

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0124941  
(43) 공개일자 2022년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0028691

(22) 출원일자 2021년03월04일

심사청구일자 2021년03월04일

(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 교학로 13(만촌동, 만촌3차 화  
성파크드림)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

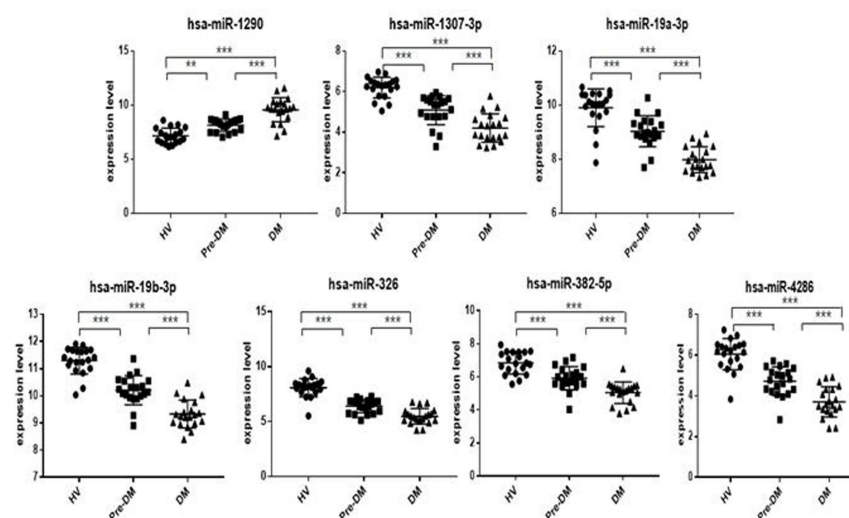
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 바이오마커 및 이의 용도

## (57) 요약

본 발명은 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증의 발병 예측을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 7개의 마이크로RNAs 중 선택되는 어느 하나 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물 및 키트, 상기 마커를 이용하여 당뇨 전단계를 진단하거나 당뇨 합병증의 발병을 예측하는 방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 정상군, 당뇨 전단계 환자군, 당뇨 환자군의 혈액에서 분리한 엑소좀(exosome) 내에 포함된 microRNA를 분석한 결과, 당뇨 전단계 환자군에서 특이적인 7개의 마이크로RNAs를 동정하였다. 이에, 상기 동정된 마이크로RNAs를 이용하여 당뇨 전단계를 조기에 진단할 수 있어 조기 당뇨의 진단이 가능하고, 이후 당뇨 또는 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 바이오마커로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 1465031001                     |
| 과제번호        | HR18C0012                      |
| 부처명         | 보건복지부                          |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                      |
| 연구사업명       | 연구중심병원육성R&D                    |
| 연구과제명       | 다중진단칩 기반 당뇨병 및 합병증 이행 예측 모델 개발 |
| 기 여 율       | 1/1                            |
| 과제수행기관명     | 계명대학교 동산의료원                    |
| 연구기간        | 2020.01.01 ~ 2020.12.31        |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 마커 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

#### 청구항 3

마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 체제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 5

제3항에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현수준을 측정하는 체제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 6

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

#### 청구항 7

피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 전단계 진단을 위한 정보제공방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 방법은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

#### 청구항 9

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀(exosome)인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

#### 청구항 10

제7항에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

#### 청구항 11

마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 마커 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

#### 청구항 13

마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 키트.

#### 청구항 17

피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 정보제공방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서,

상기 방법은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

#### 청구항 19

제17항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀(exosome)인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

## 청구항 20

제17항에 있어서,

상기 마이크로RNA의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증의 발병 예측을 위한 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 7개의 마이크로RNAs 중 선택되는 어느 하나 이상의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물 및 키트, 상기 마커를 이용하여 당뇨 전단계를 진단하거나 당뇨 합병증의 발병을 예측하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0002] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다. 국내 기준 65세 이상 인구 다섯 명 중 한 명이 당뇨로 조사되었으며, 당뇨 전단계로 불리는 공복 혈당 장애까지 합치면 노년 인구의 절반(47.4%)이 당뇨이거나 당뇨병 임박으로 집계되었다. 또한 국내 30대 이상 성인 10명 중 2명(20%)이 당뇨 전단계 환자로 당뇨병 환자(12.4%)의 2배에 가까운 잠재 집단이 있는 것으로 집계되어 당뇨 환자는 더욱더 늘어날 것으로 예측된다. 당뇨병은 심장병 뇌졸중 등 거의 모든 심혈관 질환 발생의 방아쇠 역할을 하며, 투석 생활을 해야하는 만성 신부전증이나 실명을 유발하는 망막 질환의 최대원인이므로 이에따른 심각성이 대두되고 있다.
- [0003] 한편, 당뇨 전단계(Pre-diabetes)는 혈당 수준이 정상인과 당뇨 환자 사이에 있는 단계로, 공복혈당 기준으로 정상은 99mg/dL 이하, 당뇨병은 126mg/dL 이상이며 그 사이 구간, 즉 100~125mg/dL를 당뇨 전단계로 구분하고 있다. 당뇨 전단계는 당뇨라고 명확히 진단할 수는 없지만 당뇨로 발전할 수 있는 확률은 정상인보다 5배에서 최대 17배 정도나 높은 것으로 알려져 있다.
- [0004] 기존에 알려져 있는 당뇨 전단계 마커로는 당뇨진단에 쓰이는 HbA1C, fructosamin, glycated albumin 등이 사용되고 있는데(Metab Syndr Relat Disord. 2014 Jun 1; 12(5): 258-268.), 이는 당뇨 전단계 특이적인 마커가 아니므로 특이성이나 민감도가 떨어지고 특정 임상적인 조건(acute and intermittent hyperglycemia)에서는 당뇨 전단계 진단이 불가능한 경우도 있어 당뇨 전단계 특이적인 마커에 대한 연구가 미미하다.
- [0005] 현재 당화혈색소, 당부하검사, 공복 및 임의혈당 검사 결과를 통해 당뇨병을 진단할 수는 있으나, 정상 및 당뇨 전단계가 당뇨병으로 이행될 위험도를 미리 예측할 수 있는 방법은 아직까지 연구되지 않았으며, 새로운 당뇨병 진단, 예측 바이오마커의 수립으로 당뇨병 발생 위험도를 예측할 수 있으며, 기존에 알려진 miRNA 뿐만 아니라 small RNA들의 당뇨 진행단계에 따른 변화를 생물정보학 방법을 통해 분석함으로써 당뇨병 또는 이로인한 합병증을 예방하기 위한 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0006] 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 정상군, 당뇨 전단계 환자군, 당뇨 환자군에 해당하는 대상자들로부터 혈액을 채취하고 이로부터 엑소좀(exosome) RNA를 분리한 후 NGS 분석을 통해 엑소좀 microRNA의 발현수준을 비교분석한 결과, 당뇨 전단계 환자군에서 당뇨 발생 위험 지표로 사용되거나 당뇨 합병

