



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0134580
(43) 공개일자 2021년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/72 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0149631(분할)
(22) 출원일자 2021년11월03일
심사청구일자 2021년11월03일
(62) 원출원 특허 10-2019-0071462
원출원일자 2019년06월17일
심사청구일자 2019년06월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)
차훈석
서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 류머티스내과(일원동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

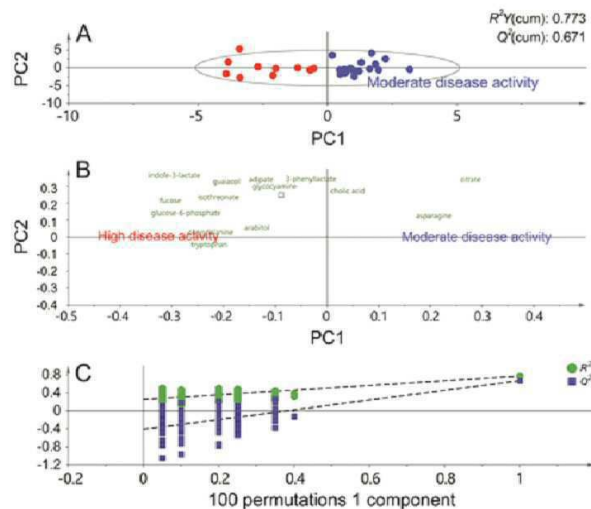
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염의 중증도 진단방법에 관한 것으로, 관절 낭액 대사체 분석을 통해 류마티스 관절염 환자에서 그 중증도를 구분하기 위한 바이오마커를 제공하며, 류마티스 관절염 환자의 중증도를 더욱 특이적으로 구분하는 키트 등에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/102 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

(72) 발명자

안중경

서울특별시 종로구 새문안로 29, 강북삼성병원 류
마티스내과(평동)

김정연

서울특별시 동대문구 신이문로8길 44, 2층(이문동)

정유은

경기도 수원시 영통구 에듀타운로 65, 5203동 180
2호(이의동, 자연앤자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711092014
과제번호	2018R1A4A1022589
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실사업
연구과제명	이소화학감각수용체 응용 연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

글라이코사이아민 (glycocycamine)의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 또는 중증도 예측용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 구아이아콜(guaiacol), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 추가로 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 또는 중증도 예측용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기인 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

글라이코사이아민 (glycocycamine)가 증가하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 고중증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 구아이아콜(guaiacol), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 고중증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 고중증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 7

제 2 항에 있어서,

시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 증가하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 중증증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

글라이코사이아민 (glycocyanine)의 농도가 감소하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 중증증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 9

제 2 항에 있어서,

인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 구아이아콜(guaiacol), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 농도가 감소하는 경향을 나타내는 경우, 류마티스 관절염 환자의 중증증도군에 해당하는 것인 키트.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

류마티스 관절염 환자의 고중증도군은 류마티스 관절염 환자의 중증도 수치인 DAS28-ESR 스코어(score) ≥ 5.1 에 만족하는 것인 키트.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

류마티스 관절염 환자의 중증증도군은 류마티스 관절염 환자의 중증도 수치인 DAS28-ESR 스코어(score) < 5.1 에 만족하는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 관절 낭액 대사체 분석을 이용한 류마티스 관절염 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

류마티스 관절염(RA: Rheumatoid Arthritis)은 관절 주위를 둘러싸고 있는 활막이라는 조직의 염증 때문에 일어나는 질환으로 우리나라 전체 인구 중 대략 1%가 환자군으로 추정되고 있는 대표적인 만성질환이다. (비특허문헌 1). 관절 낭액은 관절 간의 생물학적인 윤활유로 작용할 뿐 아니라 영양소 및 다양한 사이토카인이 통과하는 용액으로 작용한다. 따라서 관절 활막과 연골 내의 염증이나 효소에 의한 분해 등은 관절 낭액의 화학적 조성의 변화를 일으킨다. 또한 관절 낭액은 염증성 관절염의 병인학적 상태를 가장 잘 반영하는 샘플로 여겨진다 (비특허문헌 2).

