



(51) 국제특허분류:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/009023

(22) 국제출원일:

2024년 6월 27일 (27.06.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0083059 2023년 6월 27일 (27.06.2023) KR

(71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR). 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 04763 서울특별시 성동구 왕십리로 222, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이연종 (LEE, Yunjong); 16365 경기도 수원시 권선구 임북로77번길62, 101-304, Gyeonggi-do (KR). 이내웅 (LEE, Nae-Eung); 04036 서울특별시 마포구 양화로 45, 103-2402, Seoul (KR). 신정용 (SHIN, Jeong

Yong); 61175 광주광역시 북구 호동로 99, 105동 1008호, Gwangju (KR). 김희정 (KIM, Heejeong); 16357 경기도 수원시 장안구 덕영대로425번길 9-12, 301호, Gyeonggi-do (KR). 조석현 (CHO, Seok Hyun); 05276 서울특별시 강동구 고덕로80길 99, 519동 1405호, Seoul (KR). 김희태 (KIM, Hee Tae); 04164 서울특별시 마포구 마포대로1길 21, 101-1501, Seoul (KR).

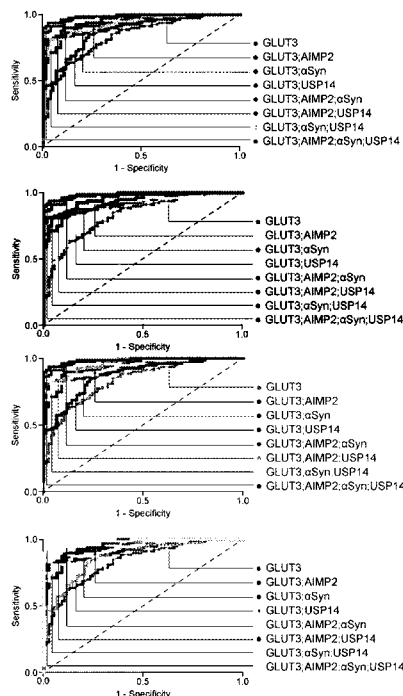
(74) 대리인: 공병욱 (KONG, Byung Wook); 08793 서울특별시 관악구 남부순환로 1922, 301호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING PARKINSON'S DISEASE AND METHOD FOR DIAGNOSING PARKINSON'S DISEASE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 파킨슨병 진단용 조성물 및 이를 이용한 파킨슨병 진단 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosing Parkinson's disease, comprising an agent for detecting a protein consisting of a combination of GLUT3 and any one or more selected from the group consisting of USP14, α -synuclein, and AIMP2, or a gene encoding the protein. The composition for diagnosing Parkinson's disease and a diagnostic kit comprising the composition, of the present invention, can be used to perform detection or diagnosis by distinguishing Parkinson's disease patient groups through a simple blood test. Furthermore, by primarily applying same to patients showing prodromal symptoms of Parkinson's disease, such as olfactory dysfunction, sleep disorders, and constipation, the composition and the diagnostic kit can be used as a preliminary test to determine whether to perform neurological examinations and brain imaging tests at large hospitals. Also, the composition and the diagnostic kit can be used as a means for quantifying the effect of treating Parkinson's disease.

(57) 요약서: 본 발명은 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 파킨슨병 진단용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 진단 키트를 활용하면, 간단한 혈액 검사를 통해 파킨슨병의 환자군을 구별하여 검출 또는 진단할 수 있다. 나아가, 후각이상, 수면장애, 변비 등 파킨슨병의 전조증상을 보이는 환자에게 우선적으로 적용함으로써 대형병원에서의 신경학적 검사, 뇌이미징 검사 진행 여부를 결정하는 예비검사로 활용될 수 있다. 또한, 파킨슨병의 치료 효과를 정량화하는 수단으로도 활용될 수 있다.

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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 파킨슨병 진단용 조성물 및 이를 이용한 파킨슨병 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 과학기술정보통신부의 지원 하에서 과제번호 2021M3H4A4079521에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리 전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “나노소재기술개발”, 연구과제명은 “등온중폭 전기화학 분자 및 디지털 형광 이미징 번역 진단기 개발”, 주관기관은 성균관대학교, 연구기간은 2022.02.01-2023.01.31 이다.
- [2] 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HU22C0143000022에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리 전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “치매극복연구개발사업(복지부)”, 연구과제명은 “알파-시누클레인 응집체 형성/전파 촉진 시스템-기반 AIMP2 타겟의 루이소체치매 발병 원인/기전 및 병변 전파 뇌지도 규명”, 주관기관은 성균관대학교 산학협력단, 연구기간은 2022.04.01-2022.12.28 이다.
- [3] 본 특허출원은 2023년 6월 27일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2023-0083059호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [4] 본 발명은 혈액 내 GLUT3, USP14, α -synuclein 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 발현 수준 검출을 통한 파킨슨병 진단용 조성물에 관한 것이다.

[5]

배경기술

- [6] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 퇴행성 뇌질환 중 하나로서, 뇌간의 중양에 존재하는 뇌흑질의 도파민계 신경이 파괴됨으로써 움직임에 장애가 나타나는 질환이다. 파킨슨병 환자는 운동 장애 뿐만 아니라 비운동성 장애(후각 이상, 수면 장애, 우울증, 조증 및 인지 장애)를 보인다. 급속히 노령화 사회로 진입하는 현대에는 파킨슨병 환자의 수도 급격하게 증가하는 추세이다. 국민건강보험공단의 질병통계자료에 따르면, 국내 파킨슨병 환자는 2004년 39,265명에서 2016년 96,499명으로 10여년 사이 약 2.5배 증가하였다.
- [7] 파킨슨병의 진단은 전문의에 의한 신경학적인 UPDRS(unified Parkinson's disease rating scale) 기반 파킨슨병 연계 운동/비운동 증상의 정량적인 점수화에 큰 부분 의존하고 있다. 하지만 파킨슨병의 초기에는 오진율이 25%(Thomas G. Beach et al., 2018)에 달하는 것으로 보고되었다. 도파민 신경세포의 축삭을 DaTscan 뇌영상 이미지로 촬영하여, 도파민세포의 소실을 조기에 진단할 수 있

지만, 고가의 장비를 보유한 대형병원에서만 이용이 가능하기 때문에 환자의 접근성에 한계가 있다.

[8] 파킨슨병 환자에게 접근성이 용이하며 정확한 진단을 위해서는 분자진단마커의 개발 및 이를 활용한 소형진단기기의 개발이 중요하다. 분자 진단 마커는 질환의 진단 뿐만 아니라 임상 시험에서의 증상 개선에 대한 정량화 및 치료 예후 판단에도 활용될 수 있으므로, 이에 대한 연구가 필요하다.

[9] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 파킨슨병의 발병 가능 유무와 조기 진단이 가능하고, 최소 침습적인 방법으로 파킨슨병을 간단하게 진단할 수 있는 진단 방법을 규명하기 위하여 예의 노력하였다. 그 결과, 혈액 내 GLUT3, 및 USP14, α -synuclein 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현 수준 검출을 통해 파킨슨병의 조기 진단이 가능함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 파킨슨병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 파킨슨병 진단 키트를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

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

[17]

과제 해결 수단

[18] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 GLUT3(glucose transporter 3), USP14(ubiquitin-specific protease 14), α -시뉴클레인(α -synuclein) 및 AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합의 단백질, 상기 단백질의 응집체(aggregate), 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 더 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.

[19] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 GLUT3(glucose transporter 3) 단백질, 상기 단백질의 응집체(aggregate), 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.

- [20] 본 발명자들은 파킨슨병의 발병 가능 유무와 조기 진단이 가능하고, 최소 침습적인 방법으로 파킨슨병을 간단하게 진단할 수 있는 진단 방법을 규명하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 혈액 내 GLUT3 및, GLUT3에 USP14(ubiquitin-specific protease 14), α -시뉴클레인(α -synuclein) 및 AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 검출을 통해 파킨슨병의 조기 진단이 가능함을 규명하였다.
- [21] 본 발명에서 용어 "응집체(aggregate)"는 단백질의 중합체, 피브릴(fibril), 피브릴 전구체, 플라크, 타 단백질과 결합된 단백질 단량체 및 중합체, 지방 혹은 탄수화물과 결합된 단백질, 핵산과 결합된 단백질 및 혈액세포와 결합된 단량체가 분해된 것을 포함할 수 있으며, 상기 피브릴은 비정상 단백질의 올리고머(oligomer)를 포함할 수 있다.
- [22] 또한, 상기 응집체는 단백질이 DNA 서열 돌연변이, DNA의 전사·번역 단계에서의 문제, 온도, pH, 산화적 스트레스 등의 환경적 스트레스, 노화 등의 다양한 원인에 의하여 IDP(Intrinsically disordered proteins) 또는 미스폴딩된 단백질(misfolded proteins)이 응집하여 생성된 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 조성물을 이용하면, 간단한 혈액 검사를 통해 파킨슨병의 환자군을 구별하여 검출 또는 진단할 수 있다. 나아가, 후각이상, 수면장애, 변비 등 파킨슨병의 전조증상을 보이는 환자에게 우선적으로 적용함으로써 대형병원에서의 신경학적 검사, 뇌이미징 검사 진행 여부를 결정하는 예비검사로 활용될 수 있다. 또한, 파킨슨병의 치료 효과를 정량화하는 수단으로도 활용될 수 있다.
- [24] 본 발명에서 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것 또는 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것을 의미한다.
- [25] 본 발명의 파킨슨병 진단용 조성물은 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함할 수 있다.
- [26] 상기 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 단백질의 검출용 제제는 상기 단백질의 정상구조뿐만 아니라, 질병 상태에서 나타나는 응집체(올리고머, 아밀로이드 응집체) 형태를 모두 검출할 수 있다.
- [27] 본 발명의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질의 검출용 제제는 별도의 언급이 없다면, 상기 단백질의 정상 구조 및 변성된 응집체 구조 모두를 포함한 정량 및 분석에 이용될 수 있다.
- [28] 하지만, 4가지 단백질의 정상구조와 변성구조를 구분하여 측정하는 방법 또한 진단에 확장되어 활용될 수 있다.

- [29] 본 발명의 GLUT3 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 이용하는 경우, 높은 민감도 및 특이도로 파킨슨 병을 진단할 수 있다.
- [30] 본 발명의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 단백질을 검출하는 제제를 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 이용하는 경우, 현저하게 높은 민감도 및 특이도로 파킨슨 병을 진단할 수 있다. 이는 혈장 내 GLUT3 단백질을 검출하는 제제만을 이용하는 경우에도 파킨슨 병을 진단할 수 있지만, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 단백질을 검출하는 제제와 조합하는 경우에 파킨슨 병의 진단 정확도가 현저하게 향상됨을 의미한다.
- [31] 본 발명의 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 대상(subject)으로부터 분리된 생물학적 시료, 보다 구체적으로 예를 들면, 혈액, 혈청 또는 혈장에 존재하는 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명에서의 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질은 인체로부터 분리된 혈액 시료 내의 단백질을 의미한다.
- [33] 종래 알려진 파킨슨병의 진단을 위하여 사용하는 방법은 전문의에 의한 신경학적인 UPDRS(unified Parkinson's disease rating scale) 기반 파킨슨병 연계 운동/비운동 증상의 정량적인 점수화 방법이다. 하지만 파킨슨병 초기에는 오진율이 25% (Thomas G. Beach et al., 2018)에 달하는 것으로 보고되어 조기진단에 적용하는 데에는 한계가 있다. 도파민 신경세포의 축삭을 DaTscan 뇌영상 이미징을 함으로써 도파민세포의 소실을 조기에 진단하는 방법도 있지만, 고가의 이미징 장비를 보유한 대형병원에서만 이용이 가능하기 때문에 환자의 접근성에 한계가 있다.
- [34] 이에 반해 본 발명의 일 실시예에 따른 파킨슨병 진단용 조성물을 이용하는 경우, 대상으로부터 분리된 혈액, 혈청 또는 혈장에 있어서, GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 신속하고 간편하면서도 정확하게 파킨슨병을 조기 진단할 수 있다는 장점이 있다.
- [35] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단백질을 검출하는 제제는 항체, 앵타머, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 올리고펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이다.
- [36] 본 발명의 "단백질을 검출"이란 파킨슨병을 진단하기 위하여 생물학적 시료인 혈액에서 본 발명에서의 파킨슨병 진단용 마커인 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기 단백질의 발현 수준 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced

Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅, 닛 블랏팅 및 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [37] 본 발명의 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [38] 본 발명의 용어 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *ProcNatl Acad Sci USA.* 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.
- [39] 본 발명의 용어 "리간드"는 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질에 결합하여 복합체를 형성하고 신호를 발생시킬 수 있는 저분자 물질을 의미한다. 포괄적으로 항체를 포함하는 의미로 해석될 수도 있다.
- [40] 본 발명의 용어 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스

당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌 [P E Nielsen, M Egholm, R H Berg, O Buchardt, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", *Science* 254(5037):1497-500 (1991)]에 상세하게 개시되어 있다.

[41] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 유전자를 검출하는 제제는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이다. 본 발명에 따른 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.

[42] 본 발명의 용어 "유전자를 검출"이란 파킨슨병을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질을 암호화하는 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정하는 것을 의미한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[43] 본 발명의 용어 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[44] 본 발명의 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질이면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.

[45] 본 발명의 용어 "LNA(Locked nucleic acids)"는, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall *Gene Therapy*

(2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, 왓슨-크릭 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 왓슨-크릭 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

[46] 본 발명의 용어 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기 쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA: 올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[47]

[48] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 다른 일 양태에 따른 파킨슨병 진단용 조성물을 포함하는 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.

[49] 본 발명의 용어 "키트"는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[50] 본 발명의 파킨슨병 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위하여 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[51] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위하여 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[52] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위하여 필요한 필수요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차

반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[53] 본 발명의 "파킨슨병 진단용 키트"는 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 "파킨슨병 진단용 조성물"을 포함하는 바, 중복되는 내용을 원용하며, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 중복 기재를 생략하도록 한다.

[54]

[55] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[56] (a) 인체로부터 분리된 혈액 시료 내의 GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[57] (b) 정상 혈액 대조군 시료에 비해 상기 발현 수준이 증가된 경우, 파킨슨병일 가능성이 높다는 정보를 제공하는 단계.

[58]

[59] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계는 하기 (a-1) 단계이고, 상기 (b) 단계는 하기 (b-1) 단계인, 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:

[60] (a-1) GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

[61] (b-1) 정상 혈액 대조군 시료에 비해, 상기 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현수준이 증가된 경우, 파킨슨병일 가능성이 높다는 정보를 제공하는 단계.

[62]

[63] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 단백질 수준을 측정하는 단계는 항체, 앵타머, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 올리고펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 제제를 이용하여 수행된다. 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 진단 대상 혈액 시료 및 정상 혈액 대조군 시료의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질 발현을 측정 및 비교할 수 있다. 상기 항체와 생물학적 시료 내의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질이 항원-항체 복합체를 형성하도록 하고, 이를 검출하는 방법을 이용한다.

[64] 본 발명의 용어 "항원-항체 복합체"는 생물학적 시료 중의 해당 유전자의 존재 또는 부존재를 확인하기 위한 단백질 항원과 이를 인지하는 항체의 결합물을 의미한다. 상기 항원-항체 복합체의 검출은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 분광

학적, 광화학적, 생물화학적, 면역화학적, 전기적, 흡광적, 화학적 방법 및 기타 다양한 방법을 이용하여 검출할 수 있다.

