



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014037

(43) 공개일자 2015년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0088793

(22) 출원일자 2013년07월26일

심사청구일자 2013년07월26일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 가호로44번길 7 102동 303호 (호탄동, 대동아파트)

김상태

서울 광진구 아차산로 262, C동 3601호 (자양동, 더샵스타시티)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

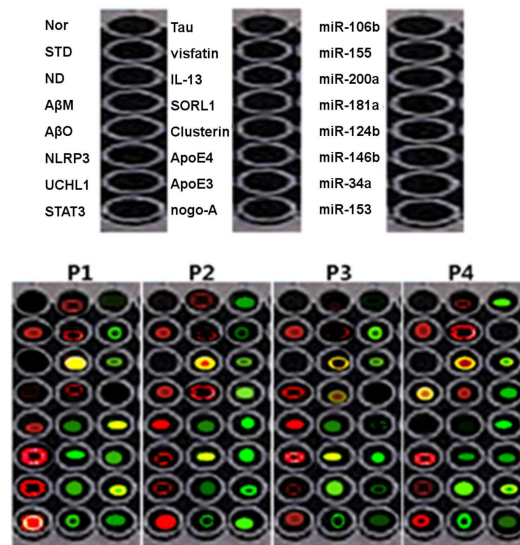
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머 치매의 조기 진단키트

(57) 요약

본 발명은 알츠하이머 치매의 조기진단을 위하여, miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 탐침분자를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단 키트를 제공한다. 더 나아가 본 발명은 상기 8가지 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 및 알츠하이머 특이적 항원인 A β ₁₋₄₂ 단백질, A β ₁₋₄₂ 올리고머, NLRP3, 타우(Tau), ApoE4, 및 nogo-A를 동시에 검출할 수 있는 탐침분자들을 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단 키트를 제공한다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능항진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 나노담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알즈하이머 특이적 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 탐침분자를 포함하는 알즈하이머 치매의 조기진단 키트.

청구항 2

하기 구조를 갖는 항원 검출용 형광 나노입자:

A-B-Y-E-B'-Z

(상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드로서 상기 Y 및 E는 탐침영역을 구성하며, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이며, 상기 B, Y, E 및 B'는 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

청구항 3

하기와 같이 III 및 IV의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자로 구성되는 항원 검출용 형광 나노입자:

A-B-Y-E-D (III), 및

Z-L (IV)

(상기 구조에 있어서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 알즈하이머 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 단일가닥 올리고뉴클레오타이드로서 상기 Y 및 E는 탐침영역을 구성하며, 상기 D는 부분적으로 상기 B와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 표적 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 소광체이며, 상기 L은 상기 B와 부분적으로 상보결합하고 상기 D와 함께 스템(stem)을 형성할 수 있는 링커영역부이고, 상기 B, Y, E, D 및 L은 상기 알즈하이머 특이적 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

청구항 4

하기 a 및 b의 구조를 각각 갖는 분자들을 포함하는 항원 검출용 형광 나노입자 생산용 키트:

A-B-COOH (a); 및

NH₂-E-B'-Z 또는 NH₂-E-D (b)

(상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 B' 또는 D는 부분적으로 상기 B와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 표적 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B와 E 사이에 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편 Y가 연결되면, 상기 B, Y, E 및 B' 또는 상기 B, Y, E, D 및 L(상기 L은 상기 B와 부분적으로 상보결합하고 상기 D와 함께 스템(stem)을 형성할 수 있는 링커영역부로서 Z-L의 구조를 갖는 별도의 분자로 제공됨)은 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

청구항 5

A-B-C-B'-Z의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자 또는 하기와 같은 I 및 II의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자를 포함하는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침 복합체:

A₁-B₁-C₁-D₁ (I), 및

Z₁-L₁ (II); 및

A₂-B₂-Y-C₂-B₂'-Z의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자 또는 하기와 같은 III 및 IV의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자를 포함하는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자 복합체:

A₂-B₂-Y-C₂-D₂ (III), 및

Z₂-L₂ (IV)

를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기 진단키트

(상기 구조에서 상기 A₁ 및 A₂는 각각 형광체이고, 상기 B₁ 및 B₂는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 알츠하이머 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 C₁은 루프를 형성하면서 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C₂는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 D₁은 부분적으로 상기 B₁와 부분적으로 상보적 결합을 하고 상기 탐침 올리고뉴클레오타드에 표적 마이크로 RNA가 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 D₂는 부분적으로 상기 B₂와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 L₁ 및 L₂는 각각 상기 B₁ 및 B₂와 부분적으로 상보결합할 수 있는 링커영역부이며, 상기 Z₁ 및 Z₂는 각각 상기 A₁ 및 A₂의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B₁, C₁, D₁ 및 L₁은 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A₁에 의한 형광은 Z₁에 의해 소광되고, 상기 B₂, Y, C₂, D₂ 및 L₂는 상기 알츠하이머 특이적 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A₂에 의한 형광은 Z₂에 의해 소광된다).

청구항 6

하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법:

하기 구조를 갖는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자가 코팅된 반응용기에 대상으로부터 채취된 시료를 반응시키는 단계:

A-B-C-B'-Z(상기 구조에서 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B, C 및 B'는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다); 및

상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.

청구항 7

하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법:

하기 구조를 갖는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자가 코팅된 반응용기에 대상으로부터 수득한 시료를 반응시키는 단계:

A-B-Y-E-B'-Z(상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이며, 상기 B, Y, E 및 B'는 상기 항원 부재시 스템-루프

(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다); 및
상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.

청구항 8

하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법:

$A_1-B_1-C-B_1'-Z$ 의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자; 및 $A_2-B_2-Y-E-B_2'-Z_2$ 의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자가 각각 코팅된 반응용기에 대상으로부터 수득된 혈장을 반응시키는 단계:

(상기 구조에서 A_1 및 A_2 는 각각 형광체이고, 상기 B_1 및 B_2 는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오티드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오티드이며, 상기 C_2 는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오티드이고, 상기 B_1' 및 B_2' 는 각각 B_1 및 B_2 와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오티드이며, 상기 Z_1 및 Z_2 는 각각 상기 A_1 및 A_2 의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B_1 , C_1 및 B_1' 는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A_1 에 의한 형광은 Z_1 에 의해 소광되며, 상기 B_2 , Y, C_2 및 B_2' 는 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A_2 에 의한 형광은 Z_2 에 의해 소광된다); 및

상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.

청구항 9

하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기 진단을 위한 정보제공 방법:

대상으로부터 수득된 시료로부터 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA; 및 $A\beta_{1-42}$ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), $A\beta_{1-42}$ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 및 비스파틴(visfatin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 항원을 정량하는 단계; 및

상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 및 상기 알츠하이머 특이적 항원의 발현수준 및 발현양상을 분석하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA는 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155이고, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 $A\beta_{1-42}$ 단량체, $A\beta_{1-42}$ 올리고머, NLRP3, 타우(Tau), ApoE4, 및 nogo-A이며, 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상기 알츠하이머 특이적 항원을 모두 동시에 분석하는, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 진단키트에 관한 것으로서, 더 상세하게는 알츠하이머 치매의 조기 진단키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 노령화 사회가 접어들면서 각종 노인질환이 큰 사회적 문제점으로 대두되면서 국가적으로 의료비 부담과 국가경제에 막대한 손실을 초래하고 있기 때문에, 이에 대하여 많은 관심이 유발되고 활발한 연구가 이루어지고 있다. 알츠하이머 치매(Alzheimer's dementia, 이하 'AD'로 칭함)는 운동력과 인지능력 저하의 파행적인 진행과 함께

다양한 심리적, 행동장애 증상이 동반되며 초기의 경미한 증상에서 시작하여 최종적으로 자발적인 개인생활이 불가능할 정도로 진행되어서 환자와 가족, 그리고 사회에까지 의료비 등 막대한 경제적 부담을 초래하며 국가적으로 경제인구의 손실을 초래하는 등 그 피해가 매우 심각하다. 알츠하이머병은 65-74세 인구의 10%, 75-84세 인구의 19%, 그리고 85세 이상의 인구의 47%가 발병하고, 발병률이 해마다 증가하는 등 심각한 사회문제로 떠오르는 퇴행성 뇌질환이다.

