(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0094938
(43) 공개일자 2021년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0008810
(22) 출원일자 2020년01월22일
심사청구일자 2020년01월22일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
조호찬
대구광역시 수성구 지범로 21-3(두산동)
배윤위
대구광역시 달성군 다사읍 세천본길 45-11
박재형
대구광역시 수성구 들안로60길 7(수성동3가, 수성3가 화성파크드림 2단지)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 8 항

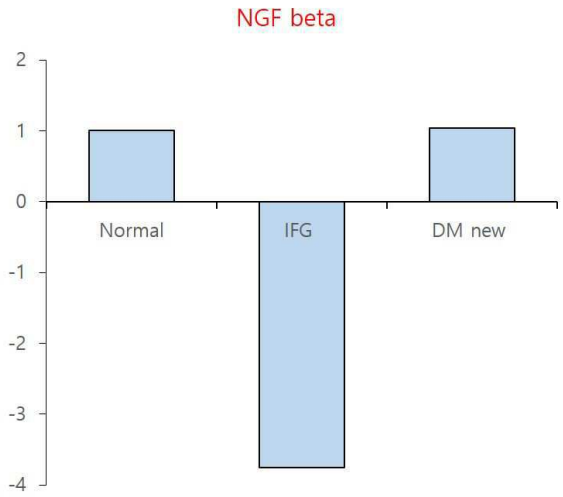
(54) 발명의 명칭 **당뇨 조기진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 당뇨 조기진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 당뇨 조기진단을 위한 NGF-β바이오마커, 상기 바이오마커를 이용한 당뇨 조기진단용 조성물, 진단 키트 및 당뇨 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 당뇨 조기 진단을 위한 NGF-β 바이오마커는 특이적으로 당뇨 전단계에서 정상개체에 비해 발현이 감소하는 것을 확인하였으므로, 당뇨 조기 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 33/6872 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/48 (2013.01)
G01N 2800/042 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HR18C0012
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성
연구과제명 다중진단칩 기반 당뇨병 및 당뇨병 합병증 이행예측
기 여 율 80/100
과제수행기관명 계명대학교 동산의료원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1D1A1B07043990
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원사업
연구과제명 망막 및 맥락막 변화와 유전체 및 바이오마커와의 연관성 확인을 통한 당뇨병성 안병증의 조기진단 방법 구축 및 예측지표 개발
기 여 율 20/100
과제수행기관명 계명대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

NGF-β(Nerve Growth Factor-beta)를 포함하는 당뇨 조기진단용 바이오마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당뇨는 제2형 당뇨인 것을 특징으로 하는 당뇨 조기진단용 바이오마커.

청구항 3

NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨 조기진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 NGF-β의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 당뇨 조기진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 NGF-β의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨 조기진단용 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는 당뇨 조기진단용 키트.

청구항 7

(a) 환자의 생물학적 시료로부터 NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 정상개체 시료와 비교하는 단계;

를 포함하는 당뇨 조기진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 당뇨 조기 진단을 위한 정보 제공 방법은 NGF-β의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 정상개체에 비해 감소하면 당뇨 초기 단계라고 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨 조기진단을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당뇨 조기진단을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 당뇨 조기진단을 위한 NGF-β바이오마커, 상기 바이오마커를 이용한 당뇨 조기진단용 조성물, 진단 키트 및 당뇨 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨병(糖尿病; diabetes mellitus)은 인슐린 분비 또는 인슐린 작용의 결함에 의해 나타나는 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환으로 인슐린이 부족하거나 표적세포에서 인슐린의 생물학적 효과가 감소됨으로써 발생하게 되어 장기간 지속됨으로써 신부전과 같은 합병증을 동반하는 만성 퇴행성 질환이다.

[0004] 특히, 제2형 당뇨병은 운동부족, 비만 또는 스트레스 등에 의한 후천적 요인으로 인슐린의 분비 조절은 원활하나 인슐린이 제기능을 하지 못하여 혈당 조절이 실패하는 경우 발생한다.

