

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0063595

(43) 공개일자 2021년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 24/08 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/68 (2013.01)

G01N 24/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0151914

(22) 출원일자 2019년11월25일

심사청구일자 2019년11월25일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

사회복지법인 삼성생명공익재단

서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)

주식회사 큐라티스

서울특별시 서초구 강남대로 327, 9층(서초동, 대림서초타워)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과대학 미생물학교실

박지혜

경기도 고양시 일산서구 강선로 33 두산아파트 1405동 702호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인(유한), 이재영

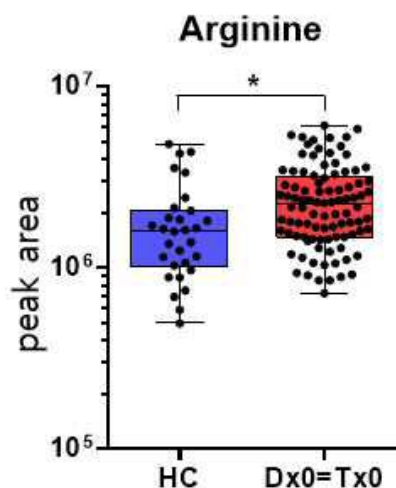
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 대사체(metabolites)를 이용하여 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 30/72 (2013.01)

G01N 33/6848 (2013.01)

G01N 2030/8818 (2013.01)

G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

김크은산

서울특별시 강서구 마곡서로 133, 마곡M밸리아파트
702동 502호

고원중

서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 호흡
기내과

전병우

서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 호흡
기내과

김수영

서울특별시 강남구 일원로 81, 삼성서울병원 호흡
기내과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2019R1A2C2003204

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 결핵의 병인 면역대사 조절 이해를 통한 치료 극대화 모색과 혁신적 치료증강제 개

발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알란토인(Allatoin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 대사체를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lysine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 아미노산은 L-형태(L-form)인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 대사체는 목적하는 개체의 전혈(whole blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum) 유래인 것인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 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), 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 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택되는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균의 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 7

아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알란토인(Allatoin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트

(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 대사체의 농도를 측정하는 정량 장치를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lysine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 아미노산은 L-형태(L-form)인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 대사체는 목적하는 개체의 전혈(whole blood), 혈장(plasma) 또는 혈청(serum) 유래인 것인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 정량 장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 12

제7항에 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), 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 시미애(M. simiae) 및 마이코박테리움 제노피(M. xenopi)로 구성된 군으로부터 선택되는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 비결핵 항산균의 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트.

청구항 14

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알란토인(Allatoin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 15

제14항에 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) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 대사체의 발현 수준을 측정하기에 앞서, 상기 생물학적 시료를 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화 또는 시약의 첨가의 전처리하는 단계를 더 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 아미노산 및 아미노산 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lysine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 아미노산은 L-형태(L-form)인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계는 핵자기 공명 분광 분석기(NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기인 정량 장치를 이용하여 수행되는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 알기닌(Arginine) 및 알란토인(Allantoin) 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 21

제17항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lysine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine), 타우린(Taurine), N,N-디메틸글라이신(N,N-

Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준이 대조군에 비하여 감소된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 22

제14항에 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*), 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 시미아(*M. simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택되는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 23

제14항에 있어서,

상기 비결핵 항산균의 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 과중성 질환인, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 바이오마커와, 상기 진단을 위한 키트 또는 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움(*Mycobacterium*) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵(牛形結核), 나병(癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균 종(species)뿐 아니라, 기회 감염균으로 일컬어지는 균 종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물(死物) 기생의 균 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 마실리엔시스(*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.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 일 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 키트를 제공하고자 한다.
- [0006] 본 발명의 또 다른 목적은 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공하고자 한다.
- [0007] 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

- [0008] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 대사체를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 본 발명의 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0010] 본 발명에 따른 진단용 바이오마커는 비결핵 항산균의 감염자 또는 감염 후 질환이 발병한 자를 건강한 정상 대조군과 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 비결핵 항산균에 의해 감염된 대상체 유래의 생물학적 시료에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 대사체, 바람직하게는 혈액 대사체를 포함한다.
- [0011] 본 발명에서 상기 "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 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.
- [0012] 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.
- [0013] 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.
- [0014] 본 발명에서 상기 대사체는 혈액, 바람직하게는 혈청 기원의 액상 시료로부터 수득한 대사물질인 것이 바람직하고, 구체적인 예를 들면, 아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알라토인(Allatoxin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid)은 D-형태(D-form)인 것이 바람직하나, 이에

제한되는 것은 아니다.

