

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2024년 9월 12일 (12.09.2024)



(10) 국제공개번호  
**WO 2024/186167 A1**

(51) 국제특허분류:

A61K 38/17 (2006.01)

A23L 33/17 (2016.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A23K 20/147 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/003028

(22) 국제출원일:

2024년 3월 8일 (08.03.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0030987 2023년 3월 9일 (09.03.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]: 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 세종대학교산학협력단 (INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY) [KR/KR]: 05006 서울특별시 광진구 능동로 209, Seoul (KR).

(72) 발명자: 송호석 (SONG, Hoseok); 13814 경기도 과천시 뚝골1로 39, Gyeonggi-do (KR). 권영수 (KWON, Young Soo); 06659 서울특별시 서초구 명달로28길 18, 301호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유)화우 (YOON & YANG (IP) LLC); 06164 서울특별시 강남구 영동대로 511, 34층, 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, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

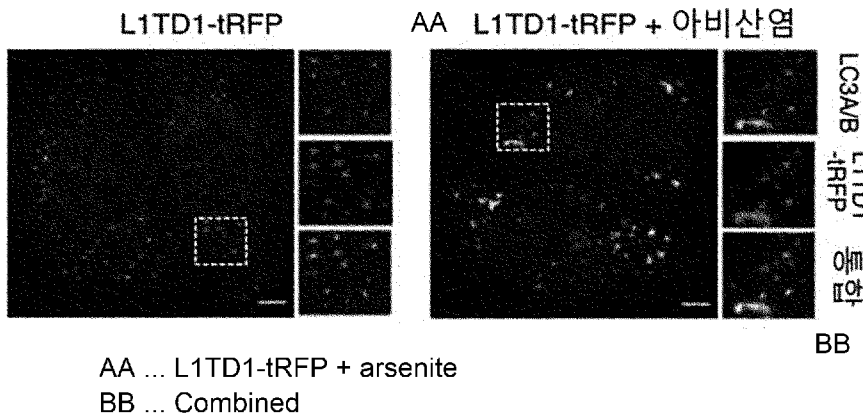
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING L1TD1 PROTEIN FOR PREVENTING OR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) 발명의 명칭: L1TD1 단백질을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating neurodegenerative diseases, containing L1TD1 protein as an active ingredient. The L1TD1 protein according to the present invention alleviates disease symptoms by decomposing RNA granules produced by stress or mutant proteins that cause neurodegenerative diseases, and thus can be effectively used for preventing, treating or alleviating neurodegenerative diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 L1TD1 단백질을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 L1TD1 단백질은 신경퇴행성 질환을 유발하는 변이 단백질 또는 스트레스에 의해 생성되는 RNA 과립을 분해함으로써 질환의 증상을 완화시켜 신경퇴행성 질환의 예방, 치료 또는 개선용으로 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2024/186167 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: L1TD1 단백질을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 L1TD1 단백질을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 신경퇴행성 질환은 신경세포(뉴런)의 점진적인 구조적, 기능적인 손실로 인해 발생하는 정신적 기능의 퇴화 질환이다. 신경퇴행성 질환은 신경계의 특정부위에 신경세포 퇴화가 진행되어 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위에 이상이 나타나 증상이 복합적으로 나타날 수도 있다. 환자가 보이는 임상 양상에 따라 질환을 진단하는데, 증상이 다양하게 나타나고 서로 다른 질환들이 공통적인 임상 증상을 보이는 경우가 많아 진단에 어려움이 있다.

- [4] 신경퇴행성 질환은 질환 징후가 서서히 나타나며, 노화와 함께 발병되는 경우가 많다. 일단 발병하면 사망까지 수년 혹은 수십년에 걸쳐 지속적으로 병이 진행되어 사회적 부담이 매우 크다. 발병원인에 가족력에 따른 유전적 영향이 상당히 있는 것으로 알려져 있으나 후천적인 요인도 중요하게 작용하는 것으로 판단된다. 신경퇴행성 질환은 그 임상 증상에 따라 크게 진행성 치매(알츠하이머병 등), 신경학적 이상(파킨슨병 등), 자세 및 운동 이상(파킨슨병 등), 진행성 실조증, 근위축 및 위약, 감각 및 운동 장애 등으로 구분된다.

- [5] 신경퇴행성 질환에 대한 여러 치료제가 연구되고 있으나, 많은 연구에도 불구하고 대부분 진행 속도를 늦추는 정도의 효과를 나타낼 뿐, 뚜렷한 치료 효능을 나타내는 경우는 드물다. 특히 척수성 근위축의 경우 antisense oligonucleotide (ASO)를 이용한 mRNA의 교정이 FDA 승인을 받았으나 효과가 제한적이며, 유전자 치료제인 ZOLGENSMA는 매우 고가이며 환자의 유전체에 변이를 유도하는 등의 위험성이 존재한다.

- [6] 한편, RNA granule(과립)은 세포내에서 동적으로 생성과 해소가 반복되며, 스트레스에 대한 대처 과정의 하나로 발생한다. 많은 신경퇴행성 질환에서 신경세포 내에 RNA 과립의 형성 및 해소 과정에 문제가 있으며, 해소되지 않은 RNA 과립은 세포에 독성을 나타내고 용해되지 않는 침전물을 생성할 수 있다. 또한 변이에 의해 이들 질환을 유도하는 단백질이 RNA 과립에 위치하며 이들의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

- [7] 따라서 세포내 RNA 과립은 신경퇴행성 질환을 치료하는 새로운 타겟이 될 수 있으며, RNA 과립의 해소를 촉진하기 위하여 세포내 mRNA의 번역(translation)

을 감소시키거나 자식작용(autophagy)을 증가시키는 간접적인 방법들이 시도되고 있다. 다만 실험실 수준에서는 어느정도 효과가 관찰되지만, 세포 활동에서 번역(translation) 및 자식작용의 역할을 고려하면, 이들 과정의 제어를 통해 실질적인 효과를 얻기에는 한계가 있다.

- [8] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 세포 내 RNA 과립을 해소하여 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 물질을 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, L1TD1 단백질이 신경퇴행성 질환의 개선용 소재로서 적용 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[9]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [10] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명의 일 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 신경퇴행성 질환의 개선, 예방

또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

- [17] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료를 위한 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 용도를 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한, L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 용도를 제공하는 것이다.
- [19] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[20]

### 과제 해결 수단

- [21] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [22] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [23] 상기 L1TD1은 줄기세포에서 발현되는 단백질로 세포 내 RNA 과립에 위치하는 것으로 알려져 있다. 상기 L1TD1의 아미노산 서열은 NCBI reference No. NP\_061952.3로서 서열번호 1로 표시되며, 상기 L1TD1의 유전자(mRNA) 서열은 NCBI reference No. NM\_019079.5로서 서열번호 2로 표시된다.
- [24] 본 발명에 있어서, 상기 L1TD1 단백질은 상기 아미노산 서열을 구성하는 펩타이드의 단편 또는 이의 유사체를 포함하는 개념일 수 있다.
- [25] 본 발명에 있어서, 상기 단편 또는 유사체는 상기 L1TD1의 아미노산 서열의 일부가 결실, 추가, 또는 치환되더라도 기능적 동일성을 갖는 경우 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 상기 기능적 동일성을 갖는다는 의미는 본 명세서 내에 서열로 한정된 L1TD1이 목적하는 효과를 달성할 수 있음을 의미한다.
- [26] 본 명세서에서 용어 “도메인(domain)”은 구조적, 기능적 특징을 가진 단백질의 일 영역으로서, 단백질 내에서 독립적인 구조를 갖거나, 특정한 기능을 수행할 수 있는 아미노산 서열의 연속적인 구간에 해당하는 영역을 의미한다.

