



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0077779  
(43) 공개일자 2020년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2333/4709 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0167008

(22) 출원일자 2018년12월21일

심사청구일자 2018년12월21일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김현정

서울특별시 양천구 오목로 100-6, 501호(신월동, 오진참사랑)

김어수

서울특별시 종로구 자하문로35길 22, 303호(청운동, 효성빌라)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

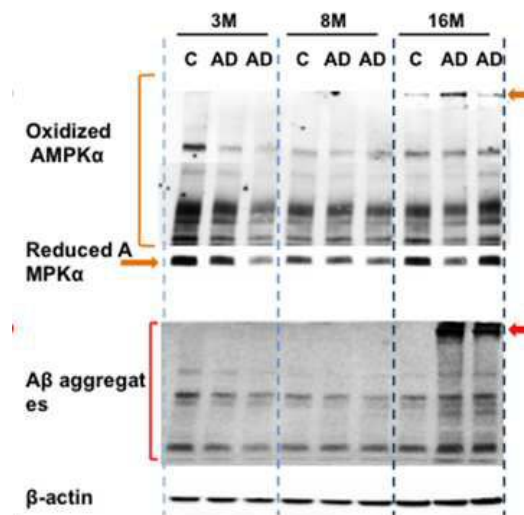
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 뇌질환 발병 위험성 예측용 조성물 및 이를 이용한 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물 및 이를 이용한 퇴행성 뇌질환의 위험성을 예측하는 방법에 관한 것으로, 본 발명은 뇌 조직, 뇌 척수액과 같은 시료에 비해, 비교적 채취가 용이한 생물학적 시료에서 산화된 AMPK를 측정함으로써, 퇴행성 뇌질환을 정확하고, 비교적 간편하게 발병 위험성을 예측할 수 있다. 특히 상기 본 발명과, 간이인지검사와 같이 간단한 인지기능검사 결과를 함께 이용하는 경우 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측 정확도를 현저하게 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2333/912 (2013.01)  
G01N 2500/04 (2013.01)  
G01N 2800/2814 (2013.01)  
G01N 2800/50 (2013.01)

**조소연**

서울특별시 서대문구 연희로14길 45, 403호(  
연희동, 화이트빌)

(72) 발명자

**이지민**

경기도 성남시 분당구 미금일로 136, 506동 301호  
(구미동, 까치마을건영빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1D1A1A02061664

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업\_ 기본연구지원(한국형SGER)

연구과제명 치매 약물 개발을 위한 대사조절 중심 단백 AMPK의 조절 전략 탐구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

산화된 AMPK(AMP-activated protein kinase) 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions) 및 세포 추출물(cell extract)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 생물학적 시료에서 단백질이 존재하는 수준을 측정하기 위한 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 세포는 심근 조직, 간 조직 및 근육 조직으로부터 분리된 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 산화된 AMPK 단백질은 AMPK 단백질을 구성하는 서브유닛(subunit)의 시스테인 잔기가 산화된 형태인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 산화된 AMPK 단백질은 산화된 시스테인의 측쇄와,

상기 산화된 시스테인과는 다른 아미노산의 측쇄가 결합된 형태인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 산화된 AMPK를 구성하는 서브유닛은  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$  서브유닛으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 타우(Tau), 인산화된 타우(Tau), 아밀로이드  $\beta$  (Amyloid  $\beta$ ), 아포리포단백질 E(apolipoprotein E) 또는 APP(amyloid precursor protein)/ 아밀로이드  $\beta$ 의 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제를 더 포함

하는 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 피크병 및 크로이츠펔트-야콥 병으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 아밀로이드  $\beta$  펩타이드 축적에 의해 뇌 신경세포의 손상이 유발된 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물.

#### 청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 키트.

#### 청구항 12

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 전혈, 백혈구, 말초혈액 단핵 세포, 백혈구 연층, 혈장 및 혈청을 포함하는 혈액, 객담, 눈물, 점액, 세비액, 비강 흡인물, 호흡, 소변, 정액, 침, 복강 세척액, 골반 내 유체액, 낭종액, 양수, 선액, 췌장액, 림프액, 흉수, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 활액, 관절 흡인물, 기관 분비물 및 세포 추출물로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴행성 신경 질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 산화된 AMPK 단백질은 AMPK 단백질을 구성하는 서브유닛의 시스테인 잔기가 산화된 형태인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 산화된 AMPK 단백질은 산화된 시스테인의 측쇄와,

상기 산화된 시스테인과는 다른 아미노산의 측쇄가 결합된 형태인 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 16

제 12항에 있어서,

상기 목적하는 개체의 생물학적 시료에서 측정된 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준이, 정상 대조군에 비하여 증가되어 있는 경우 상기 목적하는 개체에서 퇴행성 뇌질환이 발병되었거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 17

제 12항에 있어서,

상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블롯 분석(western blot assay), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학 염색법(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)으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 방법에 의해 수행되는 것인, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 단백질의 비-환원 조건에서 수행되는 것인, 퇴행성 신경 질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 19

제 12항에 있어서,

상기 측정하는 단계는 타우, 인산화된 타우, 아밀로이드  $\beta$ , 아포리포단백질 E 및 APP/ 아밀로이드  $\beta$ 의 단백질이 존재하는 수준을 추가로 측정하는 것인, 퇴행성 신경 질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 20

제 12항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 파킨슨 및 크로이츠펔트-야콥 병으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 퇴행성 신경 질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법.

#### 청구항 21

퇴행성 뇌질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 생물학적 시료에서 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 22

제 21항에 있어서,

상기 후보물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준이 감소하거나, 정상 대조군에서 분리된 생물학적 시료에서 측정된 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준에 비하여 감소하는 경우, 상기 후보물질을 퇴행성 신경 질환 치료제로 선별하는 단계를 더 포함하는 것인, 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 23

