

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0170568
(43) 공개일자 2022년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0081578

(22) 출원일자 2021년06월23일

심사청구일자 2021년06월23일

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

이사민

서울특별시 강남구 도산대로92길 10, 101-1404(청담동, 청담대우유료카운티)

지은혜

서울특별시 광진구 능동로28길 17, 201호(능동)

김아람

부산광역시 북구 화명신도시로 39, 707동 1803호
(화명동, 대림쌍용강변타운)

(74) 대리인

이명진

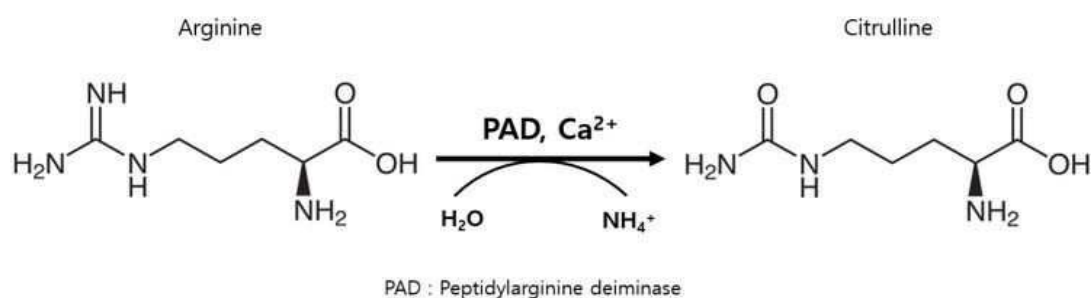
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 대동맥판막 협착증 진단 및 예후 예측을 위한 바이오마커로서 항-시트룰린화 펩티드 항체의
용도

(57) 요약

본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 및/또는 예후 예측을 위한 정보제공방법 등에 관한 것으로, 심장초음파검사 및 항-시트룰린화 펩티드 항체 검사를 모두 받은 약 700명의 환자를 대상으로 후향적 관찰을 수행한 결과 항-시트룰린화 펩티드 항체의 수준 증가가 대동맥판막 협착증의 발생 및 진행 정도와 연관되어 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준의 측정을 통해 대동맥판막 협착증의 발생 여부를 조기에 정확히 진단할 수 있을 뿐만 아니라 대동맥판막의 변성 정도, 중증도, 및 고혈압, 류마티스 관절염, 간질성 폐질환과 같은 합병증의 가능성 등을 예측할 수 있음을 확인한 바, 항-시트룰린화 펩티드 항체는 보다 효과적인 대동맥판막 협착증의 진단, 예후 예측, 및 치료를 위한 바이오마커로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/323 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312488
과제번호	2019R1I1A2A01060702
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	세포소기관 선택적 자가포식 기능 조절을 통한 노화성 난치 심장병 극복 연구
기 여 율	2/3
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2023.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033254
과제번호	HR20C0026010021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성(R&D)
연구과제명	고위험 환자 최적진료를 위한 차세대 융합 케어기술 개발 및 사업화
기 여 율	1/3
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis)의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 (anti-citrullinated peptide antibodies) 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및

(S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도가 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 진공흡입생검 검체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 진단을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 예후 예측을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 예후는 대동맥판막 협착증의 발생, 중증도, 진행 (progression), 재발, 무질병 생존 (disease-free survival), 대동맥판막의 변성 (degeneration), 및 합병증 발생으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 합병증은 고혈압, 류마티스 관절염, 및 간질성 폐질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준의 측정은 웨스턴 블롯, 형광 효소 면역분석법 (fluorescence enzyme immunoassay, FEIA), ELISA, 화학발광 마이크로입자 면역분석법 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법 (Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 대동맥판막 협착증은 대동맥판막의 석회화를 수반한 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

하기 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 치료 물질의 스크리닝 방법:

(S1) 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;

(S2) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및

(S3) 대조군 시료와 비교해 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도를 감소시킨 시험물질을 대동맥판막 협착증 치료 물질로 선별하는 단계.

청구항 10

항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제는 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 단백질 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 따른 조성물을 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 키트는 제1항의 정보제공방법이 기재된 설명서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대동맥판막 협착증 진단 및/또는 예후 예측을 위한 정보제공방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대동맥판막 협착증 (Aortic stenosis, AS)은 대동맥판막의 직경이 좁아져 좌심실에서 대동맥으로 혈류가 충분히 나가지 못하는 질환으로, 고령화 인구 비율이 높아지는 현대 사회에서 가장 흔히 발견되는 판막성 심장 질환이다. 대동맥판막 협착증은 기계적 스트레스 (mechanical stress)로 인한 내피세포의 손상에 따른 염증, 지질 침투 (lipid penetration)으로 인한 엽 (leaflet) 섬유화, 비후 (thickening), 및 석회화 (calcification)에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 대동맥판막 석회화와 함께 대동맥 경화증 (aortic sclerosis)을 동반한다. 대동맥판막 협착증은 증상이 경도인 경우에는 거의 무증상인 경우가 많고 따라서 무증상 기간 (subclinical period)이 길지만, 중증도 이상으로 진행되고 나면 전신으로 혈액이 순조롭게 나가지 못하므로 현기증, 흉통, 실신 등을 유발하며 치명적이다. 대동맥판막을 치료하지 않고 방치하는 경우 연간 사망률은 25%에 달하며, 평균 생존 기간은 2 내지 3년에 불과한 것으로 알려져 있다.

[0003] 현재 대동맥판막 협착증은 심장초음파검사 (echocardiography)를 통해 중증도를 평가하는데, 초음파 이미지가 선명하지 않거나 정확한 판별이 불가능한 경우 소화기 내시경과 유사한 방법으로 탐촉자가 결합되어 있는 기구를 식도에 삽입하여 식도를 가로질러 심장을 관찰하는 경식도 초음파 검사를 보충해 실시해야 하는 등, 복잡한 과정이 필요하다. 보다 정확한 검사를 위해서는 심도자술을 수행하는데, 심도자술은 국소마취하여 대퇴동맥을 통해 도관을 넣고 X선 투시를 이용하여 심장 내 각 구역의 압력 및 산소포화도를 측정해야 하므로 마찬가지로 복잡한 과정을 수반하며 환자의 불편을 초래한다. 최근에는 심장근육 섬유화 여부를 통해 대동맥판막 협착증을 진단하기도 하지만, 마찬가지로 심장조직 검사를 수행해야 하는 점에서 효율성이 떨어진다.

[0004] 대동맥판막 협착증은 대부분 퇴행성 원인에 의해 발생하므로 현재의 기술로는 정확한 진단이 어려운데, 특히 수술한 바와 같이 대동맥판막 협착증은 초기에는 증상이 거의 없기 때문에 더욱 발견하기 어렵고, 중증 이상으로 진행된 뒤에는 환자 생명에 치명적이다. 따라서 대동맥판막 협착증을 조기에 신속하고 정확하게 진단 및 예후 예측을 하기 위한 바이오마커의 발굴이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2019-0075953호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 심장초음파검사 및 항-시트룰린화 펩티드 (citrullinated peptide) 항체 검사를 모두 시행한 환자들을 대상으로 후향적 관찰연구를 수행한 결과, 항-시트룰린화 펩티드 항체의 역가 (titer)의 증가가 대동맥판막 협착증 진행의 독립적인 예측 인자로 작용할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 대동맥판막 협착증 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 조성물 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될

