



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월24일
(11) 등록번호 10-1375552
(24) 등록일자 2014년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7011105

(22) 출원일자(국제) 2006년09월25일

심사청구일자 2011년09월23일

(85) 번역문제출일자 2008년05월08일

(65) 공개번호 10-2008-0066785

(43) 공개일자 2008년07월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/037186

(87) 국제공개번호 WO 2007/047029

국제공개일자 2007년04월26일

(30) 우선권주장

11/246,524 2005년10월11일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2003102016 A1

전체 청구항 수 : 총 32 항

(73) 특허권자

블랜체트 록펠러 뉴로사이언스즈 인스티튜트

미국 웨스트버지니아주 26596-9301 모르간타운 메
디칼 센터 드라이브 피오박스 9301

(72) 발명자

칸 타판 쿠마르

미국 메릴랜드주 20878 케이더스버그 아파트먼트
넘버 103 웨스트사이드 드라이브 415

알콘 다니엘 엘

미국 메릴랜드주 20817 베데스다 보나벤츄라 코트
6701

(74) 대리인

장훈

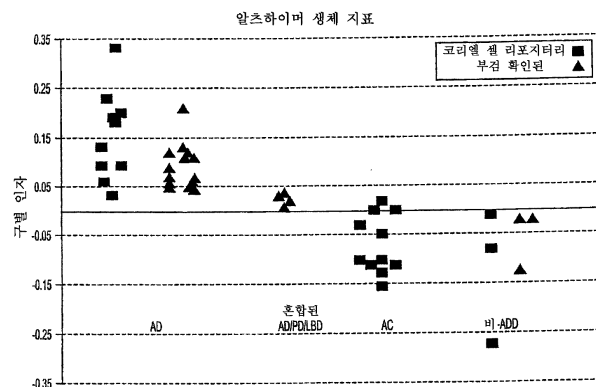
심사관 : 강연무

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(AD SMB)로서 ERK1/ERK2 포스포릴화비의 알츠하이머병-특이적 변화

(57) 요약

본 발명은 알츠하이머병 진단 방법 뿐만 아니라 개체에서 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 확인하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 비-알츠하이머 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키고, 세포를 단백질 키나제 C 활성화제를 사용하여 자극하고, 세포를 시험 화합물과 접촉시키고, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값을 측정함으로써 알츠하이머병 치료에 유용한 선도 화합물을 확인하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 단백질 키나제 C 활성화제를 사용한 자극 후 세포에서 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비 변화를 검출함으로써 개체에서 알츠하이머병을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 알츠하이머병 진단, 개체에서 알츠하이머병 진행 모니터링 및 알츠하이머병 치료 또는 예방용 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법에서 유용하다. 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 사용하여 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 검출 및 진단하기 위한 시약을 포함하는 키트에 관한 것이다.

대표도



(30) 우선권주장

PCT/US2005/36014 2005년10월11일 미국(US)

PCT/US2006/022156 2006년06월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

a) 개체로부터 수득된 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키는 단계, 및

b) 상기 접촉 단계가 상기 세포에서 알츠하이머병 표현형을 유도하는지를 측정하는 단계를 포함하고,

여기서, 알츠하이머병 표현형이 상기 접촉 단계에 의해 유도되는 경우, 개체에서 알츠하이머병이 부재임을 나타내는, 개체에서 알츠하이머병의 유무를 측정하기 위해 개체로부터 수득된 세포에서 알츠하이머병 표현형을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 아밀로이드 베타 펩타이드와의 항온처리가 세포에서 알츠하이머병 표현형의 유의적인 변화 또는 변경을 초래하지 않는 경우, 개체에서 알츠하이머병의 존재가 지시되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 아밀로이드 베타 펩타이드가 A β (1-42)인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 세포를 단백질 키나제 C 활성화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 단백질 키나제 C 활성화제가 브라디키닌, 브리오스타틴, 붐베신, 콜레시스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 세포가 말초 세포인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포가 섬유아세포, 타액, 혈액, 소변, 피부 세포, 구강 점막 세포 및 뇌척수액으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 시험관내 분석을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(biomarker)의 값을 측정함을 추가로 포함하는 방법으로서, 여기서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 0을 초과하는 양(+)의 값인 경우 알츠하이머병 표현형이 세포에서 유도되고, 이때 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표가, 브라디키닌으로 자극된 상기 세포에서 포스포릴화 Erk2에 대한 포스포릴화 Erk1의 비로부터 브라디키닌으로 자극되지 않은 상기 세포에서 포스포릴화 Erk2에 대한 포스포릴화 Erk1의 비를 공제한 값인, 방법.

청구항 10

개체로부터 수득한 세포를 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계, 및

상기 세포에서 특이적 포스포릴화 미토겐-활성화 단백질(MAP) 키나제 단백질의 비를 측정하는 단계를 포함하는, 개체에서 알츠하이머병을 진단하기 위해 개체로부터 수득된 세포에서 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 단계가 시험관내 분석을 포함하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질이 서로 서열 변종(sequence variant)이고, 동일한 단백질 군에 속하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비가 포스포릴화 Erk2에 대한 포스포릴화 Erk1의 비이고, 표준화된 양의 포스포릴화 Erk1을 표준화된 양의 포스포릴화 Erk2로 나누어서 계산되는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 단백질 키나제 C 활성화제가 브라디키닌, 브리오스타틴, 봄베신, 콜레시스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 세포가 말초 세포인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 말초 세포가 피부 세포, 피부 섬유아세포, 혈액 세포 및 구강 점막 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 포스포릴화 MAP 키나제 단백질이 면역분석에 의해 검출되는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 면역분석이 방사면역분석, 웨스턴 블롯 분석, 면역형광 분석, 효소 면역분석, 면역침전 분석, 화학발광 분석, 면역조직화학적 분석, 면역전기영동 분석, 도트 블롯 분석 또는 슬롯 블롯 분석인 방법.

청구항 19

제10항에 있어서, 측정이 단백질 어레이, 펩타이드 어레이 또는 단백질 마이크로 어레이를 사용하여 수행되는 방법.

청구항 20

- a) 개체로부터 수득된 세포를 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계,
- b) 접촉단계 후 상기 세포로부터 수득된 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 대한, 접촉단계 후 상기 세포로부터 수득된 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 단계,
- c) 단계(a)의 제제와 접촉시키지 않은 상기 개체로부터 수득된 세포에서 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 대한 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 단계, 및
- d) 단계(b)에서 수득한 비로부터 단계(c)에서 수득한 비를 공제하는 단계를 포함하는,

개체에서 알츠하이머병 존재를 진단하기 위해, 단백질 키나제 C 활성화제와의 접촉 전후 개체로부터 수득한 세포에서 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 대한 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질의 비의 차이를 측정하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 단계(d)에서 수득한 차가 양(+)의 값인 경우, 개체의 알츠하이머병의 존재를 지시하는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 단계(d)에서 수득한 차가 음(-)의 값 또는 0인 경우, 개체의 알츠하이머병의 부재를 지시하는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 단계가 시험관내 분석을 포함하는 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 제1 및 제2 MAP 키나제 단백질이 서로 서열 변종인 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 제1 MAP 키나제 단백질이 Erk1이고, 제2 MAP 키나제 단백질이 Erk2인 방법.

청구항 26

제20항에 있어서, 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 대한 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질의 비가 표준화된 양의 포스포릴화 Erk1을 표준화된 양의 포스포릴화 Erk2로 나누어서 계산되는 방법.

청구항 27

제20항에 있어서, 단백질 키나제 C 활성화제가 브라디키닌, 브리오스타틴, 봄베신, 콜레시스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 28

제20항에 있어서, 세포가 말초 세포인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 말초 세포가 피부 세포, 피부 섬유아세포, 혈액 세포 및 구강 점막 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 30

제20항에 있어서, 포스포릴화 MAP 키나제 단백질이 면역분석에 의해 검출되는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 면역분석이 방사면역분석, 웨스턴 블롯 분석, 면역형광 분석, 효소 면역분석, 면역침전 분석, 화학발광 분석, 면역조직화학적 분석, 면역전기영동 분석, 도트 블롯 분석 또는 슬롯 블롯 분석인 방법.

청구항 32

제20항에 있어서, 측정이 단백질 어레이, 펩타이드 어레이 또는 단백질 마이크로 어레이를 사용하여 수행되는 방법.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

명세서

[0001] 본 출원은 본 명세서에서 이들 내용 모두가 참조 문헌으로 인용되는 2005년 10월 11일자로 출원된 공개류중인 출원 제PCT/US2005/036014호의 부분 연속 출원인 2006년 6월 7일자로 출원된 공개류중인 출원 제PCT/US2006/022156호의 부분 연속 출원이다.

[0002]

기술분야

[0003] 본 발명은 알츠하이머병을 진단하는 방법 또는 개체에서 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 확인하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 알츠하이머병 치료 또는 예방에 유용한 치료제를 개발하기 위해 사용될 수 있는 선도(lead) 화합물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 단백질 키나제 C 활성화제를 사용하

여 자극한 후 세포에서 특이적 포스포릴화 미토젠-활성화 단백질(MAP) 키나제 단백질의 비 변화를 검출함으로써 개체에서 알츠하이머병을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)는 알츠하이머병 진단, 알츠하이머병 진행 모니터링 및 선도 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법에서 유용하다.

배경 기술

- [0004] 세포내 칼슘 항상성 교란, 산화성 스트레스의 수준 증가, 및 흥분성 독성 및 신경세포사를 초래하는 염증 메커니즘은 알츠하이머병(AD)의 발병에 기여하는 것으로 제시되어 왔다(참조: Ito et al, 1994, Putney, 2000; Yoo et al, 2000; Sheehan et al, 1997; De Luigi et al, 2001; Anderson et al, 2001; Remarque et al, 2001). 세포내 Ca^{2+} 수준에서 다수의 AD-관련 이상 및 기타 세포 과정은 자극제로서 브라디키닌을 사용하는 연구로부터 비롯되었다. 강력한 염증 매개체로서, 브라디키닌(BK)은 병적-생리학적인 상태, 예를 들면, 외상, 졸충, 동통 허혈, 및 천식하에 뇌 및 말초 세포에 의해 생성된다(참조: Regoli et al, 1993; Bockmann & Paegelow, 2000; Ellis et al, 1989; Kamiya et al, 1993). G-단백질-커플링 수용체인 B2 브라디키닌 수용체(BK2bR) 상에 작용함으로써, BK는 포스포리파제 C(PLC)의 활성을 통해 포스포티딜이노시톨(PI) 턴오버를 유도하고, 이어서 IP3-민감성 스토어로부터 세포내 Ca^{2+} 방출을 증가시키는 이노시톨 1,4,5-트리스포스페이트(IP3)를 생성시킨다(참조: Noda et al, 1996; Venema et al, 1998; Wassdal et al, 1999; Cruzblanca et al, 1998; Ricupero et al, 1997; Pascale et al, 1999). 동일한 경로를 통해, BK는 또한 미토젠-활성화 단백질(MAP) 키나제의 활성화를 통해 기타 전염증 사이토킨의 생성을 유도한다(참조: Hayashi et al, 2000; Schwaninger et al, 1999; Phagoo et al, 2001). 세포내 Ca^{2+} 수준의 강화된 상승은 브라디키닌의 자극 및 K^+ 채널의 불활성화에 대한 반응으로 AD 말초 세포 뿐만 아니라 AD 뇌에서 발견되었다(참조: Etcheberrigaray et al, 1993, 1998; Hirashima et al, 1996; Gibson et al, 1996(a)).
- [0005] BK2bR 활성화에 이은 단백질 키나제 C(PLC) 자극은 또한 디아실글리세롤의 생성을 초래하여, 증가한 세포내 Ca^{2+} 에 따라, 단백질 키나제 C(PKC) 이종형(isoform)을 활성화한다. BK-활성화 PLC/인지질- Ca^{2+} /PKC 캐스케이드는 Ras/Raf 시그널링 경로와 상호 작용하여 MAP 키나제 군의 서브타입인 세포외 시그널-조절된 키나제(extracellular signal-regulated kinase) 1/2(Erk 1 및 Erk2, 함께 "Erk1/2"라 함)을 활성화시킨다(참조: Berridge, 1984; BAssa et al, 1999; Hayashi et al, 2000; Blaukat et al, 2000, Zhao et al, Neurobiology of Disease 11, 166-183, 2002). Erk1/2은 다중 시그널 전달 경로로부터 시그널을 수용하고, AP-1, NF- κ B 및 사이클릭 AMP-반응 요소 결합 단백질(CREB)을 포함하는 다수의 전사 인자를 통한 유전자 발현의 조절에 의해 세포 증식 및 분화를 초래한다. 주요 키나제 중의 하나로서 작용함으로써, Erk2는 Ser-262 및 Ser-356을 포함하는 다중 세린/트레오닌 부위에서 tau를 포스포릴화한다(참조: Reynolds et al, 1993; Lu et al, 1993). 또한, PKC-활성화된 MAP 키나제 및 BK 수용체-관련 통로는 상이한 실험에 의해 아밀로이드 전구체 단백질의 가용성 형태(sAPP)의 형성 및 분비를 조절하는 것으로 제시되었다(참조: Desdouits-Magnen et al, 1998; Gasparini et al, 2001; Nitsch et al., 1994, 1995, 1996, 1998). 이러한 발견은 BK-관련 sAPP 프로세싱이 PKC-MAP 키나제 경로와 결합할 수 있는 가능성을 보여준다. 한편, 병리학적인 상태, 예를 들면, 바이러스 감염, 증가한 산화성 스트레스, APP의 비정상적인 발현 및 $AP\beta$ 에 대한 노출은 MAP 키나제의 활성화(참조: Rodems & Spector, 1998; McDonald et al, 1998; Ekinci et al, 1999; Grant et al, 1999), 및 증가한 tau 포스포릴화(참조: Greenberg et al, 1994; Ekinci & Shea, 1999; Knowles et al, 1999)를 야기한다. 이러한 결과는 AD의 발병에서 MAP 키나제 시그널링 경로(들)의 혼란을 포함한다.
- [0006] 미토젠-활성화된 단백질 키나제(예: Erk1 및 Erk2)는 미소관 관련 단백질 tau의 포스포릴화 및 아밀로이드 단백질 β 의 프로세싱을 조절하며, 이들 결과 둘 다 알츠하이머병의 병리생리학에 중요하다. 브라디키닌과의 반응으로 증가하고 연장된 Erk1/2 포스포릴화는 가족성 및 산발성 알츠하이머병 둘 다의 섬유아세포에서 검출되나, 동일 연령 대조군(age-matched control)에서는 검출되지 않았다(참조: Zhao et al, Neurobiology of Disease 11, 166-183, 2002). 브라디키닌에 의해 유도된 지속된 Erk1/2 포스포릴화는 알츠하이머병 섬유아세포에서 이전에 발견되었으며, 이의 내용이 본 명세서에서 참고문헌으로 인용되는 WO 02/067764의 주제이다.
- [0007] 알츠하이머병을 진단하고 알츠하이머병의 치료 및 예방에 유용한 화합물을 스크리닝하는데 매우 민감하고 매우 특이적인 시험이 필요하다. 본 발명자들은 본 발명에 이르러 이미 공지된 진단 시험과 비교하여 매우 민감하고

매우 특이적인 방법으로 알츠하이머병을 진단하는데 유용한 독특한 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 확인하였다. 따라서, 본 명세서에 기술된 독특한 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 알츠하이머병 검출 및 진단에 대하여 고도의 민감성 및 특이성을 갖는 진단 방법에 대한 기초(basis)로서 제공된다. 본 발명의 독특한 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 또한 알츠하이머병의 치료 및 예방에서 치료제로서 사용될 수 있는 화합물을 확인하는 스크리닝 방법에서 유용하다.

