



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월14일

(11) 등록번호 10-2613980

(24) 등록일자 2023년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/487 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/487 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0070051
 (22) 출원일자 2021년05월31일
 심사청구일자 2021년05월31일
- (65) 공개번호 10-2022-0161826
 (43) 공개일자 2022년12월07일
- (56) 선행기술조사문헌
 A.P.Wijnands et al., Nutrients, Vol. 7, 2015, pp. 1426-1463.*
 J.Darcy et al., PLOS ONE, Vol. 6, No. 6, 2011.*
 L.Su et al., PLOS ONE, 2015.*
 KR102039815 B1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

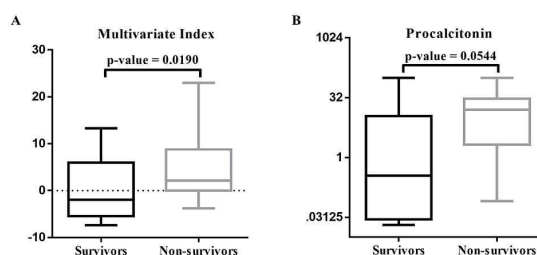
- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
이상국
 서울특별시 강서구 마곡서1로 111-11 마곡엠밸리 5단지 508동 103호
박무석
 서울특별시 강남구 선릉로 120, 개포우성2차아파트 11동 202호
안선영
 서울특별시 서대문구 이화여대길 50-12, 106동 1509호
- (74) 대리인
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 **패혈증 진단에 관한 정보를 제공하는 방법****(57) 요약**

본 발명에 따른 조성물 및 방법을 이용하는 경우 패혈증에서 나타나는 혈청 내 아미노산 수준 변화에 따른 병태 생리학적 기전을 이용하여 패혈증을 신속하고, 정밀하게 진단할 수 있으며, 이를 통해 패혈증의 조기 치료를 도모함으로써 생존율 향상에 기여할 수 있다.

대표도 - 도5

(52) CPC특허분류

G01N 33/49 (2019.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033094
과제번호	HR14C0006060021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성R&D
연구과제명	제2유닛(6세부) 패혈증 신속 진단 바이오마커발굴 및 POCT 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	(주)아리바이오
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711117371
과제번호	2020R1F1A1051360
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	대사체 프로파일링을 통한 비알콜성 지방간질환의 진단 및 치료효과 모니터링 바이
오마커의 발굴	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 대사체를 포함하는, 패혈증의 진단용 바이오 마커 조성물로서,

상기 조성물은 하기 다변량 지수 계산을 통해 패혈증을 진단하기 위한 것인, 조성물:

[식 1]

$$\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times 27.7705 - \text{ARG} \times 0.0515 + \text{PHE} \times 0.0643 - 5.4721$$

상기 식 1 에서,

KT ratio 는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG 는 ARG 의 수준이며,

PHE 는 PHE 의 수준이다.

청구항 2

키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 대사체의 발현 수준을 측정하는 정량 장치를 포함하는, 패혈증의 진단용 키트로서,

상기 키트는 하기 다변량 지수 계산을 통해 패혈증을 진단하기 위한 것인, 키트:

[식 1]

$$\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times 27.7705 - \text{ARG} \times 0.0515 + \text{PHE} \times 0.0643 - 5.4721$$

상기 식 1 에서,

KT ratio 는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG 는 ARG 의 수준이며,

PHE 는 PHE 의 수준이다.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 대사체는 목적하는 개체의 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), 뇌척수막액(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)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 생물학적 시료에 대하여 측정되는 것인, 키트.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 정량 장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기인, 키트.

청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 패혈증은 세균, 진균, 바이러스, 곰팡이, 그람양성(gram-positive) 박테리아, 그람음성(gram-negative) 박테리아, 원생동물 및 기생물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 감염성 병원체에 의해 야기되는 것인, 키트.

청구항 6

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

측정된 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 수준을 하기 식 1 에 대입하여 다변량 지수를 계산하는 단계;를 포함하는, 패혈증 진단에 관한 정보 제공 방법.

[식 1]

$$\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times 27.7705 - \text{ARG} \times 0.0515 + \text{PHE} \times 0.0643 - 5.4721$$

상기 식 1 에서,

KT ratio 는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG 는 ARG 의 수준이며,

PHE 는 PHE 의 수준이다.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 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)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인, 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 발현 수준은 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기에 의해 측정되는, 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 6항에 있어서,

계산된 다변량 지수 값이 -1.1280의 유리수 값 이상인 경우 목적하는 개체에게 패혈증의 발병하였거나 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 단계;를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

제 6항에 있어서,

상기 패혈증은 세균, 진균, 바이러스, 곰팡이, 그람양성(gram-positive) 박테리아, 그람음성(gram-negative) 박테리아, 원생동물 및 기생물로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 감염성 병원체에 의해 야기되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 패혈증 진단용 바이오 마커와, 상기 진단을 위한 키트 및 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 패혈증 (sepsis)이란 박테리아, 바이러스, 곰팡이, 세균 등과 같은 병원체에 감염되어 발열, 빠른 맥박, 호흡수 증가, 백혈구 수의 증가 또는 감소 등의 전신에 걸쳐 염증 반응이 나타나는 상태로써 조직이나 기관에 상처가 생겼을 때 감염에 대한 염증성 면역반응에 의해 일어나게 된다. 일반적으로, 이러한 감염은 주로 세균성 감염에 의한 경우가 많지만, 포자성, 바이러스성 감염 등에 의해서도 패혈증이 일어날 수 있다.

[0003] 패혈증은 빠른 시간 내 오염된 혈액이 순환하며 다양한 기관 및 장기에 영향을 미치므로 조기 발견하여 치료하지 않을 경우 사망률이 40 내지 70 %에 이를 정도로 높다. 가령 폐렴이나 요로감염과 같은 급성감염이 발생했을 때 감염균 혹은 염증반응이 몸 전체에 퍼지면서 혈압이 감소하고 주요 장기의 기능 손상이 발생하게 된다. 2018 년 조사 결과, 중증 패혈증으로 인한 사망률은 35 % 내외이며, 패혈성 쇼크로 인한 사망률은 40 내지 60 %에 달하며, 호흡곤란증후군 등의 합병증이 동반되는 경우로 인한 사망률은 이보다 훨씬 높은 80 %에 이르는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 많은 연구에서 패혈증의 조기 발견을 위한 노력이 이루어 지고 있으나, 현재 사용되고 있는 패혈증 바이오 마커로서 백혈구(WBC) 수는 임상 실습에서 진단 정확도, 민감도 및 특이성 측면에서 만족스럽지 못한 문제점이 있으며, 이는 수술, 운동, 외상, 정서적 스트레스와 같은 이유로 감염이 없는 상태에서도 관찰되는 백혈구의 증가 때문인 것으로 예측이 된다. 또한, 이와 유사하게 다른 패혈증 바이오 마커로서 C-반응단백(C-reactive protein; CRP)은 염증 및 감염과 같은 86 가지 면역 염증 반응에 민감하지만 세균 감염에는 특이적이지 않는 문제점이 있다. 최근 가장 검증되고 널리 인정되는 패혈증, 세균성 감염 표지자로서의 프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)는 메타 분석을 통하여 비 감염성 기원의 전신 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)과 패혈증을 효과적으로 구분할 수 있음에도 불구하고 추가적으로 임상 정보 및 미생물학적 평가와 함께 신중하게 적용해야 하며, 바이러스 감염이나 호중구 감소증 환자의 경우 혈장 PCT 수치는 일반적으로 크게 증가하지 않는 것으로 확인되는 문제가 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 상처 치유를 촉진하고 면역 기능을 유지하며 제지방량을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 단백질 대사가 패혈증의 결과로 현저하게 변화하는 점에서 착안하여 생화학적 과정에서 비효율적일 뿐만 아니라 증가된 대사 요구로 인해 높은 에너지 소비를 초래하는 패혈증을 혈청 아미노산 프로파일링을 통하여 효과적으로 진단할 수 있는 방법을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 패혈증을 진단하기 위한 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 패혈증 진단을 위한 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 패혈증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 패혈증 진단에 관한 정보를 제공하기 위한 진단기기를 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해

