(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 8 월 27 일 (27.08.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/171650 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/002542

(22) 국제출원일: 2020 년 2 월 21 일 (21.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0021461 2019 년 2 월 22 일 (22.02.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김경헌 (**KIM, Kyoung Heon**); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초4동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 차훈석 (**CHA, Hoon Suk**); 06351 서울시 강남구 일원로 81 삼성서울병원 류머티스내과 (일원동 50), Seoul (KR). 안중경 (**AHN, Joong Kyong**); 03181 서울시 종로구 새문안로 29 강북삼성병원 류머티스내과 (평동 108), Seoul (KR). 김정연 (**KIM, Jung Yeon**); 02412 서울시 동대문구 신이문로 8길 44 2층 (이문2동 256-142호), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (**DANA PATENT LAW FIRM**); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

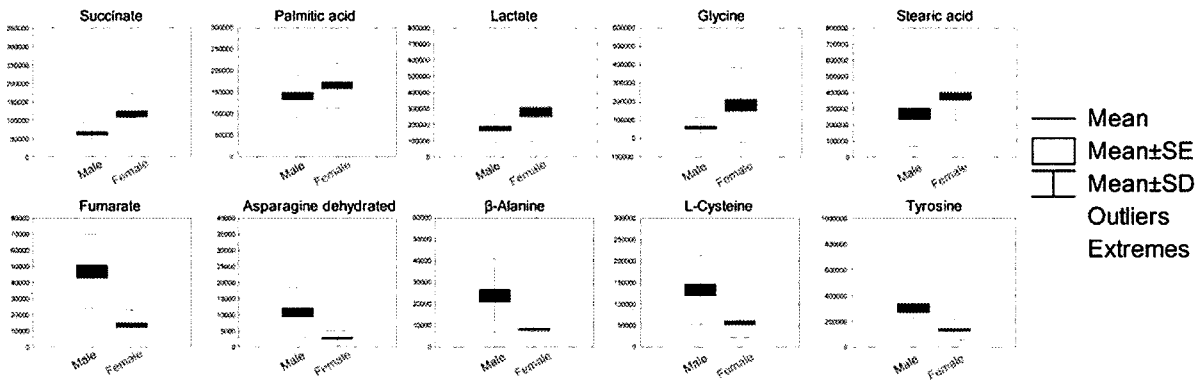
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) **Title:** METHOD FOR ANALYZING DIFFERENTIATION OF METABOLITES IN URINE SAMPLE BETWEEN DIFFERENT GROUPS

(54) **발명의 명칭:** 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for metabolite sampling and analysis for reproducibly sampling as many metabolites as possible in a urine sample without changes to metabolites. The method has effects of presenting a biomarker detection method according to the sex or the like, by establishing optimal conditions for metabolite sampling in urine samples and presenting a metabolite comparison analysis method between different groups on the basis of the optimal conditions.

(57) **요약서:** 본 발명은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위한 대사체 샘플링 및 분석 방법에 관한 것으로, 소변 시료 내 대사체 샘플링을 위한 최적 조건을 확립하고, 또한 이에 기반한 서로 다른 그룹 간의 대사물질 비교 분석법을 제시함으로써, 성별 등의 바이오마커 검출법을 제시하는 효과가 있다.

WO 2020/171650 A1

명세서

발명의 명칭: 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 소변은 건강 검진에 가장 유용하게 사용되는 생체 시료이다. 소변 시료는 비침투적으로 편리하게 채취할 수 있으며 다양한 대사 물질을 많이 함유하고 있으므로 질병 진단에 일상적으로 이용될 수 있다. 당뇨, 통풍, 단백뇨 등의 질병이나 임신과 같은 특이적인 생리학적 변화는 생체 내 대사물질의 분비를 변화시키고 소변에 함유된 대사물질의 조성을 바꾼다. 따라서 질병 및 생리학적 변화에 특이적으로 변화하는 소변 내 대사물질을 찾고 정량하여 바이오마커를 제시하는 연구는 예로부터 많이 진행되어왔다. 이러한 특이적 상태 변화에 따른 대사물질들의 변화를 찾는 연구를 대사체학이라고 한다.

[4] 대사체학 연구는 시료 내 대사물질의 변화를 막고 가능한 많은 물질을 변화없이 재현성 있게 추출하는 것이 매우 중요하다. 소변 대사체학의 경우, 표준화된 소변 대사체 추출법이 nature protocol에 제시된 바 있다 (Chan EC et al., 2011, Nat. Protoc. vol. 6, pp. 1483-1499). 그러나 이 추출 방법은 실험적 연구에 기반하지 않고, 기존에 사용해왔던 방법을 차용 및 정리한 것이라 최적의 소변 대사체 추출법이라고 할 수 없다. 표준화 소변 대사체 추출법은 소변 내 우레아(urea)를 제거하기 위하여 우레아제(urease)를 처리하고, 메탄올을 투여하여 소변 내 단백질 침전 및 대사체 추출을 시행한다. 그러나 우레아제의 처리는 37℃에서 1 시간 동안 반응시키므로 소변 내 효소 등의 활성에 의해 대사물질의 변화를 일으킬 수 있다. 이는 질병의 진단용 바이오마커를 발굴하고자 소변 대사체학 연구를 수행할 때 바이오마커 발굴 능력을 떨어뜨릴 수 있다. 또한 순수 메탄올은 그 추출 효율 및 재현성에 대해 다른 추출 용매와 비교, 분석된 바가 없어서 최적의 추출 용매라고 할 수 없다. 따라서 기존의 표준화 방법에서 우레아제 처리가 미치는 영향을 살펴봄과 동시에 다양한 추출 용매를 비교 분석함으로써, 소변 시료의 대사체를 변화 없이 원 상태로, 가능한 많이 재현성 있게 추출하는 최적화된 추출법을 제시하는 것이 필요하다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이에, 본 발명자들은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성

있게 추출하기 위하여, 우레아제 처리 없이 최적의 추출 용매를 사용한 소변 대사체 추출법 및 이에 기반한 서로 다른 그룹(예, 성별, 질병 등) 간의 대사체 분석법을 확립함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[7] 따라서, 본 발명은 소변 시료 내 대사체 추출에 의한 성별 구별용 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[8] 또한, 본 발명은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 본 발명은 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 성별 구별용 키트를 제공한다.

[11]

[12] 또한, 본 발명은

[13] 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법으로서,

[14] 소변에 우레아제(urease) 처리 없이, 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계를 포함하는, 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법을 제공한다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명은 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 비처리, 다양한 추출 용매 간 추출 효율 및 추출 재현성 비교를 통해 최적화된 소변 시료의 대사체 추출법을 제시하는 효과가 있다. 또한, 이에 기반한 서로 다른 그룹 간의 대사물질 비교 분석법을 제시함으로써, 성별, 질병 등의 바이오마커 검출법을 제시하는 효과가 있다.

[17] 본 발명은 소변 시료의 대사체 분석을 통한 다양한 병리학 및 바이오마커 제시 연구에 이용될 것으로 기대된다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37 ℃에서 1시간 정치 배양군(WI), 우레아제 비처리 및 정치 배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일 (A: score plot; B: loading plot)을 나타낸 것이다.

[20] 도 2는 PLS-DA를 이용한 우레아제 비처리 및 정치 배양 비처리군(DE)에서

남성 (DE_Male)과 여성 (DE_Female) 간의 대사체 프로파일 (A: score plot; B: loading plot)을 나타낸 것이다.

[21] 도 3은 남성과 여성을 구분 짓는 10개의 대사체의 양을 박스 플롯으로 나타내어 비교한 것이다.

[22] 도 4는 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세토니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 추출율 비교 박스 플롯을 나타낸 것이다.

[23] 도 5는 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세토니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 변동 계수 (%CV) 비교 박스 플롯을 나타낸 것이다.

[24] 도 6은 소변의 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세토니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v) 기반 대사체 추출 시의 단백질 침전율 비교 박스 플롯 (A) 및 사진 (B)을 나타낸 것이다.

[25]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명은 소변의 대사체 분석을 위한 소변 샘플 처리 방법에 관한 것이다.

[27] 본 발명의 일 구현예에서, 소변 시료의 대사체를 변화 없이 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 처리 없이 대사체를 바로 추출한다.

[28] 또한, 본 발명의 일 구현예에서, 소변 시료의 대사체를 기반으로 서로 다른 그룹을 구별하고, 바이오마커를 찾을 수 있는 연구 방법을 제시하기 위하여 소변 시료에서 우레아제 처리 없이 추출된 대사체를 기반으로 서로 다른 그룹 간의 비교 분석한다.

