

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 1월 4일 (04.01.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/005591 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/009231
- (22) 국제출원일: 2023년 6월 30일 (30.06.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0080863 2022년 6월 30일 (30.06.2022) KR
- (71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 조선대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 61452 광주광역시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 박지용 (PARK, Zee-Yong); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학부, Gwangju (KR). 장세환 (JANG, Se Hwan); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학부, Gwangju (KR). 김유림 (KIM, You

Rim); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학부, Gwangju (KR). 황대희 (HWANG, Daehye); 42758 대구광역시 달서구 조암남로 10, 106동 1304호, Daegu (KR). 이진호 (LEE, Kunho); 61746 광주광역시 남구 노대실로 33, Gwangju (KR).

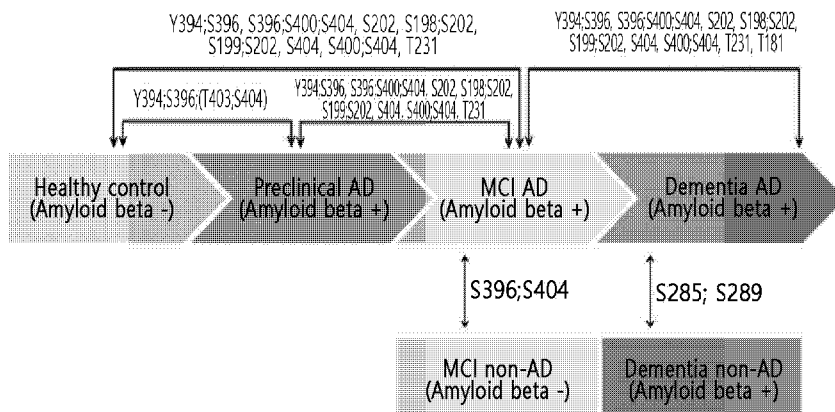
(74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY & LAW); 05836 서울특별시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING EARLY AND CLASSIFYING STAGES OF ALZHEIMER'S DISEASE AND DETERMINING AMYLOID BETA ACCUMULATION IN BRAIN BY USING TAU PROTEIN-DERIVED PHOSPHORYLATED PEPTIDE

(54) 발명의 명칭: 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 이용한 알츠하이머병 조기 진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing Alzheimer's disease early by using a tau protein-derived phosphorylated peptide and, more specifically, to a method for diagnosing early or classifying stages of Alzheimer's disease and determining amyloid beta accumulation in the brain by measuring the phosphorylation level of tau protein in a biological sample. The tau protein-derived phosphorylated peptide quantification method according to the present invention can effectively diagnosis early or classify stages of Alzheimer's disease and determine amyloid beta accumulation in the brain.

(57) 요약서: 본 발명은 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 이용한 알츠하이머병 조기 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생물학적 시료 내 타우 단백질의 인산화 수준 측정을 통한 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분 방법, 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드 정량 방법을 통해 알츠하이머병을 효과적으로 조기 진단하거나 단계를 구분하고 뇌의 아밀로이드 베타의 축적을 판별할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2024/005591 A1

ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 이용한 알츠하이머병 조기 진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 이용한 알츠하이머병 조기 진단 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생물학적 시료 내 타우 단백질의 인산화 수준 측정을 통한 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분 방법, 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 알츠하이머병은 치매를 일으키는 가장 큰 원인의 하나로 환자의 수가 점점 증가하고 있어 관심이 높아지고 있다. 그러나 지금까지 정확한 원인이 규명되지 않고 있으며 치료제 또한 발견되지 않고 있다. 현재 임상적으로 사용되는 알츠하이머병의 진단은 자기공명영상법 (MRI), SPECT (single-photon emission computed tomography), positron emission tomography (PET) 등을 이용하여 특정 뇌조직 (해마, 피질 등)의 변화양상을 관찰하고, MMSE (mini mental status examination)와 같은 문진을 통하여 행동과 지각능력의 변화 관찰을 종합하여 알츠하이머병으로 진단을 내리게 된다.
- [4] 그러나, 상기 방법들은 비용이 많이 들거나 대부분의 방법이 질환이 진행되어 증상이 나타난 이후에 진단이 가능하다는 한계점을 가진다. 현재 진단을 확증할 수 있는 유일한 방법은 환자가 사망한 후 부검을 통해 뇌 조직을 검사하는 사후 분석으로 아밀로이드 베타 플라크(amyloid beta plaque)의 뇌세포에서의 침착 여부와 타우 단백질의 과인산화로 형성된 신경섬유다발(neurofibrillary tangles)을 확인하는 것이다. 이처럼 확인이 어렵고 정도의 인지기능장애 단계를 지나 치매에 이른 환자들의 치료 방법이 없기 때문에 초기 환자들을 대상으로 한 약물 개발의 필요성과 그를 위한 초기 환자들의 선별 및 정확한 조기진단의 중요성이 부각되고 있다. 알츠하이머병은 대부분 질환의 증상이 나타나기 이전 단계에 환자의 행동은 정상적으로 보이나 뇌에서는 병리학적인 변화가 일어나는 “잠복기(preclinical)” 단계와 정도의 인지기능저하가 일어난 “경도인지장애(MCI)” 단계가 존재하기 때문에 이러한 초기 단계에 알츠하이머병 진단이 이루어질 수 있다면 보다 효과적인 치료가 가능할 것이다. 또한 알츠하이머성 치매의 원인물질이며 질병의 진행과 큰 연관성을 갖는 뇌의 아밀로이드 베타 축적의 감별은 동일한 정도의 인지기능을 가진 치매 단계별 환자군에서도 알츠하이머성 질환과 비알츠하이머성 질환을 갖는 환자군으로 세분류하는 근거가 되어 환자개인별 맞춤형 치료 및 향후 추가진단에 활용될 수 있다.

- [5] 현재 증상이 나타나기 이전의 알츠하이머병 환자의 혈액이나 뇌척수액에서 특이하게 증가하거나 감소하는 단백질 수준을 측정하여 알츠하이머병을 조기에 진단하고 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적을 감별하는 방법에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 뇌척수액은 시료 채취 과정에 있어서 고통을 수반하며 채취가 용이하지 않고 의학적 부작용 등이 우려되며 특히 고령의 알츠하이머병 환자로부터 채취가 어려워 실제 일반적 진단방법으로는 용이하게 사용될 수 없는 문제점이 있다. 반면 혈액의 경우 뇌척수액에 비해 채취가 용이하다는 점과 매일 500 ml의 뇌척수액이 혈액으로 흡수된다는 연구결과 등을 바탕으로 효과적인 알츠하이머병 바이오마커 개발에 적합한 시료로 여겨진다.
- [6] 그에 따라, 혈액 내 아밀로이드 베타와 타우 단백질을 조기진단 마커로서 사용하고자 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 아밀로이드 베타의 경우 연구그룹마다 전혀 상반된 결과들이 나왔고 타우 단백질 전체를 대상으로 분석하는 경우 알츠하이머병 환자군과 정상 대조군의 타우 단백질의 농도범위가 많이 겹치는 결과가 나왔기 때문에 조기진단을 위한 지표로서의 활용도와 특이성이 매우 떨어지는 것으로 보였다. 그에 반해 혈액 내 타우 단백질의 과인산화 현상은 기존 타우 전체 단백질보다 알츠하이머병에 특이적이고 뇌에서의 아밀로이드 베타 병변 및 타우 병변과의 연관성도 더 높은 것으로 드러나 타우 단백질의 과인산화 현상을 혈액 내 지표로 이용해 알츠하이머병을 진단하려는 연구들이 진행되고 있다. 특히, 혈액 내 인산화된 타우 단백질은 뇌조직으로부터 뉴런의 사멸(신경변성)에 의한 수동적 방출뿐만 아니라 인산화 위치에 따른 타우 단백질의 능동적 방출을 종합적으로 반영하기 때문에, 뇌조직이 아닌 혈액 내 존재하는 타우 단백질의 인산화 수준을 직접적으로 측정하여 조기진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 감별을 위한 지표로 이용하는 것이 필수적이다. 그러나, 현재 혈액 내 타우 단백질의 인산화를 정량하고 진단하는 방법은 수십 마이크로 크기의 마이크로 웰 어레이를 이용, 효소 단일 분자 활동을 디지털방식으로 측정하는 초고감도 면역분석기술인 Digital ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay)에 의해서만 이루어졌다. 상기 방법은 immunoassay의 문제점(low throughput, 시료와 epitope들에 따라 달라지는 항체의 친화도와 특이성, 정량하려는 epitope에 대한 antibody 개발의 필요성)을 가지고 있으며 타우 단백질의 181번과 217번 인산화 위치에 한정되어 분석을 하기 때문에 실제 임상에서 사용이 가능한 알츠하이머병 조기진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 감별을 위해서는 대체적인 방법이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 알츠하이머병의 효과적인 조기진단 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 감별을 위한 검사방법을 개발하고자 연구 노력한 결과, 효율적인 인산화 펩타이드 농축 방법과 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용하여 혈액 내

에 존재하는 타우 단백질로부터 유래된 다양한 인산화 펩타이드의 양들을 동시에 측정함으로써 알츠하이머병 특이적인 타우 단백질 인산화위치들과 이들의 인산화 정도 차이를 이용하여 알츠하이머병의 조기진단과 단계 구분을 가능하게 하고 뇌의 아밀로이드 베타 축적을 감별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 본 발명의 하나의 목적은, 혈액과 뇌척수액을 포함한 생물학적 시료 내 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 수득하고 정량 분석함으로써 알츠하이머병의 조기 진단, 단계 구분과 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별하는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 하나의 목적은, 상기 알츠하이머병 조기 진단, 단계 구분과 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 바이오마커 및 조성물을 제공하는 것이다.

