



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월17일
(11) 등록번호 10-2033776
(24) 등록일자 2019년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 2440/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0144000

(22) 출원일자 2017년10월31일

심사청구일자 2017년10월31일

(65) 공개번호 10-2019-0048788

(43) 공개일자 2019년05월09일

(56) 선행기술조사문헌
WO2001055725 A2*

S. Shekhar et al., 'Estimation of Tau and Phosphorylated Tau181 in Serum of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Patients', PLoS One, 2016, Vol. 11, pp e0159099. 1부.*

M. S. Fiandaca et al., 'Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study', Alzheimer's & Dementia, 2015.*

Alzheimer's & Dementia, 2015, Vol. 11, P870.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

가천대학교 산학협력단

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)

(의료)길의료재단

인천광역시 남동구 남동대로774번길 21 (구월동)

재단법인대구경북과학기술원

대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,

(72) 발명자

장근아

서울특별시 양천구 목동 동로 350 목동신시가지아파트 523동 204호

남은주

경기도 부천시 송내대로 14 송내파인푸르지오 2단지 202동 2202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 차명훈

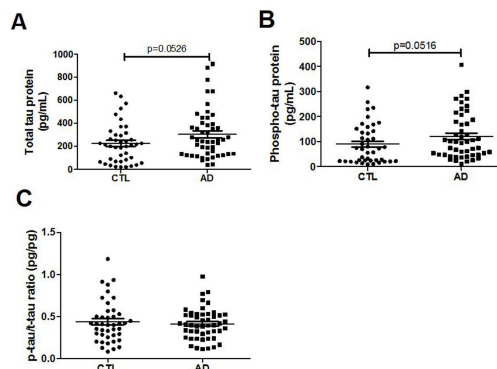
(54) 발명의 명칭 타우 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물 및 이를 이용한 알츠하이머 중증도의 진단방법

(57) 요약

본 발명은 타우 단백질을 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물 및 이를 이용한 알츠하이머 중증도의 진단 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명에 따른 알츠하이머 중증도 진단용 조성물에 포함되는 p-타우 단백질은 중도 알츠하이머 환자에서 연령 일치 대조군 및 경도 알츠하이머 환자 대비 유의적으로 증가하고, 경도 알츠하이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



며 환자에서 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가하며, 중도 알츠하이머 환자에서 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경증 알츠하이머 환자 대비 상당히 증가하고, 중도 알츠하이머 환자에서 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 대비 상당히 증가함으로써, 상기 조성물은 알츠하이머 중증도를 효율적으로 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 2800/2821 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

문제일

대구광역시 수성구 무열로 47, 101동 705호(만촌동, 만촌태왕리더스)

(72) 발명자

이영배

서울특별시 강남구 도곡로 78길 22 대치삼성래미안 아파트 104-305

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HR14C0002-030017

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 노인성 뇌질환 진단-치료를 위한 특화 방사성 의약품과 분자영상시스템 개발

기여율 40/100

주관기관 가천대학교 산학협력단

연구기간 2017.02.01 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017060018

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업- 바이오·의료기술개발사업- 차세대의료기기플랫폼기술

연구과제명 타액 및 콧물을 이용한 치매 조기진단시스템 개발

기여율 30/100

주관기관 대구경북과학기술원

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711052205

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발

연구과제명 청년기 우울증 정밀 진단 및 평가를 위한 분자의학적 임상/전임상 기술 개발

기여율 30/100

주관기관 가천대학교

연구기간 2017.04.01 ~ 2018.01.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

전체 타우(tau) 단백질; 202번째 세린이 인산화된 타우 단백질; 202번째 세린 및 205번째 트레오닌 잔기가 인산화된 타우 단백질; 및 181번째 트레오닌 잔기가 인산화된 타우 단백질;의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중증도는 경도(mild) 및 중도(moderate)인, 알츠하이머 중증도 진단용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 전체 타우 단백질의 함량을 기준으로 인산화된 타우 단백질의 함량비를 확인하는, 알츠하이머 중증도 진단용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 타우 단백질이 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드인, 알츠하이머 중증도 진단용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제제가 항체 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 알츠하이머 중증도 진단용 조성물.

청구항 8

제1항의 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 키트.

청구항 9

시료로부터 전체 타우 단백질; 202번째 세린이 인산화된 타우 단백질; 202번째 세린 및 205번째 트레오닌 잔기가 인산화된 타우 단백질; 및 181번째 트레오닌 잔기가 인산화된 타우 단백질;의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 중증도 진단의 정보를 제공하기 위한 타우 단백질 발현 수준 측정 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 시료가 엑소좀인, 타우 단백질 발현 수준 측정 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 타우 단백질의 발현 수준 측정은 전체 타우 단백질의 함량을 기준으로 인산화된 타우 단백질의 함량비를 확인하는, 타우 단백질 발현 수준 측정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타우 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물 및 이를 이용한 알츠하이머 중증도의 진단방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 의학의 급속한 발전으로 인간의 평균수명이 늘어나고, 장노년 인구가 증가함에 따라 새로운 사회적 문제들이 부각되고 있다. 특히, 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 노인성 신경계 질환들은 치명적인 신경계의 기능장애로 나타나며, 현재까지는 이를 치료하기 위한 효과적인 방법이 없다.

[0004] 특히, 노인성 신경계 질환 중 가장 흔하게 나타나고 있는 것이 알츠하이머(Alzheimer's disease, AD)이다. 알츠하이머는 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 기억력, 사고력 및 행동상의 문제를 야기하는 뇌 질환이다. 치매는 일상생활을 방해할 정도로 심각한 기억력 및 기타 지적능력의 상실을 의미하는 일반 용어로서 알츠하이머는 치매 사례의 60 내지 80%를 차지한다.

[0005] 알츠하이머의 발병 기전 및 원인은 정확하지 않으나, 신경전달물질인 아세틸콜린의 합성 감소, β -아밀로이드의 침착 및 타우 단백질의 과인산화로 인한 신경세포의 손상이 주요 원인으로 알려져있다. 알츠하이머의 임상적 진단은 병력과 신경심리학적 검사에 주로 의존하며, 부차적인 검사로 자기공명영상(MRI)이나 PET와 같은 영상검사를 시행한다. PiB-PET(pittsburgh compound B-positron emission tomography)는 뇌 영상촬영을 통해 뇌 내 아밀로이드 베타의 축적 수준을 확인함으로써 알츠하이머의 진단에 이용되는 방법이나, 고가이다.

[0006] 이와 관련하여, 대한민국 특허공개 제10-2016-0135430호는 초기 알츠하이머 병 또는 경도 인지 장애를 진단하기 위해 후각 조직의 miR-206의 발현 수준을 확인하는 방법을 개시하고 있다.

[0008] 한편, 타우(tau) 단백질은 분자량이 50,000 내지 70,000 Da인 미세소관 결합 단백질의 일종으로, 신경 섬유의 얽힘에 주로 관여한다. 타우 단백질은 현저한 분자적 다양성을 나타내는데, 그 중 가장 잘 알려진 원인은 프롤린지향성 인산화에 의한 것이다. 종전의 연구에서, 타우 단백질은 신경 세포에 특이적이고 축삭에만 존재하는 것으로 알려져 있었으나, 최근, 신경 세포 외에도 성상 세포, 올리고수지 신경 세포 또는 축삭 등에도 발현되어 있음이 알려졌다.

