



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0065656
(43) 공개일자 2023년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/5695 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0151451
(22) 출원일자 2021년11월05일
심사청구일자 2021년11월05일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)

성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자
신성재
서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과대학 미생물학교실

박지혜
서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과대학 미생물학교실
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
파도특허법인유한회사

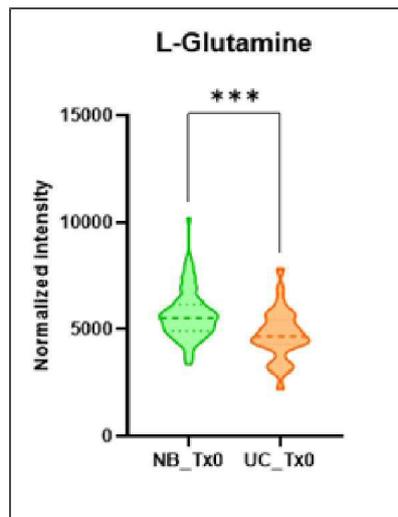
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **마이코박테리움 아비움 복합체 감염증의 중증도 예측용 대사체 마커**

(57) 요약

본 발명은 지질대사체, 아미노산 및/또는 아미노산 유도체를 표지자로 하는 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도 예측용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 비결핵 항산균(NTM), 특히 질환의 진행 경과에 대한 객관적이고 신뢰도 높은 바이오마커가 전무한 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC)에 있어서, 상기 대사체들을 질환의 진행 경과 및 중증도를 높은 정확도로 예측하는 표지자로 적용함으로써, 비결핵 항산균으로 인한 감염 환자의 중증도를 판정하여 환자 맞춤형 치료 전략을 조기에 수립함으로써, 환자의 생존률을 현저히 개선시키는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/6806 (2013.01)
 G01N 33/6893 (2013.01)
 G01N 33/92 (2013.01)
 G01N 2405/00 (2013.01)
 G01N 2800/56 (2013.01)

김수영

서울특별시 강남구 일원로 81

이원식

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 약학대학
 530518

(72) 발명자

김크은산

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
 대학 미생물학교실

전병우

서울특별시 강남구 일원로 81

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033427
과제번호	HI20C0017
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병 예방치료 기술개발
연구과제명	MAC 폐질환의 치료향상을 위한 항생제 관용 극복기술 검증과 새로운 치료기법의 적
용근거 확립	
기여율	1/2
과제수행기관명	삼성서울병원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129358
과제번호	NRF-2020M3A9H5104234
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발
연구과제명	Metabolic Remodeling 에 의한 다제내성균의 생성기전 규명과 대사조절을 통한 새로
운 치료 타겟 발굴	
기여율	1/2
과제수행기관명	성균관대학교(자연과학캠퍼스)
연구기간	2021.03.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

지질대사체(lipid metabolites), 아미노산(amino acid) 및 아미노산 유도체로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도 예측용 조성물로,

상기 지질대사체는 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine; LPC), 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC), 스펅고마이엘린(Sphingomyeline; SM) 및 트리아실글리세롤(Triacylglycerol; TAG)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상이고,

상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 글루타민(Glutamine), 히스티딘(Histidine), 메티오닌(Methionine), 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamate), 라이신(Lysine), 글라이신(Glycine), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 트레오닌(Threonine), 호모세린(Homoserine), 트립토판(Tryptophan) 및 시트룰린(Citrulline)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 리소포스파티딜콜린은 LPC (14:0), LPC (15:0) 또는 LPC (20:3)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 리소포스파티딜콜린인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린은 PC 32:2(18:2/14:0), PC 34:3(16:1/18:2), PC 36:1(18:0/18:1), PC 36:3(16:0/20:3), PC 36:6(14:0/22:6) 및 PC 38:7(16:1/22:6)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 포스파티딜콜린인 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 스펅고마이엘린은 SM d34:1(d18:1/16:0), SM d36:1(d18:1/18:0) 또는 SM d42:2(d18:1/24:1)로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 스펅고마이엘린인 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 트리아실글리세롤은 TAG 58:11(22:6/20:5/16:0)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 글루타민, 히스티딘, 메티오닌, 아스파라긴, 글루탐산, 트레오닌, 라이신, 트립토판은 L-형태(L-form)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 글루타민, 히스티딘, 메티오닌, 아스파라긴, 라이신, 글라이신, N,N-디메틸글라이신, 트레오닌, 호모세린, 트립토판 또는 시트룰린의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 글루탐산의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 리소포스파티딜콜린 또는 트리아실글리세롤의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 4 항에 있어서, 상기 스피고마이엘린의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 3 항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 PC 32:2(18:2/14:0), PC 34:3(16:1/18:2), PC 36:6(14:0/22:6) 또는 PC 38:7(16:1/22:6)의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 3 항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린 PC 36:1(18:0/18:1) 또는 PC 36:3(16:0/20:3)의 농도가 상엽 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 지질대사체, 아미노산 및 아미노산 유도체는 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) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 내 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*M. celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*M. gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*M. haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 마

이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*), 마이코박테리움 테레(*M. terrae*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*M. ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*M. simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

지질대사체(lipid metabolites), 아미노산(amino acid) 및 아미노산 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도를 예측하기 위한 정보 제공 방법으로서,

상기 지질대사체는 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine), 스피고마이엘린(Sphingomyeline) 및 트리아실글리세롤(Triacylglycerol)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이며,

상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 글루타민(Glutamine), 히스티딘(Histidine), 메티오닌(Methionine), 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamate), 라이신(Lysine), 글라이신(Glycine), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 트레오닌(Threonine), 호모세린(Homoserine), 트립토판(Tryptophan) 및 시트룰린(Citrulline)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 대사체의 농도를 측정하는 단계는 크로마토그래피 또는 질량분석기인 정량 장치를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이코박테리움 아비움 복합체 감염환자의 중증도 구분을 위한 대사체 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 종류에는 결핵, 우형결핵(Mycobacterium bovis), 나병(Mycobacterium leprae)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균 종(species)뿐 아니라, 기회 감염균으로 일컬어지는 균 종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 수포성 종(saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다. 이러한 마이코박테리움 속은 일반적으로 사용되는 염색액으로는 용이하게 염색되지 않지만 일단 염색되면 알코올이나 염산 등으로 처리시에도 용이하게 탈색되지 않기 때문에 항산균이라고도 불린다.