- [0016] 본 발명에서 상기 락테이트(Lactate)는 S-형태(S-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서 상기 말산(Malic acid)은 L-형태(L-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서 상기 아미노산 및 그 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 아미노산은 L-형태(L-form)일 수 있고, 바람직하게는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine) 또는 세린(Serine)은 L-형태(L-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 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 스크로폴라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*M. ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*M. simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서 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 파종성 질환 등을 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 섬유공동형(fibrocavitary form), 기관지 확장증형(nodular bronchiectatic form), 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 또한, 상기 감염성 폐 질환은 기침, 객담, 혈담, 발열, 호흡곤란, 흉통 또는 이들의 조합을 동반하는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 감염성 폐 질환을 일으키는 균으로, 예를 들면, 마이코박테리움 아비움 복합체(*M. avium complex*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*), 마이코박테리움 셀라툼(*M. celatum*), 마이코박테리움 스크로폴라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 테레(*M. terrae*) 또는 마이코박테리움 시미애(*M. simiae*)에 의한 감염성 폐 질환인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 대사체의 농도를 측정하는 정량 장치를 포함하는, 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [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.
- [0028] 본 발명에서 상기 대사체는 혈액, 바람직하게는 혈청 기원의 액상 시료로부터 수득한 대사물질인 것이 바람직하고, 구체적인 예를 들면, 아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알란토인(Allatoin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid)은 D-형태(D-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 락테이트(Lactate)는 S-형태(S-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 상기 말산(Malic acid)은 L-형태(L-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서 상기 아미노산 및 그 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 아미노산은 L-형태(L-form)일 수 있고, 바람직하게는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine) 또는 세린(Serine)은 L-형태(L-form)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 상기 정량 장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (NMR), 크로마토그래피 또는 질량분석기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 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.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명의 키트에서 비결핵 항산균의 감염 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 바이오마커 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 대사체의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 비결핵 항산균의 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 비결핵 항산균에 의한 감염 여부가 불확실한 개체로, 감염 가능성이 높은 개체를 의미한다.
- [0041] 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.

[0042] 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.

[0043] 본 발명에서 상기 대사체는 혈액, 바람직하게는 혈청 기원의 액상 시료로부터 수득한 대사물질인 것이 바람직하고, 구체적인 예를 들면, 아미노산(amino acid), 아미노산 유도체, 알란토인(Allatoin), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 아미노산 및 그 유도체는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine) 및 타우린(Taurine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 아미노산은 (L)-형태((L)-form)일 수 있고, 바람직하게는 알기닌(Arginine), 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine) 또는 세린(Serine)은 (L)-형태((L)-form)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 대사체의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가 또는 감소된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 예시로, 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 알기닌(Arginine) 및 알란토인(Allatoin) 중 적어도 하나의 발현 수준이 대조군에 비하여 증가된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 다른 예시로, 본 발명에서 상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 측정된 프롤린(Proline), 트레오닌(Threonine), 류신(Leucine), 라이신(Lycine), 글루타메이트(Glutamate), 트립토판(Tryptophan), 아스

파라긴(Asparagine), 메티오닌(Methionine), 세린(Serine), 호모세린(Homoserine), 타우린(Taurine), N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 2-하이드록시글루타릭산(2-hydroxyglutaric acid), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), 락테이트(Lactate), 말산(Malic acid) 및 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 수준이 대조군에 비하여 감소된 경우, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "대조군"이란 비결핵 항산균에 의해 감염되지 않은 정상 대조군이거나, 비결핵 항산균에 의해 감염되었거나 감염 가능성이 높거나, 또는 감염 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 환자 모집단의 중앙값(또는 해당 환자의 평균값)일 수 있다.

