



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123665
(43) 공개일자 2017년11월08일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)
 <i>A23L 33/13</i> (2016.01) <i>A61K 31/4985</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/395</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/10</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7027544
 (22) 출원일자(국제) 2015년02월27일
 심사청구일자 2017년09월27일
 (85) 번역문제출일자 2017년09월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/KR2015/001902
 (87) 국제공개번호 WO 2016/137037
 국제공개일자 2016년09월01일</p> | <p>(71) 출원인
 재단법인 아산사회복지재단
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
 울산대학교 산학협력단
 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)</p> <p>(72) 발명자
 장은주
 서울특별시 송파구 올림픽로 135, 237동 1103호
 (잠실동, 리센츠아파트)
 송재관
 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 302동 1401호
 (신천동, 파크리오)
 김미정
 인천광역시 부평구 동수로 56 심장내과 (부평동,
 가톨릭대학교인천성모병원)</p> <p>(74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **DPP-4 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 DPP-4 억제제는 DPP-4 뉴클레오타이드의 발현 또는 DPP-4 단백질의 활성을 억제하는 것을 모두 포함할 수 있으며, DPP-4에 대한 항체, 시타글립틴 (sitagliptin), 빌다글립틴 (vildagliptin), 삭사글립틴 (saxagliptin), 리나글립틴 (linagliptin), 두토글립틴 (dutogliptin), 제미글립틴 (gemigliptin), 알로글립틴 (alogliptin), 아나글립틴 (Anagliptin), 에보글립틴 (evogliptin), 베르베린 (Berberine), 디프로틴 (Diprotin) 또는 루페올 (Lupeol), DPP-4의 mRNA에 대한 안티센스 뉴클레오타이드, 앵타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 또는 RNA 간섭 (RNAi) 등이 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A23L 33/13 (2016.08)

A61K 31/4985 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/5434 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 DPP-4 억제제는 DPP-4 뉴클레오티드의 발현 또는 DPP-4 단백질의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 DPP-4 뉴클레오티드의 발현을 억제하는 것은 상기 DPP-4 의 mRNA에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 앵타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 및 RNA 간섭 (RNAi)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 DPP-4 단백질의 활성을 억제하는 것은 DPP-4에 대한 항체, 시타글립틴 (sitagliptin), 빌다글립틴 (vildagliptin), 삭사글립틴 (saxagliptin), 리나글립틴 (linagliptin), 두토글립틴 (dutogliptin), 제미글립틴 (gemigliptin), 알로글립틴 (alogliptin), 아나글립틴 (Anagliptin), 에보글립틴 (evogliptin), 베르베린 (Berberine), 디프로틴 (Diprotin) 및 루피올 (Lupeol)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 판막 석회화는 판막증, 고지혈증, 노화, 에스트로겐 부족, 협심증, 심부전, 신장질환, 요독증, 당뇨병, 염증 질환 및 심혈관계질환로 이루어진 군으로부터 선택된 것에 의한 것을 특징으로 하는, 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 판막 석회화는 대동맥판 석회화인 것을 특징으로 하는, 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심혈관계 석회화는 고혈압, 심부전, 급성 관상동맥증후군, 판막 질환 및 이로 인한 여러 가지 합병증을 유발한다. 또한 다수의 역학 연구에서 혈관석회화가 독립적으로 사망률을 증가시킨다고 알려져 있다. 혈관석회화는 정상적인 태생기 또는 골절 후 골 형성 프로그램과 유사한 기전으로 일어나며, 노령, 당뇨, 만성심부전, 만성 염증 질환에서 활성화 된다. 염증반응에 의해 골에서 미네랄 소실이 촉진되고 유리된 미네랄이 비정상적인 혈관내피 세포에 침착된다.

[0003] 혈관내피세포 기능 부전은 혈관석회화의 중요한 기전이다. eNOS는 정상적으로 혈관내피 세포, 심내막 심근

세포, 심방 세포, 혈관 평활근 세포, 기도 내피세포 등에서 일정한 수준으로 항상 발현되며, 산화질소 (nitric oxide, NO)를 생성하여 혈관 긴장도를 조절하고 혈관 내피세포의 항상성을 유지하는 역할을 한다. eNOS의 기능 부전이 있는 경우에 구조와 기능이 유사한 nNOS neuronal NOS (neuronal NOS)나 iNOS inducible NOS (inducible NOS) 등의 동종 효소가 보완적으로 증가하여 eNOS의 역할을 대치하지만 지속적으로 정상 혈관내피 세포 기능을 유지하기는 어려우므로 죽상경화증 포함한 혈관의 병적인 변화가 조기에 일어난다. eNOS (Endothelial nitric oxide synthase)의 심혈관계 영향에 대한 실험동물 모델, 즉 eNOS 유전결핍동물 (eNOS knock-out, eNOS KO)은 고혈압과 죽상경화증이 증가하며, 대조군에 비해 뇌졸중과 심근경색증 후 손상 범위가 넓고 재형성이 심하다고 알려져 있다.

[0004] 한편, 심혈관계 석회화가 유도된 동물 모델에서 DPP-4의 발현이 증가된다는 점이 보고된 바 있지만, DPP-4의 발현과 심혈관계, 특히 심장 판막의 석회화가 관련성이 있다는 점이나 DPP-4 발현이나 활성 억제를 통해 심장 판막의 석회화를 예방 또는 치료할 수 있다는 점이 제시된 바는 없다

[0005] 본 발명자는 심혈관계 석회화 과정과 이의 치료 약물을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, DPP-4의 억제제가 판막, 특히 심장판막의 석회화를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

[0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 CAVD 환자에서 석회화 섬유화 염증관련 유전자의 발현 프로파일을 나타낸 것으로, 상향조절은 빨강, 하향조절은 녹색으로 나타내었다.

도 2a는 qRT-PCR로 나타낸 CAVD 환자와 정상인에서의 hDPP-4 mRNA 발현 수준을 나타낸 것이고, 도 2b는 DPP-4에 의하여 활성화되는 케모카인과 DPP-4에 의하여 조절되는 유전자의 발현 프로파일을 나타낸 것이며, 도 2c는 마이크로어레이 세트에서 DPP-4에 의해 조절되는 유전자의 mRNA 수준을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3는 CAVD 환자 및 정상인에서 Von Kossa 염색, Alizarin red 염색, DAPI, DPP-4 및 DAPI와 DPP-4의 머지에 의한 조직학적 분석 결과를 나타낸 것이다. 핵은 DAPI(파란색)으로 염색하였다

도 4는 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 대동맥 판막 부위의 파라핀 포매 섹션을 AR과 VK로 염색한 결과를 나타낸 것이다. 상기 섹션은 항 류틴 DPP-4로도 염색하였다.

