



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025195
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2333/4709 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0102177

(22) 출원일자 2018년08월29일

심사청구일자 2018년08월29일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

이정섭

광주광역시 서구 풍암순환로 5, 202동 1305호(풍암동, 대주파크빌아파트)

박정은

광주광역시 광산구 수등로123번길 21, 102동 602호(신가동, 수완지구 호반베르디움 1차 아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

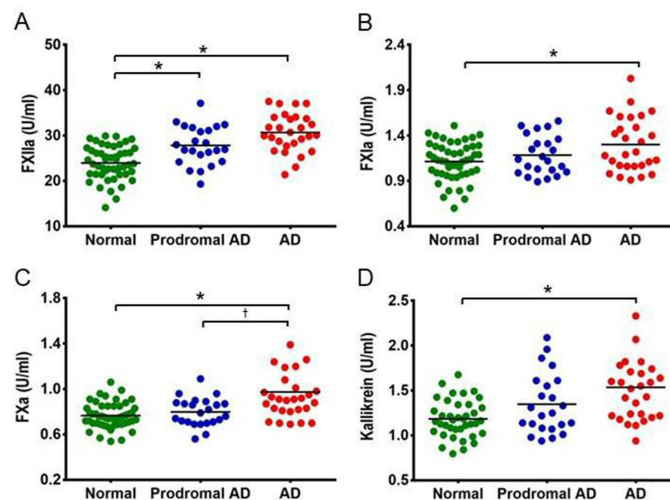
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 일 실시예에 따른 조성물, 키트, 및 방법에 의하면, 혈액 샘플을 이용하여 알츠하이머성 치매를 높은 정확도로 조기 진단이 가능하므로, 알츠하이머성 치매 진단 분야의 핵심 기술로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2333/96455 (2013.01)

G01N 2800/2821 (2013.01)

(72) 발명자

이건호

광주광역시 남구 노대실로 33(노대동, 송화마을휴먼시아)

김병채

광주광역시 동구 제봉로 42(학동)

임도성

전라남도 무안군 삼향읍 오룡동길 60

조영희

광주광역시 광산구 비아로 185, 102동 301호(비아동, 하남지구 호반아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064765

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

연구과제명 다중생물지표 기반 치매 중증도 정밀 분류체계 개발 및 코호트 구축

기 여 율 6/10

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711073984

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

연구과제명 MRI 기반 알츠하이머성 치매 특이 뇌 손상 규명 및 뇌지도 구축

기 여 율 2/10

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.05.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711067288

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 비브리오 단백질분해효소에 의한 혈액 항상성 변화, 염증반응 유도 및 autophagy 활성화

상관관계 분석

기 여 율 1/10

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711070668

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 명주실타래 갯지렁이로부터 신규 혈전분해 단백질분해효소의 개발 및 유전자 데이터베이스

구축

기 여 율 1/10

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

FXIIa(Activated factor XII), FXIa(Activated factor XI), FXa(Activated factor X), 및 칼리크레인(Kallikrein)으로 구성된 접촉계로부터 선택되는 어느 하나의 단백질을 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

FXIIa(Activated factor XII), FXIa(Activated factor XI), FXa(Activated factor X), 및 칼리크레인(Kallikrein)으로 구성된 접촉계로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 활성 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 제제는 상기 단백질과 반응하는 기질 펩티드 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 베타 아밀로이드₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂), 베타 아밀로이드₁₋₄₀(A β ₁₋₄₀), t-Tau, p-Tau 181 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 수준을 측정하기 위한 제제를 추가로 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 조성물은 FXIIa의 활성 수준을 측정하기 위한 제제; 및 베타 아밀로이드₁₋₄₂의 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 6

청구항 2에 있어서, 상기 알츠하이머성 치매는 전조증상단계의 알츠하이머성 치매(Prodromal Alzheimer's dementia)를 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 7

청구항 2 내지 6 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 키트.

