

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2019년 4월 4일 (04.04.2019)



(10) 국제공개번호  
**WO 2019/066263 A1**

(51) 국제특허분류:  
*G01N 33/68* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)  
*C12Q 1/6883* (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/009725

(22) 국제출원일: 2018년 8월 23일 (23.08.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2017-0125341 2017년 9월 27일 (27.09.2017) KR

(71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울특별시 성동구 왕십리로 222, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김승현 (KIM, Seung Hyun); 06551 서울특별시 서초구 동광로1길 112, 4층 102동 403호, Seoul (KR). 노민영 (NOH, Min Young); 07587 서울특별시 강서구 공항대로 351-21, 102동 903호, Seoul (KR). 권민수 (KWON, Min Soo); 02798 서울특별시 성북구 종암로24가길 53, 101동 2206호, Seoul (KR). 오기욱 (OH, Ki Wook); 08018 서울특별시 양천구 목동동로 130, 1410동 204호, Seoul (KR). 남민엽 (NAHM, Min Yeop); 03100 서울특별시 종로구 이화장1길 16, 302호, Seoul (KR). 이수정 (LEE, Soo Jung); 04745 서울특별시 성동구 왕십리로 19나길 9-3, 201호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울특별시 강남구 테헤란로 63길 14, 8층, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, 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, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASE COMPRISING NCKAPI PROTEIN OR GENE ENCODING SAME

(54) 발명의 명칭: NCKAPI 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a novel use of NCKAPI gene in neurodegenerative diseases. More specifically, the present invention relates to a marker composition for predicting the prognosis of a neurodegenerative disease, comprising a NCKAPI protein or a gene encoding same, a composition and a kit for predicting the prognosis of a neurodegenerative disease, which comprises a formulation for measuring the mRNA level of the protein or the gene encoding same, and a pharmaceutical composition for preventing or treating neurodegenerative disease, comprising the protein or the gene encoding same as an active ingredient. The pharmaceutical composition comprising the NCKAPI protein or the gene encoding the same, according to the present invention, can selectively control only specific signal transduction related to the phagocytosis of microglial cells unlike conventional therapeutic agents that induce immunosuppression, and thus can be usefully used for the development of therapeutic agents with high safety and efficiency, and the NCKAPI protein or the gene encoding the same may be usefully utilized, as a marker for predicting the prognosis of a neurodegenerative disease, for predicting a disease progression rate and treatment outcome.

(57) 요약서: 본 발명은 신경계 퇴행성질환에서 NCKAPI 유전자의 신규 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 NCKAPI 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예후예측용 마커 조성물, 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물 및 키트, 및 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 NCKAPI 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 약학적 조성물은 면역억제를 유도하는 기존 치료제와 달리 미세아교세포의 포식작용과 관련된 특정 신호전달만을 선택적으로 조절하므로 안전성 및 효율성이 높은 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 상기 NCKAPI 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커로써 질환의 진행 속도 및 치료 결과를 예측하는데 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

WO 2019/066263 A1

## 명세서

# 발명의 명칭: NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

### 기술분야

- [1] 본 발명은 신경계 퇴행성질환에서 NCKAP1 유전자의 신규 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예후예측용 마커 조성물, 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물 및 키트, 및 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 신경계 퇴행성질환(Neurodegenerative Disease)은 신경구조와 기능 상실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 유발하는 질환으로, 전 세계적으로 인구 고령화가 빠르게 진행되면서 루게릭병(근위축성 측삭경화증, Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD) 및 파킨슨병(Parkinson's disease; PD) 등의 신경계 퇴행성질환 환자가 빠르게 증가하고 있다. 이러한 신경계 퇴행성질환은 일단 손상되거나 사멸되고 나면 복구와 재생이 어려운 신경세포의 특성 때문에 중대한 후유증을 남기면서 정상 상태로 회복되지 못하고 계속 악화되면서 진행되는 경우가 많다. 따라서 이를 해결하고자 지난 수십 년 이상 국내외 연구가 활발히 진행되어 왔으나, 치료제 개발은 아직까지 매우 어려울 뿐만 아니라 정확한 원인조차 제대로 파악하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 특성 때문에 대부분의 신경계 퇴행성질환들이 현재까지의 치료기술로는 완치가 불가능하며, 주로 진행속도를 조절하여 증상을 완화시키기 위한 신경전달 과정을 표적으로 하는데 초점이 맞춰지고 있다. 따라서, 신경계 퇴행성질환의 신규 치료 표적 및 치료제 개발이 시급한 실정이며, 상기 질환을 보다 조기에 진단하고 예후를 예측할 수 있는 마커의 발굴 또한 중요한 과제이다.
- [3] 과거에는 신경계 퇴행성질환의 병리소견상 관찰되는 신경교세포(neuroglial cell)의 증식, 면역-염증에 관련된 세포 및 면역매개 물질의 침윤 등은 신경세포의 파괴에 따른 비특이적인 이차적 현상으로만 받아들여져 왔다. 그러나, 분자생물학의 발전으로 면역-염증 기전(immune-inflammatory mechanism)에 중요한 역할을 하는 세포들의 표피지표에 대한 동정이 가능해졌고, 면역-염증매개 물질들의 정체 및 기능들이 규명됨에 따라 면역-염증 기전이 신경계 손상에 대한 비특이적인 이차적 반응만이 아니고 신경계 퇴행성 질환의

진행경과 중 초기부터 관여할 수도 있으며, 병리현상의 완급을 조절하고 신경세포의 생존 및 사멸에 적극적으로 관여할 것이라는 증거들이 제시되고 있다. 따라서 이러한 연구결과들은 면역-염증반응을 조절하고 억제하는 치료가 퇴행성질환의 새로운 치료 전략으로 이용될 수 있는 근거가 된다.

- [4] 한편, 미세아교세포(Microglia)는 신경계 퇴행성질환의 신경염증에 영향을 주는 주요세포로서 시냅스 리모델링, 다양한 신경성장인자의 분비, 뇌에 축적되는 다양한 찌꺼기(debris)를 제거하여 뇌의 신경세포 보존(neuronal integrity)과 사멸에 관여함으로써 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 최근 논문에 따르면 정상적인 환경에서는 이러한 미세아교세포의 기능이 잘 조절되지만, 신경계 퇴행성질환에서는 다양한 비접힘 또는 응집 단백질에 의해 미세아교세포가 활성화되며(예로, 알츠하이머병을 유발하는 amyloid- $\beta$ ,  $\alpha$ -synuclein, 루게릭병을 유발하는 SOD1, 측두엽 치매를 유발하는 TDP-43 등), 더불어 수적 변화와 기능 이상이 염증반응의 자극제로 작용하여 신경염증을 유발하여 신경계 퇴행성질환의 발생 및 질병 진행 정도에 영향을 준다고 밝혀지면서 신경계 퇴행성질환에서 미세아교세포의 손실 또는 기능 이상 현상이 강조되고 있다(Mol Neurobiol. 2016 Nov 9. [Epub ahead of print]). 따라서 기존의 치료방법 이외에 미세아교세포의 기능 조절을 통한 신경계퇴행성 질환 치료에 관심이 집중되고 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [5] 이에 본 발명자들은 대표적인 신경계 퇴행성질환인 루게릭병 및 알츠하이머병 환자에서 각각 다른 질병진행 정도를 갖는 환자유래 미세아교세포의 기능을 분석한 결과, 빠른 진행속도를 나타내는 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1의 발현 감소 및 기능 이상을 발견하였고, NCKAP1의 발현 조절에 의해 미세아교세포의 기능이 회복됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [6] 이에, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [7] 또한, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 예후 예측용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [9]
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에

제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제 해결 수단

- [11] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일구현예로, 상기 NCKAP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 NCKAP1 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 신경계 퇴행성질환은 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 미세아교세포에서 액틴 중합화 반응을 통해 상기 세포의 포식작용 기능을 활성화시키는 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

### 발명의 효과

- [22] 본 발명자들은 포식작용 기능 이상을 나타내는 신경계 퇴행성질환 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1 유전자의 발현이 감소되어 있음을 관찰하였고, 상기 유전자가 미세아교세포의 액틴 중합반응에 관여하여 상기 세포의 포식작용 기능을 조절하는 것을 실험적으로 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 NCKAP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 약학적 조성물은 면역억제를

유도하는 기존 치료제와 달리 미세아교세포의 포식작용과 관련된 특정 신호전달만을 선택적으로 조절하므로 안전성 및 효율성이 높은 치료제 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 상기 NCKAP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커로써 질환의 진행 속도 및 치료 결과를 예측하는데 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 본 발명의 실시예에 참여한 질병의 진행 정도가 다른 루게릭병 환자 두 그룹의 특성을 보여주는 것이다.
- [24] 도 2a는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS(S) 및 ALS(R))에서 면역세포화학염색법으로 미세아교세포의 표현형 마커인 P2ry12 및 iba-1 단백질의 발현을 확인한 결과이다.
- [25] 도 2b는 루게릭병 환자 유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포에서 qRT-PCR을 통해 미세아교세포의 표현형 마커인 P2ry12, iba-1, Olfml3, Tgf- $\beta$ r1 및 Tmem119의 mRNA 발현수준을 측정한 결과이다.
- [26] 도 2c는 도 2b와 동일한 방법으로 미세아교세포의 표현형 마커인 CD11b 및 CD45 mRNA의 발현수준을 측정한 결과이다.
- [27] 도 3a는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS(slow) 및 ALS(Rapid))의 포식작용 기능을 면역염색을 통해 분석한 결과이다.
- [28] 도 3b는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS(slow) 및 ALS(Rapid))에서 면역염색을 통해 단계별 포식작용 기능을 분석한 결과이다.
- [29] 도 4a는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(S/C 및 R/C)의 전사체 분석 결과이다.
- [30] 도 4b는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(S/C 및 R/C)에서 포식기능과 관련된 전사체의 발현수준을 비교한 히트맵 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 5a는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS(slow) 및 ALS(Rapid))에서 qRT-PCR을 통해 NCKAP1 mRNA 수준을 측정한 결과이다.
- [32] 도 5b는 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS i-MG(S) 및 ALS i-MG(R))에서 면역염색을 통해 NCKAP1 단백질 수준을 분석한 결과이다.
- [33] 도 6은 루게릭병이 유발된 마우스 모델의 척수 조직에서 마우스 주령 즉, 루게릭병의 진행(30, 60, 90, 120 일(days))에 따른 NCKAP1 mRNA의 발현수준을 측정한 결과이다.

- [34] 도 7은 NCKAP1의 발현조절에 따른 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식작용 변화를 분석한 결과로서, 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(ALS (S)-iMG 및 ALS (R)-iMG)에서 각각 NCKAP1의 발현을 저해(shNCKAP1) 및 과발현(O/E)시킨 후 포식작용 기능 변화를 실시간 이미징을 통해 보여주는 결과이다.
- [35] 도 8은 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 알츠하이머병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(AD (S)-iMG 및 AD (R)-iMG)의 포식작용을 실시간 이미징을 통해 보여주는 결과이다.
- [36] 도 9는 NCKAP1의 발현조절에 따른 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포의 포식 기능변화를 분석한 결과로서, 각각 느린 진행 및 빠른 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(AD (S)-iMG 및 AD (R)-iMG)에서 각각 NCKAP1의 발현을 저해(sh NCKAP1) 및 과발현(O/E)시킨 후 포식작용 기능 변화를 실시간 이미징을 통해 보여주는 결과이다.
- [37] 도 10a는 Hela 세포에서 NCKAP1의 과발현 또는 발현 저해에 따른 F-actin 단백질의 발현변화를 보여주는 결과이다.
- [38] 도 10b는 느린 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1의 발현을 저해(ALS (S)+shNCKAP1)시키거나 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1을 과발현(ALS (R)+NCKAP1 O/E)시킨 후 F-actin의 발현변화를 분석한 결과이다.
- [39] 도 11은 루게릭병 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1이 액틴 역학(actin dynamic)에 의한 식세포 컵 형성(phagocytic cup formation)에 관여함을 보여주는 면역염색 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명자들은 신경계 퇴행성질환의 예후 예측 및 치료에 이용할 수 있는 NCKAP1의 신규 용도를 규명하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [41] 이에, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커 조성물을 제공한다.
- [42] 또한, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 키트를 제공한다.
- [43] 본 발명에 있어서, 상기 NCKAP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [44] 본 발명에서 대상으로 하는 질병인 “신경계 퇴행성질환”은 신경구조와 기능의 상실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능

이상이 유발되는 질환을 의미한다. 신경세포는 손상되거나 사멸되면 복구와 재생이 어렵기 때문에 발병 후 중대한 후유증을 남길 수 있으며, 현재까지 효과적인 치료제가 개발되어 있지 않다. 따라서 신경계 퇴행성질환의 진행 경과 및 치료결과를 예측할 수 있는 유용한 마커 및 부작용 위험이 적은 효율적인 치료제 개발이 시급한 실정이다. 본 발명에 있어서 상기 신경계 퇴행성질환은 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [45] 본 발명에서 사용되는 용어, “예후(prognosis)”란, 병세의 진행, 회복에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명에서 예후는 신경계 퇴행성질환의 진행, 치료 결과, 또는 회복에 관한 예측을 의미하는 것이나, 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [46] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명에서 사용되는 용어, “항체”는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [48] 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [49] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다.
- [50] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [51] 본 발명의 예후 예측용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다.
- [52] 예컨대, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl<sub>2</sub>를 함유할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

- [53] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량구조 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 본 발명의 마커 유전자가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이 형태일 수 있다.
- [55] 또한, 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트일 수 있다. ELISA 키트는 마커 단백질에 대한 특이적인 항체를 포함하며, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함한다. 상기 ELISA 키트는 “항원-항체 복합체”를 형성한 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소, 및 그의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [56] 본 발명에서 사용되는 용어 “항원-항체 복합체”란 유전자가 코딩하는 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미한다. 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미세입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [58] 상기 피검체 유래의 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함할 수 있고 보다 바람직하게는 혈액일 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 단백질 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 또는 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 상기 mRNA의 발현수준은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로

