



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월18일

(11) 등록번호 10-2253363

(24) 등록일자 2021년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0145775

(22) 출원일자 2019년11월14일

심사청구일자 2019년11월14일

(56) 선행기술조사문헌

January Weiner 3rd et al., 'Biomarkers of Inflammation, Immunosuppression and Stress Are Revealed by Metabolomic Profiling of Tuberculosis Patients', PLoS ONE, 2012, Vol. 7, e40221. 1부.*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

부산가톨릭대학교 산학협력단

부산광역시 금정구 오륜대로 57(부곡동)

(72) 발명자

강영애

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

이상국

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 16 항

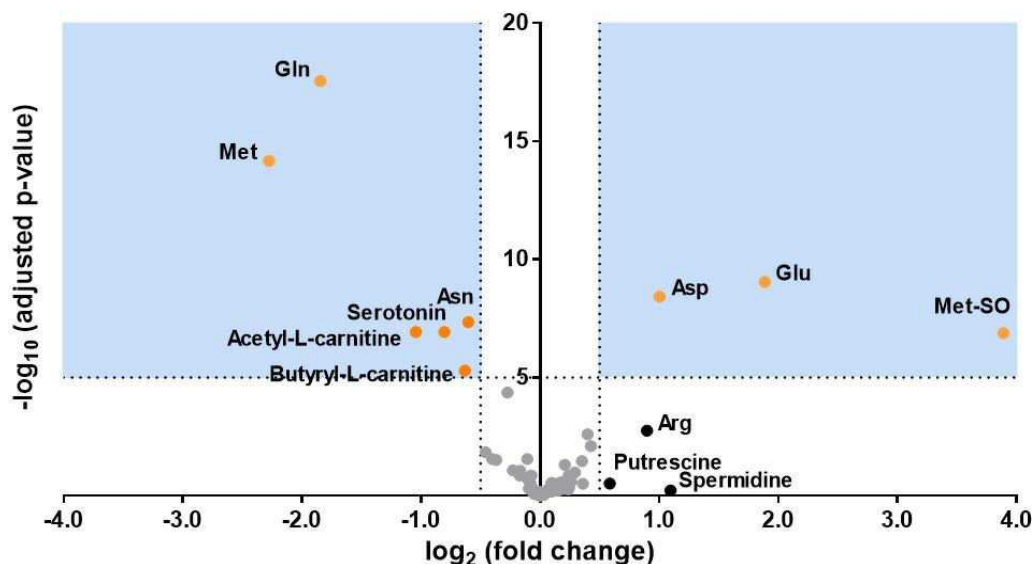
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 결핵에 대한 신규한 대사체 마커 및 이를 이용한 결핵의 진단방법

(57) 요약

본 발명은 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환에 대한 신규한 대사체 마커 및 이를 이용한 미코박테리움 감염 질환의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명은 상기 대사체 마커를 표지자로 하여 미코박테리움 감염 여부 뿐만 아니라 종래 기술로는 구별하기 어렵던 잠복결핵(latent tuberculosis) 또는 활동성 결핵(active tuberculosis)의 감염 여부에 대한 신뢰도 높은 정보를 신속하게 제공한다. 이에, 본 발명은 결핵의 신속하고 정확한 진단은 물론, 결핵 치료제에 대한 반응성 평가 및 치료제 후보물질의 스크리닝 도구로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/6812 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 2030/8818 (2013.01)
G01N 2333/35 (2013.01)
G01N 2560/00 (2013.01)
G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

조용근

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

박영목

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

최인홍

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

이혜준

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

심보라

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

김정호

부산광역시 금정구 오륜대로 57(부곡동)