도 5는 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC를 골형성 배지에서 배양한 후, ALP, AR 및 VK 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 6의 a는 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC의 배양배지에서 mDPP-4의 수준을 ELISA로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 b는 mDPP-4의 mRNA 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 c는 혈장 mDPP-4의 수준을 ELISA로 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 DETA-NO 24시간 처리 후 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC의 DPP-4의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 7b는 DETA-NO 48시간 처리 후 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC에 대하여 mDPP-4의 이뮤노블롯 분석 결과를 나타낸 것이며, 도 7c는 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC에서 mDPP-4 프로모터 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이고, 도 7d는 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC에서 NF-κB 활성을 확인한 것이고,

도 7e는 NF- κ B 억제제가 처리된 야생형 또는 eNOS-/- 마우스의 VSMC의 배양 배지에서 mDPP-4의 농도를 ELISA로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8는 NF- κ B 결합부위 변이를 포함하는 mDPP-4 프로모터와 루시퍼레이스 유전자를 함유하는 프로모터로 형질 전환된 eNOS-/- 마우스의 VSMC에서 DETA-NO 처리 후 mDPP-4 프로모터 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9a 및 b는 eNOS-/- 마우스에서 시타글립틴 투여 후, 골 형성 활성을 검출하기 위하여, 비스포스포네이트- 컨쥬게이트 영상화제를 투여한 결과를 나타낸 것이다.

도 10a는 eNOS-/- 마우스에서 시타글립틴 투여 후, eNOS-/- 마우스의 전체(위열) 및 대동맥판막 부위(아래열)를 VK 염색한 결과를 나타낸 것이고, 도 10b는 VK 염색에서 양성으로 나타낸 부위를 그래프로 나타낸 것이다.

도 12a는 eNOS-/- 마우스 VSMC에 시타글립틴을 처리하여 배양한 후, 골형성을 AR 염색으로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 12b는 eNOS-/- 마우스 VSMC에서 DPP-4 기질을 처리하였을 때, 골형성에 미치는 영향을 ALP 활성을 측정하여 확인한 결과를 나타낸 것이다. 각 기질은 DPP-4(50ng/ml) 존재 하 또는 부재 상태에서 200ng/ml로 처리하였다.

도 11는 사람 대동맥 판막 세포(hVIC)에서 조골세포 전이분화가 DPP-4 처리에 의하여 저해되는 것을 나타낸 것이다.

도 12는 CAVD 환자(n=48)와 정상인(n=111)의 혈장에서의 hDPP-4 농도를 나타낸 결과이다.

도 13a는 CAVD 환자 중 석회화가 진행된 환자(n=30)와 석회화가 없는 환자(n=18)의 혈장 hDPP-4 농도를 나타낸 것이고, 도 13b는 활성혈장에서의 hDPP-4 농도를 나타낸 것이다.

도 14는 eNOS-/- 마우스의 VSMC에 여러 종류의 DPP-4 억제제를 처리한 후, ALP 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명은 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제를 포함하는 판막 석회화의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 치료용 조성물을 이용한 판막 석회화의 치료방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명에 있어서, DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4)는 CD26 (cluster of differentiation 26)으로 명명되기도 하며, 면역 조절, 아포토시스, 신호전달 등에 관여하는 단백질로 알려져 있다.
- [0016] 본 발명의 조성물에서 DPP-4 억제제는 DPP-4 뉴클레오티드의 발현 또는 DPP-4 단백질의 활성을 억제하는 것을 모두 포함할 수 있다. DPP-4 뉴클레오티드의 발현을 억제하는 것은 예를 들면, DPP-4 의 mRNA에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 앵타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 또는 RNA 간섭 (RNAi) 등 일 수 있다.
- [0017] 또한, DPP-4 단백질의 활성을 억제하는 것은 예를 들면, DPP-4에 대한 항체, 시타글립틴 (sitagliptin), 빌다글립틴 (vildagliptin), 삭사글립틴 (saxagliptin), 리나글립틴 (linagliptin), 두토글립틴 (dutogliptin), 제미글립틴 (gemigliptin), 알로글립틴 (alogliptin), 아나글립틴 (Anagliptin), 에보글립틴 (evogliptin), 베르베린 (Berberine), 디프로틴 (Diprotin), 또는 루피올 (Lupeol) 등 일 수 있다. 본 발명에서 상기 DPP-4에 대한 항체는 단클론항체 또는 다클론 항체일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 판막이 석회화된 경우 DPP-4의 발현이 증가되며, DPP-4 억제제를 투여시 그 석회화가 현저히 감소하는 바, DPP-4 억제제는 판막의 치료 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 판막 석회화는 판막 내에 세포외성 기질 (matrix) 수산화인회석 (hydroxyapatite) (인산 칼슘) 결정 침착물 (crystal deposits)의 형성, 성장 또는 침착을 의미한다.
- [0020] 석회화는 중막성 석회화 또는 죽상경화성 석회화를 포함한다. 석회화된 조직을 석회질이라고 한다. 판막 석회화는 두 부위에서 특징적으로 일어난다. 내막 석회화는 죽상 경화증과 연관되어 발생한다. 죽상 경화증은 처음에

는 판막 내측에 지방이 풍부한 대식세포들과 T 임파구들이 축적되어 지방층을 형성하고, 이어서 평활근 세포들이 중막으로부터 이동하여 들어온다. 이들의 이동을 자극하는 화학적물질들은 인근 내피, 활성화된 탐식세포 등에서 생성되는 것으로 생각되고 있다. 이동된 평활근 세포들은 증식하고, 지방이 축적되고, 세포외 간질을 생성한다. 석회화는 죽상경화 반의 중심부에서 일어난다. 중막성 석회화는 죽상 경화증 및 내막 석회화와는 독립적으로 발생한다. 말단 동맥들에서 생긴 혈관 중막 석회화를 뮌케베르그 경화증 (Muckeberg's sclerosis)이라고 부르기도 하며, 이는 주로 노령의 당뇨병 환자에서 많이 관찰된다. 발생에는 평활근 세포와 엘리스틴이 연관된다고 알려져 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, 죽상경화성 석회화 (atherosclerotic calcification)는 내막층을 따라 죽종성 플라크 (atheromatous plaques)내에 발생하는 혈관 석회화를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 중막성 석회화 (medial calcification), 중막 벽 석회화(medial wall calcification) 또는 뮌케베르그 경화증(Moenckeberg's sclerosis)은 중막 벽 내에 칼슘의 존재에 의해 특징지어진 석회화를 의미한다.

[0023] 또한, 본 발명의 석회화는 판막증, 고지혈증, 노화, 에스트로겐 부족, 협심증, 심부전, 신장질환, 요독증, 당뇨병, 염증 질환 또는 심혈관계장애에 의한 것일 수 있다. 상기 신장질환의 예로는 사구체 신장염, 당뇨병성신증, 루프스신염, 다발성의 우포신, 신맹신염, 신결석, 신결핵, 신종양 등이 있다. 또한 염증 질환의 예로는 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진 또는 다발성 경화증 등이 있다. 또한 상기 심혈관계질환으로는 심근장애, 원발성 심장정지, 허혈성 심부전, 고혈압, 허혈성 심장 질환, 관상동맥질환, 협심증, 심근경색증, 죽상경화증 또는 부정맥 등이 있다.

