

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0123495

(43) 공개일자 2019년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/49 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/49 (2019.01)

G01N 30/72 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0047278

(22) 출원일자 2018년04월24일

심사청구일자 2018년04월24일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

문명희

경기도 광주시 오포읍 수레안길 70-4

김어수

서울특별시 서초구 신반포로 45

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

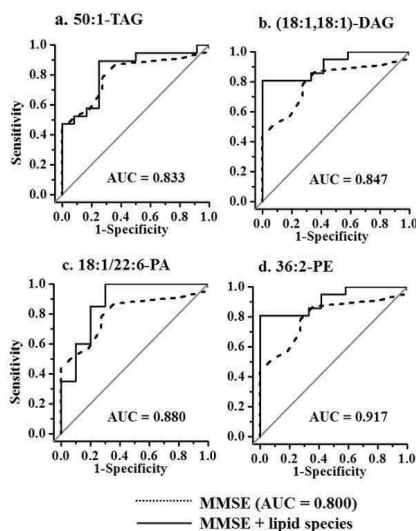
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 대사체 프로파일링을 이용한 알츠하이머병의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법, 및 키트

(57) 요약

본 발명은 특정 바이오마커에 기반하여 알츠하이머병 또는 경도인지장애 관련 위험도를 평가하는 방법에 관한 것으로, (a) 대상체(subject)의 생물학적 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료에서 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체 농도를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 대사체의 수준을 정상 대조군 시료의 측정값과 비교하는 단계;를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 30/88 (2013.01)
G01N 2030/8822 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김산하

서울특별시 마포구 월드컵로3길 14, 201동 1910호
 (합정동)

이준영

서울특별시 성동구 뚝섬로 51, 105동 1203호 (옥수
 동, 옥수강변풍림아이원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A01004677

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 지질체 다중분석체계 기반 생활습관병의 미래형 진단/분석법

개발(3/3)(2015.5.1~2018.4.30)

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 대상체(subject)의 생물학적 시료를 제공하는 단계;
- (b) 상기 생물학적 시료에서 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체 농도를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 측정된 대사체의 수준을 정상 대조군 시료의 측정값과 비교하는 단계;를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)이고, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)이고, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 포스파티딘산(PA)의 대사체 농도를 더 측정하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 포스파티딘산은 PA(18:1/22:6)인 방법.

청구항 5

포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)이고, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)이고, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)인 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

PA(18:1/22:6)에 대한 정량장치를 더 포함하는 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특정 바이오마커의 농도를 측정하여 알츠하이머병 또는 경도인지장애 관련 위험도를 평가하는 진단 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화 등으로 현대인들은 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환에 관심이 커지고 있다.
- [0003] 세계적으로 고령인구의 비중은 점차 증가하고 있다. 우리나라도 2010년 기준 65세 이상 인구의 비율이 11%로 상승하였고, 2018년에는 고령사회, 2026년에는 초고령 사회로 접어들 것으로 예견되며, 고령인구의 노인성 질병의 해결이 시급한 사회적 문제로 대두되고 있다.
- [0004] 특히, 급속한 노령 인구의 증가에 따라, 뇌, 척추, 말초신경의 손상을 포함한 퇴행성 신경질환이 점차 증가하고 있는 추세이다.
- [0005] 퇴행성 신경질환은 허혈에 기인한 신경손상 및 활성산소에 의한 신경손상과 관련된 질환을 포함한다.
- [0006] 신경세포는 발생 및 시냅스를 재구성하는 과정에서 끊임없이 세포사멸하며, 스트레스와 세포독성 약물에 의한 세포사멸이 퇴행성 신경질환의 주요 요인이 된다.
- [0007] 산화적 스트레스는 퇴행성 신경질환의 유발원인과 많은 연관관계를 가진 것으로 알려져 있으며, 최근 연구에 따르면 만성적인 스트레스 및 산화적 스트레스는 시상하부-뇌하수체-부신피질계, 해마, 선조체, 흑질 그리고 전뇌 피질 부위에서 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸을 증가시키고 뉴런 및 성장인자를 감소시켜 퇴행성 신경질환을 초래하는 것으로 보고된 바 있다.
- [0008] 한편, 알츠하이머 환자의 뇌에는 발병 수십 년 전부터 아밀로이드 베타 플라크가 축적이 되기 시작해 시간의 경과에 따라 인지기능이 서서히 악화되지만 정상적인 노화에 의한 인지기능 감퇴현상과 임상증상이 비슷하여 조기 발견이 어렵다.
- [0009] 뿐만 아니라, 한번 손상된 뇌는 회복이 불가능 하고 병의 진행을 지연시키는 치료만 가능하여 빠른 예후가 요구된다.
- [0010] 알츠하이머의 주요 발병 요인인 아밀로이드 베타는 혈액 내 지단백에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으며, 치료가 가능한 알츠하이머의 전-단계인 경도인지장애 환자의 경우 지단백 내 뚜렷한 지질 변화가 야기되는 바, 질병의 조기 진단을 위한 잠재적인 바이오마커 후보군을 발굴하는 것은 매우 중요하다.
- [0011] 세포 내의 대사물질과 대사회로를 총체적으로 분석하는 대사체학(metabolomics)은 질병의 바이오마커를 검출하는데 널리 사용되고 있다.
- [0012] 알츠하이머를 진단하는 특이적 마커로 DNA, mRNA, 및 단백질이 연구되어 왔으나, 알츠하이머 환자 및 건강한 사람 간의 대사체 변화에 대한 포괄적인 이해는 아직 미흡한 상태이다.
- [0013] 본 발명자들은 대사체학을 통해 알츠하이머 관련 대사체를 동정하고 질병의 발병 간의 상관관계를 규명하여 알츠하이머의 위험성 또는 예후를 진단하는 방법을 제공하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 특정 대사체의 수준을 측정하여 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 위험성 또는 예후를 진단하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 대상체(subject)의 생물학적 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료에서 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체 농도를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 대사체의 수준을 정상 대조군 시료의 측정값과 비교하는 단계;를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법이 제공된다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)이고, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)이고, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 단계에서 포스파티딘산(PA)의 대사체 농도를 더 측정할 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 포스파티딘산은 PA(18:1/22:6)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애 진단용 키트가 제공된다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)이고, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)이고, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)일 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 진단용 키트는 PA(18:1/22:6)에 대한 정량장치를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 일 측면에 따르면, 혈청 내 특정 대사체의 농도를 측정함으로써, 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 발병 가능성을 효과적으로 예측할 수 있다.

