



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) C07K 14/65 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/001906
- (22) 국제출원일: 2016년 2월 26일 (26.02.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0027375 2015년 2월 26일 (26.02.2015) KR
- (71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 05505 서울시 송파구 올림픽로 43길 88, Seoul (KR). 울산대학교산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 44610 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 장은주 (CHANG, Eun Ju); 05502 서울시 송파구 올림픽로 135, 237-1103, Seoul (KR). 송재관 (SONG, Jae Kwan); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 302-1401, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 06133 서울특별시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).

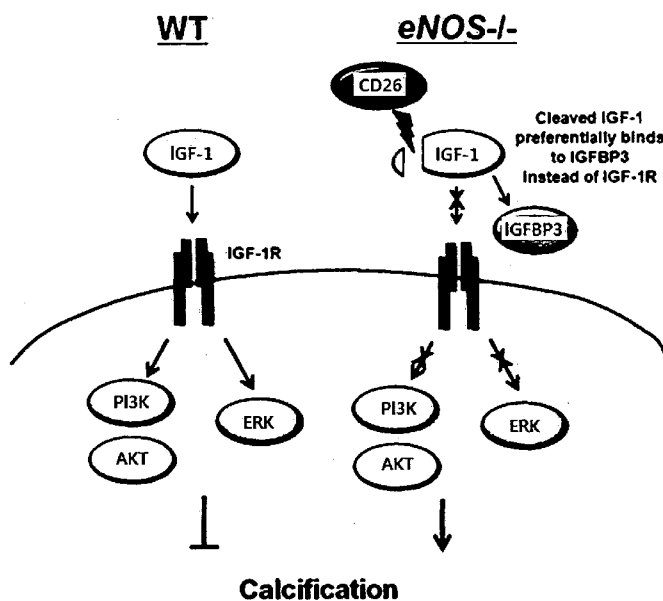
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: USE OF IGF-1 AS PROGNOSTIC FACTOR IN CALCIFICATION OF AORTIC VALVES

(54) 발명의 명칭: 대동맥판막 석회화의 예후인자로서의 IGF-1의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for diagnosing aortic valve calcification diseases, containing a preparation, which measures the protein level of deactivated IGF-1, wherein the composition is capable of diagnosing aortic valve calcification diseases involving calcification of aortic valves; a kit for diagnosing aortic valve calcification diseases, comprising the composition; a method for detecting deactivated IGF-1 so as to provide information necessary in the diagnosis of aortic valve calcification diseases; and a method for detecting deactivated IGF-1 so as to provide information necessary in the diagnosis of the progression level of aortic valve calcification diseases. According to the present invention, when using the composition or the kit for diagnosing aortic valve calcification diseases, it is possible to determine whether aortic valve calcification diseases, which involve the calcification of aortic valves, have occurred, and to determine the progression level of aortic valve calcification diseases which have already occurred, and thus the composition or the kit of the present invention can be used for more effectively diagnosing and treating aortic valve calcification diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 대동맥판막의 석회화를 수반하는 대동맥판막 석회화질환을 진단할 수 있는, 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 체계를 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 키트, 대동맥판막 석회화질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법 및 대동맥판막 석회화질환의 진행수준의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물 또는 진단용 키트를 이용하면, 판막의 석회화가 수반되는 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 뿐만 아니라 이미 발병된 대동맥판막 석회화질환의 진행수준을 파악할 수 있으므로, 보다 효과적인 대동맥판막 석회화질환의 진단 및 치료에 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 대동맥판막 석회화의 예후인자로서의 IGF-1의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 대동맥판막 석회화의 예후인자로서의 IGF-1의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 대동맥판막의 석회화를 수반하는 대동맥판막 석회화질환을 진단할 수 있는, 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 키트, 대동맥판막 석회화질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법 및 대동맥판막 석회화질환의 진행수준의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 심장에는 혈액의 흐름을 전방으로 안내하는 4개의 판막이 있다. 이중 2개는 산소화된 혈액이 흐르는 좌측심장에 있고 나머지 2개는 탈산소화된 혈액이 흐르는 우측심장에 위치하고 있다. 좌측에 있는 판막은 승모판막과 대동맥 판막이고 우측에 있는 판막은 삼첨판막과 폐동맥 판막이 그것이다. 이중 대동맥 판막은 좌심실과 대동맥사이에 위치하며 제일 높은 압력에 견디도록 되어 있다. 대동맥판막은 정상적으로 세 개의 판막엽(Leaflet)으로 구성되나 간혹 두 개 또는 네 개의 판막엽을 가지는 수도 있다. 각 판막엽은 대동맥 판막륜(Annulus)에 의해 대동맥 벽에 부착되고, 대동맥 벽과 판막엽 사이에는 발살바동(Sinus of Valsalva)이라고 하는 공간이 있다. 이러한 대동맥 판막이 3개의 판막엽으로 이루어지는 보통의 경우, 각각의 판막엽은 좌관상동맥엽, 우관상동맥엽 및 무관상동맥엽으로 호칭된다. 상기 판막엽과 판막엽이 만나는 곳을 교합부(Commissure)라고 부르는데 이에 따라 판막엽이 3개인 통상의 경우에 세 개의 교합부가 대동맥 벽 근처에 존재하고, 각 판막엽의 중앙을 판막첨이라 부른다. 각 판막엽은 평면으로 되어 있지 않고 발살바동에서 보면 가운데가 오목한형태로 되어 있어 마치 장미꽃잎 모양과 비슷한 형태로 되어있다. 대동맥 판막과 판막륜 그리고 대동맥 벽과 그 사이의 발살바동을 모두 포함해서 대동맥근 또는 뿌리 (Aortic Root) 라고 부른다. 따라서, 대동맥 근부는 사다리꼴 모양의 원통형으로 아래쪽은 대동맥판막륜(Aortic Annulus), 위쪽은 상행대동맥이행부(Sinotubular Junction)으로 경계지어지고 이 사이에 대동맥 판막엽이 위치하고 있다. 그러므로 대동맥 판막은 대동맥 근의 비틀림과 기울임(Twisting & Tilting)에 의해 열림이 시작되고 좌심실의 수축으로 혈액이 전방으로 지나면서 완전히 열렸다가 좌심실의 이완으로 전방으로 흐르는 혈액이 줄어들면 대동맥 압력에 의해 판막엽끼리 교합되는 폐쇄국면을 만든다.

[4] 이러한 대동맥 판막의 폐쇄가 완전하기 위해서는 판막엽끼리 서로 기댈 수 있도록 상행대동맥 이행부의 직경이 유지되어야 하는데, 이러한 부분에서 비정상적으로 작동할 경우, 대동맥판막 석회화질환이 유발될 수 있다. 예를 들어, 대동맥판막 석회화질환은 판막엽 자체의 단독적인 병변만 존재하는 경우와 대동맥근부의 병변이있는 것으로 나눌 수 있고 이 양극단 사이에는 혼합형 병변이 존재할 수 있다. 이러한 대동맥판막 석회화질환의 초기에는 판막엽 자체의 병변만 있을 수 있으나, 시간이 점점 지나면서 주변 대동맥 근부의 구조적인 변형도 함께 초래하는 경우가 대부분이고, 반대로 대동맥 근부의 병변으로 판막의 교합이 이루어지지 못하는 경우도 있다. 이러한 대동맥판막 석회화질환을 치료하는 방법으로는 인공판막을 제작하여 외과적인 수술을 통해 삽입하는 방법이 사용되고 있는데, 이러한 기술의 성공율을 향상시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제100370호에는 일시적인 혈액펌프용 인공판막 뿐만 아니라 치환용 완전인공심장(total artificial heart, TAH) 및 심실보조장치(ventricular assist device, VAD) 등의 심장판막으로 사용가능한 혈액적합성과 내구성이 뛰어난 수채형 양엽고분자심장판막(sinkhole bileaflet polymer heart valve, 약칭 수채형 판막)이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1258213호에는 소 심낭과 돼지 심낭을 몰드에 감아서 소 심낭은 폐동맥도관 내벽에 지지되도록 관 형태로 형성하고, 돼지 심낭이나 소심낭은 혈액의 역류를 방지하는 인공판막의 기능을 수행하는 심낭을 이용한 인공심장판막도관 및 그의 제조방법이 개시되어 있다.

[5]

[6] 한편, 대동맥판막 석회화질환을 진단하기 위하여는 해부학적으로 판막의 상태를 점검하여야 하나, 이는 실질적인 수행이 불가능하기 때문에, 환자의 심혈관계 진단 데이터를 조합하여 간접적으로 대동맥판막 석회화질환의 발병여부를 진단하는 방법이 사용되고 있으나, 이의 진단성공율은 매우 낮은 수준이다. 뿐만 아니라, 상기 대동맥판막 석회화질환에 대한 치료가 수행된 후에 치료예후 역시 동일한 방법에 의해 확인되고 있기 때문에, 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 그의 진행수준을 확인하는 방법에 대한 필요성이 요구되고 있으나, 아직까지는 별다른 방법이 개발되지 않고 있는 실정이다.