[0005] 현재 급속한 경제발전에 따른 식생활의 변화로 당뇨병 유병율은 해마다 증가하여 국내의 경우 약 5 ~ 10%에 달하고 있으며, 2005년 통계 기준으로 당뇨병 환자는 400만 명을 넘어서 인구 100명 중 83명이며, 2025년에는 약 680만 명으로 늘어날 것으로 추산된다(대한당뇨정보센터, 2005년) 당뇨병은 전 세계적으로 3번째로 심각한 질병이며 우리나라에서도 사망원인 4위의 질병이고 다양한 합병증으로 인해 수명이 5 ~ 10년 정도 단축되게 된다.

[0006] 이러한 급격한 유병률의 증가는 영양 상태의 개선과 운동의 부족 등 환경적 요인의 변화가 가장 주된 원인인 것으로 추정된다. 우리나라의 경우, 인슐린 비의존형의 제2형 당뇨 환자가 전체 당뇨 환자의 90-95%를 차지하고 있으며, 선진국뿐만 아니라 개발 도상국의 사람들도 점차 신체 활동은 줄고 비만은 늘어나면서, 제2형 당뇨병의 발생이 무서운 속도로 증가하고 있다. 기존의 당뇨병 진단에는 혈당 수치나 당화 혈색소의 수치로만 진단이 되지만, 이는 당뇨의 진행이 충분히 진행되고 나서의 임상학적 징후이므로 조기 진단의 도구로 쓰기는 힘들며, 하나의 혈액학적 수치로는 진단이 정확하다고 볼 수 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 당뇨 조기진단을 위한 민감도 및 특이성이 높은 혈액 단백질 마커를 발굴하기 위해 노력한 결과, NGF-β(Nerve Growth Factor-beta) 바이오마커를 선별하였으며, NGF-β의 경우 특이적으로 당뇨전단계에서 정상개체에 비해 발현이 감소하는 패턴을 보이는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 당뇨 조기진단을 위한 바이오마커를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커를 이용한 당뇨 조기진단용 조성물 또는 진단 키트를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오마커를 이용한 당뇨 조기진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위해,

[0015] 본 발명은 NGF-β(Nerve Growth Factor-beta)를 포함하는 당뇨 조기진단용 바이오마커를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨 조기진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 NGF-β의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 마커의 유전자

에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 NGF-β의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 당뇨 조기진단용 조성물을 포함하는 당뇨 조기진단용 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 (a) 환자의 생물학적 시료로부터 NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0025] (b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 정상개체 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 당뇨 조기진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준 측정은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩을 이용하여 수행할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정은 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 이용하여 수행할 수 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 단백질 발현 수준 측정은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDITOF(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LCMS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM), 병행 반응 모니터링(parallel reaction monitoring: PRM), sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution(SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 또는 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)을 이용하여 수행할 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 당뇨 조기 진단을 위한 정보 제공 방법은 NGF-β의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 정상개체에 비해 감소하면 당뇨 초기 단계라고 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 (b) 단계의 분석은 통계적 분석 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 있어서, 상기 통계적 분석 방법은 선형 또는 비선형 회귀 분석방법, 선형 또는 비선형 분류(classification) 분석방법, 로지스틱 회귀 분석방법(logistic regression), 분산분석(Analysis of Variance; ANOVA), 신경망 분석방법, 유전적 분석방법, 서포트 벡터 머신 분석방법, 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법, 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘 또는 커널 주성분(Kernel principal component) 분석방법, 마르코프 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법, 회귀 특성 소거(recursive feature elimination) 또는 엔트로피-기본 회귀 특성 소거 분석방법, 전방 플로팅 서치(floating search) 또는 후방 플로팅 서치(floating search) 분석방법, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 당뇨 조기 진단을 위한 NGF-β 바이오마커는 특이적으로 당뇨 전단계에서 정상개체에 비해 발현이 감

소하는 것을 확인하였으므로, 당뇨 조기 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자의 혈액에서 항체 어레이를 수행한 결과를 클러스터 및 히트맵으로 시각화한 데이터이다.

