



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0132318
(43) 공개일자 2017년12월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/84 (2006.01) *A61B 5/00* (2006.01)
A61B 5/145 (2006.01) *A61K 31/4412* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/84 (2013.01)
A61B 5/0055 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7031704
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월01일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2016/050248
- (87) 국제공개번호 WO 2016/154682
국제공개일자 2016년10월06일
- (30) 우선권주장
 2015901210 2015년04월02일 오스트레일리아(AU)
 2016900347 2016년02월03일 오스트레일리아(AU)

- (71) 출원인
씨알씨 포 멘탈 헬스 리미티드
 오스트레일리아 빅토리아 3053 칼튼 사우스 배리
 스트리트 161 레벨 2
- (72) 발명자
에이튼 스콧
 오스트레일리아 빅토리아 3162 콜필드 머레이 스
 트리트 3/120
폭스 노엘
 오스트레일리아 빅토리아 3053 칼튼 사우스 배리
 스트리트 161 레벨 2 씨알씨 포 멘탈 헬스 리미티
 드
부쉬 애슬리 이안
 오스트레일리아 빅토리아 3000 멜버른 세인트 킬
 다 로드 701/505
- (74) 대리인
제일특허법인

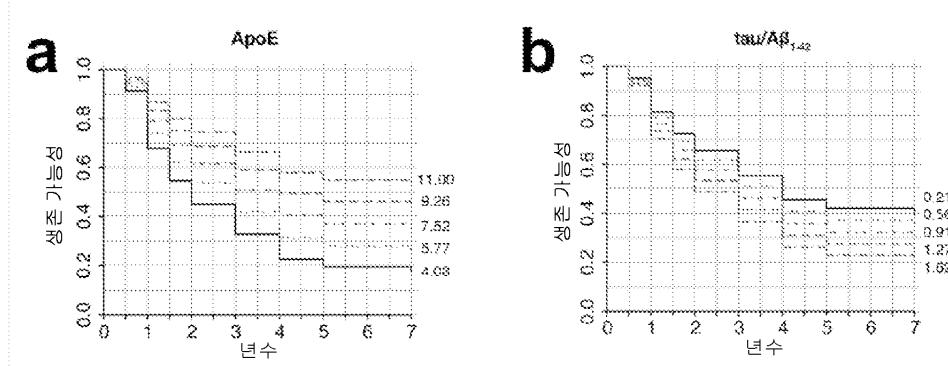
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 인지 저하의 위험을 예측하는 방법

(57) 요약

본 발명은 환자에서 인지 저하의 위험을 예방하는 방법, 인지 저하의 진행을 모니터링하는 방법, 및 인지 저하를 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 뇌 철분 수준을 환자에서 낮추거나 CSF 폐리틴 수준을 환자에 서 낮춤으로써 인지 저하의 진행 속도를 환자에서 경감시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61B 5/14507 (2013.01)
A61B 5/4064 (2013.01)
A61B 5/4088 (2013.01)
A61B 5/7275 (2013.01)
A61K 31/4412 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 2800/2814 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
이러한 차이로부터 인지 저하의 위험을 환자에서 추론하는 단계
를 포함하는, 인지 저하의 위험을 환자에서 예측하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
뇌 철분의 수준에서의 차이가 상승이고, 이로써 인지 저하의 증가된 위험을 지시하는 방법.

청구항 3

뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
이러한 차이로부터 인지 저하를 환자에서 추론하는 단계
를 포함하는, 인지 저하를 환자에서 진단하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,
뇌 철분의 수준에서의 차이가 상승이고, 이로써 인지 저하를 진단하는 방법.

청구항 5

뇌 철분의 수준을 환자에서 제1 시점에 결정하는 단계;
뇌 철분의 수준을 동일한 환자에서 제1 시점 이후의 제2 시점에 결정하는 단계;
임의적으로 제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계;
제1 시점 및 제2 시점 각각에서 뇌 철분의 수준에서의 차이를 결정하는 단계; 및
제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준에서의 차이로부터 인지 저하의 진행을 추론하는 단계
를 포함하는, 인지 저하의 진행을 환자에서 모니터링하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
기준 수준과 비교하여 제2 시점에서의 뇌 철분의 수준이 제1 시점에서 보다 더 높도록 뇌 철분의 수준에서의 차이가 제1 및 제2 시점 사이에서 상승이고, 이로써 인지 저하의 증가된 진행을 지시하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서,

뇌 철분의 수준을 세룰로플라스민(ceruloplasmin), 아밀로이드 전구체 단백질, 타우(tau), 페리틴(ferritin), 트랜스페린(transferrin) 및 트랜스페린 결합 단백질로 구성된 군에서 선택된 철분 관련된 단백질의 수준의 측정값으로서, 또는 자기 공명 영상촬영(MRI: magnetic resonance imaging) 또는 초음파검사에 의해 결정하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항중 어느 한 항에 있어서,

뇌 철분이 피질성 철분인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

뇌 철분의 수준을 뇌척수액(CSF: cerebrospinal fluid) 페리틴의 측정값으로서 결정하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서,

뇌 철분의 수준을 MRI, 임의적으로 초 자장(ultra field) 7T MRI 또는 임상적 3T MRI에 의해 결정하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항중 어느 한 항에 있어서,

아포지질단백질 E(ApoE)의 수준을 환자에서 결정하는 단계;

환자의 ApoE의 수준을 CN 개별자로부터의 ApoE의 기준 수준과 비교하는 단계;

환자에 상응하는 뇌 철분의 수준과 뇌에서의 기준 수준에 대하여 환자의 ApoE의 수준과 기준 수준 사이의 상관관계를 결정하는 단계; 및

ApoE의 수준 및 뇌 철분의 수준 사이의 상관관계로부터 인지 저하의 위험을 추론하는 단계
를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상관관계가 양성 상관관계이고, 이로써 인지 저하의 증가된 위험을 지시하는 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

ApoE 유전자형을 환자에서 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

ApoE 유전자형이 Apo ε 4 대립유전자를 포함하는 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항중 어느 한 항에 있어서,

ApoE의 수준을 CSF ApoE의 수준의 측정값으로서 결정하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항중 어느 한 항에 있어서,

아밀로이드 β 웨타이드, 타우, 포스포-타우, 시누클레인(synuclein), Rab3a, A β , CSF 타우/A β_{1-42} 및 신경사 단백질로 구성된 군에서 선택된 인지 손상의 생체표지자, 임의적으로 타우 또는 A β 의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항중 어느 한 항에 있어서,
기준 수준을 인지적으로 정상적인 개별자로부터 결정하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항중 어느 한 항에 있어서,
인지 저하가 경도 인지 장애(MCI: mild cognitive impairment), MCI의 알츠하이머병(AD: Alzheimer's Disease)으로의 전환, 및 AD를 포함하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항중 어느 한 항에 있어서,
뇌 철분, 페리틴 또는 CSF 페리틴을 측정하기 이전에, 결합되지 않은 세포 철분을 제거하여 단지 철분 관련된 단백질의 수준만을 결정하는 방법.

청구항 20

뇌 철분의 수준을 환자에서 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 환자에서 경감시키는 방법.

청구항 21

CSF 페리틴의 수준을 환자에서 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 환자에서 경감시키는 방법.

청구항 22

CSF 페리틴의 수준을 환자에서 낮추는 단계를 포함하는, 인지 수행(cognitive performance)을 환자에서 증가시키는 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서,
효과량의 데페리프론(Deferiprone) 또는 철분 강하 약물을 투여함으로써 CSF 페리틴의 수준을 낮추는 방법.

청구항 24

제20항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서,
환자가 ApoE 유전자형을 갖고, 임의적으로 $\epsilon 4$ 대립유전자를 갖는 방법.

청구항 25

제20항 내지 제23항중 어느 한 항에 있어서,
환자가 CN 환자인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치매, 인지 장애 및/또는 정동 장애 및/또는 행동 기능장애, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease) 및 관련된 치매 분야에 관한 인지 저하의 위험을 예측하는 방법에 관한 것이다. 더욱 특별히, 본 발명은 유전적

취약성, 예후적 방법 및 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 뇌 철분 및 인지 저하 사이의 상관관계에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명은 인지 저하의 진행을 진단, 예후 및/또는 모니터링하고 인지 저하의 진단 또는 예후에 따라서 개별자를 하나 이상의 부류로 계층화시키기 위한 방법에서 뇌 철분 수준의 지시자로서의 페리틴(ferritin) 또는 더욱 바람직하게는 뇌척수액(CSF: cerebrospinal fluid) 페리틴에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 피험자에서 알츠하이머병(AD)을 진단, 예후 및 모니터링하거나, AD 생체표지자로서 유전자형과 상관된 뇌 철분 수준을 결정함으로써 이러한 질환을 갖는 개별자를 계층화하는 것이다.

배경기술

[0002]

오스트레일리아의 알츠하이머병(AD)에 대한 이미 광대한 부담은 노령화 집단 인구통계학 및 비효과적 치료에 기인하여 증가하는 것으로 추정된다. AD에 연루된 공지된 경로를 표적화하는 약물에 대한 최근의 대규모 상(large-scale phase) III 임상 실험은 환자에게 유용하지 않았다. 아밀로이드 β ($A\beta$) 병리학이 축적되기 시작함에 따라, 질환-완화 치료는 질환의 임상전 상 동안 전달되어야 한다는 합의가 도출되었다. 따라서, AD의 초기 검출은 이러한 질환을 효과적으로 치료하기 위해 필수적이다. AD 및 AD를 유도하는 연관된 증상, 예컨대 인지 저하에 대한 임상적으로 허용가능한 예후적 생체표지자는 현재 존재하지 않는다.

[0003]

AD 뇌 병리학은 인지적 증후가 개시되기 대략 20년 이전에 시작되어 진행된다. 결과적으로, 항-AD 치료법은 이러한 임상전 기간에 제공될 경우 최고의 성공 기회를 가질 수 있다. AD에서 초기에 인지 저하를 예측하는 생체표지자를 식별하는 것이 요구된다. 아밀로이드 PET 영상은 노인병적 인지 저하의 가장 진보된 생체표지자이다. PiB, 플루테메타몰(Flutemetamol), 또는 플로베타피르(Florbetapir) 방사리간드에 의해 식별된 높은 $A\beta$ 축적량($A\beta^+$)은, 3~4년에 걸쳐 인지적으로 정상적인(CN: cognitively normal) 피험자에서 기억 복합 스코어(memory composite score)에 대하여 약 0.5의 평균 효과 크기(기울기 간의 차이)를 갖고 인지 쇠퇴를 예측한다. $A\beta$ 영상은 인지 쇠퇴의 민감한 예측자(98%)이지만, 여러 연구들은 뇌에 이미 높은 $A\beta$ 축적량을 갖는 60세 이상의 인지적으로 손상되지 않은 사람들의 높은 유병률(약 20 내지 30%)을 반복적으로 보여주었다. 이제, 다른 인자들이 인지 쇠퇴를 알츠하이머형 치매로 촉발시키는데 필수적인 것이 분명하다.

[0004]

사후 분석 연구에 따르면, 타우(tau) 침적은 $A\beta$ 축적량에 비해 인지 손상과 더욱 강하게 상관관계된다. 표적, 예컨대 타우 및 $A\beta$ 의 수준을 환자에서 측정함으로써 AD를 진단하거나 차등적으로 진단하기 위한 시도가 이루어졌고, 이러한 수준은 치매 환자의 뇌척수액("CSF")에서 특이적으로 증가하거나 감소된다.

[0005]

$A\beta$ 및 타우는 뇌 아밀로이드를 형성하고 AD의 단백질침증(tangle proteopathies)을 복잡하게 하여, 광범위한 생체표지자 연구의 대상이 되어왔다. 피질 아밀로이드 및 해마 타우의 축적은 AD의 병리특징이지만, 임상적으로 정상인 것으로 간주되는 사람들에서도 또한 상당할 수 있다.

[0006]

이제, $A\beta$ 의 예후적 및 진단적 값은, 이것이 체액에서 측정되는지 양전자 방출 단층촬영(PET: Positron Emission Tomography) 영상을 통해 측정되는지와 무관하게, 그 자체로 제한되는 것으로 이해된다. 사후 분석 연구는 정상적 노령화에서의 뇌 타우 축적을 밝혀내고, 상승된 CSF 타우가 최적의 이용가능한 예후적 생체표지자 중 하나이지만, 이는 아직 임상적으로 유용하지 않다.

[0007]

이러한 견지에서, 신경 질환, 예컨대 AD 또는 인지 쇠퇴를 나타내는 질환을 유도하는 인지 저하를, 특별히 이러한 질환의 개시시에 식별하고, 질환 진행을 지연시키는데 도움을 줄 수 있는 개선된 방법이 필요하다. AD를 앓는 것으로 의심되는 피험자로부터의 생물학적 샘플에 존재하는 표지의 믿을만한 측정을 통해 임상전 또는 초기 단계 질환을 검출하는 능력은 또한 질환의 치료 및 처치가 더욱 빨리 시작될 수 있도록 허용할 것이다. 현재 이용가능한 진단 및 예후 방법에서의 고가의 장비, 불편함 및 부작용 없이, 동일한 시험을 사용하여 쇠퇴의 진행을 모니터링할 수 있다.

[0008]

검출가능한 임상적 지시자에 의한 판단 이전에 초기 단계 예후에 도달하는데 있어서 임상가에게 도움을 제공할 수 있고 실제의 확증적 뇌 영상촬영 시험에 대한 필요성을 없애는 시험이 유용할 것이다.

[0009]

임상적 실험하에 있는 AD에 대한 질환 완화 치료법과 함께, 가능한 가장 초기 단계에 위협이 있는 개별자에서 질환의 특징을 검출하는 생체표지자를 식별하는 것이 사회적으로 및 경제적으로 필수적이고, 따라서 항-AD 치료법은 질환의 부담이 경미할 경우 한 번에 실행될 수 있고 이는 기능적 및 비가역적 인지적 손상을 방지하거나 지연시킬 것이다.

[0010]

따라서, 인지 저하를 겪는 환자를 진단, 예후 또는 모니터링하기 위해 사용될 수 있고 환자에서 인지 저하와 상관관계가 있는, 환자에서 인지 저하에 대한 단순하고 효과적인 측정을 제공하는 것이 요망된다. 이러한 초기

검출은 초기에 적절히 치료된다면 AD의 개시를 지연시키는 것을 돋거나, 인지 저하에 대한 약물 치료법을 받는 환자의 진행 상태를 모니터링하는 것을 도울 수 있다.

발명의 내용

- [0011] AD의 개시 이전에 인지 저하를 측정하는 것은 약물에 의한 초기 치료를 가능하게 하여 질환의 진행을 지연시킬 수 있을 것이다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 한 양태에서:
- [0013] 뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
- [0014] 뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0015] 뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0016] 이러한 차이로부터 인지 저하의 위험을 환자에서 추론하는 단계
- [0017] 를 포함하는, 인지 저하의 위험을 환자에서 예측하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 AD를 유도하는 인지 저하에 대한 대안적/보조적 예후로서 뇌 철분 상승을 식별하였다. 이들은 뇌의 철분 축적량이 이러한 질환의 더욱 확립된 생체표지자(예를 들어, CSF 타우 및 A β)의 규모와 유사하게 AD의 종적 결과(인지, 뇌 위축)에 영향을 미친다는 것을 보여준다.
- [0019] 본 발명의 한 실시태양에서, 뇌 철분의 수준은 임의의 철분 관련된 단백질 수준, 예컨대 제한되지 않지만, 세룰로플라스민(ceruloplasmin), 아밀로이드 전구체 단백질, 타우, 페리틴, 트랜스페린(transferrin) 또는 트랜스페린 결합 단백질의 측정값으로서 결정될 수 있다. 바람직하게는, 뇌 철분은 페리틴 수준에 의해 또는 MRI에 의해 또는 당분야의 숙련가에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 결정된다. 한 바람직한 실시태양에서 뇌 철분의 수준은 뇌척수액(CSF) 페리틴의 측정값으로서 결정된다.
- [0020] 지표로서 CSF중 주요 철분 결합 단백질 페리틴을 사용한 결과, 높은 뇌-철분 적재량은 인지적으로 정상적인 피험자, 경도 인지 장애 피험자 및 AD 피험자 코호트(cohort)에서 6 내지 7년에 걸쳐 더욱 불량한 인지 및 뇌 위축과 연관되었다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에서:
- [0022] 뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
- [0023] 뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0024] 뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0025] 이러한 차이로부터 인지 저하를 환자에서 추론하는 단계
- [0026] 를 포함하는, 인지 저하를 환자에서 진단하는 방법이 제공된다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 양태에서,
- [0028] 뇌 철분의 수준을 환자에서 제1 시점에 결정하는 단계;
- [0029] 뇌 철분의 수준을 동일한 환자에서 제1 시점 이후의 제2 시점에 결정하는 단계;
- [0030] 임의적으로 제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0031] 제1 시점 및 제2 시점 각각에서 뇌 철분의 수준에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0032] 제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준에서의 차이로부터 인지 저하의 진행을 추론하는 단계
- [0033] 를 포함하는, 인지 저하의 진행을 환자에서 모니터링하는 방법이 제공된다.
- [0034] 뇌 철분의 수준의 변화는 추가적으로 환자의 인지 저하의 임의의 변화를 평가하는데 사용될 수 있다. 따라서, 뇌 철분의 수준을 모니터링함에 있어서, 일정 기간에 걸쳐 인지 저하의 존재에 대해 모니터링하거나, 인지 저하 진행을 환자에서 추적하는 것이 가능하다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 인지 저하를 결정하는 방법은

