

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
G01N 33/563

(11) 공개번호 특2002 - 0007432
(43) 공개일자 2002년01월29일

(21) 출원번호 10 - 2000 - 0040102
(22) 출원일자 2000년07월13일

(71) 출원인 셀로직스 주식회사
박현석
서울 강남구 논현2동 247 - 4
(72) 발명자 김도관
서울특별시송파구송파동151한양아파트22동105호
강상순
충청북도청주시흥덕구모충동492금호타운107동1101호
(74) 대리인 이한영

심사청구 : 있음

(54) 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로포함하는 알츠하이머병의 진단시약

요약

본 발명은 멜라노트랜스페린(melanotransferrin, p97)에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 진단시약에 관한 것이다. 본 발명의 알츠하이머병의 진단시약은 마우스의 T 세포와 사람의 암세포가 융합된 하이브리도마 세포주로부터 분리된 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 하는 바, 환자로부터 수득된 혈청에 처리되어 면역반응으로 검출된 멜라노트랜스페린의 양을 정상인의 그것과 비교하고, 정상인에 비하여 증가된 멜라노트랜스페린의 양을 기준으로 알츠하이머병임을 판별·진단할 수 있으며, 민감성·특이성·정확성이 높아 특히 진단이 어려운 초기단계의 알츠하이머병의 진단에 유용하다.

대표도
도 1

색인어
멜라노트랜스페린, 단클론 항체, 알츠하이머병

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 알츠하이머병 환자, 비알츠하이머 치매환자 또는 정상인의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도를 비교한 그래프이다.

도 2는 알츠하이머병 환자의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도 대 연령의 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 3은 알츠하이머병 환자의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도에 의한 ROC 커브를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 멜라노트랜스페린(melanotransferrin, p97)에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 진단시약에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 알츠하이머병에 특이적인 멜라노트랜스페린을 검출하여 알츠하이머병을 판별·진단하기 위한, 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는, 민감성·특이성·정확성이 향상된 진단시약에 관한 것이다.

알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 뇌의 진행성 퇴행성 질환으로서, 전세계적으로 치매환자 중 70%의 상당한 부분을 차지하는데, 아밀로이드(amyloid) 소체를 둘러싼 축삭말단(telodentron) 및 수상돌기(dendrite)로 구성된 노인성판(senile plaque)으로 불리는 뚜렷한 병리조직학적 변화를 동반하며, 대뇌피질 전반에 걸친 미만성 위축(diffuse cerebral atrophy)과 세포내 신경원 섬유덩어리(neurofibrillary tangle)를 특징으로 한다. 특히, 알츠하이머병은 질환이 진행됨에 따라 신경세포의 다량 손실이 동반되지만 초기의 임상적인 변화를 관찰하기 어려우므로, 다른 질병보다도 진단을 통하여 병을 조기에 발견하는 것이 상당히 중요하다(참조: Nagy, Z.et al., Dement. Geriatr. Cogn. Disor d., 10, 109 - 114, 1999; Varma, A.R.et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 66, 184 - 188, 1999).

현재까지 베타 - 아밀로이드단백질($A\beta$, β - amyloid), 타우단백질(Tau), 아포리포단백질 E(ApoE, apolipoprotein E), α_1 - 안티키모트립신(α_1 - antichymotrypsin) 및 케모카인(chemokine)이 알츠하이머병을 진단할 수 있는 물질로 제시되었으나(참조: Geldmacher, D.S.et al., New Engl. J. Med., 335, 330 - 336, 1996), 이들은 알츠하이머병을 초기에 효과적으로 진단할 수 없는 단점이 있어, 알츠하이머병에 대한 생화학적 표지자 및 진단시약의 개발이 시급히 요구되었다.

한편, 멜라노트랜스페린(melanotransferrin, p97)은 세포에서 고농도로 발견되고 철이온의 섭취(iron uptake) 및 철의 운반에 관여하며 97kDa의 크기를 가지며, 최근에는 뇌조직의 아밀로이드판(amyloid plaque)의 축적과 관련이 있다고 알려졌다. 이에, 알츠하이머병 환자의 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF) 및 혈청에 대하여 멜라노트랜스페린에 대한 항체를 사용함으로써 알츠하이머병을 진단하고자 하는 시도가 있었으나(참조: Kennard et al., Nature Med., 2, 1230 - 1235, 1996), 알츠하이머병 환자와 정상인의 뇌척수액에서의 멜라노트랜스페린의 양의 변화는 현저히 차이를 보였지만 선택성이 낮고, 더우기 혈청의 멜라노트랜스페린에 대한 민감성, 정확성이 낮으며, 알츠하이머병 환자의 뇌척수액이나 혈청에서조차 멜라노트랜스페린이 검출되지 않는 특이성의 문제점이 있어서, 효과적인 진단시약으로 사용될 수 없는 단점이 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 알츠하이머병을 진단할 수 있는 효과적인 진단시약을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 마우스의 T 세포와 사람의 암세포가 융합된 하이브리도마 세포주를 제조하는데 성공하였으며, 이로부터 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 수득하여, 전기 수득된 항체를 유효성분으로 하는 진단시약으로 사용하여 혈청의 멜라노트랜스페린을 검출할 경우, 멜라노트랜스페린이 알츠하이머병 환자에서 민감성(sensitivity), 특이성(selectivity) 및 정확성(accuracy)이 높게 측정되어, 전기 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 진단시약의 유효성분으로 사용할 수 있음을