증 발병 예측에 용이한 당뇨 조기진단 바이오마커를 발견하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

- [0007] 이에, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 전 단계 진단용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 전단계 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 당뇨 합병증 발병 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 마커 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 마이크로RNA의 발현수준을 측정하는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 당뇨 전단계 진단용 조성물을 포함하는, 당뇨 전단계 진단용 키트를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 전단계 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일구현예로, 상기 방법은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀(exosome)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 마이크로RNA의 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation

sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 측정될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물을 포함하는, 당뇨 합병증 발병 예측용 키트를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0029] 본 발명자들은 정상군, 당뇨 전단계 환자군, 당뇨 환자군의 혈액에서 분리한 엑소솜(exosome) 내에 포함된 microRNA를 분석한 결과, 당뇨 전단계 환자군에서 특이적인 7개의 마이크로RNAs를 동정하였다. 이에, 상기 동정된 마이크로RNAs를 이용하여 당뇨 전단계를 조기에 진단할 수 있어 조기 당뇨의 진단이 가능하고, 이후 당뇨 또는 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 바이오마커로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 정상군(HV) 및 당뇨 전단계(Pre-DM) 대상자들의 혈장에서 분리한 엑소솜 내 microRNAs의 발현수준을 비교분석한 결과로서, 도 1a는 정상군에 비해 당뇨 전단계에서 유의적으로 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소 또는 증가한 microRNAs의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, 도 1b는 상기에서 검출된 microRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과이다.

도 2는 당뇨 전단계(Pre-DM) 및 당뇨군(DM) 대상자들의 혈장에서 분리한 엑소솜 내 microRNAs의 발현수준을 비교분석한 결과로서, 도 2a는 당뇨 전단계군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소 또는 증가한 microRNAs의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, 도 2b는 상기에서 검출된 microRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과이다.

도 3은 정상군(HV) 및 당뇨군(DM) 대상자들의 혈장에서 분리한 엑소솜 내 microRNAs의 발현수준을 비교분석한 결과로서, 도 3a는 정상군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소 또는 증가한 microRNAs의 발현수준에 따른 계층적 클러스터링을 수행한 히트맵 결과이고, 도 3b는 상기에서 검출된 microRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과이다.

도 4는 상기 도 1 내지 도 3의 결과를 바탕으로 정상군(HV), 당뇨 전단계(Pre-DM) 및 당뇨군(DM)에 대하여 다차원척도법(MDS) 분석을 실시한 결과이다.

도 5는 정상군(HV), 당뇨 전단계(Pre-DM) 및 당뇨군(DM) 간의 마이크로RNAs(miRNAs)의 발현수준을 측정하여 비교한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명자들은 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측을 위한 바이오마커를 발굴하기 위해 예의 연구한 결과, 당뇨 전단계에서 특이적인 발현 변화를 나타내는 바이오마커를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0032] 이에, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)을 포함하는 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 마커 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 마커 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명은 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는, 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 키트



를 제공한다.

- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨 전단계 진단용 또는 당뇨 합병증 발병 예측용 조성물은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “진단(diagnosis)”이란 넓은 의미로는 환자의 병의 실태를 모든 면에 걸쳐서 판단하는 것을 의미한다. 판단의 내용은 병명, 병인, 병형, 경중, 병상의 상세한 양태, 및 합병증의 유무 등이다. 본 발명에서 진단은 당뇨 전단계의 진행 수준 등을 판단하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어, “발병 예측(predict development)”이란 특정 개인에 대하여 당뇨 합병증이 발병할 가능성이 있는지, 발병할 가능성이 상대적으로 높은지, 또는 당뇨 합병증이 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 말한다. 본 발명에서의 예측은 당뇨 전단계 마커의 발현 여부를 기반으로 당뇨 합병증의 발병 위험도를 예측하는데 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, “당뇨 전단계(Pre-diabetes)”는 혈당 수준이 정상인과 당뇨 환자 사이에 있는 단계로, 공복혈당 기준으로 정상은 99mg/dL 이하, 당뇨병은 126mg/dL 이상이며 당뇨 전단계는 그 사이 구간, 즉 100~125mg/dL의 공복혈당을 나타내는 단계를 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, “당뇨 합병증(diabetic complications)”은 당뇨로 인해 발생하는 다양한 병증으로, 당뇨성 망막증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증 또는 당뇨성 혈관 합병증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명자들은 실시예를 통해 당뇨 전단계 진단용 바이오마커로써 상기 마이크로RNA 1290(microRNA-1290), 마이크로RNA 4286(microRNA-4286), 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)를 발굴하였다.
- [0041] 보다 구체적으로, 본 발명의 일실시예에서는 정상군, 당뇨 전단계군, 당뇨군에 해당하는 대상자들을 모집하고 이들의 혈액에서 엑소좀을 분리하여 엑소좀 내 miRNA의 발현수준을 비교분석하였다(실시예 1 참조).
- [0042] 본 발명의 다른 실시예에서는, 각각 (1) 정상군 및 당뇨 전단계군, (2) 당뇨 전단계군 및 당뇨군, (3) 정상군 및 당뇨군에서 차이가 있는 microRNAs를 분석하였으며, microRNAs 발현수준 결과를 이용하여 다차원척도법으로 분석한 결과 2차원 상에서 정상군, 당뇨 전단계군, 당뇨군이 순차적인 패턴을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 정상에서 당뇨 전단계 및 당뇨로 갈수록 점점 증가(miR-1290)하거나 정상에서 당뇨 전단계 및 당뇨로 갈수록 점점 감소(miR-1307-3p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-326, miR-382-5p, miR-4286)하는 miRNAs를 최종적으로 선별하였다. 선별된 miRNAs는 실제로 정상군과 당뇨 전단계군 간에 유의한 발현 차이를 나타내는 것을 확인하였다(실시예 2-1 내지 2-4 참조).
- [0043] 상기 결과로부터, 본 발명에서 발굴한 마이크로RNA 1290(microRNA-1290), 마이크로RNA 4286(microRNA-4286), 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)는 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 바이오마커로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 발굴한 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증의 발병 예측용 바이오마커인 마이크로RNA 1290(microRNA-1290), 마이크로RNA 4286(microRNA-4286), 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)는 하기 [표 1]에 도시된 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

