

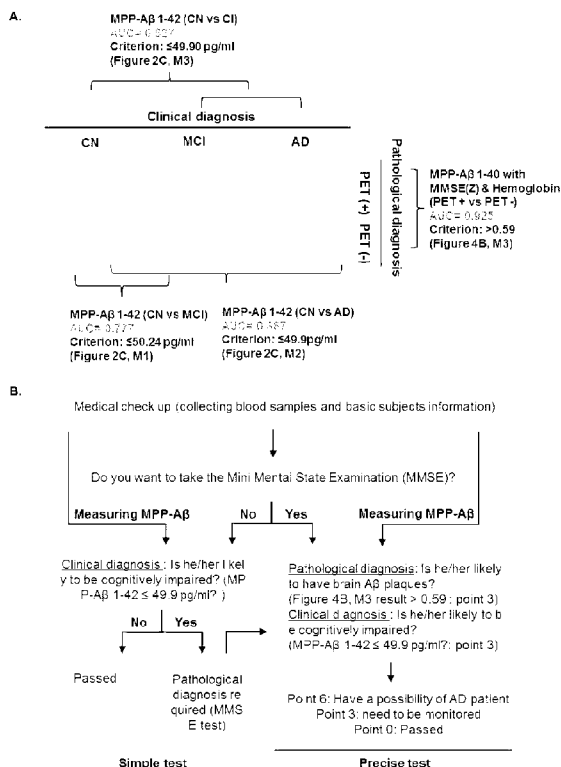


- (51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) A61B 5/15 (2006.01)
G01N 1/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004572
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 30일 (30.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0061626 2015년 4월 30일 (30.04.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR];
08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 묵인희 (MOOK, Inhee); 03486 서울시 용산구 한강대로 30길 25, A-1602, Seoul (KR). 박종찬 (PARK, Jong-Chan); 02715 서울시 성북구 길음로 13길 22, 두산위브 아파트 701동 1202호, Seoul (KR). 조현진
- (74) 대리인: 이종승 (LEE, Jong Seung); 05836 서울시 송파구 법원로 11길 11, 현대 지식산업센터 A-513, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR CLINICALLY AND PATHOLOGICALLY MONITORING ALZHEIMER'S DISEASE THROUGH CONCENTRATION OF AMYLOIDBETA IN PLASMA

(54) 발명의 명칭 : 혈장 내 아밀로이드베타의 농도를 통해 알츠하이머병을 임상학적 및 병리학적으로 모니터링하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for quantifying Aβ in plasma by treating the plasma with MPP and/or TCEP, and a method for diagnosing, using the quantifying method, whether or not clinical cognitive deterioration and pathological Aβ accumulation occur. Through cut-off values of measured values measured by the method for quantifying Aβ according to the present invention, it is possible to identify normal, MCI and AD subjects and determine whether or not accumulation of Aβ in the brain occurs, and it is possible to predict progression to AD.

(57) 요약서: 본 발명은 혈장에 MPP 및/또는 TCEP을 처리함으로써 혈장 내 Aβ를 정량하는 방법 및 이를 통한 임상학적인지능력 저하 및 병리학적 Aβ 축적 여부를 진단하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 Aβ 정량 방법으로 측정된 측정값들의 cut-off 값을 통하여 정상인, MCI 및 AD와 뇌에서의 Aβ 축적 여부를 판별할 수 있고, AD로의 진행을 예측할 수 있다.



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, 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 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 혈장 내 아밀로이드베타의 농도를 통해 알츠하이머병을 임상학적 및 병리학적으로 모니터링하는 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 혈장에 프로테아제 억제제와 포스파타아제 억제제의 혼합물 (Mixture of protease inhibitors and phosphatase inhibitors, MPP) 및/또는 TCEP를 포함하는 혈장 전처리 조성물을 처리한 후 혈장 내 A β 농도를 정량함으로써 임상학적 인지능력 저하 및 병리학적 A β 축적 여부를 진단하여 알츠하이머병으로의 진행을 모니터링하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 알츠하이머병(AD)은 기억력 감소와 그 외의 인식 부족 등의 특징이 나타나는 신경퇴행성병으로(Mckhann et al., Neurology 34;939(1984)), 치매의 가장 중요한 원인이다. 기억력, 사고력이 급격히 저하하는 퇴행성 뇌질환인 치매는 대표적인 노인성 질환으로, 뇌기능이 점진적으로 쇠퇴하여 기억, 사고 및 일상적 생활 능력 및 행동에 문제가 생기는 질병으로 뇌 내에 독성의 아밀로이드베타(Amyloid beta, A β , Abeta)가 축적되는 것을 특징으로 한다. 뇌 속에 축적된 A β 는 뇌세포의 손상 및 사멸을 일으켜 뇌의 여러 기능에 문제를 가져온다. 국내의 경우, 65세 이상 노인 인구 중 약 9.5%인 29만명 정도가 노인성 치매로 고생하고 있으며, 이중 73%인 18 만명은 습관적으로 거리를 배회하는 등 중증 환자로 구분된다. 이는 앞으로 인구의 노령화가 가속화됨에 따라 치매 환자는 지속적으로 증가하여, 2020년에는 현재보다 2.4배까지 증가한 70만명에 이를 것으로 예상된다. 치매는, 유형별로는 알츠하이머병이 51%, 혈관성 치매가 34%로 85%를 차지하며, 이 밖에 감염성 질환, 대사성 질환 등에 의한 치매가 15%를 차지한다. 알츠하이머병과 혈관성 치매는 전체 치매 원인 질환의 대부분을 차지하는 가장 흔한 원인이다. 그러나 사망 전 정확한 감별 진단이 마련되어 있지 않아 그 진단의 신뢰도에 많은 논란이 계속되고 있다. 특히 국내의 경우에는 사망 후에도 죽음에 대한 동양적인 사고 방식으로 인해 뇌조직을 얻는 것이 힘들어 병리학적 최종 진단을 구하는 것이 거의 불가능한 실정이다. 알츠하이머병의 임상적 진단은 병력(history taking)과 신경심리학적 검사에 주로 의존하며, 부차적인 검사로 자기공명영상(MRI)나 PET과 같은 영상 검사를 시행한다. PiB- PET(Pittsburgh compound B- positron emission tomography)은 뇌 영상촬영을 통해 뇌 내 A β 축적 수준을 확인할 수 있는 방법으로서 AD 및 MCI 진단에 이용되나 고가이다.
- [3] 뇌에서 아밀로이드베타 단백질 (A β) 응집체, 특히 A β 40(A β 1-40) 및 A β 42(A β 1-42)의 축적은 알츠하이머병(AD)과 관련되며 이들 단백질 응집체는 알츠하이머병에 대한 표준마커로서 생각되고 있다. 그러나, AD에 대한 유일하게

확실한 테스트는 사후 뇌 샘플로부터 섬유성 A β 응집체의 플라크를 면역조직화화학적으로 염색하는 것이다. 현재, AD에 대한 사전진단테스트로서 FDA에 인정된 것은 없으나, A β 42에 대한 항체 또는 형광으로 표지된 A β 42를 사용하는 시드멀티머화(seeded multimerization) 방법이 알려져 있다. 이는 건강한 대조군 피험자로부터 채취한 뇌척수액(CSF)과 비교하여 알츠하이머병에 걸린 환자로부터 수득한 뇌척수액에서 A β 올리고머 종이 증가된 수준으로 확인되었던 연구에 기초하며(Georganopoulou et al. PNAS, 2005, 102, 2273; Pitschke et al., Nature Medicine, 1998, 4(7)), 알츠하이머병 환자의 뇌척수액에서 베타아밀로이드를 측정한다.

- [4] 혈액 내에서 A β 들은 단량체가 아닌 섬유형태로 응집되어 있고, 혈액 내에 존재하는 다양한 단백질들은 A β 농도에 대한 정확한 측정을 방해한다. 대표적으로 혈액 내 단백질의 많은 부분을 구성하는 인간 혈청알부민(Human Serum Albumin, HSA)은 혈액 내 존재하는 A β 에 결합하고 이들과 함께 3차 구조를 이룬다. 그 결과, A β 이 알부민 내에 감춰지게 되면 이것의 에피토프가 표면에 노출되지 않으며, 이에 따라 항-A β 항체에 결합하지 않을 가능성이 높아진다. 뿐만 아니라 혈액 내에는 다양한 프로테아제들이 존재하며, 이들 프로테아제들이 단백질을 절단하여 안정적인 단백질 농도 유지를 방해한다.

- [5] 현재까지 혈액 내 A β 농도를 정확하게 측정하는 방법에 대한 연구가 많이 진행되어 있지 않으며, 알츠하이머병의 조기 검출을 위한 보다 더 빠르고 효율적인 진단방법, 및 잠재적 치료법을 평가하고자 하는 추가적 생체마커가 필요한 실정이다. 특히, 알츠하이머병과 경도인지장애(MCI)를 혈액으로부터 간단하게 구별할 수 있는 진단방법은 현재 존재하고 있지 않은 실정이다.

- [6] 한편, 대한민국 등록특허 제10-1493935호는 생체로부터 분리된 세포, 또는 조직에 존재하는 아밀로이드베타 플라크(plaque)에 특이적인 이광자 형광프로브를 이용하여 이를 영상화하는 것을 기술한다. 또한, 대한민국 등록특허 제10-1478609호는 커큐민 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 베타아밀로이드 응집물 관련 질환 진단용 조성물을 기술한다. 그러나, 혈장을 전처리 하여 혈장 내 A β 를 정량하고 이를 통해 MCI 및 AD를 진단 및 예측하는 방법에 대한 기술은 전무한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에, 본 발명은 혈액(혈장)에 프로테아제 억제제와 포스파타아제 억제제의 혼합물(MPP)을 처리하여 혈장 내 A β 42 및/또는 A β 40를 안정화시킨 후, 이(들)의 농도의 측정함으로써, 임상학적 인지능력(또는 인지기능) 저하 및 뇌에서의 병리학적 A β 축적 여부를 진단 및 예측하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 방법으로 측정된 혈장 내 A β 42 및/또는 A β 40의 농도로부터, 알츠하이머병의 발병을 진단 및 예측하는 방법을 제공하는 것을

목적으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 방법으로 측정된 혈장 내 A β 42 및/또는 A β 40의 농도로부터, 임상학적 인지능력 저하 여부 및 뇌에서의 병리학적 A β 축적 여부를 예측 및 진단하며, 이를 통해 뇌 PET 촬영 여부를 결정하는 일련의 진단시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물을 포함하여, 혈장 내 A β (amyloid beta)의 농도(분포) 표준편차를 감소 시키는, 혈장 전처리 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 혈장에서, A β 의 농도 및 농도변화를 검출하고 이를 정상인의 혈장 내 A β 평균농도 값과 비교하여, 인지기능 이상을 진단 및 예측하는 방법을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 혈장에서 A β 의 농도를 측정하고, 뇌 속에서의 병리학적 A β 축적 여부를 예측 및 진단하는 방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 농도값, 피험자로부터 분리된 혈액 샘플 내 헤모글로빈 농도값, 및 피험자의 MMSE스코어(Z) 측정값을 입력하는 정보입력부; 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 평균농도 값이 저장된 데이터베이스부; 상기 정보입력부에서 입력한 정보를 데이터베이스부에 저장된 값과 비교 분석하고 로지스틱 회귀분석을 수행하는 정보처리부; 및 상기 정보처리부로부터 연산된 결과를 출력하는 정보출력부로 구성된, 임상학적 및 병리학적 알츠하이머병 예측 및 진단시스템을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에 따르면, 혈장에 MPP를 처리하거나, MPP를 처리한 다음 환원제인 TCEP를 추가로 처리한 후, 혈장 내 A β 의 농도를 정량하고, 이를 정상인에서의 A β 농도값과 비교함으로써, 임상학적 인지기능 이상인 MCI 및 AD를 진단 및 예측할 수 있다. 또한, 상기 정량된 혈장 내 A β 농도로부터 뇌 속에서의 병리학적 A β 축적 여부를 확인하고 AD로의 진행을 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 *in vitro*에서 제작된 A β 의 양을 측정한 도이다;
- [14] A: 실험실에서 제작한 A β 의 단량체 및 섬유형태의 비교; 및
- [15] B: 같은 농도의 단량체 및 섬유형태의 A β 를 정량 한 그래프.
- [16] 도 2는 혈장 내 A β 검출 값에 대한 MPP의 처리 효과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 3은 MPP를 처리한 혈장 내 A β 42 및 A β 40의 농도와 MMSE 스코어 (Z)를 확인하여, [A β 의 농도]와 [정상인과 MCI], [정상인과 AD] 및 [정상인과 CI (MCI 및 AD)]의 상관관계를 검증한 것이다.
- [18] 도 4는 임상적 인지기능 이상으로 판별된 환자들로부터 수득한 혈장 샘플에

MPP를 처리한 후 A β 42 및 A β 40 농도를 검출하고, 이를 PET 촬영결과와 비교하여, 뇌 A β 플라크와의 상관관계를 확인한 것이다.

