(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12Q 1/68
C07K 17/00
C12P 19/34

(45) 공고일자 2001년04월02일
(11) 등록번호 10-0279898
(24) 등록일자 2000년11월06일

(21) 출원번호	10-1995-0701013	(65) 공개번호	특1995-0703656
(22) 출원일자	1995년03월15일	(43) 공개일자	1995년09월20일
번역문제출일자	1995년03월15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 93/09310	(87) 국제공개번호	WO 94/09155
(86) 국제출원일자	1993년09월30일	(87) 국제공개일자	1994년04월28일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 말라위 수단 EA EURASIAN특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남 라트비아 우즈베키스탄		
(30) 우선권주장	959992 1992년10월13일 미국(US) 114448 1993년08월31일 미국(US)		
(73) 특허권자	듀크 유니버시티 로버트 엘. 타버 미합중국 노스 캐롤라이나 27706 듀러햄 에르윈 로드		
(72) 발명자	알렌 디. 로즈 미합중국 노스 캐롤라이나 27705 더럼 스트림리 코트 10 워렌 제이. 스트리트매터 미합중국 노스 캐롤라이나 27707 더럼 시펜함 로드 3817 가이 에스. 살베센 미합중국 노스 캐롤라이나 27514 채플 힐 하이뷰 드라이브 303 잔 엥힐드 미합중국 노스 캐롤라이나 27701 더럼 이스트 녹스 스트리트 311 도날드 이. 쉬메켈 미합중국 노스 캐롤라이나 27705 더럼 프렌드쉽 로드 2965		
(74) 대리인	장용식		

심사관 : 최규환

(54) 알쯔하이머 질환의 검출방법

요약

환자에게서 알쯔하이머 질환을 진단하거나 또는 예측하는 방법이 개시되었다. 이 방법은 환자에게서 아포리포단백질E 타입4(ApoE4) 아이소폼 또는 ApoE4를 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함한다. ApoE4의 존재는 환자가 알쯔하이머 질환에 걸리거나 또는 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것을 나타낸다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

알쯔하이머 질환의 검출방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 윗쪽패널은 배양후 고정화된 βA 펩티드에, 그리고 콘트롤 펩티드 [“이븐-히드로 펩티드” (even-hydro peptide), 또는 “E.H.”]에 결합하는 뇌척수액의 단백질을 나타내며, 컬럼 1은 인산염 완충

식염수로 용출하고; 컬럼2는 5% 황산 도데실나트륨으로 용출하고; 컬럼3은 4몰 우레아로 용출하고; 또한 컬럼4는 6몰 구아니딘 하이드로클로라이드로 용출한 것이다. 아포리단백질E의 결합은 아래쪽 패널의 면역 조직화학적 염색에 의해 보여진다.

제2도는 윗쪽패널은 다양한 고정화된 펩티드에 대해서 뇌척수액의 단백질들이 결합하는 것을 나타낸다. 아포리포단백질E의 결합은 역시 아래쪽 패널의 면역 조직화학적 염색에 의해 보여진다.

제3도는 0,1, 및 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자의 발현(onset)연령을 나타낸다. 각 곡선은 ApoE4 대립유전자의 수로서 표지된다. 기호 '*' 는 짧은 범위에서의 다수의 진단을 나타낸다. 발현 곡선은 카플란-마이어(Kaplan-Meier)곱 극한 분포에 의해 평가되었고 명백하게 식별능력이 있었다(로그랭크 카이-제곱(logrank chi-square) = 53.8, 2 자유도, P < 0.001).

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 NIH LEAD Award 5R35 AG0 7922 및 NIH 알쯔하이머질환 연구센터 5P50 AG0 5128하에서 미국정부 지원으로 행해졌다. 미국정부는 본발명에 대한 일부 권리를 갖고 있다.

[관련 출원]

본 출원은 1992년 10월 13일 출원한, 공통적으로 소유되고 공계류중인 미국출원 제 07/959,992호의 일부 계속출원이며, 이것의 개시내용은 전부 여기서 참고문헌으로 통합되었다.

[발명의 분야]

본 발명은 알쯔하이머 질환의 진단 및 예측방법에 관한 것이다.

[발명의 배경]

노인성 반점 및 콩고필릭 혈관장애(congophilic angiopathy)는 알쯔하이머 질환 환자의 뇌에서 풍부하게 발견되는 비정상적인 세포의 구조이다. 이 구조의 생화학적 조성은 이 치매질환의 발병에서의 그것의 가능한 역할을 보다 잘 이해하기 위해서 광범위하게 연구되었다. 성숙한 노인성 반점은 발육이상 신경돌기, 축산돌기말단, 수상돌기, 소신경교세포 및 섬유모양의 성상세포로 둘러싸인 아밀로이드 미소섬유의 중심 코어로 구성되는 복잡한 구조이다. D. Selkoe Neuron 6, 487-498(1991)참조. 콩고필릭 혈관장애를 생성하는 혈관을 둘러싸는 노인성 반점은 아밀로이드 코어는 β-아밀로이드(Aβ)펩티드로 명명된 39 내지 43 아미노산의 펩티드이다. G.Glenner 및 C.Wong, Bichem. Biophys. Re. Comm. 120, 885-890(1984). Aβ펩티드는 알쯔하이머 질환, 다운증후군, 네델란드 타입의 유전성 뇌출혈에서, 그리고 노년에 뇌에서 발견된다. K.Kosik, Science 256, 780-783 (1992). Aβ는 보다 더 큰 단백질인 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 비정상적인 단백질 분해 프로세싱에 의하여 생성된다. K. Beyreuther 및 C.Masters, Brain Path. 1, 241-251(1991) 참조.

노인성 반점 및 콩고필릭 혈관장애는 βA 펩티드뿐만 아니라 여러 단백질을 포함한다. 전구체 단백질의 아미노- 및 카르복시- 터미널을 인식하는 항체를 이용하는 조직화학적 연구에 의하여 노인성 반점에서 특히 APP 자체가 확인되었다. 예컨대 F. Tagliavine등, Neurosci. Lett. 128, 117-120 (1991); C. Joachim 등, Amer. Jour. Path. 138, 378-384 (1991) 참조. 이 단백질들이 세포외공간에서 응집하여 노인성 반점 및 콩고필릭 혈관장애와 연관되는 기작은 알려져 있지 않다.

알쯔하이머 질화에 내재하는 기작에 대하여 상당한 연구가 있었지만, 이 질환은 조사하고 이 질환에 대항하는 새로운 방법에 대한 요구가 계속 존재한다.

[발명의 요약]

환자에게서 알쯔하이머 질환을 진단하거나 또는 예측하는 방법이 개시된다. 한 구체예는 환자에게서 아포리포단백질E 타입4(ApoE4) 아이소폼(isoform)을 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 검출하는 것으로 이루어진다.

다른 구체예는 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 검출하는 것으로 이루어진다. ApoE4 아이소폼의 존재 또는 ApoE4 아이소폼을 코딩하는 DNA의 존재는 환자가 알쯔하이머 질환에 걸리거나 또는 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것을 나타낸다.

본발명의 상술한 목적과 양상 및 다른 목적과 양상은 도면과 하기에서 기술하는 명세서에서 상세하게 설명한다.

[발명의 상세한 개시]

상술한 것처럼 본발명은 환자에게서 알쯔하이머 질환을 스크리닝(가령 진단 또는 예측)하는 방법을 제공한다. 이 방법은 환자에게서 ApoE4 아이소폼을 코딩하는 DNA 또는 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 검출하는 것으로 이루어진다. 그러나 아이소폼 또는 DNA 의 존재는 환자가 알쯔하이머 질환에 걸리거나 또는 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것을 나타낸다. 적합한 환자는 사전에 알쯔하이머 질환에 걸린 것으로 진단되지 않은 환자, 사전에 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있다고 결정된 환자, 확실한 정보가 요구되는 알쯔하이머 질환에 걸린 것으로 초기에 진단된 환자를 포함한다. 예컨대 치매에 걸린 것으로 진단 또는 결정된 환자, 특히 진행성 치매에 걸린 것으로 결정된, 사전에 임상적으로 정상이었던 환자가 적합한 환자이다. 따라서 본발명은 가족성 알쯔하이머 질환(후기 발현 및 초기발현) 뿐만아니라 산재성 알쯔하이머 질환을 검출하는데 이용될 수 있다.

ApoE4 또는 그러한 아이소폼을 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 검출하는 방법은 어떤 적당한 수단에 의하여 직접적으로 또는 간접적으로 수행될 수 있다. 다양한 기술이 당업자에게 공지되었다. 일반적으로 모든 방법은 환자로부터 DNA 또는 ApoE를 함유하는 생물학적 물질의 샘플을 수집하는 단계, 그 다음 그 샘플에서 ApoE4 또는 그러한 아이소폼을 코딩하는 DNA를 그 환자가 갖고있는지의 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 예컨대 검출단계는 환자로부터(가령 뇌척수액, 또는 ApoE를 함유하는 어떤 다른 체액 도는 조

직드로부터) ApoE 샘플을 수집하고 그 다음 ApoE 샘플에서 ApoE4 아이소폼의 존재 도는 부재를(가령 등전 집속 또는 면역분석에 의하여) 결정함으로써 수행할수 있다. 다른 방법으로 검출단계는 환자로부터 DNA를 함유하는 생물학적 샘플을 수집하고, 그후 생물학적 샘플에서 ApoE4 아이소폼을 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행할수 있다. 조직샘플 및 혈액샘플을 포함하여, 그 환자의 DNA를 함유하는 어떤 생물학적 샘플이 이용될수 있는데, 혈구가 특히 편리한 공급원이다. ApoE4 아이소폼을 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재의 결정은 적당한 검축가능기로 표지화된 올리고뉴클레오티드 프로브를 가지고 행할수 있고, 또는 폴리머라제 연쇄 반응 또는 리가제 연쇄반응등의 증폭반응에 의하여 행할수 있다(그후 증폭반응의 산물이 표지화된 올리고뉴클레오티드 포로브로 검출될수 있다). 더욱이, 검출단계는 환자가 ApoE4 아이소폼을 코딩하는 유전자에 대해서 이형 또는 동형인지의 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 본발명을 수행하는데 이용될수 있는 무수히 다른 올리고뉴클레오티드 프로브 검사 포맷이 알려져 있다.

가령, Wahl등의 미국특허 4,302,204; Falkow등의 미국특허 4,358,535; Ranki등의 미국특허 4,563,419; 및 Stavrianopoulos 등의 미국특허 4,994,373 참조(출원인들은 특이적으로 여기서 인용된 모든 미국특허 참고문헌의 개시내용이 참고문헌으로 여기서 통합되는 것을 의도한다.)