- [27] 본 발명에 있어서, 상기 L1TD1을 구성하는 도메인은 OH(ORF1-homology regions)1 도메인, ER(glutamate-rich domain) 도메인 및 OH2 도메인 중 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 ER 도메인 및 OH2 도메인을 포함하는 것일 수 있으며, 더 바람직하게는 ER 도메인과 OH2 도메인의 조합 또는 이들이 융합된 융합단백질일 수 있다.
- [28] 바람직한 일 예시로써, 상기 OH1 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 4로 표시되며, 상기 OH1 도메인의 유전자(mRNA) 서열은 서열번호 5로 표시된다.
- [29] 바람직한 일 예시로써, 상기 ER 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 6으로 표시되며, 상기 ER 도메인의 유전자(mRNA) 서열은 서열번호 7로 표시된다.
- [30] 바람직한 일 예시로써, 상기 OH2 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 8로 표시되며, 상기 OH2 도메인의 유전자(mRNA) 서열은 서열번호 9로 표시된다.
- [31] 상기 L1TD1 단백질은 Long interspersed element 1(LINE-1 또는 L1)에서 유래된 단백질로 알려져 있으며, 구체적으로 본 발명의 실시예 및 도 11에서 확인하고 있는 바와 같이, L1TD1과 L1 OFR1(Open Reading Frame 1)은 유전적 동질성을 공유한다. 구체적으로 L1TD1를 코딩하는 두개의 엑손 중 첫번째 코딩 엑손은 L1 OFR1과 CTD(C-terminal domain) 영역이 보존되어 있고, 두번째 코딩 엑손은 L1 OFR1과 CC(coiled-coil motif), RRM(RNA recognition motif) 및 CTD(C-terminal domain) 영역이 보존되어 있다.
- [32] 상기 OH1 도메인, OH2 도메인 및 ER 도메인은 상기 각각의 아미노산 서열을 구성하는 펩타이드 단편 또는 이의 유사체를 포함하는 개념일 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 단편 또는 유사체는 상기 OH1 도메인, OH2 도메인 및 ER 도메인의 아미노산 서열의 일부가 결실, 추가, 또는 치환되더라도 기능적 동일성을 갖는 경우 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 상기 기능적 동일성을 갖는다는 의미는 본 명세서 내에 서열로 한정된 OH1 도메인, OH2 도메인 및 ER 도메인의 목적하는 효과를 달성할 수 있음을 의미한다.
- [34] 본 발명에 있어서, 상기 OH1 도메인, OH2 도메인 및 ER 도메인 또는 이를 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립을 분해하는 것일 수 있다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 L1TD1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립을 분해하는 것일 수 있다.
- [36] 상기 RNA 과립은 신경퇴행성 질환을 유발하는 변이 단백질 또는 세포가 받는 스트레스에 의해 생성되는 것일 수 있다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 변이되는 단백질은 FUS1, TDP-43, SOD-1 또는 SMN1일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 변이 단백질은 상기 단백질의 전부 또는 일부에 변이를 포함하는 단백질로서, 예를 들어 FUS1의 변이 단백질인 FUS1-493X 또는 TDP-43의 변이 단백질인 TDP-43-M337V일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 스트레스는 산화 스트레스, 삼투압 스트레스 또는 고온 스트레스일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [40] 본 발명에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 루게릭병, 전두측엽 변성, 척수성 근 위축, 알츠하이머 질환, 파킨슨병, 헌팅턴무도병, 척수소뇌변성, 프리온질환, 크로이츠펔트야콥병, 전두측두엽치매, 혈관치매, 루이소체치매 및 파킨슨병에 동반된 치매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [41] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는, HeLa 세포주 내 L1TD1을 도입한 후 산화 스트레스, 삼투압 스트레스 및 열 스트레스를 각각 가하였을 때, L1TD1이 도입되지 않은 대조군에 비해 스트레스 과립을 함유하는 세포의 수가 현저히 감소함을 확인하였으며, L1TD1을 세포주에 도입하였을 때 L1TD1이 도입되지 않은 대조군에 비해 신경퇴행성 질환을 유발하는 돌연변이 단백질에 의해 생성되는 과립을 현저히 감소시킴을 확인하였다.
- [42] 본 발명의 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여를 통해 신경퇴행성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 본 발명의 용어 "치료"는 본 발명의 조성물을 투여함으로써 발병한 신경퇴행성 질환이 호전 또는 완화되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 용어 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 신경퇴행성 질환이 호전되는 모든 행위를 의미한다.
- [43] 본 발명의 용어 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 투여 경로에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 투여 경로는 국소 경로, 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로일 수 있으며, 두 가지 이상의 경로를 조합하여 사용할 수도 있다. 두 가지 이상 경로의 조합의 예는 투여 경로에 따른 두 가지 이상의 제형의 약물이 조합된 경우로서 예컨대 1차로 어느 한 약물은 정맥 내 경로로 투여하고 2차로 다른 약물은 국소 경로로 투여하는 경우이다.
- [44] 약학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 '대한민국약전'을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다.
- [45] 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따른 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 '대한민국약전'을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제는 비자연적 담체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [46] 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 약학적 조성물의 구체적인 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 투여량 및 횟수는 어떠한 면에서든 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [48] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로를 통해 투여될 수 있으며, 인간인 경우가 바람직할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있으며, 예를 들어 경구, 정맥, 근육 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 본 발명의 용어 "유효성분으로 포함하는"의 의미는, 약학적 조성물으로써 신경퇴행성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있는 정도의 유효량을 포함하는 것을 말한다.
- [50] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [51] 상기 L1TD1, 도메인 및 신경퇴행성 질환은 전술한 바와 같다.

- [52] 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 구체적으로는 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류, 음료류, 껌류 및 캔디류로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [53] 또한, 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품 첨가물이 포함될 수 있다. 식품 첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있으며, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 상기 식품 첨가물은 기능면에 있어서 감미제, 풍미제, 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등으로 구분되며, 본 발명의 식품 조성물이 달성하고자 하는 목적에 부합하는 한 특별히 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 상기 식품 첨가물 이외에 기능성과 영양보충의 목적으로 당업계에 공지되고 식품 첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질 또는 미네랄류를 포함할 수 있다. 상기 생리활성 물질 또는 미네랄류는 본 발명의 식품 조성물이 달성하고자 하는 목적에 부합하는 한 특별히 제한되지 않는다.
- [54] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품 첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 유효량으로 포함될 수 있으며, 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품 첨가물과 관련하여서는 각국 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [55] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [56] 상기 L1TD1, 도메인 및 신경퇴행성 질환은 전술한 바와 같다.
- [57] 본 발명에서 용어 "건강기능식품"이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말한다. 상기 "기능성"은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 제조시 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [58] 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있으며, 상기 제형의 비제한적인 예로는 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류, 음료류, 껌류 및 캔디류로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.

- [59] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물을 제공한다.
- [60] 상기 L1TD1, 도메인 및 신경퇴행성 질환은 전술한 바와 같다.
- [61] 본 발명의 의약품 조성물은 상기 L1TD1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 외에 의약품 조성물에 통상적으로 사용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 연마제, 습윤제, 결합제, 기포제, 감미제, 방부제, 약효성분, 향미제, 색소, 용제, 증백제, 가용화제 또는 pH 조정제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 의약품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의약품일 수 있다. 상기 의약품의 비제한적인 예로는, 치약, 구강청결제, 껌, 캔디류, 구강스프레이, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬(varnish), 구강필름 및 잇몸 마사지 크림으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [63] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [64] 상기 사료 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.
- [65] 본 발명에서 용어, "사료"는 특히 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.
- [66] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [67] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 신경퇴행성 질환의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료방법을 제공한다.