수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis)의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보 제공방법을 제공한다:
- [0014] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 (anti-citrullinated peptide antibodies) 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0015] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도가 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 정보제공방법은 (S3) 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및/또는 시트룰린화 단백질 활성 정도가 대조군에 비해 증가되어 있는 경우 대동맥판막 협착증으로 진단하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세 침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 진공흡입생검 검체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 진단을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 예후 예측을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 예후는 대동맥판막 협착증의 발생, 중증도, 진행 (progression), 재발, 무질병 생존 (disease-free survival), 대동맥판막의 변성 (degeneration), 및 합병증 발생으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 합병증은 고혈압, 류마티스 관절염, 및 간질성 폐질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준의 측정은 웨스턴 블롯, 형광 효소 면역분석법 (fluorescence enzyme immunoassay, FEIA), ELISA, 화학발광 마이크로입자 면역분석법 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법 (Mass spectrometry), FACS 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 대동맥판막 협착증은 대동맥판막의 석회화를 수반한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0025] (S1) 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;
- [0026] (S2) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0027] (S3) 대조군 시료와 비교해 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도를 감소시킨 시험물질을 대동맥판막 협착증 치료 물질로 선별하는 단계.
- [0028] 또한, 본 발명은 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

- [0029] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제는 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 단백질 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 또한, 본 발명에 따른 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 키트는 본 발명에 따른 정보제공방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 방법을 제공한다:
- [0033] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0034] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및/또는 시트룰린화 단백질 활성 정도가 대조군에 비해 증가되어 있는 경우 대동맥판막 협착증으로 진단하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계.
- [0035] 또한, 본 발명은 항-시트룰린화 펩티드 항체의 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 및/또는 예후 예측을 위한 정보제공방법 등에 관한 것으로, 심장초음파검사 및 항-시트룰린화 펩티드 항체 검사를 모두 받은 약 700명의 환자를 대상으로 후향적 관찰을 수행한 결과 항-시트룰린화 펩티드 항체의 수준 증가가 대동맥판막 협착증의 발생 및 진행 정도와 연관되어 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준의 측정을 통해 대동맥판막 협착증의 발생 여부를 조기에 정확히 진단할 수 있을 뿐만 아니라 대동맥판막의 변성 정도, 중증도, 및 고혈압, 류마티스 관절염, 간질성 폐질환과 같은 합병증의 가능성 등을 예측할 수 있음을 확인한 바, 항-시트룰린화 펩티드 항체는 보다 효과적인 대동맥판막 협착증의 진단, 예후 예측, 및 치료를 위한 바이오마커로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 대동맥판막 협착증 발병에 기여하는, PAD (Peptidylarginine Deiminase)에 의한 시트룰린화 단백질의 생성과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명과 관련된 연구 개략도이다. 흉벽 심장초음파검사 (transthoracic echocardiography) 및 항-시트룰린화 펩티드 항체 (항-CCP 항체) 검사를 모두 받은 총 678명의 피험자를 대상으로 실험을 진행하였으며, 331명의 환자가 후속적 흉벽심장초음파검사를 받았다.
- 도 3a는 정상 대동맥판막 조직 및 대동맥판막 협착증(AS) 환자의 대동맥판막 조직의 시트룰린화 단백질을 면역조직화학 분석법으로 확인한 결과이다.
- 도 3b는 면역조직화학으로 염색된 정상 대동맥판막 조직 또는 AS 환자의 대동맥판막 조직의 사진에서 염색된 시트룰린화 단백질의 비율을 수치화하여 비교한 결과이다.
- 도 4는 정상 대동맥판막 조직 및 AS 환자의 대동맥판막 조직의 시트룰린화 단백질 수준을 웨스턴블롯으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹별 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 수준, 대동맥판막 변성 정도, 및 대동맥판막 협착증 진행 정도를 나타낸다.
- 도 6은 대동맥판막 협착증을 예측하기 위한 독립적인 인자들을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명자들은 심장초음파검사 및 항-시트룰린화 펩티드 특이적 항체 (anti-citrullinated peptide

antibodies) 검사를 모두 시행한 환자들을 대상으로 후향적 관찰연구를 수행한 결과, 항-시트룰린화 펩티드 항체의 역가 (titer)의 증가가 대동맥판막 협착증 진행의 독립적인 예측 인자로 작용할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

- [0041] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 대동맥판막 협착증 환자의 변성된 대동맥판막 조직과 정상 대동맥판막 조직 내의 시트룰린화 단백질 (citrullinated protein) 수준을 비교한 결과, 대동맥판막 협착증 환자의 대동맥판막 조직에서 시트룰린화 단백질 수준이 증가한 것을 확인한 바, 대동맥판막 협착증과 시트룰린화 펩티드의 관련성을 확인하였다 (실시예 1).
- [0042] 본 발명의 다른 실시예에서는 대동맥판막의 변성 여부에 따른 피험자들의 임상적 특성을 확인한 결과, 변성된 대동맥판막을 가진 환자는 관상동맥, 고혈압 등의 질환뿐만 아니라 항-시트룰린화 펩티드 항체 양성 비율이 높은 것을 확인하였다 (실시예 2).
- [0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹 (음성, 낮은 양성, 높은 양성)별 환자 특성을 비교한 결과 항-시트룰린화 펩티드 항체의 높은 양성 그룹에서 고혈압, 류마티스 관절염, 간질성 폐질환 등의 합병증 동반 비율이 높고, 항-시트룰린화 펩티드 항체 양성 그룹 (낮은 양성, 높은 양성)에서 대동맥판막 변성 비율이 더 높은 것을 확인하였다 (실시예 3-1).
- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 항-시트룰린화 펩티드 항체의 역가에 따른 임상적 결과를 비교한 결과 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가의 높은 양성 그룹 및 낮은 양성 그룹에서 음성 그룹에 비해 대동맥판막 협착증 진행 비율이 더 높은 것을 확인하였다 (실시예 3-2).
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 단변량 및 다변량 분석을 통해 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가와 대동맥판막 협착증의 연관성을 확인한 결과, 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가가 대동맥판막 협착증 진행의 독립적인 예측 인자로 기능할 수 있음을 확인하였다 (실시예 4).
- [0047] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0049] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis)의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보 제공방법을 제공한다:
- [0050] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 (citrullinated peptide) 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0051] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도가 대조군에 비해 증가되어 있는지 확인하는 단계.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 정보제공방법은 상기 단계 (S1)에서 측정된 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 경우 대동맥판막 협착증으로 진단하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 좋지 않은 것으로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis, AS)은 좌심실에서 대동맥으로 피가 유출되는 부위에 있는 심장 판막인 대동맥판막이 좌심실이 수축할 때 잘 열리지 않는 질환을 의미하며, 대동맥판막 협착증 환자는 좌심실에서 대동맥으로 혈류가 충분히 나가지 못하므로 흉통, 실신, 호흡 곤란 등을 겪는다. 본 발명에 있어 대동맥판막 협착증은 대동맥판막의 퇴행성 변화 (degenerative changes), 즉, 대동맥판막의 지질 침착 (lipid deposition) 및/또는 염증을 수반하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 대동맥판막의 섬유화 (fibrosis) 및 석회화 (calcification)를 수반하는 것을 특징으로 할 수 있다. 대동맥판막 협착증은 전신의 혈류의 장애를 유발하므로 이로 인해 심장의 수축력이 과하게 증가하면서 심비대로 이어질 수 있으며, 과도한 심장 수축이 지속 되면 오히려 심장 근육의 수축력이 저하되어 심부전 증세가 나타날 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 사용된 용어, “시트룰린화 펩티드 (citrullinated peptide)” 또는 “시트룰린화 단백질 (citrullinated protein)”은 단백질 알지닌 디아미네이즈 (protein arginine deaminase, PAD) 효소에 의해 시트룰린화 (citrullination)가 일어난 펩티드를 의미한다. 시트룰린화 (citrullination)는 단백질의 번역 후 변형 (post-translational modification) 중 하나로, PAD 효소에 의한 펩티딜-알지닌 (peptidyl-arginine)의 탈아민