[65] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 체제를 이용하여 수행된다. 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 또는 AIMP2 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준의 측정 또는 비교는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 측정방법들을 통하여 정상 대조군에서의 mRNA 발현량과 질환 발병 여부를 진단하고자 하는 개체의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량 정도를 비교함으로써 파킨슨병의 발병 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.

[66] 본 발명의 "파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법"은 상술한 본 발명의 다른 일 양태인 파킨슨병 진단용 조성물을 이용하여 실시하는 진단 방법에 관한 것인 바, 중복되는 내용을 원용하며, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 중복 기재를 생략하도록 한다.

[67]

[68] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[69] a) 혈액 내 GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되어 있는 파킨슨병 동물 모델에 대해 의약 후보 물질을 투여하는 단계;

[70] b) 단계 a) 이후 상기 동물 모델로부터 혈액을 채취하고, 채취된 혈액 내 상기 단백질 또는 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[71] c) 채취된 혈액 내 GLUT3 단백질 또는 유전자 발현 수준이 의약 후보 물질 투여에 의해 유의한 감소를 보이는 경우, 상기 의약 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판정하는 단계.

[72]

[73] 본 발명의 단계 a)의 투여는 경구 또는 비경구로 투여 가능하며, 의약 후보 물질의 특성에 따라, 당업자가 적합한 투여 경로를 선택할 수 있다.

[74]

[75] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 a) 단계는 하기 a-1) 단계이고, 상기 c) 단계는 하기 c-1) 단계인, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[76] a-1) 혈액 내 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되어 있는 파킨슨병 동물 모델에 대해 의약 후보 물질을 투여하는 단계;

- [77] c-1) 채취된 혈액 내 GLUT3, 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 발현 수준이 의약 후보 물질 투여에 의해 유의한 감소를 보이는 경우, 상기 의약 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판정하는 단계.

[78]

발명의 효과

- [79] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [80] (a) 본 발명은 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.
- [81] (b) 본 발명은 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.
- [82] (c) 본 발명의 파킨슨병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [83] (d) 본 발명은 파킨슨병 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [84] (e) 본 발명의 파킨슨병 진단용 조성물 및 진단 키트를 활용하면 혈액검사를 통해 매우 신속하고 간편하게 파킨슨병을 조기 진단할 수 있다.

[85]

도면의 간단한 설명

- [86] 도 1은 파킨슨병 환자군 및 정상 대조군의 연령 분포를 나타낸다(파킨슨병 환자군 $n = 80$, 정상대조군 $n = 78$)
- [87] 도 2는 Sandwich ELISA 기반 파킨슨병 환자 및 연령 매치 정상 대조군 유래 혈장 내 단백질 마커(GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2)의 정량 분석 그래프이다(정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시되었으며, 유의성 판별은 unpaired student t test로 검정, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
- [88] 도 3은 Sandwich ELISA 기반 파킨슨병 환자 및 연령 매치 정상 대조군 유래 혈장 내 단백질 마커 DJ-1의 정량 분석 그래프이다(정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시되었으며, 유의성 판별은 unpaired student t test로 검정, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).
- [89] 도 4은 혈장 단백질 마커(GLUT3, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2)에 대한 ROC 커브 분석 및 진단 정확도 분석 결과이다. 각 단백질 마커의 정상 대조군/파킨슨병 환자의 혈장 농도 값에 대한 ROC 커브 분석 및 민감도/1-특이도 그래프이다. 도 5는 혈장 단백질 마커(DJ-1)에 대한 ROC 커브 분석 및 진단 정확도 분석 결과이다. 각 단백질 마커의 정상 대조군/파킨슨병 환자의 혈장 농도 값에 대한 ROC 커브 분석 및 민감도/1-특이도 그래프이다.
- [90] 도 6은 로지스틱 회귀분석 기반 다중마커패널 ROC 커브 분석 및 진단 정확도 분석 결과이다. AIMP2 단독 혹은 α -시뉴클레인, GLUT3, USP14 마커들과 조합시의 진단 정확도 분석을 위해 로그회귀 함수를 계산하고 이에 기반하여 ROC 커브를 분석한 그래프이다.

- [91] 도 7은 로지스틱 회귀분석 기반 다중마커패널 ROC 커브 분석 및 진단 정확도 분석 결과이다. GLUT3 단독 혹은 α -시뉴클레인, AIMP2, USP14 마커들과 조합시의 진단 정확도 분석을 위해 로그회귀 함수를 계산하고 이에 기반하여 ROC 커브를 분석한 그래프이다.
- [92] 도 8은 AIMP2 응집체 항원을 제작하고 검증한 도이다:
- [93] A: GST-AIMP2 재조합 단백질 (0) 및 7일간의 응집 반응을 통해 얻은 GST-AIMP2 응집체 (7)에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과; B: 재조합 단백질인 정상 구조의 GST-AIMP2 (GST-AIMP2 monomer) 및 GSTAIMP2 응집체 (GST-AIMP2 fibril)에 대한 티오프라빈 T 형광 분석을 통한 아밀로이드 구조 분석; 및 C: GST-AIMP2 응집체 항원의 쿠마시 블루 염색 결과 (1: BSA, 2: 사이즈 마커 및 3: GST-AIMP2 응집체).
- [94] 도 9는 AIMP2 응집 형태별 특이적인 단일 항체 클론을 제작하고 이의 아이소타입 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [95] A: AIMP2 모노머 및/또는 AIMP2 응집체에 결합하는 8종의 항체 생산 클론; 및 B: 8종의 클론에 대한 항체 아이소타입 분석 결과.
- [96] 도 10은 AIMP2 항체 클론의 AIMP2 정상 구조 (monomer) 및 응집체 (Aggregate) 구조에 대한 반응성을 분석한 결과를 나타낸 도이다:
- [97] A: 8종의 클론에서 정제한 항체의 닛 블롯 분석 결과; 및 B: 8종의 클론에서 정제한 항체의 웨스턴 블롯 분석 결과.
- [98] 도 11은 8종의 AIMP2 항체 클론의 AIMP2 입체 구조 특이적 반응성을 종합적으로 정리한 표이다.
- [99] 도 12는 AIMP2 응집체 입체 형태 특이적 항체 클론 (5B2 및 6C7)에서 생산되는 항체의 서열 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [100] 연두색: CDH1, CDH2 및 CDH3 아미노산 서열; 파란색: CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열; 회색: Igblast로 분석되는 아미노산 서열 외의 N 말단 아미노산 서열; 회색 및 밑줄: 인간화 키메라 항체 제조시의 완전한 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 내의 불변 영역; 및 붉은 네모칸: 두 클론의 항체의 아미노산 서열 차이 부위.
- [101] 도 13은 AIMP2 모노머 입체 형태 특이적 항체 클론 (3C2 및 7H9)에서 생산되는 항체의 서열 분석 결과를 나타낸 도이다:
- [102] 연두색: CDH1, CDH2 및 CDH3 아미노산 서열; 파란색: CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열; 회색: Igblast로 분석되는 아미노산 서열 외의 N 말단 아미노산 서열; 회색 및 밑줄: 인간화 키메라 항체 제조시의 완전한 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 내의 불변 영역; 및 붉은 네모칸: 두 클론의 항체의 아미노산 서열 차이 부위.
- [103] 도 14는 AIMP2 모노머 및 응집체 입체 형태에 대해 모두 결합하는 항체 클론 (13H9)에서 생산되는 항체의 서열 분석 결과를 나타낸 도이다:

- [104] 연두색: CDH1, CDH2 및 CDH3 아미노산 서열; 파란색: CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열; 회색: Igblast로 분석되는 아미노산 서열 외의 N 말단 아미노산 서열; 및 회색 및 밑줄: 인간화 키메라 항체 제조시의 완전한 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열 내의 불변 영역.
- [105] 도 15는 나이가 일치하는 대조군과 파킨슨병 환자군의 혈장 단백질을 nitrocellulose membrane에 결합시킨 후 ponceau 염색을 통한 전체 단백질 양 확인 및 5B2 항체를 통해 각 혈장 샘플 내에 존재하는 AIMP2 응집체의 양을 닛 블롯으로 확인한 결과이미지이다.
- [106] 도 16은 도 15의 스탠다드로부터 확인되는 재조합 AIMP2 응집체 단백질의 농도별 5B2 dot blot 신호 세기를 기반으로 계산한 각 혈장 샘플 내에 존재하는 AIMP2 응집체 단백질의 농도값 그래프이다 (n=대조군 24개 및 PD 24개)
- [107] 도 17은 혈장내 AIMP2 응집체 농도의 파킨슨병 진단 마커로서의 유효성을 평가하기 위한 ROC 곡선 분석 (n=대조군 24개 및 PD 24개). AUC, cut off value 및 진단 민감도와 특이도값은 그래프 아래에 표시됨.

[108]

발명의 실시를 위한 형태

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

[110]

[111] 실시예

[112] 실시예 1: 파킨슨병 환자 및 대조군 혈장 샘플 준비

[113] 한양대학교 병원으로부터 파킨슨병 환자군 80명, 및 연령이 매치된 정상 대조군 78명으로부터 분리한 혈액을 공여받았다. 한양대학교 병원의 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받았으며, 승인번호는 HY-2021-06-040이다. 도 1 및 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 평균 연령대는 64세였으며, 두 그룹 사이의 연령의 유의한 차이가 없는 것을 확인하였다.

[114]

[115] [표1]

정상 대조군 및 파킨슨병 환자군의 연령 및 성별 분포 요약표

	정상 대조군	파킨슨환자
Age average	64.15	64.93
Sex	M = 36	M = 41
	F = 42	F = 39

- [116] 나트륨 헤파린 튜브(7cc)에 샘플링된 혈액을 공여받아, 상기 혈액을 3000rpm으로 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 혈장 1 cc씩 EP tube에 담고 -70°C에서 보관하였다. 혈장은 추후 혈장 단백질 마커 분석에 이용하였다.
- [117]
- [118]
- [119] 실시예 2: **Sandwich ELISA** (효소 연결 면역 흡착제 분석) 분석 및 절대 정량
- [120] 파킨슨병의 진단 마커 단백질의 후보 물질로 AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2), USP14(ubiquitin-specific protease 14), GLUT3(glucose transporter 3), DJ-1 및 α -시뉴클레인(α -synuclein)을 Sandwich ELISA를 통해 정량하였다.
- [121] 코팅 버퍼(coating buffer)에서 포획 항체(capture antibody)를 1:1000 내지 1:2000으로 희석하여 코팅 솔루션(coating solution)을 준비하였다. 코팅 버퍼를 포함한 모든 버퍼는 ELISA buffer kit (CNB0011, Invitrogen)를 사용하였다. 코팅 솔루션을 96-well 기준으로 1 well 당 100 μ L로 플레이트를 코팅하였다. 플레이트를 덮고 2 내지 8°C에서 밤새(12 내지 18시간 동안) 배양하였다. 배양 후 well의 용액을 흡인(suction)하고 well 당 200 μ L의 세척 버퍼(wash buffer)로 1회 세척하였다. 세척 후 뒤집어서 흡수지에 두드려 여분의 액체를 제거하였다. 실온에서 1시간 동안 블로킹 버퍼(blocking buffer)로 well당 200 μ L로 블로킹(blocking) 해주고 1시간 뒤에 흡인하고 여분의 액체를 최대한 제거하였다. 블로킹 버퍼로 표준(standards) 샘플과 혈장 샘플들을 최종용액이 100 μ L이 되도록 희석하여 미리 준비해두었다. 100 μ L의 표준 샘플과 혈장 샘플들을 지정된 well에 넣어주었다. 셰이커(shaker)를 사용하여(~ 500rpm) 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 뒤, well 당 200 μ L의 세척 버퍼로 5회 흡인 및 세척을 진행하였다. 세척 후 뒤집어서 여분의 액체를 충분히 제거하였다. 블로킹 버퍼에 디텍션 항체(detection antibody)를 1:1000 내지 1:2000으로 희석하여 디텍션 항체 솔루션(detection antibody solution)을 준비하였다. 디텍션 항체 솔루션 100 μ L를 각 well에 넣어주었다. 셰이커를 사용하여(~ 500rpm) 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 2시간 뒤, well 당 200 μ L의 세척 버퍼로 5회 흡인 및 세척하였다. 세척 후 뒤집어서 여분의 액체를 제거하였다. 1:5,000으로 희석하여 블로킹 버퍼가 포함된 Streptavidin-HRP 솔루션을 제조하였다. 100 μ L의 Streptavidin-HRP 솔루션을 각 well에 추가하였다. 셰이커를 사용하여(~ 500rpm) 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양 30분 뒤, well 당 200 μ L의 세척 버퍼로 5회 흡인 및 세척하였다. 세척 후 뒤집어서 여분의 액체를 제거하였다. 제거 후, 각 well에 100 μ L의 TMB 기질 솔루션(substrate solution)을 추가하였다. 실온에서 30분 동안 배양하였다. 배양 30분 뒤, 각 well에 스톱 솔루션(stop solution)을 100 μ L를 추가로 넣었다. 스톱 솔루션을 첨가한 후, 30분 이내에 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 로그-로그(log-log) 또는 4-parameter curve fit을 사용하여 결과를 계산하였다.
- [122] 결과는 도 2, 도 3 및 표 2에 나타내었다.

[123]

[124] [표2]

ELISA 분석 기반 정상 및 파킨슨 환자 유래 혈장 내 단백질 마커의 농도의 평균 및 표준 오차

마커	혈장 내 농도 (pg/μl)	
	정상군	파킨슨환자
GLUT3	1.65 ± 0.06	2.63 ± 0.10
USP14	1.09 ± 0.04	1.61 ± 0.07
α-synuclein	0.22 ± 0.02	1.44 ± 0.32
AIMP2	5.54 ± 0.19	9.34 ± 0.36
DJ-1	1.59 ± 0.21	1.57 ± 0.13

[125]

[126] 도 2 및 3에 나타난 바와 같이, DJ-1을 제외한 나머지 4개의 단백질 (GLUT3, USP14, α-시뉴클레인 및 AIMP2)의 발현양이 파킨슨병 환자의 혈액에서 유의적으로 증가되어 있는 것으로 확인되었다.

[127] 상기 표 2에 4개 단백질(GLUT3, USP14, α-시뉴클레인 및 AIMP2)의 파킨슨병 환자 및 연령 매치 정상 대조군의 혈장 내 평균 농도를 나타내었다. GLUT3의 혈장 내 평균 농도는 정상군에서 1.68 pg/μl, 파킨슨병 환자군에서 2.49 pg/μl(48% 증가)로 측정되었다. USP14의 혈장 내 평균 농도는 정상군에서 1.17 pg/μl, 파킨슨병 환자군에서 1.66 pg/μl(41% 증가)로 측정되었다. α-synuclein의 혈장 내 평균 농도는 정상군에서 0.14 pg/μl, 파킨슨병 환자군에서 1.92 pg/μl(13배 증가)로 측정되었다. AIMP2의 혈장 내 평균 농도는 정상군에서 6.38 pg/μl, 파킨슨병 환자군에서 10.44 pg/μl(63% 증가)로 측정되었다.

[128]

[129]

[130] 실시예 3: ROC(Receiver Operating Characteristic) 커브 분석을 통한 개별 마커의 진단 민감도 특이도 분석

[131] 파킨슨병 환자군 및 정상 대조군의 혈장 내 단백질 마커의 농도값(도 2 및 도 3)을 기반으로 개별 마커가 정상 대조군과 파킨슨병 환자군을 구분할 수 있는지 평가하기 위하여 ROC 커브 분석을 진행하였다.