[0024] 본 발명에서는 대동맥 판막석회화(CAVD)에서 대동맥 판막 석회화의 진행과정이 DPP-4가 연계하여 관여하고 있다는 것을 확인하였다. NO 공급이 결핍된 마우스에서 NO의 결핍은 DPP-4 발현을 증가시킨다. 이는 대동맥 판막에서 조골세포 전이분화를 일으키고, 석회화를 가속화시킬 것이다.

[0025] DPP-4 억제제를 투여하면 VSMC의 조골세포 전이분화가 억제되어 병의 진행을 억제할 수 있으며, DPP-4가 CAVD 치료에 있어서 잠재적 치료 타겟이 될 수 있다는 개념을 뒷받침한다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액 및 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있으며, 이들 약학적으로 허용되는 담체, 약학적 조성물의 제제, 이들 제제를 제조하는 방법의 실례는 공지된 방법에 의한다.

[0027] 또한, 이들 약학적 조성물은 상기 기술된 바와 같이, 판막 석회화를 치료하기 위하여 본 발명의 DPP-4 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는데 유용하다. 본 발명의 조성물이 투여되는 개체에서 판막 석회화를 치료하는데 유효한 양으로 제공되며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 당업자는 적절한 양을 편의하게 결정할 수 있다.

[0028] 상기 DPP-4 억제제의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 500 mg/kg 바람직하게는 0.01 내지 5 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내, 혈관 내 또는 피하투여)할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다. 경구투여를 위해서, 캡슐, 정제, 분말, 과립 또는 현탁액으로 제공될 수 있다. 또한, 이들 제제는 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 통상적인 첨가제를 함유할 수 있으며, 이들 제제에 사용될 결합제로는 결정성 셀룰로오스, 셀룰로오스 유사체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스가 제공될 수도 있다.

[0030] 이들 제제에는 또한 이염기성 인산칼슘 또는 무수성 나트륨 전분 글리콜레이트가 제공될 수도 있다. 최종적으로

이들 제제에는 윤활제, 예를 들면 활석 또는 스테아르산 마그네슘이 제공될 수 있다.

- [0031] 또한, 본 발명의 조성물은 판막 석회화의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 판막 석회화의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다
- [0033] 본 발명의 식품 조성물에서 포함될 수 있는 DPP-4 억제제 외에 추가적으로 포함될 수 있는 다른 성분에 특별한 제한이 없으며, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 식품보조첨가제를 추가로 포함할 수 있는데 식품보조첨가제는 당업계에 통상적으로 사용되는, 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0034] 실시예
- [0035] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 실시예 1: 사람 대동맥판 석회화(CAVD)에서의 DPP-4 발현 확인
- [0037] 사람 대동맥 판막 표본은 서울 아산 병원에서 대동맥 판막 치환술을 받은 정상환자와 심한 석회화 병변 형성 환자로부터 얻었다. 각 샘플의 절반은 바로 RNeasy Lipid Tissue kit(Qiagen, USA)에 저장하고, 나머지 절반의 OCT 화합물(사쿠라 Finetek 사)에 고정시켰다. 사람유래 샘플의 수집에 대한 연구 프로토콜은 서울 아산 병원(서울, 한국)의 임상 시험 심사위원회(IRB)의 승인받아 진행하였다.
- [0038] 사람심장 대동맥판 석회화(CAVD)에서의 세포 진행에 관여하는 유전자 발현 프로파일을 마이크로어레이로 확인하였다.
- [0039] 유전자 발현 프로파일은 석회화가 일어나지 않은 정상 환자와 석회화 환자의 대동맥 판막 샘플을 Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST 어레이(Affymetrix, USA)를 사용하여 수행하였다. 분위기 정규화와 데이터 분석은 Affymetrix GCOS 소프트웨어(Affymetrix 사)를 사용하여 수행 하였다.
- [0040] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 석회화, 섬유화 및 염증과 관련된 유전자들이 정상인에 비하여, CAVD 환자의 대동맥 판막에서 상향조절되는 것으로 확인되었다.
- [0041] 또한, 리얼타임 PCR(qRT-PCR)을 수행하여, CAVD 환자에서의 DPP-4 발현을 재확인하였다. qRT-PCR 방법은 먼저, 각 샘플의 총 RNA를 RNeasy Lipid Tissue kit(Qiagen, USA)를 사용하여 분리하고, cDNA 합성 키트(Thermo scientific, EU)를 사용하여 cDNA를 합성한 후, 광학 96 웰 플레이트에서 Power SYBR 그린 1step 키트와 ABI 7000 리얼 타임 PCR 시스템(Applied Biosystems)를 이용하여, qRT-PCR 분석을 수행하였으며, 내부 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.
- [0042] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, DPP-4가 CAVD 환자에서 높은 수준으로 발현되는 것을 리얼타임 PCR로 확인하였다.
- [0043] 마이크로어레이 분석을 통하여, DPP-4 활성이 염증성 케모카인을 활성화시키고, DPP-4에 의하여 조절되는 다운스트림 유전자들과 케모카인 유전자들이 대동맥 판막 석회화 조직에서 상향조절되는 것을 확인하였으며(도 2b). 상기유전자들은 상향조절은 리얼타임 PCR을 이용한 mRNA 발현을 분석하여 재확인하였다(도 2c).

