



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043322
(43) 공개일자 2020년04월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/6883</i> (2018.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 <i>C12Q 1/6883</i> (2018.05) <i>G01N 33/6896</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0043157(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2020년04월09일 심사청구일자 2020년04월09일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2019-0165478 원출원일자 2019년12월12일 심사청구일자 2019년12월12일</p> | <p>(71) 출원인 주식회사 바이오오케스트라 대전광역시 유성구 과학로 125, 바이오벤처센터 116호 (어은동, 한국생명공학연구원)</p> <p>(72) 발명자 류진협 대전광역시 중구 계룡로 922, 202동 1203호 (문화동, 하우스토리2차)</p> <p>조현정 대전광역시 중구 계룡로 922, 202동 1203호 (문화동, 하우스토리2차)</p> <p>(74) 대리인 특허법인충현</p> |
|---|--|

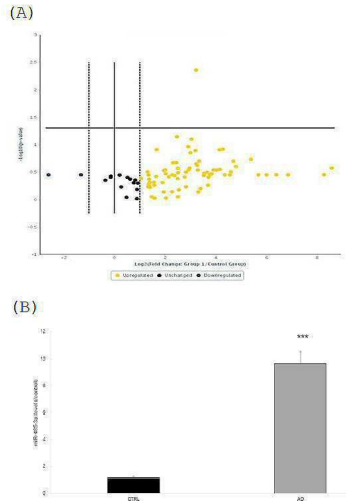
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **miR-485-3p를 이용한 알츠하이머병 진단 방법**

(57) 요약

본 발명은 miR-485-3p를 이용한 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법, 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단용 조성물 및 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 혈액 내 miR-485-3p의 발현량 측정에 의해 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 진단에 대한 객관적인 데이터 분석이 가능하며, 타액 내 아밀로이드베타 42의 농도 측정에 의해 환자의 위험성을 최소화하며, 빠르고 정확한 진단이 가능하다. 따라서, 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 예방에 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
 C12Q 2600/178 (2013.01)
 G01N 2333/4709 (2013.01)
 G01N 2800/2821 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425109874
 부처명 중소벤처기업부
 연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원-(사)한국엔젤투자협회
 연구사업명 민간투자주도형 기술창업지원사업
 연구과제명 알츠하이머성 치매의 조기진단 platform 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 주식회사 바이오오케스트라
 연구기간 2017.05.01 ~ 2019.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425110325
 부처명 중소벤처기업부
 연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원
 연구사업명 창업성장기술개발사업(창조경제연계과제)
 연구과제명 miRNA를 활용한 알츠하이머성 치매의 조기진단 solution 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 주식회사 바이오오케스트라
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

miR-485-3p과 ELAVL2 단백질(ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2)을 코딩하는 유전자의 3'-UTR 간 상호작용 감소능을 갖는 서열번호 3, 4, 5, 6 또는 7 서열의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 단계를 포함하는, miR-485-3p 활성 억제제의 제조방법.

청구항 2

제1항의 제조방법으로 제조된 서열번호 3, 4, 5, 6 또는 7 서열의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, miR-485-3p 활성 억제제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 7 서열의 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는, miR-485-3p 활성 억제제.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 서열번호 3, 4, 5, 6 또는 7 서열의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드가 2'-O- 메틸화 또는 메톡시에틸화되거나, 또는 상기 각 하나 이상의 뉴클레오타이드는 LNA이거나, 또는 상기 뉴클레오타이드의 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포티오에이트인 것을 특징으로 하는 miR-485-3p 활성 억제제.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 ELAVL2(ELAVL like neuron-specific RNA binding protein 2) 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 miR-485-3p 활성 억제제.

청구항 6

제1항의 제조방법으로 제조된 miR-485-3p 활성 억제제 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, 상기 뇌질환은 자폐 스펙트럼 장애, 정신지체, 근위축성 측색 경화증, 경련, 뇌졸중, 파킨슨씨 병 또는 척수손상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 miR-485-3p를 이용한 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 채취된 시료로부터 마이크로 RNA miR-485-3p의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다. 또한, miR-485-3p 또는 아밀로이드베타 42를 이용한 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단용 조성물 및 진단용 키트에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 알츠하이머병에 대한 최근 치료 기조는 대뇌피질(cerebral cortex)과 해마 (hippocampus)에서 기능 손상된 콜린성 시그널링 및 전달(cholinergic signaling and transmission)에 의해 알츠하이머병이 유래 된다는 가능성에 중점을 두고 있다 (Bartus et al., Science. 217(4558): 408-14(1982) 및 Coyle et al., Science. 219(4589):1184-90(1983)).
- [0004] 이런 뇌의 영역은 기억 및 지능과 연결되어 있으므로, 뇌의 이들 부분의 기능적인 결함은 기억 및 판단에 대한 손상을 주고 지적 능력을 상실케 한다. 신경 신호전달(neuronal signaling)에 손상이 이루어지는 정확한 과정이 논쟁 대상이 되고 있지만, 노인성 플라크(senile plaque) 및 신경원 섬유 농축체(neurofibrillary tangle: NFT)가 병리학적으로 주 현상으로 여겨진다.
- [0005] 특히 아밀로이드 베타(A β)의 축적으로 인한 노인성 플라크는 이병의 가장 큰 특징으로, 알츠하이머병은 사후 부검으로 확인이 가능하다(Khachaturian, Arch. Neurol. 42(11):1097-105(1985)).
- [0006] 알츠하이머병의 경우, 콜린성 신경 전달의 손상을 억제할 수 있도록 아세틸콜린의 양을 증가시키거나, 아세틸콜린이 장기간 존재할 수 있도록 하거나 또는 신경세포의 전달에 아세틸콜린이 더욱 효과적으로 작용하도록 하는 약물과 치료법이 제시되고 있어서, 알츠하이머병 환자들의 아세틸콜린 활성도를 높이는 다양한 화합물들이 사용되고 있다.
- [0007] 현재 가장 효과적인 접근 방법은 시냅스에서 아세틸콜린을 빠르게 분해하여 신경 신호 전달을 막는 아세틸콜린 에스테라아제의 활성을 억제하는 방법이다. 실제로 이런 저해제 (예: tacrine, donepezil, galantamine 및 rivastigmine)들은 현재 FDA에서 인정한 알츠하이머병 치료 약물로 시장에서 유통되고 있지만, 많은 경우 상기 약물들은 병의 진행을 완화하는데 유효하나, 완치에는 잘 적용되지 않고 있다.
- [0008] 또한, 어떤 화합물들은 신경의 일반적인 건강 상태를 개선하여 나이가 들어감에 따른 세포의 기능을 정상적으로 유지하는데 목적을 두고 있다. 예를 들어, NGF와 에스트로겐 같은 몇몇 약물들은 신경의 퇴화를 늦추어 주는 신경보호 역할을 하며, 항산화제와 같은 다른 약물들은 세포의 산화를 감소시켜 정상적인 노화의 결과로 나타나는 해로운 세포의 손상의 증가를 감소시킨다.
- [0009] 아밀로이드 베타 펩타이드가 축적되는 정도가 많으면 알츠하이머병이 심각해지는데, 신경염 공간(neuritic space)에 아밀로이드 베타의 축적을 낮추어 주면 알츠하이머병의 진행을 늦추게 될 것으로 생각되고 있다. 또한, 아밀로이드 전구체 단백질(Amyloid precursor protein: APP)이 α -, β -, γ -세크레타아제들과 같은 세포내의 단백질 분해효소들과 조합으로 많은 다양한 형태들로 진행되는 것으로 생각된다. 하지만, 아밀로이드 베타의 형성 과정이 실제 과학적으로 완전히 규명되지 않았기 때문에, 아밀로이드 베타의 형성을 조절하는 것은 아직은 가능하지 않다.
- [0010] 아밀로이드 베타의 축적이 신경신호 전달에 이상을 주는 과정은 명확하지 않으며, APP가 이상하게 절단되어 아밀로이드 베타가 많이 생성되어 신경염 공간에 축적되게 되면 플라크 형성이 유발된다. 따라서 이런 절단 반응에 관여하는 많은 다른 요인들(예: 염증반응 등)은 타우(tau) 단백질의 인산화를 증가시키고, NFT들과 쌍나선형 필라멘트(paired helical filament: PHF)들의 축적을 증가시켜서 결국 신경의 손상을 증가시킨다. 이런 요인들 모두 신경의 기능 장애를 유발하고 궁극적으로 알츠하이머병의 치매로 진행을 가속시킨다.
- [0011] 비록 알츠하이머병의 영향을 줄이기 위한 치료 방법의 개발이 활발히 진행되고 있으나, 현재로는 일시적인 증상의 개선을 제공하는 것이다. 결론적으로 현재 알츠하이머병 치료는 병의 진행 과정을 되돌리는 것이 아니라 병의 증상을 개선하는데 초점을 두고 있으며, 병의 생물학적인 지식에 대하여 보다 많이 알고 있으나, 임상에서의 적용 결과는 아직 성공적이지는 않다.
- [0012] 이와 관련하여 미국 등록특허 제5,532,219호는 4,4 '-디아미노디페닐술폰 등을 포함하는 알츠하이머병 치료용 조성물을 개시하고 있고, 미국 등록특허 제5,506,097호는 파라-아미디노페닐메탄술폰 플루오리드 또는 에베락톤 A를 포함하는 알츠하이머병 치료용 조성물을 개시하고 있으며, 미국 등록특허 제6,136,861호는 비시클로 [2.2.1]헵탄을 포함하는 알츠하이머병 치료용 조성물을 개시하고 있다.
- [0013] ELAVL2는 ELAVL like neuron-specific RNA binding protein 2로 nELAVL2의 1가지 형태이다. nELAVL2는 뇌 특이적으로 발현되는 RNA binding protien으로 Neurodegenerative disease에 관련이 있다고 알려져 있다. 알츠하이머병 환자 사후부검 후 뇌 조직을 이용해 high-throughput RNA sequence를 실시한 결과 ELAVL2가 저발현되어

있는 것이 알려져 있다.

