



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월12일
 (11) 등록번호 10-1947141
 (24) 등록일자 2019년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12Q 1/68 (2018.01) C12Q 1/44 (2006.01)
 G01N 33/68 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 C12Q 1/6883 (2018.05)
 C12Q 1/44 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-0155859
 (22) 출원일자 2016년11월22일
 심사청구일자 2016년11월22일
 (65) 공개번호 10-2018-0057347
 (43) 공개일자 2018년05월30일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR101521117 B1*
 (뒷면에 계속) 기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
 경북대학교 산학협력단
 대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
 한양대학교 산학협력단
 서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
 사회복지법인 삼성생명공익재단
 서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
 (72) 발명자
 배재성
 대구광역시 수성구 들안로 325, 101동 1702호 (수성동2가, 톨바드아파트)
 진희경
 대구광역시 남구 효성중앙길 82, 105동 1703호 (봉덕동, 래미안웰리스트 1단지아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김승범

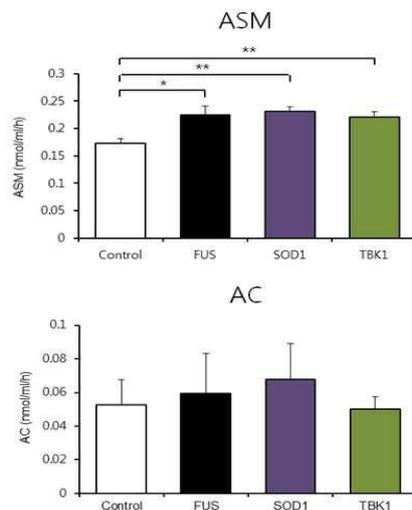
(54) 발명의 명칭 산성 스펡고미엘리나제를 이용한 근위축성측삭경화증 진단용 조성물과 진단 마커 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 산성 스펡고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)를 이용한 근위축성측삭경화증(ALS) 진단용 조성물과 진단 마커 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 시료에서 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

본 발명자들이 규명한 바에 따르면, ALS 환자의 시료에서는 정상인과 비교하여 스펡고지질 대사에 관련된 지질과 효소 중, ASM의 활성이 특이적으로 증가되어 있다. 이를 ALS를 진단하기 위한 마커로 활용하여 신규하고 효과적인 진단용 시약을 개발할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Y 301/04012 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/916 (2013.01)

G01N 2800/2878 (2013.01)

(72) 발명자

이주연

경상남도 김해시 구지로 63, 102동 804호 (내동, 동부아파트)

김승현

서울시 서초구 동광로1길 112, 102동 403호 (롯데캐슬해론)

기창석

서울시 강남구 일원로 81

(56) 선행기술조사문헌

Neurobiology of Aging, Vol.50, pp.170.e1-170.e6 (2016.11.19.)*

Annals of Neurology, Vol.52, No.4, pp.448-457 (2002)

Journal of the Neurological Sciences, Vol.278, pp.5-15 (2009)

Molecular Neurodegeneration, Vol.8, Article 28 (2013)

PNAS, Vol.102, No.49, pp.17822-17827 (2005)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C2131

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업/치매극복기술개발사업

연구과제명 한국인 치매환자 맞춤형 스핑고지질 조절 치료제 개발

기여율 1/1

주관기관 경북대학교

연구기간 2016.09.07 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여

- (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- (b) 상기 시료에서 산성 스펅고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)의 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 ASM의 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 피검체는 FUS, SOD1, TBK1, C9orf72, TARDBP, OPTN 및 NEK1로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자 돌연변이를 갖는 환자 또는 산발형(散發形) ALS 환자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 피검체는 한국인인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 시료는 신경조직, 전혈, 혈장, 혈청 및 뇌척수액으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

