

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 1월 24일 (24.01.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/017680 A9

- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/6883* (2018.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008085
- (22) 국제출원일: 2018년 7월 17일 (17.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0091417 2017년 7월 19일 (19.07.2017) KR
10-2017-0116583 2017년 9월 12일 (12.09.2017) KR
10-2017-0132866 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR
10-2017-0132867 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR
10-2017-0132868 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR
10-2017-0132869 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR
10-2017-0132870 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR
- (71) 출원인: 국민대학교 산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 02707 서울시 성북구 정릉로 77, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 류현정 (LIEW, Hyunjeong); 06556 서울시 서초구 방배로43길 5, 1동 1003호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 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 국내 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).

(54) Title: miRNA AS BIOMARKER FOR PARKINSON'S DISEASE AND DIAGNOSTIC KIT USING SAME

(54) 발명의 명칭: 파킨슨병 바이오마커로서의 miRNA 및 이를 이용한 진단키트

[도1]

Index	Probe Set ID	Transcript ID (miRNA name)	Accession	log ratio [W vs. C]	FCAbsolute [W vs. C]	Regulation [W vs. C]
436	20503803	hsa-miR-494-3p	MIMAT0002816	-3.024323	8.136018728	down
898	20506835	hsa-miR-1244	MIMAT0005896	-2.68516	6.431521165	down
2207	20525497	hsa-miR-6768-5p	MIMAT0027436	-2.33117	5.032132814	down
1198	20517704	hsa-miR-4324	MIMAT0016876	-2.119451	4.34528559	down
1740	20519566	hsa-miR-4726-5p	MIMAT0019845	-2.045094	4.127001607	down
510	20503877	hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	-2.019889	4.055525878	down

(57) Abstract: The present invention relates to a method for providing information on the diagnosis of Parkinson's disease. Also, the present invention relates to a composition for preventing, alleviating, or treating Parkinson's disease. The miRNA of the present invention can be effectively availed for diagnosis and treatment of Parkinson's disease as the miRNA shows specifically down- or upregulated expression in a Parkinson's disease model.

(57) 요약서: 본 발명은 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 miRNA는 파킨슨병 모델에서 특이적으로 발현이 감소되거나 증가되어, 파킨슨병의 진단 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2019/017680 A9



공개:

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

(88) 국제조사보고서 공개일:

2019 년 4 월 18 일 (18.04.2019)

(48) 본 정정판 공개일:

2019 년 5 월 16 일 (16.05.2019)

(15) 정정사항에 관한 정보:

2019 년 5 월 16 일 (16.05.2019) 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 파킨슨병 바이오마커로서의 miRNA 및 이를 이용한 진단키트

기술분야

- [1] 본 발명은 파킨슨병에서 발현이 감소 또는 증가되는 miRNA를 이용한 파킨슨병의 진단방법 및 상기 miRNA를 이용한 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 파킨슨병은 중추신경계 퇴행성질환의 하나로 중뇌의 흑색질 밀집부(Substantia nigra pars compacta)의 변형을 시작으로 뇌의 부피의 감소, 알파-시누클레인(α -synuclein, α Syn)의 응집 등을 병태생리적 증상으로 갖는 질환으로 보행의 불완전, 손떨림, 강직된 행동 등을 보인다.
- [3] 대한민국 내 파킨슨병 환자 현황으로는 2010년 6만 1,565명이었으며 연평균 8.7%로 성장하여 2014년 8만 5,888명으로 증가하였고, 2014년 환자의 경우 60세 이상 환자 비율이 95.7%로, 유병율은 환자의 나이와 상관관계를 보였으며 성비율의 경우 남성이 3만 3,831명이고 여성은 5만 2,057명을 나타내었다(최근 5년 파킨슨병 환자·진료비 증가세, 청년의사, 2015년).
- [4] 주요 7개국(미국, 일본, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국)의 파킨슨병 환자 인구는 2008년 약 454만명, 2012년에는 505만명으로 연평균 2.72% 증가하였으며, 아시아의 경우, 2008년 198만명에서 2012년 219만명으로 늘어났으며, 유럽은 2008년 82만명에서 2012년 91만명으로 증가되었다(Product and Pipeline Analysis of the Global Parkinson's Disease Therapeutic Market, F&S, 2014년).
- [5] 세계 파킨슨병 치료제 제품 동향을 살펴보면, 2011년 47%로 가장 큰 점유율을 보였던 도파민 아고니스트 약물이 2021년 42%로 줄어들 것으로 예상되며 신규 파이프라인 약물들이 2021년에 약 20% 비중을 차지할 것으로 전망되고 있다(R&D Trends: Parkinson's Disease, Datamonitor, 2012년).
- [6] 파킨슨병의 진단과 관련하여 수행되는 검사로는 1) PET 검사, 2) MRI 검사, 3) 내과적 질환에 대한 검사 등이 있다.
- [7] 뇌 도파민 운반체 양전자 단층 촬영(dopamine transporter PET, positron emission tomography) 검사는 도파민성 세포의 손상 여부를 알 수 있는 검사로서, 뇌 도파민 운반체 양전자 단층 촬영을 하게 되면 파킨슨병 때문이 아닌 다른 원인들에 의한 파킨슨증상을 확인할 수 있다. 약물 유발성 파킨슨증후군, 혈관성 파킨슨증후군, 알츠하이머병에서 동반되는 파킨슨증상, 본태성 진전에서 동반되는 파킨슨증상의 경우 언뜻 봐서는 파킨슨증상과 유사한 떨림, 운동 완서를 보이는 경우가 있으나, 도파민성 신경세포는 정상임을 확인할 수 있다.

- [8] 파킨슨 증상을 보이는 경우에 파킨슨병과 유사한 질환들과 구분하는 것이 중요하고, 이차성 파킨슨증후군 및 비전형성 파킨슨증후군등과 구분하기 위해서는 가장 먼저 뇌 자기공명영상(MRI) 검사가 필요하다. 파킨슨병의 경우에는 MRI가 정상소견인 반면에 다른 질환들은 특징적인 MRI 소견을 보인다.
- [9] 파킨슨병 진단 방법 중 내과적 질환에 대한 검사(혈액검사, 소변 검사, 심전도, 가슴 엑스선 검사)방법은 내과적 질환이 전신 위약감을 일으키면서, 파킨슨증상으로 오인하는 경우가 있는데 이를 확인하기 위해서는 다른 내과적인 질환이 없는지 확인하기 위한 검사이다.
- [10] 하지만, 상기 파킨슨병 진단 방법들은 고가이고 진단 절차가 복잡한 문제가 있다. 파킨슨병의 치료 및 진단에 주력하고 있는 최고의 기업 중 하나인 룬드백(Lundbeck)사의 경우 홈페이지에 파킨슨병의 빠른 진단을 위한 도구 개발의 중요성에 대한 언급은 있지만, 상용화 되어 있는 시약 또는 키트는 현재 판매하고 있지 않다. 또한, 파킨슨병을 앓고 있는 환자는 해마다 크게 증가하고 치료제 시장도 이에 비례하여 크게 성장하고 있지만, 정작 파킨슨병 진단 시장의 발전은 미진한 실정이다. 따라서, 파킨슨병을 그 유사질환과 구분하여 신속하고 경제적으로 진단할 수 있는 기술 및 이와 동시에 치료를 병행할 수 있는 기술에 대한 개발이 시급한 상황이다.
- [11]
- [12] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명자들은 파킨슨병을 그 유사질환과 구분하여 신속하고 경제적으로 진단할 수 있는 기술 및 이와 동시에 치료를 병행할 수 있는 기술을 개발하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 파킨슨병 모델에서 특정 miRNA의 발현양이 특이적으로 증가 또는 감소되어 있음을 확인하고, 이를 이용하여 파킨슨병의 효율적 진단 및 치료를 할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [14]
- [15] 따라서, 본 발명의 목적은 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 다른 목적은 파킨슨병의 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는데 있다.
- [17]
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 유발물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병의 치료방법을 제공하는데 있다.

