

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 12월 24일 (24.12.2020) WIPO | PCT

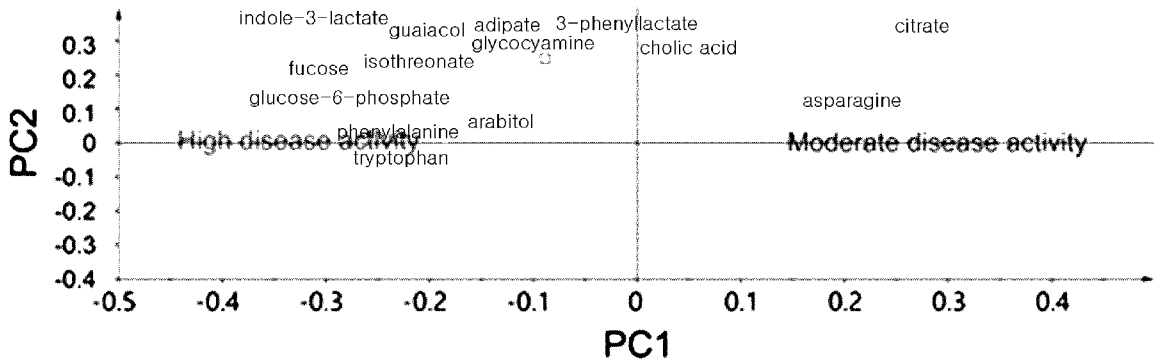
WO 2020/256351 A1

- (51) 국제특허분류: G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/007646
- (22) 국제출원일: 2020년 6월 12일 (12.06.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0071462 2019년 6월 17일 (17.06.2019) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호, Seoul (KR). 차훈석 (CHA, Hoon Suk); 06351 서울시 강남구 일원로 81 삼성서울병원 류머티스내과, Seoul (KR). 안중경 (AHN, Joong Kyoung); 03181 서울시 종로구 새문안로 29 강북삼성병원 류마티스내과, Seoul (KR). 김정연 (KIM, Jung Yeon); 02412 서울시 동대문구 신이문로8길 44, 2층, Seoul (KR). 정유은 (CHEONG, Yu Eun); 16509 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 65, 5203동 1802호, Gyeonggi-do (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 국내 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: BIOMARKER FOR PREDICTING OR CLASSIFYING SEVERITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS USING METABOLITE ANALYSIS

(54) 발명의 명칭: 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing the severity of rheumatoid arthritis using metabolite analysis. The present invention provides a biomarker which is for classifying the severity of rheumatoid arthritis in patients suffering from same through the analysis of joint capsule fluid metabolites, and can be applied to a kit for more specifically classifying the severity of rheumatoid arthritis in patients.

(57) 요약서: 본 발명은 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염의 중증도 진단방법에 관한 것으로, 관절 낭액 대사체 분석을 통해 류마티스 관절염 환자에서 그 중증도를 구분하기 위한 바이오마커를 제공하며, 류마티스 관절염 환자의 중증도를 더욱 특이적으로 구분하는 키트 등에 적용될 수 있다.

WO 2020/256351 A1

명세서

발명의 명칭: 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커

기술분야

- [1] 본 발명은 관절 낭액 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 류마티스 관절염(RA: Rheumatoid Arthritis)은 관절 주위를 둘러싸고 있는 활막이라는 조직의 염증 때문에 일어나는 질환으로 우리나라 전체 인구 중 대략 1%가 환자군으로 추정되고 있는 대표적인 만성질환이다. (McInnes I. B. and Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis (2011) N Engl J Med vol. 365, pp. 2205-2219). 관절 낭액은 관절 간의 생물학적인 윤활유로 작용할 뿐 아니라 영양소 및 다양한 사이토카인이 통과하는 용액으로 작용한다. 따라서 관절 활막과 연골 내의 염증이나 효소에 의한 분해 등은 관절 낭액의 화학적 조성의 변화를 일으킨다. 또한 관절 낭액은 염증성 관절염의 병인학적 상태를 가장 잘 반영하는 샘플로 여겨진다 (O'Connell J. X. Pathology of the synovium (2000) Am J Clin Pathol vol. 114, pp. 773-784).
- [3] 따라서 류마티즘 관절염 환자의 관절 낭액의 분석은 진단의 바이오마커를 제공하거나, 류마티스 관절염의 병인학적 이해를 도와서 임상에 적용될 수 있다.
- [4] 또한, 류마티스 관절염의 치료 방법으로는 관절의 손상을 최소화하고, 기능 손실을 방지하며 통증을 줄이기 위하여 일반적으로 진통소염제를 다양한 항류마티스제제와 병합 투여하는 약물치료 방법이 사용되고 있고, 최근에는 생물학적 치료제가 개발되어 항류마티스 약제와 함께 병용 치료로 이용되고 있으며, 질병의 중증도가 심각한 경우에는 수술요법이 시행되고 있다. 그러나 이와 같은 치료 방법은 상당히 뛰어난 효과에도 불구하고 관절 변형이 지속될 수 있고 약제 부작용으로 적절한 치료가 어려운 경우도 있으며, 신약 개발 비용에 따른 약가 상승으로 많은 비용이 드는 단점이 있기 때문에, 류마티스 관절염의 중증도 예측 또는 구분할 수 있는 키트 개발이 시급한 실정이다.
- [5] 대사체학은 생체의 대사적 변화에 따른 종합적인 대사물질의 변화를 살펴보는 학문으로, 다양한 생리학적, 병리학적 상태를 밝히는데 사용된다 (Johnson C. H. et. al. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms (2016) Nat Rev Mol Cell Biol vol. 17, pp. 451-459). 류마티스 관절염은 유전적, 환경적 인자를 포함한 다양한 인자들이 작용하여 발생하는 것이기에 대사물질의 변화를 유도할 수 있으며, 대사체학을 통해 생리학 및 병리학적 변화를 밝히는데 유용할 수 있다.
- [6] 다른 관절염 환자와 류마티스 관절염 환자를 구분할 수 있는 바이오마커에