(56) 선행기술조사문헌

JP2011524159 A
 KR1020180104038 A
 International Journal of Infectious Disease,
 2017, Vol. 56, pp 258-262.
 Microbiol Spectr. 2017, Vol. 5, No. 3(HHS
 Author manuscript version, internal pp 1-26).
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465029037
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성R&D
연구과제명	제2 유닛(1세부) : 결핵퇴치 가속화를 위한 백신 산업화 기술 및 중증감염질환의 저
비용 신속 진단기술 개발(Therapeutic and Preventive Va	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메치오닌 설펍사이드에 대한 정량 장치를 포함하는 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환의 진단 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환은 결핵(tuberculosis)인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 결핵은 활동성 결핵(active tuberculosis)인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 키트는 글루타메이트, 글루타민, 메치오닌, 아스파르테이트 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 정량 장치는 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight), SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight), ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight), 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)로 구성된 군으로부터 선택되는 질량분석 장치인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 질량분석 장치는 LC-MS/MS인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 글루타메이트, 메치오닌 설펍사이드 및 아스파르테이트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체의 농도가 증가하거나, 또는 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴 및 메치오닌 설펍사이드/메치오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도 간 비율이 증가하는 경우 증가된 미코박테리움 감염 질환의 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 글루타민, 메치오닌 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도가 감소하는 경우 증가된 미코박테리움 감염 질환의 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 메치오닌 설폭사이드의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환은 결핵(tuberculosis)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 결핵은 활동성 결핵(active tuberculosis)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈청 또는 혈장인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 방법은 글루타메이트, 글루타민, 메치오닌, 아스파르테이트 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체의 농도를 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 방법은 측정된 대사체 농도로부터 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴 및 메치오닌 설폭사이드/메치오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도 간 비율 값을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 글루타메이트, 메치오닌 설폭사이드 및 아스파르테이트로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체의 농도가 증가하거나, 또는 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴 및 메치오닌 설폭사이드/메치오닌으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도 간 비율이 증가하는 경우 미코박테리움 감염 질환의 위험도가 증가된 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상기 글루타민, 메치오닌 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도가 감소하는 경우 미코박테리움 감염 질환의 위험도가 증가된 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미코박테리움 감염증에 대한 표지자가 되는 새로운 대사체 마커, 및 이의 혈청 내 농도를 측정함으로써 미코박테리움 감염증, 구체적으로는 활동성 결핵을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 결핵(Tuberculosis, TB)은 단일 감염원에 의한 사망의 주요 원인이며 2017년 전세계적으로 1,000만명이 발생하여 이 중 160만명이 사망한 것으로 추정된다(World Health Organization, *Global tuberculosis report 2018* (WHO/CDS/TB/2018.20).2018). TB를 성공적으로 관리하려면 시기적절한 진단과 치료가 매우 중요하다. 현재, 결핵과의 접촉을 평가하는 방법으로는 투베르쿨린 피부 검사(TST)와 인터페론 감마 방출 분석(IGRA)의 두 가지 방법이 있다. 그러나 이러한 기존 진단방법은 잠복결핵 감염(latent tuberculosis infection, LTBI)과 활동성 결핵간의 구별이 어려운데, 이는 이들 방법이 결핵균(*Mycobacteria Tuberculosis*, MTB) 항원에 대한 면역학적 반응을 보여주는 간접적인 방법이기 때문이다(Targowski, T., S. Chelstowska, and T. Plusa, *Lung*, **192**(6): 869-874 (2014)). 따라서, 인체 내 실제 결핵균 존재 여부를 보여주는 생체 표지자의 개발은 TST, IGRA에 대한 양성 결과를 보이는 환자에 대한 치료 전략을 수립하는데 중요하다.

[0004] 대사체학(Metabolomics)은 생물학적 시료에서 대사물질의 다중화 프로파일링과 비교를 가능하게 함으로써 새로운 생체 표지자 연구의 현저한 발전을 이룰 수 있는 새로운 기술이다(Isa, F., et al., *EBio Medicine*, **31**:157-165 (2018)). 대사체학은 다양한 전산, 통계 및 수학적 분석과 함께 고도로 전문화된 분석기법을 이용하여 생물학적 시료에 존재하는 대사물(또는 저분자 화합물)의 비 편향 식별 및 정량을 수행하는 수단이다(Dunn, W.B., N.J. Bailey, and H.E. Johnson, *Analyst*, **130**(5):606-625(2005)). 따라서 대사체학은 다른 질병 상태에 대한 새로운 생체표지자를 식별하는데 성공적으로 사용되었다(Nagana Gowda, G.A. and D. Raftery, *Curr Metabolomics*, **1**(3):227-240(2013)). 새로운 마커는 질병과 숙주의 반응에 대한 민감도를 높이고 결과적으로 향상된 진단 및 치료전략을 개발하는데 사용될 수 있다(Loots, D.T., *Biomark Med*, **10**(10): 1025-1028(2016)). 결핵과 관련하여 현재 몇 가지 대사 체학 연구가 수행되어 가래, 혈액, 호흡, 소변을 사용한 결핵 감염 또는 치료 반응과 관련된 수 있는 새로운 대사체 마커를 탐색하고 있으나, 이러한 대사체 연구는 여전히 제한적으로만 이루어지고 있다.

[0006] 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

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 출원 제10-2017-0121014호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 대상체 내의 미코박테리움 감염을 간단한 과정을 통해 신속하면서도 높은 정확도로 판단하는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 상기 나열한 8개의 대사체 수준을 측정함으로써 대상체 내의 미코박테리움 존재 여부에 대한 직접적인 정보를 현저히 향상된 신뢰도로 실시간 획득할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환의 진단 키트를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 미코박테리움 감염 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 글루타메이트, 글루타민, 설펡시 메치오닌, 메치오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 키뉴레닌 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체에 대한 정량 장치를 포함

하는 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환의 진단 키트를 제공한다.

