



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141993
(43) 공개일자 2017년12월27일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/72</i> (2006.01) <i>G01N 33/92</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/6893</i> (2013.01)
 <i>C12Q 1/6883</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0075146
 (22) 출원일자 2016년06월16일
 심사청구일자 2016년06월16일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 김제
 대전광역시 중구 서문로 96, 201동 1503호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)
 김지연
 대전광역시 중구 서문로 96, 201동 1503호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 김순웅</p> |
|--|---|

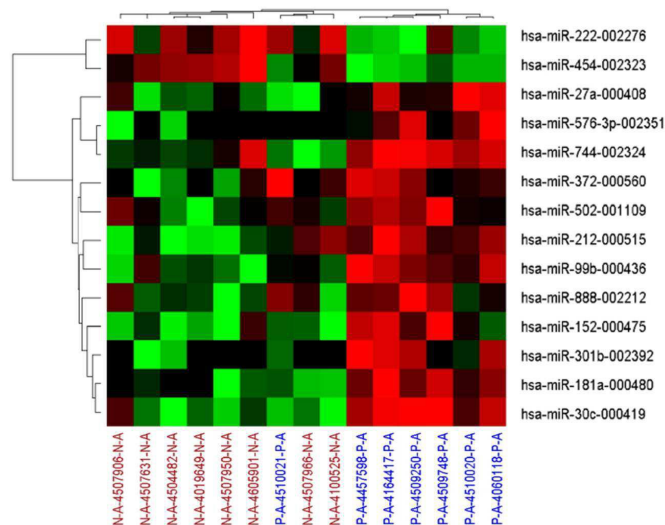
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물, 동맥경화증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단용 키트 및 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물은 환자의 혈액을 이용하여 손쉽게 동맥경화증 발생 위험을 예측하거나, 동맥경화증을 신속하고 정확하게 진단할 수 있어, 동맥경화증과 관련된 의학 및 진단 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/721 (2013.01)

G01N 33/92 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/805 (2013.01)

G01N 2800/323 (2013.01)

(72) 발명자

이석훈

대전광역시 유성구 노은동로75번길 102-19 (노은동)

정혜선

대전광역시 중구 서문로 96, 207동 702호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2010072

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (구)기본연구지원사업

연구과제명 뇌혈관질환 환자에서 혈액 및 DNA를 이용한 biomarker의 탐색 및 유용성 검증

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

HbA1C(hemoglobin A1C), HDL(high density lipoprotein-cholesterol), 리포프로테인(lipoprotein (a)) 및 miR-212(microRNA-212)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 동맥경화증(atherosclerosis) 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 동맥경화증은 대동맥, 관동맥, 뇌저동맥, 신동맥, 또는 말초동맥에서 발생한 것을 특징으로 하는, 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 3

HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 동맥경화증 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 상기 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 특이적으로 결합하는 올리고핵타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid), 앵타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 동맥경화증 진단용 조성물.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단용 키트.

청구항 6

생물학적 시료에서 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 단계;를 포함하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 소변 및 타액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 측정은 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 증합효소반응(real time RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 유전자 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물, 동맥경화증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단용 키트 및 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥경화증(atherosclerosis)은 죽상경화증, 또는 죽상동맥경화증이라고도 하며, 주로 혈관의 가장 안쪽을 덮고 있는 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.

[0003] 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, 운동 부족, 과체중 및 복부비만 등이 그 원인으로 알려져 있다.

[0004] 동맥경화증은 경동맥 초음파, CT (CTA, CT-angiography) 및 MR 혈관조영술 (MRA, magnetic resonance angiography), 뇌혈관 (cerebral angiography) 및 심혈관조영술 (coronary angiography) 등과 같은 영상검사를 이용하여 진단하고 있다. 이런 영상 검사를 통하여 환자별로 동맥경화의 발생 여부를 확인할 수 있지만, 검사 과정이 복잡하고, 검사로 인한 부작용 및 합병증이 있을 수 있으며, 영상 검사 별로 가격이 비싼 경우가 있다. 따라서, 이미 알려진 동맥경화증에 대한 위험인자와 함께 혈액을 이용하여 손쉽고, 저렴하고, 신속하게 동맥경화증을 예측할 수 있는 바이오마커를 개발하는 것이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 동맥경화증을 진단하는 방법을 연구한 결과, HbA1C(hemoglobin A1C), HDL(high density lipoprotein-cholesterol), 리포프로테인(lipoprotein (a)) 및 miR-212(microRNA-212)을 조합하여 바이오 마커로 이용 시, 동맥경화증을 신속하고 정확하게 진단할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 동맥경화증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 HbA1C(hemoglobin A1C), HDL(high density lipoprotein-cholesterol), 리포프로테인(lipoprotein (a)) 및 miR-212(microRNA-212)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 동맥경화증(atherosclerosis) 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 동맥경화증 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에서 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 단계;를 포함하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 동맥경화증 진단용 바이오 마커 조성물은 환자의 혈액을 이용하여 손쉽게 동맥경화증 발생 위험을 예측하거나, 동맥경화증을 신속하고 정확하게 진단할 수 있어, 동맥경화증과 관련된 의학 및 진단 산업에 유용하