청구항 8

개체의 시료로부터 FXIIa(Activated factor XII), FXIa(Activated factor XI), Fxa(Activated factor X), 및 칼리크레인(Kallikrein)으로 구성된 접촉계로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 활성 수준을 측정하는 단계를

포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 측정된 활성 수준이 정상 대조군 시료의 수준보다 높은 경우, 알츠하이머성 치매로 판단하는 것을 포함하는, 정보제공방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 시료는 혈액 또는 혈장인 것인, 정보제공방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 알츠하이머성 치매는 전조증상단계의 알츠하이머성 치매를 포함하는 것인, 정보제공방법.

청구항 12

청구항 8에 있어서, 개체의 뇌 척수액 시료로부터 베타 아밀로이드₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂), 베타 아밀로이드₁₋₄₀(A β ₁₋₄₀), t-Tau, p-Tau181 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, (a) 개체의 시료로부터 FXIIa(Activated factor XII)의 활성 수준을 측정하고, 개체의 뇌 척수액 시료로부터 베타 아밀로이드₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂)의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 수준으로부터, 베타 아밀로이드₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂) 수준/FXIIa(Activated factor XII)의 활성 수준의 비율 값을 산출하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 산출된 비율 값이 정상 대조군 시료의 수준보다 낮은 경우, 알츠하이머성 치매로 판단하는 것을 포함하는, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노령화 사회에 접어들면서 각종 노인 질환은 큰 사회적 문제점으로 대두되고 있다. 특히, 이러한 질환들은 국가적으로 의료비 부담과 국가경제에 막대한 손실을 초래하고 있기 때문에, 많은 관심을 불러일으키고 있으며, 이에 대한 활발한 연구가 이루어지고 있다. 이 중에서도, 알츠하이머성 치매(Alzheimer's dementia, 이하 'AD'로 칭함.)는 운동력과 인지능력 저하의 파행적인 진행과 함께 다양한 심리적, 행동장애 증상이 동반된다. 초기의 경미한 증상에서 시작하여 최종적으로 자발적인 개인생활이 불가능할 정도로 진행되어서 환자와 가족, 그리고

사회에까지 의료비 등 막대한 경제적 부담을 초래하며 국가적으로 경제인구의 손실을 초래하는 등 그 피해가 매우 심각하다. 알츠하이머성 치매는 65-74세 인구의 10%, 75-84세 인구의 19%, 그리고 85세 이상의 인구의 47%가 발병하고, 발병률이 해마다 증가하는 등 심각한 사회문제로 떠오르는 퇴행성 뇌질환이다.

[0003] 한편, 알츠하이머성 치매는 알츠하이머병으로부터 야기되며, 알츠하이머병의 발병 기전 중 하나인, '아밀로이드 가설', 구체적으로, 환자의 조직에 존재하는 베타-아밀로이드(β -amyloid protein) 및 이들이 축적되어 발생하는 신경반(플라크)에 의해 신경세포의 지속적인 사멸을 유도하고 뇌신경 전달을 저해하여 인지기능의 손상을 일으켜 병을 유발한다는 가설에 따르고 있다. 이에 따라, 상기 질병의 주요한 병인으로 작용하는 베타-아밀로이드 단백질, 즉, $A\beta 42$, 또는 t-Tau, p-Tau181의 수준이 알츠하이머성 치매를 진단하는 기준으로 이용되고 있다. 이 밖에도, 알츠하이머성 치매의 진단은 신경심리검사, MRI 뇌영상 검사, 유전변이 검사, 및 $A\beta$ PET 검사 등을 이용하여 이루어지고 있다.

[0004] 그러나, 이러한 기존의 진단법은 고가의 검사 비용을 필요로 하거나, 샘플의 확보 과정에서 극심한 고통을 수반하므로 알츠하이머성 치매의 진단에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 특히, 알츠하이머병 동물 모델에서 뇌척수액과 혈장의 $A\beta 42$, 또는 $A\beta 40$ 의 수준은 연령에 비례하여 증가하다가, 인지장애가 시작되면 오히려 감소하는 경향을 보인다는 사실이 보고된 바 있다. 따라서, 뇌척수액 등에서의 아밀로이드 단백질의 수준을 알츠하이머성 치매에 대한 진단 지표 또는 발병 예측의 기준으로 삼는 것은 논란이 되고 있다.

