



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0068981
(43) 공개일자 2025년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/573 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/5005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0155154
(22) 출원일자 2023년11월10일
심사청구일자 2023년11월10일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
조호찬
대구광역시 수성구 지범로 21-3(두산동)
박재형
대구광역시 수성구 교학로 13(만촌동, 만촌3차 화
성파크드림)
유경임
대구광역시 달서구 장기로 115 (성당동, 성당동
더 샵)
(74) 대리인
특허법인지평

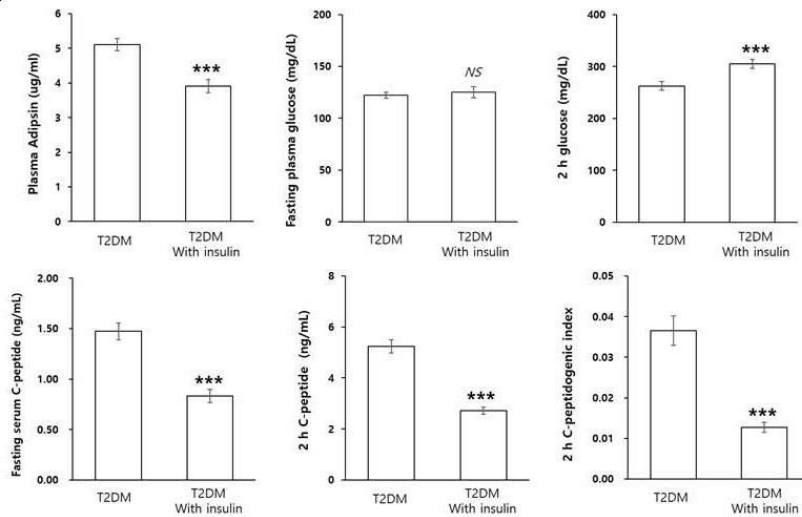
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 제2형 당뇨병 환자의 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 제2형 당뇨병 환자에서 췌장 베타 세포 기능을 평가할 수 있는 바이오마커로 활용될 수 있는 아디프신에 관한 것으로, 보다 상세하게는 체중 및 BMI 지수 고려를 최소화하거나 배제하여, 정상군 및 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자 대비 인슐린 치료를 받고 있는 제2형 당뇨병 환자의 혈중 아디프신 농도가 감소됨을 확인하였다. 따라서, 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 바이오마커 조성물은 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 진단에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 2800/042 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039959
과제번호	HR18C0012 (HR18C0012040023)
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성
연구과제명	개방형 모듈 기반 대사성 질환 진단과 치료 실용화 시스템 개발 (다중진단칩 기반
당뇨병 및 당뇨병 합병증이행 예측 모델 개발)	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 동산의료원
연구기간	2018.07.26 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 베타 세포 기능은 인슐린 분비능인, 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아디프신(Adipsin)의 수준은 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생물학적 시료에서 측정되는, 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 아디프신(Adipsin) 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)인, 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 측정은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDITOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(Radio Immunodiffusion, RID), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역 전기영동, 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), 전체 고해상도의 순차적 윈도우 데이터 독립적 수집(sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution, SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 및 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법에 의해 수행되는, 바이오마커 조성물.

청구항 6

아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 키트.

청구항 7

(a) 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 아디프신(Adipsin) 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 아디프신(Adipsin) 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 베타 세포 기능은 인슐린 분비능인, 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 대조군은 정상 환자군 또는 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군인, 정보 제공 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 아디프신(Adipsin) 수준이 대조군 대비 감소한 경우, 상기 대상의 췌장 베타 세포 기능이 저하된 것으로 판정되는, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제2형 당뇨병 환자의 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 제2형 당뇨병 환자에서 분리된 생물학적 시료로부터 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하고 이를 대조군과 비교하여 췌장 기능을 평가하는 조성물, 키트 및 베타 세포 기능 평가를 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병(糖尿病; diabetes mellitus)은 인슐린 분비 또는 인슐린 작용의 결함에 의해 나타나는 고혈당을 특징으로 하는 대사성 질환으로 신부전과 같은 합병증을 동반하는 만성 퇴행성 질환이다. 특히, 제2형 당뇨병은 운동 부족, 비만 또는 스트레스 등에 의한 후천적 요인으로 인슐린의 분비 조절은 원활하나 인슐린이 제 기능을 하지 못하여 혈당 조절이 실패하는 경우 발생한다.

