



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월10일

(11) 등록번호 10-2154601

(24) 등록일자 2020년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0111442

(22) 출원일자 2019년09월09일

심사청구일자 2019년09월09일

(56) 선행기술조사문헌

Sharon Kuzi et al., 'Canine procalcitonin messenger RNA expression', J Vet Diagn Invest., 2008, Vol. 20, pp 629-633. 1부.*

(뒷면에 계속) 기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

공주대학교 산학협력단

충청남도 공주시 공주대학로 56 (신관동)

(72) 발명자

유도현

경상남도 진주시 새평거리 111, 312동 1501호(평거동, 평거휴먼시아3단지)

김상기

광주광역시 동구 밤실로 69(산수동)

안수민

전라남도 광양시 폭포사랑길 96, 10동 104호(금호동, 장미아파트)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 3 항

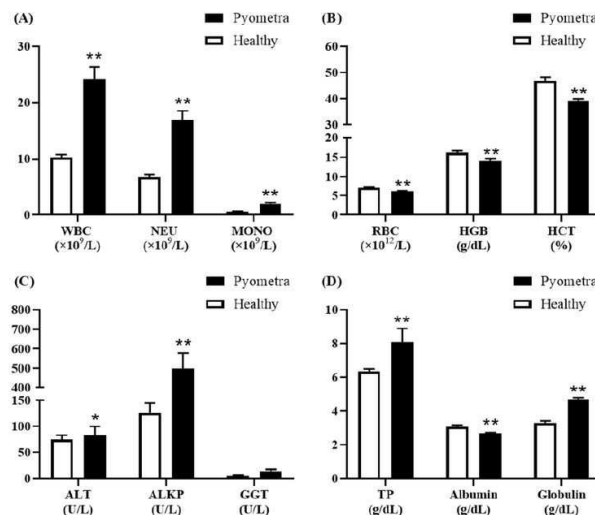
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 프로칼시토닌 측정을 통한 개 자궁 축농증의 예후 예측용 조성물

(57) 요약

본 발명은 프로칼시토닌 측정을 통한 개 자궁 축농증의 예후 예측용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 자궁 축농증에 걸린 개를 치료하였을 때 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)이 현저하게 감소하였으며, 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)은 조직 손상 지표와 통계적으로 유의적인 상관관계를 보여, 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 측정을 통해 개 자궁 축농증의 예후를 판정할 수 있는 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/5753 (2013.01)
G01N 2333/585 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160111202 A
 Genbank accession no: X56994.1 (Canine mRNA for calcitonin), (2016.07.)
 NCBI Reference Sequence: NP_001003266.1 (calcitonin isoform 2 preproprotein), (2019.02.)

BMC Veterinary Research, 2018, Vol. 14, pp 1-9.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ0128432019
부처명	농림수산식품부
과제관리(전문)기관명	경상대학교 산학협력단
연구사업명	반려견사업
연구과제명	반려견 자궁축농증에 대한 조기진단 바이오 마커 탐색 및 간이진단 키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립축산과학원
연구기간	2017.03.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

피검체 유래의 생물학적 시료에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현수준을 측정하는 단계 및 난소자궁절제수술(OHE) 후에 난소자궁절제수술(OHE) 전 보다 프로칼시토닌이 60 내지 70 퍼센트의 수치로 감소하는 경우 예후가 좋은 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 진단방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 개 자궁 축농증 예후 진단방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

상기 예후는 난소자궁절제수술(OHE)후에 개 자궁 축농증이 재발하지 않고 생존 또는 무병생존인 것을 특징으로 하는, 개 자궁 축농증 예후 진단방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 프로칼시토닌 측정을 통한 개 자궁 축농증의 예후 예측용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 수의학에서 패혈증은 20-70%로 높지만, 아직까지 이에 대한 빠르고 정확한 진단 방법이 없는 실정이다. 개의 자궁 축농증(pyometra)은 패혈증을 유발하는 개의 대표적인 질병이며, 임상증상을 보이기 전에는 무증상이지만 패혈증으로 빠르게 진행되는 경우 심각한 장기 손상을 유발한다.
- [0003] 자궁 축농증에 걸린 개의 경우 초기에는 구토와 무기력, 설사 등의 일반적인 증상을 보이는 경우가 많다. 하지만 복부 팽만, 외음부의 농성 분비물 등 증상과 나이, 중성화 수술 여부를 확인해보고, 구체적인 진단을 위해서는 초음파와 방사선 검사를 통해 확인해야한다.
- [0004] 이에 개의 자궁 축농증을 보다 간편한 방법으로 정확하게 진단 및 이의 예후를 예측할 수 있는 방법이 필요한 실정이나 아직까지 그 연구가 미미한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1732787호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 개의 자궁 축농증을 보다 간편한 방법으로 정확하게 진단 및 이의 예후를 예측할 수 있는 방법을 찾기 위해 예의 노력 중, 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)을 이용 시 자궁 축농증의 예후 및 치료의 모니터링 지표로 사용하기 적합함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 나아가, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 진단방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자가 코딩하는 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0018] 나아가, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 진단방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 예후는 난소자궁절제술(OHE)후에 개 자궁 축농증이 재발하지 않고 생존 또는 무병생존일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 자궁 축농증에 걸린 개를 치료하였을 때 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)이 현저하게 감소하였으며, 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)은 조직 손상 지표와 통계적으로 유의적인 상관관계를 보여, 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 측정을 통해 개 자궁 축농증의 예후를 판정할 수 있는 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 자궁 축농증이 있는 암컷 및 건강한 암컷의 다양한 임상 데이터에 대한 평균 변수를 나타낸 것이다.

도 2는 건강한 암컷보다 자궁 축농증이 있는 암컷에서 혈장 CRP, SAA 및 cfDNA가 증가하였음을 확인한 결과이다.

도 3은 자궁 축농증이 있는 개의 검출을 위한 각 바이오마커의 진단 민감도와 1-specificity를 비교하는 ROC 분석(Receiver operating characteristic analysis) 곡선을 나타내는 결과이다.

도 4는 건강한 암컷(A) 및 자궁 축농증이 있는 암컷(B, C, D) 자궁 조직의 대표적인 2 차원 겔 전기 영동 (2-DE)지도도를 나타는 결과이다.

도 5는 자궁 축농증이 있는 암컷의 임상 데이터에 대한 평균 변수의 변화를 난소자궁절제술(OHE) 이전 및 난소자궁절제술(OHE) 이후로 나눠 확인한 결과이다.

도 6은 건강한 암컷 및 자궁 축농증이 있는 암컷의 염증 매개 변수의 평균 농도를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명자들은 자궁 축농증의 진단 및 예후 예측을 위한 유전자 마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 자궁 축농증의 예후 예측 또는 치료에 이용할 수 있는 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자 마커를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0024] 이에 본 발명은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는, 개 자궁 축농증 예후 예측용 마커 조성물, 및 상기 조성물을 포함하는 개 자궁 축농증 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0026] 본 발명의 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자가 코딩하는 단백질을 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 대상으로 하는 질병인 “자궁 축농증”은 매우 대표적인 노령견의 질환으로 증성화를 하지 않은 암컷 노령견에서 흔하게 발생한다. 자궁 축농증의 진단은 초음파와 방사선 검사를 통해 이루어진다. 자궁 축농증은 적절한 치료가 안되면 치사율이 매우 높으므로 초기 진단이 매우 중요하다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어, “진단(diagnosis)”이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다.

- [0029] 본 발명에서 진단은 자궁 축농증의 발병 여부 및 진행단계 수준 등을 판단하는 것이다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어, “예후(prognosis)”란, 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명에서 예후는 자궁 축농증의 재발, 생존(overall survival), 또는 무병생존(disease-free survival)을 의미하는 것이나, 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기 길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이종결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 예후 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.
- [0037] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl₂를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량구조 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 본 발명의 마커 유전자가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이 형태일 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함하며, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함한다. 상기 ELISA 키트는 “항원-항체 복합체”를 형성한 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소, 및 그의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어 “항원-항체 복합체”란 유전자가 코딩하는 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미한다. 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT) 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁 축농증 예후 예측을 위한 정보제공방

법을 제공한다.

- [0043] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 또는 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 또는 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 용어 "개 자궁 축농증 예후 예측을 위한 정보제공방법"은 예후 예측을 위한 예비적 단계로써 자궁 축농증 예후 예측을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [0047] 나아가, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 개 자궁 축농증 진단방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명에서 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)의 발현 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정할 수 있다.
- [0050] 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.
- [0052] **<실시예 1>**
- [0053] **실험재료 및 방법**
- [0055] **1. 실험 설계**
- [0056] 전향적 무작위 체외 분석을 통해 염종의 몇 가지 바이오 마커를 분석한 결과 외과적 치료(ovariohysterectomy (OHE)) 전후에 채취된 혈액 샘플을 지속적으로 모니터링하여 설계하였다. 환자 선택, 임상 데이터 수집 및 혈액 샘플링은 전향적으로 수행하였다.
- [0057] 본 실험은 경상대학교(GNU)의 기관 동물위원회(IACUC) GNU-190218-D0010의 승인을 받아 수행되었다. 현재 연구에 포함시키는 기준은 자궁축농증(pyometra)의 진단 및 수술 전후 2 회 연속 수집된 해파린 혈장의 분취량을 포함한다. 본 실험에서는 2016-2019 년 동안 서울, 광주, 진주의 지역 동물 병원의 자궁축농증(pyometra)을 가진 개를 검토했다.
- [0058] 자궁축농증(pyometra)의 예비 진단은 신호, 케이스 내역 및 식욕 부진, 다발성 경화증, 다뇨증, 화농성 질 분비물, 진단 영상과 같은 임상 증상을 토대로 작성하였다. 자궁축농증(pyometra)의 진단의 확인은 이전에 제안된 정의뿐만 아니라 자궁 시스템의 전반적인 조직 병리학 검사를 기반으로 했다.
- [0059] 자궁축농증(pyometra)의 내과 기록, 신호, 신체 검사, 임상 징후, 일상 혈액 분석 및 진단 영상이 포함된 의료 기록을 검토하였다.
- [0060] 난소가 제거된 건강한 암개는 자궁축농증(pyometra) 개와 비교를위한 통제군 역할을 하였다. 수술 전 개는 역사상의 발견 할 수 없는 결과, 신체 검사, 완전한 혈구 수 및 혈청 생화학 분석을 토대로 건강한 것을 분류하였다.
- [0062] **<1-1> 자궁축농증(pyometra)과 건강한 개를 비교하기 위한 혈액 샘플 수집**