[0005] 이러한 기술적 배경 하에서, 알츠하이머성 치매를 조기에 진단할 수 있는 혈액 샘플 기반의 신규 바이오마커를 발굴하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있으나(한국공개특허 10-2009-0009579) 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 FXIIa(Activated factor XII), FXIa(Activated factor XI), FXa(Activated factor X), 및 칼리크레인(Kallikrein)으로 구성된 접촉계(Contact system)로부터 어느 하나의 단백질을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 상기 단백질의 활성 수준을 측정하기 위한 체제를 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 상기 단백질의 활성 수준을 측정하기 위한 체제를 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 개체의 시료로부터 FXIIa, FXIa, FXa, 및 칼리크레인으로 구성된 접촉계로부터 어느 하나의 단백질 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법을 구축하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 FXIIa(Activated factor XII), FXIa(Activated factor XI), FXa(Activated factor X), 및 칼리크레인(Kallikrein)으로 구성된 접촉계로부터 어느 하나의 혈장 단백질을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어, "마커"는 알츠하이머성 치매를 진단할 수 있는 물질로서, 알츠하이머성 치매의 발병 및/또는 진행과 밀접하게 관련된 폴리펩티드, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 마커는 정상 대조군에 비해 증가된 활성을 갖는 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인일 수 있다.

[0012] 본 명세서에서 사용되는 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 알츠하이머성 치매의 발병 여부, 알츠하이머성 치매의 진행 여부 등을 확인하는 것을 포함하는 의미일 수 있다.

[0013] 상기 알츠하이머성 치매(Alzheimer's dementia)는 정상적인 노화와는 구분되는 병적 현상인 치매 중 하나로서, 베타-아밀로이드의 축적으로부터 야기되는 알츠하이머병이 주요한 병인으로 작용하는 질환이다. 현재, 베타-아밀로이드 단백질을 타겟으로 하는 진단기술이 통상적으로 사용되고 있으나, 뇌 척수액 시료의 획득 과정에서의 극심한 고통, 알츠하이머성 치매 조기 진단의 어려움 등으로 인해 새로운 진단 기술의 개발이 필요한 실정이다.