[0003]

현재까지 알려진 알츠하이머병의 발병기전은 '아밀로이드 가설'인데, 이는 치매 환자의 내에서 존재하는 아밀로이드 베타 및 이들이 축적되어 발생하는 신경반(플라크)이 신경세포의 지속적인 사멸을 유도하고 뇌신경 전달을 저해하여 인지기능의 손상을 일으켜 병을 유발한다는 가설이다. 치매의 조직병리학적 소견이 현재까지 이 질환의 핵심적인 병리기전과 관련되어 있다고 보고되고 있다. 즉, 사후 조직부검을 통한 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, 이하 'NFT'라 칭함)과 아밀로이드 신경반(amyloid plaque)의 병리소견이 유일한 확진방법이다. 이중 아밀로이드 신경반은 세포 외부에 단백질과 죽은 세포 등이 축적되어 형성되는 것으로, 주 구성분은 아밀로이드-베타(Amyloid-beta, 이하, ' $A\beta$ '라 칭함)라는 펩티드이다(Hardy, J. *et al.*, *Nat. Neurosci.* 1: 355-358, 1998). 알츠하이머병 환자의 주요 특징인 인지작용의 점진적 상실은 비정상적으로 축적된 $A\beta$ 에 의해 유발되는 것으로 보이며, $A\beta$ 는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein: 이하 'APP'라 칭함)로부터 β -세크레타제(BACE) 및 γ -세크레타제(GSCE)에 의해 분해되는, 단백질분해(proteolysis) 과정을 통해 생성된다. 상대적으로 비침습적인 시료인 혈액으로부터 알츠하이머의 진단지표를 개발하려는 노력이 활발하게 이루어지고 있는데, 이러한 내용으로는 글루타민 합성효소를 지표로 한 알츠하이머 진단키트에 관한 W02002/088706호 및, 후성유전적 마커인 DNA 메틸화 정도를 확인함으로써 알츠하이머 질환을 진단하는 방법에 관한 W02010/144634호 등이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004]

그러나, 아직까지 상기 선행기술을 포함하여, 증상이 나타나기 전에 치매를 조기에 진단할 수 있는 신뢰성 있는 방법은 아직까지 제공되지 못하고 있는 실정이다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명은 알츠하이머 치매의 조기진단 키트 및 글루 이용한 치매의 조기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005]

본 발명의 일 관점에 따르면, miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA를 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 탐침분자를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단 키트가 제공된다.

[0006]

상기 키트에 있어서, 상기 탐침분자는 하기 구조를 가질 수 있다:

[0007]

A-B-C-B'-Z(상기 구조에서 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 올리고뉴클레오타이드인 탐침영역이고, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B, C 및 B'는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

[0008]

상기 탐침분자는 추가적으로 바이오틴(biotin)을 포함할 수 있으며, 상기 바이오틴은 상기 B' 및 Z 사이에 위치할 수 있으나, 특별히 그의 위치가 제한되는 것은 아니다.

[0009]

선택적으로, 상기 키트는 하기와 같은 I 및 II의 구조를 각각 갖는 두 개의 탐침분자를 포함할 수 있다:

[0010]

A-B-C-D (I); 및

[0011]

Z-L (II)

[0012]

(상기 구조에서 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 D는 부분적으로 상기 B와 상보적 결합을 하고 상기 탐침 올리고뉴클레오타드에 표적 마이크로 RNA가 결합할 때 열역학적으로 상

기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t의 3'-말단 올리고뉴클레오티드이며, 상기 L은 상기 B와 부분적으로 상보결합하고 상기 D와 함께 스템(stem)을 형성할 수 있는 링커영역부이고, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이며, 상기 B, C, D 및 L은 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

[0013] 상기 탐침분자 또는 탐침 복합체에 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA가 결합하게 되면 상기 스템-루프 구조가 풀리게 되고, 이렇게 되면 상기 형광체와 상기 소광체는 이격되어 상기 형광체에 의한 형광이 나타나게 된다.

[0014] 아울러, 상기 키트에는 스트렙타비딘(streptavidin)이 도말된 반응용기가 추가적으로 포함될 수 있고 상기 반응용기는 24웰, 48웰, 96웰, 192웰 또는 384웰의 마이크로플레이트일 수 있다.

[0015] 상기 진단키트에 있어서, 상기 형광체는 폴리 L-리신-플루오레세인 이소티오시아나트(poly-lysine-flourescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아나트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC), 로다민(rhodamine) 및 그의 유도체로서 6-카복시-X-로다민(ROX), 6-카르복시로다민(R6G), 리사민 로다민 B, 설포닐 클로라이드, 로다민 B, 로다민 123, 로다민 X 이소티오시아네이트, 설포로다민 B, 설포로다민 101, 설포로다민 101의 설포닐 클로라이드 유도체(Texas Red), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민(TAMRA), 테트라메틸 로다민, 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 리보플라빈, 로줄산, 터븀 킬레이트 유도체, Alexa 유도체, Alexa-350, Alexa-488, Alexa-547 및 Alexa-647, Cy2, Cy3, Cy5 및 양자점(quantum dot, 이하, 'QD'라 칭함)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0016] 상기 양자점은 중심체, 상기 중심체를 봉입한 상태로 있는 중심부 및 상기 중심부를 코팅하고 있는 고분자 코팅층의 구조로 이루어질 수 있다. 본 발명에서 상기 양자점의 구체적인 종류는 특별히 제한되는 것은 아니고, 생체 이미징에 사용 가능하도록 생체적합성을 가지고 있는 것이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서는 상기 양자점의 입자 직경이 5 nm이하인 것을 사용할 수 있다. 상기 양자점의 중심체를 구성하는 성분은 CdSe(카드뮴-셀레늄), CdTe(카드뮴-텔루라이드) 또는 CdS(황화 카드뮴) 등 주로 중금속이 사용되고 있으므로, 양자점의 사용이 인체에 유해할 수도 있다. 그러나, 본 발명에서는 양자점의 직경 크기를 5 nm 이하로 제어함으로써, 양자점의 빠른 체외 배출을 통해 체내에서 잔류 시간을 축소하여 독성을 절감할 수 있다(Choi *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 25(10): 1165-1170, 2007).

[0017] 첨부된 도 1은, 형광체가 결합되어 있는 올리고뉴클레오티드 및 소광체가 결합되어 있는 올리고뉴클레오티드가 혼성화되어 있는 본 발명의 일실시예에 따른 분자영상을 위한 탐침분자 또는 형광 나노입자가 신경세포, 조직 또는 혈장과 같은 시료에서 특정 표적분자와 결합시 해리될 수 있는 영역이 결합된 상태를 모식화한 도면이다. 첨부된 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 탐침분자 또는 형광 나노입자는 바이오틴(11)이 연결된 링커영역부(12), 및 링커영역부(12)에 연결된 소광체(13)로 구성된 제1분자(10); 및 알츠하이머 특이적 표적분자인 miRNA 또는 알츠하이머 특이적 항원인 염증매개인자 또는 치매유발 단백질과 혼성화 내지 친화도를 지닌 영역을 포함하는 탐침영역(21), 상기 탐침영역(21)의 양 말단에 연결된 올리고뉴클레오티드로서 서로 혼성화할 수 있는 5'-말단 올리고뉴클레오티드(22) 및 3'-말단 올리고뉴클레오티드(23), 및 5'-말단 올리고뉴클레오티드(22) 또는 3'-말단 올리고뉴클레오티드(23)의 말단에 연결되어 표적분자 존재시 해리되어 형광을 나타낼 수 있는 형광체(24)를 포함하는 제2분자(20)로 구성될 수 있으며, 이 때 상기 링커영역부(12)와 5'-말단 올리고뉴클레오티드(22) 또는 3'-말단 올리고뉴클레오티드(23) 사이에 부분적으로 상보결합을 형성함으로써, 제1분자(10)와 제2분자(20)는 본 발명의 탐침 복합체(1)를 형성할 수 있다. 치매유발 특이적 표적분자가 항원일 경우, 상기 탐침영역(21)은 도 1의 B에 도시된 바와 같이, 항체(21')가 포함될 수 있다. 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 소광체(13)와 상기 형광체(24)는 그 위치가 바뀌어도 무방하고, 제1분자(10)와 제2분자(20)로 나뉘어 구성되지 않고, 소광체(13)와 형광체(24)가 하나의 분자에 연결되어 스템-루프(stem-loop) 구조를 갖는 단일 탐침분자를 형성할 수도 있다.

[0018] 첨부된 도 2에 나타난 바와 같이, 소광체(13)는 형광체(24)가 근접한 위치에서 링커영역부(12)에 의해 5'-말단 올리고뉴클레오티드(22) 또는 3'-말단 올리고뉴클레오티드(23)과 상보결합하고 있기 때문에, 형광체(24)는 소광체(13)에 의해 소광화(Quenching)되게 된다. 즉, 소광체(13)와 결합되어 있는 링커영역부(12)는 표적분자 부재시에는 상기 제2분자(20)와 혼성화되어 있으므로 에너지 소거상태로 존재하여 형광소광상태로 존재하여 형광이 나타나지 않는다. 반면, 시료에 표적분자인 치매 특이적 miRNA 또는 치매 특이적 단백질 항원이 존재하면, 이들 표적분자가 탐침 복합체(1)의 탐침영역의 표적 염기서열 또는 항체와 반응하여 소광체(13)가 해리되면서 탐침복합체(1)의 형광체(24)가 여기 상태로 되어 형광을 나타내게 된다. 즉, 표적분자가 존재하지 않을 상태에서는 신

호꺼짐(signal-off) 상태이지만, 표적분자가 상기 탐침분자 또는 탐침 복합체와 접촉할 경우에는 신호켜짐(signal-on)이 되는 분자형광 감지 시스템을 제공할 수 있다.

