였다. 10개 대사체의 생체표지자 panel이 베체트병의 진단적 목적의 이용 가능성을 확인하기 위해 ROC curve를 이용하여 검증하였으며, sensitivity가 96.7%, specificity가 93.3%, AUC 값 0.974로 베체트병을 진단하는 데 매우 우수한 결과를 보였다. 또한, 이 모델의 적정성을 확인하기 위해 다시 외부에서 받은 14개의 베체트병 환자와 11개의 건강한 대조군의 소변을 이용하여 10개 대사체 생체표지자 panel의 외부 샘플 진단 가능 여부를 살펴보았다. 그 결과 우리가 발견한 10개의 대사물질을 이용한 생체표지자 panel이 베체트병 진단에 적절함을 검증할 수 있었다.
- [0035] 보다 바람직하게는 fold change가 2.0 이상인 만노오스(mannose), 시틀린(*L*-citrulline), 하이폭산틴(hypoxanthine), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 구아닌(guanine) 및 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine)으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사물질을 사용하여 베체트병을 진단할 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것(예컨대, 베체트병 의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 진단 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피이다. 더불어 본 발명에서 이용되는 질량분석기는 MALDI-TOF MS 또는 TOF MS 이고, 보다 바람직하게는 TOF MS이다.
- [0039] 본 발명의 소변 대사체는 가스 크로마토그래피에서 각 성분들이 분리되며, Q-TOF MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보(elemental composition)를 통해 구성 성분을 확인한다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 구아닌, 피롤-2-카복실레이트 및 3-하이드록시피리딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가되는 경우, 베체트병을 나타내고 하이폭산틴(hypoxanthine), *L*-시틀린(*L*-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소되는 경우, 베체트병을 나타낸다.
- [0041] 본 명세서에서, 용어 "소변 대사체 농도의 증가"는 건강한 정상인에 비해 베체트병 환자의 소변 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 바람직하게는 70% 이상 증가된 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 30% 이상 증가된 것을 의미한다.

- [0042] 본 명세서에서, 용어 "소변 대사체 농도의 감소"는 건강한 정상인에 비해 베체트병 환자의 소변 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 의미하며, 바람직하게는 40% 이상 감소된 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소된 것을 의미한다.
- [0043] 본 발명에 따르면, 구아닌, 피롤-2-카르복실레이트 및 3-하이드록시피리딘으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 건강한 정상인에 비해 베체트병 환자에서 유의하게 증가된 농도를 나타내고, 하이폭산틴(hypoxanthine), *L*-시틀린(*L*-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 건강한 정상인에 비해 베체트병 환자에서 유의하게 감소된 농도를 나타낸다(표 3).
- [0045] 본 발명은 또한 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성을 검출하는 방법으로,
- [0046] (1) GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry)를 이용한 대사체 분석 단계;
- [0047] (2) GC/TOF MS에서 동정된 대사체에 대해 부분최소자승판별분석(PLS-DA)를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 확인하는 단계;
- [0048] (3) PLS-DA에서 도출된 대사체의 VIP(Variable Importance for Projection) 값이 1.0 이상인 값을 대사체 바이오마커 후보물질로 선정하고, PLS-DA의 로딩 값을 통해 대사체 바이오마커 후보물질의 증감 확인하는 단계; 및
- [0049] (4) ROC 곡선(Receiver Operating Characteristic curve)을 이용하여 대사체 바이오마커를 검증하는 단계;
- [0050] 를 순차적으로 적용하여, 소변으로부터 대사체 바이오마커를 분석하는 것을 포함하는 정상 대조군과 베체트병에서 얻은 소변 간의 대사체 차별성 분석 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 두 생체시료군 간의 대사체 차별성 분석 방법은 베체트병과 정상군에서 얻은 소변 시료군 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법을 예로 들어 구체적으로 설명한다.
- [0052] 우선, 정상인과 베체트병 환자에서 채취한 소변 샘플을 100% 메탄올로 추출한 후 GC/TOF MS 분석에 사용할 수 있도록 공지 기술을 이용하여 유도체화 과정을 거친다.
- [0053] 상기 GC/TOF MS를 이용한 소변의 대사체 분석 방법은 소변 추출물을 GC/TOF MS 기기로 분석하고, 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환한 다음, 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 것을 포함한다.
- [0054] GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 것은 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정하는 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 구현예에 따르면, GC/TOF MS 분석 결과 총 110개의 대사체를 동정하였고, 이 중 유기산류가 가장 많이 검출 되었으며, 그 다음으로 아미노산류, 당류, 지방산류, 아민류, 인산류 등의 순서로 검출 되었다.
- [0056] 상기 GC/TOF MS 분석 결과 나온 대사체의 강도를 총 동정된 대사체의 강도 합으로 나누어 각 대사체를 표준화하고, PLS-DA 분석을 실시한다.
- [0057] 대사체의 PLS-DA 로딩 값과 VIP 값으로 구성된 V-plot를 작성하고, VIP 값이 1.0 이상인 값을 대사체 바이오마커 후보물질로 선정하고, PLS-DA의 로딩 값의 증감을 확인하며, 이때 로딩 값이 양수인 것은 대사체의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체의 감소 경향을 나타내는 것이다.
- [0058] GC/TOF MS에서 분석된 혈액의 대사체의 강도를 이용하여 대사체의 증감을 확인할 수 있다.
- [0059] ROC 곡선을 통해 상기 대사체 바이오마커를 검증한다.
- [0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 베체트병을 진단하기 위한 바이오마커로, 구아닌(guanine), 3-하이드록시피리딘(3-hydroxypyridine), 하이폭산틴(hypoxanthine), *L*-시틀린(*L*-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 피롤-2-카르복실레이트(pyrrole-2-carboxylate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 정상군과 베체트병에서 얻은 소변 시료군 간의 대사체 차별성 분석 방법을 통해 보다 일관성 있고 신

