

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2010/147251 A1

(43) 국제공개일
2010년 12월 23일 (23.12.2010)

PCT

- (51) 국제특허분류: G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/003303
- (22) 국제출원일: 2009년 6월 19일 (19.06.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 인포피아 (INFOPIA CO., LTD.) [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 관양 2 동 889-3 동일테크노타운 에이동 1603 호, 431-716 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 배병우 (BAE, Byeong-Woo) [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 호계동 목련선 경아파트 104 동 1403 호, 431-080 Gyeonggi-do (KR). 이성동 (LEE, Sung-Dong) [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 비산동 비산래미안아파트 121 동 2003 호, 431-760 Gyeonggi-do (KR). 김형수 (KIM, Hyong-Soo) [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 매산로 2 가 75-10 205 호, 442-853 Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 씨앤에스 로고스 (C&S LOGOS PATENT AND LAW OFFICE); 서울특별시 서초구

서초동 1451-34 서초평화빌딩 13층, 137-070 Seoul (KR).

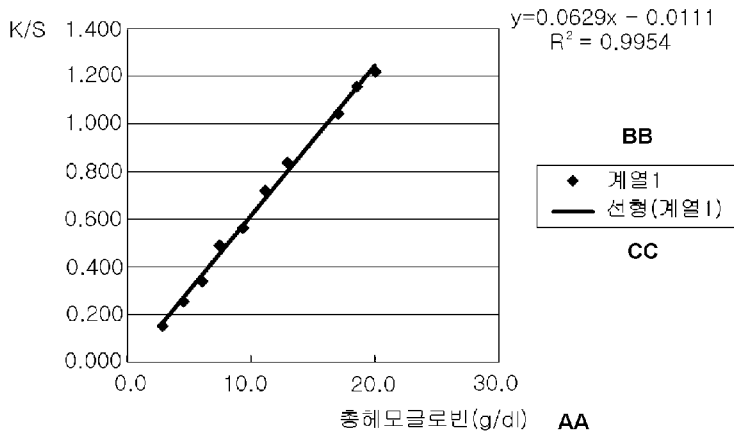
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN

(54) 발명의 명칭 : 당화혈색소 측정 방법

[Fig. 5]



AA ... Total hemoglobin (g/dl)
 BB ... Series 1
 CC ... Linear type (series 1)

(57) Abstract: The present invention relates to a method for measuring glycosylated hemoglobin. The method of the present invention comprises: a hemolysis step of hemolyzing a blood sample with a hemolysate; a reaction step of reacting the hemolyzed blood sample with bead conjugates in which beads are conjugated with glycosylated hemoglobin binding materials; a first measuring step of measuring the amount of total hemoglobin in blood; an isolation step of isolating normal hemoglobin from the glycosylated hemoglobin conjugated with the bead conjugates; a second measuring step of measuring the amount of glycosylated hemoglobin in blood; and a calculation step of calculating the concentration of glycosylated hemoglobin in the blood sample based on the measured amount of total hemoglobin and glycosylated hemoglobin in the blood sample. The method for measuring the glycosylated hemoglobin of the present invention is able to simplify measuring steps by measuring the total amount of hemoglobin in blood from a blood sample that contains

normal hemoglobin and glycosylated hemoglobin conjugated with bead conjugate in which beads and glycosylated hemoglobins are conjugated. In addition, the present invention enables easier measurement of the concentration of glycosylated hemoglobin in the blood sample since a separate dye for signal amplification is not needed.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2010/147251 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 당화혈색소 측정 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 혈액 샘플을 용혈액으로 용혈시키는 용혈 단계; 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체를 상기 용혈된 혈액 샘플과 반응시키는 반응단계; 혈액 내의 총 혈색소의 양을 측정하는 제 1 측정 단계; 비드접합체와 결합된 당화혈색소로부터 정상 혈색소를 분리하는 분리 단계; 혈액 내 당화혈색소의 양을 측정하는 제 2 측정 단계; 및 상기 측정된 혈액 샘플 내 총 혈색소의 양과 당화혈색소의 양을 기초로 하여 상기 혈액 샘플 내 당화혈색소의 농도를 계산하는 계산 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 당화혈색소 측정방법에 의하면, 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체가 결합된 당화혈색소 및 정상 혈색소를 포함하는 혈액 시료의 상태에서 혈액 내 총 혈색소의 양을 측정함으로써 측정 단계를 보다 단순화할 수 있으며, 또한 본 발명에 의하면 신호 증폭을 위한 별도의 염료를 필요로 하지 않으므로 보다 용이하게 혈액 샘플 내의 당화혈색소의 농도를 측정할 수 있다.

명세서

당화혈색소 측정 방법

기술분야

[1] 본 발명은 당뇨병 여부를 검사하는데 이용되는 당화혈색소 측정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 보다 단순화된 과정으로 당화혈색소를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 최근 의학적 진단이나 약물을 통한 치료 영역에 있어서, 마취제 또는 유해한 화학물질에 대한 분석 물질의 농도 측정이 의학적 또는 환경적 분야에서 유용하게 사용되고 있다. 그 중 의학적 진단 및 치료 분야에 사용되는 생체 시료 농도의 측정은 다양한 질환으로부터 해방되고 싶어하는 인간의 욕구 증가와 함께 관심이 계속 증가하고 있다. 특히 당뇨병과 관련하여 혈당을 측정할 수 있는 당화혈색소 검사는 한번의 측정으로 비교적 장기간의 혈당 평균치를 알 수 있으므로 그에 대한 관심이 증가하고 있다.