[11]

발명의 효과

[12] 본 발명의 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드 정량 방법을 통해 알츠하이머병을 효과적으로 조기 진단하거나 단계를 구분하고 뇌의 아밀로이드 베타의 축적을 판별할 수 있다.

[13]

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 본 발명의 방법을 수행하기 위한 전체적인 모식도를 나타낸다.

[15] 도 2는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 구체적인 단계를 나타낸다.

[16] 도 3은 본 발명의 인산화 펩타이드의 정량을 수치로 기재한 도이다.

[17] 도 4는 본 발명의 인산화 펩타이드의 정량을 히스토그램으로 도식화한 도이다.

[18] 도 5는 본 발명의 인산화 펩타이드의 정량을 히트맵(heatmap)으로 도식화한 도이다.

[19] 도 6은 본 발명의 인산화 펩타이드의 정량 결과를 정상 대조군 대비 fold change로 나타낸 도이다.

[20] 도 7은 본 발명의 알츠하이머병 단계에 따른 특이적 증가를 보이거나 동일 단계에서 뇌의 아밀로이드 축적에 따른 특이적 변화를 보이는 인산화 위치들을 도식화한 도이다.

[21] 도 8은 본 발명의 알츠하이머병 잠복기 단계를 판단할 수 있는 인산화 펩타이드를 정량한 결과이다.

[22] 도 9는 본 발명의 알츠하이머성 경도인지장애를 판단할 수 있는 인산화 펩타이드를 정량한 결과이다.

[23] 도 10은 MCI 동일 단계에서 아밀로이드 침착 여부를 구분할 수 있는 인산화 펩타이드를 정량한 결과이다.

- [24] 도 11은 AD 동일 단계에서 아밀로이드 침착 여부를 구분할 수 있는 인산화 펩타이드를 정량한 결과이다.
- [25] 도 12는 본 발명에서 알츠하이머병 단계 구분을 통하여 임상시험을 위한 알츠하이머병 단계에 해당하는 환자군 또는 정상군을 선별하기 위한 구체적인 단계를 나타낸다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[28]

- [29] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분 방법을 제공한다.

- [30] 상기 방법은 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분을 위한 정보의 제공 방법을 의미할 수 있다.

[31]

- [32] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 분리된 생물학적 시료로부터 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계를 포함하는, 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법을 제공한다.

- [33] 상기 방법은 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 정보의 제공 방법을 의미할 수 있다.

[34]

- [35] 상기 방법에 있어서, (c) 상기 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[36]

- [37] 보다 구체적으로, 본 발명의 상기 알츠하이머병 조기 진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법은, 분리된 생물학적 시료 내 단백질을 단백질 분해효소를 이용하여 펩타이드화하는 단계; 상기 수득된 펩타이드에 인산화 펩타이드 농축법을 적용하여 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 농축하는 단계; 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 질량분석법을 이용하여 상기 농축된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계; 및 상기 정량된 인산화 펩타이드의 양을 대조군과 비교하는 단계를 포함하여 수행될 수 있다.

[38]

- [39] 본 발명의 기본적인 특징은, 알츠하이머병의 효과적인 조기 진단, 단계 구분 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 검사방법을 개발하고자 하는 데에 있는 것으로서, 알츠하이머병에 아직 도달하기 이전의 환자에 대하여, 잠복기 단계(preclinical AD, 전임상 알츠하이머병) 및/또는 알츠하이머성 경도인지장애(MCI) 여부를 조기에 알 수 있고 동일한 정도의 인지기능을 가진 인지기능 정상군, 경도인지장애군 또는 치매군에서의 뇌의 아밀로이드 베타 축적 감별을 하는 것일 수 있다.
- [40] 기존에는 실제 알츠하이머병 치매 환자와 정상인 간의 유의미한 차이를 보이는 연구는 다수 진행되었으나, 질환의 증상이 나타나기 이전 단계인 잠복기 단계(preclinical AD) 및/또는 알츠하이머성 경도인지장애(MCI) 단계와 정상인 간에는 유의미한 차이가 나타나지 않아 조기 진단이 어려웠다. 그러나, 본 발명에서는 다양한 위치에서 인산화가 일어난 타우 단백질 유래 펩타이드를 통한 정량을 통해 혈액 시료를 이용한 조기 진단 및 뇌의 아밀로이드 베타 축적 감별 방법을 개발한 것이다.
- [41] 구체적으로는 상기 인산화 펩타이드의 종류에 따라 알츠하이머병의 각 단계를 판단하고 동일 인지기능 단계에 있는 환자군으로부터 뇌의 아밀로이드 베타 축적을 감별할 수 있다.
- [42]
- [43] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 알츠하이머병 잠복기 및 알츠하이머성 경도인지장애의 조기 진단을 포함할 수 있으며, 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머병 잠복기 단계, 알츠하이머성 경도인지장애 단계, 및 알츠하이머성 치매 단계 간의 구분을 포함할 수 있다.
- [44] 상기 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분을 위하여 정량되는 타우 단백질의 인산화는 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및/또는 T181 위치의 인산화일 수 있다. 구체적으로 상기 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분을 위한 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및/또는 T181 위치의 인산화를 포함하는 인산화 펩타이드일 수 있으며, 상기 인산화 펩타이드는 상기 나열된 위치의 인산화를 포함하는 3 내지 50개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있고, 구체적으로는 5 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 9 내지 21개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.
- [45]
- [46] 본 발명의 일 실시양태로서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머병 잠복기를 조기 진단하는 것일 수 있다. 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머병 잠복기를 조기 진단하는 방법은, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며,

정량값이 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머병 잠복기인 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 알츠하이머병 잠복기인 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머병 잠복기인 것으로 판단할 수 있다.

- [47] 다른 일 실시양태로서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머성 정도인지장애를 조기 진단하는 것일 수 있다. 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머성 정도인지장애를 조기 진단하는 방법은, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및 T231로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 보다 바람직하게는 Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S199;S202 및 S404로 구성된 군에 해당하는 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애인 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애인 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애인 것으로 판단할 수 있다.

[48]

- [49] 본 발명의 일 실시양태로서, 상기 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머병 잠복기 단계와 알츠하이머성 정도인지장애 단계를 구분하는 것일 수 있다. 알츠하이머병 잠복기 단계와 알츠하이머성 정도인지장애 단계를 구분하는 방법은, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및 T231로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 보다 바람직하게는 Y394;S396, S202, S404로 구성된 군에 해당하는 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 알츠하이머병 잠복기 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애 단계인 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 알츠하이머병 잠복기 대조군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애 단계인 것으로 판단할 수 있으며, 대

조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애 단계인 것으로 판단할 수 있다.

- [50] 다른 일 실시양태로서, 상기 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머성 정도인지장애 단계와 알츠하이머성 치매 단계를 구분하는 것일 수 있다. 알츠하이머성 정도인지장애 단계와 알츠하이머성 치매 단계를 구분하는 방법은, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231 및 T181로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 보다 바람직하게는 S202, S404, T231 및 T181로 구성된 군에 해당하는 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 알츠하이머성 정도인지장애 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 치매 단계인 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 알츠하이머성 정도인지장애 대조군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 알츠하이머성 치매 단계인 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 치매 단계인 것으로 판단할 수 있다.

[51]

- [52] 본 발명에서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

- [53] 본 발명에서, 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 분리된 생물학적 시료 내 단백질을 단백질 분해효소를 이용하여 펩타이드화하여 획득되는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 단백질 분해효소는 Lys-c, Arg-C, Asp-N, Gluc-C, Lys-N, 서몰리신(thermolysin), 엘라스타제(elastase), Tryp-N, 트립신(trypsin) 및 키모트립신(chymotrypsin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 분해효소일 수 있다. 또한, 상기 인산화된 타우 단백질 또는 타우 단백질의 단편은 인산화 단백질 또는 인산화 펩타이드 농축법에 의해 획득되는 것일 수 있다.

- [54] 본 발명에서, 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량은 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 질량분석법에 의해 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 질량분석법은 LC-SRM(liquid chromatography-selected reaction monitoring), PRM(Parallel Reaction Monitoring), SIM(Selected Ion monitoring) 또는 MRM(Multiple Reaction Monitoring)일 수 있다.

- [55] 본 발명에서, 상기 정량된 인산화 펩타이드의 양은 총 타우에 대한 비율일 수 있다.

- [56] 본 발명에서, 상기 정량된 인산화 펩타이드의 양에 대하여 정량적 프로파일링을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 정량된 인산화 펩타이드의 양에 대하여 T 검정 p-값 분석, ROC (Receiver-Operating curve) 및 AUC (Area under the ROC curve) 분석 중 한 가지 이상을 선택하여 수행함을 특징으로

하는 정량적 프로파일링을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 정량적 프로파일링은 동위원소로 치환된 단백질 표준물(stable isotope labeled protein standard) 또는 펩타이드 표준물(stable isotope labeled peptide standard)을 단백질들의 펩타이드화 이전 또는 이후에 주입하여 합성 표지 펩타이드를 이용하여 구한 인산화 펩타이드의 절대 정량값을 이용하여 얻어지는 것일 수 있다. 상기 절대 정량값은 총 타우 단백질양에 대한 비율로서 비교될 수 있고, 여기서 총 타우 단백질의 양도 동위원소로 치환된 단백질 표준물(stable isotope labeled protein standard) 또는 펩타이드 표준물(stable isotope labeled peptide standard)에 의해 구해진 절대 정량값일 수 있다. 해당 기준치는 구체적인 실시양태에 따라 적절한 기준치를 설정하여 실시할 수 있다. 그 예로 대조군 범위의 임계값 (cutoff) (증가하는 경우에는 상한치 / 감소하는 경우에는 하한치)을 결정하여, 인산화가 일어난 타우 단백질의 단편 펩타이드의 양이 임계값보다 변동한 경우, “평균에 비해 유의하게 높은 경우”로 판단할 수 있다. 상기 정량된 인산화 펩타이드의 절대 함량값을 이용하여 대조군에 해당하는 절대 정량값 참조 정보와 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 각각의 단계인 것으로 판단할 수 있다.