되도 높은 정확한 베체트병을 진단할 수 있고, 이를 치료제 개발에 적용할 수 있다.

[0063] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0065] [실시예]

[0066] 실시예 1: GC/TOF MS를 이용한 대사체 동정

[0067] 베체트병 환자 및 건강한 대조군 각각의 소변 10 µl에 순수 메탄올 990 µl을 섞고 강하게 볼텍싱 한 후에 원심 분리하여 대사체를 추출하였다.

[0068] GC/TOF MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다.

[0069] 추출한 검체를 스피드 백으로 건조시킨 후에 5 µl의 40%(w/v) 농도의 *O*-methylhydroxylamine hydrochloride/pyridine을 넣고 30℃ 200 rpm에서 90분간 반응을 시켰다. 그리고 45 µl의 *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37℃ 200 rpm에서 30분간 반응을 실시하였다.

[0070] GC/TOF MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다.

[0071] 분석할 때 사용한 컬럼은 RTX-5Sil MS capillary column (30 m length, 0.25 mm film thickness, 및 25 mm inner diameter)이며, GC 컬럼 온도 조건은 먼저 50℃에서 5분간 유지시킨 후 330℃까지 승온시킨 다음 1분간 유지하였다. 1 µl의 샘플을 비분할법(splitless)으로 주입(injection)하였다. Transfer line 온도와 Ion source 온도는 각각 280℃, 250℃로 유지시켰다. GC/TOF MS 결과를 보유하고 있는 라이브러리에서 찾아 110개의 대사체를 동정하였으며, 기기 검출 영역 이상으로 고농도인 urea가 통계 분석에 악영향을 미칠 수 있으므로 109개의 대사체를 분석에 사용하였다(표 1).

[0072] 하기 표 1은 베체트병 환자와 건강한 대조군의 소변 검체를 이용하여 대사체 분석 결과 확인된 109개 대사체를 나타낸 것으로, 각각의 대사체군별로 분류하였을 때, 유기산 23.6%, 아미노산 21.8%, 당 21.8%, 지방산 12.7%, 아민 11.8%, 인 1.8%, 기타 6.4%로 나타났다.

