



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0024004

(43) 공개일자 2020년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 33/6854 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0100614

(22) 출원일자 2018년08월27일

심사청구일자 2018년08월27일

(71) 출원인

광주과학기술원

광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

전남대학교산학협력단

광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

(72) 발명자

박성규

광주광역시 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학부

심규영

광주광역시 첨단과기로 123 광주과학기술원 생명과학부

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

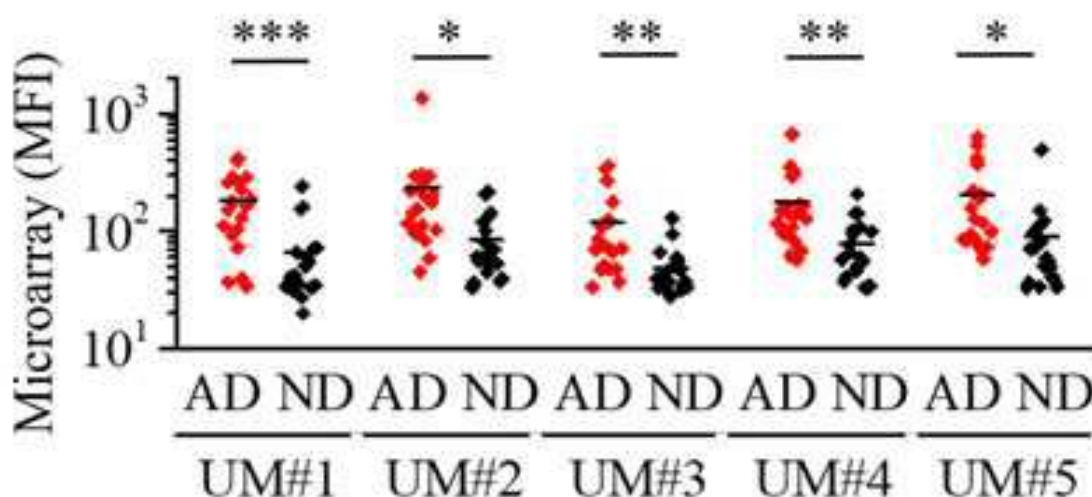
(54) 발명의 명칭 알츠하이머성 치매 진단용 펩타이드 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 알츠하이머성 치매 환자의 특이적인 자가항체와 결합하는 펩타이드의 알츠하이머성 진단 용도에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물; 진단용 키트; 상기 조성물을 이용한 알츠하이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도5



머성 치매 진단을 위한 정보제공방법; 및 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 펩타이드에 관한 것이다.

본 발명에 따른 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드는 알츠하이머성 치매환자의 혈액 내에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체와 특이적으로 결합할 수 있으므로, 혈액을 통한 진단이 불가능하였던 기존 알츠하이머성 치매 진단 방법의 한계점을 극복하고, 혈액을 기반으로 한 알츠하이머성 치매 진단에 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 2800/2821 (2013.01)

(72) 발명자

이건호

광주광역시 남구 노대실로 33 510동 301호

김병채

광주광역시 남구 제석로 80번 안길 11, 한국아텔리움 1차 102동 1602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064972(NN19882)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 다중생체정보 기반 치매 중증도 모니터링 기술 개발

기 여 율 60/100

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711068289(NN20910)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 전략과제

연구과제명 Treg/Th17 리프로그래밍 전사인자 조절 연구

기 여 율 30/100

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711073984

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 MRI 기반 알츠하이머성 치매 특이 뇌 손상 규명 및 뇌지도 구축

기 여 율 10/100

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2018.05.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 모두 유효성분으로 포함하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 것인, 진단용 조성물.

청구항 4

서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 모두 유효성분으로 포함하는 것인, 알츠하이머성 치매 진단용 키트.

청구항 6

개체로부터 분리된 시료로부터, 제1항의 조성물을 이용하여 시료 내 IgM 항체를 검출 또는 이의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 IgM 항체의 발현 수준을 정상 대조군으로부터 분리된 시료 내 IgM 항체의 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 정보제공방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 IgM 항체의 발현 수준이 정상 대조군으로부터 분리된 시료 내 IgM 항체의 발현 수준보다 높을 경우, 상기 개체가 알츠하이머성 치매로 진단되는 것인, 정보제공방법.

청구항 9

서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 알츠하이머성 치매 환자의 특이적인 자가항체와 결합하는 펩타이드의 알츠하이머성 치매 진단 용도에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물; 진단용 키트; 상기 조성물을 이용한 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법; 및 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 펩타이드에 관한 것이

[0001]

다.