- [68] 본 발명에서 "유효량"은 상술한 본 발명의 조성물이 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [69] 본 명세서에서 용어 "대상(subject)"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아피그일 수 있고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미할 수 있다.
- [70] 본 명세서에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상 (subject)에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다.
- [71] 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효 성분을 표적 세포, 조직 또는 기관으로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [72] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료를 위한 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 용도를 제공한다.
- [73] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자 용도를 제공한다.

[74]

### 발명의 효과

- [75] 본 발명에 따른 L1TD1 단백질은 신경퇴행성 질환을 유발하는 변이 단백질 또는 스트레스에 의해 생성되는 RNA 과립을 분해함으로써 질환의 증상을 완화시켜 신경퇴행성 질환의 예방, 치료 또는 개선용으로 유용하게 사용될 수 있다.

[76]

### 도면의 간단한 설명

- [77] 도 1은 CRISPR/Cas9을 이용한 본 발명의 유전자 도입 모식도(A) 및 GFP가 결합된 eIF3b 단백질의 발현(B)을 확인한 결과이다.
- [78] 도 2는 산화 스트레스(아비산염 첨가)에 의한 HeLa-eIF3B-GFP 세포주 내 스트레스 과립 형성을 확인한 결과이다.
- [79] 도 3은 산화 스트레스에 의해 생성되는 과립을 함유하는 세포주에 L1TD1를 도입했을 때 스트레스 과립 형성(A) 및 과립 함유 세포 수 변화를 확인한 결과이다.
- [80] 도 4는 삼투압 스트레스에 의해 생성되는 과립을 함유하는 세포주에 L1TD1를 도입했을 때 스트레스 과립 형성(A) 및 과립 함유 세포 수 변화(B)를 확인한 결과이다.

- [81] 도 5는 열 스트레스에 의해 생성되는 과립을 함유하는 세포주에 L1TD1를 도입했을 때 스트레스 과립 형성(A) 및 과립 함유 세포 수 변화(B)를 확인한 결과이다.
- [82] 도 6은 산화 스트레스를 받은 HeLa-eIF3B-GFP 세포주 내 생성되는 eIF3B 과립, G3BP1, G3BP2, DDX6와 L1TD1의 위치를 확인한 결과이다.
- [83] 도 7은 아비산염 처리 전후 L1TD1 단백질과 LC3 단백질의 위치를 확인한 결과이다.
- [84] 도 8은 아비산염 처리, 아비산염 및 클로로퀸 처리 후 L1TD1 단백질 양을 확인한 결과이다.
- [85] 도 9는 신경퇴행성 질환을 유발하는 돌연변이에 의해 생성되는 과립에 L1TD1 단백질이 미치는 영향을 확인한 결과이다(A: TDP-43-M337V 단백질 및 L1TD1 발현에 의한 과립 형성 확인, B: FUS1-493X 단백질 및 L1TD1 발현에 의한 과립 형성 확인, C: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V를 각각 L1TD1과 함께 발현시켰을 때 eIF3B 과립 함유 세포 수 변화).
- [86] 도 10은 HeLa-eIF3B-GFP 세포주 내 FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질에 의해 생성되는 과립과 L1TD1 단백질의 위치를 확인한 결과이다(A: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질과 eIF3B의 동일 위치 확인, B: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질과 L1TD1 동일위치 확인).
- [87] 도 11은 L1 ORF1p과 L1TD1 단백질을 구성하는 도메인 영역의 개략도를 나타낸 것이다.
- [88] 도 12는 L1TD1 단백질의 결손 돌연변이체인 OH2, OH1-OH2 및 ER-OH2에 대한 개략도를 나타낸 것이다.
- [89] 도 13은 L1 ORF1p 및 L1TD1 결손 돌연변이체의 세포 내 위치(A) 및 스트레스 과립 함유 세포 수 변화(B)를 확인한 결과이다.
- [90] 도 14는 신경퇴행성 질환을 유발하는 돌연변이에 따른 L1 ORF1p 및 L1TD1 결손 돌연변이체의 세포 내 위치(A) 및 스트레스 과립 함유 세포 수 변화(B)를 확인한 결과이다.
- [91] 도 15는 ER-OH2 결손 돌연변이체의 세포 내 위치를 확인한 결과이다.
- [92] 도 16은 L1TD1의 전장 단백질 및 결손 돌연변이체의 유전자 발현량을 확인한 결과이다.

[93]

### 발명의 실시를 위한 형태

- [94] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[95]

- [96] 실시예 1. HeLa-eIF3B-GFP 세포주 제조

- [97] eIF3B는 스트레스 과립 마커로 신경퇴행성 질환의 신경세포 내에서 해소(분해)되지 않을 경우 세포에 독성을 나타내며 용해되지 않는 침전물을 생성하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양한 스트레스 조건 하에서 다른 단백질 및 RNA와 함께 스트레스 과립을 형성한다. 스트레스 과립의 형성 및 분해의 관찰이 용이하도록 eIF3B 유전자와 GFP를 융합한 형태의 단백질(eIF3B-GFP)을 발현하는 HeLa 세포주(HeLa-eIF3B-GFP 세포주)를 제조하였다.
- [98] 구체적으로, Neon transfection system(Thermo)를 이용하여 pRGEN-CMV-Cas9 (Toolgen), 가이드 플라스미드 및 타겟 컨스트럭트를 HeLa 세포에 도입하여, puromycin 저항성을 가지는 클론을 수득하였다. 타겟 컨스트럭트는 HeLa 세포 유전체중 EIF3B 유전자의 해당부분을 PCR을 이용하여 확보하고 pBluescript-SK + 벡터에 삽입한 다음 stop codon 앞 부분에 GFP-IRES-puro 카세트를 삽입하여 제조하였다. 도 1A은 CRISPR/Cas9을 이용한 유전자 적중 방법을 나타낸 것이다. 이후, 상기 방법으로 제조한 HeLa 세포주가 성공적으로 제작되었는지를 확인하기 위하여 전기영동을 실시하였다. 그 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이 CRISPR/Cas9를 이용하여 제작된 HeLa 세포주는 eIF3B(eIF3B-GFP) 및 GFP(eIF3B-GFP)에 밴드가 나타나, 성공적으로 eIF3B 유전자와 GFP를 융합한 형태의 단백질(eIF3B-GFP)을 발현하는 HeLa 세포주(HeLa-eIF3B-GFP 세포주)가 제작되었음을 확인하였다.
- [99] 제조된 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 산화 스트레스를 일으키는 arsenite(0.5 mM sodium arsenite, 아비산 나트륨)를 첨가하고 15분 경과 후, 형광 이미지 분석을 수행하였다.
- [100] 형광 이미지 분석을 위해 각 세포주를 차가운 메탄올로 -20°C에서 5분간 고정하고 PBS로 세척 후 이미지를 확보하였다. 형광염색의 경우 고정된 세포를 0.1% Tween-20 와 2.5% BSA를 함유한 PBS로 상온에서 40분간 처리하였다. 1차 항체는 0.1% Tween-20와 0.5% BSA를 함유한 PBS에 희석한 후 4°C에서 12시간 처리하였다. PBS로 3회 세척 후 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 처리하였다. DAPI (1 µg/mL) 로 상온에서 5분간 염색후 VECTASHIELD Antifade Mounting Media (Vector Lab, #H1200)를 이용하여 마운팅(mounting)하였다. 이미지 분석은 형광현미경(EVOS FL Auto 2 Cell Imaging System) 과 공초점 현미경(ZEISS LSM 900)을 사용하였으며, 사용한 항체는 다음과 같다: anti-Human L1TD1 mouse monoclonal antibody (R&D, #MAB8317); anti-beta Actin mouse monoclonal antibody (SantCruz, #SC47778); anti-DDX6 rabbit polyclonal antibody (Bethyl, #A300-461A); anti-G3BP1 rabbit polyclonal antibody (Bethyl, #A302-034A); anti-rabbit Alexa Fluor™ 594 (Invitrogen, #A11037); anti-mouse Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, #A11029); anti-rabbit Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, #A11034).
- [101] 이하 모든 실험에서 동일한 방법으로 형광 이미지 분석을 수행하였다.

