



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0026834
(43) 공개일자 2020년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C07K 16/44 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7038919
(22) 출원일자(국제) 2018년06월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년12월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/035614
(87) 국제공개번호 WO 2018/223003
국제공개일자 2018년12월06일
(30) 우선권주장
62/514,316 2017년06월02일 미국(US)
62/679,161 2018년06월01일 미국(US)

(71) 출원인
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400
(72) 발명자
도슨, 테드
미국 21205 메릴랜드 볼티모어 노스 브로드웨이 733 엠알비 731
도슨, 바닐라
미국 21205 메릴랜드 볼티모어 노스 브로드웨이 733 엠알비 711
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

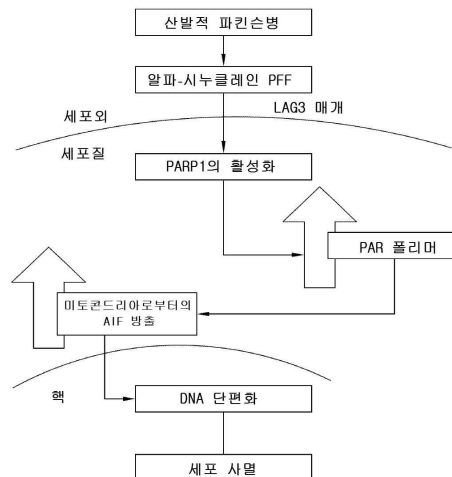
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 파킨슨병에 걸린 환자의 CSF 중 PAR의 검출

(57) 요약

폴리(ADP-리보스)(PAR)는 파킨슨병(PD)을 포함하는 많은 신경변성 질병 상태에 연루된 단백질이다. 현재까지, PD로 고통받는 환자를 진단, 평가 또는 모니터링하기 위한 관례적인 실험실 테스트는 개발되지 않았다. 환자의 뇌척수액(CSF) 중 PAR의 농도를 평가하고, PD 환자의 의학적 상태와 농도를 상관시키는 신규한 방법이 본원에 개시된다. 또한, PD에 대한 바이오마커로서 PAR의 용도가 기재된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2018.05)

C07K 2317/21 (2013.01)

G01N 2800/2835 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

캄, 태-인

미국 21205 메릴랜드 볼티모어 노스 브로드웨이
733 엠알비 732

로젠탈, 리아나

미국 21042 메릴랜드 루터빌 폴스 로드 10751 스위트 250

안드라비, 샤이다

미국 35294-0019 알라바마 버밍엄 유니버스티 블러
바드 1670 볼커 홀 242

명세서

청구범위

청구항 1

뇌척수액(CSF) 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 결정하는 방법으로서,
환자로부터 뇌척수액의 샘플을 수집하는 단계,
상기 CSF 샘플에 대해 PAR-샌드위치 ELISA를 수행하여 상기 CSF 중 PAR 농도를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, CSF 샘플 중 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 샌드위치 ELISA가 적어도 포획 항체 및 검출 항체를 포함하며, 포획 항체, 검출 항체 또는 이들 모두는 항-PAR 모노클로날 항체인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 포획 항체가 고정 지지체에 부착되는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 항-PAR 모노클로날 항체가 완전히 인간 항체인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, CSF 샘플 중 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플과 비교하는 단계가 비색 검정법에 의해 수행되는 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 검출 항체가 비오틴에 컨쥬게이션되는 방법.

청구항 8

파킨슨병에 대한 의학적 치료의 치료 효능을 결정하는 방법으로서,
PD에 대해 적어도 하나의 의학적 치료를 받은 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하는 단계,
상기 CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하는 단계, 및
상기 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 대조군 샘플이 초기 기간의 환자로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 대조군 샘플이 건강한 도너로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,
환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도보다 높은 경우, 의학적 치료가 환자에 대해 비효과적이며,
환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도와 동일하거나 이보다 낮은 경우, 의학적 치료가 환자에 대해 효과적

인 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 의학적 치료가 하나 이상의 의약을 환자에 투여하거나, 환자에 수술을 수행하거나, 이들의 조합인 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, CSF 샘플 중 PAR 농도를 측정하는 단계가 샌드위치 ELISA에 의해 수행되는 방법.

청구항 14

파킨슨병(PD) 환자의 질병 진행을 모니터링하는 방법으로서,

PD에 대해 적어도 하나의 의학적 치료를 받은 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하는 단계,

상기 CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하는 단계, 및

상기 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 대조군 샘플이 초기 기간의 환자로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 대조군 샘플이 건강한 도너로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도보다 높은 경우, 의학적 치료가 환자에 대해 비효과적이며,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도와 동일하거나 이보다 낮은 경우, 의학적 치료가 환자에 대해 효과적인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 의학적 치료가 하나 이상의 약제를 환자에 투여하거나, 환자에 수술을 수행하거나, 이들의 조합인 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, CSF 샘플 중 PAR 농도를 측정하는 단계가 샌드위치 ELISA에 의해 수행되는 방법.

청구항 20

파킨슨병 환자를 진단하는 방법으로서,

환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하는 단계,

상기 CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하는 단계, 및

상기 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 대조군 샘플이 초기 기간의 환자로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 대조군 샘플이 건강한 도너로부터 수집된 CSF 샘플인 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도보다 높은 경우, 환자는 PD 발병 위험이 높거나 PD를 가지며,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도와 동일하거나 이보다 낮은 경우, 환자는 PD 발병 위험이 없거나 PD를 갖지 않는 방법.

청구항 24

파킨슨병의 치료진단(theranostic) 방법으로서,

PD에 대해 적어도 하나의 의학적 치료를 받고 있는 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하는 단계,

상기 CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하는 단계, 및

상기 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 단계를 포함하는 치료진단 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 대조군 샘플이 초기 기간의 환자로부터 수집된 CSF 샘플인 치료진단 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 대조군 샘플이 건강한 도너로부터 수집된 CSF 샘플인 치료진단 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도보다 높은 경우, 방법이 환자에 의해 수용된 적어도 하나의 의학적 치료를 변경시키는 단계를 추가로 포함하며,

환자의 PAR 농도가 대조군 샘플의 PAR 농도와 동일하거나 이보다 낮은 경우, 방법이 환자에 의해 수용된 의학적 치료를 변경하지 않는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, CSF 샘플 중 PAR 농도를 측정하는 단계가 샌드위치 ELISA에 의해 수행되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2017년 6월 2일 출원된 미국 가출원 62/514,316 및 2018년 6월 1일 출원된 미국 가출원 62/679,161에 대한 우선권을 청구하며, 이 둘 모두는 모든 목적상 그 전체가 참조로 통합된다.

[0002] 연방 후원 연구 & 개발에 관한 진술

[0003] 본 발명은 국립보건원에 의해 부여된 승인 번호 NS38377 및 U01NS082133 하에 정부 지원에 의해 이루어졌다. 정부는 발명에 대해 특정 권리를 가지고 있다.

배경 기술

[0004] 발명의 배경

[0005] 폴리(ADP-리보스)("PAR") 폴리머라제-1("PARP-1")은 DNA 손상에 반응하며 DNA 수복에 필요한 중요한 핵 효소이다. 활성화 시, PARP-1은 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드("NAD+")로부터의 ADP-리보스의 전달을 촉매하고, PAR을 다양한 핵 단백질 예컨대, 히스톤, DNA 폴리머라제, 토포아이스머라제 및 전사 인자는 물론 PARP-1 자체의 자가-변형에 컨쥬게이션시켜, 다양한 생리적 과정을 조절한다. PARP-1의 과다 활성화는 내재적 세포 사멸 프

로그를 초래하며, 이는 파르타나토스(parthanatos)(또는 대안적으로, PARP-1-의존적 세포 사멸)를 피사 및 아포토시스로부터 구별하기 위해 설계되었다. 파르타나토스는 많은 질병 및 질환 예컨대, 뇌졸중, 파킨슨병, 심장마비, 당뇨병 및 허혈성 재관류 손상에서 발생하는 것으로 알려져있다. PARP-1 억제 또는 PARP-1 유전자 결실은 뇌졸중, 트라우마, 허혈성 재관류 손상, 당뇨병 및 신경변성 질환을 포함하는 많은 세포 손상 파라다임 모델에서 현저하게 보호성이며, 이는 파르타나토스가 이들 장애에서 중요한 역할을 담당함을 나타낸다.

[0006] 미토콘드리아 단백질 아포토시스-유도 인자("AIF")는 파르타나토스에서 중심적인 역할을 수행하며, 파르타나토스 동안 AIF는 미토콘드리아로부터 방출되어 핵으로 전위된다. AIF는 미토콘드리아 산화환원효소이며, 이는 사이토크롬 C와 같이 2개의 독립된 기능을 갖는다. 세포 생존을 포함하는 첫 번째는 미토콘드리아내에 있으며, 호흡 복합체 I의 어셈블리 또는 안정화를 통한 것으로 여겨진다. 두 번째는 파르타나토스 세포 사멸의 프로모터로서의 기능이다. AIF는 PARP-1 활성화 후 세포질 내로 방출되어, 궁극적으로 핵으로 유입되어 세포 사멸을 유도한다.

[0007] 파킨슨병(PD)은 연령-관련 신경변성 질환이며, 여기에서 α -syn은 루이소체 및 신경돌기로 불리는 구조에서 세포질내 봉입체에서 피브릴로서 침착된다. 재조합 α -syn은 시험관내에서 응집되어 생체내에서 발견된 것과 구조적으로 유사한 피브릴을 형성하며, 이러한 α -syn 사전-형성된 피브릴(α -syn PFF)은 프리온-유사 방식으로 확산될 수 있다: 마우스 뇌 내로 주입되고 병리학적 α -syn 및 신경독소의 마커인 세린 129 상에서 α -syn의 인산화 수반하는 경우 시험관내 뉴런 배양 및 생체내 둘 모두에서. 응집된 α -syn이 PD의 병리의 기초가 됨이 명백하지만, α -syn의 비정상 응집을 추진하는 것은 물론 이러한 응집에 의해 활성화되는 세포 손상 및 사멸 메커니즘은 아직 알려지지 않았다. 폴리(ADP-리보스)(PAR) 폴리머라제-1(PARP-1) 및 PAR은 신경 장애에 관련된 세포 사멸에서 주요한 기여 역할을 하기 때문에, 여기서 병리학적 α -syn 유도된 신경변성에서 PARP-1 및 PAR의 역할을 평가하였다.

[0008] 또한, PD는 느리고 감소된 움직임, 근육 경직성, 휴식 떨림, 자세 불안정, 인지 장애 및 치매를 특징으로 하는 서서히 진행되는 신경변성 CNS 장애이다. PD의 주요 병리학적 특징은 흑질 밀집부(SNpc)에서 도파민성 뉴런의 선택적 변성 및 미상(putamen) 및 피곡(putamen)에서 이들의 말단의 손실이다. 미상핵 및 피곡으로 돌출되는 흑질 뉴런의 손실은 이들 영역에서 도파민을 고갈시킨다. 증거는 유전자 및 환경적 인자를 포함하는 다중 인자가 이러한 신경변성 질환에서 도파민 신경변성에 기여함을 시사한다.

[0009] PD의 의학적 치료는 흑질선조체 뉴런에서 신경변성 과정을 중단시키거나, 감속시키거나 이의 범위를 감소시키거나 이를 최소화시키며(신경보호 요법), 생화학적 불균형을 제거하도록 지시한다(증상 요법). PD에서 증상 요법의 주요 방향은 도파민 합성을 증가시키거나, 도파민 수용체 활성화 및 시냅스전 공간으로부터의 도파민 방출을 자극하고, 시냅스전 수용체에 의한 도파민 재흡수 및 도파민 대사를 억제하는 것이다.

[0010] 이 시점에서 PD에 대해 알려진 치료법이 없고, 다른 환자가 치료법에 대해 다르게 반응하기 때문에, 의료 전문가가 환자의 질환 진행을 주의 깊게 모니터링하는 것이 중요하다. 이는 현재 치료가 비효과적인 경우 의료 전문가가 환자가 받는 의학적 치료를 조절하거나 변경할 수 있게 한다. PD 진행을 모니터링하는 현재 방법은 환자가 경험하는 장애 및 손상 수준에 근거한 주관적인 척도이다.

[0011] 따라서, 더욱 특히 의학적 치료를 미세 조정하기 위해 PD 환자의 치료 및 진행을 평가하고 모니터링할 필요가 남아있다. 또한, 정성적 측면은 물론 정량적 측면에서 평가의 주관적 요소를 제거하거나 감소시킬 필요가 있다.

발명의 내용

[0012] 발명의 간략한 설명

[0013] 제1 양태에서, 뇌척수액 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 결정하는 방법으로서, 환자로 부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플에 대해 PAR-샌드위치 ELISA를 수행하여 CSF 중 PAR 농도를 결정하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.

[0014] 제2 양태에서, 파킨슨병에 대한 의학적 치료의 치료 효능을 결정하는 방법으로서, 환자로 부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.

[0015] 추가의 또 다른 양태에서, 파킨슨병(PD) 환자의 질병 진행을 모니터링하는 방법으로서, 환자로 부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하며, 여기에서 환자는 PD를 위한 적어도 하나의 의학적 치

료를 받는 중인 방법이 본원에 기재된다.

[0016] 추가의 또 다른 양태에서, 파킨슨병 환자를 진단하는 방법으로서, 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.

[0017] 추가의 또 다른 양태에서, 파킨슨병에 대한 치료진단(thernostic) 방법으로서, PD에 대해 적어도 하나의 의학적 치료를 받고 있는 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.

[0018] 추가의 또 다른 양태에서, PD에 대한 바이오마커로서 환자의 CSF 중 PAR의 용도가 본원에 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 파르타나토스에서 PAR-독립적 AIF 방출 모델을 예시하는 세포의 프로세스의 모식도이다.
- 도 2는 항-PAR 항체를 이용하는 샌드위치 ELISA 검정의 모식도 및 농도 곡선이다.
- 도 3은 PD 환자 대 건강한 대조군의 CSF 중 PAR 농도의 막대 그래프이다.
- 도 4는 PD-정상 환자 vs PD 인지 손상 환자에서 PAR 농도의 막대 그래프이다.
- 도 5는 α -syn PFF-처리된 일차 피질 뉴런에서 PARP-1의 활성화를 보여준다. PAR 축적 수준의 대표적인 웨스턴 블롯 분석(상단) 및 정량화(하단). 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트($n=3-4$).
- 도 6은 1h 동안 ABT-888(10 μ M), AG-014699(1 μ M) 또는 BMN 673(10 μ M)와 사전-인큐베이션하고, 추가로 14 일 동안 α -syn PFF(5 μ g/ml)와 인큐베이션한 일차 피질 뉴런으로부터 호케스트(Hoechst) 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색의 대표적인 이미지를 보여준다. 스케일 바, 20 μ m.
- 도 7은 세포 사멸의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트($n=3$).
- 도 8은 α -syn PFF-유도된 PAR 축적의 억제가 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되었음을 보여준다.
- 도 9는 AAV-sgCon 또는 AAV-sgPARP-1로 형질도입시키고, 추가로 14일 동안 α -syn PFF와 인큐베이션한 일차 피질 뉴런으로부터의 호케스트 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색의 대표적인 이미지를 보여준다. 스케일 바, 20 μ m.
- 도 10은 세포 사멸의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. ($n=3$).
- 도 11은 WT 또는 PARP-1 KO 일차 피질 뉴런으로서, 추가로 14일 동안 α -syn PFF와 인큐베이션한 WT 또는 PARP-1 KO 일차 피질 뉴런으로부터의 호케스트 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색의 대표적인 이미지를 보여준다. 스케일 바, 20 μ m.
- 도 12는 세포 사멸의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트($n=3$). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$.
- 도 13은 α -syn PFF 주입된 마우스의 선조체에서 PAR 축적 수준의 대표적인 면역블롯 및 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트($n=4$).
- 도 14는 α -syn PFF 주입된 WT, PARP-1KO, 및 선조체내 α -syn PFF 또는 PBS 주입 후 6개월째에 ABT-888이 공급된 WT 마우스의 SNpc DA 뉴런의 대표적인 TH 및 니슬(Nissl) 염색을 보여준다.
- 도 15는 입체 카운트를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=5$ 내지 7마리 마우스).
- 도 16은 HPLC에 의해 측정된, WT, PARP-1KO, 및 선조체내 α -syn PFF 또는 PBS 주입 후 6개월째에 ABT-888이 공급된 WT 마우스의 선조체 중 DA 농도를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 $n=6$ 내지 30마리 마우스).
- 도 17은 α -syn PFF 주입 후 180일째의 폴 테스트 결과를 보여준다. 폴 테스트는 WT, PARP-1 KO, 또는 ABT-888이 공급된 WT 마우스에서 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=$

7 내지 9마리 마우스). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 18은 α -syn PFF 주입 후 180일째의 악력 결과를 보여준다. 악력 테스트는 WT, PARP-1 KO, 또는 ABT-888이 공급된 WT 마우스에서 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 7 내지 9마리 마우스). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 19는 PAR에 의한 α -syn 피브릴화의 가속화를 보여준다. 5 nM의 정제된 PAR 함유 또는 비함유의 모노머 α -syn을 지시된 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. α -syn의 피브릴화는 α -syn 항체를 사용한 면역블롯에 의해 검출하였다(상단). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. (하단). 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3).

도 20은 PAR 함유 또는 비함유의 α -syn 피브릴의 형성 비율이 티오플라빈 T 형광에 의해 모니터링되었음을 보여준다(n=3).

도 21은 α -syn 피브릴에 있어서 대표적인 투과 전자 현미경(TEM) 이미지를 보여준다. 스케일 바, 200nm.

도 22는 PARP-1 KO 뉴런에서 NMDA-유도된 α -syn 피브릴화의 억제를 보여준다. WT 또는 PARP-1 KO 배아로부터의 일차 피질 뉴런은 AAV- α -syn으로 형질도입시킨 후, 5 min 동안 500 μ M NMDA와 추가로 인큐베이션하였다. α -syn 피브릴화는 NMDA 처리 후 6h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

도 23은 PARP1 억제제에 의한 NMDA-유도된 α -syn 피브릴화의 방지를 보여준다. AAV- α -syn으로 형질도입된 일차 피질 뉴런을 10 μ M ABT-888 또는 1 μ M AG-014699로 1h 동안 전처리하고, 500 μ M NMDA와 5min 동안 추가로 인큐베이션하였다. α -syn 피브릴화는 NMDA 처리 후 6h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

도 24는 증가하는 농도의 PK(0-2.5 μ g/ml)와 인큐베이션하고, α -syn 항체로 면역블롯팅한 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF를 보여준다(상단). 정량화는 비절단된 α -syn 에 대한 절단된 α -syn의 비율을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다(하단). 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3).

도 25는 1, 4 및 7일 동안 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF로 처리된 일차 피질 뉴런에서 p- α -syn(적색)의 대표적인 면역염색을 보여준다. DAPI로 표준화된 p- α -syn 시그널의 정량화(오른쪽). 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다(하단). 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=5).

도 26은 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF로 처리된 일차 피질 뉴런이 순차적으로 1% TX-100(TX 가용성) 및 2% SDS(TX 불용성)로 추출되었음을 보여준다. 세포 용해물을 α -syn, p- α -syn, 및 GAPDH 항체를 이용한 면역블롯팅으로 처리하였다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). ND는 검출되지 않음. 1일 동안 α -syn PFF와 비교한 것으로서 $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.005$, $^{\#\#\#}P < 0.0005$.

도 27은 선조체내 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR 주입 후 1, 3 및 6개월째에 WT 마우스의 SNpc DA 뉴런의 대표적인 TH 및 니슬 염색을 보여준다.

도 28은 입체 카운트를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 5 내지 8마리 마우스).

도 29는 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF, 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 DA 농도를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 4 내지 6마리 마우스).

도 30은 선조체내 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF, 또는 PAR 주입 후 1, 3 및 6개월째에 WT 마우스의 SNpc에서 대표적인 p- α -syn 면역염색을 보여준다. 스케일 바, 100 μ m.

도 31은 p- α -syn 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 5 내지 8마리 마우스).

도 32는 폴 테스트에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 행동 이상을 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 9 내지 14마리 마우스).

도 33은 악력 테스트에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 행동 이상을 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 9 내지

14마리 마우스).

도 34는 PD 환자의 CSF 중 PAR의 증가를 보여준다. 건강한 대조군(n=31) 및 PD 환자(n=80)의 CSF 중 PAR의 수준은 PAR ELISA에 의해 결정되었다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 웰치 수정된 스튜던트 t 테스트.

도 35는 PD 환자의 CSF 중 PAR의 증가를 보여준다. 건강한 대조군(n=33) 및 PD 환자(n=21)의 CSF 중 PAR의 수준은 PAR ELISA에 의해 결정되었다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 웰치 수정된 스튜던트 t 테스트.

도 36은 PD 환자의 루이소체에서 PAR의 증가 및 공동-국소화를 보여준다. PD 환자의 SNpc에서 대표적인 α-syn(적색) 및 PAR(녹색) 면역염색.

도 37은 1h 동안 ABT-888 (10 μM), AG-014699 (1 μM) 또는 BMN 673 (10 μM)과 사전-인큐베이션하고, 추가로 7일 동안 α-syn PFF와 인큐베이션한 일차 피질 뉴런에서 p-α-syn(적색)의 대표적인 이미지를 보여준다. 핵은 DAPI로 염색된다(청색).

도 38은 DAPI로 표준화된 p-α-syn 시그널의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=6).

도 39는 1h 동안 PARP 억제제로의 전-처리에 이어서 7일 동안 α-syn PFF와 인큐베이션시킨 일차 피질 뉴런으로부터 세정제-가용성 및 불용성 분획에서 α-syn의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 40은 b-액틴으로 표준화된 세정제-불용성 분획 중 α-syn 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3).

도 41은 AAV-sgPARP1로 감염된 일차 피질 뉴런에서 α-syn PFF-유도된 PAR 축적의 억제를 보여준다.

도 42는 PARP1 KO 배아로부터의 일차 피질 뉴런 중 α-syn PFF-유도된 PAR 축적의 억제를 보여준다.

도 43은 1h 동안 ABT-888 (10 μM), AG-014699 (1 μM) 또는 BMN 673 (10 μM)과 사전-인큐베이션하고, 추가로 7일 동안 α-syn PFF와 인큐베이션한 일차 피질 뉴런에서 p-α-syn(적색)의 대표적인 이미지를 보여준다. 핵은 DAPI로 염색된다(청색).

도 44는 DAPI로 표준화된 p-α-syn 시그널의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=6).

도 45는 7일 동안 α-syn PFF와 인큐베이션한 WT 또는 PARP1 KO 일차 피질 뉴런으로부터의 세정제-가용성 및 불용성 분획 중 α-syn의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 46은 b-액틴으로 표준화된 세정제-불용성 분획 중 α-syn 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3).

도 47은 1h 동안 ABT-888, Z-VAD, NEC-1, 또는 3-MA로 전-처리하고, 이어서 14일 동안 α-syn PFF와 추가로 인큐베이션한 일차 피질 뉴런으로부터 호케스트 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색의 대표적인 이미지를 보여준다. 스케일 바, 20 μm.

도 48은 세포 사멸의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). *P < 0.05, ***P < 0.001.

도 49는 α-syn PFF 전달의 대표적인 이미지를 보여준다. α-syn PFF를 미세유체 장치의 챔버 1(C1)에 첨가하였다. 14일째에, WT 뉴런이 모든 3개의 챔버에 존재한 경우 p-α-syn이 챔버 2(C2) 및 챔버 3(C3)에서 검출되었으나, C2의 PARP-1 KO 뉴런 및 C3의 WT 뉴런에서 p-α-syn의 매우 제한된 세기를 갖는다. 스케일 바, 100 μm.

도 50은 고해상도 이미지에서 p-α-syn 시그널을 보여준다. 스케일 바, 10 μm.

도 51은 각 챔버에서 p-α-syn 수준의 정량화를 보여준다. 값은 평균± s.e.m.이다. 언페어드 스튜던트 t 테스트(n=3). *P < 0.05, **P < 0.005.

도 52는 미스폴딩된 α-syn, p-α-syn, TH, DAT, PAR, 및 PARP-1 항체를 갖는, WT, PARP-1 KO, 및 ABT-888이 공급된 WT 마우스로부터의 중뇌 세포용해물의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 53은 TH 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). *P < 0.05, ***P < 0.005, ****P < 0.001.

도 54는 DAT 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 55는 불용성 α-syn 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 56은 불용성 p-α-syn 수준의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 57은 HPLC에 의해 측정된, WT, PARP-1KO 및 선조체내 α-syn PFF 또는 PBS 주입 후 6개월째에 ABT-888이 공급된 WT 마우스의 선조체 중 DA 대사산물 DOPAC 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=5 내지 10마리 마우스).

도 58은 HPLC에 의해 측정된, WT, PARP-1KO, 및 선조체내 α-syn PFF 또는 PBS 주입 후 6개월째에 ABT-888이 공급된 WT 마우스의 선조체 중 DA 대사산물 3-MT 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=5 내지 10마리 마우스).

도 59는 HPLC에 의해 측정된, WT, PARP-1KO, 및 선조체내 α-syn PFF 또는 PBS 주입 후 6개월째에 ABT-888이 공급된 WT 마우스의 선조체 중 DA 대사산물 HVA 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=5 내지 10마리 마우스).

도 60은 WT, PARP-1 KO, 및 ABT-888이 공급된 WT 마우스로부터의 p-α-syn 면역염색의 대표적인 이미지를 보여준다.

도 61은 편도체 영역에서 p-α-syn 세기의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=4 내지 5마리 마우스).

도 62는 피질 영역에서 p-α-syn 세기의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=4 내지 5마리 마우스).

도 63은 SNpc 영역에서 p-α-syn 강도의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. (군 당 n=4 내지 5마리 마우스).

도 64는 α-syn PFF 주입 후 180일째의 폴 테스트 결과를 보여준다. 폴 테스트는 WT, PARP-1 KO, 또는 ABT-888이 공급된 WT 마우스에서 수행하였다. 데이터는 평균±s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n=6 내지 30마리 마우스). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 65는 α-syn PFF 주입 후 180일째에 악력 테스트 결과를 보여준다. 악력 테스트는 WT, PARP-1 KO, 또는 ABT-888이 공급된 WT 마우스에서 수행하였다. 데이터는 평균±s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n=6 내지 30마리 마우스). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 66은 α-syn 피브릴화의 PAR-매개된 가속화에 대한 온도의 효과를 보여준다. 5 nM PAR 함유 또는 비함유의 모노머 α-syn을 지시된 온도에서 72h 동안 인큐베이션하였다. α-syn의 피브릴화는 α-syn 항체를 사용한 면역블롯에 의해 검출하였다.

도 67은 PAR-매개된 α-syn 피브릴화의 농도 의존성을 보여준다. α-syn 피브릴화는 인큐베이션 후 36h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

도 68은 α-syn 피브릴화의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트.

도 69는 36h 동안 37°C에서 5 nM의 PAR, 폴리(A) 또는 ADPr을 첨가함으로써 생성된 α-syn 피브릴화의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 70은 α-syn 피브릴화의 정량화를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트.

도 71은 WT 또는 PARP1 KO 배아로부터의 일차 피질 뉴런을 5일 동안 AAV-α-syn으로 형질도입시키고, 그 후 PAR 폴리머를 6h 동안 BioPorter로 전달시킴을 보여준다. α-syn 피브릴화는 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다.

도 72는 24h 동안 α-syn WT로 형질감염시키고, 그 후, 15 min 동안 50 μM MNNG와 추가로 인큐베이션시킨

PARP1 KO SH-SY5Y 세포 또는 WT 세포를 보여준다. α -syn 피브릴화는 MNNG 처리 후 6h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

도 73은 24h 동안 α -syn A53T로 형질감염시키고, 15 min 동안 50 μ M MNNG와 추가로 인큐베이션시킨 PARP1 KO SH-SY5Y 세포 또는 WT 세포를 보여준다. α -syn 피브릴화는 MNNG 처리 후 6h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

도 74는 WT 또는 PARP1 KO SH-SY5Y 세포를 24h 동안 α -syn WT로 형질감염시키고, 그 후, PAR 폴리머를 6h 동안 BioPorter로 전달하였음을 보여준다. α -syn 피브릴화는 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출되었다.

도 75는 24h 동안 α -syn WT로 형질감염된 SH-SY5Y 세포를 1h 동안 10 μ M ABT-888 또는 1 μ M AG-014699로 전처리하고, 15 min 동안 50 μ M MNNG와 추가로 인큐베이션하였음을 보여준다. α -syn 피브릴화는 MNNG 처리 후 6h째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 76은 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF를 0.5 μ g/ml의 PK와 인큐베이션시키고, α -syn에 대한 에피토프-특이적 항체로 면역블롯팅하였음을 보여준다.

도 77은 PAR- α -syn PFF가 증가되는 용량의 정제된 PAR 폴리머로 생성되었음을 보여준다. 일차 피질 뉴런을 동일한 양의 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF로 14일 동안 처리하였다. 세포 사멸은 호케스트 및 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색에 의해 결정되었다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트($n=3-4$).

도 78은 4일 동안 증가하는 양의 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF로 처리된 일차 피질 뉴런에서 p- α -syn(적색)의 대표적인 면역염색을 보여준다. 핵은 DAPI로 염색된다(청색).

도 79는 DAPI로 표준화된 p- α -syn 시그널의 정량화를 보여준다($n=5$). 일원 ANOVA와 터키 사후 테스트. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 80은 선조체내 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR 주입 후 1, 3 및 6개월째에 WT 마우스의 SNpc DA 뉴런의 입체 카운트(sterological count)를 보여준다. (A) 동측 니슬-뉴런을 계수하였다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=5$ 내지 8마리 마우스). $*P < 0.05$, $***P < 0.001$.

도 81은 선조체내 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF, 또는 PAR 주입 후 1, 3 및 6개월째에 WT 마우스의 SNpc DA 뉴런의 입체 카운트를 보여준다. 대측 TH-뉴런을 계수하였다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=5$ 내지 8마리 마우스). $*P < 0.05$, $***P < 0.001$.

도 82는 선조체내 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF, 또는 PAR 주입 후 1, 3 및 6개월째에 WT 마우스의 SNpc DA 뉴런의 입체 카운트를 보여준다. 니슬-양성 뉴런을 계수하였다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=5$ 내지 8마리 마우스). $*P < 0.05$, $***P < 0.001$.

도 83은 도파민 대사의 모식도를 보여준다.

도 84는 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 대측 선조체 중 DA 농도의 현저한 차이가 없음을 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트.