배경 기술

[0003] 전 세계적으로 초고령화 현상으로 인한 치매 환자의 증가는 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 2014년 국회 예산정책처에 따르면 65세 이상의 치매 유병률은 2020년에 84만명, 2050년에 217만명으로 늘어날 것으로 예상되며, 이에 따라 치매로 인한 사회적 비용의 규모 역시 2013년 11조7000억원에서, 2030년 23조 1000억원, 2040년 34조 2000억원, 2050년 43조 2000억원으로 급격히 늘어날 것으로 예상된다고 한다.

[0005] 현재, 알츠하이머성 치매 진단을 위해서 사용되고 있는 진단 방법에는 유전자 검사, 신경심리검사 및 인지기능 검사, 뇌척수액 검사, 뇌영상 검사(MRI, PET)가 있다. 유전자 검사는 ApoE4라는 알츠하이머성 치매 특이적 유전자에 대한 검사를 통해 알츠하이머성 치매 위험성을 감지하는 검사이다. 그러나, ApoE4라는 유전자는 치매 발명의 위험률을 높일 수는 있으나, 결정적인 인자가 아니기 때문에, 해당 검사만으로는 알츠하이머성 치매 진단이 어렵다. 또한, 신경심리검사 및 인지기능 검사는 설문지를 통해 환자의 인지장애 정도를 측정하는 방법으로, 간 이 정신상태검사(MMSE), 몬트리올 인지검사(MoCA), SNSB 등이 있다. 이는 설문지 형태의 진단 방법으로서, 비용 이 적게 들고 진단시 물리적 고통이 없다는 장점이 있으나, 반복된 검사로 인해 학습, 나이 및 학력 차이 등에 의한 결과 변화, 주관성 개입 등으로 인해 정확성에 문제가 생길 수 있으며, 결정적으로 해당 인지장애가 알츠하이머성 치매의 주요 인자인 베타-아밀로이드에 의한 인지장애인지, 다른 종류로 1 질환에 의한 것인지 확인할 수 없다는 문제가 있다. 또한, 뇌척수액을 통한 검사는 뇌척수액을 추출하여 알츠하이머 유발인자로 알려진 베타-아밀로이드 또는 타우 단백질을 정량 진단하는 방법으로서, 진단의 정확성은 높으나, 뇌척수액을 얻기 위한 척추 천자 방법은 환자에게 큰 고통을 줄 수 있어 거부감을 일으킬 수 있다. 또한, 시술에 있어서 전문성이 높지 않은 일반 병원에서는 이용하기 힘들며, 비용적인 한계도 존재한다. 뇌영상 검사(MRI, PET)는 MRI 또는 PET 영상촬영을 통해 뇌손상 정도 및 알츠하이머 유발인자인 베타-아밀로이드와 타우 단백질을 뇌에서 분석하는 방법이다. 진단에 대한 높은 정확성을 가지고 있으나, 알츠하이머성 치매 진단시 고가의 장비와 영상촬영에 대한 전문성을 요구하므로, 유통의 한계가 있고, 높은 진단 비용을 요구한다는 문제가 있다.

[0007] 이와 같이, 현재 알츠하이머성 치매 진단을 위한 다양한 기술이 존재하나, 각각의 기술은 정확성 문제, 비용적 문제, 시간적 문제 및 육체적 고통의 수반 등 다양한 한계점이 존재한다. 이러한 종래기술의 한계점은 알츠하이머 유발인자인 베타-아밀로이드 및 타우 단백질이 치매 진단에 사용될 수 있을 정도로 혈액 내에서는 유의미하게 나타나지 않기 때문이며, 현재까지도 혈액을 통해 이용할 수 있는 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커가 없다는 한계점이 있다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 혈액을 이용할 수 있는 알츠하이머성 진단용 조성물을 제조하고자 예의 노력 연구한 결과, 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 사용하는 경우 기존의 알츠하이머성 치매 진단방법이 가진 비용적, 시간적, 고통 및 부작용 등에 따른 한계점을 극복하고, 혈액을 통해 알츠하이머성 치매를 진단할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 개체로부터 분리된 시료로부터 상기 조성물을 이용하여 시료 내 IgM 항체를

검출 또는 이의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 펩타이드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 펩타이드는 하기 표 1에 기재된 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 또는 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

표 1

펩타이드 서열번호	펩타이드 아미노산 서열	AUC 값
서열번호 1	RGPLRQGRNTGAAGA	0.837
서열번호 2	VFTAWMGLEFAYGDK	0.825
서열번호 3	HKRIFGSHHPHDLG	0.825
서열번호 4	GRVWNVDMRRCDFSE	0.823
서열번호 5	GQRDAPMVTHRPSPH	0.820

