



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월23일

(11) 등록번호 10-2366856

(24) 등록일자 2022년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 5/00 (2021.01) A61B 5/145 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01) G16H 50/30 (2018.01)

G16H 50/50 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61B 5/4343 (2013.01)

A61B 5/14546 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0053232

(22) 출원일자 2021년04월23일

심사청구일자 2021년04월23일

(56) 선행기술조사문헌

US08883512 B1*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김영주

서울특별시 양천구 목동서로 38, 120동 902호(목동, 목동신시가지아파트1단지)

유영아

서울특별시 광진구 독섬로 510, 401호(자양동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 23 항

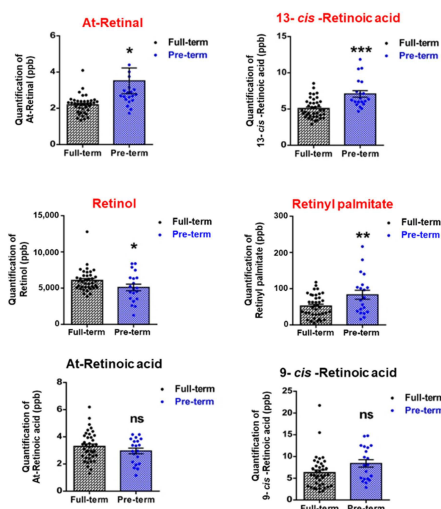
심사관 : 김상운

(54) 발명의 명칭 레티노이드 대사체를 이용한 조산의 조기 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 레티노이드 대사체를 이용한 조산의 조기 예측 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61B 5/7275 (2013.01)
G01N 24/087 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 33/487 (2013.01)
G16H 50/30 (2018.01)
G16H 50/50 (2018.01)
G01N 2800/368 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20190249254 A1*
 KR102216004 B1
 KR102180894 B1
 US20140186332 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(72) 발명자

안사리 아부자

경기도 고양시 일산동구 위시티로 51-14, A동 102호(식사동)

김수민

인천광역시 계양구 계산새로33번길 26, 103동 408호(계산동, 태산아파트)

박선화

서울특별시 양천구 목동서로 155, 105동 1902호(목동)

이가인

충청남도 천안시 동남구 목천읍 신계1길 41, 111동 806호(동우아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114123
과제번호	2020R1A2C3011850
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	다중 오믹스 기반의 바이오빅데이터 딥러닝을 이용한 조산 예측 모델 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

간 기능 장애를 가지지 않는 임산부로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 대사체를 정량하는 단계를 포함하는, 조산 예측을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 정량된 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 정량된 대사체의 수준이 대조군보다 높을 경우, 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 대조군은 정상 분만 산모인, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 시료인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 대사체를 정량하는 단계는 액체 크로마토그래피-질량분석기, 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조산은 간 기능 장애에 의한 것이 아닌 조산인, 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

간 기능 장애를 가지지 않는 임산부로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 대사체를 정량할 수 있는 제제를 포함하는, 조산 예측용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제제는 상기 대사체 수준의 증가를 정량할 수 있는 것인, 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 시료인, 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서, 액체 크로마토그래피-질량분석기, 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 상기 대사체를 정량하는 것인, 조성물.

청구항 17

간 기능 장애를 가지지 않는 임산부로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 대사체 정량용 제제, 또는 정량 장치를 포함하는, 조산 예측용 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 키트는 상기 대사체 수준의 증가를 정량하는 것인, 키트.

청구항 19

삭제

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 시료인, 키트.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 키트.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 정량 장치는 액체 크로마토그래피-질량분석기, 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 키트.

청구항 23

시험 대상인 간 기능 장애를 가지지 않는 임산부로부터 분리된 생물학적 시료를 입력받는 입력부;

상기 시료 내에서 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 대사체를 정량하는 정량부;

상기 정량된 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 연산부; 및

상기 비교 결과에 따라 상기 시험 대상의 조산 위험 여부를 나타내는 결과를 표시하는 표시부를 포함하는, 조산 예측용 시스템.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 연산부에서 상기 대사체의 수준이 대조군보다 높은 것으로 연산될 경우, 상기 표시부는 상기 시험 대상이 조산 위험성이 있는 것으로 표시하는 것인, 시스템.

청구항 25

삭제

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 시료인, 시스템.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 시스템.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 정량부는 액체 크로마토그래피-질량분석기, 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 대사체를 정량하는 것인, 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레티노이드 대사체를 이용한 조산의 조기 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조산 (Preterm birth; PTB)은 37주 미만에서 출산하는 것을 말하는데, 최근 아시아 지역 107개 국가의 통계에 의하면 약 10.6%의 빈도로 발생하고 있다. 우리나라의 경우, 2006년에는 조산율이 약 4.8% 로 나타났으나, 2016년에는 7.2% 로 약 2배 가까이 증가하여, 조산율이 증가하고 있는 추세이다. 조산은 단기적으로는 신생아 및 5세 이하 아동의 사망률이 증가하는 위험성이 있고, 신경발달 등의 문제가 발생할 확률이 높아지며, 장기적으로는 2형 당뇨, 비만, 고혈압 등의 유병율이 증가하는 위험성이 있다.

[0003] 조산의 발생기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, 자연적 진통과 흔히 연관된 위험인자는 생식기계 감염, 다태 임신, 2,3 삼분기 출혈, 이전의 조산기왕력 등이 있다. 또한, 조산의 약 75%는 조기진통과 양막 파수, 그리고 이와 관련된 자궁경관 무력증과 융모막염 등을 수반하여 발생하게 된다.

[0004] 우리나라는 저출산 국가임에도 불구하고 37주 미만의 조산율이 꾸준히 증가하고 있어, 산모 및 신생아 건강을 위협하고 나아가 경제 손실 비용을 초래하고 있다. 지금까지 조산의 극복을 위하여 태아파이브로넥틴, CRP측정, 자궁경부 길이 측정 등을 통해 조산을 예측하고 있으나, 아직까지 조산 예측물의 민감도가 낮은 실정이다.

[0005] 따라서 이른 주수에 조산의 징후가 왔을 때, 적절한 치료를 통하여 분만 주수를 지연시켜 신생아를 성숙도를 높이는 것은 산모와 신생아의 건강과 삶의 질과 비용에 중대한 관건이 된다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) US 8883512 B1

(특허문헌 0002) US 20190249254 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 예는 생물학적 시료 내 레티노이드 대사체 수준을 이용하여 조산을 예측할 수 있는, 조산 예측 방법 또는 조산 예측을 위한 정보 제공 방법을 제공하기 위한 것이다.