[0008] 발명의 요약

[0009] 본 발명은 개체에서 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 측정 또는 확인하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 방법은

[0010] 개체로부터의 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키는 단계, 및

[0011] 상기 접촉 단계가 상기 세포에서 알츠하이머병 표현형을 유도하는지를 측정하는 단계를 포함하고, 여기서, 알츠하이머병 표현형이 상기 접촉 단계에 의해 상기 세포에서 유도되는 경우, 상기 개체에서 알츠하이머병이 부재임을 확정하거나 나타낸다. 특정 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드로 항온처리하여 세포에서 알츠하이머병 표현형에서의 상당한 변화 또는 변경이 초래되지 않는 경우, 개체에서 알츠하이머병이 존재함을 확정하거나 나타낸다. 알츠하이머병 표현형에서의 상당한 변화 또는 변경이 없다는 것은 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키기 전의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값과 비교하여 변화되지 않거나, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키기 전의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값과 비교하여 약 15% 미만, 또는 약 14% 미만, 또는 약 13% 미만, 또는 약 12% 미만, 또는 약 11% 미만, 또는 약 10% 미만, 또는 약 9% 미만, 또는 약 8% 미만, 또는 약 7% 미만, 또는 약 6% 미만, 또는 약 5% 미만, 또는 약 4% 미만, 또는 약 3% 미만, 또는 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만, 또는 약 0.5% 미만, 또는 약 0.25% 미만만큼 변경 또는 변화됨을 의미한다.

[0012] 특정 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드는 A β (1-42)이나, 임의의 아밀로이드 베타 펩타이드를 사용할 수 있다. 추가의 양태에서, 본 방법은 세포를 단백질 키나제 C 활성화제와 접촉시킴을 포함한다. 추가의 또 다른 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 브라디키닌, 브리오스타틴, 봄베신, 콜레스িস토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F₂ α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가의 또 다른 양태에서, 세포는 말초 세포이다. 추가의 또 다른 양태에서, 세포는 섬유아세포, 타액, 혈액, 소변, 피부 세포, 구강 점막 세포 및 뇌척수액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 명세서에서 기술된 모든 방법은 생체내 또는 시험관내에서 수행할 수 있다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 방법은 시험관내에서 수행한다.

[0013] 본 발명의 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 0을 초과하는 양(+)의 값인 경우, 알츠하이머병 표현형이 세포에서 유도된다.

[0014] 본 발명의 바람직한 양태는

[0015] 개체로부터의 세포를 A β (1-42)와 접촉시키는 단계,

[0016] 세포를 브라디키닌과 접촉시키는 단계, 및

[0017] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값을 측정하는 단계를 포함하고, 여기서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 0을 초과하는 양(+)의 값인 경우, 개체에서 알츠하이머병이 부재임을 확정하거나 나타내는 알츠하이머병의 부재를 측정 또는 확인하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드를 사용한 항온처리가 세포에서 알츠하이머병 표현형의 상당한 변화 또는 변경을 초래하지 않는 경우, 개체에서 알츠하이머병이 존재함을 확정하거나 나타낸다. 알츠하이머병 표현형에서의 상당한 변화 또는 변경이 없다는 것은 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키기 전의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값과 비교하여 변화되지 않거나, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 세포를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키기 전의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값과 비교하여 약 15% 미만, 또는 약 14% 미만, 또는 약 13% 미만, 또는 약 12% 미만, 또는 약 11% 미만, 또는 약 10% 미만, 또는 약 9% 미만, 또는 약 8% 미만, 또는 약 7% 미만, 또는 약 6% 미만, 또는 약 5% 미만, 또는 약 4% 미만, 또는 약 3% 미만, 또는 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만, 또는 약 0.5% 미만, 또는 약 0.25% 미만만큼 변경 또는 변화됨을 의미한다. 추가의 또 다른 바람직한 양태에서, 세포는 말초 세포이다. 추가의 또 다른 바람직한 양태에서, 세포는 섬유아세포, 타액, 혈액, 소변, 피부 세포, 구강 점막 세포 및 뇌척수액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된

다.

- [0018] 본 발명은 또한
- [0019] 비-알츠하이머 세포(non-Alzheimer's cell)를 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉시키는 단계,
- [0020] 당해 비-알츠하이머 세포를 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계,
- [0021] 당해 세포를 시험 화합물과 추가로 접촉시키는 단계, 및
- [0022] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값을 측정하는 단계를 포함하여, 알츠하이머병 치료에 유용한 선도 화합물을 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 한 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드는 A β (1-42)이나, 임의의 아밀로이드 베타 펩타이드를 사용할 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 비-알츠하이머 세포는 섬유아세포, 타액, 혈액, 소변, 피부 세포, 구강 점막 세포 및 뇌척수액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 브라디키닌, 브리오스타틴, 붐베신, 콜레스티스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0024] 본 발명의 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 시험 화합물과 접촉하지 않은 대조 세포로부터 측정된 유사한 분자 생체 지표의 값 미만인 경우, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값이 알츠하이머병 치료에 유용한 화합물임을 지시한다. 바람직한 양태에서, 대조 세포는 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉된다. 기타 바람직한 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드는 A β (1-42)이나, 임의의 아밀로이드 베타 펩타이드가 사용될 수 있다. 기타 바람직한 양태에서, 대조 세포는 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉된다.
- [0025] 특정 양태에서, 알츠하이머병 치료에 유용한 선도 화합물을 확인하는 방법은 알츠하이머병 치료에 유용한 것으로 확인된 화합물을 개질시켜 개질되지 않은 화합물의 안전성 및 효능과 비교하여 개질된 화합물의 안전성 및 효능을 최적화 또는 개선하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 양태에서, 확인된 개질 화합물은 알츠하이머병 치료에 유용하다.
- [0026] 또한, 본 발명은 치료학적 유효량의 개질된 화합물을 알츠하이머병 치료를 필요로 하는 개체에게 투여함을 포함하는, 알츠하이머병 치료 방법을 기술한다.
- [0027] 본 발명은 또한
- [0028] 비-알츠하이머 대조 세포를, 임의의 아밀로이드 베타 펩타이드가 사용될 수 있으나, A β (1-42)와 접촉시키는 단계,
- [0029] 비-알츠하이머 대조 세포를 브라디키닌과 접촉시키는 단계,
- [0030] 대조 세포를 시험 화합물과 추가로 접촉시키는 단계, 및
- [0031] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 값을 측정하여 알츠하이머병 치료에 유용한 화합물을 확인하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 치료에 유용한 화합물을 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0032] 특정 양태에서, 본 발명은
- [0033] 개체로부터 수득한 세포를 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계, 및
- [0034] 세포에서 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하여 개체에서 알츠하이머병을 진단하는 단계를 포함하는, 개체에서 알츠하이머병을 진단하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비는 2개의 포스포릴화 MAP 키나제 단백질 사이의 비이다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 진단 방법은 시험관내 분석을 포함한다. 진단 방법의 추가의 바람직한 양태에서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질은 각각 서열 변종(sequence variant)이고, 동일한 단백질 군에 속한다.
- [0035] 본 발명의 특정 양태에서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비는 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비이고, 표준화된 양의 포스포릴화 Erk1을 표준화된 양의 포스포릴화 Erk2로 나누어서 계산한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 브라디키닌, 브리오스타틴, 붐베신, 콜레스티스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0036] 본 발명의 특정 양태에서, 진단 분석에 사용된 세포는 말초 세포이다. 바람직한 양태에서, 세포는 피부 세포, 피부 섬유아세포, 혈액 세포 또는 구강 점막 세포일 수 있다. 특정 양태에서, 세포는 뇌척수액으로부터 분리되

지 않는다. 기타 바람직한 양태에서, 세포는 뇌척수액을 포함하지 않는다. 기타 바람직한 양태에서, 세포는 스파이날 탭(spinal tap) 또는 요추천자(lumbar puncture)에 의해 획득되지 않는다.

[0037] 진단 방법의 특정 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 혈청을 포함하는 배지에서 세포와 접촉된다. 본 발명의 기타 바람직한 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 혈청 비함유 배지에서 세포와 접촉된다.

[0038] 본 발명의 진단 방법의 특정 양태에서, 포스포릴화 MAP 키나제 단백질은 면역분석에 의해 검출된다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 면역분석은 방사면역분석, 웨스턴 블롯 분석, 면역형광 분석, 효소 면역분석, 면역침전 분석, 화학발광 분석, 면역조직화학적 분석, 면역전기영동 분석, 도트 블롯 분석 또는 슬롯 블롯 분석일 수 있다. 본 발명의 진단 방법의 추가의 바람직한 양태에서, 단백질 어레이 또는 펩타이드 어레이 또는 단백질 마이크로 어레이가 진단 방법에 사용될 수 있다.

[0039] 특정 양태에서, 본 발명에서 기술한 진단 방법을 사용하여 알츠하이머병의 네가티브 진단이 달성 또는 지시되는 경우(즉, 알츠하이머병의 존재를 지시하는 결과의 부재 또는 결여), 추가로, 알츠하이머병의 부재와 관련된 본 명세서에 기술된 진단 방법을 사용하여 확인 진단 방법을 수행할 수 있다. 이러한 확인 진단 방법은 본 명세서에 기술한 진단 방법과 병행하여 또는 이어서 수행할 수 있다. 유사하게, 본 발명에서 기술한 진단 방법을 사용하여 알츠하이머병의 포지티브 진단이 지시되는 경우(즉, 알츠하이머병의 존재를 지시하는 결과), 추가로, 알츠하이머병의 존재와 관련된 본 명세서에 기술된 진단 방법을 사용하여 확인 진단 방법을 수행할 수 있다. 이러한 확인 진단 방법은 본 명세서에 기술한 진단 방법과 병행하여 또는 이어서 수행할 수 있다.

[0040] 본 발명의 진단 방법의 특정 양태에서, 알츠하이머병은 개체로부터의 세포를 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키고, 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 측정함으로써 개체에서 진단될 수 있으며, 여기서, 포스포릴화 제1 및 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질은 단백질 키나제 C 활성화제와 접촉시킨 후 세포로부터 획득된다. 본 발명의 진단 방법의 추가 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제와 접촉하지 않은 개체로부터의 세포에서 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하고, 단백질 키나제 C 활성화제와 접촉시킨 후 세포로부터 획득한 포스포릴화 제1 및 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 상기 비에서 빼서 비의 차를 기준으로 개체에서 알츠하이머병의 존재를 진단한다. 본 발명의 진단 방법의 바람직한 양태에서, 비의 차가 양(+)의 값인 경우, 개체에서 알츠하이머병이 있음을 진단한다.

[0041] 본 발명의 진단 방법의 다른 바람직한 양태에서, 비의 차가 음(-)의 값 또는 0인 경우, 상기 비의 차는 알츠하이머병이 부재함을 진단한다.

[0042] 본 발명의 특정 양태는 개체에서 알츠하이머병 진단 키트에 관한 것이다. 본 발명의 특정 양태에서, 키트는 단백질 키나제 C 활성화제인 제제를 함유할 수 있다. 본 발명의 추가의 양태에서, 키트는 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질에 특이적인 항체를 함유할 수 있다. 본 발명의 추가의 양태에서, 키트는 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 특이적인 항체를 함유할 수 있다. 바람직한 양태에서, 키트는 상기 항체의 배합물을 함유할 수 있다.

[0043] 본 발명의 특정 양태에서, 개체에서 알츠하이머병 진단 키트는 브라디키닌, 브리오스타틴, 붐베신, 콜레스티로키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 키나제 C 활성화제를 함유할 수 있다. 바람직한 양태에서, 키트는 상기 단백질 키나제 C 활성화제의 배합물을 함유할 수 있다.

[0044] 본 발명의 특정 양태에서, 개체에서 알츠하이머병 진단 키트는 포스포릴화 Erk1 또는 포스포릴화 Erk2 또는 이들 둘 다에 특이적인 항체를 함유할 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 키트는 항-포스포-Erk1 항체를 함유할 수 있다. 본 발명의 추가의 바람직한 양태에서, 키트는 항-포스포-Erk2 항체를 함유할 수 있다. 바람직한 양태에서, 키트는 상기 항체의 배합물을 함유할 수 있다.

[0045] 본 발명의 특정 양태에서, 알츠하이머병의 진단 키트는 아밀로이드 베타 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 바람직한 특정 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드는 A β (1-42)일 수 있다.

[0046] 본 발명의 특정 양태에서, 개체에서 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 진단하는 키트는 아밀로이드 베타 펩타이드; 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질에 특이적인 항체; 및 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질에 특이적인 항체를 포함한다. 바람직한 양태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드는 A β (1-42)이다. 바람직한 양태에서, 키트는 상기 펩타이드 및 항체의 배합물을 함유할 수 있다.

- [0047] 본 발명의 특정 양태는
- [0048] 알츠하이머병으로 진단된 개체로부터 분리된 세포를 시험 화합물(또는 선도 화합물)의 존재하에 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계,
- [0049] 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 단계(여기서, 포스포릴화 제1 및 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질은 접촉 후에 세포로부터 수득한다),
- [0050] 시험 화합물(또는 선도 화합물)과 접촉시키지 않은 개체로부터의 세포에서 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 단계,
- [0051] 시험 화합물(또는 선도 화합물)의 존재하에 수행된 접촉 단계로부터 수득한 비를 시험 화합물(또는 선도 화합물)의 부재하에 수행된 접촉 단계로부터 수득한 비에서 빼는 단계, 및
- [0052] 이러한 비의 차를 기준으로 알츠하이머병 치료에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)을 확인하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 알츠하이머병 치료에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)을 스크리닝하는 방법의 바람직한 양태에서, 계산된 비의 차가 음(-)의 값 또는 0인 경우, 계산된 비의 차는 알츠하이머병 치료에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)임을 지시한다.
- [0053] 바람직한 양태에서, 본 발명은 시험관내 분석을 포함하는, 알츠하이머병 치료 또는 예방에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0054] 알츠하이머병 치료 또는 예방에 유용한 시험 화합물(또는 선도 화합물)을 스크리닝하는 방법의 바람직한 양태에서, 제1 MAP 키나제 단백질은 Erk1이고, 제2 MAP 키나제 단백질은 Erk2이다. 본 발명의 추가의 바람직한 양태에서, 비는 표준화된 양의 포스포릴화 Erk1을 표준화된 양의 포스포릴화 Erk2로 나누어서 계산한다. 본 발명의 추가의 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 브라디키닌, 브리오스타틴, 봄베신, 콜레시스토키닌, 트롬빈, 프로스타글란딘 F2 α 및 바소프레신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 추가의 양태에서, 세포는 말초 세포이다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 말초 세포는 피부 세포, 피부 섬유아세포, 혈액 세포 및 구강 점막 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 세포는 뇌척수액으로부터 분리되지 않는다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 세포는 뇌척수액을 포함하지 않는다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 세포는 스파이날 탭 또는 요추천자에 의해 수득되지 않는다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 혈청을 포함하는 배지에서 세포와 접촉된다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 혈청 비함유 배지에서 세포와 접촉된다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 포스포릴화 MAP 키나제 단백질은 면역분석에 의해 검출된다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 면역분석은 방사면역분석, 웨스턴 블롯 분석, 면역형광 분석, 효소 면역분석, 면역침전 분석, 화학발광 분석, 면역조직화학적 분석, 면역전기영동 분석, 도트 블롯 분석 또는 슬롯 블롯 분석이다. 본 발명의 추가의 또 다른 양태에서, 단백질 어레이, 펩타이드 어레이 또는 단백질 마이크로 어레이를 사용하여 측정한다.
- [0055] 특정 양태에서, 본 발명은 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 측정하는 단계를 포함하는, 개체에서 알츠하이머병 진행을 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 특정 양태에서, 본 방법은 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 하나 이상의 시점에서 측정하는 단계를 포함한다. 바람직한 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 6개월 이상, 더욱 바람직하게는 12개월 이상 분리된 시점에서 측정한다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 수치 값의 감소(즉, 보다 적은 양(+))의 값)는 개체에서 알츠하이머병 진행이 있음을 지시한다.
- [0056] 특정 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 화합물을 스크리닝하는 방법에 의해 확인된 화합물을 포함하는, 알츠하이머병의 치료에 유용한 조성물에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 조성물은 본 명세서에 기술된 화합물을 스크리닝하는 방법에 의해 확인된 치료학적 유효량의 화합물을 포함하는, 알츠하이머병 치료를 필요로 하는 개체에서 알츠하이머병 치료용 약제학적 조성물을 포함한다.
- [0057] 특정 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물을 알츠하이머병 치료를 필요로 하는 개체에 투여함을 포함하는, 알츠하이머병 치료 방법에 관한 것이다.