[29] 본 발명의 일 구현예에서, 소변의 대사체를 가능한 많은 양을 재현성있게 추출하고, 단백질을 적절히 침전시킬 수 있는 추출 용매로는 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용한다.

[30] 본 발명자들은 소변 시료 내 두 생체시료군 간의 대사체 차별성을 구별하는 바이오마커를 찾기 위해 소변에 우레아제(urease) 처리 없이 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하고 GC/TOF MS를 이용하여 소변 대사체 전처리 방법 및 성별에 따른 대사체 프로파일 차이를 비교 분석하고, 이 차이를 이용하여 대사체에 기반하여 성별을 구별할 수 있는 바이오마커 발굴 연구를 수행하였다.

[31] 그 결과, 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 인산류, 유기산류 등을 포함한 107개 및/또는 113개의 대사체가 동정되었다.

[32] 소변 시료에서 서로 다른 전처리 방법 기반으로 샘플링하여 생체 시료를 비교하였을 때, 부분최소자승판별분석(PLS-DA)을 통해 서로 다른 전처리 방법으로 추출했을 시의 대사체 프로파일의 명확한 차이를 확인하였으며 (도 1), 성별에 따른 대사체 프로파일의 명확한 차이도 확인하였다 (도 2). 이 중 성별을 구분하는 모델은, 각각의 대사물질에 대해 PLS-DA 모델의 VIP 값을 기준으로 상위 10종의 대사체를 선별하고 성별 구분의 신규 바이오마커 후보 물질로 선정하였다(표 4).

[33] 따라서, 본 발명은 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 성별 구별용 키트를 포함한다.

[34] 또한, 남성은 대사체 중에서 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 증가하는 경향을, 스테아르산 (stearic acid), 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate) 및 글라이신 (glycine)은 감소하는 경향을 나타낸다.

[35] 여성은 대사체 중에서 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 증가하는 경향을, 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 감소하는 경향을 나타낸다.

[36] 상기 증가 또는 감소 경향이란 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 "대사체 농도의 증가"는 남성 대비 여성 소변 대사체 농도가, 혹은 여성 대비 남성 소변 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 "대사체 농도의 감소"는 남성 대비 여성 소변 대사체 농도가, 혹은 여성 대비 남성 소변 대사체 농도가 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.

[37] 본 발명의 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다.

[38] 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 Chromatograhy, 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 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기일 수 있다.

[39] 본 발명의 대사체는 가스 크로마토그래피에서 각 성분들이 분리되며, TOF MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보(elemental composition)를 통해 구성 성분을 확인한다.

[40] 본 발명은 또한 소변 내 서로 다른 그룹 간 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법을 포함한다.

[41] 일 구현예로, 본 발명은 소변 시료 내 서로 다른 그룹(예, 성별, 질병 등) 간의 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법으로서,

[42] 소변 시료를 우레아제(urease) 처리 없이 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계를 포함하는, 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 구별하기 위한 대사체 차별성을 분석하는 방법을 포함한다.

[43] 상기 대사체 차별성을 분석하는 방법은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간 차별성을 분석하는 방법으로써, 우선, 퀜칭 과정과 대사체 추출 과정을 포함하는 대사체 샘플링 단계를 거친다.

[44] 대사체 샘플링은 소변 시료를 우레아제 처리 없이 추출 용매로 순수 메탄올, 순수 에탄올, 아세토니트릴:물 혼합물, 물:2-프로판올:메탄올 혼합물, 포름산:메탄올 혼합물을 사용하여 대사체를 추출한다. 특히, 포름산:메탄올의 혼합 용매를 사용하는 것이 보다 바람직하다. 포름산과 메탄올의 혼합 비는 0.05~0.5 : 99.5~99.95 의 부피 비가 더욱 바람직하다.

[45] 이때, 소변과 추출 용매는 1:8~10의 부피비로 처리되는 것이 실험의 오차를 줄일 수 있으므로 바람직하다.

[46] 상기 대사체 샘플링 단계에서 추출된 대사체에 대해서는 다음의 분석 단계를 거친다:

[47] 추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계;

[48] GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및

[49] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 서로 다른 그룹의 차별성을 검증하는 단계를 더 포함한다.

[50] 다음으로, 대사체의 프로파일링 차이를 비교하기 위해 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 서로 다른 그룹 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고, 분석 및 검증한다.

[51] 일 구현예로서, 본 발명의 분석 방법은 GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계는 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정한다.

[52] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계는 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 분석 및 검증한다.

[53] 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 대사체 바이오마커는 남성과 여성의 성별 구별한다.

[54] 대사체 바이오마커는 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 구성된다.

[55] 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타낸다.

[56] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 성별을 구별하기 위한 바이오마커로, 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

[57] 상기 바이오마커들 중 남성에서는 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 증가하는 경향을, 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 감소하는 경향을 나타낸다.

[58] 상기 바이오마커들 중 여성에서는 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 증가하는 경향을, 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 티로신 (tyrosine)은 감소하는 경향을 나타낸다.

[59]

발명의 실시를 위한 형태

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

[61]

[62] [실시예]

[63] **실시예 1: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 대사체 프로파일링**

[64] 68 명의 건강한 성인 (표 1)에서 얻은 소변 샘플을 우레아제의 처리 및 37℃에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37℃에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE)으로 나누어 처리한 후, 기존에 많이 사용되고 있는 순수 메탄올을 추출 용매로 이용하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF MS로 분석하였다.

[65] 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 유기산류 등을 포함한 107개의 대사체를 동정하였다(표 2).

[66] 대사체 프로파일링 차이를 비교하기 위하여 우레아 (urea)를 제외한 106개의 대사체를 기반으로 PLS-DA를 실시하였다. 우레아제 및 정치배양 처리군과 우레아제 비처리 및 정치배양 처리군, 우레아제 및 정치배양 비처리군 각각에서 서로 다른 대사체 패턴을 가짐을 살펴보았다 (도 1, 표 3, 표 4). 즉, 우레아제 및 정치배양 처리군의 대사체 프로파일은 스코어 플롯에서 대부분의 샘플이 t[1] 및 t[2] 값 기준으로 음수를, 우레아제 비처리 및 정치배양 처리군은 대부분의 샘플이 t[1] 및 t[2] 값 기준으로 양수를, 우레아제 비처리 및 정치배양 비처리군은 대부분의 샘플이 t[1] 값은 양수를, t[2] 값은 음수를 띠어 처리 방법에 따라서 대사체 프로파일이 완전히 구분되었다 (표 3). 따라서 우레아제의 처리나 정치배양 각각의 처리방법이 우레아뿐만 아니라 다른 소변 본연의 대사체를 변화시킴을 밝혔다.

[67] 다음 표 1은 68명의 소변 샘플 정보는 나타낸 것이다.

[68] 다음 표 2는 68명 소변 샘플에서 순수 메탄올을 이용해 추출한 107개 대사체를 나타낸 것이다.

[69] 다음 표 3은 PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI). 우레아제 비처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 비처리 및 정치배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일에서 t[1](PC1) 및 t[2](PC2) 값을 평균 및 표준편차로 나타낸 것이다.

[70] 다음 표 4는 PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI). 우레아제 비처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 및 정치배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일에서 각 대사체의 로딩 값을 나타낸 것이다.