- [0016] 본 발명자들은 간단한 과정을 통해 대상체 내의 미코박테리움 감염 여부를 신속하면서도 높은 정확도로 판단하는 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 대상체로부터 분리된 생물학적 시료 내에서 상기 나열한 8개 대사체의 전부 또는 일부의 수준을 측정함으로써 대상체 내의 미코박테리움 존재 여부에 대한 직접적인 정보를 현저히 향상된 신뢰도로 실시간 수득할 수 있음을 발견하였다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포괄하는 의미이다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 상기 나열한 8개의 대사체의 농도가 미코박테리움에 감염된 개체와 정상 개체의 생물학적 시료, 구체적으로는 혈청 내에서 유의한 차이를 이들이 미코박테리움 감염에 대한 신뢰도 높은 진단 마커로 기능할 수 있음을 새로이 발견하였다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환”은 결핵성 또는 결핵성 미코박테리아를 포함하는 미코박테리움속 병원균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포괄하는 의미로서, 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 및 파종성 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않고 미코박테리움속 병원균의 감염을 직접적 또는 간접적인 병인으로 하는 모든 병적 상태를 포함한다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 키트로 진단되는 미코박테리움 감염 질환은 결핵(tuberculosis)이며, 보다 구체적으로는, 활동성 결핵(active tuberculosis)이다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “정량 장치”는 생물학적 시료 내에 특정 대사체의 존재 여부 뿐 아니라 이의 상대적 또는 절대적 양에 대한 정량적인(quantitative) 수치 정보를 제공하는 장치를 의미한다. 구체적으로는 상기 정량 장치는 질량분석 장치이다. 본 명세서에서 용어 질량 분석(MS)은 시료의 화학적 조성을 분석하기 위해 대상 물질의 질량을 측정하는 과정을 의미한다. 질량 분석은 시료에 존재하는 대상 물질의 이온화를 통해 하전분자나 분자조각을 생성하고 질량 대 전하비(m/z) 및 기체상 이온의 존재 비를 측정하여 질량에 대한 정보를 제공한다. 이러한 질량 분석 장치는 예를 들어 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight), ESI-TOF(Electrospray ionisation time-of-flight), 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 및 LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용될 수 있는 질량 분석 장치는 LC-MS/MS이다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 글루타메이트, 설펍시 메치오닌, 아스파르테이트 및 키뉴레닌으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 대사체의 농도가 증가하거나, 또는 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴, 설펍시 메치오닌/메치오닌 및 키뉴레닌/트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도 간 비율이 증가하는 경우 증가된 미코박테리움 감염 질환의 위험도를 나타낸다.
- [0022] 본 발명에 따르면, 본 발명의 대사체 중 글루타메이트, 설펍시 메치오닌, 아스파르테이트, 키뉴레닌의 농도는 결핵 감염 환자에서 유의하게 증가하였으며, 두 대사체 농도 간의 비율(ratio)인 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴, 설펍시 메치오닌/메치오닌 및 키뉴레닌/트립토판 역시 유의하게 증가하였다. 통계적 유의성을 갖춘 이들 데이터를 기반으로, 이들 대사체 및 대사체 간의 비율이 미코박테리움 감염에 대한 신뢰도 높은 양성 마커(positive marker)로 기능함을 알 수 있다.
- [0023] 본 발명의 구성 중 “진단 키트” 또는 “진단용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “농도의 증가” 또는 “농도 간 비율의 증가”는 미코박테리움에 감염되지 않은 정상인에 비해 혈청 내 대사체 농도 또는 두 대사체 간 농도의 비율이 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 상기 정상인과 대조군과 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 또는 약 60% 이상 증가한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 글루타민, 메치오닌 및 아스파라긴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도가 감소하는 경우 증가된 미코박테리움 감염 질환의 위험도를 나타낸다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 본 발명의 대사체 중 글루타민, 메치오닌 및 아스파라긴의 농도는 결핵 감염 환자에서 유의하게 감소하였으며, 통계적 유의성을 갖춘 이들 데이터를 기반으로, 이들 대사체가 미코박테리움 감염에 대한 신뢰도 높은 음성 마커(negative marker)로 기능함을 알 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대상체로부터 분리된 생물학적 시료에서 글루타메이트, 글루타민, 설펍시 메치오닌, 메치오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 키뉴레닌 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된