[7]

[8] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 대동맥판막 석회화질환의 발병여부를 진단하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 대동맥판막 석회화질환의 증상중의 하나인 판막 석회화가 진행될 경우 비활성화된 IGF-1의 수준이 동시에 증가하므로, 상기 비활성화된 IGF-1의 수준변화를 측정함으로써 대동맥판막 석회화질환의 발병여부를 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] **발명의 요약**

[11] 본 발명의 하나의 목적은 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 제제를

- 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 대동맥판막 석회화질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 목적은 대동맥판막 석회화질환의 진행수준의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명자들은 대동맥판막 질환(Aortic valve disease, AVD)의 일종인 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 진행수준을 진단하는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던중, DPP-4에 의하여 생성되는 비활성화된 IGF-1에 주목하게 되었다. 상기 DPP-4 또는 이에 의하여 생성되는 비활성화된 IGF-1은 정상인 보다는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자에서 증가하고, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 석회화가 진행되지 않은 환자 보다는 석회화가 진행된 환자에서 증가하며, 석회화가 진행된 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 석회화 중증도가 낮은 환자 보다는 석회화 중증도가 높은 환자에서 증가함을 확인하였다.
- [16] 따라서, 상기 대동맥판막 석회화질환의 발병이 의심되거나 또는 이의 발병이 확인된 환자의 혈장에서 비활성화된 IGF-1의 발현수준을 측정함으로써, 상기 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 진행상황을 진단할 수 있음을 확인하였다. 이처럼, 비활성화된 IGF-1의 발현수준을 측정함으로써 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 진행상황을 통합적으로 진단하는 방법은 지금까지 알려진 바 없다.
- [17] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단을 위한 정보 제공방법을 제공한다. 본 발명은 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단 방법을 제공한다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 대동맥판막 석회화질환의 발병에 관여하는 DPP-4 및 IGF-1의 작용기작을 나타내는 개략도이다.
- [20] 도 2a는 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 대동맥판막 맥관성평활근 조직에서 골세포화를 억제하는 IGF-1의 작용에 미치는 DPP-4의 효과를 검증한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.
- [21] 도 2b는 IGF-1이 처리된 eNOS 결핍 마우스에서 DPP-4의 처리여부에 따른 세포내 신호전달에 관여하는 단백질인 ERK 또는 Akt의 인산화수준의 변화를

나타내는 웨스턴블롯 분석사진이다.

- [22] 도 3a는 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [23] 도 3b는 시타글립틴을 처리하거나 또는 처리하지 않은 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에 포함된 IGFBP3와 결합된 비활성화된 IGF-1의 단백질 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [24] 도 4a는 정상인 또는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [25] 도 4b는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [26] 도 4c는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 활성화된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [27] 도 4d는 중증도 1 또는 2의 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [28] 도 4e는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 4f는 대동맥판막의 석회화가 진행된 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 석회화 중증도를 나타내지 않는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 또는 석회화 중증도를 나타내는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[30]

[31] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

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

[33] 본 발명의 용어 "IGF-1(insulin-like growth factor type 1)"이란, 포유동물의 혈장내에 존재하는 약 7.5kDa 크기의 폴리펩티드를 의미하는데, 대부분의 조직에서 검출되고, 매우 다양한 포유동물 세포의 분화 및 증식을 촉진한다고 알려져 있다. 상기 IGF-1은 세포표면에 위치한 IGF-1 수용체(IGF-1R, Insulin-like growth factor 1 receptor)에 결합하여 세포의 작용을 조절할 뿐만 아니라 초기 분화에서 중요한 역할을 수행하지만, 정상 성체에서는 특별히 중요한 역할을 수행하지는 않는 것으로 알려져 있다. 상기 IGF-1을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank:

NM_000618, NP_000609 등).

- [34] 본 발명에 있어서, 상기 IGF-1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되거나 또는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 다양한 아미노산 서열이 부가된 모든 펩타이드를 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [35] 아울러, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의 방법으로 변이된 변이체 단백질도 본 발명에서 제공하는 IGF-1의 범주에 포함될 수 있다.
- [36] 특히, 본 발명에서 제공하는 IGF-1은 서열번호 1의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다.
- [37] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 IGF-1은 일례로서, 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 다른 예로서, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 구성될 수 있으며, 또 다른 예로서, 서열번호 1의 아미노산 서열과 95% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로 구성될 수 있다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 IGF-1은 대동맥판막 석회화질환에 의하여 유발되는 대동맥판막의 석회화를 경감시킬 수 있는 효과를 나타내는 물질로 해석될 수 있다.
- [39] 본 발명의 용어 "비활성화된 IGF-1"이란, 상기 IGF-1의 N-말단 아미노산의 일부가 절단되어 IGF-1의 기능을 나타내지 않는 비활성화된 IGF-1을 의미한다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 비활성화된 IGF-1은 대동맥판막 석회화질환이 발병될 가능성이 있거나 또는 이미 발병된 환자에서 그의 N-말단의 아미노산이 DPP-4에 의해 절단된 상태로 존재하므로, 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 진행수준을 진단하는데 사용될 수 있는 바이오 마커로서 해석될 수 있는데, 상기 비활성화된 IGF-1은, 일례로서 IGF-1의 N-말단의 2 내지 10개 아미노산이 절단된 형태의 아미노산 서열로 구성된 것이 될 수 있고; 다른 예로서, IGF-1의 N-말단의 2 내지 5개 아미노산이 절단된 형태의 아미노산 서열로 구성된 것이 될 수 있으며; 또 다른 예로서, IGF-1의 N-말단의 2개 아미노산이 절단된 형태의 아미노산 서열로 구성된 것이 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 IGF-1의 N-말단의 2개 아미노산이 DPP-4에 의해 절단되어, 서열번호 2의 아미노산

서열로 표시된 것을 사용하였다.

- [41] 한편, 상기 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하는 제제는 비활성화된 IGF-1 자체를 검출하는 제제가 될 수 있는데, 일례로서, 상기 비활성화된 IGF-1에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질인 IGFBP3(IGF-binding protein 3)가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 환자의 시료에 포함된 전체 IGF-1의 수준을 측정한 다음, 상기 시료를 IGFBP3가 코팅된 ELISA 키트에 가하여 반응시킨 후, 세척하여 상기 시료에 포함된 비활성화된 IGF-1 만을 선별하였으며, 이후, 표시된 항-IGF-1 항체를 가하여 비활성화된 IGF-1의 수준을 측정하는 방식으로, 시료에 포함된 비활성화된 IGF-1의 수준을 측정하였다.
- [42] 본 발명의 용어 "DPP-4(dipeptidyl-peptidase 4)"란, CD26이라고도 하고, 대부분의 세포표면에서 발현되는 막결합 당단백질의 특성을 갖는 항원성 효소를 의미하는데, 대체로 면역조절, 신호전달 및 세포자멸과정과 관련된다고 알려져 있다. 상기 DPP-4는 구조적으로 N-말단에 존재하는 프롤린을 포함하는 2개의 펩타이드를 절단하는 활성을 나타낸다. 상기 DPP-4를 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_001935, NP_001926 등).
- [43] 본 발명의 용어 "대동맥판막 석회화질환"이란, 여러 가지 원인으로 대동맥의 판막에 칼슘 등의 무기이온이 침착되어, 대동맥판막이 석회화되고, 결과적으로는 대동맥판막 협착증이 유발되어 대동맥을 통한 혈류의 흐름을 조절하는 기능에 이상이 생기는 질병을 의미한다.
- [44] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단은 판막의 석회화를 수반하는 대동맥판막 석회화질환의 발병 여부 또는 진행수준을 확인하는 모든 행위인 것으로 해석될 수 있다.
- [45] 본 발명의 용어 "단백질의 수준을 측정하는 제제"란, 시료에 포함된 표적 단백질의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 바람직하게는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 분석법(protein chip assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머가 될 수 있다.
- [46] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체,

모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

- [47] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 비활성화된 IGF-1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 비활성화된 IGF-1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그의 일부가 될 수 있다.
- [48] 본 발명의 용어 "애타머(aptamer)"란, 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는데, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있다. 상기 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 링커의 작용기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 -NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있다.
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 애타머는 비활성화된 IGF-1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 애타머가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 비활성화된 IGF-1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 DNA 애타머가 될 수 있다.
- [50] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 대동맥판막 석회화 동물모델의 대동맥판막 맥관성평활근 조직을 대상으로 상기 조직의 골세포화에 미치는 IGF-1 및 DPP-4의 효과를 분석한 결과, 상기 조직의 골세포화는 IGF-1의 처리에 의하여 경감되는 경향을 나타내었으나, CD26의 추가에 의하여 상기 조직의 골세포화가 심화되고(도 2a), DPP-4에 의하여 IGF-1과 연관된 세포내 신호전달에 관여하는 단백질이 비활성화되며(도 2b), 야생형 마우스의 혈장 보다는 대동맥판막 석회화 동물모델 마우스의 혈장에 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되고(도 3a), 상기 DPP-4의 억제제인 시타글립틴을 처리하면, IGFBP3와 결합된 비활성화된 IGF-1의 단백질 농도가 감소됨을 확인하였다(도 3b).
- [51] 한편, 상기 결과를 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자를 이용하여 검증한 결과, 정상인의 혈장 보다는 상기 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있고(도 4a), 상기 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있으며(도 4b), 상기 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 활성화된 DPP-4 단백질이 약 4배 정도 높은 수준으로

포함되어 있고(도 4c), 상기 환자 중에서도 중증도 1의 환자의 혈장 보다는 중증도 2의 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있으며(도 4d), 상기 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 비활성화된 IGF-1 단백질이 높은 농도로 포함되어 있고(도 4e), 상기 환자 중에서도 석회화 중증도를 나타내지 않는 환자의 혈장 보다는 상기 석회화 중증도를 나타내는 환자의 혈장에서 비활성화된 IGF-1 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다(도 4f).