ASM 효소 활성을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 산성 스펅고미엘리나제를 이용한 근위축성측삭경화증 진단용 조성물과 진단 마커 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계; (b) 상기 시료에서 산성 스펅고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)은 뇌와 척수에 위치한 상위운동신경세포와 하위운동 세포가 퇴행성 손상을 입어서 발생하는 퇴행성 신경질환이다. ALS의 약 10%는 유전성 소인에 의하여 발생하지만, 대부분은 산발적으로 발생되며, 유병률은 인구 10만 명당 2~3명으로, 희귀질환에 해당한다. 여자보다는 남자에서 약 2배정도로 발병 빈도가 더 높으며, 산발성 ALS의 경우 대체로 50~63세의 연령에서 발병한다. ALS의 발병 원인이나 진행 과정이 명확하게 밝혀진 바는 없다. ALS의 발생 원인으로, 글루타민이 과잉 생산되어 운동세포에 세포독성을 일으킨다는 가설, 신경세포의 기능을 유지하고 손상을 회복하는데 필요한 영양이나 성장인자가 결핍하여 신경세포가 손상된다는 가설, 바이러스 감염으로 인하여 운동신경이 손상된다는 가설, 환경 오염 등으로 중금속과 산화 스트레스 등 세포사멸을 유발하는 물질들이 축적되어 운동세포가 사멸한다는 가설 등이 있다. ALS의 발병 유전자로서, superoxide dismutase 1(SOD1), transactive response DNA-binding protein(TARDBP), fused in sarcoma(FUS), chromosome 9 open reading frame 72(C9orf72) 등이 잘 알려져 있다. 최근 ALS 발병과 연관된 신규유전자 발견과 함께 이 질환이 전두측두엽치매(Frontotemporal dementia) 및 다양한 형태의 근육질환 및 퇴행성질환과의 연관성이 있음이 밝혀지고 있어 최근에는 운동신경질환 네트워크질환군으로 인지되고 있다.
- [0003] ALS 발생 초기에는 손, 손가락, 다리의 근육으로부터 시작하여 퇴화가 진행되면서 몸의 다른 부분에서도 근육이 감소하여 가늘어지고, 근육의 경직과 경련 등 근육을 움직이는데 어려움을 느끼며, 점점 혀와 볼의 근육이 약해져서 식사가 어려워지고, 말기에 이르면 호흡 관련 근육이 약화되어 호흡 장애와 감염의 위험이 높아진다. 한편, ALS에서 손상되는 세포는 운동신경세포에 제한되어 있어, 말초감각, 방광기능 등 자율신경으로 조절되는 생체 기능과 지적 장애는 거의 나타나지 않는다.
- [0004] 1990년대에 들어서 ALS에 대한 많은 연구가 이루어졌으나, 아직까지 ALS의 진행을 멈추거나 완치할 수 있는 치료 방법은 거의 없는 실정이다. 생존기간을 연장하거나, 증상을 호전시키는 대증요법이 대부분으로, 신경보호효과를 보이는 약물복용, 호흡보조기의 사용 등이 실시되고 있다. 또한 ALS의 진단도 운동신경의 퇴화라는 임상적인 증상에 대한 것으로, 주로 진행성 상부 및 하부운동신경의 병리를 환자의 병력과 신경학적 진찰로 확인하며, 신경전도검사와 근전도 검사를 실시한다. ALS의 진단과 진행 속도를 파악하고 예후를 예측하기 위한 바이오마커를 개발하기 위한 많은 노력이 있었으나, ALS의 분자적 생체 지표는 미비하다.
- [0005] 따라서, ALS의 진단 시약과 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 근위축성측삭경화증 환자의 혈장과 신경세포에서 스핑고지질 대사에 중요한 산성 스핑고미엘리나제 활성이 증가한 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은
- [0008] 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여
- [0009] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0010] (b) 상기 시료에서 산성 스핑고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0011] (c) 상기 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은
- [0013] ASM 효소 활성을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은
- [0015] ASM 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0017] 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여
- [0018] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0019] (b) 상기 시료에서 산성 스펡고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0020] (c) 상기 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0022] ASM 효소 활성을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0024] ASM 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0025] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] **본 발명은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여**
- [0027] (a) 피검체의 시료를 제공하는 단계;
- [0028] (b) 상기 시료에서 산성 스펡고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0029] (c) 상기 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계를 포함하는 ALS의 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0030] ‘진단’은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하여, 질병의 발병 가능성 또는 발병 여부, 질병의 진행 단계 등을 판정하는 것을 의미한다. 본 명세서에서의 진단은 근위축성측삭경화증이 발병한 것으로 판단하는 것이다.
- [0031] 본 발명의 진단의 대상인 ‘근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)’은 루게릭병(Lou Gehrig's disease)라고도 불리는 퇴행성 신경질환이다. 근위축성측삭경화증이라고도 하며, 대뇌와 뇌간, 척수의 운동신경이 선택적으로 파괴되기 때문에 운동신경 질환(motor neuron disease, MND)이라고도 불린다. 현재 ALS를 진단하는 방법은 운동신경의 퇴화로 인한 근육 약화와 운동장애, 호흡장애 등 일차적으로 나타나는 임상적 증상에 바탕을 두며 유사한 임상질환을 보이는 2차성 원인을 배제한 후 임상경과를 관찰하여 확진을 내리게 된다. 운동신경의 신경전도검사(nerve conduction velocity), 근전도 검사 등 전기생리학적 검사와 근육에 대한 조직병리학적 검사를 실시한다. 또한 유사한 증상을 동반하는 다른 질환의 가능성을 배제하기 위한 뇌척수액 검사와 혈액 검사(혈청단백질, 갑상선 호르몬, 부갑상선 호르몬, 항체)와 소변 검사, 경부 척추 X-선 및 MRI 검사를 실시하여 유사한 증상을 보일 수 있는 질환을 배제한다. 약 20여 가지의 유전자의 변이가 ALS의 발병에 연관된 것으로 보고되고 있지만, 유전성 ALS는 전체 ALS의 약 10%에 지나지 않으며, 유전자와 돌연변이의 종류가 다양하여 모든 유전자 돌연변이를 감지하여 ALS를 진단하는 데는 한계가 있다.
- [0032]
- [0033] 본 발명은 효과적인 분자적 질환 진단 마커가 부재한 ALS를 진단하기 위한 정확하고 효율적인 바이오마커와 진단 마커의 검출 방법을 제공한다. 본 발명자들은 ALS 환자의 혈액과 신경세포에서 산성 스펡고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM) 활성이 정상인보다 증가해 있음을 확인하였다. 본 발명자들은 건강한 정상인의 혈액과 ALS 관련 유전자 돌연변이를 가지고 있는 ALS 환자의 혈액에서 스펡고지질 대사 관련 산물과 효소 활성을 확인한 결과, 스펡고지질이나 산성 세라미다제(acid ceramidase) 활성에는 큰 차이가 없었으나, ASM의 활성이 ALS 환자에서 일관되게 증가했음을 발견하였다. 또한 ALS 환자의 섬유아세포에서 유도된 신경세포에서도 정상인의 유도된 신경세포보다 높은 ASM 활성이 측정되었다. 따라서, 본 발명자들의 발견을 바탕으로 ASM의 활성

