



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0156996
(43) 공개일자 2021년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0074737

(22) 출원일자 2020년06월19일

심사청구일자 2021년07월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김동식

서울특별시 성북구 고려대로 73, 고대안암병원 연구실 6726(안암동5가)

이도엽

서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대 교수아파트 122D-403(신림동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

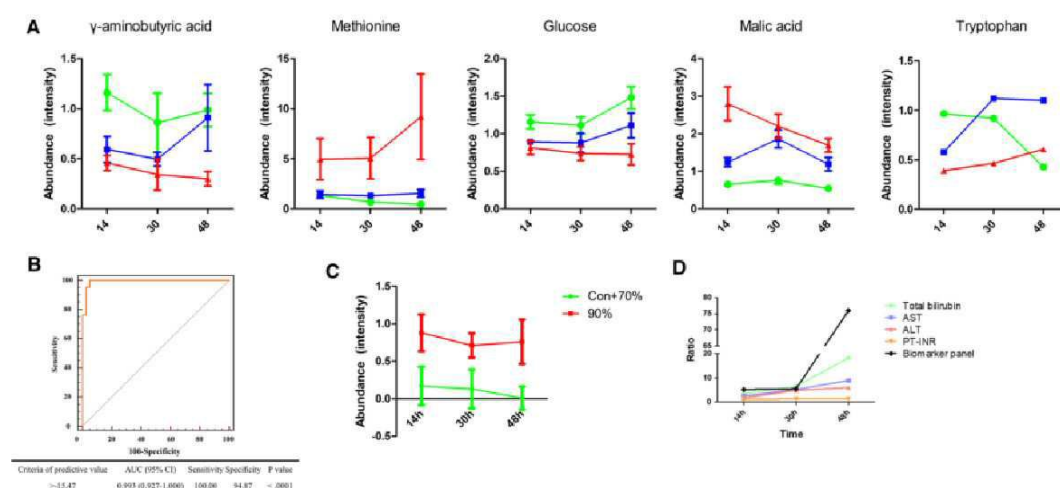
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 간질환 또는 간기능 마커

(57) 요약

본 발명은 간질환 또는 간기능 특이적 마커에 관한 것으로, 본 발명의 현저히 높은 민감도 및 특이도 (민감도 100% 및 특이도 94.7%)를 가지는 간부전의 생체 표지자 (마커)는, 임상에서 다양한 간종양으로 간절제를 받는 모든 환자들에게 적용 가능하며, 간절제술 후 48시간 이내 높은 민감도로 간기능부전을 예측 및 진단할 수 있는 효과가 있어, 간절제술 직후부터 시작되는 간손상을 신속하게 예측 및 진단함으로써 적절한 치료가 가능하고, 간부전 치료 효과에 따른 생체 표지자의 변화를 확인함으로써 향후 수술 후 간부전을 예방 및 치료하는 물질의 스크리닝에도 이용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

G01N 30/7206 (2013.01)
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 33/6812 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)
G01N 2030/8818 (2013.01)
G01N 2800/085 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

권형도

서울특별시 노원구 한글비석로 91, 101동 103호(하계동, 하계1차청구아파트)

(72) 발명자

강유진

서울특별시 강북구 숭실로68길 18-21, 403호(미아동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711051044
과제번호	NRF-2017R1A2B2005754
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자 지원사업 (총연구비 3억 초과-5억 이하)
연구과제명	효율적 간재생 유도 기전 연구를 통한 '수술후 간기능부전'의 조기진단과 치료법 개

발

기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

말산(malic acid), 메티오닌(methionine), 트립토판(tryptophan), 글루코스(glucose) 및 GABA(γ -aminobutyric acid)를 포함하는 간질환 진단용 마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, 간질환은 간경변(liver cirrhosis), 간 섬유증(Liver fibrosis), 간부전(liver failure) 및 간염(hepatitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 간질환 진단용 마커.

청구항 3

제 1항에 있어서, 간질환은 급성 간부전인 간질환 진단용 마커.

청구항 4

제 1항에 있어서, 간질환은 간절제술 후 간부전인 간질환 진단용 마커.

청구항 5

말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA를 포함하는 간기능 검사용 마커.

청구항 6

말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간질환 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 간질환은 간경변, 간 섬유증, 간부전 및 간염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 간질환 진단용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 간부전은 급성 간부전인, 간질환 진단용 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 간부전은 간절제술 후 간부전인, 간질환 진단용 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 발생하는 간부전인, 간질환 진단용 조성물.

청구항 11

제 6항의 조성물을 포함하는, 간질환 진단 키트.

청구항 12

말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간기능 검사용 조성물.

청구항 13

제 12항의 조성물을 포함하는, 간기능 검사 키트.

청구항 14

대상체로부터 분리된 시료에서 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 측정한 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 1에 대입하여 나온 수치 X가 -46.41 내지 -5.16 이상이면 간질환인 것으로 판단하는, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법:

[수학식 1]

$$X = -a*(포도당) + b*(말산) + c*(메티오닌) - d*(트립토판) - e*(GABA) - f$$

상기에서, a: 4.32-38.85; b: 1.98-17.79; c: 0.82-7.38; d: 2.52-22.71; e: 3.98-35.79; 및 f: 2.45-22.02.