선택된 또는 표적, 헥산서열의 증폭은 어떤 적합한 수단에 의해 수행될 수 있다. 일반적으로 D. Kwoh 및 T. Kwoh, Am, Biotechol. Lab. 8, 14-25(1990) 참조. 적합한 증폭기술의 실례에는 하기의 것들이 포함되지만, 이것들에 제한되지는 않는다. 폴리머라제 연쇄반응, 리가제연쇄반응, 스트래드(strand) 치환증폭(일반적으로 G. Walket등, Proc. Natℓ. Acad. Sci. USA 89, 392-296(1992); G. Walker 등, Nucleic Acids Res. 20, 1691-1696(1992) 참조), 전사-기초 증폭(D. Kwoh등, Proc, Natℓ. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177(1989 참조), 자체-유지서열복제(또는 "3SR")(J. Guatelli 등, Proc. Natℓ. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878 (1990)참조), Qβ레플리카제 시스템(P. Lizardi 등, BioTechnology 6, 1197-1202(1988)참조), 헥산서열-기초 증폭(또는 "NASBA")(R. Lewis, Genetic Engineering News 12 (9). 1 (1992)참조), 회복연쇄반응(또는 "RCR")(상기의 R. Lewis 참조), 부메랑 DNA 증폭 (또는 "BDA")(상기의 R. Lewis 참조)이 그것이다. 현재는 폴리머라제 연쇄반응이 선호된다.

일반적으로 상기와 같은 DNA 증폭기술은 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE4를 코딩하는 DNA에 특이적으로 결합하지만, ApoE2 또는 ApoE3를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않고, 증폭반응에서 ApoE4 DNA 또는 그것의 일부의 증폭을 위한 프라이머 또는 프라이머들로서 작용하는 하나의 프로브, 한쌍의 프로브, 또는 두쌍의 프로브의 이용을 포함한다(마찬가지로, 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE2를 코딩하는 DNA에 특이적으로 결합 하지만, ApoE3 또는 ApoE4를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않고, 증폭반응에서 ApoE2 DNA 또는 그것의 일부의 증폭을 위한 프라이머 또는 프라이머들로서 작용하는 하나의 프로브, 한쌍의 프로브, 또는 두쌍의 프로브를 사용할수 있다; 그리고 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE3를 코딩하는 DNA에 특이적으로 결합하지만 ApoE2 또는 ApoE4를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않고, 증폭반응에서 ApoE3 DNA 또는 그것의 일부의 증폭을 위한 프라이머 또는 프라이머들로서 작용하는 하나의 프로브, 한쌍의 프로브, 또는 두쌍의 프로브를 사용할수 있다).

일반적으로 ApoE4를 코딩하는 DNA를 검출하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드 프로브는 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE4를 코딩하는 DNA에는 결합하지만 ApoE2 또는 ApoE3를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드 프로브이다.

올리고뉴클레오티드 프로브는 항체와 관련하여 하기에서 기술되는 것과 같은 적합한 검출가능기로 표지화된다. 마찬가지로, ApoE2를 코딩하는 DNA를 검출하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드 프로브는 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE2를 코딩하는 DNA에는 결합하지만 ApoE3 또는 ApoE4를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드 프로브이다. 그리고 ApoE3를 코딩하는 DNA를 검출하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드 프로브는 동일한 혼성화 조건하에서 ApoE3를 코딩하는 DNA에는 결합하지만 ApoE2 또는 ApoE4를 코딩하는 DNA에는 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드 프로브이다.

폴리머라제 연쇄반응(PCR)은 공지된 기술에 따라 수행할수 있다.

예컨대, 미국특허 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 및 4,965,188참조.

일반적으로 PCR은 각 헥산 스트랜드에 상보적인 각 프라이머의 연장생성물이 합성되도록 혼성화조건하에서 검출할 특정서열의 각 스트랜드에 대한 하나의 올리고뉴클레오티드 프라이머로, 각 프라이머부터 합성된 연장생성물이 그것의 상보물로부터 분리되었을 때 다른 프라이머의 연장생성물의 합성을 위한 주형으로 작용할수 있도록 그것과 혼성화할 특정서열의 각 스트랜드에 충분히 상보적인 프라이머들로 먼저 핵산 샘플을 철리하고(가령, 열안정 DNA 폴리머라제의 존재하에서), 그 다음엔 변성조건하에서 샘플을 처리하여 검출할 서열 또는 서열들이 존재하면 프라이머 연장 생성물을 그것의 주형으로부터 분리시키는 것을 포함한다. 원하는 정도의 증폭이 달성될 때가지 이 단계들을 순환적으로 반복시킨다. 증폭된 서열의 검출은 반응생성물에 혼성화할수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브(가령, 본발명의 올리고뉴클레오티드 프로브), 검출가능한 표지를 운반하는 프로브를 반응생성물에 첨가하고, 그후 공지된 기술에 따라서 표지를 검출함으로서 수행될수 있다.

리가제 연쇄반응(LCR)도 또한 공지된 기술에 따라 수행된다. 예컨대, R. Weiss, science 254, 1292(1991) 참조.

일반적으로 두쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머 반응이 수행된다; 한쌍은 검출할 서열의 한 스트랜드에 결합한다; 다른 쌍은 검출할 서열의 다른 스트랜드에 결합한다.

각 쌍은 함께 그것이 대응하는 스트랜드를 완전히 포갠다.

이 반응은 먼저 검출할 서열의 스트랜드들을 변성시키고(가령, 분리시키고), 그 다음 각 쌍의 올리고뉴클레오티드 프로브가 함께 결합되도록 열안정한 리가제의 존재하에서 두 쌍의 올리고뉴클레오티드 프로브와 스트랜드들을 반응시키고, 그후 반응생성물을 분리시키고, 그 다음에는 서열이 원하는 정도로 증폭될때가지 이 과정을 순환적으로 반복시켜서 수행한다. 그 다음엔 PCR에 대해 상술한 것과 유사한 방법으로 검출을 행할수 있다.

여기서 기술된 검출단계는 직접적으로 또는 간접적으로 수행될수 있다는 것이 용이하게 이해될 것이다. 가령 환자에게서 ApoE2 또는 ApoE3가 검출되면, 환자는 ApoE4에 대해서 동형이 아니라고 결정된다. 그리고 환자에게서 ApoE2 및 ApoE3가 검출되면 환자는 ApoE4에 대해서 동형도 아니고 이형도 아니라고 결정된다.

등전접속 및 대립형질 검출기술의 대안으로서, 샘플에서 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 결정하는 단계는 ApoE4에 선택적으로 결합하는 항체(즉, 동일한 결합 조건에서 ApoE4에 결합하지만 본질적으로 ApoE2 도는 ApoE3에 결합을 나타내지 않는 항체)로 항체 분석에 의해 수행될수 있다. 환자의 정확한 ApoE 상보물과 그 환자가 ApoE4에 대해서 동형인지 또는 이형인지의 여부를 결정하고 싶을때에는 ApoE2 및 ApoE3에 선택적으로 결합하는 항체를 이용할수 있다(즉, 동일한 결합조건에서 ApoE2에 결합하지만 본질적으로 ApoE3 또는 ApoE4에의 결합을 나타내지 않는 항체; 동일한 결합조건에서 ApoE3에 결합하지만 본질적으로 ApoE2 또는 ApoE4에의 결합을 나타내지 않는 항체).

선택적으로 ApoE2, ApoE3 및 ApoE4에 결합시키는데 사용되는 항체는 어떤 적합한 기술에 의해 생성될수 있다. 예컨대 모노클로날 항체는 Kohler 및 Milstein, Nature 265, 495-97(1975)의 기술에 따라서 하이브리도마 세포주에서 생성될수 있다. 동형인 것으로 결정된 인간환자로부터 ApoE2, ApoE3 또는 ApoE4를 구할수 있고, 그 다음에는 S. Rall등, Methods in Enzymol. 128, 273(1986)에서 기술된 기술에 의해 정제하고, 모노클로날 또는 폴리클로날 항체의 제조를 위한 면역원으로서 사용할수 있다. 정제된 ApoE 아이소폼은 생물학적으로 활성이 있는 아이소폼을 발현시키는 재조합수단에 의해 생성될수 있고, 또는 그것의 면역원성 단편이 면역원으로서 이용될 수도 있다. 모노클로날 Fab 단편은 당업자에게 공지된 재조합기술에 의하여 공지된 서열로부터 Escherichia coli에서 생성될수 있다. 예컨대 W. Huse, Science 246, 1275-81(1989)(재조합 Fab 기술); P. Wenham등, Lancet 337, 1158(1991)(Apo PCR 프라이머)참조. ApoE의 하나의 서브타입을 코당하는 DNA는 부위- 특이적 돌연변이유발에 의해 얻어질수 있고 다른 것으로 전환될수 있다. 예컨대, T. Kunkel 등, Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987); T. Kunkel, 미국특허 4,872,192 참조.

여기서 사용되는 용어 “항체”는 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE를 포함하여 모든 유형의 면역글로불린을 나타낸다. 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일수 있고 (가령) 마우스, 래트, 토끼, 말 또는 인간을 포함하여 어떤 종에서도 공급될 수 있고, 또는 키메라 항체일수도 있고, 예컨대 Fab, $F(ab')_2$, Fv단편등의 항체 단편을 포함하고, IgG가 아닌 다른 항체에서 얻어진 대응하는 단편들을 포함한다.

항체분석은 일반적으로 동종 분석 또는 이종분석일수 있다. 동종분석에서는 면역학적반응이 대개 특정항체, 표지화된 검체, 및 관심있는 샘플을 포함한다. 표지로부터 생기는 시그날은 표지화된 검체와 항체의 결합시 직접적으로 또는 간접적으로 변형된다. 면역학적 반응과 그것의 정도의 검출이 동종용액에서 수행된다. 이용할수 있는 면역화학적 표지에는 자유라디칼, 방사성동위원소, 형광염료, 효소, 박테리오파지, 조효소등이 포함된다.

이종 분석방법에서 시약은 대개 표본, 본발명의 항체, 검추가능시그날을 생성하기 위한 수단이다. 상술한 유사한 표본들이 이용될 수도 있다. 항체는 일반적으로 비드, 플레이트 또는 슬라이드등의 지지체상에 고정화되고, 액상에서 항원을 포함하는 것으로 추정되는 표본과 접촉된다. 그 다음 액상으로부터 지지체를 분리하고 시그날을 생성하기 위한 수단을 이용하여 검출가능 시그날에 대해서 지지체상 또는 액상을 조사한다. 이 시그날은 표본에서 검체의 존재에 관련된다. 검출가능 시그날을 생성하기 위한 수단은 방사성표지, 형광표지, 효소표지등의 사용을 포함한다. 예컨대, 검출되는 항원이 제2결합부를 포함하면, 그 부위에 결합하는 항체는 검출가능기에 컨쥬게이트(conjugate) 될 수 있고, 분리단계전에 액상 반응용액에 첨가될수 있다. 고체 지지체상에서의 검출가능기의 존재는 시험샘플에서 항원의 존재를 나타낸다. 적합한 면역분석의 실례는 방사면역분석시험법, 면역형광법, 효소-결합면역분석법등이다.

