(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월04일
(11) 등록번호 10-2775400
(24) 등록일자 2025년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0171593
(22) 출원일자 2024년11월27일
심사청구일자 2024년11월27일
(56) 선행기술조사문헌
Cells (2021) 10(1):113
Frontiers in Molecular Neuroscience (2018) 11:388
Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease (2020) 1866(12):165937

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (호탄동, 대동디지털황토아파트)
박태주
경상남도 진주시 정촌면 화개길 344
(74) 대리인
최규환

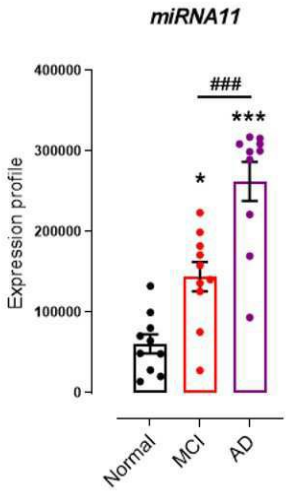
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리지 및 진단기기**

(57) 요 약

본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리지 및 진단기기에 관한 것으로, 분자기반 분석에 의해 확보한 서열번호 1 의 신규 miRNA는 정상, 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 환자군의 혈장에서 발현량의 차이가 있으며, 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 관련 단백질의 발현량을 감소시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명은 비침습적으로 혈장에 존재하는 신규 miRNA를 분자진단 지표로 활용함으로써, 알츠하이머성 치매의 조기진단뿐만 아니라 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 선별진단이 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2535/122 (2019.08)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2710018272
과제번호 RS-2024-00441331
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 융복합 분자진단 기술이 접목된 알츠하이머병 조기진단 원천기술 및 기기 개발(치매 조기진단 기술개발 연구단)
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2024.07.01 ~ 2028.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 신규 마이크로 RNA를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신규 마이크로 RNA는 인간의 혈장 유래인 것을 특징으로 하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 신규 마이크로 RNA는 SNAP25(Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa) 단백질의 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드; 프라이머; 프로브; 및 형광체 또는 소광체가 연결된 루프 형성 올리고뉴클레오티드; 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제4항의 조성물을 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지.

청구항 7

제6항의 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지가 장착된 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 항온장치, 교반기 및 일회용 팁 검체 주입용기 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 RT-PCR, 실시간(real-time) PCR, 등온 PCR, 노던 블랏팅 및 RNA 보호분석 중 어느 하나를 수행할 수 있는 기기인 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 HTS(high-throughput-screening) 기반 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기인 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 RNA 추출장치, 열 순환기, 자동 리퀴드 핸들러 및 형광검출기를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 초소형 전혈분리기, 형광검출기 및 리퀴드 핸들러가 내장된 올인원 장치인 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 인간의 혈액으로부터 치매 위험지수를 계산하는 검출부를 포함하는 것을 특징으로 하는 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리지 및 진단기기에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인지기능의 손상과 아밀로이드 가설을 기반으로 신경심리검사 및 영상진단을 통해 알츠하이머성 치매를 진단하고 있지만 많은 한계점으로 인해, 최근 상대적으로 비침습적인 시료인 혈액으로부터 알츠하이머성 치매의 진단 지표를 개발하려는 노력이 활발하게 이루어지고 있다.

[0003] miRNA는 약 20개 정도의 염기서열을 가진 단일 사슬의 작은 RNA로써 특정 타겟이 되는 mRNA의 3'-UTR(3'-untranslated regions)과 결합하여 mRNA의 번역 억제를 통해 단백질을 조절할 수 있는 짧은 서열의 RNA이다. 현재까지 밝혀진 miRNA는, 사람의 경우 1,000여 개 정도의 miRNA가 밝혀졌으나 대부분의 miRNA는 기능이 밝혀지지 않은 상태이다.