청구항 16

제 14항에 있어서, 측정한 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 2에 대입하여 나온 수치 X가 -15.47 이상이면 간질환인 것으로 판단하는, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법:

[수학식 2]

$$X = -12.95*(포도당) + 5.93*(말산) + 2.46*(메티오닌) - 7.57*(트립토판) - 11.93*(GABA) - 7.34$$

청구항 17

제 14항에 있어서, 간질환은 간절제술 후 간부전인, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 18

제 14항에 있어서, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 19

대상체로부터 분리된 시료에서 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간기능 검사 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 측정한 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 1에 대입하여 나온 수치 X가 -46.41 내지 -5.16 이상이면 간기능 저하인 것으로 판단하는, 간기능 검사 방법:

[수학식 1]

$$X = -a*(포도당) + b*(말산) + c*(메티오닌) - d*(트립토판) - e*(GABA) - f$$

상기에서, a: 4.32-38.85; b: 1.98-17.79; c: 0.82-7.38; d: 2.52-22.71; e: 3.98-35.79; 및 f: 2.45-22.02.

청구항 21

제 19항에 있어서, 측정한 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 2에 대입하여 나온 수치 X가 -15.47 이상이면 간기능 저하인 것으로 판단하는, 간기능 검사 방법:

[수학식 2]

$$X = -12.95*(포도당) + 5.93*(말산) + 2.46*(메티오닌) - 7.57*(트립토판) - 11.93*(GABA) - 7.34$$

청구항 22

제 19항에 있어서, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는, 간기능 검사 방법.

청구항 23

a) 간부전 환자에게 후보 물질을 투여하고 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하여 하기 수학식 2에 대입하여 도출된 수치 X를 확인하는 단계:

[수학식 2]

$$X = -12.95 * (\text{포도당}) + 5.93 * (\text{말산}) + 2.46 * (\text{메티오닌}) - 7.57 * (\text{트립토판}) - 11.93 * (\text{GABA}) - 7.34 \quad ; \text{ 및}$$

b) X가 -15.47 미만인 경우, 상기 후보물질을 효과적인 간질환 치료제 또는 간기능 개선제로 판단하는 단계를 포함하는, 간질환 치료제 또는 간기능 개선제 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 24

말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준 측정부; 및

간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 예측 연산부를 포함하는 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치.

청구항 25

제 24항에 있어서, 간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 예측 연산부는 하기 수학식 2에 의해 연산하는, 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치:

[수학식 2]

$$X = -12.95 * (\text{포도당}) + 5.93 * (\text{말산}) + 2.46 * (\text{메티오닌}) - 7.57 * (\text{트립토판}) - 11.93 * (\text{GABA}) - 7.34$$

청구항 26

제 25항에 있어서, 간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 X가 -15.47 이상일 경우 간질환이 발병되거나 간기능이 저하된 것으로 판단하는, 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치.

청구항 27

제 24항에 있어서, 간절제술 수술 후 48시간 이내의 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준인 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간질환 또는 간기능 특이적 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 당 대사, 아미노산/단백질 대사, 지질 대사 등의 생체 신진 대사, 대사산물의 배출, 암모니아 등의 화학 물질 해독, 비타민류의 저장 등, 생명 유지에 매우 중요한 기능을 담당하고 있다. 또한, 간은 알부민 등 인체에 필수적인 단백질을 생합성하여 공급하기도 하며, 이들 생체활성물질들을 생성 및 처리하는 기능도 있으며, 인체 내 소화기계와 전신 순환계 사이에 위치함으로써 생체 내로 흡수된 음식물, 약물 및 여러 외부 물질들이 반드시 거치면서 외부로부터 들어온 생체의 물질로부터 전신을 방어한다. 따라서 일단 생체 내로 들어온 생체 외 물질이 간을 통과하는 까닭에 간은 영양소 이외에도 많은 독성물질에 노출될 위험이 다른 장기보다 커서 그만큼 손상될 확률도 다른 장기에 비해 높다. 간은 재생능력이 우수한 장기로 약간의 손상에도 충분히 정상으로 회복된다. 그러나 지속적으로 손상된 경우 간 조직의 일부가 파괴되면서 정상으로 회복되지 못하고 결합조직이 과다 축적되게 된다. 간 손상이 만성화 되면 그 원인에 상관없이 결국에 간섬유화 및 간경화가 초래된다. 간섬유화

및 간경화는 바이러스 감염, 알코올 과다섭취 또는 약물 섭취 등의 원인으로 발생되며, 사망율도 높은 것으로 알려져 있다. 간 질환의 치료 요법은 약물 치료 외에도, 에탄올 주입법, 초음파 소작법 또는 간동맥 색전술(hepatic artery embolization) 등의 내과적 처치가 실시되거나, 또는 간절제술(hepatectomy) 또는 생체 간이식과 같은 외과적 처치가 실시되는 치료가 있다. 일반적으로 간 질환의 치료는 내과적 처치가 선행되는 것이 일반적이지만, 외과적 처치가 행해지는 경우에는 잔류성 간 기능이 유지되는 것을 전제로 한다. 그러나 이러한 내과적 처치나 외과적 처치 후에 간 기능의 저하 또는 이상이 초래되는 경우가 많다. 외과적 수술기법의 발전으로 인하여 간암 등의 적응증에 간절제술이 많이 사용되고 있으나, 대량 간절제술 후 남은 간조직의 부피가 적어 생길 수 있는 간부전(posthepatectomy liver failure, PHLF)을 초래할 수 있다. 종래의 807명의 환자를 대상으로 한 연구에서 약 12%에서 간부전이 발생하였으며, 그로 인한 사망률은 65%나 되는 것으로 보고되었다(Rahbari, N.N. et al., Annals of Surgical Oncology, 18(13), 3640-3649, 2011). 또한 간이식술은 말기 간질환 환자에게 널리 행하여지고 있으나, 이로 인해 이식편 공급의 부족을 초래하고 있어 분할 간이식이나 생체 공여 간이식 방법이 사용되고 있다. 하지만, 수혜자가 받는 간의 부피가 작은 경우 과소이식편 증후군(small-for-size syndrome, SFSS)과 같은 간 기능 이상증의 위험이 있다. 간 기능 저하, 즉 간부전을 줄이기 위해 정상 간의 경우 간조직의 25% 이상을 남기는 것이 중요하고 질병이 있는 경우나 고령에서는 그 이상을 남겨야 한다고 하며, 과소이식편 증후군의 위험성을 줄이기 위해서는 적어도 recipient standard liver volume의 35% 이상 또는 graft-recipient weight ratio 0.8% 이상이 되어야 한다(Clavien PA, P.H. et al., N Engl J Med., 356, 1545-1559, 2007).