[22]

[23] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

[24] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[25] (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및

[26] (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 감소된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.

[27]

[28] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 추가적으로 포함한다:

[29] (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및

[30] (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 증가된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.

[31]

[32] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[33] (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및

[34] (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 증가된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.

[35]

[36] 본 명세서에 있어서 “miRNA”는 특별히 언급하지 않는 한, 헤어핀 모양 구조의 RNA 전구체로서 전사되고, RNase III 절단 활성을 갖는 dsRNA 절단 효소에 의해 절단되어 RISC라고 칭하는 단백질 복합체에 도입되고, mRNA의 번역 억제에

관여하는 15~25염기의 비코딩 RNA를 의도하여 사용된다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 miRNA는 특정 염기서열(또는 서열번호)로 나타내어지는 miRNA뿐만 아니라 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, pri-miRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다. 이러한 전구체, 동족체, 변이체 또는 유도체로서는 구체적으로는 miRBase release 20(<http://www.mirbase.org/>)에 의해 동정할 수 있고, 엄격한 조건 하에서 서열목록 제1서열 내지 제9서열의 miRNA의 상보서열과 하이브리다이징하는 염기서열을 갖는 miRNA를 들 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용하는 miRNA는 miR 유전자의 유전자산물이어도 좋고, 그러한 유전자산물은 성숙 miRNA(예를 들면, 상기와 같은 mRNA의 번역 억제에 관여하는 15~25염기 또는 19~25염기의 비코딩 RNA) 또는 miRNA 전구체(예를 들면, 상기와 같은 pre-miRNA 또는 pri-miRNA)를 포함한다.

- [37] 본 명세서에 있어서 “핵산”이란 RNA, DNA, 및 RNA/DNA(키메라) 모두 포함하는 핵산에 대하여 사용된다. 또한, 상기 DNA에는 cDNA, 게놈DNA, 및 합성DNA 모두가 포함된다. 또한, 상기 RNA에는 total RNA, mRNA, rRNA, miRNA, siRNA, snoRNA, snRNA, 비코딩(non-coding)RNA 및 합성RNA 모두가 포함된다. 본 명세서에 있어서 “합성DNA” 및 “합성RNA”는 소정의 염기서열(천연형 서열 또는 비천연형 서열 중 어느 것이어도 좋음)에 의거하여, 예를 들면 자동핵산 합성기를 사용하여 인공적으로 제작된 DNA 및 RNA를 말한다. 본 명세서에 있어서 “비천연형 서열”은 광의의 의미로 사용하는 것을 의도하고 있고, 천연형 서열과 상이한, 예를 들면 1 이상의 뉴클레오티드의 치환, 결실, 삽입 및/또는 부가를 포함하는 서열(즉, 변이 서열), 1 이상의 수식 뉴클레오티드를 포함하는 서열(즉, 수식 서열) 등을 포함한다. 또한, 본 명세서에서는 폴리뉴클레오티드는 핵산과 호환적으로 사용된다.
- [38] 본 명세서에서 사용되는 “피검자”는 인간, 침팬지를 포함한 영장류, 개, 고양이 등의 애완동물, 소, 말, 양, 염소 등의 가축동물, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유동물을 포함하는 의미로 해석된다. 또한, “정상균”도 또한 이러한 의미로 해석되며, 검출하고자 하는 파킨슨병에 이환되어 있지 않은 객체를 의미한다.
- [39] 본 발명이 포함하는 샘플은 피검자로부터 자연적 또는 인위적으로 분리되어 피검자의 파킨슨병 관련 유전정보를 포함하는 한 제한되지 않으며, 바람직하게는 체외로 분리된 분변, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 모발 또는 뇨 등으로부터 분리될 수 있으며, 보다 바람직하게는 체외로 분리된 혈액, 혈장, 혈청 등을 이용할 수 있다.
- [40] 본 발명의 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 공지된 다양한 시험방법을 사용할 수 있으며, 예컨대 혼성화법, 면역분석(immunoassay) 방법 또는 유전자 증폭방법을 이용하여 실시할 수 있고 이에 한정되는 것은 아니다.
- [41] 상기 혼성화법은 프로브를 이용하여 miRNA의 존재를 확인한다.
- [42] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는

연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.

- [43] 본 발명의 방법이 혼성화 방식 중 마이크로어레이 방식으로 실시되는 경우, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화 된다. 바람직한 기질은 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기의 기질 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예컨대, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.
- [44] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 변경할 수 있다. 또한, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [45] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 또는 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, Nick 트랜스레이션 방법(nick translation), 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [46] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에

의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

- [47] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.
- [48] 생물학적 시료에서 상기 miRNA의 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 상향 조절(up-regulation) 또는 하향 조절(down-regulation)되는 경우에는 파킨슨병으로 진단된다.
- [49] 본 발명의 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 면역분석 방법에 의해 실시될 수 있다. 상기 면역분석 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [50] 본 발명의 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법은 유전자 증폭방법에

의해 실시될 수 있다. 유전자 증폭방법을 이용한 miRNA의 검출은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시할 수 있으며, 이 경우 miRNA의 프라이머 또는 프로브가 이용될 수 있다.

- [51] 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 상기 miRNA의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 상기 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 세포)에서 상기 마커의 mRNA 양을 조사하여 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 결정한다. 따라서 본 발명은 원칙적으로 생물학적 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.
- [52] 우선, mRNA를 얻기 위하여 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *MolecularCloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *PlantMol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *CurrentProtocolsinMolecularBiology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다.
- [53] 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A LaboratoryManual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다. 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *MolecularCloning, A LaboratoryManual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A PracticalApproach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [54] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, E. coli DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermusthermophilus*(Tth), *Thermusfiliformis*, *Thermisflavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcusfuriosus*(Pfu)를 포함한다. 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를

소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[55] 본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[56] 본 명세서의 용어“증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에서 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. L.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기재되어 있다. 본 발명의 유전자 증폭방법은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[57] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 및 멀티플렉스 PCR이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