- [0019] 따라서, 상기와 같은 본 발명의 분자영상센서를 이용하면 특정 표적분자의 세포나 조직에서 존재여부를 간단한 시험관 내 실험방법을 통해 확인할 수 있고 핵산센서가 표적으로 하는 세포나 조직내부로 형질이입 후, 감지하고자 하는 표적분자의 존재여부를 형광 신호의 꺼짐-켜짐(on-off)를 통해 확인할 수 있다.
- [0020] 비록, 상술한 도 2에서는 분자영상 센서의 좌측 말단부에 형광체를 용이하게 접합하기 위해 링커 영역을 이용하고 있지만, 본 발명에 따른 분자비콘의 구성에 있어서, 상기 링커영역이 반드시 필요한 것은 아니다. 상기 탐침분자 또는 형광 나노입자의 링커영역이 존재하지 않더라도 표적분자와 혼성화될 수 있는 영역의 일 말단부(5'-또는 3'-)에 형광물질을 갖도록 개질할 수 있다. 또한 상기 형광센서의 링커영역부에 바이오틴화 기능기를 부착하도록 개질화할 수 있지만 반드시 필요한 것은 아니다.
- [0021] 상기 진단키트에 있어서, 상기 소광체는, 4-(디메틸아미노)아조벤젠-4-카복실산(DABCYL), 4-(디메틸아미노)아조벤젠 설펜산(DABSYL), BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 등의 BHQ(Biosearch Technologies, Inc) 또는 Eclipse(Amersham Bioscience)일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 하기 구조를 갖는 항원 검출용 형광 나노입자가 제공된다:
- [0023] A-B-Y-E-B'-Z(상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드로서 상기 Y 및 E는 탐침영역을 구성하며, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이며, 상기 B, Y, E 및 B'는 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).
- [0024] 선택적으로, 상기 나노입자는 하기와 같이 III 및 IV의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자로 구성될 수 있다:
- [0025] A-B-Y-E-D (III), 및
- [0026] Z-L (IV)
- [0027] (상기 구조에 있어서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 알즈하이머 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 단일가닥 올리고뉴클레오타이드로서 상기 Y 및 E는 탐침영역을 구성하며, 상기 D는 부분적으로 상기 B와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 표적 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 소광체이며, 상기 L은 상기 B와 부분적으로 상보결합하고 상기 D와 함께 스템(stem)을 형성할 수 있는 링커영역부이고, 상기 B, Y, E, D 및 L은 상기 알즈하이머 특이적 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다)
- [0028] 상기 나노입자는 추가적으로 바이오틴을 포함할 수 있고, 상기 바이오틴은 상기 B' 및 Z 사이 또는 L의 말단에 연결될 수 있으나, 특별히 그 위치가 그에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 나노입자의 항체 또는 그의 단편인 Y에 상기 항원이 결합하면, 상기 스템-루프의 구조가 풀리게 되며, 이 경우 상기 형광체(A)와 상기 소광체(Z)는 서로 이격되어 상기 형광체에 의한 형광이 나타나게 된다.
- [0030] 아울러, 상기 키트에는 스트렙타비딘이 도말된 반응용기가 추가적으로 포함될 수 있고 상기 반응용기는 24웰, 48웰, 96웰, 192웰 또는 384웰의 마이크로플레이트일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 하기 a 및 b의 구조를 각각 갖는 분자들을 포함하는 항원 검출용 형광 나노입자 생산용 키트가 제공된다.
- [0032] A-B-COOH (a); 및
- [0033] NH₂-E-B'-Z 또는 NH₂-E-D (b)
- [0034] (상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 B' 또는 D는 부분적으로 상기 B와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 표적 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말

단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B와 E 사이에 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편 Y가 연결되면, 상기 B, Y, E 및 B' 또는 상기 B, Y, E, D 및 L(상기 L은 상기 B와 부분적으로 상보결합하고 상기 D와 함께 스템(stem)을 형성할 수 있는 링커영역부로서 Z-L의 구조를 갖는 별도의 분자로 제공됨)은 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다).

- [0035] 상기 키트를 이용할 경우 하기와 같은 과정을 거쳐 항원 검출용 형광 나노입자를 제조할 수 있다:
- [0036] 상기 분자 (a)의 카르복실기(-COOH)와 항체 또는 그의 단편(Y)의 N-말단의 아미노기(-NH₂) 사이에 아마이드결합(-CONH-)이 형성되고, 상기 항체 또는 그의 단편(Y)의 C-말단의 카르복실기(-COOH)와 상기 분자 (b)의 아미노기(-NH₂) 사이에 아마이드 결합이 형성됨으로써, A-B-Y-E-B'-Z의 구조를 갖는 항원 검출용 형광 나노입자가 형성된다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면,
- [0038] A-B-C-B'-Z의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자 또는 하기와 같은 I 및 II의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자를 포함하는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침 복합체:
- [0039] A₁-B₁-C₁-D₁ (I), 및
- [0040] Z₁-L₁ (II); 및
- [0041] A₂-B₂-Y-C₂-B₂'-Z의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자 또는 하기와 같은 III 및 IV의 구조를 각각 갖는 두 개의 분자를 포함하는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자 복합체:
- [0042] A₂-B₂-Y-C₂-D₂ (III), 및
- [0043] Z₂-L₂ (IV)
- [0044] 를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기 진단키트가 제공된다
- [0045] (상기 구조에서 상기 A₁ 및 A₂는 각각 형광체이고, 상기 B₁ 및 B₂는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 알츠하이머 특이적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 C₁은 루프를 형성하면서 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C₂는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 D₁은 부분적으로 상기 B₁와 부분적으로 상보적 결합을 하고 상기 탐침 올리고뉴클레오타이드에 표적 마이크로 RNA가 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 D₂는 부분적으로 상기 B₂와 상보적 결합을 하고 상기 항체 Y에 항원이 특이적으로 결합할 때 열역학적으로 상기 Z가 상기 A로부터 해리되도록 스위치 역할을 수행하는 3 내지 12 n.t.의 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 L₁ 및 L₂는 각각 상기 B₁ 및 B₂와 부분적으로 상보결합할 수 있는 링커영역부이며, 상기 Z₁ 및 Z₂는 각각 상기 A₁ 및 A₂의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B₁, C₁, D₁ 및 L₁은 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A₁에 의한 형광은 Z₁에 의해 소광되고, 상기 B₂, Y, C₂, D₂ 및 L₂는 상기 알츠하이머 특이적 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A₂에 의한 형광은 Z₂에 의해 소광된다).
- [0046] 상기 진단키트에 있어서, 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA는 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 또는 miR-155일 수 있고, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 또는 비스파틴(visfatin)일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법이 제공된다:
- [0048] 하기 구조를 갖는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자가 코팅된 반응용기에

대상으로부터 채취된 시료를 반응시키는 단계:

- [0049] A-B-C-B'-Z(상기 구조에서 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이고, 상기 B, C 및 B'는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다); 및
- [0050] 상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.
- [0051] 상기 방법은, 상기 형광 유무 및 형광 패턴으로부터 상기 대상의 알츠하이머 치매의 발병 여부 및 진전 정도를 분석하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 방법에 있어서, 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA는 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 또는 miR-155일 수 있다.
- [0053] 상기 방법에 있어서, 상기 탐침분자는 추가적으로 바이오틴을 포함할 수 있고, 상기 바이오틴과 상기 반응용기에 도말된 스트렙타비딘 사이의 결합에 의해 상기 탐침분자가 상기 반응용기에 코팅될 수 있다.
- [0054] 상기 방법에 있어서, 상기 시료는 대상으로부터 수득한 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법이 제공된다:
- [0056] 하기 구조를 갖는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자가 코팅된 반응용기에 대상으로부터 수득한 시료를 반응시키는 단계:
- [0057] A-B-Y-E-B'-Z(상기 구조에서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 E는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 B'은 상기 B와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 Z는 상기 A의 형광을 상쇄시킬 수 있는 소광체(quencher)이며, 상기 B, Y, E 및 B'는 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A에 의한 형광은 Z에 의해 소광된다); 및
- [0058] 상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.
- [0059] 상기 방법은 상기 형광 유무 및 형광 패턴으로부터 상기 대상의 알츠하이머 치매의 발병 여부 및 진전 정도를 분석하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 방법에 있어서, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 $A\beta_{1-42}$ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), $A\beta_{1-42}$ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 또는 비스파틴(visfatin)일 수 있다.
- [0061] 상기 방법에 있어서, 상기 형광 나노입자는 추가적으로 바이오틴을 포함할 수 있고, 상기 바이오틴과 상기 반응용기에 도말된 스트렙타비딘 사이의 결합에 의해 상기 탐침분자가 상기 반응용기에 코팅될 수 있다.
- [0062] 상기 방법에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법이 제공된다:
- [0064] $A_1-B_1-C-B'_1-Z_1$ 의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 검출용 탐침분자; 및 $A_2-B_2-Y-E-B'_2-Z_2$ 의 구조를 갖는 알츠하이머 특이적 항원 검출용 형광 나노입자가 각각 코팅된 반응용기에 대상으로부터 수득된 혈장을 반응시키는 단계:
- [0065] (상기 구조에서 A_1 및 A_2 는 각각 형광체이고, 상기 B_1 및 B_2 는 각각 3 내지 10 n.t.의 5'-말단 단일가닥 뉴클레오타이드이며, 상기 Y는 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편이고, 상기 C는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상보결합을 하는 탐침 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 C_2 는 루프를 형성하는 루프형성 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 B'_1 및 B'_2 는 각각 B_1 및 B_2 와 상보결합할 수 있는 3'-말단 올리고뉴클레오타이드이며, 상기 Z_1 및 Z_2 는 각각 상기 A_1 및 A_2 의 형광을 상쇄시킬 수 있는

소광체(quencher)이고, 상기 B₁, C₁ 및 B₁'는 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하며, 이 경우 A₁에 의한 형광은 Z₁에 의해 소광되며, 상기 B₂, Y, C₂ 및 B₂'는 상기 항원 부재시 스템-루프(stem-loop)를 형성하고, 이 경우 A₂에 의한 형광은 Z₂에 의해 소광된다); 및

[0066] 상기 반응용기의 형광 유무 및 형광 패턴을 확인하는 단계.