대해서는 비특허문헌(Kim S. et. al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis (2014) PLOS ONE vol. 9(6), e97501)에 보고된 바 있으나, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 또는 구분을 위한 바이오마커라는 점에 그 특징이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 대사체학을 통해 류마티스 관절염 환자 관절 낭액에서 대사물질이 중증도에 따라 어떻게 변화하는지 살펴보고, 중증도를 나타내는 대사체 마커를 제시하여 환자의 중증도를 더욱 특이적으로 구분할 수 있는 새로운 바이오마커를 발굴하였다.
- [8] 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액을 채취하고 GC/TOF MS를 이용하여 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액 내 대사체 분석을 통해 총 125개의 대사체를 검출하였다. 이를 기반으로 환자의 중증도 수치 (DAS28-ESR) 와 연관지어 분석하였다.
- [9] 먼저, 각 환자의 중증도를 DAS28-ESR을 통하여 산출하고, 중증도의 증가에 따라서 통계적으로 유의미하게 증가 혹은 감소하는 대사물질을 비모수적 상관관계 분석인 Spearman's rank correlation coefficient를 구해서 찾았다. 이때 p -value가 0.05 미만인 14개의 대사물질을 신규생체표지자 후보 물질로 선정하였다.
- [10] 이 14개의 류마티스 관절염 환자의 중증도 신규생체표지자 후보 물질을 이용하여 다변량 통계분석법에 기반한 직교부분최소제곱회귀법(Orthogonal partial least squares discriminant analysis: OPLS-DA) 모델을 만들어 고중증도군과 중중증도군을 구분할 수 있도록 하였다.
- [11] 또한, 중증도 진단 모델이 외부 샘플의 중증도 진단에도 적용될 수 있는지 확인하기 위하여, 10명의 환자로부터 얻은 관절낭액 샘플에서 대사체 분석 및 모델에 적용하여 중증도를 정확히 판별할 수 있음을 확인하고 모델을 검증하였다.
- [12] 따라서, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중중증도 군의 구별용 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [13] 또한, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트를 제공하는데 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및

트립토판(tryptophan)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트를 제공한다.

- [15] 또한, 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트를 제공한다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명을 통하여 대사체학을 이용해 류마티스 관절염 중증도를 특이적으로 예측 또는 구분할 수 있는 바이오마커를 규명하였다. 이러한 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커는 중증도 예측 또는 고중증도와 중증증도를 구별하기 위한 중증도 구분 키트 등의 다양한 형태로 적용될 수 있다.
- [18] 따라서, 류마티스 관절염 중증도에 특이적인 바이오마커를 표적으로 한 신약 개발에 활용될 수 있는 바, 류마티스 관절염의 중증도에 특이적인 바이오마커를 이용하여 류마티스 관절염의 발병 기전을 좀 더 정확히 파악하고 이를 근거로 해서 신약 개발이나 신약 후보 약물들에 대한 선별 도구로서 이용될 수 있다.
- [19] 또한, 류마티스 관절염 중증도의 파악 및 예측을 통한 맞춤형 조기 치료가 가능함으로써 류마티스 관절염으로 의심되는 환자나 류마티스 관절염으로 진단된 환자에서 특정 대사체의 농도를 통하여 중증도를 파악하여 이에 대한 맞춤형 조기 치료에 활용될 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 14개의 잠재적 중증도 구분 바이오마커 기반으로 생성된 OPLS-DA를 이용한 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 (RA_high) 중증증도군 (RA_moderate) 간의 비교 진단 모델(a: score plot; b: loading plot; c: permutation tests)을 나타낸 것이다.
- [22] 도 2는 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 OPLS-DA 모델의 ROC curve를 이용한 통계학적 검증을 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 OPLS-DA 모델의 외부 검체를 이용한 중증도 진단 검증을 나타낸 것이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [26] 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측용 키트 및/또는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트에 관한 것이다.
- [27] 본 발명에서 용어, "류마티스 관절염의 중증도 예후 예측"이란 류마티스 관절염 환자의 전반적인 염증 정도, 골 파괴 정도, 또는 류마티스 관절염의 진행 정도를 평가하였을 때 높은 질병활성으로 인해 골 파괴가 진행될 가능성 또는 관절 변형이 초래될 가능성과 관련된다. 종래 임상에서 류마티스 관절염의 질병 중증도를 측정하는 대표적인 방법인 DAS(Disease Activity Score) 또는 이것의 변형된 형태인 DAS28(Disease Activity Score 28)은 점수 계산 방식의 지수 평가 방법으로, 염증 표지자 검사나 방사선 소견 같은 일부 객관적 요소와 함께 환자 및 의사가 평가하는 주관적인 요소들을 함께 평가한다. DAS28은 환자의 28개 관절 중 압통을 느끼는 관절 수, 부종을 보이는 관절 수, 적혈구 침강속도, 환자의 전신적 평가로 구성된 종합 지수로서, 28개의 관절에는 양쪽 어깨 관절, 팔꿈치 및 손목 관절, 중수지 관절, 근수지 관절, 무릎 관절 등을 포함한다.
- [28] DAS28을 이용한 질병의 중증도 판별은 적혈구 침강 속도에 (erythrocyte sedimentation rate) 기반한 DAS28-ESR score와 C-reactive protein의 활성도 지수를 기반으로 계산하는 DAS28-CRP score가 있으며, 특히 환자에 대한 기타 종합적인 검사를 생략하고 DAS28의 ESR score와 tender joint count, swollen joint count를 이용하여 질병의 중증도를 계산하는 DAS28-ESR(3) score가 널리 사용된다 (<https://www.mdcalc.com/disease-activity-score-28-rheumatoid-arthritis-esr-das28-esr>) .
- [29] DAS28-ESR(3) score로 조사된 류마티스 관절염 질병 활성도는 0점에서 최대 9.4점까지 계산될 수 있으며, 일반적으로 DAS28 점수가 2.6 미만이면 질병 활성이 거의 없는 상태(Remission, 관해), 2.6점 이상 3.2점 미만이면 낮은 질병활성(Low Disease Activity, 경증), 3.2점 이상 5.1 점 미만이면 중간 질병활성(Moderate Disease Activity, 중증증도), 그리고 5.1점 이상이면 높은 질병활성(High Disease Activity, 고중증도)으로 정의하고 있다.
- [30] 본 발명은 환자의 향후 질병 중증도를 손쉽게 예측할 수 있어, 추가 필요한 치료 방법의 사용 여부를 결정함으로써 류마티스 관절염 발병 후의 질병의 지연, 완화 및/또는 완치를 위한 정보로 활용할 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 구현예로서, 관절낭액에서 순수 메탄올을 섞고 강하게 볼텍싱 한 후에 원심분리하여 대사체를 추출하는 과정을 포함하는 대사체 샘플링 단계를 거친다.
- [32] 상기 대사체의 추출에 사용하는 용매로는 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [33] 상기 125개의 대사체에는 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 인산류, 유기산류 등을 포함하고 있다.
- [34] 상기 대사체 샘플링 단계에서 추출된 대사체에 대해서는 다음의 분석 단계를