실시예

- [0153] 실시예 1: 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)
- [0154] 브라디키닌(10nM, 37°C에서 10분)은 알츠하이머(AD) 섬유아세포 대 비-AD 치매 및 비-치매(non-demented) 대조군 섬유아세포에서 Erk1/2의 보다 큰 포스포틸화를 야기하는 것으로 밝혀졌다. AD 섬유아세포에 대한 이러한 증가된 Erk1/2 포스포틸화가 여기서 추가의 코리엘 세포주와 함께 관찰될 수 있지만, 이러한 측정에서 발견된 고유의 변이성은 개선된 정량, 신뢰성, 및 재현성에 대한 요구를 나타냈다. 따라서, 본원에서 섬유아세포 세포주의 성장 속도에서의 고유 차이 뿐만 아니라 겔에 적용되는 단백질 추출물의 정확한 양의 차이를 조절하기 위해, 본 발명자들은 새로운 포스포틸화 척도 - BK+ 자극 전 및 후에 Erk1/2 비를 사용하여 모든 환자 샘플에서 Erk1 대 Erk2 포스포틸화를 비교하는 척도를 도입한다. Erk1/Erk2 포스포틸화 비의 이러한 척도, 즉 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)은 모든 AD 섬유아세포(도 1 및 도 4A)로부터 모든 비-치매 대조군 섬유아세포를 완전히 구별했다. 대조군 케이스(BK-)에 대한 p-Erk1의 명백한 높은 수준(도 3)은 모든 환자에게 일치하지 않았다. 비-AD 치매의 몇몇 경우는 임상 진단의 부검 확인의 결핍으로 인해 야기될 수 있더라도 구별되지 않았다. 이러한 해석은 부검-확인된 진단을 받은 환자로부터의 섬유아세포로 얻은 ADSMB 측정 결과에 의해 지지되었으며(도 1 및 도 4B), 여기서 ADSMB는 모든 AD 케이스를 모든 비-AD 치매, 및 심지어는 AD 및 그 밖의 비-AD 병리학(예: 파킨슨씨병) 모두로 인한 "혼합된" 치매의 케이스로부터 정확하게 구별하였다. AD를 비-AD 치매 및 비-치매 대조군 환자 모두로부터 구별함에 있어서의 이러한 높은 정확성은 코리엘 세포 샘플 및 부검-확인된 샘플 모두를 고려하여 ADSMB의 현저한 민감성 및 특이성에서 반영되었다(도 6). 단지 부검-확인된 진단만이 고려되는 경우, 민감성 및 특이성은 100% 수준이다.
- [0155] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)은 질환 지속 기간에 따라 변한다.
- [0156] 질환 지속 기간이 허용되는 환자 샘플의 경우[즉, 증상(들) 개시의 시간으로부터의 ADSMB 측정 시간], 본 발명자들은 이러한 질환 지속 기간에 대한 ADSMB 진폭의 관계를 검사하였다. 도시한 바와 같이(도 2), ADSMB 크기와 질환 지속 기간의 유의적인(선형 회귀 분석에 의한) 역상관이 있었다. 이 결과는 MAP 키나제 포스포틸화 ADSMB가 뚜렷할수록 측정되는 질환의 경로에서 시간이 더욱 빨라진다는 것을 나타낸다.
- [0157] A β (1-42)에 의한 알츠하이머 표현형의 유도
- [0158] A β (1-42) 수준이 대부분 초기 AD에서 결정적으로 관련될 가능성이 있기 때문에, 그리고 관찰된 ADSMB가 초기 AD 진단력을 갖는 데이터에 의해 도시되었기 때문에, 본 발명자들은 여기서 향상된 A β (1-42)가 MAP 키나제 D.F.의 이상을 유도할 수 있는 가능성을 검사하였다. 따라서, 정상의 대조군 환자로부터의 섬유아세포 세포주를 1.0 μ M A β (1-42)에 24시간 동안 노출시켰다. 도 5 A에 도시된 바와 같이, A β (1-42)에 의한 예비향은 처리는 예시한 바와 같이 정상의[음(-)의] ADSMB 표현형을 AD 표현형 모두에 대해 관찰된 이상의 양(+)의 값 ADSMB 표현형으로 전환시켰다. 이들 결과는 AD 환자에서의 이러한 ADSMB 표현형이 실제로 A β (1-42)의 향상된 수준으로부터 야기됨을 보여준다.
- [0159] PKC 활성화제인 브리오스타틴에 의한 알츠하이머 표현형의 역전
- [0160] 앞에서 논의한 바와 같이, MAP 키나제 포스포틸화(ADSMB에 의해 측정된)는 PKC 활성화에 의해 조절되며, 순차적으로 A β 의 향상된 수준으로 취약성이 나타났다. 추가로, 강력한 PKC 활성화제인 마크로락톤, 즉 브리오스타틴은 사람 섬유아세포에서 PKC 활성화를 향상시킬 뿐만 아니라 사람 AD 유전자를 갖는 유전자 도입(transgenic) 마우스의 뇌에서 A β (1-42) 수준을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이러한 발견에 기초하여, 본 발명자들은 A β (1-42)-처리된 사람 섬유아세포에 대한 브리오스타틴(0.1nM)의 효과를 시험하였다. 도시한 바와 같이(도 5B 및 표 1), 브리오스타틴은 A β (1-42)에 의해 정상의 섬유아세포에서 유도된 MAP 키나제 포스포틸화의 변화를 완전히 역전시켰다. 브리오스타틴은 A β -처리된 섬유아세포의 이상의 양(+)의 값을 비-AD 섬유아세포에 대해 이전에 관찰된 정상의 음(-)의 값의 ADSMB로 변화시켰다. 브리오스타틴의 이러한 "치료" 효과는 만성 브리오스타틴 처리에 노출된 AD-유전자 도입 마우스의 크게 증가된 생존과 일치한다.
- 표 1**
- [0161] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)을 AC(대조군 세포주)(대조군), 아밀로이드 베타(A β) 유도된 세포,

및 아밀로이드 베타(Aβ) 유도된 세포 + 브리오스타틴 처리(Aβ+BY)에 대해 측정하였다.

세포주	ADSMB ^a		
	대조군 [*]	Aβ ^{**}	Aβ+BY [#]
AG06959	-	0.13	0.0
AG07732	-0.11	0.12	-0.13
AG11363	0.0	0.16	0.09
AG09977	-0.15	0.13	0.01
평균±SE	-0.099±0.05	0.13±0.01	-0.01±0.05

[0162] *P<0.001, #P<0.01

[0163] ^aADSMB는 이 연구에 의해 방법 사용에 따라 계산되었다.

[0164] ^{*}T-시험은 대조군과 Aβ 처리된 세포 사이에 수행되었다.

[0165] [#]T-시험은 Aβ 처리된 세포 및 Aβ+ 브리오스타틴 처리된 세포 사이에 수행되었다.

[0166] AD를 진단하기 위해 MAP 키나제 포스포릴화의 ADSMB 측정의 높은 민감성 및 특이성은 치매의 임상 평가에서 보조하기 위해 AD에 대한 실험실 시험으로서 중요한 잠재성을 제안한다. 현재까지, 임상-진단된 치매의 부검 확인은 여러 해에 걸친(long-standing) 질환을 가진 환자에 대해서만 시행된다. AD가 8 내지 15년 동안에 지속될 수 있음을 고려하여, 짧은 지속 기간의 AD에 대한 임상 진단은 이후에 질환 진행시에 임상 진단과 비교한 다음, 부검 인증을 받는 경우 높은 부정확성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 사람 섬유아세포에 대한 말초 생체 지표, 즉 여기서 MAP 키나제의 포스포릴화 비가 치매에 대한 치료 전략에 도달하는 데 실질적인 유용성을 갖는다.

[0167] 이론에 의해 제한하고자 하지는 않더라도, Erk1 대 Erk2 포스포릴화의 비가 Aβ 대사의 AD-특이성 차이로 인한 이상에 민감할 수 있는 이유를 고려하는 것이 유리하다. AD에 대한 말초 생체 지표의 현재 및 과거의 연구의 한 가지 암시는 AD의 병태생리학이 뇌를 포함할 뿐만 아니라 다양한 그 밖의 기관계를 포함한다는 것이다. AD의 이러한 전신성 병태생리학적 관점은 아밀로이드 및 tau 대사 경로가 사람 몸에서 편재하며 혈액, 타액, 피부 및 뇌의 조직(extra-brain tissue)에서 명백하다는 관찰과 일치한다.

[0168] 여기서 나타난 AD와 Erk1/Erk2 비의 밀접한 상관관계는 AD 시그널링의 "리드-아웃(read-out)"으로서 이러한 기질에 대한 주의에 집중한다. 예를 들면, PKC 동종효소는 MAP 키나제에서 수렴하는 몇몇 분자 표적을 조절한다. PKC는 (1) s-APP의 α-세크레타제 증가, 및 이에 따라서 간접적으로, β-아밀로이드의 감소를 활성화하며; (2) β-아밀로이드는 MAP 키나제 포스포릴화를 증가시키는 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)를 활성화하며; (3) PKC는 GSK-3β를 억제하며; (4) PKC 자체는 GSK-3β를 포스포릴화하고; (5) PKC는 BK 및 그 밖의 AD-개시된 사건에 반응할 수 있는 사이토킨 염증성 시그널을 활성화하며; (6) 독성 콜레스테롤 대사물질(예: 17-OH 콜레스테롤)은 PKC α를 억제하고, 결국 Aβ를 감소시키고 포스포릴화 tau를 감소시킨다.

[0169] 따라서, PKC 동종효소 자체의 기능 장애가 AD 공정의 초기 개시에 기여할 수 있다는 증거는 상기의 모든 시그널링 사건을 통해, Erk1/2 포스포릴화 비의 이상에서 반영되었다.

[0170] 마지막으로, 어떻게 해서 AD 포스포릴화 이상의 특이성이 사람 섬유아세포 세포주의 연속 통과를 통해 유지될 수 있는 지에 관해서는 불명확하다. 이러한 현상은 섬유아세포 계통을 갖는 PKC/MAP 키나제 수준의 상호작용을 통해 설명될 수 있다. PKC 및 MAP 키나제는 유전자 발현을 조절하는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 자체 합성의 PKC/MAP 키나제 자극의 진행중인 사이클이 사람 섬유아세포의 한 세대로부터 다음 세대까지의 PKC 수준 및 MAP 키나제 포스포릴화의 이상을 영속시킬 수 있음은 가능할 수 있다.

[0171] 실시예 2: Aβ 처리

[0172] Aβ(1-42) 용액의 제조: 초기에 Aβ(1-42) 1mg을 3mM의 농도에서 헥사-플루오로이소프로판올[시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스]에 용해시키고, 살균 마이크로원심분리 튜브에서 나누어 분리시켰다. 헥사-플루오로이소프로판올을 진공하에 제거하고, 동결건조하였다. Aβ(1-42) 막을 사용할 때까지 건조 조건하에 -20℃에

서 저장하였다. 5mM Aβ(1-42) 저장 용액을 실험 직전에 DMSO에서 저장된 Aβ(1-42)로부터 제조하였다. 1.0 μM 저장 용액을 DMSO 저장 용액으로부터 Aβ(1-42)를 용해시켜 DMEM 배지(10% 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충)에서 제조하였다. 1.0 μM Aβ(1-42)를 함유하는 DMEM 배지를 25mL 배양된 플라스크에서 90-100% 합류 단계에서 비-AD 대조군(AC) 세포에 가하고, 24시간 동안 세포 배양 항온처리기(5% CO₂로 37℃에서)에서 유지시켰다. 세포는 16시간 동안 무혈청 배지(DMEM)에서 '아사'(starved)되었다. 10nM 브라디키닌(DMSO 중) 용액을 10% 혈청을 갖는 DMEM 배지에서 제조하였다. 10nM BK 용액 7mL를 25mL 배양된 플라스크에 가하고, 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다. 대조군의 경우, 동량의 DMSO를 10% 혈청을 갖는 DMEM 배지에 가하였다. DMSO(<0.01%)를 갖는 이러한 배지 7mL를 25mL 배양된 플라스크에 가하고, 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다. 차가운(4℃) 1 × PBS로 4회 세척 후, 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물 속에서 15분 동안 유지시켰다. 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물로부터 제거한 다음, 세포 용해 완충제(10mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 프로테아제 억제제 콕테일, 1% ser/thr/티로신 포스파타제 억제제 콕테일) 100 μL를 각각의 플라스크에 가하였다. 플라스크를 냉각실(4℃)에서 30분 동안 엔드-투 엔드(end-to end) 교반기에서 유지시키고, 세포를 세포 스크래퍼를 사용하여 각각의 플라스크로부터 수집하였다. 세포를 초음파처리한 다음, 14000rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 전체 단백질 분석 후 웨스턴 블로팅을 위해 사용하였다. 전체 Erk1, Erk2, 및 Erk1 및 Erk2의 포스포릴화 형태(p-Erk1, p-Erk2)를 특이 항체를 사용하여 측정하였다: 항-정규 Erk1/2 및 항-포스포 ERK1/2. 3개 이상의 브라디키닌 처리된 플라스크(BK+) 및 상응하게 3개의 대조군 플라스크(BK-)는 측정시에 오류를 최소화하기 위해 각각의 세포주에 대해 포함되었다.

[0173] 브리오스타틴 처리

[0174] 브리오스타틴 용액 0.1nM을 DMSO 저장 용액으로부터 정규 DMEM 배지(10% 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충)에서 제조하였다. Aβ 처리 후, 세포를 정규 배양 배지(10% 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충)로 4시간 동안 세척하였다. 브리오스타틴 0.1nM을 세포에 가하고, 배양 플라스크를 20분 동안 세포 배양 항온처리기(5% CO₂로 37℃에서)에서 유지시켰다. 무혈청 배지로 5회 세척한 후, 플라스크를 무혈청 조건에서 16시간 동안 항온처리기(5% CO₂로 37℃에서)에서 유지시켰다. 브라디키닌 유도된 MAPK 분석을 위에서 논의한 바와 같이 수행하였다.