- [0044] 사람 대동맥 판막 샘플을 4% 포르말린 용액에 24시간 동안 고정한 후 파라핀으로 포매하여 4 μ m 두께의 절편을 만들었다. 파라핀 포매한 대동맥판 및 심장 기저부 절편에서 칼슘 침착을 확인하기 위하여 Von Kossa 염색(VK), Alizarin red 염색(AR)을 하였다. Von Kossa 염색은 포르말린에 고정된 대동맥판을 증류수로 씻은 후 실온에서 5% 수용성 AgNO₃와 강한 빛에 60분간 노출시켰다. 이후 2.5% 티오황산나트륨에 5분간 처리하여 흑갈색이 나타나면 양성 반응으로 판독하였다. Alizarin red 염색은 포르말린에 고정된 대동맥판을 증류수로 씻은 후 2% Alizarin red S (aqueous, Sigma)에 5분간 처리하여 붉은색 또는 주황색이 나타나면 양성 반응으로 판독하였다.
- [0045] 석회화된 대동맥판막 조직을 면역형광 염색한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, DPP-4는 본코사(VK)와 알리자린 레드(AR)에 의해서 염색되는 석회화가 진행된 부분에서 높게 발현되었으며, 정상 사람 대동맥 판막 조직에서는 발현이 확인되지 않았다.
- [0046] 실시예 2: eNOS 녹아웃 마우스 모델에서의 DPP-4 발현 확인
- [0047] C57BL/6J 기원의 eNOS^{-/-} (Endothelial nitric oxide synthase knock-out) 마우스 (8주령, n = 10, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, USA)와 동종 야생 대조군 생쥐 (8주령, wide type, WT, n = 10)를 이용하였다. 반입 후 3개월령까지는 표준 설치류 사료를 급여하고, 하였다.
- [0048] 마우스는 깊이 마취 시킨 상태에서 4% 파라포름알데하이드를 함유하는 PBS를 투여하였으며, 심장과 대동맥을 적출하고, 하룻밤 고정시킨 후, 파라핀 포매하여, 전체 대동맥 판막 부위에 대하여, 5 μ m 두께의 절편을 수득하였다. 마우스를 안락사시키고 혈액과 대동맥 샘플은 분석을 위해 보관하였다.
- [0049] 파라핀 포매한 대동맥판 및 심장 기저부 절편에서 칼슘 침착을 확인하기 위하여 von Kossa 염색, Alizarin red 염색을 하였다.
- [0050] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 대동맥판의 von Kossa 염색에서, 대조군과 달리 eNOS KO 생쥐의 대동맥판에 무기질 침착을 의미하는 흑갈색으로 염색된 부분이 관찰되었으며, Alizarin red 염색에서도 칼슘 침착을 의미하는 붉게 염색된 부분이 관찰되었다. 또한, AR염색과 VK 염색에서 석회화가 확인된 부분에서 높은 DPP-4 발현이 확인되는 세포가 관찰되었다.
- [0051] 실시예 3: 마우스 혈관평활근세포 (Vascular smooth muscle cells, VSMC)에서의 석회화 확인
- [0052] 실시예 2에서 eNOS^{-/-} 마우스와 야생형 마우스에서, 심장과 함께 적출한 대동맥을 무혈청 (serum-free) M199 (Cellgro)에 담가 씻은 후 작은 조각으로 자른 다음, M199에 20% 우태혈청 (fetal calf serum), 3 mg/mL 콜라게나아제 (Sigma)를 첨가하여 37℃의 수조에 3시간 중탕하였다. 분리된 세포는 항 SM 단클론항체 (Sigma)를 사용하여 혈관평활근세포임을 확인하였다. 분리된 혈관평활근세포를 30% 농도로 분주하고 24시간 후 골 형성 배지 (Osteogenic Basal Medium, Osteogenic SingleQuots, Lonza, USA)로 교체하였다. 배지는 3일마다 교체하고 28일 동안 배양하였다.
- [0053] 야생형 및 eNOS KO 마우스에 대하여, 석회화의 초기단계 염색법인 ALP염색, 중기단계 염색법인 Alizarin Red (AR) 염색법, 후기단계 염색법인 Von Kossa(VK) 염색을 이용하여 CD26가 맥관성 평활근세포의 골화 촉진을 유발하는지 확인하였다.
- [0054] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군 마우스에 비해 eNOS Knock-Out 형질전환 마우스에서, 맥관성 평활근 세포 (Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC)의 골세포화 (Osteogenic differentiation)가 촉진됨 관찰할 수 있었다.
- [0055] 혈관평활근세포 배양액의 유리 CD26/DPP-4 농도를 상용 ELISA 키트(Sigma)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, eNOS^{-/-} 마우스 유래 VSMC 배양액에서 증가된 DPP-4 농도를 확인할 수 있었다.
- [0056] 대동맥판막 조직의 DPP-4 mRNA 발현수준을 리얼타임 PCR을 이용하여 측정하였으며, 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이, 야생형에 비하여 eNOS^{-/-} 마우스의 대동맥판막 조직에서 DPP-4 mRNA가 증가하는 것을 확인하였다.
- [0057] 또한, eNOS^{-/-} 마우스와 야생형 마우스의 혈장 내의 DPP-4 단백질 수준은 ELISA를 이용하여 측정하였으며, 그 결과, 도 6c에 나타난 바와 같이, eNOS^{-/-} 마우스 혈장에서 야생형에 비하여 DPP-4 단백질 수준이 증가하는 것을 확인하였다).
- [0058] 실시예 4: 혈관평활근세포(VSMC)에서 NO에 의한 DPP-4 발현 조절 확인

