



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월10일
(11) 등록번호 10-2177280
(24) 등록일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6848 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0054410
(22) 출원일자 2019년05월09일
심사청구일자 2019년05월09일
(56) 선행기술조사문헌
W02015064594 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 세종산학협력단
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박영자
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511, 제2과학기술훈 102호
칸아드난
세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511, 약학대학 실험동 403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 차명훈

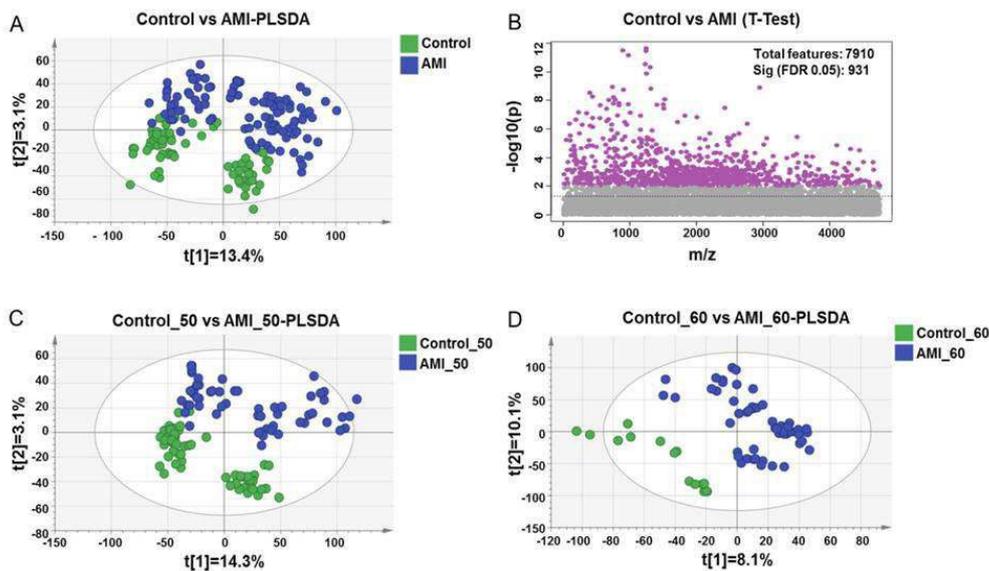
(54) 발명의 명칭 호모시스테인 설편산 또는 시스테인산을 포함하는 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 호모시스테인 설편산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설편산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물; 상기 바이오마커 수치를 측정할 수 있는 체제를 포함

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



하는 급성심근경색 진단용 조성물; 상기 급성심근경색 진단용 조성물을 포함하는 급성심근경색 진단용 키트; (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계, 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 급성심근경색 조기 진단을 위한 바이오마커 조성물을 이용하면, 급성심근경색 발병 전 혈청으로부터 심근경색의 발생 가능성을 예측하여 조기 진단할 수 있어 심혈관 질환이 의심되는 환자로부터 급성심근경색을 판정하거나 급성심근경색 예방 및 치료 등에 이용할 수 있는바, 의학분야를 비롯한 다양한 산업분야에서 널리 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

- G01N 2030/8818 (2013.01)
- G01N 2560/00 (2013.01)
- G01N 2570/00 (2013.01)
- G01N 2800/324 (2013.01)
- G01N 2800/50 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

- KR1020170072215 A
- KR1020170102983 A
- KR1020160123859 A
- Molecular BioSystems, 2017, Vol. 13, pp 1109-1120.

(72) 발명자

나진혁

세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511, 약학대학실
협동 403호

지선하

서울특별시 마포구 월드컵북로30길 9-22, 101동
903호

정금지

서울특별시 서대문구 수색로 100, 110동 203호

이선주

서울특별시 용산구 녹사평대로 66, 202동 903호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C2686
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	보건복지부
연구사업명	타겟질환극복연구개발
연구과제명	대사체 연구기반 대사성 증후군 신규바이오마커 발굴 및 임상적 유의성 확보
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.12.04 ~ 2019.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01345402
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물수확후융복합실용화기술개발
연구과제명	대사체학 기반 심혈관질환 바이오마커 발굴 및 통합분석 시스템 구축
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교 세종산학협력단
연구기간	2014.12.01 ~ 2019.11.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

트립토판(tryptophan), 카르니틴(carnitine), 시스테인(cystein) 및 시스테인 설핀산(cysteine sulfinic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체를 더 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 바이오마커 조성물의 수치를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 조성물.

청구항 4

제3항의 급성심근경색 조기 진단용 조성물을 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 키트.

청구항 5

(a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하고,

상기 호모시스테인 설핀산 또는 상기 시스테인산의 수치가 대조군과 비교하여 증가된 경우 급성심근경색으로 판단하는, 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 바이오마커가 트립토판(tryptophan), 카르니틴(carnitine), 시스테인(cystein) 및 시스테인 설핀산(cysteine sulfinic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체를 더 포함하는, 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서,

트립토판 또는 카르니틴의 수치가 대조군과 비교하여 증가된 경우 급성심근경색으로 판단하는, 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

시스테인 또는 시스테인 설핀산의 수치가 대조군과 비교하여 감소된 경우 급성심근경색으로 판단하는, 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물; 상기 바이오마커 수치를 측정할 수 있는 체계를 포함하는 급성심근경색 진단용 조성물; 상기 급성심근경색 진단용 조성물을 포함하는 급성심근경색 진단용 키트; (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계, 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심장 마비라고도 알려진 급성심근경색(Acute myocardial infarction, AMI)은 전 세계적인 사망의 주요 원인이다. 한국에서 AMI는 특히 60세 이상의 사람들에게 사회 경제적 부담이 크다. 한국인 급성심근경색증 등록연구(Korea Acute Myocardial Infarction Registry, KAMIR)에 따르면, 2005년 이래 62,000명 이상의 한국인이 ST-elevation myocardial infarction (STEMI)으로 진단받았다(비특허문헌 1). 진단의 측면에서, AMI 환자는 일반적으로 크레아틴 키나아제-MB 및 트로포닌 I 및 T를 포함하는 심근 괴사의 전형적인 생화학적 마커에 기초하여, 다음 중 어느 하나 이상에 의해 진단될 수 있다: 허혈성 증상, ST-세그먼트 상승 또는 우울증과 같은 허혈의 심전도 지표, 및 심전도상의 병리학적 Q 파의 발달; 그러나 간단한 심장 바이오마커를 확인하는 것 또한 AMI 평가에서 중요한 진단 및 예후 역할을 할 수 있다.

[0003] 바이오마커는 질병의 시기 적절한 진단을 돕기 위해 널리 사용되고 있다. 최근 급성 관상 동맥 증후군(acute coronary syndrome) 환자의 결과를 예측할 수 있는 새로운 마커가 많이 보고되고 있으나, 어느 누구도 크레아틴 키나아제-MB (CK-MB) 및 미오글로빈과 결합한 트로포닌의 결과를 결정하는 능력을 설득력 있게 입증하지 못하고 있다(비특허문헌 2). 트로포닌, CK-MB 및 미오글로빈은 심근 경색시 급속히 방출되며 AMI 2시간 후 조기에 발견될 수 있지만, 이러한 마커는 심근 손상 후 4-6 시간에 안정적으로 검출되지 않으며 일단 검출되면 AMI 환자는 이미 돌이킬 수 없는 단계에 있다(비특허문헌 3). 따라서, 최대 감도를 위해, 트로포닌은 심근 괴사가 시작될 때 측정되어야 한다. 또한 근육 질환, 감염, 신장 질환 및 심장 마힘과 관련이 없는 기타 많은 조건을 가진 환자에서도 상승된 트로포닌과 미오글로빈 수치가 나타날 수 있다는 문제가 있다(비특허문헌 4).

[0004] 고혈압, 흡연 및 알코올 섭취는 AMI 위험 증가를 포함하여 다양한 심혈관 질환 (CVD)과 관련되어 있다(비특허문헌 5). 흥미롭게도, 흡연과 음주는 모두 트로포닌과 CK의 혈청 수준에 영향을 미치는 것으로 나타났다; 전자는 낮은 트로포닌 농도와 관련이 있으며, 후자는 CK 농도를 비정상적인 값으로 상승시키는 것으로 나타났다. 또한 CVD 관련 바이오마커인 피브리노겐과 호모시스테인은 흡연에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다(비특허문헌 6). 또한, 고령자에서 침묵하는 AMI의 주요 위험 인자인 고혈압은 독립적으로 상승된 트로포닌 수치와 관련이 있는 것으로 보고되었다(비특허문헌 7). 유사하게, 고혈압 환자에서 경미하게 상승된 CK-MB가 여러 연구들을 통해 보고된바 있다(비특허문헌 8). 따라서, 고혈압, 흡연 및 음주에 영향을 받지 않는 AMI 진단용 바이오마커의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 고해상도 대사체학(high-resolution metabolomics, HRM)를 이용하여 나중에 AMI를 앓고 있는 환자로 진단된 AMI 위험군 환자에 대하여 전향적 코호트 연구(prospective cohort study)를 실시하였으며, 변화된 경로와 화합물의 혈청 농도를 결정하여, AMI가 발생하기 전에 AMI의 변화된 대사와 병태생리를 이해하기 위하여 예의 노력한 결과, 호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid)과 시스테인산(cysteic acid), 및 그 주변 대사체가 AMI를 조기 진단용 바이오마커로 유용하게 활용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Sim DS, Jeong MH. Differences in the korea acute myocardial infarction registry compared with western registries. Korean Circulation Journal. 2017;47:811-822

