

## (12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(10) 국제공개번호

WO 2017/003166 A1

(43) 국제공개일

2017년 1월 5일 (05.01.2017)

WIPO | PCT

## (51) 국제특허분류:

G01N 30/72 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

## (21) 국제출원번호:

PCT/KR2016/006937

## (22) 국제출원일:

2016년 6월 29일 (29.06.2016)

## (25) 출원언어:

한국어

## (26) 공개언어:

한국어

## (30) 우선권정보:

10-2015-0092428 2015년 6월 29일 (29.06.2015) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박영자 (PARK, Young Ja Hwang); 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511 고려대학교 세종캠퍼스 제 2 과학기술대학 102 호, Sejong (KR). 메드리안노칼엔젤로 (MEDRIANO, Carl Angelo); 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511 고려대학교 세종캠퍼스 약학대 실험동 403 호, Sejong (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5 층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 규칙 4.17에 의한 선언서:

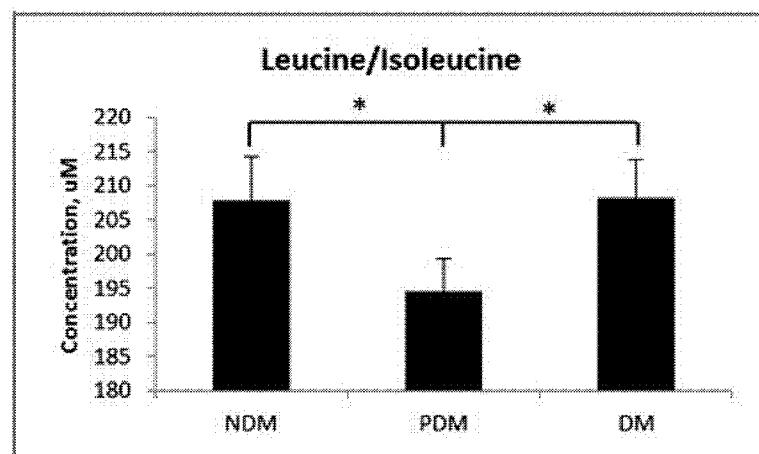
- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

## 공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR EARLY DIAGNOSIS OF DIABETES USING METABOLOME ANALYSIS

(54) 발명의 명칭 : 대사체 분석을 이용한 당뇨병 조기 진단용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for early diagnosis of diabetes using metabolome analysis and, more specifically, provides biomarkers which can diagnose the early stage of diabetes on the basis of concentration change of metabolome in blood by using metabolomics, and the biomarkers can be applied to leading materials for developing therapeutic agents of diabetes.

(57) 요약서: 본 발명은 대사체 분석을 이용한 당뇨병 조기 진단용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대사체학을 이용하여 혈액 내 대사체들의 농도 변화를 기반으로 초기 당뇨병을 진단할 수 있는 바이오마커를 제공하며, 이들은 당뇨병 치료제 개발을 위한 선도물질로 적용할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 대사체 분석을 이용한 당뇨병 조기 진단용 조성물 기술분야

[1] 본 발명은 혈액 내 대사체의 변화를 기반으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명을 지원한 국가연구개발사업은 보건복지부 질환극복기술개발사업으로서, 연구 과제번호 HI14C2686, 대사체 연구 기반 대사증후군 신규 바이오마커 발굴 및 임상적 유의성 확보사업이며, 주관기관인 고려대학교 산학협력단이 지원하였다.

#### 배경기술

[2] 소아 당뇨병이라 불리는 제1형 당뇨병과 달리, 제2형 당뇨병은 운동부족, 비만 또는 스트레스 등에 의한 후천적 요인으로 인슐린의 분비 조절은 원활하나 인슐린이 제기능을 하지 못하여 혈당 조절이 실패하는 경우 발생한다. 2008년 질병 관리본부의 통계에 따르면, 30세 이상 국민에서 당뇨병의 유병률은 9.1%에 달하며, 40세가 넘으면 유병률이 급격히 증가하여 50대에는 20%에 이르는 것으로 나타났다. 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. 최근 10년간 한국인의 식단에서 지방이 차지하는 비율이 1969년 7.2%에서 2007년 18.5%까지 증가하였으며, 당뇨병으로 인한 사망률은 빠르게 증가하여 1988년 7.4%에서 2007년 22.9%에 이르렀다.

[3] 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 진단의 정확성을 담보할 수 없다.

[4] 최근, 대사체 연구는 인간 혈장 대사체들이 인슐린 저항성, 제2형 당뇨병 및 당뇨병 전증으로 발생한 혈당 부하와 관련이 있음을 보여주고 있다(한국 공개특허 10-2012-0134272). 하지만, 최근의 혈장 대사체 연구들은 당뇨병 진단 방법 개발하거나 치료제 효과를 높이는데 목표를 두고 있다. 특히, 초기 당뇨병 환자 및 건강한 사람 간의 염증 마커, 산화적 마커 및 동맥 경직 마커의 차이점 및 대사체 변화에 대한 포괄적인 이해는 아직까지 연구되어 있지 않다.

#### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

[5] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 당뇨병이 의심되는 환자들의 혈액 내 대사체들의 변화를 관찰하고,

이들의 농도 변화를 기반으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[6] 또한, 본 발명의 목적은 당뇨병 진단을 위한 상기 조성물의 의약적 용도를 제공하는데 있다.

[7]

[8] 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.

### 과제 해결 수단

[9] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 대사체에 대한 검출 제제를 포함하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물/키트를 제공한다.

[10] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 당뇨병은 초기 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.

[11] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 프롤린 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 증가된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것일 수 있다.

[12] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 루신, 라이신, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 감소된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것일 수 있다.

[13] 또한, 본 발명은 피검체에서 분리된 생체 시료로부터 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사체의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 대사체의 농도를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[14] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병이거나 초기 당뇨병일 수 있다.

[15] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 생체 시료는 혈액, 혈청, 또는 혈장일 수 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 대사체의 농도를 측정하는 단계는 크로마토그래피/질량 분석법을 통해 측정하는 것일 수 있다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 당뇨병 조기 진단 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 당뇨병 조기 진단 용도를 제공한다.