[0004] 현재, 혈액을 이용한 치매 분석은 주로 단백질에 의존하고 있으나, 구조적 안정성에 비해 환자별 편차가 심하고, 알츠하이머성 치매 병리를 혈액에 온전히 반영하지 못하는 단점이 있다. 더 예민한 진단 지표 도출을 위해서는, 더 작은 사이즈의 타겟이 필요하다. 특히 알츠하이머성 치매의 경우, 비정상적 단백질의 응집 등이 유전적인 요인으로만 일어나는 것이 아닌, 다양한 환경적 자극으로 유발되기 때문에, 단백질이라는 결과보다 단백질의 번역 이전인 유전자 발현 조절 변화 분석으로 근본적인 타겟을 찾는 것이 중요할 것으로 사료된다. miRNA를 진단 지표로 활용할 경우 혈액, 소변 및 타액을 포함한 모든 생체 유체에 존재하는 21-25 뉴클레오타이드의 단일 가닥 RNA로 mRNA의 번역을 억제하여 유전자 발현을 직접 제어하는 역할을 한다. 또한, RNA에 의한 분해에 강해 혈액에서 안정적으로 존재하며, miRNA의 대사 또는 기능의 결함은 치매의 발병과 밀접한 관련이 있고, 질병에 따라 높은 특이성 및 민감도를 가지는 것으로 알려져 가장 최적의 진단지표로 활용할 수 있다.

[0005] 알츠하이머성 치매의 진단은 환자에 대해 가장 잘 알고 있는 보호자의 보고를 통한 정확한 병력 청취가 매우 중요하다. 의사는 이전에 비해 기억력을 포함한 인지 기능의 변화가 있는지, 있다면 언제부터 어떠한 양상으로 나타났는지 확인하고, 신체검사와 신경학적 검사, 정신상태 검사, 일상생활 기능수준 검사, 혈액 검사 등의 생화학적 검사, 뇌영상학 검사, 신경심리 검사 등을 통해 진단하고 있지만, 아직까지는 알츠하이머성 치매을 진단하는 데는 여러 가지 한계점이 존재하여, 조기 진단이 어려운 상황이다. 주로, 인지기능의 손상과 아밀로이드 가설을 기반으로 신경심리검사 및 영상진단을 통해 알츠하이머성 치매를 진단하고 있고, 최근 들어 비침습적 시료인 혈액으로부터 알츠하이머성 치매를 체외 진단하는 지표를 개발하려는 노력이 활발하게 이루어지고 있다.

[0006] 한편, 마이크로 RNA를 이용한 진단기술로, 한국등록특허 제2333797호에 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 선별 진단을 위한 신규 마이크로 RNA 바이오마커에 관한 기술이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1992539호에 miRNA 기반의 인지장애 질환 진단용 조성물 및 방법에 관한 기술이 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리

지 및 진단기기에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리지 및 진단기기를 제공하고, 본 발명에 따른 서열번호 1의 신규 miRNA가 정상, 경도인지장애 환자군 및 알츠하이머성 치매 환자군의 혈장에서 발현량의 차이가 있으며, 알츠하이머성 치매 관련 단백질의 발현량을 감소시킬 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 신규 마이크로 RNA를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물을 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지가 장착된 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (1) 개체로부터 혈액을 채취하는 단계;

[0013] (2) 상기 단계 (1)의 혈액으로부터 혈장을 분리하는 단계; 및

[0014] (3) 상기 단계 (2)에서 분리한 혈장 내 서열번호 1의 miRNA 발현량을 확인하는 단계;를 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 체외 조기 진단용 신규 마이크로 RNA 및 이를 이용하는 융복합 진단카트리지 및 진단기기에 관한 것으로, 본 발명에 따른 서열번호 1의 신규 miRNA가 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 환자군의 혈장에서 발현되며, 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 관련 단백질의 발현을 감소시키는 효과가 있는 것이다. 따라서 본 발명은 상대적으로 침습성이 낮은 혈장에 존재하는 신규 miRNA를 진단지표로 활용함으로써, 알츠하이머성 치매의 조기진단뿐만 아니라 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매간의 구분이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에서 확인한 신규 miRNA11의 스템 루프(stem loop) 구조 및 서열 정보를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 신규 miRNA 기능을 확인하기 위한 miRNA11 및 저해자 합성 서열을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 신규 miRNA11의 타겟 유전자가 코딩하는 SNAP25(Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa)의 발현량 변화를 확인한 웨스턴블랏 및 면역형광 결과이다. ***은 아무것도 처리하지 않은 대조군과 본 발명의 miRNA mimic 또는 miRNA 저해자를 처리한 군에서의 타겟 단백질 발현량이 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.001$이다.

도 4는 본 발명의 신규 miRNA가 실제 환자의 혈액 내에서 그룹별 발현량 차이가 나는지를 확인한 결과로, 정상(Normal), MCI 및 AD로 분류된 환자의 혈장 내 신규 miRNA11(서열번호 1)의 발현량을 나타낸 것이다. *, ***은 정상군에 대비하여 경도인지장애 군(MCI) 및 알츠하이머성 치매군(AD)의 miRNA11 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p<0.05$이고, ***은 $p<0.001$이다. ###은 경도인지장애 군에 대비하여 알츠하이머성 치매군의 miRNA11 발현량이 통계적으로 유의미하게 더 증가하였다는 것으로, $p<0.001$이다.