을 측정하고 그 수준의 변화를 감지하여 ALS를 진단하는 표지자로 이용할 수 있음을 알 수 있다.

[0034] 상기 본 발명의 방법의 (a) 단계는 피검체의 시료를 제공하는 단계이다.

[0035] 본 발명에 따른 방법은 피검체의 인종, 민족 등에 특별히 제한받지 않고 실시할 수 있으나, 바람직하게는 아시아인, 가장 바람직하게는 한국인을 피검체로 할 수 있다.

[0036] ALS는 그 발생 원인에 따라 크게 두 가지로 분류가 되는데 가족형(familial)과 단독적으로 오게 되는 산발형(sporadic)으로 나뉘게 된다. 가족형 ALS가 전체의 약 10%를 차지하게 되는데 하나 이상의 유전자의 변이가 발생원인이 된다. 가족형 환자의 약 15% 정도가 SOD1 유전자의 변이로 질환이 발생하며 상염색체우성형태로 한쪽 부모에게서 결합유전자를 물려받아도 질환이 발생할 수 있다. 한편, 산발형 ALS의 원인은 구체적으로 밝혀진 바가 없다. 환경적인 요소인 알루미늄, 수은, 치아봉에 쓰이는 납 등의 중금속이 원인으로 제시되고 있으나 명확한 것은 아니다. 본 발명에서, ALS의 환자는 그 종류가 특별히 제한되지 않지만 바람직하게는, 상기 피검체는 ALS의 발병과 관련된 것으로 알려져 있는 FUS, SOD1, TBK1, C9orf72, TARDBP, OPTN 및 NEK1로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 돌연변이를 가지고 있거나 산발형 ALS 환자 일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에서, 본 발명자들은 건강한 정상인과 FUS, SOD1, 또는 TBK1 유전자의 이상이 확인된 ALS 환자군의 혈액과 신경세포에서 ASM의 활성을 비교한 결과, ALS 환자가 가지고 있는 돌연변이 유전자의 종류에 관계없이 ASM의 활성이 일관되게 증가하여 있음을 확인하였다.

[0038] SOD1(superoxide dismutase 1, soluble)은 superoxide radical을 제거하는 항산화 효소이다. 인간의 SOD1 유전자는 염색체 21q22.11 위치해 있다. 유전성 ALS의 약 20%가 산화적 스트레스를 일으키는 SOD1의 손상에 의한 것으로 알려졌으며, ALS 발병과 관련하여 약 110여 가지 다른 종류의 SOD1의 돌연변이가 보고되어 있다. FUS(FUS RNA binding protein/Fused in Sarcoma)는 전사 활성화, 스플라이싱, RNA 운송 등 다양한 기능을 갖는 핵내 리보단백질 복합체(hnRNP)를 구성하는 단백질이다. 인간의 FUS 유전자는 염색체상 16p11.2에 위치하며, 약 5%의 유전성 ALS 환자에서 50여 가지의 FUS 유전자 돌연변이가 발견되었다. TBK1(TANK-binding kinase 1)는 I κ B와 유사하게 특정 세포 신호에 반응하여 NF κ B를 활성화하는 단백질이다. 인간의 TBK1 유전자는 염색체상의 12q14.1에 위치하며, 전두측두엽치매와 ALS의 발병과의 관련성으로 FTDALS4(frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis type 4)라고 불리기도 한다.