서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [0012] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 패혈증의 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명에서 상기 바이오 마커 조성물은 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 대사체일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "키누레닌 (kynurenine; KYN)"이란 니아신 생성에 사용되는 아미노산인 L-트립토판의 대사 중간 생성물에 해당하며, 주로 간에서만 만들어지는 효소인 트립토판 디옥시게나제 효소 또는 면역 활성화에 반응하여 많은 조직에서 만들어지는 인돌 아민 2,3- 디옥시게나제에 의해 합성된다. 키누레닌과 키누레닌의 추가적인 분해 산물들은 염증동안 혈관 확장 및 면역 반응을 조절하여 다양한 생물학적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 또한, 일부 암은 키누레닌 생성을 증가시켜 종양 성장을 증가하는 것으로도 알려져 있는 아미노산이기도 하다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "트립토판 (tryptophan; TRP)"이란 20 여개의 유전코드로 암호화된 아미노산 중 인간 생존에 필요한 필수 아미노산으로 지정 코돈은 UGG인 아미노산을 말한다. 트립토판을 포함하는 아미노산들의 가장 중심적인 역할로는 단백질 생합성 재료로 쓰인다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "아르기닌 (arginine; ARG)"이란 모든 생물에 존재하는 조건부 필수 아미노산이다. 간에서는 체내 암모니아를 제거하기 위하여 요소의 합성 과정이 일어나는데, 이때 아르기닌이 요소 회로 (urea cycle)에서 요소로 분해된다. 아르기닌은 상피세포, 뇌신경세포, 중성구(neutrophil), 산화질소(nitric oxide) 생성에도 반드시 필요하다. 특히 혈압, 장운동의 조절, 혈소판의 응고, 식균세포의 기능에 관여하는 일산화질소(NO)의 전구체로서 중요한 역할을 하고 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)"이란 필수 아미노산 중 하나이며, 체내에 이 아미노산을 분해하는 효소(phenylalanine hydroxylase)가 없을 경우엔 페닐케톤뇨증에 걸리게 된다. 티로신의 전구물질이 될 수 있다. 한편 감미료 중 아스파탐의 주 원료이기도 하다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "진단"이란 특정 질환에 대한 개체의 발병 여부 또는 발병 가능성의 판정 및 특정 질환이 발병한 개체의 예후의 판정을 포괄하는 것으로, 특정 질환 존재 및 존재 가능성 여부를 미리 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 패혈증의 발병 또는 발병 가능성 여부를 미리 예상하는 행위로 해석될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물에서 진단의 대상은 패혈증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 목적하는 개체일 수 있다. 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 상기 "인간"은 패혈증이 발생하였거나 그 발생이 의심되는 자로, 패혈증의 적절한 치료가 필요하거나 예상되는 환자를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 상기 진단의 대상이 되는 질환으로 상기 "패혈증"은 정상적인 생화학적 과정의 효율성 저하뿐만 아니라 높은 에너지 소비를 초래하게 되는 과대사의 예시로 높은 이화 작용 상태, 휴식기 에너지 소비 증가, 단백질 이화 작용의 증가, 지방 이화 작용의 증가, 음의 질소 균형, 인슐린 저항성, 고혈당증 및 간 글리코겐 생산 증가 등과 같은 패혈증과 관련된 과대사 상태 및 대사 조절 장애로 인해, 패혈증 환자에서 단백질 대사를 반영하는 혈액 아미노산 조성이 현저하게 변할 수 있는 질환에 해당한다. 본 발명에서의 패혈증은 박테리아, 바이러스

스, 곰팡이, 세균 등과 같은 병원체에 감염되어 발생하는 질환일 수 있으며, 바람직하게는 세균성 감염에 의한 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 패혈증 환자의 병리 생리학적 변화를 즉시 반영하는 대사체 분석, 보다 바람직하게는 아미노산 프로파일링을 통해 패혈증을 진단할 수 있으며, 특히는 구별이 어려운 전신 염증 반응 증후군 (systemic inflammatory response syndrome; SIRS)과 패혈증을 구분함으로써 SIRS가 아닌 패혈증을 정밀하게 진단할 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물에서 상기 "대사체(metabolite)"는 대사물질 또는 대사산물이라고도 불리우며, 물질 대사의 중간생성물 또는 생성물이다. 이러한 대사체는 연료, 구조, 신호전달, 효소에 대한 촉진 및 저해 효과, 그 자신의 촉매 활성(일반적으로 효소에 대한 보조 인자로서), 방어, 다른 생물체와의 상호작용(예: 색소, 방향 화합물, 페로몬)을 포함하는 다양한 기능을 가지고 있다. 1차 대사체는 정상적인 생장, 발생 및 생식에 직접적으로 관여한다. 2차 대사체는 이러한 과정들에 직접적으로 관여하지 않지만, 대개 중요한 생태학적 기능을 가지고 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 대사체는 생체 기원의 시료, 즉 생물학적 시료로부터 수득한 대사 물질을 말하는 것으로, 상기 생물학적 시료는 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 전혈(whole blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum)일 수 있고, 보다 바람직하게는 혈청(serum)일 수 있다.

[0027] 본 발명에서는 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.

[0029] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 패혈증 진단용 키트에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 진단용 키트는 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 대사체의 발현 수준을 측정하기 위한 정량 장치를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 대사체는 생체 기원의 시료, 즉 생물학적 시료로부터 수득한 대사 물질을 말하는 것으로, 상기 생물학적 시료는 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 전혈(whole blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum)일 수 있고, 보다 바람직하게는 혈청(serum)일 수 있다.

[0032] 본 발명에서는 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.