표 1

| miRNA           | 서열                               |
|-----------------|----------------------------------|
| hsa-miR-1290    | uggauuuuuggaucagggga (서열번호 1)    |
| hsa-miR-1307-3p | acucggcguggcgucggucgug (서열번호 2)  |
| hsa-miR-19a-3p  | ugugcaaaucuaugcaaaacuga (서열번호 3) |
| hsa-miR-19b-3p  | ugugcaaauccaugcaaaacuga (서열번호 4) |
| hsa-miR-326     | ccucuggggcccuuccuccag (서열번호 5)   |



|                |                               |
|----------------|-------------------------------|
| hsa-miR-382-5p | gaaguuguucguggggaucg (서열번호 6) |
| hsa-miR-4286   | acccacuccugguacc (서열번호 7)     |

- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로RNA 1290(microRNA-1290), 마이크로RNA 4286(microRNA-4286), 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 마이크로RNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기 쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0050] 본 발명의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.
- [0051] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl<sub>2</sub>를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290) 및 마이크로RNA 4286(microRNA-4286)의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨 전단계 진단 또는 당뇨 합병증의 발병을 예측하기 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 정보제공방법은 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 및 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨 등을 포함할 수 있고, 보다 바람직하게는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 방법에 따라 피검자 유래 시료에서 분리한 엑소좀 내에서 마이크로RNA 1290(microRNA-1290)의 발현수준이 정상인 보다 높을 경우 당뇨 전단계로 판정할 수 있고, 마이크로RNA 4286(microRNA-4286), 마이크로RNA 1307-3p(microRNA-1307-3p), 마이크로RNA 19a-3p(microRNA-19a-3p), 마이크로RNA 19b-3p(microRNA-19b-3p), 마이크로RNA 326(microRNA-326) 또는 마이크로RNA 382-5p(microRNA-382-5p)의 발현수준이 정상인 보다 낮을 경우 당뇨 전단계로 판정할 수 있다.
- [0057] 상기 microRNAs의 발현수준은 당업계에서 알려진 통상적인 방법으로 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 또는 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] [실시예]

[0063] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**

[0064] **1-1. 분석 대상 모집**

[0065] 본 발명자들은 당뇨 전단계의 조기 진단 또는 당뇨병 관련 합병증의 발병을 예방하기 위한 바이오마커를 발굴하기 위해, 각각 정상군(HV, 공복혈당 95이하, HbA1c 5.5 이하) 20명, 당뇨-전단계군(Pre-DM, 공복혈당 100-125, HbA1c 5.8-6.3 이하) 20명 및 당뇨군(DM, HbA1c 6.5 이상) 20명의 대상자들을 모집하였다. 이때 각 군을 나누는 기준은 미국 당뇨병 학회 기준을 참고하였으며, 환자군간 구분을 명확히 하여 좀 더 정확한 마커를 찾기 위해 경계부분을 제외한 새로운 기준을 적용하였다 (미국 당뇨병 학회 기준 ; 정상 (공복혈당 100미만, HbA1c 5.7 미만) 당뇨 전단계 (공복혈당 100-125, HbA1c 5.8-6.4) 당뇨 (공복혈당 126이상, HbA1c 6.5 이상)). 상기 정상군, 당뇨-전단계군, 당뇨군으로부터 혈장 샘플을 채취하여 그룹 간 차이를 나타내는 생체지표를 찾고자 하였다. 이를 위해, 상기 각 군의 대상자들로부터 혈장을 제공받았다.

[0067] **1-2. 혈장으로부터 RNA 분리 및 서열분석 수행**

[0068] 상기 실시예 1-1에서 각 군의 대상자들로부터 채취한 혈장 샘플에 대하여 Exoquick(SBI, USA)을 사용해 엑소좀(exosome)을 분리하였고, 상기 분리된 엑소좀으로부터 Qiagen miRNeasy kit을 이용하여 총 RNA를 추출하였으며, 추출된 총 RNA의 질은 Agilent RNA Bioanalyzer를 이용해 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0069] 이후 상기 분리된 RNA를 이용하여 마크로젠사에서 Takara SMARTer smRNA for illumina kit를 사용하여 라이브러리를 제작한 후 Hiseq 2500으로 차세대 염기서열 분석(NGS)을 실시하여 microRNA를 검출하였다.

[0071] **실시예 2. 당뇨 전단계 진단용 microRNA 발굴**

[0072] **2-1. 정상군 vs. 당뇨 전단계의 발현수준에 차이가 있는 microRNA 분석**

[0073] 먼저, 본 발명자들은 상기 정상군 20명과 당뇨 전단계 20명의 혈액 유래 엑소좀에서 발현수준의 차이가 나는 microRNA(miRNA)를 동정하기 위하여, 상기 실시예 1-1 및 1-2의 방법에 따라 각 대상자들에서 채취한 혈장으로부터 엑소좀을 분리하고 추출된 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 486개의 miRNAs가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNAs의 발현수준을 비교하였다.