(비특허문헌 0002) Aldous SJ. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. International Journal of Cardiology. 2013;164:282-294

(비특허문헌 0003) Zimmerman J, Fromm R, Meyer D, Boudreaux A, Wun CC, Smalling R, Davis B, Habib G, Roberts R. Diagnostic marker cooperative study for the diagnosis of myocardial infarction. Circulation. 1999;99:1671-1677

(비특허문헌 0004) Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: The present and the future. Journal of the American College of Cardiology. 2006;48:1-11

(비특허문헌 0005) Tavani A, Bertuzzi M, Negri E, Sorbara L, La Vecchia C. Alcohol, smoking, coffee and risk of non-fatal acute myocardial infarction in italy. Eur J Epidemiol. 2001;17:1131-1137

(비특허문헌 0006) Kimberly WT, Wang Y, Pham L, Furie KL, Gerszten RE. Metabolite profiling identifies a branched chain amino acid signature in acute cardioembolic stroke. Stroke. 2013;44:1389-1395

(비특허문헌 0007) Aeschbacher S, Schoen T, Bossard M, van der Lely S, Glattli K, Todd J, Estis J, Risch M, Mueller C, Risch L, Conen D. Relationship between high-sensitivity cardiac troponin i and blood pressure among young and healthy adults. American Journal of Hypertension. 2015;28:789-796

(비특허문헌 0008) Alexander JH, Sparapani RA, Mahaffey KW, Deckers JW, Newby LK, Ohman EM, Corbalan R, Chierchia SL, Boland JB, Simoons ML, Califf RM, Topol EJ, Harrington RA. Association between minor elevations of creatine kinase-mb level and mortality in patients with acute coronary syndromes without st-segment elevation. Pursuit steering committee. Platelet glycoprotein iib/iiia in unstable angina: Receptor suppression using integrilin therapy. JAMA. 2000;283:347-353

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커 수치를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 급성심근경색 조기 진단용 조성물을 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 바이오마커 수치를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 급성심근경색 조기 진단용 조성물을 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 키트를 제공한다.
- [0014] 아울러, 본 발명은 (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산

및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 조기 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 급성심근경색 조기 진단을 위한 바이오마커 조성물을 이용하면, 급성심근경색 발병 전 혈청으로부터 심근경색의 발생 가능성을 예측하여 조기 진단할 수 있어 심혈관 질환이 의심되는 환자로부터 급성심근경색을 판정하거나 급성심근경색 예방 및 치료 등에 이용할 수 있는바, 의학분야를 비롯한 다양한 산업분야에서 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 AMI 위험군 및 대조군 혈청의 부분 최소 자승 판별 분석 및 T-검정 결과를 나타낸 것으로, (A)는 AMI 위험군 환자의 혈청과 대조군의 혈청 (50-69 세) 사이에서 FDR을 0.05의 p value 임계값으로 조정된 Student's t test를 사용하여 도출된 Manhattan 플롯에 의해 선택된 주요 특징을 나타낸다. (B)는 $R^2Y(CUM) = 0.994$ 및 $Q^2(CUM) = 0.915$ 인 2차원 부분 최소 자승 판별 분석 (PLS-DA)을 통해 AMI 위험군 환자의 혈청과 대조군의 혈청 (50-69 세)간에 검출된 특징을 구별한 결과를 나타낸 것이다. (C)는 $R^2Y(CUM) = 0.99$ 및 $Q^2(CUM) = 0.88$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험군 환자의 혈청과 대조군의 혈청 (50-69 세)간에 검출된 특징을 구별한 결과를 나타낸 것이다. (D)는 $R^2Y(CUM) = 0.992$ 및 $Q^2(CUM) = 0.854$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험군 환자의 혈청과 대조군의 혈청 (60-69 세)간에 검출된 특징을 구별한 결과를 나타낸 것이다. PLS-DA 스코어 플롯에서 각 데이터 포인트는 하나의 혈청 샘플을 나타내며, AMI는 AMI 위험에 있는 환자를 나타낸다.

도 2는 혈압, 흡연 및 알코올 섭취가 AMI 위험군 및 대조군 혈청의 대사 프로파일에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 $R^2Y(CUM) = 0.996$ 및 $Q^2(CUM) = 0.778$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 고혈압 환자의 혈청과, 고혈압 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(좌측), 및 $R^2Y(CUM) = 0.989$ 및 $Q^2(CUM) = 0.898$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 비고혈압 환자의 혈청과 비고혈압 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(우측)를 나타낸 것이다. (B)는 $R^2Y(CUM) = 0.994$ 및 $Q^2(CUM) = 0.868$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 흡연자 혈청과, 흡연자 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(좌측), 및 $R^2Y(CUM) = 0.991$ 및 $Q^2(CUM) = 0.837$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 비흡연자 환자의 혈청과 비흡연자 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(우측)를 나타낸 것이다. (C)는 $R^2Y(CUM) = 0.996$ 및 $Q^2(CUM) = 0.863$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 알코올 음주자 혈청과, 알코올 음주자 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(좌측), 및 $R^2Y(CUM) = 0.997$ 및 $Q^2(CUM) = 0.835$ 인 PLS-DA에 의해 AMI 위험이 있는 비음주자 환자의 혈청과 비음주자 대조군 혈청 사이에 검출된 특징을 구별한 결과(우측)를 나타낸 것이다. PLS-DA 스코어 플롯에서 각 데이터 포인트는 하나의 혈청 샘플을 나타낸다. HTN은 고혈압, NHTN은 비고혈압, Sm은 흡연자, NSm은 비흡연자, Alc는 알코올 음주자, NAlc는 알코올 비음주자를 나타낸다.

도 3은 AMI 조기진단지표 후보 물질 대사경로 및 혈압, 흡연 및 알코올 섭취가 대사체에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다. (A)는 호모시스테인 대사와 관련된 중요 화합물들의 경로 개요 및 상대 강도를 나타낸 것이다; 0-succinyl homoserine ($m/z: 242.06 [M+Na]^+$), L-homocysteine ($m/z: 136.04 [M+H]^+$), L-homocysteine sulfinic acid ($m/z: 205.98 [M+K]^+$), L-cystathionine ($m/z: 205.06 [M+H-H_2O]^+$), L-cysteine ($m/z: 159.98 [M+K]^+$), cysteic acid ($m/z: 170.01 [M+H]^+$), 및 L-cysteine sulfinic acid ($m/z: 136.006 [M+H-H_2O]^+$). (B)는 AMI 위험군 및 대조군 사이에서, 고혈압 또는 비- 고혈압 피험자 (왼쪽), 흡연자 또는 비흡연자 (중간), 알코올 음주자 또는 비음주자 (오른쪽)의 혈청에서 확인된 25 가지 대사 산물의 subset에 대한 히트 플롯(Heat plots)을 나타낸 것이다. 높은 수치는 밝고 어두운 빨간색으로 표시되고 낮은 수치는 밝고 진한 녹색으로 표시된다. HTN은 고혈압, NHTN은 비고혈압, Sm은 흡연자, NSm은 비흡연자, Alc는 알코올 음주자, NAlc는 알코올 비음주자를 나타낸다(***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05 by Student's t test).

도 4는 LC-ESI/MS/MS를 통해 AMI 조기진단지표 후보 물질의 혈청 내 농도를 측정된 결과를 나타낸 것이다. (A)

는 AMI 위험군 및 대조군 혈청에서 각 표준 화합물의 검정 곡선을 참조하여 측정된 L- 트립토판, 카르니틴, L- 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, L-시스테인 설핀산, L-시스테인 및 L-호모시스테인의 정량 농도(마이크로몰)를 나타낸다. 각 화합물의 농도는 검출 한계 및 정량 범위의 한계 내에서 외부 표준의 피크 면적을 참조하여 계산하였다. AMI는 AMI 위험에 있는 환자를 나타낸다(*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ by Student's t test).

도 5는 LC-ESI/MS/MS를 통해 AMI 조기진단지표 후보 물질의 혈청 내 농도에 혈압, 흡연 및 알코올 섭취가 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다. (A) 내지 (C)는 AMI 위험군 및 대조군 사이에서, 고혈압 또는 비- 고혈압 피험자 (A), 흡연자 또는 비흡연자 (B), 알코올 음주자 또는 비음주자 (C)의 혈청에서 측정된 L- 트립토판, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산, 시스테인산, L-시스테인 설핀산, L-시스테인 및 L-호모시스테인의 정량 농도(마이크로몰)를 나타낸다. 각 화합물의 농도는 검출 한계 및 정량 범위의 한계 내에서 외부 표준의 피크 면적을 참조하여 계산하였다. HTN은 고혈압, NHTN은 비고혈압, Sm은 흡연자, NSm은 비흡연자, Alc는 알코올 음주자, NAlc는 알코올 비음주자를 나타낸다(*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ^{ns} not significant ($p > 0.05$) by Student's t test).