확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 진단시약을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명의 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 진단시약을 구체적으로 설명하고자 한다.

우선, 본 발명자들은 모세혈관내피(capillary endothelium)에서 발현되며, 알츠하이머병 환자 뇌조직의 소신경교세포(microglia)에 존재하는 아밀로이드판(amyloid plaque)내에 함께 나타나는 멜라노트랜스페린과 알츠하이머병과의 연관성을 알아보았다: 즉, 멜라노마 세포주로부터 수득한 97kDa의 멜라노트랜스페린과, 뇌손상, 알콜중독 및 의약품남용의 현상이 나타나지 않는 알츠하이머병 환자, 비알츠하이머 - 치매(non - Alzheimer's Disease dementia)의 일종인 혈관성 치매(vascular dementia)와 파킨슨병(Parkinson's disease) 환자 또는 정상인으로부터 수득된 혈청에 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체와 반응시켜, 멜라노트랜스페린이 알츠하이머병 환자들에서만 고농도로 존재함을 확인하였다.

이어, 초기와 후기 단계별 알츠하이머병 환자, 비알츠하이머 - 치매환자 또는 정상인을 대상으로 멜라노트랜스페린의 양을 상기 항체를 반응시켜 측정해 본 결과, 초기단계 및 후기단계의 알츠하이머병 환자에서의 멜라노트랜스페린의 수치에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이에 반하여, 비알츠하이머 - 치매환자는 정상인과 같은 수치를 나타냈는 바, 멜라노트랜스페린이 알츠하이머병에만 특이적으로 나타남을 확인할 수 있었다.

아울러, 전기의 결과로부터 수득된 멜라노트랜스페린양의 수치로부터 ROC(receiver operating characteristic curve)를 작성한 결과, 놀라울 정도로 진단의 민감성, 특이성 및 정확성이 높게 확인되었다. 따라서, 본 발명의 멜라노트랜스페린에 대한 항체를 환자 또는 정상인으로부터 수득된 혈청에 처리하여, 멜라노트랜스페린에 대한 항체와 반응하는 멜라노트랜스페린의 증가된 양으로 알츠하이머병임을 판별할 수 있으므로, 혈청의 멜라노트랜스페린의 양을 측정할 수 있는 물질을 사용하여 알츠하이머병의 초기 발병을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 발명의 알츠하이머병의 진단시약의 유효성분으로 포함되는 멜라노트랜스페린에 대한 항체는 단클론 항체, 다클론 항체를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 마우스 T 세포 및 사람의 암세포주가 융합된 하이브리도마 세포로부터 분리된 단클론 항체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 마우스 비장세포 및 사람의 멜라노마 세포주가 융합된 하이브리도마 세포주(ATCC HB8446)으로부터 수득된 단클론 항체를 사용할 수 있으나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 알츠하이머병과 멜라노트랜스페린과의 상관관계