[0053] 본 발명의 정보 제공 방법에서 비결핵 항산균의 감염 질환에 관한 정의는 상기 본 발명의 바이오마커 조성물에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 혼잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0054] 본 발명에서는 목적하는 개체의 생물학적 시료에 대하여 혈액 대사체의 발현 수준을 측정함으로써 비결핵 항산균에 의한 감염 질환의 발병 유무 또는 발병 가능성을 간단하고 용이하면서도 정확하게 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-알기닌(L-Arginine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 알란토인(Allatoin)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-프롤린(L-Proline)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-트레오닌(L-Threonine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-류신(L-Leucine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-라이신(L-Lycine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-글루타메이트(L-Glutamate)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-트립토판(L-Tryptophan)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 N,N-디메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 호모세린(Homoserine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 D-2-하이드록시글루타릭산(D-2-hydroxyglutaric acid)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-아스파라긴(L-Asparagine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와

건강한 사람의 혈청 시료에서 L-메티오닌(L-Methionine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 콜린(Choline)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 하이포잔틴(Hypoxanthine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 S-락테이트(S-Lactate)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-말산(L-Malic acid)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 타우린(Taurine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에서 항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 혈청 시료에서 L-세린(L-Serine)의 발현 수준을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0058] 실시예

[0060] [실험예 1] MAC 감염 환자와 건강한 사람의 시료 수집

[0061] 2012년 1월부터 2016년 8월까지 기간 동안 대략 6년간 서울 삼성병원에서 수집한 마이코박테리움 아비움 복합체 (*Mycobacterium avium* complex) (*avium* : 46명, *intracellulare* : 50명, 총 96명) 감염 폐 질환 환자의 항생제 치료 전의 혈청 샘플 96개와 건강한 사람의 혈청 30개를 준비하였다. 단, 상기 마이코박테리움 아비움 복합체 감염 폐 질환 환자 96명 중 기관지 확장증형 (nodular bronchiectatic form) 환자는 66명이고, 상엽 공동형 (upper lobe cavitory form) 환자는 30명이었다.

[0063] [실험예 2] 시료에 대한 전처리

[0064] 먼저, 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 상층액(250 μ l) 분리해내어 Speed vacuum (full vacuum, no temp, 5hours)을 이용하여 건조하여 이하의 대사체 분석 전까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 질량 분석기 분석을 위해 건조된 시료를 250 μ l 아세트 니트릴-H₂O(Acetonitrile-H₂O)(75:25, v/v)에 재용해 후, 존재할 가능성이 있는 불순물 제거를 위하여 필터 튜브(Filter tube)(Costar 8169)를 이용하여 여과한 후 분석을 진행하였다. 기계 품질 관리(Machinery Quality Control; MQC)로, MS/MS 기기상태를 체크하기 위하여 혈청 샘플과 같은 전 처리방법으로 건강한 사람의 혈청을 기계 품질 관리(MQC)의 샘플로 사용하여 배치 당 4회 반복 분석하였다. 시료 품질 관리(Sample Quality Control; SQC)를 위하여 각 배치 안에서 시료 간의 차이를 비교하기 위해 시료 당 20 μ l씩 모아 시료 품질 관리를 제작하여 배치 당 4회 반복 분석하였다.

[0066] [실험예 3] HPLC-Triple Quad-MS를 통한 대사체 분석

[0067] 혈청에서 처리한 분석 시료 내의 극성 대사체를 분석하기 위하여 크로마토그래피-탠덤 질량분석기(HPLC-MS/MS)를 이용하여 분석을 진행하였다. 사용된 장비는 Agilent 1200 HPLC와 Sciex API4000 triple quadrupole MS를 이용하였다. 친수성 상호 작용을 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 분리하였다. 첫 번째 이동상으로는 (A) H₂O (v/v) 및 (B) 아세트니트릴 (v/v)을 이용하였고, 두 번째 이동상으로는 (A) H₂O (v/v, 0.1% formic acid) 및 (B) 아세트니트릴 (v/v)을 이용하였으며, 각각 조건의 기울기 용리는 총 분석 시간을 15분으로 하여 아래 표 1과 동일하게 수행하였다. 분무기 가스(Ion-Source Gas 1/2) 단위는 50/50 임의 단위(arbitrary unit)이었으며, 가스 커튼(Curtain Gas)의 단위는 25 임의 단위(arbitrary unit)이었다. 소스 온도(Source temperature)는 500 $^{\circ}$ C이고, 이온 스프레이 부유 전압(Ion-spray Floating Voltage)은 5.5 kV(negative -4.5kV)이며, 매스 범위(Mass range)는 50 ~ 1000 m/z이었다. 시료 주입은 HTC_PAL system/CTC analytics auto-sampler를 이용하여 3 μ l씩 주입하였으며, 탠덤 질량 분석기 조건 (예약 다중 반응 검지법; Scheduled Multiple Reaction Monitoring, sMRM)은 아래 표 2 내지 5와 같이 수행하였다. 단, 하기 표 2 내지 5에서 m/z는 질량 대 전하비(mass to charge ratio)를 의미하고, RT는 머무름 시간(Retention time)을 의미하며, CE는 충돌 에너지(Collision energy)를 의미하고, (+)는 양이온 모드를, (-)는 음이온 모드를 의미하며, sMRM 분석을 통해 얻어진 결과는 Sciex의 정량 분석 소프트웨어(Quantitative Analysis Software)를 통하여 로우 데이터(raw data)를 계산하였고, MQC data 평균값을 이용하여 상대 표준 편차(RSD<20)이하의 대사체를 산출 하였다.