### 발명의 효과

[19] 본 발명은 대사체학을 이용하여 혈액 내 대사체들의 농도 변화를 기반으로 초기 당뇨병을 진단할 수 있는 바이오마커를 제공하며, 이들은 당뇨병 치료제 개발을 위한 선도물질로 적용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 Q-TOF MS 및 QQQ MS를 이용하여 당뇨 발병 전의 정상군 (Pre-DM)과 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 루신의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [21] 도 2는 Q-TOF MS 및 QQQ MS를 이용하여 당뇨 발병 전의 정상군 (Pre-DM)과 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 타이로신의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [22] 도 3은 Q-TOF MS 및 QQQ MS를 이용하여 당뇨 발병 전의 정상군 (Pre-DM)과 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 발린의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [23] 도 4는 Q-TOF MS 및 QQQ MS를 이용하여 당뇨 발병 전의 정상군 (Pre-DM)과 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 페닐알라닌의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [24] 도 5는 Q-TOF MS를 이용하여, 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 및 제2형 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 콜레스테롤의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [25] 도 6은 Q-TOF MS를 이용하여, 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 및 제2형 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 프롤린의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [26] 도 7은 Q-TOF MS를 이용하여, 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 및 제2형 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 루신의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [27] 도 8은 Q-TOF MS를 이용하여, 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 및 제2형 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 라이신의 농도 변화를 비교한 결과이다.
- [28] 도 9는 Q-TOF MS를 이용하여, 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 및 제2형 당뇨 발병군 (DM)의 혈액 내 페닐알라닌의 농도 변화를 비교한 결과이다.

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [30]
- [31] 당뇨병은 대사성 질환이므로 대사회로의 차이에서 나오는 대사체 농도의 변화가 조기 진단의 중요한 요소가 될 수 있을 것으로 판단하였으며, 이에, 본 발명자들은, 당뇨 발병 전, 초기, 및 후의 혈액을 채취하여 액체크로마토그래피/질량분석을 통해 대사체 프로파일, 특히 체내에서 관찰이 잘 되는 아미노산 등을 위주로 변화를 관찰함과 동시에 이들의 농도 변화를 함께 확인한 결과, 루신 (Leucine), 라이신 (Lysine), 프롤린 (Proline), 페닐알라닌 (Phenylalanine), 및 콜레스테롤 (Cholesterol)의 뚜렷한 농도 변화를 관찰하고, 이들을 당뇨병 조기 진단을 위한 바이오마커로 사용하였다.
- [32]
- [33] 본 발명은 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 대사체에 대한 검출 제제를 포함하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물/키트를 제공하며, 보다 구체적으로, 당뇨병 조기 진단을 위한 혈장 내 바이오마커로서, 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합을 제공한다.
- [34] 본 발명에서 사용되는 용어, "검출 제제"는 당뇨병 환자로부터 분리된 생체

시료로부터 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 또는 콜레스테롤을 정량적으로 검출하기 위한 제제를 의미하며, 상기 제제는 특별히 제한되는 것은 아니나, 검출하고자 하는 성분이 아미노산의 경우, 상보적 결합이 가능한 프라이머, 프로브, 압타머, 또는 항체일 수 있으며, 이 외의 성분들에 대해서는 이들을 정량화할 수 있는 시약 또는 화학 물질일 수 있다.

- [35] 본 발명에서 사용되는 용어, “대사체”는 생체 기원의 시료로부터 수득한 대사물질을 말하며 바람직하게, 상기 대사체를 수득할 수 있는 생체 기원의 시료는 전혈이고, 더욱 바람직하게는 혈장일 수 있다. 한 구체예로서, 상기 대사체를 검출하기 위해 전혈을 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.
- [36] 본 발명의 조성물에 의한 진단 대상 질병인 “당뇨병”은 바람직하게 초기 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.
- [37] 본 발명에서 사용되는 용어, “초기 당뇨병”은 혈당이 정상보다 다소 높지만 당뇨병으로 확진되기까지 추가적인 정보가 필요한 상태를 포함한다. 대부분의 사람은 제2형 당뇨병으로 확진되기 전에 초기 당뇨병 과정을 거친다. 초기 당뇨병에서 나타나는 혈당의 상승은 인슐린 저항성 문제로 인해 시작되며, 초기 당뇨병에 있다고 해서 자동적으로 당뇨병으로 진행하지는 않으나, 당뇨병으로 진행될 위험성이 있는 상태에 놓인다. 이러한 초기 당뇨병에서 당뇨병으로의 진행 여부를 조기에 판단하는 것은 예방적 치료의 관점에서 매우 중요하다. 한편, 초기 당뇨병은 심장 질환 발생의 위험 요인이 될 수 있고, 제2형 당뇨병 환자와 마찬가지로 초기 당뇨병의 사람들도 과체중인 경향이 있으며, 혈압이 높고 비정상적인 콜레스테롤 농도를 보일 수 있다.
- [38] 본 발명에서 사용되는 용어, “제2형 당뇨병”은 인슐린은 정상적으로 분비되나 인슐린이 제 기능을 못하는 경우에 발병하는 당뇨병을 말하며, “성인형 당뇨병 또는 인슐린 비의존형 당뇨병”으로도 불린다. 제2형 당뇨병은 세포가 췌장에서 생성된 인슐린에 효과적으로 반응하지 않는 경우에 발생하는데 이러한 상태를 인슐린 저항성이라고 한다. 인슐린 저항성이 있는 환자들은 처음에 정상적인 혈당을 유지하기 위해 추가로 더 많은 인슐린을 생산하는데, 결국에는 인슐린 저항성에 의해 췌장이 인슐린 요구량을 감당할 수 없게 되어 혈당이 상승하게 된다. 즉, 전당뇨 상태(초기 단계)에서는, 정상적인 혈당이 유지되나 (normal glucose tolerance), 일정 시간이 경과 후, 인슐린 저항성에 대한 췌장 베타 세포 (pancreatic beta cell)의 보상 작용이 실패하기 시작하면서, 고혈당증 (hyperglycemia)로 진행되고, 결과적으로, 제2형 당뇨 상태에 이르게 된다. 따라서, 공복혈당검사 (Fasting blood sugar test)와 같은, 혈당에 기반하는 기준의 당뇨병 진단 방법만으로는, 제2형 당뇨병으로 진행될 수 있는, 초기 당뇨병을 조기에 진단할 수 없다는 문제점이 있다.