- [52] 본 발명에서 제공하는 대동맥판막 석회화질환의 발병에 관여하는 DPP-4 및 IGF-1의 작용기작은 도 1에 도시된 바와 같다. 도 1은 대동맥판막 석회화질환의 발병에 관여하는 DPP-4 및 IGF-1의 작용기작을 나타내는 개략도이다. 도 1에서 보듯이, 정상 개체에서는 IGF-1이 세포표면에 위치한 이의 수용체(IGF-1R)과 결합하여 신호전달을 수행하고, 이에 의하여 PI3K, ERK, AKT 등이 활성화되어 판막의 석회화를 방지하지만, 대동맥판막 석회화질환이 발병된 개체에서는 DPP-4에 의하여 IGF-1가 절단됨에 따라 비활성화된 IGF-1이 생성되고, 상기 비활성화된 IGF-1은 세포표면에 위치한 IGF-1R과 결합하지 못하여, PI3K, ERK, AKT 등이 활성화되지 않으며, 이에 따라, 판막의 석회화가 유발되고, 상기 비활성화된 IGF-1의 수준이 증가할 수록 판막의 석회화 수준 또한 증가하게 된다.
- [53] 따라서, 상기 DPP-4 및 비활성화된 IGF-1의 수준은 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 질환 중증도 또는 석회화 수준을 진단하는 바이오 마커로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.
- [54] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물을 포함하는 대동맥판막 석회화질환 진단용 키트를 제공한다.
- [55] 본 발명의 키트는 대동맥판막 석회화질환이 발병된 환자에서 유래된 분리된 시료로부터 비활성화된 IGF-1의 단백질 수준을 측정하여 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 또는 진행수준을 진단하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 단백질의 수준을 측정하기 위한 항체 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [56] 본 발명의 용어 "시료"란, 판막의 석회화가 수반되는 대동맥판막 석회화질환의 발병이 의심되거나 또는 발병된 개체에서 분리되어 비활성화된 IGF-1 단백질의 발현수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하고, 일례로서 대동맥판막 석회화질환이 유발될 수 있는 포유동물로부터 분리된 혈액, 혈청, 혈장, 조직시료 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [57] 구체적인 일례로서, 본 발명의 키트는 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준을 측정하기 위한 ELISA 키트 또는 단백질 칩 분석용 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재,

적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기제는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(Peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.

[58] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 대동맥판막 석회화질환의 진단 또는 상기 대동맥판막 석회화질환의 진행수준의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법을 제공한다.

[59] 본 발명에서 제공하는 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법은 대동맥판막 석회화질환의 발병 및 진행에 따라, 대동맥판막의 석회화를 진단하거나, 또는 이미 석회화된 대동맥판막의 석회화의 진행수준을 진단하기 위한 수단으로서 사용될 수 있으므로, 상기 대동맥판막 석회화질환의 진단방법 또는 상기 대동맥판막 석회화질환의 진행수준을 진단하기 위한 방법으로 사용될 수도 있다.

[60] 일례로서, 본 발명에서 제공하는 대동맥판막 석회화질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법은 (a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 단백질의 수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 개체의 생물학적 시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, 혈액, 혈청, 혈장, 조직시료 등이 될 수 있고, 상기 방법은 대동맥판막 석회화질환의 진단을 위한 정보를 제공하기 위하여 수행될 수 있다.

[61] 상기 방법에 있어서, 상기 검사대상 개체의 생물학적 시료에서 측정된 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준이 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하여 유의하게 증가하는 경우에는 상기 검사대상 개체에서 대동맥판막 석회화질환이 발병하였다고 판정할 수 있고, 유의하게 증가하지 않은 경우에는 상기 검사대상 개체에서 대동맥판막 석회화질환이 발병하지 않았다고 판정할 수 있다. 이때, 상기 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준을 측정하는 방법은 상술한 바와 동일하다.

[62] 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 대동맥판막 석회화질환의 진행수준 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법은 (a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 단백질의 수준을 대동맥판막 석회화질환의 중증도 표준시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를

포함한다. 이때, 상기 개체의 생물학적 시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, 혈액, 혈청, 혈장, 조직시료 등이 될 수 있다.

[63] 아울러, 상기 중증도 점수는 대동맥판막 석회화질환에 의하여 유발되는 대동맥판막 협착증의 중증도 점수를 사용할 수 있는데, 일례로서, 석회화가 많이 진행된 중증일수록 밝기가 증가된다는 점을 이용한 심장초음파로 관찰되는 대동맥판막의 밝기(echo-brightness)를 이용하는 정성적인 방법 또는 심장초음파에서 대동맥판막을 지나는 혈류속도를 도플러 기법으로 직접 제거나 컴퓨터단층촬영에서 석회화 지수(calcium score)를 산출하는 정량적인 방법으로 측정된 점수를 사용할 수 있다. 이들 중증도 점수의 기준수치는 당업계에 이미 공지되어 있다.

[64] 상기 방법에 있어서, 상기 대동맥판막 석회화질환의 중증도 표준시료는 각각의 대동맥판막 석회화질환의 중증도 점수를 나타내는 시료가 될 수 있는데, 상기 검사대상 개체의 생물학적 시료에서 측정된 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준이 상기 각 표준시료로부터 측정된 수준과 비교하여 유의하게 증가하는 경우에는 상기 검사대상 개체에서 발병된 대동맥판막 석회화질환이 상기 각 표준시료가 나타내는 대동맥판막 석회화질환의 중증도 보다도 심화된 것으로 판정할 수 있고, 유의하게 증가하지 않은 경우에는 상기 검사대상 개체에서 대동맥판막 석회화질환이 각 표준시료가 나타내는 대동맥판막 석회화질환의 중증도에 미치지 않는 것으로 판정할 수 있다. 이때, 상기 비활성화된 IGF-1 단백질의 수준을 측정하는 방법은 상술한 바와 동일하고, 상기 방법은 대동맥판막 석회화질환 진행수준의 진단을 위한 정보를 제공하기 위하여 수행될 수 있다.

[65]

[66] 실시예

[67] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[68]

[69] 실시예 1: 골세포화에 미치는 IGF-1 및 DPP-4의 효과

[70] 실시예 1-1: 골세포화 수준 비교

[71] 야생형 마우스 또는 대동맥판막 석회화 동물모델인 eNOS 결핍 마우스에 IGF-1(insulin-like growth factor type 1)를 단독으로 처리하거나 또는 DPP-4(dipeptidyl-peptidase 4)와 IGF-1을 동시에 처리한 다음, 대동맥판막 맥관성평활근 조직을 대상으로 ALP 염색을 수행하여, 상기 조직의 골세포화 수준을 비교하였다(도 2a). 이때, 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 대동맥판막 맥관성평활근 조직을 사용하였다.

[72] 도 2a는 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 대동맥판막 맥관성평활근 조직에서 골세포화를 억제하는 IGF-1의 작용에 미치는 DPP-4의 효과를 검증한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 2a에서 보듯이, 야생형 마우스 또는

eNOS 결핍 마우스의 대동맥판막 맥관성평활근 조직에서 유발되는 골세포화는 IGF-1의 처리에 의하여 경감되는 경향을 나타내었으나, DPP-4의 추가에 의하여 상기 조직의 골세포화가 심화됨을 확인하였다.

[73]

[74] 실시예 1-2: 세포내 신호전달 단백질의 활성화 비교

[75] 또한, 상기 DPP-4에 의한 골세포화에 의하여 세포내 신호전달에 관여하는 단백질의 활성화 수준이 변화되는지를 확인하기 위하여, eNOS 결핍 마우스에 0, 5, 15 또는 30분 동안 IGF-1를 단독으로 처리하거나 또는 DPP-4와 IGF-1을 동시에 처리한 다음, 이들 마우스로부터 대동맥판막 맥관성평활근 조직을 적출하고, 상기 적출된 조직에서 발현되는 세포내 신호전달에 관여하는 단백질인 ERK 또는 Akt의 인산화수준을 웨스턴블롯 분석을 통해 비교하였다(도 2b). 이때, 내부대조군으로는 β -액틴을 사용하였다.