[0039] 또한 상기 피검체의 시료는 피부조직, 신경조직, 전혈, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 소변, 타액, 비액, 객담, 골수, 양수, 복수 및 자궁경부 또는 질 분비물로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다. 상기 신경조직은 뇌를 비롯한 중추 신경 또는 말초 신경의 조직일 수 있으며, 신경세포로 유도 및 분화가 가능한 조직인 피부 혹은 골수를 포함할 수 있다. 또한 상기 신경세포는 피검체에서 채취되거나 분리된 것일 수 있으며, 원래 신경세포가 아닌 세포로부터 탈분화, 재분화, 교차분화, 분화유도 등의 과정을 통하여 유도된 신경세포(induced neuron)일 수도 있다.

[0040] 피검체의 시료는 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 채취하여 제공할 수 있다. ASM 효소 활성을 정확하게 측정하기 위해서는 신선한 시료를 사용하는 것이 바람직하지만, ASM의 활성을 크게 변화시키지 않는 범위에서 ASM의 활성 수준을 측정하는 방법에 따라 당해 기술분야에 공지된 대로 적절하게 전처리할 수 있다. 예를 들어 혈액이나 조직 등의 시료를 액체 질소 등으로 급속 냉동하여 -20℃ 나 -70℃에서 냉동 보관할 수 있다.

[0041] 상기 (b) 단계는 피검체에서 채취한 시료에서 산성 스펅고미엘리나제의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하는 단계이다.

[0042] 상기 ‘산성 스펅고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)’는 스펅고미엘린(sphingomyelin)을 세라마이드(ceramide)와 포스포릴콜린(phosphorylcholine)으로 분해하는 효소인 스펅고미엘리나제(sphingomyelinase, SMase) 패밀리에 속하는 단백질이다. Sphingomyelin phosphodiesterase 1(SMPD1), NPD, aSMase 등으로도 불리며, 인간의 염색체상 11p15.4-p15.1 위치에 SMPD1 유전자에 암호화되어 있다. 인간 ASM의 mRNA 및 단백질의 서열정보는 각각 NCBI Genbank accession no. NM_000543.4(mRNA)과 NP_000534.3(단백질) 등으로 공지되어 있다. ASM의 발현이나 기능이 결손되면 대사 질환의 일종인 니만-픽 병(Niemann-Pick disease)가 발생한다.

[0043]

[0044] SMase는 최적의 반응성을 나타내는 pH에 따라 분류되는데, 이중 ASM의 활성은 지질, 양이온, pH, 산화 환원 상태 및 다른 단백질의 상호작용에 의하여 영향을 받는다. ASM은 효소의 존재 위치와 기질 반응성 등에 따

라 lysosomal sphingomyelinase(L-SMase)와 secretory sphingomyelinase(S-SMase) 등 두 종류로 나뉜다. L-SMase는 세포질 내 라이소좀(lysosome)에 존재하며, 스트레스, 감염, death ligand 등 사멸신호, 항암제 등의 세포 자극에 반응하여 세라마이드를 생성해내는 주요한 효소로 생각된다. S-SMase는 분비되어 세포 외부에 존재하는 ASM으로, 주로 lipoprotein에 결합한 스핑고미엘린을 세라마이드로 분해하고, LDL particle을 응집시키는 작용을 하는 것으로 보고되었다. 본 발명의 실시하기 위한 ASM은 L-SMase 또는 S-SMase 등의 종류에 상관없이 acid sphingomyelinase의 특징을 갖는 것이라면 적용가능하다.

[0045] ASM의 효소의 활성을 측정하는 방법은 해당 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것이라면 제한 없이 사용가능하며, ASM 활성 측정 키트도 상용화되어 있다. ASM 효소 활성을 측정하는 방법은 주로 pH 4.5~5.0에서 ASM의 기질인 스핑고미엘린(sphingomyelin)을 제공하고 단위 시간 동안 생성된 대사 산물의 양을 측정하는 것이다. 예를 들어, ASM의 활성으로 생성되는 포스포릴콜린(phosphorylcholine)은 다음과 같은 연속적인 효소 반응을 통하여 최종적으로는 형광 표지된 산물의 양을 측정하여 확인할 수 있다: 먼저 포스포릴콜린은 alkaline phosphatase에 의하여 콜린(choline)으로 분해되고, 콜린은 콜린 산화효소(choline oxidase)에 의하여 분해되어 H₂O₂를 생성하는데, H₂O₂는 최종적으로 퍼옥시다제(horse radish peroxidase)와 적절한 기질(예를 들어, 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine 등)의 반응에 의하여 530nm~550nm에서 측정가능한 형광 산물로 변환된다. 또한 ASM의 기질로서 스핑고미엘린이 아닌, 바로 발색 또는 형광 산물이 생성될 수 있도록 하는 기질을 제공하는 반응을 통하여 ASM의 활성을 측정할 수도 있다.