표 1

[0073]

Identified metabolites		
Amines		
3-hydroxypyridine	5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	Adenosine
benzamide	guanine	hypoxanthine
inosine	<i>O</i> -phosphorylethanolamine	putrescine
spermidine	thymine	xanthine
Amino acids		
5-aminovalerate	alanine	asparagine
asparagine dehydrated	glutamate	glycine
isoleucine	isothreonate	<i>L</i> -citrulline
<i>L</i> -cysteine	<i>L</i> -homoserine	lysine
methionine	<i>N</i> -methylalanine	ornithine
oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan
tyrosine	valine	β -alanine
Fatty acids		
1-monopalmitin	arachidic acid	arachidonic acid
capric acid	heptadecanoic acid	lauric acid
lignoceric acid	myristic acid	octadecanol
oleic acid	palmitic acid	pelargonic acid
pentadecanoic acid	stearic acid	
Organic acids		
2-hydroxyvalerate	2-ketoadipate	3-hydroxypropionate
3-phenyllactate	adipate	aminomalonnate

aspartate	citramalate	citrate
fumarate	galactonate	galacturonate
gluconate	gluconic acid lactone	glycerate
glycolate	hexonate	isocitrate
lactate	malate	malonate
N-carbamoylaspartate	oxalate	pyrrole-2-carboxylate
succinate	<i>α</i> -ketoglutarate	
Sugars and sugar alcohols		
1,5-anhydroglucitol	arabitol	cellobiose
fructose	galactinol	galactose
glucose	glycerol	lactulose
lyxose	maltotriose	mannitol
mannose	melezitose	melibiose
myo-inositol	palatinitol	phytol
ribose	sedoheptulose	sedoheptulose anhydrous
threitol	threose	xylose
Phosphates		
phosphate	sedoheptulose-7-phosphate	
Others		
indole-3-lactate	nicotinamide	salicylaldehyde
taurine	uracil	uric acid
xanthurenic acid		

[0075] 실시예 2: OPLS-DA를 이용한 베체트병 환자와 건강한 대조군의 소변 내 대사체 프로파일 차이

[0076] 실시예 1로부터 나온 대사체의 강도(intensity)를 총 동정된 대사체의 강도 합으로 나누어 각 대사체를 표준화하였다. 그 후 SIMCA-P+ (ver. 14.1)를 이용하여 OPLS-DA 분석을 실시하였다.

[0077] 도 1에 나타난 바와 같이, 베체트병 환자와 건강한 대조군의 소변 내 대사체 프로파일링이 명확하게 차이가 나는 것을 확인하였다.

[0078] 표 2에 각 대사체가 모델에 미치는 영향의 정도를 나타내는 지표인 loading 및 VIP values를 표시하였다.

표 2

[0079]

Metabolites	Loading values	VIP values	Metabolites	Loading values	VIP values
1,5-anhydroglucitol	-0.0593	0.7113	lignoceric acid	-0.0642	1.0590
1-monopalmitin	-0.1023	1.4834	lysine	-0.0013	0.8195
2-hydroxypyridine	-0.0192	0.2700	lyxose	-0.0551	0.7533
2-hydroxyvalerate	0.1232	1.2138	malate	-0.0845	1.0576
2-ketoadipate	-0.1000	1.3208	malonate	-0.0948	0.9821
3-hydroxypropionate	-0.0196	0.3913	maltotriose	-0.1108	1.3878
3-hydroxypyridine	-0.1188	1.1866	mannitol	-0.0519	0.5484
3-phenyllactate	-0.0726	0.7635	mannose	0.1883	1.8823
5-aminovalerate	-0.0015	0.1858	melezitose	-0.1391	1.5541
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	0.0656	0.6751	melibiose	-0.1041	1.0622
adenosine	0.0988	0.9730	methionine	-0.0280	0.3681
adipate	0.0634	0.6578	myo-inositol	0.0037	0.4271
alanine	-0.0434	0.5891	myristic acid	-0.1031	1.3964
α-ketoglutarate	0.0748	0.8083	N-carbamoylaspartate	-0.0447	0.4426
aminomaltonate	0.0129	0.5310	nicotinamide	0.1371	1.3656