당업자들은 여기서 개시된 방법을 수행하는데 유용한 무수한 특이적인 면역분석포맥 및 그것의 변형을 잘 이해할 것이다. 일반적으로는 E. Maggio, Enzyme-Immunoassay, (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL)참조; 또한 “리간드-리셉터 상호작용의 조절방법과 그것의 응용”이라고 명명된 Skold 등의 미국특허 제4,727,022호, Forrest 등의 미국특허 제 4,659,678호, David 등의 미국특허 제4,376,110호, Litman등의 미국특허 제4,275,149호, Maggio등의 미국특허 제4,233,402호, Boguslaski 등의 미국특허 제4,230,767호 참조. 선택적으로 ApoE 아이소폼에 결합하는(즉 동일한 결합조건하에서 ApoE2, ApoE3 또는 ApoE4 중 하나에 결합하지만 본질적으로 다른것에의 결합을 보이지 않는) 항체는 침전과 같은 공지된 기술에 따라서 진단분석에 적합한 고체지지체(가령, 라텍스 도는 폴리스티렌과 같은 재료로부터 형성된 비드, 플레이트, 슬라이드 또는 웰)에 컨쥬게이트될수 있다. ApoE 아이소폼에 결합하는 항체는 마찬가지로 공지기술에 따라서 방사성표지(가령 ^{35}S, ^{125}I, ^{131}I), 효소표지(가령, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제), 형광표지(가령, 플루오레세인)와 같은 검출가능기에 컨쥬게이트될수 있다.

항체 분석을 수행하기 위한 진단 키트는 여러 가지의 방식으로 제조될수 있다. 한 구체예에서는 진단 키트가 (a)고체지지체에 컨쥬게이트된 ApoE2, ApoE3 또는 ApoE4에 결합하는 항체 및 (b) 검출가능기에 컨쥬게이트된 ApoE2, ApoE3 또는 ApoE4에 결합하는 제2항체로 이루어진다. 시약은 또한 완충제와 단백질 안정화제, 가령 다당류등과 같은 보조작용제를 포함할수 있다. 진단키트는 추가로 필요한 경우에는 검출가능기가 한 요소인 시그날-생성시스템의 다른 요소(가령, 효소기질), 시험에서 백그라운드 방해를 감소시키기 위한 작용제, 콘트롤시약, 시험을 수행하기 위한 장치등을 포함한다. 시험키트의 제2구체예는 (a) 상기와 같은 항체 및 (b) 검출가능기에 컨쥬게이트된 항체의 특정 결합 파트너로 이루어진다. 상술함 보조작용제가 마찬가지로 포함될수 있다. 시험 키트는 어떤 적당한 방식으로 포장될수 있는데, 전형적으로 시험수행을 위한 인쇄된 지시사항 팜플렛과 함께 모든 성분들을 단일 컨테이너 속에 포장할수 있다.

본발명은 하기의 비-제한적인 실시예보다 더 자세히 설명된다.

[실시예 1]

고정화된 베타-아밀로이드 전구체 단백질 단편과 뇌척수의 아포리포단백질 E의 결합 βA 펩티드(Bachem), 다른 펩티드, 또는 에탄올아민은 Immobilon AV 친화성막(Millipore)에 공유적으로 고정화되었다. 이 막은

아미노 및 티올기를 통해서 펩티드와 단백질을 공유적으로 고정화시키는 화학적으로 활성화된 친수성 미공성 막이다. βA 펩티드, 또는 콘트롤 펩티드를 1 mg 펩티드/100㎕으로 증류수에 녹였다. 10㎕(100㎍ 펩티드 함유)를 13mm 직경 Immobilon 디스크에 적용시키고, 실온에서 하룻밤동안 배양 건조시켰다. 펩티드는 막위의 기능적인 결합기의 수에 비해 과량이었다. 콘트롤막은 Immobilon AV 막위의 반응성 기들을 블로킹하기 위해 1.0M $NAHCO_3$, pH 9.5중의 2.0M 에탄올아민에서 막을 배양함으로써 제조했다. 막을 건조기속에서 -20℃에서 보관했다. 사용하기전에 막을 인산염 완충식염수로 세척하였다. 12-28 히드로파틱 미믹 펩티드(Hydropathic Mimic Peptide) 및 이븐-히드로 펩티드(Even-Hydro Peptide)는 Applied Bio-Science 430A 펩티드 합성장치로 표준 f-Moc합성을 이용하여 합성하였다. 아미노산은 블로킹 기들로 보호 되었고, 수동절단전에 탈보호되고 세척되었다. 펩티드의 순도는 역상 고성능 액체크로마토그래피에 의해 확인되었다.

[고정화된 펩티드와 CSF 단백질의 결합]

βA 펩티드로, 에탄올아민으로 또는 히드로미믹 또는 이븐-히드로 펩티드로 사전에 결합된 Immobilon Av 막을 50㎕ 인산염-완충식염소, pH 7.3을 갖는 100㎕ 뇌척수액(사전에 0.22μ 필터를 통해 여과됨)과 실온에서 30분간 배양하였다. 배양후 막을 Milipore 필터 홀더(Swinnex)에 위치시키고, 3.0㎖ 인산염-완충식염수로 세척한 다음, 700㎕ 5% 황산도데실 나트륨(SDS)으로 세척하였다. 필더홀더에서 막을 제거하고 반으로 나누고 150㎕의 Laemmli 완충액(2% 황산도데실나트륨, 5% 베타-메르캅토에탄올, pH 6.8)중에 위치시키고, 5분간 끓여서 잔류 단백질을 가용화시켰다. 가용화된 단백질을 갖는 Laemmli 완충액 45㎕를 2% SDS를 갖는 12% 폴리아크릴아미드의 분리겔(separating gel), 4%의 스태킹 젤(stacking gel)이 있는 Bio-Rad Minigel 장치의 10개의 레인 각각에 로딩하였다.

[ApoE의 면역검출]

전기영동한 단백질을 표준웨스턴(Western) 전이 기술을 이용하여 Immobilon P로 전이시켰다. 전이후에 막을 실온에서 1시간동안 Blotto(0.5% Tween-20(Pierce) 이 있는 트리스 완충식염수 pH 7.6 중의 5% 건조 밀크)에서 배양하였다. Blotto 중의 1:1,000 희석된 토끼-항-인간 아포리포단백질 E 항체(Dr. Joel Morrisett, Dept. of Medicine, Baylor College of Med., Houston, TX.에 의해 공급됨)에서 막을 다시 4℃에서 하룻밤동안 배양하고, 그 다음엔 Blotto에서 5번 세척하였다. 1:10,000 희석된 호스래디쉬 퍼옥시다제와 컨쥬게이트된 염소-항-토끼 이차 항체에 실온에서 1시간동안 막을 노출시킨 다음, Blotto에서 7번 세척하였다. 그후 강화된 화학발광 검출키트(Amersham)로 호스래디쉬 퍼옥시다제를 가시화시키고, 하이퍼필름 ECL(Amersham)에 노출시켰다.

[뇌척수액 샘프]

고지(告知)에 의한 동의후 사람 환자에 대해 수행된 임상 진단적 요추천자로부터 뇌척수액을 얻었고, -80℃에서 보관했다.

[결과]

뇌척수액은 배양하고 인산염완충식염수(제1도, 윗쪽, 컬럼1)로 용출시킨후에 고정화된 βA 펩티드에, 그리고 콘트롤 펩티드("이븐-히드로 펩티드")에 결합하는 많은 단백질을 포함한다. 이것들중에서 잔류단백질은 제1도, 아랫쪽, 컬럼1에서 보여지는 것처럼 아포이단백질E이다. 이 단백질들중 많은 것은 두 고정화된 펩티드로부터 5% 황산도데실나트륨에 의해(컬럼2); 4 몰 우레아에 의해(컬럼3); 또는 6몰 구아니딘 하이드로 클로라이드(컬럼4)에 의해 용출된다. 그러나, 구아니딘 하이드로클로라이드는 $βA_{(1-28)}$ 펩티드로부터 아포리포단백질E를 용출시키지 않았지만 제1도, 아랫쪽, 컬럼4에서 보여지는 것처럼 콘트롤 펩티드에 사전에 결합된 거의 모든 아포리포단백질E를 용출시켰다.

다양한 고정화된 펩티드와 아포리포단백질E의 결합은 제2도에서 보여진다. 뇌척수액의 아포리포단백질E는 배양 및 PBS와 5% 황산도데실나트륨으로의 세척후 고정화된 $βA_{(1-40)}$, $βA_{(1-28)}$ 및 $βA_{(12-28)}$과 높은 친화성으로 결합한다. "12-28 이븐 히드로-펩티드"는 $βA_{(12-28)}$와 동일한 아미노산을 포함하지만 다른 히드로파틱 프로필을 갖는다. 제2도, 아랫쪽에서 보여지는 것처럼 아포리포단백질E는 이 고종화된 펩티드에 결합하지 않았다. 12-28 히드로파틱 미믹 펩티드는 $βA_{(12-28)}$과는 다른 아미노산을 포함하지만, $βA_{(12-28)}$, 및 또한 결합된 아포리포단백질E와 매우 유사한 히드로파틱 프로필을 가진다.

[실시예 2]

[알쯔하이머환자 및 콘트롤환자의 CSF에서 ApoE의 면역검출]

알쯔하이머질환환자와 콘트롤환자의 뇌척수액은 면역반응성 아포리포단백질E를 포함한다. 각 콘트롤 CSF의 아포리포단백질E는 고정화된 $βA_{(12-28)}$에 결합되었다.

그러나 알쯔하이머질환 뇌척수액샘플의 아포리포단백질E는 βA 펩티드와의 결합의 두드러진 변화성을 나타냈다.

[실시예 3]

[등전접속(Isoelectric Focusing)에 의한 알쯔하이머 CSF에서의 ApoE 아이소폼의 확인]

상술한 βA 펩티드와의 결합의 변화가 아포리포단백질E 자체의 이종성에 의해 설명될수 있는지를 결정하기 위해서, CSF 단백질을 등전접속에 의해 분리하고 면역 반응성 아포리포단백질E를 가시화했다. 30㎕ CSF를 동일 체적의 클로로포름: 메탄올 2:1(v/v)으로 교반하여 뇌척수액(CSF) 단백질을 탈지질화하였다. 탈지질화된 CSF를 수직 슬랩겔장치(Biorad Minigel)에서 Biorad 암폴리트(ampholyte) Ph 3-10으로 우레아, 폴리아클리아미드겔상에서 표준기술을 이용하여 등전접속하였다. 전기영동후 웨스턴 기술을 이용하여 단백질을 Immobilon P로 옮기고 상술한대로 검출하였다. 여러개의 아포리포단백질E의 아이소폼이 등전접속에 의해 검출되었다.

[실시예 4]

[알쯔하이머질환환자의 혈구에서 ApoE 타입4 아이소폼을 코딩하는 DNA의 검출]

아포리단백질E의 집단 군집연구는 가족성 알쯔하이머질환에 걸린 환자들로부터의 85 혈액샘플에 걸쳐서 수행되었으며, 여기서 알쯔하이머질환의 진단은 부검으로 증명되었다.

표준기술에 따라서 혈액샘플에서 게놈 DNA를 추출하였고 P. Wenham등, Lancet 337, 1158(1991)에서 기술된 프라이며 및 Techne HI-TEMP 96웰 플레이트를 이용하여 Stratagene SCS-96 또는 Techne MW-2 열사이클러에서 폴리머라제 연쇄반응으로 증폭시켰다. 폴리머라제 연쇄반응 프로토콜은 상기의 Wenham등, 그리고 J. Hixson 및 D. Vernier, J. Lipid Res. 31, 545 (1990)에서 기술된 것과 본질적으로 같았다.