[0003] 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM)은 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex) 및 나균(Mycobacterium leprae)을 제외한 항산균을 의미한다. 한편, 마이코박테리움 아비움 복합체(Mycobacterium avium complex; MAC)에 속하는 비결핵 항산균주 중 흔히 인간에게서 폐 질환을 일으키는 균주로는 공식적으로 대략 180 종 이상이 규명되었다. MAC는 주로 M. 아비움(*M. avium*)과 M. 인트라셀룰라(*M. intracellulare*)를 포함하고, 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*; MAB)는 주로 M. 압세수스 아종인 압세수스(*M. abscessus subspecies abscessus*)와 M. 압세수스 아종인 마실리엔스(*M. abscessus subspecies massiliense*)를 포함한다. 최근 전세계적으로 비결핵 항산균에 기인한 폐 감염 보고가 증가하고 있지만, 건강한 개체군으로부터 비결핵 항산균 폐 감염 질환자를 구별하기 위한 바이오마커나, 질환에 대한 병태 생리의 연구가 부족한 실정이다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 한국특허등록 제10-2247643호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 객관적이고 신뢰성 높은 진단 마커의 개발이 어려운 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM), 특히 인간에게 매우 흔하게 폐 질환을 일으키는 마이코박테리움 아비움 복합체(Mycobacterium avium complex; MAC)에 감염된 환자의 중증도를 판정하기 위한 진단 표지자 발굴을 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 비결핵 항산균 감염증의 중증도를 높은 재현성과 신뢰도로 반영할 수 있는 진단 표지자로서, 극성 및 지질대사체 25종을 발굴하였다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 비결핵 항산균 감염 질환의 중증도 예측용 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 지질대사체(lipid metabolites), 아미노산(amino acid) 및 아미노산 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도 예측용 조성물로,

[0011] 상기 지질대사체는 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine; LPC), 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC), 스팅고마이엘린(Sphingomyeline; SM) 및 트리아실글리세롤(Triacylglycerol; TAG)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이고,

[0012] 상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 글루타민(Glutamine), 히스티딘(Histidine), 메티오닌(Methionine), 아스파라긴(Asgparagine), 글루탐산(Glutamate), 라이신(Lysine), 글라이신(Glycine), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 트레오닌(Threonine), 호모세린(Homoserine), 트립토판(Tryptophan) 및 시트룰린(Citrulline)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 객관적이고 신뢰성 높은 진단 마커의 개발이 어려운 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM), 특히 인간에게 매우 흔하게 폐 질환을 일으키는 마이코박테리움 아비움 복합체(Mycobacterium avium complex; MAC)에 감염된 환자의 중증도를 판정하기 위한 진단 표지자 발굴을 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 비결핵 항산균 감염증의 중증도를 높은 재현성과 신뢰도로 반영할 수 있는 진단 표지자로서, 극성 및 지질대사체 25종을 발굴하였다.

[0014] 본 명세서에서 용어 “비결핵 항산균”은 결핵균이 아닌 항산균을 의미하며 구체적으로는 결핵 및 나병을 유발하지 않는 모든 마이코박테리아를 포함하는 의미이다. 항산균은 일반적인 세균들과 달리 염색과정에서 산(acid)을 첨가해도 용해되지 않고 견딜 수 있는 능력을 가지는 균주를 의미한다. 이런 항산균들 중 대표적인 것이 바로 결핵균이며, 결핵균이 이외의 항산균을 비결핵항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM)이라고 하고, 거의 매년 새로운 비결핵항산균이 발견되고 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어 “예측”은 한 객체가 특정 질병 또는 질환이 현재 중증으로 진행되었거나 또는 향후 중증으로 진행될 위험이 있는지 여부를 중증도와 유의한 상관관계를 가지는 표지자를 기반으로 평가하는 것을 의미한다.

[0016] 본 명세서에서 용어 “예측용 조성물”은 대상체의 비결핵 항산균의 감염이 중증으로 변화했거나 향후 중증으로 진행될 위험성을 가지는지를 예측하기 위해 지질대사체(lipid metabolites), 아미노산(amino acid) 또는 아미노

산 유도체의 농도 측정 수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “예측용 키트”로 표현될 수도 있다. 본 발명의 예측용 조성물은 본 발명에서 발굴된 대사체를 측정하기 위한 수단이 포함되므로, 용어 “예측용 조성물”은 대사체의 “정량 장치”로 표현될 수도 있다.

- [0017] 본 명세서에서 용어 "대사체(metabolite)"는 대사물질 또는 대사산물이라고도 불리우며, 물질 대사의 중간 생성물 또는 생성물이다. 이러한 대사체는 연료, 구조, 신호전달, 효소에 대한 촉진 및 저해 효과, 그 자신의 촉매 활성화(일반적으로 효소에 대한 보조 인자로서), 방어, 다른 생물체와의 상호작용(예: 색소, 방향 화합물, 페로몬)을 포함하는 다양한 기능을 가지고 있다. 1차 대사체는 정상적인 성장, 발생 및 생식에 직접적으로 관여한다. 2차 대사체는 이러한 과정들에 직접적으로 관여하지 않지만, 대개 중요한 생태학적 기능을 가지고 있다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 상기 대사체는 생체 기원의 시료, 즉 생물학적 시료로부터 수득한 대사 물질을 말하는 것으로, 상기 생물학적 시료는 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것이다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 상기 대사체는 혈액, 구체적으로는 혈청 기원의 액상 시료로부터 수득한 대사물질일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 리소포스파티딜콜린은 LPC (14:0), LPC (15:0) 또는 LPC (20:3)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 리소포스파티딜콜린이다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 포스파티딜콜린은 PC 32:2(18:2/14:0), PC 34:3(16:1/18:2), PC 36:1(18:0/18:1), PC 36:3(16:0/20:3), PC 36:6(14:0/22:6) 및 PC 38:7(16:1/22:6)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 포스파티딜콜린이다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 스펅고마이엘린은 SM d34:1(d18:1/16:0), SM d36:1(d18:1/18:0) 또는 SM d42:2(d18:1/24:1)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 스펅고마이엘린이다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 트리아실글리세롤은 TAG 58:11(22:6/20:5/16:0)이다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 글루타민, 히스티딘, 메티오닌, 아스파라긴, 글루탐산, 트레오닌, 라이신, 트립토판은 L-형태(L-form)이다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 글루타민, 히스티딘, 메티오닌, 아스파라긴, 라이신, 글라이신, N,N-디메틸글라이신, 트레오닌, 호모세린, 트립토판 또는 시트룰린의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavity form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0026] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 상업 공동형(upper lobe cavity form) 또는 결절 결절 기관지 확장증형 (nodular bronchiectatic form)이다. 또한 상기 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도인 것은 상업 공동형임을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서, 측정되는 대사체 농도는 비결핵 항산균에 의한 감염 후 대상체에서 발병한 질환이 상업 공동형 폐 질환인지 결절 기관지 확장증형 폐 질환인지 구별하여 진단이 가능하다.
- [0028] 본 발명에서 용어, “상업 공동형”은 오래 전부터 잘 알려진 질환으로 주로 40대에서 50대의 중년남성에서 오랜 기간 흡연력과 음주력이 있는 경우에 빈번하게 발생하고 치료를 하지 않으면 1-2년 이내에 광범위한 폐 실질의 파괴와 호흡부진으로 사망에 이르는 질환을 의미한다. 흉부방사선촬영에서는 폐결핵과 유사한 상업의 공동과 섬유화를 보이는 병변이 관찰되지만, 폐실질에 둘러싸인 얇은 벽을 가진 공동과 기관지를 통한 병변의 전파보다는 접촉성 전파가 더 뚜렷하고 흉막을 더 현저히 침범하는 특징을 가지고 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어, “결절 기관지확장증형”은 1980년대 후반에서야 알려진 질병으로 기저 질환이 없는 중년 이상의 비흡연자 여성에서 주로 발견되어 “레이디 윈더미어 증후군(Lady Windermere syndrome)”으로 불려지기도 하며, 상업 공동형 MAC 폐질환에 비해 진행속도가 매우 느려서, 장기간의 추적 관찰이 필요한 질환을 의미한다. 이 질환은 특징적인 고해상도 전산화단층촬영 소견을 가지는데 중심부에 다발성 기관지 확장증과 주변의 작은 결절과 침윤이 주로 우중엽과 좌상엽의 설상엽에서 관찰되는 특징을 가진다.
- [0030] 본 발명의 구성 중 “예측용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “농도의 감소 또는 낮음”은 결절 기관지확장증형 환자에 비해 상업 공동형 환자 혈청 내 대사체 농도가 유의하게 낮은 경우를 의미하며, 구체적으로는 상기 대사체의 농도가 결절 기관지확장증형 환자와 상업 공동형 환자와 비교하여 약 5% 이상 감소, 약 10% 감소, 약 15% 이상 감소, 약 20% 이상 감소 또는 약 25% 이상 감소를 의미하고, 보다 구체적으로는 약 30% 이상 감소하는 경우를 의미하며, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

