



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047371
(43) 공개일자 2020년05월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0132027
(22) 출원일자 2019년10월23일
심사청구일자 2019년10월23일
- (30) 우선권주장
1020180127909 2018년10월25일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
목인회
서울특별시 용산구 한강대로30길 25
황대회
경기도 수원시 장안구 화산로 85
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박원미

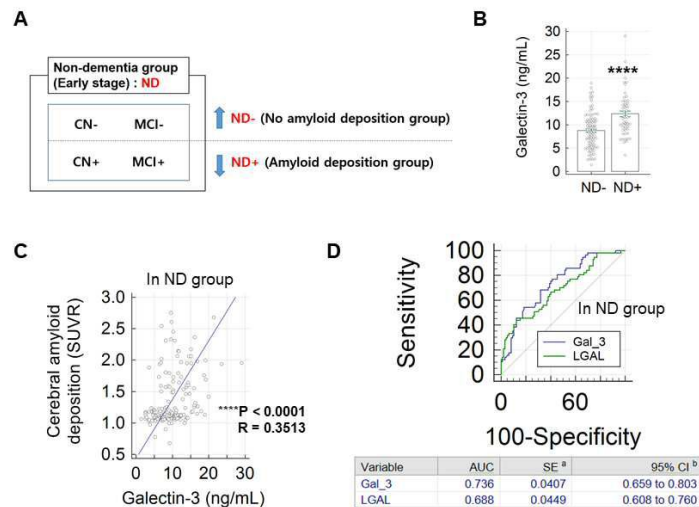
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 인지기능 정상군 또는 경도 인지장애에서 아밀로이드 베타의 뇌 침착 검출용 혈액 바이오 마커

(57) 요약

본원은 혈액 검사를 통해 뇌 아밀로이드 베타 축적 및 이와 관련된 질환의 조기 진단이 가능한 바이오마커를 개시한다. 본원에 따른 마커는 혈액을 이용하여 임상 증상이 나타나기 전의 인지장애 정상군 및 경도 인지장애군의 뇌의 아밀로이드 베타 축적을 검출할 수 있어 이와 관련된 질환의 조기 진단 등에 편리하고 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

이상원

서울특별시 성북구 고려대로17가길 64

한선호

서울 특별시 강남구 선릉로 222

박종찬

서울특별시 강동구 성내로6가길 29

명세서

청구범위

청구항 1

혈액에서 바이오마커 검출을 통한 뇌의 아밀로이드 베타 축적 검출용 조성물로, 상기 조성물은 바이오마커로서 Galectin-3의 검출용 물질을 포함하고, 상기 혈액은 인지기능 정상군 또는 경도인지 장애군 유래인, 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 Galectin-3는 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 증가하는 것인, 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 바이오마커는 ACE(angiotensin converting enzyme), LGALS3BP, 및 ApoE 중 하나 이상의 마커를 추가로 포함하는 것인, 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부 검출용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 바이오마커는 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비를 추가로 포함하며, 상기 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비는 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 감소하는 것인, 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부 검출용 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뇌 아밀로이드 베타 축적은 뇌 아밀로이드 베타 축적과 관련된 질환의 조기 진단, 또는 PIB(Pittsburgh compound B)-PET(positron emission tomography) 검사가 필요한 지 여부의 판단에 사용되며,

상기 뇌 아밀로이드 베타 축적 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병 치매, 루이소체치매, 헌팅톤병 치매, 또는 전임상 알츠하이머병, 다운 신드롬, 또는 인지장애를 포함하는 것인, 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부 검출용 조성물.

청구항 6

뇌 아밀로이드 베타 축적 여부의 검출이 필요한 검사 대상자 유래의 혈액 샘플을 제공하는 단계로, 상기 검사 대상자는 인지기능 정상군 또는 경도인지 장애군이고;

상기 혈액 샘플에서 Galectin-3 바이오마커를 정량하는 단계; 및

상기 정량된 마커의 양을 상기 대상자의 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부와 연관시키는 단계를 포함하는, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 연관시키는 단계는 대조군에서 결정된 정량 결과와 비교하여, 상기 Galectin-3 마커의 양의 증가한 경우, 상기 혈액이 유래된 대상자는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 마커는 LGALS3BP, ACE(Angiotensin Converting Enzyme) 또는 ApoE 중 하나 이상을 추가로 포함하며,

상기 연관시키는 단계는 상기 LGALS3BP 농도는 감소, 상기 ACE(Angiotensin Converting Enzyme) 농도는 증가, 상기 ApoE 중 ApoE 4인자가 존재하는 경우, 상기 혈액이 유래된 대상자는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 바이오마커는 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비를 추가로 포함하며,

상기 연관시키는 단계는, 대조군에서 결정된 정량 결과와 비교하여, 상기 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비가 감소한 경우, 상기 혈액이 유래된 대상자는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적된 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 혈장 아밀로이드 베타는 MPP(Mixture of protease and phosphatase)로 처리된 것인, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본원은 혈액 검사를 이용하여 인지기능 정상군과 경도인지장애 대상체 뇌의 베타아밀로이드 축적 예측 또는 이와 관련된 질환의 조기 진단과 관련된 것이다.

배경 기술

[0003]

뇌의 베타아밀로이드가 축적되어 발생하는 대표적 질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)은, 치매 중 가장 일반적인 형태로서, 대표적인 신경 퇴행성 질환이다. 80세 이상 노인의 20% 이상이 알츠하이머병의 영향을 받고 있을 것으로 추정되며, 고령화 사회가 될수록 그 수가 급격히 증가하고 있다. 알츠하이머병은, 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein: APP)이 β , γ -시크리테아제에 의해 순차적으로 절단되어 생성되는 β -아밀로이드($A\beta$ peptide)가 뇌조직에 침착되는 노인반(senile plaque)과 미세소관 연관 단백질인 타우(Tau) 단백질의 과인산화로 인한 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle: NTF)가 주된 병리학적 특징이다. 알츠하이머병 환자의 뇌조직에서 일어나는 변화는, 환경 및 다양한 병인학적인 요인들에 의한 것으로서, 아직까지 뚜렷

한 진단 방법과 치료 요법이 없다.