[0020] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 무작위 펩타이드 마이크로어레이 및 스튜던트 t-검정을 통해 얻은, 29,490 종의 펩타이드의 마이크로어레이 강도 배수 변화 및 P-값을 이용하여, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 항체를 표적으로 하는 170종의 펩타이드 후보군을 선별하였다(도 1). 이후, 170 종의 펩타이드 후보군 중에서, 수신자 조작 특성 곡선(ROC)의 곡선하면적(AUC) 값을 이용하여, AUC 값이 0.75이상으로 나타난 보다 유의적인 64종의 펩타이드를 선별하였다. 최종적으로, 64 종의 펩타이드 중에서도 AUC 값의 상위 5종의 펩타이드를 선별하였다(도 2 및 3).

[0021] 상기 펩타이드는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절 또는 하향 조절되는 자가항체에 결합하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 용어 “알츠하이머성 치매”는 알츠하이머 질환에 의하여 유발된 치매 증상을 의미한다. 상기 알츠하이머성 질환은 독일의 알츠하이머 박사에 의하여 최초로 보고된, 치매를 유발하는 가장 일반적인 퇴행성 뇌질환을 의미하는데, 상기 알츠하이머 질환이 진행됨에 따라 기억력을 포함하는 전체적인 인지기능이 점진적으로 악화된다고 알려져 있다.

[0025] 본 발명의 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위해 개체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0026] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 계층 군집화 분석을 수행하여, 상기 선별된 64종의 펩타이드는 실시예에서 구축된 연구집단을 알츠하이머성 치매 집단(AD)과 정상 개체 집단(ND)로 명확하게 구분할 수 있음을 확인하였다(도 4). 또한, 마이크로어레이 강도(MFI) 분석을 통해, 상기 선별된 5종의 펩타이드 및 이들의 조합은 AD 집단 및 ND 집단 간의 MFI 값의 유의적 차이를 나타냄을 확인하였다(도 5 및 6). 또한, K-MMSE 점수와의 상관관계 분석을 통해, 상기 서열번호 1로 이루어지는 펩타이드를 이용하는 경우, 치매의 중증도 평가에 사용되는 K-MMSE

점수와 높은 유사성을 나타냄을 확인하였다(도 7).

- [0027] 즉, 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 본 발명의 조성물은 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가되는 IgM 항체의 타겟이 되어, 알츠하이머성 치매의 우수한 진단 효능을 가짐을 확인할 수 있었다. 특히, 서열번호 1 내지 5의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 모두 사용한 경우 매우 높은 AUC 값인 0.945를 나타내어, 매우 유의적인 알츠하이머 진단 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0029] 본 발명의 다른 하나의 양태는 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공한다.
- [0030] 이때, 상기 용어 “펩타이드”, “알츠하이머성 치매”, “진단” 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0031] 본 발명의 키트는 상기 알츠하이머성 치매 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미하며, 본 발명의 키트를 이용하여 알츠하이머성 치매 환자인 것으로 판단하거나 알츠하이머성 치매의 발병 위험을 예측할 수 있다. 본 발명의 알츠하이머성 치매 진단용 키트에는 알츠하이머성 환자에서 특이적으로 증가되는 자가항체, 특히 IgM의 검출 또는 이의 발현을 측정하기 위한 상기 펩타이드 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96웰 플레이트, 폴리스테렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리코팅 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸벤지딘)가 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 개체로부터 분리된 시료로부터 상기 조성물을 이용하여 시료 내 IgM 항체를 검출 또는 이의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0034] 이때, 상기 용어 “펩타이드”, “알츠하이머성 치매”, “진단” 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [0035] 본 발명의 용어 “개체”는 알츠하이머성 치매를 진단하거나 발병 위험을 예측하고자 하는 대상을 의미한다. 이때, 상기 개체는 사람을 비롯하여, 개, 말, 소, 쥐, 염소, 토끼, 닭, 오리, 거위 등의 알츠하이머성 치매가 발병될 수 있는 동물이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 용어 “시료”는 상기 개체로부터 유래되어 알츠하이머성 치매에서 특이적으로 상향 조절되는 자가항체를 검출할 수 있는 조직, 세포, 진혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하며, 특히 개체로부터 분리된 혈액 샘플일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 정보제공방법은 알츠하이머성 치매를 진단하거나, 알츠하이머성 발병 위험을 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서, 항체의 존재 또는 항체의 상향-조절 또는 하향-조절되는 정도를 확인하기 위해 개체로부터 분리된 시료 내 IgM 항체를 검출 또는 이의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 정보제공방법이다.
- [0038] 또한, 상기 정보제공방법은 상기 IgM 항체의 발현 수준을 정상대조군으로부터 분리된 시료 내 IgM 항체의 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 구체적으로, 상기 IgM 항체의 발현 수준을 비교하는 단계의 기준이 되는 값은 수신자 조작 특성 곡선(ROC)의 곡선하면적(AUC) 값 또는 마이크로어레이 강도(MFI) 값일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이 경우, 개체로부터 분리된 시료 내 IgM 항체와 상기 조성물 간의 결합 정도를 측정하여, 정상 대조군에 비하여 증가된 결합 정도를 보이는 경우 또는 특정 컷-오프 값(cut-off value)보다 높은 경우, 상기 개체가 알츠하이머성 치매 환자인 것으로 판단되거나 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높은 것으로 판단될 수 있다. 구체적으로는, IgM 항체의 발현 수준이 정상 대조군으로부터 분리된 시료 내 IgM 항체의 발현 수준보다 높을 경우, 상기 개체가 알츠하이머성 치매 환자로 판단되거나, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높은 것으로 판단될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 이루어진,