하나 이상의 대사체의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [0028] 본 발명에서 진단에 필요한 정보를 제공하고자 하는 미코박테리움 감염 질환 및 아미노산 대사체의 농도를 측정하는 방법에 대해서는 이미 상술하였으므로 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0029] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, 미코박테리움속 병원성 균주를 포함하고 있거나 포함할 가능성이 있는 모든 시료로서, 혈액, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 생물학적 시료는 혈청 또는 혈장이다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 미코박테리움 감염 여부를 조사하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 미코박테리움 균주에 의해 감염되었는지 여부의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 측정된 대사체 농도로부터 글루타메이트/글루타민, 아스파르테이트/아스파라긴, 설포시 메치오닌/메치오닌 및 키뉴레닌/트립토판으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 대사체 농도 간 비율 값을 수득하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0033] 본 발명에서 발굴된 미코박테리움 감염에 대한 양성 마커, 음성 마커 및 이들의 판단 기준에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0036] (a) 본 발명은 미코박테리움(*Mycobacterium*)에 감염된 환자와 정상인 간 유의한 농도 차이를 보이는 8가지 혈청 대사체 및 이중 일부 대사체들 간의 농도 비(ratio)를 제안한다.
- [0037] (b) 본 발명은 상술한 대사체 농도 또는 농도 비율을 표지자로 하여 미코박테리움(*Mycobacterium*) 감염 여부 뿐 아니라 종래 기술로는 구별하기 어렵던 잠복결핵(latent tuberculosis) 또는 활동성 결핵(active tuberculosis)의 감염 여부에 대한 신뢰도 높은 정보를 신속하게 제공한다.
- [0038] (c) 본 발명은 결핵의 신속하고 정확한 진단은 물론, 결핵 치료제에 대한 반응성 평가 및 치료제 후보물질의 스크리닝 도구로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 PCA-DA 분석을 통한 정상 대조군, 잠복결핵 감염자, 활동성 결핵환자의 혈청에서의 대사체 프로파일링을 수행한 결과를 보여주는 그림이다.
- 도 2는 볼케이노 플롯 분석을 통한 활동성 결핵환자에서 통계학적으로 유의하게 증감하는 대사물질의 수준을 비교한 결과를 보여주는 그림이다.
- 도 3은 정상 대조군, 잠복결핵감염자 및 활동성 결핵환자 그룹에서의 글루타메이트, 글루타민, 글루타메이트/글루타민, 설포시 메치오닌, 메치오닌, 설포시 메치오닌/메치오닌(도 3a), 아스파르테이트, 아스파라긴, 아스파르테이트/아스파라긴, 키뉴레닌, 트립토판, 키뉴레닌/트립토판(도 3b)의 농도를 비교한 결과를 보여주는 그림이다.
- 도 4는 본 발명에서 발굴된 대사체 마커의 임상적 유용성을 확인하기 위해 글루타메이트, 글루타민, 글루타메이트/글루타민, 설포시 메치오닌, 메치오닌, 설포시 메치오닌/메치오닌(도 4a), 아스파르테이트, 아스파라긴, 아스파르테이트/아스파라긴, 키뉴레닌, 트립토판, 키뉴레닌/트립토판(도 4b)에 대해 ROC 분석을 수행한 결과를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 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.

[0043] 실시예

[0045] 실시예 1. 혈청 검체로부터 LC-MS/MS를 이용한 대사체 동정

[0046] 본 발명에 사용된 검체는 신촌 세브란스병원에서 21명의 활동성 결핵 환자와 함께 건강한 대조군 28명, 잠복결핵 감염자 20명의 혈청으로서, 환자의 임상정보를 알고 있는 검체를 대상으로 실시하였다.

[0047] 활동성 결핵 환자, 잠복결핵 감염자 및 건강한 대조군 각각의 혈청 10 µl을 40% 메탄올에 15:1로 희석시킨 후 대사체 분석을 진행하였다. LC-MS/MS 분석 과정은 다음과 같다: 아미노산 및 생체 아민의 분리는 Waters Acquity가 장착된 Agilent 1260 infinity HPLC system (SCIEX, Woodlands Central, Singapore)을 사용하여 수행되었다. 피분석물은 물에 용해된 0.1% 포름산으로부터 아세트오니트릴에 용해된 0.1% 포름산까지의 구배를 사용하여 분리하였다. 총 LC 분석 시간은 샘플마다 약 12분정도 소요되었다. 이후 아실카르니틴 (acylcarnitines), 글리세로인지질 (glycerophospholipids), 헥소오스 (hexose)를 분석하기 위해 FIA-MS/MS를 수행하였다. 피크 적분 (peak integration), 품질관리 (calibration) 및 농도 계산을 위해 LC-MS/MS 데이터를 SCIEX 응용 프로그램 AnalystTM를 이용하여 진행하였다. SCIEX 응용 프로그램 AnalystTM으로부터 분석된 LC-MS/MS 데이터와 FIA-MS/MS 데이터는 Biocrates MetIDQTM 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이 전략은 187개의 대사산물(42개의 아미노산 및 이원성 아민, 40개의 아실카르니틴, 90개의 글리세로인지질, 14개의 스펅고 미엘린 (sphingomyelins), 1개의 단당류를 동시에 정량 할 수 있다. 그러나, 7개의 대사산물은 검출 한계가 너무 낮기 때문에 분석에 포함되지 않았다.