- [0063] 샘플을 정맥 천자(venipuncture)를 통해 수집하고 EDTA 튜브 또는 리튬 헤파린 튜브에 저장하였다. EDTA 혈액 샘플은 자동 혈액 분석기를 사용하여 분석하였다. 헤파린 튜브로부터 $3,000 \times g$ 에서 10 분간 원심 분리하여 헤파린화 된 혈장을 분리하였다. 플라스마는 플라스틱 동결 튜브(cryotubes)에 보관하였으며, 염증성 바이오 마커의 주기적 분석을 위해 경북대학교의 수의학 교육 병원 (Veterinary Teaching Hospital)에 배송될 때까지 $-20^{\circ}C$ 에서 냉동하였다. 지역 동물 병원의 샘플은 드라이 아이스로 보관하여 경북대학교로 이송되었다. 도착 시 모든 샘플을 동결시켰고 플라스마는 염증 바이오 마커의 분석에 필요할 때까지 디프 프리저(deep freezer)에 $-80^{\circ}C$ 로 보관했다. 동결과 해동은 반복되지 않았으며, 헤파린 처리된 혈장 샘플을 실온(RT)에서 해동시키고 분석 직전에 원심 분리하였다.
- [0065] **<1-2> 자궁 조직 수집**
- [0066] 자궁축농증(pyometra)과 건강한 개에서 자궁 조직 샘플은 proteomic 분석을 위해 자궁에서 염증의 원인 바이오 마커를 식별하기 위해 준비했다. 절제된 자궁 조직을 잘라내어 2 ml의 에펜 도르프 튜브에 넣고 분석할 때까지 $-80^{\circ}C$ 의 디프 프리저(deep freezer)에 보관했다. 자궁축농증(pyometra) 3개와 건강한 1개가 무작위로 선택된 4 개의 샘플을 Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Tandem(MALDI-TOF / TOF) MS와 결합한 2-DE를 받았다. 샘플에서 조직 단백질 프로파일링은 등전점 및 분자량 차이를 기반으로 하였다. 자궁 샘플을 분석하는 연구원은 환자 개의 결과를 모르게하였으며, 2 차원 겔 분석을 수행하여 의심되는 염증 단백질 스폿을 결정하게 하였다. 상응하는 단백질 반점을 MALDI-TOF / TOF MS에 적용하여 펩타이드 지문을 얻었으며 이후 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스를 통해 확인하였다.
- [0068] **<1-3> 외과적 절제술 후 자궁축농증(pyometra)와 건강한 개 간의 혈액 분석 비교**
- [0069] 초기 혈액 샘플은 개 시술 전 (OHB 시술 이전 처리군), 외과적 치료 후 1-3일이 경과된 처리군(임상적으로 호전됨, OHB 시술 이후 처리군)의 혈액 샘플을 채취하였다. 손상되지 않은 암개의 임상 자궁축농증(pyometra)은 OHE 후 1-3 일 후에 염증성 자극의 출현에서부터 염증의 제거까지 염증성 바이오 마커에서 발생하는 역동적인 변화를 감지 할 수 있는 기회를 제공했다. 자궁축농증(pyometra)과 건강한 대조군 간의 장기 기능 장애의 비교도 가능하다.
- [0071] **2. 자궁축농증(pyometra)의 임상 매개 변수 비교**
- [0072] 의료 기록에서 수집된 데이터에는 품종, 연령, 체중, 사례 기록, 신체 검사 결과, 적어도 전체 혈액 검사 및 혈청 생화학 분석을 포함한 모든 임상 데이터 평가가 포함된다. 제외 기준은 임신 또는 분만이다.
- [0073] 글루코스, 총 단백질, 알부민, 글로불린, 총 빌리루빈, 알라닌 아미노 전이 효소 (ALT), 알칼리 포스파타아제 (ALKP), 감마 - 글루타밀 전이 효소 (GGT), 혈액 요소 질소 (BUN), 크레아티닌 및 인을 포함하는 장기 손상 및 개들의 전반적인 임상 상태를 평가하기 위해 혈액 가스 분석기(Nova pHOX 분석기, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA)와 측매 Dx[®]를 사용하여 산 - 염기 균형, 전해질 농도 및 혈청 생화학 분석을 실시했다. 플라스마 콜레스테롤, 아밀라아제 및 리파아제도 이 패널에서 혈장 분리 직후 분석되었다.
- [0075] **3. 자궁축농증(pyometra)에서 염증 매개 변수의 비교**
- [0076] 한 번 상온에서 해동된 냉동 혈장 시료를 원심 분리하고 조심스럽게 혼합하고 분석을 위해 피펫팅하여 버피 코트를 방해할 위험을 최소화하였다. 모든 바이오 마커 측정은 적절한 대조군과 함께 2 회 수행하였다.
- [0078] **cfDNA.**
- [0079] 이전에 개에 사용하기 위해 검증된 cfDNA의 측정은 관련 시약을 사용하는 형광 검출법을 통해 탁상형 형광 측정기(Qubit[®] dsDNA HS Assay 키트 및 Qubit[®] 1.0 형광 측정기, Life Sciences, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 수행되었으며, 이를 제조자의 지시에 따라 처리 하였다.
- [0080] 간략하게, 분석 당 사용된 반응 부피는 혈장 샘플 $10\mu l$ 를 포함하여 $200\mu l$ 였다. 각 배치를 분석하기 전에 표준 측정 값을 사용하여 형광 측정기를 보정하였다. cfDNA의 농도는 희석 알고리즘 Qubit[®] 1.0 (Life Sciences, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 결정하였다. 필요한 경우, 분석 결과를 선형 분석 범위로 가져 오기 위해 샘플을 희석하였으며, 모든 결과는 2 배 희석하여 보정하였다.
- [0082] **IL-6.**
- [0083] 혈장 IL-6은 상업적으로 이용 가능한 매치된 개 항체 쌍 (DuoSet ELISA 개발 키트, R & D Systems,

Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 ELISA법으로 측정하였다.

- [0084] 검정은 DuoSet ELISA를 DuoSet Ancillary Reagent Kit2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 이중으로 수행하였다.
- [0085] 간단히, 96-웰 플레이트의 웰을 포획 항체 (goat anti-canine IL-6 capture antibodies)로 코팅하고, 실온에서 PBS로 밤새 희석하였다. 플레이트를 시약 희석제[1% BSA (bovine serum albumin) in PBS (phosphate buffered saline), 300 μ l/well, R&D Systems]로 2 시간 동안 차단하고 세척 완충액(0.05% Tween[®] 20)을 사용하여 세척하였다.
- [0086] 스탠다드 및 혈장 샘플을 실온에서 2 시간 동안 각 웰(100 μ l/well)에 첨가 하였다. 세척 후, 검출 항체 (biotinylated goat anti-canine IL-6 antibody)를 각 샘플에 첨가하고, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP);(1:200 in reagent diluent, 100 μ l/well, R&D Systems)를 첨가하여 검출을 달성 하였다; 및 테트라 메틸 벤지딘(TMB); (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)액체 기질 용액을 첨가한 다음, 각 샘플을 20 분 동안 인큐베이션 하였다.
- [0087] 그런 다음 반응을 중지 용액 (2N H₂SO₄, 50 μ l / well, R & D Systems)을 사용하여 중단시켰다. IL-6의 검출 한계는 62.5 pg / ml이었다. 모든 개들의 혈장 샘플을 스파이크 및 회복 실험의 기준으로 사용하였으며, 스파이킹 레벨은 분석검출 한계에 기반하여 결정하였다. 본 발명에서는 75 % ~ 125 %의 회복은 수용 가능한 것으로 간주 하였다.
- [0089] **CRP and SAA.**
- [0090] 시판되는 ELISA 키트 (Phase SAA, CRP kit, Tridelata Development Limited, County Kildare, Ireland)를 사용하여 CRP 및 SAA를 분석 하였다.
- [0091] 초기 측정 전에 샘플을 500 배 희석하는 것과 같은 제조사의 지시 사항을 각 분석 단계에서 따랐다. 그러나, 거의 모든 개에 대한 결과 흡광도 값은 분석의 읽을 수 있는 범위 이상이었다(데이터 미도시). 모든 후속 검정은 SAA에 대해 20 만 배 희석 및 CRP에 대해 2,000 배 희석을 사용하여 수행 하였다. 개 CRP에 대한 분석은 각 웰에 첨가된 anti-canine-CRP 항체를 이용하여 수행하였다. 다시 세척하여 비 결합 된 물질을 제거한 후, TMB 기질 용액을 첨가 하였다. SAA는 웰에 코팅 된 SAA에 특이적인 단일 클론 항체를 사용하여 샌드위치 형 ELISA를 통해 분석하였다. 각 웰에 50 μ l의 샘플을 첨가한 후, TMB 기질 용액 및 정지 용액을 첨가하였다.
- [0092] 분석 검출의 하한은 CRP의 경우 7.5ng / mL 및 SAA의 경우 10ng / mL였다.
- [0094] **HMGB1.**
- [0095] 샘플을 희석하지 않는 것과 같은 제조사의 프로토콜에 따라 Canine HMGB1을 시판용 canine ELISA 키트 (MyBiosource, San Diego, CA, USA)를 사용하여 정량화하였다.
- [0096] 이를 간단히 설명하면, 스탠다드 및 혈장 샘플을 각 스트립 플레이트 웰 (50 μ l / 웰)에 첨가하였다. 그 다음, HRP- 접합체 시약 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 액체 기질 용액을 첨가하고 어두운 조건 하에서 15 분 동안 인큐베이션함으로써 검출을 달성하였다. 산성 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰으며, 분석 검출의 하한은 6.25 ng / mL였다.
- [0098] **PCT.**
- [0099] PCT는 제조사의 지침에 따라 시판용 canine ELISA 키트 (Biovendor LLC, Asheville, NC, USA)를 사용하여 측정 하였다.
- [0100] 이를 간단히 설명하면, 스탠다드 및 혈장 샘플을 96- 웰 플레이트 (100 μ l / 웰)의 각 웰에 피펫팅하고 실온에서 1 시간 동안 배양하였다.
- [0101] 매뉴얼에 따라 세척 후, 각 세척 단계에서 4 번째 세척을 첨가하여 웰 당 세척 완충액 350 μ l를 사용하여 수행한 후, 100 μ l의 바이오틴 표지된 폴리클론 항 - 개과 프로칼시토닌을 각 웰에 첨가하고 1 시간 동안 반응시켰다. 다음으로, 스트렙타비딘-HRP를 첨가하고 기질을 사용하여 퍼옥시다제 활성을 정량하였다. PCT분석 검출의 하한은 12.5 pg / mL였다.
- [0102] 위에서 설명한 모든 ELISA는 광학 밀도 Softmax[®] Pro 분석 소프트웨어 (Molecular Devices, Boston, MA, USA)

를 측정하기 위한 기준 파장으로 450 nm의 마이크로 플레이트 분광 광도계 VersamaxTM (Molecular Devices, Boston, MA, USA)를 사용하여 개발하였다. 540 nm에서 판독 값을 뺀 값으로 파장을 보정했다. IL-6의 경우 450 nm에서, CRP, SAA 및 PCT의 경우 450 nm에서, HMGB1의 경우 450 nm에서 630 nm에서 판독되었다.

