

|                                                                                   |                                                                                    |                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                 | (11) 공개번호 10-2016-0095862<br>(43) 공개일자 2016년08월12일 |
| <hr/>                                                                             |                                                                                    |                                                    |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)                | (71) 출원인<br>이화여자대학교 산학협력단<br>서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)                    |                                                    |
| (52) CPC특허분류<br>G01N 33/53 (2013.01)<br>G01N 33/68 (2013.01)                      | (72) 발명자<br>김선중<br>서울특별시 양천구 목동서로 37, 503호 (목동)<br>김진우<br>서울특별시 양천구 안양천로 1071 (목동) |                                                    |
| (21) 출원번호 10-2015-0017343                                                         | (74) 대리인<br>안소영                                                                    |                                                    |
| (22) 출원일자 2015년02월04일<br>심사청구일자 2015년02월04일                                       |                                                                                    |                                                    |

전체 청구항 수 : 총 9 항

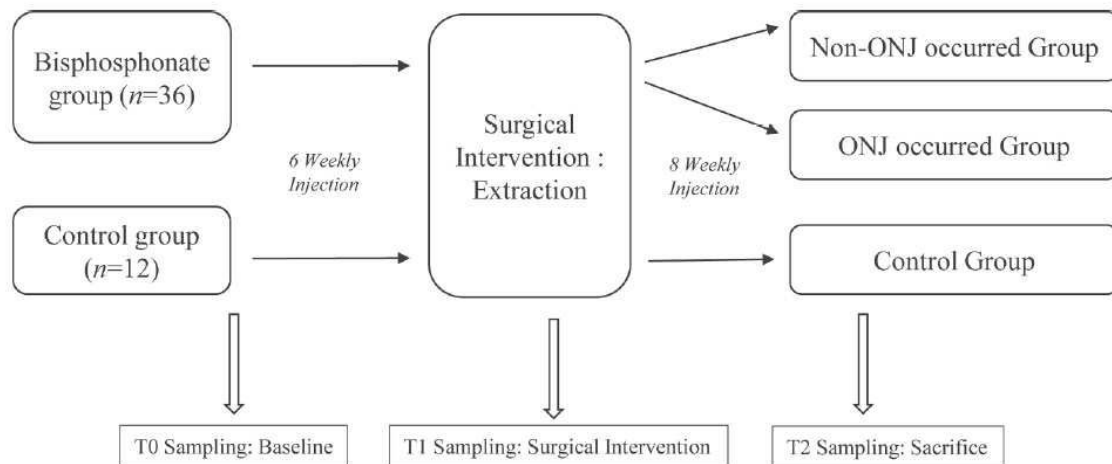
(54) 발명의 명칭 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단 방법

### (57) 요약

본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단 및 예후 예측 방법에 관한 것이다.

본 발명의 바이오마커를 이용하여 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증을 조기 진단하고, 발병 기전에 의거한 치료법과 예방법을 통해 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증에 대한 치료 효과를 높이고 치료의 부작용을 최소화한다.

### 대표도 - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 중 선택되는 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발현 수준의 측정은 TRACP 5b 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)/OPG(Osteoprotegerin) 비율을 측정하는 제제인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 제제는 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer) 중 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 키트.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 중 어느 하나인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 키트.

#### 청구항 6

환자로부터 분리된 샘플 중에서 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 수준 측정은 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer) 중 어느 하나인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 수준 측정 및 비교 방법은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)으로 구성된 군으로부터 선택되는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법.

## 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 측정된 수준을 상기 기준 수준과 비교하여 기준 수준 이하의 샘플들을 선별하는 단계를 더 포함하는, 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 전 세계적으로 늘어나는 비스포스포네이트의 사용 및 고령화 사회의 본격적 진입에 따라 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 발생 빈도 또한 폭발적으로 증가할 것으로 예상되어 이와 관련된 연구가 매우 시급한 실정이다.

[0003] 비스포스포네이트 복용과 관련하여 악골의 괴사증이 2003년 처음 발표된 이래, 본 질병의 발생 원인과 병리 생 태에 대해 규명하려는 많은 노력들이 있어왔다. 그러나 아직도 발생 기전은 명확히 이해되지 않고 있으며, 현재 이 질병은 비스포스포네이트의 주 작용인 파골세포 작용의 억제에 의한 골 재형성의 과억제에 따른 치유 능력 부전에 의한 질병으로 이해되고 있다.