- [0007] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내 레티노이드 대사체 수준을 이용하여 조산을 예측할 수 있는, 조산 예측용 조성물을 제공하기 위한 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내 레티노이드 대사체 수준을 이용하여 조산을 예측할 수 있는, 조산 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내 레티노이드 대사체 수준을 이용하여 조산을 예측할 수 있는, 조산 예측용 시스템에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 단계를 포함하는, 조산 예측 방법, 또는 조산 예측을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량할 수 있는 제제를 포함하는, 조산 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 정량용 제제, 또는 정량 장치를 포함하는, 조산 예측용 키트에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 정량부를 포함하는, 조산 예측용 시스템에 관한 것이다.
- [0015] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0016] 본 발명의 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 단계를 포함하는, 조산 예측을 위한 정보 제공 방법, 조산 예측 방법, 조산 진단을 위한 정보 제공 방법, 또는 조산 진단 방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 "조산", "premature birth", "preterm birth", "PTB" 등은 동일한 의미를 갖고, 37주 미만에서 태아의 출산을 의미한다.
- [0018] 본원 실시예에 의하면 본 발명에 따른 조산에 대한 레티노이드 대사체 마커는, 산모의 혈액 시료를 이용하여 분석한 것으로, 조산군과 만삭 분만군에서 유의한 차이를 보였으며, 이에 본 발명의 일 예에 따른 레티노이드 대사체 마커를 이용하면 조산을 예측할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "조산의 위험성 진단" 또는 "조산의 위험성 예측"이란, 임산부가 조산을 할 가능성이 있는지, 조산의 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 조산의 징후를 나타낼 가능성이 있는지 여부를 판별하는 것을 말한다.
- [0020] 본 발명은 조산 위험성이 높은 임산부들을 특별하고 적절한 관리를 통하여 조산을 지연시키거나 방지하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 조산을 조기에 진단하여 가장 적절한 치료 방식을 선택함으로써 치료 결정을 하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "또는"은 명확하게 내용이 특정되지 않는 한, "및/또는"을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "마커", "진단용 마커", "진단하기 위한 마커", "진단 마커(diagnosis marker)" 또는 "표지자"란 조산 임산부를 예측하여 정상 분만군과 구분하는 기준이 되는 물질로, 상기 대조군의 시료에 비하여 조산으로 예측되는 임산부의 시료에서 유의적인 차이를 나타내는 생체 유기 분자들을 의미한다. 본 발명의 일 예에 따르면, 상기 마커 등은 생물학적 시료 내의 대사체를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 "대사체 (metabolite)"는 생체 내 대사의 결과로서 생성되는 물질로서, 대사물질, 중간대사물질, 대사중간체 등으로 표기될 수 있으며, 주로 세포 과정 중 발생하는 소분자의 대사산물 전체 (metabolome)를 뜻한다. 예를 들어, 본 발명의 일 예에 따르면 상기 대사체는 레티노이드 대사체인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 대사체는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 대사체는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료"는 시험 대상, 또는 시험 개체, 예를 들어 임산부로부터 분리 또는 채취된 시료를 의미한다. 상기 생물학적 시료는 임산부에서 유래한 시료, 구체적으로 임산부의 혈액 시료, 예를 들어

전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종인 것일 수 있다.

- [0025] 본 발명의 일 예에 따른 조산 예측을 위한 정보 제공 방법, 조산 예측 방법, 조산 진단을 위한 정보 제공 방법, 또는 조산 진단 방법은, 상기 정량된 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 예를 들어, 상기 대사체가 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상이고, 상기 정량된 대사체의 수준이 대조군보다 높을 경우, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 대조군은 조산을 하지 않고 정상 분만한 산모, 임신 37주 이상에서 분만한 산모, 또는 만삭 분만한 산모인 것일 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "증가"는 비교 대조군, 예를 들면, 확립된 대조군 또는 표준 대조군 (예를 들면, 정상 분만을 한 산모의 생물학적 시료, 또는 임신 37주 이상에서 분만한 산모의 생물학적 시료에서 나타난 마커 대사체의 평균 수준)으로부터 양(quantity)의 증가, 수준(level)의 증가, 분포(distribution)의 증가, 분포비율의 증가, 또는 농도(concentration)의 증가 등을 의미한다. 구체적으로, 상기 분포 비율은 액체 크로마토그래피-질량분석기 등의 분석 결과 생물학적 시료 내 특정 대사체의 상대적 함량, 또는 상대적 농도일 수 있다.
- [0028] 예를 들어, 상기 증가는 대조군 값의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.15배 이상, 1.2배 이상, 1.25배 이상, 1.3배 이상, 1.35배 이상, 1.4배 이상, 1.45배 이상, 또는 1.5배 이상의 증가 또는 통계적으로 유의한 증가일 수 있으나, 통상의 기술자라면 절대적인 증가량이 특정되지 않더라도, 대조군 대비 유의하게 증가된 변화를 명확하게 이해할 수 있을 것이다. 상기 대조군 값은 예를 들어 적어도 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 30개 이상, 또는 35개 이상의 대조군 값의 평균값인 것일 수 있다.
- [0029] 예를 들어, 생물학적 시료 내 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal)의 농도가 대조군 값의 1.5배 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0030] 예를 들어, 생물학적 시료 내 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)의 농도가 대조군 값의 1.4배 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 생물학적 시료 내 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)의 농도가 대조군 값의 1.5배 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0032] 예를 들어, 생물학적 시료 내 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal)의 농도가 2.48 ppb 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0033] 예를 들어, 생물학적 시료 내 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)의 농도가 5.56 ppb 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0034] 예를 들어, 생물학적 시료 내 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)의 농도가 100.33 ppb 이상일 때, 상기 생물학적 시료가 분리된 임신부는 조산 위험성이 있는 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0035] 상기 증가를 나타내는 용어, 예를 들어 “높은”, “더”, “더 높은”, “유의하게 높은”, “통계적으로 유의하게 높은” 등의 용어는 상기 기술된 바와 같이 동일한 의미로 사용된다. 대조적으로, 용어 “유의하지 않게”, “동등하게”, “실질적으로 동일”, “실질적으로 변화 없는” 등은 표준 대조군의 $\pm 10\%$ 이내, $\pm 5\%$ 이내, $\pm 3\%$ 이내, 또는 $\pm 2\%$ 이내 등, 표준 대조군 값으로부터 변화가 거의 없거나 유의하지 않은 변화를 보이는 것을 의미한다.
- [0036] 본 명세서에서 용어 “대조군”은 조산을 예측하기 위해 본 발명에 따른 대사체의 수준을 비교하기 위한 대상으로, 비교 대조군, 표준 대조군, 또는 정상 대조군 등의 용어와 호환 가능하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 대조군은 조산을 하지 않은 산모, 정상 분만을 한 산모, 또는 임신 37주 이상에서 분만한 산모일 수 있다.
- [0037] 상기 대사체를 정량하는 단계는 액체 크로마토그래피-질량분석기 (LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 예에 따른 조산은, 간 기능 장애 (liver dysfunction)에 의한 조산이 아닌 것일 수 있다. 본원 실시예에 의하면, 본 발명에 따른 레티노이트 대사체 조산 마커의 유의한 차이를 보인 조산군 및 정상 대조군은, 간 기능 관련 지표, 구체적으로 알라닌아미노기전달효소 (alanine aminotransferase; ALT) 및 아스파르트산아미

노기전달효소 (aspartate aminotransferase; AST) 등의 간세포 손상 인자 수준의 유의한 차이를 보이지 않았으며, 더욱 구체적으로 임신 3기에서 상기 간세포 손상 인자 수준의 유의한 차이를 보이지 않았다. 이에, 본 발명의 일 예에 따른 조산은 간 기능 장애에 의한 조산이 아닌 것일 수 있다.