[0003] 현재, 이러한 간 질환, 간 수술 이후의 간 기능 저하 또는 이상을 진단하기 위해 혈액검사를 통한 간 기능검사(AST, ALT, 빌리루빈, 알칼리성 포스파타제(ALP) 등)와 간염바이러스에 대한 혈청학적 표지자 검사, 간 초음파 검사, 복강경검사, 간 조직검사 등이 이용되며, 남은 잔여 간 기능의 평가를 위해서 혈액의 알부민 검사나 혈액 응고시간(프로트롬빈 시간, PT)을 측정하고 있으나, 민감도와 신속성이 매우 낮은 실정이다. 특히, 수술 후 간부전을 예측하는 기존 진단 방법은 예측률이 약 59% (수술 후 5일 기준)인 것으로 보고되었으므로, 간 수술 후 간 기능의 저하 또는 이상을 확인하기 어렵고, 간부전의 예방 또는 치료제의 효과를 판단하기 어려운 문제점이 있어왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 간질환 진단용 마커를 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 목적은 간기능 검사용 마커를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 간질환 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 간기능 검사용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 간기능 검사 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 간질환 치료제 또는 간기능 개선제 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 아울러, 본 발명의 목적은 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA를 포함하는 간질환 진단용 마커를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA를 포함하는 간기능 검사용 마커를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 마커를 포함하는 간질환 진단용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 마커를 포함하는 간기능 검사용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 간기능 검사 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 간질환 치료제 또는 간기능 개선제 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 아울러, 본 발명은 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에서는 대사체 분석을 통해 현저히 높은 민감도 및 특이도 (민감도 100% 및 특이도 94.7%)를 가지는 간부전의 생체 표지자 (마커)를 찾았으므로, 임상에서 다양한 간증양으로 간질환을 받는 모든 환자들에게 적용 가능한 효과가 있으며, 간질환 후 48시간 이내 높은 민감도로 간기능부전을 예측 및 진단할 수 있는 효과가 있어, 간질환 직후부터 시작되는 간손상의 손상을 신속하게 예측 및 진단함으로써 적절한 치료가 가능하고, 간부전 치료 효과에 따른 생체 표지자의 변화를 확인함으로써 향후 수술 후 간부전을 예방 및 치료하는 물질의 스크리닝에도 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 종래의 생화학 마커의 일련의 변화를 확인한 도이다 (* $P=0.05$, 70% vs. 90% 간질환, 선형 혼합 모델).

도 2는 PCA에 기반한 무감독다변량 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 OPLS-DA에 기반한 간질환-관련 치사율 (90% 간질환 군)에 대한 판별 모델을 나타낸 도이다.

도 4는 VIP 분석을 통해 식별에 가장 많이 기여하는 변수를 우선순위화한 도이다.

도 5는 대사 산물 (VIP 점수>1.2인 21개의 대사 산물)의 후속 경로 분석을 나타낸 도이다.

도 6은 바이오마커 패널의 성능을 평가한 도이다:

A: 각 시점에서 대사 물질의 선형 그래프 및 통계적 유의성;

B: 혈청 대사 바이오마커의 ROC 커브 분석;

C: 선형적으로 변형된 바이오마커의 선형 그래프 및 통계적 유의성; 및

D: 바이오마커 모델 및 종래의 임상 마커의 시간적 프로파일 비교.

도 7은 예측 모델의 성능을 stepwise ROC(receiver operating characteristic) Z 커브 분석을 통해 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0023] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0024] 본 발명에서 용어, "대상체" 또는 "환자"는 인간, 유인원, 원숭이, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[0025] 본 발명에서 용어, "시료(샘플)"는 대상 또는 환자로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이

