(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 10 월 30 일 (30.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/175693 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003643

(22) 국제출원일: 2014 년 4 월 25 일 (25.04.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
61/816,343 2013 년 4 월 26 일 (26.04.2013) US
10-2014-0038989 2014 년 4 월 2 일 (02.04.2014) KR
10-2014-0038988 2014 년 4 월 2 일 (02.04.2014) KR

(71) 출원인: **한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 136-791 서울시 성북구 화랑로 14 길 5, Seoul (KR).

(72) 발명자: **김영수 (KIM, Young Soo)**; 446-561 경기도 용인시 기흥구 마북로 139, 108-302, Gyeonggi-do (KR). **김동진 (KIM, Dong Jin)**; 139-800 서울시 노원구 화랑로 51 나길 15, 104 동 306 호, Seoul (KR). **김혜연 (KIM, Hye Yun)**; 135-842 서울시 강남구 영동대로 325, 502 호, Seoul (KR). **조수민 (CHO, Soo Min)**; 136-791 서울시 성북구 화랑로 14 길 5, 한국과학기술연구원 뇌의약연구단, Seoul (KR).

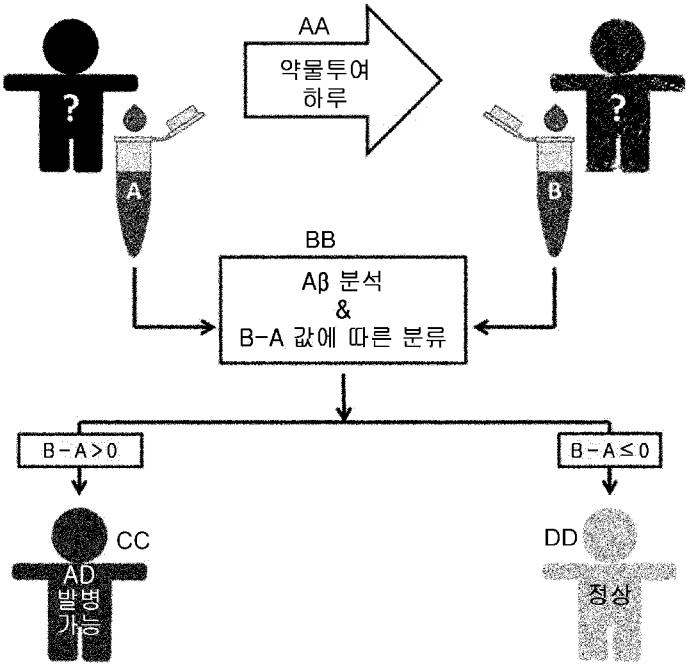
(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 137-130 서울시 서초구 바우뫼로 225 한마음빌딩 4 층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DIAGNOSTIC KIT FOR DIAGNOSING DISORDERS OR DISEASES RELATED TO ABNORMAL PROTEIN AGGREGATION OR MISFOLDING OF PROTEIN USING DISSOLUTION OF PROTEIN AGGREGATES

(54) 발명의 명칭 : 단백질 응집체의 용해를 이용한 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 진단키트



AA ... One day of drug injection
BB ... Classification according to Aβ analysis and B-A value
CC ... Possibility of AD outbreak
DD ... Normal

(57) **Abstract**: The present invention relates to a diagnostic kit for diagnosing disorders or diseases related to abnormal protein aggregation or misfolding of protein by using dissolution of protein aggregates in the body, capable of accurately diagnosing disorders or diseases such as Alzheimer's disease caused by aggregation of beta amyloid, as well as disorders and diseases related to abnormal protein aggregation or misfolding of protein by analyzing concentrations through the dissolution of aggregated protein in the blood of a person having other disorders or diseases due to protein aggregation.

(57) **요약서**: 본 발명은 체내 단백질 응집체의 용해를 이용한 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 진단키트에 관한 것으로 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환의 혈액 중에 응집된 단백질의 용해를 통한 농도 분석으로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 정확한 진단이 가능하다.

WO 2014/175693 A1

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 단백질 응집체의 용해를 이용한 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 진단키트

기술분야

[1] 본 발명은 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환의 응집된 단백질의 용해를 통한 농도 분석으로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 정확한 진단이 가능한 혈액진단키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 신경세포 기능장애 및 손상은 독성의 응집되기 쉬운 단백질에 의해 유발될 수 있고, 다수의 신경계 질환은 그러한 용태를 특징으로 한다. 이들은 근위축성 측삭 경화증, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 프리온 질병, 폴리글루타민 확장증, 척수소뇌성 실조증, 척수 및 연수 근육위축, 해면 뇌병증, 타우증(tauopathy), 헌팅톤 병, 또는 근육긴장 이상과 같은 질환을 포함한다.

[3] 상기 질환을 유발하는, 독성의 응집되기 쉬운 단백질을 코딩하는 단백질, 및

[4] 단백질을 코딩하는 유전자가 동정되었다. 정상적인 대사 효소는 합성 및 분해의 영구적인 순환을 형성하는 단백질을 재순환시킨다. 상기 유전자가 돌연변이화될 경우, 미스폴딩된 단백질은 비정상적으로 축적되고 분해된다. 이러한 미스폴딩된 단백질이 신경세포 손상의 지시일 수 있는 신경세포 봉입체 및 플라크를 유발하는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 세포 기전을 이해하고, 상기 미스폴딩된 단백질을 감소시키고, 저해하고, 호전시키기 위해 필요한 분자 수단을 동정하는 것이 중요하다. 추가로, 단백질 미스폴딩 및 응집이 신경세포 생존에 미치는 효과를 이해함으로써 이들 질환에 대한 합리적이고 유효한 치료법을 개발할 수 있을 것이다.

[5] 치매 중 특히 알츠하이머 병이란 뇌 내 정상적으로 존재하던 베타아밀로이드 및 타우 단백질이 비정상적으로 응집하여 각각 아밀로이드 플라크(Aβ plaque)와 신경섬유매듭(neurofibrillary tangle)을 형성하고, 신경세포 및 신경세포 연접이 손상되어 발생하는 신경계 퇴행성 질병이다.

[6] 이러한 알츠하이머 병은 뇌혈관 질환, 암 다음으로 3 번째로 높은 노화에 관련된 사망원인이며, 발생 시 평균 유병기간이 10년 이상이 되므로 보호자의 정신적, 경제적 부담과 더불어 사회적 부담이 증가하고 있다.

[7] 알츠하이머 병 환자의 뇌에서 특이적으로 발견되는 베타아밀로이드는 단백질 분해효소(secretase)에 의해 대사되어 나타나는 펩타이드로, 질병의 진행에 따라 단량체(monomer), 중합체(oligomer), 피브릴 전구체(proto-fibril), 피브릴(fibril) 및 플라크(plaque)와 같이 특이한 복합구조를 띄게 되며 그 중 동적 변형이 활발한

중합체와 피브릴 전구체가 뇌세포를 파괴하는 주원인으로 알려져 있다.

[8] 임상 시험에 나타나듯 사람에서 알츠하이머 병 증상이 발생하기 10 내지 15년 전부터 뇌에서 베타아밀로이드의 비정상적인 응집이 나타난다(Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM. "Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease." Nature. 2009;461:916-22). 이러한 베타아밀로이드는 단량체, 작은 이량체 및 삼량체의 형태로 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB)에 존재하는 RAGE 및 LRP에 의하여 뇌와 혈액 사이를 이동할 수 있어 혈액 중 베타아밀로이드의 농도 변화는 알츠하이머 병의 진행과 직접적인 연관 관계가 있을 것이라 판단된다.

[9] 혈액 내 베타아밀로이드 농도를 이용해 알츠하이머 병을 진단하는 방법에 대한 여러 견해가 있다. 우선 알츠하이머 병의 진행에 따라 베타아밀로이드가 증가한다는 연구결과가 있으며(van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM. "Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study." Lancet Neurol. 2006;8:655-660, Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD. "Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk." Neurology. 2003;8:1185??1190), 이와 반대로 알츠하이머 병의 진행에 따라 혈액 중 베타아밀로이드가 감소한다는 연구결과가 있다(Sundstrom J, Ingelsson E, Ronnemaa E, Arnlov J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H. et al. "Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study." Arch Neurol. 2008;8:256-263). 그리고 알츠하이머 병의 진행에 따른 인지능력 저하와 혈액 중 베타아밀로이드의 변화와는 관련이 없다는 연구결과도 있다(Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K. "Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment." Neurobiol aging. 2010;8:357-367, Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gacsh HM, Sweet RA, Chang YF, Tracy R, DeKosky ST. "Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the cardiovascular health study." Neurology. 2008;8:1664-1671). 이러한 연구 결과의 차이는 혈액 내로 들어온 베타아밀로이드를 정확하게 측정하기 어렵기 때문으로 추정된다.