알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체에 결합하는 펩타이드를 제공한다.

[0041] 이때, 상기 용어 “펩타이드”, “알츠하이머성 치매” 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0042] 본 발명의 펩타이드는 또한 프로브로 이용될 수 있으며, 상기 프로브는 알츠하이머성 치매 환자의 특이적인 자가항체와 결합을 이룰 수 있는, 라벨링(labeling)된 펩타이드를 의미한다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드는 알츠하이머성 치매환자의 혈액 내에서 특이적으로 증가하는 IgM 항체와 특이적으로 결합할 수 있으므로, 혈액을 통한 진단이 불가능하였던 기존 알츠하이머성 치매 진단 방법의 한계점을 극복하고, 혈액을 기반으로 한 알츠하이머성 치매 진단에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 알츠하이머성 치매 특이적 IgM에 대한 펩타이드를 화산 도표(volcano plot)로 나타낸 것이다. 알츠하이머성 치매에서 특이적으로 증가하는 IgM의 표적이 되는 펩타이드는 빨간색으로 표시되었다.

도 2는 도 1에서 선별된 펩타이드(n=170)의 ROC(Receiver operating curve) 분석을 통한 AUC 값을 나타낸 것이다. $AUC \geq 0.75$ 를 기준으로 하여, 알츠하이머성 치매에서 특이적으로 증가하는 IgM에 대한 타겟 펩타이드(n=64)를 추가적으로 선별하였다.

도 3은 도 2에서 선별된 펩타이드 중 AUC 값 상위 5종의 펩타이드를 선별하여, 이들 조합의 ROC 분석을 통한 AUC 값을 나타낸 것이다.

도 4는 도 2에서 선별된 알츠하이머성 치매 특이적인 펩타이드(n=64)를 통한 계층 군집화(Hierarchical clustering) 분석 결과를 보여주는 히트맵이다.

도 5는 도 2에서 선별된 펩타이드 중 AUC 값 상위 5종의 펩타이드를 선별하여, 각각의 5종의 펩타이드를 타겟으로 하는 IgM 항체의 MFI 값을 점 도표(dot plot)로 나타낸 것이다.

도 6은 도 2에서 선별된 펩타이드 중 AUC 값 상위 5종의 펩타이드를 선별하여, 이들 조합을 타겟으로 하는 IgM 항체의 MFI 값을 점 도표로 나타낸 것이다.

도 7은 선별된 펩타이드 중에서 K-MMSE 점수와 상관성이 있는 서열번호 1의 펩타이드에 대한 피어슨 상관계수 분석을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0049] 실시예 1: 알츠하이머성 치매 특이적 자가항체를 표적으로 하는 펩타이드의 선별

[0051] 실시예 1-1: 연구집단의 구축

[0052] 하기 실시예에 이용된 혈청 샘플은 조선대학교 병원 및 충남대 의대로부터 수득된 19명의 알츠하이머성 치매 환자(실험군, AD) 및 상기 실험군과 나이가 일치하는 19명의 정상 개체(대조군, ND)의 혈청샘플이다. 또한, 여성에서 알츠하이머성 치매가 더 빈번하게 발병하기 때문에, 잠재적인 성적 편향성을 감소시키기 위해, 혈청 샘플은 모두 여성으로부터 수득하였다. 알츠하이머성 치매의 임상적 진단은 국립 노화-알츠하이머 협회(National Institute on Aging-Alzheimer's Association)에 의해 규정된 기준에 기초하였다. 알츠하이머성 치매의 진단을 확인하기 위해, 모든 실험군(AD) 및 대조군(ND) 개체는 F-18 florbetaben(NeuraCeq™)을 이용한 자기공명 이미지화(magnetic resonance imaging) 또는 양전자 단층촬영(positron emission tomography)을 받았다. 또한,

치매의 중증도를 평가하기 위해 한국형 간이-정신상태 검사(K-MMSE: Korean Mini-Mental State Examination) 점수를 측정하였다.