[0003] 아디프신(Adipsin)은 지방세포에서 분비되는 효소(serine protease)로 보체인자(complement factor) D로도 알려져 있다. 제2형 당뇨병 환자에서 혈중 아디프신 농도의 증감 유무 및 아디프신과 인슐린 저항성 또는 인슐린 분비능과의 상관관계에 대해서는 다양한 상반된 결과들이 보고되고 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 인슐린 치료를 받고 있는 제2형 당뇨병 환자에서 췌장 베타 세포의 기능을 대변할 수 있는 바이오마커로 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하고자 하였으며, 비만도의 영향을 최소화하기 위해 과체중 또는 경도 비만에 해당하는 환자들을 선별하였고, 혈중 아디프신 농도와 췌장 베타 세포의 기능의 상관관계 분석 시 BMI(Body Mass Index)를 조절해 그 영향을 최소화하거나 배제하였다. 이를 통해 본 발명자들은 인슐린 치료를 받는 환자 중 췌장 베타 세포의 기능이 저하된 경우 혈중 아디프신 농도가 유의하게 감소함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커를 제공하는 것이다.

[0006] 이에 따라, 본 발명의 목적은 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 아디프신(Adipsin) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 아디프신(Adipsin) 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료

를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 키트를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 (a) 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 아디프신(Adipsin) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 아디프신(Adipsin) 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물을 이용하는 경우 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포의 기능을 평가할 수 있어, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 인슐린 치료 효과를 모니터링할 수 있고, 이를 통해 개인 맞춤형 치료를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자군의 혈액에서 인슐린 분비 지표들과의 상관관계를 막대그래프로 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명에서, 어느 구성요소 또는 어느 단계를 "포함한다"고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소 또는 다른 단계를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소 또는 다른 단계를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명에서, 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 인슐린 치료를 받는 당뇨병환자에서 췌장 베타 세포의 인슐린 인슐린 저장 기능, 합성 기능 및 분비능을 확인하는 것이다.

[0018] 본 발명에서, 용어 "바이오마커"란 체내 변화를 알아낼 수 있는 지표로서,

[0019] 당뇨병이 걸리지 않은 정상 대조군 또는 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군 대비 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병을 가진 환자군에서 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준의 유의적인 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함하며, 바람직하게는 아디프신의 감소 양상을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에서, 용어 "단백질 발현수준 측정"이란 생물학적 시료에서 인슐린 치료를 받는 당뇨병환자에서 췌장 베타 세포의 인슐린 분비능의 예측 또는 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 애포타머(aptamer)를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 전술한 바이오마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 바이오마커 유전자가 암호화하는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩타이드도 포함될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함 된다. 이러한 본 발명의 바이오마커 유전자가 암호화하는 단백질에 대한 항체는 당 업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있는 모든 항체가 될 수 있다. 예를 들어, 전술한 바이오마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의