반응 (deamination)에 의해 일어난다. 시트룰린화는 여러 만성적 염증 질환에서 종종 발생하며 염증과 관련된 면역학적 매커니즘과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 시트룰린화 펩티드에는 시트룰린기 (Cit-Gly motifs)를 포함하는 펩티드라면 제한 없이 포함될 수 있고, 바람직하게는, 상기 시트룰린화 펩티드는 순환성 시트룰린화 펩티드 (cyclic citrullinated peptide, CCP)을 포함하며, 합성 CCP (synthetic CCP) 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 시트룰린화 펩티드에는 바람직하게는 시트룰린화가 일어난 프로-필라그린 펩티드 (pro-filaggrin peptide), 필라그린 단백질 (filaggrin protein), 비멘틴 (vimentin), 돌연변이된 비멘틴 (mutated vimentin), 피브리노젠 (fibrinogen), 오브알부민 (ovalbumin), EBNA-1, EBNA-2, 프로테오글리칸 (proteoglycan), 콜라겐 (collagen), 에놀레이즈 (enolase), 알파-에놀레이즈 등이 포함될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 펩티드 및 단백질들은 공지된 것들로서, 공공 단백질 데이터베이스 Uniprot (<https://www.uniprot.org>) 등에서 상기 펩티드 및 단백질의 서열을 확인할 수 있다. 일부 시트룰린화 펩티드의 서열 중 일부를 아래 표에 정리하였다 (서열 중 “X”는 시트룰린화 부위를 의미한다).

[0055] [시트룰린화 펩티드 서열]

명칭	서열	서열번호
Pro-filaggrin (1)	HQCHQEST-X-GRSRGRCGRSGS	1
Pro-filaggrin (2)	SHQEST-X-GRSRGRS	2
Fibrinogen	DHEGTHSTK-X-GHAKSRPVRD	3
Ovalbumin (1)	TRTQINKVV-X-GDKLPGFGDS	4
Ovalbumin (2)	VESQTNGII-X-GVLQPSSVDS	5
EBNA-1 (1)	GGR-X-GRGRERARGGRERAR	6
EBNA-1 (2)	GGRRGRGRERA-X-GGRERAR	7
EBNA-1 (3)	A-X-GGRERARGRGRGRGEKR	8
EBNA-1 (4)	ARGGRERARGRGRG-X-GEKR	9
EBNA-1 (5)	GGSKTSLYNLR-X-GTALAIPQ	10
Proteoglycan	PQASVPLRLT-X-GSRAPISRAQ	11
α -Enolase	CKIHA-X-EIFDS-X-GNPTVEC	12
Vimentin	GRVYAT-X-SSAVR	13

[0056]

[0058] 본 명세서에서 사용된 용어, “항체 (antibodies)”는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다.

[0059] 일반적으로 항체는 체내로 외부 물질이 침입했을 때 생성되어 외부 물질을 항원으로 인식하고 이를 무력화시키는 기능을 수행하지만, “자가항체 (autoantibody)”의 경우 자기 자신의 체성분을 항원으로 인식하여 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있다. 즉 자가항체는 면역체계의 이상으로 자신의 체성분에 대해 생성되는 항체인데, 자가항체의 과도한 생성은 류마티스 관절염, 루푸스, 항인지질 증후군과 같은 자가면역 질환을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0060] 본 발명에 따른 “항-시트룰린화 펩티드 항체”는 체내의 시트룰린화 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 자가 항체, 즉, 시트룰린기 (Cit-Gly motifs)를 포함하는 펩티드를 항원 (epitope)으로 인식하는 모든 자가 항체를 의미한다. 즉, 본 발명에 따른 항-시트룰린화 펩티드 항체는 종류에 제한이 없으며 시트룰린화 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 제한 없이 포함된다. 본 명세서 전반에 걸쳐 “항-시트룰린화 펩티드 항체”는 항-CCP (cyclic citrullinated peptide) 항체, anti-CCP antibodies (Ab) 등과 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명에 있어서, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상 (subject)의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후 (prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스 (therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.

- [0062] 본 발명에 있어서, “예후” 는 병의 발생, 진행, 회복, 재발, 및 약물 내성 등에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 있어서 “예후” 란 대동맥판막 협착증의 발생, 중증도, 진행 (progression), 재발, 무질병 생존 (disease-free survival), 대동맥판막의 변성 (degeneration), 및 합병증 발생으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다. 상술한 바와 같이, “대동맥판막의 변성” 은 대동맥판막의 지질 침착, 염증, 섬유화 및/또는 석회화를 포함한다.
- [0063] 본 발명에 있어서 대동맥판막 협착증의 “진행 (progression)” 이란 증상의 악화, 즉, 중증도의 심화를 포함하는 개념일 수 있다. 구체적으로, 중증도는 없음 (none), 경도 (mild), 보통 (moderate), 또는 중증 (severe)으로 분류될 수 있으며, 본 발명에 있어 대동맥판막 협착증의 “진행 (progression)” 은 중증도가 일 등급 이상 악화된 것을 의미할 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명에 있어서 상기 “합병증” 에는 대동맥판막 협착증과 관련하여 발생한 질환 또는 대동맥판막 협착증을 유도하는 것으로 알려진 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다. 즉, 대동맥판막 협착증과 동시에 또는 서로 진후에 발생하는 것으로 알려진 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 상기 합병증에는 심부전, 심내막염, 실신, 협심증, 사망, 심혈관계 질환에 의한 사망, 대동맥판막 치환술, 대동맥판막 기능부전, 승모판 기능부전, 승모판 협착, 류마티스 관절염, 고혈압, 당뇨병, 관상동맥 질환, 만성 신장질환, 뇌혈관 사건 (cerebrovascular accident), 및 간질성 폐질환 (interstitial lung disease) 등이 포함될 수 있고, 바람직하게는 류마티스 관절염, 고혈압, 및/또는 간질성 폐질환을 의미할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서 상기 “생물학적 시료” 는 대동맥판막 협착증을 진단하거나 예후를 예측하고자 하는 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 항-시트룰린화 펩티드 항체 검사에서 일반적으로 사용되는 시료로 알려진 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검 (core needle biopsy) 검체 및 진공흡입생검 검체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화 (homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출 (sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서 “대조군 (control)” 은 정상인 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 의미할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 진단을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료를 의미할 수 있고, 본 발명에 따른 정보제공방법이 대동맥판막 협착증 예후 예측을 위한 것인 경우, 상기 대조군은 정상인 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료를 의미할 수 있다. 상기 용어 “정상인” 은 대동맥판막 협착증에 걸린 적이 없는 개체 또는 건강한 개체를 의미한다. 본 발명에 있어서 “피검체” 는 인간을 포함한 포유류일 수 있으며, 대동맥판막 협착증을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 개체일 수 있다.
- [0068] 본 명세서에서 사용된 용어, “측정” 은 목적하는 물질 (본 발명의 경우 항-시트룰린화 펩티드 항체)의 존재 (발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준 (발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것 (즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법 (분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적인 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 단백질 검출은 항-시트룰린화 펩티드 항체의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가 (상향 조절) 또는 감소 (하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0069] 체내의 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 단백질 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법에 특별한 제한은 없으나 웨스턴 블롯, 형광 효소 면역분석법 (fluorescence enzyme immunoassay, FEIA), ELISA, 화학발광 마이크로입자 면역분석법 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법 (Mass spectrometry), FACS, 및/또는 단백질칩 등의 방법에 의해 측정할 수 있다. 항-시트룰린화 펩티드 항체의 수준

을 측정하는 방법은 특히 당업계에 잘 알려져 있는데, 예를 들면, 표면에 시트룰린화 단백질이 코팅 (coating) 된 마이크로플레이트 (microplate)에 시료를 처리하여 상기 시료 내에 존재하는 항-시트룰린화 펩티드 항체를 특정 시트룰린화 단백질에 결합시킨 후, 발광 효소 (예를 들어, HRP)가 결합되어 있으며 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 결합할 수 있는 항-인간 IgG 항체를 처리하여 발광 정도를 측정하는 방법을 통해 시료 내의 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정할 수 있다.