[76] 도 2b는 IGF-1이 처리된 eNOS 결핍 마우스에서 DPP-4의 처리여부에 따른 세포내 신호전달에 관여하는 단백질인 ERK 또는 Akt의 인산화수준의 변화를 나타내는 웨스턴블롯 분석사진이다. 도 2b에서 보듯이, IGF-1이 처리된 eNOS 결핍 마우스에 DPP-4를 처리하면, 세포내 신호전달에 관여하는 단백질인 ERK 또는 Akt의 인산화수준이 감소함을 확인하였으므로, DPP-4에 의하여 세포내 신호전달에 관여하는 단백질이 비활성화됨을 알 수 있었다.

[77] 상기 도 1a 및 1b의 결과로부터, 골세포화를 경감시킬 수 있는 IGF-1의 작용이 DPP-4의 처리에 의하여 억제되고, 이러한 억제작용은 세포내 신호전달에 관여하는 단백질을 비활성화시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[78]

[79] 실시예 2: 대동맥판막 석회화 및 비활성화된 IGF-1의 상관관계 분석

[80] 상기 실시예 1의 결과로부터, DPP-4가 IGF-1을 비활성화시키는 작용을 수행할 것이라는 가능성이 대두되었다. 즉, 상기 DPP-4는 펩티다아제로서의 활성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에, 상기 DPP-4가 IGF-1의 N-말단의 2개 아미노산을 절단하여 비활성화된 형태의 IGF-1을 형성함으로써, 상기 IGF-1의 골세포화 경감효과를 제거할 수 있을 것으로 예상되었다.

[81] 먼저, 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스로부터 각각의 혈장을 수득하고, 상기 각 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다(도 3a). 이때, DPP-4 단백질의 농도는 고정된 항-DPP-4 항체, 바이오틴이 결합된 검출용 항-DPP-4 항체 및 HRP가 결합된 스트렙타비딘을 포함하는 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다.

[82] 도 3a는 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 보듯이, 야생형 마우스의 혈장 보다는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.

[83] 다음으로, 상기 비활성화된 형태의 IGF-1이 IGF 결합단백질의 일종인

IGFBP3와 특이적으로 결합한다는 점을 이용하여, DPP-4의 억제제로 알려진 시타글립틴(Sitagliptin)을 처리하거나 또는 처리하지 않은 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에 포함된 비활성화된 IGF-1의 단백질 농도를 측정하였다.

- [84] 구체적으로, 각 혈장시료에 포함된 전체 IGF-1의 수준을 측정한 다음, 상기 시료를 IGFBP3가 코팅된 ELISA 키트에 가하여 반응시킨 후, 세척하여 상기 시료에 포함된 전체 IGF-1 중에서 비활성화된 IGF-1 만을 결합시켰으며, 이후, 표지된 항-IGF-1 항체를 가하여 비활성화된 IGF-1의 수준을 측정하는 방식으로, 시료에 포함된 비활성화된 IGF-1의 수준을 측정하였다(도 3b).
- [85] 도 3b는 시타글립틴을 처리하거나 또는 처리하지 않은 야생형 마우스 또는 eNOS 결핍 마우스의 혈장에 포함된 IGFBP3와 결합된 비활성화된 IGF-1의 단백질 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3b에서 보듯이, DPP-4의 억제제인 시타글립틴을 처리하면, IGFBP3와 결합된 비활성화된 IGF-1의 단백질 농도가 감소됨을 확인하였다.
- [86] 상기 결과로부터, 혈장내 비활성화된 IGF-1의 수준은 DPP-4의 활성을 직접적으로 반영함을 알 수 있었으며, 이로부터 비활성화된 IGF-1을 대동맥판막 석회화를 예측할 수 있는 바이오마커로서 사용할 수 있을 것으로 분석되었다.
- [87]
- [88] 실시예 3: 대동맥판막 석회화질환 환자를 이용한 검증
- [89] 실시예 3-1: 대동맥판막 석회화질환 환자의 혈장내 DPP-4 단백질 수준
- [90] 정상인 또는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장으로부터 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다(도 4a).
- [91] 도 4a는 정상인 또는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4a에서 보듯이, 정상인의 혈장 보다는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.
- [92]
- [93] 실시예 3-2: 석회화 및 DPP-4 단백질 수준의 상관관계 분석
- [94] 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장으로부터 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다(도 4b).
- [95] 도 4b는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4b에서 보듯이, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.
- [96]

- [97] 실시예 3-3: 석회화 수준과 활성화된 DPP-4 단백질 수준의 상관관계 분석
- [98] 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장으로부터, DPP-4의 효소활성을 측정함으로써, 활성화된 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다.
- [99] 즉, DPP-4에 의하여 절단될 수 있는 기질(Gly-Pro-AMC)에 혈장시료를 가하면, 상기 혈장시료에 포함된 DPP-4에 의해 상기 기질이 분해되면서 AMC(7-Amino-4-Methyl Coumarin)가 분리되고, 상기 분리된 AMC에 의해 형광(Ex 360 nm, Em 460nm)이 방출된다. 상술한 원리를 이용하여, 상기 혈장시료와 상기 기질을 반응시키고, 이로부터 발색되는 형광값을 측정하여, DPP-4의 활성을 산출하고, 이를 환산함으로써, 상기 혈장시료에 포함된 활성화된 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다(도 4c).
- [100] 도 4c는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 활성화된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4c에서 보듯이, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 활성화된 DPP-4 단백질이 약 4배 정도 높은 수준으로 포함되어 있음을 확인하였다.
- [101]
- [102] 실시예 3-4: 석회화 정도와 DPP-4 단백질 수준의 상관관계 분석
- [103] 중증도 1 또는 2의 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장으로부터 DPP-4 단백질의 농도를 측정하였다(도 4d).
- [104] 도 4d는 중증도 1 또는 2의 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 DPP-4 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4d에서 보듯이, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 중증도 1의 환자의 혈장 보다는 중증도 2의 환자의 혈장에서 DPP-4 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.
- [105]
- [106] 실시예 3-5: 석회화 및 비활성화된 IGF-1 단백질 수준의 상관관계 분석
- [107] 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장으로부터 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 측정하였다(도 4e).
- [108] 도 4e는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자 또는 석회화가 진행된 환자의 혈장에 포함된 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4e에서 보듯이, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 대동맥판막의 석회화가 진행되지 않은 환자의 혈장 보다는 상기 석회화가 진행된 환자의 혈장에서 비활성화된 IGF-1 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.

[109]

[110] 실시예 3-6: 석회화 수준 및 비활성화된 IGF-1 단백질 수준의 상관관계 분석

[111] 대동맥판막의 석회화가 진행된 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 석회화 중증도를 나타내지 않는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 또는 석회화 중증도를 나타내는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장으로부터 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 측정하였다(도 4f).

[112] 도 4f는 대동맥판막의 석회화가 진행된 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서 석회화 중증도를 나타내지 않는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 또는 석회화 중증도를 나타내는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 혈장에 포함된 비활성화된 IGF-1 단백질의 농도를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4f에서 보듯이, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 석회화 중증도를 나타내지 않는 환자의 혈장 보다는 상기 석회화 중증도를 나타내는 환자의 혈장에서 비활성화된 IGF-1 단백질이 높은 농도로 포함되어 있음을 확인하였다.

[113]

[114] 상기 도 4a 내지 4f의 결과를 종합하면, DPP-4 및 비활성화된 IGF-1의 수준은 정상인 보다는 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자에서 증가하고, 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 석회화가 진행되지 않은 환자 보다는 석회화가 진행된 환자에서 증가하며, 석회화가 진행된 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자 중에서도 석회화 중증도가 낮은 환자 보다는 석회화 중증도가 높은 환자에서 증가함을 확인하였다.

[115] 따라서, 상기 DPP-4 및 비활성화된 IGF-1의 수준은 대동맥판막 석회화질환이 유발된 환자의 질환 중증도 또는 석회화 수준을 진단하는 바이오 마커로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[116]

산업상 이용가능성

[117] 본 발명의 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물 또는 진단용 키트를 이용하면, 판막의 석회화가 수반되는 대동맥판막 석회화질환의 발병여부 뿐만 아니라 이미 발병된 대동맥판막 석회화질환의 진행수준을 파악할 수 있으므로, 보다 효과적인 대동맥판막 석회화질환의 진단 및 치료에 활용될 수 있을 것이다.

[118]

[119] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는

사항이다.

