

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 3월 6일 (06.03.2025)



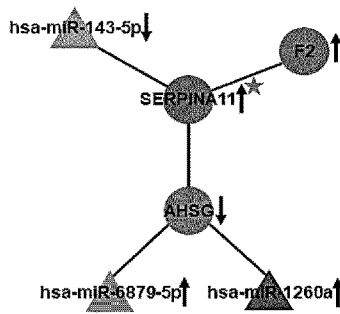
(10) 국제공개번호
WO 2025/048335 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/012030
- (22) 국제출원일: 2024년 8월 13일 (13.08.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0112724 2023년 8월 28일 (28.08.2023) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임도선 (LIM, Do-Sun); 06281 서울특별시 강남구 선릉로 206, 101-204, Seoul (KR). 김경섭 (KIM, Kyung-Seob); 02577 서울특별시 동대문구 왕산로 71, 1105호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

(54) Title: EXOSOME-DERIVED BIOMARKER FOR DIAGNOSING ARTERIOSCLEROSIS

(54) 발명의 명칭: 동맥경화증 진단용 엑소솜 유래 바이오 마커



AA ... Gene symbol
BB ... Fold

유전자 기호	AA		
	EA/BL	LA/BL	LA/EA
F2	3.978	1.532	2.979
AHSR	0.064	0.174	2.681
SERPINA11	0.72	0.507	0.058

유전자 기호	AA		
	EA/BL	LA/BL	LA/EA
hsa-miR-143-5p	0.288	1.757	6.102

유전자 기호	AA		
	EA/BL	LA/BL	LA/EA
hsa-miR-6879-5p		1.000	0.008
hsa-miR-1260a		0.033	0.004

(57) Abstract: The present invention relates to exosome-derived biomarkers for diagnosing arteriosclerosis. The biomarkers of the present invention exhibit specific changes in expression associated with arteriosclerosis, particularly during the early stages of the disease, and thus are highly effective for early diagnosis and prognosis of arteriosclerosis. Particularly, the 3D arteriosclerosis model of the present invention closely mimics the arterial condition of actual patients, allowing for the combined use of the biomarkers and the model to enable early diagnosis, personalized treatment development, and precise monitoring of disease prognosis.

(57) 요약서: 본 발명은 동맥경화증을 진단하기 위한 엑소솜 유래 바이오 마커들에 관한 것으로, 본 발명의 바이오 마커들은 동맥경화증에 특이적으로 발현이 변화하며, 특히, 동맥경화증의 발병 초기에 특이적이므로, 동맥경화증의 조기 진단과 예후 예측에 활용될 수 있는 효과가 있고, 특히, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델은 실제 환자의 동맥 상태와 더 유사하므로 이를 함께 이용하면 동맥경화증을 조기 진단하고 개인 맞춤형으로 치료를 개발하며 예후를 정밀하게 모니터링할 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

발명의 설명

발명의 명칭: 동맥경화증 진단용 엑소좀 유래 바이오 마커 기술분야

- [1] 본 발명은 동맥경화증을 진단하기 위한 엑소좀 유래 바이오 마커들에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 성인병 증가와 더불어 동맥경화, 고지혈증, 심근경색 등의 심혈관계 질환이 크게 증가하고 있다. 대표적인 심혈관계 질환으로서 동맥경화(Atherosclerosis)는 지질대사와 관련된 유전적 요인과 식습관, 흡연, 운동부족 등의 환경적 요인에 의하여 동맥이 경화되는 질환으로, 뇌, 심장, 신장 등의 인체의 중요 장기의 혈액순환에 이상을 초래함으로써 심근경색증, 뇌경색증, 폐쇄성 말초혈관질환 및 동맥류 등의 심혈관질환의 원인을 제공하며, 뇌동맥 또는 관상동맥에서 일어나기 쉽고, 이로 인해 심장질환, 뇌혈관 질환 등의 심혈관계 질환으로 발전하게 된다. 뇌동맥경화의 경우에는 두통, 현기증, 정신장애 등을 나타내고 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화의 경우에는 심장부에 동통과 부정맥을 일으켜 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한, 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발되어, 동맥경화로 인한 질병이 현대 사회에 있어, 특히 50 내지 60대의 남성들에게 가장 큰 사망요인으로 부각되고 있다. 동맥경화는 동맥혈관의 손상 및 리포프로테인으로 인한 콜레스테롤 축적 등이 발생원인으로 알려져 있다. 동맥벽은 얇은 단층의 세포로 된 내막, 평활근육 세포로 된 동맥벽의 중간층, 동맥을 보호역할을 하는 외막으로 되어 있다. 동맥경화는 동맥벽의 손상과 변성으로 동맥경화 형성을 유발하여 발병하지만, 고혈압, 고지혈증, 흡연이 중요하다. 혈액 속의 콜레스테롤 수치가 높은 고지혈증일 경우는 동맥 내막과 근육층 사이의 식세포가 많은 기름기를 세포질 속에 함유하여 동맥벽에 지방이 축적된다.
- [3] 혈관 내벽의 플라그(plaque) 형성 및 혈관과열은 심근경색 발병의 주요한 요인이며, 동맥의 혈류를 저해하거나 차단함으로써 심혈관질환의 심각한 합병증을 초래할 수 있다. 동맥경화의 초기 발생에 관한 가설은 혈관벽의 손상에 대한 만성 염증과정으로 제시되고 있다. 이는 유전적 변이, 과산화물, 고혈압, 당뇨, 혈장 호모시스테인 농도 증가 또는/및 미생물 감염 등의 원인에 의하여 혈관 내피세포가 정상적인 항상성을 유지하지 못하는 기능부전 상태가 되는 것이다. 구체적으로, 상기의 원인들로 인하여 혈중 저밀도 지방단백질(low-density lipoprotein; LDL)이 산화, 당결합, 집적화, 당단백 결합 등을 거쳐 변형-LDL(highly modified LDL; HM-LDL)로 변화하게 되고, 이들은 혈관 내피세포 및 평활근을 자극하고 손상을 유발한다. 이로 인하여, 내피세포의 혈관세포부착물질-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1)의 발현 및 염증세포의 염증매개인자 방출이 촉진되면

LDL은 내피세포 아래에 유입 및 축적되고, 축적된 LDL 및 산화된 HM-LDL은 다시 대식세포, T 임파구 등의 면역세포의 유입 및 활성화를 유발하는 과정을 되풀이하여 병변의 염증반응을 촉진시키게 된다. 유입된 대식세포나 임파구로부터 방출된 가수분해효소, 염증매개인자, 성장인자 등의 작용으로 병반은 괴사하게 되고, 괴사된 병소 부위로 단핵구의 유입, 평활근의 이동 및 분화, 섬유성 조직의 형성 등의 반복적인 과정이 이루어진다. 상기 과정을 통해 병변 조직은 HM-LDL을 핵으로 한 괴사조직에 섬유질이 덮인 복잡한 구조의 섬유질 병변으로 발달하게 되며, 발달된 병변 조직으로부터 혈전이 생성되고, 동맥벽의 근육층은 더욱 두꺼워지며 혈관은 점점 좁아지게 되어 심혈관계 질환에 따른 여러 장기의 손상이 야기될 수 있다.

- [4] 동맥경화증(atherosclerosis)은 죽상경화증, 또는 죽상동맥경화증이라고도 하며, 주로 혈관의 가장 안쪽을 덮고있는 내막(endothelium)에 콜레스테롤이 침착하고 내피세포의 증식이 일어난 결과, "죽종(atheroma)"이 형성되는 혈관질환을 말한다. 죽종에 의해서 혈관내부가 막히게 되면 혈액순환에 장애가 생기면서, 관상동맥질환(coronary artery disease) 또는 뇌경색(ischemic cerebrovascular disease)이 발생한다. 동맥경화증의 발생과 진행을 초래하는 주요 위험 인자로서 혈액 내에 총 콜레스테롤이 높아지거나, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)이 낮은 경우, 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL-콜레스테롤)이 높은 경우, 중성지방이 높은 경우, 혈압이 높은 경우 (140/90mmHg 이상), 흡연, 당뇨병, 심혈관 질환의 가족력, 연령 증가, 운동부족, 과체중 및 복부비만 등이 그 원인으로 알려져 있다. 동맥경화증은 경동맥 초음파, CT (CTA, CT-angiography) 및 MR 혈관조영술 (MRA, magnetic resonance angiography), 뇌혈관 (cerebral angiography) 및 심혈관 조영술 (coronary angiography) 등과 같은 영상검사를 이용하여 진단하고 있다. 이런 영상 검사를 통하여 환자별로 동맥경화의 발생 여부를 확인할 수 있지만, 검사과정이 복잡하고, 검사로 인한 부작용 및 합병증이 있는 문제점이 있다.

발명의 내용

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.
 [6] 또한, 본 발명의 목적은 동맥경화증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
 [7] 또한, 본 발명의 목적은 동맥경화증 진단용 키트를 제공하는 것이다.
 [8] 아울러, 본 발명의 목적은 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.
 [10] 또한, 본 발명은 동맥경화증 진단용 조성물을 제공한다.
 [11] 또한, 본 발명은 동맥경화증 진단용 키트를 제공한다.

- [12] 아울러, 본 발명은 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명의 바이오 마커들은 동맥경화증에 특이적으로 발현이 변화하며, 특히, 동맥경화증의 발병 초기에 특이적이므로, 동맥경화증의 조기 진단과 예후 예측에 활용될 수 있는 효과가 있고, 특히, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델은 실제 환자의 동맥 상태와 더 유사하므로 이를 함께 이용하면 동맥경화증을 조기 진단하고 개인 맞춤형으로 치료를 개발하며 예후를 정밀하게 모니터링할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 본 발명의 3D 동맥경화증 모델의 세포로부터 조직으로 분비되는 엑소좀 및 분비되어 조직 내에 존재하는 엑소좀을 TEM으로 확인한 도이다:
- [15] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [16] Early athero: 동맥경화 초기; 및
- [17] Late athero: 동맥경화 후기.
- [18] 도 2는 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 엑소좀의 양성 마커의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 도이다:
- [19] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [20] Early athero: 동맥경화 초기; 및
- [21] Late athero: 동맥경화 후기.
- [22] 도 3은 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소좀을 나노입자추적분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [23] BL: Baseline;
- [24] EA: Early athero; 및
- [25] LA: Late athero.
- [26] 도 4는 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소좀의 수를 정량 분석한 도이다:
- [27] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [28] Early athero: 동맥경화 초기; 및
- [29] Late athero: 동맥경화 후기.
- [30] 도 5는 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소좀에서 엑소좀 양성 마커 및 음성 마커의 발현을 웨스턴 블롯으로 분석한 도이다:
- [31] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [32] Early athero: 동맥경화 초기; 및
- [33] Late athero: 동맥경화 후기.
- [34] 도 6은 유세포 분석으로 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소좀의 CD63 및 CD9 발현을 확인한 도이다:

- [35] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [36] Eearly athero: 동맥경화 초기; 및
- [37] Late athero: 동맥경화 후기.
- [38] 도 7은 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소솜에서 종래 알려진 심혈관질환 바이오 마커의 발현을 확인하고 각 그룹간 비교한 도이다:
- [39] BL: 동맥경화 발병 전;
- [40] EA: 동맥경화 초기; 및
- [41] LA: 동맥경화 후기.
- [42] 도 8은 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 분리한 엑소솜에서 심혈관질환과 관련된 엑소솜 유래 단백질 바이오 마커들의 발현을 확인하고 각 그룹간 비교한 도이다:
- [43] BL: 동맥경화 발병 전;
- [44] EA: 동맥경화 초기; 및
- [45] LA: 동맥경화 후기.
- [46] 도 9는 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 동맥경화 발병 전 그룹 대비 동맥경화 초기 그룹 및 동맥경화 후기 그룹에서 달라지는 단백질 발현 양상을 벤다이어그램으로 나타낸 도이다:
- [47] Baseline: 동맥경화 발병 전;
- [48] Eearly athero: 동맥경화 초기; 및
- [49] Late athero: 동맥경화 후기.
- [50] 도 10은 동맥경화 발병 과정 동안 시기적으로 달라지는 발현 단백질들을 Heat map으로 분석한 도이다:
- [51] BL: 동맥경화 발병 전;
- [52] EA: 동맥경화 초기; 및
- [53] LA: 동맥경화 후기.
- [54] 도 11은 동맥경화 초기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가한, 종래에 알려지지 않은 초기 동맥경화증 특이적 단백질 바이오 마커들을 도출한 도이다:
- [55] BL: 동맥경화 발병 전;
- [56] EA: 동맥경화 초기; 및
- [57] LA: 동맥경화 후기.
- [58] 도 12는 도 11의 14개의 바이오 마커를 전사체 빅데이터 분석하여 심혈관질환과 연관성이 높은 마커들을 도출한 도이다:
- [59] BL: 동맥경화 발병 전;
- [60] EA: 동맥경화 초기; 및
- [61] LA: 동맥경화 후기.
- [62] 도 13은 동맥경화증 초기에 엑소솜에서 발현이 증가하는 바이오 마커 SERPIN A11와 다른 단백질들의 상호작용을 분석한 도이다.

- [63] 도 14는 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 SERPINA11와 상호작용하는 것으로 분석된 F2 및 AHSG 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다:
- [64] BL: 동맥경화 발병 전;
- [65] EA: 동맥경화 초기; 및
- [66] LA: 동맥경화 후기.
- [67] 도 15는 동맥경화증 초기 그룹 및 동맥경화증 후기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가하는 엑소솜 유래 단백질들을 도출한 도이다:
- [68] BL: 동맥경화 발병 전;
- [69] EA: 동맥경화 초기; 및
- [70] LA: 동맥경화 후기.
- [71] 도 16은 도 15의 바이오 마커를 전사체 빅데이터 분석하여 심혈관질환과 연관성이 높은 마커 RANBP1를 도출한 도이다:
- [72] BL: 동맥경화 발병 전;
- [73] EA: 동맥경화 초기; 및
- [74] LA: 동맥경화 후기.
- [75] 도 17은 동맥경화 후기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가한, 종래에 알려지지 않은 후기 동맥경화증 특이적 엑소솜 유래 단백질 바이오 마커들을 도출한 도이다:
- [76] BL: 동맥경화 발병 전;
- [77] EA: 동맥경화 초기; 및
- [78] LA: 동맥경화 후기.
- [79] 도 18은 도 17의 바이오 마커를 전사체 빅데이터 분석하여 심혈관질환과 연관성이 높은 엑소솜 유래 단백질 마커 MAN1A1, TKFC 및 UROC1를 도출한 도이다:
- [80] BL: 동맥경화 발병 전;
- [81] EA: 동맥경화 초기; 및
- [82] LA: 동맥경화 후기.
- [83] 도 19는 초기 동맥경화증 특이적 단백질 바이오 마커 SERPINA11, F2 및 AHSG와 상호작용하는 microRNA 바이오 마커들 중 동맥경화증 초기 그룹에서 발현이 감소한 microRNA들을 도출한 도이다:
- [84] BL: 동맥경화 발병 전;
- [85] EA: 동맥경화 초기; 및
- [86] LA: 동맥경화 후기.
- [87] 도 20은 도 19의 microRNA들 중 SERPINA11 및 F2 단백질을 표적화하는 microRNA를 도출한 도이다:
- [88] BL: 동맥경화 발병 전;
- [89] EA: 동맥경화 초기; 및
- [90] LA: 동맥경화 후기.

[91] 도 21은 동맥경화증 초기 그룹에서 발현이 증가하는 miRNA들을 분석한 도이다:

[92] BL: 동맥경화 발병 전;

[93] EA: 동맥경화 초기; 및

[94] LA: 동맥경화 후기.

[95] 도 22는 도 21의 miRNA들 중 AHSR를 표적화하는 microRNA를 도출한 도이다:

[96] BL: 동맥경화 발병 전;

[97] EA: 동맥경화 초기; 및

[98] LA: 동맥경화 후기.

[99] 도 23은 본 발명에서 도출한 동맥경화증의 조기 진단을 위한 바이오 마커들의 발현 변화를 나타낸 도이다:

[100] BL: 동맥경화 발병 전;

[101] EA: 동맥경화 초기; 및

[102] LA: 동맥경화 후기.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[103] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[104] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[105] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[106]

[107] 일 측면에서, 본 발명은 RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSR, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물에 관한 것이다.

- [108] 일 구현예에서, 동맥경화증은 대동맥, 관동맥, 뇌저동맥, 신동맥, 또는 말초동맥에서 발생한 것일 수 있다.
- [109] 일 구현예에서, 상기 동맥경화증은 염증성 관상동맥경화증일 수 있다.
- [110] 일 구현예에서, 상기 바이오 마커는 동맥경화증의 발병시 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀(exosome)에서 발현이 변화할 수 있다.
- [111] 일 구현예에서, RANBP1는 초기 및 후기 동맥경화증에 특이적으로 발현이 변화할 수 있으며, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p는 초기 동맥경화증에 특이적으로 발현이 변화할 수 있고, MAN1A1, TKFC 및 UROC1는 후기 동맥경화증에 특이적으로 발현이 변화할 수 있다.
- [112] 일 구현예에서, RANBP1는 초기 및 후기 동맥경화증에서 발현이 증가할 수 있고, SERPINA11, F2, hsa-miR-6879-5p 및 hsa-miR-1260a는 초기 동맥경화증에서 발현이 증가할 수 있으며, MAN1A1, TKFC 및 UROC1는 후기 동맥경화증에서 발현이 증가할 수 있다.
- [113] 일 구현예에서, AHSG 및 hsa-miR-143-5p는 초기 동맥경화증에서 발현이 감소할 수 있다.
- [114] 일 구현예에서, 상기 바이오 마커 조성물은 SERPINA11(serpin A11), F2(prothrombin), AHSG(Association of low fetuin-A), hsa-miR-143-5p, hsa-miR-1260a 및 hsa-miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, SERPINA11, F2, AHSG, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-1260a 및 hsa-miR-6879-5p를 포함할 수 있고, 상기 바이오 마커는 동맥경화증의 조기 진단용일 수 있다.
- [115] 일 구현예에서, 동맥경화증의 발병에 의해 SERPINA11, F2, miR-6879-5p 및 miR-1260a의 발현이 증가할 수 있다.
- [116] 일 구현예에서, 동맥경화증의 발병에 의해 AHSG 및 miR-143-5p의 발현이 감소할 수 있다.
- [117] 본 발명에서 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [118] 일 측면에서, 본 발명은 RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 바이오 마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 동맥경화증 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [119] 일 구현예에서, 단백질 바이오 마커인 RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2 및 AHSG의 발현 수준을 측정하는 제제는 단백질 전장 또는 그 단편에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 앵타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)일 수 있으며, 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역형광염

색법(immunofluorescence), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 질량 분석 또는 단백질 마이크로어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 발현 수준이 측정될 수 있다.

[120] 일 구현예에서, microRNA 바이오 마커인 miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p의 발현 수준을 측정하는 제제는 microRNA의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 PNA(Peptide nucleic acid), 앵타머(aptamer), 프라미어 쌍, 프로브, 또는 프라이머 쌍 및 프로브일 수 있으며, 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), RNase 보호분석법(RNase protection assay; RPA), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏(northern blot), DNA 칩, multiplex PCR 또는 ddPCR로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 발현 수준이 측정될 수 있다.

[121] 일 구현예에서, 본 발명의 항체의 면역학적 활성을 가진 단편은 Fab, Fd, Fab', dAb, F(ab'), F(ab')₂, scFv(single chain fragment variable), Fv, 단일쇄 항체, Fv 이량체, 상보성 결정 영역 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 디아바디(diabody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[122] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[123] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.

[124] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 microRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 상기 microRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 상기 microRNA 발현 정도를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 통상의 기술분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있으므로 본 발명에서는 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.

[125] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산

서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

- [126] 본 발명에서, 프로브를 microRNA 분자와 혼성화시키는 적합한 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.
- [127] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 상기 항체의 제조방법은 널리 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [128] 일 구현예에서, 표지를 추가로 포함할 수 있으며, 표지는 형광 물질, 프로브 또는 태그(tag)일 수 있다. 상기 표지 물질은 본 기술 분야에서 알려진 어떠한 방법에 의해 검출될 수 있는 어떠한 화학적 모이어티라도 될 수 있다. 검출가능한 표지의 예는 분광(spectroscopy), 광화학(photochemistry)에 의해 또는 생화학적(biochemical), 면역학적(immunochemical) 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있는 어떠한 모이어티라도 포함될 수 있다. 핵산 프로브에 표지하는 적절한 방법은 상기 표지의 종류 및 상기 표지의 위치 및 프로브에 따라 선택될 수 있다. 표지의 예는 효소, 효소 기질, 동위원소물질, 형광 다이, 발색단(chromophores), 화학발광 표지

(chemiluminescent label), 전기화학적 발광 표지(electrochemical luminescent label), 특이적인 결합 파트너를 갖는 리간드, 및 서로 반응하여 검출 신호의 강도를 증가, 변형 또는 감소시킬 수 있는 기타 표지를 포함할 수 있다.

