(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0035959
(43) 공개일자 2024년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/132* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A61K 31/132 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0028167(분할)
(22) 출원일자 2024년02월27일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-0155970
원출원일자 2021년11월12일
심사청구일자 2021년11월12일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이사민
서울특별시 강남구 도산대로92길 10, 101동 1404호
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호
송나아름
서울특별시 송파구 백제고분로 497, 1210호
(74) 대리인
이명진

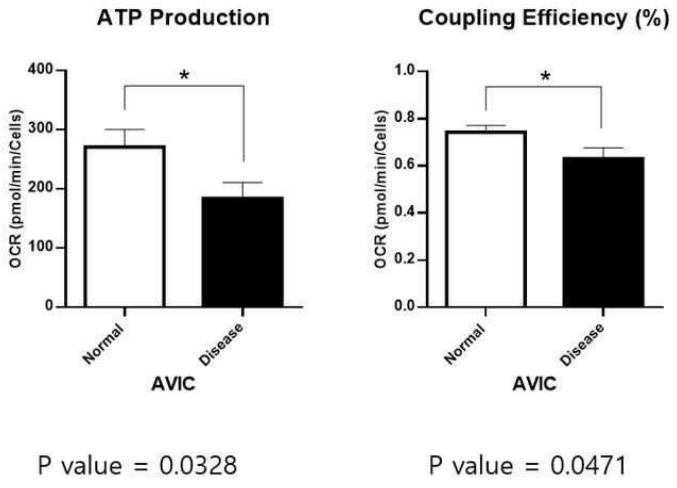
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **대동맥판막 협착증의 진단을 위한 미토콘드리아 바이오마커 및 미토콘드리아 활성화제를 포함하는 대동맥판막 협착증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측방법, 및 상기 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 대사경로와 관련된 유전자들의 발현 양상이 변화하고, 미토콘드리아의 기능 및 수준이 저하되어 있으며, 미토콘드리아 활성화제가 대동맥판막 협착증의 주요 병리기전인 판막 섬유화 및 석회화를 억제하는 효과가 있음을 확인하여 완성된 것이다. 따라서, 본 발명을 통해 대동맥판막 협착증의 정확한 진단이 가능할 뿐만 아니라 미토콘드리아 기능 활성화를 통한 대동맥판막 협착증의 근본적인 치료가 가능하므로, 대동맥판막 협착증의 신규한 진단 및 치료 수단으로 적극 활용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
A61P 9/00 (2018.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)
C12Q 2600/112 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/323 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345301080
과제번호	2019R1I1A2A01060702
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	세포소기관 선택적 자가포식 기능 조절을 통한 노화성 난치 심장병 극복 연구
기 여 율	2/3
과제수행기관명	울산대학교(의대)
연구기간	2019.06.01 ~ 2023.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준을 대조군과 비교하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2,* 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되어 있는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는, 정보제공방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 정보제공방법은 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함하는, 정보제공방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 정보제공방법은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하여 대조군과 비교하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

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

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 대조군은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단백질 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법 (Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 mRNA 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 (northern blotting), 서던 블랏팅 (southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.

청구항 9

OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7, 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하는 제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머인 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 키트는 하기 단계를 포함하는 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 방법이 기재된 설명서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 진단 또는 예후 예측용 키트:

(S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계;

(S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준을 대조군과 비교하는 단계; 및

(S3) 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2,* 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되어 있는 경우; 또는 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 경우, 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계.

청구항 15

스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

(a) 판막의 석회화를 억제함;

(b) 판막의 섬유화를 억제함; 및

(c) 판막간질세포의 골세포화를 억제함.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 조성물은 ALP (Alkaline phosphatase), Osteocalcium, RUNX2, COL1A1, Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현 또는 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 조성물은 정상인에 비해 미토콘드리아 수준 또는 기능이 저하되어 있는 대동맥판막 협착증 환자의 치료를 위한 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오마커, 및 대동맥판막 협착증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

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

[0003] 현재 대동맥판막 협착증은 심장초음파검사 (echocardiography)를 통해 중증도를 평가하며, 초음파 이미지가 선명하지 않거나 정확한 판별이 불가능한 경우 소화기 내시경과 유사한 방법으로 탐촉자가 결합되어 있는 기구를 식도에 삽입하여 식도를 가로질러 심장을 관찰하는 경식도 초음파 검사를 보충해 실시해야 하는 등, 복잡한 과정이 필요하다. 보다 정확한 검사를 위해서는 심도자술을 수행하는데, 심도자술은 국소마취하여 대퇴동맥을 통해 도관을 넣고 X선 투시를 이용하여 심장 내 각 구역의 압력 및 산소포화도를 측정해야 하므로 역시 환자의 불편을 초래한다.

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

[0005] 대동맥판막 협착증을 근본적으로 개선해주는 약물은 아직까지 규명되지 않았으며, 따라서 대동맥판막 협착증의 치료는 대개 손상된 판막을 제거하고 인공판막을 삽입하는 인공판막 치환술로 이루어진다. 그러나 판막 치환을 위해서는 심장을 여는 개심술을 시행해야 하며, 특히 개심술을 받는 동안에는 심장을 정지시키고 심폐 기능을 대신하는 인공 심폐기를 사용하여야 하므로 환자에게 부담이 된다. 또한 기계 판막으로 치환하는 경우 혈액 응고를 막기 위해 항응고제를 평생 복용해야 하는 문제가 있다. 최근에는 수술 위험도가 높은 환자를 대상으로 비수술적 치료인 경피적 대동맥판막 삽입술을 시행하고 있으나, 인위적으로 제조한 조직 판막을 삽입하는 것으로서, 결국 대동맥판막 협착증의 근본적인 치료는 여전히 불가능한 실정이다. 따라서, 대동맥판막 협착증의 발병 기전을 개선하여 상기 질환을 근본적으로 치료하기 위한 새로운 치료법의 발굴이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

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

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 미토콘드리아의 기능 및 대사경로와 관련된 유전자들이 대동맥판막 협착증 환자에서 특징적인 발현 변화를 보이고, 미토콘드리아 활성화제가 대동맥판막 협착증의 주요 병리기전인 판막 섬유화 및 석회화를 억제하는 효과가 있음을 확인하여 완성된 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 미토콘드리아 기능 관련 유전자 및/또는 대사경로 조절 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 미토콘드리아 기능 관련 유전자 및/또는 대사경로 조절 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

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

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 방법; 및 이를 위한 정보제공방법을 제공한다:

[0013] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0014] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준을 대조군과 비교하는 단계.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 진단 또는 예후 예측 방법; 및 이를 위한 정보제공방법은 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2,* 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되어 있는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 진단 또는 예후 예측 방법; 및 이를 위한 정보제공방법은 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 진단 또는 예후 예측 방법; 및 이를 위한 정보제공방법은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하여 대조군과 비교하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 미토콘드리아의 수준 또는 기능이 대조군에 비해 저하된 경우 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나, 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체, 및 진공흡입생검 검체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 대조군은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 mRNA 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및 RNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 또한, 본 발명은 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세

트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 진단 또는 예후 예측용 조성물을 포함하는 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 키트는 하기 단계를 포함하는 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0028] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *OPA-1*, *TOM20*, *DRP1*, *SOD2*, *SQOR*, *OXSR1*, *SPARC*, *DNMT1*, *SYNPO*, *PFDN1*, *MXRA7*, 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계;

[0029] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준을 대조군과 비교하는 단계; 및

[0030] (S3) 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OPA-1*, *TOM20*, *DRP1*, *SOD2*, 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되어 있는 경우; 또는 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OXSR1*, *SPARC*, *DNMT1*, *SYNPO*, *PFDN1*, *MXRA7*, 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 증가되어 있는 경우, 피검체를 대동맥판막 협착증으로 판정하거나 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계.

[0031] 뿐만 아니라, 본 발명은 *OPA-1*, *TOM20*, *DRP1*, *SOD2*, *SQOR*, *OXSR1*, *SPARC*, *DNMT1*, *SYNPO*, *PFDN1*, *MXRA7*, 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제의 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 용도를 제공한다.

[0032] 뿐만 아니라, 본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 제제의 제조를 위한 *OPA-1*, *TOM20*, *DRP1*, *SOD2*, *SQOR*, *OXSR1*, *SPARC*, *DNMT1*, *SYNPO*, *PFDN1*, *MXRA7*, 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제의 용도를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 미토콘드리아 활성화제는, 바람직하게는 스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0035] (a) 판막의 석회화를 억제함;

[0036] (b) 판막의 섬유화를 억제함; 및

[0037] (c) 판막간질세포의 골세포화를 억제함.

[0038] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 ALP (Alkaline phosphatase), Osteocalcium, RUNX2, COL1A1, Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현 또는 활성을 억제할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 정상인에 비해 미토콘드리아 수준 또는 기능이 저하되어 있는 대동맥판막 협착증 환자의 치료를 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 뿐만 아니라, 본 발명은 스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0041] 뿐만 아니라, 본 발명은 대동맥판막 협착증 치료용 약제 제조를 위한 스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

[0042] 뿐만 아니라, 본 발명은 스퍼미딘 (Spermidine) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측방법, 및 상기 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 대사경로와 관련된 유전자들의 발현 양상이 변화하고, 미토콘드리아의 기능 및 수준이 저하되어 있으며, 미토콘드리아 활성화제가 대동맥판막 협착증의 주요 병리기전인 판막 섬유화 및 석회화를 억제하는 효과가 있음을 확인하여 완성된 것이다. 따라서, 본 발명을 통해 대동맥판막 협착증의 정확한 진단이 가능할 뿐만 아니라 미토콘드리아 기능 활성화를 통한 대동맥판막 협착증의 근본적인 치료가 가능하므로, 대동맥판막 협착증의 신규한 진단 및 치료 수단으로 적극 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1a는 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 기능 변화를 확인하기 위해 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군으로부터 판막간질세포를 분리한 후 미토콘드리아에 의한 산소 소비율 (oxygen consumption rate, OCR)을 측정한 결과를 나타낸다.

도 1b는 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 기능 변화를 확인하기 위해 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군으로부터 판막간질세포를 분리한 후 미토콘드리아의 ATP 생성량 및 커플링 효율을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군의 판막간질세포의 미토콘드리아 단백질 수준을 상대적으로 비교한 결과를 나타낸다.

도 3은 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군의 판막간질세포의 미토콘드리아를 형광 염료로 염색한 결과를 나타낸다 (Scale bar=20 μm).

도 4a 내지 도 4i는 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군의 대동맥 판막 조직에서 본 발명에 따른 대동맥판막 협착증 바이오마커들의 단백질 수준을 면역화학염색법으로 확인한 결과를 나타낸다 (도 4a, SQOR 단백질 수준 측정 결과; 도 4b, OXSR1 단백질 수준 측정 결과; 도 4c, SPARC 단백질 수준 측정 결과; 도 4d, DNMT1 단백질 수준 측정 결과; 도 4e, SYNPO 단백질 수준 측정 결과; 도 4f, PFDN1 단백질 수준 측정 결과; 도 4g, PYCR1 단백질 수준 측정 결과; 도 4h, SOD2 단백질 수준 측정 결과; 및 도 4i, MXRA7 단백질 수준 측정 결과).

도 5는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막세포에 미토콘드리아 활성화제인 스퍼미딘을 처리한 후 석회화 바이오마커 ALP, Osteocalcium, RUNX2, 및 COL1A1의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다 (A treatment: 스퍼미딘 처리군, 이하 동일).

