

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 5월 7일 (07.05.2020)

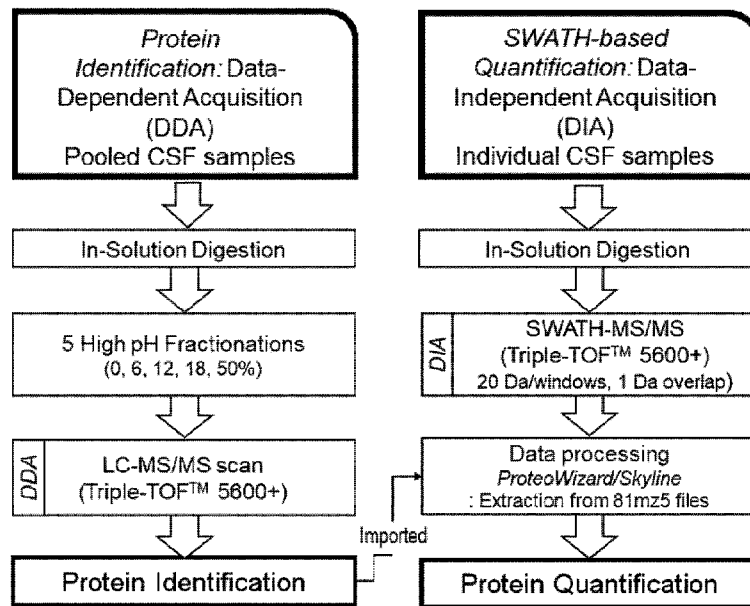


(10) 국제공개번호  
WO 2020/091222 A1

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6883* (2018.01)      *G01N 33/68* (2006.01)
- (72) 발명자: 박선아 (PARK, Sun Ah); 08001 서울시 양천구 오목로 299 2702호, Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011862
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 05836 서울시 송파구 범원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2019년 9월 11일 (11.09.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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.
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2018-0131309 2018년 10월 30일 (30.10.2018) KR  
10-2019-0028903 2019년 3월 13일 (13.03.2019) KR
- (71) 출원인: 아주대학교 산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: BIOMARKER PROTEINS FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE, AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 단백질 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for diagnosing Alzheimer's disease, comprising a preparation for measuring the level of mRNA(s) of one or more genes selected from the group consisting of neurotrimin (NTM), peptidyl glycine alpha amidating monooxygenase (PAM), receptor type tyrosine protein phosphatase N2 (PTPRN2), opioid-binding protein/cell adhesion molecule (OPCML), 14-3-3 protein ζ/δ (YWHAZ), chromogranin-A (CHGA) and secretogranin-1 (CHGB), or the level of protein(s) expressed therefrom; a kit for diagnosing Alzheimer's disease, comprising the composition; and a method for providing information for the diagnosis of Alzheimer's disease, comprising the steps of measuring the level of mRNA(s) of the gene(s), or protein(s) expressed therefrom, and comparing the measured level with the level measured in a sample isolated from a normal individual. The composition for diagnosing Alzheimer's disease, of the present invention, enables Alzheimer's disease to be diagnosed with high sensitivity and specificity by the measuring of the expression level of the mRNA(s) of the gene(s), or the expression level of protein(s) expressed



WO 2020/091222 A1

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

therefrom, so as to compare same with that of a normal control group.

**(57) 요약서:** 본 발명은 NTM(neurotrimin), PAM(peptidyl glycine alpha amidating monooxygenase), PTPRN2(receptor type tyrosine protein phosphatase N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질 ζ/δ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트; 및 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하고, 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 알츠하이머성 치매 진단용 조성물은 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현량을 측정하여, 정상 대조군과 비교함으로써, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능하다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 알츠하이머성 치매 진단용 바이오마커 단백질 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트; 및 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하고, 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 전 세계적으로 초고령화 현상으로 인한 치매 환자의 증가는 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 2014년 국회예산정책처에 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.
- [4] 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, 간이 정신상태검사(MMSE), 몬트리올 인지검사(MoCA), SNSB 등이 있다. 이는 설문지 형태의 진단 방법으로서, 비용이 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 종류의 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. 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.

[5]

### 발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 뇌척수액으로부터 유래한 7종의 유전자 또는 단백질(NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1))의 발현량이 정상 대조군과 비교하여 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적인 발현량 차이가 나타남을 확인하고, 상기 7종의 유전자 또는 단백질, 보다 구체적으로 3종의 유전자 또는 단백질(YWHAZ, CHGA 및 CHGB) 수준의 동시 비교를 통해 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측과 관련된 정보를 보다 정확히 획득할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[7]

### 과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서, NTM, PAM, PTPRN2, OPCML, YWHAZ, CHGA 및

CHGB로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[11]

### 발명의 효과

[12] 본 발명의 알츠하이머성 치매 진단용 조성물은 7종의 유전자(NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1))의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현량을 측정하여, 정상 대조군과 비교함으로써, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능하다.

[13]

### 도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 뇌척수액을 대상으로 9종의 단백질(NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, OPCML, YWHAZ, CHGA, CHGB 및 VGF)을 분석할 수 있는 고효율 단백질 분석 과정의 모식도이다.

[15] 도 2는 상기 회귀방정식 값(Equation, 빨강)을 통해, 개별적인 단백질 및 3종의 단백질(YWHAZ, CHGA 및 CHGB) 조합의 알츠하이머성 치매의 진단 유용성을 분석한 결과를 나타낸다. 3종의 단백질 조합(그래프에서 'combine')으로 구해지는 회귀방정식 값을 통해, 진단 유용성이 높아짐을 ROC 커브 분석에서 확인할 수 있다

[16] 도 3은 단백질 발현 농도와 알츠하이머병으로 인한 인지기능 장애를 평가할 수 있는 mini-mental state examination(MMSE) 수치와의 상관관계를 나타내는 그래프이다. 3종의 단백질(YWHAZ, CHGA 및 CHGB) 조합은 그래프에서 'combined'로 표시됨.

[17] 도 4는 단백질 발현 농도와 치매의 심한 정도를 임상적으로 평가하는 clinical dementia rating-sum of box(CDR-SOB) 수치와의 상관관계를 나타내는 그래프이다. 3종의 단백질(YWHAZ, CHGA 및 CHGB) 조합은 그래프에서 'combined'로 표시됨.

[18]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[19] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[20]

[21] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 체제를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물을 제공한다.

[22] 상기 조성물은 상기 7종의 유전자 중 1종의 유전자 또는 2종, 3종, 4종, 5종, 6종 또는 7종의 유전자 조합을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 YWHAZ, CHGA 및 CHGB의 유전자 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[23] 또한, 상기 3종의 유전자 조합에 NTM, PAM, LY6H(림프구 항원 6 패밀리 멤버 H), PTPRN2, OPCML 및 VGF(신경분비 단백질 VGF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 LY6H(림프구 항원 6 패밀리 멤버 H), VGF(신경분비단백질 VGF) 또는 OPCML 중 어느 하나 이상의 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[24]

[25] 본 발명의 조성물은 상기 유전자는 알츠하이머성 치매 환자에서 정상 개체와 비교하여 상기 유전자의 유의적인 발현 차이가 나타남을 이용하여 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측을 위한 유용한 정보를 획득할 수 있는 것이다. 이는 지금까지 알려진 바 없으며, 본 발명에 의해 최초로 밝혀진 것으로, 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측이 가능한 점에서 그 의의가 크다.

[26]

[27] 본 발명의 용어, “NTM” 유전자는, 뉴로트리민(Neurotrimin)을 코딩하는 유전자로써, 신경돌기의 생장, 신경 세포의 세포간 연결 기능 및 특이항체 메커니즘에 의한 접착과 밀접하게 연결되어 있다고 알려져 있다. 상기 뉴로트리민은 구체적으로, NTM 유전자에 의해 코딩되는 뉴로트리민 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 1로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 NTM 유전자의 mRNA는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[28]

본 발명의 용어, “PAM” 유전자는, 펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제(Peptidylglycine- $\alpha$ -amidating monooxygenase)를 코딩하는 유전자로써, 시냅스의 기능 증강, C-말단 아미드화를 통한 신경생물학적 기능 조절 및 생체 내에서 비활성 단백질에 활성을 부여하기 위해 카르복실기 말단을  $\alpha$ -아미드화시키는 효소로 알려져 있다. 상기 펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화

모노옥시게나제는 구체적으로, PAM 유전자에 의해 코딩되는 펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 3로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 PAM 유전자의 mRNA는 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[29] 본 발명의 용어, "PTPRN2" 유전자는, ICAAR(Islet cell autoantigen-related protein) 또는 포그린(Phogrin)으로도 알려져 있으며, 수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2(receptor type tyrosine protein phosphatase N2) 효소를 코딩하는 유전자이다. 상기 유전자는 소포체를 통한 신경분비 물질 배출과 단백질의 인산화 조절 및 신경세포 골격 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 ICAAR은 구체적으로, PTPRN2 유전자에 의해 코딩되는 ICAAR 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 5로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 PTPRN2 유전자의 mRNA는 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[30] 본 발명의 용어, "LY6H" 유전자는, 신규한 뇌특이적 단백질인 림프구 항원 6 패밀리 멤버 H(Lymphocyte Antigen 6 Family Member H, LY6H)를 코딩하는 420개의 코돈 오픈 리딩 프레임(open reading frame; ORF)을 포함하는 cDNA이며, 전체 길이가 854개의 염기로 이루어져 있고 인지 기능에 중요한 역할을 하는 아세틸콜린 수용체의 발현 및 기능을 조절한다고 알려져 있다. 상기 LY6H 단백질은 구체적으로, LY6H 유전자에 의해 코딩되는 LY6H 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 7로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 LY6H 유전자의 mRNA는 서열번호 8의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[31] 본 발명의 용어, "OPCML" 유전자는, 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(Opioid-binding protein/cell adhesion molecule)를 코딩하는 유전자로서, 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자는 종의 진화 동안 매우 잘 보존되므로, 포유류 시스템에서 근본적인 역할을 할 것으로 알려져 있다. 상기 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자는 구체적으로, OPCML 유전자에 의해 코딩되는 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 9로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 OPCML 유전자의 mRNA는 서열번호 10의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[32] 본 발명의 용어, "YWHAZ(1433Z)" 유전자는 모든 진핵 세포에서 발현되는 보존 조절 분자(conserved regulatory molecules)에 속하는 단백질인 14-3-3 단백질 제타/델타(14-3-3 proteins  $\zeta/\delta$ )를 코딩하는 유전자로서, 14-3-3 단백질은 키나아제, 포스파타아제, 막관통 수용체를 포함하여, 다양한 신호 단백질과

결합할 수 있으며, 200개 이상의 신호 단백질이 14-3-3 리간드로 알려져 있다. 또한, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease) 환자의 뇌 척수액에서 14-3-3 단백질의 양이 증가하는 것으로 발견된 바 있다. 상기 14-3-3 단백질은 구체적으로, YWHAZ 유전자에 의해 코딩되는 14-3-3 단백질 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 11로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 YWHAZ 유전자의 mRNA는 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.