- [129] 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광 물질일 수 있으며, 형광 물질은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP) 또는 변형된 적색 형광 단백질(modified red fluorescent protein; mRFP)일 수 있다.
- [130] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 구성물을 포함하는 동맥경화증 진단용 키트에 관한 것이다.
- [131] 일 구현예에서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.
- [132] 일 구현예에서, 상기 키트는 대상체 또는 환자로부터 생체 시료를 수집하기 위한 도구 및/또는 시약 뿐 아니라 그 시료로부터 게놈 DNA, cDNA, RNA 또는 단백질을 준비하기 위한 도구 및/또는 시약을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 게놈 DNA의 관련 영역을 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 키트는 약리개념학적 프로파일링에 유용한 유전 인자의 프로브를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 키트의 사용에 있어서, 표지화된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 분석 중 용이하게 동정할 수 있다.
- [133] 본 발명에서 용어 "동맥경화증 진단용 구성물"이란 동맥경화증의 발생 위험도를 예측/진단하거나, 특정 병기의 동맥경화증을 진단할 수 있는 물질로, 동맥경화증의 발생 가능성과 유의미한 상관관계를 가지고 발현이 증가 또는 감소하는 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: miRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 동맥경화증 진단용 바이오 마커는 동맥경화증 발생 또는 병기(초기/후기)에 특이적으로 miRNA 발현 또는 단백질 발현 정도가 증가 또는 감소하는 마커이다. 이러한 마커들은 마커 자체의 단백질 또는 핵산뿐만 아니라 어느 하나의 마커와 상보적인 핵산을 포함한다.
- [134] 일 측면에서, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [135] 일 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀일 수 있다.
- [136] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체" 또는 "개인"이란, 동맥경화증이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [137]

- [138] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [139]
- [140] 실시예 **1. 3D 동맥경화증 모델 제작**
- [141] 3D 관상동맥 조직 제작
- [142] 콜마(ColMA) 하이드로젤에 염증성 대식세포 (1×10^6 cells/mL) (M1 대식세포), 관상동맥 평활근 세포 (5×10^6 cells/mL) 및 관상동맥 내피세포 (2×10^6 cells/mL)를 각각 혼합하여 바이오잉크를 제조하고, 주사기 고정 장치, UV LED, 주사기 및 챔버 온도 조절 장치가 장착된 바이오 프린팅 기계와 이의 소프트웨어로서 NewC reatorK (Rokit, Seoul, South Korea)를 사용하여 관상동맥 평활근 세포, 염증성 대식세포 및 관상동맥 내피세포의 순서로 3D 프린팅함으로써, 가장 위층에 내피세포 (두께 0.15mm), 중간층에 염증성 대식세포 (두께 0.6mm) 및 가장 아래층에 평활근세포 (두께 0.3mm)의 구조이며, 평균 공극 크기가 $370 \mu\text{m}$ 내지 $480 \mu\text{m}$ 인 다공성인, 격자형 그물망 구조의 균질한 시트 구조물 (평균 직경 약 7 mm 및 높이 약 1.05 mm)을 제작하였다. 제조된 구조물에 UV LED를 조사하여 하이드로젤을 가교 결합시킨 후 12 웰 플레이트에서 배양하여 그물망 구조의 3D 관상동맥 조직을 제작하였다. 이 후, 상기 3D 관상동맥 조직에 LDL을 2mg/mL을 처리하여 염증성 동맥경화를 유발하고, 이의 동맥경화증 진행 특성에 따라 동맥경화증 유발 전 (baseline) (0일 차), 발병되는 시기를 초기 동맥경화증(Early athero)으로, 심화되는 시기를 후기 동맥경화증(Late athero) 그룹으로 구분하였다.
- [143]
- [144] 실시예 **2. 3D 동맥경화증 모델로부터 분리되는 엑소좀 분석**
- [145] 상기 실시예 1의 3D 동맥경화증 모델의 동맥경화증 진행 시기에 따라 분리되는 엑소좀 (30-150nm)의 특성을 투과전자현미경 및 면역형광염색법으로 확인하였다.
- [146] 투과전자현미경을 통해 3D 관상동맥 조직 내부의 세포를 관찰한 결과, 동맥경화 발병 전 (BL; Baseline; 0일차), 동맥경화 초기 (EA; Early Athero; 발병 3일차) 및 동맥경화 후기 (LA; Late Athero; 발병 14일차) 그룹 모두에서 세포로부터 조직으로 분리되는 엑소좀 및 분리되어 조직 내에 존재하는 엑소좀을 관찰할 수 있었다 (도 1). 또한, 엑소좀의 마커인 CD9, CD63 및 CD81에 대한 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행한 결과, 동맥경화 발병 전, 동맥경화 초기 및 동맥경화 후기 모두에서 세포와 조직 내에 CD63 양성 엑소좀들이 관찰되었다 (도 2).
- [147]
- [148] 실시예 **3. 3D 동맥경화증 모델로부터 분리한 엑소좀 분석**

- [149] 동맥경화증 시기별 분리된 엑소솜 내부의 단백질 및 miRNA의 조성이 변화하는지 확인하기 전에 이의 특성을 분석하기 위해, 각 그룹에서 엑소솜을 순수 분리하고, 나노입자추적분석, 웨스턴 블롯 및 유세포 분석을 수행하였다.
- [150] 나노입자추적분석 결과, 모든 그룹에서 30-150nm 크기의 엑소솜들이 많이 분리되는 것으로 나타났으며 (도 3), 특히 동맥경화 발병 전 그룹에 비해 동맥경화 초기 그룹 및 동맥경화 후기 그룹에서 엑소솜 분비가 현저하게 증가하였다 (도 4). 또한, 엑소솜 양성 마커 (CD9, CD63 및 CD81) 및 음성 마커 (Calnexin)들을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, 모든 그룹에서 양성 마커 (CD9, CD63 및 CD81)가 발현되었으며 음성 마커 (Calnexin)는 발현하지 않는 것으로 나타났다 (도 5). 아울러, 유세포 분석 결과, CD63 및 CD9 양성 엑소솜들이 상기 3 그룹에서 확인되었다 (도 6). 이를 통해, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델의 동맥경화증 시기별 엑소솜이 순수 분리된 것을 확인하였다.
- [151]
- [152] 실시예 4. 3D 동맥경화증 모델의 종래 심혈관질환 바이오 마커 발현 분석
- [153] 본 발명의 3D 동맥경화증 모델이 심혈관질환을 모사하는 것을 검증하기 위해, 동맥경화증 모델에서 분리되는 엑소솜을 용해하여 단백질을 분리한 뒤 프로테오믹스 방법으로 각 그룹의 엑소솜에서 발현된 단백질들을 동정하고, 이들 중 종래에 알려진 심혈관질환 바이오 마커 단백질들의 발현 정도를 분석하였다.
- [154] 그 결과, 급성기 반응 수치(Acute Phase Reactants)인 CRP 및 SAA는 동맥경화 발병 전 그룹(Baseline)에 비해 동맥경화 초기 그룹(Early Athero) 및 동맥경화 후기 그룹(Late Athero)에서 증가하였으며, 동맥경화 후기 그룹에 비해 동맥경화 초기 그룹에서 증가하였다 (도 7). 이와 반대로, 죽상경화반 파열(Plaque Rupture)와 관련된 마커 PAPPA는 동맥경화 초기 그룹에 비해 동맥경화 후기 그룹에서 발현이 증가 되는 것으로 나타났다 (도 7). 아울러, 종래의 심혈관질환과 관련된 엑소솜 유래 단백질 바이오 마커인 APOD, APOC3, C1QA, C5, CRP, PIGR, SEPRING1, SERPINC1 및 SERPINF2가 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 발현되는 것을 확인하였다 (도 8). 이를 통해, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 동맥경화증 유발 과정 동안 시기에 따른 단백질 발현 변화가 종래의 심혈관질환 조직 및 엑소솜 유래 바이오 마커의 발현 양상과 유사한 것을 확인하였으므로, 본 발명의 3D 동맥경화증 모델에서 발굴할 새로운 마커들이 동맥경화증을 특이적으로 진단 및 검출할 수 있음을 알 수 있다.
- [155]
- [156] 실시예 5. 엑소솜 유래 초기 동맥경화증 특이적 단백질 바이오 마커 발굴
- [157] 동맥경화증 시기별 분리된 엑소솜 내부에서 발현이 변화된 단백질 및 miRNA를 Proteomics 및 miRNA sequencing으로 분석하여 초기 동맥경화증에 특이적인 신규한 바이오 마커를 발굴하였다. 분석한 결과를 벤다이어그램(Venn diagram)을 이용하여 동맥경화 발병 전 그룹에 비해 동맥경화 초기 그룹 및 동맥경화 후기 그룹에서 발현이 변화하는 엑소솜 유래 단백질들을 확인하고 (도 9), Heat ma

p 분석을 통해 동맥경화 발병 과정 동안 시기적으로 달라지는 발현 단백질들을 시각적으로 분석하였다 (도 10). 이렇게 분석된 초기 동맥경화증 관련 단백질 바이오 마커 후보군에서 종래에 알려지지 않았지만 동맥경화증 초기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가하는 단백질들을 분석하였다. 그 결과, IGHV3-53, IGHV3-43 D, IGHV2-5, IGKV1-16, ASCC3, IGHV1-3, IGHV3-20, SERPINA11, TPD52L2, IGKV1D-16, GRPEL1, MINPP1, IGHV3OR16-12 및 IGHV3-35의 단백질 바이오 마커를 발굴하였으며 (도 11), 상기 14가지 단백질 중에서 잠재적인 동맥경화증 바이오 마커 후보군을 정하기 위해, ARCHS4 data base를 통해 전사체 빅데이터 분석을 진행하였다. 전사체 빅데이터 분석 결과, 상기 14종의 단백질 중 ASCC3, SERPINA11, TPD52L2, GRPEL1 및 MINPP1이 심혈관질환과 연관이 있는 것으로 분석되었으며, 그 중 SERPINA11이 심혈관질환과 가장 연관성이 높은 것으로 나타나 (도 12), 이를 초기 동맥경화증 바이오 마커로 선택하였다. 이렇게 선별한 초기 동맥경화증 마커인 SERPINA11 단백질과 다른 단백질들의 상호작용을 분석하기 위해 기존 data base를 통해 STRING을 구성하였다 (Szklarczyk et al. Nucl eic Acids Res. 2015 43(Database issue):D447-52). 그 결과, SERPINA11은 CEP350, EIF2B3, SERPINA7, F2, ALB, AHSG, LRRC27, LRRC66, PPIB 및 ALG1L 단백질 들과 network를 구성하였으며(도 13). 심혈관질환과 관련된 SERPINA7, F2, ALB 및 AHSG 단백질 중 F2 단백질이 동맥경화 발병 전 그룹에 비해 동맥경화 초기 그룹 및 동맥경화 후기 그룹에서 발현이 증가하고, AHSG 단백질은 동맥경화 발병 전 그룹에 비해 동맥경화 초기 그룹 및 동맥경화 후기 그룹에서 발현이 감소 하는 것을 확인하였다 (도 14).

[158]

[159] 실시예 6. 엑소솜 유래 초기 및 후기 동맥경화증 특이적 단백질 바이오 마커 발굴

[160] 동맥경화증 초기부터 후기까지 발현이 지속되는 새로운 동맥경화 관련 바이오 마커 후보군을 발굴하기 위해, 종래에 알려지지 않았지만 동맥경화증 초기 그룹 및 동맥경화증 후기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가하는 엑소솜 유래 단백질을 분석하였다. 그 결과, APOC3, CFI, APCS, APOA4, CD5L, BPGM, C1QA, HBE1, RANBP1, C4B, SPP1, SELL, CPN1, PKLR, MTPN, PNP, COPS8, PLXDC2, ANT XR2, PGLS, MYLK, APOE, F11, GCLC, FMOD, CAB39, MGAT1 및 VTN 단백질 이 후보군으로 도출되었으며 (도 15), 이를 ARCHS4 data base를 통해 전사체 빅데이터 분석한 결과, 심혈관질환과 연관된 단백질 RANBP1이 도출되어, 이를 동맥경화증의 초기부터 후기까지 발현이 지속적으로 변화된 새로운 동맥경화증 관련 바이오 마커로 선택하였다 (도 16).