[0004] 이와 같이 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 (Bisphosphonate-related Osteonecrosis of Jaw; BRONJ)이 골대 사 질환이라는 점에 근거하여, BRONJ의 진단을 목적으로 C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX)의 측정을 통한 위험도 예측이 제안된 바가 있었으나, 이후 시행된 많은 임상 연구에서 혈청 CTx와 BRONJ 발생의 관련성이 없다는 결과가 발표되었으며, 이외에도 여러 골 대사 바이오마커를 이용한 임상 연구가 수행되었으나 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 질환에 대한 마커로써 밝혀진 것은 확인되는 바가 없다.

[0005] 또한, 관련 연구의 대부분은 후향적 환자 리뷰를 통한 연구들로서 진행되어 왔으나, 이는 selection bias의 가능성 및 환자군 수의 제한 때문에 통계적 유의성을 이끌어내기에는 부족한 면이 있고, 현재까지의 연구는 대개 골다공증을 기초로 정기적 내원을 통해 바이오마커 검사를 시행한 환자를 대조군으로 설정하였기 때문에, 구강 내 수술을 시행한 나이, 성별 등이 짝 지어진 환자 중 BRONJ가 발병하지 않은 환자군을 대조군으로 설정하지 않은 제대로 시행된 임상 연구로 보기 어려운 점이 있다. 또한, 위험 인자로서 바이오마커를 적용하는데 있어서 BRONJ 발병 전에 검사가 이루어져야 하나, 대부분 연구가 이미 BRONJ가 발병한 이후의 검사 결과로 결론을 도출 하는데 문제점이 존재한다.

[0006] 이러한 배경하에, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증에 대한 새로운 바이오마커를 탐지하여 이를 통해 발생 기 전을 규명하고, 이에 의거한 질환의 진단 및 예후 예측 방법에 대한 도입이 시급한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1474053, 2014.12.11

(특허문헌 0002) KR 10-1463505, 2014.11.13

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand) 중 선택되는 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 키트를 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명은 환자로 부터 분리된 샘플 중에서 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는

OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 바이오 마커 발굴을 위해 예의 노력한 결과, TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)이 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 바이오마커로 효과를 보임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명은 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)중에서 선택되는 1개 이상의 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 발병 여부, 예후 예측을 포함하여 질환 현황을 확인하는 것이다.
- [0014] 본 발명에 있어서 사용된 용어 "비스포스포네이트 연관 악골괴사증"이란 비스포스포네이트 화합물 (예컨대 졸레드로닉산, 파미드로닉산 등)의 처리에 의해 악골에 발생하는 모든 비정상적인 골수염 증상, 세포괴사 현상 등을 의미하며, 비스포스포네이트 처리에 따른 이환부의 동통, 치아 동요, 점막 부종, 궤양, 이환부 감각 변화 등의 비정상적인 임상적 증상들을 포함한다.
- [0015] 본 발명에서 정상 대조군(비질환 개체)이란 비스포스포네이트 투여를 받지 않은 정상 개체를 의미한다.
- [0016] 본 발명에서 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체란 비스포스포네이트 투여 및 수술적 개입 후 정상 치유되지 않고 악골 괴사증이 발생한 개체로써, 노출되어 괴사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해가 존재하며 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)이 존재하고, 부골 및 세균 콜로니가 존재하는 증상을 가지는 그룹을 의미한다.
- [0017] 본 발명에서 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체란 비스포스포네이트 투여 및 수술적 개입 후에도 악골 괴사증이 발생하지 않고 정상적으로 치유가 일어난 개체를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어 "진단용 바이오마커"란 정상 대조군(비질환 개체) 또는 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에 비하여 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준의 유의적인 증가 또는 감소의 변화 양상을 보이는 폴리펩티드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 진단용 바이오마커는 바람직하게 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)/OPG(Osteoprotegerin) 비율일 수 있다.
- [0020] 본 발명은 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 중 선택되는 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0021] 본 발명의 3개 단백질의 유전자 정보는 각각 TRACP 5b(GeneBank Accession No. NP\_001104506.1), OPG(GeneBank Accession No. AAB53709.1,) 또는 RANKL(GeneBank Accession No. AAB86811.1)일 수 있다.
- [0022] 상기 TRACP 5b 및 RANKL은 비-비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체와 비교하여 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 특이적으로 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 감소하며, OPG는 비-비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체와 비교하여 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체에서 특이적으로 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 증가한다.
- [0023] 바람직하게 상기 진단용 조성물은 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)/OPG(Osteoprotegerin) 비율을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0024] 본 발명의 발현 수준 측정은 mRNA 발현 수준 측정 또는 단백질 수준 측정이며, 바람직하게 단백질 수준의 측정

이다.