- [33] 본 발명의 용어, "CHGA" 유전자는 신경내분비성 단백질의 그라닌(*granin*) 군에 속하는 단백질인, 부갑상샘 분비 단백질 1(*parathyroid secretory protein 1*)로도 불리는 크로모그라닌 A(*Chromogranin A*)를 코딩하는 유전자이다. 크로모그라닌 A는 이자의 섬형 베타 세포 분비 과립(*islet beta cell secretory granules*)과 같은 뉴런 및 내분비 세포의 분비 소포에 위치해 있다. 또한, 크로모그라닌 A는 체장암 및 전립선 암의 지표로 사용될 수 있을 것으로 보고된 바 있다. 상기 크로모그라닌 A는 구체적으로, CHGA 유전자에 의해 코딩되는 크로모그라닌 A 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 13으로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 CHGA 유전자의 mRNA는 서열번호 14의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [34] 본 발명의 용어, "CHGB" 유전자는 신경내분비성 단백질의 그라닌 군에 속하는 단백질인, 시크리토그라닌 I(*Secretogranin I*)로도 불리는 크로모그라닌 B(*Chromogranin B*)를 코딩하는 유전자이다. 크로모그라닌 B는 신경내분비계 종양의 예후 바이오마커로 이용될 수 있을 것으로 보고된 바 있다. 상기 크로모그라닌 B는 구체적으로, CHGB 유전자에 의해 코딩되는 크로모그라닌 B 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 15로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 CHGB 유전자의 mRNA는 서열번호 16의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [35] 본 발명의 용어, "VGF" 유전자는 신경분비 단백질 VGF(*Neurosecretory protein VGF*)를 코딩하는 유전자로서, 신경분비 단백질 VGF는 에너지 항상성, 대사 및 시냅스 가소성(*synaptic plasticity*)을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 신경분비 단백질 VGF는 구체적으로, VGF 유전자에 의해 코딩되는 신경분비 단백질 VGF 활성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단백질일 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 17로 이루어진 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한, 상기 VGF 유전자의 mRNA는 서열번호 18의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [36]
- [37] 본 발명에 따른 상기 9종의 단백질들 또는 유전자들의 mRNA는 각 서열번호 1,



3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 및 17로 구성된 아미노산 서열, 각 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 및 18로 구성된 염기서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열 또는 염기서열로서 실질적으로 상기 각 단백질 또는 유전자와 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질 또는 유전자 서열이라면 제한없이 포함한다. 또한 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열 또는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열 또는 염기서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[38] 본 발명에서 용어, "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이어티 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 하나의 모이어티로부터 다른 하나의 모이어티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상동성은 서열정보를 정렬하고 용이하게 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리뉴클레오티드 분자 또는 두 개의 폴리펩타이드 분자 간의 서열 정보를 직접 정렬하여 결정될 수 있다. 상기 컴퓨터 프로그램은 BLAST(NCBI), CLC Main Workbench(CLC bio), MegAlign™(DNASTAR Inc) 동일 수 있으나, 상동성을 결정할 수 있는 프로그램이라면 제한 없이 이용할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드 간 상동성은 상동 영역 간의 안정된 이중가닥을 이루는 조건하에서 폴리뉴클레오티드를 혼성화한 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제로 분해시켜 분해된 단편의 크기를 결정함으로써 결정할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[39]

[40] 본 발명의 일 실시예에서는, 정상 개체와 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적으로 발현량 차이가 나타나는 9종의 단백질(NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, VGF, YWHAZ, CHGA, CHGB 및 OPCML)을 동정하였고, 이들 중에서도 3종의 단백질(YWHAZ, CHGA 및 CHGB)을 동시 측정하는 경우 높은 민감도 및 특이도로 알츠하이머성 치매의 진단이 가능함을 확인하였다. 이를 통해, 상기 3종 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하여, 알츠하이머성 치매의 진단에 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다(도 2).

[41]

[42] 본 발명의 용어, "mRNA의 수준을 측정하는 제제"는 시료에 포함된 본 발명의 9종의 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 상기 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 구체적으로 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

- [43] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [44] 구체적으로, 상기 9종의 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 방법에 사용되는 각각의 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.
- [45]

[46] [표1]

NTM (neurotrimin)UniProt ID: Q9P121Gene ID: 50863	Forward:CCCTACGTCTCAATTCATCATAAG(서열번호 19)Backward:TACGATACTGTTGATTACTAAAGC(서열번호 20)
PAM (Peptidylglycine- $\alpha$ -amidating monooxygenase)UniProt ID: P19021Gene ID: 5066	Forward: CCCTATCCCAGCCCTATC(서열번호 21)Backward: GTGATGCCCAGGCTGAGATC(서열번호 22)
PTPRN2 (receptor type tyrosine protein phosphatase N2)UniProt ID: Q92932Gene ID: 5799	Forward: CTGGTCTGCCCCTCTCCT(서열번호 23)Backward: TTCAGGAGATTTTCATCCTTCC(서열번호 24)
LY6H (lymphocyte antigen 6H)UniProt ID: O94772Gene ID: 4062	Forward:CTGCTGGCCGTCCTGCTGTGC(서열번호 25)Backward:CCAACCTACTGCTGCTGGGATCC(서열번호 26)
OPCML	F: CCTAGGTCCTCTGAGCAACG(서열번호 27)R: GGTCAAGGTAGCAGGAGCAG(서열번호 28)
YWHAZ	F: GCCTGCATGAAGTCTGTAAGT(서열번호 29)R: TGACCTACGGGCTCCTACAAC(서열번호 30)
CHGA	F: CCTGTGAACAGCCCTATG(서열번호 31)R: GGAAAGTGTGTCGGAGAT(서열번호 32)
CHGB	F: CAACTGGACCAGCTCCTTAC(서열번호 33)R: GCACAGTCATTGTCATAAGCATGT(서열번호 34)
VGF	F: CCTCTTGGTCATGAAAGC(서열번호 35)R: GGCTCTTTATGCTCAGAG(서열번호 36)

[47]

[48] 한편, 상기 "프로브"는 상기 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 될 수 있고, 상기 각 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 한, 상기 프로브의 뉴클레오티드 서열은 제한되지 않는다.

[49]

[50] 본 발명의 용어, "단백질의 수준을 측정하는 제제"는 시료에 포함된 본 발명의 9종의 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법에 사용되는

제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 제제는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [51] 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로블린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [52] 상기 "앵타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.
- [53] 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상일 수 있으나 이들에 한정되지 아니한다. 본 발명의 앵타머는 상기 9종의 유전자에 의해 코딩되는 단백질에 대하여 사용될 수 있다. 상기 단백질에 결합 활성을 갖는 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [54]
- [55] 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 약화된다고 알려져 있다.

- [56] 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 또는 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위해 개체의 상태를 모니터링 하는 것을 포함한다. 본 발명의 목적상, 진단은 알츠하이머성 치매의 발병 여부 또는 알츠하이머성 치매의 발병 단계를 확인하는 것이다.
- [57]
- [58] 본 발명은 다른 양태로서 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머성 치매 진단용 키트를 제공한다.
- [59] 상기 용어 "알츠하이머성 치매", "진단" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [60] 본 발명의 키트는 알츠하이머성 치매를 진단하기 위하여, 상기 NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, OPCML, YWHAZ, CHGA, CHGB 및 VGF 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [62] 구체적으로, 본 발명의 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [63] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 분석용 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [64] 아울러, 본 발명의 키트는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 수준을 측정하기 위한 단백질 칩 분석용 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기재는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나

퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.

[65]

[66] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 (a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서, NTM, PAM, PTPRN2, OPCML, YWHAZ, CHGA 및 CHGB로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[67] 상기 용어 "알츠하이머성 치매", "진단" 등에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[68] 본 발명의 용어, "개체"는 알츠하이머성 치매를 진단하거나 알츠하이머성 치매의 예후를 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 제한 없이 포함될 수 있다.

[69] 본 발명의 용어, "시료"란 이에 제한되는 것은 아니나, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장 외에도, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하며, 구체적으로는, 뇌척수액을 의미할 수 있다.

[70] 본 발명의 용어, "정상 개체"란 알츠하이머성 치매로 진단되지 않은 개체를 의미하며, 정상 개체로부터 분리된 시료와 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하고자 하는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 발현 수준을 측정하고, 비교함으로써, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체의 알츠하이머성 치매 발병 여부 또는 알츠하이머성 치매의 예후를 정확하게 예측할 수 있다.

[71]

[72] 본 발명에 있어서, 용어, "mRNA 발현수준 측정"이란 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA칩 분석법(DNA chip technology assay) 등이 있다.

[73] 본 발명에 있어서, 용어, "단백질 발현수준 측정"이란 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후를 예측하기 위하여 생물학적 시료에서의 본 발명의 9종의

유전자에 의해 코딩된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[74]

[75] 본 발명의 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정한 결과, 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정되는 수준 보다 유의적으로 높거나 낮은 경우, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높거나, 그 예후가 나쁘다고 판정될 수 있다. 구체적으로, 알츠하이머성 치매 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 상기 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준이 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하여, i) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 YWHAZ 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 높은 경우, 또는 ii) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, VGF, CHGA, CHGB 또는 OPCML 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 낮은 경우, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높다고 판정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[76]

### 발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[78]

[79] <실시예 1> 실험 재료의 준비 및 분석 방법

[80] 실시예 1-1: 대상 검체 및 이의 특징

[81] 알츠하이머성 치매 환자(AD) 및 정상인(Control)으로부터 수득된 뇌척수액의

정확한 단백질 분석을 수행하기 위해 각 조건에 맞게 채취하였다(Park SA 등, J Clin Neurol 2015). 이들 검체는 단백질 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  초저온 냉동고에 보관하였다. 이후, 드라이아이스가 포함된 용기에 넣어 단백질 분석 전문 업체로 이동시키고, 해동 후 분석에 활용하였다. 검체 제공자의 임상적 특징은 하기 표 2에 나타내었다.