와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

- [0028] 일 측면에서, 본 발명은 말산(malic acid), 메티오닌(methionine), 트립토판(tryptophan), 글루코스(glucose) 및 GABA(γ -aminobutyric acid)를 포함하는 간질환 진단용 마커에 관한 것이다.
- [0029] 일 구현예에서, 간질환은 간경변(liver cirrhosis), 간 섬유증(Liver fibrosis), 간부전(liver failure) 및 간염(hepatitis)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 간질환은 급성 간부전일 수 있으며, 간절제술 후 간부전인 것이 더욱 바람직하다.
- [0030] 일 측면에서, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA를 포함하는 간기능 검사용 마커에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 용어, “간질환 진단용 마커 또는 간기능 검사용 마커”란 간질환의 발병 위험도를 예측/진단하거나 간기능의 상향 및 하향 조절을 판단할 수 있는 물질로, 간질환의 발생 가능성 또는 간기능과 유의미한 상관관계를 가지고 시료 내 수준이 증가 또는 감소하는 양상을 보이는 아미노산, 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0032] 일 측면에서, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0033] 일 구현예에서, 간질환은 간경변, 간 섬유증, 간부전 및 간염으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 간질환은 급성 간부전일 수 있으며, 간절제술 후 간부전인 것이 더욱 바람직하고, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 발생하는 간부전인 것이 가장 바람직하다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 간기능 검사용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 조성물은 간절제술 수술 후 48시간 이내에 발생하는 간기능부전을 확인할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어, “검출” 또는 “측정”은 검출 또는 측정 여부 및, 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.
- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 간질환 진단용 조성물을 포함하는, 간질환 진단 키트에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에서 용어, “간질환 진단 키트”는 간질환 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “간질환 진단 키트”는 “간질환 진단용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다. 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 대상의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 대상의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0039] 일 측면에서, 본 발명은 간기능 검사용 조성물을 포함하는, 간기능 검사 키트에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 용어, “간기능 검사 키트”는 간기능 검사용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 따라서, 상기 표현 “간기능 검사 키트”는 “간기능 검사용 조성물”과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다.
- [0041] 일 구현예에서, 상기 키트는 대상체 또는 환자로부터 생체 시료를 수집하기 위한 도구 및/또는 시약 뿐 아니라 그 시료로부터 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA를 준비하기 위한 도구 및/또는 시약을 더 포함할 수 있다.
- [0042] 일 측면에서, 본 발명은 대상체로부터 분리된 시료에서 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간질환 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0043] 일 구현예에서, 측정한 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 1에 대입하여 나온 수치 X가 -46.41 내지 -5.16 이상이면 간질환인 것으로 판단할 수 있다:

수학식 1

$$X = -a * (\text{포도당}) + b * (\text{말산}) + c * (\text{메티오닌}) - d * (\text{트립토판}) - e * (\text{GABA}) - f$$

[0044]

[0045]

상기에서, a: 4.32-38.85; b: 1.98-17.79; c: 0.82-7.38; d: 2.52-22.71; e: 3.98-35.79; 및 f: 2.45-22.02.

[0046]

일 구현예에서, 측정된 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 2에 대입하여 나온 수치 X가 -15.47 이상이면 간질환인 것으로 판단할 수 있다:

[0047]

[수학식 2]

$$X = -12.95 * (\text{포도당}) + 5.93 * (\text{말산}) + 2.46 * (\text{메티오닌}) - 7.57 * (\text{트립토판}) - 11.93 * (\text{GABA}) - 7.34$$

[0048]

[0049]

일 구현예에서, 간질환은 간절제술 후 간부전일 수 있다.

[0050]

일 구현예에서, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정할 수 있다.

[0051]

일 측면에서, 본 발명은 대상체로부터 분리된 시료에서 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 간기능 검사 방법에 관한 것이다.

[0052]

일 구현예에서, 일 구현예에서, 측정된 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 1에 대입하여 나온 수치 X가 -46.41 내지 -5.16 이상이면 간기능 저하인 것으로 판단할 수 있다:

[0053]

[수학식 1]

$$X = -a * (\text{포도당}) + b * (\text{말산}) + c * (\text{메티오닌}) - d * (\text{트립토판}) - e * (\text{GABA}) - f$$

[0054]

[0055]

상기에서, a: 4.32-38.85; b: 1.98-17.79; c: 0.82-7.38; d: 2.52-22.71; e: 3.98-35.79; 및 f: 2.45-22.02.

[0056]

일 구현예에서, 측정된 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 하기 수학식 2에 대입하여 나온 수치 X가 -15.47 이상이면 간기능 저하인 것으로 판단할 수 있다:

[0057]

[수학식 2]

$$X = -12.95 * (\text{포도당}) + 5.93 * (\text{말산}) + 2.46 * (\text{메티오닌}) - 7.57 * (\text{트립토판}) - 11.93 * (\text{GABA}) - 7.34$$

[0058]

[0059]

일 구현예에서, 간절제술 수술 후 48시간 이내에 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정할 수 있다.

[0060]

일 구현예에서, 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있으며, 혈액인 것이 더욱 바람직하다.

[0061]

일 측면에서, 본 발명은 간부전 환자에게 후보 물질을 투여하고 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준을 측정하여 상기 수학식 2에 대입하여 도출된 수치 X를 확인하는 단계; 및 X가 -15.47 미만인 경우, 상기 후보물질을 효과적인 간질환 치료제 또는 간기능 개선제로 판단하는 단계를 포함하는, 간질환 치료제 또는 간기능 개선제 후보 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0062]

일 측면에서, 본 발명은 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준 측정부; 및 간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 예측 연산부를 포함하는 간질환 또는 간기능 저하 위험도 예측 장치 또는 시스템에 관한 것이다.

[0063]

일 구현예에서, 간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 예측 연산부는 상기 수학식 2에 의해 연산될 수 있다.

[0064]

일 구현예에서, 간질환 발병 또는 간기능 저하 위험도 X가 -15.47 이상일 경우 간질환이 발병되거나 간기능이 저하된 것으로 판단할 수 있다.

[0065]

일 구현예에서, 상기 말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준은 간절제술 수술 후 48시간 이내의

말산, 메티오닌, 트립토판, 글루코스 및 GABA의 수준일 수 있다.