- [102] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 아비산염을 첨가하지 않은 첨가하지 않은 대조군에 비해 아비산염을 첨가하여 산화 스트레스를 가했을 때 eIF3B 과립이 생성됨을 확인하였다.
- [103]
- [104] 실시예 2. L1TD1 단백질의 신경퇴행성 질환 개선 효능 분석
- [105] **2-1. 스트레스에 의해 생성된 과립에 미치는 L1TD1 영향 분석**
- [106] 아비산염 첨가에 의한 산화 스트레스, 소비톨(sorbitol) 첨가에 의한 삼투압 스트레스 및 고온 스트레스에 의해 생성되는 과립에 미치는 L1TD1의 영향을 분석하였다.
- [107] 먼저, 실시예 1에서 제조한 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 pCAG-tRFP 플라스미드를 도입한 대조군, pCAG-L1TD1tRFP 플라스미드를 도입한 실험군을 제조하였다. L1TD1 유전자는 H1 배아줄기세포의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 얻었으며 염기서열 분석을 통하여 NCBI reference No. NM\_019079.5의 코딩 서열(서열번호 2)과 일치함을 확인하였다. pCAG 벡터는 CAG promoter와 BGA polyA signal을 포함하는 플라스미드이며, CAG promoter는 여러 요소를 결합하여 제조한 것으로서 서열번호 3의 염기 서열을 가진다.
- [108] 모든 플라스미드는 pCAG 벡터에 CAG 프로모터와 함께 BGH polyA site에 도입하여 제조하였다. 제조한 플라스미드는 Lipofectamine 3000 (Thermo)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 도입하였다.
- [109] 24시간 경과 후, 산화 스트레스(15분간 0.5mM sodium arsenite 처리), 삼투 스트레스(1시간동안 0.4M 소비톨 처리) 및 고열 스트레스(30분간 42°C 처리)를 가하였다. 그 후 각 대조군 및 실험군 내 스트레스 과립이 존재하는 세포 수를 계수하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 각각 100개의 세포주를 분석하였다.
- [110] 그 결과, 아비산염 첨가에 의한 산화 스트레스, 소비톨 첨가에 의한 삼투압 스트레스 및 고온 스트레스에 의해 생성되는 과립(stress granules, SGs)을 함유하는 세포가 L1TD1 존재하에 빠르게 감소하는 것을 확인하였다(도 3 내지 5).
- [111] 구체적으로, 도 3A에 나타난 바와 같이, 스트레스 미처리에서도 전환과정이나 비정상적인 RNA 발현으로 인한 결과로 인하여 tRFP만을 발현하는 세포 중 약 40%가 스트레스 과립을 형성하는 것을 확인하였다. 반면에 L1TD1-tRFP를 결합한 단백질을 발현하는 세포들은 거의 eIF3B 단백질이 세포 내에서 특정 위치에 존재하는 것이 확인되지 않았다. 또한, 도 3A 및 도 3B에 나타난 바와 같이, 아비산염 첨가에 의하여 산화 스트레스를 주는 경우 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-tRFP 에서 모두 100%까지 증가하였으며, 처리 후 회복 60, 75, 90 분 후에는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-Trfp 에서 모두 감소하였으나, L1TD1-tRFP의 경우 회복 60 분 후 40 % 미만으로 감소하여 보다 신속하게 스트레스 과립을 분해하는 것으로 확인되었다.
- [112] 도 4에 나타난 바와 같이, 소비톨을 첨가하여 삼투압 스트레스를 주는 경우 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-tRFP 에서 모두 100%까지

증가하였으며, 처리 후 회복 30, 60 분 후에는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-tRFP 에서 모두 감소하였으나, L1TD1-tRFP의 경우 회복 30 분 후 10 % 미만으로 감소하여 보다 신속하게 스트레스 과립을 분해하는 것으로 확인되었다.

- [113] 도 5에 나타난 바와 같이, 열을 가하여 열 스트레스를 주는 경우 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-tRFP 에서 모두 100%까지 증가하였으며, 처리 후 회복 15, 30 분 후에는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 tRFP 및 L1TD1-tRFP 에서 모두 감소하였으나, L1TD1-tRFP의 경우 회복 30 분 후 10 % 미만으로 감소하여 보다 신속하게 스트레스 과립을 분해하는 것으로 확인되었다.
- [114] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 아비산염을 이용하여 산화 스트레스를 주는 경우 L1TD1이 eIF3B 과립과 같은 곳에 위치할 뿐만 아니라, 스트레스 과립의 핵심 구성 요소 G3BP1, G3BP2, RNA 대사와 세포 내 위치에 관여하는 RNA 결합 단백질인 DDX6 와 같은 곳에 위치하는 것을 형광 이미지 분석을 통해 확인하였다.
- [115] 아울러, 자식작용에 미치는 L1TD1의 영향을 분석하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 형광염색을 통하여 자식작용 표지인자인 LC3가 스트레스 적용 전에도 L1TD1과 함께 위치함을 확인하였으며, 아비산염 처리 후 형성된 스트레스 과립에도 L1TD1과 함께 위치함을 확인하였다. 또한 아비산염 처리 후 L1TD1이 감소함을 확인하였다.
- [116] 전술한 바와 같이 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 pCAG-L1TD1tRFP 벡터를 도입한 후 12시간이 지나 자식작용을 억제하도록 50  $\mu$ M 클로로퀸(chloroquine)을 처리하고, 다시 12시간 후 0.5 mM 아비산염을 15분간 처리하였다. 이후 웨스턴블랏팅을 통해 단백질 양을 분석하였다.
- [117] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 아비산염만 처리하면 L1TD1이 감소하나, 클로로퀸을 처리하여 자식작용을 억제하는 경우 클로로퀸을 처리하지 않은 경우에 비해 감소 폭이 경감됨을 확인하였으며, proteasome inhibitor인 MG132의 경우 이러한 효과가 관찰되지 않았다. 따라서 L1TD1이 스트레스 과립 형성 조건에서 자식작용에 의해 분해되며, 이러한 작용이 스트레스 과립의 빠른 해소의 원인 중 하나로 추정된다.

[118]

[119] **2-2. 신경퇴행성 질환을 유발하는 돌연변이 단백질에 의해 생성된 과립에 미치는 L1TD1 영향 분석**

[120] 루게릭병을 유발하는 변이 단백질 FUS1-493X 및 전두측엽 변성을 유발하는 TDP-43-M337V에 의해 생성되는 과립에 L1TD1이 미치는 영향을 분석하였다.