[161]

[162] 실시예 7. 엑소솜 유래 후기 동맥경화증 특이적 단백질 바이오 마커 발굴

[163] 새로운 동맥경화 관련 후기 발현 단백질 바이오 마커 후보군을 발굴하기 위해, 종래에 알려지지 않았지만 동맥경화증 후기 그룹에서 발현이 2배 이상 증가하

는 엑소솜 유래 단백질들을 분석하였다. 그 결과, KIF3C, IGKV2-24, NMRAL1, IGLV2-14, MAN1A1, HOOK3, NEK9, RELCH, CLEC11A, KAZALD1, OLFML3, TKFC, PSMA3, DARS1, FAHD2A, UROC1, OR5A2, PCYOX1L, PSMA5, SEPTIN1 및 ANKRD13A 단백질이 후보군으로 도출되었으며 (도 17), 이를 ARCHS4 database를 통해 전사체 빅데이터 분석한 결과, 심혈관질환과 연관된 단백질로서 KIF3C, IGKV2-24, NMRAL1, IGLV2-14, MAN1A1, HOOK3, NEK9, KAZALD1, TKFC, FAHD2A, UROC1, PCYOX1L 및 PSMA5, ANKRD13A이 도출되었고, 이 중 가장 연관성이 높은 MAN1A1, TKFC 및 UROC1 단백질을 새로운 후기 동맥경화증 바이오 마커로 선택하였다 (도 18).

[164]

[165] 실시예 8. 엑소솜 유래 초기 동맥경화증 특이적 **miRNA** 바이오 마커 발굴

[166] 동맥경화증을 초기에 진단하여 심혈관질환을 예방하는 것이 바람직하므로, 동맥경화증을 조기 진단하기 위해, 상기 실시예 5에서 도출한 초기 동맥경화증 특이적 바이오 마커들 SERPINA11, F2 및 AHSG와 상호작용하는 microRNA 바이오 마커들을 발굴하였다. 동맥경화증 초기 그룹에서 발현이 감소하는 miRNA들을 분석한 결과, 37개 miRNA들이 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (도 19). miRNA Walk 분석을 이용하여 상기 37개의 miRNA들 중 SERPINA11 및 F2 단백질을 표적화(targeting)하는 miRNA를 분석한 결과, hsa-miR-143-5p가 SERPINA11을 표적화하는 것으로 나타나 이를 마커로 선택하였으며, F2를 표적화하는 miRNA는 도출되지 않았다 (도 20). 또한, 본 발명의 동맥경화증 모델 초기 그룹에서 발현이 증가하는 miRNA들을 분석한 결과 114개 miRNA들이 도출되었으며 (도 21), 그 중 AHSG를 표적화하는 miRNA는 hsa-miR-6879-5p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-4474-3p, hsa-miR-4728-3p, hsa-miR-6731-3p 및 hsa-miR-197-3p로 나타났고, 이 중 특히 발현이 높은 hsa-miR-6879-5p 및 hsa-miR-1260a를 마커로서 선택하였다 (도 22).

[167] 이를 통해, 동맥경화증의 조기 진단을 위한 바이오 마커는 SERPINA11, F2, AHSG, hsa-miR-143-5p, has-miR-1260a 및 has-miR-6879-5p인 것으로 확인되었다 (도 23).

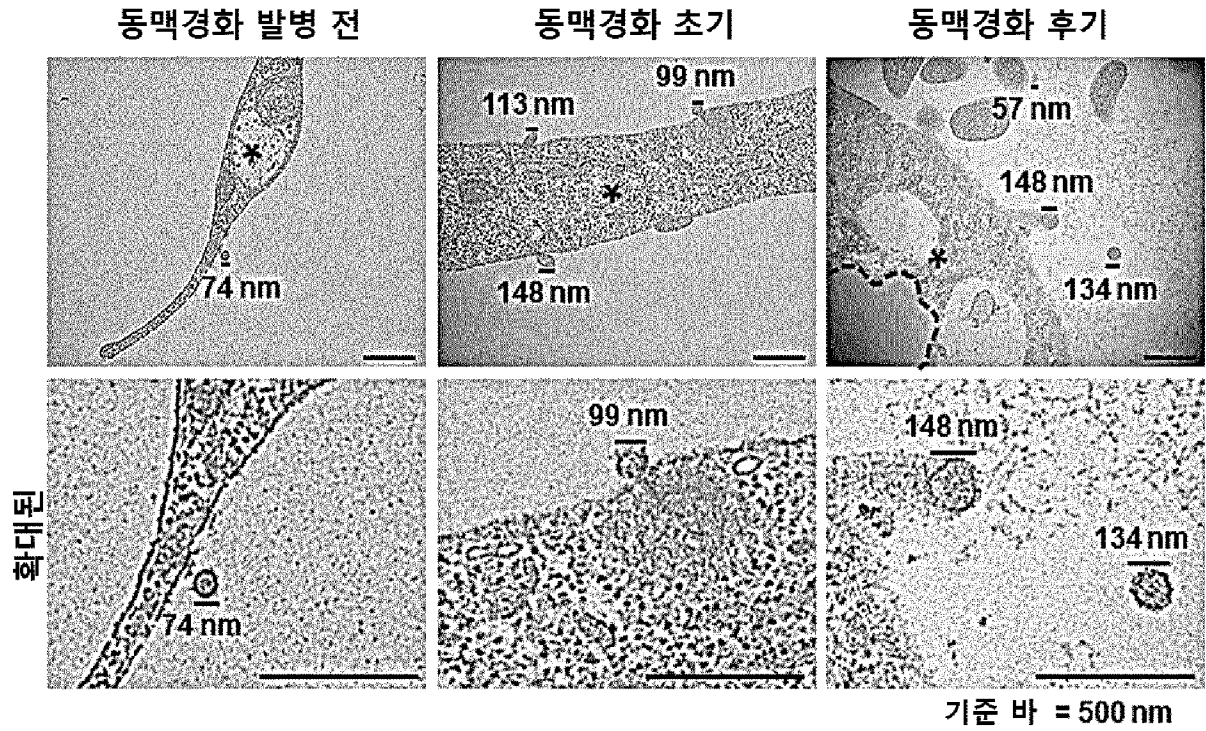
청구범위

- [청구항 1] RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는, 동맥경화증(atherosclerosis) 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 동맥경화증은 대동맥, 관동맥, 뇌저동맥, 신동맥, 또는 말초동맥에서 발생한 것인, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 동맥경화증 진단용 바이오마커 조성물은 동맥경화증의 조기 진단용인, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 5] 제 3항에 있어서, 상기 동맥경화증 진단용 바이오마커 조성물은 동맥경화증의 발병시 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀(exosome)에서 발현이 변화하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 6] 제 3항에 있어서, 상기 SERPINA11, F2, miR-6879-5p 및 miR-1260a는 동맥경화증의 발병에 의해 발현이 증가하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 7] 제 3항에 있어서, 상기 AHSG 및 miR-143-5p는 동맥경화증의 발병에 의해 발현이 감소하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.
- [청구항 8] RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 바이오 마커의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 동맥경화증 진단용 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 단백질 바이오 마커의 발현 수준을 측정하는 제제는 단백질 전장 또는 그 단편에 특이적으로 결합하는 펩타이드, 항체 또는 이의 면역학적 활성을 가진 단편, 앵타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)인, 동맥경화증 진단용 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 측정은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 면역형광염색법(immunofluorescence), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 질량분석 또는 단백질 마이크로어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행되는, 동맥경화증 진단용 조성물.
- [청구항 11] 제 8항에 있어서, 상기 microRNA 바이오 마커의 발현 수준을 측정하는 제제는 microRNA의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 PNA(Peptide n

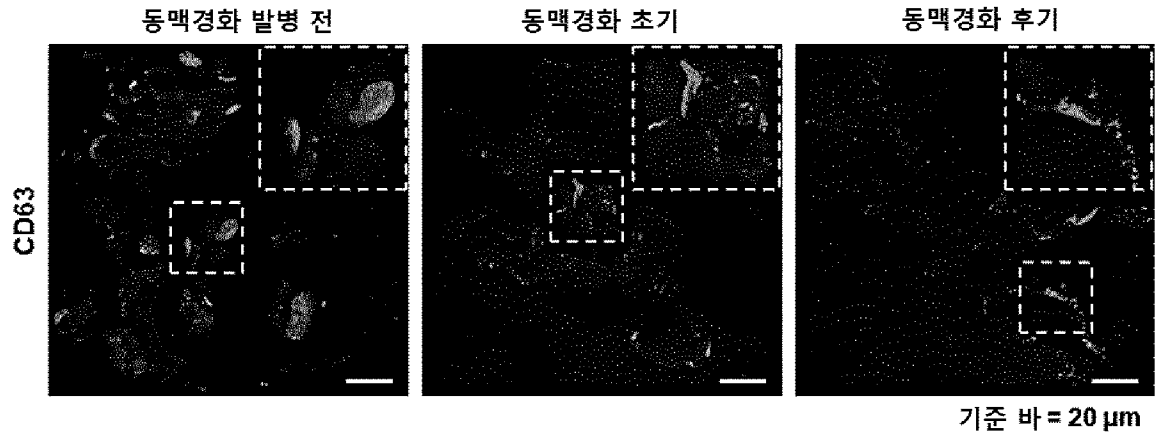
ucleic acid), 앵타머(aptamer), 프라미어 쌍, 프로브, 또는 프라이머 쌍 및 프로브인, 동맥경화증 진단용 조성물.

- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 측정은 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), RNase 보호분석법(RNase protection assay; RPA), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏(northern blot), DNA 칩, multiplex PCR 또는 ddPCR로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행되는, 동맥경화증 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제 1항 또는 제 8항의 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단용 키트.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인, 동맥경화증 진단용 키트.
- [청구항 15] 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a 및 miR-6879-5p로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈장 유래 엑소좀인, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

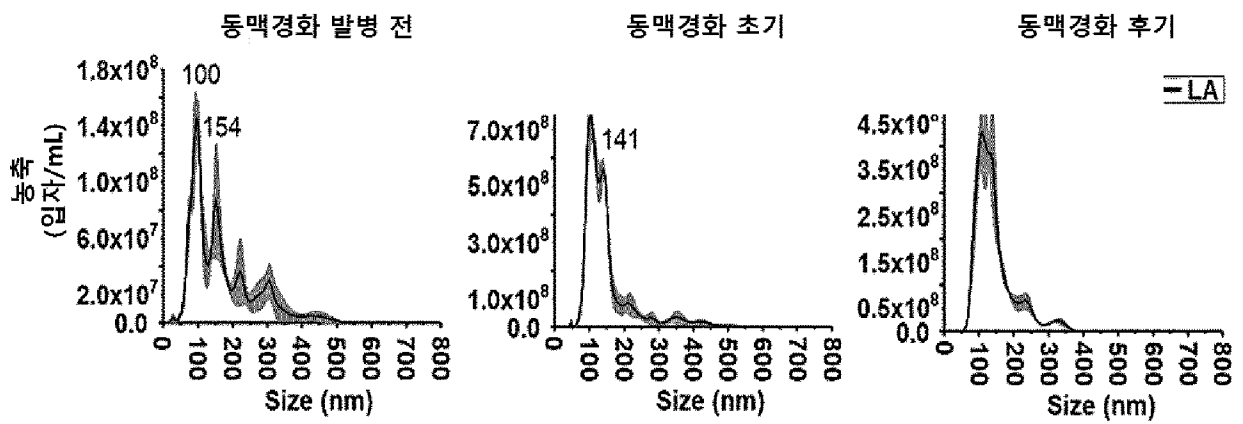
[도1]



[도2]

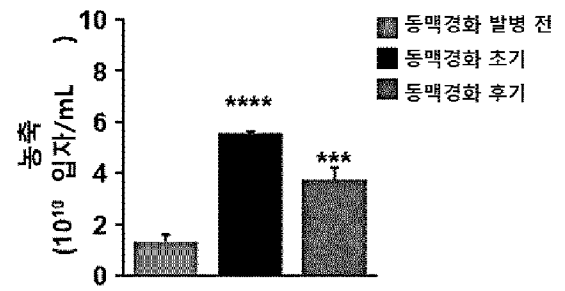


[도3]

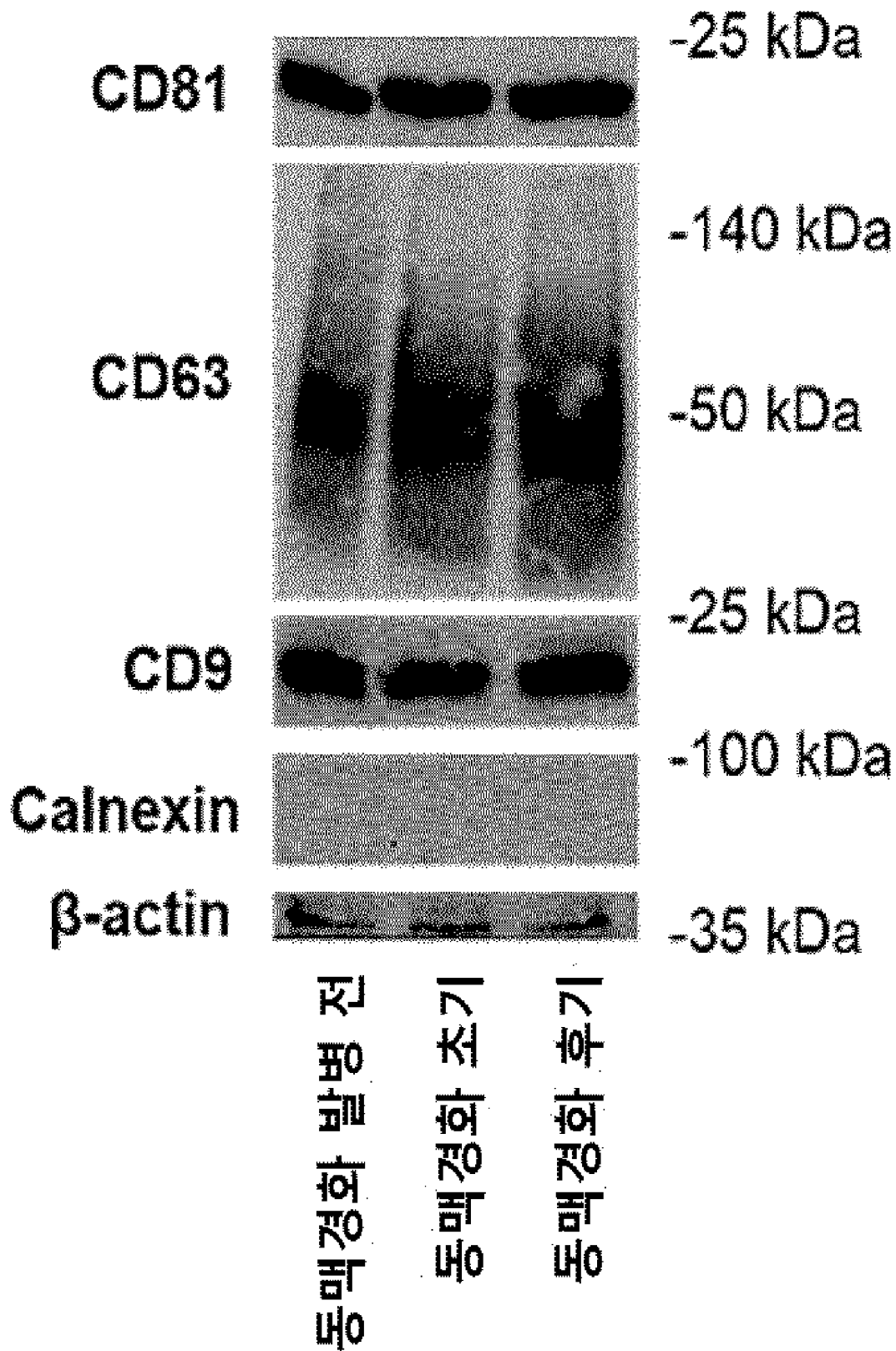


[도4]

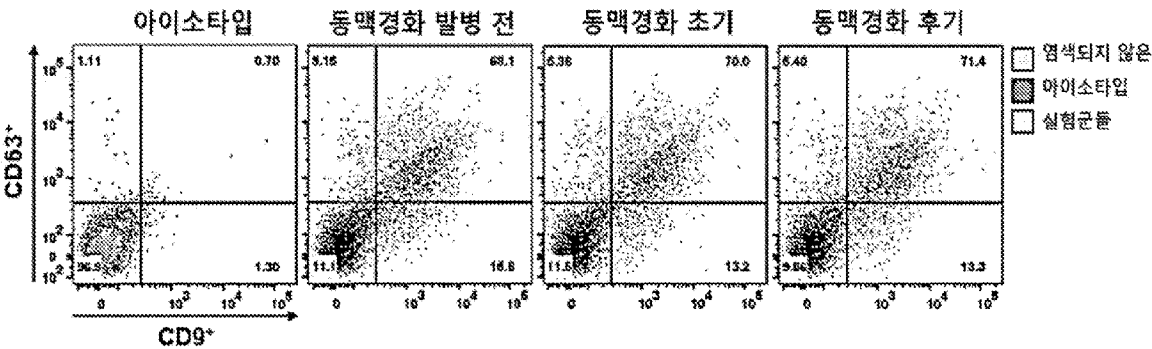
그룹	평균 (nm)	모드 (nm)	SD (nm)	농축된 입자의 수 (입자/mL)
동맥경화 발병 전	169.2	96.3	92.0	1.34×10^{10}
동맥경화 초기	148.4	105.4	79.4	5.55×10^{10}
동맥경화 후기	145.8	123.2	55.3	3.76×10^{10}



[도5]



[도6]



규칙 91,
23.10.2024

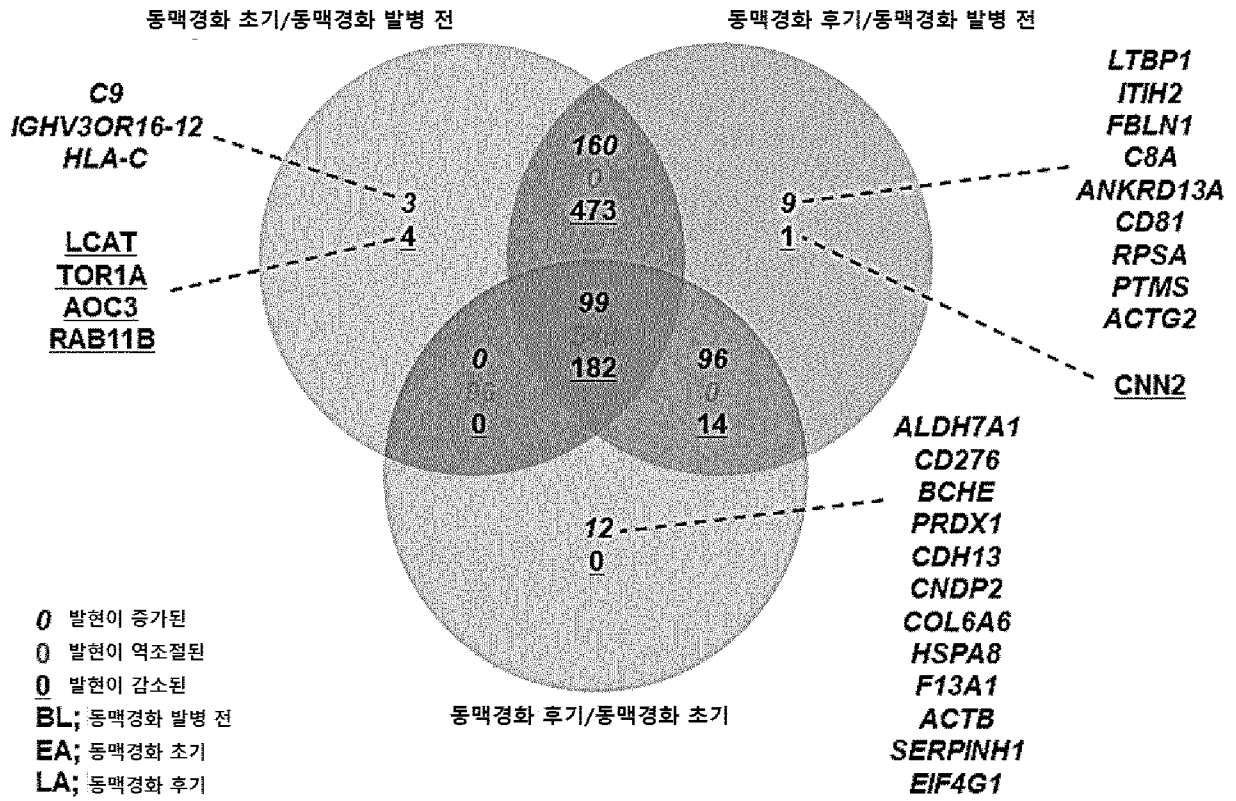
[도7]

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
CRP	15.086	13.317	0.883
SAA1	100	100	0.26
SAA2	100	74.292	0.496
PAPPA	0.618	12.385	20.05