- [19] 도 5는 MPP 처리한 혈장 내 A β 40 농도 또는 다른 인자들 (MMSE z-스코어 및 혈액 내 헤모글로빈의 농도)과 PiB-PET 스캔 양성 또는 음성 (뇌 속의 A β 축적여부) 결과의 상관관계를 검증한 것이다.
- [20] 도 6은 MPP 처리 후 혈장 내 A β 42 또는 A β 40의 임의의 cut-off 값을 통한 임상적 인지능력 진단 및 병리학적인 뇌 속에서의 A β 축적(플라크)을 판별하는 것을 도식화한 것이다.
- [21] 도 7은 MPP 처리에 후속하여 TCEP를 추가로 처리한 다음, *in vitro* 상태 (A)의 A β 농도 변화 및 혈장 내 (B) A β 의 농도 변화를 확인한 것이다.
- [22] 도 8은 정상군의 MPP 처리된 혈장에 TCEP를 처리함으로써 증가한 A β 의 농도를 통한 PET 양성 및 PET 음성을 구별하는 cut-off 값을 구한 것이다.
- [23] 도 9는 본 발명의 혈장 전처리 조성물 및 혈액응고방지제를 포함하는 혈액 수집 장치의 예를 나타낸 도이다.
- [24] 도 10은 피검자의 혈액으로부터 분리한 혈장을 보관하는 본 발명의 혈장 수집 장치의 예를 나타낸 도이다.
- [25] 도 11은 피검자의 혈액으로부터 분리한 혈장을 본 발명의 혈장 전처리 조성물을 포함하는 혈장 수집 장치에 수집하는 예를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명은 다양한 형태로 변경 또는 변형되어 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 구현예에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.
- [28] 본 발명에서 사용된 용어 "A β 40"은 "A β 1-40"로도 표기될 수 있다.
- [29] 본 발명에서 사용된 용어 "A β 42"는 "A β 1-42"로도 표기될 수 있다.
- [30] 본 발명에서 사용된 용어 "정상군"은 "정상인"과 혼용될 수 있다.
- [31] 본 발명에서 사용된 용어 "혈장 전처리 조성물 (MPP)"은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제를 혼합한 혼합물(Mixture of protease inhibitors and phosphatase inhibitors)이며, TCEP를 추가로 포함할 수 있다. TCEP는 총 부피에 대해 3mM의 농도가 되도록 추가할 수 있다. 프로테아제 억제제는 PMSF(phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride)와 같이 일반적으로 사용될 수 있는 프로테아제 억제제를 1종 이상 사용할 수 있으며, 2종 이상인 경우 프로테아제 억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail, PIC)이라고 불릴 수 있다. 본 발명에서 MPP는 혈장 내 단백질(들)의 안정성을 높여주어, 이에 따라 A β 의 농도가 안정적으로 측정된다.
- [32] 일 측면에서, 본 발명은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물을 포함하여, 혈장 내 A β 농도의 표준편차를 감소 시키는, 혈장 전처리

조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 혈장 전처리 조성물은 상기 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제를 1:1(v/v)로 포함한다. 또한, MPP는 프로테아제 억제제 콕테일(Protease inhibitor cocktail, PIC):PMSF(Serine protease inhibitor):포스파타아제 억제제 콕테일 I:포스파타아제 억제제 콕테일 II를 1:1:1:1(v/v)로 혼합한 것일 수 있다. 또한, 일 구현예에서, 상기 전처리 조성물은 TCEP를 추가로 포함할 수 있다.

- [33] 일 측면에서, 본 발명은 피험자 및 정상인으로부터 수득한 혈장 샘플을 본 발명의 전처리 조성물로 처리한 후 혈장 내 A β 42의 농도를 정량하고; 피험자 혈장 샘플로부터 정량한 A β 42의 농도를 정상인 혈장 샘플로부터의 A β 42의 평균농도 값과 비교하는 것을 포함하여, 인지기능 이상을 예측 및 진단하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 인지기능 이상은 MCI(경도인지 장애) 또는 AD(알츠하이머병)일 수 있다. 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 8.0% 초과하여 감소한 경우 65% 이상의 특이도에서 MCI 환자인 것으로 예측할 수 있다. 다른 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 8.0 내지 11.0% 감소한 경우 65% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도에서 MCI 환자인 것으로 예측할 수 있다. 다른 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 9.0% 초과하여 감소한 경우 70% 이상의 특이도에서 AD 환자인 것으로 예측할 수 있다. 또 다른 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 9.0 내지 21.0% 감소한 경우 70% 이상의 특이도 및 80% 이상의 민감도에서 AD 환자인 것으로 예측할 수 있다. 또 다른 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 8.5% 초과하여 감소한 경우 65% 이상의 특이도에서 CI (MCI 및 AD) 환자인 것으로 예측할 수 있다. 또 다른 일 구현예에서, 피험자의 혈장 내 A β 42의 농도가 정상인의 평균 A β 42 농도와 비교하여 8.5 내지 10.0% 감소한 경우 65% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도에서 CI (MCI 및 AD) 환자인 것으로 예측할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 인지기능 이상을 진단하는 방법을 통해, 임상학적으로 인지능력에 이상이 있는지를 판별할 수 있다.

- [34] 다른 일 측면에서, 본 발명은 피험자로부터 분리된 혈장 샘플을 본 발명의 전처리 조성물로 처리한 후 혈장 내 A β 40의 농도를 정량하고; 피험자로부터 분리된 혈액 샘플에서 헤모글로빈 농도를 검출하며; 상기 혈장 내 A β 40의 농도, 상기 혈액 내 헤모글로빈의 농도 및 MMSE 스코어 (Z)를 하기 수식 1의 로지스틱 회귀분석 및 수식 2에 적용하여 p값을 도출하고; 및 상기 도출한 p값을 PET 음성인 대조군의 평균 p값과 비교하는 것을 포함하여, 뇌 속에서의 병리학적 A β 축적 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

- [35] [수식 1]

- [36]

$$[37] \quad \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} + \dots + \beta_m X_{m,i}$$

[38] (pi: 확률, β_0 : 상수, β_m : 변수의 계수)

$$[39] \quad \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} + \beta_3 X_{3,i}$$

[40] (즉, β_1 : MPP-A β 40의 계수, β_2 : MMSE(Z) 스코어의 계수, β_3 : 헤모글로빈의 계수, x_1 : MPP-A β 40 값, x_2 : MMSE(Z) 스코어 값 및 x_3 : 헤모글로빈 수치)

[41] [수식 2]

$$[42] \quad \text{logit}(p) = \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right)$$

$$P = \frac{1}{1 + e^{-\text{logit}(p)}}$$

[43] 일 구현예에서, 피험자로부터 도출한 p값이 PET 음성인 대조군의 평균 p값과 비교하여 190.0% 이상 증가하는 경우 85% 이상의 특이도에서 뇌 속에 A β 가 축적된 것으로 예측할 수 있다. 본 발명에서 뇌 속에 A β 축적 여부는 궁극적으로 PiB-PET(Pittsburgh compound B- positron emission tomography) 촬영을 통해 확인하였다. 일 구현예에서, 피험자로부터 도출한 p값이 PET 음성인 대조군 평균 p값과 비교하여 190.0 내지 230.0% 증가하는 경우 85% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도에서 뇌에 A β 가 축적된 것으로 예측할 수 있다. 본 발명에서 뇌 속에 A β 가 축적된 것은 PiB-PET 양성 (PiB-PET (+))으로 나타내었다.

[44] 일 측면에서, 본 발명은 1) 피험자로부터 분리된 혈장 샘플을 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제를 혼합한 전처리 조성물로 처리한 뒤 혈장 내 A β 40의 농도를 정량하고; 2) 피험자로부터 분리된 혈장 샘플을 프로테아제 억제제, 포스파타아제 억제제 및 TCEP를 혼합한 전처리 조성물로 처리한 다음 혈장 내 A β 40의 농도를 정량하며; 및 3) 상기 1)에서 정량 한 A β 40의 농도보다 상기 2)에서 정량 한 A β 40의 농도가 8.0 pg/ml 초과 증가하면 65% 이상의 특이도 및 80% 이상의 민감도에서 뇌 속에 병리학적으로 A β 가 축적된 것으로 판단하는 뇌 속에 A β 축적 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다. 특정의 증가된 A β 40의 농도, 예컨대, 9.24 pg/ml 증가는 약 70%의 특이도 및 약 87%의 민감도에서 뇌 속에 A β 축적 여부를 진단할 수 있다. 이처럼 증가된 혈장 내 A β 40의 농도를 갖는 피험자는, 인지기능상으로는 정상일지라도 향후 AD로 진행될 확률이 높은 것으로 예측할 수 있다.

[45] 본 발명에서 사용된 TCEP는 혈장 내에서 알부민 등의 단백질과 결합된 A β 를

분리할 수 있어, 혈장 내 A β 의 검출을 보다 더 정확하게 할 수 있다. 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제만 혼합한 MPP를 처리한 혈장에 비해 TCEP를 함께 포함한 MPP를 처리한 경우에서 정상인의 혈장 내 A β 40 농도가 증가하였으며, 본 발명의 방법을 통해, 병리학적으로 뇌에 A β 가 축적되었는지 여부를 판별할 수 있다.

- [46] 일 측면에서, 본 발명은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물 처리 후 정량한 혈장 내 A β 42 또는 A β 40의 농도로 인지기능 이상 및 뇌의 A β 축적 여부를 동시에 판별하는 방법에 관한 것이다.
- [47] 본 발명의 일 실시예에서, A β 의 정량(검출 또는 측정)은 Bioplex 법을 통하여 측정한 것으로 다른 방법인 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)와 비교하여 민감도와 특이도가 현저히 우수하다.
- [48] 일 측면에서, 본 발명은 피험자 및 정상인으로부터 각각 분리된 혈장 샘플에 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물을 처리한 후 피험자 및 정상인의 혈장 샘플 내 A β 40 및/또는 A β 42의 농도를 각각 비교하여 임상학적으로 인지기능 이상 여부를 판단하고; 및 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물을 처리한 혈장 내 A β 40의 농도값, 피험자로부터 분리한 혈액 샘플 내 헤모글로빈 농도값 및 MMSE(Z) 스코어를 상기 수식 1의 로지스틱 회귀분석 및 상기 수식 2에 적용하여 얻은 p값을 PET 음성인 대조군들의 평균 p값과 비교하여 뇌의 A β 축적 여부를 판단하는 것을 포함하는, 알츠하이머병의 발병 가능성을 예측 및/또는 모니터링 하는 방법을 제공한다.
- [49] 일 측면에서, 본 발명은 MCI(경도인지장애)에서 AD(알츠하이머병)으로의 진행 경과를 모니터링 하는 데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 통하여 정상인과 MCI 및 AD를 구별하고, PiB-PET 양성군과 음성군을 구별함으로써, 단순히 임상학적 인지능력 저하의 진행을 진단하는 것뿐만 아니라, 실제 병리학적 진행 여부도 진단해 낼 수 있다.
- [50] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈장 전처리 조성물로 처리한 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 40 또는 A β 42 농도값, 피험자로부터 분리된 혈액 샘플 내 헤모글로빈 농도값, 및 MMSE스코어(z) 측정값을 입력하는 정보입력부; 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 평균농도 값, PET 음성군의 평균 p값이 저장된 데이터베이스부; 상기 정보입력부에서 입력한 정보를 데이터베이스부에 저장된 값과 비교 분석하고, 상기 수식 1의 로지스틱 회귀분석 및 상기 수식 2의 연산을 수행하는 정보처리부; 및 상기 정보처리부로부터 연산된 결과를 출력하는 정보출력부로 구성된, 임상학적 및 병리학적 알츠하이머병 예측 및 진단시스템을 제공한다. 일 구현예에서, 1) 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 40 농도를 정보입력부에 입력하는 단계; 2) 상기 정보입력부에 입력된 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 40 농도가 상기 데이터베이스에 저장된 정상인의 평균 A β 40 농도와 비교하여 8.5% 초과하여 감소한 경우, 상기

피험자로부터 분리된 혈액 샘플 내 헤모글로빈 농도, 및 상기 MMSE(z) 측정값을 정보입력부에 추가로 입력하는 단계; 3) 상기 정보처리부에 대해, 상기 단계 1) 및 단계 2)의 입력된 정보 및 데이터베이스에 저장된 정보를 이용한 상기 수식 1의 로지스틱 회귀분석 및 수식 2의 연산을 수행하여 P값을 도출하도록 명령을 내리는 단계; 및 4) 로지스틱 회귀분석의 결과, 피험자로부터 도출한 p값이 데이터베이스부의 PET 음성인 대조군의 평균 p값과 비교하여 190.0% 이상 증가하는 경우, 임상학적으로 인지기능 이상이면서 병리학적으로 뇌 속에 A β 가 축적된 것으로 예측하는, 임상학적 및 병리학적 알츠하이머병 예측 및 진단시스템을 제공한다.