도 5는 본 발명의 신규 miRNA11이 탑재된 알츠하이머성 치매 진단용 POCT All in One PCR 카트리지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 신규 마이크로 RNA를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에서 마이크로 RNA(miRNA)는 표적 RNA의 분해(degradation)를 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21~23개의 비코딩 RNA를 말한다. 특정 염기서열로 나타내는 miRNA뿐만 아니라 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, pri-miRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다.

[0019] 상기 신규 마이크로 RNA는 인간의 혈장 유래인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0020] 상기 서열번호 1의 신규 마이크로 RNA는 SNAP25(Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa) 단백질의 발현량을 감소시키는 것이 특징이다.

[0021] 본 발명의 '진단'은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함하는 개념이다. 또한, 본 발명에서 진단은 알츠하이머성 치매의 조기진단뿐만 아니라, 주관적 인지장애, 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매를 구별(선별)하는 것을 의미한다.

[0022] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0023] 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 마이크로 RNA에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드; 프라이머; 프로브; 및 형광체 또는 소광체가 연결된 루프 형성 올리고뉴클레오티드; 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0024] 본 발명에서, '경도인지장애'는 정상적인 노화현상으로 인한 인지능력의 감퇴와 치매의 중간 단계를 의미한다. 즉, 동일한 연령대에 비해 인지 능력이 저하되어 있는 상태를 말하며, 일상생활이 가능한 것이 치매와 다른 점이다. 이러한 경도인지장애는 정상과 치매의 중간단계이며, 치매의 고위험군으로 분류된다.

[0025] 본 발명에서, '알츠하이머성 치매'는 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조 행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증까지 나타나게 되는 질병으로, 초기에는 매우 서서히 진행되어 발병을 인지하기 어려울 수도 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 바이오마커 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지에 관한 것이다.

[0027] 또한, 본 발명은 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 카트리지가 장착된 다중 현장진단(multiplexed POCT)용 기기에 관한 것이다.

[0028] 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 항온장치, 교반기 및 일회용 팁 검체 주입용기 중에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0029] 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 RT-PCR, 실시간(real-time) PCR, 등온 PCR, 노던 블랏팅 및 RNA 보호분석 중 어느 하나를 수행할 수 있는 기기인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0030] 본 발명의 기기는 서열번호 1의 마이크로 RNA와 특이적으로 결합 가능한 핵산을 추가로 포함할 수 있고, 상기 핵산은 RNA, DNA, 또는 RNA/DNA(키메라) 모두 포함하는 것을 의미하고, 상기 DNA에는 cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 DNA 모두가 포함될 수 있다. 상기 RNA에는 total RNA, mRNA, rRNA, miRNA, siRNA, snoRNA, snRNA, 비코딩(non-coding)RNA 및 합성 RNA 모두가 포함될 수 있다. 본 발명의 기기는 상기 핵산에 추가하여 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단 및 선별 진단을 가능하게 하는 기지의 핵산 또는 장래 발견될 수 있는 핵산을 포함할 수 있으며, 공지의 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단용 마커를 측정하기 위한 항체도 포함시킬 수 있다. 상기 기기에 포함되는 상기 핵산은 개별적으로 또는 임의로 조합하여 다른 용기에 포장될 수 있다.

[0031] 본 발명의 기기에는 바이오센스 표지용 형광 물질, 핵산 증폭용 효소 및 배지, 사용 설명서 등을 포함시킬 수

있다. 본 발명의 카트리지는 상기 핵산이 예를 들면 고상에 결합 또는 부착된 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단을 위한 장치이다. 고상의 재질의 예는 플라스틱, 종이, 유리, 실리콘 등이며, 가공의 용이함으로부터 바람직한 고상의 재질은 플라스틱일 수 있다. 고상의 형상은 임의이며, 예를 들면 사각형, 원형, 직사각형, 필름형 등일 수 있다.

[0032] 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 HTS(high-throughput-screening) 기반 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0033] 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 RNA 추출장치, 열 순환기, 자동 리퀴드 핸들러 및 형광검출기를 포함할 수 있다. 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 초소형 전혈분리기, 형광검출기 및 리퀴드 핸들러가 내장된 올인원 장치일 수 있다. 상기 다중 현장진단(multiplexed POCT) 기기는 인간의 혈액으로부터 치매 위험지수를 계산하는 검출 시스템을 포함하는 것이 특징이다.