- [0036] 아포지질단백질 E(ApoE) 수준을 환자에서 결정하는 단계;
- [0037] 환자에서 ApoE의 수준을 ApoE의 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0038] 환자에 상응하는 뇌 철분 수준과 뇌 철분의 기준 수준에 대하여 환자의 ApoE 수준과 기준 수준 사이의 상관관계를 결정하는 단계; 및
- [0039] ApoE 수준 및 뇌 철분 수준 사이의 상관관계로부터 인지 저하의 위험을 추론하는 단계
- [0040] 를 추가로 포함한다.
- [0041] 본 발명자들은 CSF 페리틴 수준이 CSF ApoE 수준과 현저한 연관성을 형성하고 APOE- ϵ 4 이소폼(isoform)을 갖는 피험자가 AD 위험 대립유전자가 없는 피험자에 비해 상승된 CSF 페리틴을 가짐을 발견하였다.
- [0042] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 방법은 추가로 단일하게 사용되거나 인지 저하를 평가하기 위한 방법과 조합하여 사용되는, 인지적 손상의 생체표지자, 예컨대 제한되지 않지만, 타우 또는 A β 의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 이를 추가적인 표지는 인지 저하의 위험을 결정하기 위한 방법의 정확도를 향상시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에서, 뇌 철분 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 경감시키는 방법이 제공된다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태에서, CSF 페리틴 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 경감시키는 방법이 제공된다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에서, CSF 페리틴 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 수행(cognitive performance)을 증가시키는 방법이 제공된다.
- [0046] 뇌 철분 또는 CSF 페리틴 수준을 낮추기 위해 철 킬레이트제와 같은 화합물, 예컨대 데페리프론(Deferiprone)을 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 기선 CSF 생체표지자에 의해 예측되는 경우 MCI로부터 치매로의 전환을 보여준다. 최소 콕스 비례 위험 모델(minimal Cox proportional hazards model)에 기초하여(표 4 참조), 전환은 (a) ApoE(페리틴 = 6.5 ng/ml, 타우/A β 1-42 = 0.69 단위) 및 (b) 타우/A β 1-42(페리틴 = 6.5 ng/ml, ApoE = 7.2 μ g/ml)의 각각의 5분위수에 대해 도표화된다. 그래프의 우측 상의 숫자는 5분위수 경계를 나타낸다.
- 도 2는 AD로의 MCI 전환에 대한 생체표지자로서의 CSF 페리틴의 유용성을 보여준다. AD로의 MCI 전환에 대한 로지스틱 회귀 모델링(logistic regression modelling)의 수신기 작동 곡선(receiver operating curve)(표 4 참조). (a) 인구통계학 정보를 포함하는 기본 모델: 연령, 성별, BMI, 학력, 및 APOE- ϵ 4 상태. (b) 기본 모델 + CSF 페리틴. (c) 기본 모델 + CSF ApoE. (d) 기본 모델 + 타우/A β 1-42. AUC- 곡선하 면적(Area Under Curve).
- 도 3은 CSF 페리틴이 ApoE 수준과 연관되고 ApoE 유전자형에 따라 달라짐을 보여준다. (a,b) CSF에서의 페리틴의 모델링(보충적 표 1의 M3). 최소 다중 회귀는 CSF ApoE 및 APOE- ϵ 4를 포함한다. (a) APOE- ϵ 4 담체 및 비- ϵ 4 담체에서 CSF ApoE 및 페리틴 수준의 산포도. 유전자형은 ApoE 및 페리틴 사이의 관계에 영향을 주지 않았지만; 유전자형은 CSF 페리틴 수준과 연관되고, 이에 따라 ϵ 4 담체 및 비- ϵ 4 담체는 별도로 도표화된다. 전체 모델의 선형 성분에 대한 R^2 는 0.341이었다(그래프 상에 나타남). (b) APOE- ϵ 4 담체 및 비-담체에서의 CSF 페리틴 수준(ANCOVA: P-값 = 1.10×10^{-8}). (c) CSF ApoE의 다중 회귀. APOE- ϵ 4 담체 및 비-담체에서의 ApoE 수준(ANCOVA: P = $2.50 \times 10^{-0.9}$). 데이터는 평균 \pm s.e이다. "n"은 그래프 칼럼에 표시된다.

도 4는 CSF 페리틴 수준이 독립적으로 인지 상태를 예측함을 보여준다. (a-c) CSF의 3분위수로서 표현된 기선 ADAS-Cog13 스코어의 다중 회귀: (a) 페리틴(L<5.5; H>7.3 ng/ml), (b) ApoE(L<5.8; H>7.8 mg/ml) 및 (c) 타우/A β 1-42(L<0.35; H>0.76). (d) CSF 페리틴 3분위수로서 표현된 기선 RVLT 스코어의 다중 회귀. 데이터는 최소 모델에서 기선 진단, 성별, 학력 및 AD CSF 생체표지자에 대해 조정된다. 데이터는 평균 \pm s.e이다. "n"은 그래프 칼럼에 제시된다. CN, 인지적으로 정상적; MCI, 경도 인지 장애.

도 5는 기선 CSF 생체표지자에 의해 예측되는 경우 MCI로부터 치매로의 전환을 보여준다. (a) MCI 생존은 최소

콕스 비례 위험 모델에 기초하고(표 2), 전환은 페리틴의 각각의 5분위수에 대해 도표화된다(코호트에 대한 평균 값을 적용함: ApoE = 7.2 mg/ml, 타우/A β ₁₋₄₂ = 0.69 단위). 그레프의 우측 상의 숫자는 5분위수 경계를 지시한다. 이러한 최소 모델은 단지 CSF 생체표지자만을 포함한다. (b) CSF 생체표지자에 따른 진단의 평균 연령에서의 변화. 콕스 모델에서 각각의 5분위수 경계의 B50% 생존에 걸린 개월수는 이들 경계의 단위 값에 대해 그래프화되었다. 선형 모델의 기울기는 피분석물에서 각각의 단위 변화에 대하여 전환 연령에서의 변화를 추정하기 위해 사용되었다(도 5a 및 도 1 비교). (c-e) AD로의 MCI 전환에 대한 로지스틱 회귀 모델링의 수신기 작동 곡선(표 2): (c) 연령, 성별, BMI, 학력, 및 APOE- ϵ 4 상태에 대한 기본 모델 제어, (d) 기본 모델 + ApoE 및 타우/A β ₁₋₄₂, (e) 기본 모델 + ApoE, 타우/A β ₁₋₄₂ 및 페리틴. AUC, 곡선하 면적.

도 6은 CSF 페리틴 수준이 독립적으로 뇌 구조적 변화를 예측함을 보여준다. (a-c) CSF의 3분위수에 기초한 종적 해마 변화: (a) 페리틴(L<5.5; H>7.3 ng/ml), (b) ApoE(L<5.8; H>7.8 mg/ml) 및 (c) 타우/A β ₁₋₄₂(L<0.35; H>0.76) 3분위수. (d-f) CSF에 기초한 종적 측뇌실 변화: (d) 페리틴, (e) ApoE 및 (f) 타우/A β ₁₋₄₂ 3분위수. 이들 혼합 효과 모델은 연령, 성별, 기선 진단, 학력, APOE- ϵ 4 상태 및 두개내(intracranial) 용적에 대해 조정되었다. 기선에서의 3분위수는 모든 모델에 대해 그다지 차이가 없었고, 따라서 시각적 표시를 위해 기선 값은 각각의 진단 군에 대해 조정된 평균에서 유지되었다. CN, 인지적으로 정상적; H, 최고 3분위수; M, 중간 3분위수; MCI, 경도 인지 장애; L, 최저 3분위수.

도 7은 AD 발현에 미치는 페리틴 및 기타 생체표지자의 영향에 대한 개략도를 보여준다. (a) CSF 페리틴은 인지적으로 정상적인 피험자(점선) 및 AD가 진행된 피험자(실선)에서 시간에 따른 인지 수행에 대하여 (b) CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 및 ApoE에 의해 정량적으로 차이나는 영향을 갖는다. 더 높은 CSF 페리틴 수준은 더 불량한 기선 인지 상태(예를 들어, RAVLT)와 [α] 포인트만큼 연관되고, 여기서 [α] = Ln[페리틴(ng/ml)]*1.77이다(표 2). 이러한 효과는 [α] = [β , γ]이도록 시간에 따라 일정하다. 결과적으로, 페리틴은 AD로의 전환 연령에서 [δ] 개월만큼 좌측으로 이동시키고, 여기서 [δ] = 페리틴(ng/ml)*3이다(도 5b). 타우/A β ₁₋₄₂ 또는 ApoE의 수준은, [ϵ] < [ϕ , ψ]이도록, 기선 인지 상태[ε] 및 인지 저하 속도 둘 다와 연관된다. 이러한 효과는 [η] 개월만큼 진단 연령의 이동을 일으키고, 여기서 [η] = ApoE(mg/ml)*8 또는 타우/A β ₁₋₄₂(단위)*17(도 5b)이다.

도 8은 APOE- ϵ 4 대립유전자 상태에 의해 계층화된 기선 CSF 인자에 의해 예측되는 경우 인지적으로 정상적인(CN) 피험자에서의 인지 쇠퇴를 보여준다. (A-B) 기선 (A) CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 비율 및 (B) CSF 페리틴 사이의, APOE- ϵ 4 담체 및 비-담체에서 RAVLT 스코어에서의 7년에 걸친 연간 변화와의 연관성. (C-D) 기선 (C) CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 비율 및 (D) CSF 페리틴 사이의, APOE- ϵ 4 담체 및 비-담체에서 ADAS-Cog13 스코어에서의 7년에 걸친 연간 변화와의 연관성. (E) 7년에 걸쳐 CN ϵ 4 피험자에서 안정하거나 저하된(≥1 RAVLT 단위 변화/1년) 인지를 예측하기 위한 기선 CSF 페리틴의 ROC. 곡선하 면적(AUC) = 0.96.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] AD의 개시 이전에 인지 저하를 측정하는 것은 초기 치료 개입을 가능하게 하여 질환 진행을 지연시킬 수 있을 것이다. 임상전 기간에 제공된 항-AD 치료법은 최고의 성공 기회를 가질 것이다. 그러나, 몇몇 경우에, 치매 또는 AD는 완전히 진행되지 않을 수 있지만, 환자는 경도 인지 장애(MCI)의 증후를 나타내거나, 인지적으로 정상적이지만 종내에는 인지 저하를 겪을 수 있는 노인이다. 진행을 모니터링하는 것은 시간에 따른 인지 저하를 처리하기 위해 필수적일 것이다.
- [0049] 따라서, 본 발명의 한 양태에서,
- [0050] 뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
- [0051] 뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0052] 뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0053] 이러한 차이로부터 인지 저하의 위험을 환자에서 추론하는 단계
- [0054] 를 포함하는, 인지 저하의 위험을 환자에서 예측하는 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명자들은 AD를 유도하는 인지 저하에 대한 대안적/보조적 예후로서 뇌 철분 상승을 식별하였다. 철분은 질환을 앓는 동안 병변 영역에 축적되지만, 최근까지, 발병 과정에 미치는 이의 영향에 대해 논쟁되었다. 본

발명자들은 AD의 진행에 대한 뇌 철분의 기여도를 정량화하였다. 본 발명자들은 뇌의 철분 측적량이 이러한 질환의 더욱 확립된 생체표지자(예를 들어, CSF 타우 및 A β)의 규모와 유사하게 AD의 종적 결과(인지, 뇌 위축)에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 이를 발견은, AD 발병 과정에서 철분 상승이 연루된다는 증거들과 함께, MRI 및 진보된 기법을 사용하여 AD에 대한 생체표지자로서 뇌 철분 수준이 작용함을 지지한다.

[0056] AD에서의 철분 상승은 인지 쇠퇴에 대한 검토되지 않고 추정적인 공동-결정자(co-determinate)이다. 최근까지, AD 발병 과정에 대한 철분의 기여도는 분명하지 않았다. 본원에서 출원인은 종적 AD 결과에 미치는 철분의 영향을 보여준다.

[0057] 본 발명은 인지 능력에 있어서 쇠퇴도로서 측정되는 인지 저하의 위험을 사정(assessment)함에 관한 것이다. 환자의 인지 능력이 쇠퇴할 경우, 노화와 연관된 다양한 증후, 예컨대 건망증, 집중을 유지하는 능력의 감소, 및 감소된 문제 해결 능력을 일으키는 변화가 초래된다. 증후는 종종 더욱 위중한 증상, 예컨대 치매 및 우울증, 또는 심지어 알츠하이머병으로 진행된다.

[0058] 경도 인지 장애(MCI)는 정상적 노령화에 의해 예상되는 인지 쇠퇴 및 치매에 의한 더욱 위중한 쇠퇴 사이의 중간 단계이다. 이는 정상적인 연령-관련된 변화에 비해 더 큰 기억, 언어, 사고 및 판단과 관련된 문제를 포함할 수 있다. 경도 인지 장애는 이를 경험하는 개별자 또는 다른 사람들에 의해 주지되기에 충분히 위중한 인지적 변화를 일으키지만, 이러한 변화는 일상 생활 또는 독립적 기능을 방해할 정도로 심각한 것은 아니다.

[0059] 현재, 치매, 인지 장애 및/또는 정동 장애 및/또는 행동 기능장애, 알츠하이머병 및 관련된 치매의 분야에 있어서 임상적 진단은 일반적으로 병력의 평가 및 신체 검사, 예컨대 신경학적, 신경심리적 및 정신의학적 사정, 예컨대 기억 및/또는 심리학적 시험, 언어 손상 및/또는 기타 중심 인지 결함(예컨대 실행증, 계산불능증 및 좌우지남력장애)에 대한 사정, 손상된 판단력 및 일반적 문제-해결 장애에 대한 사정, 점진적인 수동성으로부터 현저한 동요에 이르는 범위의 인격 변화에 대한 사정, 뿐만 아니라, 다양한 생물학적, 방사선학적 및 전기생리학적 시험, 예컨대 관련 뇌 영역의 자기 공명 영상촬영(MRI: magnetic resonance imaging) 또는 양전자 방출 단층촬영(PET)으로부터 유래된 뇌 용적 또는 활성 측정값의 측정을 필요로 한다. 본 발명자들은 이들 환자에서 뇌 철분, 페리틴 및 CSF 페리틴, 및 인지 저하의 위험에 대한 간단한 사정을 가능하게 하는 인지 기능 사이의 상관관계를 발견하였다.

[0060] 본원에 사용될 경우, 인지 저하에 대한 언급은 경도 인지 장애(MCI), 알츠하이머병(AD)으로의 MCI 전환, 및 AD를 포함한다. 그러나, 본 발명은 또한 광범위하게는 치매, 인지 장애 및/또는 정동 장애 및/또는 행동 기능장애, 알츠하이머병 및 관련된 치매의 분야에 관한 것이다. 용어 "인지 저하"는 "인지 쇠퇴"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0061] 용어 "인지적으로 정상적인(CN) 환자"는 본원에 사용될 경우 상당한 인지 손상이나 일상 생활의 손상된 활성이 없는 피험자를 의미한다. 인지 저하가 의심되거나 이의 위험이 있는 환자는 CN 환자에 대해 비교될 수 있다. 이는 인지적으로 정상적이지만 신경 질환을 나타내는 표지의 수준, 예컨대 뇌에서의 아밀로이드 적재량이 변화된 환자를 포함한다(바람직하게는 PET 영상에 의해 결정됨). CN 환자의 특징은 정상으로부터의 저하가 결정될 수 있는 기준 수준 또는 기준 값을 제공하는데 도움을 줄 것이다. 바람직하게는, CN 환자는 Apo ε 4 대립유전자를 갖지 않는다.

[0062] 인지 저하의 위험은 기준 수준을 제공할 것인 CN 환자와 비교하여 사정될 수 있다. 인지 저하 및/또는 알츠하이머병의 위험이 있는 환자는 가족 병력, 유전적 취약성 및 대립유전자 결손을 갖는 환자를 포함한다. 이들은 취약하고 치매 및 AD를 유도하는 더욱 신속한 인지 저하에 이들을 놓이도록 하는 유전자를 가질 수 있다.

[0063] 본 발명의 임의의 방법에 따라 시험되고/되거나 치료될 수 있는 환자는 치료된 우울증 병력에 의한 인지 기능장애, 우울증의 병력에 의한 인지 기능장애, 양극성 장애 또는 분열 정동 장애에 의한 인지 기능장애, 범불안 장애에 의한 인지 기능장애, 주의력 결핍, ADHD 장애 또는 주의력 결핍 및 ADHD 장애 둘 다에 의한 인지 기능장애, 난독증, 발달 장애, 학교 적응 반응, 알츠하이머병, 건망증성 경도 인지 장애, 비-건망증성 경도 인지 장애, 신경영상 상의 또는 임상적 검사에 따른 백질 질환에 의한 인지 손상 및 전두측두엽 치매를 갖는 환자, 65세 이하의 인지 장애를 갖는 환자, 10 nmol / l 미만의 혈청 호모시스테인(homocysteine)을 갖는 환자, 및 고 혈청 트랜스페린 수준(가장 상위 집단 4분위수)을 갖는 환자를 포함한다.

[0064] 본원에 사용될 경우, 용어 "개별자", "피험자" 및 "환자"는, 예를 들어, 일반적으로 뮤린, 원숭이류, 개과 동물, 고양이과 동물, 유제류 등(예를 들어, 마우스, 래트, 다른 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말, 영장류 등)으로 지칭되는, 생체내 모델(예를 들어, 약물 독성 실험을 위함)에서 유용한 비-인간 포유동물에 관

하여 달리 지시되지 않는 한, 일반적으로 인간 피험자를 지칭한다.

[0065] 용어 "결정하는", "측정하는", "평가하는", "사정하는" 및 "분석하는"은, 본원에 사용될 경우, 일반적으로 임의의 형태의 측정을 지칭하고, 어떤 요소가 생물학적 샘플에 존재하거나 존재하지 않는지의 여부를 결정함을 포함한다. 이들 용어는 정량적 및/또는 정성적 결정 둘 다를 포함하고, 이는 샘플 가공 및 생물학적 샘플의 변형 단계를 필요로 한다. 사정은 상대적이거나 절대적일 수 있다. "~의 수준을 결정하는"이라는 문구는 특정 물질이 존재하는지 존재하지 않는지의 여부를 결정하는 것, 및 이의 양을 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0066] 뇌 철분의 수준은 인지 저하를 갖는 것으로 의심되는 환자로부터 또는 또 다른 시간 기간에 동일한 환자로부터 결정될 수 있다. 다르게는, 뇌 철분의 수준은 인지 저하를 갖지 않는 것으로 알려진 환자로부터 결정되어, 기준 값 또는 기준 수준 또는 대조 수준을 제공한다. 바람직하게는, 이는 건강한 대조군 또는 인지적으로 정상적인 개별자(CN)로부터 일 것이다.