[0046] 본 발명의 일실시예에서는, 시료 3 μ l를 ASM 활성 완충액과 혼합하여 37°C에서 보관하였다. 상기 시료에 114 μ l의 에탄올을 가하여 가수분해 반응을 종료시킨 후, 원심분리하여 시료를 준비하였다. 준비된 시료 30 μ l의 상층액을 유리 바이알에 옮긴 후, 5 μ l를 UPLC 시스템에 적용시켰다. 상기 ASM 농도 수준을 스핑고미엘린 및 세라마이드와 결합된 Bodipy(aminoacetaldehyde)와 비교함으로써 측정하였다.

[0047] 한편, 시료에서 측정되는 효소 활성의 증가는 개개 효소의 반응 효율 또는 반응 속도의 향상으로 인하여 나타날 수도 있고, 효소의 수가 늘어남으로써 야기될 수도 있다. 따라서 피검체의 시료에서 ASM의 발현 수준을 측정하여 정상인 수준보다 증가하였으면 ASM 단백질의 수준이 높아진 것이므로, ASM의 활성도 증가되어 있을 것으로 예측할 수 있다. 따라서, ASM의 활성을 예측하기 위한 방법으로서 ASM의 활성을 직접 측정하는 대신 ASM 단백질 또는 ASM mRNA의 발현 수준을 측정할 수도 있다.

[0048] 상기 ASM의 발현 수준을 측정하는 단계는 ASM의 단백질 또는 ASM mRNA의 발현 수준을 측정하여 실시할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 ‘폴리뉴클레오티드(polynucleotide)’ 또는 ‘핵산’은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 일반적으로 DNA는 아데닌(adenine, A), 구아닌(guanine, G), 시토신(cytosine, C), 티민(thymine, T) 등 네 가지 염기로 구성되어 있으며, RNA는 티민 대신 우라실(Uracil, U)을 가지고 있다. 핵산 이중 가닥에서 A는 T 또는 U, C는 G 염기와 수소결합을 이루는데, 이러한 염기의 관계를 ‘상보적(complementary)’이라고 한다.

[0050] 한편, 'mRNA(messenger RNA 또는 전령 RNA)'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자의 염기서열의 유전 정보를 리보솜(ribosome)으로 전달하여 폴리펩티드 합성(단백질 번역, translation)의 청사진 역할을 하는 RNA이다. 유전자를 주형(template)으로 하여 단일 가닥의 mRNA가 전사(transcription) 과정을 통하여 합성된다.

[0051] 또한 ‘단백질’은 ‘폴리펩타이드(polypeptide)’ 또는 ‘펩타이드(peptide)’와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다.

[0052] 본 명세서에서 용어 ‘발현(expression)’은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미한다.

[0053] mRNA 발현의 측정은 당업계에서 통상적인 발현 수준 확인 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 분석 방법의 예로 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA:RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩(microarray chip), RNA 염기서열분석(RNA sequencing), 나노스트링(nanostring) 등이 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 또한 단백질의 발현 수준 측정 방법은 당업계에서 공지되어 있는 방법은 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent

assay), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직 화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩 방법 등이 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 (c) 단계는 (b) 단계에서 측정된 ASM의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 정상인과 비교하여 증가한 피검체를 ALS에 걸린 것으로 판정하는 단계이다.

[0056] 피검체의 시료에서 측정된 ASM의 발현 수준 또는 ASM의 활성 수준을 정상인과 비교하여 정상인에 비하여 유의한 증가를 보이는 경우 ALS가 발병한 것으로 판단하는 것이다. 통상적으로 ASM의 발현 수준 또는 활성 수준의 변화에 변화가 있는지 확인하기 위하여 다수의 정상인의 시료로부터 ASM의 발현 수준 또는 활성 수준을 측정하여 정상 범위의 기준을 세우게 된다. 한 예시로서, 본 명세서의 일실시예에서 정상인의 혈액(혈장)에서 측정된 ASM의 활성 수준은 0.16-0.17nmol/ml/h이었다.