- [0039] 즉, 본 발명의 일 예에 따라 조산을 예측하는 대상 산모는, 간 기능 장애를 가지지 않는 산모일 수 있다. 구체적으로, 상기 산모는 임신 3기에서 간 기능 장애를 가지지 않는 산모일 수 있다.
- [0040] 예를 들어, 상기 산모는 간 기능 관련 지표, 또는 간세포 손상 인자 수준이 정상 대조군과 유의한 차이가 없는 산모일 수 있다. 구체적으로, 상기 산모는 임신 3기에서 간 기능 관련 지표, 또는 간세포 손상 인자 수준이 정상 대조군과 유의한 차이가 없는 산모일 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 상기 산모는 알라닌아미노기전달효소 (alanine aminotransferase; ALT) 및/또는 아스파르트산아미노기전달효소 (aspartate aminotransferase; AST) 수준이 정상 대조군과 유의한 차이가 없는 산모일 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 상기 산모는 AST 50 U/L 이하, 45 U/L 이하, 40 U/L 이하, 35 U/L 이하, 30 U/L 이하, 25 U/L 이하, 또는 20 U/L 이하인 산모일 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 산모는 ALT 50 U/L 이하, 45 U/L 이하, 40 U/L 이하, 35 U/L 이하, 30 U/L 이하, 25 U/L 이하, 20 U/L 이하, 또는 15 U/L 이하인 산모일 수 있다.
- [0044] 예를 들어, 상기 산모는 AST/ALT 비율이 0.1 내지 2, 0.1 내지 1.8, 0.1 내지 1.5, 0.3 내지 2, 0.3 내지 1.8, 0.3 내지 1.5, 0.5 내지 2, 0.5 내지 1.8, 0.5 내지 1.5, 0.7 내지 2, 0.7 내지 1.8, 0.7 내지 1.5, 1 내지 2, 1 내지 1.8, 또는 1 내지 1.5인 산모일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량할 수 있는 제제를 포함하는, 조산 예측용 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 상기 레티노이드 대사체는 전술한 바와 같으며, 예를 들어 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 대사체는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0047] 상기 제제는 생물학적 시료 내에서 대사체의 양 (quantity), 수준 (level), 분포 (distribution), 분포비율, 또는 농도 (concentration)를 정량하는 것일 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 상기 제제는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상, 일 예로 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 증가, 예를 들어 양, 수준, 분포, 분포비율, 또는 농도의 증가를 정량할 수 있는 것일 수 있다.
- [0049] 상기 대사체는 액체 크로마토그래피-질량분석기 (LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 정량되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 일 예는 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 정량용 제제, 또는 정량 장치를 포함하는, 조산 예측용 키트에 관한 것이다. 상기 레티노이드 대사체는 전술한 바와 같다.
- [0051] 상기 키트는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상, 일 예로 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 증가, 예를 들어 양, 수준, 분포, 분포비율, 또는 농도의 증가를 정량할 수 있는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 정량 장치는 액체 크로마토그래피-질량분석기 (LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 일 예는, 조산을 예측 또는 진단하기 위한 장치, 장비, 또는 시스템에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 기술된 조산 예측 방법, 조산 예측을 위한 정보 제공 방법, 조산 진단 방법, 또는 조산 진단을 위한 정보 제공 방법 단계의 전부 또는 일부를 수행할 수 있는 장치, 장비, 또는 시스템에 관한 것이다. 상기 장치,

장비, 또는 시스템은 본 발명의 일 예에 따른 조산 예측용 조성물, 또는 조산 예측용 키트 등을 사용하여 상기 단계의 전부 또는 일부를 수행하는 것일 수 있다.

[0054] 예를 들어, 상기 장치, 장비, 또는 시스템은 시험 대상의 생물학적 시료, 예를 들어 시험 대상 임신부에서 분리된 혈액 시료를 얻고, 상기 시료 중 본 발명에 따른 마커 대사체의 양 또는 농도를 정량하고, 상기 양 또는 농도를 대조군, 예를 들어 정상 분만한 대조군 산모의 수치값과 비교하고, 상기 비교 결과에 따라 상기 시험 대상의 조산 위험 존재여부를 나타내는 결과를 표시하는 것일 수 있다. 이에, 본 발명의 일 예에 따른 장치, 장비, 또는 시스템은 생물학적 시료 내에서 레티노이드 대사체를 정량하는 정량부를 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 구체적으로, 상기 장치, 장비, 또는 시스템은 시험 대상의 생물학적 시료를 입력받는 입력부; 상기 시료 내에서 본 발명에 따른 마커 대사체를 정량하는 정량부; 상기 정량된 대사체의 수준을 대조군의 수치값과 비교하는 연산부; 및 상기 비교 결과에 따라 상기 시험 대상의 조산 위험 존재여부를 나타내는 결과를 표시하는 표시부를 포함하는 것일 수 있다.

[0056] 상기 마커 대사체는 전술한 바와 같으며, 예를 들어 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate) 로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 마커 대사체는 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 연산부에서 전-트랜스-레티날 (all trans-retinal), 13-시스-레티노산 (13-cis-retinoic acid), 및 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate)로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 수준이 대조군보다 높은 것으로 연산될 경우, 상기 표시부는 상기 시험 대상이 조산 위험성이 있는 것으로 표시하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 생물학적 시료는 임신부로부터 분리된 것일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 혈액 시료일 수 있으며, 일 예로 전혈, 혈장, 및 혈청으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0059] 상기 정량부는 액체 크로마토그래피-질량분석기 (LC/MS), 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), 및 질량분석기로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상으로 대사체를 정량하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 일 예에 따른 레티노이드 대사체 조산 마커를 이용하면 조산을 조기에 예측할 수 있고, 비침습적이고 정확도 높은 조산 예측이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 본 발명의 일 예에 따라 시험 대상을 선정하는 과정을 나타낸 순서도 (flowchart)이다.
 도 2는 RPC 양성에서 TB와 비교하여 PTB에 대해 명확하게 구분된 범주를 보여준다 ($Q2 = 0.072$; $R2 = 0.085$).
 도 3은 경로 영향 분석의 산점도 (scatter plot)을 나타낸 것으로, y축은 p-value를 나타낸다.
 도 4는 레티노이드 대사 산물 분석을 통해 조산 산모의 혈장 시료에서 변화를 보이는 레티노이드 대사체를 나타낸 도면이다 (39TB, 20PTB).
 도 5는 대사체에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 도면으로, 민감도 및 특이도의 ROC 곡선을 이용한 조산 바이오마커의 예측 성능을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0064] 실험 재료 및 방법

[0065] 실시예 1. 연구 대상

[0066] 이화여자대학교 의료원에서 산전 검진 및 분만을 위해 방문한 임신부를 모집하였다. 피험자를 대사체 프로파일 분석하기 위한 탐색 그룹 (discovery group) (10 TB 및 11 PTB)과, 레티노이드 대사체를 분석하기 위한 검증 그룹 (validation group) (39 TB 및 20 PTB)으로 나누었다. 연구 대상은 임신 16주에서 35주 5일 사이의 무증

상 단계 임신부 (asymptomatic singleton pregnant women with asymptotary) 또는 조기 산통 (preterm labor; PTL) 및/또는 조기 양막 파열 (premature rupture of membrane; pPROM)이 있는 입원 임신부였다.

[0067] 심전도 검사로 감지하여, 규칙적인 자궁 수축과 20 분 내에 4회 이상의 수축, 또는 60분 내 8회 이상의 수축이 있는 환자를 조기 진통 (PTL)으로 진단하였다. 조기양막파수 (pPROM)를 진단하기 위해, 질강 내 양수 고착을 감지하기 위한 멸균 검경 검사와, 막 파열 감지를 위한 니트라진 검사 (nitrazine test)를 실시했다. 재태 연령은 마지막 월경 첫날과 초음파 검사를 사용하여 결정되었다. 임신부가 산전 검진을 위해 방문하거나 분만을 위해 병원에 입원했을 때 혈액 샘플을 채취하여 대사체 분석을 수행할 때까지 -80 °C에서 보관했다.

[0068] 본 연구는 이화여자대학교 병원기관심의위원회 (EUMC 2018-07-007-010)의 승인을 받았다. 모든 실험은 승인된 지침에 따라 수행되었으며, 모든 피험자로부터 사전 동의를 얻었다.