[0067] 본원에 사용될 경우, "기준 값" 또는 "기준 수준"은 상호교환적으로 사용될 수 있고, 절대 값; 상대 값; 상한치 및/또는 하한치를 갖는 값; 일정 범위의 값; 평균 값; 중간 값, 평균과, 수축 중심 값(shrunken centroid value), 또는 특별한 대조 또는 기선 값과 비교되는 값으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는, 이는 해당 생물학적 또는 시험 샘플과 병행하여 제조된 공지의 샘플로부터 수득된 예정된 기준 값이다. 기준 값을 결정하기 위해 다른 통계학적 변수가 사용될 수 있음을 알아야 한다. 기준 값은 개별자 샘플 값, 예를 들어, 인지 저하를 갖는 개별자로부터이지만 더욱 초기 시점의 샘플로부터 수득된 값, 또는 시험된 개별자와 다른 장애를 갖는 1명의 환자 또는 또 다른 환자, 또는 인지 저하 진단을 받지 않은 "정상적"이거나 "건강한 개별자", 달리는 CN 개별자 샘플로부터의 값에 기초할 수 있다. 기준 값은, 예컨대 AD 환자 또는 인지 저하를 갖는 환자, 정상 개별자로부터의 다수의 기준 샘플에 기초하거나, 시험되는 샘플을 포함하거나 배제한 샘플 모음에 기초할 수 있다.

[0068] 진단적 및 예후적 방법의 경우, "기준 수준"은 전형적으로 예정된 기준 수준, 예컨대 인지 저하로 고통받는 집단으로부터 수득된 수준의 평균이다. 몇몇 경우에, 예정된 기준 수준은 연령-부합된 집단으로부터 수득된 수준으로부터 유래된다(예를 들어, 이의 평균 또는 중간값). 본원에 개시된 몇몇 예에서, 연령-부합된 집단은 비-AD 개별자 또는 신경퇴행성 질환 개별자를 포함한다.

[0069] 인지 저하의 예후 또는 인지 저하의 위험을 제공하는 방법을 위해, 기준 수준은 또한 일반적으로 특별한 진단의 경우 "정상적"으로 고려된 예정된 수준으로서 고려될 수 있지만(예를 들어, 인지 저하로 진단되지 않은 연령-부합된 개별자에 대한 평균 수준 또는 AD 이외의 인지 저하로 진단된 연령-부합된 개별자 및/또는 건강한 연령-부합된 개별자에 대한 평균 수준), 동시에 결정된 기준 수준(예를 들어, 시험된 샘플을 포함하는 샘플 모음으로부터 유래된 기준 값)이 또한 고려된다.

[0070] 기준 수준은 또한 시험들 사이의 가변성을 감소시키도록 제1 수준 및 기준 수준의 측정값을 표준화하기 위해 일정한 내부 대조군의 측정값일 수 있다. 내부 대조군은 혈액 은행, 예컨대 적십자로부터의 샘플일 수 있다.

[0071] 이런 이유로, 본 발명의 방법을 실행함에 있어서, 일련의 샘플은 인지 저하를 갖는 개별자로부터 수득될 수 있고, 일련의 샘플은 인지 저하를 갖지 않는 개별자로부터 수득될 수 있다.

[0072] 측정된 뇌 철분의 수준은 뇌에서 결합되거나 결합되지 않은 철분 수준의 1차적 측정값이거나, 이는 철분의 2차적 측정값[이로부터 철분의 정량이 결정될 수 있지만 추론될 필요는 없음(정량적 데이터)], 예컨대 철분 관련된 단백질, 예컨대 페리틴 수준의 측정값이다. 이런 이유로, 샘플은 철분 관련된 단백질 수준, 예컨대 페리틴 수준을 측정하는 경우 결합되지 않은 세포 철분을 배제하도록 가공될 수 있다.

[0073] 본 발명의 한 실시태양에서, 뇌 철분의 수준은 임의의 철분 관련된 단백질, 예컨대 제한되지 않지만 세룰로플라스민, 아밀로이드 전구체 단백질, 타우, 페리틴, 트랜스페린, 트랜스페린 결합 단백질 등의 수준의 측정값으로서 결정될 수 있다. 바람직하게는, 뇌 철분은 페리틴 수준에 의해, 또는 MRI 또는 초음파검사에 의해, 또는 당분야의 숙련가에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 결정된다.

[0074] 따라서 본 발명은, ApoE 유전자형, CSF 타우, A β 및 ApoE 수준에 관한 정보와 함께, 철분 관련된 단백질 수준(예를 들어, 세룰로플라스민, 아밀로이드 전구체 단백질, 타우, 페리틴, 트랜스페린, 트랜스페린 결합 단백질 등)을 사용하여, 정상인 및 MCI를 갖는 개별자에서 인지 쇠퇴의 속도를 예측한다.

[0075] 페리틴은 신체의 철분 저장 단백질이고 AD 뇌 조직에서 상승한다. 배양된 시스템에서, 신경교에 의한 페리틴 발현 및 분비는 세포 철분 수준에 의존한다. CSF에서의 페리틴 수준은 뇌에서의 철분 수준을 반영하는 경향이

있고 임상적 유용성을 가질 수 있다.

[0076] 따라서, 한 바람직한 실시태양에서, 뇌 철분의 수준은 뇌척수액(CSF) 페리틴의 측정값으로서 결정된다. 예를 들어, 본 발명은 CSF 페리틴 농도 측정값을 사용하여(ApoE 유전자형, CSF 타우, A β 및 ApoE 수준에 관한 정보와 함께), 바람직하게는 경도 인지 장애(MCI)의 증후를 나타내는 개별자에서 인지 쇠퇴 속도를 예측한다.

[0077] 또 다른 실시태양에서, CSF 페리틴 농도의 측정값을 사용하여(바람직하게는, ApoE 유전자형, CSF 타우, A β 및 ApoE 수준에 관한 정보와 함께) 증후를 나타내지 않는(정상적) 개별자에서 인지 쇠퇴 속도를 예측한다.

[0078] CSF에서의 주요 철분 결합 단백질 페리틴을 지표로 사용함으로써, 높은 뇌-철분 적재량은 6 내지 7년에 걸쳐 인지적으로 정상적인(n = 91), 경도 인지 장애(n = 144) 및 AD(n = 67) 피험자의 코호트에서 더욱 불량한 인지(예를 들어, ADAS-Cog; 도 5a) 및 뇌 위축(예를 들어, 측뇌실-구조적 MRI; 도 5b)과 연관되었다. 이들 및 기타 AD-결과에 미치는 CSF 페리틴의 영향 크기는 AD에 대한 표준 CSF 생체표지자인 타우/A β 42 비율에 필적할만하다. CSF 페리틴은 독립적으로 연구 기간 동안 AD로의 진행을 예측하였고(도 5c), 타우/A β 의 예측 잠재성을 개선시켰다. 페리틴에서 각각 1 ng/ml의 증가는 진단을 3 개월 앞당겼다. 이에 따라, 본 발명자들은 AD에서의 뇌 철분의 역할을 입증하였고, AD 예후를 위한 표적으로서 뇌 철분을 제시한다.

[0079] 현재 청구된 방법을 수행함에 있어서, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준은 바람직하게는 식별되었다. 당분야의 숙련가라면 이해할 수 있듯이, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준(예를 들어, 농도, 발현 및/또는 활성)은 정성화되거나 정량화될 수 있다. 바람직하게는, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준은 DNA, RNA, 지질, 탄수화물, 단백질, 금속 또는 단백질 발현의 수준으로서 정량화된다.

[0080] 다수의 정성적 및 정량적 기법이 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 식별하기 위해 사용될 수 있음이 분명할 것이다. 이들 기법으로는 2D DGE, 질량 분석(MS), 예컨대 다중 반응 모니터링 질량 분석(MRM-MS), 실시간(RT)-PCR, 핵산 어레이(array); ELISA, 기능적 검정, 효소 검정, 다양한 면역학적 방법, 또는 생화학적 방법, 예컨대 모세관 전기영동, 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC: high performance liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC: thin layer chromatography), 고-확산 크로마토그래피, 2차원 액상 전기영동(2-D-LPE: two-dimensional liquid phase electrophoresis) 또는 젤 전기영동 또는 MRI에서의 이들의 이동 패턴이 포함될 수 있다.

[0081] 그러나, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 식별하기 위해 사용되는 적절한 기법이 분자의 특징에 좌우될 것임은 당분야의 숙련가에게 분명할 것이다. 예를 들어, 분자가 철인 경우, MRI가 분자의 수준을 정량화하기 위해 사용될 수 있다.

[0082] 또 다른 예에서, 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 존재를 결정한다면, 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준은 2차적 검출 시약, 예컨대 페리틴에 특이적인 태깅된(tagged) 항체를 사용하여 ELISA 기법을 통해 결정될 수 있다. 정확성을 증진시키기 위해, 환자로부터 취해진 CSF 샘플은 철분 수준을 검출하기 이전에 미리-가공되어 비-철분 미결합 분자 또는 페리틴 이외의 철분-결합 분자를 제거할 수 있다. 이런 이유로, 샘플은 사정 이전에 처리될 수 있다.

[0083] 철분 결합 분자가 단백질인 비제한적인 예에서, 단백질의 수준은 또한 면역검정에 의해 검출될 수 있다. 면역검정은 항원(즉, 단백질)에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 검정으로서 당분야의 숙련가에 의해 간주될 것이다. 면역검정은 이에 따라 단백질의 항체로의 특이적 결합의 검출을 특징으로 한다. 단백질을 검출하기 위한 면역검정은 경쟁적이거나 비-경쟁적일 수 있다. 비-경쟁적 면역검정은 포획된 피분석물(즉, 단백질)의 양을 직접적으로 측정하는 검정이다. 경쟁적 검정에서, 샘플에 존재하는 피분석물(즉, 단백질)의 양은 샘플에 존재하는 피분석물(즉, 단백질)에 의해 포획 제제(즉, 항체)로부터 떨어진(또는 경쟁에서 밀린) 첨가된(외래성) 피분석물의 양을 측정함으로써 간접적으로 측정된다.

[0084] 경쟁 검정의 한 예에서, 공지된 양의 (외래성) 단백질이 샘플에 첨가되고, 이어서 샘플은 항체와 접촉된다. 항체에 결합된 첨가된(외래성) 단백질의 양은 외래성 단백질이 첨가되기 이전의 샘플중의 단백질의 농도에 반비례한다. 또 다른 검정에서, 예를 들어, 항체는 이들이 부동화되는 고체 기질에 직접 결합될 수 있다. 이들 부동화된 항체는 이어서 시험 샘플에 존재하는 흥미로운 단백질을 포획한다. 다른 면역학적 방법으로는, 제한되지 않지만, 유체 또는 젤 침전 반응, 면역확산(단일 또는 이중), 응집반응 검정, 면역전기영동, 방사선면역검정(RIA: radioimmunoassay), 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay), 웨스턴 블롯(Western blot), 리포솜 면역검정, 보체-고정 검정, 면역방사 검정, 형광 면역검정, 단백질 A 면역검정 또는

면역-PCR이 포함된다.

[0085] 페리틴은 효소-연결된 면역흡착 검정(ELISA) 또는 당분야의 숙련가에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 편리하게 측정될 수 있다.

[0086] 이런 이유로, 장애, 예컨대 AD를 유도하는 인지 저하를 갖거나 이로 진행되는 경향이 있는 개별자를 지시할 수 있는 뇌 철분 수준은 당분야의 숙련가에게 이용가능한 임의의 방법에 의해, 바람직하게는 페리틴, 가장 바람직하게는 CSF 페리틴을 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0087] CSF 페리틴은 대체적으로 요추 천자(척추 천자)에 의해 뇌척수액으로부터 수득된 CSF 샘플에서 측정된다. 일례로서, CSF는 폴리프로필렌 관 및 주사기내로 수집되고, 이어서 임의의 원심분리 단계 없이 폴리프로필렌 전달관으로 전달된 다음, 수집 이후 1 시간 이내에 드라이 아이스 상에서 동결된다. 이들은 즉각적으로 분석되거나 -80°C에서 동결된다. CSF 페리틴 단백질 수준은 미리아드 룰스 베이스드 메디슨 플랫폼(Myriad Rules Based Medicine platform)[휴먼 디스커버리(Human Discovery) MAP, v1.0]을 사용하여 결정되었다.

[0088] 뇌 철분 수준은 시험된 피험자 또는 개별자로부터의 뇌 철분 수준을 구체적으로 결정할 수 있는 임의의 이용 가능한 측정 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 측정은, 뇌 철분의 수준이 기준 샘플로부터의 기준 값을 초과하는지 미달하는지의 여부를 지시할 수 있는 한, 정량적이거나 정성적일 수 있다.

[0089] 또 다른 바람직한 실시태양에서, 뇌 철분의 수준은 MRI, 임의적으로 초 자장(ultra field) 7T MRI 또는 임상적 3T MRI 영상에 의해 결정된다.

[0090] 3가지 주요 방법은 MRI에 의해 생체내에서 철분을 정량화하기 위해 존재한다. 1) T₂^{*} 맵: 철분의 존재는 양성자의 코히어런트(coherent) 스픈을 국소적으로 교란시켜 T₂^{*}를 단축시키고, 이는 T₂^{*} 매핑(mapping)에 의해 영상화될 수 있다[다중 기울기 에코(GRE: multiple gradient echo) 사용]. 2) QSM: 철분 존재는 또한 기울기 에코 영상을 사용하여 매핑될 수 있는 조직의 감수성에 영향을 준다. 3) 자기장-의존적 이완 속도 증가(FDRI: Field-Dependent Relaxation Rate Increase): 2개의 상이한 자장 강도(3T 및 7T)에서 수집된 T2w를 사용함으로써, 철분 수준이 추정될 수 있다.

[0091] ≤3T에서 MRI를 사용하여 AD(아래 참조) 및 기타 질환에서 피질성 철분에서의 교차 증가를 보고하는 고려할만한 문헌이 발행되었지만, 다른 조직 변화로부터 철분 축적을 구별하는 MRI의 능력에 관하여, 철분 함량을 추론하는데 있어서 7T가 3T에 비해 주된 이점을 갖는다는 통고가 있어왔다. 하나는 더 높은 신호 대 잡음 비이고, 이는 공간적 해상도를 증가시키고/시키거나 스캐닝(scanning) 시간을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 7T는 자기감수성에 대한 증가된 감도의 추가적인 이점을 갖는다. 자기장 강도가 증가함에 따라, 철분-감도 영상에서의 콘트라스트(contrast)는 향상된다. 이는 기울기 에코 상 영상에서 입증되었다. 해상도에서의 증가와 조합된 감수성-감도는 신경퇴행성 질환, 예컨대 AD40-42 파킨슨병(Parkinson's disease), 및 근위축성 측삭 경화증에서 철분을 정량화하기 위해 7T의 사용을 유도한다. 연구들은 해마 및 피질 층의 향상된 시각화를 보여주고, 이는 7T의 증가된 철분 감도에 기인한 것이다. 7T에서의 철분에 대한 예상된 증가된 감도는 분산을 감소시키고 통계적 힘을 증진시킬 수 있다. 3T에 비해 더 높은 7T의 공간 해상도는 상에서의 피질 적층물의 시각화를 허용하여, 피질 층 사이의 철분 침적에 대한 조사를 용이하게 한다.

[0092] 지난 20년에 걸쳐, MRI는 뇌 철분 함량을 측정하기 위해 사용되어 노화된 뇌에서의 철분 상승을 밝혀내었고, 이는 AD에서 극대화된다. 교차 연구에서, 개인적으로 순상된 개별자 및 AD를 앓는 개별자에서 뇌 철분 농도 및 기억 기능 사이에 역 상관관계가 존재하지만, MRI에 의해 측정된 철분의 AD 결과에 미치는 영향에 대한 종적 연구는 없었다. 이제 본 발명자들은 높은 뇌 철분 함량이 더욱 이론 연령에서의 개시를 의미함을 보여준다.

[0093] 바람직하게는, CSF 페리틴을 경유하여 측정될 경우 기준 수준에 상대적으로 높은 뇌 철분 함량이 인지 저하를 의미한다는 발견에 기초하여, 본 발명에서 뇌 철분 및 CSF 페리틴의 증가는 환자 및 기준 수준 사이에서의 차이를 의미하는 것으로 고려된다. 이러한 차이는 인지 저하의 위험을 추론하는데 도움을 준다.

[0094] 환자 및 기준 수준 사이의 상승인 뇌 철분 수준에서의 차이는 인지 저하의 증가된 위험을 나타낼 것이다. 상승도는 인지 저하의 위험에 대한 진단 또는 사정이 존재하는지의 여부를 지시할 것이다. 작은 상승은 위험을 지시하는 반면, 높은 상승은 인지 저하를 지시하는 경향을 갖는다. 환자 및 기준 수준 사이의 증가된 상승은 인지 저하에 대한 증가된 위험을 지시할 것이다.

[0095] 간편성을 위해, 본원에 포함된 일부 설명은 AD에 관하여 이루어질 것이다. 그러나, 당분야의 숙련가라면 본 발

명은 또한 예후적 또는 진단적으로 사용되거나, 기타 신경 질환, 예컨대 제한되지 않지만 다발성 경화증, 뇌성 마비, 파킨슨병, 신경병증(말초 신경에 영향을 주는 증상), 치매, 루이소체 치매(DLB: dementia with Lewy bodies), 다경색 치매(MID: multi-infarct dementia), 혈관성 치매(VD: vascular dementia), 조현병 및/또는 우울증, 인지 손상 및 전두측두엽 치매의 진행을 진단/예후 및/또는 모니터링하는 것을 돋는데 사용될 수 있음을 이해할 것으로 고려된다.