[71] [표1]

남자 성인 샘플	나이	여자 성인 샘플	나이
Male_1	M/33	Female_1	F/32
Male_2	M/32	Female_2	F/36
Male_3	M/32	Female_3	F/37
Male_4	M/37	Female_4	F/34
Male_5	M/36	Female_5	F/37
Male_6	M/32	Female_6	F/39
Male_7	M/38	Female_7	F/39
Male_8	M/37	Female_8	F/38
Male_9	M/39	Female_9	F/34
Male_10	M/37	Female_10	F/37
Male_11	M/30	Female_11	F/36
Male_12	M/34	Female_12	F/38
Male_13	M/35	Female_13	F/39
Male_14	M/41	Female_14	F/36
Male_15	M/41	Female_15	F/45
Male_16	M/42	Female_16	F/44
Male_17	M/49	Female_17	F/47
Male_18	M/41	Female_18	F/48
Male_19	M/48	Female_19	F/43
Male_20	M/44	Female_20	F/42
Male_21	M/46	Female_21	F/40
Male_22	M/43	Female_22	F/46
Male_23	M/42	Female_23	F/42
Male_24	M/41	Female_24	F/41
Male_25	M/48	Female_25	F/43
Male_26	M/50	Female_26	F/53
Male_27	M/54	Female_27	F/50
Male_28	M/51	Female_28	F/51
Male_29	M/52	Female_29	F/50
Male_30	M/51	Female_30	F/51
Male_31	M/53	Female_31	F/51

[72] (계속)

[73]

		Female_32	F/54
		Female_33	F/53
		Female_34	F/52
		Female_35	F/52
		Female_36	F/65
		Female_37	F/63

[74] [표2]

Identification of metabolites			
Amines			
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5-deoxy-5-methylthioadenosine	adenosine
benzamide	carnitine	glycocyamine	hypoxanthine
inosine	nicotinamide	O-phosphorylethanolamine	spermidine
thymine	tyrosine	uracil	urea
uric acid	uridine	xanthine	
Amino acids			
alanine	asparagine dehydrated	glycine	histidine
isoleucine	L-allothreonine	L-cysteine	L-homoserine
lysine	methionine	methionine sulfoxide	N-methylalanine
ornithine	oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan	valine
β-alanine			
Fatty acids			
1-monopalmitin	1-monostearin	arachidic acid	capric acid
heptadecanoic acid	lignoceric acid	myristic acid	palatinitol
palmitic acid	pelargonic acid	stearic acid	
Organic acids			
2-hydroxyvalerate	2-ketoadipate	3-hydroxypropionate	5-aminovalerate
adipate	aspartate	citramalate	citrate
DL-3-aminoisobutyrate	fumarate	galactonate	galacturonate
gluconic acid lactone	glycerate	glycolate	guaiacol
hexonate	indole-3-lactate	lactate	lactobionate
malate	malonate	oxalate	oxamate
pyrrole-2-carboxylate	pyruvate	succinate	

[75] (계속)

[76]

Sugars and sugar alcohols			
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol	dihydroxyacetone
fructose	galactinol	galactose	glucose
glycerol	glycerol-1-phosphate	lactose	lyxose
maltotriose	mannitol	mannose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose	tagatose
threitol	threose	trehalose	xylose
Miscellaneous			
1,2,4-benzenetriol	caffeic acid	phosphate	taurine
xanthurenic acid			

[77] [표3]

Class	t[1]_average	t[2]_average	t[1]_stdev	t[2]_stdev
DE	4.368	-0.401	2.117	1.687
WI	0.837	3.231	3.376	3.203
UI	-5.257	-2.776	4.334	1.468

[78] 표 3은 각 처리에 따라서 대사물질의 종류와 양이 달라진다는 것을 판단할 수 있다. DE 군은 전처리 없이 대사물질을 추출하여 소변 본연의 대사물질 종류 및 양을 유지함을 확인한다고 가정할 수 있다. 기존에 사용되던 우레아제의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI). 우레아제 비처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(WI)은 대부분의 샘플의 t[1] 값 혹은 t[2] 값을 변화시켰으므로 대사물질의 종류 및 양의 변화가 일어난 것을 알 수 있다 (도 1, 표 3). 이러한 처리를 통해 대사물질의 종류 및 양이 변화하는 것은 질병의 진단용 바이오마커 물질의 종류나 양을 변화시키고 바이오마커를 발굴하는 능력을 떨어뜨리고 잘못된 바이오마커가 선정될 수 있다.

[79] 따라서 우레아제 처리는 대사체 프로파일을 변화시키므로 (표 3) 본연의 대사체 프로파일을 갖고 있는 우레아제 비처리군 DE 보다 바이오마커 발굴 능력이 떨어진다.

[80] [표4]

대사물질	로딩 1	로딩 2
1,2,4-benzenetriol	0.015	0.174
1,5-anhydroglucitol	-0.043	0.020
1-monopalmitin	0.001	-0.013
1-monostearin	-0.058	-0.047
2-hydroxypyridine	0.048	0.269
2-hydroxyvalerate	-0.111	-0.025
2-ketoadipate	0.001	0.078
3,6-anhydro-D-galactose	-0.102	0.052
3-hydroxypropionate	-0.134	-0.067
3-hydroxypyridine	-0.058	0.120
5-aminovalerate	-0.055	0.037
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	-0.130	-0.067
adenosine	-0.128	-0.004
adipate	-0.035	0.095

[81] (계속)

[82]

alanine	-0.085	0.067
arabitol	-0.019	0.122
arachidic acid	-0.080	0.072
asparagine dehydrated	-0.076	-0.010
aspartate	-0.076	0.029
benzamide	-0.031	0.134
β-alanine	-0.043	0.035
caffeic acid	-0.023	0.112
capric acid	-0.160	-0.135
carnitine	0.041	0.135
citramalate	-0.098	0.035
citrate	0.009	0.080
dihydroxyacetone	-0.002	0.064
DL-3-aminoisobutyrate	0.018	0.041
fructose	-0.052	0.059
fumarate	0.037	0.246
galactinol	-0.069	-0.007
galactonate	-0.158	-0.032

[83] (계속)

[84]

galactose	-0.093	0.090
galacturonate	-0.159	-0.044
gluconic acid lactone	-0.084	0.025
glucose	-0.111	0.057
glycerate	-0.075	-0.032
glycerol	-0.153	-0.080
glycerol-1-phosphate	-0.043	0.129
glycine	0.048	0.136
glycocyamine	-0.090	0.070
glycolate	-0.130	-0.046
guaiacol	0.038	0.175
heptadecanoic acid	-0.147	0.047
hexonate	-0.152	-0.096
histidine	-0.104	-0.057
hypoxanthine	-0.045	0.135
indole-3-lactate	-0.075	0.026
inosine	-0.080	-0.001
isoleucine	-0.165	-0.095

[85] (계속)

[86]

lactate	-0.076	0.010
lactobionate	-0.099	-0.090
lactose	-0.218	-0.261
L-allothreonine	-0.009	0.147
L-cysteine	-0.101	0.009
L-homoserine	-0.143	-0.131
lignoceric acid	-0.092	-0.041
lysine	-0.066	0.014
lyxose	-0.052	0.063
malate	-0.060	0.076
malonate	0.032	0.108
maltotriose	-0.071	-0.076
mannitol	-0.026	0.036
mannose	-0.047	0.134
melibiose	-0.063	-0.008
methionine	-0.131	-0.065
methionine sulfoxide	-0.132	0.026
myo-inositol	-0.049	0.048

[87] (계속)

[88]

myristic acid	-0.112	0.034
nicotinamide	0.008	0.211
N-methylalanine	-0.137	-0.078
O-phosphorylethanolamine	-0.129	-0.048
ornithine	-0.083	0.015
oxalate	-0.177	-0.128
oxamate	0.166	0.193
oxoproline	-0.008	0.252
palatinitol	-0.128	-0.080
palmitic acid	-0.164	0.019
pelargonic acid	-0.127	-0.018
phenylalanine	-0.137	-0.030
phosphate	-0.033	-0.019
proline	-0.105	-0.128
pyrrole-2-carboxylate	-0.074	-0.017
pyruvate	-0.027	-0.051
ribose	-0.131	0.015
serine	-0.187	-0.175

[89] (계속)

[90]

spermidine	0.006	0.126
stearic acid	-0.013	0.152
succinate	-0.042	0.103
sucrose	-0.166	-0.127
tagatose	-0.052	0.045
taurine	-0.087	-0.019
threitol	-0.010	0.079
threonine	0.006	0.126
threose	-0.096	-0.138
thymine	-0.016	0.214
trehalose	-0.207	-0.232
tryptophan	-0.099	0.019
tyrosine	-0.086	0.046
uracil	-0.068	0.070
uric acid	-0.037	0.077
uridine	-0.096	0.036
valine	-0.150	-0.051
xanthine	-0.076	0.118

[91] (계속)

[92]

xanthurenic acid	-0.084	0.093
xylose	-0.125	-0.033

[93]

[94] **실시예 2: 68 개 소변 샘플의 주요 대사체 선정**

[95] 실시예 1로부터 나온 PLS-DA 분석을 이용하여, 68 개 소변 샘플의 우레아제의 처리 및 37℃에서 1시간 정치배양군(UI), 우레아제 비처리 및 37℃에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 비처리 및 정치배양 비처리군(DE) 세 개의 그룹을 분리하는데 높은 기여를 한 주요 대사체를 VIP값 기준으로 상위 10개를 선정하였다 (표 5).