[132] 상기 실시예 2의 ELISA 분석을 통해서 얻어진 O.D 값을 정규화(normalize)한 다음, GraphPad prism 프로그램을 사용하여 대조군에 대한 O.D value 또는 실제 농도값을 A 열에 입력하고, B 열에 PD에 대한 O.D 값을 입력하였다. 입력 후, 데이터 테이블창에서 분석을 누르고 Receiver-operator characteristic curve을 선택하였다. ROC 대화 상자에서 대조군 및 파킨슨병 결과가 있는 열을 지정하고, 결과값이 Fraction 또는 percentage 인지를 설정하고 분석을 진행하였다. 분석결과로

Area Under the Curve (AUC)값, 민감도(sensitivity), 특이도(specificity), 및 ROC 커브를 얻었다. cut off 값은 Prism 프로그램에서 ROC 커브의 좌표를 표로 얻을 수 있는데 곡선에서 cut off 값, 민감도 및 특이도의 3부분을 엑셀로 가져왔다. 민감도 및 특이도를 선택하여 꺾은선형 차트를 도시화하였다. 두 그래프가 만나는 지점의 수치값을 cut off 값으로, 그 지점의 민감도 및 특이도 값을 이 ROC 커브에 대한 민감도 및 특이도로 해석하였다.

[133] 결과는 도 4, 도 5 및 표 3에 나타내었다.

[134]

[135] [표3]

개별 마커별 ROC 커브 분석에 의한 AUC 값 및 진단마커로서의 cut off 값에 대한 진단 민감도/특이도 수치 요약표

마커	AUC	Cut off value (pg/μl)	Sensitivity (민감도, %)	Specificity (특이도, %)
GLUT3	0.7713	1.907	66.67	71.43
USP14	0.7551	1.195	66.70	66.70
α-시뉴클레인	0.7577	0.1750	66.67	66.67
AIMP2	0.8549	7.460	78.57	80.95
DJ-1	0.6859	1.011	61.02	62.22

[136] 도 4, 도 5 및 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 개별 마커들은 상대적으로 높은 수준의 area under curve(AUC) 값을 나타냈으며, AIMP2가 0.8549로 가장 좋은 AUC 값(0.8549)을 보였다. 민감도와 특이도를 최대로 얻을 수 있는 cut off 수치를 확인하였으며, α-시뉴클레인, GLUT3 및 USP14은 66% 수준의 민감도를 보였다. DJ-1은 62% 수준, α-시뉴클레인과 USP14은 66% 수준의 특이도를 보인 반면 GLUT3는 71%의 상대적으로 높은 특이도를 보였다. 가장 좋은 AUC값을 보인 AIMP2는 7.46 ng/μl cut off 수치를 기준으로 78.57%의 민감도 및 80.95%의 특이도를 보였다.

[137]

[138] 실시예 4: 다중마커 로그 회귀 분석 및 다중마커 패널별 ROC 커브 분석 (1)

[139] 파킨슨병 진단 마커 AIMP2 및 α-시뉴클레인에 본 발명자들이 새로 발굴한 GLUT3와 USP14을 조합하여 다중마커패널을 구축하고, 구축한 다중마커패널을 이용하면 파킨슨병의 진단 정확도가 높아질 수 있는지를 로지스틱 회귀분석을 통해 검증하였다.

[140] 각각의 항체별로 상기 실시예 2의 ELISA를 통해 얻어진 정규화(normalize) 한 O.D 값 또는 실제 농도값을 엑셀에서 대조군 그룹과 파킨슨병 그룹을 한 줄로 나열한 다음, '대조군 = 0, 파킨슨 병 = 1'로 다른 열에 입력하였다. SPSS 프로그램을 실행하여 데이터 보기창에 붙여 넣었다. 변수 보기창에서 각각의 열이 의미하는

것을 입력하고, '대조군 = 0, 파킨슨 병 = 1'로 입력한 열은 값 레이블에 들어가서 '0은 대조군, 1은 파킨슨 병이다'를 추가하였다. 차례로 분석, 회귀분석, 이분형 로지스틱을 클릭하면 이분형 로지스틱 창이 나타나는데 여기서 종속변수에는 대조군 = 0, 파킨슨 병 = 1을, 그 외 독립변수에 해당하는 AIMP2, α Syn, GLUT3, USP14는 블록 칸으로 이동시킨다. 방법에는 모든 변수를 동시에 입력하는 '입력 상태 그대로 둔다.' 저장을 클릭하면 예측값, 영향력, 잔차등을 선택하는 창이 뜨는데, 기본적으로 확률, 소속집단, Cook의 거리, 표준화를 선택하고 계속을 클릭하였다. '저장' 메뉴에서 선택한 항목들은 분석이 완료된 후 '데이터 보기' 창으로 이동하여 선택된 항목들이 저장된 것을 확인하였다. '확률(P)'은 각 케이스마다 사건의 예측발생 확률을 저장한다. '소속집단(G)'은 예측확률에 기초하여 각 케이스가 할당될 집단이 표시된다. '표준화(N)' 또는 표준화 잔차는 잔차를 각각의 표준편차로 나누어 표준화한 것으로 이상치 판정의 중요한 기준이 된다. 'Cook의 거리'는 영향력이 큰 관측치를 색출하는 기능을 가진다. 다음은 옵션 메뉴를 클릭하여 분류도표, Hosmer-Lemeshow 적합도, 반복계산과정, exp에 대한 신뢰구간 4가지 항목을 체크하고 계속을 클릭하였다. 확인을 클릭하고 분석 결과를 확인하였다. 분석 결과를 통해 ROC 커브에서 얻을 수 있는 AUC, 민감도, 특이도 및 cut off 값을 구할 수 있으며, 추가적으로 Hosmer와 Lemeshow 표를 통해서 로지스틱 회귀분석 모형의 적합도를 유의확률 값으로 알 수 있었다. 또한 오즈비 또는 승산비는 Odds (OR) = $P / (1-P)$ 의 공식으로 계산하였다. 이를 통해 최종적으로 로지스틱 회귀분석의 NPD/PD여부에 대한 추정된 회귀식을 구성할 수 있었다.

[141] 로지스틱 회귀분석에 의한 각 마커패널별 로그 확률 함수는 하기 표 4에 나타내었다.

[142]

[143] [표4]

로지스틱 회귀분석에 의한 각 마커패널별 로그 확률 함수

패널	로그 함수[ln(P/1-P)]
AIMP2	$-5.994 + 0.8567X_{AIMP2}$
AIMP2, α Syn	$-9.041 + 0.9499X_{AIMP2} + 6.487X_{\alpha syn}$
AIMP2, α Syn, GLUT3	$-15.46 + 1.019X_{AIMP2} + 7.965X_{\alpha syn} + 2.627X_{GLUT3}$
AIMP2, α Syn, GLUT3, USP14	$-21.41 + 1.192X_{AIMP2} + 9.811X_{\alpha syn} + 2.940X_{GLUT3} + 2.658X_{USP14}$

[144] 결과는 도 6 및 표 5에 나타내었다.

[145] 도 6에 나타낸 바와 같이, AIMP2 단독, AIMP2 및 α -시뉴클레인 패널, AIMP2, α -시뉴클레인 및 GLUT3 패널, AIMP2, α -시뉴클레인, GLUT3 및 USP14 패널 등으로 조합하는 마커의 수를 늘려가면서 최적의 로그회귀함수를 도출하였다. 각

다중마커패널로부터 도출한 로그회귀함수를 기반으로 ROC 커브 분석을 진행하였다.

[146]

[147] [표5]

다중마커패널별 로지스틱 회귀분석 및 로그 확률 함수에 기반한 ROC 커브의 AUC, cut-off 수치, 진단 민감도 및 특이도 요약표

패널	AUC	Cut off (Probability)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
AIMP2	0.8974	0.4805	85.00	87.18
AIMP2, α Syn	0.9603	0.4273	88.75	89.74
AIMP2, α Syn, GLUT3	0.9798	0.4536	91.25	92.31
AIMP2, α Syn, GLUT3, USP14	0.9878	0.4685	93.75	94.87

[148] 그 결과, 도 6 및 상기 표 5에 나타난 바와 같이, AIMP2 단독 마커 대비 모든 다중마커패널에서 AUC 값이 증가하였으며, 4개 마커를 모두 조합한 패널에서 AUC 값이 0.9878로 최대 값을 보였다. 그리고 최대의 민감도와 특이도를 얻을 수 있는 확률값을 cut off 수치로 하여 각 패널별 민감도와 특이도를 분석한 결과, AIMP2 단독에서 민감도 85%, 특이도 87.18% 인 반면 4개 마커패널의 경우 cut off 수치 0.4685에서 민감도 93.75%, 특이도 94.87%으로 파킨슨병의 진단 정확도가 현저하게 개선된 것으로 확인되었다.

[149]

[150] 실시예 5: 다중마커 로그 회귀 분석 및 다중마커 패널별 ROC 커브 분석 (2)

[151] 본 발명자들이 새로 발굴한 GLUT3와 USP14에 파킨슨병 진단 마커 AIMP2 및 α -시뉴클레인을 조합하여 다중마커패널을 구축하고, 구축한 다중마커패널을 이용하면 파킨슨병의 진단 정확도가 높아질 수 있는지를 로지스틱 회귀분석을 통해 검증하였다. 상기 실시예 4의 로지스틱 회귀분석 방법과 동일하게 실시하였다. 로지스틱 회귀분석에 의한 각 마커패널별 로그 확률 함수는 하기 표 6에 나타내었다.

[152]

[153] [표6]

로지스틱 회귀분석에 의한 각 마커패널별 로그 확률 함수

패널	로그 함수[$\ln(P/1-P)$]
GLUT3	$-4.416 + 2.151X_{\text{GLUT3}}$
GLUT3, AIMP2	$-11.30 + 2.500X_{\text{GLUT3}} + 0.8427X_{\text{AIMP2}}$

GLUT3, α Syn	$-6.123 + 2.152X_{\text{GLUT3}} + 4.256X_{\alpha\text{Syn}}$
GLUT3, USP14	$-6.790 + 1.999X_{\text{GLUT3}} + 2.083X_{\text{USP14}}$
GLUT3, AIMP2, α Syn	$-15.46 + 2.627X_{\text{GLUT3}} + 1.019X_{\text{AIMP2}} + 7.965X_{\alpha\text{Syn}}$
GLUT3, AIMP2, USP14	$-14.17 + 2.469X_{\text{GLUT3}} + 0.8595X_{\text{AIMP2}} + 2.152X_{\text{USP14}}$
GLUT3, α Syn, USP14	$-8.380 + 1.995X_{\text{GLUT3}} + 4.363X_{\alpha\text{Syn}} + 1.999X_{\text{USP14}}$
GLUT3, AIMP2, α Syn, USP14	$-21.41 + 2.940X_{\text{GLUT3}} + 1.192X_{\text{AIMP2}} + 9.811X_{\alpha\text{Syn}} + 2.658X_{\text{USP14}}$

[154]

[155] 결과는 도 7 및 표 7에 나타내었다.

[156] 도 7에 나타낸 바와 같이, GLUT3 단독, GLUT3 및 AIMP2 패널, GLUT3 및 α -시뉴클레인 패널, GLUT3 및 USP14 패널, GLUT3, AIMP2 및 α -시뉴클레인 패널, GLUT3, AIMP2 및 USP14 패널, GLUT3, α -시뉴클레인 및 USP14 패널, 및 GLUT3, AIMP2, α -시뉴클레인 및 USP14 패널로 조합하는 마커의 수를 늘려가면서 최적의 로그회귀함수를 도출하였다. 각 다중마커패널로부터 도출한 로그회귀함수를 기반으로 ROC 커브 분석을 진행하였다.

[157]

[158] [표7]

다중마커패널별 로지스틱 회귀분석 및 로그 확률 함수에 기반한 ROC 커브의 AUC, cut-off 수치, 진단 민감도 및 특이도 요약표

패널	AUC	Cut off (Probability)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
GLUT3	0.8375	0.3417	75.32	72.84
GLUT3, AIMP2	0.9482	0.6414	88.89	89.61
GLUT3, α Syn	0.9170	0.5567	88.16	84.15
GLUT3, USP14	0.8787	0.4381	79.49	77.50
GLUT3, AIMP2, α Syn	0.9798	0.7909	93.59	91.25
GLUT3, AIMP2, USP14	0.9619	0.6813	87.34	86.08
GLUT3, α Syn, USP14	0.9369	0.6126	87.18	85.00

GLUT3, AIMP2, α Syn, USP14	0.9878	0.8382	96.15	93.75
-----------------------------------	--------	--------	-------	-------

[159] 그 결과, 상기 표 7에 나타낸 바와 같이, GLUT3 단독 마커 대비 모든 다중마커 패널에서 AUC 값이 증가하였으며, 4개 마커를 모두 조합한 패널에서 AUC 값이 0.9878로 최대 값을 보였다. 그리고 최대의 민감도와 특이도를 얻을 수 있는 확률 값을 cut off 수치로 하여 각 패널별 민감도와 특이도를 분석한 결과, GLUT3 단독에서 민감도 75.32%, 특이도 72.84% 인 반면 4개 마커패널의 경우 cut off 수치 0.8382에서 민감도 96.15%, 특이도 93.75%으로 파킨슨병의 진단 정확도가 현저하게 증가한 것으로 확인되었다.

[160]

[161] 실시예 6: AIMP2 모노머 및/또는 AIMP2 응집체에 특이적으로 결합하는 항체 규명

[162] 6-1. AIMP2 응집체 제작 및 검증

[163] 본 발명자들은 AIMP2 응집체를 표지하는 단일 항체 클론을 제작하기 위하여 항원으로서 재조합 AIMP2 응집체를 제작하였다. GST-AIMP2 재조합 단백질을 암호화하는 벡터를 BL21에 트랜스포메이션한 후 이를 배양한 후 GST 비드를 이용하여 용출하고 정제하여 GST-AIMP2 재조합 단백질을 수득하였다. 정제한 GST-AIMP2 재조합 단백질(GST-AIMP2 monomer)을 7일간 시험관에서 37°C에서 250 rpm 조건으로 7일 동안 인큐베이션하여 고분자량(high molecular weight)의 응집체 (GST-AIMP2 fibril)를 형성하였다. 참고로, GST가 잘린 AIMP2 (모노머) 및 AIMP2 응집체 (AIMP2 fibril)는 상기 GST-AIMP2 및 GST-AIMP2 응집체를 투석하고 Glutathione Sepharose 4B(GE Healthcare #17-0756-01) 100ul와 Prescission protease (GE Healthcare #27-0843-01) 10ul을 처리하고 하룻밤 동안 인큐베이션하여 수득하였다. 제작한 GST-AIMP2 및 GST-AIMP2 응집체를 AIMP2 특이 항체 (Proteintech Group rabbit antibody)를 이용하여 웨스턴 블롯 분석하였으며, GST-AIMP2 응집체를 SDS-PAGE 겔에 내린 뒤 쿠마시 블루 염색하여 확인하였다. 그 결과, GST-AIMP2가 검출되었으며, GST-AIMP2 응집체 (Days 7)가 형성된 것을 확인할 수 있었다 (도 8A). 또한, GST-AIMP2 응집체의 아밀로이드 구조를 티오플라빈(thioflavin) T 형광 분석으로 검증하였다 (도 8B).