[0070] 실시예 2. 산모 혈액 샘플 준비

[0071] 200 μ L의 혈장 샘플을 600 μ L의 용매 혼합물 (아세토니트릴/메탄올/아세톤; 1:1:1, v/v)으로 침전시킨 다음, 3분 동안 볼텍스로 혼합하고 30분 동안 -20° C에 보관하였다. 침전된 샘플을 10,000g, 4 ° C에서 10분 동안 원심분리 한 다음, 600 μ L의 상층액을 다른 시험관으로 옮기고 온화한 질소 스트림 (gentle nitrogen stream) 하에서 증발 건조시켰다. 잔류 물을 200 μ L의 50 % 메탄올로 재구성한 다음 5 μ L (RPC 분리 모드) 샘플을 UPLC-LTQ-Orbitrap MS로 분석했다.

[0073] 실시예 3. LTQ-Orbitrap MS에 의한 대사체 프로파일링

[0074] 대사체 프로파일링은 포지티브 모드 (ESI+)에서 작동하는 전기 분무 소스가 장착된 LTQ-OrbitrapVelos Pro 하이브리드 질량 분석기 (Thermo Fisher Scientific)와 결합된 Ultimate 3000 UHPLC 시스템 (Thermo Fisher Scientific, 미국 캘리포니아주 산 호세)을 이용하여 수행하였다. Acquity™ UPLC BEH C18 컬럼 (2.1mm $\times$ 100mm, 1.7 μ m, Waters, Milford, MA, USA) UPLC 분석 컬럼에서 역상 분리 (reversed-phase separation)를 수행했다. 이동상 용매는 95% 물, 5% ACN 및 0.1% 포름산 (이동상 A) 및 95% ACN, 5% 물 및 0.1% 포름산 (이동상 B)을 사용하였다. 용출 구배는 다음과 같았다: 0-3분까지 100% 이동상 A; 3-10분까지 50% 이동상 B로 선형 증가 (linear increase); 10-12분까지 이동상 B를 50-90%까지 선형 증가 (linear increase); 12-15분까지 100% 이동상 A의 선형 증가 유지; 15-18분까지 100% 이동상 A로 재-평형화 (re-equilibration). 컬럼은 40° C에서 유지되었고; 총 실행 시간은 18 분이였다. 분석을 위해 각 샘플의 5 μ L 표본 (aliquot)을 주입했다. 샘플은 분석 중에 자동 샘플러 (auto sampler)에서 4° C로 유지되었다.

[0076] 실시예 4. 레티노이드 대사체 검증을 위한 표준 원액 준비

[0077] TB와 PTB의 대사 경로를 분석하기 위해 레티노이드 대사체를 분석하기로 결정했다. 레티놀 (retinol; ROH), 레티닐 아세테이트 (retinyl acetate; RAc), 레티닐 팔미테이트 (retinyl palmitate; RP), 전-트랜스 레티날 (all-trans retinal; at-RAL), 전-트랜스 레티노산 (all-trans retinoic acid; at-RA), 13 시스-레티노산 (13cis-retinoic acid; 13cis-RA), 레티닐 아세테이트-D6 (retinyl acetate-D6; RAc-D6), 전-트랜스 레티날-D6 (all-trans retinal-D6; at-RAL-D6), 및 전-트랜스 레티노산-D6 (all-trans retinoic acid-D6; at-RA-D6)에 대해, 레티노이드의 모든 표시된 분석 참조 표준 (analytical reference standards) 및 내부 표준 (internal standards)의 저장 용액을 최종 농도가 2000 ppm이 되도록 메탄올에 균일하게 용해하였다. 레티놀-D6 (ROH-D6)은 예외적으로 1000ppm의 최종 농도로 제조하였다. 용액은 사용할 때까지 -20° C 온도에 보관하였다. 타겟 레티노이드들의 최종 정량화를 위한 검량선 (calibration curve)은 800 ~ 0.05 ppb 범위에서 이러한 표준 스톡 용액 (standard stock solutions)을 4배 연속 희석하여 제조했다. ROH, RAc, at-RAL 및 at-RA 표준은 Cayman Chemicals, Inc. (Ann Arbor, Michigan)에서 입수했고, RP, 13cis-RA는 Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, USA, Missouri)에서 입수했다. 위에서 언급한 4개의 동위 원소 표시된 내부 표준 (internal standards)은 모두 Cambridge Isotopes Laboratories, Inc. (Tewksbury, USA, Massachusetts)에서 구입했다.

[0079] 실시예 5. 샘플 준비

[0080] 혈장 샘플에서 표적 레티노이드를 효과적으로 추출하기 위해 액체-액체 추출 방법을 사용하였다. 200 μ L의 혈장 샘플 각각에, 동위 원소 표시된 내부 표준 혼합물 (internal standard mixture)을 첨가하고, 200 μ L의 아세토니트릴 (acetonitrile)로 혈청 단백질을 침전 전에, 잠시 볼텍싱하였다. 1분 동안 볼텍싱 한 후, 1.2 mL의 메틸-tert-부틸 에테르 (methyl-tert-butyl ether)를 각 튜브에 추가로 첨가하고 다시 1분 동안 볼텍싱했다. 다음으로 샘플을 13,000 rpm, 4° C에서 10 분 동안 원심 분리하고, 상부 유기층을 최종적으로 새로운 시험관으로 옮겼다. 이송된 상청액 (supernatant)을 실온에서 질소 가스로 건조하고 잔류 물을 메탄올 20 μ L로 재구성하였다.

5분 동안 볼텍싱 한 후, 상청액을 최종적으로 깨끗한 유리 MS 바이알 튜브로 옮기고 추가 LC-MS/MS 분석을 위해 캡을 닫았다.

[0082] 실시예 6. LC-MS/MS 분석

[0083] 혈장 샘플 추출물의 크로마토그래피 분리는 Accucore C18 컬럼 (2.1x100mm, 2.6 μm 입자 크기, Thermo Scientific™, USA)에서 수행되었으며, 온도는 실험 내내 30° C로 유지하였다. 샘플의 주입 부피는 2 μL로 고정되었다. 표적 레티노이드는 80 % 아세트 니트릴 (A) 및 100 % 메탄올 (B)로 구성된 이동상 조성 하에서 22 분 이내에 분리되었으며, 둘 다 0.1 % 포름산으로 변형되었다. 이동상 시스템은 초기에 상 A (phase A)의 100 %에서 등용매 모드로 7분 동안 유지되었으며 유속을 0.2 mL/min에서 0.4 mL/min으로 선형적으로 증가시켰다. 그 후 즉시 B 상 (phase B) 100 %로 변경하고 15 분까지 유지하여 유속을 0.4mL/분으로 유지했다. 추가 2분 동안 시스템은 선형 구배를 사용하여 점차적으로 100 % 상 A (phase A)로 되돌아가고 유속을 0.2mL/분으로 다시 감소시켰다. 다시 평형을 이루기 위해 5 분 동안 조건을 유지했다. 그런 다음 ESI (electrospray ionization) 소스가 장착된 Agilent 6460C Triple Quadrupole LC-MS/MS 시스템을 사용하여 컬럼 유출물을 분석했다. 질량 분석기는 질소를 분무 가스로 사용하여 양이온 모드로 작동되었다. 가열된 분무기의 온도는 4,500의 이온 스프레이 전압으로 300 ° C로 설정되었다. 레티노이드의 정량화는 레티놀 (ROH), 레티놀-D6 (ROH-D6), 레티닐 아세테이트 (RAc), 레티닐 아세테이트-D6 (RAc-D6) 및 레티닐 팔미테이트 (RP)에 대해 [M+H-fatty acid-H2O]⁺의 전구체 이온을 선택하고, at-RAL, at-RAL-D6, at-RA, 9cis-RA, 13cis-RA 및 at-RA-D6에 대해 [M+H]⁺를 선택하여 다중 반응 모니터링 (MRM) 모드에서 수행하였다. 언급된 모든 분석 물질의 최적화된 MRM 전환, MS 매개 변수 및 LC 머무름 시간이 표 1에 요약되어 있다. 최종 정량화를 위해 표적 레티노이드의 각 피크 영역을 해당 내부 표준의 반응에 대해 정규화했다 (ROH의 경우 0.5ppm ROH-D6; RAc 및 RP의 경우 0.25ppm RAc-D6; at-RAL의 경우 0.25ppm at-RAL-D6; at-RA, 9cis-RA, 13cis-RA의 경우 1ppm at-RA-D6).