- [0015] 알츠하이머병은 치매의 가장 흔한 형태이며 75%의 치매 환자가 알츠하이머병이다. 대부분의 경우 알츠하이머병은 65세가 넘어 발병하지만, 드물게 그 이전에 발병할 수 있다. 미국에서는 65~74세 인구의 약 3%, 75~84세 인구의 약 19%, 85세 이상 인구의 50%가 이 병을 앓고 있다. 한국에서는 최근 한 농촌 지역을 중심으로 한 연구 보고에 의하면, 농촌 지역 60세 이상의 인구에서 약 21%가 치매 양상을 보이고, 이 중 63%가 알츠하이머형 치매인 것으로 보고되고 있다. 2006년 전 세계 26.6만명이 가진 질병이다. 2050년에는 85명중 1명꼴로 발병될 것으로 예측된다.
- [0016] 알츠하이머성 치매는 치료제가 없고 진단에 이은 증상 완화제 처방이 유일한 방법이다. 또한, 조기 진단 시스템도 전무한 상황이다. 기존 진단의 경우 다양한 방법으로 진행되고 있으나, 많은 단점이 존재한다. 문진법은 인지차이에 의한 오류가 있을 수 있고, 구조적 뇌영상은 고비용, 핵의학적 뇌영상은 방사성 동위원소의 사용 및 고비용의 단점이 있다. 뇌척수액 분석을 통한 타우 단백질 측정은 침습적 방법 및 뇌척수액 추출에 따른 위험성이 있다.
- [0018] 이에, 본 발명자들은 알츠하이머병 등의 뇌신경 질환을 진단할 수 있는 마커를 선정함과 동시에 보다 정확한 진단법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 혈액으로부터 추출한 miR-485-3p의 발현량이 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명의 목적은 miR-485-3p의 발현량을 측정하여 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 조기진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 데 있다. 또한, 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단 방법, 진단용 조성물 및 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 채취된 시료로부터 miR-485-3p의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법 및 진단 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한, miR-485-3p의 발현량 또는 아밀로이드베타 42의 농도를 측정하는 알츠하이머병 등의 뇌 질환 진단용 조성물 및 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따르면, 혈액 내 miR-485-3p의 발현량 측정에 의해 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 진단에 대한 객관적인 데이터 분석이 가능하며, 추가로 타액 내 아밀로이드베타 42의 농도 측정에 의해 환자의 위험성을 최소화하며, 빠르고 정확한 진단이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따르면, 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 조기 진단으로 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 예방에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 (A)는 정상군 대비 환자군에서 miRNA발현 패턴 분석(volcano blot) 결과이며, (B)는 정상군 대비 환자군에서 miR-485-3p의 발현을 비교한 그래프이다.
- 도 2는 5xFAD의 3'-비번역 부위(UTR)mRNA와 miR-485-3p의 Seed 서열이다.
- 도 3은 (A)는 hippocampus 및 cortex에서 miR-485-3p의 발현을 비교한 그래프이며, (B) 및 (C)는 5xFAD의 해마 및 대뇌피질에서 ELAVL2의 발현 및 관련 단백질 발현 비교 결과이다.
- 도 4는 (A)는 5xFAD의 대뇌피질에서 A β 42의 정량 비교 분석 그래프이며, (B)는 해마에서 A β 42의 정량 비교 분석 그래프이다.
- 도 5는 자성입자 모음 장치의 모식도이다. 항원, 항체, 자성입자 그리고 형광물질이 콤플렉스를 이루는 과정을 보여준다.
- 도 6은 자성입자 모음 장치를 이용한 타액 유래 A β 정량화 결과이다.
- 도 7은 자성입자 모음 장치를 이용한 타액 유래 A β 농도 측정을 통하여 치매 환자를 구별할 수 있음을 보여준다.
- 도 8은 아밀로이드베타(A β) 42를 발현하는 핵산 레벨 측정 과정의 모식도이다.
- 도 9는 Hippocampal primary cell에서 AM485-3p transfection에 따른 ELAVL2 발현을 비교한 결과이다.
- 도 10은 AM485-3p를 비강내 처리한 5xFAD에서 ELAVL2포함 관련 단백질 및 A β 42 정량 비교 분석 결과이다.
- 도 11은 AM485-3p를 비강내 처리한 5xFAD에서 인지 기능 여부를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 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 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0032] 본 발명의 구체적 실시예에서 의사로부터 알츠하이머 치매 진단을 받은 환자로부터 얻은 혈액 내에서 miR-485-3p의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 채취된 시료로부터 miR-485-3p의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다. 또한, 채취된 시료로부터 miR-485-3p의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명은 시료로부터 마이크로 RNA miR-485-3p를 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 시료는 혈액 또는 혈장인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에서, 의사로부터 알츠하이머 치매 진단을 받은 환자로부터 Sod. citrate (3.2% w/v)가 첨가된 혈액 튜브 (백톤 디킨슨 (Becton Dickinson), 독일)에 약 3ml의 혈액을 채혈하였다. 혈액은 3,500 rpm에 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였으며 RNA 추출 전까지 -80℃에 보관하였다. 제조업자의 권장에 따라 miRNeasy Serum/Plasma Kit(키아젠(Qiagen, USA))를 사용하여 miRNA를 추출하였다. miRNA 추출은 다음과 같은 순서로 이루어진다. 혈장 또는 혈청 샘플을 QIAzol Lysis Reagent에 용해시키고, 클로로포름을 첨가한 뒤 원심분리에 의해 용해물을 수용액상과 유기상으로 분리한다. RNA 부분은 상부의 수용액상으로, DNA 부분은 중간 층으로, 단백질은 중간 층 또는 하부의 유기상으로 나뉘어진다. 상부의 수용액상을 추출하여, 약 18 뉴클레오타이드 이상의 RNA 분자들과 결합할 수 있는 적절한 조건을 제공하기 위해 에탄올을 첨가한다. 샘플을 RNeasy MinElute spin column에 적용하여 모든 RNA는 막에 결합하고, 페놀 및 다른 오염 물질은 효율적으로 씻어낸다. 고품질의 RNA는 RNase가 없는 소량의 물에서 용출시킨다. 혈청과 혈장에는 주로 작은 RNA를 포함하므로, 작은 RNA와 큰 RNA 분획을 별도로 정제할 필요는 없다.
- [0036] 본 발명은 마이크로 RNA miR-485-3p의 발현량을 측정하는 단계를 포함한다.

- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 miR-485-3p의 발현량은 rea-time PCR, 정량 PCR 프라이머 신장분석, 핵산 칩분석, 서열 분석, 앵타머 기반 검정 및 전기영동에 의한 젤크로마토그래피로 구성된 군에서 선택되는 방법에 의해 측정되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서, 추출된 RNA의 농도와 순도를 Bioanalyzer2100 (Agilent, USA)을 이용하여 분석하였다. 상기 추출된 RNA는 Human Neurological Development 및 Neurological Disease의 진행과 연관되어 있다고 알려진 84개의 다른 miRNA를 함유하는 miRNA array를 사용하여 스크리닝하였다.
- [0039] Quantitative PCR assay 방법은 다음과 같이 요약할 수 있다. Mature한 miRNA는 일반적으로 22nt, noncoding RNA이며 전사 후 조절을 담당한다. Mature한 miRNA는 poly(A) polymerase에 의해 polyadenylation을 유도하고 oligo-dT primers로 cDNA로 합성하였다. oligo-dT primers는 3' degenerate anchor를 갖고 있고 5' 말단에 universal tag sequence를 갖고 있어 Real-time PCR 과정에서 mature miRNA 증폭을 가능하게 한다. miScript SYBR Green PCR Kit (퀴아젠)을 이용해 real-time PCR 과정에서 mature한 miRNA를 정량하였다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 miR-485-3p의 발현량이 정상군 대비 5배, 더욱 구체적으로 9배 이상인 경우 알츠하이머 병 또는 뇌 질환을 갖는 것으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 정상군은 59세에서 64세 사이이며, 알츠하이머병 또는 뇌 질환을 겪은 이력이 없는 사람들로 선정하였다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 뇌 질환은 자폐 스펙트럼 장애, 정신지체, 근위축성 측색 경화증, 경련, 뇌졸중, 파킨슨씨 병, 척수손상으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 따른 정보제공 방법 및 진단 방법은 마커의 발현량을 검사 대상체의 알츠하이머병 및/또는 여러 가지 뇌 질환의 진단 또는 예후 판별시에 발작 질환 검사 대상체의 비마커 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 검사 대상체의 비마커 임상정보는 상기 대상체의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환 및 뇌파검사, 발작 종류, 뇌 MRI, 뇌 CT, 또는 뇌 척수액 검사, 혈액검사, 타액검사를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단을 위한 정보제공 방법은 채취된 시료로부터 아밀로이드 베타 42(Aβ42)의 농도를 측정하는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 상기 시료는 타액 또는 혈액인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 시료로 타액을 이용하는 것은 환자의 위험성을 최소화하며, 빠르고 정확한 진단이 가능하게 한다.
- [0047] 상기 아밀로이드베타 42의 농도 측정은 항원-항체 반응 또는 핵산 앵타머를 이용하여 측정되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 항원-항체 반응은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 포함하는 당업계에서 널리 알려진 것일 수 있다. 채취된 타액으로부터 아밀로이드베타 42의 농도를 측정하는 경우, 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 한국특허공개 10-2014-0025978 또는 한국특허공개 10-2013-0140528을 참조한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 용어 '앵타머(aptamer)'는 표적 분자에 대한 특정 결합 친화력을 가지는 핵산을 말하며, 본 발명에서는 특히, 상기 표적분자가 아밀로이드베타 42이다.
- [0049] 표적에 대한 앵타머의 특정 결합 친화력(specific binding affinity)은 앵타머는 시료에서의 다른 성분에 결합하는 것보다 일반적으로 더 높은 정도의 친화력으로 그것의 표적에 결합함을 의미한다. 앵타머는 하나 이상의 이와 같은 분자 세트를 말한다. 서로 다른 앵타머는 동일하거나 서로 다른 수의 뉴클레오티드 중 하나를 가질 수 있다. 앵타머는 DNA 또는 RNA 또는 화학적으로 변경된 핵산일 수 있고, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 이중 가닥 영역을 포함하는 것일 수 있고, 매우 질서정연한(higher ordered) 구조를 포함할 수 있다. 광반응성(photoreactive) 또는 화학적 반응성 기능기(chemically reactive functional group)가 그것의 대응하는 표적에 공유적으로 결합될 수 있도록 앵타머에 포함되어 있는 한, 앵타머는 또한 광앵타머(photoaptamer)일 수 있다. 본 발명에 기재된 임의의 앵타머 방법은 동일한 표적 분자와 특이적으로 결합하는 두 개 또는 그 이상의 앵타머의 사용을 포함할 수 있다.
- [0050] 앵타머는 SELEX를 포함하는 임의의 공지의 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 일단 확인되면, 앵타머는 화학 합성 방법 및 효소 합성 방법을 포함하는 임의의 공지의 방법에 따라 제조되거나 합성될 수 있다.
- [0051] 상기 용어 "SELEX" 및 "SELEX 공정(SELEX process)"은 (1) 바람직한 방식, 예를 들어 단백질에 고친화력을 가

지는 결합으로 표적 분자와 상호작용하는 앵타머의 선별과 (2) 그 선택된 핵산의 증폭(amplification)의 조합을 일반적으로 칭하기 위하여 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 SELEX 공정은 특정 표적 또는 바이오마커에 대하여 고친화력을 가지는 앵타머를 확인하는데 사용될 수 있다. SELEX는 일반적으로 핵산의 후보물질 혼합물을 제조하고, 친화 복합체(affinity complex)를 형성하기 위하여 원하는 표적 분자에 후보물질 혼합물을 결합시키고, 결합되지 않은 후보물질 핵산으로부터 친화 복합체를 분리하고, 친화 복합체로부터 핵산을 분리 및 단리시키고, 핵산을 정제하고, 특정 앵타머 서열을 증폭하는 것을 포함한다. 상기 공정은 선별된 앵타머의 친화력을 더 개선하기 위한 반복 회전(multiple rounds)을 포함할 수 있다. 상기 공정은 공정에서의 하나 또는 그 이상의 지점에서 증폭 단계를 포함할 수 있다(예를 들어, US 5,475,096: Nucleic Acid ligands). 상기 SELEX 공정은 그것의 표적에 공유적으로 결합하는 앵타머 뿐만 아니라 그것의 표적에 비공유적으로 결합하는 앵타머를 생성하기 위하여 사용될 수 있다(예를 들어, US 5,705,337: Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX). 상기 SELEX 공정은 예를 들어, 생체 내(in vivo) 안정성을 향상시키거나 운반 특성을 향상시키는 것과 같은, 앵타머 상에 향상된 특성을 부여하는 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 고친화성 앵타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 변경의 예는 리보오스(ribose) 및/또는 포스페이트(phosphate) 및/또는 염기 위치(base position)에서의 화학적 치환을 포함한다. SELEX 공정에서 확인된 앵타머는 피리딘의 5'- 및 2'-위치에서 화학적으로 변경된 뉴클레오티드 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 기술하고 있는 미국특허번호 제5,660,985호("High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides")에 기재되어 있다. 상기를 참고하여, US 5,580,737는 2'-아미노(2'-NH₂), 2'-플루오로(2'-F) 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변경된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 고티이성 앵타머를 기술하고 있다. 또한, SELEX 및 광SELEX에서 확장된 물리 및 화학적 특성을 가지는 핵산 라이브러리 및 그것들의 용도를 기술하고 있는 US 2009/0098549(SELEX 및 PHOTOSELEX)를 참고할 수 있다. SELEX는 또한 바람직한 오프-레이트(off-rate) 특성을 가지는 앵타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 표적 분자에 결합할 수 있는 앵타머를 생성하기 위한 향상된 SELEX 방법을 기술하고 있는 US 2009/0004667(Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates)를 참고할 수 있다.