[120]

서열목록 Free Text

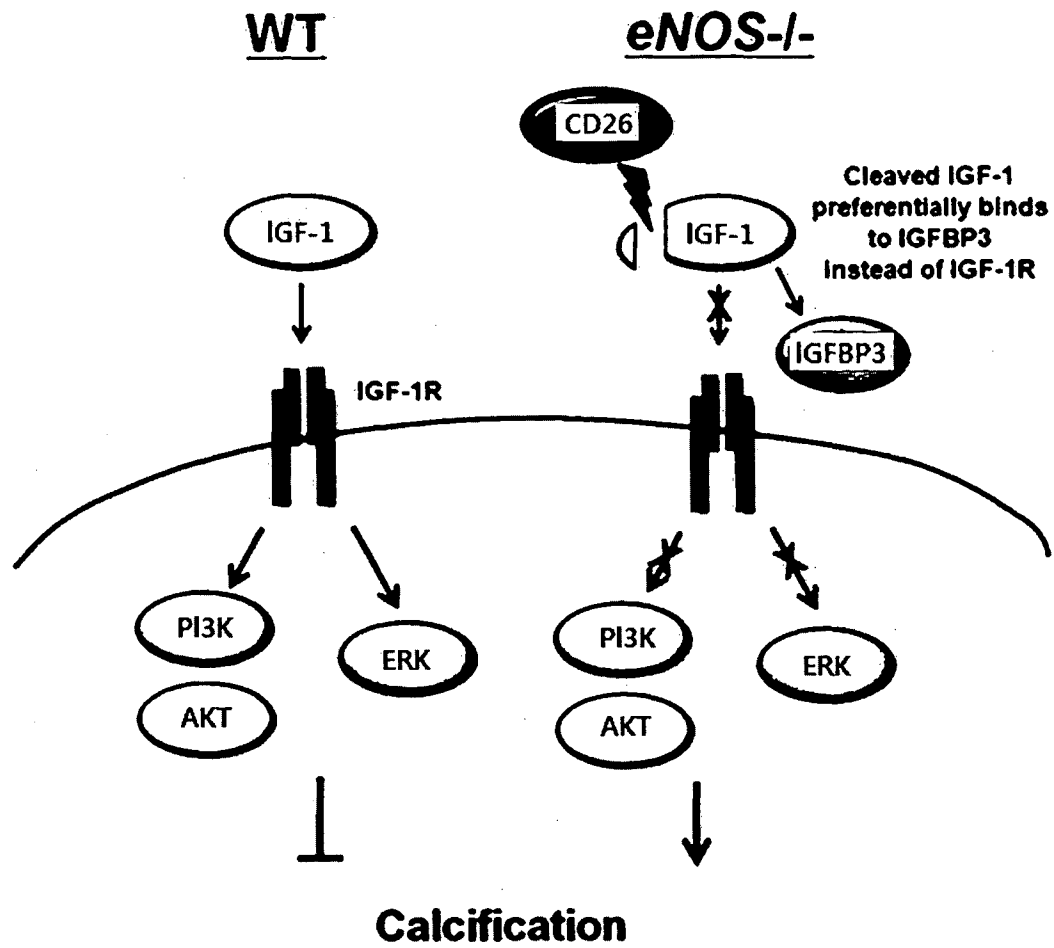
[121]

전자파일 첨부하였음.

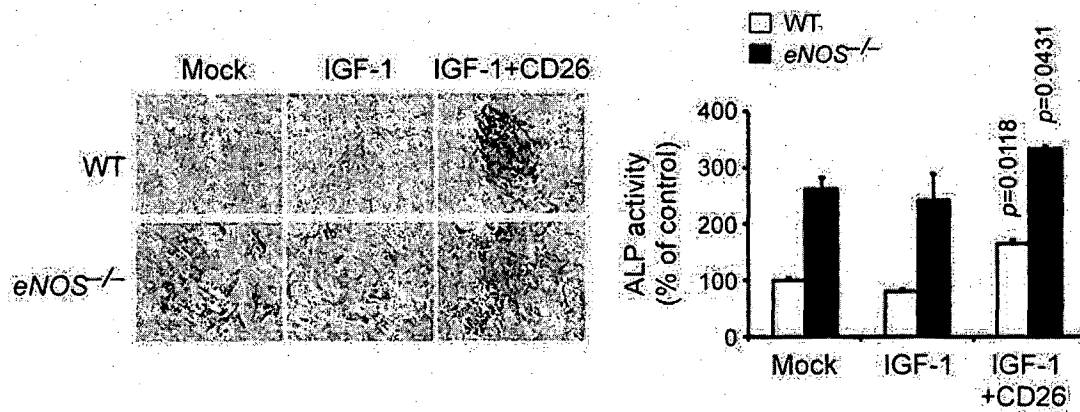
청구범위

- [청구항 1] IGF-1의 N-말단의 2 내지 10개 아미노산이 절단된 형태의 비활성화된 IGF-1(insulin-like growth factor type 1)의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 대동맥판막 석회화질환 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 비활성화된 IGF-1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것인 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 비활성화된 IGF-1에 특이적인 항체 또는 앵타머를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 대동맥판막 석회화질환 진단용 키트.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 키트는 단백질 칩 키트인 것인 키트.
- [청구항 6] (a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 비활성화된 IGF-1(insulin-like growth factor type 1) 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 측정된 단백질의 수준을 정상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는,
대동맥판막 석회화질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장 또는 조직시료인 것인 방법.
- [청구항 8] (a) 검사대상 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 비활성화된 IGF-1(insulin-like growth factor type 1) 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및
(b) 상기 측정된 단백질의 수준을 대동맥판막 석회화질환의 중증도 표준시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는,
대동맥판막 석회화질환의 진행수준 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 비활성화된 IGF-1을 검출하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장 또는 조직시료인 것인 방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 대동맥판막 석회화질환의 중증도 표준시료는 대동맥판막 석회화질환의 중증도 점수를 나타내는 시료인 것인 방법.

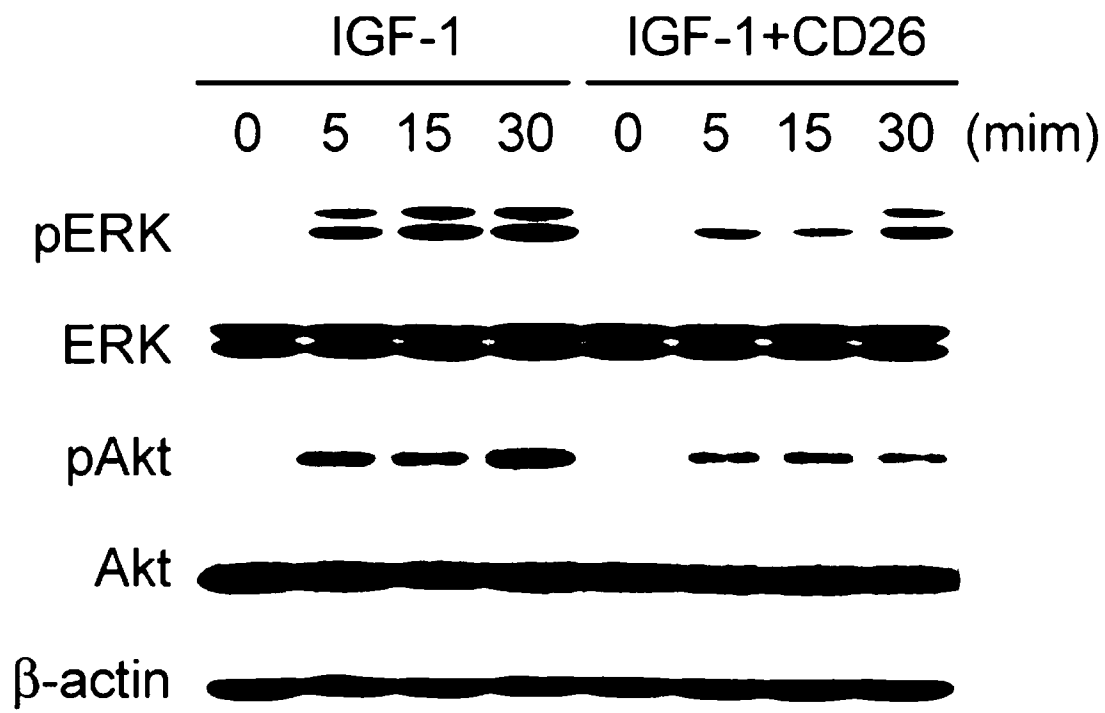
[도1]