[82]

[83] [표2]

	정상 대조군(n = 39)	AD(n = 42)	p-값	
성별 (남:여)	10 : 29	14 : 28	0.476	
샘플링 당시 나이	$58.9 \pm 6.3$	$60.3 \pm 5.7$	0.309	
Education (년)	$10.2 \pm 3.2$	$10.2 \pm 4.0$	0.962	
유병기간(년)	-	$2.0 \pm 1.2$	-	
MMSE	$28.3 \pm 1.6$	$18.9 \pm 6.4$	< 0.001	
CDR	$0 \pm 0$	$1.1 \pm 0.8$	< 0.001	
CDR-SOB	$0 \pm 0.1$	$5.5 \pm 5.3$	< 0.001	
APOE $\epsilon$ 4 carriers	12.8%	45.2%	0.001	
APOE $\epsilon$ 4 carriers	One allele	5	13	-
	Two allele	0	6	-
CSF A $\beta$ 42 (pg/mL)	$704.2 \pm 141.4$	$348.4 \pm 88.5$	< 0.001	
CSF tTau (pg/mL)	$207.7 \pm 55.3$	$637.8 \pm 301.8$	< 0.001	
CSF pTau181 (pg/mL)	$42.2 \pm 12.6$	$78.3 \pm 28.1$	< 0.001	

[84] 값은 평균  $\pm$  표준편차로 표시함, p-값은 변수의 특성에 따라 독립표본 t-검증 또는 카이-제곱 검정(Chi-squared test)을 통해 결정됨.

[85] AD, 알츠하이머성 치매; APOE, 아포지단백 E; CDR-SOB, 임상 치매 등급 평가 합계(clinical dementia rating scale sum of box); CSF, 뇌척수액; MMSE, 간이 정신상태 검사(mini-mental state examination).

[86]

[87] 알츠하이머성 치매의 진단은 임상적 증상뿐만 아니라, 뇌척수액 내의 베타-아밀로이드 단백질 1-42, 총 타우 단백질, 인산화 타우 단백질의 농도를 측정하여, 알츠하이머성 치매로 진단되는 경우를 알츠하이머성 치매 환자로 분류하여, 매우 정확한 진단 방법에 근거하였다. 즉, 상기와 같은 알츠하이머성 치매 진단에 이용된 방법은 2018년도 NIA-AA 연구 구조(research framework)에 따른 알츠하이머병 진단의 AT(N) 바이오마커 모두를 충족하는 조건이다(Jack Jr



CR, 등 Alzheimer's & Dementia 2018).

[88]

[89] 실시예 1-2: 단백질 분석 방법

[90] 정상인 및 알츠하이머성 치매 환자군에서 뇌척수액을 수집하여, 이들을 비-편향(non-biased) 비-표지(label-free) 단백질 분석을 시행하였다. 단백질 분석 방법 중에서도, 정량의 정확도 및 민감도가 높고, '비표적 단백질 분석'이 가능한 SWATH(Sequential Window Acquisition of all THEoretical fragment-ion spectra)-MS(mass spectroscopy, 질량 분광학) 방법을 이용하였다. SWATH-MS 단백질 분석의 방법의 장점은 선행문헌에 의해 기술된 바 있다(Gillet LC et al, Mol Cell Proteomics 2012).

[91] 도 1에서 보듯, 분석 준비 단계는 2개의 뇌척수액(CSF) 검액(pooled sample) 100  $\mu$ l 을 이용하였다. 단백질을 변성시키고, 전처리 과정을 거치게 하면서 펩티드로 분해시켰다. 펩티드로 잘려진 시료 전체를 각 분획별로 동정하고, 정량을 위한 스펙트럼 라이브러리 확보하였다. 1% FDR조건으로 필터링 후, 총 301개의 동정 단백질을 확보하였다(시퀀스 특이적 펩티드는 총 2,691개, 시퀀스 특이적 스펙트럼은 총 5,366개 확인). 검출되는 모든 단백질의 종류에 대하여 SWATH-MS 정량 분석을 할 수 있는 라이브러리를 확보하였다.

[92] 검체의 본격적인 분석단계는 81개의 뇌척수액(CSF) 검체에 대해 각각 100  $\mu$ l을 얻어, 상기 준비단계와 동일한 처리 단계를 거쳐 Triple-TOFTM 5600+(AB Sciex, Concord, Canada)를 이용하여 단백질 분석을 실시하였다. 기계에 연결된 Eksigent NanoLC-2D 및 nanoFlex cHiPLC 시스템(0.075 mm x 75  $\mu$ m column)을 이용하여 단백질을 찾아 정량하였다. SWATH-MS 분석은 Triple-Tof 5600+ 및 20 Da/매스 윈도우(mass windows)를 이용하여 루프 프로덕트 이온 모드(looped product ion mode)로 시행하였다. 각 SWATH 윈도우는 400-1000 Da 범위에서 1 Da 오버랩을 가지면서 반복 측정하였다(예를 들어, 실험 1은 400~420 Da, 실험 2는 419~440 Da, 이후 실험 31는 979~1000 Da 범위까지 특정함). 얻어진 값에 대해서 ProteinPilotTM을 이용하여 단백질들의 스펙트럼을 찾고, ProteoWizard 및 Skyline 소프트웨어를 이용하여 해당 단백질 및 이의 정량 값을 얻었다. 마지막으로, 개별 라이브러리 스펙트럼과 SWATH 스펙트럼을 확인하여 최종적으로 단백질의 종류와 정량값을 검증하였다.

[93]

[94] <실시예 2> 알츠하이머성 치매 진단의 바이오 마커로서, 9종의 단백질(NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, VGF, YWHAZ, CHGA, CHGB, OPCML) 선별

[95] 42명의 알츠하이머성 치매 환자와 39명의 동일 연령대의 정상대조군의 뇌척수액을 SWATH-MS 방법을 이용하여 모든 시료에서 수행하였다. 미리 2개의 검액(약 6개의 뇌척수액 시료를 합쳐서 1개의 검액을 제조함)을 이용한 예비 실험을 통해서 SWATH-MS 방법으로, 사람의 뇌척수액에서 정확히 찾아낼 수 있는 단백질들의 종류 및 데이터 처리방법을 미리 파악하였다. 그 후, 본

실험으로 81개의 모든 시료에 대해 개별적으로 SWATH-MS 단백질 분석 방법을 시행하여, 274종류의 단백질이 모든 검체에서 공통적으로 검출됨을 확인하고, 이들의 발현량을 얻었다.

- [96] SWATH-MS 분석 및 데이터 처리 과정은 모든 검체에서 동일한 조건으로 시행하였다. 274개 단백질의 발현량은 단백질 분석 스펙트럼에서 해당 단백질 피크의 면적값(AUC: area under the curve)으로 얻을 수 있는데, 이 값은 어떤 농도의 특정 단위로 표현할 수 있는 개념은 아니지만, 동시에 분석된 단백질들의 농도를 상대적 비교가 정확히 가능하므로, 통상적으로 사용되는 단백질 발현량의 검출 방법이다.
- [97] 즉, 상기 실시예 1에 기재된 SWATH-MS 방법으로 검출된 274개의 단백질들의 종류와 이들의 알츠하이머성 치매 환자 및 정상 대조군에서의 비교한 통계 처리 결과를 하기 표 3 내지 10에 나타내었다(p-값은 독립 표본 t 검정 상에서 Benjamini-Hochberg false discovery rate(FDR)의 임계값 0.2의 미만 값을 표시함, 약어에 대한 설명: FC (log2), 대조군 vs 알츠하이머성 치매 환자의 AUC의 log2 배수 변화).
- [98] SWATH-MS 분석의 스펙트럼상의 각 단백질에 해당되는 피크를 형성하는 면적값(AUC)들을 알츠하이머성 치매 환자 42명과 정상 대조군 39명 간의 비교를 수행한 결과, 하기 표 3 내지 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 274개의 단백질들 중에서 25개의 단백질들이 독립 표본 t-검정을 통해서 p-값이 0.05 미만으로 측정되어, 유의적임을 확인하였다.
- [99]

[100] [圖.3]

UniProt ID	단백질	p-값	FC (log2)		Rank in significance	FDR
			평균	표준편차		
O15240	Neurosecretory protein VGF	0.0001	-0.43	0.44	1	< 0.05
P31946	14-3-3 protein beta/alpha	0.0008	0.31	0.75	2	< 0.05
P10645	Chromogranin-A	0.0018	-0.55	0.65	3	< 0.05
P05060	Secretogranin-1	0.0021	-0.28	0.47	4	< 0.05
Q14982	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	0.0027	-0.51	0.81	5	< 0.05
		0.0043	-0.39	0.64	6	> 0.05
		0.0043	-1.87	1.35	7	> 0.05
		0.0074	-0.27	0.44	8	> 0.05
		0.0107	0.15	0.37	9	> 0.05
		0.0116	-0.39	0.75	10	> 0.05
		0.0139	-0.24	0.41	11	> 0.05
		0.0162	-0.21	0.42	12	> 0.05
		0.0185	-0.33	0.62	13	> 0.05
		0.0196	-0.26	0.51	14	> 0.05
		0.0235	-0.35	0.63	15	> 0.05
		0.0248	0.13	1	16	> 0.05
		0.0252	-0.38	0.64	17	> 0.05
		0.0252	-0.24	0.49	18	> 0.05
		0.0265	-0.23	0.47	19	> 0.05
		0.0267	-0.2	0.44	20	> 0.05
		0.0267	-0.26	0.51	21	> 0.05
		0.0326	-0.26	0.62	22	> 0.05
		0.0326	-0.25	0.45	23	> 0.05
		0.0417	-0.23	0.41	24	> 0.05
		0.0431	0.13	0.48	25	> 0.05
		0.0501	0.08	0.6	26	> 0.05
		0.0526	0.12	0.61	27	> 0.05
		0.0541	-0.27	0.71	28	> 0.05
		0.0593	-0.24	0.43	29	> 0.05
		0.06	0.1	0.51	30	> 0.05
		0.0662	-0.29	0.61	31	> 0.05
		0.0711	0.12	0.71	32	> 0.05