[0033] 본 발명에서 상기 키트는 생물학적 시료 내에 특정 대사체의 존재 여부뿐 아니라 특정 대사체의 상대적 또는 절대적 양에 대한 정량적인 수치 정보를 제공하는 장치를 추가로 포함하는 키트를 의미한다. 상기 정량적인 수치 정보를 제공하는 정량 장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0034] 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), 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.
- [0035] 본 발명에서 상기 질량분석기는 시료의 화학적 조성을 분석하기 위해 대상 물질의 질량을 측정하는 과정을 의미하는 것으로 시료에 존재하는 대상 물질의 이온화를 통해 하전분자나 분자조각을 생성하고 질량 대 전하비(m/z) 또는 기체상 이온의 존재 비율 측정하여 질량에 대한 정보를 제공할 수 있다. 특별한 제한없이 종래 공지된 질량 분석기를 이용할 수 있지만, 구체적인 일 예시로, 푸리에 변환 질량분석기(FTMS, Fourier transform mass spectrometer), 말디토프 질량분석기(MALDI-TOF MS), SELDI-TOF(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight), ESI-TOF(electrospray ionisation time-of-flight), Q-TOF MS 또는 LTQ-Orbitrap MS, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 또는 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 LC-MS/MS를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 진단용 키트는 KT 비율(KYN/TRP ratio; KT ratio)을 측정함으로써 패혈증의 발병 여부 또는 발병 가능성을 진단할 수 있다. 여기서 상기 "KT 비율(KYN/TRP ratio; KT ratio)"란 KYN 및 TRP의 수준으로 계산된 비율을 말한다. 패혈증에서 TRP의 KYN으로의 이화 작용은 인돌아민-2,3-디옥시게나제(indoleamine-2,3-dioxygenase; IDO)에 의해 매개되고, 인터페론 감마는 TRP를 독성 대사 산물인 KYN으로 대사되는 IDO를 활성화한다. 인터페론 감마는 크론병이나 류마티스 관절염과 같은 염증 반응과 관련이 있지만 감염 시 항균제 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 감염에 대한 반응으로 인터페론 감마는 NK 세포와 T 림프구에 의해 생성되어 단핵구와 대식세포가 TNF- α 를 합성하도록 자극하고 독성 화합물인 산화 질소(NO)를 방출한다. 본 발명에서 IDO가 감염 중에 강화된 인터페론 감마 분비에 의해 고도로 활성화될 것이라고 예측하여 결과적으로 높은 KYN 및 낮은 TRP 수준으로 높은 KT 비율이 패혈증의 지표로 사용될 수 있음을 가정하였다.
- [0037] 본 발명의 키트에서 패혈증 및 대사체에 관한 정의는 상기 본 발명의 바이오 마커 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재 생략한다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 패혈증 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 상기 방법은 상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 키누레닌(kynurenine; KYN), 트립토판(tryptophan; TRP), 아르기닌(arginine; ARG) 및 페닐알라닌(phenylalanine; PHE)으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 패혈증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체로, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있고, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 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), 뇌척수막액(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) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 전혈(whole blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum)일 수 있고, 보다 바람직하게는 혈청(serum)일 수 있다.

- [0043] 본 발명에서는 상기 대사체의 발현 수준을 측정하기에 앞서, 상기 생물학적 시료, 바람직하게는 전혈, 혈장 또는 혈청을 전처리하는 단계를 수행할 수 있다. 본 발명에서 상기 전처리로는, 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 대사체의 발현 수준을 측정하여 패혈증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 지 여부를 선별하기 위한 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 대사체의 발현 수준은 정량 장치를 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명에서 상기 정량 장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 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), 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.
- [0047] 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), SELDI-TOF(surface enhanced laser desorption/ionization time of flight), ESI-TOF(electrospray ionisation time-of-flight), Q-TOF MS 또는 LTQ-Orbitrap MS, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 또는 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 LC-MS/MS를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에서 상기 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 또는 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 수준은 LC-MS/MS에 의해 측정된 것일 수 있고, 바람직하게는 μM 의 단위로 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 정보 제공 방법은, 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 수준을 아래의 식 1에 대입하여 다변량 지수를 계산하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] [식 1]
- [0051] $\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times (a) - \text{ARG} \times (b) + \text{PHE} \times (c) - (d)$
- [0052] 상기 식 1에서,
- [0053] KT ratio는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,
- [0054] ARG는 ARG의 수준이며,
- [0055] PHE는 PHE의 수준이고,
- [0056] 계수 a는 26.05 내지 29.05의 유리수이며,
- [0057] 계수 b는 0.03 내지 0.07의 유리수이고,
- [0058] 계수 c는 0.04 내지 0.08의 유리수이며,
- [0059] 계수 d는 5.05 내지 5.95의 유리수일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 정보 제공 방법은 계산된 상기 다변량 지수 값이 -1.25 내지 -1.00의 유리수 값, 바람직하게는 -1.128의 유리수 값 이상인 경우 목적하는 개체에게 패혈증의 발병하였거나 발병 가능성이 높을 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 정보 제공 방법에서 패혈증 및 대사체 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0062] 본 발명에 따른 조성물 및 방법을 이용하는 경우 패혈증 환자에게서 나타나는 단백질 대사를 반영하는 혈청 아미노산 조성 변화를 통해 패혈증을 신속하고 정밀하게 진단함으로써, 패혈증의 조기 치료를 도모하여 생존을 향상에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 트레이닝 그룹의 아미노산 농도를 PLS-DA 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 후보 아미노산의 PLS-DA의 중요도 플롯 어세이 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 Kruskal-Wallis 테스트를 수행하여 트레이닝 그룹의 아미노산 각각의 농도 수준을 비교 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 기존 패혈증 바이오 마커의 성능과 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 다변량 지수를 비교 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 테스트 그룹에서의 생존자 하위 그룹과 생존자가 아닌 하위 그룹 간 Mann-Whitney U 테스트 결과를 비교 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] 준비예 1: 피험자의 데이터 모집

[0067] 본 발명자들은 패혈증 다변량 바이오 마커를 식별하기 위해 트레이닝 그룹을 사용하고 식별된 바이오 마커를 검증하기 위해 테스트 그룹을 모집하였다. 구체적으로 각 그룹에는 건강한 대조군, 전신 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome; SIRS) 환자 및 패혈증 환자의 세 가지 하위 그룹이 포함되었다.