표 1

[0069]

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

[0071]

물 방법 (+)(Water method (+)), 대사체 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

[0073]

물 방법 (-)(Water method (-)), 대사체 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
시투릴린(Citrulline)	174	131	1.21	-13
하이드록시페닐파이트루베이트(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

[0075]

포름산 방법 (+)(Formic acid method (+)), 대사체 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-Lysine)	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
스페르민(Spermine)	203	112	0.53	27

표 5

[0077]

포름산 방법 (-)(Formic acid method (-)), 대사체 24종

대사체 종류(Compounds)	m/z	Product ion	RT	CE
아스파테이트(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
카바모일포스페이트(Carbamoyl-phosphate)	140	79	0.9	-22
글리세라이트(Glycerate)	105	75	1.24	-15
포스포에놀피루베이트(Phosphoenolpyruvate)	167	79	2.3	-16
디하이드록시아세톤포스페이트 (Dihydroxyacetone phosphate)	169	79	1.7	-38
글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-Phosphate)	171	79	1.5	-22
시키메이트(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
프룩토스 1,6-비스포스페이트 (Fructose 1,6-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
프룩토스 6-포스페이트(Fructose 6-Phosphate)	259	79	1.23	-54

[0079]

[실험예 4] 비결핵 항산균 감염자의 혈청 시료 내 대사체 분석 결과

[0080]

항생제 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람의 대사체 농도를 비교하기 위해 다음의 통계 검정 2가지 방법으로 Metaboanalyst(data 통계사이트)와 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 데이터를 산출하였고, 그 결과를 이용하여 치료 전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 폐 질환 환자와 건강한 사람을 구분 할 수 있는 질병 관련 대사체 총 20 종(p-value>0.05)을 각각의 p-value와 건강한 사람 대비 발현 수준의 배수 변화(Fold change) 값을 토대로 선정하여 그 결과를 하기 표 6 및 도 1 내지 20에 나타내었다. 단, 도 1 내지 20에서, HC는 건강한 사람 30명의 혈청 샘플에서 각 대사체의 발현 수준을 나타낸 것이고, Dx0=Tx0(Success & Fail), 항생제 치료 시작전의 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC) 감염 환자 96명의 혈청 샘플에서 각 대사체의 발현 수준을 나타낸 것이다. 또한, 유의성 unpaired t-test에서 *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001를 의미한다.

