

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 7월 27일 (27.07.2023)

WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/140652 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/000954

(22) 국제출원일:

2023년 1월 19일 (19.01.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0009470 2022년 1월 21일 (21.01.2022) KR

(71) 출원인: (재)바이오나노헬스가드연구단 (BIONANO

HEALTH GUARD RESEARCH CENTER) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).

(72) 발명자: 신용범 (SHIN, Yong Beom); 34032 대전광역시 유성구 배울로 119, Daejeon (KR). 김용준 (KIM,

Young Jun); 34070 대전광역시 유성구 지족북로 60, Daejeon (KR). 김상윤 (KIM, Sang Yun); 06574 서울특별시 서초구 방배로 278, Seoul (KR). 박영호 (PARK, Young Ho); 13600 경기도 성남시 분당구 수내로192번길 25, Gyeonggi-do (KR). 조현민 (CHO, Hyun Min);

34118 대전광역시 유성구 가정로 43, Daejeon (KR). 정다정 (CHUNG, Da Jung); 34049 대전광역시 유성구 엑스포로 448, Daejeon (KR). 배판기 (BAE, Pan Kee); 34120 대전광역시 유성구 가정로 65, Daejeon (KR).

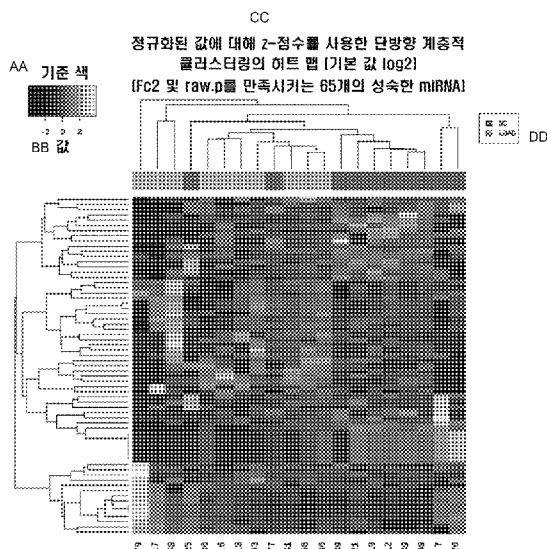
(74) 대리인: 특허법인 피씨알 (PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 441, 10층, Seoul (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, 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,

(54) Title: BIOMARKER FOR EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 알츠하이머 조기진단용 바이오마커와 이의 용도



AA ... Reference color
BB ... Value
CC ... Heat map of one-way hierarchical clustering using z-scores for normalized values (base value log2) (65 mature miRNAs satisfying Fc2 and raw p)
DD ... LOAD

(57) Abstract: The present invention relates to a composition and kit for diagnosis of Alzheimer's disease for diagnosing Alzheimer's disease by using a novel miRNA biomarker, and to a method for providing information for diagnosis of Alzheimer's disease using same. The present invention provides a composition and kit for diagnosis of Alzheimer's disease by proposing a novel biomarker capable of predicting Alzheimer's disease, and thus can diagnose Alzheimer's disease patients quickly and accurately and provide appropriate treatment to the Alzheimer's disease patients.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 miRNA 바이오마커를 이용하여 알츠하이머병을 진단하는 알츠하이머병 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 이용한 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 알츠하이머병을 예측할 수 있는 신규 바이오마커를 제시함으로써 알츠하이머병 진단용 조성물 및 키트를 제공하여 알츠하이머병 환자를 신속하고 정확하게 진단할 수 있으며, 알츠하이머병 환자에게 적절한 치료법을 제공할 수 있다.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME,
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))

명세서

발명의 명칭: 알츠하이머 조기진단용 바이오마커와 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 신규 miRNA 바이오마커를 이용하여 알츠하이머병을 진단하는 알츠하이머병 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 이용한 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 치매(Dementia)는 대표적인 노년기 질환으로, 후천적으로 지적 능력을 상실하고 인지 장애, 행동 심리증상 (불면증, 과식증, 불안, 초조, 우울, 망상 등의 이상 행동 및 심리 증상)에 의한 성격의 점진적 황폐화가 나타나는 퇴행성 질환이다. 전반적인 뇌 기능의 손상을 일으킬 수 있는 모든 질환이 치매의 원인이 될 수 있다. 흔히 알려진 알츠하이머형 치매 또는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 전체 치매의 약 60%를 차지하며, 대뇌 피질이나 해마에서 신경세포가 변성되거나 서서히 쇠퇴하면서 뇌 조직이 소실되고 뇌가 위축된다. 일부에서는 뇌 혈액순환 장애나 뇌혈관 이상으로 인해 뇌세포가 죽으면선 발생하는 혈관성 치매가 발생한다.
- [4] 알츠하이머병은 80세 이상 노인의 20% 이상이 알츠하이머병의 영향을 받고 있을 것으로 추정되며, 고령화 사회가 될수록 그 수가 급격히 증가하는 추세이다. 하지만 알츠하이머병은 뇌 조직에서의 베타 아밀로이드(β -amyloid) 축적을 동반한 다양한 병인학적 요인에 의해 발병하기 때문에 아직까지 명확한 진단 및 치료 방법이 없다. 가장 일반적인 알츠하이머병의 진단 방법으로는 MRI(magnetic resonance imaging), PET(positron emission tomography) 등의 영상 진단과 함께 간이 인지 상태 검사(mini mental state examination: MMSE), 문진 등의 간접적인 방법이 사용되고 있으나, 영상 진단은 고가의 비용과 장비의 제한성 때문에 환자의 부담이 크며, MMSE를 통한 진단은 나이, 학력 등에 의해 그 결과가 달라지므로 진단의 정확성이 문제가 되고 있다.
- [5] 최근 전세계적으로 알츠하이머병 진단을 위해 혈중 바이오마커에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 현재까지의 결과물은 극히 제한적이며 이에 대해서도 다양한 반박의 의견 및 결과가 나오고 있고, 단백질 바이오마커의 경우 체내 존재하는 무수히 많은 단백질 간의 결합 상태 또는 응집 여부에 의해 정량적 수치 차이를 보이고 있다. 따라서 단백질 이외의 다른 형태의 바이오마커에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

[6]

[7] [선행기술문헌]

[8] [특허문헌]

[9] 대한민국 공개특허 제10-2018-0067313호

[10] 대한민국 공개특허 제10-2020-0097636호

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명은 신규 miRNA 바이오마커를 이용한 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 상기 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[14] 또한, 본 발명은 신규 miRNA 바이오마커를 이용한 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[15]

과제 해결 수단

[16] 본 발명의 일 양상은 hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군(이하, “알츠하이머병 조기진단용 miRNA 군”이라 한다)에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공한다.

[17]

[18] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 Mature_99는 서열번호 1로 표시되는 것이고, 상기 Mature_141는 서열번호 2로 표시되는 것이고, 상기 Mature_163은 서열번호 3으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_167는 서열번호 4로 표시되는 것이고, 상기 Mature_184는 서열번호 5로 표시되는 것이고, 상기 Mature_258는 서열번호 6으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_385는 서열번호 7로 표시되는

것이고, 상기 Mature_649는 서열번호 8로 표시되는 것이고, 및 상기 Mature_776는 서열번호 9로 표시되는 것일 수 있다.

- [19] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA는 hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385 및 Mature_649로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA는 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258 및 Mature_385로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 타액, 소변 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [22] 상기 제제는 miRNA에 결합하는 물질일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 다른 양상은 전술한 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트를 제공한다.
- [25] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 핵산 증폭용 시약을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 PCR, RT-PCR 키트, 실시간 PCR 키트 및 마이크로어레이 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 핵산 분리용 시약을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [28] 본 발명의 다른 양상은 a) 진단이 필요한 개체로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계; b) 상기 생물학적 시료에서 상기 ‘알츠하이머병 조기진단용 miRNA군’에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및 c) 상기 측정된 miRNA 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 타액, 소변 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [30] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA는 hsa-miR-10393-5p,

hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385 및 Mature_649로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

- [31] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA는 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258 및 Mature_385로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA 발현 수준은 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 핵산분해효소 보호 분석(nuclease protection assay), in situ 교잡법, 마이크로어레이 및 노던 블롯으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 측정되는 것일 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 대조군은 정상인 또는 알츠하이머병이 의심되는 증상이 없거나 알츠하이머병을 진단받지 않은 개체, 또는 이로부터 수득한 시료인 것일 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것일 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p 및 hsa-miR-642a-5p로 이루어진 군에서 선택된

1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 낮은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것일 수 있다.

[36] 본 발명의 다른 양상은, 상기 ‘알츠하이머병 조기진단용 miRNA군’의 알츠하이머 조기 진단 용도를 제공한다.

[37] 본 발명의 다른 양상은, 알츠하이머 조기 진단용 키트의 제조를 위한, 상기 ‘알츠하이머병 조기진단용 miRNA군’의 용도를 제공한다.

[38] 상기 용도에 있어서, 알츠하이머, 진단, miRNA에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[39]

발명의 효과

[40] 본 발명에서는 알츠하이머병을 예측할 수 있는 신규 바이오마커를 제시함으로써 알츠하이머병 진단용 조성물 및 키트를 제공하여 알츠하이머병 환자를 신속하고 정확하게 진단할 수 있으며, 알츠하이머병 환자에게 적절한 치료법을 제공할 수 있다.

[41]

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 전체 시료 20개에 대한 리드 수를 나타낸 것이다.

[43] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 가공 데이터에서 분류된 smRNA (small RNA) 유형 및 이의 비율을 나타낸 것이다.

[44] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 전체 시료 20개에서 공통적으로 관찰되는 성숙 miRNA의 수를 나타낸 것이다.

[45] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 원본 데이터 (리드 수), 리드 백만개당 개수(CPM)의 로그 변환 및 TMM 정규화를 기반으로 각 시료의 발현 분포를 나타낸 것이다.

[46] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 원본 데이터 (리드 수), 리드 백만개당 개수(CPM)에 대한 로그 변환 및 TMM 정규화를 기반으로 각 시료의 발현 밀도를 나타낸 것이다.

[47] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 정규 값에 대한 피어슨 상관계수를 이용하여 각 시료들 간의 유사도를 나타낸 것이다.

[48] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 정규 값을 이용한 계층적 군집화 분석을 나타낸 것이다.

[49] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 정규 값을 이용한 다차원 척도 분석을 나타낸 것이다.