[0054] 실시예 1-2: 무작위 펩타이드 마이크로어레이(Random peptide microarray)

[0055] 무작위 펩타이드 마이크로어레이(Random peptide microarray)의 칩에 29,240종의 펩타이드를 이중(duplicate)으로 코팅하였다(58,480개의 펩타이드 스팟). FLAG(DYKDDDKAS) 펩타이드와 HA(YPYDVPDYAG) 펩타이드는 대조군 펩타이드로 추가 코팅하였다. 코팅된 마이크로어레이는 30분간 blocking buffer MB-070(Rocland, Gilbertsville, PA, USA)를 통해 블로킹 과정을 거쳤다. 이후, 칩은 상온(RT)에서 1:5000으로 희석된 DyLight680에 컨쥬게이트된 염소(goat) 항-인간 IgM으로 45분간 항온처리(incubation)를 하였다. 이는 2차 항체와 플레이트 내 펩타이드 라이브러리 간의 백그라운드를 체크하기 위해 진행하였다. 다음으로 PBS (pH 7.4)/0.05 % Tween 20/ 10% Rockland blocking buffer MB-070을 통해 1:500으로 희석된 환자 혈액 샘플을 4 °C에서 16시간 동안 항온처리를 하였다. 칩은 다시 1:5000으로 희석된 2차 항체로 항온처리를 하였다. 마지막으로 대조군 펩타이드에 대한 DyLight680에 컨쥬게이트된 단클론성 항-HA 항체 및 DyLight800에 컨쥬게이트된 단클론성 항-FLAG 항체를 상온에서 45분간 항온처리를 하였다. 각각의 항온처리 단계 이후, 마이크로어레이 칩은 PBS (pH 7.4)/0.05 % Tween 20 buffer를 통해서 3번 세척하였고, 마이크로어레이 칩의 스캐닝은 LI-COR Odyssey Imaging System을 통해서 7/7 (레드/그린)의 스캐닝 강도로 진행하였다.

[0057] 상기 과정에 의해 수득된, 무작위 펩타이드 마이크로어레이 데이터는 다음의 신호 강도의 보정 과정을 거쳤다. 우선, 마이크로어레이 데이터는 Spotxel® microarray Image and Data Analysis software를 통해서 백그라운드 노이즈를 제거하였다. 이후, 2차 항체와 펩타이드 라이브러리 간의 백그라운드 신호는 평균 중앙값(averaged median)의 강도를 기반으로 제거하였다. 마이크로어레이 칩 간의 미가공 데이터(raw data)는 칩 간의 변이(variation)를 보정하기 위해 R 3.4.0 software(R Development Core Team, 2017)의 devtools package를 통해서 quantile 정규화 과정을 진행하였다.

[0059] 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가하는 IgM 타입 항체의 표적이 되는 펩타이드 마커 선별을 위해, 알츠하이머성 치매 환자와 정상 개체 간의 마이크로어레이 강도 배수 변화(microarray intensity fold change) ($ND/AD \geq 2$)와 스튜던트 t 검정(student's t test)을 이용한 P-값 (≤ 5)를 이용하여 펩타이드 후보군을 선별하였다.

[0061] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 무작위 펩타이드 마이크로어레이로 확인한 29,490 종류의 펩타이드의 배수 변화($ND/AD \geq 2$) 및 P-값 (≤ 5)을 이용한 선별을 통해, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 항체를 표적으로 하는 펩타이드를 선별하였으며, 이를 빨간색으로 표시하였다. 이를 통해 170개의 펩타이드 후보군을 선별하였다.

[0063] 실시예 1-3: 수신자 조작 특성 곡선(ROC: Reciever operation curve)의 분석

[0064] 상기 실시예 1-2에서 선별된 170개의 펩타이드 후보군 중에서, ROC 곡선의 곡선하면적(AUC: area under the receiver operating characteristic curve) 값을 통해서 보다 유의적인 펩타이드 마커를 추가로 선별하였다. 이를 위해, R 3.4.0 software(R Development Core Team, 2017)의 pROC package를 통해서 각각의 펩타이드에 대한 AUC 값을 수치화하였고, AUC 값(≥ 0.75)를 기준으로 선별하였다.