[164]

[165] 6-2. 하이브리도마 세포주 제작 및 항체 분석

[166] 상기 실시예 6-1에서와 같이 아밀로이드 구조로 응집체를 형성한 도 8C의 GST-AIMP2를 항원으로 이용하여 ELISA 분석을 수행하여, GST에 대해서는 반응하지 않고 GST-AIMP2 정상 구조(monomer) 또는 GST-AIMP2 응집체 (fibril)에 결합

[167] 하는 항체를 생성하는 8 종의 하이브리도마(hybridoma) 클론 3C2, 5B2, 6C7, 7G2, 10F3, 12D12 및 13H9를 선별하였다 (도 9A). 그 후, 각 하이브리도마 클론의 배양 상등액을 수집한 뒤, Protein G IgG binding buffer (Thermo Fisher Scientific)

을 처리하고 Capturem Protein G Maxiprep Column (Cat. No. 635727)을 이용하여 각 클론에서 생성하는 항체를 정제하였다. 정제한 각 클론의 항체의 아이소타입(isotype)을 분석하였다 (도 9B).

[168]

[169] **6-3. 클론별 AIMP2 입체 구조 특이적 반응성 분석**[170] **6-3-1. 닷 블롯 분석**

[171] 상기 실시예에서 선별한 8 종의 클론별로 생산되는 각 항체의 AIMP2 3차원 구조에 대한 결합능을 검증하기 위해, 닷 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, GST, GST-AIMP2 (Monomer) 및 GST-AIMP2 응집체 (Aggregate)의 농도를 동일하게 0.1mg/ml로 1X PBS로 희석한 뒤, 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 프린팅한 후 진공(Vacuum)으로 내린 뒤, ponceau로 로딩을 확인한 뒤 이를 다시 빼고, 5% 스킴 밀크로 블로킹하였다. 블로킹한 멤브레인을 TBS-T로 3회 세척한 뒤, 상기 실시예에서 정제한 각 클론의 항체들을 1차 항체와 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다(대조군으로 Proteintech Group의 rabbit AIMP2 항체 및 GST 항체 사용). TBS-T로 3회 세척하고 2차 항체 (5000 : 1)와 RT에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, ECL을 이용하여 블랏을 현상하였다. 그 결과, ELISA 결과와 다르게 10F3 및 12D12는 GST에도 결합하기 때문에 적합한 AIMP2 항체 클론이 아닌 것으로 나타났다. 또한, 대조군 항체로 이용한 Proteintech Group의 rabbit AIMP2 항체는 AIMP2 정상구조와 응집체구조를 선택성 없이 표지하였으며, 7G2 클론의 항체는 AIMP2 모노머 (정상구조) 및 응집체 모두에 결합능을 보이지 않았고, 10F3 클론의 항체 및 12D12 클론의 항체는 GST를 인지하는 것으로 나타났다 (도 10a). 또한, 5B2 및 6C7의 항체 클론은 AIMP2 응집체에 상대적으로 잘 결합하였으며, 3C2 7H9 및 13H9의 항체 클론은 AIMP2의 정상구조 및 응집체 구조 모두에 대해서 동일한 수준의 결합 신호를 나타냈다 (도 10a).

[172]

[173] **6-3-2. 웨스턴 블롯 분석**

[174] 변성된 형태의 단백질에 대한 항체 인식 검증을 위해, GST, GST-AIMP2 (Monomer) 및 GST-AIMP2 응집체 (Aggregate)를 웨스턴 블롯 분석을 통해 SDS-PAGE에서 크기에 따라 분리한 후 각 항체 클론에서 정제한 항체를 이용해 선택적인 반응성을 분석하였다. 그 결과, 상기 실시예 6-3-1의 닷 블롯 분석 결과와 마찬가지로 종래의 Proteintech Group의 항체는 60 kDa 정도의 GST-AIMP2 정상 구조(monomer)를 표지할 뿐 아니라 고분자량의 GST-AIMP2 응집체 구조를 모두 검출하였고, 닷 블롯 분석에서 AIMP2 응집체에 대해서 선택성을 보인 5B2 클론 및 6C7 클론의 경우에는 특히 고분자량의 AIMP2 응집체를 선택적으로 표지하는 것으로 나타났으며, 특히, 5B2 클론의 항체는 6C7 클론의 항체보다도 AIMP2 응집체에 대한 선택성이 높은 것으로 나타났다 (도 10b). 또한, 3C2 클론 및 7H9 클론은 정상 구조의 AIMP2 (60 kDa)에서만 신호가 검출되어, 응집체 보다는 정상 구조(monomer)의 AIMP2에 선택성을 보이는 클론임을 알 수 있었다 (도 10b). 아울러

러, 13H9 클론에서 정제한 항체는 AIMP2의 구조에 상관없이 모두 표지하였다 (도 10b).

[175] 상기 닛 블롯 분석 결과 및 웨스턴 분석 결과를 종합한 결과, 10F3 클론 및 12D12 클론은 GST에도 결합하였고, 7G2 클론은 AIMP2에 대한 결합력이 낮아 적합한 AIMP2 항체 클론이 아닌 것으로 나타났으나, 3C2 및 7H9 클론을 AIMP2 정상구조 특이적인 단일 항체 생산 클론으로, 5B2 및 6C7을 AIMP2 응집체 구조 특이적인 단일 항체 생산 클론으로, 13H9 클론을 AIMP2 구조 비특이적인 단일 항체

[176] 생산 클론으로 구분할 수 있었다 (도 11).

[177]

[178] 6-4. AIMP2 항체의 CDS 아미노산 시퀀스 분석

[179] 각 항체 클론이 암호화(encoding)하는 각 항체의 cDNA 서열을 확보하기 위해 기존 논문 (Lena Meyer et al. A simplified workflow for monoclonal antibody sequencing, PlosOne, 2019)을 참조하여 항체 가변 영역(variable region)의 서열을 확보하였다. 구체적으로, 각 하이브리도마 세포에서 추출한 cDNA에 대해 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 하기 표 8의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 후 T 벡터에 클로닝한 뒤, 해당 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한 T 벡터를 시퀀싱하여 cDNA 서열을 확보하고, IgBlast (Igblast: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)를 이용하여 가변 영역 서열을 분석하고

[180] CDR(complementarity determining region) 아미노산의 서열 또한 분석하였다.

[181] [표8]

Primer Name	Forward or reverse	Primer Sequence
ISPCR	Universal F primer	5' aagcagtgggtatcaacgcagag 3'
mIGK PCR	R primer for kappa chain	5' acattgatgtctttgggtagaag 3'
mIGL PCR	R primer for lamda chain	5' atcgtacacaccagtgtggc 3'
mIGHG PCR	R primer for heavy chain	5' gggatccagagttccaggtc 3'

[182] 그 결과, AIMP2 응집체에 특이적인 반응성을 보인 5B2 클론 및 6C7 클론의 cDNA 서열을 분석한 결과 일치하는 CDR 부위의 아미노산 서열을 확인하였으며, 경쇄를 코딩하는 아미노산 중 하나만 다른 것으로 분석되었다 (도 12). 이에, 이를 이용해서 인간화(humanized) IgG를 만들 경우의 불변 영역(constant region)의 서열을 포함한 항체의 전체 서열도 구성하였다 (도 12). 같은 방법으로, 정상 구조의 AIMP2에 특이적인 결합능을 보인 3C2 클론 및 7H9 클론의 항체의 가변 영역의 서열을 분석한 결과, 두 클론 또한 동일한 CDR 아미노산 시퀀스를 공유하고 있었으며, 차이는 경쇄 부분의 가변 영역의 두 아미노산 서열에서만 나타났다 (도 13). 마찬가지로 인간 IgG의 불변 영역을 중합한 인간화 항체의 전체 서열도 구성하였다 (도 13). 아울러, 정상 구조의 AIMP2 및 응집체를 모두 검출하는

항체 클론인 13H9은 위의 다른 4개 클론과는 구별되는 항체 아미노산 서열을 나타냈다 (도 14). 이에 대해서도 가변 영역의 아미노산 서열, CDR 아미노산 서열 및 인간화 항체의 전체 아미노산 서열을 도 14에 기재하였다.

[183]

[184] 실시예 7: 대조군 및 파킨슨병 환자의 혈청에서 AIMP2 응집체의 발현 분석

[185] 대조군 및 파킨슨병 환자의 혈청에서 AIMP2 응집체의 발현을 분석하기 위하여, 닷 블롯(Dot blot) 및 ROC 곡선 분석을 수행하였다.

[186] NC membrane을 TBS 버퍼(buffer)에 담가 준비하고, 준비된 NC membrane을 Bio-Dot microfiltration apparatus (Bio-Rad)에 셋팅 시키고 진공(vacuum) 튜브를 연결시켰다. 각 well에 샘플을 로딩시키고 나서, Bio-Dot microfiltration apparatus를 분리시키고 NC membrane을 꺼내어 TBS-T 버퍼 (5% tween 20이 포함된 TBS buffer)로 5분씩 3번 세척하였다. 2.5% 탈지 우유 (skim milk, TBS-T 바탕)를 이용하여 NC membrane을 1시간동안 블로킹시켰다. 1차 항체를 사용하여 NC membrane을 인큐베이션시켰다 (O/N). TBS-T 버퍼를 이용하여 10분씩 3번 세척하고, 1차 항체에 맞는 HRP-conjugation 된 2차 항체를 사용하여 1시간 30분 동안 incubation 시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 10분씩 3번 세척하고, ECL solution을 이용하여 암실에서 결과를 확인하였다. 닷 블롯을 통해서 얻어진 정량값을 정규화한 다음, GraphPad prism 프로그램을 사용하여 ROC 곡선 분석을 수행하였다.

[187] 결과는 도 15 내지 17에 나타내었다.

[188] 도 15 및 16에 나타낸 바와 같이, 파킨슨병 환자에서 AIMP2 뿐만 아니라, AIMP2 응집체의 발현이 대조군보다 현저히 높은 것으로 확인되었다. 도 17에 나타낸 바와 같이, ROC 곡선 분석 결과, AUC 값은 0.731로, AIMP2 응집체 농도가 파킨슨병을 진단하는 데 있어 마커로 활용될 수 있음이 확인되었다. 최적의 cut off 값은 2.6 pg/μl이며, 이 값에서의 민감도는 58.3%, 특이도는 87.5%로 확인되었다.

[189]

[190] 본 발명에 사용된 서열목록은 아래 표와 같다.

[191] [표9]

서열번호	서열 명칭	서열
1	ISPCR - Universal F primer	5' aagcagtgggtatcaacgcagag 3'
2	mIGK PCR - R primer for kappa chain	5' acattgatgtctttggggtagaag 3'
3	mIGL PCR - R primer for lamda chain	5' atcgtacacaccagtgtggc 3'

4	mIGHG PCR - R primer for heavy chain	5' gggatccagagttccaggtc 3'
5	5B2/6C7-CDRH1	GFTFSDFY
6	5B2/6C7-CDRH2	SRNKANDYTT
7	5B2/6C7-CDRH3	ARDAFYGYGA MDY
8	5B2/6C7-CDRL1	KSIRKY
9	5B2/6C7-CDRL2	SGS
10	5B2/6C7-CDRL3	QQHNEYPYT
11	5B2/6C7-VH	MKLWLNWVFL LTLLHGIQCE VKLVESG GGL VQPGGSLRLS CATSGFTFSD FYME WVRQPP GKRLEWIAAS RNKANDYTTE YSESVKGRFI VSRDISQSIL YLQMNALR AE DTAIYYCARD AFYGYGAMDY WGQ GTSVTVS S
12	5B2-VL	MGNQFLPGHS LDMRFQVQVL GLLLLWI SGA QCDVQITQSP SYLAASPGET ITINCR ASKS IRKYLAWYQE KPGKTNKLLI YSG STLQSGI PSRFSGSGSG TDFTLTISSL EPE DFAMYCYC QQHNEYPYTF GGGTKLEIK
13	6C7-VL	MRFQVQVLGL LLLWISGAQC DVQITQS PSY LAASPGETIT INCRASKSIR KYLAW YQEKPGKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSG SGSGID FTLTISSLEP EDFAMYCYCQQ HN EYPYTFGG GTKLEIK
14	5B2/6C7-Heavy chain	MKLWLNWVFL LTLLHGIQCE VKLVESG GGL VQPGGSLRLS CATSGFTFSD FYME WVRQPP GKRLEWIAAS RNKANDYTTE YSESVKGRFI VSRDISQSIL YLQMNALR AE DTAIYYCARD AFYGYGAMDY WGQ GTSVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ES TAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTS G VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNF GTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKC CVECPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT L MISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWY

		VD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSV LTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA P IEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQP ENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDK SRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
15	5B2-Light chain	MGNQFLPGHS LDMRFQVQVL GLLLLWI SGA QCDVQITQSP SYLAASPGET ITINCR ASKS IRKYLAWYQE KPGKTNKLLI YSG STLQSGI PSRFSGSGSG TDFTLTISL EPE DFAMYCYC QQHNEYPYTF GGGTKLEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLL NN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQES VTEQDS KDSTYSLST LTLKADYEK H KVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
16	6C7-Light chain	MRFQVQVLGL LLLWISGAQC DVQITQS PSY LAASPGETIT INCRASKSIR KYLAW YQEKPGKTNKLLIYS GSTLQSGIPS RFSG SGSGID FTLTISL EPEDFAMYCYCQH EYPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP S DEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQW KV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSL SSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LS SPVTKSFN R GEC
17	3C2/7H9-CDRH1	GFSLSSTSGMG
18	3C2/7H9-CDRH2	IWWDDDK
19	3C2/7H9-CDRH3	ARIANSWFAY
20	3C2-CDRL1	KSVSTSAYS
21	7H9-CDRL1	KSVSTSGYTY
22	3C2/7H9-CDRL2	LAS
23	3C2/7H9-CDRL3	QHSRELPT
24	3C2-VH	MGRLTSSFLI LIVPAYVLSQ VTLKESGP GI LQPSQTLSLT CSFSGFSLST SGMGVG WIRQ PSGKGLEWLA HIWWDDDKYY NT

		ALKSGLTI SKDTSKNQVF LKIASVDTAD TATYYCARIA NSWFAYWGQG TLVTVS A
25	7H9-VH	MGDKCAVMGR LTSSFLLIV PAYVLSQ VTL KESGPGILQP SQTLSLTCSF SGFSLS TSGM GVGWIRQPSG KGLEWLAHIW WD DDKYYNTA LKSGLTISKD TSKNQVFLKI ASVDTADTAT YYCARIANSW FAYWGQ GTLV TVSA
26	3C2-VL	MGSCQEPKKH PLFQLSEMET DTL LLWV LLL WVPGSTGDIV LTQSPASLAV SLGQ RATISC RASKSVSTA YSYMHWYQQK P GQPPKLLIY LASNLD SGVP ARFSGSGSG T DFTLNIHPVE EEDAATYYCQ HSRELPP TFG AGTKLELK
27	7H9-VL	METDTLLLV LLLWVPGSTG DIVLTQS PAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYT YMHYQQKPGQSPKL LIY LASNLES GV PARFSGSG SGT DFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPP TFGAGTKLEL K
28	3C2-Heavy chain	MGRLTSSFLL LIVPAYVLSQ VTLKESGP GI LQPSQTLSLT CSFSGFSLST SGMGVG WIRQ PSGKGLEWLA HIWDDDKYY NT ALKSGLTI SKDTSKNQVF LKIASVDTAD TATYYCARIA NSWFAYWGQG TLVTVS AAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGC LVKD YF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF P AVLQSSGLY SLSSVTVPS SNFGTQTYT C NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPP CPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTP EVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVE V HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVH QDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TIS KTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDISVEWESN GQPENNY KTT PPMLDSGSGF FLYSKLTVDK SRWQ

		QGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS P GK
29	7H9-Heavy chain	MGDKCAVMGR LTSSFLLIV PAYVLSQ VTL KESGPGILQP SQTLSLTCSF SGFSLS TSGM GVGWIRQPSG KGLEWLAHIW WD DDKYYN TA LKSGLTISKD TSKNQVFLKI ASVDTADTAT YYCARIANSW FAYWGQ GTLV TVSAASTKGP SVFPLAPCSR STSE STAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL T SGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSN F GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERK CCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDT LMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVS VLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPA PIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MT KNQVSLTC LVKGFYPSDI SVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDK SRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKS LSLSPGK
30	3C2-Light chain	MGSCQEPKKH PLFQLSEMET DTL LLWV LLL WVPGSTGDIV LTQSPASLAV SLGQ RATISC RASKSVSTA YSYMHWYQQK P GQPPKLLIY LASNLD SGVP ARFSGSGSG T DFTLNIHPVE EEDAATYYCQ HSRELPP TFG AGTKLELKRT VAAPSVFIFP PSDEQ LKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK V DNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSST L TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPV TKSF NRGEC
31	7H9-Light chain	METDTLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQS PAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYT YMHY YQQKPGQSPKL LIYLASNLES GV PARFSGSG SGT DFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPP TFGAGTKLEL KRTVAAP SVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYP REAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ D

		SKDSTYSLS STLTLISKADY EKHKVYACE V THQGLSSPVT KSFNRGEC
32	13H9-CDRH1	DYSITSGYS
33	13H9-CDRH2	IHYRGST
34	13H9-CDRH3	ATWDYRLAY
35	13H9-CDRL1	SQHSTYT
36	13H9-CDRL2	LKKDGS
37	13H9-CDRL3	GVGDTIKEQF VYV
38	13H9-VH	MRVLILLCLF TAFPGILSDV QLQESGPD L V KPSQSLSLTC TVTDYSITSG YSWHWIR QFP GNKLEWMAYI HYRGSTNYPN SLKS RISITR DTSKNQFFLQ LNSVTTEDTA TY YCATWDYR LAYWGQGTLV TVSA
39	13H9-VL	MGNLSVSAEI SSTCIMA WTP LFFFVLH CS GSFSQLVLTQ SSSASFSLGA SAKLTC TLSS QHSTYTI EWY QQQPLKPPKY VME LKKDGS STGDGIPDRF SGSSSGADRY L SISNIQPED EAIYICGVGD TIKEQFVYVF GGGTKVTVL
40	13H9-Heavy chain	MRVLILLCLF TAFPGILSDV QLQESGPD L V KPSQSLSLTC TVTDYSITSG YSWHWIR QFP GNKLEWMAYI HYRGSTNYPN SLK SRISITR DTSKNQFFLQ LNSVTTEDTA T YYCATWDYR LAYWGQGTLV TVSAAST KGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVK DYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV L QSSGLYSL SVVTVPSSNF GTQTYTCNV D HKPSNTKV D TVERKCCVEC PPCPAP PVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTC VVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVS VLT VVHQDWL NGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKG QPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC L VKGFYPSDI SVEWESNGQP ENNYKTPP

		M LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNV FSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
41	13H9-Light chain	MGNLSVSAEI SSTCIMAWTP LFFFFVLH CS GSFSQLVLTQ SSSASFSLGA SAKLTC TLSS QHSTYTIEWY QQQPLKPPKY VME LKKDGS SH STGDGIPDRF SGSSSGADRY L SISNIQPED EAIYICGVGD TIKEQFVYVF GGGTKVTVLG QPKAAPSVTL FPPSSEEL QA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKAD SSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY L SLTPEQWKS HRSYSCQVTH EGSTVEKT VA PTECS

청구범위

- [청구항 1] GLUT3(glucose transporter 3), USP14(ubiquitin-specific protease 14), α -시뉴클레인(α -synuclein) 및 AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합의 단백질, 상기 단백질의 응집체(aggregate), 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 더 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 2] GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합의 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 검출하는 제제를 더 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단백질은 인체로부터 분리된 혈액 시료 내의 단백질인, 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 단백질을 검출하는 제제는 항체, 앵타머, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 올리고펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 유전자를 검출하는 제제는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 파킨슨병 진단용 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 파킨슨병 진단용 키트.
- [청구항 8] 다음 단계를 포함하는 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:
 (a) 인체로부터 분리된 혈액 시료 내의 GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
 (b) 정상 혈액 대조군 시료에 비해 상기 발현 수준이 증가된 경우, 파킨슨병일 가능성이 높다는 정보를 제공하는 단계.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 (a) 단계는 하기 (a-1)단계이고, 상기 (b) 단계는 하기 (b-1) 단계인, 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:
 (a-1) 인체로부터 분리된 혈액 시료 내의 GLUT3; 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;
 (b-1) 정상 혈액 대조군 시료에 비해, 상기 GLUT3; 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이

루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현수준이 증가된 경우, 파킨슨병일 가능성이 높다는 정보를 제공하는 단계.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 단계는 항체, 앵타머, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 올리고펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 제제를 이용하여 수행되는 것인, 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 프라이머, 프로브 및 안티센스뉴클레오타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 제제를 이용하여 수행되는 것인, 파킨슨병 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 12] 다음 단계를 포함하는 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법:

a) 혈액 내 GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되어 있는 파킨슨병 동물 모델에 대해 의약 후보 물질을 투여하는 단계;

b) 단계 a) 이후 상기 동물 모델로부터 혈액을 채취하고, 채취된 혈액 내 상기 단백질 또는 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계; 및

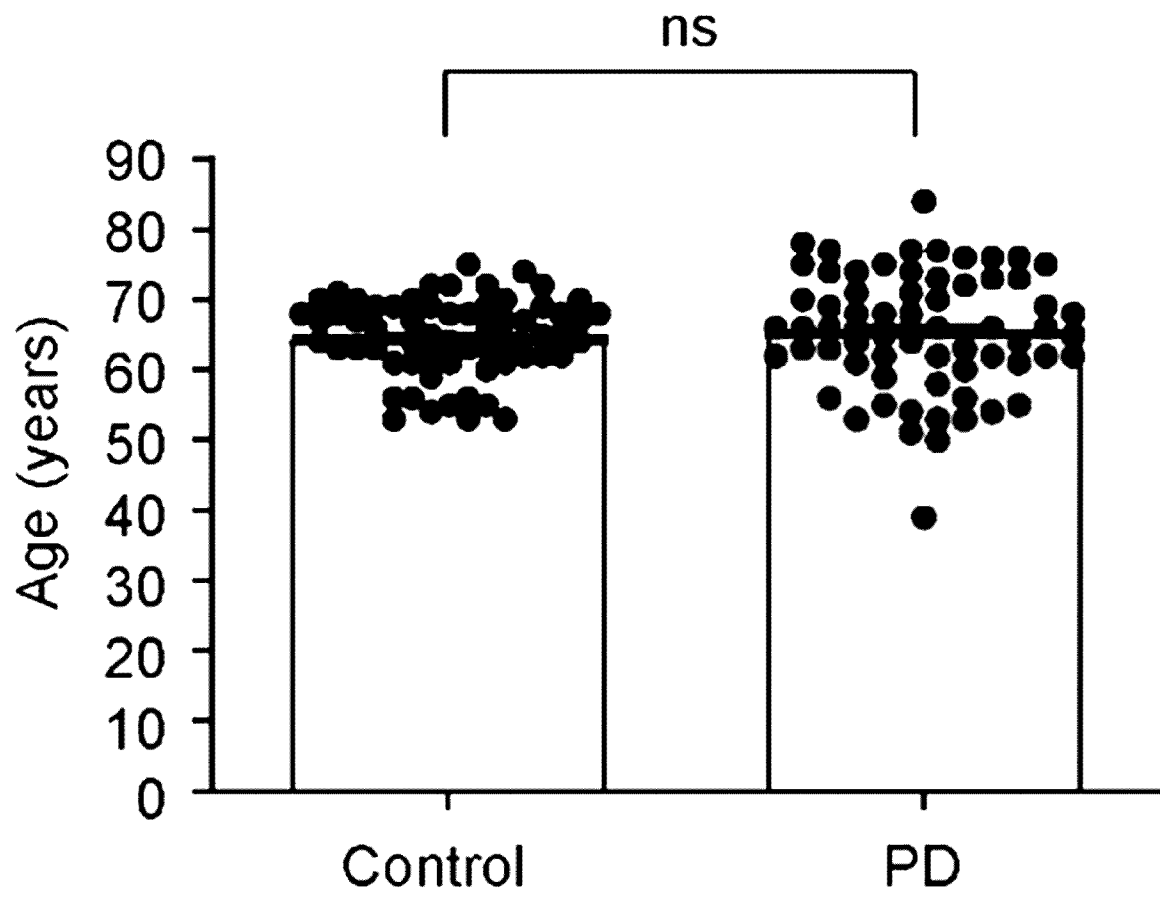
c) 채취된 혈액 내 GLUT3 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 발현 수준이 의약 후보 물질 투여에 의해 유의한 감소를 보이는 경우, 상기 의약 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판정하는 단계.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 a) 단계는 하기 a-1) 단계이고, 상기 c) 단계는 하기 c-1) 단계인, 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법:

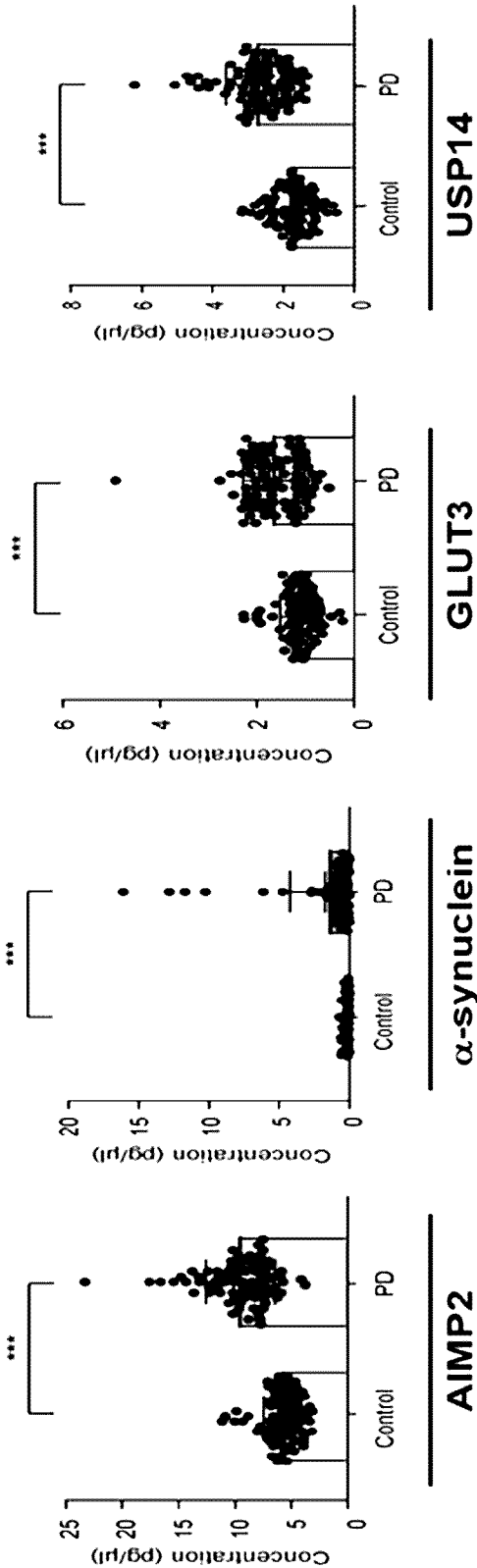
a-1) 혈액 내 GLUT3; 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준이 증가되어 있는 파킨슨병 동물 모델에 대해 의약 후보 물질을 투여하는 단계;

c-1) 채취된 혈액 내 GLUT3; 및 USP14, α -시뉴클레인 및 AIMP2로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 조합으로 이루어진 단백질, 상기 단백질의 응집체, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 발현 수준이 의약 후보 물질 투여에 의해 유의한 감소를 보이는 경우, 상기 의약 후보 물질을 파킨슨병 치료제로 판정하는 단계.

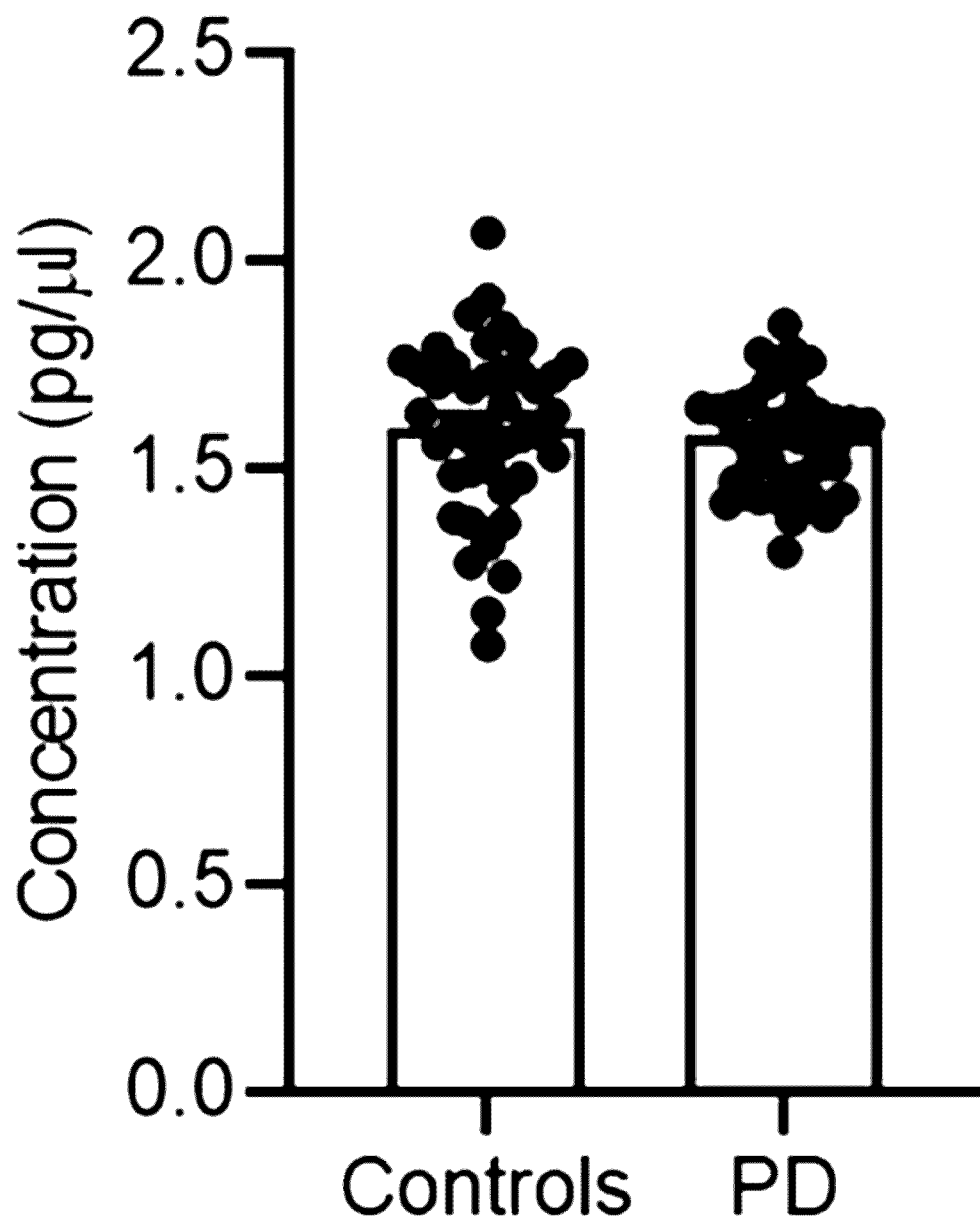
[도1]