- [0004] 따라서 류마티즘 관절염 환자의 관절 낭액의 분석은 진단의 바이오마커를 제공하거나, 류마티스 관절염의 병인학적 이해를 도와서 임상에 적용될 수 있다.
- [0005] 또한, 류마티스 관절염의 치료 방법으로는 관절의 손상을 최소화하고, 기능 손실을 방지하며 통증을 줄이기 위하여 일반적으로 진통소염제를 다양한 항류마티스제제와 병합 투여하는 약물치료 방법이 사용되고 있고, 최근에는 생물학적 치료제가 개발되어 항류마티스 약제와 함께 병용 치료로 이용되고 있으며, 질병의 중증도가 심각한 경우에는 수술요법이 시행되고 있다. 그러나 이와 같은 치료 방법은 상당히 뛰어난 효과에도 불구하고 관절 변형이 지속될 수 있고 약제 부작용으로 적절한 치료가 어려운 경우도 있으며, 신약 개발 비용에 따른 약가 상승으로 많은 비용이 드는 단점이 있기 때문에, 류마티스 관절염의 중증도 예측 또는 구분할 수 있는 키트 개발이 시급한 실정이다.
- [0006] 대사체학은 생체의 대사적 변화에 따른 종합적인 대사물질의 변화를 살펴보는 학문으로, 다양한 생리학적, 병리학적인 상태를 밝히는데 사용된다 (비특허문헌 3). 류마티스 관절염은 유전적, 환경적 인자를 포함한 다양한 인자들이 작용하여 발생하는 것이기에 대사물질의 변화를 유도할 수 있으며, 대사체학을 통해 생리학 및 병리학적인 변화를 밝히는데 유용할 수 있다.
- [0007] 다른 관절염 환자와 류마티스 관절염 환자를 구분할 수 있는 바이오마커에 대해서는 비특허문헌 4에 보고된 바 있으나, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 또는 구분을 위한 바이오마커라는 점에 그 특징이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) McInnes I. B. and Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis (2011) N Engl J Med vol. 365, pp. 2205-2219
- (비특허문헌 0002) O'Connel J. X. Pathology of the synovium (2000) Am J Clin Pathol vol. 114, pp. 773-784
- (비특허문헌 0003) Johnson C. H. et. al. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms (2016) Nat Rev Mol Cell Biol vol. 17, pp. 451-459
- (비특허문헌 0004) Kim S. et. al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis (2014) PLOS ONE vol. 9(6), e97501

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 대사체학을 통해 류마티스 관절염 환자 관절 낭액에서 대사물질이 중증도에 따라 어떻게 변화하는지 살펴보고, 중증도를 나타내는 대사체 마커를 제시하여 환자의 중증도를 더욱 특이적으로 구분할 수 있는 새로운 바이오마커를 발굴하였다.
- [0010] 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액을 채취하고 GC/TOF MS를 이용하여 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액 내 대사체 분석을 통해 총 125개의 대사체를 검출하였다. 이를 기반으로 환자의 중증도 수치 (DAS28-ESR) 와 연관지어 분석하였다.
- [0011] 먼저, 각 환자의 중증도를 DAS28-ESR을 통하여 산출하고, 중증도의 증가에 따라서 통계적으로 유의미하게 증가 혹은 감소하는 대사물질을 비모수적 상관관계 분석인 Spearman's rank correlation coefficient를 구해서 찾았다. 이때 p -value가 0.05 미만인 14개의 대사물질을 신규생체표지자 후보 물질로 선정하였다.
- [0012] 이 14개의 류마티스 관절염 환자의 중증도 신규생체표지자 후보 물질을 이용하여 다변량 통계분석법에 기반한 직교부분최소제곱회귀법(Orthogonal partial least squares discriminant analysis: OPLS-DA) 모델을 만들어 고중증도군과 중중증도군을 구분할 수 있도록 하였다.
- [0013] 또한, 중증도 진단 모델이 외부 샘플의 중증도 진단에도 적용될 수 있는지 확인하기 위하여, 10명의 환자로부터

염은 관절낭액 샘플에서 대사체 분석 및 모델에 적용하여 중증도를 정확히 판별할 수 있음을 확인하고 모델을 검증하였다.

