



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0009028
(43) 공개일자 2017년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2800/2821 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0100354

(22) 출원일자 2015년07월15일

심사청구일자 2015년07월15일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

민경태

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 울산과학기술대학교 교수아파트 402 동 502호

(74) 대리인

특허법인태백

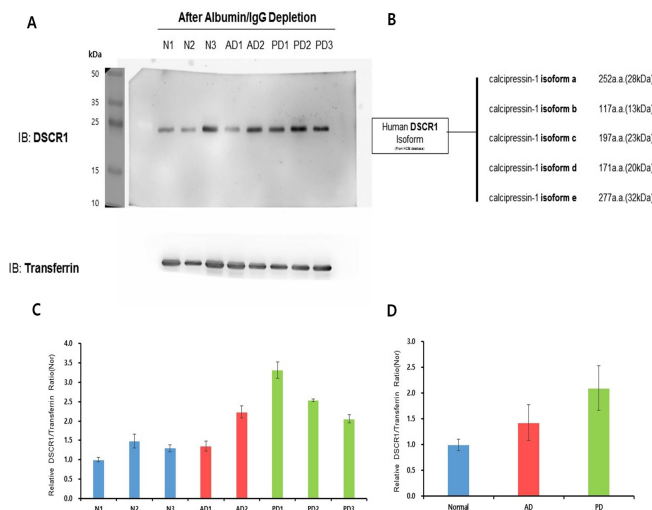
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 신경질환 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물에 관한 것으로, 상기 DSCR1 단백질은 알츠하이머병 또는 파킨슨병 환자의 혈액 또는 뇌척수액에서 과발현되므로, 이 발현 차이를 이용하여 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환을 초기에 진단할 수 있으므로, 퇴행성 신경질환 진단용 조성물, 진단 키트 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/2835 (2013.01)

G01N 2800/2878 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 다운증후군 초래 단백질 1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spino cerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물.

청구항 4

혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 키트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단용 키트.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spino cerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단용 키트.

청구항 7

혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 시료로부터 DSCR1 단백질 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

상기 시료의 DSCR1 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 그것보다 높을 경우 퇴행성 신경질환으로 진단하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spino cerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퇴행성 신경질환 진단용 조성물, 진단 키트 및 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 신경질환은 신경세포(뉴런)의 점진적인 구조적, 기능적인 손실을 의미하며 발병의 징후가 서서히 나타나며, 노화와 함께 발병되는 경우가 많다. 일단 발병하면 사망 시까지 수년 혹은 수십 년에 걸쳐 지속적으로 병이 진행되며, 가족력에 따른 유전적 영향이 상당히 있는 것으로 알려져 있다. 퇴행성 신경질환은 신경계의 특정부위를 주로 침범하여 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위가 침범되어 복합적인 증상이 나타날 수도 있다. 환자가 보이는 임상 양상에 따라 진단을 하게 되는데, 이 경우 증상이 다양하고 서로 다른 질환들이 공통적인 임상 증상을 보이는 경우가 많아 진단이 어렵다.

[0003] 대표적인 퇴행성 신경질환의 하나인 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 베타-아밀로이드(β -amyloid)의 뇌내 축적과 그로 인한 신경독성이 발병의 중요한 원인으로 알려져 있다. 특히 베타-아밀로이드(β -amyloid)는 단백질이 뇌에 축적되어 엉키게 되는 플라그를 만들고 이로 인해 알츠하이머병이 발병하는 것으로 알려져 있다. 상기 알츠하이머병에 걸리게 되면, 뇌의 전반적인 위축, 뇌실의 확장, 신경 섬유의 다발성 병변(neurofibrillary tangle) 및 신경반(senile plaque) 등과 같은 병리조직학적 특징이 나타나고, 기억력, 판단력 및 언어능력 등의 지적 기능 감퇴와 행동 양상 장애가 나타나게 되며, 심하게 되면 우울증과 같은 정신의학적 증세도 동반된다. 또한, 상기와 같은 증세들이 점진적으로 진행되어 발병 후 6 내지 8년 정도가 지나면 죽음에 이를 수 있다.