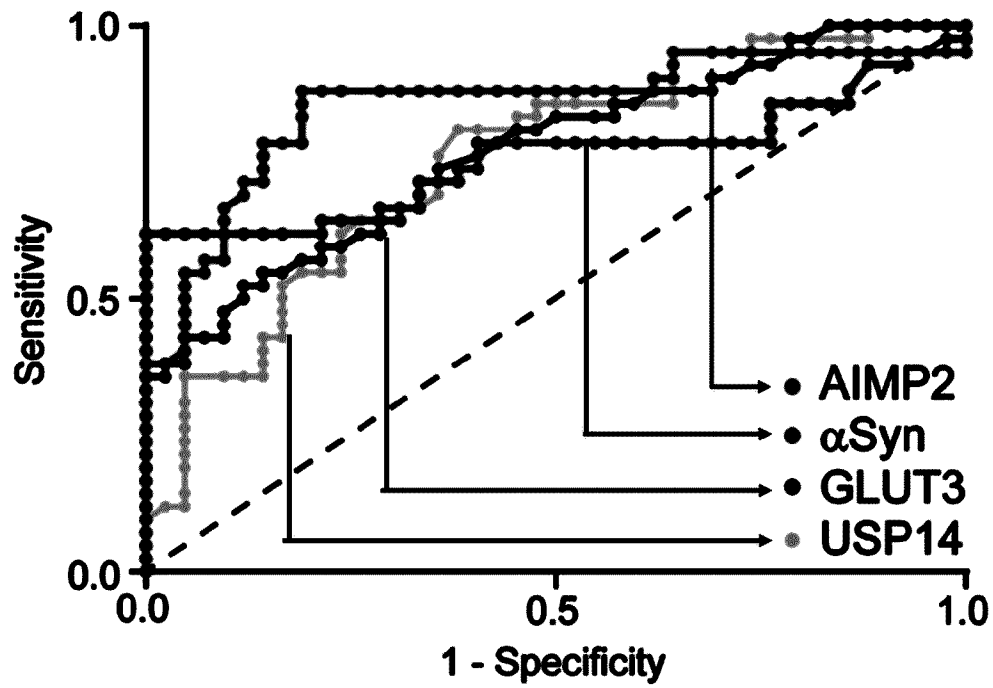
[도2]



[도3]

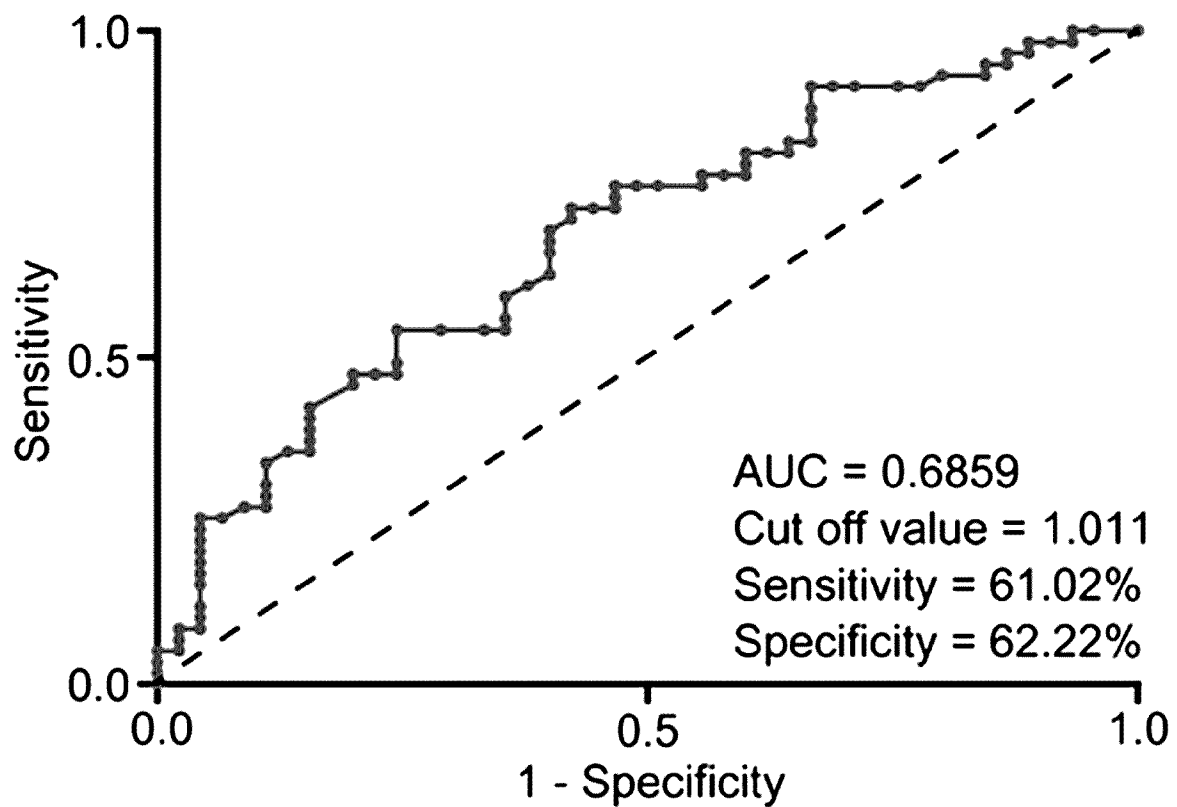


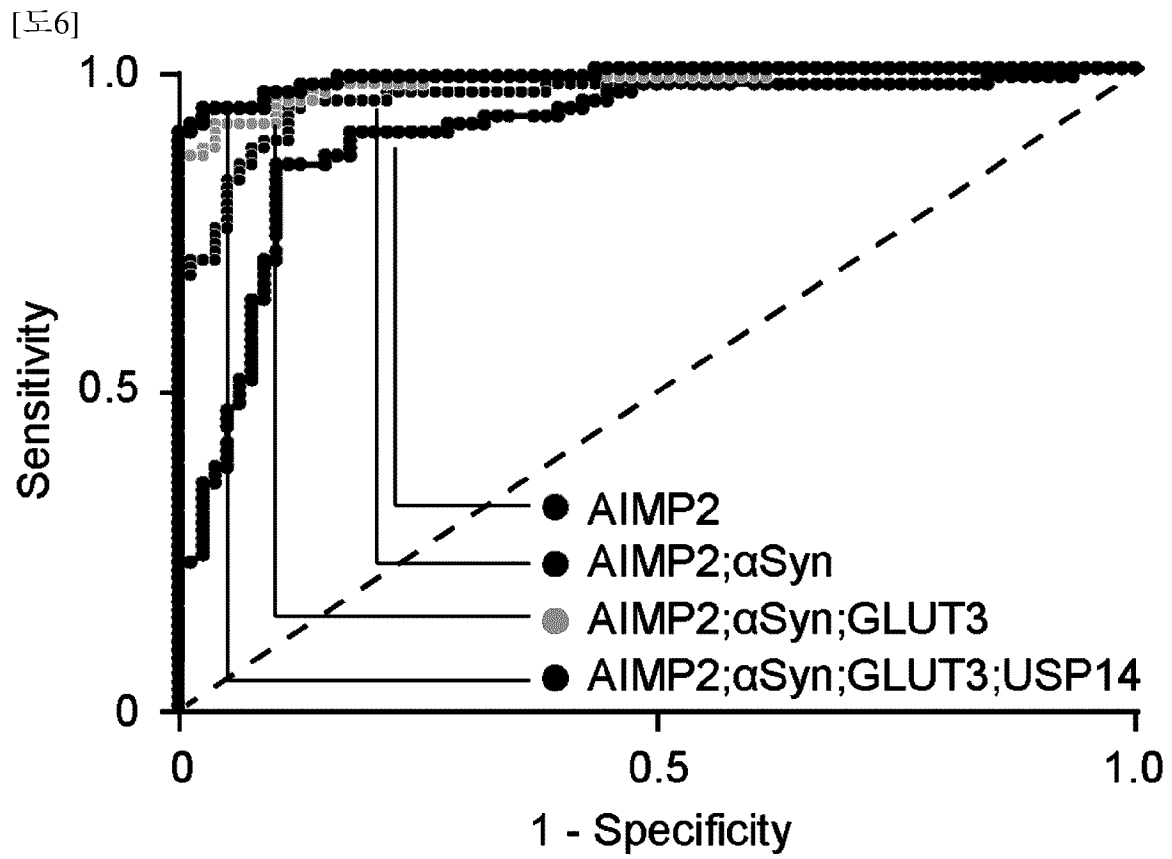
[도4]



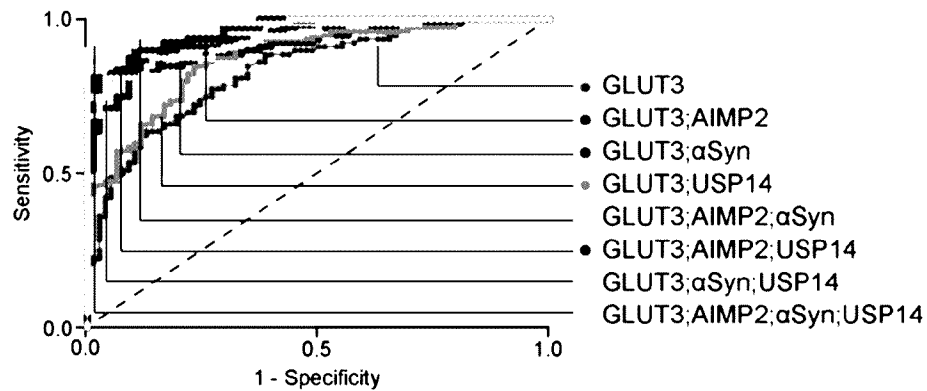
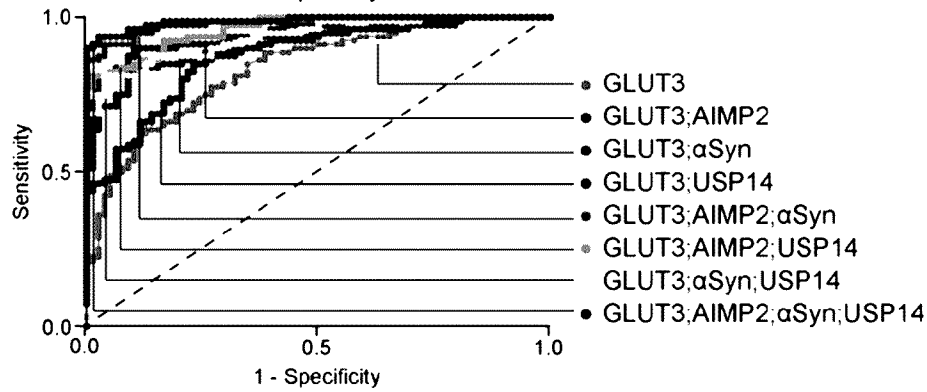
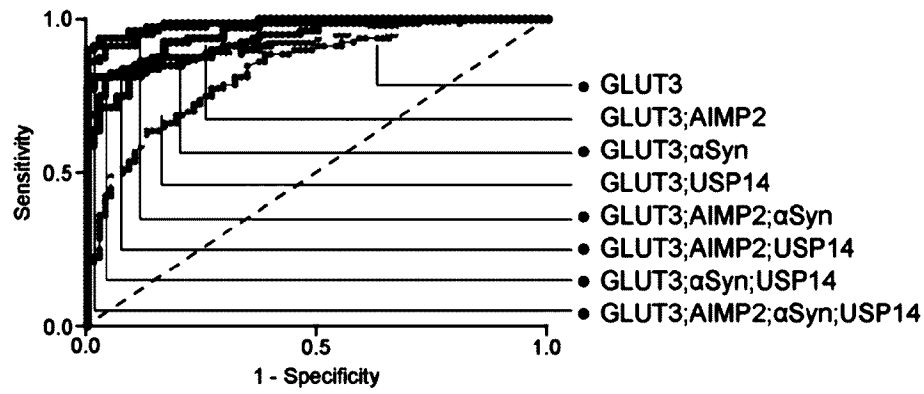
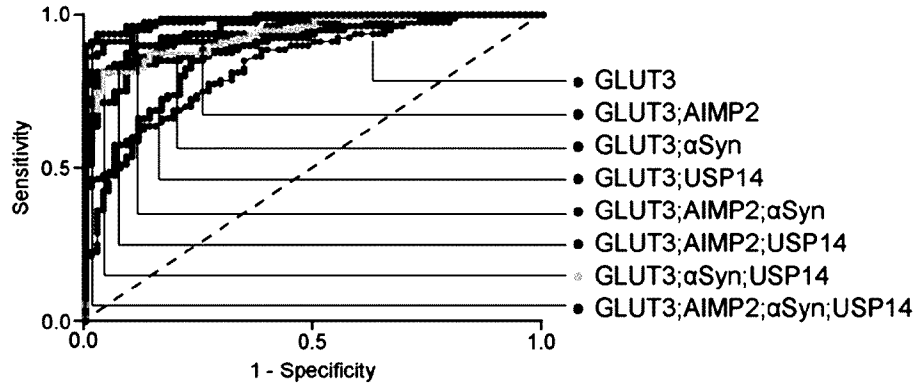
[도5]

DJ-1 ROC curve

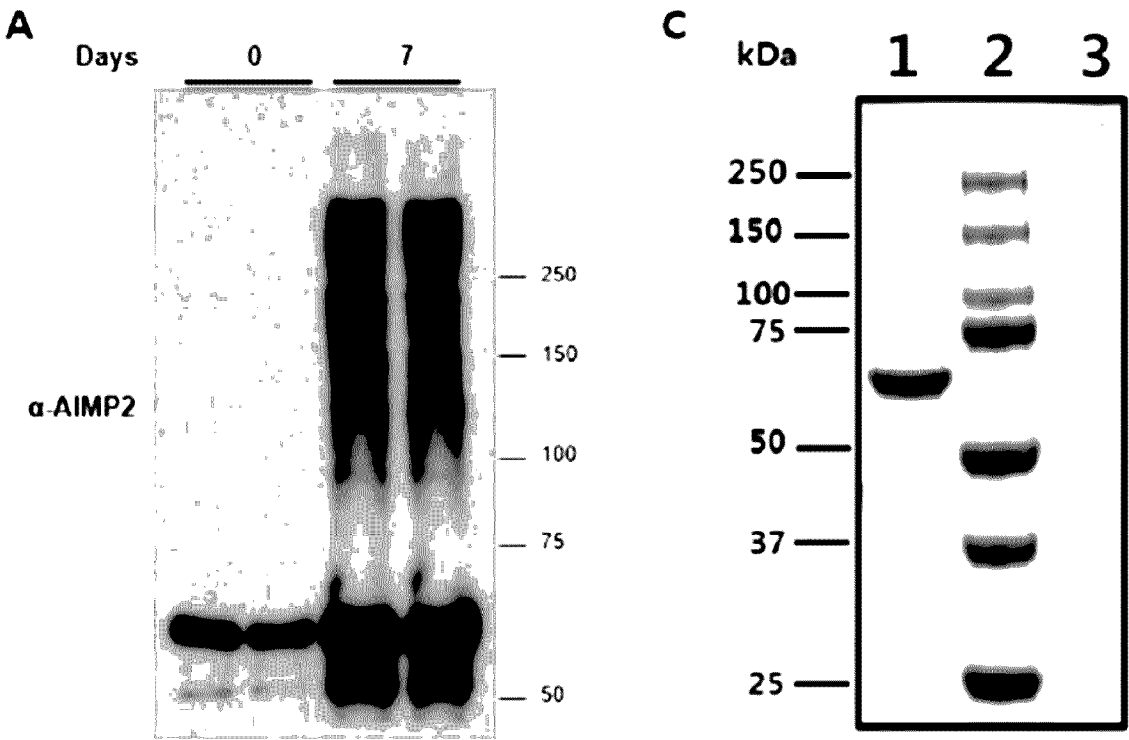




[도7]



