(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 11 월 11 일 (11.11.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/225371 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005642

(22) 국제출원일: 2021 년 5 월 6 일 (06.05.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0053852 2020 년 5 월 6 일 (06.05.2020) KR

(71) 출원인: 건국대학교 산학협력단 (**KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORPORATION**) [KR/KR]; 05029 서울시 광진구 능동로 120, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 이충환 (**LEE, Choon-Hwan**); 05813 서울시 송파구 송파대로8길 42, 1204동 302호, Seoul (KR). 우정택 (**WOO, Jeong-Taek**); 06001 서울시 강남구 압구정로 151, 125동 704호., Seoul (KR). 이상열 (**RHEE, Sang-Youl**); 06215 서울시 강남구 역삼로 307, 205동 1301호, Seoul (KR). 정은성 (**JUNG, Eun-Sung**); 16225 경기도 수원시 영통구 대학3로 55, 7007동 506호, Gyeonggi-do (KR).

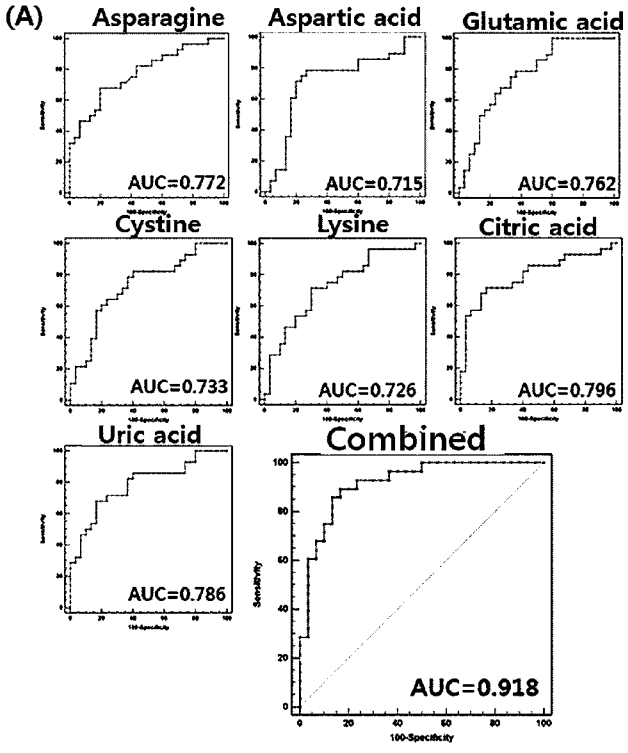
(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung-Gap**); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(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, IT, 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

(54) **Title:** BIOMARKER IN BLOOD FOR MACULAR EDEMA AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 당뇨병성 황반부종에 대한 혈액내 바이오마커 및 이의 용도



(57) **Abstract:** In the present invention, among blood metabolites, amino acids, organic compounds and oxylipins that were statistically significantly differentiated from the control group, were selected from type 2 diabetes patients. Specifically, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, cysteine, lysine, citric acid, and uric acid, and 12-oxo ETE, 15-oxo ETE, 9-oxo ODE, and 20-carboxy leukotriene B4, which are oxylipins, were confirmed to have cutoff values of AUC>0.7. In addition, the blood metabolites showed a significant difference between a DME patient group and a non-DME patient group, and thus were confirmed to be usable for accurate diagnosis of DME.

(57) **요약서:** 본 발명은 제2 형 당뇨병환자에서, 혈중 대사물질중 대조군과 비교하여 통계적으로 유의미하게 차별되는 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀을 선별하였다. 이중, 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid) 과 옥시리핀인 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)의 컷오프 값이 AUC>0.7 인 것을 확인하였다. 또한, DME 환자군과 비-DME 환자군에서 상기의 혈중 대사체가 유의미한 차이를 나타내어, DME 의 정확한 진단에 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

WO 2021/225371 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 당뇨병성 황반부종에 대한 혈액내 바이오마커 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은, 당뇨병성 황반부종에 대한 혈액내 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 당뇨병의 이환 기간이 길어짐에 따라 전신의 다양한 합병증을 동반하게 되는데, 대표적인 당뇨합병증으로 심혈관계 질환, 당뇨병성신증, 당뇨신경병증, 당뇨병성 황반부종이 발생하게 된다.

[3] 당뇨병 환자의 유병률과 질병 기간이 증가함에 따라, 당뇨 합병증에 대한 중요도도 증가하고 있다. 특히 당뇨병성 망막증은 고혈당과 관련이 있으며, 당뇨환자의 삶의 질을 심하게 회손시키는 합병증으로 알려져 있다. 그러나, 당뇨병성 망막증을 진단하고 치료하는 것은 환자의 삶의 질을 개선시키는 방안이지만, 당뇨병성 망막증의 정확한 진단 및 치료는 다른 합병증과 비교하여, 만족스러운 결과는 보고된적이 없다.

[4] 당뇨병성 망막증은 일반적으로 신생 혈관 형성정도에 따라 경증, 중증, 중증의 비증식성 및 증식성 망막증으로 분류되지만, 당뇨 환자에 있어서, 실명과 가장 직접적으로 연관된 합병증은 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema, DME)이다. 당뇨병성 황반부종은 망막이 두꺼워지고, 황반이 포함된 경질의 삼출물이 동반되는 질병으로 알려져 있다. 이러한 황반부종은 혈관 내피 세포와 혈장 내 단백질의 삼출과정과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[5] 당뇨병성 망막증을 앓고 있는 환자들 중 약 10%가 당뇨병성 황반부종으로 추정되고 있으며, 일반적으로 당뇨병성 망막증이 진행됨에 따라 당뇨병성 황반부종의 유병율 또한 증가하게 된다. 그러나, 당뇨병성 망막증이 심하다고 하여, 당뇨병성 황반부종이 무조건 동반되는 것은 아니므로, 당뇨병성 황반부종을 정확하게 진단할 수 있는 바이오마커가 요구되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 생물학적 시료에서, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병성 황반부종(Diabetic macular edema, EDM) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[7] 본 발명의 다른 목적은 상기의 조성물을 포함하는 당뇨병성 황반부종 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 또 다른 목적은 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여,

혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[9] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 당뇨병성 황반부종 개체에 피검물질을 처리하는 단계; 및

[11] 상기 피검물질을 처리한 개체의 생물학적 시료에서, 무처리 대조군과 비교하여 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은, 본 발명은 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[13] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생물학적 시료에서, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병성 황반부종(Diabetic macular edema, EDM) 진단용 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 당뇨병성 황반부종 진단용 키트를 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[17] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 당뇨병성 황반부종 개체에 피검물질을 처리하는 단계; 및

[19] 상기 피검물질을 처리한 개체의 생물학적 시료에서, 무처리 대조군과 비교하여 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[21] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[22] 본 발명은 제2형 당뇨병환자에서, 혈중 대사물질중 대조군과 비교하여 유의미하게 차별되는 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀을 선별하였다. 이 중, 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid)과 옥시리핀인 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)이 당뇨병성 황반부종의 바이오마커로 이용될 수 있고, 민감도 및 특이도가 높은 것을 확인하였다. 따라서 상기의 바이오마커는 당뇨병성 황반부종의 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 본 발명의 당뇨병성 황반부종 진단을 위한 바이오마커의 발굴 과정을 모식화한 도이다.

[24] 도 2a는 본 발명의 DME 및 비-DME 환자군에서 상대적 대사산물 수준을 평균값으로 정규화한 히트 맵을 나타낸 것이다.

[25] 도 2b는 본 발명의 DME 및 비-DME 환자군에서 상대적 대사산물 수준을 평균값으로 정규화한 히트 맵을 나타낸 것이다.

[26] 도 3a는 본 발명의 GC-TOF-MS로 분석된 DME 및 비-DME 환자군에 대한 혈장 주성분 분석 결과를 나타낸 도이다(red plots: DME 군, black plots: 비-DME 군).

[27] 도 3b는 본 발명의 GC-TOF-MS로 분석된 DME 및 비-DME 환자군에 대한 OPLS-DA 점수 플롯을 나타낸 도이다(red plots: DME 군, black plots: 비-DME 군).

[28] 도 4a는 본 발명의 DME 및 비-DME 환자군과 비교하여 컷오프 값이(AUC)>0.7이상인 선별된 바이오 마커 및 이들의 조합하였을 때의 AUC 값을 나타낸 도이다(아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인, 리신, 시트르산, 요산 및 조합).

[29] 도 4b는 본 발명의 DME 및 비-DME 환자군과 비교하여 컷오프 값이(AUC)>0.7이상인 선별된 바이오 마커 및 이들의 조합하였을 때의 AUC 값을 나타낸 도이다(12-옥소 ETE, 15-옥소 ETE, 9-옥소 ETE, 20-카르복시 류코트리엔 B4 및 조합).

[30] 도 5는 DME와 대사과정 사이의 관계를 설명하기 위해 구축된 대사경로를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[31] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[32] 본 발명은 생물학적 시료에서, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는

당뇨병성 황반부종(Diabetic macular edema, EDM) 진단용 조성물을 제공한다.

[33] 본 발명에서, 상기 "대사체"는 생체 기원의 시료로부터 수득한 대사물질을 말하며, 상기 대사체는 구체적으로 혈장아미노산 또는 유기화합물인 것이 바람직하다. 또한 상기 대사체를 검출하기 위해 시료를 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 의해 생산된 물질 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.

[34] 본 발명에서, 상기 "발현 수준을 측정하는 제제"는 당뇨병 환자로부터 분리된 생체 시료로부터 혈중 아미노산 또는 유기화합물을 정량적으로 검출하기 위한 제제를 의미하며, 상기 제제는 특별히 제한되는 것은 아니며, 상기 대사체를 정량화할 수있는 시약 또는 화학 물질일 수 있다.

[35] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혈장 아미노산 및 유기화합물은 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것일 수 있다.

[36] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 옥시리핀은 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것일 수 있다.

[37] 본 발명에서, 상기 "대사체의 발현 수준"은 대사체의 농도 또는 대사체의 양을 말하며, 상기 대사체의 수준은 예를 들어 크로마토그래피/질량분석법, 광흡수분석법, 발광분광분석법 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 및 질량분석기로 구성된 군에서 선택된 1이상인 것을 이용하여 측정되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량법을 사용할 수 있다.

[38] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 크로마토그래피/질량분석법은 LC-triple-Q-MS(Liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry) 또는 GC-TOF-MS(gas chromatography/time-offlight mass spectrometry)인 것을 특징으로 하는 것 일 수 있다.

[39] 본 발명의 대사체는 LC 또는 GC에서 각 성분들이 분리되며 triple-Q-MS 또는 TOF-MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보(elmental composition)을 통해 구성 성분을 확인할 수 있다.

[40] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 눈물, 객담, 비분비물, 기관지 분비물, 기관지 세척액, 폐분비물, 및 폐포 세척액으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물일 수 있다.

[41] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것일 수 있다.

[42] 또한, 상기 조성물은 검출시약을 더 포함할 수 있다. 상기 검출시약은 발색효소,

형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지된 접합체일 수 있다. 발색효소는 퍼록시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 산성 포스파타제일 수 있고, 형광물질은 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로 테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸, Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(RITC), PE(Phycoerythrin) 또는 로다민일 수 있다.