중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 또는 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [61] 본 발명에서 사용되는 용어 “신경계 퇴행성질환의 예후 예측을 위한 정보제공방법”은 예후 예측을 위한 예비적 단계로써 신경계 퇴행성질환의 예후 예측을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [62] 본 발명자들은 질병의 진행 정도가 상이한 루게릭병 환자유래 미세아교세포에서 포식작용의 기능 이상이 관찰된 세포에서 NCKAP1의 발현이 저해되어 있음을 확인함으로써 상기 유전자와 환자유래 미세아교세포의 기능 이상 간에 밀접한 연관성이 있음을 확인하였다.
- [63] 본 발명의 일실시예에서는, 질병의 진행 정도가 상이한 루게릭병 환자유래 말초혈액에서 유도된 미세아교세포 각각 얻었으며, 이들의 포식작용을 관찰한 결과 빠른 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 심각한 포식작용의 기능 이상을 관찰하였다(실시예 3 참조).
- [64] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 질병의 진행 속도가 느리거나 빠른 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 전사체 분석을 실시함으로써 차등적으로 발현되는 유전자들이 다수 존재함을 확인하였고, 상기 세포의 포식작용과 관련된 유전자들의 발현수준을 비교한 결과 포식 기능의 이상을 나타내는 미세아교세포에서 NCKAP1 유전자의 발현이 크게 감소되어 있는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [65] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, NCKAP1 유전자의 발현수준을 다시 검증하기 위해 각각 질병의 진행 정도가 다른 루게릭병 환자 유래 미세아교세포에서 상기 유전자의 mRNA 및 단백질 수준을 측정된 결과 포식작용의 기능 이상을 나타내는 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 발현수준이 매우 낮은 것을 확인하였으며, 루게릭병을 유발시킨 마우스 모델의 척수조직에서도 상기 유전자의 mRNA 수준이 루게릭병 말기로 갈수록 감소되는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [66] 상기 결과들을 통해 NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자가 신경계 퇴행성질환의 예후 예측을 위한 분자 마커로 이용될 수 있음을 알 수 있다.
- [67] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 용어, “예방”이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 신경계 퇴행성질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든

행위를 의미한다.

[69] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 신경계 퇴행성질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[70] 본 발명에서는 포식작용의 기능 이상을 갖는 루게릭병 및 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1 유전자의 발현수준 조절을 통한 기능 회복 효과를 확인하였다.

[71] 본 발명의 일실시예에서는, 포식작용에 대한 정상 기능 및 기능 이상을 나타내는 루게릭병 및 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포를 관찰하였고, 상기 세포들에서 각각 NCKAP1 유전자의 발현을 낮추거나 과발현시켰을 때, NCKAP1 낮추는 것에 의해 정상적인 포식기능이 저하되고 상기 유전자의 과발현에 의해 포식작용의 기능이 회복되는 것을 확인하였다(실시예 6 및 7 참조).

[72] 본 발명의 다른 실시예에서는, NCKAP1에 의한 포식작용 조절 기능이 어떠한 기전에 의해 일어나는지 분석한 결과, 상기 유전자의 발현수준에 따른 미세아교세포의 F-actin 발현변화를 확인함으로써 액틴 중합반응을 조절하여 포식작용을 조절함을 확인하였으며 또한 상기 유전자가 식세포 컵 형성에 관여함을 확인하였다(실시예 8 참조).

[73] 상기 결과들을 통해 NCKAP1이 신경계 퇴행성질환 환자유래 미세아교세포에서 포식작용 기능을 활성화시키는 것을 확인하였으며, 이에 NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자는 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

[74] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 NCKAP1 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제제에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[75] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 바람직하게는 경구투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의

정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [76] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [77] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [78] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 *in vitro* 상에서 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 세포의 NCKAP1 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 후보물질 비처리군에 비해 NCKAP1의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질을 신경계 퇴행성질환의 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 신경계 퇴행성질환 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [79] 상기 세포는 신경계 퇴행성질환 환자유래 미세아교세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 상기 NCKAP1 유전자의 발현 또는 활성 측정은 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 및 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [82] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[83] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[84] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물의 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[85]

[86] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[87]

[88] **[실시예]**

[89] **실시예 1. 실험준비 및 실험방법**

[90] **1-1. 피검자 모집**

[91] 본 실험은 한양대학교 윤리위원회의 승인을 받은 후 실시하였다. 구체적으로 본 발명자들은 루게릭병 진단기준인 개정된 El Escorial criteria에 따라 고발성 루게릭(sporadic ALS)으로 진단받은 11명의 루게릭병 환자(6명은 느린 진행 및 5명은 빠른 진행) 및 이들과 연령이 일치하는 2명의 건강한 성인 지원자를 등록하였으며, 상기 지원자 및 루게릭병 환자 모두 진행중인 전염병은 없는 것을 확인하였다. 상기 11명의 루게릭병 환자는 임상적으로 초기로 확인되었으며(ALSFRS-R 점수: 29-41), 질병의 진행은 AALS 점수의 변화, 시간의 변화, 초기 평가와 수집 시 평가 또는 분석 종료시의 평가와 비교하여 결정하였다. 질병이 빠르게 진행되는 환자는 1.5 델타 ALSFRS-R 점수/월 이상의 속도로 진행되는 환자로 정의하였고, 느리게 진행되는 환자는 혈액 수집 당시 0.5 델타 ALSFRS-R 점수/월 미만의 속도로 진행되는 환자로 정의하였다. 또한, 유도된 미세아교세포 유사(induced microglia-like; iMG) 세포를 확립하기 위해, 서면 동의서를 받은 후 상기 환자들로부터 혈액 샘플을 채취하였다. 본 실험에 참가한 상기 환자들의 정보는 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다.

[92] [Table 1]

| Patients | Age(2016) | Sex | Age of onset(yr) | ALSFRS-R score | ALSFRS/mon | Site of onset                   |
|----------|-----------|-----|------------------|----------------|------------|---------------------------------|
| S1       | 68        | F   | 63               | 41             | 0.18       | Lt. U/Ext. distal               |
| S2       | 63        | M   | 55               | 37             | 0.14       | Rt. L/Ext.                      |
| S3       | 60        | M   | 56               | 44             | 0.2        | Axial wk.                       |
| S4       | 49        | F   | 46               | 39             | 0.36       | Lt. U/Ext. distal               |
| S5       | 50        | M   | 47               | 46             | 0.33       | Rt. u/Ext. prox                 |
| S6       | 61        | F   | 56               | 45             | 0.11       | Rt. u/Ext. distal               |
| R1       | 57        | M   | 56               | 42             | 1.5        | both u/Ext. (prox)              |
| R2       | 49        | F   | 47               | 39             | 1.8        | Rt. L/Ext.                      |
| R3       | 57        | M   | 55               | 29             | 1.73       | Dysarthria, Rt. u/Ext. (distal) |
| R4       | 76        | M   | -                | -              | -          |                                 |
| R5       | 49        | M   | 47               | 37             | 1.57       | Dysarthria, Lt. U/Ext.          |

[93]

[94] **1-2. PBMC로부터 유도 미세아교세포 유사(induced microglia-like; iMG) 세포의 제조**

[95] 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell; PBMC)로부터 유도 미세아교세포 유사세포를 제조하기 위하여, 상기 실시예 1-1의 건강한 성인 지원자와 11명의 루게릭병 환자로부터 헤파린 튜브를 사용하여 10cc의 말초혈액을 채취하였다. 다음으로, Histopaque-1077(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 밀도 구배 원심분리법을 통해 상기 말초혈액으로부터 말초혈액단핵세포를 분리한 후, 열처리하여 불활성화시킨 10% 소태아혈청(FBS, Endotoxin 5 0.692 EU/ml, Japan Bio Serum, Hiroshima, Japan) 및 1% 항생제/항균제(Invitrogen, Carlsbad, CA)가 포함된 RPMI-1640(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 배지로 배양하였다. 이후 배양한 말초혈액단핵세포를 500,000 세포/ml의 밀도로 배양 챔버에 분주하고 표준 배양 조건(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 밤새 배양한 다음, 배지를 조심스럽게 제거하고 1% 항생제/항균제, 제조합 인간 GM-CSF(10 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), 및 제조합 인간 IL-34(100 ng/ml; R&D Systems)가 첨가된 RPMI-1640 Glutamax(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 배지를 이용해 부착세포인 단핵구(monocytes)를 배양하여 유도 미세아교세포 유사세포(iMG cell)가 되도록 하였다. 배양 14일 후 배양 플레이트를 완전히 세척하여 부유 세포를 제거하고 새로운 배지를 첨가한 다음 세포를 회수하거나

21일까지 기능 분석에 이용하였다.

[96]

[97] **1-3. 면역세포화학염색법(Immunocytochemistry)**

[98] 상기 실시예 1-2의 방법으로 제조한 iMG 세포가 미세아교세포의 특성을 갖는지 검증하기 위해 P2ry12 및 Iba-1을 미세아교세포 표현형 마커로 이용하였다. 보다 상세하게, iMG 세포를 PBS로 세척하고 4% 포르말데히드(formaldehyde)로 고정시킨 다음, 0.1 % Triton X-100을 5분 동안 처리하여 세포막의 투과성을 높이고 토끼 항-P2ry12 항체(#ab86195, 1:100, abcam) 및 마우스 항-Iba-1 항체(#ab15690, 1:100, abcam)를 이용하여 간접적 면역염색법을 실시하였다. 구체적으로, 5% 정상 염소 혈청을 함유한 PBS로 희석된 0.1% Triton-X 100으로 각 항체를 희석한 후 세포에 처리하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 다음으로 PBS(-)를 이용해 5분 동안 세포를 3회 헹군 다음, 항-토끼 Alexa 546 및 항-마우스 Alexa 488이 접합된 2차 항체(Invitrogen, CA, USA)를 처리하여 반응시켰다. 이후 제조사의 프로토콜에 따라 로다민-팔로이딘(Rhodamine-phalloidin)이 접합된 당나귀 항-토끼 면역글로불린 G 항체(1:400 희석액; invitrogen)를 이용하여 단백질을 시각화하였다. 한편, 세포를 4', 6-diamidino-2-phenylindole(DAPI; Sigma, MO, USA)로 대조염색한 다음, Fluoromount-G(Cytomation; Dako)로 마운팅하였다. 형광 이미지는 공초점 현미경(TCS SP5, Leica, Wetzlar, Germany)으로 촬영하였다.

[99]

[100] **1-4. 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real time-polymerase chain reaction; qRT-PCR)**

[101] 세포에 TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 시약을 처리하여 총 RNA를 추출하고, 나노드롭(Thermo Scientific, ND-2000)을 이용해 RNA의 농도와 순도를 측정하였다. 상기 추출한 RNA를 이용하여 EcoDry™ cDNA 키트(Clontech, CA, USA)로 cDNA를 합성한 다음, 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하여 CD11b(Qiagen, Germany, PPH00644F), CD45(Qiagen, Germany, PPH01510C), P2ry12(Qiagen, Germany, PPH02545B), Olfm13(Qiagen, Germany, PPH07681A), TGF-βr1(Qiagen, Germany, PPH00237C), CD206(Qiagen, Germany, PPH09939B), Tmem119(Qiagen, Germany, PPH21875A), Nckap1(Qiagen, Germany, PPH15666A), mNckap1(Qiagen, Germany, PPM26732A), 및 GAPDH(Qiagen, Germany, PPH00150F) mRNA의 발현수준을 측정하였다. 보다 구체적으로, cDNA에 Power SYBR Green PCR Master Mix와 각 유전자에 특이적인 프라이머를 처리하고 Applied Biosystems Step One Plus™ system(Life Technologies, USA)을 이용해 95°C에서 10분, 95°C 15초 및 60°C 1분 과정을 40 사이클 반복 수행하여 cDNA를 증폭시켰다. 증폭반응 시 융합 곡선(melting curve)을 생성하여 증폭의 특이성을 검증하였으며, 상대적 표준편차(relative quantity; RQ)는 간헐성 표준 대조군으로써 GAPDH를 사용하여  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법으로 계산하였다. 상기 방법을 통해

독립적으로 3회 반복 실험하여 결과를 도출하였다.

[102]

[103] **1-5. 포식작용 분석(Phagocytosis assay)**

[104] 미세아교세포의 포식작용을 정량화하기 위하여, 상기 실시예 1-2의 방법에 따라 21일 동안 배양하여 유도한 미세아교세포 유사세포에 적색형광 라텍스 비드(2  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 4  $\mu\text{l}$ 를 처리하고 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 다음으로 2 ml의 차가운 PBS를 처리하여 포식 활성을 중지시킨 후 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고 고정시킨 다음 DAPI로 대조염색하였다. 이후 공초점현미경(TCS SP5, Leica, Wetzlar, Germany)으로 세포를 관찰 및 분석하였으며, 세포 당 포식작용에 의해 섭취된 비드의 수가 포식작용 활성을 나타내는 것으로 간주하였다.

[105]

[106] **1-6. 라이브러리 제조 및 RNA 서열분석**

[107] 대조군과 시험군에서 추출한 RNA에 대하여, 제조사의 지시에 따라 센스 3' mRNA-Seq 라이브러리 제조 키트(Lexogen, Inc. Austria)를 이용하여 라이브러리를 제작하였다. 간단하게, 500 ng의 총 RNA를 각각 준비하고, RNA의 5' 말단에 Illumina 호환 서열을 포함하는 oligo-dT 프라이머를 혼성화시켜 역전사 반응을 실시하였다. RNA 주형의 분해 후, 제 2가닥 합성은 그것의 5' 말단에 Illumina-호환 링커 서열을 포함하는 랜덤 프라이머를 이용해 수행되도록 하였다. 이중가닥 라이브러리는 모든 반응 성분을 제거하기 위해 마그네틱 비드를 사용하여 정제하였다. 또한, 클러스터 생성에 필요한 전체 어댑터 서열을 추가하기 위해 라이브러리를 증폭시켰다. 완성된 라이브러리는 PCR로 정제하였으며, NextSeq 500(Illumina, Inc., USA)을 이용하여 단일-말단 75 시퀀싱으로 고속대량 서열분석(High-throughput sequencing)을 실시하였다.

