



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0144275
(43) 공개일자 2021년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/37 (2006.01) C12Q 1/26 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/37 (2013.01)
C12Q 1/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0061389
(22) 출원일자 2020년05월22일
심사청구일자 2020년05월22일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이병완
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 3층 내과학교실(신촌동)
이민영
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 3층, 내과학교실(신촌동)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사, 특허법인충현

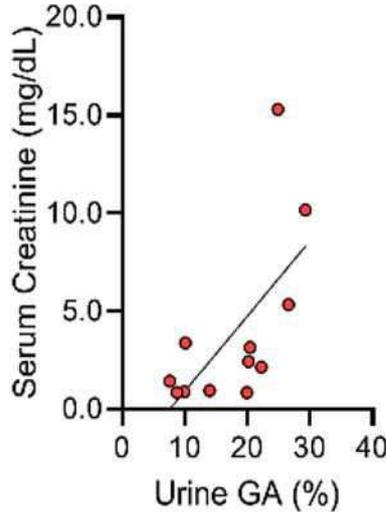
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 소변 당화 알부민을 포함하는 당뇨병성 신병증의 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 진단용 조성물 및 혈당 변화량 측정용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 소변 내 당화 알부민의 비침습적 측정만으로도 당뇨병성 신병증 및 혈당의 변화량에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 제공한다. 본 발명은 당뇨병성 신병증에 있어서 사구체 손상에 선행하는 신세뇨관의 손상은 물론 혈당 변화에 대한 정보까지 제공함으로써, 질환의 조기 진단 뿐 아니라 질환의 진행 정도에 대한 효율적인 바이오마커로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

G01N 33/6839 (2013.01)

G01N 2333/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

소변 내의 당화 알부민 측정용 제제를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 당뇨병은 알부민뇨를 동반한 2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 당뇨병성 신병증은 만성신부전(Chronic renal disease, CKD)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 당화 알부민 측정용 제제는 알부민-특이적 프로티네이즈(proteinase) 및 당화 아미노산 산화효소(glycated amino acid oxidase)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 당화 아미노산 산화효소(glycated amino acid oxidase)는 케토아민 옥시다제(ketoamine oxidase)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병성 신병증의 조기 진단용 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 신세뇨관의 손상 정도에 대한 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

소변 내의 당화 알부민 측정용 제제를 유효성분으로 포함하는 대상체의 혈당 변화량 측정용 조성물.

청구항 9

대상체로부터 분리된 소변 내의 당화 알부민 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 예측 또는 진단에 필요한 정보 제공 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 당뇨병성 신병증은 만성신부전(Chronic renal disease, CKD)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 당뇨병성 신병증은 초기 당뇨병성 신병증인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 방법은 신세뇨관의 손상 정도에 대한 정보를 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

대상체로부터 분리된 소변 내의 당화 알부민 농도를 측정하는 단계를 포함하는, 대상체 내의 혈당 변화량의 예측 또는 측정에 필요한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소변 내 당화 알부민의 농도를 측정함으로써 당뇨병성 신병증을 조기 진단하고 대상체 내 혈당 변동성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 당뇨병은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 이로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다. 현대인의 식생활 변화 및 운동 부족으로 인해 인체 고유의 에너지 대사과정에 커다란 변화가 발생하면서, 당뇨병의 유병률이 현저히 증가하고 있다.

[0004] 당뇨병은 제1형 당뇨, 제2형 당뇨로 구분된다. 소아 당뇨병으로도 불리는 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β-세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다. 제2형 당뇨는 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식단, 운동 부족 및 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이지만, 이 외에 특정 유전자의 결합에 의해서도 당뇨병이 생길 수 있으며, 췌장 수술, 감염, 약제에 의해서도 생길 수 있다. 당뇨병의 95% 이상은 제2형 당뇨병이다.

[0005] 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)은 당뇨병 환자에서 신장으로 공급되는 동맥에 고혈당으로 인한 동맥경화가 발생하여 신장 내 작은 혈관들이 손상됨으로써 신장 기능이 저하되는 질환이다. 신장 기능의 이상으로 인해 단백뇨가 발생하고 체내 물과 염분의 정체로 체중증가와 발목 부종 등의 증상과 함께 혈압 상승, 구토, 식욕 상실, 피로감, 근육경련 등의 증상을 수반한다. 특히, 당뇨병으로 인한 말기신질환(End-stage renal disease) 환자는 ESRD를 수반하지 않는 당뇨병 환자에 비해 사망률이 2배 정도 상승하므로, ESRD 및 만성신부전(Chronic renal disease, CKD)을 포함하는 당뇨병성 신병증에 대한 신뢰도 높은 바이오마커의 발굴이 매우 중요하다.