도 6은 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 스퍼미딘을 처리한 후 섬유화 바이오마커 Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 7은 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포의 골세포화를 유도하면서 스퍼미딘을 처리한 후 Alizarin red S 염색을 통해 골세포화 정도를 측정한 결과를 나타낸다 (IC, DMEM/F12 처리; OM, 골세포화 유도 배지 처리).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명은 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 대사경로와 관련된 유전자들이 특징적인 발현 변화를 보이고, 미토콘드리아의 기능 및 수준이 저하되어 있으며, 미토콘드리아 활성화제가 상기 질환의 주요 병리기전인 판막 섬유화 및 석회화를 억제하는 효과가 있음을 확인하여 완성된 것이다.

[0046] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 대동맥판막 협착증 환자 및 정상 심장을 이식 받은 대조군으로부터 판막간질세포를 각각 확보하여 단백체를 분석 및 비교한 결과, 미토콘드리아 및 대사경로 관련 유전자들이 유의미한 발현 차이를 보이는 것을 확인하였다 (실시예 1).

[0047] 본 발명의 다른 실시예에서는 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 기능 분석 결과, 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아는 대조군에 비해 ATP 생성량 및 커플링 효율이 저하되어 있으며 (실시예 2-1), 주요 미토콘드리아 단백질 OPA-1, Tom20, 및 DRP의 수준이 감소되어 있고 (실시예 2-2), 대동맥판막세포 내 미토콘드리아의 단편화가 발생한 바 (실시예 2-3) 대동맥판막 환자는 미토콘드리아 기능 및 수준이 저하되어 있음을 확인하였다.

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 단백체 분석을 통해 발굴한 미토콘드리아 또는 대사경로 관련 유전자 SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7, 및 PYCR1가 환자 조직에서도 동일한 발현 변화 양상을 보이는 것

을 확인하였다 (실시예 2-4).

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 미토콘드리아 활성화제인 스퍼미딘을 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리한 판막간질세포에 처리한 결과 석회화 및 섬유화 마커들의 수준이 감소하고, 판막간질세포의 골세포화가 억제되는 것을 확인하였다 (실시예 3).

[0050] 상기 실시예를 바탕으로, 본 발명은 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 정보제공방법, 및 대동맥판막 협착증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0052] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.

[0053] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측 방법, 또는 이를 위한 정보제공방법을 제공한다:

[0054] (S1) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0055] (S2) 상기 단계 (S1)에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준을 대조군과 비교하는 단계.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 하기를 만족하는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증 발병 가능성이 높은 것으로 판단하거나; 대동맥판막 협착증으로 판정하거나 (즉, 대동맥판막 협착증이 발병한 것으로 판단하거나); 및/또는 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있다:

[0057] (i) 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2,* 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 감소되어 있음; 및/또는

[0058] (ii) 상기 단계 (S1)에서 측정된 *OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군에 비해 증가되어 있음.

[0059] 본 발명에 있어서, 대동맥판막 협착증 (aortic stenosis, AS)은 좌심실에서 대동맥으로 피가 유출되는 부위에 있는 심장 판막인 대동맥판막이 좌심실이 수축할 때 잘 열리지 않는 질환을 의미하며, 대동맥판막 협착증 환자는 좌심실에서 대동맥으로 혈류가 충분히 나가지 못하므로 흉통, 실신, 호흡 곤란 등을 겪는다. 대동맥판막 협착증의 주요 원인으로는 노화, 판막 석회화 (퇴행), 류마티스, 선천적/구조적 이상, 및 감염성 심내막염 등이 있다. 본 발명에 있어서 대동맥판막 협착증은 바람직하게는 퇴행성 (degenerative) 대동맥판막 협착증이다. 퇴행성 대동맥판막 협착증은 대동맥판막의 퇴행성 변화 (degenerative changes), 즉, 대동맥판막의 지질 침착 (lipid deposition) 및/또는 염증을 수반하는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 대동맥판막의 섬유화 (fibrosis) 및 석회화 (calcification)를 수반하는 것을 특징으로 할 수 있다. 대동맥판막 협착증은 전신의 혈류의 장애를 유발하므로 이로 인해 심장의 수축력이 과하게 증가하면서 심비대로 이어질 수 있으며, 과도한 심장 수축이 지속되면 오히려 심장 근육의 수축력이 저하되어 심부전 증세가 나타날 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측을 위한 바이오마커 유전자들은 미토콘드리아 또는 대사경로 관련 유전자들인 것을 특징으로 한다. 상기 유전자들의 정보는 하기 표 1과 같다. 상기 바이오마커 유전자들은 각각 병기된 Uniprot (https://www.uniprot.org/) ID에 등록된 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

표 1

[0061]

Gene	Description	Uniprot_ID
OPA-1	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	O60313
TOM20	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	Q15388
DRP1	Dynamin-1-like protein	O00429
SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P04179
SQOR	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9Y6N5
OXSR1	Serine/threonine-protein kinase OSR1	O95747
SPARC	SPARC	P09486
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	P26358

SYNPO	Synaptopodin	Q8N3V7
SYNPO	Isoform 2 of Synaptopodin	Q8N3V7-2
PFDN1	Prefoldin subunit 1	O60925
MXRA7	Isoform 2 of Matrix-remodeling-associated protein 7	P84157-2
PYCR1	Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	P32322

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 진단 또는 예후 예측 방법; 또는 이의 정보제공방법은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하여 대조군과 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다. 나아가, 상기 진단 또는 예후 예측 방법; 또는 이의 정보제공방법은 상기 미토콘드리아의 수준 또는 기능이 대조군에 비해 감소되어 있는 경우 상기 피검체를 대동맥판막 협착증 발병 가능성 (위험)이 높은 것으로 판단하거나; 대동맥판막 협착증으로 판정하거나; 및/또는 대동맥판막 협착증의 예후가 나쁠 것으로 판정할 수 있다.

[0064] 본 발명에 있어서, "미토콘드리아 (mitochondria)"는 진핵생물에서 산소를 사용하여 세포에 필요한 에너지(즉, ATP)를 생산하는 이중막 (double membrane)의 세포소기관이다. 미토콘드리아는 산화적 인산화, 시트르산 회로를 통해 ATP를 생산하는것 외에도 신호전달, 세포주기 조절, 분화, 세포사멸, 세포성장 등을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 미토콘드리아의 기능은 산소소모율, ATP 생성율(양), 커플링 효율(coupling efficiency) 등으로 평가할 수 있다. 미토콘드리아의 기능 또는 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 실시간 세포분석기 (Seahorse analyzer)를 이용해 미토콘드리아의 산소소모율, 대사산물 등을 직접 평가할 수 있다.

[0065] 본 발명에 있어서, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상 (subject)의 감수성 (susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후 (prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스 (therametrics) (예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.

[0066] 본 발명에 있어서, "예후" 는 병의 발생, 진행, 치료의 성공 여부, 회복, 재발, 및 약물 내성 등에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 즉, 의학적 귀추 (예컨대, 장기 생존 가능성, 무병생존율 등)에 대한 예상을 의미하며, 양성적 예후 (긍정적 예후) 또는 음성적 예후 (부정적 예후)를 포함하며, 상기 음성적 예후는 재발, 증상 악화 (암의 경우, 종양의 성장, 전이 등), 약 저항성 등의 병의 진행 또는 치명성(mortality)을 포함하고, 양성적 예후는 질병이 없는 상태 등의 질병의 차도, 질병의 개선 또는 안정화(stabilization)를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 있어서 "예후"는 대동맥판막 협착증의 발생, 중증도, 진행 (progression), 재발, 무질병 생존 (disease-free survival), 대동맥판막의 변성 (degeneration) 정도, 및 합병증 발생 여부 등을 종합적으로 고려하여 판단할 수 있다. 상술한 바와 같이, "대동맥판막의 변성"은 대동맥판막의 염증, 섬유화 및/또는 석회화를 포함한다.

[0067] 본 발명에서 사용된 용어, "예측"은 의학적 귀추에 대하여 미리 헤아려 짐작하는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상 대동맥판막 협착증으로 진단받은 환자의 병의 경과 (병의 진행, 개선, 재발, 중증화, 약 저항성 등)를 미리 짐작하는 것을 의미한다.

[0068] 본 발명에 있어서 "생물학적 시료"란 대동맥판막 협착증을 진단하거나 예후를 예측하고자 하는 피검체로부터 채취된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장, 소변, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체, 및 진공흡입생검 검체 등으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 생물학적 시료는 대동맥 판막 조직 및/또는 대동맥 판막 조직에서 유래한 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 생물학적 시료는 판막간질세포 (Cardiac valve interstitial cells)일 수 있다.

[0069] 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0070] 본 발명에 있어서 "대조군 (control)"은 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있다. 바람직하게는, 상

기 정상인은 대동맥판막 협착증 치료 후 완치된 환자, 예컨대 정상 심장을 이식 받은 환자를 포함한다. 또한, 본 발명에 있어서 "피검체"는 인간을 포함한 포유류일 수 있으며, 대동맥판막 협착증을 앓거나 앓는 것으로 의심되는 개체일 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 용어, "측정"은 목적하는 물질 (본 발명의 경우 OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7, 및/또는 PYCR1)의 존재 (발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것 (즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 유전자로부터 발현된 mRNA 및/또는 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. mRNA 또는 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 mRNA 또는 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서 상기 목적 mRNA 및/또는 단백질 검출은 본 발명에 따른 11종의 대동맥판막 협착증 바이오마커 유전자로부터 발현된 mRNA 및/또는 단백질의 존재 여부의 검출, 또는 상기 mRNA 및/또는 단백질 발현량의 증가 (상향 조절) 또는 감소 (하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 용어, "분석"은 바람직하게는 "측정"을 의미하는 것일 수 있고, 상기 정성분석은 목적하는 물질의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있으며, 상기 정량분석은 목적하는 물질의 존재 수준 (발현 수준) 또는 양의 변화를 측정 및 확인하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 본 발명에서 분석 또는 측정은 정성적인 방법과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있으며, 바람직하게는 정량적인 측정이 수행되는 것일 수 있다.

[0073] 본 명세서에 있어서, "수준이 증가되어 있다"는 것은, 검출되지 않던 것이 검출된 것, 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 검출량이 많아지는 것을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.

[0074] 예를 들어, 수준이 "증가"되어 있다는 것은, 실험군의 수준이 대조군의 그것에 비교하여 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 그 이상, 예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 높은, 및/또는 0.5배, 1.1배, 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배 또는 그 이상 높은 것을 의미한다. 구체적으로는, 대조군의 그것에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 증가한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 본 발명에 있어서 단백질 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및/또는 단백질칩 등의 방법으로 측정될 수 있다.

[0076] 본 발명에 있어서 mRNA 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, DNA 칩, 및/또는 RNA 칩 등의 방법으로 측정될 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대동맥판막 협착증의 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0079] (S1) 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;

[0080] (S2) 상기 시험물질을 처리한 시료와 처리하지 않은 대조군 시료에서 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

[0081] (S3) 대조군 시료와 비교해 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2,* 또는 *SQOR*의 mRNA 또는 단백질 수준을 증가시키거나; 또는 *OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질 수준을 감소시킨 시험물질을 대동맥판막 협착증 치료 물질로 선별하는 단계.

[0082] 본 발명에 있어서 "시험물질"은 생물학적 시료 내의 미토콘드리아 기능 및/또는 대사경로 관련 단백질들의 수준 내지 활성 정도에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다.

상기 시험물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 재조합 플라스미드(recombinant plasmid), 나노입자(nanoparticle), 단백질, 올리고펩타이드, 항체, 앱타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어, "대조군"은 시험물질을 처리하지 않은 시료일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0084] 또한, 본 발명은 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및 *PYCR1*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아의 수준 또는 기능을 측정하는 제제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0086] 상기 조성물이 mRNA의 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있다. 상기 콜라겐 유전자들의 mRNA에 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용함으로써 피검체에서 본 발명에 따른 바이오마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.

[0087] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[0088] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(labelling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오티드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0089] 상기 "프라이머" 또는 "프로브"는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 모든 기능적 등가물을 포함한다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0090] 상기 조성물이 단백질의 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앱타머일 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')2 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 본 발명 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메릭 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.

