



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월08일
(11) 등록번호 10-1876914
(24) 등록일자 2018년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 30/86 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 30/8679 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0183417
(22) 출원일자 2016년12월30일
심사청구일자 2016년12월30일
(56) 선행기술조사문헌
Jung-Eun Lee, 외 6명, 'Discovery of distinct urine metabolic profiles and biomarkers in primary nephrotic syndrome', 2015년 한국질량 분석학회(KSMS) 여름정기학술대회, (2015.08.), 포스터 발표.*
PLoS ONE, 2013, Vol. 8, pp e78531.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
국민대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(72) 발명자
이상호
서울특별시 송파구 양재대로 1218 218동 308호 (방이동, 올림픽선수촌아파트)
이도엽
서울특별시 노원구 십발로 229 11동 1503호 (하계동, 벽산아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

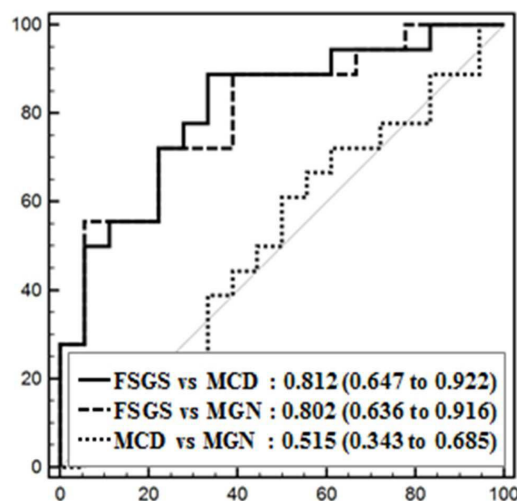
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 비침습적 사구체질환 감별진단용 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 시트르산, 피루브산, 프럭토스, 에탄올아민, 시스테인, 메티오닌, 시트룰린 등을 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 판별용 마커 조성물, 상기 마커 조성물을 이용하여 사구체 신염의 원인질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는 사구체 신염의 원인질환 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 소변내 대사체의 수준변화를 이용하여 사구체 신염의 원인을 진단하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법은 사구체 신염의 원인질환을 감별하고 치료할 수 있는 기회를 제공함으로써, 침습적 신장 조직 검사의 합병증 예방 및 비용 지출 감소, 말기신부전증으로의 발전을 막고, 말기신부전환자 투석에 소요되는 막대한 국민건강보험료 지출을 줄이고 환자의 삶의 질 향상에 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 30/88 (2013.01)

G01N 33/6815 (2013.01)

G01N 2030/8813 (2013.01)

G01N 2030/8818 (2013.01)

G01N 2800/347 (2013.01)

(72) 발명자

이정은

서울특별시 강동구 올림픽로83길 22 3층 (천호동)

김연수

서울특별시 강남구 압구정로 151 신현대아파트 10
6동 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A2016-0243

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 식품유래 고지방식이섭식에 의한 뇌대사질환 가속기작 규명 및 다기관(뇌조직-혈액-간조
직-근육세포) 통합적 대사체 모델 구축을 통한 식품-질환 연관 지표 도출(1/3)

기 여 율 1/1

주관기관 국민대학교산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

시트르산(citric acid), 피루브산(pyruvic acid), 프럭토스(fructose), 에탄올아민(ethanolamine), 및 시스테인(cysteine)을 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 중 국소분절성사구체경화증 판별용 마커 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

시스테인(cysteine), 피루브산(pyruvic acid), 메티오닌(methionine) 및 시트룰린(citrulline)을 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 중 미세변화신증 또는 막성신증 간 판별용 마커 조성물.

청구항 5

소변시료로부터 시스테인, 피루브산, 메티오닌 및 시트룰린으로 구성된 마커를 검출 또는 정량분석하는 단계를 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 중 미세변화신증 또는 막성신증 간 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

소변시료로부터 시트르산, 피루브산, 프럭토스, 에탄올아민 및 시스테인으로 구성된 마커를 검출 또는 정량분석하는 단계를 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 중 국소분절성사구체경화증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 소변시료는 사구체 신염 환자에게서 수집된 것인, 방법.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서,

대사체를 검출 또는 정량분석하여 수득한 결과를 사구체 신염의 원인질환 진단과 연관시키는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 연관시키는 단계는 대사체의 정량분석 결과를 조합하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 정량분석 결과의 조합은 선형 또는 비선형 회귀 분석방법; 선행 또는 비선형 classification 분석방법; ANOVA; 신경망 분석방법; 유전적 분석방법; 서포트 벡터 머신 분석방법; 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법; 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘, 또는 Kernel principal components 분석방법; Markov Blanket 분석방법; recursive feature elimination 또는 엔트로피-기반 recursive feature elimination 분석방법; 전방 floating search 또는 후방 floating search 분석방법; 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 분석방법을 이용하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 정량분석 결과의 조합은 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 수행되는 것인, 방법.

청구항 12

시트르산(Citric acid), 피루브산(Pyruvic acid), 프럭토스(Fructose), 에탄올아민(Ethanolamine) 및 시스테인(Cysteine)으로 구성된 마커에 대한 정량장치를 포함하는 국소분절성사구체경화증 진단용 키트.