[43] 상기 검출시약은 추가로 상기 검출시약에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지된 접합체, 및 스트렙타비딘 또는 아비딘이 처리된 리간드일 수 있다.

[44] 본 발명의 조성물은 상기 서술한 바와 같은 검출시약 외에도 이들의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.

[45]

[46] 또한 본 발명은, 상기의 조성물을 포함하는 당뇨병성 황반부종 진단용 키트를 제공한다.

[47] 본 발명의 진단 키트는 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid), 옥시리핀인 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1이상의 혈중 대사체에 대한 농도를 측정하는 정량장치를 추가적으로 포함할 수 있다.

[48]

[49] 또한 본 발명은, 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[50] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[51] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 방법은 대조군과 개체를 비교하여 상기 대사체 혈중 농도가 증가한 경우 당뇨병성 황반 부종에 걸렸거나, 걸릴 위험이 있는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[52] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 방법은 혈중 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체의 컷오프 값이 0.7 이상인

것일 수 있다.

[53]

[54] 또한 본 발명은, 당뇨병성 황반부종 개체에 피검물질을 처리하는 단계; 및

[55] 상기 피검물질을 처리한 개체의 생물학적 시료에서, 무처리 대조군과 비교하여 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계;를 포함하는당뇨병성 황반부종의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[56] 본 발명의 방법에 있어서, 상기의 피검물질은, 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 활성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[57]

[58] 또한, 본 발명은 개체의 생물학적 시료에서, 상기의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[59] 상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

[60] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[61]

[62] **<실시예 1> 피험자 및 임상시험 디자인**

[63] 임상시험은 2014년 9월부터 2015년 7월까지 수집한 전향 코호트 연구(prospective cohort study) 등록자의 기본적인 특징을 이용한, 인체자원중앙은행(National Biobank) 프로젝트의 일부분으로 수행되었다. 본 코호트의 피험자는 15년 이상 제2형 당뇨병을 앓고 있는 환자였다.

[64] 상기 피험자의 임상 정보는 대한당뇨병학회(Korean Diabetes Association)에 의해 승인된 다기관 임상 데이터등록 표준화 방법에 기초하여 등록되었고, 생물정보(biospecimens)는 한국 인체 자원 중앙은행(National Biobank of Korea)의 가이드라인에 따라 수집하였다.

[65] 또한, 임상시험을 위하여 경희대학교 병원의 임상시험심사위원회(Institutional review board)의 승인을 받았다(IRB No. KMC IRB 1428-04). 모든 피험자로부터 서면 동의를 얻었다. 또한, 임상시험 정보는 세계보건기구의 ICTRP(International Clinical Trials Registry Platform)와 연계된 한국 국가서비스인 임상연구정보서비스(http://cris.nih.go.kr)에서 제공하였다(CRIS, No.

KCT0001269).

[66]

[67] **<실시예 2> 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema ; DME) 표현형 분석**

[68] 상기 <실시예 1>의 피험자 각각의 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema ; DME) 증상은 안저 사진(fundus photography)(FF 540 Plus; Carl Zeiss Meditech, Jena, Germany) 및 광학단층촬영(optical coherence tomography)(HD-OCT; Carl Zeiss Meditech, Dublin, CA, USA)을 통해 평가하였다. ETDRS(Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) 기준에 따라, DME를 3가지 범주로 분류하였다: 1)황반 중심으로부터 500 nm 이상으로 두꺼워진 범주, 2)황반 중심으로부터 경질의 삼출물 및 인접한 망막의 두께가 500 nm 이상인 범주 또는 3) 두꺼워진 망막이 황반 중심으로부터 1 disk 미만의 직경에 위치한 범주로 분류하였다. 2명 이상의 안과 의사가 시험 결과를 기초로 DME 상태를 분류하였다. 의사 간 불일치가 발생하는 경우 다시 이미지를 검토하여 최종 해석에 도달하였다.

[69]

[70] **<실시예 3> 임상시험 결과에 대한 통계 분석**

[71] 오랜 기간 제2형 당뇨병을 앓으면서도 망막병증을 가지지 않은 피험자의 특징을 파악하는 데 초점을 맞춰, DME 환자 및 비-DME 환자의 임상 특성을 비교하였다. 임상 자료의 검증과 통계 분석은 통계학자에 의해 독립적으로 수행되었다. 환자의 DME 유무에 관계없이 평균, 비율(proportions), 분산(dirtributions)를 비교하였다. 초기 분석 후, DME와 유사한 임상 특성을 갖는 성향점수매칭(propensity score matching; PSM)을 통해 케이스 및 대조군 세트(case and control set)를 선별하였고, 상기와 동일한 샘플을 대사체학 연구에 사용하였다. 모든 통계분석을 위해 SAS 소프트웨어(버전 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하였다

[72]

[73] **<실시예 4> 혈청 샘플을 이용한 대사체학 연구**

[74] **<4-1> 샘플 준비**

[75] 대사체는 200 μl의 혈장에서 추출하였다. 내부 표준 용액(물 중 2-클로로페닐알라닌(2-chlorophenylalanine) 1 mg/㎖)을 포함하는 메탄올 1 ml을 혈장과 혼합한 뒤 10분 동안 초음파분쇄기로 균질화 하였다. 균질화 후 현탁액을 60분 동안 4℃에서 유지한 다음 13,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 0.2-㎛ PTFE(polytetrafluoroethylene) 필터로 여과하고 고속진공농축기(Modulspin 31; Biotron, South Korea)를 이용하여 건조하였다. 건조한 추출물은 GC-TOF-MS분석을 시행하였다.

[76]

[77] **<4-2> GC-TOF-MS 분석**

[78] GC-TOF-MS 분석을 위하여, 상기 <실시예 4-1>에서 건조한 샘플을 50 ㎕ 메톡시아민 염산염(methoxyamine hydrochloride)(피리미딘 중 20 mg/㎖)을

이용하여 90분 동안 30℃에서 옥심화(oximate)하고 50 ㎕ MSTFA(Nmethyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)를 이용하여 30분 동안 37℃에서 실릴레이트화(silylate)하였다. GC-TOF-MS 분석은 Agilent 7693 auto-sampler (Agilent Technologies)가 결합되고 Pegasus™ HT TOF MS system(LECO Corp., St. Joseph, MI, USA)이 장착된 Agilent 7890 gas chromatography system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 컬럼은 Rtx-5MS 컬럼(i.d., 30 m × 0.25 mm, 0.25 ㎛ particle size; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA)을 이용하였고, 운반 기체로 유량 1.5 ㎖/분의 헬륨을 이용하였다. 1 ㎕로 분주한 샘플을 splitless 모드로 GC에 주입하였다. 온도는 2분 동안 75℃로 유지한 후, 15℃/분으로 상승시켜 300℃가 되도록 한 후 3분 동안 유지하였다. 전면 유입구 및 이송라인(transfer line) 온도는 각각 250℃ 및 240℃로 하였다. 전자 이온화는 -70 eV에서 수행하였고, 데이터 수집을 위해 50-1000 m/z 범위에서 전체 스캐닝을 수행하였다.

[79]

[80] **<4-3> LC-triple-Q-MS 분석**

[81] 혈장으로부터 옥시리핀을 검출하기 위하여 Oasis-HLC 카트리지를 사용하였다. 옥시리핀은 검출 전에, 카트리지를 에틸 아세테이트 2 ml, 메탄올 (2x2 ml), 물의 혼합 용매 (2 ml) 및 0.1% 아세트산을 함유하는 메탄올(95 : 5 v/v)로 세척하였다. 카트리지를 세척한 후 200 μl의 혈장을 카트리지에 로딩하였다. 혈장을 로딩한 후, 카트리지를 1.5 ml의 혼합용매(물 : 메탄올, 95 : 5 v/v, 0.1% 아세트산)로 고진공하에서 세척하였다. 세척된 카트리지는 저진공 조건으로 20분 동안 건조시켰다. 건조된 카트리지에 옮겨진 옥시리핀을 용출하기 위하여, 0.5 ml의 메탄올과 2 ml의 에틸아세테이트를 첨가하여, 30% 글리세롤이 포함된 메탄올을 6 μl의 메탄올이 담긴 튜브로 용출시켰다. 용출 후 진공 농축기를 사용하여, 용출액을 건조하였으며, 건조 후 메탄올로 재현탁(10 mg/ml)하였다. 재현탁 된 현탁액은 여과 후 LC-triple-Q-MS 분석을 하였다.

[82] LC-triple-Q-MS분석은 전기 분무 공급원 및 트리플 쿼드 루폴 MS가 결합된 Nexera2 LC로 분석하였다. 상기의 재현탁 된 현탁액(5%) 1 μl를 0.1% 포름산(용매 A) 및 0.1% 포름산을 포함하는 아세토니트릴(용매 B)을 이동상으로 Kinetex C18 컬럼 (100 × 2.1mm, 2.6μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)에 주입하였다. 300 μL/min의 유속으로 용매의 구배는 첫 1분 동안 5% 비율로 용매 B를 주입하고, 9 분에 걸쳐 선형적으로 5%에서 100%까지 증가시켜 주입하였으며, 용매B를 증가시켜 주입한 후, 1분 동안 다시 5 %로 감소 되도록 용매구배를 조절하였다. 추가 적인 조건으로는 모세관 전압 -3000V, 모세관 온도 450℃, 기화기 온도 400℃, 시스 가스 3L/min, 이온 스위프 가스 2.0Arb, 보조 가스 10Arb 및 건조 가스 8L/분의 조건으로 분석하였다.

[83]

[84] **<4-4> 대사체학 연구를 위한 데이터 가공 및 다변량 통계 분석**

[85] 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 GC-TOF-MS 분석을 수행한 후 LECO Chroma TOF TM 소프트웨어(version 4.44, LECO Corp.)를 이용하여 GC-TOF-MS 데이터를 획득하여 전처리하고, NetCDF format (*.cdf)으로 변환하였다. 또한, 상기 실시예 <4-3>에 기재된 방법으로 LC-triple-Q-MS 분석을 수행한 후, 미가공 데이터를 MassLynx software (version 4.1, Waters Corp.)를 이용하여 획득하였다. 미가공 데이터 파일은 MassLynx DataBridge software (version 4.1, Waters Corp.)를 이용하여 NetCDF format (*.cdf)으로 변환하였다. 변환 후, 피크 검출, 머무름 시간(retention time) 보정 및 정렬(alignment)은 Metalign software package (http://www.metalign.nl)를 이용하여 처리하였다. 결과 데이터는 Microsoft Excel 파일로 저장하였다. 다변량 통계 분석(Multivariate statistical analysis)은 SIMCA-P+ (version 12.0; Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 수행하였다. 데이터 세트는 자동으로 단위 분산 스케일링 되었고, 열 기준으로 평균 중심화 되었다. 각각의 데이터 세트를 비교하기 위하여 OPLS-DA(orthogonal partial least squares-discriminant analysis)를 수행하였다. OPLS-DA의 VIP(variable importance to projection) 값에 기초하여 변수를 선택하였다. 통계학적으로 유의적인 차이는 PASW Statistics 18 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA 분석, Student's t-test 및 Duncan's multiple range tests에 의해 검증되었다. ROC(Receiver operating characteristic), 및 곡선 및 로지스틱 회귀 분석은 Medcalc software (version 14.8.1; Medcalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하여 획득하였다.