[0065] 본 발명의 실시예에서, AUC 값은 알츠하이머성 치매환자에서 특이적으로 증가되는 IgM 타입 항체의 표적이 되는 펩타이드 마커의 알츠하이머성 진단 성능을 정량적으로 표현한 값이다. 구체적으로는, 펩타이드 마커의 AUC 값이 0.75 이상인 경우 보통의 진단 성능을 가지고, AUC 값이 0.80 이상인 경우 우수한 진단 성능을 가지는 것으로 볼 수 있다.

[0066] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 빨간색으로 표시된 부분은 선별된 펩타이드를 의미하고, 파란색으로 표시된 부분은 선별되지 않은 펩타이드를 의미한다. 즉, AUC 값이 0.75 이상으로 나타난 64개의 펩타이드

를 선별하였다.

[0067] 추가적으로, 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 타입의 항체의 타겟이 되는 펩타이드로서 64개의 펩타이드 중에서도 AUC 값의 상위 5종의 펩타이드를 선별하였다. 선별된 5종의 펩타이드에 대한 AUC 값 및 선별된 펩타이드의 서열번호와 각각의 아미노산 서열은 하기 표 2에 나타낸다.

[0068] 선별된 5종의 펩타이드는 최소 0.82 이상의 AUC 값을 가지며, 이를 통해 본 발명의 5종의 펩타이드 마커는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가되는 IgM 항체의 표적이 되는 펩타이드로서, 상기 질환의 진단에 있어 우수한 진단 성능을 가짐을 확인할 수 있다.

표 2

[0069]

펩타이드 서열 번호	펩타이드 아미노산 서열	AUC 값
서열번호 1	RGPLRQGRNTGAAGA	0.837
서열번호 2	VFTAWMGLEFAYGDK	0.825
서열번호 3	HKRIFGSHHPTDHLG	0.825
서열번호 4	GRVWNVDMRRCDFSE	0.823
서열번호 5	GQRDAPMVTHRPSPH	0.820

[0070] 또한, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 선별된 5종의 펩타이드가 조합된 마커에 대하여 ROC 분석을 통해 AUC 값을 계산한 결과, 0.945의 매우 높은 AUC 값을 나타내었다. 이를 통해, 선별된 5종의 각각의 펩타이드 마커뿐만 아니라, 이들의 조합은 알츠하이머성 치매에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 타입 항체의 타겟으로서 작용하여, 매우 우수한 진단 성능을 가짐을 확인할 수 있다.

[0072] 실시예 2: 선별된 5종의 펩타이드 마커 및 이의 조합을 이용한 알츠하이머성 치매의 진단 효능 확인

[0074] 실시예 2-1: 계층 군집화 (Hierarchical clustering) 분석

[0075] 상기 실시예 1-3에서 선별된 64개의 펩타이드 마커의 알츠하이머성 치매의 진단 효능을 확인하기 위해, 계층 군집화 분석(Hierarchical clustering)을 수행하였다.

[0076] 그 결과, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 선별된 64개의 펩타이드 마커는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 타입 항체의 타겟이 되어, 상기 연구 집단을 알츠하이머성 치매 집단(AD)과 정상 개체 집단(ND)으로 명확하게 구분할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0078] 실시예 2-2: MFI(Microarray intensity) 분석

[0079] 상기 실시예 1-3에서 선별된 5종의 펩타이드 마커 및 이들의 조합의 알츠하이머성 치매의 진단 효능을 확인하기 위해, 상기 펩타이드 마커를 타겟으로 하는 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 타입 항체의 무작위 펩타이드 마이크로어레이 강도(MFI: Microarray intensity) 값을 알츠하이머성 치매 환자(AD) 및 정상 개체(ND)에서 분석하여 점 도표(Dot plot)로 나타내었다. 여기에서, 알츠하이머성 치매 환자 및 정상 개체의 MFI 값의 차이가 클수록, 상기 펩타이드 마커의 진단 성능이 우수하다고 해석할 수 있다. 각각의 펩타이드 및 이들의 조합에 대한 통계 검사는 스튜던트 t 검정을 통해 진행하였다. *은 $p < 0.05$, **은 $p < 0.01$, ***은 $p < 0.001$ 의 유의성을 나타낸다.

[0080]

[0081] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 선별된 5종의 각각의 펩타이드 마커는 알츠하이머성 치매 환자(AD) 및 정상 개체(ND)에 대한 MFI 값의 차이가 유의적으로 나타남을 확인할 수 있다. 특히, 5종의 펩타이드 중에서도 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(UM#1)의 경우, MFI 값의 차이가 가장 크게 나타내므로, 가장 우수한 진단 성능을 가짐을 확인할 수 있다.