도 85는 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 동측 DOPAC 농도를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=4$ 내지 6마리 마우스). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 86은 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 대측 DOPAC 농도를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=4$ 내지 6마리 마우스). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 87은 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 동측 3-MT 농도를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 $n=4$ 내지 6마리 마우스). $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

도 88은 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의

선조체 중 대측 3-MT 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 4 내지 6마리 마우스). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 89는 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α-syn PFF, PAR-α-syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 동측 HVA 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 4 내지 6마리 마우스). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 90은 HPLC에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α-syn PFF, PAR-α-syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 대측 HVA 농도를 보여준다. 막대는 평균±s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(군 당 n= 4 내지 6마리 마우스). * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 91은 1, 3 및 6개월에서 PBS, α-syn PFF, PAR-α-syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 선조체 중 TH, DAT 및 β-액틴의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 92는 β-액틴으로 표준화된 선조체 중 TH 및 DAT 수준의 정량화를 보여준다. 오차 막대는 평균 ± s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=3-4).

도 93은 폴 테스트에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α-syn PFF, PAR-α-syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 행동 이상을 보여준다. 데이터는 평균± s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 94는 악력 테스트에 의해 측정된, 1, 3 및 6개월에서 PBS, α-syn PFF, PAR-α-syn PFF 또는 PAR-주입된 마우스의 행동 이상을 보여준다. 데이터는 평균± s.e.m.이다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

도 95는 PAR ELISA의 성립을 보여준다. ELISA는 PAR을 3 pM만큼 낮게 검출하였으며, 50 nM에서 포화되었다.

도 96은 대조군 및 PD 환자의 흑질 중 PAR, TH 및 β-액틴의 대표적인 면역블롯을 보여준다.

도 97은 β-액틴으로 표준화된 PAR 및 TH 수준의 정량화를 보여준다. 오차 막대는 평균 ± s.e.m.을 나타낸다. 일원 ANOVA 후 터키 사후 테스트(n=5). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

발명의 상세한 설명

[0021]

종래에는, PAR-AIF 상호작용을 방해하는 제제의 투여에 의해 PARP-1의 활성화 후 세포 사멸을 예방하기 위한 신규하고 유용한 메카니즘을 발견하였다(그 전체가 본원에 참조로 통합된 US 20120122765 참조). 이러한 메카니즘은 파킨슨병으로 고통받는 환자를 치료하는데 유용하다. 이와 관련하여, PAR 폴리머-결합 단백질로서 AIF의 확인은, PAR 폴리머와 AIF의 상호작용을 억제하는 치료학적 화합물이 PARP-1을 활성화시키는 스트레스에 대한 보호 화합물로서 단일 또는 조합 치료법에 유용할 수 있음을 확립한다.

[0022]

이러한 작업을 계속함에 있어서, PD로 고통받는 환자를 모니터링하고 평가하기 위한 신규한 방법이 본원에 기재된다. PD로 고통받는 환자에게 투여된 의학적 치료의 효능을 모니터링하고 평가하는 신규한 방법이 본원에 기재된다. 본원에 기재된 치료진단 방법은 의료 전문가가 질병의 진행을 늦추거나 저지할 수 있는 가장 좋은 기회를 갖는 PD 환자에 대한 치료 계획을 더욱 잘 개발할 수 있게 해준다.

[0023]

일 양태에서, 뇌척수액 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 결정하는 방법으로서, 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플에 대해 PAR-샌드위치 ELISA를 수행하여 CSF 중 PAR 농도를 결정하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.

[0024]

일부 구체예에서, 방법은 CSF 샘플 중 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플 중의 PAR 농도와 비교하는 것을 추가로 포함한다. 대조군 샘플은 동일한 환자 또는 다른 환자로부터 미리 수집된 CSF 샘플일 수 있다. 일부 양태에서, 하나 초과와 대조군 샘플이 사용된다. 각 대조군 샘플을 다른 모든 대조군 샘플로부터 독립적으로 선택된 다른 환자 또는 동일한 환자로부터 비롯될 수 있다.

[0025]

일부 양태에서, 대조군 샘플은, 시험 샘플을 대조군 샘플과 비교할 수 있게 하여 시험 샘플 중 PAR 농도를 결정할 수 있게 하는 공지된 농도의 PAR를 갖는 준비된 표준이다. 도 2에 도시된 것과 같은 제조된 대조군 표준이 사용될 수 있으며, 이에 의해 시험 샘플과 생성된 대조군 곡선을 비교하여 시험 샘플 중 PAR 농도의 정량화를

가능하게 한다.

- [0026] 샌드위치-ELISA의 설명은 본원의 다른 곳에 제공된다. 일부 양태에서, 포획 항체, 검출 항체 또는 이 둘 모두는 항-PAR 항체이다. 이들은 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있으며, 이들은 인간화될 수 있거나 없다. 일부 양태에서, 항체는 인간 조합 항체 라이브러리로부터 제조된 항-PAR 항체이다. 일부 양태에서, 인간 조합 라이브러리는 Bio-RAD[®]로부터 HuCAL[®] Technology이다. HuCAL[®] Technology의 예로서, 문헌 [Knappik, A. et al., (2000). "Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides," *J Mol Biol.*, 296:57-86, and Prassler, J. et al., (2011). "HuCAL PLATINUM, a synthetic Fab library optimized for sequence diversity and superior performance in mammalian expression systems," *J Mol Biol.*, 413:261-78] 참조(이 둘 모두는 이의 교시를 위해 참조로 통합됨).
- [0027] 검출 항체는 비색 또는 다른 검정에 의한 검출에 적합한 적어도 하나의 제제에 컨주게이션된다. 일부 양태에서, 제1 검출 항체에 특이적인 제2 검출 항체가 사용되며, 제2 검출 항체는 비색 또는 기타 검정에 의한 검출에 적합한 제제에 컨주게이션된다. 일부 양태에서, 비색 검정에 의한 검출에 적합한 제제는 비오틴이다. 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)는 비오틴에 강하게 결합하고, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)와 반응하여 착색 생성물을 형성한다. 일부 양태에서, 비색 검정은 HRP 및 TMB를 사용하여 환자의 CSF 샘플 중 PAR의 농도를 측정한다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 파킨슨병에 대한 의학적 치료의 치료 효능을 결정하는 방법으로서, 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0029] 일부 양태에서, 대조군 샘플은 동일한 환자로부터 미리 수집된 CSF 샘플이다. 미리 수집된 CSF 샘플은 과거 임의의 시간에 수집될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 현재 수집된 샘플 이전 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 12개월, 15개월, 18개월, 21개월, 24개월, 27개월, 30개월, 33개월 또는 36개월에 수집될 수 있다. 일부 양태에서, 샘플은 환자의 수명 동안 임의의 지점에서 수집된다. 이러한 샘플 수집은 환자 건강의 관련적 모니터링의 일부로서 규칙적으로 또는 반복적으로 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 대조군 샘플은 건강한 환자로부터 취해진다. 본원에 사용된 바와 같은 건강한, 환자가 테스트 결과에 영향을 끼칠 수 있는 의학적 상태의 어떠한 증상도 나타내지 않음을 의미한다. 일부 양태에서, 건강한 환자는 PD 또는 유사한 신경학적 병태의 어떠한 증상도 나타내지 않는다.
- [0030] PARP-1의 활성화 및 PAR의 축적은 PD의 신경병리에 관련되어, 본원에 기재된 일부 양태에서, 환자의 CSF 중 PAR 농도 증가는 환자가 PD를 갖거나 PD 발병 위험이 있음을 나타냄이 종래 입증되었다. 일부 양태에서, 환자의 PAR 농도가 동일한 환자로부터 미리 수집된 대조군 샘플보다 높은 경우, 환자의 PD는 악화됨을 나타낸다. 일부 양태에서, 동일한 환자로부터 미리 수집된 대조군 샘플과 비교하여 환자의 PAR 농도 증가는, 환자에 의해 수용된 의학적 치료가 질병의 진행을 저지하지 못함을 나타낸다.
- [0031] 본원에 기재된 방법 및 기술을 이용하여 또는 또 다른 방법에 의해 PD에 걸린 것으로 이전에 진단되고, 환자가 PD에 대한 의학적 치료를 받고 있는 환자에서, 환자의 PAR 농도가 동일한 환자로부터 사전 수집된 샘플의 PAR 농도와 비교하여 증가된 경우, 이는 의학적 치료가 질병을 저지하지 않음을 나타낸다. 이러한 경우, 의료 전문가는 동일한 치료를 계속할지의 여부 또는 환자에게 가해지는 치료를 변경할지의 여부를 결정할 것이다.
- [0032] 추가의 또 다른 양태에서, PD 환자의 질병 진행을 모니터링하는 방법으로서, 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0033] 일부 양태에서, 대조군 샘플은 동일한 환자로부터의 미리 수집된 CSF 샘플이다. 미리 수집된 CSF 샘플은 과거 임의의 시간에 수집될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 현재 수집된 샘플 이전 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 12개월, 15개월, 18개월, 21개월, 24개월, 27개월, 30개월, 33개월 또는 36개월에 수집될 수 있다. 일부 양태에서, 샘플은 환자의 수명 동안 임의의 지점에서 수집된다. 이러한 샘플 수집은 환자의 건강 및/또는 치료의 관련적 모니터링의 일부로서 규칙적으로 또는 반복적으로 수행될 수 있다.
- [0034] 초기 기간의 동일한 환자로부터 취해진 샘플과 PAR 농도를 비교할 경우, CSF 중 PAR 농도 증가는 환자 상태가 악화되고 있음을 나타낸다. 환자가 의학적 치료를 받고 있는 경우, 증가된 PAR 농도는 치료가 환자에 효과적이지 않음을 나타낼 것이다. PAR 농도가 동일하거나 낮은 경우, 이는 환자가 받고 있는 치료가 질병의 진행을 늦추거나 저지시키는데 효과적임을 나타낼 것이다. PAR 농도는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 샌드위치-

ELISA를 사용하여 측정된다.

- [0035] 추가의 또 다른 양태에서, 환자가 PD 발병 위험이 있는지를 진단하거나 결정하는 방법으로서, 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0036] 본 방법에 따르면, 일부 양태에서, 환자의 CSF 중 PAR 농도가 소정의 농도보다 높은 경우, 환자는 PD에 걸린 것으로 진단되거나 PD 발병 위험이 있다. 일부 양태에서, 소정의 농도는 건강한 환자의 CSF 중 PAR 농도이다. 일부 양태에서, 환자의 CSF 중 PAR 농도 측정은 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 샌드위치-ELISA를 사용하여 수행된다.
- [0037] 본 방법에 따르면, 환자가 건강한 환자로부터의 대조군 샘플 또는 동일한 환자로부터 미리 취해진 대조군 샘플보다 높은 PAR 농도를 갖는 경우, 환자는 PD를 갖는 것으로 진단되거나 PD 발병 위험이 있는 것으로 결정된다. 환자의 CSF 중 PAR 농도가 건강한 환자의 음성 대조군 또는 대조군 샘플 중 PAR 농도보다 낮거나 이와 동일한 경우, 환자는 현재 PD를 갖지 않거나 그 시점에서 PD 발병 위험이 낮다. PD의 궁극적 원인은 아직 알려지지 않았기 때문에, 환자에게 결코 PD가 발병되지 않을 것이라고 결론내리는 것은 불가능하다.
- [0038] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료진단"은 개별화된 치료 계획 또는 치료법이 특정 환자에 대해 개발되는 과정을 나타낸다. 상기 단어는 다양한 질병에 대해 더욱 구체적이고 개별화된 치료를 개발하고, 진단 및 치료 능력을 단일 작용제로 조합시키려는 지속적인 임상적 노력을 정의한다. 그 근거는 PD 및 알파 같은 많은 질병이 대단히 이종성이며, 현재 치료가 단지 제한된 환자 집단 또는 하위집단 및/또는 단지 특정 단계의 질병 진행에 대해서만 효과적이라는 점으로부터 발생한다. 희망은 진단과 치료법의 밀접한 조합이 개인에게 더욱 특정한 치료 프로토콜을 제공할 수 있으며, 따라서 개선된 예후를 제공할 가능성이 있다는 점이다.
- [0039] PD에 대한 표준 치료는 존재하지 않는다. 개별화된 치료 계획은 이들의 증상 및 전반적인 건강 상태를 기반으로 하여 각 환자에 대해 개발된다. 치료 옵션은 의약, 수술 및 라이프 스타일 변경을 포함한다. PD를 치료하는데 사용되는 의약의 예로는 비제한적으로, 레보도파(levodopa), 도파민 작용제, 아만타딘, 항콜린제, COMT 억제제 및 MAO-B 억제제를 포함한다. 수술 치료는 비제한적으로, 뇌심부 자극, 시상절제, 담창구절단 및 시상밑절제(subthalamotomy)를 포함한다. 라이프스타일 치료는 비제한적으로, 운동 및 다이어트를 포함한다. 많은 환자는 종종 허브 및 비타민 보충제를 포함할 수 있는 소위 "대체 의약"을 탐색한다. 추가적인 치료는 임상 시험에서 항상 연구중에 있다. 일부 양태에서, 환자는 PD에 특이적인 의학적 치료의 적어도 하나의 유형을 수용한다. 환자에 대한 최적의 조합을 결정하기 위해 환자가 다수의 다양한 유형의 의학적 치료를 받는 것은 드문 일이 아니다. 얼마나 많은 다양한 유형의 의학적 치료가 환자에 부여되는지에 관계 없이, 본원에 기재된 방법 및 기술은 환자에서 PAR 농도를 평가하고, 의학적 치료 또는 이들 치료의 조합의 치료학적 효능을 결정하는데 적합하다.
- [0040] 또한, PD 환자에 대해 개별화된 치료 계획을 개발하는데 있어서 의료 전문가를 돕는 치료진단 방법이 본원에 기재된다. 상기 방법은 PD에 대해 적어도 하나의 의학적 치료를 받고 있는 환자로부터 뇌척수액(CSF)의 샘플을 수집하고, CSF 샘플 중 폴리(ADP-리보스)(PAR) 농도를 측정하고, 환자의 PAR 농도를 적어도 하나의 대조군 샘플의 PAR 농도와 비교하는 것을 포함한다.
- [0041] 의학적 치료가 본원의 다른 곳에 기재된 임의의 치료일 수 있거나, 이는 의료 전문가에 의해 또는 이의 관리 하에 부여된 임의의 다른 치료일 수 있다. 일부 양태에서, 적어도 의약이 효과를 가질 것으로 예상되는 기간 동안 환자에게 의약을 투여하고, 환자의 PAR 농도가 증가되는 경우, 방법은 의약이 환자에게 투여되는 방식을 변경하는 것을 추가로 포함한다. 의약이 투여되는 방식의 변경은 의약의 용량 증가 또는 감소를 포함할 수 있다; 이는 약물이 환자에 의해 취해지거나 환자에게 투여되는 빈도를 증가 또는 감소시키는 것을 포함할 수 있다; 이는 환자에게 투여되는 특정 의약의 교체 또는 제거를 포함할 수 있다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 환자의 CSF 중 PAR 농도가 동일한 환자로부터의 미리 수집된 CSF 샘플과 비교하여 증가된 경우, 의료 전문가는 환자에 의해 수용되는 의학적 치료를 변경하여 추가적인 형태의 치료를 가할 수 있다. 예를 들어, 환자가 치료로서 하나 이상의 의약만을 수용한 경우, 의료 전문가는 제2 의약(예를 들어, 도파민 작용제)의 추가를 권고할 수 있다. 의료 전문가가 환자의 의학적 치료를 변경하는 정확한 특성은 환자의 의학적 필요 및 의료 전문가의 전문적 판단에 근거하여 개별화될 것이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "바이오마커"는 국립 보건원 바이오마커 정의 작업 그룹(National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group)에 의해 확립된 정의를 나타낸다. 이는 "치료적 개입에 대한 정

상적인 생물학적 과정, 병원성 과정 또는 약리학적인 반응의 지표로서 객관적으로 측정되고 평가되는 특징"이다. 또한, PD에 대한 바이오마커로서 환자의 CSF 중 PAR의 용도가 본원에 기재된다. 본원의 다른 곳에 기재된 방법은 PD에 걸린 환자를 진단하거나 환자가 PD 발병 위험이 있는지의 여부를 결정하는데 적합하다. 환자의 CSF 중 PAR의 증가된 농도는 환자가 PD 발병 위험이 있음을 나타내거나 PD를 나타낸다. 환자가 PD의 증상을 이미 나타내는 경우, 환자의 CSF 중 PAR의 증가된 농도는 환자가 PD를 가짐을 시사한다. PD의 증상은 비제한적으로, 떨림 또는 흔들림, 글씨 또는 언어 패턴의 변화, 후각 손실, 수면 장애, 보행 또는 움직임 장애, 운동 둔화, 변비, 가면 얼굴, 현기증 또는 실신, 또는 구부정하거나 기울어진 자세를 포함한다. 환자의 CSF 중 증가된 PAR 농도와 결합된 PD의 이러한 초기 경고 징후는 환자가 PD가 있음을 시사한다. 이러한 진단을 확인하는데 추가의 평가가 필요할 수 있다. 또한, PD에 대한 바이오마커로서 PAR의 용도가 본원에 기재된다. 환자의 CSF 중 PD의 증가된 농도 검출은 환자가 PD를 갖거나 PD 발병 위험이 있음을 나타낸다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 "샌드위치 ELISA"는 도 2에 도시된 바와 같이, 샘플 항원 검출 및 정량화에 매우 특이적인 전통적인 ELISA의 변형이다. 샌드위치 ELISA는 항체의 두 층(즉, 포획 항체 및 검출 항체) 사이의 항원을 정량화한다. 적어도 2개의 항체가 샌드위치로 작용하기 때문에, 측정하고자 하는 항원은 항체에 결합할 수 있는 적어도 2개의 항원 에피토프를 함유해야 한다. 모노클로날 또는 폴리클로날 항체는 샌드위치 ELISA 시스템에서 포획 항체 및 검출 항체로서 사용될 수 있다. 모노클로날 항체는 항원 간의 작은 차이의 미세한 검출 및 정량화를 허용하는 단일 에피토프를 인지하는 반면, 폴리클로날 항체는 가능한 많은 항원을 포획하기 위한 포획 항체로서 종종 사용된다. 샌드위치 ELISA의 한 이점은 샘플 제조의 용이성에 있으며, 이는 샘플이 분석 전 정제될 필요가 없음을 의미한다. 샌드위치 ELISA의 또 다른 이점은 특이적 항원을 검출하고 정량화하기 위한 기술의 민감성이다.

[0045] 본원에 기재된 바와 같은 샌드위치 ELISA의 일부 양태에서, 포획 항체는 플레이트, 칩 또는 다른 물리적 구조체에 고정된다. 제2 단계에서, 고정화된 포획 항체는 표적 단백질을 포함하는 샘플에 노출된다. 본원에 기술된 바와 같이, 표적 단백질은 PAR이다. 소정의 기간 후, 제1 검출 항체가 첨가되어 고정된 포획 항체에 결합된 항원에 결합된다. 일부 구체예에서, 제2 검출 항체가 첨가되어 제1 검출 항체에 결합한다. 모든 구체예에서, 검출 항체 중 적어도 하나는 검출가능한 기재를 포함할 것이다. 검출가능한 기제는 추가적인 시약과 반응하여 검출가능하고 정량화가능한 생성물을 형성할 수 있는 효소일 수 있거나, 검출가능한 기제는 추가의 반응 없이 검출될 수 있다. 일부 구체예에서, 검출가능한 기제는 비오틴이다. 모든 구체예에서, 검출가능한 기제의 검출가능하고 정량화 가능할 것이다. 일부 구체예에서, 기질의 검출은 비색적일 것이다.

[0046] 본원에 기재된 샌드위치 ELISA에 사용하기에 적합한 인간 항체는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 당업계에 기술되어 있다(문헌 [Kozbor J., Immunol. 133:3001, 1984.; Brodeur et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications," Marcel Dekker, Inc., New York, 1987], 이 둘 모두는 이의 교시를 위해 참조로서 통합됨). 일부 양태에서, 항체는 인간 조합 항체 라이브러리로부터 제조된 항-PAR 항체이다(예를 들어, Bio-RAD[®]로부터의 HuCAL[®] Technology).

[0047] α -syn PFF가 PARP의 활성화를 유도하는지의 여부를 결정하기 위해, PAR의 수준은 α -syn PFF의 일차 마우스 피질 뉴런으로 투여 후 매우 민감하고 특이적인 PAR 모노클로날 항체를 사용하여 측정된다(도 5 내지 12). α -syn PFF(1 μ g/ml)는 3일 내지 7일에 PARP 활성화 피크를 유도하였으며, 14일 이하 동안 증가된 상태를 유지하였다(도 5). PAR 증가가 수반하는 것은 프로피디움 아이오다이드(PI) 염색에 의해 평가되는 바와 같이 뉴런의 사멸이다(도 6 및 7). PARP 억제제, ABT-888(벨리파립(veliparib))(10 μ M), 또는 AG-014699(루카파립(Rucaparib))(1 μ M) 또는 BMN 673(탈라조파립(Talazoparib))(10 μ M)으로의 피질 뉴런의 처리는 α -syn PFF-매개된 PARP 활성화 및 세포 사멸을 예방한다(도 6, 7 및 8). 이들 PARP 억제제는 또한, 면역염색에 의해 평가되는 바와 같이 세린 129에서 α -syn의 α -syn PFF-매개된 인산화(p- α -syn)(도 37 및 38) 및 면역블롯 분석에 의해 나타난 바와 같이 α -syn 응집을 감소시키며(도 39 및 40), 이 둘 모두는 α -시누클레인병증의 병리와 관련된다. PARP-1이 파르타나토스에서 중요한 역할을 수행하기 때문에, PARP-1은 PARP-1에 대한 가이드 RNA를 수반하는 아데노 결합된 바이러스(AAV) 형질도입을 통해 CRISPR/Cas9를 사용하여 피질 뉴런으로부터 제거되거나(도 9, 10 및 41), PARP-1 녹아웃으로부터의 피질 배양에 사용되었다(도 11, 12 및 42 내지 46). PARP-1의 결실 또는 녹아웃은 α -syn PFF-매개된 PARP 활성화 및 세포 사멸을 예방한다(도 9 내지 12, 41 및 42). PARP1의 녹아웃은 또한 면역블롯 분석에 의해 나타난 바와 같이 p- α -syn 면역염색 및 α -syn 응집을 감소시킨다(도 43 내지 46). 광범위 스펙트럼 카스파제 억제제 Z-VAD-FMK(Z-VAD)로의 피질 뉴런의 처리는 부분적으로 α -syn PFF

독성을 감소시킨다. 네크로토시스 억제제 네크로스타틴-1(Nec-1) 및 오토파지 억제제 3-메틸아데닌(3-MA)은 효과를 갖지 않는 반면, PARP 억제제 ABT-888은 α -syn PFF 독성을 방지한다(도 47 및 48). PARP 억제 및 PARP-1의 녹아웃이 p- α -syn 면역염색의 감소에 의해 나타난 바와 같이 병리학적인 α -syn의 축적을 감소시키기 때문에, α -syn의 세포-대-세포 전달은 종래 기술된 바와 같이 평가되었다. PARP-1의 녹아웃은 병리학적인 α -syn의 세포-대-세포 전달을 감소시킨다(도 49 내지 51). 종합된 이들 결과는 α -syn PFF가 파르타나토스를 통해 뉴런을 주로 치사시키며, PARP-1이 병리학적인 α -syn의 생성에 기여함을 시사한다.

[0048]

합성 α -syn PFF가 파르타나토스를 통해 일차 피질 뉴런을 치사하기 때문에, 파르타나토스가 표준의 검증된 프로토콜을 사용하여 α -syn PFF의 선조체내 주입 후 DA 뉴런의 손실에 역할을 수행하는지를 결정하기 위해 실험을 수행하였다(도 13 내지 18). α -syn PFF(5 μ g)의 단일 선조체내 주입은 PAR 수준을 평가함으로써 결정되는 바와 같이 PARP 활성화를 유도한다(도 13). α -syn PFF의 PARP-1 녹아웃 마우스로의 선조체내 주입은 PAR 수준을 증가시키는데 실패한다(도 13). α -syn PFF의 단일 선조체내 주입은 WT 마우스에서 주입 후 6개월째에 DA 뉴런의 대략 50% 손실로 이어진다(도 14 및 15). 대조적으로, α -syn PFF의 PARP-1 녹아웃 마우스내로의 단일 선조체내 주입은 DA 세포 손실을 유도하는데 실패한다(도 14 및 15). 또한, WT 마우스에 PARP 억제제 ABT-888(125 mg/kg)을 함유하는 식단을 공급하고, 대조군 식단이 주어진 마우스와 비교하였다(도 14 및 15). ABT-888로 처리된 마우스는 대조군 식단의 마우스와 비교하여 α -syn PFF의 선조체내 주입 후 DA 뉴런의 현저하게 더 적은 손실을 나타낸다(도 14 및 15). ABT-888은 또한 PAR 수준에 있어서 α -syn PFF 유도된 증가의 형성을 감소시킨다(도 52). 티로신 하이드록실라제(TH) 및 도파민 수송인자(DAT) 수준은 또한 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되는 바와 같이 α -syn PFF에 대해 반응하여 WT 마우스에서 감소되는 반면, TH 및 DAT 수준의 감소는 PARP-1 녹아웃 마우스 또는 ABT-888 처리된 ST 마우스에서 방지된다(도 52 내지 54). DA 뉴런의 손실을 수반하는 것은 HPLC에 의해 결정되는 바와 같이 WT 마우스에서 선조체 DA 및 이의 대사산물의 감소이나, PARP-1 녹아웃 마우스 또는 ABT-888 처리된 마우스에서는 그렇지 않다(도 16, 57, 58 및 59). 선조체내 α -syn PFF의 주입은 WT 마우스의 DA 뉴런에서 p- α -syn에 대한 면역염색(도 60 내지 63) 및 웨스턴 블롯(도 52, 55 및 56)에 의해 평가된 바와 같이 α -syn 병리로 이어진다. α -syn 병리는 각각 신경변성의 부재 및 감소와 일치하여 PARP-1 녹아웃 마우스 및 ABT-888 처리된 WT 마우스에서 현저하게 감소된다. α -syn PFF의 선조체내 주입은 WT 마우스에서 폴 테스트, 도파민 기능의 민감성 행동 측정에서 결손을 초래하는 반면, PARP-1 녹아웃 마우스 및 ABT-888 WT 처리된 마우스에서는 결손이 없었다(도 17 및 64). 앞다리와 뒷다리 및 앞다리 악력 강도 둘 모두는 또한 α -syn PFF 주입 후 WT 마우스에서 감소되었으나, PARP-1 녹아웃 또는 ABT-888 처리된 WT 마우스에서는 그렇지 않다(도 18 및 65). 종합하면, 이들 결과는 DA 뉴런의 선조체 α -syn PFF-유도된 손실이 PARP-1에 의존적임을 나타낸다.

[0049]

PAR은 응집을 유도하는 본질적으로 무질서한 단백질의 액체 탈혼합을 초래하기 때문에, 실험은 PAR이 α -syn 응집을 씨앗하고 가속화시킬 수 있는지의 여부를 결정하기 위해 수행되었다. 재조합 α -syn은 37°C에서 인큐베이션하고, 뇌 조직에서 관찰되는 농도인 5 nM의 PAR의 존재 및 부재하에 진탕시켰다. PAR의 부재하에 α -syn의 고분자량 형태는 인큐베이션 4시간만큼 초기에 관찰되며, α -syn은 시간에 따라 계속해서 피브릴화된다(도 19). α -syn의 다양한 분자량 형태가 72시간째에 관찰된다. PAR의 존재하에, α -syn의 피브릴화는 인큐베이션 24h 만큼 초기에 관찰되는 α -syn의 다양한 분자량 형태로 현격하게 가속화된다(도 19). 티오플라빈 T 형광은 또한, PAR이 α -syn의 피브릴화를 가속화시키는 반면, PAR 단독은 티오플라빈 T 형광에 영향을 미치지 않음을 나타낸다(도 20). α -syn의 피브릴화의 PAR 매개된 가속화에 대한 온도 효과를 또한 평가하였다(도 66). PAR은 PAR의 부재하에 α -syn 피브릴화에 대해 허용되지 않는 온도에서 α -syn의 피브릴화를 초래한다(도 66). 투과전자현미경(TEM)을 사용하여 α -syn 피브릴의 형성을 모니터링하였다. PAR의 부재하에 α -syn 피브릴은 12시간째에 형성되기 시작하며, 72시간의 진탕 및 37°C에서의 인큐베이션 후 완전하게 형성되고 광대해진다(도 3c). 대조적으로, PAR의 존재하에, α -syn은 12시간째에 광대하게 피브릴화되며, 24 및 72시간째에 더욱 광대하게 피브릴화된다(도 21). 36시간째에 PAR의 존재하에 α -syn 피브릴화의 농도 의존성을 모니터링하였다. 1 nM PAR은 5 nM PAR에서 발생하는 피크 응집과 α -syn 피브릴화를 향상시킬 수 있는 반면, 20 nM PAR은 α -syn 피브릴화를 눈에 띄게 증가시키지 않는다(도 67 및 68). PAR은 고도로 음으로 하전된 분자이기 때문에, 또 다른 고도로 하전된 폴리머인 폴리A의 효과를 평가하였으며, α -syn 피브릴화에 영향을 끼치지 않았다(도 69 및 70). ADP 리보스 모노머는 또한 α -syn 피브릴화에 영향을 끼치지 않았다(도 69 및 70). 내생적 PAR 형성이 α -syn 피브릴화를 가속화시킬 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, AAV- α -syn 형질도입 후 WT 인간 α -syn을 과다발현하는 일차 마우스 피질 뉴런을 독성 용량의 N-메틸-D-아스파르테이트(NMDA)로 처리하였다. WT 배양물에서, NMDA 처리는 PAR 면역블롯에 의해 평가된 바와 같이 PARP의 활성화 및 α -syn의 동시적 응집으로 이어지는 반면, NMDA로 처리된 PARP-1 KO 배양물에서는 α -syn이 응집하지 않았다(도 22). 바이오포터를 통한 PAR의 외인성 투여는 AAV- α -syn이 형질도입된 PARP-1 KO 배양물 및 WT 둘 모두에서 α -syn의 응집을 증가시키며(도 71), 이는 PARP-1은

아닌 PAR이 α -syn 응집을 직접적으로 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 2개의 상이한 억제제인 ABT888 및 AG014699는 NMDA 투여에 반응하여 α -syn 응집 및 PARP 활성화를 방지한다(도 23). SH-SY5Y 세포에서, 강력한 PARP 활성인자 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)은 SH-SY5Y 세포에서 과다발현된 WT 또는 A53T α -syn의 응집을 향상시키는 반면, MNNG는 PARP-1 KO SH-SY5Y 세포에 영향을 미치지 않는다(도 72 및 73). PAR의 외인성 투여는 SH-SY5Y WT 및 SH-SY5Y PARP-1 KO 배양물 둘 모두에서 α -syn의 응집을 증가시켰다(도 74). 2개의 상이한 PARP 억제제인 ABT888 및 AG014699는 SH-SY5Y 세포에서 MNNG 투여에 반응하여 α -syn 응집 및 PARP 활성화를 방지한다(도 75).