[0057] 또한 본 발명은 ASM 효소 활성을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 ASM 효소 활성을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 ASM 효소 활성을 측정하는 제제로 이루어진 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 ASM 효소 활성을 측정하는 제제가 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

[0059] 본 명세서에서 용어 ‘을 포함하는(comprising)’ 이란 ‘함유하는(including)’ 또는 ‘특징으로 하는(characterized by)’ 과 동일한 의미로 사용되며, 본 발명에 따른 조성물 또는 방법에 있어서, 구체적으로 언급되지 않은 추가적인 구성 성분 또는 방법의 단계 등을 배제하지 않는다. 또한 용어 ‘로 구성되는(consisting of)’ 이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 ‘필수적으로 구성되는(essentially consisting of)’ 이란, 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 물질 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계 등을 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0060] ASM의 활성을 측정하기 위한 제제는 스펅고미엘린 등과 같은 ASM의 기질, ASM으로 생성되는 반응 산물을 측정하기 위한 제제 또는 효소와 기질, 반응 조효소, 반응인자, 이온, 그리고 정량화를 위하여 표준 곡선(standard curve)을 도출하는 데 필요한 반응 산물의 표준 용액 등을 포함한다.

[0061] 또한 본 발명은 ASM 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진단용 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은 ASM의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 ASM의 발현 수준을 측정하는 제제로 이루어진 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 ASM의 발현 수준을 측정하는 제제가 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

[0063] 본 발명의 진단용 조성물에 포함되는 산성 스펅고미엘리나제(ASM)의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 ASM 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0064] 항체(antibody)는 항원성 부위에 특이적으로 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin)을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 ASM 이외에, 다른 종류의 스펅고미엘리나를 비롯하여 다른 단백질에는 반응하지 않고, ASM 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체이다. ASM 항체는 ASM을 코딩하는 유전자를 발현백터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 수득하고, 수득한 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다. 상기 항체는 다클론항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 포함하며, ASM 에 특이적으로 결합하는 모든 면역글로불린 항체가 포함된다.

[0065]

[0066] 또한 본 발명의 진단용 조성물에서 ASM mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 ASM mRNA에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머 세트일 수 있다.

[0067] 프라이머(primer)는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15 내지 30개의

염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, T_m)가 달라진다.

[0068]

[0069]

프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 ASM mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 ASM 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 ASM mRNA 또는 cDNA의 특정 구간을 증폭하여 ASM mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 ASM mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 ASM mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.

[0070]

프로브(probe)는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 ASM mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 ASM mRNA의 발현양을 측정함으로써 근위축성측삭경화증의 진단에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.

[0071]

[0072]

본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 ASM mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

발명의 효과

[0073]

따라서 본 발명은 피검체의 시료에서 산성 스펅고미엘리나제(ASM)의 발현 수준 또는 효소 활성 수준을 측정하여 근위축성측삭경화증(ALS)의 진단 마커를 검출하는 방법 및 조성물을 제공한다. ALS 환자의 시료에서는 정상인과 비교하여 스펅고지질 대사에 관련된 지질과 효소 중, ASM의 활성이 특이적으로 증가되어 있어, ALS를 진단하기 위한 마커로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074]

도 1은 스펅고지질(sphingolipid) 대사 과정과 관련 효소를 나타낸 모식도이다.

도 2는 정상인(Control)과 ALS 환자(FUS, SOD1, TBK1)의 혈장에서 측정된 스펅고미엘린(sphingomyelin), 세라마이드(ceramide) 및 스펅고신(sphingosine)의 수준을 나타낸다.

도 3은 정상인(Control)과 ALS 환자(FUS, SOD1, TBK1)의 혈장에서 측정된 산성 스펅고미엘리나제(acid sphingomyelinase)와 산성 세라마시다제(acid ceramidase)의 효소 활성 수준을 나타낸다. *, ** 표시는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.

도 4는 정상인(Control)과 ALS 환자(FUS, SOD1, TBK1)에서 유래한 신경세포(induced neuron)에서 측정된 산성 스펅고미엘리나제(acid sphingomyelinase)의 효소 활성 수준을 나타낸다. * 표시는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0076]