- [0025] 본 발명에 사용된 용어 "mRNA 발현수준 측정"이란 비스포스포네이트 연관 악골괴사증을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머쌍 또는 프로브이며, 상기 유전자들의 핵산 정보가 GeneBank 등에 알려져 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 사용된 용어 "단백질 발현수준 측정"이란 비스포스포네이트 연관 악골괴사증을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정이다. 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있으나, 해당 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적인 친화력(affinity)을 가지는 모든 검출 수단을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 이용하지 않고 단백질 발현 수준 자체를 측정한다.
- [0028] 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 바람직하게 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)로부터 선택되는 1개 이상의 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 압타머(aptamer)를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 사용된 용어 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 중에서 선택되는 1 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다.
- [0031] 또한 본 발명의 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')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 있다.
- [0032] 본 발명에 사용된 용어 "압타머(aptamer)"란 단일, 이중 나선의 DNA, RNA 형태로 특정 타겟 단백질과의 3차원적 결합을 통해 단백질의 상호작용을 억제하는 생고분자 물질로서, 다양한 표적분자에 결합하는 특징을 가진다. 전형적으로 압타머는 규정된 2차 및 3차 구조, 예컨대 스템-루프 구조로 접혀지는 15~50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 압타머는  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$ , 또는  $10^{-12}$  보다 적은 kd로 표적 고발현 단백질 또는 저발현 단백질과 결합하는 것이 바람직하다. 압타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 고발현 단백질 또는 저발현 단백질과 결합할 수 있으며, 압타머는 다수의 리보뉴클레오타이드 단위, 데옥시리보뉴클레오타이드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오타이드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 또한, 본 발명의 압타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 조성물을 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. 바람직하게, 상기 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른

구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

- [0034] 보다 바람직하게는, ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 aptamer를 포함한다. 항체는 각 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 환자로부터 분리된 샘플 중에서 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 사용된 용어 "환자로부터 분리된 샘플"이란 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 발병에 의해 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준이 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에 있어서, "기준 수준"이란 본원에 기재된 방법에 의해 기준 샘플들로부터 검출 및 판단되는 높은 진단의 예측성을 나타낼 수 있는 유전자 또는 단백질의 발현 수준과 동일한 수준을 의미한다. 기준 수준은 동일한 질환을 앓는 피험체, 연령 범위가 동일하거나 유사한 피험체, 인종 군이 동일한 또는 유사한 피험체를 포함하는 군집 연구로부터 취득되는 개수 또는 값에 대해 상대적일 수 있거나, 치료를 받는 피험체의 출발 샘플에 대하여 상대적일 수 있다. 이러한 기준 수준은 수학적 알고리즘 및 계산된 지수로부터 취득된, 군집의 통계학적 분석 및/또는 위험성 예측 데이터로부터 유도될 수 있다. 기준이 되는 특정 계수 또한 통계학적 및 구조적 분류 알고리즘 및 기타 다른 방법을 이용함으로써 구성되고 사용될 수 있다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 본원에서 용어 "기준 수준"은 미리 측정된 값을 의미하며, 예를 들어 당업자는 기준 수준이 미리 측정되고 특이성, 민감성 및/또는 정확성의 관점에서 요건을 충족시키도록 설정될 수 있다. 일례로, 민감성 또는 특이성은 각각 일정 한계, 예를 들면, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%로 설정될 수 있으며, 이들 요건은 양성 또는 음성 예측 값의 관점에서 정의될 수도 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 발현 수준의 기준 수준을 결정하기 위하여 평균값 산출이나 ROC 곡선 분석 등의 통계적 분석 방법이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일실시양태에 따른 ROC 곡선 분석은 진단의 성능을 나타내는 곡선으로 민감도(sensitivity), 특이도(specificity), 정확도(accuracy)로 구성된다. 본 발명의 일실시양태에 따르면, 민감도(sensitivity)는 질병이 있는 집단에서 검사법이 질병이 있다고 판정을 내리는 비율이며, 특이도(specificity)는 질병이 없는 집단에서 검사법이 질병이 없다고 판정을 내리는 비율이며, 정확도(accuracy)는 전체 사례 중에서 검사결과의 적중 비율을 나타낸다. 여기서, 특이도와 민감도가 모두 높을 때, 검사의 정확도가 높아지게 되므로, ROC 곡선에서 x 축이 1-특이도, y 축이 민감도가 되고, 정확도(accuracy)를 나타내는 AUC(area under curve)는 곡선의 아래 면적을 의미한다.
- [0041] 본 발명의 일실시양태에 따르면, "기준 수준"은 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증에 대한 발병 예측에 높은 예측 효과를 보이는 임계값(Cutoff value)이다. 진단 예측을 위해 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 OPG(Osteoprotegerin)/RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 비율은 ROC 곡선 분석에서 AUC 값이 중등 수준 (약 0.6 수준) 이상이 바람직하며, 기준 수준 이하의 샘플에 대해 발병률이 높음을 예측한다. 바람직하게, TRACP 5b는 3.09 U/L 이하, RANKL/OPG ratio는 0.88 이하일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 용어 "이상" 또는 "초과"는 기준 수준 초과 수준을 의미하거나, 기준 수준과 대비하여 본원에 기재된 방법에 의해 검출된 발현 수준에서의 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 전체 증가를 의미한다. 본 발명에 있어서, 용어 "이하" 또는 "미만"은 기준 수준 미만의 수준을 의미하거나, 기준 수준과 대비하여 본원에 기재된 방법에 의해 검출된 발현 수준에서의 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 전체 감소를 의미한다.