[101] [圖4]

		0.0731	-0.16	0.34	33	> 0.05
		0.0751	-0.4	0.52	34	> 0.05
		0.078	0.07	0.7	35	> 0.05
		0.08	-0.32	0.7	36	> 0.05
		0.0944	-0.33	0.69	37	> 0.05
		0.0945	0.09	0.51	38	> 0.05
		0.1018	0.08	0.48	39	> 0.05
		0.102	-0.21	0.44	40	> 0.05
		0.1034	-0.25	0.52	41	> 0.05
		0.1039	-0.18	0.44	42	> 0.05
		0.1042	-0.16	1.4	43	> 0.05
		0.1064	-0.23	0.56	44	> 0.05
		0.1073	0.1	0.48	45	> 0.05
		0.1079	-0.22	0.59	46	> 0.05
		0.1122	0.1	0.6	47	> 0.05
		0.1178	-0.49	0.9	48	> 0.05
		0.1196	-0.29	0.65	49	> 0.05
		0.1218	-0.2	0.46	50	> 0.05
		0.1223	-0.16	0.42	51	> 0.05
		0.1282	0.05	0.59	52	> 0.05
		0.1283	-0.17	0.44	53	> 0.05
		0.1298	0.06	0.65	54	> 0.05
		0.1307	-0.18	0.43	55	> 0.05
		0.1332	0.07	0.58	56	> 0.05
		0.1421	-0.52	0.97	57	> 0.05
		0.1425	-0.58	1.06	58	> 0.05
		0.1428	-0.25	0.62	59	> 0.05
		0.1492	0.06	0.39	60	> 0.05
		0.1492	0.05	0.47	61	> 0.05
		0.1524	0.06	0.38	62	> 0.05
		0.1526	-0.29	0.63	63	> 0.05
		0.153	0.05	0.66	64	> 0.05
		0.1548	-0.36	0.79	65	> 0.05
		0.1553	-0.13	1.24	66	> 0.05
		0.1618	-0.43	0.87	67	> 0.05
		0.1702	0.06	0.47	68	> 0.05
		0.1736	0.06	0.54	69	> 0.05
		0.174	-0.23	0.64	70	> 0.05





[102] [圖5]

		0.174	-0.02	0.87	71	> 0.05
		0.1777	0.05	0.63	72	> 0.05
		0.1784	0.05	0.54	73	> 0.05
		0.1804	-0.17	0.43	74	> 0.05
		0.1811	0.05	0.55	75	> 0.05
		0.1861	-0.33	0.75	76	> 0.05
		0.1877	-0.18	0.47	77	> 0.05
		0.1895	-0.23	0.55	78	> 0.05
		0.1902	-0.07	1	79	> 0.05
		0.1956	0.04	0.54	80	> 0.05
		0.1982	-0.5	0.85	81	> 0.05
		0.2022	0.05	0.43	82	> 0.05
		0.2025	-0.51	0.88	83	> 0.05
		0.2032	0.04	0.49	84	> 0.05
		0.206	0.04	0.53	85	> 0.05
		0.213	-0.25	0.75	86	> 0.05
		0.2135	0.05	0.38	87	> 0.05
		0.2149	0.02	0.64	88	> 0.05
		0.2158	-0.34	0.95	89	> 0.05
		0.2202	-0.22	0.56	90	> 0.05
		0.2205	-0.22	0.59	91	> 0.05
		0.2253	-0.01	0.79	92	> 0.05
		0.2263	0.05	0.42	93	> 0.05
		0.2283	0.03	0.5	94	> 0.05
		0.2314	-0.26	0.82	95	> 0.05
		0.2327	0.01	0.61	96	> 0.05
		0.233	0.03	0.54	97	> 0.05
		0.2418	-0.4	0.82	98	> 0.05
		0.2431	-0.16	0.41	99	> 0.05
		0.2477	0.02	0.55	100	> 0.05
		0.2495	0.03	0.49	101	> 0.05
		0.2503	-0.13	0.4	102	> 0.05
		0.2519	-0.06	0.96	103	> 0.05
		0.252	0.04	0.43	104	> 0.05
		0.2557	0.04	0.45	105	> 0.05
		0.2577	0.03	0.53	106	> 0.05
		0.2589	0.01	0.67	107	> 0.05
		0.2602	0	0.71	108	> 0.05



[103] [圖6]

		0.2643	-0.14	0.43	109	> 0.05
		0.2658	0.03	0.58	110	> 0.05
		0.2699	-0.19	0.58	111	> 0.05
		0.2701	0	0.63	112	> 0.05
		0.2719	0.05	0.52	113	> 0.05
		0.2747	0.04	0.32	114	> 0.05
		0.2774	-0.19	0.56	115	> 0.05
		0.2856	0	0.64	116	> 0.05
		0.2878	-0.16	0.51	117	> 0.05
		0.2919	-0.2	0.56	118	> 0.05
		0.2921	-0.26	0.83	119	> 0.05
		0.2935	-0.15	0.42	120	> 0.05
		0.2977	-0.15	0.46	121	> 0.05
		0.2994	-0.09	0.96	122	> 0.05
		0.2995	-0.22	0.6	123	> 0.05
		0.2999	0.02	0.53	124	> 0.05
		0.3004	0	0.59	125	> 0.05
		0.3008	-0.06	0.88	126	> 0.05
		0.314	0.02	0.49	127	> 0.05
		0.3166	0.02	0.32	128	> 0.05
		0.3173	0.01	0.51	129	> 0.05
		0.3178	-0.07	0.87	130	> 0.05
		0.3207	-0.16	0.56	131	> 0.05
		0.3316	-0.3	0.76	132	> 0.05
		0.3347	-0.03	0.77	133	> 0.05
		0.3363	-0.07	0.84	134	> 0.05
		0.3367	0.01	0.58	135	> 0.05
		0.3368	0	0.58	136	> 0.05
		0.3409	-0.07	0.87	137	> 0.05
		0.3454	-0.16	0.51	138	> 0.05
		0.3482	-0.12	0.41	139	> 0.05
		0.3497	-0.16	0.54	140	> 0.05
		0.3518	-0.06	0.86	141	> 0.05
		0.3523	-0.08	0.31	142	> 0.05
		0.3581	-0.02	0.64	143	> 0.05
		0.3606	-0.09	0.34	144	> 0.05
		0.3739	-0.01	0.6	145	> 0.05
		0.3784	-0.06	0.76	146	> 0.05



[104] [표7]

		0.3828	-0.2	0.64	147	> 0.05
		0.3861	0.02	0.36	148	> 0.05
		0.392	-0.19	0.62	149	> 0.05
		0.3968	-0.01	0.57	150	> 0.05
		0.4016	0.01	0.47	151	> 0.05
		0.4031	0.01	0.47	152	> 0.05
		0.404	-0.03	0.63	153	> 0.05
		0.4193	0	0.54	154	> 0.05
		0.4195	-0.01	0.56	155	> 0.05
		0.4198	-0.04	0.67	156	> 0.05
		0.42	-0.4	0.85	157	> 0.05
		0.423	-0.51	1.06	158	> 0.05
		0.4371	-0.18	0.56	159	> 0.05
		0.4377	-0.13	0.49	160	> 0.05
		0.4415	-0.42	0.9	161	> 0.05
		0.4442	-0.45	0.98	162	> 0.05
		0.4469	-0.03	0.62	163	> 0.05
		0.4478	-0.06	0.71	164	> 0.05
		0.4492	-0.1	0.39	165	> 0.05
		0.4496	-0.06	0.72	166	> 0.05
		0.4499	-0.11	0.41	167	> 0.05
		0.4522	-0.02	0.65	168	> 0.05
		0.4603	-0.29	0.82	169	> 0.05
		0.4662	-0.05	0.66	170	> 0.05
		0.4771	-0.18	1	171	> 0.05
		0.4785	-0.13	0.48	172	> 0.05
		0.4786	0	0.44	173	> 0.05
		0.4869	0	0.39	174	> 0.05
		0.4905	-0.31	0.97	175	> 0.05
		0.4921	-0.39	0.97	176	> 0.05
		0.4938	0	0.42	177	> 0.05
		0.4947	-0.03	0.61	178	> 0.05
		0.4961	-0.03	0.61	179	> 0.05
		0.5002	-0.1	0.4	180	> 0.05
		0.5009	-0.17	0.53	181	> 0.05
		0.505	-0.04	0.68	182	> 0.05
		0.5126	-0.02	0.53	183	> 0.05
		0.5145	-0.23	0.73	184	> 0.05





[105] [圖8]

		0.5179	-0.24	0.73	185	> 0.05
		0.5199	-0.01	0.49	186	> 0.05
		0.5235	-0.1	0.4	187	> 0.05
		0.5283	-0.01	0.43	188	> 0.05
		0.5293	-0.18	0.69	189	> 0.05
		0.539	-0.01	0.43	190	> 0.05
		0.5535	-0.04	0.57	191	> 0.05
		0.5625	-0.21	0.74	192	> 0.05
		0.5654	-0.07	0.66	193	> 0.05
		0.58	-0.01	0.43	194	> 0.05
		0.5845	-0.04	0.54	195	> 0.05
		0.5895	-0.03	0.52	196	> 0.05
		0.596	-0.01	0.41	197	> 0.05
		0.5967	-0.05	0.58	198	> 0.05
		0.6027	-0.1	0.45	199	> 0.05
		0.6066	-0.17	0.61	200	> 0.05
		0.609	-0.02	0.5	201	> 0.05
		0.6111	-0.12	0.5	202	> 0.05
		0.6165	-0.19	0.66	203	> 0.05
		0.6228	-0.14	0.58	204	> 0.05
		0.6376	-0.01	0.46	205	> 0.05
		0.6402	-0.11	0.49	206	> 0.05
		0.6442	-0.09	0.74	207	> 0.05
		0.6456	-0.03	0.45	208	> 0.05
		0.6474	0	0.33	209	> 0.05
		0.6594	-0.16	0.6	210	> 0.05
		0.6599	-0.18	1.04	211	> 0.05
		0.6624	-0.05	0.57	212	> 0.05
		0.6794	-0.04	0.48	213	> 0.05
		0.6818	-0.48	1.17	214	> 0.05
		0.6935	-0.49	1.46	215	> 0.05
		0.6981	-0.08	0.63	216	> 0.05
		0.6987	-0.13	0.59	217	> 0.05
		0.6987	-0.06	0.55	218	> 0.05
		0.7075	-0.12	0.83	219	> 0.05
		0.7077	-0.09	0.66	220	> 0.05
		0.7085	-0.02	0.39	221	> 0.05
		0.7244	-0.07	0.39	222	> 0.05