청구항 13

메티오닌(methionine), 시스테인(cysteine), 시트룰린(citrulline) 및 피루브산(pyruvic acid)으로 구성된 마커에 대한 정량장치를 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 중 미세변화신증 또는 막성신증 간 진단용 키트.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 비침습적 사구체질환 감별진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 시트르산, 피루브산, 프럭토스, 에탄올아민, 시스테인, 메티오닌, 시트룰린 등을 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 판별용 마커 조성물, 상기 마커 조성물을 이용하여 사구체 신염의 원인질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는 사구체 신염의 원인질환 진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

사구체질환은 혈액을 여과하여 소변의 원료를 만들어내는 신장 기본 구조인 사구체의 질병을 의미한다. 사구체 질환은 임상양상, 혈액 및 소변검사 결과에 따라 크게 5가지로 분류가 되며, 이 중 사구체 신염은 3.5g/일 이상의 단백뇨, 그리고 이와 동반되는 저알부민혈증, 말초부종 및 고지혈증 등을 동반하는 사구체질환으로 말기신부전의 원인 중 약 15%를 차지하고 있다. 다양한 사구체 질환이 사구체 신염을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 막성신증(membranous glomerulonephritis, MGN), 국소분절성사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS), 미세변화신증(minimal change disease, MCD) 이 성인 사구체 신염의 가장 흔한 세

가지 원인으로서는 이 질환들은 치료, 예후가 모두 다르기 때문에 이들을 감별하는 것은 매우 중요하다 할 수 있겠다. 임상의는 각 질환의 유병률, 역학적인 특성 및 피, 소변검사를 통해 어느 질환인지 추정해 볼 수 는 있으나, 정확한 진단을 하기 위해서는 초음파 유도하 신장 조직 검사를 필요로 한다. 하지만 신장 조직 검사는 침습적인 방법으로 환자에게 통증을 유발하며 시술후 출혈, 감염, 동정맥루 형성, 드물지만 사망과 같은 치명적인 합병증까지 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 출혈경향이 있거나 해부학적인 문제등 신장 조직 검사를 시행할 수 없는 경우 사구체 신염의 원인질환을 감별할 수 없기 때문에 신장 조직 검사를 시행하지 않고 위의 세가지 질환을 감별할 수 있는 검사법이 필요한 상황이다.

[0003] 현재 사구체질환의 비침습적인 감별진단을 위하여 다양한 바이오마커 연구가 진행이 되고 있다. 성인 사구체 신염의 가장 흔한 원인인 일차성 막성신증은 인지질 A2 수용체에 대한 자가항체에 의해 발생하는 질환임이 알려지면서 인지질 A2 수용체 자가항체의 진단적 가치에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 국소 분절성 사구체 경화증과 미세변화 신증을 감별하기 위한 바이오마커로써 plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor(suPAR) 와 CD80 등이 제시되고 있다. 또한 소변내 마이크로RNA를 이용한 사구체 신염의 감별진단이 연구가 되고 있으나, 아직까지 실제 임상에 적용할 수 있는 결과는 없는 상태이다.

[0004] 대사체학(metabolomics) 은 체액에 존재하는 대사체(metabolites) 들을 분석, 연구하는 학문으로 정의한다. 대사체들은 신장의 기능에 의해 혈중농도, 소변농도가 영향을 받기 때문에 최근 만성신부전, 당뇨병성 신증, 신장 이식과 같은 신장학 분야에 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 사구체 신염 분야의 경우 막성신증, 국소분절성 사구체 경화증 환자에서의 대사체의 변화에 대해 기술한 논문이 있으나(Keiji Mimura et al., Metabolism., 33(10):882-890, 1984; Pitkanen E, Clin Nephrol., 45(4):226-229, 1996; Xianfu Gao et al., BMC Systems Biology, 6(Suppl 1):S14, 2011; Mohan Kundal et al., Clin Transl Sci., 7(2):132-136, 2014), 대사체를 이용해 사구체 신염의 원인을 감별진단 하는 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 대사체를 이용해 사구체 신염의 원인을 감별진단 하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 소변내 대사체인 시트르산(citric acid), 피루브산(pyruvic acid), 프럭토스(fructose), 에탄올아민(ethanolamine), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 시트룰린(citrulline) 등의 수준변화를 이용하여, 사구체 신염의 원인을 감별할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 시트르산, 피루브산, 프럭토스, 에탄올아민, 시스테인, 메티오닌, 시트룰린 등을 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 판별용 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 마커 조성물을 이용하여 사구체 신염의 원인질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마커에 대한 정량장치를 포함하는 사구체 신염의 원인질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 시트르산(citric acid), 피루브산(pyruvic acid), 프럭토스(fructose), 에탄올아민(ethanolamine), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 시트룰린(citrulline) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사체를 마커로 포함하는, 사구체 신염의 원인질환 판별용 마커 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 용어 "사구체 신염(nephrotic syndrome)"이란, "신증후군"이라고도 호칭되며, 신장의 사구체를 이루는 모세혈관의 이상에 의하여 발병되는 질환을 의미한다. 상기 사구체의 모세혈관이 손상되면, 혈액내의 단백질이 체외로 배출되는 단백뇨 증상이 유발되어, 혈액내 단백질 수준이 감소되고, 이로 인하여 저알부민혈증(hypoalbuminemia)이 발생한다. 상기 저알부민혈증으로 인하여 혈액내 수준이 혈관밖으로 유출되고, 유출된 수분으로 인하여 부종이 형성되고, 혈관내에서는 고지혈증이 유발된다. 대체로, 24시간 동안 성인에게서 소변으로 배출되는 단백질의 양이 3.5g이상이거나, 소아의 경우 체표면적 1제곱미터당 소변으로 소실되는 단백질 양이 960mg 이상인 경우에 사구체 신염이 발병된 것으로 진단할 수 있다.

[0011] 본 발명에서 상기 사구체 신염의 원인질환은 구체적인 증상에 따라, 막성신증(membranous glomerulonephritis;

MGN), 국소분절성사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS) 또는 미세변화신증(minimal change disease; MCD)을 의미할 수 있다.