[0023] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정된 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 흐름 장-흐름 분획법을 이용한 정상인, 경도인지장애, 및 알츠하이머 환자의 혈장 내 지단백을 분리한 결과이다.

도 2는 정성 및 정량분석을 수행한 363개의 지질 종을 대상으로 정상군과 비교하여 환자군(경도인지장애, 알츠하이머)에서 fold change와 p-value값의 경향성을 보이는 Volcano plot을 나타낸 것이다.

도 3은 정상군, 경도인지장애 및 알츠하이머 환자군의 지단백 내 지질 종 가운데 정상군을 기준으로 상대적으로 양이 많은 지질 종만 그래프 상에 명시한 중첩 막대 그래프(stacked bar graph)이다.

도 4는 HDL 그리고 LDL/VLDL 내에서 각 그룹별로 유의미한 차이(2배 이상 차이 & $p < 0.01$)를 보인 지질 종들을 대상으로 나타낸 주성분분석(PCA) 결과이다.

도 5는 HDL과 LDL/VLDL 내에서 정상군을 기준으로 상대적으로 양이 많이 존재하며 알츠하이머로의 병이 진행됨에 따라 점진적인 감소 혹은 증가 폭 보이는 지질 종을 나타낸 것이다.

도 6은 뇌 병변 및 위축 정도에 따라서 분류 하였을 때, HDL 과 LDL/VLDL 내에서 TAG(50:1), DAG(18:1, 18:1), PE(36:2) 세 지질 종의 변화 양상을 나타낸 것이다.

도 7은 경도인지장애 환자의 LDL/VLDL에서 바이오마커 후보군 지질 종 TAG(50:1), DAG(18:1, 18:1), PA(18:1/22:6), PE(36:2) 에 대한 수신자 조작 특성 곡선(ROC curve)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0026] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0027] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고서에 기술되어 있다.

[0028] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0029] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특

정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 대상체(subject)의 생물학적 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 생물학적 시료에서 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체 농도를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 측정된 대사체의 수준을 정상 대조군 시료의 측정값과 비교하는 단계;를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법이 제공된다.
- [0032] 상기 "알츠하이머병(Alzheimer's disease)"은 치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 신경질환으로 서서히 발병하여 기억력을 포함한 인지기능의 악화가 점진적으로 진행되는 질병을 의미한다.
- [0033] 베타 아밀로이드(β β -amyloid)라는 작은 단백질이 과도하게 생성되어 뇌에 침착되면서 뇌 세포에 유해한 영향을 주는 것이 알츠하이머 발병의 핵심 기전으로 알려져 있다.
- [0034] 상기 알츠하이머의 진행 과정에서 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 행동 심리 증상(BPSD; Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia)이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변 실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증이 수반될 수 있다.
- [0035] 상기 대상체(subject)는 진단 대상으로서 인간일 수 있고, 상기 생물학적 시료는 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 위험성을 평가하고자 하는 상기 대상체에서 분리될 수 있으며, 조직, 세포, 혈액, 혈장, 복막액, 활막액, 타액, 소변, 대변 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 생물학적 시료는 혈액일 수 있으며, 구체적으로 혈액에서 분리된 혈장일 수 있다.
- [0036] 상기 "혈장 대사체"는 혈액 유래의 액상 시료로부터 수득한 대사물질들을 의미한다. 상기 혈장 대사체를 검출하기 위해 혈액을 전처리할 수 있다.
- [0037] 상기 전처리는 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 따라 생산된 물질, 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사 작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 대사체 각각을 개별적으로 분석하여 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험성 여부를 진단할 수 있으나, 상기 대사체의 수준을 동시에 분석함으로써 진단의 정확성을 향상시킬 수 있다.
- [0039] 상기 대사체는 대사체학을 통하여 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 병리학적 경로를 연구함으로써 결정될 수 있다.
- [0040] 상기 "대사체학"은 세포내의 대사물질과 대사회로를 총체적으로 분석 및 연구하는 생물학 분야 중 하나이다. 상기 "대사체"는 주로 혈액 등에서 분류가 가능한 세포 과정(cellular process) 중 발생하는 소분자의 대사산물 전체(metabolome)를 말하며, 상기 대사체학은 혈액에서 추출된 상기 대사체를 분석하는 것이 기본이며, 그 응용은 주로 대사관련 질병을 연구하는 것이다.
- [0041] 상기 알츠하이머병 또는 경도인지장애의 예후 또는 위험도를 평가하는 방법에 있어서, 상기 "포스파티딜에탄올아민(PE)"은 글리세롤인지질의 일종으로 생물계에는 생체막의 구성지질로서 널리 존재하며, 상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)일 수 있다.
- [0042] 상기 "디아실글리세롤(DAG)"은 혈중 중성 지방의 상승을 억제하는 작용이 있어서 주목을 받고 있으며, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)일 수 있다.
- [0043] 상기 "트리아실글리세롤(TAG)"은 글리세롤과 3개의 지방산들의 에스테르로서, 자연계에 널리 분포하는 중요한 지질이며, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)일 수 있다.
- [0044] 본 발명자들은 실험 대상의 혈장시료를 흐름 장-흐름 분획법(flow field-flow fractionation, FIFFF)을 이용해 고밀도 지단백(high-density lipoprotein, HDL), 저밀도 지단백(low-density lipoprotein, LDL) 및 초저밀도지단백(very low-density lipoprotein)으로 분리하고 각 지단백 분획을 회수한 후 총 363종의 지질의 분자구조를 식별하고 각각에 대한 정량분석을 수행하였다.
- [0045] 본 발명자들은 HDL 또는 LDL/VLDL 내의 상대적으로 많은 양의 지질 종이면서 정상인군과 비교하여 경도인지장애 환자에서 유의적인 차이가 있으며, 알츠하이머로 진행됨에 따라 점진적으로 감소 또는 증가하는 14개종의 지질

종을 선별하였다.