arabitol	0.0306	0.7338	N-methylalanine	0.1127	1.1333
arachidic acid	-0.1367	1.6301	octadecanol	-0.1541	1.7112
arachidonic acid	-0.0296	0.3509	oleic acid	-0.0252	0.6095
asparagine	-0.0419	0.6707	O-phosphorylethanolamine	0.0082	0.2112
asparagine dehydrated	-0.0549	0.6539	ornithine	-0.0078	0.6479
aspartic acid	-0.0002	0.1325	oxalate	0.0866	0.9415
benzamide	-0.0668	0.6704	oxoproline	0.1214	1.2978
capric acid	0.0742	0.8457	palatinitol	0.0074	0.1672
cellobiose	-0.0088	0.3257	palmitic acid	-0.1548	1.8311
citramalate	0.1169	1.1789	pelargonic acid	-0.0562	1.0990
citrate	0.1425	1.4614	pentadecanoic acid	0.0351	0.3500
fructose	-0.0652	0.7439	phenylalanine	-0.0275	0.2835
fumarate	-0.0495	0.5353	phosphate	-0.0275	0.3971
galactinol	0.0753	0.7605	phytol	-0.0349	0.4157
galactonate	0.1909	1.9495	proline	-0.0106	0.3257
galactose	0.1039	1.1282	putrescine	-0.0598	0.6729
galacturonate	0.0993	1.0650	pyrrole-2-carboxylate	-0.1471	1.5941
gluconate	0.1226	1.2099	ribose	0.0683	0.7309
gluconic acid lactone	0.1264	1.2758	salicylaldehyde	-0.0550	1.1026
glucose	-0.0077	0.3953	sedoheptulose	0.1692	1.7424
glutamate	0.0298	0.3166	sedoheptulose anhydrous	0.0275	0.9273
glycerate	0.1072	1.1258	sedoheptulose-7-phosphate	-0.0626	0.6228
glycerol	-0.0282	0.7482	serine	-0.0072	0.3837
glycine	-0.0204	0.6732	spermidine	-0.0049	0.0542
glycolate	0.0528	0.7763	stearic acid	-0.1473	1.7348
guanine	-0.1303	1.3016	succinate	0.0158	0.3017
heptadecanoic acid	-0.1045	1.3528	taurine	0.0173	0.5294
hexonate	0.0093	0.6113	threitol	0.1315	1.4346
hypoxanthine	0.1535	1.5140	threonine	-0.0198	0.7759
indole-3-lactate	-0.0149	0.6259	threose	-0.1359	1.6001
inosine	-0.0190	0.4995	thymine	0.0791	0.7797
isocitrate	0.1425	1.4583	tryptophan	0.0488	0.9356
isoleucine	-0.0178	0.2488	tyrosine	0.0619	1.0672
isothreonate	0.1931	1.9892	uracil	0.0176	0.2551
lactate	-0.0555	1.1998	uric acid	-0.0388	0.4579
lactulose	-0.0436	0.4362	valine	-0.0324	0.4396
lauric acid	-0.0764	1.1532	xanthine	0.0361	0.4511
L-citrulline	0.1917	2.0143	xanthurenic acid	0.0834	0.9389
L-cysteine	0.0807	1.1293	xylose	-0.0548	0.8691
L-homoserine	-0.0861	0.9158	β-alanine	0.0237	0.3000

[0081] 실시예 3: 베체트병 환자에 특이적인 생체표지자 대사물질들의 선별

[0082] 베체트병 환자에서 특이적으로 증감한 생체표지자를 찾기 위해서, 각각의 대사물질로부터 실시예 2로부터 도출된 대사체 프로파일링의 차이에 영향을 미치는 VIP 값과 fold change, AUC, *p*-value를 구하였다. VIP 값이 1.0 이상, fold change 1.5 이상, AUC 0.800 이상, *p*-value 0.01 미만의 기준을 각각의 대사물질에 대해 구하였고, 10개의 대사물질이 베체트병 진단에 적절함을 보였다(표 3).

[0083] 하기 표 3은 베체트병 진단을 위한 잠재적 생체표지자로 선정된 10개의 대사물질의 VIP, AUC, fold change, *p*-

value 값[BD, 베체트병 환자; control, 건강한 대조군]을 나타낸 것이다.

[0084] 또한, 이 대사물질들의 절대적 intensity를 박스 플롯을 이용하여 그룹별로 비교하였다 (도 2).