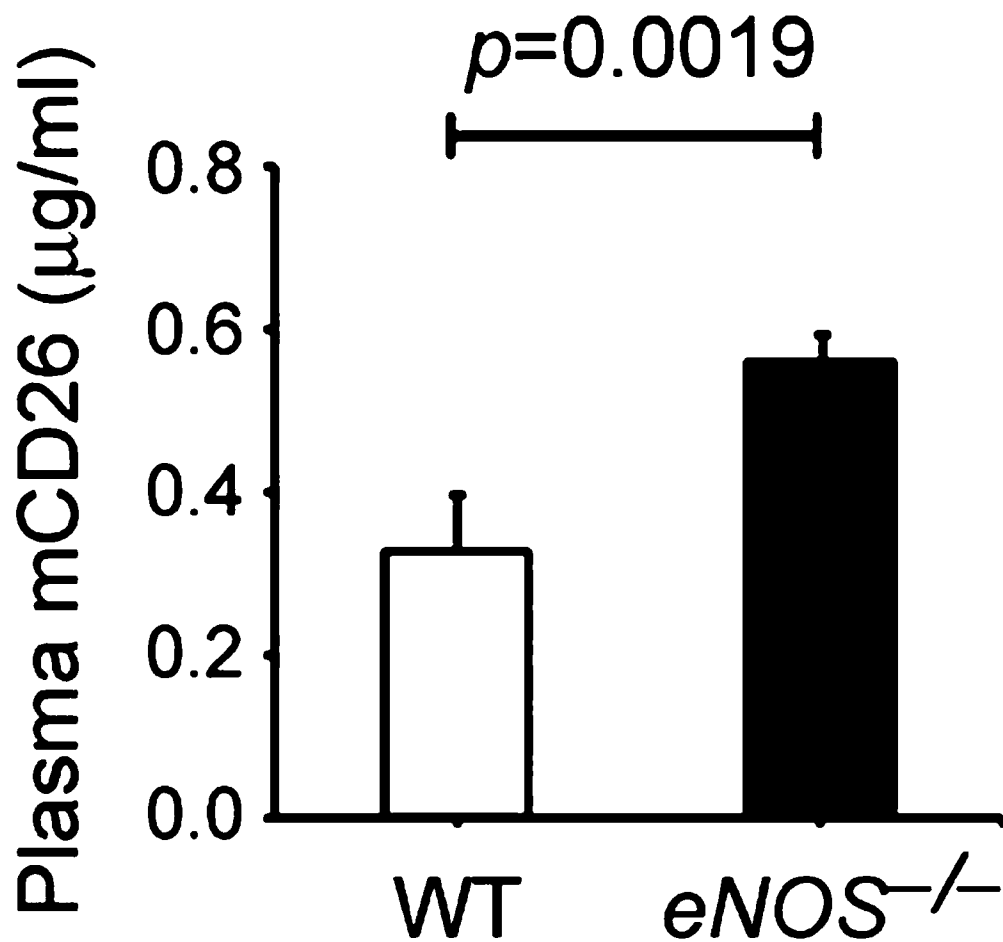
[도2a]



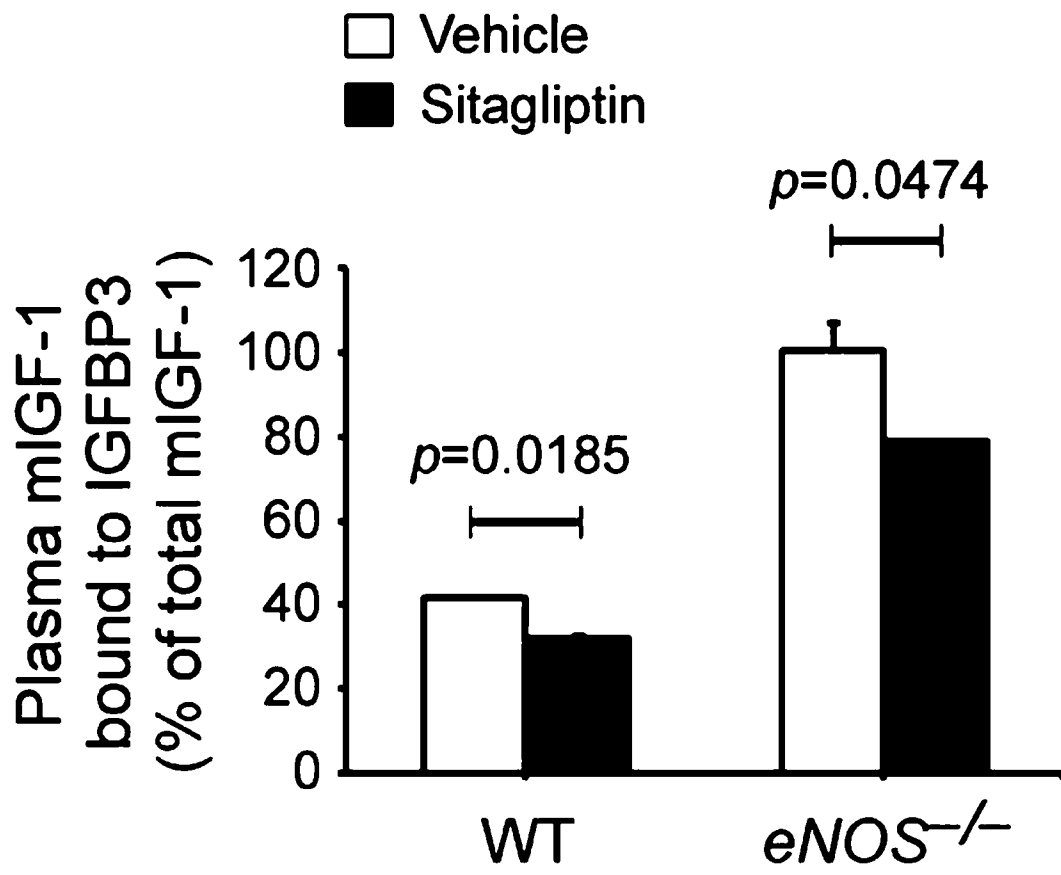
[도2b]



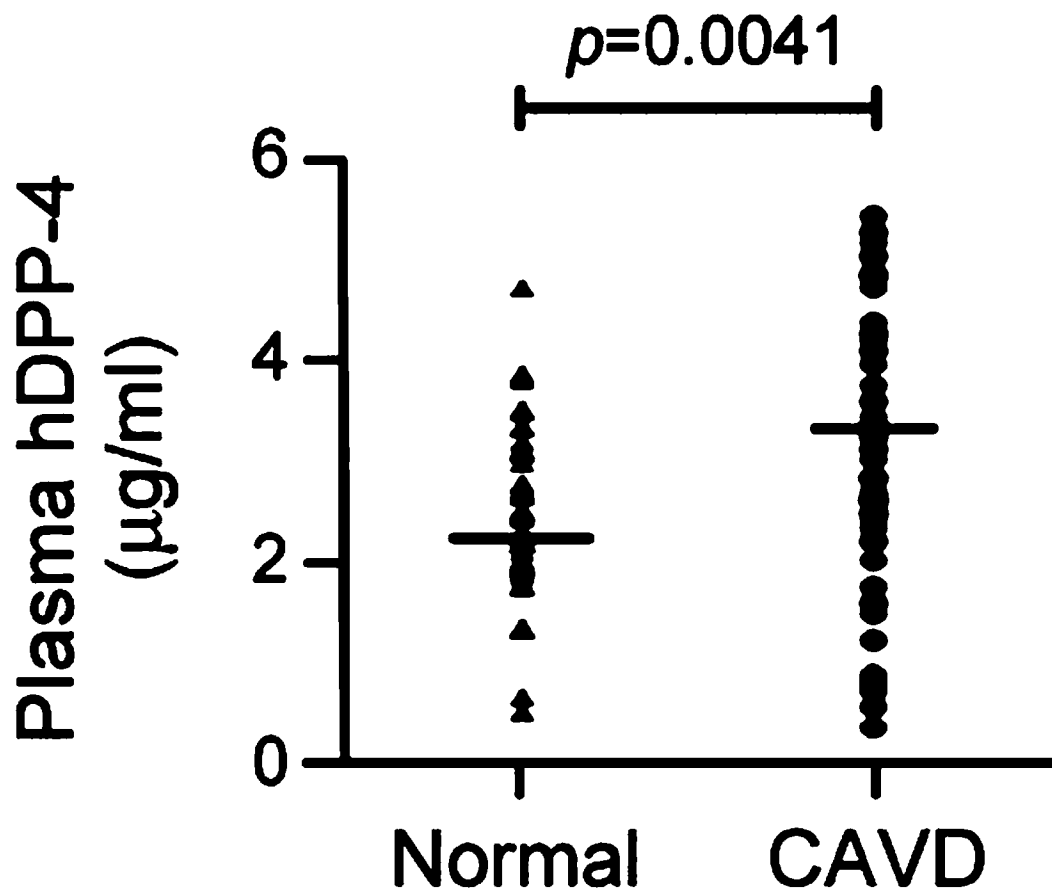
[도3a]