각 증폭반응은 20ng 게놈 DNA, 각 프로이머 1.0pmol/㎕, 10% 디메틸술폭시드(Sigma), 200㎛ 각 dNTP(Pharmacia), 2.0μCi (알파-32p) dCTP (10mm 트리신중의 800 Ci/몰, NEN Research 제품) 0.05 유니트/㎕ Taq DNA 폴리머라제를 포함했으며 15㎕의 최종 체적의 1x배양완충액(Boehringer Mannheim)으로 공급되었다.

94℃에서 5분간 초기 변성후, 65℃에서 0.5분간 어닐링, 70℃에서 1.5분간 연장, 94℃에서 0.5분간 변성, 70℃에서 10분간 최종신장의 35 사이클이 수행되었다.

증폭후, 5 유니트의 HhaI(Pharmacia)을 각 웰에 직접 첨가하고, 37℃에서 적어도 3시간 플레이트를 배양하였다. 각 반응물 3㎕를 6% 비변성겔(0.4mm 두께 x 43cm길이)에 로딩하고 일정 전류(45 mA)하에서 1시간 동안 전기영동하였다. 전기영동후, 겔을 Whatman 3M 크로마토그래피 페이퍼로 옮기고, 건조시키고, Kodak XAR-5 필름을 이용하여 1시간동안 방사선 자동사진법에 적용시켰다.

하기의 표 1에 데이타를 나타냈다. 이 결과들은 혼하지 않은 타입4 아이소폼이 정상 집단과 비교했을때 알쯔하이머 질환과 매우 연관되어 있다는 것을 나타냈다. 일반 집단에서 아포리포단백질E의 이러한 타입4 아이소폼의 유전자 빈도는 16%인 반면에, 조사된 알쯔하이머 질환환자에서는 유전자 빈도가 51%였다.

[표 1]

정상 및 알쯔하이머 질환환자의 ApoE 아이소타입

아포리포단백질E 아이소타입(각 염색체)	환자 집단	
	알쯔하이머 질환	정 상
2/2	0%	1%
3/3	20.7%	60%
4/4	24.4%	3%
2/3	3.6%	12%
2/4	3.6%	2%
3/4	47.6%	23%

이러한 데이타는 아포리단백질E의 타입4 아이소폼을 코딩하는 DNA의 검출은 가족성 알쯔하이머 질환에 대한 예측 및 진단 시험으로서 유용하다는 것을 나타낸다.

[실시예 5]

[후-발현(late-onset) 가족성 및 산재성 알쯔하이머 질환과 ApoE4의 연관]

이 데이타는 후-발현 가족성 및 산재성 AD의 발병에 있어서 ApoE4 대립유전자(ApoE-e4)의 관여를 더욱 지지한다.

가계(families)

게놈 DNA 연구를 위한 혈액 샘플은 이전에 기술된 가계로부터 얻어졌다.

(J. Murrell et al., Science 254, 97-99 (1991); H. Karlinsky et al., Neurology 42, 1445-1453 (1992); P. St. George-Hyslop et al., Nature Genet. 2, 330-334 (1992); M. Pericak-Vance et al., Am. J. Hum. Genet. 48, 1034-1050 (1991); 및 P. St. George-Hyslop et al., Nature 347, 194-197 (1990)).

유력한 알쯔하이머 질환환자(AC)로서 진단된 모든 샘플채취된 사람들은 토론토 대학교의 신경퇴행성질환 센터, 듀크대학교의 조셉 앤드 캐쓰린 브라이언 알쯔하이머 질환 리서치 센처(ADRC) 기억장애클리닉, 또는 하바드 의과대학 및 매사추세츠 종합병원 신경과의 신경병 학자와 관련 진단팀에 의하여 조사되었다. 임상진단은 NINCDS-ADRDS 기준에 따라 행해 졌다(C. Mckhann 등, Neurology 34, 939-944 (1984)).

듀크 가계도는 주로 35 가계에서 평균연령 66.1±10.3 세의 후기-발현 AD 가계였다. 가계들중 셋은 초기-발현(M < 60세) AD 가계로서 분류될 수 있다. 한 가계는 APP717val-ile 돌연변이를 지니고 분리되고(A.

Goate 등, Nature 349, 704-706(1991)), 두번째는 APP717val-phe 돌연변이를 지니고 분리되고(J. Murrell 등, Science 254, 97-99 (1991)), 다른 가계는 최대 lod 스코어가 3.5인 염색체 14 마커에 연결되어 있다.(G. Schellenberg등, Science 258, 668-671 (1992) 및 P. St. George-Hyslop 등, Nature Genet 2, 330-334 (1992)). 토론토 가계도는 주로 초기-발현가계로서 분류되었다(17 가계들중 13). 가계들중 다섯은 각 가계에서 3.0보다 더 큰 lod 스코어를 갖는 염색체 14에 연결되었고(P.H. St. George-Hyslop 등, Nature Genet 2, 330-334 (1992)), 여섯번째 가계도는 APP17 val-ile 돌연변이를 지니고 있었다(H. Karlinsky 등, Neurology 42, 1445-1453(1992)). 가계 및 유전형 데이타는 PEDIGENE™ 시스템(C. Haynes 등, Genet. Epidemiol. 3, 235-239 (1986))을 통해서 처리되었다.

듀크, 토론토, 및 보스톤에서 유력한 AD의 산재성 사례로서 진단된 일부 환자의 게놈 DNA가 지난 6년간 축적되어 왔다. 산재성 AD 환자는 AD 또는 치매의 알려진 가계 경력이 없는 환자들로서 정의되었다. 브라이언 ADRC 기억장애 클리닉에서 1992년 8월 시작된 진행중인 예상계열을 제외하고, 유력한 산재성 AD 환자는 1992년 11월까지 토론토 및 듀크뱅크에서 축적된 DNA의 모든것을 나타냈다.

이 사람들의 DNA는 ApoE 아이소타이핑에서의 어떤 관심 이전에는 임의로 수집되었다. 이 클리닉에서 평가된 산재성 AD 환자 모두가 일상적으로 나열되지 않았다. 이 그룹의 가능성 있는 AD의 진단은 대부분의 전문화된 AD 클리닉에서 관찰되는 80-90% 정확도를 갖는 것으로 기대할수 있다. 듀크의 캐쓰린 브라이언 브레인 뱅크, 토론토 대학교 및 하바드 의과대학에서 축적된 부검-확인된, 백인 AD사례로부터 브레인 DNA가 얻어졌다. 6명의 흑인 또는 아메리칸 인디언 부검은 일련의 산재성 AD 부검에서 제거되었는데, 그것은 어소시에이션 분석이 콘트롤 그룹에 민감하기 때문이다. 두 콘트롤 세트가 연구에 이용되었다. 첫번째 세트는 Centre d´ Etude du Polymorphisme Humain(CEPH) 참조 가계들로부터의 91 미연관 조부모들이었다(J. Dausett등, Gemomics 6, 575-577 (1990)). 이 가계들은 인간 유전자 매핑을 위해 수집되었고, DNA 매핑에 이용할수 있는 조부모, 부모, 많은 손자 손녀들을 갖는 것을 특징으로 한다. 조부모는 후기-발현 FAD 가계 및 부검-확인된 산재성 AD 집단과 유사하게, 유럽 및 미국 백그라운드의 백인의 연령에 따른 콘트롤의 임의의 그룹을 나타낸다. 또한 유력한 AD환자와 배우자의 진행성 예상분석에 참여한 환자의 백인배우자도 콘트롤 그룹으로서 사용되었다.

[게놈 DNA]

공지된 기술(M. Pericak-Vance 등, Neurology 36, 1418-1423 (1986) 및 M. Pericak-Vance 등, Exp. Neurol 102, 271-279(1988))에 따라서 또는 GENEPURE 341™ 헥산 추출기의 공급된 프로토콜(Applied Biosystems)에 따라서, 형질전환된 림프아구로부터 고분자량 DNA를 얻었다. 브레인 조직에서의 게놈 DNA는 대략 300㎎의 동결된 브레인 조직을 액체질소하에서 분쇄하고, 4㎖의 용해완충액(Applied Biosystems)및 1㎎의 프로틴아제 K(Applied Biosystems)을 첨가하고, GENEPURE 341™상에서 추출하기 전에 37℃에서 하룻밤 동안 천천히 진동시켜서 단리하였다.

ApoE의 증폭 및 제한 아이소타이핑

P. Wenham등, Lancet 337, 1158-1159 (1991)에서 기술된 프라이머 및 HI-TEMP 96-웰 플레이트(Techne)를 이용하여 Techne MW-2 열 사이클러에서의 폴리머라제 연쇄반응(PCR)에 의해 게놈 DNA를 증폭시켰다. PCR 프로토콜은 Wenham등 및 J. Hixson등, J. Lipid Res. 31, 545-548(1990)에서 기술된 것에 기초하였다.

각 증폭반응은 20 ng 게놈 DNA, 각 프라이머 1.0pmol/㎕, 10% 디메틸술폭시드(Sigma) 200㎛ 각 dNTP(Pharmacia), 1.0 μCi(알파-32P) dCTP (10mM 트리신중의 800 Ci/mol, NEN Research 제품), 0.05 유니트/㎕ Taq DNA 폴리머라제를 포함하였고, 최종체적 15㎕의 1x완충액(Boehringer Mannheim)으로 공급되었다. 5분간 94℃에서의 초기 변성후, 65℃에서 0.5분간 어닐링, 70℃에서 1.5분간 연장, 94℃에서 0.5분간 변성, 70℃에서 10분간 최종 연장의 35사이클이 수행되었다. 증폭후, 각 웰에 5유니트의 Hhal(Gibco)를 직접 첨가하고, 37℃에서 플레이트를 적어도 3시간 배양하였다.

각 웰에 2x타입 III 스톱 염료(J. Sambrook 등, Cold Spring Harbor Laboratory Press B. 24 (1989) 15㎕를 첨가하고, 각 반응물 3㎕ 6% 비변성 폴리아크릴아미드겔(0.4 mm두께x43cm 길이)에 로딩하고, 일정 전휴(45mA)하에서 1시간동안 전기영동하였다. 전기 영동후 겔을 Whatman 3M 크로마토그래피 페이퍼로 옮기고, 건조시키고, 코닥 XAR-5 필름을 이용하여 1시간동안 방사선 자동사진법에 적용시켰다. 각 방사선 사진을 두명의 다른 관찰자가 독립적으로 계측했다.