- [0004] 현재, 가장 일반적인 AD 진단 방법으로는, MRI(Magnetic resonance Imaging), PET(positron emission tomography) 등의 이미지 방법이나, 미니-인지 상태 검사(Mini mental state examination: MMSE), 문진 등의 간접적인 방법이 사용되고 있으나, MMSE를 통한 진단은 나이, 학력 등에 의해 그 결과가 달라지므로, 진단의 정확성이 문제가 되고 있다. AD 환자의 뇌 조직에서 노인반 및 신경섬유 덩어리 두 가지 병변을 확인하는 방법도 사용되고 있으나, 병을 진단하거나 진행 정도를 확실하게 파악할 수 있는 방법은 알려져 있지 않다.
- [0005] AD 진단을 위한 생화학적 진단 표지자를 찾기 위한 연구는 중요한 연구 분야로서 혈액, 뇌척수액 등의 체액을 포함한 다양한 조직에서 이루어지고 있다. 뇌척수액(cerebrospinal fluid: CSF)은, 뇌의 세포 외부 부분과 직접 접촉하는 부위로, 뇌의 단백질 변화를 반영하고 있으며, 정상 노인에 비해 알츠하이머병 환자의 CSF에서 A β 42 농도의 감소, 전체 타우와 자가인산화 타우의 증가 등이 보고되고 있다. 그러나, 대부분의 AD 환자가 65세 이상의 고령임을 고려하면, 뇌척수액을 얻기 위한 요부천공(lumbar puncture)의 경우, 상당한 위험을 동반한다.
- [0006] 알츠하이머성 치매의 원인물질이며 질병의 진행에 따라 뇌에 축적되는 아밀로이드 베타에 대해 특이적으로 결합하는 물질로 최근 개발된 Pittsburgh compound B (PiB)는 알츠하이머성 치매의 진단에 유용한 물질이다. PIB를 투여한 후 PET 영상을 찍음으로써 뇌의 아밀로이드 베타의 축적 정도를 측정하고 이를 알츠하이머성 치매의 진단에 효율적으로 이용할 수 있기 때문이다. 하지만 이 진단 방법은 고가의 비용과 장비의 제한성 때문에 보편적인 알츠하이머성 치매의 진단 방법으로 사용하기에 한계가 있다.
- [0007] 이와 비교하여 채취의 상대적인 용이성, 검사의 경제성, 시간절약 등을 고려하면, 혈액 진단 표지자는 많은 장점이 있다. 혈액 진단 표지자는 알츠하이머병 진행에 따른 뇌의 기능적 병리적 변화를 잘 반영할 수 있어야 하는 반면 알츠하이머병 진행에 따른 다양한 뇌 단백질들의 변화가 항상 혈액내에서 감지되지는 않아 진단 표지자 발굴의 어려움을 겪고 있다. 또한 대개의 알츠하이머병의 진행에 따라 증감되는 뇌 단백질이 뇌척수액이나 혈액 내에서는 반대의 증감 경향성을 보이고 있는 것이 일반화된 현상이다. 예를 들면, 알츠하이머병의 진행에 따라 뇌 아밀로이드베타42(A β 42)는 증가하는 반면 뇌척수액 아밀로이드베타42는 감소하고, 트랜스 사이레틴은 뇌에서는 증가, 반면 혈액에서 감소함으로 알려져있다(Scheuner et al., Nature Medicine 2, 864-870 (1996); Galasko et al., Arch Neurol 55(7):937-45 (1998); Li et al., Journal of Neuroscience 31(35):12483-12490 (2011); 및 Han et al., Journal of Alzheimer disease 25(1)77-84 (2011)).
- [0008] 대한민국 공개특허공보 제2012-0041823호는 알츠하이머병 조기진단용 단백질성 마커에 관한 것으로 ATP synthase subunit beta 및 adenosine kinase(Isoform Long) 및 regucalcin을 이용한 알츠하이머병 조기 진단용 마커를 개시한다.
- [0009] 대한민국 공개특허 제2010-0049363호는 비타민 D 결합 단백질을 이용한 알츠하이머병의 진단장치 및 진단방법에 관한 것으로 비타민 D 결합 단백질과 결합하는 항체를 이용한 진단방법 및 장치에 대하여 개시한다.
- [0010] 대한민국 공개특허 제2014-0042331호는 인지장애 질환 진단용 다중 마커 및 그 용도에 관한 것으로 인지장애 질환 진단 마커로서 트랜스사이레틴(Transthyretin), ApoE, 알파-사이뉴클레인(α -synuclein), 비타민 D 결합 단백질, 뉴로그래닌(neurogranin), 비멘틴(vimentin), 스테쓰민(stathmin), 컨택틴(contactin), 및 HDL-콜레스테롤을 개시하고 있다.
- [0011] 하지만 알츠하이머병이 조기 진단이 어렵고, 병증이 계속 진행되면 사회적 비용이 많이 요구되는 정상 생활이 어려운 심각한 질환임을 고려하면, 혈액과 같은 간편한 시료를 통해 알츠하이머병의 조기 진단, 특히 증상이 나타나기 전인 전임상(preclinical)단계에서도 진단할 수 있는 새로운 마커 개발의 필요성이 있다.
- [0012] 최근 활발한 연구에 의해 다양한 알츠하이머성 치매 진단의 혈액 바이오 마커 후보물질들이 발굴되고 있으나 각각의 바이오 마커는 민감도와 정확성에 있어서 요구 기준을 충족시키지 못하고 있는 현실이다.

[0013]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 한 양태에서 본원은 혈액 샘플을 이용하여 뇌의 베타 아밀로이드 축적 예측 또는 이와 관련된 질환을 조기 진단할 수 있는 바이오 마커를 개발하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 한 양태에서 본원은 Galectin-3의 혈액에서 바이오마커, 그 검출을 통한 뇌의 아밀로이드 베타 축적 검출, 특히 비치매군에 속하는 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군에서 뇌의 아밀로이드 베타 축적 검출 및 이와 관련된 질환의 조기진단 등의 용도를 제공한다.
- [0017] 일 구현예에서 혈액에서 Galectin-3 바이오마커 검출을 통한 뇌의 아밀로이드 베타 축적 검출용 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 Galectin-3의 검출용 물질을 포함하고, 상기 혈액은 특히 인지기능 정상군 또는 경도인지 장애군 유래이다.
- [0018] 본원에 따른 바이오마커 Galectin-3의 농도는 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 증가한다.
- [0019] 본원에 따른 바이오마커는 추가로 ACE(angiotensin converting enzyme), LGALS3BP, 및 ApoE 중 하나 이상의 마커를 포함하며, 이와 조합으로 사용될 수 있다.
- [0020] 본원에 따른 바이오마커는 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비를 추가로 포함하며, 상기 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비는 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 감소한다.
- [0021] 다른 구현예에서 본원에 따른 마커는 상기 뇌 아밀로이드 베타 축적은 뇌 아밀로이드 베타 축적과 관련된 질환의 조기 진단, 또는 PIB (Pittsburgh compound B)-PET (positron emission tomography) 검사가 필요한 지 여부의 판단으로 사용되며, 상기 뇌 아밀로이드 베타 축적 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병 치매, 루이소체치매, 헌팅톤병 치매, 또는 전임상 알츠하이머병, 다운 신드롬, 또는 인지장애를 포함한다.
- [0022] 다른 구현예에서 본원은 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부의 검출이 필요한 검사 대상자 유래의 혈액 샘플을 제공하는 단계로, 상기 검사 대상자는 인지기능 정상군 또는 경도인지 장애군이고; 상기 혈액 샘플에서 Galectin-3 바이오마커를 정량하는 단계; 및 상기 정량된 마커의 양을 상기 대상자의 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부와 연관시키는 단계를 포함하는, 혈액에서 뇌 아밀로이드 베타 축적 검출 방법을 제공한다.
- [0023] 본원에 따른 방법에서 상기 연관시키는 단계는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적되지 않은 대조군에서 결정된 정량 결과와 비교하여, 상기 Galectin-3마커의 양의 증가한 경우, 상기 혈액이 유래된 대상자는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적된 것으로 판단하는 단계를 포함한다.
- [0024] 본원에 따른 방법에서 추가의 마커로 LGALS3BP, ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 또는 ApoE 중 하나 이상을 포함하며, 뇌 아밀로이드 베타 축적은 상기 LGALS3BP 혈중 농도는 감소, 상기 ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 혈중 농도는 증가, 상기 ApoE 중 ApoE 4인자의 존재 여부로 판단한다.
- [0025] 본원에 따른 방법에서 추가의 마커로 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비를 포함하며, 상기 연관시키는 단계는, 대조군에서 결정된 정량 결과와 비교하여, 상기 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비가 감소한 경우, 상기 혈액이 유래된 대상자는 뇌에 아밀로이드 베타가 축적된 것으로 판단한다.