표 1

[0084] 타겟 분석물 (target analytes)에 대한 LC 머무름 시간 (LC retention times), MRM 전환 (MRM transitions) 및 MS 파라미터 (MS parameters)

Analytes	R _t (min)	polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Fragmentor Energy (V)	Collision Energy (V)
13Cis-retinoic acid	3.128	positive	301.2	123.1	105	12
9Cis-retinoic acid	3.334	positive	301.2	123.1	105	12
All-trans retinoic acid	3.530	positive	301.1	159.1	115	18
Retinoic acid-D6*	3.531	positive	307.2	165.2	115	18
All-trans retinal	4.679	positive	285.2	161.1	115	2
Retinal-D6*	4.679	positive	291.2	69	95	22
Retinol	3.674	positive	269.2	93.1	115	18
Retinol-D6*	3.674	positive	275.2	96	110	14
Retinyl acetate	6.889	positive	269.2	96	108	21
Retinyl acetate-D6*	6.889	positive	275.2	96	115	16
Retinyl palmitate	13.982	positive	269.1	96	111	21

[0085] * Internal standards

[0087] 실시예 7. 통계 분석

[0088] 연구 그룹의 기본 특성은 연속 변수에 대한 Student's t-test와 범주형 변수에 대한 카이 제곱 테스트를 사용하여 비교되었다. TB 및 PTB 임산부의 혈장에서 대사 프로파일의 변이로부터 변수 목록을 얻기 위해 다변량 분석을 수행했다. 다변량 분석은 Umetrics (Umea, Sweden)의 SIMCA-P 소프트웨어 v14.0을 사용하여 수행하였다. 경로 영향 분석 및 히트맵 시각화는 웹 기반 대사체학 데이터 처리 도구 및 시각화 대사체학 인 Metaboanalyst 3.0 (Montreal, QC, Canada)에 의해 수행되었다. 경로 맵핑 및 화학적 유사성 분석은 R 버전 3.2.2, MetaMapp 및 CytoScape 3.4.0 (Boston, MA, USA)에 의해 생성되었다. LC-MS/MS를 사용한 검증에서는 샘플링 시간에 재태 연령에 맞게 조정된 일반화된 선형 모델을 사용하여 차등 대사체 수준을 분석했다. PTB의 진단 정확도는 ROC 곡선의 AUC를 적용하여 요약되었다. 통계적으로 p<0.05는 유의한 것으로 간주되었다. 통계 분석에는 사회 과학을 위한 통계 패키지 (SPSS, 버전 2.0 Chicago, IL, USA)와 온라인 MEDCALC 소프트웨어가 사용되었다.

[0090] 실험 결과

[0091] 1. 실험 대상의 임상적 특성

[0092] 조산 (PTB)의 대사체학적 특성을 확인하고 (탐색 그룹; TB, n = 10; PTB, n = 11; 표 2) 표적 대사체를 검증하기 위해 (검증 그룹; TB, n = 39; PTB n = 20; 표 3), 임신 16주에서 40주 5일 사이의 임신부들로부터 말초 혈액을 수집했다 (도 1). 도 1은 시험 대상을 선정하는 과정을 나타낸 순서도 (flowchart)이다. 탐색 그룹의 조산 산모 및 만삭 산모의 임상학적 특징을 표 2에 나타냈고, 검증 그룹의 조산 산모 및 만삭 산모의 임상학적 특징을 표 3 및 표 4에 나타냈다.

[0093] 샘플링 및 분만 시의 재태 연령 (gestational age) 등의 임상적 요인은 탐색 그룹 (discovery group) 및 검증 그룹 (validation group) 모두에서, 조산군과 만삭군 간 유의하게 달랐다 ($p < 0.05$, 표 3). 표 3은 검증 그룹의 대상자들 (subjects for validation)의 임상적 특성을 나타낸 것이다. 백혈구 수, 및 C-반응성 단백질 (C-reactive protein)은 검증 그룹에서 두 그룹간에 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.05$). 임신 3기 임신부의 알라닌아미노기전달효소 (alanine aminotransferase; ALT) 및 아스파르트산아미노기전달효소 (aspartate aminotransferase; AST)와 같은 간 기능 효소와, 지질 프로파일 (lipid profiles)은 조산 그룹 (Preterm birth)과 만삭 그룹 (Term birth) 간 유의한 차이가 없었다 (표 4). 만삭 분만 산모에서는 용모양막염 (chorioamnionitis)이 없었으나, 조산 여성에서는 2명의 환자가 확인되었다.

표 2

[0094] 비표적 대사체 프로파일 분석을 위한 피험자 (탐색 그룹; discovery group)의 임상적 특성 (n = 21)

	Term birth (n = 10)	Preterm birth (n = 11)	p-value
	Median (IQR)	Median (IQR)	
Maternal age	33.0 (4.8)	33.0 (4.8)	0.669*
GAS	38.5 (1.6)	31.4 (7.4)	< 0.00*1
Parity			0.423 [†]
Nulliparous, n	3	4	
Multiparous, n	7	7	
Gravidity			0.237 [†]
0, n	3	7	
≥ 1, n	7	4	
WBC (x 10 ³ /ml)	9.8 (2.9)	10.3 (8.4)	0.468*
C-reactive protein (mg/dl)	-	0.5 (0.9)	-
AST (IU/L)	21.0 (7.3)	21.0 (3.0)	0.809*
ALT (IU/L)	14.5 (3.8)	14.0 (9.0)	1.000*
AST/ALT ratio	1.4 (0.6)	1.4 (0.7)	0.918*
TC (mg/dl)	259.5 (29.0)	253.0 (36.0)	0.512*
TG (mg/dl)	259.0 (115.5)	178.0 (148.0)	0.114*
BUN (mg/dl)	7.0 (1.6)	6.0 (6.0)	0.863*
Creatinine (mg/dl)	0.7 (0.1)	0.6 (0.2)	0.223*
BUN/Creatinine ratio	10.1 (2.9)	10.1 (8.8)	0.705*
pregBMI	25.2 (3.3)	25.0 (3.7)	0.029*
GAD	38.5 (1.6)	33.0 (8.6)	< 0.001*
Delivery mode			0.063 [†]
Normal delivery, n	7	3	
Cesarean section, n	3	8	
Birth weight (Kg)	3.3 (0.3)	2.0 (1.5)	< 0.001*
Gender, n (%)			0.426 [†]
Male, n	7	7	
Female, n	3	4	
APGAR 1min	10.0 (0.0)	6.0 (6.0)	< 0.001*
APGAR 5min	10.0 (0.0)	9.0 (3.0)	0.003*

[0095] 데이터는 중앙값 (사분위수 범위; IQR)으로 표시되어 있음.

[0096] * Mann Whitney test, $p < 0.05$;

[0097] χ^2 test, $p < 0.05$

[0098] GAS: 샘플링 시 재태연령 (gestational age at sampling);

[0099] PregBMI: 분만 시 체질량 지수 (body mass index at delivery);

[0100] GAD: 분만시 재태연령 (gestational age at delivery).