도 2는 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자의 혈액에서 NGF-β 발현 정도를 분석한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0038] 본 발명은 NGF-β(Nerve Growth Factor-beta)를 포함하는 당뇨 조기진단용 바이오마커에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨는 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 한다.

[0040] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 당뇨 조기진단, 당뇨 발명 여부를 확인하는 것이다.

[0041] 본 발명에서 사용된 용어 "진단용 바이오마커"란 정상 대조군(당뇨가 아닌 개체)에 비하여 당뇨 전단계를 가진 개체에서 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준의 유의적인 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩티드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함하며, 바람직하게는 NGF-β(Nerve Growth Factor-beta)이다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일구현예에서는, 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자의 혈액에서 항체 어레이를 수행한 결과를 클러스터 및 히트맵으로 시각화하였다 (도 1). 그 결과, NGF-β(Nerve Growth Factor-beta) 바이오마커를 선별하였으며, NGF-β의 경우 특이적으로 당뇨 전단계에서 정상에 비해 발현이 현저하게 감소하는 패턴을 확인하였다 (도 2).

[0043] 구체적으로, 정상인에 비해 NGF-β 발현이 3 내지 4배 감소하면 당뇨 조기 단계(당뇨 전단계)라고 진단 할 수 있으므로, 본 발명의 NGF-β 바이오마커는 당뇨 조기 진단에 활용할 수 있다.

[0045] 본 발명은 다른 관점에서, NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨 조기진단용 조성물에 관한 것이다.

[0046] 본 발명에 사용된 용어 "mRNA 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 당뇨 조기 진단을 위한 바이오마커의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNaseprotection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0047] 상기 NGF-β의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 NGF-β 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 프라이머쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 디자인할 수 있다.

[0048] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다.

[0049] 본 발명에서 사용된 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다.

[0050] 본 발명에서 사용된 용어 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 NGF-β의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0053] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 당뇨 조기 진단 또는 당뇨병성 합병증 진단을 위한 바이오마커로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 유전자의 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자 (nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0054] 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring: MRM), 병행 반응 모니터링(parallel reaction monitoring: PRM), sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution(SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 또는 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 바이오마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[0057] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 당뇨 조기진단용 조성물을 포함하는 당뇨 조기진단 용 키트에 관한 것이다.

[0058] 상기 키트는 당업계에 알려져 있는 통상의 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 키트는 예를 들면, 동결 건조 형태의 항체와 완충액, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0059] 상기 키트는 검출 가능한 표지를 더 포함할 수 있다. 용어 "검출 가능한 표지"는 표지가 없는 동일한 종류의 분자들 중에서 표지를 포함하는 분자를 특이적으로 검출하도록 하는 원자 또는 분자를 의미한다. 상기 검출 가능한 표지는 상기 단백질 또는 그의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자, 또는 압타머에 부착된 것일 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 방사종(radionuclide), 형광원(fluorophore), 효소(enzyme)를 포함할 수 있다.

[0060] 상기 키트는 당업계에 알려진 다양한 면역분석법 또는 면역염색법에 따라 이용될 수 있다. 상기 면역분석법 또는 면역염색법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석, 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 키트는 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(multiple reaction monitoring)인 것일 수 있다.

[0061] 또한, 상기 키트는 질량분석에 이용될 수 있다. 이 경우, 상기 단백질의 특정 아미노산 잔기는 미리스토일화(myristoylation), 이소프레닐화, 프레닐화, 글리피칸화(glypiation), 리포일화(lipoylation), 아실화, 알킬화, 메틸화, 탈메틸화, 아미드화, 유비퀴틴화, 인산화, 탈아미드화, 글리코실화, 산화, 또는 아세틸화 등과 같은 변형을 가질 수 있다.

[0063] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 환자의 생물학적 시료로부터 NGF-β의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0064] (b) 상기 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 정상개체 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 당뇨 조기진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

[0065] 상기 방법에서 "생물학적 시료(biological sample)"란 당뇨 발병에 의해 단백질 발현 수준 또는 유전자 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청을 의미한다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨 조기 진단을 위한 정보 제공 방법은 NGF-β의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 정상개체에 비해 감소하면 당뇨 초기 단계라고 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0067] 상기 (a) 단계의 mRNA 발현 수준 측정은 상기 mRNA 발현 수준 측정 또는 비교는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 본 발명은 이들에 제한되는 것이 아니며, 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.