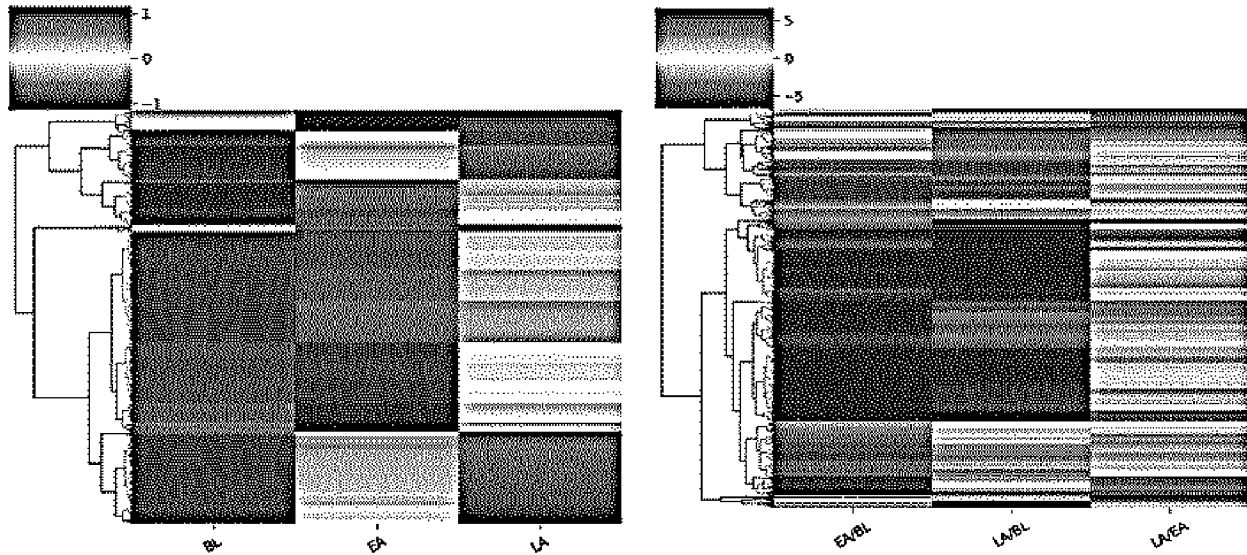
[도8]

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
APOD	29.62	100	16.229
APOC3	100	100	0.929
C1QA	31.947	30.995	0.97
C5	2.369	3.748	1.582
CRP	15.086	13.317	0.883
PIGR	41.422	21.748	0.525
SERPING1	6.788	2.399	0.353
SERPINC1	0.494	4.452	9.021
SERPINF2	51.437	100	1.972

[도9]



[도10]



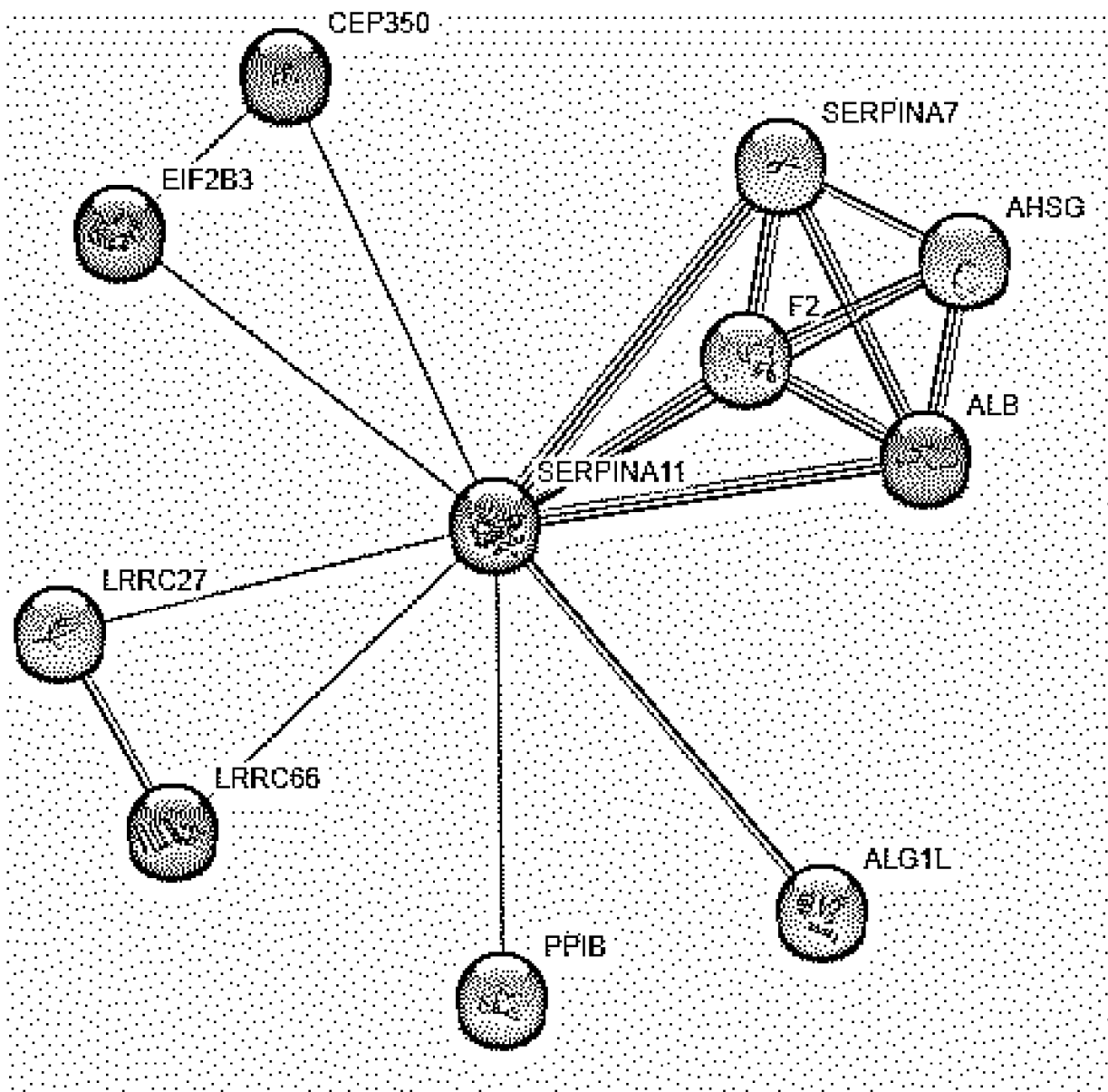
[도11]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)
IGHV3-53	89.28	1.357	0.015
IGHV3-43D	45.62	1.195	0.026
IGHV2-5	24.77	0.786	0.032
IGKV1-16	12.85	0.212	0.016
ASCC3	12.51	0.484	0.039
IGHV1-3	10.99	0.851	0.077
IGHV3-20	9.521	0.504	0.053
SERPINA11	8.7	0.507	0.058
TPD52L2	6.347	1.439	0.227
IGKV1D-16	4.545	0.031	0.01
GRPEL1	3.185	0.267	0.084
MINPP1	3.078	1.341	0.436
IGHV3OR16-12	3.034	1.963	0.647
IGHV3-35	2.372	0.788	0.332

[도12]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)	예측된 인간 표현형		
				순위	심혈관 질환 관련 유전자 세트	Z-score
ASCC3	12.51	0.484	0.039	28	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.4067143
				86	Right ventricular cardiomyopathy (HP:0011663)	1.850146
				109	Arterial thrombosis (HP:0004420)	1.7421707
				140	Renovascular hypertension (HP:0100817)	1.6086612
SERPINA11	8.7	0.507	0.058	1	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	7.5754934
				9	Hyperlipoproteinemia (HP:0010980)	5.6474624
				14	Abnormality of the level of lipoprotein cholesterol (HP:0010979)	4.4508649
				44	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.9461597
				56	Vascular calcification (HP:0004934)	2.5532266
				76	Cardiovascular calcification (HP:0011915)	2.2635082
TPD52L2	6.347	1.439	0.227	78	Thrombophlebitis (HP:0004418)	2.243562
				49	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.3973351
				65	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	2.3257339
GRPEL1	3.185	0.267	0.084	99	Abnormality of the fetal cardiovascular system (HP:0010948)	2.0965151
				71	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	2.5486088
MINPP1	3.078	1.341	0.436	28	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	2.7344371
				59	Abnormality of the fetal cardiovascular system (HP:0010948)	2.1792886
				141	Thrombophlebitis (HP:0004418)	1.6279929

[도13]



[도14]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)
F2	3.878	11.552	2.979
AHSG	0.064	0.171	2.681
SERPINA11	8.7	0.507	0.058

WO 2025/048335

PCT/KR2024/012030

[도15]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)
APOC3	100	100	0.929
CFI	91.61	88.6	0.967
APCS	96.09	87.17	0.907
APOA4	95.29	86.33	0.906
CD5L	75.34	68.82	0.913
BPGM	64.83	62.21	0.96
C1QA	31.95	31	0.97
HBE1	22.34	24.57	1.1
RANBP1	22.78	21.81	0.958
C4B	22.07	21.49	0.973
SPP1	22.9	20.93	0.914
SELL	16.17	14.57	0.901
CPN1	15.27	14.42	0.944
PKLR	12.97	13.89	1.071
MTPN	11.68	12.36	1.059
PNP	10.6	11.36	1.071
COPS8	11.42	11	0.963
PLXDC2	10.26	10.43	1.017
ANTXR2	9.053	9.35	1.033
PGLS	8.76	9.272	1.058
MYLK	7.665	7.109	0.927
APOE	6.672	6.055	0.907
F11	5.534	5.89	1.064
GCLC	4.514	4.695	1.04
FMOD	3.738	3.428	0.917
CAB39	2.929	3.089	1.055
MGAT1	2.782	2.821	1.014
VTN	2.254	2.128	0.944

[도16]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)	예측된 인간 표현형		
				순위	심혈관 질환 관련 유전자 세트	Z-score
RANBP1	22.78	21.81	0.958	78	Abnormality of the fetal cardiovascular system (HP:0010948)	2.1096362
				131	Angiofibromas (HP:0010615)	1.7135561

[도17]

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)
KIF3C	0.896	100	100
IGKV2-24	1.357	100	76.162
NMRAL1	0.16	10.008	62.373
IGLV2-14	0.139	5.906	42.346
MAN1A1	0.253	10.186	40.321
HOOK3	0.198	7.734	39.103
NEK9	0.666	17.581	26.41
RELCH	0.415	8.783	21.167
CLEC11A	0.438	7.795	17.776
KAZALD1	0.483	7.099	14.702
OLFML3	0.227	3.291	14.51
TKFC	0.428	4.851	11.336
PSMA3	1.681	17.453	10.38
DARS1	1.388	9.785	7.047
FAHD2A	1.16	6.557	5.652
UROC1	1.113	5.819	5.228
OR5A2	1.043	5.284	5.066
PCYOX1L	0.803	3.291	4.097
PSMA5	0.551	2.155	3.913
SEPTIN11	1.476	4.56	3.089
ANKRD13A	1.443	2.586	1.792

[도18]

