



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0026097
(43) 공개일자 2023년02월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/74 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 33/74 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0108065

(22) 출원일자 2021년08월17일

심사청구일자 2021년08월17일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

전진평

경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)

김봉준

강원도 춘천시 교동길 50

윤동혁

충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

(74) 대리인

김남혁

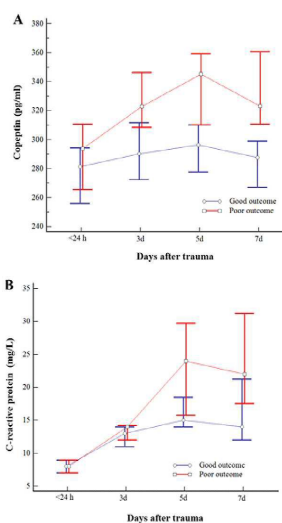
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 코뮬틴의 농도를 이용한 외상성 뇌 손상의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 코뮬틴(copeptin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단용 정보제공 방법, 치료제 스크리닝 방법 및 진단 장치에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2410/04 (2013.01)
 G01N 2500/00 (2013.01)
 G01N 2800/048 (2013.01)
 G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345322048
과제번호	2020R1I1A3070726
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2025.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

코펩틴(copeptin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI)의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

C-반응성 단백질(CRP)을 검출할 수 있는 제제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 키트.

청구항 5

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코펩틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코펩틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 상기 대조군의 코펩틴(copeptin) 수준을 비교하는 단계;를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 개체의 코펩틴(copeptin) 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 개체에서 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 코펩틴(copeptin) 수준이 상기 대조군에 비해 1.1 배 이상인

경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 혈중 코뮙틴(copeptin) 수준이 300pg/ml 이상인 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것인, 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료는 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 2일 내지 8일이 지난 개체로부터 수득한 것인, 방법.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)인, 방법.

청구항 12

외상성 뇌 손상(TBI) 모델에, 외상성 뇌 손상(TBI)과 관련된 후보 물질을 투여하는 단계; 및

상기 후보 물질의 투여에 따른 코뮙틴(copeptin) 수준을 확인하는 단계;를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 13

목적하는 개체의 코뮙틴(copeptin) 수준에 관한 정보를 수신하는 수신부; 및

상기 코뮙틴(copeptin) 수준이 기준치 이상인 경우, 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 연산부;를 포함하는, 진단 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코뮙틴(copeptin)을 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단용 정보제공 방법, 치료제 스크리닝 방법 및 진단 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 외상성 뇌 손상(traumatic brain injury; TBI)은 예측이 어렵고 불량한 예후를 특징으로 한다. 특히 외상성 뇌 손상(TBI)은 염증, 혈액뇌장벽(Blood-brain barrier; BBB) 파괴, 산화스트레스, 대사장애 악화 등 병리학적 반응으로 인한 2차 뇌 손상이 초기 뇌 외상보다 환자에게 더 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그 결과 고위험 외상성 뇌 손상(TBI) 환자의 질병 진행 및 악화를 조기에 감지하는 것은 매우 중요하다.

[0004] 따라서, 지금까지 질병 진행을 예측할 수 있는 가능성에 대해 여러 예후 바이오 마커가 탐색되었으나, 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후는 매우 이질적인 초기 손상 정도에 의해 크게 결정되므로, 바이오 마커에 대해 정의된 기

준을 마련하는 것이 어려울 수 있다. 이를 위하여 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후에 큰 영향을 미치는 요인에 대한 조정 및 중증도에 따른 분류가 필요하다. 글래스고 코마 스케일(Glasgow Coma Scale; GCS)에 따르면, 외상성 뇌 손상(TBI)의 중증도는 경증(mild: 13-15), 중등도(moderate: 9-12) 및 중증(severe: 3-8)으로 분류된다.

[0005] 그 중에서도 중등도 외상성 뇌 손상(TBI) 환자는 사망률과 중증 장애율이 낮지만 기능 회복이 불량하고 예상보다 예후가 악화될 가능성이 많다. 이는 중등도 외상성 뇌 손상(TBI) 환자의 80% 이상이 컴퓨터 단층촬영(CT)에서 비정상 소견을 보였고, 이 중 60%가 중환자실에 입원하였다는 연구 결과 및 중등도 외상성 뇌 손상(TBI) 환자에 대한 상기 응급 수술의 비율은 22% 이고, 지연된 수술의 비율은 14% 라고 보고된 연구 결과에서 뒷받침하고 있다.

[0006] 따라서, 중등도 외상성 뇌 손상(TBI) 환자 중 악화 위험이 높은 환자의 조기 발견을 위해 엄격한 환자 모니터링과 강력한 예후 바이오 마커를 식별해야 하나, 종래 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)에 대한 예후 바이오 마커는 예측의 정확도가 낮은 문제점이 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 아르기닌 바소프레신(arginine vasopressin; AVP)의 C-말단 부분인 코셉틴(copeptin)의 발현 수준을 분석하여 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후를 예측할 수 있는 진단용 조성물 및 진단을 위한 정보 제공방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1211280호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 코셉틴(copeptin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단용 정보제공 방법, 치료제 스크리닝 방법 및 진단 장치를 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 발명의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 발명의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 발명의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 코셉틴(copeptin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한 본 발명에서, C-반응성 단백질(CRP)을 검출할 수 있는 제제를 더 포함할 수 있다.

[0015] 또한 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코셉틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단을 위한 정보제공 방법을 제공할 수 있다.