- [0059] NO 생합성 억제제인 L-NAME(N ω -Nitro-L-arginine methyl ester)를 처리하면 대동맥에서 DPP-4의 발현이 현저히 증가하는 것으로 나타나, NO 결핍이 DPP-4 발현을 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [0060] 본 실시예에서는 실시예 3의 방법으로 획득한 혈관평활근세포에 NO 공여체인 DETA-NONOate(DETA-NO)를 처리하면, VSMC에서 DPP-4 mRNA의 발현이 감소될 뿐만 아니라(도 7a), DPP-4 단백질 발현도 감소하는 것으로 확인되었다(도 7b).
- [0061] DPP-4 발현감소에서 NO의 조절역할에 대한 보다 직접적인 증거를 얻기 위하여, DPP-4 프로모터 활성이 NO에 의하여 조절되는지 확인하였다.
- [0062] 그 결과, DPP-4 프로모터 활성은 야생형 마우스 유래 VSMC에서 보다 eNOS-/- 마우스 유래 VSMC에서 더 높았으며, 이는 DETA-NO 처리에 의하여 농도의존적으로 억제되는 것으로 나타났다(도 7c).
- [0063] VSMC에서의 NF- κ B 활성은 NO에 의해서 억제된다. eNOS-/- 마우스 유래의 VSMC에서 야생형 마우스 유래 VSMC보다 높은 NF- κ B 활성을 나타내며, 이는 DETA-NO 처리에 의하여 감소되었다(도 7d). DPP4 프로모터에 NF- κ B의 추정상의 결합부위가 존재하기 때문에, 우리는 NF- κ B활성이 직접적으로 DPP-4 프로모터의 활성을 조절할 수 있는지를 확인하였다.
- [0064] 먼저, VSMC를 6웰 플레이트에서 80% 컨플루언시가 될때까지 배양한 후, Lipofectamine2000(Life Technology)를 이용하여, NF- κ B 결합부위 변이를 포함하거나 정상 결합부위를 가지는 DPP-4 리포터 부분을 루시퍼레이즈 pGL3-basic 벡터(promega)에 클로닝한 후 형질도입시켰다. 24시간 후, 개통벌레 및 Renilla 루시퍼레이즈 활성을 Dual-Glo 루시퍼레이즈 어세이 시스템(Promega)를 사용하여 측정하였다. 개통벌레 루시퍼레이즈 활성은 Renilla 루시퍼레이즈 활성으로 표준화하였다.
- [0065] 상기 NF- κ B 결합부위의 SDM(site directed mutagenesis)를 위하여는, 하기 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [0066] 서열번호 1: 5'-CAGCCAGATAACATGCCACACCCAACCCCTTC-3'
- [0067] 서열번호 2: 5'-GAAGGGGTGGGTGTGGCATGTTATCTGGCTG-3'
- [0068] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, DPP-4 프로모터의 NF- κ B 결합 부위를 변이시키면 DPP-4 프로모터 활성이 현저하게 억제되었으며, NF- κ B 억제제를 처리하면 DPP-4 생산이 완전히 억제되었다(도 7e). 이러한 결과는, 혈관 평활근 세포에서 NF- κ B의 활성화를 통한 DPP-4의 유도가 NO 결핍에 의해서 일어나며, NO 공급을 조절하여 VSMC의 조골세포 전 이분화를 조절할 수 있을 것이라는 것을 제안하고 있다.
- [0069] 실시예 5: 대동맥 판막 석회화에서 DPP-4 억제제인 시타글립틴의 효과확인
- [0070] 대동맥 판막의 석회화 과정에서 DPP-4가 현저하게 증가되는 것은 판막의 석회화에서 DPP-4가 잠재적인 역할을 한다는 것을 의미한다. 이를 증명하기 하여, eNOS-/- 마우스의 대동맥 석회화에 선택적 DPP-4 억제제인 시타글립틴(sitagliptin)을 처리하여, 그 효과를 확인하였다.
- [0071] C57BL/6J 기원의 eNOS-/- (Endothelial nitric oxide synthase knock-out) 마우스 (8주령, n = 10, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, USA)와 동종 야생 대조군 생쥐 (8주령, wide type, WT, n = 10)를 이용하였다. 반입 후 3개월령까지는 표준 설치류 사료를 급여하고, 식염수, 또는 시타글립틴(sitagliptin, 15 mg / kg / day, Merck & Co., Inc)을 12주간 투여하였다.
- [0072] eNOS-/- 마우스에서 골 형성 활성을 검출하기 위하여, 꼬리 정맥 주사를 통해 비스포스포네이트- 컨쥬게이트 영상화제 (Osteosense680, VisEn Medical Inc.)를 주사 하였다. Osteosense680는 생체 내에서 석회화 부위, 특히 하이드록시아파타이트에 결합하고, 조골세포 활동의 검출을 위한 영상화제 역할을 한다. 마우스를 안락사 시킨 후, 몸 전체 또는 분리된 대동맥을 OptixMX3(ART Advanced Research Technologies, Inc)을 사용하여 이미징하였다.
- [0073] 그 결과, eNOS-/- 마우스에서 대동맥 주위에 석회화가 크게 진행되는 것을 확인하였으며(도 9), 시타글립틴을 경구투여한 경우, 마우스 생체 내에서 대동맥 부위의 석회화가 감소되는 것을 확인하였다(도 9 a, b). 또한, eNOS-/- 마우스의 대동맥 판막 부위를 VK 염색한 섹션에서도 DPP-4 활성을 억제할 경우 대동맥 석회화 과정을 억제할 수 있다는 것을 확인하였다(도 10 a, b).
- [0074] 실시예 6: 사람 대동맥 판막 세포(VIC)에서의 시타글립틴 처리효과 확인

- [0075] 사람 대동맥 판막의 VIC(valve interstitial cell)은 섬유아세포, 근아세포 및 평활근 세포의 이중세포들의 집합이며, VSMC와 유사한 특징을 가지고, 조골세포 전이분화를 할 수 있다.
- [0076] 사람 VIC를 이용하여 조골세포 전이분화에서 DPP-4의 역할을 확인하였다.
- [0077] 사람 VIC는 대동맥 밸브 전단에서 통상적인 세포 분리방법으로 분리하였으며, 2~10 계대의 것을 사용하였다. DPP-4 (R & D) 또는 시타글립틴, DETA-NONOate (엔조 생명 과학)와 함께 배양하였다.
- [0078] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, DPP-4 처리는 VIC의 골형성능력을 증가시켰으며, 이러한 현상은 시타글립틴 처리에 의하여 없어졌다.
- [0079] 질병 활성에서 DPP-4의 관계를 확인하기 위하여, CAVD 환자의 혈장에서 DPP-4 농도를 분석하였으며, 류마틱 대동맥 판막질환을 가진 환자와 DPP-4 저해제를 투여한 환자는 분석에서 제외하였다.
- [0080] 그 결과, CAVD 환자의 DPP-4 수준이 정상인보다 높았다(도 12, 표 1).

표 1

대동맥 판막질환환자의 임상적 특징

	Avpathology (-) (n=111)	AV pathology (+) (n=48)	p value
Age, y ^a	60±41	78±15	<0.001
Male, n ^b	69 (62)	20 (42)	0.017
Body surface area, m ²	1.7±0.4	1.54±0.35	<0.001
Systolic blood pressure, mmHg	118±38	123±45	0.079
Diastolic blood pressure, mmHg	71±32	66±33	0.023
Hypertension, n	53 (48)	37 (77)	0.001
Diabetes, n	23 (21)	12 (25)	0.550
Dyslipidemia, n	53 (48)	25 (52)	0.616
Renal insufficiency, n	3 (3)	8 (17)	0.001
Coronary artery disease, n	56 (50)	19 (40)	0.208
Previous stroke, n	15 (14)	9 (19)	0.410
Hemoglobin, g/dL	13.6±4.5	11.8±6.7	<0.001
Creatinine, mg/dL	0.95±6.26	1.48±7.76	0.006
Cholesterol, mg/dL	165±155	158±77	0.316
Aortic Vmax (peak velocity), m/s	1.4±1.1	4.6±2.1	<0.001

- [0081]
- [0082] 석회화가 나타난 CAVD 환자는 석회화가 없는 환자와 비교하여, DPP-4 수준이 34% 증가하였으며(도 13a), 활성화된 단백질 분해능을 가지는 DPP-4도 증가하였다(도 13b), 이는 DPP-4 순환 레벨이 사람 CAVD 환자의 중증도와 관련이 있는 것을 의미한다 (표 2).