[통계분석]

대립유전자를 계수하고 샘플비율을 계산하여 콘트롤 및 AD 그룹의 대립유전자 빈도를 평가하였다. 각 가계로부터 임의로 선택한 환자를 이용하여 초기- 및 후기- 발현 FAD 가계에 대한 대립유전자 빈도 평가를 계산했다. 두 비율을 비교하기 위한 Z 통계량이 계산되었다(R. Elston 및 W. Johnson, Essentials of Biostatistics, (1987) 그리고 G. Schellenberg 등, J. Neurogenet. 4, 97-108(1987)). 표준 정상 분포의 확률과 비교한 Z의 극한 값은 두 그룹의 대립유전자 빈도가 동일하다는 귀무가설(null hypothesis)을 거부하는 것을 제안하였다. 다른 집단, 즉 AD 대 콘트롤에서 그리고 콘트롤 그룹사이에서 ApoE 대립유전자 빈도를 비교하기 위해서, 하기의 비교를 행하였다: 1)CEPH 콘트롤 대 배우자 콘트롤; 2) CEPH 콘트롤 대 문헌 콘트롤; 3) CEPH 콘트롤 대 후기- 발현; 4) CEPH 콘트롤 대 초기- 발현; 5) CEPH 콘트롤 대 임상적(유력한) 산재성 AD; 및 6) CEPH 콘트롤 대 부검- 확인된 산재성 AD. ApoE에 대한 환자- 가계- 일원(APM)연관 분석은 공지된 기술에 따라 행해졌다(M. Pericak-Vance 등, Am, J. Hum. Genet. 48, 1034-1050(1991) 및 D. Weeks 등, Am. J. Hum. Genet. 42, 315-326(1988)). 2 포인트 lod 스코어는 컴퓨터 프로그램 LINKAGE™ 프로그램패키지(Version 5.0)를 이용하여 계산되었다(G. Lanthrop등, Am. J. Hum. Genet. 36, 460-465(1984) 및 G. Lanthrop 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3443-3446(1984)). lod 스코어 계산에 사용된 발현연령 및 질환 파라미터는 이전에 개략된 것과 같았다(상기의 M. Pericak-Vance 등).

결과

표 2는 3 콘트롤 집단에서 ApoE e4 대립유전자 빈도평가를 나타낸다: 1)CEPH 참조 가계의 91 조부모; 2)

연속되는 산재성, 가능성있는 AD 환자를 조사하는 진행성 예상연구로 부터의 21 배우자, 및 3) 문헌의 유사한 집단으로부터의 대표적인 콘트롤 계열(G. Lanthrop등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3443-3446(1984)). 또한 몇가지의 다른 알쯔하이머 질환 그룹에 대한 ApoE e4 대립유전자 빈도 평가도 기술되었다: 1) 조합된 듀크 및 토론토/보스톤 후기-발현 FAD 계열에서 임의로 선택한 환자; 2) 조합된 토론토/보스톤 및 듀크 초기-발현 FAD 가계에서 임의로 선택한 환자; 3) 듀크 및 토론토/보스톤 클리닉에서 유력한 AD 진단을 나타낸 산재성 환자의 축적된 DNA 샘플; 및 4) 듀크 및 토론토/보스톤의 176 부검-확인된 산재성 AD 환자의 DNA.

상기의 실시예1-4와 일치하게 우세하게 후기-발현인 FAD 가계에서 임의로 선택된 환자의 ApoE e4 대립유전자 빈도는 CEPH 콘트롤과 상당히 달랐다: 0.50±0.06 대 0.16±0.027 (대립유전자 빈도 평가± 표준오차, Z=2.44, P=0.014). 마찬가지로 여기서 주어진 조합된 듀크 및 토론토/보스톤 후기-발현 FAD 계열은 CEPH 콘트롤과 상당히 다르다(P=0.000017). 토론토/보스톤 및 듀크의 조합된 초기- 발현 FAD 계열의 ApoE-e4빈도(0.19±0.069)는 CEPH 콘트롤의 빈도와 크게 다르지 않았다(P=0.069). 통계분석은 CEPH 콘트롤과 비교했을때 산재성(유력한) AD (P=0.00031)및 부검- 확인된 산재성 AD (P < 0.00001)에서 ApoE-e4 대립유전자 빈도의 매우 큰 차이를 나타낸다.

[표 2]

ApoE-e4 대립유전자 빈도 평가

집단	e4 대립유전자[1]	Z[2]	P 값
정상콘트롤			
CEPH[3] (182)	0.16±0.027		
배우자[4] (42)	0.10±0.046	0.59	0.56
Menzel[5] (2000)	0.14±0.008	0.71	0.48
알쯔하이머 질환(AD)			
LOAD[6] (72)	0.42±0.058	4.30	0.000017
EOAD[7] (32)	0.19±0.069	0.40	0.069
임상산재성			
AD[8] (138)	0.36±0.042	4.17	0.00031
부검산재성			
AD[9] (352)	0.40±0.026	6.49	<0.00001

1 대립유전자 빈도평가 ± 표준오차; 계수된 염색체의 수가 괄호안에서 주어진다.

2 Z값은 CEPH 콘트롤 그룹에 대한 것이다.

3 Centre D′ Etude du Polymorphism Humain(CEPH)의 91 미연관 조부모들.

4 듀크 대학교 브라이언 ADRC 기억장애 클리닉의 배우자 콘트롤.

5 H. Menzel등, Apolipoprotein E polymorphism and Coronary Artery Disease, Arteriosc-lerosis 3, 310-315 (1983)의 집단.

6 "LOAD"는 후기발현 AD를 의미한다; 32 듀크 및 4 토론토/보스톤 후기-발현 FAD 가계 각각에서 임의로 선택한 환자.

7 "EOAD는 초기발현 AD를 의미한다; 13 토론토/보스톤 및 3듀크 초기- 발현 FAD 가계 각각에서 임의로 선택한 환자.

8 39 듀크 및 30 토론토/보스톤 산재성(유력한) AD환자.

9 143 듀크 및 33 토론토/보스톤 부검-확인된 산재성 AD환자.

[실시예 6]

검시 조직의 아포리단백질E 타입과 아밀로이드 베타-펩티드 침착의 연관

본 실시예에서는 ApoE-e4 대립유전자를 갖는 AD 브레인이 별개의 패턴의 아밀로이드 침착을 가지는 지의 여부를 결정하기 위해서, 알려진 ApoE 유전형의 산재성 후기-발현 AD를 갖는 환자의 일련의 브레인을 조사하였다. ApoE-e4에 대해 동형인 환자의 브레인은 ApoE e3 동형접합체와 비교했을때 증가된 혈관내 아밀로이드 침착 및 아밀로이드와 산경돌기 반점의 수와 밀도를 포함하는 것으로 밝혀졌다.

면역조직화학적 연구에서 하나 또는 둘의 ApoE-e4 대립유전자를 갖는 환자들에서 β-펩티드가 상당히 증가되었다. 연구된 3가지의 주요 ApoE 유전형(e3/3, e3/4, 및 e4/4)은 성별, 발현연령 또는 질환의 지속시간에 있어서 통계학적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 하나 또는 둘의 ApoE-e4 대립유전자와 연관된 후기- 발현 Ad 사례는 ApoE-e3 대립유전자에 대해 동형인 사례와 비교했을때 별개의 신경병리학적 표현형을 가진다.

[사례 선택]

NIH 및 CERAD 기준(C. McKhann 등, Neurology 34, 939-944 (1984) 및 S. Mirra 등, Neurology 41, 479-486(1991))을 충족시키고 질환에 걸린 가계 일원 또는 다른 신경병 질환없는 후- 발현 알쯔하이머질환(AD)의 143 부검- 확인된 사례는 듀크 대학교의 캐쓰린 브라이언 브레인 뱅크를 통해서 얻었고 ApoE 유전형에 대해 분석했다. 이 사례들은 1985년과 1992년 사이에 축적되었다. 이 143 사례의 평균 사망연령은 77.2±8.9세였고, 평균질환지속시간은 8.6±4.2년이었고, 환자중 63%가 여자였다.

[ApoE 유전형 결정]

각 사례로부터 대략 300㎎의 동결 브레인 조직에서 DNA를 분리하여 게놈 DNA를 얻었다. 각 환자의 ApoE 프라이머의 폴리머라제 연쇄반응에 의한 증폭 및 HhaI 제한 아이소타이핑 및 방사선 자동사진법에 의한 검출을 이용하여 상술한 대로 수행하였다. ApoE 유전형 결정은 다음과 같다: 47 사례 ApoE e3/3, 64 사례 ApoE e3/4, 23 사례 ApoE e4/4, 3 사례 ApoE e2/3 및 6 사례 ApoE e2/4.

[신경병리학적 분석]

사망연령, 질환지속시간, 성, 브레인중량, 대뇌혈관내 아밀로이드 침착의 존재(콩고레드 염색이용) 그리고 신경돌기반점밀도 및 신경섬유엉킴의 양의 기술(변형된 킹 은염색 [B. Lloyd 등, J. Histotech 8, 155-156(1985])에 대한 정보는 본래의 신경병리학적 레포트로부터 취해졌다. 신경돌기반점카운트는 100사례에서 그리고 신경섬유엉킴카운트는 95사례에서 언급되었다. 각 카운트는 그 부위의 단면에서 가장 영향을 받은 영역으로 느낀 단일의 현미경 필드를 나타냈다. 반점은 10x대물렌즈(필드 2.91㎟)로 카운팅된 반면에 엉킴은 20x대물렌즈(필드 0.72㎟)로 카운팅되었다. 반점 카운트는 10x필드당 100으로 절단되었다. 이 데이타 모드 ApoE 유전형 분석 1 내지 5년전에 환자의료기록속에 기록되었다.

[혈관내 아밀로이드에 대한 콩고레드염색물질의 분석]

이미 존재하는 콩고레드 염색된 슬라이드를 갖는 사례들을 날짜순으로 선별함으로써 53환자들의 서브세트를 선택했다. ApoE 유전형 e4/4의 17 환자(23 전체 환자중에서); ApoE 유전형 e3/3의 20 환자(49 전체환자중에서); ApoE 유전형 e3/4의 16 환자(65 전체환자 중에서)가 선택되었을때 선별이 종결되었다. 53 부검 레포트중 40은 특히 혈관내 아밀로이드를 언급했고 유전형 결정전에 완결된 한 세트의 되는대로의 관찰을 행하였다. 혈관내 아밀로이드의 존재는 3단계로 등급을 매겼다: 명백한 아밀로이드 짐착이 없음(등급 0), 하나의 양성 혈관을 포함하는 미량의 아밀로이드 침착(등급1), 및 용이하게 식별할수 있는 혈관내 아밀로이드(등급2),.부가적으로 모든 53 사례의 전뇌피질과 해마회의 콩고레드 염색된 슬라이드를 동일한 등급표시 시스템을 이용하여 혈관내 아미로이드에 대해서 3명의 관찰자가 조사하였다. 이러한 관찰을 독립적으로 분석했고, 8.5%의 평균 인터-레이트(inter-rate) 일치로 이중맹검법으로 분석했다.

[면역조직화학적 방법]

ApoE e4/4의 7사례, ApoE e3/3의 8사례, ApoE e3/4의 4사례에 대해서 해마회 부위, 전두엽 및 두정엽의 파라핀블록을 얻었다. 사례의 선별은 신경병리학적 레포트의 정보없이 임의로 행해졌다. 6-8미크론 파라핀 단편을 절단하고 면역조직화학을 위한 피복된 슬라이드에 올려놓았다. 단편을 탈파라핀화하고, 3 분간 90% 포름산으로 처리하고, 세척한 다음 아밀로이드 β-펩티드의 면역집중화(immunolocalization)를 위한 모노클로날 항체와 배양하였다(Drs. George Glenner 및 David Allsop의 선물, S. Ikeda등, Prog. Clin. Biol. Res. 317, 313-323 (1989) 에서 기술된 항체).