[0068] 트레이닝 그룹은 2018 년 7 월부터 2019 년 1 월까지 세브란스 검진 센터 (대한민국 서울)에서 정기 건강 검진을 받은 개인으로 구성된 건강한 대조군과, SIRS 환자 하위 그룹은 2018 년 8 월부터 2019 년 5 월까지 세브란스 병원에서 선택적 정형 외과 수술을 받았으며 감염을 포함한 다른 기저 질환이나 상태가 없는 환자로 구성되었다. 특히, SIRS 그룹 피험자는 (1) 발열 (fever) ($> 38^{\circ}\text{C}$) 또는 저체온증 (hypothermia) ($< 36^{\circ}\text{C}$), (2) 빈호흡 (tachypnea) ($> \text{분당 } 24 \text{ 호흡}$), (3) 빈맥 (tachycardia) (심박수 $> \text{분당 } 90 \text{ 회}$) 및 (4) 백혈구 증가증 (leukocytosis) ($> 12 \times 10^9/\text{L}$) 또는 백혈구 감소증 (leukopenia) ($< 4 \times 10^9/\text{L}$) 또는 10 % 이상의 호중구 밴드 수 (a count of band neutrophils) 중 두 가지 이상의 상태를 가진 환자로 정의되었다. 수술 전 사전 동의를 얻은 후 수술 후 검사 결과를 토대로 SIRS 그룹 모집에 대한 최종 결정을 내렸으며 공복 상태에서 수술 후 12 시간 이내에 123 명의 SIRS 환자로부터 혈액 샘플을 수집하였다. 마지막으로 2018 년 6 월부터 2019 년 5 월까지 세브란스 병원의 기존 코호트에 속한 패혈증 환자로부터 115 개 표본을 수집하였다(중환자실 패혈증 환자에 대한 세브란스 코호트 연구). 이 코호트는 패혈증-3 지침(Sepsis-3 guidelines)에 따라 ICU 입원 시 의료진이 확인한 패혈증 환자로 구성되었고, 등록 후 24 시간 이내에 혈액 샘플링을 수행하였다. 패혈증에 대한 포함 기준은 a) 의심되는 감염; b) 두 가지 이상의 하위 기준(sub-criteria)으로서 호흡 수 (respiratory rate) ≥ 22 회/분, 바뀐 심리상태 (altered mentation) 또는 수축기 혈압 (systolic blood pressure) $\leq 100 \text{ mmHg}$; c) ICU 또는 응급실 (ER)에 입원한 후 24 시간 이내에 순차적 장기 부전 평가 점수 (sequential organ failure assessment score; SOFA 점수) ≥ 2 인 경우로 하였다. 이때, 인간 면역 결핍 바이러스 감염 또는 암 화학요법 치료로 인한 호중구 감소증 환자 또는 중환자실 또는 응급실 입원 24 시간 이내에 심폐 소생술을 받은 환자는 제외시켰다.

[0069] 테스트 그룹의 경우 세브란스 병원의 외래 환자 클리닉에서 22 개의 건강한 대조군을 모집하였고, 이들로부터 수집된 잔류 혈청 분석은 비정상적인 실험 결과 또는 기저 질환을 나타내지 않은 것을 확인하였다. SIRS 하위 그룹의 경우, 금식 상태에서 수술 후 12 시간 이내에 2018 년 7 월부터 8 월 사이에 세브란스 병원에서 선택적 정형 외과 수술을 받은 50 명의 환자로부터 혈청을 수집하였다. 2018 년 6 월부터 2019 년 2 월까지 세브란스

병원의 다른 코호트에서 45 개의 패혈증 표본을 수집하였고(응급실을 통해 입원 한 패혈증 환자에 대한 세브란스 코호트 연구), ER 코호트의 패혈증 환자는 ER 입원 당시 ER 임상지에 의해 패혈증이 있는 것으로 확인된 환자로 구성되었다. 이 연구에서는 응급실 입원 시 수집된 혈액 샘플을 사용하였으며, 패혈증 하위 그룹의 포함 또는 제외 기준은 ICU의 패혈증 환자 코호트 연구에서 사용된 것과 동일하게 적용하였다.

[0070] 본 연구는 대한민국 서울 세브란스 병원 기관 심의위원회 (승인 번호: 4-2018-0387)의 승인을 받았으며, 모든 연구는 참가자로부터 사전 동의를 얻어 수행되었다. 참가자의 임상 및 실험실 데이터는 전자 의료 기록을 검토하여 얻었고, 모든 참가자는 19 세 이상으로 샘플 크기는 건강한 대조군 하위 그룹 ($n = 10$), SIRS 하위 그룹 ($n = 12$) 및 패혈증 하위 그룹 ($n = 49$)의 세 하위 그룹에 걸쳐 71 명의 피험자를 기반으로 한 예비 연구를 기반으로 계산되었다.

[0072] 준비예 2: 통계 분석

[0073] 이하 실시예에서는 Mann-Whitney U 검정과 Kruskal-Wallis 검정은 여러 독립 그룹의 중앙값 13 개의 차이를 비교하는 데 사용되었으며, PLS-DA를 수행하여 하위 그룹이 잘 분리되었는지 확인하였다. 또한, PLS-DA는 하위군 클러스터링에 중요한 영향을 미치는 후보 아미노산을 확인하는 데 사용되었으며, 후보 아미노산을 사용하여 로지스틱 회귀 분석을 수행하여 R 스튜디오 소프트웨어 "캐럿 (caret)" 패키지 (버전 1.1.453, MA, USA)를 사용하여 다변량 인덱스를 생성하였다. Analyse-it (버전 5.40.2, Analyse-it Software, Ltd., Leeds, UK), R studio, GraphPad Prism (버전 6, GraphPad Software, CA, USA) 및 SPSS (버전 18, IBM, NY)를 사용하여 얻었고, $p < 0.05$ 인 결과는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0075] 실시예 1: 후보 아미노산의 선별

[0076] 1.혈청 아미노산 수준 측정 및 시약

[0077] 22 개 아미노산의 혈청 수준은 생물학적 유체 (biological fluids)의 아미노산에 특이적인 액체 크로마토그래피 질량 분석기 (LC-MS / MS)용 키트인 Zivak 아미노산 키트 (Zivak Technologies, 터키)를 사용하여 측정하였다. 알라닌 (alanine; ALA), 아르기닌 (alanine; ARG), 아스파라긴 (asparagine; ASN), 아스파르트산 (aspartic acid; ASP), 시트룰린 (citrulline; CIT), 글루타민산 (glutamic acid; GLU), 글루타민 (glutamine; GLN), 글리신 (glycine; GLY), 히스티딘 (histidine; HIS), 하이드록시프롤린 (hydroxyproline; HYP), 이소류신 (isoleucine; ILE), 류신 (leucine; LEU), 라이신 (lysine; LYS), 메티오닌 (methionine; MET), 오르니틴 (ornithine; ORN), 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE), 프롤린 (proline; PRO), 세린 (serine; SER), 트레오닌 (threonine; THR), 티로신 (tyrosine; TYR), 발린 (valine; VAL) 및 트립토판 (tryptophan; TRP)과 같은 22 개의 아미노산 수준을 측정하였다. 액체 크로마토그래피 분석은 전용 컬럼 (Zivak Amino Acid Biological Fluids LC-MS/MS 분석 컬럼, Zivak Technologies), 이동상 (mobile phase) 용액 A 및 B (Zivak 키트 제조업체에서 제공하는 유기 용매) 및 Agilent 1260 Infinity 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 경사 방법 (gradient methods)으로 수행되었다. 다중 반응 모니터링 (multiple reaction monitoring; MRM) 모드에서 질량 분석 시스템 (QTRAP 5500, SCIEX, Woodlands Central, 싱가포르)을 사용하여 신호를 검출하였으며, 외부 교정 물질 (external calibrators) 및 정도 관리 물질 (quality control materials)는 각 분석 과정의 시작, 중간 및 마지막에 사용되었다. 분석의 반복성을 나타내는 변동 계수 (coefficient of variation; CV)는 0.5 % 에서 4.6 % 사이로 확인되었다.