[0175] 데이터 분석

[0176] 웨스턴 블롯 단백질 밴드의 시그널을 후지(Fuji) LAS-1000 플러스 스캐너로 스캐닝하였다. Erk1, Erk2, p-Erk1 및 p-Erk2의 강도를 블랜체트 록펠러 뉴로사이언시즈 인스티튜트(Blanchette Rockefeller Neurosciences Institute, Rockville, MD)에서 닥터 넬슨(Dr. Nelson)에 의해 개발된 특별히 고안된 소프트웨어에 의해 스캔된 단백질 밴드로부터 측정하였다. 강도를 스트립 사진 농도계에 의해 측정하였다. 단백질 밴드를 스트립에 의해 선택하고, 각각의 화소 밀도를 소프트웨어에 의해 배경 공제 후 계산하였다. p-Erk1/p-Erk2의 비는 샘플(BK+) 및 대조군(BK-) 각각으로부터 계산되었다. 다음 수학적식은 AD 및 비-AD 케이스 사이를 구별하는 데 사용되었다: $ADSMB = [p-Erk1/p-Erk2]^{BK+} - [p-Erk1/p-Erk2]^{BK-}$ (ADSMB = 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표).

[0177] 실시예 3: 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 측정하기 위한 피부 섬유아세포의 시험관내 분석

[0178] 코리엘 인스티튜트(Coriell Institute of Medical Research)로부터의 بانک 피부 섬유아세포 세포(알츠하이머병(AD), 비 AD 치매(비-ADD)(예: 헌팅톤병, 파킨슨씨병 및 임상 정신분열증) 및 동일 연령 대조군 세포(AC)를 90-100% 합류 단계로 배양하였다. 세포를 무혈청 배지(DMEM)에서 16시간 동안 "아사"시켰다. 정규 배지에서 DMSO 중 브라디키닌(BK) 10nM을 0 및 10분 동안 37℃에서 첨가하였다. 대조군의 경우, 동량의 DMSO를 첨가하였다.

[0179] 차가운(4℃) 1 × PBS로 4회 세척 후, 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물에서 15분 동안 유지시켰다. 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물로부터 제거한 다음, 세포 용해 완충제(10mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 프로테아제 억제제 콕테일, 1% ser/thr/티로신 포스파타제 억제제 콕테일) 80 μL를 각각의 플라스크에 가하였다.

- [0180] 플라스크를 냉각실(4℃)에서 30분 동안 엔드-투-엔드 교반기에서 유지시키고, 세포를 세포 스크래퍼를 사용하여 각각의 플라스크로부터 수집하였다. 세포를 초음파처리한 다음, 14000rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 전체 단백질 분석 후 웨스턴 블로팅에 사용하였다.
- [0181] 전체 Erk1, Erk2, 및 Erk1 및 Erk2의 포스포릴화 형태(p-Erk1, p-Erk2)를 특이 항체를 사용하여 측정하였다: 항-정규 Erk1/2 및 항-포스포 ERK1/2.
- [0182] 실시예 4: 피부 섬유아세포
- [0183] AD 및 동일 연령 대조군을 갖는 환자로부터의 बैं크 피부 섬유아세포를 코리엘 인스티튜트(Coriell Institute for Medical Research)로부터 구입하였다. 부검 확인된 피부 섬유아세포는 별도로 구하였다. 환자들은 중증 치매, 진행성 기억 상실증 및 그 밖의 손상된 인지 기능에 의해 임상적으로 영향을 받을 수 있다. 이러한 환자로부터의 뇌는 CAT 또는 CT 스캔에 의한 이상의 EEG 및 상이한 정도의 대뇌 쇠퇴를 나타낸다. 연령이 거의 동일한 정상 개인으로부터의 세포는 대조군으로서 사용된다.
- [0184] 새로 구한 피부 섬유아세포. 새로 구한 피부 조직으로부터의 섬유아세포의 수집 및 배양은 다음과 같이 수행된다: 비-FAD(nFAD) 환자 및 동일 연령 대조군으로부터의 편치-생검 피부 조직을 적격 인원에게 구하였다. 모든 환자들(또는 대리인) 기호는 동의 서식들을 통지하였다.
- [0185] 헌팅턴병으로부터의 बैं크 섬유아세포. 이들 섬유아세포는 전형적인 헌팅턴병 증상을 수반하는 치매를 앓는 헌팅턴병(HD) 환자로부터 구한다. 정상의 동일 연령 및 동일 성별의 개인으로부터의 섬유아세포는 대조군으로서 사용된다.
- [0186] 실시예 5: 재료
- [0187] DMEM은 기브코 비알엘(Gibco BRL)로부터 구입한다. 소 태아 혈청을 바이오 플루이드(Bio Fluids)로부터 구입한다. 브라디키닌, 디페닐붕산 2-아미노에틸 에스테르(2ABP), 프로테아제 및 포스파타제 억제제 콕테일을 시그마(Sigma)로부터 구한다; 비스인돌릴말레이미드-1 및 LY294002는 알렉시스(Alexis)로부터 구한다; PD98059는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)로부터 구한다. 항-포스포-Erk1/2 항체는 셀 시그널링 테크놀로지로부터 구한다. 항-정규 Erk1/2는 업스테이트 바이오 테크놀로지(Upstate Biotechnology)로부터 구한다. SDS 미니겔(4-20%)은 인버트로젠 노벡스(Invertroge-ne-Novex)로부터 구한다. 니트로셀룰로즈 막은 슬라이크헤르 운트 쉘(Schleicher & Schuell)(뉴 햄프셔주 킨)로부터 구한다. 모든 SDS 전기이동 시약은 바이오-래드(Bio-Rad)로부터 구입한다. 슈퍼 시그널 케미루미네센스(SuperSignal chemiluminescence) 기질 키트는 피어스(Pierce)로부터 구입한다.
- [0188] 대안으로, 브라디키닌(분자량 1060.2)은 칼바이오켄(Calbiochem, San Diego, CA)으로부터 구입하였다. 토끼로부터의 항 포스포-p44/p42 MAPK는 셀 시그널링 테크놀로지(Danvers, MA)로부터 구입하였다. 항-정규 Erk1/2는 업스테이트 바이오 테크놀로지(Charlottesville, VA)로부터 구입하였고, 항-토끼 제2 항체는 잭슨 랩(Jackson Lab, Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. 베타 아밀로이드(1-42)(분자량 4514.1)는 아메리칸 펩타이드(American Peptide, Sunnyvale, CA)로부터 구입하였다. 브리오스타틴은 바이오몰(Biomol, Plymouth Meeting, PA)로부터 구입하였다.
- [0189] 실시예 6: AC 및 AD 섬유아세포 세포의 배양
- [0190] FAD 및 nFAD 유형을 포함하는 알츠하이머병 환자 및 동일 연령 대조군(AC)으로부터의 बैं크 섬유아세포를 10% 소 태아 혈청(FBS)을 함유하는 DMEM을 갖는 T25/T75 플라스크에서 유지시키고, 배양하였다. 세포는 6 내지 17회 계대대의 것을 사용하였다.
- [0191] 실시예 7: 신선한 생검 조직 또는 बैं크 샘플로부터의 섬유아세포의 처리 및 배양
- [0192] 샘플을 1 × PBS에 위치시키고, 전달 배지에서 증식용 실험실로 수송하였다. 전달 배지를 제거한 후, 피부 조직을 PBS로 세정하고, 1mm 크기의 외식편으로 미세하게 초평하였다. 외식편을 45% FBS, 100U/ml 페니실린 및

100U/ml 스트렙토마이신(Pen/Strep)을 함유하는 생검 배지 3ml를 갖는 통기된 T25 플라스크의 성장 표면에 한 조각씩 전달하였다. 조직을 10% FBS를 함유하는 생검 배지 2ml를 가하기 전에 37℃에서 24시간 동안 배양한다. 이 배지를 10% FBS 및 100U/ml Pen/Strep를 함유하는 정규 배양 배지 5ml로 48시간 후 대체하였다. 이어서, 세포를 통과시키고, 위에서 제공한 정규 과정에 따라 유지시켰다.

[0193] 사람 피부 섬유아세포 세포 배양 시스템은 또한 이러한 연구를 사용해 왔다. 코리엘 인스티튜트(Coriell Institute of Medical Research, Camden, New Jersey)로부터의 뱅크 피부 섬유아세포 세포 알츠하이머병(AD), 비-AD 치매(예: 헌팅톤 및 파킨슨씨병 및 임상 정신분열증) 및 동일 연령 대조군(AC)는 25mL들이 세포 배양된 플라스크에서 90-100% 합류 단계로 배양하였다(10% 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신으로 보충, 5% CO₂로 37℃). 세포를 16시간 동안 무혈청 배지(DMEM)에서 '아사'시켰다. 10nM 브라디키닌(DMSO 중) 용액을 10% 혈청을 갖는 DMEM 배지 속에 제조하였다. 10nM BK 용액 7mL를 25mL 배양된 플라스크에 첨가하고, 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다. 대조군의 경우, 동량의 DMSO를 10% 혈청을 갖는 DMEM 배지 속에 첨가하였다. DMSO(<0.01%)를 갖는 이러한 배지 7mL를 25mL들이 배양된 플라스크에 첨가하고, 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다. 차가운(4℃) 1 × PBS로 4회 세척한 후, 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물에서 15분 동안 유지시켰다. 플라스크를 드라이 아이스/에탄올 혼합물로부터 제거한 다음, 세포 용해 완충제(10mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 프로테아제 억제제 콕테일, 1% ser/thr/티로신 포스파타제 억제제 콕테일) 100 μL를 각각의 플라스크에 첨가하였다. 플라스크를 냉각실(4℃)에서 30분 동안 엔드 투 엔드 교반기에서 유지시키고, 세포를 세포 스크래퍼를 사용하여 각각의 플라스크로부터 수집하였다. 세포를 초음파 처리한 다음, 14000rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 전체 단백질 분석 후 웨스턴 블로팅에 사용하였다.

[0194] 실시예 8: 상이한 단백질 키나제 C 활성화제로 섬유아세포의 처리

[0195] 브라디키닌 또는 상이한 특이 단백질 키나제 C 활성화제를 사용하여 섬유아세포를 처리한다. 뱅크 AC 및 AD 피부 섬유아세포를 무혈청 DMEM에서 밤새 "아사"시키기 전에 80-100% 합류로 배양한다. 세포는 37℃에서 상이한 길이의 시간 동안 10nM 단백질 키나제 C 활성화제로 처리하여 단백질 키나제 C 활성화제-유도된 효과에 대한 시간 경로를 설정한다. 단백질 키나제 C 활성화제의 적용 직후 반응이 종결되는 시점은 단백질 키나제 C 활성화제 처리 후 "0분"으로서 정의된다. 각각의 처리 시점에서 각각의 세포주에 대한 세포의 대조군 플라스크는 동일한 용적의 PBS를 첨가한다. 반응은 배양 배지를 제거하고, 세포를 예비냉각된 PBS, pH 7.4로 신속하게 세정하고, 플라스크를 드라이 아이스/에탄올에 전달함으로써 종결된다. 신선한 생검 조직으로부터 취하여 배양된 세포의 경우, 0.1nM의 농도의 단백질 키나제 C 활성화제가 사용될 수 있다. 처리 시간은 37℃에서 약 10분이다.

[0196] 처리된 세포로부터의 세포 용해물을 제조하기 위해, 플라스크를 드라이 아이스/에탄올로부터 물 얼음상에서 이동시킨다. 각각의 플라스크에 10mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, pH 8, 0.5% NP-40, 1% 트리톤 X-100, 1% 프로테아제 억제제 콕테일(Sigma), 1% Ser/Thr, 및 티로신 포스파타제 억제제 콕테일(Sigma)을 함유하는 세포 용해 완충제 1mL를 첨가한다. 냉각실에서 30분 동안 엔드-투-엔드 교반기에서 로킹(rocking)한 후, 세포를 세포 스크래퍼를 사용하여 각각의 플라스크로부터 수집한다. 세포를 초음파처리하고, 5000rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상청액을 웨스턴 블로팅에 사용한다.

[0197] 실시예 9: 웨스턴 블로팅

[0198] 프로토콜 1: 세포 용해물을 동일한 용적의 2 × SDS-샘플 완충제로 처리하고, 10분 동안 비등시킨다. 각각의 샘플로부터의 단백질을 4-20% 미니-구배 겔에서 용해시키고, 니트로셀룰로즈 막으로 전달한다. 포스포릴화 Erk1/2을 슈퍼 시그널 ECL 검출 키트를 사용하여 항-포스포-Erk1/2 항체로 검출한다. Erk1/2의 전체의 양에 대한 포스포릴화 Erk1/2의 양을 표준화하기 위해, 항-포스포-Erk1/2 항체로 블로팅한 후, 동일한 막을 60℃에서 45분 동안 62.5mM 트리스-HCl, pH 6.7, 2% SDS, 및 100mM 2-머캅토에탄올을 함유하는 스트리핑 완충제로 스트리핑한 다음, 항-정규 Erk1/2 항체로 블로팅한다. 대안으로, SDS-PAGE에서 용해시키고 니트로셀룰로즈 막으로 전달된 복제 샘플은 각각 항-포스포- 및 항-정규 Erk 항체로 블로팅한다. 0.01% 트윈(Tween) 20을 함유하는 10mM PBS, pH 7.4로 세척한 후(10분 동안 3회), 막을 항-정규 Erk1/2 항체로 블로팅하고, 이로부터 SDS 겔에 부하된 Erk1/2의 전체 양을 측정한다.

[0199] 프로토콜 2: 동일 용적의 $2 \times$ SDS 샘플 완충제를 각각의 세포 용해물에 첨가하고, 비등수 욕에서 10분 동안 비등시켰다. 전기이동을 8-16% 미니-구배 겔에서 수행하고, 니트로셀룰로즈 막으로 전달한다. 전체 Erk1, Erk2, 및 Erk 1 및 Erk2의 포스포릴화 형태(p-Erk1, p-Erk2)를 특이 항체를 사용하여 측정하였다.

[0200] 실시예 10: 데이터 분석

[0201] Erk1/2의 포스포릴화 및 정규 형태 모두에 대한 시그널은 후지필름(Fujifilm) LAS-1000 플러스 스캐너로 스캐닝한다. 각각의 단백질 밴드의 평균 광학 밀도를 NIH 영상 소프트웨어를 사용하여 측정한다. 포스포-Erk1/2 시그널로부터의 값은 전체 Erk1/2 시그널의 값에 대해 각각 표준화한다. 표준화 후, 각각의 처리된 세포주로부터의 데이터를 기본적인 대조군의 백분율(%)로 전환시키고, 통계학적으로 분석한다.