제 21항에 있어서,

상기 산화된 AMPK 단백질은 AMPK 단백질을 구성하는 서브유닛의 시스테인 잔기가 산화된 형태인 것인, 퇴행성

뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물 및 이를 이용한 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease)은 진행성 뇌 질환으로, 기억력과 언어력, 그리고 시간과 공간을 인식하는 능력이 점차적으로 감소하여 결국은 혼자서 자신을 돌볼 수 없는 상태가 되는 심각한 질환이다. 1906년에 독일인 의사인 알로이스 알츠하이머에 의해서 처음 기술된 이 병은 처음에는 젊은 사람들에게서만 발생하는 매우 희귀한 질환으로 생각되었으나, 요즘은 65세 이상의 사람들에게서 지적 능력의 소실을 일으키는 가장 흔한 질환이라는 것이 밝혀졌다. 알츠하이머병은 30대 내지 50대에서도 발병 가능하나, 전체 알츠하이머병 환자의 5% 정도 이하이고 대부분의 환자들은 60대 이상이 되어서 발생된다. 65세 이전에 발생하는 알츠하이머병은 조발성 알츠하이머병이라고 부르는데, 65세 이후에 발생하는 경우에 비해 유전적 경향이 강하다. 하지만 나이가 들어감에 따라 알츠하이머 질환의 발생률이 높아지기 때문에, 알츠하이머 질환은 정상적인 노화와 달리 병적인 퇴행성 뇌 신경 변화로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 알츠하이머 질환은 치매 중 50 내지 70%를 차지하는 가장 흔한 형태로, 4백만 명의 미국인과 전 세계적으로 거의 15백만 명이 겪고 있는 심각한 질환이다. 알츠하이머 질환은 개인적으로 엄청난 피해와 고통을 주지만, 사회적으로도 많은 문제를 야기하게 되는데, 특히 이 질병의 후기 환자는 그 보호자에게 엄청난 부담을 주게 된다. 상당한 경제적 비용이 보존적 치료(Supportive care) 및 수용시설 입원을 통해 사용되게 된다. 사회에서 노인 인구의 비율이 급속하게 증가한다는 것은 알츠하이머 질환에 걸리는 환자수가 급격하게 증가한다는 것을 의미하고, 이런 이유로 알츠하이머 질환의 조기 진단과 치료법의 발견은 전 세계적으로 중요한 이슈가 되고 있다. 하지만, 다양한 병인으로 일어나는 알츠하이머 질환의 정확한 원인을 결정하는 진단 과정은 매우 난해할 뿐 아니라, 현재 실시되고 있는 검사들로 알츠하이머 질환과 다른 유형의 치매를 구별하는 것 또한 어려운 실정이다.

[0004] 현재 치매의 선별 진단 검사에는 MMSE(Mini Mental State Examination)와 같은 정신상태학적 검사 및 CDR(Clinical dementia rating)과 같은 중증도 평가 방법 등이 이용되고 있다. 상기 MMSE 검사를 이용한 알츠하이머 질환의 진단은 선별을 위한 비교적 간단한 방법인 반면, 정확한 정보를 얻기 위해서는 신경심리검사 등 다양한 검사가 병행되어야 하므로 MMSE 검사 단독을 통해 치매를 확진하거나, 치매 유형을 구별하기에는 어려움이 존재한다. 현재는 신경심리검사를 통해 인지기능의 장애 여부를 판단하고, 추가적으로 여러 생체 마커(뇌영상 검사, 뇌척수액 검사 등)에 대한 정보를 활용하여 진단 여부 및 치매 유형에 대한 가능성 수준을 결정하는 방식으로 임상적 진단을 하게 된다. 즉 치매의 확진은 사후 뇌부검을 통해 이루어지는 것이기 때문에, 임상적인 진단에서는 최대한 정확한 진단과 유형 파악을 위해 '인지기능검사결과 + 생체 마커 정보'라는 형식을 취하게 된다. 이 때 생체 마커에 대한 정보는 인지기능검사 결과만으로 진단했을 때보다 진단 정확도를 높이기 위한 부가 정보로 이용되는 것이다. 즉 치매 진단에 있어서 생체 마커의 기능은 그 자체로서 진단적 의미를 갖는 것이라기보다 인지기능검사 결과의 진단 예측력을 높이는 것이라고 할 수 있다.

[0005] 한편, 알츠하이머 질환을 초기에 진단하기 위해 이용되는 생체 마커로는 뇌자기공명영상 촬영, 뇌양전자방출단층촬영(포도당 대사 혹은 아밀로이드, 타우 축적 평가), 뇌척수액검사 (아밀로이드 및 타우 농도 측정) 등이 있다. 이러한 검사는 매우 고가이거나 일부 대형병원에서만 시행할 수 있다는 문제점, 그리고 뇌척수액검사처럼 침습적이고 심리적 거부감이 높다는 한계점이 있다. 이러한 면에서 간편 시료인 혈액을 이용하여 검사가 가능한 혈장 내 마커가 존재한다면, 초기에 알츠하이머 질환의 발병 가능성을 예측하기 위해, 특히 지역사회에서 많은 수의 노인을 대상으로 하는 스크리닝(선별) 검사에서 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 하지만 아직 신뢰성 있게 이용할 수 있는 말초혈액에서 확인할 수 있는 마커는 전무한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 산화된 AMPK(AMP-activated protein kinase) 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 체제를

포함하는, 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물을 제공한다.

- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 발병 위험성 예측용 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 키트를 제공한다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 비교적 시료의 채취가 용이한 혈액 및 근육 조직 시료에서 AMPK(AMP-activated protein kinase)  $\alpha$ 의 시스테인 잔기가 산화되어, 상기 산화된 시스테인과는 다른 아미노산의 측쇄와, 상기 산화된 시스테인의 측쇄가 결합된 형태로 구성된 단백질의 측정을 통해 뇌의 해마 조직에서 퇴행성 뇌질환의 병리 관련 단백질의 존재 수준을 매우 정확하게 예측하고, 이를 이용하여 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성을 예측할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 본 발명의 일 구현 예에서는 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 상기 조성물은 산화된 AMPK(AMP-activated protein kinase) 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 상기 발병 위험성 예측이란, 목적하는 대상체에 대하여 질환이 발병할 가능성이 있는지, 발병 가능성이 상대적으로 높은지 또는 이미 질환이 발병 하였는지 여부를 판별하는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 퇴행성 뇌질환의 발병 가능성이 존재 또는 높거나, 이미 퇴행성 질환이 발병한 경우를 판별하는 것일 수 있다. 이와 같이, 발병 위험성을 예측함으로써 퇴행성 뇌질환 발병 위험성이 높은 사람을 선별함으로써, 초기에 적절한 조치를 통해 발병 시기를 늦추는 치료 방법 등을 제공할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 상기 AMPK 단백질은 세포 에너지가 낮을 때, 주로 포도당과 지방산 흡수와 산화를 활성화 하기 위한 항상성을 유지하는 기능을 갖는 효소로서, 상기 AMPK 단백질은  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$  서브유닛(Subunit)에 의해 형성되는 헤테로 단백질 복합체로 구성될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 상기 산화된 AMPK 단백질은, 퇴행성 뇌질환에서 발생할 수 있는 산화 스트레스 조건에서, 상기 AMPK 단백질을 구성하는 아미노산 중 시스테인 잔기의 측쇄들이 산화된 후, 주변의 다른 AMPK 단백질들이 가진 산화된 시스테인 잔기의 측쇄들과 서로 간의 결합을 이루는 형태를 의미하는 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 AMPK  $\alpha$  서브유닛에 존재하는 시스테인 잔기의 티올기가 산화된 후,  $\alpha$  서브유닛과 동일한 또는 상이한 서브유닛에 존재하는 다른 아미노산의 측쇄와 결합된 형태일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 AMPK  $\alpha$  서브유닛에 존재하는 시스테인 잔기의 티올기가 산화된 후  $\alpha$  서브유닛에 존재하는 다른 아미노산과 결합된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 상기 AMPK  $\alpha$  서브유닛은 PRKAA1 및 PRKAA2 유전자에 의해 암호화되는 단백질로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는  $\alpha 1$  및 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는  $\alpha 2$  아형을 포함할 수 있다. 상기 AMPK  $\alpha$  서브유닛은 N-터미널에 측쇄 도메인을 포함하고 있는 서브유닛으로서, 신장, 폐, 지방, 근육, 간 등의 다양한 장기에 분포되어 있다. 따라서, 본 발명의 상기 산화된 AMPK  $\alpha$  서브유닛을 측정하는 경우, 비교적 국소적인 부위에 분포되어 있는 AMPK의 다른 서브유닛에 비하여 보다 다양한 시료에서 손쉽게 측정할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 상기 티올기가 결합되는 다른 아미노산이 티올기를 갖는 아미노산 잔기인 경우 이황화 결합을 통해 결합될 수 있고, 티올기를 갖지 않는 경우에는 아마이드 결합을 통해 결합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적상 상기 산화된 AMPK 단백질은,  $\alpha$  서브유닛에 존재하는 시스테인 잔기들이 이황화 결합을 통해 결합된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 상기 산화된 AMPK 단백질의 시스테인 잔기는 상기 AMPK  $\alpha 1$  서브유닛의 108, 132, 176, 211, 229, 299, 303, 313, 416, 494 및 541 중 적어도 하나일 수 있고, AMPK  $\alpha 2$  서브유닛의 106, 130, 174, 200, 209, 297, 302, 382, 490 및 543 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 AMPK  $\alpha 1$  서브유닛의 132, 176과  $\alpha 2$  서브유닛의 130, 174일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.