[0048] 신촌 세브란스병원으로부터 사용된 환자의 특성은 하기 표 1에 요약하였다. 본 연구에서의 검체 구성은 정상 대조군 28명 (평균 나이 28세, 남자 10명 (35.7%)), 잠복결핵 감염자 20명 (평균 나이 48.5세, 남자 6명 (30.0%)), 활동성 결핵환자 21명 (평균 나이 27세, 남자 10명 (47.6%))이다.

표 1

[0050] 정상대조군, 잠복결핵감염자, 활동성 결핵환자의 임상정보 결과

	활동성 결핵환자 (N=21)	잠복결핵 감염자 (N=20)	정상 대조군 (N=28)
연령 중앙값 (범위)	27 (20-50)	48.5 (23-69)	28 (22-57)
성별, 남성	10 (47.6)	6 (30.0)	10 (35.7)
BMI, kg/m ² , 중앙값 (IQR)	20.0 (18.6-21.9)	21.7 (20.9-23.9)	22.1 (20.6-23.4)
과거 TB 병력	0 (0)	2 (10.0)	0 (0)
BCG 흉터 존재	16 (76.2)	17 (85.0)	19 (67.9)
동발질환			
고혈압	0 (0)	2 (10.0)	0 (0)
당뇨	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
기타 ^b	1 (4.8)	3 (15.0)	0 (0)
폐 TB 진단			
객담 AFB 도말, 양성	1 (4.8)		
객담 AFB 배양, 양성	19 (90.5)		
흉부영상범위 ^c			
3분의1 미만	17 (81.0)		
3분의2 미만	4 (19.0)		
3분의2 초과	0 (0)		
폐외 손상 조합	2 (9.5)		
TST 양성	2 (100)	16 (80.0)	0 (0)
TST 경화, mm, 중앙값 (범위)	15 (12-18)	14 (0-25)	0 (0-4)
QFT-GIT 양성	19 (100)	20 (100)	0 (0)

[0052] 실시예 2. PCA-DA를 이용한 활동성 결핵 환자와 건강한 대조군 및 잠복결핵감염자의 혈청 내 대사체 프로파일 차이

[0053] 실시예 1로부터 도출된 대사체에 대해 PCA-DA (Principal component analysis and discriminant analysis)을 이

용하여 대사체 프로파일링을 실시하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 활동성 결핵환자와 건강한 대조군 및 잠복 결핵 감염자의 혈청 내 대사체 프로파일링이 명확하게 차이가 나타남을 확인하였다.

[0055] 실시예 3. 활동성 결핵환자에 특이적인 생체표지자 대사물질들의 선별

[0056] 활동성 결핵환자에서 특이적으로 증감한 생체 표지자를 찾기 위해서, 각각의 대사물질로부터 상기 실시예 2로부터 도출된 대사체 프로파일링의 차이에 영향을 미치는 배수 변화(fold change), p-값을 구하였다. p-값 (<0.00001 ; $-\log_{10}(0.00001)=5$) 또는 배수 변화(>1.414 ; $\log_2(1.414)=0.5$ 또는 <0.707 ; $\log_2(0.707)=-0.5$)를 기준(컷오프)으로 볼케이노 플롯 분석을 통해 8개의 대사물질이 활동성 결핵 진단에 적절한 생체 표지자임을 확인하였다(도 2).

[0058] 실시예 4. 혈청 검체를 통한 활동성 결핵의 진단을 위해 8개의 대사물질 농도 및비율 분석

[0059] 실시예 3으로부터 선정된 8개의 대사산물인 글루타메이트, 글루타민, 설폭시 메치오닌, 메치오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 키뉴레닌, 트립토판, 농도와 4개의 비율(ratio)인 글루타메이트/글루타민, 설폭시 메치오닌/메치오닌, 아스파르테이트/아스파라긴, 키뉴레닌/트립토판 비율을 분석하였다. 그 결과, 글루타메이트, 글루타메이트/글루타민, 설폭시 메치오닌, 설폭시 메치오닌/메치오닌, 아스파르테이트, 아스파르테이트/아스파라긴, 키뉴레닌 및 키뉴레닌/트립토판은 활동성 결핵환자에서 통계학적으로 유의하게 증가한 반면, 글루타민, 메치오닌 및 아스파라긴의 농도는 통계학적으로 유의하게 감소함을 확인하였다(도 3).