- [0012] 본 발명의 용어 "국소분절성사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS)"이란, "국소토리균음증"이라고도 호칭되는 난치성 콩팥증후군의 대표질환의 하나로서, 콩팥생검에 의한 광학현미경 소견에서 일부의 토리(국소성)에 부분적인(분절성) 경화성 병변이 보이는 질환을 의미한다. 일차성에서는 콩팥증후군을 나타내는 경우가 많다. 대부분이 스테로이드 저항성을 나타내며, 콩팥기능의 예후는 좋지 않아 20년이 지나면 57%가 콩팥 기능상실에 이른다. 이차성(속발성)의 원인으로는 바이러스(HIV관련 콩팥증 등), 약물(헤로인 등) 등이 있다. 상기 국소분절성사구체경화증의 병변은 속질결 영역(결질의 심부)에 분포되기 때문에, 콩팥생검으로 결질 표층의 정상 부위만을 채취한 경우, 진단이 안 되거나 최소변화콩팥병증(MCNS)이라고 판단해 버리는 경우가 있어 감별에 주의해야 한다고 알려져 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 사구체 신염의 원인질환 중 국소분절성사구체경화증을 판별하기 위하여는, 본 발명에서 새롭게 규명한 5가지 대사체 마커인 시트르산(Citric acid), 피루브산(Pyruvic acid), 프럭토스(Fructose), 에탄올아민(Ethanolamine) 및 시스테인(Cysteine)을 사용할 수 있다.
- [0014] 상기 5가지 대사체 마커를 발굴하는 방법의 일 예를 다음과 같이 서술한다:
- [0015] 먼저, 국소분절성사구체경화증에 의하여 발병된 사구체 신염 환자의 소변샘플을 채취하여 대사체를 추출한다. 추출시에 사용되는 용매로는 메탄올:아이소프로판올:중류수(3:3:2)를 사용하며, 추출된 샘플은 효과적인 Mass spectrometer 분석을 위해, pyridine, MSTFA 유도체화를 실시한다. 내부 보유 마커로는 13가지 다른 지방산메틸 에스터를 첨가하도록 한다.
- [0016] 이후, GC/TOF MS를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 비교, 분석한다. 이를 위하여 분석결과를 통계처리 가능한 수치로 변화한 다음, 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 그 차별성을 검증하는 것을 포함한다. 결과 130종의 대사체를 동정하였고, 표준화를 위하여 GC/TOF MS 분석결과 나온 강도를 대사체의 강도 합으로 나누는 방법을 사용하였으며, 추가적으로 변위차 표준화법을 실시한다.
- [0017] 그런 다음, 그룹간 차이를 보이는 단일 바이오마커 후보를 탐색하기 위하여, t-검정을 통한 3가지 다른 신증후군 그룹에 특이적으로 차이를 보이는 5가지 대사체 프로파일을 확보한다.
- [0018] 이어, 상기 확보된 대사체에 대하여 부분최소제곱법(PLS)를 이용하여 다변량 방식으로 반응 변수를 모형화한 다음, 비선형 반복 부분 최소 제곱(NIPALS) 알고리즘을 사용하여 예측변수와 반응변수간의 최대 상관을 설명하는 일련의 성분을 추출한다.
- [0019] GC/TOF MS에서 분석된 대사체의 강도를 이용하여 상대적 수준차이를 비교한 다음, ROC(Receiver Operating Characteristic) 분석을 통해 얻어진 AUC(Area Under the Curve) 값을 비교하여, 대사체 바이오마커의 민감도와 특이도를 분석한다.
- [0020] 또한, 상기 발굴된 대사체 마커의 효과를 검증하는 방법의 일 예를 다음과 같이 서술한다:
- [0021] 먼저, 재모집한 소변시료를 대상으로 GC/TOF MS 분석을 수행하고, COMBAT 알고리즘을 이용하여 배치효과를 제거하여 이전 데이터와의 차이를 최소화하며, 비선형 반복 부분 최소 제곱(NIPALS) 알고리즘의 주성분분석(PCA)를 이용하여 예측변수와 반응변수간의 최대 상관을 설명하는 일련의 성분을 추출한다.
- [0022] 상기 추출된 성분을 이용하여 ROC 곡선을 작성한 후, 상기 작성된 ROC 곡선을 분석하여 대사체 바이오마커의 효과를 검증한다.
- [0023] 본 발명의 용어 "막성신증(membranous glomerulonephritis; MGN)"이란, "막성사구체 신염"이라고도 호칭되며, 신조직(腎組織) 소견상 면역 침착으로 사구체 모세혈관 막이 두꺼워지는 질환을 의미한다. 형태학적으로는 미만성의 사구체 기저막 비후와 내장상피 하부와 관련하여 과립상의 전자밀도성 면역글로불린의 침착을 특징으로 하는 신질환이다. 35세 이상의 성인에게 가장 흔하게 나타나고, 남성이 여성에 비해 2배 정도 많이 발생한다. 환자의 80% 정도는 단백뇨, 혈중 알부민의 감소, 지방질 증가, 부종 등 사구체 신염의 4대 증세가 나타난다. 증세 없이 단백뇨만 관찰되는 경우는 환자의 20%이다. 85% 정도가 진행되는 질환이나 요인 없이 발생하고 있어 이를 특발성 막성사구체 신염으로 분류한다. 혈중에서 면역복합체가 발견되는 경우는 15~25%이고, 항원물질의 정확한 성상도 규명되지 않았다. 환자의 10 내지 20%만이 진단 후 10 내지 15년 안에 말기 신부전으로 진행한다고 알려져 있다.