[4]

[5] 성인 신장병에 이르는 원인의 한 가지인 당뇨병은 평균 수명 기대치를 15년까지 줄일 수 있는 것으로 알려져 있으며, 낮은 혈당 수치 조절로 당뇨병에 의한 만성 합병증의 발생을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[6]

[7] 헤모글로빈 A1c(HbA1c)는 당화혈색소라고도 불리며, 이는 혈색소(Hemoglobin) 중의 하나로 사람의 적혈구(Red Blood Cell)에 들어있다. 혈액 속의 혈당(포도당)이 상승하면 혈액 내 포도당의 일부가 혈색소에 결합하게 된다. 이렇게 포도당과 결합한 혈색소(Hemoglobin)를 당화혈색소(glycated Hemoglobin)라고 하며, 헤모글로빈 에이원씨(HbA1c)라고도 불린다. 당화혈색소의 수치는 지난 2~3 개월 동안의 혈당 수치와 균형을 이루므로, 당화혈색소는 지난 2~3 개월 동안의 혈당 수치로서 인정될 수 있다. 당화혈색소의 수치를 확인함으로써 당뇨의 관리와 향후 약물 조절 등의 지표로 이용될 수 있으므로 당화혈색소의 측정이 중요하다.

[8]

[9] 당화혈색소는 혈액 내에 존재하는 헤모글로빈 베타-체인의 N-말단의 발린(valine)에 글루코스가 결합한 형태로 헤모글로빈과 구분하기 위해 글루코스 부분만을 특이적으로 감지하여 측정하여야 한다. 이 부분을 측정하는 방법은 여러 가지가 있으며, 항체를 이용하는 방법과 붕산염 친화성 크로마토그래피가 가장 많이 이용된다.

[10]

[11] 당화혈색소 수치를 정량적으로 측정하기 위해서는 사람마다 총 혈색소의 양이 다르기 때문에, 총 혈색소 양에 대한 당화혈색소 양의 비율로 나타내며, 이 때 총 혈색소의 양도 함께 측정하게 된다. 성인 및 영유아의 일반적인 총 혈색소 범위는 남성의 경우 13.0~17.0 g/dl, 여성의 경우 12.0~15.0 g/dl, 영유아의 경우 11.0~14.0 g/dl의 범위를 갖는다. 당화혈색소의 수치가 6.0%라면 3개월 동안 혈당이 평균적으로 120 g/dl로 유지되었다고 표현할 수 있다. 미국당뇨협회(ADA)에서는 7.0% 이하로 당화혈색소의 수치를 유지하여야 한다고 하며, 정상범위는 4.0~6.5%이다.

[12]

[13] 한편, 미국등록특허 US5,242,842 및 미국등록특허 6,399,293 및 6,300,142의 경우 염료 등의 신호 발생 물질이 추가로 요구되어 측정 단계가 번거로우며, JP3340129에서는 회색하는 단계가 추가로 요구되는 등 역시 추가의 단계들이 수행되어야 한다. 즉 이러한 작업은 측정자에게 여러 단계의 직접적인 개입을 요구하므로 측정자는 번거로움을 느낄 수 있다. 또한 측정자의 개입은 측정 과정을 복잡하게 할 수 있고 자연스레 측정시간이 지체되는 문제점이 있다.

[14]

[15] 따라서, 보다 단순화된 절차의 수행을 통해 용이하게 총 혈액 샘플 내의 당화혈색소 농도를 측정하기 위한 방법이 요구된다.

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 이에 본 발명의 한 측면은 종래 보다 단순화된 과정을 통해 용이하게 당화혈색소의 농도를 측정할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[18]

기술적 해결방법

[19] 본 발명의 일 견지에 의하면, 혈액 샘플을 용혈액으로 용혈시키는 용혈 단계; 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체를 상기 용혈된 혈액 샘플과 반응시키는 반응단계; 혈액 내의 총 혈색소의 양을 측정하는 제 1 측정 단계; 비드 접합체와 결합된 당화혈색소로부터 정상 혈색소를 분리하는 분리 단계; 혈액 내 당화혈색소의 양을 측정하는 제 2 측정 단계; 및 상기 측정된 혈액 샘플 내 총 혈색소의 양과 당화혈색소의 양을 기초로 하여 상기 혈액 샘플 내 당화혈색소의 농도를 계산하는 계산 단계를 포함하는 당화혈색소 측정방법이 제공된다.

[20]

[21] 상기 용혈 단계 및 반응단계는 용혈액 및 비드접합체를 혈액 샘플에 동시 투여함으로써 단일의 단계로 수행되는 것이 바람직하다.

[22]

- [23] 상기 용혈액은 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TEs) 및 피페스(PIPES)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [24]
- [25] 상기 비드는 아가로즈, 셀룰로즈, 세파로즈, 폴리스티렌, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리비닐톨루엔, 라텍스 비드 및 유리 비드 중 적어도 하나인 것이 바람직하다.
- [26]
- [27] 상기 당화혈색소 결합물질은 보로닉산(boronic acid), 콘카나발린 A(concanavalin A) 및 항체(antibody) 중 적어도 하나인 것이 바람직하다.
- [28]
- [29] 상기 제 1 측정 단계 및 제 2 측정 단계는 광 센서를 통한 광반사 측정 방식으로 측정하는 것이 바람직하다.
- [30]
- [31] 상기 분리단계는 세척액을 흘려주어 수행되는 것이 바람직하다.
- [32]
- [33] 상기 세척액은 pH 7~8.5사이에서 작용하는 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TEs), 피페스(PIPES)등의 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [34]
- [35] 상기 분리 단계는 정상 혈색소를 흡수 패드를 이용하여 흡수하여 수행되는 것이 바람직하다.
- [36]
- [37] 상기 흡수 패드는 다공성 패드인 것이 바람직하다.
- [38]
- [39] 상기 다공성 패드에 포함된 포어(pore)의 크기는 혈색소보다 크고 비드 보다 작은 것이 바람직하다.
- [40]