ABC 방법(Vectorstain, Burlingame, CA)을 이용하여 동일한 항체 희석 및 효소검출단계로 단편들을 일치하게 반응시키고, 탈수후 Permount 상에 커버글래스를 위치시켰다. 절반- 인접한 단편들(포름산으로 처리되지 않음)을 이용하여, 웨스턴 블롯에서 ApoE2, ApoE3 및 ApoE4 아이소폼을 인식하는 인간 ApoE에 대한 폴리클로날항체(희석 1:20,000)(Baylor College of Medicine, Dr. Joel Morrisett의 선물)를 이용하여 ApoE에 대해서, 그리고 164 Kd-신경섬유단백질에 대한 모노클로날 항체(희석 1:1000)(SMI-34, Sternberger-Meyer Immunocytochemicals, Inc)로 신경돌기반점을 증명하였다. 이 실험에서는 대응되는 콘트롤을 염색하지 않았다.

[면역조직화학적물질의 분석]

각 단편에서 최대 반점밀도의 부위를 선별하고, 160 동일 그리드로 나누어진 0.25㎟의 일정 직사각형위에 카메라 루시다를 이용하여 반점 윤곽을 그려서 그래프 분석을 행하였다. 면역 반응성 반점 모두 또는 일부를 포함하는 어떤 그리드 박스를 카운팅하였고, 전체를 실제의 유전형으로 나누었다. 인터- 레이트 신뢰도는 이 방법으로 85%이고, 동일 단편에서의 별개의 필드사이의 분산은 15%이다. 대표적인 필드를 자이스(Zeiss) 현미경 사진기로 사진촬영하였다.

[통계 분석]

변수사이의 관계를 사용되는 스태트그래픽스(Statgraphics)패키지 및 분산의 분석에 데이타를 적용시켰다. 143 사례의 주요세트, 53사례의 서브세트, 또는 사망연령, 성비 또는 브레인 중량에 관한 콩고레드 또는 면역조직화학적 분석을 위해 선택한 ApoE e3/3, e3/4 및 e4/4 유전형의 상기의 더 작은 서브세트 사이에서 큰 차이가 존재하지 않았다. 반점 및 신경섬유엉킴 카운트의 비교를 위해서, 관찰이 정상분포에 맞지 않았기 때문에 크루스칼-월리스 원-웨이(Kruskal-Wallis one-way) 분석을 이용하였다.

[ApoE e3 또는 e4 대해 동형인 산재성 AD 환자의 브레인에서 β-펩티드 아밀로이드 침착의 면역집중화]

산재성 후기-발현 AD 를 갖는 환자 브레인의 β-펩티드에 대한 면역조직화학은 ApoE e3/3 및 ApoE e4/4 사례로부터의 뇌 피질의 면역염색된 단편 사이에서 일관된 차이를 나타냈다(데이타는 나타내지 않음). ApoE e3/3 사례의 단편에서 β-펩티드 면역반응성은 최소 내지 거의 없는 혈관 염색 및 희미하게 면역반응하는 반점을 나타내지만 ApoE e4/4 사례의 단편은 뇌표면상의 충부한 면역반응성혈관 및 실질조직의 강하게 면역반응하는 반점과 혈관으로 짙게 염색된다. 이 차이는 전형적으로는 ApoE e4/4 브레인의 β-펩티드 면역 염색된 단편이 현미경없이 ApoE e3/3 브레인의 단편과 구별될수 있는 크기이다.

[ApoE e3 또는 e4 대해 동형인 AD 환자의 브레인에서 ApoE의 면역집중화]

ApoE 면역반응성은 이전의 논문에서 기술된 것처럼(J. Diedrich등, J. Virol. 65, 4759-4768 (1991); 및 Y. Namba 등, Brain Res. 541, 163-166(1991)) 뇌혈관, 뉴론, 신경교질세포, 노인성반점 및 신경섬유 엉킨것에서 관찰되었다. β-펩티드 면역반응성과 유사하게 ApoE 면역반응성은 포름산 처리후에 강화된다. ApoE e4/4와 비교했을때 ApoE e3/3 사례에서는 ApoE 면역반응성의 강도 또는 집중화에 큰 차이가 없었다(ApoE에 대한 이 폴리클로날 항혈청은 ApoE3 및 ApoE4 아이소폼을 검출한다.). 특히, 대부분의 다소 큰 뇌혈관은 ApoE e4/4 사례에서 그리고 ApoE e3/3 사례에서 ApoE 면역 반응성이 있었다.

[e3/3, e4/4 및 e3/4 ApoE 유전형에서 혈관내 아밀로이드의 정도-부검보고서의 회고분석(retrospective analysis)]

53사례중 40에서, 콩고레드염색에 의해 검출되는 혈관내 아밀로이드의 존재 또는 부재의 부검보고서에서 명백하게 기술되었다. 혈관내 아밀로이드 침착량에 대한 이 부검보고서의 회고 등급결정은 ApoE e4 대립유전자의 수와 혈관내 아미로이드의 상당한 연관을 나타냈다(P < .0001). 전형적으로는 ApoE e3/3 사례에 대해서는 어떤 혈관내 아밀로이드도 언급되지 않았고, e3/4 사례에 대해서는 미량의 혈관내 아밀로이드, 그리고 대부분의 e4/4 사례에서는 다량이 관찰되었다(표 3.A.1 하기).

[콩고레드 염색물질의 예기분석(prosspective analysis)]

53 사례의 전체계열에서 혈관내 아미로이드중의 정도를 예기조사하기 위하여 해마회 및 전두피질의 콩고레드 염색된 단편의 이중맹검법을 수행하였다. 이러한 분석은 53 사례에서 ApoE e4 대립유전자의 양과 콩고레드 양성 아밀로이드 혈관장애의 존재 사이의 매우 중요한 연관을 확인시켰다(표 3.A.1). 그러한 아미로이드중 혈관은 ApoE e4/4 동형접합체에서 주어진 대뇌피질 부위에 걸쳐서 반드시 존재하지는 않았지만, 종종 해마회 열구같은 뇌구의 깊은곳에서 우세하였다.

[β-펩티드 면역반응성 혈관의 분석]

53환자의 계열 서브세트의 단편이 β-펩티드에 대해 면역반응하고 유사하게 평가하였을 때, 혈관내 아밀로이드의 양과 ApoE e4 대립유전자의 양 사이의 동일한 통계학적으로 중요한 연관이 발견되었다(표 3.C.1). ApoE e4 동형접합체의 아미로이드중 혈관은 주위의 반점- 같은 아밀로이드 축적과 함께 피질플레이트에서 대소혈관들 및 연뇌막혈관을 포함하였다(숄쯔의 반점- 같은 혈관장애[W. Scholze, Z. Gesamte Meurol. Psych. 162, 694-715 (1938)]).

[신경돌기 반점수는 ApoE e3 동형접합체와 비교했을때 ApoE e4 동형접합체에서 증가한다]

5 피질부위중4 에서, 은 염색된 물질에서 신경돌기 반점의 평균수는 ApoE e3 동형접합체에서 보다 ApoE e4 동형접합체에서 더 컸다.(표 1.A.2). 크루스칼-월리스 원- 웨이 분석은 증가된 평균 신경돌기 반점 카운트가 3부위; 전두, 측두 및 두정피질에서 ApoE e4 대립유전자 양과 중요하게 연관되었다는 것을 나타냈고, 연관이 해마회의 CA1 서브필드의 중요성과 가깝다는 것을 나타냈다. 신경돌기반점 카운트는 질환지속시간과 관련되지 않았다.

[신경섬유엉킴 카운트는 ApoE e3 동형접합체와 비교했을때 ApoE e4에서 약간 증가한다.]

상기에서 주어진 피질부위 다섯모두에서 신경섬유 엉킴의 평균수는 ApoE e3 동형접합체와 비교했을때 ApoE-e4 동형접합체에서 더 컸다(표 3.A.3).

다섯부위 모두 ApoE e3/3 사례와 비교했을때 ApoE e4/4 사례에서 평균 신경섬유엉킴 카운트가 증가할 기회는 3%이다(비모스 쌍 샘플테스트). 각 영역에 대한 평균 카운트의 차이는 크지않고 크루스칼-월리스 테스트에 의해서는 중요하지 않다. 그러나 각 피질부위의 평균신경섬유엉킴카운트는 환자의 전 세트에서 그리고 ApoE 유전형 서브세트에서 질환지속시간에 따라 크게 변한다(P < .01). ApoE-e4 동형접합체에서 평균신경섬유엉킴 카운트의 증가는 명백하게 ApoE-e4와 연관된 질환지속시간의 위쪽으로의 경향에 의해 설명된다.

[산재성 AD 사례에서 아밀로이드 침착의 면역조직화학적 분석]

산재성 AD를 갖는 ApoE-e3 동형접합체와 비교하여 ApoE-e4 동형접합체에서 나타난 아밀로이드 침착의 큰 증가는 혈관내 아밀로이드 침착 및 노인성 반점에서의 침착을 포함한다. 이러한 차이를 정성적으로 및 정량적으로 확인하기 위해서, ApoE-e4에 대해 동형인 7환자의 세트를 ApoE-e3에 대해 동형인 8환자의 세트와 비교하였다. 또한 가능한 ApoE양 효과를 결정하기 위해서 4 이형접합체(ApoE-e3/4)를 조사하였다. 뇌피질의 저배율 관찰은 e4 동형접합체와 비교하여 ApoE e3 동형접합체의 β-펩티드 면역반응된 피질 단편에서 관찰된 전체 β-펩티드 면역반응성의 전형적인 차이를 나타낸다(데이타는 나타나지 않음). 이러한 차이는 주어진 피질부위의 β-펩티드 면역염색된 단편을 최대밀도의 면역반응성 반점을 갖는 현미경 필드에 대해서 조사할때 조차 일관되게 발견된다.

ApoE e4/4 사례의 반점은 ApoE e3/3 사례에서 관찰되는 것보다 더 수가 많았고, 다수 더 흔하게 혈관을 포함하고 더 짙은 색이었다.

[반점의 β-펩티드 면역반응성의 정량분석]

산재성 AD의 15 사례의 전두피질 단편을 β-펩티드 집중화를 위해서 면역반응시켰으며, 정량분석은 각 사례의 β-펩티드 면역반응성 반점의 최대 밀도를 포함하는 현미경 필드로 이루어졌다(표 3.B.2) ApoE e3/3 동형접합체와 비교하여 ApoE e4/4 동형접합체에서 강하게 β-펩티드 면역반응하는 반점이 차지하는 평균 면덕이 매우 크고, 7-배 더 컸다(P < .002). ApoE e3/4 사례는 중간정도이다.

몇가지의 ApoE e3/3 사례에서는 또한 약하게 면역반응하는 반점이 존재하였고 그것의 수는 ApoE e4/4 사례에서 보다 매우 더 컸다(P=.04). 그럼에도 불구하고, ApoE e3/3 동형접합체와 비교하여 ApoE e4/4 동형접합체에서 모든 β-펩티드 면연반응성 반점이 차지하는 평균전체 면적이 두배 더 컸다(P < .008)(표

3.B.2).

