



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0008218  
(43) 공개일자 2009년01월21일

- (51) Int. Cl.<sup>9</sup>  
 G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/37 (2006.01)  
 G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7024813  
 (22) 출원일자 2008년10월10일  
 심사청구일자 없음  
 번역문제출일자 2008년10월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2007/006653  
 국제출원일자 2007년03월13일  
 (87) 국제공개번호 WO 2007/106595  
 국제공개일자 2007년09월20일
- (30) 우선권주장  
 60/781,924 2006년03월13일 미국(US)  
 (뒷면에 계속)
- (71) 출원인  
 백톤 디킨슨 앤드 컴퍼니  
 미합중국, 뉴저지주, 프랭클린 레이크스, 1백톤  
 드라이브 (우:07417-1880)
- (72) 발명자  
 오펜란, 패트릭  
 미국 08527 뉴저지주 잭슨 제니 레인 23  
 젤판드, 크래이그, 에이.  
 미국 08527 뉴저지주 잭슨 버튼우드 드라이브 569
- (74) 대리인  
 김영, 양영준

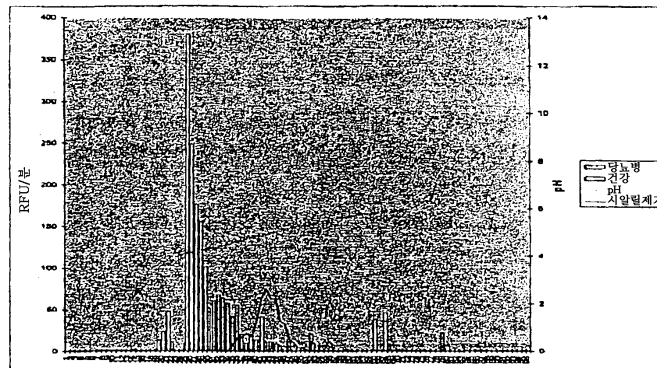
전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 디펩티딜 펩티다제-관련 질병 상태의 진단 및 예후

(57) 요약

환자 샘플로부터의 식별화된 디펩티딜 디펩티다제의 파라미터의 측정, 및 상기 파라미터의 질병과의 상관을 포함하는, 질병 상태의 진단 또는 예후를 위한 방법이 제공된다.

대표도 - 도10



(30) 우선권주장

60/804,397 2006년06월09일 미국(US)

60/892,767 2007년03월02일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

환자 샘플로부터의 특정 DPP의 하나 이상의 식별화된 분획의 1종 이상의 파라미터를 측정하는 것; 및  
상기 측정된 DPP 파라미터를 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도와 상관시키는 것을 포함하는, 특정 디펩티딜 펩티다제 (DPP) 파라미터에 의해 특성화되는 질병 상태 또는 이상의 진단 또는 예후 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 각 분획이 1종 이상의 DPP 동형을 포함하는 방법.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, 각 분획이 1종의 DPP 동형을 포함하는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 하나 이상의 분획은 DPP 동형을 포함하지 않으며, 다른 분획들은 1종 이상의 DPP 동형을 포함하는 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 질병 상태가 대사 질병 상태, 암, 바이러스 감염 및 자가면역 질병으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 질병 상태가 유형 II의 당뇨병인 방법.

### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 파라미터가 양, 농도, 활성, 발현, 번역-후 수식의 유형 및 번역-후 수식의 양으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 파라미터가 DPP 활성이며, 상기 측정이 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 기질 상에서 DPP 활성의 가수분해 생성물의 존재 또는 양을 검출하는 분석법을 통하여 수행되는 방법.

### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 특정 DPP가 DPP-IV이며, 상기 파라미터가 DPP-IV 활성인 방법.

### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 기질이 X-Y-R이며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고, Y는 프롤린, 알라닌 또는 아르기닌이며, R은 임의의 검출가능한 표지인 방법.

### 청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 파라미터가 1종 이상의 DPP 동형에 특이적인 항체 또는 렉틴을 사용하여 측정되는 방법.

### 청구항 12

제 1항에 있어서, 1종을 초과하는 DPP 파라미터가 측정되는 방법.

### 청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 환자 샘플이 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 눈물, 점액, 소변, 양수, 윤활관절액,

정액, 뇌척수액 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 14**

제 1항에 있어서, 질병 상태의 존재, 부재 또는 중증도를 운용자에게 전달하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 15**

제 14항에 있어서, 상기 전달이 전자 스크린, 디지털 스크린, 인쇄가능 재료 및 청취가능 신호로 구성되는 군에서 선택되는 매체에 질병 상태를 표시하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 16**

제 1항에 있어서, 환자 샘플에 존재하는 특정 DPP의 DPP 분획을 식별화하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 상기 식별화가 상기 측정 전에 수행되는 방법.

**청구항 18**

제 16항에 있어서, 상기 식별화가 상기 측정과 동시에 수행되는 방법.

**청구항 19**

제 1항에 있어서, 상기 환자 샘플이 상기 측정 전에 가공되는 방법.

**청구항 20**

제 19항에 있어서, 상기 가공이 균질화, 희석, 농축, 냉동 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 21**

제 16항에 있어서, 상기 식별화가 물리적 분리 또는 단리에 의해 수행되는 방법.

**청구항 22**

제 21항에 있어서, 상기 식별화가 겔이 없는 구성(gel-free format)을 사용하여 수행되는 방법.

**청구항 23**

제 22항에 있어서, 상기 겔이 없는 구성이 자유-유동 전기영동 및 매트릭스 없는 전기영동으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 24**

제 16항에 있어서, 상기 DPP 분획이 DPP 동형의 등전점을 기반으로 식별화되는 방법.

**청구항 25**

제 16항에 있어서, 2개 이상의 상기 DPP 분획이 존재하는 방법.

**청구항 26**

제 1항에 있어서, 상기 상관이 측정된 파라미터를 상응하는 표준의 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 27**

제 1항에 있어서, 상기 상관이 측정된 파라미터를 상응하는 자체 대조의 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 28**

제 25항에 있어서, 상기 파라미터가 상기 2개 이상의 분획에 대하여 측정되는 방법.

**청구항 29**

제 28항에 있어서, 상기 상관이 하나 이상 분획의 파라미터를 2개 이상의 분획에 대한 상응하는 총 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 30**

제 29항에 있어서, 상기 상관이 하나 이상 분획의 파라미터를 모든 분획에 대한 상응하는 총 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 31**

제 28항에 있어서, 상기 상관이 하나 이상 분획의 측정된 파라미터를 하나 이상의 다른 분획의 상응하는 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 32**

제 28항에 있어서, 상기 상관이 2개 이상 분획에 대한 총 측정 파라미터를 상응하는 표준의 총 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 33**

제 28항에 있어서, 상기 상관이 2개 이상 분획에 대한 총 측정 파라미터를 상응하는 자체 대조의 총 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 34**

제 1항에 있어서, 상기 특정 DPP는 DPP-IV인 방법.

**청구항 35**

환자 샘플로부터의 하나 이상의 식별화된 DPP 동형의 1종 이상의 파라미터를 측정하는 것; 및 상기 측정된 DPP 파라미터를 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도와 상관시키는 것을 포함하는, 디펩티딜 펩티다제 (DPP) 파라미터에 의해 특성화되는 질병 상태 또는 이상의 진단 또는 예후 방법.

**청구항 36**

제 35항에 있어서, 상기 질병 상태가 대사 질병 상태, 암, 바이러스 감염 및 자가면역 질병으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 37**

제 35항에 있어서, 상기 파라미터가 양, 농도, 활성, 발현, 번역-후 수식의 유형 및 번역-후 수식의 양으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 38**

제 35항에 있어서, 1종을 초과하는 DPP 파라미터가 측정되는 방법.

**청구항 39**

제 35항에 있어서, 상기 환자 샘플이 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 눈물, 점액, 소변, 양수, 윤활관절액, 정액, 뇌척수액 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 40**

제 35항에 있어서, 질병 상태의 존재, 부재 또는 중증도를 운용자에게 전달하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 41**

제 35항에 있어서, 환자 샘플에서 DPP 동형을 식별화하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 42**

제 41항에 있어서, 상기 식별화가 상기 측정 전에 수행되는 방법.

**청구항 43**

제 41항에 있어서, 상기 식별화가 상기 측정과 동시에 수행되는 방법.

**청구항 44**

제 41항에 있어서, 상기 환자 샘플이 상기 측정 전에 가공되는 방법.

**청구항 45**

제 41항에 있어서, 상기 식별화가 물리적 분리 또는 단리에 의해 수행되는 방법.

**청구항 46**

제 45항에 있어서, 상기 DPP 분획이 DPP 동형의 등전점을 기반으로 식별화되는 방법.

**청구항 47**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 측정된 파라미터를 상응하는 표준의 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 48**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 측정된 파라미터를 상응하는 자체 대조의 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 49**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 1종 이상 동형의 파라미터를 2종 이상의 다른 동형에 대한 상응하는 총 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 50**

제 49항에 있어서, 상기 상관이 1종 이상 동형의 파라미터를 모든 동형에 대한 상응하는 총 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 51**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 1종 이상 동형의 측정된 파라미터를 1종 이상의 다른 동형의 상응하는 측정 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 52**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 2종 이상 동형에 대한 총 측정 파라미터를 상응하는 표준의 총 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 53**

제 35항에 있어서, 상기 상관이 2종 이상 동형에 대한 총 측정 파라미터를 상응하는 자체 대조의 총 파라미터에 비교하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 54**

환자 샘플로부터의 DPP-IV 동형의 하나 이상의 식별화된 분획의 1종 이상의 파라미터를 측정하는 것; 및 상기 측정된 파라미터를 유형 II 당뇨병의 존재, 부재 또는 중증도와 상관시키는 것을 포함하는, 유형 II 당뇨병의 진단 또는 예후 방법.

**청구항 55**

제 54항에 있어서, 각 측정된 분획이 1종 이상의 DPP-IV 동형을 포함하는 방법.

**청구항 56**

제 54항에 있어서, 각 측정된 분획이 1종의 DPP-IV 동형을 포함하는 방법.

**청구항 57**

제 54항에 있어서, 하나 이상의 분획은 DPP-IV 동형을 포함하지 않으며, 다른 분획들은 1종 이상의 DPP-IV 동형을 포함하는 방법.

**청구항 58**

제 54항에 있어서, 상기 파라미터가 양, 농도, 활성, 발현, 번역-후 수식의 유형 및 번역-후 수식의 양으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 59**

제 58항에 있어서, 상기 파라미터가 DPP-IV의 활성인 방법.

**청구항 60**

제 59항에 있어서, 상기 DPP-IV의 활성이 표지된 기질 상에서 DPP-IV 활성의 가수분해 생성물의 존재 또는 양을 검출하는 분석법을 통하여 측정되는 방법.

**청구항 61**

제 60항에 있어서, 상기 기질이 X-Y-R이며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고, Y는 알라닌, 프롤린 또는 아르기닌이며, R은 임의의 검출가능한 표지인 방법.

**청구항 62**

제 54항에 있어서, 상기 파라미터가 1종 이상의 DPP 동형에 특이적인 항체 또는 렉틴을 사용하여 측정되는 방법.

**청구항 63**

제 54항에 있어서, 1종을 초과하는 DPP-IV 파라미터가 측정되는 방법.

**청구항 64**

제 54항에 있어서, 상기 환자 샘플이 혈액, 혈장, 혈청 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 방법.

**청구항 65**

제 54항에 있어서, 유형 II 당뇨병의 존재, 부재 또는 중증도를 운용자에게 전달하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 66**

제 54항에 있어서, DPP-IV를 분획으로 식별화하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 67**

제 66항에 있어서, 상기 식별화가 상기 측정 전에 수행되는 방법.

**청구항 68**

제 54항에 있어서, 상기 DPP-IV 동형이 등전점을 기반으로 식별화되는 방법.

**청구항 69**

제 68항에 있어서, 측정되는 파라미터가 DPP-IV의 활성인 방법.

**청구항 70**

제 69항에 있어서, 연속되는 범위의 분획들의 활성이 측정되는 방법.

**청구항 71**

제 70항에 있어서, 연속되는 범위의 분획들 전체에 걸친 활성 추이도표를 수득하는 것을 더 포함하는 방법.

**청구항 72**

제 71항에 있어서, 당뇨병의 존재가

- a. 약 pH 4.4 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 90 %를 초과하지 않는 것;
- b. 약 pH 4.15 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 60 %를 초과하지 않는 것;
- c. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 10 % 이상이 약 pH 4.4 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 것;
- d. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 40 % 이상이 약 pH 4.15 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 것;
- e. 약 pH 4.4에서 DPP-IV 활성 추이도표의 피크가 존재하며, 여기서 상기 피크는 연속되는 범위의 총 측정된 활성의 약 10 % 이상과 관련되는 것;
- f. 약 pH 4.8에서 DPP-IV 활성 추이도표의 피크가 존재하며, 여기서 상기 피크는 연속되는 범위의 총 측정된 활성의 약 10 % 이상과 관련되는 것;
- g. 자체 음성 대조와 비교하여 더 높은 pH로의 DPP-IV 활성 추이도표의 이동;
- h. 음성 표준과 비교하여 더 높은 pH로의 DPP-IV 활성 추이도표의 이동; 및
- i. 이들의 조합

으로 구성되는 군에서 선택되는 활성 추이도표 특징과 상관되는 방법.

**청구항 73**

제 71항에 있어서, 당뇨병의 부재가

- a. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 90 % 이상이 약 pH 4.2 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 것;
- b. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 60 % 이상이 약 pH 3.9 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 것;
- c. 약 pH 4.2 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 10 %를 초과하지 않는 것;
- d. 약 pH 3.9 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 40 %를 초과하지 않는 것;
- e. 자체 양성 대조와 비교하여 더 낮은 pH로의 DPP-IV 활성 추이도표의 이동;
- f. 양성 표준과 비교하여 더 낮은 pH로의 DPP-IV 활성 추이도표의 이동; 및
- g. 이들의 조합

으로 구성되는 군에서 선택되는 활성 추이도표 특징과 상관되는 방법.

명세서

기술분야

- <1> <상호 참조>
- <2> 본 출원은 "Method of Diagnosing Disease by Isoform Profiling"이라는 발명의 명칭으로 2006년 3월 13일에 출원된 미국 가출원 제60/781,924호, "Separation and Characterization of Dipeptidyl Peptidase IV Isoforms Using Free Flow Electrophoresis (FFE)"라는 발명의 명칭으로 2006년 6월 9일에 출원된 미국 가출원 제60/804,397호, 및 "Separation and Characterization of Dipeptidyl Peptidase IV Isoforms and/or Isozymes Using Matrix (Free Flow) Electrophoresis"라는 발명의 명칭으로 2007년 3월 2일에 출원된 출원번호 미지정 미국 가출원 (대리인 기록 번호 P-7148)의 출원일에 대한 우선권을 주장하는 바이며, 이로써 그 전체 개시내용은 여기에 참조로써 개재되는 바이다.
- <3> 본 발명은 일반적으로 질병 또는 이상(condition)의 진단 및 예후에 관한 것이다.