[0070] 또한, 시트룰린화 단백질 수준 및/또는 시트룰린화 단백질 활성 정도를 측정하는 방법 역시 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면, 웨스턴 블롯, 형광 효소 면역분석법 (fluorescence enzyme immunoassay, FEIA), ELISA, 화학발광 마이크로입자 면역분석법 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA), 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로켓 면역전기영동 (Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법 (Mass spectrometry), FACS, 및/또는 단백질칩 등의 방법에 의해 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 용어, '분석'은 바람직하게는 '측정'을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.

[0072] 본 명세서에 있어서, “수준이 증가되어 있다”는 것은, 검출되지 않던 것이 검출된 것, 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 검출량이 많아지는 것을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

[0073] 예를 들어, 수준이 “증가”되어 있다는 것은, 실험군의 수준이 대조군의 그것에 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 그 이상, 예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 높은, 및/또는 0.5배, 1.1배, 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배 또는 그 이상 높은 것을 의미한다. 구체적으로는, 대조군의 그것에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 증가한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0075] (S1) 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;

[0076] (S2) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및 시트룰린화 단백질 활성 정도로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 측정하는 단계; 및

[0077] (S3) 대조군 시료와 비교해 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 또는 시트룰린화 단백질 활성 정도를 감소시킨 시험물질을 대동맥판막 협착증 치료 물질로 선별하는 단계.

[0078] 본 발명에 있어서 “시험물질”은 생물학적 시료 내의 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 시트룰린화 단백질 수준, 및/또는 시트룰린화 단백질 활성 정도에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 재조합 플라스미드(recombinant plasmid), 나노입자(nanoparticle), 단백질, 올리고펩타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어, “대조군”은 시험물질을 처리하지 않은 시료일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 또한, 본 발명은 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다. 또한, 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제는 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 단백질 또는 앵타머일 수 있다. 바람직하게는, 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 단백질은 항-시트룰린화 펩티드 항체를 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 제한없이 포함될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 단백질은 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 항체일 수 있다.

- [0080] 본 발명에 있어서, 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 “항체”는 항-시트룰린화 펩티드 항체의 항원상 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준을 측정하는 제제로서의 항체는 항-시트룰린화 펩티드 항체에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항-시트룰린화 펩티드 항체 특이적 항체에는 본 발명 단백질 (항-시트룰린화 펩티드 항체)에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.
- [0081] 본 명세서에서 사용된 용어, “애타머(aptamer)”는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 애타머의 제조는 일반적인 애타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 애타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 상기 항-시트룰린화 펩티드 항체에 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한 없이 사용하여 피검체(본 발명에서는 피검체로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는, 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다. 또한, 상기 키트는 본 발명에 따른 대동맥판막 협착증 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.
- [0085] 상기 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 및/또는 애타머뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 키트는 시트룰린화 펩티드가 코팅된 플레이트, 항-시트룰린화 펩티드 항체의 시트룰린화 펩티드에의 결합을 검출하기 위한 효소 및/또는 발광 반응을 위한 기질, 세척 용액, 대조군 시료 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0088] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0089] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0091] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽

게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실험예]

실험예 1. 인간 대동맥판막 조직의 확보

대동맥판막 협착증(aortic stenosis, AS)이 있거나 없는 환자의 대동맥판막 조직은 대동맥판막 교체 또는 심장 이식이 이루어질 때 얻었다. 모든 환자는 임상적으로 류마티스 관절염이 없었다. 본 발명의 실시예는 헬싱키 선언 (Declaration of Helsinki)를 준수하였으며, 서울 아산병원 기관 심사위원회 (Institutional Review Board, IRB)가 인체 시료 수득을 위한 연구 프로토콜을 승인하였고, 모든 환자로부터 서면 동의를 얻었다.

실험예 2. 일차 대동맥판막 간질 세포 (primary aortic valve interstitial cells)의 분리

확보한 인간 대동맥 판막의 한 개 엽 (leaflet)을 4 내지 5 조각으로 절단한 후 콜라겐분해효소(collagenase)와 37℃에서 30분간 반응시켜 대동맥판막 내피세포 (endothelial cells)을 제거하였다. 이어서, 37℃에서 1.5시간 동안 추가 배양하여 대동맥판막 간질세포 (aortic valve interstitial cells, AVICs)를 수득했다. 단리된 인간 AVIC은 1% 항세균-항진균제 및 10% FBS가 함유된 DMEM/F12에서 배양했다. 패시지(passages)가 2 내지 5인 세포 만을 웨스턴 블롯 등의 실험에 사용하였다.

실험예 3. 웨스턴 블롯 (Western blot)

수득한 대동맥판막 및 단리된 AVIC를 단백질분해효소 억제제와 혼합한 1X RIPA 용액으로 균질화 (homogenization)한 후, 용해물을 SDS-PAGE 젤에 로딩(loading)했다. 분리된 단백질은 PVDF 막에 트랜스퍼 (transfer) 하였으며, 이어서 PVDF 막을 상온에서 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였다. 이어서 전-시트룰린화 단백질 항체 (pan-citrullinated protein antibody) (abcam, ab6464, 1:1000 비율 희석) 및 HRP-결합 항-토끼 IgG 항체를 사용하여 검출하였다.

실험예 4. 면역조직화학 (Immunohistochemistry)

조직 고정 (fixation) 및 수크로오스 처리 (sucrose skinking) 단계 등을 통해 제조한 동결 조직 블록 (block)은 마이크로톰 (microtome)을 이용해 8 μ m 두께로 절단하였다. 절단된 조직은 0.025% Triton X-100을 함유한 TBS로 세척하였고, 블로킹 용액 (blocking solution) (Dako, X0909)으로 실온에서 30분간 인큐베이션 (incubation) 하였다. 3회의 세척 단계 후, 4℃에서 밤새 일차 항체 (abcam, ab6464, 1:1000 희석)를 조직 슬라이드에 처리하였으며, 동시에 음성 대조에는 TBS를 처리하였다. 그 후 세척액으로 조직을 5분씩 2회 행군 후, 내인성 퍼옥시데이즈 (peroxidase) 활성을 소거 (quenching)하기 위해 상온에서 10분간 퍼옥시데이즈 블로킹 용액에서 인큐베이션하였다. 2회의 세척 후, 상온에서 30분간 2차 항체 (Dako REAL Envision detection system, Dako, K5077)를 처리하였다. 이어서 항체 용액을 세척해내고, 조직을 DAB+ 크로모젠(chromogen) 및 기질 용액 (substrate buffer) (Dako, K5077) 혼합 용액에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 반응을 중단시키기 위해 조직을 물에 담그고, 헤마톡실린 (hematoxylin)으로 2분간 염색하였다. 그 후, 조직을 탈수 및 투명화 과정을 통해 마운팅 (mounting)한 후 현미경으로 관찰하였다.

실험예 5. 연구 집단 (study population)

연구 개략도는 도 2에 나타났다. 본 발명은 서울에 위치한 3차 의탁 병원 (tertiary referral hospital)인 서울 아산병원에서 수행한 후향적 관찰 연구 (retrospective observational study)를 통해 이루어졌다. 2000년 4월부터 2020년 7월 사이에 심장초음파검사 (echocardiography) 및 항-시트룰린화 펩티드 항체 (항-CCP 항체) 검사를 모두 받은 18세 이상의 피험자가 등록되었다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 검사 전후 6개월 내에 실시한 경흉벽 심장초음파검사 (transthoracic echocardiography) 결과를 분석에 포함시켰다. 피험체 중, (i) 항-시트룰린화 펩티드 항체 검사 전에 대동맥판막 수술 또는 중재시술 (intervention)을 받은 환자, (ii) 기타 심각한 (중증도가 중간 수준 이상) 심장판막증 (valvular heart disease)이 있는 환자, (iii) 류마티스-판막 질환이 있는

환자, 및 (iv) 이첨대동맥판막 (bicuspid aortic valve)이 있는 환자는 제외하였다.