[57]

[58] 본 발명에서 상기 알츠하이머병 조기 진단이라 함은, 이후의 발병에 대하여 대상을 식별하는 것을 포함할 수 있다. 구체적으로, 알츠하이머병 잠복기의 조기 진단은 알츠하이머성 경도인지장애의 발병으로부터 약 5 년 내지 25 년 이하로 대상을 식별하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 알츠하이머성 경도인지장애의 조기 진단은 알츠하이머성 치매 발병으로부터 약 5 년 내지 25 년 이하로 대상을 식별하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[59]

또한, 본 발명에서 상기 알츠하이머병 단계 구분이라 함은, 피험자를 대상으로 임상시험에서 실제 치료제가 목표로 하는 알츠하이머병 단계에 해당하는 대상만으로 선별하기 위한 것이거나, 또는 각 단계에 해당하는 약학 조성물을 투여하기 위한 대상을 선별하기 위한 것일 수 있다.

[60]

[61] 본 발명의 다른 일 실시양태에서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 인지 기능 정상군, 경도인지장애 환자군 또는 치매 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 여부를 판별하는 것일 수 있다.

[62]

상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위하여 정량되는 타우 단백질의 인산화는 Y394;S396;(T403/S404), S396;S404, 및/또는 S285;S289 위치의 인산화일 수 있다. 구체적으로 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), S396;S404, 및/또는 S285;S289 위치의 인산화를 포함하는 인산화 펩타이드일 수 있으며, 상기 인산화 펩타이드는 상기 나열된 위치의 인산화를 포함하는 3 내지 50개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있고, 구체

적으로는 5 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 9 내지 21개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.

[63]

[64] 본 발명의 일 실시양태로서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 인지기능 정상군에서 판별하는 것일 수 있다. 인지기능 정상군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 인지기능 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 인지기능 정상군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 높은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다.

[65] 다른 일 실시양태로서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 경도인지장애 환자군에서 판별하는 것일 수 있다. 경도인지장애 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은, S396;S404 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 경도인지장애 환자 대조군과 비교하여 낮은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 경도인지장애 환자군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다.

[66] 다른 일 실시양태로서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 치매 환자군에서 판별하는 것일 수 있다. 치매 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은, S285;S289 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 치매 환자 대조군과 비교하여 낮은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다. 구체적으로, 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드가 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 치매 환자군과 비교하여 2배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 보다 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있으며, 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단할 수 있다.

[67]

- [68] 본 발명에서 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별이라 함은, 피험자를 대상으로 임상시험에서 실제 치료제가 목표로 하는 뇌 아밀로이드 베타 축적에 해당하는 대상만으로 선별하기 위한 것이거나, 또는 각 단계에서 뇌 아밀로이드 베타 축적에 해당하는 약학 조성물을 투여하기 위한 대상을 선별하기 위한 것일 수 있다. 또한 상기 뇌 아밀로이드 베타 축적은 뇌 아밀로이드 베타 축적과 관련된 질환의 진단, 또는 아밀로이드 베타 관련 PET 검사가 필요한지 여부의 판단으로 사용되며, 상기 뇌 아밀로이드 베타 축적 질환은 알츠하이머병 파킨슨병 치매, 루이소체 치매, 헌팅톤병 치매, 또는 전임상 알츠하이머병, 다운 신드롬, 또는 인지장애를 포함하는 것인 뇌 아밀로이드 축적 여부의 판단을 위한 것일 수 있다.
- [69]
- [70] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및 T181로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화 부위를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분, 또는 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 조성물을 제공한다.
- [71] 상기 인산화 부위 및 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분, 또는 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [72]
- [73] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분, 또는 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 인산화 펩타이드를 제공할 수 있다. 구체적으로, 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 타우 단백질에서 각각의 위치의 인산화를 포함하는 인산화 펩타이드로서, 각각의 위치의 인산화를 포함하는 3 내지 50개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있고, 구체적으로는 5 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 9 내지 21개의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.
- [74] 일 실시양태로서, 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머병 잠복기를 조기 진단하기 위한, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 4의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [75] 다른 일 실시양태로서, 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머성 경도인지장애를 조기 진단하기 위한, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및/또는 T231 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S199;S202 및/또는 S404 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및/또는 서열번호 12의 인산화 펩타이드, 보다 바람직하게는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7 및/또는 서열번호 8의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [76] 다른 일 실시양태로서, 알츠하이머병 잠복기 단계와 알츠하이머성 경도인지장애 단계를 구분하기 위한, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및/또는 T231 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Y394;S396, S202 및/또는 S404 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및/또는 서열번호 12의 인산화 펩타이드, 보다 바람직하게는 서열번호 2, 서열번호 5 및/또는 서열번호 8의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [77] 다른 일 실시양태로서, 알츠하이머성 경도인지장애 단계와 알츠하이머성 치매 단계를 구분하기 위한, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231 및/또는 T181 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 보다 바람직하게는 S202, S404, T231 및/또는 T181 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 12 및/또는 서열번호 13의 인산화 펩타이드, 보다 바람직하게는 서열번호 5, 서열번호 8, 서열번호 12 및/또는 서열번호 13의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [78] 다른 일 실시양태로서, 인지기능 정상군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 4의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [79] 다른 일 실시양태로서, 경도인지장애 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한, S396;S404 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 1의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [80] 다른 일 실시양태로서, 치매 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한, S285;S289 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 11의 인산화 펩타이드일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [81]
- [82] 본 발명에서는 전술한 바와 같이 타우 단백질의 과인산화를 측정하여 알츠하이머병의 조기 진단 및 단계 구분과 뇌내 아밀로이드 베타 축적 감별을 가능하게 하며, 이러한 타우 단백질의 과인산화는 타우병증(tauopathy)의 주된 특징이기 때문에 알츠하이머병 뿐만 아니라, 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy, PSP), 피질기저핵변성(Corticobasal degeneration, CBD), 피크병(Pick's disease), FTDP-17(frontotemporal dementias with parkinsonism linked to chromosome 17), 만성

외상성 뇌병증(Chronic traumatic encephalopathy, CTE)을 비롯한 타우병증과 관련된 퇴행성 뇌질환에도 적용이 가능하다.

[83]

발명의 실시를 위한 형태

[84]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[85]

[86]

혈액을 통해 알츠하이머병을 진단하는 것은 비침습성, 비용, 시설 등 여러 측면에 있어서 장점이 있지만 혈액은 뇌를 포함한 다양한 조직들과 물질교환이 이루어지기 때문에 혈액 내 지표를 통한 진단에 있어 지표로서의 특이성이 떨어지는 경우가 많다. 아울러, Immunoassay 방법을 이용하는 기존의 사례에서는, 항체의 가용도, 특이도, 민감도 등에 의해 제한이 존재하였다.

[87]

그에 따라, 혈액시료를 분석하는데 방해가 되는 혈액시료의 특성에서 기인한 문제점들을 해결하기 위한 다양한 전처리 방법, 예컨대, 소수의 고농도 단백질들을 제거하는 immunodepletion 방법, 단백질 농도의 dynamic range를 줄이는 방법으로서 다양한 펩타이드 리간드 조합의 bead library를 이용하여 고농도의 단백질 농도를 희석시키고 저농도의 인산화 단백질을 농축시키는 방법, complexity를 낮추기 위해 fractionation하는 방법 등이 시도되었으나, 각각의 한계점이 존재하였다.

[88]

이러한 혈액시료의 특성을 극복하기 위한 많은 연구들이 있었음에도 불구하고 혈액 인산화 단백질의 분석은 조직이나 세포시료에 비해 현저히 낮은 인산화 펩타이드 농축효율과 선택성으로 고통받고 있다.

[89]

이에, 본 발명에서는 높은 complexity와 넓은 dynamic range를 가진 depletion이 시행되지 않은 혈액 시료를 대상으로 인산화 펩타이드 농축법을 최적화하고 가장 높은 인산화 펩타이드 농축효율을 가진 방법을 개발하고자 하였다. 그에 따라, 동일한 양의 혈장시료를 사용했음에도 불구하고 인산화 펩타이드 농축법의 종류나 버퍼조성에 따라서 동정된 인산화 펩타이드, 인산화단백질, 인산화 위치, 인산화 펩타이드에 해당하는 spectra의 수가 크게 달라지는 것을 알 수 있었으며, 본 발명의 방법은 높은 인산화 펩타이드 농축효율을 가진 농축법을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.

[90]

[91]

실시예 1: 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량

[92]

[93]

알츠하이머병 조기 진단을 위하여 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하여 이를 토대로 알츠하이머병 잠복기 단계(preclinical AD 단계) 또는 알츠하이머성 경도인지장애(MCI-AD)를 판단하고자 하였다.

[94]

[95] 전체적인 실험의 모식도는 도 1에 나타내었고 구체적인 실험 방법은 도 2에 도시된 바와 같다. 구체적으로, 실험에 이용한 그룹별 혈장은 각 그룹에 해당하는 환자 10명으로부터 동일한 양을 얻어 합쳐진 혈액샘플로부터 얻었다.