[50] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 NC 그룹과 LOAD 그룹 간의 배수 변화(fold change, fc)에 기반하여 상향 및 하향 조절된 성숙 miRNA 수를 나타낸 것이다.

[51] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 NC 그룹과 LOAD 그룹 간의 배수 변화 및

- p 값에 기반하여 상향 및 하향 조절된 성숙 miRNA 수를 나타낸 것이다
- [52] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 NC 그룹과 LOAD 그룹을 비교한 로그 변환된 배수 변화 및 p 값을 나타낸 것이다.
- [53] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 NC 그룹에 비해 발현 차이가 있는 전사체를 나타낸 것이다.
- [54] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 성숙 miRNA와 시료의 유사성을 계층적 군집화 분석한 것이다.

[55]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 본 발명의 일 양상은 상기 '알츠하이머병 조기진단용 miRNA군' 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공한다.
- [57] 본 발명에서 사용된 "알츠하이머병"은 뇌 병리 소견으로 베타 아밀로이드의 침착과 관련한 신경반(neuritic plaque), 신경섬유 다발(neurofibrillary tangle) 등이 관찰되며, 육안으로는 신경세포 소실에 의한 전반적인 뇌 위축 소견을 보이는 퇴행성 뇌질환을 의미한다. 초기에 기억력 저하가 주로 나타나다가 진행됨에 따라 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 동반되며 심해진다.
- [58] 본 발명에서는 알츠하이머병 진단을 위한 바이오마커로써 miRNA를 이용할 수 있다. 여기서 바이오마커(biomarker)란 일반적으로 생물학적 시료에서 검출 가능한 물질로서 생체 변화를 알아낼 수 있는 폴리펩티드, 단백질, 핵산, 유전자, 지질, 당지질, 당단백질, 당 등과 같은 유기 생체 분자들을 모두 포함한다.
- [59] 본 발명에서 사용된 "miRNA"는 마이크로 RNA(micro RNA)라고도 하며, 표적 RNA의 분해를 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비암호화(non-coding) RNA를 의미한다. 일반적으로 miRNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀(hairpin) 구조를 가지는 약 70 ~ 80 nt (nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후 RNase III 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA(mature miRNA)가 형성된다.
- [60] 이러한 miRNA는 차세대 염기서열분석(next-generation sequencing, NGS)을 통해 확인된 알츠하이머병 환자에서 특이적인 발현 수준 변화를 보이는 특정 miRNA로 구성되며, 알츠하이머병 진단을 위한 바이오마커로 제시될 수 있다.
- [61] 상기 NGS는 수십만 개의 반응을 동시에 수행하는 다중화(multiplexing) 능력이 있으며, 적은 양의 샘플로도 시퀀싱이 가능하다. NGS는 상용화된 기술에 따라 구체적인 적용 기법이 다소 다르지만, 일반적으로 클론증폭(clonal amplification), 대량병렬 시퀀싱 및 Sanger 방법과 작용기전이 다른 새로운 염기서열결정법을

사용한다. 상용화 기술로는 2007년에 Roche가 출시한 454 GS 개량형 FLX model sequencer, 2006년에 Illumina가 출시한 Genome Analyzer HiSeq, 2007년에 Applied Biosystems가 출시한 SOLiD 등이 있다. 이러한 세 가지의 플랫폼은 공통적으로 복잡한 라이브러리 구축과 클로닝 과정을 버리고 클론증폭기술을 채택하였고, 한꺼번에 대량으로 처리할 수 있는 대량병렬방식(massively parallel sequencing) 기술을 택하였으며, 순환 시퀀싱(cyclic sequencing)을 통한 합성신호읽기(sequencing by synthesis)로 염기서열을 결정하여 번잡한 전기영동과정을 배제하였다. 또한 shotgun 방식을 사용하여 읽혀진 짧은 리드(read)를 컴퓨터로 배열하여 중복된 부분을 찾아 전체를 완성하는 알고리즘을 사용한다.

- [62] 이러한 알츠하이머병 진단을 위한 64개의 miRNA는 기존에 확인된 miRNA뿐만 아니라 본 발명자들에 의해 miRNA로 처음 확인된 신규 miRNA를 포함한다.
- [63] 상기 신규 miRNA는 기존 레퍼런스에 보고된 바 없는 것으로, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776가 해당한다.
- [64] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 Mature_99는 서열번호 1로 표시되는 것이고, 상기 Mature_141는 서열번호 2로 표시되는 것이고, 상기 Mature_163은 서열번호 3으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_167는 서열번호 4로 표시되는 것이고, 상기 Mature_184는 서열번호 5로 표시되는 것이고, 상기 Mature_258는 서열번호 6으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_385는 서열번호 7로 표시되는 것이고, 상기 Mature_649는 서열번호 8로 표시되는 것이고, 및 상기 Mature_776는 서열번호 9로 표시되는 것일 수 있다.
- [65] 이러한 64개의 miRNA는 알츠하이머 진단을 위한 바이오마커로써 단독으로 사용되거나, 또는 2종 이상의 복수로 사용될 수 있다.
- [66] 보다 구체적으로, 64개의 miRNA 중에서 보다 정확한 알츠하이머병 진단을 위해 통계적으로 유의성이 높은 발현 차이 ($|fcl| > 2$ 및/또는 $p < 0.01$)를 가지는 miRNA 단독 또는 miRNA 조합을 이용하는 것이 바람직하다.
- [67] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA는 hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385 및 Mature_649로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [68] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA는 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99,

Mature_141, Mature_258 및 Mature_385로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[69] 본 발명에 따른 miRNA는 생물학적 시료에서 그 발현 수준을 측정할 수 있다.

[70] 본 발명에서 사용된 "생물학적 시료"는 생체에서 유래되어 생체 변화를 알아낼 수 있는 핵산, 유전자, 펩티드, 아미노산, 단백질, 지질, 당, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자들뿐만 아니라 세포, 조직을 포함하는 시료를 의미한다. 본 발명에서는 miRNA를 포함하는 시료라면 제한되지 않는다.

[71] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 타액, 소변 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[72] 상기 제제는 miRNA에 결합하는 물질일 수 있다.

[73] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[74] 본 발명에서 사용된 "특이적으로 결합하는"이란 결합에 의해 표적 물질의 존재 여부를 검출할 수 있을 정도로 다른 물질에 비해 표적 물질에 대한 결합력이 뛰어남을 의미한다.

[75] 본 발명에서 사용된 "프라이머(primer)"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)를 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 7개 내지 50개의 뉴클레오티드 서열을 가진 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 핵산으로 구성되며, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 수준에서 15 ~ 30개의 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다.

[76] 본 발명에서 사용된 "프로브(probe)"는 자연의 또는 변형된 모노머(monomer) 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하고, 표적 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.

[77]

[78] 본 발명의 다른 양상은 전술한 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트를 제공한다.

[79] 본 발명에서 사용된 "알츠하이머병 진단용 키트"는 검사 대상자로부터 채취한 생물학적 시료를 통해 알츠하이머병 여부를 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 이를 통해 알츠하이머병을 신속하고 정확하게 그리고 간편하게 진단할 수 있다. 본 발명에서는 알츠하이머병 진단용 키트가 miRNA 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하며, 그 제제로서 프라이머 또는 프라이머 세트를 포함하는 것이

바람직하다.

[80] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 핵산 증폭용 시약을 더 포함하는 것일 수 있다.

[81] 상기 핵산 증폭용 시약은 당업계에 공지된 통상적인 PCR용 시약을 포함할 수 있으며, 일례로 뉴클레오시드 트리포스페이트, (디옥시)리보뉴클레아제 저해제, 내열성 중합효소 및 반응 완충액 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[82] 상기 뉴클레오시드 트리포스페이트는 퓨린(purine)계 또는 피리미딘(pyrimidine)계 뉴클리오시드가 리보스(ribose) 또는 디옥시리보스(deoxyribose)에 결합하여 세 개의 인산기와 결합된 분자를 의미하며, (디옥시)아데노신 트리포스페이트((deoxy)adenosine triphosphate, ATP 또는 dATP), (디옥시)구아노신 트리포스페이트((deoxy)guanosine triphosphate, GTP 또는 dGTP), (디옥시)사이티딘 트리포스페이트((deoxy)cytidine triphosphate, CTP 또는 dCTP) 및 (디옥시)티아미딘 트리포스페이트((deoxy)thymidine triphosphate, TTP 또는 dTTP)를 포함한다.

[83] 상기 반응 완충액은 Taq 중합효소 완충액, PCR 완충액 등일 수 있으며, 증폭 반응의 pH를 조절함으로써 증폭 반응의 하나 이상의 성분들의 안정성, 활성 및/또는 지속성(longevity)을 변화시키는 증폭 반응에 첨가되는 화합물이다. 이러한 반응 완충액은 효율적인 PCR 반응을 최적화하기 위한 첨가물질들을 더 포함할 수 있다.

[84] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 PCR, RT-PCR 키트, 실시간 PCR 키트 및 마이크로어레이 칩 키트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

[85] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 키트는 핵산 분리용 시약을 더 포함하는 것일 수 있다.

[86] 상기 핵산 분리용 시약은 당업계에 공지된 통상적인 RNA 또는 miRNA 추출용 시약으로, 세포 용해(lysis)가 가능한 염, 계면활성제, 금속 이온, 당, 환원제 (예, DTT) 등을 포함할 수 있다.

[87] 본 발명에 따른 키트는 통상적인 유전자 정량 분석에 기반한 진단 키트를 제한 없이 포함할 수 있다.

[88] 예를 들면, 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로 PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합효소 보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있으며, 본 발명의 키트는 DNA 또는 RNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 진단용 키트일 수 있다.

[89]

[90] 본 발명의 다른 양상은 a) 진단이 필요한 개체로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계; b) 상기 생물학적 시료에서 상기 ‘알츠하이머병 조기진단용

miRNA군' 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및 c) 상기 측정된 miRNA 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.