[0074] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이 486개의 miRNAs 중에 정상군(HV)에 비해 당뇨 전단계 (Pre-DM)에서 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소하는 miRNA가 82개, 발현이 증가하는 miRNA가 39개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과를 도 1b에 나타내었다.

[0076] **2-2. 당뇨 전단계 vs. 당뇨군의 발현수준에 차이가 있는 microRNA 분석**

[0077] 상기 결과에 더하여, 본 발명자들은 상기 당뇨 전단계 20명과 당뇨군 20명의 혈액 유래 엑소좀에서 발현수준의 차이가 나는 miRNA를 동정하기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 얻은 엑소좀 내 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 486개의 miRNA가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNAs의 발현수준을 비교하였다.

[0078] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 486개의 miRNAs 중에 당뇨 전단계에 비해 당뇨군에서 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소하는 miRNA가 28개, 발현이 증가하는 miRNA가 47개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과를 도 2b에 나타내었다.

### 2-3. 정상군 vs. 당뇨병군의 발현수준에 차이가 있는 miRNA 분석

또한, 본 발명자들은 정상군 20명과 당뇨병군 20명의 혈액 유래 엑소솜에서 발현수준의 차이가 나는 miRNA를 동정하기 위하여, 상기와 동일한 방법으로 얻은 엑소솜 내 총 RNA에 대한 NGS 분석을 실시하였다. 분석 결과 486개의 miRNAs가 검출되었으며, 나아가 상기 검출된 miRNAs의 발현수준을 비교하였다.

그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이 486개의 miRNAs 중에 정상군(HV)에 비해 당뇨병군(DM)에서 2배 이상( $p < 0.05$ ) 발현이 감소하는 miRNA가 139개, 발현이 증가하는 miRNA가 103개로 나타났다. 또한, 상기 유의한 발현 변화를 보이는 miRNAs의 발현수준에 따른 산점도(scatter plot) 결과를 도 3b에 나타내었다.

### 2-4. 정상군 vs. 당뇨 전단계 vs. 당뇨병군의 발현수준에 차이가 있는 miRNA 분석

나아가 정상군, 당뇨 전단계 및 당뇨병군에 대하여 다차원적도법(MDS)을 통해 개별 샘플에 대한 변화량을 도출하여 이를 시각화하여 분석하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 정상군과 당뇨병군에서 각각 나타나는 2차원상의 공간적 위치가 두개의 그룹으로 확연하게 구분되어 나타났으며, 대체적으로 정상군, 당뇨 전단계 및 당뇨병군이 순차적인 패턴을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 상기 실시예 2-1 내지 2-3의 결과를 통해 얻은 분석 결과로서, 발현수준의 변화가 나타나는 miRNAs를 분류하였으며, 구체적으로 하기 [표 2]에 나타난 바와 같이, 정상에서 당뇨 전단계 및 당뇨로 갈수록 점점 증가(miR-1290)하거나 정상에서 당뇨 전단계 및 당뇨로 갈수록 점점 감소(miR-1307-3p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-326, miR-382-5p, miR-4286)하는 miRNAs를 최종적으로 선별하였다.