[0108] 연구 프로토콜은 서울 아산병원 기관 심의위원회의 승인을 받았다 (IRB No.:2019-1024). 후향적 분석이므로, 사전 동의 여부는 배제되었다.

[0109] 인구 통계학적 정보, 임상 진단, 및 기타 실험 데이터를 확보하기 위해 환자의 차트를 검토하였다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가뿐만 아니라 적혈구 침강 속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR) 및 혈장 C 반응성 단백질 (C reactive protein, CRP)도 측정하였다. 2차원 심장초음파검사 및 대동맥 횡단 피크 속도 (transaortic peak velocity)와 같은 도플러 측정법 (Doppler measurement) 등을 통해 질병 중증도 및 대동맥 판막의 형태를 평가하였다.

[0111] 실험예 6. 심장초음파 검사 평가

[0112] 모든 환자 (n=678)가 M-모드, 2차원, 컬러 도플러 (colour Doppler)를 사용하여 심장초음파 검사를 받았다. 이첨판 및 류마티스 판막 협착 (rheumatic valves stenosis)는 이들 특유의 형태로 판별하였다. 대동맥 판막 엽이 두꺼워지거나 하나 이상의 엽이 석회화 (calcification)된 경우에 대동맥판막 변성 (degeneration)으로 정의하였다. 대동맥판막 협착증의 중증도는 미국 심장학회 (American College of Cardiology/American Heart Association) 및 유럽 심장학회 (European Society of Cardiology) 지침에 따라 구조, 도플러, 및 정량적 파라미터를 통합 고려하여 없음 (none), 경도 (mild), 보통 (moderate), 또는 중증 (severe)으로 분류하였다. 좌심실 수축 기능 (LV ejection fraction)은 4개 및 2개 챔버 뷰 (chamber views)를 조합한 복엽기 심슨 체적법 (biplane Simpson volumetric method)으로 측정했다. 전체 피험자 중 331명 (48.8%)의 환자에 대해 12개월 동안 추적된 심장초음파 데이터를 얻을 수 있었다. 이들 피험자에 대해, 대동맥협착증 진행 여부를 평가했다.

[0114] 실험예 7. 항-시트룰린화 펩티드 항체 평가

[0115] 항-시트룰린화 펩티드 항체는 피험자의 혈액에서 형광 효소 면역분석 (fluorescence enzyme immunoassay, FEIA) (ELIA™) 방법 또는 화학발광 마이크로입자 면역분석 (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) (Architect™) 방법을 통해 측정하였다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준은 농도가 각각 >10 U/mL 또는 ≥5.0 U/mL 일 때 양성 (positive)인 것으로 간주하였다. 그보다 낮은 수준은 음성 (negative)으로 간주하였다. FEIA 및 CMIA 판막을 비교하기 위해, 역가 (titer)를 다음과 같이 분류하였다: 음성 (정상 상한선 (upper limit of normal, ULN) 미만), 낮은 양성 (정상상한선 이상 및 중앙값 미만; FEIA = 322.0 U/mL, CMIA = 200.0 U/mL), 및 높은 양성 (중앙값 이상).

[0117] 실험예 8. 연구 결과

[0118] 1차 결과는 대동맥판막 협착증 진행으로서, 상기 협착증 진행은 후속 심장초음파 평가에서 AS 중증도가 최소 한 등급 이상 증가한 것으로 정의하였다. 2차 결과는 대동맥판막 교체율, 전체 원인의 사망률 (all-cause mortality), 및 심혈관 원인성 사망률을 포함한다. 상기 대동맥판막 교체에는 수술 및 카테터 대동맥판막 교체가 모두 포함된다.

[0120] 실험예 9. 통계 분석

[0121] 모든 데이터는 연속 변수의 경우 평균 (± 표준편차) 또는 중앙값 (사분위수 범위; interquartile range, IQR)으로 나타냈으며, 범주형 변수의 경우 카운트 (%)로 나타냈다. 연속 변수에 대해서는 Student *t*-검정 또는 Mann-Whitney *U* 검정으로, 범주형 변수에 대해서는 카이-제곱 또는 Fisher 정확 검정을 통해 데이터를 비교했다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹간의 차이를 평가하기 위해 분산분석 (ANOVA) 및 카이-제곱 검정을 수행했다. 측정된 변수간의 연관성을 측정하기 위해, 이원 로지스틱 회귀 분석 (binary logistic regression analysis)을 이용해 각 변수에 대해 개별적으로 대동맥판막 협착증 진행, 단변량 분석 (univariate analysis)을 수행했다. 대동맥판막 협착증 진행의 독립적 예측 변수는 단변량 분석에서 P 값이 0.10 미만인 변수를 포함하는, 단계적 다변량 로지스틱 회귀 분석 (multivariable logistic regression)을 통해 측정했다. 모든 검정은 양측검정 (two-sided)로 수행했으며, P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의미한 것으로 간주했다.

다. 모든 통계 분석은 Social Sciences version 22.0의 Statistical Package으로 수행했다 (IBM Corp.).

[실시예]

실시예 1. 인간 대동맥판막 조직 내의 시트룰린화 단백질의 존재 확인

본 발명자들은 면역조직화학 및 웨스턴 블롯을 이용해 대동맥판막 및 AVIC 내의 시트룰린화 단백질 (citrullinated proteins)의 존재를 확인했다. 면역조직화학 분석 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 대동맥판막 협착증 환자의 변성된 (degenerative) 대동맥판막 조직 내에 시트룰린화 단백질이 존재하는 것을 확인하였으며, 정상 대동맥판막 조직 (심장이식을 받은 환자의 대동맥판막 조직) 및 대동맥판막 협착증 환자의 대동맥판막 조직 전체를 고배율로 여러장 촬영 후 사진상에서 염색된 시트룰린화 단백질의 비율을 수치화하여 정량적으로 비교 분석한 결과, 정상 대동맥판막 조직에 비해 대동맥판막 협착증 환자의 조직에서 시트룰린화 단백질의 수준이 더 높은 것을 확인하였다 (도 3b). 또한, 웨스턴블롯을 통해 시트룰린화 단백질 수준을 비교한 결과에서도 정상 대동맥판막 조직에 비해 환자의 대동맥판막 조직에서 시트룰린화 단백질이 증가된 것을 확인하였다 (도 4). 이와 같은 결과는 대동맥판막의 염증 과정 및 대동맥판막 협착증의 발병이 시트룰린화 펩티드와 관련이 있음을 암시한다.

실시예 2. 대동맥판막 변성에 따른 피험자들의 특성 확인

적격성 스크리닝 (eligibility screening)을 통해 항-시트룰린화 펩티드 항체 및 흉벽 심장초음파검사 (transthoracic echocardiography) 결과를 가진 678명의 환자를 확인하였다 (도 2). 678명의 환자 중, 254명은 양성 항-시트룰린화 펩티드 항체 결과를 보였고, 424명은 음성 항-시트룰린화 펩티드 항체 결과를 보였다. 또한, 241명의 환자는 대동맥판막에서 퇴행성 변화를 갖는 것으로 나타났으며, 나머지 437명의 환자는 정상적인 대동맥판막 형태를 보였다. 대동맥판막의 변성 여부에 따른 기초 특성 (baseline characteristics)은 표 1에 나타냈으며, 대동맥판막의 퇴행성 변화로 계층화하였다.