[0010] 알츠하이머를 조기에 효과적으로 진단하기 위한 바이오마커는 임상시험 동안 질병 개입의 효능을 모니터링하고, 질병의 중증도 정도를 탐지할 수 있어야 한다. 따라서, 혈액에 기초한 바이오마커가 새롭게 주목받고 있다. 이와 관련하여, 최근, 알츠하이머의 진단을 위한 몇몇의 바이오마커 후보로서 혈소관 내의 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 형태의 변화된 패턴, 말초 혈액구 내에서 산화적 DNA 손상, 혈장 24S-하이드록시콜레스테롤 및 혈장 IL-8의 발현 수준 등이 제안된 바 있다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 알츠하이머의 중증도의 진단에 사용 가능한 바이오마커 및 상기 마커를 이용한 알츠하이머 중증도의 진단방법을 연구하던 중, 중도 알츠하이머 환자의 p-타우 단백질의 함량이 연령 일치 대조군뿐만 아니라 경도 알츠하이머 환자에 비해서도 유의적으로 증가하고, 경도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율이 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다. 또한, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율이 경중 알츠하이머 환자에서의 데이터와 비교하여 상당히 증가하고, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율이 연령 일치 대조군 비교하여 상당히 증가함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2016-0135430호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은, 타우(tau) 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은, 상기 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 이용하여 알츠하이머 중증도 진단의 정보를 제공하기 위한 타우 단백질 발현 수준 측정 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 타우 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 키트를 제공한다.

[0020] 나아가, 본 발명은 시료로부터 타우 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단의 정보를 제공하기 위한 타우 단백질 발현 수준 측정 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 알츠하이머 중증도 진단용 조성물에 포함되는 p-타우 단백질은 중도 알츠하이머 환자에서 연령 일치 대조군 및 경도 알츠하이머 환자 대비 유의적으로 증가하고, 경도 알츠하이머 환자에서 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가하며, 중도 알츠하이머 환자에서 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경증 알츠하이머 환자 대비 상당히 증가하고, 중도 알츠하이머 환자에서 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 대비 상당히 증가함으로써, 상기 조성물은 알츠하이머 중증도를 효율적으로 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 모든 알츠하이머 환자에서 대조군 대비 전체 타우(t-tau) 및 인산화된 타우(p-tau) 단백질의 발현 수준을 확인한 그래프이다.

도 2는 연령 일치 대조군, 경도 및 중도의 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 발현 수준을 확인한 그래프이다.

도 3은 성별에 따른 타우 단백질의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 4는 연령 일치 대조군 및 중도 알츠하이머 환자에서 아밀로이드 베타의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 5는 알츠하이머 환자에서의 혈청 t-타우 발현 수준과 간이 정신상태 검사(MMSE), 임상 치매 평가(CDR-SOB) 및 전반적 퇴화 척도(GDS)와의 상관관계를 확인한 그래프이다.

도 6은 연령에 따른 타우 단백질의 발현 변화를 확인한 그래프이다.

도 7은 혈청 t-타우 및 p-타우 단백질 함량의 ROC(receiver operating characteristics)곡선을 확인한 그래프이다.

도 8은 혈청 엑소솜의 예상 직경 내 포함 여부(A), 엑소솜 마커인 CD63 및 신경 세포 마커인 NCAM-L의 발현여부(B), 및 연령 일치 대조군, 경도 및 중도의 알츠하이머 환자에서의 신경 세포 유래 엑소솜의 발현 수준(C)을 확인한 그래프이다.

도 9는 연령 일치 대조군, 경도 및 중도 알츠하이머 환자 각각의 신경 세포 유래 엑소좀의 t-타우 및 p-타우 단백질의 함량을 ELISA로 실험하여 확인한 그래프이다(pSer202 항체 사용).

도 10은 연령 일치 대조군, 경도 및 중도 알츠하이머 환자 각각의 신경 세포 유래 엑소좀의 t-타우 및 p-타우 단백질의 함량을 웨스턴 블롯팅으로 실험하여 확인한 그래프이다(pSer202 + pThr205 및 pThr181 항체 사용).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 타우(tau) 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 조성물은 경도(mild) 및 중도(moderate)로 구별되는 알츠하이머의 중증도를 진단 또는 판별하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 타우 단백질은 미세소관 결합 단백질 중 하나로서, 신경 섬유의 얽힘에 관여하는 단백질일 수 있다. 본 발명에 따른 타우 단백질은 전체 또는 인산화된 타우 단백질일 수 있다. 상기 타우 단백질은 통상의 기술분야에 타우 단백질이라고 알려진 모든 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 단백질의 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체 또는 단편을 모두 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 또는 펩티드에서의 아미노산 교환은 통상의 기술분야에 공지되어 있다. 경우에 따라서는 인산화, 황화, 아크틸화, 당화, 메틸화, 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 타우 단백질은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0030] 상기 인산화는 타우 단백질에서 인산화된다고 공지된 아미노산 잔기에서 나타날 수 있다. 구체적으로, 상기 인산화는 202번째 세린, 205번째 트레오닌 및 181번째 트레오닌 잔기로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 잔기에 대한 인산화일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 조성물은 전체 타우 단백질의 함량을 기준으로 인산화된 타우 단백질의 함량비를 확인함으로써 알츠하이머의 중증도를 판별할 수 있다.
- [0032] 상기 조성물에 포함될 수 있는 제제는 타우 단백질의 발현량을 측정할 수 있는 항체 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 항체는 단일클론항체, 다클론항체 또는 재조합 항체일 수 있고, 이는 통상의 기술분야에 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 한편, 상기 항체 단편은 항체 분자의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 그 예로는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0033] 상기 단일클론항체는 통상의 기술분야에 공지된 하이브리도마 방법 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 단일클론항체를 분리하는 하이브리도마 세포는 항원 단백질을 주사한 마우스와 같이 면역학적으로 적합한 숙주로부터 분리된 면역세포와 암 세포를 융합하여 만들 수 있다. 이런 두 집단의 세포 융합은 폴리에틸렌글리콜과 같이 본 발명이 속하는 기술분야에 공지되어 있는 방법을 이용하여 융합시키고 항체 생산 세포를 표준적인 배양 방법에 의해 증식시킴으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 한계 희석법을 이용하여 서브 클로닝을 하고, 수득된 균일한 세포집단을 이용하여 항원에 특이적인 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마 세포를 시험관 또는 생체 내에서 대량으로 배양하여 제조할 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리 및 정제될 수 있다.
- [0034] 상기 다클론항체는 통상의 기술분야에 공지된 방법에 따라 면역원인 바이오마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 상기 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물일 수 있다. 상기 면역원이 근내, 복강내 또는 피하 내로 주사되는 경우, 항원성을 증가시키기 위해 보조제(adjuvant)를 함께 투여할 수 있다. 이후, 외부 숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수득하고 이로부터 항체를 분리 및 정제하여 제조될 수 있다.
- [0035] 상기 제제는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출제로 표지된 접합체일 수 있다. 상기 발색효소는 퍼록시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 산성 포스파타제일 수 있다. 한편, 상기 형광물질은 플로오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플로오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-

3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로 테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸, Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민-B-이소티오시아네이트(RITC), PE(phycoerythrin) 또는 로다민일 수 있다.