- [0014] 일 실시예에 따르면, 혈장 내 증가된 활성을 갖는 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인은 정상(ND) 대조군과, 전조증상단계의 알츠하이머성 치매(Prodromal AD) 군 및/또는 알츠하이머성 치매(AD) 군을 구분하는 유용한 지표 또는 기준으로 사용될 수 있다. 따라서, 증가된 활성을 갖는 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인은 알츠하이머성 치매를 진단하기 위한 바이오마커로서 사용될 수 있다.
- [0015] 다른 양상은 FXIIa, FXIa, FXa, 및 칼리크레인으로 구성된 접촉계로부터 선택되는 어느 하나의 혈장 단백질 활성 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 알츠하이머성 치매 진단용 조성물에 있어서, 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.
- [0017] 상기 활성 수준의 측정은 활성화된 단백질의 농도 또는 활성능(예를 들어, 단백질 분해 활성) 등을 평가하는 것일 수 있으며, 이는 당업계의 통상적인 방법에 따라 적절하게 정량화하여 평가할 수 있다. 상기 활성 수준을 측정하기 위한 제제로는 활성화된 단백질과 반응하는 기질 펩티드 또는 활성화된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 적용될 수 있다.
- [0018] 예를 들어, 상기 기질 펩티드로는 FXIIa의 기질 S-2302[H-D-Pro-Phe-Arg-pNA], FXIa의 기질 S-2366[pyroGlu-Pro-Arg-pNA], 칼리크레인의 기질 H-D-Val-Leu-Arg-AFC, 또는 FXa의 기질 S-2765[Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA]이 적용될 수 있다. 또한, 공지된 아미노산 서열을 갖는 상기 단백질로부터 이에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 것은 당업계에 자명한 사항에 해당하므로, 활성화 단백질에 특이적인 항체 역시 적용될 수 있다. 상기 항체로는 다중클론 항체 및 재조합 항체를 포함할 수 있고, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 갖는 완전한 형태 외에도, 적어도 항원 결합 기능을 보유하는 기능성 단편인 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함할 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 혈액 시료 내 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인의 활성 증가는 알츠하이머성 치매의 발병 또는 진행과 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다. 특히, 이들의 활성 변화는, 알츠하이머성 치매의 초기 단계, 즉, 전조증상단계의 알츠하이머성 치매(Prodromal Alzheimer's dementia)까지도 정확하게 예측 가능하게 하였다. 따라서, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인의 활성을 측정하기 위한 제제는 알츠하이머성 치매를 조기 진단하는데 사용될 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 조성물은 베타 아밀로이드₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂), 베타 아밀로이드₁₋₄₀ (Aβ₁₋₄₀), t-Tau, p-Tau181 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 수준 또는 농도를 측정하기 위한 제제 등 알츠하이머성 치매 진단을 위한 당업계에 알려진 바이오마커 또는 진단용 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 바이오마커 또는 진단용 조성물과의 조합을 통해 알츠하이머성 치매의 발병 및 진행의 예측에 대한 신뢰도 또는 정확도를 향상시킬 수 있으며, 예를 들어, FXIIa의 활성 수준을 측정하기 위한 제제 및 베타 아밀로이드₁₋₄₂의 수준을 측정하기 위한 제제의 조합일 수 있다.
- [0021] 또 다른 양상은 상기 진단용 조성물을 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공한다.
- [0022] 상기 알츠하이머성 치매 진단용 키트에 있어서, 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.
- [0023] 상기 키트는 예를 들어, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인과 반응하는 기질 펩티드 또는 특이적으로 결합하는 항체 등의 검출을 위하여, 기질, 적합한 버퍼, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 물질, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 또는 유리 슬라이드글라스가 이용될 수 있다. 발색효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase), 또는 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase)가 사용될 수 있다. 형광물질은 AFC, FITC, 또는 RITC가 사용될 수 있다. 발색 기질은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), 또는 TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 키트는 예를 들어, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인 단백질 또는 그를 코딩하는 유전자의 mRNA 발현량을 측정할 수 있는 마이크로어레이일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 상기, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인 유전자를 이용하여 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 당업자가 용이하게 제조할 수 있다. 상기 마이크로어레이는, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인 단백질을 코딩하는 유전자의 mRNA 또는 그의 단편에 해당하는 서열의 cDNA가 프로브로서 기판에 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 키트가 예를 들어, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 칼리크레인 유전자의 mRNA의 발현량을 측정하기 위한 경

우, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 테옥시 리보뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (dEPC-water), 또는 멸균수를 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0026] 또 다른 양상은 개체의 시료로부터 FXIIa, FXIa, FXa, 및 칼리크레인으로 구성된 접촉계로부터 선택되는 어느 하나의 단백질 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0027] 상기 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법에 있어서, 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상기한 바와 같다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개체"는 알츠하이머성 치매의 발병 여부 또는 진행 가능성을 확인하거나 발병 위험도를 예측하고자 하는 개체를 의미한다. 상기 개체는 알츠하이머성 치매가 발병할 수 있는 동물이라면 그 종류를 한정하지 않으나, 구체적으로 포유동물일 수 있고, 예를 들어 인간(Homo sapiens)일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어, "시료"는 개체의 체외로 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌 척수액, 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 혈장일 수 있다.

[0030] 상기 활성 수준을 측정하는 방법으로는, 흡광도측정법, 웨스턴블랏팅, 자석비드-항체면역침강법, ELISA, 질량분석기, 방사선 면역분석법, 면역침전법 등이 사용될 수 있다.

[0031] 상기 방법은 측정된 활성 수준을 정상 대조군 시료의 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 시료에서의 활성 수준이 정상 대조군 시료의 수준보다 높으면, 상기 개체는 알츠하이머성 치매가 발병하거나 진행될 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다. 상기 활성 수준의 변화는 개체의 활성 수준이 정상 대조군 또는 음성 대조군에 비하여 유사한 수준 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 및 1000% 이상 증가하는 것을 포함할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 시료 내 측정된 FXIIa 농도가 26 내지 26.5 U/ml 이상 또는 27 내지 27.5 U/ml 이상을 갖는 경우, 상기 시료는 각각 전조증상단계의 알츠하이머성 치매, 또는 알츠하이머성 치매 환자로부터 유래한 것으로 판단할 수 있다.