배경기술

- <4> 질병에 대한 위험도를 평가하거나 그것을 진단하는 현재의 방법들은 종종 소실 과정인 생리적마모(attrition)에 의하거나, 또는 침습 수술(invasive surgery)이나 생검에 의한 진단에 의존하고 있다. 명확한 진단이 내려진 후에도, 예후는 일반적으로 주관적인 요인에 기반한다.
- <5> 대사 질병과 같은 소정 질병에서는, 그에 의해 객관적인 진단이 이루어질 수 있는 방법들이 종종 귀찮고, 시간이 걸리며, 비용이 소요된다. 예를 들어, 유형 2 당뇨병을 진단하는 주된 방법은 혈장의 혈당 농도를 측정하는 공복 혈당(fasting plasma glucose) 시험이다. 이 시험은 환자가 8-14시간 동안 금식할 것을 필요로 하며, 종종 수시간 내지 수일의 기간에 걸친 여러 번의 혈액 채취를 필요로 한다. 또한, 공복 혈당 시험은 유형 2 당뇨병의 존재를 진단하는 데에 유용하긴 하지만, 질병의 예후를 제공하는 그의 능력에 있어서는 시험이 매우 제한적이다.
- <6> 의학 분야에서는, 질병 또는 이상을 진단하여 치료하기 위한 덜 침습성이며, 물리적으로 덜 귀찮고, 더 정확한 방법에 대한 꾸준한 탐색이 있어 왔다. 생물학적 과정들 및 이러한 과정들과 관련된 생화학의 더 큰 지식이 펼쳐지면서, 소정 질병 또는 이상에 대한 표식자 또는 지표로서 어떤 조성을 식별할 수 있을 것이라는 소정의 이론들이 전개되었다. 그의 일종으로서, 프로테아제 및 펩티다제들이 진단에서의, 그리고 환자 치료를 위한 표적으로서의 그의 유용성에 대하여 조사되었다.
- <7> 일반적인 예비지식으로로서, 프로테아제/펩티다제는 통상적으로 작용 부위, 기질 선호도, 및 기작과 같은 수많은 기준에 의해 분류된다. 예를 들어, 아미노펩티다제는 폴리펩티드의 N-말단 잔기에 우선적으로 작용하며, 카복시펩티다제는 C-말단에 우선적으로 작용하고, 엔도펩티다제는 이들 양 말단의 사이의 부위에 작용한다.
- <8> 디펩티딜 펩티다제 (DPP)는 그의 특이적 기질로부터 디펩티드 단위, 즉 2개 아미노산 단위를 특이적으로 절단하는 펩티다제이다. 수많은 상이한 DPP들이 있으며, 그 기질 선호도는 종종 절단 부위에 접하는 N-말단인 아미노산 잔기를 기준으로 표현된다. 예를 들어, DPP-I (IUBMB 효소 명명법 EC.3.4.14.1)은 Xaa가 Arg 또는 Lys이거나, Yaa 또는 Zaa가 Pro인 경우를 제외하고는 Xaa-Yaa-|-Zaa로 N-말단 디펩티드를 방출하는 리소솜계 시스템인-유형의 펩티다제이다. DPP-II (IUBMB 효소 명명법 EC.3.4.14.2)는 Yaa 가 Ala 또는 Pro인 경우에 우선적으로 N-말단 디펩티드 Xaa-Yaa-|-를 방출하는 리소솜계 세린-유형의 펩티다제이다. DPP-III (IUBMB 효소 명명법 EC.3.4.14.4)는 pH 9.2에서 Arg-Arg-z (z는 임의의 아미노산임)에 대해 매우 선택적이기는 하나, 펩티드에 대해 광범위한 활성을 가지는 세포질계 펩티다제이다. DPP-IV (IUBMB 효소 명명법 EC.3.4.14.4)는 Yaa가 Pro이고, 단 Zaa가 Pro 또는 하이드록시프롤린이 아닌 경우에 우선적으로 Xaa-Yaa-|-Zaa로부터 N-말단 디펩티드를 방출하는 막-결합의 세린-유형 펩티다제이다.
- <9> DPP는 생리학적으로 중요한 광범위한 활성들과 관련되어 있으며, 신경 시스템, 내분비 시스템, 면역 시스템 및 소화 시스템의 조절과 연관되어 있다. 단백질 분해 및 효소 활성화와 같은 많은 세포내 및 세포외 기능에서 DPP의 활성이 증명된 바 있다.
- <10> 상기 언급한 특정 DPP들 중에서는, DPP-IV가 그의 부수적인 동형(isoform) 및 동종효소(isozyme) 또는 구조적 동족체(structural homolog), 및 DPP-IV-유사 활성을 나타내는 단백질들과 함께 폭넓게 연구되어 왔다. DPP-IV-유사 활성을 나타내는 단백질들은 디펩티딜 펩티다제 IV 활성의, 및/또는 구조적 동족체, 또는 "DASH"로 명

명된 바 있다. DPP-IV는, 그에 제한되는 것은 아니나, DPP4, DP4, DAP-IV, FAP β 아데노신 데아미나제 복합 단백질 2, 아데노신 데아미나제 결합 단백질 (ADAbp), 디펩티딜 아미노펩티다제 IV; Xaa-Pro-디펩티딜-아미노펩티다제; Gly-Pro 나프틸아미다제; 포스트프로린 디펩티딜 아미노펩티다제 IV; 림프구 항원 CD26; 글리코단백질 GP110; 디펩티딜 펩티다제 IV; 글리실프롤린 아미노펩티다제; 글리실프롤린 아미노펩티다제; X-프롤릴 디펩티딜 아미노펩티다제; pep X; 백혈구 항원 CD26; 글리실프롤릴 디펩티딜아미노펩티다제; 디펩티딜-펩티드 하이드롤라제; 글리실프롤릴 아미노펩티다제; 디펩티딜-아미노펩티다제 IV; DPP IV/CD26; 아미노 아실-프롤릴 디펩티딜 아미노펩티다제; T 세포 유발 분자 Tp103; X-PDAP를 포함한 수많은 명칭으로 지칭되는 유형 II의 막 단백질이다 (부르게스(Burgess) 등의 미국 특허 제7,169,926호).

- <11> 세프라제, 섬유모세포 활성화 단백질 α, DPP6, DPP8, DPP9, 아트락틴, N-아세틸화-α-결합-산성 디펩티다제 I, II 및 L, 휴지 세포 프롤린 디펩티다제, 가슴샘-특이적 세린 프로테아제 및 DPP IV-β (문헌 [Busek et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:408-421 (2004)])와 같은 수많은 DASH 단백질들이 보고되어 있다.
- <12> DPP-IV는 장, 간, 폐, 신장 및 태반을 포함한 매우 다양한 조직의 상피 및 내피 세포에서 항상 발현된다 (문헌 [Hartel et al., *Histochemistry* 89 (2):151-161 (1988)]; [Yaron and Naider, *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28 (1):31-81 (1993)]). DPP-IV는 혈중 T-림프구에서 발현되며, 세포-표면 항원인 CD-26과 같은 것을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Sedo et al., *Arthritis Res. Ther.* 7:253-269 (2005)]). 막-결합 형태 이외에도, DPP-IV는 가용성의 형태로도 존재하며, 혈장 및 윤활액과 같은 체액에서도 DPP-IV 활성이 발견될 수 있다 (문헌 [Sedo et al., *Arthritis Res. Ther.* 7:253-269 (2005)]; [Gorrell, *Clinical Sci.* 108:277-292 (2005)]).
- <13> DPP-IV는 신경펩티드 대사, T-세포 활성화, 세포 부착, 신장과 장에서의 프롤린 함유 펩티드의 분해, HIV 감염 및 세포자멸사, 및 소장 흑색종 세포에서의 종양형성의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다 (문헌 [Mattem et al., *Scand. J. Immunol.* 33:737 (1991)]; [Pethiyagoda et al., *Clin. Exp. Metastasis* 18 (5):391-400 (2000)]).
- <14> DPP-IV의 자연상에서의 기질에는 수종의 케모카인, 시토카인, 신경펩티드, 혈중 호르몬 및 생물활성 펩티드가 포함된다 (문헌 [Lambeir et al., *J. Biol. Chem.* 276 (32):29839-29845 (2001)]). 펩티드 호르몬의 대사 및 아미노산 수송에서의 DPP-IV의 핵심적인 조절 역할이 제시된 바 있다 (문헌 [Hildebrandt et al., *Clin. Sci. (Lond.)* 99 (2):93-104 (2000)]).
- <15> DPP-IV의 발현은 T-세포에서 분열유발성 또는 항원성 자극에 의해 증가되는데, 이는 면역 시스템에서의 역할을 암시한다 (문헌 [Mattem et al., *Scand. J. Immunol.* 33:737 (1991)]). 시토카인 생성, IL-2 매개 세포 증식 및 B-세포 조력자(helper) 활성화와 같은 T-림프구의 다른 다양한 기능들 역시 DPP-IV 활성화에 의존하는 것으로 밝혀진 바 있다 (문헌 [Schon et al., *Scand. J. Immunol.* 29:127 (1989)]). 또한, DPP-IV는 T-세포 활성화 및 증식시 공동-자극 기능을 가지는 것으로 보인다 (문헌 [von Bonin et al., *Immunol. Rev.* 161:43-53 (1998)]).
- <16> DPP-IV는 세포의 효소인 아데노신 데아미나제 (ADA)의 위치결정을 위한 막-고정 기능 (문헌 [Franco et al., *Immunol. Rev.* 161:27-42 (1998)]) 및 콜라겐 및 섬유결합소에의 결합에 의한 세포 기질 부착에의 참여 (문헌 [Loster et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (1):341-348 (1995)])를 포함한 다른 생물학적 과정에도 관련되어 있다.
- <17> DPP-IV는 또한, 내분비 조절 및 대사 생리에서도 역할을 하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, DPP-IV는 글루카곤 유사 펩티드-1 (GLP-1)의 아미노-말단 His-Ala 디펩티드를 절단하여 GLP-1 수용체 길항제를 생성시킴으로써 GLP-1에 대한 생리학적 반응을 단축시킨다. 해당 기질에 그 2개의 N-말단 아미노산의 제거에 의해 불활성화되는 인슐린자극성 호르몬 GLP-1 및 위장 억제 펩티드 (GIP)가 포함되기 때문에, DPP-IV는 글루코스 대사의 조절에도 관련되어 있다 (문헌 [Mannucci et al., *Diabetologia* 48:1168-1172 (2005)]).
- <18> 정상적인 생리학적 기능 이외에도, DPP는 암, 자가면역 질병, 심장혈관 질병, 대사 질병 및 감염성 질병을 포함한 질병 상태에서의 그의 역할에 대해서도 연구되어 왔다.
- <19> 예를 들어, DPP-IV가 폐-전이성 유방 및 전립샘 암종 세포를 위한 부착 분자라는 것이 제안된 바 있다 (문헌 [Johnson et al., *J. Cell. Biol.* 121:1423 (1993)]). 양성 전립샘 비대증을 가진 환자로부터의 조직 균질액 및 프로스타토솜(prostatosome)에서 높은 DPP-IV 활성이 발견된 바 있다 (문헌 [Vanhoof et al., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30:333 (1992)]).
- <20> 자가면역 질병인 건선, 류마티스 관절염 (RA) 및 편평 태선을 가지는 환자로부터의 인간 피부 섬유모세포 세포

에서 고농도의 DPP-IV 발현이 발견된 바도 있다 (문헌 [Raynaud et al., *J. Cell. Physiol.* 151:378 (1992)]).

- <21> DPP-IV는 비만증과 같은 수많은 대사 질병 및 식욕 조절과 관련되어 있다. 예를 들어, 더 집중적으로 연구된 DPP-IV-관련 대사 질병 중 하나는 유형 2의 당뇨병이다. 만누치(Mannucci) 등은 당뇨병에서의 만성 고혈당증과 DPP-IV 사이의 관계를 규정하여 기술하고 있다. 이 연구는 혈중 DPP-IV 활성이 유형 II 당뇨병에서의 고혈당증 정도와 직접적으로 상관되어 있다고 결론하고 있다.
- <22> 다른 연구에서는 DPP-IV와 혈당 농도를 조절하는 호르몬 연쇄반응에 관련된 다양한 호르몬들 사이의 관계에 대해 논의되고 있다. 이러한 연구들은 DPP-IV가 인슐린 분비에 중요한 호르몬을 분해하는 것으로 결론짓고 있다. 구체적으로는, DPP-IV가 글루카곤-유사 1 펩티드 (GLP-1)을 분해함으로써 인슐린 분비의 감소 및 그에 따른 혈당의 증가를 초래한다는 것이 제안된 바 있다. 이러한 현상을 기반으로, 유형 II 당뇨병의 치료를 위한 DPP-IV의 억제제들이 개발되고 있다 (문헌 [Green et al., *Diab. Vasc. Dis. Res.* 3 (3):159-165 (2006)]).
- <23> DPP-IV는 분명히 CD4<sup>+</sup> T-세포에서의 HIV-1 및 HIV-2 바이러스의 침투 및 감염성에 필수적이다 (문헌 [Wakselman et al., *J. Dermatol. Sci.* 22:152-160 (2000)]). 따라서, DPP-IV의 억제가 이러한 기작 역시 억제할 수 있을 것이라는 일부 제안이 있다.
- <24> 최근, 일부 DPP 연구 조류는 DPP-관련 질병 상태 및 이상의 치료법 및 요법을 개발하기 위한 수단으로서 DPP 농도의 조작에 대해 초점을 맞추고 있다. 그러나, 지금까지는 이러한 작업으로부터 거의 치료법 및 요법이 나오지 않고 있다.
- <25> <발명의 개요>
- <26> DPP 및 생물학적 과정들에서의 그의 역할에 기반한 치료법과 진단 수단의 개발은 여전히 탐색중이다. 여기에서 기술되는 본 발명의 일 구현예는 DPP-관련 질병 상태 또는 이상의 예후 또는 진단 방법에 관한 것이다. 구체적으로는, 특정 DPP의 식별화된 분획(discriminated portions of a specific DPP)의 1종 이상의 파라미터가 측정되고, 측정치는 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도와 상관된다.
- <27> 여기에서 기술되는 본 발명의 다른 구현예는 DPP-관련 질병 상태 또는 이상의 예후 또는 진단 방법에 관한 것이다. 구체적으로는, DPP 동형의 식별화된 분획(discriminated portions of DPP isoforms)의 1종 이상의 파라미터가 측정되고, 측정치는 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도와 상관된다.
- <28> 기술되는 본 발명의 또 다른 구현예는 유형 II 당뇨병의 진단 또는 예후 방법에 관한 것이다. 구체적으로는, 환자 샘플로부터의 하나 이상의 DPP-IV 동형의 식별화된 분획(discriminated portions of DPP-IV isoforms)의 1종 이상의 파라미터가 측정되고, 측정치는 유형 II 당뇨병의 존재, 부재 또는 중증도와 상관된다.

**발명의 상세한 설명**

- <43> <본 발명 수행을 위한 최적 양태>
- <44> 여기에서 기술되는 방법들은 디펩티딜 펩티다제 (DPP)-관련 질병 상태 또는 이상의 위험도 평가, 진단 또는 예후를 제공한다. 특히, 기술되는 방법들은 특정 DPP 파라미터와 관련된 질병 상태 또는 이상의 위험도 평가, 진단 또는 예후 방법에 관한 것이다. 기술되는 방법의 구현예들에 따라, 식별화된 DPP 분획의 파라미터가 측정된다. 다음에, 측정치는 상기 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도와 상관된다.
- <45> 본 출원의 목적상, "프로테아제" 및 "펩티다제"라는 용어는 호환가능하게 사용되며, 펩티드성 아마이드 결합의 가수분해를 촉진하는 효소를 지칭한다. 디펩티딜 펩티다제 (DPP)는 폴리펩티드로부터 디펩티드 단위를 절단하는 프로테아제이다.
- <46> 여기에서 사용되는 "특정 DPP의 식별화된 분획"이라는 용어는 소정의 방식으로 서로 구별되거나, 분리되거나 또는 단리된 환자 샘플로부터의 특정 DPP (예, 특정 DPP 계열, 예컨대 DPP-I, DPP-II, DPP-III, DPP-IV 등에 속하는 1종 이상의 동형)를 지칭한다.
- <47> 일 구현예에서는, 특정 DPP가 특정 DPP의 1종 이상의 동형을 1종 이상의 다른 DPP 동형으로부터 구별하게 되는 소정의 조건에 적용된다. 각 식별화된 분획은 특정 DPP의 1종 이상의 DPP 동형을 포함할 수 있으며, 어떤 분획은 DPP 동형을 포함하지 않을 수도 있다. 다른 구현예에서는, DPP (하나의 계열 또는 하나 이상 계열의 DPP를 포함할 수 있는)가 DPP의 1종 이상의 동형을 1종 이상의 다른 DPP 동형으로부터 구별하게 되는 소정의 조건에 적용된다.