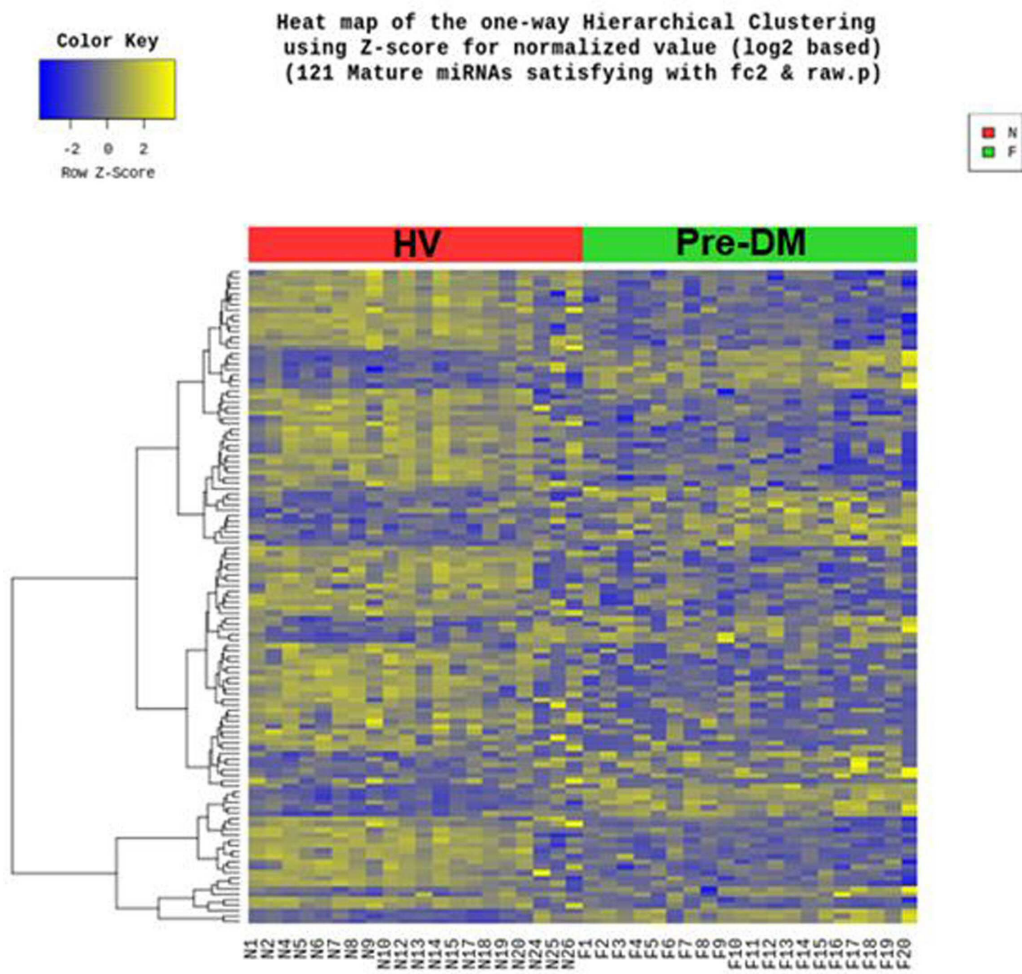
표 2

| MaturemiRNA     | Fold change |           |        | ANOVA |
|-----------------|-------------|-----------|--------|-------|
|                 | Pre-DM/HV   | DM/Pre-DM | DM/HV  |       |
| hsa-miR-326     | -5.09       | -2.38     | -12.13 | ***   |
| hsa-miR-4286    | -3.50       | -2.84     | -9.94  | ***   |
| hsa-miR-19b-3p  | -2.68       | -2.39     | -6.39  | ***   |