유리한 효과

- [41] 본 발명의 당화혈색소 측정방법에 의하면, 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체가 결합된 상태의 당화혈색소 및 정상 혈색소를 포함하는 전체 혈액 시료로부터 총 혈색소의 양을 측정함으로써 측정 단계를 보다 단순화하고, 신호 증폭을 위한 별도의 염료를 필요로 하지 않으므로 보다 용이하게 혈액 샘플 내의 당화혈색소의 농도를 측정할 수 있다.
- [42]

도면의 간단한 설명

- [43] 도 1은 보론산을 당화혈색소 결합물질로 이용하여 제조된 비드접합체와 당화혈색소가 반응하는 화학구조를 나타낸 것이다.
- [44]

[45] 도 2는 본 발명의 반응 단계(a), 상기 반응 단계를 거친 후 샘플 내에 정상 혈색소와 비드 접합체가 결합된 당화혈색소가 함께 존재하는 상태(b) 및 정상 혈색소가 제거된 상태(c)를 도식화하여 나타낸 것이다.

[46]

[47] 도 3은 혈색소의 농도를 측정하기 위한 예시적인 방법을 도시한 것이다.

[48]

[49] 도 4는 정상 혈색소가 흡수 패드로 흡수되고 측정 창에는 비드접합체와 결합된 당화혈색소가 분리하여 존재하는 상태를 도식적으로 나타낸 것이다.

[50]

[51] 도 5는 비드의 존재가 혈색소 농도의 측정 값에 영향이 없음을 나타내는 그래프이다.

[52]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[53] 본 발명은 상술한 바와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 혈액 샘플에 존재하는 당화혈색소를 보다 용이하게 측정할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[54]

[55] 보다 상세하게, 본 발명의 일 견지에 따르면, 혈액 샘플을 용혈액으로 용혈시키는 용혈 단계; 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체를 상기 용혈된 혈액 샘플과 반응시키는 반응단계; 혈액 내의 총 혈색소의 양을 측정하는 제 1 측정 단계; 비드 접합체와 결합된 당화혈색소로부터 정상 혈색소를 분리하는 분리 단계; 혈액 내 당화혈색소의 양을 측정하는 제 2 측정 단계; 및 상기 측정된 혈액 샘플 내 총 혈색소의 양과 당화혈색소의 양을 기초로 하여 상기 혈액 샘플 내 당화혈색소의 농도를 계산하는 계산 단계를 포함하는 당화혈색소 측정방법을 제공한다.

[56]

[57] 이하에서 본 발명을 상세히 설명한다.

[58]

[59] 혈액 샘플 내의 당화혈색소 농도는 혈액 내 총 혈색소의 양에 상대적으로 측정되므로, 당화혈색소의 농도를 측정하기 위해서는 먼저 혈액 샘플을 용혈시켜서 혈액에 포함된 정상 혈색소 및 당화혈색소를 노출시키기 위한 용혈단계를 수행한다.

[60]

[61] 이 때 사용될 수 있는 용혈액은 용혈이 가능한 삼투압의 머피농도를 지니고 pH 7~8.5사이에서 작용하는 용혈액을 사용하며, 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TEs) 및 피페스(PIPES)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 계면활성제가 들어있는 완충용액으로서,

에컨대 20 mM 헤페스 완충용액(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid HEPES; pH 8.1)을 사용하는 것이 바람직하다. 다만, 용혈액은 이에 제한되지 않고 당해 기술분야에 알려진 어떠한 적절한 용혈액을 사용할 수 있다. 용혈된 혈액 샘플에는 혈색소(Hemoglobin) 및 당화혈색소(glycated Hemoglobin)가 함께 존재한다.

[62]

[63] 그 다음, 상기 용혈된 혈액 샘플에 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체를 반응시켜서, 당화혈색소가 비드에 의해 표지되도록 하는 반응 단계를 수행한다. 본 발명에서 사용되는 "비드접합체"의 용어는 당화혈색소에 결합할 수 있는 결합물질에 비드가 결합한 것을 의미하며, 상기 비드접합체는 당화혈색소 결합물질에 의해 당화혈색소에 부착된다. 이 때 본 발명에서 사용되는 "당화혈색소 결합물질"의 용어는 당화혈색소에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 예를 들어 보론산(boronic acid), 콘카나발린 A(concanavalin A) 및 항체(antibody) 중 적어도 하나일 수 있으며, 바람직하게는 보론산을 사용할 수 있다.

[64]

[65] 도 1에는 보론산을 당화혈색소 결합물질로 이용한 비드접합체와 당화혈색소가 반응하는 화학구조가 예시적으로 설명되어 있다. 도 1에 나타난 바와 같이, 보론산의 OH 작용기와 당화혈색소 말단에 결합된 당의 시스-디올(sis-diol)이 반응하여 오각형의 링 구조를 이루며, 이러한 특성을 이용하여 보론산은 총 혈색소 중에서 당화혈색소에만 특이적으로 결합된다.

[66]

[67] 따라서, 상기 당화혈색소 결합물질에 표지체를 부착시키는 경우 당화혈색소만을 선택적으로 표지할 수 있으며, 선행기술로는 염료 또는 자기를 띠는 물질 등을 부착시켜서 당화혈색소를 구분한다. 그러나, 본 발명에서는 당화혈색소의 분리를 위해 일정한 크기를 갖는 비드를 이용한다.

[68]

[69] 본 발명에서 사용될 수 있는 비드(bead)는 아가로즈(agarose), 셀룰로즈(cellulose) 또는 세파로즈(sepharose)와 같은 고분자 다당류 지지체, 폴리스티렌(polystyrene), 폴리메틸 메타크릴레이트(polymethylmethacrylate), 폴리비닐톨루엔(polyvinyltoluene)과 같은 라텍스(latex) 비드 및 유리(glass) 비드 중 적어도 하나일 수 있으며, 바람직하게는 세파로스 비드를 사용한다.