도 6은 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics) 분석에서 AMI 위험군 및 대조군 혈청 사이에 가장 영향을 많이 받은 상위 10개의 경로를 나타낸 것으로, Y-축은 경로 이름을 나타내고, X-축은 각각의 경로의 히트 수를 나타낸 것이다.

도 7은 AMI 위험군 및 대조군 혈청에서 대사 시그널의 상대 강도를 나타낸 것이다. AMI 위험군 혈청 및 대조군 혈청 중 아미노산 생합성, 2-ococarboxylic acid 대사, 트립토판 대사 및 아미노당 및 뉴클레오티드 당 대사에 관련된 중요한 화합물의 상대 강도는 $FC > 2$, $VIP = 1.5$ 및 $q < 0.05$ 를 기준으로 하였다(L-tryptophan (m/z: 205.09 [M+H]⁺), carnitine (m/z: 136.11 [M+H]⁺), L-phenylalanine (m/z: 188.07 [M+Na]⁺), L-arginine (m/z: 175.11 [M+H]⁺), isoleucine (m/z: 132.10 [M+H]⁺), serotonin (m/z: 177.10 [M+H]⁺), L-tyrosine (m/z: 220.03 [M+K]⁺), L-valine (m/z: 140.06 [M+Na]⁺), Glutaryl-CoA (m/z: 864.14 [M+H-H₂O]⁺), indolelactate (m/z: 206.08 [M+H]⁺), L-2,4-diaminobutanoate (m/z: 101.07 [M+H-H₂O]⁺), L-2-aminopentanoic acid (m/z: 140.05 [M+Na]⁺), O-propionyl carnitine (m/z: 240.11 [M+Na]⁺), indoxyl (m/z: 156.04 [M]⁺), piperidine (m/z: 84.08 [M+H]⁺), L-urobilinogen (m/z: 579.35 [M+H-H₂O]⁺), malonamoyl-CoA (m/z: 835.12 [M+H-H₂O]⁺), 및 creatine (m/z: 149.10 [M+NH₄]⁺)의 상대강도(*** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$; per student's t -test).

도 8은 AMI 위험군 및 대조군 중 환자와 대조군에 중요한 영향을 미치는 화합물의 아미노산 생합성 KEGG 경로를 나타낸 것이다. 빨간 점들은 경로 내 화합물 히트수를 나타낸다.

도 9는 AMI 위험군과 대조군을 구별하기 위한, 확인된 대사 산물의 특이성을 예측하기 위해 설정된 6가지 대사 산물의 정량화된 농도의 ROC(Receiver operating characteristic) 곡선을 나타낸 것이다. ROC 곡선은 다중 교차 유효성 검사(cross-validations, CV)와 여러 대사 산물의 subset을 사용하여 작성하였다. 6개의 모든 특징을 포함하는 대사 산물 세트는 95% 신뢰 구간을 갖는 $AUC = 0.82$ 의 예측 값을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] 본 발명의 일 예에서는, LC-MS/MS 기반 고해상도 대사체학(HRM)을 이용하여 급성심근경색이 발생한 환자들(AMI 위험군)의 발병 전 혈청과, 급성심근경색 비위험 대조군 혈청의 차별적인 대사 현상을 확인하였다. 구체적으로, AMI 위험군에서는 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 트립토판 및 카르니틴의 발현은 상향조절되는 반면, 시스테인 및 시스테인 설핀산의 발현은 하향조절됨을 확인하였다.

[0020] 본 발명은 일 관점에서, 호모시스테인 설핀산(homocysteine sulfinic acid), 시스테인산(cysteic acid), 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 유효성분으로 포함하는 급성심근경색 조기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서 사용된 용어, "바이오마커"는 급성심근경색 또는 급성심근경색 위험이 있는 상태와, 급성심근경색이 아니거나 급성심근경색 위험이 없는 상태와 구분하여 진단할 수 있는 물질로서, 급성심근경색이 발병되지 않은 개체의 샘플에 비해 급성심근경색이 발병된 개체의 샘플에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드, 핵산,

지질, 당지질, 당단백질, 당, 단백질 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명에 있어서, 급성심근경색 초기 진단용 바이오마커는, 바람직하게는 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 트립토판(tryptophan), 카르니틴(carnitine), 시스테인(cystein) 및 시스테인 설핀산(cysteine sulfinic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 대사체일 수 있고, 더욱 바람직하게는 호모시스테인 설핀산 또는 시스테인산일 수 있다.

- [0022] 본 발명에서 사용된 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 진단은 급성심근경색의 위험이 있는지 또는 급성심근경색의 발병 여부를 확인하거나, 나아가 급성심근경색의 진행 여부 또는 심화 여부를 확인하는 것을 의미할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 다른 관점에서 (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 초기 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 피시험자 또는 환자를 말하는 것으로, 상기 개체는 포유류 또는 비포유류 동물일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 용어, "생물학적 샘플"은 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 혈액, 타액, 림프액 또는 소변 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어, "수치(level)"는 생물학적 샘플에서 바이오마커를 검출하기 위한 임의의 분석 방법을 사용하여 만들어진 측정값을 칭하기 위하여 상호교환적으로 사용되며, 생물학적 샘플에서 바이오마커에 대응하는 것에 대한 존재, 부재, 절대적인 양 또는 농도, 상대적인 양 또는 농도, 역가(titer), 수치(level), 발현 수치, 측정된 수치의 비율 등을 나타내는 것으로, 수치의 정확한 특성은 바이오마커를 검출하는데 사용된 특정 분석 방법의 특정 설계 및 성분에 의존하는 것이다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 급성심근경색 초기 진단용 바이오마커 조성물의 수치를 측정할 수 있는 제제를 포함하는 급성심근경색 초기 진단용 조성물 및 이를 포함하는 급성심근경색 초기 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 상기 급성심근경색 진단용 바이오마커 조성물의 수치를 측정할 수 있는 제제 뿐만 아니라, 수치 분석에 적합한 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 제제는 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 개체의 생물학적 샘플에서 호모시스테인 설핀산, 시스테인산, 또는 호모시스테인 설핀산 및 시스테인산을 포함하는 바이오마커 수치를 측정하는 단계; 및 (b) 측정된 상기 바이오마커 수치를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 급성심근경색 초기 진단 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 바이오마커가 트립토판(tryptophan), 카르니틴(carnitine), 시스테인(cystein) 및 시스테인 설핀산(cysteine sulfinic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 호모시스테인 설핀산 또는 시스테인산의 수치가 대조군과 비교하여 증가된 경우 급성심근경색으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 트립토판 또는 카르니틴의 수치가 대조군과 비교하여 증가된 경우 급성심근경색으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 시스테인 또는 시스테인 설핀산의 수치가 대조군과 비교하여 감소된 경우 급성심근경색으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] [실시예]
- [0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0038] **실험 방법**
- [0039] 샘플 수집

[0040] 본 발명은 고려대학교 기관윤리위원회 (KU-IRB-15-19-A-1)와 연세대학교 인체연구기관윤리위원회 및 모든 참여한 건강증진센터의 승인을 받아 진행하였으며, 사용된 샘플은 한국암예방연구-II (KCPS-II) 바이오은행 (서울 및 경기, 대한민국)에서 채취하였다. 2004년부터 시작된 정기적인 건강검진에서 혈액샘플의 제공 및 향후, 장기간의 관찰에 동의한 총 156,701명이 (94,840명의 남성 및 61,861명의 여성) 참여하였다. 샘플링은 생명윤리 및 안전 시행 규칙 (No. 9100)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 진행하였다. 혈액은 대한민국의 서울과 경기지역의 11곳의 시험 센터에서 연구 목적 실험에 동의한 714명으로부터 얻었다. 대상자 모집은 중간값은 2007년 말, 90%는 2005년 중반과 2008년 말에 완료되었다. 참여자들은 연구 계획 요약을 읽은 후 연구에 참여하는 것에 동의하였고 응답률은 90%를 넘었다. 참여자들은 혈액 샘플 채취 전 야간 공복을 요청받았다. 혈당, 총콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL 및 다른 지표들은 COBAS INTEGRA 800 및 7600 Analyzer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 병원 실험실에서 측정되었다. 총 714명의 참여자들 중에서, 50-67세의 185명의 참가자를 선택하였다. 이 참여자들은 다시 급성심근경색 (AMI, Acute Myocardial Infarction)이 발병한 그룹과 발병하지 않은 그룹으로 나누었다. 83명의 급성심근경색을 진단받지 않았던 참여자는 대조군으로 분류하였다. 한편, 112 명의 급성심근경색을 진단받았던 참여자들은 급성심근경색 위험군으로 분류하였다. 그 외 성별, 연령, BMI, 공복혈당, 총콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL, 혈압, 흡연 여부와 음주 여부는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	Control group (%)	AMI-risk group (%)
<i>n</i>	83	112
Male (<i>n</i>)	64 (77.1)	88 (78.5)
Female (<i>n</i>)	19 (22.8)	24 (21.4)
Age (year)	56.5 ± 5.5	58.1 ± 4.2
Body mass index (kg m ⁻²)	24.1 ± 0.7	24.7 ± 0.8
Fasting blood sugar (mg dL ⁻¹)	95.02 ± 16.5	100.4 ± 22.2
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	197.3 ± 38.7	205.9 ± 40.6
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	158.5 ± 86.2	183.4 ± 123.8
High density lipoproteins (mg dL ⁻¹)	49.9 ± 9.5	47.01 ± 11.1
Low density lipoproteins (mg dL ⁻¹)	117.9 ± 32.3	129.5 ± 37.9
Systolic blood pressure (mmHg)	123.4 ± 14.1	130.7 ± 16.2
Diastolic blood pressure (mmHg)	78.4 ± 11.7	90.8 ± 12.1
Smokers	45 (54.2)	62 (55.3)
Alcohol drinkers	47 (56.6)	60 (53.5)

All clinical values are expressed as mean ± SD. *re presents $p \leq 0.05$.