[0050] PAR이 α -syn PFF의 생물물리학적 특성을 변화시키는 지의 여부를 결정하기 위해, 일련의 생화학적 분석을 PAR(PAR- α -syn PFF)의 존재하에 α -syn PFF 및 PAR- α -syn PFF를 사용하여 수행하였다. 먼저, α -syn PFF의 프로테아제 K(PK) 분해를 수행하고, α -syn 면역블롯에 의해 모니터링하였다. α -syn PFF 및 PAR- α -syn PFF는 PK 분해 후 매우 뚜렷한 밴딩 패턴을 보였으며, PAR- α -syn PFF는 증가하는 농도의 PK에 대해 더욱 내성이 된다(도 24). PAR- α -syn PFF는 더 높은 농도의 PK에서만 유사한 분해 밴드를 갖는 α -syn의 비분해된 밴드(1^{st} 밴드)를 우세하게 보여주는 반면, α -syn PFF는 더 낮은 농도의 PK(0.5 및 1 μ g/ml)에서 더 작은 단편으로 분해되며(2^{nd} 내지 5^{th} 밴드), 이들 밴드는 더 높은 농도의 PK(1.5-2.5 μ g/ml)에서 우세하게 되었다(도 24). α -syn에 대한 에피토프 특이적 항체를 사용하여, PAR은 대부분의 α -syn 영역이 PK 분해에 대해 내성을 갖게 하는 것으로 밝혀졌다(도 76). PAR- α -syn PFF의 PK 분해에 대한 내성은 PAR이 α -syn PFF보다 더욱 미스폴딩되고 조밀한 구조를 갖는 구별되는 α -syn PFF 종의 형성을 유도함을 시사한다. 그 후, α -syn PFF 및 PAR- α -syn PFF-유도된 뉴런 세포 사멸을 배양된 뉴런에서 비교하였다. 처리 14일 후, α -syn PFF로의 처리와 비교하여 PAR- α -syn PFF로 처리된 배양물에서 현저한 세포 사멸이 존재한다(도 77). PAR 자체는 심지어 더 높은 농도 (20 nM)에서 현저한 세포 사멸을 초래하지 않는다(도 77). 신경병리의 효력을 추가로 확인하기 위해, p- α -syn 면역반응성을 다양한 농도의 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF의 처리 후 모니터링하였다. p- α -syn 면역반응성은 500 ng의 α -syn PFF와 동등한 수준에서 20 ng의 PAR- α -syn PFF에서 관찰되었으며, 이는 α -syn PFF의 PAR 변형이 독성을 25배 증가시킴을 시사한다(도 78 및 79). PAR- α -syn PFF는 더 높은 농도에서 p- α -syn 면역반응성을 현저하게 증가시켰다(도 78 및 79). 다양한 시점에서 포스포- α -syn 면역반응성을 또한 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF에 노출된 배양된 뉴런에서 모니터링하였다. PAR의 부재하에, α -syn PFF 처리는 처리 후 1일에 간신히 검출가능한 p- α -syn 면역반응성을 유도한 반면, PAR- α -syn PFF 처리는 처리후 1일만큼 초기에 검출가능한 수준의 p- α -syn 면역반응성을 유도하며, 7일째에 면역반응성을 현격하게 향상시킨다(도 25). α -syn의 면역블롯 분석은 응집되고 인산화된 α -syn이 4일째에 검출가능한 반면, PAR의 부재하에, 이러한 종의 α -syn이 처리 7일후에만 검출가능함을 나타낸다. PAR의 존재하에, α -syn의 응집된 형성이 증가된다(도 26).

[0051] PAR- α -syn PFF 종이 생체내에서 향상된 신경독성을 나타내는지의 여부를 결정하기 위해, PAR- α -syn PFF(5 μ g)의 단일 선조체내 주입은 α -syn PFF (5 μ g)의 것과 비교하였다. PAR- α -syn PFF 주입 후 1개월 후 SNpc의 주입 측에 동측으로 DA 뉴런의 손실 및 3개월후 DA 뉴런의 현저한 손실을 띠는 경향이 있는 반면, α -syn PFF 주입은 이들 시점에서 영향을 미치지 않았다(도 27, 28 및 80). PAR- α -syn PFF 또는 α -syn PFF 주입 후 6개월째에 DA 뉴런의 손실에서 현저한 차이는 없다(도 27, 28 및 80). 어느 시점에서도 주입 측에 대해 대측으로 DA 뉴런의 현저한 손실이 없다(도 81 및 82). PAR 주입 자체는 DA 뉴런 수에 영향을 미치지 않는다(도 27, 28 및 80). PAR- α -syn PFF는 또한 HPLC에 의해 결정되는 바와 같은 선조체 DA 및 이의 대사산물의 손실을 가속화시키며, DA 및 이의 대사산물의 현저한 감소가 α -syn PFF와 대조적으로 PAR- α -syn PFF 주입 후 1개월째에 관찰된다(도 29 및 83 내지 90). PAR- α -syn PFF 또는 α -syn PFF 주입 후 3 및 6개월째에 DA 및 이의 대사산물의 손실에서 현저한 차이는 없다(도 29 및 83 내지 90). TH 및 DAT 수준은 또한, 주입 후 3개월째에 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정되는 바와 같이 α -syn PFF와 비교하여 PAR- α -syn PFF 후 감소된 반면, 6개월째에는 손실 정도에서의 차이가 없다(도 91 내지 94). DA 뉴런에서 p- α -syn에 대해 면역염색에 의해 평가되는 바와 같이 α -syn 병리는 주입 후 3개월 및 6개월째에 α -syn PFF와 비교하여 PAR- α -syn PFF에 의해 증가되었다(도 30 및 31). PAR- α -syn PFF는 3개월째에 DA 뉴런의 손실 및 DA 결손과 일치하게 3개월째의 폴 테스트에 대한 결손을 초래하는 반면, α -syn PFF 또는 PAR 주입된 마우스에서 현저한 결손은 없었다(도 32 및 93). 앞다리 플러스 뒷다리 및 앞다리 악력 둘 모두가 또한 PAR- α -syn PFF에서 감소되었으나, 3개월째에 α -syn PFF 또는 PAR 주입 마우스에서는 그렇지 않았다(도 33 및 94). 6개월째에, PAR- α -syn PFF 또는 α -syn PFF에 의해 유도된 행동적 결손에서 현저한 차이가 없다(도 32, 33, 92 및 94). 종합하면, 이들 결과는 PAR- α -syn PFF가 생체내에서 α -syn PFF보다 실질적으로 더욱 신경독성임을 나타낸다.

[0052] PAR이 PA 환자에서 역할을 담당하는지의 여부를 결정하기 위해, PAR에 대한 민감성 ELISA를 사용하여 PD 환자

대 대조군의 CSF(표 1) 중 PAR 수준을 모니터링하였다(도 95). PAR 수준은 2개의 독립된 환자 코호트에서 대조군과 비교하여 PD 환자에서 증가된다(도 34 및 35). 종래 보고된 바와 같이, PD 환자의 흑질 중 PAR 수준은 대조군과 비교하여 증가된다(도 96 및 97, 및 표 2). PAR 면역반응성은 PD 환자의 루이소체에서 α -syn와 공동화(colocalize)된다(도 36).

[0053] 결과는 α -syn PFF가 세포 사멸 공정 설계된 파르타나토스에서 PARP-1의 활성화를 통해 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 뉴런을 치사시킴을 나타낸다. PARP-1의 녹아웃 및 PARP의 억제제 선조체내 α -syn PFF 주입에 의해 개시된 신경변성 및 행동 결손을 방지한다. 파르타나토스의 활성화는 α -syn PFF 신경변성의 일차 구동인자로 보이는데, 네크로토시스 및 오토파지 억제제는 α -syn PFF 신경독성에 영향을 끼치지 않으며, 카스파제 억제제에 의한 단지 완전한 보호가 존재하기 때문이다. α -syn PFF는 염증 매개인자 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이는 아마도 세포 사멸에 부분적으로 기여하며, 광범위한 카스파제 억제제인 ZVAD에 의한 완전한 신경보호를 설명해준다.

[0054] 최근 연구는 α -시누클레인병증의 다양한 특성에 기여하는 구별되는 신경독성, 씨딩 능력 및 증식을 나타내는 α -syn 중의 구조 변형체를 확인하였다. α -syn PFF가 PARP 활성화 및 PAR 축적을 유도함을 고려하면, PAR은 α -syn 피브릴화를 가속화시키고, α -syn PFF의 생화학적 특성을 변화시켜 이를 더욱 독성인 종으로 전환시킨다. PAR- α -syn PFF가 부모 α -syn PFF와 비교하여 α -syn 응집 및 신경독성에서 약 25배 증가를 보여주는 관찰이 이러한 개념과 일치된다. 게다가, PAR- α -syn PFF-주입된 마우스는 α -syn PFF 주입된 마우스와 비교하여 가속화된 질병 진행 및 표현형을 보여준다. 배양된 뉴런 및 마우스 뇌에서 증가되는 PAR 수준 이외에, PD의 PAR 수준이 흑질뿐만 아니라 CSF에서 증가됨이 관찰되었다. PD 환자의 CSF 및 뇌에서 PAR의 증가 및 PD 환자의 흑색질에서 PARP 활성화 증가는, PARP 활성화가 파르타나토스를 통한 PD의 병인 및 α -syn의 더욱 독성인 종으로의 전환에 기여함을 시사한다.

[0055] 이러한 기술된 설명은 최상의 모드를 포함하여 본 발명을 기재하고, 또한 임의의 장치 또는 시스템을 제조 및 사용하고, 임의의 통합된 방법을 수행하는 것을 포함하여 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하기 위해 예시를 이용한다. 본 발명의 특허가능한 범위는 청구범위에 의해 규정되고, 당업자에게 발생하는 다른 예를 포함할 수 있다. 이러한 다른 예는 이들이 청구범위의 언문과 상이하지 않은 구조적 요소를 가지거나 청구범위의 언문과 비현실적으로 상이한 등가의 구조적 요소를 포함하는 경우 청구범위의 범위내에 있는 것으로 의도된다.

[0056] 실시예

[0057] 동물

[0058] C57BL/6 마우스는 The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)로부터 입수하였다. PARP-1 KO 마우스는 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)로부터 입수하였다. WT 및 PARP1 KO 마우스의 새끼를 실험에 사용하였다. 모든 주거, 육종 및 절차는 실험 동물 관리 사용을 위한 NIH 가이드(the NIH Guide for the Care and Use of Experimental Animals)에 따라 수행되었으며, 존스 홉킨스 유니버시티 동물 관리 및 사용 위원회(Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

[0059] α -syn PFF 및 PAR- α -syn PFF의 제조

[0060] 제조합 마우스 α -syn 단백질을 정제하였다. α -syn PFF를 씨모믹서(37℃에서 1,000 rpm)(Eppendorf)로 α -syn을 일정하게 진탕함으로써 PBS에서 제조하였다. 인큐베이션 7일 후, α -syn 응집물을 PBS로 0.1 mg/ml로 희석하고, 10% 진폭에서 30s 동안(0.5 sec 펄스 온/오프) 초음파처리하였다(Branson Digital Sonifier, Danbury, CT, USA). α -syn PFF를 사용때까지 -80℃에서 유지시켰다. PAR 폴리머의 합성 및 정제는 다른 곳에 기술된 바와 같이 수행하였다. PAR- α -syn PFF를 α -syn 피브릴화 반응에서 5 nM 또는 지시된 용량의 PAR을 첨가함으로써 제조하였다.

[0061] α -syn PFF의 정위적 주입

[0062] 2 내지 3월령 WT 및 PARP1 KO 마우스를 케타민(100 mg/kg) 및 자일라진(10 mg/kg)의 혼합물로 깊게 마취시켰다. PBS, α -syn PFF, PAR- α -syn PFF 또는 PAR을 다음 좌표로 단독으로 선조체(반구 당 2 μ l, 0.4 μ l/min)내에 주입하였다: 브레그마로부터 앞뒤(AP) = +2.0 mm, 양측(ML) = $\pm$ 2.0 mm, 배측(DV) = +2.8 mm. 주입 후, 바늘을 용액의 완전한 흡수를 위해 추가로 5 min 동안 유지시켰다. 수술 후, 동물을 모니터링하고, 수술 후 관리를 제공하였다. 주사 후 1, 3 및 6개월째에 행동 시험을 수행하고, 마우스를 생화학적 및 조직학적 분석을 위해 안락사시켰다. 생화학적 연구를 위해, 조직을 즉시 절제하고, -80℃에서 냉동시켰다. 조직학적 연구를 위해, 마우스를 PBS 및 4% PFA로 관류시키고, 뇌를 제거한 후, 밤새 4% PFA로 고정시키고, 동결방지를 위해

30% 수크로스로 옮겼다.

[0063] 티오플라빈 T(ThT) 결합 검정

[0064] PAR의 존재 또는 부재하의 α -syn 피브릴화를 ThT 형광으로 모니터링하였다. 인큐베이션 혼합물로부터 5 μ L의 분취액을 다양한 시점에서 취하고, PBS 중의 25 μ M ThT로 100 μ L로 희석하고, 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 형광을 SpectraMax 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm 여기 및 510 nm 방사에서 기록하였다(Molecular Devices, Sunnyvale, CA). 실험을 삼중으로 수행하였다.

[0065] 투과전자현미경(TEM) 측정

[0066] α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF를 흡착시켜 방전된 400 메쉬 탄소 코팅된 구리 그리드(Electron Microscopy Sciences)를 2 min 동안 글로(glow)시키고, Tris-HCl(50 mM, pH 7.4)로 2회 신속하게 세척하고, 각각 30 s 동안 2방울의 0.75% 우라닐 포르메이트를 부유시켰다. 그리드를 건조시킨 후 80 kV에서 작동하는 Phillips CM 120 TEM에서 이미지화시켰다. 이미지를 첨단 현미경 기술에 의해 ER-80 CCD (8 메가픽셀)로 캡처하고 디지털화시켰다.

[0067] PAR의 세포내 전달

[0068] 정제된 PAR을 제조업자의 지시에 따라 BioPORTER (Genelnatis, San Diego, CA)를 사용하여 세포내 전달하였다. PAR 폴리머를 PBS로 요망되는 농도로 희석하였다. 희석된 용액을 건조된 BioPORTER 시약에 첨가하고, 부드럽게 혼합한 후, 실온에서 5 min 동안 인큐베이션하였다. BioPORTER-PAR 복합물을 무혈청 배지에서 세척한 후 세포 배양물에 첨가하고, 37°C에서 3-4h 동안 인큐베이션하였다. 후속하여 배양물을 실험에 사용하였다.

[0069] 조직 세포용해물 제조 및 웨스턴 블롯 분석

[0070] 인간 사후 뇌(표 1) 또는 마우스 뇌 조직을 균질화하고, Diac 900 균질화기(Sigma-Aldrich)를 사용하여 세포용해 완충액[50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton x-100, 0.5 % SDS, 0.5 % 소듐-데옥시콜레이트, 포스파타제 억제제 혼합물 I 및 II(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 및 완전 프로테아제 억제제 혼합물(Roche, Indianapolis, IN, USA)]에서 제조하였다. 균질화 후, 샘플을 완전한 세포용해를 위해 4°C에서 30 min 동안 회전시키고, 균질화물을 20 min 동안 15,000 g에서 원심분리하고, 상청액을 추가 분석에 사용하였다. 단백질 수준을 BCA 검정(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 정량화시키고, 샘플을 SDS-폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 분리하고, 니트로셀룰로스 막 상에 전달하였다. 막을 1h 동안 TBS-T(0.1% Tween-20을 갖는 Tris-완충된 염수)에서 5% 무지방 밀크로 차단하고, 일차 항체(표 3)를 사용하여 프로빙시키고, 적절한 HRP-컨쥬게이션된 이차 항체와 인큐베이션하였다. 밴드를 ECL 기판에 의해 가시화시켰다.

[0071] 표 1. 도 34에 사용된 대조군 및 PD CSF의 임상 정보

군	연령	성별	군	연령	성별
대조군 (n=31)	72	F	PD (n=80)	64	F
	82	F		74	M
	82	M		63	M
	56	F		70	M
	70	F		67	M
	69	F		67	M
	67	F		74	F
	57	F		67	M
	70	F		57	M
	66	F		72	M
	78	M		56	F
	46	F		77	F
	61	F		68	M
	68	M		75	F
	54	F		67	M
	66	F		52	M
	46	F		55	M
	76	M		75	M
	68	M		67	M
	74	M		63	M
	57	F		65	F
	64	F		74	F
	65	F		69	M
	69	F		76	M

[0072]

	82	F		64	M
	71	M		56	M
	55	M		60	F
	67	F		58	F
	60	M		49	M
	74	F		49	M
	69	M		66	M
PD (n=80)	66	M		54	M
	70	M		74	F
	87	M		64	M
	56	F		64	M
	69	F		68	M
	55	F		68	F
	72	M		67	F
	66	M		68	M
	56	F		70	M
	78	M		63	M
	70	F		64	M
	59	F		78	M
	57	M		69	M
	61	M		58	F
	61	M		61	M
	73	M		68	M
	71	M		79	M
	57	M		66	M
	69	F		56	F
	62	M		66	M
	51	F		68	M

	68	F		74	M
	59	F		75	M
	61	M		64	F
	70	M			
요약된 정보					
군	평균 연령 ± s.e.m.	F/M 비 (%)	군	평균 연령 ± s.e.m.	F/M 비 (%)
대조군	66.9 ± 1.69	67.7 / 32.3	PD	66.0 ± 0.85	31.2 / 68.8

세포 배양, 형질감염, 일차 뉴런 배양 및 처리

SH-SY5Y 세포(ATCC)를 10% 소태 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 5% CO₂ 하에 37°C에서 배양하였다. 세포를 제조업자의 지시에 따라 PolyFect 시약(Qiagen)을 이용하여 형질감염시켰다. WT 또는 PARP1 KO 배아로부터의 일차 피질 뉴런을 제조하였다. 간략하게는, 일차 피질 뉴런을 B-27, 0.5 mM L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신(Invitrogen, Grand Island, NY)이 보충된 신경기저 배지에서 배아 16일에 배양하였다 (Invitrogen, Grand Island, NY). 뉴런을 3-4일마다 새로운 배지로 교체하였다. ABT-888(10 μM), AG-014699(1 μM), BMN 673(10 μM), Z-VAD(20 μM), Nec-1(20 μM) 또는 3-MA(500 μM)로 뉴런을 전처리한 후 1h째에 α-

syn PFF로 처리하였다. α -syn PFF를 시험관내(DIV)에서 7일째에 첨가하고, 지시된 시간 동안 추가로 인큐베이션한 후 세포 사멸 검정 또는 생화학 실험을 수행하였다. 일차 뉴런을 DIV 4-5에서 AAV2-대조군 sgRNA 또는 AAV2-PARP1 sgRNA (ViGene Biosciences, Rockville, MD, USA), 및 AAV- α -syn WT 또는 AAV- α -syn A53T로 감염시켰다.

[0077] 세포 사멸 평가

[0078] 일차 배양된 피질 뉴런을 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF로 14일 동안 처리하였다. 세포 사멸의 퍼센트는 7 μ M 호케스트 33342 및 2 μ M 프로피디움 아이오다이드(PI) (Invitrogen, Carlsbas, CA)로의 염색에 의해 결정하였다. 이미지를 취하고, 자동화 컴퓨터 보조 소프트웨어가 장착된 Zeiss 현미경(Axiovision 4.6, Carl Zeiss, Dublin, CA, USA)에 의해 계수하였다.

[0079] 미세유체 챔버

[0080] 삼중 구획 미세유체 장치(TCND1000)는 Xona Microfluidic, LLC (Temecula, CA, USA)로부터 입수하였다. 미세유체 장치에 부착시키기 전에 유리 덮개를 준비하고 코팅하였다. 챔버 당 대략 100,000 WT 또는 PARP1 KO 뉴런을 개별적으로 플레이팅하였다. 7 DIV에서 0.5 mg α -syn PFF를 챔버 1에 첨가하였다. 흐름 방향을 제어하기 위해, 챔버 1과 챔버 2 및 챔버 2와 챔버 3 간의 배지 부피의 차이를 50 μ l로 유지하였다. PBS 중 4% 파라포름알데하이드를 사용하여 α -syn PFF 처리 후 14일째에 뉴런을 고정하였다. 그 후, 챔버를 p- α -syn 항체로의 면역 형광 염색을 위해 처리하였다.

[0081] 행동 테스트

[0082] α -syn PFF 주입된 WT 또는 PARP-1 KO 마우스, ABT-888이 공급된 α -syn PFF 주입된 마우스, 및 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF 주입된 마우스에서 행동 결손을 희생 1주 전에 폴 테스트 및 악력 테스트에 의해 평가하였다. 모든 실험은 맹검 방식으로 수행하였다.

[0083] 폴 테스트. 봉대 거즈로 감싼 금속 막대(75 cm 길이와 9 mm 직경)를 폴로서 사용하였다. 실제 테스트 전에, 마우스를 이를 연속 훈련시키고, 각 훈련 세션은 3번의 테스트 실험으로 이루어진다. 마우스를 폴 꼭대기로부터 7.5 cm 떨어진 곳에 위치시키고, 던하는 시간 및 폴 바닥에 도달하는 총 시간을 기록하였다. 테스트 종료는 4개의 발이 모두 맨 아래에 놓인 것으로 규정되었다. 테스트 및 기록을 중지하는 최대 컷오프 시간은 60 s이다. 각 실험 후, 미로는 70% 에탄올로 세척하였다.

[0084] 악력 테스트. 신경근육 기능은 기구(Bioseb, USA)를 이용하여 마우스에 의해 발생한 최대 피크 힘을 결정함으로써 측정되었다. 마우스를 금속 그리드에 두어 앞다리 또는 양 다리로 잡게하고, 각각 '앞다리' 및 '앞다리와 뒷다리'로서 기록하였다. 꼬리를 부드럽게 당기고, 마우스가 그림을 놓기 전에 그리드에 가해지는 힘을 그래프(g)으로 표시된 피크 장력으로 기록하였다.

[0085] HPLC를 사용한 도파민 및 유도체 측정

[0086] 생물기원 아민 농도를 고성능 액체 크로마토그래피와 전기화학 검출(HPLC-ECD)에 의해 측정하였다. 선조체를 뇌로부터 신속하게 회수하고, 무게를 측정하고, 0.01% EDTA를 함유하는 0.01 mM의 빙냉 과염산 중에서 초음파처리하였다. 60 ng의 3,4-디하이드록시벤질아민(DHBA)를 내부 표준으로서 사용하였다. 30 min 동안 4°C에서 15,000g에서 원심분리한 후, 상청액을 0.2 μ m 필터를 사용하여 세척하고, 20 μ l의 상청액을 이중 채널 쿨로캡 III 전기화학 검출기(Model 5300, ESA, Inc. Chelmsford, MA, USA)에 의해 HPLC 칼럼 (3 mm $\times$ 150 mm, C-18 역상 칼럼, AcclaimTM Polar Advantage II, Thermo Scientific, USA)에서 분석하였다. 조직 균질액의 단백질 농도를 BCA 단백질 검정 키트(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 데이터는 단백질 농도로 표준화시키고, ng/mg 단백질로 표현하였다.

[0087] 면역조직화학 및 면역형광

[0088] 마우스를 PBS 및 4% PFA로 관류시키고, 뇌를 제거한 후, 밤새 4% PFA로 밤새 고정시키고, 동결방지를 위해 30% 수크로스로 옮겼다. 면역조직화학(IHC) 및 면역형광(IF)은 40 μ m 두께의 일련의 뇌 절편에서 수행하였다. 일차 항체 및 작업 희석액은 표 2에 자세히 설명되어 있다. 조직학적 연구를 위해, 자유-부유 절편을 0.2% Triton X-100을 갖는 PBS 중에 10% 염소 혈청으로 차단하고, TH 또는 p- α -syn 항체와 인큐베이션한 후, 비오티-컨쥬게이션된 항-토끼 또는 마우스 항체와 각각 인큐베이션하였다. 3회 세척 후, ABC 시약(Vector laboratories, CA, USA)을 첨가하고, 절편은 SigmaFast DAB 퍼옥시다제 기질(Sigma-Aldrich)을 사용하여 발색시켰다. 절편은 니슬(0.09% 티오닌)로 비염색하였다. 정량화를 위해, 컴퓨터 제어 전동 스테이지(Ludl Electronics, Hawthorne,

NY, USA), Hitachi HV C20 카메라 및 Stereo Investigator 소프트웨어(MicroBright-Field, Williston, VT, USA)가 장착된 Axiophot photomicroscope (Carl Zeiss)로 구성된 컴퓨터-보조 이미지 분석 시스템을 이용하여 세포 계수에 대한 비편향된 방법으로서 광학 분별기를 통해 SNpc 영역으로부터 TH- 및 니슬-양성 DA 뉴런 둘 모두를 계수하였다. TH-염색된 뉴런 및 니슬 계수의 총 수를 분석하였다. 면역형광 연구를 위해, TH 및 p- α -syn 항체로의 이중-라벨링된 섹션을 Alexa-fluor 488- 및 594-컨주게이션된 이차 항체의 혼합물과 인큐베이션하였다 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 형광 이미지는 초소형 스캐닝 현미경(LSM710, Carl Zeiss)에 의해 획득하였다. 모든 이미지는 Zen 소프트웨어(Carl Zeiss)에 의해 처리하였다. 임계값의 시그널 강도 범위에서 선택된 영역은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0089]

표 2. 도 35에 사용된 대조군 및 PD CSF의 임상 정보

군	연령	성별	군	연령	성별
대조군 (n=33)	71	M	PD (n=21)	50	M
	62	F		67	F
	63	M		76	M
	63	F		57	F
	74	F		54	M
	65	M		51	F
	62	M		56	F
	64	M		50	M
	79	M		66	M
	66	M		53	M
	27	M		56	F
	60	F		50	M
	55	M		43	M
	60	M		75	M
	62	F		58	F
	60	F		69	M
	65	F		62	F
	66	F		62	M
	27	M		85	M
	63	F		73	F
	62	M		82	F
	62	F			
	60	F			
	74	M			
	61	M			
	66	M			
	76	F			

[0090]

	65	F			
	61	F			
	71	M			
	71	F			
	63	F			
	74	M			
요약된 정보					
군	평균 연령 ± s.e.m	F/M 비 (%)	군	평균 연령 ± s.e.m	F/M 비 (%)
대조군	62.76 ± 1.83	48.5 / 51.5	PD	61.67 ± 2.52	42.9 / 57.1

[0091]

[0092]

α -syn PFF의 PK 분해

[0093]

PK 분해를 수행하였다. 십 마이크로그램의 α -syn PFF 또는 PAR- α -syn PFF를 PBS 중 0.5 내지 2.5 ug/ml의 PK와 혼합하고, 37°C에서 30 min 동안 인큐베이션하였다. 1 mM PMSF를 첨가하여 반응을 중단시키고, 5 min 동안 SDS-샘플 완충액과 비등시켰다. PK 분해 생성물의 밴드는 에피토프-특이적 α -syn 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 검출하였다(표 3).

[0094]

표 3. 본 연구에서 검사한 항체의 일부 목록

항체	공급처	식별자	희석
PAR	Dawson lab에서 제조됨	N/A	1:2,000 (WB) 1:500 (IF)
PARP-1	BD Bioscience	611039	1:2,000 (인간에 있어서 WB)
	Cell Signaling	9532	1:1,000(마우스에 있어서 WB)
α -syn	BD Bioscience	610787	1:3,000 (WB) 1:500 (IHC)
α -syn (121-125), Syn211	Sigma	S5566	1:3,000 (WB)
α -syn(N-말단)	LSBio	LS-C352877	1:3,000 (WB)
α -syn (115-122), LB509	Abcam	ab27766	1:3,000 (WB)
α -syn (61-95), 5C2	Novus	NBP1-04321	1:3,000 (WB)
p- α -syn (Ser129)	Biologend	825701	1:1,000 (WB) 1:500 (IF)
TH	Novus Biologicals	NB300-19	1:2,000 (WB) 1:1,000 (IHC, IF)
DAT	Sigma	D6944	1:1,000 (WB)
GAPDH	Abcam	ab8245	1:5,000 (WB)
β -액틴-HRP	Sigma	A3854	1:20,000 (WB)

[0095]

[0096]

인간 임상 실험

[0097]

인간 CSF 샘플 및 PAR ELISA

- [0098] NINDS 파킨슨병 바이오마커 프로그램(Parkinson's Disease Biomarker Program) (PDBP)의 존스 홉킨스 유니버시티(Johns Hopkins University) 사이트 참가자들에 대해 매년 광범위한 임상 및 인지 검사와 요추 천자를 시행하였다. CSF를 원심분리하고, 분취하고, 습득 1시간 내에 -80℃에서 저장하였다. 모노클로날 항-PAR 항체의 2개의 상이한 클론(#19 및 #25)을 PAR ELISA에 사용하였다. 항-PAR 항체(포획 항체, 클론 #19)(5 ug/ml)를 96-웰 미세적정 플레이트(NUNC, Cat #46051)에 코팅하고, 정상 또는 PD 환자로부터의 다양한 농도의 정제된 PAR(0-200 nM, 양성 대조군) 및 CSF 샘플을 각 웰에 첨가하고, 실온(RT)에서 1h 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST(PBS 완충액 중 0.05% Tween20)로 5회 세척한 후, 바이오티닐화된 PAR 항체(검출 항체, 클론 #25)를 RT에서 1h 동안 인큐베이션하였다. 색 변화는 HRP-컨쥬게이션된 스트렙타비딘 항체(Thermo Scientific)를 통해 검출하였다. 검정은 3 pM만큼 낮은 PAR을 검출하였으며, 50 nM에서 포화시켰다.
- [0099] 임상 치매 등급
- [0100] 임상 치매 등급(CDR) 척도는 신경 변성 및 치매 환자에 적용되는 인지 및 기능적 성능의 6개의 상이한 영역을 평가하는데 사용된 5-점 척도이다. 교시를 위해 참조로 통합된 문헌 [Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL, "A New Clinical Scale for the Staging of Dementia," *Br J Psychiatry*, (1982) 140:566-72] 참조. 6개 영역은 기억, 방향성, 판단 & 문제 해결, 지역 사회 문제, 가정 & 취미, 및 개인 관리이다. 모든 환자는 CDR 척도 및 개인 인터뷰를 이용하여 평가하여 이들이 정상적인 인지, 가벼운 인지 손상 또는 치매가 있는지를 결정하였다.
- [0101] 스튜던트 t-테스트를 이용하여 대조군과 PD 개체간 및 정상 인지를 갖는 개체와 인지 장애를 갖는 개체간의 PAR의 농도를 비교하였다. 그 후, 일반화된 선형 모델은 PAR 농도 변화의 결정요인을 평가하고, PAR 농도가 인지 변화와 관련있는지의 여부를 평가하였다.
- [0102] 인간 조합 항체 라이브러리
- [0103] HuCAL[®] 기술은 기존의 맞춤형 항체 획득 방법에 대한 대체 방법을 제시한다. 모노클로날 항체의 생성은 마우스, 토끼 또는 염소의 면역화, 및 이후 제시된 항체를 회수하기 위해 비장으로부터 B 세포를 추출하는 것을 필요로 하는 경우, HuCAL[®] 기술은 더 빠른 생산 시간을 허용한다. 상보성 결정 영역(CDR), 6개 경쇄 가변 영역(V_L) 및 7개 중쇄(V_H)의 라이브러리를 사용하여, 시험관내에서 수십억개의 항체를 생성할 수 있다. 이는 항체 유전자를 박테리오파지에 통합하여 이항화 결합을 통해 항체를 코팅 상에 제시함으로써, 표현형과 유전자형의 물리적 연결을 나타내는 파지(phage) 디스플레이와 짝을 이룬다. 이항화 결합의 환원성 절단은 항원에 대한 친화성과 무관하게 스크리닝 후 항체의 회수를 허용한다. AbD Serotec은 합성 정제된 말단-바이오티닐화된 PAR 폴리머를 제공하였다. 이는 순수한 PAR 폴리머(2-300 mer)의 환원성 아민화를 통해 합성되었다. 항체 클론은 ADP-리보스 모노머가 아닌 단지 폴리머 및 올리고머에만 결합하도록 선택되었다.
- [0104] HuCAL[®] 항체 생성 과정은 자기 비드에의 공유 결합을 사용하여 항원(PAR)의 고정화로 시작된다. 이후 이들을 비특이적 항체가 세척제거되고, 특이적 항체-파지가 용리되는 HuCAL[®] 라이브러리와 인큐베이션하였다. E. 콜라이배양물을 특이적 항체-파지로부터 감염 처리하여 후속 라운드의 파지 스크리닝을 위한 풍부한 항체 라이브러리를 생성하였다. 이들 농축된 항체-상으로부터의 DNA를 회수하고 Fab 발현 벡터내로 서브클로닝하고, E. 콜라이콜로니에 플레이팅하여 Fab 단편을 생성하였다. 그 후, 콜로니를 384-미세적정 플레이트에 성장시키는 콜로니 채집, 1차 스크리닝이 이어진다. 항체 발현을 유도하고, 배양물을 용해시킨 후 수집하였다. 이들 배양물을 말단 라벨링된-PAR 항원을 이용하여 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 그 후, 일차 스크리닝으로부터의 양성 히트(hit)를 시퀀싱하여 고유 항체를 식별하고, 이를 재현성을 위한 추가의 합성을 위해 저장하였다. 2차 스크리닝을 PAR 모노머 결합 항체를 선별하기 위해 수행하였다. 마지막으로, 친화성 크로마토그래피를 통한 발현 및 정제를 수행하여 항체 클론을 수득하였다.
- [0105] 샌드위치-ELISA
- [0106] 항-PAR 항체(포획 항체, 클론 #19)(5 ug/ml)를 96-웰 미세적정 플레이트(NUNC, Cat #46051) 상에 코팅하였다. 정상인 또는 PD 환자로부터의 다양한 농도의 정제된 PAR(0-200 nM, 양성 대조군) 및 CSF 샘플을 각 웰에 첨가하고, 1hr 동안 실온(RT)에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST(PBS 완충액 중 0.05% Tween20)로 5회 세척한 후, 바이오티닐화된 PAR 항체(검출 항체, 클론 #25)를 RT에서 1hr 동안 인큐베이션하였다. 색 변화는 HRP-컨쥬게이션된 스트렙타비딘 항체를 통해 검출하였다. 이러한 검정은 PAR 농도를 3 pM만큼 낮게 검출하였으며, 50 nM

에서 포화시켰다.