[86]

[87] **<실험예 1> PSM에 따른 피험자의 임상 특성 확인**

[88] 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 모집한 220명의 피험자 중 동의를 얻은 198명의 피험자로부터 임상 데이터 및 샘플을 수집하였다. 동의 후 15명의 피검자가 동의를 철회하여, 총 183명의 피검자를 대상으로 안과 검사를 수행하였다(도 1). 임상시험 참여자의 평균 연령은 66.8 세, 당뇨병의 평균 기간은 22.6년 이였으며 50.3%가 여성이였다. 안과 검사를 받은 총 183명의 임상시험 참여자 중 124명(67.8 %)이 DR(diabetic retinopathy)로 진단받았으며, 46명 (25.1%)이 DME로 진단되었다. 따라서 PSM을 시행한 결과를 기초로 하여 하기 표 1-1 내지 1-6에 나타낸 바와 같이 DME의 유무를 제외하고 임상 특성에 유의한 차이가 없는 30쌍의 환자와 대조군을 선정하였으며, 상기 환자에 대해 대사체학 연구를 수행하였다. 또한, 발견 세트에서 파생된 결과의 유효성 검증은 42쌍의 유효성 검증 세트를 사용하여 수행하였다.

[89] [표 1-1]

[90]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
Clinical characteristics	Gender (female, pair)	9	2	1	16	10	1
	DM duration (yr)	22.10 ± 6.78	23.70 ± 6.95	0.329	21.84 ± 7.27	23.81 ± 6.37	0.088
	Age (yr)	66.07 ± 8.71	61.73 ± 10.51	0.068	65.02 ± 8.81	62.33 ± 10.18	0.143
	Height (cm)	159 ± 9.21	158.73 ± 8.2	0.913	159.57 ± 9.21	158.63 ± 8.51	0.731
	Weight (kg)	61.87 ± 8.8	61.91 ± 8.77	0.988	62.42 ± 9.06	61.17 ± 8.84	0.456
	BMI (kg/m^2)	24.48 ± 2.96	24.65 ± 3.7	0.834	24.49 ± 2.83	24.37 ± 3.61	0.92
	Waist circumference (cm)	89.04 ± 7.79	89.58 ± 11.84	0.819	88.58 ± 7.41	88.27 ± 10.91	0.781
	Systolic blood pressure (mmHg)	123.17 ± 14.05	123.6 ± 14.13	0.897	125.44 ± 13.85	124.19 ± 14.41	0.515
	Diastolic blood pressure (mmHg)	69.37 ± 8.04	68.43 ± 10.23	0.635	70.49 ± 8.15	68.21 ± 9.89	0.235
	HbA1c (%)	8.37 ± 1.92	8.35 ± 1.56	0.974	8.20 ± 1.76	8.42 ± 1.45	0.586
	Fasting plasma glucose (mg/dL)	166.7 ± 71.48	159.93 ± 68.98	0.708	169.51 ± 81.48	166.67 ± 67.11	0.976

[91] [표 1-2]

[92]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
Clinical characteristics	Total cholesterol (mg/dL)	178.1 ± 41.35	165.5 ± 33.46	0.265	177.58 ± 38.1	163.65 ± 31.72	0.169
	Triglyceride (mg/dL)	147.33 ± 111.43	154.2 ± 85.01	0.782	139.49 ± 105.01	143.79 ± 79.15	0.465
	LDL cholesterol (mg/dL)	107.8 ± 33.45	96.23 ± 28.89	0.237	105.3 ± 31.65	94.44 ± 27.8	0.22
	HDL cholesterol (mg/dL)	52.13 ± 19.49	48.63 ± 10.9	0.377	53.6 ± 18.12	49.86 ± 14.87	0.48
	BUN (mg/dL)	21.93 ± 10.5	19.33 ± 6.81	0.213	22.95 ± 15.43	21.44 ± 10.77	0.596
	Creatinine (mg/dL)	0.89 ± 0.43	0.88 ± 0.37	0.969	1.12 ± 1.29	1.03 ± 0.72	0.735
	Creatinine Clearance (mL/min/1.73m^2)	91.86 ± 38.5	90.16 ± 33.6	0.828	89.08 ± 37.99	84.85 ± 34.91	0.664
	AST (IU/L)	23.7 ± 5.09	21.83 ± 6.81	0.194	22.84 ± 5.08	21.6 ± 6.19	0.206
	ALT (IU/L)	16.43 ± 3.47	16.1 ± 5.31	0.796	17.14 ± 5.1	15.51 ± 5.41	0.157
	GGT (IU/L)	23.03 ± 12	23 ± 8.55	0.987	29 ± 23.96	21.12 ± 8.37	0.094
	ALP (IU/L)	80.87 ± 27.6	86.63 ± 22.98	0.362	83.95 ± 28.73	85.47 ± 22.27	0.532

[93] [표 1-3]

[94]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
History of macrovascular complication	Hypertension (pair)	5	20	1	7	29	1
	Dyslipidemia (pair)	11	10	0.48	14	14	1
	Myocardial infarction (pair)	0	0	-	0	0	-
	Angina (pair)	3	0	-	4	0	-
	Heart failure (pair)	0	0	-	1	0	-
	Atrial fibrillation (pair)	0	0	-	2	0	-
	Any stroke (pair)	2	1	0.683	3	1	1

[95] [표 1-4]

[96]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
History of microvascular complication	Retinopathy (pair)	2	14	0.01	3	21	0.002
	Glaucoma (pair)	3	1	1	3	1	0.228
	Cataract (pair)	6	11	1	9	15	1
	Chronic Kidney Disease (pair)	5	1	1	7	3	1
	Peripheral neuropathy (pair)	8	7	0.814	11	12	0.556
	Autonomic neuropathy (pair)	6	5	1	6	6	0.789

[97] [표 1-5]

[98]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
Current Medications	Metformin (pair)	4	18	1	7	20	0.803
	Sulfonylurea (pair)	7	11	0.773	13	12	0.383
	DPP-4 inhibitor (pair)	8	2	0.579	10	3	0.628
	Meglitinide (pair)	1	0	1	2	0	0.683
	Thiazolidine dione (pair)	1	0	1	2	0	1
	SGLT-2 inhibitor (pair)	0	0	-	0	0	-
	Alpha glucosidase inhibitor (pair)	0	0	-	0	0	-
	Rapid acting insulin (pair)	5	3	1	8	4	1
	Basal insulin (pair)	9	5	1	13	8	0.677
	Pre-mixed insulin (pair)	3	2	1	4	2	0.547

[99] [표 1-6]

[100]

Category	Variables	Discovery cohort (30 pairs)			Extended cohort (43 pairs)		
		No ME	ME	p	No ME	ME	p
Current Medications	GLP-1 agonist (pair)	0	0	-	0	0	-
	Angiotensin Receptor Blocker (pair)	8	9	0.789	11	12	0.48
	Angiotensin Converting Enzyme inhibitor (pair)	0	0	0.074	2	0	0.289
	Calcium channel blocker (pair)	6	2	1	9	3	0.823
	Diuretics (pair)	5	1	0.221	6	1	0.505
	Beta blocker (pair)	4	1	0.683	6	3	0.289
	Statin (pair)	10	8	1	12	12	1
	Fibrate (pair)	1	0	1	1	0	-
	Aspirin (pair)	5	1	1	8	2	0.387
	Clopidogrel (pair)	4	0	0.683	6	0	0.752
	Cilostazol (pair)	8	4	0.387	11	9	0.211

[101] *expressed as mean±SD, or n (%).by Paired sample t-test, or McNemar's test.

[102] *ME, macular edema; DM, diabetes mellitus; BMI, body mass index; LDL, Low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; BUN, blood urea nitrogen; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transferase; ALP, alkaline phosphatase; CAG, coronary angiography; DPP, dipeptidylpeptidase; SGLT, sodium-glucose transporter.

[103]

[104] **<실험예 2> 혈장에서 DME의 다중 바이오 마커 발견**

[105] 대사체학 연구를 바탕으로 비-DME 피험자 중에서 DME를 진단하는데 도움이 되는 혈장 내 다중 바이오 마커를 조사하였다(도 1). DME의 유무에 관계없이 대사체를 구별하는 대사산물을 후보 대사산물 바이오 마커로 확인하고 선택하였다. 후보 대사산물 바이오 마커는 상대 수준을 비교함으로써 연장 된 코호트에서 확인하였다. DME 및 비-DME 대상을 구별하기 위한 다중 바이오마커는 최종적으로 다음의 자격으로 선택되었다 : 1) 발견 및 연장 된 코호트로부터 통계적으로 유의미한 차별 대사 물 및 2)곡선 아래 면적 (AUC)>0.7을 갖는 DME 대 비-DME 대상에 대해 우수한 차별력을 나타내는 조건을 만족하는 대사산물을 선별하였다.

[106]

[107] **<실험예 2-1>혈장에서의 GC-TOF-MS 분석 기반 대사산물 및 옥시리핀 분석**

[108] GC-TOF-MS 분석 기반 대사산물 프로파일링은 다변량 통계 분석과 함께 발견 코호트의 혈장을 사용하여 수행하였다. PLS-DA 모델에서 DME 및 비-DME 그룹은 PLS1(8.2 %)에서 명확하게 차이를 보였다. PLS-DA 모델의 품질은 유효한 모델을 나타내는 $R^2Y(cum)=0.847$, $Q^2(cum)=0.546$ 및 교차 검증 분석 (7.77e-7)에 의해 확인 되었으며, DME 그룹과 비-DME그룹에서 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 분리된, PLS-DA의 VIP 값은 >0.7이 적용되는 것을 확인하였다. 19 개의 아미노산, 14 개의 유기 화합물, 8 개의 지방산 및 지질, 8 개의 탄수화물을 포함한 총 49 개의 대사산물이 DME와 비 DME를 가진 피험자 그룹간에 차이가있는 대사산물로 확인되었으며, 총 60 개의 옥시리핀은 표적 분석으로 식별하였다. 옥시리핀은 36 개의 아라키돈 유래, 9 개의 DHA 유래, 6 개의 EPA 유래 및 9 개의 리놀레산 유래를 포함하였으며, 상대적 대사산물 수준은 평균값으로 정규화하고 히트 맵으로 시각화하였다(도 2a 및 도 2b).