- [0036] 상기 제제는 추가로 제제에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지한 접합체 및 스트렙타비딘 또는 아비딘을 처리한 리간드일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 진단용 조성물은 상기 서술한 바와 같은 제제 외에도 이들의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 모든 알츠하이머 환자에서 대조군 대비 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준이 증가하고(도 1 참조), 중도의 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 함량이 연령 일치 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 2).
- [0040] 또한, 중도 알츠하이머 환자의 p-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군 및 경도 알츠하이머 환자 대비 유의적으로 증가하고, 경도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(도 9 참조).
- [0041] 아울러, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경증 알츠하이머 환자 대비 상당히 증가하고, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 대비 상당히 증가함을 확인하였다(도 10 참조).
- [0042] 따라서, 상기 타우 단백질의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 조성물은 알츠하이머 중증도의 진단용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 알츠하이머 중증도 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머 중증도 진단용 키트를 제공한다.
- [0045] 상기 알츠하이머 중증도 진단용 조성물은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 일례로, 상기 조성물은 타우 단백질의 발현수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있고, 상기 조성물은 경도 및 중도로 구별되는 알츠하이머의 중증도를 진단 또는 판별하는 것일 수 있다. 상기 타우 단백질은 전체 또는 인산화된 타우 단백질일 수 있고, 상기 인산화는 타우 단백질의 202번째 세린, 205번째 트레오닌 및 181번째 트레오닌 잔기로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 잔기에 대한 인산화일 수 있다. 이때, 알츠하이머병의 중증도는 전체 타우 단백질의 함량을 기준으로 인산화된 타우 단백질의 함량비를 확인함으로써 판별될 수 있다. 상기 인산화된 타우 단백질의 발현수준은 항체 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 사용하여 측정될 수 있다. 상기 타우 단백질은 서열번호 1로 표시되는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0046] 상기 제제는 세척이나 복합체의 분리 등과 같은 후속 단계를 용이하게 하기 위해 고형기질에 결합된 것일 수 있다. 상기 고형기질은 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리섬유, 미세구체 또는 미세비드로 제조된 것일 수 있다. 또한, 상기 합성수지는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 키트는 환자가 알츠하이머병인지 아닌지를 구별하여 의사 등 진료 행위자가 알츠하이머병을 진단하는 것을 가능하게 할 뿐만 아니라, 알츠하이머 중증도의 진행 정도를 판별 또는 진단할 수 있도록 하고, 치료에 대한 환자의 반응을 모니터링하여 그 결과에 따라 치료 방법을 변경할 수 있게 한다. 또한, 마우스 및 래트 등을 포함하는 알츠하이머병 동물모델의 생체 내에서 타우 단백질의 발현을 조절하는 물질을 동정하는데도 사용될 수 있다.
- [0048] 상기 진단용 키트는 통상의 기술분야에 알려진 방법에 따라 제조될 수 있으며, 필요에 따라 완충액, 안정화제, 불활성 단백질 등을 더 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 진단용 키트는 타우 단백질의 발현수준을 측정하는 제제의 양을 탐색하기 위해, 검출체로서 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법을 통한 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템, 검출체를 표지하지 않고 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법, 또는 SPR 시스템을 영상화하

여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용할 수 있다.

- [0051] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 모든 알츠하이머 환자에서 대조군 대비 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준이 증가하고(도 1 참조), 중도의 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 함량이 연령 일치 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 2).
- [0052] 또한, 중도 알츠하이머 환자의 p-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군 및 경도 알츠하이머 환자 대비 유의적으로 증가하였고, 경도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(도 9 참조).
- [0053] 아울러, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경증 알츠하이머 환자 대비 상당히 증가하였고, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 대비 상당히 증가함을 확인하였다(도 10 참조).
- [0054] 따라서, 상기 타우 단백질의 발현량을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 조성물은 알츠하이머 중증도 진단용 키트의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0056] 나아가, 본 발명은 시료로부터 타우 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 알츠하이머 중증도 진단의 정보를 제공하기 위한 타우 단백질 발현 수준 측정 방법을 제공한다.
- [0057] 상기 타우 단백질은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [0058] 상기 시료는 정상적인 상태와 구별할 수 있는 타우 단백질을 포함하는 생체 시료라면 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 시료는 엑소좀일 수 있다.
- [0059] 상기 시료는 타우 단백질의 발현량을 측정하기 이전에, 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 연속추출, 원심분리 또는 젤 전기영동 등과 같은 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 방법에서, 상기 타우 단백질의 발현량은 웨스턴 블랏, 효소-면역화학 검출법(ELISA), 면역조직화학 염색법, 면역침강 및 면역형광법으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있다. 또한, 상기 타우 단백질의 발현 수준의 측정은 전체 타우 단백질의 함량을 기준으로 인산화된 타우 단백질의 함량비를 확인하는 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 모든 알츠하이머 환자에서 대조군 대비 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준이 증가하고(도 1 참조), 중도의 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 함량이 연령 일치 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 2).
- [0063] 또한, 중도 알츠하이머 환자의 p-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군 및 경도 알츠하이머 환자 대비 유의적으로 증가하였고, 경도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(도 9 참조). 아울러, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경증 알츠하이머 환자 대비 상당히 증가하였고, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 대비 상당히 증가함을 확인하였다(도 10 참조).
- [0064] 따라서, 타우 단백질의 발현 수준 측정방법은 알츠하이머 중증도 진단을 위한 정보를 제공하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [0066] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0067] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0069] **실시예 1. 알츠하이머 환자의 모집**
- [0070] 먼저, 가천대학교 길병원에서 총 95명의 피험자를 모집하였다. 여기에는 이전 연구에서 사용된 기준(Chang, K. A. *et al.* Plasma soluble neuregulin-1 as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 97, 1-7(2016)에 따라 알츠하이머로 분류된 환자 50명 및 건강한 대조군 45명을 포함하였다. 주관적 인지 결함(subjective cognitive complaints)을 가진 이들은 간이 정신상태 검사(mini-mental state examination, MMSE; 점수 < 25)에 의해 인지 결함으로 선별되었다. 다음으로, 치매의 분류를 위해 임상 치매 평가(clinical dementia rating, CDR-SOB(sum of box); 점수 > 2.5)와 전반적 퇴화 척도(global deterioration scale, GDS; 점수 > 3)를 포함한 신경 심리 검사를 통해 상세한 평가를 실시하였다. 상기 임상 치매 평가(CDR)와 전반적 퇴

화 척도(GDS)는 치매의 연구자료로서 임상자들에게 공지되어 있다. 이때, 다른 합병증을 갖는 알츠하이머 환자는 제외되었으며, 알츠하이머를 진단하기 위한 진단 기준은 미국정신의학회의 DSM-IV를 따랐다. 모든 임상적 평가는 임상 조사자에 의해 피험자의 유전적 상태를 숨긴 채로 수행되었다. 시험은 가천대학교 길의료재단의 기관 감사위원회(IRB)의 승인을 받았고, 모든 참가자들은 본인 또는 가족들의 동의하에 실험에 참여하였다.

[0072] 실시예 2. 알츠하이머 환자 및 대조군의 통계 분석

[0073] 실시예 1에서 모집한 알츠하이머 환자를 중증도의 정도에 따라 분류하기 위해 환자들을 신경인지(neurocognitive) 검사 점수인 MMSE, CDR-SOB 및 GDS 점수에 따라 경도 및 중도의 두 그룹으로 분류하였다. 또한, 연령은 알츠하이머의 주요 연관 인자 중 하나이므로, 환자와 대조군의 평균 연령을 비슷하게 만들기 위해 대조군을 연령 일치 대조군(AMC, age-matched control) 21명과 비-연령 일치 대조군(non-AMC) 24명으로 분류하여 분석하였으며, 조사 집단의 통계적 매개 변수를 요약한 결과를 하기의 표 1에 나타내었다.

표 1

[0075]

변수	대조군		알츠하이머	
	비-AMC	AMC	경도(mild)	중도(moderate)
참가자 수	24	21	30	20
여성(F)- 남성(M)	10F-14M	7F-14M	18F-12M	17F/3M
연령 (mean ± SEM)*	66.79 ± 0.39	75.00 ± 0.94	75.13 ± 0.99	76.60 ± 1.33
MMSE (mean ± SEM)	27.70 ± 0.18 (MMSE: 26~30)	27.76 ± 0.18 (MMSE: 27~30)	23.27 ± 0.19 ^{***} (MMSE: 21~24)	16.55 ± 0.52 ^{***} , ### (MMSE: 13~20)
CDR-SOB (mean ± SEM)*	0.49 ± 0.01 (CDR-SOB: 0.0~1.5)	0.48 ± 0.02 (CDR-SOB: 0.0~1.5)	2.63 ± 0.06 ^{***} (CDR-SOB: 2.5~3)	4.48 ± 0.28 ^{***} , ### (CDR-SOB: 3.5~7)
GDS (mean ± SEM)*	2.00 ± 0.00 (2: n=24)	1.95 ± 0.05 (1: n=1; 2: n=20)	3.03 ± 0.03 ^{***} (3: n =26)	3.75 ± 0.14 ^{***} , ### (4: n=12; 5: n=2)
AMC(age-matched control), 연령 일치 대조군; 비-AMC, 비-연령 일치 대조군; MMSE(mini-mental state examination), 간이 정신상태 검사; CDR-SOB(clinical dementia rating-sum of box), 임상 치매 평가; GDS(global deterioration scale), 전반적 퇴화 척도. ^{***} p <0.0001, One-way ANOVA 및 Tukey Multiple 비교 테스트를 사용하여 AMC 군과 비교함. ^{###} p <0.0001, One-way ANOVA 및 Tukey Multiple 비교 테스트를 사용하여 경도 군과 비교함.				