[121] FUS1-493X는 변이에 의해 493번 아미노산 위치에 stop codon이 나타나 길이가 짧은 단백질이 만들어지는 것으로 알려져 있다. FUS1과 TDP-43 (TARBP) 유전자는 H1 배아줄기세포의 cDNA로부터 PCR을 통하여 확보하였으며, 염기서열 분석을 통하여 각각 NCBI referece sequence NM\_004960.4와 NM\_007375.4

의 코딩 서열과 일치함을 확인하였다. FUS1의 1-493 염기서열을 PCR을 통해 얻은 후 tRFP 유전자와 접합시켜 pCAG 벡터에 도입하여 발현 플라스미드(pCAG-FUS1-493X-tRFP)를 제조하였다. TDP-43-M337V 변이의 경우 TDP 염기서열을 PCR을 이용하여 클로닝한 후 337 번 아미노산 위치에 변이를 도입하고 tRFP 유전자와 접합시켜 pCAG 벡터에 도입하여 발현 플라스미드(pCAG-TDP-43-M337V-tRFP)를 제조하였다. 각 플라스미드를 L1TD1 발현 벡터(pCAG-L1TD1tRFP)와 함께 transfection을 통해 실시예 1에서 제조한 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 도입하여 실험군을 제조하고, 각 플라스미드를 빈 벡터(pCAG)와 함께 transfection을 통해 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 도입하여 대조군을 제조하였다.

[122] 24시간 경과 후 각 대조군 및 실험군 내 스트레스 과립이 존재하는 세포의 수를 계수하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 각각 100개의 세포주를 분석하였다.

[123] 그 결과, 대조군에 비해 FUS1-493X 및 TDP-43-M337V를 각각 L1TD1과 함께 발현시킨 실험군에서 eIF3B 스트레스 과립을 함유하는 세포주가 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 9, A: TDP-43-M337V 단백질 및 L1TD1 발현에 의한 과립 형성 확인, B: FUS1-493X 단백질 및 L1TD1 발현에 의한 과립 형성 확인, C: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V를 각각 L1TD1과 함께 발현시켰을 때 eIF3B 과립 함유 세포 수 변화).

[124] 또한, 형광 이미지 분석을 통해 HeLa-eIF3B-GFP 세포주 내 FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질에 의해 생성되는 과립인 eIF3B와 L1TD1이 같은 곳에 위치함을 확인하였다(도 10, A: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질과 eIF3B의 동일위치 확인, B: FUS1-493X 및 TDP-43-M337V 단백질과 L1TD1 동일위치 확인).

[125]

[126] 실시예 3. L1TD1 단백질의 각 도메인별 기능 분석

[127] **3-1. L1TD1 단백질의 도메인 확인 및 융합 단백질 제작**

[128] 도 11에 나타난 바와 같이, L1TD1 단백질은 두개의 코딩 엑손(coding exon 1, 2)로 이루어져 있고, 각각의 코딩 엑손은 L1 ORF1과 보존된 영역을 가지고 있는 것을 확인하였다. 구체적으로, 코딩 엑손 1은 CTD영역이 보존되어 있었고, 코딩 엑손 2는 CC, RRM, CTD 영역이 보존되어 있어, 코딩 엑손 2가 코딩 엑손 1보다 더 보존되어 있음을 확인하였다.

[129] 코딩 엑손 1과 2로 구성된 L1TD1전장 단백질을 이루는 각각의 도메인의 기능을 확인하기 위하여, L1TD1전장 단백질을 IUPred2A와 CIDER v2.0의 결과를 기반으로 나누어진 OH1 도메인, ER 도메인, OH2도메인의 세개의 도메인을, 도 12에 나타난 바와 같이 L1TD1의 결손 돌연변이(deletion mutation)를 통해 OH2, OH1-OH2, ER-OH2으로 이루어진 융합 단백질을 제조하였다. 구체적으로, OH2는 L1TD1 coding sequence의 HpaI/AflIII 부분을 제거하고 nuclease P1을 이용하여 절단 부위를 blunt end로 만들고, 이를 self-ligation하여 OH1과 ER부분이 제거된 변이를 제조하였다. OH1-OH2, ER-OH2는 L1TD1 coding sequence의 HpaI/AflIII 부

분을 제거하고 PCR로 증폭한 OH1 및 ER을 해당 부위에 삽입하여 OH1-OH2, ER-OH2 결손 돌연변이를 제조하였다.

[130] OH1 도메인, ER 도메인, OH2도메인의 아미노산 서열 및 mRNA 서열은 하기 표 1과 같다.

[131] [표1]

|          |          | 서열<br>(N-ter → C-ter<br>또는 5' → 3')                                       | 서<br>열<br>번<br>호 |
|----------|----------|---------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>O</b> | <b>아</b> | MSDVSTSVQSKFARLAKKKENITYMKREQLTETDKDIAPVLDLK                              | <b>4</b>         |
| <b>H</b> | <b>미</b> | CKDVSAIMNKFVKVLMEIQDLMFEEMRETLKNDLKAVLGGKATIP                             |                  |
| <b>1</b> | <b>노</b> | EVKNSSENSSRTEFQQIINLALQKTGMVGKIEGENSKIGDDNENLT                            |                  |
|          | <b>산</b> | FKLEVNELSGKLDNTNEYNSNDGKKLPQGERSYEVMGSMEEITL                              |                  |
|          | <b>서</b> | CNIDDRDGNRNVHLEFTERESRKDGEDEFVKEMREERKFQKLKN                              |                  |
|          | <b>열</b> | KEEVLKASREEKVLMDEGAVLTLVADLSSATLDISKQWSNVFNIL                             |                  |
|          | <b>열</b> | RENDFEPKFLCEVKLAFKCDGEIKTFSDLQSLRKFFASQKSSVKELL<br>KDVLPQKEEINQGGRKYGIQEK |                  |
| <b>m</b> |          | ATGTCTGATGTATCTACTAGTGTACAATCAAAATTTGCTAGAC                               | <b>5</b>         |
| <b>R</b> |          | TTGCAAAGAAAAAGGAAAATATCACCTATATGAAAAGAGAGC                                |                  |
| <b>N</b> |          | AGTTAACAGAACTGATAAGGACATAGCTCCGGTATTAGATTT                                |                  |
| <b>A</b> |          | AAAATGCAAGGACGTATCAGCAATTATGAATAAGTTTAAGGTC                               |                  |
|          | <b>서</b> | TTAATGGAAATTCAAGACCTGATGTTTGAGGAGATGAGGGAA                                |                  |
|          | <b>열</b> | ACTCTTAAAAATGACCTAAAAGCAGTTTTAGGGGGAAAAGCT                                |                  |
|          |          | ACAATACCTGAGGTAAAGAATTCAGAGAACTCCAGTAGTAGG                                |                  |
|          |          | ACAGAGTTTCAGCAAATAATCAATTTAGCATTACAAAAACAG                                |                  |
|          |          | GGATGGTAGGGAAAATAGAAGGAGAAAACCTCTAAAATAGGTG                               |                  |
|          |          | ATGATAATGAAAATTTAACCTTTAAATTAGAAGTAAATGAGCT                               |                  |
|          |          | GAGTGGTAAATTAGACAACACTAACGAATACAATAGTAATGA                                |                  |
|          |          | TGGTAAGAAATTACCCAGGGTGAATCACGAAGTTACGAAGT                                 |                  |
|          |          | CATGGGAAGTATGGAAGAAACCTTATGCAATATAGATGACAG                                |                  |
|          |          | AGATGGAAATCGCAATGTCCATTTAGAATTTACAGAAAGAGA                                |                  |
|          |          | GAGTAGGAAGGATGGAGAGGATGAATTTGTCAAAGAAATGAG                                |                  |
|          |          | AGAGGAAAGAAAATTTAGAAATTGAAGAATAAAGAGGAGGT                                 |                  |
|          |          | TTTAAAAGCCTCCAGAGAAGAAAAAGTGTTGATGGATGAAGG                                |                  |
|          |          | AGCAGTACTTACCCTGGTAGCCGACCTTTCATCAGCAACACTG                               |                  |
|          |          | GATATTAGTAAGCAATGGAGTAATGTCTTCAACATTCTGAGAG                               |                  |
|          |          | AAAATGATTTTGAACCTAAATTTCTGTGTGAAGTTAAATTAGC                               |                  |