[0068] 또한, 상기 (a) 단계의 단백질 발현 수준 측정은 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 이용하여 측정 및 비교할 수 있으며, 구체적인 내용은 상술한 바와 같다.

[0069] 상기 (b) 단계의 분석은 진단의 정확도를 향상시키기 위해 통계적 방법 또는 알고리즘을 사용하여 분석할 수 있으며, 선형 또는 비선형 회귀 분석방법, 선행 또는 비선형 분류(classification) 분석방법, 로지스틱 회귀 분석방법(logistic regression), 분산분석(Analysis of Variance; ANOVA), 신경망 분석방법, 유전적 분석방법, 서포트 벡터 머신 분석방법, 계층 분석 또는 클러스터링 분석방법, 결정 트리를 이용한 계층 알고리즘 또는 커널 주성분(Kernel principal component) 분석방법, 마르코프 블랭킷(Markov Blanket) 분석방법, 회귀 특성 소거(recursive feature elimination) 또는 엔트로피-기본 회귀 특성 소거 분석방법, 전방 플로팅 서치(floating search) 또는 후방 플로팅 서치(floating search) 분석방법, 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 분석방법을 이용할 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게, 상기 통계적 방법은 로지스틱회귀(logistic regression) 분석 방법을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0072] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0074] **환자 선정 및 혈액 채취**

[0075] 본 발명에서는 당뇨 조기 진단용 바이오마커를 선별하기 위해, 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자를 선별하여 환자의 혈액을 채취하였다. 총 43명의 환자를 선별하였으며, 환자의 임상적 특징은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0076] 환자의 임상정보

	Normal(16)	IFG(14)	DM(13) 신환
Age	54.00±2.73	66.43±4.64	59.31±9.20
height	158.41±5.32	154.82±6.11	156.76±5.70
weight	55.15±5.27	54.41±6.56	57.92±5.19
BMI	22.04±1.54	22.61±1.90	23.53±1.50
waist	74.58±5.57	78.38±4.69	82.50±5.70(10)
FBS	86.44±5.01	105.86±5.65	126.92±20.79
HbA1c	5.33±0.17	6.04±0.17	7.36±0.94
M/C ratio	-(0)	9.77±8.91	14.24±7.79

hypertension [1/0]	0/16	3/11	2/11
Hyperlipidemia[1/0]	0/16	2/12	5/8
Smoking[1/0]	0/16	0/14	0/13
Drinking[1/0]	3/13	0/14	1/12

[0077] 상기 표 1에서 괄호안의 숫자는 표본 수이며, "Normal"은 정상인, "IFG"는 당뇨 전단계, "DM 신환"은 당뇨 진단을 막 받은 당뇨치료제를 투약한 적이 없는 환자를 의미한다.

실 시 예 2

[0079] **당뇨 조기 진단을 위한 바이오마커 선별**

[0080] 2-1 : 단백질 분리

[0081] 1% 단백질 분해효소 억제제 칵테일(시그마, 미국) 및 1% 포스파타아제 억제제 칵테일(시그마, 미국)을 포함하는 단백질 추출 완충액(Fullmoon biosystems, 캐나다) 및 용해 비드(lysis beads, Fullmoon biosystems, 캐나다)를 이용하여 단백질을 추출하였다.

[0082] 추출한 단백질 용액을 항체 어레이 분석 키트(antibody array assay kit, Fullmoon biosystems, 캐나다)에 포함된 겔 매트릭스 컬럼을 사용하여 정제하였다. 컬럼은 5초 동안 볼텍싱 한 다음, 상온에서 60분 동안 수화 처리한 후, 컬럼은 750 × g에서 2분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 컬럼을 수집 튜브에 넣고 100 ㎕의 단백질 샘플을 컬럼에 첨가한 다음, 750 × g에서 2분 동안 원심분리하여 단백질을 정제하였다.