거친다:

- [35] 추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계;
- [36] GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및
- [37] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계.
- [38] 즉, 상기 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.
- [39] 다음으로, 대사체의 프로파일링 차이를 비교하기 위해 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고, 분석 및 검증한다.
- [40] 부분최소제곱회귀법의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타내는 것으로 판정한다.
- [41] 본 발명의 이 구현예에 따르면, 류마티스 관절염의 고중증도군과 중증증도군의 대사체를 구별하기 위한 바이오마커로, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체를 사용할 수 있다.
- [42] 고중증도군에서는, 상기 바이오마커들 중 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 증가하는 경향을, 시트레이트(citrate), 아스파라진(asparagine)은 감소하는 경향을 나타낸다.
- [43] 반면에, 중증증도군에서는 상기 바이오마커들 중 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나

이상은 감소하는 경향을, 시트레이트(citrate), 아스파라진(asparagine)은 증가하는 경향을 나타낸다.

- [44] 상기 증가 또는 감소 경향이란 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 "대사체 농도의 증가"는 류마티스 관절염 환자 고중증도군에서 중증도군 대비 또는 중증도군에서 고중증도군 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 "대사체 농도의 감소"는 류마티스 관절염 환자 고중증도군에서 중증도군 대비 또는 중증도군에서 고중증도군 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.
- [45] 따라서, 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자 고중증도군과 중증도군의 구별용 키트를 제공한다.
- [46] 다음으로 류마티스 관절염의 중증도의 증가에 따라 유의하게 증감하는 대사체를 찾고자, DAS-28 ESR (3) score와 실시예 1에서 얻은 대사체의 intensity 간의 상관관계를 구하기 위해서 두 변수 간의 상관관계 비모수적 통계 분석 방법인 Spearman's rank correlation coefficient (Spearman R)를 통하여 분석하여 통계적으로 유의적인 증감을 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고 분석 및 검증한다.
- [47] Spearman R값이 양수인 것은 질병 중증도의 증가에 따라서 대사체 바이오마커의 인테시티가 증가하는 경향을, Spearman R값이 음수인 것은 질병 중증도의 증가에 따라서 대사체 바이오마커의 인테시티가 감소하는 경향을 나타내는 것으로 판정한다.
- [48] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 류마티스 관절염의 중증도를 예측하기 위한 바이오마커로, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체를 사용할 수 있다.
- [49] 상기 바이오마커들은 중증도의 증가에 따라서 시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 감소하는 경향을, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate),

글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 증가하는 경향을 나타낸다.

- [50] 상기 증가 또는 감소 경향이란 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 "대사체 농도의 증가"는 류마티스 관절염 환자 중증도의 증가에 따라서 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 "대사체 농도의 감소"는 류마티스 관절염 환자 중증도의 증가에 따라서 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.
- [51] 본 발명의 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다. 구체적으로, 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), 젤 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC) 또는 젤 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 가장 구체적으로는, GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기일 수 있다.
- [52] 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.

[53]

발명의 실시를 위한 형태

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

[55]

[56] [실시예]

- [57] 실시예 1: GC/TOF MS를 이용한 류마티스 관절염 환자의 관절낭액 대사체 동정

- [58] 30명의 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액을 채취하여 각각의 관절낭액 샘플

100 μ l에 순수 메탄올 900 μ l을 섞고 강하게 볼텍싱한 후에 원심분리하여 40 개의 서로 다른 샘플에서 대사체를 추출하였다.

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

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

[61] GC/TOF MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다.

[62] 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 50도에서 5분간 유지시킨 후 330도까지 승온시킨 다음 1분간 유지하였다. 1 μ l의 샘플을 비분할법(splitless)으로 주입(injection)하였다. Transfer line 온도와 Ion source 온도는 각각 280도, 250도로 유지시켰다. GC/TOF MS 결과를 보유하고 있는 라이브러리에서 찾아 동정하여, 125개의 대사체를 동정하였다(표 1).