- [0020] 본 발명의 일 구체 예에서, 상기 조성물은 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions) 및 세포 추출물(cell extract)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 생물학적 시료에서 단백질이 존재하는 수준을 측정하기 위한 것일 수 있고, 바람직하게는 전혈(whole blood) 또는 혈장(plasma) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 및 세포 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 상기 세포는 심근 조직, 간 조직 및 근육 조직으로부터 분리된 것일 수 있고, 바람직하게는 근육 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 상기 퇴행성 뇌질환과 직접적으로 관련이 있는 뇌의 해마 조직 또는 뇌척수액 등에 산화된 AMPK가 존재하는 수준은 상기 본 발명의 생물학적 시료에 존재하는 수준과 유의미하게 정적 상관관계가 있다. 때문에 환자에게 거부감이 심한 뇌 조직 또는 뇌척수액을 채취하지 않고, 비교적 채취가 용이한 상기 본 발명의 생물학적 시료를 이용함으로써 용이하고 정확하게 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성을 예측할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 상기 조성물에 산화된 AMPK 단백질의 측정과 더불어 상기 퇴행성 뇌질환과 관련된 단백질, 예를 들면 타우(Tau), 인산화된 타우(Tau), 아밀로이드  $\beta$  (Amyloid  $\beta$ ), 아포리포단백질 E(apolipoprotein E) 및 APP(amyloid precursor protein)/ 아밀로이드  $\beta$ 의 단백질을 측정하는 제제가 더 포함되는 경우, 퇴행성 뇌질환의 정확도를 더욱 현저하게 높일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 파킨슨병 및 크로이츠펠트-야콥 병으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 치매 또는 알츠하이머병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 상기 퇴행성 뇌질환은 아밀로이드  $\beta$  펩타이드 축적에 의해 뇌 신경세포의 손상이 유발된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 제제는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학 염색법(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 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 목적상 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 분석은 비-환원성 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 상기 비-환원 조건은 단백질의 이황화 결합 등을 끊어 전기 영동과 같은 분석을 용이하게 해주는 제제, 예를 들면  $\beta$ -메르캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol) 또는 DTT (dithiothreitol)가 포함되어 있지 않은 조건으로서, 본 발명의 목적상 산화된 AMPK 단백질을 검출하는데 적합한 조건일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 키트가 단백질의 수준을 측정하기 위한 경우에는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등이 포함될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 항체는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 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>, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.



- [0030] 본 발명의 상기 앵타머는 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. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 항체는, AMPK 단백질을 암호화하는 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현 예에서는 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 상기 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 퇴행성 뇌질환이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 본 발명의 상기 생물학적 시료에서 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준이 증가되어 있는 경우, 퇴행성 뇌질환의 발병 가능성이 높을 것으로 예측할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 키트에서, 산화된 AMPK, 시스테인 잔기, 단백질의 수준을 측정하는 제제, 퇴행성 뇌질환, 타우 단백질, 인산화된 타우 단백질, APP/ 아밀로이드  $\beta$  단백질, 아밀로이드  $\beta$  단백질, 생물학적 시료, 발병 위험성 예측 및 비-환원성 조건 등은 상기 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0036] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(Rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 상기 키트가 단백질의 수준을 측정하기 위한 경우에는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당량 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표시된 2차 항체, 발색 기질 등이 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 기재는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지 또는 폴리스티렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 사용될 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); ATBS), o-페닐렌디아민(o-Phenylenediamine; OPD), 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine; TMB)가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 상기 퇴행성 신경 질환의 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법은 상기 발병 위험성 예측용 조성물을 사용하여 퇴행성 뇌질환이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체의 본 발명의 상기 생물학적 시료에서 측정된 AMPK 단백질이 존재하는 수준이 증가되어 있는 경우, 상기 목적하는 개체에게 퇴행성 뇌질환이 발병 하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 발병 위험성 예측을 위한 정보를 제공하는 방법에서, 산화된 AMPK, 시스테인 잔기, 단백질의 수준을 측정하는 제제, 퇴행성 뇌질환, 타우 단백질, 인산화된 타우 단백질, APP/ 아밀로이드  $\beta$  단백질, 아밀로이드  $\beta$  단백질, 생물학적 시료, 발병 위험성 예측 등은 상기 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0044] 본 발명의 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 웨스턴 블롯 분석, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학 염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 면역형광법, 면역크로마토그래피법, FACS 및 단백질 칩 분석으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 수행될 수 있고, 바람직하게는 상기 단계는 비-환원 조건에서

수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 상기 비-환원 조건은 단백질의 이황화 결합 등을 끊어 전기 영동과 같은 분석을 용이하게 해주는 제제, 예를 들면  $\beta$ -메르캅토에탄올 또는 DTT가 포함되어 있지 않은 조건으로서, 본 발명의 목적상 산화된 AMPK 단백질을 검출하는데 적합한 조건일 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 퇴행성 신경 질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준을 확인하는 단계를 포함한다.

[0049] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 상기 후보물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 측정된 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준이 감소하거나, 정상 대조군에서 분리된 생물학적 시료에서 측정된 산화된 AMPK 단백질이 존재하는 수준에 비하여 감소하는 경우, 상기 후보물질을 퇴행성 신경 질환 치료제로 선별하는 단계를 더 포함한다.