[70]

[71] 본 발명에 사용되는 상기 비드는 염료로서 작용하지 않으며, 당화혈색소를 이후 단계에서 비드의 부피에 의해 정상 혈색소로부터 분리할 수 있도록 한다. 이때 비드의 입경 크기는 반응 후 당화혈색소와 결합한 당화혈색소 결합물질-비드의 침전 시간과 당화혈색소와 반응하는 정도를 고려하여 선택하는 것이 바람직하다.

[72]

[73] 한편, 상기 용혈 단계 및 반응 단계는 별도의 단계로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 상기 용혈액 및 비드접합체를 혈액 샘플에 동시에 투입함으로써 단일의 단계로 수행될 수 있다.

[74]

[75] 이때 용혈 단계 및 반응단계에서 혈액샘플과 용혈액 및 비드접합체의 반응을 촉진하도록 반응 용기로 사용되는 카트리지를 흔들어 주는 것이 바람직하다. 이는 혈액샘플이 용혈액에 의해 용혈되어 빠져 나오고 동시에 당화혈색소가 비드접합체와 특이적으로 반응하도록 유도하기 위함이다. 여기서 용혈된 혈액샘플이 비드접합체와 충분히 반응할 수 있도록 일정 시간, 예를 들면 3분의 시간을 소요할 수 있다.

[76]

[77] 도 2에 도시된 바와 같이, 용혈 단계 및 반응 단계를 거치면 샘플 내에는 정상 혈색소와 비드 접합체가 결합된 당화혈색소가 함께 존재하며, 이 때 상기 혈액 내의 총 혈색소의 양을 측정한다. 즉, 도 2(a)에서는 비드접합체가 당화혈색소과 결합하는 과정을 도시하며, 도 2(b)는 상기 표지된 당화혈색소 및 정상 혈색소가 모두 포함된 총 혈색소의 상태를 도시한다. 한편, 도 2(c)는 혈액 샘플로부터 정상 혈색소가 제거되고 당화혈색소만 남은 상태를 나타낸다.

[78]

[79] 즉, 비드접합체가 결합된 당화혈색소 및 정상 혈색소가 함께 존재하는 상태에서 혈액 내 총 혈색소의 농도를 측정하는 제 1 측정 단계가 수행되며, 이는 광반사 특성을 이용한 측정방식에 따라 당화혈색소의 양을 측정할 수 있다. 예를 들면 혈액샘플의 당화혈색소의 양을 측정하고자 할 경우 특정 주파수의 광신호를 특이적으로 흡수하는 혈색소의 특성을 이용한다. 이 때 당화혈색소 측정장치는 포토 다이오드와 같은 발광소자와 수광소자를 이용하여 당화혈색소의 양을 측정하는 것이 바람직하다. 도 3은 예시적인 측정 과정을 도시하며, 도 3에 나타난 바와 같이 혈색소의 농도를 측정하기 위해 상기 반응은 투명한 측정창을 포함하는 카트리지 내에서 수행되는 것이 바람직하다.

[80]

[81] 부연하면 발광소자는 특정 파장을 갖는 광신호를 발광한다. 예를 들면 당화혈색소의 양을 측정하고자 할 경우 혈액샘플의 혈색소는 특이적으로 흡광을 나타내는 약 430nm 파장을 갖는 광신호를 발광할 수 있다. 이때 수광소자는 발광소자로부터 방사되어 카트리지를 통과한 광신호를 수신한다. 즉, 발광소자로 발광 제어 신호를 출력하고 수광소자로부터 입력되는 광신호를 A/D변환기를 통해 전기 신호로 변환하여 카트리지에 담겨져있는 혈색소의 양을 측정할 수 있다.

[82]

[83] 공지 기술에서는 당화혈색소에 붙은 비드가 당화혈색소 양의 측정 값에 영향을

주는 것을 방지하기 위하여, 비드의 부착 전에 총 혈액의 혈색소 양을 검출하고 당화혈색소의 양을 측정하기 위하여 비드접합체에 결합한 당화혈색소를 해리시키는 단계를 거쳐야 했으나, 본 발명자들은 실시예 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 당화혈색소에 비드접합체가 결합한 상태에서도 총 혈색소 양의 측정 값에 영향이 없는 것을 발견하여, 불필요한 단계를 생략할 수 있도록 하였다.

[84]

[85] 그 다음 단계로, 당화혈색소의 농도를 구하기 위해, 비드접합체와 결합된 당화혈색소로부터 정상 혈색소를 분리하는 분리 단계를 수행하여야 하며, 바람직하게 상기 분리 단계는 흡수 패드를 이용하여 정상 혈색소만을 흡수시켜서 수행될 수 있다.

[86]

[87] 본 발명에 사용될 수 있는 상기 흡수 패드는 다공성 패드인 것이 바람직하며, 이때 다공성 패드에 포함된 구멍의 크기는 혈색소보다 크지만 비드보다는 작은 크기를 가지는 것이어야 한다. 보다 상세하게 폴리에스터 및 폴리우레탄 등로부터 선택된 다공성 패드가 사용될 수 있다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 정상 혈색소는 상기 흡수 패드로 흡수되고, 비드와 결합된 당화혈색소가 따로 분리되며, 측정 창에는 비드접합체와 결합된 당화혈색소만을 분리하여 존재하도록 한다.