[0006] 현재까지 2형 당뇨병과 관련된 당뇨병성 신병증의 진단을 위해 알부민뇨(albuminuria)와 신사구체여과율(estimated glomerular filtration rate, eGFR)이 적용되어 왔으나, 이들은 당뇨병성 신병증으로 인한 사구체의 손상을 대변할 수는 있으나 사구체 손상에 선행하는 신세뇨관의 손상을 반영하지 못할 뿐 아니라 환자 내에서의 혈당 변화에 대한 정보도 제공하지 못한다. 이에, 이러한 기존의 당뇨병성 신병증 진단 방법의 단점을 보완하면서 보다 간편하고도 정확하게 조기 진단할 수 있는 새로운 바이오마커의 개발이 요구되고 있다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. J Diabetes Sci Technol. 2011 Nov 1;5(6):1455-62

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 당뇨병 환자의 삶의 질과 사망률에 중대한 영향을 미치는 주요 합병증인 당뇨병성 신병증에 대한 정확하고도 신속한 진단 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 소변 내 당화 알부민의 농도가 공복 혈당, 혈청 HbA1c, 혈청 당화 알부민, 혈청 크레아티닌 수준과 같은 이미 검증된 혈청 파라미터들과 유의한 양의 상관관계를 가지고, 추정 사구체 여과율(eGFR)과 같은 신장 기능 표지자와 유의한 음의 상관관계를 가져, 소변 내 당화 알부민의 비침습적 측정만으로도 이들 혈청 파라미터들을 간접적으로 예측함으로써 당뇨병성 신병증, 이로 인한 신세뇨관 손상 여부 및 혈당의 변화량 등에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 획득할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 대상체의 혈당 변화량 측정용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 소변 내의 당화 알부민 측정용 제제를 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 당뇨병 환자의 삶의 질과 사망률에 중대한 영향을 미치는 주요 합병증인 당뇨병성 신병증에 대한 정확하고도 신속한 진단 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 소변 내 당화 알부민의 농도가 공복 혈당, 혈청 HbA1c, 혈청 당화 알부민, 혈청 크레아티닌 수준과 같은 이미 검증된 혈청 파라미터들과 유의한 양의 상관관계를 가지고, 추정 사구체 여과율(eGFR)과 같은 신장 기능 표지자와 유의한 음의 상관관계를 가져, 소변 내 당화 알부민의 비침습적 측정만으로도 이들 혈청 파라미터들을 간접적으로 예측함으로써 당뇨병성 신병증, 이로 인한 신세뇨관 손상 여부 및 혈당의 변화량 등에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 획득할 수 있음을 발견하였다.

[0019] 본 명세서에서 용어 “당뇨”는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 조성물로 진단할 수 있는 신병증의 원인 질환이 되는 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 저항성에 의해 초래된다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과

지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다.