[108]

[109] **1-7. 서열분석 결과 분석**

[110] 센스 3' mRNA-서열 리드를 Bowtie2 버전 2.1.0(Langmead and Salzberg, 2012)을 이용하여 정렬하였다. Bowtie2 지수는 게놈 조립 서열 또는 게놈 및 전사체 정렬을 위한 대표적인 전사체 서열로부터 제조하였다. 정렬(alignment) 파일은 전사체를 모으고, 그 발현량을 추정하고, 유전자의 차등적인 발현 수준을 검출하는데 사용하였다. 차등적으로 발현되는 유전자는 BIOCONDUCTOR version 3.0을 이용하여 R 버전 3.2.2(R Development Core Team (2011), R: 통계 컴퓨팅을 위한 언어 및 환경, 오스트리아 비엔나: 통계 컴퓨팅을 위한 R 재단. ISBN: 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>에서 온라인으로 이용 가능)내에서 EdgeR을 이용해 고유 및 다중 정렬의 계수를 기반으로 결정되었다.

[111] RT(Read Count) 결과는 Genewiz™ 버전 4.0.5.6(Ocimum Biosolutions, India)을 이용하는 글로벌 표준화 방법에 기반하여 처리하였다. 유전자 분류는 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)와 Medline

데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로 검색된 결과를 기반으로 하였다. 또한 MeV 4.9.0을 사용하여 샘플 및 유전자 클러스터링을 수행하였는데, 계층적 클러스터 분석은 Euclidean 거리 상관관계를 사용하여 평균 연관성을 갖는 거리를 측정하여 실시하였고, 클러스터 및 히트 맵은 MeV 4.9.0을 통해 시각화하였다.

[112]

[113] **1-8. 형질전환 SOD1-G93A 마우스 제조**

[114] B6SJL-Tg(SOD1-G93A) 1Gur/J 마우스는 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였으며, 실험 전 12시간의 명암주기 하에서 공급자의 프로토콜에 따라 사육 하였다. 인간 G93A 형질전환 유전자의 존재는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통해 확인하였고 형질전환 유전자 카피 수를 평가하였다. 상기 스트레인을 갖는 마우스에서, 루게릭의 초기 및 말기 증상은 약 77 및 136일째에 나타난다고 알려져 있으므로, 본 발명자들은 SOD1-G93A 생쥐를 3개의 그룹으로 나누어 각 시점 즉, 60일(무증상), 90일(초기 증상) 및 120일(후기 증상)에 평가하였다. 야생형(WT) 마우스로는 B6SJL F1/J을 구입하여 대조군으로 사용하였다. 모든 동물 실험은 한양대학교 실험동물운영위원회의 승인을 받아 진행하였다.

[115]

[116] **1-9. 세포 내 NCKAP1 유전자의 과발현 및 발현저해 조작**

[117] 세포 내에서 인간 NCKAP1 유전자를 과발현시키거나 또는 억제하기 위해, 분석 2일 전 pLenti-C-mGFP-Human NCK-associated protein 1(NCKAP1, NM\_013436) cDNA ORF 클론(OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) 또는 pGFP-C-shLenti-NCKAP1 Human shRNA 렌티바이러스 파티클(Gene ID 10787, OriGene Technologies)을 세포에 도입하였다. 유전자 억제 효율은 qRT-PCR 및 단백질 발현수준 측정을 통해 검증하였다.

[118]

[119] **1-10. 세포의 포식작용 실시간 이미징**

[120] 배양된 iMG 세포를 이미징 접시(챔버 슬라이드 Lab-Tek II 4, Fisher)에서 배양한 다음, 살아있는 세포의 세포골격을 이미지화 하기 위해 iMG 세포에 실리온 로다민 형광단(rhodamine fluorophore)과 F-actin 결합 저분자인 팔로이딘(phalloidin)을 기반으로 하여 100 nM의 SiR-액틴 염료(Cytoskeleton Inc., 북미, 미국 및 CA)를 사용하여 표지하였다. 이후 세포를 PBS로 2회 세척하고, 새로운 배지로 교체한 다음 포식작용을 시각화하기 위해 분석 전 세포에 3  $\mu$ l의 라텍스 비드(1.1  $\mu$ m, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 처리하였다. 실시간 영상은 4시간 동안 1분 30초마다 한 프레임씩 촬영하였으며, 한양대학교 연구센터에 설치된 DeltaVision 형광 현미경 시스템(Applied Precision)을 이용하여 진행하였다.

[121]

[122] **1-11. 통계분석**

[123] 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차 측정값(means $\pm$ SEM)으로 나타내었다. 그룹간 유의성은 Prism Version 7.0 소프트웨어를 이용해 Student's t test 및 one way-ANOVA로 평가하였으며, P-value < 0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[124]

[125] **실시예 2. 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포의 표현형 분석**

[126] 상기 실시예 1-1 및 1-2의 방법에 따라 질병의 진행 정도(slow/rapid progression)가 다른 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포 유사(iMG) 세포가 미세아교세포의 표현형을 갖는지 알아보려고 하였다. 이를 위해, 상기 iMG 세포에 대하여 상기 실시예 1-3 및 1-4의 방법에 따라 면역세포화학염색법 및 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 실시하여 미세아교세포의 핵심유전자인 P2ry12, iba-1, Olfml3, Tgf- $\beta$ 1, Tmem119, CD11b, 및 CD45의 발현 수준을 측정하였다.

[127] 먼저 면역세포화학염색법을 실시하여 각각 P2ry12 및 iba-1 단백질의 발현여부를 관찰한 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 정상 대조군유래 iMG 세포(HC)와 유사하게 느린(slow) 진행 및 빠른(rapid) 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 iMG 세포(ALS(s) 및 ALS(R)) 모두에서 상기 단백질들이 발현되는 것을 확인하였다. 또한, qRT-PCR을 통해 상기 각 유전자들의 mRNA 발현수준을 측정한 결과, 도 2b 및 도 2c에 나타낸 바와 같이 단핵구(monocyte)의 발현 값을 기준으로 하여 상대적으로 비교할 때 P2ry12, iba-1, Olfml3, Tgf- $\beta$ 1, Tmem119, 및 CD11b의 mRNA 수준이 증가하였고 CD45의 mRNA 수준이 감소된 것을 확인하였다.

[128] 상기 결과로부터 상기 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포 유사세포가 미세아교세포의 특성을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

[129]

[130] **실시예 3. 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포의 포식작용 분석**

[131] 상기 실시예 2의 결과에 더하여, 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식작용 기능을 분석하고자 하였다. 루게릭병의 질병진행 정도에 따라 차이가 나타나는지 알아보기 위해 각각 느린(slow) 진행 및 빠른(rapid) 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(ALS(slow) 및 ALS(Rapid))에서 실시예 1-5의 방법에 따라 포식작용을 분석하였다.

[132] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 면역염색 결과 ALS(Rapid)에서 심각한 포식기능 이상이 관찰되었다. 또한, 도 3b를 통해서도 ALS(slow)의 경우에만 적색형광이 선명히 관찰되는 것을 통해 ALS(slow)에서만 포식작용이 활발히 일어난 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 루게릭병 환자유래

말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포에서 포식작용 기능을 확인하였으며, 이러한 작용은 느린 진행속도를 갖는 루게릭병 환자에서만 나타나는 것을 관찰하였다.

[133]

[134] 실시예 4. RNA 서열분석을 통한 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 유전자 발현 차이 분석

[135] 상기 실시예 3의 결과를 통해 질병의 진행 정도가 다른 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식작용 활성이 다르게 나타난 것을 확인하였는바, 상기 실시예 1-6 및 1-7의 방법에 따라 RNA 서열분석을 실시하여 상기 질병 진행 정도가 다른 환자유래 미세아교세포의 전사체분석을 실시하였다.

[136] 먼저 각각 빠른 진행속도 및 느린 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 미세아교세포(R/C 및 S/C)의 전사체 분석 결과를 벤 다이어그램으로 나타낸 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이 차등적으로 발현되는 유전자가 다수 존재하였다. 나아가 포식기능과 관련된 전사체의 발현수준을 비교한 결과, 도 4b에 나타낸 바와 같이 빠른 진행 속도를 갖는 루게릭병 환자유래 미세아교세포(R/C)에서 NCKAP1 유전자의 발현이 크게 감소되어 있는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 루게릭병에서 상기 유전자가 미치는 영향을 보다 자세히 분석하기 위해 하기 실험들을 진행하였다.

[137]

[138] 실시예 5. 루게릭병 환자 및 동물모델에서 NCKAP1의 발현수준 분석

[139] **5-1. 루게릭병 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1 발현수준 분석**

[140] 질병의 진행 정도가 다른 루게릭병 환자유래 미세아교세포에서 상기 실시예 4를 통해 발견한 NCKAP1 유전자의 발현수준을 알아보기 위해, qRT-PCR 및 면역세포화학염색법을 실시하여 상기 유전자의 mRNA 및 단백질 발현수준을 측정하였다.

[141] 그 결과, 도 5a에 나타낸 바와 같이 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(ALS(Rapid))에서 NCKAP1 mRNA의 발현수준이 크게 감소되어 있는 것을 관찰하였고, 도 5b에서 볼 수 있듯이 단백질 수준에서도 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(ALS i-MG (R))에서 단백질 발현수준이 매우 낮은 것을 확인하였다.

[142]

[143] **5-2. 루게릭병 마우스모델의 척수 조직에서 NCKAP1 mRNA 발현수준 분석**

[144] 나아가 본 발명자들은 상기 실시예 1-8의 방법으로 제조한 루게릭병 마우스 모델의 척수 조직에서 NCKAP1 mRNA의 발현수준을 측정하였다.

[145] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 상기 마우스의 루게릭병 말기에 상기 유전자의 발현수준이 크게 감소되어 있는 것을 확인하였다.

[146]

[147] 실시예 6. NCKAP1의 발현조절에 따른 루게릭병 환자유래 미세아교세포의

### 포식작용 기능변화 분석

- [148] 본 발명자들은 상기 실시예 4 및 5의 결과를 바탕으로 NCKAP1의 발현수준에 따라 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식기능이 변화하는지 알아보고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-9의 방법에 따라 상기 미세아교세포에서 NCKAP1을 과발현시키거나 또는 녹다운 시킨 후 상기 세포의 포식작용 기능 변화를 실시간 영상으로 촬영하여 분석하였다.
- [149] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 느린 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(ALS (S)-iMG)에서 shRNA를 이용해 NCKAP1의 발현을 저해(shNCKAP1)한 경우 상기 실시예 3의 결과와 상반되게 상기 세포의 포식작용이 현저히 감소한 것을 관찰하였다. 이에 반해 빠른 진행 속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(ALS (R)-iMG)에서 NCKAP1을 과발현(O/E)시킨 경우 포식작용 기능이 회복된 것을 확인하였다.
- [150] 상기 결과를 통해 NCKAP1 유전자가 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식작용 기능을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[151]

- [152] 실시예 7. 알츠하이머병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포의 포식작용 및 NCKAP1에 의한 조절 기능 분석

- [153] **7-1. 알츠하이머병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포의 포식작용 관찰**
- [154] 본 발명자들은 또 다른 신경계 퇴행성질환인 알츠하이머병에서도 NCKAP1 유전자가 포식작용 기능에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3과 유사하게 질병의 진행 정도에 따라 포식작용 기능이 다르게 나타나는지 조사하기 위해, 각각 느린(slow) 진행 및 빠른(rapid) 진행 속도를 갖는 알츠하이머병 환자유래 말초혈액으로부터 유도된 미세아교세포(AD(R)-iMG 및 AD(S)-iMG)에 대하여 실시예 1-9의 방법에 따라 실시간으로 포식작용을 관찰하였다.
- [155] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 상기 루게릭병 환자에서와 유사하게 빠른(rapid) 진행 속도를 갖는 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포(AD(R)-iMG)에서 심각한 포식기능 이상이 관찰되었다.

[156]

- [157] **7-2. NCKAP1 발현조절에 따른 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포의 포식기능 변화 분석**

- [158] 상기 실시예 7-1의 결과를 바탕으로 NCKAP1의 발현수준에 따라 루게릭병 환자유래 미세아교세포의 포식기능이 변화하는지 알아보고자 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 1-9의 방법에 따라 상기 미세아교세포에서 NCKAP1을 과발현시키거나 또는 녹다운 시킨 후 상기 세포의 포식기능의 변화를 실시간 영상으로 촬영하여 분석하였다.
- [159] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 느린 진행속도를 갖는 환자유래

미세아교세포(AD(S)-iMG)에서 shRNA를 이용해 NCKAP1의 발현을 저해(shNCKAP1)한 경우 상기 실시예 7-1의 결과와 상반되게 상기 세포의 포식작용이 현저히 감소한 것을 관찰하였다. 이에 반해 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포(AD(R)-iMG)에서 NCKAP1을 과발현(O/E)시킨 경우 포식작용 기능이 회복된 것을 확인하였다.

[160] 상기 결과를 통해 NCKAP1 유전자가 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포의 포식작용 기능을 조절하는 것을 알 수 있었다.

[161]

[162] 실시예 8. NCKAP1에 의한 포식작용 조절기전 분석

[163] **8-1. NCKAP1의 발현조절에 따른 F-actin 발현변화 확인**

[164] 본 발명자들은 상기 실시예 결과들을 통해 NCKAP1이 루게릭병 및 알츠하이머병 환자유래 미세아교세포의 포식기능을 조절할 수 있음을 확인하였는바, 상기 유전자가 세포의 액틴 중합반응에 관여하여 세포의 포식작용을 조절하는지 알아보기 위해, 먼저 인간 자궁암세포주인 Hela에서 NCKAP1의 발현조절에 따른 F-actin의 발현변화를 분석하였다.