[0107] 결과

[0108] 110명 개체는 기준선의 CSF에 기여하고(80 PD, 30 대조군), 94명 개체는 첫 번째 추적 검사의 CSF에 기여하고(68 PD, 26 대조군), 71명 개체는 두 번째 추적 검사의 CSF에 기여하고(51 PD, 20 대조군), 36명 개체는 세 번째 추적 검사의 CSF에 기여한다(28 PD, 8 대조군). 기준선에서, PD 및 대조군 둘 모두의 평균 연령은 약 66세($p=0.71$)이며, PD 환자중 67%는 남성인 반면, 대조군의 37%는 남성이었다($p<0.01$). 평균 PD 기간은 6.7년이었다. 처음 세 번의 방문시 PD 개체 및 대조군 간의 PAR의 평균 농도의 차이가 존재하였으며, 4차 방문에서의 차이로 기우는 경향을 갖는다(방문 1: PD 평균 112.13, 대조군 평균 87.99 $p=0.04$; 방문 2: PD 평균 145.49, 대조군 평균 110.63 $p=0.04$; 방문 3: PD 평균 132.29, 대조군 평균 86.06 $p=0.01$; 방문 4: PD 평균 151.88, 대조군 평균 111.07 $p=0.08$).

PAR 농도(pM)		
	PD 환자	건강한 대조군
방문 1	112.13	87.99
방문 2	145.49	110.63
방문 3	132.29	86.06
방문 4	151.88	111.07

[0109]

[0110] 질병 상태는 연령, 성별, MDS-UPDRS 운동 점수, 레보도파 등가 투여 및 인지 장애에 대한 조절 후에도 PAR 농도($p<0.01$)의 중요한 예측인자이다(도 3 및 4 참조). 방문 2 및 방문 4에서 PAR 농도는 방문 1에서의 PAR 농도와 현저하게 상이하다($p<0.01$, $p=0.01$). 단지 PD 참가자들 사이에서, PAR 농도($p=0.03$) 및 MDS-UPDRS 운동 점수($p<0.01$)는 인지 쇠퇴의 중요한 예측인자였다.

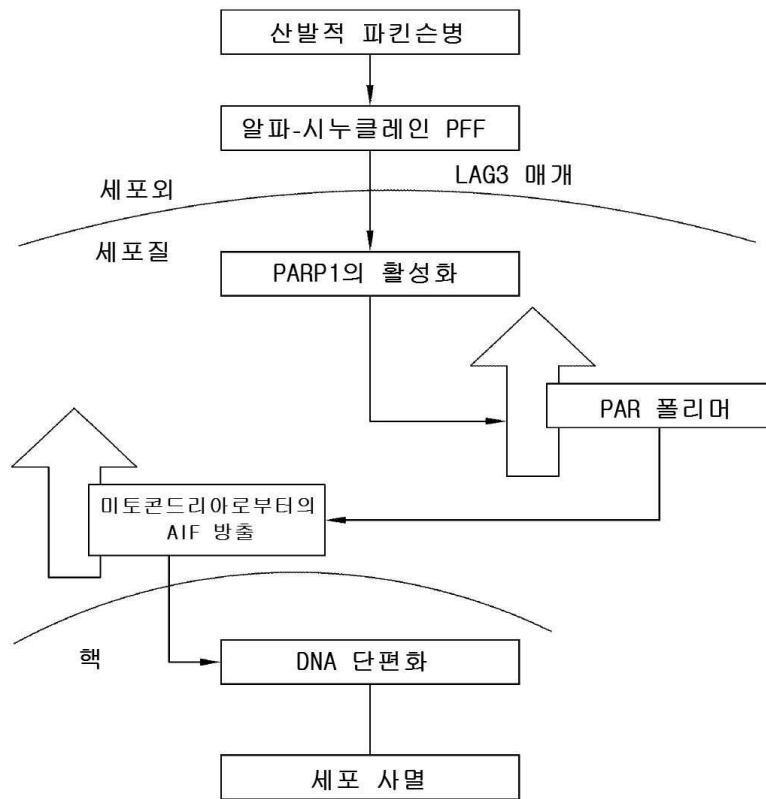
[0111] 통계적 분석

[0112] 모든 데이터는 적어도 3개의 독립된 실험을 이용한 평균 $\pm$ s.e.m.으로 나타내었다. 통계적 분석은 GraphPad Prism을 사용하여 수행하였다. 2개의 평균 간의 및 다수의 평균 간의 차이는 각각 언페어드 투-테일드 스튜던트 t 테스트 및 ANOVA 이어서, 터키 사후 테스트에 의해 평가되었다. 유의성은 $*P < 0.05$, $**P < 0.005$ 및 $***P < 0.001$ 로서 평가하였다.

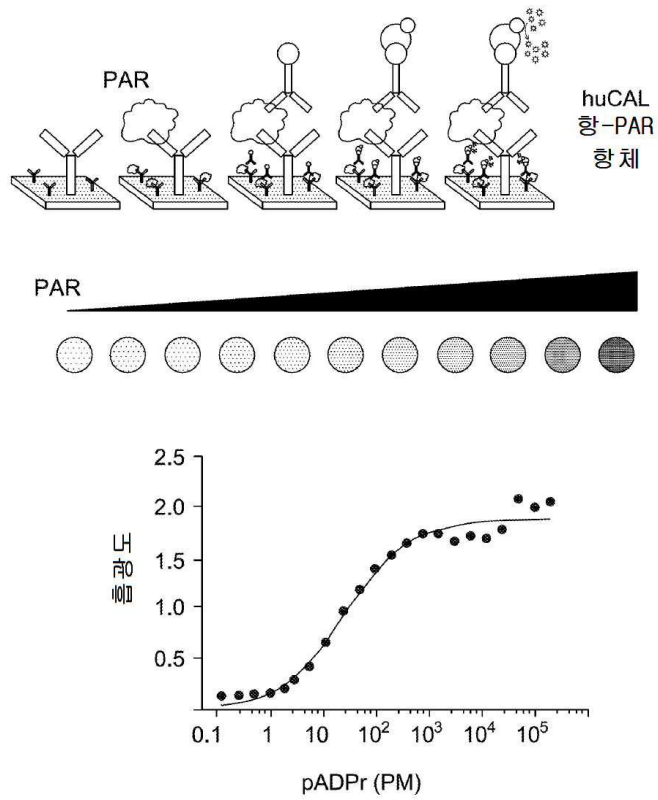
[0113] 요약하면, PC 환자와 대조군 환자 간의 PAR 농도에 있어서 유의한 차이가 있었다. 또한, 후속 샘플 수집 방문시 환자들 간의 PAR 농도에 있어서 현저한 차이가 있었다.