[0104] 4. 자궁 조직이있는 프로테오믹스

[0106] <4-1> 2-DE 용 샘플 준비

[0107] 실험방법에 대해 간단히 설명하면, 자궁 조직을 PBS로 2 회 세척하여 잔류 성분을 제거하고, 7M 우레아, 2M 티오우레아 및 4 % (w / v) CHAPS를 포함하는 용해 완충액 얼음에서 1 시간 동안 현탁시켰다. 샘플을 초음파 처리하여 모든 조직 샘플의 파괴를 확인하고 균질화시켰다. 14,000 rpm, 4℃의 온도에서 15 분 동안 원심 분리한 후, 상등액을 분리하고 에펜도르프 튜브에 넣었다. 단백질을 침전시키기 위해 단백질 펠렛을 20 % 트리클로로아세트산(TCA)에 4℃의 온도에서 30 분간 재현탁하고 균질화기를 사용하여 파쇄하였다. 생성된 펠렛을 얼음으로 냉각시킨 100 % 아세톤으로 2 회 세척하고, 동결 건조기(SFDSM06, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)로 건조시켰으며, 200μl의 샘플 완충액에 용해시켰다. 단백질 농도는 PierceTM BCA 단백질 분석 키트(Thermo ScientificTM Waltham, MA, USA)를 사용하여 제조자의 프로토콜에 따라 결정하였다.

[0109] <4-2> 2-DE 및 이미지 분석

[0110] Isoelectric focusing은 GE Healthcare ImmobilineTM DryStrip Gels (18cm, pH 4-7, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 수행하였으며, 스트립은 7M 요소, 2 % CHAPS, 20mM DTT, 0.5 IPG 완충액, 브로모페놀 블루를 첨가하고 실온에서 배양 하였다. 각 단백질 샘플의 동일한 양(500 μg)을 IPG 스트립에서 재수화 하였다. 등전위 포커싱은 Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)의 하기 조건인 50V (1 시간), 200V (1 시간), 500V (30 분), 기울기 4,000V (30 분), 4,000V (1 시간), 기울기 10,000V (1 시간), 10,000V (13 시간) 및 50V (3 시간)에서 수행하였다.

[0111] 스트립을 평형 완충액[6 M urea, 30% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris-HCl]에서 먼저 10mg / ml DTT로 15 분간 반응시키고, 이어서 40mg / ml 요오도 아세트 아미드 (IAA)와 15 분 동안 연속적으로 반응시켰다.

[0112] 첫 번째 디멘션(dimension) 다음에, 12 % SDS-PAGE를 사용한 두 번째 디멘션(dimension)을 20 ℃에서 25 mA / 겔의 정전류로 Ettan DALT II 시스템에서 수행했다. 염료가 겔의 바닥에 도달 할 때까지 실온에서 Protein-II 전기 영동 장비 (Bio-Rad)를 사용하여 2-DE를 수행하였다.

[0113] 전기 영동 후, 수정과 함께 질산은으로 염색하였다. 총 4 개의 독립적인 겔을 3 중으로 사용하였다. 간단히 말해서, 겔을 고정 용액 (5% acetic acid in 50% ethanol)에서 3 시간 동안 항온 배양하고, 30 분 에탄올로 15 분 동안 1 회 세척하고 증류수로 3 회 각 5 분씩 행구었다. 세척 후, 겔을 0.02 % 티오황산나트륨(sodium thiosulfate)을 사용하여 10 분 동안 감작시키고, 매회 1분씩 증류수로 3 회 행구었다. 겔을 실온에서 20 분 동안 은 염색 용액 (0.3 % 질산은)을 사용하여 염색하고, 매회 1분씩 증류수로 3 회 세척하였으며, 3 % 탄산나트륨, 0.02 % 티오 황산나트륨 및 0.05 % 포르말린을 함유하는 용액으로 단백질 반점이 충분히 시각화될 수 있을 때까지 전개시켰다. 이어서, 정지 용액 (6 % 아세트산)을 사용하여 반응을 정지시켰다.

[0114] 은 염색된 겔을 BioRad GS-800 농도계로 스캐닝하고 Progenesis SameSpotsTM 2D 소프트웨어 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)를 통해 이미지 분석을 수행 하였다.

[0115] Variations of Analysis의 analog에 의해 처리된 바와 같이 1.5 배를 초과하는 단백질 반점과 P <0.05 인 발현 변화가 유의적으로 변화된 것으로 간주하였으며, 선택된 스팟(spot)을 육안으로 확인하고 염색된 겔에서 수동으로 절제하였다.

[0117] <4-3> MALDI-TOF / TOF MS 분석에 의한 단백질 동정

[0118] MALDI-TOF / TOF MS에 대한 겔 스팟을 준비하기 위해 탈색 용액 (30 mM potassium hexacyanoferrate, 100 mM sodium thiosulfate)을 모든 스팟에 첨가하여 은 염색을 제거 하였다.

[0119] 단백질 소화는 기존 방법에서 약간 수정하여 수행하였다. 간략하게 설명하면, 절제된 단백질 반점을 50 % 메탄올 중 10 % 아세트산으로 3 회 세척 하였다. 세척 후, 겔 스팟을 100μl의 아세토니트릴 및 100μl의 100mM 암모늄 바이카보네이트로 각각 5 분 동안 처리하였다. 이어서, 진공 동결 건조기 (SFDSM06, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)를 사용하여 excised gel spot을 건조시키고, 실온에서 45 분 동안 환원 용액

(10 mM DTT in 0.1 M ammonium bicarbonate)에서 배양하고, 알킬화 용액(55 mM iodoacetamide in 0.1 M ammonium bicarbonate)으로 30 분 동안 암실에서 처리하였다. 그 후, 0.1M 암모늄 바이카보네이트를 사용하여 5 분 동안, 0.1M 암모늄 바이카보네이트를 사용하여 15 분 동안 스팟들을 탈수시켰다.

[0120] 마지막으로, 20 ng / μ l trypsin (Promega Corporation, Madison, WI, USA) 및 0.1 % octyl beta-D glucopyranoside를 포함하는 소화 완충액을 얼음 냉각 25 mM 중탄산 암모늄에서 사용하여 겔 스팟을 단백질 분해 하였다. 45 분 후, 용액을 트립신이 없는 50 mM NH_4HCO_3 30 μ l로 대체하고, 단백질 분해를 37 °C에서 밤새 수행 하였다.

[0121] 트립신 펩타이드는 66 % 아세토니트릴 중 0.1 % 트리플루오로 아세트산을 사용하여 추출하고 진공 동결 건조기를 사용하여 2 시간 동안 건조시켰다.

[0122] MALDI-TOF / TOF MS 분석은 전술한 바와 같이 수행 하였다. 간단히 말하면, 소화된 펩타이드 용액 (in 50% ACN, 0.1% TFA)을 피켓으로 MALDI-TOF / TOF 표적 판상에 스폿팅하였다. MS / MS 분석은 355 nm에서 작동하는 200 Hz ND : YAG 레이저를 사용하는 ABI 4800 Plus TOF-TOF 질량 분석기 (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)에서 수행하였다. 신호 / 잡음 비율 > 25 인 MALDI 스팟 당 가장 강한 10 개의 이온을 800-1,000 회 연속 레이저 샷을 사용하는 1 KV 모드에서 후속 MS / MS 분석을 위해 선택하였다. MS / MS 분석 동안 공기를 충돌 가스로 사용하였다. 데이터를 4500 Proteomics Analyzer (calibration Mixture1)를 위한 Mass Standard Kit로 사용하였다. Protein Pilot v.3.0 (with MASCOT as the database search engine)에 의해 NCBI 데이터베이스에 대해 MS / MS 스펙트럼을 검색하였으며, 소화성 및 조각 이온 질량 허용 오차는 50ppm이었다. 펩타이드 탐색 동안 시스테인의 카르바미도메틸화(Carbamidomethylation) 및 메티오닌의 산화가 허용되었다. 선택된 단백질의 펩티드 질량 내성 및 프래그먼트 질량 내성을 50 ppm으로 설정하였다. 개별 펩티드 이온 점수는 P = 0.05의 통계적으로 유의한 한계점을 사용하여 조사하였다.

[0124] 5. 통계 분석

[0125] 평균, 표준 편차 및 유의한 차이를 계산하였다. 자궁축농증(pyometra)과 건강한 동물의 차이점 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하여 수행되었으며, 다른 임상 데이터를 보여주는 자궁축농증(pyometra) 개 소그룹 간의 염증 매개 변수의 차이를 평가하는데도 사용하였다. 두 변수 간의 선형 상관 관계는 피어슨의 상관 계수를 통해 테스트하였다. 연속 변수의 경우, Wilcoxon 2 샘플 테스트를 사용하여 자궁축농증(pyometra)과 건강한 개 사이 및 OHE 전후의 차이를 테스트하였다. 또한, 자궁축농증(pyometra) 및 건강과 관련된 특성, 실험실 조건 및 개입 결과와 관련된 개는 선형 혼합 모델을 사용하여 테스트하였다. 통계적 유의성은 P < 0.05와 P < 0.01로 설정하였다. 통계 소프트웨어 패키지 SPSS (SPSS 25.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 모든 통계적 평가를 수행하였다. GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 사용하여 모든 그래프를 플롯하였다. 또한, 모든 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD)로 표시하였다.