[0043] 상기 TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b) 또는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand)/OPG(Osteoprotegerin) 비율은 모두 비-비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체와 비교하여 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체에서 특이적으로 유전자 발현 수준 또는 해당 단백질의 발현 수준이 감소하는 특징을 가지므로, 상기 수준이 감소하면 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 개체로 진단하여 정보제공할 수 있다.

[0044] 바람직하게 본 발명의 상기 단백질 발현 수준은 해당 단백질 또는 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 애포머(aptamer)를 이용하여 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료 내의 해당 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을 이용한다. 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 유전자의 존재 또는 부존재를 확인하기 위한 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 바와 같은 방법, 예를 들어 분광학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 및 기타 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

[0045] 보다 바람직하게, 본 발명에서 상기 단백질 발현 수준 측정 및 비교는 항체를 이용하지 않고 단백질 발현 수준 자체를 측정 및 비교하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 목적상, 상기 단백질 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LCMS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏, 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

### 발명의 효과

[0046] 본 발명의 바이오마커를 이용하여 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증을 조기 진단하고, 발병 이전에 의거한 치료법과 예방법을 통해 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증에 대한 치료 효과를 높이고 치료의 부작용을 최소화한다.

### 도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본원 발명의 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 바이오마커 확인을 위한 실험 디자인을 나타내는 도이다.

도 2는 비-비스포스포네이트 연관 악골괴사증 그룹과 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 그룹의 악골의 임상적 양상을 나타내는 도이다.

도 3은 궤양성 병변 및 괴사골을 가지는 악골괴사증 랫트의 조직 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 시간 경과에 따른 바이오마커 CTx(C-terminal crosslinked telopeptide of type I collagen), TRACP 5b(Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b), OPG(Osteoprotegerin), Glu-OC(Undercarboxylated osteocalcin), RANKL(Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$   $\beta$  ligand) 및 RANKL/OPG 비율의 변화를 나타내는 도이다.

도 5는 혈청 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율의 ROC 곡선 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 혈청 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율의 개별 퍼센트 변화를 나타내는 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0049] <실시예 1> 동물 모델 및 실험 디자인

[0050] 이화여자대학교 의과연구소(Ewha Medical Research, 대한민국 서울)에서 구입된 8주령의 평균 무게 220g (범위 190~247g) 암컷 랫트(rat)(Sprague Dawley, SD)(n=48)가 본 실험에 사용되었다. 동물들은 케이지(cage)당 3마리씩 수용되었으며, 이어 펀치(ear punch)를 사용하여 각각 번호가 매겨졌다. 케이지는 정화된 공기의, 온도  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\% \pm 10\%$ 의 방에 위치시켰다. 12시간 명/암 주기가 유지되었다. 동물들은 평균적인 설치류의 식사 및 물을 자유식으로 먹었다. 동물들은 실험 시작 1주일 전부터 순응시켰다. 본 실험은 동물 연구 윤리 위원회 규정(Institutional animal research ethics committee)에 승인되었고, 그 지침에 따라 수행되었다.

[0051] 랫트는 임의로 두 집단으로 나뉘어 졌다. 비스포스포네이트(bisphosphonate) 집단(n=36)은 졸레드론산(zoledronic acid)  $200 \mu\text{g/kg}$ 를, 대조군(n=12)은 생리 식염수를 주1회 피하로 투여하였다. 비스포스포네이트의 약력학이 설치류에서 밝혀지지 않았음을 고려하여, 다음 요인에 따라 투여량을 결정하였다: (1) 종양학에서 사람의 적절한 졸레드로네이트(zoledronate) 투여량( $67 \mu\text{g/kg/4주}$ ); (2) 설치류의 상대적으로 빠른 골 대사; (3) 비스포스포네이트의 투여 경로(정맥 투여와 대비하여 피하 투여를 사용하였을 때 낮은 더 혈장 농도); 및 (4) 상대적으로 짧은 실험 기간 동안 최대의 약물 노출.