[0052] 상기 앵타머는 샘플과 접촉하기 이전에 고체 지지체 상에 고정화된다. 그러나, 어떤 환경하에서, 샘플과 접촉하기 전 앵타머의 고정화는 최적의 검정을 제공하지 않을 수도 있다. 예를 들면, 앵타머의 전-고정화(pre-immobilization)는 아마도 긴 반응시간에 따른 고체 지지체 표면상의 표적 분자와 앵타머의 비효율적인 혼합을 야기할 수 있으므로, 그것의 표적 분자에 대한 앵타머의 효율적인 결합을 위하여 긴 배양기간을 요한다. 게다가, 광앵타머가 검정법에 사용되고 고체 지지체로서 사용된 물질에 의존하는 경우, 상기 고체 지지체는 광앵타머와 그것의 표적 분자 간의 공유 결합의 형성을 이루기 위하여 사용되는 빛을 산란시키거나 흡수하는 경향이 있을 수 있다. 더욱이, 사용된 방법에 따라, 고체 지지체의 표면은 또한 임의의 표지 시약에 노출되고 그것에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에, 그것의 앵타머에 결합된 표적 분자의 검출은 부정밀도(imprecision)에 영향을 받기 쉽다. 마지막으로, 고체 지지체 상의 앵타머의 고정화는 일반적으로 샘플에 대한 앵타머의 노출 이전에 앵타머-제조 단계(즉, 고정화)를 포함하며, 이 제조 단계는 상기 앵타머의 활성 또는 기능성에 영향을 미칠 수 있다.

[0053] 앵타머는 앵타머 바이오마커 복합체(또는 광앵타머 바이오마커 공유결합 복합체)로부터 검정 성분의 분리를 용이하게 하고, 검출 및/또는 정량화를 위한 앵타머의 단리가 가능하도록 구성될 수 있다. 일 구현에서, 이 구조체는 앵타머 서열 내에 절단 가능하거나(cleavable) 방출 가능한(releasable) 구성요소를 포함할 수 있다. 다른 구현에서, 부가적인 기능성, 예를 들어 표지 되거나 검출 가능한 성분, 스페이서(spacer) 성분 또는 특정 결합 태그 또는 고정화 구성요소가 앵타머 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 앵타머는 절단 가능한 부분(moiety), 표지(label), 표지를 분리하는 스페이서 성분 및 방출 가능한 부분을 통하여 앵타머에 연결된 태그를 포함할 수 있다.

[0054] 상기 핵산 앵타머는 이에 한정되는 것은 아니나, DNA, RNA, 앤타고미어(anti-miR), 안티센스 분자, 소방해 RNA 분자(siRNA), 소해어핀 RNA 분자(shRNA), 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 리보뉴클레오타이드, 디코이 올리고뉴클레오타이드, PNA(peptide nucleic acid) 올리고뉴클레오타이드 또는 LNA(locked nucleic acid) 올리고뉴클레오타이드로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 실시예에서, 아밀로이드베타 42에 특이적으로 결합하는 sequence 및 핵산 내부 자체 결합하는 sequence를 이용하여 아밀로이드베타 42와 결합 시 소광물질(quencher)이 떨어짐과 동시에 형광이 발현되는 구조적 특징을 가진 멀티핵산을 합성하였다. 상기 멀티핵산의 크기는 항체보다 작으므로 특이성 및 선택성이 우수

하며, 1시간 이내 샘플링 및 대량분석이 가능하므로 진단 용이성이 높은 진단 방법 제공이 가능하다.

- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 아밀로이드베타 42의 농도가 0 이상 500pg/ml 미만인 경우 정상, 500pg/ml 이상 1ng/ml 미만인 경우 경도인지장애(MCI) 또는 1ng/ml 이상인 경우 중증 환자로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 일 실시예에서, 선행 연구를 통하여 100명 이상의 치매 환자에서 아밀로이드베타 42를 정량화하여 경도 인지장애와 중등도 치매 구분에 성공(임상 의사의 진단과 90%이상 일치)하였다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에서, miR-485-3p의 증가 패턴이 아밀로이드베타 전구체로 알려져 있는 APP발현량에 유의하게 영향을 미치는 것을 확인하였다.
- [0060] 본 발명은 다른 관점에서, miR-485-3p를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 miR-485-3p와 혼성화할 수 있는 프로브를 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 증폭될 miR-485-3p의 각 가닥과 대체적으로 상보성을 가지도록 제작되고, 적당한 G 또는 C 뉴클레오티드를 포함한다. 이것은 중합반응을 수행하는 조건에서 프라이머가 대응하는 핵산 가닥과 하이브리다이제이션 되기에 충분한 상보성을 가지는 것을 의미한다. 본 발명의 프라이머는 증폭 과정에 사용되며, 상기 증폭 과정은 예를 들면, PCR과 같은, 타겟 로커스가 많은 반응 단계를 거치면서 기하급수적인 속도로 증가하는 효소 연속 반응이다. 전형적으로, 한 프라이머(안티센스 프라이머)는 로커스의 네가티브(-) 가닥에 대하여 상동성을 가지고, 나머지 하나의 프라이머(센스 프라이머)는 포지티브(+) 가닥에 대하여 상동성을 가진다. 변성된 핵산에 프라이머가 어닐링되면, DNA 폴리머라아제 I(Klenow) 및 뉴클레오티드와 같은 효소 및 반응물들에 의하여 사슬이 신장되고, 그 결과, 타겟 로커스 서열을 함유하는 + 와 - 가닥이 새롭게 합성된다. 상기 새로이 합성된 타겟 로커스가 주형으로도 사용되어 변성, 프라이머 어닐링 및 사슬 신장의 사이클이 반복되면 타겟 로커스 서열의 기하급수적인 합성이 진행된다. 상기 연속 반응의 산물은 반응에 사용된 특이 프라이머의 말단과 대응하는 말단을 가지는 독립적인 이중가닥 핵산이다.
- [0062] 상기 증폭 반응은 당해 분야에서 보편적으로 사용되고 있는 PCR인 것이 바람직하다. 그러나, Real-time PCR 또는 등온 효소를 사용한 선형증폭과 같은 대체적인 방법도 사용할 수 있으며, 멀티플렉스 증폭 반응 역시 사용할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 검출할 수 있도록 표지되며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다. 상기 프로브는 알려진 질병 진단용 핵산 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프로브를 이용할 수 있으며, 이러한 프로브와의 결합 여부를 통하여, 특정 바이오마커 또는 그 단편의 함유 여부를 확인하여 질병을 진단할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, miR-485-3p의 서열은 포유류 유래 예를 들면, 인간, 마우스, 또는 래트 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에서, miR-485-3p의 서열은 인간 유래이며, 성숙된 서열 (5' GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU 3' (서열번호 1))은 물론, 전구 서열 (5'-ACUUGGAGAGAGGCGGCCGUGAUGAAUUCGAUUCAUCAAAGCGAGUCAUACACGGCUCUCCUCUCUUUAGU- 3' (서열번호 2))을 포함하는 것이다.
- [0066] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기 서열의 전부 또는 일부와 상보적인 서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단용 조성물은 아밀로이드베타 42에 특이적으로 결합하는 항체 또는 핵산 앵타머를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 항체 또는 핵산 앵타머는 아밀로이드베타 42를 검출하기 위한 것으로, 시료로부터 아밀로이드베타 42의 검출을 위해 어떠한 형태로도 사용할 수 있다.
- [0070] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 알츠하이머병 또는 뇌 질환 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 또는 뇌

질환 진단용 키트에 관한 것이다.

- [0071] 본 발명의 진단용 키트는 알츠하이머병 및 또는 여러 가지 뇌 질환 질환의 진단에 사용될 수 있으며, 가장 바람직하게는 알츠하이머병의 진단에 이용될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합 효소 보조인자 및 dNTP를 포함할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명에 따른 키트는 마이크로어레이일 수 있으며, 바람직하게는 유전자 증폭 키트가 될 수 있다. 상기 키트가 마이크로어레이인 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화되어 있다. 본 발명의 키트가 유전자 증폭 키트인 경우에는 프라이머를 포함한다. 프로브 또는 프라이머는 본 발명에 따른 miR-485-3p를 특이적으로 인식하는 것으로 상기 서열에 상보적인 서열을 가진다. 사용된 용어 '상보적(complementary)'은 상기에서 정의된 바와 같이, 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건하에서 상기 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 정도의 상보성을 갖는 것을 의미하며, 본 발명의 프로브 또는 프라이머는 완전 상보적인 것 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다. 프라이머 또는 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명의 miRNA의 뉴클레오타이드 서열은 miRBase에서 확인할 수 있으며, 이 서열을 참조하여 프라이머 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 알츠하이머병 또는 뇌 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 제공될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 miR-485-3p에 의한 ELAVL2의 발현 감소가 알츠하이머병과 연관되어 있음을 규명한 것에 근거한 것으로, miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 알츠하이머병 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0077] 이때 상기 "miR" 는 주로 표적 RNA의 번역을 억제하거나 분해를 촉진함으로써 유전자 발현 후 전사단계에 관여하는 조절인자로 알려져 있고 21 내지 23개 디옥시리보뉴클레오타이드로 이루어진 비코딩 RNA를 의미한다.
- [0078] 또한, 상기 miR의 성숙 서열은 miR데이터베이스 (<http://www.mirbase.org>)에서 얻을 수 있다. 2012년 8월 현재 miR데이터베이스 (19판, miRBase)에 의하면 193개 중에서 유래한 25,141개의 성숙 miR가 등록되어 있다.
- [0079] 본 발명에 있어서, miR-485-3p는 이에 한정되는 것은 아니지만, 뇌, 특히 해마 및 피질에서 발현되어, ELAVL2 단백질을 코딩하는 ELAVL2 mRNA의 3' 비번역 부위에 결합하여, 이의 발현을 억제하여, 뇌에서의 ELAVL2 단백질 농도를 감소시킨다.
- [0080] 본 발명에 있어서, miR-485-3p의 활성 억제는 miR-485-3p의 세포 내 작용 또는 기능을 억제 또는 방해하는 것을 의미하는 것으로 전형적으로 miR-485-3p가 이의 표적, 예를 들면 ELAVL2 단백질을 코딩하는 mRNA 분자와의 결합을 직접적으로 억제하거나, 또는 저분자 억제제, 항체 또는 항체의 단편을 이용하여 miR-485-3p의 기능을 직접적으로 억제하거나, 또는 억제제 또는 small interfering RNA (siRNA) 분자를 이용하여 간접적으로 조절되는 것을 포함한다.
- [0081] 나아가 miR-485-3p의 활성의 방해 또는 억제는 직접 또는 간접적으로 전구서열(서열번호 2) 및 성숙서열(서열번호 1)의 활성을 억제하는 것을 포함한다. 또한, miR-485-3p의 활성 억제는 miR-485-3p의 전사를 억제하여 이의 세포 내 농도를 낮추는 것을 포함한다.
- [0082] 상기 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질은 이의 발현 및/또는 활성을 억제할 수 있는 임의의 물질을 포함하며, 이러한 물질은 예로서 화합물 (저분자, 고분자), 엔타고미어, 안티센스 분자, 쇼헤어핀 RNA 분자 (shRNA), 소방해 RNA 분자 (siRNA), 시드 표적 LNA (Locked Nucleic Acid) 올리고뉴클레오타이드, 데코이올리고뉴클레오타이드, 앵타머, 리보자임, 또는 DNA:RNA 하이브리드를 인지하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적으로 하는 miRNA, 특히 miRNA의 씨드 서열의 전부 또는 일부와 상보적인 서열을 가지고 있어 miRNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 핵산-기반 분자를 포괄하는 것이다. 따라서 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상보적 핵산-기반 억제제로 나타낼 수 있다.
- [0084] 또한, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드에는 다양한 분자가 포함되며, 예를 들면 리보핵산(RNA), 디옥시리보

핵산(DNA), 엔타고미어, 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 리보뉴클레오타이드, PNA(peptide nucleic acid) 올리고뉴클레오타이드 또는 LNA(locked nucleic acid) 올리고뉴클레오타이드로서, 바람직하게는 리보핵산이다.