[0067] 상기 방법은 상기 형광 유무 및 형광 패턴으로부터 상기 대상의 알츠하이머 치매의 발병 여부 및 진전 정도를 분석하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0068] 상기 방법에 있어서, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 또는 비스파틴(visfatin)일 수 있고, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 또는 비스파틴(visfatin)일 수 있다.

[0069] 상기 방법에 있어서, 상기 탐침분자 및 상기 형광 나노입자는 각각 추가적으로 바이오틴을 포함할 수 있고, 상기 바이오틴과 상기 반응용기에 도달된 스트렙타비딘 사이의 결합에 의해 상기 탐침분자가 상기 반응용기에 코팅될 수 있다.

[0070] 상기 방법에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈장 또는 혈청일 수 있다.

[0071] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 조기진단을 위한 알츠하이머 특이적 표적분자의 검출방법이 제공된다:

[0072] 대상으로부터 수득된 시료로부터 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA; 및 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta₁₋₄₂ monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta₁₋₄₂ oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 및 비스파틴(visfatin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 알츠하이머 특이적 항원을 정량하는 단계; 및

[0073] 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 및 상기 알츠하이머 특이적 항원의 발현수준 및 발현양상을 분석하는 단계.

[0074] 상기 방법에 있어서, 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA는 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155이고, 상기 알츠하이머 특이적 항원은 A β ₁₋₄₂ 단량체, A β ₁₋₄₂ 올리고머, NLRP3, 타우(Tau), ApoE4, 및 nogo-A이며, 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상기 알츠하이머 특이적 항원을 모두 동시에 분석할 수 있고, 이 경우 상기 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA와 상기 알츠하이머 특이적 항원의 발현양상을 분석함으로써 치매 유무 및 치매의 진전 정도를 정확하게 분석할 수 있다.

[0075] 본 발명자들은 알츠하이머 특이적 miRNA에 결합 친화도를 확인하고자 A β ₁₋₄₂ 올리고머를 처리하거나 하지 않은 해마 세포주인 HT-22 세포에서 염증 특이적 miRNA의 수준을 마이크로어레이를 이용하여 분석하였고(도 3 및 표 1), 알츠하이머 질병 모델에서의 혈청학적 표지인자를 확인하기 위해, 염증이 야기하는 정상군의 비형질전환 마우스(6 마리), 및 경도 인지장애 유사 동물모델 APP/PS/ApoE 넉다운 마우스(6 마리)의 혈장에서 염증매개인자, 경도인지장애, 치매 바이오마커를 분리하였다(도 4 및 표 2). 이에 따라, 본 발명자들은 치매 유발 염증 특이적 miRNA인 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155를 선별하였고, 치매 유발 염증인자인 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 및 비스파틴(visfatin)을 선별하였다.

[0076] 아울러, 본 발명자들은 상기 선별된 표지인자가 실제 치매 동물에서 치매정도의 혈청학적 진단에 활용될 수 있는지 확인하기 위하여, 대표적인 치매 관련 항원인 A β ₁₋₄₂ 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 연결된 분자영상 센서 나노입자를 제조한 후, 이를 정상군(non-Tg 마우스), 염증초기군(ApoE 넉다운 마우스), 경도인지장애군(APP/PS 넉다운 마우스) 및 치매단계군(APP/PS/ApoE 넉다운 마우스)로부터 수득된 혈장과 반응시킴으로써, A β ₁₋

β_{42} 의 수준을 측정하였다. 그 결과, 도 X에 나타난 바와 같이, $A\beta_{1-42}$ 의 수준은 정상군에 비해 염증초기, 경도인지장애 및 치매단계군의 혈장에서, $A\beta_{1-42}$ 항원이 점점 증가됨을 확인하였다. 구체적으로 $A\beta_{1-42}$ 에 대한 정량적인 값은 대조군은 약 $0.2 \pm 0.05 \times 100$ RFI(임의적 형광강도), ApoE 넉아웃 마우스는 $0.5 \pm 0.4 \times 100$ RFI(임의적 형광강도), APP/PS 넉아웃 마우스는 $3.5 \pm 0.02 \times 100$ RFI(임의적 형광강도)이고, APP/PS/ApoE 넉아웃 마우스는 $10.5 \pm 0.02 \times 100$ RFI(임의적 형광강도)이었다. $A\beta_{1-42}$ 항원의 수준은 NLRP3가 발현되는 염증초기군에 해당하는 ApoE 넉아웃 마우스에는 40%, Tau의 발현이 시작되는 경도인지장애군인 APP/PS 넉아웃 마우스에서는 175%($p < 0.05$), 치매중증군인 APP/PS/ApoE 넉아웃 마우스는 525%($p < 0.01$)로서 정상군보다 치매 바이오마커인 $A\beta_{1-42}$ 항원이 특이적으로 기하급수적으로 증가함을 확인하였다.

[0077]

본 발명자들은 상기에서 제조된 본 발명의 일 실시예에 따른 분자영상 탐침분자 또는 탐침 복합체가 실제 인간으로부터 취득된 혈장을 이용하여 치매의 발병 유무 판정 및 치매의 진행정도를 판정하는 진단키트로 사용가능한지 여부를 확인하기 위하여, 상술한 8가지 miRNA 및 12가지의 항원을 각각 검출할 수 있는 분자영상 센서 복합체 및 분자영상 나노입자를 제조한 후 치매의 경과 정도가 다른 네 명의 환자로부터 취득한 혈장과 반응시켜, 형광이미지를 검출하였다(도 10 참조). 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 환자의 치매정도를 진단하는데 상기 표지인자들이 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 효과

[0078]

상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 대상의 혈장과 같은 상대적으로 침습성이 낮은 시료를 이용하여 알츠하이머 치매의 조기 진단이 가능하여, 이렇게 조기 진단된 알츠하이머 치매의 경우 치료 및 더 이상의 질병의 진행을 억제할 수 있기 때문에, 치매 발병으로 인한 사회적 비용의 절약을 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0079]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 탐침 복합체의 구조를 나타내는 개요도이다:

A: miRNA 탐지용 탐침 복합체; 및

B: 항원 탐지용 탐침 복합체.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탐침 복합체를 활용한 치매 초기 특이적miRNA와 항원을 탐지할 수 있는 형광센서의 플라스틱용기에서 반응과정을 개략적으로 나타낸 개요도이다.

도 3은 $A\beta_{1-42}$ 올리고머를 처리하거나 하지 않은 HT-22 세포에서의 miRNA의 발현양상의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 정상 마우스(non-Tg) 및 치매유발 모델 마우스(APP/PS/ApoE 넉아웃 마우스)의 혈장의 각종 염증 관련 항원의 발현양상의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 5는 정상 마우스와 치매유발 형질전환 마우스에서 해마조직의 프로그래밍을 나타낸 현미경 촬영 사진이다.

도 6은 치매유발 올리고머성 아밀로이드 펩타이드를 해마신경세포에 처리시 염증과 관련된 miRNA 발현을 대조군과 비교하여 녹색형광과 적색형광을 띄는 공초점 전자현미경으로 확인한 사진이다.

도 7은 치매유발 올리고머성 아밀로이드 펩타이드를 처리후 세포내의 아밀로이드 펩타이드를 탐지시 녹색형광을 공초점 전자현미경으로 확인한 사진이다.

도 8은 동물의 뇌조직에서 치매진행시 $A\beta_{1-42}$, STAT3, Tau, NLRP3의 발현 유무를 보여주는 면역세포화학 분석결과 사진이다.

도 9는 치매유도 형질전환 마우스의 뇌조직에서 발현되는 $A\beta_{1-42}$ 와 nogo-A의 발현양상을 나타낸 면역세포화학 분석결과 사진이다.