- [0031] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 글루탐산의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0032] 본 발명의 구성 중 “예측용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “농도의 증가 또는 높음”은 결절 기관지확장증형 환자에 비해 상업 공동형 환자 혈청 내 대세체 농도가 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 상기 대사체의 농도가 결절 기관지확장증형 환자와 상업 공동형 환자와 비교하여 약 5% 이상 증가, 약 10% 이상 증가 또는 약 15% 이상 증가를 의미하고, 보다 구체적으로는 약 20% 이상 증가하는 경우를 의미하며, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 리소포스파티딜콜린 또는 트리아실글리세롤의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0035] 본 발명의 구성 중 “예측용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “농도의 감소 또는 낮음”은 결절 기관지확장증형 환자에 비해 상업 공동형 환자 혈청 내 상기 대세체 농도가 유의하게 낮은 경우를 의미하며, 구체적으로는 대사체의 농도가 결절 기관지확장증형 환자와 상업 공동형 환자와 비교하여 약 10% 이상 감소, 약 20% 감소 또는 약 30% 이상 감소를 의미하고, 보다 구체적으로는 약 40% 이상 감소하는 경우를 의미하며, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 스펅고마이엘린의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0037] 본 발명의 구성 중 “예측용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “농도의 증가 또는 높음”은 결절 기관지확장증형 환자에 비해 상업 공동형 환자 혈청 내 대세체 농도가 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 대사체의 농도가 결절 기관지확장증형 환자와 상업 공동형 환자와 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가 또는 약 30% 이상 증가를 의미하고, 보다 구체적으로는 약 35% 이상 증가하는 경우를 의미하며, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 포스파티딜콜린PC 32:2(18:2/14:0), PC 34:3(16:1/18:2), PC 36:6(14:0/22:6) 또는 PC 38:7(16:1/22:6)의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 낮은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 포스파티딜콜린PC 36:1(18:0/18:1) 또는 PC 36:3(16:0/20:3)의 농도가 상업 공동형(Upper lobe cavitory form) 환자대비 높은 경우, 중증의 비결핵 항산균으로 판정한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 지질대사체, 아미노산 및 아미노산 유도체는 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) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 내 존재한다. 구체적으로는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 구체적으로는, 상기 대사체를 검출하기 위해 전혈, 혈장 또는 혈청을 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 의해 생산된 물질 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼

(*M. celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*M. gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*M. haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*), 마이코박테리움 테레(*M. terrae*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*M. ulcerans*), 마이코박테리움 시미에(*M. simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 따르면, 상기 비결핵 항산균 감염 질환은 상기 비결핵 항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 과중성 질환 등을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 지질대사체(lipid metabolites), 아미노산(amino acid) 및 아미노산 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도를 예측하기 위한 정보 제공 방법으로서,

[0048] 상기 지질대사체는 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine), 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine), 스피링고마이엘린(Sphingomyeline) 및 트리아실글리세롤(Triacylglycerol)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상이며,

[0049] 상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 글루타민(Glutamine), 히스티딘(Histidine), 메티오닌(Methionine), 아스파라긴(Asparagine), 글루탐산(Glutamate), 라이신(Lysine), 글라이신(Glycine), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 트레오닌(Threonine), 호모세린(Homoserine), 트립토판(Tryptophan) 및 시트룰린(Citrulline)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체를 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 것을 제공한다.

[0050] 본 발명에서 비결핵 항산균의 측정대상인 지질대사체, 아미노산 및 아미노산 유도체에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0051] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 대사체의 농도를 측정하는 단계는 크로마토그래피 또는 질량분석기인 정량 장치를 이용한다.

[0052] 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 고성능 액체 크로마토그래피(High performance Liquid Chromatography, HPLC), 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 폼 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 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 상기 질량분석기는 특별한 제한없이 종래 공지된 질량 분석기를 이용할 수 있지만, 구체적으로 예를 들면, 푸리에 변환 질량분석기(FTMS, Fourier transform mass spectrometer), 말디토프 질량분석기(MALDI-TOF MS), Q-TOF MS 또는 LTQ-Orbitrap MS일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0056] (a) 본 발명은 지질대사체, 아미노산 및/또는 아미노산 유도체를 표지자로 하는 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 중증도 예측용 조성물을 제공한다.