[0078] 먼저 혈청 (serum) 내 KYN 농도는 동일한 LC-MS/MS 시스템에서 측정되었고, 냉동된 혈청 샘플은 25 °C에서 해동되었다. 그런 다음, 1 $\mu\text{L/mL}$ KYN 내부 표준 물질 (KYN-d₄)이 포함된 80 μL 단백질 침전 용액에 20 μL 혈청 샘플 또는 교정기를 추가하였고, 샘플을 볼텍스 믹서를 사용하여 1 분 동안 혼합하고 25 °C에서 14,000 rpm으로 10 분 동안 원심 분리하였다. 이어서, 10 μL 의 상층액 (supernatant)을 9.0 μL 이동상 A와 혼합하고 혼합물 1 μL 을 Kinetex pentafluorophenyl propyl 컬럼 (100 mm x 3 mm, 2.6 μm C18 100 Å, Phenomenex, CA, USA)이 장착된 Agilent 1260 Infinity HPLC 시스템 (Agilent Technologies Inc.)에 주입하였다.

[0079] 이동상 A는 0.1 % 포름산과 탈 이온수를 포함하고 이동상 B는 0.1 % 포름산과 메탄올을 포함한다. 경사는 90 % 이동상 A로 시작하여 90 % 이동상 A에서 0.5 분 동안 유지되고, 2.5 분 내에 40 % 이동상 A로 감소하고, 1 분 내에 10 % 이동상 A로 추가 감소, 10 % 이동상 A에서 1 분 동안 유지되고, 최종적으로 0.1 분 만에 90 % 이동상 A로 다시 증가하여 1.4 분에 평형을 유지하였다. KYN 및 KYN-d₄는 QTRAP 5500 (SCIEX)을 사용하여 양이온 모드에서 전기 분무 이온화에 의해 이온화되었으며 MRM 모드 m/z 209/94 및 m/z 213/122에서 각각 검출되었다. 분석의 반복성을 나타내는 CV는 3.0 % 에서 4.8 % 사이였다.

- [0081] 2. 후보 아미노산 선택
- [0082] 혈청 아미노산 농도를 측정한 후, 부분 최소 자승 분석(partial least squares discriminant analysis; PLS-DA)을 수행하여 하위 그룹 클러스터링을 평가하고 훈련 그룹에서 하위 그룹 구분을 담당하는 아미노산 6 개 (KYN, TRP, PHE, ARG, ASP, GLU)를 식별하였다.
- [0083] 도 1a 및 도 1b를 참조하면, PLS-DA의 점수 플롯을 기반으로 트레이닝 그룹의 세 하위 그룹이 명확하게 구분되고 별개의 클러스터를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0084] 더욱이, 본 발명자들은 아미노산의 중앙값 농도를 세 하위 그룹 사이에서 비교한 결과, 도 2와 같이 PLS-DA 중요도 플롯어세이를 통해 PLS-DA에서 하위 그룹 구분에 중요한 역할을 하고 하위 그룹 간의 중간값 농도에서 유의한 차이를 보이는 후보 아미노산을 선별하였다. Kruskal-Wallis 테스트를 수행하여 트레이닝 그룹의 아미노산 농도를 비교 분석하여 도 3에 나타내었다. 이를 통해 PLS-DA에서 중요했던 KYN, TRP, PHE, ARG, ASP, GLU의 농도는 건강한 대조군과 SIRS 및 패혈증 환자간에 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 나타내는 것을 확인하였다. GLN과 GLU는 글루타민 합성 효소와 글루타민아제에 의해 서로 대사될 수 있기 때문에 GLN을 후보로 추가하였고, TRP-KYN 경로의 일부이고 그 수준이 서로 반비례하여 KYN 수준이 증가하면 TRP 수준이 감소하고 그 반대로 마찬가지로이기 때문에 KYN/TRP 비율 (KT ratio)을 계산하였다. 새로운 다변량 바이오 마커를 개발하기 위하여 앞서 언급한 8 가지 지표 (KYN, TRP, PHE, ARG, ASP, GLU, GLN, KT ratio)를 후보 아미노산으로 선별하여 지수 공식에 적용하였다.
- [0086] **실시예 2: 다변량 지수 공식의 도출 및 검증**
- [0087] 1. 다변량 지수 공식 도출
- [0088] 다변량 분석을 이용한 패혈증 바이오 마커 개발 다음으로, 선별된 후보 아미노산의 다양한 조합으로 여러 다변량 지수 공식을 만들기 위해 트레이닝 그룹을 사용하여 로지스틱 회귀 분석을 수행하였다. 이를 통해 10 개의 다변량 지수 공식을 아래의 표 1과 같이 도출하였다.

표 1

공식 No.	Factors and Generated Formula	AUC	cut-off	민감도(sensitivity)	특이도(specificity)	정확도(accuracy)
1	KT ratio, ARG, PHE, GLU, GLN, ASPKT ratio X 25.8002-ARG X 0.0519+PHE X 0.0570-GLU X 0.0218-GLN X 0.0034+ASP X 0.0275-3.5413	0.9870	-1.0460	0.9331 [0.8958, 0.9581]	0.9478 [0.8852, 0.9786]	0.9373 [0.9089, 0.9590]
2	KT ratio, ARG, PHE, GLU, GLNKT ratio X 26.5502-ARG X 0.0492+PHE X 0.0628+GLU X 0.0013-GLN X 0.0037-3.8763	0.9880	-1.2880	0.9366 [0.8999, 0.9609]	0.9652 [0.9080, 0.9888]	0.9449 [0.9177, 0.9651]
3	KT ratio, ARG, PHE KT ratio X 27.7705-ARG X 0.0515+PHE X 0.0643-5.4721	0.9870	-1.1280	0.9401 [0.9041, 0.9637]	0.9652 [0.9081, 0.9888]	0.9474 [0.9207, 0.9671]
4	KYN, TRP, ARG, PHEKYN X 0.3925-TRP X 0.0937-ARG X 0.0516+PHE X 0.0688-1.0310	0.9870	-1.1390	0.9266 [0.8917, 0.9553]	0.9652 [0.9081, 0.9887]	0.9398 [0.9118, 0.9611]
5	KT ratio, ARG, PHE, ASPKT ratio X 26.1522-ARG X 0.0541+PHE X 0.0547+ASP X 0.0312-5.0448	0.9670	-1.2370	0.9366 [0.8999, 0.9609]	0.9565 [0.9565, 0.9839]	0.9424 [0.9148, 0.9631]
6	KT ratio, PHE, GLU, GLNKT ratio X 28.4968+PHE X 0.0399+GLU X 0.0042-GLN X 0.0053-5.7122	0.9760	-1.1590	0.9437 [0.9083, 0.9663]	0.9391 [0.8742, 0.9731]	0.9424 [0.9148, 0.9631]
7	KT ratio, ARG, GLU, GLNKT ratio X 33.1247-ARG X 0.0229+GLU X 0.0187-GLN X 0.0002-3.4614	0.9600	-1.0440	0.9225 [0.8835, 0.9497]	0.9217 [0.8526, 0.9613]	0.9223 [0.8915, 0.946]