[0014] 따라서, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트를 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyanine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관절 낭액 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측 키트를 제공한다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 류마티스 관절염 환자의 중증도 예측용 키트 및/또는 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 중증증도 군의 구별용 키트에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 용어, "류마티스 관절염의 중증도 예측 예측"이란 류마티스 관절염 환자의 전반적인 염증 정도, 골 파괴 정도, 또는 류마티스 관절염의 진행 정도를 평가하였을 때 높은 질병활성으로 인해 골 파괴가 진행될 가능성 또는 관절 변형이 초래될 가능성과 관련된다. 종래 임상에서 류마티스 관절염의 질병 중증도를 측정하는 대표적인 방법인 DAS(Disease Activity Score) 또는 이것의 변형된 형태인 DAS28(Disease Activity Score 28)은 점수 계산 방식의 지수 평가 방법으로, 염증 표지자 검사나 방사선 소견 같은 일부 객관적 요소와 함께 환자 및 의사가 평가하는 주관적인 요소들을 함께 평가한다. DAS28은 환자의 28개 관절 중 압통을 느끼는 관절 수, 부종을 보이는 관절 수, 적혈구 침강속도, 환자의 전신적 평가로 구성된 종합 지수로서, 28개의 관절에는 양쪽 어깨 관절, 팔꿈치 및 손목 관절, 중수지 관절, 근수지 관절, 무릎 관절 등을 포함한다.

[0022] DAS28을 이용한 질병의 중증도 판별은 적혈구 침강 속도에(erythrocyte sedimentation rate) 기반한 DAS28-ESR score와 C-reactive protein의 활성도 지수를 기반으로 계산하는 DAS28-CRP score가 있으며, 특히 환자에 대한 기타 종합적인 검사를 생략하고 DAS28의 ESR score와 tender joint count, swollen joint count를 이용하여 질병의 중증도를 계산하는 DAS28-ESR(3) score가 널리 사용된다(<https://www.mdcalc.com/disease-activity-score-28-rheumatoid-arthritis-esr-das28-esr>).

[0023] DAS28-ESR(3) score로 조사된 류마티스 관절염 질병 활성도는 0점에서 최대 9.4점까지 계산될 수 있으며, 일반적으로 DAS28 점수가 2.6 미만이면 질병 활성이 거의 없는 상태(Remission, 관해), 2.6점 이상 3.2점 미만이면 낮은 질병활성(Low Disease Activity, 경증), 3.2점 이상 5.1 점 미만이면 중간 질병활성(Moderate Disease Activity, 중증증도), 그리고 5.1점 이상이면 높은 질병활성(High Disease Activity, 고중증도)으로 정의하고 있다.

[0024] 본 발명은 환자의 향후 질병 중증도를 손쉽게 예측할 수 있어, 추가 필요한 치료 방법의 사용 여부를 결정함으로써 류마티스 관절염 발병 후의 질병의 지연, 완화 및/또는 완치를 위한 정보로 활용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예로서, 관절낭액에서 순수 메탄올을 섞고 강하게 볼텍싱 한 후에 원심분리하여 대사체를 추출하는 과정을 포함하는 대사체 샘플링 단계를 거친다.

[0026] 상기 대사체의 추출에 사용하는 용매로는 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0027] 상기 125개의 대사체에는 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 인산류, 유기산류 등을 포함하고

있다.