- [0046] 상기 PE(36:2), DAG(18:1, 18:1), TAG(50:1)은 뇌 자기공명영상(MRI)에서 뇌 위축 및 병변 정도에 따라 분류한 결과 정도에 따라 지단백 내의 지질 양이 점진적으로 증가하였다.
- [0047] 한편, 상기 (b) 단계에서 포스파티딘산(PA)의 대사체 농도를 더 측정할 수 있고, 상기 포스파티딘산은 PA(18:1/22:6)일 수 있다.
- [0048] 상기 “포스파티딘산(PA)”은 글리세롤의 1,2자리에 지방산이 결합하고 3자리에 인산이 결합한 1,2-디아실-sn-글리세로-3-인산에 해당되는 가장 간단한 형태의 글리세로인 지질이다.
- [0049] 상기 PE(36:2), DAG(18:1, 18:1), 및 TAG(50:1)와 함께 PA(18:1/22:6)에 대한 지질 변화 및 MMSE점수를 사용하여 질병을 진단하였을 때 더욱 정확한 결과가 도출되었다.
- [0050] 즉, 상기 대사체의 수준을 추가적으로 분석하고 상기 정상 대조군과 비교함으로써 평가의 신뢰도가 더욱 개선될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 포스파티딜에탄올아민(PE), 디아실글리세롤(DAG), 및 트리아실글리세롤(TAG)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 대사체에 대한 정량장치를 포함하는 알츠하이머병 또는 경도인지장애 진단용 키트가 제공된다.
- [0052] 상기 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 정량장치는 상기 각 대사체의 농도를 측정하기 위한 것으로, 크로마토그래피, 질량분석기 등을 예시할 수 있다.
- [0054] 상기 크로마토그래피는 액체 크로마토그래피(LC), 액체-고체 크로마토그래피(LSC), 종이 크로마토그래피(PC), 박층 크로마토그래피(TLC), 기체-고체 크로마토그래피(GSC), 액체-액체 크로마토그래피(LLC), 포말 크로마토그래피(FC), 유화 크로마토그래피(EC), 기체-액체 크로마토그래피(GLC), 이온 크로마토그래피(IC), 겔 여과 크로마토그래피(GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(GPC)일 수 있고, 바람직하게는 액체 크로마토그래피, 더 바람직하게는 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC, ultra-performance liquid chromatography)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 또한, 상기 질량분석기는 푸리에 변환 질량분석기(FTMS, Fourier transform mass spectrometer)를 사용할 수 있고, 구체적으로 LTQ-Orbitrap-XL 질량분석기를 사용할 수 있다.
- [0056] 상기 크로마토그래피는 분자마다 상이한 이동성을 이용하여 각 대사체를 분리할 수 있고, 상기 질량분석기는 상기 분석 대상의 분자량 정보뿐만 아니라 구조 정보를 통해 대사체를 식별할 수 있다.
- [0057] 상기 포스파티딜에탄올아민은 PE(36:2)이고, 상기 디아실글리세롤은 DAG(18:1, 18:1)이고, 상기 트리아실글리세롤은 TAG(50:1)일 수 있으며, 상기 진단용 키트는 PA(18:1/22:6)에 대한 정량장치를 더 포함할 수 있다.
- [0058] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 기술한다.
- [0059] **실험 준비**
- [0060] 혈장 시료는 IRB(Institutional Review Board)의 승인을 얻어 대학제후 종합병원(university affiliated general hospital)에서 제공받았으며 평균 나이 73세 여성의 혈장 시료를 정상인(n=13), 경도인지장애(MCI, n=23), 알츠하이머 환자(AD, n=14)로 분류하였다(표 1).

표 1

구분	대조군(n=13)	경도인지장애(n=23)	알츠하이머(n=14)
나이(years)	71.5 ± 3.6	72.5 ± 3.1	72.6 ± 3.1
성별	female	female	female
교육(년)	9.8 ± 3.8	7.2 ± 4.9	5.3 ± 4.0
MMSE	27.4 ± 2.1	22.9 ± 3.8	18.9 ± 3.8
CDR-GS	CDR 0	6 (46%)	0
		0	0

	CDR 0.5	7 (54%)	22 (96%)	8 (57%)
	CDR 1	0	1 (4%)	6 (43%)
CDR-SB		0.4 ± 0.5	2.0 ± 0.7	3.9 ± 1.7
APOE 4		3 (23%)	4 (18%)	6 (43%)
공복혈당(mg/dL)		100.3 ± 6.8	95.8 ± 8.0	100.2 ± 11.1
BMI(kg/m ²)		23.6 ± 1.9	23.8 ± 2.8	24.1 ± 3.8
총콜레스테롤(mg/dL)		192.5 ± 34.8	181.8 ± 42.4	204.1 ± 45.4
TG(mg/dL)		97.2 ± 32.3	110.1 ± 57.6	171.3 ± 103.0
HDL-C(mg/dL)		54.8 ± 11.1	53.9 ± 19.4	49.7 ± 12.3
LDL-C(mg/dL)		121.8 ± 33.4	109.5 ± 39.4	131.3 ± 40.3