- [51] 다른 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈장 전처리 조성물을 포함하는 혈액 수집 장치를 제공한다 (도 9 참조). 일 구현예에서, 상기 혈액 수집 장치는 혈액응고 방지제를 추가로 포함하는 혈액 수집 장치, 예를 들어, 혈액 수집 튜브, 에펜도르프 튜브 또는 키트일 수 있고, 상기 혈액응고제는 혈액이 응고되는 것을 방지하는 약품이 사용될 수 있으며, EDTA일 수 있다.
- [52] 다른 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈장 전처리 조성물을 포함하는 혈장 수집 장치를 제공한다 (도 10 참조). 일 구현예에서, 상기 혈장 수집 장치에 혈액 수집 장치에 피험자의 전혈 중 혈장만을 분리하여 수집하고 보관할 수 있다 (도 11 참조). 일 구현예에서, 본 발명의 혈장 전처리 조성물은 동결건조되어 장치에 포함될 수 있으며, 혈액 (전혈) 약 ~8.5 ml 또는 혈장 3 내지 4 ml 당 혈장 전처리 조성물이 약 340 μ l 포함될 수 있다. 혈장 전처리 조성물은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제를 포함할 수 있으며, 예를 들어, AEBSF 26mM, Aprotinin 20uM, Bestatin 1mM, E-64 0.35mM, 류펩틴(Leupeptin) 0.5mM, 펩스타틴(Pepstatin) A 0.375mM, (-)-p-브로모테트라미솔 옥살레이트(Bromotetramisole oxalate) 0.625mM, 칸타리딘(Cantharidin) 125uM, 마이크로시스틴(Microcystin) LR 125nM, 이미다졸(Imidazole) 50mM, 플루오린나트륨(Sodium Fluoride) 25mM, 몰리브덴산나트륨(Sodium Molybdate) 28.75mM, 오르토바나듐산나트륨(Sodium orthovanadate) 25mM, 주석산나트륨 2수화물(Sodium Tartrate Dihydrate) 100mM 및 PMSF(Phenylmethanesulfonylfluoride) 25mM를 포함할 수 있다. 본 발명의 혈액 수집 장치는 혈액 또는 혈장 수집 후 2 내지 8°C에서 보관될 수 있다.
- [53] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 통상의 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [54] [실시예]
- [55] <실시예 1> 응집에 따른 A β 검출량 확인

- [56] *in vitro*에서 단량체 형태(monomer form) 또는 응집된 섬유형태(fibrillar form)로 제작된 A β 의 검출량을 확인하기 위하여, A β 단백질을 아메리칸웹타이드(CA, USA)에서 구매하고, 제조사의 지시에 따라 준비하였다. 구체적으로, A β 단량체는 A β 펩타이드를 DMSO에 녹인 후 Speedvac(Thermo savant사)으로 동결건조하여 제조하였고, 섬유형태 A β 는 단량체 A β 를 상온에서 24시간 동안 인큐베이션 하여 제조하였다. 프로테아제 억제제 칵테일(Protease inhibitor cocktail, PIC), 세린 프로테아제 억제제(Serine protease inhibitor, PMSF) 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)은 Sigma Aldrich (CA, USA)에서, 포스파타아제 억제제 칵테일(Phosphatase inhibitor cocktail) I (Lot # D1151) 및 II (Lot # C1346)는 A.G. Scientific, Inc에서 각각 구입하였다. 준비한 같은 농도의 단량체 형태 및 섬유형태의 A β 를 Bioplex (Fujirebio Europe N.V.(구 innogenetics)사의 inno-bia plasma A β forms kit를 활용하여 실험한 후 Bio-rad 사의 Bio-plex 200로 정량하였다. 그 결과, 단량체 형태의 A β 보다 섬유형태의 A β 가 원래 제작된 농도보다 현저하게 적게 검출되었다(도 1). 이를 통해, 단량체 형태의 A β 의 검출이 더 정확함을 알 수 있었다.
- [57] <실시에 2> MPP 처리한 혈장 내 A β 농도에 따른 임상학적 인지능력 구별
- [58] <2-1> MPP 처리에 의한 혈장 내 A β 42 및 A β 40 검출 값의 표준편차 확인
- [59] 혈장 내 A β 42 및 A β 40 농도를 동시에 확인하기 위하여, INNO-BIA plasma A β forms 키트 (Innogenetics, Gent, Belgium)를 사용하였고, 혈장 내 A β 수준은 X-map technology (Bioplex 200 systems; Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다. 실험에 이용한 혈장은 하기 표 1의 개체들로부터 얻었다. 혈액 샘플은 K2 EDTA 튜브 (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK)에 수득되었으며, 상온에서 30분 동안 안정화된 뒤 700xg로 5분 동안 상온에서 원심분리하여 상등액인 혈장 샘플을 얻었다. 시료의 순도를 높이기 위해, 수득한 혈장을 동일한 조건으로 추가 원심분리하여 순수한 혈장을 얻은 뒤, 이를 분주하여 -80°C에서 보관하였다. 혈장 전처리 조성물인 MPP는 프로테아제 억제제 칵테일:PMSF(Serine protease inhibitor):포스파타아제 억제제 칵테일 I:포스파타아제 억제제 칵테일 II를 1:1:1:1 (v/v)로 혼합하여, 즉, 프로테아제 억제제와 포스파타아제 억제제를 1:1(v/v)로 혼합하여 제조하였다. MPP 처리에 의한 혈장 내 A β 농도를 확인하기 위하여, 상기 MPP를 혈장 희석액(plasma diluent) 버퍼에 1/25로 희석하고, 상기 희석된 용액으로 다시 혈장을 1/3로 희석 (MPP가 첨가된 혈장 희석액:인간 혈장 샘플 = 2:1)한 다음, 30분 동안 인큐베이션 하였다. 그 후 bioplex로 정량하여, MPP를 처리하기 전의 정량 값과 비교하여 MPP 처리에 의한 혈장 내 A β 42 및 A β 40 농도의 표준편차 값을 구하였다(도 2).

[60] [표 1]

Table 1. Baseline characteristics of subjects in the study.

Characteristics	Normal controls (n=23)	MCI (n=15)	AD (n=16)	P-value
Sex, M/F	7/16	3/12	4/12	-
Age, years, mean $\pm$ SE	71.9 $\pm$ 1.1	74.9 $\pm$ 1.3	69.8 $\pm$ 2.1	0.2226
Education, mean $\pm$ SE	12.5 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 1.1	9.7 $\pm$ 1.2	0.0173
MMSE score, mean $\pm$ SE	27.0 $\pm$ 0.4	22.7 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 0.7	<0.0001
CDR (n)	0 (23)	0.5 (15)	0.5 (5), 1 (11)	<0.0001
ApoE types (n)	E2/E3 (3) E2/E4 (2) E3/E3 (14) E3/E4 (4)	E2/E3 (3) E3/E3 (6) E3/E4 (4) E4/E4 (2)	E2/E3 (0) E3/E3 (7) E3/E4 (7) E4/E4 (2)	-
PiB-PET +/-, n	17/6	9/6	-/16	-

Abbreviations; CN, cognitively normal subjects; MCI, mild cognitive impairment subjects; AD, Alzheimer's Disease patients; MMSE z-score, revised Mini-Mental State Examination considering age, sex and education; CDR, Clinical Dementia Rating; SE, Standard Error; n, number of subjects

[61] CN: 인지 정상 개체들(cognitively normal);

[62] MCI: 경도인지장애 개체들;

[63] AD: 알츠하이머병 환자들;

[64] MMSE z-score: 나이, 성별 및 교육을 고려한 개정필의
간이정신상태평가(Mini-Mental State Examination);

[65] CDR: 치매 척도 검사(Clinical Dementia Rating);

[66] SD: 표준편차;

[67] NA: Non-available; 및

[68] n: 개체 수.

[69] 그 결과, 환자(피험자)의 표현형에 상관없이 전체 개체에서 MPP 처리로 인해 A β 농도의 표준편차값이 감소하였으며, MPP를 처리한 정상인, MCI 환자 및 AD 환자의 혈장 내의 A β 42 및 A β 40 표준편차가 감소하여 환자 개체 간 A β 42 및 A β 40의 농도 분포 폭이 감소함을 알 수 있었다(도 2). 즉, MPP 처리로 인해 혈장 내 A β 42 및 A β 40 값의 노이즈가 제거되어 측정값의 재현성 및 신뢰성이 증대됨을 알 수 있었으며, 특히 A β 40에서 더 안정되었다.[70] <2-2> 임상학적 인지능력 진단 결과와 MPP 처리를 통한 혈장 내 A β 농도의
관련성확인[71] 상기 실시예 <2-1>에서 검출한 MPP 처리 후 혈장 내 A β 42 및 A β 40 값을
확인하고 통계 분석은 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Sandiego, CA, USA)
및 MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium) 소프트웨어를 이용하여
수행하였다. 모든 데이터는 평균의 표준오차(mean $\pm$ standard error of the mean,
SEM)으로 나타냈다. 또한, 단일 스튜던트 t-검정(unpaired Student's t-test)를
이용하여 혈장 내 A β 농도와 PiB-PET 양성 또는 음성군과 비교하였다. ANOVA
분석 후에 GraphPad Prism 5로 Turkey's 다중비교 검정을 수행하였다. 진단
테스트의 성능을 평가하기 위하여, MedCalc를 이용하여 ROC(Receiver Operating

Characteristic) 커브 분석에 따른 회귀분석(stepwise logistic regression)을 수행하였다. 혈장 내 A β 농도 데이터를 이용하여 ROC 커브를 그리고 AUC(Area under the curve)를 Wilcoxon 통계를 이용하여 측정하였다.

- [72] MPP 처리 전 후의 혈장 내 A β 42의 농도를 ROC(Receiver Operating Characteristic) 커브 분석에 따른 회귀분석(stepwise logistic regression)한 결과, MPP 처리에 의해 정상군 (CN) vs MCI, 정상군 vs AD 및 정상군 vs CI (cognitive impairment patients-MCI 및 AD) 모두에서 AUC 값이 현저하게 증가하였으며, MPP 처리 후 정상군 vs MCI 에서 AUC는 77.7 %, 민감도 (질병에 걸린 개체를 질병에 걸렸다고 판별하는 정도)는 87.5% 및 특이도 (질병에 걸리지 않은 개체를 질병에 걸리지 않았다고 판별하는 정도)는 69.6%로 나타났고, 정상군 vs AD에서는 AUC는 86.7%, 민감도는 90.0% 및 특이도는 78.3%로 나타났으며, 정상군 vs CI에서 AUC는 82.7%, 민감도는 83.3% 및 특이도는 78.3%로 나타나, 혈장 내 A β 42가 임상학적 인지능력 정도를 진단하기 위한 바이오 마커로 활용될 가능성이 증가하였음을 확인하였다. 아울러, 이를 통해, MPP 처리 후 혈장 내 A β 42의 농도가 50.24 pg/ml 이하면 MCI 환자이고, MPP 처리 후 혈장 내 A β 42의 농도가 49.90 pg/ml 이하면 AD 환자이며, MPP 처리 후 혈장 내 A β 42의 농도가 49.90 pg/ml 이하면 MCI 및 AD 환자임을 예측할 수 있다 (표 2 및 도 3).