- [0096] 본 발명의 또 다른 양태에서,
- [0097] 뇌 철분의 최초 수준을 환자에서 결정하는 단계;
- [0098] 뇌 철분의 최초 수준을 뇌 철분의 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0099] 뇌 철분의 최초 수준과 기준 수준 사이의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0100] 이러한 차이로부터 인지 저하를 환자에서 추론하는 단계
- [0101] 를 포함하는, 인지 저하를 환자에서 진단하는 방법이 제공된다.
- [0102] 높은 뇌 철분 적재량이 더욱 불량한 인지와 연관된다는 본 발명자들에 의한 발견은 인지 저하를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 환자 수준 및 기준 수준 사이에서 상승된 뇌 철분 수준에서의 차이는 인지 저하의 진단을 지시할 것이다. 상승 정도는 인지 저하의 위중성을 지시할 것이다. 작은 상승은 위험을 지시하는 반면, 높은 상승은 인지 저하의 진단을 지시하는 경향이 있다. 환자 및 기준 수준 사이의 증가된 상승은 증가된 인지 저하를 지시할 것이다.
- [0103] 당분야의 숙련가라면 진단은 가능한 질환 또는 장애를 결정하거나 식별하고자 하는 과정, 및 이러한 과정에 의해 도달된 의견을 지칭하는 것으로 이해할 것이다.
- [0104] 게다가, 환자에서 인지 저하의 양성 진단은, 보장되는 한, 유효하거나 확인될 수 있고, 예컨대 아밀로이드 적재량 또는 아밀로이드 수준을 결정하는 것은 높은 신피질 아밀로이드의 존재를 확인한다. 종종 상호교환적으로 사용되는 용어 아밀로이드 적재량 또는 아밀로이드 수준, 또는 아밀로이드 및 아밀로이드 단편의 존재는, 뇌에 침적된 뇌의 아밀로이드 베타(A β 또는 아밀로이드- β)의 농도 또는 수준을 지칭하고, 아밀로이드-베타 웹타이드는 (노인성) 반점의 주요 구성성분이다.
- [0105] 또한, 환자는 PET 및 MRI를 비롯한 영상 기법을 사용하여, 또는 진단 도구, 예컨대 PET와 함께 사용될 경우 PiB(다르게는 PiB-PET로 지칭됨)의 도움으로 인지 저하에 대해 양성인 것으로 확인될 수 있다. 바람직하게는, 인지 저하에 대해 양성인 환자는 PiB 양성이다. 더욱 바람직하게는, 환자는 높은 신피질 아밀로이드 적재량 (PiB 양성)에 상응하는 표준 섭취 값 비율(SUVR: standard uptake value ratio)을 갖는다. 예를 들어, 현행 관행에 따르면 SUVR은 1.5가 뇌에서 신피질 아밀로이드 적재량의 높은 수준을 반영하고 1.5 미만이 낮은 수준을 반영할 수 있는 것으로 간주된다. 당분야의 숙련가라면 고려되는 사항이 신피질 아밀로이드 적재량의 높은 수준인지 낮은 수준인지를 결정할 수 있을 것이다. 당분야의 숙련가라면 이해할 수 있듯이, 환자는 또한 CSF로부터 아밀로이드 베타 및 타우를 측정함으로써 신경학적 질환에 대해 양성인 것으로 확인될 수 있다.
- [0106] 더욱이, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴에 대한 진단적 능력을 특징짓는데 있어서, 당분야의 숙련가는 이를 생체표지자에 대한 진단 컷오프(cutoff)를 계산할 수 있다. 이러한 컷오프는 일정한 값, 수준 또는 범위일 수 있다. 진단 컷오프는 인지 저하를 결정하거나 식별하고자 하는 과정에 도움을 주는 값, 수준 또는 범위를 제공해야 한다.
- [0107] 예를 들어, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준은 그 수준이 진단 컷오프를 초과할 경우 인지 저하에 대해 진단적일 수 있다. 다르게는, 당분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준은 그 수준이 진단 컷오프 미만일 경우 인지 저하에 대해 진단적일 수 있다.
- [0108] 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴에 대한 진단 컷오프는 당분야의 숙련가에게 공지된 다수의 통계 분석 소프트웨어 프로그램을 사용하여 유도될 수 있다. 일례로서 진단 컷오프를 결정하는 혼란 기법은 정상적 개별자의 평균을 결정하고, 예를 들어, 협정된 감도 및 특이성 값을 갖는 +/- 2 SD 및/또는 ROC 분석을 사용함을 포함한다. 전형적으로 80% 보다 큰 감도 및 특이성은 허용가능하지만, 이는 각각의 질환 상황에 따라 달라진다. 진단 컷오프의 정의는 시험이 진행되는 설정과 상이한 임상적 설정하에 사용된다면 다시 유도되어야 할 수 있다. 이를 달성하기 위해, 대조 개별자는 평균 +/- SD를 결정하도록 측정된다. 당분야

의 숙련가가 이해하는 바와 같이, 대조 개별자로부터 수득된 측정값으로부터 +/- 2를 벗어난 SD를 사용하여 정상 범위밖의 개별자를 식별할 수 있다. 정상 범위 밖의 개별자는 질환에 대해 양성인 것으로 고려될 수 있다. 이어서, 신규한 임상적 설정에서 수득된 값은 통계적 시험에 의해 판단될 경우 구형의 진단 기준이 여전히 허용 가능한지의 여부를 결정하기 위해 예전의 값과 비교될 것이다. 질환 증상을 갖는 것으로 공지된 개별자는 또한 분석에 포함될 것이다. 질환 및 대조 상태 샘플 둘 다가 이용가능한 상황에서, 선택된 감도 및 특이성을 갖는 ROC 분석 방법이 인지 저하를 지시하는 진단 값을 결정하기 위해 선택될 수 있고, 전형적으로 80%이다. 진단 컷오프의 결정은 또한 당분야의 숙련가에게 공지된 통계 모델을 사용하여 결정될 수 있다.

- [0109] 본 발명의 방법에서 뇌 철분, 바람직하게는 폐리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 폐리틴의 사용은 또한 신경학적 질환의 존재에 대한 진단적 평가의 제공에 있어서 당분야에 공지된 신경학적 질환의 임상적 사정의 다른 방법과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 사료된다.
- [0110] 정의적 진단은, 예컨대 PET 및 MRI를 비롯한 영상 기법을 통해, 또는 예를 들어 진단적 도구, 예컨대 PET와 함께 사용될 경우 PiB(다르게는 PiB-PET로서 지칭됨)의 보조에 의해 보장된다면, 유효하거나 확인될 수 있다.
- [0111] 본 발명의 방법을 적용함에 있어서, 환자에서 인지 저하의 존재에 관한 임상적 또는 거의 임상적 결정이 이루어질 수 있고 이는 정의적 진단에 관하여 결론적이거나 결론적이지 않을 수 있는 것으로 고려된다.
- [0112] 유사하게, 본 발명의 방법은 인지 저하의 예후를 보조하는데 사용될 수 있고, 인지 저하의 존재 또는 성질에 관한 임상적 결정의 사정을 돋는 것으로 고려될 것이다. 이는 포유동물이 진행되는 인지 저하의 유의적으로 증진된 가능성을 갖는다는 것을 발견함을 지칭하는 것으로 고려될 것이다.
- [0113] 당분야의 숙련가라면, 뇌 철분, 바람직하게는 폐리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 폐리틴의 수준에 대한 사정과 조합하여(ApoE 유전자형, CSF 타우, A β 및 ApoE 수준에 관한 정보와 함께) 인지 저하의 존재에 대한 임상적 결정은, 제한되지 않지만 기억 및/또는 심리학적 시험, 언어 손상 및/또는 기타 중심 인지 결함(예컨대, 실행증, 계산불능증 및 좌우 지남력장애)에 대한 사정, 손상된 판단력 및 일반적 문제-해결 장애에 대한 사정, 점진적인 수동성으로부터 현저한 동요에 이르는 범위의 인격 변화에 대한 사정을 포함하는 사정에 관한 것으로 고려될 것으로 이해할 것이다. 본 발명의 방법은 또한 신경학적 질환의 존재에 대한 예후적 평가를 제공함에 있어서 당분야에 공지된 신경학적 질환의 임상적 사정의 다른 방법과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 사료된다.
- [0114] 인지 저하가 의심되는 환자의 인지 저하에 대한 정의적 진단은, 예컨대 PET 및 MRI를 비롯한 영상 기법을 통해, 또는 예를 들어 진단적 도구, 예컨대 PET와 함께 사용될 경우 PiB(다르게는, PiB-PET로서 지칭됨)의 보조에 의해 보장된다면, 유효하거나 확인될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 환자를 인지 저하에 대하여 사정하기 위한 선별전 또는 예후적 방식에서 사용될 수 있고, 보장된다면, 추가의 정의적 진단은, 예를 들어, PiB-PET에 의해 실행될 수 있다.
- [0115] 본 발명의 역시 또 다른 양태에서:
- [0116] 뇌 철분의 수준을 환자에서 제1 시점에 결정하는 단계;
- [0117] 뇌 철분의 수준을 동일한 환자에서 제1 시점 이후의 제2 시점에 결정하는 단계;
- [0118] 임의적으로 제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준을 기준 수준과 비교하는 단계;
- [0119] 제1 시점 및 제2 시점 각각에서 뇌 철분의 수준에서의 차이를 결정하는 단계; 및
- [0120] 제1 시점 및 제2 시점으로부터의 뇌 철분의 수준에서의 차이로부터 인지 저하의 진행을 추론하는 단계
- [0121] 를 포함하는, 인지 저하의 진행을 환자에서 모니터링하는 방법이 제공된다.
- [0122] 뇌 철분의 수준에서의 변화는 추가적으로 환자의 인지 저하에서의 임의의 변화를 사정하는데 사용될 수 있다. 따라서, 뇌 철분 수준의 모니터링에 있어서, 일정 기간에 걸쳐 인지 저하의 존재에 대해 모니터링하거나, 환자에서 인지 저하 진행을 추적하는 것이 가능하다.
- [0123] 따라서, 환자로부터의 뇌 철분 수준에서의 변화는 인지 기능 및 인지 저하를 사정하고, 인지 저하를 진단하거나 이의 예후 또는 진단에 도움을 주고/주거나 환자에서 AD로의 진행을 모니터링(예를 들어, 환자에서 진행을 추적하고/하거나 환자에서 의학적 또는 수술적 치료법의 효과를 추적)하기 위해 사용될 수 있다.
- [0124] 또한, 이는 동일한 포유동물에 대해 이전에 취해진 샘플에 비하여 변경된 수준에 관한 것으로 사료될 수 있다. 이런 이유로, 예컨대 CN 샘플로부터의 기준 수준에 대하여 비교할 필요가 없을 수 있다. 이와 관련하여, 기준

수준은 더욱 이론 시점에서의 뇌 철분의 수준일 수 있다.

[0125] 뇌 철분에 대한 수준이 또한 하나 보다 많은 시점에서 환자로부터 수득될 수 있는 것으로 사료된다. 이러한 일련의 샘플링은 인지 저하의 진행을 환자에서 모니터링하는 것과 관련된 본 발명의 방법을 통해 실현가능한 것으로 고려될 것이다. 일련의 샘플링은 임의의 바람직한 타임라인(timeline)으로, 예컨대 매달, 분기별(즉, 3개월마다), 반년, 매년, 2년마다, 또는 덜 빈번히 수행될 수 있다. 측정된 수준 및 예정된 수준 사이의 비교는 신규 샘플이 측정되는 각 시간마다 실행되거나, 수준에 대한 데이터는 덜 빈번한 분석을 위해 유지될 수 있다.

[0126] 또 다른 실시태양에서, 뇌 철분 수준에서의 차이는 기준 수준과 비교하여 제2 시점에서의 철분 수준이 제1 시점보다 더 높도록 제1 및 제2 시점 사이에서 상승하고, 이로써 인지 저하의 증가된 진행을 지시한다. 본 발명자들은, 비교적 낮은 페리틴(6.6 ng/ml 미만)을 갖는 환자는 예측가능한 미래에 저하되지 않을 것임을 보여주었다. 이는 $\epsilon 4+ve$ 피험자의 30%가 AD로 진행되지 않는 이유를 잠재적으로 설명할 수 있다. 역으로, 이러한 역치를 초과하는 페리틴의 각각의 단위 증가는 더욱 신속한 저하를 예측하였다.

[0127] 본 발명의 방법은 추가적으로 치료학적 모니터링으로도 지칭되는, 포유동물에 투여되는 치료법의 효과를 모니터링하고 환자를 처치하는데 사용될 수 있다. 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준에서의 변화는 약물 치료에 대한 환자의 반응을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 환자에서 검사하고, 이후 치료를 시작함으로써 신규한 치료 섭생이 또한 개발될 수 있다.

[0128] CSF 샘플은 페리틴 수준에 대한 사정 이전에 예비-가공되어 결합되지 않은 철분을 제거할 수 있다.

[0129] 이에 따라, 본 발명의 방법은, 예를 들어, 신경 질환을 위한 특정 치료법을 평가하기 위해 임상 연구를 모니터링하는데 도움을 줄 수 있다. 예를 들어, 케미칼 화합물은 인지 저하를 갖는 환자에서의 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 대조군 또는 CN 환자에서 발견되는 수준으로 정상화시키는 그의 능력에 대해 시험될 수 있다. 치료되는 환자에서, 케미칼 화합물은 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 대조군 또는 CN 환자에서 보여지는 수준 또는 거의 해당 수준으로 유지시키는 그의 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0130] 본 발명의 또 다른 실시태양에서, 인지 저하를 결정하는 방법은

[0131] 아포지질단백질 E(ApoE) 수준을 환자에서 결정하는 단계;

[0132] 환자에서 ApoE의 수준을 ApoE의 기준 수준과 비교하는 단계;

[0133] 환자에 상응하는 뇌 철분 수준과 뇌 철분의 기준 수준에 대하여 환자에서의 ApoE 수준과 기준 수준 사이의 상관관계를 결정하는 단계; 및

[0134] ApoE 수준 및 뇌 철분 수준 사이의 상관관계로부터 인지 저하의 위험을 추론하는 단계

[0135] 를 추가로 포함한다.

[0136] 본 발명자들은 CSF 페리틴이 CSF ApoE 수준과 현저한 연관성을 형성하고(도 3a), APOE- ϵ 4 이소폼을 갖는 피험자가 AD 위험 대립유전자가 없는 피험자에 비해 상승된 CSF 페리틴을 가짐을 발견하였다(도 3b). 사후의 전전 두엽 괴질에서 ApoE 및 페리틴 mRNA 수준을 분석한 결과 이러한 CSF 단백질 연구와 유사한 강도 및 병향성의 연관성이 확인되었다(연령, 공지되지 않은 유전자형에 대해 보정됨). APOE ϵ 3 및 ϵ 4 네-인(knock-in) 마우스에서 뇌 철분 함량을 측정한 결과, ϵ 4 네-인 마우스는 WT에 비해 철분이 상승된 것으로 밝혀졌다(+32%; 3 개월령의 마우스).

[0137] 특히, HFE의 철분-축적 돌연변이(이는 혈색소증을 유발함)는 APOE- ϵ 4와 상위(epistatic) 상호작용을 가져서 AD 위험을 증가시키고 질환의 개시를 5.5년 만큼 가속화시킨다. 본 발명자들은 APOE- ϵ 4가 CSF 페리틴 및 인지 저하 사이의 연관성에 영향을 미침을 보여준다. 종적 기억 수행의 혼합 효과 모델(RAVLT; 7년)에서, 상승된 CSF 페리틴은 APOE- ϵ 4 담체에서 가속화된 인지 쇠퇴를 예측하였지만($p = 0.003$), 비-담체에서는 아니었다(도 5). 이에 따라, APOE- ϵ 4 대립유전자의 함유는 뇌 철분의 상승을 일으키고, 뇌 철분 상태의 보고자로서의 CSF 페리틴을 사용하여 측정될 경우 철분 중재된 손상에 대한 취약성을 증가시킨다.

[0138] 본 발명자들은 또한 7년에 걸쳐 정상인에서 인지 쇠퇴를 예측함에 있어서 CSF 페리틴이 확립된 AD 위험 변수, APOE- ϵ 4, CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 및 ApoE와 조합됨을 보여준다.