- <48> 구체적으로, 개별적인 DPP 동형은 완전하게 또는 부분적으로만 일부로 및 서로 식별화될 수 있다. 따라서, 하나의 식별화된 분획이 1종 이상의 동형을 포함할 수 있거나, 또는 각 식별화된 분획이 하나의 동형 만을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 하나의 식별화된 분획이 하나의 동형을 포함할 수 있는 동시에, 다른 식별화된 분획들은 1종 이상의 동형을 포함한다. 또한, 1종 이상의 다른 분획이 1종 이상의 DPP 동형을 포함하게 되면, 어떤 식별화된 분획은 DPP 동형을 포함하지 않을 수 있다.
- <49> 특정 DPP는 DPP-I, DPP-II, DPP-III 또는 DPP-IV를 포함한 소정의 특정 DPP 또는 DASH 계열의 구성원일 수 있다. 예시되는 구현예들에서, DPP는 DPP-IV이다. 특정한 것으로 명시되지 않는 DPP에는 비-특정 및 특정 DPP 모두가 포함된다.
- <50> 여기에서 사용되는 DPP의 "동형"이라는 용어는 일부 물리적인 특징에서는 상이하나 모두 공통적인 특징적 촉매 활성, 상동의 1차 구조/아미노산 서열을 가지며, 동일한 유전자 좌에서 유래하는 1종 이상 DPP 효소의 다중적인 형태들 중 어느 것을 지칭한다. DPP 동형의 촉매 활성이 촉매작용의 정도 또는 속도에서 동일할 필요는 없으며 단지 공통적인 기질 프로파일만을 필요로 한다. 마찬가지로, 동형의 1차 구조가 동일할 필요는 없으며, 오히려 효소 아미노산 서열에서의 미미한 첨가, 결실 또는 돌연변이의 결과물일 수 있다.
- <51> 동형은 유사하거나 동일한 1차 구조를 가질 수 있으며, 동일한 촉매 활성 또는 상이한 촉매 활성(들)을 가질 수 있다. 동형의 1차 구조는 동일한 촉매 활성을 유지하면서도 상당히 다를 수 있다. 동형은 동일하거나 상이한 2차 구조, 3차 구조 및/또는 4차 구조를 가질 수 있으나, 그들이 동일하거나 유사한 1차 구조 및/또는 효소 활성을 유지하거나 및/또는 동일한 유전자 좌로부터 유래하는 한, 여전히 서로 간의 동형이다.
- <52> 동형은 동일한 유전자 좌로부터, 또는 상이한 유전자 좌로부터 유래할 수 있다. 이들은 상이한 대립유전자; 다중의 유전자 좌; 동일한 유전자로부터 생성된 전령 RNA의 선택적인 스플라이싱(splicing)의 결과; 또는 다당류, 인산, 술폰드릴, 시알산 또는 기타 기의 첨가와 같은 번역-후 수식(post-translational modification)의 결과일 수 있다.
- <53> 여기에서 사용되는 경우, "동형"에는 또한 동종효소가 포함된다. 여기에서 사용되는 "동종효소(isozyme)" (다르게는 동종효소(isoenzyme))라는 용어는 1차 구조/아미노산 서열의 유전적으로 결정된 차이로부터 발생하는 효소의 다중 형태들 중 어느 것을 지칭하는 동형의 유형이다.
- <54> 동일한 촉매 활성, 유전자 좌 또는 1차 구조를 공유하는 모든 효소 군은 서로 간의 동형이다. 다수의 DPP 동형들이 알려져 있다. 예를 들면, DPP-I은 동일한 유전자 (엔트레즈(Entrez) 유전자 유전자ID: 1075)로부터 코딩되는 전사체 변형물로부터 유래하는 2종 이상의 동형으로 존재한다. 마찬가지로, 다수의 동형이 DPP-II (문헌 [DiCarantonio et al., *Gamete Res.* 15 (2):161 175 (2005)]), DPP-III (문헌 [Mazzocco et al., *FEBS Journal* 273 (5):1056 1064 (2006)]) 및 DPP-IV (문헌 [Schmauser et al., *Glycobiol.* 9 (12):1295 1305 (1999)])에 대하여 보고된 바 있다.
- <55> 예를 들어, 프롤린-후 디펩티드 결합을 절단하는 모든 효소는 DPP-IV 동형이다. 업계 숙련자라면, DPP의 많은 동형에 대하여 쉽게 알 수 있을 것이다. 여기에서 모든 동형이 식별되는 것은 아니다. 제한하는 것은 아니나 예시하자면, DPP-IV 동형에는 DPP-IV; DPP-IV의 다양한 시알화 형태들; 막-결합 DPP-IV; 용해성 DPP-IV; 및 디펩티딜 펩티다제 IV 활성 및/또는 구조 동족체 (DASH) 중 어느 것, 예컨대 세프라제, 섬유모세포 활성화 단백질  $\alpha$ , DPP6, DPP8, DPP9, 아트락틴, *N*-아세틸화- $\alpha$ -결합-산성 디펩티다제 I, II 및 L, 휴지 세포 프롤린 디펩티다제, 가슴샘-특이적 세린 프로테아제 및 DPP IV- $\beta$ 가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <56> 측정될 수 있는 DPP 파라미터에는 양, 농도, 활성, 발현, 또는 번역-후 수식의 양 또는 유형이 포함된다.
- <57> DPP의 "양"에는 DPP의 존재, 부재 또는 양이 포함된다. DPP의 "활성"에는 비활성(specific activity)을 포함한 효소 활성의 존재, 부재, 양, 정도 또는 속도가 포함된다. DPP의 "발현"에는 DPP 발현의 존재, 부재, 속도 또는 양이 포함된다. DPP의 "농도"는 분획(portion)에 존재하는 단위 부피 당 DPP 동형의 양이다.
- <58> DPP 파라미터는 직접적으로 또는 간접적으로 측정될 수 있으며, 정성적인 것 또는 정량적인 것일 수 있다.
- <59> DPP 활성은 정량적으로 또는 정성적으로 DPP 활성을 측정할 수 있는 모든 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. DPP의 활성을 측정하는 데에 적합한 분석법에는 검출가능하게 표지된 기질 상에서 DPP 활성의 가수분해 생성물의 존재 또는 양을 검출하는 분석법이 포함된다. 표지는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능할 수 있으며, 형광발생성, 화학발광성, 비색성 또는 방사성일 수 있다. 형광성 표지에는 7-아미노-4-메틸쿠마린 (AMC) 및 7-아미노-4-트리플루오로메틸쿠마린 (AFC)가 포함된다.

- <60> 업계 숙련자들이 이해할 수 있는 바와 같이, 신호의 검출 양식은 분석에 이용되는 정확한 검출 시스템에 따라 달라질 것이다. 검출 시스템은 질량 변화, 아미노산 서열 또는 펩티드 길이 상의 변화, 발색성의 변화 또는 형광성의 변화를 측정할 수 있다. 검출 방법으로는 업계에 기술되어 있는 매우 다양한 검출 체계 중에서도 검출 가능한 변화로 귀결되는 2차적인 효소 반응을 포함한 2차 검출 체계를 사용할 수 있다.
- <61> 예를 들어, 방사성표지된 검출 시약이 이용되는 경우에는, 신호는 섬광 계수, 방사선사진촬영 (통상적으로 주사 농도측정법과 조합된) 등과 같이 생물학적 샘플로부터의 신호를 정량할 수 있거나, 또는 생물학적 샘플로부터의 신호를 참조 샘플로부터의 신호와 비교할 수 있는 기술을 사용하여 측정될 것이다. 화학발광성 검출 시스템이 사용되는 경우라면, 신호는 통상적으로 조도계를 사용하여 검출될 것이다. 형광성 검출 시스템이 사용되는 경우에는, 분광형광측정기(spectrofluorometer)를 사용하여 형광성이 측정될 수 있다. 검출 시스템으로부터의 신호를 검출하는 방법들은 업계에 잘 알려져 있다.
- <62> 일부 구현예에서, DPP 활성은 검출가능하게 표지된 기질 상에서의 DPP 활성의 가수분해 생성물의 존재 또는 양을 검출하는 분석법을 통하여 측정된다. DPP-IV 활성은 DPP-IV에 의해 촉매작용을 받게 될 소정의 검출가능하게 표지된 기질, 즉 X-Y-R (여기서 X는 임의의 아미노산이며; Y는 Pro (프롤린), Ala (알라닌) 또는 Arg (아르기닌)이고; R은 소정의 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 표지이다)의 가수분해를 검출하는 분석법을 사용하여 측정될 수 있다.
- <63> DPP의 양은 1종 이상 DPP 동형의 양을 정량적으로 또는 정성적으로 측정할 수 있는 소정의 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. DPP의 양을 측정하는 데에 적합한 분석법에는 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 분광광도측정법, 방사성면역측정법, 경쟁적-결합 분석법, 및 ELISA 분석법이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 관련하여, 1종 이상의 DPP 동형에 특이적인 항체는 특히 유용하다.
- <64> DPP의 농도는 1종 이상 DPP 동형의 농도를 정량적으로 또는 정성적으로 측정할 수 있는 소정의 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. DPP의 농도를 측정하는 데에 적합한 분석법에는 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 분광광도측정법, 방사성면역측정법, 경쟁적-결합 분석법, 및 ELISA 분석법이 포함된다. 이와 관련하여, 1종 이상의 DPP 동형에 특이적인 항체는 특히 유용하다.
- <65> DPP의 발현은 1종 이상 DPP 동형의 발현을 정량적으로 또는 정성적으로 측정할 수 있는 소정의 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. DPP의 발현을 측정하는 데에 적합한 분석법은 일반적으로 DPP mRNA 또는 단백질을 검출하며, 노던 블롯 분석법 및 웨스턴 블롯 분석법 또는 이들의 변형물 (예, 파 웨스턴 분석법, 마이크로어레이 칩 (microarray chip))이 포함된다.
- <66> 번역후 수식의 유형 또는 정도는 1종 이상 DPP 동형의 수식을 정량적으로 또는 정성적으로 측정할 수 있는 소정의 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. 번역후 수식의 유형 또는 정도를 측정하는 데에 적합한 분석법에는 렉틴 결합, 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 분광광도측정법, 방사성면역측정법, 경쟁적-결합 분석법, 및 ELISA 분석법이 포함된다.
- <67> 1종 또는 1종을 초과하는 파라미터가 측정될 수 있다. 예를 들어, 단일의 파라미터 (예, 양, 농도, 활성, 발현, 번역후 수식의 양 또는 유형)가 측정될 수 있다. 다르게는, 2종 이상의 파라미터가 측정될 수 있는데, 예를 들면, 양과 농도, 양과 활성, 양과 발현, 농도와 활성, 농도와 발현, 또는 활성과 발현이 함께 측정될 수 있다. 마찬가지로, 양, 활성 및 발현; 양, 농도 및 발현; 또는 농도, 활성 및 발현이 측정될 수 있다.
- <68> 2종 이상의 측정이 이루어지는 경우, 이들은 동시에 또는 연속적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 활성과 동시에 양이 측정될 수 있다. 다르게는, 활성 전 또는 후에 양이 측정될 수 있다. 3종 이상의 측정이 이루어지는 경우, 이들 역시 연속적으로 또는 동시에 이루어질 수 있다. 예를 들어, 번역-후 수식의 유형과 활성 전에 양이 측정될 수 있으며, 여기서 번역-후 수식의 유형과 활성은 동시에 측정되거나, 또는 양, 번역-후 수식의 유형 및 활성이 각각 서로에 대하여 동시에 또는 연속적으로 측정된다. 마찬가지로, 더 많은 측정이 이루어지는 경우, 이들은 서로에 대하여 동시에 또는 연속적으로, 또는 각 군이 군 서로에 대하여 동시에 또는 연속적으로 측정되도록 하는 각 가능한 방식으로 군화되어 이루어질 수 있다. 다른 말로 하면, 각 측정은 계승적이거나 (factorial) 또는 분배적인(distributive) 방식으로 군화될 수 있으며, 각 군은 모든 군들 서로에 대하여 연속적이거나 동시적인 것 중 어느 것으로 측정될 수 있다.
- <69> 다중의 측정 이외에도, 모든 주어진 측정은 1종인지 또는 그 이상의 파라미터에 대한 것인지에 관계없이, 모든 주어진 환자 샘플에 대하여 1회 이상, 즉 반복하여 이루어질 수 있다.

- <70> 또한, 측정치의 임의 조합이 분획에 대하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 단일 파라미터가 하나의, 일부의 또는 모든 분획에 대하여 측정될 수 있다. 마찬가지로, 1종을 초과하는 파라미터가 하나의, 일부의 또는 모든 분획에 대하여 측정될 수 있다. 단일 파라미터가 하나 또는 일부의 분획에 대하여 측정되는 동시에 다른 파라미터가 기타 또는 모든 분획에 대하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 하나의 분획에 대해서만 양이 측정될 수 있는 동시에 모든 분획의 활성이 측정될 수 있다. 마찬가지로, 하나의 분획만의 활성이 측정될 수 있는 동시에, 모든 분획의 양이 측정될 수 있다.
- <71> 1종 이상의 DPP 파라미터를 측정하는 경우, 환자 샘플은 수많은 분취량으로 분할되고, 개별 분취량이 상이한 DPP 파라미터를 측정하는 데에, 또는 반복 측정을 수행하는 데에 사용될 수 있다. 추가적으로 또는 다르게는, 각 식별화된 DPP 분획이 상이한 DPP 파라미터의 측정 또는 반복 측정을 위한 수많은 분취량으로 분할될 수 있다. 반복 측정이 본 발명의 방법에 필수적인 것은 아니지만, 본 발명의 많은 구현예가 반복적인 시험, 특히 2배수 및 3배수 시험을 이용하게 된다.
- <72> 다르게는, 환자 샘플 또는 그로부터의 분취량은 어레이-유형(array-type)의 분석법 또는 다중화된 검출 기술을 이용하는 분석법 (예, 상이한 형광 염료 표식자로 표지된 검출 시약들을 이용하는 분석법)과 같이 단일 분석으로 상이한 DPP 파라미터의 개별적인 수준을 측정할 수 있는 분석법을 사용하여, 단일 반응으로 다수 DPP 파라미터의 수준을 측정하도록 시험될 수 있다.
- <73> 여기에서 사용되는 "DPP-관련 질병 또는 이상"이라는 용어는 1종 이상의 측정가능한 특정 DPP 파라미터에서의 차이를 특징으로 하는 질병 또는 이상을 지칭한다. DPP-관련 질병 또는 이상이 필수적으로 DPP의 변화에 의해야기되는 것은 아니며, 오히려 1종 이상의 DPP 파라미터를 측정하는 것에 의해 진단되고 모니터링될 수 있다.
- <74> DPP-관련 질병 상태 및 이상에는 대사 질병, 자가면역 질병, 암 및 바이러스 감염이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <75> 여기에서 그 용어가 사용되는 경우, 대사 질병(들)은 대사의 장애로서, 후천성 및 유전적 질병 모두를 포함한다. 그들 중 많은 것들이 문헌 [Harrison's Principles of Internal Medicine]에 기술되어 있다. 일반적으로, 대사 질병은 3개의 주요 종류인 글리코겐 저장 질병 (즉, 유형 II 당뇨병과 같이 탄수화물 대사에 영향을 주는 질병), 지방산 산화 장애 (즉, 파브리 병과 같이 지방 성분의 대사에 영향을 주는 장애), 및 미토콘드리아 장애 (즉, 레이 증후군과 같이 미토콘드리아에 영향을 주는 장애)로 나누어진다.
- <76> 본 발명을 사용하여 검출될 수 있는 대사 질병 상태에는: 유형-II 당뇨병, 저혈당증, 고혈당증, 그레이브스 병, 쿠싱 증후군, 알칼토뇨증, 백색증, 히스티딘혈증, 고오르니틴혈증, 월슨 병, 테이-삭스 병, 니이만-픽 병, 크라베 병, 파제트병, 단풍시럽노 병 또는 페닐케톤뇨증이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 구현예에서, DPP는 DPP-IV이며, 질병은 유형 II의 당뇨병이다.
- <77> 본 발명을 사용하여 검출될 수 있는 자가면역 질병에는: 류마티스 관절염, 편평 태선, 건선, 포도막염, 용혈성 빈혈, 류마티스 열, 크론 병, 길랑-바레 증후군, 건선, 갑상샘염, 그레이브스 병, 중증 근육무력증, 사구체신염, 자가면역 간염, 또는 전신 홍반 루프스가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 소정 구현예에서, 자가면역 질병은 건선, 류마티스 관절염 또는 편평 태선이며, DPP는 DPP-IV이다.
- <78> 본 발명을 사용하여 검출될 수 있는 암에는: 유방; 결장; 직장; 폐; 입인두; 후두인두; 식도; 위; 췌장; 간; 쓸개; 쓸개관; 소장; 신장, 방광 및 요로상피를 포함한 요로; 자궁목, 자궁, 난소, 융모막암종 및 임신영양모세포종을 포함한 여성 생식로; 전립샘, 정낭, 고환 및 생식 세포 종양을 포함한 남성 생식로; 갑상샘, 부신, 및 뇌하수체를 포함한 내분비샘; 혈관종, 흑색종, 뼈 또는 연조직으로부터 발생하는 육종 및 카포시 육종을 포함한 피부의 원발 및 전이성의 고형 종양 및 암종; 별아교세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 망막모세포종, 신경종, 신경모세포종, 신경집종 및 수막종을 포함한 뇌, 신경, 눈, 및 수막의 종양; 백혈병과 같은 조혈기관계 암으로부터 발생하며, 녹색종, 형질세포종, 균상 식육종의 플라크 및 종양, 및 피부 T-세포 림프종/백혈병을 포함하는 고형 종양; 호지킨성 및 비-호지킨성 모두를 포함한 림프종이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <79> 본 발명을 사용하여 검출될 수 있는 바이러스 감염에는; 아데노비리다에(Adenoviridae), 비르나비리다에(Birnaviridae), 부냐비리다에(Bunyaviridae), 코로나비리다에(Coronaviridae), 플라비비리다에(Flaviviridae), 헤르페스비리다에(Herpesviridae), 오르소믹소비리다에(Orthomyxoviridae), 파포바비리다에(Papovaviridae), 파르보비리다에(Parvoviridae), 피코르나비리다에(Picornaviridae), 레오비리다에(Reoviridae), 레트로비리다에(Retroviridae) (예, HIV), 라보비리다에(Rhaboviridae), 또는 토가비리다에(Togaviridae)와 같이 인간 및 기타 동물에 대하여 병원성인 바이러스 과에 의해 야기되는 감염이 포함되나, 이