표 1

대동맥판막 형태에 따른 환자의 임상적 특성				
특징	수 (n= 678)	퇴행성 변화 (Degenerative change) (N=241)	정상 형태 (Normal morphology) (n=437)	p 값
연령	62.1±13.8	69.8±9.4	57.9±14.0	<0.001
남성	288 (42.5)	106 (44.0)	182 (41.6)	0.556
체질량 지수 (kg/m ²)	23.2±3.9	23.2±3.9	23.2±4.0	0.846
항-시트룰린화 펩티드 항체 양성 (Anti-citrullinated peptide Ab positive)	254 (37.5)	103 (42.7)	151 (34.6)	0.035
고혈압 (Hypertension)	204 (30.1)	98 (40.7)	106 (24.3)	<0.001
당뇨병 (Diabetes mellitus)	141 (20.8)	62 (25.7)	79 (18.1)	0.019
관상동맥 질환 (Coronary artery disease)	82 (12.1)	46 (19.1)	36 (8.2)	<0.001
만성 콩팥병 (Chronic kidney disease)	62 (9.1)	26 (10.8)	36 (8.2)	0.270
뇌혈관 사건(Cerebrovascular accident)	24 (3.5)	12 (5.0)	12 (2.7)	0.132
심방세동 (Atrial fibrillation/flutter)	50 (7.4)	24 (10.0)	26 (5.9)	0.056
류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)	225 (33.2)	103 (42.7)	122 (27.9)	<0.001
간질성 폐질환 (Interstitial lung disease)	161 (23.7)	50 (20.7)	111 (25.4)	0.173
현재 또는 과거 흡연	208 (30.7)	77 (32.0)	131 (30.0)	0.594

기초 AV Vmax (m/sec)	1.56±0.71	1.91±1.03	1.37±0.30	<0.001
기초 LVEF (%)	58.7±10.9	58.7±10.4	58.8±11.1	0.937
기타 판막 질환과의 조합(Combined other valve dz.)	78 (11.5)	32 (13.3)	46 (10.5)	0.282
수치는 n (%) 또는 평균 (±SD)으로 나타났다. 약어: Ab, antibody; AV Vmax, peak aortic jet velocity (최고 대동맥 제트 속도); LVEF, left ventricle ejection fraction (좌심실 박출계수); dz., disease				

[0131] 일반적으로, 변성된 대동맥판막을 가진 환자는 연령이 높고, 고혈압, 당뇨병, 및 관상동맥 질환을 동반한 경우가 많았다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 양성 비율은 정상 대동맥판막을 가진 환자보다 변성된 대동맥판막을 가진 환자에서 더 높았다 (34.6% vs. 42.7%, p=0.035). 또한, 변성된 대동맥판막 그룹에서 류마티스 관절염 동반 비율이 더 높았다 (27.9% vs. 42.7%, p<0.001). 최고 대동맥 제트 속도 (peak aortic jet velocity) 역시 변성된 대동맥판막 그룹에서 더 높았다.

[0133] 실시예 3. 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준에 따른 피험자들의 특성 확인

[0134] 1년 이상의 추적 관찰 후 331명의 환자에 대해 심장초음파검사를 수행한 바, 추적 기간의 중앙값은 4.6년 이다 (IQR: 2.0 내지 8.0년).

[0136] 실시예 3-1. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹별 환자 특성 비교

[0137] 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준 및 대동맥판막의 변화 등의 관련성을 확인하기 위해, 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 수준에 따른 환자 특성을 비교하였다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 양성 그룹은 다음의 두 하위 그룹으로 분류될 수 있다: ULN 초과 및 중앙값 (FEIA의 경우 322.0 U/mL, CMIA의 경우 200.0 U/mL) 미만인 “낮은-양성”, 및 ULN 이상인 “높은-양성”. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가에 따른 특성을 표 2에 정리하였다.

표 2

[0138]

항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹별 특성				
	음성 (Negative) (N=424)	낮은 양성 (Low positive) (N=138)	높은 양성 (High positive) (N=116)	p 값
연령	59.4±14.9	65.6±10.4	67.8±10.1	<0.001
남성	206 (48.6)	42 (30.4)	40 (34.5)	<0.001
체질량 지수 (kg/m ²)	23.2±3.9	23.7±3.9	22.4±3.9	0.022
고혈압 (Hypertension)	113 (26.7)	48 (34.8)	43 (37.1)	0.014
당뇨병 (Diabetes mellitus)	94 (22.2)	24 (17.4)	23 (19.8)	0.392
관상동맥 질환 (Coronary artery disease)	60 (14.2)	15 (10.9)	7 (6.0)	0.016
만성 콩팥병 (Chronic kidney disease)	50 (11.8)	5 (3.6)	7 (6.0)	0.010
뇌혈관 사건(Cerebrovascular accident)	17 (4.0)	3 (2.2)	4 (3.4)	0.571
심방세동 (Atrial fibrillation/flutter)	35 (8.3)	8 (5.8)	7 (6.0)	0.312
류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis)	55 (13.0)	85 (61.6)	85 (73.3)	<0.001
간질성 폐질환 (Interstitial lung disease)	86 (20.3)	41 (29.7)	34 (29.3)	0.013
현재 또는 과거 흡연	144 (34.0)	34 (24.6)	30 (25.9)	0.035
기초 AV Vmax (m/sec)	1.54±0.72	1.55±0.67	1.65±0.70	0.279
기초 LVEF (%)	57.6±12.2	60.8±7.3	60.5±8.4	0.002

기타 판막 질환과의 조합(Combined other valve dz.)	65 (15.3)	7 (5.1)	6 (5.2)	<0.001
기초에서 AV 변성 변화 (AV degenerative change at baseline)	138 (32.5)	55 (39.9)	48 (41.4)	0.042
항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 (U/mL)	0.8±1.9	87.9±79.5	284.4±68.0	<0.001
CRP (mg/dL)	2.8 [0.5 - 8.4]	1.6 [0.4 - 5.5]	1.7 [0.5 - 5.8]	0.055
ESR (mm/hr)	42.5 [19.0-73.0]	43.0[22.0-76.0]	52.0[26.0-87.0]	0.143
수치는 n (%) 또는 평균 (±SD)으로 나타냈다 [IQR]. 약어: AV Vmax, peak aortic jet velocity (최고 대동맥 제트 속도); LVEF, left ventricle ejection fraction (좌심실 박출계수); AV, aortic valve (대동맥 판막); Ab, antibody (항체); CRP, C-reactive protein (C-반응성 단백질); ESR, erythrocyte sedimentation rate (적혈구 침강 속도)				

[0140] 음성 그룹과 비교하여, 높은 양성 그룹은 연령이 유의미하게 더 높았으며, 고혈압, 류마티스 관절염, 및 간질성 폐질환 (interstitial lung disease, ILD) 동반 비율이 더 높았다. 남성 비율, 흡연 비율, 관상동맥 질환, 및 만성 콩팥 질환 동반 비율은 음성 그룹에 비해 낮은-양성 및 높은-양성에서 낮았지만, 대동맥판막의 변성 변화 (degenerative changes)의 증가 추세는 음성 그룹에 비해 양성 그룹에서 더욱 높았다 (p=0.042). CRP 및 ESR 수치는 그룹간에 유의미한 차이가 없었다.

[0142] 3-2. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 수준에 따른 환자의 임상적 결과 분석

[0143] 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준에 따른 환자의 임상적 결과는 표 3에 나타났다. 모든 환자의 임상적 추적 기간은 중앙값이 3.5년이었으며 (IQR: 1.1 내지 7.5년), 심장초음파 검사를 받은 환자의 임상적 추적 기간은 중앙값이 6.2년 이었다 (IQR: 3.4 내지 9.8년).