[0034] 또한, 본 발명은 (1) 개체로부터 혈액을 채취하는 단계;

[0035] (2) 상기 단계 (1)의 혈액으로부터 혈장을 분리하는 단계; 및

[0036] (3) 상기 단계 (2)에서 분리한 혈장 내 서열번호 1의 miRNA 발현량을 확인하는 단계;를 포함하는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단 방법에 관한 것이다.

[0037] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0038] **1. 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 환자의 시료 확보**

[0039] 정상, MCI(mild cognitive impairment) 및 AD(Alzheimer's disease)로 분류된 환자의 혈액을 EDTA 튜브에 채취한 후, 혈장(plasma)을 분리하여 경상국립대학교 신경생물학실험실에서 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0040] **2. Total miRNA 추출**

[0041] 소량의 혈청 및 혈장에서 주로 miRNA 및 기타 small RNA를 정제할 수 있는 QIAGEN miRNeasy 혈청/혈장 분리 키트를 사용하여 상기 확보한 환자군 및 정상군의 각 혈장 내 있는 Total RNA를 추출하였다.

[0042] 이후, Bioanalyzer RNA Small RNA chip을 이용하여 NGS 분석을 위한 라이브러리 제작에 충분한 RNA 양이 확보되었는지를 확인하였다.

[0043] **3. 차세대 염기 서열 분석(Next Generation Sequencing; NGS)**

[0044] 소량의 RNA에서도 고품질 miRNA 라이브러리 제작이 가능한 SMARTer smRNA-Seq Kit를 사용하여 Illumina Platform에서 small RNA-seq 라이브러리를 생성하였다. SMARTer smRNA-Seq Kit 매뉴얼에 따라 NovaSeq 6000 시퀀싱 플랫폼으로 준비된 시료를 시퀀싱하였다.

[0045] **4. 가공하지 않은 데이터 분석을 통한 miRNA 데이터 선별**

[0046] NGS 분석으로 획득한 가공하지 않은 데이터에서, Adapter, Quality 및 Length의 trimming 순으로 혈장 속에 존재하는 오염되거나 양이 적은 데이터를 제거하였다. 이러한 trimming 과정을 거쳐 불필요한 정보가 제거된 clean 데이터로 miRNA Deep2* 시퀀싱을 실시하였다.

[0047] **5. miRNA Deep2* 시퀀싱**

[0048] miRNA Deep2*는 정제된 가공하지 않은 데이터에서 신규 miRNA를 식별할 수 있는 소프트웨어로, RNAfold 알고리즘에 따라, mature, star 및 loop 서열에 짧게 잘려진 miRBase(Pre-miRNA) 라이브러리를 나란히 배열하여 신규 miRNA를 예측할 수 있으며, RNAfold 알고리즘은 가장 비슷한 열역학 모델을 이용해 RNA 서열이 최소 자유에너지를 갖는 2차 구조를 예측하는 방식으로 도출할 수 있다. RNA fold 생성 그래픽에는 헤어핀(hairpin)의 각 부분에 대한 읽기 수, 최소 자유 에너지에 대한 점수, randfold에 대한 점수 및 conserved seed sequence 점수가 포함되어 있다.

[0049] miRDeep2* 시스템은 RNA 데이터베이스를 활용한 맵핑으로 기존에 알려진 miRNA를 탐지하고 신규 miRNA을 탐지할 수 있다.

[0050] **6. 혈액에 반영되는 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매 관련 신규 miRNA의 검증**

[0051] 신규 miRNA가 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매와 어떤 연관이 있는지에 대한 기능 검증을 위해 miRNA의 서열 기반으로 타겟 유전자(miRNA)를 스코어링하는 miRDB 소프트웨어를 사용하여 스크리닝하였다. 높은 유전자 스코어를 가진 타겟 유전자 중 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매와 관련된 유전자에 대한 발현량 분석을 통해 검증하였다.

[0052] 신경 기능 및 분화 모델로 사용되는 SH-SY5Y 세포를 사용하였으며, 선별된 신규 miRNA의 과발현 효과를 나타내는 miRNA mimic, 신규 miRNA의 발현을 억제하는 miRNA 억제제(inhibitor) 및 음성대조군 miRNA를 SH-SY5Y에 형질주입 후, 타겟 유전자의 단백질 발현을 웨스턴블랏 및 면역형광으로 확인하였다.