[0061] 실시예 5. 혈청 검체를 이용한 활동성 결핵의 진단을 위한 대사체 생체표지자의 ROC(receiver operating characteristic) 분석

[0062] 실시예 4를 통해 선별된 혈청 검체 내 12개의 생체 지표자를 이용한 활동성 결핵의 진단의 유용성을 시험하기 위하여 ROC를 분석하였다(도 4). 그 결과, 글루타메이트, 글루타민, 글루타메이트/글루타민, 설폭시 메치오닌, 메치오닌, 설폭시 메치오닌/메치오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 아스파르테이트/아스파라긴, 키뉴레닌, 트립토판 및 키뉴레닌/트립토판의 AUC값이 0.998, 1.0000, 1.0000, 1.0000, 0.9916, 1.0000, 0.9732, 0.9325, 0.9980, 0.6329, 0.4807 및 0.6379임을 확인하였다(표 2).

표 2

[0064] 각 대사체 생체표지자의 중앙값과 진단적 가치

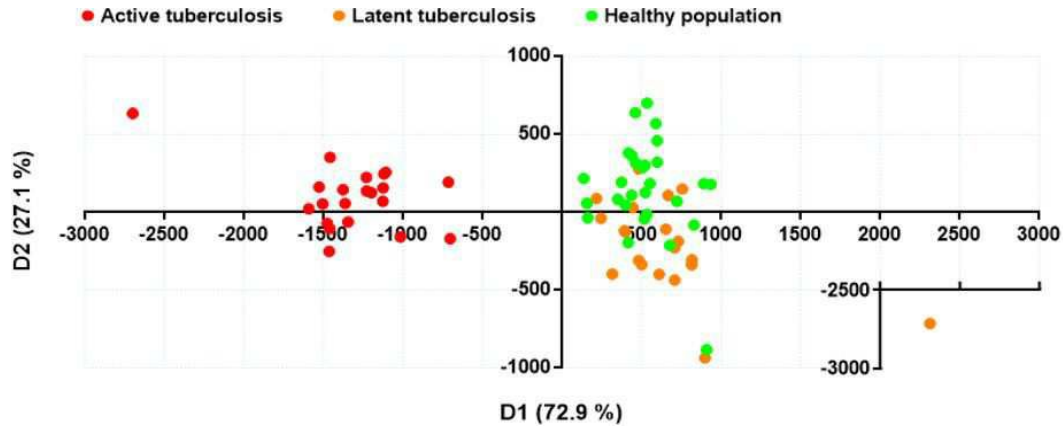
대사체 및 비율	활동성결핵환자 (N=21)	건강인 및 잠복결핵 감염자 (N=48)	P-값 ^b	AUC ^c
Glu (nmol/L)	386000 [344000-428000]	100200 [70900-150000]	< 0.001	0.9980 [0.9933-1.0000]
Gln (nmol/L)	180000 [136000-257000]	638000 [596000-715000]	< 0.001	1.0000 [NA]
Glu/Gln	1.7650 [1.5341-2.9930]	0.1506 [0.1133-0.2144]	< 0.001	1.0000 [NA]
MetSO (nmol/L)	23500 [19800-27200]	1485 [1210-2030]	< 0.001	1.0000 [NA]
Met (nmol/L)	3400 [1530-7350]	28250 [24900-31850]	< 0.001	0.9916 [0.9770-1.0000]
MetSO/Met	7.4359 [3.5374-22.3197]	0.0516 [0.0424-0.0763]	< 0.001	1.0000 [NA]
Asp (nmol/L)	83200 [72400-94200]	41050 [31750-47400]	< 0.001	0.9732 [0.9430-1.0000]
Asn (nmol/L)	30900 [28300-42900]	51800 [46450-58500]	< 0.001	0.9325 [0.8704-0.9947]
Asp/Asn	2.3108 [2.1264-2.9890]	0.7557 [0.6119-0.9315]	< 0.001	0.9980 [0.9933-1.0000]
Kyn (nmol/L)	2170 [1810-2720]	1995 [1680-2275]	0.082	0.6329 [0.4719-0.7940]
Trp (nmol/L)	62400 [56000-71100]	60700 [56050-73500]	0.804	0.4807 [0.3230-0.6383]
Kyn/Trp	0.0329 [0.0282-0.0412]	0.0309 [0.0271-0.0350]	0.071	0.6379 [0.4756-0.8002]