[96] 다음 표 5는 PLS-DA를 이용한 우레아제의 처리 및 37 ℃에서 1시간 정치배양군(UI). 우레아제 비처리 및 37℃에서 1시간 정치배양군(WI), 우레아제 비처리 및 정치배양 비처리군(DE) 간의 대사체 프로파일에서 큰 차이를 보이는 10개의 주요 대사체의 VIP(variable importance in projection) score 값을 나타낸 것이다.

[97] [표5]

대사물질	VIP value
succinate	2.650
palmitic acid	2.468
1-monostearin	2.093
1-monopalmitin	1.873
benzamide	1.786
heptadecanoic acid	1.724
malate	1.696
β-alanine	1.632
histidine	1.573
gluconic acid lactone	1.567

[98]

[99] **실시예 3: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링**

[100] 68 명의 건강한 성인 (표 1)에서 얻은 소변 샘플 중 31명의 남성 소변 샘플과 37명의 여성 소변 샘플에 우레아제 처리 없이 기존에 많이 사용되고 있는 순수 메탄올을 추출 용매로 이용하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF MS로 분석하였다. 이 후 각 성별을 구분지을 수 있도록 우레아를 제외한 106개의 대사체를

이용하여 PLS-DA 모델을 생성하였다 (도 2, 표 6, 표 7).

[101] 도 2에 나타난 바와 같이 남성과 여성의 소변 내 대사체는 서로 다른 패턴을 가지며, PLS-DA 모델을 기반으로 통계적으로 유의적 차이를 보였다. 즉, 남성 구분 시의 대사체 프로파일은 스코어 플롯에서 대부분의 샘플이 t[1] 및 t[2] 값 기준으로 양수를, 여성 구분 시의 대사체 프로파일은 스코어 플롯에서 [t]1 및 t[2] 값 기준으로 음수를 띠어 성별에 따른 대사체 프로파일이 완전히 구분되었다 (표 7). 이러한 대사체 프로파일의 차이를 나타내는 주요 대사물질을 선정하기 위해서 표 8에서의 로딩 1과 로딩 2 모두에서 동일한 경향을 보이고 그 값이 큰 대사체를 선별하였다.

[102] 다음 표 6는 PLS-DA를 이용한 68개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 대사체 프로파일에서 각 샘플의 t[1]값과 t[2] 값의 평균 및 표준편차를 나타낸 것이다.

[103] 다음 표 7는 PLS-DA를 이용한 68개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 대사체 프로파일에서 각 대사체의 로딩 값을 나타낸 것이다.

[104] [표6]

Class	t[1]_average	t[2]_average	t[1]_stdev	t[2]_stdev
Male	-3.054	-2.210	3.821	2.485
Female	2.558	1.852	1.981	3.231

[105] [표7]

대사물질	로딩 1	로딩 2
1,2,4-benzenetriol	0.070	-0.043
1,5-anhydroglucitol	-0.043	-0.120
1-monopalmitin	0.132	0.155
1-monostearin	0.140	0.161
2-hydroxypyridine	0.082	-0.028
2-hydroxyvalerate	0.047	-0.038
2-ketoadipate	0.047	0.105
3,6-anhydro-D-galactose	0.110	-0.011
3-hydroxypropionate	-0.068	-0.229
3-hydroxypyridine	0.103	0.012
5-aminovalerate	0.055	-0.034
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine	-0.015	-0.123
adenosine	0.111	0.004
adipate	0.009	-0.074

[106] (계속)

[107]

alanine	0.119	0.031
arabitol	0.122	0.071
arachidic acid	0.046	-0.030
asparagine dehydrated	0.210	0.139
aspartate	-0.022	-0.195
benzamide	0.023	-0.075
β-alanine	0.195	0.149
caffeic acid	-0.015	-0.073
capric acid	0.116	0.058
carnitine	0.021	0.060
citramalate	0.091	-0.019
citrate	-0.111	-0.236
dihydroxyacetone	0.039	0.089
DL-3-aminoisobutyrate	0.079	0.019
fructose	0.006	-0.151
fumarate	0.250	0.231
galactinol	-0.040	-0.102
galactonate	0.015	-0.149

[108] (계속)

[109]

galactose	0.110	-0.030
galacturonate	0.094	-0.019
gluconic acid lactone	0.064	-0.038
glucose	0.073	-0.083
glycerate	-0.022	-0.096
glycerol	-0.056	-0.228
glycerol-1-phosphate	0.101	0.044
glycine	-0.132	-0.242
glycocyamine	0.019	-0.146
glycolate	0.074	-0.043
guaiacol	0.040	0.053
heptadecanoic acid	-0.045	-0.203
hexonate	0.060	0.010
histidine	0.138	0.059
hypoxanthine	0.134	0.041
indole-3-lactate	-0.047	-0.124
inosine	-0.020	-0.095
isoleucine	0.164	0.096

[110] (계속)

[111]

lactate	-0.119	-0.262
lactobionate	-0.070	-0.219
lactose	-0.057	-0.153
L-allothreonine	0.104	0.128
L-cysteine	0.192	0.102
L-homoserine	0.044	-0.046
lignoceric acid	0.100	0.081
lysine	0.098	0.031
lyxose	0.082	0.034
malate	-0.093	-0.227
malonate	0.125	0.088
maltotriose	-0.054	-0.071
mannitol	0.126	0.112
mannose	0.048	-0.088
melibiose	-0.041	-0.092
methionine	0.157	0.057
methionine sulfoxide	0.117	-0.028
myo-inositol	0.048	-0.023

[112] (계속)

[113]

myristic acid	-0.034	-0.152
nicotinamide	0.131	0.012
N-methylalanine	0.128	0.068
O-phosphorylethanolamine	0.096	0.049
ornithine	-0.009	-0.113
oxalate	0.036	-0.008
oxamate	0.066	0.051
oxoproline	0.114	-0.034
palatinitol	0.015	-0.052
palmitic acid	-0.086	-0.281
pelargonic acid	-0.096	-0.220
phenylalanine	0.136	0.001
phosphate	-0.026	-0.094
proline	0.105	0.232
pyrrole-2-carboxylate	0.049	-0.026
pyruvate	0.023	-0.055
ribose	0.064	-0.071
serine	0.107	0.029

[114] (계속)

[115]

spermidine	0.088	0.027
stearic acid	-0.107	-0.242
succinate	-0.180	-0.353
sucrose	-0.034	-0.069
tagatose	0.023	-0.079
taurine	0.051	-0.025
threitol	0.068	-0.083
threonine	0.107	0.193
threose	0.016	-0.031
thymine	0.153	0.075
trehalose	-0.018	-0.078
tryptophan	0.154	0.049
tyrosine	0.178	0.088
uracil	-0.007	-0.126
uric acid	0.146	0.131
uridine	0.135	-0.002
valine	0.115	0.012
xanthine	0.017	-0.088

[116] (계속)

[117]

xanthurenic acid	0.143	0.034
xylose	-0.026	-0.162

[118]

[119] **실시예 4: PLS-DA를 이용한 68 개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 주요 대사체 선정**

[120] 실시예 3으로부터 나온 PLS-DA 분석을 이용하여, 각 성별 그룹이 분리가 됨을 확인하고, 모델 내 각 성별의 분리에 기여하는 정도인 VIP값에서 높은 수치를 보인 주요 대사체 상위 10개를 선정하였다 (표 8). 또한 10개의 대사체의 양을 박스 플롯으로 나타내어 성별에 따른 대사체의 양을 비교하였다 (도 3).

[121] 다음 표 8은 PLS-DA를 이용한 68개 소변 샘플의 남성 및 여성을 구분하는 대사체 프로파일링에서 차이를 나타내는 대사체 프로파일에서 큰 차이를 보이는 10개의 주요 대사체의 VIP(variable importance in projection) score 값을 나타낸 것이다.

[122] [표8]

대사물질	VIP score
succinate	2.045
fumarate	2.003
asparagine dehydrated	1.666
palmitic acid	1.595
β-alanine	1.541
L-cysteine	1.540
lactate	1.494
tyrosine	1.432
glycine	1.420
stearic acid	1.373

[123]

[124] **실시예 5: 소변 샘플의 대사체 분석을 위한 최적의 추출 용매 선정**

[125] 소변 샘플에서 대사체 샘플을 얻기 위하여 68 명의 소변 샘플을 동일한 비율로 하나로 합쳐서 소변 혼합물로 만든 후에, 100 μl의 소변 혼합물에 우레아제 처리 없이 직접 900 μl의 추출용매, 순수 메탄올 (MeOH), 순수 에탄올 (EtOH), 아세토니트릴:물 혼합물 (50ACN; 1:1, v/v), 물:2-프로판올:메탄올 혼합물 (WiPM; 2:2:5, v/v/v), 포름산:메탄올 혼합물 (AM; 0.125:99.875, v/v)을 처리하여 대사체를 추출한 후 GC/TOF-MS로 분석하여 추출 효율을 비교 분석하였다.

