(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0171298
(43) 공개일자 2023년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6803 (2013.01)
G01N 2800/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0071695
(22) 출원일자 2022년06월13일
심사청구일자 2022년06월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
조은경
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
전상민
대전광역시 중구 오류로 16, 나이스타운 808호(오류동)
어형진
미국 캘리포니아주 로스앤젤레스시 조날 에비뉴 1975번지
(74) 대리인
김원준

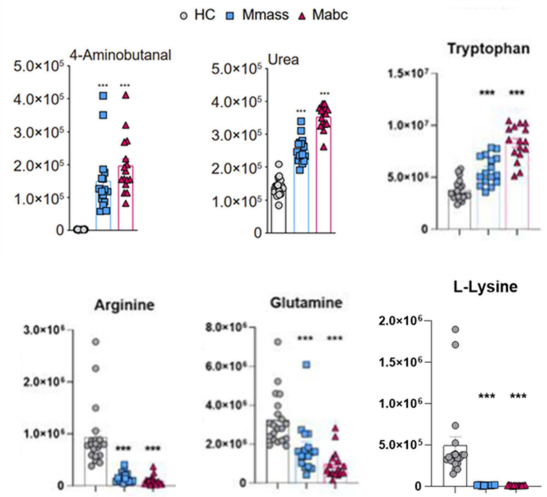
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **비결핵 항산균 감염여부 진단을 위한 정보제공방법 및 진단용 키트**

(57) 요 약

본 발명은 비결핵 항산균 폐질환 의심 환자가 비결핵 항산균에 의한 감염 질환인지를 신속하게 확인하기 위한 정보제공방법과 진단용 키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 비결핵 항산균 폐질환 의심 환자의 혈액 중의 아르기닌, 글루타민, 라이신, 트립토판, 유레아 및 4-아미노부탄알로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 비결핵 항산균 감염여부 진단을 위한 정보제공방법과, 아르기닌, 글루타민, 라이신 및 트립토판으로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 장치를 포함하는, 비결핵 항산균 감염여부 진단용 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169233
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

비결핵 항산균 폐질환 의심 환자의 혈액 중의 아르기닌, 글루타민, 라이신, 트립토판, 유레아 및 4-아미노부탄알로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 비결핵 항산균 감염여부 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

4-아미노부탄알 및 라이신의 농도를 측정하는 것을 포함하는, 비결핵 항산균 감염여부 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 3

아르기닌, 글루타민, 라이신, 트립토판, 유레아 및 4-아미노부탄알로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 장치를 포함하는, 비결핵 항산균 감염여부 진단용 키트.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 장치는, 4-아미노부탄알 및 라이신의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 비결핵 항산균 감염여부 진단용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비결핵 항산균 폐질환 의심 환자가 비결핵 항산균에 의한 감염 질환인지를 신속하게 확인하기 위한 정보제공방법과 진단용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비결핵 항산균(non-tuberculous mycobacteria; NTM)에 의한 감염의 발생률, 유병률 및 사망률은 전 세계적으로 급속히 증가하고 있다. 비결핵 항산균성 폐질환(NTM pulmonary diseases; NTM-PDs)은 NTM 감염의 가장 빈번한 임상 증상으로, 느리게 성장하는 *Mycobacterium avium* (Mav) 복합체와 빠르게 성장하는 *M. abscessus* 복합체에 의해 발생한다.

[0003] 일반적으로, NTM-PD에 대한 치료 기간은 12개월 이상으로, 본래적 또는 획득된 항생제 내성으로 그 치료과정이 복잡하고 집중적인데 반해 결과가 좋지 않은 경우가 많다. 최근 전세계적으로 비결핵 항산균에 기인한 폐 감염 보고가 증가하고 있어 비결핵 항산균 폐 감염 질환자를 신속하게 구별하기 위한 방법이나 바이오마커에 관한 연구가 요청되고 있다.

[0004] 등록특허 10-2270398(비결핵 항산균에 의한 감염 질환을 구별하기 위한 바이오마커)은 대상체에게 발병한 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 종류를 구별 진단하기 위한 바이오마커와, 상기 구별 진단을 위한 키트 또는 구별 진단 방법에 관한 것이다. 그러나 이 문헌은 그 실시예에 명확하게 기재되어 있듯이, 사전에 "마이코박테리움 아비움 복합체(*Mycobacterium avium* complex) 감염"이라는 것이 확인된 상태에서 폐 질환, 림프절염, 피부·

연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등 관련 질환들 중 구체적으로 어떤 질환인지를 구별하여 진단하는 바이오 마커에 관한 것이다.