[0127] <실시예 2>

[0128] 개들의 분류와 특성

[0129] 본 발명에서는 다양한 품종, 체중 및 연령의 암컷 개 116 마리를 연구에 포함시켰다. 이 동물들은 임상 데이터 분석에 사용된 자궁축농증(pyometra) 90 케이스와 건강한 대조군 개 26 케이스를 포함한 것이다. 이 중 자궁 내 감염원의 바이오 마커를 검출하기 위해 3 개의 자궁축농증(pyometra)과 1 개의 건강한 개를 자궁 조직으로 무작위 추출 하였다.

[0130] 수술 후 22 개의 자궁축농증(pyometra)과 9 개의 건강한 대조 샘플을 치료 모니터링 지표 분석에 활용하였다. 90 케이스의 자궁축농증(pyometra) 개 중 54 케이스는 OHE 전 임상 데이터에 대해서만 분석되었으며, 14개의 케이스는 OHE 후 혈장 샘플 부족으로 사전 OHE 기간 동안 데이터의 실험실 분석에 사용되었다. 유사하게, 26 명의 건강한 대조군 중 15 마리의 개는 OHE 이전의 임상 데이터에 대해서만 분석되었다.

[0131] 90 케이스의 자궁축농증(pyometra)의 품종은 다음과 같다; 말티즈(24 마리), 시츄(11 마리), 요크셔 테리어(10 마리), 소형 푸들(9 마리), 소형 슈нау저(7 마리), 포메라니안(7 마리), 혼합 품종 개(6 마리), 미니어처 핀셔(4 마리), 닥스훈트(2 마리), 프렌치 불독(2 마리), 진돗개(2마리) 및 차우차우, 코카스페니얼, 골든 리트리버, 포인터, 풍산, 시바개는 각 한 마리씩이다. 자궁축농증(pyometra) 및 대조군인 건강한 개의 특성을 표로 나타냈다(표 1 참조).

[0132] 대조군으로 사용된 건강한 개들은 모두 5 세(range 1-10)의 중간 나이를 가진 건강한 암컷 개로 구성되었다. 대

부분의 건강한 개의 품종은 혼합된 품종이었다. 자궁축농증(pyometra) 개의 연령은 대조군으로 사용된 건강한 개에 비해 유의적으로 높았다(mean 9 years for pyometra dogs versus 5 years for healthy controls, P = 0.000).

[표 1] 자궁축농증(pyometra) 및 대조군인 건강한 개의 특성 확인

Variables	Category	Pyometra		Healthy	
		n	%	n	%
Breed	Maltese	24	26.7	4	15.4
	Shih Tzu	11	12.3	1	3.8
	Yorkshire Terrier	10	11.1	1	3.8
	Miniature Poodle	9	10	6	23.1
	Miniature Schnauzer	7	7.8	1	3.8
	Pomeranian	7	7.8	0	0
	Mixed breed	6	6.7	4	15.4
	Miniature Pinscher	4	4.4	1	3.8
	Dachshund	2	2.2	1	3.8
	French Bulldog	2	2.2	0	0
	Jindo	2	2.2	1	3.8
	Chow Chow	1	1.1	0	0
	Cocker Spaniel	1	1.1	2	7.7
	Golden Retriever	1	1.1	0	0
	Pointer	1	1.1	0	0
	Pungsan	1	1.1	0	0
	Shiba	1	1.1	0	0
	Chihuahua	0	0	3	11.5
	Bichon Frise	0	0	1	3.8
Age	Median (range)	9 years (1-15)		5 years (1-10)	

<실시예 3>

자궁축농증(pyometra)과 건강한 암컷 개 비교 결과

<3-1> 임상데이터 평가 결과

본 발명에서는 혈액 및 생화학 데이터를 포함한 임상 데이터를 대부분의 피검자에 대해 분석하였다. 대부분의 임상 데이터 분석 결과, 자궁축농증(pyometra)을 앓고 있는 개와 건강한 대조군간에 유의한 차이를 보였다. 본 실험에서 사용된 116마리 개 전체에 대한 혈액학적 데이터를 분석하였다.

그 결과, 분석된 혈액학 변수(표 2 참조) 중 자궁축농증(pyometra) 개는 백혈구, 호중구 및 단핵구 수($24.29 \pm 2.08 \times 10^9$, $16.91 \pm 1.67 \times 10^9$, $1.95 \pm 0.29 \times 10^9$ / L, 각각)가 현저하게 높게 나타났으며, 적혈구, 헤마토크릿, 헤모글로빈 농도($6.10 \pm 0.12 \times 10^{12}$ / L, 39.15 ± 0.89 %, 14.06 ± 0.52 g / dL, 각각)는 건강한 개보다 유의하게 낮았다(도 1-A,B 참조). 그러나 림프구와 혈소판을 포함한 혈구 수와 관련된 다른 변수는 통계적으로 차이가 없었다.

자궁축농증(pyometra) 개에서 총 단백질, 글로불린, ALKP, 그리고 아밀라아제 농도가 유의하게 증가하였다(8.07 ± 0.82 g / dL, 4.66 ± 0.13 g / dL, 497.85 ± 81.59 U / L, 1334.57 ± 354.85 U / L, 각각); (도 1-C, D 참조), 건강한 대조군에 비해(6.34 ± 0.15 g / dL, 3.29 ± 0.11 g / dL, 126.00 ± 18.61 U / L, 561.35 ± 48.85 U / L, 각각); (P <0.01). 또한 자궁축농증(pyometra)의 ALT와 콜레스테롤 농도(83.29 ± 16.48 g / dL, 252.80 ± 11.93 mg / dL, 각각)는 건강한 대조군(74.85 ± 8.13 g/dL, 191.83 ± 15.17 mg/dL, 각각)에 비해

유의하게 증가 하였다.

[0143] 알부민, 리파아제 및 염화물 농도는 건강한 대조군(3.06 ± 0.09 g/dL, 783.83 ± 79.26 U/L, 114.36 ± 0.69 mmol/L)에 비해 자궁축농증(pyometra) 군(2.66 ± 0.05 g/dL, 651.54 ± 159.95 U/L, 107.07 ± 1.968 mmol/L, 각각)에서 유의하게 감소 하였다.

[표 2] 자궁축농증(pyometra) 군과 대조군인 건강한 암컷 개의 임상데이터
(도 2의 데이터 제외)의 평균 변수

Variables	Pyometra	Healthy	P-value
PLT ($\times 10^9/L$)	326.62 ± 20.45	348.42 ± 34.97	0.428
Glucose (mg/dL)	118.84 ± 6.01	102.58 ± 4.24	0.185
BUN (mg/dL)	23.84 ± 2.72	18.80 ± 1.20	0.191
Creatinine (mg/dL)	1.15 ± 0.19	0.73 ± 0.06	0.160
Phosphorus (mg/dL)	5.76 ± 0.42	4.66 ± 0.29	0.346
Total Ca (mg/dL)	9.54 ± 0.18	9.19 ± 0.41	0.895
Total bilirubin (mg/dL)	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.06	0.550
Cholesterol (mg/dL)	252.80 ± 11.93	191.83 ± 15.17	0.010*
Amylase (U/L)	1334.57 ± 354.85	561.35 ± 48.85	0.008**
Lipase (U/L)	651.54 ± 159.95	783.83 ± 79.26	0.000**
pH	7.39 ± 0.01	7.40 ± 0.01	0.446
Na (mmol/L)	145.45 ± 1.07	146.28 ± 0.76	0.808
K (mmol/L)	4.25 ± 0.07	4.46 ± 0.13	0.185
Cl (mmol/L)	107.07 ± 1.968	114.36 ± 0.69	0.002**
iCa (mmol/L)	1.36 ± 0.08	1.25 ± 0.02	0.644
iMg (mmol/L)	0.51 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.124
HCO ₃ (mmol/L)	20.18 ± 1.04	19.51 ± 0.55	0.669
Lactate (mmol/L)	2.16 ± 0.28	2.11 ± 0.31	0.869

Data are presented as mean $\pm$ SD. * indicates $P < 0.05$ and ** indicates $P < 0.01$ versus healthy group.

PLT, platelet; BUN, blood urea nitrogen; iCa, ionized calcium; iMg, ionized magnesium; HCO₃, bicarbonate.

[0145]

[0147] <3-2> 염증 매개 변수 평가

[0148] 도 2는 자궁축농증(pyometra) 군과 건강한 개에서 염증 매개 변수의 농도를 나타내었다.

[0149] 건강한 개에서 CRP의 혈장 농도는 $0.2 \sim 24.0$ mg / L 범위였다. 자궁축농증(pyometra)에서 CRP 농도는 $1.8 \sim 410.4$ mg / L 범위였고, 6 마리의 개는 건강한 개의 범위와 겹쳤다(도 2-A 참조). CRP 농도의 차이는 통계적으로 유의했다($P = 0.000$).

[0150] SAA 수치(range: 26.9 to 21,007.4 mg/L)는 가변적으로 넓게 기록되었다. 건강한 개에서 SAA의 혈장 농도는 26.9에서 725.9 mg / L 범위였다. 자궁축농증(pyometra)에서 SAA 농도는 132.5에서 21,007.4mg / L 범위였다. SAA 농도의 차이는 유의적이었다 ($P = 0.001$; Mann-Whitney U test); (도 2-B 참조).

[0151] 건강한 개에서 cfDNA의 혈장 농도는 554.5에서 1,015 μ g / L 범위였다. 자궁축농증(pyometra)에서 cfDNA는 638.5에서 3,860 μ g / L 범위였다. SAA와 유사하게, cfDNA 농도는 가변적이었다. cfDNA 농도의 차이는 유의미하게 나타났다($P = 0.001$; Mann-Whitney U test); (도 2-C 참조).

[0152] 건강한 개의 78 % (7/9)에서 IL-6의 혈장 농도는 검출 한계 이하였다. 흥미롭게도, 자궁축농증(pyometra) 개는 30 % (11/36)가 $0.16 \sim 106.63$ ng / mL 범위의 혈장에서 측정 가능한 IL-6을 갖는 유사한 결과를 산출했다. 혈장 IL-6 농도 간에는 유의한 차이가 없었다($P = 0.65$, Mann-Whitney U test); (도 2-D 참조).