게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 동맥경화증을 진단하기 위하여, 동맥경화증 환자의 시료를 이용하여 후보 microRNA를 마이크로어레이로 수행한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 HbA1C(hemoglobin A1C), HDL(high density lipoprotein-cholesterol), 리포프로테인(lipoprotein (a)) 및 miR-212(microRNA-212)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 동맥경화증(atherosclerosis) 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에 있어서, "HbA1C(hemoglobin A1C)"은 당화혈색소라고도 하며, 주로 당뇨의 진단 및 치료 효과 판정을 위하여 사용되는 생화학적 검사이다.

[0018] 본 발명에 있어서, "HDL(high density lipoprotein-cholesterol)"은 고밀도지단백질 혈장 중 물에 녹지 않는 지질이 단백질과 결합하면 지용성인 지단백질이 만들어지는데, 상기 지단백질 중 비중(1.063 이상)이 높은 콜레스테롤을 의미한다.

[0019] 본 발명에 있어서, "리포프로테인(lipoprotein (a))"은 지질과 단백질이 결합된 복합단백질의 하나이다. 세포막 및 세포벽, 세포내 과립막의 구성요소로서 생체 내의 혈액응고, 면역현상 및 막현상 등에 관여한다.

[0020] 본 발명에 있어서, "miR-212(microRNA-212)"은 Hsa-Mir-212 또는 MIRN212과 같이 명명될 수 있으며, 본 발명의 명세서에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 인간의 경우 NCBI(National Center for Biotechnology Information) Gene ID는 406994으로 확인 가능하다.

[0021] 본 발명에 있어서, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 예후, 동맥경화증의 경과, 병기 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 목적상, 진단은 동맥경화증을 정확하게 구별하여 진단하는 것이다.

[0022] 본 발명에서 용어, "바이오 마커"는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 동맥경화증 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 시료에 비하여 동맥경화증 환자에서 채취한 시료에서 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

[0023] 본 발명의 목적상, 본 발명의 동맥경화증 진단용 바이오 마커는 정상 대조군에 비하여, 동맥경화증 환자의 시료에서 HbA1C, 리포프로테인 및 miR-212가 특이적으로 높은 수준의 발현을 보이고, HDL는 특이적으로 낮은 수준의 발현을 보이는 것을 의미한다.

[0024] 상기 4개의 마커가 동시에 동맥 경화증 진단을 위해 사용되는 경우, 단독 또는 miR-212가 제외된 3종을 이용할 때 보다 특이도, 민감도, 정확도가 모두 증가하여 현저히 우수한 진단효과를 나타낼 수 있다.

[0025] 상기 동맥경화증은 대동맥, 관동맥, 뇌저동맥, 신동맥, 또는 말초동맥에서 발생한 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에 있어서, "miRNA(microRNA)"는, mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사후 억제자 역할을 하는 대략 22 nt의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 체제를 포함하는, 동맥경화증 진단용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에 있어서, "HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 체제"란 상기와 같이 동맥경화증 환자의 생물학적 시료에서 발현 또는 활성이 증가; 또는 감소하는 마커인 HbA1C, HDL, 리포프로테인의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA 또는 miR-212에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 또는 활성 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.

- [0030] 상기 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 상기 HbA1C, HDL, 리포프로테인에 특이적으로 결합하는 올리고핵타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid), 앵타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 있어서 "HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정"이란, 예컨대, 동맥경화증을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 동맥경화증 마커 유전자에서 발현된 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정일 수 있으며, 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 양을 확인하는 것이다.
- [0032] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 있어서, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 HbA1C, HDL, 리포프로테인에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 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.
- [0034] 본 발명의 동맥경화증 진단용 마커의 검출에 사용되는 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 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "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 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 MED30 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미데이트 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.