- [0028] 상기 대사체 샘플링 단계에서 추출된 대사체에 대해서는 다음의 분석 단계를 거친다:
- [0029] 추출된 대사체를 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기로 분석하는 단계;
- [0030] GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계; 및
- [0031] 변환된 수치를 이용하여 통계학적으로 상기 두 생체시료군의 차별성을 검증하는 단계.
- [0032] 즉, 상기 GC/TOF MS 분석 결과를 통계처리 가능한 수치로 변환하는 단계는 총 분석시간을 단위시간 간격으로 나누어 단위시간 동안 나타난 크로마토그램 피크의 면적 또는 높이 중 가장 큰 수치를 단위시간 동안의 대표값으로 정한다.
- [0033] 다음으로, 대사체의 프로파일링 차이를 비교하기 위해 부분최소제곱회귀법(Partial least squares discriminant analysis: PLS-DA)을 수행하여 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고, 분석 및 검증한다.
- [0034] 부분최소제곱회귀법의 로딩 값이 양수인 것은 대사체 바이오마커의 증가 경향을, 로딩 값이 음수인 것은 대사체 바이오마커의 감소 경향을 나타내는 것으로 판정한다.
- [0035] 본 발명의 이 구현예에 따르면, 류마티스 관절염의 고중증도군과 중증증도군의 대사체를 구별하기 위한 바이오마커로, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체를 사용할 수 있다.
- [0036] 고중증도군에서는, 상기 바이오마커들 중 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 증가하는 경향을, 시트레이트(citrate), 아스파라진(asparagine)은 감소하는 경향을 나타낸다.
- [0037] 반면에, 중증증도군에서는 상기 바이오마커들 중 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 감소하는 경향을, 시트레이트(citrate), 아스파라진(asparagine)은 증가하는 경향을 나타낸다.
- [0038] 상기 증가 또는 감소 경향이란 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 "대사체 농도의 증가"는 류마티스 관절염 환자 고중증도군에서 중증증도군 대비 또는 중증증도군에서 고중증도군 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 "대사체 농도의 감소"는 류마티스 관절염 환자 고중증도군에서 중증증도군 대비 또는 중증증도군에서 고중증도군 대비 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.
- [0039] 따라서, 본 발명은 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함하는 류마티스 관절염 환자 고중증도군과 중증증도군의 구별용 키트를 제공한다.
- [0040] 다음으로 류마티스 관절염의 중증도의 증가에 따라 유의미하게 증감하는 대사체를 찾고자, DAS-28 ESR (3) score와 실시예 1에서 얻은 대사체의 intensity 간의 상관관계를 구하기 위해서 두 변수 간의 상관관계 비모수적 통계 분석 방법인 Spearman's rank correlation coefficient (Spearman R)를 통하여 분석하여 통계적으로 유의적인 증감을 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고 분석 및 검증한다.
- [0041] Spearman R값이 양수인 것은 질병 중증도의 증가에 따라서 대사체 바이오마커의 인테시티가 증가하는 경향을,

Spearman R값이 음수인 것은 질병 중증도의 증가에 따라서 대사체 바이오마커의 인텐시티가 감소하는 경향을 나타내는 것으로 판정한다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 류마티스 관절염의 중증도를 예측하기 위한 바이오마커로, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid), 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체를 사용할 수 있다.

[0043] 상기 바이오마커들은 중증도의 증가에 따라서 시트레이트(citrate) 및 아스파라진(asparagine)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 감소하는 경향을, 인돌-3-락테이트(indole-3-lactate), 시트레이트(citrate), 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 푸코오스(fucose), 이소트레오네이트(isothreonate), 3-페닐락테이트(3-phenyllactate), 구아이아콜(guaiacol), 글라이코사이아민(glycocyamine), 아디프산(adipate), 페닐알라닌(phenylalanine), 아라비톨(arabitol), 아스파라진(asparagine), 콜산(cholic acid) 및 트립토판(tryptophan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상은 증가하는 경향을 나타낸다.

[0044] 상기 증가 또는 감소 경향이든 대사체 농도의 증가 또는 감소를 의미하는 것으로, 용어 "대사체 농도의 증가"는 류마티스 관절염 환자 중증도의 증가에 따라서 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 본 명세서에서, 용어 "대사체 농도의 감소"는 류마티스 관절염 환자 중증도의 증가에 따라서 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 뜻한다.

[0045] 본 발명의 키트에 포함된 정량 장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다. 구체적으로, 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatography, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 가장 구체적으로는, GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기일 수 있다.

[0046] 본 발명의 대사체는 가스 크로마토그래피에서 각 성분들이 분리되며, TOF MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보(elemental composition)를 통해 구성 성분을 확인한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명을 통하여 대사체학을 이용해 류마티스 관절염 중증도를 특이적으로 예측 또는 구분할 수 있는 바이오마커를 규명하였다. 이러한 중증도 예측 또는 구분용 바이오마커는 중증도 예측 또는 고중증도와 중증증도를 구별하기 위한 중증도 구분 키트 등의 다양한 형태로 적용될 수 있다.

[0049] 따라서, 류마티스 관절염 중증도에 특이적인 바이오마커를 표적으로 한 신약 개발에 활용될 수 있는 바, 류마티스 관절염의 중증도에 특이적인 바이오마커를 이용하여 류마티스 관절염의 발병 기전을 좀 더 정확히 파악하고 이를 근거로 해서 신약 개발이나 신약 후보 약물들에 대한 선별 도구로서 이용될 수 있다.