[10] 현재 알츠하이머 병의 확진은 사후검사로만 인정이 되며 진행정도 등에 대한 진단은 신체검사와 신경학적 검사 정신상태 검사 등 간접적인 증상에 관한 검사를 시행하는 방법, 뇌척수액 내의 베타아밀로이드의 양을 측정하는 방법, 및 가장 정확하게는 뇌 영상검사를 통해 뇌의 구조적 변화나 기능적 변화를 확인하며 베타아밀로이드 플라크를 확인하는 방법이 있으나, 매우 침습적이며 고가의 진단을 진행해야한다는 단점이 있다. 또한, 이러한 단점으로 인해 정확하게 알츠하이머 병을 진단하기 어렵다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명의 목적은 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환의 응집된 단백질의 용해를 통한 농도 분석으로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 정확한 진단이 가능한 혈액진단키트를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[12] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 혈액진단키트는 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전과 후의 혈장 내 단백질의 농도를 측정할 수 있다.

[13] 구체적으로, 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트는 (a) 체 내 비정상적 응집 또는 미스폴딩된 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전에 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제1 측정부; (b) 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제2 측정부; (c) 상기 제1 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 1]로 계산하는 연산부;를 포함할 수 있다;

[14] [수학식 1]

[15] 단백질 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질 농도(B) - 단백질 단량체화 조성물을 투여하기 전 혈장 내 단백질의 농도(A)

[16] 상기 제2 측정부에서 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 다음 20 내지 450시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정할 수 있다.

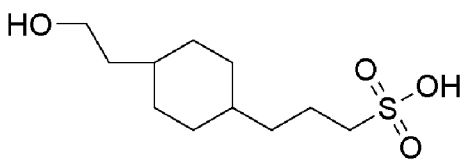
[17] 상기 단백질은 베타아밀로이드일 수 있다.

[18] 상기 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후의 혈장 내 단백질은 뇌 내의 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크가 분해되어 혈액 내로 이동한 것일 수 있다.

[19] 상기 연산부에서 계산된 값이 양(+)의 값을 갖는 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병으로 진단될 수 있다.

[20] 상기 단백질의 단량체화 조성물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유할 수 있다;

[21] [화학식 1]

[22] 

.

[23] 상기 단백질의 단량체화 조성물은 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크를 단량체로 분해할 수 있다.

[24] 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 진단키트는 전혈에서 단백질 단량체의 농도가 감소하는 것을 이용하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 키트로서, 단백질의 단량체화 조성물로 처리하지 않은 혈장 내 단백질의 농도, 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 후 혈장 내 단백질 단량체의 농도 및 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 후 전혈 내 단백질 단량체의 농도를 측정할 수 있다.

[25] 구체적으로, 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트는 (A) 단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제1` 측정부; (B) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제2` 측정부; (C) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 전혈의 전혈 내 단백질의 농도를 측정하는 제3` 측정부; 및 (D) 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제3` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 2]로 계산 또는 상기 제1` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 3]으로 계산하는 연산부;를 포함할 수 있다;

[26] [수학식 2]

[27] $$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 전혈 내 단백질 농도}}{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 혈장 내 단백질 농도}}$$

[28] [수학식 3]

[29] $$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장 내 단백질 농도}}{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리한 혈장 내 단백질 농도}}.$$

[30] 상기 제1` 측정부에서는 전혈에서 분리한 혈장에 단량체화 조성물을 처리하지 않거나 수송물질을 처리하여 23 내지 25 시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정할 수 있다.

[31] 상기 제2` 측정부 및 제3` 측정부에서는 단백질의 단량체화 조성물로 처리하고 23 내지 25시간 후 단백질 단량체의 농도를 측정할 수 있다.

[32] 상기 단백질은 베타아밀로이드일 수 있다.

[33] 상기 단량체화된 단백질은 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체가 분해된 것일 수 있다.

[34] 상기 연산부에 측정된 값이 1.0 미만인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병으로 진단될 수 있다.

[35] 상기 수송물질은 PBS(Phosphate Buffered Saline)일 수 있다.

[36] 상기 단백질의 단량체화 조성물은 상기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유할 수 있다.

발명의 효과

[37] 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트는 단백질의 단량체화 조성물 투여 전과 후의 단백질의 농도를 제1 및 제2 측정부에서 측정, 특히 체내에 집적된 형태의 단백질을 분해하여 간접적으로 혈장에서 단백질 농도를 측정부에서 측정함으로써 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환을 진단 및 예측할 수 있다.

[38] 또 다른 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트는 전혈에서 단량체화된 단백질의 제거로 단백질의 농도가 감소하며; 전혈 및 혈장 내에서 집적된 단백질이 단량체화 또는 저분자-다량체화되어 단백질 측정농도가 높아지는 것을 이용하고, 타 단백질, 지방, 탄수화물, 핵산 및 혈액 세포에 결합되어 있는 단백질도 분리되어 혈장 및 전혈 내 함유된 단백질의 농도를 제1`, 제2` 및 제3` 측정부에서 측정함으로써 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환을 진단 및 예측할 수 있다.

[39] 현재, 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단할 수 있는 방법은 침습적이고 고가이며 병의 진행이 많이 된 경우에만 진단이 가능하다. 단백질의 집적은 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병 환자가 증상을 나타내기 훨씬 이전에 일어나기 때문에 병이 많이 진행된 경우에는 단백질의 집적을 저해하는 것을 목적으로 하는 약물의 효과를 보기 어렵다. 따라서 단백질의 집적을 막아주는 기전의 약물들의 효과를 보기 위해서는 증상이 나타나기 이전에, 단백질이 뇌 내에서 집적되고 있는 시점을 알아내야 한다. 즉, 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 정확한 진단이 반드시 필요하므로 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 저침습적이며 혈장, 혈청 또는 혈액 등의 보편적인 진단시료를 사용한 진단키트가 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[40] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전 및 투여 후의 혈장 내 단백질 농도를 제1 및 제2 측정부에서 측정하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 방식을 나타낸 도면이다.

[41] 도 2는 정상 뇌 및 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환

또는 질병에 의하여 단백질이 집적된 뇌를 보여주는 도면이다.

[42] 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전 및 투여 24시간 후의 혈장 내 베타아밀로이드 42 농도를 나타낸 도면이다.

[43] 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전 및 투여 1일, 5일, 19일 및 33일 후의 혈장 내 베타아밀로이드 42 농도를 나타낸 도면이다.

[44] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따라 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 혈장 및 전혈의 단백질 단량체 농도를 제1`, 제2` 및 제3` 측정부 측정부에서 측정하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 방식을 나타낸 도면이다.

[45] 도 5는 본 발명의 다른 실시예 및 비교예에 따라 단백질의 단량체화 조성물 또는 PBS 투여 24시간 후의 혈장 또는 전혈 내 베타아밀로이드 42 농도를 나타낸 도면이다.

[46] 도 6은 상기 도 5와 상이한 마우스를 이용하여 본 발명의 다른 실시예 및 비교예에 따라 단백질의 단량체화 조성물 또는 PBS 투여 24시간 후의 혈장 또는 전혈 내 베타아밀로이드 42 농도를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[47] 본 발명은 베타아밀로이드의 응집을 원인으로 하는 알츠하이머 병 등의 질병 또는 질환뿐만 아니라 단백질 응집으로 인한 다른 질병 또는 질환의 응집된 단백질의 용해를 통한 농도 분석으로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 정확한 진단이 가능한 진단키트에 관한 것이다.

[48] 상기 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병은 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척수소뇌성 실조증(spinocerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serpin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제 II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 알츠하이머 병, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 축색 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 뇌허혈(brain ischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebralischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질

후 모델(post-status epilepticusmodel), 척수손상(spinal cord injury), 산발성 루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펠트-야콥병, 스폰지폼 뇌질환(Spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(transmissible spongiform encephalopathy)과 같은 프리온 질병(prion disease)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[49] 바람직한 폴딩은 단백질이 가능은 하지만 바람직하지 못한 입체형태의 배열로부터 하나의 특정 구조를 취할 것을 요한다. 폴리펩티드가 그의 적합한 구조를 채용하지 못한 것이 세포 작용 및 생육성에 대한 주된 위협이 된다. 미스폴딩된 단백질은 그 자체로, 및 그 스스로 독성일 수 있고 매우 중증이거나 심지어는 치명적인 결과를 초래할 수 있는 응집체를 형성할 수 있다. 결과적으로, 정교한 시스템은 미스폴딩된 단백질의 유해 효과로부터 세포를 보호하도록 진화하였다.

[50] 또한, 본 발명에서 "단백질 응집"은 폴리펩티드중 하나가 탈용매화 상태가 되도록 하는 방식으로 적어도 2개의 폴리펩티드가 서로 접촉하고 있는 현상을 포함한다. 이는 또한 폴리펩티드 본래의 작용 또는 활성의 손실도 포함할 수 있다.

[51] 또한, 본 발명에서 "단백질"은 바람직하게는 베타아밀로이드일 수 있다.

[52]

[53] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[54] 1. 체내 응집된 단백질의 용해 전, 후의 농도를 측정하여 진단하는 키트

[55] 본 발명의 진단키트는 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전과 후의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단한다.

[56] 구체적으로, 본 발명에 따른 진단키트는 (a) 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전에 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제1 측정부; (b) 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제2 측정부; (c) 상기 제1 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 [수학식 1]로 계산하는 연산부;를 포함한다.