- [0024] 본 발명의 용어 "미세변화신증(minimal change disease; MCD)"이란, "최소변화콩팥병증"이라고도 호칭되고, 통상적인 사구체 신염 증상인 단백뇨, 저알부민혈증, 부종 등이 유발되고, 혈전을 수반하는 질환을 의미하는데, 고혈압과 신기능 저하는 거의 나타나지 않는다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 사구체 신염의 원인질환 중 막성신증 또는 미세변화신증을 판별하기 위하여는 본 발명에서 별도로 규명한 4가지 대사체 마커인 메티오닌(methionine), 시스테인(cysteine), 시트룰린(citrulline) 및 피루브산(pyruvic acid)을 사용할 수 있다.
- [0026] 상기 4가지 대사체 마커를 발굴하는 방법의 일 예를 다음과 같이 서술한다:
- [0027] 먼저, 막성신증 또는 미세변화신증에 의하여 발병된 사구체 신염 환자의 소변샘플을 채취하여 대사체를 추출한다. 상기 대사체의 추출방법은 상술한 바와 동일하다.
- [0028] 이후, GC/TOF MS를 이용하여 대사체 프로파일의 차이를 비교, 분석한다. 상기 분석법 역시 상술한 바와 동일하다.
- [0029] 그런 다음, 보다 높은 ROC 분석을 통해 얻어진 ROC 곡선의 AUC 값을 도출하기 위하여 신증후군 2그룹의 부분최소제곱법(PLS)를 이용하여 다변량 방식으로 반응 변수를 모형화 한 후, 4가지 대사체를 선정한다.
- [0030] 이어, 상기 선정된 대사체를 대상으로 GC/TOF MS에서 분석된 대사체의 강도를 이용하여 상대적 수준차이를 비교한다.
- [0031] 또한, 비선형 반복 부분 최소 제곱(NIPALS) 알고리즘의 주성분분석(PCA)를 이용하여 예측변수와 반응변수간의 최대 상관을 설명하는 일련의 성분을 추출한다.
- [0032] 끝으로, ROC 곡선에서 얻어진 AUC 값을 비교하여, 선정된 4가지 대사체의 민감도와 특이도를 분석한다.
- [0033] 아울러, 상기 발굴된 대사체 마커의 효과를 검증하는 방법은 상술한 바와 동일하다.
- [0034] 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 마커 조성물을 이용하여 사구체 신염의 원인질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0035] 구체적으로, 본 발명의 사구체 신염의 원인질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 소변시료로부터 시트르산(citric acid), 피루브산(pyruvic acid), 프럭토스(fructose), 에탄올아민(ethanolamine), 시스테인(cysteine), 메티오닌(methionine), 시트룰린(citrulline) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사체를 검출 또는 정량분석하는 단계를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 용어 "진단"이란, 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0037] 상기 소변시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 사구체 신염이 발병된 개체로부터 분리된 소변시료를 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 소변시료에서 대사체의 수준측정은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 질량분석기(Mass Spectrometer), 크로마토그래피(Chromatography) 기기, 크로마토그래피가 결합된 질량분석기(Chromatography-mass spectrometer), 핵자기공명분광분석기(Nuclear Magnetic Resonance spectrometer), 라만 분광기(Raman spectroscopy), 광흡수분석(light absorption analysis)기, 유동주입분석(flow injection analysis)기 등의 기기장치를 이용한 분석법 등의 방법을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0039] 상기 질량분석기는 상기 바이오마커의 수준을 측정할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, LDI-TOF MS(Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time Of Flight mass spectrometry), TOF MS(Time Of Flight mass spectrometry) 등을 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 크로마토그래피 역시 상기 바이오마커의 수준을 측정할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion

Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC), 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC) 등을 각각 개별적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 대사체의 수준을 측정하는 방법으로서 기체 크로마토그래피 분석법 및 질량분석법을 사용하였다.

[0041] 아울러, 상기 기기장치를 이용한 분석법을 수행할 경우, 상기 소변시료로부터 대사체를 추출하여 수득하고, 추출된 대사체에 메톡시아민을 처리하여 유도체화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 한편, 상기 소변시료로부터 정량분석된 각 대사체인 시트르산, 피루브산, 프럭토스, 에탄올아민, 시스테인, 메티오닌 또는 시트룰린의 수준을 사구체 신염의 원인질환 진단과 연관시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 상기 각 대사체는 정상인의 소변에서도 검출되기 때문에, 상기 대사체의 단편적인 수준만으로는, 사구체 신염의 원인질환을 진단하기가 용이하지 않으므로, 상기 각 대사체의 수준을 조합하여 분석함으로써, 사구체 신염의 원인질환을 진단할 수 있다.

[0043] 이처럼, 상기 대사체에 대한 각각의 정량분석 결과를 조합하여 분석하는 방법으로는, 통상적인 통계분석방법을 사용할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 통계분석방법은 사구체 신염의 원인질환을 진단할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 선형 또는 비선형 회귀 분석방법; 선형 또는 비선형 classification 분석방법; ANOVA; 신경망 분석방법; 유전적 분석방법; 서포트 벡터 머신 분석방법; 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법; 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘, 또는 Kernel principal components 분석방법; Markov Blanket 분석방법; recursive feature elimination 또는 엔트로피-기반 recursive feature elimination 분석방법; 전방 floating search 또는 후방 floating search 분석방법 등을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 정량분석 결과의 조합은 상기 통계방법을 자동적으로 수행할 수 있는 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 수행할 수도 있다.

[0045] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 시트르산(Citric acid), 피루브산(Pyruvic acid), 프럭토스(Fructose), 에탄올아민(Ethanolamine) 및 시스테인(Cysteine)으로 구성된 마커에 대한 정량장치를 포함하는 국소분절성사구체경화증 진단용 키트를 제공한다.

[0046] 본 발명의 진단 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있다. 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피 또는 질량분석기는 상기한 것과 같다.

[0047] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 메티오닌(methionine), 시스테인(cysteine), 시트룰린(citrulline) 및 피루브산(pyruvic acid)으로 구성된 마커에 대한 정량장치를 포함하는 막성신증 진단용 키트를 제공한다.

[0048] 본 발명의 진단 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있다. 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피 또는 질량분석기는 상기한 것과 같다.

[0049] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 메티오닌(methionine), 시스테인(cysteine), 시트룰린(citrulline) 및 피루브산(pyruvic acid)으로 구성된 마커에 대한 정량장치를 포함하는 미세변화신증 진단용 키트를 제공한다.