- [91] 상기 a) 내지 c) 단계에 대해 다음에서 자세히 살펴보면, 전술한 내용과 공통된 내용은 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [92] 상기 a) 단계는 알츠하이머병 여부에 대한 검사가 필요한 대상자로부터 생물학적 시료를 채취하는 과정이다.
- [93] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 타액, 소변 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [94] 상기 b) 단계는 생물학적 시료에서 바이오마커 miRNA의 존재 여부와 함께 발현 수준을 측정하는 과정이다.
- [95] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA는 hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385 및 Mature_649로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [96] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA는 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258 및 Mature_385로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [97] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 b) 단계의 miRNA 발현 수준은 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 핵산분해효소 보호 분석(nuclease protection assay), in situ 교잡법, 마이크로어레이 및 노던 블롯으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 측정되는 것일 수 있다.
- [98] 이러한 miRNA 발현 수준은 전술한 본 발명에 따른 알츠하이머병 진단용 조성물 또는 키트를 이용하는 것이 바람직하다.
- [99] 상기 c) 단계는 생물학적 시료에서 측정된 miRNA 발현량을 대조군과 비교하여 알츠하이머병 여부를 판단하는 과정이다.
- [100] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 대조군은 정상인 또는 알츠하이머병이 의심되는 증상이 없거나 알츠하이머병을 진단받지 않은 개체, 또는 이로부터 수득한 시료인 것일 수 있다.
- [101] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-136-3p,

hsa-miR-136-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것일 수 있다.

- [102] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p 및 hsa-miR-642a-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 낮은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것일 수 있다.

[103]

발명의 실시를 위한 형태

- [104] 이하, 첨부된 도면을 참조하며 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[105]

[106] 실시예: 알츠하이머병 진단용 신규 바이오마커 발굴

[107] 1. 모집단 선정

- [108] 2020년 4월부터 2021년 2월까지 MMSE를 포함한 알츠하이머병 검사를 받은 정상인(normal control, NC) 10명과 알츠하이머병 환자(late-onset Alzheimer's disease, LOAD) 10명을 선정하여 모집단을 구성하였다(표 1).

[109] [표1]

구분	ID	성별	연령	MMSE
NC	19	여	72	28
	25	여	73	30
	77	여	73	29
	21	여	74	30
	7	여	75	28
	12	남	75	30
	30	여	76	30
	26	여	77	27
	39	남	79	18
	49	여	82	29
LOAD	86	여	72	25
	46	남	73	25
	56	여	73	21
	13	여	75	21
	48	남	75	29
	63	여	75	22
	41	여	76	23
	16	여	77	15
	17	남	79	23
	79	여	82	12

[110]

[111] **2. miRNA 서열분석 및 데이터 가공**

[112] 정상인과 알츠하이머병 환자 간의 유전자 발현 패턴을 분석하기 위해 NGS 분석을 실시하였다. 모집단에서 채취한 혈액 시료는 miRNA 서열분석 (*Homo sapiens* miRNA sequencing)을 위해 사용하였으며, (주)마크로젠에 의뢰하였다. 간략하게 설명하면, PrimeScript 역전사효소(reverse transcriptase, RT) 및 SMARTer® smRNA-Seq Kit for Illumina® (TaKaRa)를 사용하여 혈액에 존재하는 RNA를 cDNA로 합성한 후 PCR 증폭을 수행하였다. 서열분석 후 데이터 가공을 위해 원본 서열 리드(raw sequence read)에 대해 품질을 평가하여 어댑터 시퀀스(adapter sequence)를 포함한 리드를 제외하였고, 트림 리드(trimmed

read)와 어댑터 시퀀스가 없는 리드(non-adaptor read) (≥ 50 bp)를 선택하였다 (도 1). 이후, 리드 길이, 서열 동일성(sequence identity) 등이 100% 일치하는 리드를 모아서 하나의 클러스터(cluster)를 형성한 후 불필요한 rRNA를 제거하여 miRNA 프로파일링에 사용하였다. 대부분의 rRNA를 제거하고 남은 RNA는 18 ~ 100 nt의 짧은(short) RNA이며, 47 bp의 트림 리드 및 20 ~ 25 nt의 성숙 miRNA를 포함하였다.

[113]

[114] **3. miRNA 프로파일링**

[115] miRNA 분석 소프트웨어 miRDeep2를 사용하여 가공 데이터로부터 신규 miRNA를 예측하였다. 먼저, 레퍼런스 게놈(reference genome) miRBase v22.1 (human miRNA 2,656개)와 비암호화 RNA 데이터베이스(non-coding RNA database) Rnacentral 14.0를 순차적으로 사용하여 종래 알려진 miRNA와 tRNA, snRNA, snoRNA 등 다른 RNA를 분류하였다 (도 2). 이후, 레퍼런스 Homo sapiens GRCh3를 사용하여 기존에 보고된 바 없는 miRNA를 신규 miRNA로 판단하였다.

[116]

[117] **4. 차등 발현 miRNA 분석 결과**

[118] NC 그룹 ($n = 10$) 및 LOAD 그룹 ($n = 10$)에서 시료들 간의 차등 발현 miRNA 분석을 수행하였다. 차등 발현 miRNA 분석에서는 miRDeep2 Quantifier module에서 얻은 성숙 miRNA 리드 수를 원본 데이터(raw data)로 사용하였다.

[119] 먼저, 데이터 전처리 과정으로 데이터 품질 및 유사성 검사를 수행하였다. 총 3,473개의 성숙 miRNA (원본 데이터) 중 273개가 전체 시료 20개에서 공통적으로 관찰된 반면, 1,068개가 전체 시료에서 전혀 관찰되지 않았다. 전체 시료 수의 절반이 넘는 10개 이상의 시료에서 공통적으로 관찰되는 성숙 miRNA 895개 (가공 데이터)를 분석에 이용하였다 (도 3). 이후, 데이터의 체계적인 편향(systematic bias)을 줄이기 위해 데이터 변환 및 정규화를 수행하였다. calcNormFactors 방법으로 원본 데이터의 리드 크기를 추정하여 리드 수를 리드 백만개당 개수(counts per million read, CPM)로 로그 변환하였으며, 이를 TMM(Trimmed mean of M-values) 방법으로 정규화하였다 (도 4). 여기서 음(-)의 값을 방지하기 위해 CPM 또는 정규화된 리드 수에 1을 더하였다. 그리고 원본 데이터, 로그 변환 및 TMM 정규화를 시각화하여 시료당 발현 밀도를 나타내었다 (도 5). 각 시료들 간의 연관성 분석을 위해 각 시료에 대한 정규 값(normalized value)의 피어슨 상관관계수(Pearson's coefficient, r)를 이용하여 각 시료들 간의 유사도(similarity)를 파악하였다. 상관관계수(r)는 약 0.7 내지 1.0의 범위로 나타났다 (도 6). 이어서 계층적 군집화 분석(Hierarchical clustering analysis)에서는 각 시료의 정규 값을 이용하여 높은 발현 유사성을 가지는 시료들을 그룹화하였다 (도 7). 여기서 거리 척도(Distance metric)로는 유클리드 거리(Euclidean distance)를, 연결법(Linkage method)으로는 완전 연결(Complete Linkage)을 사용하였다. 전체 데이터의 변동성을 나타내기 위해 다차원 척도

분석(multidimensional scaling analysis)을 통해 각 시료의 정규 값을 이용하여 시료들 간의 유사성을 2차원 그래프로 나타내었다 (도 8). 그래프에서는 이상점(outlier)을 갖는 샘플 유무 및 그룹 간 발현 패턴 유사성을 확인할 수 있었다.

- [120] 이후, 성숙 miRNA 895개에 대해 통계 분석 (fold change 및 exactTest)을 수행하여 NC 그룹과 LOAD 그룹 간의 상향 및 하향조절된 성숙 miRNA를 확인하였다. 895개 중 배수 변화(fold change, fc)에 의해 발현 차이를 보인 성숙 miRNA는 114개였으며 (도 9), 배수 변화와 함께 p 값에 의해 유의미한 발현 차이를 보인 성숙 miRNA는 65개였다 (도 10). $|fc| \geq 2$ 및 exactTest 초기 p 값 < 0.05 의 조건을 만족하는 64개의 성숙 miRNA를 핵심 데이터(significant data)로 선택하였다 (표 2). NC 그룹과 LOAD 그룹 간의 비교하여 배수 변화와 p 값을 로그 변환하였다 (도 11). 또한 전체 평균 발현 수준에 따라 NC 그룹에 비해 발현 차이가 큰 miRNA를 확인하기 위해 산점도로 나타내었다 (도 12). 예를 들면, 성숙 miRNA가 배수 변화에서 2배 이상의 차이가 있더라도 평균 logCPM보다 높은 경우 더 신뢰성이 있다고 할 수 있다. 이를 종합하여, 핵심 데이터의 발현 수준 (정규 값)에 따라 성숙 miRNA와 시료의 유사성을 군집화하여 계층적 군집화 분석으로 나타내었다 (도 13).

[121] [표 2]

	fold change > 2	p-value < 0.05		fold change > 2	p-value < 0.05
hsa-miR-1-3p	2.463	0.0401	hsa-miR-4485-5 p	10.264	0.0017
hsa-miR-10393-5 p	3.291	0.0332	hsa-miR-4645-3 p	-2.182	0.0170
hsa-miR-10395-3 p	-14.515	0.0003	hsa-miR-4659b- 5p	-2.242	0.0374
hsa-miR-122-3p	3.431	0.0090	hsa-miR-4743-5 p	-2.815	0.0460
hsa-miR-1233-5p	2.981	0.0301	hsa-miR-490-5p	-3.147	0.0389
hsa-miR-1287-3p	-2.333	0.0174	hsa-miR-494-3p	2.080	0.0398
hsa-miR-1287-5p	-2.073	0.0272	hsa-miR-497-5p	-2.272	0.0096
hsa-miR-1296-3p	-3.776	0.0405	hsa-miR-518e-5p	-2.789	0.0112
hsa-miR-136-3p	2.228	0.0091	hsa-miR-519a-5p	-2.789	0.0111
hsa-miR-136-5p	2.172	0.0420	hsa-miR-519b-5 p	-2.794	0.0113
hsa-miR-148a-5p	-2.612	0.0420	hsa-miR-519c-5p	-2.794	0.0113
hsa-miR-15a-5p	2.054	0.0406	hsa-miR-522-5p	-2.793	0.0113
hsa-miR-188-3p	-2.179	0.0334	hsa-miR-523-5p	-2.793	0.0113
hsa-miR-199a-5p	-2.193	0.0175	hsa-miR-5582-3 p	2.796	0.0344
hsa-miR-19b-2-5p	-2.897	0.0309	hsa-miR-579-5p	-2.015	0.0409
hsa-miR-214-3p	-2.149	0.0162	hsa-miR-598-5p	-2.665	0.0343
hsa-miR-27a-5p	-2.075	0.0166	hsa-miR-642a-5p	-3.195	0.0370
hsa-miR-29a-3p	-2.971	0.0004	hsa-miR-6809-5 p	2.674	0.0080