- [0039] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 동맥경화증 진단 키트를 제공한다.
- [0040] 상기 키트에는 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 제제뿐만 아니라, 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0041] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 키트는 상술한 바이오 마커 조성물 및 진단용 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 HbA1C, HDL, 리포프로테인 및 miR-212로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현 또는 활성을 측정하는 단계;를 포함하는, 동맥경화증의 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0045] 상기 생물학적 시료는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 소변 및 타액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 상기 측정은 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 중합효소반응(real time RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 유전자 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 수행되고, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0050] **실험예 1. 동맥경화증 또는 비-동맥경화증 환자의 심혈관계 위험 요소 확인**
- [0051] 동맥경화증 또는 비-동맥경화증 환자의 심혈관계 위험 요소를 확인하였다.
- [0052] 구체적으로, 2013년에서 2015년 2월까지 충남대학교 병원의 뇌졸중 조직 은행에 저장된 총 1728명의 허혈성 뇌졸중 환자를 선택하였다. 그 중 65세 이상의 1129명의 허혈성 뇌졸중 환자를 선택하고, 이 중 일과성 신경 결손이 있고, 증상이 보인 후 24시간 이내에 DWI(diffusion weighted images)로 확인된 비 정상적 신호 강도를 보이는 171명의 일과성 허혈증(transient ischemic attack, TIA) 환자를 선택하였다. 또한, 초점 신경 결핍이 나타나고 초기 DWI에서 1.5 cm 이하의 높은 신호 강도를 보이는 244명의 허혈성 뇌혈관 질환 환자를 선택하였다. 상기 일과성 허혈증 환자 및 허혈성 뇌혈관 질환 환자의 동맥 경화증 상태를 확인하기 위하여, 두개 내(intracranial) 또는 두개 외(extracranial) 혈관의 협착 상태를 확인하였다. 두개 내 협착은 11개의 두개 내 혈관(ICA(intracranial internal carotid arteries), MCA(middle cerebral arteries), ACA(anterior cerebral arteries), PCA(posterior cerebral arteries) 및 VA(intracranial vertebral arteries)의 양면, 및 BA(basilar artery))을 TOF-MRA(time of flight-magnetic resonance angiography)으로 종래 방법(AJNR 2000)을 이용하여 측정하였다. 두개 외 협착은 6개의 두개 외 혈관(CCA(common carotid artery), ECA(extracranial ICA, external carotid artery)의 양면)을 CDU(carotid duplex ultrasonography)를 이용하여 측정하였다. 최종적으로, 동맥 경화군은 MRA에서 50% 이상의 협착을 갖는 3개 이상의 두개 내 혈관을 갖는 것을 두개 내 협착이라 정의하였다. 또한, CDU에서 50% 이상의 협착을 갖는 2개 이상의 두개 외 혈관을 갖는 것을 두개 외 협착이라 정의하였다. 또한, 두개 내 및 두개 외 혈관 평가에서 비 협착 영역을 갖는 것을 비-동맥 경화군으로 정의하였다.

[0053] 비-동맥 경화군 및 동맥 경화군으로 분류된 환자는 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 고혈압(hypertension), 당뇨병(diabetes), 흡연, 음주 및 체질량 지수(Body mass index)에 대한 의학적 기록이 존재하는지 확인하였고, HbA1C(hemoglobin A1C), hsCRP(high sensitivity C-reactive protein), 리포프로테인(a), apoA(apolipoprotein-A), ApoB(apolipoprotein-B), LDL(low density lipoprotein-cholesterol), HDL(high density lipoprotein-cholesterol), 트리글리세리드(triglyceride), 호모시스테인(homocysteine)과 같은 심혈관계 위험 인자를 확인하였으며, 공복 글루코스(fasting glucose)는 환자 입원 후 24시간 이내에 말초 혈액에서 수득하여 확인하였다.

[0055] **실험예 2. 혈청 수집 및 miRNA 분리**

[0056] 환자의 혈청은 입원 24시간 이내에 수득한 3 ml의 말초 혈액에서 분리하여 뇌졸중 조직 은행에 저장한 후, miRNA 분리까지 -80도에 저장하였다. 혈청에서 miRNA의 분리 전에, 각 용혈 양은 자유 산화헤모글로빈 평가 방법을 이용하여 확인하였다(Henkelman et al 2009). miRNA 분리를 위해 415 nm에서 0.2 이하의 흡광도를 보이는 혈청을 이용하였다 (Kirschner et al 2011). miRNA는 제조사의 프로토콜에 따라 TaqMan® miRNA ABC Purification Kit-Human-Panel A 및 B (Part no. 4473087 및 4473088, Applied Biosystems™, USA)를 이용하여 50 µl의 혈청에서 분리하였다. 각 Panel의 항-miRNA 올리고뉴클레오티드의 특정 세트를 포함하는 Panel A 또는 B는 superparamagnetic Dynabeads (Panel A 및 B를 위한 TaqMan® miRNA ABC 분리 비드 Kit-HUMAN, Part no. 4473085 및 4473086, Applied Biosystems™)을 이용하였다. 분리된 miRNAs는 -80도에 저장한 후 이후 일련의 실험에 이용하였다.