[0057] (b) 본 발명은 비결핵 항산균(NTM), 특히 질환의 진행 경과에 대한 객관적이고 신뢰도 높은 바이오마커가 전무한 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC)에 있어서, 상기 대사체들을 질환의 진행 경과 및 중증도를 높은 정확도

로 예측하는 표지자로 적용함으로써, 비결핵 항산균으로 인한 감염 환자의 증증도를 판정하여 환자 맞춤형 치료 전략을 조기에 수립함으로써, 환자의 생존률을 현저히 개선시키는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1a는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-글루타민(L-Glutamine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-히스티딘(L-Histidine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-메티오닌(L-Methionine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1d는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-아스파라긴(L-Asparagine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1e는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-글루탐산(L-Glutamate)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1f는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-트레오닌(L-Threonine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1g는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1h는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-라이신(L-Lysine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1i는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 글라이신(Glycine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1j는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 호모세린(Homoserine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1k는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 시트룰린(Citrulline)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1l는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 L-트립토판(L-Tryptophan)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine; LPC 14:0)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 리

소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine; LPC 15:0)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine; LPC 20:3)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2d는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 32:2(18:2/14:0))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2e는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 34:3(16:1/18:2))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2f는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 36:1(18:0/18:1))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2g는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 36:3(16:0/20:3))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2h는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 36:6(14:0/22:6))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2i는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine; PC 38:7(16:1/22:6))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2j는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 스팅고마이엘린(Sphingomyeline; SM d34:1(d18:1/16:0))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2k는 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 스팅고마이엘린(Sphingomyeline; SM d36:1(d18:1/18:0))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2l은 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 스팅고마이엘린(Sphingomyeline; SM d42:2(d18:1/24:1))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2m은 본 발명의 일 실시예에서 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자 중 결절 기관지 확장 증형(nodular bronchiectatic form) 환자와 상엽 공동형(upper lobe cavitory form) 환자의 혈청 시료에서 트리아실글리세롤(Triacylglycerol; TAG 58:11(22:6/20:5/16:0))의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] 실시예

[0062] [실�험예 1] MAC 감염 환자의 폐질환의 형태별 기관지확장증형(Nodular bronchiectatic; NB)과 상엽 공동형(Upper lobe cavitory; UC) 환자의 시료 수집

[0064] 2012년 1월부터 2016년 8월까지 기간 동안 대략 6년간 서울 삼성병원에서 수집한 마이코박테리움 아비움 복합체 (Mycobacterium avium complex) 감염 환자의 혈청샘플을 폐 질환 형태(NB : 83명, UC : 31명, 총 114명)에 따라 나누어 추출하고 준비하였다.

[0066] [실험예 2] 시료에 대한 전처리

[0067] 먼저, 지질대사체 분석을 위하여 상기 실험예 1에서 얻어진 혈청 시료 (50 μ l)에 300 μ l 클로로포름, 150 μ l 메탄올 (chloroform-methanol, 2:1, v/v, 4 $^{\circ}$ C)을 첨가하고 30초 동안 섞어 주었다. 여기에 150 μ l 물을 첨가하고 30 초 동안 섞은 뒤 ICE에 넣어 10 분간 방치하여 추출하였다. 이후, 원심분리기기를 이용하여 10 분간 13,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리한 뒤 하층액(200 μ l)을 분리해내어 Speed vacuum (full vacuum, no temp, 1-2hours)을 이용하여 건조하여 이하의 대사체 분석 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 질량 분석기 분석을 위해 건조된 시료를 200 μ l 아이소프로판올:아세토니트릴:물(Isopropanol:Acetonitrile:Water(2:1:1, v/v))에 재용해 후, 존재할 가능성이 있는 불순물 제거를 위하여 필터 튜브(Filter tube)(Costar 8169)를 이용하여 여과한 후 분석을 진행하였다. 극성 대사체 분석을 위해 혈청 시료 (10 μ l)에 86 μ l 물과 201 μ l 아세토나이트릴 (총 287 μ l의 70% Acetonitrile, 4 $^{\circ}$ C, v/v)를 첨가하고 3 μ l의 internal standard mixture (Cambridge Isotope Laboratories사의 Isotopic solution과 13C labeled taurine, allantoin, hypoxanthine)을 넣고 30초 동안 섞은 뒤 ICE에 넣어 10분간 방치하여 추출을 진행하였으며, 불순물 제거를 위해 필터 튜브(Filter tube, Costar 8169)를 이용하여 여과 후 분석 진행하였다. 기계 품질 관리(Machinery Quality Control; MQC)로, MS/MS 기기 상태를 체크하기 위하여 구입한 인간의 혈청 샘플을 환자 혈청 샘플과 같은 전 처리방법으로 기계 품질 관리(MQC)의 샘플로 사용하여 배치 당 6회 반복 분석하였다. 시료 품질 관리(Sample Quality Control; SQC)를 위하여 각 배치 안에서 시료 간의 차이를 비교하기 위해 시료 당 10 μ l씩 모아 시료 품질 관리를 제작하여 배치 당 6회 반복 분석하였다.

[0069] [실험예 3] HPLC-Triple Quad-MS를 통한 대사체 분석

[0071] 혈청에서 처리한 분석시료내의 극성 대사체를 분석하기 위해 크로마토그래피-텐덤 질량분석기(HPLC-MS/MS)를 이용하여 분석을 진행 하였다. 사용된 장비는 Agilent 1200 HPLC와 Sciex API4000 triple quadrupole MS를 이용하였다. 친수성 상호작용을 위한 크로마토그래피 조건으로는 Luna PFPP(2.0 x 150 mm, 3 μ m, Phenomenex) 컬럼을 이용하여 20 $^{\circ}$ C에서 용매에 따른 2가지 방법으로 기울기 용리를 이용하여 극성 대사체들을 분리 하였다. 첫 번째 이동상으로는 (A) H2O (v/v) 및 (B) Acetonitrile (v/v)를 이용하였고, 두 번째 이동상으로는 (A) H2O (v/v, 0.1% formic acid) 및 (B) Acetonitrile (v/v) 이용하였으며, 각각 조건의 기울기 용리는 총 분석 시간을 15분으로 하여 아래 표 1.과 동일하게 수행 하였다. 분무기 가스(Ion-Source Gas 1/2)단위는 50/50 arbitrary unit 이었으며, 가스커튼(Curtain Gas)의 단위는 25 arbitrary unit이었다. 소스 온도(Source temperature)는 500 $^{\circ}$ C 였으며, 이온스프레이 부유 전압(Ion-spray Floating Voltage)는 5.5kV(negative -4.5kV)이었으며, 매스 범위(Mass range)는 50-1000 m/z였다. 시료 주입은 HTC_PAL system/CTC analytics auto-sampler를 이용하여 3 μ l씩 주입하였으며, 텐덤 질량 분석기 조건 (예약 다중 반응 감지법; Scheduled Multiple Reaction Monitoring, sMRM)은 아래 표 2, 3, 4, 5와 같이 수행 하였다.