[0153] 건강한 개에서 PCT의 혈장 농도는 50에서 297 pg / mL 범위였다. 자궁축농증(pyometra)에서 PCT는 5에서 1,420

μg / L 범위였다. 혈장 PCT 농도 간에는 유의 한 차이가 없었다($P = 0.35$, Mann-Whitney U test); (도 2-E 참조).

[0154] 건강한 개 (n = 3)의 HMGB1 혈장 농도는 42.6에서 56.4 μg / L 범위였다. 자궁축농증(pyometra)(n = 34)에서 HMGB1 농도는 6.25 ~ 190.8 μg / L 범위였다. 건강한 개의 평균값은 자궁축농증(pyometra)보다 높았으나 혈장 HMGB1 농도에는 유의한 차이가 없었다($P = 0.24$, Mann-Whitney U test); (도 2-F 참조).

[0155] 자궁축농증(pyometra) 개와 건강한 개를 구별하기위한 각 바이오마커의 유용성을 ROC 곡선을 사용하여 평가했다 (도 3 참조). 또한, 개에서 자궁축농증(pyometra) 검출에 대한 민감도, 특이성 및 차단 값을 평가했다(표 3 참조). 혈장 cfDNA는 자궁축농증(pyometra) (cut-off value 682.75 μg/L)를 가진 분화된 개를위한 가장 좋은 감도 (97 %)와 특이성 (80 %)을 보였으며, 복합 감도는 88 %, 특이도는 100 % 컷 - 오프 값은 13.17 mg / L이다.

[0156] 자궁축농증(pyometra) 개에서 SAA와 CRP는 유의한 상관 관계가 있었다 ($r = 0.68$, $P = 0.000$). cfDNA 농도는 WBC, 호중구 및 글로불린 수와 상관 관계가 있었다 ($r = 0.46$, $r = 0.47$, $r = 0.44$, $P < 0.01$). 유사하게, IL-6 과 총 단백질 함량 간에는 적절한 상관 관계가 있었다($r = 0.88$, $P = 0.000$). 또한, PCT는 헤마토크리트 (hematocrit), 단핵구(monocyte), BUN, 총 칼슘, 알부민, 글로불린 및 ALKP와 유의한 상관 관계가 있었다(표 4 참조).

[0157] 임상 자료를 통해 결정된대로 자궁축농증(pyometra) 개 (임상적으로 나쁜 개)의 소그룹 사이의 염증 매개 변수의 차이에 대한 자세한 내용을 얻기 위해 일부 독립적인 범주도 평가했다(표 5 참조). 염증 매개 변수의 차이는 cfDNA와 CRP에서 발견되었으며 두 가지 바이오마커는 몇 가지 중요한 임상 매개 변수와 관련이 있다.

[표 3] 개에서 자궁축농증(pyometra) 검출을 위한 각 바이오마커의 감도, 특

이성 및 컷-오프 값

	cfDNA (μg/L)	CRP (mg/L)	SAA (mg/L)	IL-6 (ng/ml)	PCT (pg/ml)	HMGB1 (ng/ml)
Cut-off value	682.75	13.17	668.89	0.11	52.0	42.83
Sensitivity	97%	88%	73%	29%	79%	44%
Specificity	80%	100%	80%	100%	40%	20%

cfDNA, cell-free DNA; CRP, C-reactive protein; SAA, serum amyloid A; IL-6, interleukin-6;

PCT, procalcitonin; HMGB1, high-mobility group box 1.

[0159]

[표 4] 자궁축농증(pyometra)가 있는 개의 매개 변수 간의 피어슨의 순위 상

관 계수 평가 결과(1)

Variables	cdDNA (ng/L)		CRP (mg/L)		SAA (mg/L)		IL-6 (ng/ml)		PCT (pg/ml)		HMGB1 (ng/ml)	
	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value
RBC ($\times 10^{12}/L$)	-0.02	0.912	-0.08	0.622	-0.02	0.902	0.01	0.912	-0.04	0.771	0.12	0.463
HCT (%)	0.00	0.994	0.14	0.411	0.10	0.533	0.06	0.693	-0.33	0.043*	0.30	0.086
HGB (g/dL)	-0.12	0.473	-0.20	0.224	-0.12	0.458	-0.02	0.901	0.18	0.382	-0.10	0.564
WBC ($\times 10^9/L$)	0.46	0.000**	0.22	0.195	-0.03	0.821	0.03	0.828	0.23	0.178	-0.07	0.693
NEU ($\times 10^9/L$)	0.47	0.000**	0.24	0.153	-0.01	0.943	0.04	0.804	0.19	0.263	-0.05	0.742
LYM ($\times 10^9/L$)	0.11	0.492	0.01	0.937	-0.12	0.464	0.01	0.948	0.09	0.587	-0.05	0.776
MONO ($\times 10^9/L$)	0.28	0.091	0.09	0.598	-0.13	0.452	0.00	0.992	0.38	0.025*	-0.09	0.613
EOS ($\times 10^9/L$)	0.20	0.223	0.23	0.187	0.19	0.268	0.05	0.776	-0.13	0.436	-0.13	0.455
BASO ($\times 10^9/L$)	0.42	0.014*	0.16	0.346	0.09	0.585	-0.06	0.724	0.29	0.088	-0.03	0.853
PLT ($\times 10^9/L$)	-0.30	0.072	-0.21	0.215	-0.09	0.608	-0.32	0.057	0.10	0.534	-0.19	0.271
Glucose (mg/dL)	-0.09	0.583	-0.26	0.133	-0.15	0.379	-0.03	0.864	-0.12	0.477	-0.20	0.278
BUN (mg/dL)	0.28	0.095	0.14	0.418	0.09	0.564	-0.13	0.447	0.41	0.012*	-0.16	0.365
Creatinine (mg/dL)	0.17	0.302	-0.22	0.189	-0.11	0.513	-0.07	0.653	0.12	0.455	-0.26	0.134
Phosphorus (mg/dL)	0.24	0.191	0.08	0.655	0.05	0.758	0.11	0.527	0.28	0.123	-0.11	0.559
Total Ca (mg/dL)	0.03	0.862	-0.15	0.383	-0.04	0.805	0.01	0.915	0.44	0.001**	0.03	0.866
Total protein (g/dL)	-0.07	0.663	0.17	0.314	-0.00	0.996	0.88	0.001**	-0.07	0.642	0.18	0.308
Albumin (g/dL)	-0.42	0.012*	-0.11	0.496	0.15	0.353	-0.35	0.843	-0.37	0.025*	0.15	0.394
Globulin (g/dL)	0.44	0.002**	0.31	0.068	0.11	0.518	0.29	0.086	0.33	0.043*	0.09	0.607
ALT (U/L)	-0.15	0.363	-0.30	0.079	-0.16	0.345	-0.06	0.702	0.10	0.535	0.07	0.664
ALKP (U/L)	-0.03	0.824	-0.23	0.160	-0.05	0.755	-0.09	0.575	0.34	0.036*	0.14	0.427

[0161]

[표 4] 자궁축농증(pyometra)가 있는 개의 매개 변수 간의 피어슨의 순위 상

관 계수 평가 결과(2)

Variables	cfDNA (μg/L)		CRP (mg/L)		SAA (mg/L)		IL-6 (ng/ml)		PCT (pg/ml)		HMGB1 (ng/ml)	
	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value	r	P-value
GGT (U/L)	0.01	0.951	-0.37	0.152	-0.18	0.483	-0.15	0.562	0.05	0.841	-0.15	0.572
Total bilirubin (mg/dL)	0.05	0.744	0.05	0.776	0.06	0.717	-0.04	0.795	0.12	0.466	-0.11	0.543
Cholesterol (mg/dL)	0.26	0.153	0.32	0.073	0.67	0.000**	-0.01	0.954	-0.16	0.384	0.12	0.516
Amylase (U/L)	0.16	0.357	0.05	0.774	-0.03	0.874	-0.06	0.743	-0.13	0.463	0.35	0.052
Lipase (U/L)	-0.04	0.792	-0.26	0.152	-0.14	0.445	-0.12	0.495	-0.06	0.726	-0.00	0.998
pH	0.38	0.033*	-0.17	0.356	-0.24	0.193	0.12	0.524	0.08	0.649	-0.03	0.842
Na (mmol/L)	-0.40	0.026*	-0.20	0.267	-0.24	0.187	0.04	0.823	0.23	0.192	0.20	0.286
K (mmol/L)	-0.01	0.946	-0.30	0.094	-0.27	0.145	0.04	0.815	0.04	0.796	0.10	0.584
Cl (mmol/L)	-0.40	0.029*	-0.27	0.143	-0.02	0.876	-0.01	0.947	0.119	0.294	0.17	0.363
iCa (mmol/L)	-0.13	0.487	0.16	0.386	-0.12	0.523	0.43	0.014	-0.04	0.818	-0.13	0.497
iMg (mmol/L)	0.25	0.263	0.51	0.011*	0.50	0.012*	0.12	0.582	-0.16	0.475	-0.11	0.592
HCO3 (mmol/L)	0.12	0.524	-0.13	0.495	-0.22	0.233	-0.02	0.919	-0.20	0.283	-0.04	0.825
Lactate (mmol/L)	-0.50	0.207	-0.41	0.302	-0.05	0.894	-0.11	0.795	0.26	0.522	-0.14	0.723

* indicates $P < 0.05$ and ** indicates $P < 0.01$ versus healthy group.

cfDNA, cell-free DNA; CRP, C-reactive protein; SAA, serum amyloid A; IL-6, interleukin-6; PCT, procalcitonin; HMGB1, high-mobility group box 1;

RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; WBC, white blood cells; NEU, neutrophils; LYM, lymphocytes; MONO, monocytes; EOS,

eosinophils; BASO, basophils; PLT, platelet; BUN, blood urea nitrogen; ALT, alanine aminotransferase; ALKP, alkaline phosphatase; GGT, gamma-