8	KT ratio, ARGKT ratio X 36.2083- ARG X 0.0230-1.4355	0.9430	- 0.9170	0.9331 [0.8958, 0.9581]	0.8783 [0.8009, 0.9294]	0.9173 [0.8858, 0.9424]
9	KT ratio, PHEKT ratio X 30.1206+PHE X 0.0416-8.0384	0.9740	- 1.2870	0.9261 [0.8876, 0.9525]	0.9391 [0.8742, 0.9731]	0.9298 [0.9002, 0.9529]
10	KT ratioKT ratio X 38.7780-3.8869	0.9430	- 2.0510	0.8732 [0.8275, 0.9085]	0.9304 [0.8633, 0.9673]	0.8897 [0.8548, 0.9187]

가장 효율적인 다변량 지수 공식을 스크리닝하기 위해 각 공식은 민감도, 특이성, 정확도 및 수신기 작동 특성 (ROC) 곡선 아래 영역 (AUC)을 포함한 진단 성능을 기반으로 평가되었다. 상기와 같이 패혈증 판별 성능을 기준으로 KT 비율, ARG 및 PHE (KT 비율 \times 27.7705 - ARG \times 0.0515 + PHE \times 0.0643 - 5.4721)로 구성된 아래의 식 1과 같은 다변량 지수 공식을 선택하였다.

[식 1]

다변량 지수 = KT ratio \times 27.7705 - ARG \times 0.0515 + PHE \times 0.0643 - 5.4721

상기 식1에서,

KT ratio는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG는 ARG의 수준이며,

PHE는 PHE의 수준이다.

본 연구의 결과를 통해 새로운 다변량 지수에 포함된 아미노산 TRP, ARG 및 PHE와 이들의 대사 산물 KYN은 패혈증 환자의 대사 과정과 밀접한 관련이 있음을 확인하였으며, 이를 기반으로 하여 새로운 패혈증 바이오 마커로 최고의 성능을 보여주는 상기 식 1과 같은 다변량 지수 공식을 결정할 수 있었다. 다변량 지수 값이 -1.1280 이상일 경우 패혈증 양성으로 판정할 수 있다.

2. 개발된 패혈증 바이오 마커 검증

선택된 다변량 지수의 임상 진단 성능은 테스트 그룹에서 패혈증과 비 패혈증을 구별하는 능력을 기준으로 ROC 분석을 수행하여 평가되었다. 다변량 지수의 성능은 WBC, CRP 및 PCT와 같은 기존 패혈증 바이오 마커의 성능과도 비교하였고, 이때, 기존 패혈증 바이오 마커와의 비교를 위하여, 혈청 CRP 농도는 Cobas c 702 (Roche, Basel, Switzerland) 시약을 사용하여 면역 탁도 분석법 (immunoturbidimetric assay)으로 측정하였으며, 혈청 PCT 수준은 Cobas e 601 (Roche) 시약을 사용하여 전기 화학 발광 면역 분석법 (electrochemiluminescence immunoassay)으로 측정하여 수행되었다.

그 결과, 개발된 다변량 바이오 마커는 하기 표 2에서 보는 바와 같이 AUC 0.931로 패혈증 진단에 탁월한 성능을 보였으며 잠재적인 패혈증 예후 바이오 마커임을 확인할 수 있었다.

표 2

	AUC	95% CI	SE
다변량지수(multivariate index)	0.931	0.887 to 0.974	0.0222
프로칼시토닌(procalcitonin; PCT)	0.945	0.904 to 0.986	0.0209
KT 비율(KT ratio)	0.835	0.756 to 0.915	0.0403
CRP	0.796	0.706 to 0.885	0.0457
WBC	0.635	0.514 to 0.755	0.0614

테스트 그룹에서 KT 비율 단독의 AUC는 0.835이었고 KT 비율 외에 PHE와 ARG를 포함한 다변량 지수의 AUC는 0.931 (95 % CI, 0.887-0.974)로 나타났다. 상기 두 아미노산을 새로운 다변량 지수에 추가하면 KT 비율만 사용하여 관찰한 것보다 더 나은 성능을 보여주는 것을 확인할 수 있었던 반면, ASP, GLU 및 GLN과 같은 아미노산의 추가는 지수의 임상 성능을 더 이상 향상시키지 못하는 것으로 확인되었다. 본 발명의 선택된 다변량 지수는 AUC 0.931로 프로칼시토닌의 진단 성능인 AUC 0.945과 유사하게 나타나 개발된 다변량 지수의 진단 마커로서의

가능성을 확인하였다.

[0105] 더 나아가, 기존 패혈증 바이오 마커와 본 발명의 개발된 다변량 지수를 비교하여 보면, 도 3에서 보는 바와 같이 PCT와 CRP는 패혈증과 비 패혈증을 비교적 잘 구별할 수 있었던 반면, 정상 상태와 SIRS의 차별 성능이 낮은 문제가 있음을 확인할 수 있었다. 이로부터 패혈증 바이오 마커를 사용할 때 패혈증과 거의 구별되지 않는 상태인 SIRS 환자를 포함시켜 검증하여 본 결과 본 발명의 다변량 지수는 패혈증과 SIRS를 구별할 수 있는 패혈증 진단 바이오 마커로서의 잠재력을 확인할 수 있었다.

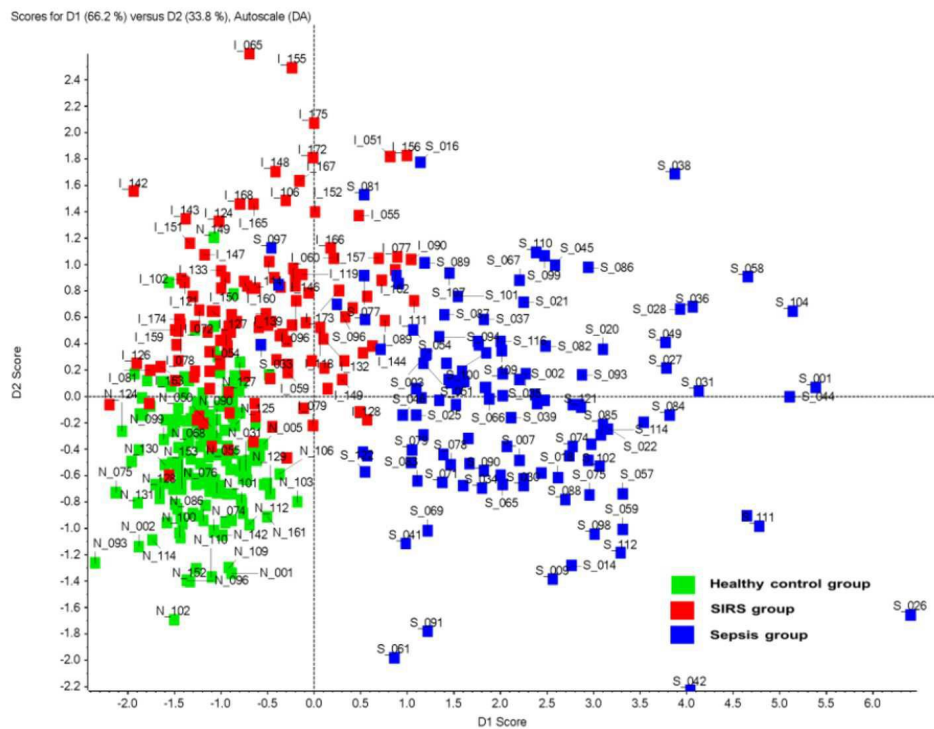
[0106] 또한, 테스트 그룹에서 생존자 하위 그룹과 생존자가 아닌 하위 그룹 간의 Mann-Whitney U 테스트를 적용하여 생존자와 비-생존 하위 그룹 사이에서 선택된 다변량 지수의 차이를 비교하여 평가한 결과를 도 5에 나타내었다. 상기 결과를 참조하면 다변량 지수는 테스트 그룹 (Mann-Whitney U test, p-value = 0.019)에서 생존자와 비 생존자간에 유의한 차이를 보여주었으나, PCT 농도는 생존자와 비 생존자 간에 통계적으로 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 패혈증에 대한 예후 바이오 마커로서 새로 개발된 다변량 지수가 적합함을 뒷받침할 수 있을 것이다.