[109]

[110] **<실험예 2-2> 비-DME와 구별되는 DME에 대한 혈장 대사산물 바이오마커의 검증**

[111] 발견 코호트에서 유래 한 혈장 대사산물을 바이오마커로 이용할 수 있는지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 상기 <실험예 1>의 그룹에서, 연장 된 코호트를 사용하여 다변량 분석 및 옥시리핀 프로파일링을 추가로 수행하였다. PCA 및 OPLS-DA 점수 플롯은 발견 코호트와 유사한 경향을 나타냈다(도 3a 및 도 3b). 그러나 OPLS-DA 모델 값은 $R^2Y(cum)=0.693$, $Q^2(cum)=0.211$로 모델의 적합도 및 예측 정확도가 발견 코호트보다 낮았지만 모델의 품질은 교차 검증 분석으로 평가되었으며, 대사산물은 확장 코호트의 VIP 값 (>0.7)에 따라 선택된 비-DME와 DME를 구별하고, 상대적 내용을 히트 맵으로 시각화하였다. 발견 코호트 및 확장 코호트, DME 및 비-DME 환자 그룹 사이의 상대적 대사산물 수준으로부터 유도된 히트 맵의 비교는 유사한 경향가지는 것을 확인하였다. DME 환자 진단을 위한 다중 바이오 마커가 최종 선택되어 다음과 같은 자격 조건을 모두 충족하였다. 1) 발견 코호트 및 연장 코호트 둘 다로부터의 통계적으로 유의미한 판별 대사 물이며, 2) 대사산물은 곡선 아래 면적 (AUC)> 0.7 인 DME 대 비-DME 대상에 대해 우수한 차별력을 가지는 대사산물. 상기의 조건을 모두 충족하는 대사산물 중 글루탐산, 시스테인, 아스파라긴, 아스파르트산, 리신, 요산, 말산, 시트르산, 노난산, 15-옥소 ETE, 12-옥소 ETE, 20-카르복시 류코트리엔 B4 및 9-옥소 ODE는 통계적으로 유의미한 것으로 나타났다. 또한, 발견 코호트 및 연장 코호트 둘 다에서 DME 및 비-DME를 갖는 대상체 그룹 사이의 상이한 수준이였다. 또한, 실험군의 발견 코호트의 상대적 대사산물 함량을 사용하여 109 개의 할당 된 혈중 대사산물(표 2-1 내지 표 3-4)에 대해 ROC 곡선을 구축 하였다. 이들 중 대사산물은 곡선 아래 면적 (AUC)>0.7 인

당뇨병 대 DME에 대해 우수한 차이를 나타냈으며, 글루탐산(0.762), 시스테인(0.733), 아스파라긴(0.772), 아스파르트산(0.715), 리신(0.726)을 포함하여, 요산(0.786), 시트르산(0.796), 페닐아세트산(0.810), 15-케토프로스타글란딘 F2α(0.750), 15-케토프로스타글란딘 E2(0.719), 15-옥소ETE(0.812), 12-옥소 ETE(0.867) , 20-카르복시 류코트리엔 B4(0.743), 9-옥소 ODE(0.755) 및 (±) 9-HODE 또는 13-HODE(0.743)인 것을 확인하였다(도 4a 및 도 4b). 마지막으로, 비-DME 대상체로부터의 DME 환자를 진단하기 위해 선택된 다중 바이오마커는 아스파라긴(0.729 배)이였으며, 아스파르트산(0.782 배), 글루탐산(0.653 배), 시스테인(0.666 배), 리신(0.849 배), 시트르산(0.741 배), 요산(0.707 배), 12-옥소 ETE(1.526 배), 15-옥소 ETE(1.319 배), 9-옥소 ODE(0.692 배) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(5.575 배)인 것을 확인하였다. GC-TOF-MS 분석을 기반으로 대사산물을 DME 진단을 위하여 대사산물을 조합해본 결과 아스파라긴, 아스파르트 산, 글루탐산을 포함한 대사산물 프로파일링은, 시스틴, 리신, 시트르산 및 요산과 조합되었을 때 DME 대상체 그룹과 비-DME 대상체를 구별하는 특이성을 고도로 향상시켰으며, 조합 된 AUC 값은 0.918이었다(도 4a). 또한, 12-옥소 ETE, 15-옥소 ETE, 9-옥소 ODE 및 20-카르복시 류코트리엔 B4를 포함하는 옥시 리핀의 조합은 0.957의 결합 된 AUC 값을 산출하고(도 4b), 비-DME 대상체로부터 DME 대상체를 구별하는 능력이 우수한 것을 확인하였다. 최종적으로, 혈장 아미노산 유래의 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인 및 리신, 유기화합물 유래의 시트르산 및 요산, 옥시리핀으로는 12-옥소 ETE, 15-옥소 ETE, 9-옥소 ODE 및 20-카르복시류코트리엔 B4를 선별하여 DME 와 비-DME를 구분하는 바이오마커로 이용하였다.

[112] [표 2-1]

[113]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
1	9.75	220	Cysteine	0.658	0.645	0.0934
2	10.23	246	Glutamic acid	0.762	0.653	0.0003
3	14.76	218	Cystine	0.733	0.666	0.0015
4	10.66	116	Asparagine	0.772	0.729	0.0006
5	9.45	232	Aspartic acid	0.715	0.782	0.013
6	8.31	219	Threonine	0.67	0.819	0.0296
7	11.72	142	Ornithine	0.682	0.82	0.0504
8	9.51	156	5-Oxoproline	0.676	0.826	0.1042
9	10.19	142	Arginine	0.62	0.842	0.2285
10	8.06	204	Serine	0.692	0.843	0.0463
11	12.45	174	Lysine	0.726	0.849	0.0041
12	11.12	156	Glutamine	0.621	0.857	0.0867
13	9.45	176	Methionine	0.602	0.878	0.0985
14	7.58	174	Glycine	0.664	0.88	0.0837
15	12.58	218	Tyrosine	0.536	0.941	0.409
16	10.33	218	Phenylalanine	0.576	0.95	0.3471
17	5.56	116	Alanine	0.542	1.08	0.4789

[114] [표 2-2]

[115]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
18	7.5	142	Proline	0.524	1.098	0.3269
19	14.46	204	Tryptophan	0.562	1.245	0.2263
20	9.04	218	Aminomalonic acid	0.693	0.693	0.0051
21	13.64	441	Uric acid	0.786	0.707	0.0001
22	11.76	273	Citric acid	0.796	0.741	0.0001
23	9.18	233	Malic acid	0.688	0.749	0.0169
24	7.8	189	Glyceric acid	0.638	0.803	0.0735
25	12.64	333	Galacturonic acid	0.62	0.859	0.3721
26	5.05	174	Pyruvic acid	0.566	0.894	0.343

[116] [표 2-3]

[117]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
27	5.29	177	Glycolic acid	0.59	0.914	0.2367
28	7.32	299	Phosphoric acid	0.519	1.049	0.4954
29	5.15	117	Lactic acid	0.562	1.059	0.2686
30	5.7	133	Hydroxylamine	0.64	1.155	0.0318
31	7.06	189	Urea	0.63	1.223	0.0749
32	9.79	115	Creatinine	0.652	1.239	0.0946
33	7.51	164	Phenylacetic acid	0.81	1.393	0
34	16.12	91	Docosahexaenoic acid	0.6	0.805	0.0797
35	6.61	131	3-Hydroxyisovaleric acid	0.528	0.929	0.3489
36	15.35	131	Oleamide	0.56	1.037	0.4464
37	17.07	397	Monoolein	0.518	1.039	0.7291
38	16.23	371	Monopalmitin	0.602	1.135	0.1011
39	8.01	215	Nonanoic acid	0.671	1.171	0.0332

[118] [표 2-4]

[119]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
40	8.86	229	Decanoic acid	0.691	1.192	0.0881
41	15.03	117	Arachidonic acid	0.53	1.424	0.3116
42	13.62	217	myo-Inositol	0.619	0.807	0.1552
43	7.25	117	Glycerol	0.592	0.911	0.2024
44	12.26	103	Fructose	0.588	0.918	0.3479
45	12.38	205	Glucose	0.52	0.999	0.9894
46	12.52	205	Glucose	0.52	1.022	0.6353
47	12	191	1,5-Anhydroglucitol	0.531	1.028	0.9199
48	17.24	361	Maltose	0.612	1.188	0.3224
49	16.69	361	Sucrose	0.546	18.71	0.2991

[120] [표 3-1]

[121]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
50	7.11	320.5	20-HETE	0.598	0.301	0.2217
51	3.96	352.5	15-keto Prostaglandin F2α	0.75	0.341	0.0134
52	3.91	350.5	15-keto Prostaglandin E2	0.719	0.491	0.1439
53	3.35	370.5	Thromboxane B2	0.598	0.643	0.4696
54	4.32	352.5	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin D2	0.617	0.746	0.5744
55	5.11	336.5	5(S)-HpETE	0.624	0.752	0.2161
56	7	320.5	(±)11-HETE	0.624	0.775	0.3183
57	7.24	320.5	(±)8(9)-EET	0.588	0.783	0.4773
58	7.07	320.5	(±)12-HETE	0.579	0.804	0.352
59	7.29	320.5	(±)5-HETE or (±)8-HETE	0.586	0.805	0.4086
60	4.94	336.5	(±)12-HpETE	0.505	0.848	0.5845
61	3.74	625.8	Leukotriene C4	0.505	0.853	0.6197
62	4.48	334.5	Prostaglandin A2	0.526	0.878	0.8179
63	3.88	352.5	Prostaglandin D2	0.586	0.915	0.7283
64	4.61	334.5	Prostaglandin J2	0.524	0.991	0.9806
65	8.02	318.5	5-OxoETE	0.548	1.041	0.9355
66	4.94	338.5	(±)11(12)-DiHET or (±)14(15)-DiHET	0.557	1.06	0.8009

[122] [표 3-2]

[123]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
67	7.14	320.5	(±)5(6)-EET	0.574	1.115	0.7319
68	3.64	332.5	Leukotriene A4 methyl ester	0.519	1.14	0.3959
69	4.08	496.7	Leukotriene D4	0.605	1.203	0.5726
70	5.17	336.5	Leukotriene B4	0.562	1.22	0.5217
71	6.81	320.5	(±)15-HETE	0.655	1.274	0.3533
72	7.24	318.5	15-OxoETE	0.812	1.319	0.0015
73	7.28	320.5	(±)9-HETE	0.602	1.373	0.3123
74	4.5	334.5	Prostaglandin B2	0.595	1.453	0.4526
75	3.99	352.5	Prostaglandin E2 or Prostaglandin H2	0.648	1.463	0.3641
76	7.28	320.5	(±)11(12)-EET or (±)14(15)-EET	0.686	1.465	0.0815
77	4.01	352.5	20-hydroxy Leukotriene B4	0.602	1.479	0.4298
78	6.07	318.5	12-OxoETE	0.867	1.526	0.0012
79	3.38	368.5	11-dehydro Thromboxane B2	0.538	1.578	0.448
80	4.5	354.5	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2α	0.571	2.816	0.3957
81	3.98	352.5	Lipoxin B4	0.586	4.364	0.1504
82	3.02	366.5	20-carboxy Leukotriene B4	0.743	5.575	0.0121

[124] [표 3-3]