- [0085] 상기 리보핵산은 이중가닥 쇼헤어핀 RNA 분자 (shRNA), 소방해 RNA 분자 (siRNA) 및 라이보자임을 포함한다.
- [0086] 상기 LNA는 기존 올리고뉴클레오타이드에 비해 리보오스 당 부위의 2' 내지 4' 탄소 사이에 추가적인 변형을 가하여 잠금(locked) 형태를 가지게 되어 열 안정성을 확보한다.
- [0087] 상기 PNA(peptide nucleic acids)는 당-포스페이트 백본 대신에 펩타이드-기반 백본을 포함한다. 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 2'-O-알킬 올리고뉴클레오타이드이고, 보다 바람직하게는 2'-O-C1-3 알킬 올리고뉴클레오타이드이며, 가장 바람직하게는 2'-O-메틸 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0088] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 좁은 의미의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 엔타고미어 및 억제 RNA 분자를 포함한다.
- [0089] 상기 엔타고미어는 단일-가닥의 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드로서, 내인성 microRNA의 침묵 (silence)에 사용된다. 엔타고미어는 Arganoute 2 (Ago 2) 절단 부위에서 상보적이지 않는 서열을 포함하거나, 또는 Ago2 절단이 억제되도록 염기가, 예를 들면 2' 메톡시기, 3' 콜레스테롤기, 포스포로씨오에이트로 변형되어 있으며, 표적서열에 상보적 서열을 가진다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 엔타고미어는 miR-485-3p에 적어도 부분적으로 또는 완전하게 상보적인 서열을 갖는다. 본 발명의 실시예에서 엔타고미어는 하나 이상의 변형 (예컨대, 2'-O-메틸-당 변형, 또는 3' 콜레스테롤 변형)을 포함한다. 다른 실시예에서 엔타고미어는 하나 이상의 포스포로씨오에이트 결합을 포함하며, 적어도 부분적으로 포스포로티오에이트 백본을 갖는다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 miR-485-3p의 발현을 억제하기 위하여 적합한 엔타고미어의 길이는 7-50 뉴클레오타이드, 특히 10-40 뉴클레오타이드, 특히 15-30 뉴클레오타이드, 더더욱 특히 15-25 뉴클레오타이드, 특히 16 내지 19nt이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0092] 본 발명에서 사용된 용어 '상보적'은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 miR-485-3p 표적에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 일부 또는 부분적으로 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적 (perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 실질적으로 상보적이란, 완전히 상보적인 것은 아니지만, 표적 서열에 결합하여 본 발명에 따른 효과 즉, miR-485-3p의 활성을 방해하기에 충분한 효과를 낼 정도의 상보성을 의미하는 것이다.
- [0093] 상기 '핵산'은 올리고뉴클레오타이드, DNA, RNA, 및 폴리뉴클레오타이드, 그 유사체 및 그 유도체를 포함하는 것으로 예를 들면 펩타이드 핵산 (PNA) 또는 그 혼합물을 포함한다. 또한, 핵산은 단일 또는 이중 가닥일 수 있으며, mRNA, microRNA, siRNA 또는 폴리펩타이드 등을 포함하는 분자를 코딩할 수 있다.
- [0094] 본 발명의 실시예에서, miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질은 miR-485-3p의 전구체 및/또는 성숙 서열의 전부 또는 일부, 특히 씨드 서열에 상보적으로 결합하여, 이의 활성을 억제할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 상기 활성의 억제는 miR-485-3p의 전사 및/또는 miR-485-3p의 표적 mRNA와의 결합을 억제하는 것이다. 본 발명에 따른 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이를 구성하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 연결하는 백본(골격)이 하기 하나 이상의 변형을 포함할 수 있거나, 또는 포함하지 않을 수 있다. 즉 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 LNA, 또는 이를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 당이 2'-O- 메틸화 및 메톡실에틸, 또는 이의 백본에 하나 이상의 포스포티오에이트를 포함할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 실시예에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산분자는 miR-485-3p의 씨드서열의 전부 또는 일부에 상보적인 서열을 포함한다. 상기 씨드서열은 miRNA의 표적분자의 인지에 매우 중요한 다양한 종에서 보존된 서열이다(Krenz, M. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 44:2390-2397(2004); H. Kiriazis, et al., Annu. Rev. Physiol. 62:321(2000)). miRNA는 씨드서열을 통해 표적과 결합하기 때문에, 씨드서열의 표적과의 상호작용을 억제하는 경우, 표적 mRNA의 번역 등을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 실시예에서 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열 중 1번째 또는 2번째부터 7번째 또는 8번째까지의 뉴클레오타이드 서열에 전부 또는 부분적으로 상보적인 서열을 포함하며, 예를 들면 본 발명의 안티센스 올리고뉴

클레오타이드는 5'-GUGUAUGAC-3'(서열번호 3), 5'-UGUAUGAC-3'(서열번호 4), 5'-GUGUAUGA-3'(서열번호 5), 5'-UGUAUGA-3'(서열번호 6) 또는 5'-AGAGAGGAGAGCCGUGUAUGAC-3'(서열번호 7)일 수 있으며, 상기 올리고뉴클레오타이드를 구성하는 하나 이상의 각 뉴클레오타이드는 2'-O- 메틸화 또는 메톡시메틸화되거나, 또는 상기 각 하나 이상의 뉴클레오타이드는 LNA이거나, 또는 상기 백본을 구성하는 화학결합 중 하나 이상은 포스포티오에이트일 수 있으나, 상기 변형을 포함하지 않을 수도 있다.

- [0098] 본 발명은 miR-485-3p이 ELAVL2의 발현을 과도하게 억제하여 알츠하이머병 및 여러 가지 뇌질환 발병에 관여한다는 발견에 근거한 것이다.
- [0099] ELAVL2 발현량 감소는 알츠하이머병, 자폐 스펙트럼 장애, 정신지체, 근위축성 측색 경화증발병과 관련이 있다고 알려져 있다. 특히 흥분독성을 유발하는 kainic acid, NMDA, quisulate, AMPA, glutamate 등의 물질에 ELAVL2의 단백질 레벨이 감소하고, 뇌신경 세포죽음을 초래하여 뇌 기능의 장애를 유발하여 경련, 뇌졸중, 파킨슨씨 병, 척수손상 등과 같은 여러 가지 뇌 질환을 일으킨다는 것이 알려져 있다(Kaminska, B. et al., Acta Biochim Pol. 44:781-789).
- [0100] 따라서 본 발명의 miR-485-3p 활성 억제를 통한 ELAVL2 단백질의 회복은 알츠하이머병 및/또는 자폐 스펙트럼 장애, 정신지체, 근위축성 측색 경화증, 경련, 뇌졸중, 파킨슨씨 병, 척수손상 등과 같은 여러 가지 뇌 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 실시예에서는 상기 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질을 포함하는 약학 조성물은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)의 치료에 사용되고, 뇌 질환은 알츠하이머병을 비롯하여, 자폐 스펙트럼 장애, 정신지체, 근위축성 측색 경화증, 경련, 뇌졸중, 파킨슨씨 병, 척수손상을 포함하지만 이에 한정된 것은 아니다.
- [0102] 본 발명에서 사용된 용어 '치료', '완화' 또는 '개선'이란 본 조성물의 투여로 관련 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학 협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0103] 본 발명에서 사용된 용어 '예방'은 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서 상기 약학 조성물은 초기 증상, 또는 나타나기 전에 투여할 경우 관련 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 본 발명의 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질 이외에 관련질환의 치료를 위해 동일, 유사 또는 시너지 기능을 나타내는 유효성분을 1종류 이상 또는 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질 및 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 선택적으로, 면역조절제 및/또는 화학치료제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0105] 상기 약학 조성물은 상기 언급한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 희석제, 담체 및/또는 아주번트를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 하나 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- [0106] 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다.
- [0107] 나아가 해당 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제형화할 수 있다. 예를 들면 현탁액, 리포솜 제형, 에멀전, 정제, 캡슐, 젤, 시럽 또는 좌제 중 어느 한 가지로 제형화 할 수 있다.
- [0108] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니며, 공지된 억제제의 투여방법을 적용할 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 비강내, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위해서는 비강내 주입에 의한 투여가 바람직하다.
- [0109] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 '약학적 또는 치료적으로 유효

한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0110] 상기 약학 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 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0111] 상기 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 폴리뉴클레오타이드의 구체적 효능 정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인 비보 동물모델 및 인 비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC50을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 μg 내지 1g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간당 일 회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 약학 조성물이 투여될 수 있다.

[0113] 본 발명의 실시예에서, miR-485-3p를 시험물질과 접촉시키는 단계 및 상기 시험물질과 접촉된 miR-485-3p의 활성을 결정하는 단계를 포함하며, 상기 접촉된 miR-485-3p의 활성이, 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군의 miR-485-3p의 활성과 비교하여 감소한 경우 이를 후보물질로 선별하는 것인, 알츠하이머병 또는 뇌 질환치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제시한다.

[0114] 상기 miR-485-3p는 이를 발현하는 세포의 형태로 제공되며, 상기 활성은 miR-485-3p의 발현으로 분석되는 것이다. 예를 들어 본 발명에 따른 miR-485-3p를 발현하는 세포를 시험물질과 접촉시킨 후, miR-485-3p의 발현량의 변화를 접촉 전 또는 접촉되지 않은 대조군 세포와 비교하여, 발현량에 변동, 특히 감소가 있는 것을 후보물질로 선별한다. 상기 miR-485-3p의 발현량 측정은 노던블랏, RT-PCR, 마이크로 어레이를 이용한 혼성화 방법 등과 같은 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0115] 상기 miR-485-3p는 이를 발현하는 세포의 형태로 제공되며, 상기 활성은 상기 miR-485-3p와 이의 표적인 ELAVL2 단백질(ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2)의 3'-UTR과의 상호작용 분석으로 결정된다. 예를 들어 본 발명에 따른 miR-485-3p를 발현하는 세포를 시험물질과 접촉시킨 후, ELAVL2 단백질의 3'-UTR과 miR-485-3p의 상호작용 정도를 접촉 전 또는 접촉되지 않은 대조군 세포와 비교하여, 상호작용에 변동, 특히 감소가 있는 것을 후보물질로 선별한다. 본 발명에 따른 방법에 사용되는 RNA-RNA 상호작용을 검출하는 방법은 당업계의 공지된 것으로 예를 들면 RNA Walk (Lusting et al., Nucleic Acids Res. 2010; 38(1):e5 에 기재된 것 참조) 또는 Yeast two hybrid system (Piganeau et al., RNA 2006; 12: 177-184) 등을 이용하여 검출할 수 있으며, RNA: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 2011)를 참조할 수 있다.

[0116] 상기 스크리닝 방법에서 사용되는 세포의 종류 및 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 세포의 종류, 양 및/또는 조건을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재 하에서 miR-485-3p의 활성의 감소를 가져오는 물질을 후보물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80% 감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 약 45% 이하 감소, 약 40% 이하 감소, 약 30% 이하 감소, 약 20% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0117] 상기 '시험물질'은 상술한 바와 같은 miR-485-3p의 활성 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하며, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 바이오의약품(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 엡타머, RNAzyme 및 DNAzyme), 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 상기 시험물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브

러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레사블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0118] 본 발명에 따른 알츠하이머병 및/또는 여러가지 뇌 질환을 치료하는 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물 (예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로 사이클 (예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.

[0119] 또한, 세포 또는 바이오분자가 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 바이오분자란, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 일컫는 것이다. 바이오분자를 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합으로 제공될 수 있다. 바이오분자는 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함하는 것이다.

[0121] 본 발명의 실시예에서, 검체로부터 miR-485-3p마커의 발현을 검출하는 단계; 및 상기 검출된 마커의 발현량을 검사 대상체의 알츠하이머병 및/또는 여러 가지 뇌 질환의 진단 또는 예후와 연관시키는 단계를 포함하여 알츠하이머병 및/또는 여러 가지 뇌 질환의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 상기 마커를 검출하는 방법을 제시한다.

[0122] 본 발명에 있어서, 상기 연관시키는 단계는 상기 결정된 마커의 발현량을 대조군에서 결정된 상기 각 마커에 대한 검출결과와 비교하는 것으로, 상기 마커 중 miR-485-3p는 대조군과 비교하여 그 발현량이 증가한 것이다.