[0077] 그 결과, 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 중도 알츠하이머 환자의 중증도의 정도가 경도 알츠하이머 환자보다 더 높음을 확인하였다. 또한, 중도 알츠하이머 환자가 MMSE 점수는 유의적으로 낮은 반면, CDR-SOB 점수 및 GDS 점수는 유의적으로 높았다. 또한, 세 그룹 각각의 평균 나이는 거의 비슷하였다(표 1).

[0079] 실험예 1. 알츠하이머 환자 및 대조군의 혈청에서 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준 확인

[0080] 실험예 참여한 알츠하이머 환자 및 대조군의 혈청에서 전체 타우(t-tau) 및 인산화된 타우(p-tau) 단백질의 발현 수준을 다음과 같이 측정하였다.

[0081] 구체적으로, 상기 실험예 1에서 모집한 95명의 참가자 각각으로부터 무균 조건 속 살균된 진공시험관(vacutainer)을 이용하는 정맥채혈법을 사용하여 10 ml의 혈액을 수득하였다. 수득된 혈액을 응고시키기 위해 약 30분 동안 실온에서 보관하였고, 응고된 혈액을 1,000 X g, 4℃의 조건으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 수득한 혈청에 단백질 분해효소 억제제 카테일(535140; EMD Biosciences, Inc., 독일)과 탈인산화효소 억제제 카테일(P5726 및 P0044; Sigma-Aldrich, Inc., 미국)을 첨가하였고, 혈청을 분주하여 분석이 이루어지기 전까지 바로 -80℃에서 보관하였다.

- [0082] 준비된 혈청에서 t-타우, p-타우 단백질, 및 아밀로이드 베타(Aβ42)와 같은 혈청 병원성 단백질의 함량은 인간 타우 단백질 ELISA 키트(MBS022635; MyBioSource, Inc., 미국), 인간 p-타우 단백질 ELISA 키트(MBS013458; MyBioSource, Inc., 미국) 및 인간 Aβ42 탐지 ELISA 키트(KHB3544, Thermo Fisher Scientific, Incorporated)를 사용하여 분석하였다. 키트 제조사의 지시사항에 따라 50 μl의 샘플을 사용하였으며, 필요한 경우에는 샘플을 1:5의 비율로 희석하여 사용하였다.
- [0083] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 알츠하이머 환자를 중증도의 정도로 분류하지 않았을 때, 모든 알츠하이머 환자에서 대조군 대비 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준이 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한, 혈청 단백질 내에 존재하는 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율도 두 그룹 간에 유의적인 차이가 없었다(도 1).
- [0084] 한편, 도 2에 나타낸 바와 같이, 중도의 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다. 또한, 경도 및 중도의 알츠하이머 환자에서 혈청 p-타우 단백질의 함량이 연령 일치 대조군 대비 약간 증가하였으나, t-타우 함량에 대한 p-타우 함량 비율은 그룹들 간에 유의적인 차이가 없었다(도 2).
- [0085] 또한, 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 여성은 남성보다 알츠하이머병의 발병률이 높았으나, 혈청 속 t-타우 또는 p-타우 단백질의 함량이나 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율에는 유의미한 차이가 없었다. 아울러, 알츠하이머의 공지된 표지자인 아밀로이드 베타의 혈청 속 농도도 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다(도 3 및 4).
- [0087] **실험예 2. 알츠하이머 환자에서의 혈청 t-타우 발현 수준과 간이 정신상태 검사(MMSE), 임상 치매 평가(CDR-SOB) 및 전반적 퇴화 척도(GDS)와의 상관관계 확인**
- [0088] 상기 실시예 2에서 혈청 t-타우 단백질의 발현 수준과 신경인지(neurocognitive) 검사 점수 사이의 상관관계가 유의하였으므로, 혈청 t-타우 단백질의 발현 수준과 신경인지 검사 점수 사이의 상관관계를 평가하였다.
- [0089] 그 결과, 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 혈청 t-타우 단백질의 함량 수준은 MMSE 점수와 유의적인 음의 상관관계를 가지고, GDS 점수와는 유의적인 양의 상관관계를 나타냈으나, CDR-SOB 점수와의 유의적인 상관관계는 없었다(도 5).
- [0090] 또한, 연령은 알츠하이머의 가장 중요한 연관 인자로 알려졌으나, 혈청 t-타우 단백질의 수준과 연령 간에 유의적인 상관관계는 없었다(도 6).
- [0092] **실험예 3. 혈청 t-타우 및 p-타우 단백질 함량의 ROC 확인**
- [0093] 혈청 t-타우 단백질의 진단학적 특징을 평가하기 위해 ROC(receiver operating characteristics) 분석을 수행하여 혈청 t-타우 및 p-타우 단백질의 ROC 곡선을 확인하였다.
- [0094] 구체적으로, ROC 분석은 대조군 및 알츠하이머의 구별 모델의 효과를 결정하기 위해 면적의 표준 오차에 대한 비모수적 분포(nonparametric distribution)를 가정하여 수행하였다. 이때, Graph Pad Prism 5(La Jolla, CA, USA)를 사용하여 평균을 비교하기 위한 통계적 분석을 수행하였다.
- [0095] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 연령 일치 대조군 대비 중도 알츠하이머 환자의 혈청 t-타우 단백질의 곡선 면적(area under curve, AUC)은 0.7638이었다. 또한, 중도의 알츠하이머 환자를 검출하기 위한 t-타우 단백질의 컷오프(cutoff) 값은 249.9 pg/ml이었다(p = 0.01259)(민감성 68.42%, 특이성 68.42%). 한편, 혈청 p-타우 단백질은 곡선 면적이 연령 일치 대조군 대비 0.6648이었고, 중도의 알츠하이머 환자를 검출하기 위한 p-타우 단백질의 컷오프 값은 71.82 pg/ml이었다(p = 0.8234)(민감성 68.42%, 특이성 68.42%)(도 7).
- [0097] **실험예 4. 신경 세포 유래의 엑소좀의 분리 및 농축**
- [0098] 혈청 타우 단백질은 신경 세포에서 유래되는 것으로 알려져 있으므로, 혈청 엑소좀으로부터 신경 세포 유래의 엑소좀(neuronal cell-derived exosome, NEX)을 다음과 같은 방법으로 분리하였다.
- [0099] 구체적으로, 각 그룹별 16개의 샘플을 무작위로 선별한 뒤, 혈청의 절반을 252 μl의 ExoQuick 엑소좀 침전 용액(EXOQ5A-1, System Biosciences, Inc., 미국)과 혼합하여 4℃에서 1시간 동안 배양하고, 1,500 X g, 4℃의 조건으로 30분 동안 원심분리한 뒤, 각 펠렛을 억제제 칼슘과 마그네슘이 없는 Dulbecco's balanced salt solution(calcium and magnesium free DBS²⁻; Thermo Fisher Scientific, Incorporated)을 이

용하여 재현탁하였다. 상기 엑소솜 현탁액을 나노입자 추적 시스템(NS500; Malvern Instruments Limited, 영국)을 사용하여 3 내지 15×10^8 /ml의 범위에서 계수할 수 있도록 1:200의 배율로 희석시켰다.