[0050] 본 발명의 진단 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있다. 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피 또는 질량분석기는 상기한 것과 같다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에서 제공하는 소변내 대사체의 수준변화를 이용하여 사구체 신염의 원인을 진단하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법은 사구체질환의 원인질환을 감별하고 치료할 수 있는 기회를 제공함으로써, 침습적 신장 조직 검사의 합병증 예방 및 비용 지출 감소, 말기신부전증으로의 발전을 막고, 말기신부전환자 투석에 소요되는 막대한 국민건강보험료 지출을 줄이고 환자의 삶의 질 향상에 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 연구과정의 전체적인 진행과정을 도식적으로 나타내는 개략도로서, 사구체 신염 환자의 소변으로부터 바이오마커의 검출, 질량분석, 데이터 가공 및 통계분석 과정을 도식적으로 나타내는 것이다.

도 2는 질량 분석을 통해 나온 결과를 주성분분석(principal component analysis, PCA) 을 이용, 대조군과 사

구체질환 환자군에서 검출된 대사체들의 대사체 프로필을 도식적으로 나타내는 것이다.

도 3은 부분최소자승(partial least squared, PLS) 분석법을 이용, 사구체질환을 일으키는 3가지 질환에 따른 대사체의 분포를 도식적으로 나타내는 것이다.

도 4는 단일 대사체를 이용한 사구체질환의 감별 진단 능력을 AUC 값으로 나타낸 도표이다.

도 5는 사구체 신염 환자의 원인질환에 따른 5개의 대사체(citric acid, pyruvic acid, fructose, ethanolamine, cysteine)의 소변중 농도를 나타내는 것이다.

도 6은 사구체 신염 환자의 소변으로부터 유래된 5개의 대사체(citric acid, pyruvic acid, fructose, ethanolamine, cysteine)의 ROC 분석을 수행하고, 이로부터 얻어진 AUC, 민감도 및 특이도를 나타내는 그래프이다.

도 7은 검증군에서 보이는 batch effect를 제거하기 전과 후의 대사체 분포를 나타내는 것이다.

도 8은 도 5에서 선택한 5가지 대사체를 검증군에 적용하였을 때 각각의 질환을 감별하는 AUC curve 를 나타낸다.

도 9는 미세변화신증과 막성신증의 감별을 위해 새로운 4가지 대사체(methionine, cysteine, citrulline, pyruvic acid)를 이용한 모델을 적용하였을 때의 AUC curve를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1: 환자 프로필 확인

[0055] 실시예 1-1: 환자의 선발

[0056] 사구체 신염의 원인질환을 진단하기 위한 대사체 바이오마커를 발굴하기 위하여, 개발군과 검증군으로 나누어 환자를 선발하였다.

[0057] 먼저, 개발군으로는 대조군인 12명의 정상인과 실험군인 36명의 사구체 신염 환자를 선발하였는데, 상기 36명의 사구체 신염 환자는 3가지 원인질환 별로 국소분절성사구체경화증(FSGS) 환자 12명, 막성신증(MGN) 환자 12명 및 미세변화신증(MCD) 환자 12명으로 선발하였다.

[0058] 다음으로, 검증군으로는 54명의 사구체 신염 환자를 선발하였는데, 3가지 원인질환 별로 국소분절성사구체경화증(FSGS) 환자 18명, 막성신증(MGN) 환자 18명 및 미세변화신증(MCD) 환자 18명으로 선발하였다.

[0059] 실시예 1-2: 환자 임상조건 확인

[0060] 상기 개발군으로 선발된 실험군의 환자와 검증군의 환자를 대상으로 3가지 원인질환의 증상을 확인하였다.

[0061] 그 결과, 통계적으로 유의하지는 않으나, 국소분절성사구체경화증(FSGS) 환자의 경우에는 다른 증상의 환자에 비하여, 사구체 여과율이 상대적으로 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0062] 또한, 미세변화신증(MCD) 환자의 경우에는 다른 증상의 환자에 비하여, 소변단백질/크레아티닌 비율과 저밀도 지질단백질의 수준이 상대적으로 높은 수준을 나타내는 반면, 혈청 알부민의 수준이 상대적으로 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0063] 끝으로, 상기 대조군인 정상인의 소변시료에 포함된 대사체 프로필은, 개발군으로 선발된 실험군의 환자와 검증군의 환자의 소변시료에 포함된 대사체 프로필과 구별됨을 확인하였다.

[0064] 실시예 2: 시료의 준비

[0065] 실시예 2-1: 소변 검체의 전처리

[0066] IRB(Institutional Review Board, 임상시험심사위원회) 동의서를 받은 사구체 신염 환자로부터 조직검사 수행 전 획득한 소변을 하기와 같은 방법으로 전처리 하였다. 환자의 소변을 상온에서 2,000 xg 로 20분간 원심분리한 후, 상등액을 취한 뒤 상기 상등액 9 ml에 Tris(pH 7.0) 용액 1 ml를 첨가하여 대사체 추출 전 까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

[0067] **실시예 2-2: 소변 검체 내의 대사체 추출**

[0068] 상기 실시예 2-1에서 준비한 냉동 보관 되어 있는 소변을 상온에서 녹여 30 μ l씩 튜브에 담은 후 750 μ l의 추출용제(메탄올:이소프로프라놀:증류수, 3:3:2, v/v/v)를 첨가하였다. 이로부터 수득한 혼합물을 4℃에서 10분간 초음파 분쇄한 후, 5분간 13,200 rpm 으로 원심분리하여 700 μ l의 상등액을 다른 튜브에 담고 speed vacuum concentrator 를 사용하여 건조시켰다. 건조된 추출물은 GC-TOF 질량 분석기로 분석할 때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

[0069] **실시예 2-3: 소변 검체 내의 대사체 유도체화**

[0070] 상기 실시예 2-2 에서 추출한 대사체 시료에 40 mg/ml 농도의 메톡시아민 염산(methoxyamine hydrochloride) 5 μ l를 첨가하고 90분간 반응하였다(200rpm, 30℃). 또한 지방산 메틸에스테르(Fatty acid methyl esters: FAME, C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28 and C30)를 이용하여 머무름 시간 색인지표(internal retention index markers)인 혼합물을 합성하고, C8 내지 C16과 C18 내지 C30은 각각 0.8mg/ml, 0.4 mg/ml 농도의 클로로포름에 용해시킨 후, 지방산 메틸에스테르 2 μ l, N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA + 1% TMCS, Thermo, USA) 45 μ l를 추가하여 1시간동안 반응하였다(200rpm, 37℃).