|          |          |                                                                                                                                                                              |          |
|----------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|          |          | ATTTAAATGTGATGGTGAAATAAAGACATTTTCAGATCTGCAA<br>AGCCTTAGAAAATTTGCCAGCCAAAAATCTTCTGTGAAAGAAT<br>TACTGAAAGATGTACTCCCACAAAAGGAAGAAATAAATCAAG<br>GAGGAAGAAAATATGGAATTCAAGAAAAAAGG |          |
| <b>E</b> | <b>아</b> | DKTLIDSKHRAGEITSDGLSFLFLKEVKVAKPEEMKNLETQEEEFs                                                                                                                               | <b>6</b> |
| <b>R</b> | <b>미</b> | ELEELDEEASGMEDDEDTSGLEEEEEEPSGLEEEEEEEASGLEEDE                                                                                                                               |          |
|          | <b>노</b> | ASGLEEEEEQTSEQDSTFQGHTLVDAKHEVEITSDGMETTFIDSVE                                                                                                                               |          |
|          | <b>산</b> | DSESEEEEEGKSSETGKVKTTSLTEKKASRRQKEIPFSYLVGDSGK                                                                                                                               |          |
|          | <b>서</b> | KKLVKHQVVHKTQEEETAVPTSQ                                                                                                                                                      |          |
|          | <b>열</b> |                                                                                                                                                                              |          |
| <b>m</b> |          | GATAAAACCCTAATAGACTCAAAGCATAGAGCTGGAGAAATA                                                                                                                                   | <b>7</b> |
| <b>R</b> |          | ACCACTGATGGCTTGAGCTTCCTATTTCTTAAAGAAGTAAAAG                                                                                                                                  |          |
| <b>N</b> |          | TTGCTAAGCCAGAGGAGATGAAAACTTAGAGACTCAAGAGG                                                                                                                                    |          |
| <b>A</b> |          | AAGAGTTTTCCGAGCTAGAGGAGCTGGATGAAGAGGCCTCAG                                                                                                                                   |          |
|          | <b>서</b> | GGATGGAGGATGATGAAGATACCTCAGGGCTGGAGGAGGAGG                                                                                                                                   |          |
|          | <b>열</b> | AGGAAGAGCCCTCAGGGCTGGAGGAGGAAGAAGAAGAAGAG                                                                                                                                    |          |
|          |          | GCTTCAGGGTTGGAGGAGGATGAGGCCTCAGGGCTAGAGGAG                                                                                                                                   |          |
|          |          | GAAGAGGAACAGACTTCAGAACAGGACTCAACCTTTCAGGGT                                                                                                                                   |          |
|          |          | CATACTTTGGTAGATGCAAAGCATGAAGTTGAGATAACCACTG                                                                                                                                  |          |
|          |          | ATGGCATGGAACTACTTTCATTGACTCTGTAGAGGATTCTGA                                                                                                                                   |          |
|          |          | ATCAGAGGAGGAAGAAGAAGGAAAGAGCTCTGAAACAGGAA                                                                                                                                    |          |
|          |          | AGGTAAAGACTACCTCCCTGACTGAGAAAAAAGCCTCACGTA                                                                                                                                   |          |
|          |          | GACAAAAAGAAATTCCCTTTAGTTATTTGGTTGGGGACTCTGG                                                                                                                                  |          |
|          |          | GAAGAAAAAGTTGGTGAAACACCAGGTGGTGACAAAACCCA                                                                                                                                    |          |
|          |          | GGAGGAAGAGGAAACAGCTGTGCCACAAAGTCAA                                                                                                                                           |          |
| <b>O</b> | <b>아</b> | GTGTPCLTLCLASPSKSLEMSHDEHKKHSHTNLSISTGVTKLKKT                                                                                                                                | <b>8</b> |
| <b>H</b> | <b>미</b> | EEKKHRTLHTEELTSKEADLTEETEENLRSSVINSIREIKEEIGNLK                                                                                                                              |          |
| <b>2</b> | <b>노</b> | SSHSGVLEIENSVDDLSSRMDILEERIDSLEDQIEEFsKDTMQMTK                                                                                                                               |          |
|          | <b>산</b> | QIISKERQRDIEERSRSCNIRLIGIPEKESYENRAEDIIKEIIDENFAEL                                                                                                                           |          |
|          | <b>서</b> | KKGSSLEIVSACRVPSKIDEKRLTPRHILVKFWNSSDKEKIIRASRE                                                                                                                              |          |
|          | <b>열</b> | RREITYQGTRIRLTADLSLDTLDARSKWSNVFKVLLEKGFNPRILY                                                                                                                               |          |
|          |          | PAKMAFD FRGKTKVFLSIEEFRDYVLHMPTLRELLGNNIP                                                                                                                                    |          |
| <b>m</b> |          | GGAAGTGGCACACCCTGTCTGACCTTATGTTTGGCCTCTCCCTC                                                                                                                                 | <b>9</b> |
| <b>R</b> |          | AAAGTCACTAGAGATGAGTCATGATGAGCATAAAAAGCATTC                                                                                                                                   |          |
| <b>N</b> |          | ACATACAAATTTGAGTATTTCAACAGGAGTCACCAAACCTTAAG                                                                                                                                 |          |
| <b>A</b> |          | AAAACAGAAGAAAAGAAACACAGAACTCTGCACACAGAAGA                                                                                                                                    |          |
|          |          | ACTAACATCCAAAGAAGCAGACTTAACAGAGGAAACAGAAGA                                                                                                                                   |          |

|   |                                              |
|---|----------------------------------------------|
| 서 | AAACTTGAGAAGTAGTGTGATTAATAGCATCAGAGAGATAAA   |
| 열 | AGAGGAGATTGGAAATTTGAAAAGTTCCCATTCAGGTGTCTTG  |
|   | GAAATTGAAAATTCAGTAGATGATCTGAGTAGCAGAATGGAC   |
|   | ATACTTGAAGAAAGAATAGACAGTCTAGAAGATCAAATTGAA   |
|   | GAATTCTCTAAGGATACAATGCAAATGACCAAACAGATAATTA  |
|   | GTAAAGAAAGGCCAAAGAGATATAGAGGAGAGATCTAGAAGTT  |
|   | GCAACATTCGTTTGATAGGAATTCCAGAAAAGGAGAGTTATGA  |
|   | GAATAGGGCAGAGGACATAATTAAAGAAATAATTGATGAAAA   |
|   | CTTTGCAGAACTAAAGAAAGGTTCAAGTCTTGAGATTGTCAGT  |
|   | GCTTGTGAGTACCTAGTAAAATTGATGAAAAGAGACTGACTC   |
|   | CTAGACACATCTTGGTGAAATTTTGGAATTCTAGTGATAAAGA  |
|   | GAAAATAATAAGGGCTTCTAGAGAGAGAAGAGAAATTACCTA   |
|   | CCAAGGAACAAGAATCAGGTTGACAGCAGACTTATCACTGGA   |
|   | CACACTGGATGCTAGAAGTAAATGGAGCAATGTCTTCAAAGTT  |
|   | CTGCTGGAAAAAGGCTTTAATCCTAGAATCCTATATCCAGCCA  |
|   | AAATGGCATTGATTTTAGGGGTAAAACAAAGGTATTTCTTAG   |
|   | TATTGAAGAATTTAGAGATTATGTTTTGCATATGCCCCACCTGA |
|   | GAGAATTACTGGGGAATAATATACCT                   |