[106] [표9]

		0.7367	-0.08	0.61	223	> 0.05
		0.7447	-0.1	0.47	224	> 0.05
		0.7451	-0.06	0.33	225	> 0.05
		0.7556	-0.12	0.74	226	> 0.05
		0.7663	-0.02	0.34	227	> 0.05
		0.7688	-0.1	0.68	228	> 0.05
		0.775	-0.21	1.04	229	> 0.05
		0.7803	-0.06	0.54	230	> 0.05
		0.7835	-0.05	0.54	231	> 0.05
		0.7845	-0.09	0.48	232	> 0.05
		0.7959	-0.24	0.87	233	> 0.05
		0.8047	-0.09	0.6	234	> 0.05
		0.8135	-0.12	0.55	235	> 0.05
		0.8142	-0.04	0.42	236	> 0.05
		0.8182	-0.08	0.6	237	> 0.05
		0.8192	-0.02	0.35	238	> 0.05
		0.8238	-0.04	0.41	239	> 0.05
		0.833	-0.33	1.18	240	> 0.05
		0.8406	-0.09	0.54	241	> 0.05
		0.8417	-0.12	0.58	242	> 0.05
		0.848	-0.09	0.59	243	> 0.05
		0.8523	-0.17	0.84	244	> 0.05
		0.8569	-0.1	0.61	245	> 0.05
		0.8615	-0.03	0.37	246	> 0.05
		0.8627	-0.08	0.46	247	> 0.05
		0.874	-0.04	0.42	248	> 0.05
		0.888	-0.22	0.93	249	> 0.05
		0.8884	-0.14	0.67	250	> 0.05
		0.8897	-0.06	0.39	251	> 0.05
		0.8926	-0.12	0.55	252	> 0.05
		0.8957	-0.04	0.31	253	> 0.05
		0.8995	-0.06	0.42	254	> 0.05
		0.9037	-0.07	0.43	255	> 0.05
		0.9037	-0.14	0.71	256	> 0.05
		0.9151	-0.04	0.36	257	> 0.05
		0.9179	-0.23	0.9	258	> 0.05
		0.918	-0.18	0.79	259	> 0.05
		0.9308	-0.1	0.53	260	> 0.05

[107] [표10]

		0.9312	-0.16	0.75	261	> 0.05
		0.9315	-0.69	1.29	262	> 0.05
		0.9401	-0.06	0.4	263	> 0.05
		0.9401	-0.02	0.26	264	> 0.05
		0.9427	-0.06	0.46	265	> 0.05
		0.9572	-0.03	0.31	266	> 0.05
		0.9576	-0.2	0.78	267	> 0.05
		0.958	-0.15	0.66	268	> 0.05
		0.96	-0.04	0.36	269	> 0.05
		0.9654	-0.05	0.41	270	> 0.05
		0.9664	-0.17	0.76	271	> 0.05
		0.9664	-0.04	0.42	272	> 0.05
		0.9709	-0.11	0.59	273	> 0.05
		0.9968	-0.11	0.57	274	> 0.05

[108]

[109] 다만, 274개 단백질들의 검체에 대한 동시 비교이므로, 반복 비교에 따른 통계적 오류를 줄이기 위해 통계기법인 'Benjamini-Hochberg false discovery rate(FDR)'을 활용하여 p-값을 재평가하였다. 즉, 'FDR < 0.2' 인 경우만을 최종적으로 유의적인 차이로 선별하였다. 이를 통해, 최종적으로 NTM (neurotrimin), PAM (peptidyl glycine alpha amidating monooxygenase), PTPRN2 (receptor type tyrosine protein phosphatase N2), LY6H (lymphocyte antigen 6H) 및 FDR < 0.05 수준의 신경분비단백질 VGF(VGF), 14-3-3 단백질 ζ/δ (YWHAZ), 크로모그라닌-A(Chromogranin-A, CHGA), 시크리토그라닌-1(Secretogranin-1, CHGB), 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(Opioid-binding protein/cell adhesion molecule, OPCML)를 포함한, 총 9개의 단백질을 선별하였다. 알츠하이머성 치매 환자에서 유의적으로 발현 차이를 보인, 상기 9종의 단백질의 종류 및 이의 통계적 수치를 하기 표 11에 나타내었다.

[110]

[111] [표11]

UniProt ID	단백질	유전자	AUC		p-값	FC (log2)
			대조군	AD		
O15240	Neurosecretory protein VGF	VGF	23478.5 ± 6236.6	18243.9 ± 5387.3	0.0001**	-0.4 ± 0.4
P63104	14-3-3 protein ζ/δ	YWHAZ	1219.8 ± 502.4	1676.7 ± 712.5	0.0012**	0.3 ± 0.75
P10645	Chromogranin-A	CHGA	7950.8 ± 3236.5	5909.1 ± 2302.6	0.0018**	-0.6 ± 0.6
P05060	Secretogranin-1	CHGB	46505.7 ± 9216.4	39804.8 ± 9753.9	0.0021**	-0.3 ± 0.5
Q14982	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	OPCML	7684.5 ± 2262.7	6039.4 ± 2498.3	0.0027**	-0.5 ± 0.8
Q9P121	Neurotrimin	NTM	13841.1 ± 2094.8	12390.1 ± 3084.6	0.0162*	-0.2 ± 0.4
P19021	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	PAM	2776.4 ± 642.9	2382.8 ± 823.6	0.0185*	-0.3 ± 0.6
O94772	Lymphocyte antigen 6H	LY6H	6568.1 ± 1798.8	5567.3 ± 2098.1	0.0235*	-0.4 ± 0.6
Q92932	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2	PTPRN2	3469.8 ± 1047.5	2914.9 ± 1135.2	0.0252*	-0.2 ± 0.5



[112] \*\* FDR < 0.05

[113] \* FDR < 0.2

[114] AD, 알츠하이머성 치매; AUC, SWATH-MS분석에서 해당 단백 spectral peak의 곡선 하면적; FC (log2), 대조군 vs 알츠하이머성 치매 환자의 AUC의 log2 배수 변화.

[115]

[116] 상기 선별된 9종의 단백 중 상위 5종의 단백질의 개별적인 알츠하이머성 치매 진단의 유용성을 확인하기 위해, ROC 커브 분석을 수행하였다. 그 결과, 하기 표 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, AUC 값이 0.7 내외로 측정되어 상기 5종의 단백질은 개별적으로도 알츠하이머성 치매 진단에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

[117]

[118] [표12]

Sen (%)
82
69
56
79
79

[119]

[120] <실시예 3> 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합 및 이의 유용성 확인

[121] 실시예 3-1: 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합(YWHAZ, CHGA, CHGB)의 선별

[122] 알츠하이머성 치매를 진단함에 있어서, 상기 실시예 2에서 선별한 5종의 단백질의 조합이 개별적인 단백질 보다 더 유용한지 확인하기 위해, 역행 단계적인 선별 방법(Backward stepwise selection)을 이용한 로지스틱 회귀분석(Logistic regression)을 수행하였다. 3종의 단백질(YWHAB, CHGA 및 CHGB)의 동시 측정을 통한 알츠하이머성 치매의 진단 가능성을 설명할 수 있는, 회귀방정식을 도출하는 과정을 나타내는 표 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 신경분비 단백질 VGF 및 오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자(OPCML)은 어떤 조합을 구성하더라도, 모든 경우에서 유의확률(p-값)이 0.05 수준을 넘게 나오므로, 상기 2종의 단백질을 제외한, 14-3-3 단백질 ζ/δ (YWHAZ), 크로모그라닌-A(CHGA), 시크리토그라닌-1(CHGB)를 포함한 3종의 단백질의 조합이 가장 유의적인 유의확률을 나타내어, 상기 3종의 단백질의 조합을 알츠하이머성 치매 진단을 위한 최적의 단백질 조합으로 선별하였다.

[123]

[124] [표 13]

Step		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup>	VGF	-2.135	2.076	1.058	1	.304	.118	.002	6.911
	YWHAZ	3.487	.829	17.694	1	.000	32.674	6.437	165.860
	CHGA	-2.611	1.362	3.675	1	.055	.073	.005	1.060
	CHGB	-2.719	2.626	1.073	1	.300	.066	.000	11.325
	OPCML	-1.063	1.296	.672	1	.412	.345	.027	4.384
	Constant	3.539	1.518	5.440	1	.020	34.443	-	-
Step 2 <sup>a</sup>	VGF	-2.182	2.092	1.088	1	.297	.113	.002	6.806
	YWHAZ	3.504	.835	17.612	1	.000	33.242	6.472	170.747
	CHGA	-2.638	1.352	3.807	1	.051	.071	.005	1.012
	CHGB	-3.728	2.424	2.365	1	.124	.024	.000	2.782
	Constant	3.587	1.517	5.592	1	.018	36.119	-	-
Step 3 <sup>a</sup>	YWHAZ	3.530	.837	17.800	1	.000	34.114	6.619	175.822
	CHGA	-3.384	1.161	8.502	1	.004	.034	.003	.330
	CHGB	-5.222	2.042	6.540	1	.011	.005	.000	.295
	Constant	3.639	1.520	5.734	1	.017	38.038	-	-

[125] <sup>a</sup> 각 단계에서 입력한 변수: 1 단계; VGF, YWHAZ, CHGA, CHGB, OPCML, 2 단계; VGF, YWHAZ, CHGA, CHGB, 3 단계; YWHAZ, CHGA, CHGB.