hsa-miR-301b-5p	-2.559	0.0037	hsa-miR-6825-5 p	2.395	0.0448
hsa-miR-323b-3p	2.119	0.0281	hsa-miR-6842-5 p	2.297	0.0130
hsa-miR-329-3p	2.031	0.0382	hsa-miR-6858-3 p	2.983	0.0316
hsa-miR-3667-3p	3.060	0.0250	hsa-miR-7112-3 p	3.327	0.0243
hsa-miR-375-3p	3.218	0.0226	hsa-miR-758-5p	4.532	0.0147
hsa-miR-376a-2-5 p	2.432	0.0256	Mature_99	4.733	0.0089
hsa-miR-376a-3p	2.051	0.0252	Mature_141	14.250	0.0011
hsa-miR-376b-5p	3.295	0.0036	Mature_163	6.791	0.0306
hsa-miR-376c-5p	3.145	0.0033	Mature_167	3.024	0.0317
hsa-miR-3920	2.458	0.0211	Mature_184	4.433	0.0421
hsa-miR-410-3p	2.165	0.0384	Mature_258	5.417	0.0071
hsa-miR-4301	-2.469	0.0437	Mature_385	23.504	0.0001
hsa-miR-4436b-3 p	-2.068	0.0219	Mature_649	3.799	0.0234
hsa-miR-4467	3.133	0.0462	Mature_776	2.468	0.0248
* hsa-miR는 레퍼런스에 보고된 성숙 miRNA이며, Mature는 신규 miRNA로 예측되는 서열임					

[122]

[123]

상기 표 2는 핵심 데이터에 해당하는 성숙 miRNA 64개를 나타낸 것으로, 기존에 보고된 성숙 miRNA 55개와 이번 서열분석에서 처음 확인된 신규 성숙 miRNA 9개를 포함한다. 이러한 miRNA는 알츠하이머병 진단을 위한 후보 바이오마커로 선정되었다.

[124]

신규 성숙 miRNA 9개의 서열은 하기 표 3에 나타내었다

[125] [표3]

신규 성숙 miRNA	염기서열 (5'-3')	서열번호
Mature_99	TTGTTTTTGGGGTTTGGCAG	1
Mature_141	AGGATGAGACTCCGTCAC	2
Mature_163	CTCAGGCTACACCCTAGACC	3
Mature_167	GGGGGGAGGGGGGAAAAAGG	4
Mature_184	CATGGAGGCCATGGGGTGG	5
Mature_258	ACTGAAGAATGGAGAGAG	6
Mature_385	GGAGGCCATGGGGTTGGGG	7
Mature_649	CATGGAGGCCATGGGGTCA	8
Mature_776	AGAGCGAGACCCCGTCTCTT	9

[126]

[127] 그리고 하기 표 4에서와 같이 64개의 miRNA 중 NC 그룹 대비 발현 수준의 배수 변화(fc)가 3배를 초과하거나 p 값이 0.01 미만 ($fc > 3$ 또는 $p < 0.01$)인 28개의 miRNA를 알츠하이머병 진단용 바이오마커로 선택하였으며, 이들 중 상기 조건을 모두 만족하는 9개의 miRNA ($fc > 3$ 및 $p < 0.01$)가 알츠하이머병 진단의 정확도 및 신뢰도를 향상시킬 것으로 예상할 수 있다.

[128] [표 4]

	fold change > 3	p-value < 0.01
hsa-miR-10393-5p	O	-
hsa-miR-10395-3p	O	O
hsa-miR-122-3p	O	O
hsa-miR-1296-3p	O	-
hsa-miR-136-3p	-	O
hsa-miR-29a-3p	-	O
hsa-miR-301b-5p	-	O
hsa-miR-3667-3p	O	-
hsa-miR-375-3p	O	-
hsa-miR-376b-5p	O	O
hsa-miR-376c-5p	O	O
hsa-miR-4467	O	-
hsa-miR-4485-5p	O	O
hsa-miR-4659b-5p	-	O
hsa-miR-490-5p	O	-
hsa-miR-497-5p	-	O
hsa-miR-642a-5p	O	-
hsa-miR-6809-5p	-	O
hsa-miR-7112-3p	O	-
hsa-miR-758-5p	O	-

Mature_99	O	O
Mature_141	O	O
Mature_163	O	-
Mature_167	O	-
Mature_184	O	-
Mature_258	O	O
Mature_385	O	O
Mature_649	O	-

[129]

[130] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[131]

산업상 이용가능성

[132] 본 발명에서는 알츠하이머병을 예측할 수 있는 신규 바이오마커를 제시함으로써 알츠하이머병 진단용 조성물 및 키트를 제공하여 알츠하이머병 환자를 신속하고 정확하게 진단할 수 있으며, 알츠하이머병 환자에게 적절한 치료법을 제공할 수 있다.

[133]

서열목록 Free Text

[134] 서열목록 전자파일 첨부

청구범위

- [청구항 1] hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 Mature_99는 서열번호 1로 표시되는 것이고, 상기 Mature_141는 서열번호 2로 표시되는 것이고, 상기 Mature_163은 서열번호 3으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_167는 서열번호 4로 표시되는 것이고, 상기 Mature_184는 서열번호 5로 표시되는 것이고, 상기 Mature_258는 서열번호 6으로 표시되는 것이고, 상기 Mature_385는 서열번호 7로 표시되는 것이고, 상기 Mature_649는 서열번호 8로 표시되는 것이고, 및 상기 Mature_776는 서열번호 9로 표시되는 것인 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 miRNA는 hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385 및 Mature_649로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,

상기 miRNA는 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258 및 Mature_385로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서,

상기 제제는 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 조성물.

[청구항 6] 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트.

[청구항 7] 청구항 6에 있어서,

상기 키트는 핵산 증폭용 시약을 더 포함하는 것인 키트.

[청구항 8] a) 진단이 필요한 개체로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계;

b) 상기 생물학적 시료에서 hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및

c) 상기 측정된 miRNA 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단을 위한 정보의 제공 방법.

[청구항 9] 청구항 8에 있어서,

상기 a) 단계의 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프액, 타액, 소변 및 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.

[청구항 10] 청구항 8에 있어서,

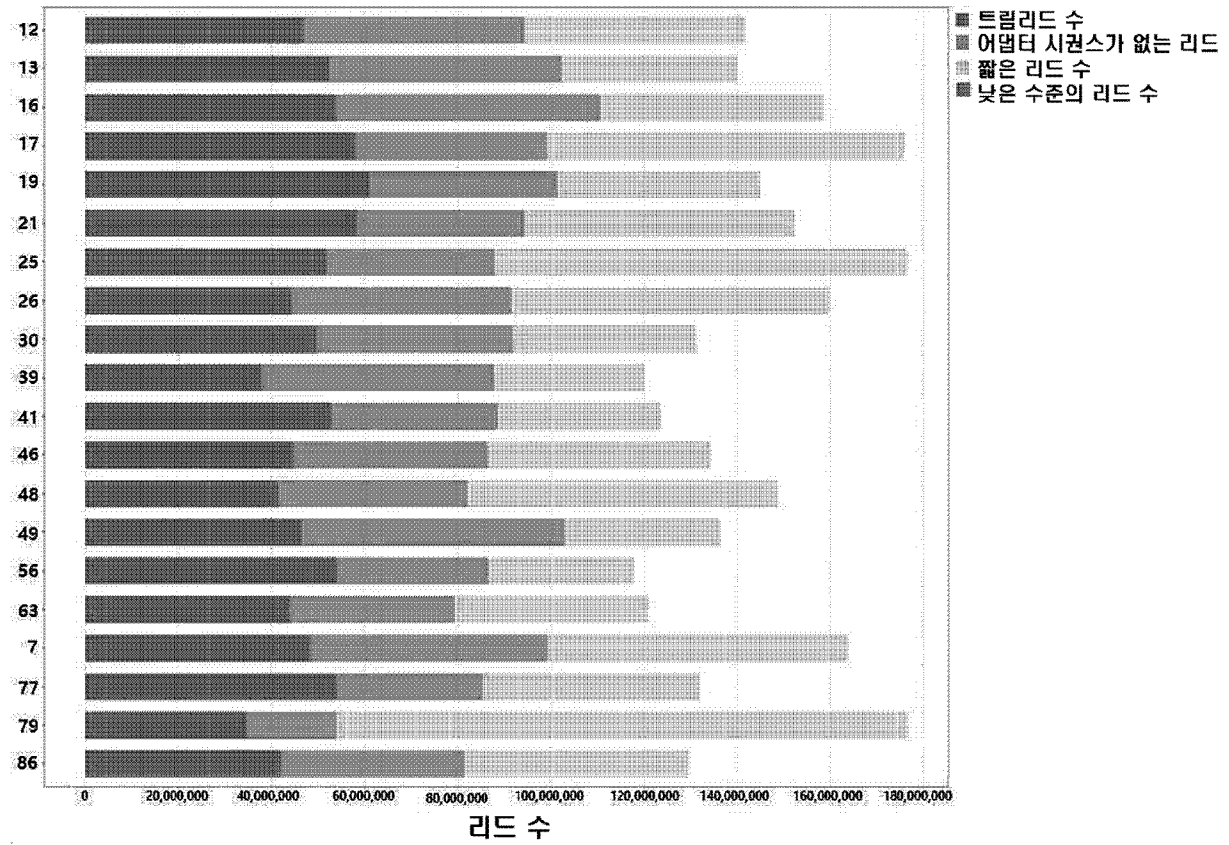
상기 b) 단계의 miRNA 발현 수준은 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR,

핵산분해효소 보호 분석(nuclease protection assay), in situ 교잡법, 마이크로어레이 및 노던 블롯으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 측정되는 것인 방법.