알츠하이머병 환자, 혈관성 치매 환자, 파킨슨병 환자 또는 정상인의 그룹을 선별하기 위하여 진단학적인 측면에서 알츠하이머병의 척도는 맥칸 등의 방법(참조: McKhann, G. et al., Neurology, 34, 939 - 944, 1984)을 사용하였고, 비알츠하이머 - 치매인 혈관성 치매 및 파킨슨병의 척도는 각각 로만 등의 방법(참조: Romann, G.C. et al., Neurology, 43, 250 - 260, 1993) 및 휴 등(참조: Hughes, A.J. et al., Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 55, 181 - 184, 1992)의 방법이 사용되었다. 아울러, 전기 환자 또는 정상인들은 전기 치매 이외에 다른 치매의 가능성을 배제시키는 조건하에서, 뇌의 MRI(brain magnetic resonance imaging) 및 뇌파검사법(electroencephalography)의 신경정신적 테스트가 수행되었으며, 뇌손상(head trauma), 알콜중독 및 의약품 남용의 병력이 없는 알츠하이머병 환자 71명, 비알츠하이머 - 치매환자 56명 및 정상인 84명 그룹이 선별되었다. 전기 선별된 환자 또는 정상인의 혈액을 채취한 다음, 혈청 및 DNA를 수득하여 4°C에 보관하면서 24시간 이내에 사용하였다. 대조군으로는 사람 멜라노마 세포주(SK-MEL 28, ATCC, U.S.A.)로부터 멜라노트랜스페린을 분리하여 사용하였다. 사람 멜라노마 세포주는 56°C에서 30분간 열로 불활성화된 소의 자궁내에 있는 송아지혈청(fetal bovine serum), 100mU/ml의 포타슘 페니실린G, 2mM 글루타민 및 20mM 중탄산나트륨이 첨가된 돌베코의 변형된 배지(Dulbecco's modified essential medium, DMEM)로 포화시켜 75cm³의 플라스크내에서 37°C, 5%의 이산화탄소와 95%의 습도조건의 배양기에서 3일동안 배양하였다. 하기 표 1은 진단하려는 환자의 그룹과 상태를 나타낸다.

진단하려는 환자의 그룹과 상태

그룹	숫자	여성/남성	연령(년)	인식가능한 증상(symptom)이 나타난 기간(개월)	CDR*	K-MMSE†
			평균(범위)			
알츠하이머병	71	54/17	70(62 - 75)	28(18 - 48)	1(1 - 2)	14(10 - 21)
비알츠하이머	56	35/21	68(64 - 73.5)	27(12 - 52)	0.5(0.5 - 2)	16(13 - 21)
치매 혈관치매	41	26/15	68(64 - 73)	30(11 - 53)	1(0.5 - 2)	15(13 - 20)
파킨슨병	15	9/6	69(63 - 74)	22(12 - 52)	0.5(0.5 - 1)	18(15 - 23)
정상 대조군	84	53/31	32(29 - 60.5)			

* : 임상적인 치매 확률(Clinical Dementia Rating)

† : 신경상태검사(Mini - mental State Examination)의 한국형

전기 수득한 각각의 혈청 1μl과 대조군인 사람 멜라노마 세포에서 분리된 멜라노트랜스페린을 나이트로셀룰로스막(nitrocellulose membrane, 이하 'NC'라 함)에 적하하고, 완전히 건조시켰다. 이어, 건조된 NC를 상온에서 1시간 동안 차단용액(blocking solution)에 적시고, 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체인 L235(ATCC - HB 8446 L235(H - 19))로 4°C에서 밤새 반응시킨 후, 0.01%의 트윈 - 20(Tween 20)이 용해된 PBS로 3회 세척하고, 이차항체로 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이어, 0.01% 트윈 - 20이 용해된 PBS로 3회 이상 세척하고, 퍼옥시다제 기질 용액(peroxidase substrate solution, LumiGLO, New England Biolabs, Inc.)을 사용하여 상온에서 1분동안 반응시킨 후, X - 레이 필름상에서 1분동안 노출시켜, 멜라노트랜스페린의 양을 대조군과 비교하였다.

도 1은 알츠하이머병 환자, 비알츠하이머 치매환자 또는 정상인의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도를 비교한 그래프이다. 도 1에서 보듯이, 멜라노트랜스페린은 알츠하이머병 환자들의 경우 10.20 내지 17.00pg/μl(중양값: 15.00pg/μl)로 나타났는데 비하여, 비알츠하이머 - 치매환자의 경우 1.93 내지 7.15pg/μl(중양값: 2.85pg/μl), 정상인의 경우 2.55 내지 3.95pg/μl(중양값: 3.20pg/μl)로 나타났는데, 알츠하이머병 환자는 비알츠하이머 - 치매환자 또는 정상인과는 멜라노트랜스페린 수치에서 상당한 차이를 보이며, 알츠하이머병 환자의 경우에 멜라노트랜스페린의 수치가 3배 내지 5배 이상 높은 것을 확인하였다.

아울러, 전기 환자와 정상과는 연령 차이가 있으므로, 연령 차이가 전기 결과에 영향을 줄 수 있는지 여부를 확인하고자, 50세 이상의 정상인과 가장 나이가 적은 환자에 대해서도 동일하게 멜라노트랜스페린의 수치를 측정하였다.