표 6

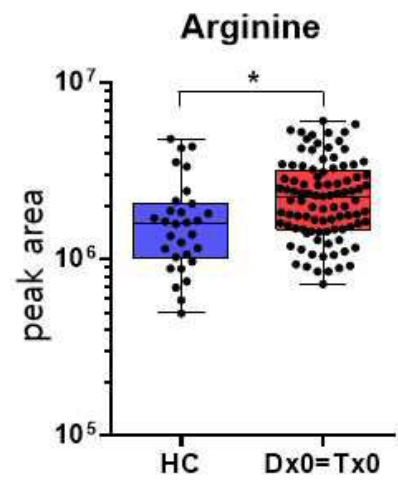
건강한 사람 대비 치료전 MAC 감염 환자에서 증가된 대사체		
대사체 종류(Compounds)	유의성 (p-value)	Fold Change
알기닌(L-Arginine)	0.0137	1.36
알란토인(Allantoin)	0.0061	1.12
건강한 사람 대비 치료전 MAC 감염 환자에서 감소된 대사체		
프롤린(L-Proline)	0.0311	0.83
트레오닌(L-Threonine)	0.001	0.71
류신(L-Leucine)	0.0399	0.79
라이신(L-Lysine)	0.0109	0.75
글루타메이트(L-Glutamate)	0.0124	0.71
트립토판(L-Tryptophan)	0.0008	0.78
N,N-다이메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine)	0.0001	0.72
호모세린(Homoserine)	0.0007	0.69
D-2-하이드록시글루타릭 엑시드(D-2-hydroxyglutaric acid)	0.0316	0.68
아스파라긴(L-Asparagine)	0.0339	0.74
메티오닌(L-Methionine)	0.0008	0.65
콜린(Choline)	0.001	0.73
하이포잔틴(Hypoxanthine)	0.0001	0.36
(S)-락테이트(S)-Lactate)	0.0001	0.44
말릭 엑시드(L-Malic acid)	0.0017	0.34
글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate)	0.0138	0.42
타우린(Taurine)	0.0001	0.37
세린(L-Serine)	0.0551	0.84

상기 표 6 및 도 1 내지 20에서 보는 바와 같이, 혈액 대사체 중 L-알기닌(L-Arginine) 및 알란토인(Allantoin)은 건강한 사람 대비 비결핵 항산균 감염자에서 유의적으로 그 발현이 증가하였고, 그 외에 L-프롤린(L-Proline), L-트레오닌(L-Threonine), L-류신(L-Leucine), L-라이신(L-Lysine), L-글루타메이트(L-Glutamate), L-트립토판(L-Tryptophan), N,N-다이메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 호모세린(Homoserine), D-2-하이드록시글루타릭산(D-2-hydroxyglutaric acid), L-아스파라긴(L-Asparagine), L-메티오닌(L-Methionine), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), S-락테이트(S-Lactate), L-말산(L-Malic acid), 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate), 타우린(Taurine) 및 L-세린(L-Serine)은 건강한 사람 대비 비결핵 항산균 감염자에서 유의적으로 그 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

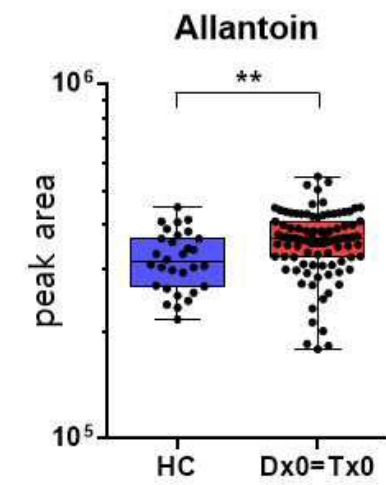
이를 통하여 대사체로, L-알기닌(L-Arginine), 알란토인(Allantoin), L-프롤린(L-Proline), L-트레오닌(L-Threonine), L-류신(L-Leucine), L-라이신(L-Lysine), L-글루타메이트(L-Glutamate), L-트립토판(L-Tryptophan), N,N-다이메틸글라이신(N,N-Dimethylglycine), 호모세린(Homoserine), D-2-하이드록시글루타릭산(D-2-hydroxyglutaric acid), L-아스파라긴(L-Asparagine), L-메티오닌(L-Methionine), 콜린(Choline), 하이포잔틴(Hypoxanthine), S-락테이트(S-Lactate), L-말산(L-Malic acid), 글리세롤 3-포스페이트(Glycerol 3-phosphate), 타우린(Taurine) 및 L-세린(L-Serine)을 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 진단하기 위한 바이오마커로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