[0083] 정제된 샘플의 농도는 BCA 단백질 분석 키트(Pierce, 미국) 및 나노포토미터(NanoPhotometerTM, 임플렌, 영국)를 사용하여 측정하였으며, 정제된 샘플의 순도는 UV 스펙트럼으로 확인하였다.

[0085] 2-2 : 항체 어레이(Antibody array assay)

[0086] 50 ㎍의 단백질 샘플을 75 ㎕의 표지 완충액(labeling buffer)으로 채우고 3 ㎕의 10 ㎍/㎕ 비오틴/DMF 용액으로 처리하였다. 샘플을 혼합하고 90분 동안 상온에서 반응시켰으며, 반응 후 35 ㎕의 정지용액을 추가 혼합한 다음 30분 동안 실온에서 반응시켰다.

[0087] 항체 마이크로 어레이 슬라이드(antibody microarray slide, Fullmoon biosystems, 캐나다)를 페트리 접시 위에 넣고 30 ㎖의 블로킹용액(blocking solution)으로 처리한 다음, 실온에서 30분 동안 60 rpm으로 진탕기에서 배양하고 증류수로 세척하였으며, 이를 3번 반복하였다. 블로킹 후 슬라이드를 Milli-Q 등급의 물로 세척하였다.

[0088] 표지된 샘플을 6 ㎖의 커플링 용액으로 혼합한 후, 혼합된 커플링 혼합액을 블로킹 슬라이드 에 처리한 후, 5분 동안 60 rpm으로 진탕기에서 반응시켰다. 커플링 후, 슬라이드를 30 ㎖의 세척용액으로 60 rpm 진탕기에서 5분 동안 세척하였으며, 이를 6회 반복하였다. 마지막으로 슬라이드를 Milli-Q 등급의 물로 세척하였다.

[0089] 30 ㎕의 0.5 ㎎/㎖ Cy3- 스트렙트아비딘(Cy3-streptavidin, GE Healthcare, 영국)을 30 ㎖의 검출 용액을 혼합한 다음, 상기 커플링된 어레이 슬라이드에 처리하고, 60 rpm 진탕기에서 20분 동안 반응시켰다. 검출 반응 후, 슬라이드에 30 ㎖의 세척용액을 처리하고 60rpm 진탕기에서 5분 동안 세척하였으며, 이를 6회 반복하였다. 마지막으로 슬라이드를 Milli-Q 등급의 물로 세척하였다.

[0091] 2-3 : 항체 어레이 데이터 수집 및 분석

[0092] 슬라이드 스캔은 GenePix 4100A 스캐너(Axon Instrument, 미국)를 사용하여 수행하였다. 스캐닝 전에 슬라이드를 완전히 건조시키고 24 ~ 48시간 내에 스캔하였다. 슬라이드는 10 ㎛ 해상도, 최적의 레이저 출력 및 PMT로 스캔하였다. 스캔 이미지를 수득한 후, GenePix 7.0 소프트웨어(Axon Instrument, 미국)로 그리드화(grided) 및 정량화 하였다.

[0093] 수치 데이터는 Genowiz 4.0TM(Ocimum Biosolutions, 인도)를 사용하여 분석하였으며, 분석 후, 단백질 정보에

대한 데이터는 UniProt DB를 사용하여 주석을 달았다.

[0095] 2-4 : 클러스터링 히트맵 시각화

[0096] MeV 4.9.0.을 사용하여 샘플 및 유전자 클러스터링을 수행하였다. 계층적 군집 분석은 평균 연계를 통한 거리 측정으로서 유클리드 거리 상관관계(Euclidean distance correlation)를 사용하여 수행하였다. 클러스터 및 히트맵은 MeV 4.9.0.을 이용하여 시각화 하였다 (도 1).

[0098] 2-5 : 바이오마커 선별

[0099] 상기와 같이 정규화된 데이터를 바탕으로 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자를 비교하여 배수변화값(fold change)을 구하고, 당뇨전단계나 당뇨에서 특이한 패턴을 보이는 마커를 선별하였다.