[표 3]

산재성 AD 를 갖는 환자의 신경병리학적 및 면역화학적 특성

유전형	e3/3	e3/4	e4/4
사망연령:(yr)	76.4	79.1	75.8 NS
질환지속시간:(yr)	7.7	8.5	9.0 p=.06
A.부검보고서의 데이타			
1.콩고필릭 아밀로이드 혈관장애: 평균등급(0= 없음, 1=미량, 2=있음)			
보고서에 의해:	0.27	0.80	1.92 p<.0001
재검토에 의해:	0.40	1.16	1.76 p<.0001
	n = 20	n = 16	n = 17
2.신경돌기반점: 저배율필드 w/10x 대물렌즈(2.92 ㎟) 당 평균반점			
전두피질	59	81	87 p<.0003
측두피질	62	77	87 p<.009
두정피질	61	68	86 p<.007
내강피질	27	30	25 p=.69
해마회(CA1)	12	13	18 p=.13
	n = 30	n = 48	n = 22
3.신경섬유엉킴: 고배율필드 w/20x 대물렌즈(0.72 ㎟) 당 평균수			
전두피질	6	7	8 p=.34
측두피질	7	9	13 p=.16
두정피질	7	10	8 p=.15
내강피질	31	35	42 p=.22
해마회(CA1)	26	37	48 p=.07
	n = 28	n = 46	n = 21
B.면역세포화학적 연구			
1. β- 펩티드 면역반응성 혈관: 평균등급(0= 없음, 1=미량, 2=있음)			
	0.50	0.50	2.00 p<.0001
	n = 8	n = 4	n = 7
2. β- 펩티드 면역반응성 반점: % 차지하는 면적			
강한 면역반응성	4.5	9.4	31.7 p<.002
약한 면역반응성	12.9	4.0	6.1 p=.04
전체 반점	17.4	13.4	37.8 p<.008
	n = 8	n = 4	n = 7

[신경돌기 반점의 크기]

상기 사례중 8사례로부터 전두 피질의 부가적인 절반-인접한 단편을 ApoE-e3과 ApoE-e4 동형접합체 사이에서 신경돌기반점 밀도가 달라지는지를 시험하기 위해서 신경 섬유단백질(SMI-34)에 대한 항체로 면역염색하였다. SMI-34 면역반응성은 신경돌기와 신경섬유엉킴을 갖는 뉴론을 나타낸다. 신경돌기의 함량에 의해 신경돌기 반점을 식별 할수 있다.

신경돌기반점(SMI-34 면역반응성에 의해 정의됨) 이 차지하는 전체면적 및 수가 아밀로이드 반점(β-펩티드 면역반응성에 의해 정의됨)에 대한 것보다 더 작지만(데이타는 나타내지 않음), 절반-인접한 단편의 반점 면적 측정의 비교는 이 8사례에서 반점 검출의 두 방법의 중요한 선형의 관계를 보여준다($P < .006$, $r = 0.73$). 또한 신경돌기반점이 차지한 면적은 ApoE-e3 동영접합체에서 보다 ApoE-e4 동형접합체에서 상당히 더 크다($P < .02$).

[실시예 7]

[ApoE4 유전자 양과 알쯔하이머질환의 위험의 관계]

본 실시예는 후기 발현 AD 가계의 ApoE4 대립유전자에 의하여 제공되는 AD의 위험증가 및 더 빠른 발현 연령을 정량화한다. ApoE4 대립유전자의 수가 증가함에 따라서 위험이 20%에서 90%까지 증가했고, 평균 발현 연령이 84세에서 68세로 감소하였다. 이러한 데이타는 ApoE4 유전자 양이 후기발현 AD의 주요위험인자이며, ApoE4에 대한 동형 접합체가 80세경에 AD를 야기하는데 거의 충분하다는 것을 나타낸다.

지금까지 시험된 46 가계중 넷은 초기 발현가계이다; 둘은 염색체 21 APP 돌연변이를 가지고 둘은 염색체

14와 연관되어 있다. 이 가계들에서는 ApoE4의 빈도가 상승되지 않았다. 알려진 ApoE 유전형을 가지고, AD로 진단되거나 또는 60세 이후 질환에 걸리지 않은 것으로 조사되고 밝혀진 42 후기발현가계들의 일원을 평가하였다. 우리의 연구에 등록하기 전에, 각 환자로부터 고지에 의한 동의 또는 필요할때는 그들의 법적 후견인을 구하였다. 모든 연구 프로토콜을 듀크대학교 메디칼센터 제도 검열 위원회에 의해 승인되었다. 질환에 걸린 환자 및 걸리지 않은 환자의 기술통계는 표 4에서 주어진다. 평균적으로, 질환에 걸리든(P=0.02), 또는 걸리지 않든(P=0.13) 여성이 남성보다 더 오래 생존하였다.

표 4에 있어서 임상적으로 진단된 사례중 90% 이상이 부검으로 확인되었다. 가계일원이 부검- 확인된 AD의 진단을 가질때에는 임상조사의 예상값은 거의 100%이다. AD 진단을 갖는 4환자와 60세 이전에 조사된 30 환자는 분석으로부터 제외하였다. 후기발현가계는 사전에 초기발현 AD 와 연관된 부위의 19% 제조합내에서 염색체 21 또는 염색체 14와 연관되지 않았다. AD와 ApoE에 대한 어림잡는 최대 투-포인트(two-point) LOD 스코어는 6% 재조합에서 2.61이었다.

[표 4]

질환에 걸린 환자 및 걸리지 않은 환자의 기술 통계

질환에 걸린 환자(n = 95)			
	발현 연령		
	n	평균	(SD)
남 성	34	71.8	(8.4)
여 성	61	70.4	(8.0)
질환에 걸리지 않은 환자 (n = 139)			
	사망 연령		
	n	평균	(SD)
남 성	62	77.7	(8.0)
여 성	77	82.6	(9.2)

질환에 걸린 사람의 비율은 유전형 2/3 또는 3/3을 갖는 환자의 20%에서 유전형 2/4 또는 3/4을 갖는 환자의 47%까지, 그리고 4/4 유전형을 갖는 환자의 91%까지 ApoE4 대립유전자의 수에 따라 증가했다(표 5). 이러한 부가적인 경향은 매우 큰 의미가 있다(카이-스퀘어=33.4 1df, P < 0.00001)(G. Koch등, Analysis of Categorical Data (Les Presses de L´ Universite de Montreal, Montreal, 1985) 및 SAS Insitute, Inc., SAS/STAT User´ s Guide, Release 6.03 Edition (SAS Institute, Cary NC, 1988)). 남성보다 더 많은 여성들이 질환에 걸렸다(P=0.04). 이것은 아마도 여성이 AD에 대한 위험이 더 클것이라는 것을 제안한다.

[표 5]

각 ApoE 유전형에 대한 % 질환에 걸린 환자

ApoE 유전형	% 질환에 걸린 남성(n)	% 질환에 걸린 여성(n)
2/2	… (0)	… (0)
2/3	28.6(7)	11.1(9)
3/3	7.1(28)	28.6(49)
2/4	50.0(2)	0.0(3)
3/4	38.3(47)	54.5(66)
4/4	91.7(12)	90.9(11)

표 6에서 보여지는 것처럼, 각 부가적인 ApoE4 대립유전자에 대해서 AD의 위험이 2.84 인수만큼 증가하였다(95% 신뢰구간(CI) 2.03 내지 3.96)(D.R. Cox 등, Analysis of Survival Data (Chapman 및 Hall, London, 1984) 및 L. Wei 등, JASA 84, 1065 (1989)). 따라서 4/4 유전형을 갖는 환자는 2/3 또는 3/3 유전형을 갖는 환자보다 8배정도 더 질환에 잘 걸리는 것 같았다. 0,1, 및 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에 대해서 별도의 평가를 행하였을때, 여성이 남성보다 더 위험이 높다는 일관된 증거가 되었다(통계학적 중요성에 도달하지는 못하였다). 남성에 대한 여성의 위험은 0,1, 및 2 ApoE4 유전자양에서 각각 1.33 (95% CI 0.42 내지 4.26), 1.39 (95% CI 0.76 내지 2.55), alc 1.30 (95% CI 0.50 내지 3.38)이었다.

[표 6]

ApoE4 대립유전자의 수에 따른 질환에 걸린 환자의 퍼센트 및 상대위험도(Relative Hazard)

ApoE4	남 성		여 성		조 합		위험도
유전자 양	% Aff	(n)	% Aff	(n)	% Aff	(n)	비 율
0	11.4	(35)	25.9	(58)	20.4	(93)	1.00
1	38.8	(49)	52.2	(69)	46.6	(118)	2.84+
2	91.7	(12)	90.9	(11)	91.3	(23)	8.07+

표 6에서 위험의 평가는 위험도를 남성과 여성이 다르도록 하는 Cox 비례위험도모델(proportional hazard model)에서 얻은 파라미터 평가의 누승법에 의하여 유도되었다(SAS Insitute, Inc., Analysis of Survival Data (Chapman and Hall, London, 1984), 및 SAS Insititute, Inc., SAS Technical Report P-217, SAS/STAT 소프트웨어: The PHREG Procedure, Version 6 (SAS Institute, Inc., Cary NC, 1991)). 기호 '+' 는 위험도가 참고값1과 상당히 다르다는 것을 나타낸다. 2 ApoE-e4 대립유전자를 갖는 거의 모든 사람의 75세경의 진단 이후에는 비례 위험도의 가정이 유지되지 않기 때문에 60 세와 75세 사이의 각 환자에 대한 정보를 이용하였다. 연관된 사람들을 평가할때조차 비례 위험도 모델로부터 완전히 효율적이지는 않지만 통계학적으로 일관된 상대 위험도의 평가가 얻어진다.(L. Wei 등, JASA 84, 1065 (1989)). 따라서 위험의 평가는 훨씬 더 큰 가계의 집합 각각으로부터 단지 한 사람을 샘플링함으로써 발견되는 평가에 밀접하게 가까워진다.

가계에 의해 층별화된 Mantel-Haenszel 상관통계((SAS Insitute, Inc., SAS/STAT USER′ S Guide Release 6.03 Editions(SAS Institute, Cary NC, 1988), 및 D.R. Cox 등, Analysis of Survival Data (Chapman 및 Hall, London, 1984))를 이용하여 ApoE4 유전자 양이 증가할때 위험이 증가하는 경향을 평가하였다. 질환에 걸린 환자의 비율은 ApoE4 유전자 양에 따라 크게 증가했다(카이-스퀘어 = 33.4, 1d.f., P < 0.00001).

다음에는 발현연령이 ApoE4 유전자 양에 연관되어 있는지를 결정하기 위해 발현연령을 조사하였다. 발현분포는 질환에 걸린 환자의 발현연령 및 질환에 걸리지 않은 환자의 마지막 조사시 연령에 대한 정보로부터 만들어졌고 각 유전자 양에게 별개였다(카이-스퀘어 = 53.84, 2 d.f, P < 0.00001)(R.G Miller Jr., Survival Analysis(Whiley, New York, 1981), 및 SAS Institute, Inc., SAS User′ s Guide: Statistics, Version 5 Edition (SAS Institute, Cary NC, 1985)(제3도). 각 부가적인 ApoE4 대립유전자는 발현을 더 젊은 나이로 이동시켰다; 평균 발현은 1 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 84.3(SE 1.3)세이고, 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 68.4(1.2)세였다. 발현은 남성보다 여성에서 더 빠른 경향이 있었다 (P=0.04).