[0050] 또한, 류마티스 관절염 중증도의 파악 및 예측을 통한 맞춤형 조기 치료가 가능함으로써 류마티스 관절염으로 의심되는 환자나 류마티스 관절염으로 진단된 환자에서 특정 대사체의 농도를 통하여 중증도를 파악하여 이에 대한 맞춤형 조기 치료에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 14개의 잠재적 중증도 구분 바이오마커 기반으로 생성된 OPLS-DA를 이용한 류마티스 관절염 환자의 고중증도군과 (RA_high) 중증증도군 (RA_moderate) 간의 비교 진단 모델(A: score plot; B: loading plot; C:

permutation tests)을 나타낸 것이다.

도 2는 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 OPLS-DA 모델의 ROC curve를 이용한 통계학적 검증을 나타낸 것이다.

도 3은 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 OPLS-DA 모델의 외부 검체를 이용한 중증도 진단 검증을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1: GC/TOF MS를 이용한 류마티스 관절염 환자의 관절낭액 대사체 동정

30명의 류마티스 관절염 환자의 관절 낭액을 채취하여 각각의 관절낭액 샘플 100 μ l에 순수 메탄올 900 μ l을 섞고 강하게 볼텍싱한 후에 원심분리하여 40 개의 서로 다른 샘플에서 대사체를 추출하였다.

GC/TOF MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다.

추출한 검체를 스피드 백으로 건조시킨 후에 5 μ l의 40%(w/v)농도의 *O*-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm에서 90분간 반응을 시켰다. 그리고 45 μ l의 *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm에서 30분간 반응을 실시하였다.

GC/TOF MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다.

분석할 때 사용한 컬럼은 RTX-5Sil MS capillary column (30 m length, 0.25 mm film thickness, 및 25 mm inner diameter)이며, GC 컬럼 온도 조건은 먼저 50도에서 5분간 유지시킨 후 330도까지 승온시킨 다음 1분간 유지하였다. 1 μ l의 샘플을 비분할법(splitless)으로 주입(injection)하였다. Transfer line 온도와 Ion source 온도는 각각 280도, 250도로 유지시켰다. GC/TOF MS 결과를 보유하고 있는 라이브러리에서 찾아 동정하여, 125개의 대사체를 동정하였다(표 1).

다음 표 1과 같이, 각각의 대사체군별로 분류하였을 때, 유기산 20.8%, 아미노산 21.6%, 당 18.4%, 지방산 14.4%, 아민 11.2%, 인 5.6%, 기타 7.9%로 나타났다.

표 1

류마티스 관절염 환자의 관절 낭액에서 추출한 125개의 대사체 확인

Amines		
2-hydroxypyridine	3-hydroxypyridine	5'-deoxy-5'-methylthioadenosine
glycocyamine	guanosine	hypoxanthine
inosine	O-phosphorylethanolamine	thymine
uracil	urea	uric acid
uridine	xanthine	
Amino acids		
alanine	asparagine	asparagine dehydrated
aspartate	cyano-L-alanine	glutamate
glutamine	glycine	histidine
isoleucine	L-citrulline	L-cysteine
leucine	L-homoserine	lysine
methionine	N-methylalanine	ornithine
oxoproline	phenylalanine	proline
serine	threonine	tryptophan
tyrosine	valine	β -alanine
Fatty acids		
1-monopalmitin	1-monostearin	2-ketoisocaproic acid

arachidonic acid	behenic acid	capric acid
heptadecanoic acid	lauric acid	lignoceric acid
linoleic acid	linolenic acid	myristic acid
oleic acid	palatinitol	palmitic acid
palmitoleic acid	pelargonic acid	stearic acid
Organic acids		
2-hydroxyhexanoate	2-hydroxyvalerate	2-ketoadipic acid
3-phenyllactate	adipate	citramalate
citrate	DL-3-aminoisobutyrate	fumarate
galactonate	glycerate	glycolate
guaiacol	hexonate	indole-3-lactate
isothreonate	malate	malonate
oxalate	phenylacetate	pyrrole-2-carboxylate
pyruvate	succinate	terephthalate
α -ketoglutarate	β -hydroxybutyrate	
Sugars and sugar alcohols		
1,5-anhydroglucitol	3,6-anhydro-D-galactose	arabitol
fructose	fucose	galactose
glucose	glycerol	lactose
lyxose	maltotriose	mannitol
mannose	melezitose	melibiose
myo-inositol	ribose	sucrose
threitol	threose	trehalose
xylose	β -gentiobiose	
Phosphates		
adenosine-5-monophosphate	glucose-6-phosphate	glycerol-1-phosphate
mannose-6-phosphate	phosphogluconic acid	pyrophosphate
β -glycerolphosphate		
Miscellaneous		
1,2,4-benzenetriol	benzoate	cholic acid
nicotinamide	phthalic acid	salicylaldehyde
salicylic acid	sulfuric acid	taurine
α -tocopherol		