[132] **3-2. 스트레스에 의해 생성된 과립에 미치는 L1TD1 각 도메인별 영향 분석**

[133] 스트레스 과립의 해소는 구성 요소의 분산과 자식작용을 통해 이루어지므로, L1TD1의 결손 돌연변이를 통해 OH2, OH1-OH2, ER-OH2으로 이루어진 융합 단백질의 세포 내 분포를 확인하고, 스트레스 과립을 포함하고 있는 세포의 수를 계수하기 위하여, 실시예 1에서 제조한 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 pCAG-tRFP 플라스미드를 도입한 대조군, pCAG-L1ORF1-tRPF, pCAG-L1TD1-tRPF, pCAG-ER-OH2-tRPF, pCAG-E1-OH2-tRPF, pCAG-OH2-tRPF 플라스미드를 도입한 실험군을 제조하였다. 구체적인 제조 방법은 실시예 2-1에 기재된 것과 동일하다.

[134] 또한, 실시예 1과 같은 방법으로 형광 이미지 분석을 통해 세포 내 분포를 확인하고, 24시간 경과 후 각 대조군(tRFP) 및 실험군 내 스트레스 과립이 존재하는 세포 수를 계수하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 각각 100개의 세포주를 분석하였다.

[135] 그 결과, 도 13A에 나타난 바와 같이, L1 ORF1-tRFP는 스트레스 과립이 존재하는 세포 내에서 eIF3B, OH2-tRFP와 유사한 위치에 분포하였고, OH1-OH2-tRFP는 결손 돌연변이 되지 않은 L1TD1과 비교하여 세포 내 분포가 달라지지 않았고, ER-OH2는 세포질에 분산되어 분포하였다.

[136] 또한, 도 13B에 나타난 바와 같이, OH2-tRFP는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 대조군(tRFP)와 대비하여 크게 감소하지 않았으나, ER-OH2-tRFP는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 가장 적은 것으로 확인되었다.

[137]

[138] **3-3. 신경퇴행성 질환을 유발하는 돌연변이 단백질에 의해 생성된 과립에 미치는 L1TD1 각 도메인별 영향 분석**

[139]

실시에 2-2와 동일한 방법으로 FUS1의 1-493 염기서열을 PCR을 통해 얻은 후 tRFP 유전자와 접합시켜 pCAG 벡터에 도입하여 발현 플라스미드(pCAG-FUS1-493X-tRFP)를 제조하고, 플라스미드를 발현 벡터, L1 ORF1-tRFP, L1TD1-tRFP 및 결손 돌연변이체인 ER-OH2-tRFP, OH1-OH2-tRFP, OH2-tRFP를 각각 발현하는 벡터와 함께 transfection을 통해 실시예 1에서 제조한 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 도입하여 실험군을 제조하고, 각 플라스미드를 빈 벡터(pCAG)와 함께 transfection을 통해 HeLa-eIF3B-GFP 세포주에 도입하여 대조군을 제조하였다. 실시예 1과 같은 방법으로 형광 이미지 분석을 통해 세포 내 분포를 확인하고, 24시간 경과 후 각 대조군 및 실험군 내 스트레스 과립이 존재하는 세포 수를 계수하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 각각 100개의 세포주를 분석하였다.

[140]

그 결과, 도 14A에 나타난 바와 같이, 대부분의 융합 단백질들은 FUS 감염 세포에서 개별적으로 위치하는 것으로 확인되었다.

[141]

도 14B에 나타난 바와 같이, OH2-tRFP는 대조군(tRFP)과 대비하여 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 크게 감소하지 않았으나, ER-OH2-tRFP는 스트레스 과립을 포함하는 세포의 수가 가장 적은 것으로 확인되었다.

[142]

따라서, L1TD1 단백질 도메인 중 ER-OH2의 도메인의 경우 우수한 스트레스 과립 분해 활성이 있을 것으로 예상되었다.

[143]

추가적으로, ER-OH2에 대한 특성을 확인하기 위하여, 각 단백질들의 세포 내 분포를 형광 이미지 분석을 통해 확인하였다. 먼저, L1TD1-tRFP 및 ER-OH2의 세포 내 분포를 스트레스 미처리 및 아비산염 처리(산화 스트레스 처리)에 따라 확인한 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, ER-OH2-tRFP는 스트레스 미처리 및 아비산염 처리시 모두 세포질에 분산되어 분포하는 것으로 확인되었다.

[144]

추가적으로, IPC 2.0 tool을 이용하여 ER 도메인의 등전점을 확인한 결과, ER 도메인은 예상 등전점이 약 4.33으로 고도로 산성을 띠는 바, RNP 과립과 RNA와 같은 다른 음전하를 띤 분자들과 반발력이 있을 가능성이 높은 것으로 예상되었다.

[145]

또한, 추가적으로, L1TD1 전장 단백질 및 결손 돌연변이(ER-OH2, OH1-OH2, OH2)의 발현을 전기영동을 통해 분석한 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, L1TD1 전장 단백질에서 가장 밴드가 두껍게 나타나 L1TD1 전장 단백질의 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 즉, ER이 강한 음전하를 띠고 있어 음전하를 띠는 RNA 분자 등의 분산을 유도하므로 ER-OH2가 분산되는 분포를 보였고, 이는 OH1이 스트레스 과립의 다른 구성요소와 상호작용하여 ER에 의한 반발력을 상쇄하여 분산을 억제하고, OH2의 RNA 결합을 통해 SG로 이동하게 하는 것으로 예상되었다.