도 10은 치매환자의 혈장에서 존재하는 바이오마커를 대상으로 분석한 본 발명의 일 실시예에 따른 분자영상기반 치매 조기진단 키트에 의한 각종 알츠하이머 특이적 마이크로 RNA 및 항원의 발현양상을 조사한 형광 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080]

이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0081]

실시예 1: 알츠하이머 특이적 miRNA의 발현 양상 확인

[0082]

본 발명자들은 치매에 유발시 A β 의 축적에 따른 염증반응에 반응하여 생성되는 염증반응 인자가 어떤 것인지 확인하기 위해, 해마 세포주인 HT-22 세포주에 A β 를 처리하거나 하지 않은 상태에서, 40종류의 miRNA의 발현정도를 상기 miRNA에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 집적된 마이크로어레이를 이용하여 분석하였다(도 3 및 표 1). 그 결과, miR-106b, miR-146b, miR-181a, miR-200a, miR-200c, miR-29 및 miR-124b는 대조군(A β 를 처리하지 않은 HT-22 세포)과 비교하여 염증유발군에서 더 높은 발현이 관찰된 반면, miR-34a, miR-200b, miR-133, miR-128, miR-153, miR-286, miR-24, miR-86, miR-87, miR-327 및 miR-155 등은 대조군에 비하여 그 발현량이 더 낮은 것을 확인하였다.

표 1

[0083]

대조군과 치매유발군에서의 miRNA의 발현정도 비교

miRNA	HT-22		HT-22+A	
	평균	표준편차	평균	표준편차
miR-106b	56.07	25.924	856.707	109.67
miR-146b	35.24	15.226	535.924	23.458
miR-181a	15.26	13.731	315.226	34.147
miR-200a	23.31	13.712	233.731	45.631
miR-200c	34.12	13.501	234.712	51.672
miR-29	23.01	13.48	123.501	34.721
miR-124b	313.8	13.457	113.48	23.632
miR-34a	893.57	13.45	93.457	16.341
miR-200b	763.15	13.35	63.45	10.162
miR-133	151.75	23.277	53.35	9.127
miR-26	43.27	13.23	43.277	8.237
miR-128	133.23	23.118	33.23	6.813
miR-16	3.118	13.098	23.118	6.118
miR-153	63.98	3.064	23.098	4.145
miR-286	213.64	1.88	13.064	2.381
miR-7	612.8	2.831	12.88	3.314
miR-24	210.31	2.754	10.831	0.154
miR-134	71.54	2.691	11.754	0.071
miR-27	19.691	2.671	9.691	0.151
miR-176	37.671	2.669	7.671	0.034
miR-86	36.669	2.651	6.669	0.161
miR-87	64.651	2.595	4.651	0.027
miR-243	23.595	2.542	3.595	0.123
miR-144	2.542	2.499	2.542	0.265
miR-327	22.499	2.412	2.499	0.122
miR-289	11.412	2.382	1.412	0.012
miR-93	10.382	2.382	1.382	0.014
miR-386	4.382	2.366	0.382	0.076
miR-143	20.366	2.352	0.366	0.021
miR-145	4.352	2.301	0.352	0.011
miR-144	10.301	2.286	0.301	0.062
miR-155	568.286	2.247	0.286	0.027
miR-489	1.247	2.214	0.247	0.021

[0084] 실시예 2: 알츠하이머 특이적 항원의 발현 양상 확인

[0085] 본 발명자들은 아울러, 치매에 유발시 A β 의 축적에 따른 염증반응에 반응하여 생성되는 염증반응 인자가 어떤 것인지 확인하기 위해, 대조군으로서 비형질전환 마우스와 치매동물모델인 APP/PS/ApoE 4/4 마우스의 혈장을 대상으로 하기 20가지 항원 및 양성대조군으로 표준 A β 및 음성대조군에 대한 면역화학분석을 수행하였다(도 3 및 표 2). 그 결과 A β ₁₋₄₂ 단량체 및 올리고머의 경우 정상 마우스에 비하여 치매유발 모델 마우스에서 매우 높은 수준을 나타냈다.

표 2

[0086] 대조군과 치매모델 동물의 혈장에서의 염증매개인자 항원의 수준 비교

항원	non-Tg mice		APP/PS/ApoE 4/4	
	m	sd	m	sd
A β ₁₋₄₂ 단량체	26.07	5.924	728.707	95.924
A β ₁₋₄₂ 올리고머	5.24	1.226	635.924	35.226
UCHL1	35.26	5.731	425.226	53.731
NLRP3	33.31	13.712	653.731	63.712
Tau	2.12	0.501	734.712	32.501
STAT3	13.01	3.48	421.501	53.48
SORL1	15.8	3.457	323.48	21.457
clusterin	21.57	3.45	393.457	23.45
ApoE3	323.15	42.35	263.45	43.35
ApoE4	300.75	31.277	364.35	11.277
nogo-A	11.27	3.23	432.277	32.23
visfatin	23.23	2.118	413.23	33.118
BDNF	243.118	23.098	76.118	6.098
GFAP	17.98	4.064	523.098	52.064
IL1B	33.64	2.88	343.064	41.88
IL4	12.8	5.831	412.88	22.831
caspase1	50.31	7.754	610.831	52.754
IL18	41.54	12.691	611.754	32.691
TNF	39.691	2.671	419.691	22.671
p300	57.671	12.669	527.671	62.669
표준A5M	842.669	92.651	896.669	32.651
무혈청	14.651	5.595	12.651	3.595
음성대조군	20.595	5.542	21.595	4.542
알부민	761.542	22.499	690.542	32.499

[0087] 실시예 3: 염증-치매 유발체를 감지하기 위한 형광 나노입자, 특이적 miRNA 및 항체가 결합해 분자영상에 쉐도우 게이트된 형광영상센서의 제조

[0088] 3-1: 염증 및 치매 특이적 발현 miRNA와 염증인자 감응성 분자영상 형광센서의 제조

[0089] 상기 실시예 1 및 2의 결과를 바탕으로 본 발명자들은 정상 마우스와 치매유발 모델 마우스에서 발현이 현저하게 차이가 나는 마이크로 RNA와 염증매개 인자를 선별하여, 이를 검출할 수 있는 분자영상 센서를 하기와 같이 제작하였다:

[0090] 우산 마이크로 RNA의 경우, 별아, 아교 및 해마 신경세포에서 특이적으로 발현되는 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155를 선별하였고, 염증 및 치매에 관련인자로는 A β ₁₋₄₂ 단량체(amyloid-beta monomer), A β ₁₋₄₂ 올리고머(amyloid-beta oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, nogo-A 및 비스파틴(visfatin)을 선별하였다. 먼저, miR-153a, 155 및 106b와 혼성화될 수 있는 영역을 포함하는 핵산 염기서열을 설계 합성하였다. 이를 위해, 성숙형 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155의 상보적인 뉴클레오타이드인 탐침 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 스템(stem)을 형성할 수 있는 5'-말단 올리고뉴클레오타이드(TCGCTGT)이 연결되고 상기 5'-말단 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에 적색 형광을 나타내는 양자점(QD₅₆₅)이 부착되며, 상기 탐침

올리고뉴클레오타이드의 3'-말단에 상기 5'-말단 올리고뉴클레오타이드와 탐침 올리고뉴클레오타이드의 5'-과 부분적으로 상보결합을 하며 열역학적으로 표적 miRNA가 상기 탐침 올리고뉴클레오타이드에 상보결합할 때 소광체가 결합된 가닥이 이격되어, 형광이 방출될 수 있도록 하는 스위치 기능을 수행하는 임의의 서열(GTCGCTTT)인 3'-말단 올리고뉴클레오타이드가 연결된 분자영상 센서 핵산분자를 주문제작하였다(Bioneer, Korea). 아울러, 상기 분자영상 센서 핵산분자와 상보결합을 할 수 있는 핵산서열(CAGCG)를 링커영역으로 갖고 상기 링커영역의 5'-말단에 바이오틴이 결합되고 상기 링커영역의 3'-말단에 상기 QD₅₆₅의 형광을 소광시킬 수 있는 소광체로 BHQ2(blackhole quencher 2)가 연결된 스위치 핵산분자 역시 주문제작하였다(Bioneer, Korea). 상기 바이오틴은 스템-루프(stem-loop) 형태의 복합체를 이루는 상기 분자영상 센서 핵산분자와 상기 스위치 핵산분자가 스트렙타비딘이 도포된 반응용기나 마이크로어레이 상에 고정될 수 있도록 하는 역할을 수행한다. 마우스(mmu) 및 인간(hsa)의 전체 성숙형 miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-106b, miR-153 및 miR-155을 탐지할 수 있는 분자영상 센서 핵산분자(molecular imaging sensor nucleotide, 이하, 'MISN'으로 약칭함) 및 상기 분자영상 센서 핵산분자의 신호를 켜고 끌 수 있는 스위치 핵산분자의 구조는 하기 표 3과 같다(서열번호는 소문자 영역 부분에 대한 서열만을 나타냄).