[0041]

[0043] 대사체 분석에 사용되는 화학물질과 시약

[0044] 고성능 액체 크로마토그래피급 물(HPLC-grade water)은 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ)에서 구입하였으며, 아세토니트릴은 Tedia(Fair Lawn, NJ)에서 구입하였다. 폼산은 Fluka(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 모든 화학물질과 시약은 적정 온도와 조건하에서 보관하였다. 표준 용액과 혈청 샘플은 -80 °C에서 보관하였다.

[0046] 대사체 추출을 위한 샘플 전처리

[0047] 대조군과 급성심근경색 발병군의 혈청 50 μL에 195 μL의 아세토니트릴과 5 μL의 3가지 동위원소 포함 표준물질 ([3-methyl-13C]-caffeine, [dimethyl-D6]-N,N-diethyl-M-toluamide, 및 [13C5, 15N]-L-methionine)을 즉, 1:4의 부피비로 섞었다. 샘플들을 vortex 하였고, 단백질을 침전 및 대사 산물 추출을 위해 13,000 rpm으로 4 °C에서 10분 동안 원심 분리하였다. 극성 대사 산물을 포함하는 상층액을 LC-MS/MS 분석을 위해 수집하였다. 샘플들은 사용할 때까지 -80 °C에서 보관하였다.

[0049] LC-MS/MS를 이용한 대사 산물 분석

[0050] 대사체 프로파일링은 Agilent LC-MS / MS Q-TOF 6550 질량 분석기와 결합된 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC) 시스템 (Agilent 1260 Infinity Quaternary)을 사용하여 수행하였다. 샘플들은 C18 Hypersil GOLD aQ, 1.9 μm , 100x2.1 mm; (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 무작위 추출하여 분석하였다. Column과 autosampler의 온도는 각각 45 $^{\circ}\text{C}$ 와 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 증류수 중 0.1% 포름산을 포함한 용액 A와 아세트오니트릴 중 0.1% 포름산을 포함한 용액 B를 이동상으로 사용하였다. 주입 용량과 유속은 각각 5 μL 와 0.4 mL/min였다. HPLC 변화도는 다음과 같이 프로그램 되었다: 물 95%를 1분 동안, 8분에 걸쳐 55%까지 감소, 3분에 걸쳐 10%까지, 1.5분 동안 유지하고 0.1분 동안 95%까지 되돌렸다. 전기 분무 이온화 검출기는 가스 온도 250 $^{\circ}\text{C}$, 14mL/min으로 공급된 35 psi의 curtain, 11mL/min의 유속으로 공급된 250 $^{\circ}\text{C}$ 의 sheath gas로 작동되었다. 이온의 질량/전하 비 (m/z)의 검출은 15분에 걸쳐 20,000의 분해능으로 50에서 1,000으로 설정하였다. 모든 샘플을 3번 반복분석하였고, 각 이온화 기술 데이터를 양이온 모드로 획득하였다.

[0052] 대사 프로파일링

[0053] 다변량과 일변량 분석은 대조군으로부터 AMI 위험군이 구별되는 분자 특징을 확인하기 위해 수행하였다. 먼저 apLCMS를 후속 통계 분석으로 샘플의 모든 특징을 분석하기 위해 사용하였다. apLCMS는 질량 스펙트럼 데이터로부터 50에서 1,000으로 설정한 이온의 범위 안에서 12,018개의 m/z(질량/전하 비)를 제공했다. 데이터는 MetaboAnalyst 4.0, SIMCA 14.1 (Umetrics AB, Umea^o, Sweden)을 사용하여 통계적으로 분석하였다. 데이터 집합은 변위치-정규화, 로그 변환 및 pareto-scaled를 통해 각 특징들이 더 잘 비교될 수 있도록 조정하였다. 위양성 (false-positives) 발생률을 줄이기 위해 FDR (false discovery rates)을 계산하였고, AMI 위험군 혈청과 대조군 혈청 간에 유의한 차이가 있는 대사 산물을 확인하기 위해 Metaboanalyst 3.0을 사용하여 Manhattan 플롯을 제작하였다. 지도된 다변수 분석 (즉, 부분 최소 자승 관별 분석(PLS-DA))을 SIMCA 14.1을 사용하여 수행하였다. PLS-DA 모델은 다변량 모델의 질을 보장하고 과대 적합의 위험을 피하기 위해 R2Y 및 Q2Y 값을 측정하였다. PLS-DA 분석은 다음과 같이 수행하였다: 50대 대조군 및 60대 대조군의 혈청을 50대 AMI 및 60대 AMI 위험군 혈청과 집단 비교하였다. 결합된 50대 및 60대 대조군 혈청을 50대 및 60대 AMI 위험군을 합한 것과 비교하였고, 이어서 50대 대조군 대 50대 AMI 위험군 혈청 그리고 60대 대조군 대 60대 AMI 위험군 혈청을 각각 분석하였다. 또한 흡연 및 음주가 대사 장애에 미치는 영향을 관찰하기 위해 모든 비 흡연자/비 음주자 (NSm/NA1c)와 흡연자/음주자(Sm/A1c) AMI 위험군 혈청 (50대 및 60대 포함)을 비흡연자/비 음주자(NSm/NA1c)와 흡연자/음주자(Sm/A1c) (50대 및 60대 포함)의 대조군 혈청과 비교하였다. 그리고, 흡연자/음주자(Sm/A1c) AMI 위험군 혈청을 흡연자/음주자(Sm/A1c) 대조군 혈청과 개별적으로 비교한 데 반해 PLS 분석의 스코어 플롯을 더 잘 시각화하기 위해 비흡연자/비음주자(NSm/NA1c) AMI 위험군 혈청 (50대 및 60대 포함)을 비흡연자/비음주자 (NSm/NA1c) 대조군 혈청과 비교하였다.

[0055] 대사 경로 분석

[0056] Manhattan plot에서 AMI 위험군과 대조군 간에 현저히 다른 (FDR 보정된 p value <0.05) 것으로 확인된 대사 산물은 잠재적인 바이오마커로 중요하게 고려되었다. 확인된 대사 산물을 xMSannotator 및 Metlin Mass Spectrometry Database (METLIN)에 입력하였다. 거기서 얻은 각 물질에 매치된 KEGG ID 는 인간 생체 대사 경로에 사용하였다. 그로 인해 KEGG에서 대조군과 AMI 위험군 사이의 바뀐 대사 경로가 확인되었다. 유의한 변화가 있는 물질 (p-value <0.05)은 검색에 의한 대사 작용과 관련된 잠재적인 바이오마커로 확인되었다.

[0058] 표적 대사 물질 프로파일링

[0059] 대사 물질의 식별과 정량화를 위해, 참조 표준(reference standards)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 표준 물질의 무게를 정확하게 측정하고, 물질에 대한 지침에 따라 메탄올/물에 용해시키고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 대조군과 AMI 위험군의 모든 혈청 샘플을 아세트오니트릴 (1:2, v/v)로 처리하고 원심 분리하여 단백질을 침전시켰다. ESI 인터페이스가 수반된 Agilent 6490A Triple Quad Mass Spectrometer (Agilent Technologies, Inc.)를 사용하여 Tandem mass spectrometry (MS/MS) 데이터를 positive mode에서 얻었다. 표준 물질 및 혈청 샘플을 먼저 질량 범위 (m/z) 50-1000에서 스캔하였다. 0, 5, 10, 15 및 20 V의 충돌 에너지를 사용하여 positive mode에서 product-ion 분석 동안 추정 대사 산물의 조각 이온을 생성시켰다. 크로마토그래피는 C18 100mm x 2.1mm column (Hypersil Gold aq, Thermo)에서 유속 0.4 mL/min으로 수행하였다. 대조군 또는 AMI 위험군의 혈청 샘플에서 확인된 대사 산물의 농도를 최소 8가지의 적절한 농도 수준으로 각 표준 화합물의 보정 곡선을 만들어 정량화하였다. 본 크로마토그래피 조건 하에서 검출 한계 (LOD) 및 정량 한계 (LOQ)는 각각 3 및 10의 signal-to-noise(S/N) 비로 결정하였다. 분석은 3회 실시하였고 데이터는 평균 \pm SEM으로 나타내었다. 표적 대사 산물의 농도는 LOD와 LOQ의 범위 내에서 외부 표준의 peak area를 참조하여 계산하

였다.