[0100] 상기 희석시킨 각 샘플에 100 μ l의 3% 소혈청 알부민(BSA)을 첨가하였고, 1 mg의 비오틴 결합 항-인간 CD171/NCAM-L1(L1 세포 접착 분자, L1CAM 토끼 항체(bs-1996R-Biotin; Bioss Antibodies Inc., 미국)를 첨가하여 4°C에서 10분 동안 배양한 뒤, 여기에 25 μ l의 스트렙타비딘-아가로즈 레진(53116, Thermo Fisher Scientific, Incorporated) 및 50 μ l의 3% 소혈청 알부민을 첨가하였다. 이를 200 X g, 4°C의 조건으로 10분 동안 원심분리한 뒤, 상등액을 제거하고 각 펠렛을 50 μ l의 글리신-HCl(pH 3.0, 0.05 M)에서 10초 동안 볼텍싱하였다. 그 후, 각각의 현탁액에 0.45 ml의 M-PER 포유동물 단백질 추출 시약(78501, Thermo Fisher Scientific, Incorporated)을 첨가한 뒤, 37°C에서 10분 동안 볼텍싱하였으며, 추출된 단백질은 분석이 이루어지기 전까지 -80°C에 저장하였다. 한편, 예상되는 엑소솜(ExoQuick 침전물의 입자)의 크기는 Nanosight 시스템을 사용하여 결정하였다.

[0101] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 총 혈청 엑소솜의 직경은 예상된 크기인 83 nm 내지 159 nm 범위로 확인되었다(도 8a).

[0103] **실험예 5. 신경 세포 유래의 엑소솜의 특징 확인**

[0104] 실험예 4에서 농축시킨 엑소솜에서 엑소솜 마커인 CD63 및 신경 세포 마커인 NCAM-L1을 사용한 웨스턴 블롯팅 실험을 다음과 같이 수행하였다.

[0105] 각 그룹별 9개의 신경 세포 유래 엑소솜 샘플을 무작위로 선별한 후, 각 샘플에서 20 μ l의 총 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 단백질을 PVDF 막(Merck Millipore, 독일)으로 옮긴 후, TBS(10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl)로 제조한 5%의 스킴밀크를 가하여 실온에서 1시간 동안 처리한 후, TBS로 희석한 1차 항체를 4°C에서 밤새 처리하였다. 이때, 1차 항체로는 엑소솜에 대해, 항-인간 CD63 토끼 항체(1:1000, System Biosciences, Inc., Palo Alto, CA, USA) 및 신경 세포 유래 엑소솜에 대해, 항-인간 NCAM-L1 염소 항체(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, 미국)가 사용되었다.

[0106] 상기 PVDF 막을 TBS-T(20 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl 및 0.05 % Tween 20)로 세척한 후, HRP가 결합된 2차 항체인 항-토끼 염소 항체(1:5000, Bio-Rad, Hercules, 미국), 항-마우스 염소 항체(1:3000, Bio-Rad, Hercules, 미국) 또는 항-염소 당나귀 항체(1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 미국)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이를 TBS-T로 세척한 후, 밴드를 Enhanced Chemiluminescent System(Thermo Fisher Scientific, Incorporated)으로 시각화하였으며, 각 그룹 간 단백질의 발현은 Image J(미국 국립 보건원, 미국 <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016)를 사용하여 정량적으로 비교하였다. 특히, 신경 세포 마커인 NCAM-L1 과의 비교를 위해, 결과는 CD63의 발현으로 표준되었고, 타우 단백질을 표준화된 NCAM-L1 값으로 다시 표준화하였다. 결과는 연령 일치 대조군에 대한 배수 변화로 표현하였다.

[0107] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 알츠하이머 환자와 대조군의 혈청에서 전체 엑소솜(EX) 분획(초기 ExoQuick 침전물)과 신경 세포 유래 엑소솜(NEX) 분획(면역화학적 처리 후)에서 CD63과 NCAM-L1이 모두 발현되었다. 신경 세포 유래 엑소솜에서의 CD63의 발현은 전체 엑소솜 분획에 비해 감소하였으나, NCAM-L1 발현은 증가하였다(도 8b).

[0109] 또한, 신경 세포 유래 엑소솜에서의 타우 단백질의 양을 엑소솜 마커 CD63에 대한 ExoELISA 키트(EXOEL-CD63, System Biosciences, Inc., 미국)를 사용하여 정량화하였다. 키트 제조사의 지시사항에 따라 50 μ l의 샘플을 사용하였으며 필요한 경우에는 샘플을 1:5의 비율로 희석하여 사용하였다. 또한, 각 그룹별 분석에서 CD63의 모든 측정에 대한 평균값을 1.00으로 설정하고, 각 샘플의 상대적인 값은 t-타우 및 p-타우 단백질의 수준을 표준화하는데 사용하였다. 샘플 및 표준시약은 각각 중복 측정하여 통계 분석에 사용하였다.

[0110] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 중도 알츠하이머 환자에서의 엑소솜이 경도 환자 및 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 8c).

[0112] **실험예 6. 경도 및 중도 알츠하이머 환자에서의 신경 세포 유래 엑소솜의 t-타우 및 p-타우 단백질 함량 확인**

[0113] 신경 세포 유래 엑소솜에서의 타우 단백질의 함량 수준과 알츠하이머 중증도의 정도와의 상관관계를 확인하기 위해, 연령 일치 대조군, 경도 및 중도 알츠하이머 환자 각각의 신경 세포 유래 엑소솜의 t-타우 및 p-타우 단백질의 함량을 엘라저 실험 방식으로 측정하였다(각 n = 16). 이때, 실험에는 항-인간 인산-PHF-타우 pSer202 마우스 항체(AT8)(1:500, Thermo Fisher Scientific, Incorporated) 및 항-인간 타우 염소 항체(C-17)(1:500,

Santa Cruz Biotechnology, Incorporated, 미국)를 사용하였다.

[0114] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 중도 알츠하이머 환자의 t-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한, 중도 알츠하이머 환자의 p-타우 단백질의 함량은 연령 일치 대조군뿐만 아니라 경도 알츠하이머 환자에 비해서도 유의적으로 증가하였다. 아울러, 경도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 p-타우의 함량 비율은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(도 9).

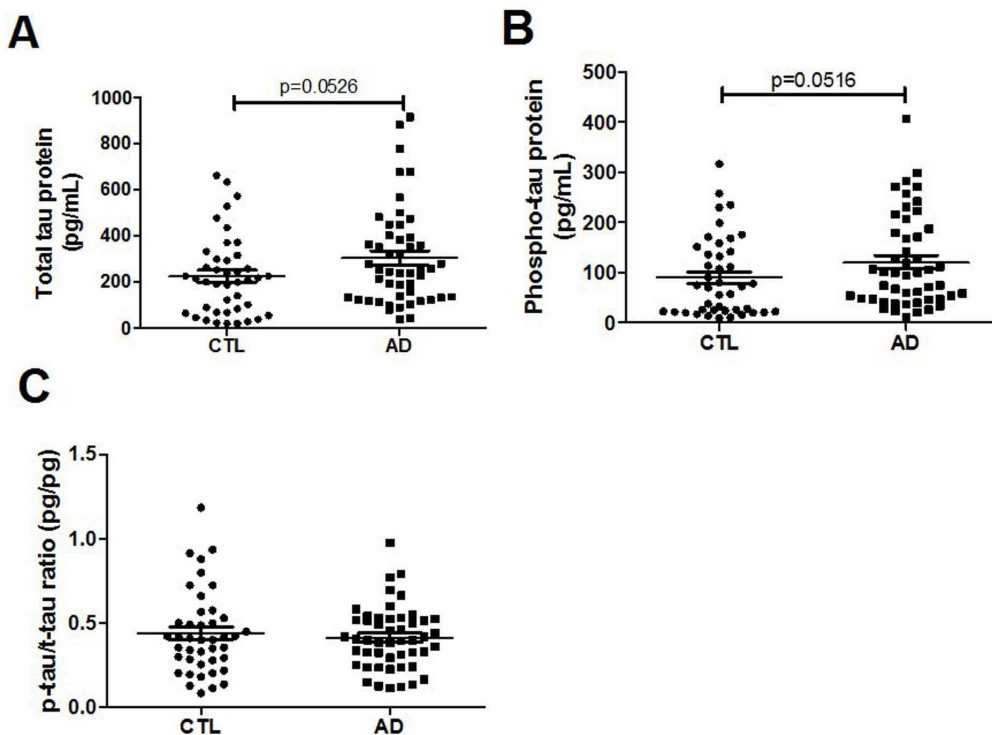
[0116] 또한, 신경 세포 유래 엑소솜에서 t-타우 및 p-타우 단백질의 발현 수준 변화는 웨스턴 블롯팅 실험을 통해 확인하였다.