[0053] **실시예 1. 시료 확보 및 Total RNA 추출**

[0054] 소량의 혈장에서 miRNA 및 기타 small RNA를 정제할 수 있는 QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit를 사용하여 환자군(MCI, AD) 및 정상군에서 채취한 각 혈장 내에 있는 Total RNA를 추출하였다. 이후 NGS를 위한 라이브러리 제작에 충분한 RNA 양이 확보되었는지 Bioanalyzer RNA Small RNA chip를 이용하여 RNA를 정량하여 NGS 분석에 충분한 양이 확보되었다는 것을 확인하였다.

[0055] **실시예 2. Next Generation Sequencing(NGS)**

[0056] **(1) 라이브러리 구축 및 가공하지 않은 데이터 도출**

[0057] NGS를 위한 Illumina Platform에서 시퀀싱을 위한 작은 RNA-seq 라이브러리를 생성하는데 있어, 소량의 RNA에서도 고품질 miRNA 라이브러리 제작이 가능한 SMARTer smRNA-Seq Kit를 사용하였다. 혈장에서 획득한 환자군 및 정상군의 총 RNA 시퀀싱을 위한 라이브러리를 제작하였고, 제작된 라이브러리 및 NovaSeq 6000 시퀀싱 플랫폼을 이용하여 시퀀싱하여 가공하지 않은 데이터를 도출하였다.

[0058] **(2) 가공하지 않은 데이터(Raw data)로부터 miRNA의 데이터 선별**

[0059] NGS 분석에서 획득한 가공하지 않은 데이터를 Adapter, Quality, Length 순서로 trimming 하여 오염되거나 적은 양의 데이터를 제거하였다.

[0060] 시퀀싱하여 획득한 가공하지 않은 데이터인 Total Read Count에서 Adapter 유무(nonAdapter Read Count), 적당한 길이(Short Read Count), 낮은 품질(Low Quality Read Count)의 정도를 확인하였으며, 이러한 trimming 선별과정을 통해 불필요한 정보가 제거된 1차 가공 데이터를 이용하여 miRNA Deep2* 시퀀싱을 수행하였다.

[0061] **(3) miRNA Deep2* sequencing**

[0062] miRNA Deep2*는 상기 1차 가공된 데이터로부터 새롭게 알려진 miRNA를 식별할 수 있는 소프트웨어의 RNAfold 알고리즘에 따라, mature, star, loop 서열에 짧게 잘려진 miRBase(Pre-miRNA) 라이브러리를 나란히 배열하여 신규 miRNA를 예측하였으며, RNAfold 알고리즘은 가장 비슷한 열역학 모델을 이용해 RNA 서열이 최소 자유에너지를 갖는 2차 구조를 예측하는 방식으로 도출하였다.

[0063] RNA fold 생성 그래픽에는 hairpin의 각 부분에 대한 읽기 수, 최소 자유 에너지에 대한 점수, randfold에 대한 점수 및 conserved seed sequence 점수가 포함되어 있다. miRDeep2* 시스템은 RNA 데이터베이스를 활용한 맵핑으로 기존 알려진 miRNA 및 신규 miRNA을 탐지하였다.

[0064] 상기 각각의 시료에 대해 최종 처리된 리드는 miRBase v22.1과 non-coding RNA database(RNAcentral release 14.0)를 통해 piRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, 이미 알려진 miRNA 및 신규 miRNA를 분류하였다.

[0065] 게놈(genome) 맵핑은 RSEM을 사용하여 Bowtie와 STAR에 의해 처리되었다. Bowtie는 이후 게놈 서열을 사용하여 miRDeep2 분석에 이용하였다. miRDeep2에 의해 예측된 알려진/신규 miRNA 및 RNAcentral과 일치하는 다른 small RNA는 Bowtie(표적 small RNA, <50nt) 및 Bowtie2(표적 smRNA, ≥50nt)를 사용하여 정렬하였다.