[0092] 본 명세서에서 사용된 용어, "앱타머 (aptamer)"는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앱타머의 제조는 일반적인 앱타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오티드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이나 3' 말단을 앱타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도

록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH_2로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 본 발명 따른 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체 (본 발명에서는 피검체로부터 수득한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

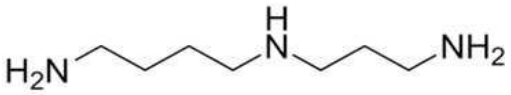
[0094] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 진단 또는 예후 예측용 조성물을 포함하는, 대동맥판막 협착증의 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0095] 본 발명에 있어서, "키트 (kit)"란 특히 조직 또는 세포 시료 내에 포함되어 있는 *OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7,* 및/또는 *PYCR1*의 mRNA 또는 단백질의 양을 측정하여 대동맥판막 협착증을 진단하거나 예후를 예측할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 상기 유전자들의 발현량을 측정할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 따라서, 본 발명의 키트에는 표적 단백질을 마커로 인식하는 항체 또는 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머 세트, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 키트는 본 발명에 따른 바이오마커 펩티드가 코팅된 플레이트, 항체-펩티드 결합을 검출하기 위한 효소 및/또는 발광 반응을 위한 기질, 세척 용액, 대조군 시료 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0096] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 활성화제인 스퍼미딘 (Spermidine) 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대동맥판막 협착증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0097] 본 발명에 있어서 "스퍼미딘 (Spermidine)"은 리보솜 등에서 발견되는 지방족 폴리아민으로 사람의 정액에서 처음 발견되었다. 대사회로상에서는 퓨트레신 (putrescine), 스퍼민 (spermine)의 중간단계의 물질인데, 아민기를 여러 개 포함하고 있어 양전하를 가지므로, 음전하를 띠는 DNA나 세포막 등과 반응하여 이들을 안정화시키고, 암모니아 등을 무독한 형태로 저장하여 세포 스트레스를 줄인다. 또한, 스퍼미딘은 SOD (Superoxide dismutase)와 CAT의 활성화를 통해 미토콘드리아 내의 활성산소 환경을 개선시켜 미토콘드리아의 기능을 강화시킬 수 있는 미토콘드리아 활성화제로 기능한다. 또한 스퍼미딘은 SIRT1 및 PGC-1α의 신호전달경로를 활성화시킴으로써 PGC-1α의 미토콘드리아 내 유입을 유도하고, 이를 통해 미토콘드리아의 생합성과 관련된 단백질들의 발현을 촉진하여 미토콘드리아 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 스퍼미딘은 하기 화학식 1로 표시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0098] [화학식 1]

[0099] 

[0100] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 조성물은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있다: (a) 판막의 석회화를 억제함; (b) 판막의 섬유화를 억제함; 및 (c) 판막간질세포의 골세포화를 억제함. 바람직하게는, 상기 판막은 대동맥판막이다.

[0101] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 ALP (Alkaline phosphatase), Osteocalcium, RUNX2, COL1A1, Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 판막간질세포에서 상기 단백질들의 발현 또는 활성을 억제할 수 있다.

[0102] 본 발명에 있어서, ALP (Alkaline phosphatase), Osteocalcium, RUNX2, 및 COL1A1은 판막 석회화의 바이오마커로서, 이들의 발현 또는 활성 수준이 높을수록 판막 석회화가 높은 수준으로 일어났음을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 대동맥판막 석회화 억제용 조성물로 활용될 수 있다.

[0103] 본 발명에 있어서, Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9는 판막 섬유화의 바이오마커로서, 이들의 발현 또는 활성 수준이 높을수록 판막 섬유화가 높은 수준으로 일어났음을 의미한다. 따라서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 대동맥판막 섬유화 억제용 조성물로 활용될 수 있다.

[0104] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 정상인에 비해 미토콘드리아 수준 또는 기능이 저하되어 있는 대동맥판막 협착증 환자의 치료를 위한 것일 수 있다. 또는, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 대동맥판막에 석회화 및/또는 섬유화가 일어난 대동맥판막 협착증 환자; 또는 ALP (Alkaline phosphatase), Osteocalcium, RUNX2, COL1A1, Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이 (발현 또는 활성의 증

가)를 수반한 대동맥판막 협착증 환자의 치료를 위한 것일 수 있다.

[0105] 본 명세서에서 사용된 용어, “약학적으로 허용 가능한”이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체 (예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범주 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.

[0106] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0107] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0108] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.

[0109] 본 발명의 조성물 내의 상기 스퍼미딘, 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0110] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0111] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0112] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0113] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0114] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0115] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0116] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예

를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0117] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0118] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0119] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0120] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0122] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[0124] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0126] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0128] **[실험방법]**

[0129] <u>인간 대동맥판막 조직의 확보</u>

[0130] 대동맥판막 협착증이 있거나 없는 환자의 대동맥판막 조직은 대동맥판막 교체 또는 심장 이식이 이루어질 때 얻었다. 모든 환자는 임상적으로 류마티스 관절염이 없었다. 본 발명의 실시예는 헬싱키 선언 (Declaration of Helsinki)를 준수하였으며, 서울 아산병원 기관 심사위원회 (Institutional Review Board, IRB)가 인체 시료 수득을 위한 연구 프로토콜을 승인하였고, 모든 환자로부터 서면 동의를 얻었다.

[0132] <u>일차 대동맥판막 간질 세포 (primary aortic valve interstitial cells)의 분리</u>

[0133] 확보한 인간 대동맥 판막의 한 개 엽 (leaflet)을 4 내지 5 조각으로 절단한 후 콜라겐분해효소(collagenase)와 37 ℃에서 30분간 반응시켜 대동맥판막 내피세포 (endothelial cells)을 제거하였다. 이어서, 37 ℃에서 1.5시간 동안 추가 배양하여 대동맥판막 간질세포 (aortic valve interstitial cells, AVICs)를 수득했다. 단리된 인간 AVIC은 1% 항세균-항진균제 및 10% FBS가 함유된 DMEM/F12에서 배양했다. 패시지(passages)가 2 내지 5인 세포만을 웨스턴 블롯 등의 실험에 사용하였다.

[0135] <u>웨스턴 블롯 (Western blot)</u>

[0136] 수득한 대동맥판막 및 단리된 대동맥판막간질세포를 단백질분해효소 억제제와 혼합한 1X RIPA 용액으로 균질화(homogenization)한 후, 용해물을 SDS-PAGE 젤에 로딩(loading)했다. 분리된 단백질은 PVDF 막에 트랜스퍼(transfer) 하였으며, 이어서 PVDF 막을 상온에서 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하였다. 트랜스퍼가 완료된 PVDF 막은 1차 항체 및 2차 항체와 인큐베이션하여 단백질 수준을 측정했다. 본 실험에 사용된 1차 항체의 정보는 다음과 같다: 항-OPA-1 항체 (CST-67589, Cell signaling), 항-TOM20 항체 (CST-42406, Cell signaling), 항-DRP1 항체 (CST-8570, Cell signaling), 모두 1:1000의 비율로 사용함.

[0138] <u>면역조직화학 (Immunohistochemistry) 염색법</u>

[0139] 조직 고정 (fixation) 및 수크로오스 처리 (sucrose skinking) 단계 등을 통해 제조한 동결 조직 블록 (block)은 마이크로톰 (microtome)을 이용해 8 μm 두께로 절단하였다. 절단된 조직은 0.025% Triton X-100을 함유한 TBS로 세척하였고, 블로킹 용액 (blocking solution) (Dako, X0909)으로 실온에서 30분간 인큐베이션(incubation) 하였다. 3회의 세척 단계 후, 4℃에서 밤새 일차 항체 항-SQOR-항체 (PA5-53549, Invitrogen, 1:100 희석), 항-OXSR1-항체 (A301-579A, Invitrogen, 1:100 희석), 항-SPARC-항체 (33-5500, Invitrogen, 1:1000 희석), 항-DNMT1-항체 (MA5-32547, Invitrogen, 1:100 희석), 항-SYNPO-항체 (ab259976, abcam, 1:50 희석), 항-PFDN1-항체 (11033-2-AP, Proteintech, 1:100 희석), 항-PYCR1-항체 (PA5-89175, Invitrogen, 1:500 희석), 항-SOD2-항체 (CST-13141, CST, 1:20 희석), 항-MXRA7-항체 (PA5-60840, Invitrogen, 1:200 희석)를 조직 슬라이드에 처리하였으며, 동시에 음성 대조군으로 TBS를 처리하였다. 그 후 세척액으로 조직을 5분씩 2회 헹군 후, 내인성 퍼옥시데이즈 (peroxidase) 활성을 소거 (quenching)하기 위해 상온에서 10분간 퍼옥시데이즈 블로킹 용액에서 인큐베이션하였다. 2회의 세척 후, 상온에서 30분간 2차 항체 (Dako REAL Envision detection system, Dako, K5077)를 처리하였다. 이어서 항체 용액을 세척해내고, 조직을 DAB+ 크로모젠(chromogen) 및 기질 용액(substrate buffer) (Dako, K5077) 혼합 용액에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 반응을 중단시키기 위해 조직을 물에 담그고, 헤마톡실린 (hematoxylin)으로 2분간 염색하였다. 그 후, 조직을 탈수 및 투명화 과정을 통해 마운팅 (mounting)한 후 현미경으로 관찰하였다.

[0141] <u>단백체 분석 방법</u>

[0142] (1) 단백질 추출 및 peptide 제조

[0143] 조직으로부터 분리된 각 대동맥판막 간질세포 (aortic valve interstitial cells, AVICs)는 5% Sodium Dodecyl Sulfate, 50mM Triethy Ammonium Bicarbonate (pH 8.5) 버퍼 100ul로 lysis를 수행하고 20% sonification을 1분간 수행 후 80 ℃에서 5분간 가열하여 단백질을 추출하였다. 1,500 rpm으로 원심분리하여 상층액을 확보하고 이를 Bicinchoninic acid (BCA) assay를 수행하여 단백질 정량을 수행하였다. 총 300g 에 해당되는 각 시료에 대해 최종 10 mM이 되도록 1,4-디티오트레이톨 (1,4-Dithiothreitol)을 첨가하고 95 ℃에서 10분 동안 반응시켜 이황화결합을 환원시켰다. 그 후, 알킬화를 위해 20 mM이 되도록 아이오도아세트아미드 (iodoacetamide)를 첨가하여 암조건하에 실온에서 30분 동안 반응시키고, 6μg의 트립신/라이스씨 혼합물로 37 ℃에서 18시간동안 분해시켰다. 펩티드를 융출하여 콜드 트랩 (CentriVap Cold Traps, LABCONCO)으로 동결 건조하고 사용할 때까지 -80 ℃에서 보관하였다. 액체 크로마토 그래피-탠덤 질량 분석법 (LC-MS/MS) 분석 전에 건조된 펩티드 샘플을 버퍼 A (0.1 % formic acid in HPLC water)로 녹이고 총 펩티드 농도를 UV/Vis 분광 광도계 (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific)로 흡광도를 측정하였다. 파장 280 nm, 샘플 유형 옵션이 "1 Abs = 1 mg/mL"로 설정되었다.