[96]

[97] 여기에서 각 그룹은 다음을 의미한다.

[98] Normal-: 인지기능도 정상이고 아밀로이드(amyloid) 침착이 일어나지 않은 그룹

[99] Normal+ (preclinical AD): 인지기능은 정상이지만 아밀로이드 침착이 발견된 그룹

[100] MCI-: 경도인지장애를 가지고 있지만 아밀로이드 침착이 일어나지 않은 그룹

[101] MCI+ (MCI-AD): 경도인지장애를 가지고 있고 아밀로이드 침착이 발견된 그룹

[102] AD-: 치매로 진단될 정도의 인지기능 저하가 일어났지만 아밀로이드 침착이 일어나지 않은 그룹

[103] AD+ (Dementia-AD): 치매로 진단될 정도의 인지기능 저하가 일어났고 amyloid 침착이 발견되어 알츠하이머성 치매로 진단된 그룹

[104]

[105] 혈장 샘플을 용해 버퍼 (50mM Tris HCl pH 8.0, 8M urea, 25x Complete (protease inhibitor), 10X phosphatase inhibitor)로 용해(lysis)시켰다. 상기 용해된 샘플을 37°C에서 DTT(최종 농도 20mM)를 첨가하여 실온에서 30분 내지 1시간 동안 디설파이드 환원반응 시키고, 이오도아세트아미드(최종 농도 50mM)를 첨가하여 실온에서 암조건으로 30분간 설프히드릴기 알킬화 반응을 수행하였다. 처리된 샘플을 50mM NH_4HCO_3 를 이용하여 우레아의 최종 농도가 2M 이하가 되도록 희석하였고, 트립신과 샘플의 비율을 1:50으로 트립신 처리하여 37°C에서 18시간 반응시켰다. 그 후 C-18 Reverse Phase로 탈염화 하여 펩타이드 혼합물을 수득하였다. 리간드로 철 이온(Fe^{3+})이 흡착된 Fe-IMAC column을 사용하여 고정화 금속 이온 친화성 크로마토그래피 (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography, IMAC)를 수행하였다. 수득된 펩타이드 혼합물을 로딩 버퍼 용액에 용해시킨 후 동일한 로딩 버퍼 용액으로 평형화 시켜놓은 Fe-IMAC column에 주입하였다. 샘플이 로딩된 Fe-IMAC column을 로딩 버퍼 용액으로 세척된 후 용출 버퍼 용액에 의해 인산화 펩타이드가 농축된 용출액을 수득하였다. 수득한 용출액을 액체크로마토그래피-병행 반응 모니터링(liquid chromatography-parallel reaction monitoring: LC-PRM)을 이용한 질량분석법을 통해 정량하였다.

[106]

[107] 여기에서 정량된 인산화 펩타이드의 목록은 하기 표 1에 기재된 바와 같다. 구체적으로, 타우 단백질 전체 아미노산 서열(서열번호 14)로부터 넘버링된 인산화 위치를 기재하였으며, 각 펩타이드의 인산화 위치를 밑줄 및 볼드로 표시하였다.

[108]

[109] [표1]

일련번호	아미노산 서열	인산화 위치	서열목록
#1	TDHGAEIVYK <u>SPVVS</u> GDT <u>SPR</u>	S396;S404	서열번호 1
#2	TDHGAEIV <u>YK</u> <u>SPVVS</u> GDTSPR	Y394;S396	서열번호 2
#3	TDHGAEIVYK <u>SPVVS</u> GDT <u>SPR</u>	S396;S400;S404	서열번호 3
#4	TDHGAEIV <u>YK</u> <u>SPVVS</u> GDT <u>SPR</u>	Y394;S396;(T403/S404)	서열번호 4
#5	SGYSSPG <u>SPG</u> TPGSR	S202	서열번호 5
#6	SGYSSPG <u>SPG</u> TPGSR	S198;S202	서열번호 6
#7	SGYSSPG <u>SPG</u> TPGSR	S199;S202	서열번호 7
#8	SPVVSGDT <u>SPR</u>	S404	서열번호 8
#9	SPVV <u>SGDT</u> <u>SPR</u>	S400;S404	서열번호 9
#10	KLDLSNVQ <u>SK</u>	S289;N286(deami)	서열번호 10
#11	KLDLSNVQ <u>SK</u>	S285;S289	서열번호 11
#12	VAVVR <u>T</u> PPK	T231	서열번호 12
#13	TPPAPK <u>T</u> PPSSGEPP K	T181	서열번호 13

[110] 실시예 2: 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량결과 확인

[111]

[112] 상기 실시예 1의 방법을 통하여 각 그룹 별로 인산화 펩타이드를 정량한 결과를 나타내었다.

[113] 구체적으로, 도 3에서 인산화 펩타이드의 정량을 수치로 기재하였으며, 이를 히스토그램(도 4)과 히트맵(heatmap)(도 5)을 이용하여 도식화하였다. 히트맵에서는 정상 대조군 대비 fold change로 도식화하였으며, 그 수치를 도 6에 나타내었다.

[114]

[115] 도 3 내지 도 6에서 보는 바와 같이, 타우 단백질로부터 유래된 인산화 펩타이드들이 알츠하이머병 특이적으로 증가된 것이 확인되었으며, 그 중 일부 인산화 펩타이드들은 알츠하이머성 치매 초기, 즉 이전 단계인 preclinical AD 와 MCI-AD 에서 이미 2배 이상으로 증가한 것이 확인되었다.

[116]

[117] 실시예 3: 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량결과 분석

[118]

[119] 상기 실시예 2의 결과를 통하여, 일부 인산화 펩타이드들이 알츠하이머성 치매 초기에 이미 증가한 것을 확인하였는바, 도 7에 나타난 바와 같이 각 단계에 따른 특이적 증가와 각 단계에서 뇌의 아밀로이드 축적에 특이적인 변화를 보다 상세하게 확인하였다.

[120]

[121] **3-1: preclinical AD 단계에서 조기 진단이 가능한 인산화 펩타이드**

[122]

[123] 도 8은 #4 인산화 펩타이드를 정량한 결과를 나타낸다. Normal- 그룹에 비하여 Normal+ 그룹, 즉 인지기능은 정상이지만 아밀로이드 침착이 발견되어 preclinical AD로 진단할 수 있는 그룹의 인산화 펩타이드 측정값이 2배 이상 증가한 것을 확인하였다.

[124] 이를 통해, #4 인산화 펩타이드의 정량을 통해 아직 증상이 나타나지 않더라도 preclinical AD 단계에 있는 피검체를 진단할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[125]

[126] **3-2: MCI-AD 단계에서 조기 진단이 가능한 인산화 펩타이드**

[127]

[128] 도 9는 #2, #3, #5, #6, #7, #8, #9, #12 인산화 펩타이드를 정량한 결과를 나타낸다. Normal+ 그룹에서는 별다른 증가를 확인할 수 없으나, MCI+ 그룹, 즉 경도인지장애를 가지고 있고 아밀로이드 침착이 발견된 그룹의 인산화 펩타이드 측정값이 2배 이상 증가한 것을 확인하였다.

[129] 이를 통해, #2, #3, #5, #6, #7, #8, #9, #12 인산화 펩타이드의 정량을 통해 경도인지장애가 있을 뿐 아니라 추후 치매로 발전될 수 있는 가능성이 있는 피검체를 진단할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[130]

[131] **3-3: MCI 동일 단계에서 아밀로이드 침착 여부를 구분할 수 있는 인산화 펩타이드**

[132]

[133] 도 10은 #1 인산화 펩타이드를 정량한 결과를 나타낸다. MCI+ 그룹에 비하여 MCI- 그룹에서 오히려 측정값이 증가한 것을 확인하였다.

[134] 이러한 결과는, 경도인지장애를 가지는 동일한 단계에 있는 피검체라 하더라도, 아밀로이드 침착이 일어나지 않는 것으로 보아 비알츠하이머성 경도인지장애인지를 구분하는 데에도 활용될 수 있음을 나타낸다.

[135]

[136] **3-4: AD 동일 단계에서 아밀로이드 침착 여부를 구분할 수 있는 인산화 펩타이드**

[137]