[0066] - RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization): RNA-Seq 전사체를 정량화하는 도구

[0067] - Bowtie: 서열 정렬 및 서열 분석에 일반적으로 사용되는 소프트웨어

[0068] - STAR(Spliced Transcripts Alignment to a Reference): 빠른 RNA-seq read mapper

[0069] 신규 miRNA를 예측하기 위해 고유 클러스터링 된 read는 reference genome 및 전구체 miRNA에 대해 별도로 정렬되었다. miRNA는 miRNA Deep2*를 사용하는 RNAfold 알고리즘에 따라 성숙한 star 및 loop 서열을 예측할 수 있다. RNAfold 함수는 가장 근접한 이웃 열역학 모델을 사용하여 RNA 서열의 최소 자유 에너지 2차 구조를 예측하

였다. RNAfold에서 생성된 그래픽에는 실제 in silico-folded 헤어핀이 포함되어 있으며, 헤어핀의 각 부분에 대한 판독 횟수, 최소 자유 에너지 점수, randfold 점수 보존된 seed 서열의 점수도 포함되어 있다.

[0070] miRDeep2*는 -10~10의 점수를 통해 신규 miRNA를 도출하였다. 상기 도출된 신규 miRNA는 경도인지장애 군 및 알츠하이머성 치매 군에서 모두 발현하는 것으로, 그 중 miRDeep2* 점수는 1 이상, RNA fold는 "yes"이고, mature read의 수가 10 이상인 miRNA 5종을 선별하였다.

[0071] 선별된 신규 miRNA11의 stem loop 구조를 도 1에 개시하였으며, 서열 정보는 도 2에 개시하였다.

[0072] **실시예 3. 경도인지장애 및 알츠하이머성 치매의 조기 진단을 위한 신규 miRNA의 유전자 발현량의 차이 확인**

[0073] 신규 miRNA가 알츠하이머성 치매과 어떤 연관이 있는지를 검증하기 위해 miRNA의 서열 기반으로 타겟이 되는 유전자를 스코어별로 스크리닝하는 miRDB 소프트웨어를 사용하였다. 높은 유전자 스코어를 가진 타겟 유전자 중 알츠하이머성 치매과 관련된 유전자를 선별하였다.

[0074] 신경 기능 및 분화에 모델로 사용되는 SH-SY5Y 세포를 사용하였으며, 선별된 신규 miRNA의 과발현 효과를 나타내는 miRNA mimic, 신규 miRNA의 발현을 억제하는 miRNA inhibitor, 음성대조군 miRNA를 SH-SY5Y에 형질주입 후, 타겟 유전자의 단백질 발현을 웨스턴블랏 및 면역형광으로 확인하였다.

[0075] miRNA mimic은 실제로 생체 내에 있는 신규 miRNA처럼 기능할 수 있는 miRNA로 이중결합으로 제작되었다. miRNA inhibitor는 도출된 해당 miRNA의 상보적인 서열로, 단일 결합으로 제작되어 해당 miRNA를 억제할 수 있는 miRNA이다. 한편, 음성대조군 miRNA는 유전자를 조절하지 않는 miRNA로 이루어진 miRNA로 검증의 기준이 된다. 제작한 신규 miRNA11 및 miRNA inhibitor를 도 2에 개시하였다.

[0076] [miRDB 소프트웨어를 이용한 유전자 스크리닝]

[0077] 신규 miRNA가 제어하는 유전자 중, 알츠하이머성 치매와 관련성이 높은 타겟을 선별하기 위해, 신규 miRNA 중 miRNA11 mimic은 서열 5'-AGGAAAGGGAGGGGAAAG-3'(서열번호 1)를 기반으로, 타겟 예측 miRDB 소프트웨어를 이용해 유전자를 스코어별로 스크리닝하였다. 서열번호 1의 miRNA mimic에 대한 miRNA11 inhibitor는 5'-CUUUCCCCUCCCUUUCCU-3'(서열번호 2)이다.

[0078] 해당 miRNA의 유전자 스코어의 컷-오프 값을 80으로 설정한 후, 경도인지장애 및 및 알츠하이머성 치매 관련 타겟 유전자를 선별하였다.

[0079] miRNA11의 타겟 유전자로, SNAP25(Synaptosomal-Associated Protein, 25kDa) 유전자를 선별하였다. SNAP25는 syntaxin, synaptic vesicle protein VAMP 및 synaptobrevin과 함께 세포외 분비를 조절하는 SNARE docking complex를 형성하고, 또한 다른 종류의 voltage gated 칼슘 채널을 조절하는 다기능성 단백질로 신경전달물질 방출의 여러 단계에서 중요한 역할을 한다.