[0202] 실시예 11: 면역세포화학

[0203] 섬유아세포는 0.02mg 폴리리신으로 피복시킨 2.5cm-직경의 유리 커버슬립의 표면에서 성장한다. 브라디키닌 또는 위에서 언급한 또 다른 단백질 키나제 C 활성화제로 처리시에, 세포를 차가운 PBS, pH 7.4로 급히 세척하고, pH 7.4의 PBS 중 4% 포름알데히드로, 실온에서 15분 동안 고정시킨다. pH 7.4의 PBS로 3회 세척한 후, 각각 5분 지속시키고, 세포를 실온에서 30분 동안 pH 7.4의 PBS 중 0.1% 트리톤 x-100에 침투시킨다. 실온에서 30분 동안 pH 7.4의 PBS 중 10%의 정상 말 혈청으로 항온처리한 후, 세포를 항-포스포-Erk1/2 항체(1:200)로 40℃에서 밤새 항온처리한다. 커버슬립에 대한 세포를 pH 7.4의 PBS로 3회 세척한 다음, 플루오레세인[벡터 라보라토리즈(Vector Laboratories)]으로 표지된 항-마우스 IgG를 첨가하고(1:200), 실온에서 60분 동안 세포로 항온처리한다. PBS로 3회 세척한 후, 벡타선틸(Vectashield)(벡터 라보라토리즈)로 밀봉시키고, 세포에서 면역착색 시그널을 니콘(Nikon) 형광 현미경으로 관찰한다. 세포 상에서 면역세포화학 시그널의 강도는 바이오-레드 퀀티티 원 소프트웨어(Bio-Rad Quantity One software)(바이오레드) 및 티엔이미지(Tnimage)로 측정한다. 피부 섬유아세포에서 BK 또는 단백질 키나제 C 활성화제 수용체의 국소화의 경우, 모노클로날 항-BK B2 항체, 또는 항 단백질 키나제 C 활성화제 항체를 정상의 섬유아세포에 적용한 다음, Cy5-접합된 항-마우스 IgG로 항온처리한다. 생성된 면역 작용성 시그널은 형광 현미경으로 이미징한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 부검 확인된 환자로부터 수득하고 조직 배양시에 즉시 위치시킨 펀치 피부 생검 샘플(punch skin biopsy sample)에서 및 코리엘 셀 리포지터리(Coriell Cell Repository)로부터 수득한 뱅크(banked) 피부 섬유아세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)의 측정 결과를 나타낸다. AD는 알츠하이머병 세포라고 하며; 혼합된 AD/PD/LBD는 알츠하이머병, 파킨슨씨병 및/또는 루이체(Loewi body) 병의 혼합된 병을 앓고 있는 환자로부터 취한 세포라고 하며; AC는 비치매 동일 연령 대조군 세포라고 하며; 비-ADD는 비-알츠하이머병 치매(예: 헌팅톤병 또는 파킨슨씨병 또는 임상 정신분열증)으로 진단된 환자로부터 수득한 세포라고 한다. 시험된 AD 세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 약 0.02 초과 약 0.4 미만에 속하는 양(+)의 값이다. 혼합된 AD/PD/LBD에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 매우 낮은 양(+)의 값, 즉 약 0.02 또는 약 0.03 미만에 서 함께 집락화된다. 비치매 동일 연령 대조군 세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 음(-)의 값 또는 매우 낮은 양(+)의 값, 즉 약 0.01 미만이다. 비-ADD 세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 음(-)의 값이다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 브라디키닌으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비에서 브라디키닌 비함유 배지로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 뺀 값을 측정함으로써 측정되었다. 이는 다음과 같이 나타내었다: 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표 = $\{(pErk1/pErk2)_{\text{브라디키닌}}\} - \{(pErk1/pErk2)_{\text{비배출}}\}$.

[0059] ADSMB(도면에서 "구별 인자"(D.F.)라고 주지됨)는 4개의 상이한 카테고리의 환자에 대해 플로팅되었으며: 알츠하이머병(AD), 혼합된 AD/PD/DLV[부검 확인에 의해 알츠하이머, 파킨슨씨병 및 루이체병의 혼합된 진단], 동일 연령 대조군(AC) 및 코리엘 셀 리포지터리 및 부검 확인된 세포주에 대한 비-AD 치매(파킨슨씨병 및 헌팅톤병).

[0060] 도 2는 치매의 지속 기간의 함수로서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 선형 회귀 분석을 나타낸다. 선형 회귀는 치매의 지속 기간 및 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 양(+)의 크기 사이의 역상관을 나타내는 대략 -0.01의 음(-)의 구배를 나타낸다. 치매의 지속 기간이 증가함에 따라(즉, 알츠하이머병이 진행됨에 따라), 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 보다 낮은 양(+)의 수치 값이 된다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지

표의 측정은 보다 높은 양(+)의 값이 당해 병의 초기 단계의 징후가 있기 때문에 알츠하이머병의 초기 진단을 허용한다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 브라디키닌으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비에서 브라디키닌 비함유 배지로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 뺀 값을 측정함으로써 측정된다. 이것은 다음과 같이 나타내었다: 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표 = $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{브라디키닌}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{비이클}}\}$.

- [0061] 부검 확인된 경우의 질병 기간의 함수로서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)의 선형 회귀 분석. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 당해 질병의 초기 수년간에 보다 유효하다. 이는 당해 방법이 알츠하이머병의 초기 진단시에 보다 유효함을 나타낸다.
- [0062] 도 3은 AD 및 대조군 세포주에 대해 브라디키닌(BK+) 처리 및 비이클(DMSO, 브라디키닌 부재하에, BK-) 후 p-Erk1/2(포스포릴화 Erk1 및 Erk2)의 웨스턴 블롯 데이터(western blot data)를 나타낸다. 브라디키닌 처리(BK+)에 대해, 무혈청(serum free)(24시간) 세포를 37°C에서 10분 동안 브라디키닌 10nM로 처리하였다. 상응하는 비이클 처리(BK-), 무혈청(24시간) 세포를 37°C에서 10분 동안 동량의 DMSO(BK 부재하에)로 처리하였다. 10분 후, P-Erk1/2 밴드는 AD 세포주에 대해 BK- 처리보다 BK+에 대해 더욱 어둡지만, 대조군 세포주와는 반대이다. 이는 Erk의 BK 유도된 활성화가 AD 세포주에 대해 더욱 높음을 나타낸다.
- [0063] 도 4A 및 도 4B는 본원에서 논의된 바와 같이 계산된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(ADSMB)(도면에서 "구별 인자"(D.F.)로서 주지됨)를 나타낸다. ADSMB는 코리엘 리포지터리(Coriell Institute of Medical Research, Camden, New Jersey)로부터의 AD(알츠하이머병), AC(동일 연령 대조군) 및 비-ADD[비-AD 치매, 예: 파킨슨씨병 또는 루이체병] 세포주(A) 및 뉴로로지 인코포레이티드(Neurologic Inc.)에 의해 제공된 (부검 확인된) 세포주(B)에 대해 플로팅되었다. 결과는 AD 케이스에 대한 ADSMB가 AC 및 비-ADD 케이스에 대해서보다 지속적으로 높음을 나타낸다.
- [0064] 도 5A 및 도 5B는 가용성 Aβ가 유도하고 브리오스타틴 처리가 사람 섬유아세포의 알츠하이머 표현형을 역전시킴을 보여준다. (A) 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표(도면에서 "구별 인자"(D.F.)로서 주지됨)은 본원에 기재된 대조군(비-AD) 세포주(AG07723, AG11363, AG09977, AG09555 및 AG09878)에 대해 측정되었으며 작은 음(-)의 값인 것으로 밝혀졌다. 1.0 μM Aβ-42 처리 후, (ADSMB)는 기재된 바와 같이 다시 측정되었으며, 더욱 높고 양(+)의 값인 것으로 밝혀졌다. 이는 브라디키닌 유도된 활성화 Erk1/Erk2 비가 1.0 μM Aβ(1-42) 처리 후 높아짐을 나타낸다. AC 세포주는 Aβ(1-42) 처리 후 AD 표현형과 같이 거동한다. (B) ADSMB("구별 인자"(D.F.))는 AC 세포주에 대해 24시간 동안 1.0 μM Aβ(1-42) 처리 후 측정되었다. ADSMB 값은 초기에 발견된 것보다 더욱 높고 양(+)의 값이다. 동일한 세포주는 24시간 동안 1.0 μM Aβ(1-42)로 먼저 처리한 다음, 20분 동안 0.1nM 브리오스타틴 처리를 하였다. ADSMB(D.F.) 값은 다시 측정되었고 작고 음(-)의 값인 것으로 밝혀졌다. 이는 가용성 Aβ-유도된 변화가 브리오스타틴 요법에 의해 역전될 수 있음을 나타낸다.
- [0065] 도 6A 및 도 6B는 ADSMB의 결정 매트릭스 분석을 나타낸다. 생체 지표의 민감성 및 특이성은 코리엘 셀 리포지터리(A) 및 부검 확인된(B) 세포에 대해 질병을 검출하기에 유효성을 나타내는 것으로 플로팅된다.
- [0066] 상세한 설명
- [0067] 본 발명은 특정 국면에서, 시험 및 진단에 대해 확인된 사람으로부터 수득한 사람 세포에서 알츠하이머병의 진단방법에 관한 것이다. 진단은 독특한 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 발견에 기초한다. 특정 국면에서, 본 발명은 알츠하이머병 진행의 모니터링 방법 및 알츠하이머병의 치료 또는 예방용 선도 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법에 관한 것이다. 특정 국면에서, 본 발명은 환자에게서 또는 환자로부터 수득한 샘플에서 알츠하이머병의 존재 또는 부재를 측정하거나 확인하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0068] 살아있는 사람의 뇌에서 뉴런에의 직접 접근이 불가능하기 때문에, 알츠하이머병의 초기 진단은 매우 어렵다. 본원에 기재된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 측정함으로써, 본 발명은 알츠하이머병의 초기 진단을 위해 매우 실질적이고, 매우 특이하며 매우 선택적인 시험을 제공한다. 또한, 본원에 기재된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 질병 진행을 수행하기 위해 및 알츠하이머병의 치료 및 예방을 목적으로 한 약물 개발용 치료제를 확인하기 위한 기초를 제공한다.
- [0069] 본 발명에 이르러, 본 발명자들은 알츠하이머병의 진단을 위해 매우 민감하고 매우 특이적 진단 분석시에 유용한 말초(비-CNS) 조직을 사용하여 알츠하이머병에 대한 독특한 분자 생체 지표를 밝혀내었다. 본 발명의 큰 이점은 본원에 기재된 분석 및 방법에서 사용되는 조직이 침습 과정을 최소한으로 사용하여, 즉, 스핀알 탭을 사용하지 않고 환자로부터 얻을 수 있다는 점이다. 따라서, 본 발명의 한 가지 국면은 단백질 키나제 C 활성화

제(예: 브라디키닌)에 의해 유도된 Erk1 포스포릴화 대 Erk2 포스포릴화의 내부 조절된 비가 피부 섬유아세포와 같은 사람 세포, 또는 혈액 세포와 같은 기타의 말초 세포에서 성장 배지에 대한 기저선 표준화 반응을 사용하여 특이 항체로 측정된 환자에서 알츠하이머병의 초기 검출용 분석 또는 시험에 관한 것이다.

[0070] 본 발명의 방법에서, 개인 또는 환자로부터 수득한 세포는 임의의 생존 가능한 세포일 수 있다. 바람직하게는, 이는 피부 섬유아세포이지만, 이러한 세포가 수득하거나 가공하기에 보다 편리한 경우, 임의의 다른 말초 조직 세포(즉, 중추 신경계 외부의 조직 세포)가 본 발명의 시험에서 사용될 수 있다. 그 밖의 적합한 세포는 적혈구 및 림프구와 같은 혈액 세포, 구강 점막 세포, 신경 세포, 예를 들면, 후신경 뉴런, 뇌척수액, 소변 및 임의의 기타 말초 세포 유형을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 추가로, 비교 목적을 위해 사용되는 세포는 건강한 공여자로부터 수득하는 것이 필수적인 것은 아니다.

[0071] 세포는 신선하거나 배양될 수 있다[참조: 본원에 전문이 참고로 인용되어 있는 미국 특허 제6,107,050호]. 특정 양태에서, 펀치 피부 생검은 환자로부터 피부 섬유아세포를 수득하는 데 사용될 수 있다. 이러한 섬유아세포는 본원에 기재되거나 세포 배양 조건으로 도입된 기술을 사용하여 직접 분석된다. 이어서, 생성된 배양된 섬유아세포를 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐서 기재된 바와 같이 분석한다. 그 밖의 단계는 구강 점막 세포, 신경 세포, 예를 들면, 후신경 세포, 혈액 세포, 예를 들면, 적혈구 및 림프구 등과 같은 분석에 사용될 수 있는 그 밖의 유형의 세포를 제조하는 데 요구될 수 있다. 예를 들면, 혈액 세포는 말초 정맥으로부터 혈액을 유출시킴으로써 용이하게 수득될 수 있다. 이어서, 세포는 표준 과정[예: 세포 분리기(sorter), 원심분리 등을 사용하여]에 의해 분리된 후, 분석될 수 있다.

[0072] 따라서, 본 발명은 특정 국면에서 환자에게서 알츠하이머병의 진단 및 치료방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명의 진단방법은 단백질 키나제 C 활성화제인 제제로 자극된 환자로부터 수득한 세포에서 2개의 특이하고 독특한 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하는 데 기초한다. 본 발명은 또한 특정 양태에서, 알츠하이머병의 검출 또는 진단에 유용한 시약을 함유하는 키트에 관한 것이다. 특정 국면에서, 본 발명은 알츠하이머병의 치료에 유용한 선도 화합물을 확인하기 위한 스크리닝 방법 뿐만 아니라 이의 치료를 요하는 환자에게 알츠하이머병을 치료 또는 예방하기 위해 약제학적 제형에서 이들 화합물 또는 선도 화합물의 화학적 유도체의 사용방법에 관한 것이다.

[0073] I. 정의

[0074] 의학 스크리닝 및 진단과 관련하여, 본원에서 사용되는 용어 "민감성"는, 시험이, 즉 통상 %로서 나타낸, 전체의 진정한 양(+)의 결과 및 거짓된 음(-)의 결과로 분리되는 진정한 양(+)의 결과를 나타내는 것으로 생각되는 질병에 대해 양(+)의 시험 결과를 제공하는 영향받은 개인의 비를 의미한다.

[0075] 의학 스크리닝 및 진단과 관련하여, 본원에서 사용되는 용어 "특이성"은 시험이, 즉 통상 %로서 나타낸, 진정한 음(-)의 결과 및 거짓된 양(+)의 결과 전체의 비로서 진정한 음(-)의 결과를 나타내는 것으로 생각되는 질병에 대해 음(-)의 시험 결과를 갖는 개인의 비를 의미한다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "매우 민감한"은 약 50% 이상 민감한, 또는 약 55% 이상 민감한, 또는 약 60% 이상 민감한, 또는 약 65% 이상 민감한, 또는 약 70% 이상 민감한, 또는 약 75% 이상 민감한, 또는 약 80% 이상 민감한, 또는 약 85% 이상 민감한, 또는 약 90% 이상 민감한, 또는 약 95% 이상 민감한, 또는 약 96% 이상 민감한, 또는 약 97% 이상 민감한, 또는 약 98% 이상 민감한, 또는 약 99% 이상 민감한, 또는 약 100% 이상 민감한 진단방법을 의미한다.

[0077] 본원에서 사용되는 용어 "매우 특이적"은 약 50% 이상 특이적, 또는 약 55% 이상 특이적, 또는 약 60% 이상 특이적, 또는 약 65% 이상 특이적, 또는 약 70% 이상 특이적, 또는 약 75% 이상 특이적, 또는 약 80% 이상 특이적, 또는 약 85% 이상 특이적, 또는 약 90% 이상 특이적, 또는 약 95% 이상 특이적, 또는 약 96% 이상 특이적, 또는 약 97% 이상 특이적, 또는 약 98% 이상 특이적, 또는 약 99% 이상 특이적, 또는 약 100% 이상 특이적 진단방법을 의미한다.