- [138] 도 11은 #11 인산화 펩타이드를 정량한 결과를 나타낸다. AD+ 그룹에 비하여 AD- 그룹에서 오히려 측정값이 증가한 것을 확인하였다.
- [139] 이러한 결과는, 치매를 가지는 동일한 단계에 있는 피검체라 하더라도, 아밀로이드 침착이 일어나지 않는 것으로 보아 비알츠하이머성 치매인지를 구분하는데에도 활용될 수 있음을 나타낸다.
- [140]
- [141] 실시예 4: 혈액내 타우를 포함한 치매 관련 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량을 통해 비임상/임상시험을 위한 알츠하이머병 단계별 환자군 또는 정상군을 선별하는 방법
- [142]
- [143] 전술한 결과들에 따르면, 혈액내 타우를 포함한 치매 관련 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량을 통해 알츠하이머병군 또는 정상군 선별에 활용하여 임상시험 성공 확률을 높이는 방법을 제공할 수 있다. 약 효능 입증을 위한 임상시험은 미리 예측한 기대 효과를 임상시험 참여자들에 대해 달성하는지 통계적 유의성을 보임으로서 결과가 판정되는데, 도 7에서 나타나는 바와 같이, 본 발명에서 이용된 타우를 포함한 치매 관련 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량을 통해 알츠하이머병 단계들을 구분하는 경우 정확히 신약이 목표로 하는 알츠하이머병 환자만을 시험 대상으로 포함시킴으로써, 최대한 임상시험 성공 확률을 높일 수 있다. 알츠하이머병의 경우, 약 효능에 의한 증상의 호전 여부 측정은 이미지/뇌척수액을 이용한 바이오마커 또는 문진에 의해 측정되는데 이미지/뇌척수액을 이용한 바이오마커는 비용, 시설, 치료 채취에서의 접근성과 부작용 등의 문제점이 있었고 문진에 의한 방법 또는 문진의 경우 척도가 세밀하지 않고 객관적이고 표준화된 정량이 어렵다는 문제점이 있다.
- [144] 본 발명에서는 이 문제점을 해결하기 위해, 정확히 치료제가 목표로 하는 알츠하이머병 환자만을 효능평가를 위한 임상시험 대상으로 선별하여 최대한 임상시험 성공 확률을 높이려 한다. 중추신경계 약물의 경우 위약에 대한 반응비율이 높아 대상군의 이질성을 낮추고 약물 반응성을 예측할 수 있는 바이오마커를 설정하는 것이 성공률을 높이는데 있어 중요한 전략이 된다. 특히 알츠하이머병의 경우, 확진 자체가 어렵기 때문에 치료제가 목표로 하는 정확한 대상자 선별 및 약물 반응군 선별이 더욱 중요하다. 따라서 본 발명은 도 12에 나와 있는 방법을 통해 타우를 포함한 치매 관련 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량을 대상자 또는 대상모델의 선별에 활용하여 임상시험의 확률을 높이는데 활용하고자 한다.
- [145] 도 12를 참조하면, 가장 먼저, 알츠하이머병 치료제 효능 입증을 위한 임상시험 실험 후보군을 모집하는 단계(S1)가 진행된다. 이후, 복수의 실험 후보군을 대상으로, 실험 후보군의 혈액 시료를 준비하는 단계(S2), 혈액내 단백질을, 단백질 분해효소를 이용하여 펩타이드화하는 단계(S3), 상기 수득된 펩타이드에 인산화 펩타이드 농측법을 적용하여 타우를 포함한 치매 관련 단백질 유래 인산화 펩타

이드를 농축하는 단계 (S4), 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 질량분석법을 이용하여 상기 농축된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계 (S5) 및 정량 결과를 토대로 알츠하이머 병이 존재하는지 진단하는 단계(S6)가 진행된다. 이후 S6 단계를 통해 진단 결과가 도출되면, 진단 결과를 기초로, 복수의 실험 후보군을 치료제가 목표로 하는 알츠하이머병 단계에 해당하는 환자군과 정상 환자군으로 구분하는 단계(S7)가 진행될 수 있다. 이 때 실제 목표로 하는 알츠하이머병 단계에 해당하는 환자군만을 기초로, 임상 시험을 진행하는 단계(S8) 및 임상 시험 결과를 토대로 치료제 효과를 입증하는 단계(S9)를 통해, 정확히 새로운 치료제가 목표로 하는 알츠하이머병 단계에 해당하는 군만을 임상 시험 대상으로 포함시킴으로써 최대한 임상 시험 성공 확률을 높일 수 있다.

[146]

[147] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] (a) 분리된 생물학적 시료로부터 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 수득하는 단계; 및
(b) 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 알츠하이머병 잠복기 및 알츠하이머성 경도인지장애의 조기 진단을 포함하고; 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머병 잠복기 단계, 알츠하이머성 경도인지장애 단계, 및 알츠하이머성 치매 단계 간의 구분을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 타우 단백질의 인산화는 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및 T181로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화인 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및 T181로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 5 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, (c) 상기 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머병 잠복기를 조기 진단하는 것으로서, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 상기 정량값이 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머병 잠복기인 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 알츠하이머병 조기 진단은 정상 대조군과 구분하여 알츠하이머성 경도인지장애를 조기 진단하는 것으로서, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및 T231로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 인지기능이 정상이고 뇌 아밀로이드 플라크가 없는 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 경도인지장애인 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머병 잠복기 단계와 알츠하이머성 경도인지장애 단계를 구분하는 것으로서, Y394;S396,

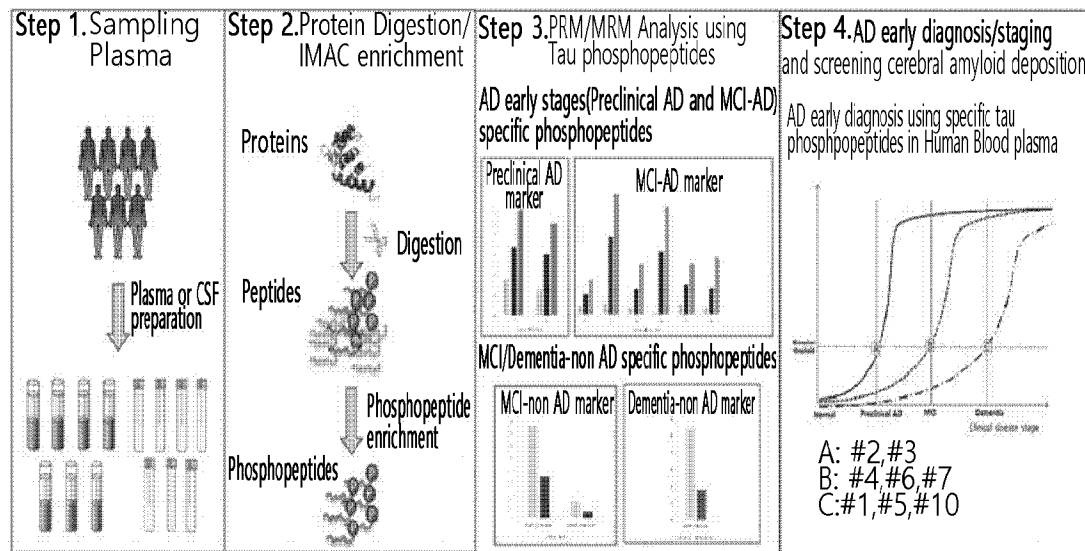
S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404 및 T231로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 알츠하이머병 잠복기 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 정도인지장애 단계인 것으로 판단하는 것인, 방법.

- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 알츠하이머병 단계 구분은 알츠하이머성 정도인지장애 단계와 알츠하이머성 치매 단계를 구분하는 것으로서, Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231 및 T181로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 알츠하이머성 정도인지장애 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 알츠하이머성 치매 단계인 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 분리된 생물학적 시료 내 단백질을, 단백질 분해효소를 이용하여 펩타이드화하여 수득되는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 단백질 분해효소는 Lys-c, Arg-C, Asp-N, Gluc-C, Lys-N, 서몰리신(thermolysin), 엘라스타제(elastase), Tryp-N, 트립신(trypsin) 및 키모트립신(chymotrypsin)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 분해효소인 것인, 방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 수득된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 인산화 펩타이드 농축법에 의해 농축하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 방법.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드의 정량은 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)를 이용한 질량분석법에 의해 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 질량분석법은 LC-SRM(liquid chromatography-selected reaction monitoring), PRM(Parallel Reaction Monitoring), SIM(Selected Ion monitoring) 또는 MRM(Multiple Reaction Monitoring)인 것인, 방법.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 정량된 인산화 펩타이드의 양에 대하여 T 검정 p-값 분석, ROC (Receiver-Operating curve) 및 AUC (Area under the ROC curve) 분석 중 한 가지 이상을 선택하여 수행함을 특징으로 하는 정량적 프로파일링을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

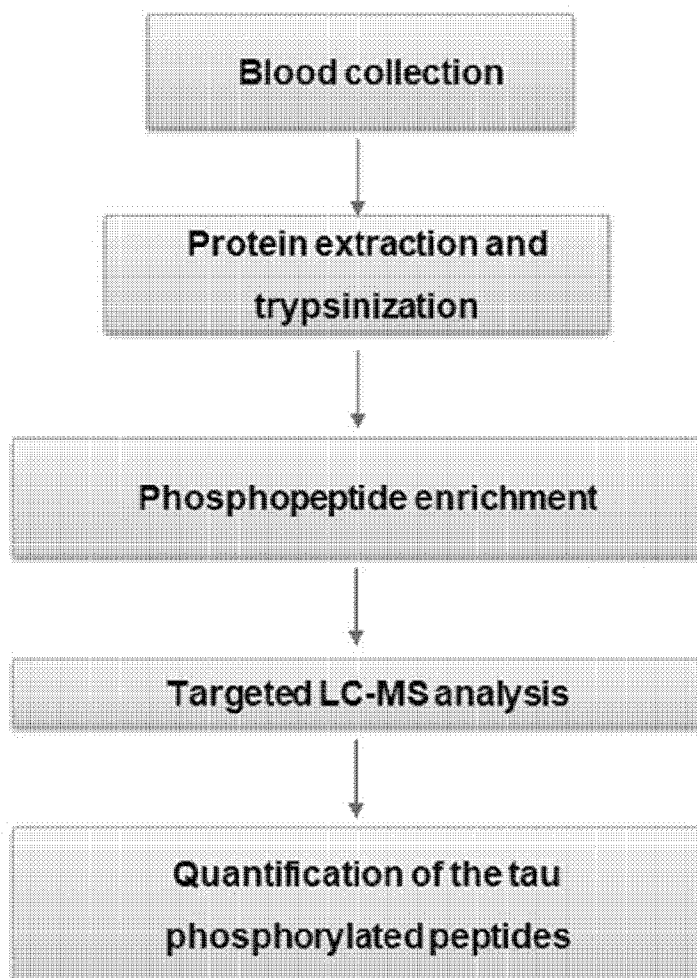
- [청구항 17] (a) 분리된 생물학적 시료로부터 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 수득하는 단계; 및
(b) 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 단계를 포함하는, 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 인지기능 정상군, 경도인지장애 환자군 또는 치매 환자군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 여부를 판별하는 것인, 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 타우 단백질의 인산화는 Y394;S396;(T403/S404), S396;S404, 및 S285;S289로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화인 것인, 방법.
- [청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드는 서열번호 14의 아미노산 서열로 표시되는 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), S396;S404, 및 S285;S289로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화를 포함하는 5 내지 30개의 아미노산 서열로 구성되는 것인, 방법.
- [청구항 21] 제17항에 있어서, (c) 상기 정량된 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 대조군과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 22] 제17항에 있어서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 인지기능 정상군에서 판별하는 것으로서, Y394;S396;(T403/S404) 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 인지기능 정상 대조군과 비교하여 높은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 높은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 23] 제17항에 있어서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 경도인지장애 환자군에서 판별하는 것으로서, S396;S404 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 경도인지장애 환자 대조군과 비교하여 낮은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 24] 제17항에 있어서, 상기 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별은 치매 환자군에서 판별하는 것으로서, S285;S289 위치의 인산화를 포함하는 타우 단백질 유래 인산화 펩타이드를 정량하는 것이며, 정량값이 뇌의 아밀로이드 베타 축적되지 않은 치매 환자 대조군과 비교하여 낮은 경우 또는 대조군의 정량값으로 정해진 기준치보다 낮은 경우 뇌의 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단하는 것인, 방법.
- [청구항 25] 타우 단백질에서 Y394;S396;(T403/S404), Y394;S396, S396;S400;S404, S202, S198;S202, S199;S202, S404, S400;S404, T231, 및 T181로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 위치의 인산화 부위를 검출할 수 있는 제제를 포