[88]

[89] 상기 흡수 패드는 측정이 끝난 혈액샘플 혼합물을 흡수하여 혈액샘플 혼합물의 이동을 차단한다. 예를 들면 이때 흡수 패드는 도 4에 도시된 바와 같이 측정영역의 하부에 위치하는 것이 바람직하다. 상기 분리단계는 흡수 패드 형식일 수 있으나, 다만 이에 한정되는 것은 아니다.

[90]

[91] 상기 분리단계는 보다 명확한 분리 및 분리 시간의 단축을 위해 세척액을 흘려주어 수행되는 것이 바람직하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 세척액은 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TES) 및 피페스(PIPES) 등의 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기 세척액이 혈액샘플 혼합물을 세척함에 따라 혈액샘플 내에 비특이적으로 존재하는 일반 혈색소(Ao)가 제거된다.

[92]

[93] 부연하면, 혈액샘플의 적혈구 내에 존재하는 헤모글로빈(Hb)은 대부분 비당화된 일반 헤모글로빈(Ao)이며, 이때 일반 헤모글로빈 중 4~14%만이 글루코즈(glucose)와 반응하여 당화된 헤모글로빈(HbA1c)으로 존재한다. 따라서 혈액 속의 당화된 헤모글로빈을 측정하기 위해서는 일반 헤모글로빈을 제거해야만 하며, 이를 위해 일반 헤모글로빈을 세척할 수 있는 세척액을 이용하여 당화된 헤모글로빈을 보다 용이하게 분리하여 측정할 수 있게 하는 것이 바람직하다.

[94]

[95] 그 결과 측정층에 당화혈색소만이 남는 결과가 되며, 이 때 상기 분리된 당화혈색소의 농도를 측정하는 제 2 측정단계를 수행한다. 제 2 측정단계는 상술한 제 1 측정 단계와 동일한 방법에 의해 수행될 수 있다. 즉, 제 2 측정 단계 역시 광 센서를 통한 광반사 측정 방식으로 측정하는 것이 바람직하다.

[96]

[97] 이 후 총 혈색소의 양을 당화혈색소의 양으로 나누어 혈액샘플 내의 당화혈색소의 상대적인 양을 측정한다. 이 때 당화혈색소 비율은 다음 식에 의해 계산된다.

[98]

[99] $\text{당화혈색소의 비율(\%)} = \text{당화혈색소} / \text{총혈색소} \times 100$

[100]

[101] 상술한 바와 같이 혈색소 농도의 용이한 측정을 위해 상기 반응은 측정영역이 포함된 카트리지 내에서 수행되는 것이 바람직하며, 상기 "측정영역"은 카트리지에서 혈액샘플 내의 혈색소 및 당화혈색소의 양을 측정하는 영역으로, 예를 들어 도 4에서 흡수 패드 상부의 영역을 지칭할 수 있다. 이때 측정영역은 광반사 특성 측정방식에 따라 혈색소의 양을 측정할 수 있다. 예를 들면 혈색소가 특정 주파수의 광신호를 특이적으로 흡수하는 특성을 이용한다. 이러한 혈색소의 특성에 의해 빛의 농도나 색조의 비교가 가능하여 혈색소의 농도를 측정할 수 있다. 나아가 측정영역은 광반사 특성 측정을 위해 외부 광센서를 통해 빛이 반사되는 광 윈도우를 더 포함할 수 있다.

[102]

[103] 본 발명을 하기의 실시예를 통해 보다 상세하게 설명하나, 이는 예시를 목적으로 한 것으로서 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[104]

발명의 실시를 위한 형태

[105] 실시예 1: 비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체의 제조

[106]

[107] (1) 세척단계:

[108] CM세파로스 비드를 총 부피가 1L가 되도록 증류수로 세 번 세척한 후, 100mM MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) PH 4.7 로 두 번 세척한다. 이 때 세척 방식은 버퍼를 첨가 후 침전시키고 상층액을 버리는 방식에 의한다. 세척 단계를 통해 비드에 남아있는 에탄올 성분을 없애고 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드 하이드로클로라이드(EDC or EDAC)의 수율이 좋은 최적 합성 pH로 변경한다.

[109]

[110] (2) 접합단계:

[111] 상기 EDC(1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드

하이드로클로라이드(EDC or EDAC)는 카르복실기와 1차 아민을 연결하는 제로-길이(zero-length) 교차결합제(crosslinking agent) 로써 상기 시약을 이용하여 카르복실기가 연결되어 있는 CM 세파로스와 3-아미노페닐 보론산의 아민기를 접합(conjugation)하여 APBA 비드를 합성할 수 있다.

[112]

[113] EDC를 46g, APBA를 4.65g 넣어 100mM MES(PH 4.7)에 녹인 뒤 차례로 비드 용액에 첨가하고, 4°C에서 두 시간 반응시킨다. APBA는 빛에 민감하므로 어두운 곳에서 반응시켜야 하며, EDC는 습기를 잘 흡수하므로 무게 잴 후 바로 뚜껑을 닫아서 보관에 유의하여야 한다.

[114]

[115] 교차결합제(cross linker)인 EDC와 합성 물질인 보론산을 첨가하여 합성하는 단계는 합성 부산물 생성 등 효율을 좋게 하기 위해 저온에서 합성한다.

[116] (3) 퀀칭(quenching) 및 블로킹(blocking) 단계:

[117] 1M 소듐 아세테이트(in D.W), 100mM 아세트산(in D.W), 50mM NaOH/1M NaCl (in D.W)용액을 각각 500ml씩 첨가하고, 1시간동안 상온에서 반응시킨다. 이 때 반응물은 빛에 민감하므로 어두운 곳에서 반응시킨다. 합성이 끝나고 남은 EDC를 소듐 아세테이트로 퀀칭하고 아세트산과 NaOH, NaCl 로 세척 및 블로킹한다.