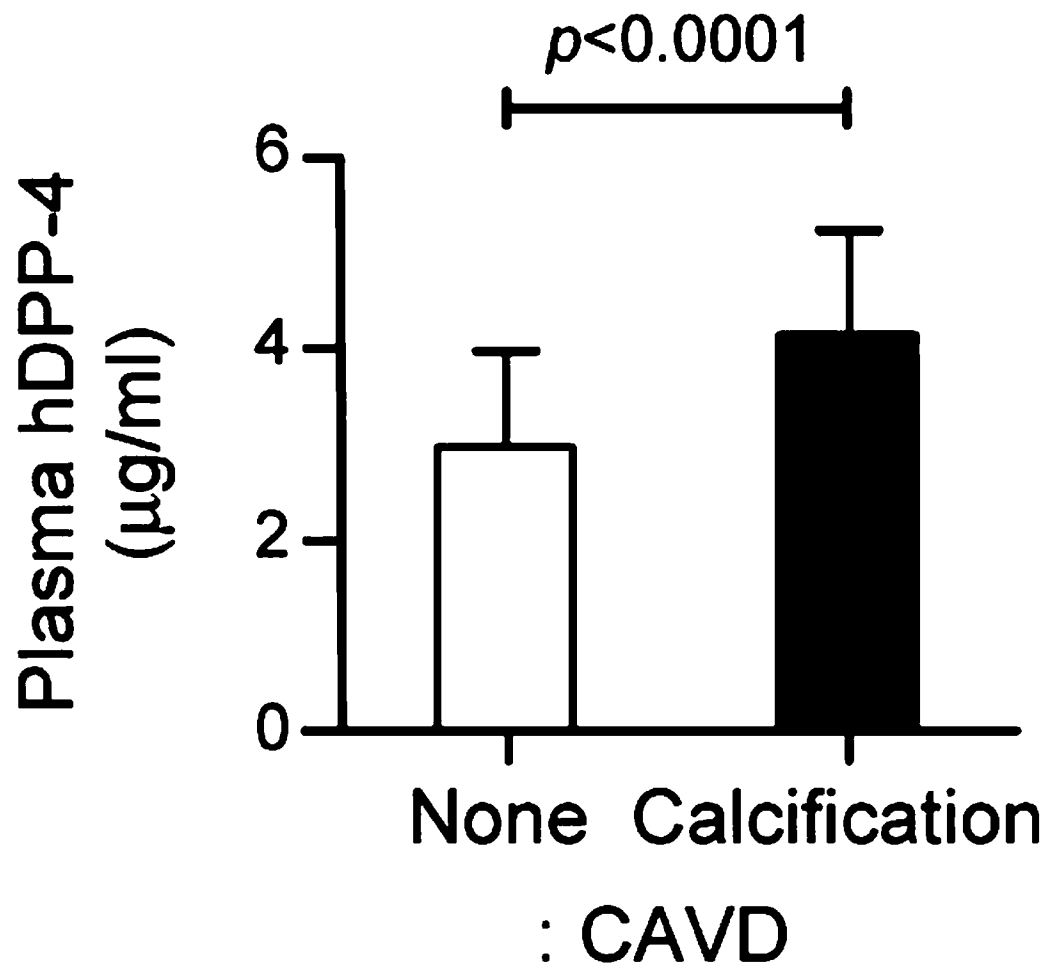
[도3b]



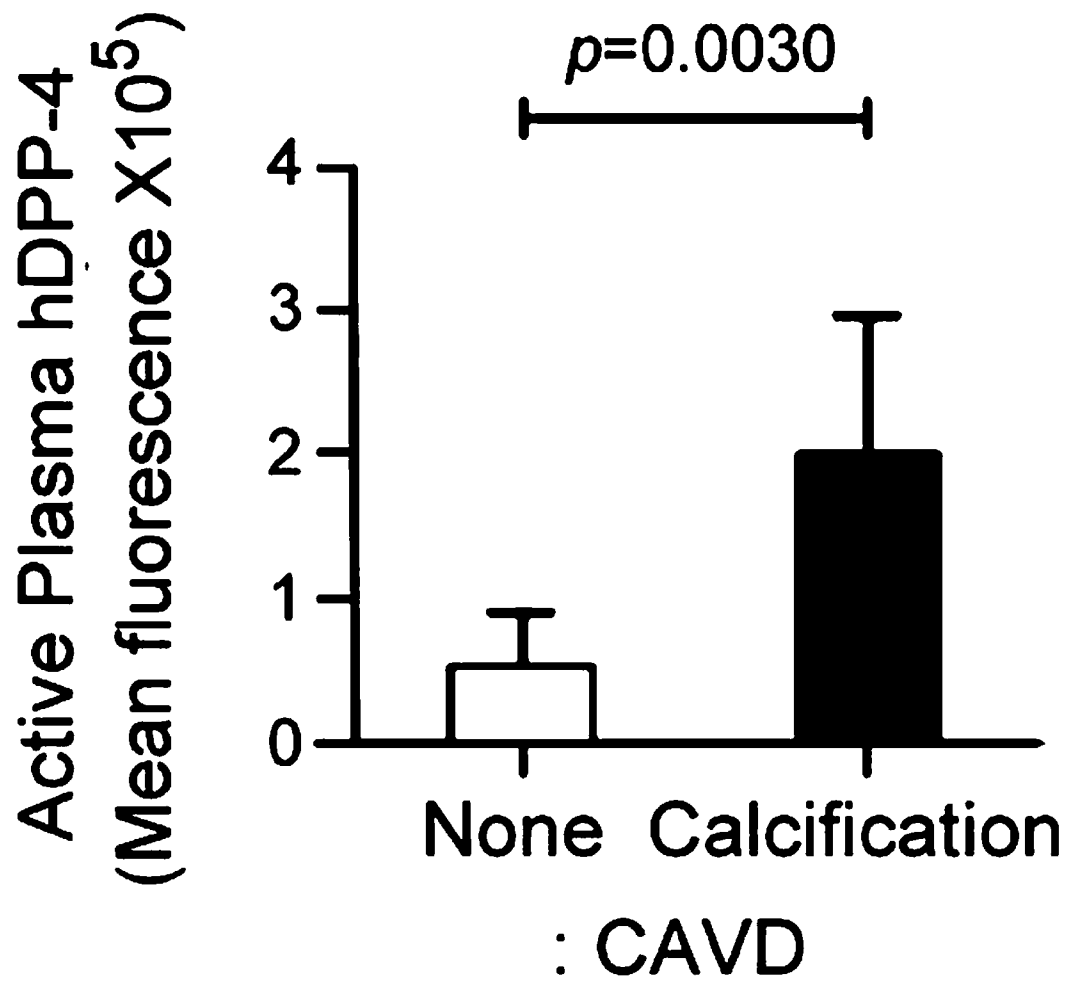
[도4a]



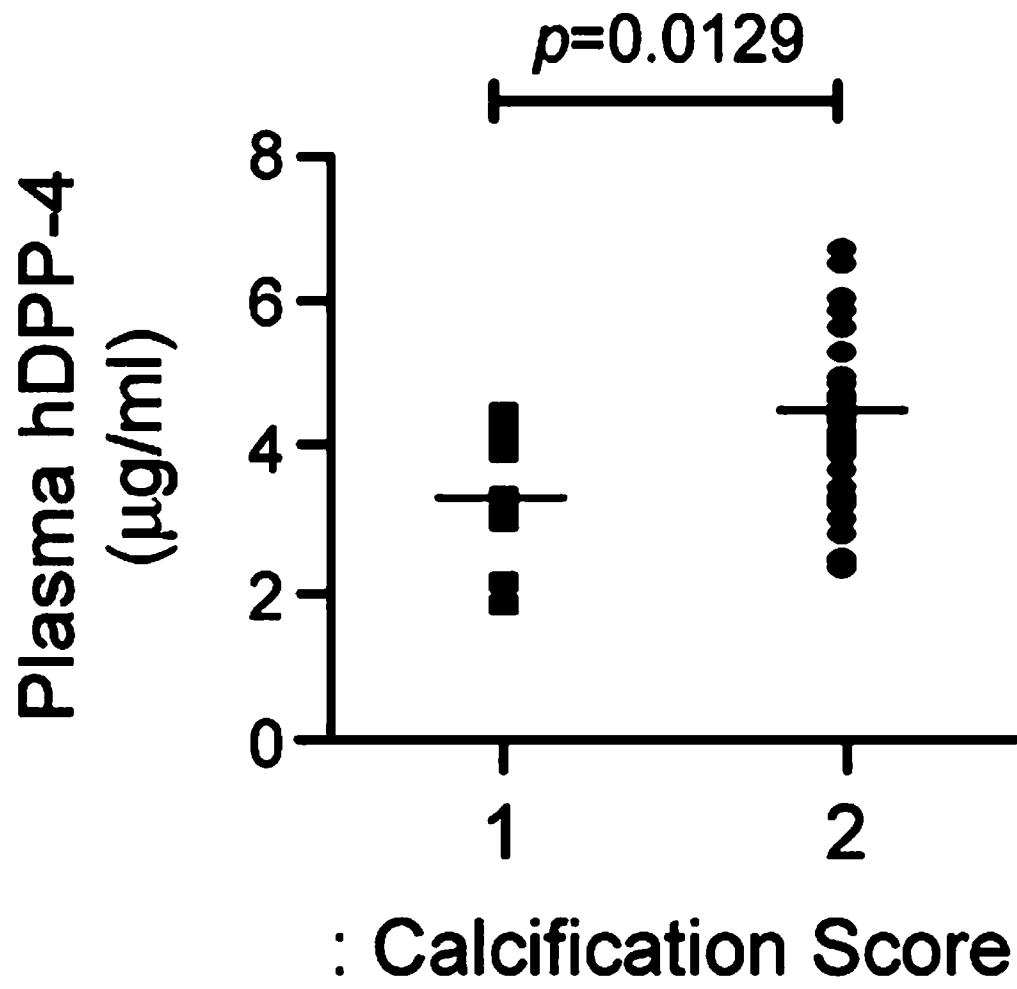
[도4b]