함하는, 알츠하이머병 조기 진단 또는 단계 구분, 또는 뇌의 아밀로이드 베타 축적 판별을 위한 조성물.

[도1]



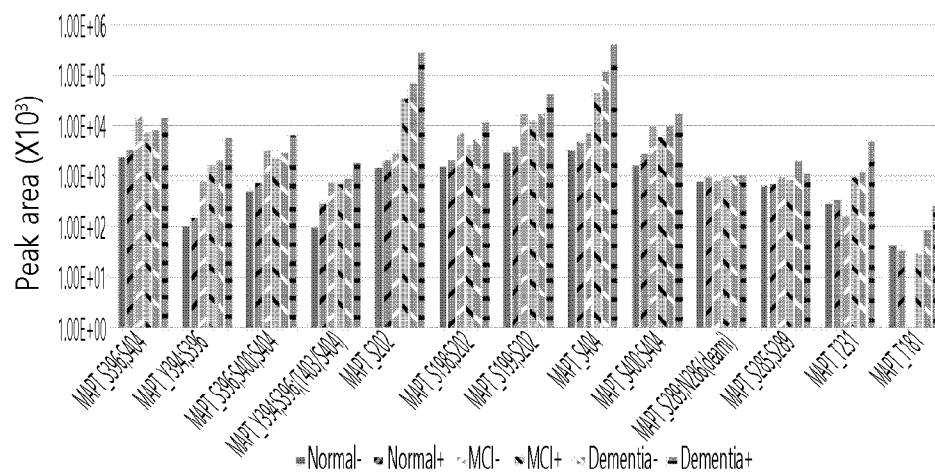
[도2]



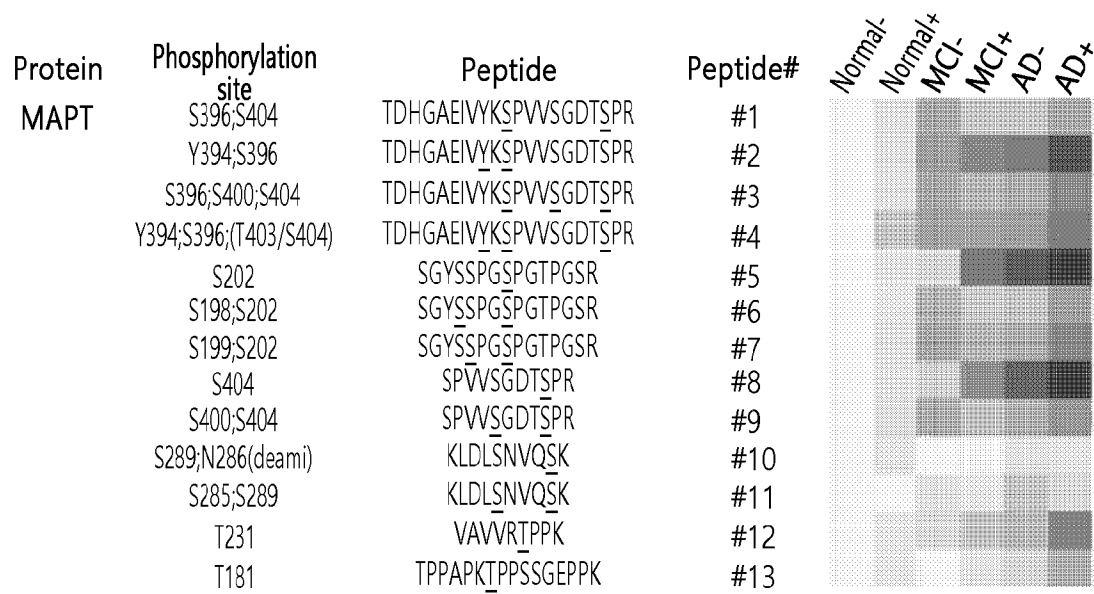
[도3]

Sequence	modification	Normal-	Normal+	MCI-	MCI+	Dementia-	Dementia+
TDHGAIVYKSPWVSGDTSPR	S396;S404	2.4E+06	3.2E+06	1.5E+07	7.3E+06	8.1E+06	1.4E+07
TDHGAIVYKSPWVSGDTSPR	Y394;S396	1.0E+05	1.5E+05	7.7E+05	1.7E+06	2.1E+06	5.7E+06
TDHGAIVYKSPWVSGDTSPR	S396;S400;S404	4.9E+05	7.4E+05	3.2E+06	2.3E+06	2.8E+06	6.4E+06
TDHGAIVYKSPWVSGDTSPR	Y394;S396;(T403/S404)	9.6E+04	2.9E+05	7.4E+05	7.4E+05	8.7E+05	1.8E+06
SGYSSPGSPGTPGSR	S202	1.5E+06	2.0E+06	2.9E+06	3.4E+07	6.7E+07	2.8E+08
SGYSSPGSPGTPGSR	S198;S202	1.6E+06	2.0E+06	7.1E+06	4.1E+06	5.3E+06	1.2E+07
SGYSSPGSPGTPGSR	S199;S202	2.9E+06	3.9E+06	1.7E+07	1.3E+07	1.7E+07	4.1E+07
SPVVS_GDTSPR	S404	3.1E+06	4.6E+06	7.1E+06	4.4E+07	1.2E+08	3.9E+08
SPVVS_GDTSPR	S400;S404	1.6E+06	2.7E+06	9.3E+06	5.9E+06	9.6E+06	1.7E+07
KLDLSNVQSK	S289;N286(deami)	7.6E+05	9.5E+05	7.9E+05	9.1E+05	1.0E+06	1.0E+06
KLDLSNVQSK	S285;S289	6.3E+05	6.9E+05	9.2E+05	8.4E+05	2.0E+06	1.1E+06
VAWVRTPPK	T231	2.8E+05	3.3E+05	1.6E+05	9.8E+05	1.2E+06	4.8E+06
TPPAPKTPPSSGEPPK	T181	4.3E+04	3.3E+04	0.0E+00	2.9E+04	8.5E+04	2.5E+05

[도4]



[도5]



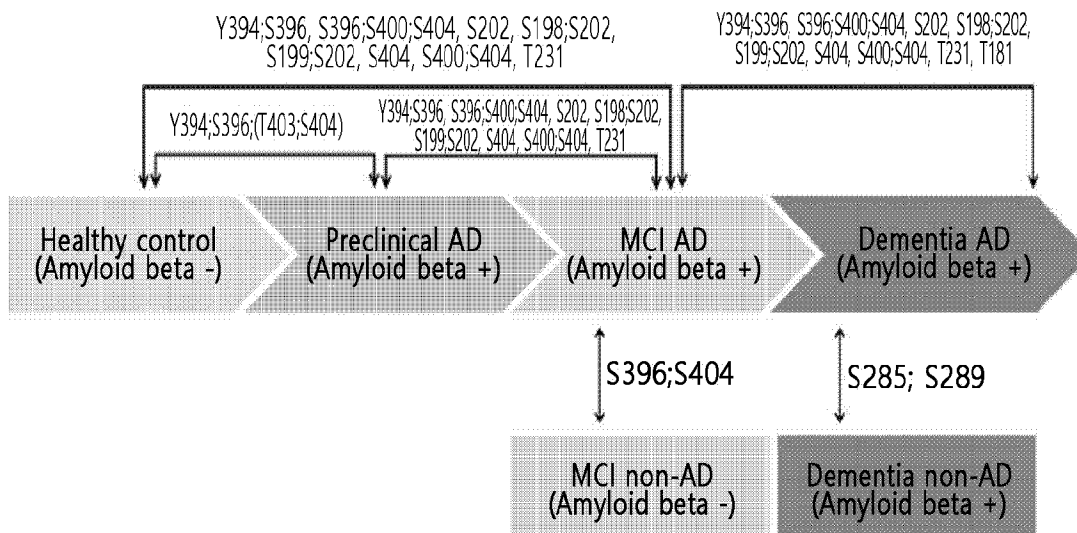
[도6]

타우단백질의 인산화 위치별 정량 결과 (정상대조군 대비 fold change)