[118]

[119] (4) 세척 단계

[120] 마지막으로 증류수로 3회 세척한 후, 20mM HEPES(PH 8.1) 버퍼로 2회 세척하고, 최종 pH는 7.4로 맞춘다.

[121]

[122] 도 1에는 아미노페닐보론산(aminophenyl-boronic acid, APBA)을 당화혈색소 결합물질로 이용한 비드접합체와 당화혈색소가 반응하는 화학구조가 예시적으로 설명되어 있다. 도 1에 나타난 바와 같이, 보론산의 OH 작용기와 당화혈색소 말단에 결합된 당의 시스-디올(sis-diol)이 반응하여 오각형의 링 구조를 이루며, 이러한 특성을 이용하여 보론산은 총 혈색소 중에서 당화혈색소에만 특이적으로 결합된다.

[123]

[124] 실시예 2: 당화혈색소 측정 값에 대한 비드의 영향

[125]

[126] 비드 크기에 따른 굴절이나 비드에 특이적으로 결합한 당화혈색소의 양과 상관 없이 총 헤모글로빈의 양에 따라 반사광이 일정하게 측정되는지 확인하기 위하여 하기의 실험을 실시 하였다.

[127]

[128] 당뇨병자와 정상인의 혈액을 포함한 임의의 10개 샘플을 원심분리한 후 혈장과 침전된 적혈구의 비율을 조절하는 방법으로 다음의 샘플을 준비하였다.

헤모글로빈 수치의 측정은 Hb 201(HemoCue, Sweden)을 사용하였다.

[129] -0~5g/dl:2개

[130] -5~10g/dl:3개

[131] -11~15g/dl:2개

[132] -15~20g/dl:3개

[133]

[134] 클로버 에이원씨((주)인포피아)를 팩토리모드로 전환하며, 팩토리모드에서는 반사광의 세기를 미가공(raw) 데이터로 LCD에 표시해 준다. 클로버 에이원씨 카트리지를((주)인포피아)를 클로버 에이원씨에 넣은 후에 용혈액과 비드접합체 혼합물을 700ul를 반응구역에 주입한다. 각 샘플 잘 흔들어 준 후 4ul을 용혈액에 주입한 후 기계를 작동 시킨다. 5분 후에 클로버 에이원씨 카트리지의 LCD창에 표시된 데이터를 읽는다.

[135]

[136] 그 결과 값은 하기 표 1과 같다.

[137]

[138] 표 1

헤모글로빈 수치와 k/s 값의 상관성

샘플 번호	당화혈색소 수치%	총 헤모글로빈 g/dl	k/s
1	5.1	2.8	0.152
2	7.6	6.0	0.339
3	5.2	11.1	0.720
4	5.3	7.4	0.490
5	8.6	4.5	0.255
6	9.6	20.0	1.219
7	6.7	12.9	0.837
8	5.4	18.5	1.157
9	10.1	9.3	0.563
10	4.9	17.0	1.043

[139]

[140] 그 결과 그래프를 도 5에 나타내었다. 상기 그래프에서 x축은 헤모글로빈 수치이며, y축은 k/s 값이다. k/s값은 반사광의 세기를 나타낸다.

[141]

[142] 따라서, x축과 y 축이 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 상관성이 있다는 것은, 헤모글로빈의 수치가 변함에 따라 비드의 반사광이 또한 그에 비례하여 일정하게 변하는 것을 확인할 수 있는 것이다.

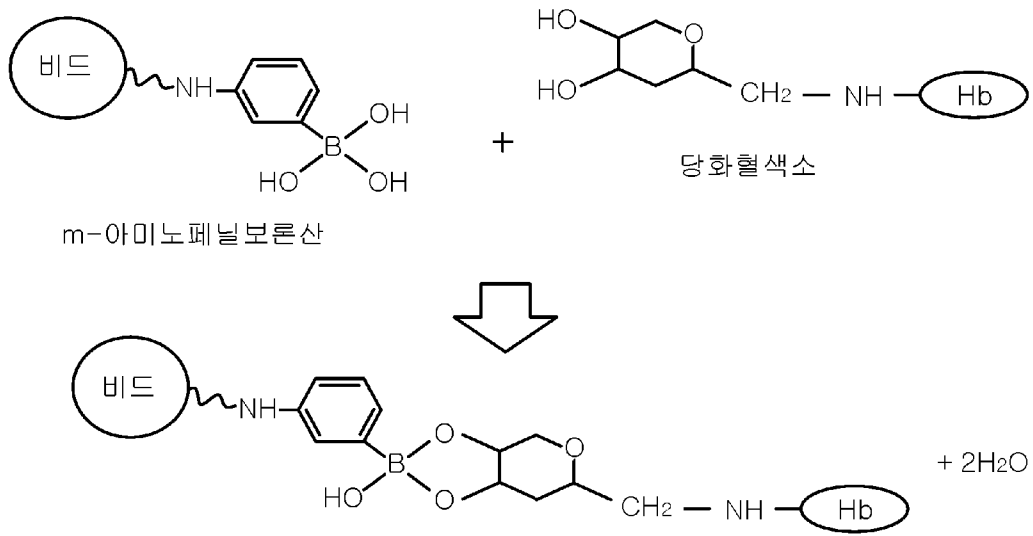
[143]