[0018] 또한 본 발명에서, 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코셉틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 코셉틴(copeptin) 수준을 비교하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에서, 상기 개체의 코셉틴(copeptin) 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 개체를 외상성 뇌

손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

- [0020] 또한 본 발명에서, 상기 개체에서 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 코셉틴(copeptin) 수준이 상기 대조군에 비해 1.1 배 이상인 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명에서, 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 혈중 코셉틴(copeptin) 수준이 300pg/ml 이상인 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명에서, 상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료는 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 2일 내지 8일이 지난 개체로부터 수득한 것일 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 외상성 뇌 손상(TBI) 모델에, 외상성 뇌 손상(TBI)과 관련된 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 후보 물질의 투여에 따른 코셉틴(copeptin) 수준을 확인하는 단계;를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 치료제의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 목적하는 개체의 코셉틴(copeptin) 수준에 관한 정보를 수신하는 수신부; 및 상기 코셉틴(copeptin) 수준이 기준치 이상인 경우, 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 연산부;를 포함하는, 진단 장치를 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 코셉틴(copeptin)의 발현량을 검출하여 외상성 뇌 손상(TBI)을 진단할 수 있는 조성물, 이를 포함하는 진단용 키트 및 상기 조성물을 이용하여 외상성 뇌 손상의 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 특히 본 발명으로 중등도 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후를 높은 정확도로 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 중등도 내지 중증 TBI를 가진 환자를 선정하는 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2는 예후가 불량한 TBI 환자와 예후가 양호한 TBI 환자 간 혈중 코셉틴 수준 및 CRP 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 중등도 TBI 발생 후 7일차 코셉틴 수준을 측정할 경우 불량한 예후를 예측하는 정확도를 ROC 곡선으로 나타낸 것이다.
- 도 4는 중등도 TBI 발생 후 코셉틴과 CRP 간 예후 예측 정확도의 차이를 나타낸 것이다.
- 도 5는 중등도 TBI 발생 후 코셉틴과 다른 변수 간 예후 예측 정확도의 차이를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [0031] 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0032]
- [0033] 본 발명에서, 검출 내지 측정의 대상이 되는 바이오 마커인 "코셉틴(copeptin)"은 전구체인 바소프레신-뉴로피신 2-코셉틴(Vasopressin-neurophysin 2-copeptin, 서열번호 1)의 C-말단에서 유래된 39개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 포함하는 당단백질로서, 시상 하부의 뇌실 뉴런과 초상핵에서 주로 합성되며, 상기 코셉틴은 뇌하수체 후 분비 과립에 저장되고, 삼투성 자극에 의해 방출되는 것이다.

- [0034] 본 발명에서, 검출 내지 측정의 대상이 되는 바이오 마커인 "C-반응성 단백질(C reactive protein; CRP)"은 서열번호 2와 같은 아미노산 배열로 구성된 단백질로서, 염증(inflammation) 발생시 간에서 생합성되고 혈액으로 분비되는 단백질이다. 상기 C-반응성 단백질(CRP)는 링구조(ring-shaped)의 오량체 단백질(pentameric protein)로 존재하고, 생체 내에서 염증 반응시 혈중 농도가 급격하게 증가하기 때문에 염증 관련 질환의 임상적인 진행 양상을 알 수 있다.
- [0035] 본 발명에서, 진단의 대상이 되는 "외상성 뇌 손상(traumatic brain injury; TBI)"은 머리에 충격이 비교적 약하게 가해졌을 때, 주로 부종과 출혈과 같은 육안적 구조 변화는 초래되지 않았으나, 물리적 충격으로 인한 뇌의 동시 다발적인 신경세포들의 기능이상으로 일시적으로 뇌 기능이 감소 내지 소실되는 것을 의미한다. 상기 외상성 뇌 손상(TBI)의 중증도는 글래스고 코마 스케일(Glasgow Coma Scale; GCS)에 의하여 경증(mild: 13-15), 중등도(moderate: 9-12) 및 중증(severe: 3-8)으로 분류되는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 용어 "마커" 내지 "바이오 마커"는 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있는 것이다.
- [0037] 본 발명에서, 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 예측 내지 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 외상성 뇌 손상(TBI)의 중증도 내지 예후를 판별하는 것이고, 바람직하게는 중증도의 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 개체의 3개월 이후의 예후, 바람직하게는 6개월 이후의 예후를 확인하는 것이다.
- [0038] 본 발명에서, 용어 "검출"은 검출하고자 하는 바이오 마커의 존재 여부, 생물학적 시료 내의 농도, 발현 수준 등을 측정하고 비교하기 위한 것일 수 있고, 상기 검출 결과 바이오 마커 수준의 증가는 상기 바이오 마커를 인코딩하는 유전자의 수의 증가, 유전자 전사의 증가(예를 들어, 구성성 프로모터의 제어 하에 유전자를 배치함으로써), 유전자의 번역의 증가, 경쟁 유전자의 낙아웃 또는 이들 및/또는 다른 방법의 조합을 포함하는 다수의 방법에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 증가로 이어질 수 있다. 반면, 바이오 마커 수준의 감소는 유전자 수의 감소, 유전자의 전사의 감소, 경쟁 유전자의 발현 등에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 감소로 이어질 수 있다. 일 예로, 개체의 코셉틴(copeptin) 수준이 대조군보다 높다는 것은, 상기 개체로부터 유래된 시료에 포함된 코셉틴(copeptin)이 대조군으로부터 유래된 시료에 포함된 코셉틴(copeptin)보다 농도가 높거나, 양이 많은 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 바이오 마커들을 검출하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 바이오 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩티드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 코셉틴(copeptin) 또는 C-반응성 단백질(CRP)과 같은 바이오 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다.
- [0041] 본 발명의 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다.

DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩티드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254(5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0043] 본 발명에서 상기 "앱타머"는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 앱타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 바이오 마커들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩티드 등을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall Gene Therapy (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오타이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다. 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛 간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 검출은 혈액 내지 혈장 내 검출 내지 측정의 대상이 되는 바이오 마커의 농도 내지 수준을 확인하는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 용어 "키트"는 바이오 마커 성분에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 항체를 검출 가능한 표지로 표지하여 바이오 마커의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브 또는 항체 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다. 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 예후 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으나, DNA를 분석하기 위한 것이라면 제한없이

포함될 수 있다.

- [0051] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 상기 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 상기 키트는 고정체를 더 포함할 수 있고, 상기 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC(로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌디아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단백질들의 존재 유무를 검출한다.
- [0056] 본 발명의 상기 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H2SO4)이 바람직하게 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명에서, 용어 "개체"는 뇌동맥류가 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에서, 용어 "시료" 내지 "생물학적 시료"는 외상성 뇌 손상(TBI)가 발생하거나 발생한 것으로 의심되는 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서, 용어 "대조군"은 외상성 뇌 손상(TBI)이 발병되지 않은 일반 개체, 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 개체 전체 개체군 또는 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 개체 중 양호한 예후를 보이는 개체군을 의미하는 것일 수 있다.