전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유 하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [0022] 본 발명에서, 용어 "압타머"란 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 항체와 유사한 기능을 가져 화학적 항체(chemical antibody)로도 불리며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 압타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 압타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.
- [0023] 상기 압타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있으나 이들에 한정 되지 않는다. 상기 3종의 바이오마커 단백질 각각에 결합 활성을 갖는 압타머는 각 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 베타 세포는 인슐린을 생성하는 세포로, 이자의 랑게르한스 섬에 위치해 있다. 제1형 당뇨병 환자 또는 인슐린 의존성 당뇨병 환자는 면역계가 베타 세포를 스스로 공격해 파괴하는 자가면역 질환으로, 베타 세포가 파괴되어 인슐린을 생산 또는 분비할 수 없어 혈당을 조절할 수 없다. 제2형 당뇨병 환자 또는 인슐린 비의존성 당뇨병 환자는 나이, 가족력, 비만, 식이 등 다양한 요인에 의해 발생할 수 있으며, 인슐린은 계속 분비되지만 체내에서 인슐린 저항이 생겨 인슐린에 대한 반응이 감소하게 된다.
- [0026] 상기 베타 세포 기능은 인슐린 저장 기능, 합성 기능, 분비능일 수 있고, 바람직하게는 인슐린 분비능일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 아디프신(Adipsin)의 수준은 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 생물학적 시료에서 측정될 수 있고, 바람직하게는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 하나 이상의 상기 시료가 혼합되어 사용될 수 있다. 이러한 생물학적 시료는 검사 직전에 환자로부터 통상의 시료 획득방법에 의해 직접 획득한 것이거나 또는 종전에 분리되어 보관된 것일 수 있다.
- [0028] 상기 체제는 상기 아디프신(Adipsin) 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 아디프신(Adipsin) 수준 측정은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDITOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(Radio Immunodiffusion, RID), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 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), 전체 고해상도의 순차적 윈도우 데이터 독립적 수집(sequential windowed data independent acquisition of the total high-resolution, SWATH), 선택 반응 모니터링(selected reaction monitoring: SRM) 및 면역 다중 반응 모니터링(immuno multiple reaction monitoring: iMRM)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법에 의해 수행될 수 있고, 바람직하게는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명은 또한 아디프신(Adipsin)의 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 키트를 제공한다.
- [0031] 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 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0032] 본 발명은 또한 (a) 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 아디프신(Adipsin) 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 아디프신(Adipsin) 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 기능 평가를 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 베타 세포 기능은 인슐린 저장 기능, 합성 기능, 분비능일 수 있고, 바람직하게는 인슐린 분비능일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 상기 대조군은 정상 환자군 또는 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군일 수 있 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 혈장 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 하나 이상의 상기 시료가 혼합되어 사용될 수 있다. 이러한 생물학적 시료는 검사 직전에 환자로부터 통상의 시료 수득방법에 의해 직접 수득한 것이거나 또는 종전에 분리되어 보관된 것일 수 있다.
- [0036] 상기 단계 (b)에서 아디프신(Adipsin) 수준이 대조군 대비 감소한 경우, 상기 대상의 췌장 베타 세포 기능이 저하된 것으로 판정될 수 있다.
- [0037] 상기 (b) 단계의 비교는 통계적 분석 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0038] 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 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 분석 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 상기 바이오마커 조성물 및 키트는 기존 바이오 마커 및/또는 진단방법등과 함께 사용될 수 있다.
- [0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0043] **실시예 1: BMI, 혈당 및 혈중 아디프신 농도 변화 측정 - 환자 선정 및 혈액 채취**
- [0044] **1-1. ELISA를 이용한 혈중 아디프신 농도 변화 측정**
- [0045] 플레이트 프레임에서 여분의 마이크로플레이트 스트립을 제거하고 건조제 팩이 들어 있는 호일 파우치에 다시 넣은 다음 다시 밀봉하였다.
- [0046] 각 웰에 분석 희석제(assay diluent) RD1W 50 μ L를 추가 후 표준물질, 대조물질 또는 샘플을 각 웰에 50 μ L 추가하여 제공된 접착 스트립으로 덮고, 실온에서 2시간 동안 배양하였다.
- [0047] 각 웰을 흡인하고 세척 과정을 3회 반복하여 총 4회 세척하였다. 물병, 매니폴드 디스펜서 또는 자동 세척기를 사용하여 각 웰을 세척 완충액(400 μ L)으로 채워 세척하였다. 마지막 세척 후 흡입 또는 디캔팅을 통해 남은 세척 버퍼를 제거 후 접시를 뒤집어 깨끗한 종이 타월로 닦아내었다.
- [0048] 각 웰에 인간 보체 인자 D 접합체 100 μ L를 추가 후 새 접착 스트립으로 덮고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 흡인/세척을 반복하였다.
- [0049] 각 웰에 기질 용액 100 μ L를 추가 후 실온에서 30분간 배양하였다. 빛으로부터 차단하였다. 각 웰에 정지 용액 100 μ L를 추가 후 완전히 혼합되도록 플레이트를 가볍게 두드렸다.
- [0050] 450 nm로 설정된 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 30분 이내에 각 웰의 광학 밀도를 결정하였다. 파장 보정이 가능한 경우 540 nm 또는 570 nm로 설정하였다.