[63] 다음 표 1과 같이, 각각의 대사체군별로 분류하였을 때, 유기산 20.8%, 아미노산 21.6%, 당 18.4%, 지방산 14.4%, 아민 11.2%, 인 5.6%, 기타 7.9%로 나타났다.

[64]

[표1]

류마티스 관절염 환자의 관절 낭액에서 추출한 125개의 대사체 확인

Amines		
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5'-deoxy-5'-methylthioadenosine
glycoamine	guanosine	hypoxanthine
inosine	O-phosphorylethanolamine	thymine
uracil	urea	uric acid
uridine	xanthine	
Amino acids		
alanine	asparagine	asparagine dehydrated
aspartate	cyano-L-alanine	glutamate
glutamine	glycine	histidine
isoleucine	L-citrulline	L-cysteine
leucine	L-homoserine	lysine
methionine	N-methylalanine	ornithine
oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan
tyrosine	valine	β -alanine
Fatty acids		
1-monopalmitin	1-monostearin	2-ketoisocaproic acid
arachidonic acid	behenic acid	capric acid
heptadecanoic acid	lauric acid	lignoceric acid
linoleic acid	linolenic acid	myristic acid
oleic acid	palatinitol	palmitic acid
palmitoleic acid	pelargonic acid	stearic acid
Organic acids		
2-hydroxyhexanoate	2-hydroxyvalerate	2-ketoadipic acid
3-phenyllactate	adipate	citramalate
citrate	DL-3-aminoisobutyrate	fumarate
galactonate	glycerate	glycolate
guaiacol	hexonate	indole-3-lactate
isothreonate	malate	malonate
oxalate	phenylacetate	pyrrole-2-carboxylate
pyruvate	succinate	terephthalate
α -ketoglutarate	β -hydroxybutyrate	
Sugars and sugar alcohols		
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol
fructose	fucose	galactose
glucose	glycerol	lactose
lyxose	maltotriose	mannitol
mannose	melezitose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose
threitol	threose	trehalose
xylose	β -gentiobiose	
Phosphates		

[65] (계속)

[66]

adenosine-5-monophosphate	glucose-6-phosphate	glycerol-1-phosphate
mannose-6-phosphate	phosphogluconic acid	pyrophosphate
β-glycerolphosphate		
Miscellaneous		
1,2,4-benzenetriol	benzoate	cholic acid
nicotinamide	phthalic acid	salicylaldehyde
salicylic acid	sulfuric acid	taurine
α-tocopherol		

[67]

[68] 실시예 2: Spearman's rank correlation coefficient를 이용한 류마티스 관절염 중증도와 대사체 상관관계 분석 및 잠재적 중증도 구분 바이오마커의 제시

[69] 류마티스 관절염의 중증도의 증가에 따라 유의하게 증감하는 대사물질을 살펴보고자, 30명의 류마티스 관절염 환자에서 중증도인 DAS-28 ESR (3) score를 계산하고, 각 환자의 대사체 intensity와 어떻게 상관관계를 갖는지 Spearman's rank correlation coefficient를 통하여 분석하였다 (표 2). Spearman's rank correlation coefficient는 서로 다른 두 변수가 얼마나 연관성을 갖는지 상관관계를 분석하는 통계기법으로, 여기선 중증도 환자가 낮은 환자에서 높거나 낮은 수준의 대사물질이 중증도가 높은 환자에서 통계적으로 유의하게 높아지거나 낮아지는지 살펴보기 위하여 적용되었다. 그 결과 30명의 환자에서 DAS-28 ESR (3) score와 검출된 125개의 대사물질 intensity 간의 상관관계를 구하였으며, 125개의 대사물질 중 환자의 중증도인 DAS-28 ESR (3) score가 증가할 때 *p*-value가 0.05 미만으로 통계적으로 유의하게 증가하거나 감소하는 상관관계를 갖는 대사물질은 14개였다 (표 2). 표 2의 N은 샘플의 개수를 의미하며, Spearman R은 DAS-28 ESR (3) score, 즉 중증도가 증가함에 따라서 대사물질의 intensity가 감소하거나 증가하는 정도를 나타낸다. *t*(N-2)는 Spearman R을 통한 상관관계 분석 시의 통계적으로 계산된 상대 수치를 의미하며, *p*-value는 각 대사물질이 DAS-28 ESR (3) score에 증가에 따라서 얼마나 통계적으로 유의하게 증가하였거나 감소하였는지 보여주는 신뢰구간을 나타낸다. Spearman R을 통한 상관관계 분석에서 DAS-28 ESR (3) score의 증가에 따른 대사물질의 증감이 *p*-value가 0.05 미만 수준에서 이루어질 경우에 통계적으로 유의하다고 제시하였다.