[0061] GraphPad를 이용한 통계 분석

[0062] 각 그룹의 상대적 강도를 측정하기 위해 GraphPad Prism software (5.03, La Jolla, CA)를 사용하여 예상 정체 (identities)들을 분석했다. 데이터는 평균 ±SEM으로 제시되고 p-value의 차가 0.05 미만(differences with p-values < 0.05)인 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[0064] 결과 및 고찰

[0065] 샘플 특성

[0066] 본 발명의 연구 대상은 한국에 거주하는 급성 심근 경색 위험군 (AMI) 과 건강한 대조군이다. 대사체 분석은 총 112명의 AMI 위험군과 83명의 건강한 대조군을 대상으로 수행하였다. 대조군과 AMI 위험군 모두 남성과 여성 대상의 비율은 동일하였다. Student's t-test를 기반으로, 두 그룹에서 성별, 연령, BMI (kg / m²), 공복 혈당 (mg/dL), 총 콜레스테롤 (mg/dL), 중성 지방 (mg/dL), 이완기 혈압 (mmHg), 그리고 고밀도 지단백질 (HDL, mg/dL)에서 아무런 통계적 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 저밀도 지단백질 (LDL, mg/dL)과 수축기 혈압 (mmHg)은 대조군과 비교하여 AMI 환자에서 유의하게 높았다. 흡연자와 음주자의 비율은 AMI 위험군과 대조군 간에 유의미한 차이가 나지 않았다.

[0068] 건강한 혈청과 비교하여 AMI 위험군 혈청 대사 표현형의 차이

[0069] 먼저, 지도적 다변량 분석인 PLS-DA를 사용하여 유의미한 분리 변화(separation shift)를 찾아 대조군과 AMI 위험군 사이의 차별적인 대사 표현형을 결정하고자 하였다. 데이터에서 대사 산물 분별의 정확도를 높이기 위해 단위 분산(UV) 비례 축소(scaling)를 사용하여 7,910 개의 m/z들을 포함하는 apLCMS feature table을 SIMCA 14.1 (Umetrics AB, Umea °, Sweden)에 삽입하였다. 도 1A에 나타난 바와 같이, AMI 위험군과 건강한 대조군 간 PLS-DA의 score plot에서 명확한 분리가 관찰되었다. PLS-DA 모델의 품질은 R²Y(cum) 와 Q²(cum) 값을 사용하여 평가하였다. SIMCA에서 0.5 이상의 Q² 값처럼, 계산된 모델의 질이 과도히 올라가지 않았고 신뢰할 수 있음을 나타내는 PLS-DA 모델에서 관찰된 R²Y (cum) 값 0.994와 Q₂(cum)값 0.915는 타당한 예측으로 주로 인정받는다. 이 결과는 AMI 위험군의 혈청 대사 물질이 건강한 대상과 유의미하게 다르다는 것을 나타낸다. 추가적으로, Metaboanalyst 3.0으로 대조군과 AMI 위험군 혈청 사이에서 false discovery rate(FDR)를 q value 0.05로 조정 한 student's t test를 수행하였다. 도 1B에 나타난 바와 같이, FDR q = 0.05 보정 후 비교된 그룹에서 931개의 특징(분홍색 점)이 유의미한 것으로 나타났다. q < 0.05의 주요한 대사 산물들과 변수 중요도 척도(the variable importance in projection) (VIP)> 1인 첫 번째 주성분(first principal component)들이 PLS-DA 분석에서 샘플 분리에 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

[0070] 본 발명에 따른 연구에 참여한 피험자는 주로 50세에서 67세 사이였다. 따라서 대조군과 AMI 환자 간의 연령에 따른 대사 장애를 관찰하기 위해 50대/60대의 AMI 환자와 50대/60대 대조군을 분리 분석하였다. 이에 따라서 60대 대조군과 대조적으로 60대 AMI 환자에 대한 대사 변화는 50대 대조군 (도 1D)에 대한 50대 AMI 환자의 대사 변화와 비교하여 PLS-DA의 score plot에서 더 효율적이었다 (도 1C). 그러나, score plot이 둘 다 좋은 R²Y (cum) 과 Q² (cum) 값으로 예측되었는바, AMI로 인한 연령층 별 대사 장애는 50대 및 60대 피험자 간에 비슷한 것으로 나타났다.

[0072] AMI 위험군 혈청의 대사 표현형에 흡연 및 음주가 미치는 영향

[0073] AMI로 인한 특정 대사 현상의 차이(differential metabolic phenomena)를 평가하는 동안 흡연 및 음주와 같은 AMI의 위험 요소를 고려하였다. 이러한 위험 요소로 인해 잘못된 대사적 해석의 가능성을 배제하기 위해 전술한 결과를 흡연자와 음주자의 AMI 위험군 혈청과 대조군 혈청에서 검증하였다. 통제 피험자는 흡연자 45명과 음주자 47명으로 구성되었는바, PLS-DA의 score plot (Figure 1)에서 대사 변화가 흡연 또는 음주로 인한 것일 수 있다고 추정하였다. 흡연이나 알코올 관련 대사 작용에 의한 데이터 왜곡의 가능성을 배제하기 위해 흡연자와 비흡연자인 AMI 위험군과, 흡연자와 비흡연자인 대조군들을 집단적으로 또는 개별적으로 분석했다. 그러나 대조군과 AMI 위험군 중, 흡연자와 관계없이 대조군에서 흡연자와 비흡연자를 합친 것과 흡연자와 비흡연자가 합쳐진 AMI 환자군에서도 PLS-DA의 score plot은 대조군과 AMI 환자군을 효과적으로 분리했다 (도 2A). 또한, 비흡연자 대조군 대 비흡연자 AMI 환자군의 분리 분석은 흡연자 대조군 대 흡연자 AMI 환자군(도 2C)과 같이 유의미

한 분리(도 2B)를 보였다. 유사하게, 음주자를 포함한 대조군, 제외한 대조군, 그리고 음주자를 포함한 AMI 환자군, 제외한 AMI 위험군을 별도로 분석했다. 도 3A에 나타난 바와 같이, PLS-DA의 score plot은 음주자와 비음주자를 합친 AMI 위험군과 똑같이 음주자와 비음주자를 합친 대조군을 효과적으로 분리했다. 유사한 결과가 비음주자 AMI 위험군과 음주자 AMI 위험군 혈청에 대조되는 비음주자 대조군 또는 음주자 대조군의 분리 분석에 의해 얻어졌다(도 3B&C). 이러한 결과는 대조군과 AMI 위험군 간 대사 변화가 심근 경색에 의해 유발되었으며 흡연이나 음주가 아니라는 것을 시사한다.