표 2

CT 칼슘 점수로 확인된 CAVD 환자의 임상특징

	Group I sevAS_AVCi (-) (n=50)	Group II sevAS_AVCi (+) (n=22)	p value
Age, y	66±21	79±14	<0.001
Male, n	34 (68)	9 (41)	0.031
Body surface area, m ²	1.7±0.5	1.6±0.3	0.004
Systolic blood pressure, mmHg	120±45	121±41	0.789
Diastolic blood pressure, mmHg	71±32	62±28	0.004
Hypertension, n	31 (62)	19 (86)	0.039
Diabetes, n	13 (26)	6 (27)	0.910
Dyslipidemia, n	26 (52)	14 (64)	0.360
Renal insufficiency, n	2 (4)	3 (14)	0.138
Coronary artery disease, n	31 (62)	7 (32)	0.018
Previous stroke, n	9 (18)	2 (9)	0.318
Hemoglobin, g/dL	13.8±6.2	11.4±7.1	<0.001
Creatinine, mg/dL	1.1±8.0	1.1±1.2	0.994
Cholesterol, mg/dL	167±129	157±66	0.262
Agatston score (AU) ^a	230±832	611±2515	0.011
Valve Calcium (AU) ^a	184±1386	3460±4282	<0.001
Total Calcium (AU) ^a	422±1878	4185±6464	<0.001
Valve calcium score/ BSA (AVCi, AU/ m ²) ^a	119±866	2176±1964	<0.001
Aortic Vmax (peak velocity), m/s	1.9±3.0	5.2±1.4	<0.001

[0083]

[0084]

실시예 7: 여러 종류의 DPP-4 억제제 투여에 의한 VSMC에서의 조골세포 전이분화 억제효과 확인

[0085]

시타글립틴 이외의 DPP-4 억제제에 의한 판막 석회화 억제효과를 확인하기 위하여, 여러 종류의 DPP-4 억제제 처리에 의한 eNOS-/- 마우스 유래 VSMC(Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC)의 골세포화 (Osteogenic differentiation) 억제 효과를 확인하였다.

[0086]

알로글립틴(alogliptin), 에보글립틴(evogliptin), 리나글리핀(linagliptin), 삭사글립틴 (saxagliptin), 빌다글립틴 (vildagliptin)을 각각 48 웰 플레이트에서 배양된 eNOS-/- 마우스 유래 VSMC에 10 μM 농도로 7일간 처리하고, ALP 활성을 측정하였다. 그 결과, DPP-4 억제제를 처리하지 않은 음성대조군에 비하여 50%이하의 ALP 활성억제를 확인하였으며, 이는 시타글립틴 이외의 DPP-4 억제제도 대동맥 혈관판막 석회화 억제효과를 나타내는 것을 의미한다.

[0087]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

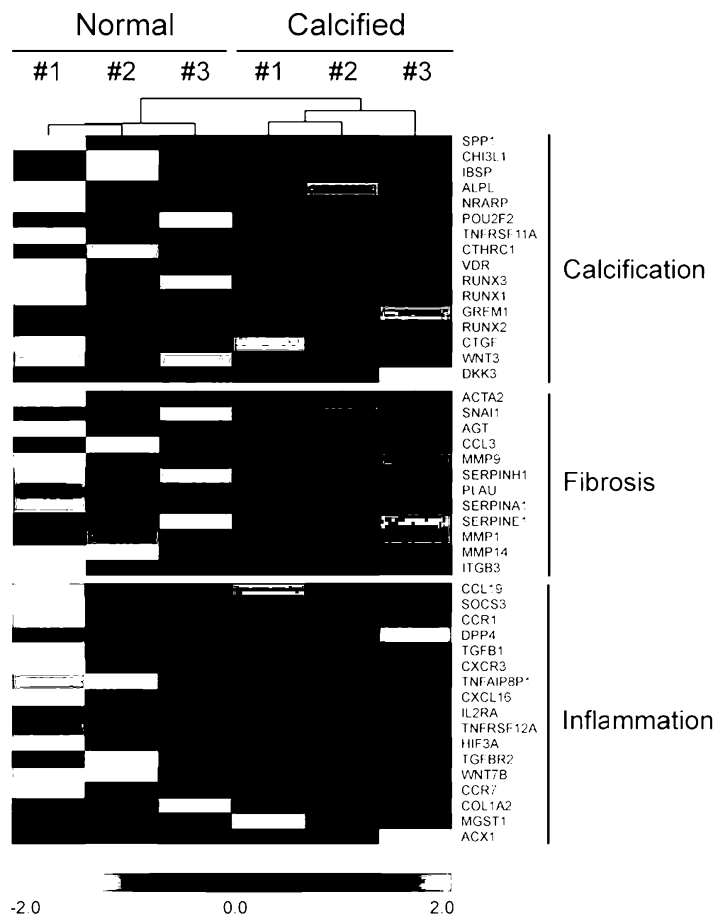
산업상 이용가능성

[0088]

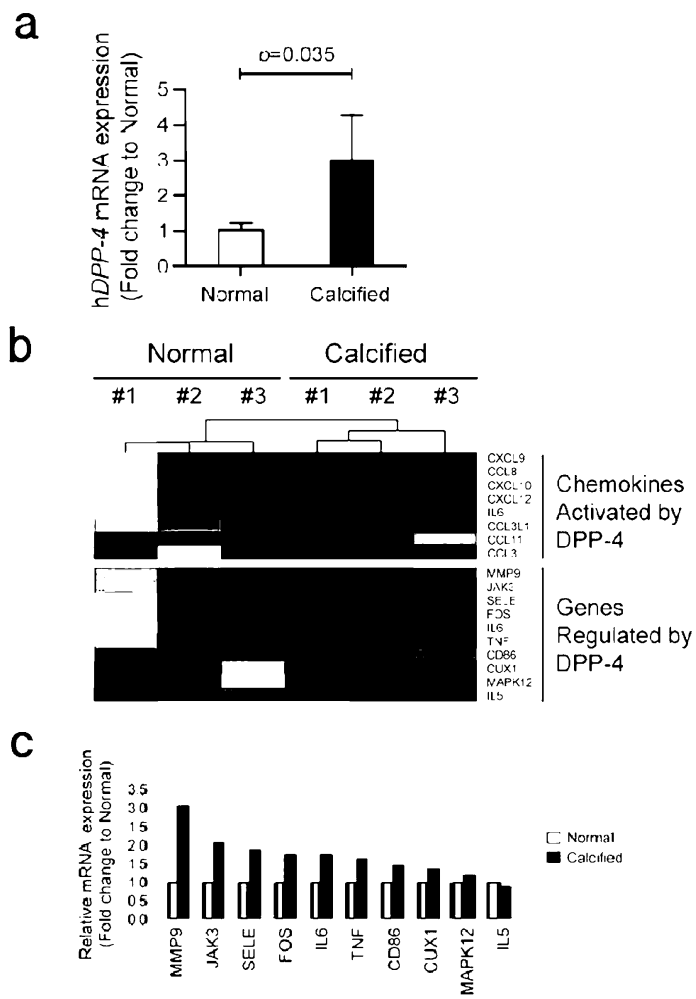
본 발명의 DPP-4는 판막이 석회화된 경우 발현이 증가하며, DPP-4 억제제를 투여시 그 석회화가 현저히 감소하는 바, DPP-4 억제제는 판막의 치료 또는 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