[0032] 또한, 상기 방법은 개체의 뇌 척수액 시료로부터 베타 아밀로이드₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂), 베타 아밀로이드₁₋₄₀(Aβ₁₋₄₀), t-Tau, p-Tau181 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 단계를 통해 알츠하이머성 치매의 발병 및 진행의 예측에 대한 신뢰도 또는 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0033] 일 구체예에서, 상기 방법은 개체의 시료로부터 FXIIa (Activated factor XII)의 활성 수준을 측정하고, 개체의 뇌 척수액 시료로부터 베타 아밀로이드₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂)의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 측정된 수준으로부터, 베타 아밀로이드₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂) 수준/FXIIa (Activated factor XII)의 활성 수준의 비율 값을 산출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0034] 상기 시료로부터 유래한 비율 값이 정상 대조군 시료의 수준보다 낮으면, 상기 개체는 알츠하이머성 치매가 발병하거나 진행될 가능성이 높은 것으로 판단할 수 있다. 상기 비율 값의 변화는 개체의 비율 값이 정상 대조군 또는 음성 대조군에 비하여 유사한 수준 또는 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 및 1000% 이상 감소하는 것을 포함할 수 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 시료 내 측정된 Aβ₁₋₄₂/FXIIa의 값이 33 내지 34 pg/ml 이하 및 27 내지 28 pg/ml 이하를 갖는 경우, 상기 시료는 각각 전조증상단계의 알츠하이머성 치매, 또는 알츠하이머성 치매 환자로부터 유래한 것으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 일 양상에 따른 조성물 및 방법에 의하면, 혈액 시료 내 특정 혈장 단백질의 활성 측정을 통해 알츠하이머성 치매의 발병 또는 진행을 초기에 예측할 수 있으므로, 종래 치료제 또는 치료방법의 효능을 향상시키는데 기여할 수 있다.

[0036] 일 양상에 따른 조성물 및 방법에 의하면, 알츠하이머성 치매의 발병 및 진행의 예측에 대한 높은 신뢰도 또는 정확도를 나타내며, 이는 기존의 바이오마커와의 조합을 통해 보다 향상될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 혈액 내 접촉계 활성도를 측정을 위한 표준곡선을 나타낸 것으로서, (A) FXIIa, (B) FXIa, (C) FXa, 및 (D) Kallikrein의 활성을 측정한 결과이다.

도 2는 알츠하이머성 치매의 발병 및/또는 진행(정상, prodromal AD, AD)과 접촉계 활성도간 상관관계를 확인한 것으로서, (A) FXIIa, (B) FXIa, (C) FXa, 및 (D) Kallikrein의 활성을 측정한 결과이다.

도 3은 FXIIa와 알츠하이머성 치매 바이오마커들간 상관관계 분석한 것으로서, (A) $A\beta_{1-42}$, (B) t-Tau 및 (C) p-Tau181과의 상관관계를 확인한 결과이다.

도 4는 알츠하이머성 치매의 발병 및/또는 진행을 평가하기 위한 신규 마커로 FXIIa의 활용 가능성을 확인한 것으로서, (A) 정상군(ND)과 전조증상단계의 알츠하이머성 치매군(prodromal AD)의 구분에 대한 ROC 커브, (B) 정상군(ND)과 알츠하이머성 치매군(AD)의 구분에 대한 ROC 커브이다.