도면

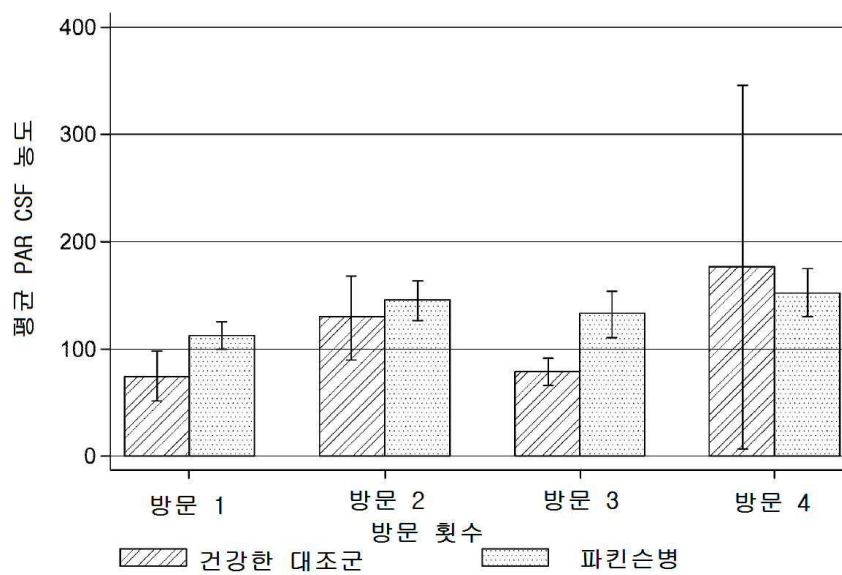
도면1



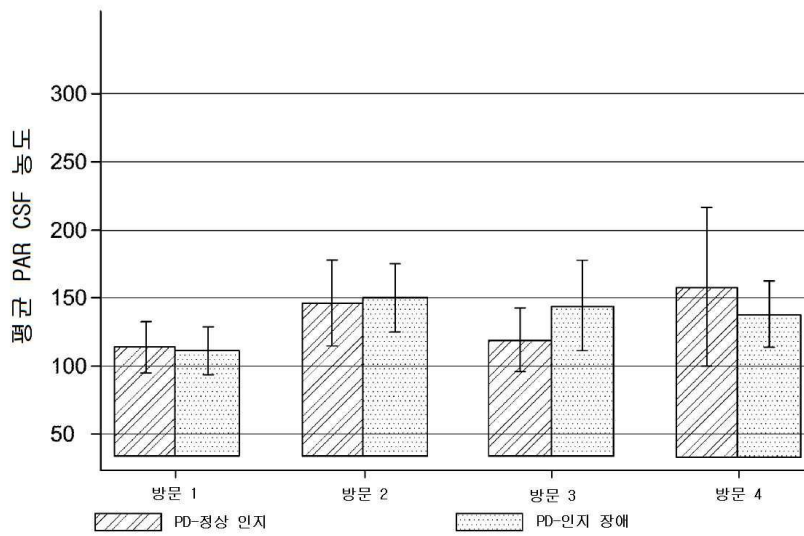
도면2



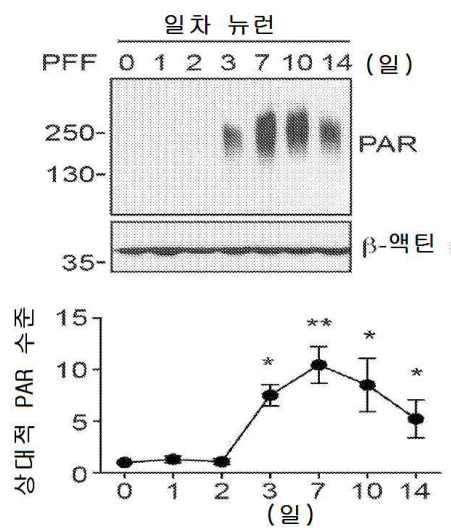
도면3



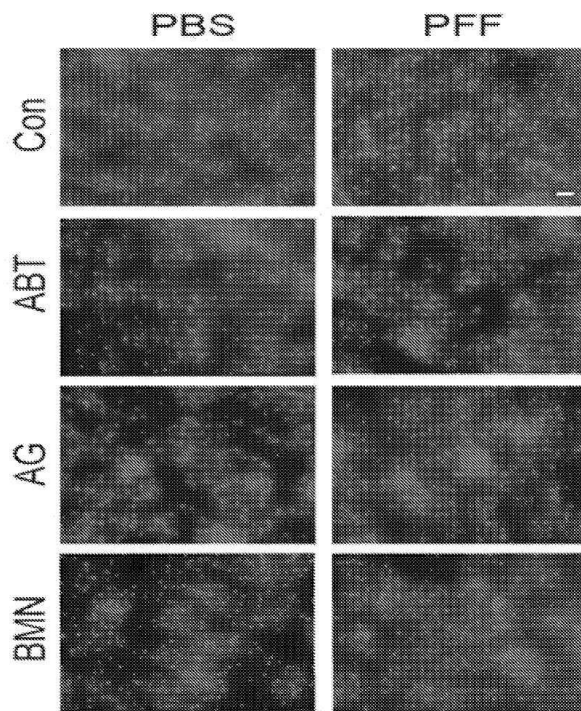
도면4



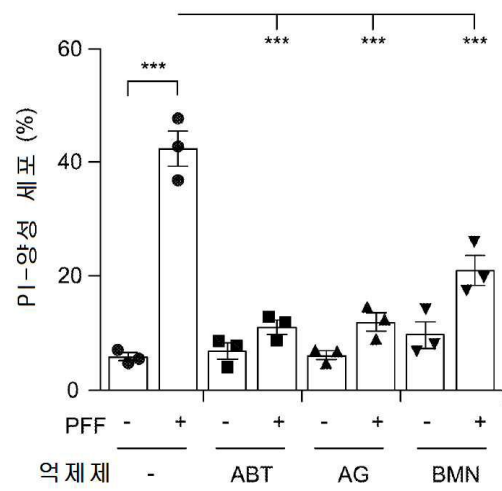
도면5



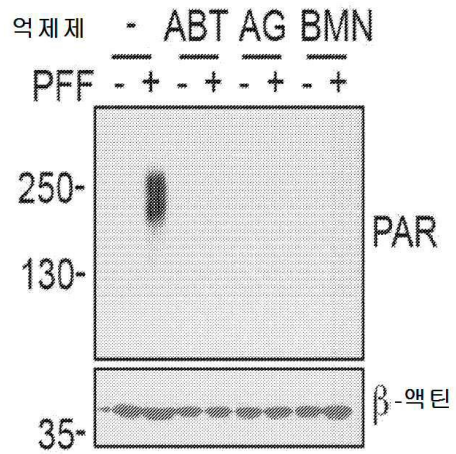
도면6



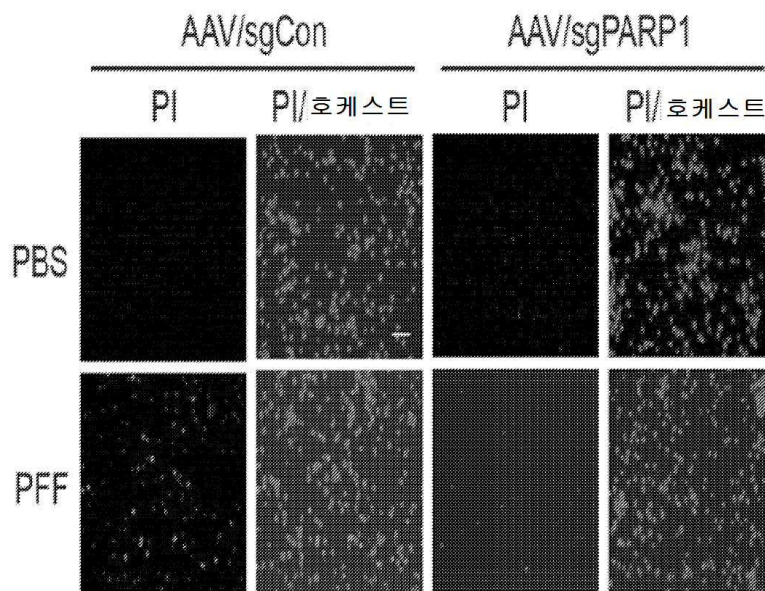
도면7



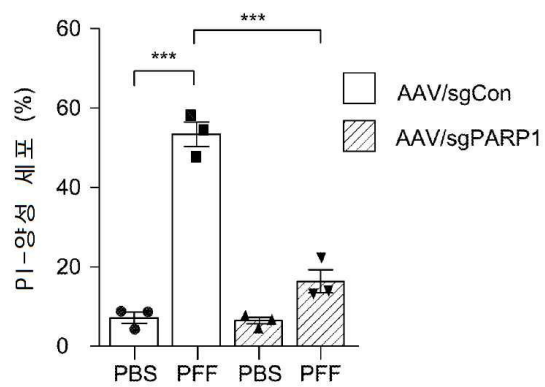
도면8



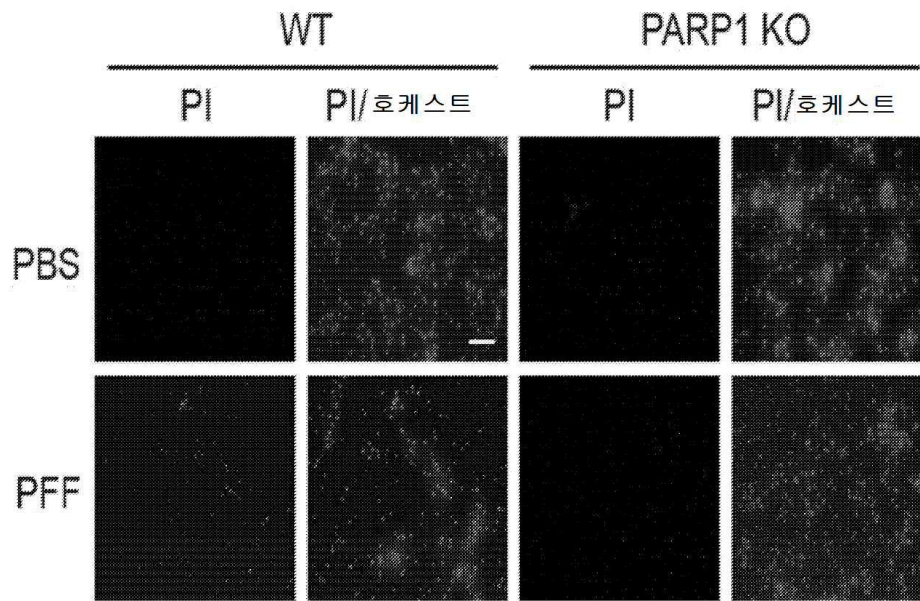
도면9



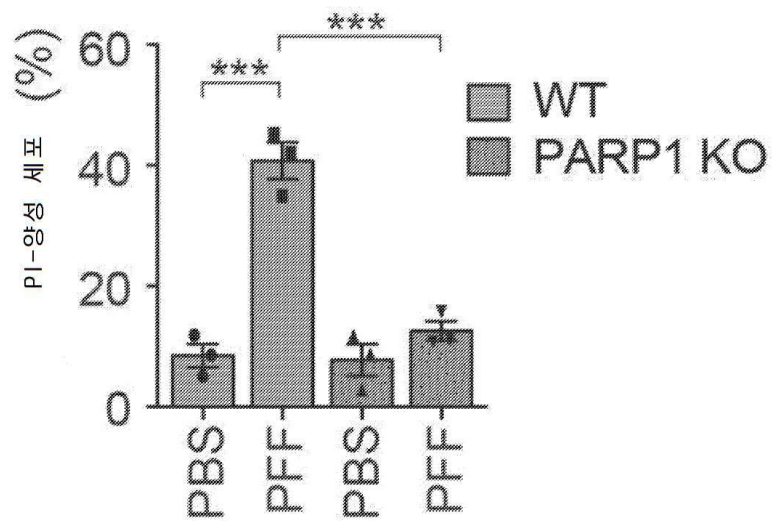
도면10



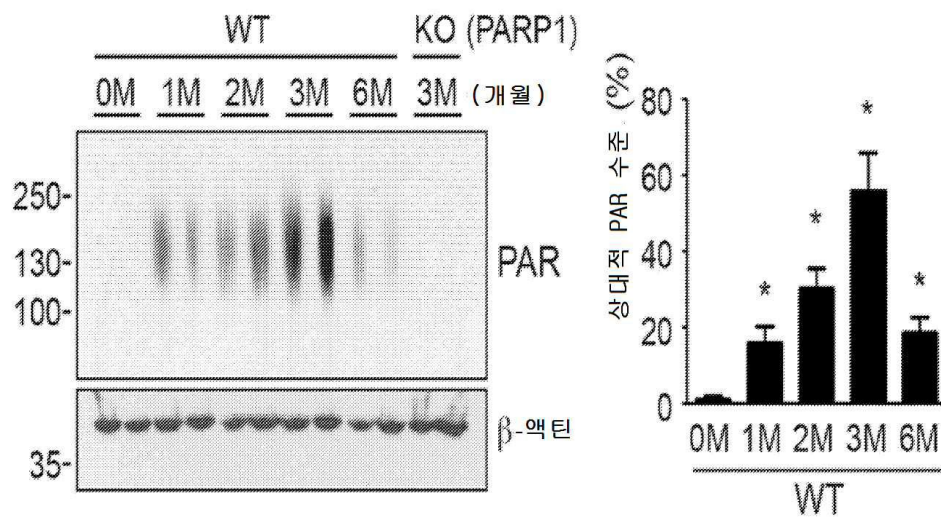
도면11



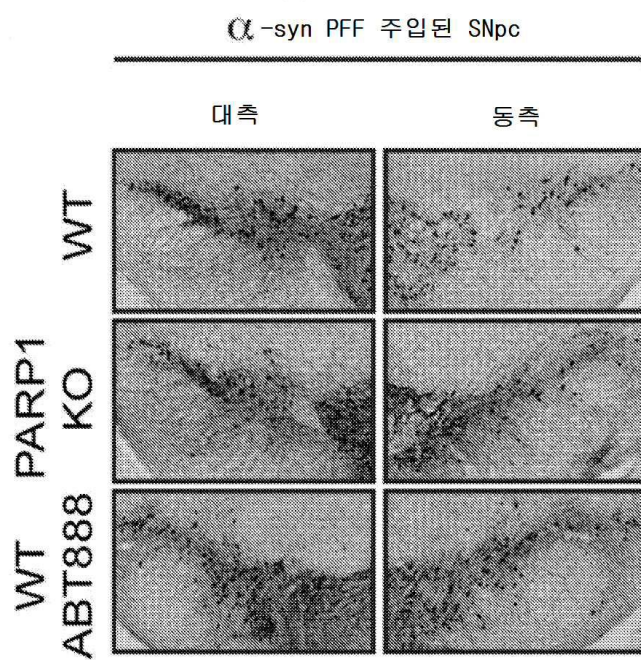
도면12



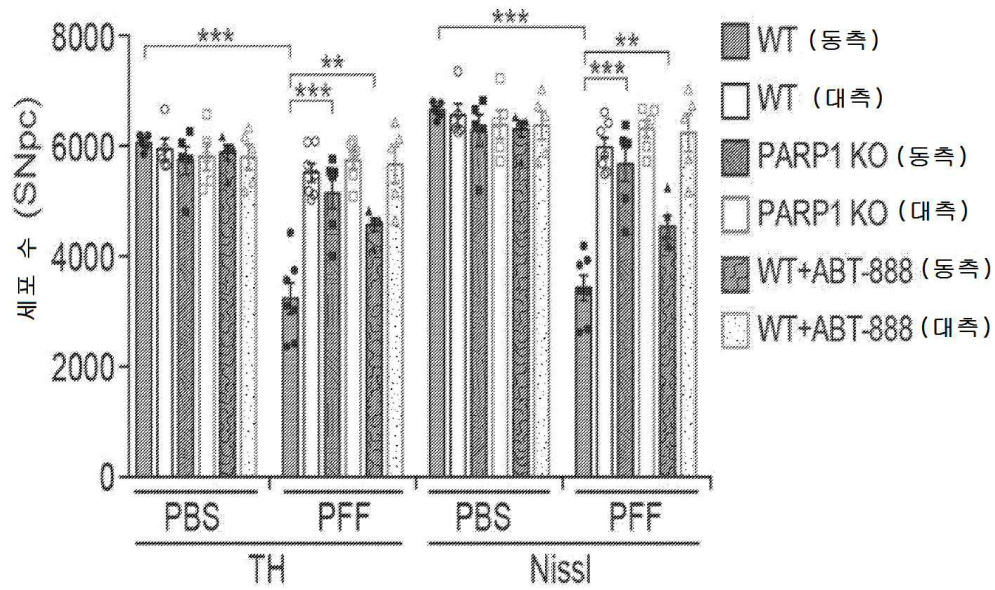
도면13



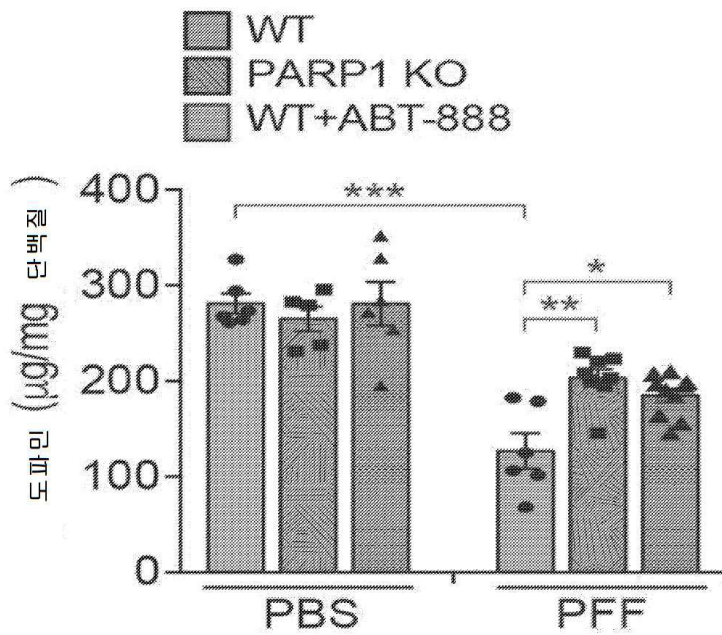
도면14



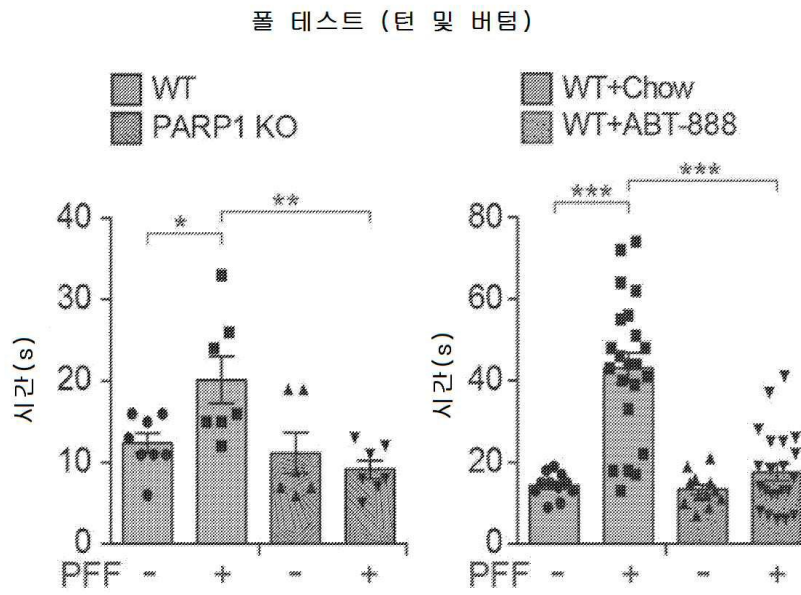
도면15



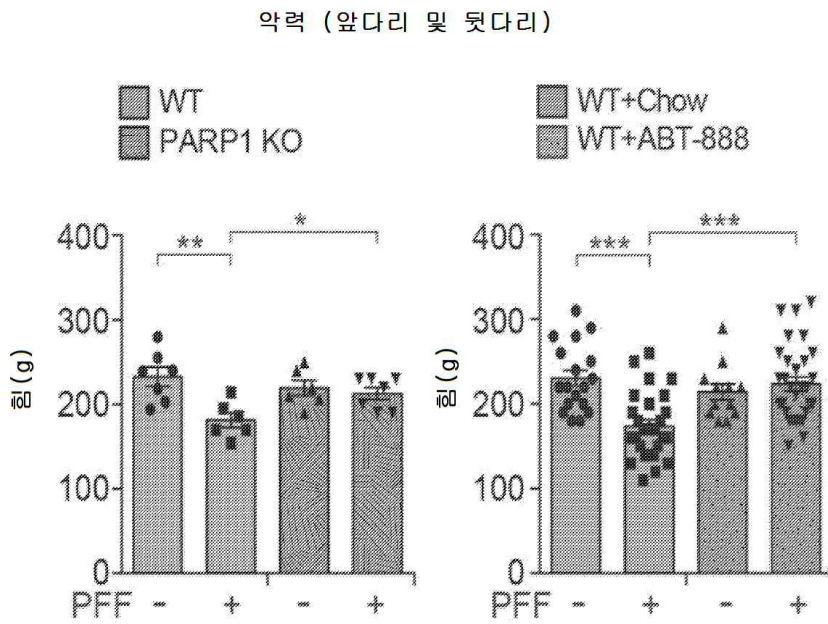
도면16



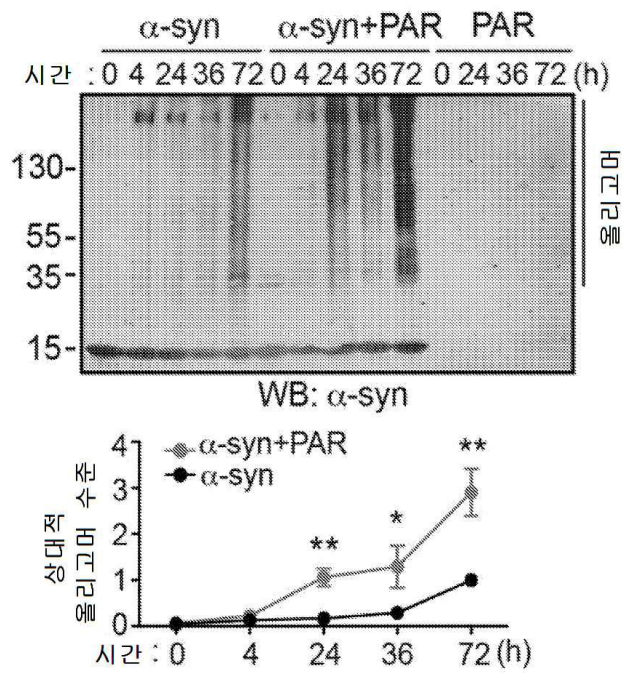
도면17



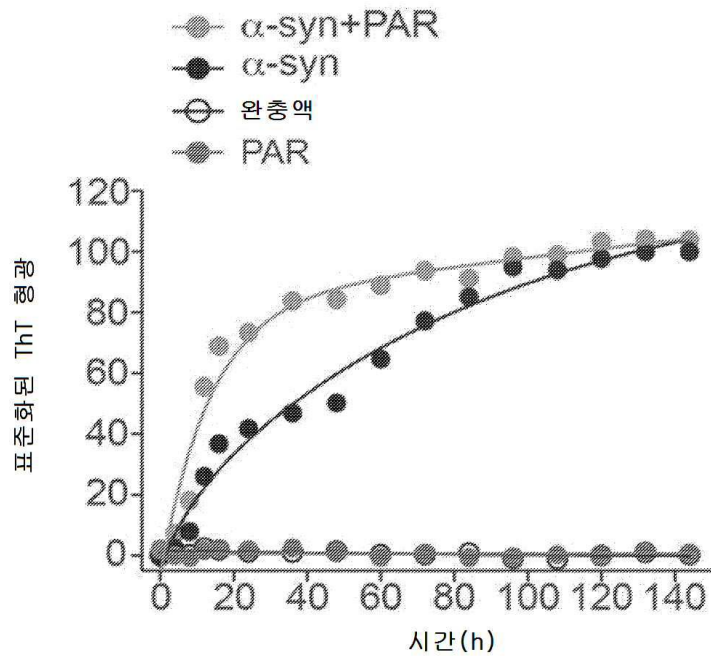
도면18



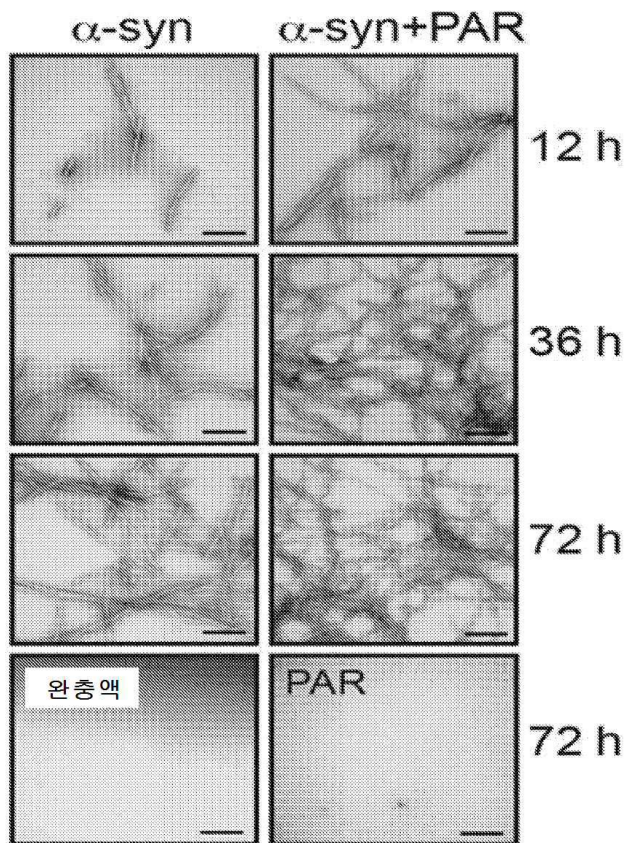
도면19



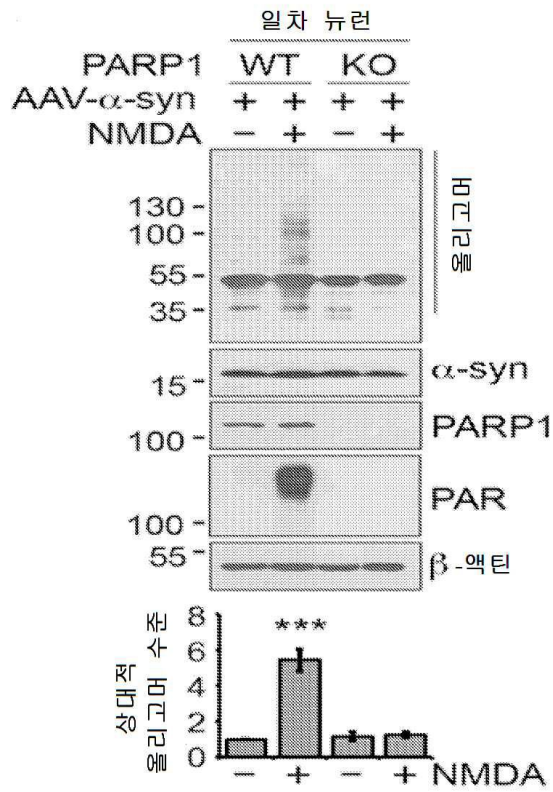
도면20



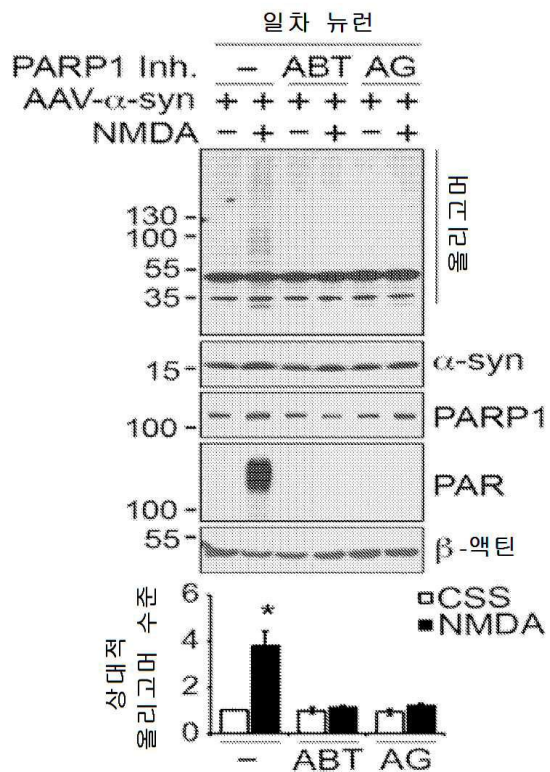
도면21



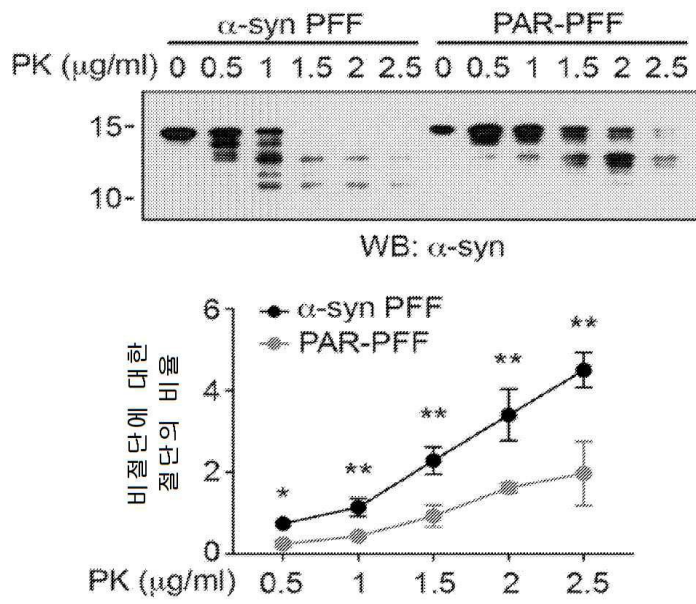