표 3

Metabolite	VIP	Fold	AUC	p-value
Metabolites with higher abundances in the BD group than in the control group				
guanine	1.63	2.33	0.834	3.68E-05
pyrrole-2-carboxylate	1.40	1.95	0.806	1.01E-04
3-hydroxypyridine	1.36	2.25	0.846	2.75E-03
Metabolites with higher abundances in the control group than in the BD group				
mannose	2.02	3.28	0.860	1.11E-08
L-citrulline	1.87	2.08	0.884	2.19E-08
galactonate	1.79	1.78	0.856	1.54E-07
isothreonate	1.79	1.76	0.862	1.38E-07
sedoheptulose	1.55	1.69	0.820	9.53E-06
hypoxanthine	1.48	2.25	0.849	1.06E-04
gluconic acid lactone	1.24	2.07	0.818	8.33E-04

[0086] AUC, area under the ROC curve; BD, Behcet's disease; VIP, variable importance on projection

[0088] 실시예 4: PLS-DA를 이용한 베체트병 환자에서 증감한 대사물질에 약물 효과 존재 유무 검증

[0089] 베체트병 환자에서 특이적으로 증감한 생체표지자가 약물에 의해 증감한 물질이 아님을 보이기 위해서, 각각의 약물투여 그룹 vs. 약물비투여 그룹을 PLS-DA를 이용해 비교한 결과, 분리 수준이 적절하지 않고 재현성이 없는 것으로 나타났다. 3개의 투여된 약물 그룹 steroid, colchicine, azathioprine에서 각각 재현성이 없는 결과를 보였으며, 약물에 따른 차이가 통계적으로 유의미하지 않았다.

[0090] 따라서, 실시예 3에서 보인 베체트병에서 증감한 대사물질이 질병 자체에 의한 변화이므로 생체표지자로 적절함을 확인하였다(도 3).

[0091]

[0092] 실시예 5: 소변 검체를 통한 베체트병의 진단을 위해 10개의 대사물질을 이용한 대사체적 진단 panel의 생성

[0093] 실시예 3으로부터 선정된 베체트병에서 유의미하게 증가한 3개 대사물질(구아닌, 피롤-2-카복실레이트, 3-하이드록시피리딘)과 유의미하게 감소한 7개 대사물질(하이포산틴(hypoxanthine), L-시톨린(L-citrulline), 이소트레오네이트(isothreonate), 갈락토네이트(galactonate), 글루콘산 락톤(gluconic acid lactone), 세도헵툴로오스(sedoheptulose), 만노오스(mannose))의 베체트병 진단을 위한 생체표지자 10개를 동시에 사용하여 베체트병을 진단할 수 있는 대사체적 진단 panel을 OPLS-DA를 통해 생성시켰다.

[0094] t[1] 하나의 축을 이용했을 때, R^2X 값이 0.592, R^2Y 값이 0.650, Q^2 값이 0.600으로 통계학적으로 유의미한 모델을 통하여 베체트병 환자와 건강한 대조군을 적절하고 재현성 있게 구분하였다(도 4).