- [0060]
- [0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 코셉틴(copeptin)을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI)의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0062] 본 발명에서, 상기 조성물은 C-반응성 단백질(CRP)을 검출할 수 있는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0064] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 명세서의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0065]
- [0066] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물을 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단용 키트를 제공하는 것일 수 있다.
- [0067] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 진단용 조성물에 대한 기재 및 그 밖의 명세서의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0068]
- [0069] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코셉틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0070] 본 발명에서, 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 코셉틴(copeptin) 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 코셉틴(copeptin) 수준을 비교하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서, 상기 개체의 코셉틴(copeptin) 수준이 상기 대조군보다 높은 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서, 상기 개체에서 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 코셉틴(copeptin) 수준이 상기 대조군에 비해 1.1 배 이상인 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명에서, 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 혈중 코셉틴(copeptin) 수준이 300pg/ml 이상인 경우, 상기 개체를 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료는 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 2일 내지 8일이 지난 개체로부터 수득한 것일 수 있다.
- [0075] 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0076] 본 발명에서, 상기 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, C-반응성 단백질(CRP) 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0077] 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0078] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 진단용 조성물, 진단용 키트에 대한 기재 및 그 밖의 명세서의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0079]
- [0080] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 외상성 뇌 손상(TBI) 모델에, 외상성 뇌 손상(TBI)과 관련된 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 후보 물질의 투여에 따른 코셉틴(copeptin) 수준을 확인하는 단계;를 포함하는, 외상성 뇌 손상(TBI) 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명에서, “외상성 뇌 손상(TBI) 모델”이란 인간을 제외한 동물로서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)의 병리학 적 상태에 있다고 통상의 기술자가 판단할 수 있는 상태에 있는 동물을 의미한다.
- [0082] 본 발명에서, 상기 모델에 외상성 뇌 손상(TBI)과 관련된 후보 물질을 투여하기에 앞서, 본 발명의 바이오 마커를 검출하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서, “후보 물질”은 외상성 뇌 손상(TBI) 환자에 적용하여 예후를 호전시키거나 이롭게 변경할 수 있는 물질을 제한없이 포함될 수 있고, 상기 후보 물질은 천연 물질뿐만 아니라 합성 물질을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0084] 본 발명에서, 상기 코펩틴(copeptin) 수준이 상기 후보 물질이 처리되기 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 물질을 외상성 뇌 손상(TBI)에 대한 예방 또는 치료용 약제로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 코펩틴(copeptin) 수준은 상기 모델에 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 2일 내지 8일이 지난 후 측정된 것일 수 있다.
- [0085] 본 발명에서, 상기 C-반응성 단백질(CRP) 수준이 상기 후보 물질이 처리되기 전에 비하여 감소한 경우 상기 후보 물질을 외상성 뇌 손상(TBI)에 대한 예방 또는 치료용 약제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 C-반응성 단백질(CRP) 수준은 상기 모델에 외상성 뇌 손상(TBI)이 발생한 후 4일 내지 8일이 지난 후 측정된 것일 수 있다.
- [0086] 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0087] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 진단용 조성물, 진단용 키트, 정보제공 방법에 대한 기재 및 그 밖의 명세서의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0088]
- [0089] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 목적하는 개체의 코펩틴(copeptin) 수준에 관한 정보를 수신하는 수신부; 및 상기 코펩틴(copeptin) 수준이 기준치 이상인 경우, 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 연산부;를 포함하는, 진단 장치를 제공할 수 있다.
- [0090] 본 발명에서, 상기 수신부는 목적하는 개체로부터 취득된 시료에서 상기 C-반응성 단백질(CRP) 수준에 관한 정보를 더 수신하는 것일 수 있다.
- [0091] 본 발명에서, 상기 연산부는 상기 C-반응성 단백질(CRP) 수준이 기준치 이상인 경우, 외상성 뇌 손상(TBI)의 예후가 나쁠 것으로 예측하는 것일 수 있다.
- [0092] 본 발명에서, 목적하는 개체로부터 취득된 시료에서 상기 코펩틴(copeptin) 수준을 측정하는 측정부를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0093] 본 발명에서, 상기 측정부는 목적하는 개체로부터 취득된 시료에서 상기 C-반응성 단백질(CRP) 수준을 더 측정하는 것일 수 있다.
- [0094] 본 발명에서, 상기 외상성 뇌 손상(TBI)은 중등도의 외상성 뇌 손상(TBI)일 수 있다.
- [0095] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 진단용 조성물, 진단용 키트, 정보제공 방법, 스크리닝 방법에 관한 기재 및 그 밖의 명세서의 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0096]
- [0097] **[실시예]**
- [0098]
- [0099] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0100]
- [0101] **실시예 1: 코호트 수집 및 연구 방법**
- [0102]
- [0103] 본 발명의 실시예에서, 코호트는 2017년 5월부터 2020년 11월 간 TBI로 입원한 환자를 대상으로 한 것이다. 코펩틴 수준은 ELISA를 사용하여 외상 후 24시간 이내와 3일, 5일, 7일에 혈장 코펩틴을 연속적으로 측정하는 방식을 사용하였다. 이를 통하여 중등도 TBI 후 6개월에 혈장 코펩틴 수치와 좋지 않은 신경학적 결과의 상관관계를 파악하고, 환자의 상태를 평가할 때 코펩틴과 C-반응성 단백질(CRP)의 예후 정확도를 비교할 수 있었다.
- [0104]
- [0105] 본 발명의 실시예는 기관심의위원회의 승인을 받았으며 환자 또는 가족의 서면 동의서에 서명하였다. 먼저, 2015년부터 확립된 코호트를 통해 전향적으로 수집된 5개 대학 병원의 뇌 장애(예: TBI 및 뇌졸중) 데이터를 확보하였다. 상기 확보된 환자 중 2017년 5월부터 2020년 11월까지 진단된 TBI 환자를 코호트에 등록하였다. 코호

트에 포함된 기준은 다음과 같다: 1) 초기 신경학적 검사에서 GCS 점수가 9-12인 중등도 TBI 환자; 2) 18세 이상의 성인 환자; 및 3) TBI로 입원한 환자. 코호트에서 제외된 기준은 다음과 같다: 1) GCS 점수 ≤ 8 을 갖는 중증 TBI 환자; 2) 입원하지 않은 환자; 3) 척수 손상, 관통 손상 또는 외과적 개입이 필요한 기타 손상이 수반되는 환자; 4) 추적 관찰이 불가능한 환자; 5) 불충분한 의료 기록을 가진 환자; 6) 다른 병원에서 사용하는 약물에 의한 영향 가능성에 대해 정확하게 교차 확인되지 않아 GCS 점수가 부정확한 환자; 및 7) 기존 의학적 상태의 악화로 인해 72시간 이내에 심각한 전신 염증이 있는 환자.