[0058] **실험예 3. 타겟 miRNAs 선별을 위한 마이크로어레이**

[0059] 3-1. miRNAs 마이크로어레이

[0060] miRNAs 마이크로어레이를 수행하기 위하여, 분리된 3 µl miRNAs를 상이한 프라이머 풀(Pool A를 위하여, Megaplex™ RT Human Pool A [Part No. 4399966] 및 Pool B를 위하여, Pool B [Part No. 4399968]를 사용, Biosystems™)로 각 고유 377개 및 4개의 대조군 miRNAs를 최종 볼륨이 10 µl되게 하여 각각 역전사 하였다. 반응은 16도에 2분, 42도에 1분, 50도에 1초, 최종적으로 85도에 5분 조건으로 40회 반복하였다. 그 후, Pool A 또는 B로 역전사된 2.5 µl의 cDNA는 최종 볼륨을 25 µl로 하여 매칭 프라이머 pool A 또는 B(Megaplex™ RT Human Pool A 및 B)를 포함하는 전증폭 혼합물(TaqMan® PreAmp Master Mix, Part No. 4391128)로 전증폭(preamplified)하였다. 상기 전증폭은 95도에 10분, 55도에 2분, 72도에 2분으로 수행한 후, 95도에 15초, 60도에 4분, 최종적으로 99.9도에서 10분간 16회 수행하였다. 상기 전증폭 반응물은 75 µl의 Tris-EDTA 버퍼(pH 8.0)로 희석하고 마이크로어레이에 이용하였다. 최종적으로, miRNA 마이크로어레이는 real-time PCR 기기(QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems™)에서 프라이머 Pool A 또는 B의 프라이머 세트를 포함하는 두 어레이 카드에서 전증폭된 cDNA로 수행하였다. 상기 두 카드는 95도에 10분 처리 후, 95도에 15초, 60도에 1분간 40회 조건으로 real time PCR로 수행하였다.

[0062] 3-2. 미가공(Raw) 마이크로어레이 데이터로 사용하기 위한 타겟 miRNAs의 선별

[0063] 미가공 마이크로 어레이 데이터는 프로그램(Expression Suite software v1.0.4.4, Applied Biosystem)을 이용하여 분석하였다. 미가공 마이크로어레이 데이터 유래의 Ct(Cycle threshold)는 베이스라인 임계값을 초과하는 형광 수준에 대한 주기로서 정의하였다. PCR 주기의 임계값은 가능한 한 많이 발현된 캡처에 대한 40개로 설정하였다(Andrology 2015;3:85-91). 확인되지 않은 값은 사이클의 최대 넘버로 대체되었다(Andrology 2015;3:85-91). 타겟 miRNAs의 선정 전에, 두개의 마이크로어레이 플레이트에 포함된 754개의 miRNAs의 기준 miRNAs를 확인하였다. 총 miRNAs로부터 기준 miRNAs에 대한 후보를 선택하기 위하여, 기준 miRNAs에 대한 이전 표준을 이용하였다(Oncology Letters 2014;8:1889-1895); 1) 모든 혈청 시료를 포함한 검출, 2) 평균 발현 변화의 0.9-1.1 배, 및 3) 비-동맥경화군 및 동맥경화군 사이에 유의적인 발현 차이(p>0.05)가 없음. 그 후, 후보 miRNAs의 안정성 값은 NormFinder(<http://moma.dk/normfinder-software>), (Cancer Res 2004;64:5245-5259)로 계산하였다. 가장 낮은 안정성 값을 갖는 단일 또는 조합의 miRNA(s)는 본 발명을 위하여 기준 miRNA(s)로서 선발하였다.