발명의 효과

- [0027] 본원에 따른 혈중 Galectin-3의 마커는 혈액에서 알츠하이머성 치매의 병인 물질로 알려진 뇌 아밀로이드 베타의 축적 및 이들을 이용하여 증상이 나타나기 전 알츠하이머성 치매의 조기 진단이 가능하다. 혈액 검사를 통한 검출로서 비용 및 편리성 측면에서 기존의 방법과 비교하여 월등한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 정상군과 경도인지장애군(비치매군)에서 혈중 galectin-3 농도와 뇌 속 베타-아밀로이드 농도와의 유의한 상관관계를 나타낸 결과이다, 도 1A는 본원의 실험에 사용된 그룹의 특징을 나타낸 것으로 인지기능 정상군(CN)과 경도인지장애(MCI)군을 포함하는 비치매군(ND)에서 아밀로이드 베타의 뇌 축적이 있는 군을 ND+, 축적이

없는 군을 ND-로 나타냈다. 도 1B는 각 ND-, ND+군의 환자 혈장에서 ELISA로 galectin-3를 정량한 값을 분석한 결과이다. ND+ 에서 ND- 대비 Galectin-3의 유의한 농도 증가(****p < 0.0001)를 나타낸다. (unpaired t-test). 도 1C에서는 partial correlation analysis를 통해 혈장 galectin-3농도와 뇌 아밀로이드 축적 정도가 유의한 상관관계가 있음을 확인한 결과이다(p<0.0001, r=0.3513). 도 1D는 바이오마커의 특이성 및 민감성을 분석하는 ROC 커브 분석을 통해 기존 마커(LGALS3BP) 대비 Galectin-3의 AUC 값이 0.688에서 0.736로 유의하게 증가하여, Galectin-3가 기존 마커 대비 특이성 및 민감도에서 우수함을 나타낸다.

도 2는 혈중 베타-아밀로이드 농도비 대비 galectin-3 농도 추가시의 ROC 커브 유의성 변화를 나타낸 것이다.

도 3은 기존 바이오마커 조합(LGALS3BP, ACE) 대비 Galectin-3를 추가 하였을 때 AUC 값이 0.792에서 0.856으로 향상되는 것을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 실험결과를 요약해서 도식적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본원은 Galectin-3의 혈중농도가 뇌의 아밀로이드 베타 침착과 긴밀한 연관성이 있음을 밝히고, 이를 이와 관련된 질환의 조기 진단 및 뇌 아밀로이드 베타 축적 여부 판단에 대한 혈중 바이오 마커로 이용할 수 있다는 발견에 근거한 것이다.
- [0031] 이에 한 양태에서 본원은 혈액에서 뇌의 아밀로이드 베타 침착, 특히 비치매 군으로 분류되는 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군에서 아밀로이드 베타 침착을 검출할 수 있는 Galectin-3 바이오마커 및 그 용도에 관한 것이다.
- [0032] 본원에 따른 바이오마커는 인비트로 또는 인비보에서 검출할 수 있는 검출용 물질을 포함하는 조성물, 키트의 형태, 또는 상기 마커 자체를 포함하는 조성물의 형태, 또는 상기 마커를 이용한 베타 아밀로이드 축적 검출 방법의 형태로 구현될 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서 본원은 혈액에서 Galectin-3 바이오마커 검출을 통한 뇌의 아밀로이드 베타 축적 검출용 조성물로, 상기 조성물은 상기 Galectin-3의 검출용 물질을 포함하고, 상기 혈액은 인지기능 정상군 또는 경도인지 장애군 유래이다.
- [0034] Galectin-3는 LGALS3 유전자에 의해 코딩되는 단백질로 예를 들면 인간 단백질의 UniProt ID는 P17931로 표시되는 단백질로 본원에서는 특히 비치매군으로 분류되는 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군에서 혈액 검사를 통해 이들의 뇌에 베타 아밀로이드가 축적되었는지 여부의 검출이 가능하며, 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 그 농도가 증가한다.
- [0035] 아밀로이드 베타는 알츠하이머성 치매(AD)의 원인 물질이며 질병의 진행에 따라 뇌에 축적되는 AD의 대표 병인 물질로 알려져있다. 이 물질에 대해 특이적으로 결합하는 화합물로 최근 개발된 Pittsburgh compound B (PIB)는 알츠하이머성 치매의 진단에 유용한 물질이다. PIB를 투여한 후 PET 영상을 찍음으로서 뇌의 아밀로이드 베타의 축적 정도를 측정하고 이를 알츠하이머성 치매 진단에 이용할 수 있기 때문이다. 하지만 이러한 진단 방법은 고가의 비용과 장비의 제한성 때문에 보편적인 알츠하이머성 치매의 진단 방법으로 사용하기에 한계가 있다.
- [0036] 뇌 아밀로이드 베타의 축적은 치매나 건망증 등의 임상적 증상이 나타나기 15~20년 전부터 시작되므로 임상적 증상이 없거나 또는 경미한 임상적 증상을 나타내는 환자의 혈액검사를 통해 뇌 아밀로이드 베타 축적여부를 확인할 수 있다면 알츠하이머 치매를 조기 진단할 수 있고 초기에 그 진행을 늦추거나 막을 수 있다. 따라서 뇌 아밀로이드 베타의 축적을 확인할 수 있는 본원에 따른 혈액 바이오마커는 그 중요성이 매우 크다.
- [0037] 또한 본원에 따른 마커를 이용한 뇌의 베타 아밀로이드 축적 검출은 또한 베타 아밀로이드가 축적되어 발생하는 질환의 진단에 또한 사용될 수 있다.
- [0038] 구체적으로, 뇌에 베타 아밀로이드가 축적되어 발생하는 다양한 질환이 알려져 있고(Head, E., and Lott, I. T. (2004) Down syndrome and beta-amyloid deposition. Curr Opin Neurol 17; Primavera et al., (1999) Brain Accumulation of Amyloid-beta in Non-Alzheimer Neurodegeneration. J Alzheimers Dis; Masliah et al., (2001) beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci), 따라서 본원에 따른 마커는 또한 뇌 아밀로이드 베타 축적과 관련된 다양한 질환의 진단, 검출 등에 사용될 수

있다.