도면

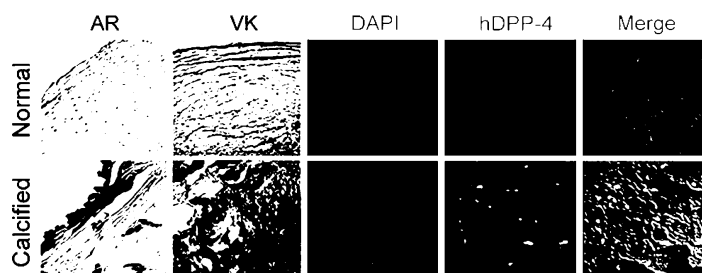
도면1



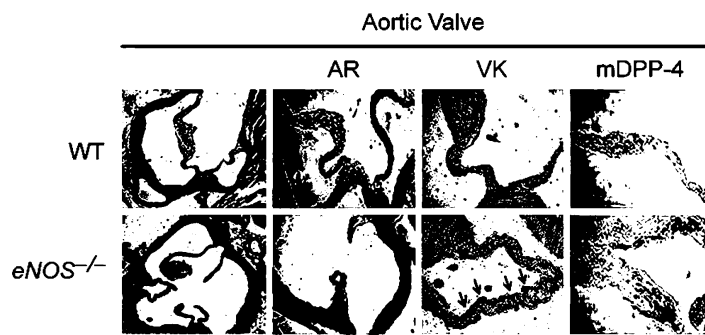
도면2



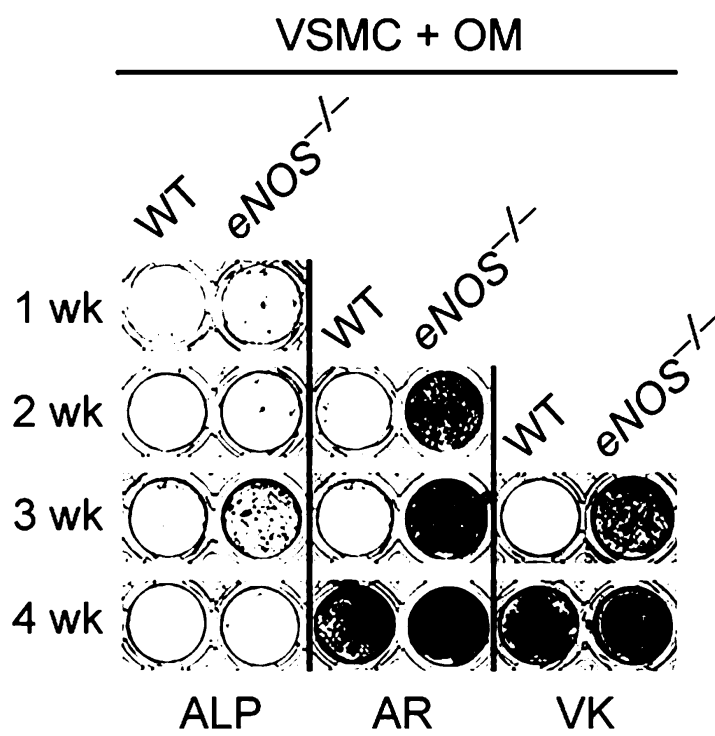
도면3



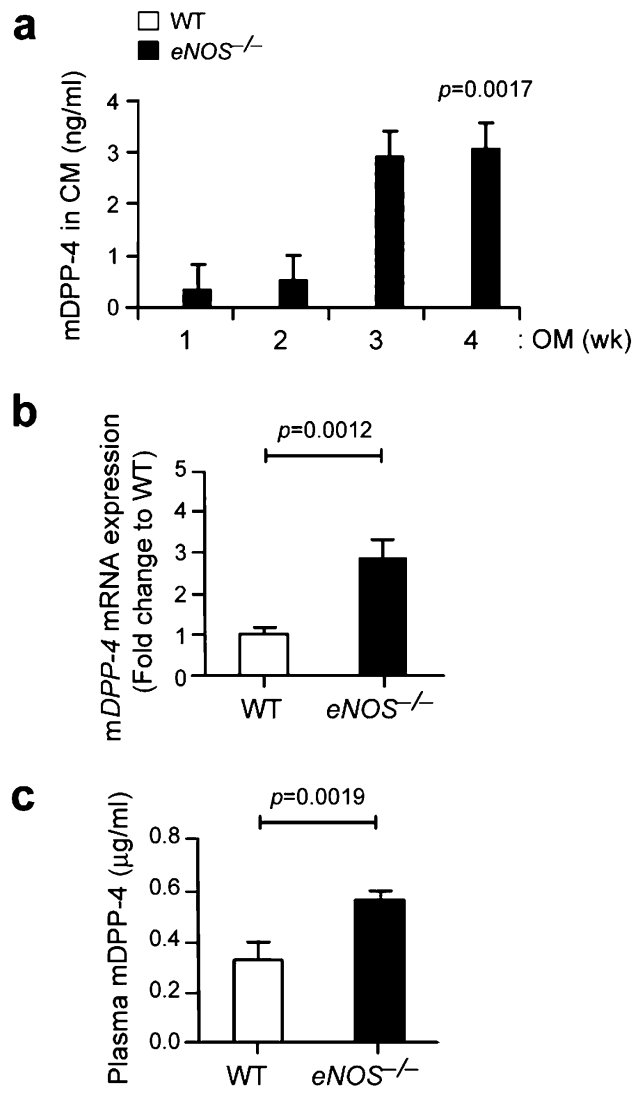
도면4



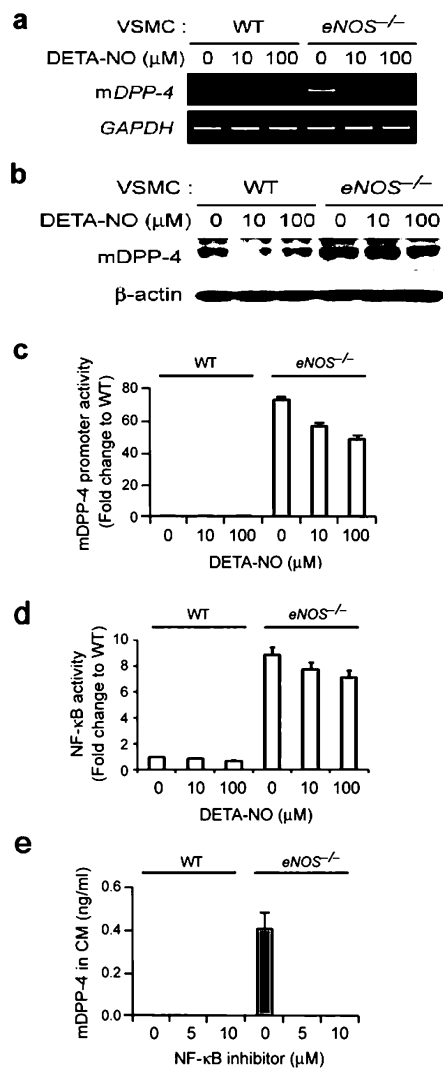
도면5



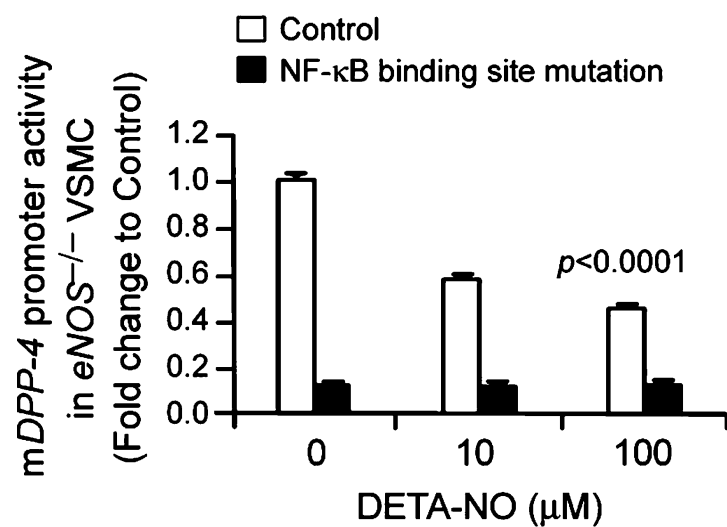
도면6



도면7

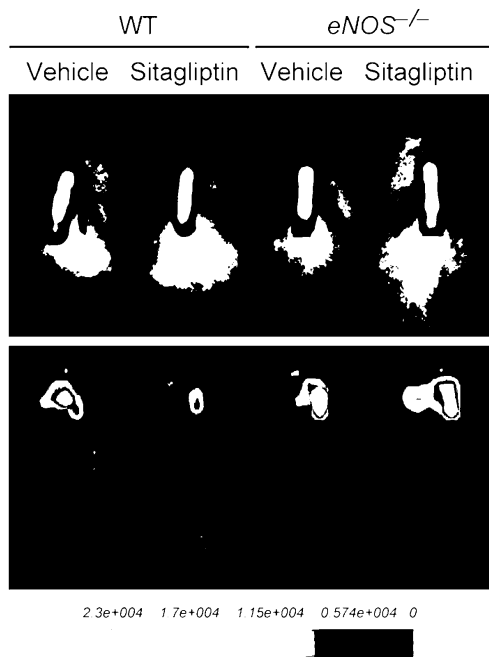


도면8

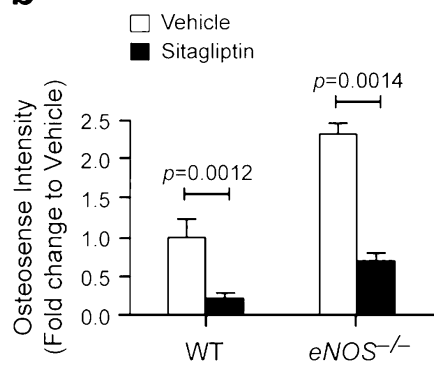


도면9

a

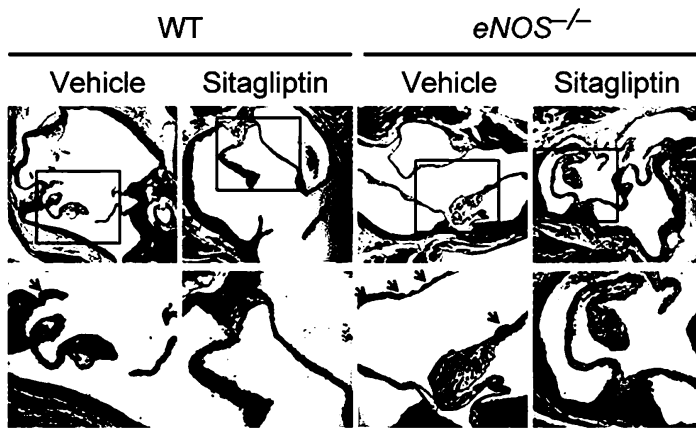


b