[70]

[표2]

Spearman's rank correlation coefficient를 이용한 류마티스 관절염 환자의 DAS28-ESR(3) 수치와 대사물질 intensity 간의 상관관계

Metabolite	N	Spearman R (ESR vs. intensity)	t(N-2)	p value
citrate	30	-0.58	-3.81	7.01.E-04
asparagine	30	-0.38	-2.16	3.97.E-02
tryptophan	30	0.37	2.08	4.72.E-02
cholic acid	30	0.38	2.15	3.99.E-02
arabitol	30	0.39	2.22	3.44.E-02
phenylalanine	30	0.41	2.38	2.43.E-02
adipate	30	0.42	2.42	2.22.E-02
glycocyanine	30	0.43	2.55	1.63.E-02
guaiacol	30	0.46	2.72	1.11.E-02
3-phenyllactate	30	0.48	2.87	7.68.E-03
isothreonate	30	0.52	3.19	3.48.E-03
fructose	30	0.53	3.30	2.62.E-03
glucose-6-phosphate	30	0.53	3.34	2.36.E-03
indole-3-lactate	30	0.60	3.96	4.70.E-04

[71]

[72] 실시예 3: 14개의 잠재적 바이오마커를 이용하여 생성한 OPLS-DA 다변량 모델에 기반한 중증도 구분 진단 모델 확립

[73] 중증도 구분 진단 모델을 확립하기 위해서, 각 환자의 DAS28-ESR(3) score의 정도에 따라서 각각의 샘플을 고중증도군과 중중중도군 환자로 나누었다. DAS-ESR(3) score가 5.1 이상이면 고중증도군, 5.1 미만이면 중중중도군으로 분류하였다.

[74] 실시예 2에서 제시한 14개의 잠재적 중증도 진단용 대사물질의 intensity를 기반으로 고중증도와 중중중도의 환자군을 구분할 수 있는지 다변량 통계 및 모델링 OPLS-DA 기법을 통해 살펴보았을 때, 대사체 프로파일이 명확하게 차이가 나는 것을 확인하였다(도 1). 도 1a는 PLS-DA의 score plot으로 중중중도군의 환자는 PC1 차원의 값이 양수가 되며, 고중증도군의 환자는 PC2 차원의 값이 음수가 되어 중중중도 환자 1개의 샘플을 제외하고는 환자의 관절낭액 샘플을 14개의 대사물질 intensity에 따라서 정확하게 구분되는 것을 보여주는 도면이다. 도 1b는 OPLS-DA의 loading plot으로 각 대사물이 모델의 형성에 기여하는 수치를 양수 혹은 음수 값으로 나타낸 그림이다. 도 1c는 OPLS-DA 모델의 permutation tests로 고중증도 및 중중중도 군을 구분하는 OPLS-DA 모델이 통계학적으로 유의하다는 점을 보여주는 도면이다.

[75]

[76] 실시예 4: 외부 검체 진단 검증에 기반한 중증도 구분 진단용 OPLS-DA 다변량 모델 실효성 검증

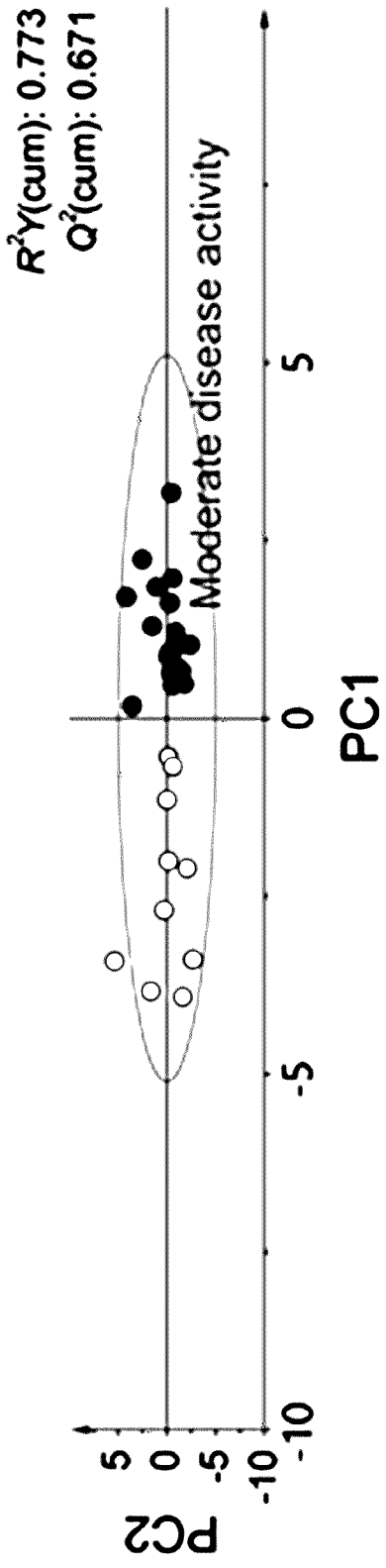
- [77] 실시예 3를 통해 생성된 관절낭액 검체를 통한 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 대사체적 생체표지자 OPLS-DA 모델이 진단에 적절한지 살펴보기 위하여 모델 내 각 검체의 PC1 score를 이용해서 ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 그렸다.
- [78] 그 결과 sensitivity가 100%, 1-specificity가 100%, AUC값이 1.000으로 모델이 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단에 매우 적합함을 보였다(도 2).
- [79] 또한, 이 모델이 외부 검체를 이용하여 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단에 적절한지 살펴보기 위하여, 류마티스 관절염 환자 고중증도군 3명 및 중중중도군 7명의 관절낭액 검체를 실시예 1의 방법으로 대사체 추출 및 14개의 대사체를 검출하여 모델에 집어넣고 고중증도군 및 중중중도군을 구분할 수 있는지 살펴보았다.
- [80] 도 1의 모델은 류마티스 관절염 환자 관절 낭액에서 추출된 14개의 대사체의 intensity를 집어넣을 때, 고중증도군의 환자이면 PC1을 기준으로 음수 값을, 중중중도군의 환자이면 PC1을 기준으로 양수 값을 나타내는 OPLS-DA 모델이다. 마찬가지로 10개의 외부 검체도 추출한 14개의 대사체 인텐시티 정보를 모델에 집어넣는 경우에 중증도에 따라 PC1을 기준으로 음수 혹은 양수값을 갖게 되고 고중증도 혹은 중중중도를 판단할 수 있게 된다. 그 결과, 10개의 검체 중 3개의 고중증도 환자 검체는 PC1을 기준으로 음수 값을 보였으며 7개의 중중중도 환자 검체 중 6개는 PC1을 기준으로 양수 값을, 1개는 PC1을 기준으로 음수 값을 보였다. 따라서 총 10개의 검체 중 9개의 검체 환자의 중증도를 정확하게 예측하였으므로 14개의 대사체 생체 표지자 OPLS-DA 모델이 외부 검체의 중증도 진단에 적절함을 알 수 있었다(도 3).