[126]

[127] 실시예 3-2: 선별된 3종의 단백질(YWHAZ, CHGA, CHGB)의 알츠하이머성 치매 진단의 유용성 확인

[128] 상기 선별된 3종의 단백질의 동시 측정을 통한 알츠하이머성 치매 진단을

설명하는 회귀방정식을 구하였다. 회귀계수 및 회귀 상수값을 얻어, 최종적으로 "3.639 + 3.530 X YWHAZ(1433Z) - 3.384 X CHGA - 5.222 X CHGB"의 회귀방정식을 얻었다. 3종의 단백질의 발현량을 모두 포함하는 상기 회귀 방정식으로, 모든 검체에서 방정식 값을 얻은 후, 그 값으로 알츠하이머성 치매 진단을 위한 ROC 분석을 실시하였다. 그 결과, 하기 표 14에서 확인할 수 있는 바와 같이, 0.889의 높은 AUC 값을 나타내었다. 또한, ROC 그래프의 좌표 분석을 통하여, 진단을 위한 컷-오프 값을 'Youden index J' 값을 가장 높게 만드는 좌표점으로 구하였다. 이를 기준으로 하는 경우, 회귀 방정식 값은 민감도(Sen) 83%, 특이도(Spe) 80% 수준으로 알츠하이머성 치매 진단을 가능하게 함을 나타낸다.

[129]

[130] [표14]

	AUC	95% CI	p-값	Youden index J	Sen (%)	Spe (%)
회귀 방정식(Regression Equation)	0.889	0.819 - 0.959	< 0.001	0.63	83	80

[131]

[132] 즉, 상기와 같은 결과 및 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 3종의 단백질의 조합이 개별적인 단백질에서 보다 훨씬 높은 ROC 커브 및 회귀방정식 값을 나타내므로, 개별적인 단백질의 측정에 비해, 3종의 단백질(YWHAZ(1433Z), CHGA, CHGB) 발현량의 동시 측정을 통해, 알츠하이머성 치매를 높은 정확도 및 민감도로 진단하는 것이 가능함을 확인할 수 있다.

[133]

[134] <실시예 4> 간이정신상태 검사(mini-mental state examination, MMSE)

[135] 알츠하이머병으로 인한 인지기능 장애를 평가할 수 있는 치매 선별 검사인 간이정신상태 검사(mini-mental state examination, MMSE)를 실시하여 상기 마커와의 상관관계를 분석하였다.

[136] 보다 구체적으로, 간이정신상태 검사(mini-mental state examination, MMSE) 점수와 상기 단백질들의 뇌척수액내 발현 농도의 log2 배수 변화 수치를 Spearman's rank correlation 분석을 통해 상관관계를 규명하였다. MMSE 점수는 인지기능 장애가 심할수록 점수가 낮아진다.

[137] 그 결과, 도 3에서 보듯이, LY6H 단백질의 뇌척수액 농도는 MMSE 점수와 상관관계수 0.307(p-값, 0.009), PAM은 상관관계수 0.248(p-값, 0.037), PTPRN2는 상관관계수 0.279(p-값, 0.019), VGF는 상관관계수 0.475(p-값, < 0.0001), CHGA는 상관관계수 0.409(p-값, 0.0004), CHGB는 상관관계수 0.396(p-값, 0.0006), 그리고

OPCML은 상관계수 0.234(p-값, 0.0498)으로 모두 각 단백질 농도가 감소할수록 인지기능이 저하되는 유의한 상관성을 보였다. NTM은 상관계수 0.174(p-값, 0.147), 그리고 YWHAZ는 상관계수 -0.152(p-값, 0.206)으로 단백질 농도 변화가 인지기능 저하와 상관성을 보이지 않았다. 그러나 YWHAZ와 CHGA, CHGB의 조합인 regression equation(combined) 값은 상관계수 -0.620(p-값, < 0.0001)으로 그 값이 증가할수록 인지기능이 저하되는 높은 수준의 유의한 상관성을 보였다.

[138] 이를 통해, 상기 단백질들의 뇌척수액내 발현 농도가 변화 양상과 치매 환자의 인지기능 장애 정도의 중증도 양상이 유의한 상관관계를 보이는 것을 확인하였고, 이 같은 상관관계는 YWHAZ, CHGA, CHGB이 조합될 때 더욱 증가하는 것을 확인하였다.

[139]

[140] <실시예 5> clinical dementia rating-sum of box(CDR-SOB) 분석

[141] 치매환자의 중증도를 임상적으로 평가할 수 있는 clinical dementia rating-sum of box(CDR-SOB)를 실시하여 상기 마커와의 상관관계를 분석하였다.

[142] 보다 구체적으로, clinical dementia rating-sum of box(CDR-SOB) 점수와, 상기 단백질들의 뇌척수액내 발현 농도의 log2 배수 변화 수치를 Spearman's rank correlation 분석을 통해 상관관계를 규명하였다. CDR-SOB는 기억력, 지남력, 판단력/문제해결 능력, 사회활동, 집안생활과 취미, 위생 및 몸치장이라는 5가지 항목에 대하여 각각 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5점을 부여한 후 이들 수치를 합한 값을 의미하며, 치매가 심할수록 점수가 높아진다.

[143] 그 결과, 도 4에서 보듯이, LY6H 단백질의 뇌척수액 농도는 CDR-SOB 점수와 상관계수 -0.321 (p-값, 0.006), PAM은 상관계수 -0.279 (p-값, 0.017), PTPRN2는 상관계수 -0.281 (p-값, 0.016), VGF는 상관계수 -0.469 (p-값, < 0.0001), CHGA는 상관계수 -0.399 (p-값, 0.0005), CHGB는 상관계수 -0.423 (p-값, 0.0002), OPCML은 상관계수 -0.347 (p-값, 0.0026)으로 모두 각 단백질 농도가 감소할수록 치매 정도가 심해지는 유의한 상관성을 보였다. NTM은 상관계수 -0.190 (p-값, 0.107)으로 단백질 농도 변화가 치매의 심한 정도와 상관성을 보이지 않았다. YWHAZ는 상관계수 0.275 (p-값, 0.0185)으로 단백질 농도가 증가할수록 치매 정도가 심해지는 유의한 상관성을 보였고, YWHAZ농도가 CHGA, CHGB농도와 regression equation (combined)으로 조합될 때 상관계수 0.722 (p-값, < 0.0001)로 단백질의 농도가 증가할수록 치매 정도가 심해지는 유의한 상관성이 더욱 증가하였다.

[144] 이를 통해, 상기 단백질들의 뇌척수액내 발현 농도 변화 양상과 치매 환자의 중증도 양상이 유의한 상관관계를 보이는 것을 확인하였고, 이 같은 상관관계는 YWHAZ, CHGA, CHGB이 조합될 때 더욱 증가하는 것을 확인하였다.

[145]

[146] 이상의 내용을 종합하면, 본 발명에서는 정상 대조군과 비교하여 알츠하이머성 치매 환자에서 공통적으로 검출되는 274종의 단백질들 중에서도, 5종의

단백질들(VGF, YWHAZ, CHGA, CHGB, OPCML)이 유의적으로 차이가 있는 발현량을 나타냄을 확인하였다. 더욱이, 상기 5종의 개별적인 단백질들에 비해, 3종의 단백질의 조합(YWHAZ, CHGA, CHGB)이 알츠하이머성 치매 진단의 유용성에 있어서 월등히 높은 민감도 및 특이도를 나타냄을 확인하였다. 이를 통해, 3종의 단백질 발현량의 동시 측정을 통해, 알츠하이머성 치매의 진단 또는 예후 예측에 유용한 정보를 획득할 수 있음을 확인하였다. 또한 상기 단백질들의 발현 변화 양상이 치매 환자의 인지기능 장애 정도 및 치매 중증도 양상과 유의한 상관관계를 보이는 것을 확인하였다. 따라서, 최종적으로 NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, VGF, YWHAZ, CHGA, 또는 CHGB 를 포함한, 총 9종의 단백질 및 이들의 조합이 알츠하이머성 치매를 진단하거나, 그 중증도를 예측하는데 유용한 바이오마커가 될 수 있음을 확인하였다.

[147]

[148] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

[149]

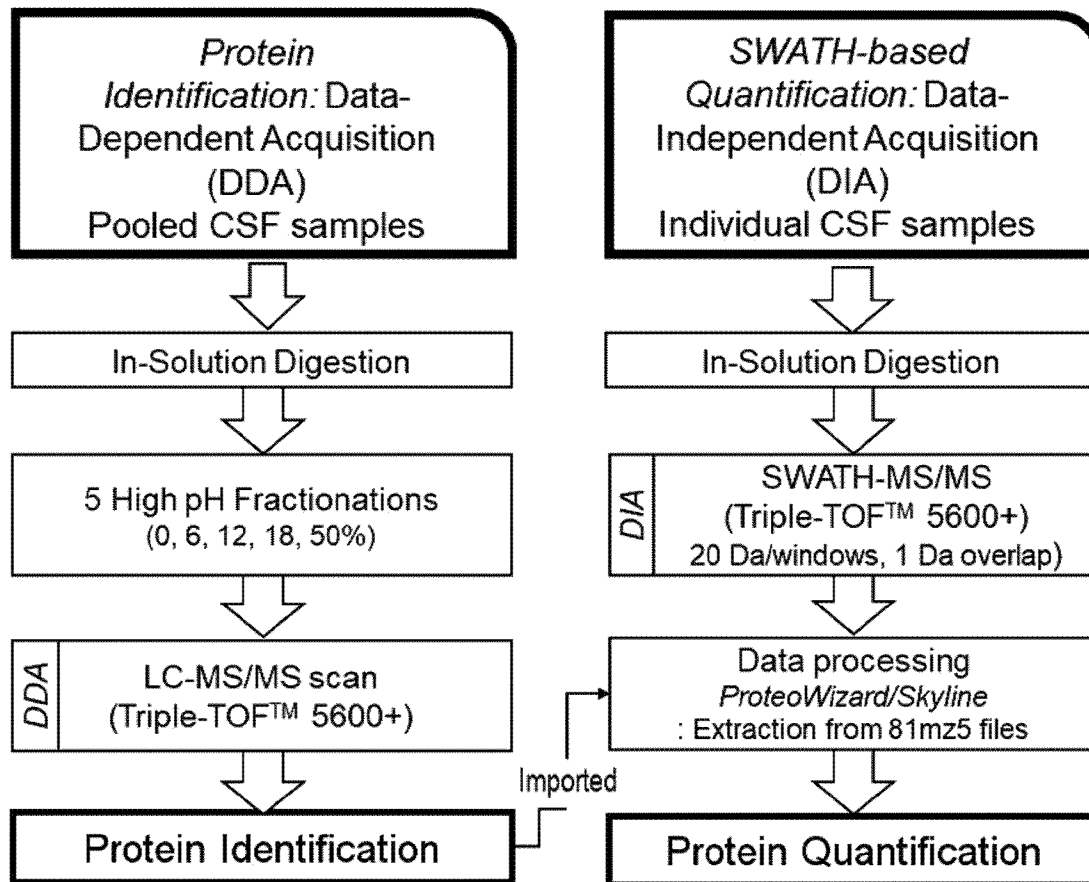
[150]