- [0021] 본 명세서에서 용어 “당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy, DN)”은 제1형 또는 제2형 당뇨병 환자에서 신장 내 혈관들의 손상으로 인해 사구체의 기능 이상이 발생하고, 이로 인해 신장 기능이 만성적으로 상실되는 질환을 의미한다.
- [0022] 당뇨병성 신병증은 심혈관 합병증을 포함한 여러 당뇨혈관 합병증의 발병 뿐 아니라 환자의 생존률 및 예후 등과 밀접한 관련이 있으므로, 당뇨병성 신병증에 대한 신속한 진단은 당뇨 환자에 대한 종합적인 치료 전략을 조기에 수립하는 데에 있어 매우 중요하다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 당뇨병 또는 그 합병증의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 특정 약물의 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 모두 포괄하는 의미이다.
- [0025] 본 발명자들은 공복 혈당, 혈청 HbA1c, 혈청 당화 알부민 농도 또는 혈청 크레아티닌 수준과 같은 당뇨병성 신병증에 대한 혈청 표지자(serum indicator)가 소변 내의 당화 알부민 농도와도 그 경향성에서 높은 일치도를 보일 뿐 아니라 신장 기능을 반영하는 추정 사구체 여과율(eGFR)과 유의한 음의 상관관계를 나타낸다는 사실을 처음으로 규명하고, 소변 내의 당화 알부민 농도를 비침습적 바이오 마커로 최초로 제안하였다. 소변과 혈액은 모두 다양한 대사체를 포함하는 체액으로서 내분비/대사 질환에 대한 정보를 제공하는 중요한 생체 시료이나, 진신을 순환하면서 다양한 대사 산물을 함유하는 혈액과 달리 소변은 신장에서 혈액을 여과한 뒤의 노폐물을 포함하고 있어 필연적으로 혈액과는 상이한 대사체 조성을 가진다. 이에, 혈액에서 나타나는 특정 대사체의 존부나 증감은 소변에서 동일하게 재연되지 않는 것이 일반적이며, 이 때문에 정확한 대사체 진단을 위해서는 불가피하게 침습적인 혈액 검사가 시행되어 왔다. 그러나, 본 발명의 새로운 발견을 통해 종래 혈액 검사로만 얻어지던 당뇨병성 신병증 및 관련 증상에 대한 진단 정보를 간단한 소변 검사만으로 신속하고 정확하게 취득할 수 있게 되었다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “당뇨병성 신병증의 진단용 조성물”은 대상체의 당뇨병성 신병증 발병 여부를 예측하기 위해 소변 내 당화 알부민 수준의 측정 수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “당뇨병성 신병증의 진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 진단하고자 하는 당뇨병성 신병증은 알부민뇨를 동반한 2형 당뇨병으로 인한 당뇨병성 신병증이다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “알부민뇨(albuminuria)”는 단백뇨(proteinuria)의 일종으로, 신장 기능의 저하로 인해 알부민이 신장에서 여과되지 않고 소변을 통해 체외로 배출되는 증상을 의미한다. 소변 내에서 하루 30mg 초과 알부민이 검출되는 경우 알부민뇨(혹은 미세알부민뇨)로 정의된다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 당뇨병성 신병증은 만성신부전(Chronic renal disease, CKD)이다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “만성신부전(Chronic renal disease, CKD)”은 수개월 또는 수년에 걸쳐 신장 기능이 점진적으로 소실되는 질환을 의미한다. 만성 심부전은 심혈관 질환, 고혈압, 골질환 및 빈혈과 같은 합병증을 유발하며, 원인질환 중 가장 큰 부분을 차지하는 것이 당뇨병으로, 만성신부전에서 투석이나 이식이 필요한 말기신질환(End-stage renal disease, ESRD)으로 진행된 환자 중 약 40%가 당뇨병을 가지고 있는 것으로 보고되었다.
- [0033] 본 발명에서 이용되는 당화 알부민 측정용 제제는, 체액 시료, 구체적으로는 소변 시료 내에서 당화 알부민과의 선택적인 반응을 통해 이를 정량적으로 검출할 수 있는 여하한 화합물, 효소, 항체, 앵타머 등을 모두 포괄하는 의미이다. 예를 들어, 단백질 분해효소를 이용한 효소적 방법을 이용하거나, 당화 알부민에 대한 항체를 이용한 면역 어세이(예를 들어 효소 면역측정법(ELISA), 효소-보론산 면역측정법(ELIBA), 측면유동면역발색법(lateral flow immunochromatography))을 이용하거나, 당화 알부민 특이적 앵타머를 이용한 분석법(예를 들어 SPR(surface plasmon resonance) 측정법)을 이용하거나, 또는 당화 알부민의 질량값을 이용한 질량 분석법(예를