[57] 상기 제1 측정부는 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전의 혈장 내 단백질의 농도를 측정(A)한다.

[58] 또한, 상기 제2 측정부는 단백질의 단량체화 조성물을 경구 또는 비경구 형태로 투여 후의 혈장 내 단백질의 농도를 측정(B)한다. 상기 단백질의 단량체화 조성물의 투여 후의 시간은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 20 내지 450시간, 더욱 바람직하게는 20 내지 300시간이다.

[59] 또한, 상기 연산부는 상기 제1 측정부에서 측정된 혈장 내 단백질의 농도(A)와 상기 제2 측정부에서 측정된 혈장 내 단백질의 농도(B) 차이를 이용하여 계산한다.

[60] [수학식 1]

[61] 단백질 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질 농도(B) - 단백질 단량체화 조성물을 투여하기 전 혈장 내 단백질의 농도(A)

[62] 도 1에 도시된 바와 같이, 상기 [수학식 1]로 계산된 값은 양(+)의 값과 음(-)의 값으로 나눌 수 있다. 여기서, [수학식 1]로 계산된 값이 0 이거나 음(-)의 값인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병이 진행되지 않고 있는 정상이며; 양(+)의 값인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높은 것으로 진단할 수 있다.

[63] 상기 [수학식 1]로 계산된 값이 양(+)의 값인 경우에는 단백질의 단량체화 조성물을 투여 후 혈액 내 단백질의 양이 증가하였음을 의미하며, 이는 뇌 내에 단백질의 집적이 진행되고 있음을 알 수 있으므로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높다고 진단 할 수 있다.

[64] 상기와 같이, 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전과 후의 혈장 내 단백질의 농도로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성을 진단 또는 예측할 수 있는 것은 정상의 뇌 내에는 단백질이 단량체로 존재하는데(도 2, 오른쪽), 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 증상이 발생하기 10 내지 15년 전부터는 뇌 내에 단백질의 비정상적인 응집(중합체, 피브릴, 플라크 등)이 나타나므로(도 2, 왼쪽) 단백질의 단량체화 조성물을 투여하면, 정상의 경우에는 뇌 내에서 단량체로 분해될 중합체의 단백질이 존재하지 않으므로 혈장 내에 단백질의 농도가 증가하지 않으며; 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 증상이 있는 경우에는 뇌 내에서 중합체의 단백질이 분해되어 혈장 내에 단백질의 농도가 증가한다.

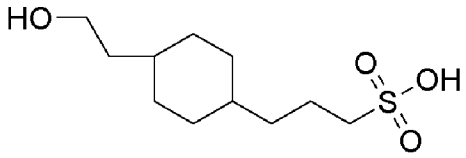
[65] 또한, 상기 뇌 내의 단백질 농도를 간접적으로 혈장에서 측정하는 것은 뇌 내에 존재하는 단백질 농도를 직접 측정할 수 없으므로 뇌 내에 존재하는 단백질 단량체, 이량체, 삼량체 등의 낮은 분자량 중합체가 뇌혈관장벽(BBB)에 존재하는 RAGE 및 LRP를 통하여 뇌, 뇌척수액 그리고 혈액 사이를 이동하는 특징을 이용한 것이다.

[66] 그러므로 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내에 존재하는 단백질은 뇌 내의 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크가 분해된 것일 수 있다. 예컨대, 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내에 존재하는 단백질은 단량체 및/또는 뇌혈관장벽(BBB)에 존재하는 RAGE 및 LRP를 통하여 이동할 수 있는 이량체, 삼량체 등의 낮은 분자량 중합체일 수도 있다.

[67] 또한, 단백질의 단량체화 조성물을 투여하고 일정 시간이 지나면 증가하던 혈액 내 단백질 집적체의 양은 점차 감소하게 되므로 본 발명의 진단키트로 뇌 내 혹은 체 내의 단백질 집적체가 줄어들고 있음을 모니터링할 수 있다.

[68] 상기 단백질의 단량체화 조성물로는 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 조성물을 들 수 있으나, 단백질 중합체를 단량체로 분해할 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다. 상기 EPPS외에 다른 단백질 중합체를 단량체로 분해할 수 있는 물질을 사용하더라도 EPPS를 사용한 것과 동일한 결과를 보인다.

[69] [화학식 1]

[70] 

[71] 상기 화학식 1의 EPPS는 SDS-PAGE를 이용한 결과, Aβ 40 및 Aβ 42의 단량체 크기인 4.3-4.5 KD 부근에서 밴드가 나타나 베타아밀로이드 피브릴이 단량체로 분해되는 것을 확인함으로써 집적된 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크를 분해하는 활성을 갖는 것을 알 수 있으며, 전자현미경을 이용한 결과, 베타아밀로이드의 집적된 형태가 나타나지 않음으로써 집적된 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크를 분해하는 활성을 갖는다는 것을 알 수 있다.

[72] 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 단백질의 단량체화 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[73] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 또한 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[74] 상기 화학식 1로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 단백질의 단량체화 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1의 EPPS를 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[75] 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한

물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[76] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 단백질의 단량체화 조성물을 단위 용량 형태로 제형화하는 경우, 유효성분으로서 상기 화학식 1의 EPPS를 약 0.1 내지 1,500 ㎎/kg의 단위용량으로 함유되는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 나이 및 질병의 특수한 성질과 심각성과 같은 요인에 따라 의사의 처방에 따른다. 그러나, 성인 치료에 필요한 투여량은 투여의 빈도와 강도에 따라 하루에 약 0.1 내지 1000 ㎎/kg/day 범위가 보통이다. 성인에게 근육 내 또는 정맥 내 투여 시 일 회 투여량으로는 분리하여 하루에 보통 약 0.5 내지 300 ㎎/kg/day의 전체 투여량이면 충분할 것이나, 일부 환자의 경우 더 높은 일일 투여량이 바람직할 수 있다.

[77]

[78] 2. 혈액 내 응집된 단백질이 용해된 농도를 측정하여 진단하는 키트

[79] 혈액 중 단백질은 뇌 내의 단백질이 단량체의 형태로 있을 때에 유입될 가능성이 가장 높으며, 집적이 많이 이루어진 형태는 혈액 내로 유입되기 거의 불가능할 것으로 예상된다. 그러나, 단백질이 단량체 형태로 혈액 내로 유입되어도, 혈액 내에서 집적될 가능성을 가지고 있을 뿐 아니라, 혈액 내 타 단백질과 결합된 상태로 존재할 가능성도 있어, 혈액 중 혈장만 단순히 분리하여 단백질의 단량체를 측정하는 방법만으로는 정확한 혈액 내의 단백질 단량체의 농도를 측정하기 불가능하다.

[80] 이런 이유로 단순 혈장 내 단백질의 단량체 농도만으로 정상인과 환자를 구분하기 어렵게 된다. 이는, 혈액 내 단백질을 단량체화 함과 동시에, 타 단백질과 혈액세포 등에서 상기 단백질의 단량체를 분리하여, 단백질 단량체의 농도를 정확하게 측정할 수 있다면 해결된다. 하지만 전혈 내 단백질 단량체의 안정성이 혈장에서 보다 떨어진다는 연구결과가 있는데(Slemmon JR1, Painter CL, Nadanaciva S, Catana F, Cook A, Motter R, Seubert P. "Distribution of Abeta peptide in whole blood."J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 ;846(1-2):24-31) 이는 단백질 단량체가 혈구 구성분에 의해 대사되거나 탐식되는 등에 의한 현상으로 생각된다. 그러므로 전혈에서의 단백질 단량체와 혈장에서의 단백질 단량체의 농도를 비교하면 정확하게 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단 또는 예측할 수 있다.

[81] 상기 타 단백질로는 락토페린(Lactoferrin), 클러스테린(Clusterin), 알파-1-항트립신(Alpha-1-antitrypsin), 아포지방단백 A-IV(Apolipoprotein A-IV), 아포지방단백 E(Apolipoprotein E) 및 아포지방단백 A-I(Apolipoprotein A-I)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 들 수 있다.

[82]

[83] 도 4는 본 발명의 실시예에 따라 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 혈장 및 전혈의 단백질 농도를 제1`, 제2` 및 제3` 측정부에서 측정하여 단백질의

비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하는 방식을 나타낸 도면이다.

[84] 구체적으로, 본 발명의 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트는 (A) 단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제1` 측정부; (B) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제2` 측정부; (C) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 전혈의 전혈 내 단백질의 농도를 측정하는 제3` 측정부; 및 (D) 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제3` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 1]로 계산 또는 상기 제1` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 2]로 계산하는 연산부;를 포함한다.

[85] 상기 제1` 측정부에서는 전혈에서 분리한 혈장에 단량체화 조성물을 처리하지 않거나 수송물질을 처리하여 23 내지 25 시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정한다.

[86] 상기 제2` 측정부에서는 전혈에서 분리한 혈장을 단백질의 단량체화 조성물로 처리하고 23 내지 25 시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정한다.