- [0039] 일 구현예에서 이러한 뇌 아밀로이드 베타 축적과 관련된 질환은 예를 들면 알츠하이머병, 파킨슨병 치매, 루이 소체치매, 헌팅톤병 치매, 또는 전임상 알츠하이머병, 다운 신드롬, 또는 인지장애를 포함한다.
- [0040] 본원에서 “인지장애”는 신경 퇴행성 질환을 일컫는 것으로 예를 들면 알츠하이머(AD : Alzheimer Disease)성 치매, 파킨슨병 치매, 루이소체치매 또는 헌팅톤병 치매, 알츠하이머성 치매증상(ADD) 보유군, 치매로 진행되기 전단계인 약한 인지기능 장애, 즉 경도 인지장애(MCI : Mild Cognitive Impairment)를 포함하는 것으로, 이런 의미에서 치매 또는 비치매 환자군을 모두 포함할 수 있다. 이러한 인지장애의 중증도는 MMSE(Mini mental state examination, 2006_Benson et al., Journal of clinical Psychiatry, 2008_0' Bryant et al., Arch Neurol) 스코어 등과 같은 방법으로 분류될 수 있다.
- [0041] 본원에서 “치매”는 알츠하이머병, 파킨슨병 치매, 루이소체치매, 또는 헌팅톤병 치매를 포함한다.
- [0042] 본원에서 “비치매”는 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군을 포함한다.
- [0043] 본원에서 “인지기능 정상군”은 베타 아밀로이드 축적 여부와 관계없이, 상술한 MMSE 등의 검사를 통해 인지능이 정상으로 판별된 군을 의미한다. 인지능이 정상인 경우라도, 인지기능 저하 없고 뇌 아밀로이드 베타 축적이 있는 정상인을 포함한다. 베타 아밀로이드가 뇌에 축적이 되어 있는 경우에는 경도 인지장애를 거쳐 치매로 진행될 수 있기 때문에, 인지기능 정상군에서의 베타 아밀로이드 축적 여부를 판별하는 것은 치매의 조기 발견에 매우 중요하다.
- [0044] 본원에서 “경도인지 장애군”은 인지기능 저하가 있지만 일상생활이 가능한 치매의 전단계로서 뇌 아밀로이드 베타 축적이 없는 환자 또는 베타 축적이 있는 환자로서 인지기능 저하가 있지만 일상생활이 가능한 치매의 전단계를 포함한다. 베타 아밀로이드 축적 여부를 판별하는 것은 치매의 조기 발견에 매우 중요하다.
- [0045] 본원에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0046] 본원에서 조기 진단은 인지기능정상 및 경도인지장애, 또는 임상증상이 나타나기 전인 전임상(preclinical) 단계에서 진단하는 것을 포함한다.
- [0047] 또한 필요한 경우 기존에 뇌의 아밀로이드 베타의 혈액 마커와 병행 사용될 수 있고, 알츠하이머성 치매의 정확한 조기 진단 및 예방을 실행할 수 있다. 이러한 이미 발견된 또는 앞으로 발견될 바이오 마커 후보물질과 병용 사용할 수 있는 장점이 있어 그 활용도가 더욱 높아질 수 있다.
- [0048] 본원에 따른 조성물 또는 방법은 ACE(angiotensin converting enzyme), LGALS3BP, 및 ApoE 중 하나 이상의 마커를 추가로 포함한다. ACE 및 LGALS3BP는 각각 Uniprot ID Q08380 및 P12821로 단백질 및 핵산 서열, 세포내 프로세싱, 변형 등이 공지된 것으로, 당업자라면, 상기 마커의 검출에 필요한 서열 및 검출 방법을 용이하게 선택할 수 있을 것이다. 상기 마커는 대조군에서 결정된 정량 결과와 비교하여, 상기 LGALS3BP 혈중 농도는 감소, 상기 ACE 혈중 농도는 증가한 경우 뇌 아밀로이드 베타 축적된 것으로 판단한다.
- [0049] 또 다른 구현예에서 본원에 따른 조성물 또는 방법은 ApoE 마커의 사용을 추가로 포함할 수 있다. ApoE 유전자는 ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4의 세가지 유전자 타입이 있는데 ApoE 4를 가지고 있는 사람이 뇌의 아밀로이드 축적 및 AD에 걸릴 확률이 안 가지고 있는 사람에 비해서 매우 높은 리스크 인자이다. 본원에 따르면 ApoE 유전자형 마커를 본원에 따른 마커에 추가하여 사용하는 경우 특이성과 민감도가 향상될 수 있다. ApoE 유전자형의 검출은 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 당업자라면 적절한 것을 선택할 수 있을 것이며, 예를 들면 대립 유전자 특이적 프라이머를 이용한 PCR 방법이 사용될 수 있다.
- [0050] 또 다른 구현예에서 상기 바이오마커는 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비를 추가로 포함하며, 상기 혈중 베타-아밀로이드 1-42 또는 1-42/1-40의 비는 뇌 아밀로이드 베타가 축적된 인지기능 정상군 및 경도인지 장애군 유래의 혈액에서 감소한다.
- [0051] 본원에서 “아밀로이드 베타 플라크” 또는 “베타 아밀로이드 플라크”는 아밀로이드 베타를 포함하는 불용성 섬유성 단백질 응집체이며, 본원에서 A-베타로도 표기되며, 주성분은 A-베타40 또는 A-베타42 이다. 일 구현예에서는 상기 아밀로이드 플라크는 세포 내, 세포 표면에, 및/또는 세포 사이의 공간에 존재하는 것일 수 있다.

특히 신경조직의 세포 사이의 공간에 존재하는 것이며, 알츠하이머 치매 진단의 표지 물질로 사용되며, 플라크의 축적 정도에 따른 치매 진단은 개시된 바를 참고할 수 있다(Mawuenyega et al., Science, 2010.Querfurth and LaFerla, The New England journal of medicine). 문맥에 따른 아밀로이드 베타 플라크를 아밀로이드 베타로 칭할 수 있으며, 이는 당업자가 용이하게 판단할 수 있을 것이다.

- [0052] 본원에서 용어 “생물학적 시료 또는 검체”는 인체나 포유동물로부터 얻어지는 모든 고형 또는 액상의 시료, 예컨대, 특정 장기 유래의 조직, 오줌, 타액, 전혈, 혈소판, 혈장 또는 혈청 시료를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본원에 따른 마커는 특히 혈액 시료에서 검출된다. 혈액시료는 치매의 진단에 사용되는 뇌 척수액과 같은 시료와 비교하여, 매우 용이하게 얻을 수 있는 것으로, 비용의 절감은 물론 편리성이 매우 증대된다. 본원에 따른 마커가 사용되는 검체는 전혈, 혈소판, 혈장 또는 혈청 시료를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일 구현예에서는 혈장이 사용된다. 본원에 사용되는 검체는, 비교 분석을 위해, 진단 또는 검출이 필요한 검사 대상자의 검체는 물론, 정상 대조군, 특정 질환을 갖는 대조군 유래의 검체가 또한 사용될 수 있다.
- [0054] 본원에서 혈장 아밀로이드 베타는 혈장 전처리 조성물(MPP)은 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제를 혼합한 혼합물(Mixture of protease inhibitors and phosphatase inhibitors)로 처리된 것이다. 이에 대하여는 원 발명자가 출원한 대한민국 공개특허 제2016-0129444호에 상세하게 개시된 것을 참조할 수 있다.
- [0055] 본원에서 용어 “검출시약”은 본원에 따른 마커를 검출 또는 정량할 수 있는 시약으로, 예를 들면 본원의 마커를 단백질 및/또는 유전자 또는 mRNA와 같은 핵산수준에서 검출할 수 있는 물질이거나, 그 외의 경우, 본원 실시예에 기재된 것을 참조할 수 있다.
- [0056] 본원에서 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 하기 실시예를 포함한 본원의 기재를 고려하여 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 것 방법을 선택할 수 있을 것이다. 예를 들어 Galectin-3의 마커는 예를 들면 본원 실시예에 기재된 방법을 참고할 수 있다.
- [0057] 예를 들면 단백질 수준의 검출 방법 및 시약은 공지된 것으로서, 예를 들면 항원-항체반응, 상기 마커에 특이적으로 결합하는 기질, 상기 마커와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자와의 반응을 통해 검출될 수 있다. 상기 본원의 마커와 특이적으로 상호작용 또는 결합하는 시약 또는 물질은 칩 방식 또는 나노입자(nanoparticle)와 함께 사용될 수 있다. 일 구현예에서 항원-항체 반응을 효소 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선 면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 면역 측정법(sandwich ELISA), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴블랏, 면역 점 블랏 분석법(Immuno dot blotting assay), 면역형광측정법(Immuno-fluorescence Assay, IFA), 면역발광측정법(Immunochemiluminescence Assay), 면역 조직 화학 염색법 또는 면역크로마토그래피측정법(Immunochromatography, Rapid), 비드나 디스크를 이용한 항원항체 반응(X-MAP technology) 등을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0058] 본원의 일 구현예에 따르면 본원에 따른 조성물은 마커를 단백질 수준에서의 검출에 필요한 시약을 포함한다. 예를 들면 상기 단백질 수준에서 검출할 수 있는 시약은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 앵타머, 수용체, 리간드 또는 보조인자 등을 포함할 수 있다. 이러한 시약은 필요한 경우 나노입자 또는 칩에 통합하여 사용할 수 있다.
- [0059] 본원의 다른 구현예에 따르면 검출시약은 항체를 포함하며, 본원의 마커의 검출은 이에 특이적으로 결합하는 항체 분자를 이용하여 실시된다.
- [0060] 본원에 이용될 수 있는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0061] 따라서 다른 측면에서 본원은 상술한 바와 같은 본원에 따른 마커 또는 마커의 조합을 아밀로이드 베타 플라크