[0075] AMI 위험군의 혈청에서 대사 변화 발견

[0076] 대사체의 차이를 확인하기 위해 PLS-DA 모델에서 생성된 VIP값과 2-tailed student's t test 결과를 결합하였다(도 1). METLIN 분석 결과를 활용한 KEGG 데이터베이스는 student's t-test에서 얻은 중요한 m/z를 명명하여 사용했다. t-test로, 대조군과 AMI 위험군 혈청 사이에서 931개의 중요한 m/z를 산출하였다. 이러한 대사체의 KEGG ID는 KEGG 데이터베이스에서 영향을 받은 경로 상위 10개를 확인하는데 사용하였다(도 6). KEGG에서 확인된 영향을 받은 경로 상위 10개를 고려하여, 도 6에 나열된 경로와 관련된 모든 대사 물질의 강도를 확인하였다. 각 대사체의 강도는 막대 그래프로 작성하였다(미도시). 배수 변화에 기초하여, 영향받은 경로 상위 10개에 포함된 대사체 중, 유의미하게 상향 조절된 ($FC > 2$ 이고 $VIP > 1.5$, 그리고 $q\text{-value} < 0.05$) 대사체가 중요하게 영향을 받은 것으로 고려되었고, AMI 위험군 혈청에서 낮은 강도를 가졌거나 반복적으로 유사한 m/z 값을 가진 대사체 또는 경로는 검증의 대상에서 제외하였다. 이러한 방법으로 2-oxocarboxylic acid 대사, 아미노산 생합성, 트립토판 대사 및 아미노당 과 뉴클레오티드 당 대사가 대조군 혈청과 비교하여 AMI 위험군의 PLS-DA 에서 분리에 영향을 미치는 것으로 여겨졌다. 도 8에 나타난 바와 같이, $FC > 2$ 와 $VIP > 1.5$, 그리고 $q\text{-value} < 0.05$ 을 기준으로 선택된 L-트립토판 (m/z: 205.09 [M+H]⁺), 카르니틴 (m/z: 136.11 [M+H]⁺), L-호모시스테인 (m/z: 136.04 [M+H]⁺), L-시스타티오닌 (m/z: 205.05 [M+H-H₂O]⁺), 호모시스테인설피산 (m/z: 205.98 [M+K]⁺), L-페닐알라닌 (m/z: 188.07 [M+Na]⁺), L-아르기닌 (m/z: 175.11 [M+H]⁺), 이소류신 (m/z: 132.10 [M+H]⁺), 세로토닌 (m/z: 177.10 [M+H]⁺), L-타이로신 (m/z: 220.03 [M+K]⁺), L-발린 (m/z: 140.06 [M+Na]⁺), 글루타릴-CoA (m/z: 864.14 [M+H-H₂O]⁺), 인돌라테이트 (m/z: 206.08 [M+H]⁺), L-2,4-디아미노부타노에이트 (m/z: 101.07 [M+H-H₂O]⁺), L-2-아미노펜타노산 (m/z: 140.05 [M+Na]⁺), O-프로피오닐 카르니틴(m/z: 240.11 [M+Na]⁺), 인독실 (m/z: 156.04 [M+H]⁺), 피페리데인 (m/z: 84.08 [M+H]⁺), L-유로빌리노젠 (m/z: 579.35 [M+H-H₂O]⁺), 말론아모일-CoA (m/z: 835.12 [M+H-H₂O]⁺), 그리고 크레아틴 (m/z: 149.10 [M+NH₄]⁺) 은 상위 10개 경로(도 6)와 관련된 대사체 중, 유의하게 상승한 것으로 확인되었다. 그러나 아미노산 생합성 경로가 가장 영향을 많이 받은 것으로 확인되니, 해당 대사 경로를 가장 중요한 것으로 고려하였다. 도 7의 붉은색 화살표로 강조된 바와 같이, L-호모시스테인과 그 주변 대사체가 주로 영향을 받은 것으로 확인되었다. 이를 위해, 도 3A에 나타난 바와 같이, O-숙시닐 호모세린 (m/z: 242.06 [M+Na]⁺), L-호모시스테인 (m/z: 136.04 [M+H]⁺), L-시스타티오닌 (m/z: 205.06 [M+H-H₂O]⁺), L-시스테인 (m/z: 159.98 [M+K]⁺) 그리고 메티오닌의 원강도를 확인하였다. 추가적으로, 심혈관계 질환에서 흥분독성을 가진 것으로 알려진 L-호모시스테인의 주변 대사체, L-호모시스테인 설피산 (m/z: 205.98 [M+K]⁺), 시스테인산 (m/z: 170.01 [M+H]⁺), 그리고 L-시스테인 설피산 (m/z: 136.006 [M+H-H₂O]⁺)의 원 강도를 확인하였다. 흥미롭게도, L-호모시스테인, L-호모시스테인 설피산, L-시스타티오닌 그리고 시스테인산은 AMI 위험군 혈청에서 높아졌으며 L-시스테인과 L-시스테인 설피산의 강도는 낮아진 것으로 확인되었다(도 3A). 더욱이, 고혈압, 흡연 및 알코올에 의한 영향을 배제하기 위하여 25개의 대사체를 AMI 위험군과 대조군에서 해당 3가지의 기준을 재분류하여 분석하였다. 도 3B에 표기한 것처럼, 18개의 대사체는 도 3A 및 도 8과 동일하게 고혈압/비고혈압, 흡연/비흡연 그리고 음주/비음주 여부와 상관없이 AMI 위험군에서 증가된 경향을 보였다. L-페닐알라닌(도 3B)의 경우, 도 8과는 반대로 고혈압이 있는 대조군 혈청에서 증가되었고, 반면 인돌아세트산과 O-프로피오닐 카르니틴은 고혈압/비고혈압 두 대조군 모두에서, L-2-아미노펜타노산은 비고혈압군에서 AMI 위험군 혈청과 비교했을 때 대조군에서 증가하는 것으로 확인되었다(도 3B). 유사하게, 글루타릴-CoA는 도 8과 반대로, 흡연 대조군 혈청에서 흡연 AMI 위험군 혈청보다 증가하였고 말론아모일-CoA는 비흡연자에서 영향을 받은 것으로 확인되었다(도 3B). 추가적으로 L-2,4-디아미노부타노산은 고혈압, 흡연 및 음주, 세 가지 모두의 영향을 받는 것으로 확인되었다(도 3B). 위험 요소의 영향을 받은 대사체들은 추가 분석에서 제외하였다.

[0078] MS/MS에 의해 AMI 혈청에서 선택된 대사 물질의 검증 및 정량화

[0079] 상기 언급된 비표적 대사체학으로 혈청에서 검출한 18개의 대사체는 AMI의 위험도를 판단함에 있어 더 높은 효과를 가져야할 필요가 있다. 그러나 많은 바이오마커의 정량에 기반한 진단은 실제 임상 분야에서 편리하지 않거나 경제적이지 않을 수 있다. AMI 위험 확인에 좀 더 실용적인 단순화된 혈청 대사체의 확인을 위해 18가지

대사체를 MS/MS로 검증하였다. AMI 혈청 시료에서 12개의 주요 대사체, 즉 L- 트립토판, 카르니틴, 호모시스테인 설핀산, L- 티로신, L- 발린, 이소류신, L- 아르기닌, 크레아틴, 라이신 및 호모시스테인의 존재는 AMI 혈청 샘플에서 표준 화학 물질의 MS/MS 스펙트럼을 HMDB 데이터베이스의 표준 물질 스펙트럼과 비교하여 확인하였다. 화합물은 충돌 에너지 값 0eV, 5eV, 10eV, 15eV, 그리고 20eV을 사용하여 조각이온 분석을 확인하였다. 혈청에서 [M+H]⁺ 이온의 LC-MS/MS 스캔 모드, 생성 이온 모드, 그리고 다중 반응 모니터링(MRM)를 하기 표 2에 나타내었다. 이들 화합물의 농도를 대조군 및 AMI 혈청에서 측정 한 후 그 결과를 도 4에 나타내었다. 혈청 내 농도는 표준 물질의 검정 곡선을 참조하여 계산하였다. LC/MS 결과에 따라 L-트립토판, 카르니틴, 호모시스테인 설핀산, L-티로신, L-발린, 이소류신, L-아르기닌의 정량된 농도는 AMI 혈청에서 유의하게 상승하는 것으로 나타났다 (도 4). 25개의 잠재력이 있는 대사체 중, 6개의 혈청 기반 대사체 바이오마커의 정량화된 농도는 AMI 위험군과 대조군을 구별할 수 있었으며 그 중 5개는 주로 L-호모시스테인 및 그 주변 대사체와 관련이 있었다. 추가적으로 정량화된 바이오마커의 성능을 검증하기 위해 ROC 커브의 AUC 분석을 MetaboAnalyst 4.0에서 수행하였다. MetaboAnalyst는 다중 CV를 사용하여 다양한 조합의 대사체를 이용하여 몇 개의 ROC 커브를 만들었다. 도 9에 나타난 바와 같이, ROC 커브들은 L-트립토판, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산, 시스테인산, L-시스테인 그리고 L-시스테인 설핀산의 정량화된 농도를 기반으로 생성되었다 (도 4). 6개 대사체의 정량화된 농도는 진단 적 가치 AUC = 0.82, 즉 AMI 위험군과 대조군을 구분할 수 있는 좋은 민감도와 특이도를 보였다.

표 2

Compound	Precursor ion	Product ion	Collision energy (V)	Retention time (min)
L-tryptophan	205.1	187.9	10	0.70
Carnitine	163.1	60.0	10	0.66
L-Homocysteine sulfinic acid	168.1	122.1	5	0.65
L-tyrosine	182.0	136.0	10	0.88
L-valine	118.0	72.0	10	0.72
Isoleucine	132.1	86.0	10	0.97
L-arginine	175.0	70.0	20	0.62
Creatine	132.1	90.1	10	0.65
Lysine	147.12	84.0	20	0.59
L-Homocysteine	136.1	118.0	5	0.69
L-cysteine	122.0	105.1	10	0.65
L-Cysteine sulfinic acid	154.0	135.9	10	0.64
Cysteic acid	170.0	124.0	10	0.64

[0080]

[0082]

정량화된 AMI 바이오마커에 미치는 혈압, 흡연 및 음주의 영향

[0083]

나아가, 도 4에 표기된 검증되고 정량화된 농도의 6개 잠재적인 바이오마커에 고혈압, 흡연 그리고 음주가 미치는 영향의 가능성을 배제하기 위해 AMI 위험군 및 대조군에서 고혈압, 흡연 및 음주에 따라 그룹을 나누어 L-트립토판, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산, 시스테인산, L-시스테인 그리고 L-시스테인 설핀산의 농도를 확인하였다. 도 5A에 나타난 바와 같이, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산, 시스테인산의 정량화된 농도는 도 4와 동일한 경향을 보였으며 AMI 위험군에서 대조군에 비해 고혈압 여부와 관계없이 유의미하게 높은 것으로 확인되었다. 그러나 L-트립토판은 도 4와 반대로 고혈압이 있는 AMI 위험군에서 높아졌으며 비고혈압 AMI 위험군에서는 그렇지 않았는데 (도 5A), 이는 L-트립토판이 AMI의 위험요소가 아닌 고혈압에 특이적이기 때문으로 판단된다. 유사하게, L-시스테인 설핀산의 농도는 고혈압 여부에 영향을 받았고 (도 5A), 고혈압/비고혈압군의 각 대조군, AMI 위험군의 비교에서 유의미한 차이를 보이지 않았다. 게다가, 도 4에 표기된 결과에 흡연과 음주가 미치는 영향은 흡연 (도 5B)과 음주(도 5B) 모두 정량화된 L-트립토판, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산, 시스테인산, L-시스테인 그리고 L-시스테인 설핀산에 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해, 카르니틴, L-호모시스테인 설핀산 그리고 시스테인산이 6개의 대사체 중, 고혈압, 흡연 및 음주 여부와 관계없이 AMI에 의해 일찍이 상승하는 바이오마커임을 확인하였다.