표 1

[0073]

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)	유속(mL/min)
0	100	0	0.35
8	73	27	0.35
9	15	85	0.35
10	100	0	0.35
15	100	0	0.35

표 2

[0078] - Water method (+), 21종

대사체 종류(Compounds)	m/z	Product ion	RT	CE
타이로신(L-Tyrosine)	182	77	2.8	41
시스타티오닌(L-Cystathionine)	223	134	0.9	11
베타인(Betaine)	118	58	1.32	39
티아민(Thymine)	127	110	5.43	21
오르니틴(Ornithine)	133	70	0.95	25
구아닌(Guanine)	152	110	2.2	27
히스티딘(Histidine)	156	110	1.32	12
아세틸오르니틴(N-Acetylornithine)	175	115	1.14	14
글루코사민(Glucosamine)	180	162	1.4	10
우라실(Uracil)	113	70	1.85	23
디옥시우리딘(Deoxyuridine)	229	113	6.21	11
씨티딘(Cytidine)	244	112	2.44	12
디옥시아데노신(Deoxyadenosine)	252	136	8.5	20
디옥시이노신(Deoxyinosine)	253	137	6.58	12
아데노신(Adenosine)	268	136	7.72	27
디옥시구아노신(Deoxyguanosine)	268	152	6.84	15
이노신(Inosine)	269	137	6.24	14
구아노신(Guanosine)	284	152	6.55	17
잔토신(Xanthosine)	285	153	6.97	20
싸이클릭 AMP(Cyclic AMP)	328	287	0.86	9
SAH	385	136	0.46	19

표 3

[0080] - Water method (-), 12종

대사체 종류(Compounds)	m/z	Product ion	RT	CE
글루코스(D-Glucose)	179	89	0.92	-12
하이드록시뷰티레이트(3-hydroxybutyric acid)	103	41	0.96	-32
타우린(Taurine)	124	80	0.9	-16
안트라닐레이트(Anthranilate)	136	92	3.68	-16
하이드록시벤조에이트(p-Hydroxybenzoate)	137	93	1.6	-21
시투롤린(Citrulline)	174	131	1.21	-13
하이드록시페닐피루베이트(p-Hydroxybenzoate)	179	107	0.97	-11
마이오이노시톨(myo-Inositol)	179	161	0.94	-15
티미딘(Thymidine)	241	125	7.02	-10
우리딘(Uridine)	243	111	4.22	-12
니코티네이트(Nicotinate)	122	78	1.54	-14
우레이트(Uric acid)	167	124	1.35	-22

표 4

[0082]

- Formic acid method (+), 32종

대사체 종류(Compounds)	m/z	Product ion	RT	CE
세린(L-Serine)	106	60	0.9	15
프롤린(L-Proline)	116	70	1.13	21
발린(L-Valine)	118	72	1.41	15
트레오닌(L-Threonine)	120	74	0.96	15
이소류신(L-isoLeucine)	132	86	1.93	15
류신(L-Leucine)	132	86	2.3	15
아스파라긴(L-Asparagine)	133	74	0.9	17
글루타민(L-Glutamine)	147	84	0.95	23
라이신(L-Lycine)	147	84	0.74	23
글루타메이트(L-Glutamate)	148	84	1	23
메티오닌(L-Methionine)	150	104	1.8	11
페닐알라닌(L-Phenylalanine)	166	120	6.41	17
알지닌(L-Arginine)	175	70	0.8	35
트립토판(L-Tryptophan)	205	188	8.4	13
다이메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine)	104	58	1.21	27
콜린(Choline)	104	60	0.9	19
글라이신(Glycine)	76	30	1.06	16
폴레이트(Folate)	442	295	9.58	19
아데닌(Adenine)	136	119	1.75	24
호모시스테인(Homocysteine)	136	90	1.26	15
하이포잔틴(Hypoxanthine)	137	110	2.8	29
잔틴(Xanthine)	153	110	2.5	23
알란토인(Allantoin)	159	99	1.17	13
사이토신(Cytosine)	112	95	0.98	17
호모세린(Homoserine)	120	56	1.03	27
티아민(Thiamine)	265	122	0.96	17
시스테인(Cysteine)	122	59	1.24	27
CMP	324	112	1.68	16
UMP	325	97	3	49
AMP	348	136	1.99	21
IMP	349	137	5.7	17
스펄민(Spermine)	203	112	0.53	27

표 5

[0084]

- Formic acid method (-), 24종

대사체 종류(Compounds)	m/z	Product ion	RT	CE
아스팔테이트(L-Aspartate)	132	88	0.96	-17
락테이트((S)-Lactate)	89	43	1.74	-18
포스포글리세라이트(3-Phosphoglycerate)	185	97	2.11	-22
석시네이트(Succinate)	117	73	3.88	-18
말레이트(L-Malic acid)	133	115	1.78	-16
시트레이트(Citrate)	191	111	3.58	-12
하이드로글루타레이트(D-2-Hydroxyglutaric acid)	147	129	1.03	-14
GTP	522	424	1.6	-30
아세틸포스페이트(Acetylphosphate)	139	79	1.65	-22
칼바모일포스페이트(Carbamoyl-phosphate)	140	79	0.9	-22
글리세라이트(Glycerate)	105	75	1.24	-15
포스포에놀피루베이트(Phosphoenolpyruvate)	167	79	2.3	-16
디하이드록시아세톤포스페이트 (Dihydroxyacetonephosphate)	169	79	1.7	-38
글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-Phosphate)	171	79	1.5	-22

시키페이트(Shikimate)	173	93	1.65	-16
알란토에이트(Allantoate)	175	132	1.05	-12
디옥시리보스 1-포스페이트 (Deoxyribose 1-Phosphate)	213	79	1.6	-33
리불로스 5-포스페이트(D-Ribulose 5-Phosphate)	229	79	1.3	-48
글루코스 6-포스페이트(Glucose 6-Phosphate)	259	79	1.73	-40
프루토스 1,6-비스포스페이트 (Fructose1,6-Bisphosphate)	339	271	0.98	-18
dGMP	346	79	2.02	-20
PRPP	389	291	1.4	-18
이타코네이트(Itaconate)	129	85	6.4	-14
프루토스 6-포스페이트(Fructose 6-Phosphate)	259	79	1.23	-54

- [0086] - m/z는 mass to charge ratio를 의미한다.
- [0087] - RT는 Retention time을 의미한다.
- [0088] - CE는 Collision energy를 의미한다.
- [0089] - (+)는 positive ion mode를 (-)는 negative ion mode를 의미한다.
- [0090] - sMRM 분석을 통해 얻어진 결과는 Sciex의 Quantitative Analysis Software를 통하여 raw data를 계산하였고, MQC data 평균값을 이용하여 상대표준편차(RSD<20)이하의 극성대사체를 산출 하였다.