[0082] 또한, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 선별된 5종의 펩타이드 마커의 조합 역시 알츠하이머성 치매

환자(AD) 및 정상 개체(ND)에 대한 MFI 값의 차이가 현저하게 나타남을 확인할 수 있다. 이를 통해, 상기 선별된 5종의 펩타이드 마커 및 이들의 조합은 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 상향 조절되는 IgM 타입 항체의 타겟이 되어, 알츠하이머성 치매의 진단에 있어 우수한 효능을 가짐을 확인할 수 있다.

[0084] 실시예 2-3: K-MMSE(Korean Mini-Mental State Examination) 점수와의 상관관계 분석

[0085] 대표적으로, 상기 실시예 2-2에서 선별된 1종의 펩타이드 마커(UM#1)의 알츠하이머성 치매의 진단 효능을 검증하기 위해, 피어슨 상관계수 분석(Pearson's correlation coefficient)을 통해, 각각의 펩타이드 마커와 치매의 중증도를 평가하기 위한 척도로 이용되는 K-MMSE 점수와의 상관관계를 분석하였다. 참고적으로, K-MMSE 점수는 최소 0점 내지 최고 30점으로 표현되며, 그 점수가 높을수록 인지기능의 저하를 나타내는 것이다.

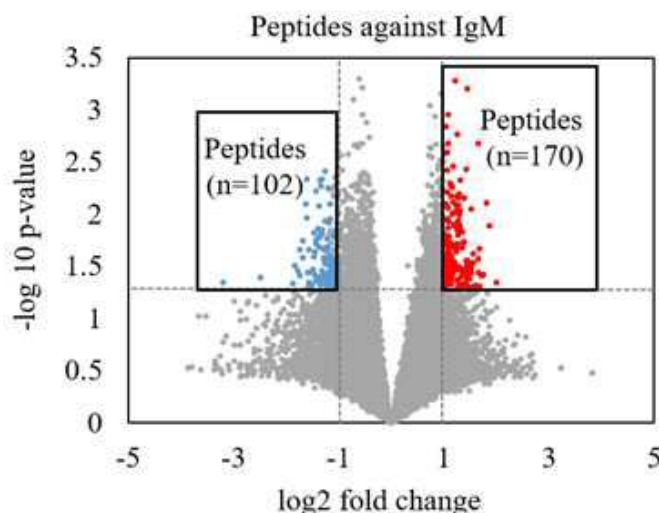
[0086] 그 결과, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 실시예 2-2에서 가장 큰 MFI 값의 차이를 나타낸, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩타이드(UM#1)의 MFI 값과 K-MMSE 점수는 $r \leq -0.5$, $p \leq 0.001$ 의 상관성을 가지고 있음을 나타낸다. 즉, 상기 펩타이드 마커를 이용하여 알츠하이머성 진단을 하는 경우, K-MMSE 점수를 통해 알츠하이머성 치매를 진단한 결과와 매우 유사함을 확인할 수 있다. 이를 통해, 본 발명의 선별된 펩타이드 마커를 이용하는 경우, 기존의 알츠하이머성 치매 진단 방법에 대등할 정도로 알츠하이머성 치매를 진단할 수 있음을 확인할 수 있는 것이다.

[0088] 이상의 내용을 종합하면, 본 발명의 선별된 5종의 펩타이드 및 이들의 조합은 알츠하이머성 치매 환자에서 특이적으로 증가되는 IgM 타입 항체의 타겟이 되어, 혈액을 통한 진단을 가능하게 하므로 기존의 알츠하이머 진단 방법이 가진 비용적, 시간적 문제 및 부작용 등에 따른 문제를 극복하고, 알츠하이머성 치매의 우수한 진단 마커로 이용될 수 있음을 확인하였다.

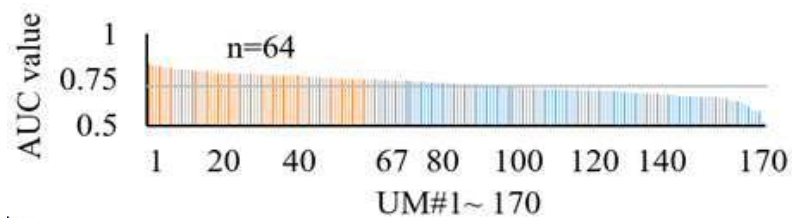
[0090] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