[0100] 그 결과, NGF-β(Nerve Growth Factor-beta) 바이오마커를 선별하였다.

실 시 예 3

[0102] **NGF-β의 발현정도 비교 분석**

[0103] 본 발명에서는 실시예 2에서 정규화된 데이터를 바탕으로 정상인, 당뇨 전단계 및 당뇨 환자로 나누어 NGF-β의 발현 정도를 배수변화값을 바탕으로 비교 분석하였다.

표 2

[0105] NGF-β의 발현정도 비교

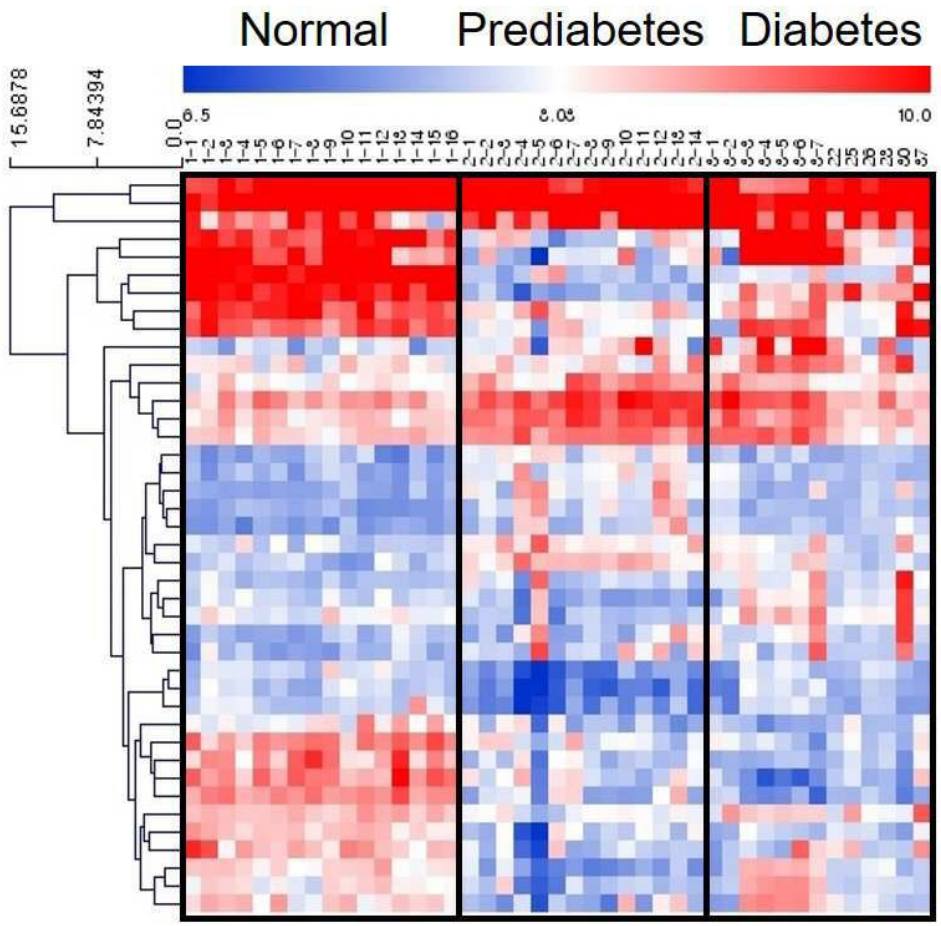
	Normal (정상)	IFG (당뇨전단계)	DM (당뇨)
Fold change	1	-3.75	1.04

[0106] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, NGF-β의 경우 특이적으로 당뇨 전단계에서 정상에 비해 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 구체적으로, 정상인에 비해 NGF-β 발현이 3 내지 4배 감소하면 당뇨 조기 단계(당뇨 전단계)라고 진단할 수 있는 것을 확인하였다.

[0107] 따라서, 본 발명의 NGF-β 바이오마커는 당뇨 조기 진단에 활용할 수 있다.

도면

도면1



도면2