[0067] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0069] **실시예 1. 간절제 후 간부전 동물모델 제작**

[0070] 2-3개월된 국내 암컷 요크셔-랜드 및 듀록 교배종 돼지 (35-40kg) 20마리를 하기의 3개 군으로 나누었다: sham 수술군 (n=6), 수술 후 회복을 예상하는 70% 간절제군 (n=7) 및 수술 후 간부전으로 가는 90% 간절제 군 (n=7). 70% 및 90% 간절제술은 Hori, T., *et al. Surg. Today* 44, 2201-2207 (2014).에 개시된대로 수행하였고, 수술 전 8시간 동안 돼지를 금식시키고 간절제술 48시간 후 안락사시켰다. 간절제술은 간-담도-췌장 외과의사가 수행하였으며, 혈액 시료를 간절제술 전 및 후 1, 6, 14, 30, 38 및 48 시간에 개복술 전 경정맥을 통해 삽입한 중심정맥카테터를 통해 수득하고 혈액 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), 총 빌리루빈(bilirubin), 및 대사산물 수준 및 프로트롬빈 시간(prothrombin time, PT)을 연속 측정하였다.

[0071] 그 결과, 총 빌리루빈 수준 (mg/dL)은 수술 38 및 48시간 후 90% 절제군에서 현저히 높게 나타났고 (각각, $P=0.0014$ 및 $P=0.0002$), AST 수준 (IU/L)도 수술 22, 30, 38 및 48시간 후 현저히 높게 나타났다 (각각, $P=0.015$, $P=0.0128$, $P=0.0314$ 및 $P=0.0171$) (도 1). ALT 수준 (IU/L)은 수술 1, 30, 38 및 48시간 후 90% 절제군에서 현저히 높게 나타났고 (각각, $P=0.0453$, $P=0.0047$, $P=0.0002$ 및 $P<0.0001$), PT도 수술 14, 22, 30, 38, and 48 시간 후 90% 절제군에서 현저히 높게 나타났다 (각각, $P=0.0035$, $P=0.0017$, $P=0.0001$ 및 $P=0.0002$) (도 1).

[0073] **실시예 2. 간절제술 후 치사율에 따른 특징적인 대사 표현형 프로파일링**

[0074] **2-1. 1차 선별**

[0075] 간절제술 후 치사율에 특이적인 대사 표현형을 프로파일링하기 위해, gas chromatography time-of-flight mass spectrometry 분석을 수행하였다. 혈청 시료들을 4°C에서 해동시키고 50 μ L을 추출용매 750 μ L와 혼합하였다 (메탄올:이소프로판올:증류수, 3:3:2, v/v/v). 초음파 처리 및 원심분리 5분 후, 각 상등액 700 μ L를 새 1.5 mL 튜브에 소분하였다. 각 시료를 고속 진공농축기 (SCANVAC, Korea)를 이용하여 완전히 농축 건조하였다. 건조된 추출물을 건조된 추출물을 피리딘 (Thermo, USA)에 녹아있는 5 μ L의 40 mg/mL 메톡시아민 하이드로클로라이드(methoxyamine hydrochloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 및 45 μ L의 N-메틸-N-트리메틸실리트리플루오로아세트아마이드 (MSTFA + 1% TMCS; Thermo, USA)으로 유도체화하였다. 13가지 지방산 메틸 에스터 혼합물 (C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28 및 C30)을 내부 체류 지수(retention index) 마커로서 첨가하였다. RTX-5Sil MS 컬럼 (Restek, Gellefonte, PA, USA)이 장착된 Agilent 7890B 가스 크로마토그래피 (Agilent Technologies)를 이용하여 크로마토그래피 분리를 수행하였다. Chroma TOF software 4.50 version (LECO, St. Joseph, MI, USA)로 제어되는 LECO Pegasus HT time-of-flight 질량분석기에서 질량 분석을 수행하였다.

[0076] 상기의 GC-TOF MS(gas chromatography time-of-flight mass spectrometry)에 기반한 표적화하지 않은 대사 산물 프로파일링을 통해, 해당작용(glycolysis), TCA 사이클, 아미노산 대사 및 지방산 대사와 같은 1차 대사 경로를 커버하는 129개의 화합물을 선별하였다. 또한, PCA(principal component analysis)에 기반한 무감독다변량 통계(Unsupervised multivariate statistic)는 세 가지 주요 클러스터를 나타냈다. 90% 간절제술 군의 프로파일은 수술 전 및 sham 수술 대상과 명확하게 분리된 반면, 70% 간절제술 군의 프로파일은 수술 전 및 sham 수술군과 비교적 유사하게 나타났다 (도 2).

[0078] **2-2. 2차 선별**

[0079] 상기에서 1차 선별된 화합물들을 추가 통계 분석하기 위해, 수술 전 대사 산물 수준에 대한 데이터를 조정하였다. 구체적으로, 임상 설정 (총 빌리루빈, AST, ALT 및 PT)에서 평가된 종래의 생화학적 마커들을 다중비교(multiple comparison)를 위한 조정을 위해 각 시점에 Tukey-Kramer 검정과 LMM(linear mixed model) 및