[0004] 하지만, 현재 퇴행성 신경질환의 진행을 늦춰주는 많은 방법이 개발되었기 때문에 초기 진단은 무엇보다 중요하다.

[0005] 그러나 현재 신뢰할 수 있는 초기 진단 검사는 없으며, 환자가 사망 후 뇌조직 검사를 통해 확인하는 방법이 보편적이다.

[0006] 따라서 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한 퇴행성 신경질환을 초기에 정확하게 진단할 수 있는 조성물 또는 진단 방법에 대해 개발이 요구된다..

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2007-0106121호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명은 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한 퇴행성 신경질환을 초기에 정확하게 진단할 수 있는 진단

용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 또한 본 발명은 퇴행성 신경질환을 초기에 정확하게 진단할 수 있는 진단용 키트를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0010] 또한 본 발명은 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 다운증후군 초래 단백질 1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 키트를 제공한다.

[0013] 상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이다.

[0014] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면 DSCR1 단백질은 알츠하이머병 또는 파킨슨병 환자의 혈액 또는 뇌척수액에서 과발현되므로, 상기 DSCR1 단백질의 발현 차이를 이용하여 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환을 초기에 진단하여, 퇴행성 신경질환의 진행을 늦추는데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 정상인, 알츠하이머병(Alzheimer Disease, AD) 환자 또는 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 환자로부터 얻은 혈청에서 다운 증후군 초래 단백질1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)의 발현을 측정한 결과이며,

도 2는 PD 환자로부터 얻은 뇌척수액에서 DSCR1 단백질을 검출한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 발명자는 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한 퇴행성 신경질환의 정확한 초기 진단 방법에 대하여 연구하던 중, 퇴행성 신경질환 환자의 혈액과 뇌척수액에서 다운 증후군 초래 단백질 1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)이 과발현한다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0018] 다운 증후군(Down syndrome, DS)은 인간의 21번 염색체가 정상보다 1개 더 많은 3개가 존재하는 염색체 질환이다. 이 염색체에 존재하는 유전자들은 과발현되어 지적 장애 또는 신체적 기형과 같은 여러 문제를 초래한다. 이 유전자들 중, 대표적인 후보 유전자가 다운 증후군 초래 단백질 1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)유전자이며 심장, 간, 신장과 같은 여러 조직에서 발현이 된다. 초기에 DSCR1은 칼시뉴린(Calcineurin)을 조절하는 단백질로만 알려져 왔었으나, 최근 연구 결과에서 DSCR1이 종양 주변부의 혈관 생성을 막아 종양을 억제하는 역할을 한다는 것이 밝혀졌다.

[0019] 하지만, 상기 DSCR1이 혈액 또는 뇌척수액에서 과발현되며, 이런 과발현과 퇴행성 신경질환과의 연관성에 대하여는 보고된 바가 없다.

[0020] 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 다운증후군 초래 단백질 1(Down Syndrome Critical Region 1, DSCR1)을 검출하는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 DSCR1 단백질은 Gene ID 1827이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화

증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spinocerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0024] 또한 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 퇴행성 신경 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0025] 상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spinocerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 항체는 다클론성 항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론 항체(monoclonal antibody)이다.
- [0028] 상기 다클론성 항체는 당업자에 알려진 방법에 따라 면역원으로 상기 유전자에 의해 발현된 단백질 또는 그 편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조할 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 랫트, 양 또는 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리정제한다.
- [0029] 상기 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자에 의해 발현된 단백질을 마우스에 면역화시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역화시킨다. 마우스에서 분리된 항원-생산 B 임파구를 인간 또는 마우스의 골수종(myeloma)과 융합하여 불멸화된 하이브리도마(hybridoma)를 생성하며, 상기 하이브리도마 세포를 가지고 간접적인 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunoabsorbent assays, ELISA)을 사용하여 모노클로날 항체의 생성 여부를 확인하고 양성 클론을 택하여 배양한 후 항체를 분리정제하거나 랫트의 복강에 주입한 후 복수를 채취함으로써, 단일클론 항체를 제조할 수 있다.
- [0030] 상기 단일클론 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호올스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 결합된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응 시킴으로써 정량분석할 수도 있고, 또는 직접 상기 단백질에 대한 단일클론 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 결합된 것을 사용하여 정량분석할 수 있다.
- [0031] 상기 단백질과 항체의 반응은 웨스턴 블랏(western blot), 면역침강법(Immunoprecipitation, IP), 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunoabsorbent assays, ELISA) 및 면역염색법(Immunohistochemistry, IHC)등의 단백질 확인 실험을 통해 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 항체를 포함하는 키트는 전형적으로 동결건조 형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있으며, 상기 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescours), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [0033] 또한 본 발명은 혈액 또는 뇌척수액에서 얻어진 시료 중 DSCR1 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 퇴행성 신경질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 시료로부터 DSCR1 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 발현 수준을 정상 대조군 시료의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 상기 시료의 DSCR1 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 그것보다 높을 경우 퇴행성 신경질환으로 진단하는 단계;를 포함한다.
- [0035] 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer Disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측생경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 폴리글루타민병(polyglutamine disease), 헌팅턴무도병(Huntingtons disease) 및 척수소뇌변성증(spinocerebellar degeneration)으로 이루어진 군에서 선택된 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명