표 3

[0144]

항-시트룰린화 펩티드 항체 역가에 따른 임상적 결과				
	음성 (Negative) (N=424)	낮은 양성 (Low positive) (N=138)	높은 양성 (High positive) (N=116)	p 값
일차 결과 (Primary outcome)				
TTE F/U 기간 (년)	5.5±4.3	6.1±3.8	5.4±3.8	0.578
AS 진행*	19/227 (8.4)	7/62 (11.3)	8/42 (19.0)	0.041
2차 결과 (Secondary outcomes)				
임상적 F/U 기간 (년)	4.7±4.5	4.9±4.4	4.5±4.2	0.761
사망 및 AVR 복합 (Composite of death, AVR)	180 (42.5)	65 (47.1)	46 (39.7)	0.855
모든-원인 사망률 (All-cause mortality)	171 (40.3)	62 (44.9)	44 (37.9)	0.906
CV 원인성 사망률 (CV cause death)	14 (9.3)	4 (6.5)	4 (9.3)	0.822
대동맥판막 교체 (Aortic valve replacement)	20 (4.7)	6 (4.3)	5 (4.3)	0.826
*후속적 심장초음파검사 결과를 확인할 수 있는 환자에서만 평가되었음. 수치는 n/후속 수치 (%), n (%), 또는 평균 (±SD)으로 나타났다. 약어: AS, aortic stenosis (대동맥판막 협착증); F/U, follow-up (후속); AVR, aortic valve replacement (대동맥판막 교체); CV, cardiovascular (심혈관)				

[0146] 대동맥판막 협착증의 진행은 낮은 양성 그룹 또는 음성 그룹에 비해 높은 양성 그룹에서 더 빈번히 일어나는 것으로 나타났다 (높은 양성 vs. 낮은 양성 vs. 음성 = 19.0% vs. 11.3% vs. 8.4%; p=0.041). 모든-원인 사망률, 심혈관 원인성 사망률, 대동맥판막 교체, 및 모든-원인 사망률 및 대동맥 판막 교체의 복합 비율은 그룹간에 유

의미한 차이가 없었다. 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 그룹별 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가 수준, 변성 대동맥판막 비율, 및 대동맥판막 협착증 진행 정도를 도 5에 나타냈다.

실시예 4. 대동맥판막 협착증 진행 지표로서의 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준의 역할 확인

대동맥판막 협착증 진행에 영향을 미치는 인자에 대해 단변량 및 다변량 분석을 수행하였다 (표 4 및 도 6).

표 4

대동맥판막 협착증 진행의 예측 인자						
	단변량 분석 (Univariate analysis)			다변량 분석 (Multivariate analysis)		
	Odds ratio	95% CI	P Value	Adjusted Odds ratio	95% CI	P Value
연령	1.056	1.018 - 1.095	0.004	1.031	0.988 - 1.076	0.157
항-시트룰린화 펩티드 항체 높은 양성(Anti-citrullinated peptide Ab high positivity)	1.932	0.931 - 4.008	0.077	2.312	1.006 - 5.310	0.048
체질량 지수 (kg/m ²)	1.087	0.987 - 1.197	0.091	1.069	0.958 - 1.194	0.234
관상동맥 질환	3.955	1.804 - 8.670	0.001	3.100	1.267 - 7.587	0.013
기초 AV Vmax	8.994	3.713 - 21.786	<0.001	6.539	2.696 - 15.857	<0.001
기타 판막 질환과의 조합(Combined other valve dz.)	2.058	0.927 - 4.571	0.076	2.408	0.994 - 5.835	0.052
약어: AV max, peak aortic jet velocity (최고 대동맥 제트 속도);						

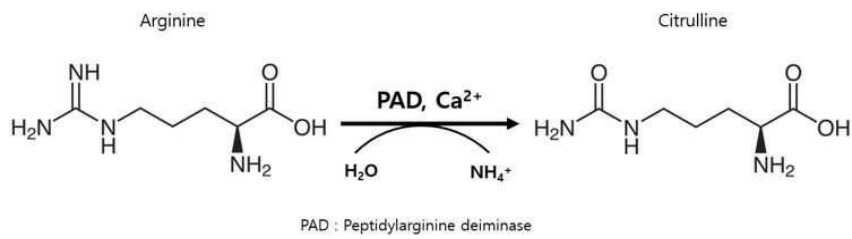
다변량 분석 결과, 항-시트룰린화 펩티드 항체 높은 양성이 대동맥판막 협착증 진행의 유의미한 인자인 것으로 나타났다 (조정된 오즈비 (odds ratio, OR), 2.312; 95% CI, 1.006 - 5.310; p=0.048). 또한, 관상동맥 질환 및 기초 AV Vmax 조합 (combined coronary artery disease and baseline AV Vmax)는 대동맥판막 협착증 진행의 독립적인 예측 인자인 것으로 나타났다 (조정된 OR, 3.100; 95% CI, 1.267 - 7.587; p=0.010, 및 조정된 OR 6.539; 95% CI, 2.696 - 15.857; p<0.001). 도 6은 높은 항-시트룰린화 펩티드 항체 역가가 대동맥판막 변성과 연관이 있으며 대동맥판막 협착증 진행의 독립적인 예측 인자로 기능할 수 있음을 명확히 보여준다.

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 높은 항-시트룰린화 펩티드 항체 수준, 특히 높은 역가가 대동맥판막의 퇴행성 변화와 연관이 있음을 확인하였으며, 항-시트룰린화 펩티드 항체 양성이 대동맥판막 협착증 진행의 예측을 위한 독립적인 인자로 기능할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 항-시트룰린화 펩티드 항체의 수준은 대동맥판막 협착증의 진단을 위한 바이오마커로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

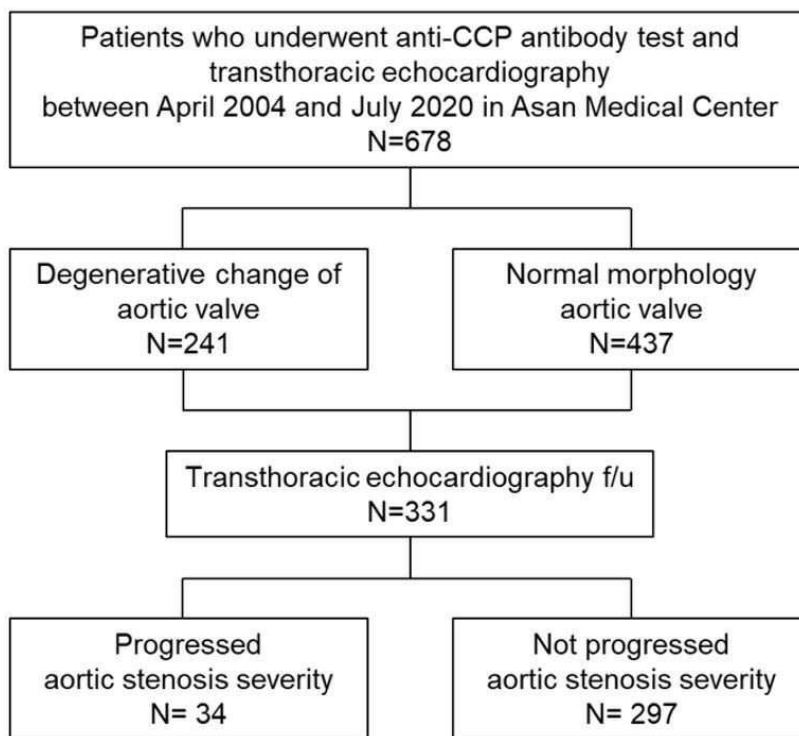
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