실시예 2: 임상 평가 방법

통계 분석을 위해 중등도 TBI 환자를 (i) GCS 점수가 낮은 9 내지 10의 환자 및 (ii) GCS 점수가 높은 11 내지 12의 환자 두 그룹으로 나누었다. 다음의 경우 신경 악화가 존재하는 것으로 간주되었다: 1) GCS 점수가 입원 당시 점수보다 2점 이상 낮거나; 2) 운동 GCS 점수가 1점 이상 감소한 경우; 3) CT에서 악화된 소견(예: 혈종 증가 및 뇌부종의 진행) 또는 두개 내 혈종이 있는 미만성 손상 유형 III, IV로 정의된 유의한 비정상 소견의 존재와 함께 입원 후 동공 크기 또는 동공 광반사의 변화가 있는 경우.

실시예 3: 코렙틴 수준 측정 방법

혈장 내 코렙틴의 수준은 ELISA 분석 키트(CUSABIO, Wuhan, China)를 사용하여, 제조사의 지시에 따라 확인하였다. 구체적으로, TBI가 발생한 환자에 대하여 TBI 발생 후 (i) 24시간 이내, (ii) 3일, (iii) 5일 및 (iv) 7일에 정맥혈을 채취하였다. 혈액 샘플을 혈청 분리기 튜브로 직접 옮기고 4°C에서 밤새 응고시킨 후 1000 x g에서 15분 동안 원심분리하였다. 상기 채취된 혈장 샘플을 제거하고 분석할 때까지 -70°C의 깊은 냉동고에 보관하였다. 다음으로 GloMAX Discover System(Promega, WI, USA)을 사용하여 450 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

실시예 4: 통계적 분석

카이제곱검정(Chi-squared test), 피셔정확검정(Fisher exact test), t-검정(Student's t-test) 또는 만-휘트니U검정(Mann-Whitney U test)이 적절하게 사용되었다. 연속 데이터는 평균±표준 편차(SD) 또는 중앙값(사분위수 범위[IQR])으로 표시되었다. 코헨카파계수(Cohen's kappa)을 사용하고, CT 소견의 합의를 위한 프로토콜을 통하여 조사자 소견 간 일치 정도를 계산하였다. 단변량 분석은 중등도 TBI에서 신경학적 결과에 대한 관련 영향 요인을 찾기 위해 수행되었다. p-값이 0.10 미만인 변수의 통계적 독립성을 확인하기 위해 다변수 로지스틱 회귀 분석을 추가로 수행하였다. 연속적으로 측정된 코렙틴과 CRP와 신경학적 결과 사이의 관계를 평가하기 위해 반복 측정 ANOVA 및 Mauchly의 구형도 검정을 수행하였다. ROC(Receiver Operator Characteristic) 곡선은 좋지 않은 결과를 예측하기 위한 최적의 컷오프 값을 결정하기 위해 만들어졌다. 코렙틴과 CRP 간 예후 예측 정확도의 비교는 ROC 곡선하 면적(area under ROC curve; AUROC)을 사용하여 수행하였다. p-값이 0.05 미만이면 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 분석은 SPSS V.25(SPSS, Illinois, USA) 및 MedCalc(www.Medcalc.org)에 의해 수행되었다.

실시예 5: 환자 분류

도 1의 절차에 따라 환자를 선정하였다. 구체적으로는 중등도 내지 중증 TBI를 가진 총 142명의 환자가 처음에 등록되었다. 이 중 다음의 환자들(이 제외되었다: 중증 TBI(n=62), 중증도 TBI 중 의료 기록 부족(n=1), 동반 손상(n=2), 이송된 환자(n=4), 추적 관찰 소실(n= 3)). 나머지 중등도 TBI를 가진 나머지 70명의 환자가 최종적으로 분석에 포함되었다. 상기 70명의 환자를 추적한 결과, 6개월 후, 29명의 환자(41.4%)가 신경학적 결과가 좋지 않은 것으로 관찰되었다(GOSE 6 미만).

[0122]

[0123] 실시예 6: 조사자 간 CT 소견 조정

[0124]

[0125] 비정상 소견 및 진단을 포함한 CT 소견에 대하여, 코헨카파계수(Cohen's kappa)를 사용하여 조사자 소견 간 일치 정도를 계산하였고, 그 결과를 하기 표 1과 같이 나타내었다. 상기 CT 소견의 합의를 위한 프로토콜은 다음과 같다: (i) 첫번째 조사자와 두번째 조사자가 CT 소견을 독립적으로 보고하였다. (ii) 다음으로는 보고된 기록에 대한 해석을 비교하였다. (iii) 모든 불일치는 세 번째 검토자가 해결하였다. 여기서 첫번째 조사자는 20년 이상의 경력의 신경외과 전문의이다. 두번째 조사자는 경력 15년 이상의 신경외과 전문의이다. 세번째 조사자는 25년 이상의 경력을 가진 방사선과 전문의이다.

[0126]

표 1

[0127]

n = 70	-	첫번째 조사자	
-	-	A	B
두번째 조사자	A	32	2
	B	3	33

[0128]

[0129] 상기 표 1에 나타난 것과 같이, 코헨카파계수(Cohen's kappa)는 0.857로 거의 완벽하게 일치함을 나타냈다.

[0130]

[0131] 실시예 7: 단변량 분석

[0132]

[0133] 중등도 TBI의 변수에 따른 6개월 후 예후의 상관관계를 확인하기 위하여, 임상적 특성, 신경학적 및 방사선학적 소견, 혈액검사 결과 및 치료 여부 등의 변수들에 대한 단변량 분석을 실시하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 단, 하기 표 2의 데이터는 이산 및 범주형 변수를 표현하는 피험자의 수 또는 평균 $\pm$ 표준편차를 나타내고, 상기 CRP의 정상 수치는 0 내지 5 mg/L이다. 또한 GOSE 점수 7은 일상 생활에 영향을 미치는 경미한 신체적 또는 정신적 결함 또는 정신적 결함을 나타내고, GOSE 점수 8은 일상 생활에 영향을 미치지 않는 완전한 회복 또는 경미한 증상을 나타낸다. GCS는 글래스고 코마 척도(Glasgow Coma Scale)를; GOSE는 글래스고 결과 척도 확장(Glasgow Outcome Scale Extended)을; IQR는 사분위수 범위(interquartile range)를 나타낸다.