에 제한되는 것은 아니다. 소정 구현예에서, DPP는 DPP-IV이며, 바이러스 질병은 HIV이다.

- <80> 여기에서 사용되는 "환자"라는 용어는 DPP-관련 질병 상태 또는 이상의 진단, 예후, 질병 진행의 모니터링, 또는 위험도 평가를 필요로 하는 모든 살아있는 생물체를 지칭하며, 여기서 환자는 DPP 발현과 관련된 생리기능을 보유한다. 이와 같은 환자에는 인간, 고등 영장류, 기타 포유류 (예, 고양이, 개 및 말과 같은 가축화된 포유류, 래트 및 마우스와 같은 설치류, 및 사자, 호랑이 및 곰과 같은 야생 동물), 조류 (예, 닭, 잉꼬) 및 기타 동물이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.
- <81> 여기에서 사용되는 "환자 샘플" 또는 "생물학적 샘플"이라는 용어는 표적 효소를 함유할 것으로 예상될 수 있는 환자로부터 채취하거나 유래한 소정의 샘플을 지칭하며, 세포성 및 무세포성 샘플 모두를 포함한다. 환자 샘플에는 근육, 간, 폐, 지라, 지방, 유선 및 중앙 조직과 같은 조직; 전혈, 혈장, 혈청 및 혈액 세포와 같은 혈액 및 혈액 산물; 및 소변, 타액, 눈물, 점액, 양수, 뇌척수액, 윤활관절액 및 정액과 같은 기타 생물학적 액이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 환자 샘플은 또한 액 및/또는 조직의 조합을 포함할 수 있다.
- <82> 샘플은 정맥천자, 요추천자, 양수천자 및 조직 생검과 같이 임상적으로 허용가능한 소정의 방법에 의해 환자로부터 입수될 수 있다.
- <83> 샘플이 환자로부터 입수된 그대로 직접 사용될 수도 있지만, 본 발명의 일 양태에서는 DPP를 분획으로 식별화하는 것 (즉, DPP 동형을 분획으로 식별화하는 것) 또는 DPP 파라미터를 측정하는 것에 앞서 샘플의 가공을 기획하였다. 가공에는 균질화, 희석, 농축, 초음파처리, 냉동, 보존제 또는 기타 제제와의 혼합, 또는 이들의 조합이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <84> 또한, DPP가 막-결합되어 있을 것으로 예상될 수 있는 세포 또는 기타 조직을 함유하는 샘플은 세포 막으로부터 DPP를 방출함으로써 그것이 이용될 수 있도록, 샘플로부터 단백질/효소를 분리/단리하기 위한 업계 공지 방법들 중 어느 것으로 가공될 수 있다. 막-결합된 단백질을 방출하는 방법은 업계에 잘 알려져 있으며, 막으로부터의 활성 효소의 냉동/해동, 균질화, 초음파처리, 및 화학적 또는 효소적 방출이 포함된다.
- <85> 일부 실시예에서, 환자 샘플은 EDTA, 프로테아제 억제제, 또는 생물학적 샘플의 수송, 보존 및 처리에 적합한 소정의 기타 성분을 포함하는 용기에 수집된다.
- <86> 환자 샘플이 액을 구성하는 경우, 가공에는 혈액 샘플의 적혈구, 백혈구 및 혈소판과 같은 유핵 및/또는 무핵 세포를 제거하는 형태 (예컨대 혈장을 수득하기 위하여)가 포함될 수 있거나, 또는 혈액으로부터 소정의 응고 연쇄반응 단백질과 같은 소정 단백질을 제거하는 것 (예컨대 혈청을 수득하기 위하여)도 포함될 수 있다. 예를 들어, 혈액은 헤파린, 시트레이트 또는 프로테아제 억제제가 포함된 용기에 수집되거나, 또는 수집시 헤파린, 시트레이트 또는 프로테아제 억제제와 접촉될 수 있다.
- <87> 추가적인 가공에는 예컨대 식별화 또는 측정에 앞서 총 단백질 함량이 표준화되도록 샘플을 농축 또는 희석하는 것이 포함될 수 있다. 이러한 활동의 수행을 위한 프로토콜은 업계에 잘 알려져 있다.
- <88> DPP 파라미터의 측정치와 질병 상태 또는 이상 사이의 상관관계가 작성된 후에는, 결과가 운용자에게 전달될 수 있다. 결과에는 질병 상태 또는 이상의 존재, 부재 또는 중증도가 포함된다.
- <89> "운용자"는 의사, 간호사, 내과 의사 보조원, 의료 기사, 실험실 기사, 또는 본 발명의 하나 이상의 단계를 수행하는 기계나 장치를 운용하는 사람, 또는 환자를 포함하여 진단 또는 예후 정보를 받을 수 있는 사람일 수 있다. 예를 들어, 진단 또는 예후 정보는 팩스, 전화, 문자 전송, 또는 이메일을 통하여 환자 또는 환자의 대리인에게 자동으로 전달될 수 있다.
- <90> 결과를 전달하기 위한 모든 수단이 사용될 수 있으며, 여기에는 전자 스크린, 디지털 스크린 또는 인쇄가능 재료와 같은 매체에 질병 상태를 표시하는 것; 버저, 벨, 전자 생성 음성, 또는 녹음된 음성과 같은 청취가능 신호를 발생시키는 것; 전화, 문자 전송, 이메일 또는 팩스를 통한 것이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- <91> DPP 동형은 소정 DPP 파라미터의 측정에 앞서 또는 그와 동시에 부분적으로 또는 완전히 DPP 분획으로 식별화될 수 있다. 예를 들어, 샘플 중에 2종을 초과하는 유형의 DPP 동형이 존재하고 있다고 가정하면, 동형은 각자 1종을 초과하는 유형의 동형을 포함하는 2개 만의 분획으로 식별화 (즉, 부분적으로 식별화)될 수 있거나; 또는 동형은 각 분획이 1종의 유형의 동형만을 포함하는 분획들로 식별화 (즉, 완전 식별화)될 수 있다. 마찬가지로, 동형은 일 분획은 1종의 유형의 동형만을 포함하고, 다른 분획은 1종을 초과하는 유형의 동형을 포함하는 2종 이상의 분획으로 부분적으로 식별화될 수 있다.

- <92> DPP 분획은 물리적 분리 또는 단리, 또는 동형을 다른 것으로부터 식별 또는 구분하는 기타 방법들을 포함한 어떠한 수단에 의해서도 식별화될 수 있다.
- <93> 예를 들어, 식별화는 전기영동 이동성 또는 등전점 (pI)과 같은 생물화학적 특성; 열 안정성; 분자량; 1차 구조에 의해 구별되는 동형의 경우에는 아미노산 서열; 항체 친화도 또는 결합력; 번역-후 수식의 정도 또는 유형; 및 Km 또는 속도 상수와 같은 동역학적 특성에서의 차이를 기반을 할 수 있다.
- <94> 상이한 DPP 동형에 대하여 특징적인 항체 또는 렉틴이 DPP 분획들을 물리적으로 분리하거나, 또는 물리적 분리 없이 분획들을 구별하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각의 서로 다른 DPP 동형에 대하여 특이적인 항체가 서로 다른 검출가능 표지를 보유할 수 있으며, 이 경우 분획들을 식별화하기 위한 물리적 분리를 필요로 하지 않는다. 다르게는, 서로 다른 DPP 동형들을 물리적으로 분획으로 분리하는 지지체 또는 컬럼 상에 항체가 사용될 수 있다.
- <95> 분리 방법에는 pI를 기반으로 분리하는 등전 집속(isoelectric focusing); 전하 및/또는 분자량을 기반으로 구분할 수 있는 겔 또는 필터와 같은 매트릭스에서의, 또는 겔이 없는 것 중 어느 것에서의 전기영동법; 렉틴 결합의 정도 또는 동형에 대한 친화성을 가지는 다양한 렉틴들; 항체 결합; 및 친화도 또는 크기를 식별화하는 크로마토그래피법이 포함된다.
- <96> 여기에서 사용되는 "등전점" (pI)이라는 용어는 분자가 순수한 전하를 보유하지 않는 pH이다. pI는 또한 등전 pH로도 지칭된다. 따라서, 본 출원의 목적상, "pI" 및 "등전 pH"라는 용어는 호환가능하게 사용된다. 예시적인 구현예에서, DPP 분획은 pI를 기반으로 식별화되며, 특정 DPP는 DPP-IV이다.
- <97> 등전 집속의 방법에는 자유 유동 전기영동, 등전 집속 전기영동, 또는 색채집속(chromatofocusing) 또는 고체-상으로 시간 경과에 따라 pH가 변화하는 버퍼 시스템을 유동시키는 것에 의해 촉진되는 기타 고체-상 매개 분리가 포함된다.
- <98> 등전-집속 전기영동에서, 해당 샘플은 고정된 pH 구배를 가지는 겔 판, 필터, 또는 기타 매체에 직접적으로 주입 또는 투여된다.
- <99> pH 구배는 전기장의 방향에 평행하게 배열되며, 샘플 중의 단백질(들)은 서로 다른 pH 환경을 통하여 일 방향으로 이동한 후, 각자의 pI와 등가인 pH 환경에 도달하는 것에 의해 서로 분리된다.
- <100> 일단 단백질이 자신의 pI에 도달하게 되면, 매트릭스 물질 내에서 움직이지 못하게 될 것이다. 이때, 샘플은 매트릭스 물질로부터 수득되어, 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) (문헌 [Zuo et al., *Analytical Biochem.* 284:266-278 (2000)]), 평면 칩 상에서의 2차원 분리 (문헌 [Becker et al., *J. Microchem. Microeng.* 8:24 28 (1998)]), 형광측정법과 같이 효소 활성을 검출하는 분석법, 또는 소정의 DPP 파라미터를 측정하는 데에 적합한 분석법과 같은 추가적인 분석에 이용될 수 있다.
- <101> 자유-유동 전기영동은 전통적인 전기영동의 아크릴아미드 겔과 같은 고체 매트릭스 또는 크로마토그래피에서 사용되는 분리 상을 사용하지 않는 전기영동법이다. 대신, 분석물은 유동 방향에 수직으로 인가된 전기장 내에서의 연속 층류 또는 버퍼 용액 중의 그의 전하 및/또는 전기영동적 이동성에 따라 분리된다.
- <102> 자유 유동 전기영동을 수행하는 기계의 예는 BD™ 프리 플로우 일렉트로포레시스 시스템(Free Flow Electrophoresis System) (백톤 디킨슨(Becton Dickenson) 사 모델 #441117)이다. 이 시스템을 이용하여, 유출물이 물리적으로 다수의 분획으로 분리되어 유지되는 수집 분배기로 연속 분획물이 유입되는 것을 가능케 하는, 분리 챔버 단부의 96 모세관에 샘플이 수집된다. 이 방법은 최소 3가지의 분리 원리: 즉 등전 집속 (IEF), 락 전기영동 (ZE) 및 등속전기영동(Isotachophoresis) (ITP)를 통하여 샘플을 분리하는 데에 적합하다. 일단 수집되고 나면, 분획은 등전 집속 후에 사용하는 것으로 기술되어 있는 분석법, 즉 SDS-PAGE, 평면 칩 상에서의 2차원 분리 및 효소 활성 분석법 중 어느 것을 통하여 추가적으로 분석될 수 있다.
- <103> 식별화 및 측정은 어떠한 특정 순서로도 제한되지 않는다. 식별화는 파라미터 측정 전 또는 후에, 또는 측정과 동시에 수행될 수 있다. 예를 들어, 전기영동과 같은 방법을 사용하여 특정 DPP가 물리적으로 분획으로 분리된 다음, 일부 또는 모든 분획의 1종 이상의 파라미터가 측정될 수 있다.
- <104> 다르게는, 측정과 식별화가 동시에 수행되는 경우, 예컨대 환자 샘플을 서로 다른 DPP 동형에 대하여 특이적이며 각각의 항체는 서로 다른 검출가능 표지에 결합되어 있는 항체들과 접촉시키는 동시에 검출가능한 표지로부터의 신호를 측정하는 것에 의해 특정 DPP가 분획으로 식별화될 수 있다.