들어 MALDI-TOF, SELDI-TOF, LC-MS, LC-MS/MS 등)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 단백질 검출/정량 수단이 모두 이용될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명은 시료 내에 이미 존재하는 당화 아미노산과 당화 펩타이드를 제거하기 위한 당화 아미노산 산화효소(glycated amino acid oxidase) 및 알부민을 아미노산 또는 펩타이드로 분해하기 위한 알부민-특이적 프로티네이즈(proteinase)를 이용한 효소적 방법을 통해 수행될 수 있다. 이때 프로티네이즈에 의해 생성된 당화 아미노산/ 펩타이드는 다시 당화 아미노산 산화효소에 의해 산화되어 과산화수소를 생성하며, 이는 다양한 방법으로 정량되어 시료 내 당화 알부민 양에 대한 정확한 정보를 제공한다.
- [0035] 보다 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 당화 아미노산 산화효소(glycated amino acid oxidase)는 케토아민 옥시다제(ketoamine oxidase) 또는 프룩토실-아미노 애시드 옥시다제(Fructosyl-amino acid oxidase)일 수 있으며, 가장 구체적으로는 케토아민 옥시다제이다.
- [0036] 보다 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 알부민-특이적 프로티네이즈(proteinase)는 프로티네이즈 N(Proteinase N), 중성 프로티네이즈(Neutral proteinase) 또는 프로티네이즈 K(Proteinase K)일 수 있으며, 가장 구체적으로는 프로티네이즈 K이다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 당뇨병성 신병증의 조기 진단용 조성물이다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “조기 진단(early diagnosis)”은 당뇨병성 신병증의 초기 단계, 예를 들어 사구체 손상(glomerular injury) 이전 단계에 당뇨병성 신병증에 대한 임상적 예측이 가능할 정도의 정보를 취득하는 것을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 신세뇨관의 손상 정도에 대한 정보를 제공한다.
- [0041] 당뇨병성 신병증에서는 사구체 손상이 일어나기 이전에 신세뇨관의 손상이 발생하는데, 만성신부전 등의 당뇨병성 신병증에 대한 종래의 진단 표지자인 알부민뇨(albuminuria)나 신사구체 여과율과 달리, 본 발명의 조성물은 소변 내 당화 단백질을 측정함으로써 신세뇨관과 신사구체의 손상을 함께 예측할 수 있어, 당뇨병성 신병증의 발병을 조기에 검출할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 소변 내의 당화 알부민 측정용 제제를 유효성분으로 포함하는 대상체의 혈당 변화량 측정용 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명에서 이용되는 소변 내의 당화 알부민 측정용 제제의 구체적인 조성에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0045] 알부민은 글루코스와 결합률이 매우 높아 당화혈색소보다 당화 알부민이 혈당 변화에 더욱 민감하게 반응하며, 적혈구 수명이 90일 정도인 것에 비하여 알부민은 15~20일 정도로 짧아서, 최근 2주 동안의 혈중 평균 글루코스 수준을 모니터링할 수 있다. 따라서, 혈당이 일정하게 유지되지 못하는 만성신부전 등의 당뇨병성 신병증 환자에서 당화 알부민의 농도는 매우 중요한 혈당 조절 지표로 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 혈청 내 당화 알부민 수준을 객관적으로 반영하는 소변 내의 당화 알부민 수준을 측정함으로써 대상체의 혈당 변화량에 대한 신호도 높은 정보를 제공할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대상체로부터 분리된 소변 내의 당화 알부민 농도를 측정하는 단계를 포함하는 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 예측 또는 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명에서 진단하고자 하는 당뇨병성 신병증 및 당화 알부민 농도의 일반적인 측정 방법에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 당화 알부민의 농도를 측정하기 위한 소변 시료를 제공하고, 당뇨병성 신병증 발병의 예측 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다. 본 발명의 조성물은 발병 여부를 예측하기 위한 정보를 제공하기 때문에, 본 발명의 대상체는 당뇨 또는 당뇨병성 신병증 환자

일 수도 있고 아직 이들 질환으로 확진되지 않은 정상개체(healthy subject)일 수도 있다.

- [0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대상체로부터 분리된 소변 내의 당화 알부민 농도를 측정하는 단계를 포함하는 대상체 내의 혈당 변화량의 예측 또는 측정에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명에서 예측하고자 하는 혈당 변화 및 당화 알부민 농도의 일반적인 측정 방법에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0054] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0055] (a) 본 발명은 당뇨병성 신병증(diabetic nephropathy)의 진단용 조성물 및 혈당 변화량 측정용 조성물을 제공한다.
- [0056] (b) 본 발명은 소변 내 당화 알부민의 비침습적 측정만으로도 당뇨병성 신병증 및 혈당의 변화량에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 제공한다.
- [0057] (c) 본 발명은 당뇨병성 신병증에 있어서 사구체 손상에 선행하는 신세뇨관의 손상은 물론 혈당 변화에 대한 정보까지 제공함으로써, 질환의 조기 진단 뿐 아니라 질환의 진행 정도에 대한 효율적인 바이오마커로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 효소적 방법을 이용한 당화 알부민의 분석 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 소변 내 당화 알부민 수준과 혈청 내 공복혈당(도 2a), HbA1c (도 2b) 및 당화 알부민(도 2c)간의 관계를 보여주는 그림이다. GA, 당화 알부민; HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c.
- 도 3은 소변 당화 알부민과 혈청 크레아티닌(도 3a), 소변 ACR과 혈청 크레아티닌(도 3b), 소변 당화 알부민과 eGFR(도 3c) 및 소변 ACR과 eGFR(도 3d)간의 관계를 각각 보여주는 그림이다. ACR, 알부민-크레아티닌 비; GA, 당화 알부민; eGFR, 추정 사구체 여과율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실시예**