[0092] [실험예 4] UHPLC-MS(Q-Exactive Orbitrap Plus)를 통한 대사체 분석

[0094] 혈청에서부터 분리한 분석 시료의 지질대사체를 분석하기 위해 크로마토그래피-탠덤 질량분석기(UHPLC-MS)를 이용하여 분석을 진행하였다. 사용된 장비는 Thermo Scientific의 Ultimate 3000RS pump UHPLC와 Q-Exactive Orbitrap Plus MS를 이용하였다. 친수성 상호작용을 위한 크로마토그래피 조건으로는 Acquity UPLC BEH C18(2.1 x 100 mm, 1.7µm, Waters) 컬럼을 이용하여 35° C에서 기울기 용리를 이용하여 지질대사체들을 분리하였다. 이동상으로는 (A) 10mM Ammonium formate in 50% ACN + 0.1% Formic acid (v/v) 및 (B) 2mM Ammonium formate in ACN/IPA/Water 10:88:2 + 0.02% Formic acid (v/v)를 이용하였고, 다음 이동상의 기울기 용리는 총 분석 시간을 28분으로 하여 아래 표 6과 동일하게 수행하였다.

[0095] 전기분무법 (Electrospray Ionization, ESI)는 positive, negative 2가지 모드의 이온화방식으로 수행하였으며, Full scan 매스 범위(Mass range)는 250-1200 m/z로 70,000 해상도(Resolution)를 사용하였으며, 자동 이득 제어(Automatic gain control, AGC) target은 1x10⁶ion으로 최대 주입 시간(Injection time, IT)는 100ms로 분석하였습니다. 충돌 에너지(Collision energy, CE)는 20, 30, 40이며 이온화 소스 (Source ionization spray voltage)는 3.0kV, Capillary temperature은 370° C였다. 분석을 통해 얻어진 결과는 Thermo Scientific의 분석소프트웨어(Compound Discoverer)를 통하여 로우 데이터(raw data)를 계산하여 유의성(p-value<0.05)이 높은 지질대사체를 산출하였다.

표 6

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)	유속(mL/min)
0	65	35	0.30
4	40	60	0.30
12	15	85	0.30
21	0	100	0.30
24	0	100	0.30
28	65	35	0.30

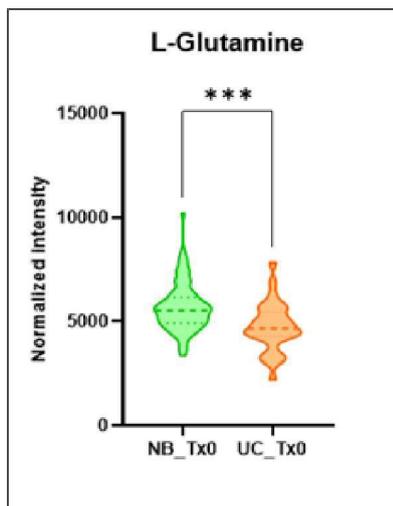
[0097] [실험예 5] 비결핵항산균 감염자의 혈청 시료 내 대사체 분석 결과

[0098] 항생제 치료전의 MAC 감염환자의 혈청 샘플 중 기관지확장증형(Nodular bronchiectatic; NB)의 환자 83명과 상엽 공동형(Upper lobe cavitary; UC)의 환자 31명의 혈청 샘플내 극성 및 지질대사체 농도를 비교하기 위해 다음의 통계검정방법으로 Metaboanalyst(통계 사이트)와 Quantitative Analysis Software of SCIEX™, Compound Discoverer of Thermofisher™,SPSS(통계 프로그램)의 Unpaired, Welch' s T-test 검정을 통하여 그룹간 유의성이 높거나 (p-value<0.05), 가능성이 높은 (p-value<0.09) 극성 및 지질대사체를 산출하였고, 그 결과를 이용하여 치료 전의 MAC환자의 중증도를 예측할 지표가 될 수 있는 극성 대사체 12종과 지질대사체 13종을 포함한 총 25종의 대사체를 각각의 p-value와 상엽 공동형(Upper lobe cavitary; UC) 대비 발현 수준의 배수 변화(Fold change) 값을 토대로 선정하여 그 결과를 하기 표 7 또는 8 및 도 1a 내지 2m에 나타내었다. 단, 도 1a 내지 2m에서, NB_Tx0는 항생제 치료 시작 전의 기관지확장증형 환자 83명의 혈청 샘플에서 각 대사체의 발현 수준을 나타낸 것이고, UC_Tx0는 항생제 치료 시작 전의 상엽 공동형 환자 31명의 혈청 샘플에서 각 대사체의 발현 수준을 나타낸 것이다. 또한, 유의성 unpaired, Welch' s t-test에서 *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001를 의미한다.

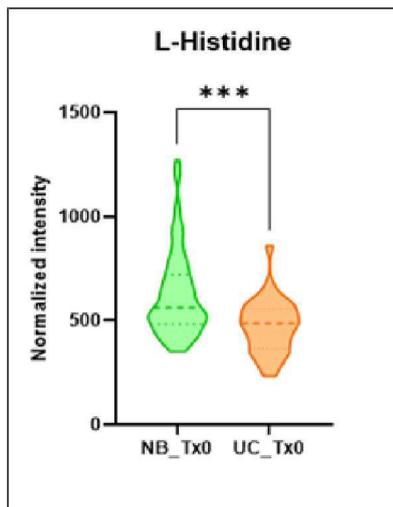
[0099] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