- [39] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 객체의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것 (예컨대, 초기 당뇨병의 동정), 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.
- [40]
- [41] 한편, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 피검체에서 분리된 생체 시료로부터 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사체의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 대사체의 농도를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병 초기 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [42] 본 발명에서, 상기 생체 시료는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 시료, 생검 표본, 조직 배양과 같은 고형 조직 시료 또는 이로부터 유래된 세포가 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 조직, 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액, 복막액 등일 수 있으며, 보다 바람직하게 전혈이고, 더욱 바람직하게는 혈장일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 생체 시료는 검출에 사용하기 전에 전처리할 수 있으며, 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있고, 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간으로부터 수득될 수 있다.
- [43] 본 발명에서, 상기 대사체의 농도는 크로마토그래피/질량 분석법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 가스 크로마토그래피 (Gas Chromatography), 액체-고체 크로마토그래피 (Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피 (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. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피일 수 있고, 본 발명에서 이용되는 질량분석기는 Q-TOF MS일 수 있다.
- [44] 본 발명의 대사체는 액체 크로마토그래피에서 각 성분들이 분리되며, Q-TOF MS를 거쳐 얻어진 정보를 이용하여 정확한 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보 (elemental composition)를 통해 구성 성분을 확인할 수 있다.

- [45] 본 발명에서, 상기 측정된 대사체의 농도를 정상 대조군과 비교함으로써, 당뇨병을 조기 진단할 수 있다. 구체적으로, 상기 프롤린 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 증가된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내며, 이와 반대로, 상기 루신, 라이신, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 감소된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타낸다.
- [46] 본 발명에서 사용되는 용어, "대사체 농도의 증가"는 당뇨 발병 전의 정상군에 비해 당뇨 발병 가능성이 높은 환자군의 시료 내 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 증가된 것을 의미하며, 바람직하게는 70% 이상 증가된 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 30% 이상 증가된 것을 의미한다.
- [47] 본 발명에서 사용되는 용어, "대사체 농도의 감소"는 당뇨 발병 전의 정상군에 비해 당뇨 발병 가능성이 높은 환자군의 혈액 내 대사체 농도가 측정 가능할 정도로 유의하게 감소된 것을 의미하며, 바람직하게는 40% 이상 감소된 것을 의미하고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소된 것을 의미한다.
- [48]
- [49] 이하, 본 발명의 이해를 돋기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [50]
- [51] 실시예 1. LC/TOF MS 등을 이용한 당뇨 발병 전 후의 대사체 변화 확인
- [52] 본 실시예에서는, 당뇨 발병에 따른 대사체의 혈중 농도 변화를 관찰하여 당뇨와 혈중 대사체간 관련성을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 당뇨 발병 전의 정상군 (Pre-DM)과 당뇨 발병군 (DM)으로부터 혈액을 채취한 뒤, 상기 혈액 내 존재하는 4개의 아미노산 (루신, 타이로신, 발린, 페닐알라닌)을 Q-TOF MS 및 QQQ MS를 통해 정량화한 후, paired t test로 유의성을 검증하였다 ( $p \leq 0.05$ ).
- [53]
- [54] 그 결과, 도 1 내지 4에 나타낸 바와 같이, 혈중 루신, 타이로신, 발린, 및 페닐알라닌의 농도는, Q-TOF MS 및 QQQ MS 모두 일관성 있게 당뇨 발병군 (DM)에서 유의적으로 높게 검출되었다. 상기 결과로부터, 루신, 타이로신, 발린, 및 페닐알라닌 등과 같은 대사체들은 당뇨의 진단을 위한 바이오마커로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [55]
- [56] 실시예 2. LC/TOF MS 등을 이용한 전당뇨 상태에서의 대사체 변화 확인
- [57] 본 실시예에서는, 상기 실시예 1의 결과에 근거하여, 전당뇨 상태에서 당뇨로의 진행 여부를 조기에 판단할 수 있는 바이오마커 및 이들의 경향성을 확인하고자 하였다.
- [58]
- [59] **2-1. 실험 대상**

[60] 고려대학교 생명 윤리 위원회 (Korea university institutional review board, IRB)의 승인 하에서, 윤리 가이드라인 (KU-IRB-15-19-A-1)에 따라 진행되었다. 실험 대상은 한국인 암 예방 연구 (Korean Cancer Prevention Study (KCPS-))로부터 선정되었으며, 상기 실험 대상자들을 당뇨 비발병군 (NDM), 전당뇨 발병군 (PDM), 제2형 당뇨 발병군 (DM)으로 분류한 뒤, 이들의 혈청 샘플을 3년에 거쳐 채취하였다. 구체적으로, 하기 표 1에 나타내 바와 같이, 총 72명의 실험 대상자 중에서 21명은 실험 기간 내내 당뇨 발병군, 17명은 당뇨 비발병군이었으며, 15명은 2년째 (Follow-up 1), 전당뇨 발병군에서 당뇨 발병군으로 진행되었으며, 19명은 3년째 (Follow-up 2), 전당뇨 발병군에서 당뇨 발병군으로 진행되었다.

[61]

[62] [Table 1]

Patients (n=72)	Start (Year 1)	Follow-up 1 (Year 2)	Follow-up 2 (Year 3)
21	DM	DM	DM
15	PDM	DM	DM
19	PDM	PDM	DM
17	NDM	NDM	NDM

DM-diabetes, NDM-no diabetes, PDM-prediabetes

[63]

[64] 또한, 상기 선정된 실험 대상자들에 대한 특성을 하기 표 2에 나타내었다.

[65] [Table 2]

	NDM	PDM	DM
n	51 (17.6% Women)	53% (17.6% Women)	112 (18.2% Women)
Age	44.63±1.31	45.26±0.89	46.56±0.66
Fasting Blood Sugar (mg/dL)	84.90±1.08	111.98±0.92	164.63±4.31
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.39±0.33	25.97±0.41	26.17±0.32
Waist size (cm)	84.41±0.93	89.13±0.87	88.67±0.78
CHO (mg/dL)	197.78±5.41	201.57±3.94	211.16±3.47
TG (mg/dL)	157.16±10.27	201.96±15.59	221.25±12.81
HDL (mg/dL)	49.82±1.20	47.47±0.76	46.44±0.81
LDL (mg/dL)	118.19±4.88	119.01±4.16	127.23±3.20
SBP (mmHg)	117.98±1.74	122.75±2.01	127.62±1.47
DBP (mmHg)	75.78±1.40	78±1.34	80.25±1.11

DM-diabetes, NDM-no diabetes, PDM-prediabetes

[66]

**[67] 2-2. LC/TOF MS 분석에 의한 대사체 분석**

[68] 상기 실시 예 2-1에서 준비한 50μl의 혈청 샘플에 200μl의 아세토나이트릴 (1:4 v/v)을 처리한 뒤, 14,000xg에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 이후, 상기 샘플들은 Q-TOF 6550 질량분석기 (Agilent, CA, USA)가 커플링된 초고속 액체크로마토그래피 (C18 Synchronis aQ 1.9μm 1002.1mm (Thermo Scientific, MA, USA))로 분석하였다. 이동상 (mobile phase)으로 각각 0.1%의 formic acid가 첨가된 H<sub>2</sub>O 및 acetonitrile을 이용하였고, 용매에 대한 중류수의 %농도로서, 95%의 중류수에서 1분, 직선농도구배를 가하여 55% 중류수까지 8분, 10% 중류수까지 3분, 95% 중류수로 0.1분 처리하여 액체크로마토그래피의 농도 구배를 형성하였다. 이후, Q-TOF 6550 질량분석기를 이용하여 m/z (mass/charge) 값을 검출한 뒤 (20,000 분리능 (resolution), 50-1,000 ions set), 단변량분석 (univariate analysis), FDR 등의 통계적 분석을 실시하였다.