[165] 그 결과, NCKAP1를 과발현(GFP-NCKAP1) 또는 녹다운(shNCKAP1) 시킨 경우 F-actin의 발현수준을 알 수 있는 팔로이딘(phalloidin) 이미지를 관찰한 결과 도 10a에 나타낸 바와 같이 NCKAP1을 과발현시켰을 때 F-actin의 발현이 증가하였으며, 이와 반대로 NCKAP1의 발현을 녹다운 시켰을 때는 F-actin의 발현이 감소한 것을 확인하였다.

[166] 상기 결과를 바탕으로, 루게릭병 환자유래 미세아교세포에서도 NCKAP1의 발현수준에 따라 F-actin의 발현변화가 유도되는지 알아보려고 하였다. 이를 위해, 상기 실시예 6의 결과에 근거하여 느린 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1의 발현을 녹다운(ALS (S)+shNCKAP1)시키거나 빠른 진행속도를 갖는 환자유래 미세아교세포에서 NCKAP1을 과발현(ALS (R)+NCKAP1 O/E)시킨 후 F-actin의 발현변화를 관찰하였다.

[167] 그 결과, 도 10b에 나타낸 바와 같이 ALS (S)+shNCKAP1의 경우에는 F-actin의 발현이 감소한 반면, ALS (R)+NCKAP1 O/E의 경우에는 F-actin의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[168] 상기 결과들은 NCKAP1이 환자유래 미세아교세포에서 액틴 중합반응에 관여함으로써 포식작용을 조절한다는 것을 의미하는 것이다.

[169]

[170] **8-2. 액틴 역학에 따른 식세포 컵 형성에 대한 NCKAP1의 기능 확인**

[171] 상기 실시예 8-1 결과를 통해 NCKAP1이 액틴 중합반응에 관여함을 확인하였는바, 이에 더하여 액틴 역학(actin dynamic)에 의한 식세포 컵 형성(phagocytic cup formation)에도 영향을 미치는지 분석하였다.

[172] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 면역염색 결과 환자유래 미세아교세포의 포식작용에 의해 포식된 비드 위치에 해당하는 식세포 컵 부분에서 F-actin의

발현과 NCKAP1의 발현이 동일하게 나타나는 것을 통해 NCKAP1이 식세포 컵 형성에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

[173]

[174] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

### 산업상 이용가능성

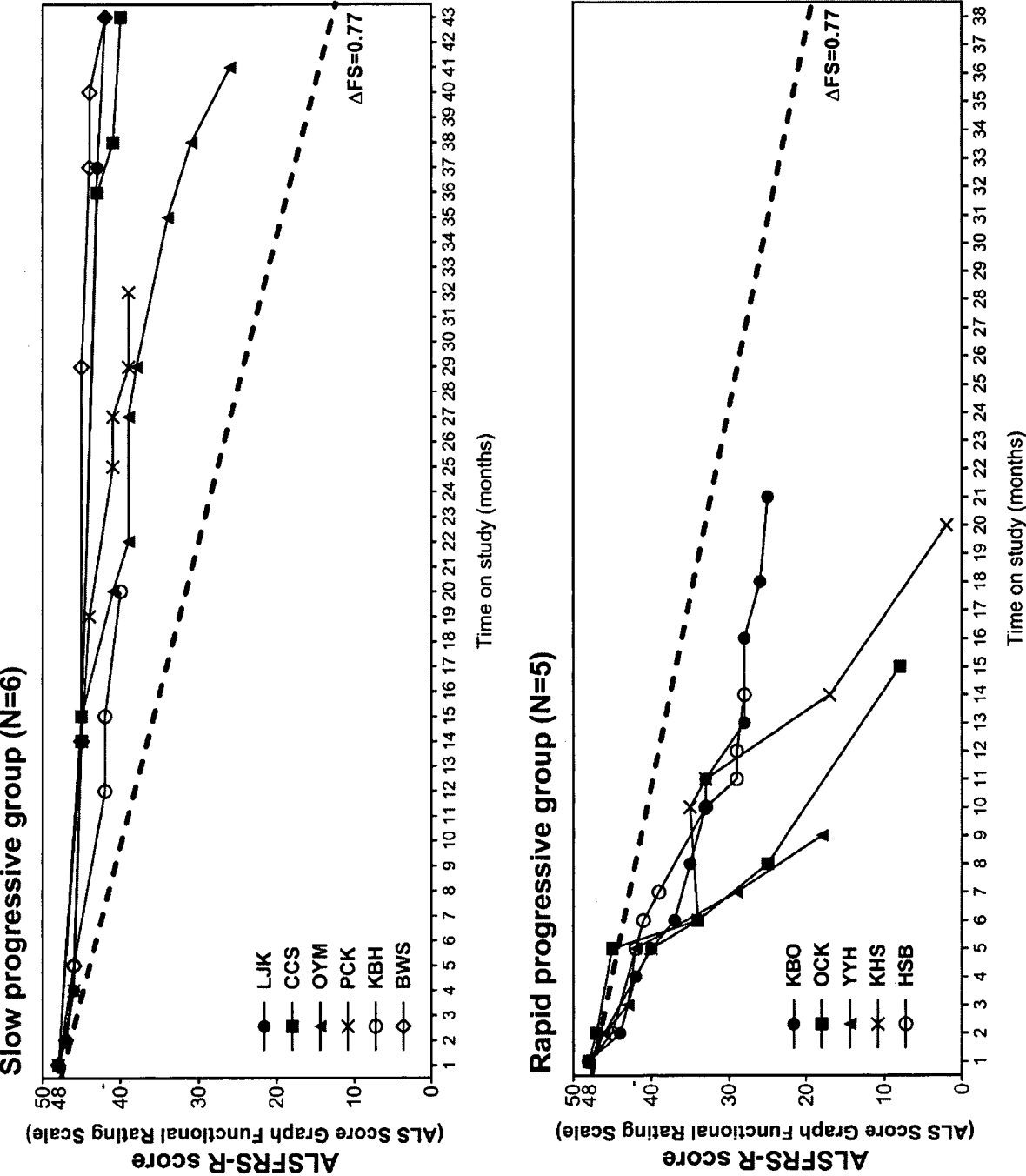
[175] 본 발명은 미세아교세포에서 포식작용 기능을 조절하는 NCKAP1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 이용하여 미세아교세포의 포식작용과 관련된 특정 신호전달만을 선택적으로 조절함으로써 신경계 퇴행성질환의 치료제로 개발할 수 있는 기술인바, 종래 면역억제를 유도하는 기존치료제에 비해 안전성 및 효율성이 높은 치료제를 개발할 수 있으며, 이에 더하여 상기 NCKAP1 유전자는 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커로써 질환의 진행 속도 및 치료 결과를 예측하는데 유용하게 활용될 수 있는바, 본 발명에 따른 기술은 신경계 퇴행성질환의 예후 예측 및 치료제 개발 분야에서 광범위하게 활용될 수 있을 것이다.

## 청구범위

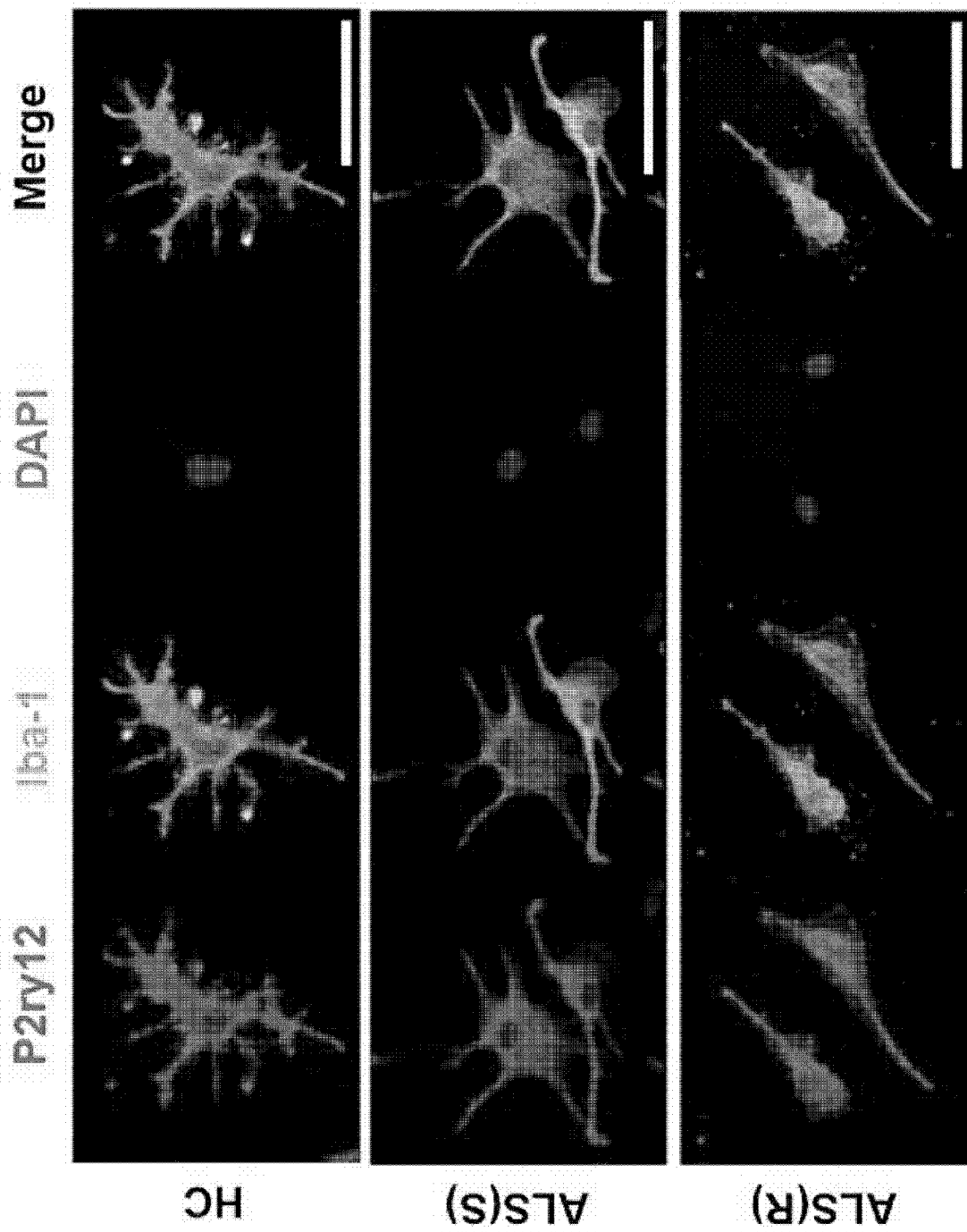
- [청구항 1] NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 마커 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 NCKAP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 NCKAP1 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 신경계 퇴행성질환은 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)인 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.
- [청구항 5] NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,  
상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 예후 예측용 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,  
상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 예후 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제5항의 조성물을 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예후 예측용 키트.
- [청구항 9] NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,  
상기 NCKAP1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,  
상기 NCKAP1 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,

- 상기 신경계 퇴행성질환은 루게릭병(Amyotrophic lateral sclerosis), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제9항에 있어서,  
상기 조성물은 미세아교세포에서 액틴 중합화 반응을 통해 상기 세포의 포식작용 기능을 활성화시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 14] NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 15] NCKAP1(NCK associated protein 1) 단백질을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의, 신경계 퇴행성질환의 예방 또는 치료용도.

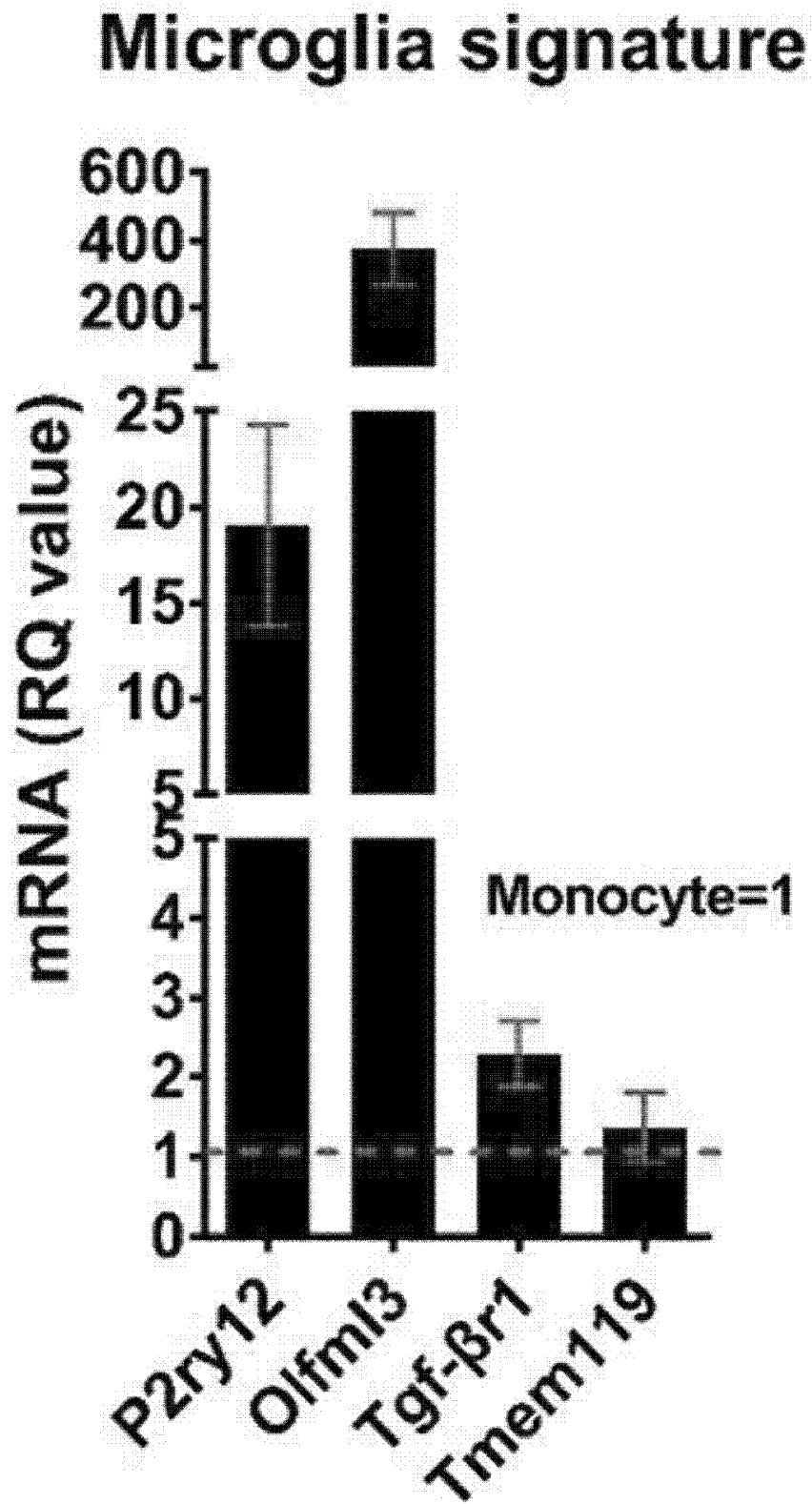
[Fig. 1]