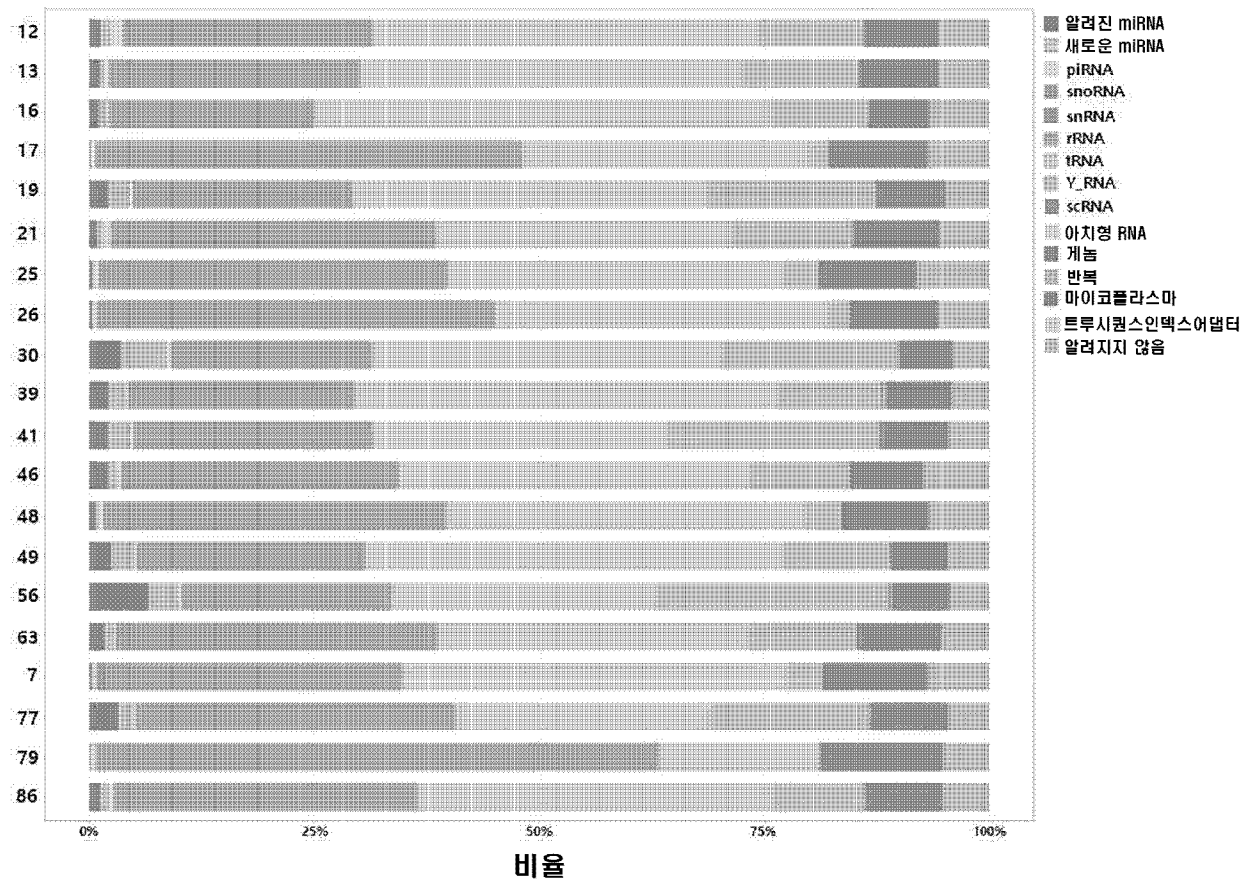
[청구항 11] 청구항 8에 있어서,
상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-1-3p, hsa-miR-10393-5p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-1233-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-136-5p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-3667-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-376a-2-5p, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-3920, hsa-miR-410-3p, hsa-miR-4467, hsa-miR-4485-5p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6842-5p, hsa-miR-6858-3p, hsa-miR-7112-3p, hsa-miR-758-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_163, Mature_167, Mature_184, Mature_258, Mature_385, Mature_649 및 Mature_776로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 높은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것인 방법.

[청구항 12] 청구항 8에 있어서,
상기 c) 단계는 개체에서 hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-1287-3p, hsa-miR-1287-5p, hsa-miR-1296-3p, hsa-miR-148a-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-19b-2-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-301b-5p, hsa-miR-4301, hsa-miR-4436b-3p, hsa-miR-4645-3p, hsa-miR-4659b-5p, hsa-miR-4743-5p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-579-5p, hsa-miR-598-5p 및 hsa-miR-642a-5p로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 miRNA 발현 수준이 대조군에 비해 낮은 경우 알츠하이머병으로 진단하는 것인 방법.

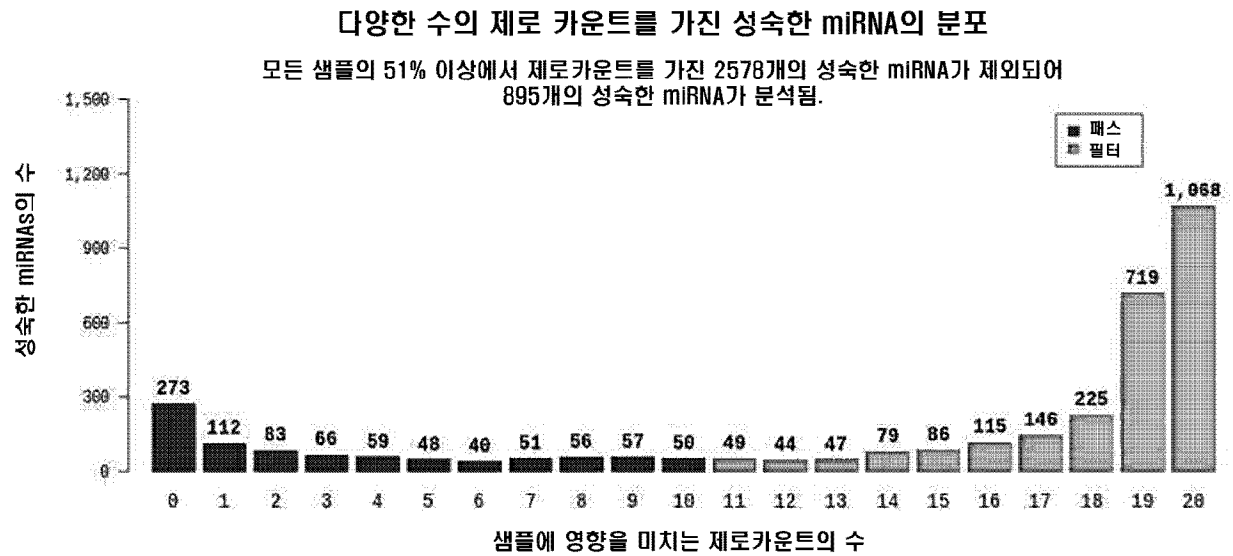
[도1]



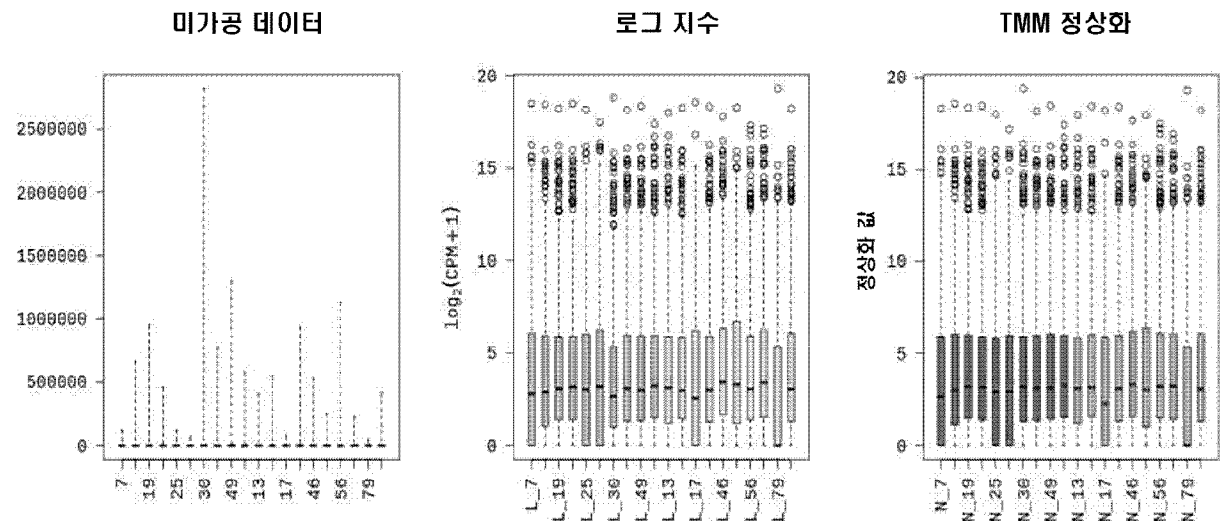
[도2]



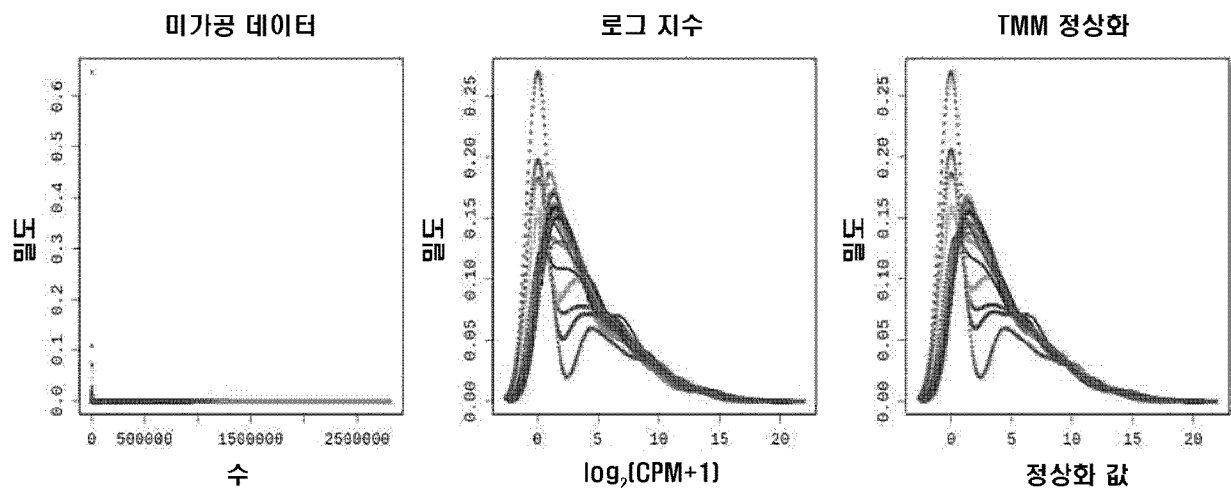
[도3]