축적의 예측, 조기 진단, 또는 PiB-PET 영상 검사가 필요한지를 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들면 본원에 따른 마커를 이용한 혈액검사에서 뇌에 아밀로이드 베타가 축적되지 않은 것으로 판단된 경우는 PiB-PET 영상을 검사할 필요가 없고, 축적된 것으로 판단된 경우는 확진을 위해 PiB-PET 영상 검사를 할 수 있다.

[0062] 본원에 따르면 알츠하이머성 치매의 진단에 널리 사용되는 PiB-PET의 뇌영상 결과에 근거한 알츠하이머성 치매의 원인물질로 알려진 아밀로이드 베타 플라크 축적 결과와 본원에 따른 혈액 마커의 농도가 높은 연관성이 있는 것으로 나타났다. 즉 PiB-PET 양성 대상자에서는 PiB-PET 음성 대상자의 결과와 비교하여, 혈액에서 본원에 따른 마커 농도가 유의적으로 증가 또는 감소하는 것으로 나타났다. 즉 도 1을 참조하면, PiB-PET 양성자에서 본원에 따른 마커가 증가하였다. 이는 본원에 따른 마커가 뇌의 베타 아밀로이드 축적에 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0063] 본원의 방법은 마커 분석 결과에 추가하여, 환자의 비단백질 임상정보 즉, 마커이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 비단백질 임상정보란, 예를 들면 환자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환, 자기공명영상법(MRI), SPECT(single-photon emission computed tomography), 또는 MMSE(mini-mental status examination) 또는 양전자 방사 단층촬영(positron emission tomography; PET) 중 하나 이상을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0064] 본원 방법은 마커의 검출 결과를 뇌의 아밀로이드 베타 플라크 축적 또는 이와 관련된 질환의 진단 또는 예후와 연관시키는 단계를 포함하며, 일 구현예에 따르면 상기 연관시키는 단계는 결정된 각 마커의 양을 대조군과 비교한다.

[0065] 일 구현예에서 본원에서 대조군으로서 PIB-PET 결과에서 음성으로 판단된 사람의 혈액시료에서 결정된 수치를 포함하는 정상 대조군에서 결정된 상기 각 마커의 검출결과와 비교, 예를 들면 그 증감을 비교한 후, 이를 근거로 축적을 예측 또는 진단하는 것이다.

[0066] 예를 들면 대조군의 값과 비교하여 본원에 따른 마커가 유의하게 증가된 경우, 대상자에서 플라크의 축적 또는 상기 질환이 발생한 것으로 진단하는 정보를 제공할 수 있다.

[0067] 예를 들면 상기 연관시키는 단계는 PIB PET 결과에서 음성으로 판단된 사람 또는 정상 대조군의 혈액시료에서 결정된 수치를 포함하는 정량 결과와 비교하여, 농도가 증가한다.

[0068] 예를 들면 또한 한 개 이상의 마커를 동시에 사용하여(다중마커) 그 증감 등 변화의 정도를 한 개의 수치로 산출하였을 때 수치가 일정 기준 이상 또는 이하인 경우 뇌 아밀로이드 베타 축적을 예측할 수 있다.

[0069] 또한 본원 일 구현예에 따르면 상기 연관시키는 단계는 정상 대조군과 대상자의 시료를 비교한 후, 본원 마커에 대하여 플라크의 축적 예측 또는 질환의 발병여부를 진단할 수 있는 임계값을 설정한 후, 대상자의 검출 결과를 상기 임계값과 비교할 수 있다. 예를 들면 뇌 아밀로이드 베타 플라크의 축적 여부 즉 음성과 양성을 판별하는, 즉 PiB-PET 음성과 양성을 판별하는 마커의 임계값은 본원에 따른 결과를 메드 칼콜레이트 프로그램을 이용하여 ROC커브 분석에 의해 결정된 Youden index를 근거로 결정될 수 있다. 상기 임계값은 뇌에 아밀로이드 베타 플라크 축적 양성을 나타내는 것으로, PiB-PET 검사 대상자 선별, 뇌 아밀로이드 베타 플라크 축적 또는 이와 관련된 질환의 진단 등에 사용될 수 있다.

[0070] PIB-PET 검사는 환자에게 불편함을 물론 많은 비용과 시간이 소요되기 때문에, 아밀로이드 플라크 축적의 가능성이 높은 사람을 대상으로 하는 선별과정이 절실한 실정이다.

[0071] 다른 양태에서 본원에 따른 방법은 뇌의 아밀로이드 베타 플라크 축적의 판단이 필요한 검사 대상자가 뇌의 PIB-PET 검사가 필요한 지 여부에 대한 정보를 제공하기 위해, 상기 대상자 유래의 혈액시료를 제공하는 단계; 상기 혈액시료에서 본원에 따른 마커를 정량하는 단계; 및 상기 마커의 농도를 대조군으로서 PIB-PET 검사 음성으로 판단된 대조군과 비교하여 상기 대상자를 PIB-PET 검사 대상자로 결정하는 단계를 포함하는, PIB-PET 검사가 필요한 대상자 선별을 위한 마커의 검출 방법을 제공한다. 예를 들면 본원에 따른 마커를 이용한 혈액검사에서 뇌에 아밀로이드 베타가 축적되지 않은 것으로 판단된 경우는 PiB-PET 영상을 검사할 필요가 없고, 축적된 것으로 판단된 경우는 확진을 위해 PiB-PET 영상 검사를 할 수 있다.

[0072] 아울러 상술한 본원에 따른 모든 방법에서 상기 각 마커에 대하여는 상술한 바를 참고할 수 있다.