- [58] 본 발명에서 유전자 증폭방법에 이용되는 프라이머는 상기 miRNA의 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 명세서에서 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 하이브리드 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.
- [59] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머 세트는 주형인 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 프라이머는 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 갖는 것이다.
- [60] 이러한 프라이머의 디자인은 상기 miRNA의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [61] 이렇게 증폭된 상기 마커의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다.
- [62] 이러한 증폭 반응을 통하여, 생물학적 시료에서 상기 유전자의 발현이 정상 시료 보다 높게 또는 낮게 나오는 경우에는 파킨슨병으로 진단된다.
- [63] 본 발명에서 miRNA는 파킨슨병에서 발현이 감소되거나 증가되는 생체 분자이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “고발현(또는 과발현)” 또는 “상향 조절(up-regulation)”은 조사 대상의 생물학적 시료에서 대상 뉴클레오타이드 서열 또는 단백질의 발현 정도가 정상 시료와 비교하여 높은 경우를 의미한다. 예컨대, 당업계에서 통상적으로 이용되는 발현 분석 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 또는 ELISA 방법(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))에 따라 발현 분석을 한 경우, 발현이 높은 것으로 분석되는 경우를 의미한다. 예컨대, 상술한 진단 방법에 따라 분석한 결과, 본 발명의 miRNA가 정상 시료와 비교하여 10% 이상 고발현 또는 저발현되는 경우, 본 발명에서의 “고발현” 또는 “저발현”으로 판정하고 파킨슨병으로 판정한다.
- [64] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 진단방법이 포함하는 상기 miRNA는 정상인과 비교하여 파킨슨병 환자에서 상향 조절(up-regulation) 또는 하향

조절(down-regulation)되어 있으며, 10% 이상, 바람직하게는 50% 이상 상향 또는 하향 조절되어 있음을 확인하였다.

[65]

[66] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324, miR-4726-5p, miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA와 특이적으로 결합 가능한 핵산을 포함하는 파킨슨병의 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.

[67]

[68] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 키트는 hsa-miR-494-3p, hsa-miR-1244, hsa-miR-6768-5p, hsa-miR-4324, hsa-miR-4726-5p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-4767 및 hsa-miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA와 특이적으로 결합 가능한 핵산을 추가적으로 포함한다.

[69] 본 발명의 키트는 상기 핵산에 추가하여 파킨슨병의 검출을 가능하게 하는 기지의 핵산 또는 장래 발견될 수 있는 핵산을 포함할 수 있으며, 공지의 파킨슨병 검사용 마커를 측정하기 위한 항체도 포함시킬 수 있다.

[70] 본 발명의 키트에 포함되는 상기 핵산은 개별적으로 또는 임의로 조합하여 다른 용기에 포장될 수 있다.

[71] 본 발명의 키트에는 체액, 세포 또는 조직으로부터 핵산(예를 들면, total RNA)을 추출하기 위한 키트, 표지용 형광물질, 핵산 증폭용 효소 및 배지, 사용 설명서 등을 포함시킬 수 있다.

[72] 본 발명의 키트는 상기 핵산이, 예를 들면 고상에 결합 또는 부착된 파킨슨병 마커 측정을 위한 디바이스이다. 고상의 재질의 예는 플라스틱, 종이, 유리, 실리콘 등이며, 가공의 용이함으로부터 바람직한 고상의 재질은 플라스틱이다. 고상의 형상은 임의이며, 예를 들면 사각형, 원형, 직사각형, 필름형 등이다.

[73] 본 발명의 키트는 상기 miRNA의 적어도 1개, 바람직하게는 적어도 2개, 보다 바람직하게는 적어도 3개의 각각과 특이적으로 결합 가능한 핵산을 포함할 수 있다.

[74]

[75] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 유발물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[76] (i) miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 유발 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및

[77] (ii) 상기 파킨슨병 유발 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 하향조절(down-regulation)될 경우 파킨슨병 유발물질로 판단하는 단계.

[78]

[79] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 스크리닝 방법은 하기의 단계를 추가적으로 포함한다:

[80] (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 유발 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및

[81] (ii) 상기 파킨슨병 유발 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 상향조절(up-regulation)될 경우 파킨슨병 유발물질로 판단하는 단계.

[82]

[83] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 유발물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[84] (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 유발 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및

[85] (ii) 상기 파킨슨병 유발 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 상향조절(up-regulation)될 경우 파킨슨병 유발물질로 판단하는 단계.

[86]

[87] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[88] (i) miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및

[89] (ii) 상기 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 상향조절(up-regulation)될 경우 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계.

[90]

[91] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 스크리닝 방법은 하기의 단계를 추가적으로 포함한다:

[92] (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및

[93] (ii) 상기 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 하향조절(down-regulation)될 경우 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계.

[94]

[95] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[96] (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 치료제 후보물질을

- 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및
- [97] (ii) 상기 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 하향조절(down-regulation)될 경우 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계.
- [98]
- [99] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용한 용어, "후보 물질"은 파킨슨병 증상을 유발, 감소, 방지 또는 제거시키는 활성이 있는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질(예를 들어, 각종 천연물, 화합물 라이브러리, 유전자 또는 단백질 라이브러리 등)이다.
- [100]
- [101] 본 명세서에서 사용된 용어, "파킨슨병 치료제"는 파킨슨병에 대한 약리활성을 나타내는 것으로 알려진, 혹은 나타내는 것으로 확인된 약물(약제학적 조성물), 건강기능식품 또는 식이요법을 의미한다. 일례로, 본 발명에서는 파킨슨병에 대한 약리활성을 가진 것으로 당업계에 알려진 약물과 기능성 식품을 사용하여, 이에 대한 파킨슨병으로 진단받은 대상체의 민감성을 진단하거나, 예후를 예측할 수 있다. 다른 예로, 본 발명은 파킨슨병에 대한 약리활성이 알려지지 않은 후보 물질 중에서 파킨슨병에 대한 약리활성을 갖는 물질을 스크리닝 하는데 적용될 수 있다.
- [102]
- [103] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [104]
- [105] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 환자에게 유효량 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 치료방법을 제공한다.
- [106]
- [107] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물인 것이다.
- [108] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히

기재되어 있다.

- [109] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 비강 투여, 점안 투여, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [110] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다.
- [111] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [112] 본 발명의 약제학적 조성물은 피부 외용제, 에어로졸, 스프레이, 점안제, 경구제 및 주사제 형태의 제형으로 제조될 수 있다.
- [113] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 식품 조성물인 것이다.
- [114] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 [예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [115] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

- [116] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [117] (i) 본 발명은 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [118] (ii) 또한, 본 발명은 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [119] (iii) 본 발명의 miRNA는 파킨슨병 모델에서 특이적으로 발현이 감소되거나 증가되어, 파킨슨병의 진단 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [120] 도 1은 파킨슨병 모델 세포의 사멸단계에서 발현량이 감소된 miRNA를 나타낸 것이다.
- [121] 도 2는 파킨슨병 모델 세포의 사멸단계에서 발현량이 증가된 miRNA를 나타낸 것이다.
- [122] 도 3은 6-OHDA를 주입한 내부대조군(internal control)에 대한 사진이다. 뇌조직에 아무것도 처리하지 않은 좌반구의 Substantia nigra(A)는 온전히 보존되고 있는 반면 우반구의 6-hydroxy dopamine injected는 Substantia nigra(B)의 신경세포사멸은 물론 조직의 변형에 의해 그 크기가 지나치게 수축되어 있다.
- [123] 도 4는 6-OHDA와 함께 주입된 494-3p 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.
- [124] 도 5는 6-OHDA와 함께 주입된 miR1244 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.
- [125] 도 6은 6-OHDA와 함께 주입된 miR4324 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.
- [126] 도 7은 6-OHDA와 함께 주입된 miR4726-5p 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.
- [127] 도 8은 6-OHDA와 함께 주입된 miR6768-5p 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.
- [128] 도 9는 6-OHDA와 함께 주입된 miR501-5p 영향으로 Substantia nigra의 신경세포가 살아있음을 확인한 결과이다. 동일 개체 내에서의 A(정상)와 B(injected)에서의 병변을 H&E staining 염색으로 확인하였다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [129] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[130]