[0052] 6주간의 주사 후, 외과 수술로 발치가 수행되어 악골괴사증을 유도하였다. 동물들은 케타민(ketamine)( $100\text{mg/kg}$ , 대한민국 서울, Yuhan pharmacy), 자일라진(xylazine)( $10\text{mg/kg}$  Rompun, 독일 Leverkusen, Bayer AG) 및 멜록시캄(meloxicam)( $1.5\text{mg/mL}$  Metacam, 독일, Boehringer Ingelheim) 근육 내 주사로 마취되었다. 빠른 치과용 탐침을 사용하여 인대절개술을 한 후, 치아의 유동성이 충분히 얻어질 때까지 적절한 탈구가 수행되었다. 이런 방식으로, 치과용 탐침을 사용해 왼쪽 아랫니의 첫 번째부터 세 번째 어금니가 순차적으로 적출되었다. 거즈 압박을 하여 출혈을 조절하고, 상처는 아무 봉합 없이 열어 두었다. 주1회의 주사가 8주간 더 지속되며, 비스포스포네이트 연관 악골괴사증의 발병 진행에 따라 그 기간이 선택되었다. 그 후, 동물들은 추가적인 조직학적 평가를 위해 희생되었다.

[0053] 상기 실험 디자인 내용은 도 1에 도시하였다.

[0054] <실시예 2> 조직학적 분석 결과

[0055] 다음 기준에 따른 조직학적 분석을 기초로 ONJ의 존재를 결정했다: (1) 노출되어 괴사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해의 존재, (2) 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)의 존재, 및 (3) 부골 및 세균 콜로니의 존재.

[0056] 희생된 랫트의 악골 사진을 도 2에 나타내었다. 도 2의 (a)는 외과 수술 8주 후 정상 점막을 보이는 비-악골 괴사증 그룹의 악골이며, 도 2의 (b)는 악골 괴사증 발병 그룹의 악골이다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 악골 괴사증 발병 그룹에서 세포 괴사가 일어난 것을 확인하였다.

[0057] 또한, 샘플들은 4% 인산완충식염수(phosphate-buffer saline) 포르말린으로 2주간 고정되고, 10% EDTA(pH 7.2)로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 28일간 탈석회화되었다. 샘플은 여러 단계에 걸쳐 에탄올로 탈수되고, 자일렌(xylene)으로 세척되어 파라핀에 담구었다. 그 후, 샘플들은 파라핀에 포매되고  $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick 절편으로 잘렸다. 절편들에서 파라핀이 제거되고, 다시 수화하여 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) (H-E)으로 염색되었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 악골 괴사증 그룹에서 취해진 절편에서 괴저성 골 및 궤양성 병변이 보이는 것을 확인하였다.

[0058] <실시예 3> 바이오마커 및 통계적 분석

[0059] 바이오 마커의 조사에서, 혈액 샘플은  $T_0$ (기준점),  $T_1$ (6주차; 외과 수술), 및  $T_2$ (14주차; 희생) 시점에서 12시간의 단식 이후에 채취되었다. 혈액 샘플은 경정맥( $T_0$ ,  $T_1$ )을 통해서, 및 심장천자( $T_2$ )로 수집되었고, 그 후 20분간 응고되도록 하였다. 수집된 혈청 샘플은 원심분리( $1600 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15분)를 통해 분리되었고, 분주되어(aliquoted), 분석될 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 저장되었다. serum CTx(RatLaps EIA, IDS, Boldon, Tyne & Wear, UK), serum undercarboxylated osteocalcin(Glu-OC; Rat Glu-Osteocalcin high sensitive EIA, Takara Bio, Shiga, Japan), serum TRACP 5b(RatTRAP, IDS, Boldon, Tyne & Wear), serum receptor activator of nuclear factor- $\kappa\beta$  ligand(RANKL; Rat sRANKL ELISA, Cusabio, Wuhan, Hubei, China) 및 serum osteoprotegerin(OPG; Rat sOPG ELISA, Cusabio)의 농도는 제조자의 시험법에 따라 수행되어 결정되었다.