규칙 91,
23.10.2024

유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)	예측된 인간 표현형		
				순위	심혈관 질환 관련 유전자 세트	Z-score
KIF3C	0.896	100	100	74	Hypsarhythmia (HP:0002521)	2.1642006
IGKV2-24	1.357	100	76.162	10	Vasculitis (HP:0002633)	3.430333
NMRAL1	0.16	10.003	62.373	53	Right ventricular cardiomyopathy (HP:0011663)	2.3625095
				110	Hypertensive crisis (HP:0100735)	1.9613928
IGLV2-14	0.139	5.906	42.346	147	Abnormality of the fetal cardiovascular system (HP:0010948)	1.7296463
				13	Vasculitis (HP:0002633)	3.1833595
MAN1A1	0.253	10.186	40.321	54	Right ventricular cardiomyopathy (HP:0011663)	2.2357554
				1	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	6.7689768
				14	Vascular calcification (HP:0004934)	3.5943497
				17	Cardiovascular calcification (HP:0011915)	3.3682053
				28	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.7481358
HOOK3	0.196	7.734	39.103	67	Thrombophlebitis (HP:0004418)	2.0999489
				100	Abnormality of the right ventricle (HP:0001707)	1.8274867
NEK9	0.666	17.581	26.41	20	Abnormality of the left ventricular outflow tract (HP:0011103)	2.7893826
				23	Ventricular tachycardia (HP:0004756)	2.6431677
				32	Right ventricular cardiomyopathy (HP:0011663)	2.5259043
				46	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	2.3338406
				58	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.0837643
				88	Dilated cardiomyopathy (HP:0001644)	1.8856177
				94	Atrial fibrillation (HP:0005110)	1.8456955
				126	Primary atrial arrhythmia (HP:0001692)	1.6601244
				139	Atrioventricular block (HP:0001678)	1.6022734
RELCH	0.415	8.783	21.167	147	Abnormality of the right ventricle (HP:0001707)	1.5905259
				-	-	-
CLEC11A	0.438	7.795	17.776	-	-	-
KAZALD1	0.483	7.099	14.702	54	Atrioventricular block (HP:0001678)	2.9266743
				128	Abnormal atrioventricular conduction (HP:0005150)	2.0280646
				158	Right ventricular cardiomyopathy (HP:0011663)	1.8338031
OLFML3	0.227	3.291	14.51	-	-	-
TKFC	0.428	4.851	11.336	3	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	6.7775724
				51	Vascular calcification (HP:0004934)	2.7628249
				55	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.7101382
				68	Cardiovascular calcification (HP:0011915)	2.4438178
PSMA3	1.681	17.453	10.33	-	-	-
DARS1	1.388	9.785	7.047	-	-	-
FAHD2A	1.16	6.557	5.652	133	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	1.8502212
UROCI	1.113	5.819	5.228	2	Deep venous thrombosis (HP:0002625)	7.337135
				43	Myocardial infarction (HP:0001658)	2.9543962
				51	Vascular calcification (HP:0004934)	2.6532604
				68	Cardiovascular calcification (HP:0011915)	2.33999
				79	Thrombophlebitis (HP:0004418)	2.1389597
OR5A2	1.043	5.284	5.066	120	Atrioventricular block (HP:0001678)	1.6689416
				-	-	-
PCYOX1L	0.803	3.291	4.097	-	-	-
				71	Vasculitis (HP:0002633)	2.5430576
PSMA5	0.551	2.155	3.913	147	Arterial thrombosis (HP:0004420)	2.0338273
				133	Abnormality of the fetal cardiovascular system (HP:0010948)	1.730344
SEPTIN11	1.476	4.56	3.089	-	-	-
ANKRD13A	1.443	2.586	1.792	85	Arterial thrombosis (HP:0004420)	2.0966771
				90	Vasculitis (HP:0002633)	2.0391813
				143	Abnormality of the pericardium (HP:0001697)	1.6800993

[도19]

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
hsa-miR-432-5p	0.000	1.233	4066.124
hsa-miR-181b-5p	0.001	3.228	4639.478
hsa-miR-382-5p	0.001	3.920	3811.241
hsa-miR-127-3p	0.001	2.761	2485.712
hsa-miR-101-3p	0.001	1.398	973.919
hsa-miR-654-5p	0.005	1.214	224.673
hsa-miR-330-3p	0.006	1.473	248.080
hsa-miR-369-5p	0.007	6.543	903.494
hsa-miR-218-5p	0.017	31.004	1850.202
hsa-miR-485-5p	0.021	35.801	1683.748
hsa-miR-323a-3p	0.023	1.264	65.618
hsa-miR-93-5p	0.062	11.423	182.967
hsa-miR-125b-5p	0.068	9.984	146.162
hsa-miR-542-3p	0.082	1.369	16.603
hsa-miR-3175	0.099	2.415	24.409
hsa-miR-3176	0.113	1.328	11.403
hsa-miR-320d	0.123	2.825	22.459
hsa-miR-708-3p	0.152	1.341	8.803
hsa-miR-4792	0.152	1.737	11.403
hsa-miR-320a	0.197	2.891	14.674
hsa-miR-320c	0.211	5.496	26.108
hsa-miR-619-5p	0.220	88.428	401.530
hsa-miR-323b-3p	0.220	753.157	3465.328
hsa-miR-4693-3p	0.248	5.404	21.807
hsa-miR-143-5p	0.283	1.757	6.202
hsa-miR-6873-3p	0.283	1.757	6.202
hsa-miR-6767-5p	0.283	3.231	11.403
hsa-miR-1246	0.346	3.684	10.659
hsa-miR-1273g-5p	0.397	2.463	6.202
hsa-miR-3135b	0.397	6.596	16.603
hsa-miR-21-5p	0.401	1.032	2.575
hsa-miR-1-3p	0.406	1.622	3.993
hsa-miR-4303	0.497	1.790	3.601
hsa-miR-3591-5p	0.497	3.083	6.202
hsa-miR-1469	0.497	21.183	42.614
hsa-miR-4451	0.497	28.941	58.219
hsa-miR-105-5p	0.497	94.878	190.862

[도20]

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
hsa-miR-143-5p	0.283	1.757	6.202

miRNA 명칭	miRNA 서열 (Mirdb)	서열번호	유전자 기호	유전자 설명	유전자은행 가입번호	결합 부위
hsa-miR-143-5p	GGUGCAGUGCU GCAUCUCUGGU	서열번호1	SERPINA11	Serpin Family A Member 11	NM_001080451	1396, 1416

[도21]

규칙 91,
23.10.2024

유전자 기호	EA/BL	LA/BL	LA/EA	hsa-miR-219a-2-3p	1.000	0.027	hsa-miR-412-3p	1.000	0.053
hsa-miR-615-3p	1.000	0.001		hsa-miR-2116-3p	1.000	0.027	hsa-miR-629-3p	1.000	0.053
hsa-miR-4487	1.000	0.001		hsa-miR-3664-3p	1.000	0.027	hsa-miR-1185-1-3p	1.000	0.053
hsa-miR-6585-3p	1.000	0.001		hsa-miR-4695-3p	1.000	0.027	hsa-miR-2115-3p	1.000	0.053
hsa-miR-937-3p	1.000	0.002		hsa-miR-3065-3p	0.497	0.014	hsa-miR-3144-3p	1.000	0.053
hsa-miR-1248-3p	0.664	0.002		hsa-miR-4454	1.000	0.005	hsa-miR-3173-3p	1.000	0.053
hsa-miR-1237-3p	1.000	0.003		hsa-miR-365b-5p	1.000	0.053	hsa-miR-3191-3p	1.000	0.053
hsa-miR-1267-5p	1.790	0.000		hsa-miR-431-5p	1.000	0.053	hsa-miR-4474-3p	1.000	0.053
hsa-miR-4419a	1.000	0.006		hsa-miR-631	1.000	0.053	hsa-miR-4728-3p	1.000	0.053
hsa-miR-3916	1.000	0.006		hsa-miR-640	1.000	0.053	hsa-miR-4755-3p	1.000	0.053
hsa-miR-4801	1.000	0.006		hsa-miR-656-5p	1.000	0.053	hsa-miR-4796-3p	1.000	0.053
hsa-miR-3182	0.894	0.006		hsa-miR-1208	1.000	0.053	hsa-miR-6762-3p	1.000	0.053
hsa-miR-6879-5p	1.000	0.008		hsa-miR-1263	1.000	0.053	hsa-miR-6785-3a	1.000	0.053
hsa-miR-4763-3p	1.000	0.008		hsa-miR-1273a	1.000	0.053	hsa-miR-6805-3p	1.000	0.053
hsa-miR-638	1.000	0.009		hsa-miR-1909-5p	1.000	0.053	hsa-miR-6835-3p	1.000	0.053
hsa-miR-6720-3p	1.000	0.009		hsa-miR-3126	1.000	0.053	hsa-miR-6850-3p	1.000	0.053
hsa-miR-1260a	0.331	0.004		hsa-miR-3145-5p	1.000	0.053	hsa-miR-6868-3p	1.000	0.053
hsa-miR-678-3p	1.000	0.011		hsa-miR-4276	1.000	0.053	hsa-miR-6870-3p	1.000	0.053
hsa-miR-3118	1.000	0.014		hsa-miR-3612	1.000	0.053	hsa-miR-108b-5p	0.664	0.053
hsa-miR-4718	1.000	0.014		hsa-miR-3945	1.000	0.053	hsa-miR-6887	0.664	0.053
hsa-miR-3182	1.000	0.014		hsa-miR-4431	1.000	0.053	hsa-miR-518c-3p	0.664	0.053
hsa-miR-6787-5p	1.000	0.014		hsa-miR-4474-5p	1.000	0.053	hsa-miR-203b-5p	0.009	0.001
hsa-miR-32-3a	1.000	0.014		hsa-miR-4502	1.000	0.053	hsa-miR-95-3p	0.497	0.053
hsa-miR-1273b-3p	1.000	0.014		hsa-miR-4506	1.000	0.053	hsa-miR-3151-3p	0.497	0.053
hsa-miR-135-5p	1.000	0.018		hsa-miR-4635	1.000	0.053	hsa-miR-203a-3p	0.011	0.001
hsa-miR-92b-5p	1.000	0.018		hsa-miR-4648-5p	1.000	0.053	hsa-tet-7e-5p	0.715	0.009
hsa-miR-1303	1.000	0.018		hsa-miR-4654	1.000	0.053	hsa-miR-5767	0.454	0.058
hsa-miR-8079	1.000	0.018		hsa-miR-219b-5p	1.000	0.053	hsa-miR-4764-3p	0.439	0.397
hsa-miR-4685-3p	1.000	0.018		hsa-miR-4704-5p	1.000	0.053	hsa-miR-549a	0.591	0.008
hsa-miR-4747-3p	1.000	0.018		hsa-miR-4721	1.000	0.053	hsa-miR-4429	0.524	0.525
hsa-miR-1972	0.664	0.014		hsa-miR-4785	1.000	0.053	hsa-miR-744-5p	0.999	1.035
hsa-miR-1260b	0.673	0.002		hsa-miR-5810-5p	1.000	0.053	hsa-miR-6729-3p	0.461	0.248
hsa-miR-437b-5p	1.000	0.027		hsa-miR-1273f	1.000	0.053	hsa-miR-92b-3p	0.912	0.149
hsa-miR-687-5p	1.000	0.027		hsa-miR-5189-5p	1.000	0.053	hsa-miR-4497	0.808	1.793
hsa-miR-366b	1.000	0.027		hsa-miR-6512-5p	1.000	0.053	hsa-miR-6731-3p	0.649	0.141
hsa-miR-4441	1.000	0.027		hsa-miR-6813-5p	1.000	0.053	hsa-miR-328-3a	0.249	0.008
hsa-miR-4651	1.000	0.027		hsa-miR-6826-5p	1.000	0.053	hsa-miR-197-3p	0.285	0.008
hsa-miR-6777-5p	1.000	0.027		hsa-miR-8852	1.000	0.053	hsa-miR-6134	0.205	0.682
hsa-miR-6882-5p	1.000	0.027		hsa-miR-155-3p	1.000	0.053			