ANOVA를 이용하여 비교하였다. 질량 분석 데이터 전처리는 데이터 수집시 Chroma TOF 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 피크 정점 질량값(Peak apex mass values), 전체 스펙트럼값(entire spectrum values), 체류 시간(retention time), 피크 순도(peak purity) 및 신호-대-노이즈 비율(signal-to-noise ratio)을 획득하였다. 전처리는 크로마토그램 검증, 1차 RI 검출 및 계산, 및 정량 질량 검증을 포함하는 BinBase 알고리즘에 기반하여 수행하였다. 정량값들을 단일 정량 질량(quant mass)의 피크 높이에 기반하여 계산하였다. 결측값(Missing values replacement) 교체는 포스트-매칭(post-matching) 및 교체를 위해 미가공 데이터를 처리하는 BinBase 알고리즘에 기반하여 수행되었다. 품질 관리 목적으로, 33개의 순수한 기준 화합물의 혼합물을 10개의 시료마다 분석하였으며, 이를 통해 분석 동안의 재현성을 보장하였다. 또한, 대사 데이터를 NOREVA (<http://idrb.zju.edu.cn/noreva/>)에서 실행된 MSTUS 방법을 기반으로 정규화하였다(normalized). 그 후, 정규화된 데이터를 수술 전 대사 산물 수준에 따라 조정하였고, sham 수술군, 70% 간절제술군 및 90% 간절제술군에 대해 선형 그래프를 도출하였다. SIMCA 15 (Umetrics AB, Umea, Sweden)를 이용하여 PCA, OPLS-DA(orthogonal projection to latent structures-discriminant analysis) 및 VIP(variable importance in projection) 분석을 수행하였다. OPLS-DA 모델을 2-배, 3-배, 4-배 및 7-배 교차 검증에 기반하여 검증하였다. 단일변량 통계 분석은 Student's t-test (EXCEL, Microsoft Office 365)을 이용하여 수행하였다. FDR(false discovery rate)을 통제하기 위해 SAM(Significance analysis of microarray)을 적용하였다.

표 1

Time	Compounds	Up-regulation	Down-regulation
14h	48	25	23
30h	24	13	11
48h	46	12	34

[0080]

[0081]

수술 전 대사 산물 수준에 대한 데이터를 조정한 후, 90% 간절제술군에서 14시간차에 48개의 화합물, 30시간차에 24개의 화합물 및 48시간차에 46개의 화합물에서 현저한 차이가 관찰되었다 (표 1). 또한, 다변량 통계 모델을 이용하여 체계적으로 간절제술 후 치사율 (90% 간절제술군)에 특이적인(고유한) 대사 프로파일을 특성화한 결과, 모든 시점에서 생존군 (즉, sham 수술군 및 70% 간절제술군)과 구별되는 90% 간절제술군에 대한 판별 모델을 수립하였다. 또한, 7-배 교차 검증한 OPLS-DA에 기반하여, 높은 수준의 설명분산(explained variance) 및 예측가능성을 얻었다 (0.995 의 Q^2_Y 및 0.814 의 Q^2) (도 3). VIP 분석은 식별에 가장 많이 기여하는 변수를 우선순위화하였고 (도 4), 가장 높은 VIP 점수가 말릭산에서 관찰되었고, 이어서 시트르산, 자일리톨, 푸마르산, 포스페이트 및 토코페롤 알파로 나타났다. 대사 산물 (VIP 점수>1.2인 21개의 대사 산물)의 후속 경로 분석은 90% 간절제술군에서 Ala-Asp-Glu 대사, Arg-Pro 대사 및 TCA 사이클이 대사 조절 장애(metabolic dysregulation)와 가장 유의하게 관련되어 있음을 나타냈다 (도 5).

[0083]

실시예 3. 간절제술 후 간부전 특이적 바이오마커 선발

[0084]

최종 결과 (생존률 또는 치사율)를 예측할 수 있는 강력한 바이오마커를 설정하기 위해, 상기 실시예에서 선별한 21개의 대사 산물의 이원 로지스틱 회귀 분석(Binary logistic regression analysis)을 수행하였다. 구체적으로, 이원 로지스틱 회귀 분석 (전진 선택(forward selection))을 Windows용 IBM SPSS Statistics, 버전 25.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)을 이용하여 수행하였다. 정규성 검사를 위해 선형 변환된 변수에 대해 Kolmogorov-Smirnov 및 Shapiro-Wilk 검정을 Windows용 IBM SPSS Statistics, 버전 25.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)을 이용하여 수행하였다. 또한, 선발된 마커들을 이용한 예측 모델의 성능을 ROC 분석을 통해 확인하기 위해, Windows용 MedCalc, 버전 12.7.0.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium)을 이용하여 ROC 분석을 수행하였다. *MetaboAnalyst* (<https://www.metaboanalyst.ca/>)에서 실행된 초기화 함수(hypergeometric) 검정 및 상대적-매개 중심성(relative-betweenness centrality)에 기반하여 경로 ORA(over-representation analysis)를 수행하였다.

[0085]

다변량 분석을 통해 선택된 모든 변수에 대해 통계적 유의성을 나타내는 5가지 모델을 도출하였다. 권장 변수는

말산(malic acid), 메티오닌(methionine), 트립토판(tryptophan), 글루코스(glucose) 및 GABA(γ -aminobutyric acid)의 수준이다 (도 6A). 또한, stepwise ROC(receiver operating characteristic) Z커브 분석 결과, 예측 모델이 우수한 성능을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (도 7). 상기 선발한 5개의 대사 산물의 선형결합(linear combination)의 AUC(area under the curve)는 1.000 (95% 신뢰 구간: 0.940-1.000, 민감도: 100.0, 특이성: 94.87)이었다 (도 6B). 상기 마커들 (마커 패널)을 이용한 간절제술 후 치사율의 위험을 예측 모델을 결정하여 하기 수학적 2로 표시하였으며, 하기 수학적식을 통해 도출한 값 X가 >-15.47면 간절제술 후 간부전이고, 그 미만이면 정상이다.