[0078] 본원에서 사용되는 "선도 화합물"은 본원에 기재된 화합물의 스크리닝 방법을 사용하여 확인된 화합물이다. 선도 화합물은 본원에 기재된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 본원에 기재된 분석에서 정상인 건강한 세포를 사용하여 측정된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표에 대해 계산된 값과 상응하는 값으로 이동시키는 데 있어서 활성을 가질 수 있다. 선도 화합물은 알츠하이머병의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에서 사용하기 위해 이의 활성을 최적화하거나 향상시키도록 후속적으로 화학적으로 개질될 수 있다.

[0079] 본원에서 사용되는 "서열 변종"은 구조적으로 및 기능적으로 서로 관련되는 단백질이다. 특정 양태에서, 서열

변종은 아미노산 서열의 수준에서 구조적 유사성을 공유하고 효소 활성의 수준에서 기능적 속성을 공유하는 단백질이다. 특정 양태에서, 서열 변종은 그 밖의 단백질의 포스포릴화를 촉매하는 MAP 키나제 단백질이다.

[0080] 본원에서 사용되는 "알츠하이머병의 부재"는 환자 또는 환자로부터 구한 세포가 측정 가능하거나 검출 가능한 알츠하이머병 표현형을 발현하지 않음을 의미한다.

[0081] 본원에서 사용되는 환자 또는 세포 샘플에서 "알츠하이머병 표현형"은 0 초과 양(+)의 값을 갖는 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.

[0082] 본원에서 사용되는 "아밀로이드 베타 펩타이드"는 아밀로이드 베타 펩타이드의 임의의 분획 또는 전장(full-length) 아밀로이드 베타 펩타이드이다.

[0083] II. 알츠하이머병의 진단방법

[0084] 본 발명은, 특정 양태에서, 알츠하이머병의 진단방법에 관한 것이다. 특정의 바람직한 양태에서, 진단방법은 환자로부터 세포 샘플을 구하는 단계, 세포 샘플을 단백질 키나제 C 활성화제인 제제와 접촉시키는 단계 및 당해 세포 샘플에서 특이 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하여 당해 환자에게서 알츠하이머병을 진단하는 단계를 포함한다. 일부 특정 양태에서, 본원에 기재된 진단 분석은 시험관내에서 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 특이한 양태에서, 단백질 키나제 C 활성화제는 브라디키닌이다. 추가의 특이한 양태에서, 특이적 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비는 상대적인 또는 표준화된 양의 포스포릴화 Erk1을 상대적인 또는 표준화된 양의 포스포릴화 Erk2로 나눔으로써 계산되는 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비이다.

[0085] 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표

[0086] 본원에 기재된 알츠하이머병을 치료하기에 유용한 화합물의 진단방법 및 스크리닝 방법은 알츠하이머병에 대한 독특한 분자 생체 지표의 본 발명자들에 의한 발견에 기초한다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 수치 값은 특정한 변수, 예를 들면, 분석에서 사용되는 세포, 분석에서 사용되는 단백질 키나제 C 활성화제 및 포스포릴화 비의 측정을 표적으로 하는 특이적 MAP 키나제 단백질에 의존한다.

[0087] 특이한 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 단백질 키나제 C 활성화제에 의해 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 측정하고 단백질 키나제 C 활성화제가 결핍된 대조군 용액(비이클)으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비로부터 뺄으로써 측정될 수 있다. 특정 양태에서, 이러한 차가 0 초과, 즉 양(+)의 값이면, 이는 알츠하이머병으로 진단된다. 추가의 바람직한 양태에서, 이러한 차가 0 이하이면, 이는 알츠하이머병이 없음을 나타낸다.

[0088] 다른 양태에서, 본 발명의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 단백질 키나제 C 활성화제로 세포를 자극한 후 2개의 포스포릴화 MAP 키나제 단백질의 비를 측정함으로써 측정될 수 있다. 분자 생체 지표는 단백질 키나제 C 활성화제에 의해 자극된 세포에서 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비를 측정하고 단백질 키나제 C 활성화제가 결핍된 대조군 용액(비이클)으로 자극된 세포에서 포스포릴화 제1 MAP 키나제 단백질 대 포스포릴화 제2 MAP 키나제 단백질의 비로부터 뺄으로써 측정될 수 있다. 특정의 바람직한 양태에서, 이러한 차가 0 초과, 즉 양(+)의 값이면, 이는 알츠하이머병으로 진단된다. 추가의 바람직한 양태에서, 이러한 차가 0 이하이면, 이는 알츠하이머병이 없음을 나타낸다.

[0089] 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 알츠하이머병(AD 세포)으로 진단된 환자로부터 구한 세포 샘플에서 양(+)의 수치 값이다. 특정의 바람직한 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표가 브라디키닌으로 자극된 AD 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 측정함으로써 측정되는 경우, AD 세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표에 대한 양(+)의 수치 값은 약 0 내지 약 0.5의 범위일 수 있다.

[0090] 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는, 예를 들면, 파킨슨씨병 또는 헌팅톤병과 같은 비알츠하이머병 치매(비-ADD 세포) 또는 임상적인 정신분열증으로 진단된 환자로부터 구한 세포에서 측정되는 경우 음(-)의 수치 값이다. 특정의 바람직한 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표가 브라디키닌으로 자극된 비-ADD 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 측정함으로써 측정되는 경우, 음(-)의 수치 값은 약 0 내지 약 -0.2 또는 약 -0.3의 범위일 수 있다.

[0091] 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 알츠하이머병을 갖지 않은 환자로부터 구한 동일 연령 대조군 세포(AC 세포)로부터의 세포 샘플에서 음(-)의 수치 값, 0 또는 매우 낮은 양(+)의 수치 값일 수 있다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표가 브라디키닌으로 자극된 AC 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 측정함으로써 측정되는 경우, AC 세포에서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 약 0.05 미만 내

지 약 -0.2의 범위일 수 있다.

[0092] 본 발명의 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 브라디키닌으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비에서 브라디키닌 비함유 용액으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 뺀 값을 계산함으로써 측정될 수 있다. 이는 다음과 같이 나타낸다: 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표 = $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{브라디키닌}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{비이클}}\}$.

[0093] 단백질 키나제 C 활성화제

[0094] 본 발명의 화합물을 확인하기 위해 진단방법, 키트 및 스크리닝 방법에서 사용하기 위해 특별하게 예상되는 단백질 키나제 C 활성화제는: 브라디키닌; α -APP 조절자; 브리오스타틴 1; 브리오스타틴 2; DHI; 1,2-디옥타노일-sn-글리세롤; FTT; 그니디마크린(Gnidimacrin), 스텔레라 차마에자스메(*Stellera chamaejasme*) L.; (-)-인돌락탐(Indolactam) V; 리폭신(Lipoxin) A₄; 링비아톡신(Lyngbyatoxin) A, 마이크로모노스포라 종(*Micromonospora* sp.); 올레산; 1-올레오일-2-아세틸-sn-글리세롤; 4 α -포르볼(Phorbol); 포르볼-12,13-디부티레이트; 포르볼-12,13-디데카노에이트; 4 α -포르볼-12,13-디데카노에이트; 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트; L- α -포스파티딜이노시톨-3,4-비스포스페이트, 디팔미토일-, 펜타암모늄염; L- α -포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트, 디팔미토일-, 펜타암모늄염; L- α -포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스포스페이트, 디팔미토일-, 헵타암모늄염; 1-스테아로일-2-아라키도노일-sn-글리세롤; 티멜레아톡신, 티멜레아 히르수타(*Thymelea hirsuta*) L; 인솔린, 포르볼 에스테르, 리소포스파티딜콜린, 리포폴리사카라이드, 안트라사이클린 단노루비신(dannorubicin) 및 바나딜 설페이트를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 또한, "브리올로게스(bryologues)"로서 공지된 화합물이 포함된다. 브리올로게스는, 예를 들면, 문헌[참조: Wender et al. Organic letters (United States) May 12, 2005, 7 (10) p1995-8; Wender et al. Organic letters (United States) Mar 17 2005, 7 (6) p1177-80; Wender et al Journal of Medicinal Chemistry (United States) Dec 16 2004, 47 (26) p6638-44]에 기재되어 있다. 단백질 키나제 C 활성화제는 본원에 기재된 화합물의 진단방법, 키트 및 스크리닝 방법에서 단독으로 사용하거나 임의의 그 밖의 단백질 키나제 C 활성화제와 배합하여 사용할 수 있다.

[0095] 브라디키닌은 다양한 염증성 조건의 경로에서 생성되는 강력한 혈관 작용성 노나펩타이드이다. 브라디키닌은 특이 세포막 브라디키닌 수용체(들)과 결합하고 활성화하여, 따라서 "미토겐 활성화 단백질 키나제"(MAPK)로서 공지된 단백질의 포스포릴화를 유도하는 세포내 사건의 캐스케이드를 촉발한다. 단백질의 포스포릴화, 즉 Ser, Thr 또는 Tyr 잔기에 포스페이트 그룹의 첨가는 단백질 키나제로서 집합적으로 공지된 다수의 효소에 의해 매개된다. 포스포릴화는 단백질의 기능을 정상적으로 개질하고, 대개 단백질을 활성화한다. 항상성은 포스포릴화가 일과성 과정일 것을 요구하며, 이는 기질을 탈포스포릴화하는 포스파타제 효소에 의해 역전된다. 포스포릴화 또는 탈포스포릴화에서 임의의 변형은 생화학적 경로 및 세포 기능을 붕괴할 수 있다. 이러한 붕괴는 특정한 뇌 질환에 대한 기초일 수 있다.

[0096] 포스포릴화 단백질의 수준의 측정 또는 검출

[0097] 알츠하이머병의 진단방법 및 본원에 기재된 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 유용한 제제를 확인하기 위해 화합물의 스크리닝 방법은 본 발명의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 측정에 의존한다.

[0098] 바람직한 양태에서, 세포에 존재하는 포스포릴화 단백질의 수준은 웨스턴 블로팅에 의해 검출된다. 포스포릴화 Erk1 또는 포스포릴화 Erk2의 단백질 수준은 항-Erk1, 항-Erk2, 항-포스포-Erk1 및 항-포스포-Erk2 항체(세포 시그널링 기술)를 사용하여 섬유아세포에서 측정될 수 있다. 상이한 단백질의 수준은 표준화에 대한 대조용 단백질로서 동일한 샘플에서 측정될 수도 있다. 가능한 대조용 단백질의 예는 액넥신(annexin)-II 또는 액틴(actin)을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.

[0099] 한 가지 양태에 있어서, ELISA는 다음 과정에 따라 수행된다: 1) 항-Erk 항체로 이전에 피복된 96-웰 마이크로플레이트에 2배 또는 3배로 처리한 후 섬유아세포 용해물을 첨가하는 단계. 2) 샘플을 마이크로플레이트 웰에서 실온에서 약 2시간 동안 항온처리하는 단계. 3) 샘플을 흡인하고 웰을 포스페이트 완충 식염수(PBS)계 세척 완충액으로 세척하는 단계. 4) 항-포스포-Erk1/2, 또는 항-정규 Erk1/2 항체의 작업 희석액을 각각의 웰에 첨가하고, 실온에서 약 1시간 동안 항온처리하는 단계. 5) 웰을 세척 완충액으로 흡인하고 세척하는 단계. 6) 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)로 공액된 제2 항체의 작업 희석액을 각각의 웰에 첨가하고 웰을 실온에서 약 30분 동안 항온처리하는 단계. 7) 웰을 흡인하고 세척 완충액으로 세척하는 단계. 8) 안정화된 크로모젠(Chromogen), 예를 들면, 디아미노벤지딘(DAB)을 가하고, 실온에서 약 30분 동안 항온처리하는 단계. 9) 중지

용액을 첨가하고 450nm에서 흡광도를 측정하는 단계. Erk1/2의 포스포틸화는 표준화 후 평가된다: $NR = A_p/A_r$. NR이 정상화된 비인 경우; A_p 는 포스포-Erk1/2에 대한 흡광도 값이고; A_r 는 전체(정규) Erk1/2에 대한 흡광도이다.

[0100] 바람직한 양태에서, Erk1/2의 포스포틸화는 항-포스포-Erk1/2 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에서 분석한다. 포스포틸화 Erk1/2에 대한 면역 작용성 시그날의 수준은 농도계 스캔을 통해 정량화된다. 포스포-Erk1/2 시그날의 평균 밀도는 별도의 웨스턴 블롯에서 항-정규 Erk1/2 항체를 갖는 동일한 세포 용해물 샘플로부터 검출되는 전체 Erk1/2 시그날의 평균 밀도로 표준화된다. 표준화 식은 다음과 같다: $NR = D_p/D_r$. NR(표준화된 비)이 Erk1/2 포스포틸화 정도를 나타내는 경우; D_p 는 포스포-Erk1/2에 대한 평균 밀도이고, D_r 는 동일한 샘플로부터 웨스턴 블롯에서 검출되는 Erk1/2의 총량에 대한 평균 밀도이다.

[0101] 단백질의 검출에 대한 본 발명의 면역분석은 면역형광 분석, 방사선면역분석, 웨스턴 블롯 분석, 효소 면역분석, 면역침전, 화학 발광 분석, 면역조직화학적 분석, 도트 또는 슬롯 블롯 분석 등일 수 있다[참조: "Principles and Practice of Immunoassay" (1991) Christopher P. Price and David J. Neoman (eds), Stockton Press, New York, New York, Ausubel et al. (eds) (1987) in "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, New York, New York]. 검출은 열량계 또는 방사능 방법 또는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 기타의 종래의 방법에 의해 수행될 수 있다. ELISA에 대해 당해 분야에서 공지된 표준 기술은 본원에 참고로 인용되어 있는 문헌[참조: Methods in Immunodiagnosis, 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds., John Wiley and Sons, New York 1980 and Campbell et al., Methods of Immunology, W. A. Benjamin, Inc., 1964]에 기재되어 있다. 이러한 분석은 당해 분야에 기재된 바와 같이 직접적, 간접적, 경쟁적 또는 비경쟁적 면역분석일 수 있다[참조: "Principles and Practice of Immunoassay" (1991) Christopher P. Price and David J. Neoman (eds), Stockton Pres, NY, NY; Oellirich, M. 1984. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 895-904 Ausubel, et al. (eds) 1987 in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, New York].

[0102] 세포 유형, 단백질 분리 및 항체

[0103] 이전에 언급한 바와 같이, 진단되는 환자로부터 구한 세포는 임의의 세포일 수 있다. 사용할 수 있는 세포의 예는 피부 세포, 피부 섬유아세포, 구강 점막 세포, 혈액 세포, 예를 들면, 적혈구, 림프구 및 림프아형 세포, 및 신경 세포 및 Erk1/2 단백질을 발현하는 임의의 그 밖의 세포를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 검시 샘플 및 병리학 샘플이 사용될 수도 있다. 이러한 세포를 포함하는 조직이 사용될 수도 있으며, 뇌 조직 또는 뇌 세포를 포함한다. 세포는 신선하거나, 배양되거나, 동결될 수 있다. 세포 또는 조직으로부터 분리된 단백질 샘플은 진단 분석 또는 화합물의 스크리닝 방법에서 즉시 사용될 수 있거나, 이후의 사용을 위해 동결될 수 있다. 바람직한 양태에서, 섬유아세포가 사용된다. 섬유아세포는 피부 편지 생검에 의해 얻어질 수 있다.