[0071] **실시예 3: GC/TOF MS를 이용한 대사체 동정**

[0072] **실시예 3-1: 기체 크로마토그래피를 이용한 대사체 검출**

[0073] 상기 실시예 2-3에서 유도체화한 대사체 시료 0.5 μ l를 Automatic Liquid Sampler(Agilent 7693 ALS, Agilent Technologies, Wilmington, DE)를 이용해 기체 크로마토그래피에 주입하였다.

[0074] 기체 크로마토그래피는 Agilent 7890B gas chromatograph(Agilent Technologies, Wilmington, DE) 과 RTX-5Sil MS column(30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness, Restek, Gellefonte, PA) 을 이용하였고 첫 1분은 50℃로, 이후 분당 20℃씩 온도를 상승시켜 330℃에 도달한 후 5분동안 유지하였다. 기체 크로마토그래피의 전채선(transfer line) 온도는 280℃로 설정하였다.

[0075] **실시예 3-2: 질량 분석기를 이용한 대사체 검출**

[0076] 본 실시예에서는 Pegasus HT time of flight(TOF) MS software 4.50(LECO, St. Joseph, MI) 프로그램을 기반으로 한 Pegasus HT TOF 질량 분석기를 이용하였으며, 85-500m/z의 질량 범위에서 초당 17 스펙트럼의 속도로 대사체들의 질량 스펙트럼을 확보하였다. 이온소스(ion source)의 온도는 250℃로 조정하였으며, 전자 충격 이온화(electron impact ionization)는 70eV로 시행하였다.

[0077] 대사체 초기동정(annotation)을 위한 라이브러리는 Fiehn library(2007)/NIST library(2012)를 사용하여 스펙트럼(spectrum)의 일치도를 통한 비교분석을 실시하였으며, 이후 표준물질의 스펙트럼(spectrum)과 머무름시간(retention time)의 직접적 비교를 통해 검증하였다. 그 결과, 총 140개의 대사체를 검출하였다.

[0078] **실시예 4: 통계분석**

[0079] **실시예 4-1: 사구체 신염의 환자군과 대조군의 대사체 분석**

[0080] 상기 실시예 3-2에서 검출된 대사체들을 주성분분석(principal component analysis, PCA) 을 통해 도식화하였다. 그 결과 도 2 에서 보는 바와 같이 사구체 신염 환자군과 대조군(정상인)의 대사체 분포가 차이가 남을 확인할 수 있었다.

[0081] 또한, 사구체 신염의 원인 질환에 따른 대사체의 분포를 확인하기 위해 부분최소자승(partial least squared, PLS) 분석을 시행하였고, 도 3에서 보는 바와 같이 각 질환별로 대사체의 분포가 차이가 남을 확인할 수 있었다.

[0082] **실시예 4-2: 바이오마커 후보군 선정**

[0083] 상기 실시예 4-1에서 확인된, 각 질환별로 분포에 차이를 나타내는 각각의 단일 대사체를 이용하여 사구체 신염의 각 원인질환을 감별할 수 있는지의 여부를 확인한 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 민감도, 특이도가 모두 낮아, 단일 대사체 바이오마커로는 사구체 신염의 세가지 원인질환을 감별하기에 충분하지 않다고 판단하였다.

[0084] 이에 따라, 상기 대사체의 조합을 통해 사구체 신염의 세가지 원인질환을 진단할 수 있는 최소한의 대사체를 찾

기 위한 모델을 설정하기에 적합한 대사체 후보군을 도출한 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 5가지 대사체(citric acid, pyruvic acid, fructose, ethanolamine, cysteine)를 선정하였다.

[0085] **실시예 5: 국소분절성사구체경화증에 대한 대사체 바이오마커의 적합성 검증**

[0086] **실시예 5-1: 개발군에서의 확인**

[0087] 상기 실시예 4-2에서 선정된 5가지 대사체를 조합하여 사구체 신염의 세가지 원인질환을 진단할 수 있는 모델을 설정하고, 실시예 1-1에서 준비한 개발군의 환자로부터 수득한 소변시료를 대상으로, 상기 설정된 모델을 이용한 사구체 신염의 세가지 원인질환을 진단하였다.

[0088] 상기 진단을 수행한 결과를 ROC(Receiver Operating Characteristic) 분석을 통해 확인한 결과, 도 6에서 보듯이, AUC 값이 FSGS vs MCD에서는 0.951, FSGS vs MGN에서는 0.802, MCD vs MGN에서는 0.889로 질환간 감별력이 매우 높음을 확인하였다.

[0089] **실시예 5-2: 검증군에서의 확인**

[0090] 상기 실시예 5-1에서 얻어진 5개 대사체 바이오마커의 적합성을 검증하기 위해 실시예 1-1에서 준비한 검증군의 환자로부터 수득한 소변시료를 대상으로, 사구체 신염의 세가지 원인질환을 분석하였다.

[0091] 먼저, 서로 다른 시기에 수행된 개발군과 검증군과의 실험간 발생할 수 있는 batch effect를 COMBAT 알고리즘을 이용하여 제외시켰다(도 7).

[0092] 그런 다음, 상기 실시예 4-3에서 설정한 모델을 적용하여 ROC 분석을 수행한 결과, 도 8에서 보듯이, AUC 값은 FSGS vs MCD에서는 0.812, FSGS vs MGN에서는 0.802로 높은 감별력을 보였으나, MCD vs MGN에서는 0.515로 감별력이 낮게 분석되었다.