의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] <실시예 1> 인간 혈액에서 DSCR1 단백질 측정

[0040] 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 정상인, 알츠하이머병(alzheimer's disease, AD) 환자 또는 파킨슨병(Parkinson's disease, PD) 환자로부터 얻은 혈액에서 DSCR1 단백질을 측정하고 비교하였다.

[0041] 상기 AD 환자와 PD 환자의 혈청은 양산부산대학교병원으로부터 공급받아 실험에 사용하였다.

[0042] 웨스턴 블롯을 하기 전, 혈청 내에 존재하는 알부민(Albumin)과 IgG를 제거하여 실험에 사용하였다. 퀴아젠(Qiagen)사의 알부민/IgG 감소 키트(Albumin/IgG Depletion Kit)를 이용하여 제거를 하였다. 이를 위하여 먼저, 혈청 25 µl를 1x 인산 완충 식염수(Phosphate buffer saline, PBS) 75 µl에 희석하였다. 업체에서 제공한 프로토콜대로 depletion spin column을 준비한 후, 희석된 혈청을 넣어주었다. Column내의 레진(resin)과 혈청이 잘 혼합되도록 충분히 흔들어 준 후, 상온에서 5분간 셰이커(end-over-end shaker)에 놓아두었다. Column에서 혈청을 분리해 내기 위하여, Column을 500 xg의 속도로 10초간 원심분리하였다. 위 과정을 통해 알부민과 IgG를 혈청에서 제거하였으며, 해당 혈청을 웨스턴 블롯에 사용하였다.

[0043] 웨스턴 블롯은 일반적인 실험방법대로 실험을 진행하였다. 단백질을 멤브레인에 이동시킨 후, 5% 무지방 건조 밀크(non-fat dry milk)를 0.1% 트윈 20(tween 20)이 포함된 트리스 완충 식염수(tris-buffered saline, TBST)에 용해시킨 후, 이를 상기 멤브레인에 첨가하여 상온에서 1시간 동안 블락킹하였다. 그런 후, 5% 탈지유가 포함된 TBST에 항-DSCR1 항체(Anti-DSCR1 antibody, Santa Cruz, Cat. sc-377507)를 1:1000으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인을 TBST을 이용하여 상온에서 10분간 3번 세척하고 5% 탈지유가 포함된 TBST에 항-마우스 IgG HRP(at-mouse IgG HRP)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인을 TBST을 이용하여 상온에서 10분간 3번 세척하였고, 1x TBS를 이용하여 멤브레인을 상온에서 각각 30분, 15분간 씻어 내었다. 그런 후, 화학발광법(chemiluminescence system, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 가시화하였다. 이때 트랜스페린(Transferrin, Abcam, Cat. ab1223, 1:1000)은 로딩 컨트롤(loading control)로 사용하였다.

[0044] 그 결과 도 1 중 A 및 C와 같이, 정상인의 혈청에 비해, AD와 PD 환자의 혈청에서 DSCR1이 더 발현된 것을 확인하였다.