[0104] 단백질은 당해 분야의 숙련자에게 공지된 통상의 방법에 의해 세포로부터 분리될 수 있다. 바람직한 방법에서, 환자로부터 분리된 세포는 포스페이트 완충 식염수(PBS)에서 세척되고 펠렛화된다. 이어서, 펠렛은 50mM NaF, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20 μ g/ml 류페틴, 50 μ g/ml 펩스타틴, 10mM 트리스-HCl, pH = 7.4를 포함하는 "균질화 완충액"으로 세척하고, 원심분리에 의해 펠렛화된다. 상청액을 버리고, "균질화 완충액"을 펠렛에 가한 다음, 펠렛을 초음파처리한다. 단백질 추출물은 신선하게 사용되거나 이후의 분석을 위해 -80°C에서 저장될 수 있다.

[0105] 본 발명의 방법에서, 기술된 면역분석에서 사용되는 항체는 기원에 있어서 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 항체를 발생시키는 데 사용되는 포스포틸화 및 비-포스포틸화 Erk1/2 단백질 또는 이의 부분은 천연 또는 재조합 공급원으로부터 생성되거나 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다. 천연 Erk1/2 단백질은 통상의 방법에 의해 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있다. Erk1/2 단백질을 분리하는 데 사용될 수 있는 생물학적 샘플의 예는 피부 세포, 예를 들면, 섬유아세포, 섬유아세포 세포주, 예를 들면, 코리엘 셀 리포지토리즈[Camden, New Jersey]를 통해 시판되며 문헌[참조: National Institute of Aging 1991 Catalog of Cell Lines, National Institute of General Medical Sciences 1992/1993 Catalog of Cell Lines [(NIH Publication 92-2011 (1992))]에 기재되어 있는 알츠하이머병 섬유아세포 세포주 및 대조군 섬유아세포 세포주를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.

[0106] III. 알츠하이머병의 진단용 키트

[0107] 본 발명이 본원에 기재된 진단 시험 중의 어느 하나를 수행하는 데 사용할 수 있는 키트에 관한 것이라는 것은

추가로 예상된다. 키트는 단일한 진단 시험 또는 본원에 기재된 시험 중의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 키트는 정규 Erk1/2(비포스포릴화 Erk1 또는 비포스포릴화 Erk2) 또는 포스포릴화 Erk1/2(포스포릴화 Erk1 또는 포스포릴화 Erk2)인 것으로 인식되는 항체를 포함할 수 있다. 키트는 정규 MAP 키나제 단백질 뿐만 아니라 포스포릴화 MAP 키나제 단백질인 것으로 인식되는 항체를 포함할 수 있다. 키트는 본원에 기재된 임의의 하나 이상의 단백질 키나제 C 활성화제(예: 브라디키닌 또는 브리오스타틴)를 포함할 수도 있다. 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날일 수 있다. 키트는 하나 이상의 생검, 예를 들면, 펀치 피부 생검을 수행하는 데 필요한 도구, 완충제 및 저장 용기를 포함할 수 있다. 키트는 본 발명의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 확인하는 데 사용되는 비의 측정에 관한 지시 뿐만 아니라 진단 시험에서의 항체 또는 그 밖의 성분의 용도를 포함할 수도 있다. 이 지시는 생검, 예를 들면, 펀치 피부 생검을 수행하기 위한 과정을 언급할 수도 있다. 키트는 진단 시험을 수행하기 위한 그 밖의 시약, 예를 들면, 표준화에 사용되는 대조용 단백질의 검출을 위한 항체를 포함할 수도 있다. 가능한 대조용 단백질인 것으로 인식되는 항체의 예는 안넥신-II 또는 악틴이라고 인식되는 항체를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 키트는 완충제, 제2 항체, 대조군 세포 등을 포함할 수도 있다.

[0108] IV. 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 유용한 화합물의 스크리닝 방법

[0109] 본 발명은 또한 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 유용한 물질을 스크리닝하고 확인하기 위한 방법에 관한 것이다. 이 양태에 따르면, 본원에 기재된 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 역전시키거나 개선시키는(즉, 정상 세포에서 발견된 수준으로 거꾸로 역전시키거나 개선시키는) 물질은 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 강력하게 유용한 물질로서 확인되고 선택된다.

[0110] 예로서, 치료 물질을 확인하기 위해 스크리닝하는 이러한 한 가지 방법은 알츠하이머병 환자로부터의 샘플 세포를 본원에 기재된 임의의 단백질 키나제 C 활성화제의 존재하에 스크리닝되는 물질과 접촉시킨 다음, 본원에 기재된 임의의 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 측정하는 단계를 포함한다. 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 정상 세포(즉, 알츠하이머병이 없는 환자로부터 구한 세포)에서 발견되는 수준으로 거꾸로 역전시키거나 개선시키는 제제는 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 강력하게 유용한 물질로서 확인되고 선택된다.

[0111] 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표를 역전시키거나 개선시키는 제제는 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표에 대해 양(+)의 값 및/또는 추가의 음(-)의 값을 향해 이동의 감소를 야기하는 제제이다.

[0112] V. 알츠하이머병의 진행을 모니터링하는 방법

[0113] 본 발명은 또한 환자에게서 알츠하이머병의 진행을 모니터링하는 방법에 관한 것이다. 도 2는 치매 지속 기간의 함수로서 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 선형 회귀 분석을 제공한다. 선형 회귀는 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 양(+)의 크기 및 치매의 지속 기간 사이의 역상관을 나타내는 대략 -0.01의 음(-)의 구배를 나타낸다. 치매의 지속 기간이 증가함에 따라(즉, 알츠하이머병이 진행됨에 따라), 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 보다 작은 양(+)의 수치 값이 된다. 특정 양태에서, 보다 큰 높은 양(+)의 값이 질환의 초기 단계를 나타내기 때문에, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표의 측정은 알츠하이머병의 초기 진단을 허용한다. 특정 양태에서, 알츠하이머병이 환자에게서 진행함에 따라, 알츠하이머병 특이 분자 생체 지표는 보다 작은 양(+)의 값이 된다.

[0114] 특정 양태에서, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표는 브라디키닌으로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비에서 브라디키닌 비함유 배지로 자극된 세포에서 포스포릴화 Erk1 대 포스포릴화 Erk2의 비를 뺀 값을 측정함으로써 측정된다. 이는 다음과 같이 나타낸다: 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표 = $\{(pErk1/pErk2)_{\text{브라디키닌}}\} - \{(pErk1/pErk2)_{\text{비이탈}}\}$.

[0115] VI. 아밀로이드 베타 펩타이드

[0116] 용어 "아밀로이드 베타 펩타이드", "베타 아밀로이드 단백질", "베타 아밀로이드 펩타이드", "베타 아밀로이드", "A. 베타" 및 "A. 베타 펩타이드"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 몇몇 형태에서, 아밀로이드 베타 펩타이드(예: A. 베타 39, A. 베타 40, A. 베타 41, A. 베타 42 및 A. 베타 43)는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)이라고 불리는 보다 큰 막 횡단 글리코단백질의 39 내지 43개의 아미노산의 약 4-kDa 내부 분획이다. APP의 여러 가지 아형, 예를 들면 APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ 및 APP⁷⁷⁰이 존재한다. 사람에게서 존재하는 것으로 통상 공지되어 있는 APP의 특이 동종형(isotype)의 예는 문헌[참조: Kang et. al. (1987) Nature 325:733-736]에 의해 기재된 "정상적" APP라고 불리는 695개의 아미노산 폴리펩타이드; 문헌[참조: Ponte et al (1988) Nature

331:525-527 (1988) and Tanzi et al. (1988) Nature 331:528-530]에 기재된 751개의 아미노산 폴리펩타이드 및 문헌[참조: Kitaguchi et. al. (1988) Nature 331:530-532]에 의해 기재된 770개의 아미노산 폴리펩타이드이다. 생체내에서 또는 동일 반응계내에서 상이한 세크레타제(secretase) 효소에 의한 APP의 단백질 가수분해 처리의 결과로서, A. 베타는 길이가 40개의 아미노산인 "짧은 형태(short form)"과 길이가 42 내지 43개의 아미노산의 범위인 "긴 형태(long form)" 모두에서 발견된다. APP의 소수성 도메인의 부분은 A. 베타의 카복시 말단에서 발견되며, 특히 긴 형태의 경우에 A. 베타의 응집 능력을 생각할 수 있다. A. 베타. 펩타이드는 정상적인 개인 및 아밀로이드 형성 장애를 앓고 있는 개인 모두를 포함하는 사람 및 다른 포유동물의 체액(예: 뇌척수액)에서 발견될 수 있거나, 이로부터 정제될 수 있다.

[0117] 용어 "아밀로이드 베타 펩타이드", "베타 아밀로이드 단백질", "베타 아밀로이드 펩타이드", "베타 아밀로이드", "A. 베타" 및 "A. 베타 펩타이드"는 분해 생성물로서 동일하거나 본질적으로 동일한 서열을 갖는 APP 및 합성 펩타이드의 세크레타제 분해로부터 야기하는 펩타이드를 포함한다. 본 발명의 A. 베타, 펩타이드는 다양한 공급원, 예를 들면, 조직, 세포주, 또는 체액(예: 혈청 또는 뇌척수액)으로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, A. 베타는, 예를 들면, 문헌[참조: Walsh et al, (2002), Nature, 416, pp 535-539]에 기재된 APP-발현 세포, 예를 들면, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포로부터 유도될 수 있다. A. 베타. 제제는 이전에 기재된 방법을 사용하여 조직 공급원으로부터 유도될 수 있다[참조: Johnson-Wood et al, (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550]. 대안으로, A. 베타, 펩타이드는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법을 사용하여 합성될 수 있다[참조: Fields et al, Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p 77]. 따라서, 펩타이드는, 예를 들면, 어플라이드 바이오시스템즈 펩타이드 신시사이저(Applied Biosystems Peptide Synthesizer) 모델 430A 또는 431에서 측쇄 보호된 아미노산을 사용하여 t-Boc 또는 F-moc 화학에 의해 보호된 α -아미노 그룹을 사용하여 고상 합성의 자동화된 메리필드 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 보다 긴 펩타이드 항원은 익히 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드 또는 융합 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 적합한 숙주 세포에 의한 트랜스펙션 및 이중 발현에 적합한 발현 벡터에서 합성될 수 있거나 분자적으로 클로닝되고 삽입된다. A. 베타 펩타이드는 또한 정상적인 유전자의 A. 베타 영역에서 돌연변이으로부터 야기되는 관련된 A. 베타 서열이라고 한다.

[0118] Erk 1/2 지수(알츠하이머병- 특이 분자 생체 지표)의 A. 베타 - 유도된 이상은 알츠하이머병의 존재 또는 부재에 대해 확인 시험으로서 사용될 수 있다. 즉, 음(-)의 아밀로이드 베타-지수 반응은 질환의 존재를 나타내는 반면, 양(+)의 반응은 질환의 부재를 나타낸다. 즉, 알츠하이머병 표현형이 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉되거나 항온처리시에 세포에서 유도되는 경우, 이는 시험 세포 또는 시험되는 환자에서 질환의 부재를 나타낸다. 반면, 알츠하이머병-특이적 분자 생체 지표에서의 변화가 아밀로이드 베타 펩타이드와 접촉되거나 항온처리시에 세포내에서 전혀 유도되지 않거나 거의 유도되지 않는 경우, 이는 시험 세포 또는 시험되는 환자에서 알츠하이머병의 존재를 나타낸다.

[0119] 아밀로이드 베타(1-42)(즉, A β (1-42))가 바람직한 유도 자극제인 반면, 임의의 그 밖의 아밀로이드 베타 분획, 예를 들면, (1-39), (1-40), (1-41), (1-43), (25-35), (16-22), (16-35), (10-35), (8-25), (28-38), (15-39), (15-40), (15-41), (15-42), (15-43) 또는 임의의 그 밖의 아밀로이드 베타 분획이 본원에 기재된 임의의 방법 또는 키트에서 사용될 수도 있다.

[0120] VII. 알츠하이머병의 치료에 유용한 조성물

[0121] 본 발명은 또한 알츠하이머병의 치료 또는 예방에 유용한 조성물에 관한 것이다. 본원에 기재된 스크리닝 방법을 사용하여 확인되는 화합물은 이의 치료를 요하는 환자에게 투여하기 위한 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다.

[0122] 본원에 기재된 스크리닝 방법을 사용하여 확인된 본 발명의 약제학적 조성물 또는 화합물(또는 선도 화합물의 화학적 유도체)은 경구 투여, 피하 투여, 피부 통과 투여, 경피 투여 또는 비경구 투여(예: 국소, 직장 또는 정맥내)를 위해 약제학적 조성물, 예를 들면, 정제(당의정 및 피막 정제 포함), 산제, 과립제, 캡슐제(소프트 캡슐제 포함), 액체, 주사제, 좌제, 지속 방출제 등을 제공하기 위해 공지된 방법에 따라, 예를 들면, 약리학적으로 허용되는 담체와 혼합함으로써 안전하게 투여될 수 있다.

[0123] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 약리학적으로 허용되는 담체의 예는 고체 제제용의 부형제, 유희제, 결합제 및 봉쇄제, 및 액체 제제용의 용매, 가용화제, 현탁제, 등장성 제제, 완충제, 진정제 등을 포함하는 다양한 통상의 유기 또는 무기 담체를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 필요한 경우, 통상의 첨가제, 예를 들면, 방부제, 산화방지제, 착색제, 감미제, 흡수제, 습윤제 등은 적절하게 적합한 양으로 사용될 수

있다.

- [0124] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 부형제의 예는 락토즈, 슈크로즈, D-만니톨, 전분, 옥수수 전분, 결정질 셀룰로즈, 광 무수물 규산, 폴리사카라이드, 디사카라이드, 탄수화물, 트레할로스 등과 같은 제제를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0125] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 윤활제의 예는 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 활석, 콜로이드성 실리카 등과 같은 제제를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0126] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 결합제의 예는 결정질 셀룰로즈, 슈크로즈, D-만니톨, 텍스트린, 하이드록시프로필셀룰로즈, 하이드록시프로필메틸셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 전분, 슈크로즈, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈 나트륨 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0127] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 봉해제의 예는 전분, 카복시메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈 칼슘, 나트륨 카복시메틸 전분, L-하이드록시프로필셀룰로즈 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0128] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 용매의 예는 주사용수, 알코올, 프로필렌 글리콜, 마크로골 (Macrogol), 참깨유, 옥수수 오일, 올리브 오일 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0129] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 가용화제의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, D-만니톨, 벤질 벤조에이트, 에탄올, 트리스-아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 나트륨 시트레이트 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0130] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 현탁제의 예는 계면활성제, 예를 들면, 스테아릴 트리에탄올아민, 나트륨 라우릴 설페이트, 라우릴 아미노프로피오네이트, 레시틴, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈 에토늄 클로라이드, 글리세릴 모노스테아레이트 등; 친수성 중합체, 예를 들면, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 카복시메틸셀룰로즈 나트륨, 메틸셀룰로즈, 하이드록시메틸셀룰로즈, 하이드록시에틸셀룰로즈, 하이드록시프로필셀룰로즈 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0131] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 등장성 제제의 예는 글루코즈, D-소르비톨, 염화나트륨, 글리세린, D-만니톨 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0132] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 완충제의 예는 포스페이트, 아세테이트, 탄산염, 시트레이트 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0133] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 진정제의 예는 벤질 알코올 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0134] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 방부제의 예는 p-옥시벤조에이트, 클로로부탄올, 벤질 알코올, 페네틸 알코올, 데하이드로아세트산, 소르브산 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0135] 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용하기 위한 산화방지제의 예는 아황산염, 아스코르브산, α -토코페롤 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0136] 본 발명의 약제학적 조성물이 주사액으로서 사용되는 특정 양태에서, 사용되는 주사용 담체는 다음 중의 어느 하나 또는 전부를 포함할 수 있다: 용매, 가용화제, 현탁제, 등장성 제제, 완충제, 진정제 등. 용매의 예는 주사용수, 생리 식염수, 링거 액 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 가용화제의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, D-만니톨, 벤질 벤조에이트, 트리스아미노메탄, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 나트륨 시트레이트 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 등장성 제제의 예는 글루코즈, D-소르비톨, 염화나트륨, 글리세린, D-만니톨 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 완충제의 예는 포스페이트, 아세테이트, 탄산염, 시트레이트 등과 같은 완충제 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 진정제의 예는 벤질 알코올 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. pH 조절제의 예는 염산, 인산, 시트르산, 수산화나트륨, 중탄산나트륨, 탄산나트륨 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다.
- [0137] 특정 양태에서, 본 발명의 주사용 조성물은 무균적으로 처리된 동결 건조기에서 동결 건조될 수 있고 분말 상태로 보존될 수 있거나, 주사용 용기(예: 앰플) 속에서 밀봉될 수 있고 보존될 수 있다.
- [0138] 추가로, 본 발명의 약제학적 조성물은 사용되는 경우 위에서 언급한 주사용 담체로 희석될 수 있다.
- [0139] 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 화합물의 함량은 제제의 형태에 따라 변할 수 있지만, 이는 일반적으로 전

체 제제의 약 0.01 내지 약 99중량%, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 50중량%, 보다 바람직하게는 약 0.5 내지 약 20중량%이다.