| hsa-miR-1307-3p | -2.62       | -2.35     | -6.15  | ***   |
| hsa-miR-382-5p  | -2.34       | -2.53     | -5.94  | ***   |
| hsa-miR-19a-3p  | -2.28       | -2.94     | -6.68  | ***   |
| hsa-miR-1290    | 2.46        | 4.92      | 12.08  | ***   |

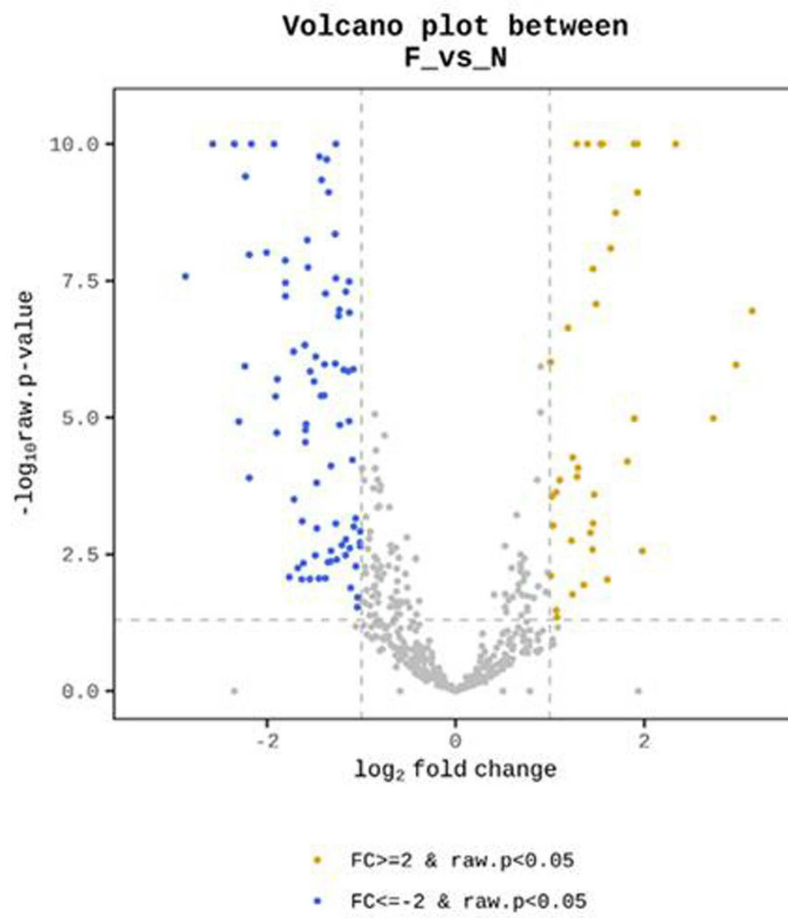
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1a



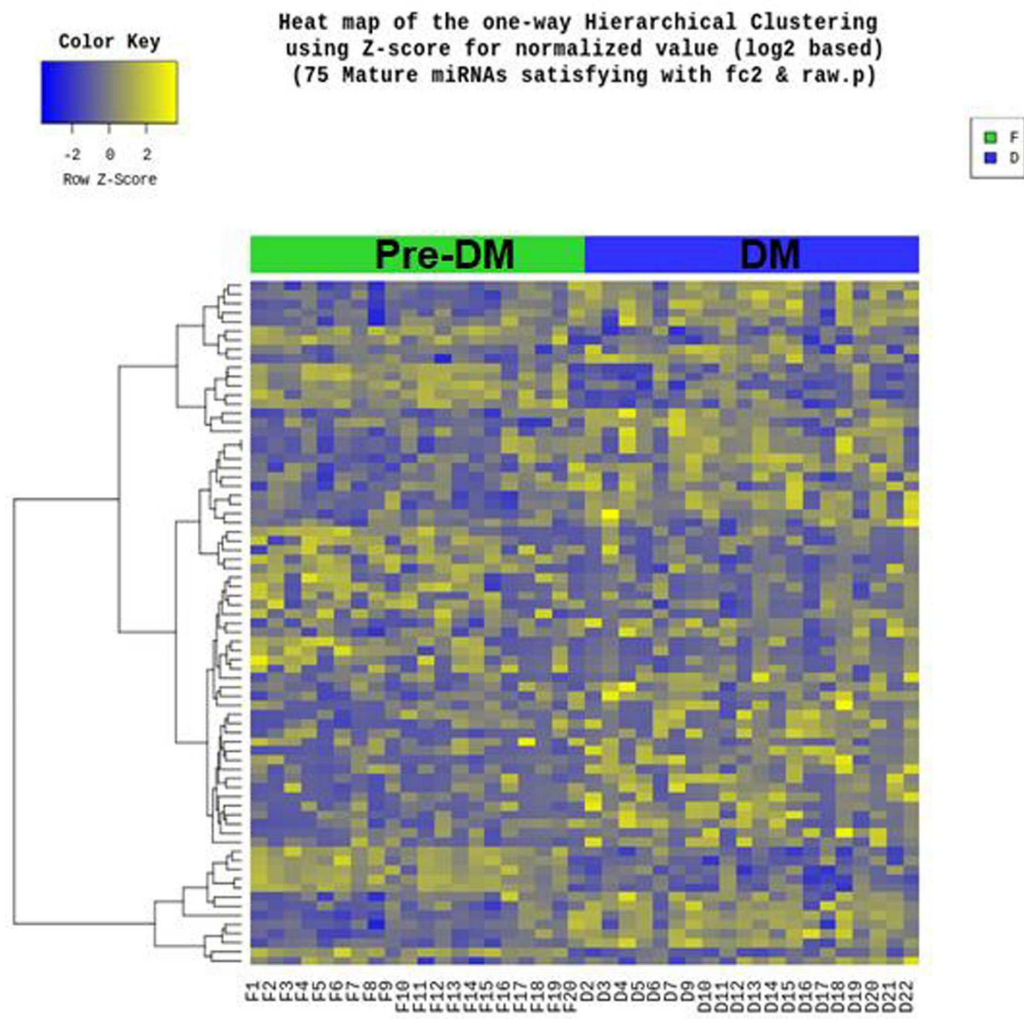
도면1b



N (HV) F (Pre-DM)