[0074] 실시예

- [0075] **실험방법 및 재료**
- [0076] **채혈(Blood sampling)**
- [0077] 환자군은 Korean Brain Aging Study for Early Diagnosis and Prediction of Alzheimer's Disease (KBASE)연구로 모집되었다. 혈액은 K2 EDTA tubes(BD Vacutainer System, Plymouth, UK)에 아침에 채혈되었고, 채혈 후에 700Xg 5분으로 원심분리 되어, 상층액의 혈장(plasma) 샘플을 얻었다. 얻어진 혈장 샘플은 -80도 초저온 냉동고에 나누어 보관되었다.
- [0078] **뇌 베타-아밀로이드 양전자 방출 단층 촬영(Pittsburgh compound B positron emission tomography; PiB-PET)**
- [0079] PiB-PET 촬영은 3.0 T PET-MR scanner(Biograph mMR scanner [Siemens, Washington DC, USA])를 이용하여 진행되었으며, 촬영 기법은 이전에 보고된 논문에 기초하였다 [1]. 참가자들은 standardized uptake value ratio (SUVR) 값에 기초하여 PiB+(베타-아밀로이드 보유군)와 PiB-(베타-아밀로이드 미보유군)으로 나누어 졌으며, 그 경계값은 4개의 ROI들 중 1개 이상에서 1.4보다 큰 값을 가질 경우 PiB+로, 1.4보다 작거나 같은 값을 가질 경우 PiB-로 구별하였다 [2, 3]. 18F-AV-1451 PET 스캔은 Biograph True point 40 PET/CT scanner(Siemens, Washington, DC, USA)를 이용하여 10분간 수행되었으며, 촬영 기법은 이전에 보고된 논문에 기초하였다 [4].
- [0080] **참가자(Participants)**
- [0081] 본 실험은 197명의 참가자를 보유하였다. 참가자는 다음과 같이 나누어진다. 인지기능 정상/뇌 아밀로이드 없음(cognitively normal/PiB-PET positive; CN-, n = 79), 인지 기능 정상/뇌 아밀로이드 있음(cognitively normal/PiB-PET negative; CN+, n = 27), 경도 인지 장애/뇌 아밀로이드 없음(mild cognitive impairment/PiB-PET negative; MCI-, n = 21), 경도 인지 장애/뇌 아밀로이드 있음(mild cognitive impairment/PiB-PET+; MCI+, n = 30), 치매 증상 보유/뇌 아밀로이드 있음(clinically dementia/PiB-PET+; Dementia+, n = 40). 모든 참가자는 심리학적 혹은 임상학적 평가를 수행하였으며, 혈액검사 및 뇌 영상 검사(MRI and PiB-PET)을 수행하였다. 또한 인지기능 검사로는 Mini-Mental State Examination (MMSE) 수행 후 해당 수치를 활용하였으며, 환자들의 성별, 나이, 교육환경을 보정한 MMSE z 점수를 최종 활용하였다.
- [0082] **효소 면역 침강법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)**
- [0083] 혈중 단백질 galectin-3의 농도는 ELISA 방식을 이용하여 측정하였다. 이는 항원-항체 반응과 전량분석(colometric analysis)을 이용하여, 생체시료에 들어있는 특정 단백질 양을 측정하는 실험 방법이다. 상세한 실험방법은 제품의 안내서를 따라 실험하였다(Human Galectin-3 Quantikine ELISA kit DGAL30; R&D Systems사). 측정법에 대해 간략히 설명하자면, 혈장 혹은 혈청 샘플과 표준화된 농도가 계산된 샘플들을 안티바디가 코팅된 웰에 투입하고, 37℃ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 그 후 세척 용액으로 세번 씻어 준 다음, 바이오틴 항체를 넣어주고 다시 37℃ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 세척 용액으로 다섯번 씻어준 다음, horseradish peroxidase (HRP) - avidin 용액으로 바이오틴 항체에 결합을 시켜주고 다시 37℃ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 TMB 용액을 넣어주고 5-10분 간 상온에서 배양한 후, 5분 내로 450 nm 파장으로 플레이트를 읽어 단백질 농도를 확정하였다.
- [0084] **혈중 베타-아밀로이드 농도 측정**
- [0085] 혈중의 베타-아밀로이드의 농도는 혈장 전처리 조성물의 처리 후, 그 농도를 X-MAP 기술을 이용하여 측정하였다. 혈장 전처리 조성물은 상기 프로테아제 억제제 및 포스파타아제 억제제(MPP)를 1:1(v/v)로 포함한다. 또한, MPP는 프로테아제 억제제 콕테일(Protease inhibitor cocktail, PIC):PMSF(Serine protease inhibitor):포스파타아제 억제제 콕테일 I:포스파타아제 억제제 콕테일 II를 1:1:1:1(v/v)로 혼합한 것일 수 있다. 이는 본 발명자의 특허 [혈장 내 아밀로이드베타의 농도를 통해 알츠하이머병을 임상학적 및 병리학적으로 모니터링하는 방법에 대한 대한민국 특허 제1786859호]에 자세히 기술되어 있다. 측정 방법을 간단히 기술하면, 혈중 베타-아밀로이드 1-42 와 1-40의 농도를 동시에 측정하기 위하여 INNO-BIA plasma Aβ forms kit (Fujirebio 사) 제품을 사용하였다. 항체가 결합되어있는 비드를 먼저 플레이트에 통과시켜 비드를 플레이트에 장착후, MPP 를 처리한 혈장 용액 샘플을 30분간 인큐베이션 한 후, standard(표준농도) 샘플들과 함께 플레이트에 넣어주었다. 이후 conjugate 항체가 붙은 비드를 넣고 하루동안 냉장보관 하였다. 다음 날, 플레이트를 워시한 이후, detection 항체를 넣어 주고 1시간을 인큐베이션 하였다. 마지막 단계로 reading 용액을 넣어서 X-MAP 기술을 이용하여 혈장 내 MPP로 전처리된 베타-아밀로이드를 측정하였다.
- [0086] **통계적 분석 방법(Statistics)**

[0087] 측정된 혈중 galectin-3의 농도는 적절한 통계분석을 통하여 바이오마커 변수로 활용되었다. 통계분석은 Graphpad Prism 7(GraphPad Software, Sandiego, CA, USA) 및 MedCalc(MedCalc Software, Ostend, Belgium) 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균의 표준오차(mean $\pm$ standard error of the mean, SEM)으로 표기되었다. 또한 단일 스튜던트 t-검정(unpaired student's t test)를 이용하여 혈장 내 단백질농도를 통해 PiB-PET 양성 또는 음성군을 비교하였다. ANOVA 분석 후에는 GraphPad Prism 7로 Tukey's 다중비교 검정을 수행하였다. 진단 테스트의 성능을 평가하기 위하여, MedCalc로 Receiver Operating Characteristic(ROC) 커브분석에 따른 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 수행하였다. 또한 이 데이터를 활용하여 ROC curve를 그리고 AUC(Area under the curve)를 Wilcoxon 통계를 이용하여 측정하였다. 다중 로지스틱 회귀 분석시엔 각각의 변수들을 독립변수로 활용하여, 최종적인 모델을 도출해 내었고, 이때 성별과 나이 같은 공변수는 보정변수로 활용되었다.

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

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

[0088]

[로지스틱 회귀분석 공식. P_i = 확률, β = 상수, x = 계수. 예를 들어, x_1 = 혈중 galectin-3 농도, x_2 = 혈중 LGALS3BP 농도...]

[0090] 또한 로지스틱 회귀분석으로 도출된 새로운 종합변수는 ROC 커브 분석을 통해 뇌 아밀로이드 축적 여부를 가리는데 활용되었으며, 회귀분석을 통해 얻은 cut-off 값 (Criterion 값)을 통해 PiB-PET 양성군과 PiB-PET 음성군을 구별하는 것의 기준으로 활용되었다.