[0134]

표 2

[0135]

변수	좋은 예후(n=41) GOSE 7 또는 8	나쁜 예후(n=29) GOSE 6 이하	p-값
임상적 특징	-	-	-
남성	35 (85.4%)	21 (72.4%)	0.182
나이(년)	60.5 $\pm$ 19.1	62.7 $\pm$ 18.7	0.635
고혈압	14 (34.1%)	13 (44.8%)	0.366
당뇨	8 (19.5%)	7 (24.1%)	0.642
고지혈증	4 (9.8%)	3 (10.3%)	0.936
흡연	13 (31.7%)	8 (27.6%)	0.711
신경학적 및 방사선학적 소견	-	-	-
GCS 점수 9 또는 10	8 (19.5%)	19 (65.5%)	<0.001
현저한 비정상 CT 소견	4 (9.8%)	15 (51.7%)	<0.001
신경 악화	6 (14.6%)	13 (44.8%)	0.005
혈액검사	-	-	-
헤모글로빈(g/dL)	11.4 $\pm$ 1.2	11.1 $\pm$ 1.0	0.376
산소포화도 O ₂ (%)	94.4 $\pm$ 2.1	94.5 $\pm$ 1.6	0.776

코렙틴(pg/mL), 중앙값(IQR)	285.9 (254.6-313.2)	327.2 (290.2-349.9)	<0.001
CRP(mg/L), 중앙값(IQR)	14.0 (11.0-16.4)	17.3 (11.8-21.3)	0.019
치료	-	-	-
개두술 및 혈종 제거	4 (9.8%)	11 (37.9%)	0.005

[0136]

[0137] 상기 표 2에 나타난 것처럼, 등록된 환자의 평균 연령은 61.5 ± 18.9 세였으며 남성이 56명(80.0%)이었다. CT상 두개 내 소견은 경막하출혈(n=19, 27.1%), 경막외출혈(n=10, 14.3%), 외상성 지주막하출혈(n=11, 15.7%), 타박상(n=5, 7.1%). 전체적으로 중등도 TBI 환자의 64.3%에서 CT에서 두개 내 병변이 있었다. 특히 성별, 연령, 기저질환(고혈압, 당뇨병, 고지혈증 등)과 흡연 등 생활습관 요인에서 예후가 좋은 환자와 나쁜 환자 간에 유의한 차이가 없었다.

[0138] 반면 상기 표 2에 나타난 것처럼, 예후가 불량한 중등도 TBI 환자의 경우 GCS 점수 9 또는 10(p<0.001), 초기 CT에서 유의한 이상 소견(p<0.001), 신경 악화(p=0.005), 개두술 및 혈종 제거(p=0.005)와 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0139] 또한 상기 표 2에 나타난 것처럼, 예후가 불량한 중등도 TBI 환자는 예후가 양호한 중등도 TBI 환자에 비해 혈중 코렙틴 농도가 높아, 유의미한 차이를 보였다(p<0.001). 구체적으로 예후가 불량한 중등도 TBI 환자의 혈중 코렙틴 수준은 327.2(290.2-349.9) pg/mL이었고, 예후가 양호한 중등도 TBI 환자의 혈중 코렙틴 수준은 285.9(254.6-313.2) pg/mL이었다. CRP 수준의 경우 예후가 양호한 중등도 TBI 환자에서 14.0(11.0-16.4) mg/L를 보여 유의미하게 높았다(p=0.019).

[0140]

[0141] 실시예 8: 다변량 분석

[0142]

[0143] 중등도 TBI의 변수에 따른 예후를 확인하기 위하여, 6개월 후 예후가 불량한 TBI 환자에 대한 다변수 로지스틱 회귀 분석을 실시하여, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0144]

표 3

변수	오즈비(OR)	95% 신뢰구간	p-값
GCS 점수 9 또는 10	4.507	1.266-16.047	0.020
유의미한 비정상 CT 소견	4.770	1.133-20.076	0.033
코렙틴	1.020	1.005-1.036	0.011
CRP	1.043	0.928-1.171	0.479
신경 악화	1.487	0.248-8.920	0.664
개두술 및 혈종 제거	0.532	0.039-7.237	0.636

[0146]

[0147] 상기 표 3에 나타난 것처럼, 다변수 로지스틱 회귀 분석 결과 코렙틴 증가(OR=1.020, 95% CI: 1.005-1.036), GCS 점수 9 또는 10(OR=4.507, 95% CI: 1.266-16.047), 초기 CT에서 유의한 이상 소견(OR=4.770, 95% CI: 1.133-20.076)의 변수들이 중등도 TBI 환자에서 예후가 불량한 환자의 결과와 유의한 상관관계가 있었다.

[0148]

[0149] 실시예 9: 코렙틴 수준과 신경학적 결과 간 연관성 확인

[0150]

[0151] 중등도 TBI 환자에서 혈장 코렙틴 수준과 신경학적 결과 간 연관성을 확인하기 위하여, 혈중 코렙틴 수준 및 CRP 수준에 따른 신경학적 결과를 확인하였다. 구체적으로는, TBI 발생 직후부터 7일까지 연속적으로 혈중 코렙틴 수준 및 CRP 수준을 측정한 후, 6개월 후 상기 환자들의 예후를 추적하여 예후가 불량한 TBI 환자와 예후가

양호한 TBI 환자 간 측정했던 상기 혈중 코렙틴 수준 및 CRP 수준을 비교하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0152] 도 2에 나타난 것처럼, 혈장 코렙틴 수준은 손상 후 점진적으로 증가하여 5일차에 최고조에 이르렀다가 그 이후 감소하는 추세를 보였다. 연속 혈장 코렙틴 수준은 환자마다 유의하게 다양했으며 신경학적 결과와 상관관계가 있었다(왼쪽, $p < 0.001$). 연속 측정된 CRP의 차이도 시간 경과에 따른 환자의 결과와 유의한 상관관계가 있었다(오른쪽, $p = 0.002$).