[0080] miRNA11 inhibitor 및 신규 miRNA11의 과발현을 위한 miRNA11 mimic을 인간신경모세포종 SH-SY5Y에 각각 1nM, 10nM 및 100 nM의 농도로 48시간 동안 형질 주입하였고, 면역형광 및 단백질을 분리하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 신규 miRNA11의 과발현으로 3'-UTR에 결합하는 miRNA11가 증가함에 따라 후보 타겟 유전자 단백질인 SNAP25의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, miRNA11 inhibitor로 3'-UTR에 결합하는 miRNA11를 제거함으로써, 후보 타겟 유전자 단백질 SNAP25의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[0081] 한편, 신규 miRNA가 실제 환자의 혈액 내에서 그룹별 발현량 차이가 나는지 확인하기 위해 Normal, MCI와 AD로 분류된 환자의 혈장 내 신규 miRNA11의 발현량 분석을 위한 타겟 시퀀싱을 실시하였다. 경도인지장애(MCI) 그룹과 알츠하이머성 치매(AD) 그룹에서의 miRNA11의 유의미한 발현량의 차이를 확인하였다(도 4).

[0082] **실시예 4. 경도인지장애 및 알츠하이머병의 조기 진단을 위한 신규 miRNA를 포함하는 카트리지 및 이를 이용한 알츠하이머병의 진단**

[0083] LUKIN의 전용 PCR 카트리지의 상부에, DNA/RNA 추출 튜브를 가지고 있으며, 상부에서 추출과정이 이루어진 다음, 인터페이스 튜브로 추출한 시료를 내려 보내지며, 회전에 의한 원심력을 이용하여 시료를 타겟 시약이 미리 로딩되어 있는 PCR 튜브로 주입하였다. 추출과정에서 사용된 폐액은 추출 튜브와 PCR 튜브 중간에 위치한 폐액 튜브로 이동하여 안전하게 보관되었다. 폐액 튜브에는 액체를 흡수하여 겔화시키는 흡수제가 미리 들어가 있는 것이 특징이다.

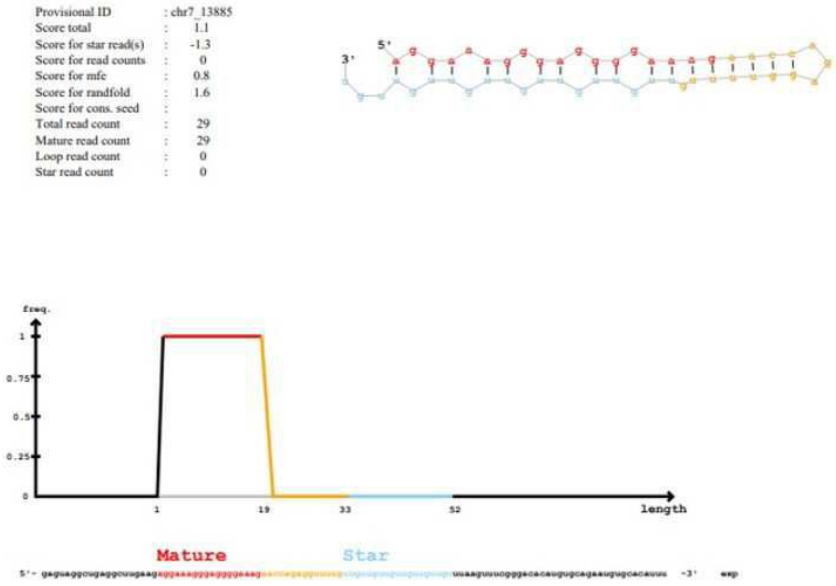
[0084] 시약이 미리 로딩되어 있는 PCR 튜브에는 PCR을 수행하는데, 필요한 모든 시약 [primer, Probe, Master mix]이

포함되어 있는 것이 특징이다.

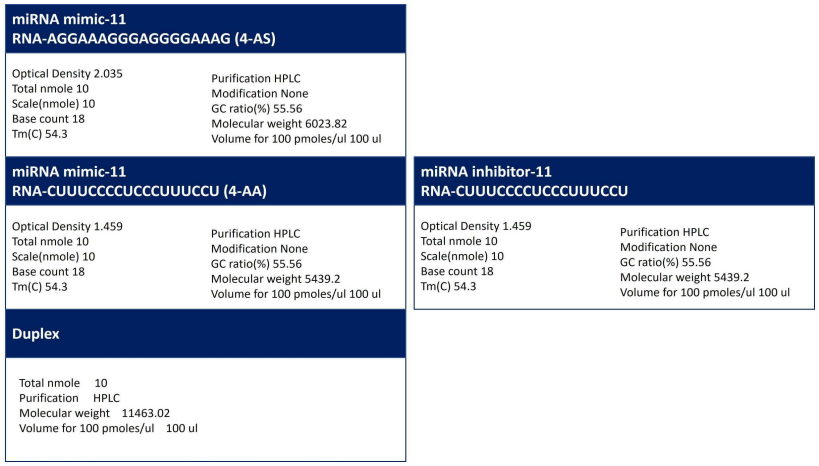
[0085] RNA 추출 시료 25㎕가 PCR 튜브에 로딩 되면, 본격적으로 열순환, 형광 측정 및 실시간 연쇄중합반응(REAL TIME PCR)을 동시에 수행하여, 알츠하이머병을 진단하였다(도 5).