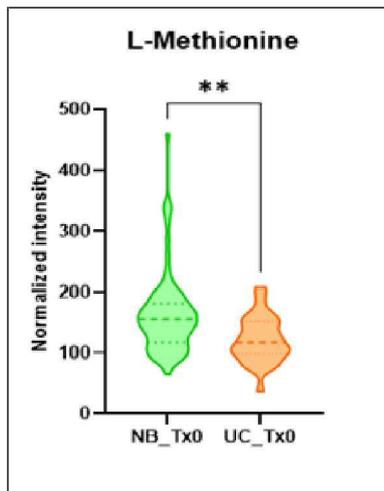
도면1a



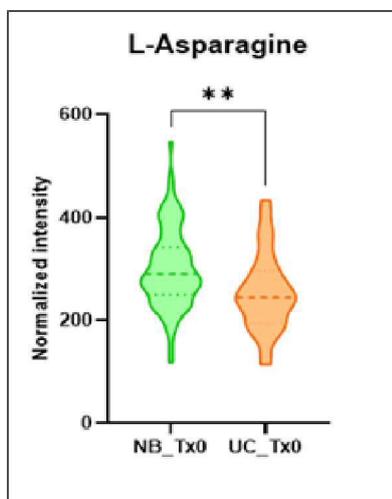
도면1b



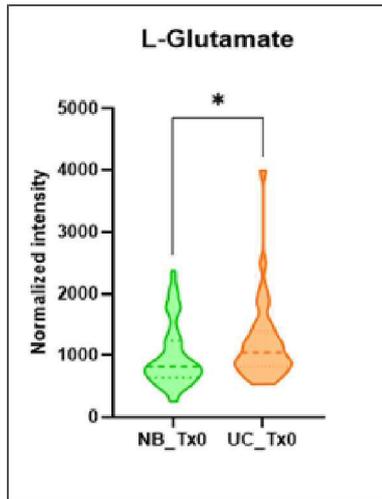
도면1c



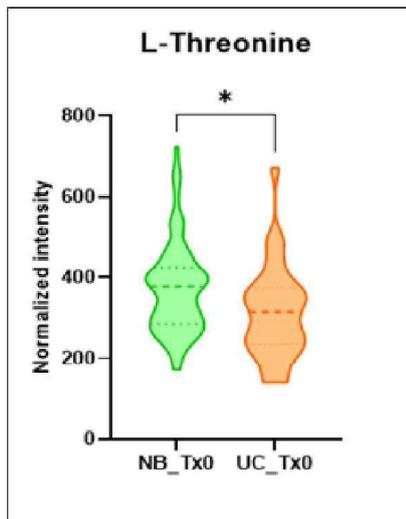
도면1d



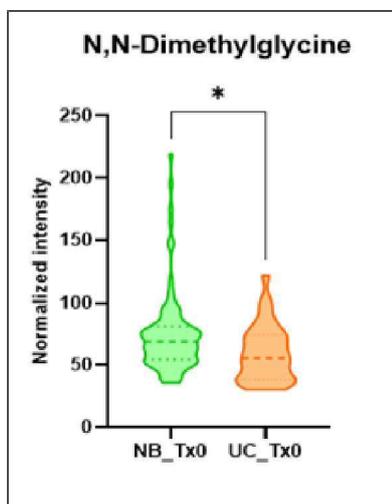
도면1e



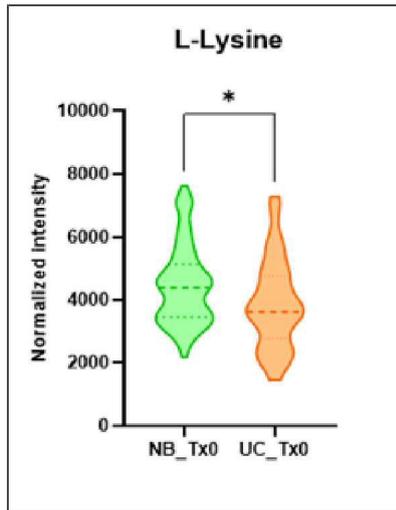
도면1f



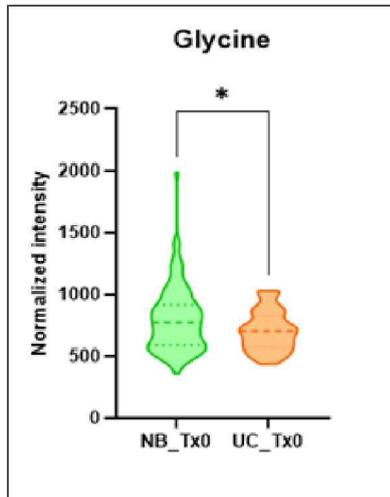
도면1g



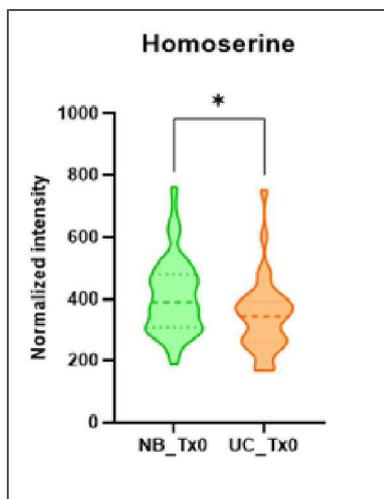
도면1h



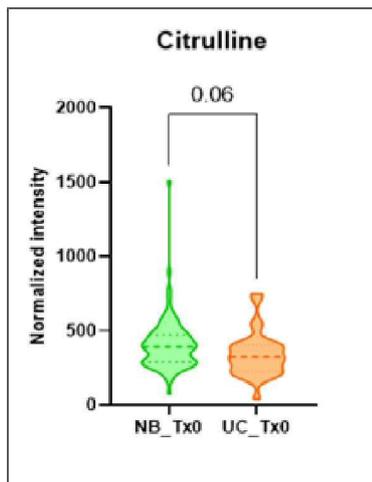
도면1i



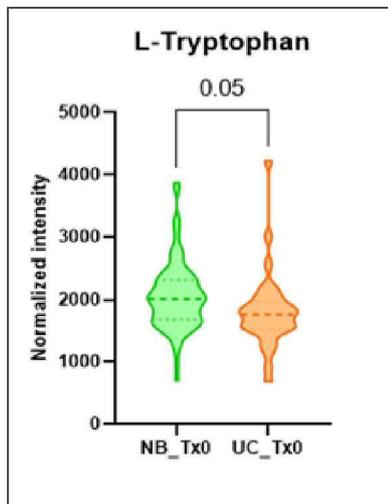
도면1j



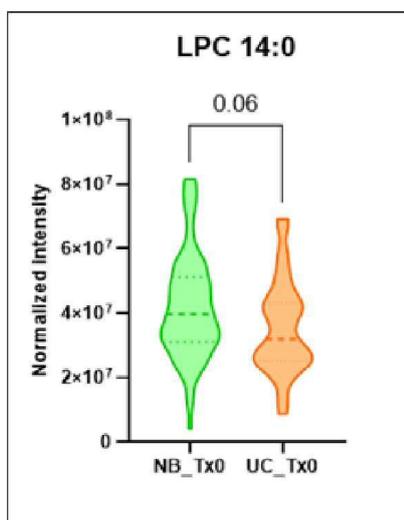
도면1k