[0065] 실시예 2: Spearman's rank correlation coefficient를 이용한 류마티스 관절염 중증도와 대사체 상관관계 분석 및 잠재적 중증도 구분 바이오마커의 제시

[0066] 류마티스 관절염의 중증도의 증가에 따라 유의미하게 증감하는 대사물질을 살펴보고자, 30명의 류마티스 관절염 환자에서 중증도인 DAS-28 ESR (3) score를 계산하고, 각 환자의 대사체 intensity와 어떻게 상관관계를 갖는지 Spearman's rank correlation coefficient를 통하여 분석하였다 (표 2). Spearman's rank correlation coefficient는 서로 다른 두 변수가 얼마나 연관성을 갖는지 상관관계를 분석하는 통계기법으로, 여기선 중증도 환자가 낮은 환자에서 높거나 낮은 수준의 대사물질이 중증도가 높은 환자에서 통계적으로 유의미하게 높아지거나 낮아지는지 살펴보기 위하여 적용되었다. 그 결과 30명의 환자에서 DAS-28 ESR (3) score와 검출된 125개의 대사물질 intensity 간의 상관관계를 구하였으며, 125개의 대사물질 중 환자의 중증도인 DAS-28 ESR (3) score가 증가할 때 p -value가 0.05 미만으로 통계적으로 유의미하게 증가하거나 감소하는 상관관계를 갖는 대사물질은 14개였다 (표 2). 표 2의 N은 샘플의 개수를 의미하며, Spearman R은 DAS-28 ESR (3) score, 즉 중증도가 증가함에 따라서 대사물질의 intensity가 감소하거나 증가하는 정도를 나타낸다. $t(N-2)$ 는 Spearman R을 통한 상관관계 분석 시의 통계적으로 계산된 상대 수치를 의미하며, p -value는 각 대사물질이 DAS-28 ESR (3) score에 증가에 따라서 얼마나 통계적으로 유의미하게 증가하였거나 감소하였는지 보여주는 신뢰구간을 나타낸다. Spearman R을 통한 상관관계 분석에서 DAS-28 ESR (3) score의 증가에 따른 대사물질의 증감이 p -value가 0.05 미만 수준에서 이루어질 경우에 통계적으로 유의미하다고 제시하였다.

표 2

[0067] Spearman's rank correlation coefficient를 이용한 류마티스 관절염 환자의 DAS28-ESR(3) 수치와 대사물질 intensity 간의 상관관계

Metabolite	N	Spearman R (ESR vs. intensity)	t(N-2)	p value
citrate	30	-0.58	-3.81	7.01.E-04
asparagine	30	-0.38	-2.16	3.97.E-02
tryptophan	30	0.37	2.08	4.72.E-02
cholic acid	30	0.38	2.15	3.99.E-02
arabitol	30	0.39	2.22	3.44.E-02
phenylalanine	30	0.41	2.38	2.43.E-02
adipate	30	0.42	2.42	2.22.E-02
glycocyamine	30	0.43	2.55	1.63.E-02
guaiacol	30	0.46	2.72	1.11.E-02
3-phenyllactate	30	0.48	2.87	7.68.E-03
isothreonate	30	0.52	3.19	3.48.E-03
fucose	30	0.53	3.30	2.62.E-03
glucose-6-phosphate	30	0.53	3.34	2.36.E-03
indole-3-lactate	30	0.60	3.96	4.70.E-04

[0069] 실시예 3: 14개의 잠재적 바이오마커를 이용하여 생성한 OPLS-DA 다변량 모델에 기반한 중증도 구분 진단 모델 확립

[0070] 중증도 구분 진단 모델을 확립하기 위해서, 각 환자의 DAS28-ESR(3) score의 정도에 따라서 각각의 샘플을 고중증도군과 중증증도군 환자로 나누었다. DAS-ESR(3) score가 5.1 이상이면 고중증도군, 5.1 미만이면 중증증도군으로 분류하였다.