[73] [표2]

Table 2. Diagnostic value of PIC- A β and other biological factors for discrimination between normal controls and cognitively impaired patients or PiB-PET negative subjects and positive subjects.

Discrimination	Parameters	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Criterion	P-value (Coefficients)	P-value (Area=0.5)	Increase in AUC (%) after PIC
(A) Discrimination ability of single markers (stepwise procedure not available)								
CN vs MCI	MPP-A β 1-42	77.7%	87.5%	69.6%	≤ 50.24 pg/ml	-	0.0004	16.0%
CN vs AD	PIC-A β 1-42	86.7%	90.0%	78.3%	≤ 49.90 pg/ml	-	<0.0001	15.0%
CN vs CI (CI, MCI+AD)	PIC-A β 1-42	82.7%	83.3%	78.3%	≤ 49.90 pg/ml	-	<0.0001	15.5%

[74] AUC: 커브 아래 면적; 및

[75] CI: 인지 장애 개체들 (즉, MCI 및 AD).

[76] <2-2-1> 정상군 VS MCI 구별

[77] 상기 실시예 <2-2>의 분석 결과를 통해 구한 cut-off 값을 경계로 하여, 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)가 15% 이내로 변하는 cut off 값 구간 (주황색 및 붉은색 수치)으로 잡으면, 하기 표 3 및 표 4 (표 4는 cutt off 구간을 확대한 것이다)과 같이 나타낼 수 있다. 즉, 정상군의 MPP-A β 42 농도 평균값은 55.1 pg/ml이고, 진단의 신뢰성이 보장되는 cut off 구간은 49.2 내지 50.24 pg/ml로 나타나, 정상군의 평균 수치에 비해 8.9 내지 10.7% 이상 감소 시 MCI 라고 진단할 수 있다. 예를 들면, 정상군의 평균 MPP-A β 42 농도보다 8.9% 미만으로 감소한 경우에는 MCI라고 진단할 수 없지만, 10.7% 초과로 감소하였을

경우에는 MCI라고 진단할 수 있음을 알 수 있다. 다만, MCI로 진단하려면 정상군의 평균 농도에 비해 감소한 비율이 8.9 내지 10.7%가 되어야 MCI로 진단할 수 있는 신뢰성이 있다는 것을 의미한다.

[78] [표3]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
<16.63	0.00	0.0 - 20.6	100.00	85.2 - 100.0		1.00
≤16.63	6.25	0.2 - 30.2	100.00	85.2 - 100.0		0.94
≤29.74	6.25	0.2 - 30.2	95.65	78.1 - 99.9	1.44	0.98
≤30.71	12.50	1.6 - 38.3	95.65	78.1 - 99.9	2.88	0.91
≤32.06	12.50	1.6 - 38.3	91.30	72.0 - 98.9	1.44	0.96
≤38.21	37.50	15.2 - 64.6	91.30	72.0 - 98.9	4.31	0.68
≤41.56	37.50	15.2 - 64.6	86.96	66.4 - 97.2	2.87	0.72
≤43.41	43.75	19.8 - 70.1	86.96	66.4 - 97.2	3.35	0.65
≤44.54	43.75	19.8 - 70.1	82.61	61.2 - 95.0	2.52	0.68
≤45.01	50.00	24.7 - 75.3	82.61	61.2 - 95.0	2.87	0.61
≤46.41	50.00	24.7 - 75.3	78.26	56.3 - 92.5	2.30	0.64
≤49.2	75.00	47.6 - 92.7	78.26	56.3 - 92.5	3.45	0.32
≤50.08	75.00	47.6 - 92.7	69.57	47.1 - 86.8	2.46	0.36
≤50.24	87.50	61.7 - 98.4	69.57	47.1 - 86.8	2.87	0.18
≤56.24	87.50	61.7 - 98.4	34.78	16.4 - 57.3	1.34	0.36
≤57.12	93.75	69.8 - 99.8	34.78	16.4 - 57.3	1.44	0.18
≤58.65	93.75	69.8 - 99.8	26.09	10.2 - 48.4	1.27	0.24
≤59.68	100.00	79.4 - 100.0	26.09	10.2 - 48.4	1.35	0.00
≤85.75	100.00	79.4 - 100.0	0.00	0.0 - 14.8	1.00	

[79] [표4]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≤49.2	75.00	47.6- 92.7	78.26	56.3- 92.5	3.45	0.32
≤50.08	75.00	47.6- 92.7	69.57	47.1- 86.8	2.46	0.36
≤50.24	87.50	61.7- 98.4	69.57	47.1- 86.8	2.87	0.18

[80] <2-2-2> 정상군 VS AD 구별

[81] 상기 실시예 <2-2>의 분석 결과를 통해 구한 cut-off 값을 경계로 하여, 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)가 15% 이내로 변하는 cut off 값 구간으로 잡으면, 하기 표 5 및 표 6 (cut off 구간을 확대한 것이다)와 같이 나타낼 수 있다. 즉, 정상군의 MPP-Aβ42 농도 평균값은 55.1 pg/ml이고, 진단의 신뢰성이 보장되는 cut off 구간은 44.9 내지 49.9 pg/ml로 나타나, 정상군의 평균 수치에 비해 9.5 내지 20.1% 이상 감소 시 AD 라고 진단할 수 있다. 예를 들면, 정상군의 평균 MPP-Aβ42 농도보다 9.5% 미만으로 감소한 경우에는 AD라고 진단할 수 없지만, 20.1% 이상으로 감소하였을 경우에는 AD라고 진단할 수 있음을 알 수 있다. 다만, AD로 진단하려면 정상군의 평균 농도에 비해 감소한

비율이 9.5 내지 20.1%가 되어야 AD로 진단할 수 있는 신뢰성이 있다는 것을 의미한다.

[82] [표5]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
<27.8	0.00	0.0 - 16.8	100.00	85.2 - 100.0		1.00
≤27.8	5.00	0.1 - 24.9	100.00	85.2 - 100.0		0.95
≤29.74	5.00	0.1 - 24.9	95.65	78.1 - 99.9	1.15	0.99
≤31.04	15.00	3.2 - 37.9	95.65	78.1 - 99.9	3.45	0.89
≤32.06	15.00	3.2 - 37.9	91.30	72.0 - 98.9	1.72	0.93
≤39.64	60.00	36.1 - 80.9	91.30	72.0 - 98.9	6.90	0.44
≤41.56	60.00	36.1 - 80.9	86.96	66.4 - 97.2	4.60	0.46
≤44.04	80.00	56.3 - 94.3	86.96	66.4 - 97.2	6.13	0.23
≤46.41	80.00	56.3 - 94.3	78.26	56.3 - 92.5	3.68	0.26
≤49.9	90.00	68.3 - 98.8	78.26	56.3 - 92.5	4.14	0.13
≤50.7	90.00	68.3 - 98.8	60.87	38.5 - 80.3	2.30	0.16
≤52.03	95.00	75.1 - 99.9	60.87	38.5 - 80.3	2.43	0.082
≤52.77	95.00	75.1 - 99.9	56.52	34.5 - 76.8	2.18	0.088
≤54.06	100.00	83.2 - 100.0	56.52	34.5 - 76.8	2.30	0.00
≤85.75	100.00	83.2 - 100.0	0.00	0.0 - 14.8	1.00	

[83] [표6]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≤44.04	80.00	56.3-94.3	86.96	66.4-97.2	6.13	0.23
≤46.41	80.00	56.3-94.3	78.26	56.3-92.5	3.68	0.26
≤49.9	90.00	68.3-98.8	78.26	56.3-92.5	4.14	0.13

[84] <2-2-3> 정상군 VS CI (MCI+AD) 구별

[85] 상기 실시예 <2-2>의 분석 결과를 통해 구한 cut-off 값을 경계로 하여, 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)가 15% 이내로 변하는 cut off 값 구간으로 잡으면, 하기 표 7 및 표 8 (표 8은 cutt off 구간을 확대한 것이다)와 같이 나타낼 수 있다. 즉, 정상군의 MPP-Aβ42 농도 평균값은 55.1 pg/ml이고, 진단의 신뢰성이 보장되는 cut off 구간은 44.9 내지 50.24 pg/ml로 나타나, 정상군의 평균 수치에 비해 8.9 내지 9.5% 이상 감소 시 CI 라고 진단할 수 있다. 예를 들면, 정상군의 평균 MPP-Aβ42 농도보다 8.9% 미만으로 감소한 경우에는 CI라고 진단할 수 없지만, 9.5% 이상으로 감소하였을 경우에는 CI라고 진단할 수 있음을 알 수 있다. 다만, CI로 진단하려면 정상군의 평균 농도에 비해 감소한 비율이 8.9 내지 9.5%가 되어야 CI로 진단할 수 있는 신뢰성이 있다는 것을 의미한다.

[86] [표7]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
<16.63	0.00	0.0 - 9.7	100.00	85.2 - 100.0		1.00
≤27.8	5.56	0.7 - 18.7	100.00	85.2 - 100.0		0.94
≤29.74	5.56	0.7 - 18.7	95.65	78.1 - 99.9	1.28	0.99
≤31.04	13.89	4.7 - 29.5	95.65	78.1 - 99.9	3.19	0.90
≤32.06	13.89	4.7 - 29.5	91.30	72.0 - 98.9	1.60	0.94
≤39.64	50.00	32.9 - 67.1	91.30	72.0 - 98.9	5.75	0.55
≤41.56	50.00	32.9 - 67.1	86.96	66.4 - 97.2	3.83	0.58
≤44.04	63.89	46.2 - 79.2	86.96	66.4 - 97.2	4.90	0.42
≤44.54	63.89	46.2 - 79.2	82.61	61.2 - 95.0	3.67	0.44
≤45.01	66.67	49.0 - 81.4	82.61	61.2 - 95.0	3.83	0.40
≤46.41	66.67	49.0 - 81.4	78.26	56.3 - 92.5	3.07	0.43
≤49.9	83.33	67.2 - 93.6	78.26	56.3 - 92.5	3.83	0.21
≤50.08	83.33	67.2 - 93.6	69.57	47.1 - 86.8	2.74	0.24
≤50.24	88.89	73.9 - 96.9	69.57	47.1 - 86.8	2.92	0.16
≤50.7	88.89	73.9 - 96.9	60.87	38.5 - 80.3	2.27	0.18
≤52.03	91.67	77.5 - 98.2	60.87	38.5 - 80.3	2.34	0.14
≤52.77	91.67	77.5 - 98.2	56.52	34.5 - 76.8	2.11	0.15
≤54.06	94.44	81.3 - 99.3	56.52	34.5 - 76.8	2.17	0.098
≤56.24	94.44	81.3 - 99.3	34.78	16.4 - 57.3	1.45	0.16
≤57.12	97.22	85.5 - 99.9	34.78	16.4 - 57.3	1.49	0.080
≤58.65	97.22	85.5 - 99.9	26.09	10.2 - 48.4	1.32	0.11
≤59.68	100.00	90.3 - 100.0	26.09	10.2 - 48.4	1.35	0.00
≤85.75	100.00	90.3 - 100.0	0.00	0.0 - 14.8	1.00	

[87] [표8]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≤49.9	80.00	67.2- 93.6	78.26	56.3- 92.5	3.83	0.21
≤50.08	80.00	67.2- 93.6	69.57	47.1- 86.8	2.74	0.24
≤50.24	88.89	73.9- 96.9	69.57	47.1- 86.8	2.92	0.16

[88] <실시에 3> MPP 처리한 혈장 내 Aβ 농도에 따른 병리학적 Aβ 축적 판별

[89] <3-1> MPP 처리한 혈장 내 Aβ42 및 Aβ40 농도와 뇌 Aβ 플라크와의 상관관계

[90] 마찬가지로 MPP를 처리한 후 혈장 내의 Aβ 농도를 측정하여, 대뇌 피질 전반에서의 SUVR (Standardized Uptake Value Ratio) 값과 MPP 처리 후 Aβ 농도와의 관련성을 확인하였다. 구체적으로, 통계 분석은 상기 실시예 <3-1>과 같이 수행했으며, 종속 변수 (PiB-PET 양성 또는 PiB-PET 음성)와 독립 변수 (MPP 처리 후 혈장 내 Aβ 농도) 사이의 관계를 측정하기 위해 로지스틱 회귀분석을 수행하였다.