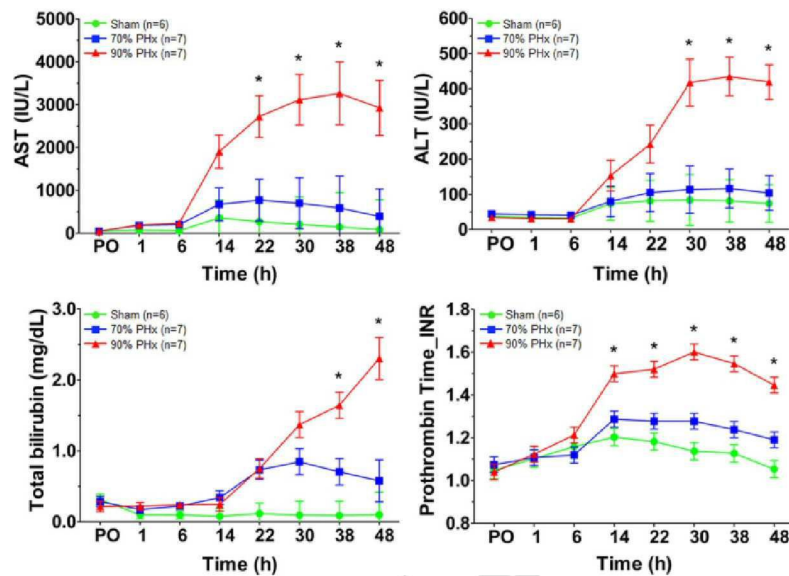
수학적식 2

$$X = -12.95 * (\text{포도당}) + 5.93 * (\text{말산}) + 2.46 * (\text{메티오닌}) - 7.57 * (\text{트립토판}) - 11.93 * (\text{GABA}) - 7.34$$

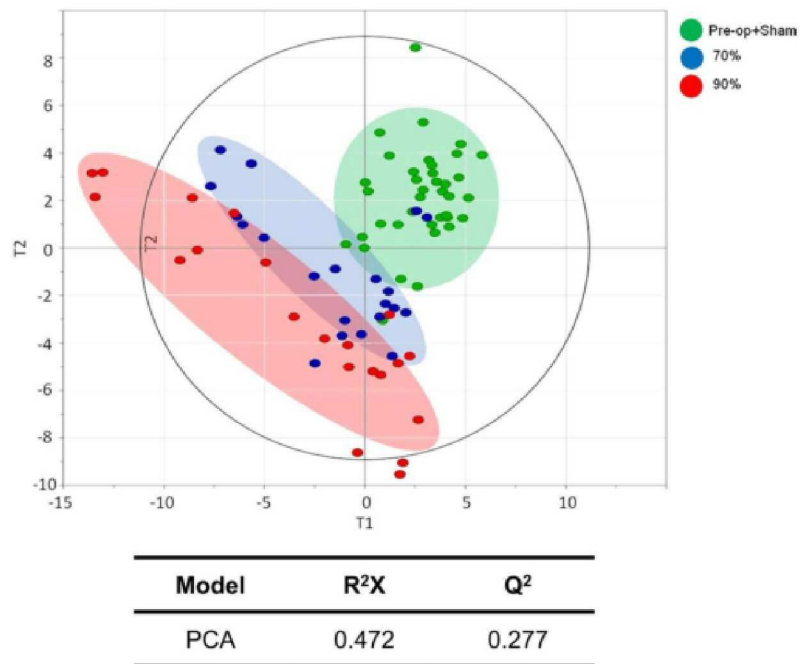
또한, 각 시점에서 치사율의 예측 가능성을 확인한 결과, 생존 그룹과 대조적으로 바이오마커 재구성 (recomposite) (수학적식 2 모델)이 간절제술 후 모든 단계에 걸쳐 90% 간절제술군에 대해 일관된 판별력을 나타냈다. 14, 30 및 48 시간 차에 AUC는 각각 0.989, 0.978 및 1.000였다. 이와 유사하게, 선형 재구성의 시간적 프로파일이 90% 간절제술군에서 모든 시점에 현저하게 높은 수준인 것으로 나타났다 ($p < 0.001$) (도 6C). 또한, ROC 커브 분석을 통해 본 발명의 바이오마커 패널의 예측력을 종래의 생화학 마커인 빌리루빈과 비교한 결과, 특히, 14시간의 초기 시점에서 본 발명의 대사 산물 바이오마커 특징의 우수성이 나타났다 (도 7). 아울러, 모든 시점 동안 비율 (생존군에 대한 90% 간절제술군)이 종래의 마커에 비해 본 발명의 바이오마커 패널이 더욱 극적인 차이를 나타냈다 (도 6D).