[0050] 본 발명의 상기 후보물질은 퇴행성 신경 질환을 치료하기 위한 활성, 즉 산화된 AMPK를 환원시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 상기 스크리닝 방법에서, 생물학적 시료, 산화된 AMPK, 시스테인 잔기, 단백질의 수준을 측정하는 제제, 퇴행성 뇌질환, 타우 단백질, 인산화된 타우 단백질, APP/ 아밀로이드  $\beta$  단백질, 아밀로이드  $\beta$  단백질, 생물학적 시료 등은 상기 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측용 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0053] [서열목록]

[0054] 서열번호 1: AMPK  $\alpha$ 1 subunit

[0055] 1 mataekqkhd grvkihiyl gdtlgvgtfg kvkvghelt ghkvavkiln rqkirsldvv  
 [0056] 61 gkirreiqln klfrhphiik lyqvistpsd ifvmeyvsg gelfdyickn grldekesrr  
 [0057] 121 lfqqilsgvd ychrmvvhrl dlpkenvlld ahmnakiadf glsnmmsdge flrtscgspn  
 [0058] 181 yaapevisgr lyagpevdiw ssgvilyall cgtlpfdddh vptlfkkicd gifytpqyln  
 [0059] 241 psvisllkhm lqvdpmkrat ikdirehewf kqdlpkylfp edpsysstmi ddealkevce  
 [0060] 301 kfecseeevl sclynrnhdq plavayhlii dnrrimneak dfylatsppd sflddhhltr  
 [0061] 361 phpervpflv aetprarhtl delnpqsksh qgvkakwhl girsqsrpnd imaevcraik  
 [0062] 421 qldyewkvvn pyylrvrrkn pvtstyskms lqlyqvdsrt ylldfrsidd eiteaksgta  
 [0063] 481 tpqrsgsvsn yrscqrdsd aeaqgkssev sltssvtsld sspvdltrp gshtieffem  
 [0064] 541 canlikilaq

[0066] 서열번호 2: AMPK  $\alpha$ 2 subunit

[0067] 1 maekqkhdgr vkihiyvgd tlgvgtfgkv kigehqltgh kvavkilnrq kirsldvvgk  
 [0068] 61 ikreiqnlkl frhphiikly qvistptdff mvmevsgge lfdyickhgr veemearrlf  
 [0069] 121 qqilsavdyc hrhmvvhrdl kpenvlldah mnakiadfgl snmmsdgefl rtscgspnya  
 [0070] 181 apevisgrly agpevdiwsc gvilyallcg tlpfddehvp tlfkkirggv fyipeylrs  
 [0071] 241 vatllmhlq vdplkratik direhewfkq dlpsylfped psydanvidd eavkevcekf

[0072] 301 ectesevmns lysgdpqdql avayhliidn rrimnqasef ylassppsgs fmddsamhip  
 [0073] 361 pglkphperm ppliadspka rcpldalntt kpkslavkka kwhlgirsqs kpydimaevy  
 [0074] 421 ramkqldfew kvvnayhlrv rrknpvtgny vkmslqlylv dnrsylldfk siddevveqr  
 [0075] 481 sgsstpqsrc saaglhprsr sfdsttaesh slsgsltgsl tgstlssvsp rlgshmdff  
 [0076] 541 emcaslittl ar

### 발명의 효과

[0077] 본 발명은 뇌 조직, 뇌 척수액과 같은 시료에 비해, 비교적 채취가 용이한 생물학적 시료, 특히 말초혈액 등에서 산화된 AMPK(AMP-activated protein kinase)를 측정함으로써, 퇴행성 뇌질환을 정확하고, 비교적 간편하게 발병 위험성을 예측할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 비-환원성 조건의 웨스턴 블롯 분석을 통해, 정상(Cont) 및 퇴행성 뇌질환(AD) 유도 쥐의 해마 조직 시료에서 산화된 AMPK  $\alpha$ (Oxidized AMPK  $\alpha$ ; oxAMPK  $\alpha$ ) 및 퇴행성 뇌질환 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2 및 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 비-환원성 조건의 웨스턴 블롯 분석을 통해, 혈액 시료(도 2) 및 근육 조직 시료(도 3)에서 산화된 AMPK  $\alpha$ (Oxidized AMPK  $\alpha$ ; oxAMPK  $\alpha$ ) 단백질이 존재하는 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4 및 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 뇌의 해마 조직 시료에서 퇴행성 뇌질환 관련 단백질이 존재하는 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 4 및 도 5에서 Cont은 정상을 나타내며, AD는 퇴행성 뇌질환을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 뇌의 해마 조직 시료와, 근육 조직 시료 및 혈액 시료에서 다양한 단백질의 상관관계에 대하여 피어슨 적률 상관계수(Pearson's product moment correlation)를 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액 시료 및 뇌의 해마 조직 시료에서 산화된 AMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준을 그래프로 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### [0081] 실시예

#### [0083] [준비예] 퇴행성 뇌질환의 진행 단계에 따른 실험 동물로부터 시료의 준비

[0084] 본 발명의 아래 실시예에서 이용된 실험 동물은 치매 유발의 대표적 퇴행성 뇌신경질환인 알츠하이머병의 핵심적인 병리 기전이 모두 유도된 B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP<sup>Swe</sup>,tauP301L)1Lfa/J mice (3xAD-Tg)로서, 상기 실험 동물은 Psen1의 돌연변이와 APP<sup>Swe</sup> 그리고 tauP301L의 전이유전자를 발현시킨 Jackson Laboratory 사의 유전자 변형이 유도된 것을 특징으로 한다. 4-6주령의 3xAD-Tg 암컷과 수컷 여러 쌍을 구입한 후 1주일간 동물사육실의 환경하에서 검역 및 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰한 후, 교배와 이유분리 관리를 반복하여 실험에 필요한 개체 수를 확보하였다. 새끼 쥐를 출생 4주 후 이유 분리하였다. 이때, 분리 시 한 배에서 태어난 2-5 마리의 3xAD-Tg들만을 함께 사육될 수 있도록 구분하고, 각 사육상자에 개체식별카드를 부착하여 특이사항을 기록하며 시료채취 전까지 사육, 관리하였다. 교배 및 이유분리 관리 시 주기적으로 중합효소연쇄반응 및 전기영동 실험을 수행하여, 각 세대별로 전이유전자의 발현이 잘 유지되고 있는지 확인하였다.