## 청구범위

- [청구항 1] NTM(뉴로트리민), PAM(펩티딜글리신- $\alpha$ -아미드화 모노옥시게나제), PTPRN2(수용체형 티로신 단백질 포스파타제 N2), OPCML(오피오이드-결합 단백질/세포 부착 분자), YWHAZ(14-3-3 단백질  $\zeta/\delta$ ), CHGA(크로모그라닌-A) 및 CHGB(시크리토그라닌-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함하는 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 유전자는 YWHAZ, CHGA 및 CHGB의 조합인 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 유전자는 NTM, PAM, LY6H(림프구 항원 6 패밀리 멤버 H), PTPRN2, OPCML 및 VGF(신경분비 단백질 VGF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 추가로 포함하는 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단용 키트.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 알츠하이머성 치매의 진단용 키트.
- [청구항 8] (a) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서, NTM, PAM, PTPRN2, OPCML, YWHAZ, CHGA 및 CHGB로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및  
(b) 상기 측정된 수준을 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 알츠하이머성 치매의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준은 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던

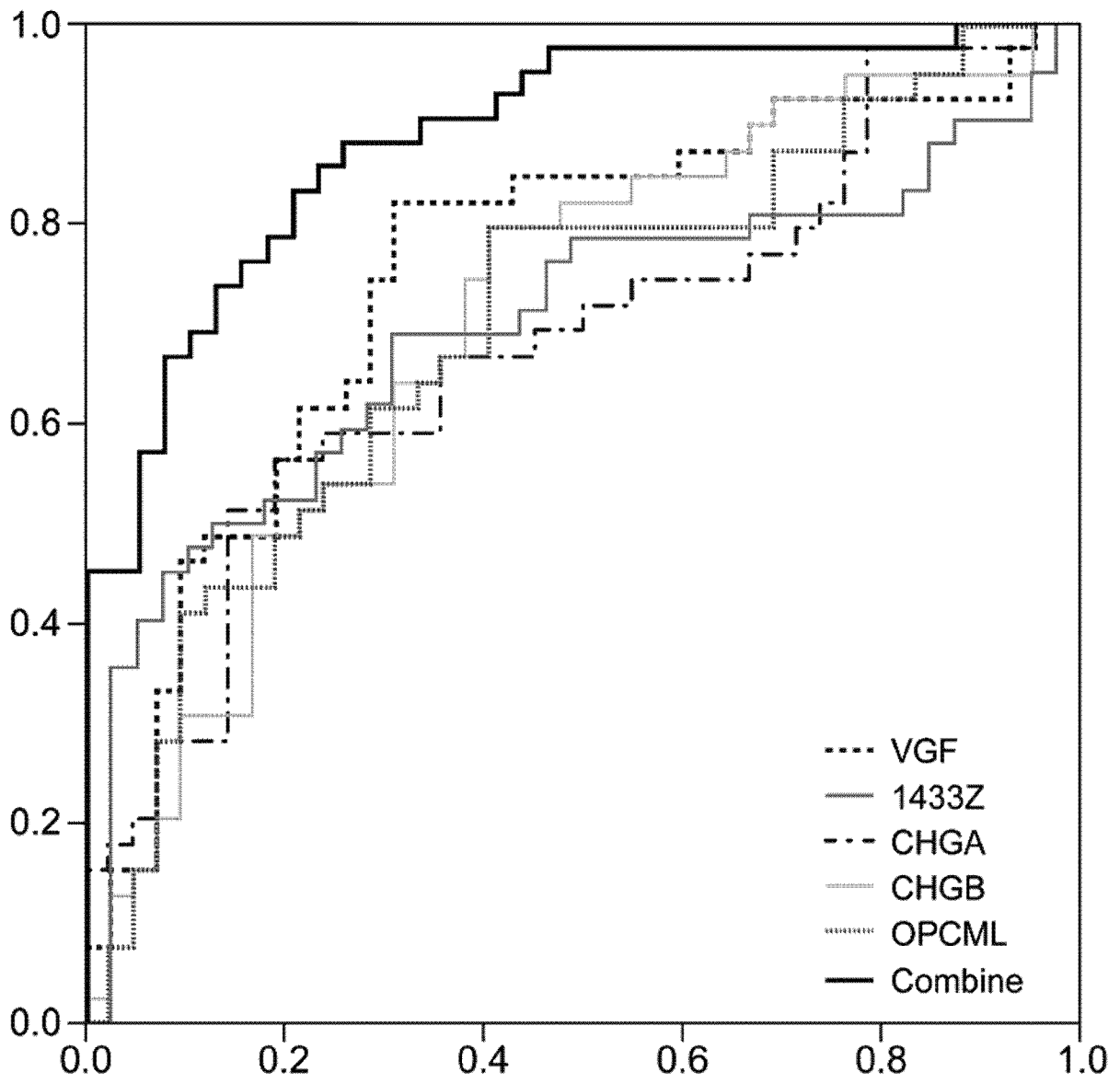
- 블랏팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 분석법(DNA chip technology assay)에 의하여 측정되는 것인, 방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 단백질의 수준은 웨스턴 블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로켓트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 이용하여 측정되는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨인 것인, 방법.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 유전자는 YWHAB, CHGA 및 CHGB의 조합인 것인, 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 유전자는 NTM, PAM, LY6H, PTPRN2, OPCML 및 VGF로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제8항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 정상 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 수준과 비교하여, i) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 YWHAZ 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 높은 경우, 또는 ii) 알츠하이머성 치매의 발병이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 측정된 NTM, PAM, PTPRN2, LY6H, VGF, CHGA, CHGB 또는 OPCML 유전자의 mRNA 또는 단백질의 수준이 낮은 경우, 알츠하이머성 치매의 발병 위험이 높다고 판정하는 것인, 방법.

[도 1]