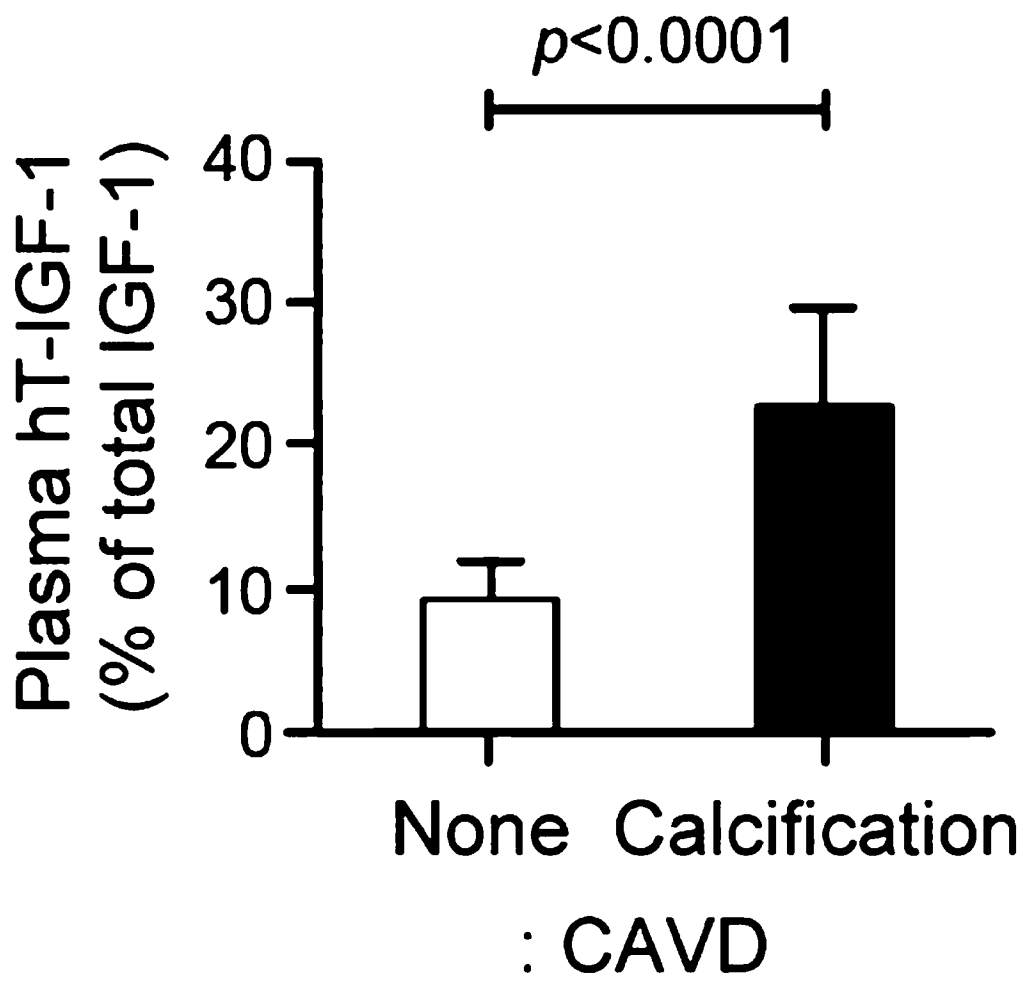
[도4c]



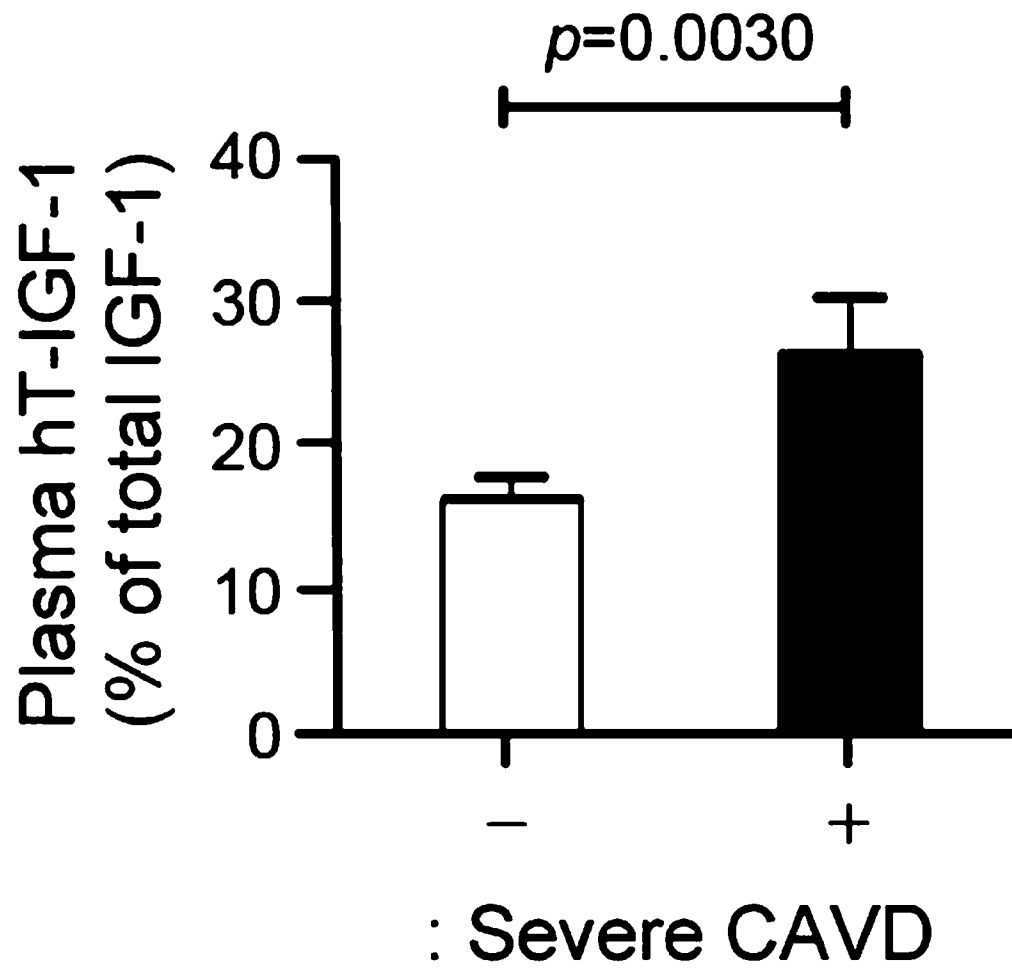
[도4d]



[도4e]



[도4f]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001906**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C07K 14/65(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 33/53; G01N 33/68; C07K 14/65

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: aortic calcification disease, truncated IGF-1, diagnosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOOS, R. et al., "Sclerostin as a Potential Novel Biomarker for Aortic Valve Calcification: an In-Vivo and Ex-Vivo Study", The Journal of Heart Valve Disease, 2013, vol. 22, no. 3, pages 317-325 See methods; results; and conclusion.	1-10
A	LIN, Ching - Ting et al., "Downregulation of Signaling-Active IGF-1 by Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV)", International Journal of Biomedical Science, 2010, vol. 6, no. 4, pages 301-309 See abstract; and pages 304-306.	1-10
A	BECKMANN, Erik et al., "(NIH Public Access Author Manuscript) Insights into the Use of Biomarkers in Calcific Aortic Valve Disease", The Journal of Heart Valve Disease, 2010, vol. 19, no. 4, pages 441-452 See abstract; and conclusion.	1-10
A	CITTADINI, A. et al., "Insulin-like Growth Factor-1 Protects from Vascular Stenosis and Accelerates Re-Endothelialization in a Rat Model of Carotid Artery Injury", Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009, vol. 7, no. 11, pages 1920-1928 See the entire document.	1-10



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

28 JUNE 2016 (28.06.2016)

Date of mailing of the international search report

01 JULY 2016 (01.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/001906

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI, GenPept accession no. NP_000609.1 (25 May 2014) See the entire sequence.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/001906

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C07K 14/65(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/53; G01N 33/68; C07K 14/65

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: 대동맥판막 석회화질환, truncated IGF-1, 진단

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KOOS, R. 등, 'Sclerostin as a potential novel biomarker for aortic valve calcification: an in-vivo and ex-vivo study', The Journal of Heart Valve Disease, 2013, 22권, 3호, 페이지 317-325 방법; 결과; 및 결론 참조.	1-10
A	LIN, CHING-TING 등, 'Downregulation of signaling-active IGF-1 by dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)', International Journal of Biomedical Science, 2010, 6권, 4호, 페이지 301-309 요약; 및 페이지 304-306 참조.	1-10
A	BECKMANN, ERIK 등, '(NIH Public Access Author Manuscript) Insights into the use of biomarkers in calcific aortic valve disease', The Journal of Heart Valve Disease, 2010, 19권, 4호, 페이지 441-452 요약; 및 결론 참조.	1-10
A	CITTADINI, A. 등, 'Insulin-like growth factor-1 protects from vascular stenosis and accelerates re-endothelialization in a rat model of carotid artery injury', Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009, 7권, 11호, 페이지 91920-1928 전체 문헌 참조.	1-10

☒ 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

2016년 06월 28일 (28.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 01일 (01.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, GenPept accession no. NP_000609.1 (2014.05.25) 전체 서열 참조.	1-10

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음