- <105> 또 다른 구현예에서, 분획 또는 동형은 이중 검출 시스템을 사용하여 식별될 수 있다. 예를 들어, DPP 동형은 모든 또는 대부분의 DPP 동형에 결합하며 더 작은 DPP 동형의 분획에 대하여 특이적인 1종 이상의 항체 또는 렉틴에 결합하는 고체상-결합 항체와 접촉될 수 있다. 더 특이적인 항체 또는 렉틴 각각은 고유의 검출가능 표지를 함유한다. 동형은 항체, 또는 항체와 렉틴 모두와 동시에 접촉되거나, 또는 예컨대 결합된 항체와 그리고 다음에 더 특이적인 항체/렉틴과, 또는 더 특이적인 항체/렉틴과 그리고 다음에 결합된 항체와의 일련 중 어느 것으로 접촉될 수 있다.
- <106> DPP는 2 이상의 분획으로 식별화될 수 있다. 분획의 수는 원하는 식별화의 정도 및 수행되는 식별화 방법에 따라 달라진다. DPP가 식별화될 수 있는 분획의 수에 제한은 없으며, 오히려 예컨대, DPP는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 36, 48, 96, 100, 200, 300, 384, 400, 500 또는 1536 분획과 같이 2 이상의 분획으로 식별화될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서는, DPP 동형을 예컨대 96 분획으로 식별화함으로써 표준 96 웰 플레이트에서의 조작 및 파라미터 측정을 가능케 하는 것이 편리하다.
- <107> 동형의 완전한 식별을 위해서는, 각 DPP 분획이 1종을 초과하지 않는 DPP 동형을 포함해야 하며, 일부 분획은 DPP 동형을 포함하지 않을 수 있다. 동형의 부분적인 식별을 위해서는, 1 이상의 DPP 분획이 1종을 초과하는 DPP 동형을 포함해야 하는 반면, 다른 분획들은 DPP 동형을 포함하지 않거나, 1종의 DPP 동형, 또는 1종을 초과하는 DPP 동형을 포함할 수 있다.
- <108> 본 발명의 소정 구현예에서, 환자 샘플은 1회를 초과하는 시점에 개체로부터 취득된다. 이와 같은 "일련의" 샘플링은 전형적인 의학적 이상이 발병하기 전에 질병의 조기 발병을 확인함으로써 더 효과적인 질병 관리 또는 심지어는 질병 회피로 이끌 수 있는 조기의 치료적 요법 전략을 촉진하는 데에 매우 적합하다. 이와 같은 일련의 샘플링은 또한, 환자에서 질병, 예컨대 유형 II 당뇨병의 진행을 모니터링하는 것과 관련된 본 발명의 양태에 매우 적합하다. 이것은 환자가 질병과 관련하여 받을 수도 있는 소정 치료의 효과를 평가하는 데에 특히 유용하다. 일련의 샘플링 또는 반복되는 샘플링은 또한, 질병 또는 이상 발생의 개별적인 위험도를 확인하는 데에도 유용할 수 있다.
- <109> 일련의 샘플링은 시간별, 반일당, 매일, 매주, 매월, 분기별 (즉, 매 3개월마다), 반년당, 매년, 격년당, 또는 그보다 덜 빈번한 것과 같이 모든 원하는 일정으로 수행될 수 있다. 새로운 샘플이 측정된 각 시점에 측정된 농도와 참조 농도 사이의 비교가 수행될 수 있거나, 또는 농도와 관련된 데이터가 덜 빈번한 분석용으로 보관될 수 있다.
- <110> 측정 또는 식별화는 바람직하게는 생체 외에서 또는 시험관 내에서 수행된다. 일 구현예에서, 측정 및 식별화 모두는 생체 외에서 수행된다.
- <111> 업계 숙련자라면 평가할 수 있는 바와 같이, 여기에서 개시되는 방법들은 환자 샘플의 완전성 및/또는 특성을 확인하기 위하여 소정의 다양한 DPP 또는 비-DPP 파라미터들 (질병 관련 파라미터이거나 그것이 아닐 수 있다) 을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일반적으로 여성에서 더 높은 에스트로겐 농도가 성별의 표식자로서, 또는 콜레스테롤 농도와 같은 기타 화학적 혈액 측정치가 측정될 수 있다.
- <112> 진단 또는 예후를 확증하기 위하여, 기타의 질병-관련 비-DPP 파라미터들이 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-DPP 파라미터는 헤모글로빈 A1C 농도이며, 질병은 당뇨병이다. 전체 헤모글로빈의 7% 미만인 헤모글로빈 A1C 농도는 당뇨병의 부재를 나타내며; 전체 헤모글로빈의 7%를 초과하는 농도는 당뇨병의 존재를 나타낸다. 비-DPP 파라미터는 DPP 파라미터의 전 또는 후에 측정될 수 있거나, 또는 동시에 측정될 수 있다.
- <113> 측정된 DPP 파라미터를 질병 상태 또는 이상에 상관시키기 위하여, 측정된 DPP 파라미터는 참조, 즉 표준 또는 자체 대조와 비교될 수 있다. 참조와 비교하였을 때의 DPP 파라미터의 개별적이거나 부가적인 증가, 감소 또는 이동은 질병 상태와 양성적으로 또는 음성적으로 상관관계에 있을 수 있다.
- <114> 다르게는, 식별화된 효소 분획의 DPP 파라미터는 또 다른 식별화된 효소 분획의 파라미터와 비교될 수 있거나, 또는 2 이상 식별화된 분획들의 총 측정치와 비교될 수 있다.
- <115> 물론, 측정된 파라미터는 상응하는 파라미터와 비교되어야 한다. 예를 들어, DPP의 양이 측정되었다면, DPP 양의 값은 참조 또는 다른 분획의 DPP 양의 값과 비교되어야 한다. DPP의 발현이 측정된 경우라면, 그것은 참조 또는 다른 분획의 DPP 발현과 비교되어야 한다.
- <116> 소정 구현예에서는, 연속하는 범위의 분획의 파라미터가 측정된다. 예를 들어, 등전점을 기반으로 분리된 동형에 있어서는, 인접한 pH 또는 등전점에서 분리되는 2 이상 분획의 1종 이상의 파라미터가 측정될 수 있다.

- <117> 연속하는 범위의 분획들에 걸쳐 측정된 파라미터(들)의 추이도표(profile)가 획득될 수 있다. 다르게는, 비-연속적인 범위의 분획들의 측정치를 기반으로 하여 측정된 파라미터(들)의 추이도표가 획득될 수 있다. 추이도표는 모든 분획을 기반으로 할 수 있거나, 또는 분획들의 하위군을 기반으로 할 수 있다.
- <118> 질병 상태와의 상관관계를 확인하기 위하여 다양한 분획들 사이 및 그 중에서 이루어질 수 있는 다양한 비교가 많이 있다. 측정된 파라미터에 대한 데이터를 분석하거나 해당 데이터를 다른 데이터와 비교하는 기술은 업계 숙련자에게 잘 알려져 있다. 따라서, 그러한 모든 기술들이 여기에서 상세하게 논의되지는 않는다. 원하는 결론 (즉, 질병 상태의 존재 또는 부재)을 이끌어내기 위하여 데이터를 분석하는 한 가지 예시적인 기술이 도 14의 그래프를 참조하여 예시되어 있다. 도 14에서, y 축은 DPP 파라미터 (예, 활성, 발현, 양, 농도, 번역-후 수식의 유형 또는 양)의 수준을 묘사한다. x 축은 식별화의 특질요소 (예, pI, pH 또는 동형의 유형)를 묘사한다.
- <119> 그래프를 참조하면, 영역 "a", 영역 "b" 및 영역 "c"의 3개의 영역이 강조되어 있다. 각 영역에 있어서, 범위 내의 총 측정치 (예, 주어진 범위에 대한 곡선 아래의 면적)를 측정하여 "a" 및 "b"의 값을 산출할 수 있으며, "c" 값으로 합산된다. 측정될 수 있는 다른 값에는 범위 내의 최대 값, 범위 내의 최대 값이 도달되는 점, 범위 내 소정 점에서의 (예컨대 특정 pI 또는 pH에서의) 고유 활성, 측정된 파라미터가 증가하거나 감소하는 점 (예, 감염점), 다른 측정치와 비교하였을 때의 x 축에 따른 측정된 파라미터의 이동, 및 이들의 소정 조합이 포함된다. 값들은 연속되는 범위의 분획들을 측정함으로써 획득된 추이도표를 기반으로 계산될 수 있거나, 또는 단일 또는 복수의 분획들의 측정치를 기반으로 계산될 수 있다.
- <120> 질병 상태를 측정치 중 하나와 상관시키기 위해서는, 범위 "a"의 값(들)을 범위 "b"의 값(들)에; 범위 "a"의 값(들)을 범위 "c"의 값(들)에; 범위 "b"의 값(들)을 범위 "c"의 값(들)에; 범위 "a"의 값(들)을 자체 대조 또는 표준에; 범위 "b"의 값(들)을 자체 대조 또는 표준에; 및/또는 범위 "c"의 값을 자체 대조 또는 표준에 비교할 수 있다.
- <121> 다르게는, 주어진 식별화의 특질요소 또는 특질요소들과 관련된 소정 범위의 별개의 정량적 측정치 또는 그러한 정량적 측정치의 소정 비율이 작성되어, 그러한 측정치에 대한 알려진 참조 값 또는 값의 범위와 비교될 수 있으며, 여기서 참조 범위는 질병의 존재, 부재 또는 중증도를 확인하기 위한 척도를 제공하는 임상적 시험을 통하여 확립된 것이다. 정량적 측정치는 또한, 식별화 (예, 동형의 식별화)의 특질요소와 동시에 또는 일련으로 진행됨으로써 정량적 해독정보를 사전-확립된 참조 범위로 표준화하는 데에 사용될 수 있는 자체 또는 외부의 표준을 포함시키는 것에 의해 보충될 수 있다.
- <122> 여기에서 사용되는 "표준"이라는 용어는 일반적으로 집단의 일부로부터 획득된 평균, 중앙 또는 중간 값인 값을 지칭한다. 표준은 양성의 표준 또는 음성의 표준일 수 있으며, 연령-일치된 집단으로부터 획득될 수 있다. 연령-일치된 집단 (그로부터 표준 값이 획득될 수 있는)은 이상적으로는 시험되는 개체와 동일한 연령을 가지나, 대략적으로 연령-일치된 집단 역시 허용가능하다. 대략적으로 연령-일치된 집단은 시험되는 개체의 연령으로부터 약 1, 약 5, 약 10, 약 15 또는 약 20세를 포함하여 1-20세 이내일 수 있거나, 또는 시험되는 개체의 연령을 포괄하는 상이한 연령대의 균일 수 있다. 대략적으로 연령-일치된 집단은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10세의 증분을 가질 수 있다 (예, 연령 62세의 개체에 대한 표준 값의 자료로써 기능하는 "5세 증분"의 군에는 58-62세 연령의 개체들, 59-63세 연령의 개체들, 60-64세 연령의 개체들, 61-65세 연령의 개체들, 또는 62-66세 연령의 개체들이 포함될 수 있다).
- <123> 양성의 표준은 특정 질병 상태에 있는 집단의 일부로부터 획득된 값, 예컨대 평균 값을 지칭한다. 음성의 표준은 특정 질병 상태에 있지 않은 집단의 일부로부터 획득된 값, 예컨대 평균 값을 지칭한다.
- <124> 여기에서 사용되는 "자체 대조(internal control)"라는 용어는 그의 질병 상태가 알려져 있는 단일 환자 또는 환자 군의 샘플 또는 샘플들로부터 획득된 값을 지칭한다. 자체 대조는 양성의 대조, 음성의 대조, 또는 동일-환자의 대조일 수 있다. 예를 들어, 자체 대조는 특정 질병 상태에 있는 환자 또는 환자들로부터의 양성 대조일 수 있거나, 또는 특정 질병 상태에 있는 환자 또는 환자들로부터의 음성 대조일 수 있다. 마지막으로, 내부 대조는 서로 다른 신체 위치 (즉, 혈액 대 간)로부터, 질병의 진행을 측정하는 서로 다른 시점에, 또는 측정 앞서 서로 다르게 가공되거나, 또는 동일한 유형이거나 상이한 유형일 수 있는 (예, 2개의 EDTA 혈장 튜브, 또는 하나의 EDTA 혈장 및 하나의 혈청 튜브) 별도의 용기에 수집된 2개 이상의 샘플로부터 유래한 샘플로부터의 것인, 진단되는 환자로부터 획득된 값일 수 있다.
- <125> 자체 대조 값은 진단되는 환자에 대한 측정치와 동시에 또는 동시적으로 획득될 수 있거나, 또는 소정의 다른

시점에 수득될 수 있다.

- <126> 측정된 값(들) 사이, 또는 측정된 값(들)과 참조 값(들) 사이의 비교 결과는 질병의 진단 또는 예후를 진단하거나 보조하는 데에, 그의 질병 중증도에 따라 환자를 계층화하는 데에, 또는 특정 환자에서 질병의 진행을 모니터링하는 데에 사용된다. 따라서, 비교가 질병을 암시/표시하는 측정된 값(들)과 참조 값(들) 사이의 차이(즉, 증가 또는 감소)를 나타내는 경우라면, 이후 적절한 진단이 보조되거나 이루어진다. 반대로, 참조 수준(들)에 대한 측정된 수준(들)의 비교가 질병 진단을 암시하거나 표시하는 차이를 나타내지 않는 경우라면, 이후 적절한 진단이 보조되거나 이루어지지 않는다.
- <127> 1종을 초과하는 질병 관련 DPP 파라미터가 측정되나, 다양한 측정치들이 질병 진단을 만장일치로 암시하거나 표시하지 않는 경우에는, "대다수(majority)" 암시 또는 표시 (예, 방법이 4종의 질병 관련 DPP 파라미터를 이용하고, 그 중 3종이 질병을 암시/표시하는 경우)가 사용된다. 그러한 결과는 개체에 대하여 질병 진단을 암시 또는 표시하는 것으로 간주될만 하다.
- <128> 측정된 값과 참조 값을 비교하는 과정은 쟁점인 당뇨병 관련 DPP 파라미터에 대한 측정 값과 참조 값의 유형에 적합한 소정의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. "측정"은 정량적이거나 정성적인 측정 기술을 사용하여 수행될 수 있으며, 측정된 값과 참조 값을 비교하는 양식은 사용된 측정 기술에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 정량적인 분석법을 사용하여 DPP 활성 수준이 측정되는 경우에는, 형광 반응 생성물의 강도를 시각적으로 비교하는 것에 의해, 또는 분광광도측정기로부터의 데이터를 비교하는 것 (예, 측정 장치로부터 유래한 막대 차트와 같은 숫자 데이터 또는 도표 데이터를 비교하는 것)에 의해 수준이 비교될 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법에서 사용되는 측정 값은 보통 대부분 정량적인 값 (예, 샘플 밀리리터 당 DPP 동형의 나노그램과 같은 농도, 또는 절대량의 정량적 측정치)일 것으로 예상된다. 다른 예에서, 측정되는 값은 정성적인 것이다. 정량적인 측정치와 마찬가지로, 숫자 데이터를 조사하는 것에 의해, 그리고 데이터의 표시를 조사하는 것 (예, 막대 또는 선 도표와 같은 도표적 표시를 조사하는 것)에 의해 비교가 이루어질 수 있다.
- <129> 비교의 과정은 수동 (예컨대 방법 실행자에 의한 시각적 조사)일 수 있거나, 또는 자동화된 것일 수 있다. 예를 들어, 분석 장치 (예컨대 화학발광 신호를 측정하기 위한 조도계)에 그것이 DPP 파라미터(들)에 대하여 측정된 값을 참조 값과 비교할 수 있도록 해주는 회로 및 소프트웨어가 포함될 수 있다. 다르게는, 별도의 장치 (예, 디지털 컴퓨터)를 사용하여 측정된 값(들)과 참조 값(들)이 비교될 수 있다. 자동화된 비교용 장치에 측정되는 질병 관련 DPP 파라미터(들)에 대한 저장된 참조 값이 포함되어 있을 수 있거나, 또는 그것이 측정된 값(들)을 동시에 측정된 참조 샘플로부터 유래하는 참조 값과 비교할 수 있다.
- <130> 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 측정된 수준(들)과 참조 수준(들) 사이의 "단순한" 또는 "이원적인" 비교를 이용하는데, 예를 들어, 측정된 수준과 참조 수준 사이의 비교는 측정된 수준이 참조 수준에 비해 더 높은지 또는 더 낮은지를 확인한다. 일부 구현예에서는, 소정의 값 차이가 질병을 표시할 수 있다.
- <131> 여기에서 기술되는 바와 같이, 파라미터는 정량적으로 (절대값) 또는 정성적으로 (상대값) 측정될 수 있다. 해당 평가를 위한 각각의 질병 관련 DPP 파라미터(들) 수준은 겹치거나 겹치지 않을 수 있다. 여기에서 기술되는 바와 같이, 일부 구현예에 있어서는, 정성적인 데이터가 질병 상태의 해당 수준 (경미, 중간 또는 중증)을 표시하며, 또 다른 구현예에서는, 정량적인 데이터가 질병 상태의 해당 수준을 표시한다.
- <132> 본 발명의 소정 양태에서는, 측정 및 참조 값 사이의 차이의 크기를 측정하기 위하여 비교가 수행되는데, 예를 들면, 측정된 값과 참조 값 사이의 "배수" 또는 백분율 차이를 비교하는 것이다. 소정의 최소 배수 차이에 비해 약 2배 더 낮거나 더 높은 배수 차이는, 예컨대 질병의 존재를 암시 또는 표시한다. 배수 차이는 DPP의 절대량, 농도, 활성 또는 발현을 측정하고, 그것을 참조의 절대값에 비교하는 것에 의해 측정될 수 있거나, 또는 배수 차이는 참조 값과 샘플 값 사이의 상대적 차이에 의해 측정될 수 있는데, 여기서 어느 값도 절대량, 농도, 활성 또는 발현의 단위(measure)가 아니며, 및/또는 여기서 양 값은 동시에 측정된다. 다르게는, 배수 차이는 예를 들어 "c"에 대한 "b"의 것에 비교한 "c"에 대한 "a"의 배수 차이, 또는 분석 시스템 내 측정가능 파라미터의 임의의 그러한 기타 비율들을 비교하는 것에 의해 시험 데이터 자체 내에서 측정될 수 있다. 따라서, 특정 진단을 암시 또는 표시하는 측정 값과 참조 값 사이의 차이의 크기는 사용되는 측정 값과 참조 값을 생산하기 위하여 측정되는 특정 파라미터에 따라 달라지게 된다.
- <133> 여기에서 기술되는 바와 같이, pI에 의해 분리된 연속되는 범위의 DPP-IV 동형으로부터 수득되는 DPP-IV 활성 추이도표와 유형 II 당뇨병의 존재, 부제 또는 중증도 사이에는 상관관계가 있다. 이러한 상관관계는 환자 샘플로부터의 식별화된 DPP-IV 분획의 1종 이상의 DPP-IV 파라미터를 측정하는 것, 및 상기 측정된 DPP-IV 파라미