[0093] **실시예 6: 미세변화신증 및 막성신증에 대한 대사체 바이오마커의 적합성 검증**

[0094] 상기 실시예 5-2의 결과에서 보듯이, 도 5에서 선정된 5가지 대사체(citric acid, pyruvic acid, fructose, ethanolamine, cysteine)를 사용할 경우, 국소분절성사구체경화증(FSGS)에 의한 사구체 신염의 발병을 확인할 수 있었으나, 막성신증(MGN) 또는 미세변화신증(MCD)에 의한 사구체 신염의 발병을 확인하기는 어려움을 알 수 있었다.

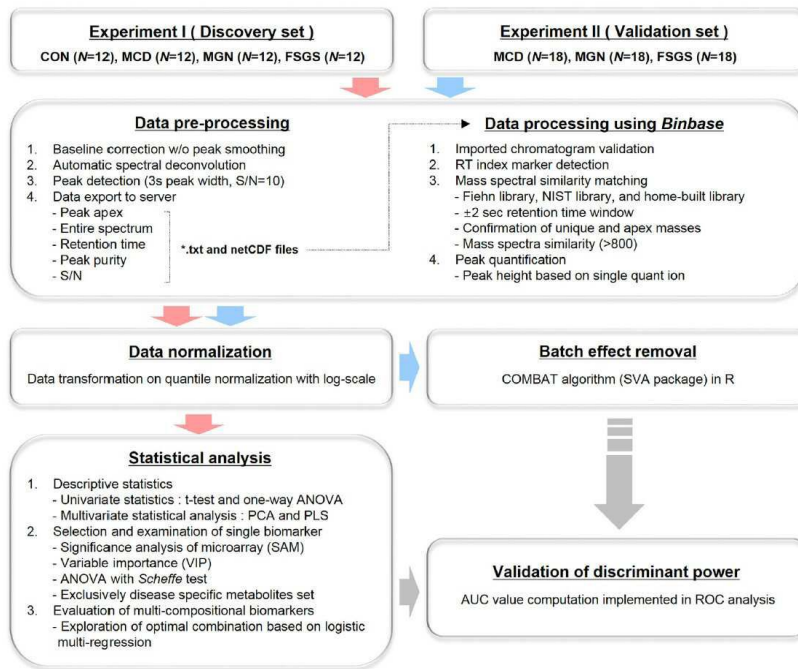
[0095] 이에 따라, 상기 실시예 2 내지 4의 방법을 사용하여 막성신증(MGN) 또는 미세변화신증(MCD)에 의한 사구체 신염의 발병을 확인할 수 있는 대사체 마커를 발굴하였다. 그 결과, 4가지 대사체(citric acid, pyruvic acid, methionine 및 citrulline)를 발굴할 수 있었다.

[0096] 상기 발굴된 대사체를 이용한 모델을 적용하여, MGN 또는 MCD에 대한 감별능력을 ROC 분석을 통해 확인하였다(도 9). 도 9에서 보듯이, 상기 4가지 대사체를 사용하여 MGN 또는 MCD에 대한 AUC값을 산출한 결과, 0.683 내지 0.942를 나타내었고, 평균값으로 0.843을 나타내었는 바, MGN 또는 MCD에 대한 질환별 감별능력이 매우 높은 수준을 나타냄을 알 수 있었다.

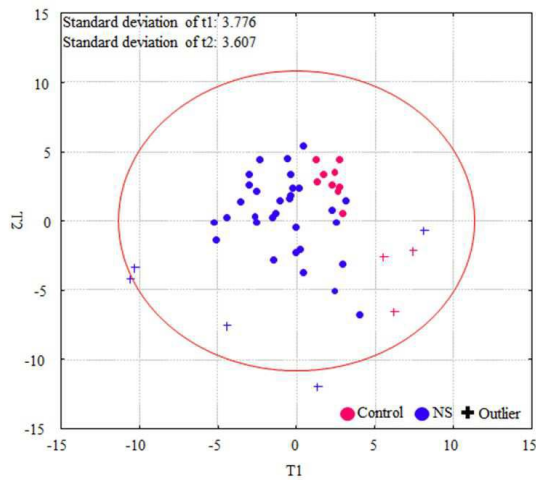
[0097] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