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0077] <실험 방법>
- [0078] 1. ALS 환자 모집 및 임상 프로토콜 승인
- [0079] 근위축성측삭경화증 환자 중 El Escorial Criteria-revised 에 근거하여 ALS 의 진단 기준에 부합한 산발형 ALS 환자 및 유전학적인 돌연변이가 발견된 환자를 대상으로 환자피부조직을 이용한 줄기세포를 유도하는 방법을 이용하였으며 이는 한양대병원 IRB 연구신청번호 (HYUH 2011-08-010-007)에 근거하여 승인을 받아 진행하였다.
- [0080] 2. 혈중 sphingolipid 측정
- [0081] 상기 스프링고미엘린, 세라미이드 및 스프링고신의 추출 및 정량화는 혈청 시료에서 지질을 추출하고, 상기 건조된 지질 추출물을 25 μ l의 0.2% Igepal CA-630(Sigma-Aldrich)에 재부유시키고, 각각의 지질의 농도 수준을 UPLC 시스템을 이용하여 정량화하였다.
- [0082] 3. ASM 및 AC(acid ceramide) 활성 측정
- [0083] 마이크로리터의 혈청 및 ALS 환자(FUS, SOD1, TBK1)에서 유래한 신경세포(induced neuron) 시료 3 μ l를 ASM 또는 AC 활성 완충액과 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 상기 시료에 114 μ l의 에탄올을 가하여 가수분해 반응을 종료시킨 후, 원심분리하여 시료를 준비하였다. 준비된 시료 30 μ l의 상층액을 유리 바이알에 옮긴 후, 5 μ l를 UPLC 시스템을 이용하여 분석 및 정량화하였다.
- [0084] 4. 신경세포 분화 방법
- [0085] ALS 연구에 흔히 사용되는 세포 모델링 (환자 섬유아세포) 시스템이 갖는 제한점을 극복하기 위해 퇴행성 신경계 질환에 적합한 환자 유도 신경세포 모델(induced neuron)로 연구를 진행하였다. 환자 induced neuron은 섬유아세포의 polypyrimidine-tract-binding (PTB) 단백질을 억제하여 기능성 신경세포로 변환시키는 직접교차분화 (direct conversion) 방법으로 유도되었다. 정상과 환자 induced neuron에 PTBP1 렌티바이러스를 감염시켜 PTB 단백질을 억제시키고 15일 후 효소 활성 수준을 측정하였다.
- [0086] <실시예 1>
- [0087] 혈중 스프링고지질 수준 측정
- [0088] 근위축성측삭경화증(ALS)이 스프링고지질(sphingolipid) 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 건강한 정상인과 ALS로 진단받은 환자의 혈액에서 스프링고지질의 수준을 측정하여 비교하였다. ALS로 진단받은 환자는 FUS (p.Q519E, p.G504Wfs*12, p.R495*), SOD1 (p.I105T, p.G11V), TBK1 (p.I472Sfs*8, I475T, R384W) 중 어느 하나의 유전자의 돌연변이를 가지고 있는 것으로 확인되었다.
- [0089] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 혈장(plasma)에서 측정된 스프링고미엘린(sphingomyelin), 세라미이드(ceramide)와 스프링고신(sphingosine) 등 분석 대상 스프링고지질 수준에 있어서, 정상인과 ALS 환자 사이에 일관된 차이가 관찰되지 않았다. 정상인과 ALS 환자의 혈중 스프링고미엘린과 스프링고신의 수준에는 큰 차이가 없었으며, 세라미이드의 경우, FUS 유전자의 돌연변이를 갖는 ALS 환자군에서 정상인 대조군과 비교하여 비교적 높은 수준을 나타냈으나 ALS 환자 전체적으로는 유의한 차이가 없었다. 건강한 정상인과 ALS 환자의 혈중 스프링고지질의 수준에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.
- [0090] <실시예 2>
- [0091] 혈중 산성 스프링고미엘리나제와 산성 세라미다제 활성 측정
- [0092] 근위축성측삭경화증(ALS)이 스프링고지질(sphingolipid) 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 건강한 정상인과 ALS로 진단받은 환자의 혈액에서 스프링고지질 관련 효소의 활성 수준을 측정하여 비교하였다.
- [0093] 스프링고지질 관련 효소로서, 스프링고미엘린을 세라미이드와 포스포틸콜린(phosphorylcholine)으로 분해하는 산성 스프링고미엘리나제(acid sphingomyelinase, ASM)과, 세라미이드를 스프링고신과 지방산(fatty acid)로 분해하는 산성 세라미다제(acid ceramidase, AC)의 활성을 측정하였다. 스프링고지질 대사와 이에 관련된 주요 효소는 도 1에 도시되어 있다.
- [0094] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 혈장에서 측정된 ASM 활성은 정상인 대조군과 비교하여 ALS 환자군에서 모두 증가한 것으로 관찰되었다. ALS 환자군의 ASM 활성은 정상인 대조군과 비교하여 변이가 확인된 ALS 관련 유전자의

종류에 관계없이 일관되고 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다. 이에 반하여 혈장에서 측정된 AC의 활성은 정상인과 ALS 환자군이 크게 다르지 않은 것으로 측정되었다. 정상인과 ALS 환자 사이에 스핑고지질 및 AC의 활성 수준의 차이는 없었으나, ASM의 활성 수준은 특이적으로 유의하게 증가하여, ASM의 활성 수준을 ALS를 진단하기 위한 마커로 이용할 수 있음을 보여주었다.

[0095]

[0096]

<실시예 3>

[0097]

유도된 신경세포의 산성 스핑고미엘리나제 활성 측정

[0098]

ALS 환자의 혈액에서 확인된 ASM의 활성 증가가 신경세포에서도 나타나는지 알아보았다. 건강한 정상인과 ALS 환자에서 채취한 섬유아세포를 신경세포로 분화시키고, 분화된 신경세포(induced neuron)에서 ASM의 활성을 확인하였다.