표 3

MISN의 구조 및 스위치 핵산분자의 구조

마이크로 RNA	구조	서열번호
mmu miR-34a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T acaaccagctaagacactgcc GT CGCTTT-3'	1
mmu mir-106b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T atttcacgactgtcacgtcta GT CGC TTT-3'	2
mmu miR-124b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T ggcattcaccgcgtgcctta GT CGCTTT-3'	3
mmu miR-146b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T agcctatggaattcagtcttca GT CGCTTT-3'	4
mmu mir-153	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T aacgtatcagtgttttactag GT CGC TTT-3'	5
mmu mir-155	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T aattacgattaacactatcccca GT CGC TTT-3'	6
mmu miR-181a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T actcaccgacagcgttgaatgtt GT CGCTTT-3'	7
mmu miR-200a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T acatcggtaccagacagtgtta GT CGCTTT-3'	8
hsa miR-34a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T acaaccagctaagacactgcc GT CGCTTT-3'	9
hsa mir-106b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T atttcacgactgtcacgtcta GT CGC TTT-3'	10
has miR-124b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T ggcattcaccgcgtgcctta GT CGCTTT-3'	11
hsa miR-146b	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T agcctatggaattcagtcttca GT CGCTTT-3'	12
has mir-153	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T aacgtatcagtgttttactag GT CGC TTT-3'	13
hsa mir-155	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T aattacgattagcactatcccca GT CGC TTT-3'	14
hsa miR-181a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T actcaccgacagcgttgaatgtt GT CGCTTT-3'	15
hsa miR-200a	5'-QD ₅₆₅ -TCG CTG T acatcggtaccagacagtgtta GT CGCTTT-3'	16
스위치 핵산분자	5'-biotin-CAGCG-BHQ2-3'	

소광체(BHQ2)를 포함하는 상기 스위치 핵산분자 500 pmol과 QD₅₆₅를 포함하는 상기 MISN 500 pmol을 1 ml의 혼성화 완충액(1x TE buffer, 100 mM NaCl, pH 7.8)에 혼합하여 93℃의 온도에서 5분동안 반응을 시키고 서서히 4℃의 온도에서 냉각시킴 다음에 조립형 탐침 복합체를 합성하였다.

3-2: 염증매개인자와 치매유발인자 인식 항원 감응성 분자비콘(molecular beacon)의 제조

분자이미지 센서 핵산-항체 복합분자(molecular imaging sensor nucleotide-antibody complex molecule, 이하, 'MISNAC'라 칭함)과 스위치 핵산분자의 복합체로 형성되는 항체결합형 분자센싱 나노입자의 구조는 하기와 같다(하기 서열번호는 항체를 기준으로 오른쪽의 우측단편의 전체 핵산서열을 나타냄):

MISNAC:

5'-QD₅₆₅-TCGCTG-CONH-antibody-CONH-TatttcacgactgtcacgtctaGTGC TTT-3' (서열번호 17)

스위치 핵산분자:

[0098]

5'-biotin-CG-BHQ2-3'

[0099]

상기 MISNAC에서 가운데 삽입되는 항체로는 $A\beta_{1-42}$ 단량체(amyloid-beta monomer), $A\beta_{1-42}$ 올리고머(amyloid-beta oligomer), UCHL1, NLRP3, 타우(Tau), STAT3, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE3, ApoE4, 노고에이(nogo-A) 및 비스파틴(visfatin)에 각각 특이적인 항체(SantaCruz, USA)를 사용하였고, 상기 항체 각각 2 μ g, QD565를 포함하는 상기 MISN의 좌측단편(left arm)과 루프형성 올리고뉴클레오티드와 열역학적으로 표적 항원이 상기 항체에 결합할 때 소광체가 결합된 가닥이 이격되어, 형광이 방출될 수 있도록 하는 스위치 기능을 수행하는 임의의 서열(GTGCTTT)인 3'-말단 올리고뉴클레오티드를 포함하는 MISNAC의 우측단편(right arm)을 별도로 주문제작한 후(Bioneer, Korea), 상기 좌측단편, 항체 및 우측단편 사이에 아마이드 결합(-CONH-)이 일어나도록 하는 조건(EDC, Tris-HCl, pH, 7.8, 0.1 M EDTA, 상온)에서 1시간 동안 반응을 시킨 후, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액은 버린 후 펠렛을 모아 인산완충용액에 녹임으로써, MISNAC를 제조하였다. 한편, 상기 좌측단편의 3'-말단은 히드록시기(-OH) 대신에 카복실기(-COOH)가 오도록 변형되었고, 상기 우측단편의 5'-말단 역시 히드록시기(-OH) 대신에 아미노기(NH_2 -)가 오도록 변형되었다. 이어, 상기 소광체(BHQ2)를 포함하는 스위치 핵산분자 500 pmol과 상기에서 제조된 QD₅₆₅를 포함하는 MISNAC 500 pmol을 1 ml의 혼성화 완충액(1x TE buffer, 100 mM NaCl, pH 7.8)에 혼합하여 93℃의 온도에서 5분 동안 반응을 시키고, 서서히 4℃의 온도에서 냉각시킴으로써, 항체결합형 분자센싱 나노입자를 제조하였다.

[0100]

실험예 1:

[0101]

1-1: 세포의 배양

[0102]

마우스 해마 세포주인 HT-22 세포를 이용하여 해마신경세포에 대한 특이적 표적인자를 관찰하기 위해, 해마신경세포를 ATCC사의 세포배양 기준에 의거하여 배양하였다. 도 6 및 7의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 해마신경세포주에서 miRNA에 의한 표적이 확인되었고, 심지어 세포 내부에 발현되어 있는 표적 miRNA를 관찰하였다. 반면 정상군에는 전혀 표적인자가 관찰되지 못하였다. 이와 같이, 성숙형 miR-155(mature형), miR-153a(mature형)와 miR-106b(mature형), miR-181c, miR-9, miR-200a에 대한 특이적 발현을 공초점 현미경 관찰을 통해 확인할 수 있었다.

[0103]

1-2: 내재화된 miR의 형광핵산센서의 공초점 현미경 관찰

[0104]

35 mm 배양접시에 미리 하룻밤 해마 신경세포인 HT-22 세포를 분주하여 배양한 후 특이적 표적인자를 관찰하기 위해, 올리고머 $A\beta_{1-42}$ 5 μ M를 2시간 동안 처리한 후 HT-22 세포를 ATCC사의 세포배양 기준에 의거하여 배양하였다. 성숙형 miR-155(mature형), miR-153a(mature형)와 miR-106b(mature형), miR-181c, miR-9, miR-200a의 시험관 내(*in vitro*) 형광 이미지를 얻기 위해, 공초점 현미경 촬영을 HT-22 세포의 배양기간 동안 수행하였다. 먼저, HT-22 세포를 4% 포름알데히드 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 고정시킨 후, PBS로 10분 동안 3회 세척하였다. 4',6-디아미디노-2-페닐인돌디하이드로클로라이드(DAPI)용액을 함유하는 마운팅 배지(Vector Laboratories, Inc., CA, USA)를 가한 후 35 mm 배양접시로부터 공초점 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 도 7 내지 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 정상 HT-22 세포는 무색, 청색은 DAPI 핵(nucleus) 영상이며, 초록형광은 QD₅₂₅/적색형광은 QD₅₆₅ 형광 나노입자에 포함되어 있는 형광신호인데 올리고머 $A\beta_{1-42}$ 는 초록형광을 나타냈고(도 7), miR-155, miR-181c, miR-9, miR-200a의 형광신호를 나타내었다(도 7). 세포에서 과발현되는 성숙 miRNA가 miRNA 분자영상센서에 결합되어 소광체가 분자비콘에서 해리됨으로써 적색 또는 초록색 형광신호가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 세포 내부에서 초록색 형광신호와 적색 형광신호가 독립적으로 각각 다른 위치에 있는 것을 확인함으로써 miRNA 분자영상이 소광체가 해리되어 나타난 것을 알 수 있었다.

[0105]

1-3: miR 분자비콘을 이용한 염증 및 치매유발 표적인자 조직학적 분석

[0106]

염증과 치매진단 연구를 수행하기 위하여, 대조군(non-Tg 마우스), 염증초기에 대한 모델인 ApoE 킥아웃 마우스(암컷, 24주령), 경도 인지장애 대한 모델인 APP/PS 킥아웃 마우스군(암컷, 40주령), 중증 치매에 대한 모델인 APP/PS/ApoE 킥아웃 마우스(암컷, 12, 24주령)를 마취한 다음 해부도구로 경추부위를 절개한 후 후두부의 일부를 절개하여 두개골의 양부위를 제거한 후 뇌를 조심스레 PBS(인산 완충액)으로 세척하여 이를 4% PFA(para-formaldehyde)로 12시간동안 4℃에서 고정하고, 이를 절편제조기(vibratome)으로 10 μ m정도 두께로 절단하여 해마 및 피질부분을 모아 24 well에 조직을 담았다. 그런 다음 상기 고정된 조직절편을 PBS에 용해시킨 상기 실시예 3-1에서 제조된 분자영상 센서 핵산 복합체와 항- $A\beta_{1-42}$ 항체, 항-Tau 항체, 항-STAT3 항체, 항-NLRP3 항체가 결합된 형광 나노입자를 각각 2 pmol이 되게 첨가하여 12시간 동안 4℃에서 반응시켰다. 그 결과 도 8에

서 나타난 바와 같이, 대조군에서는 $A\beta_{1-42}$, Tau, STAT3 및 NLRP3에 의한 신호가 나타나지 않는 반면, APP/PS/ApoE 녹아웃 마우스 경우 $A\beta_{1-42}$ 와 NLRP3에 의한 적색형광이 매우 강하게 나타났고, STAT3와 Tau에 의한 초록색형광이 강하게 나타내었다. 한편, APP/PS/ApoE 녹아웃 마우스에 대하여 $A\beta_{1-42}$ 및 nogo-A에 의한 신호가 공위치화(colocalization)되는지 여부를 확인하기 위해 공초점 현미경으로 적색형광을 나타내는 QD565를 포함하는 형광 나노입자로 $A\beta_{1-42}$ 를 검출하고, 녹색형광을 나타내는 QD525를 포함하는 형광 나노입자 nogo-A를 검출하였다(도 9). 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, $A\beta_{1-42}$ 와 신경마비 단백질인 nogo-A가 동일한 위치에서 발현됨을 확인할 수 있었다.