[0092] 실시예 1. 혈중 Galectin-3 와 뇌 속 베타-아밀로이드 농도와의 관계 분석

[0093] 본원에서는 비치매군으로 분류되는 인지기능 정상군 및 경도인지장애군에서 베타-아밀로이드 축적과 galectin-3의 농도가 유의성있게 변화하는 것을 발견하였다. 구체적으로 인지기능 정상군 및 경도인지장애 전체 환자군을 통합한 비치매군(ND)에서 혈중 galectin-3 농도변화를 관찰하기 위하여 뇌 속 베타-아밀로이드가 쌓여 있는 군(ND+)과 그렇지 않은 군(ND-)을 기준으로 나누어 galectin-3의 농도 비교를 하였을 때, ND+ 군에서 그 농도가 높아져 있음도 확인할 수 있었다(도 1의 B, 표 1).

[0094] 또한 연속적인 변수의 관계를 보기 위해 연관분석을 시행하였을 때, 각 환자가 보유한 galectin-3의 단백질 농도와 각 환자가 보유한 뇌 속 베타-아밀로이드의 농도가 유의한 상관관계를 보이는 것을 확인하였다(도 1의 C, $p < 0.0001$). 또한 ROC 커브 분석을 galectin, LGALS3BP에 대해 각각 실시했을 때 LGALS3BP의 AUC는 0.688인데 비해 galectin-3의 AUC는 0.736으로 매우 향상된 AUC 값을 나타냄을 증명하였다(도 1D, 표 2). 이는 galectin-3가 변수로 활용되었을 때, 알츠하이머병의 원인물질인 뇌속 베타-아밀로이드의 축적도를 기존의 LGALS3BP 바이오마커에 비해 훨씬 더 잘 예측할 수 있음을 시사한다.

[0095] [표 1]

Characteristics (n)	CN- (79)	CN+ (28)	MCI- (53)	MCI+ (54)
Gender, M/F	24/45	15/13	16/37	20/34
Age, years, mean $\pm$ SEM	66.90 $\pm$ 0.9	74.89 $\pm$ 1.2	74.00 $\pm$ 1.0	73.91 $\pm$ 0.9
Education, mean $\pm$ SEM	11.82 $\pm$ 0.6	12.71 $\pm$ 0.8	8.81 $\pm$ 0.6	10.53 $\pm$ 0.6
MMSE raw score, mean $\pm$ SEM	27.05 $\pm$ 0.3	27.04 $\pm$ 0.4	22.89 $\pm$ 0.4	21.67 $\pm$ 0.4
MMSE z score, mean $\pm$ SEM	0.28 $\pm$ 0.1	0.31 $\pm$ 0.2	-0.83 $\pm$ 0.2	-1.57 $\pm$ 0.2
CDR (n)	0	0	0.5 (53)	0.5 (50)
ApoE4 positivity, ϵ 4+/N (%)	13/79 (16%)	10/28 (36%)	6/53 (11%)	30/54 (56%)
PiB (SUVR), mean $\pm$ SEM	1.11 $\pm$ 0.01	1.74 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.01	1.92 $\pm$ 0.04

[0096]

[0097] [표 2]

Galectin-3		LGALS3BP	
Area under the ROC curve (AUC)		Area under the ROC curve (AUC)	
Area under the ROC curve (AUC)	0.736	Area under the ROC curve (AUC)	0.688
Standard Error ^a	0.0405	Standard Error ^a	0.0447
95% Confidence interval ^b	0.659 to 0.803	95% Confidence interval ^b	0.608 to 0.760
95% Bootstrap CI ^c	0.649 to 0.809	95% Bootstrap CI ^c	0.595 to 0.771
z statistic	5.813	z statistic	4.199
Significance level P (Area=0.5)	<0.0001	Significance level P (Area=0.5)	<0.0001
^a Hanley & McNeil, 1982		^a Hanley & McNeil, 1982	
^b Binomial exact		^b Binomial exact	
^c BC _a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).		^c BC _a bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).	
Youden index		Youden index	
Youden index J	0.3646	Youden index J	0.3149
95% Confidence interval ^a	0.2096 to 0.4491	95% Confidence interval ^a	0.1862 to 0.4160
Associated criterion	>9.916	Associated criterion	≤3.710976
95% Confidence interval ^a	>7.792 to >12.336	95% Confidence interval ^a	≤3.127876665 to ≤7.845184
Sensitivity	68.42	Sensitivity	43.86
Specificity	68.04	Specificity	87.63

[0098]

[0100] 실시예 2. 혈중 Galectin-3와 혈중 베타-아밀로이드 농도와의 관계 규명

[0101] 혈중 galectin-3 농도가 뇌 속 베타-아밀로이드와 연관관계를 보였기 때문에, 다음으로 혈액의 베타-아밀로이드와는 galectin-3가 어떠한 관계가 있을지에 대한 분석을 진행하였다. 그 결과, 혈중 galectin-3 농도는 혈중 베타-아밀로이드 1-42 농도 또는 1-42/1-40 농도비가 감소할수록 유의하게 높아지는 것으로 나타났다(베타-아밀로이드 1-42, $p = 0.0006$, $r = -0.279$; 베타-아밀로이드 1-42/1-40농도비, $p < 0.0001$, $r = -0.319$) (표 3).

[0102] [표 3]

		Gal_3	A42	A40	A4240ratio
Gal_3	Correlation coefficient Significance Level P n		-0.279 0.0006 146	0.032 0.7052 146	-0.319 0.0001 146
A42	Correlation coefficient Significance Level P n	-0.279 0.0006 146		0.371 <0.0001 202	0.661 <0.0001 202
A40	Correlation coefficient Significance Level P n	0.032 0.7052 146	0.371 <0.0001 202		-0.389 <0.0001 202
A4240ratio	Correlation coefficient Significance Level P n	-0.319 0.0001 146	0.661 <0.0001 202	-0.389 <0.0001 202	

Pearson correlation coefficient

[0103]

[0105] 실시예 3. 혈중 베타-아밀로이드 농도비에 대해 galectin-3 농도를 변수로 추가시 ROC 커브 향상 분석

[0106] 혈중 베타-아밀로이드 농도비에 대하여, galectin-3의 농도를 변수로 ROC 커브에 추가하였을 시에, AUC 값의 향상 정도를 분석하였다. 종속변수는 뇌 속 베타-아밀로이드 축적정도(PiB- vs PiB+)이며, 공변수(covariates, CV)로는 Apolipoprotein E, 나이, 성별을 활용하였다. 공변수와 함께 혈중 베타-아밀로이드 농도비(42:40 비)만을 이용하여 ROC커브 분석을 시행하였을 때는 AUC 값이 0.797로 나왔던 반면, 여기에 galectin-3의 농도변수를 추가하였을 때는 AUC 값이 0.821으로 유의하게 상승하는 것을 알 수 있었다(도 2, 표 4).

[0107] 이는 기 보고된 혈중 베타-아밀로이드의 농도비 뿐만 아니라, galectin-3를 추가하였을 때 그 복합마커의 유효성이 증대되는 것을 의미함으로써, galectin-3가 변수로 활용되었을 때, 알츠하이머병의 원인물질인 뇌속 베타-아밀로이드의 축적도를 기존의 방법보다 훨씬 더 잘 예측할 수 있음을 시사한다.