[69]

[70]      **2-3. 실험 결과**

[71]      도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 혈중 콜레스테롤 및 프롤린의 농도는 정상군 (NDM)에 비해 전당뇨 발병군 (PDM)에서 유의적으로 높게 관찰되었으며, 이러한 경향성은 제2형 당뇨 발병군 (DM)에서도 유지되었다. 한편, 도 7 내지 도 9에 나타낸 바와 같이, 혈중 루신, 라이신, 페닐알라닌의 농도는 전당뇨 발병군 (PDM)에서 유의적으로 낮게 관찰되었다. 특히, 루신의 경우, 제2형 당뇨 발병군 (DM)에서는 오히려 정상군에 비해 높게 관찰되었는바, 전당뇨에 보다 특이적 바이오마커로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[72]

[73]      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.

## 청구범위

[청구항 1]

루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 대사체에 대한 검출 제제를 포함하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물.

[청구항 2]

제1항에 있어서,  
상기 당뇨병은 초기 당뇨병인 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물.

[청구항 3]

제1항에 있어서,  
상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물.

[청구항 4]

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 당뇨병 조기 진단용 키트.

[청구항 5]

상기 프롤린 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 증가된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 키트.

[청구항 6]

제4항에 있어서,  
상기 루신, 라이신, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 감소된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 키트.

[청구항 7]

파검체에서 분리된 생체 시료로부터 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사체의 농도를 측정하는 단계; 및  
상기 측정된 대사체의 농도를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

[청구항 8]

제7항에 있어서,  
상기 당뇨병은 초기 당뇨병인 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단용 조성물.

[청구항 9]

제7항에 있어서,  
상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

[청구항 10]

제7항에 있어서,  
상기 생체 시료는 혈액, 혈청, 또는 혈장인 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

[청구항 11]

제7항에 있어서,

상기 대사체의 농도를 측정하는 단계는 크로마토그래피/질량 분석법을 통해 측정하는 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

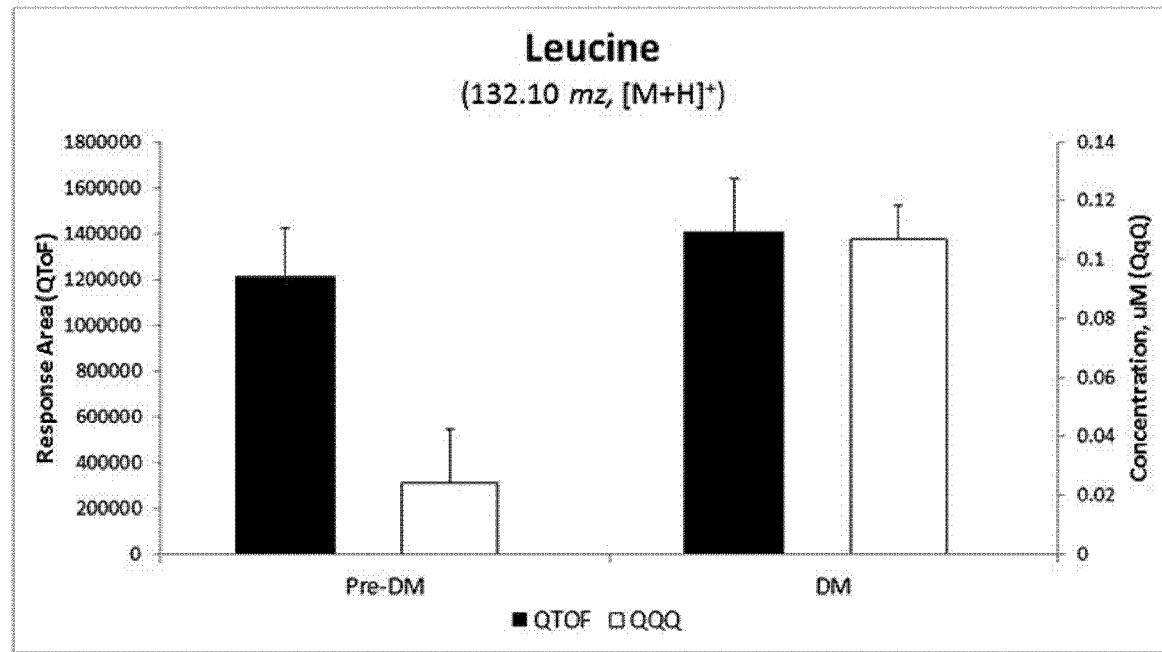
[청구항 12]

제7항에 있어서,  
상기 프롤린 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 증가된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