[87] 또한, 상기 제3` 측정부에서는 전혈을 단백질의 단량체화 조성물로 처리하고 23 내지 25시간 후 혈장을 분리하여 단백질의 농도를 측정한다.

[88] 또한, 상기 연산부는 제2` 측정부에서 측정된 혈장 내 단백질 단량체의 농도와 제3` 측정부에 측정된 전혈 내 단백질 단량체의 농도를 이용하여 연산부에서 하기 [수학식 2]로 계산 또는 제1` 측정부에서 측정된 혈장 내 단백질의 농도와 상기 제2` 측정부에서 측정된 혈장 내 단백질의 농도를 이용하여 연산부에서 하기 [수학식 3]으로 계산한다.

[89] [수학식 2]

[90] $$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 전혈 내 단백질 농도}(MB)}{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 혈장 내 단백질 농도}(MP)}$$

[91] 상기 [수학식 2]로 계산된 값은 MB/MP < 1.0 및 MB/MP ≥ 1.0 구간으로 나눌 수 있다. 여기서, 상기 MB/MP < 1.0인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높을 수 있으며; MB/MP ≥ 1.0인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 적거나 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병이 진행되지 않고 있는 정상인 것으로 진단할 수 있다.

[92] 상기 MB/MP < 1.0인 경우에는 상기 혈장 내 단백질 단량체의 농도(MP)와 전혈 내 단백질 단량체의 농도(MB)의 차이(MP-MB)가 많다는 것을 의미하며, 이는 단백질 집적체 농도가 높다는 것을 의미하므로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높을 수 있는 것이다.

[93] 혈장에서는 단백질 집적체 및 단백질 단량체가 존재하던 중 단백질 집적체를 단백질의 단량체화 조성물로 처리하여 단량체화하므로 혈장 내 단백질

단량체의 농도(MP)가 증가하며; 전혈에서는 단백질 단량체가 혈구나 타 단백질 등에 의해 탐식되거나 대사되므로 단량체화 조성물로 처리하여 집적체를 단량체화하면 전혈 내 단백질 단량체의 농도(MB)가 감소한다. 따라서 'MP-MB = 집적체의 농도'를 의미한다. 또한, 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 클수록 혈액 내 단백질 양이 많아지고 상대적으로 집적체로 집적되는 양이 많아진다. 이로 인해 혈장 내 단량체화 단백질의 농도(MP)가 높아지고 전혈 내 단백질의 농도(MB)가 대사 및 탐식으로 인해 감소하므로 MP-MB값이 커지고, MB/MP값이 1.0 미만이 되는 것이다.

[94] [수학식 3]

[95] $$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장 내 단백질 농도}(UP)}{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리한 혈장 내 단백질 농도}(MP)}.$$

[96] 상기 [수학식 3]으로 계산된 값은 UP/MP < 1.0 및 UP/MP ≥ 1.0 구간으로 나눌 수 있다. 여기서, 상기 UP/MP < 1.0인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높을 수 있으며; UP/MP ≥ 1.0인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 적거나 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병이 진행되지 않고 있는 정상인 것으로 진단할 수 있다.

[97] 상기 UP/MP < 1.0인 경우에는 상기 단량체화 조성물 처리 후 혈장 내 단백질의 농도(MP)와 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장 내 단백질 농도(UP)의 차이(MP-UP)가 많다는 것을 의미하며, 이는 단백질 집적체 농도가 높다는 것을 의미하므로 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 높을 수 있는 것이다.

[98] 혈장에서는 단백질 집적체 및 단백질 단량체가 존재하던 중 단백질 집적체를 단백질의 단량체화 조성물로 처리하여 단량체화하므로 혈장 내 단백질의 농도(MP)가 증가하므로 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장 내 단백질의 농도(UP)와 차이가 나타난다. 따라서 'MP-UP = 집적체의 농도'를 의미한다. 또한, 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병의 발병 가능성이 클수록 혈액 내 단백질 양이 많아지고 상대적으로 집적체로 집적되는 양이 많아진다. 이로 인해 혈장 내 단량체화 단백질의 농도(MP)가 높아지므로 MP-UP값이 커지고, UP/MP값이 1.0 미만이 되는 것이다.

[99] 또한, 상기 제1` 측정부, 제2` 측정부 및 제3` 측정부에서 단량체화된 단백질은 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체 및/또는 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체가 분해된 것이다.

[100] 상기 단백질의 단량체화 조성물로는 상기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 조성물을 들 수 있으나, 단백질 중합체를 단량체로

분해할 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않는다. 상기 EPPS외에 다른 단백질 중합체를 단량체로 분해할 수 있는 물질을 사용하더라도 EPPS를 사용한 것과 동일한 결과를 보일 것으로 예상된다.

[101] 상기 화학식 1의 EPPS는 SDS-PAGE를 이용한 결과, 베타아밀로이드 40 및 42의 단량체 크기인 4.3-4.5 KD 부근에서 밴드가 나타나 베타아밀로이드 피브릴이 단량체로 분해되는 것을 확인함으로써 집적된 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체를 분해하는 활성을 갖는 것을 알 수 있으며, 전자현미경을 이용한 결과, 베타아밀로이드 피브릴이 나타나지 않음으로써 집적된 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체 및/또는 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체를 분해하는 활성을 갖는 다는 것을 알 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[102] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[103] **<실시예 1> 체내 응집된 단백질의 용해 전, 후의 농도를 측정하여 진단하는 키트**

[104] 1. 마우스 준비

[105] 실험동물로는 APP/PS1 형질전환 마우스 암컷을 이용하였으며 5~6 개월(11마리), 7.2~8.6개월 및 13개월령(21마리)의 개체 총 32마리를 이용하였다. 5개월부터 베타아밀로이드가 뇌 안에 집적되어 플라크를 형성하는 모델이므로, 5~6 개월령부터 실험에 이용하였다.

[106] 연구에 사용된 형질전환 마우스 APP/PS1 모델은 B6C3-Tg(APPswe,PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax이며, 미국 잭슨 실험동물 센터(The Jackson Laboratory, USA)에서 구입하여 실험동물 윤리 규정 하에 관리하고 실험에 이용하였다.

[107] 상기 31마리의 마우스를 실험에 이용하기 위하여 마우스 각각에 1,000 mg/kg/day 용량의 EPPS를 투여하였다.

[108]

[109] 2. 마우스 채혈 및 베타아밀로이드 농도 측정

[110] 상기 마우스의 채혈은 80 iu/mL의 헤파린이 처리된 미세관(Msrienfeld, Germany)으로 안와채혈 방법으로 수집하였으며 EPPS 투여 전 및 투여 후에 걸쳐

진행하였다. 상기 EPPS 투여 후는 EPPS를 투여한지 각각 1일, 5일, 19일 및 33일후를 의미한다.

[111] 상기 혈액은 에펜도르프튜브에 수집하고 13,500 rpm, 4 ℃에서 5분 동안 원심분리 하였으며, 혈장은 세포 분획에서 분리하여 수집하고 에펜도르프 튜브에 담아 바로 실험하거나 -80 ℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

[112] 상기 EPPS 투여 전, 투여 후 수집된 혈장에서 베타아밀로이드 농도의 측정은 각각 키트의 제1 및 제2 측정부에서 측정하였으며, 상기 측정된 농도를 연산부에서 [수학식 1]에 따라 계산하여 값을 얻었다. 상기 키트를 이용하여 3회 반복하여 얻은 값의 평균값을 하기 [표 1] 내지 [표 5]에 나타내었다.

[113] 표 1

[Table 1]

구분	young (5-6 month)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A(1 day)	52.151	20.430	191.398	124.731	108.065	102.326	89.535	94.186	146.802	22.674	98.547

[114] 표 2

[Table 2]

구분	aged (7.2 month 이상)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A(1 day)	78.802	12.442	15.385	7.373	182.867	10.138	13.364	7.373	11.060	41.434	20.276
구분	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A(1 day)	4.147	16.129	194.580	18.894	6.119	345.979	19.816	156.294	180.594	140.559	

[115] 표 3

[Table 3]

구분	aged (7.2 month 이상)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A(5 day)	93.531	76.049	170.979	86.122	108.916	311.820	134.965	170.656	207.692	163.986	51.584
구분	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A(5 day)	55.115	88.441	105.420	130.096	118.007	70.105	185.315	66.259	214.549	209.711	

[116] 표 4

[Table 4]

구분	aged (7.2 month 이상)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A(19day)	298.504	70.596	86.108	129.025	57.487	53.294	43.826	101.221	82.444	52.809	-
구분	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A(19day)	-	131.569	88.695	61.725	27.070	32.708	22.406	20.515	59.409	136.814	

[117] 표 5

[Table 5]

구분	aged (7.2 month 이상)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B-A(33day)	114.33	148.154	21.599	71.410	4.797	24.240	11.079	42.621	31.969	23.509	-
구분	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
B-A(33day)	-	39.237	23.448	33.902	41.596	59.545	31.762	51.292	78.101	60.179	

[118] 위 표 1 내지 표 5에 나타낸 바와 같이, EPPS를 투여하고 24시간(1 일) 후 키트에서 베타아밀로이드 농도를 측정하여 계산된 B-A 값은 모든 마우스가 양(+)의 값을 나타내어 EPPS 투여 전보다 투여 후의 베타아밀로이드의 혈중 농도가 늘었음을 보여준다. 이는 사용된 마우스가 베타아밀로이드의 집적체를 형성하는 동물 모델로써, 베타아밀로이드의 집적체가 형성된 동물의 혈장을 본 발명에 따른 키트에 이용하면 EPPS 투여 후 베타아밀로이드가 농도가 증가된 값을 보이는 것을 확인하였으므로 본 발명의 진단키트를 사용하면 알츠하이머 병, 치매 등의 진단 또는 예측에 대한 정확도를 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[119] 도 3a에 도시된 바와 같이, 5~6개월령의 마우스(young) 및 7.2개월령 이상의 마우스(aged)에 대하여 본 발명에 따른 알츠하이머 병을 진단하기 위한 진단키트로 측정한 결과 EPPS를 투여한 후에는 EPPS를 투여하기 전에 비하여 베타아밀로이드 42 농도가 상당량 증가한 것을 확인하였다.