도 5는 알츠하이머성 치매의 발병 및/또는 진행을 평가하기 위한 신규 마커로서 $A\beta_{1-42}$ /FXIIa의 활용 가능성을 확인한 것으로서, (A) 정상군(ND)과 전조증상단계의 알츠하이머성 치매군(prodromal AD)의 구분에 대한 ROC 커브, (B) 정상군(ND)과 알츠하이머성 치매군(AD)의 구분에 대한 ROC 커브이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1. 접촉계 활성화 측정 시스템 구축

[0040] 우선, 혈장 내 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 Kallikrein의 활성을 측정하기 위하여, 각각의 표준물질을 다음과 같은 농도로 PBS에 희석시켰다.(FXIIa: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 10 U/ml, FXIa: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1 U/ml, FXa: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 U/ml, Kallikrein: 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4 U/ml). 이후, 90 μ l의 희석된 표준물질과 10 μ l의 4 mM 다양한 합성 펩티드 기질 (FXIIa의 기질 S-2302[H-D-Pro-Phe-Arg-pNA], FXIa의 기질 S-2366[pyroGlu-Pro-Arg-pNA], 칼리크레인의 기질 H-D-Val-Leu-Arg-AFC, FXa의 기질 S-2765[Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA])을 혼합하여 37℃에서 60 분간 반응시킨 후, 96-well plate leader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도 A_{405} 를 측정하였다. 한편, 상기 FXIIa, FXIa, 또는 FXa의 기질은 Chromogenix 사(Milan, Italy)로부터, 칼리크레인의 기질은 Merck 사(Darmstadt, Germany)로부터 입수하였으며, 실험 표준곡선은 sigmoidal 4-parameter curve 이용하여 작성하였다.

[0041] 그 결과, 도 1의 A 내지 D에 나타낸 바와 같이, FXIIa, FXIa, FXa, 또는 Kallikrein 각각에 대한 표준곡선에서, R-square 값은 각각 0.9694, 0.9916, 0.998, 0.9871로서 모두 0.96 이상의 값을 나타내었다. 이러한 실험결과로부터 본 실시예 따른 측정 시스템은 FXIIa, FXIa, FXa 또는 Kallikrein 활성에 대하여 높은 정확도 및 재현성을 지닐 수 있었다.

[0042] 실시예 2. 혈장 내 FXIIa, FXIa, FXa 및 Kallikrein 활성 분석

[0043] PBS에 희석된 90 μ l의 10% 혈장과 10 μ l의 4 mM 다양한 합성 펩티드 기질 (FXIIa의 기질 S-2302, FXIa의 기질 S-2366, 칼리크레인의 기질 HD-Val-Leu-Arg-AFC, FXa의 기질 S-2765)을 혼합하여 37℃에서 60 분간 반응시킨 후, 96-well plate leader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에서 이들의 활성을 측정하였다. 상기 혈장은 정상 대조군(Normal), 전조증상단계의 알츠하이머성 치매 군(prodromal AD), 알츠하이머성 치매 군(AD)으로부터 수득하였다. 상기 활성 측정은 각각 세 번 반복하여 실시하였으며, 이후 흡광도 평균 값을 units(U)로 변환하고 희석배수(10배)를 곱하여 각 샘플의 활성도를 계산하였다.

[0044] 그 결과, 도 2의 A 내지 D에 나타낸 바와 같이, FXIIa의 활성도는 정상, prodromal AD, 및 AD로 질병이 진행됨에 따라 23.9, 28.0, 및 30.6 U/ml로 증가하였으며, FXIa, FXa, 또는 Kallikrein의 활성도 또한 상기와 유사한 경향성을 보여주었다. 상기 실험결과는 알츠하이머성 치매의 발병 및/또는 진행과 FXIIa, FXIa, FXa, 또는 Kallikrein 각각의 활성이 밀접한 상관관계에 있음을 나타내는 것이다.

[0045] **실시예 3. 뇌척수액 유래 바이오마커와 FXIIa간 상관관계 분석**

[0046] 종래 뇌척수액 유래 바이오마커($A\beta_{1-42}$, t-Tau 및 p-Tau181)들과 본 실시예에 따른 접촉계 유래 바이오 마커 (FXIIa)간 상관관계 분석을 실시하였다. 본 실험은 SPSS 24.0 버전을 이용하여, 피어슨 상관계수 분석을 수행하였다.

[0047] 그 결과, 도 3의 A 내지 C에 나타난 바와 같이, FXIIa는 알츠하이머성 치매의 뇌척수액 바이오마커들과 유의한 상관 관계가 있음을 확인할 수 있었다 [$A\beta_{1-42}$ ($r = -0.463$, $P < 0.01$), t-Tau ($r = 0.509$, $P < 0.001$), p-Tau181 ($r = 0.452$; $P < 0.001$)].