[131] 실시예

[132] 재료 및 방법

[133] **1. SH-SY5Y 세포 배양**

[134] C57BL/6 SH-SY5Y 신경모세포(neuroblast cell)은 heat-inactivated fetal bovine

serum (GIBCO, MD, USA)이 최종농도 10% 되도록 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, MD, USA) 배지를 이용, 37°C 습윤 5% CO₂ chamber 내에서 배양하였다(Jang, S.-W., Oh, M.-S., Yang, S. I. & Cho, E.-M. Gene expression profiles of human neuroblastoma cells exposed to CuO nanoparticles and Cu ions. *BioChip Journal* 10, 140-149 (2016)). 그리고 6-하이드록시 도파민(6-hydroxy dopamine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 -80°C에 보관하면서 사용할 때마다 분주된 배치의 시약을 사용하였고, 특히 빛을 주의(light sensitive)하였다.

[135]

[136] **2. 세포 생존능 시험**

[137] 세포의 생존에 관한 관찰을 위해서는 stable tetrazolium salt, WST-1 assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였는데, SH-SY5Y 세포를 96-웰 플레이트 각 웰에 5000 cells로 하여 6-하이드록시 도파민(6OHDA, 25 μ M, 24h)을 처리하였다. 단지 PBS를 처리한 대조군과 비교하였고, 실험종료 2시간 전에 WST-1 solution을 10 μ l/웰 첨가하여 37°C chamber 내 배양하였다. 실험종료 후 450 nm에서 변화한 색을 측정하여 확인하였다.

[138]

[139] **3. RNA 분리**

[140] 6OHDA(25 μ M, 24h)가 처리된 SH-SY5Y 세포주의 total RNA는 Trizol reagent를 사용하여 분리하였다. 그 방법은 제조사의 권고방법을 그대로 따랐으며(Invitrogen, California, USA), 분리된 RNA의 총량과 순도는 NanoDrop ND-2000 spectrophotometer(Nano Drop, Delaware, USA)를 이용하여 260/280 nm(ratio 1.8-2.0) ratio를 기준으로 측정하였다(Kim, G. W. e. a. Integrative analyses of differential gene expression and DNA methylation of ethylbenzene-exposed workers. *BioChip Journal* 9, 259-267 (2015)).

[141]

[142] **4. miRNA 발현 프로파일링**

[143] miRNA expression profiling assay를 위하여 Affymetrix miRNA 4.0 array(Lee, S. E. e. a. Identification and characterization of MicroRNAs in acrolein-stimulated endothelial cells: Implications for vascular disease. . *BioChip Journal* 9, 144-155 (2015))를 사용하였고, microarray data는 Gene Expression Omnibus (GEO) 데이터베이스를 이용 분석하였다.

[144]

[145] **5. 타겟 예측 및 유전자 온톨로지 분석**

[146] miRNA 발현의 양상을 근거로 하는 miRNA 타겟 유전자의 예측을 위하여, TargetScan6.2 DB를 활용하였으며, miRanda algorithm(Kim, G. W. et al. Integrative analyses of differential gene expression and DNA methylation of ethylbenzene-exposed workers. *BioChip Journal* 9, 259-267 (2015))에 따랐다. 또한,

가장 빈번하고 다량으로 발현변화를 보이는 miRNA target은 Gene Ontology(GO) categories(<http://www.geneontology.org/>)(Cho, H.*et al.*A relationship between miRNA and gene expression in the mouse Sertoli cell line after exposure to bisphenol A. *BioChip Journal* 4, 75-81 (2010); Jeong, S. I.*et al.*MicroRNA microarray analysis of human umbilical vein endothelial cells exposed to benzo(a)pyrene. *BioChip Journal* 6, 191-196 (2012); Park, H. R., Lee, S. E., Yang, H., Son, G. W. & Park, Y. S. Functional screening of altered microRNA expression in 3-methylcholanthrene-treated human umbilical vein endothelial cells. *BioChip Journal* 8, 260-268 (2014); Park, J. H.*et al.* Expression profiles of miRNAs during ethanol-induced differentiation of neural stem cells. *BioChip Journal* 6, 73-83 (2012))를 이용하여 재확인하였다. log₂ fold change를 근거로 발현의 증감을 두드러지게 나타내는 순서로 miR를 선별하였다.

[147]

[148] **6. 파킨슨병의 동물모델 제조**

[149] 6-OHDA(Sigma, St. Louis, USA)에 의한 독성이 도파민성신경세포에만 영향을 줄 수 있도록 noradrenalin transporter blocker인 desipramine(12.5 mg/kg; Sigma, St. Louis, USA)을 6-OHDA를 주입하기 30분전 실험동물에 복강으로 주입하였다. Ketamine(40 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg) 혼합액을 복강주사하여 실험동물을 깊은 마취상태에 들면 호흡마취를 통해서, 뇌정위장치(David KOPF instrument.,CA, USA)에 고정하고 머리의 피부를 절개하여 머리뼈를 노출시킨 후 정수리점을 확인하고 이를 기점으로 뒤쪽으로 1.1 mm, 오른쪽으로 1.2 mm 이동된 지점에 치과용 드릴을 이용하여 작은 구멍을 뚫었다. 구멍을 통해 배쪽으로 5.0 mm 지점까지 26-gauge needle을 삽입하여 오른쪽 안쪽앞뇌다발(medial forebrain bundle; MFB)에 위치하도록 하였다. 5 µL의 Hamilton syringe를 이용하여 0.1% ascorbic acid 녹인 6-OHDA 2 µL(2.5 µg/µL)를 Infusion pump(Harvard Apparatus., USA)를 이용하여 0.5 µL/min의 속력으로 주입한다. 다른 5 µL의 Hamilton syringe를 이용하여 5µL 실험물질 miRNA를 0.5 µL/min의 속력으로 주입하고, 주입이 완료된 후 5분을 더 기다렸다가 Hamilton syringe를 제거하고 피부를 봉합하였다. 왼쪽은 내부대조군(internal control)으로 사용하기 위하여 아무것도 주입하지 않았다. 실험동물을 Ketamine(70 mg/kg)과 xylazine(8 mg/kg) 혼합액으로 마취한 뒤 심장을 통해 4% paraformaldehyde(in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 관류 고정하여 뇌조직을 적출하였다.

[150]

[151] **결과**[152] **1. PD 모델의 세포의 사멸단계에서 감소된 miR**

[153] 상기 발현의 증감을 두드러지게 나타내는 miRNA 중 PD 모델의 세포의 사멸단계에서 발현의 감소가 가장 두드러진 miR는 도 1과 같다. 이 중, miR494-3p는 아직 파킨슨병 관련 보고가 없는 상태로서 현저한 감소가 매 실험마다 반복적으로 나타났다. 그 외에도 log ratio를 기준으로 -2.0 (30% 이상)

이상의 감소를 보인 miR를 도 1에 열거하였다. 또한 이중 miR-1244는 bioinformatic data analysis 결과 ‘TBC1 domain family member 2B’라는 단백질을 targeting하는 것으로 분석되었다. 여기에서 중요한 점은 파킨슨병에서의 신경세포 사멸에서 특이적으로 나타나는 genes으로 알려진 것 중의 하나를 targeting하는 근본적인 조절자로써의 miRNA를 찾은 것이다(A Network View on Parkinson's Disease, *Comput Struct Biotechnol J*. 2013; 7: e201304004).