[120] 또한, 개체의 차이는 있지만 EPPS 투여 19일 후부터는 키트에서 얻은 값이 감소하는 경향을 보이는데, 이는 일정 시간이 지나면 뇌 내의 단백질 집적체가 약물에 의해 혈액으로 많이 빠져나오면서 뇌 내의 집적체 양이 줄어들게 되므로

자연스럽게 오랜시간 약물을 투여하게되면 뇌 내에서 혈액으로 빠져나오는 단백질 집적체의 양이 줄어들기 때문이다. 즉, EPPS를 투여하는 시간에 따라, 증가하던 혈액 내 단백질 집적체의 양은 일정시간 이후에 감소하게 되며, 이는 뇌 내에 단백질 집적체가 줄어들고 있음을 의미한다. 그러므로 장기간의 약물투여와 혈액검사를 통해 뇌 내의 병인 단백질 집적체가 줄어들고 있음을 모니터링할 수 있다.

[121] 도 3b에 도시된 바와 같이, 7.2개월령 이상의 마우스(aged)에 대하여 본 발명에 따른 진단키트로 장기투여한 후 측정한 결과, EPPS를 투여한 후에는 EPPS를 투여하기 전에 비하여 베타아밀로이드 42 농도가 상당량 증가 후 다시 감소하는 것을 확인하였다. 뇌 내 집적체 형태로 있던 베타아밀로이드가 용해되면서 혈액 내로 이동하여 진단키트로 관찰되었다. 또한, 장기투여 후 뇌 내에 집적되어 있던 베타아밀로이드의 양이 점점 감소하여 혈액 내에서 관찰되는 농도 역시 감소하게 됨을 알 수 있어 병의 진단 뿐 아니라, 단백질의 집적체가 뇌 안에서 줄고 있음을 혈액진단키트로 모니터링 할 수도 있다.

[122]

[123] **<실시예 2> 혈액 내 응집된 단백질이 용해된 농도를 측정하여 진단하는 키트**

[124] **APP/PS1/Tau 형질전환 마우스를 이용하여 베타아밀로이드 단량체 농도 측정 및 알츠하이머 병의 진단**

[125] 1. 마우스 준비

[126] 실험동물로는 APP/PS1/Tau 형질전환 마우스 암컷을 이용하였으며 5개월령의 동일 주령 개체를 이용하였다.

[127] 연구에 사용된 형질전환 마우스 APP/PS1/Tau 모델은 B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APPSwe,tauP301L)1Lfa/Mmjax이며, 미국 잭슨 실험동물 센터(The Jackson Laboratory, USA)에서 구입하여 실험동물 윤리 규정 하에 관리하고 실험에 이용하였다.

[128]

[129] 2. 혈장 및 전혈 처리

[130] 혈액은 K2 EDTA가 처리된 진공튜브에 Roche cOmplete Mini(protease inhibitor) 용액을 첨가한 후 수집하여 원심분리 하였으며, 혈장은 세포 분획에서 분리하여 수집하고 에펜도르프 튜브에 0.1 mL 표본으로 나누어 바로 실험 또는 -80 ℃에서 보관하였고, 전혈은 바로 EPPS 등을 처리하여 혈장을 세포 분획에서 분리하여 수집하고 에펜도르프 튜브에 0.1 mL 표본으로 나누어 바로 베타아밀로이드 농도를 측정하거나 -80 ℃에서 보관하였다.

[131]

[132] 3. 샘플처리 및 베타아밀로이드 농도 측정

[133] 상기 혈장을 물로 처리한 대조군과 EPPS로 처리한 EPPS 처리군으로 나누어 처리한다.

[134] 상기 EPPS 처리군은 혈장 15 μL에 400 mM EPPS로 5 μL 처리하여 최종적으로

100 mM EPPS가 처리되도록 하였으며, 상기 대조군은 혈장 15 μL에 PBS 5 μL로 처리하여 EPPS 처리군과 동일 농도가 되도록 한 다음 대조군과 EPPS 처리군을 각각 4 ℃에서 24시간 동안 교반하였다.

[135] 상기 전혈은 EPPS처리 후 분석한다.

[136] 상기 전혈 15 μL에 500 mM EPPS로 5 μL 처리하여 최종적으로 100 mM EPPS가 처리되도록 한 후 4 ℃에서 24시간 동안 교반한 다음 베타아밀로이드 농도 측정 전 원심분리하여 혈장을 수집하여 실험하였다.

[137] 상기 수집된 각 혈장에서 베타아밀로이드 농도의 측정은 제1 및 제2 측정부에서 측정하였으며, 연산부에서 [수학식 2]에 따라 3회 계산한 후 그 평균값을 하기 [표 6]에 나타내었다.

[138] 하기 [표 6]은 대조군(UP Aβ), EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ), EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ) 상기 UP와 MP에 대한 UP/MP값 및 상기 MP와 MB에 대한 MB/MP값을 나타낸 것이다.

[139] 표 6

[Table 6]

구분	UP Aβ	MP Aβ	MB Aβ	UP/MP	MB/MP
농도	45.52±17.10	49.53±19.92	30.00±5.32	0.92	0.61
p value(paired *t*-test with MP)	0.00675	-	0.00004	-	-

[140] 위 표 6에 나타낸 바와 같이, 대조군 혈장의 농도(UP Aβ)에 비하여 EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ)가 높으므로 EPPS를 사용하여 베타아밀로이드가 단량체화된 것을 확인하였다. 또한, EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ)는 오히려 UP Aβ보다도 감소되었다(도 5).

[141] 또한, 상기 대조군(UP Aβ)과 EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ)를 이용하여 측정된 UP/MP값은 0.92로서 1.0보다 작으며, 상기 EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ)와 EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ)를 이용하여 측정된 MB/MP값은 0.61로서 1.0보다 작으므로 알츠하이머 병의 위험군이거나 치매가 진행되고 있는 상태로 진단을 내릴 수 있다. 이는 사용된 마우스가 베타아밀로이드의 집적체를 형성하는 동물 모델로써, 베타아밀로이드의 집적체가 형성된 동물의 혈장을 본 발명에 따른 키트에 이용하면 EPPS 투여 후 전혈 내 베타아밀로이드가 농도가 감소된 값을 보이는 것을 확인하였으므로 본 발명의 키트를 사용하면 알츠하이머 병, 치매 등의 진단 또는 예측에 대한 정확도를 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[142] 상기 UP Aβ, MP Aβ 및 MB Aβ에 대하여 더 설명하자면, UP Aβ는 여러 형태(예컨대, 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크,

베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체)가 혼합되어있는 베타아밀로이드를 포함한 혈장을 의미하며, MP Aβ는 UP Aβ의 혼합 베타아밀로이드의 결합을 분리하여 단량체화한 베타아밀로이드를 포함하는 혈장을 의미하고, MB Aβ는 전혈에 EPPS를 처리하여 베타아밀로이드를 단량체화한 후 분리한 혈장을 의미한다. 이때, UP Aβ = [헤테로 Aβ]; MP Aβ = [총 Aβ 단량체]; MP Aβ - MB Aβ = [집적체 Aβ]이다.

[143]

[144] **<실시예 3> 혈액 내 응집된 단백질이 용해된 농도를 측정하여 진단하는 키트**

[145] **APP/PS1 형질전환 마우스를 이용하여 베타아밀로이드 중합체 농도 측정**

[146] 1. 마우스 준비

[147] 실험동물로는 APP/PS1 형질전환 마우스 암컷을 이용하였으며 9개월령의 동일 주령 개체를 이용하였다.

[148] 연구에 사용된 형질전환 마우스 APP/PS1 모델은 B6C3-Tg(APPswe,PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax이며, 미국 잭슨 실험동물 센터(The Jackson Laboratory, USA)에서 구입하여 실험동물 윤리 규정 하에 관리하고 실험에 이용하였다.