청구범위

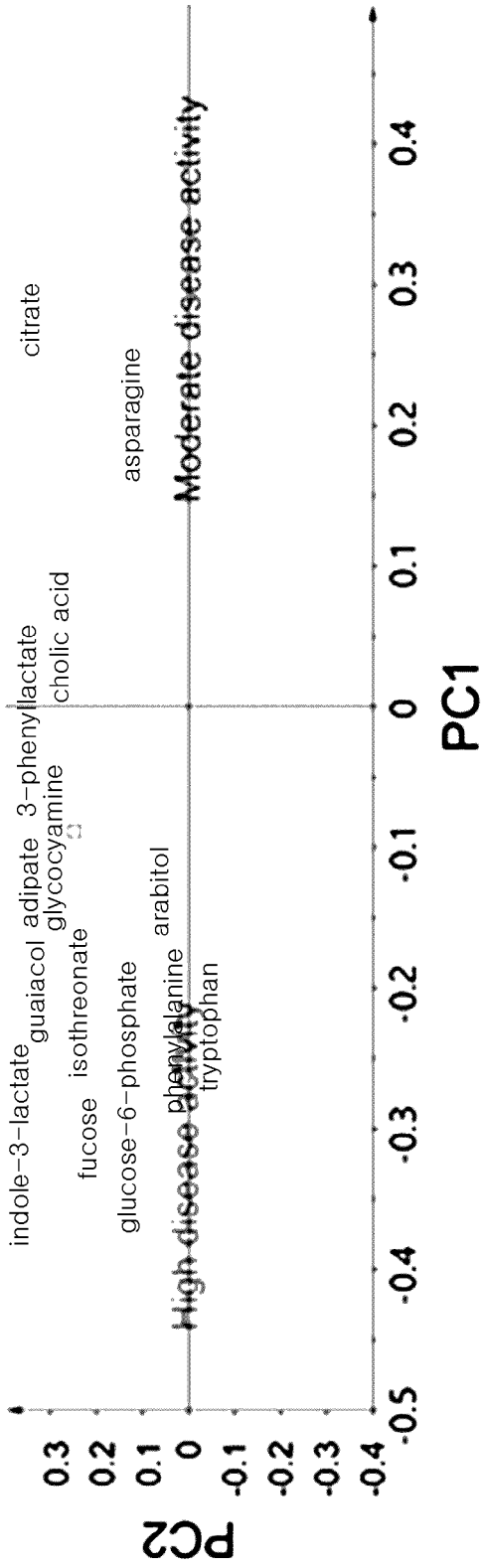
- [청구항 1] 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중중도군과 중중중도군의 구별용 키트.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기인 키트.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 고중중도군에 해당하는 것인 키트.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 고중중도군에 해당하는 것인 키트.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 중중중도군에 해당하는 것인 키트.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염

- 환자의 중증증도군에 해당하는 것인 키트.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
류마티스 관절염 환자의 고중증도군은 류마티스 관절염 환자의 중증도 수치인 DAS28-ESR 스코어(score) ≥ 5.1 에 만족하는 것인 키트.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
류마티스 관절염 환자의 중증증도군 류마티스 관절염 환자의 중증도 수치인 DAS28-ESR 스코어(score) < 5.1 에 만족하는 것인 키트.
- [청구항 9] 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서,
정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기인 키트.
- [청구항 11] 제 9 항에 있어서,
시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 대사체 농도가 류마티스 관절염 환자의 중증도의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내는 키트.
- [청구항 12] 제 9 항에 있어서,
인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민 (glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 대사체 농도가 류마티스 관절염 환자의 중증도의 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내는 키트.

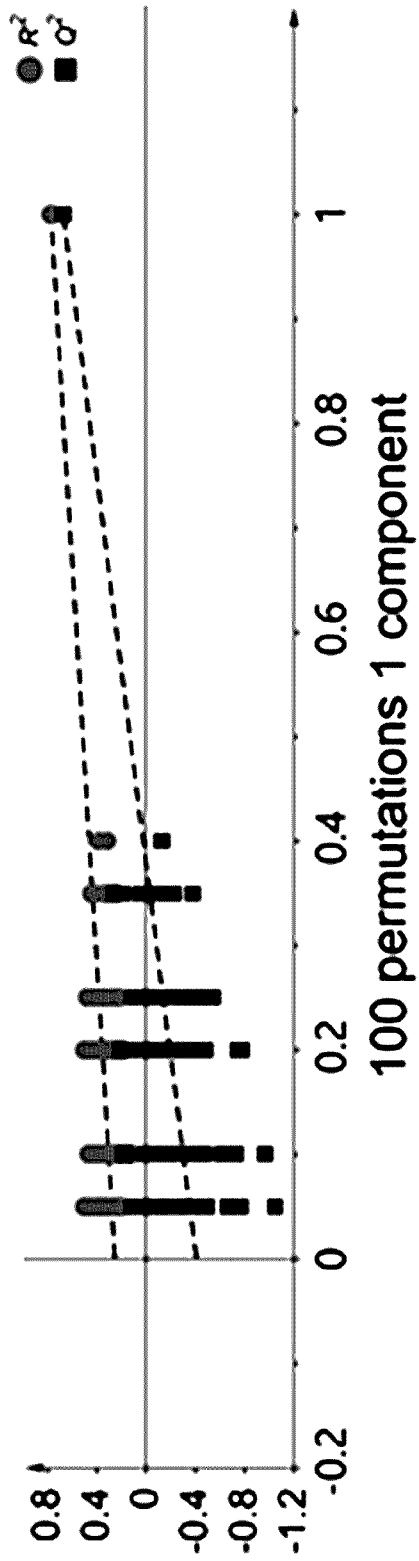
[Figure 1a]