[0052] 1-2. 측정 대상 및 결과

[0054] 본 발명에서는 혈중 아디프신을 인슐린 치료를 받고 있는 환자의 췌장 베타 세포 기능을 측정할 수 있는 바이오 마커로 개발하기 위해 소규모 집단의 정상인 60명, 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 81명, 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자 64명을 선별하여 환자의 혈액을 채취하였다. 제2형 당뇨병 환자 중 인슐린 치료(주사)를 받고 있는 환자(췌장 베타 세포의 기능 저하 또는 부전인 환자)에서만 혈중 아디프신이 유의하게 감소함을 보였다. 환자의 임상적 특징은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0056]

	정상혈당 (normoglycemia)	인슐린을 처방받지 않는 제2형 당뇨병	인슐린을 처방받는 제2 형 당뇨병	P value
수(남성/여성)	60 (19/41)	81 (46/35)	64 (38/26)	-
나이(세)	57.05 ± 7.59	57.48 ± 10.93	57.86 ± 12.04	-
제2형 당뇨병 유병 기간(년)	0	7.02 ± 6.30	15.41 ± 9.18	< 0.001
BMI(kg/m ²)	22.13 ± 1.53	25.04 ± 3.88	25.64 ± 4.02	< 0.001
공복 혈당 수치 (mg/dL)	88.95 ± 5.99	122.31 ± 27.01	125.28 ± 42.74	< 0.001
HbA1c(%)	5.41 ± 0.17	7.07 ± 1.10	8.88 ± 2.21	< 0.001
공복 혈장 인슐린 수치(μIU/mL)	4.01 ± 2.27	8.69 ± 5.19	-	-
공복 혈장 C-펩타 이드(ng/mL)	0.91 ± 0.32	1.47 ± 0.73	0.83 ± 0.54	< 0.001
HOMA-IR	0.84 ± 0.49	2.77 ± 2.52	-	-
HOMA-Beta	75.15 ± 50.30	61.45 ± 52.24	-	-
혈중 아디프신 (μg/mL)	4.53 ± 1.15	5.11 ± 1.53	3.91 ± 1.51	< 0.001
HOMA-IR(Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance): 인슐린 저항성 수치 HOMA-Beta(Homeostatic Model Assessment of β-cell function): 췌장 베타 세포의 기능				

[0058] 실시예 2: 혈중 아디프신 농도와 연관성 있는 임상지표 분석

[0060] 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자군에서는 정상 및 제2형 당뇨병 환자군에 비해 혈중 아디프신 농도가 유의하게 감소했으며, 이는 공복 혈청 C-펩타이드 농도와 같은 인슐린 분비 지표와 유의한 양의 상관관계를 보였다. 상관관계 분석 시 BMI를 조절하여 그 영향을 배제하였다(표 2).

표 2

[0062]

	부분 상관 R (partial correlation R)	부분 상관 P (partial correlation P)
공복 혈당(mg/dL)	-0.0060	0.402
HbA1c(%)	-0.196	0.006
공복 혈청 C-펩타이드(ng/mL)	0.272	< 0.001
연령, 성별, 기간 및 BMI에 따라 조정됨		

[0064] **실시예 3: BMI, 혈당, c-펩타이드, 혈중 아디프신 농도의 변화**

[0066] 본 발명에서는 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 및 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병환자군 두 그룹에서 혈중 아디프신 농도, BMI, 공복혈당, 공복 c-펩타이드 농도, 경구 당부하 검사 시 2시간째 혈당/c-펩타이드 농도, c-펩티도제닉 지수(c-peptidogenic index) 등의 변화를 스튜던트 티-테스트(student t-test)를 통해 비교 분석하였다. 타 연구와의 차별성은 두 군 모두 BMI가 동일하고, 과체중 또는 경도 비만에만 해당하는 환자들로만 구성되어 있다는 점이다(표 3).