- [0139] 이런 이유로, 본 발명자들에 의한 이들 발견은 인지 저하를 사정하기 위한 방법을 개선시키기 위해 적용될 수 있다. 한 바람직한 실시태양에서, 인지 저하는 CSF 페리틴을 사용하여 뇌 철분을 측정함으로써 결정된다. 이들 발견으로부터, APOE- ϵ 4 대립유전자 및 높은 철분을 갖는 환자는 인지 저하의 성향을 갖는다.
- [0140] 추가의 실시태양에서, 뇌 철분 또는 CSF 페리틴 수준은 정상인에서 인지 쇠퇴를 예측함에 있어서 확립된 AD 위험 변수, 예컨대 제한되지 않지만 APOE- ϵ 4, CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 및 ApoE와 조합될 수 있다.
- [0141] 따라서, 뇌 철분 및 APOE- ϵ 4 대립유전자 사이의 양성 상관관계는 인지 저하 또는 쇠퇴의 증가된 위험을 지시할 수 있다.
- [0142] 역시 또 다른 실시태양에서, 본 방법은 추가로 인지 손상의 생체표지자, 예컨대 제한되지 않지만 아밀로이드 β 웨بت아이드, 타우, 포스포-타우, 시누클레인(synuclein), Rab3a, A β 및 신경사 단백질의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 이들 추가적인 생체표지자는 단일하게 사용되거나 인지 저하를 사정하는 방법과 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 인지 저하를 결정하기 위해 단지 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴만을 사정하는 것에 제한될 필요는 없다. 이들 추가적인 표지는 인지 저하의 위험을 결정하는 방법의 정확성을 향상시키고 사정에서의 긍정 오류를 감소시킬 수 있다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 양태에서 뇌 철분 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 경감시키는 방법이 제공된다.
- [0144] 이러한 방법은 정상인이 더 높은 CSF 페리틴 수준을 가질 경우 인지 수행이 더욱 악화된다는 발견에 기초한다. CSF 페리틴 수준을 측정함으로써, 본 발명자들은 뇌 철분의 측정값 및 인지 저하의 척도를 관련시켰다. 이론에 얹매려는 것은 아니지만, 뇌 철분이 낮을 수록, 인지 저화와 연관된 CSF 페리틴 수준이 더 낮을 것이다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 양태에서, CSF 페리틴 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 저하의 진행 속도를 경감시키는 방법이 제공된다.
- [0146] 본 발명의 또 다른 양태에서, CSF 페리틴 수준을 낮추는 단계를 포함하는, 인지 수행을 증가시키는 방법이 제공된다.
- [0147] 뇌 철분 또는 CSF 페리틴 수준을 낮추기 위해서, 화합물, 예컨대 철분 칼레이트제, 예컨대 데페리프론이 사용될 수 있다. 그러나, 뇌 철분 또는 CSF 페리틴을 유사하게 더 낮추는 다른 화합물이 또한 본 발명의 범주내에 포함된다.
- [0148] 철분 칼레이트제를 환자에게 투여함은 뇌에서의 철분 또는 CSF 페리틴의 형태의 CSF의 수준을 감소시킬 수 있다. 이는 특별히 인지 저하를 나타내는 환자에 대해 효과적일 것이다. 높은 CSF 페리틴 수준이 높은 뇌 철분과 상관되므로, Apo ϵ 4 대립유전자를 갖는 환자는 또한 이러한 치료가 유익할 것이다. 그러나, Apo ϵ 4를 갖지 않는 CN 환자는 또한 CSF 페리틴 수준의 뇌 철분을 낮추는 것이 유익할 것이다.
- [0149] 철분 칼레이트제 또는 철분 강하 약물의 투여는, 철분 수준을 더 낮추기 위해 치료되는 영역에 접근 가능한 약물을 제공하기에 적합한 임의의 경로를 통해, 예컨대 정맥내, 피하, 비경구적, 경구적 또는 국소적으로 이루어질 수 있다.
- [0150] 본원에 기재된 인지 저하를 사정하는 방법에 의해 개선이 결정될 수 있다.
- [0151] 추가의 양태에서, 본 발명은 환자에서 인지 저하에 대해 진단하고/하거나 예후하기 위해, 또는 인지 저하의 위험이 있는 환자를 식별하기 위해 사용될 수 있는 키트를 제공한다.
- [0152] 따라서, 본 발명은 환자에서 인지 저하에 대해 진단하거나 예후하기 위해, 또는 인지 저하의 위험이 있는 환자를 식별하기 위해, 또는 인지 저하를 갖는 환자에게 실행되는 치료법의 효과를 모니터링하기 위해 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있는 키트를 제공한다.
- [0153] 고려되는 키트는, 제한될 필요는 없지만, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 결정하기 위해 특이적인 폴리펩타이드, 단백질, 및/또는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 시약 패널을 포함할 수 있다. 따라서, 피험자가 인지 저하를 갖는지를 지시하도록 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 결정하기 위해 사용될 수 있는 키트의 시약은 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴을 검출하는 임의의 방법, 예컨대 제한되지 않지만 2D DGE, 질량 분석(MS), 예컨대 다중 반응 모니터링 질량 분석(MRM-MS), 실시간(RT)-PCR, 핵산 어레이; ELISA, 기능적 검정, 효소 검정,

다양한 면역학적 방법, 또는 생화학적 방법, 예컨대 모세관 전기영동, 고 성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 고-확산 크로마토그래피, 2차원 액상 전기영동(2-D-LPE) 또는 겔 전기영동에서의 이동 패턴에 사용될 수 있을 것이다. 예를 들어, 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴을 인식하는 임의의 항체가 사용될 수 있는 것으로 구상된다.

[0154] 한 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 환자에서 인지 저하에 대해 선별, 진단 또는 예후하기 위한 방법에서 사용하기 위한 시약의 키트를 제공하고, 여기서 키트는 포유동물로부터의 샘플에서 적어도 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 정량화하는 시약 패널을 제공한다.

[0155] 더욱 추가의 실시태양에서, 키트는 추가로 포유동물로부터의 샘플에서 뇌 철분, 바람직하게는 페리틴 또는 더욱 바람직하게는 CSF 페리틴의 수준을 정량화하기 위한 시약 패널과 조합하여 사용하기 위해, 기타 AD 위험 변수, 예컨대 제한되지 않지만 APOE-ε 4, CSF 타우/Aβ₁₋₄₂ 및 ApoE를 결정하기 위한 수단을 제공한다. AD 위험 변수는 아밀로이드 β 웨타이드, 타우, 포스포-타우, 시누클레인, Rab3a, Aβ 또는 신경사 단백질을 정량화함으로써 결정될 수 있다. 이런 이유로, 이들 위험 변수를 결정하기에 적합한 시약이 키트에 포함될 수 있다.

[0156] 당분야의 숙련가라면 AD 위험 변수, APOE-ε 4, CSF 타우/Aβ₁₋₄₂ 및 ApoE, 더욱 바람직하게는 아밀로이드 β 웨타이드, 타우, 포스포-타우, 시누클레인, Rab3a, Aβ 및 신경사 단백질의 존재를 결정하고 정량화하기 위한 임의의 적합한 시약을 사용할 수 있을 것이다.

[0157] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 특정 실시태양에 대한 아래의 설명을 검토할 경우 당분야의 숙련가에게 분명 할 것이다.

[0158] 용어 "포함하다", "포함하고", "포함된", 또는 "포함하는"이 본 명세서에서 사용되는 경우(특히청구범위 포함), 이들은 언급된 특징, 정수, 단계 또는 성분들의 존재를 특정화하지만, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계 또는 성분들의 존재가 불가능하지 않는 것으로 해석되어야 한다.

[0159] 이제 본 발명은 하기 비제한적 실시예에 의해 더욱 충분히 설명될 것이다.

실시예

[0161] **실시예 1: 뇌척수액중의 페리틴 수준은 알츠하이머병 결과를 예측하고 ApoE에 의해 조절된다.**

[0162] 페리틴은 신체의 주요 철분 저장 단백질이고; 페리틴의 뇌척수액(CSF) 수준을 지표로서 사용함으로써, 종적 결과에 영향을 주는 뇌 철분 상태를 알츠하이머병 신경영상 이니셔티브(ADNI: Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) 코호트에서 연구하였다.

[0163] 본 실시예는 알츠하이머병 신경영상 이니셔티브(ADNI) 전망적 임상 코호트에서 7년에 걸친 기선 CSF-페리틴 데이터와 생체표지자, 인지, 해부 및 진단적 결과의 연관성을 보여준다. CSF 페리틴 수준은, AD의 다양한 결과를 예측함에 있어서, 더욱 확립된 AD CSF 생체표지자, 타우/Aβ₁₋₄₂ 비율 및 아포지질단백질 E(ApoE) 수준과 비교하여 유사한 유용성을 갖는 것으로 보인다.

[0164] (i) 방법

[0165] **ADNI 설명.** 2014년 7월 15일자로 알츠하이머병 신경영상 이니셔티브(ADNI) 데이터베이스(adni.loni.usc.edu)로부터 데이터를 다운로드하였다. ADNI 연구는 이전에 상세히 설명되었다[알리-라흐마니(Ali-Rahmani) 등의 문헌(2014)].

[0166] **ADNI 1에 대한 모집 포함 및 배제 기준.** 포함 기준은 다음과 같다: (1) 한친스키(Hachinski) 혈관성 스코어 ≤ 4; (2) 선별전 4 주 동안 안정적인 허용된 투약; (3) 노인성 우울증 척도(Geriatric Depression Scale) 스코어 <6; (4) 신경심리학 시험에 적합한 시력 및 청력; 등록이 힘든 질환을 갖지 않은 양호한 일반적 건강; (5) 6학년의 학력 또는 해당하는 일 경력; (6) 영어 또는 스페인어를 유창하게 말할 수 있는 능력; (7) 참여자와 임상 방문에 동행할 수 있는, 직접 또는 전화로 1 주 당 10 시간을 접촉하는 연구 파트너.

[0167] 상이한 진단 군에 대한 기준은 표 1에 요약되어 있다. 군은 연령-부합되었다. 인지적으로 정상적인(CN) 피험자는 심각한 인지 손상이나 일상 생활에 대한 활성 손상이 없어야 한다. 임상적으로 진단된 AD 환자는 경미한 AD를 가져야 하고, 확실한 AD39를 위해 신경 및 의사 전달 장애와 뇌졸중-알츠하이머병의 국립연구소(National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease) 및 관련된 장애 협회 기준을 충족시켜야 하는 반면, 경도 인지 장애 피험자(MCI)는 이들 기준을 충족시킬 필요가 없고, 거의 온

전한 일반적 인지 뿐만 아니라 기능적 수행을 갖지만, MCI에 대한 정의된 기준을 충족시킨다.

[0168] **CSF 생체표지자 수집 및 분석.** 기선에서 ADNI 참여자의 소집함에서 CSF를 1회 수집하였다. 루미넥스 플랫폼(Luminex platform)을 사용하여 CSF중의 A β ₁₋₄₂ 및 타우 수준을 측정하였다. 미리아드 룰스 베이스드 메디슨 플랫폼(휴먼 디스커버리 MAP, v1.0; ADNI 재료 및 방법 참조)을 사용하여 ApoE 및 페리틴 단백질 수준을 결정하였다. 약간 변형된 제조업체의 1박 프로토콜에 따라서 다중화(multiplex) 인간 신경퇴행성 키트[HNDG1-36K; 밀리포어(Millipore), 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재]를 사용하여 CSF 인자 H(FH) 수준을 측정하였다.

[0169] CSF를 각각의 자리에 제공된 폴리프로필렌 관 또는 주사기내로 수집한 다음, 원심분리 단계 없이 폴리프로필렌 전달 관으로 전달시키고, 이어서 펜실바니아 대학 메디칼 센터(University of Pennsylvania Medical Center)의 ADNI 생체표지자 코어 실험실로 드라이 아이스 상에서 하룻밤 후속적인 선적을 위하여 수집 후 1시간 이내에 드라이 아이스 상에서 동결시켰다. 실온에서 해동(1시간)하고 온화하게 혼합한 후 이를 샘플로부터 분취량(0.5 ml)을 준비하였다. 분취량을 -80°C에서 바코드-라벨링된 폴리프로필렌 바이알에 저장하였다. 종적 시점의 각각의 피험자 집합에 대해 이전에 한번도 해동되지 않은 신선한 0.5 ml의 분취량을, 본 연구를 위한 동일한 분석 운행에서 동일한 96-웰 플레이트 상에서 분석하여, 운행 대 운행 및 시약 키트(lot) 원료의 변화를 최소화하였다. 운행내에서 이중 샘플에 대한 변동 계수(%CV)는 A β ₁₋₄₂의 경우 2.5 내지 5.9%, 타우의 경우 2.2 내지 6.3%의 범위였고, CSF 모음 샘플에 대한 운행간 %CV는 A β ₁₋₄₂의 경우 5.1 내지 14%, 타우의 경우 2.7 내지 11.2%의 범위였다.

[0170] 룰스 베이스드 메디슨(휴먼 디스커버리 MAP, v1.0)을 사용하여 아포지질단백질 E(ApoE) 및 페리틴 단백질 수준을 결정하였다. 이러한 절차 및 표준 작동 절차에 대한 정보는 추가의 이전의 문헌[샤우(Shaw, L.M.) 등(2011) 및 맥칸(McKhann, G.) 등(1984)] 및 온라인(<http://www.adni-info.org/>)에서 찾아볼 수 있다.

[0171] **구조적 MRI 획득 및 가공.** 1.2mm의 표적 주변으로 동위원소에 의해 다양한 해상도로 1.5-T MRI 및 시상 용적측정 3D MPRAGE를 받은 피험자를 분석에 포함시켰다. 온라인(www.loni.ucla.edu/ADNI) 및 보다 상세히 문헌[샤우(Shaw, L.M.) 등(2009)]을 참조한다. 이용된 해마 및 뇌실 용적은 2014년 7월 15일자로 다운로드된 ADNIMERGE R 패키지의 일부로서 ADNIMERGE 초기 표에 있는 것들이다. 단지 CN 및 MCI 피험자만이 MRI 분석에 포함되었다. MRI 스캔을 기선, 6 개월, 1년째 및 이어서 6년 동안 매년 수행하였다.

[0172] **통계학적 분석.** 모든 통계학적 작업을, 패키지 ggplot2[팀(Team, R.C.)의 문헌(2014)], nlme[워크함(Wickham, H.)의 문헌(2009)], car[핀헤이로(Pinheiro, J.), 배特斯(Bates, D.), 데브로이(DebRoy, S.), 사카르(Sarkar, D.) 및 팀(Team, R.C.)의 문헌(2014)] 및 디듀서(Deducer)[폭스(Fox, J.) 및 와이스버그(Weisberg, S.)의 문헌(2011)]를 사용하여 R(버전 3.1.0)[잭(Jack, C.R., Jr.) 등의 문헌(2008)]에 의해 수행하였다. 회귀 모델, 나머지의 정상 분포 및 다중공선성(multicollinearity)의 부채를 적용하기에 필요한 조건들을 시험하였다. 모든 모델이 이를 조건을 충족시켰다. 아카이케 정보 기준(AIC: Akaike information criterion), 및 베이에시안 정보 기준(BIC: Bayesian information criterion)을 사용하여 스텝 다운(step down) 회귀를 통해 최소 모델을 수득하여, 중심 가설이 유지되도록 보장하였다. 만일 하나 이상의 공변인(covariate)이 소실된다면 피험자를 분석에서 제외시켰다. 피험자가 조기에 연구에서 탈퇴할 경우, 이들이 탈퇴한 시점에 이를 데이터를 모델링에 포함시켰다. 정규성(normality)을 보장하기 위해 변수 CSF 페리틴, 인자 H, 타우 및 혈모글로빈을 자연 로그-변형시킨 반면: ADAS-cog13을 제곱근 변형시켰다.

[0173] 진단 군 전반에 있어서 각각의 CSF 생체표지자에서의 차이점을 사정하는 ANCOVA 모델은 초기에 연령, 성별, BMI, ApoE 유전자형, 및 CSF 혈모글로빈(Hb) 및 인자 H의 수준을 포함하였다. 혈장 페리틴을 CSF 샘플내로 도입하는 외상성 천자의 가능성에 대해 제어하기 위해, 혈액 오염에 대한 프록시(proxy)로서 CSF Hb를 포함시켰다. 페리틴 수준이 특정 염증 증상에서 상승되는 것으로 공지되어 있으므로, 염증을 조절하기 위해 FH를 사용하였다.

[0174] CSF 페리틴 및 ApoE의 다중 회귀 모델은 초기에 연령, 성별, BMI, ApoE 유전자형, 및 CSF 혈모글로빈(Hb) 및 인자 H의 수준 + CSF 타우, A β ₁₋₄₂ 및 페리틴 또는 ApoE의 다양한 포함물을 함유하였다. 최소 모델은 표 5의 표 범례에 기재된다.

[0175] 기선 알츠하이머병 사정 척도 인지(ADAS-cog13: Alzheimer's Disease Assessment Scale Cognition) 및 레이 언어 학습 시험(RVLT: Rey Verbal Learning Test) 스코어와 CSF 페리틴, CSF 타우/A β ₁₋₄₂ 비율 및 CSF ApoE 사이의 연관성을 각각의 인지 척도에 대해 공변인 조정된 다중 회귀에 의해 시험하였다. 이를 분석을 위해, 연령,

성별, BMI, 학력, APOE-ε 4 대립유전자 및 기선 진단을 초기에 공변인으로서 포함시켰다. 기선 CSF 페리틴 수준과 종적 임상적 결과(7년에 걸친 ADAS-cog13 및 RVLT 스코어)의 연관성을 사정하기 위해, 선형의 혼합 효과 모델을 사용하였다. 이들 모델을 인지의 기선 모델과 동일한 변수에 대해 조정하였고, 추가적으로 각각의 CSF 생체표지자와의 상호작용 변수로서 시간을 포함시켰다. 이들 상호작용 항에 대한 유의적인 값은, 그 변수가 인지 변화의 속도에 영향을 주었음을 지시할 것이다. ADAS-cog13 종적 분석의 경우, 최소 모델은 학력, 성별, 및 APOE-ε 4 대립유전자를 포함하였다. RVLT에 의한 종적 분석의 경우, 최소 모델은 학력 및 성별을 포함하였다.

[0176] 콕스 비례 위험 모델을 사용하여 AD 전환으로의 시간에 미치는 CSF 피분석물의 영향을 사정하였다. 초기 모델은 기선에서의 연령, 성별, 학력 및 APOE-ε 4 유전자형을 혼재 변수로서 CSF ApoE, 타우/Aβ₁₋₄₂ 및 페리틴과 함께 포함하였다. BIC 스텝 다운 절차 및 로그 우도(log likelihood) 시험을 통해 단지 CSF 생체표지자만을 포함하는 최소 모델을 식별하였다. 로지스틱 회귀 분석을 사용하여 AD로의 전환 위험에 미치는 CSF 피분석물의 영향을 사정하였다. 기선에서의 연령, 성별, 학력, ApoE 유전자형 및 BMI에 대해 조정된, AD로의 MCI 전환의 로지스틱 회귀 모델에 CSF 페리틴, ApoE 및 타우/Aβ₁₋₄₂ 피분석물의 조합물을 포함시켰다. 이들 모델은 102개월 까지 AD로의 진단 변화를 갖는 MCI 참가자들로부터 안정한 MCI 참가자들을 식별하는데 있어서 이들 피분석물의 예측 수행을 결정하였다. 수신기-작동기 곡선 및 곡선하 면적을 로지스틱 회귀 모델의 예측 가능성으로부터 유도하였다.

[0177] 연령, 학력, BMI, 성별 및 ApoE 유전자형 및 두개내 용적에 대해 조정된 선형 혼합 모델을 사용하여, 해마 및 측뇌실에 대한 종적 구조적(MRI) 변화와 CSF 페리틴, ApoE, 타우/Aβ₁₋₄₂ 사이의 관계를 분석하였다. 모든 모델의 경우, CSF 페리틴, ApoE, 타우/Aβ₁₋₄₂ 및 기선 진단을 고정된 효과로서 포함시켰고, 최소 모델로부터 제거하지 않았다. 2개의 랜덤 효과, 즉 절편 및 기울기(시간)를 또한 포함시켰다. 시간 및 진단, 시간 및 CSF 페리틴, 시간 및 CSF ApoE, 뿐만 아니라 시간 및 CSF 타우/Aβ₁₋₄₂ 사이의 상호작용을 또한 모든 모델에 포함시켰다.