- [0085] 상기 쥐의 사육 환경은 온도 ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 상대습도 ( $50 \pm 20$ ) %, 환기 횟수 (10 ~ 15) 회/시간, 조명 주기 12시간 (8:00 ~ 20:00), 조도 (150 ~ 300) 렉스(Lux)의 조건으로 설정된 동물 사육실에서 사료와 음용수를 급여 하여 사육하며, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육을 실시 하였다.
- [0086] 상기와 같이 퇴행성 뇌질환이 유도된 쥐와 정상 C57BL6 대조군 쥐를 3개월(3M), 8개월(8M) 및 16개월(16M) 사육 하고, 상기 각각의 쥐에서 뇌의 해마 조직(hippocampus), 심근 조직, 간 조직 및 근육 조직을 분리하였다. 또한, 상기 쥐들에서 항응고제가 처리된 혈액채취 튜브를 이용하여 채혈함으로써 혈액 시료를 얻었다.
- [0087] 상기 조직을 유리로된 조직 균질기를 이용하여 잘게 갈고, 이를 원심분리하여 상등액만을 회수하였다. 또한, 상 기 혈액 시료를 5,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 혈구 세포만을 분리하였다. 그런 다음, 상기 분리된 혈구 세포를 초음파 분쇄기를 이용하여 용해시킨 뒤, 원심분리하여 상등액만을 수득하여 이하 실시예에서 사용하였다.
- [0089] **[실시예 1] 해마 조직 시료에서 퇴행성 뇌질환 관련 단백질이 존재하는 수준 변화 확인**
- [0090] 퇴행성 뇌질환과 관련된 단백질의 산화 현상을 관찰하기 위하여, 상기 준비예의 쥐로부터 분리된 뇌의 해마 조 직 시료에서 퇴행성 뇌질환과 관련된 단백질이 존재하는 수준을 비-환원 SDS-PAGE 방법을 통해 확인하였다.
- [0091] 구체적으로, 상기 준비예에서 얻은 뇌의 해마 조직 시료의 상등액 내에 존재하는 단백질의 양을 정량한 뒤, 동 일한 양의 시료를 비-환원 조건( $\beta$ -메르캅토에탄올( $\beta$ -mercaptoethanol) 또는 디티오프레이톨(dithiothreitol; DTT)이 제외되어 있는 조건)의 12% SDS-PAGE에 로딩하고 전기영동하였다. 전기영동이 완료된 상기 SDS-PAGE에 존재하는 단백질을 PVDF 막에 옮겼다. 상기 PVDF 막을 세척 뒤에, TBS-T 완충액에 5%의 탈지분유가 포함된 블로 킹 완충액에 넣고 상온에서 배양하였다. 그런 다음, 3%의 BSA가 포함된 TBS-T 완충액에 일정 비율로 희석된 AMPK  $\alpha$  (AMP-activated protein kinase  $\alpha$ ), 아밀로이드  $\beta$  (이하, 'A $\beta$ '라함.) 및  $\beta$ -액틴( $\beta$ -actin)에 특이적인 항체와 상기 PVDF 막을 실온에서 배양하였다. 이후, PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 세척하고, HRP가 결합된 IgG가 포함된 희석액과 함께 상온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS-T 완충액을 이용하여 상기 PVDF 막을 3회 세척하고, 검출 시약을 이용하여 시각화하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0092] 도 1 에서 보는 바와 같이, 뇌의 해마 조직에서, 대조군에 비하여 퇴행성 뇌질환이 유도된 쥐에서 산화된 AMPK  $\alpha$  (Oxidized AMPK  $\alpha$ ; 이하, 'oxAMPK  $\alpha$ '라함.) 단백질이 존재하는 수준과 A $\beta$ 가 응집된 형태가 존재하는 수준이 증가되는 것을 확인하였다. 반면, 대조군에 비하여 환원된 AMPK  $\alpha$  (Reduced AMPK  $\alpha$ ) 단백질이 존재하는 수준은 퇴행성 뇌질환이 유도된 쥐에서 감소된 것을 확인하였다.
- [0093] 상기 결과를 통해, 상기 oxAMPK  $\alpha$  단백질은 퇴행성 뇌질환과 직접적인 연관 관계가 존재하며, oxAMPK  $\alpha$  단백 질이 존재하는 수준에 따라 진행 단계에 따른 퇴행성 뇌질환, 특히 알츠하이머 질환의 발병 위험성 예측할 수 있 음을 알 수 있다.
- [0095] **[실시예 2] 혈액 시료 및 근육 조직에서 AMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준 변화 확인**
- [0096] 시료 채취가 용이한 근육 조직 시료 및 혈액 시료에서도 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 높은 수준으로 존재하는지 확인하였 다.
- [0097] 구체적으로, 상기 준비예에서 얻은 근육 조직 시료 및 혈액 시료를 상기 실시예 1의 비-환원 조건의 SDS-PAGE를 통한 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 2 및 3에 나타내었다.
- [0098] 도 2에서 보는 바와 같이, 치매 병리현상이 두드러지게 관찰되는 16개월의 퇴행성 뇌질환 쥐의 혈액 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준이 대조군과 비교하여 2배 이상 증가된 것을 확인하였다. 또한, 도 3에서 보는 바와 같이, 8개월 및 16개월의 퇴행성 뇌질환 쥐의 근육 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준이 대 조군과 비교하여 1.5배 내지 2배 이상 증가된 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 뇌의 해마 조직에서의 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준의 변화와 일치하였다.
- [0099] 나아가, oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준의 증가는 퇴행성 뇌질환이 유도된 개월 수에 비례하여 증가되는 것을 확인하였다.
- [0100] 상기 결과를 통해, 뇌의 해마 조직 시료가 아닌, 혈액 시료 및 근육 조직 시료의 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는

수준을 측정함으로써 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 퇴행성 뇌질환의 진행 단계를 예측할 수 있음을 알 수 있다.

**[실시예 3] 뇌의 해마 조직 시료에서 퇴행성 뇌질환 관련 단백질이 존재하는 수준 변화 확인**

상기 실시예 2에서 확인된 혈액 및 근육 조직 시료에 존재하는 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준이 퇴행성 뇌질환을 예측할 수 있는지 추가 검증하기 위하여, 뇌의 해마 조직 시료에서 다양한 퇴행성 뇌질환과 관련된 단백질이 존재하는 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다.

상기 웨스턴 블롯 분석은 환원 조건( $\beta$ -메르캅토에탄올 또는 DTT가 포함되어 있는 조건)의 12% SDS-PAGE를 사용한 점을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 여기서, Tau, 인산화된 Tau (이하, pTau-PHF13이라 함.), 세린 262번째에 인산화된 Tau, APP(amyloid precursor protein)/A $\beta$ , A $\beta$  및  $\beta$ -액틴에 특이적인 항체를 웨스턴 블롯 분석에 사용하였다.

도 4 및 도 5에서 보는 바와 같이, 치매 병리현상이 두드러지게 관찰되는 16개월뿐만 아니라, 8개월의 퇴행성 뇌질환 쥐 뇌의 해마 조직 시료에서 APP/A $\beta$  및 Tau 단백질이 존재하는 수준이 대조군과 비교하여 증가되었고, Tau 단백질의 262번째 세린에 인산화가 증가된 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, APP/A $\beta$  및 Tau 단백질과, Tau 단백질의 262번째 세린의 인산화 증가는 퇴행성 뇌질환의 병리와 관련된 단백질임을 알 수 있다.