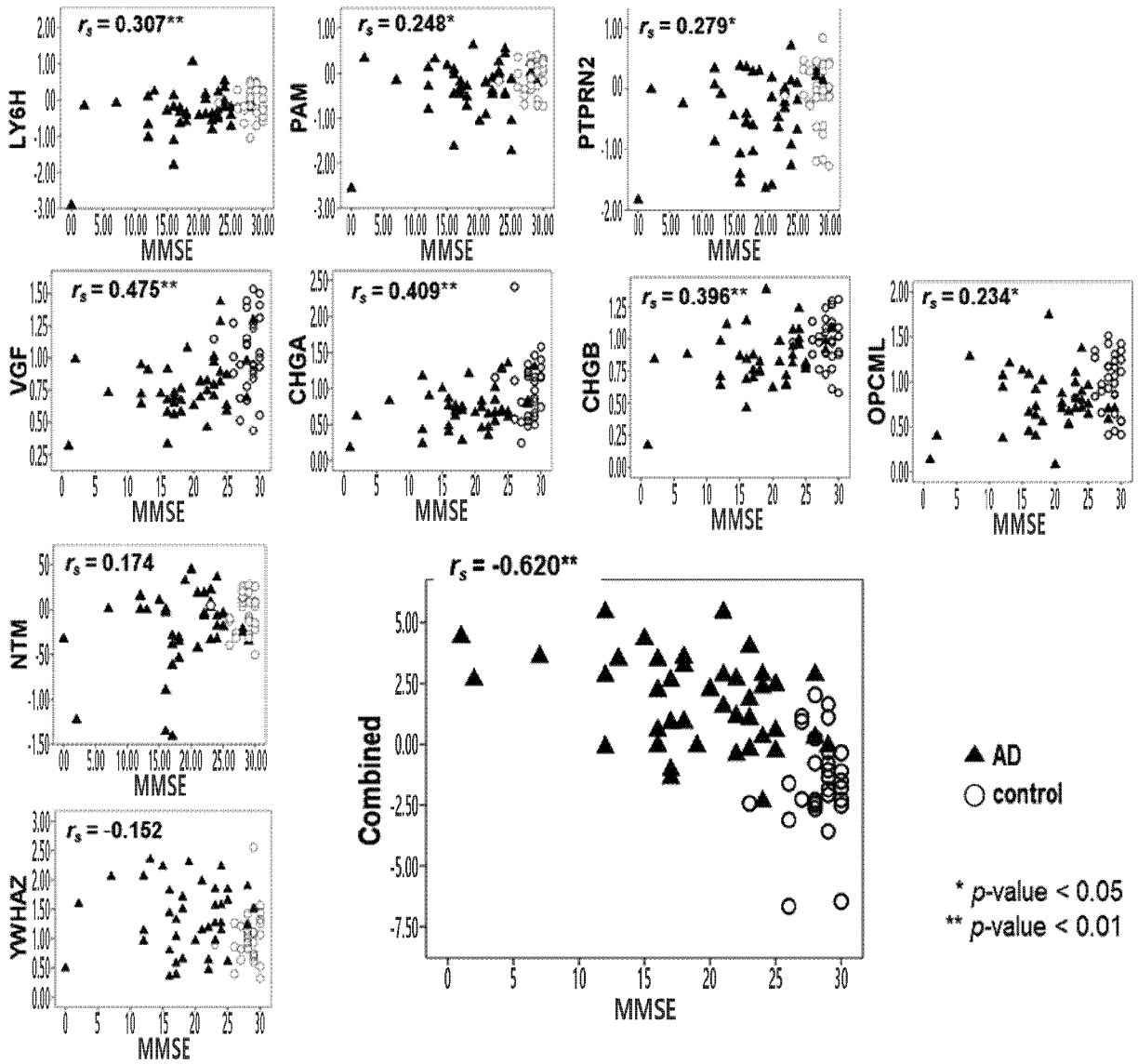




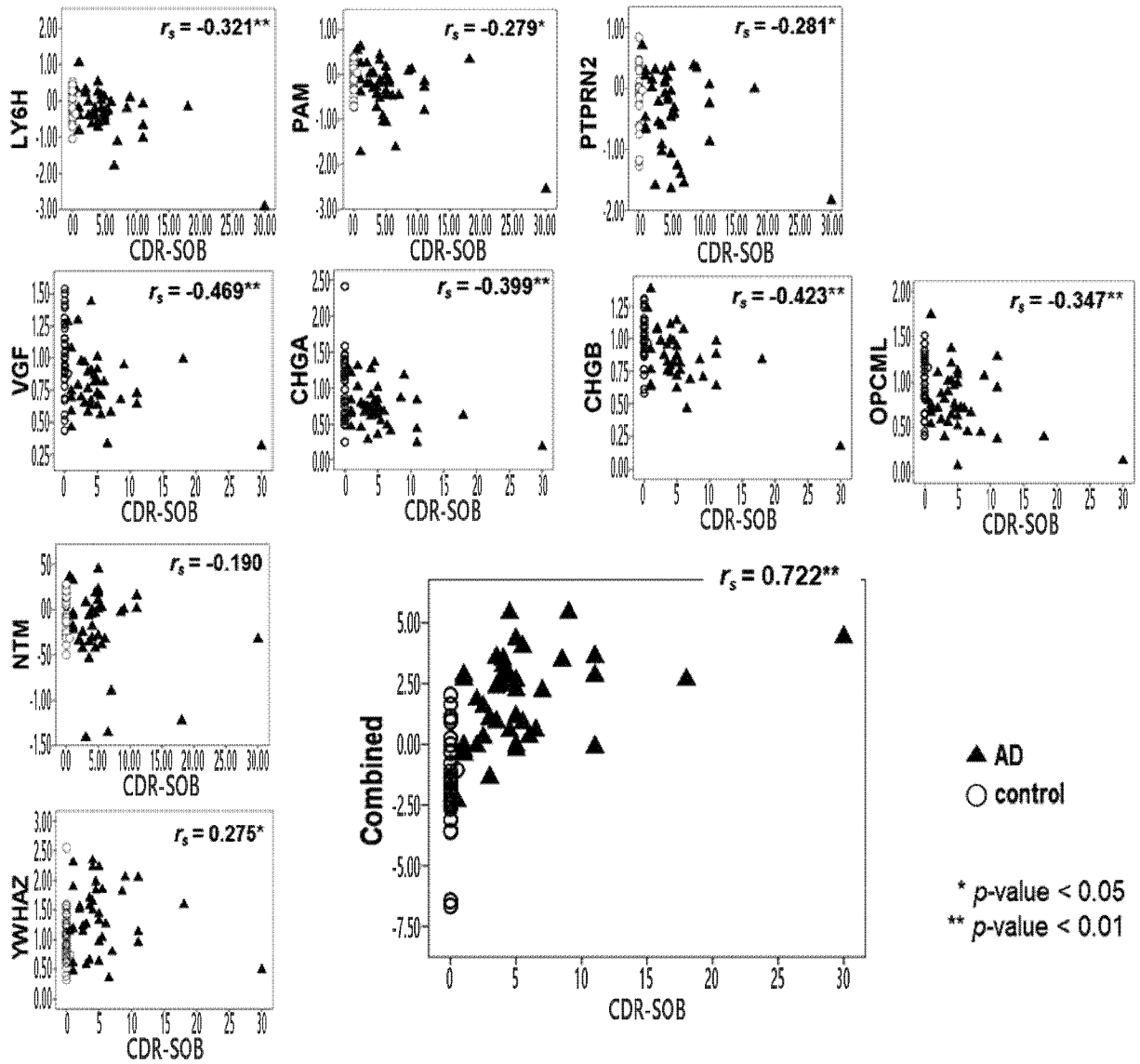
[도2]



[도3]



[도4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/011862

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(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)

C12Q 1/6883; A61K 31/13; C07K 2/00; C40B 30/04; G01N 33/15; G01N 33/50; G01N 33/543; G01N 33/68

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) &amp; Keywords: Alzheimer's disease, biomarker, NTM, PAM, PTPRN2, OPCML, YWHIAZ, CHGA, CHGB

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0067133 A1 (ELECTROPHORETICS LIMITED) 08 March 2018 See abstract, paragraph [0152]; and table 2.	1-3,6-11,14
A		4,5,12,13
A	KR 10-2015-0098519 A (SOONCHUNHYANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 28 August 2015 See the entire document.	1-14
A	US 2016-0327572 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 10 November 2016 See the entire document.	1-14
A	JP 2016-516202 A (KINEMED, INC. et al.) 02 June 2016 See the entire document.	1-14
A	US 2012-0178637 A1 (DEVANARAYAN, V. et al.) 12 July 2012 See the entire document.	1-14
A	US 2007-0031908 A1 (LAMPING, N. et al.) 08 February 2007 See the entire document.	1-14



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 DECEMBER 2019 (30.12.2019)

Date of mailing of the international search report

30 DECEMBER 2019 (30.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,  
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/011862

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUSUNURI, S. et al. Quantification of the brain proteome in Alzheimer's disease using multiplexed mass spectrometry. <i>Journal of Proteome Research</i> . 2014, vol. 13, pages 2056-2068 See the entire document.	1-14
PX	KR 10-1992060 B1 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 21 June 2019 See claims 1-10, 14.	1-14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2019/011862**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2018-0067133 A1	08/03/2018	CA 2979773 A1 EP 3271728 A1 JP 2018-510343 A WO 2016-146783 A1	22/09/2016 24/01/2018 12/04/2018 22/09/2016
KR 10-2015-0098519 A	28/08/2015	KR 10-1574766 B1	08/12/2015
US 2016-0327572 A1	10/11/2016	CA 2936056 A1 EP 3092494 A1 WO 2015-103594 A1	09/07/2015 16/11/2016 09/07/2015
JP 2016-516202 A	02/06/2016	AU 2014-232869 A1 CA 2907357 A1 EP 2972329 A2 US 2014-0274785 A1 WO 2014-145568 A2 WO 2014-145568 A3	08/10/2015 18/09/2014 20/01/2016 18/09/2014 18/09/2014 11/12/2014
US 2012-0178637 A1	12/07/2012	WO 2011-005893 A2 WO 2011-005893 A3 WO 2011-005893 A9	13/01/2011 16/06/2011 14/11/2013
US 2007-0031908 A1	08/02/2007	AT 443296 T CA 2519129 A1 CA 2553172 A1 EP 1553515 A1 EP 1604210 A2 EP 1704507 A2 EP 1704507 B1 JP 2007-526243 A US 2011-0093204 A1 WO 2004-082455 A2 WO 2004-082455 A3 WO 2005-069187 A2 WO 2005-069187 A3	15/10/2009 30/09/2004 28/07/2005 13/07/2005 14/12/2005 27/09/2006 16/09/2009 13/09/2007 21/04/2011 30/09/2004 17/03/2005 28/07/2005 02/03/2006
KR 10-1992060 B1	21/06/2019	None	

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C12Q 1/6883(2018.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12Q 1/6883; A61K 31/13; C07K 2/00; C40B 30/04; G01N 33/15; G01N 33/50; G01N 33/543; G01N 33/68

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: 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 바이오마커(biomarker), NTM, PAM, PTPRN2, OPCML, YWHAZ, CHGA, CHGB

**C. 관련 문헌**

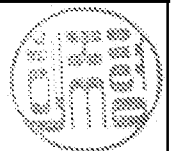
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0067133 A1 (ELECTROPHORETICS LIMITED) 2018.03.08 요약; 단락 [0152]; 및 표 2	1-3,6-11,14
A		4,5,12,13
A	KR 10-2015-0098519 A (순천향대학교 산학협력단) 2015.08.28 전체 문헌	1-14
A	US 2016-0327572 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2016.11.10 전체 문헌	1-14
A	JP 2016-516202 A (KINEMED, INC. 등) 2016.06.02 전체 문헌	1-14
A	US 2012-0178637 A1 (DEVANARAYAN, v. 등) 2012.07.12 전체 문헌	1-14
A	US 2007-0031908 A1 (LAMPING, N. 등) 2007.02.08 전체 문헌	1-14

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 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌  
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 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 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2019년 12월 30일 (30.12.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 12월 30일 (30.12.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MUSUNURI, S. 등, 'Quantification of the brain proteome in Alzheimer`s disease using multiplexed mass spectrometry', Journal of Proteome Research, 2014, 13권, 페이지 2056-2068 전체 문헌	1-14
PX	KR 10-1992060 B1 (아주대학교산학협력단) 2019.06.21 청구항 1-10, 14	1-14



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0067133 A1	2018/03/08	CA 2979773 A1 EP 3271728 A1 JP 2018-510343 A WO 2016-146783 A1	2016/09/22 2018/01/24 2018/04/12 2016/09/22
KR 10-2015-0098519 A	2015/08/28	KR 10-1574766 B1	2015/12/08
US 2016-0327572 A1	2016/11/10	CA 2936056 A1 EP 3092494 A1 WO 2015-103594 A1	2015/07/09 2016/11/16 2015/07/09
JP 2016-516202 A	2016/06/02	AU 2014-232869 A1 CA 2907357 A1 EP 2972329 A2 US 2014-0274785 A1 WO 2014-145568 A2 WO 2014-145568 A3	2015/10/08 2014/09/18 2016/01/20 2014/09/18 2014/09/18 2014/12/11
US 2012-0178637 A1	2012/07/12	WO 2011-005893 A2 WO 2011-005893 A3 WO 2011-005893 A9	2011/01/13 2011/06/16 2013/11/14
US 2007-0031908 A1	2007/02/08	AT 443296 T CA 2519129 A1 CA 2553172 A1 EP 1553515 A1 EP 1604210 A2 EP 1704507 A2 EP 1704507 B1 JP 2007-526243 A US 2011-0093204 A1 WO 2004-082455 A2 WO 2004-082455 A3 WO 2005-069187 A2 WO 2005-069187 A3	2009/10/15 2004/09/30 2005/07/28 2005/07/13 2005/12/14 2006/09/27 2009/09/16 2007/09/13 2011/04/21 2004/09/30 2005/03/17 2005/07/28 2006/03/02
KR 10-1992060 B1	2019/06/21	없음	