[154]

[155] **2. PD 모델의 세포의 사멸단계에서 증가된 miR**

[156] 상기 발현의 증감을 두드러지게 나타내는 miRNA 중 PD 모델의 세포의 사멸단계에서 발현의 증가가 가장 두드러진 miR는 도 2와 같다.

[157]

[158] **3. miR SEQ**

[159] 상기 발현의 증감을 두드러지게 나타내는 miRNA의 서열정보는 다음과 같다:

[160] PD 모델의 세포의 사멸단계에서 발현의 감소가 가장 두드러진 miRNA는

hsa-miR-494-3p(서열목록 제1서열: UGAAACAUAACACGGGAAACCUC),

hsa-miR-1244(서열목록 제2서열: AAGUAGUUGGUUUGUAUGAGAUGGUU),

hsa-miR-6768-5p(서열목록 제3서열: CACACAGGAAAAGCGGGGCCCUG),

hsa-miR-4324(서열목록 제4서열: CCCUGAGACCCUAACCUUAA),

hsa-miR-4726-5p(서열목록 제5서열: AGGGCCAGAGGAGCCUGGAGUGG) 및

hsa-miR-501-5p(서열목록 제6서열: AAUCCUUUGUCCCUGGGUGAGA)이다.

[161] PD 모델의 세포의 사멸단계에서 발현의 증가가 가장 두드러진 miRNA는

hsa-miR-1226-5p(서열목록 제7서열: GUGAGGGCAUGCAGGCCUGGAUGGGG),

hsa-miR-4767(서열목록 제8서열: CGCGGGCGCUCCUGGCCGCCGCC) 및

hsa-miR-3064-5p(서열목록 제9서열: UCUGGCUGUUGUGGUGUGCAA)이다.

[162]

[163] **4. H&E staining**

[164] 뇌의 효능평가는 파킨슨병의 주요병변이 되는 Substantia nigra pars compacta 부위의 세포생존율을 H&E staining으로 확인 비교하였다.

[165] 1) 조직의 고정: 세포의 효소를 불활성화하고 조직내 성분을 응고(coagulation) 또는 침전(precipitation)시켜 불용성 상태(insoluble state)로 전환하여 구조가 잘 보존되도록 하기 위하여 고정액에 담가 4도에서 하루이상 고정한다.

[166] 2) 탈수 및 클리닝: 수분의 제거 및 수분제거에 이용한 용매의 제거과정. 세부조직까지의 파라핀 침투를 용이하게 하기 위함이다.

[167] 3) 파라핀블럭의 제조: 파라핀을 이용하여 조직의 내외부를 정형함으로 인해 조직이나 세포의 구조가 변형되지 않는다.

[168] 4) 슬라이드 제작: 박절이란 paraffin블록을 Microtome knife으로 10 μm 두께의 연속관상절편을 Siloane coating slide에 제작한다.

[169] 5) 염색: 조직의 보존을 위해 처리한 파라핀을 제거하고 Harris hematoxylin을

이용하여 세포의 핵을 염색하고 eosin Y를 이용하여 대비염색 하였다.

[170] 6) 결과는 세포로 구분되는 남색부위와 대비염색한 분홍색으로 나뉜다.

[171]

[172] **5. miRNA들의 신경세포 사멸 억제 효과**

[173] 도 3 내지 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 6-OHDA만이 주입된 내부대조군(internal control)(도 3)에서 신경세포사멸은 물론 조직의 변형에 의해 그 크기가 지나치게 수축되어 있음에 반하여, miR494-3p(도 4), miR1244(도 5), miR4324(도 6), miR4726-5p(도 7), miR6768-5p(도 8) 또는 miR501-5p(도 9)를 투여한 실험군에서 신경세포가 살아있음이 확인되었다. 이를 통해 본 발명의 miRNA들이 신경세포 사멸작용을 방어하는데 탁월한 효과가 있는 것으로 증명되었다.

[174]

[175] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서열목록 Free Text

[176] <110> Kookmin University Industry Academy Cooperation Foundation

[177]

[178] <120> miRNA as a biomarker for parkinson's disease and diagnostic kit
[179] using thereof

[180]

[181] <130> PCT541

[182]

[183] <150> KR 10-2017-0091417

[184] <151> 2017-07-19

[185]

[186] <150> KR 10-2017-0116583

[187] <151> 2017-09-12

[188]

[189] <150> KR 10-2017-0132866

[190] <151> 2017-10-12

[191]

[192] <150> KR 10-2017-0132867

[193] <151> 2017-10-12

[194]

- [195] <150> KR 10-2017-0132868
[196] <151> 2017-10-12
[197]
[198] <150> KR 10-2017-0132869
[199] <151> 2017-10-12
[200]
[201] <150> KR 10-2017-0132870
[202] <151> 2017-10-12
[203]
[204] <160> 9
[205]
[206] <170> KoPatentIn 3.0
[207]
[208] <210> 1
[209] <211> 22
[210] <212> RNA
[211] <213> Homo sapiens
[212]
[213] <400> 1
[214] ugaacacauac acgggaaacc uc 22
[215]
[216]
[217] <210> 2
[218] <211> 26
[219] <212> RNA
[220] <213> Homo sapiens
[221]
[222] <400> 2
[223] aaguaguugg uuugaugag augguu 26
[224]
[225]
[226] <210> 3
[227] <211> 23
[228] <212> RNA
[229] <213> Homo sapiens
[230]
[231] <400> 3
[232] cacacaggaa aagcggggcc cug 23

[233]
[234]
[235] <210> 4
[236] <211> 20
[237] <212> RNA
[238] <213> Homo sapiens
[239]
[240] <400> 4
[241] cccugagacc cuaaccuuaa 20
[242]
[243]
[244] <210> 5
[245] <211> 23
[246] <212> RNA
[247] <213> Homo sapiens
[248]
[249] <400> 5
[250] agggccagag gagccuggag ugg 23
[251]
[252]
[253] <210> 6
[254] <211> 22
[255] <212> RNA
[256] <213> Homo sapiens
[257]
[258] <400> 6
[259] aauccuuugu cccuggguga ga 22
[260]
[261]
[262] <210> 7
[263] <211> 26
[264] <212> RNA
[265] <213> Homo sapiens
[266]
[267] <400> 7
[268] gugagggcau gcaggccugg augggg 26
[269]
[270]

[271] <210> 8
[272] <211> 23
[273] <212> RNA
[274] <213> Homo sapiens
[275]
[276] <400> 8
[277] cgcgggcgcu ccuggccgcc gcc 23
[278]
[279]
[280] <210> 9
[281] <211> 21
[282] <212> RNA
[283] <213> Homo sapiens
[284]
[285] <400> 9
[286] ucuggcuguu guggugugca a 21

청구범위

- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:
 (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및
 (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 감소된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 방법은 하기의 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:
 (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및
 (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 증가된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.
- [청구항 3] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:
 (a) 피검자로부터 취득한 샘플 중에 포함된 miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA의 발현양을 정상군 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양과 비교하는 단계; 및
 (b) 상기 피검자의 샘플 중에 포함된 상기 miRNA의 발현양이 정상군 샘플 중에 포함된 miRNA의 발현양 보다 증가된 경우 파킨슨병으로 진단하는 단계.
- [청구항 4] miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324, miR-4726-5p, miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA와 특이적으로 결합 가능한 핵산을 포함하는 파킨슨병의 진단 또는 예후 분석용 키트.
- [청구항 5] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 유발물질의 스크리닝 방법:
 (i) miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 유발 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및
 (ii) 상기 파킨슨병 유발 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 하향조절(down-regulation)될 경우 파킨슨병 유발물질로

판단하는 단계.