[125]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
83	3.72	354.5	Prostaglandin F2α	0.543	6.221	0.2511
84	3.25	370.5	6-keto Prostaglandin F1α	0.536	13657142858	0.3092
85	4.88	336.5	15(S)-HpETE	0.607	22557142858	0.0661
86	7.65	344.5	(±)4-HDHA	0.69	0.757	0.0752
87	7.16	344.5	(±)20-HDHA	0.669	0.769	0.1138
88	7.39	344.5	(±)7-HDHA	0.524	0.895	0.8666
89	7.38	344.5	(±)8-HDHA	0.65	0.908	0.6225
90	7.06	344.5	(±)17-HDHA	0.531	0.923	0.9411
91	7.06	344.5	(±)16-HDHA	0.595	0.939	0.7086
92	5.01	360.5	10(S).17(S)-DiHDHA	0.558	0.966	0.6005
93	7.24	344.5	(±)10-HDHA	0.505	1.13	0.5592
94	7.22	344.5	(±)13-HDHA	0.538	1.187	0.3507
95	6.4	318.5	(±)15-HEPE	0.617	0.812	0.4395
96	6.6	318.5	(±)11(12)-EpETE	0.633	0.887	0.5893
97	6.54	318.5	(±)12-HEPE	0.55	0.891	0.6076

[126] [표 3-4]

[127]

No.	RT (min)	Unique Mass	Metabolites	AUC	Fold Change (DME/DB)	t-test
98	3.88	350.5	Prostaglandin D3	0.634	0.898	0.9934
99	6.52	318.5	(±)18-HEPE	0.567	0.924	0.7107
100	3.77	350.5	Prostaglandin E3	0.518	1.417	0.3548
101	7.53	294.4	9-OxoODE	0.755	0.692	0.0225
102	7.26	294.4	13-OxoODE	0.617	0.48	0.1317
103	5.18	314.5	(±)12(13)-DiHOME	0.643	0.822	0.2681
104	6.88	296.5	(±)9(10)-EpOME	0.624	0.838	0.3235
105	5.3	314.5	(±)9(10)-DiHOME	0.586	0.914	0.7023
106	7.76	296.5	(±)9-HODE or (±)13-HODE	0.743	0.924	0.0195
107	6.15	294.4	9(S)-HOTrE	0.61	0.931	0.7274
108	6.6	312.4	13(S)-HpODE	0.548	1.037	0.8402
109	6.56	312.4	9(S)-HpODE	0.567	1.067	0.8127

[128]

[129] **<실험예 3> DME에 따른 신진대사 차이 확인**

[130] DME와 관계없이 대상체의 혈장 대사산물 분석에서, 다양한 대사산물을 차별적 요인으로 선정 하였으며, 대사와 DME 사이의 관계를 설명하기 위해 대사 경로를 구축하였다(도 5). 상기 구축된 경로에서, 탄수화물, 페닐알라닌, 알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 아르기닌 및 옥시리핀 대사(리놀레에이트, 에이코사펜타 노에이트, 아라키도네이트 및 도코사헥사에노에이트 대사)는 DME 유무에 따른 차이를 나타내었다. 특히, 세린, 트레오닌, 알라닌, 아스파르테이트 및 글루타메이트와 같은 대사산물 및 TCA 대사경로는 DME가 아닌 대상에서 비-DME 대상에서와 비교하여 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 옥시리핀대사의 경우, 리놀레산, 에이코 사펜탄산, 아라키돈산 및 도코사헥사엔산과 같은 옥시리핀 전구체 지방산의 상대적 대사산물 수준은 DME와 비-DME 대상간에 유의미한 차이가 없었다. 그러나, 다른 전구체 지방산으로부터 생성된 옥시리핀의 상대적 양은 현저한 차이를 나타냈으며, 그 중에서도 리놀레에이트, EPA 및 DHA 대사에 관여하는 대부분의 옥시리핀은 DME가 아닌 대상체에서 비-DME 대상체와 비교하여 대사산물 수준이 비교적 낮았다. 특히, 리놀레에이트 대사에서, 리폭시게나제, 퍼옥시다제 및 9-HODE 또는 13-HODE 및 9-옥소 ODE와 같은 탈수소효소에 의해 생성된 옥시리핀은 DME가 없는 대상에서보다 DME를 갖는 대상에서 유의하게 더 낮은 수준으로

존재 하였다. 아라키도네이트 대사의 경우, 다양한 옥시리핀이 비-DME 대상체에 비해 DME로 인해 대사가 증가 및 감소되었다. 이 중 하이드록시라제, 카르복실라제, 리폭시게나제, 퍼옥시다제 및 탈수소 효소를 포함한 다양한 효소에 의해 촉매되는 20-카르복시 류코트리엔 B4, 12-옥소 ETE 및 15-옥소 ETE의 수준은 DME에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 한편, 탈수소효소 활성에 의해 생성되는 15-케토프로스타글란딘 F2α는 DME 대상체에서 유의하게 감소된 수준을 나타냈다.

[131]

[132] 따라서, 본 발명은 제2형 당뇨병환자에서, 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하고 차별되는 혈중 대사체인 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀을 선별하였다. 이중, 혈중 대사물질인 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid)과 옥시리핀인 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)의 컷오프 값이 AUC>0.7인 것을 확인하였으며, DME 환자군과 비-DME 환자군에서 유의한 차이를 나타내어, DME의 정확한 진단에 이용할 수 있는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 생물학적 시료에서, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨병성 황반부종(Diabetic macular edema, EDM) 진단용 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 혈장 아미노산 및 유기화합물은 아스파라긴(Asparagine), 아스파르트산(Aspartic acid), 글루탐산(Glutamic acid), 시스테인(Cysteine), 리신(Lysine), 시트르산(Citric acid) 및 요산(Uric acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 옥시리핀은 12-옥소 ETE(12-oxo ETE), 15-옥소 ETE(15-oxo ETE), 9-옥소 ODE(9-oxo ODE) 및 20-카르복시류코트리엔 B4(20-carboxy leukotriene B4)로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 대사체 발현 수준 측정은 크로마토그래피/질량분석법, 광흡수분석법, 발광분광분석법 핵자기공명분광기, 자외선분광기, 적외선분광기, 형광분광기, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 및 질량분석기로 구성된 군에서 선택된 1이상인 것을 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 5] 제 5항에 있어서,
상기 크로마토그래피/질량분석법은 LC-triple-Q-MS(Liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry) 또는 GC-TOF-MS(gas chromatography/time-offlight mass spectrometry)인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 눈물, 객담, 비분비물, 기관지 분비물, 기관지 세척액, 폐분비물, 및 폐포 세척액으로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 8] 제 1항의 조성물을 포함하는 당뇨병성 황반부종 진단용 키트.

[청구항 9] 개체의 생물학적 시료에서, 제 8항의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을

비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 방법은 대조군과 개체를 비교하여 상기 대사체 혈중 농도가 증가한 경우 당뇨병성 황반 부종에 걸렸거나, 걸릴 위험이 있는 것으로 판단하는 것인 정보제공 방법.

[청구항 11] 제 9항에 있어서,
상기 방법은 대사체의 컷오프 값이 AUC>0.7 이상인 것을 특징으로 하는 정보제공 방법.

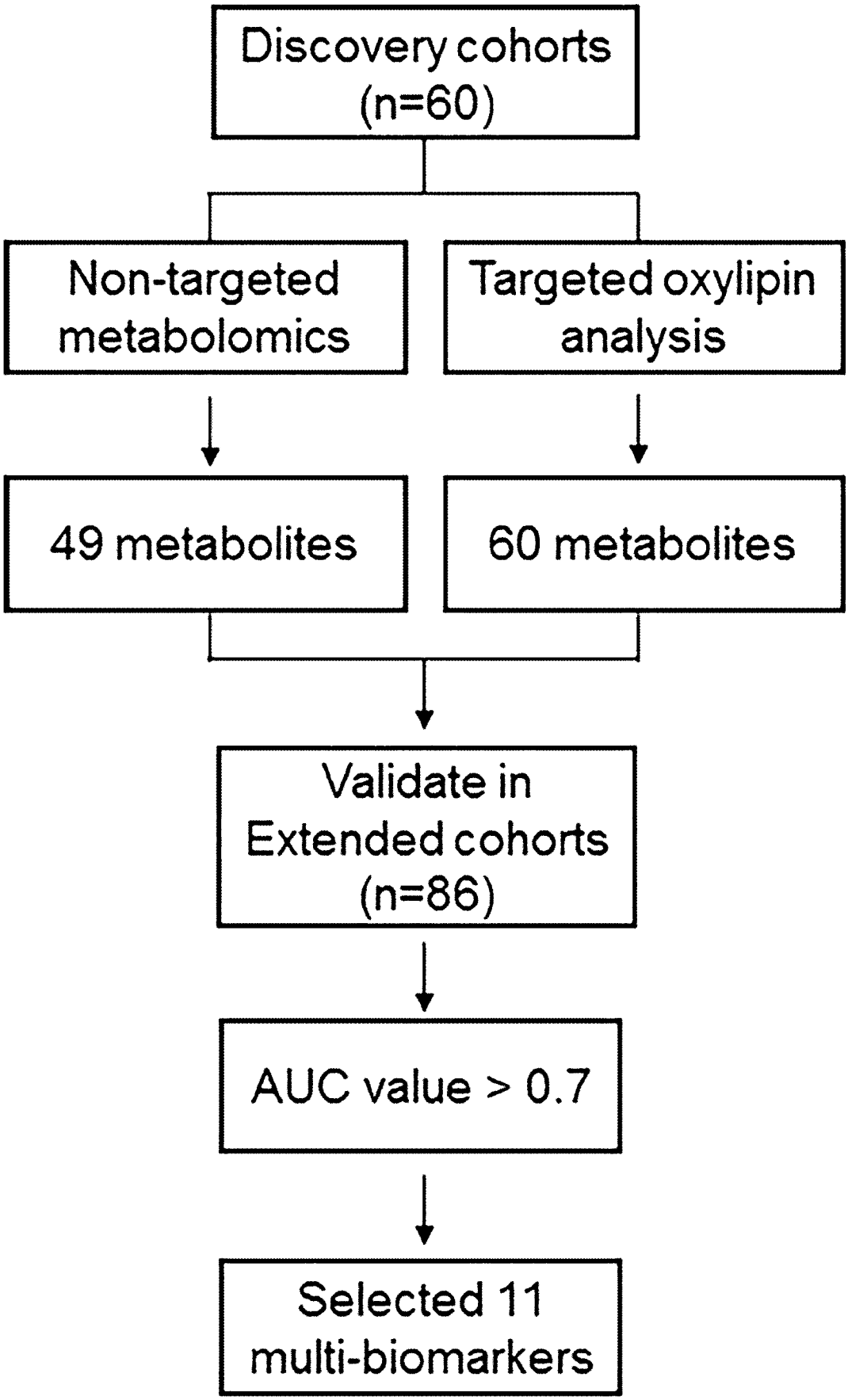
[청구항 12] 당뇨병성 황반부종 개체에 피검물질을 처리하는 단계; 및
상기 피검물질을 처리한 개체의 생물학적 시료에서, 무처리 대조군과 비교하여 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 13] 개체의 생물학적 시료에서, 제 8항의 키트를 이용하여, 혈장 아미노산, 유기화합물 및 옥시리핀으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체 발현 수준을 측정하는 단계; 및
상기 측정된 대사체 발현 수준과, 대조군 시료의 대사체의 수준을 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병성 황반부종의 진단 방법.