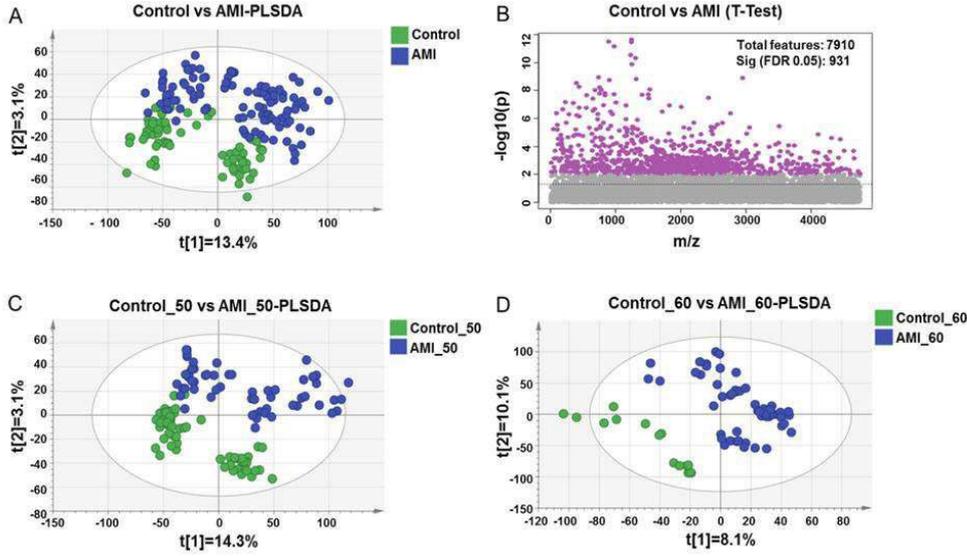
[0085]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

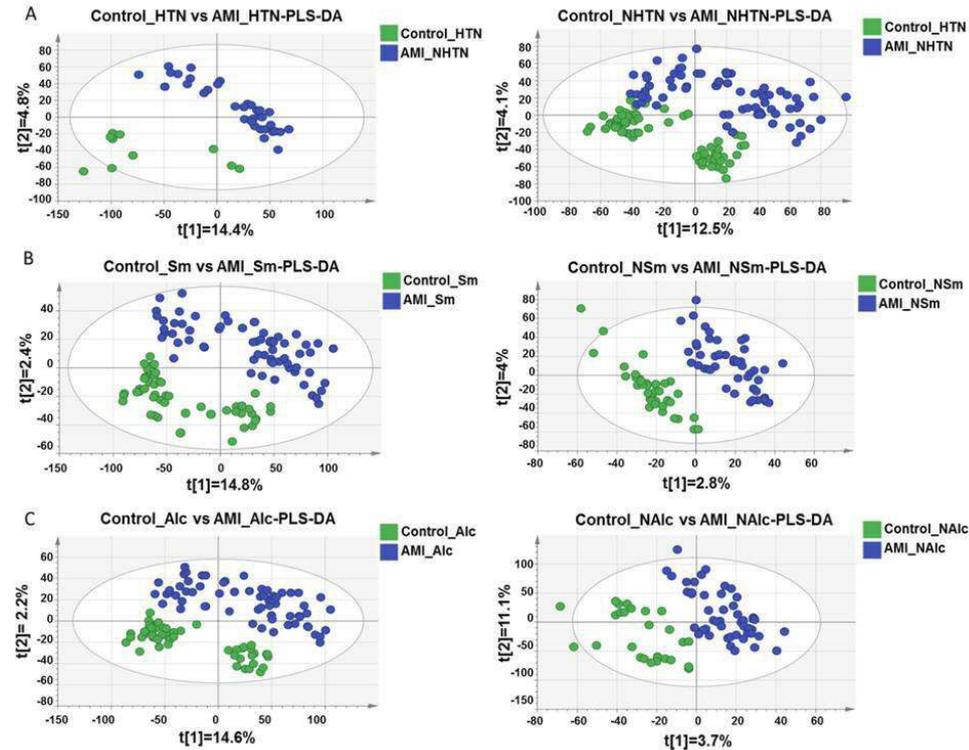
명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