[0145] (2) LC-MS 분석

[0146] iRT-Kit (Biognosys AG, Schlieren, Switzerland)에서 제공하는 iRT 표준을 1/10 부피로 샘플에 추가하여 공급업체 지침 (참고논문: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22577012/)에 따라 머무름 시간을 보정하였다. 각 샘플의 총량은 40μg이며 40μL에 용해하였다. 주입된 4 μL의 샘플은 다음 LC-MS/MS 설정과 함께 SCIEX TripleTOF 5600+ 시스템 질량 분석기를 사용하여 분석되하였다. LC 분리를 위해 nanoLC 425 (Eksigent, Dublin, CA, USA)를 Eksigent 마이크로 트랩 C18컬럼 (ChromXP C18CL, 5 μm, 120 Å)과 분석 컬럼으로서 Eksigent 컬럼 (C18-CL, 0.3 x 150 mm, 입자 크기 3 μm, 기공 크기 120 Å)을 함께 컬럼 온도가 40 ℃로 유지

되도록 하였다. 샘플을 버퍼 A를 사용하여 10μL/min의 유속으로 트랩 컬럼에 로드하였다. 10분 후, 펩티드 혼합물은 버퍼 A와 버퍼 B (0.1 % formic acid in HPLC acetonitrile)을 사용하여 57 분에 의해 5μL/분으로 유속으로 농도구배를 통한 분리를 수행하였다. 버퍼 B를 38분 동안 3-25% 변경하고, 5분 동안 25-32% 변경하고, 2분 동안 32-80% 변경하고, 3분 동안, 80%로 유지하고, 3분 동안 80-3% 변경하고, 8분 동안 3%로 유지하였다. 개별 샘플의 경우 모든 질량 분석 실행은 SCIEX 기술 노트에 따라 100개의 가변 창을 사용하여 모든 이론적 질량 스펙트럼 (SWATH) 모드의 순차 창 수집에서 작동되었다. SWATH 매개 변수는 다음과 같이 설정되었다: Lower m/z limit 400; m/z 상한선 1250; 윈도우 오버랩 (Da) 1.0; CES는 작은 창에 대해 5, 큰 창에 대해 8, 가장 큰 창에 대해 10. MS2 스펙트럼은 고감도 모드에서 2.5ms 동안 100-1500m/z 범위에서 수집되었으며 총 사이클 시간은 2.8초였다. 다른 MS 파라미터는 다음과 같이 설정되었다: 이온 소스 가스 1 (GS1) 15 psi; 이온 소스 가스 2 (GS2) 20 psi; 커튼 가스 (CUR) 30 psi; 온도 (TEM) 250 ° C; 이온 스프레이 전압 부동 (ISVF) 5500V.

[0147] 펩티드로 제조된 시료들을 LC-MS로 분석함에 있어서 분석 간 Batch별 bias를 최소화하기 위해 무작위로 혼합하여 순차적으로 SWATH LC-MS 분석을 수행하여 스펙트럼 (spectrum) 결과를 획득하였다. 해당 결과 스펙트럼 (spectrum)들을 DIA-NN software (https://github.com/vdemichev/DiaNN)와 Pan-human proteome library를 이용하여 정성적으로 단백체 분석을 수행하였다.

[0149] **(3) 단백체 결과로부터 DEPs (Differentially expressed proteins) 선별**

[0150] 대동맥판막 협착증 환자와 대조군의 단백체로부터 차별적 발현 단백질들 (DEPs)을 선별하기 위해 모든 데이터는 연속 변수의 경우 평균 (± 표준편차) 또는 중앙값 (사분위수 범위; interquartile range, IQR)으로 나타냈으며, 범주형 변수의 경우 카운트 (%)로 나타냈다. 연속 변수에 대해서는 Student *t*-검정 또는 Mann-Whitney *U* 검정으로, 범주형 변수에 대해서는 카이-제곱 또는 Fisher 정확 검정을 통해 데이터를 비교했다. 그룹간 차이를 평가하기 위해 분산분석 (ANOVA) 및 카이-제곱 검정을 수행했다. 모든 검정은 양측검정 (two-sided)로 수행했으며, *P* 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의미한 것으로 간주했다. 모든 통계 분석은 Social Sciences version 22.0의 Statistical Package으로 수행했다 (IBM Corp.). DEP들은 q value가 0.05 이하이면서 Log2 ratio가 -1.0 이하 또는 1.0 이상인 범주를 만족하는 단백질들로 선별하였다. 기능적인 연관성을 분석하기 위해 Gene Ontology (GO) 분석은 DEPs의 Uniprot accession nuberm를 ShinyGO (http://bioinformatics.sdstate.edu/go/, version 0.741)을 이용하여 biological process, cellular compartment 및 molecular function 3가지 영역에서 *p* value이 0.05 이하를 만족하는 ontology를 선택하였다.

[0152] <u>Seahorse 분석</u>

[0153] 미토콘드리아 세포 호흡을 측정하기 위해서 Seahorse XF24 Analyzers (Agilent)를 이용하였다. 이를 위해 XF Cell Mito Stress Test Kit (103015-100, Agilent) 및 XF FluxPacks mini (100867-100, Agilent) 키트를 사용하여 실험을 진행하였으며, 구체적인 실험 방법은 다음과 같다: 대동맥판막 간질 세포를 웰당 4 × 10^4 cells 수로 37 ℃ CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 다음날 Sensor Cartridge Ports에 2 μM oligomycin, 1 μM FCCP, 0.5 μM Rotenone & antimycin A을 처리하였다. 이 때 전날에 배양한 cell plate를 37 ℃ Non-CO_2 incubator에 1시간 배양하였다. 준비가 완료된 후 Seahorse XF24 Analyzers 기계에 Sensor Cartridge plate를 넣고 Calibration 하였다. Calibaration이 끝난 후에 Non-CO_2 incubation 중인 cell plate를 기계에 넣고 미토콘드리아 세포 호흡을 측정하였다. 분석은 WAVE software (Seahorse Biosciences)를 사용하였다.

[0155] <u>MitoTracker 염색</u>

[0156] 세포 내 미토콘드리아가 막 전위에 따라 축적되는 것을 적색 형광 염료인 MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, M7512)로 관찰하여 대동맥판막 협착증 환자와 대조군인 심장이식 환자의 판막간질세포의 미토콘드리아를 비교하였다. 먼저 판막간질세포를 웰당 8×10^4 cells 수로 20 mm dish에 하루 동안 배양했다. 다음날 1 mM MitoTracker stock solution을 최종 농도가 500 nM가 되도록 serum free media로 희석하여 세포에 처리한 후 30분간 37 ℃에서 incubation 하였다. 30분 후에, serum free media를 이용하여 세포를 washing 하였다. 이어 세포를 고정하기 위해서 3.7% formaldehyde (complete growth medium)를 처리하고 15분간 37 ℃에서

incubation 하였다. 15분 후에 PBS로 세포를 2~3번 washing 하였다. Washing 후 PBS용액에 0.2% Triton X-100로 만든 버퍼를 10분간 세포에 처리하여 permeabilization 하였다. 그리고 핵 염색을 위해 DAPI를 세포에 5분간 incubation 한 후에 0.2% Triton X-100 in PBS 용액으로 washing 하였다. 마지막으로 mounting solution를 세포에 한 두 방울 떨어뜨린 후에 coverslip으로 덮어준 후 실온에서 하루 동안 두었다. Mounting solution이 다 굳은 후 confocal microscopy를 이용하여 세포의 형광사진을 촬영했다.

[0158] <u>통계 분석</u>

[0159] 모든 데이터는 연속 변수의 경우 평균 (± 표준편차) 또는 중앙값 (사분위수 범위; interquartile range, IQR)으로 나타냈으며, 범주형 변수의 경우 카운트 (%)로 나타냈다. 연속 변수에 대해서는 Student *t*-검정 또는 Mann-Whitney *U* 검정으로, 범주형 변수에 대해서는 카이-제곱 또는 Fisher 정확 검정을 통해 데이터를 비교했다. 그룹간 차이를 평가하기 위해 분산분석 (ANOVA) 및 카이-제곱 검정을 수행했다. 모든 검정은 양측검정 (two-sided)로 수행했으며, P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의미한 것으로 간주했다. 모든 통계 분석은 Social Sciences version 22.0의 Statistical Package으로 수행했다 (IBM Corp.).

[0161] [실시예]

[0162] **실시예 1. 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질세포의 단백체 분석**

[0163] 대동맥판막 협착증 환자에서 특이적으로 수준이 변화하는 단백질을 확인하기 위해 대동맥판막 협착증 환자 및 정상 심장을 이식 받은 환자 (대조군)으로부터 판막간질세포를 확보하고, 이의 단백체를 비교 분석하였다.

[0164] 분석 결과는 하기 표 2에 나타냈다. 대동맥판막 협착증 환자와 대조군의 단백체를 종합적으로 비교한 결과, 미토콘드리아 및 대사경로와 관련된 유전자들이 환자 및 대조군간에 유의미한 발현 차이를 보이는 것을 확인하였다. 상기 결과는 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 세포의 대사경로 조절에 비정상적인 변화가 나타난다는 것을 시사한다.

표 2

[0165]

Prot_ID	First Prot_ID	`Gene	Description	q-value(AS/N)	log2(AS/N)
P08729;Q14CN4;Q14CN4-2;Q14CN4-3	P08729	`KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	0.031607	1.73046
O95747;Q9UEW8;Q9UEW8-2	O95747	`OXSR1	Serine/threonine-protein kinase OSR1	0.012105	1.6879
P05783	P05783	`KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	0.025705	1.61502
P05783;P08727	P05783	`KRT18	Keratin, type I cytoskeletal 18	0.021774	1.55803
P08729	P08729	`KRT7	Keratin, type II cytoskeletal 7	0.021428	1.55074
P26358;P26358-2	P26358	`DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	0.012105	1.43044
O60925	O60925	`PFDN1	Prefoldin subunit 1	0.016647	1.33313
P20908;P20908-2	P20908	`COL5A1	Collagen alpha-1(V) chain	0.013126	1.10566
P06454;P06454-2	P06454	`PTMA	Prothymosin alpha	0.000843	1.09458
Q8N3V7-2	Q8N3V7-2	`SYNPO	Isoform 2 of Synaptopodin	0.011167	1.05168
Q8N3V7;Q8N3V7-2	Q8N3V7	`SYNPO	Synaptopodin	0.036379	1.04145
P09486	P09486	`SPARC	SPARC	0.000719	1.03172
P84157-2	P84157-2	`MXRA7	Isoform 2 of Matrix-remodeling-associated protein 7	0.019876	1.01852
P26022	P26022	`PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	0.000988	-1.94217
P00352;P05091	P00352	`ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1	0.031607	-1.68892
Q9UGT4	Q9UGT4	`SUSD2	Sushi domain-containing protein 2	0.007398	-1.61476

P04179	P04179	`SOD2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0.012022	-1.59793
P00325	P00325	`ADH1B	All-trans-retinol dehydrogenase [NAD(+)] ADH1B	0.019876	-1.5674
P30838	P30838	`ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	0.046584	-1.51866
P00325;P00326	P00325	`ADH1B	All-trans-retinol dehydrogenase [NAD(+)] ADH1B	0.036554	-1.51548
P36269;P36269-3	P36269	`GGT5	Glutathione hydrolase 5 proenzyme	0.01265	-1.50446
P02545	P02545	`LMNA	Prelamin-A/C	0.018014	-1.48076
O95837	O95837	`GNA14	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14	0.031607	-1.31863
Q9H8H3	Q9H8H3	`METTL7A	Methyltransferase-like protein 7A	0.01121	-1.3132
P30838;P51648;P51648-2	P30838	`ALDH3A1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	0.036788	-1.25731
Q9Y6N5	Q9Y6N5	`SQOR	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0.003569	-1.24756
Q01628	Q01628	`IFITM3	Interferon-induced transmembrane protein 3	0.002577	-1.2359
Q9Y2J2;Q9Y2J2-2	Q9Y2J2	`EPB41L3	Band 4.1-like protein 3	0.006341	-1.23581
O00560;O00560-2;O00560-3	O00560	`SDCBP	Syntenin-1	0.028369	-1.22258
P52895	P52895	`AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1 member C2	0.018468	-1.1788
P50135	P50135	`HNMT	Histamine N-methyltransferase	0.005316	-1.11981
Q03169	Q03169	`TNFAIP2	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	0.03826	-1.11018
P43490	P43490	`NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	0.012105	-1.0925
O14495	O14495	`PLPP3	Phospholipid phosphatase 3	0.003264	-1.07461
P50453	P50453	`SERPINB9	Serpin B9	0.02016	-1.06923
Q13228;Q13228-4	Q13228	`SELENBP1	Methanethiol oxidase	0.000719	-1.05752
P07585	P07585	`DCN	Decorin	0.007725	-1.03946
Q16678	Q16678	`CYP1B1	Cytochrome P450 1B1	0.009895	-1.0215
Q8WWM9	Q8WWM9	`CYGB	Cytoglobin	0.03826	-1.01176

[0167] **실시예 2. 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 기능 저하 확인**

[0168] **2-1. 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 기능 분석**

[0169] 실시예 1를 통해 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질세포에서 미토콘드리아 및 이의 대사경로 관련 단백질에 유의미한 발현 변화가 발생하는 것을 확인하였으므로, 대동맥판막 협착증 환자에서 실제로 미토콘드리아 기능에 변화가 있는지 확인하였다. 대동맥판막 협착증 환자 (n=10) 및 대조군 (심장이식 환자; n=10)으로부터 각각 판막간질세포를 분리하였으며, 미토콘드리아 기능을 비교하기 위해 Seahorse 분석을 수행했다.