[0071] 실시예 2에서 제시한 14개의 잠재적 중증도 진단용 대사물질의 intensity를 기반으로 고중증도와 중증증도의 환자군을 구분할 수 있는지 다변량 통계 및 모델링 OPLS-DA 기법을 통해 살펴보았을 때, 대사체 프로파일이 명확하게 차이가 나는 것을 확인하였다(도 1). 도 1의 A는 PLS-DA의 score plot으로 중증증도군의 환자는 PC1 차원의 값이 양수가 되며, 고중증도군의 환자는 PC2 차원의 값이 음수가 되어 중증증도 환자 1개의 샘플을 제외하고는 환자의 관절낭액 샘플을 14개의 대사물질 intensity에 따라서 정확하게 구분되는 것을 보여주는 도면이다. 도 1의 B는 OPLS-DA의 loading plot으로 각 대사물이 모델의 형성에 기여하는 수치를 양수 혹은 음수 값으로 나타낸 그림이다. 도 1의 C는 OPLS-DA 모델의 permutation tests로 고중증도 및 중증증도 군을 구분하는 OPLS-DA 모델이 통계학적으로 유의미하다는 점을 보여주는 도면이다.

[0073] 실시예 4: 외부 검체 진단 검증에 기반한 중증도 구분 진단용 OPLS-DA 다변량 모델 실효성 검증

[0074] 실시예 3를 통해 생성된 관절낭액 검체를 통한 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단용 대사체적 생체표지자 OPLS-DA 모델이 진단에 적절한지 살펴보기 위하여 모델 내 각 검체의 PC1 score를 이용해서 ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 그렸다.

[0075] 그 결과 sensitivity가 100%, 1-specificity가 100%, AUC값이 1.000으로 모델이 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단에 매우 적합함을 보였다(도 2).

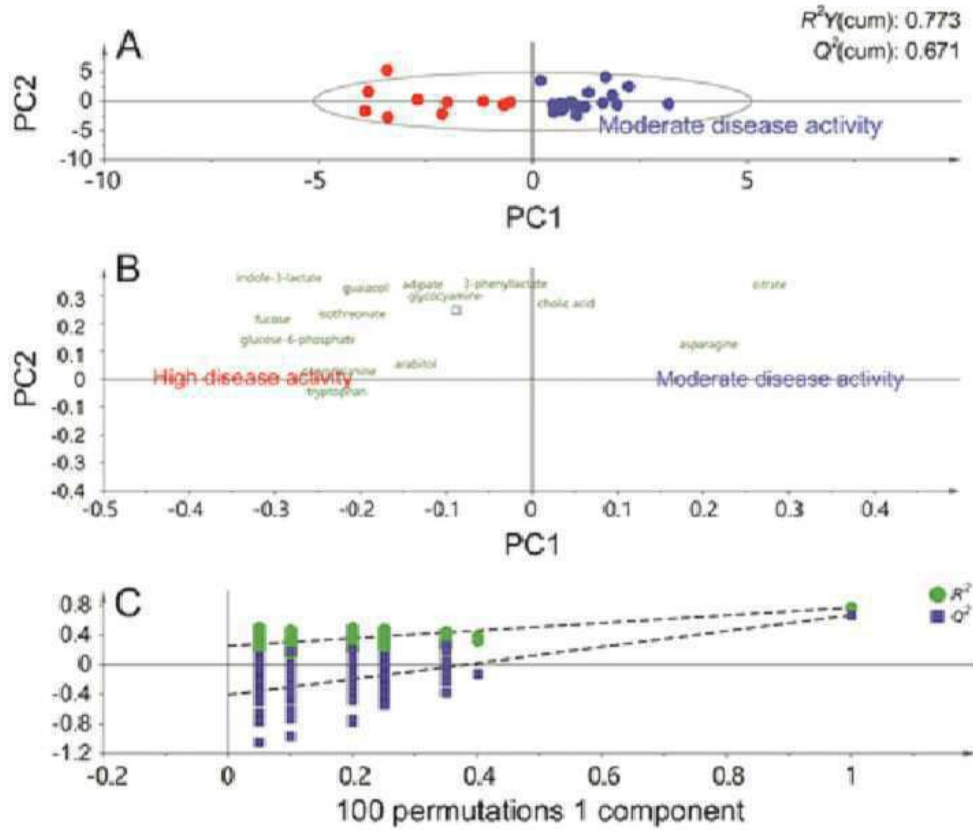
[0076] 또한, 이 모델이 외부 검체를 이용하여 류마티스 관절염 환자의 중증도 진단에 적절한지 살펴보기 위하여, 류마티스 관절염 환자 고중증도군 3명 및 중증증도군 7명의 관절낭액 검체를 실시예 1의 방법으로 대사체 추출 및 14개의 대사체를 검출하여 모델에 집어넣고 고중증도군 및 중증증도군을 구분할 수 있는지 살펴보았다.