[91] 그 결과, 대뇌피질 전반(Global cortical)의 SUVR(Standardized Uptake Value Ratio)는 MPP 처리 후 혈장 내 Aβ40와 역상관관계를 나타냈으며 (p=0.0432), PC-PRC, 외측 두정엽(lateral parietal) 및 외측 측두골(lateral temporal) ROI (각각 p=0.0453, 0.0347 및 0.0226)는 총 개체에서의 MPP 처리 후 혈장 내 Aβ40에

반비례 하였다 (도 4)

[92] <3-2> PiB-PET 데이터와 MPP 처리한 혈장 내 A β 농도의 관련성 확인

[93] 본 발명에서 측정한 혈장 내 A β 40 농도를 통해 뇌에 존재하는 A β 플라크를 확인한 PiB-PET(Pittsburgh compound B- positron emission tomography) 양성 또는 음성을 구별할 수 있는지 검증하였다. 구체적으로, PET 양성 (환자)군 및 PET 음성 (환자)군의 MPP 처리 후 혈장 내 A β 40의 농도를 단일 t-검정으로 비교하고 상기 실시예 <3-1>에서와 같이 ROC 커브를 도시하였다. 또한, MPP 처리 후 혈장 내 A β 40의 농도 및 MMSE(Z) 스코어 결과, MPP 처리 후 혈장 내 A β 40 농도 및 혈액 (whole blood) 내 헤모글로빈 농도 (Hb), MMSE(Z) 스코어 결과 및 혈액 내 헤모글로빈 농도, 및 A β 40의 농도, MMSE(Z) 스코어 결과 및 혈액 내 헤모글로빈 농도를 각각 하기 수식 1을 이용하여 로지스틱 회귀분석을 수행하였으며, 이로부터 도출한 pi 값을 수식 2를 이용하여 p 값을 구하였다. 또한, p 값을 통해 ROC 커브를 그리고 이로부터 cut-off 값 (criterion)을 도출하였다.

[94] [수식 1]

$$[95] \quad \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} +$$

$$\dots + \beta_m X_{m,i}$$

[96] (pi: 확률, β_m : 계수, β_0 : 상수)

[97] 또는

$$[98] \quad \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} +$$

$$\beta_3 X_{3,i}$$

[99] (즉, β_0 : 상수, β_1 : MPP-A β 40의 계수, β_2 : MMSE(Z) 스코어의 계수, β_3 : 헤모글로빈의 계수, x_1 : MPP-A β 40 값, x_2 : MMSE(Z) 스코어 값 및 x_3 : 헤모글로빈 수치)

[100] [수식 2]

$$[101] \quad \text{logit}(p) = \ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right)$$

$$P = \frac{1}{1 + e^{-\text{logit}(p)}}$$

[102] 그 결과, 혈장 내 A β 40, A β 40+MMSE(Z), 및 A β 40+MMSE(Z)+Hb의 AUC 값이 MPP 처리에 의해 증가하여 MPP 처리에 의해 혈장 내 A β 40이 PET 양성 및 음성을 진단하기 위한 바이오 마커로 활용될 가능성이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 이 중 A β 40+MMSE(Z)+Hb 모델이 가장 큰 활용도를 나타냈다 (표 9 및 도 5). 또한, 로지스틱 회귀분석하여 얻은 cut-off 값 (Criterion 값)을 통해 PiB-PET

양성 vs PiB-PET 음성을 구별할 수 있음을 확인하였다 (표 9). 이를 통해, MPP 처리 후 혈장 내 A β 40의 농도가 176.50 pg/ml 이하거나, MPP 처리 후 혈장 내 A β 40의 농도, MMSE(Z) 스코어 및 혈액 내 헤모글로빈 농도를 로지스틱 회귀분석하여 얻은 p 값이 0.59 초과이면 PET 양성임을 예측할 수 있다 (표 9).

[103] [표9]

Discrimination	Parameters	AUC (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Criterion	P-value (Coefficients)	P-value (Area=0.5)	Increase in AUC (%) after PIC
(B) Discrimination ability of single markers								
	PIC-A β 1-40	71.6%	92.3%	53.9%	≤ 176.50 pg/ml	-	0.0042	1.9%
	MMSE(Z)	76.0%	65.4%	88.5%	≤ -1.06	-	0.0002	-
	Hemoglobin	64.4%	69.2%	69.2%	> 13.60 g/dL	-	0.0741	-
(C) Discrimination ability of diverse markers with stepwise procedure								
PiB-PET negative vs PiB-PET positive	PIC-A β 1-40	85.9%	69.2%	92.3%	> 0.65	0.0086	< 0.0001	3.4%
	MMSE(Z)					0.0010		
	PIC-A β 1-40					0.0178		
	Hemoglobin	71.6%	96.2%	50.0%	> 0.39	0.0502	0.0042	1.8%
						(excluded)		
	MMSE(Z)					0.0010	< 0.0001	-
	Hemoglobin	83.1%	73.1%	88.5%	> 0.60	0.0193		
	PIC-A β 1-40					0.0029		
	MMSE(Z)	92.5%	80.8%	92.3%	> 0.59	0.0009	< 0.0001	5.6%
	Hemoglobin					0.0071		

[104] <3-2-1> PET 양성 VS PET 음성 구별

[105] 정상군의 평균 p 값은, 상기 수식 1에 β_0 : 상수=-15.8345, β_1 : MPP-A β 40의 계수=-0.062340, β_2 : MMSE(Z) 스코어의 계수=-1.30872, β_3 : 헤모글로빈의 계수=1.85886, PET 음성군의 평균 MPP-A β 40 값: $x_1=175.95$, PET 음성군의 평균 MMSE(Z) 스코어 값: $x_2=0.20988$ 및 PET 음성군의 평균 헤모글로빈 값: $x_3=13.5115$ 를 대입하여 구한 $\ln(1/1-p)$ 값이 -1.511910264 이므로, 이를 수식 2를 통해, PET 음성인 개체들의 평균, 즉, PET 음성인 정상군의 평균 p 값인 0.18을 구하였다. cut-off 값을 경계로 하여, 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)가 5% 이내로 변하는 cut off 값 구간으로 잡으면, 하기 표 10 및 표 11 (표 11은 cut off 구간을 확대한 것이다)과 같이 나타낼 수 있다. 즉, 진단의 신뢰성이 보장되는 cut off 구간은 0.53 내지 0.59이며, 이는 PET 음성군의 평균 p 값에 비해 194.7% 내지 224.5% 증가한 값이다. 따라서, PET 음성군의 평균 p 값에 비해 194.7% 내지 224.5%보다 크게 증가하면 PET 양성이라고 진단할 수 있다. 예를 들어, 194.7%보다 작은 %로 증가한 경우에는 PET 양성이라고 진단할 수 없지만, 224.5%보다 높은 %로 증가하였을 때에는 PET 양성이라고 진단할 수 있다. 즉, PET 양성으로 진단하려면 PET 음성군의 평균 p 값 대비 증가율이 194.7% 내지 224.5%가 되어야 PET 양성으로 진단할 수 있는 신뢰성이 있다는 것을 의미한다.

[106] [표 10]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≤0.003376866	100.00	86.8 - 100.0	0.00	0.0 - 13.2	1.00	
>0.062204897	100.00	86.8 - 100.0	38.46	20.2 - 59.4	1.62	0.00
>0.064160683	96.15	80.4 - 99.9	38.46	20.2 - 59.4	1.56	0.100
>0.16022533	96.15	80.4 - 99.9	57.69	36.9 - 76.6	2.27	0.067
>0.176890597	92.31	74.9 - 99.1	57.69	36.9 - 76.6	2.18	0.13
>0.221707277	92.31	74.9 - 99.1	65.38	44.3 - 82.8	2.67	0.12
>0.239679704	88.46	69.8 - 97.6	65.38	44.3 - 82.8	2.56	0.18
>0.378303658	88.46	69.8 - 97.6	73.08	52.2 - 88.4	3.29	0.16
>0.405163471	84.62	65.1 - 95.6	73.08	52.2 - 88.4	3.14	0.21
>0.532260355	84.62	65.1 - 95.6	88.46	69.8 - 97.6	7.33	0.17
>0.566570036	80.77	60.6 - 93.4	88.46	69.8 - 97.6	7.00	0.22
>0.586259095	80.77	60.6 - 93.4	92.31	74.9 - 99.1	10.50	0.21
>0.620488654	73.08	52.2 - 88.4	92.31	74.9 - 99.1	9.50	0.29
>0.646055644	73.08	52.2 - 88.4	96.15	80.4 - 99.9	19.00	0.28
>0.713539231	69.23	48.2 - 85.7	96.15	80.4 - 99.9	18.00	0.32
>0.729289525	69.23	48.2 - 85.7	100.00	86.8 - 100.0		0.31
>0.999883015	0.00	0.0 - 13.2	100.00	86.8 - 100.0		1.00

[107] [표 11]

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
>0.53	84.62	65.1- 95.6	88.46	69.8- 97.6	7.33	0.17
>0.57	80.77	60.6- 93.4	88.46	69.8- 97.6	7.00	0.22
>0.59	80.77	60.6- 93.4	92.31	74.9- 99.1	10.50	0.21

[108] 상기 결과들을 통해, MPP 처리 후 혈장 내 Aβ42 또는 Aβ40 농도에 따라 임상학적으로 인지능력에 따른 환자 분류 (정상인, MCI 및 AD)와 병리학적으로 뇌의 Aβ의 축적 여부 (PET 양성 및 PET 음성)를 판별할 수 있음을 알 수 있다 (도 6).

[109] <실시예 4> TCEP를 추가로 포함하는 MPP 처리에 의한 혈장에서의 Aβ 검출 확인

[110] <4-1> TCEP를 추가로 포함하는 MPP 처리를 통한 Aβ 정량

[111] 상기 <실시예 1>에서와 같이 *in vitro* 상태의 Aβ에 프로테아제, 포스파타아제 및 환원제인 TCEP(tris(2-carboxyethyl)phosphine) (Sigma Aldrich, CA, USA)를 포함하는 MPP를 각각 3mM 처리한 후 상온에서 30분 동안 인큐베이션하고 Aβ42 및 Aβ40을 정량하였다.

[112] 그 결과, *in vitro* 상태에서 인간 혈청 알부민(HSA)을 처리한 Aβ42 및 Aβ40에

TCEP를 처리시 A β 의 농도가 증가했으며, 이는 혈장 내 존재하는 알부민의 3차 구조를 파괴하여 이에 결합 및 응집되어 있는 A β 를 풀어주어 측정 가능한 A β 의 양을 증가시킨 것으로 판단된다 (도 7A). 또한, 실제 혈장 내에서도 TCEP를 처리하게 되었을 때 A β 40의 농도가 증가하였으며, 이는 알부민의 구조를 풀어줌으로써 A β 40의 농도가 증가한 것으로 판단된다 (도 7B). 아울러, 비록 실제 사람의 혈장에서 A β 42의 농도에 대해 효과가 없었으나 이는 인체 외 인공적인 실험과 체내에 실제로 존재하는 혈장을 이용한 실험에서의 차이라고 판단된다.

[113] <4-2> TCEP 추가 처리에 의한 A β 농도 증가량과 PiB-PET 이미지 데이터와의 상관관계 분석

[114] 정상군 내에서의 PET 양성군 및 PET 음성군을 구별하기 위하여 프로테아제, 포스파타아제 및 TCEP를 포함하는 MPP를 처리한 혈장 내의 A β 40 농도를 정량한 뒤, TCEP를 제외한 프로테아제 및 포스파타아제를 포함하는 MPP를 처리한 혈장 내 A β 40의 농도를 뺀 값을 구하여 PiB-PET 스캔 데이터와 비교하였다.