[표 5] 건강한 개와 비교하여 임상 데이터가 다른 자궁축농증(pyometra) 하

위 그룹 사이의 염증 매개 변수의 차이를 확인한 Mann-Whitney U 결과

Subgroups	cfDNA (μg/L)		CRP (mg/L)		SAA (mg/L)		IL-6 (ng/ml)		PCT (pg/ml)		HMGB1 (ng/ml)	
	Mean	P-value	Mean	P-value	Mean	P-value	Mean	P-value	Mean	P-value	Mean	P-value
High WBC	18.71	0.002**	19.67	0.000**	19.43	0.000**	15.95	0.596	14.86	0.541	11.45	0.315
High NEU	19.22	0.009**	20.43	0.000**	20.09	0.001**	16.83	0.692	16.04	0.660	12.45	0.315
High MONO	17.67	0.001**	18.28	0.000**	17.72	0.001**	14.50	0.566	13.72	0.797	10.56	0.421
Low HCT	15.29	0.004**	16.50	0.000**	15.21	0.005**	12.46	0.615	11.79	0.850	8.00	0.078
High BUN	11.75	0.006**	12.25	0.002**	12.38	0.001**	9.56	0.241	8.38	0.916	5.13	0.153
High Creatinine	10.00	0.028*	11.00	0.003**	9.60	0.057	8.20	0.317	6.80	0.884	3.60	0.439
High Phosphate	11.50	0.005**	11.50	0.005**	11.50	0.005**	7.06	0.917	10.50	0.031	2.75	0.077
High ALT	12.44	0.003**	12.22	0.005**	11.22	0.054	9.22	0.811	8.89	0.923	5.67	0.166
High ALKP	11.62	0.007**	11.62	0.007**	11.62	0.007**	9.00	0.417	9.85	0.657	7.31	0.535
High TP	11.43	0.030*	12.57	0.003**	12.86	0.001**	10.50	0.089	6.57	0.153	4.33	0.302
Low Albumin	12.86	0.008**	12.86	0.008**	11.86	0.051	11.14	0.028	9.86	0.558	6.71	0.482
High Globulin	17.35	0.000**	17.82	0.000**	17.53	0.000**	14.62	0.242	12.53	0.374	9.69	0.576

* indicates $P < 0.05$ and ** indicates $P < 0.01$ versus healthy group.

<실시예 4>

[0166] **2-DE에 의한 자궁 단백질의 프로파일링 결과**

[0167] 본 발명자들은 도 4-A (control) 및 4-B, 4-C, 4-D (pyometra)와 같이 건강한 대조군과 자궁축농증(pyometra)의 대표적인 2-DE 패턴을 확인함으로써 2-DE 분석을 수행했다.

[0168] Progenesis SameSpots 이미지 분석 소프트웨어(버전 4.0)를 사용하여 총 44 개의 차별적으로 발현된 단백질 반점이 확인되었다 (Fold change ≥ 1.5 ; $P < 0.05$).

[0169] 총 32 개의 단백질이 MALDI-TOF / TOF MS 분석을 통해 성공적으로 확인되었다. 차별적으로 발현된 단백질은 NCBI와 Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB) 데이터베이스를 사용하여 기능적으로 분류되었다. 반복 단백질은 삭제되었고 Uniprot 단백질 데이터베이스의 데이터 가용성에 따라 12 개의 단백질이 최종 결정되었다. 분석된 분자량, 분석 등전점, 서열 범위 및 펩타이드 일치 수와 MOWSE 점수 및 배수 변화를 갖는 확인된 모든 단백질의 기술이 제시된다(표 6).

[0170] 건강한 대조군과 비교하여, 2 개의 단백질이 상향 조절되었고, 8 개의 단백질은 자궁축농증(pyometra) 개 # 1에서 하향 조절되었다. 자궁축농증(pyometra) 개 # 2에서 3 개의 단백질이 상향 조절되었고 4 개의 단백질은 하향 조절되었다. 자궁축농증(pyometra) 개 # 3에서는 2 개의 단백질이 상향 조절되었고, 10 개의 단백질은 대조군과 비교하여 하향 조절되었다. 3 개의 자궁축농증(pyometra) 개 모두에서 2 개의 단백질이 상향 조절되었다.

[0171] 차별적으로 발현된 단백질 중 질병 상황을 반영하는 염증과 관련된 단백질을 검출했다. 알려진 단백질 12 개 중 7 개가 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 1 (IGFBP1), 페록시레독신-2 이소폼 1(Prx2), L- 락테이트 데하이드로게나제 B쇄 (LDHB), 셀레늄 결합 단백질 1(SELENBP1), 비타민 D 결합 단백질 isoformX2 (VDBP), 알파 -2-HS-당단백질(AHSG) 및 알데히드 탈수소 효소 미토콘드리아 이소 폼 2(ALDH2)를 포함한다. 나머지 단백질은 개의 염증과 관련하여 특징이 없다.

[표 6] 건강한 대조군 개와 자궁축농증(pyometra) 개 사이에서 차별적으로

발현 확인된 단백질의 목록(1)

Spot no.	NCBI ID	Protein name	MOWSE score	Sequence coverage (%)	Protein MW (Da)	pI	Fold change	Up Down pyometra dog #1	Up Down pyometra dog #2	Up Down pyometra dog #3	Biological function
1	gi545525340	Inulin-like growth factor binding protein 1	141	22	28012	5.89	4.2	↑	↑	↑	Hormone signal
2	gi359322074	Peroxiredoxin-2 isoform 1	334	31	22112	5.23	2.7	-	↓	↓	Antioxidant
3	gi345798988	Vinculin	376	24	128023	5.61	3.9	↓	-	↓	Cellular response
4	gi28186573	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 (Fragment)	48	7	131922	6.04	2.2	↓	-	↓	Ion homeostasis
5	gi356461040	L-lactate dehydrogenase B chain	109	22	36884	5.71	2.4	↑	↑	↑	Carbohydrate metabolism
6	gi545528914	Selenium-binding protein 1	260	25	52904	5.79	2.2	-	-	↓	Selenium binding
7	gi73975215	Vitamin D-binding protein isoformX2	342	25	54536	5.2	3.4	↓	↓	↓	Vitamin D metabolism
8	gi545553759	Alpha-2-HS-glycoprotein	78	7	40021	5.12	2.7	↓	-	↓	Inflammation
9	gi57108093	Actin, alpha cardiac muscle 1	178	25	42334	5.23	4	↓	↓	↓	Muscle contraction
10	gi359320104	Creatine kinase B-type	419	30	42960	5.47	2.1	↓	-	↓	Cellular homeostasis
11	gi345794141	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CWC27 homolog	34	9	53686	6.14	1.9	↓	-	↓	mRNA Splicing
12	gi73995214	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial isoform 2	435	23	57183	6.63	2.2	↓	↓	↓	Inflammation
13	gi1239956979	5-azacytidine-induced protein 2 isoformX2	45	20	33262	6.63	2.3	↓	-	↓	NA
14	gi545560773	Collagen alpha-2(VI) chain-like	181	25	48147	5.13	3.8	↓	↓	↓	NA
15	gi1150763464	Tubulin alpha-1A chain	364	39	50788	4.94	3.4	↓	↓	↓	NA

[0173]

[표 6] 건강한 대조군 개와 자궁축농증(pyometra) 개 사이에서 차별적으로

발현 확인된 단백질의 목록 (2)

Spot no.	NCBI ID	Protein name	MOWSE score	Sequence coverage (%)	Protein MW (Da)	pI	Fold change	Up Down pyometra dog #1	Up Down pyometra dog #2	Up Down pyometra dog #3	Biological function
16	gi359323129	Tubulin alpha-1C chain	280	39	50562	4.97	3.4	↓	↓	↓	NA
17	gi545514079	T-complex protein 1 subunit beta isoform X3	99	19	56867	5.69	3.7	↓	-	↓	NA
18	gi545554868	Polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 13 isoform X5	58	15	57857	6.21	2.4	↑	↑	↓	NA
19	gi1239973556	Vam6/Vpc39-like protein isoform X2	40	13	87436	6.39	2.4	↑	↑	↓	NA
20	gi545485772	T-complex protein 1 subunit alpha isoform X2	87	10	59466	5.7	2.8	↓	-	↓	NA
21	gi121583756	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1 precursor	131	8	46505	5.58	2	↓	↓	↓	NA
22	gi1239973050	Myocardial zonula adherens protein isoform X2	35	10	50621	5.53	2	↓	↓	↓	NA
23	gi73996559	Keratin, type II cuticular Hb6	42	5	55016	5.55	3.3	↓	↓	↓	NA
24	gi73983524	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	35	16	23727	5.02	2.1	↑	↑	↓	NA
25	gi928151832	14-3-3 protein zeta/delta	188	44	27899	4.73	2.1	↑	↑	↓	NA
26	gi1239956606	LOW QUALITY PROTEIN: golgin subfamily A member 4	38	2	263259	5.28	2.9	↑	↑	↓	NA
27	gi73992048	14-3-3 protein beta/alpha isoform X2	114	19	27947	4.76	7.2	↑	↑	↓	NA
28	gi545515462	Calmodulin-lyase N-methyltransferase isoform X5	48	8	30034	6.15	1.9	↓	-	↓	NA
29	gi1239930884	BEN domain-containing protein 3 isoform X2	46	4	86781	5.4	2.3	↑	-	↓	NA
30	gi1239958855	Tumor protein D54 isoform X18	36	13	21636	6.45	4	↑	↑	↑	NA
31	gi1239898771	Pre-mRNA-splicing factor SLU7	31	13	74000	6.69	3.8	↓	↓	↓	NA
32	gi57100553	Amyrin A5 isoform X1	717	37	35978	4.99	3.6	-	-	↓	NA

nI, isoelectric point; NA, not available.

<실시예 5>

자궁축농증(pyometra) 개의 수술 전후의 비교

<5-1> 외과적 처치에 따른 임상 자료의 평가

분석된 혈액학 변수들 (표 7) 중 자궁축농증(pyometra)에서 암컷 중성화 수술(OHE) 후 백혈구와 호중구 수가 유의하게 높았으며 ($P < 0.01$), 적혈구, 헤마토크리트 및 헤모글로빈은 OHE 전과 비교하여 유의하게 낮았다($P < 0.01$)(도 5-A, B 참조).

마찬가지로 생화학 패널에서 총 단백질, 글로불린, 콜레스테롤, pH 및 칼륨 농도는 포도당, BUN, 크레아티닌, 알부민, ALKP 및 이온화된 칼슘 농도($P < 0.05$)가 유의하게 낮았다($P < 0.01$).(도 5-C, D 참조). OHE 후 나트륨과 염화물(chloride) 농도만 유의하게 증가하였다($P < 0.01$). 증가된 OHE 후 백혈구와 호중구 수는 OHE 후 건강한 개에서도 통계적으로 유의했다(데이터는 미표시).