[0123] 상기 마커의 발현량을 검사 대상체의 알츠하이머병 및/또는 여러 가지 뇌 질환의 진단 또는 예후 판별시에 발작 질환 검사 대상체의 비마커 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 검사 대상체의 비마커 임상정보는 상기 대상체의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환 및 뇌파검사, 발작 종류, 뇌 MRI, 뇌 CT, 또는 뇌 척수액 검사, 혈액검사, 타액검사를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0125] 본 발명의 실시예에서 miR-485-3p 이 ELAVL2단백질의 발현을 과도하게 억제하여 알츠하이머병 및/또는 여러 가지 뇌 질환발병에 관여한다는 발견에 근거한 것으로, 또 다른 실시예에서 대상체의 세포 또는 조직에서, 특히 뇌세포 또는 뇌조직 또는 뇌에서의 miR-485-3p활성 억제를 통한 알츠하이머병 및 또는 뇌 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0126] 본 발명의 실시예에서 알츠하이머병 및 또는 뇌 질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 치료적 또는 예방적으로 유효한 양의 miR-485-3p활성 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 알츠하이머병 및 또는 뇌 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0127] 나아가 본 발명의 실시예에서는 뇌 질환 질환의 치료 또는 예방용 용도의 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질을 제공하며, 이때 miR-485-3p의 활성을 억제할 수 있는 물질은 특히 뇌로 전달된다.

[0128] 또한, 사용되는 miR-485-3p활성 억제제, miR-485-3p활성 조절 또는 억제, 투여방법, 치료 가능한 질환의 종류

등에 대하여는 앞서 설명한 것을 참조할 수 있다.

[0130] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0132] 실시예 1: 알츠하이머 환자의 plasma 에서 miRNA qPCR array를 이용한 miRNA 발현 패턴 분석

[0133] (1) 환자 및 샘플 제조

[0134] 표 1은 연구에 이용된 환자의 특징으로, 의사로부터 알츠하이머 치매 진단을 받은 4인의 환자로부터 Sod. citrate (3.2% w/v)가 첨가된 혈액 튜브 (백톤 디킨슨 (Becton Dickinson, 독일)에 약 3ml의 혈액을 채혈하였다. 4인의 연령 (±4년)을 매칭한 건강한 성인을 정상군으로 포함시켰다.

표 1

정상군 및 환자군의 성별 및 나이

[0135]

| Group | Sample No | 성별 | 나이 |
|-------|-----------|----|----|
| 정상군 | N1 | 여 | 78 |
| 정상군 | N2 | 남 | 72 |
| 정상군 | N3 | 여 | 74 |
| 정상군 | N4 | 남 | 79 |
| 환자군 | S1 | 여 | 72 |
| 환자군 | S2 | 여 | 82 |
| 환자군 | S3 | 여 | 84 |
| 환자군 | S4 | 남 | 75 |

[0136] 혈액은 3,500 rpm에 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였으며 RNA 추출 전까지 -80℃에 보관하였다. 제조업자의 권장에 따라 miRNAeasy Serum/Plasma 키트 (퀴아젠 (Qiagen, USA)를 사용하여 miRNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 농도와 순도를 Bioanalyzer2100 (Agilent, USA)을 이용하여 분석하였다. 정상군을 포함한 8개 군이 품질 기준에 적합하여 연구에 사용하였다.(2) miRNA qPCR array

[0137] 표 2는 miRNA qPCR array 분석에 이용된 gene list로서 추출된 RNA는 Human Neurological Development 및 Neurological Disease의 진행과 연관되어 있다고 알려진 84개의 다른 miRNA를 함유하는 miRNA array를 사용하여 스크리닝하였다.

표 2

miRNA qPCR array 분석에 이용된 gene list

[0138]

| No. | Mature miRNA list | No. | Mature miRNA list |
|-----|-------------------|-----|-------------------|
| 1 | hsa-let-7b-5p | 43 | hsa-miR-298 |
| 2 | hsa-let-7c-5p | 44 | hsa-miR-29a-3p |
| 3 | hsa-let-7d-5p | 45 | hsa-miR-29b-3p |
| 4 | hsa-let-7e-5p | 46 | hsa-miR-29c-3p |
| 5 | hsa-let-7i-5p | 47 | hsa-miR-302a-5p |
| 6 | hsa-miR-101-3p | 48 | hsa-miR-302b-5p |
| 7 | hsa-miR-105-5p | 49 | hsa-miR-30d-5p |
| 8 | hsa-miR-106b-5p | 50 | hsa-miR-320a |
| 9 | hsa-miR-107 | 51 | hsa-miR-328-3p |
| 10 | hsa-miR-124-3p | 52 | hsa-miR-337-3p |
| 11 | hsa-miR-125b-5p | 53 | hsa-miR-338-3p |
| 12 | hsa-miR-126-5p | 54 | hsa-miR-339-5p |
| 13 | hsa-miR-128-3p | 55 | hsa-miR-342-3p |
| 14 | hsa-miR-130a-3p | 56 | hsa-miR-346 |

| | | | |
|----|-----------------|----|-----------------|
| 15 | hsa-miR-132-3p | 57 | hsa-miR-34a-5p |
| 16 | hsa-miR-133b | 58 | hsa-miR-376b-3p |
| 17 | hsa-miR-134-5p | 59 | hsa-miR-381-3p |
| 18 | hsa-miR-135b-5p | 60 | hsa-miR-409-3p |
| 19 | hsa-miR-138-5p | 61 | hsa-miR-431-5p |
| 20 | hsa-miR-139-5p | 62 | hsa-miR-432-5p |
| 21 | hsa-miR-140-5p | 63 | hsa-miR-433-3p |
| 22 | hsa-miR-146a-5p | 64 | hsa-miR-455-5p |
| 23 | hsa-miR-146b-5p | 65 | hsa-miR-484 |
| 24 | hsa-miR-148b-3p | 66 | hsa-miR-485-3p |
| 25 | hsa-miR-151a-3p | 67 | hsa-miR-485-5p |
| 26 | hsa-miR-152-3p | 68 | hsa-miR-487a-3p |
| 27 | hsa-miR-15a-5p | 69 | hsa-miR-488-3p |
| 28 | hsa-miR-15b-5p | 70 | hsa-miR-489-3p |
| 29 | hsa-miR-181a-5p | 71 | hsa-miR-499a-5p |
| 30 | hsa-miR-181d-5p | 72 | hsa-miR-509-3p |
| 31 | hsa-miR-191-5p | 73 | hsa-miR-511-5p |
| 32 | hsa-miR-193b-3p | 74 | hsa-miR-512-3p |
| 33 | hsa-miR-195-5p | 75 | hsa-miR-518b |
| 34 | hsa-miR-19b-3p | 76 | hsa-miR-539-5p |
| 35 | hsa-miR-203a-3p | 77 | hsa-miR-652-3p |
| 36 | hsa-miR-20a-5p | 78 | hsa-miR-7-5p |
| 37 | hsa-miR-212-3p | 79 | hsa-miR-9-5p |
| 38 | hsa-miR-22-3p | 80 | hsa-miR-9-3p |
| 39 | hsa-miR-24-3p | 81 | hsa-miR-92a-3p |
| 40 | hsa-miR-26b-5p | 82 | hsa-miR-93-5p |
| 41 | hsa-miR-27a-3p | 83 | hsa-miR-95-3p |
| 42 | hsa-miR-28-5p | 84 | hsa-miR-98-5p |

[0139] Quantitative PCR assay 방법은 다음과 같이 요약할 수 있다. Mature한 miRNA는 일반적으로 22nt, noncoding RNA이며 전사 후 조절을 담당한다. Mature한 miRNA는 poly(A) polymerase에 의해 polyadenylation을 유도하고 oligo-dT primers로 cDNA로 합성하였다. oligo-dT primers는 3' degenerate anchor를 갖고 있고 5' 말단에 universal tag sequence를 갖고 있어 Real-time PCR 과정에서 mature miRNA 증폭을 가능하게 한다. miScript SYBR Green PCR Kit (퀴아젠)을 이용해 real-time PCR 과정에서 mature한 miRNA를 정량하였다.(3) Volcano plot을 통한 miRNA 발현 패턴 분석

[0140] 도 1(A)는 정상군 대비 환자군에서 miRNA 발현 패턴 분석(volcano blot)으로, 정상군 대비 환자군의 84종 miRNA 발현 패턴을 분석하였다.

[0141] x축은 Fold change를 나타내고 y축은 $-\log_{10}$ 의 p-value 값을 나타낸다. 가로 검은색 줄은 p value가 0.05 이하를 나타낸다. Volcano blot 분석 결과 hsa-miR-105-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-381-3p, hsa-miR-431-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-376b-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-499a-5p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-95-3p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-487a-3p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-489-3p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-539-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-518b, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-346, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-487a-3p, hsa-miR-489-3p, hsa-miR-499a-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-511-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-518b, hsa-miR-539-5p, hsa-miR-652-3p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-95-3p, hsa-miR-98-5p이 환자군에서 발현이 상승하는 것을 확인하였다. 그러나 hsa-miR-485-3p를 제외한 miRNA의 조절은 통계적으로 유의하지 않았다. hsa-485-3p의 경우 p-value가 0.00439를 나타내어 알츠하이머 환자에서 정상군 대비 유의적으로 증가한다고 보여진다. 정상군을 1로 보았을 때, 중증치매는 9배 정도의 차이를 보였으며, 그

사이 즉, 1배 내지 9배 사이인 경우를 경도인지장애로 구분할 수 있다(도 1(B)). 따라서 hsa-miR-485-3p는 알츠하이머병을 진단하기 위한 기대 지표가 될 수 있다.

[0143] **실시예 2: Human miRNA 표적 유전자 예측 및 마우스에서 동일 miRNA 표적 유전자 보존과 anti-mmu-miR-485-3p 합성**

[0144] hsa-miR-485-3p의 염기 서열 및 표적 위치 분석을 하기 위해 표적 예측 소프트웨어(miRDB)를 이용하여 사람유래 ELAVL2의 3 말단 비번역 부위(UTR)가 hsa-miR-485-3p의 표적인 것을 확인하였다. 여기서 확인된 시드 서열은 mmu-miR-485-3p 와 마우스 유래 ELAVL2 3 말단 비번역 부위에도 보존되어 있는 것을 확인하였다.

[0145] 도 2는 hsa-miR485-3p의 타겟으로 알려진 ELAVL2 3'-비번역 부위(UTR) mRNA를 나타낸 목록으로, miR-485-3p의 표적 ELAVL2 3'-비번역 부위(UTR) mRNA를 보여준다. miR-485-3p의 5' 씨드 서열 (ELAVL2)은 빨간색으로 표시되어 있다. 표 3은 has-miR-485-3p의 염기 서열로서, 알츠하이머 질병모델을 이용하여 miR-485-3p의 생리학적 기능을 규명하기 위해 sequence를 합성하여 Functional study를 진행하였다.

표 3

[0146] has-miR-485-3p의 염기 서열

| Gene | Sequence(5'→3') | 서열번호 |
|----------------|------------------------|------|
| hsa-miR-485-3p | GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU | 1 |

[0147] 표 4는 mmu-miR485-3p의 염기 서열 및 표적 위치 분석으로, 표적 예측 소프트웨어(TargetScan, PicTar, 및 microT)을 이용하여 마우스 ELAVL2의 3'-비번역 부위(UTR)와 mmu-miR-485-3p의 표적서열이 보존되어 있는 것을 확인하였다. 마우스 ELAVL2의 3'-비번역 부위(UTR)가 mmu-miR-485-3p의 표적인 것을 확인하였다.

표 4

[0148] mmu-miR485-3p의 염기 서열 및 표적 위치 분석

| Gene | | Sequence(5'→3') | | 서열번호 |
|----------------|---|------------------------|-------------|----------------------|
| mmu-miR-485-3p | | AGUCAUACACGGCUCUCCUCUC | | 8 |
| Target gene | Gene name | 3P-seq tags + 5 | Total sites | Representative miRNA |
| ELAVL2 | ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2 | 78 | 3 | mmu-miR-485-3p |

[0149] 알츠하이머 마우스 모델에서 과발현되는 mmu-miR-485-3p에 대하여 알츠하이머 및 뇌질환과 관련된 타겟 유전자, 특히 서열 antagomir, 2'-O- 메틸화 및 포스포로티오에이트 modification된 안티센스 올리고 뉴클레오타이드를 합성하였다.