- [0064] 테스트된 고유 754개의 miRNA 사이에서 타겟 miRNA를 확인하기 위하여, 각 고유 miRNA의 발현 차이($\Delta Ct = Ct$ 고유 miRNA-Ct 기준 miRNA(s))는 각 비-동맥경화군 및 동맥경화군 환자에서 평가하였다. 그 후, 각 고유 miRNA 발현의 상대적 양($Q_{rel} = 2^{-\Delta Ct}$)을 계산하였다(Oncology Letters 2014;8:1889-1895). 비-동맥경화군 및 동맥경화군 사이에서, 특이적 Q_{rel} 차이가 0.5 이하로 정의되거나, 통계적 유의성이 $p < 0.05$ 인 Q_{rel} 값에 2.0배 이상의 변화를 보이는 miRNAs는, 타겟 miRNAs로 정의하였다. 동맥 경화의 존재와 관련된 타겟 miRNAs의 잠재적 조합을 생성하는 타겟 miRNAs의 판별식 분석을 수행하였다. 타겟 miRNAs 유래의 판별된 조합은 비-동맥경화군 및 동맥경화군 사이의 발현 차이를 평가하기 위한 최종 타겟 miRNAs로 사용하였다.
- [0066] **실험예 4. 비-동맥경화군 및 동맥경화군 사이의 잠재적 타겟 miRNAs의 발현 차이를 평가하기 위한 Real-time RT-PCR 수행**
- [0067] Real-time RT-PCR을 수행하기 위하여, Panel A 또는 B로 정제된 3 μ l miRNAs는 각 최종 볼륨 10 μ l로 최종 타겟 miRNAs(miR-212, -372, -474, 및 -744는 타겟 miRNAs; miR-197 및 -374는 기준 miRNA)은 RT 프라이머 풀로 맞추었다. 반응은 16도에 2분, 42도에 1분, 50도에 1초, 최종적으로 85도에 5분 조건으로 40회 수행하였다. 맞춤형(customized) 프라이머 풀로 역전사된 2.5 μ l의 cDNA는 최종 볼륨이 25 μ l가 되도록 매칭 맞춤 프라이머 풀로 전-증폭 혼합물(TaqMan® PreAmp Master Mix, Part No. 4391128)을 이용하여 전 증폭을 수행하였다. 상기 전-증폭 혼합물은 95에서 10분, 55도에서 2분, 72도에 2분 수행하고, 95에 15초, 60도에 4분, 최종적으로 99.9도에서 10분을 16회 수행하였다. 전-증폭 반응물은 75 μ l의 Tris-EDTA 버퍼(pH 8.0)로 희석하였고, 마이크로 RNA 어레이에 이용하였다. 최종적으로, 각 타겟 및 기준 miRNAs는 20 μ l 최대 볼륨으로 PCR 혼합물(TaqMan® Universal Master Mix II, No AmpErase® UNG, Part No. 4324018, Applied Biosystems™, USA)의 각 프라이머 세트와 real-time RT-PCR을 수행하였다. 반응 혼합물은 95도에 10분에서 수행하고, 95도에 15초, 60도에 1분 조건으로 40회를 real time PCR 기기(Plus-One, Applied Biosystems™, USA)로 수행하였다.
- [0068] 비-동맥경화 및 동맥경화군 사이에 4개 타겟 miRNAs의 발현 차이를 확인하기 위하여, 각 타겟 miRNAs 및 기준 miRNAs(miR-197 및 -374) 사이의 발현 차이(ΔCT)로 계산된, 각 miRNAs의 Q_{rel} 차이를, 비-동맥경화 및 동맥경화군 간의 차이에서 비교하였다.
- [0070] **실험예 5. 각 조건의 통계 분석**
- [0071] 상기 실험예 1의 10가지 실험적 위험 요소(HbA1C, hsCRP, 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤, HDL, LDL, apoA 및 B, 리포프로테인(a), 및 호모시스테인)의 차이 수준 및 4개의 타겟 miRNAs(miR-212, -372, -454, 및 -744)의 발현은 t-test를 이용하여 비교하였다. 3개의 위험 인자(고혈압, 흡연, 음주)의 상이한 이력은 X²-test를 이용하여 비교하였다. miRNA의 임상적 및 실험적 위험 인자가 독립적으로 동맥 경화의 존재와 관련이 있는 지 여부를 평가하기 위하여, 4개 타겟 miRNAs, 10개의 실험적 위험 인자 및 3개의 위험 인자의 이력(고혈압, 흡연, 음주)을 로지스틱 회귀 분석하여 확인하였다. 실험적 위험 인자에 miR-212를 더하는 경우 동맥 경화 존재의 예측 여부가 상승적으로 증가될 지 여부는, 65명의 환자의 LOO-CV(leave-one-out cross-validation)로 수행하였다. 또한, 3개의 위험 인자(고혈압, 흡연, 음주)를 포함한 ROC(receiver operating characteristic) curve 하에 AUC의 여부를 측정하였고, 각 위험인자에 miR-212를 추가하여 확인하였다.
- [0073] **실시예 1. 동맥경화증 또는 비-동맥경화증 환자의 심혈관계 위험 요소 확인**
- [0074] 상기 실험예 1의 방법으로, 동맥경화증 또는 비-동맥경화증 환자의 심혈관계 위험 요소를 비교 분석하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Variable		동맥경화군 (mean±SD) (n=32)	비동맥경화군 (mean±SD) (n=33)	p
통계	성 (남성:여성)	19:13	19:14	1.000
	나이	71.4 ±5.8	69.3 ±4.9	0.110
	키	160.2 ± 9.1	161.2 ± 9.3	0.680
	몸무게	62.1 ± 10.2	62.8 ± 9.7	0.773
	체질량 지수	24.1± 3.4	24.1 ± 2.2	0.907
위험인자 과거력	고혈압	24:8 (75%)	15:18 (45.5%)	0.023
	당뇨병	18:14 (56.3%)	5:28 (15.2%)	0.001
	흡연	6:26 (18.8%)	8:25 (24.2%)	0.764
	음주	3:29 (9.4%)	3:30 (9.1%)	1.000
뇌병변장애 (Brain lesion)	TIA: Lacune	11:21	13:20	0.798
	HbA1C	6.4 ± 1.1	5.7 ± 0.7	0.004
	Hs-CRP	2.1 ± 2.8	1.0 ± 1.0	0.047
	Triglyceride	124.9±65.7	120.3±55.2	0.760
	total cholesterol	162.5±46.8	165.5±34.2	0.765
	HDL-cholesterol	40.3±12.3	45.1±9.0	0.080
	LDL-cholesterol	101.2±40.1	102.9±32.0	0.843
	apoA	101.9±26.1	108.8±20.0	0.240
	apoB	89.2±29.5	83.8±23.1	0.419
	Lipoprotein(a), Lp(a)	21.9±15.7	14.5±10.4	0.027
	Homocysteine	13.2±8.9	9.9±4.1	0.063
	Glucose	133.8±54.6	107.5±27.5	0.017

[0075]

[0076]

표 1에 나타난 바와 같이, 동맥경화군은 비-동맥경화군보다 고혈압 및 당뇨병의 이력이 더 있음을 확인하였다. 실험적 위험 인자 분석에서, 동맥경화군은 비-동맥경화군과 비교하였을 때 HbA1C, hsCRP, 리포프로테인(a), 호모시스테인(Homocysteine) 및 공복 글루코스(fasting glucose) 값이 더 높음을 확인하였고, HDL은 비-동맥경화군보다 더 낮음을 확인하였다.