- [0062] Wyatt Technology Europe GmbH(Dernbach, Germany)社에서 구입한Eclipse[®] Channel SP3 모델의 semi-preparative 비대칭 흐름 장-흐름 분획 채널(AF4)은 많은 양을 분취 받을 수 있는 용도로 제작되었다.시료를 분리할 수 있는 공간인 spacer는 250 μm 두께의 PVC(polyvinyl chloride) 소재로 폭이 일정하게 감소하는 사다리꼴 모양이며, 총 26.6 cm 의 길이로 inlet쪽 폭은 4.4 cm, outlet 쪽 폭은 0.4 cm이다.
- [0063] Millipore(Danvers, MA)에서 구입한 분획분자량이 10 kDa인 Regenerated cellulose(RC) 멤브레인을 사용하였다.
- [0064] AF4 채널 시스템은 영린社의 SP930D HPLC 펌프를 이용하여 carrier solution인 0.1 M PBS(phosphate buffered saline)의 흐름 방향 조절을 통해 시료를 분리하였으며, 초순수 증류수(> 18 MΩΩcm)를 EMD Millipore(Billerica, MA, USA)社의 0.22 μm 니트로 셀룰로오스 멤브레인 필터로 여과한 후 사용하였다.
- [0065] 실험조건은 V_{in}/V_{out}는 4.0/0.4(mL/min) 유속을 사용하여 혈장 지단백 입자들의 크기에 따라 분리된 시료들은 영린社(서울, 한국)의 YL9120 UV 검출기로 검출 후 Autochro-Win 3.0 plus 소프트웨어를 사용하여 기록하였다.
- [0066] 사람 혈장 내에는 수 많은 단백질들이 존재하기 때문에 Sigma에서 구입한 ProteoPrep[®] Immunoaffinity Albumin & IgG Depletion Kit를 통해 high abundance protein인 IgG와 albumin을 제거한 후 사용하였다.
- [0067] 분리조건 및 지단백 입자 회수에 필요한 머무름 시간 확립을 위해 혈장시료 내의 지단백 입자를 Sudan Black B(SBB)로 선택적으로 염색하였고, 분리시 영린社에서 구입한 730D UV 검출기로(600nm) 시료의 머무름 시간을 확인하였다.
- [0068] 지질 분리를 위해 염색하지 않은 온전한 혈장시료 총 100 μL를 주입하여 확립된 시간 동안 지단백을 분취 받았다.
- [0069] **실험 결과**
- [0070] **지단백 분리**
- [0071] 지질 분석은 모두 초고성능 액체크로마토그래피-전기분무이온화-질량분석기 시스템을 이용하여 정성 및 정량분석 두 단계로 수행되었다.
- [0072] 정성분석의 경우 Dionex Ultimate 3000 RSLCnano system을 LC모델로서 사용하였고, 질량분석기는 Thermo Scientific(San Jose, CA, USA)社의 LTQ Velos 이온 트랩 질량 분석기를 사용하였다.
- [0073] 각 군 별로 풀링한 시료의 지단백 내 지질 추출물을 각 지질 종마다 특징적으로 나타나는 CID fragment pattern에 따라서 지질 종을 식별하였으며, 자체 개발한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램인 LiPilot을 사용해 정성 분석하였다.
- [0074] 정성 분석한 지질 종들만 선택적으로 정량하는 SRM(selected reaction monitoring) 모드로 정량분석을 수행하였고, LC는 Waters(Milford, MA)社의 nanoACQUITY UPLC를 사용하였고, 질량분석기는 Thermo Scientific社의 TSQ Vantage triple stage quadrupole 질량분석기를 사용하였다.
- [0075] 총 7 cm 길이의 homemade 모세관 컬럼을 분석 컬럼으로 사용하였다. Polymicro Technologies, LLC(Phoenix, AZ)에서 구입한 내경이 100 μm인 모세관을 torch를 이용하여 길게 뽑아낸 후 끝 부분을 잘라 콘형태로 만들었다.