도 2는 알츠하이머병 환자의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도 대 연령의 곡선을 나타낸 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 멜라노트랜스페린의 양과 연령에는 상관관계가 없음을 확인하였고, 성별 차이 역시 이러한 결과에 영향을 주지 못함을 확인하였다.

실시예 2: 초기 및 후기단계별 알츠하이머병에서 멜라노트랜스페린의 양적 변화

임상적인 치매확률(CDR)이 0.5 또는 1.0인 초기단계의 알츠하이머병 환자 38명, 임상적인 치매확률이 2.0 또는 3.0인 후기단계의 알츠하이머병 환자 33명 및 비알츠하이머 - 치매환자와 정상인 140명을 대상으로 수득한 혈청에 대하여, 멜라노트랜스페린의 양을 전기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

그 결과, 초기단계의 알츠하이머병 환자들은 멜라노트랜스페린이 10.20 내지 17.00pg/μl(중앙값: 14.45pg/μl)이며, 후기 알츠하이머병 환자 33명의 경우에는 멜라노트랜스페린이 12.05 내지 17.05pg/μl(중앙값: 15.00pg/μl)로서 초기단계 및 후기단계는 차이를 보이지 않았다. 그에 비해, 비알츠하이머 - 치매환자와 정상인의 멜라노트랜스페린의 수치는 2.10 내지 4.50pg/μl(중앙값: 3.15pg/μl)을 나타냈는 바, 알츠하이머병의 발병초기의 멜라노트랜스페린의 양은 알츠하이머병이 진행되는 과정에서 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

실시예 3: 멜라노트랜스페린에 대한 항체를 이용한 알츠하이머병의 진단

전기 실시예 1 및 2의 혈청의 멜라노트랜스페린의 수치로부터 x축을 위양성율(위양성율=1 - 특이성)로 하고, y축을 민감성(sensitivity)으로 하여 ROC 곡선(receiver operating characteristic curve)를 작성하였다. 아울러, 통계분석에는 SAS 소프트웨어 (version 6.12)가 사용되었다.

도 3은 알츠하이머병 환자의 혈청 멜라노트랜스페린의 농도에 의한 ROC 커브를 나타낸 그래프이다: 이때, 그래프 상에서 상부의 점일 수록 민감성이 크고, 좌측의 점일수록 위양성율이 감소되어 특이성이 증가함을 나타내며, 점선은 멜라노트랜스페린의 양이 역치(cut - off level)임을 나타낸다. 도 3에서 보듯이, 멜라노트랜스페린의 양이 10.0pg/μl일 때, 알츠하이머병으로 진단할 수 있는 민감성, 특이성 및 정확성은 각각 0.915, 0.914 및 0.915로 나타났으며, 50세 이상의 환자나 정상인으로부터 알츠하이머병을 진단할 수 있는 민감성, 특이성 및 정확성은 각각 0.901, 0.888 및 0.894임을 알 수 있었다. 아울러, 알츠하이머병 환자와 비알츠하이머 - 치매 환자를 구별할 수 있는 멜라노트랜스페린의 양도 10.0pg/μl이었으며, 이때의 민감성, 특이성 및 정확성은 각각 0.901, 0.857 및 0.882로 나타났다. 또한, 알츠하이머병 환자와 50세 이상의 정상인을 구별할 수 있는 멜라노트랜스페린의 양은 9.0pg/μl로 나타났고, 이때 0.915, 0.917 및 0.916의 민감성, 특이성 및 정확성을 가짐을 확인하였다.

상술한 바와 같이, 알츠하이머병 환자를 다른 비알츠하이머 - 치매환자와 정상인으로부터 구별할 수 있는 멜라노트랜스페린의 역치값은 10pg/μl이며, 멜라노트랜스페린에 대한 항체를 사용하여 알츠하이머병을 진단할 경우 민감성 · 특이성 · 정확성이 높게 나타났는 바, 본 발명의 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 진단시약의 유효성분으로 이용하여 환자로부터 수득된 혈청에 처리할 경우 알츠하이머병을 특이적으로 진단할 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 멜라노트랜스페린(melanotransferrin, p97)에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 진단시약을 제공한다. 본 발명의 알츠하이머병의 진단시약은 마우스의 T 세포와 사람의 암세포가 융합된 하이브리도마 세포주로부터 분리된 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 하는 바, 환자로부터 수득된 혈청에 처리되어 면역반응으로 검출된 멜라노트랜스페린의 양을 정상인의 그것과 비교하고, 정상인에 비하여 증가된 멜라노트랜스페린의 양을 기준으로 알츠하이머병임을 판별 · 진단할 수 있으며, 민감성 · 특이성 · 정확성이 높아 특히 진단이 어려운 초기단계의 알츠하이머병의 진단에 유용하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