[0045] 도 1 중 B와 같이, 인간 DSCR1은 다섯 가지의 동형단백질(Isoform)을 가지며, 각각 다른 크기를 갖는다.

[0046] 그 중 DSCR1 isoform C는 23kDa의 크기를 가지는데, 상기 도 1 중 A에서 측정된 DSCR1의 크기도 이와 동일한 것을 확인하였다.

[0047] 특히 도 1 중 D를 참고하면, 특히 PD 환자의 혈청에서 DSCR1이 과발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] <실시예 2> 인간 뇌척수액에서 DSCR1 단백질 측정

[0050] 상기 실시예 1에서 가장 많은 DSCR1 발현을 보인 PD 환자의 뇌척수액으로부터 DSCR1 단백질의 발현을 측정하였다.

[0051] 이를 위해 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0052] 그 결과 도 2와 같이, 뇌척수액 내의 DSCR1 단백질의 크기와 상기 실시예 1에서 확인한 혈액 내의 DSCR1 단백질의 크기가 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

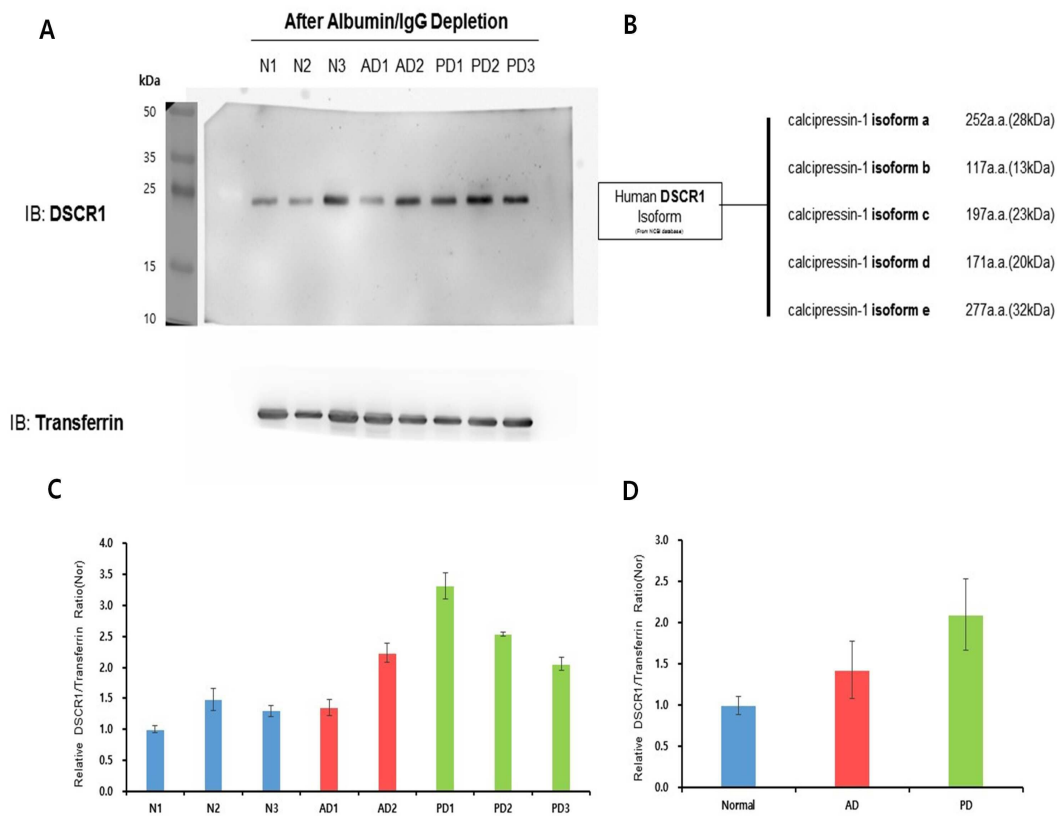
[0054] 종합하면 알츠하이머병 또는 파킨슨병 환자는 정상인보다 혈액 또는 뇌척수액에서 DSCR1 단백질의 과발현을 보이므로, 상기 DSCR1 단백질의 발현 차이를 이용하여 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경질환을 초기에 진단할 수 있다.

[0056] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한

구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