[0067] 그 결과 인슐린 치료를 받는 당뇨병환자에서 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군에 비해 혈중 아디프신 농도, 공복 c-펩타이드 농도, 경구 당부하 검사 시 2시간째 혈당/c-펩타이드 농도, c-펩티도제닉 지수 등이 유의한 감소를 보였다 (P <0.001, t-test).

표 3

	인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군	인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자군	P value
수(남성/여성)	81 (46/35)	64 (38/26)	-
BMI(kg/m ²)	25.04 ± 3.88	25.64 ± 4.02	0.526
T2DM 유병기간(년)	7.02 ± 6.30	15.41 ± 9.18	< 0.001
HbA1c(%)	7.07 ± 1.10	8.88 ± 2.21	< 0.001
공복 혈당 수치 (mg/dL)	122.31 ± 27.01	125.28 ± 42.74	0.629
공복 혈장 C-펩타이드 (ng/mL)	1.47 ± 0.73	0.83 ± 0.54	< 0.001
2시간째 혈당(mg/dL)	262.40 ± 72.05	304.92 ± 72.52	0.001
2시간째 C-펩타이드(ng/mL)	5.24 ± 2.32	2.72 ± 1.07	< 0.001
2시간째 C-펩티도제닉 지수(C-peptidogenic index)	0.0366 ± 0.03	0.0127 ± 0.01	< 0.001
혈중 아디프신(μg/mL)	5.11 ± 1.53	3.91 ± 1.51	< 0.001

[0071] **실시예 4: 혈중 아디프신 농도와 연관성 있는 임상지표 분석**

[0073] 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자군에서는 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군에 비해 혈중 아디프신 농도가 유의하게 감소했으며, 이는 공복 혈청 C-펩타이드 농도, 경구 당부하 검사 시 2시간째 c-펩타이드 농도, 2시간 c-펩티도제닉 지수와 같은 인슐린 분비 지표와 유의한 양의 상관관계를 보였다. 상관관계 분석 시 당뇨병 유병기간을 조정하여 그 영향을 배제하였다(표 4).

표 4

	부분 상관 R (partial correlation R)	부분 상관 P (partial correlation P)
공복 혈당	-0.034	0.687
2시간 짜 혈당	-0.187	0.026
HbA1c	-0.277	0.001
공복 혈청 C-펩타이드	0.321	<0.001
2시간 짜 C-펩타이드	0.384	<0.001

2시간 췌 C-펩티도제닉 지수	0.363	<0.001
제2형 당뇨병 유병기간에 따라 조정됨		

[0077] 본 발명에서는 제2형 당뇨병 환자 중 인슐린 치료(주사)를 받고 있는 환자 (췌장 베타 세포의 기능 저하 또는 부전인 환자)에서만 혈중 아디프신이 유의하게 감소함을 규명하였으며, 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자군에서는 인슐린 치료를 받지 않는 일반적인 제2형 당뇨병 환자군에 비해 혈중 아디프신 농도가 유의하게 감소했으며, 공복 혈청 C-펩타이드 농도, 경구 당부하 검사의 2시간 췌 혈당, 2시간 췌 C-펩타이드 및 2시간 췌 C-펩티도제닉 지수와 같은 인슐린 분비 지표들 또한 감소하여, 아디프신과 유의한 상관관계를 보였다.

[0078] 따라서, 본 발명을 통해 인슐린 치료를 받는 당뇨병환자(췌장 베타 세포의 기능저하 환자)에서만 혈중 아디프신 농도가 유의하게 감소하며, 이 환자군에서 아디프신은 췌장베타 세포의 인슐린 분비능을 대변하는 바이오마커가 될 수 있음을 규명하였다.