- [0076] 높은 압력에서도 컬럼의 bead가 빠져나가지 않도록 Isu Industry Corp(서울, 대한민국)에서 구입한 3 μm 크기의 Watchers[®] ODS-P C-18 particles(100Å)을 모세관 끝부분에 약 0.5cm정도 충전시킨 후 Water社에서 구입한 1.7 μm 크기의 BEH(ACQUITY UPLC ethylene bridged hybrid) C18 particles(2.1mm x 100 mm) 충전물을 약 6.5cm의 길이로 질소가스 압력에서 채워주었다.
- [0077] 지질 분리는 기울기 용리법을 통해 극성이 높은 순서로 분리되므로, 각각 H₂O:ACN(9:1, v/v), IPA:CH₃OH:ACN(6:2:2, v/v/v)을 이동상 A 및 B로 사용하고, 이온화매개체(ionization modifier)로 5 mM ammonium formate 및 0.05% ammonium hydroxide 혼합액을 두 이동상에 각각 첨가하였다.
- [0078] 정성 분석을 위해 IDEX Health & Science(Oak Harbor, WA, USA)社에서 구입한 stainless steel 소재의 microcross에 분석 컬럼과 펌프로부터 flow를 유도하는 모세관을 연결하였다.
- [0079] 다른 한쪽에는 ESI voltage를 형성하는 Pt wire를 연결하고, 나머지 한쪽에는 split flow를 조절하는 on-off 밸브를 연결하였다.
- [0080] 시료의 loading을 위하여 on-off 밸브를 닫은 후 15분 동안 650 nL/min의 유속으로 이동상 A 100%를 분석 컬럼에 흘려주고, on-off 밸브를 열어 펌프로부터 오는 유속을 6.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 증가시켜 분석 컬럼에는 약 300 nL/min의 유속이 흐르도록 하였다.
- [0081] 이동상 B를 2분 동안 40%로 조성을 변화시킨 후, 10분/6분(양이온/음이온 모드)동안 80%, 20분/10분 동안 99%로 상승시킨 후 10분/15분 동안 같은 조성에서 유지시켰다.
- [0082] 마지막으로 이동상 A의 조성을 99%로 전환하여 7분 동안 흘려주었다.
- [0083] 정량 분석은 양이온, 음이온 모드를 동시 분석이 가능하며 정성분석과 동일하게 on-off 밸브를 닫고 시료를 15 분동안 0.7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 이동상 A의 조성을 99%로 분석 컬럼에 loading한 후, 다시 on-off 밸브를 열어 펌프로부터 오는 유속을 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 증가시켜 분석 컬럼으로 300 nL/min의 유속이 전달되도록 하였다.
- [0084] 이동상 B를 1분간 50%, 10분간 80%, 15분간 100%로 상승시킨 후 다시 15분 동안 유지한 후 이동상 A를 100%로 5 분 동안 재조정하였다.
- [0085] 정량 분석시 LPG, PG, LPI, PI, LPA, PA, 그리고 CL는 음이온 모드, LPC, PC, LPE, PE, PEp, DAG, TAG, Cer, SM, MHC, DHC, 그리고 ST는 양이온 모드에서 검출하였다. 충돌에너지는 각 지질 종마다 최적화된 값으로 다음과 같이 설정하였다.
- [0086] 20 V - LPE, PE, PEp; 25 V - LPA, LPC; 30 V - LPG; 35 V - PG, DAG, TAG; 40 V - PA, CL, PC, Cer, SM, MHC, DHC, ST; 50 V - LPI, PI. 생체 내 존재 하지 않는 홀수 체인을 갖는 Internal standard(IS)를 각 지질의 종류에 따라 첨가하고, 개별 지질이 갖는 면적을 IS의 피크 면적으로 나눈 보정 값으로 지질의 양을 계산하여 정량 분석을 수행하였다.
- [0087] 총 363개의 지질 종을 정성 및 정량분석 하였으며(표 2), 지질 종들은 Minitab 17 소프트웨어 및 SPSS 소프트웨어(version 24.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 사용하여 PCA, student's t-test, 그리고 ROC curve를 이용해 통계분석을 수행하였다.
- [0088] 도 1은 흐름 장-흐름 분획법을 이용하여 개별시료 각 그룹간의 경향성을 나타낸 결과이다. 환자군은 정상군과 비교하여 LDL/VLDL의 양이 많이 존재하는 것을 볼 수 있었지만, 환자군인 경도인지장애 그리고 알츠하이머 환자 두 군 간에 큰 차이는 보이지 않았다.
- [0089] 특히, AD 1, 2 와 같이 개별시료가 같은 경도인지장애 혹은 알츠하이머 환자군에 속하더라도 개개인이 가지고 있는 LDL과 VLDL 양의 편차가 컸다.
- [0090] 따라서, LDL 및 VLDL을 구분하지 않고 합쳐서 회수하여, HDL 과 LDL/VLDL 두 개의 지단백 분획을 얻어 지질분석을 수행하였다.
- [0091] 정량/검출된 지질 수

표 2

구분	지질 수	구분	지질 수	구분	지질 수	
LPC	11	LPG	3	MHC	5	

PC	33/59	PG	16	DHC	3	
LPE	6	LPI	7	CL	4	
PE	15/20	PI	21	DAG	20	
PEp	15	ST	4	TAG	50/125	
LPA	4	SM	16			
PA	14	Cer	10			
합계		257/363				

[0093] 도 2는 정성 및 정량분석을 수행한 363개의 지질 중을 대상으로 정상군과 비교하여 환자군인 경도인지장애, 및 알츠하이머 환자군에서 얼마나 증감하였는지 나타내는 비율인 fold change와 이 결과가 신뢰할 만한 데이터인지 의미하는 p-value값을 각 각 x, y축으로 나타낸 Volcano plot이다. x축의 경우 0값에 가까이 존재 할수록 정상군과 대조하여 큰 차이가 없다는 것을 의미하며, -1보다 더 작은 값에 위치 할 수록 2배 이상 감소하고, 1보다 더 큰 값에 존재 할수록 2배 이상 증가한다는 것을 나타낸다.

[0094] y축의 경우 p-value으로 값이 클수록 두 군 간의 큰 차이가 있다는 것을 의미한다.

[0095] 따라서, HDL 내 지질 중에서는 두 환자군 모두 감소하거나 증가하는 두 경향성을 보이는 반면, LDL/VLDL 내 지질 중에서는 대부분 증가하며, 의미있는 차이를 가지는 지질 종이 더 많이 존재하는 것을 의미한다.

[0096] 분석 결과

[0097] 도 3은 stacked bar graph로 정량 분석한 모든 지단백 내 지질 중에서 정상군을 기준으로 상대적으로 양이 많은 지질 종들만 그래프에 명시하였으며 나머지 지질 종은 “low “로 표기하였다.

[0098] HDL의 경우 DAG, PI, PE, Cer, 및 CL 종은 병이 진행됨에 따라 점진적인 증가 혹은 감소하는 경향성을 보였지만 그 외의 종에서는 변화가 없는 모습을 보였다.

[0099] 반면, LDL/VLDL에서는 TAG, PA, PI, PE, PEp, SM, Cer, 그리고 MHC종에서 점진적으로 증가하는 경향을 보였다.

[0100] 도 4는 분획 받은 HDL과 LDL/VLDL내에서 정상인군과 비교하여 경도인지장애, 및 알츠하이머 환자군에서 2배 이상 차이가 있으며 $p < 0.01$ 인 지질 종에 대해 수행한 주성분 분석(Principal component analysis, PCA) 결과이다.