**[실시예 4] 다양한 시료에서 산화된 AMPK  $\alpha$ 의 상관관계 확인**

상기 실시예 2에서 확인된 혈액 및 근육 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준이, 상기 실시예 3에서 확인된 뇌의 해마 조직에서 확인된 퇴행성 뇌질환 병리 관련 단백질들이 존재하는 수준을 대표할 수 있는지 확인하였다.

또한, 혈액시료에서의 결과가 뇌의 해마 조직 내 oxAMPK  $\alpha$  단백질의 수준을 얼마나 신뢰성 있게 대변해줄 수 있는지를 확인하기 위하여 x-y 그래프를 그려주었다. 구체적으로, X축을 근육 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준(oxAMPK  $\alpha$  in muscle)와, 나이, 뇌의 해마 조직에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질(oxAMPK  $\alpha$  in hippo), APP/A $\beta$  (APP/A $\beta$  in hippo) 및 세린 262번째에 인산화된 Tau 단백질(Tau(s262) in hippo)이 존재하는 수준으로 설정하였다. 또한, Y축을 혈액 시료 및 근육 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준(oxAMPK  $\alpha$  in blood, oxAMPK  $\alpha$  in muscle)과, 나이, APP/A $\beta$  (APP/A $\beta$  in hippo) 및 세린 262번째에 인산화된 Tau 단백질(Tau(s262) in hippo)이 존재하는 수준으로 설정하였다. 이렇게 설정된 상기 X축과 Y축의 변수들 간의 선형 관계성의 정도를 0 내지 1의 척도 상에서 나타낼 수 있는 피어슨 적률 상관계수(Pearson's product moment correlation)를 통해 분석하여, 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

도 6에서 보는 바와 같이, 뇌의 해마 조직에서 확인된 퇴행성 뇌질환 병리 관련 단백질의 변화 수준과, 혈액 및 근육 조직 시료에서의 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준을 대조 분석하여 상관 관계를 분석한 결과, 혈액 및 근육 조직 시료에서의 oxAMPK  $\alpha$  단백질과 뇌의 해마 조직에서의 oxAMPK  $\alpha$  사이에 0.6 및 0.47의 값으로 정적 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라, 혈액 및 근육 조직 시료에서의 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준은 뇌의 해마 조직에서의 세린 262번째에 인산화된 Tau 단백질이 존재하는 수준 사이에서 0.54 및 0.53의 값으로 정적 상관관계가 있는 것으로 확인되었다.

도 7에서 보는 바와 같이, 혈액 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준과 뇌의 해마 조직에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준에 대한 x-y 그래프를 그려 본 결과, 혈액 시료와 뇌 해마 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질의 농도 간의 명확한 정비례관계가 있는 것을 확인하였다.

상기 결과를 통해, 비교적 시료의 채취가 용이한 혈액 및 근육 조직 시료에서 oxAMPK  $\alpha$  단백질이 존재하는 수준의 측정을 통해 뇌의 해마 조직에서 퇴행성 뇌질환의 병리 관련 단백질의 존재 수준을 매우 정확하게 예측하고, 이를 이용하여 퇴행성 뇌질환의 발병 위험성 예측할 수 있음을 알 수 있다.

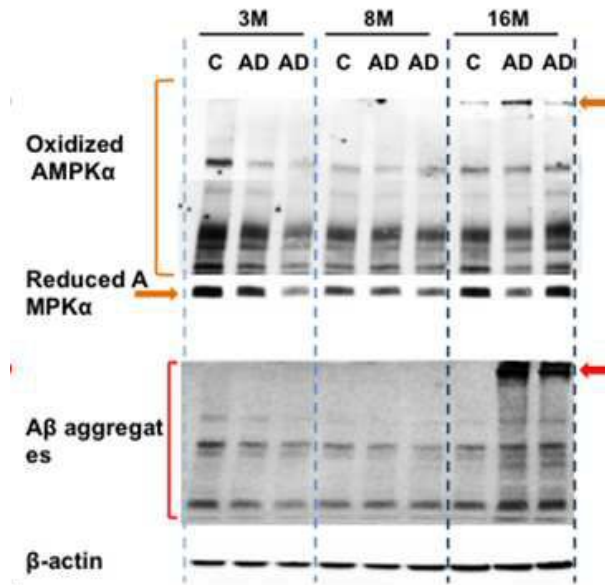
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한



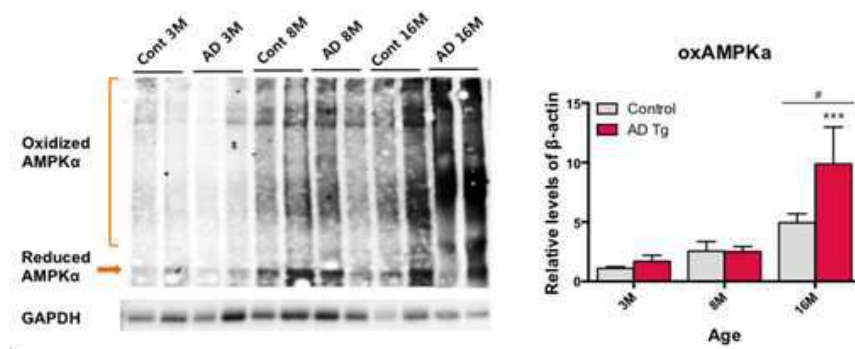
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