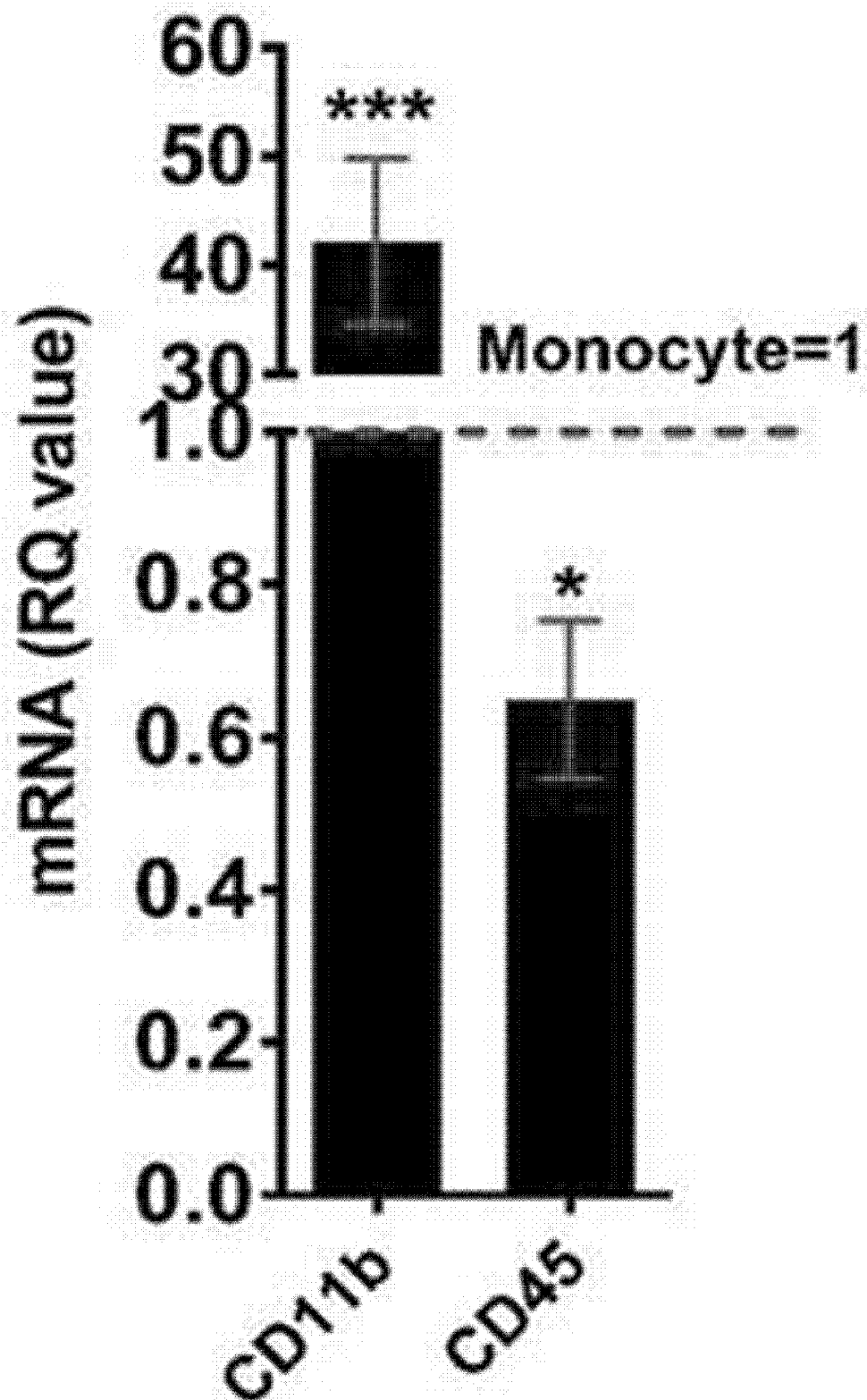
[Fig. 2a]



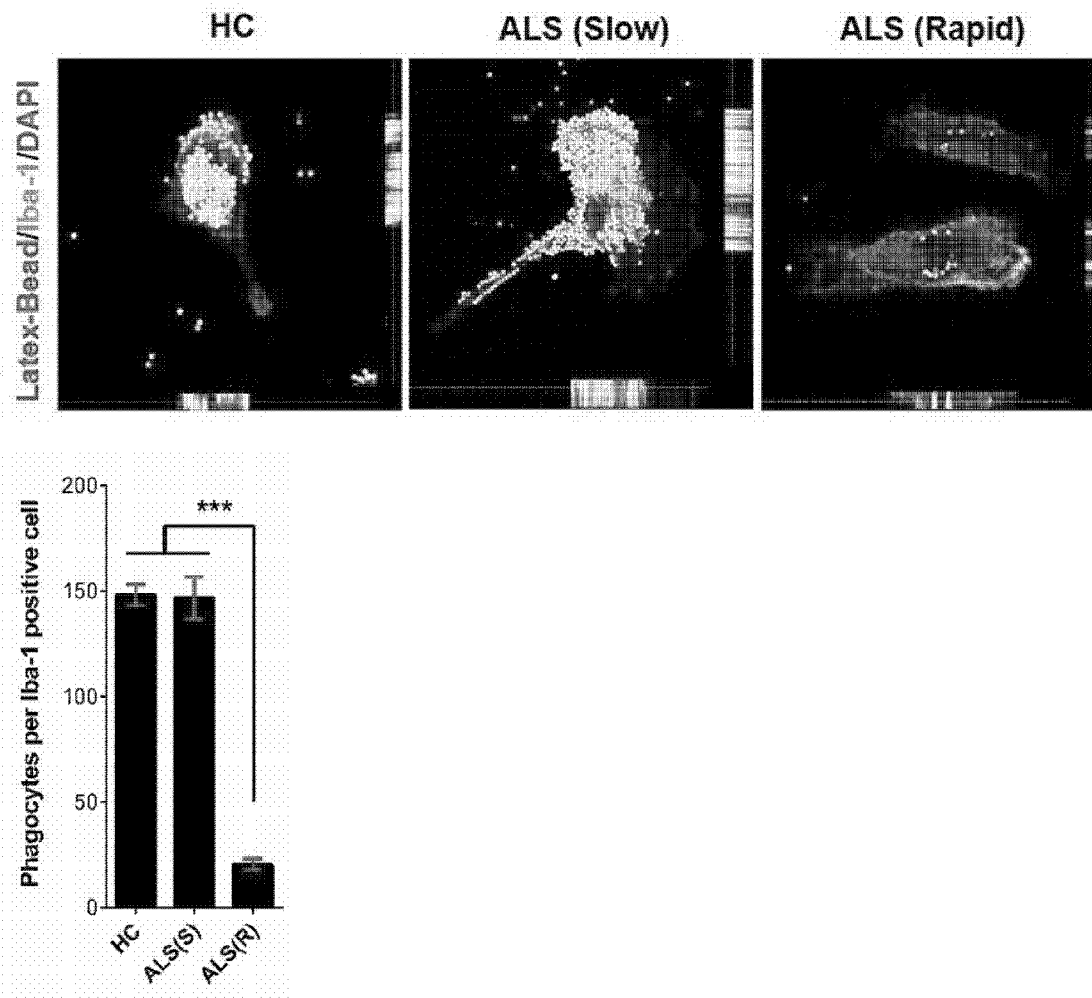
[Fig. 2b]



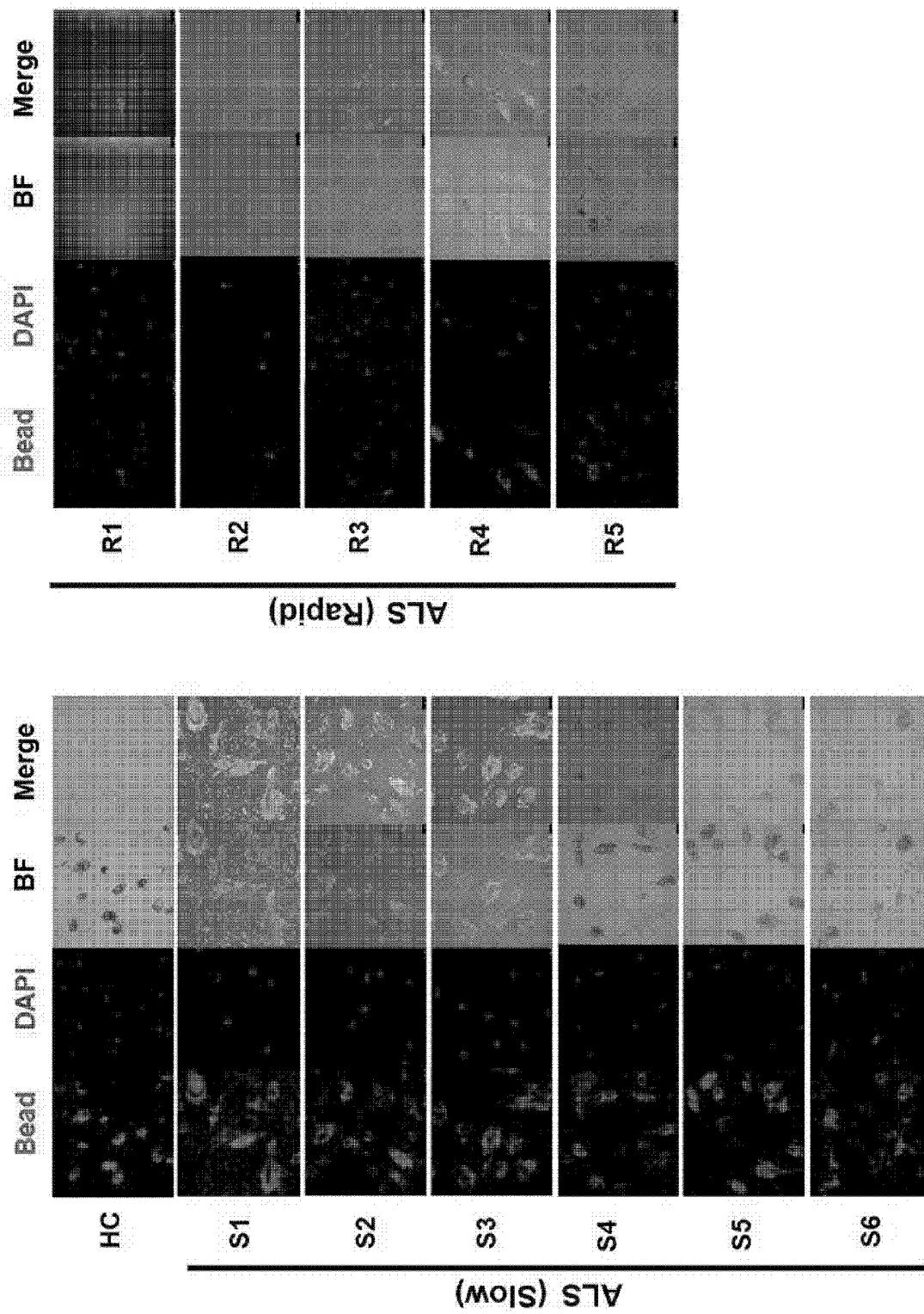
[Fig. 2c]