[115] 그 결과, 프로테아제 및 포스파타아제만 포함하는 MPP 처리 후 혈장 내 A β 40 농도보다 TCEP를 포함하는 MPP를 처리함으로써 정상군인 개체의 혈장 내 A β 40의 농도가 PET 음성 및 PET 양성인 실험군에서 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 또한, 정상군 내의 PET 양성인 개체군에서 TCEP에 의한 혈장 내 A β 증가량이 현저하였다. 이때, cut off(criterion) 값은 >9.24이며, 이를 통해, 프로테아제 및 포스파타아제만 포함하는 MPP처리에 의한 A β 농도보다 TCEP를 포함한 MPP 처리에 의해 증가한 A β 농도가 9.24 pg/ml보다 크면, PET 양성군인 개체일 확률이 큰 것을 알 수 있으며, 민감도와 특이도는 각각 87.50% 및 70.59%였다 (도 8).

[116] PiB-PET 양성 군에서의 A β 40에 대한 TCEP 효과는 PiB-PET 음성군에 비해 높았다 (**p<0.01). 이를 통해, 이후 AD로의 전환 확률이 상대적으로 높은 정상군 내에서의 PET 양성 및 PET 음성의 식별이 가능함을 알 수 있었다. 이는 정상군 내에서 뇌의 A β 플라크(plaque)가 많을 경우, TCEP를 처리한 혈액에 그것이 좀 더 반영됨을 시사한다. 즉, 환자의 뇌 영상을 고가의 비용을 들여 찍지 않더라도 혈액을 통해 용이하게 정상군 내에서 PET 양성 및 음성을 구별할 수 있는 가능성을 제시한다.

산업상 이용가능성

[117] 본 발명은 임상에서 치매 환자의 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제의 혼합물을 포함하여, 혈장 내 A β (amyloid beta) 농도의 표준편차를 감소시키는, 혈장 전처리 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제가 1:1 (v/v)로 포함된, 혈장 내 A β 농도의 표준편차를 감소시키는, 혈장 전처리 조성물.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서, TCEP가 추가로 포함된, 혈장 내 A β 농도의 표준편차를 감소시키는, 혈장 전처리 조성물.
- [청구항 4] 1) 피험자 및 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에 제 1항 또는 제 2항 혈장 전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 42 농도를 검출하고; 및
2) 상기 검출된 피험자의 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 8.0% 초과하여 감소한 경우 65% 이상의 특이도 (specificity)에서 MCI 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 2)에서 검출된 피험자의 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 8.0% 내지 11.0% 감소한 경우 65% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도 (sensitivity)에서 MCI 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 6] 1) 피험자 및 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에 제 1항 또는 제 2항 혈장 전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 42 농도를 검출하고; 및
2) 상기 검출된 피험자의 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 9.0% 초과하여 감소한 경우 70% 이상의 특이도에서 AD 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 2)에서 검출된 피험자의 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 9.0% 내지 21.0% 감소한 경우 70% 이상의 특이도 및 80% 이상의 민감도에서 AD 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 8] 1) 피험자 및 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에 제 1항 또는 제 2항 혈장 전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 42 농도를 검출하고; 및
2) 상기 검출된 피험자 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 8.5% 초과하여 감소한 경우 65% 이상의 특이도에서 CI(MCI 및 AD) 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 2)에서 검출된 피험자의 혈장 내 A β 42 농도가 정상인의 혈장 내 A β 42 평균농도 값과 비교하여, 8.5% 내지 10.0% 감소한 경우 65% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도에서 CI (MCI 및 AD) 환자로 예측하는, 인지기능 이상을 진단하는 방법.
- [청구항 10] 1) 피험자 및 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에 제 1항 또는 제 2항의

전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 40 농도를 검출하고;
 2) 피험자로부터 분리된 혈액 샘플로부터 헤모글로빈(Hb) 농도를 검출하며;
 3) 상기 1)의 혈장 내 A β 40 농도, 상기 2)의 헤모글로빈 농도, 및 MMSE스코어(Z)를 하기 수식 1 및 수식 2에 적용하여 p값을 수득하고; 및
 4) 상기 3)의 p값이, PET 음성인 개체군들의 평균 p값과 비교하여 190.0% 이상 증가한 경우 85% 이상의 특이도에서 뇌에 A β 가 축적된 것으로 예측하는, 뇌의 병리학적인 A β 축적 여부를 진단하는 방법;

[수식 1]

$$\ln \left(\frac{Pi}{1-Pi} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} +$$

$$\beta_3 X_{3,i}$$

(pi: 확률, β_0 : 상수, β_1 : MPP-A β 40의 계수, β_2 : MMSE(Z) 스코어의 계수, β_3 : 헤모글로빈의 계수, x_1 : MPP-A β 40 값, x_2 : MMSE(Z) 스코어 값 및 x_3 : 헤모글로빈 수치)

[수식 2]

$$\text{logit}(p) = \ln \left(\frac{Pi}{1-Pi} \right)$$

$$P = \frac{1}{1 + e^{-\text{logit}(p)}}$$

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 3)의 p값이, PET 음성인 개체군들의 평균 p값과 비교하여 190.0% 내지 230.0% 증가한 경우 85% 이상의 특이도 및 75% 이상의 민감도에서 뇌에 A β 가 축적된 것으로 예측하는, 뇌의 병리학적인 A β 축적 여부를 진단하는 방법.

[청구항 12] 1) 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에 제 1항 및 제 2항의 전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 40 농도를 검출하고;
 2) 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에 제 3항의 전처리 조성물을 가한 후 혈장 내 A β 40의 농도를 검출하며; 및
 3) 상기 1)의 A β 40 농도와 비교하여 상기 2)의 A β 40의 농도가 8.0 pg/ml 초과 증가하는 경우 65% 이상의 특이도 및 80% 이상의 민감도에서 뇌에 A β 가 축적된 것으로 예측하는, 뇌의 A β 축적 여부를 진단하는 방법.

[청구항 13] 1) 제 1항 또는 제 2항의 혈장 전처리 조성물로 처리한 피험자로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 농도값, 피험자로부터 분리된 혈액 샘플 내 헤모글로빈 농도값, 및 피험자의 MMSE(z) 측정값을 입력하는 정보입력부;

- 2) 상기 혈장 전처리 조성물로 처리한 정상인으로부터 분리된 혈장 샘플에서 검출한 A β 평균농도값, PET 음성인 대조군의 평균 p값이 저장된 데이터베이스부;
- 3) 상기 정보입력부에서 입력한 정보를 데이터베이스에 저장된 값과 비교 분석하고, 하기 수식 1의 로지스틱 회귀분석 및 하기 수식 2의 연산을 수행하는 정보처리부,

[수식 1]

$$\ln \left(\frac{Pi}{1-Pi} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1,i} + \beta_2 X_{2,i} +$$

$$\beta_3 X_{3,i}$$

(pi: 확률, β_0 : 상수, β_1 : MPP-A β 40의 계수, β_2 : MMSE(Z) 스코어의 계수, β_3 : 헤모글로빈의 계수, x_1 : MPP-A β 40 값, x_2 : MMSE(Z) 스코어 값 및 x_3 : 헤모글로빈 수치)

[수식 2]

$$\text{logit}(p) = \ln \left(\frac{Pi}{1-Pi} \right)$$

$$P = \frac{1}{1 + e^{-\text{logit}(p)}}$$

; 및

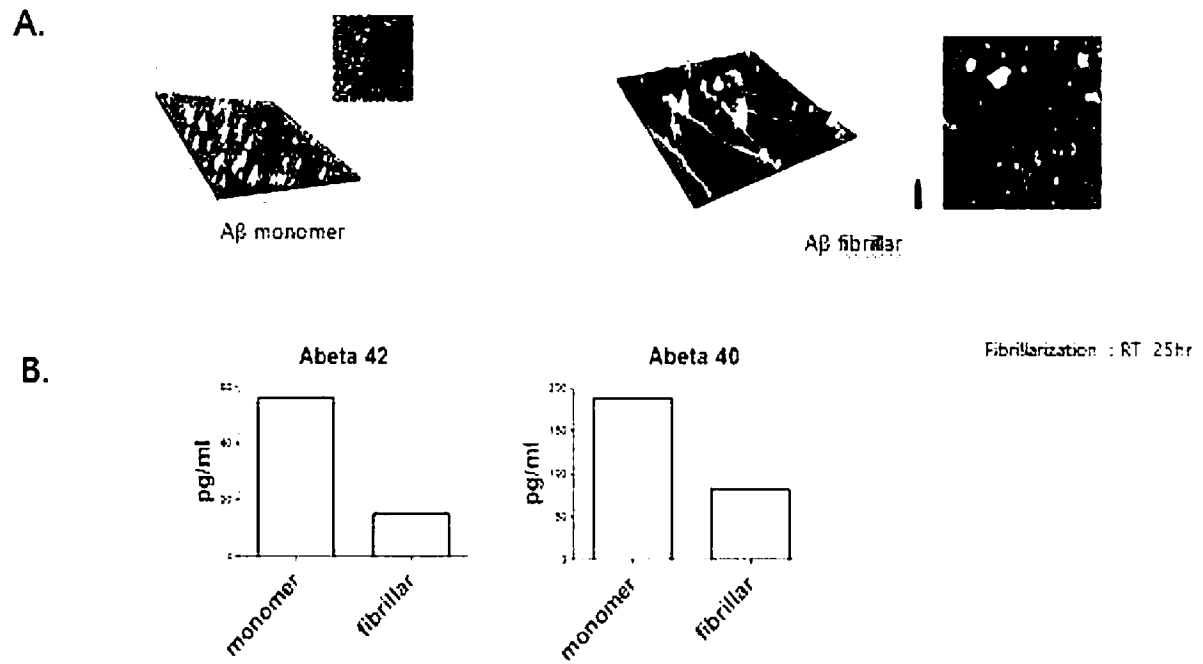
- 4) 상기 정보처리부로부터 연산된 결과를 출력하는 정보출력부로 구성된, 임상학적 및 병리학적 알츠하이머병 예측 및 진단시스템.

[청구항 14] 제 1항 또는 제 2항의 조성물을 포함하는 혈액 수집 장치.

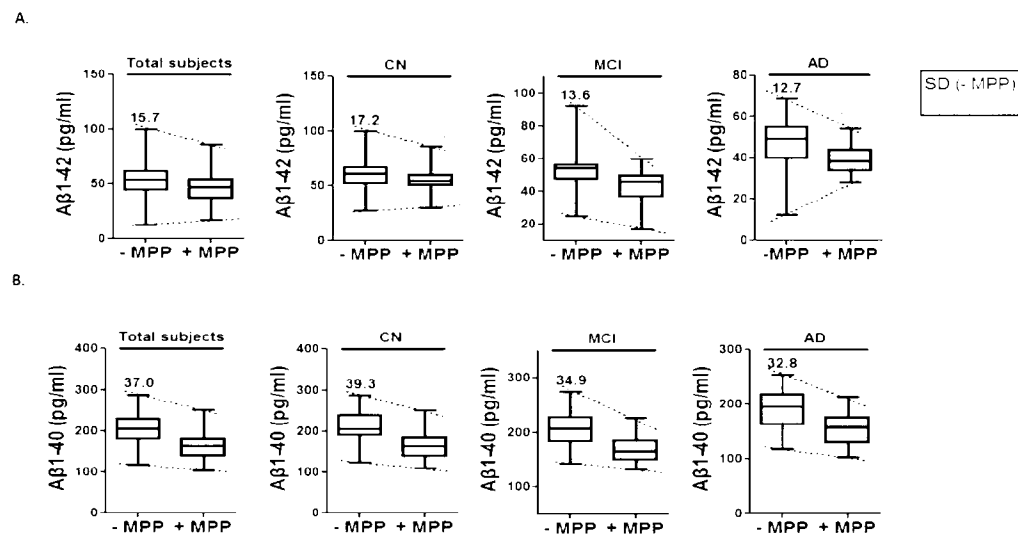
[청구항 15] 제 14항에 있어서, 혈액응고 방지제를 추가로 포함하는 혈액 수집 장치.