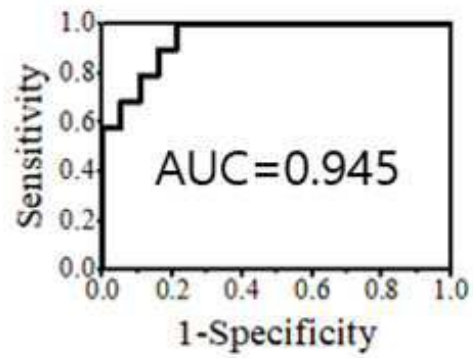
도면1



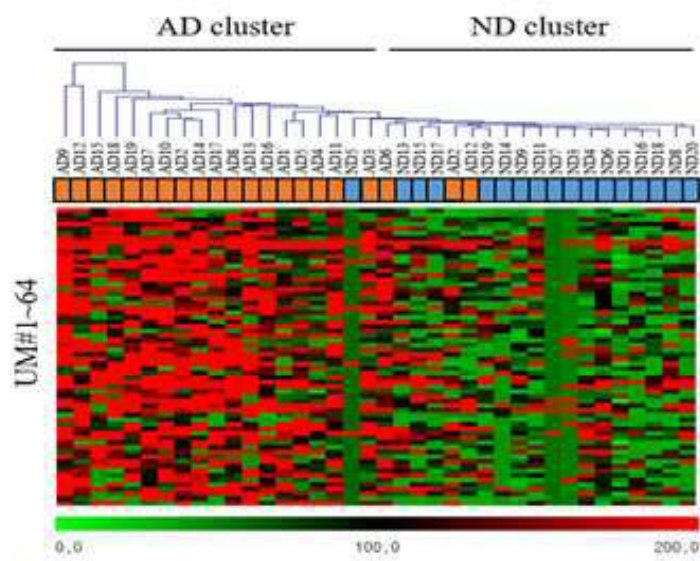
도면2



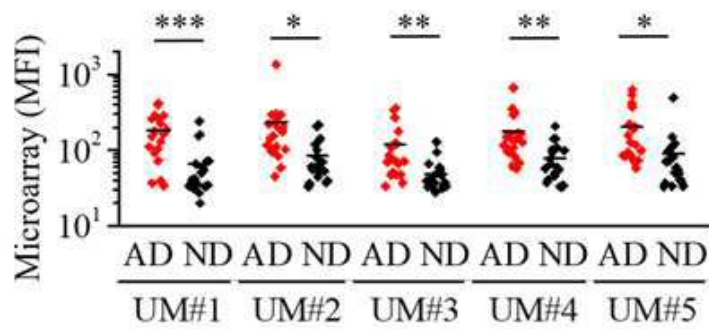
도면3



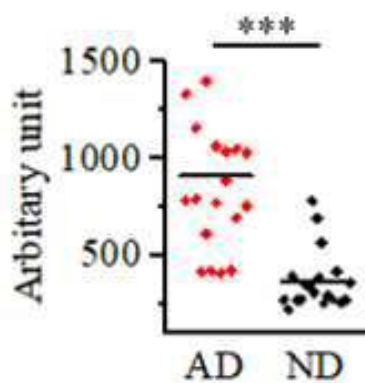
도면4



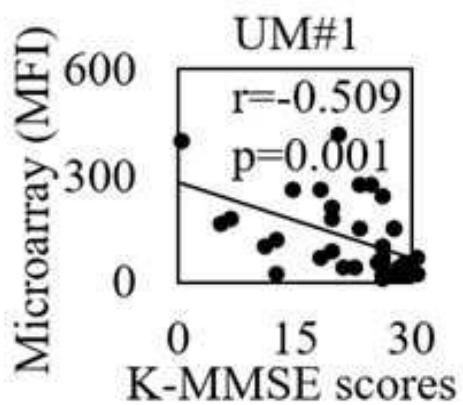
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

- <110> Gwangju Institute of Science and Technology
INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY
Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Peptide biomarker for the diagnosis of Alzheimers Dementia

<130> KPA180467-KR

<160> 5

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UM#1

<400> 1

Arg Gly Pro Leu Arg Gln Gly Arg Asn Thr Gly Ala Ala Gly Ala

1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UM#2

<400> 2

Val Phe Thr Ala Trp Met Gly Leu Glu Phe Ala Tyr Gly Asp Lys

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UM#3

<400> 3

His Lys Arg Ile Phe Gly Ser His His Pro Thr His Asp Leu Gly

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UM#4

<400> 4

Gly Arg Val Trp Asn Val Asp Met Arg Arg Cys Asp Phe Ser Glu

1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UM#5

<400> 5

Gly Gln Arg Asp Ala Pro Met Val Thr His Arg Pro Ser Pro His

1 5 10 15