[149] 혈장 및 전혈 처리; 샘플처리 및 베타아밀로이드 농도 측정은 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[150] 하기 [표 7]은 대조군(UP Aβ), EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ), EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ), 상기 UP와 MP에 대한 UP/MP값 및 상기 MP와 MB에 대한 MB/MP값을 나타낸 것이다. [표 7]의 값은 3회 측정 후 그 평균값을 나타낸 것이다.

[151] 표 7

[Table 7]

구분	UP Aβ	MP Aβ	MB Aβ	UP/MP	MB/MP
농도	151.35±20.35	151.58±24.03	118.92±10.22	0.99	0.79
p value(paired *t*-test with MP)	0.480	-	0.015	-	-

[152] 위 표 7에 나타낸 바와 같이, EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ)가 오히려 UP Aβ보다도 감소되었다(도 6). 또한, 상기 대조군(UP Aβ)과 EPPS

처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ)를 이용하여 측정된 UP/MP값은 0.99로서 1.0보다 작으며, 상기 EPPS 처리군 혈장의 단량체 농도(MP Aβ)와 EPPS 처리군 전혈의 단량체 농도(MB Aβ)를 이용하여 측정된 MB/MP값은 0.79로서 1.0보다 작으므로 알츠하이머 병의 위험군이거나 치매가 진행되고 있는 상태로 진단을 내릴 수 있다.

[153] 이는 사용된 마우스가 베타아밀로이드의 집적체를 형성하는 동물 모델로써, 베타아밀로이드의 집적체가 형성된 동물의 혈장을 본 발명에 따른 키트에 이용하면 EPPS 투여 후 전혈 내 베타아밀로이드가 농도가 감소된 값을 보이는 것을 확인하였으므로 본 발명의 키트를 사용하면 알츠하이머 병, 치매 등의 진단 또는 예측에 대한 정확도를 높일 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

산업상 이용가능성

[154] 본 발명의 진단키트를 이용하여 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단할 수 있다.

청구범위

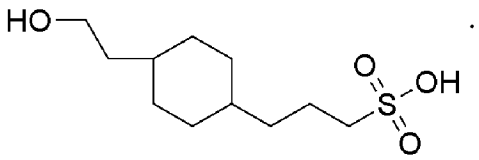
[청구항 1] 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전과 후의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 2] (a) 단백질의 단량체화 조성물을 투여하기 전에 혈장 내 단백질의 농도(A)를 측정하는 제1 측정부;
(b) 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질의 농도(B)를 측정하는 제2 측정부;
(c) 상기 제1 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2 측정부에서 측정된 농도 차이를 이용하여 하기 [수학식 1]로 계산하는 연산부;를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;
[수학식 1]
단백질 단량체화 조성물을 투여한 후 혈장 내 단백질 농도 - 단백질 단량체화 조성물을 투여하기 전 혈장 내 단백질의 농도.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후의 혈장 내 단백질은 뇌 내의 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크가 분해되어 단량체화된 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 베타아밀로이드인 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;
[화학식 1]



[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병은 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척수소뇌성

실조증(spinocerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serpin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 알츠하이머 병, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 축색 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 뇌허혈(brain ischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebralischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticusmodel), 척수손상(spinal cord injury), 산발성 루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펠트-야콥병, 스폰지폼 뇌질환(Spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(transmissible spongiform encephalopathy)과 같은 프리온 질병(prion disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 제2 측정부에서는 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 다음 20 내지 450시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

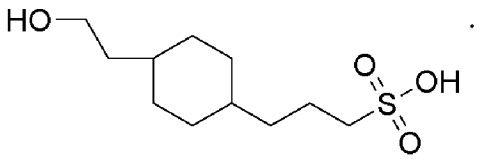
[청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 연산부에서 계산된 값이 양(+)의 값을 갖는 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병으로 진단되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물을 투여한 후의 혈장 내 단백질은 뇌 내의 베타아밀로이드 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴 및 플라크가 분해되어 단량체화된 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 단백질은 베타아밀로이드인 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;

[화학식 1]



[청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병은 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척수소뇌성 실조증(spinocerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serpin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 알츠하이머 병, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 축색 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 뇌허혈(brain ischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebralischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticusmodel), 척수손상(spinal cord injury), 산발성 루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펠트-야콥병, 스폰지폼 뇌질환(Spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(transmissible spongiform encephalopathy)과 같은 프리온 질병(prion disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한

진단키트.

[청구항 13] 전혈에서 단백질 단량체의 농도가 감소하는 것을 이용하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 키트로서,
단백질의 단량체화 조성물로 처리하지 않은 혈장 내 단백질의 농도, 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 후 혈장 내 단백질 단량체의 농도 및 단백질의 단량체화 조성물로 처리한 후 전혈 내 단백질 단량체의 농도를 측정하여 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 14] (A) 단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제1` 측정부;
(B) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 혈장의 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 제2` 측정부;
(C) 단백질의 단량체화 조성물로 처리된 전혈의 전혈 내 단백질의 농도를 측정하는 제3` 측정부; 및
(D) 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제3` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 2]로 계산 또는 상기 제1` 측정부에서 측정된 농도와 상기 제2` 측정부에서 측정된 농도를 이용하여 하기 [수학식 3]으로 계산하는 연산부;를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;

[수학식 2]

$$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 전혈 내 단백질 농도}}{\text{단백질의 단량체화 조성물로 처리한 혈장 내 단백질 농도}}$$

[수학식 3]

$$\frac{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리하지 않은 혈장 내 단백질 농도}}{\text{단백질의 단량체화 조성물을 처리한 혈장 내 단백질 농도}}.$$

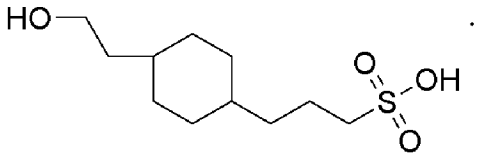
[청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 단량체화된 단백질은 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체가 분해된 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 16] 제13항에 있어서, 상기 단백질은 베타아밀로이드인 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환

또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 17] 제13항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;

[화학식 1]



[청구항 18] 제13항에 있어서, 상기 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병은 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척수소뇌성 실조증(spinocerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serpin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제 II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 알츠하이머 병, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 축색 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 뇌허혈(brain ischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebralischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticusmodel), 척수손상(spinal cord injury), 산발성 루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펠트-야콥병, 스폰지폼 뇌질환(Spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(transmissible spongiform encephalopathy)과 같은 프리온 질병(prion disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 19] 제14항에 있어서, 상기 제1` 측정부에서는 전혈에서 분리한

혈장에 단량체화 조성물을 처리하지 않거나 수송물질을 처리하여 23 내지 25 시간 후 혈장 내 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 20] 제14항에 있어서, 상기 제2` 측정부 및 제3` 측정부에서는 단백질의 단량체화 조성물로 처리하고 23 내지 25시간 후 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 21] 제14항에 있어서, 상기 연산부에 측정된 값이 1.0 미만인 경우에는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병으로 진단되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

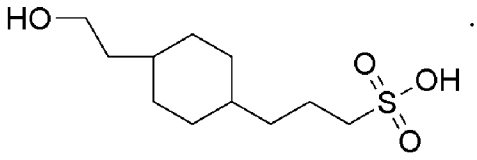
[청구항 22] 제14항에 있어서, 상기 단량체화된 단백질은 베타아밀로이드 이량체, 중합체, 피브릴 전구체, 피브릴, 플라크, 베타아밀로이드 40번 및 42번의 집적체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 단량체, 타 단백질과 결합된 베타아밀로이드 집적체, 지방과 결합된 베타아밀로이드, 탄수화물과 결합된 베타아밀로이드, 핵산과 결합된 베타아밀로이드 및 혈액세포와 결합된 베타아밀로이드 단량체가 분해된 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 23] 제19항에 있어서, 상기 수송물질은 PBS(Phosphate Buffered Saline)인 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

[청구항 24] 제14항에 있어서, 상기 단백질은 베타아밀로이드인 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