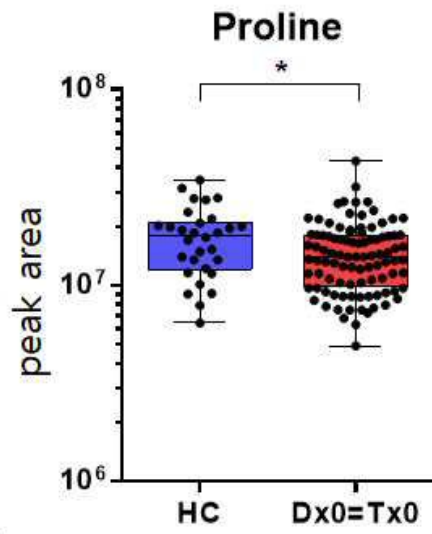
도면1



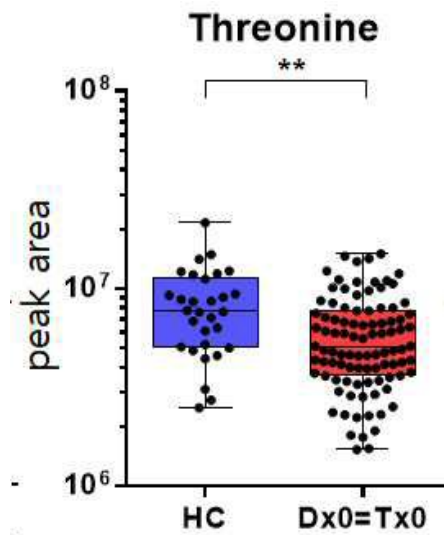
도면2



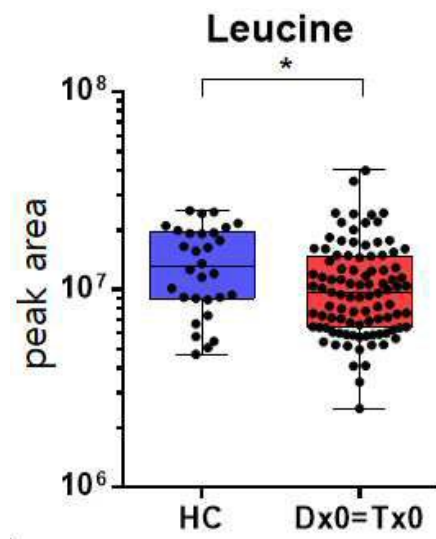
도면3



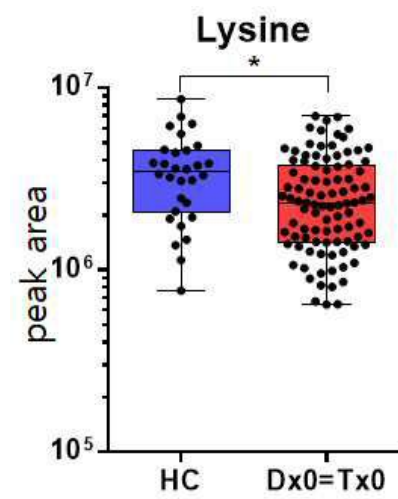
도면4



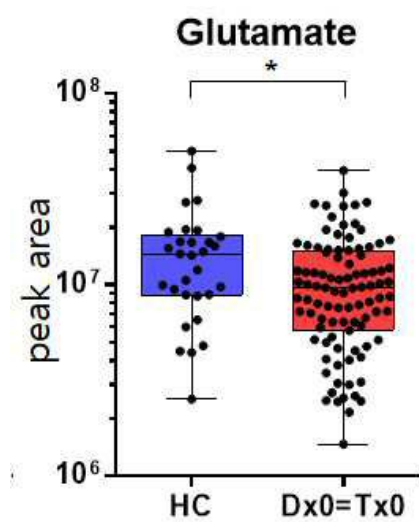
도면5



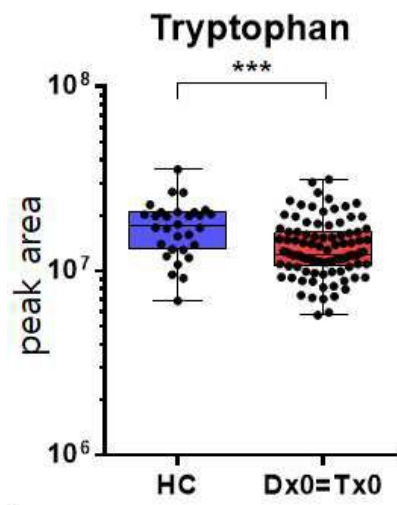