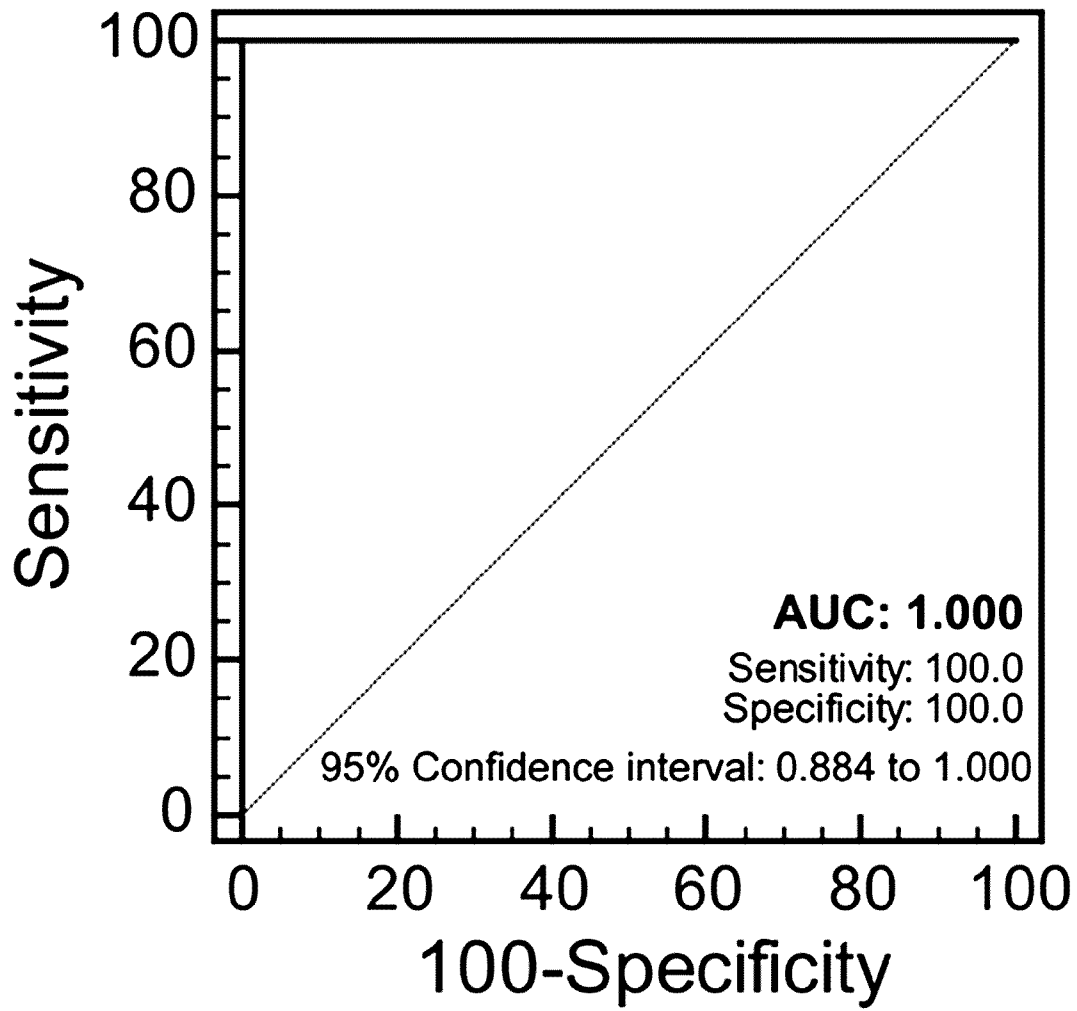
[도 1b]



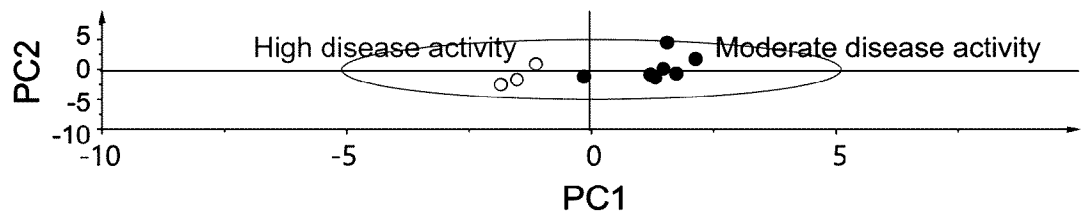
[도 1c]



[도2]