[0060] 상기 2.의 조직학적 분석 결과에 따라, 비스포스포네이트 집단(n=36)의 랫트는 비-악골괴사증 집단 및 악골괴사

증 그룹으로 추가적으로 분류되었다. 실험된 바이오마커(CTx, Glu-OC, TRACP 5b, 및 RANKL/OPG ratio)의 정규 분포와 분산의 동일성은 추가적 통계분석 전에 체크되었다. 시간의 흐름에 따른 바이오마커의 전반적인 집단 간 차이는, 반복 측정 분산분석(RM-ANOVA)을 통해 비교되었다. 독립표본 t-검정(independent t-test)은 비-악골괴사증 집단과 악골괴사증 집단 간, 및 비스포스포네이트 집단과 대조군 간의 유의한 차이를 시험하기 위해 사용되었다. T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub>에서의 ROC(receiver operating characteristic) 곡선 분석은 바이오마커를 평가하기 위해 사용되었다. 곡선 아래 면적(area under curve, AUC)과, 바이오마커의 민감도 및 특이도의 합계, cutoff value가 산출되었다. 각 바이오마커의 개체 내 변동 계수(intra-assay coefficient of variability)(Cva; analytical variability)는 2회 측정되어 평균값으로 결정되었다. 개체 간 변동 계수(inter-assay coefficient of variability)(Cvi; biological variability)는 대조군에서 T<sub>2</sub>를 T<sub>0</sub>와 대비하여 관찰된 평균 변화로 결정되었다.  $P < 0.05$  에서의 최소 유의 변화(least significant change LSC)는 방정식:  $LSC = 2.33s\sqrt{(Cva^2 + Cvi^2)}$ 을 기준으로 결정되었으며, signal to ratio는 T<sub>2</sub>(signal)에서 비스포스포네이트 집단의 각 바이오마커 변화를 바이오마커의 변동성(noise;  $\sqrt{Cva^2 + Cvi^2}$ )으로 나누어서 결정하였다. 0.05 미만의 P 값이 통계적으로 유의하다고 여겨지며, 통계적 분석은 SPSS 20.0(IBM Corp., Armonk, NY, USA) 및 MedCalc 12.7.0(Medc software, Ostend, Belgium)을 사용하여 수행되었다.

[0061] 상기 분석 결과를 표1 및 도 4 내지 도 6에 나타내었다.

[0062] 비스포스포네이트 집단의 36마리의 랫트에서, 27 마리의 랫트는 조직학적으로 악골괴사증(ONJ) 집단으로 분류되었고, 9마리 랫트는 비-악골괴사증(non-ONJ) 집단으로 분류되었다. 실험된 모든 마커의 값은 표 1에 나타내었다.

[0063] [표 1]바이오마커 분석 결과

|                 |         | T0              | T1               | T2               |
|-----------------|---------|-----------------|------------------|------------------|
| CTx (pg/mL)     | Control | 22.86 (10.81)   | 20.41 (11.27)    | 22.91 (10.15)    |
|                 | Non-ONJ | 21.61 (8.35)    | 10.50 (3.38)*    | 11.61 (7.48)*    |
|                 | ONJ     | 20.70 (7.90)    | 10.33 (3.20)*    | 10.62 (3.54)*    |
| Glu-OC (μg/L)   | Control | 39.59 (10.96)   | 42.72 (15.74)    | 41.28 (10.71)    |
|                 | Non-ONJ | 41.85 (10.66)   | 30.46 (11.81)    | 27.53 (13.69)    |
|                 | ONJ     | 45.22 (14.38)   | 31.74 (12.74)    | 30.26 (13.52)    |
| TRACP 5b (U/L)  | Control | 5.07 (1.08)     | 4.68 (1.26)      | 5.25 (1.55)      |
|                 | Non-ONJ | 4.62 (1.12)     | 2.34 (1.38)*     | 3.21 (0.71)*     |
|                 | ONJ     | 4.33 (1.21)     | 2.25 (1.14)*     | 2.40 (0.76)*†    |
| RANKL (pg/mL)   | Control | 783.64 (141.41) | 905.50 (57.46)   | 853.52 (92.44)   |
|                 | Non-ONJ | 824.55 (102.84) | 693.41 (121.71)* | 682.21 (100.60)* |
|                 | ONJ     | 798.69 (107.99) | 613.21 (151.66)* | 580.92 (103.91)* |
| OPG (pg/mL)     | Control | 611.99 (157.26) | 657.71 (99.85)   | 677.79 (134.96)  |
|                 | Non-ONJ | 705.76 (129.69) | 669.19 (169.62)  | 669.54 (177.29)  |
|                 | ONJ     | 626.92 (137.34) | 749.60 (184.08)  | 720.88 (145.53)  |
| RANKL/OPG Ratio | Control | 1.36 (0.46)     | 1.41 (0.27)      | 1.33 (0.40)      |
|                 | Non-ONJ | 1.19 (0.15)     | 1.07 (0.19)*     | 1.08 (0.32)*     |
|                 | ONJ     | 1.33 (0.31)     | 0.85 (0.24)*†    | 0.83 (0.20)*†    |

[0064]

[0065] 상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, CTx, TRACP 5b, 및 RANKL은 T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub> 모두에서 대조군과 대비하여 비스포스포네이트 집단에서 유의하게 감소되었다.