[0108] [표 4]

Variable	AUC	SE ^a	95% CI ^b
MPPAbeta4240ratio	0.797	0.0387	0.722 to 0.859
MPPAbeta4240ratio + Galectin-3	0.821	0.0357	0.749 to 0.880

[0109]

[0111] 실시예 4. 기존 바이오마커의 조합 대비 galectin-3 농도를 변수로 추가시 ROC 커브 향상 분석

[0112] 기존 혈중 아밀로이드 뇌축적 예측 바이오마커(LGALS3BP, ACE)에 galectin-3의 농도를 변수로 ROC 커브에 추가하였을 시에, 얼마나 AUC 값이 향상되는지를 확인하고자 하였다. 종속변수는 뇌 속 베타-아밀로이드 축적정도(PiB- vs PiB+)이며, 공변수(covariates, CV)로는 Apolipoprotein E, 나이, 성별을 활용하였다. 공변수와 함께 혈중 LGALS3BP, ACE농도를 조합하여 ROC커브 분석을 시행하였을 때는 AUC 값이 0.792로 나왔던 반면, 여기에 galectin-3의 농도변수를 추가하였을 때는 AUC 값이 0.856으로 유의하게 상승 하는 것을 알 수 있었다(도 3, p=0.0137).

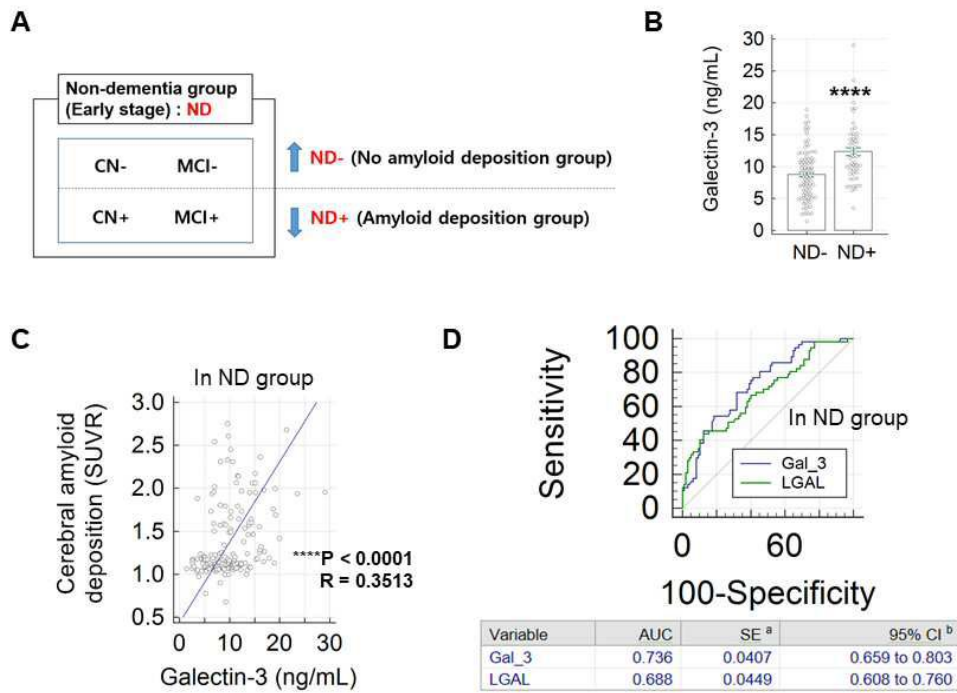
[0113] 이는 기 보고된 혈중 베타-아밀로이드 축적 예측에 대한 바이오마커 뿐 아니라, galectin-3를 추가하였을 때 그 복합마커의 유효성이 증대되는 것을 의미함으로써, galectin-3가 변수로 활용되었을 때, 알츠하이머병의 원인물질인 뇌속 베타-아밀로이드의 축적도를 기존의 방법보다 훨씬 더 잘 예측할 수 있음을 시사한다.

[0114] 본원에서는 혈중 galectin-3 농도가 정상군과 경도인지장애에서도 뇌 아밀로이드 축적에 의해 유의적으로 변하므로 정상군과 경도인지장애 군에서 특히 뇌아밀로이드 베타의 축적 여부 및 이와 관련된 질환의 조기 진단 등에 유용하게 사용될 수 있다.

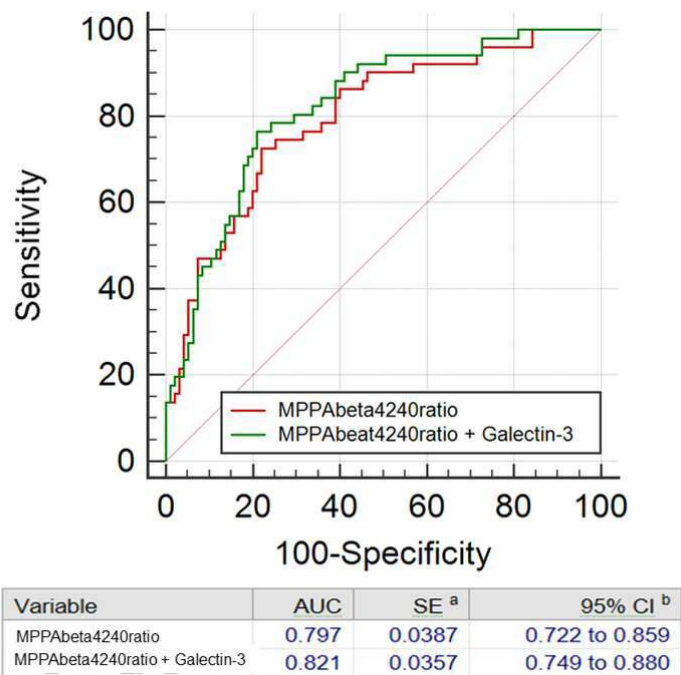
[0115] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

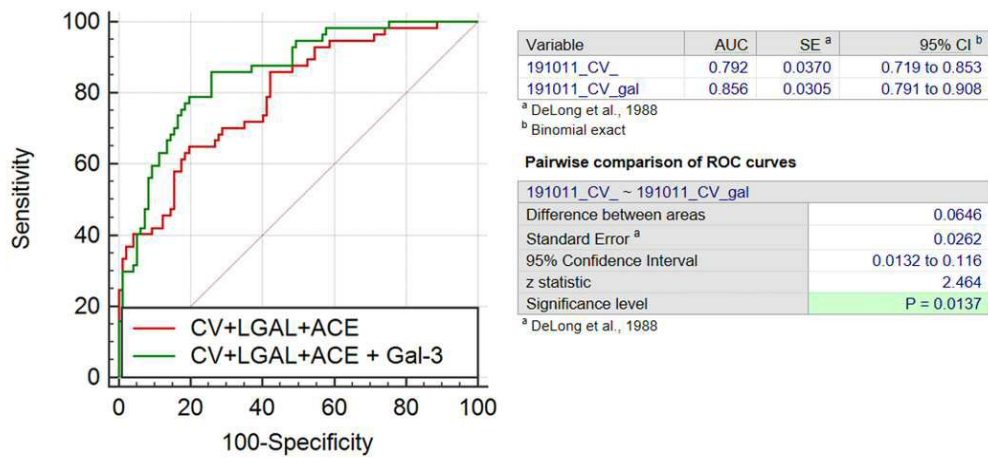
도면1



도면2



도면3



도면4