터를 환자에서의 유형 II 당뇨병의 존재, 부재 또는 중증도와 상관시키는 것을 포함하는, 유형 II 당뇨병의 진단 또는 예후 방법에 사용된다. 소정 구현예에서, DPP-IV 파라미터는 DPP-IV의 활성이다. 소정 구현예에서, DPP-IV 분획은 pI를 기반으로 식별화된다.

- <134> DPP-IV 파라미터는 집단 표준 또는 자체 대조와 비교될 수 있다. 음성적 집단 표준 또는 음성적 자체 대조와의 소정 차이는 당뇨병의 존재 또는 중증도와 상관될 수 있다. 측정된 DPP-IV 파라미터와 음성적 참조 사이의 차이 정도가 더 클수록, 예후는 더 중증이다. 마찬가지로, 양성적 집단 표준 또는 양성적 자체 대조와의 소정 차이는 당뇨병의 부재와 상관될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 파라미터에는 활성, 양, 발현 또는 농도가 포함된다.
- <135> DPP-IV 분획은 여기에서 개시되는 어떠한 특성 또는 방법에 의해서도 식별화될 수 있다. 예시적인 구현예에서, DPP-IV 분획은 pI를 기반으로 식별화된다. 소정 구현예에서, DPP-IV분획은 자유 유동 전기영동에 의해 분리된다.
- <136> 도 10은 건강한 개체와 당뇨병 환자인 개체로부터의 혈장에서의 pI 식별화된 DPP-IV 분획들 사이의 DPP-IV 활성 추이도표의 비교를 나타낸다. 본 발명자들은 당뇨병 환자에서 DPP-IV 활성의 추이도표가 더 높은 pH로 이동한다는 것을 밝혀내었다. 소정 시점 또는 시점들에서의 여기에서 나타내는 소정의 건강한 환자로부터의 값과의 DPP-IV 활성 추이도표의 임의의 차이, 또는 소정 시점 또는 시점들에서의 자체의 음성적인 대조 또는 집단 표준으로부터 수득된 값과의 DPP-IV 활성 추이도표의 임의의 차이는 당뇨병과 상관될 수 있다.
- <137> 따라서, 여기에서 나타내는 소정의 음성적인 표준 또는 집단 음성 표준으로부터의 DPP-IV 활성 추이도표의 더 높은 pH로의 이동은 당뇨병을 표시한다. 마찬가지로, 자체 음성 대조로부터의 DPP-IV 활성 추이도표의 더 높은 pH로의 이동은 유형 II 당뇨병의 존재를 표시한다. 활성 추이도표의 이동이 더 크게 나타날수록, 질병은 더 중증이다.
- <138> 건강한 샘플 또는 집단과 "상반되는" 극단의 측정과 관련된 양성 표준은 문제 pI 범위 내의 가장 극단적인 동형의 측정에 의해 표시될 수 있다. 이와 같은 양성적 표준은 예컨대 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 환자 샘플을 처리하여 모든 글리코실화를 완전히 제거하는 것에 의해 확립될 수 있는데, 이 경우 모든 글리칸의 완전한 부재는 측정가능한 동형의 조건을 전형적인 건강한 샘플에 함유되어 있는 동형으로부터 가장 멀리까지 나타내 준다. 이와 같은 처리에 기인하는 극단의 동형들은 실제 샘플 내에서는 결코 실제로 가능할 수 없지만, 분석을 위한 측정가능한 대조를 제공할 목적으로 pH의 가장 먼 가능 범위를 확립하는 데에 여전히 사용될 수 있다는 것을 주지해야 한다. 대안으로서, 이러한 "극단의" 양성 동형은 별도로 측정되거나, 또는 분석되는 샘플로의 혼합(spiking) 후에 측정될 수 있는 외부 대조일 수도 있다. 소정 구현예에서는, 이와 같은 양성의 대조가 결과적인 샘플 측정치의 표준화를 보조하는 데에 사용될 수도 있다.
- <139> 활성에서의 "이동"은 하나 이상의 DPP-IV 분획에서의 DPP-IV 활성의 소정 차이를 의미한다. 예를 들어, DPP-IV 활성에 있어서 측정된 값은 하나의 식별화된 분획에서만 참조와 다를 수 있거나, 또는 일부 또는 모든 분획에서 다를 수 있다. DPP-IV 활성 수준의 경향, 예컨대 pH가 높을수록 활성화 수준이 더 높은 것은 유형 II의 당뇨병을 검출하는 데에 특히 유용하다.
- <140> pI를 기반으로 DPP-IV가 식별화되는 경우, 당뇨병 환자와 건강한 환자 모두는 DPP-IV 활성 추이도표에서 2개의 주 피크를 나타낸다. 당뇨병 환자는 약 pH 4.4 및 약 pH 4.8에서 피크를 나타내는 경향이 있다. 이들 피크 각각은 pI 식별화된 동형의 총 측정 활성의 약 10 %와 관련되어 있다. 건강한 환자는 약 pH 3.9 및 약 pH 4.1에서 피크를 나타내는 경향이 있다.
- <141> "피크"는 측정된 모든 값에 있어서 소수의 국소적 극단값들 중 하나를 의미한다. 각 값은 식별화된 분획과 관련이 있다. 피크 값은 하나의 식별화된 분획 또는 일군의 식별화된 분획들과 관련되어 있을 수 있다. 따라서, 그 값은 단일의 식별화된 분획에 대한 별개의 값 또는 일정 범위의 식별화된 분획들에 대한 별개 값들의 합에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 식별화된 분획의 함수로서의 값들의 추이도표는 하나의 피크만을 포함할 수 있거나, 또는 하나를 초과하는 피크를 포함할 수 있다. 일반적으로, 상위 1, 2, 3, 4 또는 5개의 값 만이 피크로서 간주될 것이다. 예를 들어, 임의로, 피크는 바람직하게는 값이 상승에서 하강 크기로 변화되는, 다수의 인접하는 값들의 추이도표와 관련되거나 접하는 값일 수 있다.
- <142> 따라서, pH 3.9에서의 또는 그 부근에서의, 및/또는 pH 4.1에서의 또는 그 부근에서의 pI 식별화된 DPP-IV 동형의 DPP-IV 활성의 최대 피크는 당뇨병의 부재와 상관될 수 있다.
- <143> 마찬가지로, pH 4.4에서의 또는 그 부근에서의, 및/또는 pH 4.8에서의 또는 그 부근에서의 pI 식별화된 DPP-IV

동형의 DPP-IV 활성의 피크는 당뇨병의 존재와 상관될 수 있다. 당뇨병의 존재에 있어서는, 연속되는 범위의 DPP-IV의 총 측정 활성의 약 10 % 이상인 피크가 특히 유용하다. pH 4.4 및/또는 pH 4.8에서의 또는 그 부근에서의 피크가 더 높을수록 진단은 더 중증이다.

- <144> 도 11은 건강한 환자 및 당뇨병 환자로부터의 pI 식별화된 동형의 누적 DPP-IV 활성 추이도표를 나타내는 플롯이다. 플롯의 각 점은 연속되는 범위의 식별화된 동형의 pH 증가에 따른 함수로서의 총 활성의 누적 백분율을 나타낸다. 앞서 설명한 바와 같이, DPP 동형은 각각 특정한 좁은 밴드의 pH와 관련되어 있는 별개의 식별화된 분획으로 분리하는 것에 의해 식별화된다.
- <145> 도 12는 측정된 pH 범위의 산성 단부로부터 시작하여 식별화된 동형 분획의 활성을 총합할 때, 개별 환자로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 분획의 누적 활성이 측정된 범위의 총 활성의 90 %에 도달하는 pH를 나타낸다. 건강한 환자는 약 pH 4.2 이하에서 식별화된 동형에 대한 90 % DPP-IV 활성에 도달한다. 반면, 당뇨병 환자는 약 pH 4.4 이하에서는 식별화된 동형에 대한 90 % DPP-IV 활성에 도달하지 않는다. 더 중증의 환자로부터의 누적 DPP-IV 활성은 더욱 높은 pH에서 식별화되는 동형을 계산에 넣을 때까지 90 %의 총 누적 DPP-IV 활성에 도달하지 않는다.
- <146> 따라서, 샘플로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 분획의 누적 활성이 샘플 총 활성의 90 %에 도달하는 pH는 DPP-IV 활성 측정치를 질병과 상관시키는 데에 사용될 수 있다. 따라서, 약 pH 4.4 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 90 %를 초과하지 않는 경우라면, 당뇨병의 존재가 검출된다. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 10 % 이상이 약 pH 4.4 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 경우라면, 당뇨병의 존재가 검출되는 것이다. 90 % 활성이 도달되는 pH가 pH 4.4를 초과하여 더 높을수록, 더 중증의 예후를 표시한다.
- <147> 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 90 % 이상이 약 pH 4.2 미만의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 경우라면, 당뇨병의 부재가 검출된다. 약 pH 4.2 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 10 %를 초과하지 않는 경우라면, 당뇨병의 부재가 검출되는 것이다.
- <148> 도 13은 측정된 pH 범위의 산성 단부로부터 시작하여 동형들의 활성을 총합할 때, 개별 환자로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 분획의 누적 활성이 총 활성의 60 %에 도달하는 pH를 나타낸다. 건강한 환자는 약 pH 3.9에서 60 % DPP-IV 활성에 도달한다. 반면, 당뇨병 환자는 약 pH 4.15 및 그 이상에서까지 60 % DPP-IV 활성에 도달하지 않는다. 더 중증의 환자로부터의 누적 DPP-IV 활성은 더욱 높은 pH에서 식별화되는 동형을 계산에 넣을 때까지 60 %의 총 누적 DPP-IV 활성에 도달하지 않는다.
- <149> 따라서, 샘플로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 분획의 누적 활성이 샘플 총 활성의 60 %에 도달하는 pH는 DPP-IV 활성 측정치를 질병과 상관시키는 데에 사용될 수 있다. 따라서, 약 pH 4.15 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 60 %를 초과하지 않는 경우라면, 당뇨병의 존재가 검출된다. 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 40 % 이상이 약 pH 4.15 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 경우라면, 당뇨병의 존재가 검출되는 것이다. 60 % 활성이 도달되는 pH가 pH 4.15를 초과하여 더 높을수록, 더 중증의 예후를 표시한다.
- <150> 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 약 60 % 이상이 약 pH 3.9 이하의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 경우라면, 당뇨병의 부재가 검출된다. 약 pH 3.9 이상의 pH 범위와 관련된 등전점에서 식별화된 동형에 존재하는 연속되는 범위 중 모든 측정된 분획의 총 DPP-IV 활성의 백분율이 약 40 %를 초과하지 않는 경우라면, 당뇨병의 부재가 검출되는 것이다.

## 실시예

- <151> 실시예 1
- <152> 자유 형태의 전기영동 (FFE) (BD™ 자유 유동 전기영동 시스템)을 사용하여 전하를 기반으로 단백질을 분리함으로써, DPP-IV의 동형을 분획으로 분리하여 특성화하였다. 단백질 동형의 단리는 활성에 대한 특정 수식의 역할을 조사하는 데에 바람직하다. 활성 분석은 동형 pI의 증가와 관련된 비활성의 증가를 표시한다. 이것은 번역 후 수식이 DPP-IV 활성의 조절에 역할을 할 수 있다는 것을 암시한다. FFE는 효소 수식(들)을 질병 상태에 상관시킬 수 있는 추가적인 연구를 촉진할 수 있다.