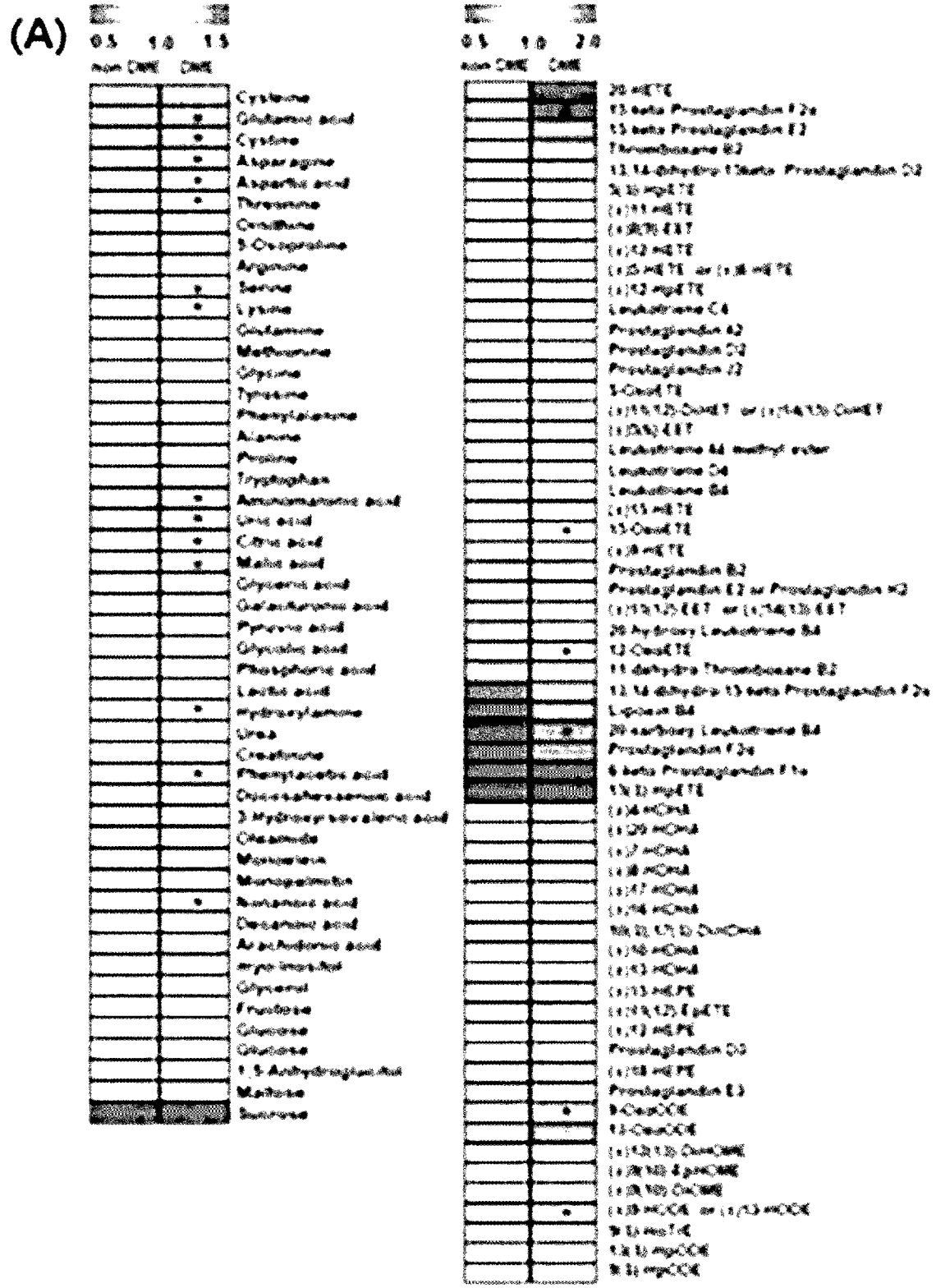
[청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 방법은 대조군과 개체를 비교하여 상기 대사체 혈중 농도가 증가한 경우 당뇨병성 황반 부종에 걸렸거나, 걸릴 위험이 있는 것으로 판단하는 것인 당뇨병성 황반부종의 진단 방법.

WO 2021/225371 PCT/KR2021/005642

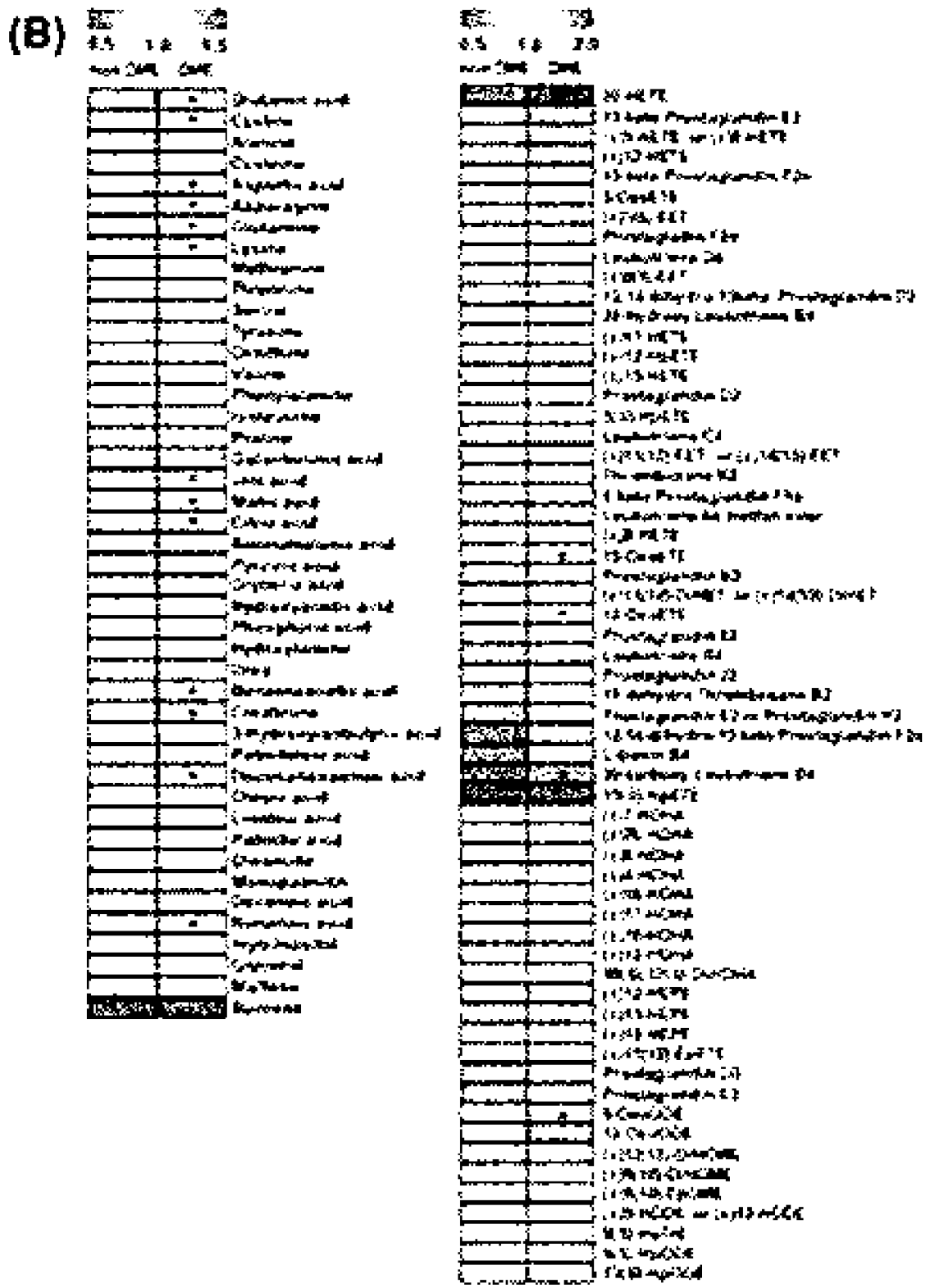
[도1]



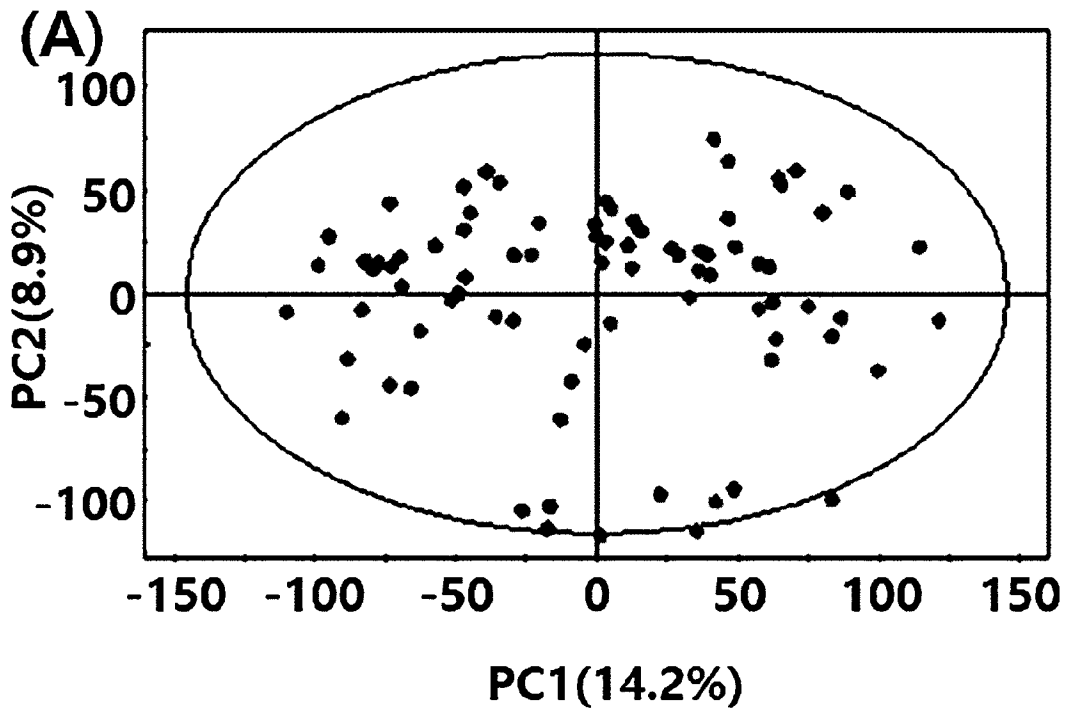
[도2a]