도면6



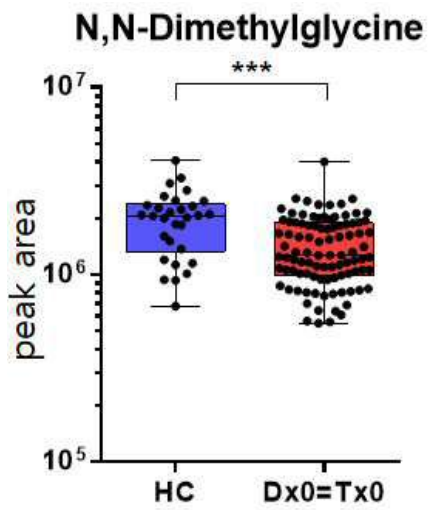
도면7



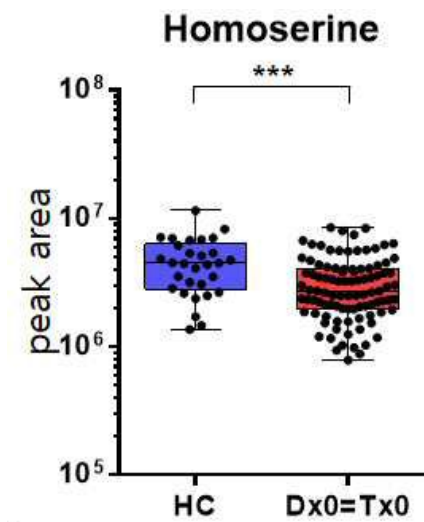
도면8



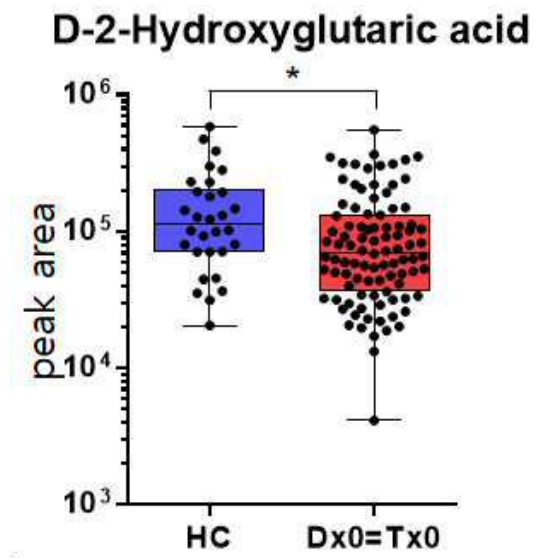
도면9



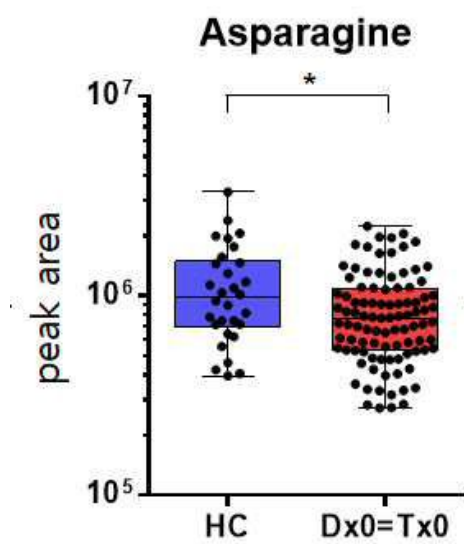
도면10



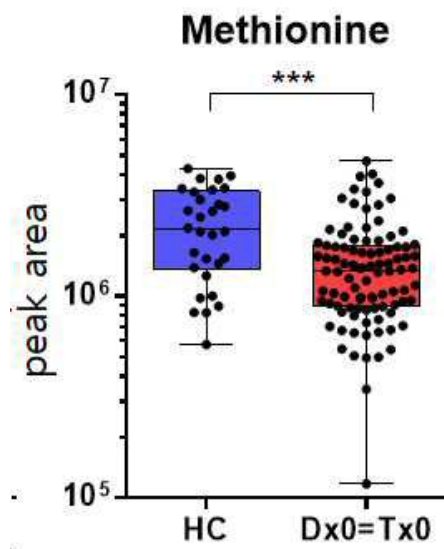
도면11



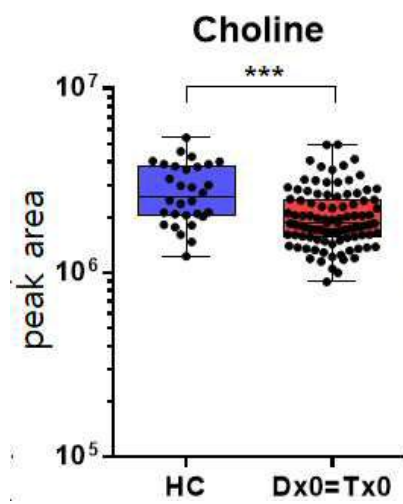