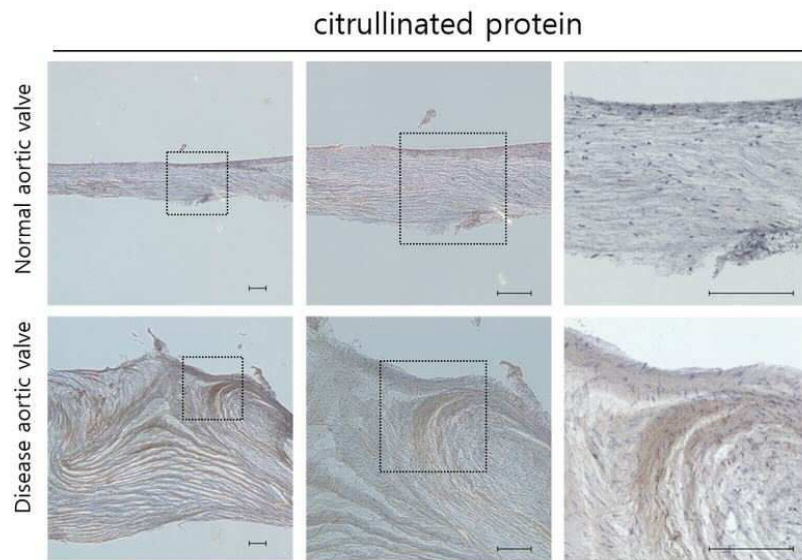
도면1



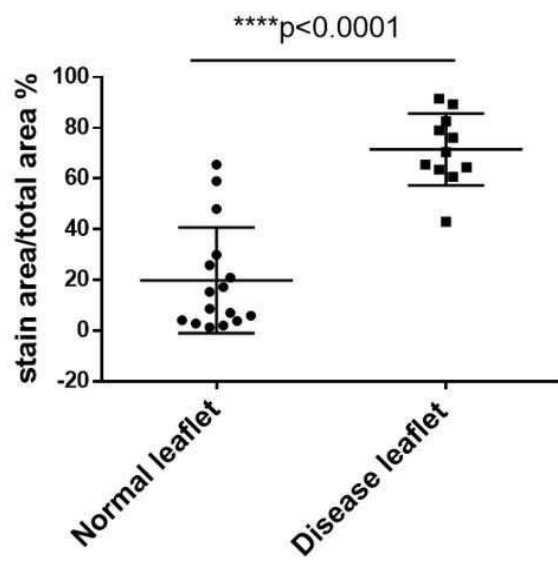
도면2



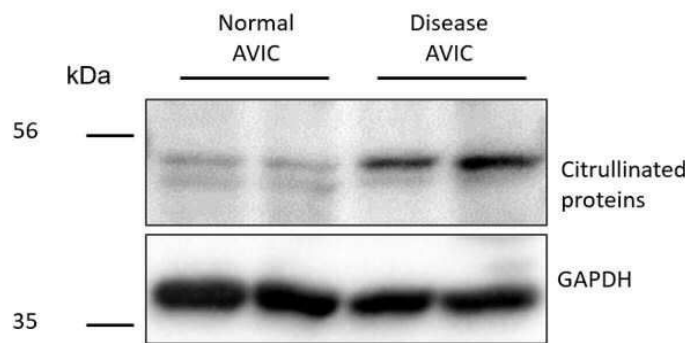
도면3a



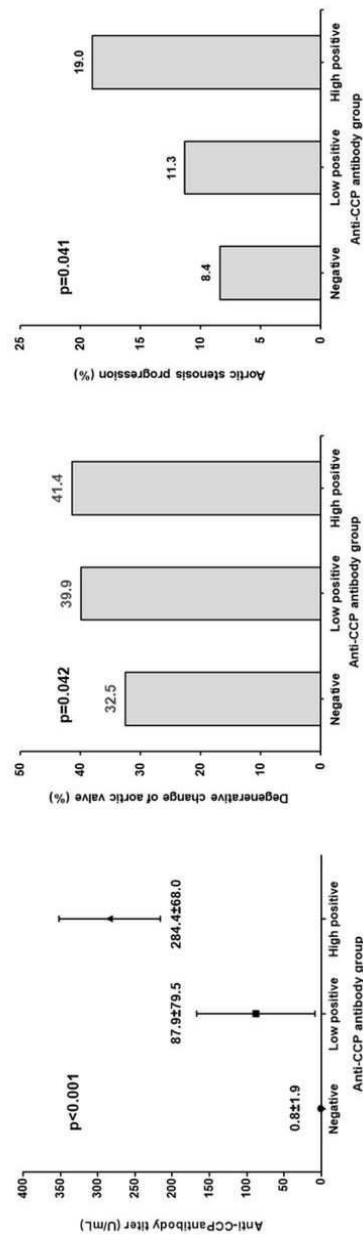
도면3b



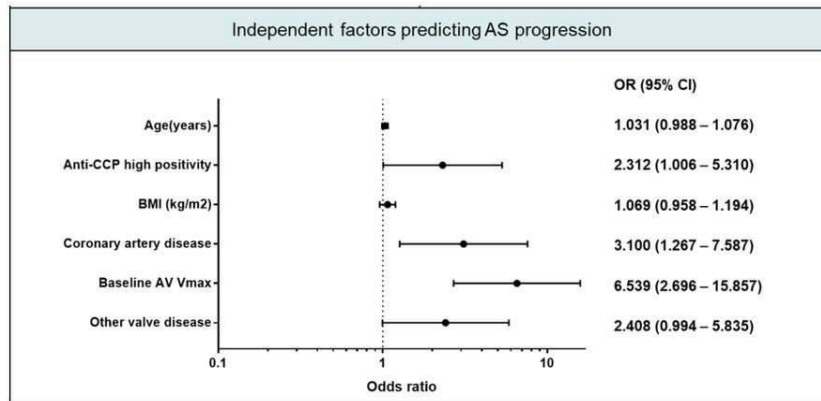
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Use of anti-CCP antibodies as a biomarker for diagnosing and predicting prognosis of aortic stenosis
- <130> MP21-077
- <160> 13
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> citrullinated pro-filaggrin (1) (X is citrulline)
- <400> 1

His Gln Cys His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Arg Ser Arg Gly Arg Cys

1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Ser

20

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated pro-filaggrin (2) (X is citrulline)

<400> 2

Ser His Gln Glu Ser Thr Xaa Gly Arg Ser Arg Gly Arg Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated fibrinogen (X is citrulline)

<400> 3

Asp His Glu Gly Thr His Ser Thr Lys Xaa Gly His Ala Lys Ser Arg

1 5 10 15

Pro Val Arg Asp

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated ovalbumin (1) (X is citrulline)

<400> 4

Thr Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Xaa Gly Asp Lys Leu Pro Gly

1 5 10 15

Phe Gly Asp Ser

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated ovalbumin (2) (X is citrulline)

<400> 5

Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Xaa Gly Val Leu Gln Pro Ser

1 5 10 15

Ser Val Asp Ser

20

<210> 6

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> citrullinated EBNA-1 (1) (X is citrulline)
 <400> 6
 Gly Gly Arg Xaa Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Arg
 20

<210> 7
 <211> 20

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> citrullinated EBNA-1 (2) (X is citrulline)
 <400> 7
 Gly Gly Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Xaa Gly Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Arg
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> citrullinated EBNA-1 (3) (X is citrulline)
 <400> 8
 Ala Xaa Gly Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Arg
 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated EBNA-1 (4) (X is citrulline)

<400> 9

Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Xaa

1 5 10 15

Gly Glu Lys Arg

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated EBNA-1 (5) (X is citrulline)

<400> 10

Gly Gly Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Xaa Gly Thr Ala Leu

1 5 10 15

Ala Ile Pro Gln

20

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated proteoglycan (X is citrulline)

<400> 11

Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Xaa Gly Ser Arg Ala Pro

1 5 10 15

Ile Ser Arg Ala Gln

20

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> citrullinated alpha-enolase (X is citrulline)

<400> 12

Cys Lys Ile His Ala Xaa Glu Ile Phe Asp Ser Xaa Gly Asn Pro Thr

1	5	10	15
Val Glu Cys			
<210>	13		
<211>	12		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	citrullinated vimentin (X is citrulline)		
<400>	13		
Gly Arg Val Tyr Ala Thr Xaa Ser Ser Ala Val Arg			
1	5	10	