[0151] **실시예 3: 5xFAD 마우스의 해마 및 대뇌 피질에서 miR-485-3p 발현 분석 (RT-qPCR)**

[0152] (1) 연구 방법

[0153] 5xFAD transgenic mouse는 돌연변이 형태의 APP와 PSEN1를 over expression시켜 6주 정도부터 intraneuronal Aβ42의 축적이 심하게 나타나는 Alzheimer disease의 동물모델이다.

[0154] 실시예 1의 결과에 따라 치매 동물 모델에서 miR-485-3p의 발현 여부를 확인하고자 RT-qPCR를 진행하였다. 10개월 된 5xFAD transgenic mouse와 Wild type (WT) mouse를 깊이 마취시킨 후 단두로 희생시켰다. 뇌를 즉시 적출하였고 해마 및 대뇌피질을 잔류 뇌구조에서 절개하였다. PAXgene Tissue miRNA Kit(Qiagen, USA)을 제조자의 방법대로 사용하여 해마에서 total miRNA를 분리하였다. miScript II RT Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였고 mmu_miR-485-3p miScript Primer Assay 및 miScript SYBR Green PCR Kit 사용하여 qPCR을 진행하였다. miRNA level은 snoRNA202(mouse control)에 따라 normalize하여 정량하였다.

- [0155] (2) 연구 결과
- [0156] 도 3(A)는 hippocampus 및 cortex에서 miR-485-3p의 발현 비교 결과로서, 5xFAD의 해마 및 대뇌피질에서 miR-485-3p의 발현 패턴을 확인하고자 RT-PCR를 진행하였다. 그 결과 WT대비 5xFAD의 해마에서 miR-485-3p의 발현이 증가된 것으로 나타났다. 따라서, 실시예 1의 연구 결과와 함께, 알츠하이머성 치매에서 miR-485-3p의 발현이 상승하는 것으로 보여진다. 이에 따라 miR-485-3p가 영향을 미칠 수 있는 neuronal target mRNA 또는 protein을 확인해보고자 하였다.
- [0158] **실시예 4: 5xFAD 마우스의 해마 및 대뇌 피질에서 ELAVL2 포함 관련단백질 및 아밀로이드베타42 단백질 발현 확인**
- [0159] (1) 연구 방법
- [0160] 실시예 3의 결과에 따라, 5xFAD의 해마 및 대뇌피질에서 ELAVL2 포함 관련단백질 및 아밀로이드베타 42 단백질 발현 여부를 확인하고자 하였다. 마취한 마우스 (9개월)를 단두로 희생시키고 즉시 뇌를 적출하였다. 뇌 부위(해마, 대뇌피질)의 균질화물을 제조하여 ELAVL2에 대한 항체 (abcam, USA), cFOS 항체 (cell signaling, USA), APP 항체 (cell signaling, USA), 아밀로이드베타 항체 (cell signaling, USA)를 사용하여 western blot을 진행하였다. 면역반응 단백질을 화학발광 시약 (GE health care, UK)로 가시화시키고 화학이미지분석기 (Fusion SL)을 이용하여 측정 및 정량하였다. 해마 및 대뇌피질의 아밀로이드베타 42 단백질을 정량하기 위해 mouse/rat amyloid beta (1-42) ELISA kit (IBL)를 이용하여 정량하였으며 세부 사항은 제조사의 설명서를 참조하였다.
- [0161] (2) 연구 결과
- [0162] 1) 해마 및 대뇌피질에서 ELAVL2 발현 확인
- [0163] 도 3(B) 및 도 3(C)는 5xFAD의 해마 및 대뇌피질에서 ELAVL2의 발현 및 관련 단백질 발현 비교 결과이다. ELAVL2는 ELAV-like RNA-binding proteins으로, 인지 및 행동 기능과 직접적으로 연관되어 있는 뉴런 흥분 또는 시냅스 전달과 같은 신경 기능을 조절하는 단백질로 알려져 있다. 또한 ELAVL2는 neural-specific RNA-binding protein으로서, RNA의 GAAA motif를 인식하여 post-transcriptional gene regulation을 담당한다. 그 타겟으로는 단백질의 발현량에 영향을 미치는 전사인자 cFOS가 알려져 있다. 또한 cFOS는 뇌세포안에서 아밀로이드베타 전구체로 알려져 있는 APP단백질 발현에 영향을 미친다고 알려져 있다. 일련의 과정에서 miR-485-3p의 증가 패턴이 APP 발현량에 유의하게 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.
- [0164] 2) 대뇌피질 및 해마에서 A β 42 발현 비교
- [0165] 도 4는 5xFAD에서 A β 42 정량 비교 분석 결과로서, 5xFAD의 대뇌 피질 및 해마의 A β 42 발현을 비교 분석 하였다. 5xFAD에서 대뇌피질(도 4(A)) 및 해마(도 4(B)) 모두 A β 42가 WT대비 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이 결과들로 보아 miR-485-3p를 조절하는 것이 알츠하이머병의 원인 물질로 알려져 있는 아밀로이드베타를 줄일 수 있는 방법이 될 수 있다고 보여진다.
- [0167] **실시예 5: 타액으로부터 분리한 아밀로이드베타(A β) 42의 농도 측정**
- [0168] (1) 연구 방법
- [0169] 뇌와 실질적으로 가까운 타액에서 아밀로이드베타를 측정하기 때문에 정확도가 혈액 대비 우수하며, 적은 양의 아밀로이드베타까지 정량함으로써 조기진단이 가능하다는 장점이 있다. 또한 보조수단(혈액, miRNA)으로 더불어 크함으로써 더 높은 정확도(99% 이상)를 확보할 수 있다.
- [0170] 아밀로이드베타 42에 특이적으로 결합하는 sequence 및 핵산 내부 자체 결합하는 sequence를 이용하여 아밀로이드베타 42와 결합 시 소광물질(quencher)이 떨어짐과 동시에 형광이 발현되는 구조적 특징을 가진 멀티핵산을 합성하였다. 상기 멀티핵산의 크기는 항체보다 작으므로 특이성 및 선택성이 우수하며, 1시간 이내 샘플링 및 대량분석이 가능하므로 진단 용이성이 높은 진단 방법 제공이 가능하다. 극미량의 바이오 마커를 모노 레이어로 집합시킬 수 있는 플랫폼 기술(magnetoimmunoassay 시스템)을 이용하여 타액 속 아밀로이드베타 42를 정량화하였다(도 5). 일정한 면적에 일정한 나노입자들이 모이는 것을 재현할 수 있다. 타액유래 아밀로이드베타와 자성

입자 복합체의 집합체는 직경 300 μm 이내이고, 집합체 속의 자성입자의 수는 $\sim 1.0 \times 10^4$ 이다(도 6(a)). Photomultiplier tube (PMT)분석의 Region-of-interest (ROI)는 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 이고, PMT에 의해 3번의 형광 물질을 측정한다 다음 각 샘플의 평균값을 계산하였다(도 6(b)).

[0171] 정상군 100명, 경도인지장애부터 중증치매까지 100명의 환자군을 모집하였으며, 연령대는 30대 초반부터 80대 후반까지이다. 치매에 영향을 줄 수 있는 다른 질환을 가질 수 있는 환자는 제외하였다.

[0172] (2) 연구 결과

[0173] 타액에서 극소량의 아밀로이드베타를 측정하며, ELISA로 나오지 않는 아밀로이드베타를 재현하였다. 연구용으로 시장에 나와 있는 ELISA와 비교 실험한 결과, 30대 정상인에서 검출되지 않았다.

[0174] 본 실시예에 따른 magnetoimmunoassay 시스템은 상업용 ELISA 시스템보다 다소 높은 $\sim 20 \text{ pg/ml}$ 의 농도에서 타액 아밀로이드베타 펩타이드를 간단히 검출할 수 있다. 참고로 사용된 ELISA 시스템의 프로토콜에 따르면, 표준 아밀로이드베타 펩타이드의 가장 낮은 측정 가능한 농도는 7.4 pg/ml 이며, 이는 측정을 위한 커브-피트가 매우 낮은 농도 범위에 대한 정확한 선형성을 만족시키지 못하기 때문에 약간 모호할 수 있다.

[0175] 각 치매 환자별 타액유래 아밀로이드베타 42 측정 결과 정상, 경도인지장애(MCI), 중증환자를 구별할 수 있었다. 즉, 정상 ($0\sim 500 \text{ pg/ml}$), 경도인지장애 ($500 \text{ pg}\sim\text{1ng/ml}$), 중증 ($1 \text{ ng/ml}\sim$)의 아밀로이드베타 농도를 확인하였다(도 7). 또한, 100명 이상의 치매 환자에서 아밀로이드베타를 정량화하여 경도 인지장애와 중등도 치매 구분에 성공(임상의사의 진단과 90%이상 일치) 하였다.

[0177] **실시예 6: Hippocampal primary cell line 제작 및 In vitro transfection**

[0178] (1) 연구 방법

[0179] 5xFAD embryo에서 적출한 해마와 대뇌피질의 조직에서 추출한 primary cell을 배양하였다. 제작 및 배양 방법인 종전의 연구를 참조하였다 (Seibenhener, M.L & Woonten M.W, Isolation and culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice, Jove, 2012). In Vitro Transfection Lipofectamine 2000을 사용하여 Primary cells에 50 nM of miR-485-3p duplex (or scrambled miRNA duplex; Bioneer, Daejeon, South Korea) 와 50 nM of Antagomir (AM)485-3p를 transfection 시켰다. transfection 후 48시간 이후부터 얻어진 cell homogenates을 제조하였고 이를 ELAVL2 antibody (abcam,UK)을 사용하여 western blot을 진행하였다. 면역반응 단백질은 면역 반응 단백질을 화학발광 시약 (GE health care, UK)로 가시화시키고 화학 이미징분석기 (Fusion SL)을 이용하여 측정 및 정량하였다. 아밀로이드베타 42 단백질은 mouse/rat amyloid beta(1-42) assay kit (IBL)을 이용하여 제조사의 설명서를 참조하여 측정하였다.

[0180] (2) 연구 결과

[0181] Hippocampal primary cell에서 AM485-3p transfection에 따른 ELAVL2 발현을 비교하였다(도 9). 5xFAD의 hippocampus primary cell 내에 ELAVL2가 발현되며 AM485-3p를 transfection시킨 cell에서 control대비 ELAVL2의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이는 miR-485-3p가 ELAVL2의 발현을 억제시킨다는 것을 의미하며 AM를 처리한 cell에서 이를 증명하였다. ELAVL2는 뉴런 흥분에 관여하여 인지 기능에 영향을 미치는 중요 인자이므로 ELAVL2를 상승시키는 miR-485-3p 억제제와 같은 약물 또는 조성물의 개발이 알츠하이머 질환을 예방/치료하는데 핵심 전략이 될 수 있다.