[도4]

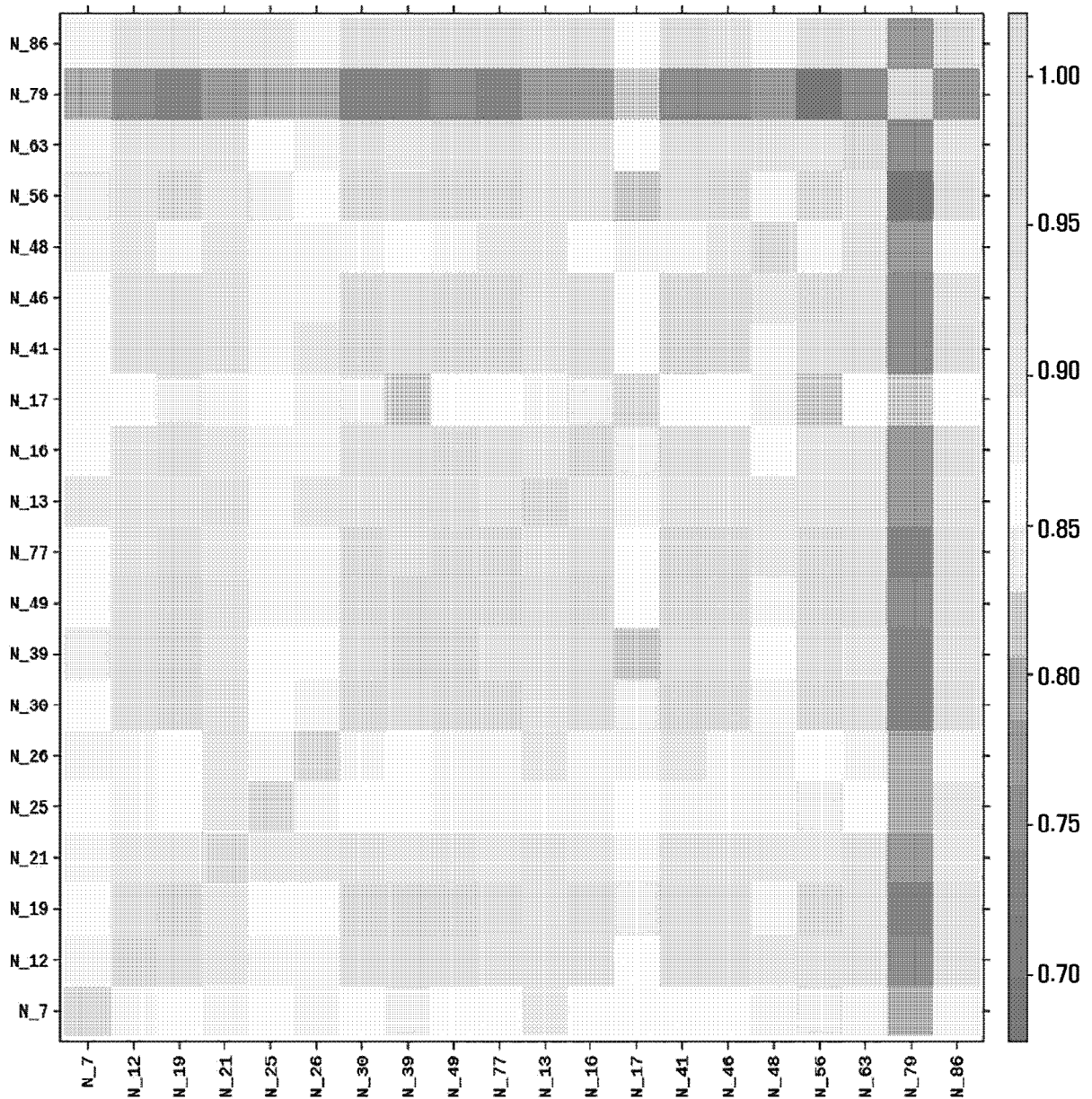


[도5]

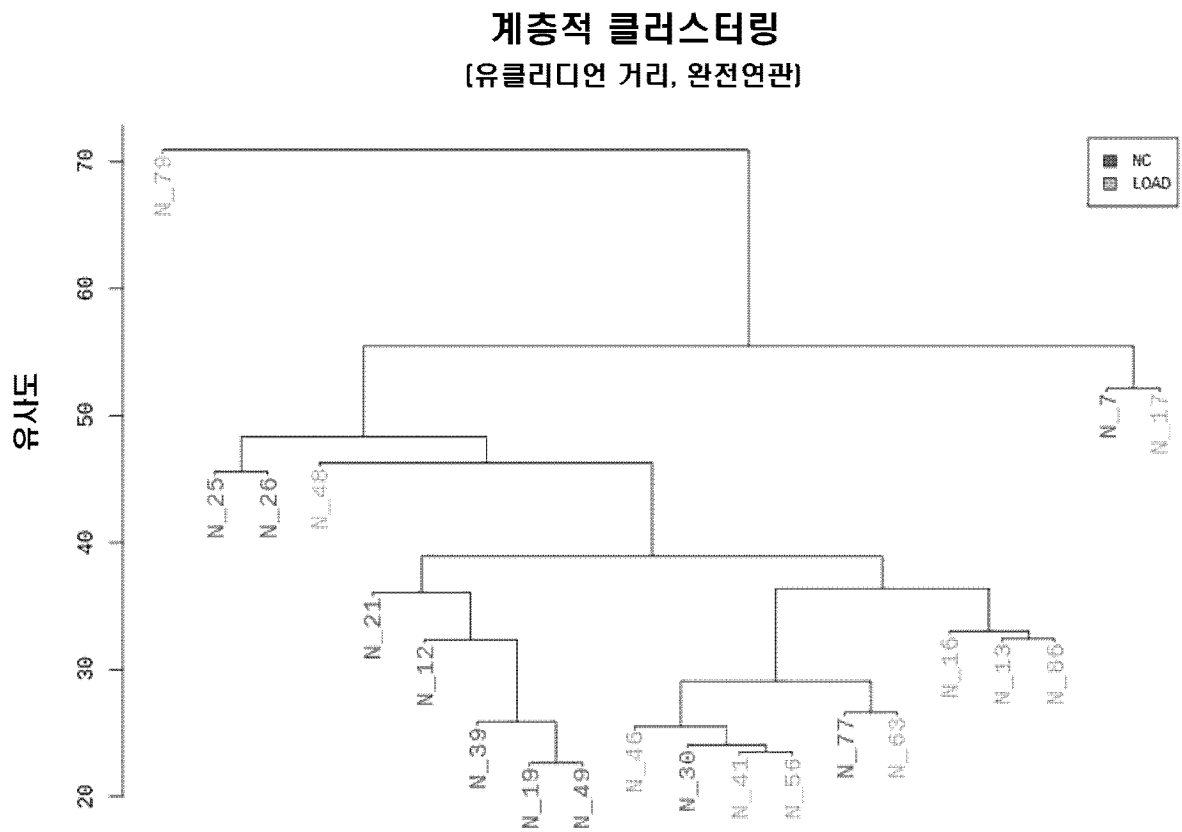


[도6]

모든 샘플들의 연관 매트릭스

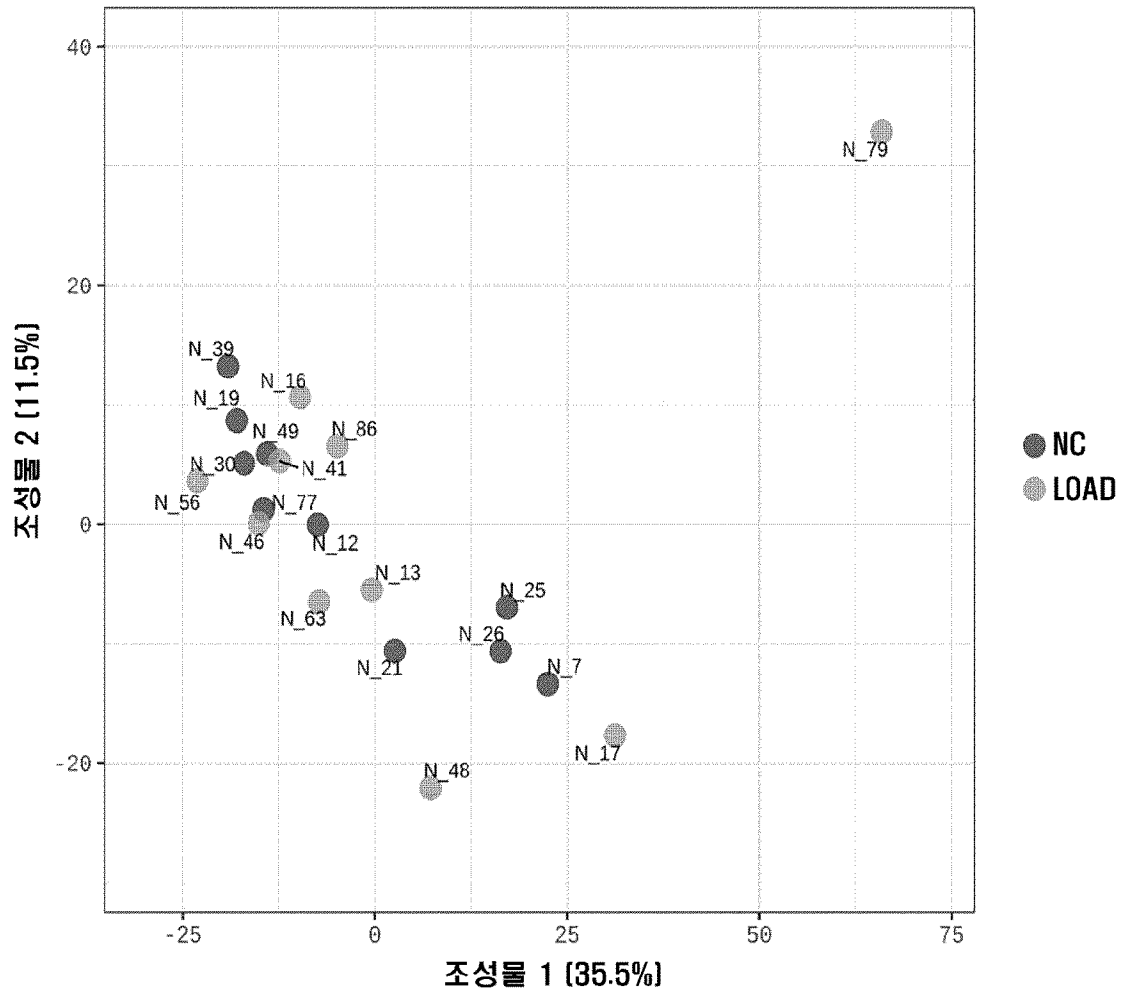


[도7]