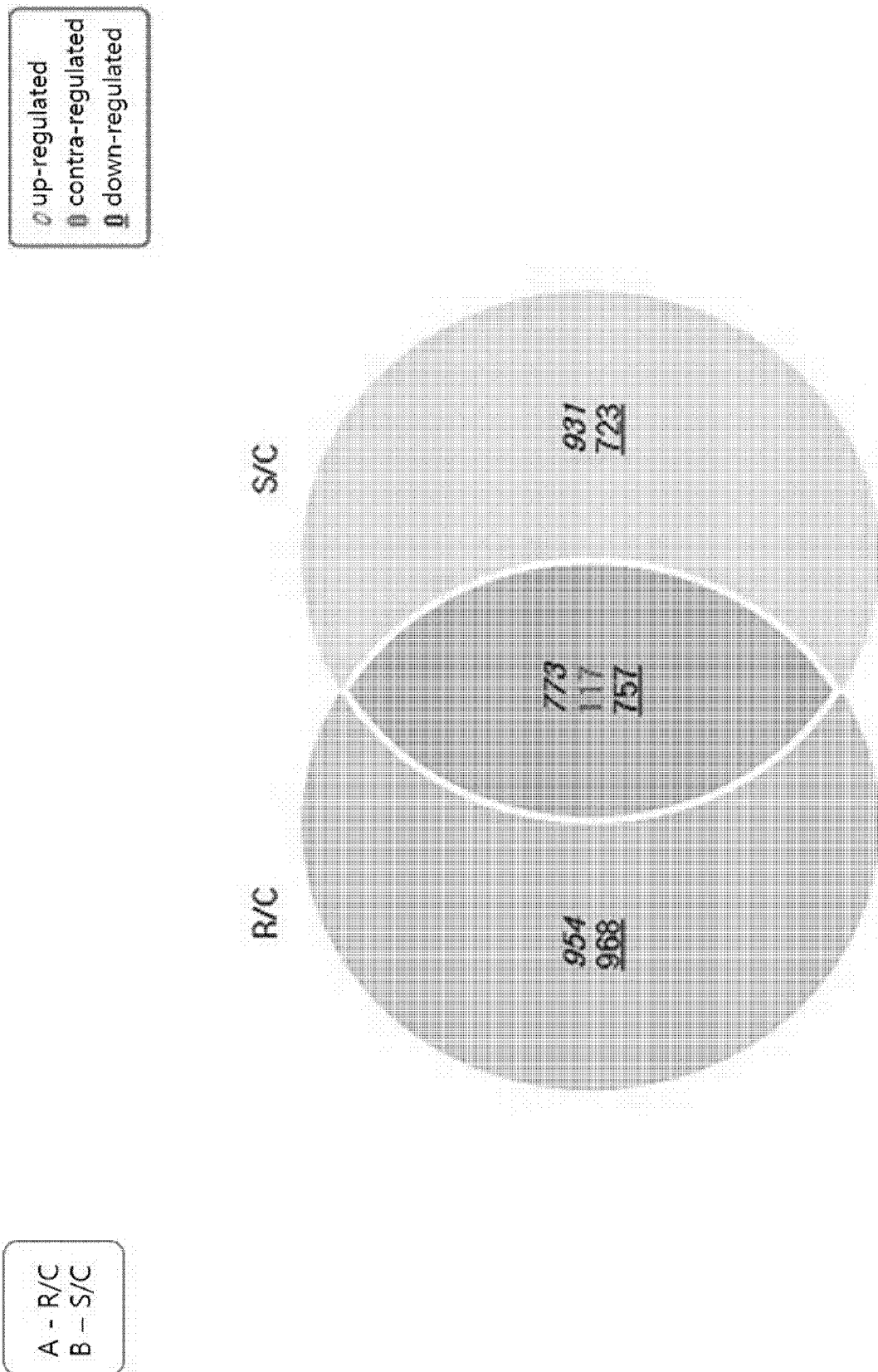
[Fig. 3a]



[Fig. 3b]

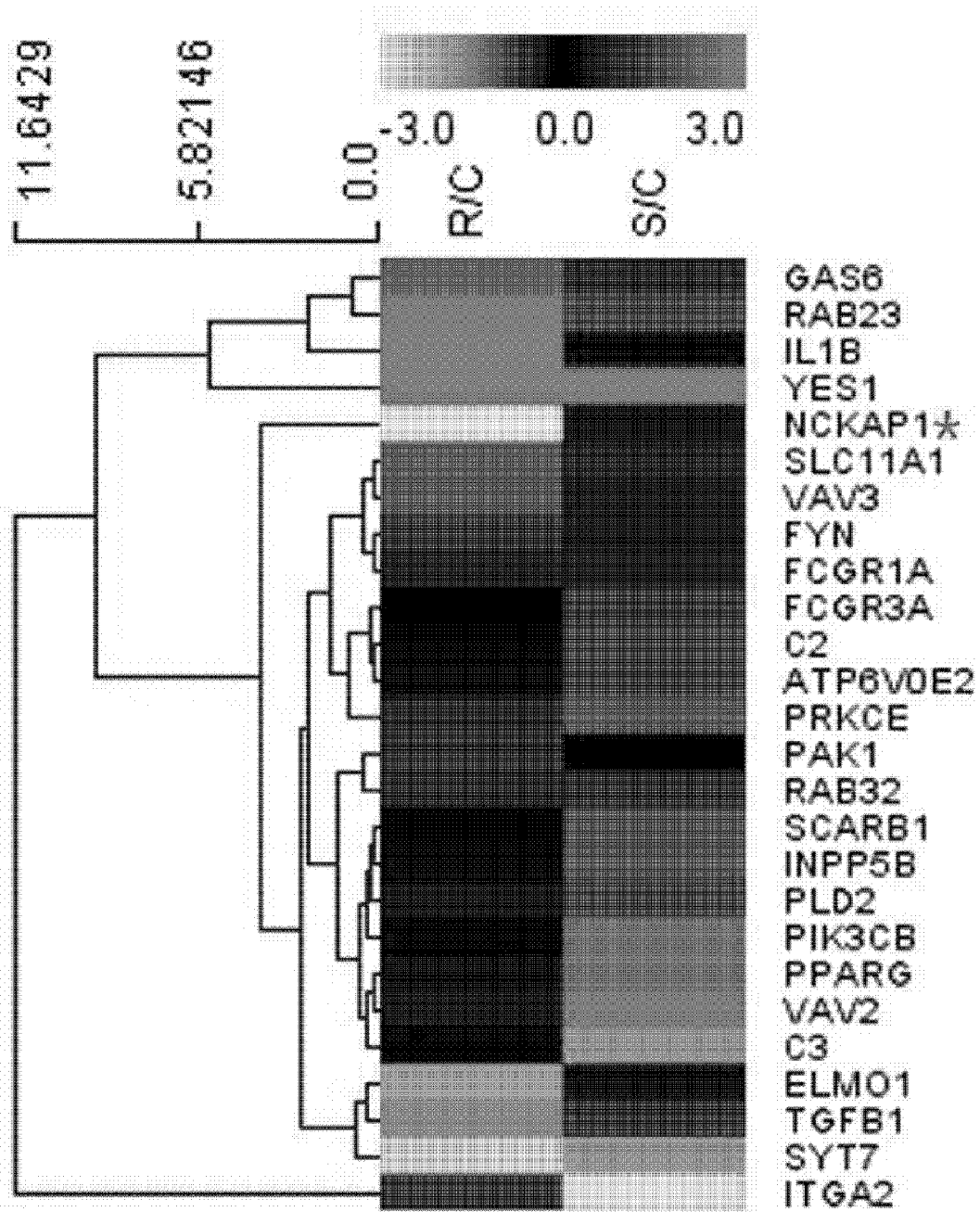


[Fig. 4a]

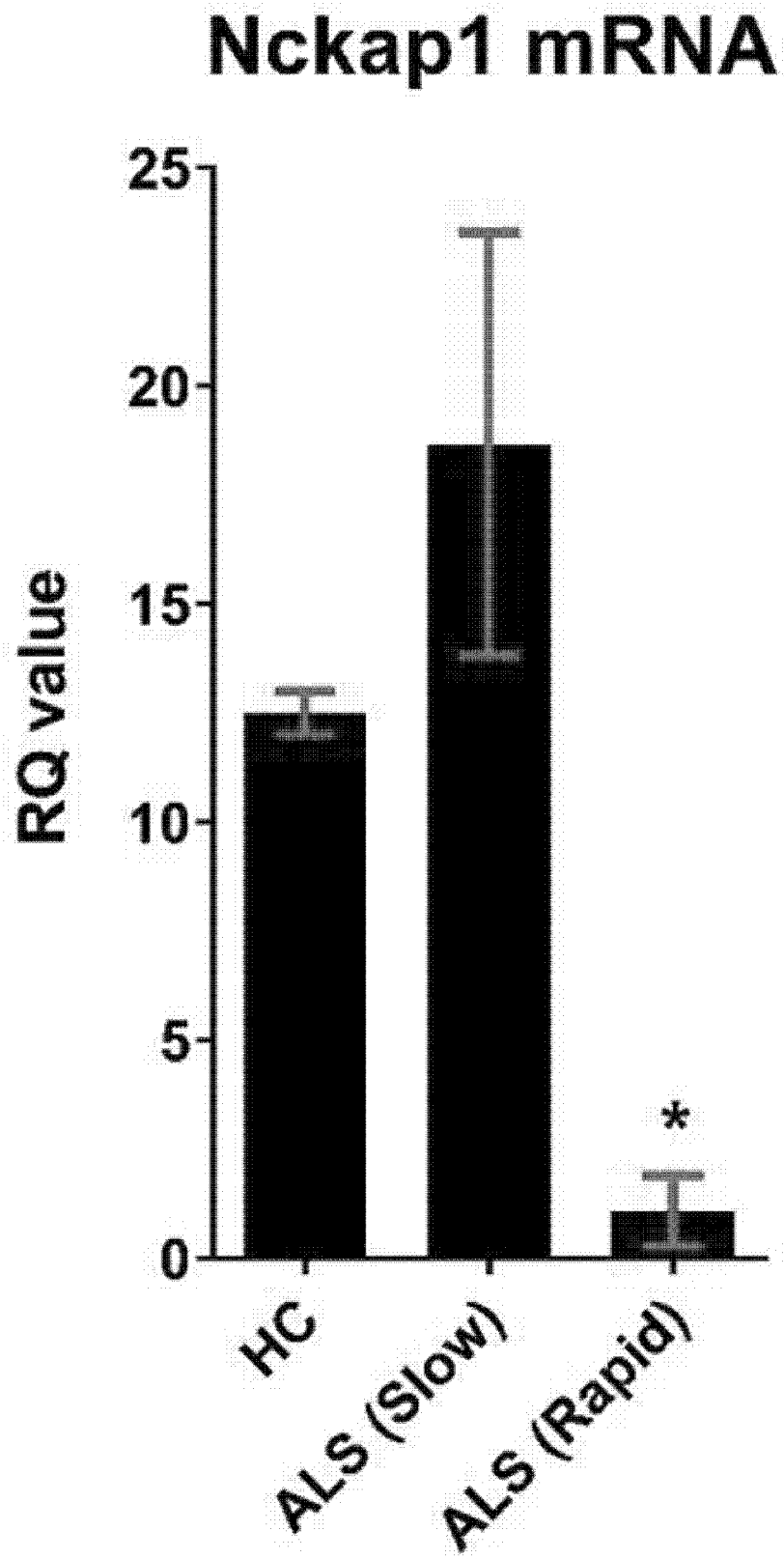


[Fig. 4b]

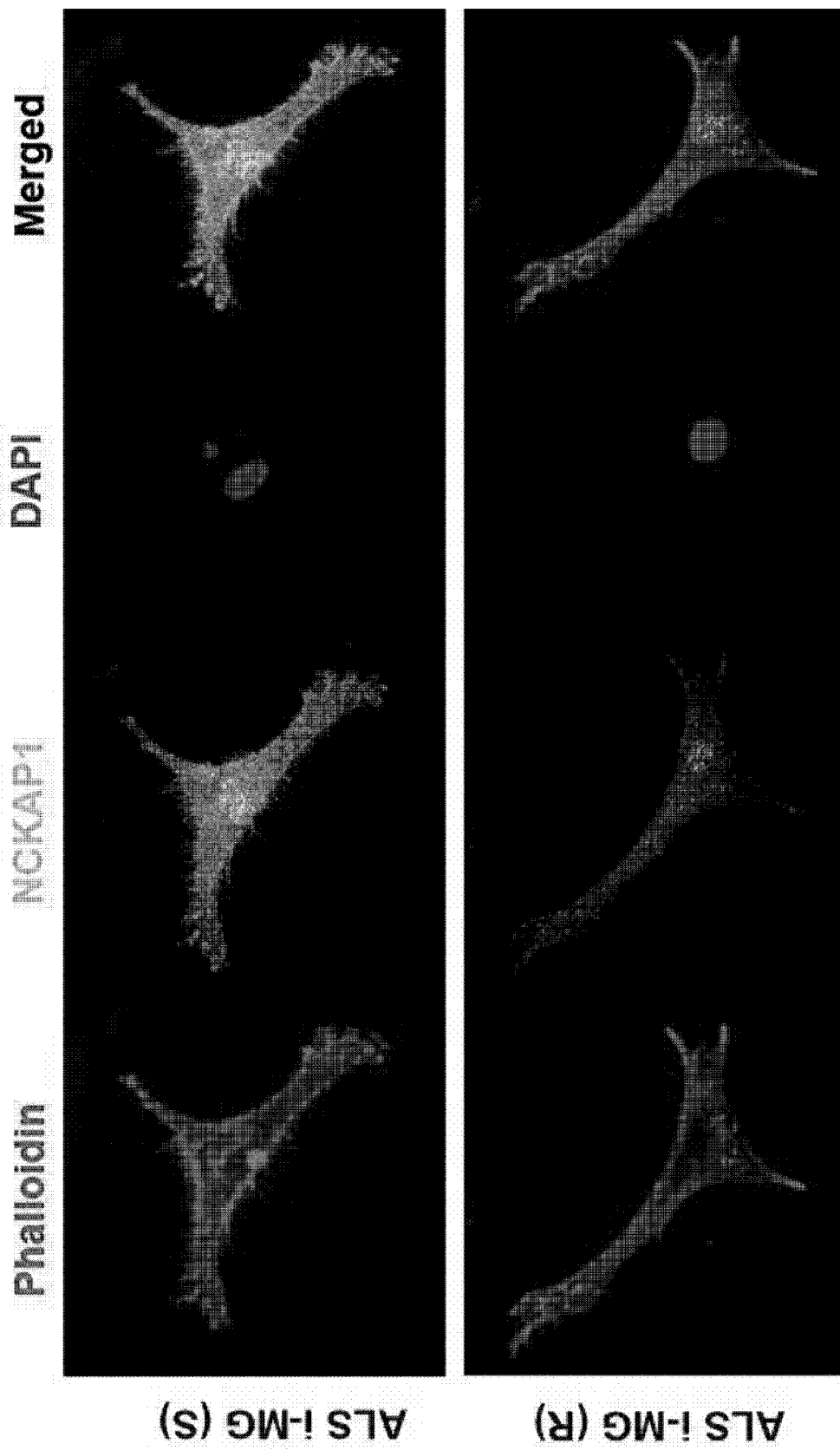
## Phagocytosis (GO:0006909)