유사하게, 생존분포는 질환상태에 관계없이, 사망한 것으로 알려진 환자의 사망연령 및 기타 환자의 마지막 조사시 연령에 대한 정보로부터 만들어졌다. ApoE4 유전자 양은 생존과 연관되었다(P=0.004); 평균 생존은 0 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 84.9(SE 1.3)세이고, 1 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 78.8 (SE 0.8)세이고, 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 78.1 (SE 1.4)세였다. 1 또는 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 사람의 더 빠른 사망은 이 환자들에게 AD가 더 흔하고 더 빨리 발현되는 것에 주로 기인하였다(P=0.001).

1 또는 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자의 더 짧은 생존에도 불구하고, 각 ApoE4 대립유전자에 의해 제공되는 더 빠른 발현은 대부분의 AD 진단과 대부분의 발현사례가 1 또는 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에 존재한다는 것을 의심하게 한다.

평균 발현과 평균생존 사이의 차이는 2 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 9.7년이고, 1 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 3.1년, 0 ApoE4 대립유전자를 갖는 환자에서 0.6년 이었다.

ApoE 유전자좌 가까이의 마커와 AD의 연관에 대한 종전의 보고는 ApoE4와 AD의 대립유전자적 연관으로부터 야기될수 있다. 이러한 마커가 ApoE와 불균형 상태에 있는것 같지는 않지만, 그것의 분리는 적어도 하나의 ApoE4 대립유전자를 분리하는 가계에서 연관을 흉내낼수 있다(D.A Greenberg, Am. J. Hum. Genet. 52, 135-143 (1993)). ApoE 유전자좌와 AD의 연관에 대한 강하지만 결정적이지는 않은 증거(2 = 2.61, 0=0.06)가 또한 이러한 설명을 지지한다.

우리의 가계도 집단에서 95 질환에 걸린 환자중 19 그리고 Saunders 등(R.G. Miller Jr., Survival Analysis(Wiley, New York, 1981))에 의해 기술된 176 부검 확인된 산지성 AD 사례중 64가 ApoE4 대립유전자를 갖고 있지 않은 것을 깨닫는 것이 중요하다. 42 후기 발현가계중 12 에는 0 ApoE4 대립유전자를 갖는 질환에 걸린 일원이 속해있다. 이것이 연관에 대해 잠재적으로 가장 유익한 가계들, 시뮬레이션 연구에 기초하고 있다는 사실은 위험의 다른 유전적 요인이 존재한다는 것을 강하게 나타낸다. ApoE4 대립유전자의 효과가 이후의 분석에서 포함되기만 하면 이러한 다른 유전자들이 확인될 것이다.

상기의 실시예들은 본발명을 예시하고, 그것을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본발명은 하기의

청구범위에 의해 정의되고, 청구범위의 등가물도 그 안에 포함된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

환자의 알쯔하이머 질환을 진단하거나 또는 예측하는 방법에 있어서, 아포리포단백질E 타입4(ApoE4) 아이소폼의 존재는 상기의 환자가 알쯔하이머 질환에 걸리거나 또는 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것을 나타내고, 상기의 방법은 상기 환자에서 ApoE4의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기의 환자로부터 DNA를 함유하는 생물학적 샘플을 수거하고, 그 다음엔 상기의 생물학적 샘플에서 ApoE4를 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4를 코딩하는 DNA를 증폭시킴으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭단계는 폴리머라제 연쇄반응에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기의 증폭단계는 리가제 연쇄반응에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 검출단계는 상기의 환자로부터 ApoE 샘플을 수거하고, 그 다음 상기의 ApoE 샘플에서 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 결정단계는 등전접속에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 결정단계는 면역분석에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체로의 면역분석에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기의 환자가 사전에 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것으로 결정된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기의 환자가 ApoE4를 코딩하는 유전자에 대해 동형인지의 여부를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

사전에 알쯔하이머 질환에 걸린 것으로 진단하지 않은 환자에서 알쯔하이머 질환을 예측하는 방법에 있어서, 아포리포단백질E 타입4 (ApoE4) 아이소폼의 존재는 상기 환자가 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것을 나타내고, 상기의 방법은 상기 환자에서 ApoE4의 존재 부재를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기 환자로부터 DNA를 함유하는 생물학적 샘플을 수거하고, 그 다음 상기의 생물학적 샘플에서 ApoE4를 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 결정함으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4를 코딩하는 DNA를 증폭시킴으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기의 증폭단계는 폴리머라제 연쇄반응에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기의 증폭단계는 리가제 연쇄반응에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액샘플을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기 환자로부터 ApoE 샘플을 수거하고, 그 다음 상기 ApoE 샘플에서 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기의 결정단계는 등전 집속에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기의 결정단계는 면역분석에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체로의 면역분석에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기의 ApoE 샘플이 혈액샘플을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제12항에 있어서, 상기의 환자가 사전에 알쯔하이머 질환이 발병할 위험이 있는 것으로 결정된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제12항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기의 환자가 ApoE 타입 4 아이소폼을 코딩하는 유전자에 대해 동형인지의 여부를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

치매에 걸린 환자를 알쯔하이머 질환에 대해 스크리닝하는 방법에 있어서, 아포리포단백질E 타입4(ApoE4) 아이소폼의 존재는 상기 환자가 알쯔하이머 질환에 걸린 것을 나타내고, 상기의 방법은 상기 환자에서 ApoE4의 존재를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기의 환자로부터 DNA를 함유하는 생물학적 샘플을 수거하고, 그 다음 상기의 생물학적 샘플에서 ApoE4를 코딩하는 DNA의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법. .

청구항 27

제26항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4를 코딩하는 DNA를 증폭시킴으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기의 증폭단계는 폴리머라제 연쇄반응에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기의 증폭단계는 리가제 연쇄반응에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기 환자로부터 ApoE 샘플을 수거하고, 그 다음 상기의 ApoE 샘플에서 ApoE4 아이소폼의 존재 또는 부재를 결정함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기의 결정단계는 등전접속에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기의 결정단계는 면역분석에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기의 결정단계는 ApoE4 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체로의 면역분석에 의하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기의 환자가 사전에 알쯔하이머 질환에 걸린 것으로 진단되지 않은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제25항에 있어서, 상기의 검출단계는 상기 환자가 ApoE 타입 4 아이소폼을 코딩하는 유전자에 대해서 동형인지의 여부를 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

아포리포단백질E 아이소폼-특이적인 항체에서, 이 항체는 (ⅰ) 아포리포단백질E 타입(ApoE2) 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체; (ⅱ) 아포리포단백질E 타입3(ApoE3) 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체; 및 (ⅲ) 아포리포단백질E 타입4 (ApoE4) 아이소폼에 선택적으로 결합하는 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기의 항체가 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기의 항체는 ApoE4 아이소폼에 선택적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 39

제36항에 있어서, 고체 지지체에 컨쥬게이트되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 40

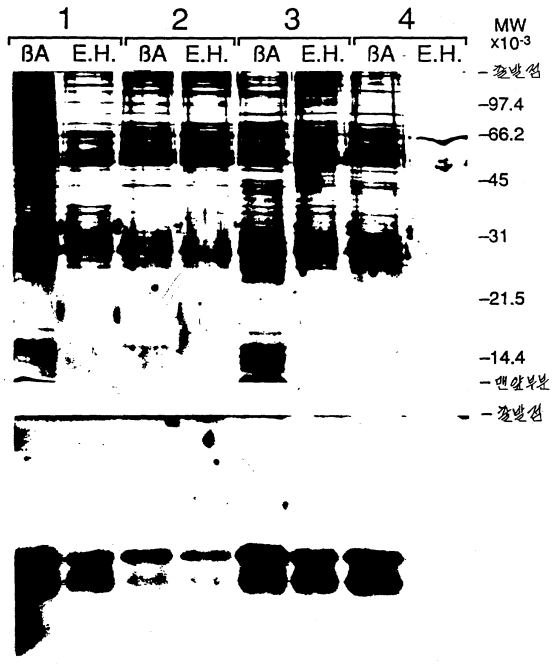
제36항에 있어서, 검출가능한 기에 컨쥬게이트되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 41

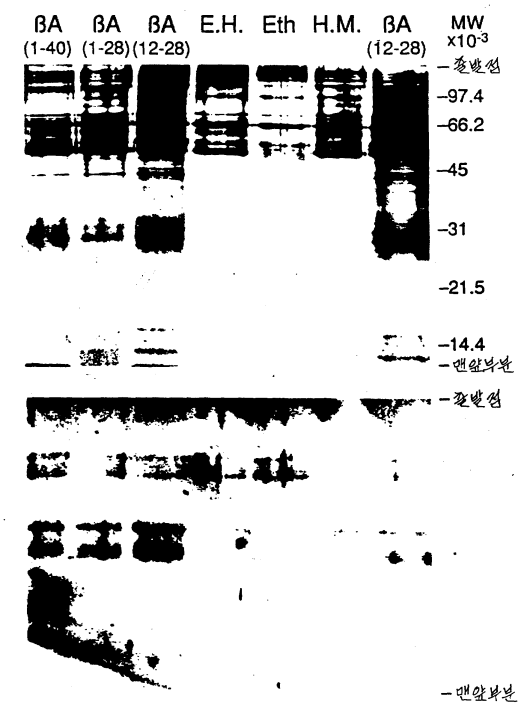
환자가 알쯔하이머 질환에 걸리거나 또는 발병할 위험이 있는지를 확인하는 방법에서, 이 방법은 상기 환자의 샘플에서 ApoE4의 존재 또는 부재를 검출하고 상기 검출의 결과를 알쯔하이머 질환 또는 그것의 증가된 위험을 나타내는 ApoE4의 존재와 연관시키는 것을 포함하고, 선택적으로 상기의 결정은 상기 환자가 ApoE4를 코딩하는 유전자에 대해서 동형인지의 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

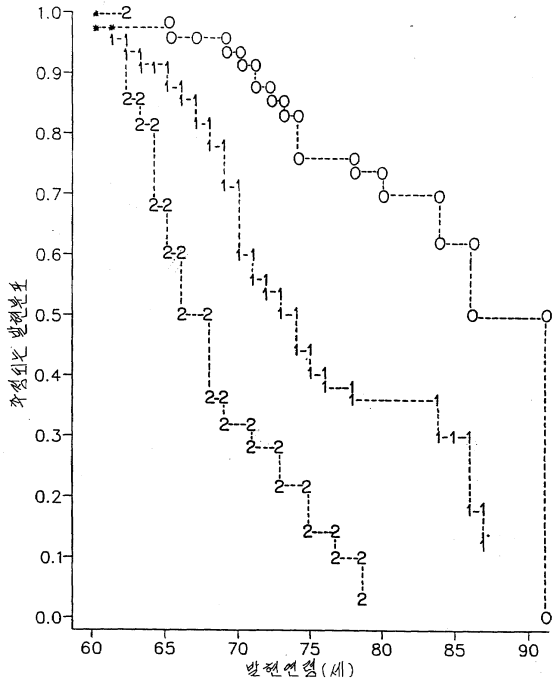
도면1



도면2


βA (1-40)
βA (1-28)
βA (12-28)
E.H.
Eth
H.M.
βA (12-28)
MW x10-3
-중합체
-97.4
-66.2
-45
-31
-21.5
-14.4
-맨앞부분
-중합체
-맨앞부분

도면3


1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
60
65
70
75
80
85
90
발현연령(세)