[0108] 상기 내용을 종합하면, 패혈증 환자의 아미노산 대사가 건강한 사람과 SIRS 환자의 아미노산 대사와 다르다는 것을 발견하여 아미노산 프로파일링을 기반으로 패혈증 바이오 마커로써 단순하고 고성능의 다변량 지수를 생성하고 이를 검증하였는 바, 상기 지수는 패혈증 진단에 매우 특이적이며 단 4 개의 혈청 아미노산과 그 대사 산물의 농도를 기반으로 하여 패혈증을 정확하게 진단할 수 있어 임상에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

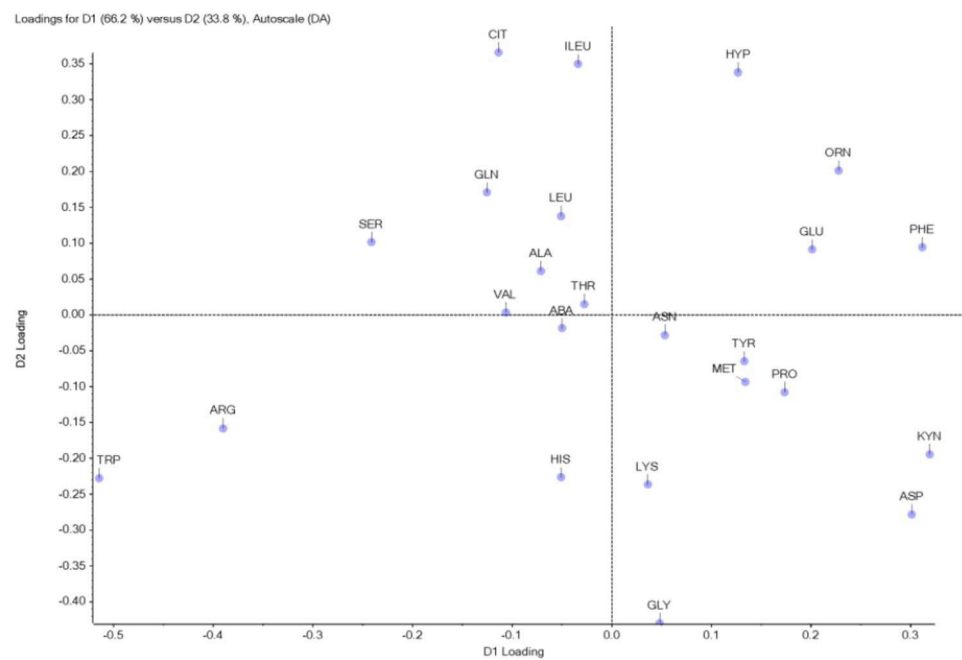
[0110] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