도면22



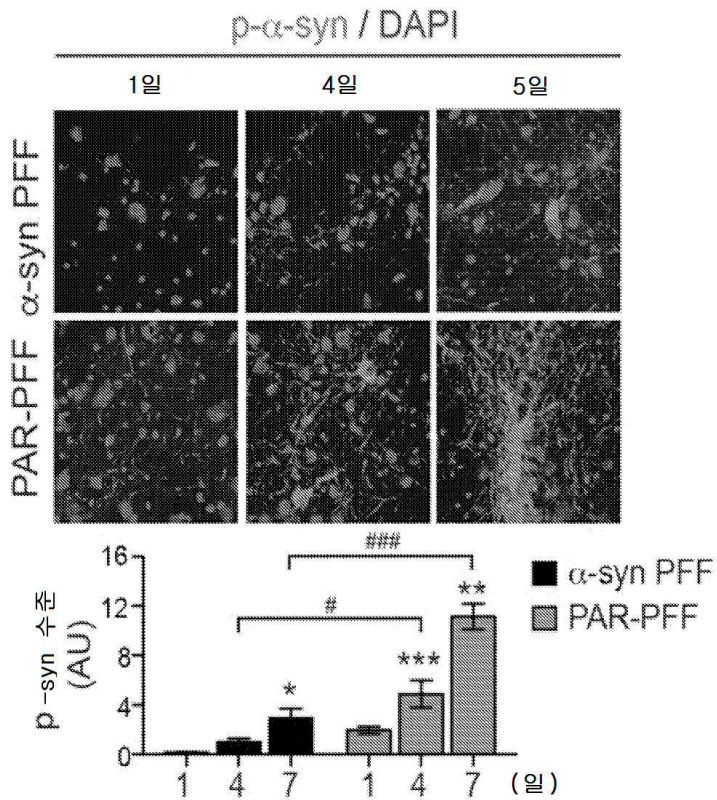
도면23



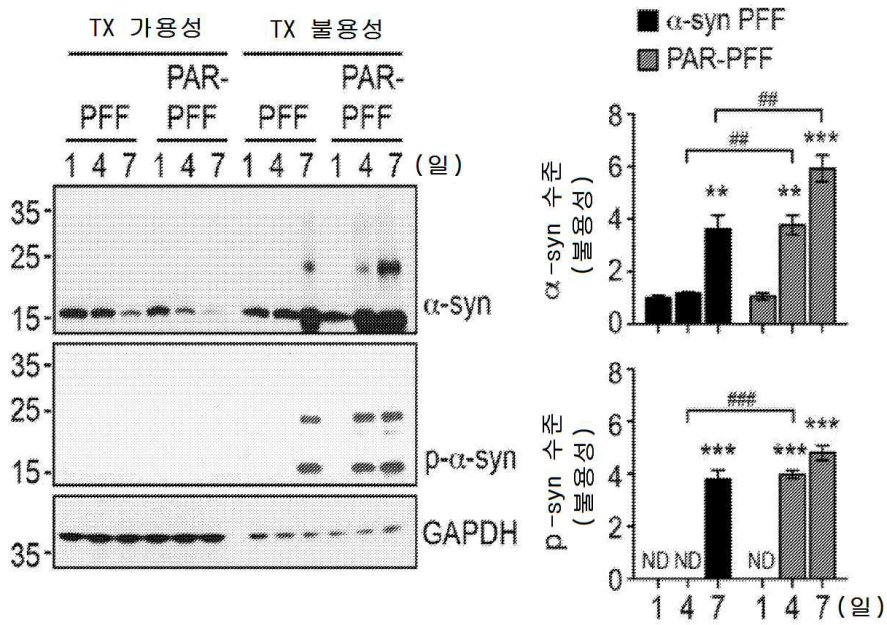
도면24



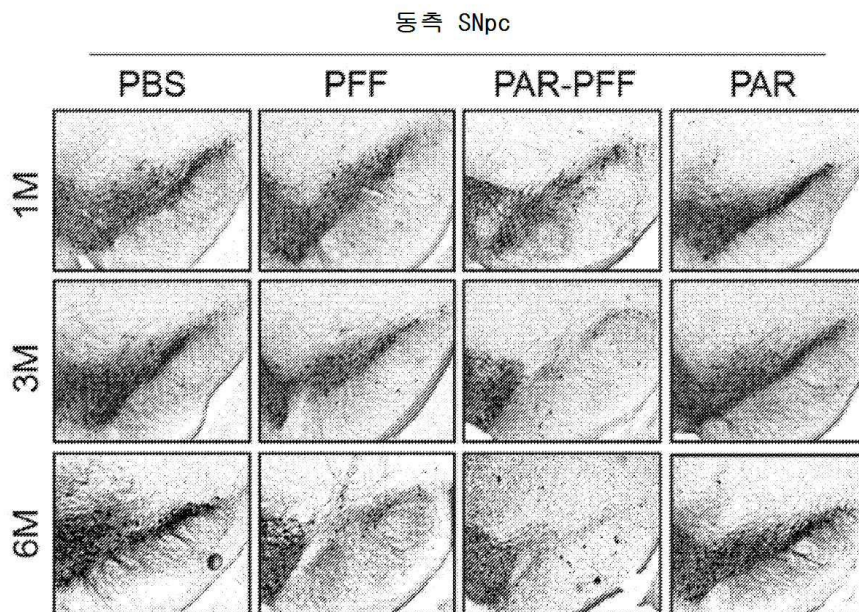
도면25



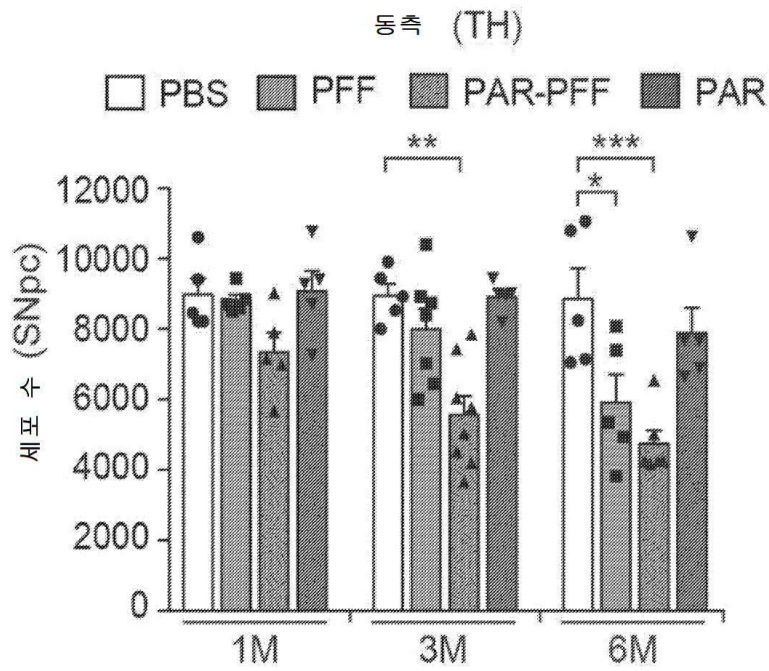
도면26



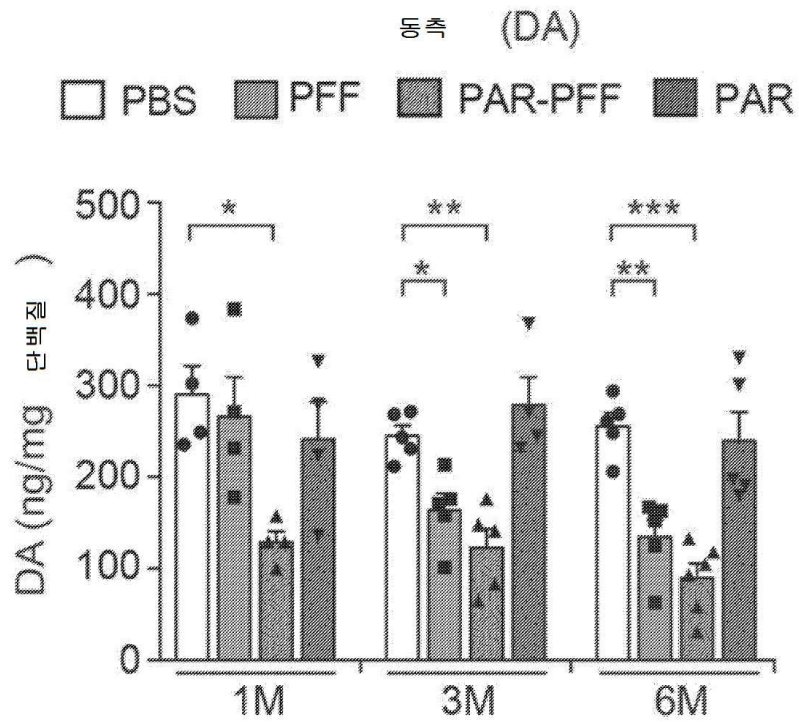
도면27



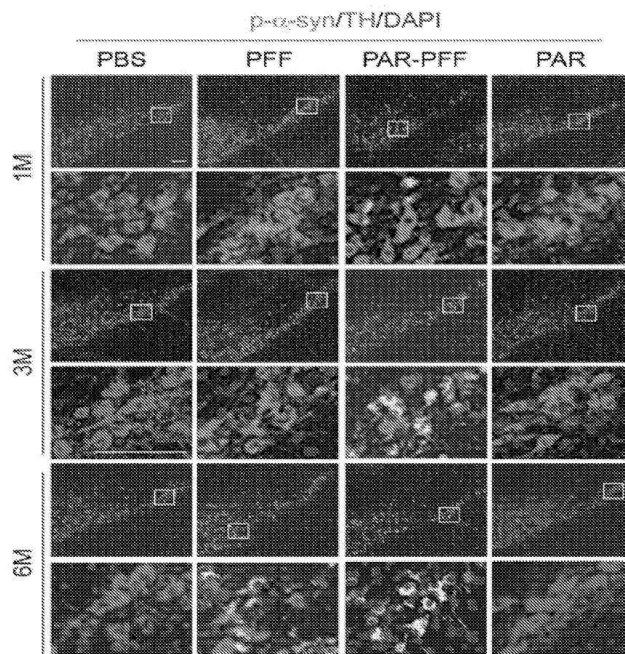
도면28



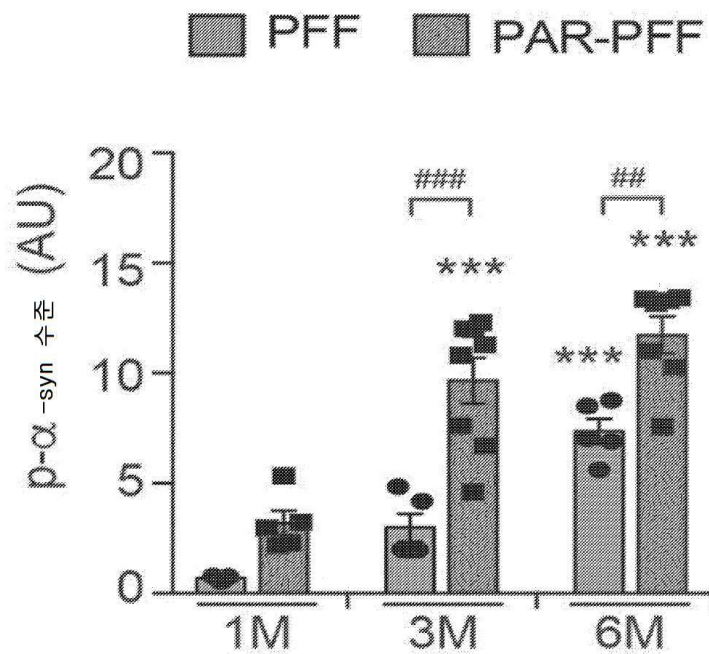
도면29



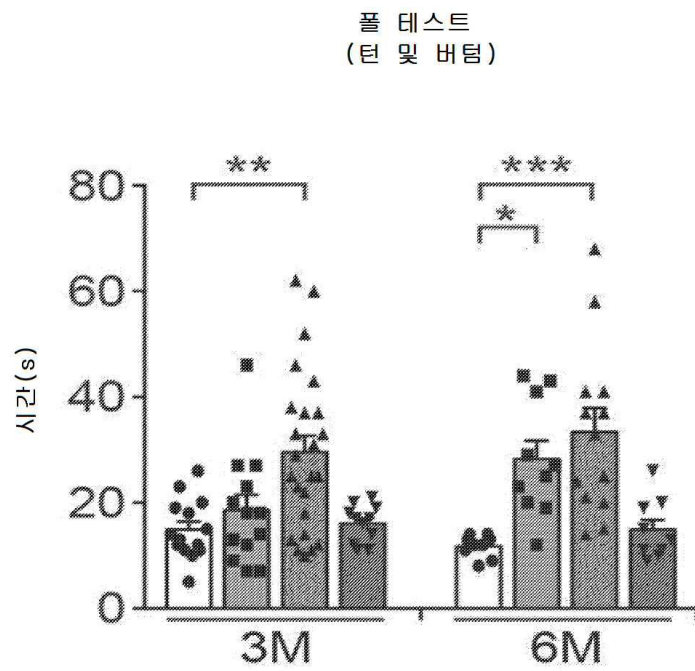
도면30



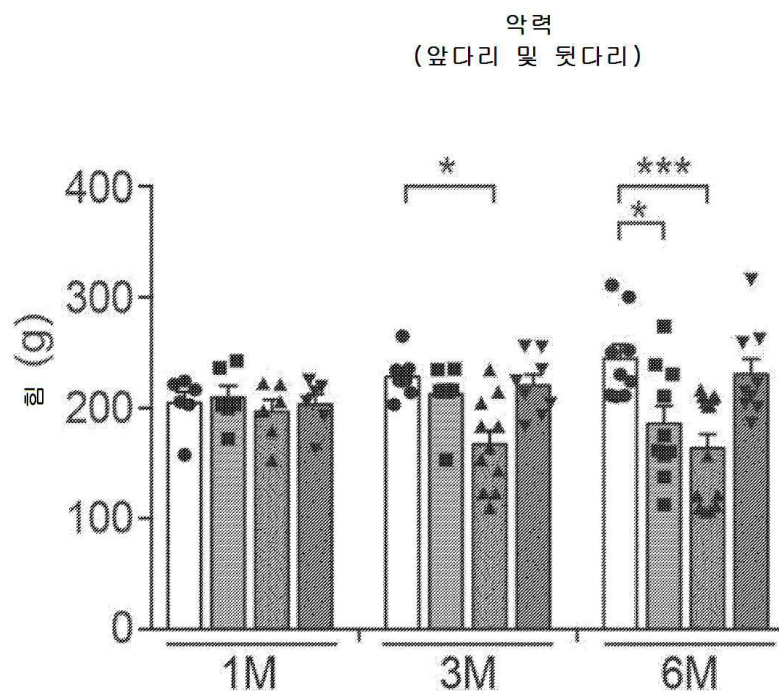
도면31



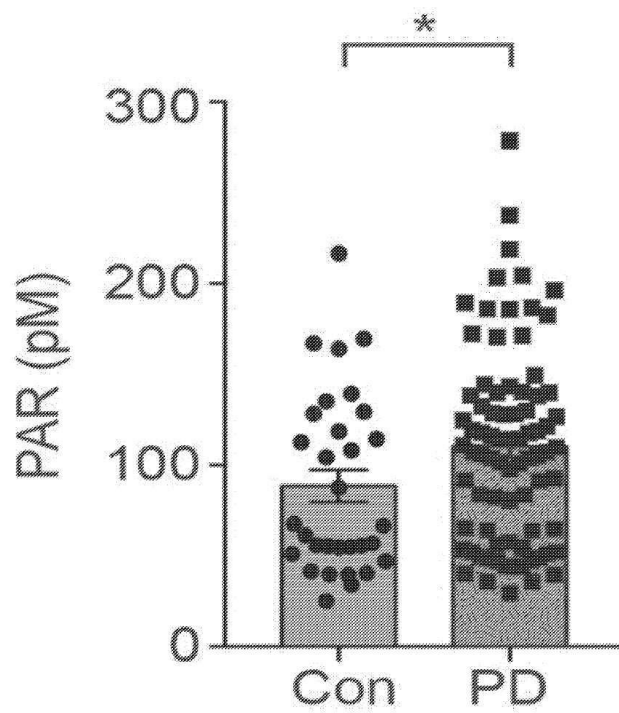
도면32



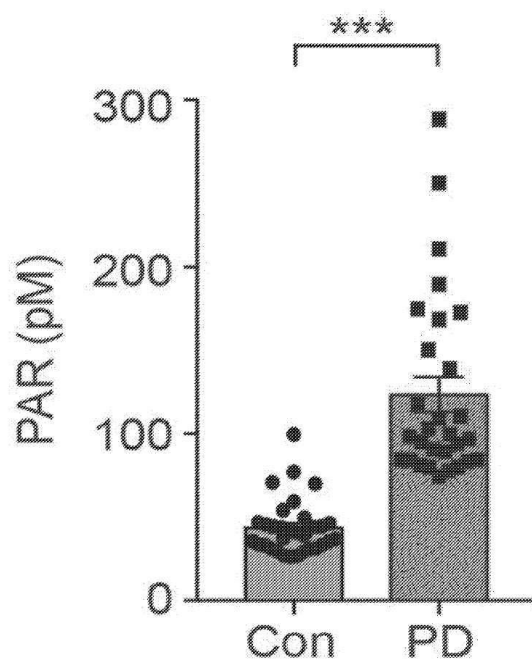
도면33



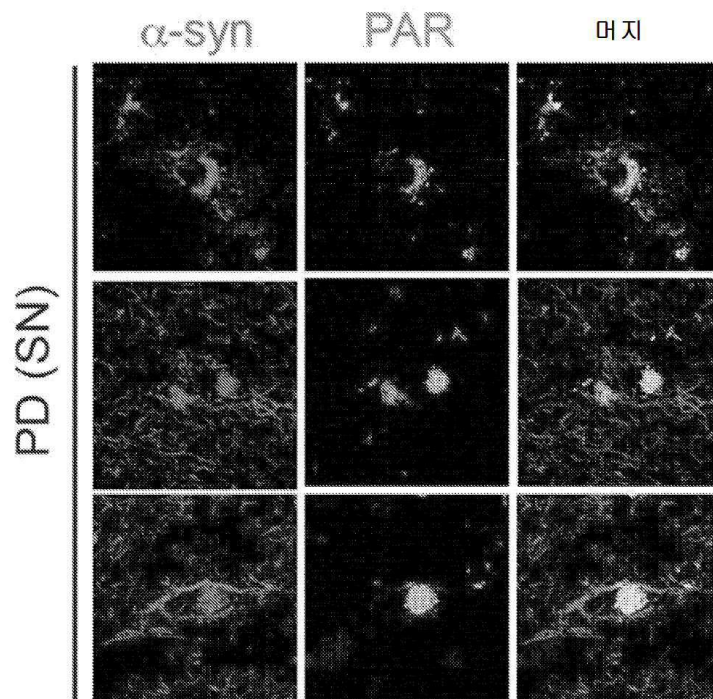
도면34



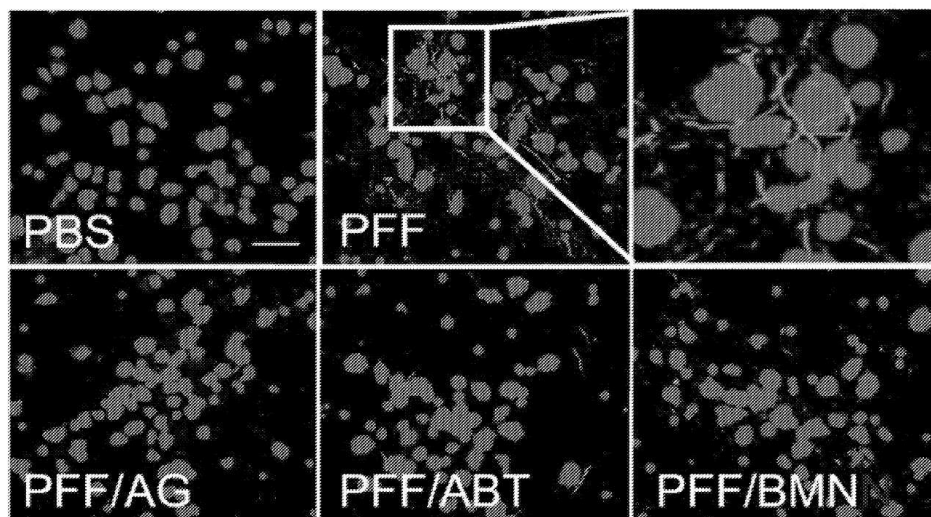
도면35



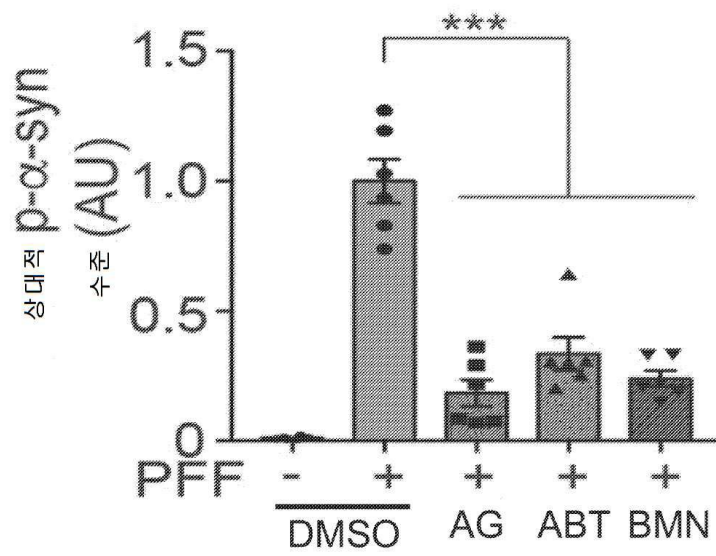
도면36



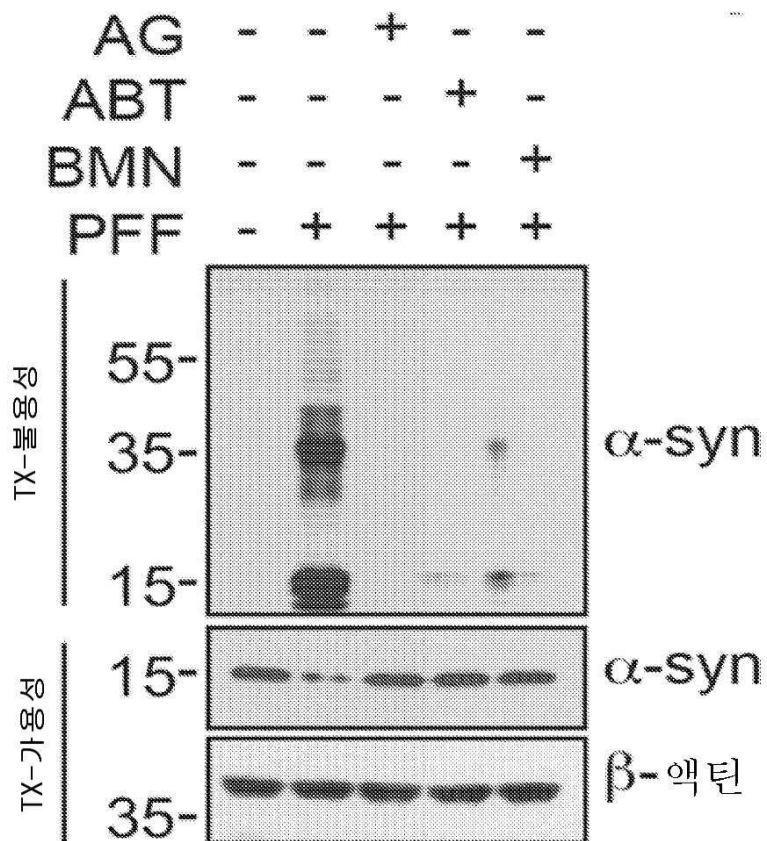
도면37



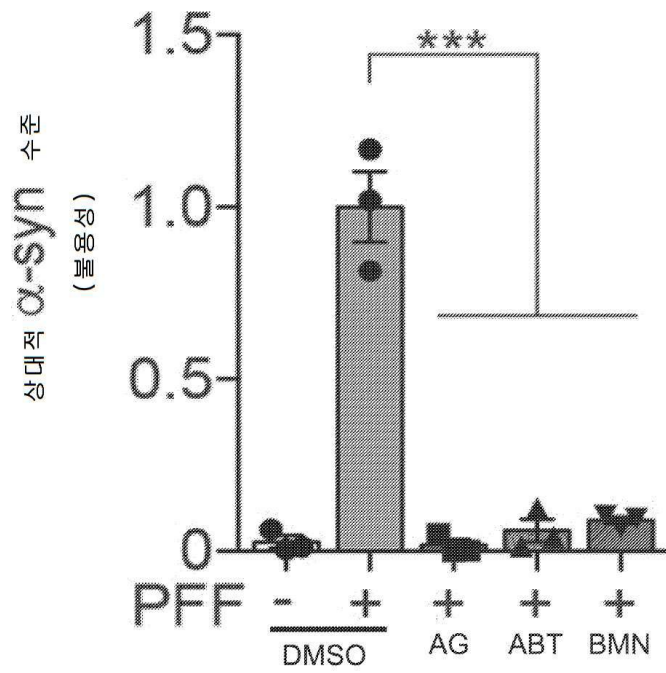
도면38



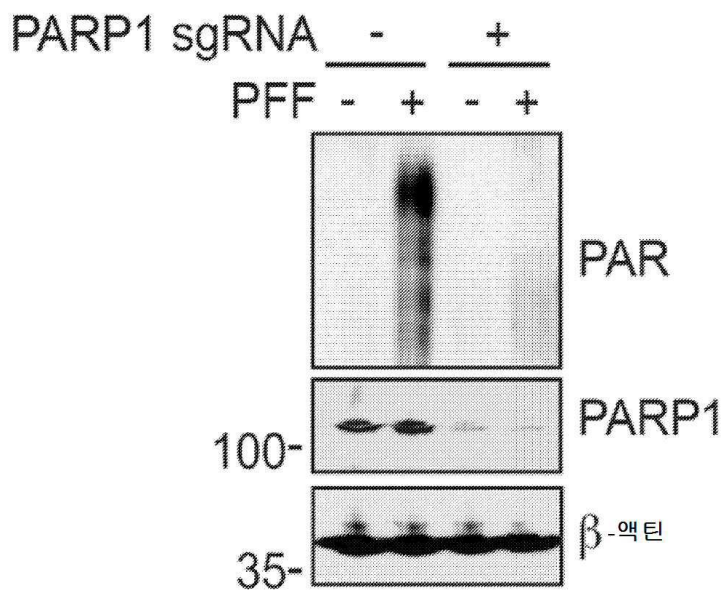
도면39



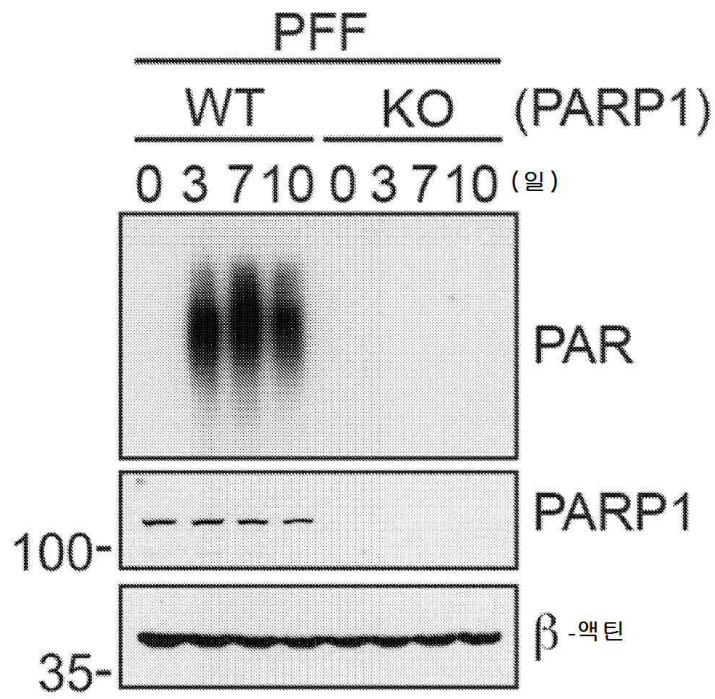
도면40



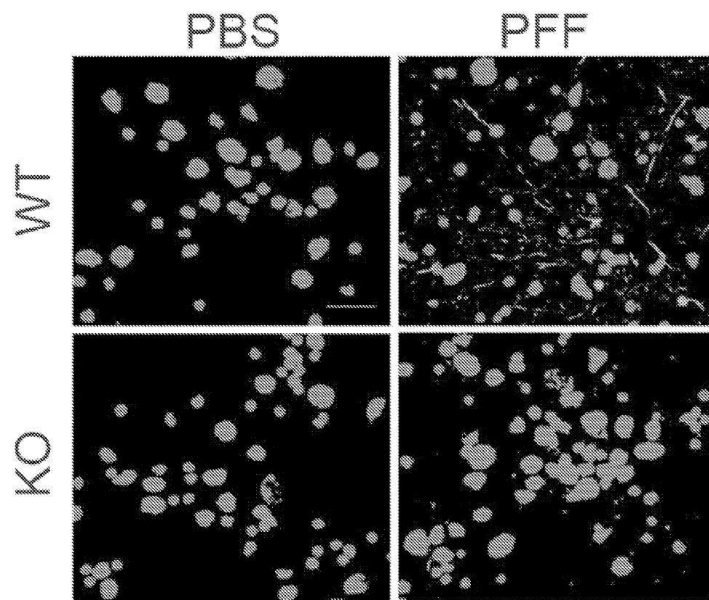
도면41



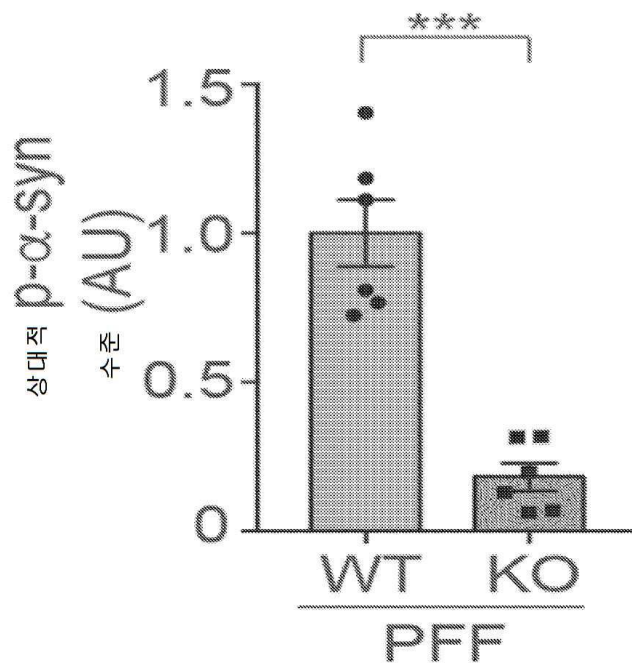
도면42



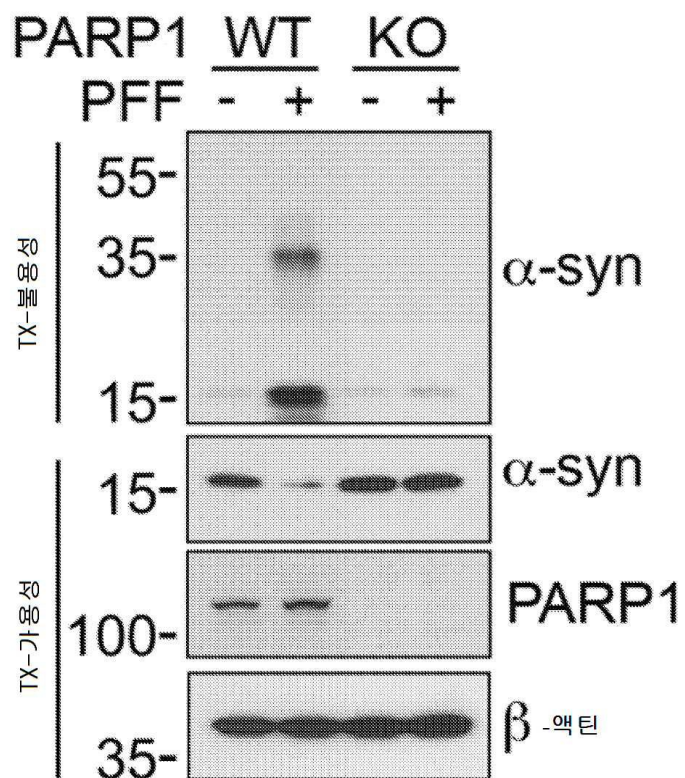
도면43



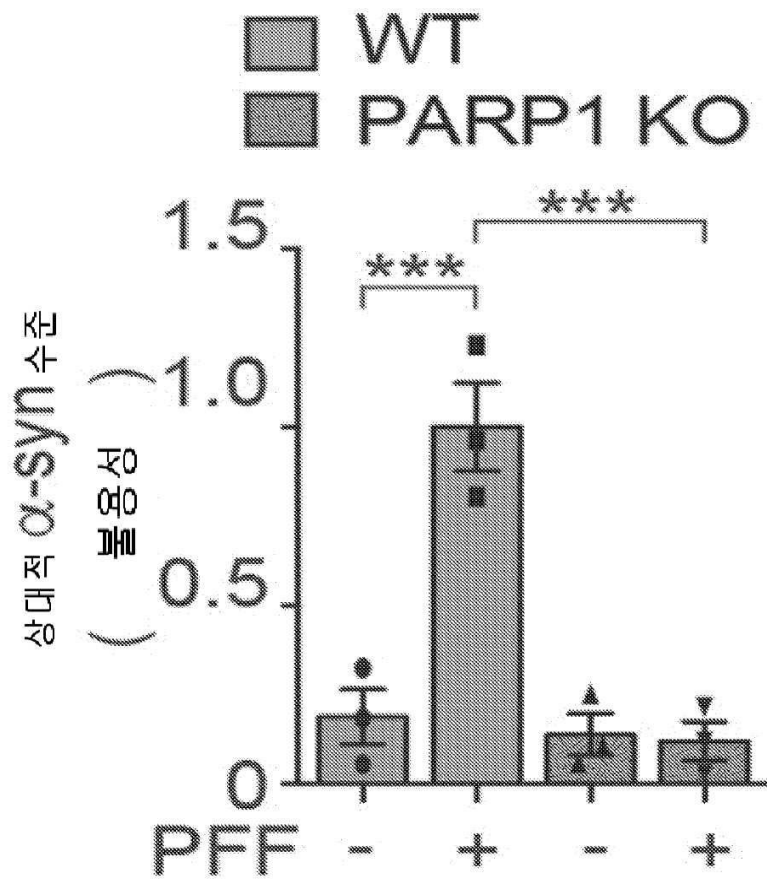