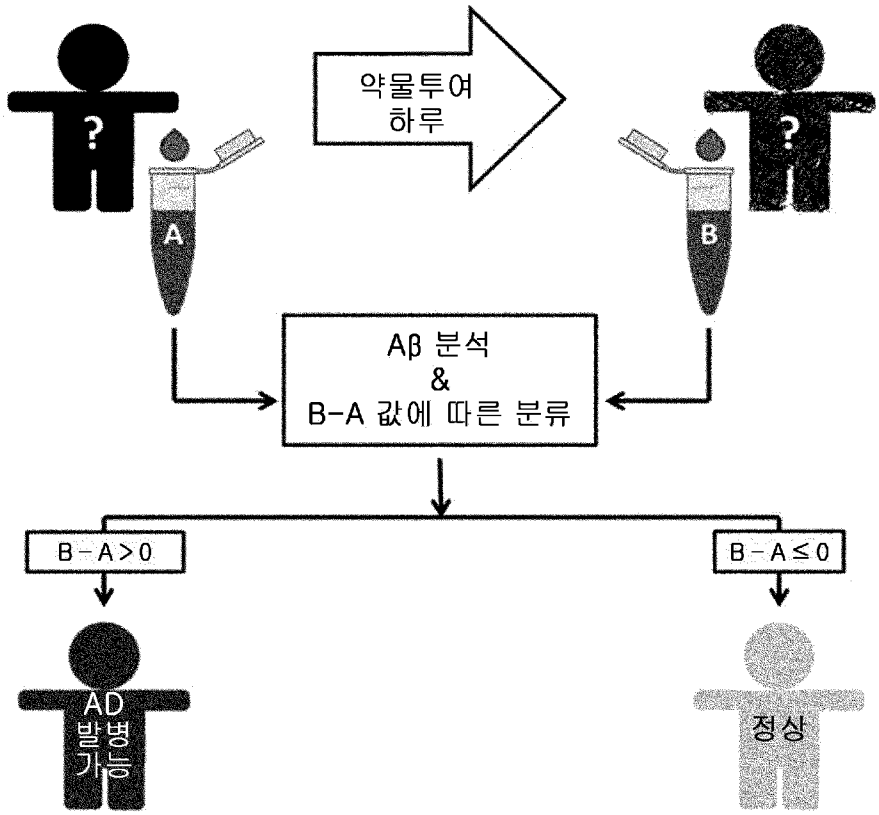
[청구항 25] 제14항에 있어서, 상기 단백질의 단량체화 조성물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 EPPS를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트;

[화학식 1]

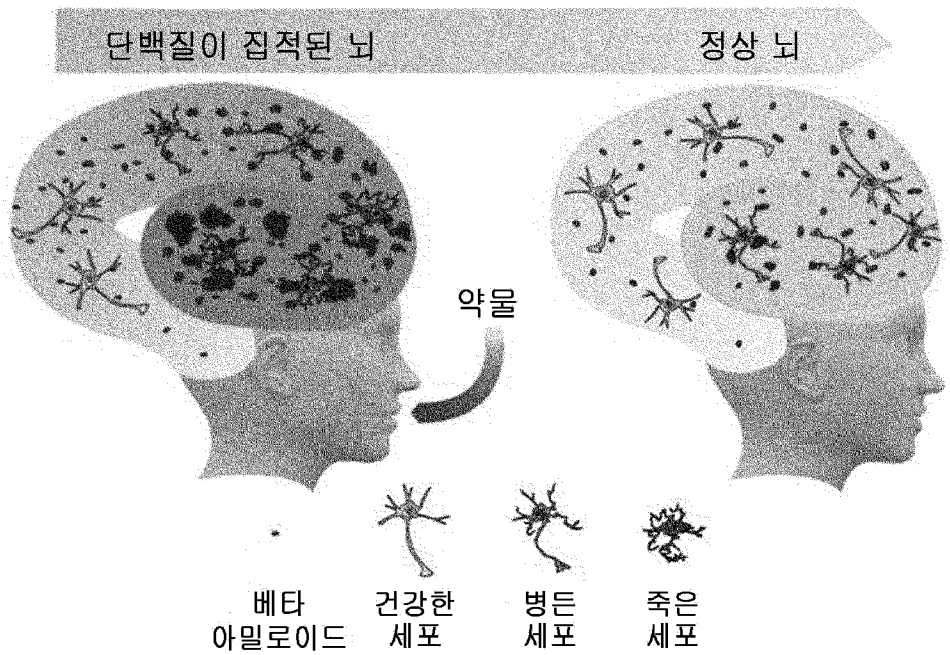


[청구항 26] 제14항에 있어서, 상기 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병은 파킨슨 질환, 헌팅톤 질환(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척수소뇌성 실조증(spinocerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serpin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제 II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 알츠하이머 병, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 축색 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 뇌허혈(brain ischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebralischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticusmodel), 척수손상(spinal cord injury), 산발성 루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펠트-야콥병, 스폰지폼 뇌질환(Spongiform encephalopathy), 전염성 해면양뇌증(transmissible spongiform encephalopathy)과 같은 프리온 질병(prion disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질의 비정상적인 응집 또는 미스폴딩과 관련된 질환 또는 질병을 진단하기 위한 진단키트.

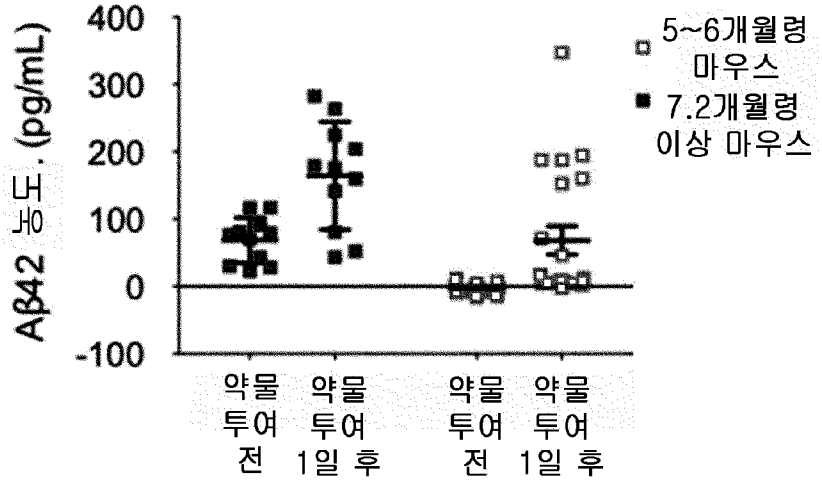
[Fig. 1]


약물투여
하루
A
B
Aβ 분석
&
B-A 값에 따른 분류
B-A>0
B-A≤0
AD
발병
가능
정상

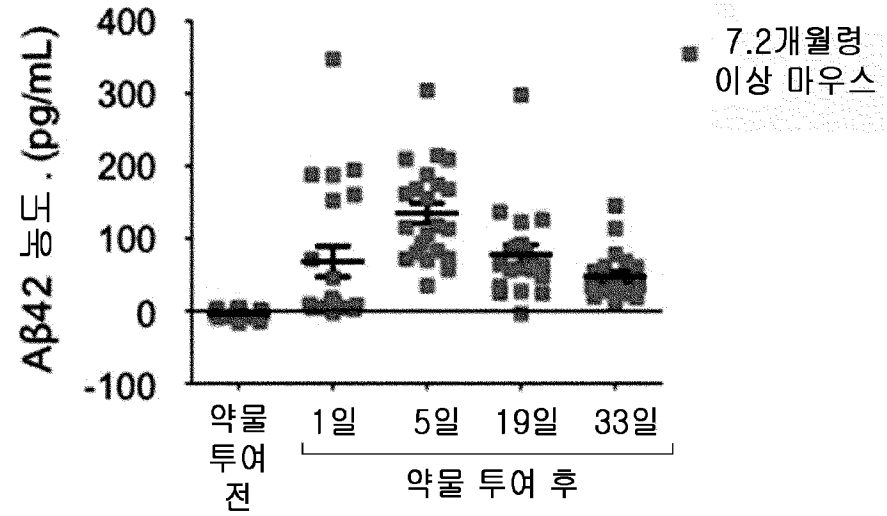
[Fig. 2]


단백질이 집적된 뇌
정상 뇌
약물
베타
아밀로이드
건강한
세포
병든
세포
죽은
세포

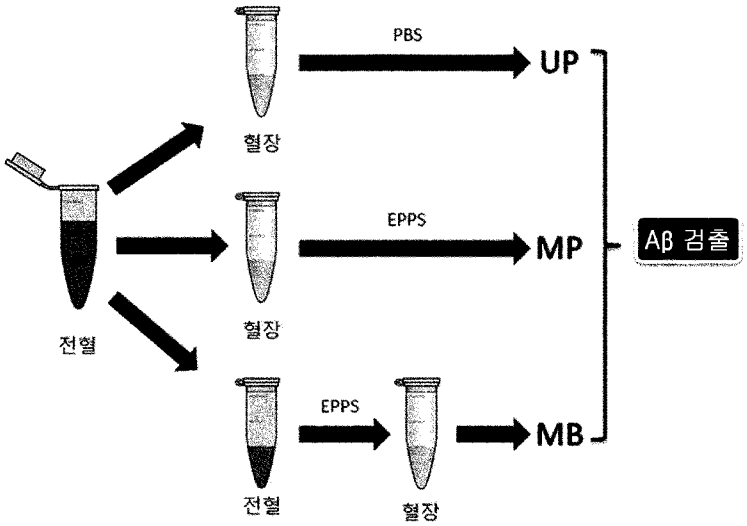
[Fig. 3a]