[0183] **실시예 7: AM485-3p를 비강내 처리한 5xFAD에서 ELAVL2포함 관련 단백질 및 아밀로이드베타42 단백질 정량 비교 분석**

[0184] (1) 연구 방법

[0185] miR-485-3p의 억제는 서열-특이적 엔타고미어 또는 스크램블-서열 엔타고미어의 비강투여로 유도하였다. 엔타고미어의 비강내 투여는 마우스를 마취시키지 않고 뇌를 표적으로 하는 방법에 따라 실시하였다. (Leah R.T., et al. (2013) Intranasal Administration of CNS Therapeutics to Awake Mice. J Vis Exp. 2013; (74): 4440). 논문에 나와있는 적응단계를 끝낸 마우스에 비강내 흡입을 위한 고정 (Intranasal grip)을 하고 복부를 위로 향하게 위치 시킨 다음 한쪽 비강 앞에 파이펫을 위치시킨다. $6\mu\text{l}$ 를 파이펫으로 2번을 흡입시키는데 drop형태로

흡입시킨다 (1drop = 3 μ l). 15초 자세유지 후에 오른쪽 비강 내에 똑같이 흡입시킨다. 2분후 똑 같은 과정을 반복하고 총 24 μ l를 흡입시킨다 (AM485 (2'-O-Methylated)-5'-gagaggagagccguguagacu-3'; 24 μ l의 0.1% v/v 디에틸피로카르보네이트-처리된 증류수 중 5nmol; 바이오니아, 한국). 대조군 마우스에게는 Vehicle을 동등한 부피만큼 투여하였다. 비강 투여 한 시점(7개월)에서 12주(주 1회 투여) 뒤, 마취한 마우스를 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하였다. 뇌 부위(해마, 및 피질)의 균질화물을 제조하여 이를 ELAVL2에 대한 항체 (abcam, USA), cFOS 항체 (cell signaling, USA), APP 항체 (cell signaling, USA), 아밀로이드베타 항체 (cell signaling, USA)를 사용하여 western blot을 진행하였다. 면역반응 단백질은 면역반응 단백질을 화학발광 시약 (GE health care, UK)로 가시화시키고 화학 이미지분석기 (Fusion SL)을 이용하여 측정 및 정량하였다. 아밀로이드베타 42 단백질은 mouse/rat amyloid beta(1-42) assay kit (IBL)을 이용하여 제조사의 설명서를 참조하여 측정하였다.

[0186] (2) 연구 결과

[0187] AM485-3p를 비강내 처리한 5xFAD에서 ELAVL2포함 관련 단백질 및 아밀로이드베타 42단백질 정량 비교 분석하였다(도 10). 실시예 6에서 mouse primary cell line에서 AM485-3p의 처리가 ELAVL2 변화를 유도하였기 때문에, 5xFAD에 AM485-3p를 비강처리하여 in vivo에서 AM485-3p의 역할을 확인해보고자 하였다. AM485-3p군에서 ELAVL2의 발현이 control군 대비 증가하였다. ELAVL2의 회복에 따라 APP에 발현에 관여하고 있는 전사인자인 cFOS의 발현이 정상화되고 이것이 APP의 발현을 줄이고 이것은 아밀로이드베타 42 단백질의 감소를 이끌어 내었다(도 10(A) 및 (B)). 이는 miR-485-3p 억제제와 같은 약물 또는 조성물의 개발이 알츠하이머 질환을 예방/치료 하는데 핵심 전략임을 제시하는 바이다. 또한, 동물 모델에서 AM485-3p의 처리가 A β 42의 생성 억제에 영향을 미친다는 것을 확인하였으므로 (도 10(C)), 관련 억제제 또는 약물 처리가 알츠하이머 치매의 병리 증상을 해소할 수 있을 것으로 보인다.

[0189] 실시예 8: 5xFAD 마우스에 AM485-3p 를 비강 내 처리한 5xFAD에서 인지 기능 여부 비교

[0190] (1) 연구 방법

[0191] AM485-3p를 비강 처리한 5xFAD의 인지 기능 개선 여부를 확인하고자 Y-maze 및 passive avoidance test를 진행하였다.

[0192] 1) Y-maze 시험

[0193] Y-미로 실험 장치는 검은 아크릴 판 (가로 10 cm, 세로 41 cm, 높이 25 cm)으로 제작한 Y자 모양의 사방이 막힌 미로로 구성되어 있으며, 각 미로는 서로 120° 의 일정한 각도로 배치되어 있다. 각각의 미로를 A, B, C 영역으로 정한 후 하나의 영역에 실험동물을 조심스럽게 놓고 8분간 자유롭게 움직이도록 한 다음, 각 미로에 들어간 횟수 및 순서를 측정하여 변경 행동력 (spontaneous alteration, %)을 평가하였다. 세 곳의 다른 영역에 순차적으로 들어가 지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 따라서 % 변경행동력 (% spontaneous alteration)은 다음과 같은 수식으로 계산하였다.

[0194] % spontaneous alteration = 총 alteration 수 / (총 입장 회수 - 2) x 100

[0195] 2) Passive avoidance 시험

[0196] 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용하고 있는 Passive avoidance test(수동회피실험)는 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이다. 수동회피실험 장치는 두 칸의 방으로 나뉘어 있는 shuttle box로 한쪽 방에는 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였으며, 다른 한쪽 방에는 빛이 들어오지 않게 하여 실험동물이 편안함을 느끼게 하였다. 2시간의 스트레스 부과가 끝나고 난 뒤, 수동회피반응을 시험했다(training test). 어두운 방의 바닥에는 알루미늄 막대가 일정한 간격으로 깔려 있어서 이를 통해 동물의 발바닥에 전기충격을 가할 수 있다. 실험동물은 어두운 방에 들어가려는 경향이 있어, 밝은 방에 두었다가 어두운 방에 들어가게 되면 전기 쇼크(5V, 0.5 mA, 10 sec)를 주어 동물이 이를 기억 하게 하였다. 이후 곧바로, 24시간 후에 전기쇼크 없이, 어두운 방으로 들어가는 시간(latency time)을 90초까지 측정하였다 (retention test 1, 2, 3).

[0197] (2) 연구 결과

[0198] AM485-3p를 비강내 처리한 5xFAD에서 인지 기능 여부를 비교하였다(도 11). 행동실험 결과 WT 대비 5xFAD에서

변경 행동력(Spontaneous alteration, 도 11(A)) 및 머무름 시간(Latency time, 도 11(B))이 모두 감소하였다. 알츠하이머성 치매의 주 증상이 행동 장애 및 기억력 저하로 대표되므로 5xFAD의 행동 장애는 아밀로이드베타의 과도한 축적 및 병리현상에 의한 것으로 보여진다. 그러나 AM485-3p를 비강 처치한 군에서는 변경 행동력 및 머무름 시간이 모두 5xFAD 대비 유의하게 증가하였다. 이는 AM485-3p의 처리가 miR-485-3p이 아밀로이드베타42단백질 생성을 촉진시켜 나타나는 행동 장애, 기억력 저하와 같은 병리 증상을 해소시켜 알츠하이머의 주요 증상을 개선시킬 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 miR-485-3p를 조절하는 약물 또는 조성물 제조는 알츠하이머 치매의 주요 증상인 행동 장애 및 인지 기능을 개선할 수 있는 새로운 전략이 될 수 있음을 제안한다.

[0200] **실시예 9: 통계 분석**

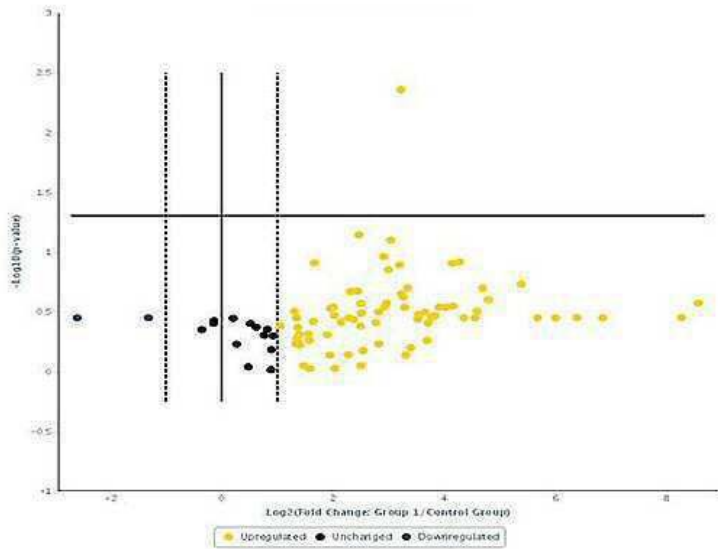
[0201] Student's-t 테스트를 사용하여 두 그룹을 비교하였고, 분산에 대한 Krushall-Wallis 분석을 사용하여 3개 이상의 그룹을 비교하였다. Krushall-Wallis 테스트에서 얻은 P-수치가 <0.05 일때, Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 그룹 사이 비교의 사후 검정 (post-hoc)을 하였다. 0.05 이하의 양측 검증된(two-tailed) P-수치가 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

[0203] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

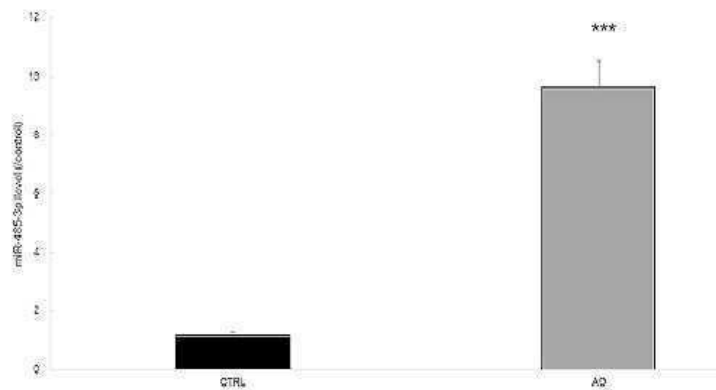
도면

도면1

(A)



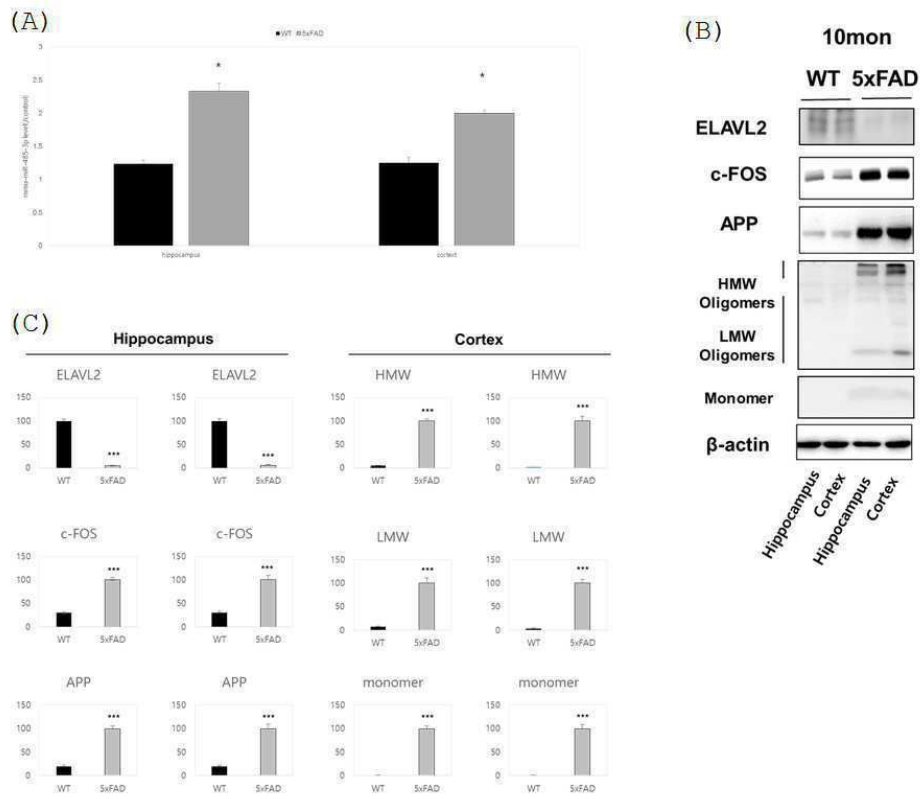
(B)