도면44



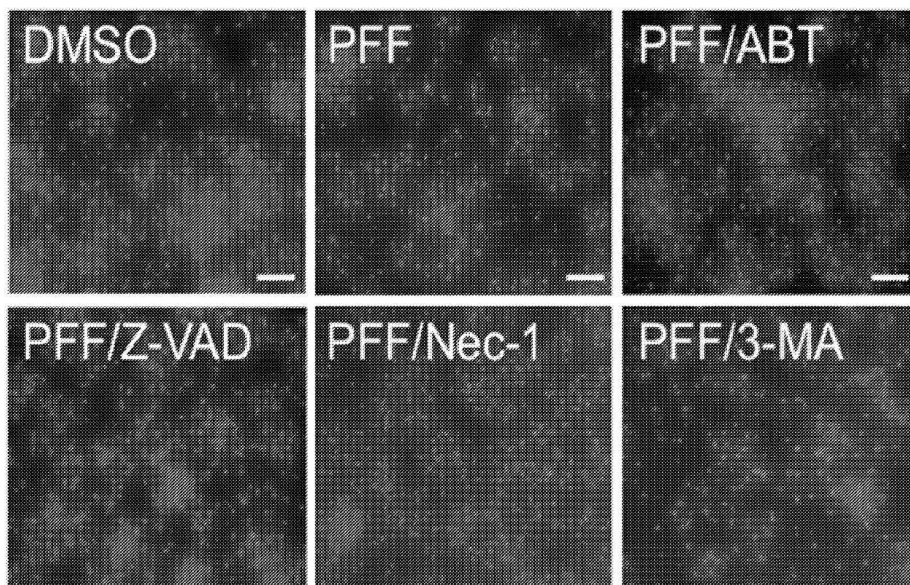
도면45



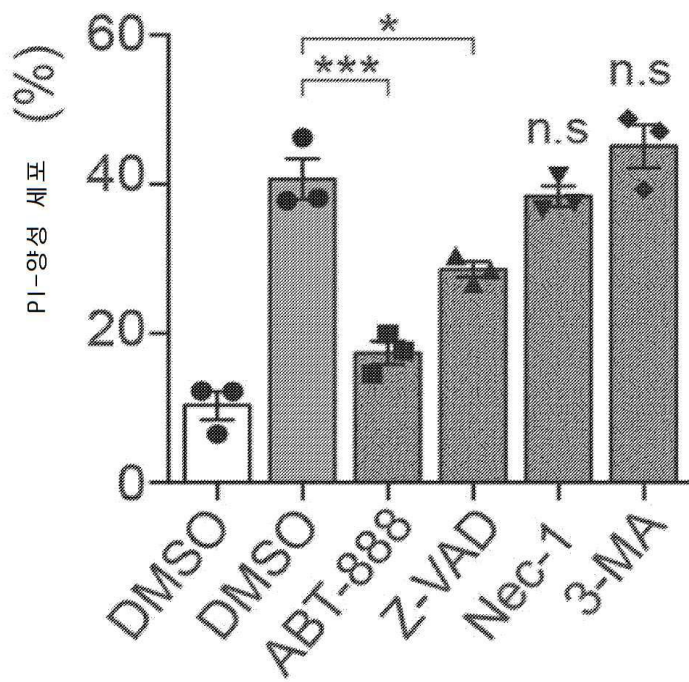
도면46



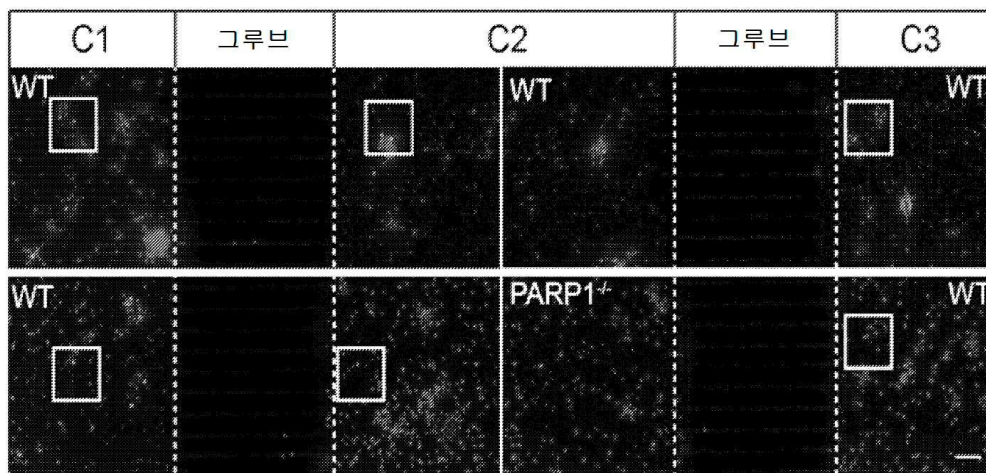
도면47



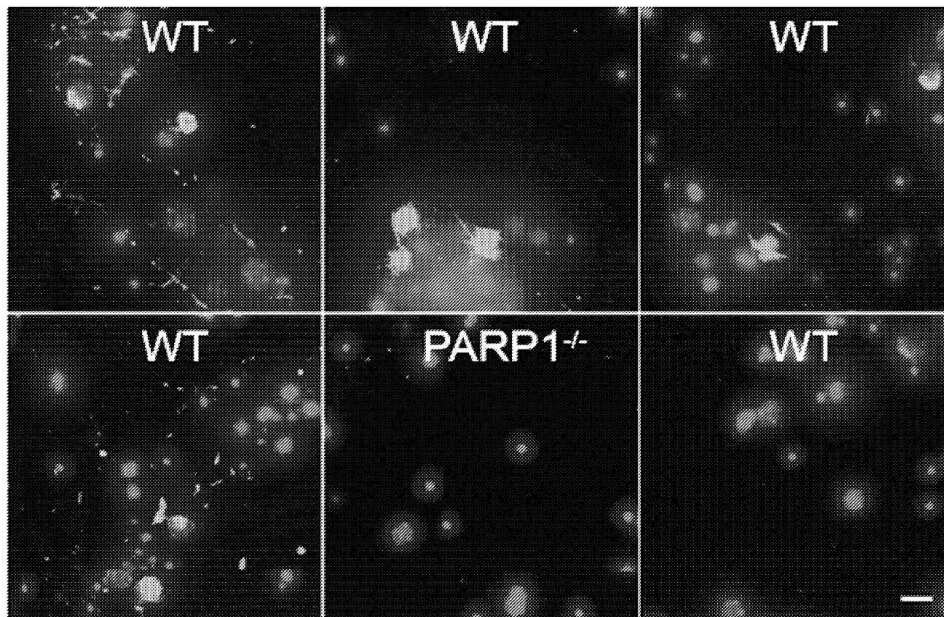
도면48



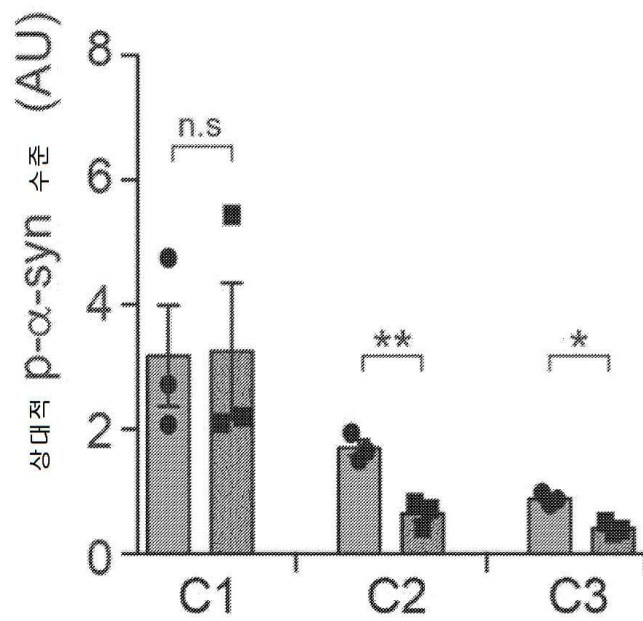
도면49



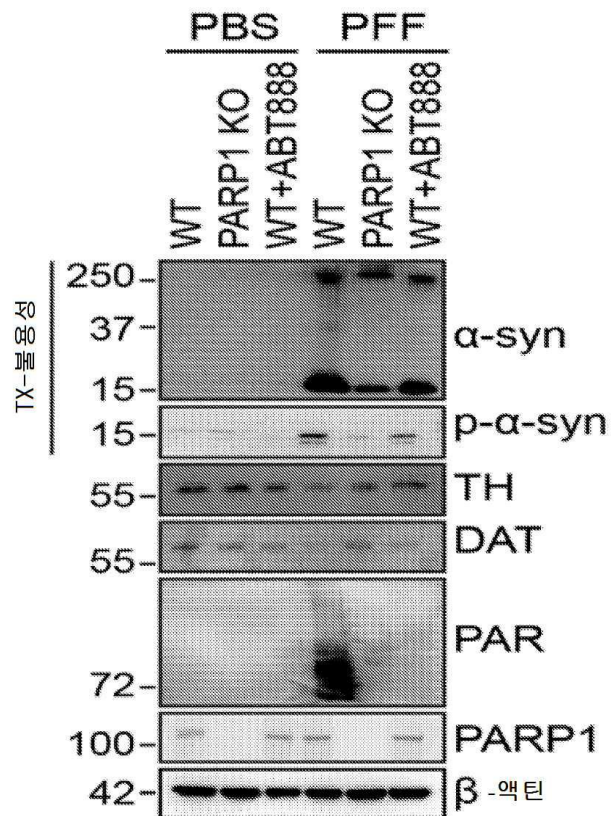
도면50



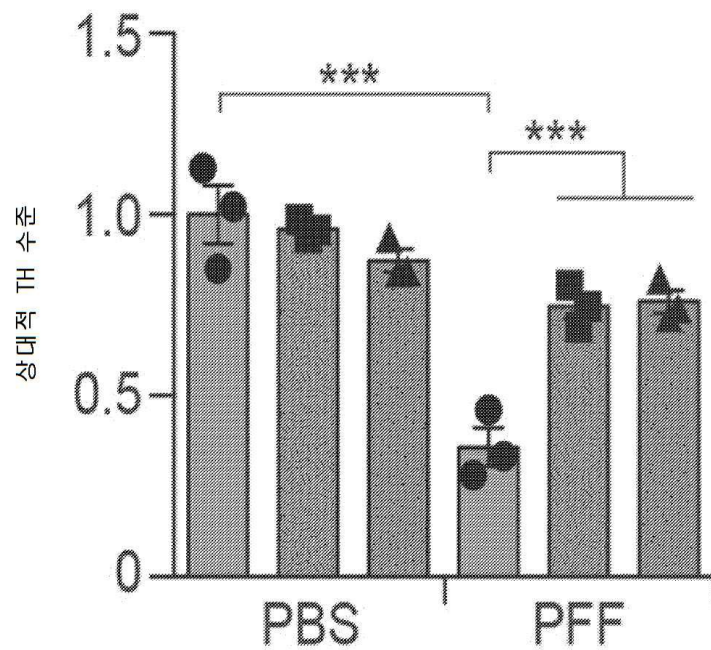
도면51



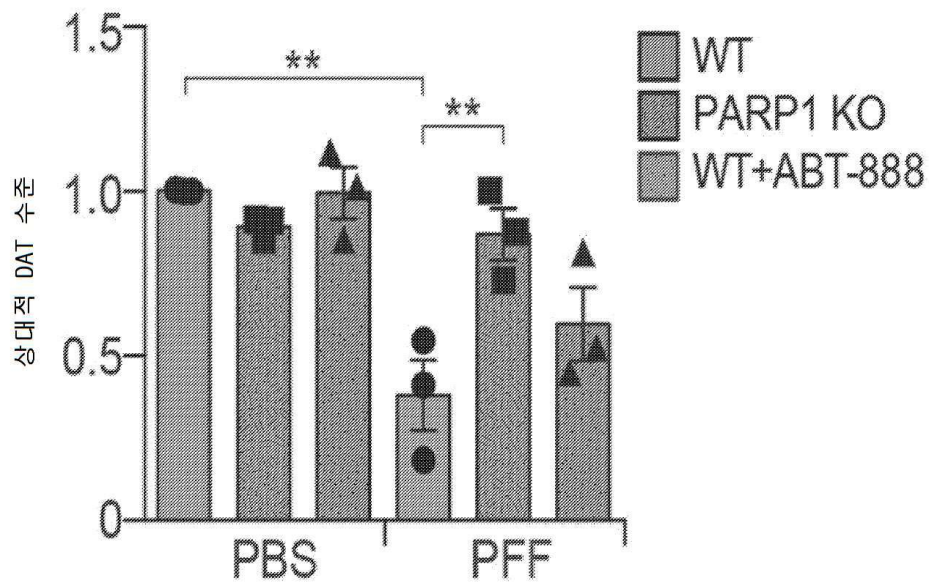
도면52



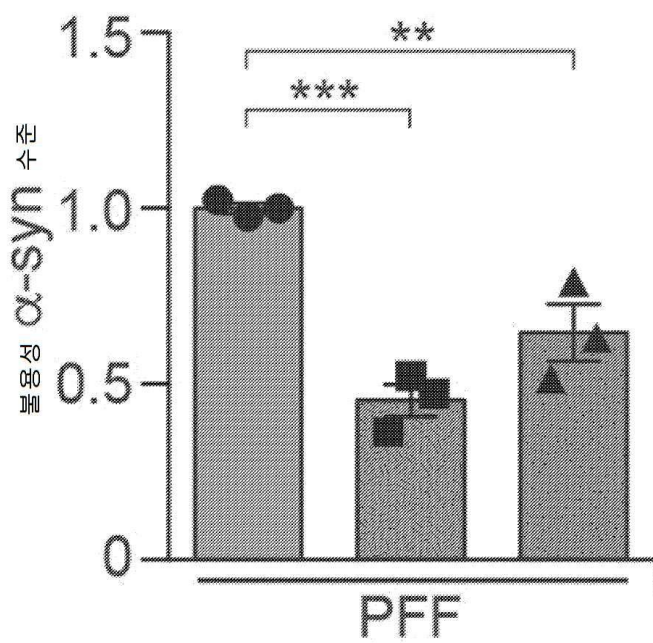
도면53



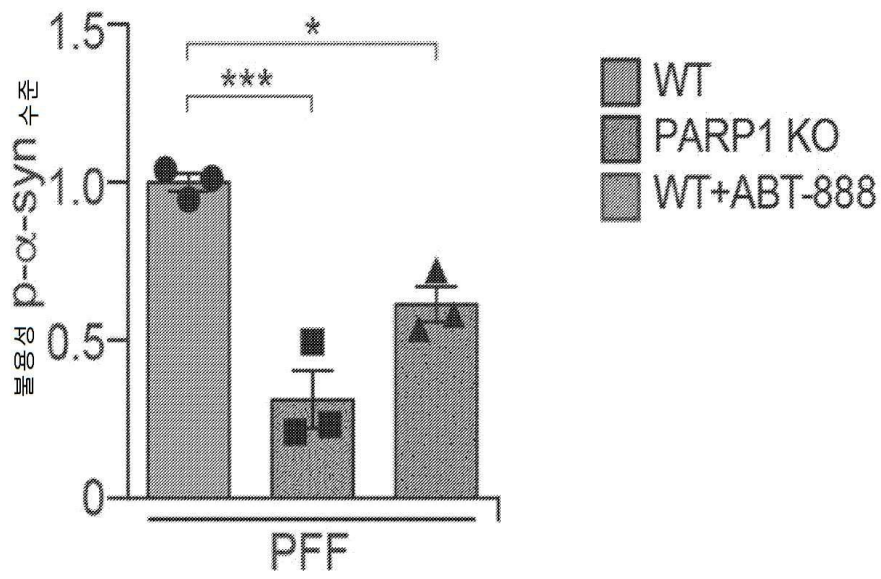
도면54



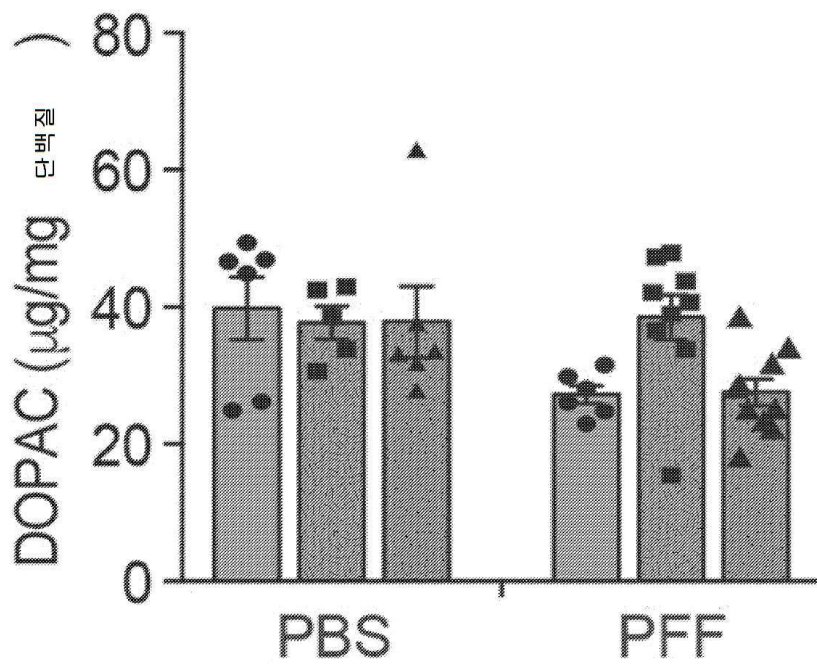
도면55



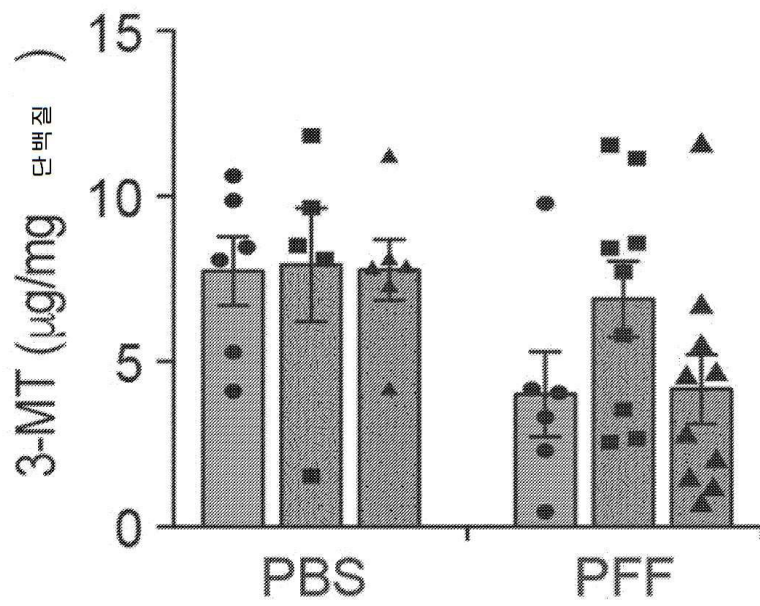
도면56



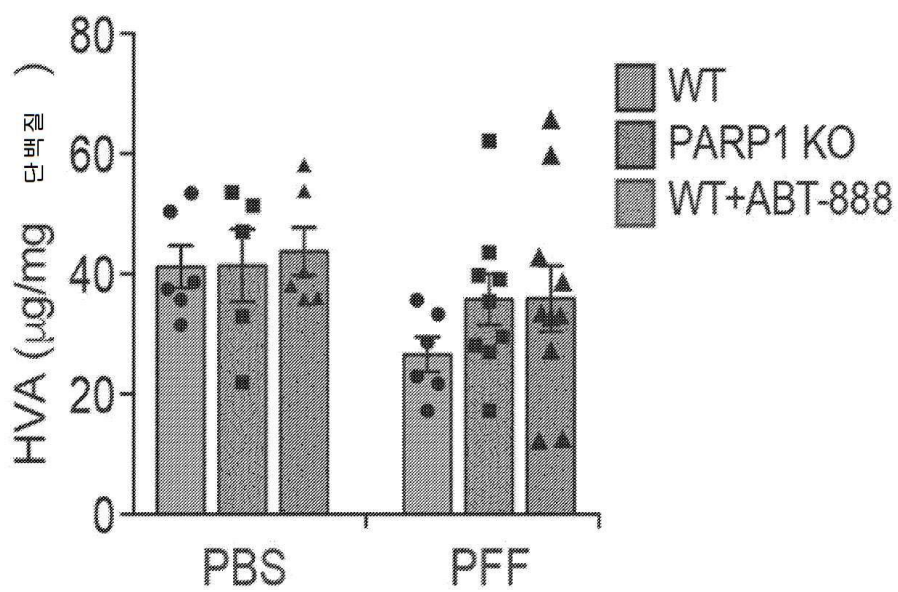
도면57



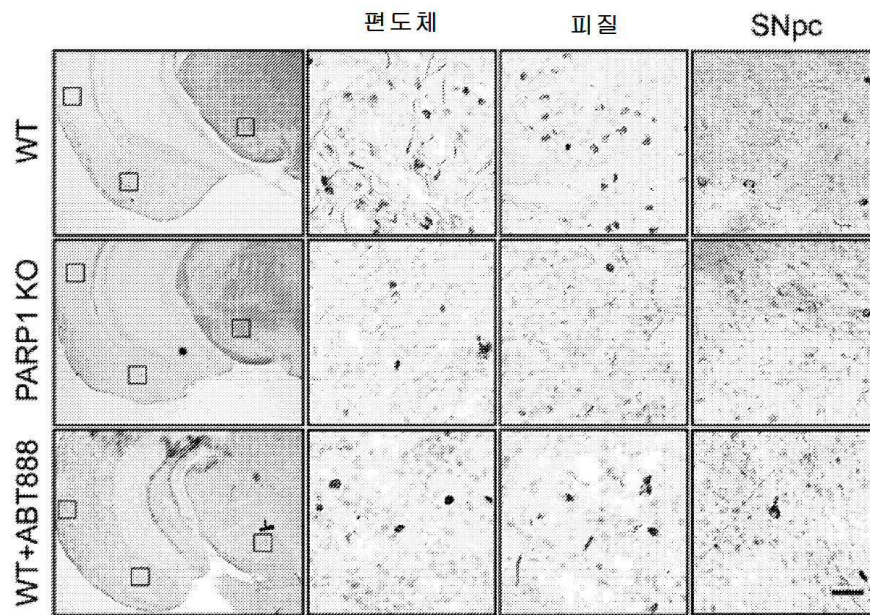
도면58



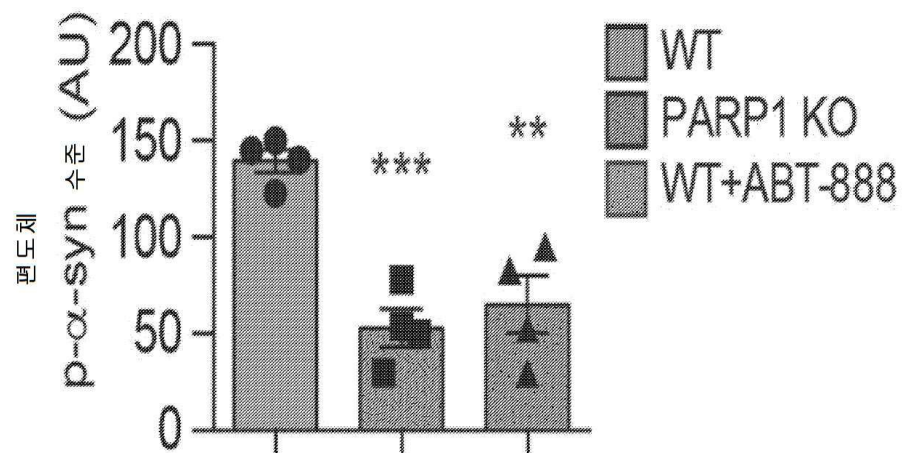
도면59



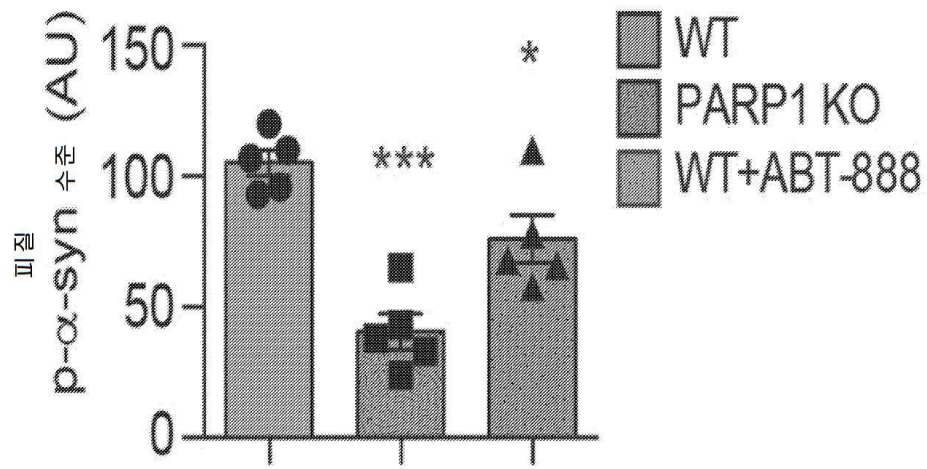
도면60



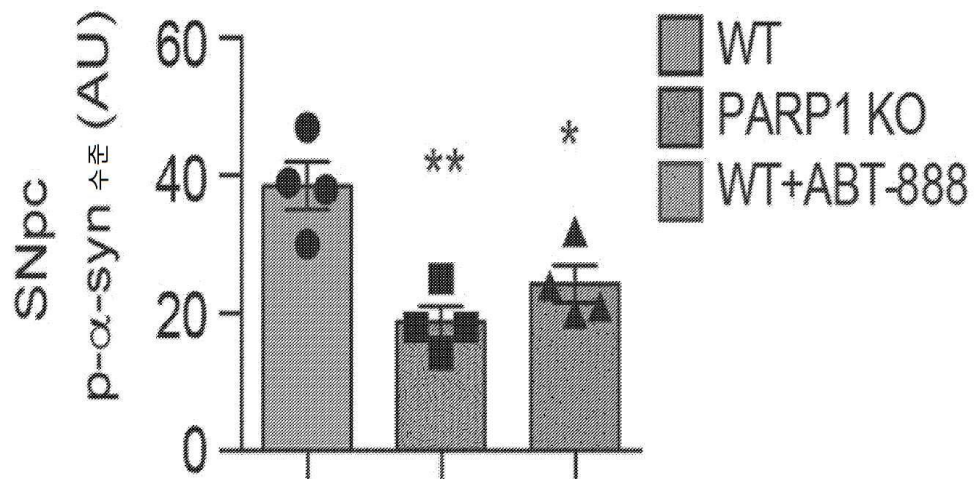
도면61



도면62

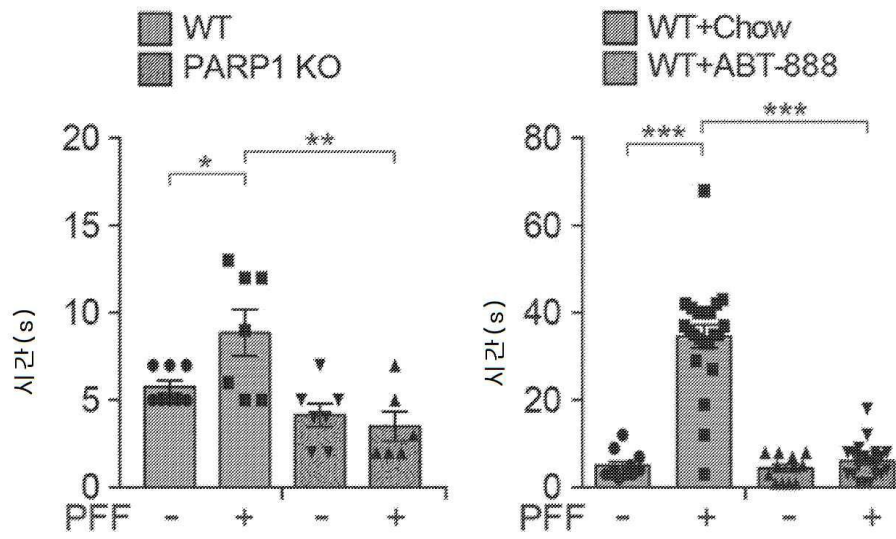


도면63



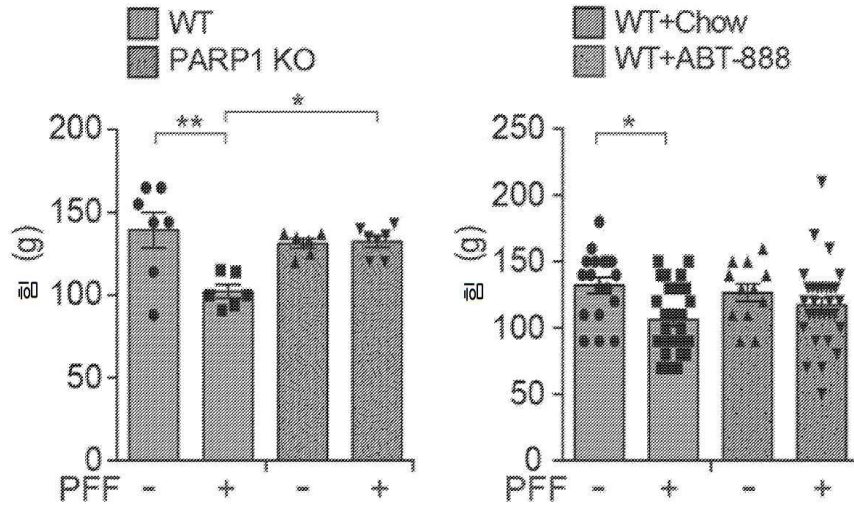
도면64

폴 테스트 (턴)

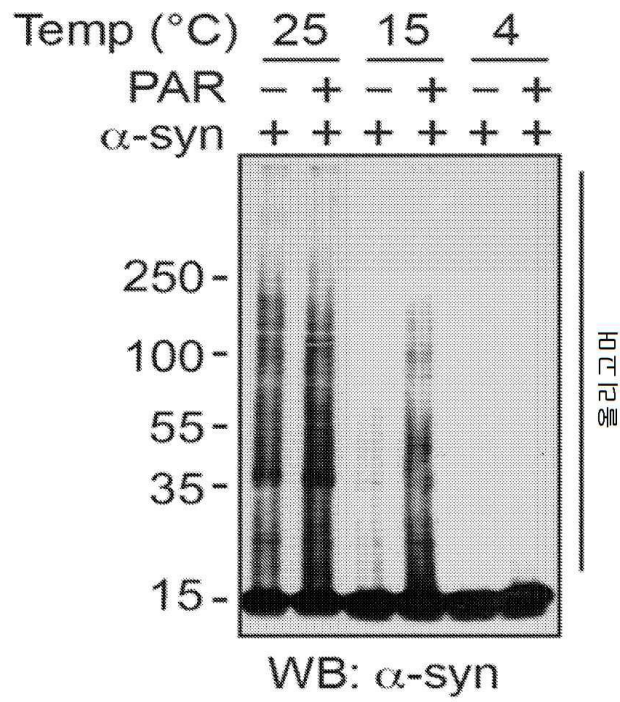


도면65

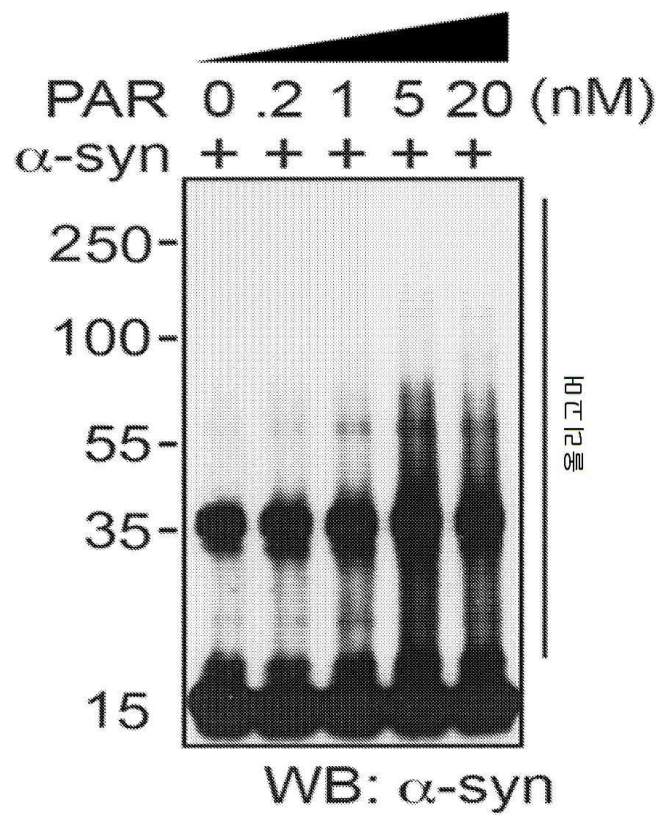
악력 (앞다리)