[0117] 실험에 사용된 1차 항체로는 t-타우 단백질에 대해, 항-인간 타우 염소 항체(C-17)(1:500, Santa Cruz Biotechnology, Incorporated, 미국), 및 p-타우 단백질에 대해, 항-인간 인산-PHF-타우 pSer202 + pThr205 마우스 항체(AT8)(1:500, Thermo Fisher Scientific, Incorporated) 및 항-인간 p-타우(Thr181) 마우스 단일 클론 항체(AT270)(1:500, Thermo Fisher Scientific, Incorporated)를 사용하여 상기 실험에 5와 같은 방법으로 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

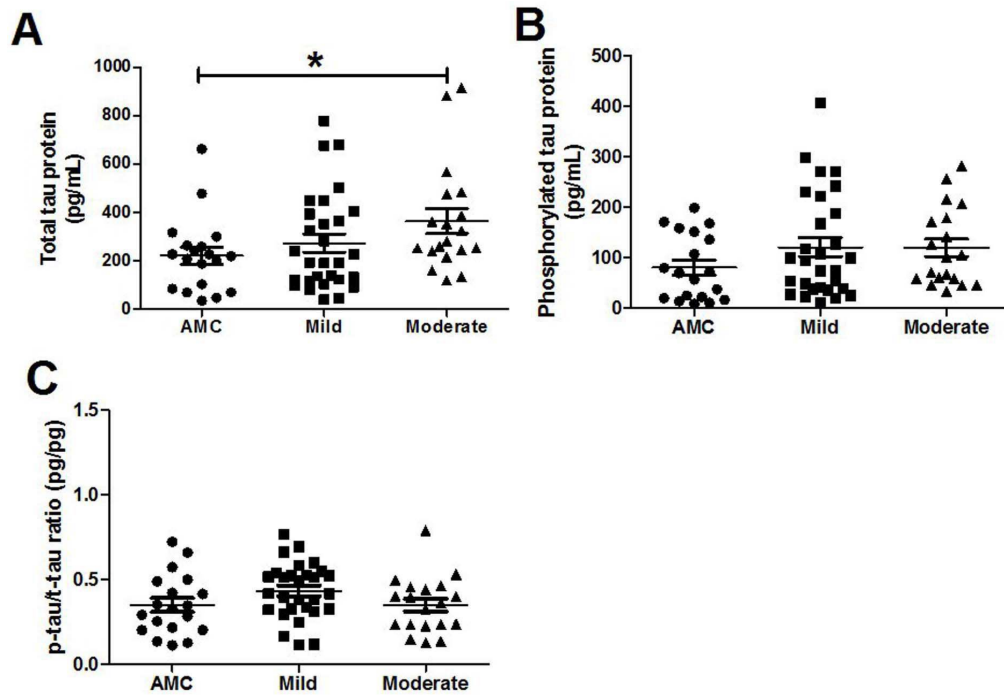
[0118] 도 10에 나타난 바와 같이, 중도 알츠하이머 환자에서의 NCAM-L1 발현 수준은 연령 일치 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 또한, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 단백질의 발현 수준은 연령 일치 대조군에 비해 유의하게 증가되었고, 중도 알츠하이머 환자에서의 pSer202 + pThr205 및 pThr181 단백질은 연령 일치 대조군뿐만 아니라 경도 알츠하이머 환자와 비교하여 유의적으로 증가하였다. 아울러, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pSer202 및 pThr205의 비율은 경중 알츠하이머 환자에서의 데이터와 비교하여 상당히 증가하였으나, 중도 알츠하이머 환자에서의 t-타우 함량에 대한 pThr181의 비율은 연령 일치 대조군 비교하여 상당히 증가하였다(도 10).