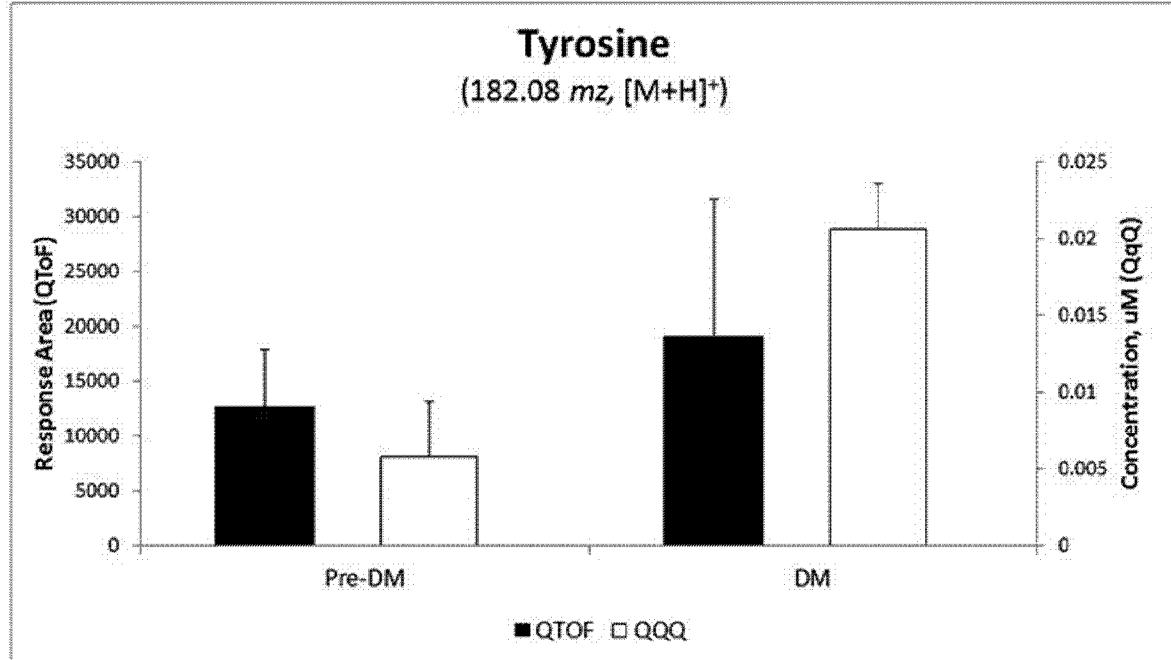
[청구항 13]

제7항에 있어서,  
상기 루신, 라이신, 및 페닐알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 대사체의 농도가 정상 대조군에 비해 감소된 경우, 증가된 당뇨병 발병 위험도를 나타내는 것을 특징으로 하는, 당뇨병 조기 진단을 위한 정보제공 방법.

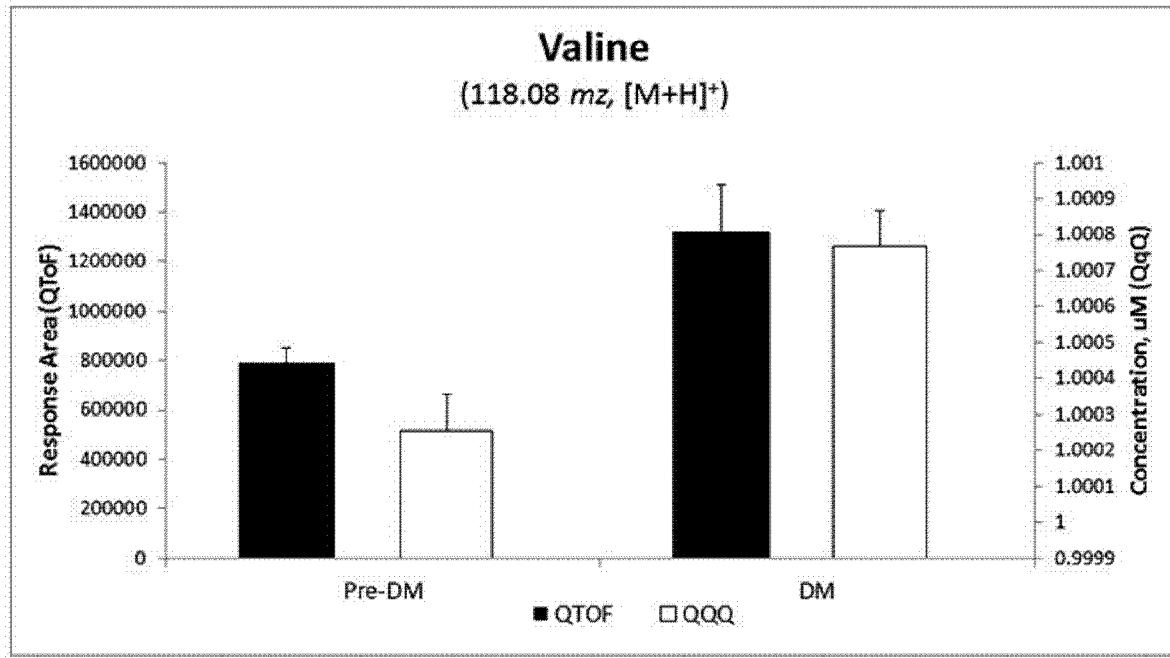
[Fig. 1]



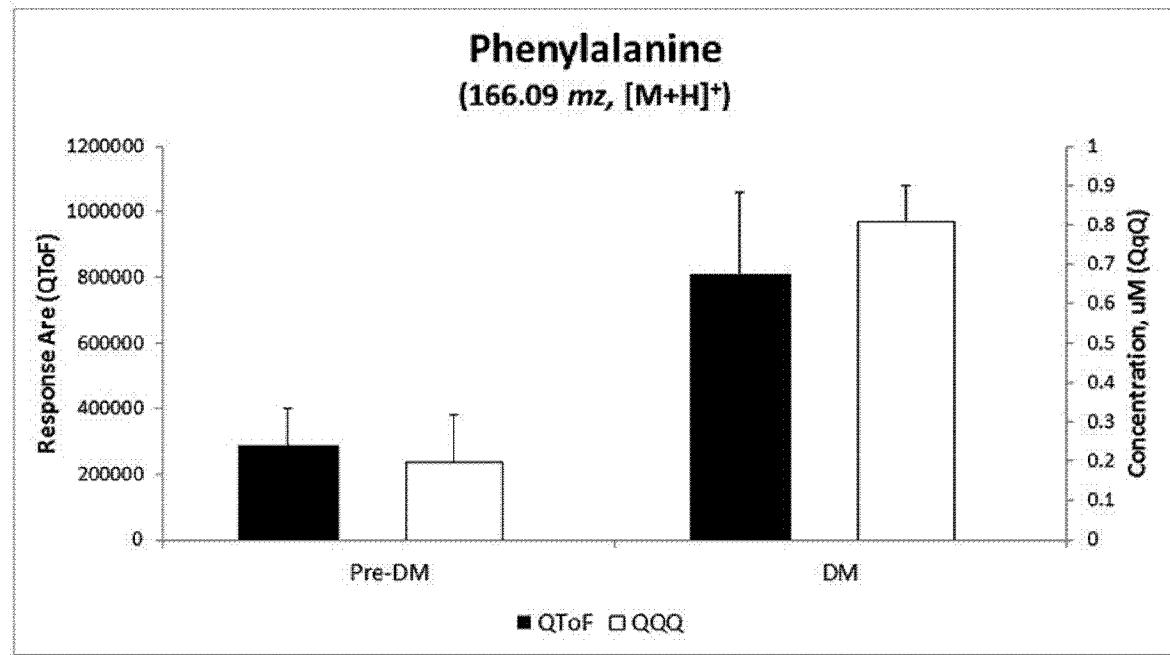
[Fig. 2]