- [청구항 6] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 유발물질의 스크리닝 방법:
 (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 유발 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및
 (ii) 상기 파킨슨병 유발 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 상향조절(up-regulation)될 경우 파킨슨병 유발물질로 판단하는 단계.
- [청구항 7] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법:
 (i) miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및
 (ii) 상기 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 상향조절(up-regulation)될 경우 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계.
- [청구항 8] 하기의 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법:
 (i) miR-1226-5p, miR-4767 및 miR-3064-5p로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 발현하는 세포에 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리하여 상기 세포에서 상기 miRNA의 발현양을 확인하는 단계; 및
 (ii) 상기 파킨슨병 치료제 후보물질을 처리한 세포에서 상기 miRNA의 발현양이 하향조절(down-regulation)될 경우 파킨슨병 치료제로 판단하는 단계.
- [청구항 9] miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 10] miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 11] miR-494-3p, miR-501-5p, miR-1244, miR-6768-5p, miR-4324 및 miR-4726-5p 로 구성된 군으로부터 선택되는 1 또는 그 이상의 miRNA를 환자에게 유효량 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 치료방법.

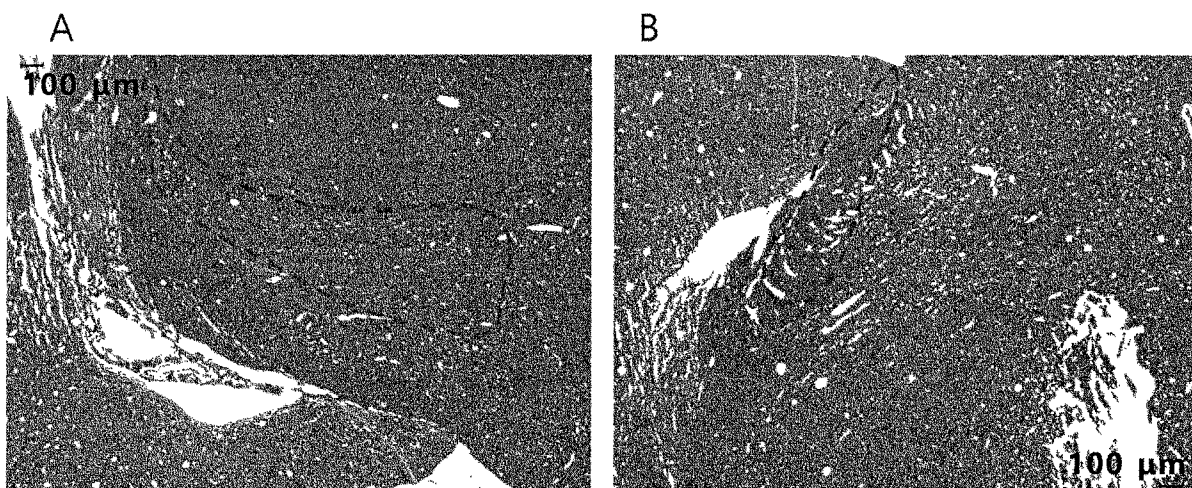
[도1]

Index	Probe Set ID	Transcript ID (miRNA name)	Accession	log ratio [W vs. C]	FCAbsolute [W vs. C]	Regulation [W vs. C]
436	20503803	hsa-miR-494-3p	MIMAT0002816	-3.024323	8.136018728	down
898	20506835	hsa-miR-1244	MIMAT0005896	-2.68516	6.431521165	down
2207	20525497	hsa-miR-6768-5p	MIMAT0027436	-2.33117	5.032132814	down
1198	20517704	hsa-miR-4324	MIMAT0016876	-2.119451	4.34528559	down
1740	20519566	hsa-miR-4726-5p	MIMAT0019845	-2.045094	4.127001607	down
510	20503877	hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	-2.019889	4.055525878	down

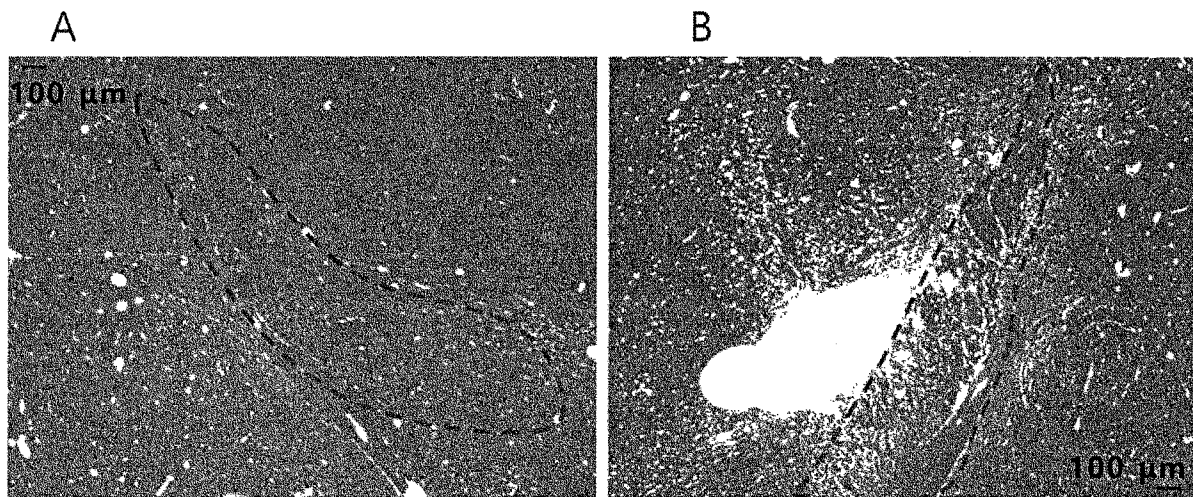
[도2]

Index	Probe Set ID	Transcript ID (miRNA name)	Accession	log ratio [W vs. C]	FCAbsolute [W vs. C]	Regulation [W vs. C]
843	20506767	hsa-miR-1226-5p	MIMAT0005576	2.117824	4.340387954	up
1816	20519642	hsa-miR-4767	MIMAT0019919	1.996284	3.989710318	up
1759	20519585	hsa-miR-3064-5p	MIMAT0019864	1.962058	3.896173707	up