[0170] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 미토콘드리아 호흡의 지표인 산소 소비율 (oxygen consumption rate, OCR)이 대조군에 비해 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질세포에서 유의미하게 감소하였다. 또한, 미토콘드리아에 의한 ATP 생성량 및 미토콘드리아의 에너지 생성 효율을 나타내는 커플링 효율 (coupling efficiency) 역시 대조군에 비해 대동맥판막 협착증 환자에서 유의미하게 감소한 것으로 나타났다 (도 1b). 상기 결과들은 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능이 저하된다는 것을 보여준다.

[0172] **2-2. 대동맥판막 협착증 환자의 미토콘드리아 단백질 수준 분석**

[0173] 이어서, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리한 판막간질세포를 이용하여, 실제로 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘트리아 관련 단백질들의 발현에 변화가 있는지 확인하였다.

[0174] 이에, 대동맥판막 협착증 환자 및 대조군 (정상 심장이식 환자)로부터 각각 판막간질세포를 분리한 후 웨스턴 블롯을 통해 주요 미토콘드리아 단백질인 OPA-1, Tom20, 및 DRP의 수준을 확인했다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 대조군과 비교하여 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아 단백질 OPA-1, Tom20, 및 DRP의 발현이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 상기 결과는 미토콘드리아 단백질들이 대동맥판막 협착증 진단을 위한 바이오마커가 될 수 있음을 보여준다.

[0176] **2-3. 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질세포의 미토콘드리아 관찰**

[0177] 상기 실시예를 통해 대동막 판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 마커 단백질들의 발현이 저하됨을 확인하였으므로, 실제로 미토콘드리아의 형태 및 기능에 변화가 있는지 검증하기 위해 살아있는 세포에서 미토콘드리아를 직접 관찰하였다.

[0178] 구체적으로, 대동맥판막 협착증 환자와 대조군으로부터 판막간질세포를 분리한 후 적색 형광 염료인 Mitotracker™ Red CMXRos (Invitrogen)를 상술한 Mitotracker 염색 실험방법에 따라 사용하여 세포 내의 미토콘드리아의 막 전위에 따라 축적된 염료를 관찰하였다. 결과는 도 3에 나타냈다. 대조군의 경우 미토콘드리아를 나타내는 적색 형광 염료가 세포질 내에 높은 수준으로 분포되어 있었으나, 대동맥 판막 환자의 경우 대조군과 비교하여 염색된 미토콘드리아 수준이 현저하게 낮을 뿐만 아니라, 미토콘드리아가 단편화 (fragmentation)된 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 수준 및 기능이 저하되어 있다는 것을 뒷받침 한다.

[0180] **2-4. 대동맥판막 협착증 환자의 조직 내 미토콘드리아 마커 및 대사경로 마커 발현 확인**

[0181] 실시예 1에서 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질세포의 단백체 분석을 통해 정상인 (정상 심장을 이식 받은 환자)과 대비하여 유의미한 발현 변화를 나타내는 미토콘드리아 단백질을 확인한 바, 실제 환자 조직에서도 단백체 분석 결과와 동일한 양상이 나타나는지 검증하였다.

[0182] 구체적으로, 대동맥판막 협착증 환자 및 정상인으로부터 대동맥 판막 조직을 확보하였으며, 실시예 1에서 대조군 대비 대동맥판막 협착증 환자에서 유의미한 발현 변화를 보인 미토콘드리아 마커 단백질 SQOR, SOD2, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7, 및 PYCR1 각각에 대한 항체를 사용해 면역조직화학염색을 수행하였다. 결과는 도 4a 내지 도 4i에 나타냈다.

[0183] 도면에서 확인 가능한 바와 같이, 단백체 분석 결과 대동맥판막 협착증 환자에서 발현이 감소하는 것으로 확인된 SQOR (Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial) 및 SOD2 (Superoxide dismutase 2, mitochondrial) 단백질은 실제 환자의 대동맥 판막 조직에서도 대조군 (정상 판막)에 비해 발현이 현저히 감소되어 있는 것을 확인하였다 (도 4a 및 4h). 마찬가지로, 단백체 분석을 통해 대동맥판막 협착증 환자에서 발현이 증가되는 단백질로 선별된 OXSR1 (Serine/threonine-protein kinase), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1), SYNPO (Synaptopodin), PFDN1 (Prefoldin subunit 1), PYCR1 (Pyrroline-5-carboxylate reductase 1) 단백질, 및 MXRA7 (Matrix-remodeling-associated protein 7) 단백질은 대조군에 비해 대동맥판막 협착증 환자의 판막 조직에서 발현이 유의하게 높은 것으로 나타났다 (도 4b 내지 4g, 및 도 4i).

[0184] 상기 결과들은 단백체 분석을 통해 대동맥판막 협착증-특이적으로 증가 또는 감소하는 마커로 선별된 미토콘드리아 단백질들이 실제 환자 조직에서도 동일한 양상을 가지며, 따라서 상기 미토콘드리아 단백질들이 대동맥판막 협착증 진단을 위한 바이오마커로 활용될 수 있음을 보여준다.

[0186] **실시예 3. 미토콘드리아 기능 활성화제의 대동맥판막 협착증 치료 효과 확인**

[0187] 실시예 1 및 2를 통해 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 기능 및 수준이 특이적으로 감소되어 있음을

확인하였으므로, 미토콘드리아 기능 활성화제가 대동맥판막 협착증을 개선할 수 있는지 확인하였다. 미토콘드리아의 활성화제로 알려진 스퍼미딘 (Spermidine)은 초과산화물 불균등화효소 2 (Superoxide dismutase 2, SOD 2)를 활성화하는 것으로 알려져 있으며, 이외의 기전으로도 미토콘드리아의 ATP 생성능 및 커플링 효율을 증진시켜 미토콘드리아의 기능을 개선하는 것으로 알려진 물질이다. 본 발명자들은 스퍼미딘을 잠재적인 대동맥판막 협착증의 치료제로 선별하여, 이의 치료 효과를 확인하였다.

[0189] **3-1. 미토콘드리아 기능 활성화제의 대동맥 판막 석회화 개선 효과 확인**

[0190] 먼저, 미토콘드리아 활성화제 스퍼미딘이 미토콘드리아 기능을 활성화하여 대동맥판막 협착증을 개선시키는지 확인하였다. 석회화 (calcification)는 칼슘이 침착되는 상태를 의미하는데, 대동맥 판막에 칼슘이 침착되면 판막이 두꺼워지고 딱딱해지면서 대동맥판막 협착증을 유발한다. 이에, 스퍼미딘 처리에 따른 석회화 마커 수준의 변화를 측정하여 스퍼미딘이 대동맥판막 협착증의 병리기전인 석회화를 개선할 수 있는지 확인하였다.

[0191] 구체적으로, 정상 판막을 가진 심장이식 환자 (대조군) 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포에 10, 50, 또는 100 μM 농도의 스퍼미딘을 24시간 동안 처리한 후, 판막 석회화의 대표적인 마커인 ALP, Osteocalcin, RUNX2, 및 COL1A1의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 대동맥판막 협착증 환자의 판막간질 세포에서는 대조군에 비해 석회화 마커 ALP, Osteocalcin, RUNX2, 및 COL1A1의 mRNA 발현이 크게 증가되어 있었으나, 스퍼미딘이 처리됨에 따라 상기 마커들의 발현이 모두 감소하였으며, 이와 같은 발현 감소 양상은 스퍼미딘의 농도에 의존적인 것으로 나타났다. 상기 결과는 미토콘드리아 기능 활성화제인 스퍼미딘이 대동맥 판막의 석회화를 효과적으로 억제할 수 있으며, 이를 통해 대동맥판막 협착증을 개선할 수 있음을 보여준다.

[0193] **3-2. 미토콘드리아 기능 활성화제의 대동맥 판막 섬유화 개선 효과 확인**

[0194] 다음으로, 스퍼미딘이 미토콘드리아 기능의 활성화를 통해 대동맥 판막 섬유화를 개선하는지 확인하였다. 섬유화 (fibrosis)는 장기 내 섬유질 결합조직이 과도하게 형성되면서 장기의 일부가 단단하게 굳는 현상을 의미한다. 대동맥판막협착증 환자에서 심장 근육 섬유화가 생기면 예후가 더욱 악화되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 스퍼미딘이 판막세포의 석회화를 억제할 수 있는지 확인하였다.

[0195] 대조군 또는 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막세포에 10, 50, 또는 100 μM 농도의 스퍼미딘을 24시간 동안 처리한 후, 판막 섬유화 관련 단백질인 Fibronectin 1, MMP2, 및 MMP9의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과, 대동맥판막 협착증 환자-유래 판막세포는 정상 판막 세포에 비해 섬유화 마커들의 mRNA 발현이 크게 증가하였으나, 스퍼미딘의 처리에 따라 농도-의존적으로 섬유화 마커들 모두 발현이 감소하였으며, 100 μM의 농도로 처리하였을 때에는 정상 판막 세포 수준으로 감소한 것을 확인하였다 (도 6). 상기 결과는 미토콘드리아 활성화제인 스퍼미딘이 판막의 석회화뿐만 아니라 섬유화도 효과적으로 억제하여 대동맥판막 협착증의 증상 및 예후를 개선할 수 있음을 보여준다.

[0197] **실시예 3-3. 미토콘드리아 기능 활성화제의 골세포화 억제 효과 확인**

[0198] 판막간질세포의 골세포화 (osteogenic differentiation)는 대동맥판막 협착증에 동반되는 대표적인 세포성 변화 중 하나로, 판막의 칼슘 침착 및 섬유화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이에, 스퍼미딘의 대동맥판막 협착증 치료 효과를 검증하기 위해, 스퍼미딘이 판막간질세포의 골세포화에 미치는 영향을 관찰하였다.