환자로부터 수득된 혈청에 멜라노트랜스페린(melanotransferrin, p97)에 대한 항체를 처리하여 면역반응으로 검출된 멜라노트랜스페린의 양을 정상인의 그것과 비교하고, 정상인에 비하여 증가된 멜라노트랜스페린의 양을 기준으로 알하이머병임을 판별·진단하기 위한, 멜라노트랜스페린에 대한 단클론 항체를 유효성분으로 포함하는 진단시약.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

멜라노트랜스페린에 대한 항체는

마우스 비장세포 및 사람의 멜라노마 세포주가 융합된

하이브리도마 세포주(ATCC HB8446)으로부터 수득된

단클론 항체인 것을 특징으로 하는

진단시약.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

환자의 멜라노트랜스페린의 양이 정상인의 그것에 비하여 3배 이상

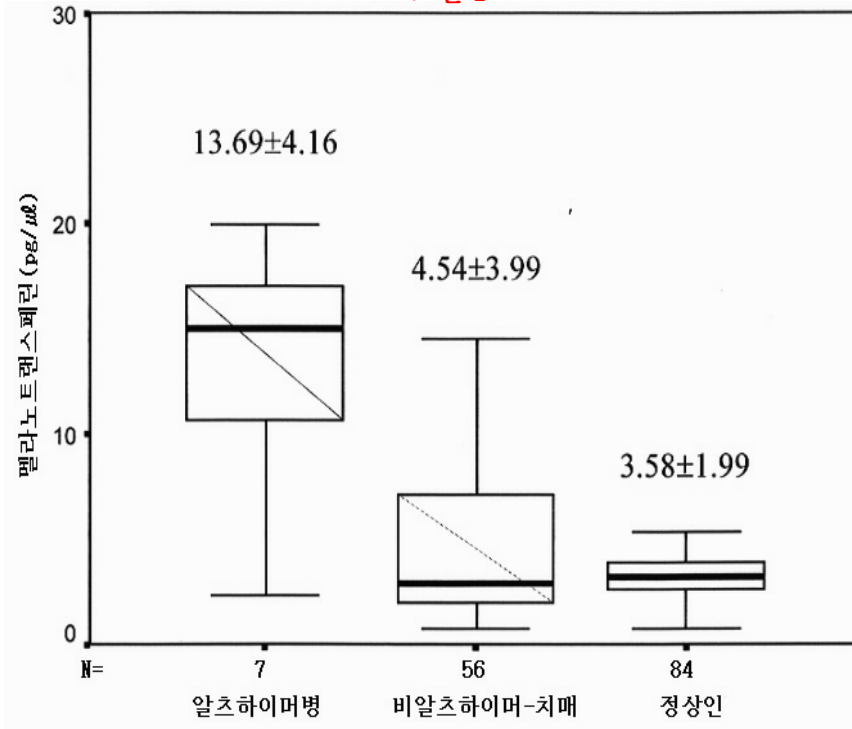
증가된 경우에, 알츠하이머병으로 판별·진단하는 것을 특징으로

하는

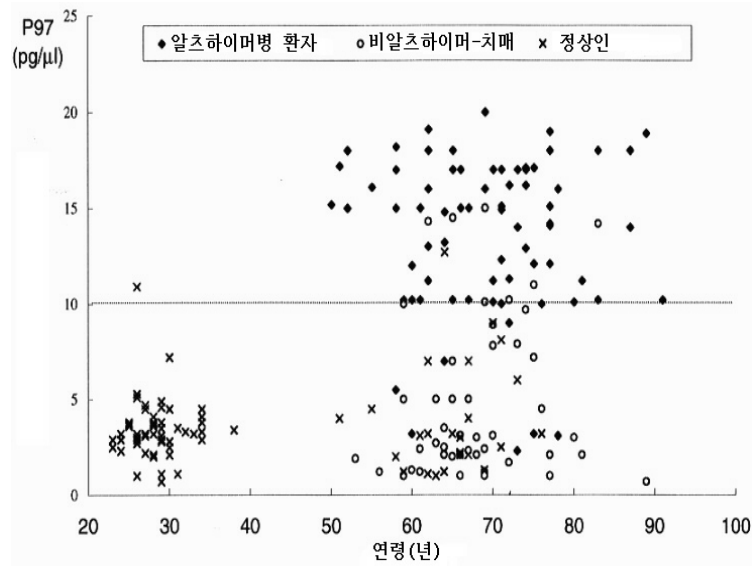
진단시약.

도면

도면 1



도면 2



도면 3