[0005] 미국등록특허 US 8580490(Markers for screening anti-mycobacterial treatment efficacy)은 아르기닌 유도체 등 대사체 농도 변화로부터 결핵의 치료 효과를 확인하는 마커에 관한 것이다. 그러나 이는 비결핵 항산균 감염 여부의 진단에 관한 것이 아니라 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex) 감염에 의한 결핵의 치료효과를 확인하기 위한 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 10-2270398

(특허문헌 0002) US 8580490

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 비결핵 항산균 감염 여부를 신속하고 정확하게 확인할 수 있는 방법 및 이를 위한 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 비결핵 항산균 폐질환 의심 환자의 혈액 중의 아르기닌, 글루타민, 라이신, 트립토판, 유레아 및 4-아미노부탄알로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 비결핵 항산균 감염여부 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0009] 이때 본 발명은, 4-아미노부탄알 및 라이신의 농도를 측정하는 것을 반드시 포함하는 것이 바람직하다.

[0010] 본 발명은 또한 아르기닌, 글루타민, 라이신 및 트립토판으로 이루어지는 군에서 하나 또는 둘 이상의 농도를 측정하는 장치를 포함하는, 비결핵 항산균 감염여부 진단용 키트에 관한 것이다.

[0011] 이때 상기 장치는, 4-아미노부탄알 및 라이신의 농도를 측정하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 이상과 같이 본 발명에 의하면 신속하고 간편하며 경제적으로 비결핵 항산균(NTM) 감염 여부를 확인할 수 있다. 이에 따라 의료진이 환자에게 적절한 처치를 조기에 진행할 수 있게 되어 비결핵 항산균(NTM) 감염에 의한 피해를 최소화할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a는 본 발명의 실시예에서 수행한 대사체 군집의 히트맵 도면.

도 1b는 본 발명의 실시예에서 대사체 군집 분석 결과 건강인 대조군과 비결핵 항산균 감염 환자 혈청간 대사체 변화를 보여주는 그래프.

도 1c는 본 발명의 실시예에서 대사체 군집 분석 결과 비결핵 항산균 환자군과 건강인 대조군 간 대사체들의 평균 존재 분포도.

도 2는 비결핵 항산균 환자나 건강인 대조군 개개인의 혈청에서 유의적 발현차이를 보이는 대사체의 농도 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나

변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0015] 본 발명자들은 건강한 사람과 비결핵 항산균 폐 감염 질환자 혈청의 대사체 분석을 통해 다음을 확인하였다.

[0016] ⓐ NTM-PD 환자에서 4-아미노부탄알, 유레아, 트립토판 농도가 유의적으로 증가함

[0017] ⓑ NTM-PD 환자에서 아르기닌, 글루타민, 라이신 농도가 유의적으로 감소함

[0018] 본 발명은 이러한 발견에 기초한 것으로서, 아르기닌, 글루타민, 라이신, 트립토판, 유레아, 4-아미노부탄알을 바이오마커로 활용하여 잠재적 환자로부터 신속하고 정확하게 비결핵 항산균 감염 여부를 확인할 수 있는 방법 및 진단용 키트에 관한 것이다.

[0019] 아래 실시예에서는 대사체 농도를 측정하기 위한 시료로 혈청을 사용하였으나 전혈 또는 혈장을 시료로 할 수도 있다. 또한 정확한 측정을 위해 예를 들면, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등의 전처리 단계가 추가될 수도 있다.

[0020] **[실시예]**

[0021] **1. 혈청을 대상으로 한 대사체 분석**

[0022] 비결핵 항산균의 종류에 따라 *M. abscessus* 환자군(Mabc ; n=16), *M. massiliense* 환자군(Mmass ; n=16)과 건강인 대조군(HC ; n=20) 혈청의 비표적 대사체 분석을 진행하였다.

[0023] 대사체의 군집 변화를 비중심 Pearson's 상관법과 중심 연결 군집분석을 통해 분석하고 MetaboAnalyst (v5.0)로 도식화하여 도 1a에 도시하였다. 도면에서 행(raw)은 시험군의 각 개체이며, 열(column)은 분석된 207종의 대사체(대사체의 명칭은 도시 생략)이다. 도면에서 데이터는 $\log_2$ scale이다. Clustered Heatmap은 대사체들을 변수로 하여 어떻게 이 변수들이 각 조건들 사이에서 얼마나 독립적으로 비슷한지 아니면 다른 지를 평가할 수 있는 방법이다.