[0101] PCA는 세 군간에 큰 분산 차이를 보이는 축이 x축, 그 다음으로 차이가 있는 축이 y축으로 설정되기 때문에 서로 다른 군간에 군집되어 있는 분포 구간이 분산되어 있을수록 차이가 있다.

[0102] PCA plot은 HDL에서는 세 군간에 큰 차이가 없으나, LDL/VLDL에서는 뚜렷한 차이를 나타내었다.

[0103] 표 3은 정상군을 기준으로 상대적으로 양이 많이 존재하는 지질 종이고, 2배 이상 차이를 보이며 $p < 0.01$ 인 의미 있는 변화를 가지는 종만 분류하였다.

[0104] 알츠하이머로 진행됨에 따라서 점진적인 증감 변화양상을 가지는 지질 종을 선택하여 도 5에 나타냈다. 정상군과 환자군 사이에 $p < 0.01$ 라는 의미 있는 차이를 보이는 종은 *, 환자 군간에 차이를 보이는 종은 †로 표시하였다.

[0105] 총 14종이 선택되었으며 18:1, 22:6-DAG는 HDL에서만 2배 이상 크게 감소하였고, TAG(50:1)는 두 지단백 모두에서 증가하는 경향성을 보였다.

[0106] 나머지 12개의 지질 종들은 LDL/VLDL에서만 증가하였다.

표 3

[0107]

구분	chain	m/z	HDL			LDL/ VLDL		
			MCI / Control	AD / Control	(%)	MCI / Control	AD / Control	(%)
LPC	16:0	496.5	0.71 ± 0.03	1.00 ± 0.05	48.84	1.34 ± 0.05	2.13 ± 0.10*	36.59

PE	34:2	716.5	1.43 ± 0.07	1.86 ± 0.09*	<u>6.90</u>	1.95 ± 0.12*	4.50 ± 0.32*	<u>6.93</u>
	36:2	744.5	1.52 ± 0.16	1.98 ± 0.21*	<u>10.70</u>	1.81 ± 0.09*	4.65 ± 0.31*	<u>12.31</u>
	38:4	768.5	1.10 ± 0.04	0.87 ± 0.04	<u>11.84</u>	1.67 ± 0.09*	2.19 ± 0.15*	<u>11.36</u>
	38:5	766.5	0.99 ± 0.05	1.01 ± 0.05	<u>14.48</u>	1.68 ± 0.14*	2.44 ± 0.22*	<u>10.43</u>
	40:6	792.5	1.15 ± 0.06	1.02 ± 0.05	<u>9.65</u>	1.57 ± 0.13	2.10 ± 0.18*	<u>11.01</u>
PEp	16:0p/20:4	724.5	1.34 ± 0.08	1.11 ± 0.06	<u>12.27</u>	1.44 ± 0.09	2.38 ± 0.16*	<u>14.00</u>
	18:0p/20:4	752.5	1.28 ± 0.12	1.07 ± 0.08	<u>22.78</u>	1.34 ± 0.08	2.69 ± 0.17*	<u>20.63</u>
LPA	16:0	409.5	0.38 ± 0.01*	0.97 ± 0.04	<u>43.87</u>	1.18 ± 0.04	2.57 ± 0.13*	<u>42.84</u>
LPA	18:0	437.5	0.26 ± 0.02*	0.52 ± 0.04*	<u>38.36</u>	1.38 ± 0.09	0.90 ± 0.06	<u>52.81</u>
PA	18:1/22:6	745.5	0.93 ± 0.04	1.32 ± 0.08	<u>54.68</u>	1.92 ± 0.08*	3.01 ± 0.14*	<u>49.98</u>
PG	16:0/18:3	743.5	0.90 ± 0.04	0.53 ± 0.03	<u>10.05</u>	2.59 ± 0.19*	2.04 ± 0.14*	<u>12.98</u>
	18:1/16:0	747.5	0.80 ± 0.03	0.48 ± 0.02	<u>21.74</u>	2.74 ± 0.12*	2.00 ± 0.09*	<u>31.59</u>
	18:2/18:1	771.5	0.69 ± 0.03	0.40 ± 0.02	<u>21.56</u>	3.28 ± 0.19*	2.40 ± 0.15*	<u>20.02</u>
LPI	18:2	595.5	0.09 ± 0.01*	0.19 ± 0.01*	<u>85.40</u>	0.72 ± 0.05	0.36 ± 0.03	<u>21.83</u>
PI	18:0/20:4	885.5	1.45 ± 0.04	0.90 ± 0.03	<u>17.17</u>	2.10 ± 0.08*	2.61 ± 0.09*	<u>19.84</u>
	18:1/16:1	833.5	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.03	<u>14.74</u>	1.65 ± 0.08*	3.77 ± 0.16*	<u>13.55</u>
	18:2/16:1	831.5	0.74 ± 0.05	0.62 ± 0.04	<u>37.97</u>	2.09 ± 0.08*	2.24 ± 0.12*	<u>39.68</u>
Cer	d18:1/22:0	622.5	1.05 ± 0.15	0.77 ± 0.16	<u>10.48</u>	2.06 ± 0.22*	3.08 ± 0.31*	6.71
	d18:1/24:0	650.5	1.01 ± 0.14	0.61 ± 0.08	<u>40.99</u>	1.60 ± 0.11	2.01 ± 0.12*	<u>45.88</u>
	d18:1/24:1	648.5	0.87 ± 0.07	0.47 ± 0.05*	<u>21.28</u>	2.09 ± 0.41*	2.31 ± 0.45*	<u>14.45</u>
MHC	d18:1/24:0	812.5	1.00 ± 0.12	0.83 ± 0.10	<u>40.36</u>	2.70 ± 0.45*	3.02 ± 0.23*	<u>31.33</u>
DHC	d18:1/24:1	972.5	0.74 ± 0.07	0.87 ± 0.07	<u>48.04</u>	1.59 ± 0.13	2.29 ± 0.21*	19.36
DAG	18:0, 22:6	686.5	0.31 ± 0.04*	0.20 ± 0.02*	<u>55.20</u>	0.47 ± 0.06*	1.21 ± 0.11	<u>52.48</u>
	18:1, 18:1	638.5	1.00 ± 0.09	1.14 ± 0.10	<u>8.67</u>	1.96 ± 0.12*	2.57 ± 0.14*	<u>7.33</u>
	18:1, 18:2	636.5	0.77 ± 0.05	0.78 ± 0.05	<u>7.51</u>	2.57 ± 0.13*	2.14 ± 0.09*	<u>5.16</u>
TAG	50:1	850.8	1.84 ± 0.15*	1.93 ± 0.14*	<u>4.37</u>	1.61 ± 0.10	2.37 ± 0.17*	<u>4.65</u>
	50:2	848.8	1.28 ± 0.07	2.39 ± 0.14*	<u>2.99</u>	1.42 ± 0.09	1.80 ± 0.13	<u>3.81</u>