[0096] 실시예 6: 소변 검체를 이용한 베체트병의 진단을 위한 대사체적 진단 panel의 ROC 및 외부 검체 검증을 통한 모델 검증

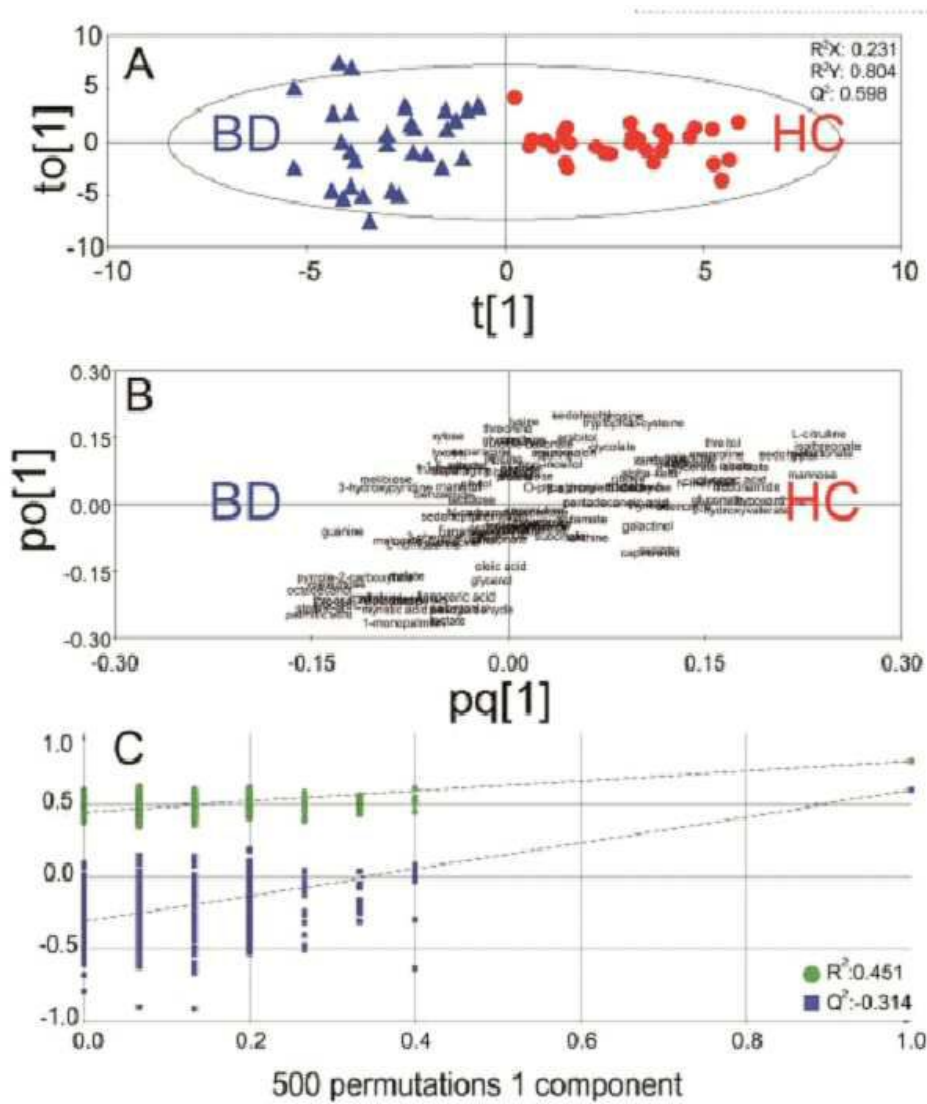
[0097] 실시예 5를 통해 생성된 소변 검체 내 10개의 바이오마커를 통한 베체트병 진단용 대사체적 생체표지자 panel이 진단에 적절한지 살펴보기 위하여 모델 내 각 검체의 PC1 score를 이용해서 ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 그렸다. 그 결과, sensitivity가 96.7%, specificity가 93.3%, AUC값이 0.974으로 모델이 베체트병 진단에 매우 적합함을 보였다(도 5).

[0098] 또한, 이 panel이 외부 검체를 이용하여 베체트 질환의 진단을 예측할 수 있는지 살펴보기 위하여, 베체트병 환자의 소변검체 14개와 건강한 대조군의 소변 검체 11개, 총 25개의 검체를 panel에 집어넣어 예측