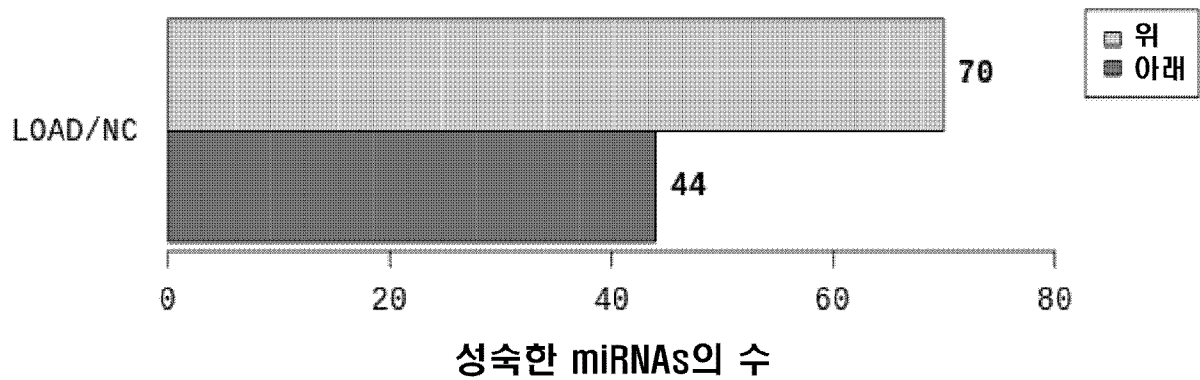


[도8]

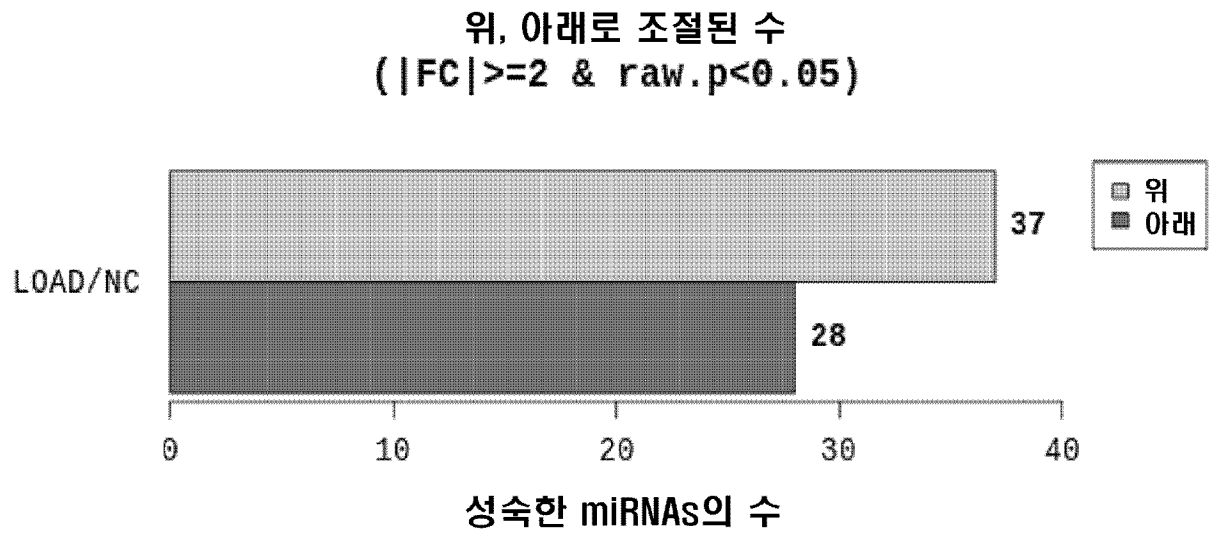
다차원 스케일링



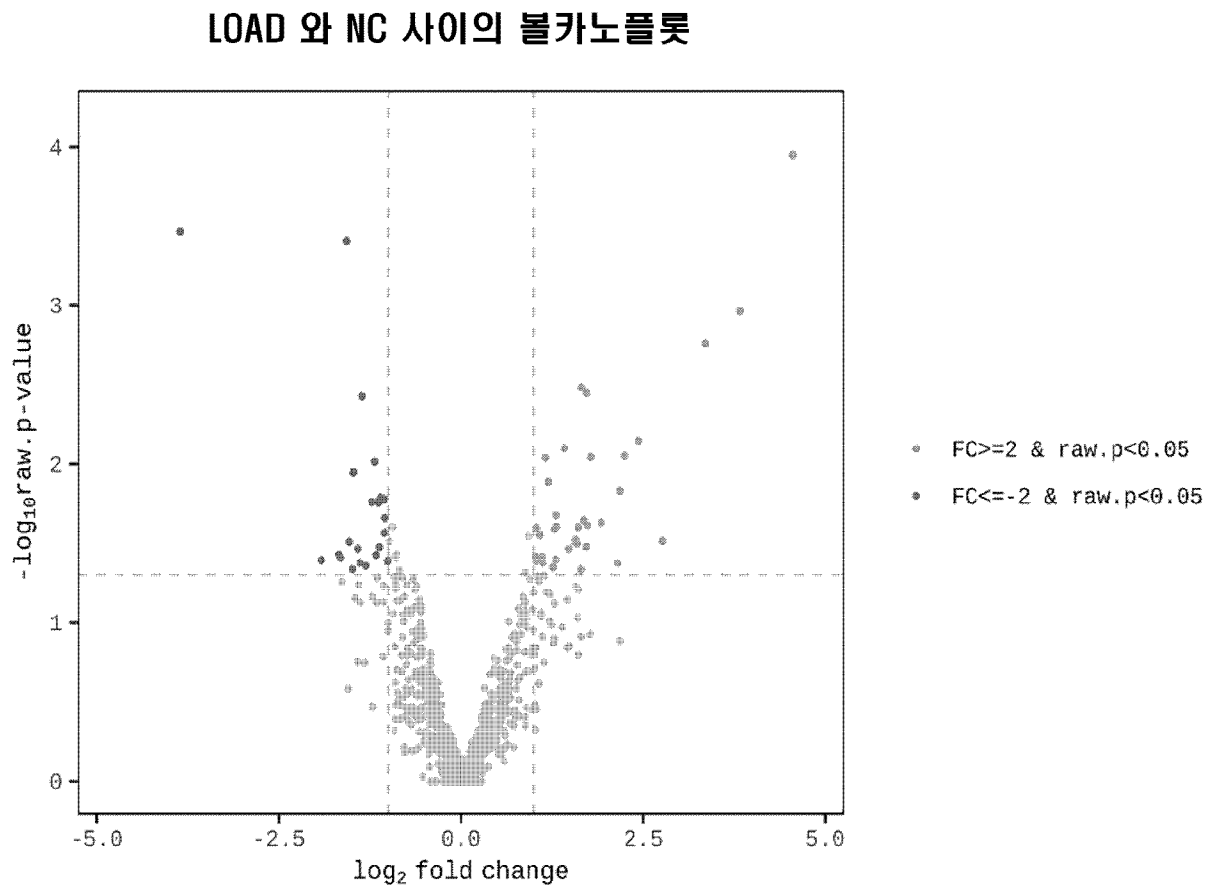
[도9]

위, 아래로 조절된 수
($|FC| \geq 2$)

[도10]

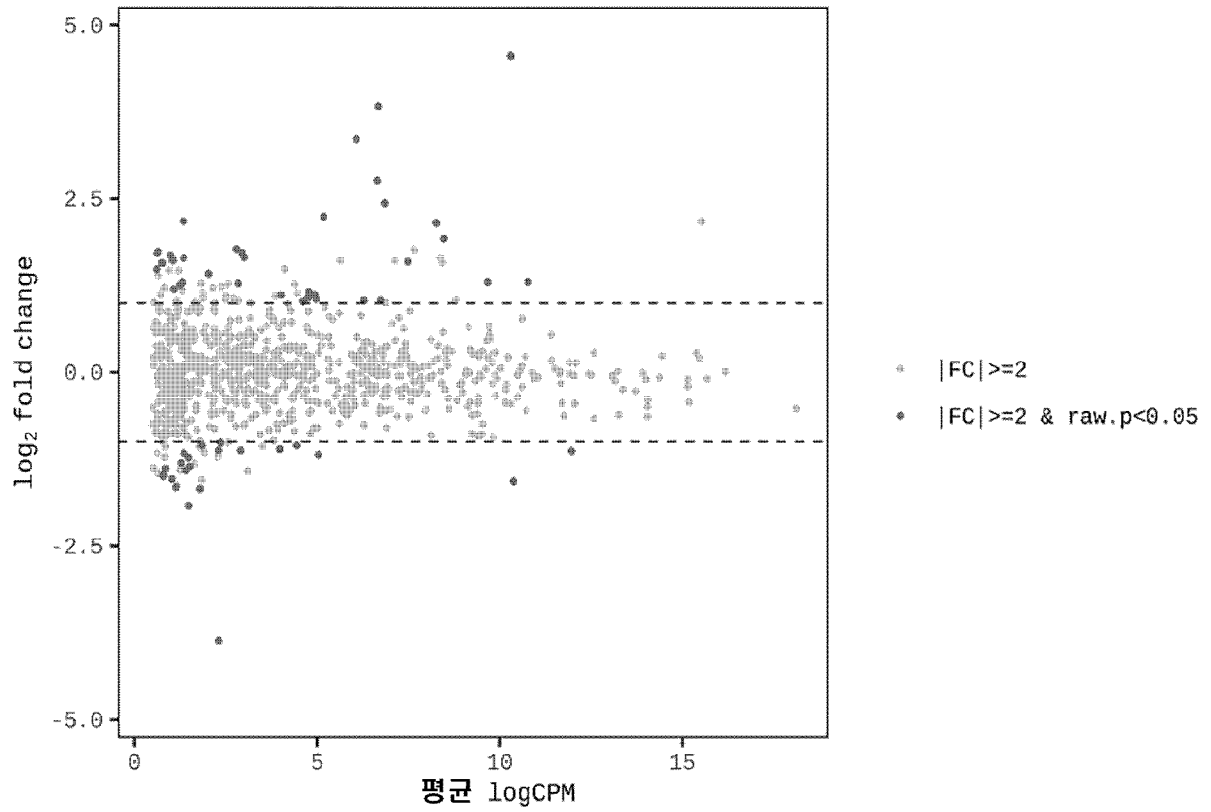


[도11]