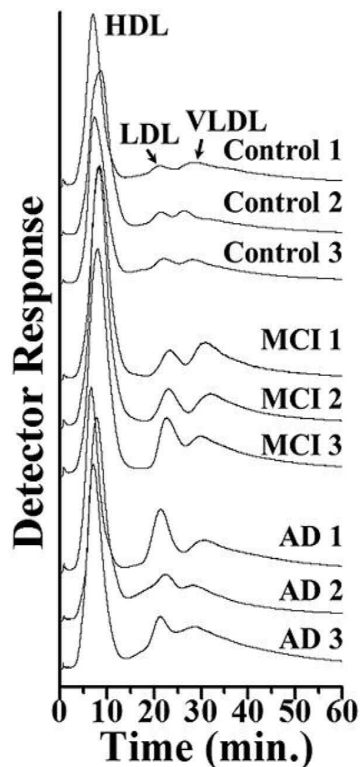
[0108]

실제 임상적으로 알츠하이머를 판단하는 기준 중 하나로 사용되고 있는 MRI 상의 결과와 도 5의 지질 종들 중 선택된 지질들 간의 상관관계를 도 6에 나타냈다. PVWML(Periventricular white matter lesion)는 뇌실부위 백색질 병변 정도, DWML(Deep white matter lesion)는 뇌실 주변이 아닌 다른 백색질 병변 정도, RMTA(Right medial temporal lobe atrophy)는 오른쪽 내측측두엽 위축 정도, LMTA(Left medial temporal lobe atrophy)는 왼쪽 내측측두엽 위축 정도를 의미하며 뇌 병변 정도는 0 내지 3, 위축 정도는 0 내지 2의 범위로 수치가 증가할수록 정도가 심해진다는 것을 의미한다.

- [0109] 도 6는 질병 단계와 상관없이 뇌 병변 및 위축 정도에 따라서 분류하였으며, 14개 지질 중들 중 TAG(50:1), DAG(18:1, 18:1), 및 PE(36:2) 세 종에서 점진적으로 증가하는 양상을 띠었다.
- [0110] 특히, LDL/VLDL에서 큰 변화폭을 보였으며 대부분 약 2 내지 4배 이상 증가하였다.
- [0111] 도 7을 참조하면, Receiver operating characteristic(ROC) curve을 통해 문진법만 사용하여 질병을 진단할 때 보다 문진법과 상기 3종의 지질을 같이 사용하여 진단하였을 때 더욱 정확한 진단 결과가 도출될 수 있다.
- [0112] AUC(ROC curve의 area under curve) 면적에 따라서 진단의 정확도를 가늠할 수 있으며, 1에 가까운 수치를 나타낼수록 정확하다고 판단할 수 있다.
- [0113] 도 7은 경도인지장애 환자의 LDL/VLDL에 대하여 도 6에서 바이오마커 후보군으로 설정한 TAG(50:1), DAG(18:1, 18:1), PE(36:2) 외에 PA(18:1/22:6)를 추가하여 4종의 지질에 대한 ROC curve를 수행한 결과이다.
- [0114] 기존 알츠하이머를 진단하는 문진법 중 하나인 간이정신상태검사(MMSE) 만으로 질병을 진단 하였을 때, AUC 값은 0.800 인 반면, MMSE와 네 가지 지질 중을 같이 사용하여 정상군, 경도인지장애 환자군을 진단하는 경우 더욱 정확한 결과가 도출되었다.
- [0115] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0116] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