(A)
0.5 1.0 1.5
non DME DME
Cysteine
Glutamic acid
Cystine
Asparagine
Aspartic acid
Threonine
Ornithine
5-Oxoproline
Arginine
Serine
Lysine
Glutamine
Methionine
Glycine
Tyrosine
Phenylalanine
Alanine
Proline
Tryptophan
Aminomalonic acid
Uric acid
Citric acid
Malic acid
Glyceric acid
Galacturonic acid
Pyruvic acid
Glycolic acid
Phosphoric acid
Lactic acid
Hydroxylamine
Urea
Creatinine
Phenylacetic acid
Docosahexaenoic acid
3-Hydroxy-sovaleric acid
Oleamide
Monoolein
Monopalmitin
Nonanoic acid
Decanoic acid
Arachidonic acid
myo-inositol
Glycerol
Fructose
Glucose
Glucose
1,5-Anhydroglucitol
Maltose
Sucrose
0.5 1.0 2.0
non DME DME
20-HETE
13-keto Prostaglandin F2α
15-keto Prostaglandin E2
Thromboxane B2
13,14-dihydro-13keto Prostaglandin D2
5(S)-HpETE
(±)11-HETE
(±)8(9)-EET
(±)12-HETE
(±)5-HETE or (±)8-HETE
(±)12-HpETE
Leukotriene C4
Prostaglandin A2
Prostaglandin D2
Prostaglandin J2
5-OxoETE
(±)11(12)-DiHET or (±)14(15)-DiHET
(±)5(6)-EET
Leukotriene A4 methyl ester
Leukotriene D4
Leukotriene B4
(±)15-HETE
15-OxoETE
(±)9-HETE
Prostaglandin B2
Prostaglandin E2 or Prostaglandin H2
(±)11(12)-EET or (±)14(15)-EET
20-hydroxy Leukotriene B4
12-OxoETE
11-dehydro Thromboxane B2
13,14-dihydro-13-keto Prostaglandin F2α
Lipoxin B4
20-carboxy Leukotriene B4
Prostaglandin F2α
6-keto Prostaglandin F1α
13(S)-HpETE
(±)4-HDHA
(±)20-HDHA
(±)7-HDHA
(±)8-HDHA
(±)17-HDHA
(±)16-HDHA
10(S),17(S)-DiHDHA
(±)10-HDHA
(±)13-HDHA
(±)15-HEPE
(±)11(12)-EpETE
(±)12-HEPE
Prostaglandin D3
(±)18-HEPE
Prostaglandin E3
9-OxoODE
13-OxoODE
(±)12(13)-DiHOME
(±)9(10)-EpHOME
(±)9(10)-DiHOME
(±)9-HODE or (±)13-HODE
9(S)-HoTrE
13(S)-HpODE
9(S)-HpODE

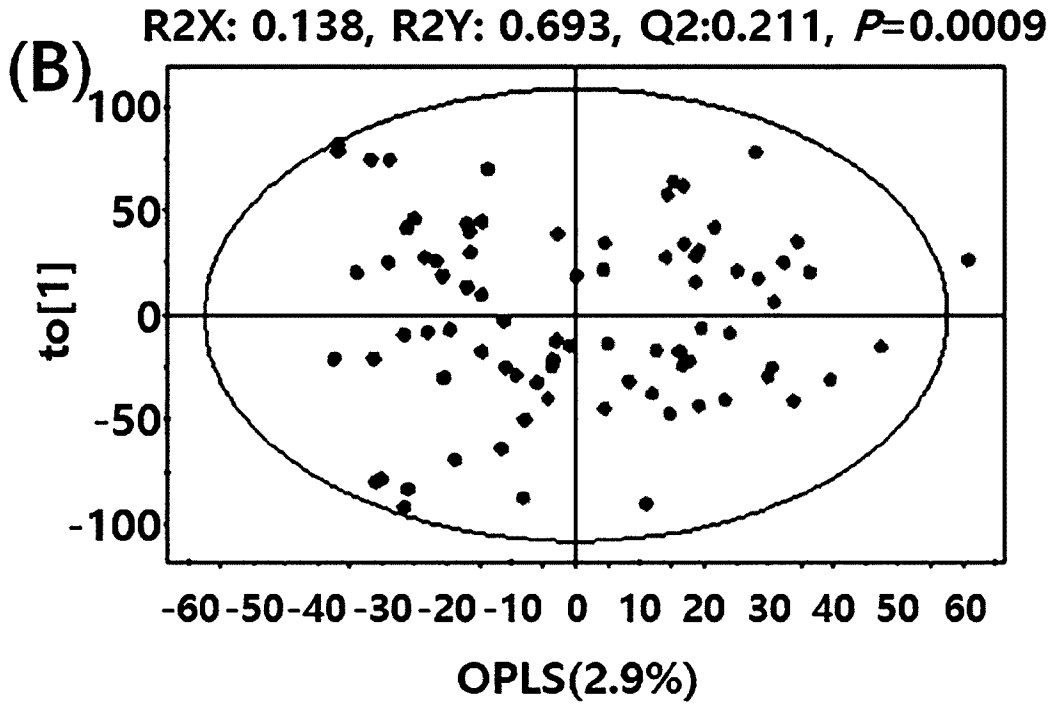
[도2b]



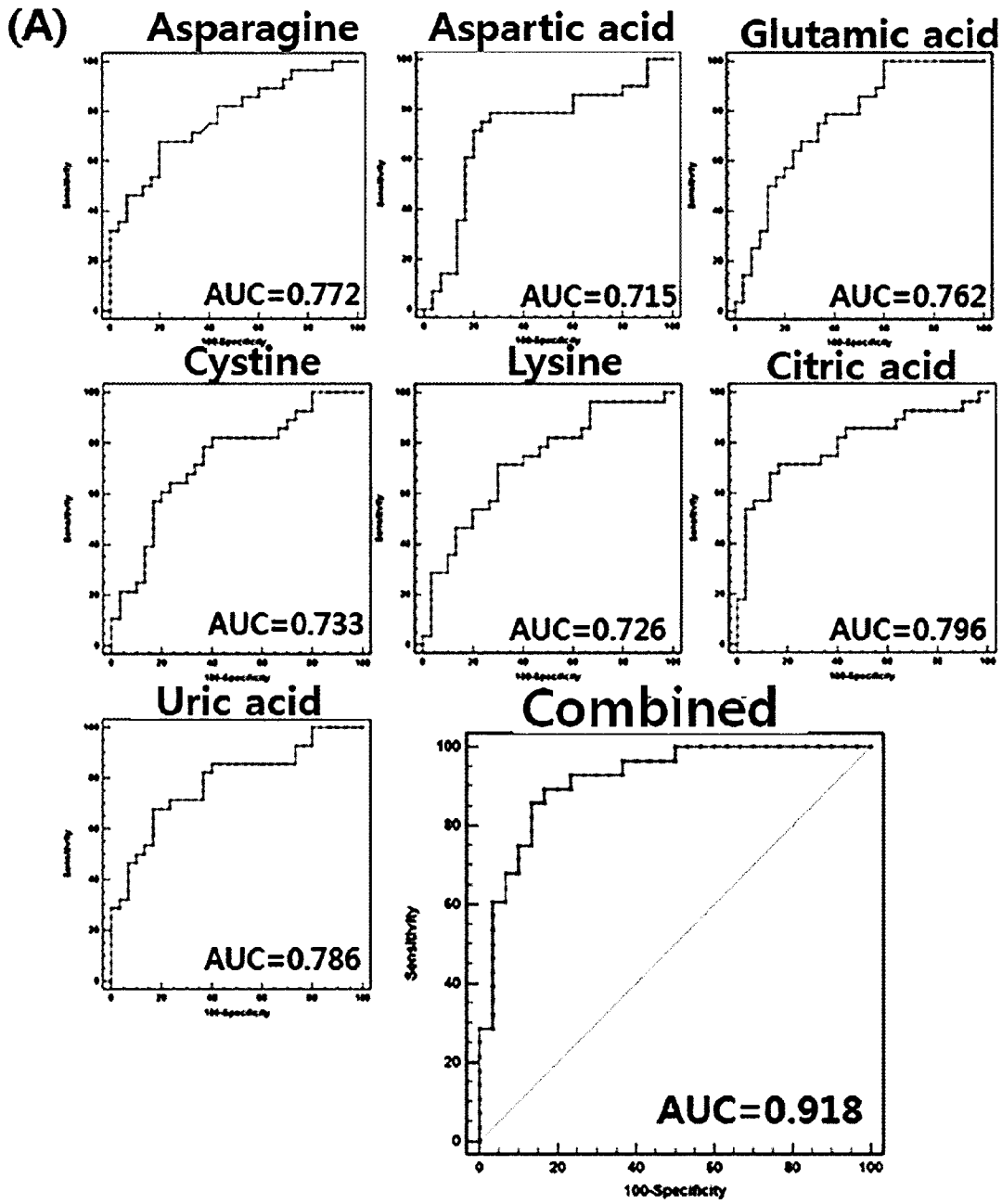
[도3a]


(A)
100
50
0
-50
-100
PC2(8.9%)
-150 -100 -50 0 50 100 150
PC1(14.2%)

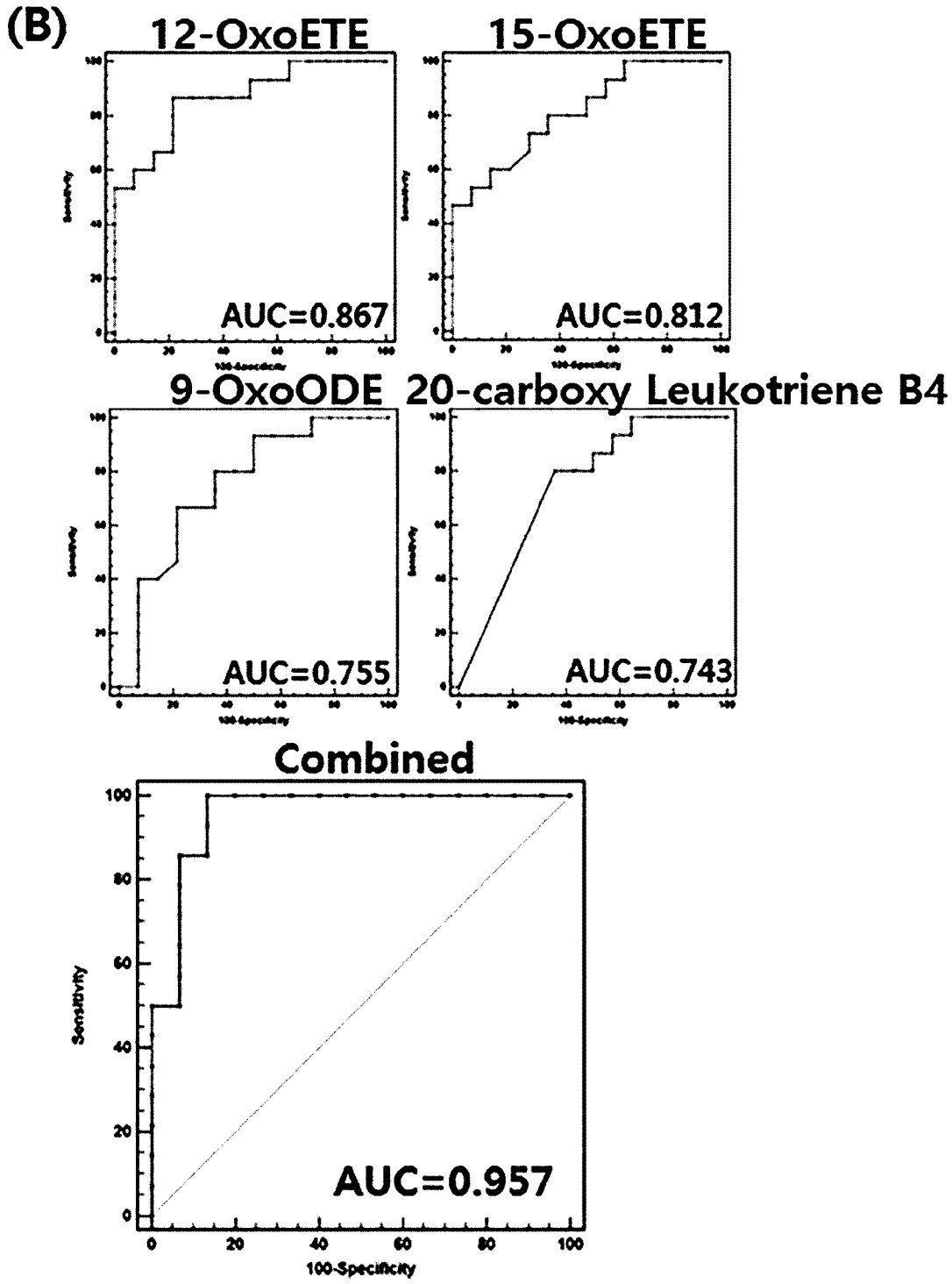
[도3b]