[청구항 16] 피검자의 혈액으로부터 분리한 혈장을 수집하여 보관하는, 제 1항 또는 제 2항의 조성물을 포함하는 혈장 수집 장치.

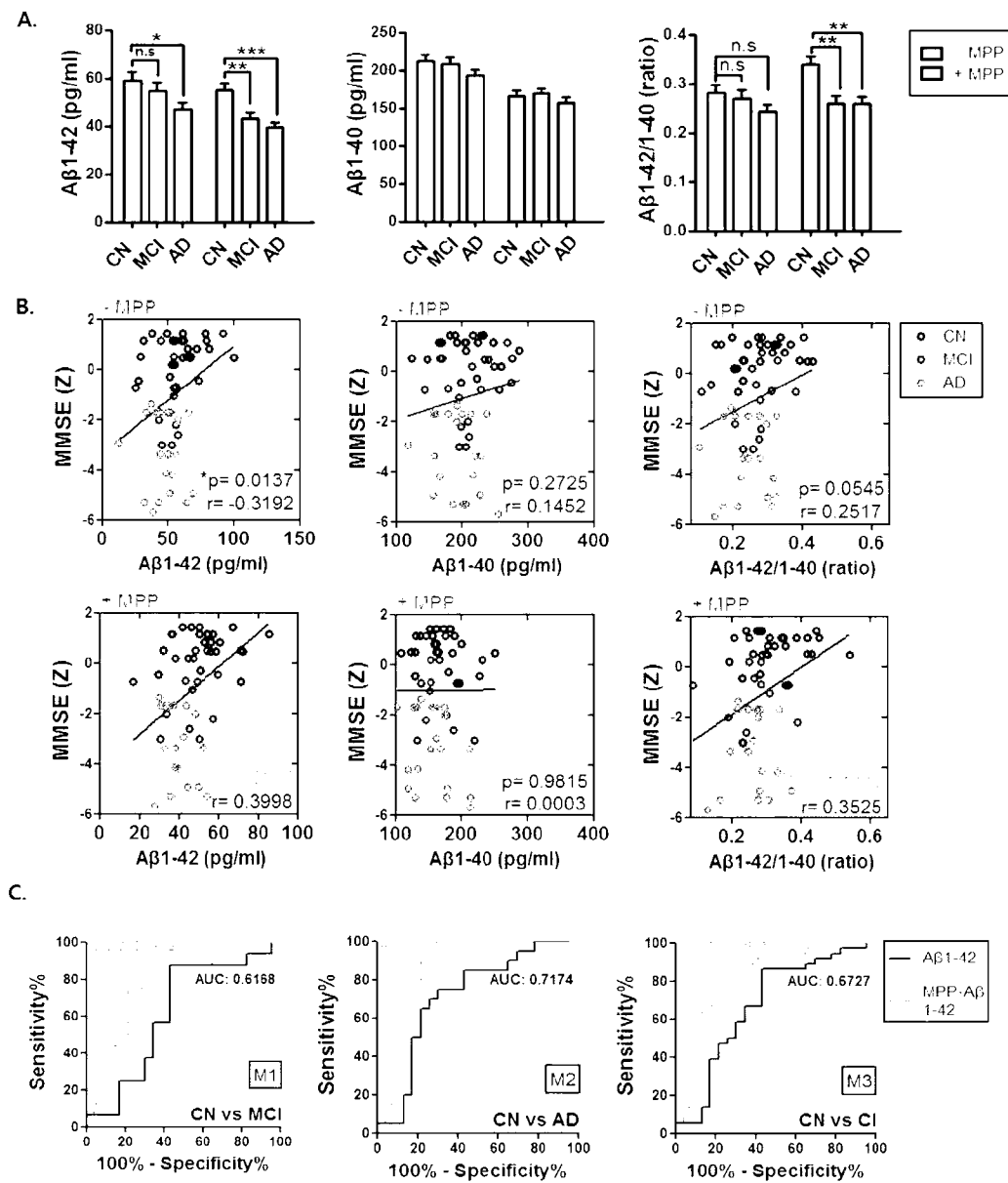
[도1]



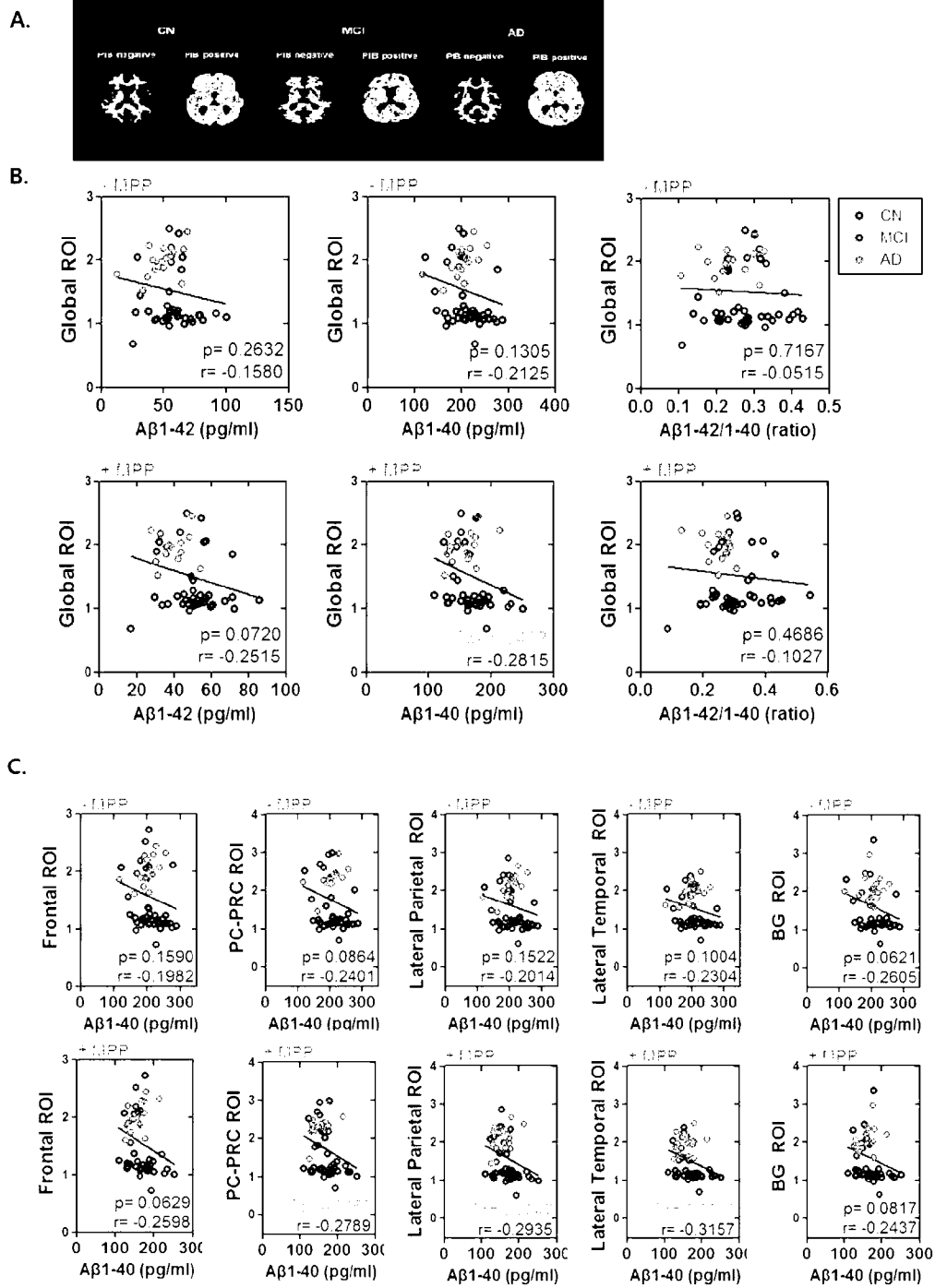
[도2]



[도3]

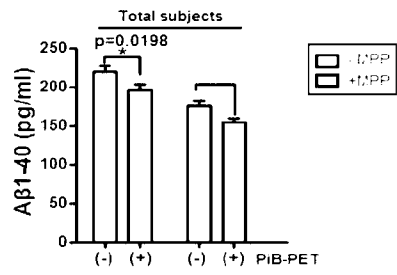


[도4]

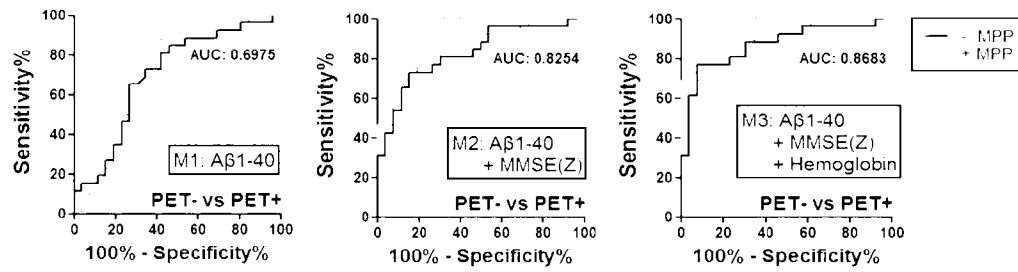


[도5]

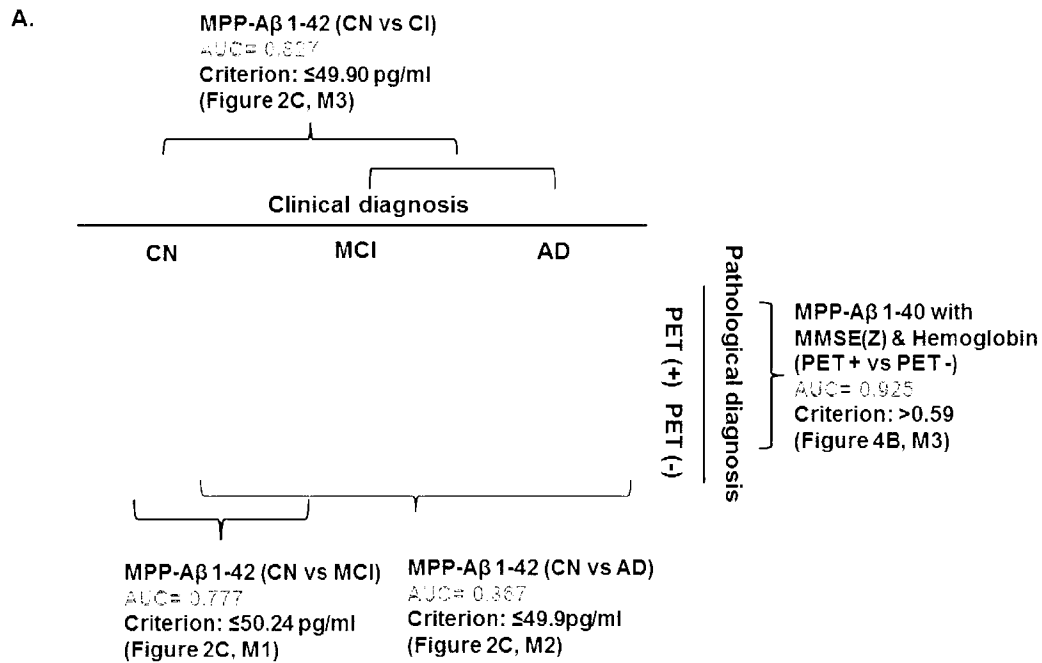
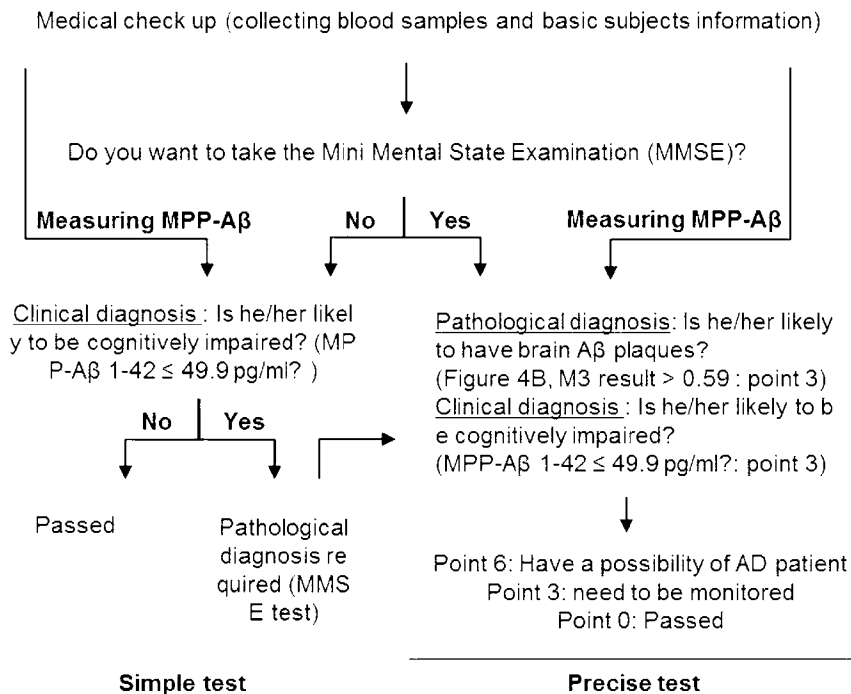
A.