[도3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007646

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; G01N 31/00; G01N 33/566; G01N 33/68; G06F 19/10; 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: 관절낭액(synovial fluid), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 바이오마터(biomarker), 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 트립토판(tryptophan)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2012-0105444 A (OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION et al.) 25 September 2012. See abstract, paragraphs [0098], [0103], [0132] and [0245] and claim 2.	1-12
Y	KIM, Sooh et al. Global Metabolite Profiling of Synovial Fluid for the Specific Diagnosis of Rheumatoid Arthritis from Other Inflammatory Arthritis. Plos One. 2014, vol. 9, no. 6, e97501. See abstract and table 2.	1-12
Y	YANG, Xin Yu et al. Energy Metabolism Disorder as a Contributing Factor of Rheumatoid Arthritis: A Comparative Proteomic and Metabolomic Study. Plos One. 2015, vol. 10, no. 7, e0132698. See abstract, page 7, table 1 and Fig 4.	1-12
A	KR 10-2018-0014419 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 08 February 2018. See paragraphs [0040]-[0047] and [0107]-[0111].	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 29 September 2020		Date of mailing of the international search report 29 September 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea 35208		Authorized officer
Facsimile No. +82-42-481-8578		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007646

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0148346 A (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 31 December 2014. See abstract and claim 1.	1-12
.....		

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 1-12 pertain to a kit for distinguishing a high severity group from a medium severity group in rheumatoid arthritis patients (claims 1-8), and a kit for predicting severity in rheumatoid arthritis patients (claims 9-12), the kits comprising a device for quantitating one or more synovial fluid metabolites selected from the group consisting of 14 metabolites.

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/KR2020/007646

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2012-0105444 A	25 September 2012	AU 2010-306593 A1	21 April 2011
		AU 2010-306593 B2	10 September 2015
		AU 2010-306593 A1	07 June 2012
		CA 2777800 A1	21 April 2011
		CA 2777800 C	12 November 2019
		CN 102858991 A	02 January 2013
		EP 2488659 A1	22 August 2012
		EP 2488659 B1	11 December 2019
		IL 219210 D0	28 June 2012
		IL 219210 A	28 June 2012
		JP 5675829 B2	25 February 2015
		JP 2013-508687 A	07 March 2013
		US 2017-074878 A1	16 March 2017
		US 2015-0377909 A1	31 December 2015
		US 2011-0137851 A1	09 June 2011
		US 2017-168070 A1	15 June 2017
		US 9200324 B2	01 December 2015
		WO 2011-047358 A1	21 April 2011
KR 10-2018-0014419 A	08 February 2018	WO 2018-021624 A1	01 February 2018
		KR 10-1978677 B1	29 August 2019
KR 10-2014-0148346 A	31 December 2014	EP 3012634 A1	27 April 2016
		EP 3012634 B1	02 January 2019
		KR 10-2014-0148345 A	31 December 2014
		KR 10-1664966 B1	11 October 2016
		KR 10-1664964 B1	11 October 2016
		US 2016-0274106 A1	22 September 2016
		WO 2014-204274 A1	24 December 2014

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; G01N 31/00; G01N 33/566; G01N 33/68; G06F 19/10; 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: 관절낭액(synovial fluid), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 바이오마커(biomarker), 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라긴(asparagine), 콜산(cholic acid), 트립토판(tryptophan)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2012-0105444 A (오클라호마 메디컬 리써치 화운데이션 등) 2012.09.25 요약, 단락 [0098], [0103], [0132], [0245] 및 청구항 2	1-12
Y	KIM, SOOAH 등, Global Metabolite Profiling of Synovial Fluid for the Specific Diagnosis of Rheumatoid Arthritis from Other Inflammatory Arthritis, Plos One, 2014년, 9권, 6호, e97501 요약 및 표 2	1-12
Y	YANG, XIN YU 등, Energy Metabolism Disorder as a Contributing Factor of Rheumatoid Arthritis: A Comparative Proteomic and Metabolomic Study, Plos One, 2015년, 10권, 7호, e0132698 요약, 페이지 7, 표 1 및 Fig 4	1-12
A	KR 10-2018-0014419 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2018.02.08 단락 [0040]-[0047], [0107]-[0111]	1-12
A	KR 10-2014-0148346 A (가톨릭대학교 산학협력단) 2014.12.31 요약 및 청구항 1	1-12

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 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌, 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 09월 29일 (29.09.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 09월 29일 (29.09.2020)
--	---

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
---	------------------------------------

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 1-12는 14개의 대사체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트(청구항 1-8) 및 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트(청구항 9-12)에 관한 것이다.

- 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0105444 A	2012/09/25	AU 2010-306593 A1	2011/04/21
		AU 2010-306593 A1	2012/06/07
		AU 2010-306593 B2	2015/09/10
		CA 2777800 A1	2011/04/21
		CA 2777800 C	2019/11/12
		CN 102858991 A	2013/01/02
		EP 2488659 A1	2012/08/22
		EP 2488659 B1	2019/12/11
		IL 219210 A	2012/06/28
		IL 219210 D0	2012/06/28
		JP 2013-508687 A	2013/03/07
		JP 5675829 B2	2015/02/25
		US 2011-0137851 A1	2011/06/09
		US 2015-0377909 A1	2015/12/31
		US 2017-074878 A1	2017/03/16
		US 2017-168070 A1	2017/06/15
		US 9200324 B2	2015/12/01
WO 2011-047358 A1	2011/04/21		
KR 10-2018-0014419 A	2018/02/08	KR 10-1978677 B1	2019/08/29
		WO 2018-021624 A1	2018/02/01
KR 10-2014-0148346 A	2014/12/31	EP 3012634 A1	2016/04/27
		EP 3012634 B1	2019/01/02
		KR 10-1664964 B1	2016/10/11
		KR 10-1664966 B1	2016/10/11
		KR 10-2014-0148345 A	2014/12/31
		US 2016-0274106 A1	2016/09/22
WO 2014-204274 A1	2014/12/24		