- <153> FFE는 BD™ 자유 유동 전기영동 시스템을 사용하여 하기와 같이 수행되었다: 시그마(Sigma)™ 사로부터 입수한 돼지의 DPP-IV (1-100 mg)를 적절한 pH의 분리 매체 중에 희석 (일반적으로 1:5)하였다. 다음에, 희석된 단백질을 벡톤™ FFE 챔버의 가장 음극성인 샘플 주입구에 적재하고, 3-10의 pH 구배를 사용하여 대략 60 mL/h의 분리 매체 유량으로 1200-1500 V 및 20-25 mA를 인가함으로써 분리하였다.
- <154> 네이티브 조건(native condition)을 사용하여 3-10의 pH 구배로 제조사 프로토콜 (벡톤™ FFE 적용 매뉴얼)에 따라 등전 집속 (IEF)-FFE 버퍼 및 매체를 제조하였다. T:4 %의 주문품 겔을 사용하여, 또는 적절한 pH 범위에서 평형화된 블랭크 프레코츠(blank Precoats)™ (세르바(Serva) 사)를 사용하여 등전 집속 폴리 아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) (IEF)를 수행하였다. 은 염색을 수행하여 단백질 밴드를 검출하고, 결과를 도 3에 나타내었다.
- <155> 하기와 같이 활성 분석을 수행하였다: 45  $\mu$ l의 분석 버퍼 (100 mM Tris-Cl [pH 8.0]; 0.05 % v/v DMSO)를 5  $\mu$ l의 단백질 샘플에 첨가하고, Tinitial로부터 형광성의 증가를 측정하였다. 30 °C에서의 Gly-Pro-AMC (250  $\mu$  M) 기질의 가수분해에 기인하는 상대적 형광성 단위 (RFU)/분의 증가로서 활성을 나타내었다. 결과를 도 2A 및 2B에 나타내었다.
- <156> 키트 권고사항 (피어스/시그마(Pierce/Sigma) 사)에 따라 PAGE (IEF) 또는 SDS-PAGE와 이어지는 분해 후에 시화된 시프로 루비(Sypro Ruby) 염색 밴드의 절제에 의해 단백질의 트립신 분해를 수행하였다.
- <157> 하기와 같이 매트릭스-보조 레이저 재흡수/이온화(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (MALDI) MS를 수행하였다: "겔-내(in-gel)" 분해된 펩티드를 추출하고 (지시된 대로), 집팁(ZipTip)<sup>®</sup> 피펫 팁 (밀리포어 (Millipore) 사)을 사용하여 세정하였다. 분해된 펩티드를 매트릭스 (60 % 아세트오니트릴 중  $\alpha$ -시아노-4-하이드록시나프탄산의 포화 용액)와 1:1로 혼합하고, 스테인리스 스틸 표적 (브루커 달토닉스(Bruker Daltonics) 사) 상에 점적하였다.
- <158> 최초 MALDI-흐름 시간(Time of Flight) (TOF) 펩티드 질량 지문(Peptide Mass Fingerprint) (PMF)을 사용하여 분해된 단백질을 식별하고, 이어서 특정 펩티드의 TOF/TOF 식별 (모두 마스코트(Mascot) 사용)이 수행되었다. 결과를 도 4A 및 4B에 나타내었다.
- <159> 실시예 2
- <160> 실시예 2에 기술되는 실험은 단백질 샘플이 건강한 환자로부터의 인간 혈장에서 유래하였다는 것 이외에는 실시예 1에 나타난 것과 동일한 프로토콜에 따랐다.
- <161> 2명의 개체로부터 인간 혈장 샘플 (EDTA 항-응고제)을 취득하여, 실시예 1에 기술되어 있는 바와 같이 DPP-IV 동형을 분획으로 분리하였다. 실시예 1에 기술되어 있는 바와 같이 활성을 측정하였다. 돼지의 DPP-IV 동형과 유사한 활성 추이도표가 존재하는지를 알아보기 위하여 DPP-IV 활성의 패턴을 조사하였다. 결과를 도 6A 및 6B에 나타내었다.
- <162> 도 6A 및 6B에 기록된 결과로부터, 인간 혈장의 DPP-IV 활성에 있어서 활성이 돼지의 DPP-IV에서 보인 것과 유사하게 전개된다는 것이 관찰되었다. 더 높은 pH 값 (대략 최대 pH 5.2)에서는 활성이 증가된다는 것이 관찰되었다. 비활성의 측정을 위해서는 정밀한 단백질 (DPP-IV) 정량이 필요할 것이다.
- <163> 실시예 1 및 2를 통하여, FFE (IEF)를 사용하여 단백질 동형이 분리될 수 있다는 것이 증명되었으며, 분리된 동형의 생화학적 특성화가 가능해졌다. 돼지의 DPP-IV 모델은 서로 다른 비활성을 나타내는 다수의 동형들 (질량 분광법을 사용하여 식별)을 나타내었다. FFE에 이어 분석하였을 때, 인간의 DPP-IV (혈장에서 분리)도 유사한 경향을 나타내었다. 번역후 수식 (PTM)은 DPP-IV의 비활성을 조절하는 데에 역할을 할 수 있다. FFE는 DPP-IV의 개별 동형은 물론 다른 단백질에 대한 잠재적 PTM의 식별화 및 암시를 용이하게 할 수 있다.
- <164> DPP-IV는 전기한 바와 같이 측정되었다. DPP-IV 돼지 실험의 결과와 비교할 때, 도 6A 및 6B에 나타난 결과는 인간의 DPP-IV가 FFE 후 분석하였을 때 유사하게 분석된 돼지의 DPP-IV와 유사한 활성 경향을 나타낸다는 것을 보여준다.
- <165> 전체적으로, 실시예 1 및 2의 결과는 번역-후 수식 (PTM)이 DPP-IV의 비활성을 조절함에 있어 역할을 할 수 있다는 것, 및 FFE가 DPP-IV의 개별 동형은 물론 다른 단백질에 대한 잠재적 PTM의 식별화 및 암시를 용이하게 할 수 있다는 것을 의미한다.
- <166> 실시예 3

<167> 실시예 3에 기술되는 실험은 단백질 샘플이 인간 혈장에서 유래하였다는 것 및 IEF가 3-7의 pH 구배로 수행되었다는 것 이외에는 실시예 1에서 나타난 것과 동일한 프로토콜에 따랐다. 구체적으로, 유형-2 당뇨병을 가지는 사람으로부터 1개 (538 mg/dL의 글루코스 농도) 그리고 건강한 사람으로부터 1개로써, 2개의 헤파린화 처리된 인간 혈장 샘플을 입수하였다.

<168> 도 7 및 8에 나타낸 결과는 당뇨병 샘플에서 더 높은 등전 범위를 가지는 DPP-IV 동형 추이도표가 나타난다는 것을 보여주고 있다.

<169> 실시예 4

<170> 4명의 건강한 환자 및 5명의 당뇨병 환자로부터의 혈장을 pI에 의해 식별화하였다. 벡톤™ FFE 챔버를 사용하여 하기와 같이 FFE를 수행하였다: 25 μl의 혈장 (1:8로 희석)을 25 μl의 글리세롤, 25 μl의 0.08 % HPMC, 125 μl의 분리 버퍼 (pH 3-7)와 혼합하였다. 다음에, 벡톤™ FFE 챔버의 가장 음극성인 샘플 주입구에 희석된 단백질을 적재하고, 네이티브 조건 및 3-7 pH 범위를 사용하며 1200-1500 V 및 20-25 mA를 인가하는 구간 (interval) 등전 집속 (IEEF)-FFE에 의해 분리하였다. IIEF-FFE는 10 °C에서 총 64분의 체류 시간으로 수행되었다. 총 60분의 5분 구간 (5분 순행 후 5분 역행) 50 mL/hr의 버퍼 유량이 사용되었다. 샘플 적용시, 180 mL/hr의 매체 유량으로 6000 μl/hr에서 2분 동안 샘플이 적용되었다. 샘플 적용에 이어서, 전압을 인가하고, 매체 유량을 총 60분의 5분 구간 (5분 순행 후 5분 역행) 50 mL/hr의 흐름으로 설정하였다. 구간 분리에 이어서, 2분 동안 순행 버퍼 흐름을 300 mL/hr로 증가시키고, 멈춘 다음, 2분 동안 96 웰로 수집하는 것에 의해 샘플을 수집하였다. 실시예 1에 개설했던 바와 같이 DPP-IV 활성을 시험하였다. 결과를 도 10 및 11에 나타내었다.

<171> 도 10에서, 밝은 색의 막대는 각 pI에서 1명의 건강한 환자로부터 수득된 값을 나타내며, 어두운 색의 막대는 각 pI에서 1명의 당뇨병 환자로부터 수득된 평균 값을 나타낸다.

<172> 건강한 환자에서는 대략 pH 3.9 및 대략 pH 4.1에서 2개의 주 피크가 관찰되었다. 마찬가지로, 당뇨병 환자에서는 대략 pH 4.4 및 대략 pH 4.8에서 2개의 주 피크가 관찰되었다. 당뇨병 혈장의 추이도표는 건강한 환자로부터의 혈장 추이도표보다 더 높은 pH로, 또는 그의 오른쪽으로 이동하였다.

<173> 본 실시예에서, 군 1은 건강하였으며 (S04, S11, S07 및 S02), 군 2는 당뇨병으로 진단되었다: L205 - 혈중 글루코스 = ~139 mg/dL; S09 - 혈중 글루코스 미상; S08 - 혈중 글루코스 = ~90 mg/dL, 약물치료로 환자의 질병 관리중; S01 - BG = ~150 mg/dL; 및 S139 - BG = ~350 mg/dL.

<174> 건강한 대상으로부터의 혈장의 분취량을 분할하여, 하나의 반량은 뉴라미니다제로 시알릴제거하고, 하나는 대조로서 남겨두었다. 본 실시예에서 상기한 조건 하에서 각 분획을 분리하여, 효소 분석법에 의해 동형 추이도표를 측정하였다. 시알산의 제거는 대략 pH 4.0으로부터 대략 pH 5.0으로의 추이도표 이동으로 귀결되었다. 결과를 도 9에 막대 그래프로 나타내었다.

<175> 시알릴제거는 또한, 표 1에 나타낸 바와 같이 비활성의 2 내지 3배 증가로 귀결되었다.

<176>

표 1. DPP-IV 비활성 (mU/mg)		
샘플 ID	비활성 정상	비활성 시알릴제거
S07	38.71	85.01
S08	22.93	61.80
S11	47.23	88.08

<177> 과도한 시알화는 DPP-IV의 효과 (비활성으로도 지칭)을 감소시키는 것으로 보인다. 따라서, 상이한 질병 상태에 있는 환자들이 상이한 동형 추이도표를 나타낼 수 있는 이유 중 하나는 시알화와 같은 번역-후 수식에 기인하는 것이다.

<178> 다수 샘플의 실제 pH 구배를 설명하기 위하여, pH 해독치 대 % 국소 활성 (그 pH에서의)을 준-통합(semi-integrate)하였다. 다음에, pH 범위에 따른 백분을 활성을 더하였다. 이것을 도 11에 나타내었다. 본질적으로, 이것은 어느 pH에서 활성의 소정 "역치"에 도달되는지의 가시화를 가능케 한다.

<179> 건강한 데이터 및 당뇨병 데이터를 60 %에서 도 12에, 90 %에서 도 13에 나타내었다. 건강한 환자는 모두 90 % 활성에 대하여 매우 밀집하여 pH 4.2에 속한 반면; 당뇨병 환자는 모두 pH 4.4를 초과하여 흩어져서, 그리고 질

병의 중증도가 증가함에 따라 더 높은 pH에 속하였다. 건강한 환자는 모두 60 % 활성에 대하여 대략 pH 3.9에 밀집하여 속한 반면; 당뇨병 환자는 모두 pH 4.15를 초과하여 흩어져서 속하였다.

<180> 여기의 본 발명이 특정 구현예들을 참조하여 기술되었다 할지라도, 이러한 구현예들은 본 발명의 원리 및 적용을 단순히 예시하고 있다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 예시적인 구현예들에 대하여 수많은 변형물들이 만들어질 수 있다는 것, 및 첨부된 청구범위에 의해 규정된 바와 같은 본 발명의 기술사상 및 영역으로부터 벗어나지 않고도 다른 각색물이 고안될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

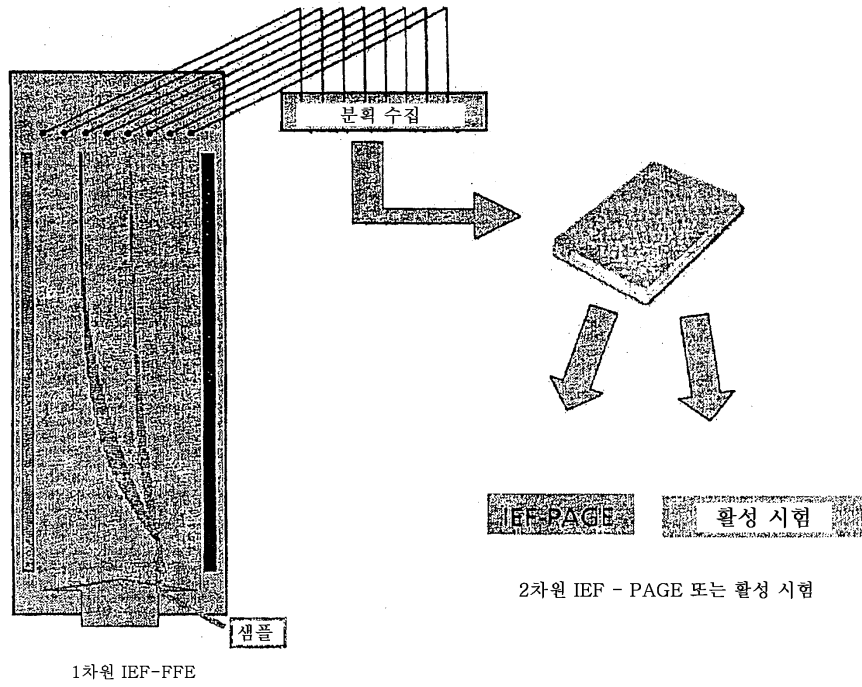
**도면의 간단한 설명**

- <29> 도 1은 동형의 자유-유동 전기영동 분리의 흐름을 묘사한 것이다.
- <30> 도 2A 및 B는 네이티브 IEF-FFE 후 돼지 DPP-IV의 활성 시험 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2B는 식별화된 돼지 DPP-IV 동형의 비활성 (U/ng 효소)을 나타낸다.
- <31> 도 3은 돼지 DPP-IV의 네이티브 FFE (pH 3-10) 분리에 따른 분획 27 내지 47의 은-염색된 IEF 아크릴아미드 겔이다.
- <32> 도 4A 및 B는 가장 산성인 (4A), 그리고 약간 더 염기성인 (4B) 동형에 대하여 IEF 겔로부터 절제된 트립신처리된(trypsinized) 단백질 밴드의 캡티드 질량 지문 분석을 나타낸다. PMF의 분석은 모든 동형을 DPP-IV로서 식별화한다.
- <33> 도 5A 및 B는 선택된 DPP-IV 피크의 MALDI TOF/TOF와의 확인을 나타낸다.
- <34> 도 6A 및 B는 건강한 대상 2명의 인간 혈장으로부터의 FFE 식별화된 DPP-IV 동형의 DPP-IV 활성을 나타낸다.
- <35> 도 7은 정상적인 인간 대상으로부터의 FFE 식별화된 동형의 DPP-IV 활성 추이도표를 나타낸다.
- <36> 도 8은 538 mg/dL의 글루코스 농도를 가지는 당뇨병 인간 대상으로부터의 FFE 식별화된 동형의 DPP-IV 활성 추이도표를 나타낸다.
- <37> 도 9는 건강한 인간 환자로부터의 FFE 식별화된 동형의 시알릴제거에 기인하는 DPP-IV 추이도표 이동의 예를 나타낸다. 활성은 RFU/분으로 나타내었다. 어두운 색의 막대는 처리된 샘플을 나타내며; 빛금친 막대는 비처리 샘플을 나타낸다.
- <38> 도 10은 건강한 환자 (밝은 색 막대) 및 당뇨병 환자 (어두운 색 막대)로부터의 혈장의 pI 식별화된 DPP-IV 동형은 물론 당뇨병 환자로부터의 시알릴제거 동형 (어두운 색 선) 사이의 DPP-IV 활성의 비교를 나타낸다. 점선은 각 분획이 식별화된 pH를 나타낸다.
- <39> 도 11은 건강한 환자 및 당뇨병 환자로부터의 pI 식별화된 DPP-동형의 pH 대 DPP-IV 활성의 전개 플롯이다. S04, S11, S07 및 S02는 건강한 환자이며; 나머지는 당뇨병 환자이다.
- <40> 도 12는 각 대상으로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 동형이 90 % DPP-IV 활성에 도달하는 pH의 플롯이다. S04, S11, S07 및 S02는 건강한 환자이며; 나머지는 당뇨병 환자이다.
- <41> 도 13은 각 대상으로부터의 pI 식별화된 DPP-IV 동형이 60 % DPP-IV 활성에 도달하는 pH의 플롯이다. S04, S11, S07 및 S02는 건강한 환자이며; 나머지는 당뇨병 환자이다.
- <42> 도 14는 식별화된 DPP 동형의 측정된 파라미터가 질병과 상관될 수 있는 다양한 방법을 묘사하는 그래프이다.