도면

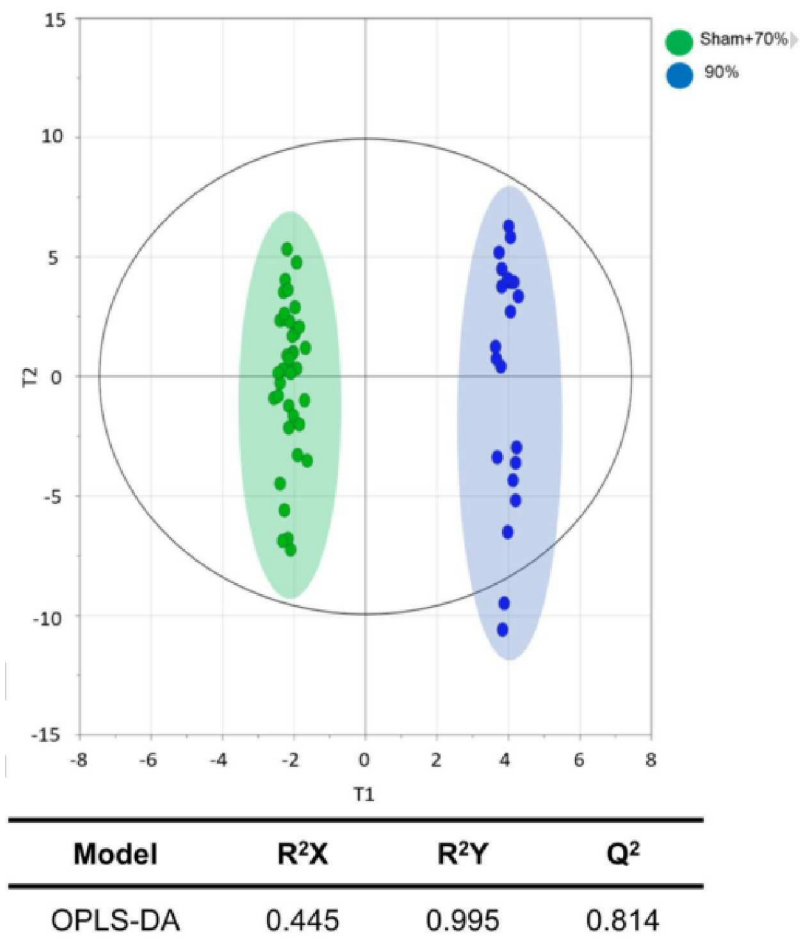
도면1



도면2



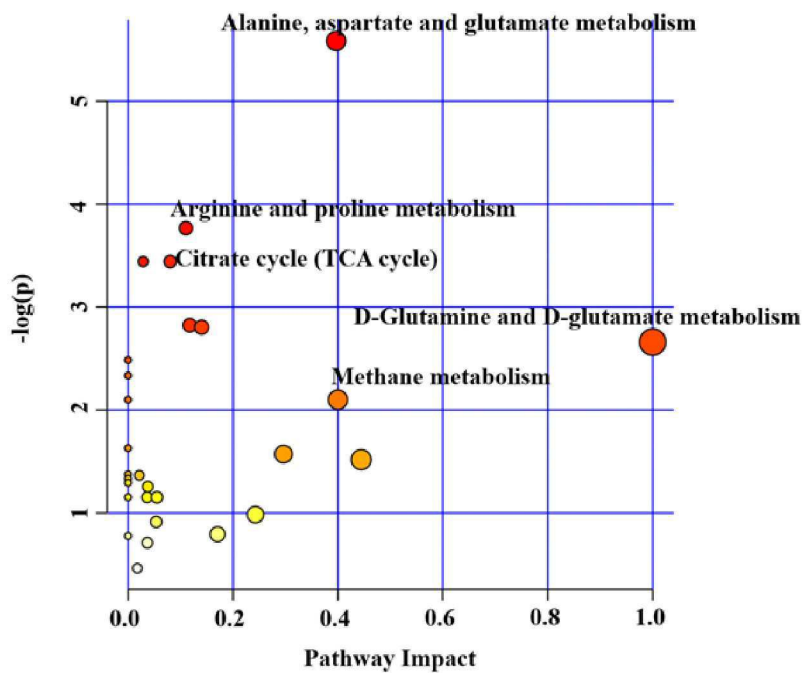
도면3



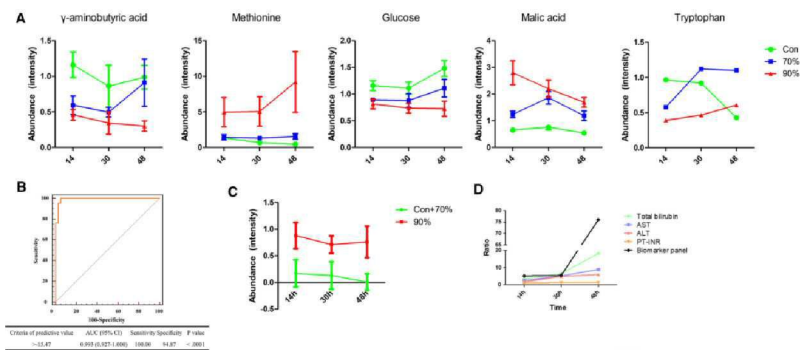
도면4

Compounds	VIP Score
Malic acid	1.80
Citric acid	1.73
Xylitol	1.70
Fumaric acid	1.67
Phosphate	1.62
Tocopherol alpha	1.50
Threonic acid	1.49
Serine	1.47
Cholesterol	1.43
lactic acid	1.43
Methionine	1.41
Thymine	1.38
β -alanine	1.35
Glucose	1.35
Ribitol	1.34
γ -aminobutyric acid	1.33
Xanthosine	1.33
Tryptophan	1.31
Oxalic acid	1.30
Xanthine	1.28
Glutamate	1.23

도면5



도면6



도면7

		Biomarker		PT	
		Bilirubin	PT	+	+
		Bilirubin		bilirubin	
14h		0.989	0.692	0.956	1.000
		SN:100.00 SP:92.31	SN:71.43 SP:61.54	SN:85.71 SP:82.31	SN:100.00 SP:100.00
30h		0.978	0.890	1.000	1.000
		SN:100.00 SP:92.31	SN:100.00 SP:84.62	SN:100.00 SP:100.00	SN:100.00 SP:100.00
48h		1.000	0.923	1.000	1.000
		SN:100.00 SP:100.00	SN:100.00 SP:84.62	SN:100.00 SP:100.00	SN:100.00 SP:100.00
All time		0.993	0.805	0.976	1.000
		SN:100.00 SP:94.87	SN:66.67 SP:84.62	SN:100.00 SP:84.62	SN:100.00 SP:100.00