[0048] **실시예 4. 알츠하이머성 치매 진단에 대한 ROC 커브 곡선 분석**

[0049] 전조증상단계의 알츠하이머성 치매 및 알츠하이머성 치매의 진단과 관련된 FXIIa의 ROC 커브 곡선을 분석하여 (SPSS 24.0 버전), 각각의 AUC와, 민감도, 특이도를 확인하였다. 또한, FXIIa의 단독 사용뿐만 아니라, 종래 뇌척수액 유래 바이오마커인 $A\beta_{1-42}$ 와의 조합, 즉 $A\beta_{1-42}$ /FXIIa의 비율에 대한 ROC 커브 곡선 역시 상기와 동일한 방법으로 분석하였다.

[0050] 그 결과, 하기 표 1 및 도 4에 나타난 바와 같이, 정상군으로부터 prodromal AD 군과 AD 군을 구분하기 위한 FXIIa의 cut-off 값은 각각 26.3 U/ml 및 27.2 U/ml이었다. 이때, 이의 민감도 및 특이도는 prodromal AD 군에 대하여 73.9% 및 74.0%, AD 군에 대해서는 78.6% 및 78.0%으로서, 알츠하이머성 치매의 발병 및 진행의 예측에 대한 높은 신뢰도를 보여주었다. 또한, 하기 표 1 및 도 5에 나타난 바와 같이, 정상군으로부터 prodromal AD 군과 AD 군을 구분하기 위한 $A\beta_{1-42}$ /FXIIa의 cut-off 값은 33.8 pg/ml 및 27.4 pg/ml이었다. 특히, 이의 민감도 및 특이도는 prodromal AD 군에 대하여 87.0% 및 86.0%, AD 군에 대해서는 100% 및 100%으로서, 신뢰도가 현격하게 향상됨을 확인하였다.

[0051] **[표 1]**

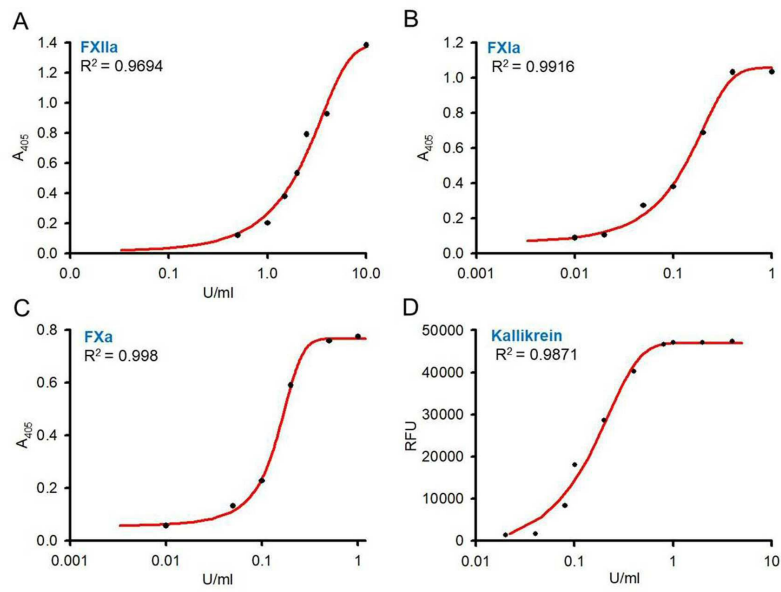
Characteristics	Normal (n = 50) versus Prodromal AD (n = 23) groups					Normal (n = 50) versus AD (n = 28) groups				
	Cutoff	Sen (%)	Spe (%)	AUC	P value	Cut-off	Sen (%)	Spe (%)	AUC	P value
Plasma										
FXIIa activity (U/ml)	> 26.3	73.9	74.0	.783	< 0.001	> 27.2	78.6	78.0	.906	< 0.001
Ratio										
$A\beta_{1-42}$ /FXIIa	< 33.8	87.0	86.0	.965	< 0.001	< 27.44	100.0	100.0	1.000	< 0.001