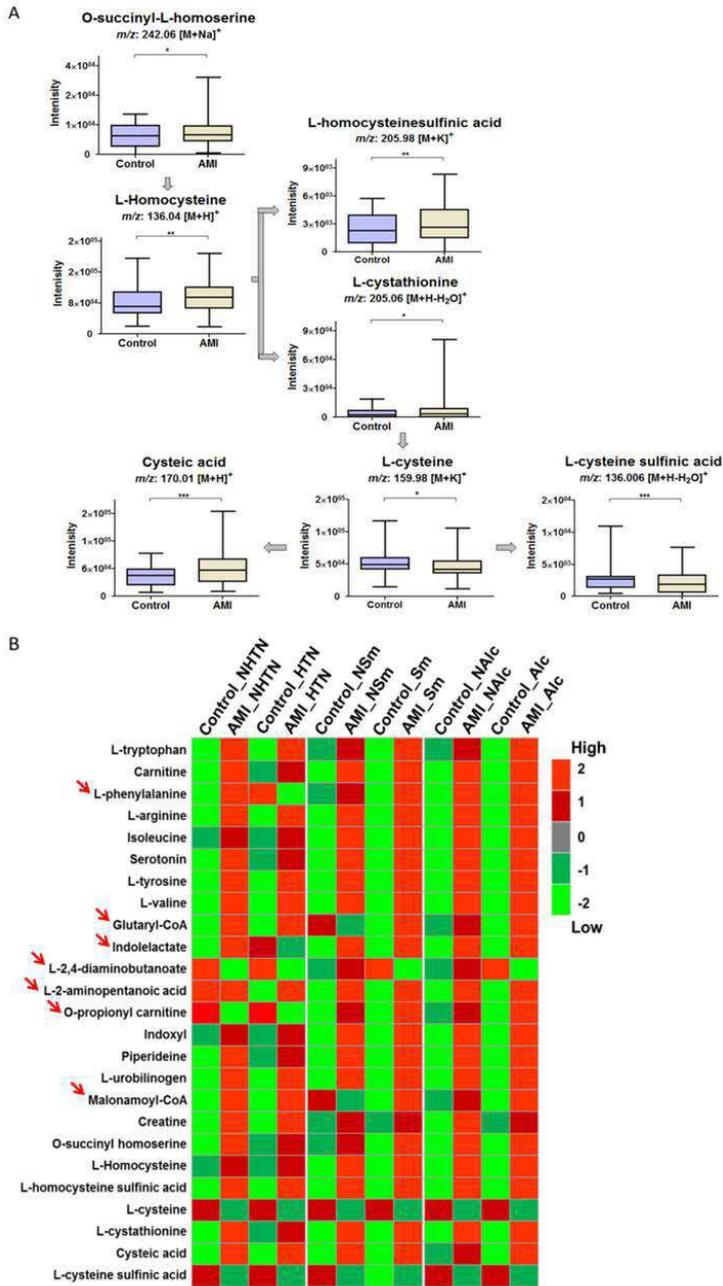
도면1



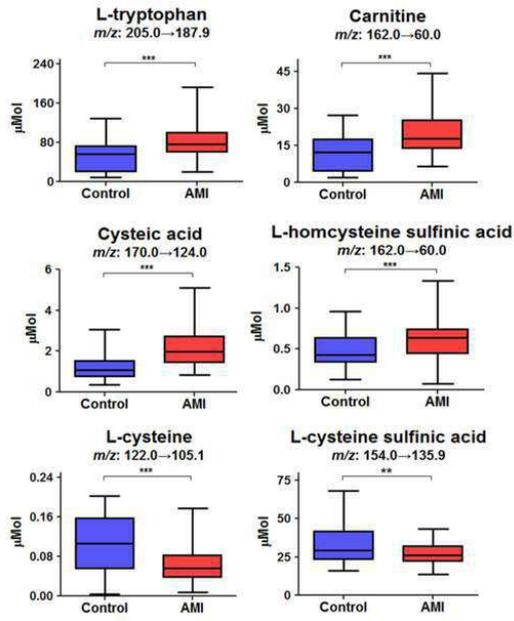
도면2



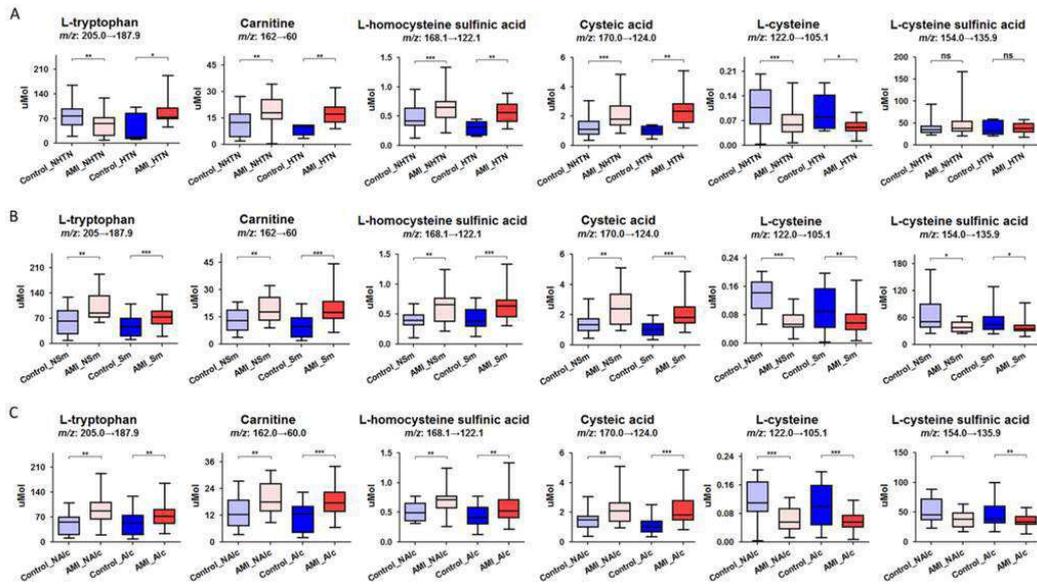
도면3



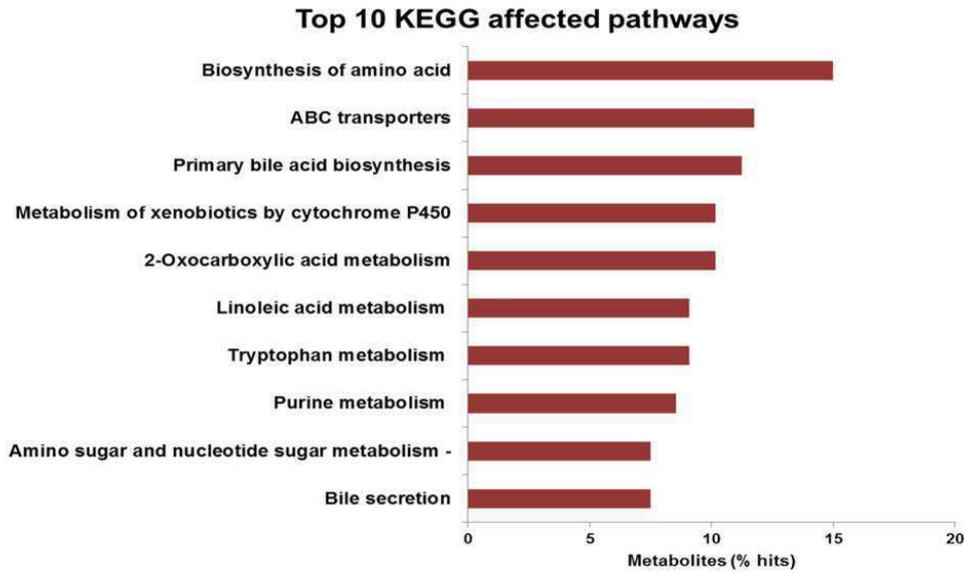
도면4



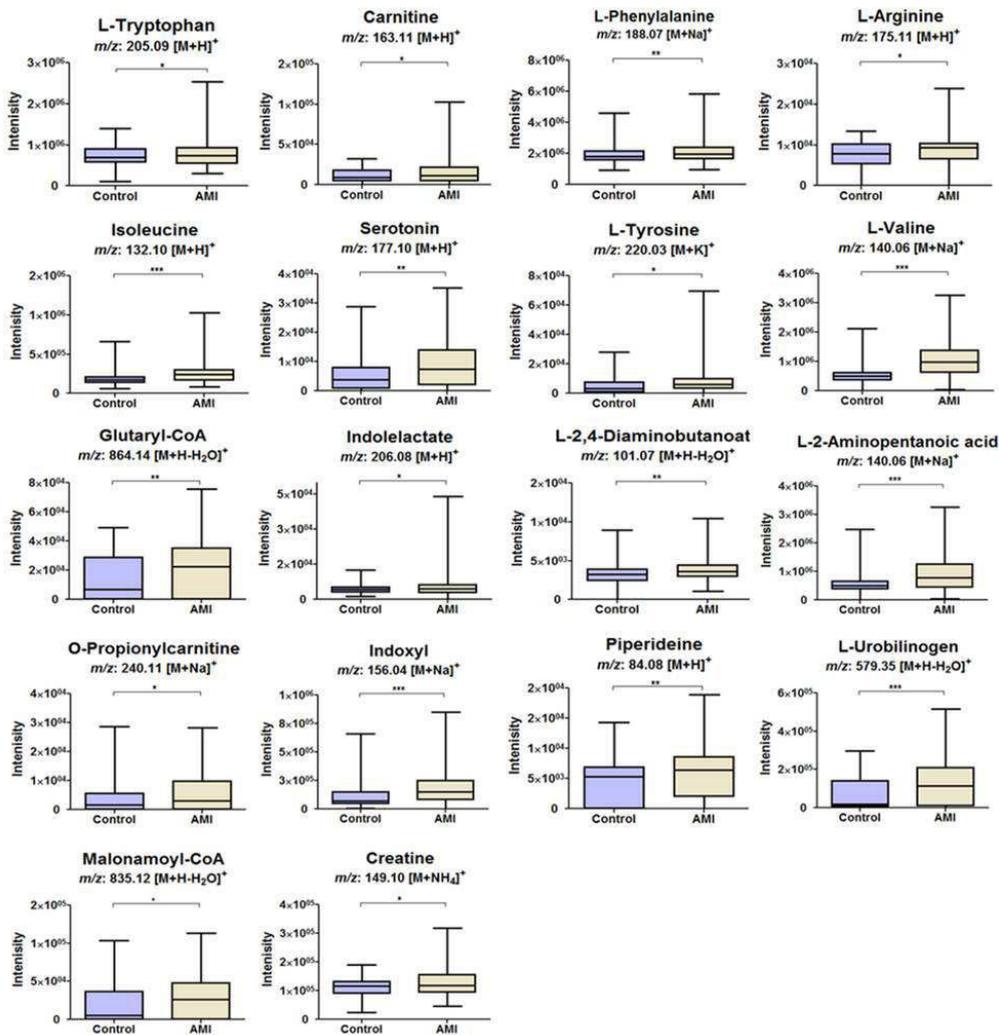
도면5



도면6

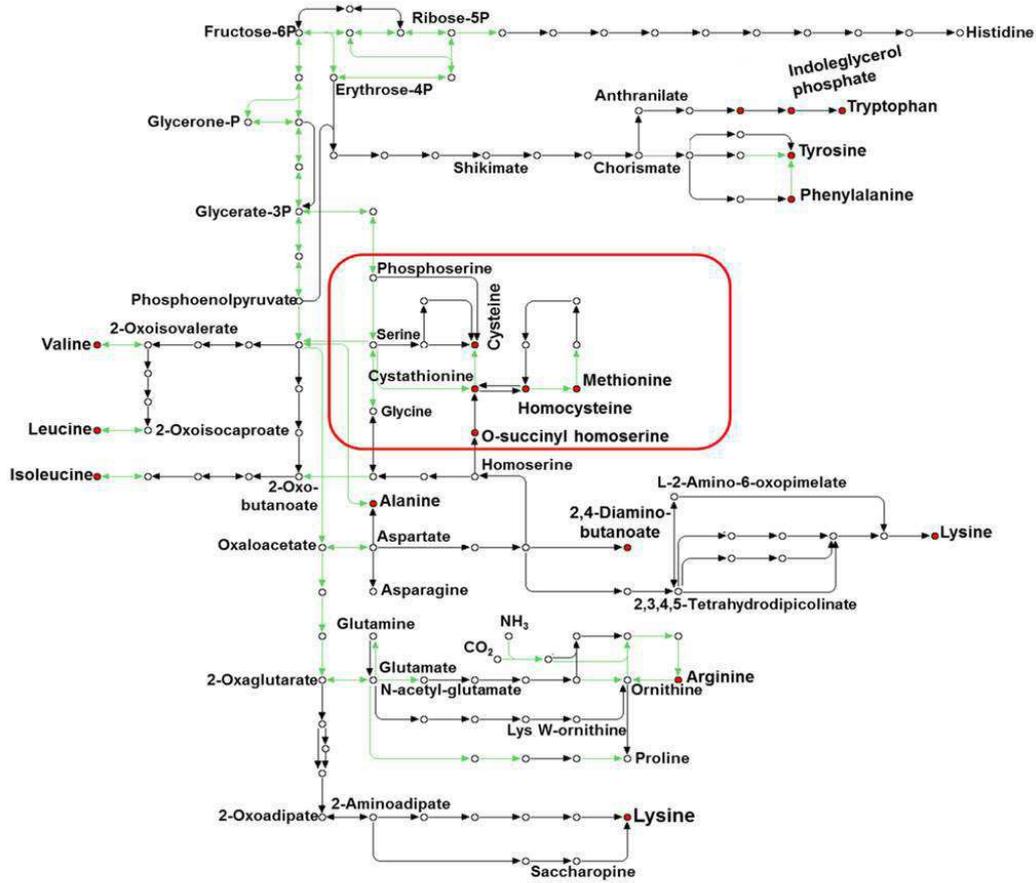


도면7



도면8

Biosynthesis of amino acids



01230 3/1/13
G1 Sciences Laboratories

도면9