[0078]

실시예 2. 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 대한 타겟 miRNA 선발

[0079]

상기 실험예 3의 방법으로, 동맥경화군으로 포함되는 8명의 환자, 비-동맥경화군으로 포함되는 8명의 환자의 혈청을 이용하여 miRNA 마이크로어레이를 수행하였다. 상기 마이크로어레이 수행 후, 한명의 비-동맥경화군 환자에서 유의적 형광 수준이 발견되지 않아, 이를 제외하고, 동맥경화군으로 포함되는 8명의 환자, 비-동맥경화군으로 포함되는 7명의 환자에서 미가공 마이크로어레이 데이터를 분석하여, 최종적으로 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 대한 기준 및 타겟 miRNA를 선발하였다.

[0081]

2-1. 기준 miRNA의 선택

[0082]

본 발명의 기준 miRNA를 선택하기 위하여, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 총 25개 후보의 기준 miRNA를 선택하고, NormFinder 분석을 수행한 결과, miR-197 및 miR-374는 가장 낮은 안정성 값(0.073)이 나타남을 확인하였다. 따라서, 상기 miR-197 및 miR-374를 이하 일련의 실험에서 기준 miRNA로서 이용하였다.

표 2

miRNA 명	안정성 값
miR-197 and miR374	0.073
miR-197	0.098
miR-374	0.102
miR-191	0.135
miR-19b	0.142
miR-19a	0.149
miR-425-5p	0.151
miR-1305	0.162
miR-20a	0.167
miR-126#	0.176
miR-151-3p	0.177
miR-192	0.186
miR-1274B	0.207
miR-202	0.247
miR-155	0.249
let-7c	0.26
miR-30a-3p	0.283
miR-145	0.303
miR-573	0.32
miR-645	0.33
miR-340	0.336
miR-375	0.348
miR-422a	0.359
miR-185	0.368
miR-345	0.387
miR-136	0.397

[0083]

[0085]

2-2. 타겟 miRNA의 선택

[0086]

동맥경화를 가지고 있는 환자에서 특이적으로 변하는 miRNA를 탐색하기 위하여, 동맥경화군 환자 8명과, 비-동맥경화군 7명을 대상으로, TaqMan® Array Human microRNA Cards A 및 B(Part No. 4444913, Applied BiosystemsTM)를 수행하여, 타겟 miRNA를 선택하였다.

[0087]

구체적으로, 타겟 miRNA은 동맥경화군과 비-동맥경화군 사이에 $p < 0.05$ 의 통계학적 유의성을 갖는 Q_{rel} (Q_{rel} 은 $2^{-\Delta C_t}$ 이고, 상기 ΔC_t 는 Ct 고유 miRNA에서 Ct 기준 miRNA(s)을 뺀 값을 의미함) 값이 0.5 이하 또는 2.0 배의 변화가 있는 특이적인 $Q_{rel}(2^{-\Delta C_t})$ 차이가 있는 것으로 정의하고 이를 선별하였다. 표 3의 14개의 miRNAs(miR-181a, miR-454, miR-30c, miR-99b, miR-744, miR-212, miR-222, miR-372, miR-576-3p, miR-502, miR-301b, miR-888, miR-27a, miR-152)을 이용하여, 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 대한 $Q_{rel}(2^{-\Delta C_t})$ 차이를 확인하고, 타겟 miRNA을 선별하였다. 그 결과를 표 3 및 도 1에 나타내었다.