[도8]



B

1XPBS	GST	GST-AIMP2 Monomer	GST- AIMP2 fibril
8084	14025	11537	70816

[도9]

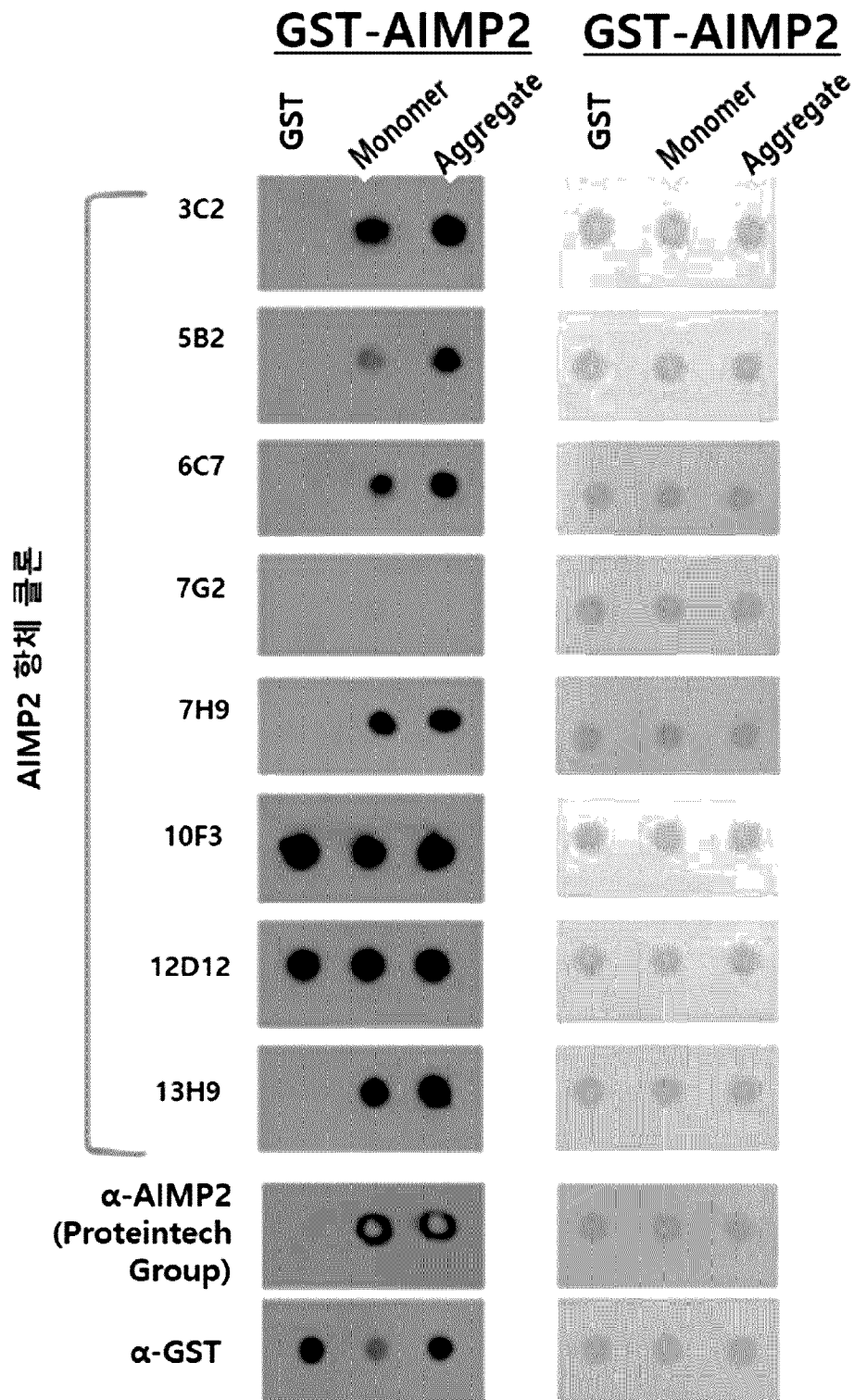
A

Clone No.	AIM2 fibril (Ag)	AIM2 mono	GST
3C2	1.983	1.361	0.059
5B2	1.081	0.500	0.068
6C7	1.151	0.467	0.061
7G2	1.740	1.192	0.050
7H9	1.676	1.115	0.059
10F3	0.922	0.473	0.105
12D12	0.749	0.257	0.066
13H9	1.656	1.371	0.057

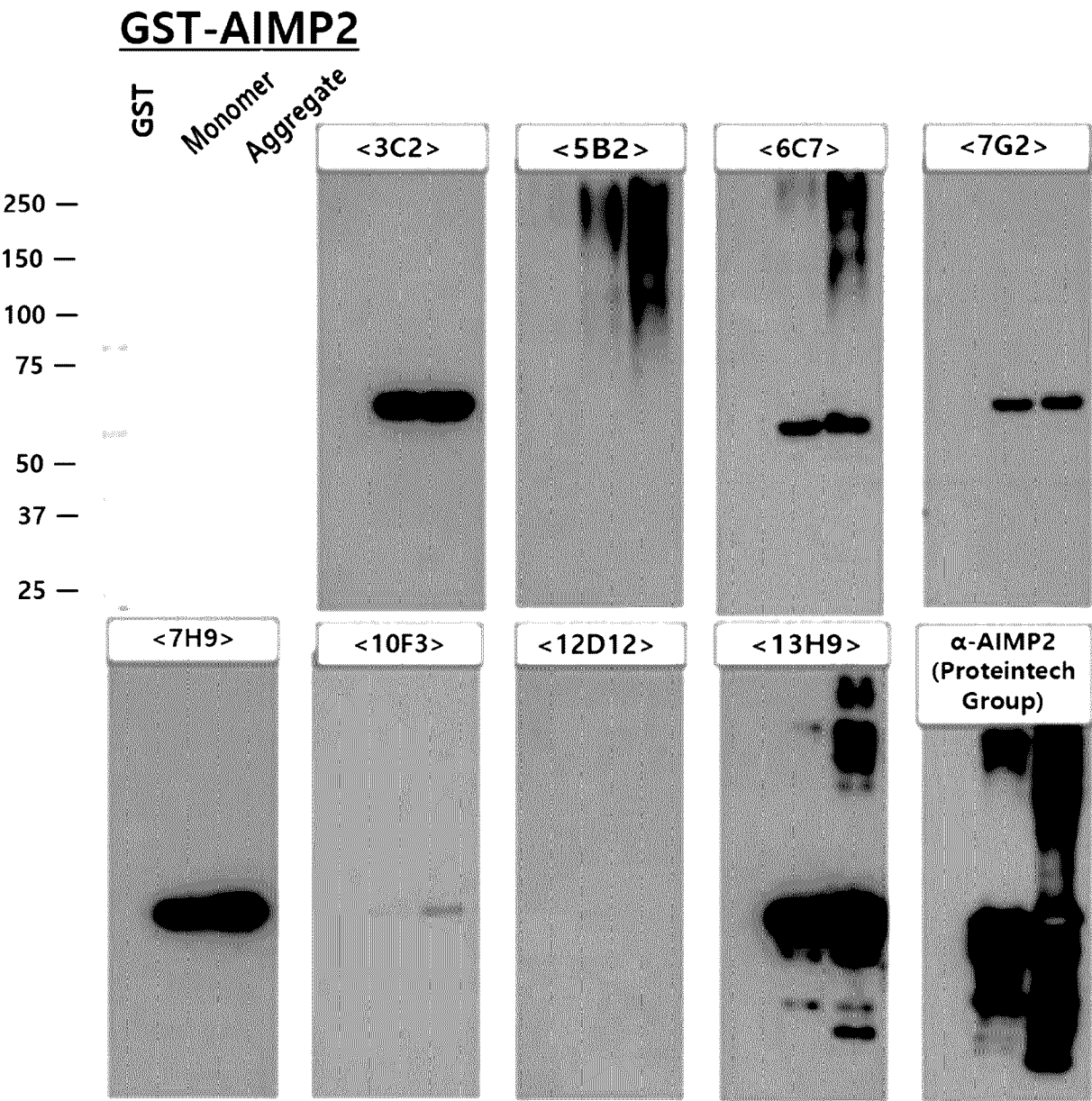
B

	3C2	5B2	6C7	7G2	7H9	10F3	12D12	13H9
IgG1	0.287	0.082	0.077	0.345	0.068	0.112	1.886	0.063
IgG2a	1.440	2.393	2.240	2.084	1.015	2.394	0.048	1.799
IgG2b	0.055	0.075	0.073	0.057	0.053	0.059	0.051	0.050
IgG3	0.051	0.049	0.049	0.049	0.071	0.073	0.051	0.050
IgA	0.047	0.064	0.047	0.047	0.053	0.046	0.050	0.046
IgM	0.048	0.070	0.046	0.049	0.049	0.052	0.050	0.048
Kappa	0.465	0.698	0.723	0.762	0.760	0.799	0.454	0.813
Lambda	0.060	0.056	0.052	0.062	0.058	0.055	0.055	0.050

[도 10a]



[도10b]



[도11]

Clone	Specificity	Isotype	Light chain	Dot blot reactivity: detection of 3D structure			Western blot reactivity		
				Native conf.	Aggregate conf.	GST	Native conf.	Aggregate conf.	GST
3C2	Monomer	IgG2a	Kappa	O	O	X	O	X	X
5B2	Aggregate	IgG2a	Kappa	-	OOO	X	X	O	X
6C7	Aggregate	IgG2a	Kappa	O	OO	X	O	O	X
7G2	NA	IgG2a	Kappa	X	X	X	O	X	X
7H9	Monomer	IgG2a	Kappa	O	O	X	O	X	X
10F3	NA	IgG2a	Kappa	O	O	O	O	X	X
12D12	NA	IgG1	Kappa	O	O	O	X	X	X
13H9	Both	IgG2a	Lamda	O	O	X	O	O	X

[도12a]

< 5B2 아미노산 서열 분석 >

CDRH1	GFTFSDFY
CDRH2	SRNKANDYTT
CDRH3	ARDAFYGYGAMDY
CDRL1	KSIRKY
CDRL2	SGS
CDRL3	QQHNEYPYT
VH	MKLWLNWVFLTLTHG IQCEVKLVE SGGGLVQPGGSLRL SCAT SG FTF SDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTEY SESVKGRFI VSRDISQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAFYGYGAMDYWGQGT SVTVSS
VL	MGNQFLPGHSLDMRFQVQLG LLLLWISGAQCDVQITQSPSYLAA SPGETITINCRASK SIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPS RFSGSGSGTFTLTIS SLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGTKLE IK
중쇄	MKLWLNWVFLTLTHG IQCEVKLVE SGGGLVQPGGSLRL SCAT SG FTF SDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTEY SESVKGRFI VSRDISQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAFYGYGAMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFQTQYTCNV DHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVS VLT VVHODWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEVWE SNGQP ENNYKTT PPM L DSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
경쇄	MGNQFLPGHSLDMRFQVQLG LLLLWISGAQCDVQITQSPSYLAA SPGETITINCRASK SIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPS RFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKOSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

[도12b]

< 6C7 아미노산 서열 분석 >

CDRH1	GFTFSDFY
CDRH2	SRNKANDYTT
CDRH3	ARDAFYGYGAMDY
CDRL1	KSIRKY
CDRL2	SGS
CDRL3	QQHNEYPYT
VH	MKLWLNWVFLTLHGIQC EVKLVE SGGGLVQPGGSLRLSCATSG FTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSESVKGRFI VSRDISQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAFYGYGAMDYWGQGT SVTVSS
VL	MRFQVQVLGLLLLWSGAQCDVQITQSPSYLAASPGETITINCRAS KSIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGIDFT LTISLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGKLEIK
중쇄	MKLWLNWVFLTLHGIQC EVKLVE SGGGLVQPGGSLRLSCATSG FTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTEYSESVKGRFI VSRDISQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDAFYGYGAMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVKDCTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
경쇄	MRFQVQVLGLLLLWSGAQCDVQITQSPSYLAASPGETITINCRAS KSIRKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGIDFT LTISLEPEDFAMYYCQQHNEYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

[도13a]

< 3C2 아미노산 서열 분석 >

CDRH1	GFSLSTSGMG
CDRH2	IWWDDDK
CDRH3	ARIANSWFAY
CDRL1	KSVSTSAYS
CDRL2	LAS
CDRL3	QHSRELPPT
VH	MGRLTSSFLLLVIPAYVLSQVTLKE SGPGILQPSQTL SLTC SFS SGF SL STSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNTALKSGLTISKD TSKNQVFLKIASVDTADTATYYCARIANSWFAYWGQGLTVTVSA
VL	MGSCQEPKKHPLFQLSEMETDTLLWVLLWPGSTGDIVLTQSPA SLAVSLGQRATISCRA SKSVSTSAYS SYMHWYQKPGQPPKLLIYL ASNLDSPVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELP PTFGAGTKLELK
중쇄	MGRLTSSFLLLVIPAYVLSQVTLKE SGPGILQPSQTL SLTC SFS SGF SL STSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNTALKSGLTISKD TSKNQVFLKIASVDTADTATYYCARIANSWFAYWGQGLTVTVSAAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKV DKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
경쇄	MGSCQEPKKHPLFQLSEMETDTLLWVLLWPGSTGDIVLTQSPA SLAVSLGQRATISCRA SKSVSTSAYS SYMHWYQKPGQPPKLLIYL ASNLDSGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELP PTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAQYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[도13b]