표 3

[0102] 검증 그룹의 연구 대상자들 (subjects for validation)의 임상적 특성

	Term birth ($n = 39$)	Preterm birth ($n = 20$)	p -value
Maternal age	33.3 ± 0.7	32.7 ± 1.0	0.626 *
GAS	23.0 ± 0.8	27.6 ± 1.6	0.010 *
preBMI	21.0 ± 0.4	21.7 ± 0.7	0.397 *
Parity			0.488 [†]
Nulliparous	16 (42.1)	8 (40.0)	
Multiparous	21 (57.9)	12 (60.0)	
Gravidity			0.416 [†]
0	25 (64.1)	11 (55.0)	
≥ 1	14 (35.9)	9 (45.0)	
WBC ($\times 10^3/\text{ml}$)	8.8 ± 0.4	11.6 ± 0.6	<0.001 *
C-reactive protein (mg/dl)	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.034 *
pregBMI	26.8 ± 0.6	26.4 ± 0.8	0.397
GAD	39.0 ± 0.2	33.3 ± 1.0	<0.001 *
Delivery mode			0.026 [†]
Normal delivery	23 (59.0)	5 (25.0)	
Cesarean section	16 (41.0)	15 (75.0)	
Birth weight (Kg)	3.2 ± 0.1	22.0 ± 0.2	<0.001 *
Gender, n (%)			0.651 [†]
Male	25 (64.1)	14 (70.0)	
Female	14 (35.9)	6 (30.0)	
APGAR 1min	9.7 ± 0.1	7.9 ± 0.5	0.002 *
APGAR 5min	9.9 ± 0.1	8.9 ± 0.4	0.009 *

[0103] 연속 변수의 데이터는 평균 $\pm$ SE로 표시하였다.

[0104] * Student' s t-test, $p < 0.05$;

[0105] χ^2 test, $p < 0.05$

[0106] TB: 만삭 분만 (term birth);

[0107] PTB: 조산 (preterm birth);

[0108] GAS: 샘플링 시 재태연령 (gestational age at sampling);

- [0109] PreBMI: 임신 전 체질량 지수 (body mass index before pregnancy);
- [0110] PregBMI: 분만 시 체질량 지수 (body mass index at delivery);
- [0111] WBC: 백혈구 (white blood cell);
- [0112] GAD: 분만시 재태연령 (gestational age at delivery);
- [0113] APGAR: 아프가 스코어 (Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration, Apgar score)

표 4

- [0114] 만삭 분만 및 조산 산모의 레티노이드 대사와 관련된 혈액 지수 (n=59)

구분	Term Birth (n=39)	Preterm birth (n=20)	p-value
AST (IU/L)	16.92 ± 0.70	17.75 ± 1.38	0.554
ALT (IU/L)	11.79 ± 1.17	12.95 ± 2.00	0.597
AST/ALT	1.69 ± 0.09	1.62 ± 0.11	0.642
TC (mg/dl)	263.64 ± 7.07	257.75 ± 9.96	0.630
TG (mg/dl)	307.23 ± 24.90	264.85 ± 29.62	0.303
BUN (mg/dl)	8.41 ± 0.53	7.50 ± 0.77	0.328
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.066
BUN/Creatinine	14.75 ± 0.56	15.60 ± 1.08	0.441

- [0115] 데이터는 평균 ± SE 로 나타냈다.

- [0116] * Student' s t-test,

- [0118] 2. 산모 혈장 샘플의 대사체 프로파일링

- [0119] 조산에 특이적인 대사체 및 대사 경로를 규명하기 위해, LTQ-Orbitrap Velos Pro hybrid 질량 분석기와 결합된 초-고성능 액체 크로마토그래피 (ultra-high performance liquid chromatography; UPLC)를 사용하여 비-표적 대사체 프로파일 링을 수행했다. 만삭 (TB) 및 조산 (PTB) 임신부의 혈장에서 대사 프로파일의 변이로부터 변수 목록을 얻기 위해 다변량 분석을 수행했다. 부분 최소 제곱 판별 분석 (partial least-squares discriminant analysis; PLS-DA)의 점수 플롯을 적용하여 PTB와 TB 그룹을 구별하는 데 사용할 수 있는 대사체학 패턴을 식별 했다. 도 2는 RPC 양성에서 TB와 비교하여 PTB에 대해 명확하게 구분된 범주를 보여준다 (Q2 = 0.072; R2 = 0.085). 도 2에 나타난 바와 같이, PLS-DA 점수 플롯 (score plots)은 조산 산모 (빨간색)와 만삭 분만 산모 (파란색)의 혈장 대사체가 다르게 분류되었다. 1보다 큰 변수중요척도 (variable importance in projection; VIP) 값 및 0.05보다 작은 p-값을 기반으로, 235개의 가변 이온 (235 variable ions) 중 15 개의 대사체가 결정되었다. 구체적인 데이터는 표 5에 나타나 있다.

표 5

- [0120] UPLC-LTQ-Orbitrap MS에 의해 식별된 가변 이온에 대한 다변량 분석의 순위 결과

No.	RT_Mass	Detected method	VIP value	p-value	Change	Fold change(P/C)
1	11.61_163.0094	RP	2.66	1.51E-03	↑	7.41
2	11.36_319.2058	RP	2.41	3.60E-02	↑	1.94
3	10.92_274.2816	RP	2.09	2.63E-02	↓	0.79
4	5.96_90.5243	RP	2.05	2.74E-02	↑	6.51
5	11.63_270.2154	RP	1.98	1.72E-02	↑	3.34
6	11.35_133.1127	RP	1.85	2.50E-02	↓	0.34
7	11.58_121.102	RP	1.54	3.07E-02	↑	8.11
8	10.97_106.0885	RP	1.53	4.25E-02	↓	0.73
9	10.2_95.0765	RP	1.34	4.65E-02	↑	2.60
10	11.53_834.6856	RP	1.30	3.95E-02	↑	61.76
11	2.16_90.5248	RP	1.29	4.76E-02	-	-
12	11.36_145.0167	RP	1.19	1.44E-02	↑	1.75
13	10.99_334.3113	RP	1.16	3.45E-02	↓	0.61

14	9.22_95.0809	RP	1.00	3.87E-02	↑	2.48
15	11.42_117.0732	RP	0.97	4.47E-02	↑	9.68
16	9.67_369.1706	RN	1.35	2.13E-02	↑	6.51
17	11.5_685.5345	RN	1.35	5.63E-03	↑	11.66
18	0.82_313.0628	RN	0.98	4.40E-02	↑	2.20

[0121] 3. 대사 경로와 관련된 조산

[0122] 모체 혈장의 대사체 변화가 조산과 어떻게 연관되어 있는지 더 잘 이해하기 위해, 대사 경로를 분석했다. 경로 분석 (pathway impact analysis)은 포괄적 인 대사 데이터 분석, 시각화 및 해석을 위해, KEGG 데이터베이스와 MetaboAnalyst 3.0을 기반으로 했다. 경로 분석 (impact pathway analysis)의 결과는 도 3에 나타냈다. 도 3은 경로 영향 분석의 산점도 (scatter plot)을 나타낸 것으로, y축은 p-value를 나타낸다. x축은 경로 위상 분석 (pathway topology analysis)을 나타내고, y축은 경로 농축 분석 (pathway enrichment analysis)을 나타낸다. 레티놀 (retinol) 대사, 리놀레산 (linoleic acid) 대사, D-아르기닌 (D-arginine) 및 D-오르니틴 (D-orithine) 대사를 포함한 대사 경로가 조산과 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0124] 4. 표적 혈장 대사체의 분석

[0125] 레티노이드 대사에 관여하는 대사체를 표적으로 분석하여 조산의 기저에 있는 병리학적 메커니즘을 조사했다. 레티노이드 대사체는 LC-MS (TB, n = 39; PTB, n = 20)를 사용하여 임신부의 혈장에서 분석되었다. 재태 연령을 조정했을 때, PTB의 레티노이드 대사체가 TB에 비해 현저하게 변화했다 (도 4). 도 4는 레티노이드 대사 산물 분석을 통해 조산 산모의 혈장 시료에서 변화를 보이는 레티노이드 대사체를 나타낸 도면이다 (39TB, 20PTB). 레티놀 수치는 TB에 비해 PTB에서 유의하게 감소한 반면, 레티날 팔미테이트, 전-트랜스(AT)-레티날 및 13-시스-레티노산 (13cis-RA)은 유의하게 증가했다 ($p < 0.05$).