[0063] **실험방법**

[0064] **소변 시료의 제작**

- [0065] 외래환자의 통상적인 소변검사 후 잔여 소변 샘플을 알부민뇨 환자 시료로부터 획득하였다. 시료를 원심분리 후 상등액 2 ml를 동결튜브(Cryotube)로 옮겼다. 이후 소변 내 당화 알부민(GA) 측정시까지 -80℃에서 보관하였다. 이후 보관된 시료를 상온으로 승온시킨 뒤 측정을 수행하였다.

[0067] **효소적 방법을 이용한 소변 GA의 측정**

- [0068] 일반적인 시약 및 정제된 혈청 단백질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 당화 알부민의 정제는 종래 보고된 방법에 따라 수행하였다(*Clin Chim Acta*, 2002;324(1-2):61-71). 당화 알부민은 Lucica® GA-L 키트를 이용한 효소적 방법을 통해 종래에 보고된 방법(*J Diabetes Sci Technol*. 2011 Nov 1;5(6):1455-62)에 따

라 측정하였다. 효소적 어세이에서, 1 단계로 먼저 내인성 당화 아미노산 및 과산화물은 케토아민 옥시다제 및 퍼옥시다제 반응에 의해 제거된다. 2 단계에서, GA는 알부민-특이적 프로티네이즈(proteinase)에 의해 아미노산 또는 펩타이드로 가수분해되며, 당화 아미노산 또는 펩타이드는 케토아민 옥시다제에 의해 산화되어 과산화수소를 생성하는데, 이는 정량적으로 측정될 수 있다.

[0069] 3 단계에서, BCP(bromocresol purple) 방법으로 알부민 농도를 측정하였으며, 마지막 4단계에서, GA 수준을 전체 알부민 대 GA의 상대적 비율로서 계산하였다(도 1).

[0071] **실험결과**

[0072] *알부민뇨 환자에서의 소변 당화 알부민 측정*

[0073] 본 발명자들은 알부민뇨 환자들의 소변 시료로부터 당화 알부민 농도를 측정하였으며, 대상 환자들의 임상적 특성은 하기 표 1과 같다:

표 1

	대상 (N = 12)
남성 (n, %)	9 (75)
연령	56 ± 12
BMI	17.8 ± 7.5
혈청 크레아티닌 (mg/dL)	3.93 ± 4.47
추정 사구체 여과율 (mL/min/1.73m ²)	45.8 ± 42.2
소변 당화 알부민(%)	7.0 ± 1.4
소변 미세알부민 (mg/dL)	530.8 ± 354.9
소변 알부민-크레아티닌 비 (mg/g)	4476 ± 1484
공복 혈당 (mg/dL)	156 ± 60
혈청 HbA1c (%) (n = 6)	7.0 ± 1.4
혈청 당화 알부민(%) (n = 3)	14.7 ± 3.5

[0075] 데이터는 평균 ± 표준편차(SD) 또는 % 값으로 나타내었다. BMI, 체질량지수; HbA1c, 당화 헤모글로빈 A1c.

[0077] *소변 당화 알부민과 혈당 파라미터 간의 관계*

[0078] 본 발명자들은 혈청 내 공복 혈당, 당화 헤모글로빈 A1c(HbA1c) 및 당화 알부민을 포함하는 혈당 파라미터와 소변 당화 알부민 간의 관련성을 조사하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 소변 내 당화 알부민 수준은 유용한 혈당 파라미터들과 양의 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 도 2에 나타난 이러한 명확한 경향성을 통해, 소변 내 당화 알부민은 혈당 조절 등에 대한 신뢰도 높은 바이오 마커로 기능할 수 있을 것으로 기대된다.