표 3

miRNA	Expression ($2^{-\Delta Ct}$, mean $\pm$ SD)		p-value
	비-동맥경화군	동맥경화군	
miR-181a	0.0855 $\pm$ 0.0682	0.3400 $\pm$ 0.1533	0.0009
miR-454	0.7692 $\pm$ 0.3256	0.1766 $\pm$ 0.0432	0.0012
miR-30c	1.9176 $\pm$ 0.7578	4.8680 $\pm$ 1.8348	0.0044
miR-99b	0.1474 $\pm$ 0.0949	0.5282 $\pm$ 0.2660	0.0082
miR-744	0.1124 $\pm$ 0.1458	0.3763 $\pm$ 0.1845	0.0085
miR-212	0.2505 $\pm$ 0.1803	0.2424 $\pm$ 0.0916	0.0159
miR-222	15.1756 $\pm$ 6.6964	6.5891 $\pm$ 5.5212	0.0188
miR-372	0.0032 $\pm$ 0.0050	0.0220 $\pm$ 0.0160	0.0203
miR-576-3p	0.0009 $\pm$ 0.0015	0.0154 $\pm$ 0.0127	0.0231
miR-502	0.1998 $\pm$ 0.1580	0.5967 $\pm$ 0.3601	0.0272
miR-301b	0.0003 $\pm$ 0.0003	0.0268 $\pm$ 0.0247	0.0292
miR-888	103.81 $\pm$ 82.17	350.70 $\pm$ 244.76	0.0375
miR-27a	0.1788 $\pm$ 0.1254	0.5827 $\pm$ 0.4045	0.0388
miR-152	0.0683 $\pm$ 0.0390	0.2617 $\pm$ 0.1986	0.0421

표 3 및 도 1에 나타난 바와 같이, 14개 miRNA 중에서, 동맥경화군 환자에서 발현이 변하는 5개의 miRNA(miR-212, miR-454, miR-372, miR-744 및 miR-30c)를 선발하였다. 상기 5개의 miRNA에 대한 판별분석(discrimination analysis)을 수행하여, 최종적 동맥경화증에 대한 바이오 마커로서 이용 가능한 miRNA를 분석하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Discrimination analysis Step	miRNA	PartialR-Square	F Value	p-value (Pr > F)
1	miR-454	0.6351	22.62	0.0004
2	miR-744	0.5734	16.13	0.0017
3	miR-372	0.3741	6.57	0.0263
4	miR-212	0.3364	5.07	0.0481

표 4에 나타난 바와 같이, 최종적으로 바이오 마커 후보로서, PartialR-Square 및 F Value 값이 높고, p-value 값이 상대적으로 낮은 miR-212, miR-454, miR-372 및 miR-744를 선발하였다.

실시예 3. 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 대한 타겟 miRNA 의 최종 선별을 위한 검증

상기 실시예 2에서 선발한 바이오 마커 후보인 4개의 miRNA 중에서, 최종적으로 효과적인 동맥경화증 진단용 바이오 마커 miRNA를 선발하였다.

구체적으로, 동맥경화군 33명 환자 및 비-동맥경화군 32명 환자의 시료를 이용하고, 상기 실시예 2에서 선발한 바이오 마커 후보인 4개(miR-212, miR-454, miR-372, miR-744)의 miRNA를 실험예 4의 real time RT-PCR 방법으

로 수행하였다. 그 후, 바이오 마커 후보 4개와 기준 miRNA(miR-197 및 miR-374) 간의 발현 차이(ΔCt)를 계산하여, 결과적으로 바이오 마커 후보 4개의 $Q_{rel}(2^{-\Delta Ct})$ 의 차이를 확인하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

Name of miRNA	Expression changes ($2^{-\Delta Ct}$)		p-value
	비-동맥경화군 (mean±SD, n=33)	동맥경화군 (mean±SD) (n=32)	
miR-212	0.027 ± 0.026	0.062 ± 0.062	0.003
miR-372	0.002 ± 0.003	0.001 ± 0.002	0.653
miR-454	1.214 ± 2.532	1.315 ± 2.895	0.882
miR-744	0.023 ± 0.039	0.077 ± 0.156	0.068

[0096]

[0097]

표 5에 나타난 바와 같이, 상기 4개의 바이오 마커 후보 중, miR-212이 동맥경화군에서 특이적으로 $Q_{rel}(2^{-\Delta Ct})$ 값이 증가하고 유의적인 차이가 나타남을 확인하였다. 따라서, 최종적으로 동맥경화증의 바이오 마커로서 miR-212을 선발하였다.

[0099]

실시예 4. 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 대하여 선발된 miR-212, 혈액 내 위험인자(HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a))를 이용한 동맥경화 진단능 확인

[0100]

4-1. 선발된 miR-212, 혈액 내 위험인자(HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a)) 각각 또는 이의 조합을 이용한, 로지스틱 회귀 분석을 통한 동맥경화 진단능 확인

[0101]

상기 실시예 3에서 최종 선발된 miR-212 마커와 함께, 동맥경화 진단에 사용할 수 있는 마커의 최적 조합을 선발하기 위하여, 상기 실시예 3에서 선발한 miR-212와 상기 표 1의 혈액내 위험인자를 함께 바이오 마커로 이용하여 동맥경화 진단능을 확인하였다. 구체적으로, 동맥경화군 33명 환자 및 비-동맥경화군 32명 환자에서 상기 실시예 3에서 선발한 miR-212와 혈액 내 위험인자인 HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a) 각각 또는 이의 조합에 대한 동맥 경화 진단능을 로지스틱 회귀 분석을 수행하여 확인하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

	p-value	Exp(B)	95% CI	
			Lower limit	Upper limit
miR-212	0.024	2.601.E+11	32.231	2.098.E+21
HbA1C	0.008	2.929	1.327	6.467
HDL-C	0.059	0.934	0.87	1.003
Lp(a)	0.020	1.065	1.01	1.123
Constant	0.057	0.003		