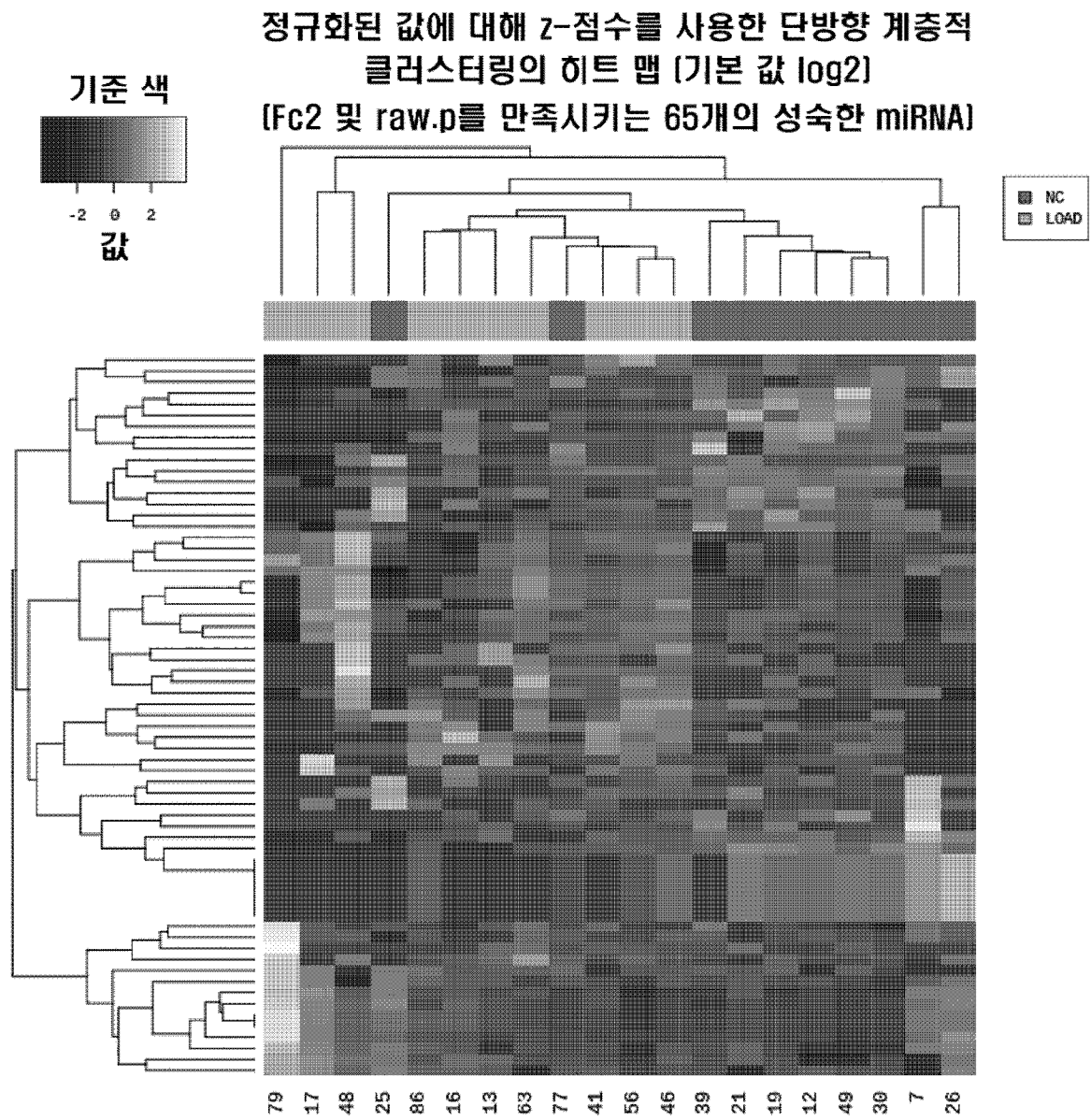


[도12]

LOAD 와 NC 사이의 스미어플롯



[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01)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(2018.01); A61P 25/00(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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) & keywords: 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 진단(diagnosis), 바이오마커(biomarker), hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258, Mature_385		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2017-184642 A (HEALTHY PASS INC. et al.) 12 October 2017 (2017-10-12) See claims 15 and 16; and paragraphs [0014], [0018], [0029], [0039], [0053] and [0062]-[0071].	1,5-10,12
A		2-4,11
X	LI, Qingqin L. et al. Integrated miRNA-Seq and mRNA-Seq Study to Identify miRNAs Associated With Alzheimer's Disease Using Post-mortem Brain Tissue Samples. Frontiers in Neuroscience. 2021, vol. 15, thesis no. 620899, inner pp. 1-14 (publication: 23 March 2021). See inner pages 3, 4 and 11; Figure 1; and Table 2.	1,3-11
X	JP 2021-121187 A (MACKAY MEMORIAL HOSPITAL) 26 August 2021 (2021-08-26) See claim 1.	1,3,4,6,7
A	NCBI Genbank. MN309058.1. Homo sapiens LNC_000421 lncRNA, complete sequence. 11 December 2019. Retrieved from (URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN309058.1/). See the entire main text.	1-12
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 April 2023		Date of mailing of the international search report 26 April 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000954

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013-055865 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN`S HOSPITAL, INC.) 18 April 2013 (2013-04-18) See claim 1.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/000954

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/000954

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2017-184642	A	12 October 2017	None			
JP	2021-121187	A	26 August 2021	CN	110872628	A	10 March 2020
				JP	2020-034560	A	05 March 2020
				JP	6938584	B2	22 September 2021
				JP	7152552	B2	12 October 2022
				TW	202024340	A	01 July 2020
				TW	1724521	B	11 April 2021
				US	2020-072843	A1	05 March 2020
WO	2013-055865	A1	18 April 2013	AU	2012-322788	A1	24 April 2014
				AU	2012-322788	A1	18 April 2013
				AU	2012-322788	B2	04 January 2018
				BR	112014008925	A2	27 October 2020
				CA	2851280	A1	18 April 2013
				CA	2851280	C	18 May 2021
				CN	104011210	A	27 August 2014
				CN	104011210	B	01 May 2018
				EP	2766482	A1	20 August 2014
				EP	2766482	B1	07 December 2016
				EP	3170899	A1	24 May 2017
				EP	3170899	B1	24 June 2020
				HK	1201294	A1	28 August 2015
				JP	2014-534810	A	25 December 2014
				JP	6234370	B2	22 November 2017
				KR	10-2014-0074997	A	18 June 2014
				MX	2014004516	A	16 January 2015
				NZ	623459	A	27 May 2016
				US	10184151	B2	22 January 2019
				US	2014-0235697	A1	21 August 2014
				US	2018-023142	A1	25 January 2018
				US	2019-276892	A1	12 September 2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6883(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6883(2018.01); A61P 25/00(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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, AD), 진단(diagnosis), 바이오 마커(biomarker), hsa-miR-10395-3p, hsa-miR-122-3p, hsa-miR-376b-5p, hsa-miR-376c-5p, hsa-miR-4485-5p, Mature_99, Mature_141, Mature_258, Mature_385		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2017-184642 A (HEALTHY PASS INC. 등) 2017.10.12 청구항 15, 16; 및 단락 [0014], [0018], [0029], [0039], [0053], [0062]-[0071]	1,5-10,12
A		2-4,11
X	LI, QINGQIN L. 등, Integrated miRNA-Seq and mRNA-Seq Study to Identify miRNAs Associated With Alzheimer's Disease Using Post-mortem Brain Tissue Samples, Frontiers in Neuroscience, 2021년, 15권, 논문번호 620899, 내부페이지 1-14 (공개: 2021.03.23.) 내부페이지 3, 4, 11; Figure 1; 및 Table 2	1,3-11
X	JP 2021-121187 A (MACKAY MEMORIAL HOSPITAL) 2021.08.26 청구항 1	1,3,4,6,7
A	NCBI Genbank, MN309058.1, Homo sapiens LNC_000421 lncRNA, complete sequence, 2019. 12. 11 (URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN309058.1/) 본문	1-12
☒ 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 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 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 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년04월26일(26.04.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년04월26일(26.04.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2017-184642 A	2017/10/12	없음	
JP 2021-121187 A	2021/08/26	CN 110872628 A	2020/03/10
		JP 2020-034560 A	2020/03/05
		JP 6938584 B2	2021/09/22
		JP 7152552 B2	2022/10/12
		TW 202024340 A	2020/07/01
		TW I724521 B	2021/04/11
		US 2020-072843 A1	2020/03/05
WO 2013-055865 A1	2013/04/18	AU 2012-322788 A1	2014/04/24
		AU 2012-322788 A1	2013/04/18
		AU 2012-322788 B2	2018/01/04
		BR 112014008925 A2	2020/10/27
		CA 2851280 A1	2013/04/18
		CA 2851280 C	2021/05/18
		CN 104011210 A	2014/08/27
		CN 104011210 B	2018/05/01
		EP 2766482 A1	2014/08/20
		EP 2766482 B1	2016/12/07
		EP 3170899 A1	2017/05/24
		EP 3170899 B1	2020/06/24
		HK 1201294 A1	2015/08/28
		JP 2014-534810 A	2014/12/25
		JP 6234370 B2	2017/11/22
		KR 10-2014-0074997 A	2014/06/18
		MX 2014004516 A	2015/01/16
		NZ 623459 A	2016/05/27
		US 10184151 B2	2019/01/22
		US 2014-0235697 A1	2014/08/21
		US 2018-023142 A1	2018/01/25
		US 2019-276892 A1	2019/09/12