[0140] 본 발명의 약제학적 조성물에서 비이온성 계면활성제의 함량은 제제의 형태에 따라 변할 수 있지만, 이는 일반적으로 전체 제제의 약 1 내지 약 99.99중량%, 바람직하게는 약 10 내지 약 90중량%, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 70중량%이다.

[0141] 본 발명의 약제학적 조성물에서 에탄올, 벤질 알코올 또는 디메틸아세트아미드의 함량은 제제의 형태에 따라 변할 수 있지만, 이는 일반적으로 전체 제제의 약 1 내지 약 99.99중량%, 바람직하게는 약 10 내지 약 90중량%, 보다 바람직하게는 약 30 내지 약 90중량%이다.

[0142] 본 발명의 약제학적 조성물에서 비이온성 계면활성제 및 에탄올의 혼합비(중량비)는 특히 제한되지는 않으며, 예를 들면, 비이온성 계면활성제 : 에탄올 = 약 0.01 내지 99.99 : 99.99 내지 0.01, 바람직하게는 약 1 내지 99 : 99 내지 1, 보다 바람직하게는 약 10 내지 90 : 90 내지 10 등이다. 보다 바람직하게는, 비이온성 계면활성제 : 에탄올은 약 10 내지 80 : 90 내지 20, 약 50 내지 80 : 50 내지 20 등이며, 특히 약 20:80, 약 65:35 등이 바람직하다.

[0143] 본 발명의 약제학적 조성물에서 용이하게 물에 용해되는 사이클로텍스트린 유도체의 함량은 제제의 형태에 따라 변할 수 있지만, 이는 일반적으로 전체 제제의 약 1 내지 약 99.99중량%, 바람직하게는 약 10 내지 약 99.99중량%, 보다 바람직하게는 약 20 내지 약 97중량%, 특히 바람직하게는 약 50 내지 약 97중량%이다.

[0144] 본 발명의 약제학적 조성물에서 그 밖의 첨가제의 함량은 제제의 형태에 따라 변할 수 있지만, 이는 일반적으로 전체 제제의 약 1 내지 약 99.99중량%, 바람직하게는 약 10 내지 약 90중량%, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 70중량%이다.

[0145] 본 발명의 약제학적 조성물은 활성 화합물, 비이온성 계면활성제, 및 용이하게 물에 용해되는 사이클로텍스트린 유도체를 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다. 이 경우, 각각의 성분, 즉 활성 화합물, 비이온성 계면활성제, 및 용이하게 물에 용해되는 사이클로텍스트린 유도체의 함량은 위에서 언급한 범위와 동일하다.

[0146] VIII. 알츠하이머병의 치료방법

[0147] 본 발명은 또한 본원에 기재된 약제학적 조성물을 사용하여 알츠하이머병의 치료 또는 예방방법에 관한 것이다.

[0148] 본 발명의 화합물은 경구 투여, 비경구 투여(예를 들면, 근육내, 복막내, 정맥내, ICV, 수조내 주사 또는 주입, 피하 주사, 또는 이식물), 흡입 분무, 비내, 질내, 직장, 설하, 또는 국소 투여 경로에 의해 투여될 수 있고, 각각의 투여 경로에 적절한 통상의 비독성의 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비이클을 포함하는 적합한 투여량 단위 제형으로 단독으로 또는 함께 제형화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물 및 방법은 알츠하이머병의 치료시에 통상 적용되는 그 밖의 치료학적 활성 화합물을 추가로 포함할 수 있다.

[0149] 알츠하이머병의 치료 또는 예방에서, 적절한 투여량 수준은 일반적으로 단일 또는 다회 용량으로 투여될 수 있는 약 0.001 내지 100mg/환자 체중 kg/일이다. 바람직하게는, 투여량 수준은 약 0.01 내지 약 25mg/kg/일, 보다 바람직하게는 약 0.05 내지 약 10mg/kg/일이다. 적합한 투여량 수준은 약 0.01 내지 25mg/kg/일, 약 0.05 내지 10mg/kg/일, 또는 약 0.1 내지 5mg/kg/일이다. 이러한 범위내에서, 투여량은 약 0.005 내지 약 0.05mg/kg/일, 0.05 내지 0.5mg/kg/일, 또는 0.5 내지 5mg/kg/일이다. 경구 투여의 경우, 당해 조성물은 바람직하게는 활성 성분 약 1 내지 1000mg, 특히 치료하고자 하는 환자에 대한 투여량의 증상 조절을 위해 활성 성분 약 1mg, 5mg, 10mg, 15mg, 20mg, 25mg, 50mg, 75mg, 100mg, 150mg, 200mg, 250mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 750mg, 800mg, 900mg 및 1000mg을 함유하는 정제의 형태로 제공된다. 화합물은 1일당 1 내지 4회, 바람직하게는 1일당 1회 또는 2회의 섭생으로 투여될 수 있다.

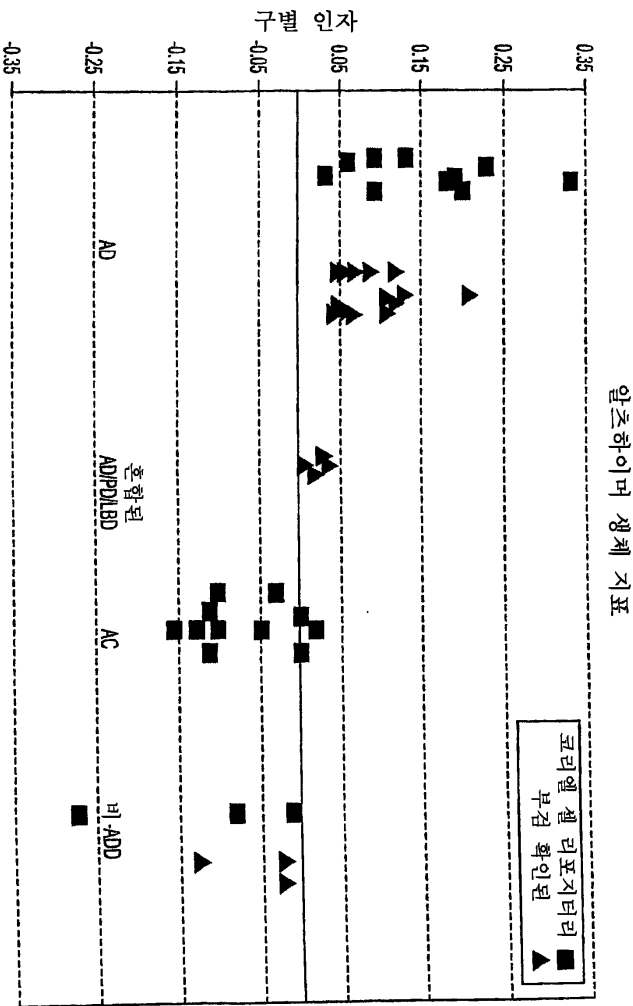
[0150] 그러나, 임의의 특별한 환자에 대한 특이 용량 수준 및 투여 빈도는 다양할 수 있으며, 사용되는 특이 화합물의 활성, 당해 화합물의 대사 안정성 및 작용 길이, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이요법, 투여 형태 및 시간, 배설 속도, 약품 배합, 특별한 질환의 중증도, 및 치료를 받는 숙주를 포함하는 다양한 인자에 의존하는 것으로 이해된다.

[0151] 당해 명세서에서 언급된 모든 참조문헌, 특허 및 인쇄된 공보는 전문이 본원에 참고로 인용되어 있다.

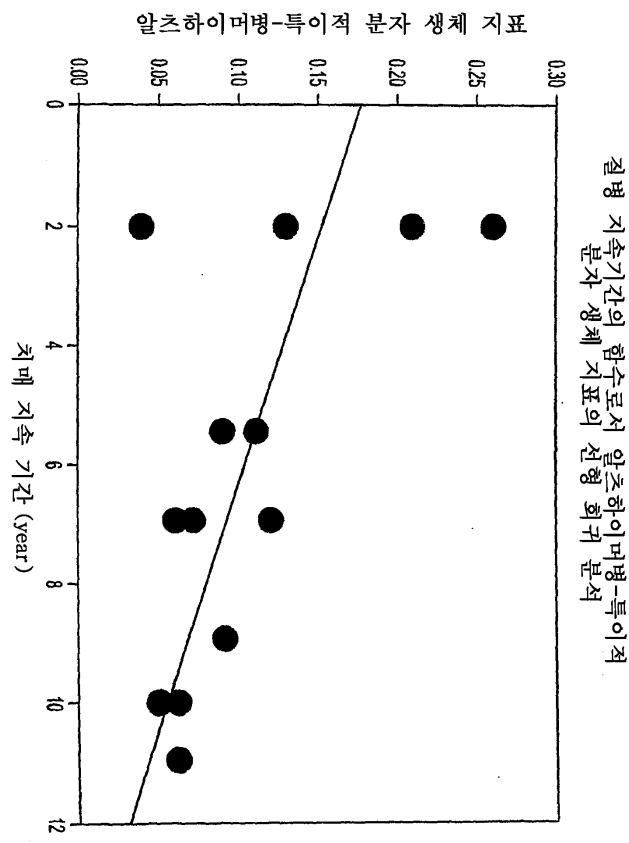
[0152] 다음 실시예는 본 발명의 특징의 바람직한 양태를 추가로 설명하기 위해 일례로 제공되며, 본 발명을 이로 제한하는 것으로 해석되지는 않는다.

도면

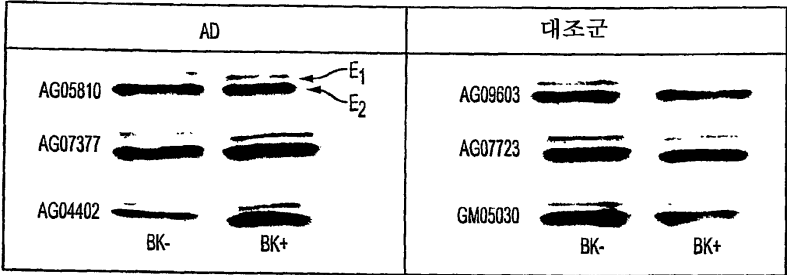
도면1



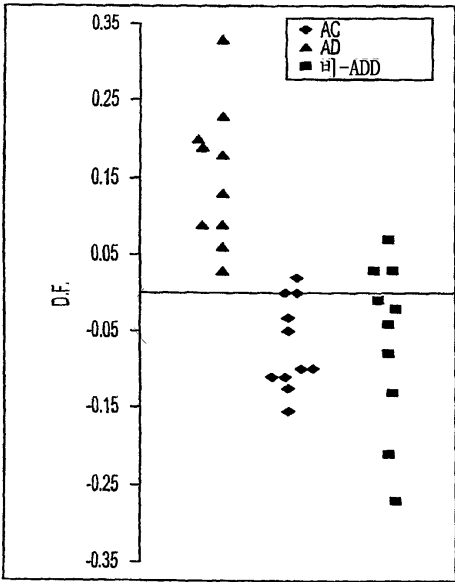
도면2



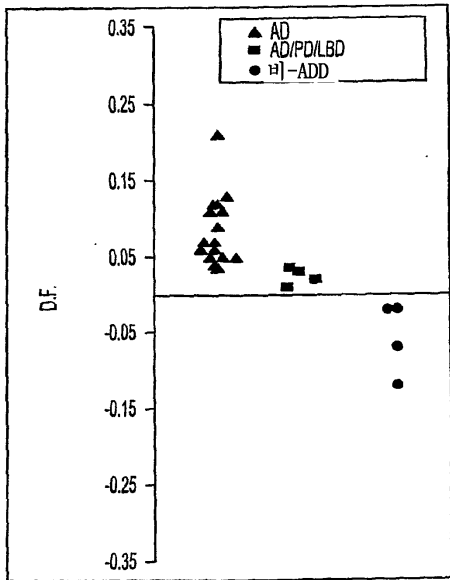
도면3



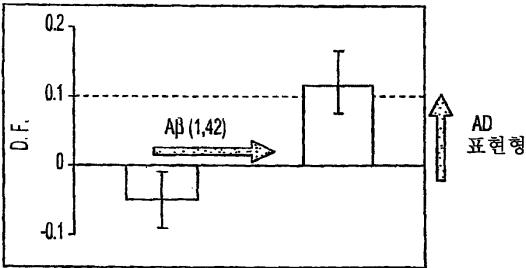
도면4A



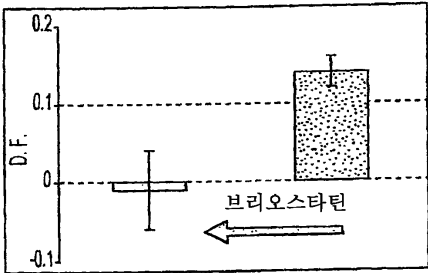
도면4B



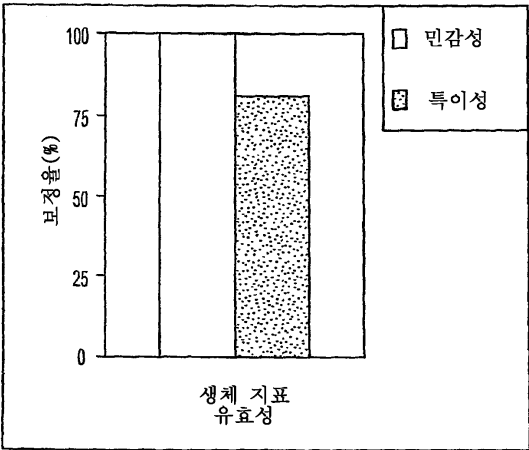
도면5A



도면5B



도면6A



도면6B