[126] 소변 혼합물에서 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 유기산류 등을 포함한 113 개의 대사체를 동정하였다(표 9).

[127] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 추출 용매에 따라서 추출율 및 추출 재현성이 다름을 확인할 수 있었다. 정성 및 상대적으로 정량 분석된 피크 인텐시티가 AM에서 가장 높아, 종합적인 대사체의 추출율이 AM에서 가장 높음을 볼 수 있었다 (도 4). 또한 추출 용매에 따른 재현성을 살펴보면, %CV 값이 AM에서 모두 최저의 수치를 기록하여, 재현성이 제일 높음을 알 수 있었다 (도 5). 또한 단백질의 침전율이 AM에서 두 번째로 높은 수치를 기록하여, AM이 적절한 단백질을 침전능을 가지는 것으로 보였다 (도 6). 이를 통하여 소변의 대사체 분석을 위한 대사체 추출 시에 추출율 및 재현성과 단백질 침전율에 기반한 최적 용매로 AM을 선정하였다.

[128] 다음 표 9는 인간 소변 혼합물 샘플에서 순수 메탄올, 순수 에탄올, 아세토니트릴:물 혼합물, 물:2-프로판올:메탄올 혼합물, 포름산:메탄올 혼합물을 이용해 추출한 113개의 대사체를 나타낸 것이다.

[129] [표9]

Identification of metabolites			
Amines			
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5-deoxy-5-methylthioadenosine	adenosine
carnitine	glycocyamine	hypoxanthine	inosine
O-phosphorylethanolamine	thymine	uracil	urea
uric acid	uridine	xanthine	
Amino acids			
alanine	asparagine dehydrated	glycine	histidine
isoleucine	L-allothreonine	L-cysteine	leucine
L-homoserine	methionine	methionine sulfoxide	N-methylalanine
ornithine	oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan	tyrosine
valine	β-alanine		
Fatty acids			
1-monopalmitin	1-monostearin	2-ketoisocaproic acid	arachidic acid
capric acid	dodecanoic acid	heptadecanoic acid	lignoceric acid
palatinitol	palmitic acid	pelargonic acid	phytol
stearic acid			
Organic acids			
2-hydroxyvalerate	2-ketoadipate	3-hydroxypropionate	5-aminovalerate
adipate	aspartate	citramalate	citrate
DL-3-aminoisobutyrate	fumarate	galactonate	galacturonate
gluconic acid lactone	glycerate	glycolate	guaiacol
hexonate	indole-3-lactate	isothreonate	lactate
lactobionate	malate	malonate	N-carbamoylaspartate
oxalate	oxamate	pyruvate	succinate

[130] (계속)

[131]

Sugars and sugar alcohols			
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol	dihydroxyacetone
fructose	fucose	galactinol	galactose
glucose	glycerol	glycerol-1-phosphate	lactose
lyxose	mannitol	mannose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose	tagatose
threitol	threose	trehalose	xylose
β-gentiobiose			
Miscellaneous			
benzoic acid	caffeic acid	ethanolamine	lactamide
nicotinamide	phosphate	salicylic acid	spermidine
taurine	xanthurenic acid		

청구범위

[청구항 1] 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소변 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 성별 구별용 키트.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
정량 장치는 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기인 키트.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
남성은 대사체 중에서 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 증가하는 경향을, 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 감소하는 경향을 나타내는 키트.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
여성은 대사체 중에서 숙신산 (succinate), 팔미트산 (palmitic acid), 젖산 (lactate), 스테아르산 (stearic acid) 및 글라이신 (glycine)은 증가하는 경향을, 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 및 티로신 (tyrosine)은 감소하는 경향을 나타내는 키트.

[청구항 5] 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법으로서,
소변에 우레아제(urease) 처리 없이 순수 메탄올 또는 포름산과 메탄올의 혼합 용매를 사용하여 대사체를 추출하는 대사체 샘플링 단계를 포함하는, 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 분석 방법은 추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계; GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[청구항 7] 제 5 항에 있어서,
GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계는 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정하는 것인, 방법.

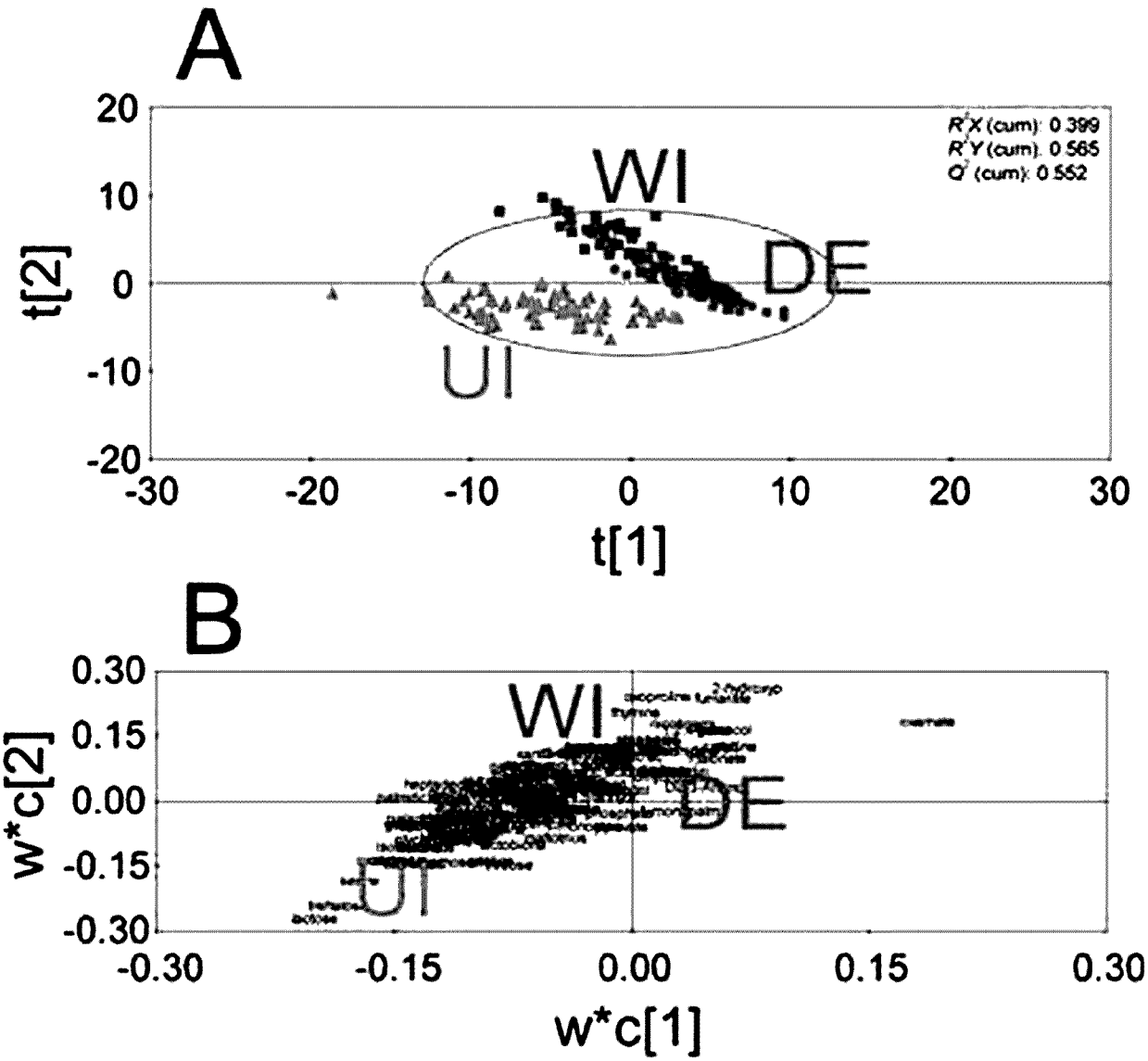
[청구항 8] 제 5 항에 있어서,
변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계는 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 분석 및 검증하는 것인, 방법.