[144] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

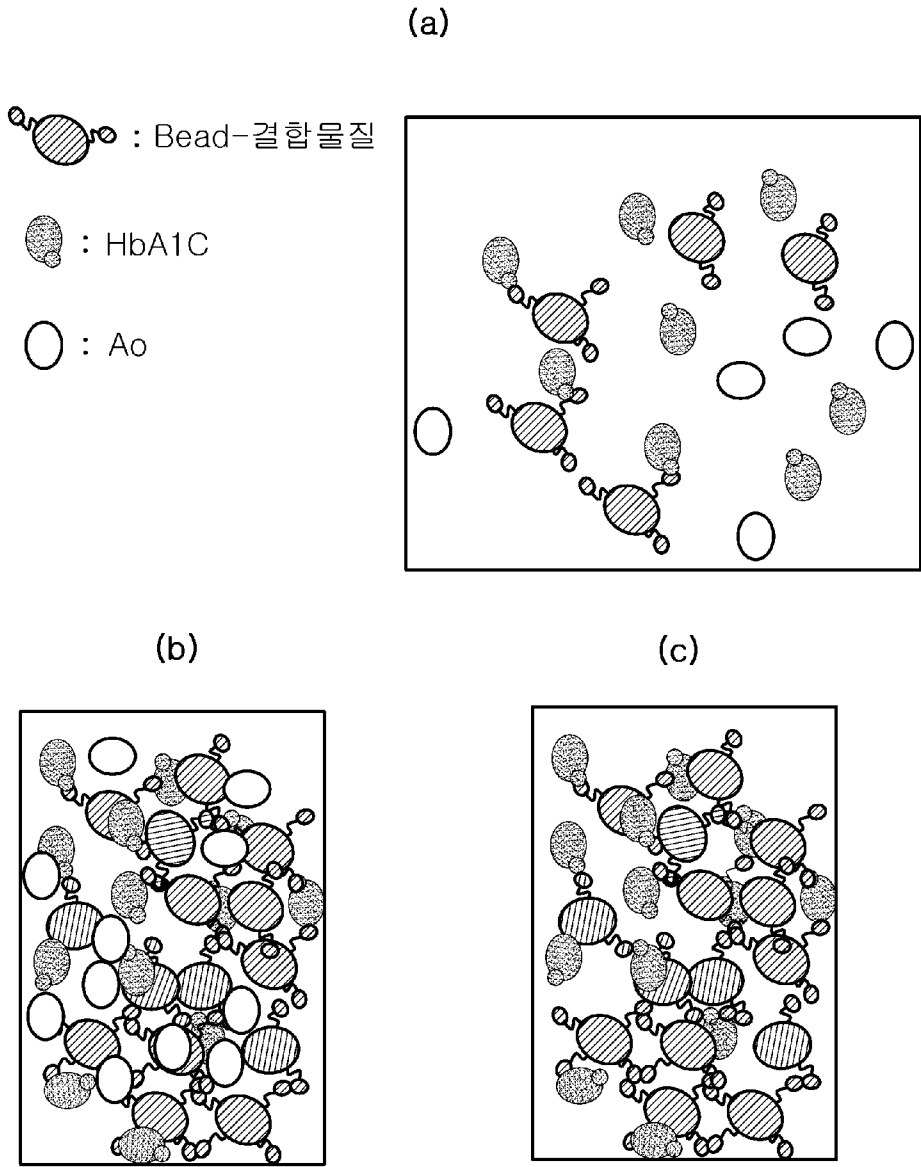
청구범위

- [1] 혈액 샘플을 용혈액으로 용혈시키는 용혈 단계;
비드와 당화혈색소 결합물질이 결합된 비드접합체를 상기 용혈된 혈액 샘플과 반응시키는 반응단계;
혈액 내 총 혈색소의 양을 측정하는 제 1 측정 단계;
비드 접합체와 결합된 당화혈색소로부터 정상 혈색소를 분리하는 분리 단계;
혈액 내 당화혈색소의 양을 측정하는 제 2 측정 단계; 및
상기 측정된 혈액 샘플 내 총 혈색소의 양과 당화혈색소의 양을 기초로 하여 상기 혈액 샘플 내 당화혈색소의 농도를 계산하는 계산 단계를 포함하는 당화혈색소 측정방법.
- [2] 제 1항에 있어서, 상기 용혈 단계 및 반응단계는 용혈액 및 비드접합체를 혈액 샘플에 동시 투여함으로써 단일의 단계로 수행되는 당화혈색소 측정방법.
- [3] 제 1항에 있어서, 상기 용혈액은 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TES) 및 피페스(PIPES)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 당화혈색소 측정방법.
- [4] 제 1항에 있어서, 상기 비드는 아가로즈, 셀룰로즈, 세파로즈, 폴리스티렌, 폴리메틸 메타크릴레이트, 폴리비닐톨루엔, 라텍스 비드 및 유리 비드 중 적어도 하나인 당화혈색소 측정방법.
- [5] 제 1항에 있어서, 상기 당화혈색소 결합물질은 보론산(boronic acid), 콘카나발린 A(concanavalin A) 및 항체(antibody) 중 적어도 하나인 당화혈색소 측정방법.
- [6] 제 1항에 있어서, 상기 제 1 측정 단계 및 제 2 측정단계는 광 센서를 통한 광반사 측정 방식으로 수행되는 당화혈색소 측정방법.
- [7] 제 1항에 있어서, 상기 분리단계는 세척액을 흘려주어 수행되는 당화혈색소 측정방법.
- [8] 제 7항에 있어서, 상기 세척액은 트리스(tris), 헤페스(HEPES), 테스(TES) 및 피페스(PIPES)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 당화혈색소 측정방법.
- [9] 제 1항에 있어서, 상기 분리 단계는 정상 혈색소를 흡수 패드를 이용하여 흡수하여 수행되는 당화혈색소 측정방법.
- [10] 제 9항에 있어서, 상기 흡수 패드는 다공성 패드인 당화혈색소 측정방법.
- [11] 제 10항에 있어서, 상기 다공성 패드에 포함된 포어(pore)의 크기는 혈색소보다 크고 비드 보다 작은 당화혈색소 측정방법.