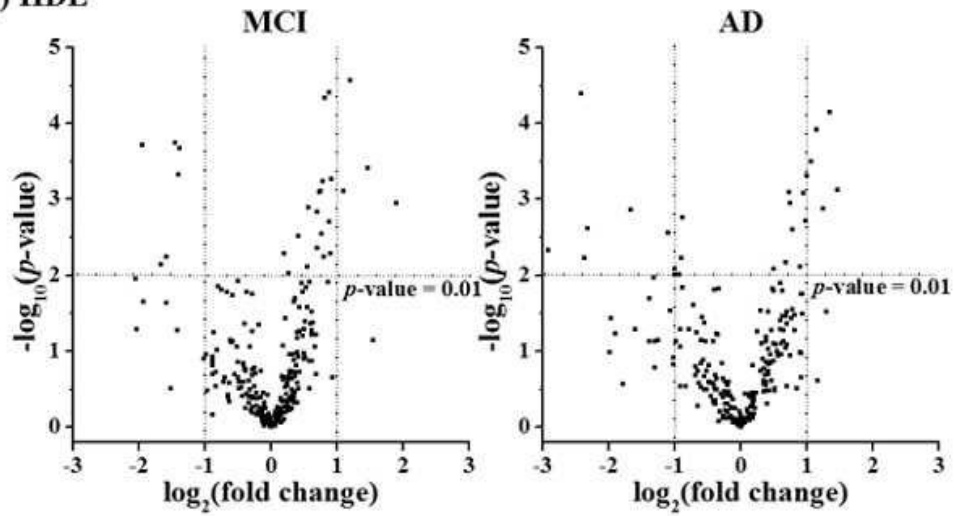
도면

도면1

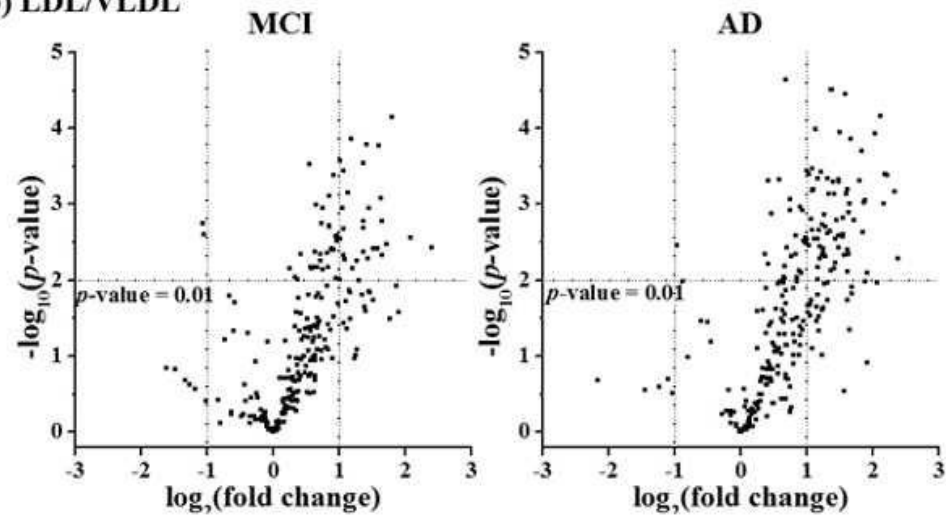


도면2

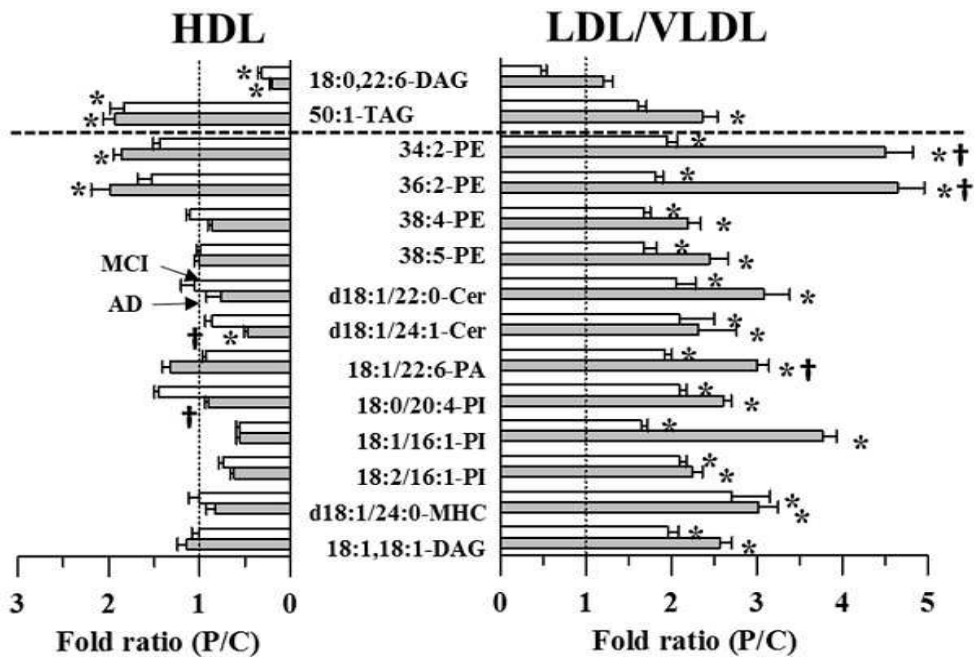
a) HDL



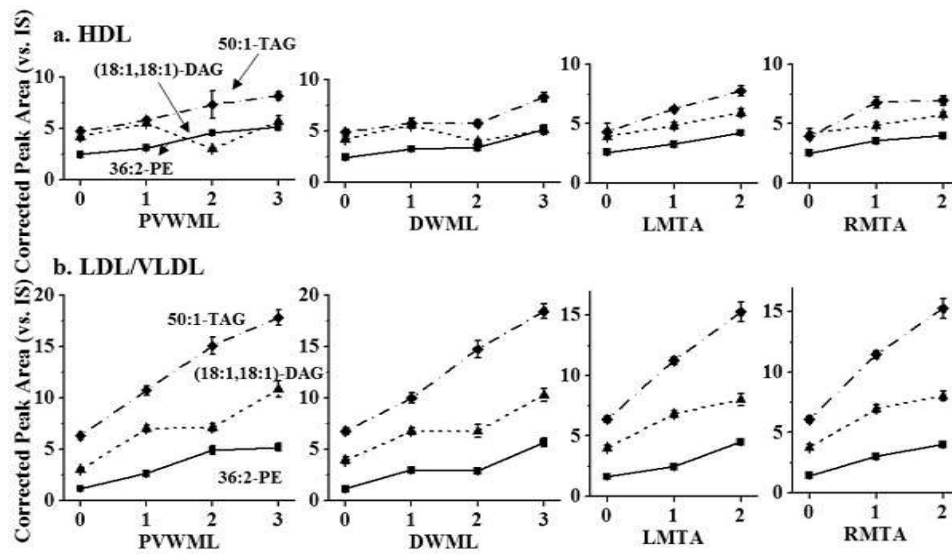
b) LDL/VLDL



도면5



도면6



도면7