[청구항 9] 제 8 항에 있어서,
부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타내는 것인, 방법.

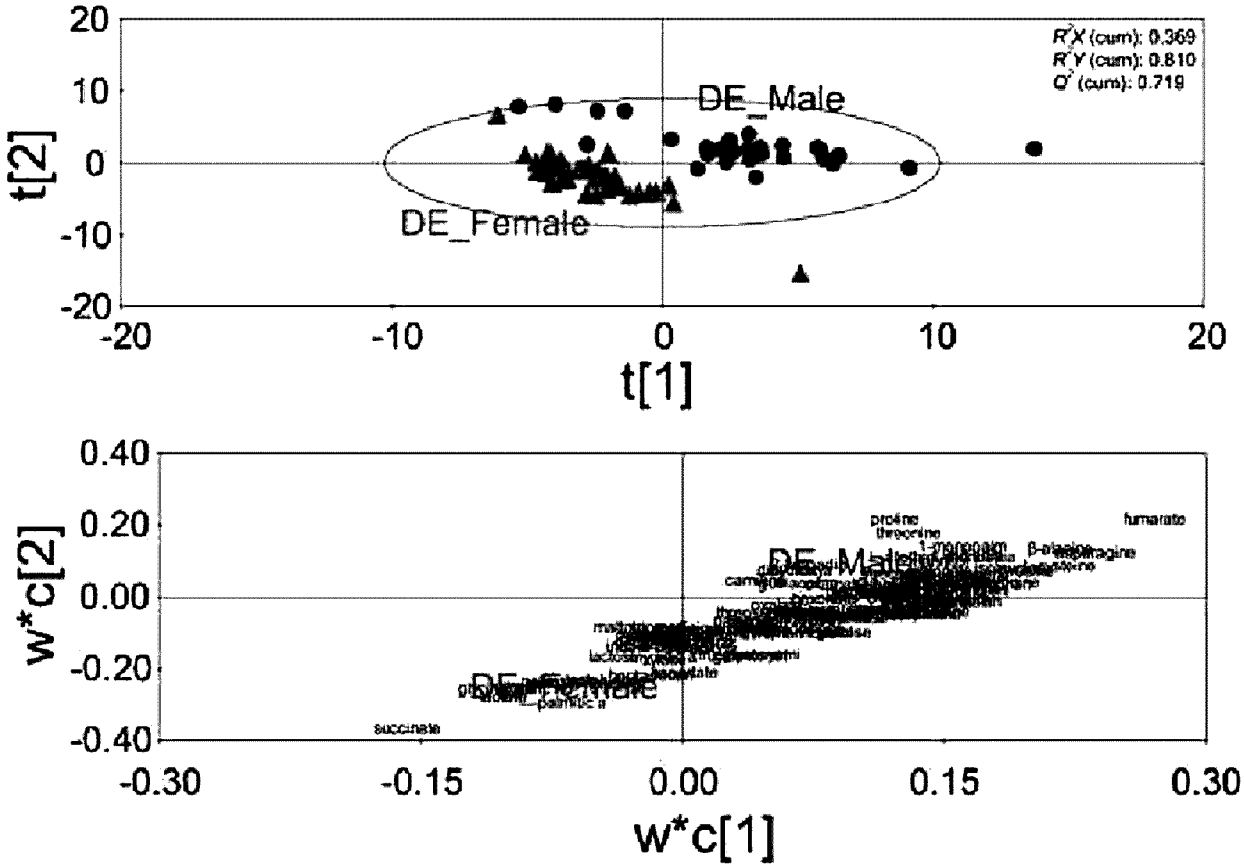
[청구항 10] 제 8 항에 있어서,
대사체 바이오마커는 숙신산 (succinate), 푸마르산 (fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드 (asparagine dehydrated), 팔미트산 (palmitic acid), 베타-알라닌 (β-alanine), L-시스테인 (L-cysteine), 젖산 (lactate), 티로신 (tyrosine), 글라이신 (glycine) 및 스테아르산 (stearic acid)으로 구성된 것인, 방법.

[청구항 11] 제 8 항에 있어서,
대사체 바이오마커는 성별을 구별하는 것인, 방법.

[도1]

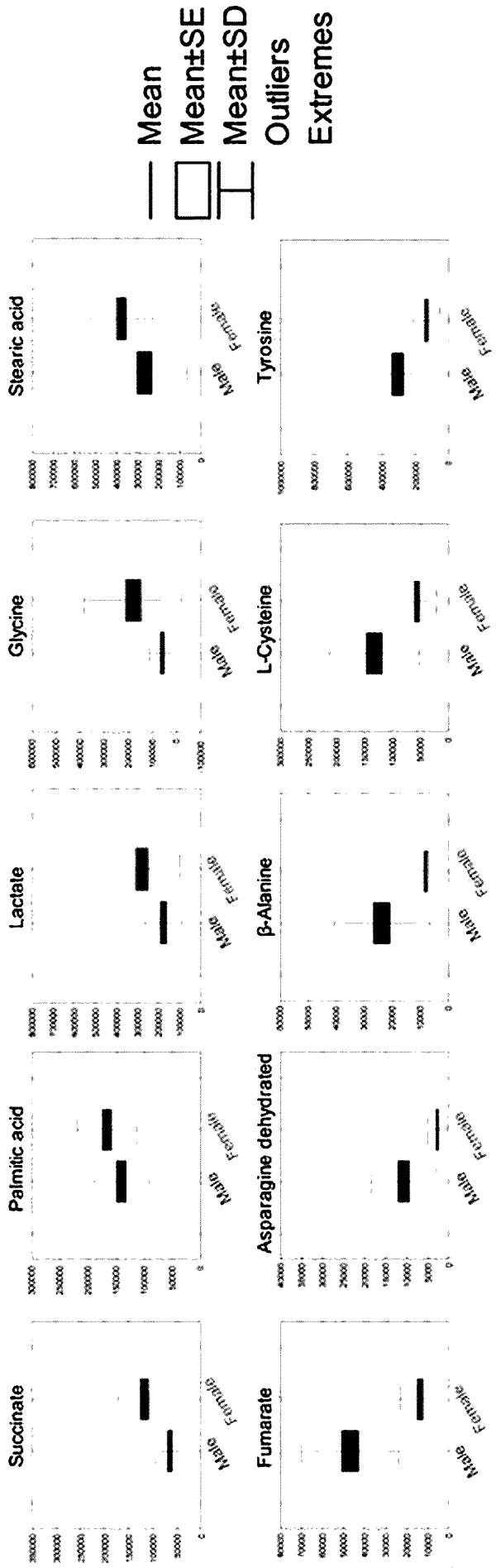

A
R²X (cum): 0.399
R²Y (cum): 0.565
Q² (cum): 0.552
WI
DE
UI
t[2]
t[1]
B
WI
DE
UI
w*c[2]
w*c[1]

[도2]