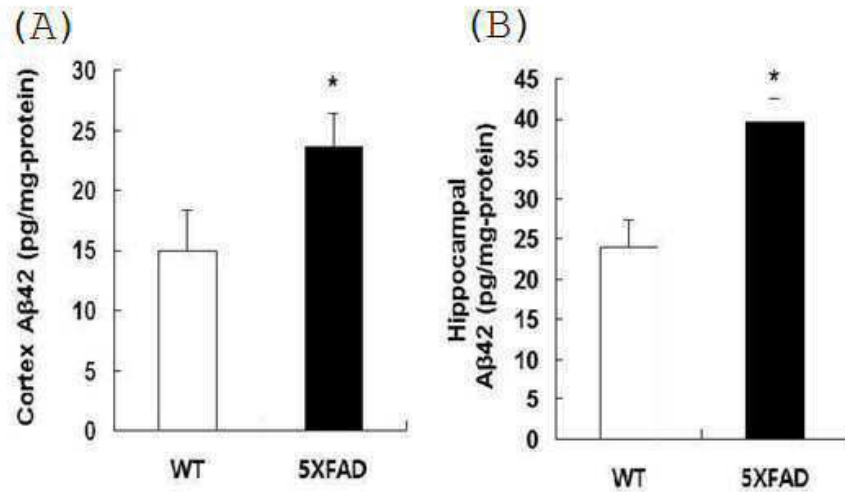
도면2

| | |
|---|---------------------------|
| miRNA binding location 841, 1621, 1675 of hELAVL2 3' UTR Sequence GenBank: NM 001171197 | 3' - TGTATGA ————— |
| has-miR-485-3p | 5' GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU |
| miRNA binding location 841, 1621, 1675 of hELAVL2 conserved mELAVL2 3' UTR Sequence GenBank: BC058393.1 | 3' - TGTATGA ————— |
| mmu-miR-485-3p | 5' AGUCAUACACGGCUCUCCUCUC |

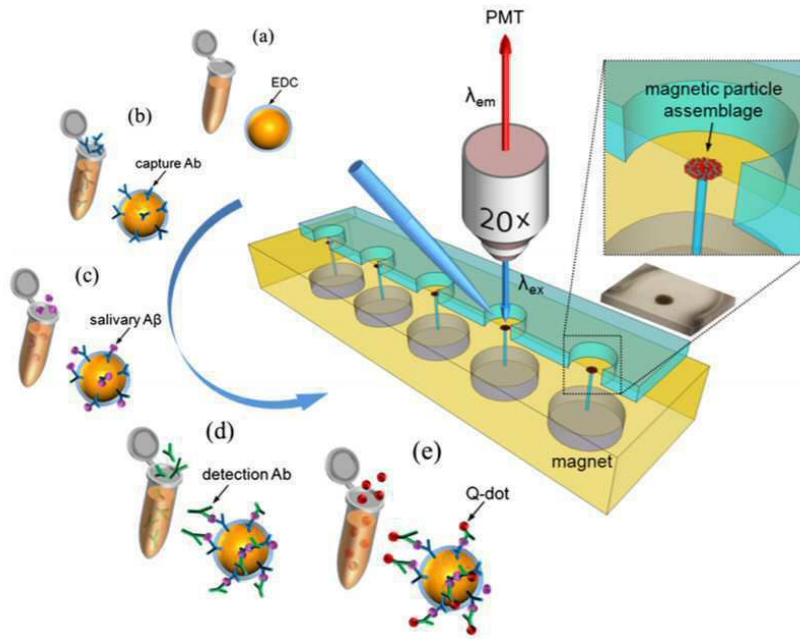
도면3



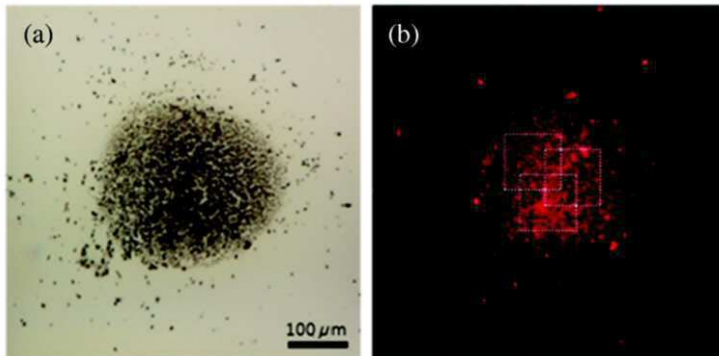
도면4



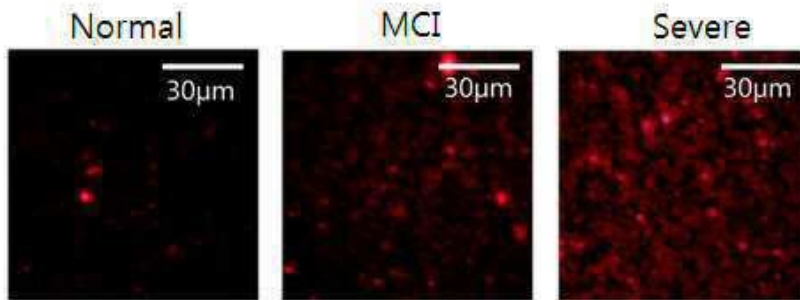
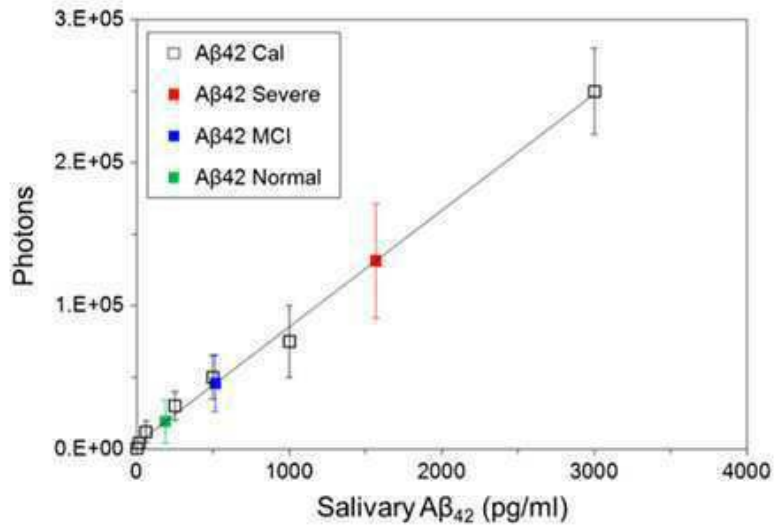
도면5



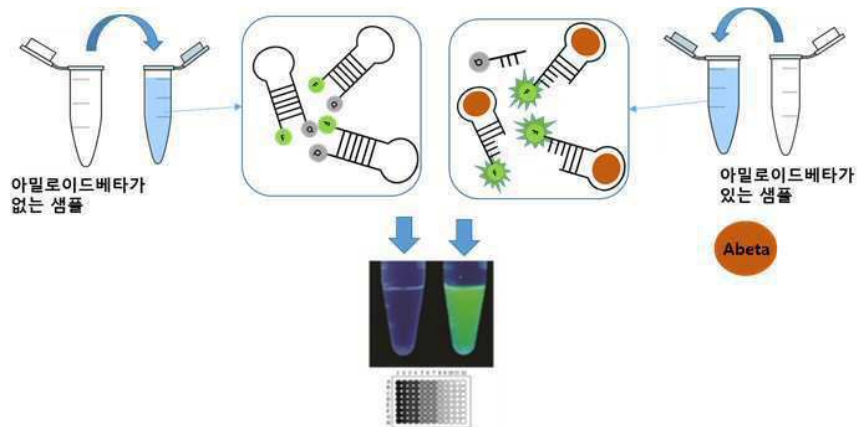
도면6



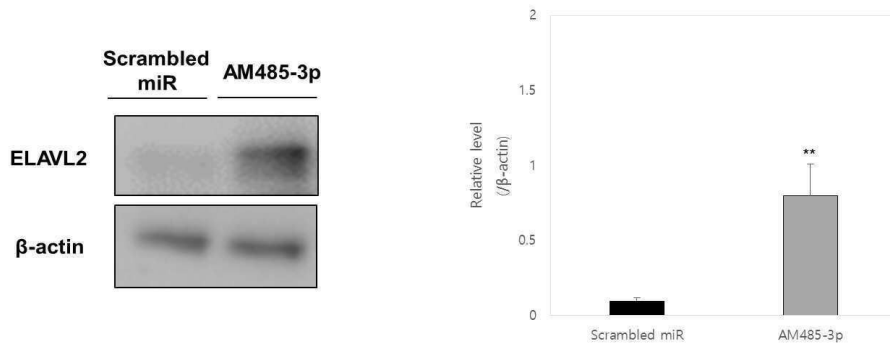
도면7



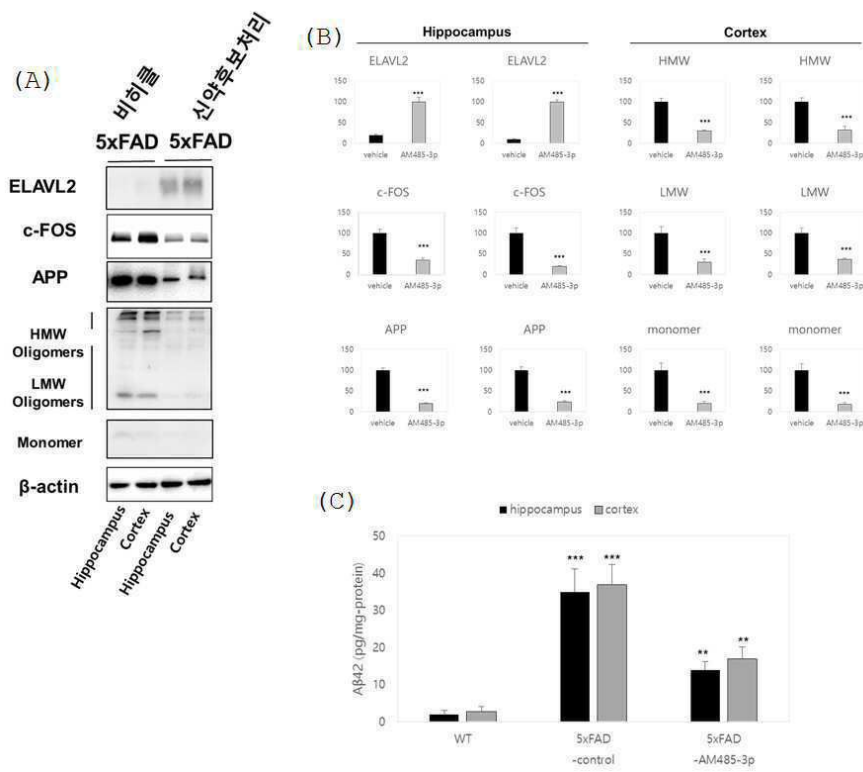
도면8



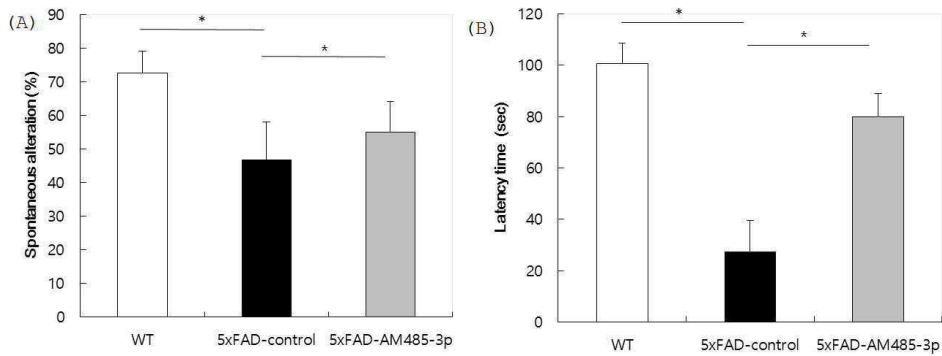
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> BIORCHESTRA Ltd.
 <120> Method for Diagnosing Alzheimer's disease Using microRNA-485-3p
 <130> HPC-9299
 <160> 8
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-485-3p
 <400> 1
 gucauacacg gcucuccucu cu 22
 <210> 2
 <211> 73
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-485-3p
 <400> 2
 acuuggagag aggcuggccg ugaugaauc gauucauca acacggcucu 60
 ccucucuuuu agu 73
 <210> 3
 <211> 9
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-485-3p
 <400> 3
 guguaugac 9
 <210> 4
 <211> 8
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-485-3p
 <400> 4
 uguaugac 8
 <210> 5

<211> 8
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miR-485-3p
 <400> 5
 guguauga 8

<210> 6
 <211> 7
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miR-485-3p
 <400> 6
 uguauga 7

<210> 7
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> miR-485-3p
 <400> 7
 agagaggaga gccguguau g ac 22

<210> 8

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mmu-miR-485-3p
 <400> 8
 agucauacac ggcucuccuc uc 22