1-4: 분자영상센서를 이용한 염증 및 치매유발 표적인자 정량화

인간 치매환자 네 명의 혈장을 분리하여 BSA로 차단되고 그 위해 스트렙타비딘(streptavidin)으로 표지된 표면을 갖는 96웰 반응용기 위에 10 μ l를 분주하고, 상기에서 제조된 분자비콘을 처리하여 반응시킨 후, 즉시 LAS-4000 공초점내지 형광스펙트럼 광도계로 관찰 내지 정량화하였다(표 4 및 도 10). 그 결과 도 10에서 나타난 바와 같이, 시료가 없는 대조군과 표준 $A\beta_{1-42}$ 를 사용한 양성대조군 및 음성대조군인 BSA로 혈액처리군에서 miR-106b, miR-155, miR-200a, miR-181a, miR-124b, miR-146b, miR-34a, miR-153의 발현수준이 일부 miRNA는 공통적으로 나타난 반면, 일부 miRNA는 다른 양상으로 나타남을 확인하였고, 동시에 염증 및 치매에 관련 인자인 아밀 $A\beta_{1-42}$ 단량체(amyloid-beta monomer), $A\beta_{1-42}$ 올리고머(amyloid-beta oligomer), NLRP3, UCHL1, STAT3, 타우(Tau), 브비스파틴(visfatin), IL-13, SORL1, 클러스터린(clusterin), ApoE4, ApoE3, 및 nogo-A 역시 환자에 따라 그 발현 패턴이 공통되는 항원과 달라지는 항원으로 구분되었다(표 4).

표 4

치매 환자의 혈장을 대상으로 한 치매 특이적 표지인자의 수준 측정 결과

환자	표지인자 및 그의 혈장내 수준(단위 임의의 형광강도, X100)							
	무시료	표준 A	BSA	A 단량체	A 올리고	NLRP1	UCHL1	STAT3
	Tau	Visfatin	IL-13	SORL1	clusterin	ApoE4	ApoE3	Nogo-A
	miR-106b	miR-155	miR-200a	miR-181a	miR-124b	miR-146b	miR-34a	miR-153
P1	12.2 $\pm$ 0.1	255 $\pm$ 23	10.2 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.5	200 $\pm$ 15	412 $\pm$ 35	360 $\pm$ 12	650 $\pm$ 52
	180 $\pm$ 12	132 $\pm$ 12	890 $\pm$ 32	160 $\pm$ 21	150 $\pm$ 31	210 $\pm$ 5	190 $\pm$ 32	190 $\pm$ 5
	30 $\pm$ 5	200 $\pm$ 5	185 $\pm$ 11	23 $\pm$ 5	750 $\pm$ 25	300 $\pm$ 11	620 $\pm$ 42	190 $\pm$ 15
P2	ND	210 $\pm$ 2	0.2 $\pm$ 0.5	230 $\pm$ 11	200 $\pm$ 5	130 $\pm$ 25	120 $\pm$ 5	450 $\pm$ 12
	14 $\pm$ 5.22	120 $\pm$ 25	920 $\pm$ 16	190 $\pm$ 2	140 $\pm$ 20	650 $\pm$ 100	130 $\pm$ 5	150 $\pm$ 25
	210 $\pm$ 35	110 $\pm$ 3	145 $\pm$ 21	450 $\pm$ 23	370 $\pm$ 78	520 $\pm$ 100	200 $\pm$ 23	250 $\pm$ 45
P3	21 $\pm$ 5	220 $\pm$ 35	12 $\pm$ 3	200 $\pm$ 13	220 $\pm$ 14	190 $\pm$ 21	90 $\pm$ 4	100 $\pm$ 6
	12 $\pm$ 3	50 $\pm$ 6	310 $\pm$ 21	280 $\pm$ 16	190 $\pm$ 31	510 $\pm$ 3	420 $\pm$ 62	220 $\pm$ 41
	14 $\pm$ 5	250 $\pm$ 32	180 $\pm$ 43	14 $\pm$ 6	50 $\pm$ 2	290 $\pm$ 21	90 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2
P4	21 $\pm$ 2	210 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	620 $\pm$ 90	21 $\pm$ 1	310 $\pm$ 21	110 $\pm$ 2	220 $\pm$ 13
	70 $\pm$ 1	230 $\pm$ 32	510 $\pm$ 23	190 $\pm$ 54	16 $\pm$ 5	150 $\pm$ 21	310 $\pm$ 23	230 $\pm$ 15
	190 $\pm$ 21	15 $\pm$ 4	230 $\pm$ 41	200 $\pm$ 11	220 $\pm$ 11	180 $\pm$ 31	310 $\pm$ 41	110 $\pm$ 3

상기 표 4에서 확인할 수 있듯이, 상기 측정값에서 상기 표지인자들, 특히 $A\beta_{1-42}$ 올리고머, 타우(Tau), ApoE4, ApoE3, nogo-A, miR-106b, miR-155, 및 miR-34a는 치매 초기진단에 중요한 바이오마커로서 이중 상기 네 명의 환자는 모두 $A\beta_{1-42}$ 단량체에 대하여 양성으로 나타났고, 타우(Tau)는 3번 환자는 검출되지 않았으며, 4번 환자는 $A\beta_{1-42}$ 음성반응 및 nogo-A 양성반응을 나타 내었는데 3번 환자의 경우 Tau의 발현이 무반응인 것으로 보아 치매 초기단계인 것으로 판단되었고 1, 2 및 4번 환자 경우 이미 치매단계를 진입한 상태이라 판단되었다. 상기 결과는 실제 상기 환자들에 대한 임상적 진단결과와 동일하게 나타났다. 아울러, miRNA의 경우 상기 3번 환자의 경우 miR-124b, miR-34a 및 miR-153의 수준이 다른 세 명의 환자에 비하여 유의하게 낮게 나타났기 때문에, 이들 miRNA들의 수준을 치매의 진전 정도를 확인하기 위한 분자표지로 활용할 수 있음을 알 수 있었다. 더 나아가, miR-106b의 경우 3번 환자에서 가장 낮은 수준을 기록하였고, 1번, 2번, 및 4번 환자에서는 높은 값을 나타냈기 때문에, 이 역시 치매의 진전 정도를 확인하기 위한 조기진단 표지인자로 활용할 수 있음을 알 수 있었다. 상기 결과를 종합하건대, miR-106b의 낮은 수치는 치매 초기진단에 활용이 가능하고, miR-153의 높은 수

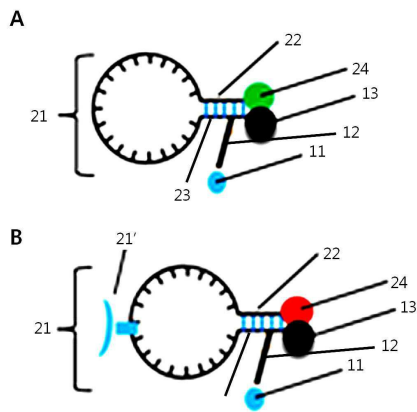
치는 치매 후기로 진단이 가능하기 때문에, 3번 환자는 치매초기단계(MCI)를 2번과 4번 환자는 중증치매단계로 판정될 것으로 사료되며 이러한 결과는 실제 임상적 소견과 일치하는 것이었다. 따라서 상기의 결과를 토대로 결론적으로 언급한다면 염증초기에서 치매단계사이의 외형적으로 나타나지 않는 표현형이 나타나기 전에 생체내에서 유전적으로 염증초기에서 치매 만성화되어지는 생리 반응을 신속하고 정밀하게 미세환경을 감지할 수 있는 염증인자와 miRNA를 바이오마커로 선정된다면 본 발명의 분자영상센서가 치매조기진단에 유용한 진단키트로 아주 충분히 활용 가치가 있음을 알 수 있고, 하나의 마커만을 사용하는 것보다 복수의 표지인자를 조합함으로써 진단의 정확성이 더욱 향상될 수 있음을 알 수 있다.