[0080] *당화 알부민 및 소변 알부민-크레아티닌 비와 신장 기능과의 관계*

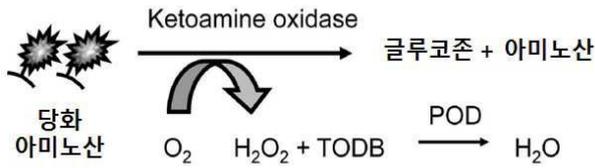
[0081] 본 발명자들은 소변 당화 알부민; 소변 알부민-크레아티닌 비(uACR); 혈청 크레아티닌 수준 및 추정 사구체 여과율(eGFR)을 포함하는 신장 기능 파라미터 간의 상관관계를 조사하였다. 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 소변 당화 알부민 수준은 uACR 보다 혈청 크레아티닌 수준 및 eGFR과 보다 두드러진 상관 관계를 나타냄을 확인하였다. 이를 통해, 소변 당화 알부민 수준이 uACR에 비해 만성신부전의 진행 정도를 반영하는 보다 우수한 바이오마커로 기능할 수 있음을 알 수 있었다.

[0082] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

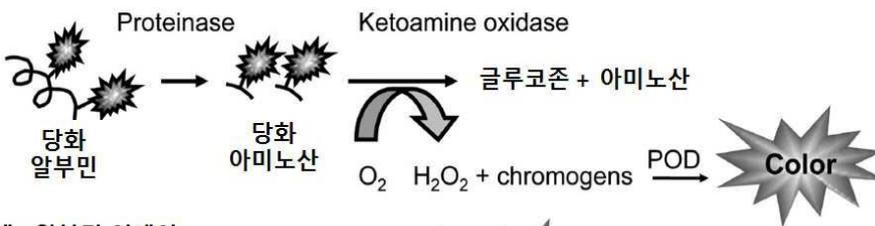
도면

도면1

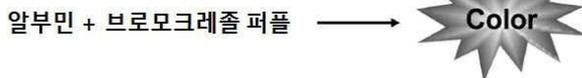
1 단계 : 당화 아미노산 제거 반응



2 단계 : 당화 알부민 어세이



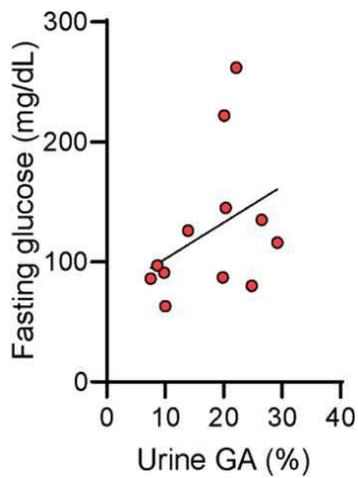
3 단계 : 알부민 어세이



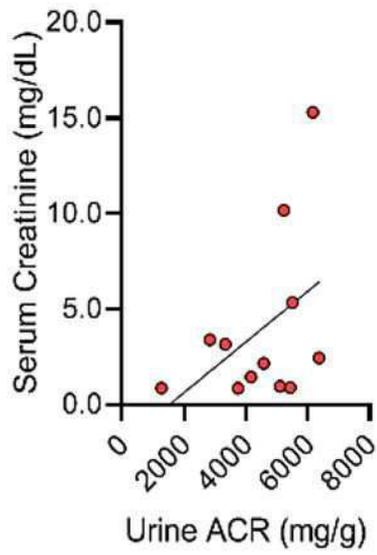
4 단계 : 전체 알부민에서 당화 알부민의 백분율 계산

$$GA \text{ 값} = GA \text{ 농도} / \text{총 알부민 농도} \times 100$$

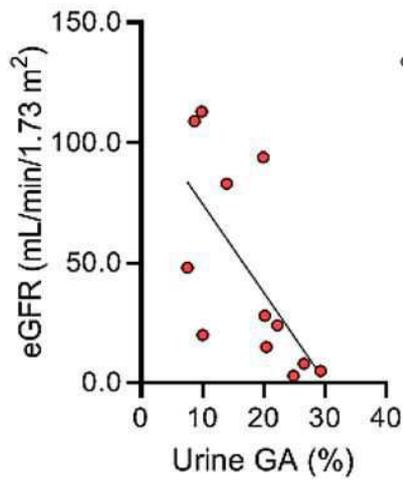
도면2a



도면3b



도면3c



도면3d