[0024] 이를 바탕으로 한 2차원 주성분 분석결과, 건강인 대조군과 비결핵 항산균 환자군의 대사 작용이 다른 변화를 나타냄을 확인하였다(도 1b 참조).

[0025] Metlin 데이터베이스(http://metlin.scripps.edu)를 토대로 비결핵 항산균 질환 환자와 건강인 간 대사체 상관관계를 Fold chain 분석과 표적 대사체 분석을 통하여 규명하였다. 그 결과, Tryptophan을 비롯한 124개의 대사체가 유의하게 증가한 반면, arginine과 glutamine 를 포함하는 23개의 대사체가 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 1c 참조). 도면은 Log fold change의 산점도를 통하여 비결핵 항산균 환자군과 건강인 대조군 간 대사체들의 평균 존재 분포도 즉, 대사체들의 양적인 차이를 도표화 한 것이다. 유의하게 증가한 대사체(Up)는 빨간색, 감소한 대사체(down)는 파란색, 차이가 없는 것(Unsig)은 회색 점으로 표현하였다. 환자군과 정상인 대조군 그룹 간에 특정 대사체들의 전체적인 대사반응이 다름을 확인할 수 있다.

[0026] **2. 바이오마커의 선정**

[0027] 대사체 분석을 통해 혈장 중의 수준에 유의한 증가나 감소가 나타나는 147개 대사체 중 혈장 중 절대 농도가 높고 환자군과 건강인 대조군 사이의 편차가 큰 대사체를 선별하였다.

[0028] 그 결과 유의하게 증가하는 대사체 중에서는 4-아미노부탄알(4-aminobutanal), 유레아(urea) 및 트립토판(tryptophan)이, 유의하게 감소하는 대사체 중에서는 아르기닌(arginine), 글루타민(glutamine) 및 라이신(lysine)이 선정되었다.

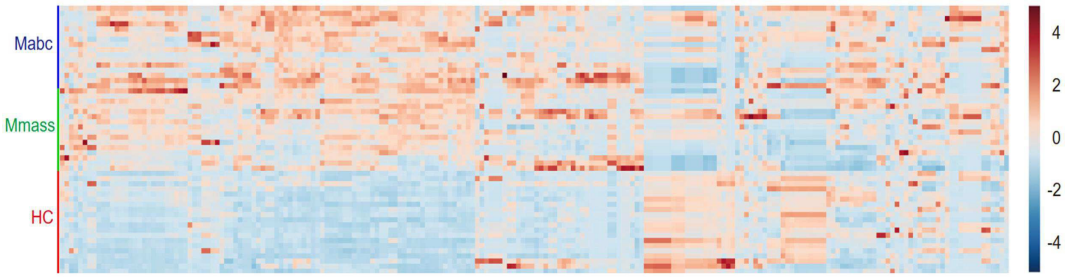
[0029] 이들 6종의 대사체에 대한 비결핵 항산균 환자와 건강인 대조군 개개인의 혈장내 농도를 도 2에 도시하였다. 도면에서 막대그래프는 대사체 군집의 크기를 나타내며, ion count (y축)로 개개인을 표현하였다. (통계 방법은 Students' t-test 검정을 이용, ***, P<0.001로 표현함)

[0030] 도 2에서 볼 수 있듯이 4-아미노부탄알, 유레아, 트립토판, 아르기닌 및 글루타민이 비결핵 항산균 감염 환자에서 그 발현이 유의적으로 증가하거나 감소하는 것을 확인하였다.