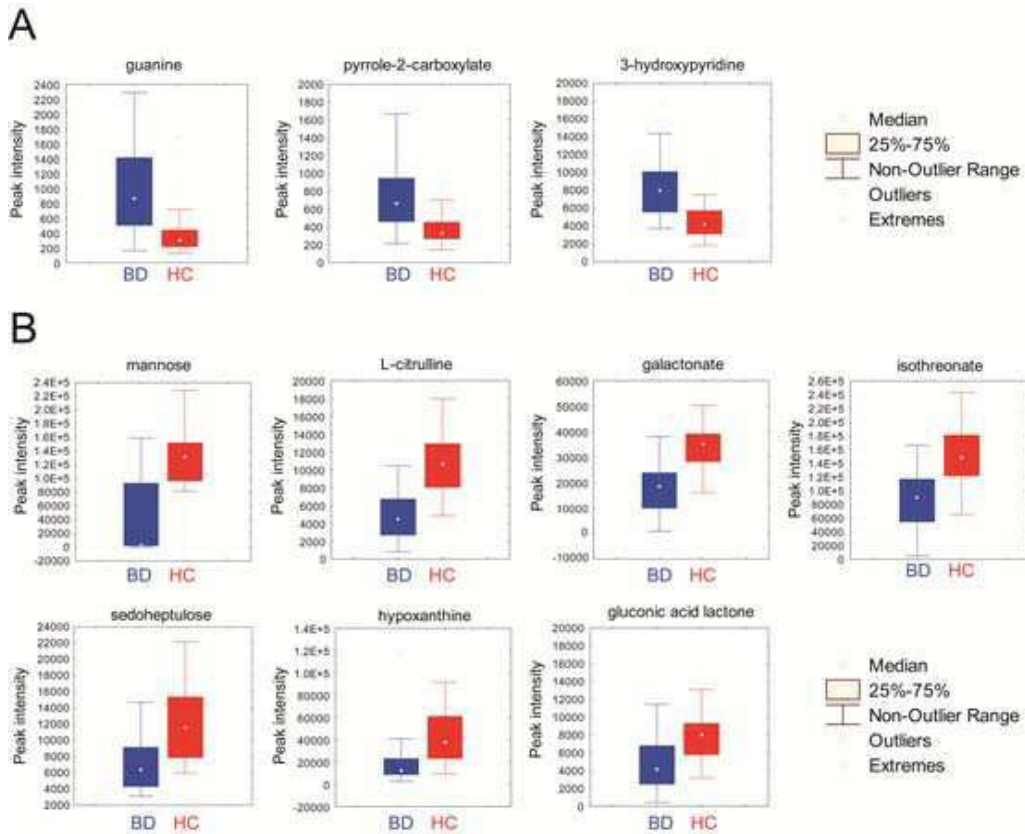
이용하였다. 그 결과, 건강한 대조군 소변 검체 11개는 모두 건강한 대조군의 값을 (모델 내에서 양수) 가져서 건강한 대조군에 속하도록 예측하였으며, 베체트병 환자 소변 검체 14개 중 11개가 베체트병 환자의 값을 (모델 내에서 음수) 가져 베체트병 환자임을 예측하였다. 따라서 25개의 외부 검체 중 22개의 검체를 정확하게 베체트병 환자 혹은 건강한 대조군으로 예측할 수 있음을 나타내어, 10개의 대사체 생체표지자 panel이 외부 검체의 베체트병 진단에도 적절함을 나타내었다 (도 6).