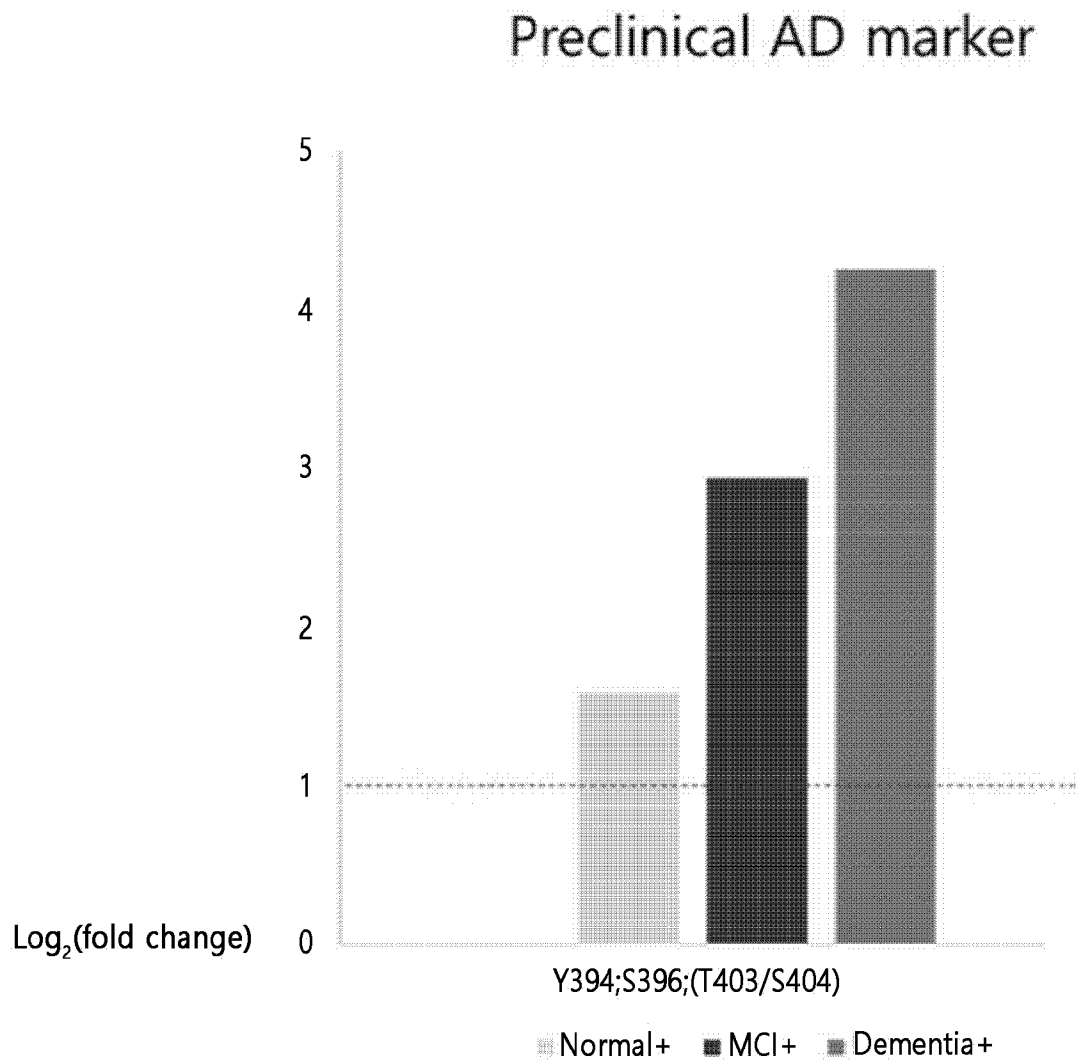
타우단백질 인산화위치	알츠하이머병 잠복기	알츠하이머성 경도인지장애	알츠하이머성 치매
S396;S404	1.33	*3.04	5.83
Y394;S396	1.50	***17	***57
S396;S400;S404	1.51	**4.69	***13.06
Y394;S396;(T403/S404)	*3.02	***7.71	***18.75
S202	1.33	***22.67	***186.67
S198;S202	1.25	*2.56	***7.5
S199;S202	1.34	**4.48	***14.14
S404	1.48	***14.19	***125.81
S400;S404	1.69	*3.69	***10.63
S289;N286(deami)	1.25	1.20	1.32
S285;S289	1.10	1.33	1.75
T231	1.18	*3.5	***17.14
T181	0.77	0.67	**5.81

2배이상(*)	
4배이상(**)	
6배이상(***)	

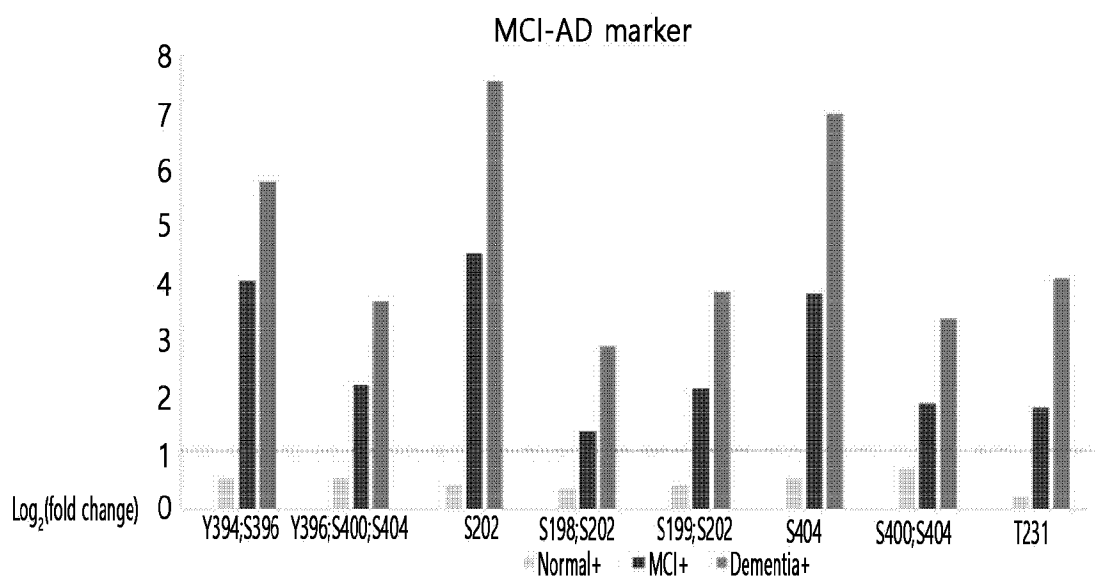
[도7]



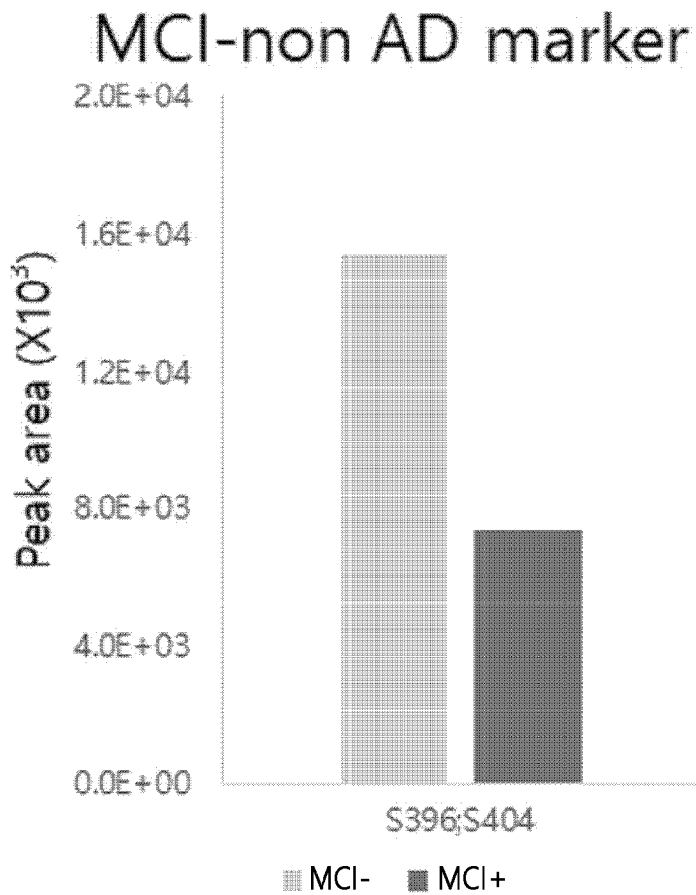
[도8]