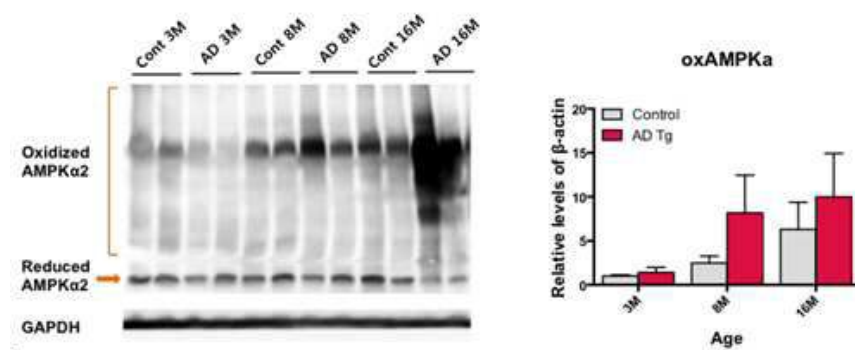
### 도면1



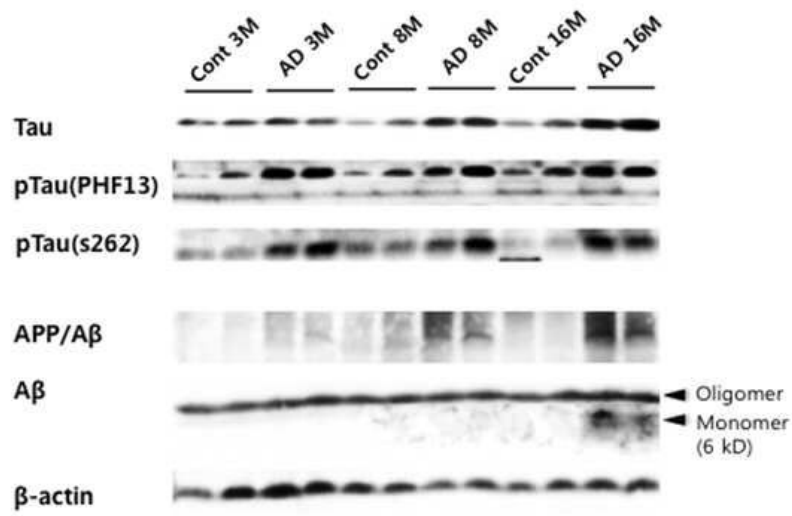
### 도면2



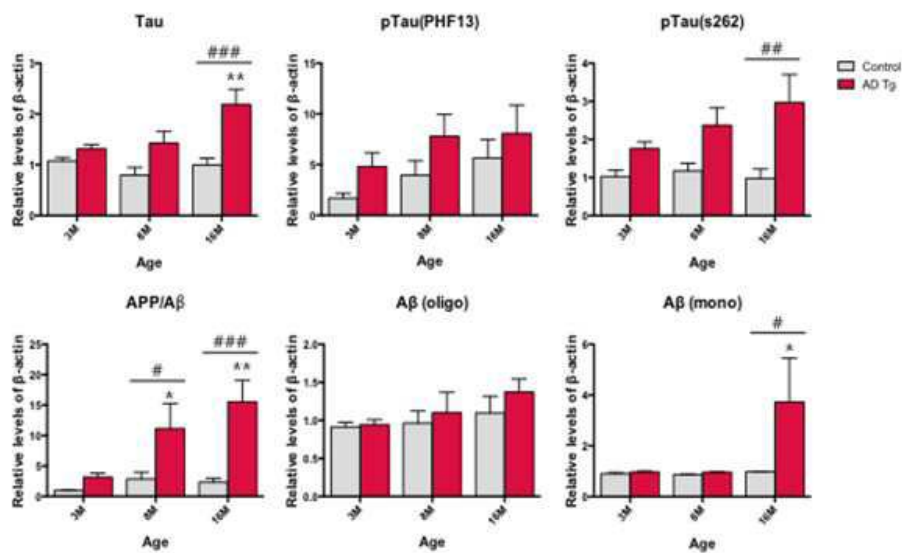
### 도면3



도면4



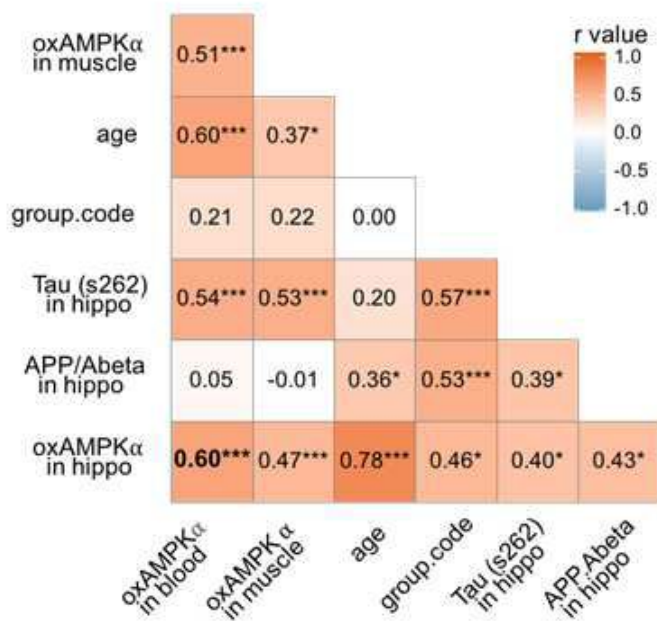
도면5



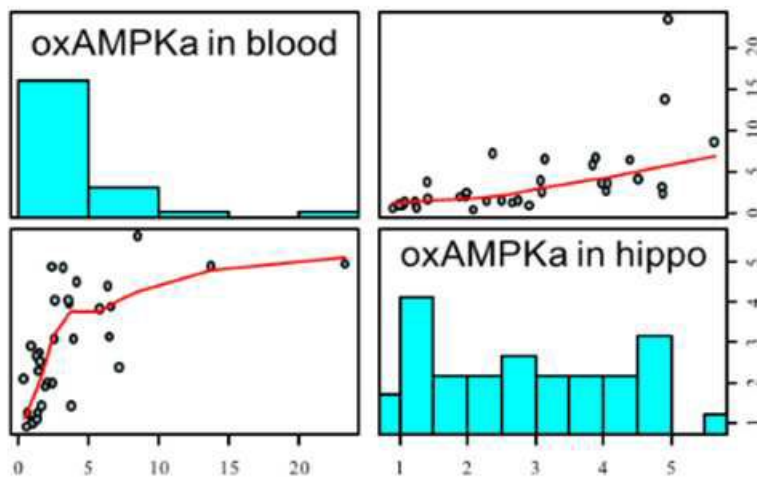


도면6

Correlation Coefficients by Pearson's product-moment correlation



도면7



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A composition for predicting a risk of neurodegenerative diseases and a method for predicting neurodegenerative diseases using the same
- <130> PDPB187343
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 Met Ala Thr Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly  
 1 5 10 15  
 His Tyr Ile Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val  
 20 25 30  
 Lys Val Gly Lys His Glu Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile  
 35 40 45  
 Leu Asn Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Arg  
 50 55 60  
 Arg Glu Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Gln Val Ile Ser Thr Pro Ser Asp Ile Phe Met Val Met Glu  
 85 90 95  
 Tyr Val Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys Asn Gly Arg  
 100 105 110  
 Leu Asp Glu Lys Glu Ser Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Gly  
 115 120 125  
 Val Asp Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro  
 130 135 140  
 Glu Asn Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys  
 165 170 175  
 Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr  
 180 185 190  
 Ala Gly Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Ser Gly Val Ile Leu Tyr Ala  
 195 200 205  
 Leu Leu Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Asp His Val Pro Thr Leu

210                      215                      220  
 Phe Lys Lys Ile Cys Asp Gly Ile Phe Tyr Thr Pro Gln Tyr Leu Asn  
 225                      230                      235                      240  
  