[0111]

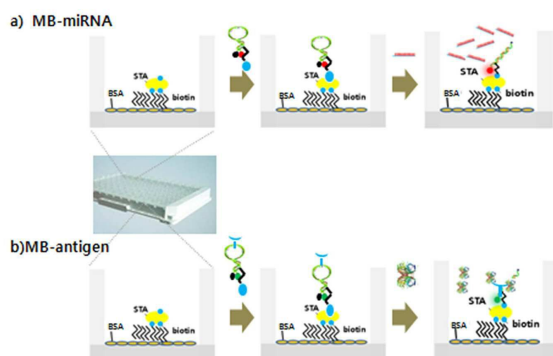
본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

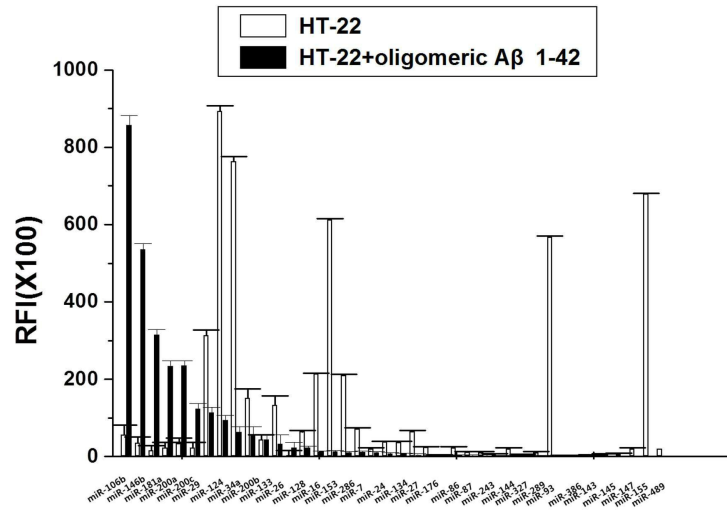
도면1



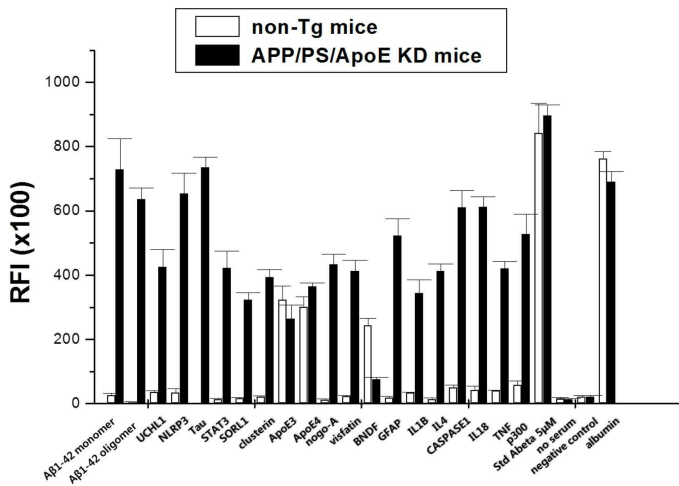
도면2



도면3

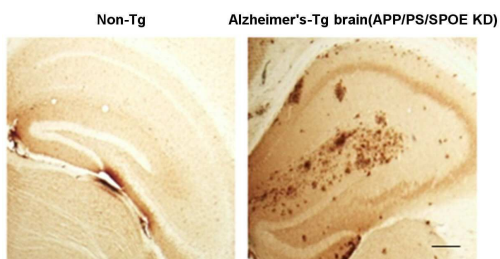


도면4

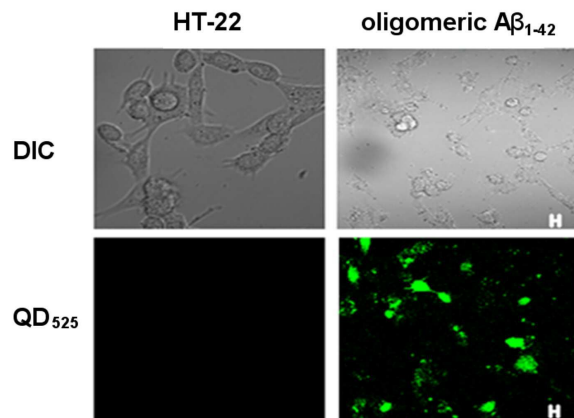


도면5

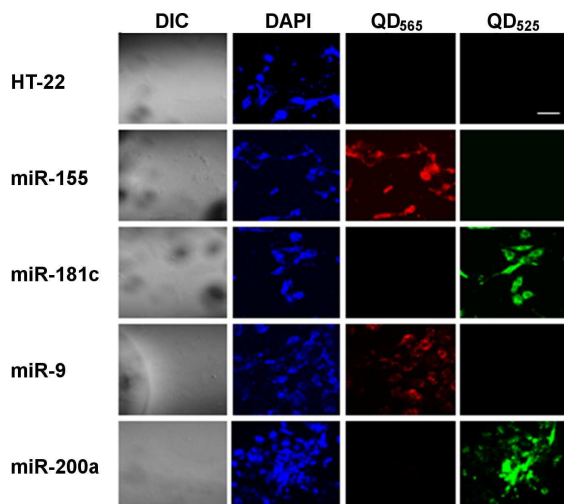
면역조직화학분석시 신경반 형성 양상



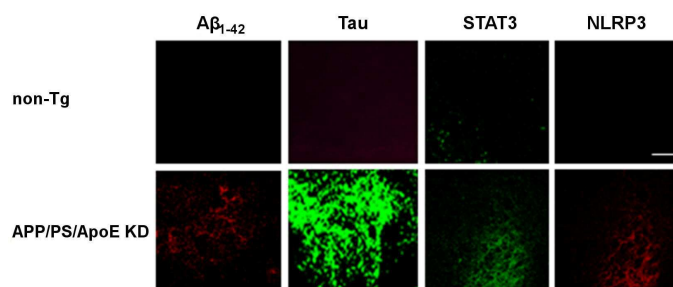
도면6



도면7

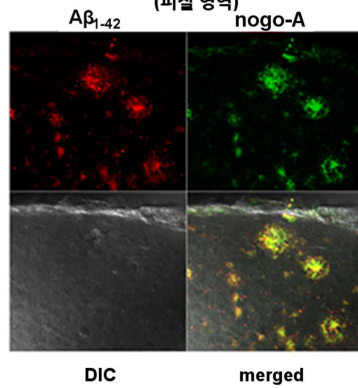


도면8

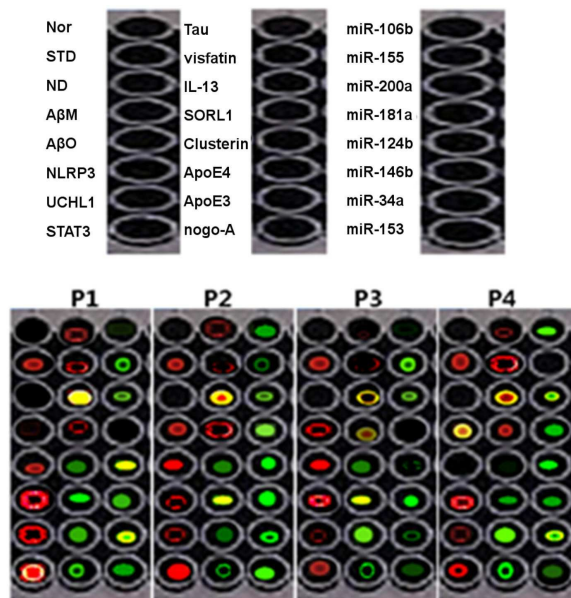


도면9

알츠하이머 모델 동물(APP/PS1/ApoE KD) 뇌의 3차원 공초점 분석
(피질 영역)



도면10



서 열 목 록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> A Kit for early diagnosing Alzheimer's dementia
- <130> PD13-0919
- <160> 17
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> anitisense oligonucleotide for mmu miR-34a	
<400> 1	
acaaccagct aagacactgc ca	22
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anitisense oligonucleotide for mmu miR-106b	
<400> 2	
atttcacgac tgtcacgtct a	21
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anitisense oligonucleotide for mmu miR-124b	
<400> 3	
ggcattcacc gcgtgcctta	20
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anitisense oligonucleotide for mmu miR-146b	
<400> 4	
agcctatgga attcagttct ca	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> anitisense oligonucleotide for mmu miR-153	
<400> 5	
aacgtatcag tgttttcact ag	22
<210> 6	
<211> 23	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for mmu miR-155	
<400>	6	
	aattacgatt aacactatcc cca	23
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for mmu miR-181a	
<400>	7	
	actcaccgac agcgttgaat gtt	23
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for mmu miR-120a	
<400>	8	
	acatcggttac cagacagtgt ta	22
<210>	9	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-34a	
<400>		
>	9	
	acaaccagct aagacactgc ca	22
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-106b	
<400>	10	
	atttcacgac tgtcacgtct a	21

<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-124b	
<400>	11	
ggcattcacc gcgtgcctta		20
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-146b	
<400>	12	
agcctatgga attcagttct ca		22
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-153	
<400>	13	
aacgtatcag tgttttcact ag		22
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-155	
<400>	14	
aattacgatt agcactatcc cca		23
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense oligonucleotide for hsa miR-181a	

<400>	15	
actcaccgac agcgttgaat gtt		23
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	anitisense oligonucleotide for hsa miR-200a	
<400>	16	
acatcggttac cagacagtgt ta		22
<210>	17	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	right arm of MISNAC	
<400>	17	
tatttcacga ctgtcacgtc tagtgcttt		29