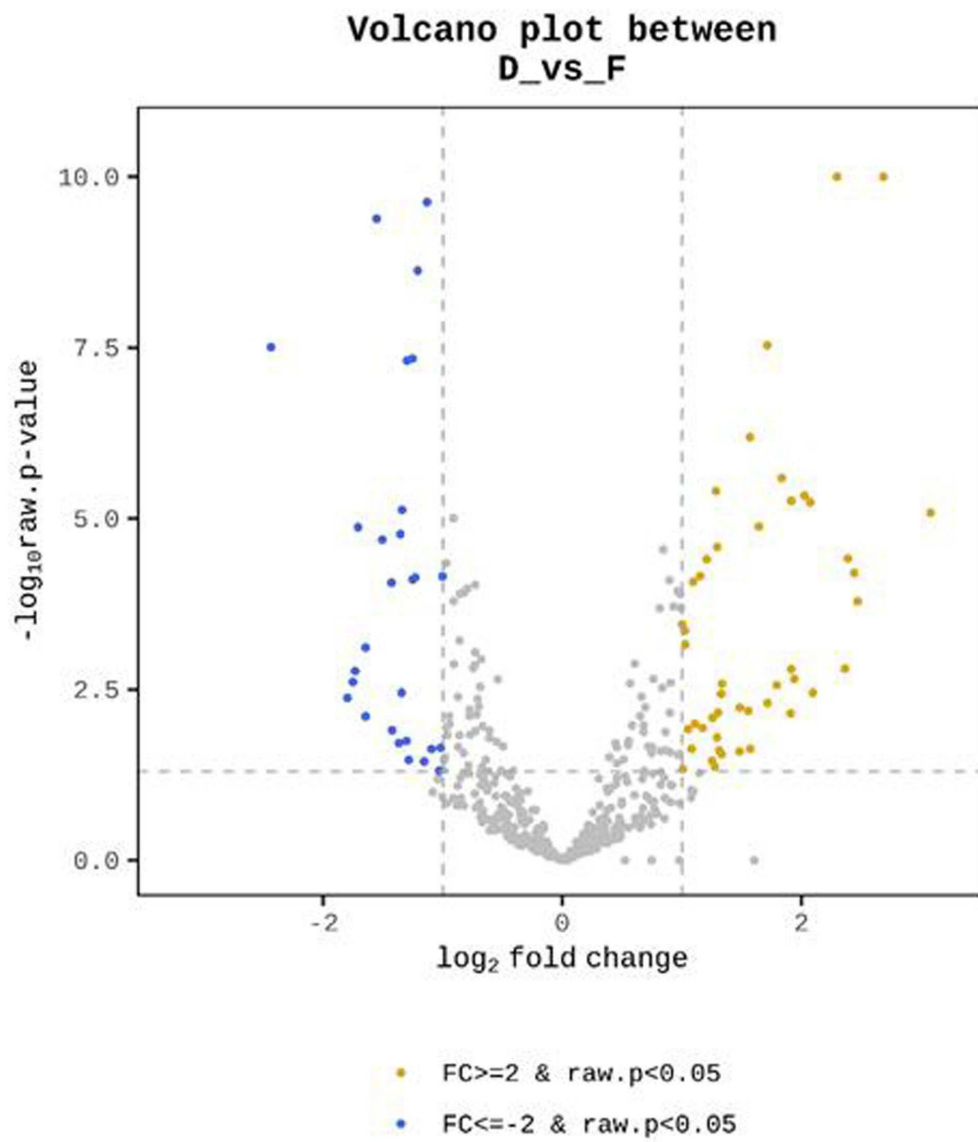


도면2a



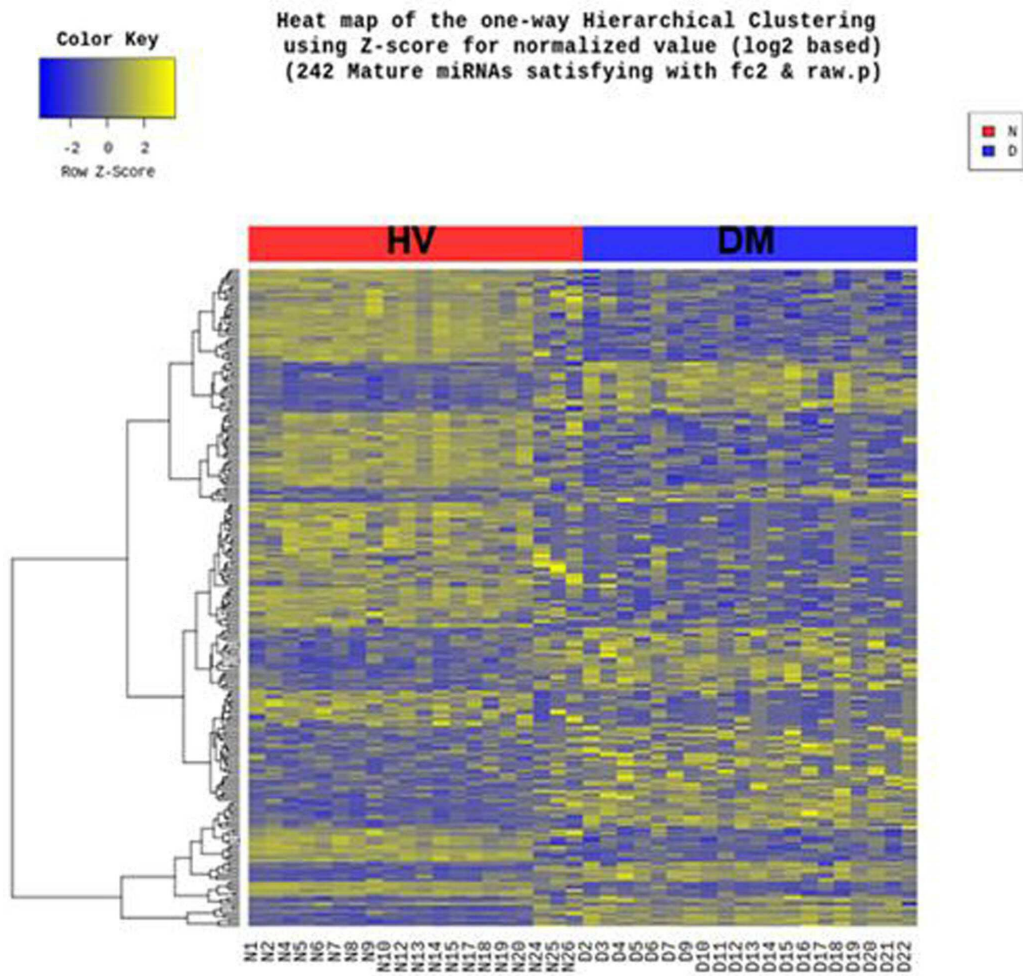


도면2b

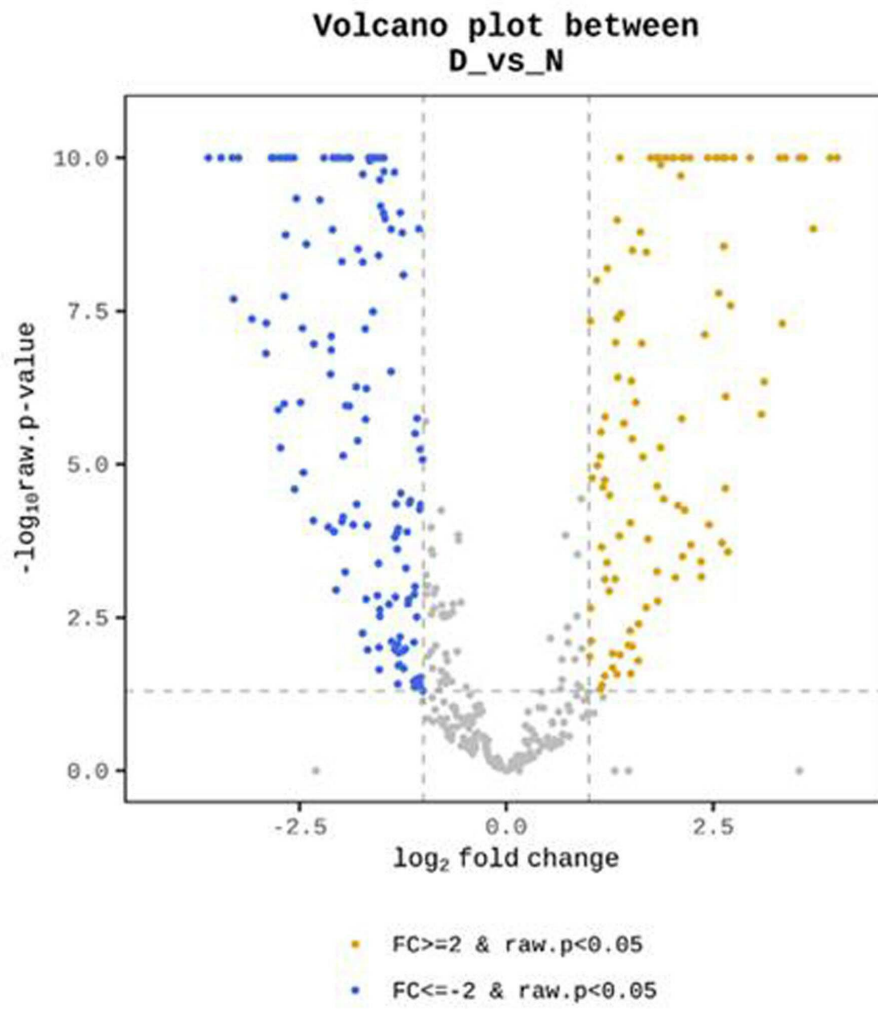


F (Pre-DM) D (DM)