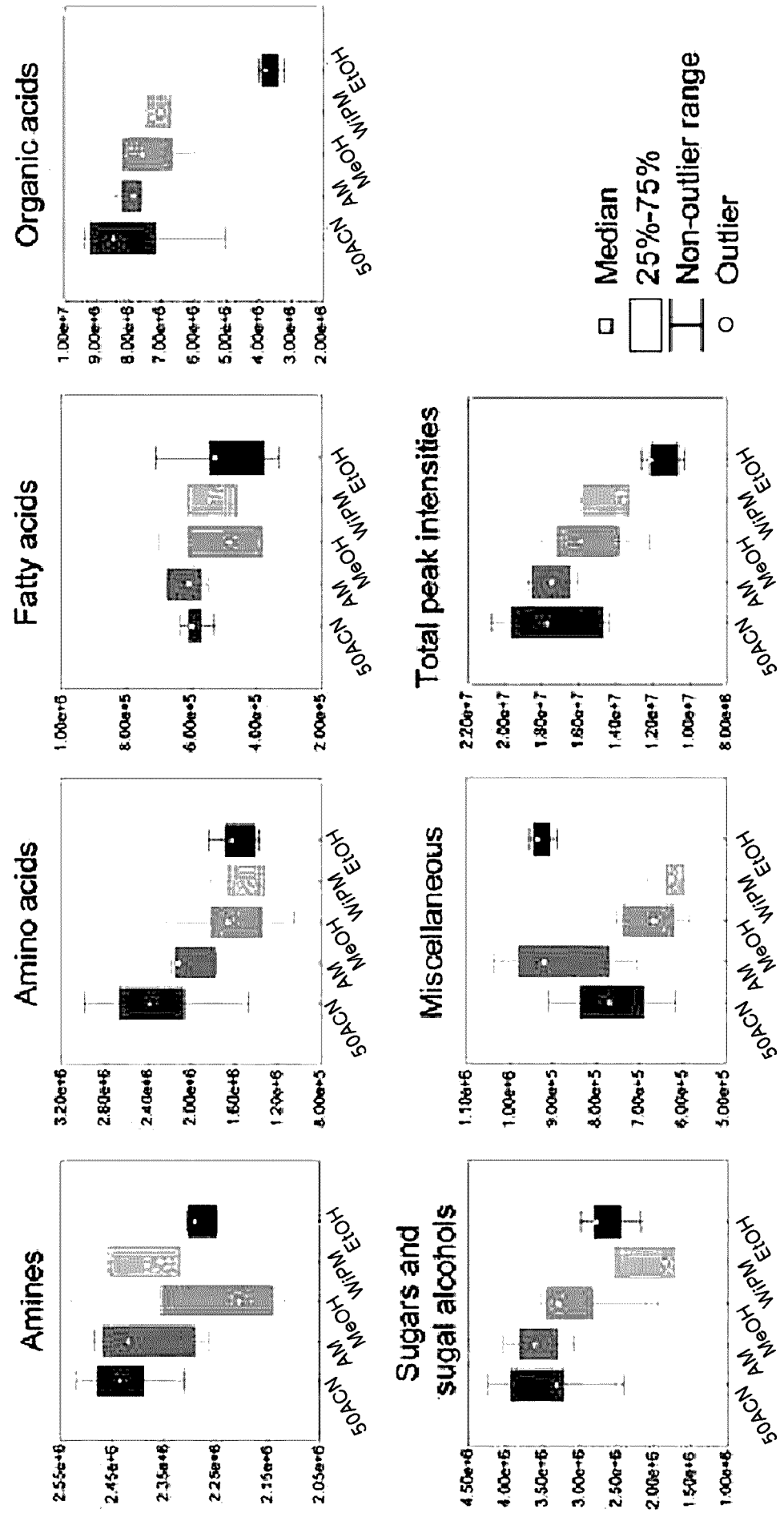

R²X (cum): 0.369
R²Y (cum): 0.810
Q² (cum): 0.719
DE_Male
DE_Female
t[1]
t[2]
20
10
0
-10
-20
-20
-10
0
10
20

w*c[1]
w*c[2]
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.30
-0.15
0.00
0.15
0.30
succinate
fumarate

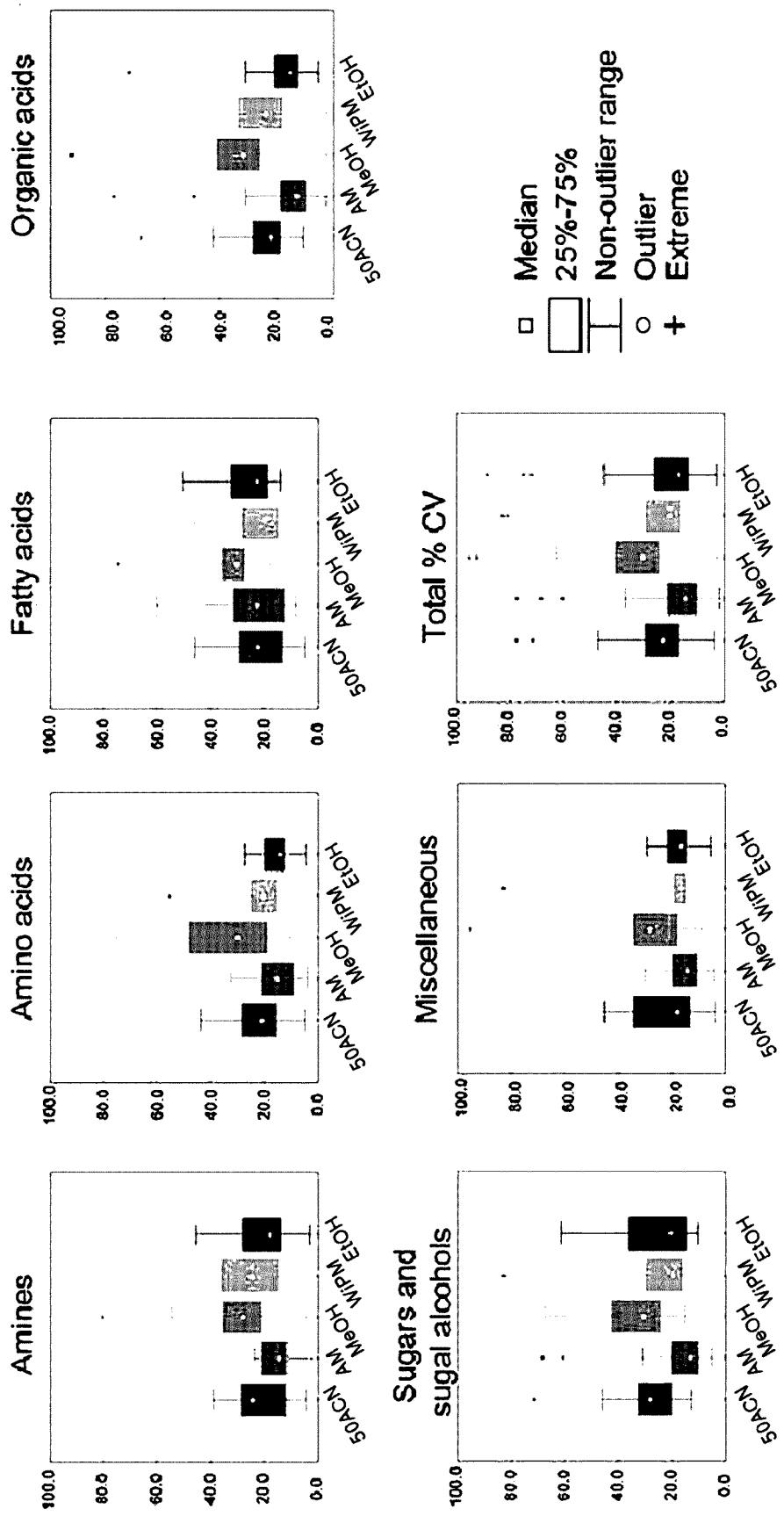
[도3]


Mean
Mean±SE
Mean±SD
Outliers
Extremes
Succinate
Palmitic acid
Lactate
Glycine
Stearic acid
Fumarate
Asparagine dehydrated
β-Alanine
L-Cysteine
Tyrosine
Male
Female