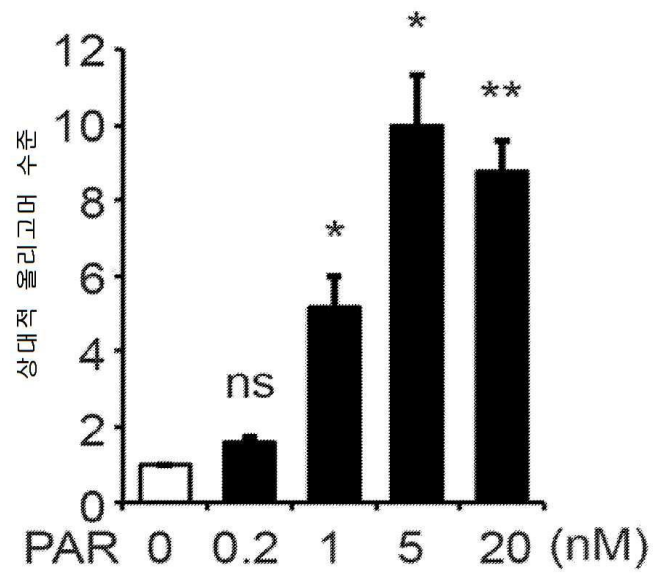
도면66



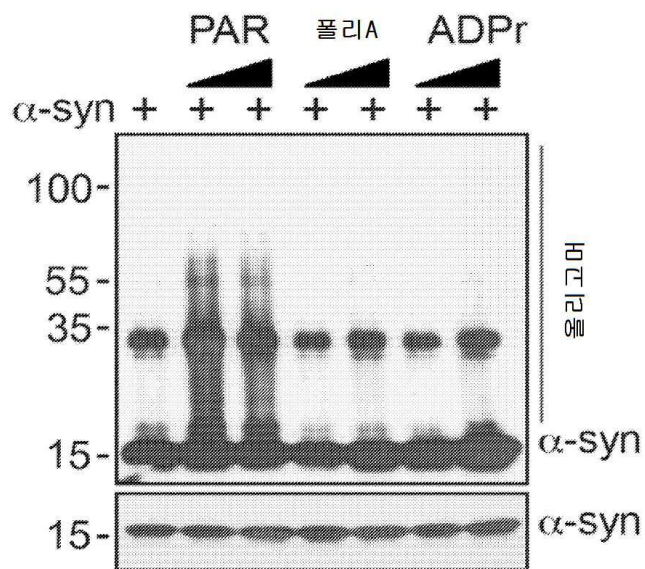
도면67



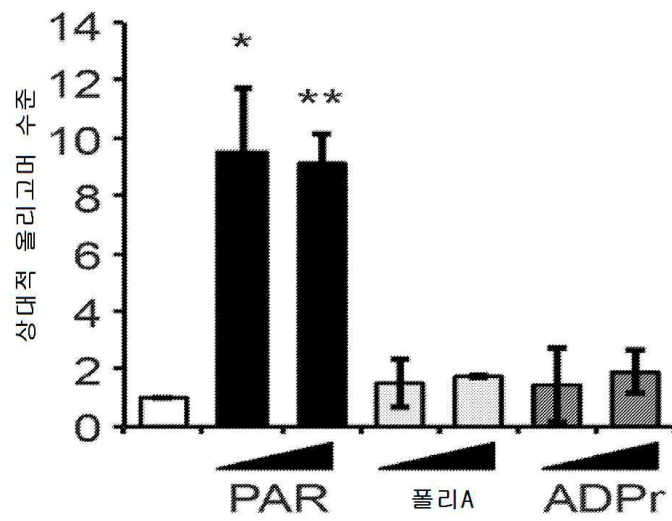
도면68



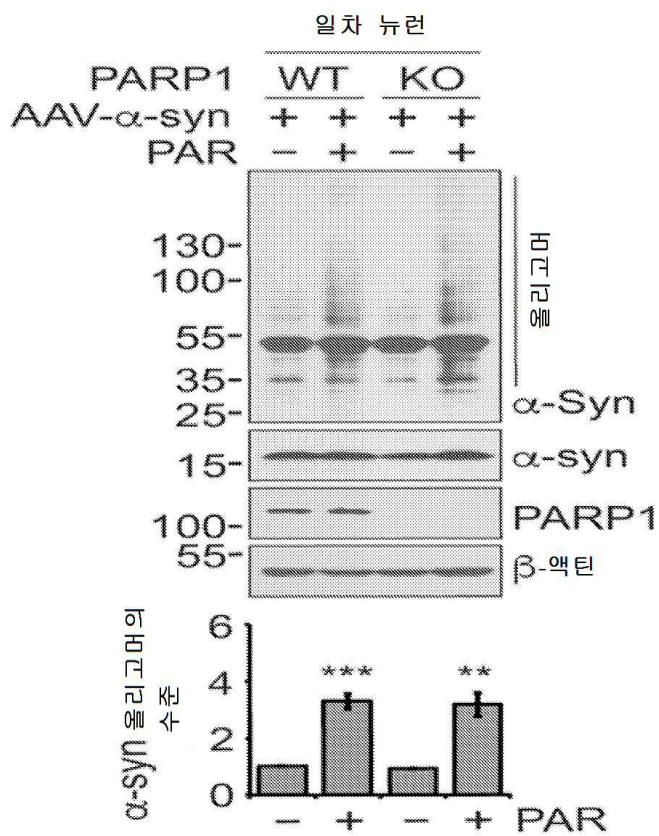
도면69



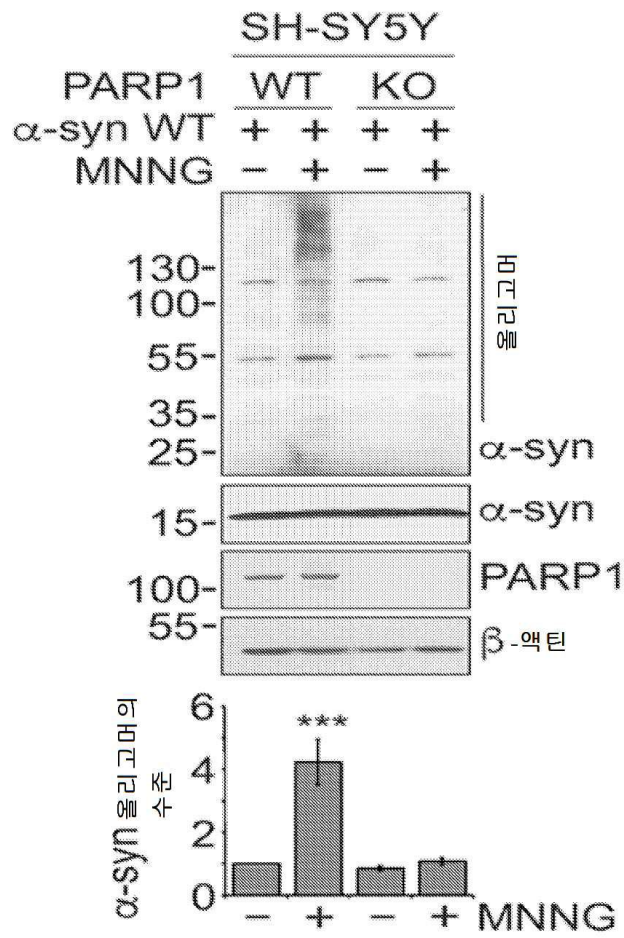
도면70



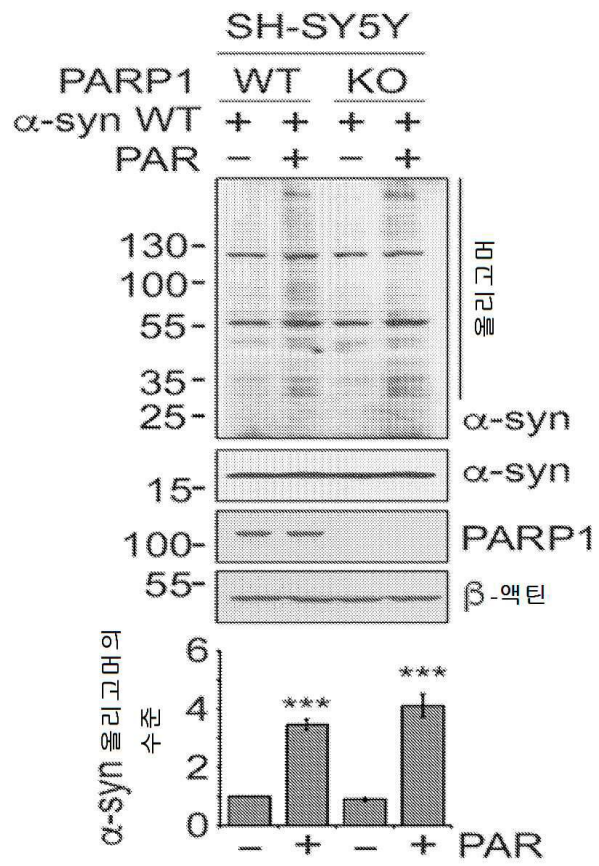
도면71



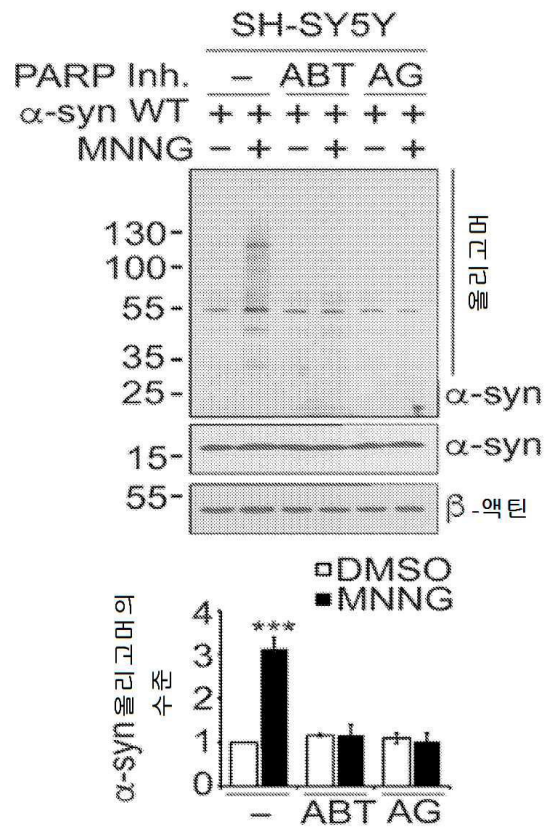
도면72



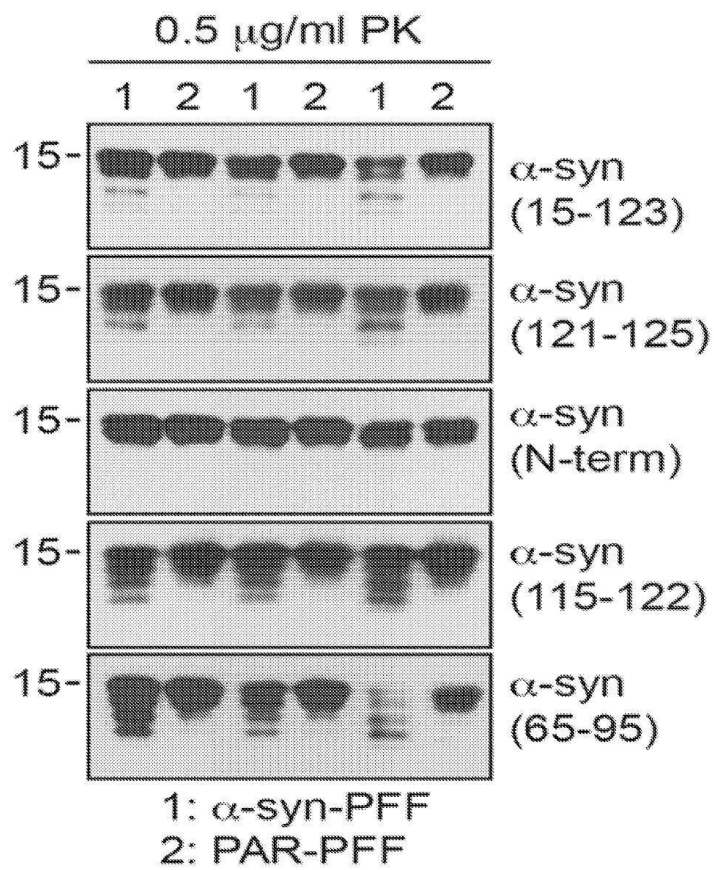
도면74



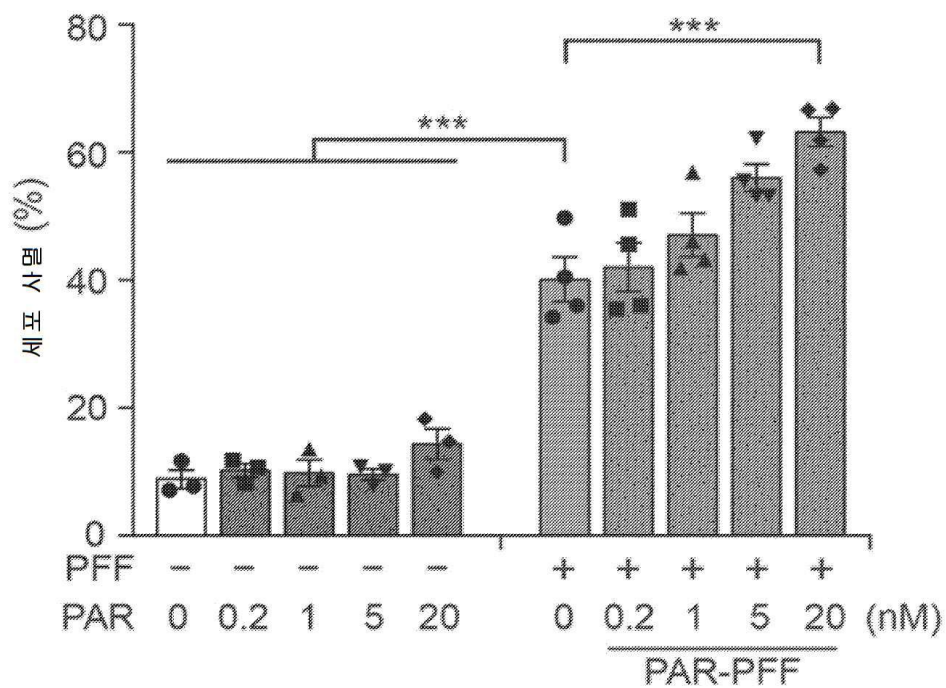
도면75



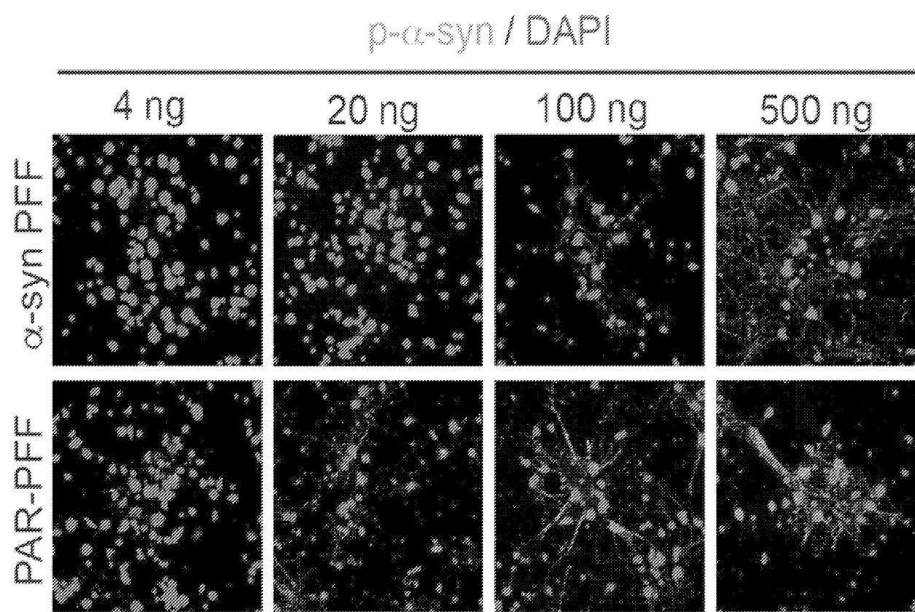
도면76



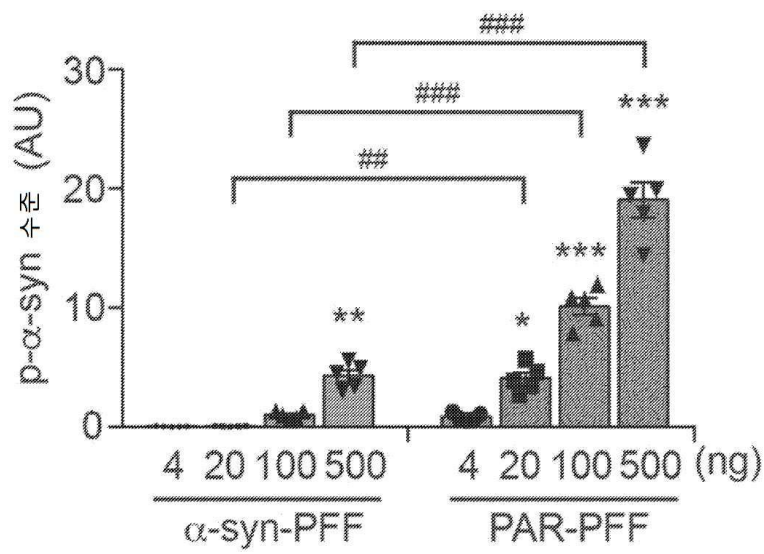
도면77



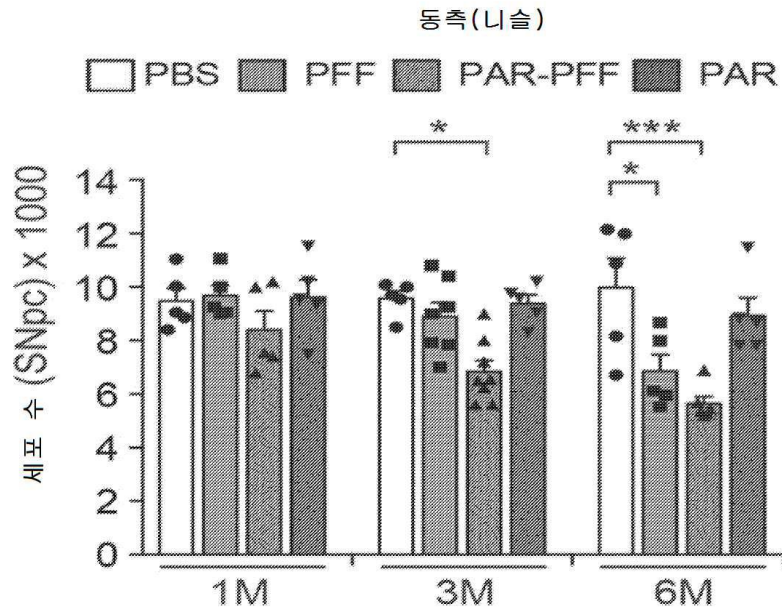
도면78



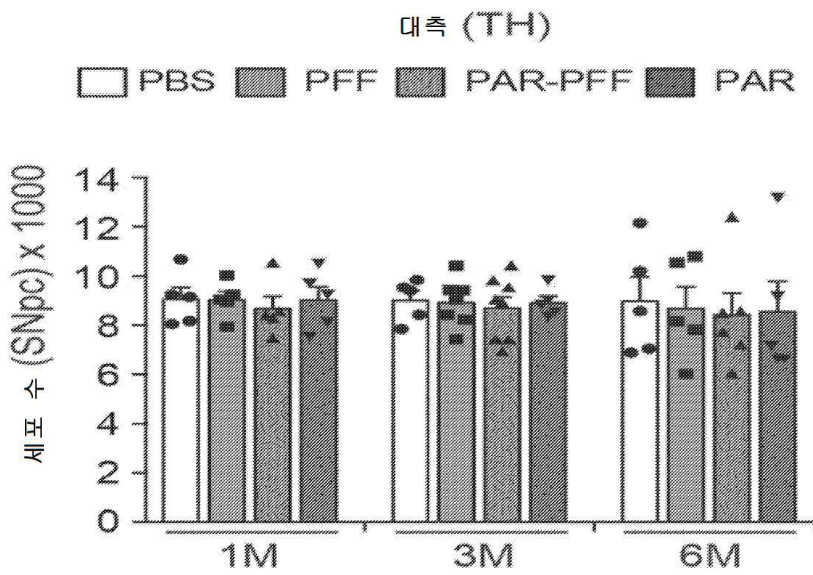
도면79



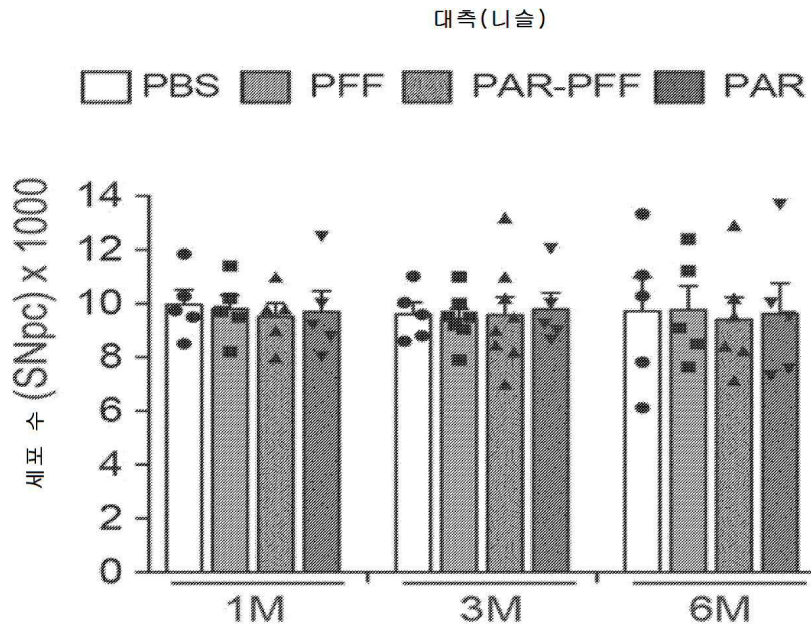
도면80



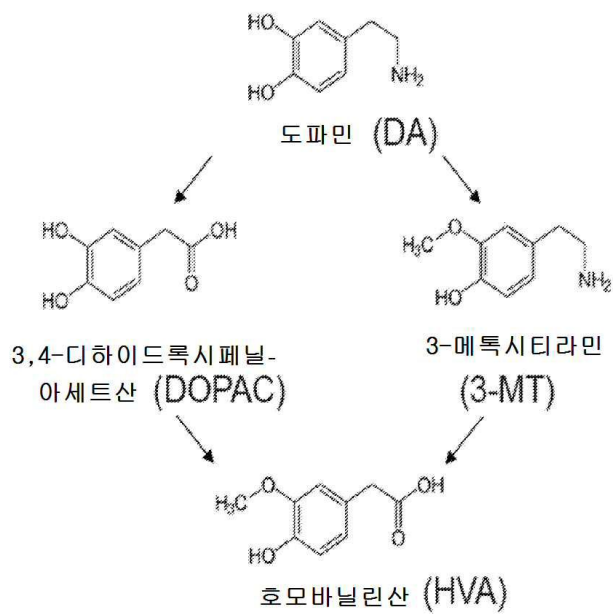
도면81



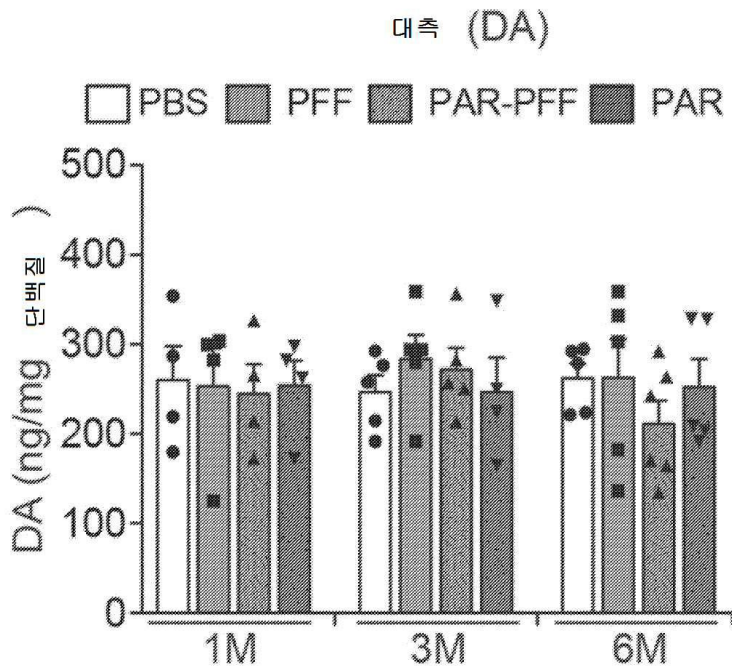
도면82



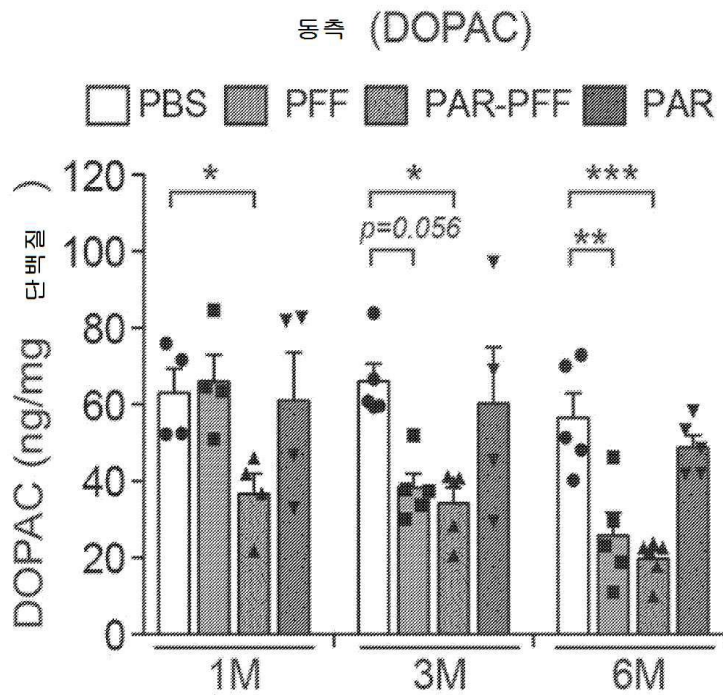
도면83



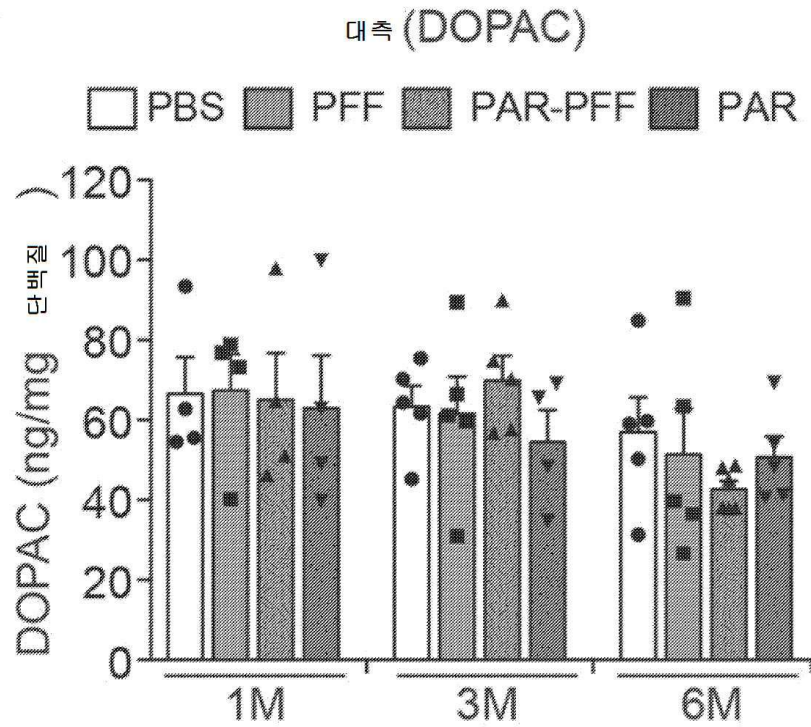
도면84



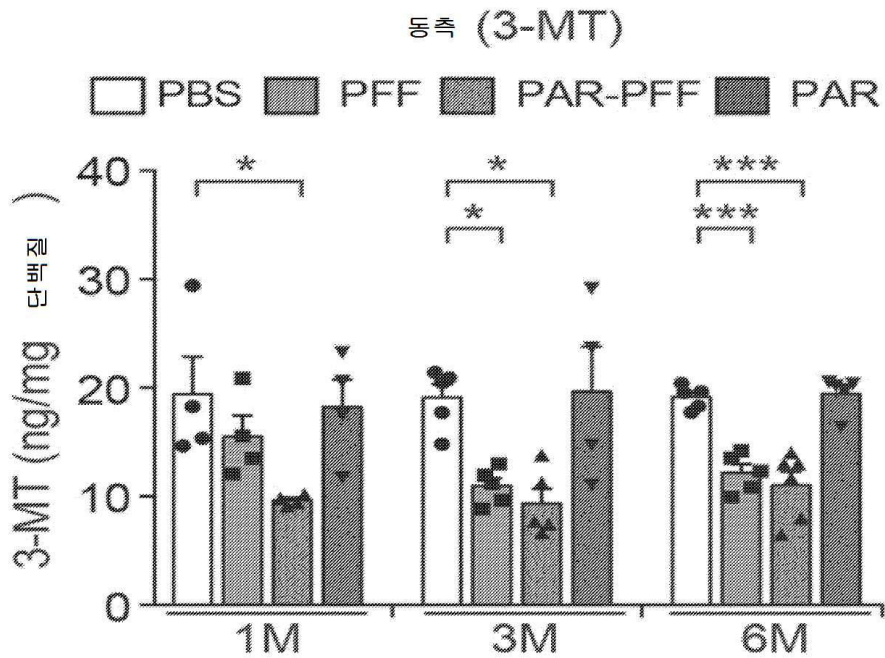
도면85



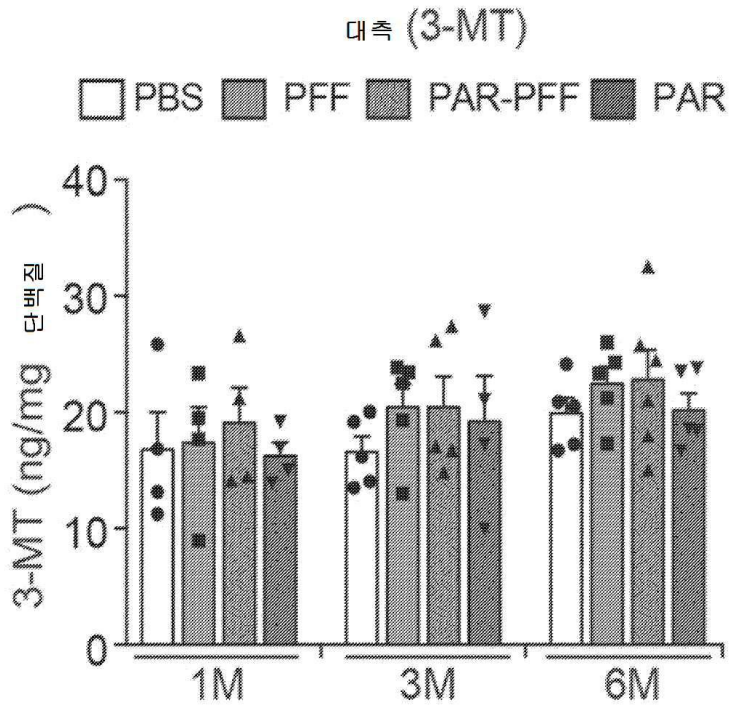
도면86



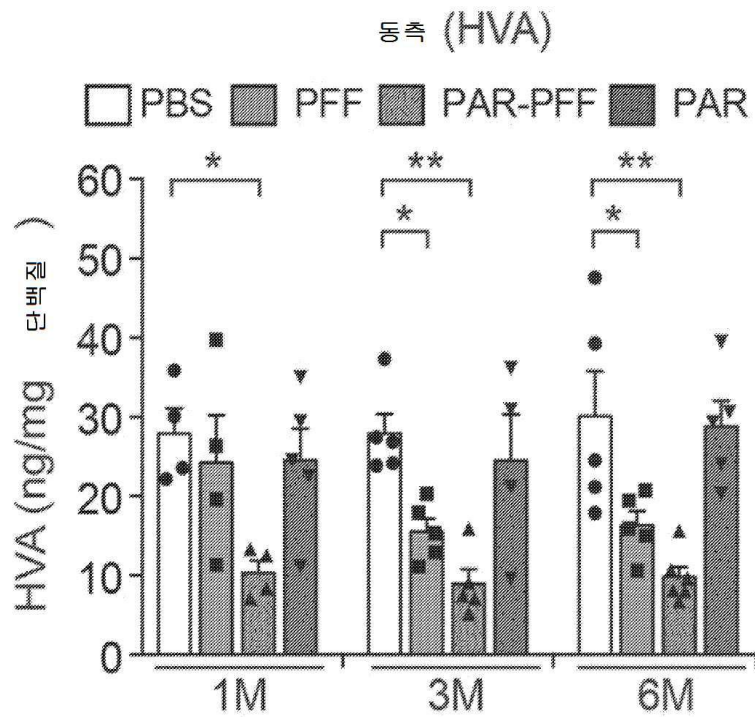
도면87



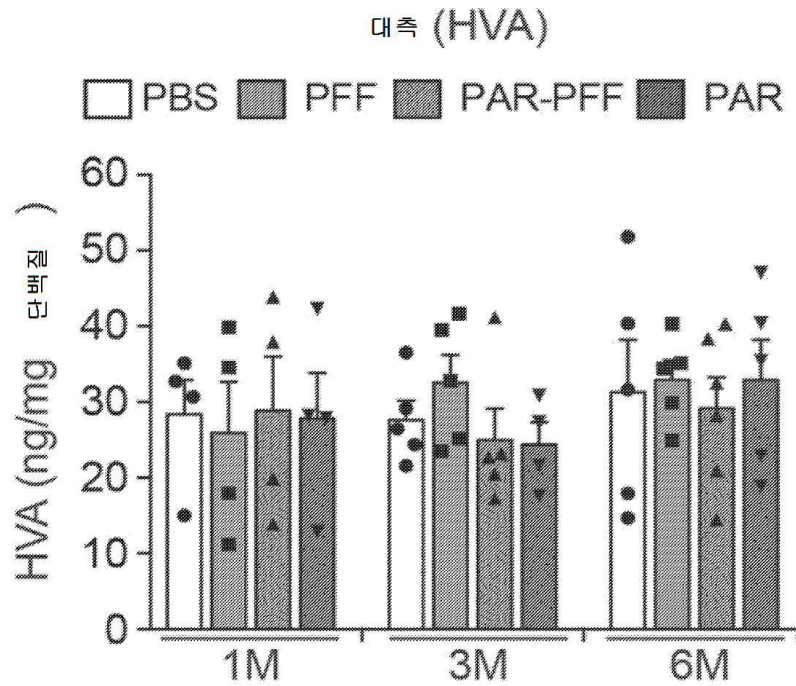
도면88



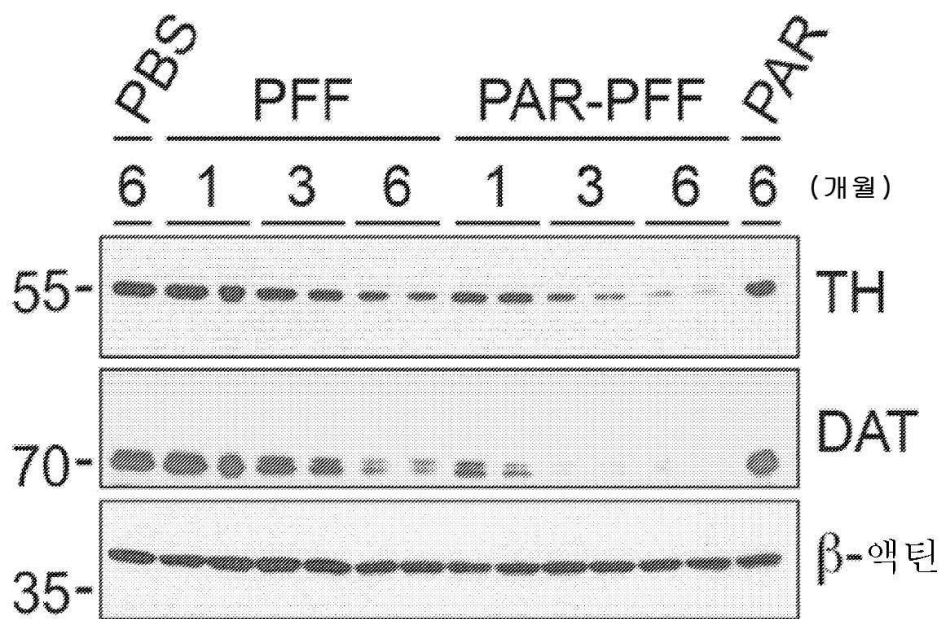
도면89



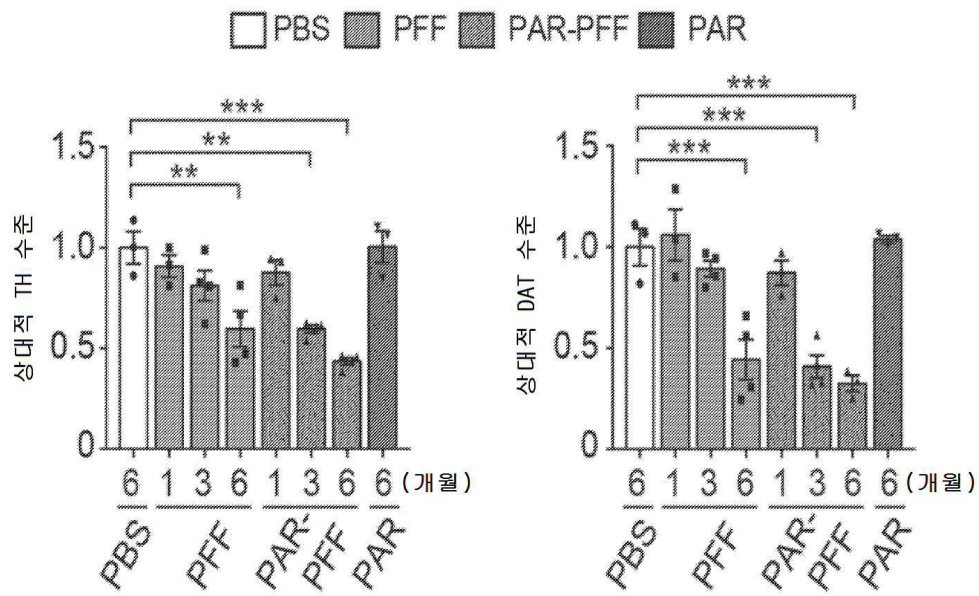
도면90



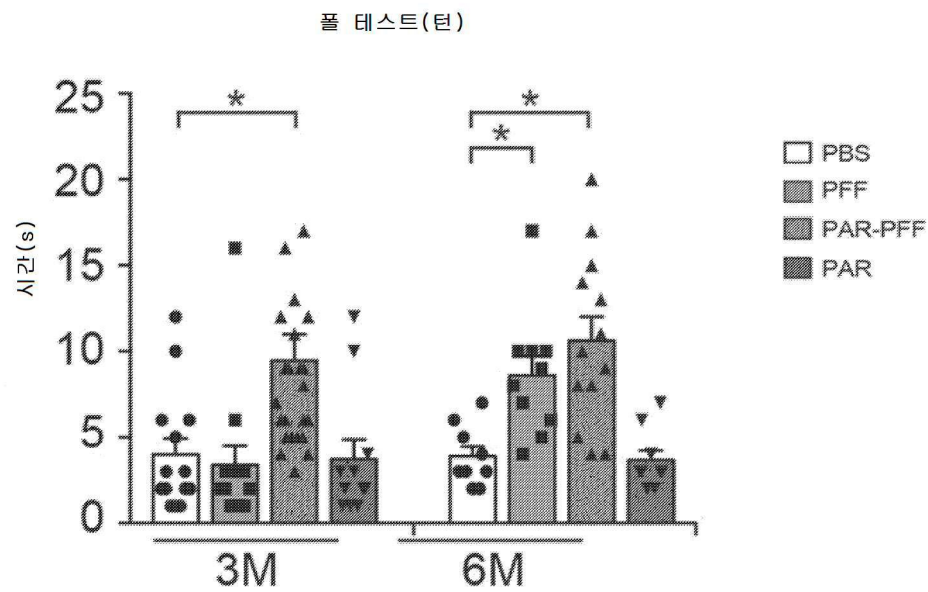
도면91



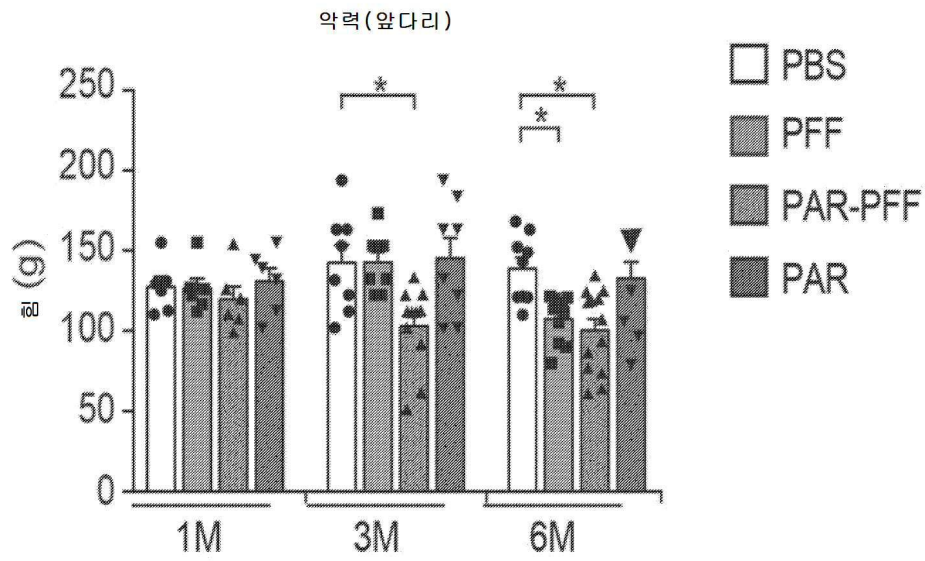
도면92



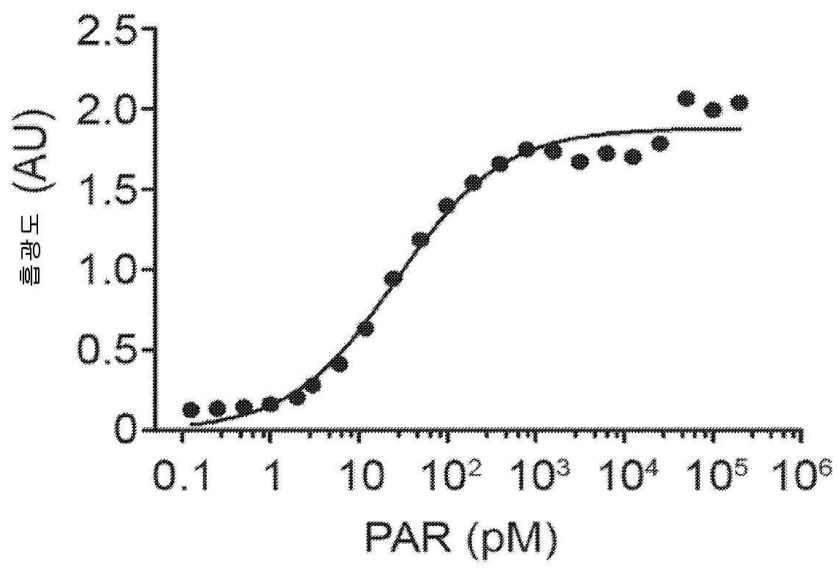
도면93



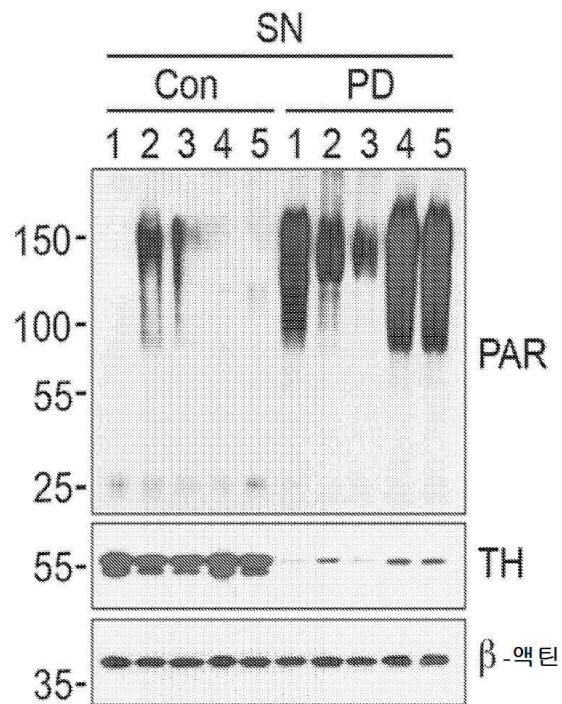
도면94



도면95



도면96



도면97