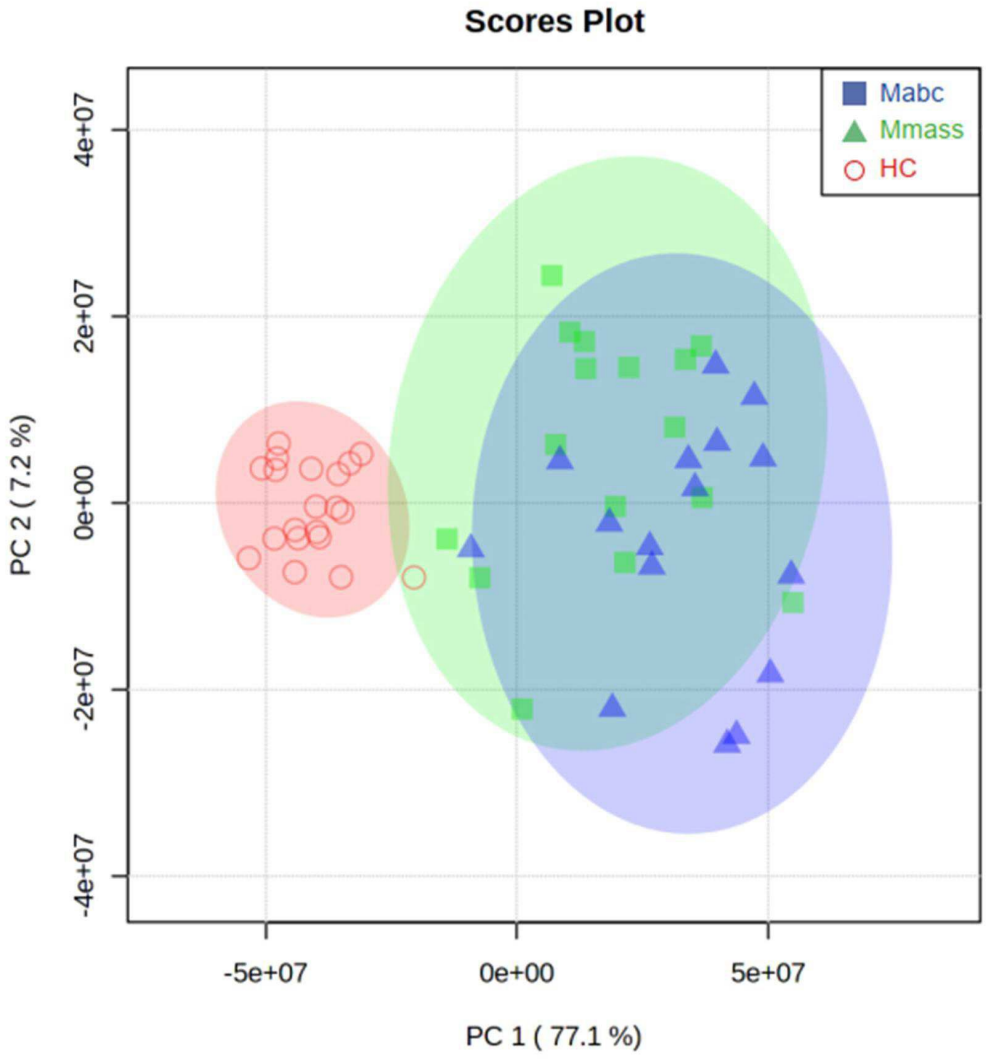
[0031] 이상의 결과를 종합하면 이들 대사체가 비결핵 항산균 환자의 진단 바이오마커로써 활용될 수 있음을 의미한다. 특히 아미노부탄알과 라이신은 환자군과 대조군 사이에 농도차이가 명확하면서 개체간 농도 겹침이 나타나지 않기 때문에 비결핵 항산균 감염 여부를 확인하는 바이오마커로 매우 유용할 것이다.