도면

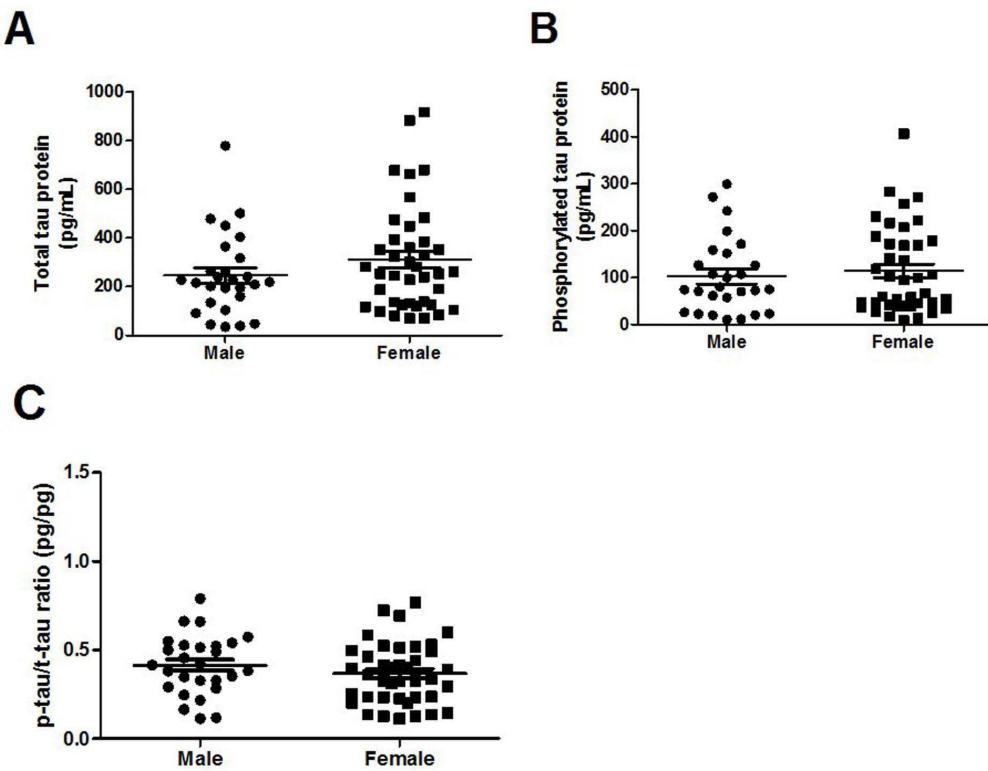
도면1



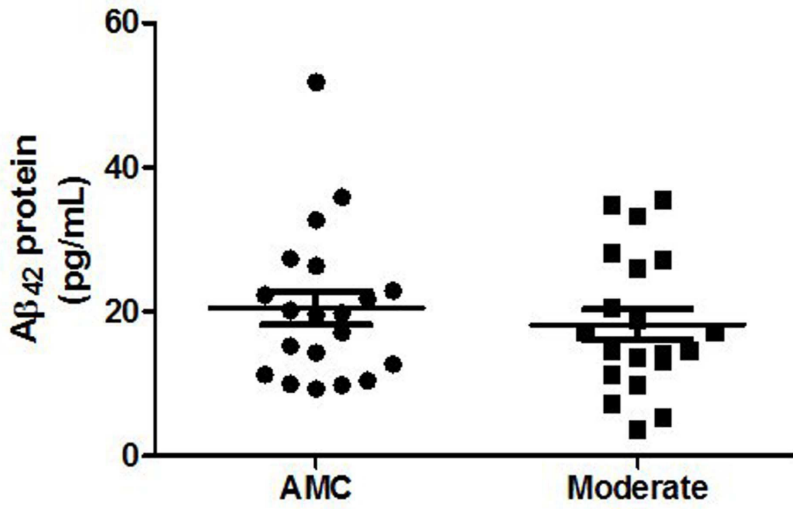
도면2



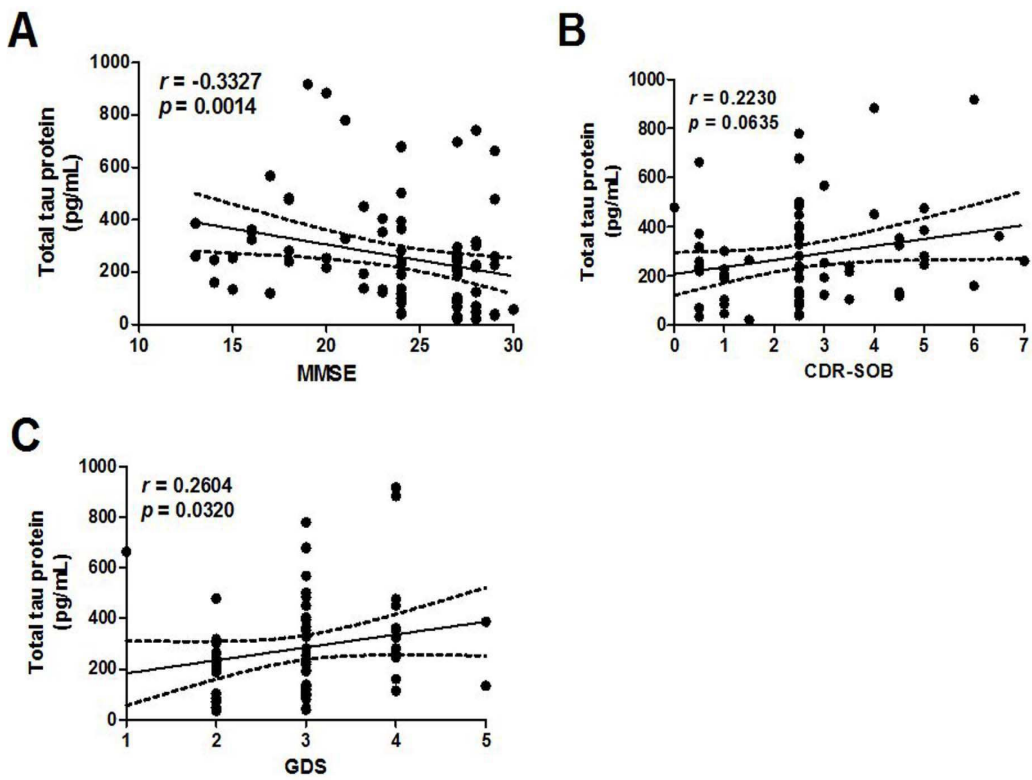
도면3



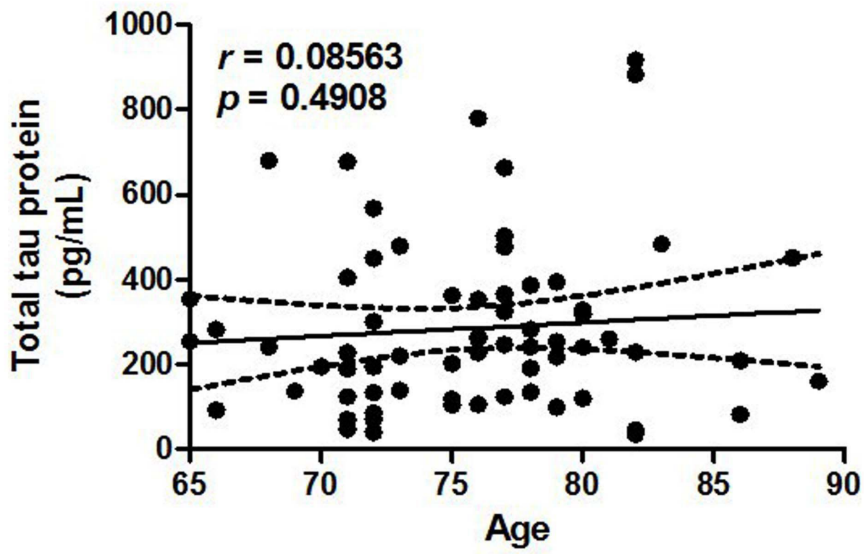
도면4



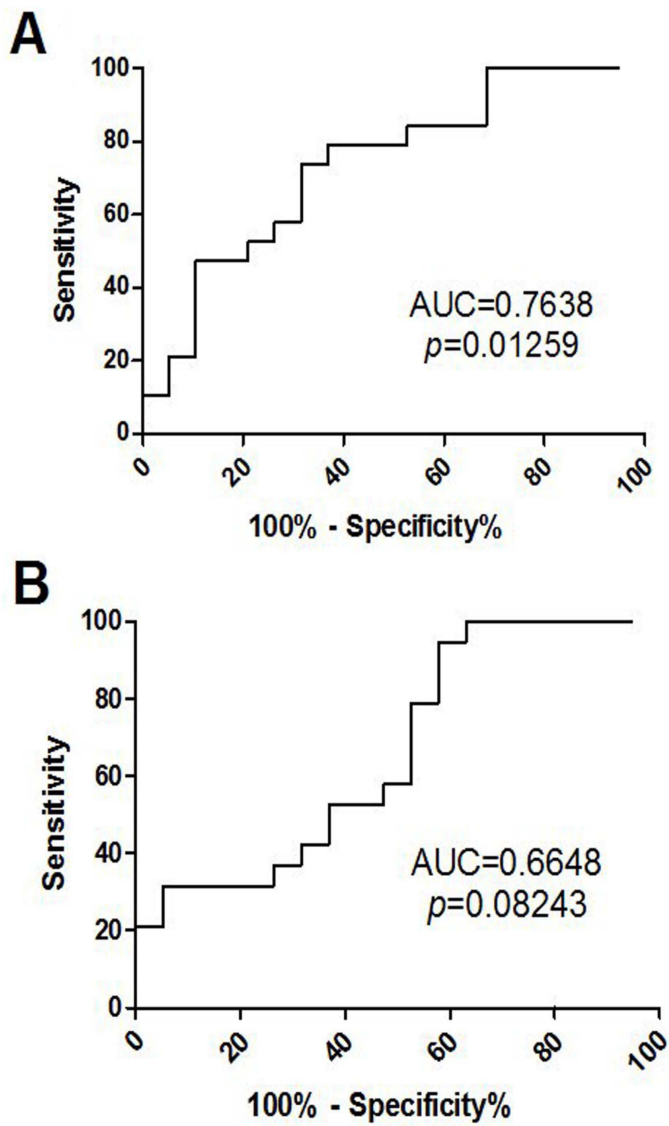
도면5



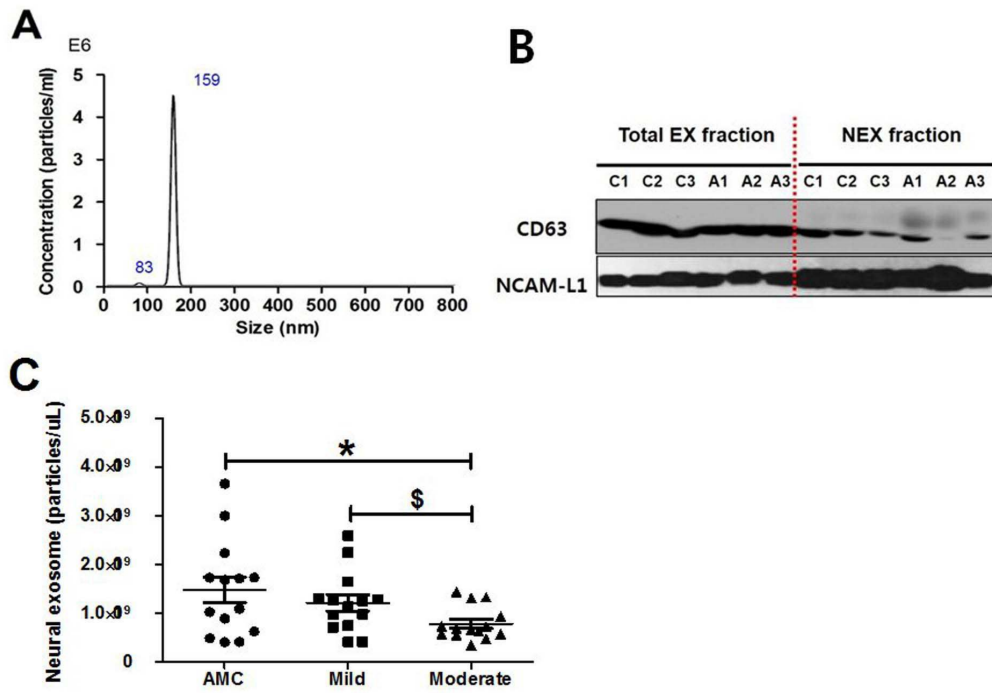
도면6



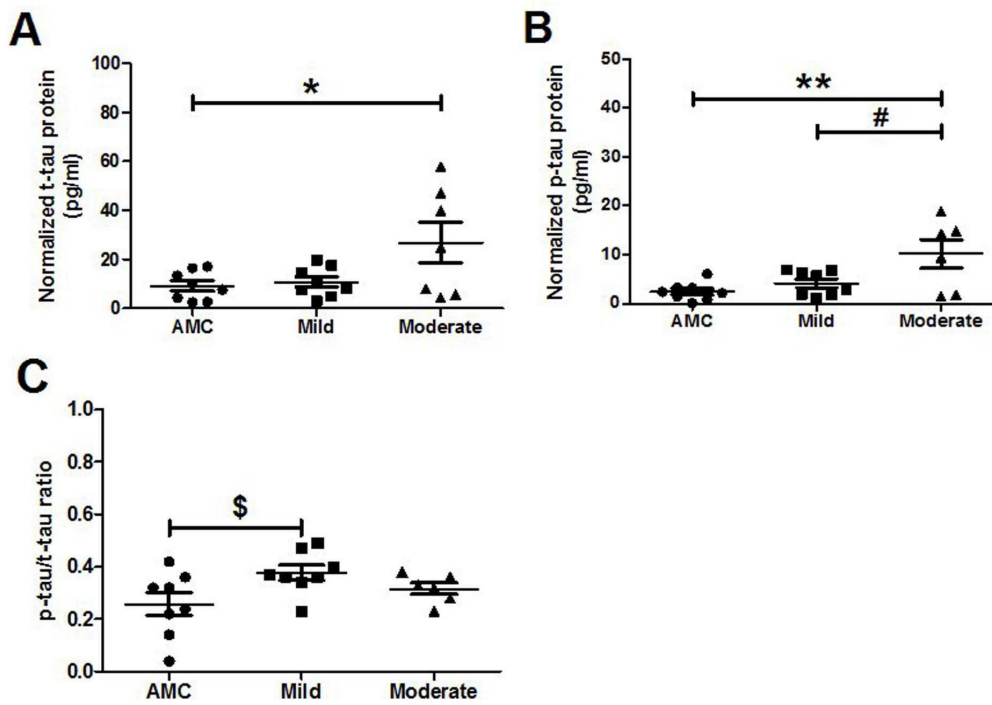
도면7



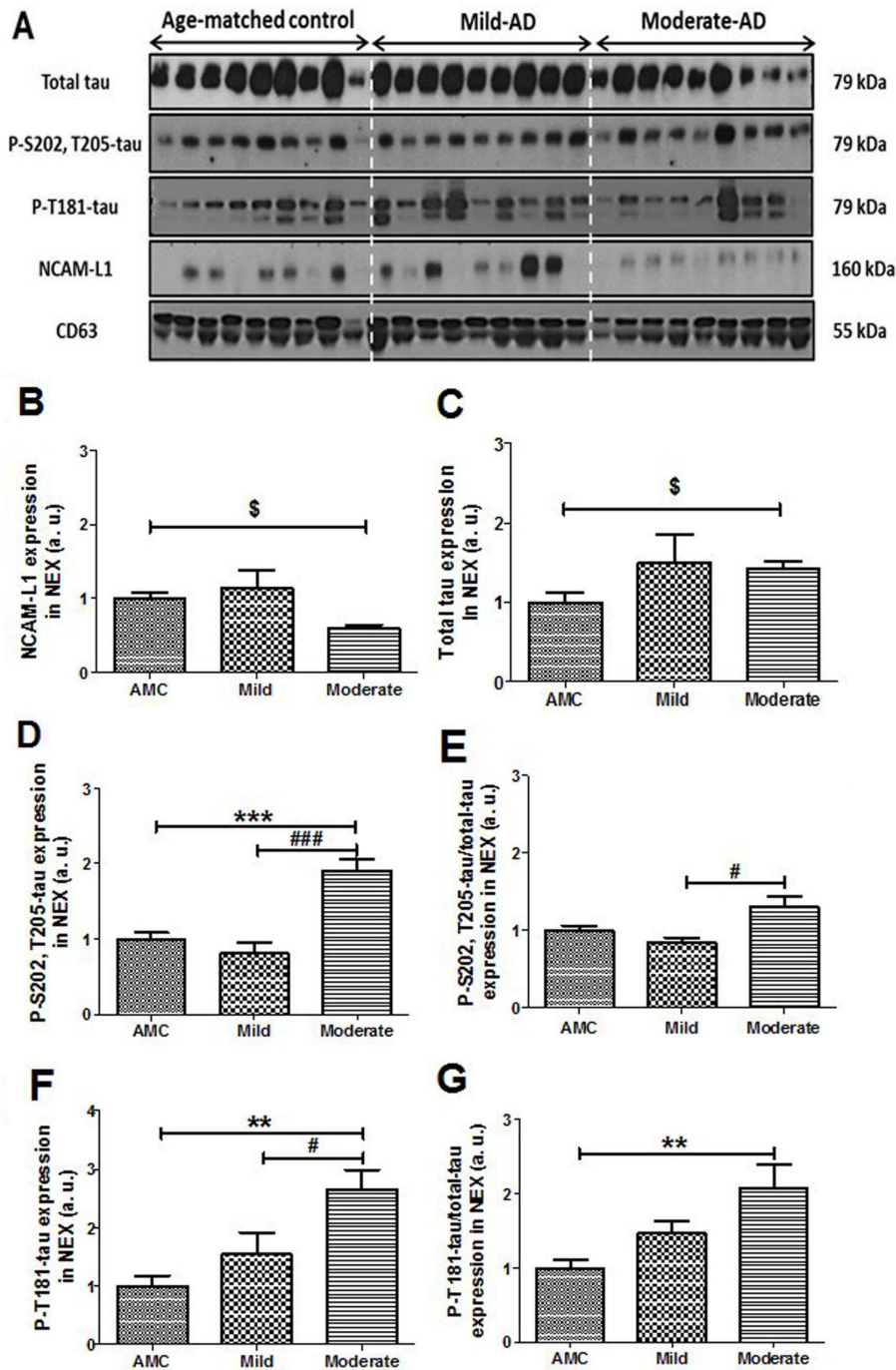
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> Gachon University of Industry-Academic cooperation Foundation
- <120> DIAGNOSTIC COMPOSITION OF ALZHEIMER'S DISEASE SEVERITY COMPRISING AGENTS MEASURING EXPRESSION LEVEL OF TAU PROTEIN AND DIAGNOSTICS METHOD OF ALZHEIMER'S DISEASE SEVERITY USING THE SAME
- <130> 2017P-05-030
- <160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala

35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val

50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp

65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro

85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg

100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly

115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser

130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro

145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys

165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met

180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu

195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 210 215 220
 Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
 225 230 235 240
 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 245 250 255
 Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 260 265 270
 Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 275 280 285
 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 290 295 300
 Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 305 310 315 320
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 325 330 335
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
 340 345 350
 Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
 355 360 365
 Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380