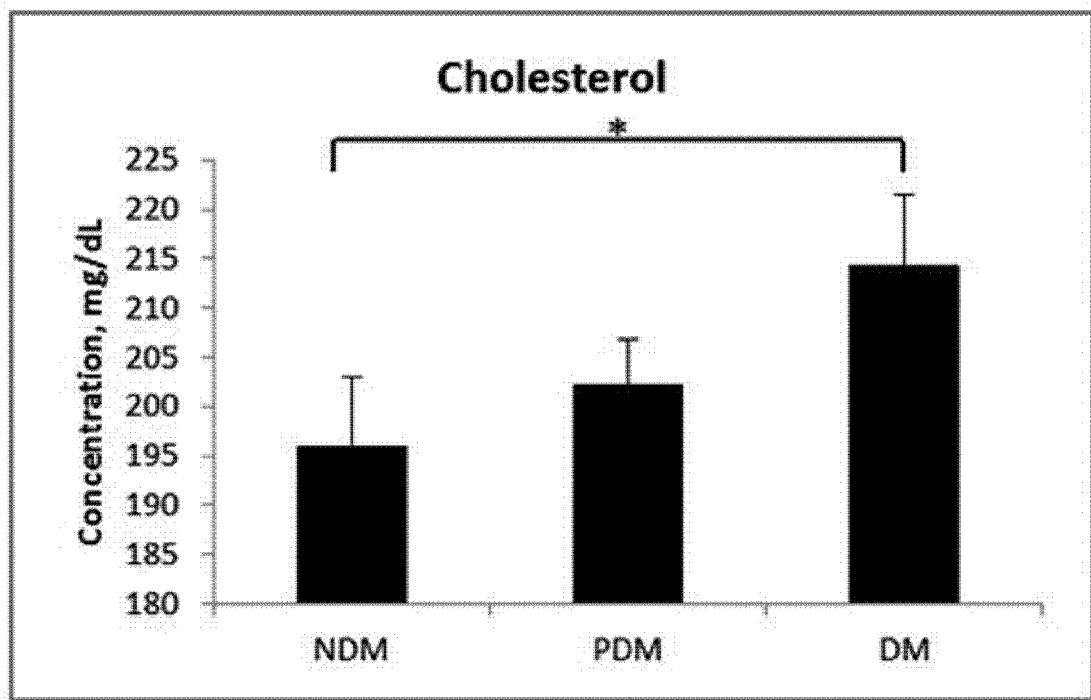
[Fig. 3]



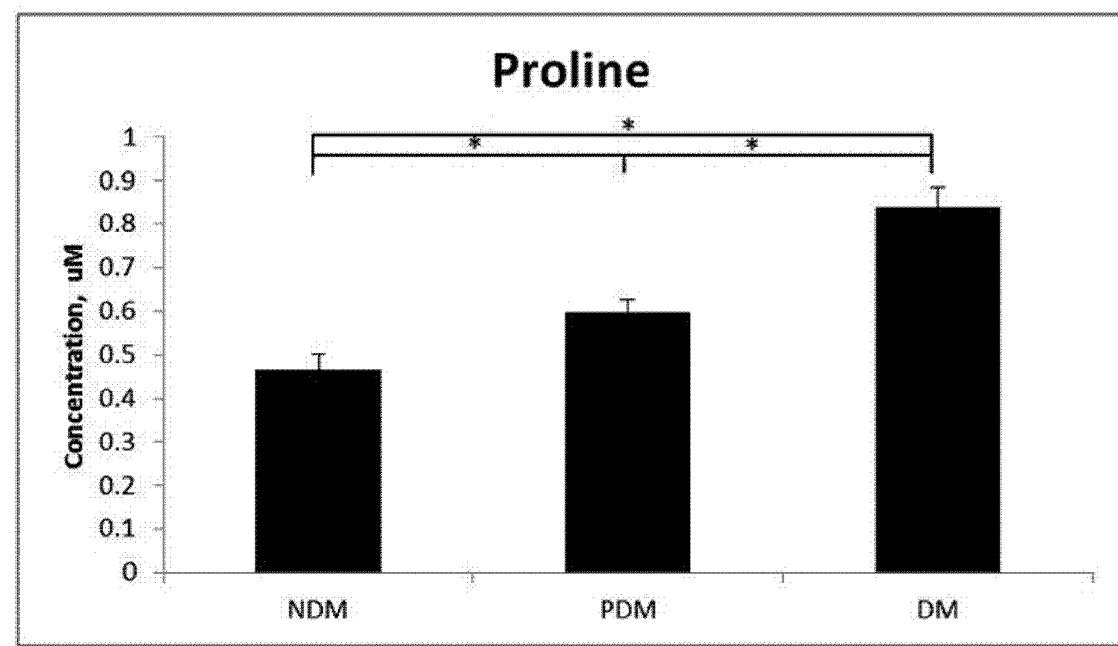
[Fig. 4]



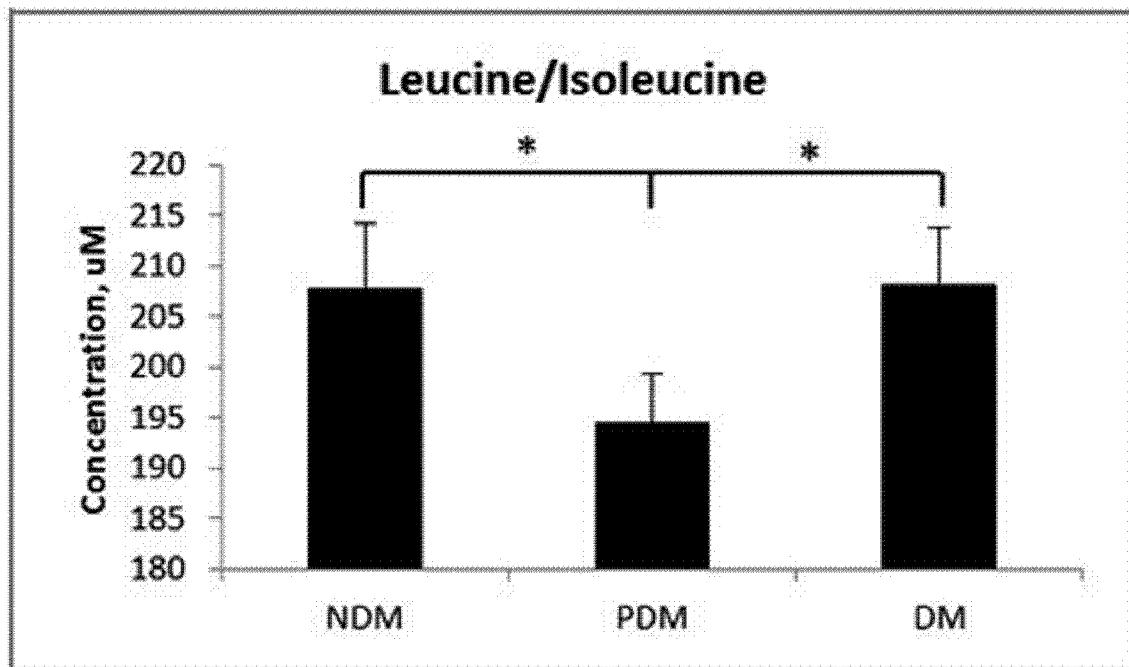
[Fig. 5]