[0066] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

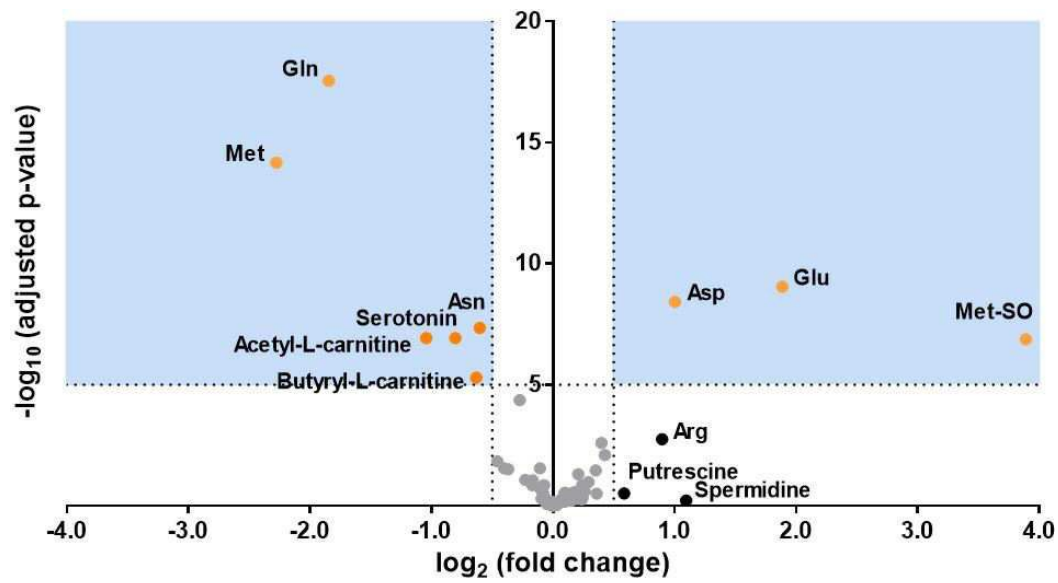
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