Included variables	Performance measurements		
	Specificity	Sensitivity	Accuracy
HbA1C	75.8	65.6	70.8
HbA1C, Lp(a) [*]	75.8	71.9	73.8
HbA1C, Lp(a), HDL-C [*]	81.8	75.0	78.5
HbA1C, Lp(a), HDL-C, miR-212	87.9	81.3	84.6

[0102]

[0103]

표 6에 나타난 바와 같이, HbA1C, HDL, 리포프로테인(a) 또는 상기 선발된 중에서, 동맥경화군 및 비-동맥경화군에 유의적인 차이를 보이는 것은 miR-212임을 확인하였다.

[0104]

또한, 각 위험 인자(HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a)) 각각, 2개 또는 3개의 조합군과 miR-212, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)을 모두 조합한 군에서 동맥경화 진단에 대한 특이도(Specificity), 민감도(Sensitivity) 및 정확도(Accuracy)를 확인한 결과, miR-212, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)을 모두 조합한 군에서 특이도는 87.9이고, 민감도는 81.3이며 정확도는 84.6임을 확인하여, 다른 조합군보다 동맥경화를 우수하게 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0106]

4-2. 선발된 miR-212, 혈액 내 위험인자(HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a)) 조합에 따른 교차검증(Cross Validation) 분석을 통한 동맥경화 진단능 확인

[0107]

상기 실시예 3에서 최종 선발된 miR-212이 HbA1C, HDL, 리포프로테인(a)와 조합하여 이용 시, 독립적으로 작용하는지 또는 조합으로 인한 시너지 효과가 있는지 여부를 확인하기 위하여, 교차검증을 수행하였다.

[0108]

구체적으로, 비-동맥경화군 33명 및 동맥경화군 32명을 대상으로, 본 발명의 로지스틱 회귀모형을 적용하여 분류기준을 만들었다(모형에서 얻어진 회귀추정식을 이용). 상기 분류기준을 이용하여 로지스틱 회귀 모형 적용시에 제외되었던 개체의 소속 집단의 동맥경화 진단능을 확인하는 것으로, 교차 검증을 수행하였다.

[0109]

그 결과, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a) 조합에 대한 예측 정확도(prediction accuracy)는 68.5%임을 확인하였다. 또한, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a) 조합에 miR-212를 더한 군의 예측 정확도는 72.6%임을 확인하였다. miR-212를 더 조합함에 따라, 예측 정확도는 약 4.1% 높아짐을 확인하였다.

[0110]

따라서, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)만을 조합했을 때 보다 여기에 miR-212를 더 추가하여 조합 시, 시너지 효과가 발생하여 동맥 경화 진단에 가장 효과적임을 확인하였다.

[0112]

4-3. 선발된 miR-212, 혈액 내 위험인자(HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a)) 조합에 따른 ROC curve 분석을 통한 동맥경화 진단능 확인

[0113]

상기 실시예 3에서 선발한 miR-212와 상기 표 1의 혈액내 위험인자를 함께 바이오 마커로 이용하는 것이 단일

사용보다 최적의 동맥경화 진단 효과를 나타내는지를 확인하기 위하여, ROC curve 분석을 수행하였다.

[0114] 구체적으로, 동맥경화군 33명 환자 및 비-동맥경화군 32명 환자에서 상기 실시예 3에서 선발한 miR-212와 혈액 내 위험인자인 HbA1C, HDL 또는 리포프로테인(a) 각각에 대한 동맥 경화 진단능을 ROC curve를 그렸을 때 변하는 AUC를 수행하여 확인하였다. 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

ROC Model	Area	Standard Error	95% Wald Confidence Limits	
HbA1C	0.7491	0.0647	0.6222	0.8759
HDL-C	0.6690	0.0701	0.5316	0.8065
Lp(a)	0.6780	0.0668	0.5472	0.8089
miR-212	0.6866	0.0661	0.557	0.8161
HbA1C+HDL+LP(a)	0.8258	0.0543	0.7194	0.9321
HbA1C+HDL+LP(a)+ miR-212	0.8646	0.0470	0.7725	0.9567

[0115]

[0116] 표 7에 나타난 바와 같이, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)의 조합에서는 증가된 area가 0.8258임을 확인하였고, miR-212, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)의 조합의 조건에서는 0.8646임을 확인하여 다른 조건들보다 AUC가 가장 커짐을 확인하여, 동맥 경화 진단에는 상기 조합 조건이 가장 효과적임을 확인하였다.

[0117] 따라서, 상기 로지스틱 회귀 분석, 교차 검증 및 ROC curve분석 결과, miR-212, HbA1C, HDL 및 리포프로테인(a)의 조합이 동맥 경화 진단에 가장 효과적임을 확인하였다.

도면

도면1