도면3a

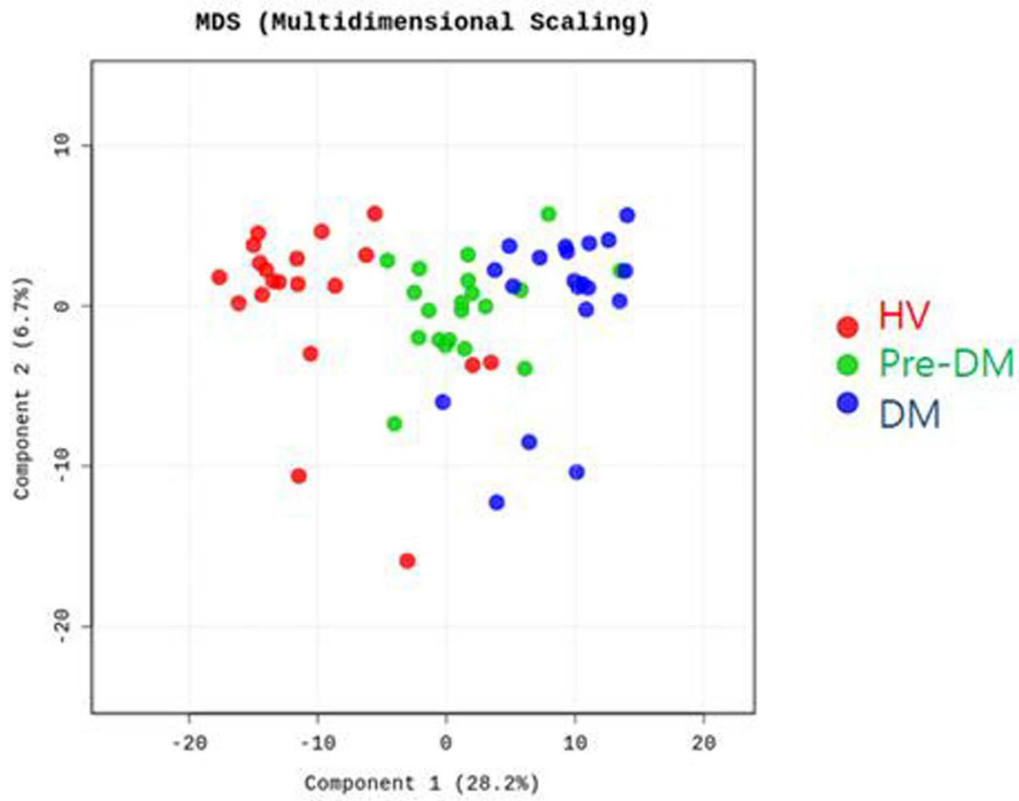


도면3b

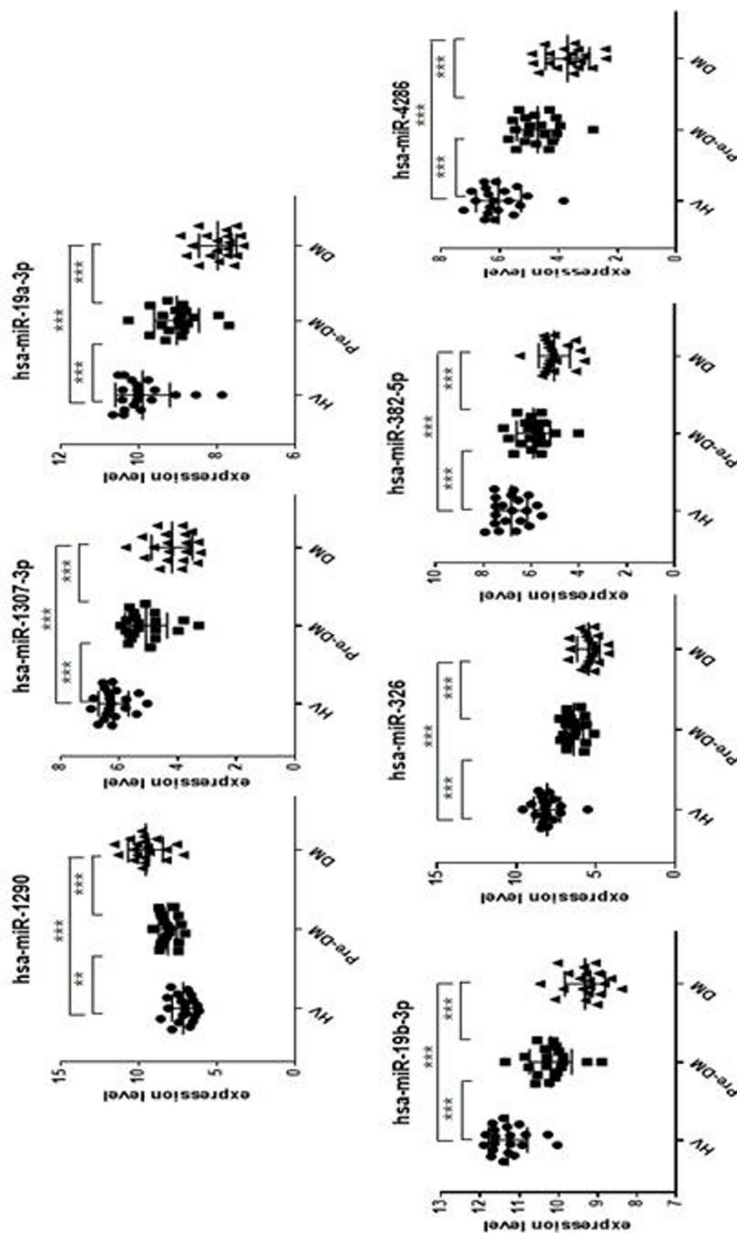


N (HV) D (DM)

도면4



## 도면5



## 서열목록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> Biomarker for diagnosing pre-diabetes or predicting development of diabetic complications and use thereof
- <130> PD21-006
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA

|       |                           |    |
|-------|---------------------------|----|
| <213> | hsa-miR-1290              |    |
| <400> | 1                         |    |
|       | uggauuuuug gaucaggga      | 19 |
| <210> | 2                         |    |
| <211> | 22                        |    |
| <212> | RNA                       |    |
| <213> | hsa-miR-1307-3p           |    |
| <400> | 2                         |    |
|       | acucggcgug gcgucggucg ug  | 22 |
| <210> | 3                         |    |
| <211> | 23                        |    |
| <212> | RNA                       |    |
| <213> | hsa-miR-19a-3p            |    |
| <400> | 3                         |    |
|       | ugugcaaauc uaugcaaaac uga | 23 |
| <210> | 4                         |    |
| <211> | 23                        |    |
| <212> | RNA                       |    |
| <213> | hsa-miR-19b-3p            |    |
| <400> | 4                         |    |
|       | ugugcaaauc caugcaaaac uga | 23 |
| <210> | 5                         |    |
| <211> | 20                        |    |
| <212> | RNA                       |    |
| <213> | hsa-miR-326               |    |
| <400> | 5                         |    |
|       | ccucugggcc cuuccuccag     | 20 |
| <210> | 6                         |    |
| <211> | 22                        |    |
| <212> | RNA                       |    |
| <213> | hsa-miR-382-5p            |    |
| <400> | 6                         |    |
|       | gaaguuguuc gugguggauu cg  | 22 |



<210> 7  
<211> 17  
<212> RNA  
<213> hsa-miR-4286  
<400> 7

acccacucc ugguacc

17