[0153] 특히 24시간 이내에 측정된 코렙틴 수치의 차이를 제외하고는 3일차, 5일차, 7일차에 코렙틴 수준에 유의한 차이가 있었다. 구체적으로는 3일차의 경우 불량한 예후의 환자에서 혈중 코렙틴 수준은 322.9(283.4-360.7) pg/mL로 나타났고, 예후가 양호한 환자에서는 290.3(251.4-321.9) pg/mL로 나타났다($p = 0.010$). 5일차 불량한 예후의 환자에서 혈중 코렙틴 수준은 345.2(307.4-380.9) pg/mL로 나타났고, 및 예후가 양호한 환자에서 혈중 코렙틴 수준은 296.3(255.4-322.1) pg/mL로 나타났다($p < 0.001$). 7일차 불량한 예후의 환자에서 혈중 코렙틴 수준은 323.2(308.8-380.6) pg/mL로 나타났고, 예후가 양호한 환자의 혈중 코렙틴 수준은 287.7(253.9-300.7) pg/mL로 나타났다($p < 0.001$).

[0154] 또한 CRP 수준의 경우 5일차와 7일차에 측정된 것이 신경학적 결과와 상관관계가 있었다. 구체적인 결과는 다음과 같다. 5일차에 불량한 예후의 환자에서 CRP 수준은 24.0 (14.7-32.2) mg/L이고, 예후가 양호한 환자에서 CRP 수준은 15.0 (13.0-22.0) mg/L로 나타났다($p = 0.014$). 7일차에 불량한 예후의 환자에서 CRP 수준은 22.0 (13.7-33.5) mg/L로 나타났고, 예후가 양호한 환자에서 CRP 수준은 14.0 (10.0-22.0) mg/L로 나타났다($p = 0.015$). 위의 결과를 바탕으로 중등도 TBI 환자에서 코렙틴은 3일차, 5일차, 7일차의 결과와 관련이 있는 반면, CRP는 5일차의 결과와 관련이 있음을 확인하였다.

[0155]

[0156] 실시예 10: 코렙틴 수준 및 CRP 수준 측정을 이용한 예후 예측

[0157]

[0158] 서로 다른 코렙틴 수준 및 CRP 수준 측정 시점에 따른 중등도 TBI 예후 예측 정확도 차이를 확인하기 위하여, 중등도 TBI 발생 후 (i) 24시간 이내, (ii) 3일차, (iii) 5일차 및 (iv) 7일차 코렙틴 및 CRP 수준을 측정하여, 하기 표 4와 같이 불량한 예후를 예측하는 정확도를 나타내는 ROC 곡선 아래 면적(AUROC)으로 계산하였고, 그 중 7일차 코렙틴 수준에 따른 예후 예측의 정확도를 도 3과 같이 ROC 곡선으로 나타내었다.

[0159]

표 4

[0160]

변수	측정 시점	AUROC	표준오차(SE)	95% 신뢰구간(CI)
코렙틴	<24 hr	0.549	0.07	0.426-0.668
	3 d	0.681	0.066	0.559-0.788
	5 d	0.796	0.054	0.682-0.883
	7 d	0.849	0.047	0.743-0.923
CRP	<24 hr	0.579	0.069	0.455-0.696
	3 d	0.598	0.068	0.473-0.713
	5 d	0.671	0.071	0.548-0.779
	7 d	0.670	0.066	0.547-0.778

[0161]

[0162] 도 3 및 상기 표 4에 나타난 것처럼, TBI 발생 3일차, 5일차, 7일차에 측정된 코렙틴 수준은 TBI 직후 측정된 코렙틴 수준에 비하여 예후 예측의 민감도와 특이도가 높은 것으로 나타났고, TBI 발생 5일차, 7일차에 측정된 CRP 수준은 TBI 직후 및 3일차에 측정된 CRP 수준에 비하여 예후 예측의 민감도와 특이도가 높은 것으로 나타났다.

[0163]

[0164] 실시예 11: 코렙틴과 다른 변수 간 예후 예측 정확도의 비교

[0165]

[0166] 혈장 코렙틴과 CRP 간 예후 예측 정확도를 비교한 결과를 도 4 및 하기 표 5에 나타내었다.

[0167]

표 5

[0168]

측정 시점	AUROC 차이	표준오차(SE)	95% 신뢰구간(CI)	p-값
<24 hr	0.029	0.089	-0.145-0.204	0.737
3 d	0.083	0.095	-0.103-0.270	0.378
5 d	0.124	0.083	-0.039-0.288	0.136
7 d	0.179	0.074	0.032-0.325	0.016

[0169]

[0170] 도 4 및 상기 표 5에 나타난 것처럼, 7일차에 측정된 코렙틴 수준은 AUROC 차이가 0.179인 CRP보다 더 나은 예후 예측 정확도를 보여주었다(95% CI: 0.032-0.325, p=0.016).

[0171]

[0172] 또한, 혈장 코렙틴과 다른 변수 간 예측 정확도를 비교한 결과를 도 5 및 하기 표 6에 나타내었다.

[0173]

표 6

[0174]

예측 방법	AUROC	표준오차(SE)	95% 신뢰구간(CI)
7일차 코렙틴 수준	0.849	0.047	0.743-0.923
GCS 점수 9 또는 10	0.730	0.054	0.611-0.829
유의한 비정상 CT 소견	0.710	0.052	0.589-0.812

[0175]

[0176] 도 5 및 상기 표 6에 나타난 것처럼, 7일차에 측정된 코렙틴은 초기의 유의한 비정상 CT 소견보다 6개월 후의 불량한 예후에 대해 높은 예측 정확도를 보였다(AUROC 차이=0.139, 95% CI: 0.017-0.260, p=0.024). 또한 환자에서 9 또는 10의 낮은 GCS 점수에 비해 더 높은 예측 정확도를 보였다(AUROC=0.119, 95% CI: -0.011-0.249, p=0.07).