[0077] 도 1의 모델은 류마티스 관절염 환자 관절 낭액에서 추출된 14개의 대사체의 intensity를 집어넣을 때, 고중증도군의 환자이면 PC1을 기준으로 음수 값을, 중증증도군의 환자이면 PC1을 기준으로 양수 값을 나타내는 OPLS-DA 모델이다. 마찬가지로 10개의 외부 검체도 추출한 14개의 대사체 인텐시티 정보를 모델에 집어넣는 경우에 중증도에 따라 PC1을 기준으로 음수 혹은 양수값을 갖게 되고 고중증도 혹은 중증증도를 판단할 수 있게 된다.

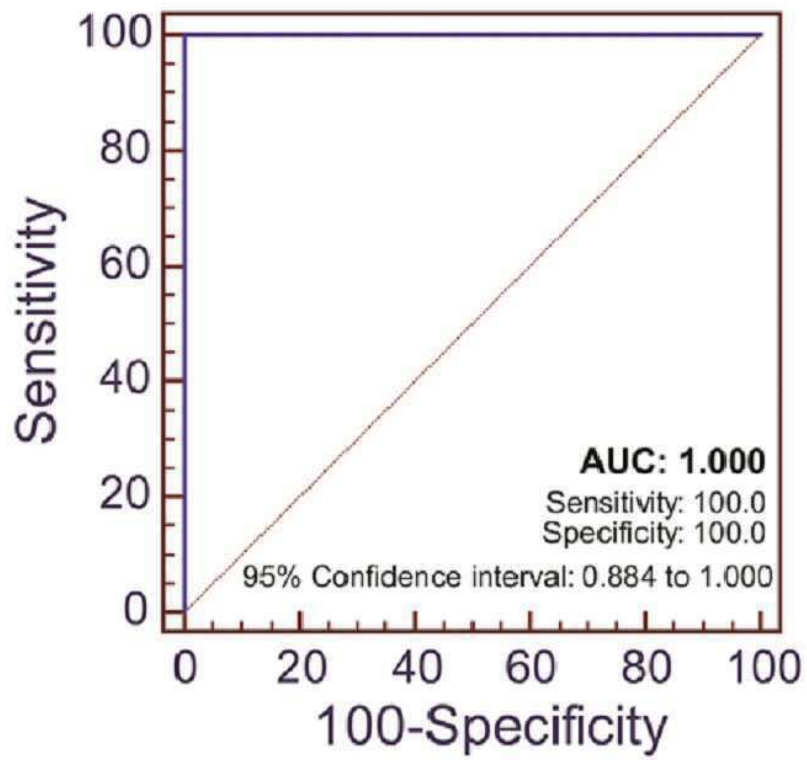
그 결과, 10개의 검체 중 3개의 고중증도 환자 검체는 PC1을 기준으로 음수 값을 보였으며 7개의 중증증도 환자 검체 중 6개는 PC1을 기준으로 양수 값을, 1개는 PC1을 기준으로 음수 값을 보였다. 따라서 총 10개의 검체 중 9개의 검체 환자의 중증도를 정확하게 예측하였으므로 14개의 대사체 생체 표지자 OPLS-DA 모델이 외부 검체의 중증도 진단에 적절함을 알 수 있었다 (도 3).

도면

도면1



도면2



도면3