흥미롭게도, 자궁축농증(pyometra) 개와 건강한 개 사이의 OHE 전, 후 차이는 글로불린 ($P = 0.001$)과 나트륨 ($P = 0.027$)에서만 나타났다.

[표 7] 자궁축농증(pyometra)가 있는 개에서 OHE 전후의 임상 데이터(도 5의 데이터 제외) 비교 결과

Variables	Pre-OHE	Post-OHE	P-value
PLT ($\times 10^9/L$)	277.82 $\pm$ 30.13	293.64 $\pm$ 27.25	0.783
Glucose (mg/dL)	111.05 $\pm$ 7.44	88.55 $\pm$ 7.52	0.037*
BUN (mg/dL)	18.94 $\pm$ 4.92	12.52 $\pm$ 3.03	0.023*
Creatinine (mg/dL)	1.62 $\pm$ 0.70	1.34 $\pm$ 0.60	0.019*
Phosphorus (mg/dL)	4.81 $\pm$ 0.58	4.55 $\pm$ 0.33	0.911
Total Ca (mg/dL)	9.60 $\pm$ 0.18	8.81 $\pm$ 0.17	0.001*
Total bilirubin (mg/dL)	0.19 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.05	0.392
Cholesterol (mg/dL)	252.77 $\pm$ 33.10	198.18 $\pm$ 27.05	0.004**
Amylase (U/L)	2469.38 $\pm$ 1109.78	1147.52 $\pm$ 188.78	0.433
Lipase (U/L)	256.59 $\pm$ 90.34	465.62 $\pm$ 143.08	0.322
pH	7.40 $\pm$ 0.01	7.33 $\pm$ 0.01	0.003**
Na (mmol/L)	147.48 $\pm$ 1.51	152.23 $\pm$ 1.20	0.003**
K (mmol/L)	4.22 $\pm$ 0.12	3.76 $\pm$ 0.12	0.009**
Cl (mmol/L)	108.12 $\pm$ 1.95	115.25 $\pm$ 1.06	0.000**
iCa (mmol/L)	1.46 $\pm$ 0.17	1.33 $\pm$ 0.02	0.025*
iMg (mmol/L)	0.56 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.02	0.484
HCO ₃ (mmol/L)	20.83 $\pm$ 2.13	19.57 $\pm$ 1.03	0.936
Lactate (mmol/L)	2.52 $\pm$ 0.55	3.10 $\pm$ 1.10	0.655

Data are presented as mean $\pm$ SD. * indicates $P < 0.05$ and ** indicates $P < 0.01$ versus pre-

OHE.

<5-2> 외과적 처치에 따른 염증 매개 변수의 평가

자궁축농증(pyometra) 개에서 OHE 전 또는 OHE 후 CRP, SAA 및 cfDNA의 값에는 차이가 없었다(각각 $P = 0.095$, 0.052 및 0.168)(도 6-A, B, C 참조).

OHE 전 IL-6 농도 (8.46 ng / ml , $0.063\text{--}106.63$)는 OHE 후 IL-6 농도 (4.71 ng / ml , $0.063\text{--}48.58$)보다 유의하게 높았다($P = 0.025$, Wilcoxon 's signed ranks test); (도 6-D 참조).

OHE 전 PCT 농도 (212.41 ng / ml , $5\text{--}1420$)는 OHE 후 PCT 농도 (137.77 ng / ml , $5\text{--}828$)보다 유의하게 높았다($P = 0.027$, Wilcoxon 's signed ranks test).; (도 6-E 참조).

OHE 전 HMGB1 농도 (50.87 ng / ml , $6.25\text{--}190.88$)는 OHE 후 HMGB1 농도 (43.05 ng / ml , $6.25\text{--}149.5$)보다 유의하게 높았다($P = 0.034$, Wilcoxon 's signed ranks test); (도 6-F 참조).

자궁축농증(pyometra)에서 OHE-의존적인 매개 변수가 상관 관계가 있었다. OHE 전 CRP는 OHE 후 SAA와 상관 관계가 있었다($r = 0.55$, $P = 0.007$). 유사하게 OHE 이전의 SAA는 호중구 ($r = 0.54$, $P = 0.009$)와 상관 관계가 있었고, 총 단백질은 IL-6 및 CRP와 상관 관계가 있었다(각각, $r = 0.65$, $P = 0.001$, $r = 0.53$, $P = 0.010$). 흥미롭게도, OHE 전 이온화 칼슘 농도는 OHE 후 IL-6과 상관 관계가 있다($r = 0.71$, $P = 0.000$).

<실시예 6>

실험 결과의 요약 및 해석

본 발명자들은 개 자궁 축농증의 진단 또는 예후를 판단할 수 있는 바이오마커를 확인하기 위하여 상기 실시예 2 내지 5와 같은 실험 결과를 얻었으며, 하기에서는 실험결과에 대한 요약 및 해석을 하고자 한다.

본 발명에서는 자궁축농증 진단 바이오마커를 찾기 위하여 90 마리의 자궁축농증에 이환된 개와 26 마리의 건강한 암개의 혈액 검사 데이터와 혈장 단백질을 비교 분석하였다. 또한 이 중 자궁축농증에 이환된 자궁 조직 3 개와 정상 자궁 조직 1 개를 무작위로 선별하여 염증 조직 단백질 이차원 전기 영동과 질량 분석을 진행하였다. 이후 염증 제거를 통한 치료 모니터링 지표를 찾기 위하여, 22 마리의 자궁축농증에 이환된 암개와 9 마리의 건

강한 암개의 임상 데이터와 혈장 단백질을 염증의 수술적 제거 (난소자궁적출술) 전-후를 시점으로 비교 분석하였다.

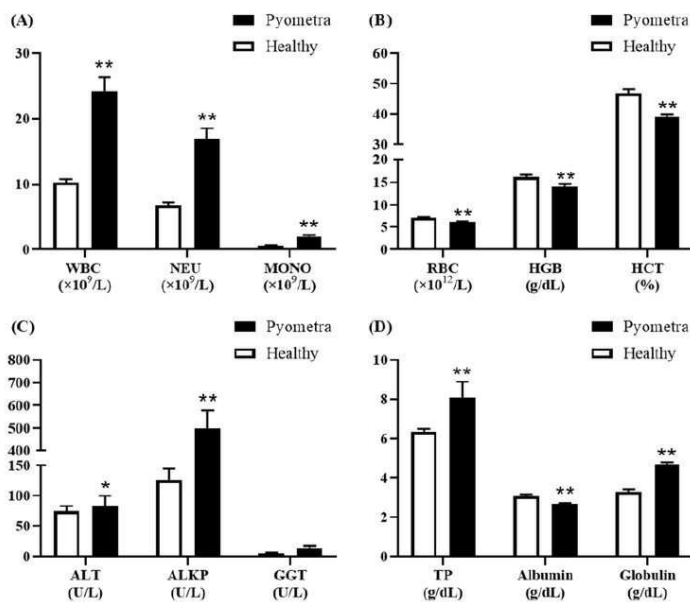
[0197] 그 결과, 자궁축농증에서는 총 백혈구 수 증가, 적혈구 수 감소, 글로불린 증가, 알부민 감소, ALT, ALKP, cholesterol, amylase 의 증가가 관찰되었고, 급성염증단백질인 C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), cellfree DNA (cfDNA)의 현저한 증가가 추가적으로 관찰되었다. 특히 이들 중 receiver operating characteristic curve 분석 결과 cfDNA (AUC = 0.959)는 CRP, SAA 보다 자궁축농증 진단에 유용한 바이오마커로 확인되었다. 전신 염증의 근원인 자궁 조직의 단백질 이차원 전기 영동과 질량 분석에서는 총 32 개의 단백질 발현을 확인하였는데, 7 개의 염증 단백질과 20 개의 규명되지 않은 신규 단백질을 확인하였다. 마지막으로 염증 제거를 통한 치료 모니터링 지표 탐색 연구에서는 혈액의 글로불린, ALKP, cholesterol 수치와 함께 interleukin-6 (IL-6), high-mobility group box 1 (HMGB1), procalcitonin (PCT)의 유의적인 감소를 확인하였다. 임상 데이터와 바이오마커의 상관 분석 결과, cfDNA 는 WBC ($r = 0.46$)와 상관성을 보였고, PCT 는 BUN ($r = 0.41$), albumin ($r = -0.37$), globulin ($r = 0.33$), ALKP ($r = 0.34$) 수치의 상관성이 유의적임을 확인하였다.

[0198] 위와 같은 결과들을 종합하여 볼 때, cfDNA, CRP 및 SAA 가 자궁축농증 진단의 바이오마커로 적절하며, PCT, IL-6 및 HMGB1 의 분석은 자궁축농증 치료의 모니터링의 지표로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 이는 향후 패혈증의 빠르고 정확한 진단 및 치료의 모니터링에도 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

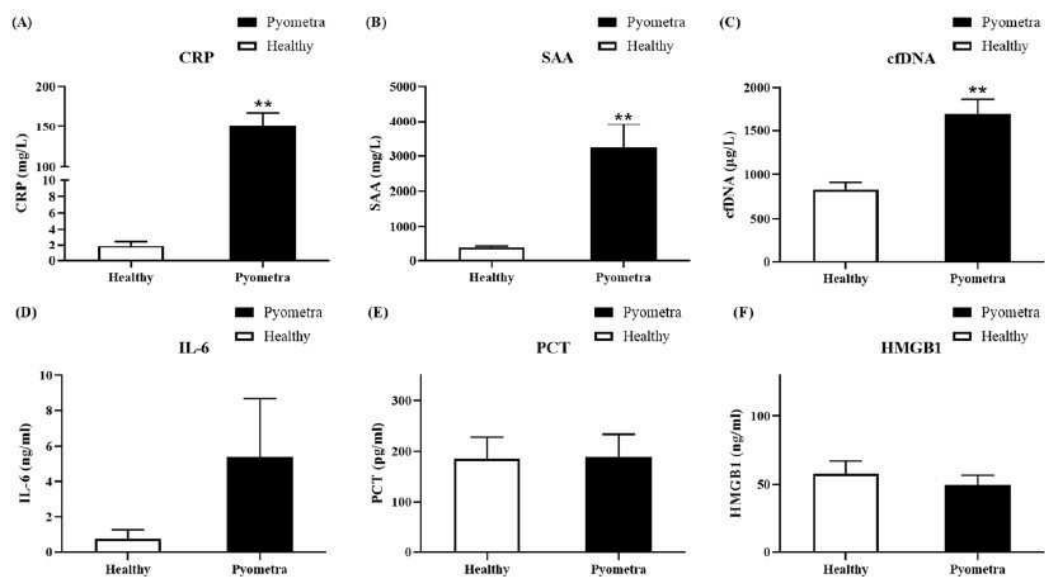
[0200] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