[0066] 또한, 악골 괴사증의 잠재적 바이오마커의 분석을 위해, 비-악골괴사증 집단과 악골괴사증 집단 간의 시간의 흐름에 따른 바이오마커 농도를 분석하였다. 데이터 중 특히 집단 간 유의한 차이를 보이는 마커로 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율을 도 4에 나타내었다. RM-ANOVA에서 악골괴사증 (ONJ) 집단은 비-악골괴사증(non-ONJ) 집단과 대비하여 시간이 흐르면서 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율의 유의한 낮은 값을 나타냄을 확인하였다( $P < 0.05$ ). 또한, 이러한 결과는 T<sub>1</sub>의 RANKL/OPG 비율 및 T<sub>2</sub>의 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율에서 일관되었다.

[0067] 악골괴사증에서 TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율의 바이오마커로서의 임상적 수행을 평가하기 위해, T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub>에서 ROC 커브 분석 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타낸 바와 같이, T<sub>2</sub>에서의 TRACP 5b의 AUC는 0.807(95% 신

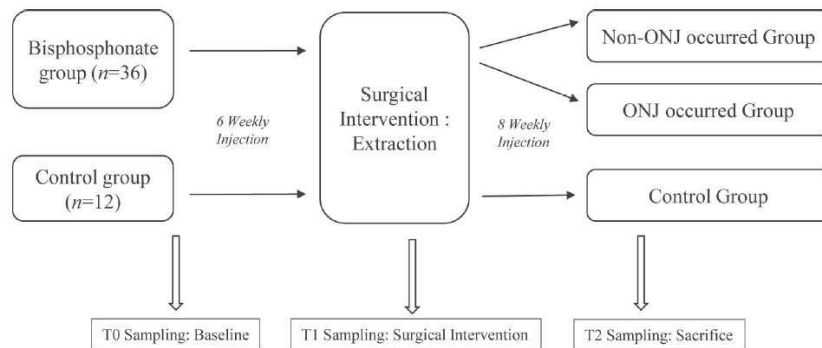
회구간[CI], 0.641-0.919;  $P<0.001$ )이고, 최대 민감도 및 특이도 모두에서 Cutoff value는 3.09U/L 이하였다. 이 Cutoff value에서 진단을 위한 TRACP 5b의 민감도 및 특이도는 각각 88.9% 및 66.7% 였다. 또한, T<sub>1</sub>에서의 RANKL/OPG 비율의 AUC는 0.776(95% CI, 0.606-0.897;  $P<0.001$ )이었다. T<sub>2</sub>에서의 AUC는 0.765(95% CI, 0.595-0.890;  $P=0.002$ )이고, Cutoff value는 0.88 이하였다.(민감도, 77.8%; 특이도, 62.9%).

[0068] 또한, TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율 각각의 퍼센트 변화(T<sub>2</sub>-T<sub>0</sub>)는 도 6에 나타내었다. TRACP 5b는 RANKL/OPG 비율(개체 내 CV, 8.14%; 개체 간 CV, 14.76%; LSC, 39.27%)와 비교하여, 낮은 개체 내 CV(6.32%) 및 개체 간 CV(11.20%)와 함께 낮은 LSC(29.6%)를 가짐을 확인하였다.

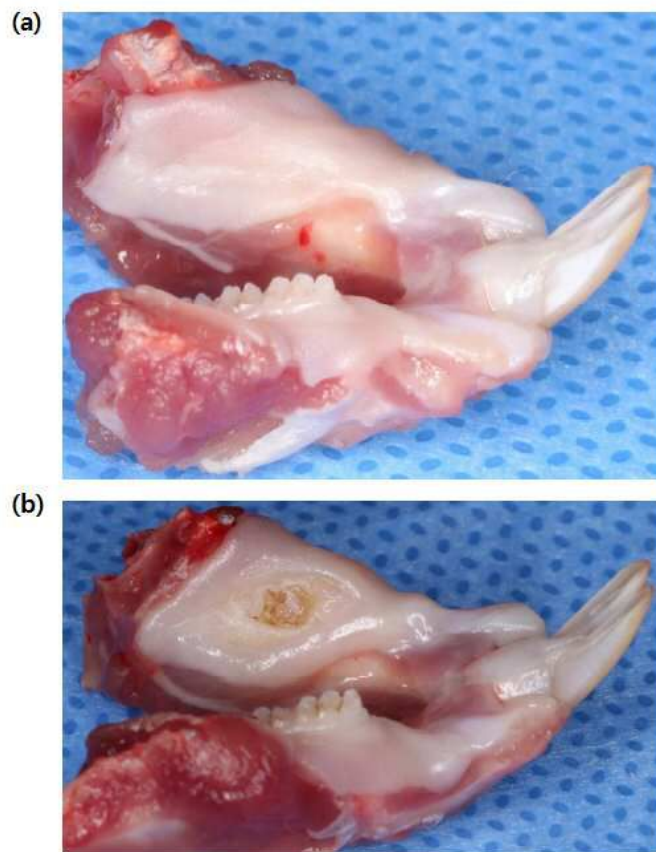
[0069] 상기 결과를 토대로, TRACP 5b 및 RANKL/OPG 비율이 악골 괴사증에 대한 바이오마커로 우수한 기능을 가지는 것을 확인하였다.