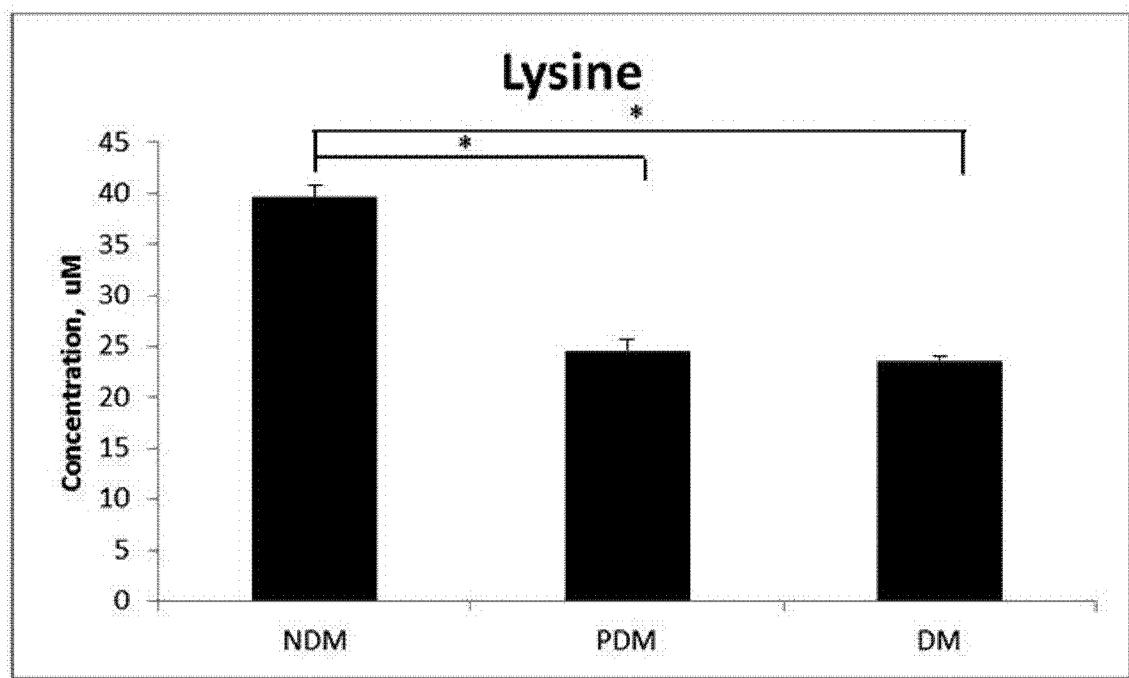
[Fig. 6]



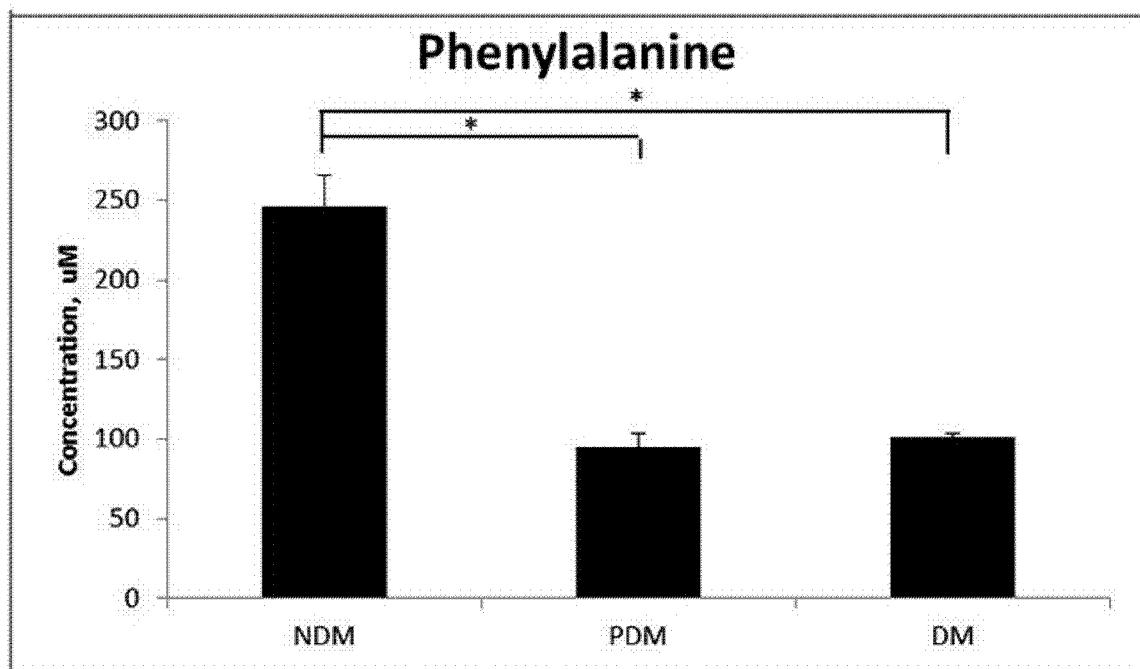
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006937

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 30/72(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 30/72; G01N 33/66; G01N 33/62; C12Q 1/54; G01N 33/68; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
 Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: type 2 diabetes mellitus, diagnosis, leucine, lysine, proline, phenylalanine, cholesterol, density