[0177]

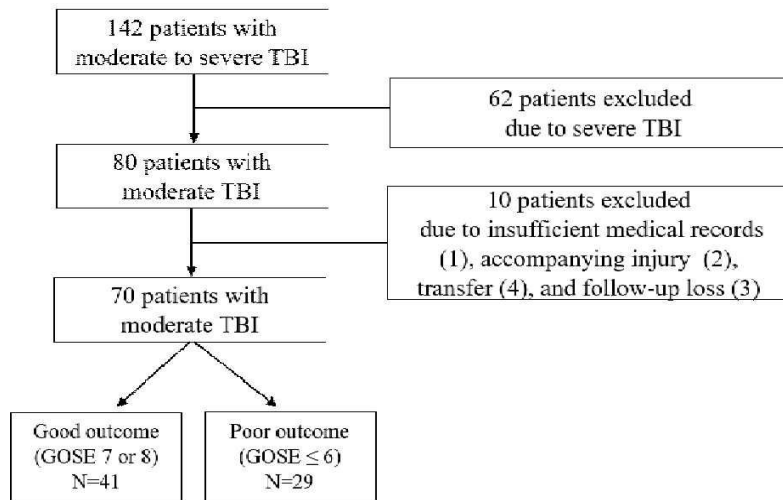
[0178] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 본 발명을 구현할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로 상기 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 한다.

[0179]

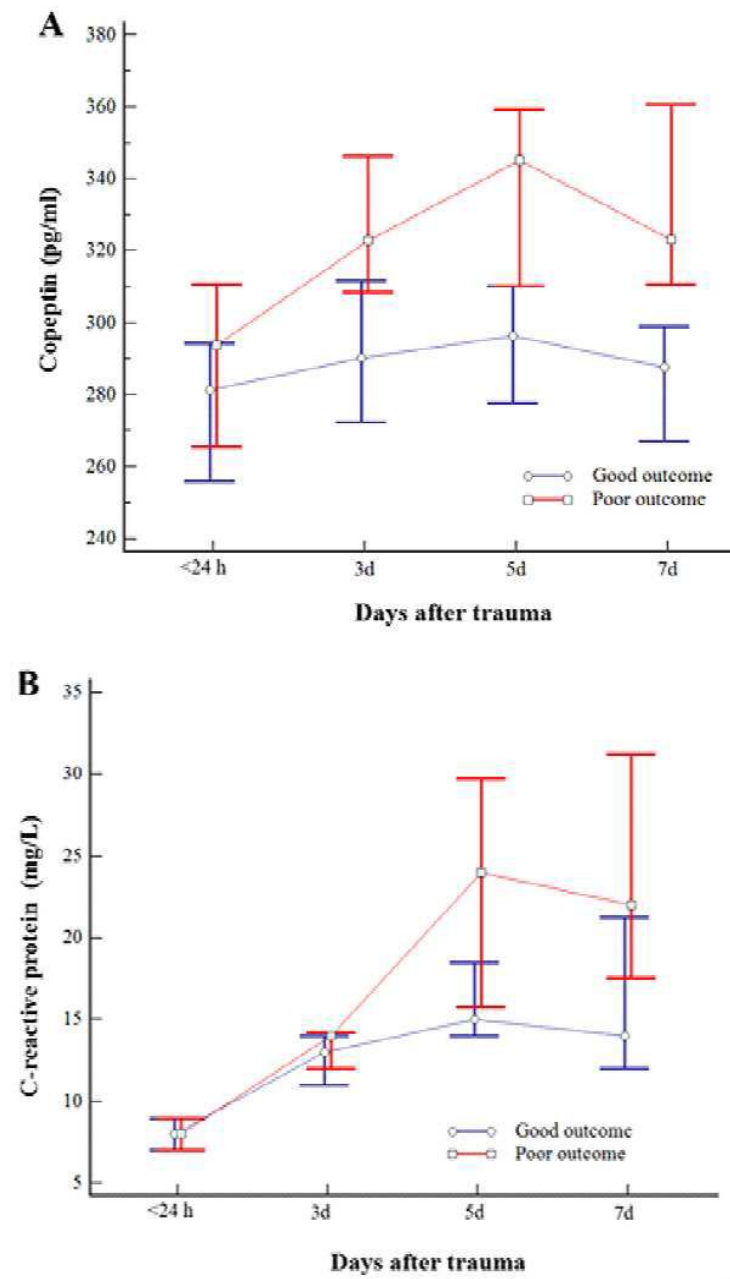
이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허 청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