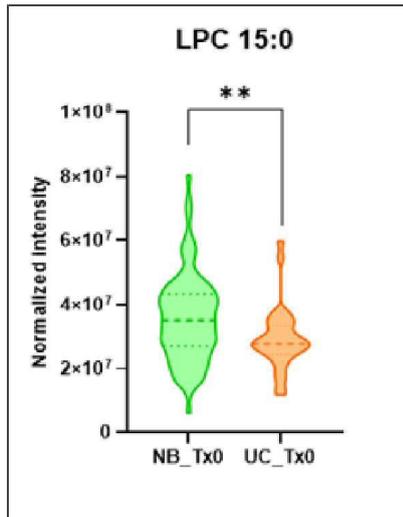
도면1l



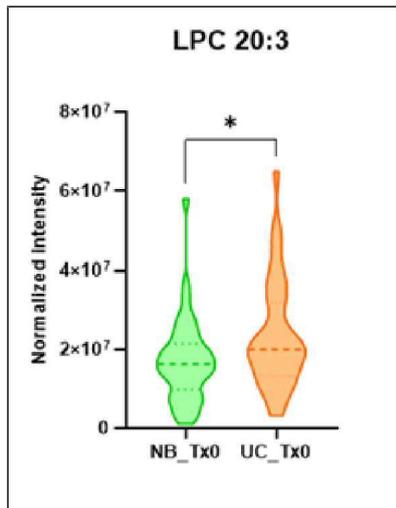
도면2a



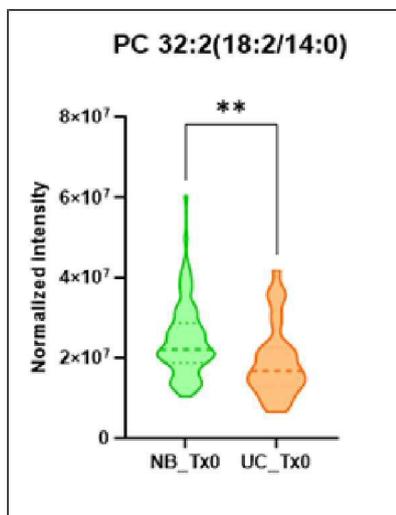
도면2b



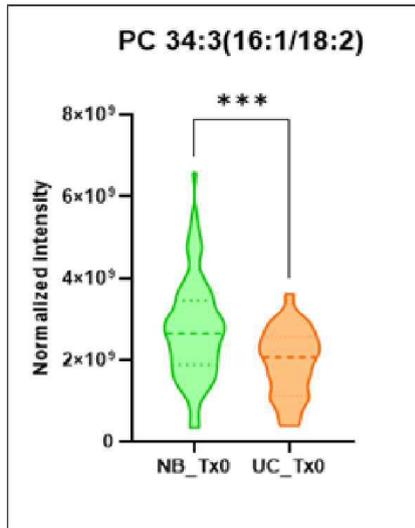
도면2c



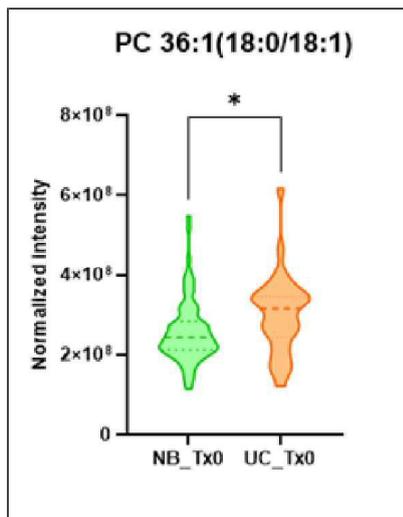
도면2d



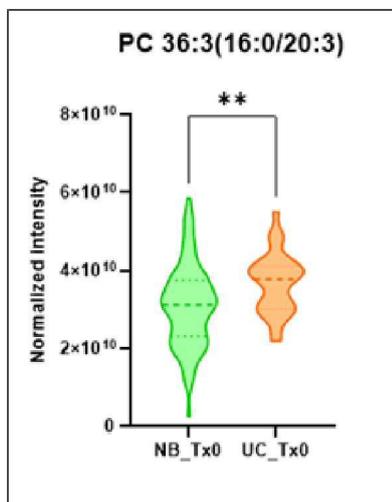
도면2e



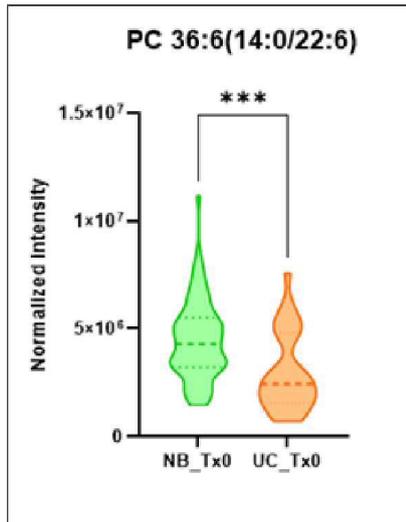
도면2f



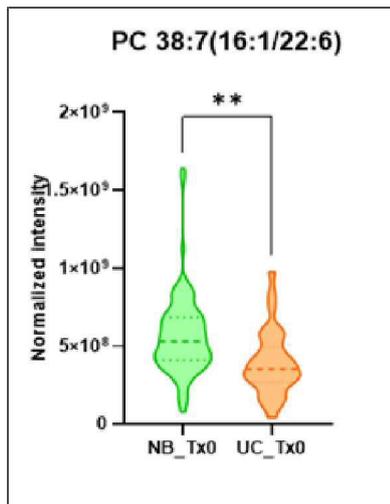
도면2g



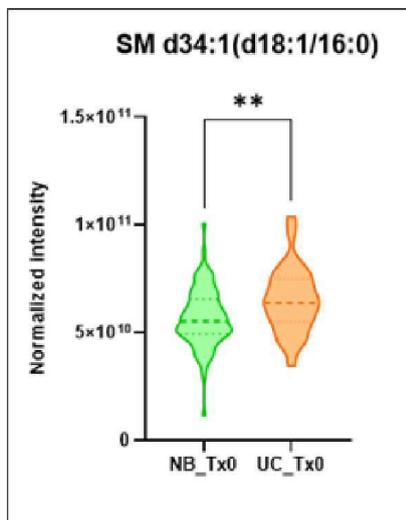
도면2h



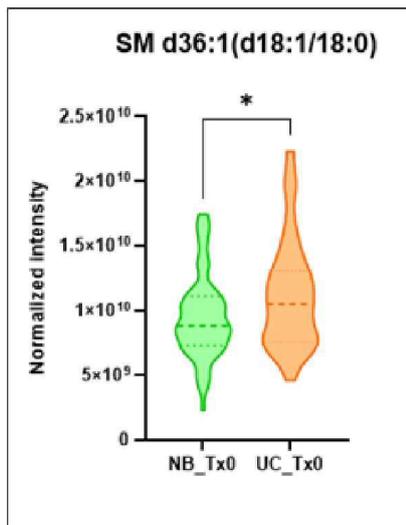
도면2i



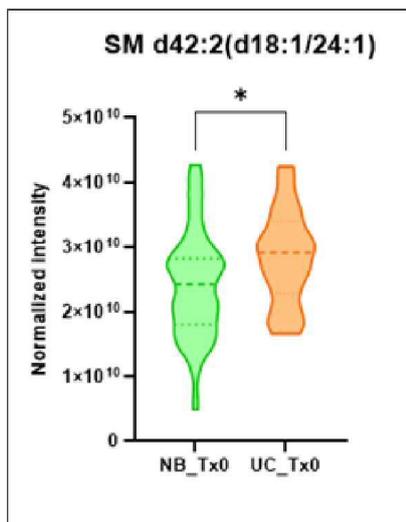
도면2j



도면2k



도면2l



도면 2m