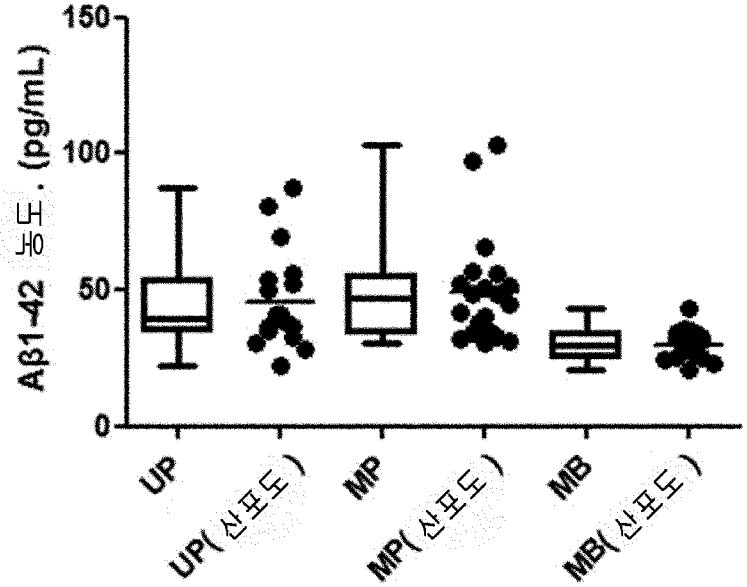
[Fig. 3b]



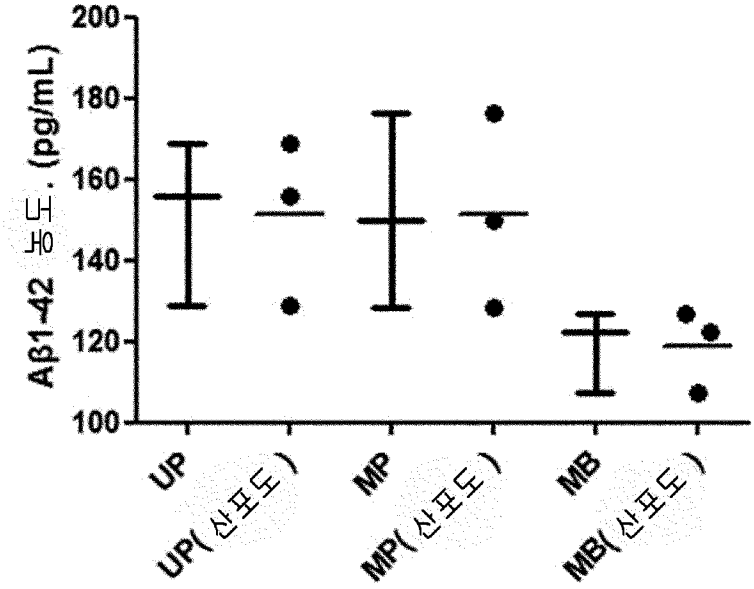
[Fig. 4]



[Fig. 5]


Aβ1-42 농도 . (pg/mL)
150
100
50
0
UP
UP(산포도)
MP
MP(산포도)
MB
MB(산포도)

[Fig. 6]


Aβ1-42 농도 . (pg/mL)
200
180
160
140
120
100
UP
UP(산포도)
MP
MP(산포도)
MB
MB(산포도)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/003643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; A61K 31/495; G01N 33/545; C07K 16/18; G01N 33/53; A61P 25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: protein aggregation, protein misfolding, protein monomerization composition, diagnostic kits, beta amyloid, Alzheimer's disease, EPPS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0066623 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 17 June 2011 See abstract and claims 1-4.	1-26
A	KR 10-2004-0076220 A (DIGITALBIOTECH CO., LTD.) 31 August 2004 See abstract and claims 1-23.	1-26
A	US 7811769 B2 (SEUBERT et al.) 12 October 2010 See abstract and column 5.	1-26
A	KR 10-2012-0116416 A (NOVARTIS AG) 22 October 2012 See abstract and examples 1-5.	1-26
A	CHO, Seon Yeong, "Evaluation of plasma amyloid-beta(amyloid-β) for diagnosis of Alzheimer's disease" Master's thesis, Graduate School Kyunghee University, February 2009. See abstract and pages 5, 23.	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 JULY 2014 (24.07.2014)	**04 AUGUST 2014 (04.08.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/003643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0066623 A	17/06/2011	KR 10-1173677 B1	13/08/2012
		US 2011-0144111 A1	16/06/2011
		US 8536178 B2	17/09/2013
KR 10-2004-0076220 A	31/08/2004	KR 10-0595494 B1	03/07/2006
		US 2006-0188951 A1	24/08/2006
		WO 2004-074837 A1	02/09/2004
US 7811769 B2	12/10/2010	AT 278957 T	15/10/2004
		AU 1996-41544 B2	03/06/1999
		AU 4154496 A	06/06/1996
		AU 705907 B2	03/06/1999
		CA 2205359 C	04/07/2006
		DE 69533623 D1	11/11/2004
		DE 69533623 T2	02/03/2006
		EP 0792458 A1	03/09/1997
		EP 0792458 A4	07/04/1999
		EP 1491889 A2	29/12/2004
		EP 1491889 A3	06/04/2005
		ES 2230551 T3	01/05/2005
		JP 10-509797 A	22/09/1998
		JP 2004-077499 A	11/03/2004
		JP 3634375 B2	30/03/2005
		PT 792458 E	28/02/2005
		US 2004-0253643 A1	16/12/2004
		US 2004-0265920 A1	30/12/2004
		US 2005-0069968 A1	31/03/2005
		US 6114133 A	05/09/2000
		US 7427392 B1	23/09/2008
		US 7700309 B2	20/04/2010
		WO 96-15452 A1	23/05/1996
KR 10-2012-0116416 A	22/10/2012	CA 2779846 A1	12/05/2011
		CA 2781952 A1	03/06/2011
		CN 102725639 A	10/10/2012
		CN 102770766 A	07/11/2012
		EP 2496947 A1	12/09/2012
		EP 2507637 A1	10/10/2012
		JP 2013-510297 A	21/03/2013
		JP 2013-512440 A	11/04/2013
		US 2013-0109581 A1	02/05/2013
		US 2013-0273573 A1	17/10/2013
		WO 2011-057029 A1	12/05/2011
		WO 2011-066583 A1	03/06/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/003643

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; A61K 31/495; G01N 33/545; C07K 16/18; G01N 33/53; A61P 25/28

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 단백질 응집, 단백질 미스폴딩, 단백질 단량체화 조성물, 진단키트, 베타 아밀로이드, 알츠하이머병, EPPS

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0066623 A (한국과학기술연구원) 2011.06.17 요약 및 청구항 1-4 참조.	1-26
A	KR 10-2004-0076220 A ((주) 디지털바이오텍) 2004.08.31 요약 및 청구항 1-23 참조.	1-26
A	US 7811769 B2 (SEUBERT 외) 2010.10.12 요약 및 컬럼 5 참조.	1-26
A	KR 10-2012-0116416 A (노파르티스 아게) 2012.10.22 요약 및 실시예 1-5 참조.	1-26
A	조선영, `알츠하이머병 진단을 위한 혈장 아밀로이드 베타(amyloid-β)의 유용성 분석` 석사학위논문, 경희대학교 대학원, 2009.02. 요약 및 페이지 5, 23 참조.	1-26

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 07월 24일 (24.07.2014)	2014년 08월 04일 (04.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/003643

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0066623 A	2011/06/17	KR 10-1173677 B1	2012/08/13
		US 2011-0144111 A1	2011/06/16
		US 8536178 B2	2013/09/17
KR 10-2004-0076220 A	2004/08/31	KR 10-0595494 B1	2006/07/03
		US 2006-0188951 A1	2006/08/24
		WO 2004-074837 A1	2004/09/02
US 7811769 B2	2010/10/12	AT 278957 T	2004/10/15
		AU 1996-41544 B2	1999/06/03
		AU 4154496 A	1996/06/06
		AU 705907 B2	1999/06/03
		CA 2205359 C	2006/07/04
		DE 69533623 D1	2004/11/11
		DE 69533623 T2	2006/03/02
		EP 0792458 A1	1997/09/03
		EP 0792458 A4	1999/04/07
		EP 1491889 A2	2004/12/29
		EP 1491889 A3	2005/04/06
		ES 2230551 T3	2005/05/01
		JP 10-509797 A	1998/09/22
		JP 2004-077499 A	2004/03/11
		JP 3634375 B2	2005/03/30
		PT 792458 E	2005/02/28
		US 2004-0253643 A1	2004/12/16
		US 2004-0265920 A1	2004/12/30
		US 2005-0069968 A1	2005/03/31
		US 6114133 A	2000/09/05
		US 7427392 B1	2008/09/23
		US 7700309 B2	2010/04/20
		WO 96-15452 A1	1996/05/23
KR 10-2012-0116416 A	2012/10/22	CA 2779846 A1	2011/05/12
		CA 2781952 A1	2011/06/03
		CN 102725639 A	2012/10/10
		CN 102770766 A	2012/11/07
		EP 2496947 A1	2012/09/12
		EP 2507637 A1	2012/10/10
		JP 2013-510297 A	2013/03/21
		JP 2013-512440 A	2013/04/11
		US 2013-0109581 A1	2013/05/02
		US 2013-0273573 A1	2013/10/17
		WO 2011-057029 A1	2011/05/12
		WO 2011-066583 A1	2011/06/03