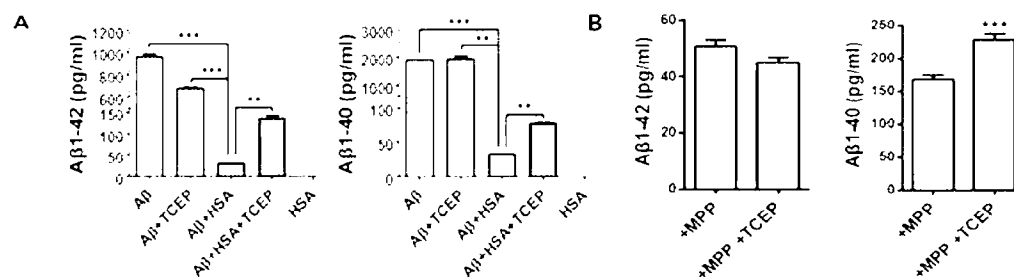
B.



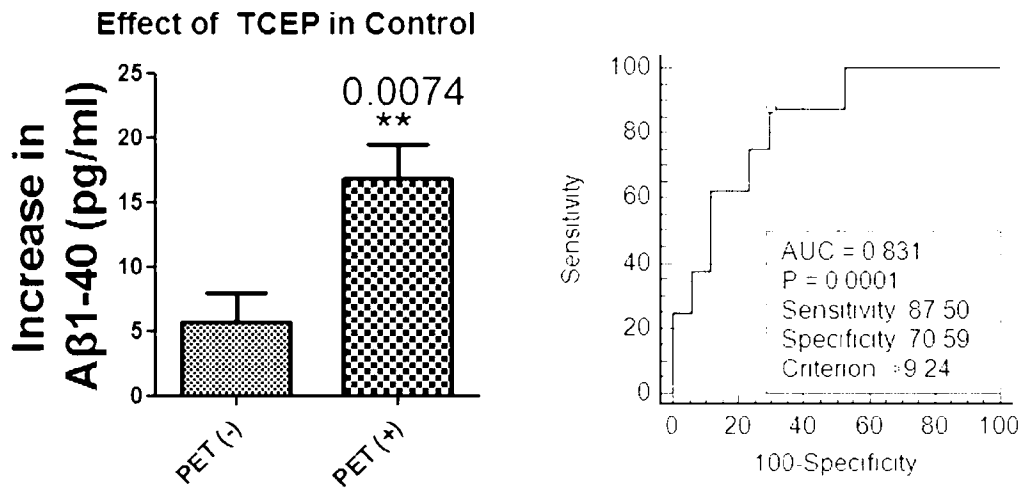
[도6]

**B.**

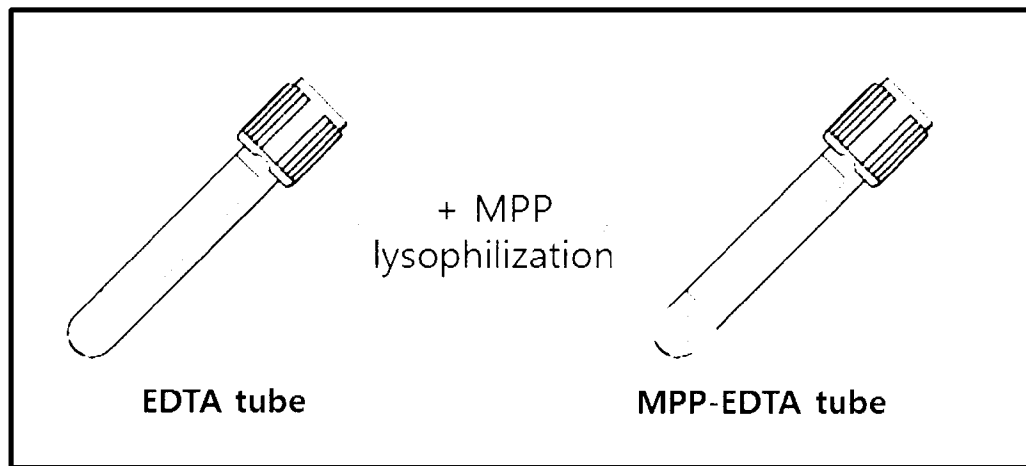
[도7]



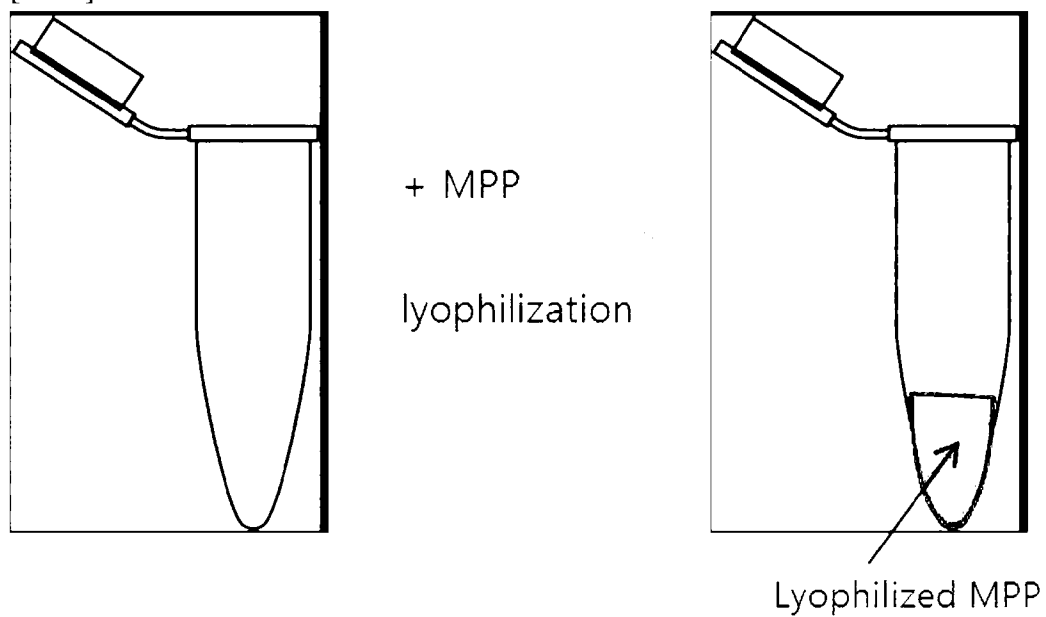
[도8]



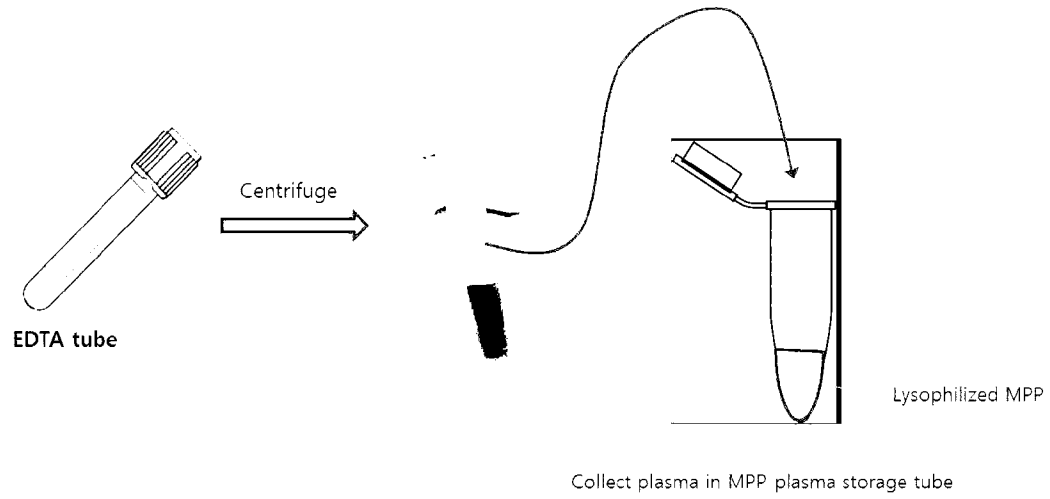
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004572**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/68(2006.01)i, G01N 1/10(2006.01)i, A61B 5/15(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; A61K 39/395; A61K 31/404; C07K 1/00; C07K 14/00; G01N 1/10; A61B 5/15

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: protease inhibitor, phosphatase inhibitor, amyloid beta, dementia, TCEP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHO et al., "Correlations of Amyloid- β Concentrations between CSF and Plasma in Acute Alzheimer Mouse Model", Scientific Reports, Vol. 4, Article No. 6777, internal pages 1-4 (2014) See pages 2, 4.	1-16
A	MARTI-FABREGAS et al., "Prognostic Value of Plasma β -amyloid Levels in Patients with Acute Intracerebral Hemorrhage", Stroke, Vol. 45, pp. 413-417 (2014) See pages 413-414.	1-16
A	WO 2014-164519 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 09 October 2014 See the entire document.	1-16
A	PESARESI et al., "Plasma Levels of Beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment", Neurobiology of Aging, Vol. 27, pp. 904-905 (2006) See the entire document.	1-16
A	US 2011-0243957 A1 (MORAN, Echeverria et al.) 06 October 2011 See the entire document.	1-16



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

"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

22 JULY 2016 (22.07.2016)

Date of mailing of the international search report

22 JULY 2016 (22.07.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004572

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-164519 A1	09/10/2014	EP 2970373 A1	20/01/2016
		US 2016-0009782 A1	14/01/2016
US 2011-0243957 A1	06/10/2011	WO 2010-036813 A1	01/04/2010
		WO 2010-036813 A8	27/05/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 1/10(2006.01)i, A61B 5/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; A61K 39/395; A61K 31/404; C07K 1/00; C07K 14/00; G01N 1/10; A61B 5/15

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: protease inhibitor, phosphatase inhibitor, 아밀로이드 베타, 치매, TCEP

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CHO 등, 'Correlations of amyloid- β concentrations between CSF and plasma in acute Alzheimer mouse model' Scientific Reports, Vol.4, Article No.6777, internal pages 1-4 (2014) 페이지 2, 4 참조.	1-16
A	MARTI-FABREGAS 등, 'Prognostic value of plasma β -amyloid levels in patients with acute intracerebral hemorrhage' Stroke, Vol.45, pp.413-417 (2014) 페이지 413-414 참조.	1-16
A	WO 2014-164519 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2014.10.09 전체 문헌 참조.	1-16
A	PESARESI 등, 'Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment' Neurobiology of Aging, Vol.27, pp.904-905 (2006) 전체 문헌 참조.	1-16
A	US 2011-0243957 A1 (ECHEVERRIA MORAN 등) 2011.10.06 전체 문헌 참조.	1-16

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 22일 (22.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 22일 (22.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-164519 A1	2014/10/09	EP 2970373 A1 US 2016-0009782 A1	2016/01/20 2016/01/14
US 2011-0243957 A1	2011/10/06	WO 2010-036813 A1 WO 2010-036813 A8	2010/04/01 2010/05/27