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010-005982 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al.) 14 January 2010 See pages 2-7, 11-24; and claims 1-16.	1-5,7-12
Y		6,13
Y	WO 2012-116074 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH et al.) 30 August 2012 See pages 3-5, 7, 8; and claims 1-8.	6,13
A	WO 2014-195306 A1 (UNIVERSITAT DE BARCELONA et al.) 11 December 2014 See page 6; and claims 1-21.	1-13
A	CONNOR, Susan C. et al., Integration of Metabolomics and Transcriptomics Data to Aid Biomarker Discovery in Type 2 Diabetes, Molecular BioSystems, 2010, vol. 6, no. 5, pages 909-921 See the entire document.	1-13
A	EP 2369346 A2 (METANOMICS GMBH.) 28 September 2011 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 SEPTEMBER 2016 (12.09.2016)

Date of mailing of the international search report

12 SEPTEMBER 2016 (12.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office  
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2016/006937****C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MEDRIANO, Carl Angelo et al., Discovery of Potential Biomarkers on Metabolic Syndrome in Patients with Acquired Diabetes, 11th Annual International Conference of the Metabolomics Society, 29 June 2015 See POSTER 240. ※ The document pertains to a known document indicating exceptions to lack of novelty.	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2016/006937**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2010-005982 A2	14/01/2010	US 2011-0311650 A1 WO 2010-005982 A3	22/12/2011 27/05/2010
WO 2012-116074 A1	30/08/2012	NONE	
WO 2014-195306 A1	11/12/2014	ES 2524194 A1 ES 2524194 B1	04/12/2014 09/09/2015
EP 2369346 A2	28/09/2011	AR 060121 A1 CA 2647122 A1 CA 2647197 A1 CN 101438168 A CN 101438168 B CN 101443663 A EP 1837657 A1 EP 2005189 A2 EP 2005189 B1 EP 2008108 A2 EP 2008108 B1 EP 2330423 A1 EP 2330423 B1 EP 2336782 A1 EP 2336782 B1 EP 2339346 A2 EP 2339346 A3 EP 2339346 B1 EP 2369346 B1 JP 2009-530626 A JP 2009-530627 A JP 2013-057672 A JP 2013-076703 A JP 5167239 B2 JP 5199994 B2 JP 5579819 B2 US 2010-0163720 A1 US 2010-0236321 A1 US 8216847 B2 US 8216848 B2 WO 2007-110357 A2 WO 2007-110357 A3 WO 2007-110358 A2 WO 2007-110358 A3	28/05/2008 04/10/2007 04/10/2007 20/05/2009 16/10/2013 27/05/2009 26/09/2007 24/12/2008 29/12/2010 31/12/2008 29/12/2010 08/06/2011 01/10/2014 22/06/2011 27/08/2014 29/06/2011 19/10/2011 03/09/2014 27/08/2014 27/08/2009 27/08/2009 28/03/2013 25/04/2013 21/03/2013 15/05/2013 27/08/2014 01/07/2010 23/09/2010 10/07/2012 10/07/2012 04/10/2007 15/11/2007 04/10/2007 15/11/2007

## A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 30/72(2006.01)I, G01N 33/68(2006.01)I

## B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 30/72; G01N 33/66; G01N 33/62; C12Q 1/54; G01N 33/68; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: 제2형 당뇨병, 진단, 루신, 라이신, 프롤린, 페닐알라닌, 콜레스테롤, 농도

## C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2010-005982 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION 등) 2010.01.14 페이지 2-7, 11-24; 및 청구항 1-16항 참조.	1-5, 7-12
Y		6, 13
Y	WO 2012-116074 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH 등) 2012.08.30 페이지 3-5, 7, 8; 및 청구항 1-8항 참조.	6, 13
A	WO 2014-195306 A1 (UNIVERSITAT DE BARCELONA 등) 2014.12.11 페이지 6; 및 청구항 1-21항 참조.	1-13
A	CONNOR, SUSAN C. 등, Integration of metabolomics and transcriptomics data to aid biomarker discovery in type 2 diabetes, Molecular BioSystems, 2010년, 6권, 5호, 페이지 909-921 전체 문서 참조.	1-13
A	EP 2369346 A2 (METANOMICS GMBH) 2011.09.28 전체 문서 참조.	1-13

 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

## \* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

## 국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 12일 (12.09.2016)

## 국제조사보고서 발송일

2016년 09월 12일 (12.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



## 국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2016/006937

C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	<p>MEDRIANO, CARL ANGELO 등, Discovery of potential biomarkers on metabolic syndrome in patients with acquired diabetes, 11th Annual international Conference of the Metabolomics Society, 2015년 06월 29일 POSTER 240 참조.</p> <p>※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.</p>	1-13

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2010-005982 A2	2010/01/14	US 2011-0311650 A1 WO 2010-005982 A3	2011/12/22 2010/05/27
WO 2012-116074 A1	2012/08/30	없음	
WO 2014-195306 A1	2014/12/11	ES 2524194 A1 ES 2524194 B1	2014/12/04 2015/09/09
EP 2369346 A2	2011/09/28	AR 060121 A1 CA 2647122 A1 CA 2647197 A1 CN 101438168 A CN 101438168 B CN 101443663 A EP 1837657 A1 EP 2005189 A2 EP 2005189 B1 EP 2008108 A2 EP 2008108 B1 EP 2330423 A1 EP 2330423 B1 EP 2336782 A1 EP 2336782 B1 EP 2339346 A2 EP 2339346 A3 EP 2339346 B1 EP 2369346 B1 JP 2009-530626 A JP 2009-530627 A JP 2013-057672 A JP 2013-076703 A JP 5167239 B2 JP 5199994 B2 JP 5579819 B2 US 2010-0163720 A1 US 2010-0236321 A1 US 8216847 B2 US 8216848 B2 WO 2007-110357 A2 WO 2007-110357 A3 WO 2007-110358 A2 WO 2007-110358 A3	2008/05/28 2007/10/04 2007/10/04 2009/05/20 2013/10/16 2009/05/27 2007/09/26 2008/12/24 2010/12/29 2008/12/31 2010/12/29 2011/06/08 2014/10/01 2011/06/22 2014/08/27 2011/06/29 2011/10/19 2014/09/03 2014/08/27 2009/08/27 2009/08/27 2013/03/28 2013/04/25 2013/03/21 2013/05/15 2014/08/27 2010/07/01 2010/09/23 2012/07/10 2012/07/10 2007/10/04 2007/11/15 2007/10/04 2007/11/15