R2X: 0.138, R2Y: 0.693, Q2:0.211, P=0.0009
(B)
100
50
0
-50
-100
to[1]
-60 -50 -40 -30 -20 -10 0 10 20 30 40 50 60
OPLS(2.9%)

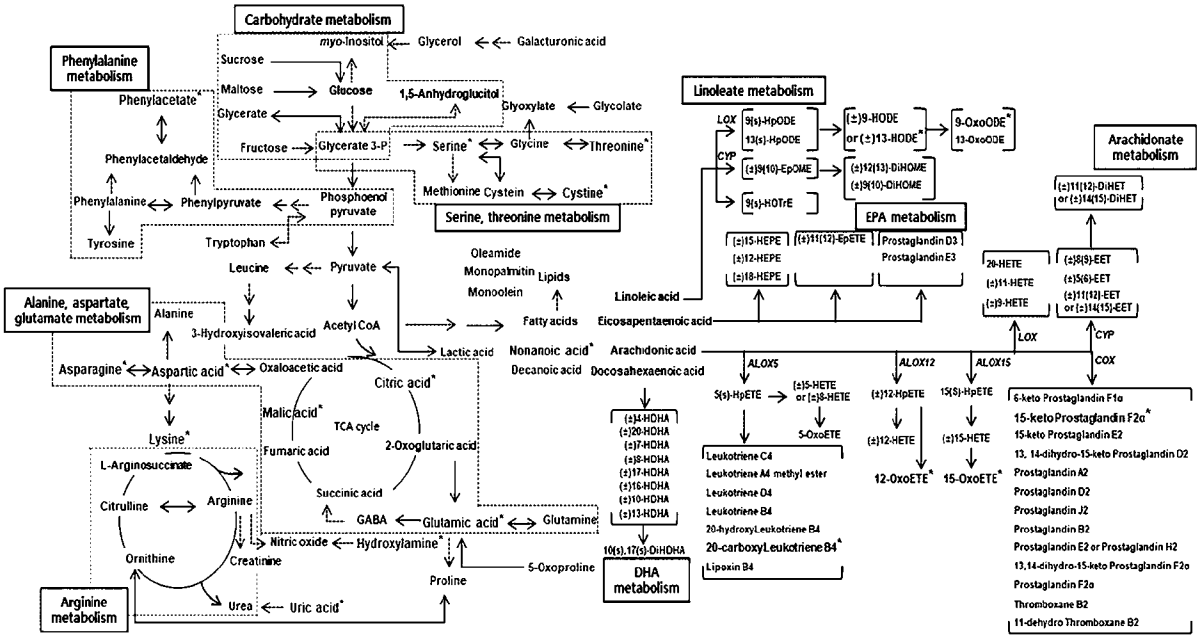
[도4a]


(A)
Asparagine
AUC=0.772
Aspartic acid
AUC=0.715
Glutamic acid
AUC=0.762
Cystine
AUC=0.733
Lysine
AUC=0.726
Citric acid
AUC=0.796
Uric acid
AUC=0.786
Combined
AUC=0.918
Sensitivity
100-Specificity
0
20
40
60
80
100

[도4b]


(B)
12-OxoETE
AUC=0.867
15-OxoETE
AUC=0.812
9-OxoODE
AUC=0.755
20-carboxy Leukotriene B4
AUC=0.743
Combined
AUC=0.957
Sensitivity
100-Specificity
0
20
40
60
80
100

[도5]


Carbohydrate metabolism
Phenylalanine metabolism
Alanine, aspartate, glutamate metabolism
Arginine metabolism
Serine, threonine metabolism
Linoleate metabolism
EPA metabolism
Arachidonate metabolism
DHA metabolism
myo-Inositol
Glycerol
Galacturonic acid
Sucrose
Maltose
Glucose
1,5-Anhydroglucitol
Glyoxylate
Glycolate
Glycerate
Fructose
Glycerate 3-P
Serine
Glycine
Threonine
Methionine
Cystein
Cystine
Phenylacetate
Phenylacetaldehyde
Phenylalanine
Phenylpyruvate
Phosphoenol pyruvate
Tyrosine
Tryptophan
Leucine
Pyruvate
Oleamide
Monopalmitin
Monoolein
Lipids
Alanine
3-Hydroxyisovaleric acid
Acetyl CoA
Fatty acids
Lactic acid
Asparagine
Aspartic acid
Oxaloacetic acid
Citric acid
Malic acid
TCA cycle
Fumaric acid
2-Oxoglutaric acid
Succinic acid
Lysine
L-Arginosuccinate
Citrulline
Arginine
Ornithine
Creatinine
GABA
Glutamic acid
Glutamine
Nitric oxide
Hydroxylamine
5-Oxoproline
Proline
Urea
Uric acid
Linoleic acid
Eicosapentaenoic acid
Arachidonic acid
Docosahexaenoic acid
Nonanoic acid
Decanoic acid
LOX
CYP
9(s)-HpODE
13(s)-HpODE
(±)9-HODE
or (±)13-HODE
9-OxoODE
13-OxoODE
(±)9(10)-EpOME
(±)12(13)-DiHOME
(±)9(10)-DiHOME
9(s)-HOTrE
(±)15-HEPE
(±)12-HEPE
(±)18-HEPE
(±)11(12)-EpETE
Prostaglandin D3
Prostaglandin E3
20-HETE
(±)11-HETE
(±)9-HETE
(±)8(9)-EET
(±)5(6)-EET
(±)11(12)-EET
or (±)14(15)-EET
(±)11(12)-DiHET
or (±)14(15)-DiHET
ALOX5
ALOX12
ALOX15
COX
5(s)-HpETE
(±)5-HETE
or (±)6-HETE
5-OxoETE
(±)12-HpETE
(±)12-HETE
12-OxoETE
15(S)-HpETE
(±)15-HETE
15-OxoETE
Leukotriene C4
Leukotriene A4 methyl ester
Leukotriene D4
Leukotriene B4
20-hydroxyLeukotriene B4
20-carboxyLeukotriene B4
Lipoxin B4
(±)4-HDHA
(±)20-HDHA
(±)7-HDHA
(±)8-HDHA
(±)17-HDHA
(±)16-HDHA
(±)10-HDHA
(±)13-HDHA
10(s),17(s)-DiHDHA
6-keto Prostaglandin F1α
15-keto Prostaglandin F2α
15-keto Prostaglandin E2
13, 14-dihydro-15-keto Prostaglandin D2
Prostaglandin A2
Prostaglandin D2
Prostaglandin J2
Prostaglandin B2
Prostaglandin E2 or Prostaglandin H2
13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2α
Prostaglandin F2α
Thromboxane B2
11-dehydro Thromboxane B2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/72(2006.01)i; **G01N 30/88**(2006.01)i; **G01N 33/68**(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(2006.01); G01N 21/78(2006.01); G01N 33/483(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

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: 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema, DME), 아미노산(amino acid), 유기화합물(organic compound), 옥시리핀(oxylipin), 바이오마커(biomarker), 스크리닝(screening)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRIZOVA, Libuse et al. Increased uric acid and glucose concentrations in vitreous and serum of patients with diabetic macular oedema. Ophthalmic Res. 46(2), 14 January 2011. [Retrieved on 01 August 2021]. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21242702/><DOI:10.1159/000322994>. See abstract; pages 74-76; and table 3.	1-11,13-14
Y		12
X	KRIZOVA, Libuse et al. Correlation of Vitreous Vascular Endothelial Growth Factor and Uric Acid Concentration Using Optical Coherence Tomography in Diabetic Macular Edema. Journal of Ophthalmology. 17 November 2015. [Retrieved on 01 August 2021]. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26682064/><DOI:10.1155/2015/478509>. See abstract; and pages 2-5.	1-5,7-14
X	SHIPPY, S. A. et al. Elevation of Vitreous Glutamate Levels With Diabetic Macular Edema. ARVO Annual Meeting. 31 May 2008. [Retrieved on 01 August 2021]. Retrieved from <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2375562>. See abstract.	1-3,7-14

☑ 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
"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	Date of mailing of the international search report
13 August 2021	**13 August 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2000827 B1 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP et al.) 16 July 2019 (2019-07-16) See claim 11.	12
A	JP 2010-085363 A (NATIONA HOSPITAL ORGANIZATION et al.) 15 April 2010 (2010-04-15) See entire document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/005642

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2000827 B1	16 July 2019	None	
JP 2010-085363 A	15 April 2010	WO 2010-038829 A1	08 April 2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2021/005642

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 30/72(2006.01)i; **G01N 30/88**(2006.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 30/72(2006.01); G01N 21/78(2006.01); G01N 33/483(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

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: 당뇨병성 황반부종(diabetic macular edema, DME), 아미노산(amino acid), 유기화합물(organic compound), 옥시리핀(oxylipin), 바이오마커(biomarker), 스크리닝(screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	LIBUSE KRIZOVA 등 Increased uric acid and glucose concentrations in vitreous and serum of patients with diabetic macular oedema, Ophthalmic Res, 46(2), 2011.01.14., [검색일 2021.08.01.], 출처<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21242702/><DOI:10.1159/000322994> 요약; 페이지 74-76; 표 3	1-11,13-14 12
X	LIBUSE KRIZOVA 등 Correlation of Vitreous Vascular Endothelial Growth Factor and Uric Acid Concentration Using Optical Coherence Tomography in Diabetic Macular Edema, Journal of Ophthalmology, 2015.11.17 , [검색일 2021.08.01.], 출처<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26682064/><DOI:10.1155/2015/478509> 요약; 페이지 2-5	1-5,7-14
X	S. A. SHIPPY 등 Elevation of Vitreous Glutamate Levels With Diabetic Macular Edema, ARVO Annual Meeting, 2008.05.31 , [검색일 2021.08.01.], 출처<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2375562> 요약	1-3,7-14
Y	KR 10-2000827 B1 (건국대학교 산학협력단 등) 2019.07.16 청구항 11	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 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
2021년08월13일(13.08.2021)	**2021년08월13일(13.08.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005642

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2010-085363 A (NATIONA HOSPITAL ORGANIZATION 등) 2010.04.15 전문	1-14

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/005642

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2000827 B1	2019/07/16	없음	
JP 2010-085363 A	2010/04/15	WO 2010-038829 A1	2010/04/08