도면

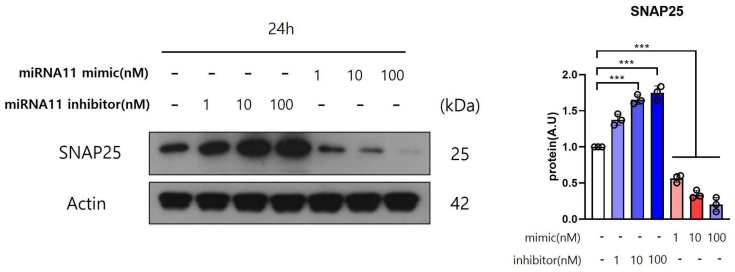
도면1

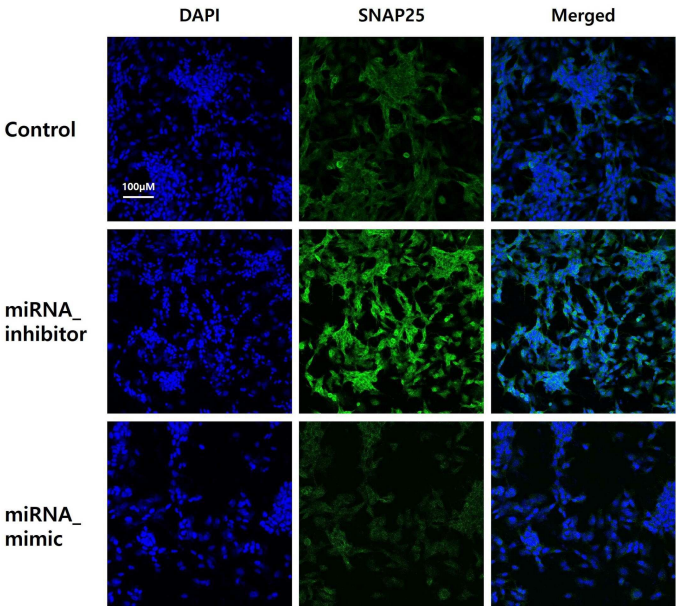


도면2

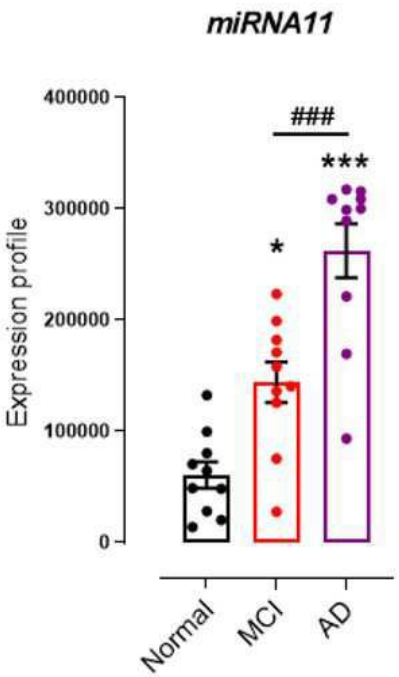


도면3


24h
miRNA11 mimic(nM) - - - - 1 10 100
miRNA11 inhibitor(nM) - 1 10 100 - - -
(kDa)
SNAP25
25
Actin
42
SNAP25
protein(A.U)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
mimic(nM) - - - - 1 10 100
inhibitor(nM) - 1 10 100 - - -


DAPI
SNAP25
Merged
Control
100μM
miRNA_
inhibitor
miRNA_
mimic

도면4


miRNA11
400000
300000
200000
100000
0
Expression profile
###
***
*
Normal
MCI
AD

도면5



POCT All in One PCR 용 카트리지

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.