[0178] 수가 적고 후속-방문(follow-up)이 짧았으므로 모든 AD 피험자를 MRI 분석으로부터 배제시켰다. ADNI로부터의 PET 영상 데이터를 분석에 포함시키지 않았는데, 이는 CSF 페리틴이 측정되고 기선에서 PET 영상을 찍은 환자의 수가 너무 적었기 때문이다.

[0179] (ii) 결과

[0180] **CSF 페리틴 및 AD의 생체표지자 사이의 관계.** 다른 보고와 일치하여, CSF 페리틴 수준은 ADNI 코호트에서 인지적으로 정상적(CN; n = 91), 경도 인지 장애(MCI; n = 144) 및 AD(n = 67) 피험자 사이에서 차이가 없었다(ANCOVA: P = 0.591; 표 4).

[0181] [표 4]

[0182] 진단에 의해 계층화된, 본 연구에 사용된 ADNI 코호트로부터의 피험자의 기선 특징

	단위	CN	MCI	AD	p
n	-	91	144	67	NA
연령	년수(S.D.)	75·74 (5·43)	74·85 (7·2)	74·57 (7·61)	0·502
여성	n (%)	46 (50·55)	47 (32·64)	29 (43·28)	0·021
학력	년수(S.D.)	15·67 (2·94)	15·91 (2·95)	15·01 (2·96)	0·123
APOE-ε4 +ve	n (%)	22 (24·18)	75 (52·08)	46 (68·66)	6·50x10 ⁻⁸
ADAS-Cog13	단위 (S.D.)	9·51 (4·16)	19·19 (5·94)	29·22 (8·21)	2·75x10 ⁻⁵⁶
CSF 페리틴	ng/ml (S.D.)	6·4 (2·07)	6·95 (2·72)	6·94 (2·99)	0·591
CSF ApoE	μg/ml (S.D.)	7·3 (2·21)	7·1 (2·22)	6·35 (2·27)	0·012
CSF 타우	pg/ml (S.D.)	69·78 (28·01)	104·3 (52·41)	122·63 (57·47)	4·57x10 ⁻⁷
CSF p타우	pg/ml (S.D.)	24·77 (13·34)	36·39 (16·09)	41·39 (20·76)	1·13 x10 ⁻⁶
CSF Aβ ₁₋₄₂	pg/ml (S.D.)	205·31 (56·38)	161·06 (52·06)	142·16 (36·84)	2·29 x10 ⁻⁶
CSF 타우/Aβ ₁₋₄₂	단위 (S.D.)	0·39 (0·26)	0·75 (0·5)	0·94 (0·52)	7·80x10 ⁻⁹
해마	mm ³ (S.D.)	7219·6 (848·6)	6230·9 (1047·8)	5766·6 (1283·2)	6·71x10 ⁻²⁰
측뇌실	mm ³ (S.D.)	34052·62 (16528·1)	44842·52 (23574·05)	49902·53 (26896·68)	3·35x10 ⁻⁵

[0183]

[0184] CN - 인지적으로 정상적; MCI - 경도 인지 장애; AD - 알츠하이머병. 조정되지 않은 단위 값이 표에 제공된다. p 값은 CSF 피분석물의 ANCOVA 모델에 대해 제공되고, MRI 뇌 구조를 연령, 성별, 학력, BMI, ApoE 유전자형, CSF 헤모글로빈 및 CSF 인자 H에 대해 조정하였다. 두개내 용적을 또한 뇌 구조의 ANCOA 모델에 포함시켰다.

[0185] 뇌 아밀로이드 축적량을 쉽게 반영하도록 코호트를 CSF A β_{1-42} 수준에 따라 분리할 경우 페리틴 수준에 변화가 없었다[192 ng / l의 것으로; 맷선(Mattsson, N.) 등의 문헌(2014)에 이전에 제안된 바와 같음](ANCOVA: P = 0.946). 그러나, AD17의 확립된 CSF 생체표지자(타우, p-타우, A β_{1-42})를 포함하는 페리틴의 다중 회귀 모델링에서, CSF 페리틴 수준을 p-타우에 의해서는 아니지만 A β_{1-42} (부분적 R² = 0.013, P = 0.029) 및 타우(부분적 R² = 0.086, P<0.001; 모델 1, 표 1)에 의해 예측하였다.

[0186] [표 1]

[0187] CSF 페리틴 및 알츠하이머병의 CSF 생체표지자 사이의 관계에 대한 모델링

모델	A β_{1-42}			타우			ApoE			ApoE ²		
	B	pR ²	p-값	B	pR ²	p-값	B	pR ²	p-값	B	pR ²	p-값
M1	0.051	0.013	0.029	0.129	0.086	4.12x10 ⁻⁸	-	-	-	160	189.5	
M2	0.003	0.000	0.904	0.026	0.003	0.219	0.213	0.236	7.69x10 ⁻²²	0.045	0.028	0.0004
M3	-	-	-	-	-	-	0.224	0.341	4.04x10 ⁻²⁵	0.047	0.049	0.0002
	23						93.32	111.7				

[0188]

[0189] CSF 페리틴 수준 및 2개의 확립된 CSF 생체표지자, A β_{1-42} 및 타우(M1 및 M2) 사이의 연관성, 뿐만 아니라 CSF 페리틴 수준 및 더욱 신규한 후보 CSF 생체표지자, ApoE 단백질 수준(M2 및 M3) 사이의 연관성을 연구하는 3가지 모델을 제시한다. 모든 모델은 초기에 다음과 같은 변수를 포함하였다: 연령, 성별, BMI, ApoE 유전자형,

기선 진단, 및 CSF 타우, p-타우, A β ₁₋₄₂, Hb 및 FH의 수준. M2 및 M3은 추가적으로 ApoE CSF 수준을 포함하였다. **M1** 최소 모델은 다음을 포함하였다: ApoE 유전자형, 타우, BMI, 성별, 및 FH. **M2** 최소 모델은 ApoE 유전자형 및 ApoE 수준을 포함하였고; 타우 및 A β ₁₋₄₂가 보유되었다. **M3** 최소 모델은 M2와 동일하게 포함하였지만, 타우 및 A β ₁₋₄₂는 강하하였다. AIC - 아카이케 정보 기준, BIC - 베이에시안 정보 기준.

[0190]

아포지질단백질 E 유전자(*APOE*) 대립유전자가 AD에 대한 주요 유전적 위험이고[코르더(Corder, E.H.) 등의 문헌(1993)], CSF 아포지질단백질 E 단백질(ApoE) 수준이 A β ₁₋₄₂[크루차가(Cruchaga, C) 등의 문헌(2012); 마르티네즈-모릴로(Martinez-Morillo, E.) 등의 문헌(2014)] 및 타우[톨레도(Toledo, J.B.) 등의 문헌(2014); 마르티네즈-모릴로(Martinez-Morillo, E.) 등의 문헌(2014)]와 연관되므로, CSF ApoE 수준을 포함하도록 모델을 다시 제작하였다. 이는 페리틴 및 기타 생체표지자 사이의 관계를 폐지하였다(A β ₁₋₄₂: R²<0.001, P = 0.904; 타우: R² = 0.003, P = 0.219; 모델 2, 표 1). 놀랍게도, 이런 이유로 ApoE 및 페리틴 사이의 강한 관계가 검출되었고(일차항 부분 R² = 0.243, P = 7.69×10⁻²²), 이는 타우(비-유의적 항)가 모델로부터 제거되었을 때 증진되었다(일차항 부분 R² = 0.341, P = 1.52; 모델 3, 표 1, 도 3a).

[0191]

모델 3에서, ApoE 유전자형은 CSF 페리틴에 강한 영향을 미치고(P = 1.10 × 10⁻⁸), 주요 AD 위험 대립유전자, ε 4는 비-ε 4 담체에 비해 22% 더 높은 수준을 유도한다(도 3b). 호혜적으로, CSF ApoE의 다중 회귀 모델링에서, APOE-ε 4-양성 괴자는 비-ε 4 담체와 비교하여 더욱 낮은 ApoE 수준(-16%; P = 2.50×10^{-0.9})을 가졌다(도 3c). 혈장 페리틴 수준은 혈장 ApoE 수준 또는 APOE-ε 4 대립유전자 상태와 연관되지 않았지만, 혈장 페리틴 및 CSF 페리틴 수준 사이에 약간의 연관성이 있었다(β = 0.075, P = 0.0002).

[0192]

페리틴과 신경정신병 사정의 연관성. AD에서 CSF 페리틴 및 인지 수행의 관계를 검사하였다. AD 생체표지자 및 기타 임상적 변수를 포함하는 다중 회귀 모델에서 기선 ADAS-Cog13(알츠하이머병 사정 척도) 스코어는 CSF 페리틴(P = 0.006; 표 5), ApoE 수준(P = 0.0003) 및 타우/A β ₁₋₄₂ 비율(P = 0.025)과 독립적으로 연관되었다. 3분위수 분석에서, 낮은 수준(<5.4 ng/ml)과 비교되는 페리틴의 높은 수준(47.2 ng/ml)은 약 3 포인트 더 불량한 ADAS-cog13 스코어와 연관되었다(도 4a). 유사하게, 이전에 보고된 바와 같이[톨레도(Toledo, J.B.) 등의 문헌(2014); 케스터(Kester, M.I.) 등의 문헌(2009)], 3분위수에서, 더 낮은 수준의 ApoE(도 4b)는 약 4 포인트 더 불량한 ADAS-Cog13과 연관되고, 더 높은 타우/A β ₁₋₄₂ 비율은 약 2 포인트 더 불량한 ADAS-Cog13과 연관되었다(도 4c).

[0193]

CSF 페리틴의 기선 값이 종적 인지 결과를 예측하는지의 여부를 결정하기 위해, 7년에 걸친 연간 ADAS-Cog13 스코어의 혼합 효과 모델을 작성하였고(통계를 위해 표 5 참조, 환자 수를 위해 표 2 참조), 이전에 보고된 바와 같이[톨레도(Toledo, J.B.) 등의 문헌(2014); 케스터(Kester, M.I.) 등의 문헌(2009)], ApoE(P = 0.006) 및 타우/A β ₁₋₄₂ 비율(P = 2.7×10⁻⁷) 둘 다 여전히 인지 변화의 속도(시간과 상호작용됨)와 연관되는 것으로 판찰되었다. 그러나, 페리틴은 일정한 교차 감소분으로 ADAS-Cog13에 영향을 주었다(P = 4.93×10⁻⁴, 단지 주요 효과만; 표 5).

[0194]

[표 2]

[0195]

종적 인지 사정을 위한 환자의 수(BI: 기선, CN: 인지적으로 정상적, MCI: 경도 인지 장애, AD: 알츠하이머병)

	CN	MCI	AD
BI	88	137	63
6개월	88	137	61
1년	86	138	63
2년	82	123	52
3년	78	97	4
4년	55	47	2
5년	49	39	0
6년	54	37	0
7년	43	27	0

[0196]

[0197]

[표 5]

[0198] AD 결과에 미치는 CSF 생체표지자의 연관성에 대한 모델링

모델	페리틴*	타우/A β_{1-42}	ApoE
인지 인지(MR)	β (se) 0.439 (0.050) p 0.006	β (se) 0.104 (0.046) p 0.025	β (se) -0.178 (0.049) p 0.0003
ADAS-Cog13 [†]	-1.77 (0.559) p 0.0017	NS	1.033 (0.561) p 0.0677
총 측 인지(MELM)	β (se)	β (se)	β (se)
ADAS-Cog13 [†]	β (se) 0.173 (0.051) p 0.0005	β (se) 0.129 (0.049) p 0.0009	β (se) -0.180 (0.051) p 0.0004
주요 효과	-0.0035 (0.016) p 0.977	-0.0811 (0.016) p 2.70x10 ⁻⁵	-0.044 (0.016) p 0.006
상호작용-시간	-1.60 (0.63) p 0.035 (0.152)	-0.847 (0.608) p 0.812 0.827	0.165 p 1.03 (0.63) p 0.379 (0.152)
주요 효과	-0.035 (0.152) p 0.827	-0.610 (0.150) p 4.85x10 ⁻⁵	0.066 p 0.379 (0.152)
상호작용-시간	-1.10 (1.01-1.19) p 0.030	1.53 (1.03-2.28) p 0.037	0.066 p 0.83 (0.73-0.95)
AD로의 MCI 전환	2.32 (1.88-2.90) p 8.60x10 ⁻¹¹	1.45 (1.16-1.83) p 0.0001	0.33 (0.30-0.48) p 1.83x10 ⁻²
-Cox (위험비)			
-LR (승선비)			
MRI 위축 속도 (MELM)	β (se) -10.33 (7.06) p 0.008	β (se) -35.31 (7.79) p 0.008	β (se) 21.38 (8.02) p 0.008
-해마 #	0.0071 (0.003) p 0.008	4.13x10 ⁻⁸ p 0.003	0.0082 p 0.003
-측뇌실 #			

[0199]

[0200]

모든 모델은 초기에 다음의 변수를 포함하였고: 연령, 성별, BMI, ApoE 유전자형, 기선 진단; MRI 모델은 추가적으로 두개내 용적을 포함하였다. 인지 모델을 위한 최소 모델은 기선 진단, 성별, 학력 및 AD CSF 생체표지자를 포함하였다. 콕스 비례 위험 모델(Cox)을 위한 최소 모델은 단지 AD CSF 생체표지자만을 포함하였다. MRI 모델을 위한 최소 모델은 연령, 성별, 기선 진단, 학력, APOE-ε 4 상태, 및 두개내 용적을 포함하였다. 이 용가능한 데이터를 갖는 모든 피험자들을 인지 모델에 포함시켰다. 기선에서 MCI로서 분류된 피험자들만을 MCI 전환 모델에 포함시켰다. MRI 모델은 기선에서 인지적으로 정상적인 것으로 분류되거나 MCI로 분류된 피험자를 포함하였다. 기선에서 AD 피험자는 수가 적고 후속-방문을 하지 못하여 포함되지 않았다(표 3). *전환 모델의 통계분석은 각각의 피분석물(페리틴: 3.3 ng/ml, 타우/A β_{1-42} : 0.67 단위; ApoE: 3.1 μg/ml)에 대한 1 사분위 수간 범위 변화에 기초하였다. [†]페리틴 값을 로그 변형하여, 비-매개변수 Cox 및 LR 모델을 배제하였다. [‡]β-계수는 ADAS-Cog13의 제곱근에 대한 것이다. [#]측뇌실의 경우, β-계수는 뇌실 용적의 자연 로그에 대한 것이다. MR: 다중 회귀. MELM: 혼합 효과 선형 모델. Cox: 콕스 비례 위험 모델. LR: 로지스틱 회귀. NS: 유의적이지 않음.

[0201]

대조군 및 MCI 환자를 구별하는데 있어서 더욱 민감한 레이 언어 학습 시험(RVLT)을 사용하여 인지를 모델링하

였다. 이러한 모델에서, 페리틴 수준만이 교차 인지 수행과 연관되었지만($P = 0.0017$; 표 5, 도 4d), CSF 페리틴은 종적 모델에서 저하 속도와 연관되지 않았다($P = 0.817$; 표 5). 기선 타우/ $A\beta_{1-42}$ 비율($P = 4.85 \times 10^{-5}$)은 RVLT에서 인지 쇠퇴의 속도와 연관되었지만, 단지 ApoE에 대한 경향만 존재하였다($P = 0.066$). 이런 이유로, 두 인지 척도에서, CSF 페리틴은 질환 상태와 무관하게 일정한 양으로 수행에 영향을 미친다.

[0202] 만일 높은 페리틴 수준이 시간에 따라서 일정한 값으로 인지 수행을 악화시킨다면, 높은 페리틴 수준을 갖는 MCI 개별자는 비교적 더욱 초기 구간에 AD 진단에 대한 기준을 만족시킬 것이다. 이를 조사하기 위해, CSF 페리틴, ApoE 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ 가 측정된 144명의 MCI 피험자에 대해 콜스 비례 위험 모델을 사용하였다. 7년에 걸친 MCI 전환의 최소 모델에서(단지 이를 CSF 생체표지자만을 포함함; 표 5), 페리틴($P = 0.03$; 도 5a), ApoE($P = 0.008$; 보충적 도 6a) 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ ($P = 0.037$; 보충적 도 6b)는 각각 유의적인 예측 변수였다.

[0203] 이러한 모델을 사용하여, 각각의 생체표지자의 각각의 5분위수에 대한 50% 생존에 필요한 개월 수를 측정하였다. 이를 값의 선형 모델을 각각의 피분석물의 5분위수 경계를 위한 값(지정된 단위; x-축)에 대하여 작성하였다(개월; y-축). 이를 가능한 기울기는 기선 CSF 피분석물에서 1 단위 변화와 연관된 전환의 평균 연령에서의 변화(개월)를 추정한다. 생체표지자들 사이의 비교를 위해, 변화를 피분석물 값에 대한 s.d. 변화와 연관된 전환의 평균 연령으로 표시하였다. 페리틴으로의 1의 s.d. 변화는 전환 연령에서 9.5-개월의 전이와 연관되고, 이는 ApoE 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ 의 경우 각각 18.2 및 8.6인 것과 비교된다(도 5b).

[0204] 별도의 조정된 로지스틱 회귀 모델에서, 그의 사분위수간 범위에 의한 각각의 생체표지자의 기선 농도에서의 증가는 페리틴(OR: 1.36, 95% CI: 1.17 내지 1.58) 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ 비율(OR: 1.13, CI: 0.95 내지 1.35)의 경우 AD로의 전환의 승산비를 증가시켰고, ApoE의 경우 승산비를 감소시켰다(OR: 0.72, CI: 0.61 내지 0.85). 하나의 모델에 모든 3개의 피분석물을 포함시키는 것은 각각의 피분석물의 예측 값을 증가시켰다(OR(CI): 페리틴 = 2.32[1.86 내지 2.9], 타우/ $A\beta_{1-42}$ = 1.45[1.16 내지 1.8], ApoE = 0.38[0.3 내지 0.48]; 표 5).