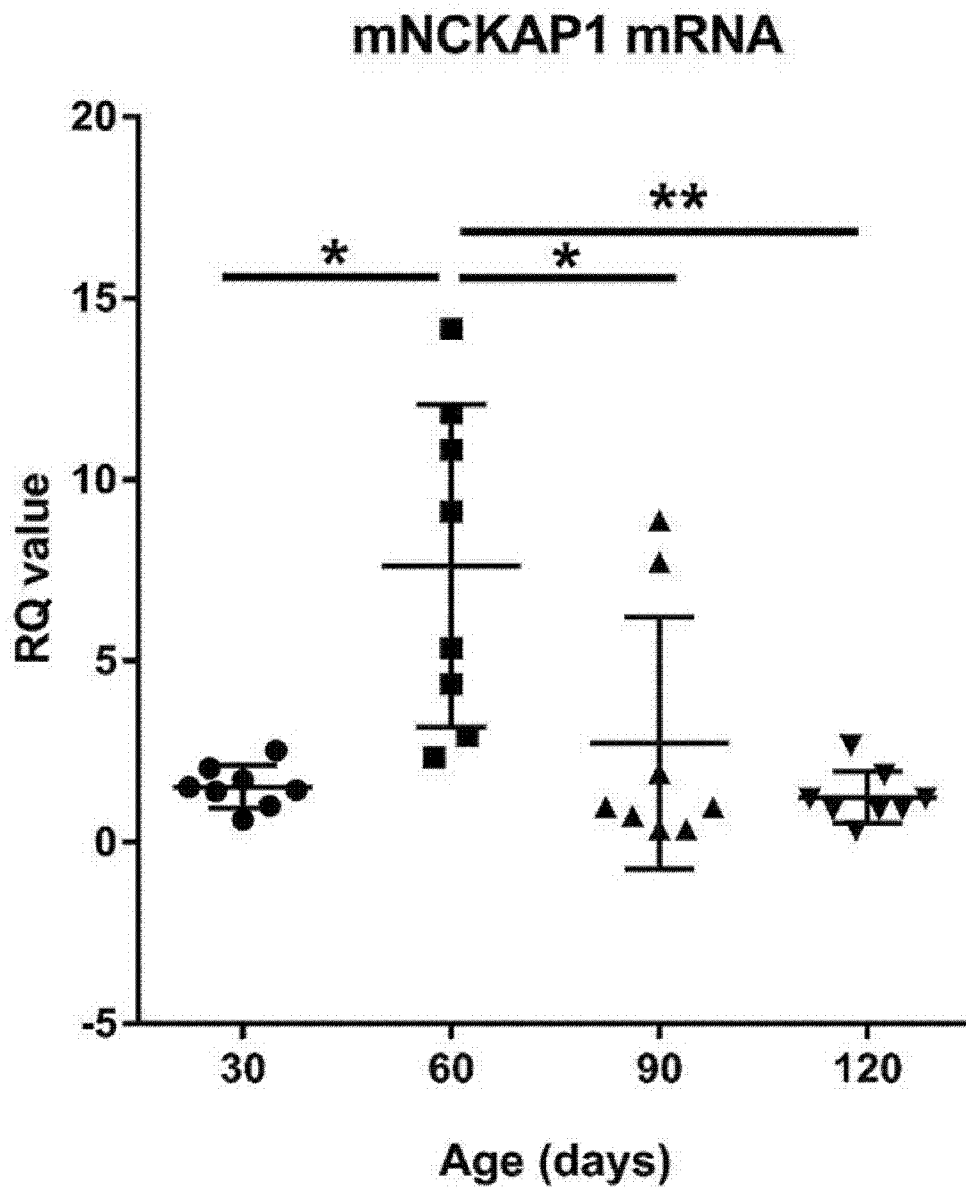
[Fig. 5a]



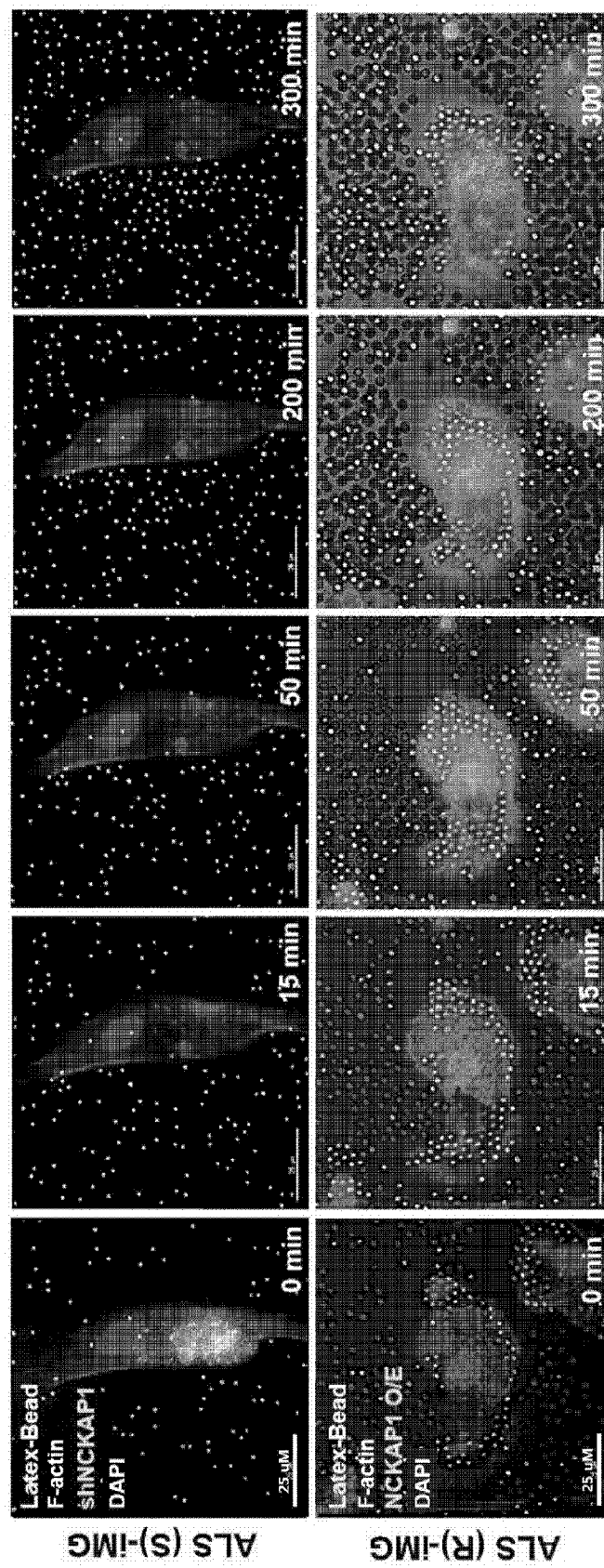
[Fig. 5b]



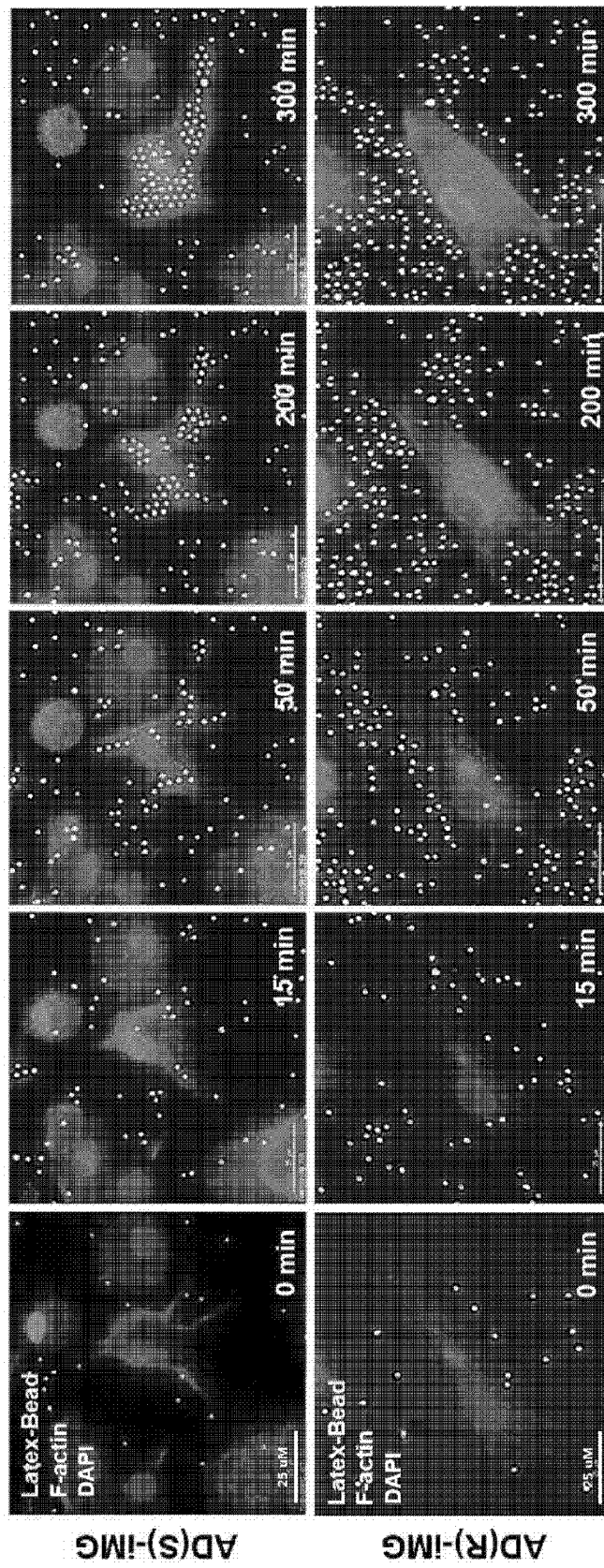
[Fig. 6]



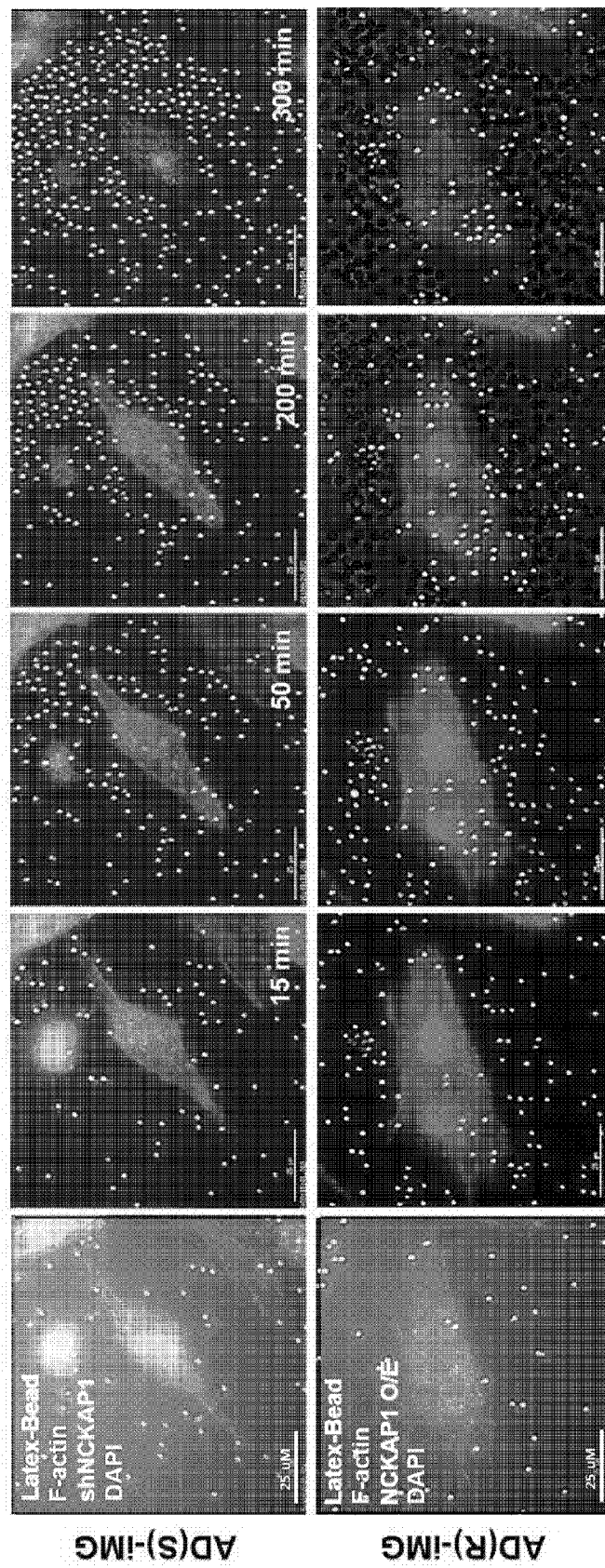
[Fig. 7]