[0127] 5. 조산에 대한 예측 성능

[0128] 조산의 진단 정확도는 ROC (receiver operating characteristic) 곡선의 AUC (are under the curve)를 적용하여 검증하였다. 레티노이드 대사체는 조산 예측에 대해 유의미한 ($p < 0.01$; 표 6, 도 5) 0.6 이상의 예측값을 나타냈다. 도 5는 대사체에 대한 ROC 곡선 분석을 나타낸 도면으로, 민감도 및 특이도의 ROC 곡선을 이용한 조산 바이오마커의 예측 성능을 나타낸다. 대사체 중 AT-retinal (AUC 0.808, 95% CI: 0.683-0.933) 및 13cis-RA (AUC 0.826, 95% CI: 0.723-0.930)는 레티놀 대사체 중 향상된 예측능을 보였다. 조산 위험군과 정상군을 구분하는 대사체 농도값의 기준인 Cut-off value는 민감도와 특이도를 더한 값 중 가장 높은 값의 데이터 값에 해당하는 대사체 농도값으로 도출되었다.

표 6

조산 예측을 위한 레티놀 관련 대사체들의 효능

Metabolite	AUC	p-value	Cut-off value (ppb)	SENS	SPEC	PPV	NPV	Accuracy
AT-retinal	0.808	< 0.001	2.48	75.0%	84.2%	68.2%	86.5%	79.7%
13cis-RA	0.826	< 0.001	5.56	85.0%	68.4%	58.6%	90.0%	74.6%
9cis-RA	0.679	0.026	9.56	45.0%	92.1%	69.2%	76.1%	74.6%
Retinyl palmitate	0.670	0.035	100.33	40.0%	94.7%	72.7%	75.0%	74.6%

[0130] 통계적 분석을 위해 ROC (Receiver Operating Characteristics) 곡선 분석을 수행했으며, $p < 0.05$ 는 유의미한 것으로 간주하였다.

[0131] AUC: 곡선 아래 영역 (Area under the curve);

[0132] SENS: 민감도 (Sensitivity);

[0133] SPEC: 특이도 (Specificity);

[0134] PPV: 양성 예측도 (Positive predictive value);

[0135] NPV: 음성 예측도 (Negative predictive value);

[0136] OR: 오즈비 (Odd ratio);

[0137] AT: 전(全)-트랜스 (all trans);

[0138] RA: 레티노산 (Retinoic acid);

[0139] Cut-off value: 임계값

[0141] **결론**

[0142] 본 발명은 혈장 대사체 프로파일과 대사 경로를 확인하여 조산의 병인 메커니즘을 뒷받침하고 임신부의 조산 예측을 위한 바이오 마커를 규명했다. 본 발명에 의하면 조산군의 대사체 프로파일이 만삭 출산군에 비해 유의하게 다르고, 전-트랜스-레티날 (AT-retinal) 및 13-시스-레티노산 (13cis-RA)이 레티놀 대사체 중 조산의 향상된 예측을 보였다.

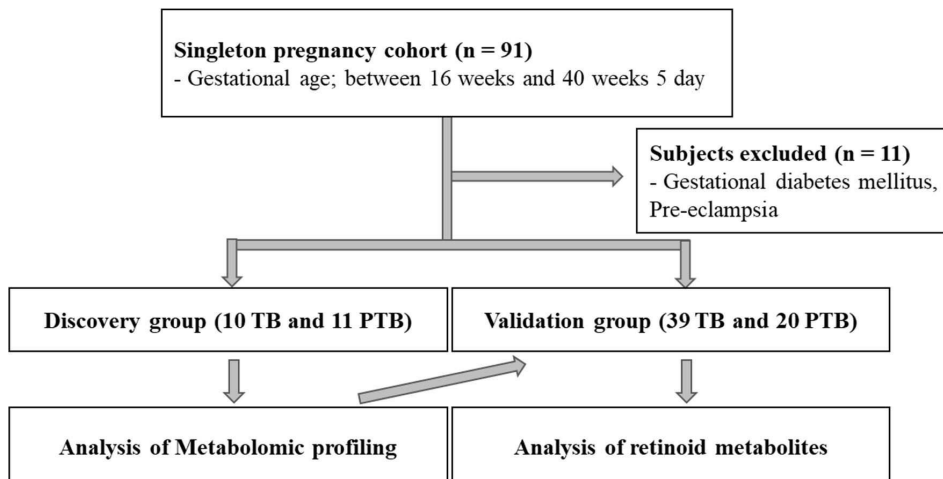
[0143] 본 발명에서 임신 2기 또는 분만시 모체 혈액을 수집했다. 조정된 재태 연령에도 불구하고 조산군의 혈장 대사체 프로파일은 만삭분만군과 상이하였고, 레티노이드 대사체의 변화가 조산과 관련되었다.

[0144] 혈액 내 비타민 A는 레티놀 결합 단백질인 RBP와 1:1 복합체로 혈장으로 운반된다. 본 발명에 따르면 혈장 레티놀 수치는 TB에 비해 PTB에서 감소했지만, AT-retinal과 13cis-RA 수준과 관련된 RBP 수치는 PTB에서 증가했으며, 이들 대사체들은 양의 상관 관계가 있었다. RBP는 레티놀뿐만 아니라 AT-retinal 및 13cis-RA와 결합될 수 있으며, Stra6 수용체를 통해 표적 조직으로 전달 될 수 있다. 높은 수준의 레티노산 (ATRA 및 13cis-RA)의 특정 대사 산물은 중요한 기관 발생 및 배아 발생 기간 동안 유전자 활동에 영향을 주어 최기성 (teratogenicity)을 유발할 수 있다.