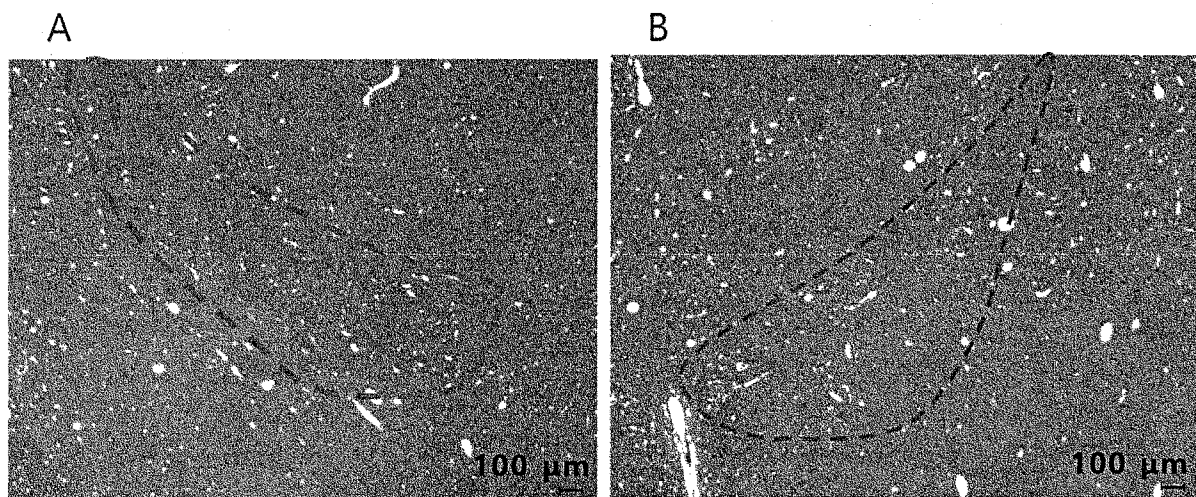
[도3]



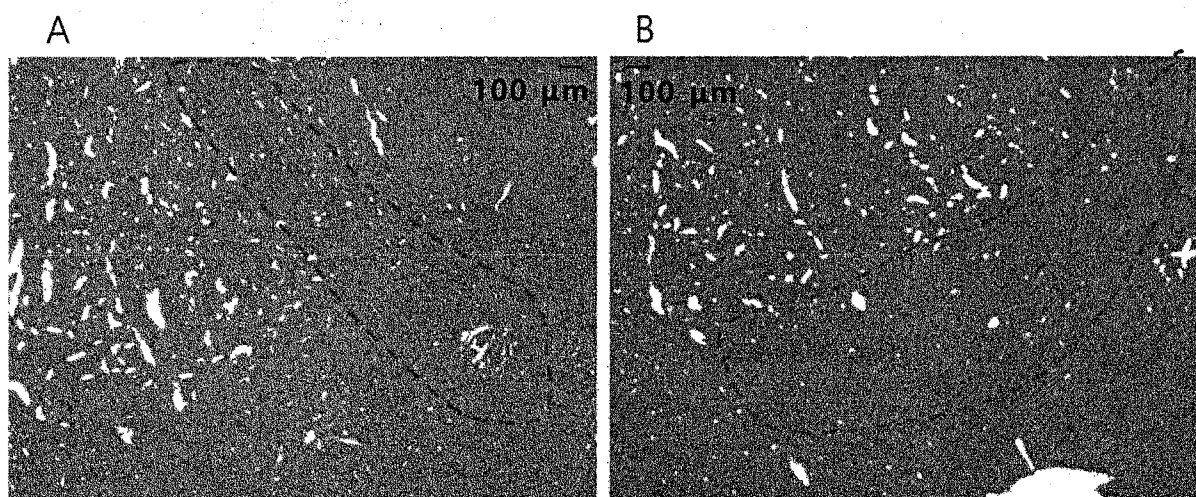
[도4]



[도5]

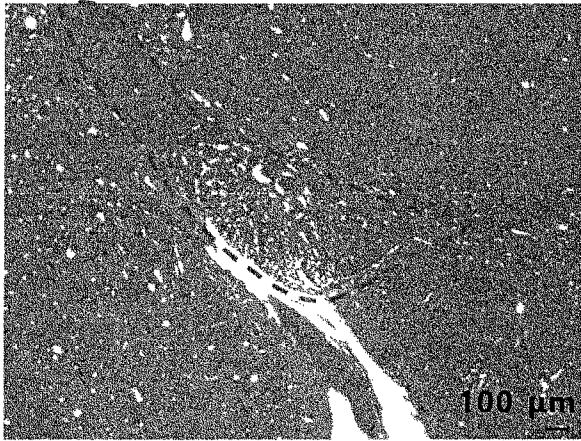


[도6]

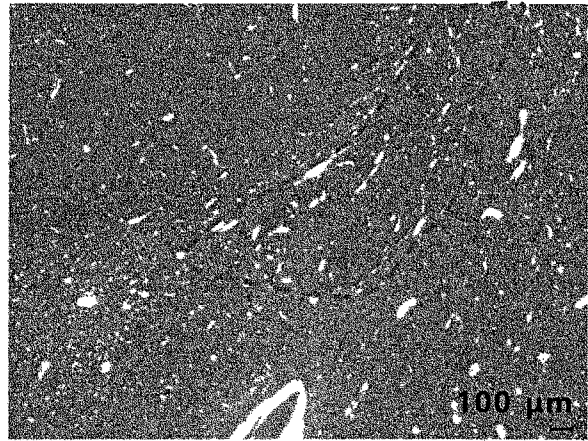


[도7]

A

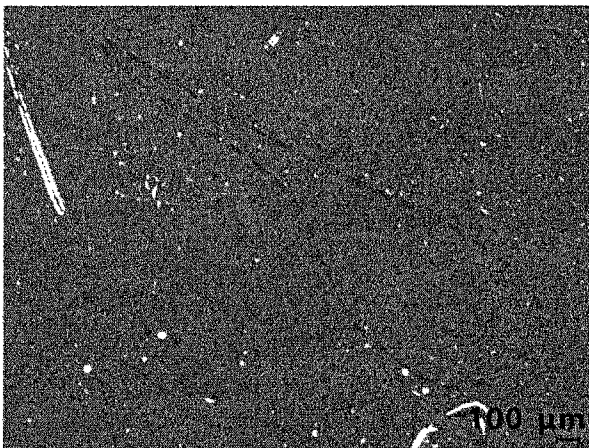


B

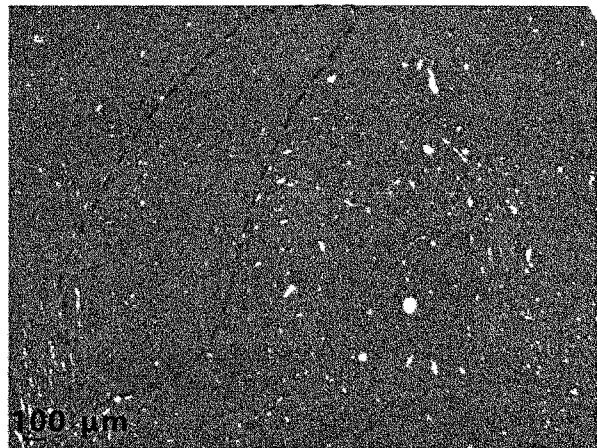


[도8]