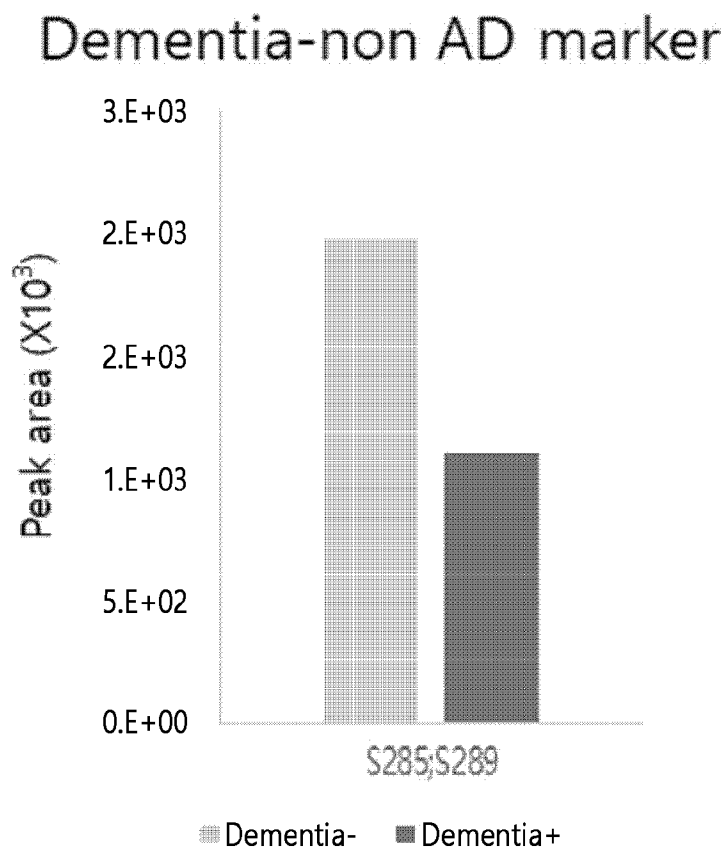
[도9]



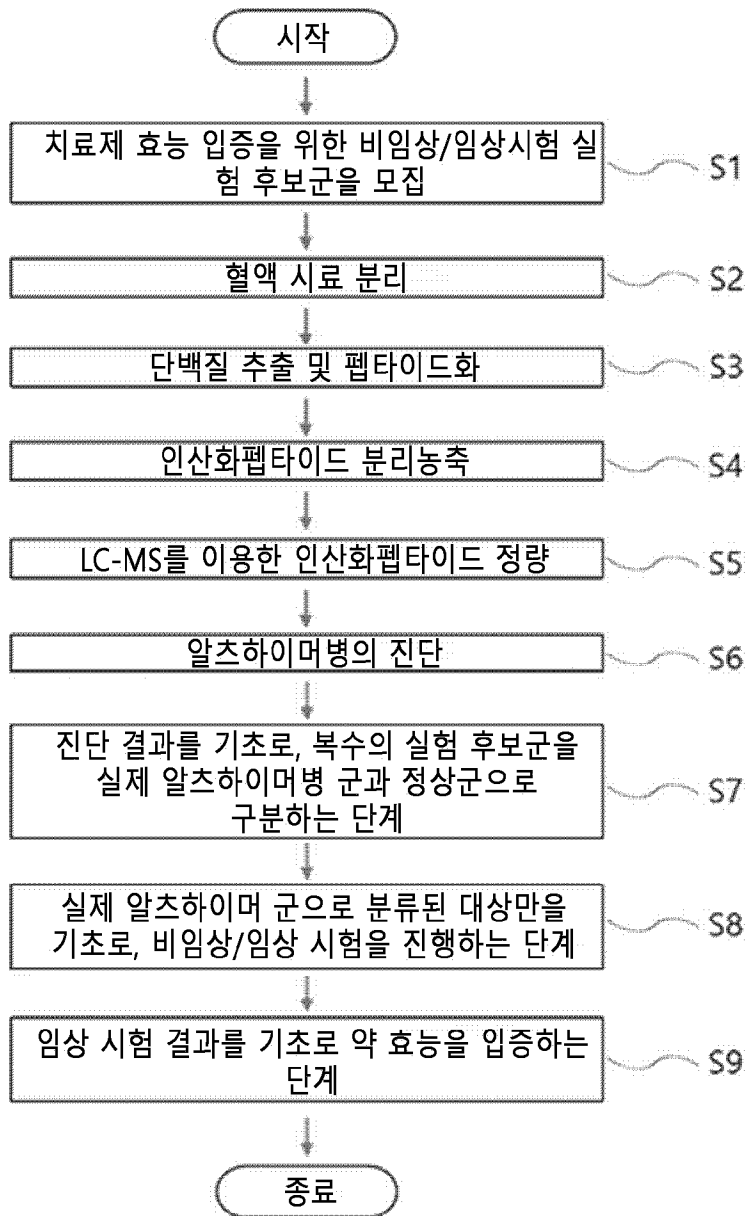
[도10]



[도11]



[도 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68(2006.01); G01N 30/02(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/68(2006.01); C07K 14/47(2006.01); G01N 27/62(2006.01); G01N 33/53(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 타우(tau), 인산화(phosphorylation), 아밀로이드 베타(amyloid beta), 알츠하이머(alzheimer), 단계(stage), 진단(diagnosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-519505 A (ELECTROPHORETICS LTD.) 19 July 2018 (2018-07-19) See paragraphs [0003], [0045], [0190], [0192], [0266]-[0268], [0272]-[0273], [0282], [0298] and [0303]; and claims 2, 11, 20-21, 25-26 and 28.	1-21,25
A		22-24
X	KR 10-2021-0004996 A (WASHINGTON UNIVERSITY) 13 January 2021 (2021-01-13) See paragraphs [0046]-[0049], [0053]-[0058], [0293]-[0294] and [0296].	1-17,21,25
X	KARIKARI, Thomas K. et al. Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. The Lancet Neurology. 2020, vol. 19, pp. 422-433. See abstract; and pages 423, 426-428 and 430-431.	1-5,9-18,21,25
X	QIN, Wei et al. Phosphorylated tau 181 serum levels predict alzheimer's disease in the preclinical stage. Frontiers in Aging Neuroscience. 13 June 2022, vol. 14, article no. 900773, pp. 1-11. See abstract; and pages 2-5 and 8-9.	1-5,9-16,25
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 October 2023		Date of mailing of the international search report 12 October 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009231

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUAREZ-CALVET, Marc et al. Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical alzheimer's continuum when only subtle changes in Aβ pathology are detected. EMBO Molecular Medicine. 2020, vol. 12, e12921, pp. 1-19. See abstract; and pages 2, 4, 8 and 11-13.	1,3-5,10-17,21,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009231

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/009231

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2018-519505	A	19 July 2018	EP	3304088	A1	11 April 2018
				JP	2021-073455	A	13 May 2021
				JP	6826543	B2	10 February 2021
				JP	7241104	B2	16 March 2023
				US	2018-0140585	A1	24 May 2018
				WO	2016-189163	A1	01 December 2016
KR	10-2021-0004996	A	13 January 2021	CN	112166117	A	01 January 2021
				CN	114761807	A	15 July 2022
				EP	3788062	A1	10 March 2021
				EP	4028775	A1	20 July 2022
				JP	2021-523357	A	02 September 2021
				JP	2022-547209	A	10 November 2022
				JP	7301394	B2	03 July 2023
				KR	10-2022-0062024	A	13 May 2022
				US	11085935	B2	10 August 2021
				US	11402392	B2	02 August 2022
				US	2020-0400689	A1	24 December 2020
				US	2021-0341495	A1	04 November 2021
				US	2022-0317136	A1	06 October 2022
				US	2023-0017557	A1	19 January 2023
				WO	2019-213612	A1	07 November 2019
				WO	2021-050733	A1	18 March 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i; G01N 30/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68(2006.01); C07K 14/47(2006.01); G01N 27/62(2006.01); G01N 33/53(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 타우(tau), 인산화(phosphorylation), 아밀로이드 베타(amyloid beta), 알츠하이머(alzheimer), 단계(stage), 진단(diagnosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2018-519505 A (ELECTROPHORETICS LTD.) 2018.07.19 단락 [0003], [0045], [0190], [0192], [0266]-[0268], [0272]-[0273], [0282], [0298], [0303]; 청구항 2, 11, 20-21, 25-26, 28 참조.	1-21,25
A		22-24
X	KR 10-2021-0004996 A (위성턴 유니버시티) 2021.01.13 단락 [0046]-[0049], [0053]-[0058], [0293]-[0294], [0296] 참조.	1-17,21,25
X	KARIKARI, THOMAS K 등, 'Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts', The Lancet Neurology, 2020, 19권, 페이지 422-433 요약; 페이지 423, 426-428, 430-431 참조.	1-5,9-18,21,25
X	QIN, WEI 등, 'Phosphorylated tau 181 serum levels predict alzheimer's disease in the preclinical stage', Frontiers in Aging Neuroscience, 2022.06.13, 14권, article no. 900773, 페이지 1-11 요약; 페이지 2-5, 8-9 참조.	1-5,9-16,25
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년10월12일(12.10.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년10월12일(12.10.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SUAREZ-CALVET, MARC 등, 'Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical alzheimer's continuum when only subtle changes in Aβ pathology are detected', EMBO Molecular Medicine, 2020, 12권, e12921, 페이지 1-19 요약: 페이지 2, 4, 8, 11-13 참조.	1,3-5,10-17,21,25

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2018-519505 A	2018/07/19	EP 3304088 A1	2018/04/11
		JP 2021-073455 A	2021/05/13
		JP 6826543 B2	2021/02/10
		JP 7241104 B2	2023/03/16
		US 2018-0140585 A1	2018/05/24
		WO 2016-189163 A1	2016/12/01
KR 10-2021-0004996 A	2021/01/13	CN 112166117 A	2021/01/01
		CN 114761807 A	2022/07/15
		EP 3788062 A1	2021/03/10
		EP 4028775 A1	2022/07/20
		JP 2021-523357 A	2021/09/02
		JP 2022-547209 A	2022/11/10
		JP 7301394 B2	2023/07/03
		KR 10-2022-0062024 A	2022/05/13
		US 11085935 B2	2021/08/10
		US 11402392 B2	2022/08/02
		US 2020-0400689 A1	2020/12/24
		US 2021-0341495 A1	2021/11/04
		US 2022-0317136 A1	2022/10/06
		US 2023-0017557 A1	2023/01/19
		WO 2019-213612 A1	2019/11/07
		WO 2021-050733 A1	2021/03/18