[0099]

도 4에 나타난 바와 같이, ALS 환자에서 유래한 신경세포에서는 정상인에서 유래한 신경세포 보다 높은 ASM의 활성이 높게 측정되어, 혈장에서 관찰된 것과 유사한 변화를 보여주었다. 이는 신경세포에서도 ASM의 활성 수준의 변화를 측정하여 ALS를 진단하기 위한 지표로 사용할 수 있음을 제시하는 것이다.

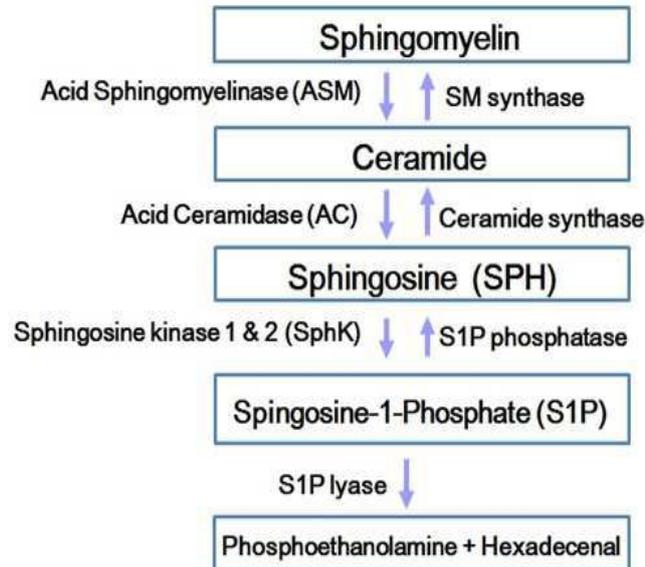
산업상 이용가능성

[0100]

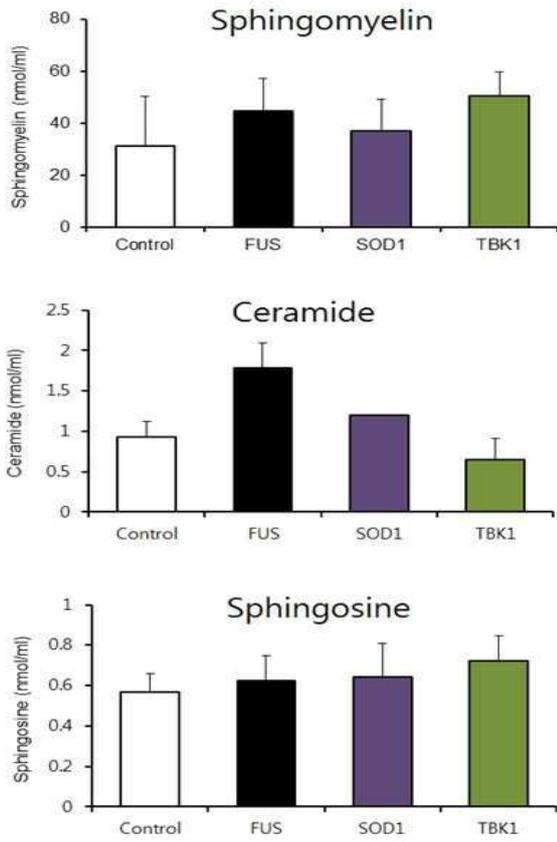
본 발명의 조성물과 방법을 이용하여 근위축성측삭경화증을 용이하게 진단할 수 있는 신규하고 효과적인 진단용 시약을 개발할 수 있다.

도면

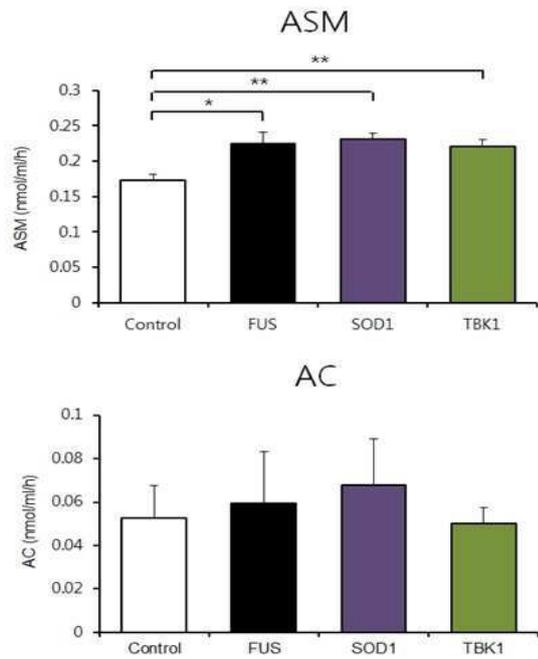
도면1



도면2



도면3



도면4