도면

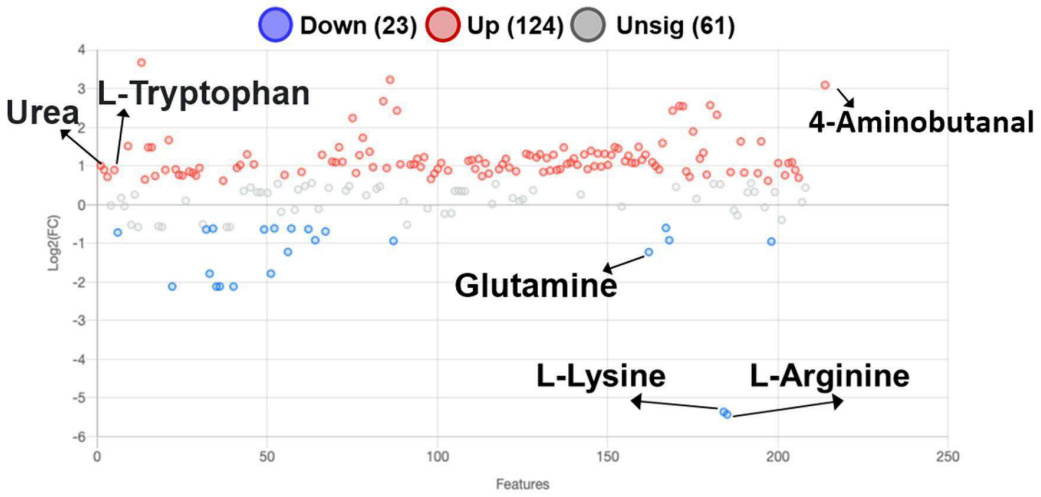
도면1a


Mabc
Mmass
HC
4
2
0
-2
-4

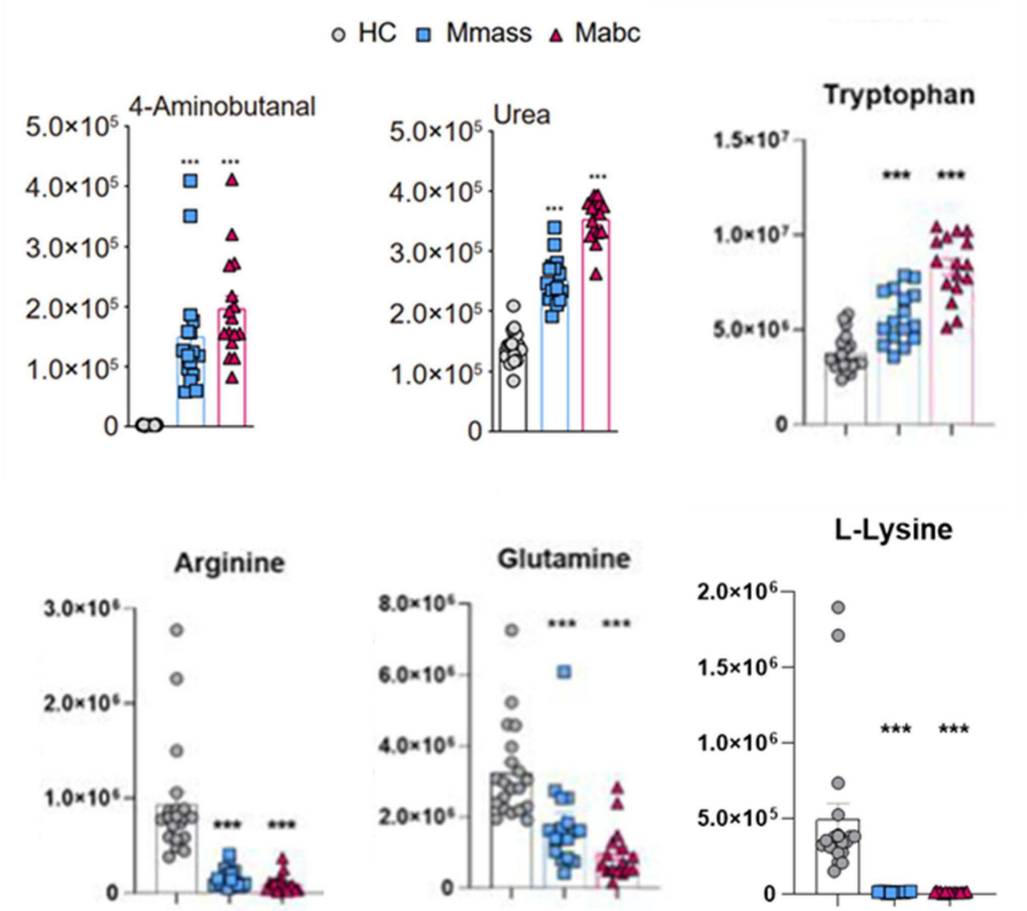
도면1b


Scores Plot
Mabc
Mmass
HC
PC 2 (7.2 %)
4e+07
2e+07
0e+00
-2e+07
-4e+07
-5e+07
0e+00
5e+07
PC 1 (77.1 %)

도면1c


Down (23)
Up (124)
Unsig (61)
Urea
L-Tryptophan
4-Aminobutanal
Glutamine
L-Lysine
L-Arginine
Log2(FC)
Features

도면2


HC
Mmass
Mabc
4-Aminobutanal
Urea
Tryptophan
Arginine
Glutamine
L-Lysine