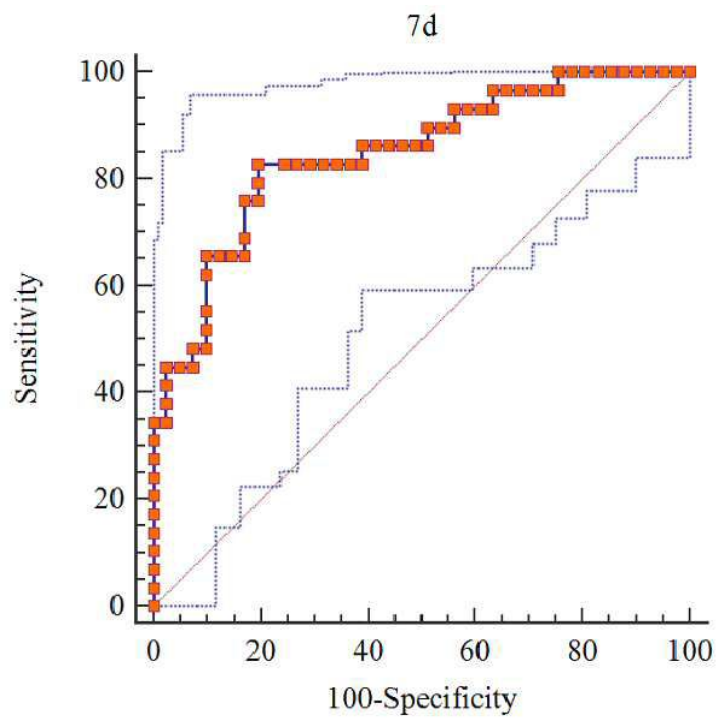
도면1



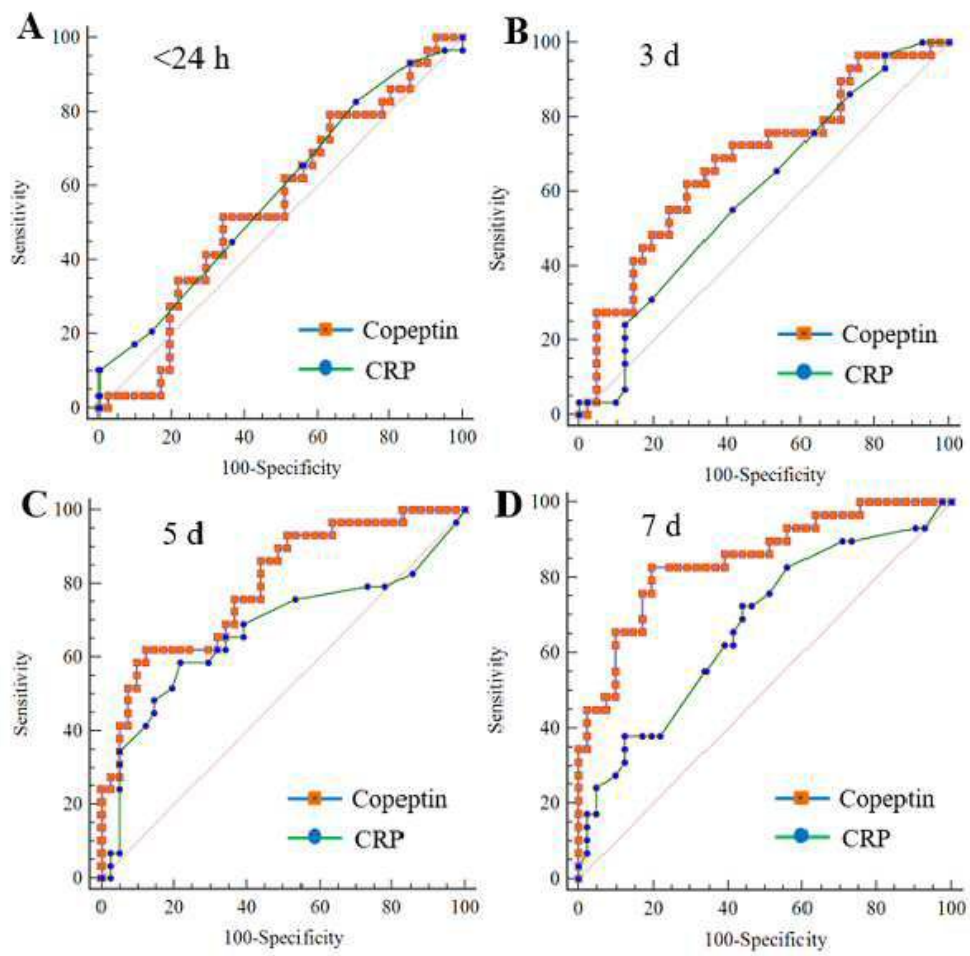
도면2



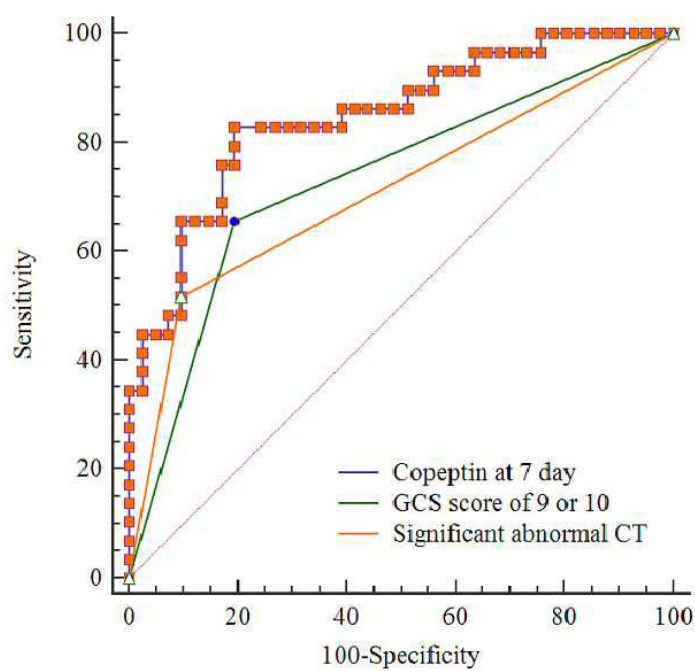
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY
 <120> A method for diagnosing traumatic brain injury using the
 concentration of copeptin
 <130> P211930
 <160> 2
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```
Met Pro Asp Thr Met Leu Pro Ala Cys Phe Leu Gly Leu Leu Ala Phe
  1           5           10          15
Ser Ser Ala Cys Tyr Phe Gln Asn Cys Pro Arg Gly Gly Lys Arg Ala
      20           25           30

Met Ser Asp Leu Glu Leu Arg Gln Cys Leu Pro Cys Gly Pro Gly Gly
      35           40           45
Lys Gly Arg Cys Phe Gly Pro Ser Ile Cys Cys Ala Asp Glu Leu Gly
      50           55           60
Cys Phe Val Gly Thr Ala Glu Ala Leu Arg Cys Gln Glu Glu Asn Tyr
      65           70           75           80
Leu Pro Ser Pro Cys Gln Ser Gly Gln Lys Ala Cys Gly Ser Gly Gly
      85           90           95
Arg Cys Ala Ala Phe Gly Val Cys Cys Asn Asp Glu Ser Cys Val Thr
      100          105          110
Glu Pro Glu Cys Arg Glu Gly Phe His Arg Arg Ala Arg Ala Ser Asp
      115          120          125
Arg Ser Asn Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu
      130          135          140
Arg Leu Val Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln
      145          150          155          160
Pro Asp Ala Tyr
```

<210> 2
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Glu Lys Leu Leu Cys Phe Leu Val Leu Thr Ser Leu Ser His Ala
 1 5 10 15
 Phe Gly Gln Thr Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu
 20 25 30
 Ser Asp Thr Ser Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu
 35 40 45
 Lys Ala Phe Thr Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser Thr
 50 55 60
 Arg Gly Tyr Ser Ile Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Arg Gln Asp Asn Glu
 65 70 75 80
 Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Val Gly
 85 90 95
 Gly Ser Glu Ile Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr Val Ala Pro Val
 100 105 110
 His Ile Cys Thr Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly Ile Val Glu Phe Trp
 115 120 125
 Val Asp Gly Lys Pro Arg Val Arg Lys Ser Leu Lys Lys Gly Tyr Thr
 130 135 140
 Val Gly Ala Glu Ala Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Gly Asn Phe Glu Gly Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn
 165 170 175
 Val Asn Met Trp Asp Phe Val Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile
 180 185 190
 Tyr Leu Gly Gly Pro Phe Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu
 195 200 205

Lys Tyr Glu Val Gln Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro

210

215

220