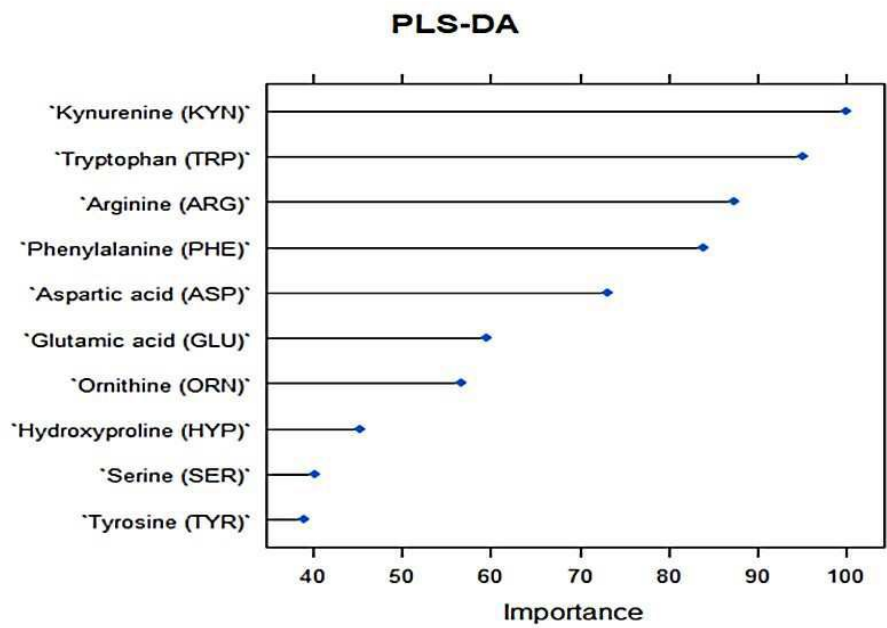
도면1a



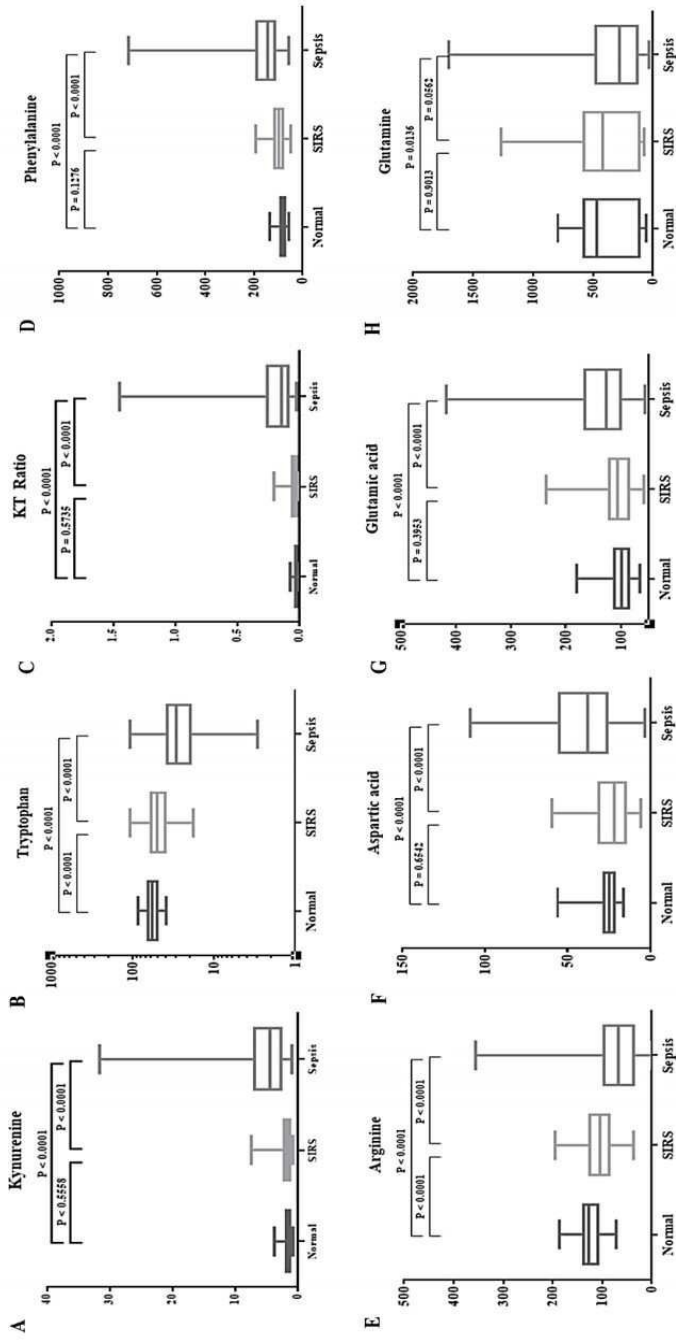
도면1b



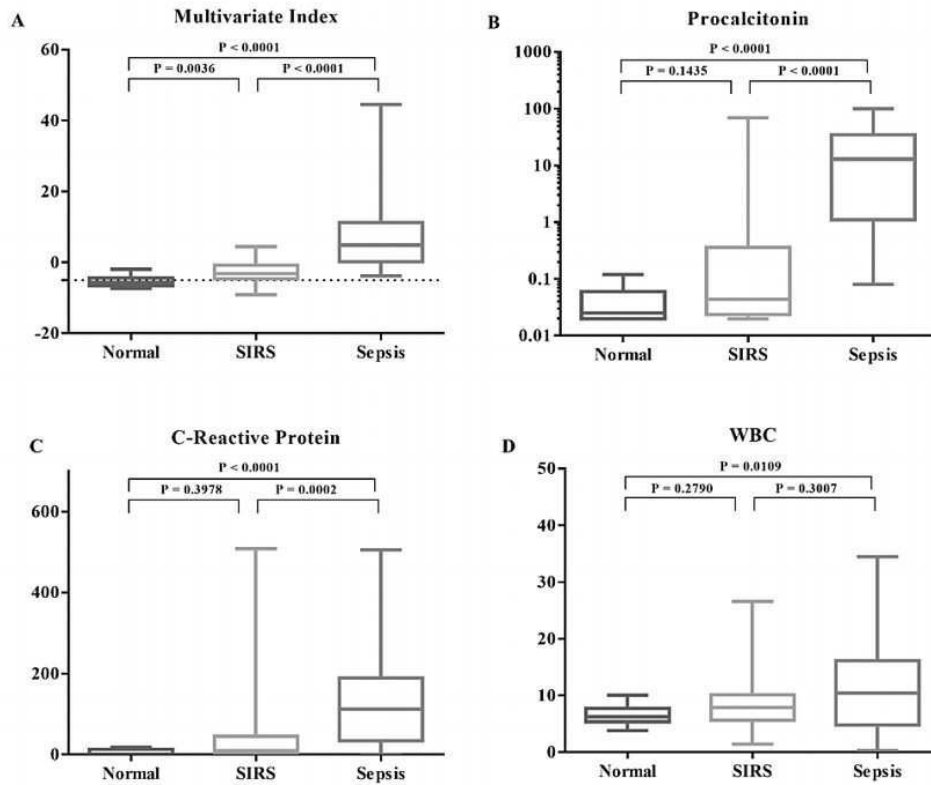
도면2



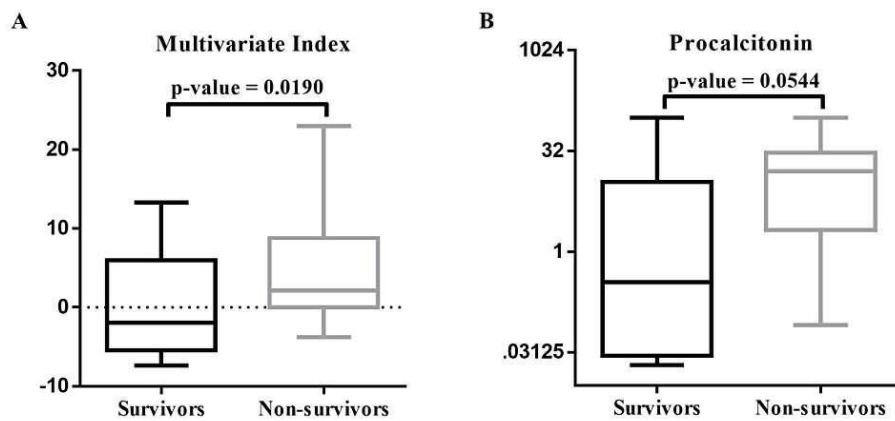
도면3



도면4



도면5



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌

(phenylalanine; PHE)의 수준을 하기 식 1 에 대입하여 다변량 지수를 계산하는 단계;를 포함하는, 패혈증 진단에 관한 정보 제공 방법으로,

[식 1]

$$\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times 27.7705 - \text{ARG} \times 0.0515 + \text{PHE} \times 0.0643 - 5.4721$$

상기 식 1 에서,

KT ratio 는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG 는 ARG 의 수준이며,

PHE 는 PHE 의 수준이다.

【변경후】

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

측정된 키누레닌 (kynurenine; KYN), 트립토판 (tryptophan; TRP), 아르기닌 (arginine; ARG) 및 페닐알라닌 (phenylalanine; PHE)의 수준을 하기 식 1 에 대입하여 다변량 지수를 계산하는 단계;를 포함하는, 패혈증 진단에 관한 정보 제공 방법.

[식 1]

$$\text{다변량 지수} = \text{KT ratio} \times 27.7705 - \text{ARG} \times 0.0515 + \text{PHE} \times 0.0643 - 5.4721$$

상기 식 1 에서,

KT ratio 는 KYN 수준/TRP 수준의 비율이고,

ARG 는 ARG 의 수준이며,

PHE 는 PHE 의 수준이다.