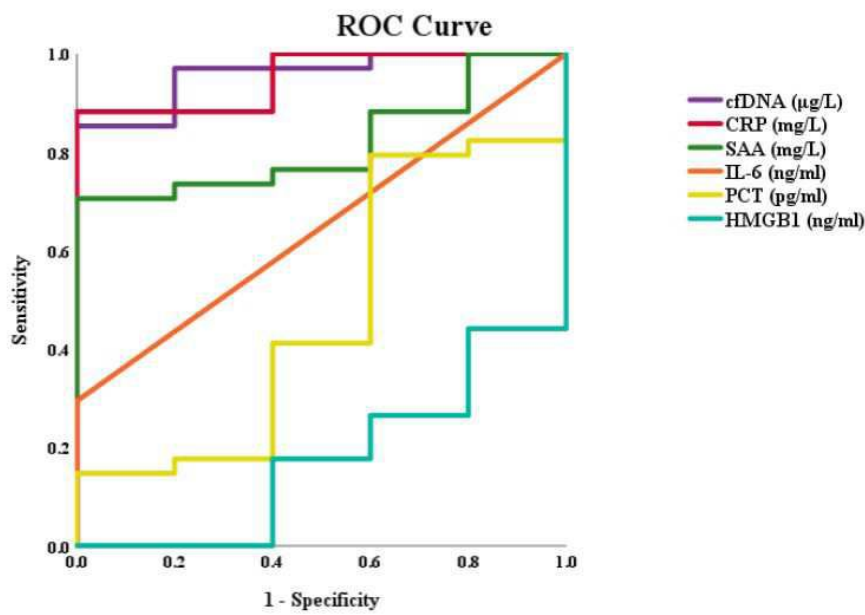
도면1



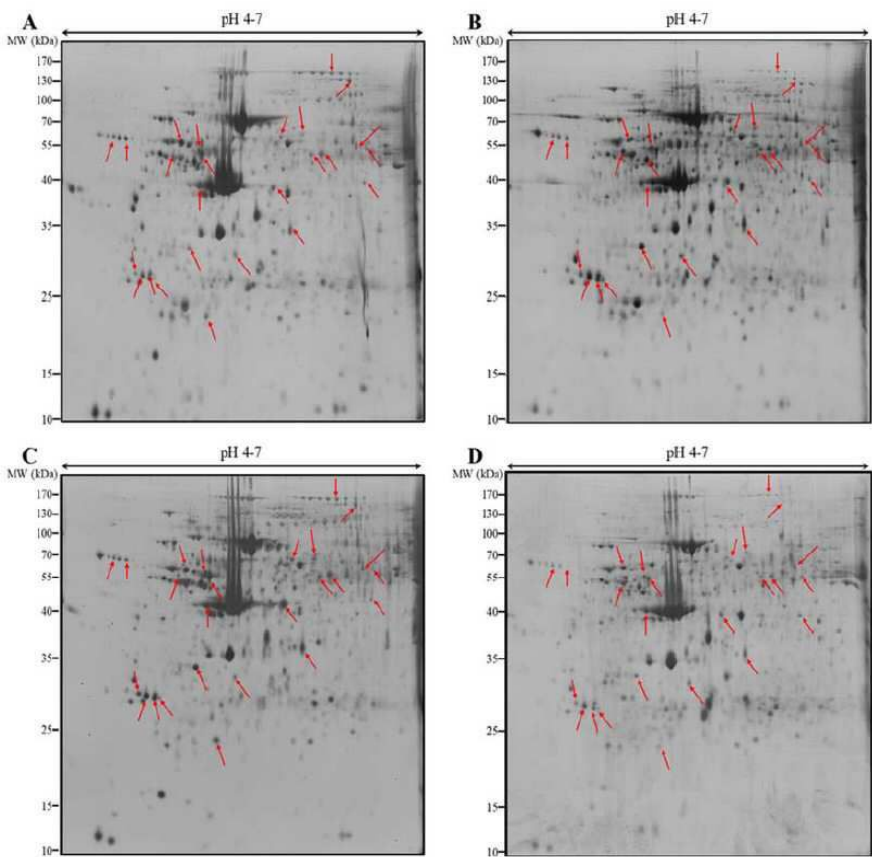
도면2



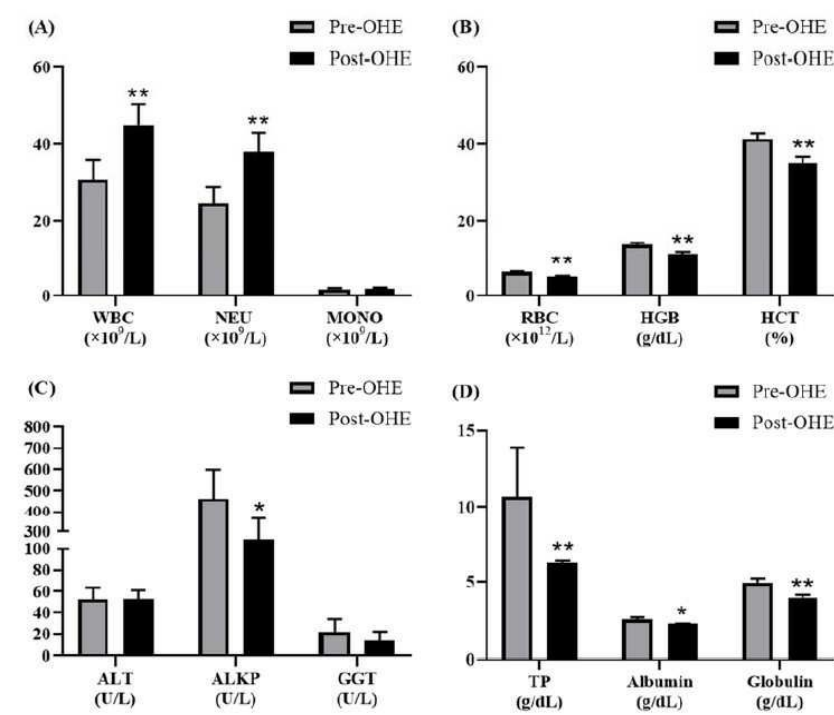
도면3



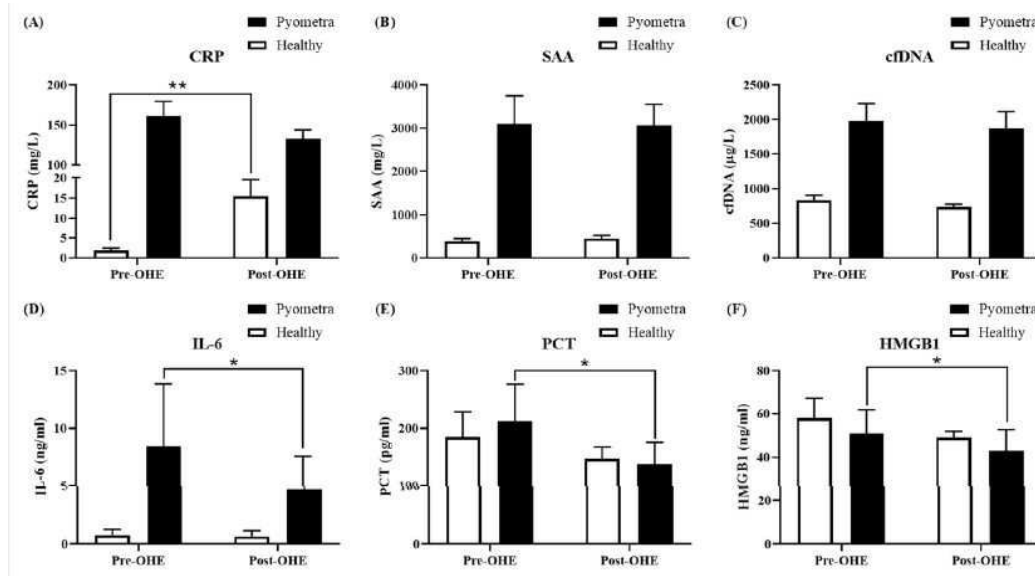
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
KONGJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION

<120> Compositions for canine pyometra prognosis prediction by
measuring the expression procalcitonin

<130> 01-00001

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 488

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> canine procalcitonin's base sequence

<400> 1

caggagcagg agcaggagca ggagactgag ggctccagcc tggacagctc cagagctaag 60

cggtgcagta atctgagtac ctgtgtgctg ggcacatact cgaaggacct gaacaacttt 120

catacttct ctggcatcgg ctctggggct gaaacacctg gcaagaaaag ggacatagcc 180

agcggcttgg agaggggccc ctaacctcgc ttgggggtgc cccaggatgc caactgatct 240

ccttcactc ctctctgact tcccttcttg ctccattga tgaatttaat gcatgcagat 300

ttcacttggg ttgctcttcc agctggcatt ggtagctttg cttgcgagag agaataattgg 360

ggatctcagg atggaaggga agtgagcagc actcatagac caggtatgag gtctttttgc 420

tcctttagag gttagaggta agagtgaggg aagcctcttg agattccaga ggatttcgag 480

gtagagtc 488

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> canine procalcitonin's amino acid sequence

<400> 2

Met Gly Leu Trp Lys Ser Ser Pro Phe Leu Ala Phe Ser Ile Leu Val

1 5 10 15

Leu Cys Gln Ala Gly Gly Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu

20 25 30

Glu Gly Leu Pro Asp Pro Thr Ala Leu Ser Glu Lys Glu Gly Arg Leu

35 40 45

Leu Leu Ala Ala Leu Val Lys Ala Tyr Val Gln Arg Lys Asn Glu Leu

50 55 60

Glu Gln Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Ser Leu Asp Ser Ser

65 70 75 80

Arg Ala Lys Arg Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr

85 90 95

Ser Lys Asp Leu Asn Asn Phe His Thr Phe Ser Gly Ile Gly Phe Gly

100 105 110

Ala Glu Thr Pro Gly Lys Lys Arg Asp Ile Ala Ser Gly Leu Glu Arg

115 120 125

Gly Arg

130