[도22]

miRNA 명칭	타겟 순위 (Mirdb)	타겟 점수 (Mirdb)	miRNA 서열	서열번호	유전자 기호	유전자 설명	유전자은행 가입번호	결합 두위
hsa-miR-1260a	-	-	AUCCACCCUCCU GCCACCA	서열번호2	AH5G	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1254, 1266 1251, 1265
hsa-miR-197-3p	-	-	UUUACACCCUUI CUCACCCACGC	서열번호3	AH5G	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1363, 1377 1360, 1374
hsa-miR-4474-3p	-	-	UUUGUGGCUGGU CAUGAGGCUAA	서열번호4	AH5G	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1248, 1288 1245, 1285
hsa-miR-4788-3p	-	-	CAUGGCUACCU CCUCCUGCCOC CAG	서열번호5	AH5G	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1198, 1222 1185, 1219
hsa-miR-6731-3p	-	-	UCUUAUCCCCA CUCUCCCCAG	서열번호6	AH5G	Alpha 5-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1251, 1270 1248, 1267
hsa-miR-6879-5p	-	-	CAGGGCAGGGA AGGUGGGAGAG	서열번호7	AH5G	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001364571 NM_001622	1430, 1458 1427, 1455

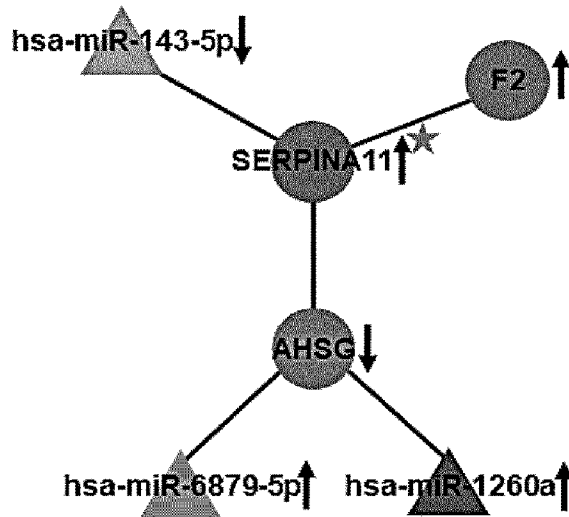
유전자 기호	EA/BL	LA/BL	LA/EA
hsa-miR-6879-5p	1.25083	1.000	0.008
hsa-miR-1260a	94.143	0.331	0.004
hsa-miR-4474-3p	18.726	1.000	0.053
hsa-miR-4728-3p	18.726	1.000	0.053
hsa-miR-6731-3p	2.649	0.141	0.053
hsa-miR-197-3p	2.385	0.008	0.004

[도22]

miRNA 명칭	타겟 순위 (Mirdb)	타겟 점수 (Mirdb)	miRNA 서열	서열번호	유전자 기호	유전자 설명	유전자은행 가입번호	결합 부위
hsa-miR-1260a	-	-	AUCCACCUUCU GCCACCA	서열번호2	AHSG	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1254, 1268 1251, 1265
hsa-miR-197-3p	-	-	UUCACCAUUCU CUCCACCCAGC	서열번호3	AHSG	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1363, 1377 1360, 1374
hsa-miR-4474-3p	-	-	UUGUGGCUUGU CAUGAGGCUAA	서열번호4	AHSG	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1248, 1288 1245, 1285
hsa-miR-4728-3p	-	-	CAUGCUGACCU CCCUCCUGCCC CAG	서열번호5	AHSG	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1198, 1222 1195, 1219
hsa-miR-6731-3p	-	-	UCUAAUCCCCA CUCUCCCCAG	서열번호6	AHSG	Alpha 5-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1251, 1270 1248, 1267
hsa-miR-6879-5p	-	-	CAGGGCAGGGA AGGUGGGAGAG	서열번호7	AHSG	Alpha 2-HS Glycoprotein	NM_001354571 NM_001622	1430, 1458 1427, 1455

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
hsa-miR-6879-5p	125.085	1.000	0.008
hsa-miR-1260a	94.143	0.331	0.004
hsa-miR-4474-3p	18.726	1.000	0.053
hsa-miR-4728-3p	18.726	1.000	0.053
hsa-miR-6731-3p	2.649	0.141	0.053
hsa-miR-197-3p	2.385	0.008	0.004

[도23]



유전자 기호	EA/BL (배수)	LA/BL (배수)	LA/EA (배수)
F2	3.878	1.552	2.979
AHSG	0.064	0.171	2.681
SERPINA11	8.7	0.507	0.058

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
hsa-miR-143-5p	0.283	1.757	6.202

유전자 기호	EA /BL	LA /BL	LA /EA
hsa-miR-6879-5p	125.085	1.000	0.008
hsa-miR-1260a	94.143	0.331	0.004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/012030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01) 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 33/68(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); G01N 33/48(2006.01); G01N 33/554(2006.01) 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: RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSB, miR-143-5p, miR-1260a, miR-6879-5p, 바이오마커(biomarker), 동맥경화증(atherosclerosis), 진단(diagnosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2011-0144914 A1 (HARRINGTON, Doug et al.) 16 June 2011 (2011-06-16) See paragraphs [0024], [0032], [0045], [0056] and [0182]; claim 4; and table 2.	1-3,5,7-10,13-16 4,6,11-12
X	BHANSALI, Shipra et al. Interleukin-35 mitigates ox-LDL-induced proatherogenic effects via modulating miRNAs associated with coronary artery disease (CAD). Cardiovascular Drugs and Therapy. 18 April 2022 (online publication date), vol. 37, pp. 667-682. See abstract; pages 672 and 681; and figures 2 and 5D.	1-6,8,11-16
X	KARERE, Genesio M. et al. Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions. Scientific Reports. 01 March 2023 (online publication date), vol. 13, article no. 3467, pp. 1-10. See abstract; and pages 2-3.	1-5,7-8,11-16
A	LIN, Fei et al. circRNA-miRNA association for coronary heart disease. Molecular Medicine Reports. 28 January 2019 (online publication date), vol. 19, no. 4, pp. 2527-2536. See entire document.	1-16
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 10 December 2024		Date of mailing of the international search report 10 December 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2022-0229071 A1 (PREVENCIO, INC.) 21 July 2022 (2022-07-21) See entire document.	1-16
A	KR 10-2255685 B1 (NUMAIS CO., LTD.) 25 May 2021 (2021-05-25) See entire document.	1-16
PX	CN 116814770 A (HUADONG HOSPITAL) 29 September 2023 (2023-09-29) See abstract; paragraph [0335]; and claim 10.	1-2,8-10,13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/012030

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/012030

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2011-0144914	A1	16 June 2011	CN	102762743	A	31 October 2012
				EP	2510116	A2	17 October 2012
				JP	2013-513387	A	22 April 2013
				US	2015-0376704	A1	31 December 2015
				WO	2011-072177	A2	16 June 2011
US	2022-0229071	A1	21 July 2022	EP	3704491	A1	09 September 2020
				JP	2021-502573	A	28 January 2021
				JP	7372251	B2	31 October 2023
				WO	2019-090166	A1	09 May 2019
KR	10-2255685	B1	25 May 2021	CN	114269368	A	01 April 2022
				EP	4024048	A1	06 July 2022
				JP	2022-546423	A	04 November 2022
				KR	10-2021-0026435	A	10 March 2021
				US	2022-0290098	A1	15 September 2022
CN	116814770	A	29 September 2023	WO	2021-040473	A1	04 March 2021
				None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); G01N 33/48(2006.01); G01N 33/554(2006.01)

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: RANBP1, MAN1A1, TKFC, UROC1, SERPINA11, F2, AHSG, miR-143-5p, miR-1260a, miR-6879-5p, 바이오마커(biomarker), 동맥경화증(atherosclerosis), 진단(diagnosis)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2011-0144914 A1 (HARRINGTON, DOUG 등) 2011.06.16 단락 [0024], [0032], [0045], [0056], [0182]; 청구항 4; 표 2 참조.	1-3,5,7-10,13-16 4,6,11-12
X	BHANSALI, SHIPRA 등, 'Interleukin-35 mitigates ox-LDL-induced proatherogenic effects via modulating miRNAs associated with coronary artery disease (CAD)', Cardiovascular Drugs and Therapy, 2022.04.18(온라인 공개일), 37권, 페이지 667-682 요약; 페이지 672, 681; 도면 2, 5D 참조.	1-6,8,11-16
X	KARERE, GENESIO M. 등, 'Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions', Scientific Reports, 2023.03.01(온라인 공개일), 13권, article no. 3467, 페이지 1-10 요약; 페이지 2-3 참조.	1-5,7-8,11-16
A	LIN, FEI 등, 'circRNA-miRNA association for coronary heart disease', Molecular Medicine Reports, 2019.01.28(온라인 공개일), 19권, 4호, 페이지 2527-2536 전체 문헌 참조.	1-16

☒ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년12월10일(10.12.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년12월10일(10.12.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2022-0229071 A1 (PREVENCIO, INC.) 2022.07.21 전체 문헌 참조.	1-16
A	KR 10-2255685 B1 (주식회사 뉴베이스) 2021.05.25 전체 문헌 참조.	1-16
PX	CN 116814770 A (HUADONG HOSPITAL) 2023.09.29 요약; 단락 [0335]; 청구항 10 참조.	1-2,8-10,13-16

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0144914 A1	2011/06/16	CN 102762743 A	2012/10/31
		EP 2510116 A2	2012/10/17
		JP 2013-513387 A	2013/04/22
		US 2015-0376704 A1	2015/12/31
		WO 2011-072177 A2	2011/06/16
US 2022-0229071 A1	2022/07/21	EP 3704491 A1	2020/09/09
		JP 2021-502573 A	2021/01/28
		JP 7372251 B2	2023/10/31
		WO 2019-090166 A1	2019/05/09
KR 10-2255685 B1	2021/05/25	CN 114269368 A	2022/04/01
		EP 4024048 A1	2022/07/06
		JP 2022-546423 A	2022/11/04
		KR 10-2021-0026435 A	2021/03/10
		US 2022-0290098 A1	2022/09/15
CN 116814770 A	2023/09/29	WO 2021-040473 A1	2021/03/04
		없음	