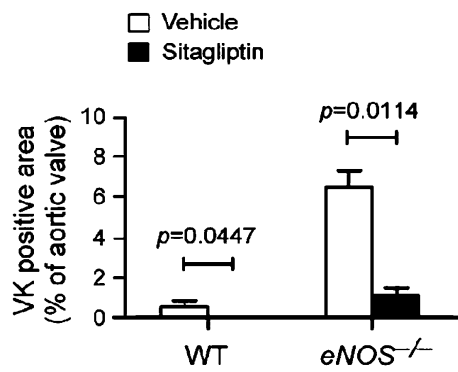


도면10

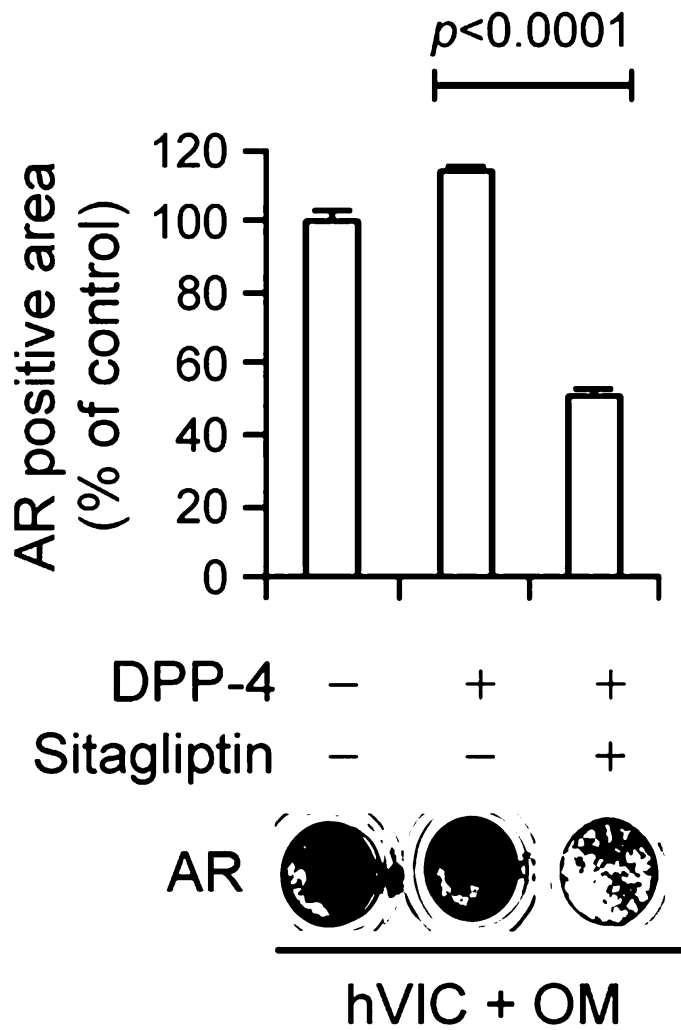
a



b



도면11



서열 목록

- <110> THE ASAN FOUNDATION
- <120> Composition for preventing or treating valvular calcification comprising Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor
- <130> PP-B1553
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1

cagccagata acatgccaca cccaaccct tc

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 2

gaaggggttg ggtgtggcat gttatctggc tg

32