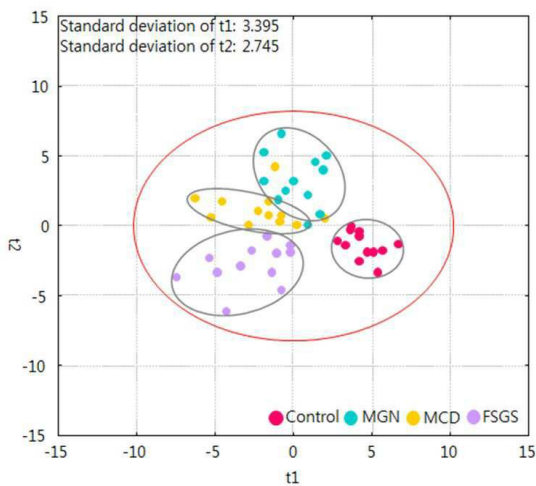
도면1



도면2



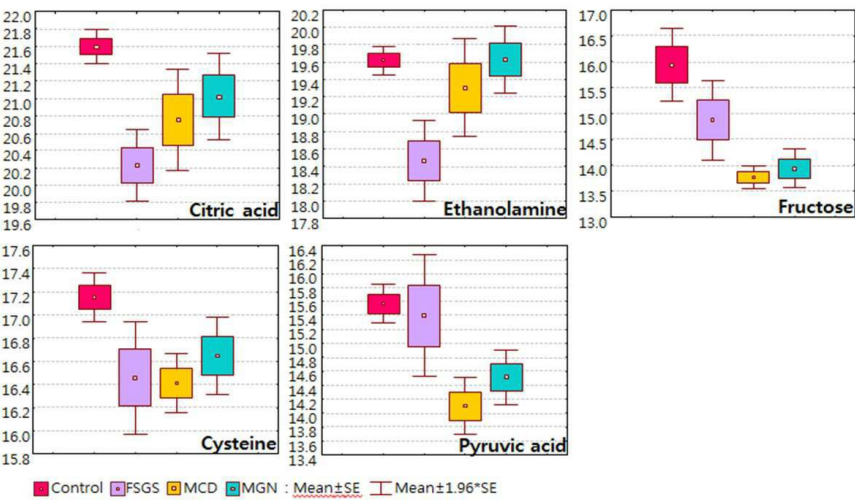
도면3



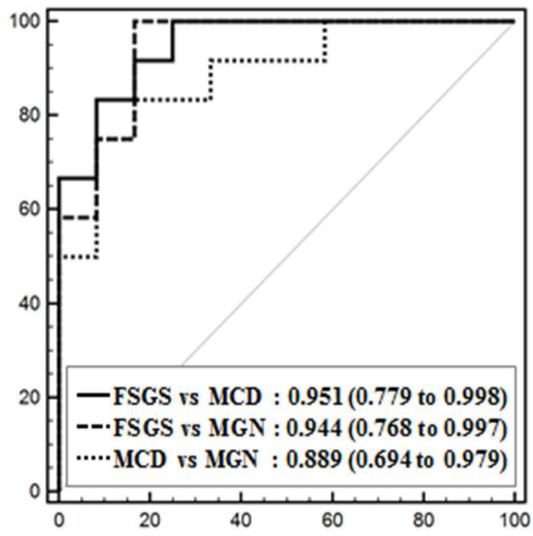
도면4

Compounds	PLS VIP score	SAM	ANOVA	AUC		
				FSGS vs. MCD	FSGS vs. MGN	MGN vs. MCD
3,6-anhydro-D-galactose	○		○		0.917	
Ethanolamine	○	○			0.847	
Citrulline	○	○	○	0.528	0.972	0.868
Myo-inositol		○	○		0.861	
Uracil	○	○	○	0.896	0.882	0.556
Xanthine	○	○	○		0.917	

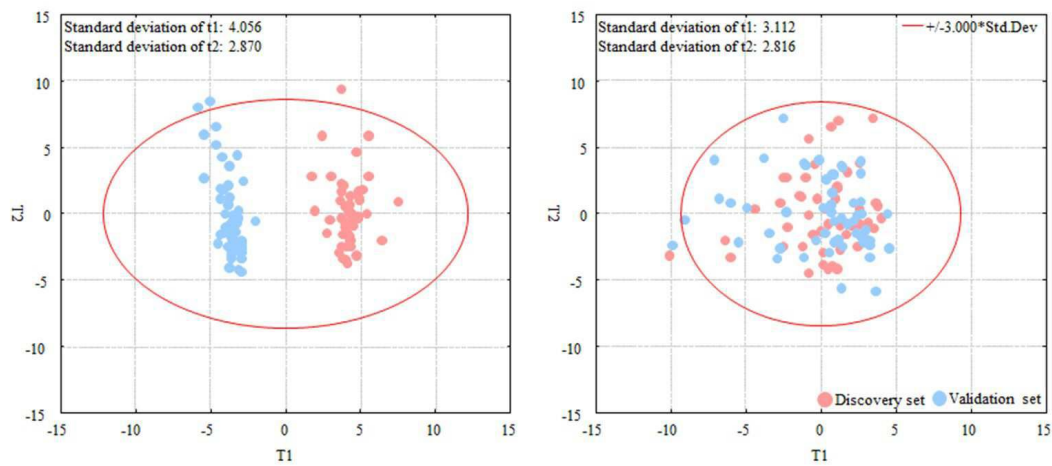
도면5



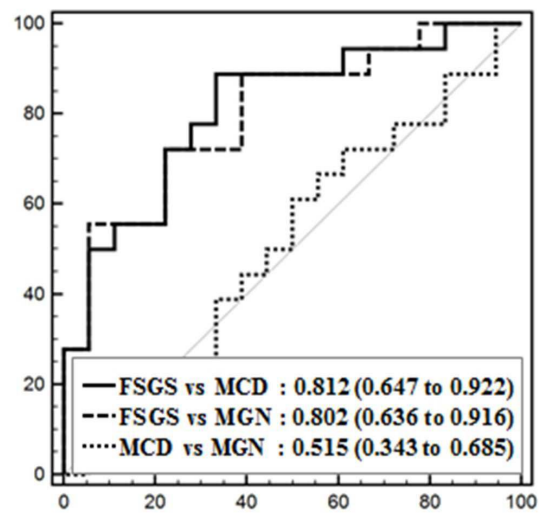
도면6



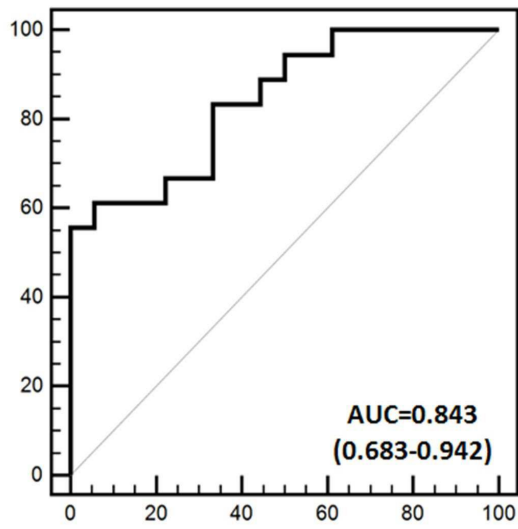
도면7



도면8



도면9



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 8

【변경전】

상기 대사체

【변경후】

대사체