도면

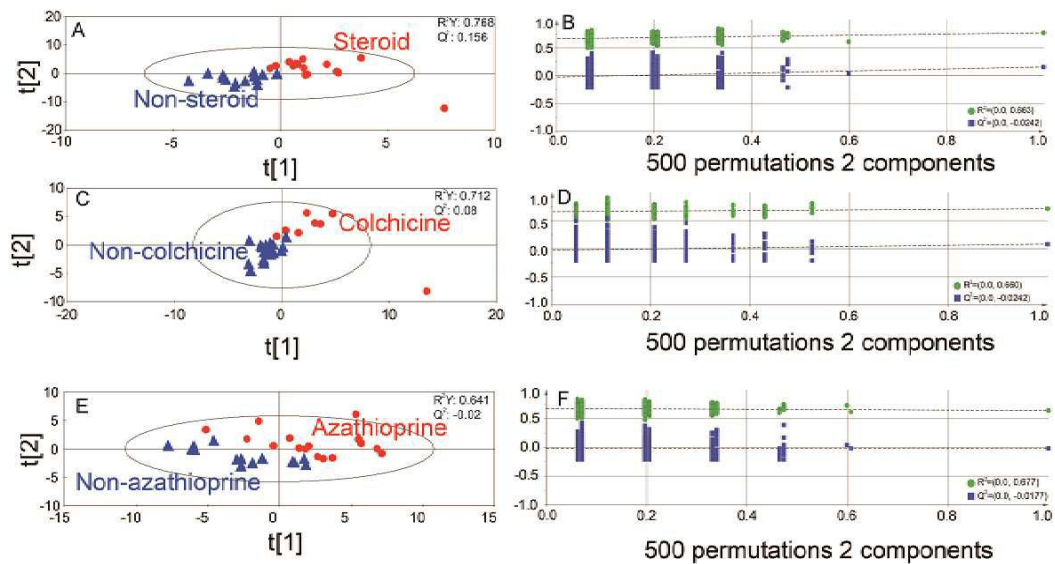
도면1



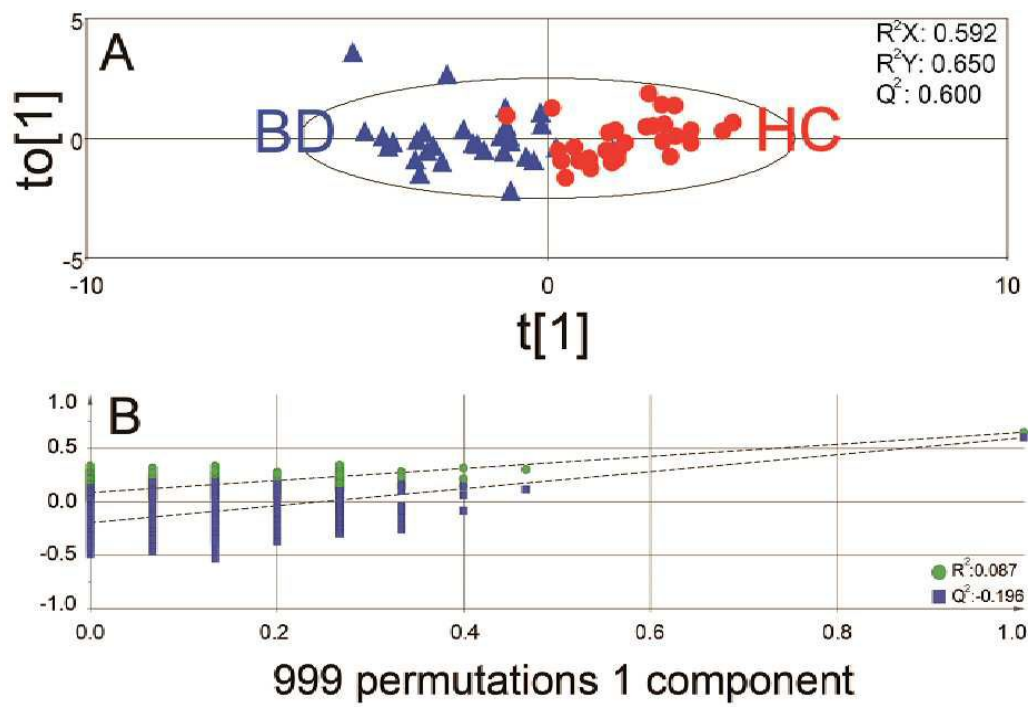
도면2



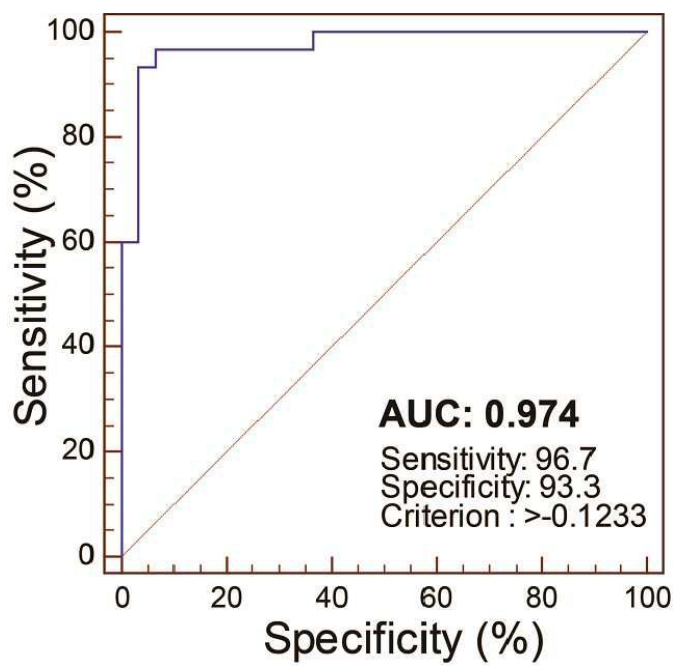
도면3



도면4



도면5



도면6