[0199] 구체적으로, 대동맥판막 협착증 환자로부터 분리된 판막간질세포를 골세포화 유도 배지 (50 μM L-ascorbic acid, 10 mM beta-glycerophosphate, 및 100 nM Dexamethasone를 함유한 DMEM (11995-065, Gibco))에서 배양하여 골세포화를 유도하는 동시에 스퍼미딘을 10, 20, 또는 30 μM 농도로 함께 처리하여 배양하였으며, Alizarin Red S 염색 (S0876, SIGMA)을 제조사의 설명에 따라 수행한 뒤 562 nm에서의 흡광도를 측정하여 판막간질세포의 골세포화 분화 정도를 확인했다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 일반 배지 (DMEM/F12 (1330-032, Gibco); IC)에서 배양하였을 때에 비해 골세포화 유도 배지에서 판막간질세포를 배양하였을 때 상기 세포로부터 분화된 골세포의 수준이 급증하였으나, 골세포화 유도 배지와 함께 스퍼미딘을 처리한 경우 골세포 수준이 절반 수준으로 유의하게 감소하였다. 상기 결과는 스퍼미딘이 판막간질세포의 골세포화를 억제하는 효과가 있으며, 따라서 골세포화로 인한 섬유화 및 석회화를 개선하여 대동맥판막 협착증을 치료할 수 있음을

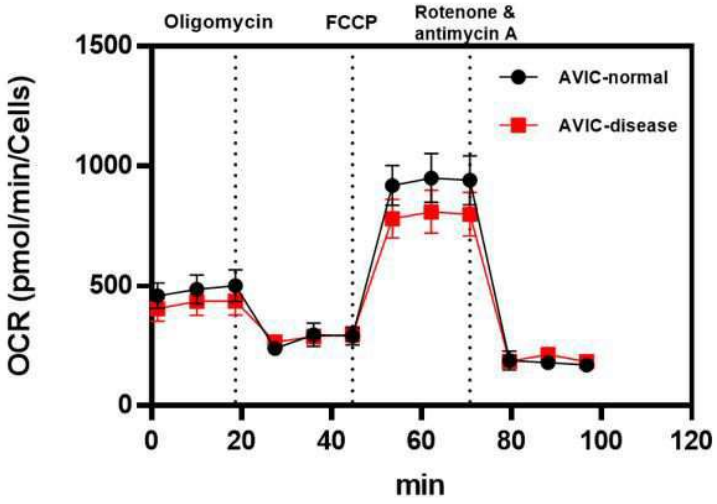
시사한다.

[0201] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 실제 대동맥판막 환자로부터 유래한 시료의 분석을 통해 대동맥판막 협착증 환자에서 미토콘드리아의 수준 및 기능 저하가 특징적으로 나타난다는 것을 규명하였으며, 주요 미토콘드리아 및 대사경로 관련 단백질 (OPA-1, TOM20, DRP1, SOD2, SQOR, SOD2, OXSR1, SPARC, DNMT1, SYNPO, PFDN1, MXRA7, 및 PYCR1)이 대동맥판막 협착증의 진단을 위한 바이오마커로 활용될 수 있음을 제시하였다. 나아가, 본 발명자들은 미토콘드리아 기능 활성화제인 스퍼미딘이 대동맥판막 협착증 환자의 판막세포에서 대동맥판막 협착증의 주요 병리기전인 석회화, 섬유화, 및 골세포화를 효과적으로 억제하여 대동맥판막 협착증을 개선 내지 치료할 수 있음을 확인하였다. 종합적으로, 본 발명은 미토콘드리아를 이용한 대동맥판막 협착증 진단방법 및 치료방법을 제시한바, 대동맥판막 협착증의 진단 및 치료 분야에서 적극 활용될 것으로 기대된다.

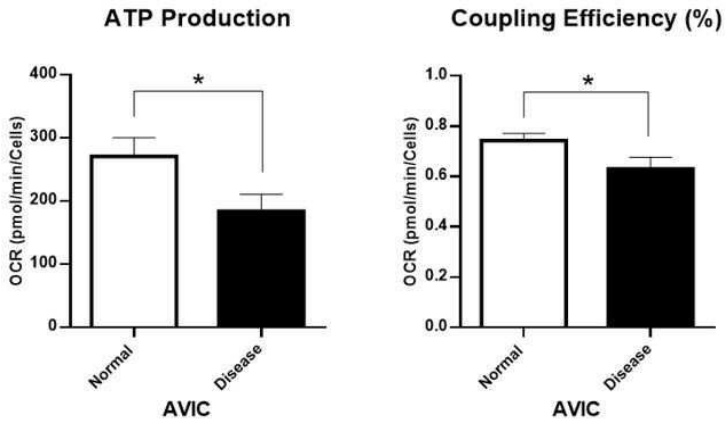
[0203] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