< 7H9 아미노산 서열 분석 >

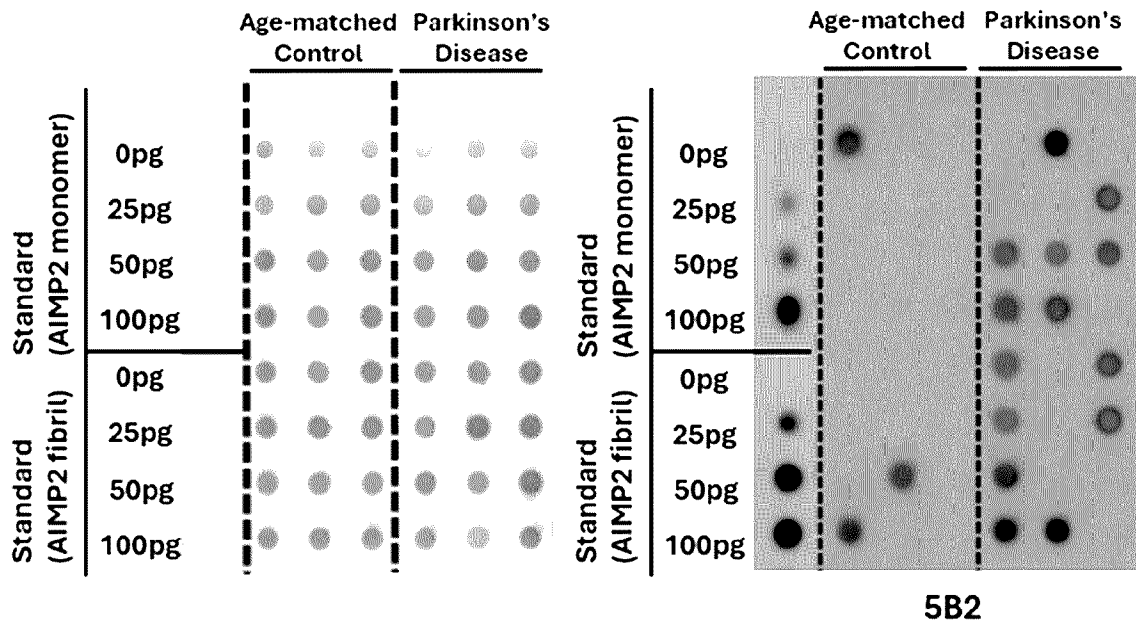
CDRH1	GFSLSTSGMG
CDRH2	IWWDDDK
CDRH3	ARIANSWFAY
CDRL1	KSVSTSGYTY
CDRL2	LAS
CDRL3	QHSRELPTT
VH	MGDKCAVMGRLTSSFLLLIPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTC SFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNTALKS GLTISKDTSKNQVFLKIASVDTADTATYYCARIANSWFAYWGQGLVT VSA
VL	METDTLLLWLLWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKS VSTSGYTYMHWWYQQKPGQSPKLLIYLA ^{SN} ESV ^{ES} VPARFSGSGSGTD FTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELPTTFGAGTKLELK
중쇄	MGDKCAVMGRLTSSFLLLIPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTC SFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNTALKS GLTISKDTSKNQVFLKIASVDTADTATYYCARIANSWFAYWGQGLVT VSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTS ^{GV} H ^{TF} PAVLQSSGLYSLSSV ^{TV} PSSNFGTQTYTCNV ^{DH} KPSN TKVDK ^{TV} ERKCCVECP ^{PC} PAPPVAGPSVFLFPPK ^{PK} DTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKFREEQFNSTFRV ^{VS} VL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEVEWESNGQPENNYKTTTPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ^{FSC} SV ^{MHE} ALHNHYTQKSLSLSP GK
경쇄	METDTLLLWLLWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKS VSTSGYTYMHWWYQQKPGQSPKLLIYLA ^{SN} ESGV ^{ES} VPARFSGSGSGTD FTLNHPVEEEDAATYYCQHSRELPTTFGAGTKLELKRTVAAPS ^{VF} IF PPSDEQLKSGTASVCLLN ^{NF} YPREAKVQW ^{KVD} NALQSGNSQESVT EQDSK ^{DS} TYSLSS ^{TL} LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT ^{KSF} NR GEC

[도14]

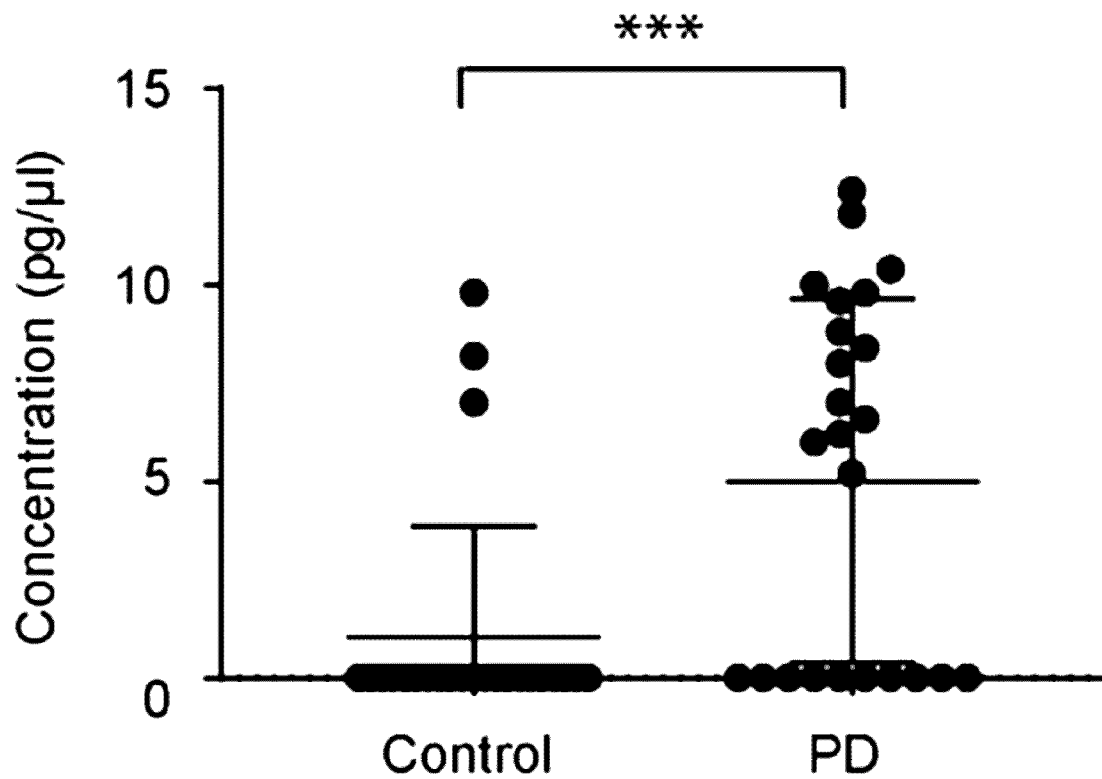
< 13H9 아미노산 서열 분석 >

CDRH1	DYSITSGYS
CDRH2	IHYRGST
CDRH3	ATWDYRLAY
CDRL1	SQHSTYT
CDRL2	LKKDGS
CDRL3	GVGDTIKEQFVYV
VH	MRVLILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSGY GYSWHWIRQFPGNKLEWMAYIHYRGSTNYPNPSLKSRISITRDTSKNQ FFLQLNSVTTEDTATYYCATWDYRLAYWGQGLTVVSA
VL	MGNLSVSAEISSTCIMAOWPLFFFFVLHCSGSFSQLVLTQSSSAFSL GASAKLTCTLSQHSYTYIEWYQQQPLKPPKYVMELKKDGSHTGD GIPDRFSGSSSGADRYLSISNIQPEDEAIYICGVGDTIKEQFVYVFGG GTKVTVL
중쇄	MRVLILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSGY GYSWHWIRQFPGNKLEWMAYIHYRGSTNYPNPSLKSRISITRDTSKNQ FFLQLNSVTTEDTATYYCATWDYRLAYWGQGLTVVSA <u>A</u> STKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISEVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
경쇄	MGNLSVSAEISSTCIMAOWPLFFFFVLHCSGSFSQLVLTQSSSAFSL GASAKLTCTLSQHSYTYIEWYQQQPLKPPKYVMELKKDGSHTGD GIPDRFSGSSSGADRYLSISNIQPEDEAIYICGVGDTIKEQFVYVFGG GTKVTVL <u>GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV</u> <u>AWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSTPEQWKSRRSY</u> <u>SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</u>

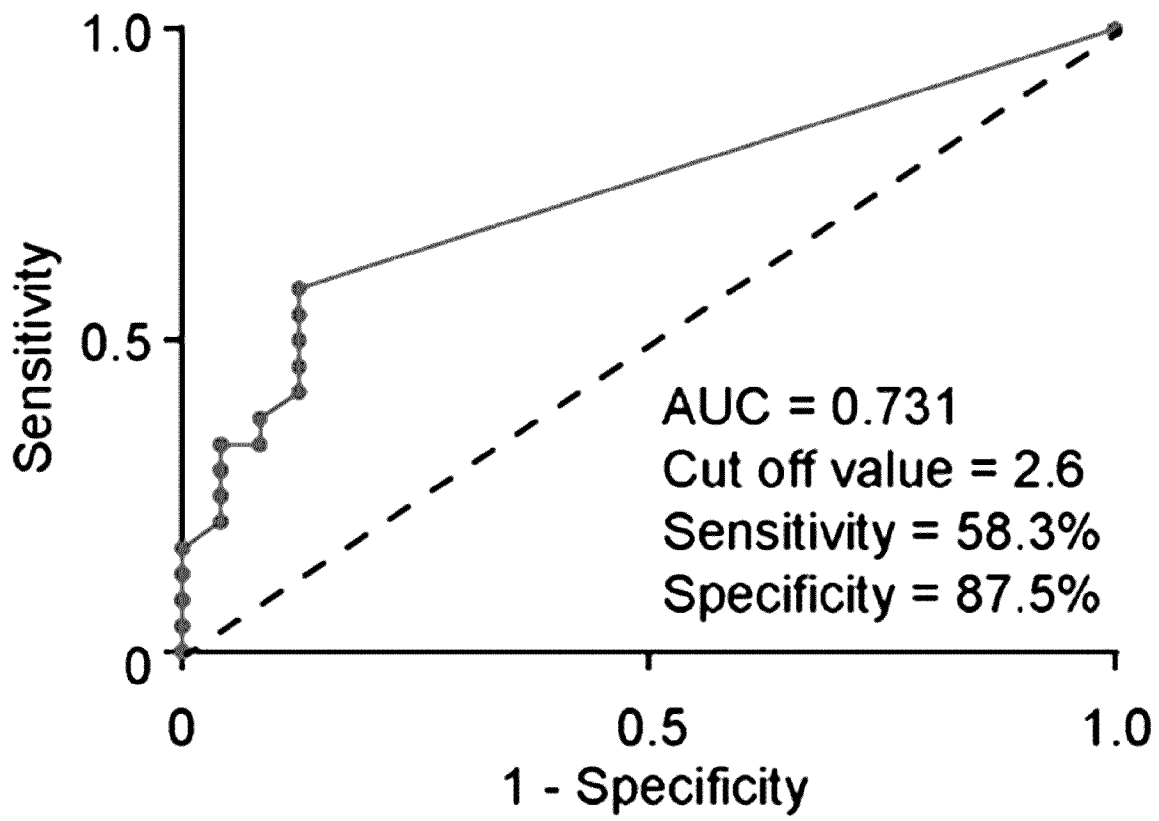
[도15]



[도16]



[도17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N 33/68**(2006.01)i; **C12Q 1/6883**(2018.01)i; **G01N 33/50**(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(2006.01); A61K 31/416(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61P 25/28(2006.01); C07K 1/00(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/50(2006.01); G01N 33/53(2006.01)

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

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: GLUT3(glucose transporter 3), USP14(ubiquitin-specific protease 14), α -시뉴클레인 (α -synuclein), AIMP2(aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 2), 파킨슨병(parkinson's disease), 진단(diagnosis), 응집체(aggregate), 검출(detection)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2022-0076658 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 08 June 2022 (2022-06-08) See abstract; claims 1, 8, 16-21 and 23; and paragraphs [0002], [0012], [0072], [0087], [0091]-[0093], [0114] and [0115].	1,4-7
A		2,3,8-13
Y	KR 10-2018-0078589 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 10 July 2018 (2018-07-10) See abstract; claims 1, 8 and 14; and paragraphs [0001], [0009] and [0013].	1,4-7
Y	KR 10-2252879 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 17 May 2021 (2021-05-17) See abstract; claims 1, 3 and 8; and paragraphs [0001], [0007], [0009], [0010] and [0016].	1,4-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

“D” document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 2024

Date of mailing of the international search report

27 October 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009023

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2010-0015038 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 12 February 2010 (2010-02-12) See abstract; and claims 1, 2 and 8-10.	1,4-7
A	KR 10-2020-0052142 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 14 May 2020 (2020-05-14) See abstract; and paragraphs [0019] and [0083].	1-13
A	KR 10-2017-0045042 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 26 April 2017 (2017-04-26) See abstract; claims 1, 6 and 13; and paragraphs [0009] and [0015].	1-13
A	HAN, R. et al. Glucose Metabolic Dysfunction in Neurodegenerative Diseases—New Mechanistic Insights and the Potential of Hypoxia as a Prospective Therapy Targeting Metabolic Reprogramming. International Journal of Molecular Sciences. 2021, vol. 22, document no. 5887, pp. 1-22. See abstract; and pages 1, 2 and 6-8.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009023

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2022-0076658	A	08 June 2022	WO	2022-119310	A1	09 June 2022
KR	10-2018-0078589	A	10 July 2018	KR	10-1956768	B1	11 March 2019
				KR	10-2018-0078589	A	10 July 2018
KR	10-2252879	B1	17 May 2021	None			
KR	10-2010-0015038	A	12 February 2010	None			
KR	10-2020-0052142	A	14 May 2020	KR	10-2198497	B1	06 January 2021
KR	10-2017-0045042	A	26 April 2017	WO	2017-065335	A1	20 April 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68(2006.01); A61K 31/416(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61P 25/28(2006.01); C07K 1/00(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 16/18(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/50(2006.01); G01N 33/53(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: GLUT3 (glucose transporter 3), USP14 (ubiquitin-specific protease 14), α -시뉴클레인(α -synuclein), AIMP2 (aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 2), 파킨슨병 (parkinson's disease), 진단(diagnosis), 응집체(aggregate), 검출(detection)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2022-0076658 A (성균관대학교산학협력단) 2022.06.08 요약; 청구항 1, 8, 16-21, 23; 단락 [0002], [0012], [0072], [0087], [0091]-[0093], [0114], [0115]	1,4-7
A		2,3,8-13
Y	KR 10-2018-0078589 A (서울대학교산학협력단) 2018.07.10 요약; 청구항 1, 8, 14; 단락 [0001], [0009], [0013]	1,4-7
Y	KR 10-2252879 B1 (성균관대학교산학협력단) 2021.05.17 요약; 청구항 1, 3, 8; 단락 [0001], [0007], [0009], [0010], [0016]	1,4-7
Y	KR 10-2010-0015038 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2010.02.12 요약; 청구항 1, 2, 8-10	1,4-7
A	KR 10-2020-0052142 A (성균관대학교산학협력단) 2020.05.14 요약; 단락 [0019], [0083]	1-13
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년10월25일 (25.10.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년10월27일 (27.10.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0045042 A (충남대학교산학협력단) 2017.04.26 요약; 청구항 1, 6, 13; 단락 [0009], [0015]	1-13
A	HAN, R. 등, "Glucose Metabolic Dysfunction in Neurodegenerative Diseases—New Mechanistic Insights and the Potential of Hypoxia as a Prospective Therapy Targeting Metabolic Reprogramming", International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22권, 문헌번호 5887, 페이지 1-22 초록; 페이지 1, 2, 6-8	1-13

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

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

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0076658 A	2022/06/08	WO 2022-119310 A1	2022/06/09
KR 10-2018-0078589 A	2018/07/10	KR 10-1956768 B1	2019/03/11
		KR 10-2018-0078589 A	2018/07/10
KR 10-2252879 B1	2021/05/17	없음	
KR 10-2010-0015038 A	2010/02/12	없음	
KR 10-2020-0052142 A	2020/05/14	KR 10-2198497 B1	2021/01/06
KR 10-2017-0045042 A	2017/04/26	WO 2017-065335 A1	2017/04/20