 Pro Ser Val Ile Ser Leu Leu Lys His Met Leu Gln Val Asp Pro Met  
                          245                      250                      255  
 Lys Arg Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln  
                          260                      265                      270  
 Asp Leu Pro Lys Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Ser Ser Thr  
                          275                      280                      285  
 Met Ile Asp Asp Glu Ala Leu Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys  
                          290                      295                      300  
 Ser Glu Glu Glu Val Leu Ser Cys Leu Tyr Asn Arg Asn His Gln Asp  
  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Leu Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met  
                          325                      330                      335  
 Asn Glu Ala Lys Asp Phe Tyr Leu Ala Thr Ser Pro Pro Asp Ser Phe  
                          340                      345                      350  
 Leu Asp Asp His His Leu Thr Arg Pro His Pro Glu Arg Val Pro Phe  
                          355                      360                      365  
 Leu Val Ala Glu Thr Pro Arg Ala Arg His Thr Leu Asp Glu Leu Asn  
                          370                      375                      380  
  
 Pro Gln Lys Ser Lys His Gln Gly Val Arg Lys Ala Lys Trp His Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Ile Arg Ser Gln Ser Arg Pro Asn Asp Ile Met Ala Glu Val Cys  
                          405                      410                      415  
 Arg Ala Ile Lys Gln Leu Asp Tyr Glu Trp Lys Val Val Asn Pro Tyr  
                          420                      425                      430  
 Tyr Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Ser Thr Tyr Ser Lys  
                          435                      440                      445  
 Met Ser Leu Gln Leu Tyr Gln Val Asp Ser Arg Thr Tyr Leu Leu Asp  
  
 450                      455                      460

Phe Arg Ser Ile Asp Asp Glu Ile Thr Glu Ala Lys Ser Gly Thr Ala  
 465 470 475 480  
 Thr Pro Gln Arg Ser Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Ser Cys Gln Arg  
 485 490 495  
 Ser Asp Ser Asp Ala Glu Ala Gln Gly Lys Ser Ser Glu Val Ser Leu  
 500 505 510  
 Thr Ser Ser Val Thr Ser Leu Asp Ser Ser Pro Val Asp Leu Thr Pro  
 515 520 525

Arg Pro Gly Ser His Thr Ile Glu Phe Phe Glu Met Cys Ala Asn Leu  
 530 535 540

Ile Lys Ile Leu Ala Gln

545 550

<210> 2

<211> 552

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Glu Lys Gln Lys His Asp Gly Arg Val Lys Ile Gly His Tyr

1 5 10 15

Val Leu Gly Asp Thr Leu Gly Val Gly Thr Phe Gly Lys Val Lys Ile

20 25 30

Gly Glu His Gln Leu Thr Gly His Lys Val Ala Val Lys Ile Leu Asn

35 40 45

Arg Gln Lys Ile Arg Ser Leu Asp Val Val Gly Lys Ile Lys Arg Glu

50 55 60

Ile Gln Asn Leu Lys Leu Phe Arg His Pro His Ile Ile Lys Leu Tyr

65 70 75 80

Gln Val Ile Ser Thr Pro Thr Asp Phe Phe Met Val Met Glu Tyr Val

85 90 95

Ser Gly Gly Glu Leu Phe Asp Tyr Ile Cys Lys His Gly Arg Val Glu

100 105 110

Glu Met Glu Ala Arg Arg Leu Phe Gln Gln Ile Leu Ser Ala Val Asp

115                                      120                                      125  
 Tyr Cys His Arg His Met Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn  
 130                                      135                                      140  
 Val Leu Leu Asp Ala His Met Asn Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Ser Asn Met Met Ser Asp Gly Glu Phe Leu Arg Thr Ser Cys Gly Ser  
 165                                      170                                      175  
 Pro Asn Tyr Ala Ala Pro Glu Val Ile Ser Gly Arg Leu Tyr Ala Gly  
  
 180                                      185                                      190  
 Pro Glu Val Asp Ile Trp Ser Cys Gly Val Ile Leu Tyr Ala Leu Leu  
 195                                      200                                      205  
 Cys Gly Thr Leu Pro Phe Asp Asp Glu His Val Pro Thr Leu Phe Lys  
 210                                      215                                      220  
 Lys Ile Arg Gly Gly Val Phe Tyr Ile Pro Glu Tyr Leu Asn Arg Ser  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Val Ala Thr Leu Leu Met His Met Leu Gln Val Asp Pro Leu Lys Arg  
 245                                      250                                      255  
  
 Ala Thr Ile Lys Asp Ile Arg Glu His Glu Trp Phe Lys Gln Asp Leu  
 260                                      265                                      270  
 Pro Ser Tyr Leu Phe Pro Glu Asp Pro Ser Tyr Asp Ala Asn Val Ile  
 275                                      280                                      285  
 Asp Asp Glu Ala Val Lys Glu Val Cys Glu Lys Phe Glu Cys Thr Glu  
 290                                      295                                      300  
 Ser Glu Val Met Asn Ser Leu Tyr Ser Gly Asp Pro Gln Asp Gln Leu  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Ala Val Ala Tyr His Leu Ile Ile Asp Asn Arg Arg Ile Met Asn Gln  
  
 325                                      330                                      335  
 Ala Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Gly Ser Phe Met  
 340                                      345                                      350  
 Asp Asp Ser Ala Met His Ile Pro Pro Gly Leu Lys Pro His Pro Glu  
 355                                      360                                      365  
 Arg Met Pro Pro Leu Ile Ala Asp Ser Pro Lys Ala Arg Cys Pro Leu

370                      375                      380  
 Asp Ala Leu Asn Thr Thr Lys Pro Lys Ser Leu Ala Val Lys Lys Ala  
 385                      390                      395                      400  
  
 Lys Trp His Leu Gly Ile Arg Ser Gln Ser Lys Pro Tyr Asp Ile Met  
                          405                      410                      415  
 Ala Glu Val Tyr Arg Ala Met Lys Gln Leu Asp Phe Glu Trp Lys Val  
                          420                      425                      430  
 Val Asn Ala Tyr His Leu Arg Val Arg Arg Lys Asn Pro Val Thr Gly  
                          435                      440                      445  
 Asn Tyr Val Lys Met Ser Leu Gln Leu Tyr Leu Val Asp Asn Arg Ser  
                          450                      455                      460  
 Tyr Leu Leu Asp Phe Lys Ser Ile Asp Asp Glu Val Val Glu Gln Arg  
  
 465                      470                      475                      480  
 Ser Gly Ser Ser Thr Pro Gln Arg Ser Cys Ser Ala Ala Gly Leu His  
                          485                      490                      495  
 Arg Pro Arg Ser Ser Phe Asp Ser Thr Thr Ala Glu Ser His Ser Leu  
                          500                      505                      510  
 Ser Gly Ser Leu Thr Gly Ser Leu Thr Gly Ser Thr Leu Ser Ser Val  
                          515                      520                      525  
 Ser Pro Arg Leu Gly Ser His Thr Met Asp Phe Phe Glu Met Cys Ala  
                          530                      535                      540  
  
 Ser Leu Ile Thr Thr Leu Ala Arg  
 545                      550