도면1a

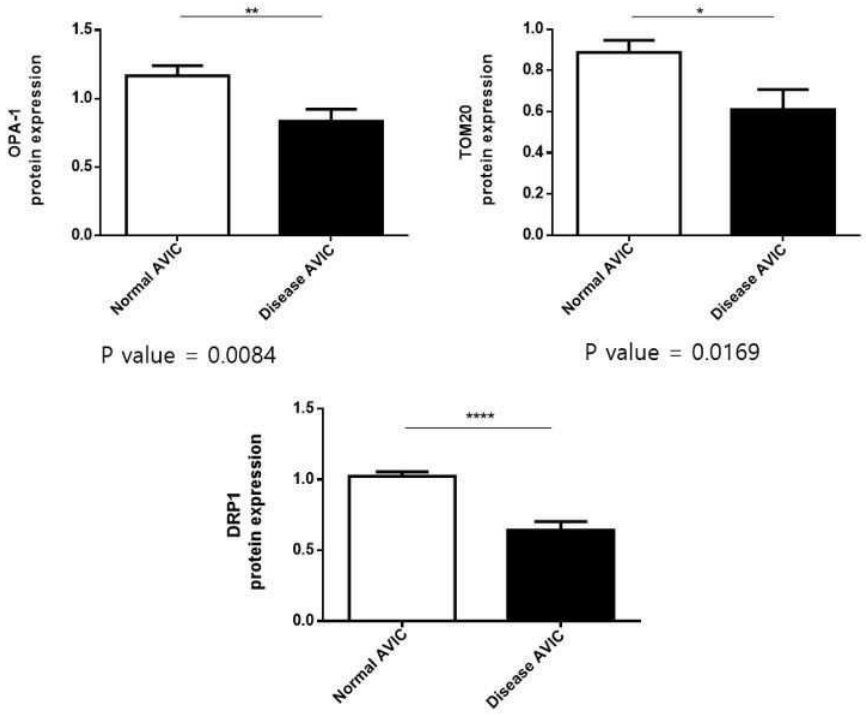


도면1b



P value = 0.0328 P value = 0.0471

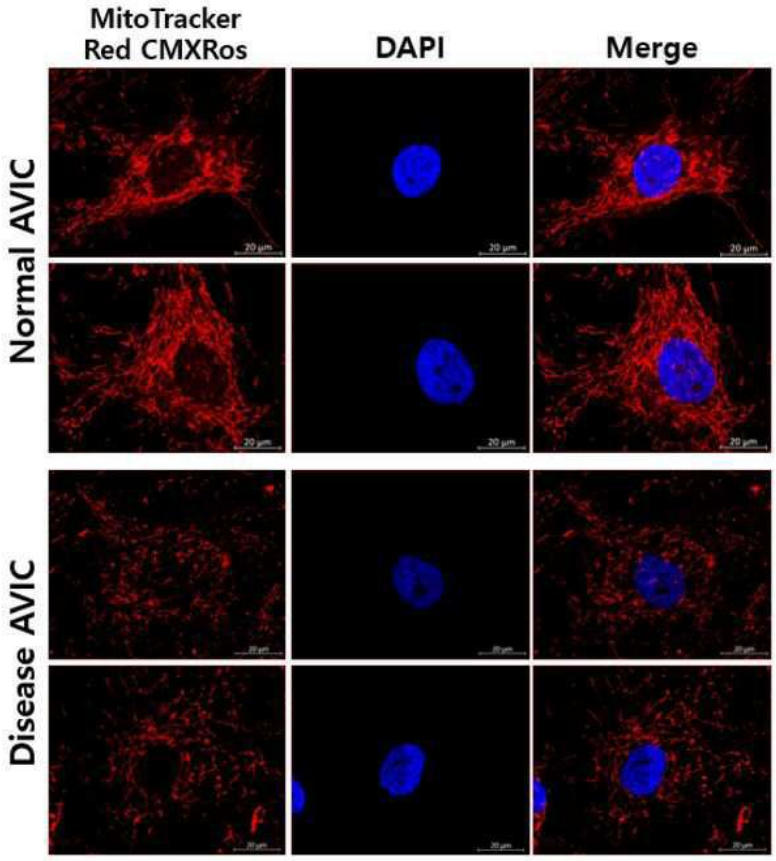
도면2



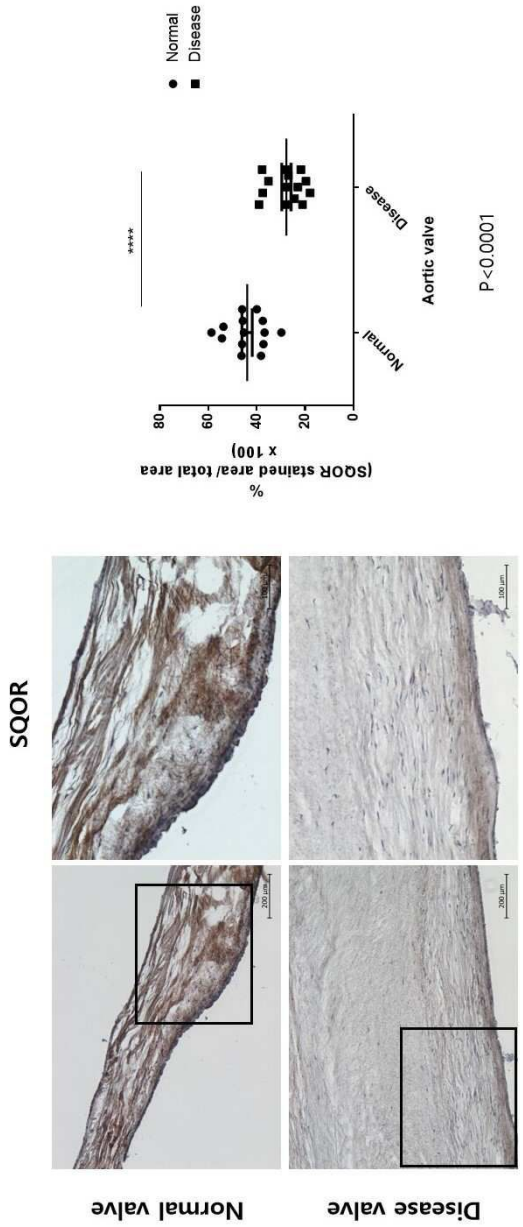
P value = 0.0084 P value = 0.0169

P value < 0.0001

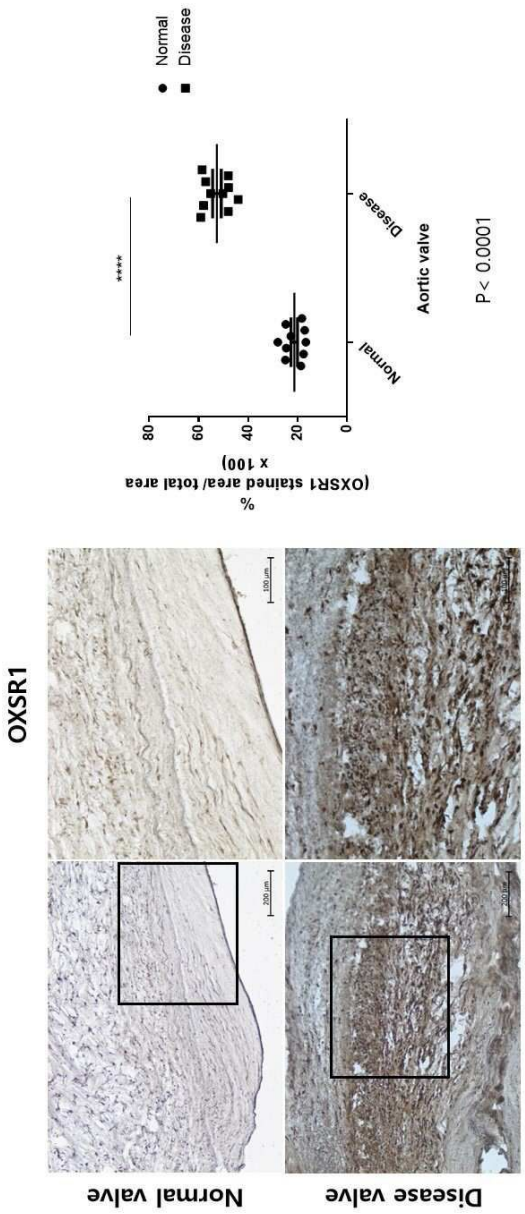
도면3


MitoTracker
Red CMXRos
DAPI
Merge
Normal AVIC
Disease AVIC

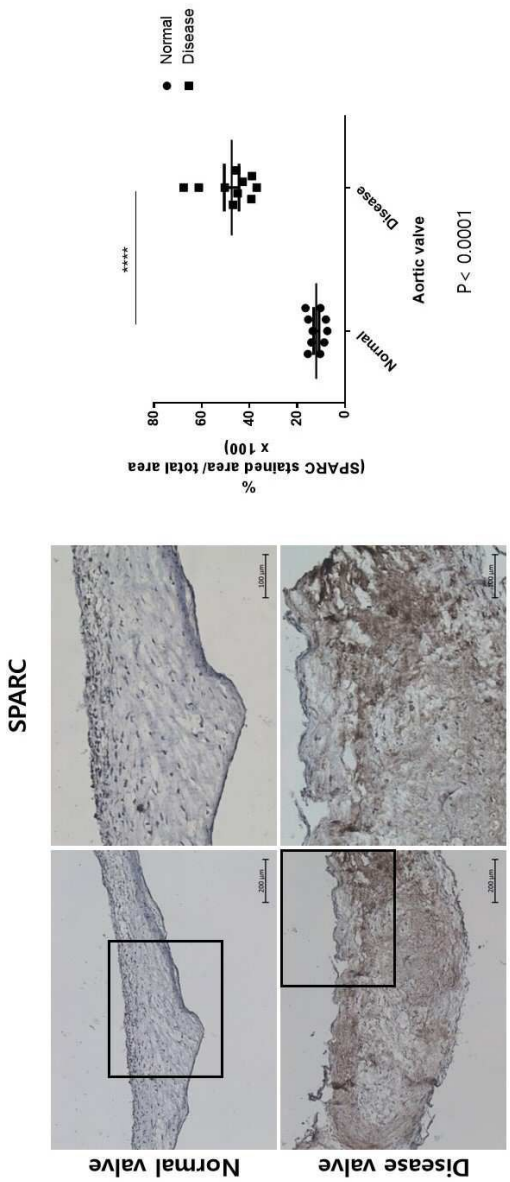
도면4a


SQOR
Normal valve
Disease valve
200 µm
100 µm
%
(SQOR stained area/ total area
x 100)
80
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P<0.0001
Normal
Disease

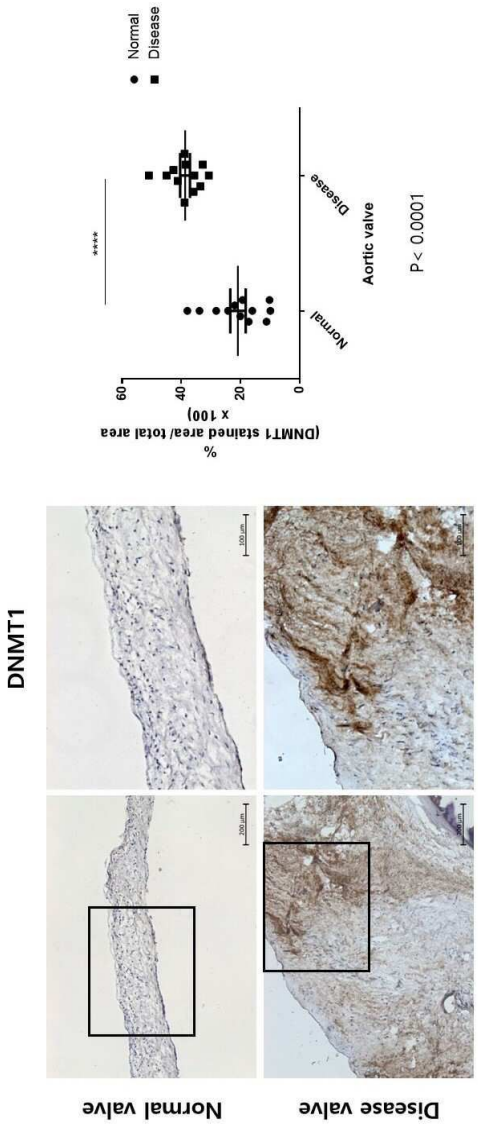
도면4b


OXSR1
Normal valve
Disease valve
%
(OXSR1 stained area/ total area
x 100)
80
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P< 0.0001
Normal
Disease

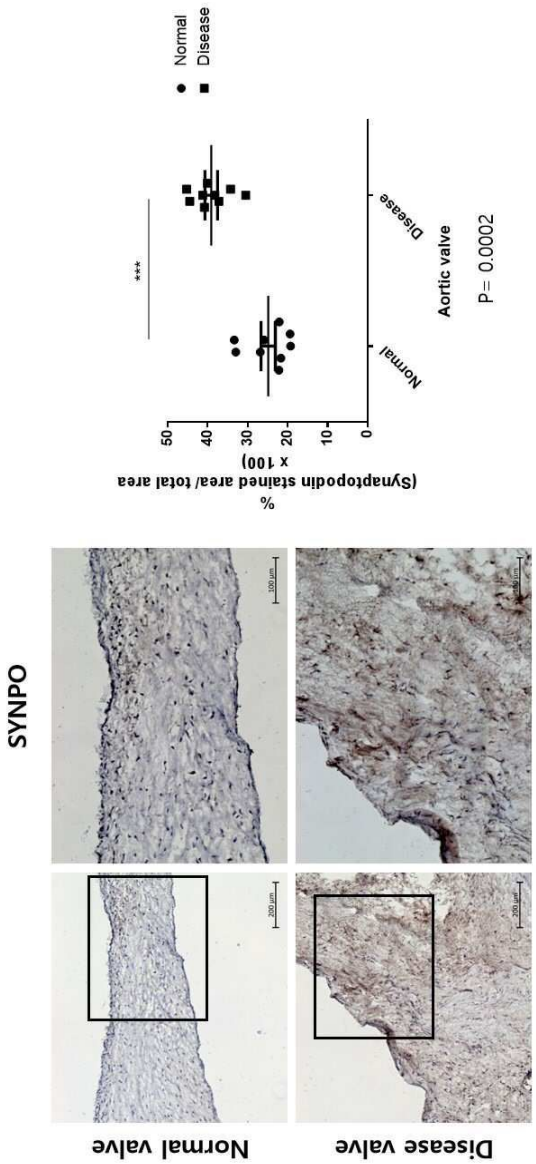
도면4c


SPARC
Normal valve
Disease valve
%
(SPARC stained area/ total area
x 100)
80
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P < 0.0001
Normal
Disease

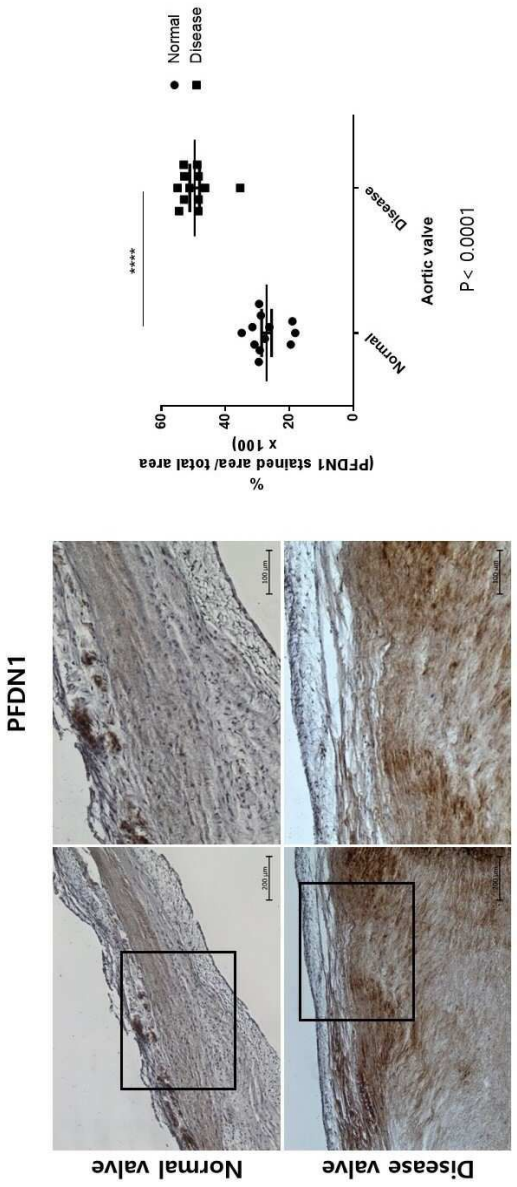
도면4d


DNMT1
Normal valve
Disease valve
200 um
100 um
(DNMT1 stained area/ total area x 100)
%
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P < 0.0001
Normal
Disease

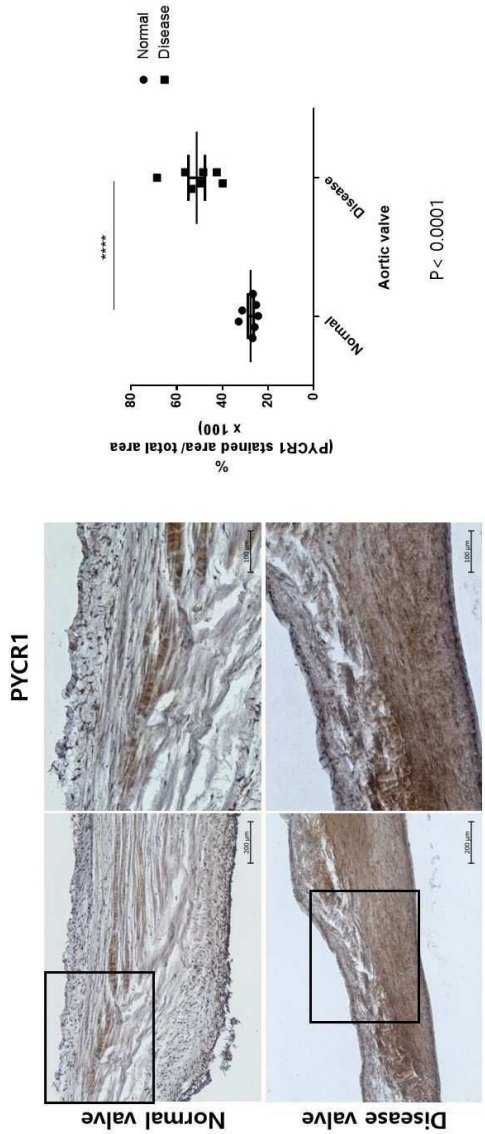
도면4e


SYNPO
Normal valve
Disease valve
200 μm
100 μm
%
(Synaptopodin stained area/ total area
x 100)
50
40
30
20
10
0
***
Normal
Disease
Aortic valve
P= 0.0002
Normal
Disease