[0080] 실시예 5: BMI, 혈당, 혈중 아디프신 농도의 변화

[0081] 본 발명에서는 정상 및 제2형 당뇨병(인슐린 치료를 받지 않는 당뇨병환자)두 그룹에서 혈중 아디프신 농도, BMI, 공복혈당, 공복 인슐린 농도, HOMA-IR 지수, HOMA-beta 지수 등의 변화를 student t-test를 통해 비교 분석하였다(표 5).

[0082] 그 결과 당뇨병환자에서 정상군에 비해 BMI, 공복혈당, 공복 혈중 인슐린 농도, HOMA-IR지수, 혈중 아디프신 농도가 유의하게 증가하였다 ($P < 0.001$, t-test).

표 5

	정상혈당 (normoglycemia)	인슐린을 처방받지 않는 제2형 당뇨병 환자군	P value
수(남성/여성)	19/41	46/35	-
나이(세)	57.05 ± 7.59	57.48 ± 10.93	-
BMI(kg/m ²)	22.13 ± 1.53	25.04 ± 3.88	< 0.001
공복 혈당 수치 (mg/dL)	88.95 ± 5.99	122.31 ± 27.01	< 0.001
HbA1c(%)	5.41 ± 0.17	7.07 ± 1.10	< 0.001
공복 혈장 인슐린 수치(μ IU/mL)	4.01 ± 2.27	8.69 ± 5.19	< 0.001
HOMA-IR	0.84 ± 0.49	2.77 ± 2.52	< 0.001
HOMA-Beta	75.15 ± 50.30	61.45 ± 52.24	0.12
혈중 아디프신(μg/mL)	4.53 ± 1.15	5.11 ± 1.53	< 0.001

[0086] 실시예 6: 혈중 아디프신 농도와 연관성 있는 임상지표 분석

[0087] 인슐린 치료를 받지 않는 당뇨병 환자군에서는 정상군에 비해 혈중 아디프신 농도가 유의하게 증가하였으나, 이는 체중 또는 BMI 증가에 따른 지방세포에서 아디프신 분비가 증가된 무의미한 결과임을 확인하였다. 특히, 상관관계 분석 시 BMI를 조절한 경우, 혈중 아디프신은 혈당, 인슐린, 인슐린 저항성, 췌장 베타 세포 인슐린 분비능 등 아무런 연관성 및 상관관계가 없었다.

표 6

[0089]

	부분 상관 R (partial correlation R)	부분 상관 P (partial correlation P)
공복 혈당	0.031	0.716
HbA1c(%)	-0.020	0.818
공복 혈장 인슐린	0.086	0.314
HOMA-IR	0.060	0.482
HOMA-Beta	0.009	0.918
나이, 성별 및 BMI 에 따라 조정됨		

[0091]

즉, 본 발명에서는 상기 실시예를 통해 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자군과 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군 간 BMI 차이가 없어 비만의 영향을 배제하였으며, 췌장 베타 세포의 인슐린 분비능을 대변할 수 있는 지표인 펩타이드 농도, c-펩티도제닉 지수 등의 지표 또한 감소하여, 혈중 아디프신 농도와 유의한 상관관계가 있음을 확인하였다.

[0092]

또한, 정상 환자군과 비교 시, 인슐린 치료를 받지 않는 제2형 당뇨병 환자군에서 혈중 아디프신 농도가 증가하였으나, 이는 체중 및 BMI에 의한 것으로, BMI를 고려한 상관관계 분석에서 인슐린 치료를 받지 않는 당뇨병 환자군의 혈중 아디프신 농도 변화는 아무 상관관계가 없음을 확인하였다.

[0093]

종합적으로, 본 발명은 상기 실시예를 통하여 아디프신이 인슐린 치료를 받는 제2형 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포 인슐린 분비능 또는 췌장 베타 세포의 기능을 대변할 수 있는 바이오마커가 될 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1