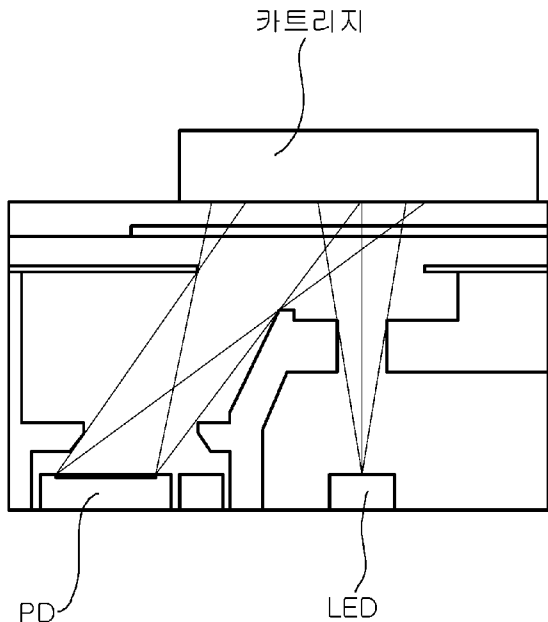
[Fig. 1]



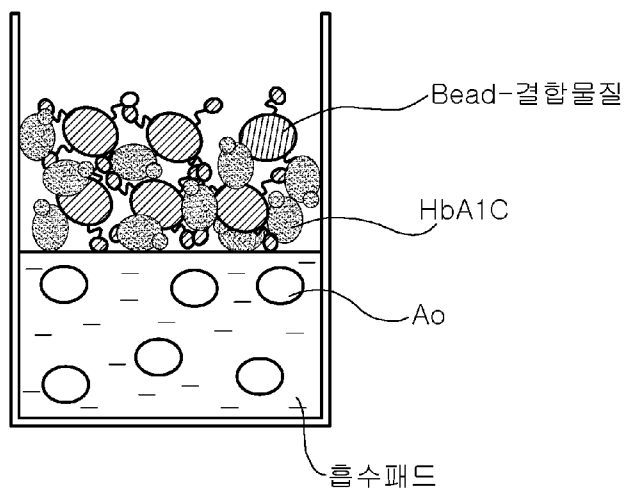
[Fig. 2]



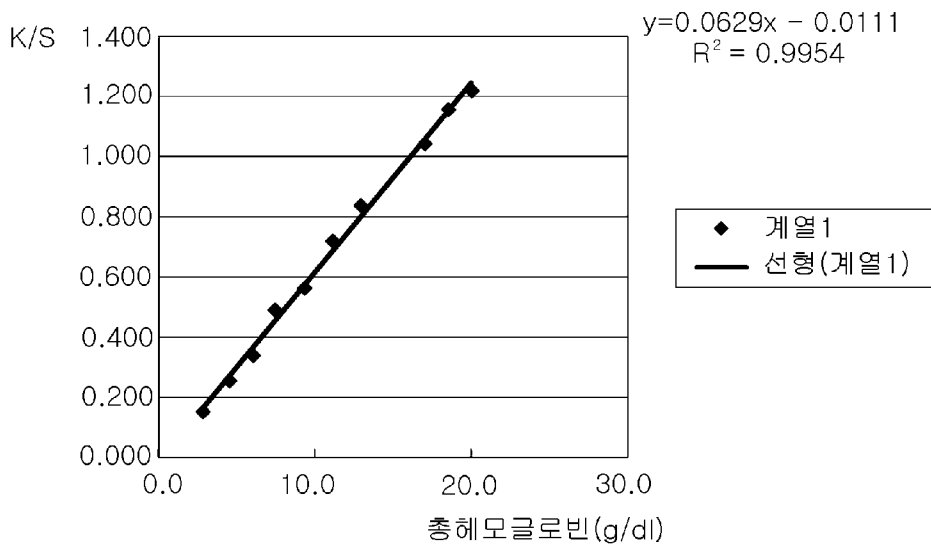
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/003303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/49(2006.01)i, G01N 33/52(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 33/49; G01N 33/36; G01N 33/50; G01N 33/53; G01N 33/543

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 aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keyword: glycated hemoglobin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0014292 A (I-SENS, INC.) 01 February 2007 Abstract, claims 1-14, and figure 1	1-11
A	KR 10-2006-0009665 A (INFOFIA CO., LTD.) 01 February 2006 Abstract and claims 1-7	1-11
A	KR 10-2004-0018893 A (BIO FOCUS LTD.) 04 March 2004 Abstract and claims 1-5	1-11



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

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

16 MARCH 2010 (16.03.2010)

Date of mailing of the international search report

17 MARCH 2010 (17.03.2010)

Name and mailing address of the ISA/


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/003303

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-2007-0014292 A	01.02.2007	NONE	
KR 10-2006-0009665 A	01.02.2006	NONE	
KR 10-2004-0018893 A	04.03.2004	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/49(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/49; G01N 33/36; G01N 33/50; G01N 33/53; G01N 33/543

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) & 키워드: 당화혈색소

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2007-0014292 A (주식회사 아이센스) 2007.02.01 요약, 청구항 1-14, 및 도면1	1-11
A	KR 10-2006-0009665 A (주식회사 인포피아) 2006.02.01 요약 및 청구항 1-7	1-11
A	KR 10-2004-0018893 A (주식회사 바이오포커스) 2004.03.04 요약 및 청구항 1-5	1-11

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 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2010년 03월 16일 (16.03.2010)	국제조사보고서 발송일 2010년 03월 17일 (17.03.2010)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 이준석 전화번호 82-42-481-8400
--	-----------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2007-0014292 A	2007.02.01	없음	
KR 10-2006-0009665 A	2006.02.01	없음	
KR 10-2004-0018893 A	2004.03.04	없음	