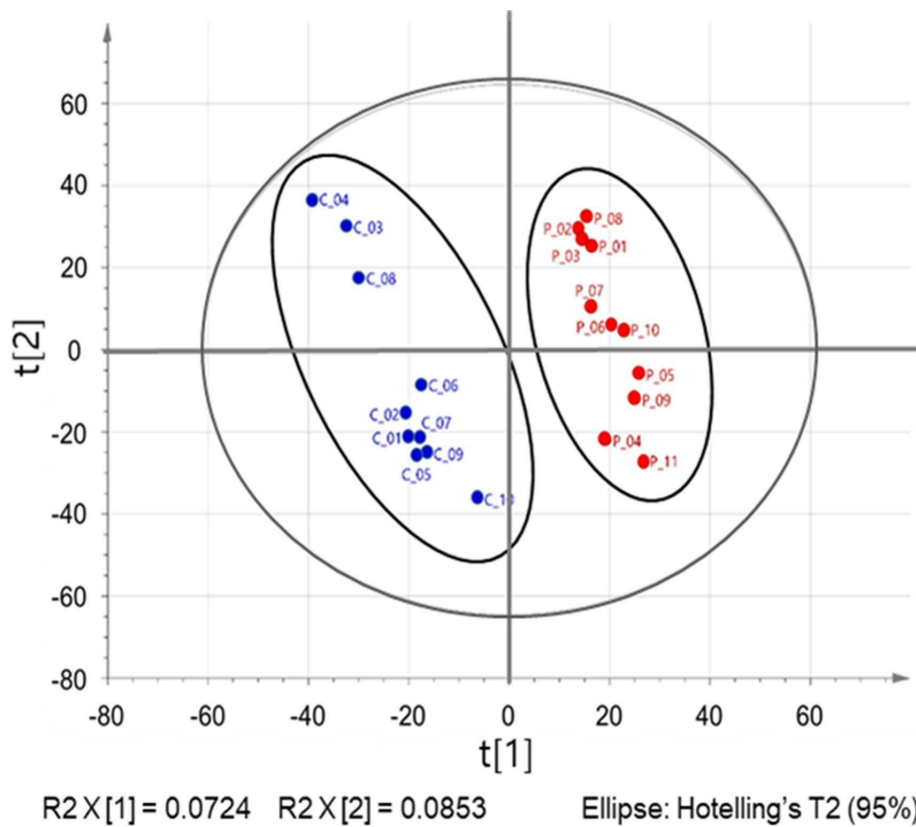
[0145] 종합하면, 본 발명은 TB 및 PTB 모체 혈장 간의 대사체 프로파일 및 타겟 대사체의 변화를 규명하였다. 특히, 전-트랜스-레티날 (AT-retinal) 및 13cis-레티노산 (13cis-RA)은 조산에 대한 예측 정확성이 우수하였다.

도면

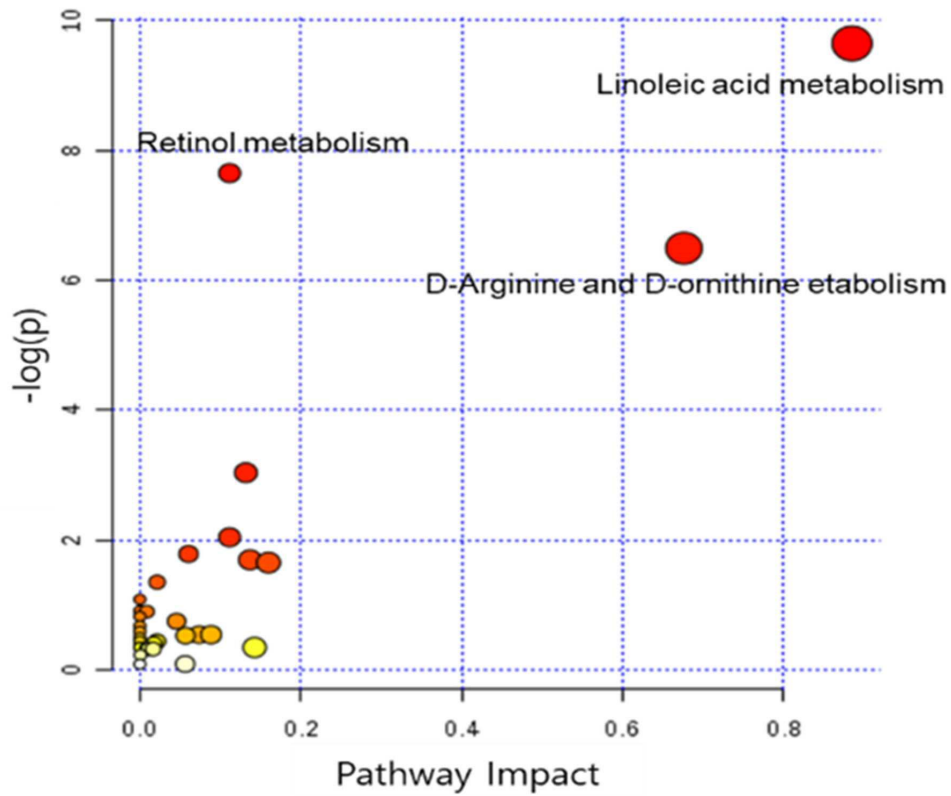
도면1



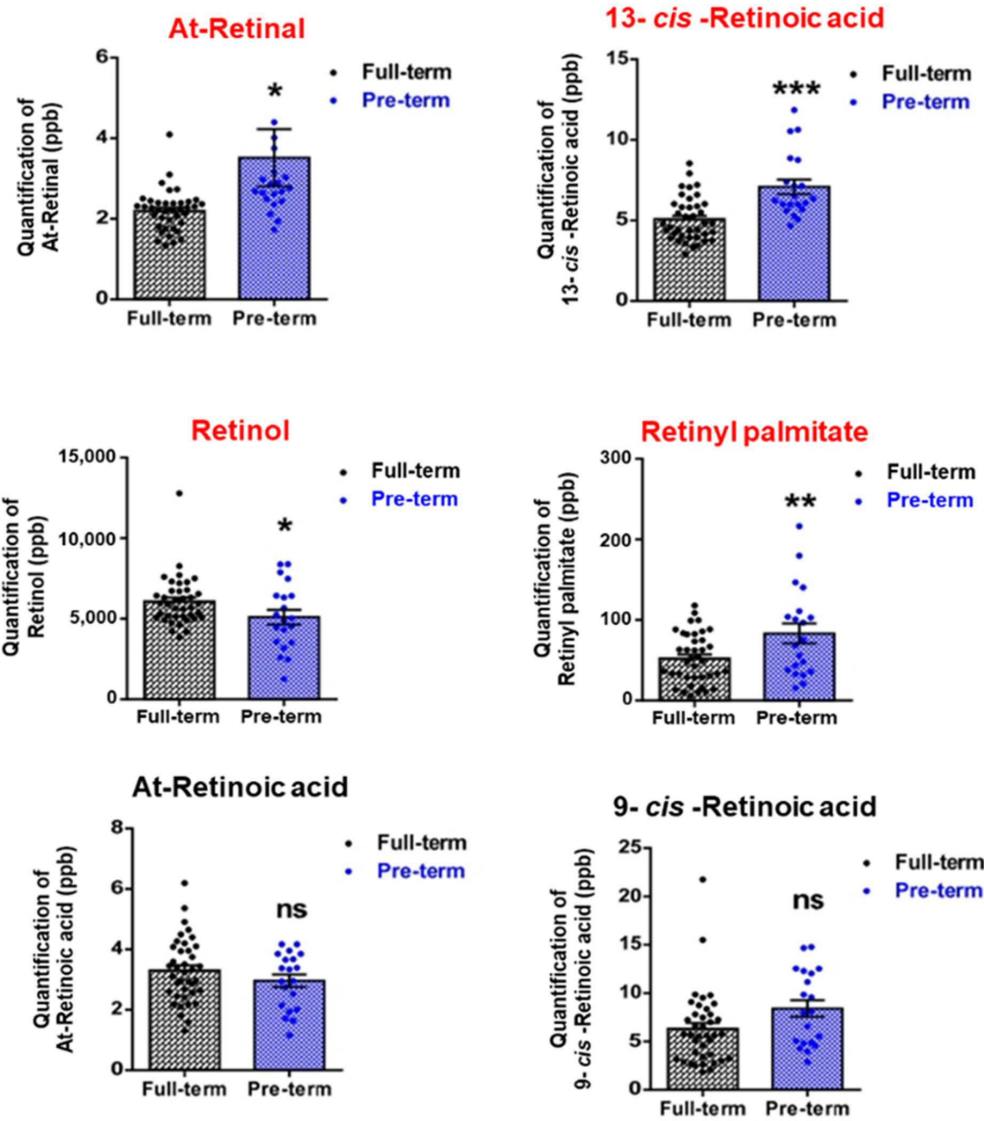
도면2



도면3



도면4



도면5