도면

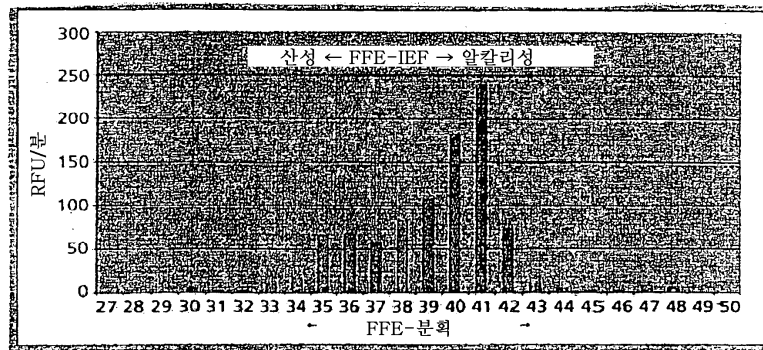
도면1

FFE 흐름



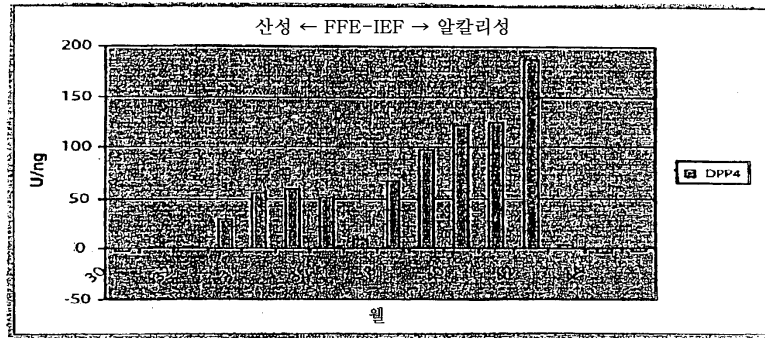
도면2A

네이티브 IEF-FFE 후 DPP-IV의 활성 시험  
 선택된 분획을 형광성 기질 Gly-Pro-AMC와 혼합하였음

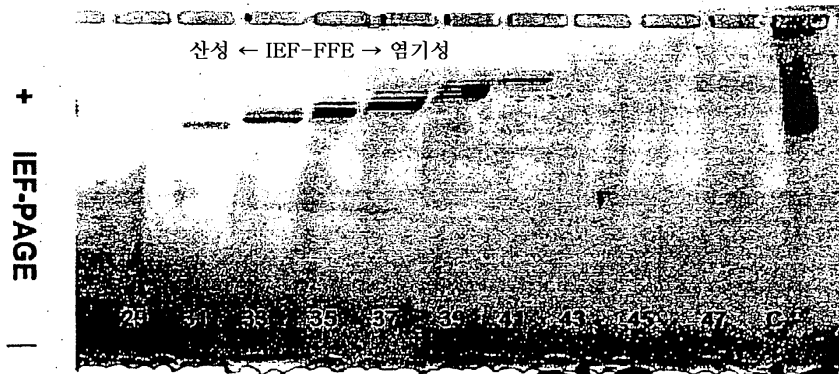


도면2B

비활성 (U/ng 효소)  
비활성의 실제 증가 증명

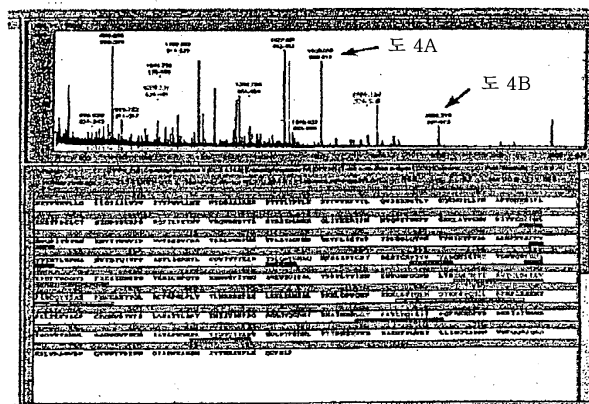


도면3



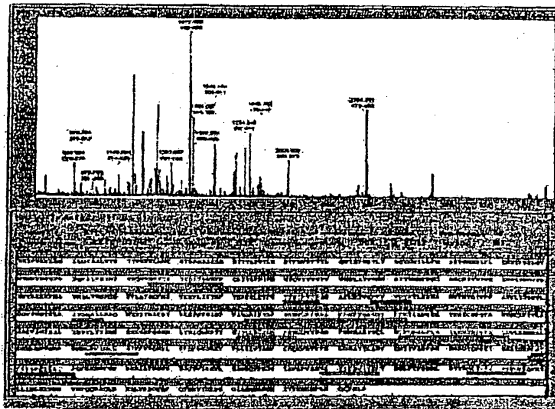
도면4A

가장 산성인 동형



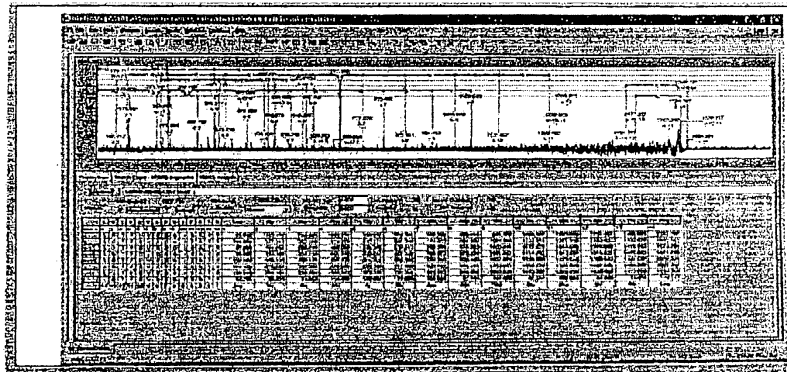
도면4B

약간 더 염기성인 동형



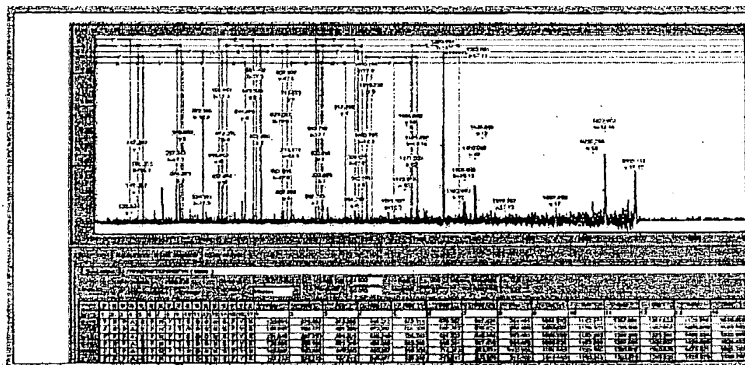
도면5A

피크 (m/z) 1608 TOF/TOF

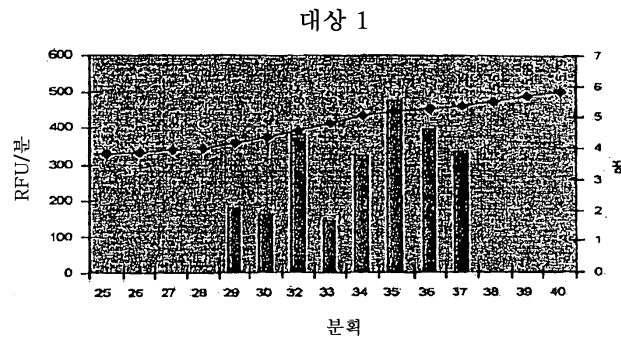


도면5B

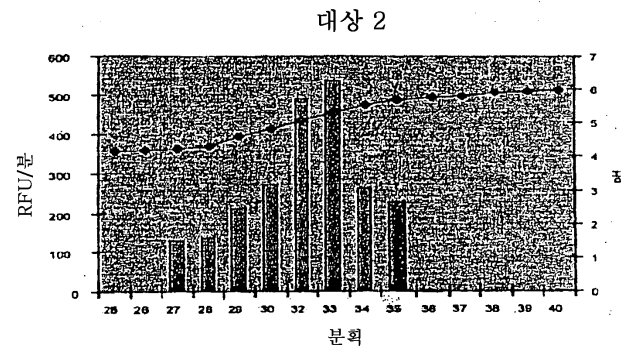
피크 (m/z) 2000 TOF/TOF



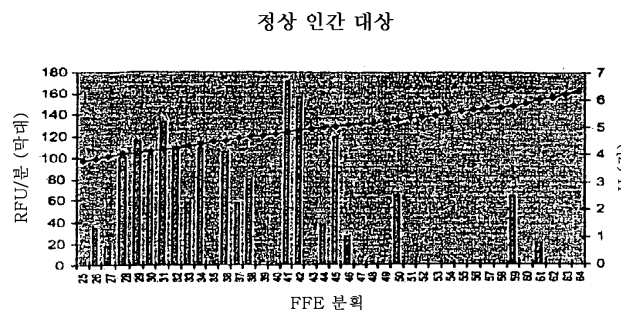
도면6A



도면6B

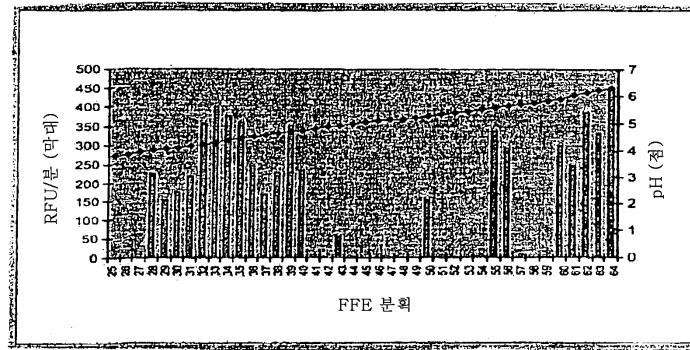


도면7

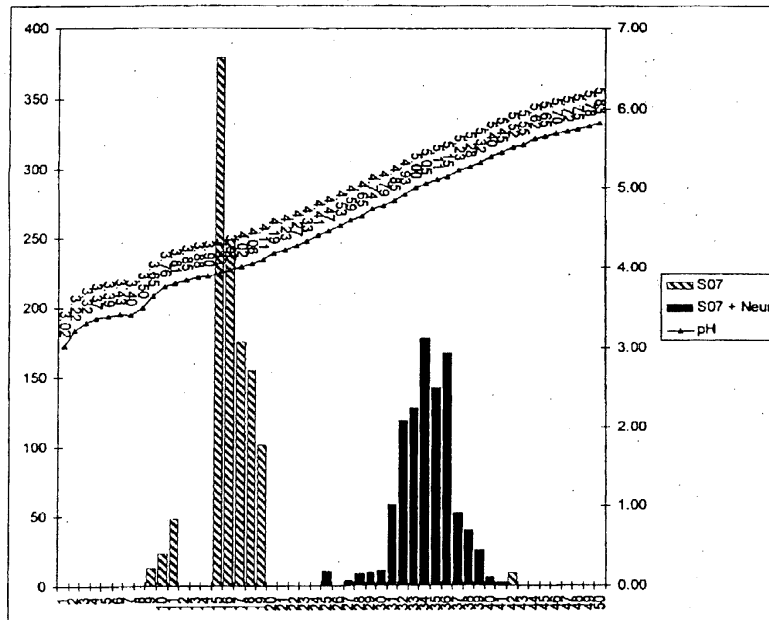


도면8

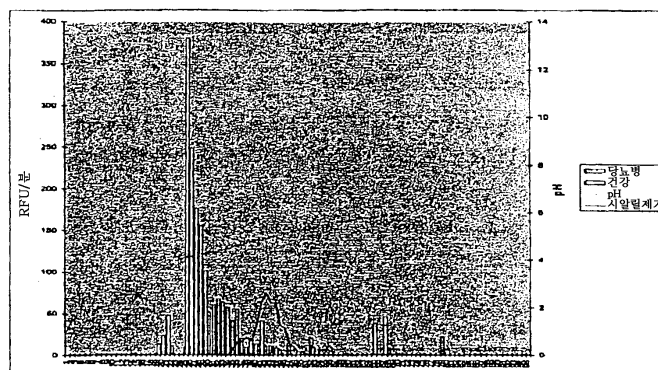
538 mg/dL의 글루코스 농도를 가지는 당뇨병 대상



도면9

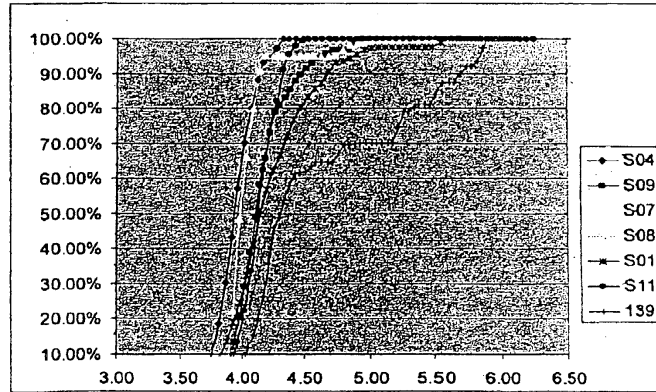


도면10

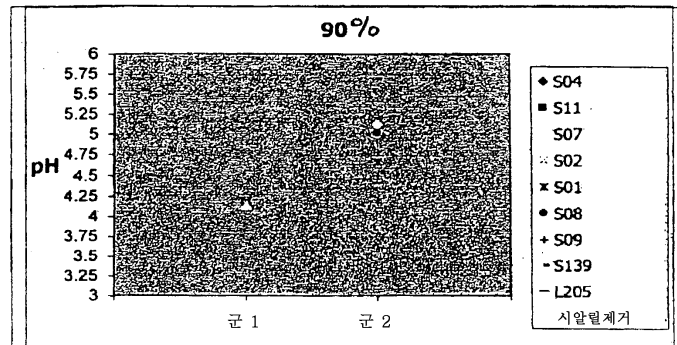


도면11

S04, S07 및 S11은 건강, 나머지는 당뇨병 (정도는 다양)



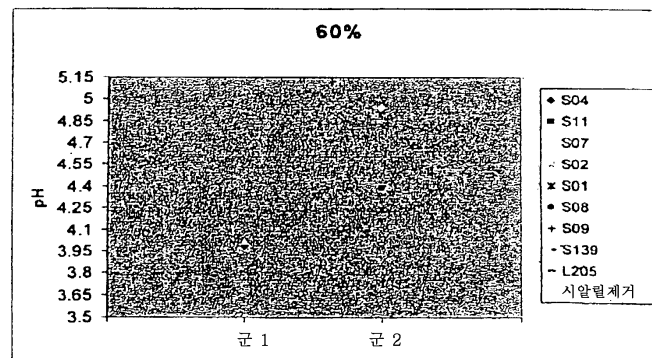
도면12



군 1: S04, S11, S07, S02 (건강)

군 2: S01, S08, S09, S139, L205 (당뇨병)

도면13

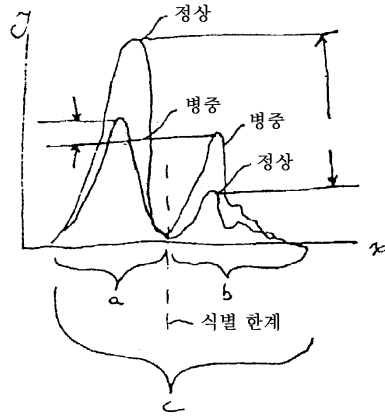


군 1: S04, S11, S07, S02 (건강)

군 2: S01, S08, S09, S139, L205 (당뇨병)

도면14

측정된 파라미터를 질병과 상관시키는 방법



专利名称(译)	二肽基肽酶相关疾病状态的诊断和预后		
公开(公告)号	<a href="#">KR1020090008218A</a>	公开(公告)日	2009-01-21
申请号	KR1020087024813	申请日	2007-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	百吨的杰森·..		
当前申请(专利权)人(译)	百吨的杰森·..		
[标]发明人	OMULLAN PATRICK 오물란패트릭 GELFAND CRAIG A 겔판드크래이그에이		
发明人	오물란,패트릭 겔판드,크래이그,에이.		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/37		
CPC分类号	G01N33/573 C12Q1/37 G01N33/6893 G01N2800/042		
代理人(译)	Yangyoungjun 金荣		
优先权	60/781924 2006-03-13 US 60/804397 2006-06-09 US 60/892767 2007-03-02 US		
其他公开文献	KR101376471B1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

ÖKIPO0026 #WIPO 2009