## 도면

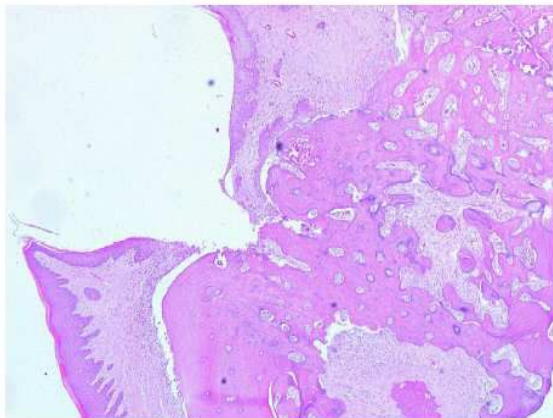
### 도면1



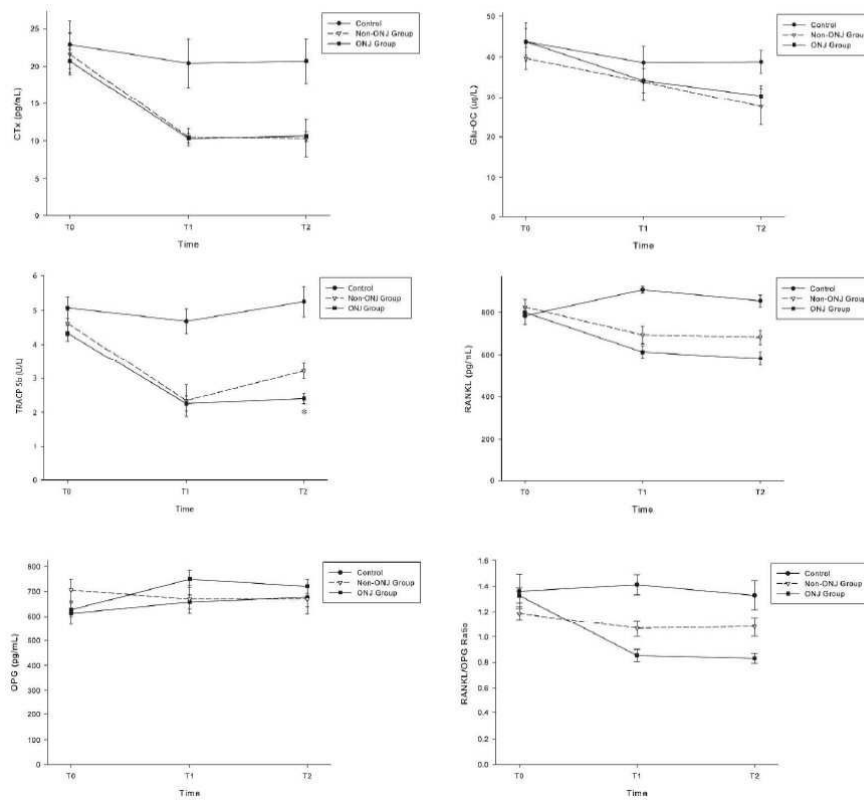
도면2



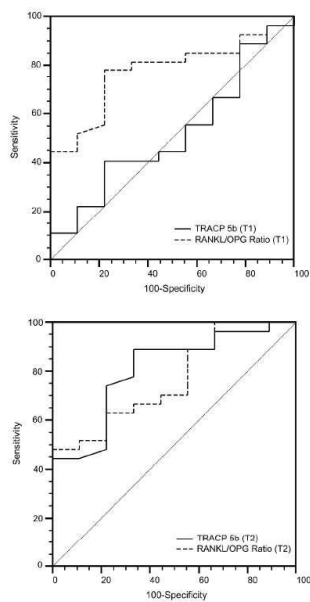
도면3



도면4



도면5



도면6