[0205] 로지스틱 회귀 모델에 기초한 수신기-작동 곡선은 AD로의 전환을 예측하는 이를 피분석물의 정확도를 결정하였다. 기본 모델(연령, 성별, 학력, BMI, APOE-ε 4 유전자형)의 곡선하 면적(AUC)은 0.6079였고(도 5c), 이는 페리틴(AUC: 0.6321; 도 2b), ApoE(0.6311; 도 2c)의 단일 포함물에 의해 또는 미미하게는 타우/ $A\beta_{1-42}$ (0.6177; 도 2d)에 의해 증가되었다. 타우/ $A\beta_{1-42}$ 가 ApoE를 함유하는 모델에 포함되는 경우, AUC는 약간 증가하였다(0.6311로부터 0.6483까지; 도 5d). AD에 대한 확립된 CSF 생체표지자와 조합된 이러한 수행은, 페리틴 값을 첨가함으로써 현저히 개선되었다(0.6483에서 0.6937로; 도 5e).

[0206] **페리틴과 뇌 위축의 연관성.** 6년에 걸친 기간 동안 1년 간격으로 CN 및 MCI 피험자에 대하여 페리틴 수준이 해마 및 측뇌실 영역으로의 신경해부학적 변화와 연관되는지의 여부를 조사하였다(환자 수에 대해 표 3 참조).

[0207] [표 3]

[0208] 종적 MRI 사정을 위한 환자 수(BI: 기선, 인지적으로 정상적. MCI: 경도 인지 장애. AD: 알츠하이머병)

	CN	MCI	AD
BI	79	108	48
6개월	80	108	49
1년	74	96	37
2년	66	85	35
3년	57	62	0
4년	38	35	0
5년	26	24	0
6년	24	14	0

[0209]

[0210] 다른 생체표지자가 또한 모델링에 포함될 경우의 CSF 페리틴의 영향이 연구된 반면, CSF 페리틴은 단독으로 고려되는 경우 다양한 뇌 구조의 위축을 예측하는 것으로 이전에 제시되었다. 기선 ApoE, 페리틴 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ 값은 각각 독립적으로 조정된 종적 모델에서 해마 용적을 예측하였다(표 5). 해마의 위축 속도는 높은 CSF 페리틴을 갖는 개별자에서 더욱 빨랐다($P = 0.02$; 도 6a). 낮은 CSF ApoE($P = 0.008$; 도 6b) 또는 높은 타우/A

β_{1-42} ($P = 6.80 \times 10^{-6}$; 도 6c)는 또한 위축을 예측하였다. 시간에 따른 측면적 확대는 독립적으로 높은-CSF 페리틴($P = 0.008$; 도 6d), 낮은-CSF ApoE($P = 0.0002$; 도 6e), 또는 높은 Q5 타우/ $A\beta_{1-42}$ ($P = 4.19 \times 10^{-8}$; 도 6f)와 유사하게 연관되었다.

[0211] (iii) 논의

[0212] 이들 분석에 따르면 CSF 페리틴 수준은 ADNI 코호트에서의 인지 수행과 독립적으로 관련되었고 AD로의 MCI 전환을 예측하였다. 이들 결과에 미치는 페리틴의 영향 크기는 확립된 생체표지자, ApoE 및 타우/ $A\beta_{1-42}$ 와 필적할만하였지만; 페리틴의 영향의 성질은 동일하지 않았다. 페리틴은 연구 기간 동안 인지 수행에서 일정한 전이와 연관된 반면(도 7a), 다른 생체표지자와 연관된 감소분은 시간에 따라 확대되었다(도 7b). 높은 페리틴 수준에 대응하는 하향 전이(더욱 불량한 인지 제공)(1 ng/ml의 페리틴 당 1.77 RVLT 포인트; 표 5)는 진단의 더 빠른 연령을 초래한다(1 ng/ml의 페리틴 당 3 개월; 도 5b). 이는 AD 개시 연령이 빠른 환자가 더 늦게 개시하는 환자에 비해 더 큰 신피질 철분 축적량을 갖는다는 발견과 일치할 것이다. 종합적으로, 이들 데이터는 뇌 철분을 더 낮추는 치료학적 전략을 고려하도록 지지하고, 이는 알츠하이머병 및 파킨슨병의 상 II 실험에서 유리한 결과를 보고하였다. 데페리프론과 같은 약물로부터 기대되는 것처럼 CSF 페리틴을 낮추는 것은 생각컨대 MCI의 AD로의 전환을 3년이나 지연시킬 수 있을 것이다.

[0213] 이러한 데이터는 AD 원인 발병 과정에서의 철분에 대한 탐구 이해를 제공하여, ApoE와 페리틴의 예기치못한 상호작용을 식별한다. 이러한 페리틴 수준은 APOE- ϵ 4 대립유전자에 의해 증가하여, ApoE가 페리틴 수준에 영향을 준다는 것을 그의 반대에 비해 분명히 보여준다. 이들 발견은 ApoE 유전자형이 구성요소적 뇌 철분 축적량에 영향을 준다는 사실을 지시한다.

[0214] 이들 데이터는 APOE- ϵ 4 상태가 페리틴 수준을 증가시킴으로써 AD에 대한 감수성을 제공한다는 개념을 뒷받침한다.

[0215] 본 실시예는, 기선 CSF 페리틴 수준이 7년에 걸쳐 91명의 인지적으로 정상적인 피험자, 144명의 경도 인지 장애(MCI) 피험자 및 67명의 AD 피험자에서 인지 수행과 부정적으로 연관되었고, MCI의 AD로의 전환을 예측하였음을 보여준다. 페리틴은 CSF 아포지질단백질 E 수준과 강하게 연관되고 알츠하이머의 위험 대립유전자, APOE- ϵ 4에 의해 상승되었다. 이들 결과는, 상승된 뇌 철분이 AD 진행에 부정적인 영향을 줌을 밝혀내고, AD에 대한 주요 유전적 위험 인자인 APOE- ϵ 4에 대한 가능한 기작으로서 뇌 철분 상승을 도입한다.

[0216] 실시예 2: 뇌척수 페리틴은 임상전 APOE- ϵ 4 담체에서 인지 쇠퇴의 위험을 결정한다.

[0217] 아포지질단백질 E(APOE)의 ϵ 4 대립유전자는 알츠하이머병(AD)에 대한 가장 큰 위험을 부여하고, 최근의 데이터는 위험 매개자로서 뇌철분 적재량이 관여됨을 시사하는데, 이는 ϵ 4 운반체가 뇌척수(CSF) 페리틴을 대략 20% 상승시키기 때문이다[아이톤(Ayton S) 등의 문헌(2015)]. CSF 페리틴 수준은 AD로 전이되는 경도 인지 장애(MCI) 피험자에 대한 위험 및 종적 인지 수행을 예측한다. 본 실시예는 CSF 페리틴이 7년에 걸쳐 정상인에서 인지 쇠퇴를 예측하는데 있어서 확립된 AD 위험 변수, APOE- ϵ 4, CSF 타우/ $A\beta_{1-42}$ 및 ApoE와 조합됨을 보여준다.

[0218] (i) 방법

[0219] 본 실시예는 알츠하이머병 신경영상 이니셔티브(ADNI) 데이터베이스(adni.loni.usc.edu; 2014년 7월 15일)로부터 수득된 데이터를 사용하였다.

[0220] $A\beta_{1-42}$, 타우[루미넥스(Luminex)], ApoE, 페리틴의 기선 CSF 수준(미리아드 룰스 베이스드 메디슨) 및 종적 레이 시청각 학습 과제[RAVLT(longitudinal Ray Auditory-Visual Learning Task); 초기 변화에 대해 민감함] 및 AD 사정 척도-인지 소집합(ADAS-Cog13) 스코어를, R에 의한 선형의 혼합 효과 모델(버전 3.2.1)에 의해 분석하였다. 다중공선성의 부재 및 정규성을 확인하였다. 초기에 탈퇴한 피험자로부터의 데이터를 탈퇴 시점에 포함시켰다.

[0221] (ii) 결과

[0222] 치매전 피험자의 초기 모델링(표 6)으로부터, 인지 수행에 대한 타우/ $A\beta_{1-42}$ 비율 및 시간 사이의 2-방식 상호작용이 밝혀졌고(RAVLT: $P = 0.011$; ADAS-Cog13: $P = 0.0011$), 이로써 상기 지표가 인지 저하의 속도를 예측함을

확인하였다. 타우/A β_{1-42} 는 다음의 다른 AD 위험 인자와 상호작용하지 않았다: APOE- ϵ 4 상태, 진단, 페리틴, 또는 ApoE 수준(별도로, 또는 고차 항으로 조합됨). 대조적으로, CSF 페리틴은 시간, APOE- ϵ 4 및 진단과 4-방식 상호작용으로 인지를 예측하였다(RAVLT: P = 0.0169; ADAS-Cog13 P = 0.0297).

[0223] 인지적으로 정상적인(CN) 피험자 및 MCI 피험자의 분리된 모델링에서, 타우/A β_{1-42} 는 MCI(RAVLT: P = 0.072; ADAS-Cog13; P = 0.019) 및 CN(RAVLT: P = 0.039; ADAS-Cog13: P = 0.006; 도 8A 및 8B) 피험자에 대한 인지 저하를 예측하였고, 이러한 지표는 다른 포함된 변수와 상호작용하지 않았다.

[0224] 페리틴과의 모든 상호작용 항은 MCI 피험자에 대해 비-유의적이었지만, 인지 수행에 대한 유의적인 주요 효과가 존재하였다[RAVLT: P = 0.019; ADAS-Cog13: P = 0.042; 아이톤(Ayton S) 등의 문헌(2015)에 기재된 바와 같은 이전의 간략화된 모델링과 일치함]. 그러나, CN 피험자의 경우, 페리틴은 시간 및 ϵ 4와 3-방식 상호작용으로 인지 저하를 예측하였다(RAVLT: P = 0.0035; ADAS-Cog13: P = 0.010; 도 8C 및 8D). ϵ 4 상태에 따른 CN 피험자의 카테고리화로부터, 페리틴이 ϵ 4+ve 피험자에서 인지 쇠퇴를 강력히 예측하는 것으로 밝혀졌다(RAVLT: P = 0.0008; ADAS-Cog13: P = 0.016). ϵ 4-ve 피험자의 경우, 더 낮은 페리틴 수준은 ADAS-Cog13(P = 0.016)에서 인지의 미미한 저하를 예측하였지만 RAVLT에서는 그렇지 않았다(P = 0.477).

[0225] 최종적으로, 기선 CSF 페리틴을 시험하여, 이것이 쇠퇴하는(RAVLT 상에서 ≥ 1 포인트/1년 악화) CN ϵ 4-ve 피험자로부터 안정한 피험자를 구별하기 위해 사용될 수 있는지의 여부를 결정하였다. 수신기 작동 특징(ROC: Receiver Operating Characteristic) 곡선하 면적은 6.6 ng 페리틴/ml의 역치 예측값에서 0.96이었다(도 8E).

[0226] [표 6]

[0227]

환자 인구통계학 및 통계학적 모델

인구통계학	모든 피험자			단지 MCI			모든 CN			CN ε4 음성			CN ε4 양성		
	n	S.D. 또는 %	p	n	S.D. 또는 %	p	n	S.D. 또는 %	p	n	S.D. 또는 %	p	n	S.D. 또는 %	p
피험자	234			144			90			69			21		
APOE ε4 +ve	96	41%		73	52%		21	22%		0	0%		21	100%	
연령	73.2	6.6		74.9	7.2		75.7	5.3		75.6	5.2		76.0	6.4	
성별 (여성)	93	40%		47	33%		46	51%		38	53%		4	16%	
학력	15.8	3.0		15.9	3		15.8	3.0		15.7	2.8		14	3.1	
RAVLT															
제어 변수															
전단	17.08	1.02		NA	NA		NA	NA		NA	NA		NA	NA	
성별	11.96	1.69		2.83	0.095		16.17	0.807		12.91	0.806		4.84	0.644	
학력	7.16	0.298		0.25	0.616		17.75	0.802		15.454	0.802		3.11	0.096	
시험 변수/상호작용															
타우/Aβ ₁₋₄₂	1.10	0.295		1.43	0.233		0.94	0.153		0.329	0.368		0.152	0.048	
타우/Aβ ₁₋₄₂ × 시간	6.51	0.012		3.24	0.072		4.27	0.019		6.058	0.014		0.643	0.424	
페리틴*	0.159	0.801		5.55	0.039		0.018	0.004		0.047	0.838		0.441	0.901	
페리틴 × 시간 × ε4 × 전단*	5.73	0.0192		0.477	0.416		8.927	0.002		0.307	0.477		1.205	0.002	
ADAS-Cog13*															
제어 변수															
전단	11.2	1.03		NA	NA		NA	NA		NA	NA		NA	NA	
성별	4.02	0.267		0.283	0.598		40.3	0.002		19.534	0.402		0.927	0.452	
학력	6.76	0.416		1.03	0.306		9.65	0.004		13.973	0.804		0.061	0.962	
시험 변수/상호작용															
타우/Aβ ₁₋₄₂	2.59	0.109		2.78	0.038		0.06	0.005		0.007	0.933		0.01	0.952	
타우/Aβ ₁₋₄₂ × 시간	10.22	0.0014		5.00	0.026		7.61	0.006		7.638	0.006		1.829	0.100	
페리틴	4.31	0.221		4.22	0.042		1.67	0.004		1.985	0.164		1.218	0.246	
페리틴 × 시간 × ε4 × 전단*	4.73	0.027		0.237	0.627		6.69	0.004		5.838	0.016		6.044	0.016	

[0228]

CN 및 MCI 피험자에서 종적(7년) 인지 수행(RAVLT, ADAS-Cog13)의 별도의 공변인-조정된 선형의 혼합 효과 모델(AD 피험자는 후속-방문의 비율이 낮으므로 종적 분석으로부터 배제되었다). 아카이케 정보 기준 및 베이에 시안 정보 기준을 사용하여 최소 모델을 수득하기 이전에, 모델링에 초기에 포함된 변수는 다음과 같았다: 연령, 성별, BMI, 학력, APOE-ε4 대립유전자, 기선 전단, CSF 타우/Aβ, CSF ApoE, CSF 페리틴. NA: 적용불 가능. [#]ADAS-Cog13 변수는 제곱근 변형되었다. [#]CSF 페리틴은 자연 로그-변형되었다. ^{*}이러한 상호작용 변수는 코호트가 칼럼 표제에 따라 제한되는 경우 더 낮은 차수 항으로 단순화되었다. CN - 인지적으로 정상적; MCI - 경도 인지 장애; RAVLT - 레이 시청각 학습 시험; ADAS-Cog13-알츠하이머병 등급 척도-인지.

[0230]

(iii) 논의

[0231]

이들 데이터에 따르면, 비교적 낮은 페리틴(<6.6 ng/ml)을 갖는 CN ε4-ve 피험자는 예측가능한 미래에 인지 저하되지 않을 것이고, 이는 ε4-ve 피험자의 30%가 AD로 진행되지 않는 이유를 잠재적으로 설명할 수 있다. 역으로, 이러한 역치를 초과하는 페리틴의 각각의 단위 증가는 더욱 신속한 인지 저하를 예측하였다.

[0232]

이들 결과로부터, ε4 담체 및 비-담체에 미치는 CSF 페리틴의 현저히 상이한 영향이 밝혀졌다. ε4 담체에서 CSF 페리틴 수준은 모두 ≥4.5 ng/ml이지만, 비-ε4 피험자에서는 그 값의 절반 범위에 이르고, 여기서 피험자는 약간의 인지 저하를 나타낸다(도 8C 및 8D).

[0233] **실시예 3: 환자에서 인지 저하의 위험에 대한 사정**

[0234] 본 발명의 방법을 실행함에 있어서, 환자는 인지 능력의 수준에 대해 사정될 것으로 고려된다. 이러한 수준은 이들이 시간에 따라 인지 저하될 것인지의 여부를 결정하기 위한 근간을 설정할 것이다. 이들 환자는 이미 사정된 이후 인지 손상의 징후를 보일 수 있다.

[0235] CSF 샘플을 수득하고 CSF 페리틴 수준을 면역검정과 같은 방법에 의해 결정하였다. 이어서, 이러한 샘플을 동일한 방식으로 가공된 CN 환자로부터의 예정된 샘플과 비교한다.

[0236] 환자 및 CN 환자의 CSF 페리틴 수준에서의 차이를 결정한다. 차이의 정도에 따라서, 인지 저하도를 결정할 수 있다. 만일 차이가 크고 환자의 CSF 페리틴 수준이 CN 환자 수준에 비해 높다면, 사정받는 환자는 인지 저하에 대한 더 큰 위험을 나타낼 수 있다. 만일 차이가 CN 환자 수준에 비해 작다면, 사정받는 환자는 인지 저하에 대한 더 낮은 위험을 나타낼 수 있다.

[0237] 본 시험은 환자의 유전자형을 결정하기 위해 병행하여 실행될 수 있다. 만일 환자가 Apo ε 4 대립유전자를 갖는다면, 인지 저하의 위험은 더 높을 것이다.

[0238] **실시예 4: 환자에서 인지 저하의 모니터링**

[0239] 환자를 제1 시점에 실시예 3에 따라 시험한다. 제2 시험을 제1 시점 이후의 또 다른 시점에 실행한다. 환자의 CSF 페리틴 및 CN 환자로부터의 기준 수준 사이의 차이를 사정한다.

[0240] 이어서 이러한 차이를 제1 시점으로부터의 차이와 비교할 수 있다.

[0241] 만일 차이가 더 크다면, 인지 저하는 진전될 것이다.

[0242] 증가하는 CSF 페리틴 수준에 기초하여 인지 저하를 갖는 것으로 환자를 진단할 수 있다.