[0052]

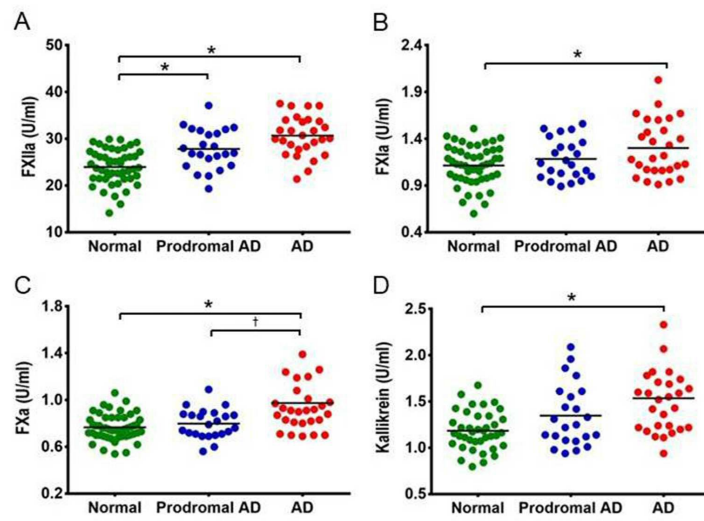
[0053] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

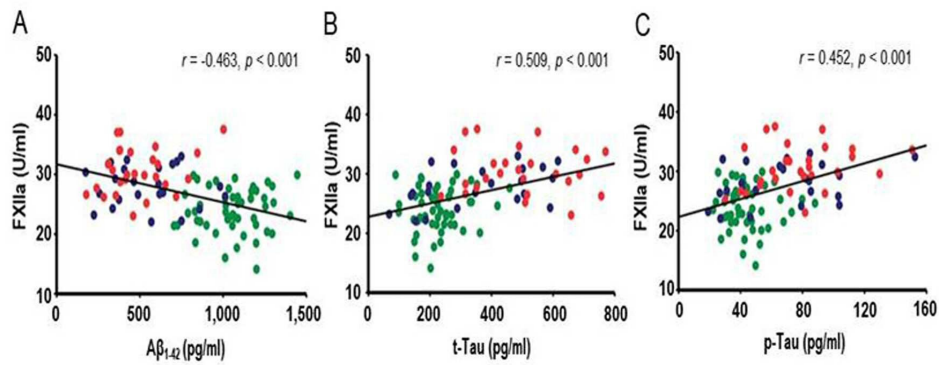
도면1



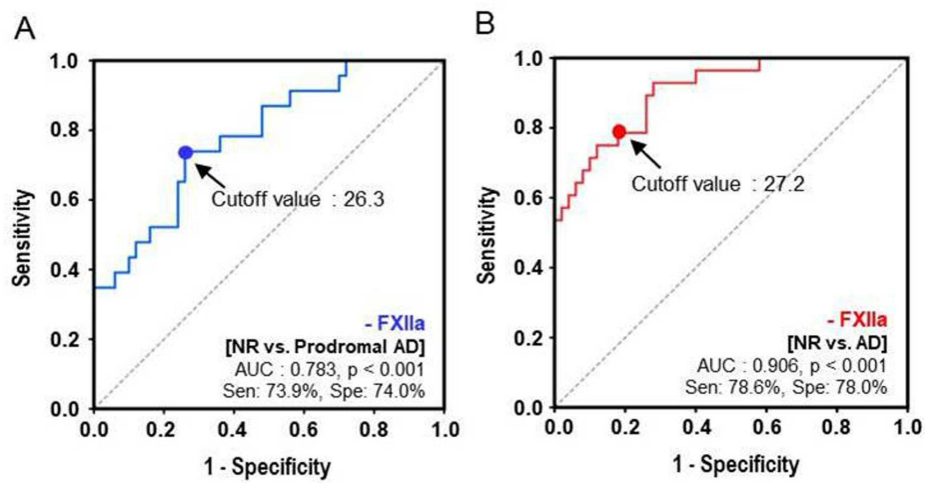
도면2



도면3



도면4



도면5