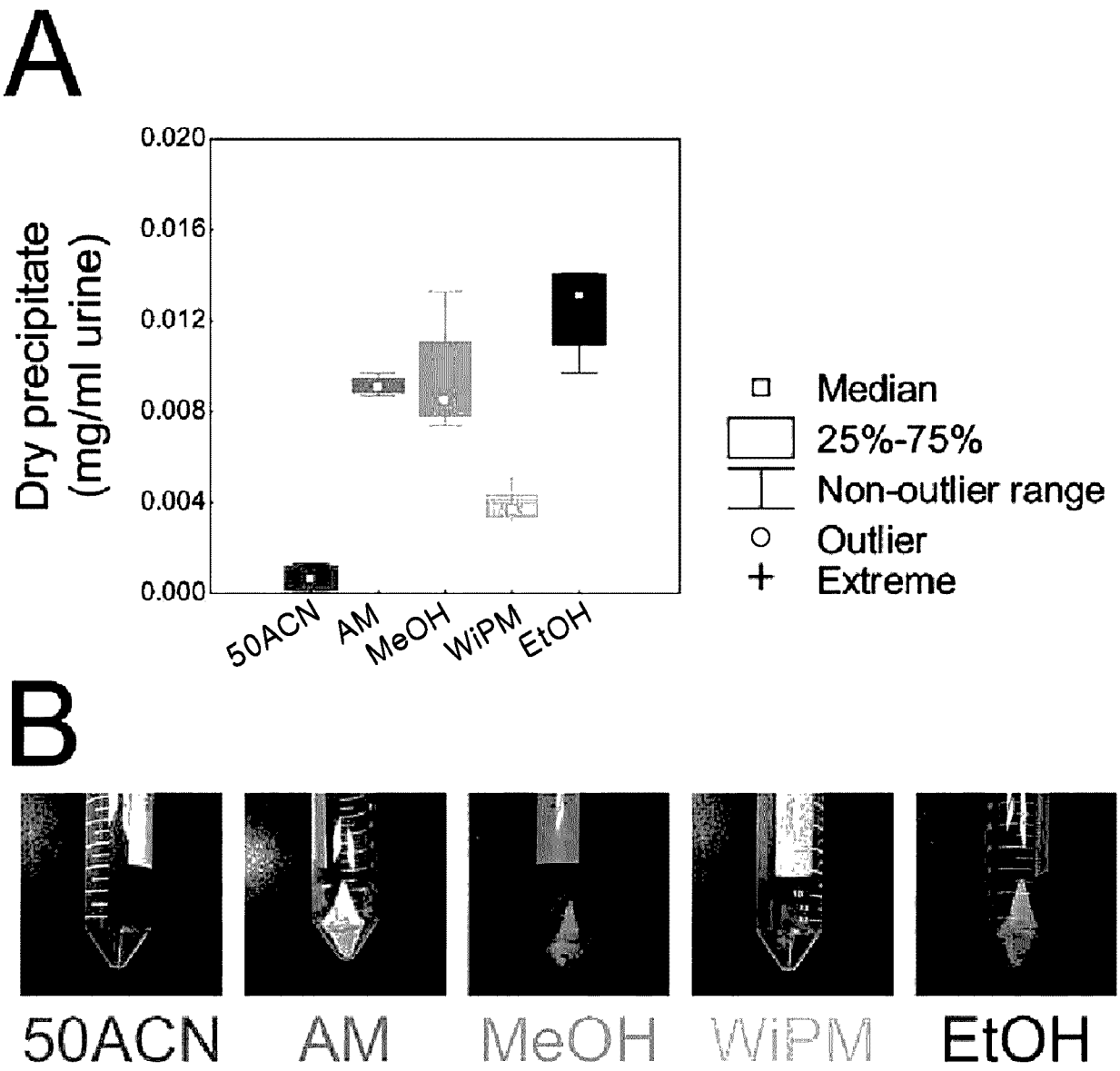
[도4]


Organic acids
Fatty acids
Amino acids
Amines
Total peak intensities
Miscellaneous
Sugars and sugal alcohols
50ACN AM MeOH WIPM EtOH
Median
25%-75%
Non-outlier range
Outlier

[도5]


Organic acids
Fatty acids
Total % CV
Amino acids
Miscellaneous
Amines
Sugars and sugal alcohols
50ACN
AM MeOH WIPM EtOH
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
Median
25%-75%
Non-outlier range
Outlier
Extreme

[도6]


A
Dry precipitate (mg/ml urine)
0.020
0.016
0.012
0.008
0.004
0.000
50ACN
AM
MeOH
WiPM
EtOH
Median
25%-75%
Non-outlier range
Outlier
Extreme
B
50ACN
AM
MeOH
WiPM
EtOH

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/002542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/72(2006.01)i, G01N 30/88(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 30/72; C12Q 1/68; G01N 30/02; G01N 33/493; G01N 33/68; G01N 30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: metabolome, urine, sex, GC/TOF(gas chromatography/time of flight), succinate, fumarate, asparagine dehydrated, palmitic acid, ß-alanine, L-cysteine, lactate, tyrosine, glycine, stearic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAN, Sili et al. Sex-associated differences in baseline urinary metabolites of healthy adults. SCIENTIFIC REPORTS. 2018, vol. 8, Article number 11883 (Published online : 08 August 2018) See abstract, pages 1-2, 6-8 and figures 1, 3.	1-4
Y		5-11
Y	MING, Dong Sheng et al. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine. Journal of Chromatography B. 2011, vol. 879, pages 421-428 See abstract.	5-11
A	WO 2017-204636 A2 (IN OVO B.V.) 30 November 2017 See abstract and claims 1-2, 9-10.	1-11
A	KR 10-2016-0134106 A (PAICHAI UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 23 November 2016 See abstract and claim 1.	1-11
A	KR 10-2010-0100154 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 September 2010 See abstract and claim 1.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 JUNE 2020 (05.06.2020)	**08 JUNE 2020 (08.06.2020)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/002542

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-4 pertain to a kit for distinguishing sex, comprising a quantitation device for one or more urinary metabolites selected from the group consisting of succinic acids, fumaric acids, asparagine dehydrated, palmitic acids, beta-alanine, L-cysteine, lactic acids, tyrosine, glycine and stearic acids,
Claims 5-11 pertain to a method for analyzing metabolite differentiation between each of the different groups in a urine sample.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/002542

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-204636 A2	30/11/2017	AU 2017-269050 A1	13/12/2018
		AU 2017-269050 A1	30/11/2017
		BR 112018074071 A2	06/03/2019
		CA 3025127 A1	30/11/2017
		CN 109477840 A	15/03/2019
		EP 3465222 A2	10/04/2019
		IL 263138 D0	31/12/2018
		JP 2019-518213 A	27/06/2019
		KR 10-2019-0041437 A	22/04/2019
		MX 2018014484 A	06/06/2019
		NL 2016818 B1	04/12/2017
		NL 2016819 B1	04/12/2017
		US 2020-0116730 A1	16/04/2020
		WO 2017-204636 A3	04/01/2018
		ZA 201807967 B	28/08/2019
KR 10-2016-0134106 A	23/11/2016	KR 10-1847634 B1	11/04/2018
KR 10-2010-0100154 A	15/09/2010	KR 10-1092371 B1	13/12/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/002542

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 30/72(2006.01)i, G01N 30/88(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 30/72; C12Q 1/68; G01N 30/02; G01N 33/493; G01N 33/68; G01N 30/88

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 대사체(metabolome), 소변(urine), 성별(sex, gender), GC/TOF(gas chromatography/time of flight), 숙신산(succinate), 푸마르산(fumarate), 아스파라진 디하이드레이티드(asparagine dehyrated), 팔미트산(palmitic acid), 베타-알라닌(β-alanine), L-시스테인(L-cysteine), 젖산(lactate), 티로신(tyrosine), 글라이신(glycine), 스테아르산(stearic acid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	FAN, SILI 등, `Sex-associated differences in baseline urinary metabolites of healthy adults`, SCIENTIFIC REPORTS, 2018년, 8권, Article number 11883 (온라인 공개 : 2018.08.08) 요약, 페이지 1-2, 6-8 및 도면 1, 3	1-4
Y		5-11
Y	MING, DONG SHENG 등, `A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine`, Journal of Chromatography B, 2011년, 879권, 페이지 421-428 요약	5-11
A	WO 2017-204636 A2 (IN OVO B.V.) 2017.11.30 요약 및 청구항 1-2, 9-10	1-11
A	KR 10-2016-0134106 A (배재대학교 산학협력단 등) 2016.11.23 요약 및 청구항 1	1-11
A	KR 10-2010-0100154 A (한국과학기술연구원) 2010.09.15 요약 및 청구항 1	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 06월 05일 (05.06.2020)	2020년 06월 08일 (08.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
한인호
전화번호 +82-42-481-3362

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/002542

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

청구항 1-4는 숙신산, 푸마르산, 아스파라진 디하이드레이티드, 팔미트산, 베타-알라닌, L-시스테인, 젖산, 티로신, 글라이신 및 스테아르산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 소변 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 성별 구별용 키트입니다.

청구항 5-11은 소변 시료 내 서로 다른 그룹 간의 대사체 차별성을 분석하는 방법입니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☒ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/002542

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-204636 A2	2017/11/30	AU 2017-269050 A1	2018/12/13
		AU 2017-269050 A1	2017/11/30
		BR 112018074071 A2	2019/03/06
		CA 3025127 A1	2017/11/30
		CN 109477840 A	2019/03/15
		EP 3465222 A2	2019/04/10
		IL 263138 D0	2018/12/31
		JP 2019-518213 A	2019/06/27
		KR 10-2019-0041437 A	2019/04/22
		MX 2018014484 A	2019/06/06
		NL 2016818 B1	2017/12/04
		NL 2016819 B1	2017/12/04
		US 2020-0116730 A1	2020/04/16
		WO 2017-204636 A3	2018/01/04
		ZA 201807967 B	2019/08/28
KR 10-2016-0134106 A	2016/11/23	KR 10-1847634 B1	2018/04/11
KR 10-2010-0100154 A	2010/09/15	KR 10-1092371 B1	2011/12/13