A

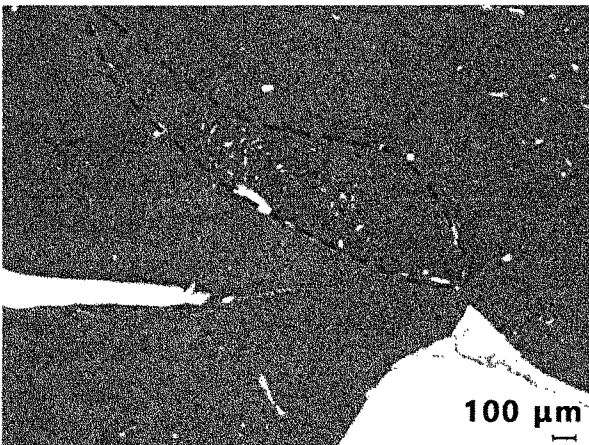


B

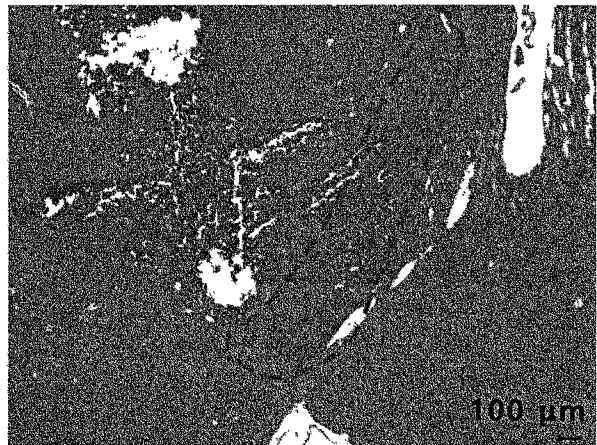


[도9]

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 31/7105(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)

C12Q 1/6883; C12N 15/113; C12Q 1/68; A23L 33/10; A61K 31/7105

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: miRNA, expression, miR-501-5p, miR-1244, Parkinson's disease, diagnosis, treatment, screening, kit, composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017-084770 A1 (BRAINDTECH S.R.L.) 26 May 2017 See claims 1-4, 6; and table 1.	4,5,7,9,10
A		6,8
X	WO 2014-018650 A1 (RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 30 January 2014 See abstract; claims 1-26; and tables 1, 30, 39.	4,6,8-10
A	WO 2014-075822 A1 (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT) 22 May 2014 See abstract; and claims 1-9.	4-10
A	US 9297007 B2 (REIJERKERK, Arie et al.) 29 March 2016 See abstract; and claims 1-16.	4-10
A	US 2017-0044529 A1 (UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS CENTER FOR COMMERCIALIZATION) 16 February 2017 See abstract; and claims 1-13.	4-10



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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

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/KR2018/008085

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.: **1-3, 11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-3 pertain to a method for diagnosis of the human body, and thus pertain 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).

Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body, 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/KR2018/008085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-084770 A1	26/05/2017	AU 2016-357565 A1	26/05/2017
		CA 3005493 A1	26/05/2017
		CN 106523982 A	22/03/2017
		CN 108463561 A	28/08/2018
		EP 3313237 A1	02/05/2018
		EP 3346844 A1	18/07/2018
		EP 3347520 A1	18/07/2018
		EP 3347659 A1	18/07/2018
		EP 3376979 A1	26/09/2018
		EP 3377075 A1	26/09/2018
		EP 3377240 A1	26/09/2018
		EP 3377246 A1	26/09/2018
		EP 3377260 A1	26/09/2018
		EP 3377649 A1	26/09/2018
		IT UB20155765 A1	20/05/2017
		KR 10-2018-0049063 A	10/05/2018
		US 0120006 B2	06/11/2018
		US 2017-0074914 A1	16/03/2017
		WO 2016-128810 A1	18/08/2016
		WO 2017-042016 A1	16/03/2017
		WO 2017-042619 A1	16/03/2017
		WO 2017-042656 A1	16/03/2017
		WO 2017-042694 A1	16/03/2017
		WO 2017-085287 A1	26/05/2017
		WO 2017-085535 A1	26/05/2017
		WO 2017-085599 A1	26/05/2017
		WO 2017-085630 A1	26/05/2017
		WO 2017-085654 A1	26/05/2017
		WO 2017-085660 A1	26/05/2017
		WO 2017-085661 A1	26/05/2017
		WO 2017-085664 A1	26/05/2017
		WO 2017-085665 A1	26/05/2017
		WO 2017-085670 A1	26/05/2017
		WO 2017-085699 A1	26/05/2017
		WO 2017-085701 A1	26/05/2017
WO 2014-018650 A1	30/01/2014	US 0011835 B2	03/07/2018
		US 2015-0275299 A1	01/10/2015
		US 2017-0137813 A1	18/05/2017
		US 9540692 B2	10/01/2017
WO 2014-075822 A1	22/05/2014	CN 104903468 A	09/09/2015
		CN 104968802 A	07/10/2015
		CN 104981548 A	14/10/2015
		EP 2733219 A1	21/05/2014
		EP 2733219 B1	20/09/2017
		EP 2733220 A1	21/05/2014
		EP 2733220 B1	18/10/2017
		US 0011873 B2	03/07/2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/008085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2015-0292013 A1	15/10/2015
		US 2015-0315641 A1	05/11/2015
		US 2016-0273040 A1	22/09/2016
		WO 2014-075911 A1	22/05/2014
		WO 2014-075939 A1	22/05/2014
US 9297007 B2	29/03/2016	EP 2611918 A1	10/07/2013
		US 2013-0158096 A1	20/06/2013
		WO 2011-149354 A1	01/12/2011
US 2017-0044529 A1	16/02/2017	US 2015-0337332 A1	26/11/2015
		US 9416369 B2	16/08/2016
		WO 2014-100252 A1	26/06/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883; C12N 15/113; C12Q 1/68; A23L 33/10; A61K 31/7105

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: miRNA, 발현, miR-501-5p, miR-1244, 파킨슨병, 진단, 치료, 스크리닝, 키트, 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2017-084770 A1 (BRAINDTECH S.R.L.) 2017.05.26 청구항 1-4, 6; 및 표 1 참조.	4,5,7,9,10
A		6,8
X	WO 2014-018650 A1 (RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 2014.01.30 요약; 청구항 1-26; 및 표1, 30, 39 참조.	4,6,8-10
A	WO 2014-075822 A1 (SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT) 2014.05.22 요약; 및 청구항 1-9 참조.	4-10
A	US 9297007 B2 (REIJERKERK, ARIE 등) 2016.03.29 요약; 및 청구항 1-16 참조.	4-10
A	US 2017-0044529 A1 (UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS CENTER FOR COMMERCIALIZATION) 2017.02.16 요약; 및 청구항 1-13 참조.	4-10

☐ 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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



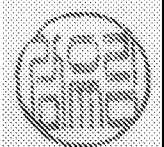
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김유림

전화번호 +82-42-481-3516



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: 1-3, 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 1-3 은 인체의 진단방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
청구항 11은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 17(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 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.

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2015-0292013 A1	2015/10/15
		US 2015-0315641 A1	2015/11/05
		US 2016-0273040 A1	2016/09/22
		WO 2014-075911 A1	2014/05/22
		WO 2014-075939 A1	2014/05/22
US 9297007 B2	2016/03/29	EP 2611918 A1	2013/07/10
		US 2013-0158096 A1	2013/06/20
		WO 2011-149354 A1	2011/12/01
US 2017-0044529 A1	2017/02/16	US 2015-0337332 A1	2015/11/26
		US 9416369 B2	2016/08/16
		WO 2014-100252 A1	2014/06/26