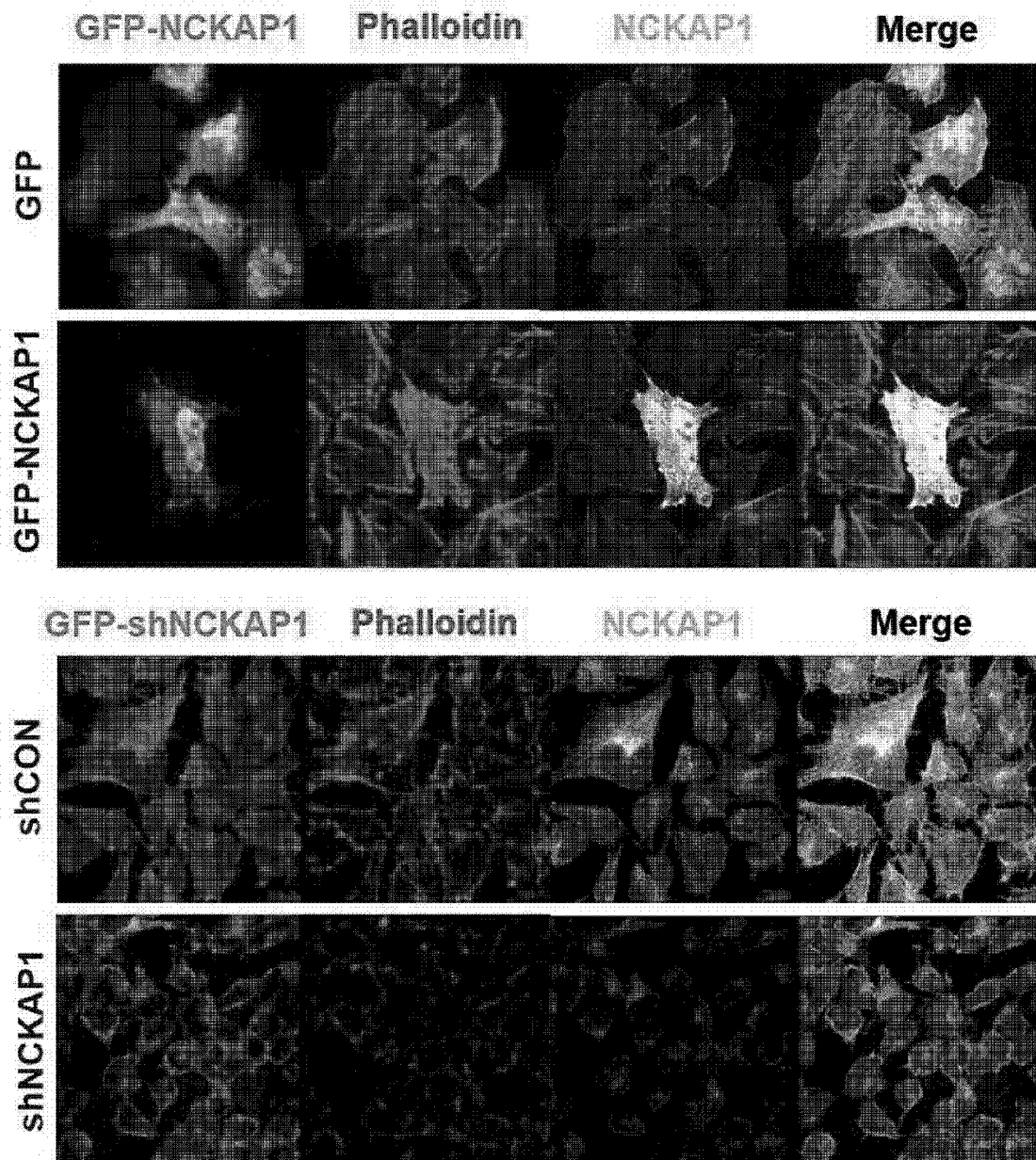
[Fig. 8]



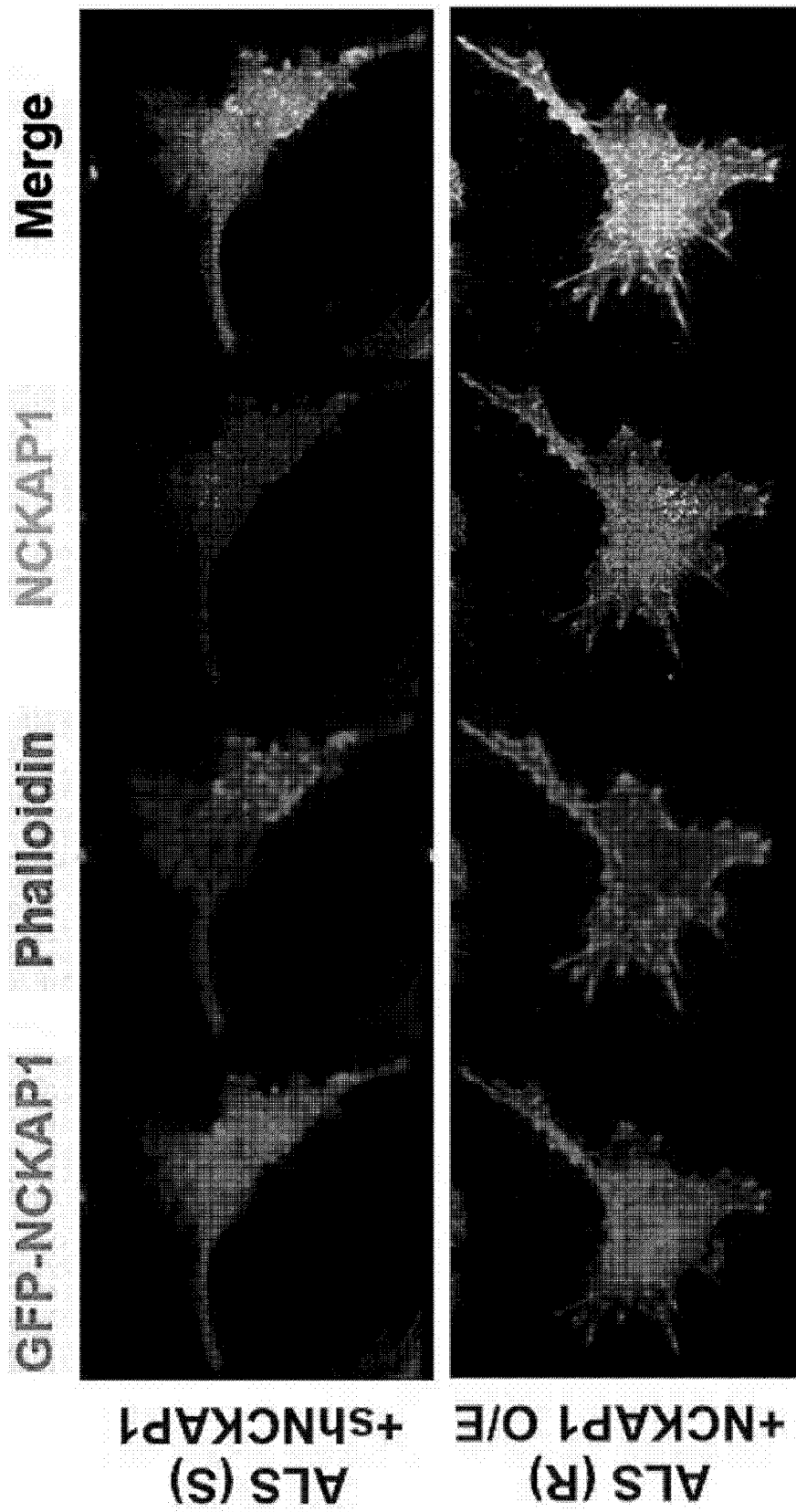
[Fig. 9]



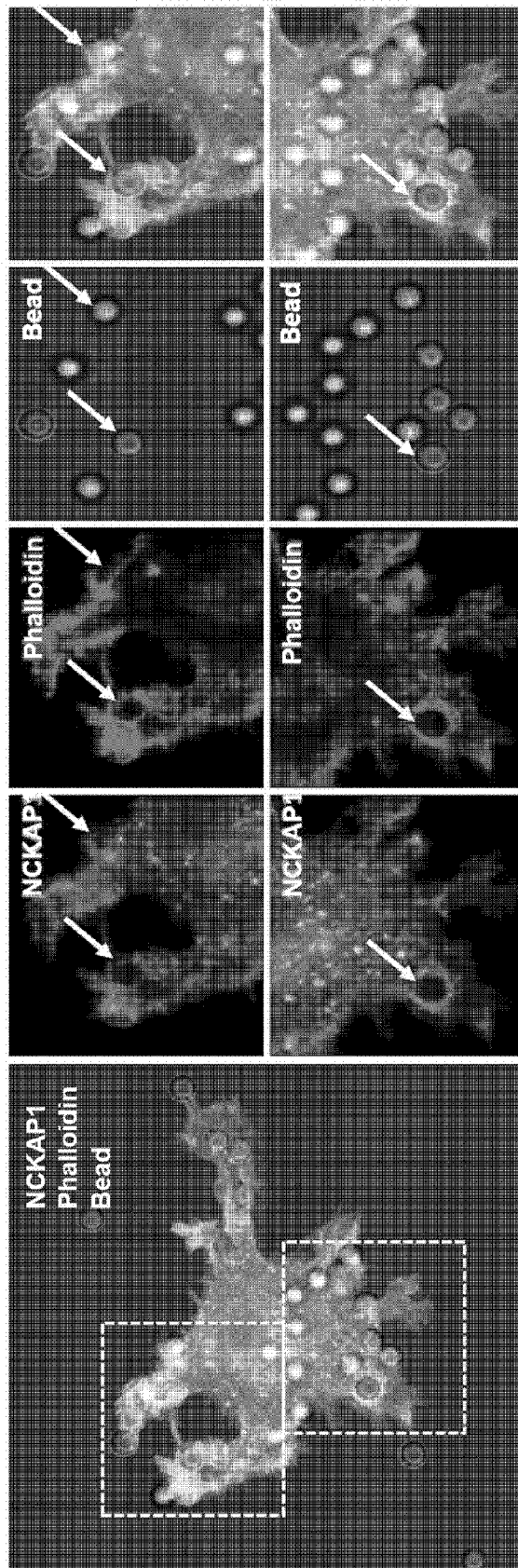
[Fig. 10a]



[Fig. 10b]



[Fig. 11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/009725

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/6883(2018.01)i, A61K 38/17(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; C12N 15/113; C12N 15/12; C12N 15/63; C12Q 1/68; C12Q 1/6883; A61K 38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: NCKAP1(NCK associated protein 1), degenerative diseases of nervous system, Alzheimer's, Parkinson, Lou Gehrig, treatment, marker, diagnosis

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | EP 1038958 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al.) 27 September 2000<br>See claims 1-4, 8-19; paragraphs [0001], [0017], [0103], [0157]; sequence nos. 1-2; figure 2. | 1-2,4-10,12-13,15     |
| Y         |                                                                                                                                                                       | 3,11                  |
| Y         | NCBI, GenBank Accession No. NM_013436.4, "Homo Sapiens NCK Associated Protein 1 (NCKAP1), Transcript Variant 1, mRNA", 28 August 2016<br>See the entire document.     | 3,11                  |
| A         | NCBI, GenBank Accession No. NP_038464.1, "Nck-associated Protein 1 Isoform 1 [Homo sapiens]", 17 January 2016<br>See the entire document.                             | 2,10                  |
| A         | US 2016-0265057 A1 (INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY) 15 September 2016<br>See the entire document.                                                                      | 1-13,15               |
| A         | US 2016-0281085 A1 (EVERON BIOSCIENCES, INC.) 29 September 2016<br>See the entire document.                                                                           | 1-13,15               |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

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

Date of the actual completion of the international search

30 NOVEMBER 2018 (30.11.2018)

Date of mailing of the international search report

30 NOVEMBER 2018 (30.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2018/009725**

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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

International application No.

**PCT/KR2018/009725**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                                                  | Publication<br>date                                  |
|-------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| EP 1038958 A1                             | 27/09/2000          | AU 1999-15074 A1<br>CA 2314909 A1<br>EP 1038958 A4<br>WO 99-31239 A1     | 05/07/1999<br>24/06/1999<br>09/10/2002<br>24/06/1999 |
| US 2016-0265057 A1                        | 15/09/2016          | CA 2924393 A1<br>EP 3049532 A2<br>WO 2015-048336 A2<br>WO 2015-048336 A3 | 02/04/2015<br>03/08/2016<br>02/04/2015<br>28/05/2015 |
| US 2016-0281085 A1                        | 29/09/2016          | RU 2016104927 A<br>US 9909125 B2<br>WO 2015-066442 A1                    | 06/12/2017<br>06/03/2018<br>07/05/2015               |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/6883(2018.01)i, A61K 38/17(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/68; C12N 15/113; C12N 15/12; C12N 15/63; C12Q 1/68; C12Q 1/6883; A61K 38/17

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) &amp; 키워드: NCKAP1(NCK associated protein 1), 신경계 퇴행성질환, 알츠하이머, 파킨슨, 루게릭, 치료, 마커, 진단

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                     | 관련 청구항               |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| X     | EP 1038958 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 등) 2000.09.27<br>청구항 1-4, 8-19; 단락 [0001], [0017], [0103], [0157]; 서열번호 1-2;<br>도면 2 참조.            | 1-2, 4-10, 12-13, 15 |
| Y     |                                                                                                                                                | 3, 11                |
| Y     | NCBI, GenBank Accession No. NM_013436.4, 'Homo sapiens NCK associated protein 1 (NCKAP1), transcript variant 1, mRNA', 2016.08.28<br>전체 문헌 참조. | 3, 11                |
| A     | NCBI, GenBank Accession No. NP_038464.1, 'nck-associated protein 1 isoform 1 [Homo sapiens]', 2016.01.17<br>전체 문헌 참조.                          | 2, 10                |
| A     | US 2016-0265057 A1 (INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY) 2016.09.15<br>전체 문헌 참조.                                                                     | 1-13, 15             |
| A     | US 2016-0281085 A1 (EVERON BIOSCIENCES, INC.) 2016.09.29<br>전체 문헌 참조.                                                                          | 1-13, 15             |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 11월 30일 (30.11.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 11월 30일 (30.11.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

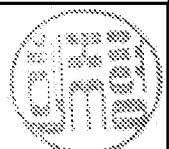
대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 14  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 14는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                   | 공개일                                                  |
|-----------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| EP 1038958 A1         | 2000/09/27 | AU 1999-15074 A1<br>CA 2314909 A1<br>EP 1038958 A4<br>WO 99-31239 A1     | 1999/07/05<br>1999/06/24<br>2002/10/09<br>1999/06/24 |
| US 2016-0265057 A1    | 2016/09/15 | CA 2924393 A1<br>EP 3049532 A2<br>WO 2015-048336 A2<br>WO 2015-048336 A3 | 2015/04/02<br>2016/08/03<br>2015/04/02<br>2015/05/28 |
| US 2016-0281085 A1    | 2016/09/29 | RU 2016104927 A<br>US 9909125 B2<br>WO 2015-066442 A1                    | 2017/12/06<br>2018/03/06<br>2015/05/07               |