[0243] **실시예 5: 환자에서 인지 저하의 진행 속도 경감**

[0244] 환자를 이들의 CSF 페리틴 수준에 기초하여 인지 저하의 수준에 대해 실시예 3에서와 같이 사정한다. 테페리프론을 환자의 사이즈, 연령 및 체중에 의해 계산된 용량으로 일정 시간 동안 환자에게 투여한다.

[0245] 인지 저하가 경감되는지의 여부를 사정하기 위해 일정 시간 이후 인지 능력에 대해 환자를 재사정한다.

[0246] 본 발명의 선행된 기재내용을 통해 당분야의 숙련가는 현재 이의 최적의 방식으로 고려되는 사항을 구성하여 사용할 수 있지만, 당분야의 숙련가라면 본원에 특정 실시태양, 방법 및 실시예의 변형, 조합 및 동등물이 존재함을 이해하고 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 상기 기재된 실시태양, 방법 및 실시예에 의해 제한되지 않고, 본원에 광범위하게 기재된 바와 같은 본 발명의 범주 및 취지내의 모든 실시태양 및 방법에 의해 제한된다.

[0247] **참고문헌**

[0248] 알리-라흐마니(Ali-Rahmani, F.), 쉘그룬드(Schengrund, C.L.) 및 코노(Connor, J.R.)의 문헌["HFE 유전자 변형체, 철분 및 지질: 알츠하이머병에서의 신규한 연관성(HFE gene variants, iron, and lipids: a novel connection in Alzheimer's disease)". Frontiers in pharmacology 5, 165 (2014)].

[0249] 맥칸(McKhann, G.) 등의 문헌["알츠하이머병의 임상적 진단: 알츠하이머병에 대한 건강 및 인간 서비스 대책 위원회 부서의 원조하의 NINCDS-ADRDA 작업 군의 보고서(Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease)". Neurology 34, 939-944 (1984)].

[0250] 샤우(Shaw, L.M.) 등의 문헌["ADNI에서 CSF 생체표지자 분석의 분석적 및 임상적 수행의 정성화(Qualification of the analytical and clinical performance of CSF biomarker analyses in ADNI)". Acta neuropathologica 121, 597-609 (2011)].

[0251] 샤우(Shaw, L.M.) 등의 문헌["알츠하이머병 신경영상 이니셔티브 피험자에서의 뇌척수액 생체표지자 특징(Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects)". Annals of neurology 65, 403-413 (2009)].

[0252] 잭(Jack, C.R., Jr.) 등의 문헌["알츠하이머병 신경영상 이니셔티브(ADNI): MRI 방법(The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): MRI methods)". Journal of magnetic resonance imaging: JMRI 27, 685-

691 (2008)].

[0253] 팀(Team, R.C.) 등의 문헌[A Language and Environment for Statistical Computing, (R Foundation for Statistical Computing, 2014)].

[0254] 위크함(Wickham, H.)의 문헌[ggplot2: elegant graphics for data analysis, (Springer New York, 2009)].

[0255] 핀헤이로(Pinheiro, J.), 바테스(Bates, D.), 데브로이(DebRoy, S.), 사카르(Sarkar, D.) 및 팀(Team, R.C.)의 문헌[nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2014)].

[0256] 폭스(Fox, J.) 및 와이스버그(Weisberg, S.)의 문헌[An R Companion to Applied Regression, (Sage, 2011)].

[0257] 맷선(Mattsson, N.) 등의 문헌["인지적으로 건강한 노인에서 뇌 위축 속도에 미치는 뇌척수액 단백질의 영향(Effects of cerebrospinal fluid proteins on brain atrophy rates in cognitively healthy older adults)". Neurobiology of aging 35, 614-622 (2014)].

[0258] 코르더(Corder, E.H.) 등의 문헌["늦은 개시의 가계에서 알츠하이머병의 위험 및 아포지단백질 E 유형 4 대립유전자의 유전자 용량(Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families)". Science 261, 921-923 (1993)].

[0259] 크루차가(Cruchaga, C) 등의 문헌["뇌척수액 APOE 수준: 알츠하이머병에 대한 유전학적 연구를 위한 내적표현형(Cerebrospinal fluid APOE levels: an endophenotype for genetic studies for Alzheimer's disease)". Human molecular genetics 21, 4558-4571 (2012)].

[0260] 마르티네즈-모릴로(Martinez-Morillo, E.) 등의 문헌["알츠하이머병 환자 및 대조군으로부터의 뇌척수액 및 혈장에서 총 아포지단백질 E 수준 및 특이적 이소폼 조성(Total apolipoprotein E levels and specific isoform composition in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients and controls)". Acta neuropathologica (2014)].

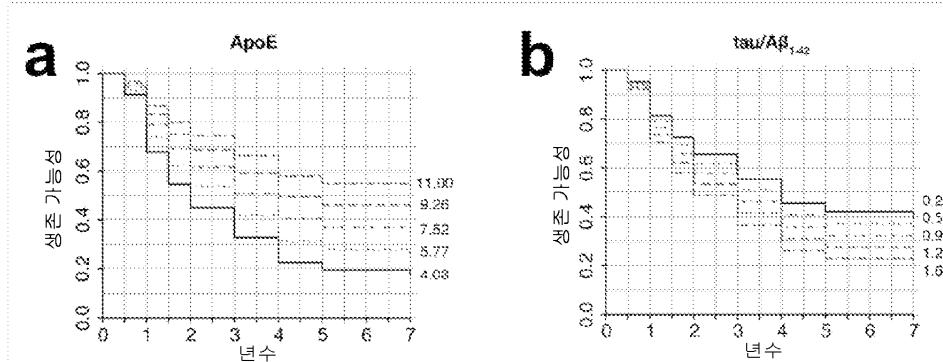
[0261] 톨레도(Toledo, J.B.) 등의 문헌["CSF 아포-E 수준은 인지 쇠퇴 및 MRI 변화와 연관된다(CSF Apo-E levels associate with cognitive decline and MRI changes)". Acta neuropathologica 127, 621-632 (2014)].

[0262] 케스터(Kester, M.I.) 등의 문헌["CSF 생체표지자는 알츠하이머병에서 인지 쇠퇴의 속도를 예측한다(CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease)". Neurology 73, 1353-1358 (2009)].

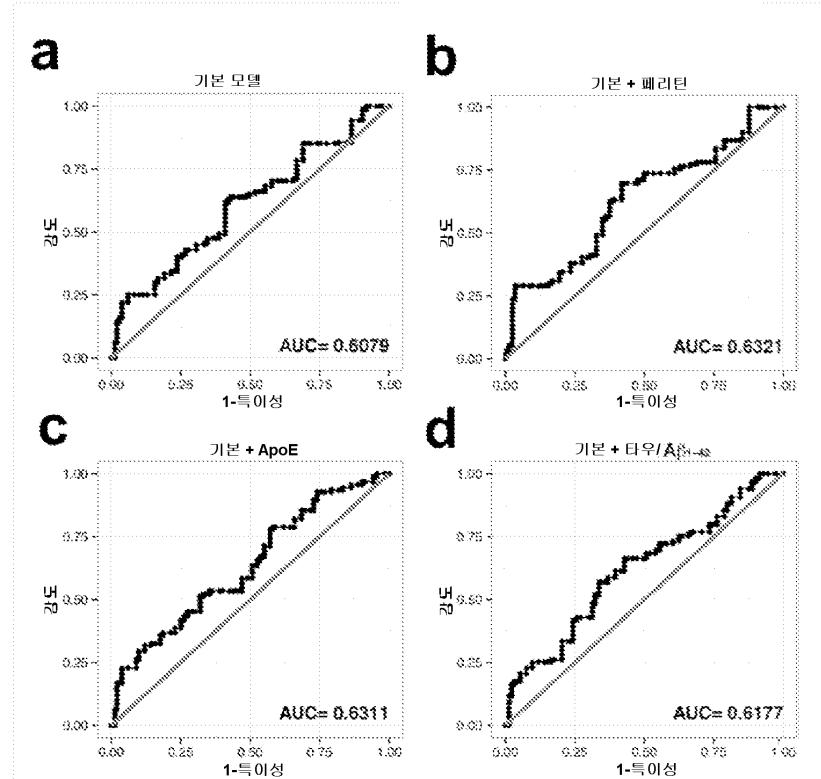
[0263] 아이톤(Ayton S), 파우스(Faux NG) 및 부쉬(Bush AI)의 문헌[알츠하이머병 신경영상 I. 뇌척수액중 페리틴 수준은 알츠하이머병 결과를 예측하고 APOE에 의해 조절된다(Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE)". Nature communications. 2015;6:6760].

도면

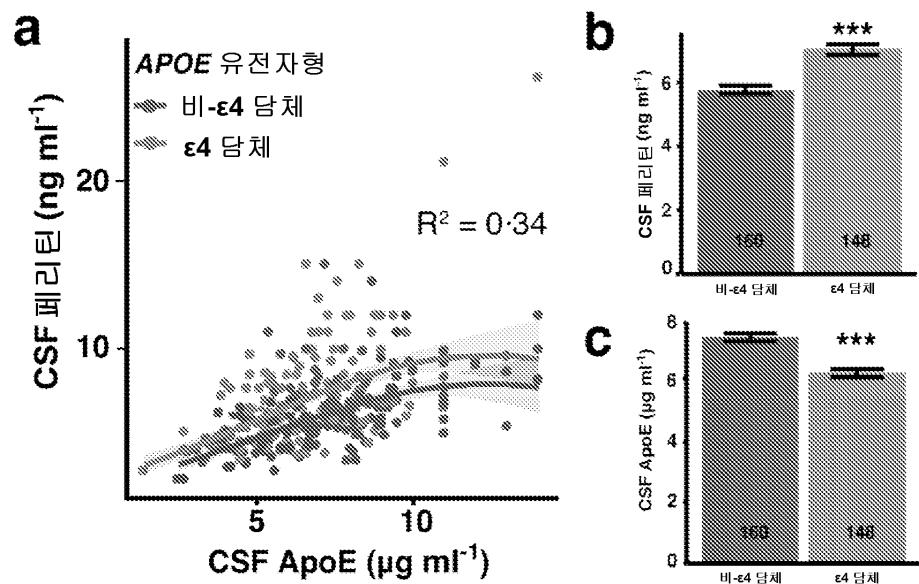
도면1



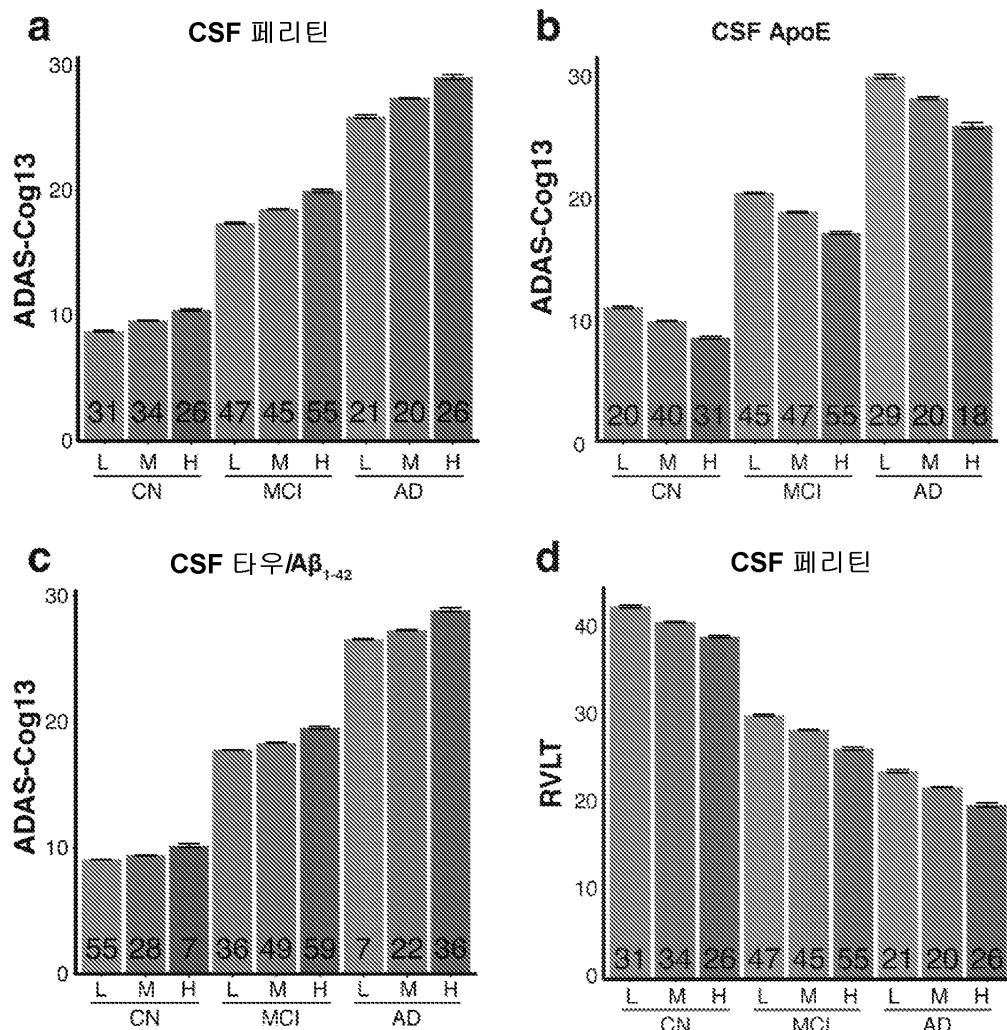
도면2



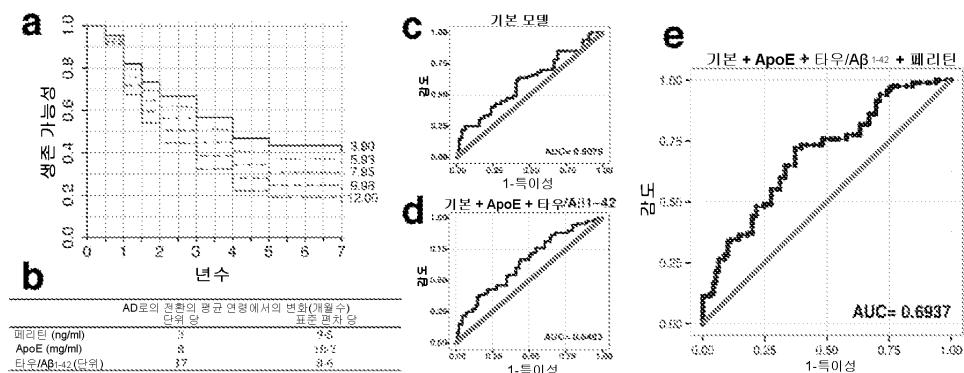
도면3



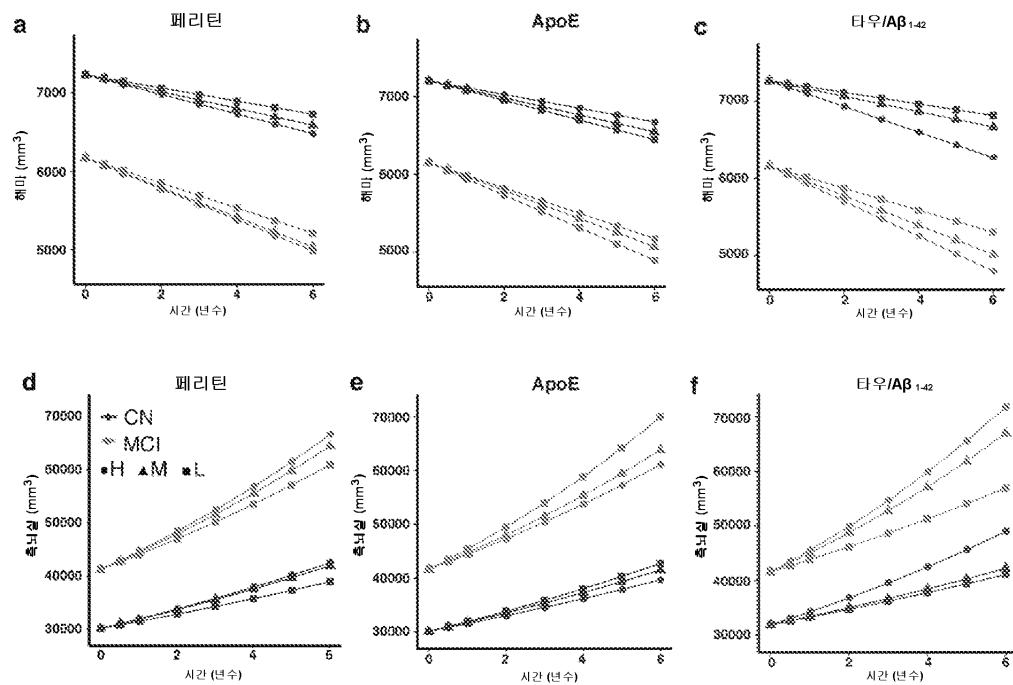
도면4



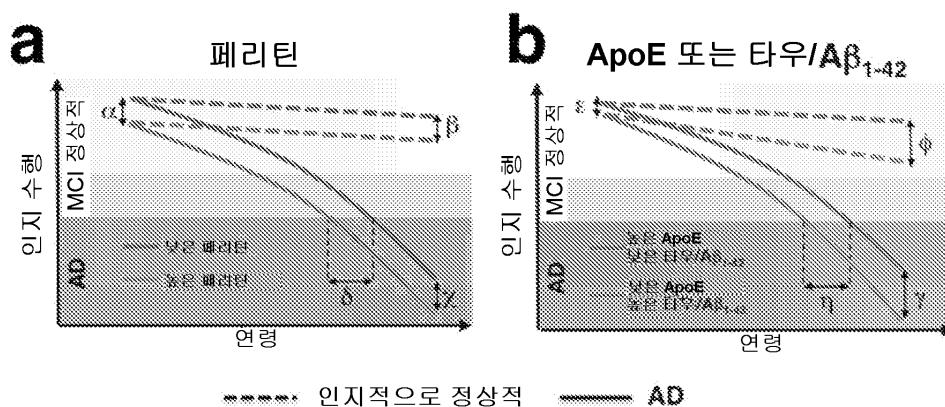
도면5



도면6



도면7



도면8