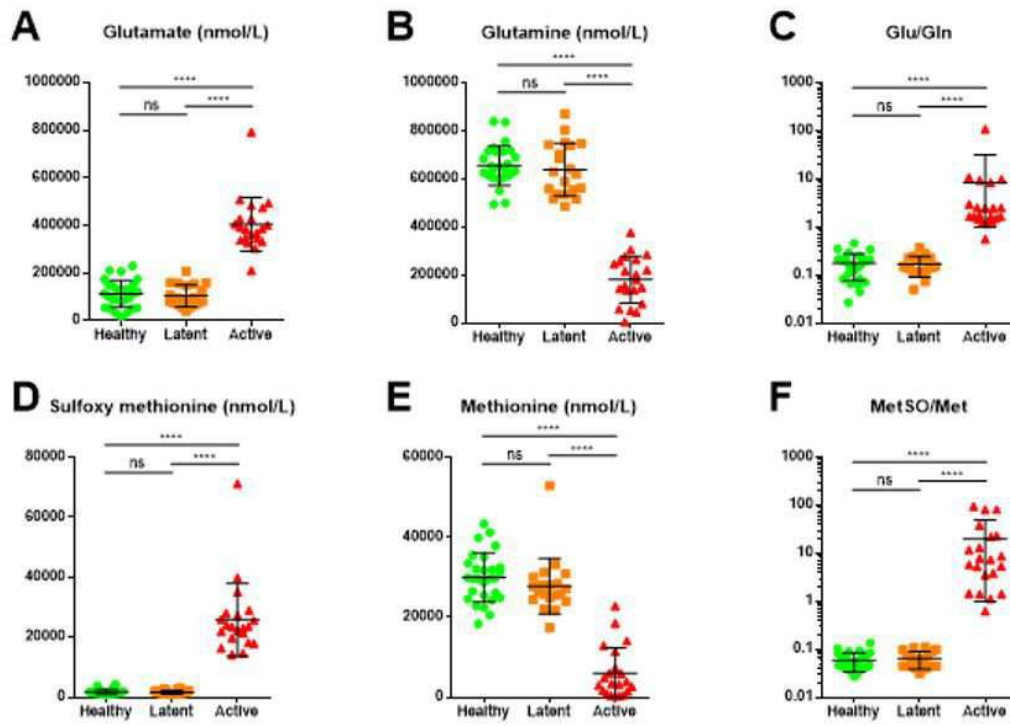
도면1



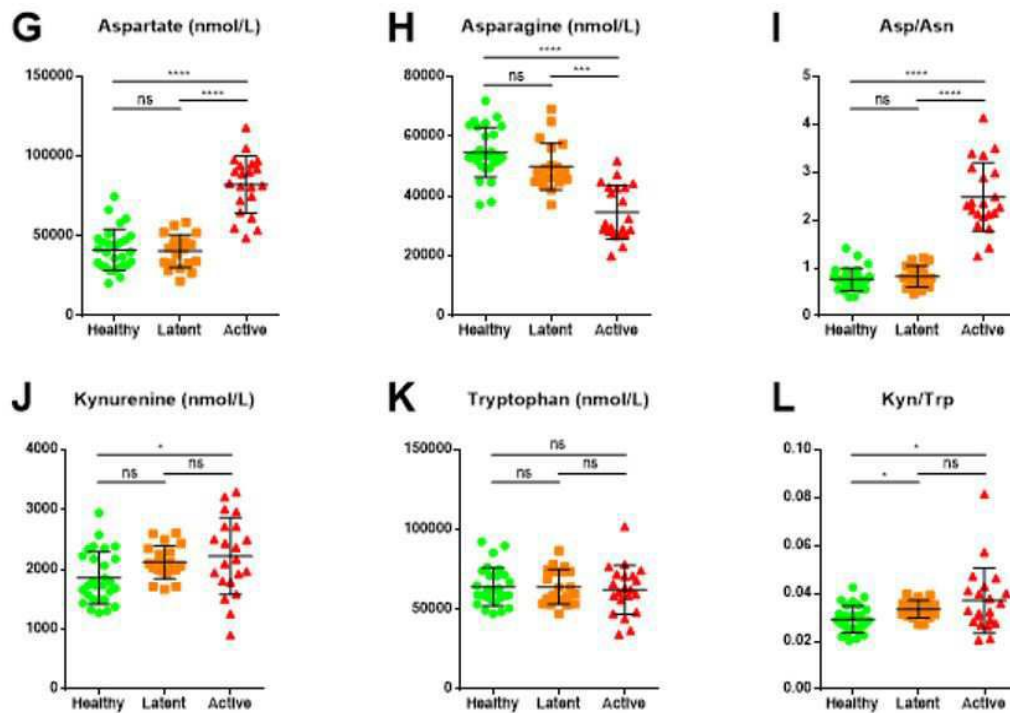
도면2



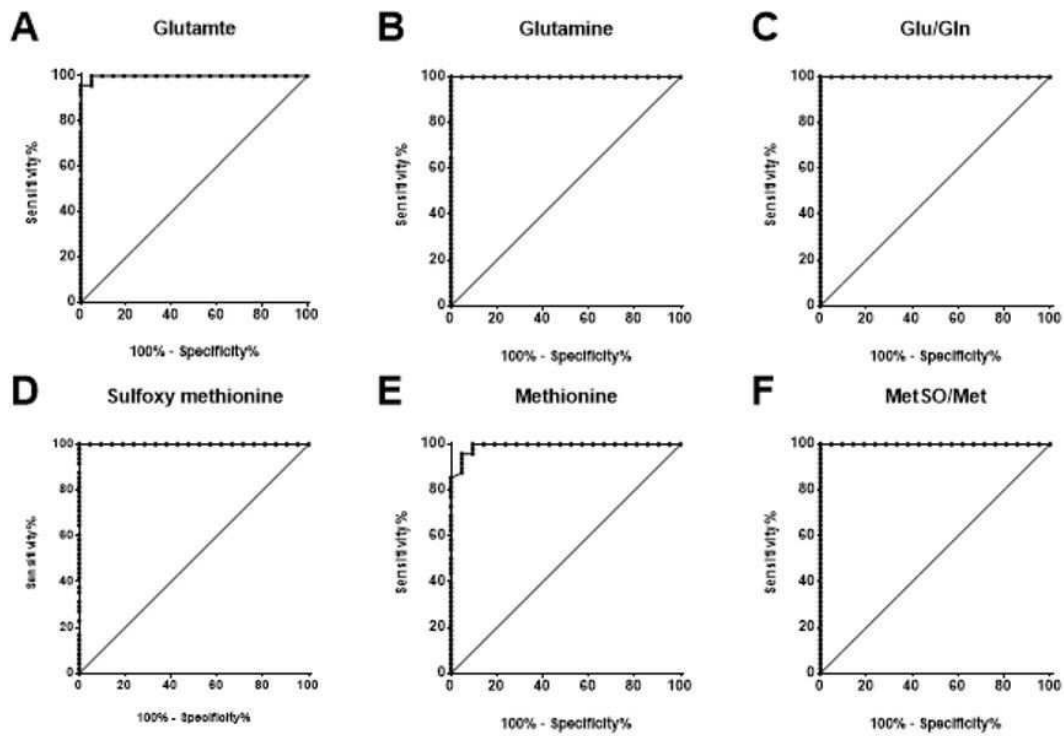
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