도면12



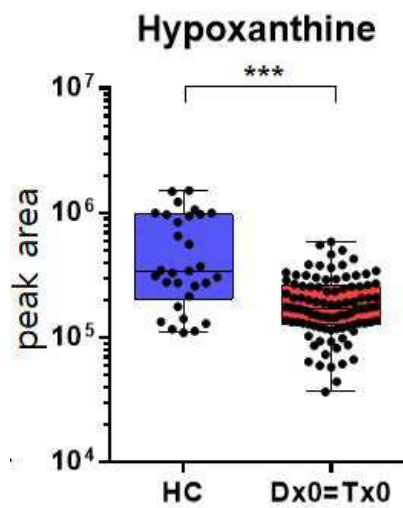
도면13



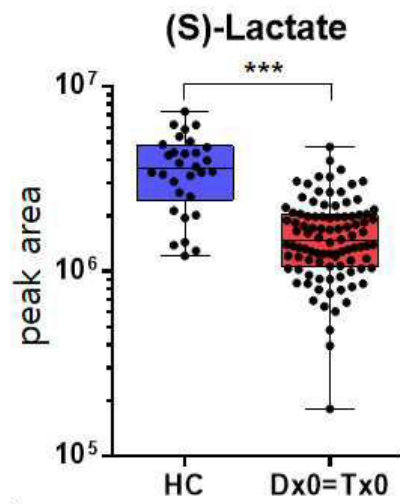
도면14



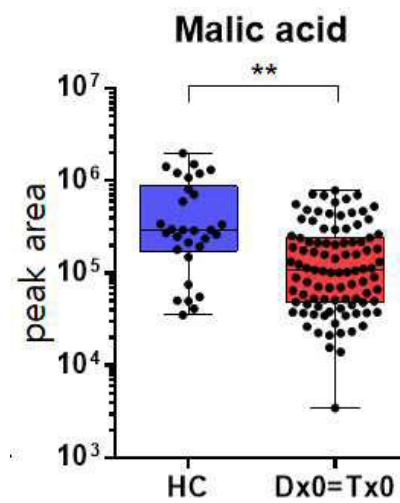
도면15



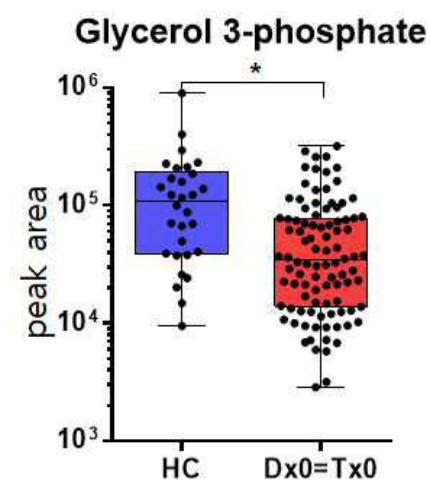
도면16



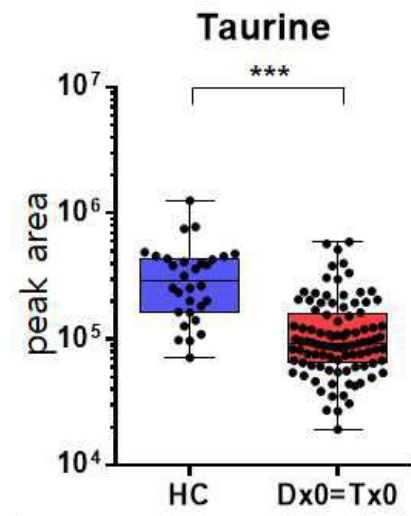
도면17



도면18



도면19



도면20