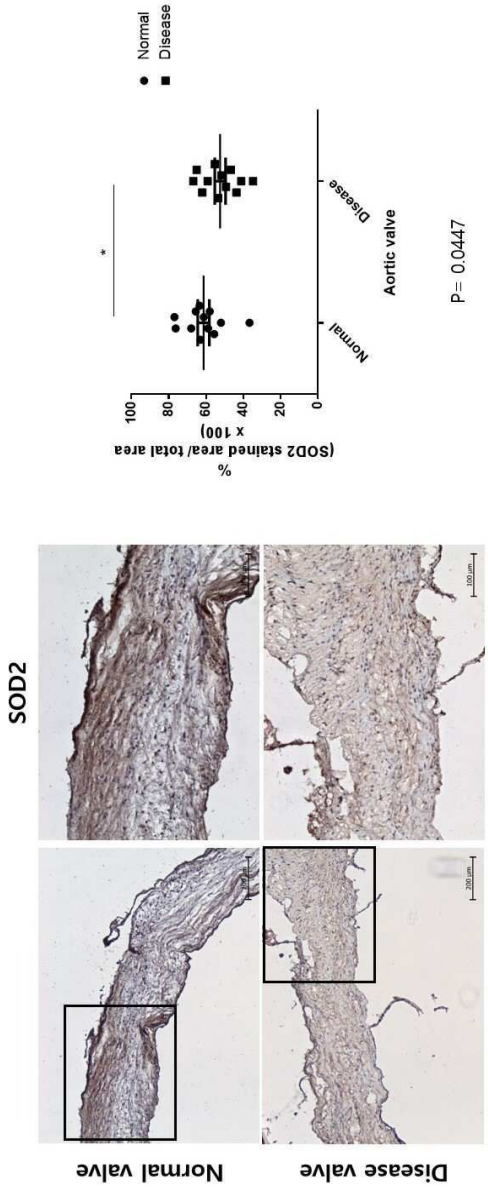
도면4f


PFDN1
Normal valve
Disease valve
200 μm
100 μm
(PFDN1 stained area/ total area x 100)
%
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P< 0.0001
Normal
Disease

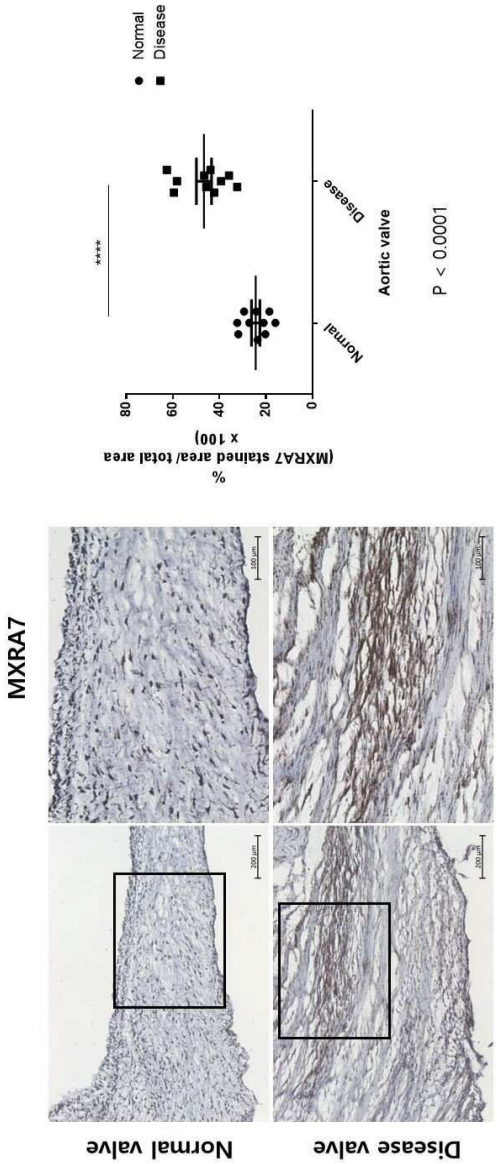
도면4g


PYCR1
Normal valve
Disease valve
200 μm
100 μm
%
(PYCR1 stained area/ total area
x 100)
80
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P< 0.0001
Normal
Disease

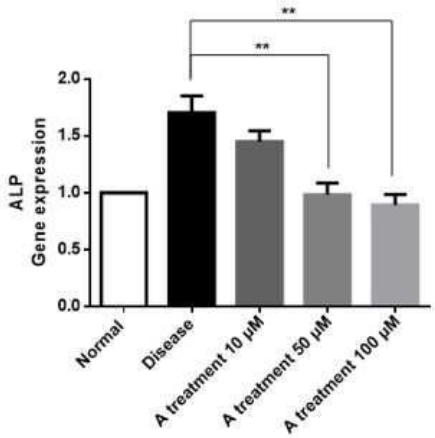
도면4h


SOD2
Normal valve
Disease valve
200 um
100 um
(SOD2 stained area/ total area
x 100)
%
100
80
60
40
20
0
*
Normal
Disease
Aortic valve
P= 0.0447
Normal
Disease

도면4i


MXRA7
Normal valve
Disease valve
200 µm
100 µm
%
(MXRA7 stained area/ total area
x 100)
80
60
40
20
0
****
Normal
Disease
Aortic valve
P < 0.0001
Normal
Disease

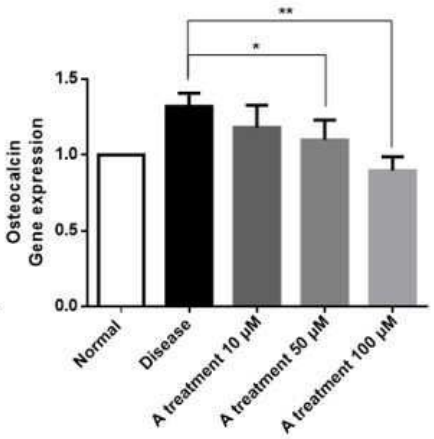
도면5



n=8

A treatment 50 uM :
P value = 0.0011

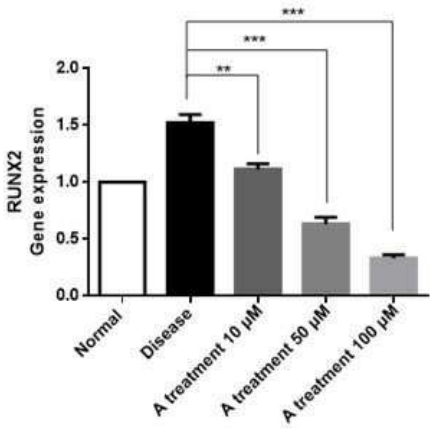
A treatment 100 uM :
P value = 0.0012



n=8

A treatment 50 uM :
P value = 0.0499

A treatment 100 uM :
P value = 0.0027

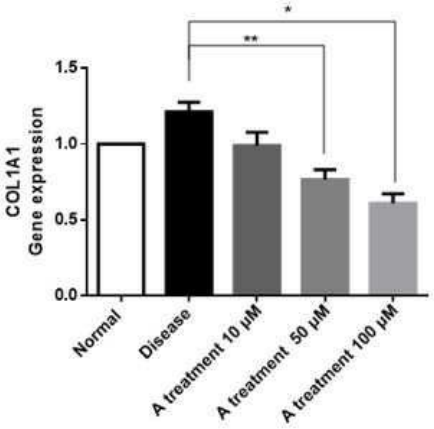


n=8

A treatment 10 uM :
P value = 0.0019

A treatment 50 uM :
P value = 0.0002

A treatment 100 uM :
P value = 0.0007

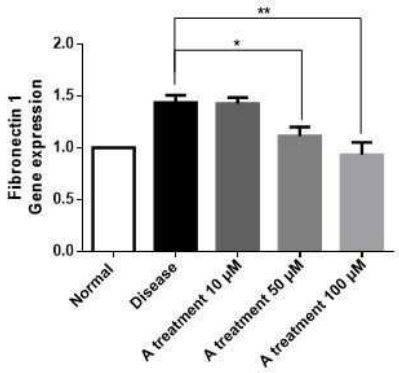


n=5

A treatment 50 uM :
P value = 0.0079

A treatment 100 uM :
P value = 0.0159

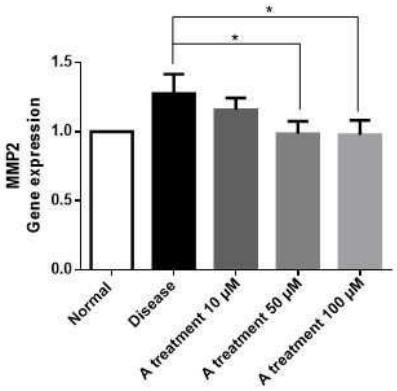
도면6



n=8

A treatment 50 uM :
P value = 0.0207

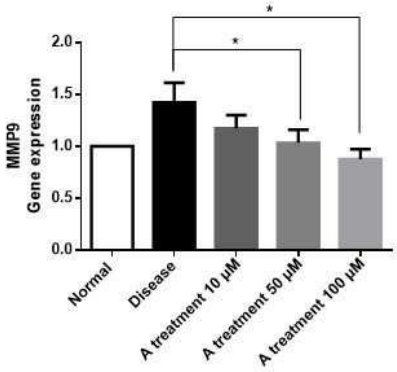
A treatment 100 uM :
P value = 0.0047



n=8

A treatment 50 uM :
P value = 0.0205

A treatment 100 uM :
P value = 0.0350

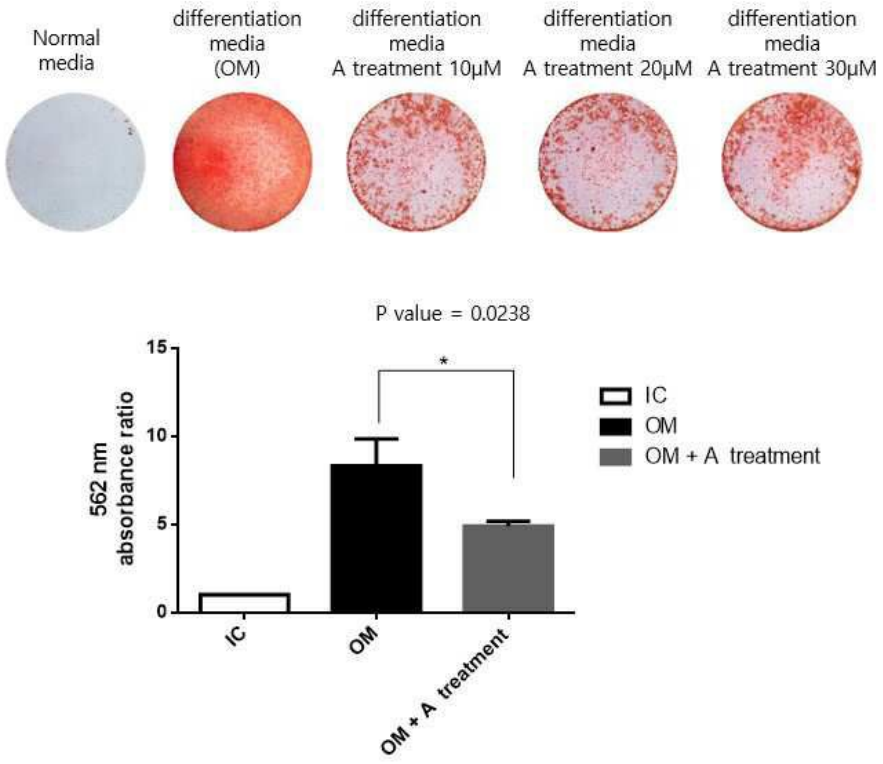


n=8

A treatment 50 uM :
P value = 0.0379

A treatment 100 uM :
P value = 0.0200

도면7


Normal media
differentiation media (OM)
differentiation media A treatment 10μM
differentiation media A treatment 20μM
differentiation media A treatment 30μM
P value = 0.0238
562 nm absorbance ratio
15
10
5
0
*
IC
OM
OM + A treatment
IC
OM
OM + A treatment