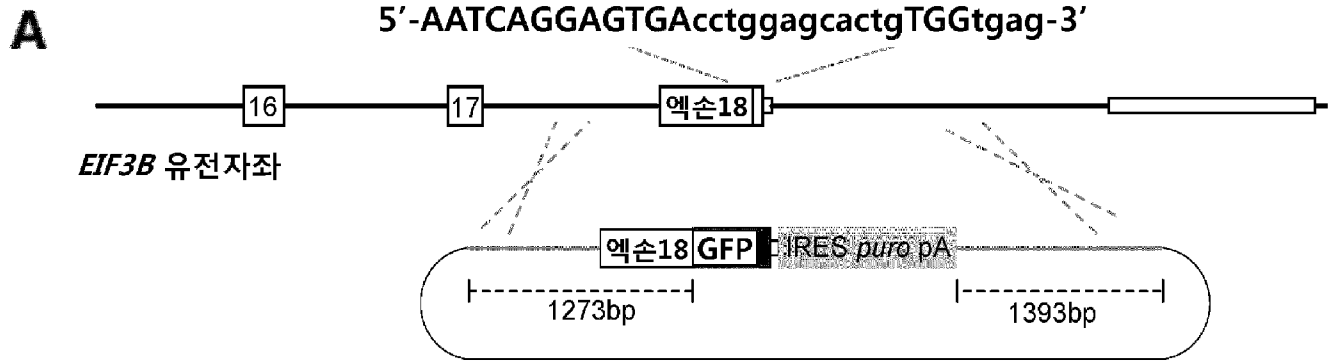
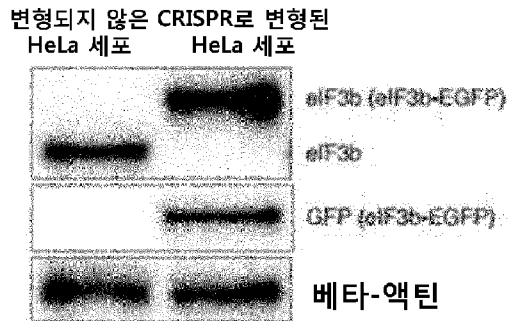
- [146] 즉, L1TD1의 다른 도메인 영역인 OH1 도메인이 추가적인 상호작용으로 인하여 RNP 과립에서 L1TD1 전장 단백질이 분해되지 않게 유지시킴으로써 스트레스 과립의 분해를 도와줄 것으로 예상되었다.
- [147] 따라서, L1TD1 단백질 도메인 중 ER-OH2의 도메인의 경우 상당히 우수한 스트레스 과립 분해 활성이 있었으나, L1TD1 전장 단백질은 OH1 도메인, ER 도메인, OH2 도메인이 각각 서로의 기능을 상호보완하여 스트레스 과립 분해 활성을 나타내는 바, OH1 도메인, ER 도메인, OH2 도메인이 전부 포함된 L1TD1 전장단백질에서 가장 큰 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.
- [148] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 청구범위

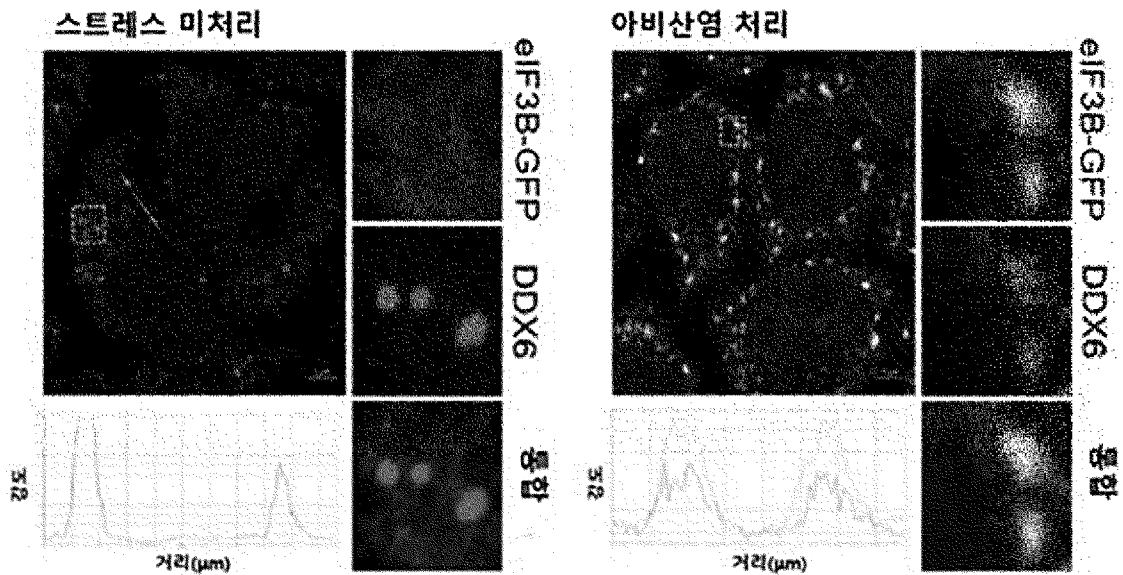
- [청구항 1] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 도메인은 OH1 도메인, ER 도메인 및 OH2 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 도메인은 ER 도메인 및 OH2 도메인의 조합인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 L1TD1 단백질, 상기 도메인; 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립(granule)을 분해하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,  
상기 RNA 과립은 신경퇴행성 질환을 유발하는 변이 단백질에 의해 생성되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,  
상기 변이되는 단백질은 FUS1, TDP-43, SOD-1 또는 SMN1인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,  
상기 신경퇴행성 질환은 루게릭병, 전두측엽 변성, 척수성 근위축, 알츠하이머 질환, 파킨슨병, 헌팅턴무도병, 척수소뇌변성, 프리온질환, 크로이츠펔트야콥병, 전두측두엽치매, 혈관치매, 루이소체치매 및 파킨슨병에 동반된 치매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,  
상기 L1TD1 단백질, 상기 도메인; 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립(granule)을 분해하는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.
- [청구항 10] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

- [청구항 11] 제10항에 있어서,  
상기 L1TD1 단백질, 상기 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립(granule)을 분해하는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.
- [청구항 12] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 의약품 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,  
상기 L1TD1 단백질, 상기 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립(granule)을 분해하는 것을 특징으로 하는, 의약품 조성물.
- [청구항 14] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,  
상기 L1TD1 단백질, 상기 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자는 신경세포 내 RNA 과립(granule)을 분해하는 것을 특징으로 하는, 사료 조성물.
- [청구항 16] L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 조성물을 신경퇴행성 질환의 개선, 예방 또는 치료 유효량으로 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료방법.
- [청구항 17] 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료를 위한, L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 용도.
- [청구항 18] 신경퇴행성 질환 개선, 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한,  
L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1) 단백질 또는 상기 단백질을 구성하는 적어도 하나의 도메인; 또는 상기 단백질 또는 도메인을 암호화하는 유전자의 용도.

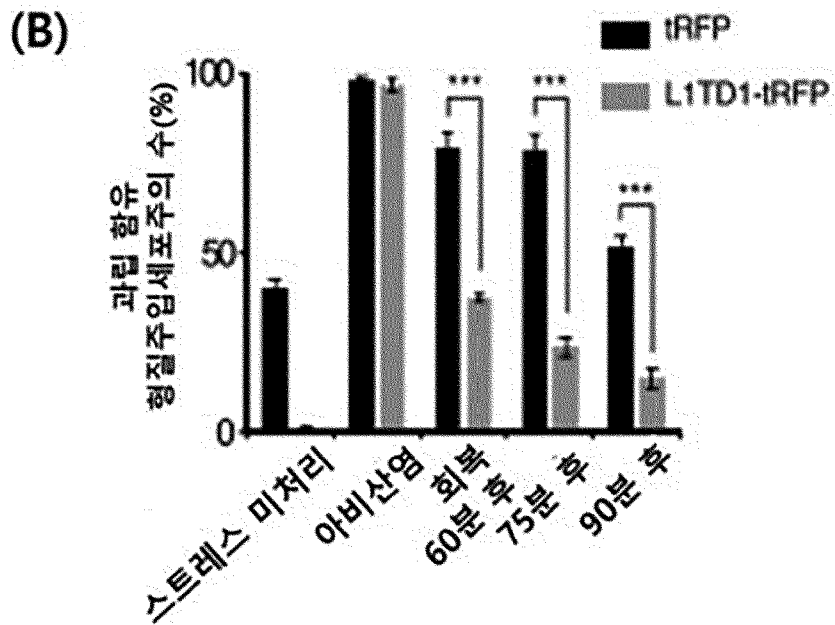
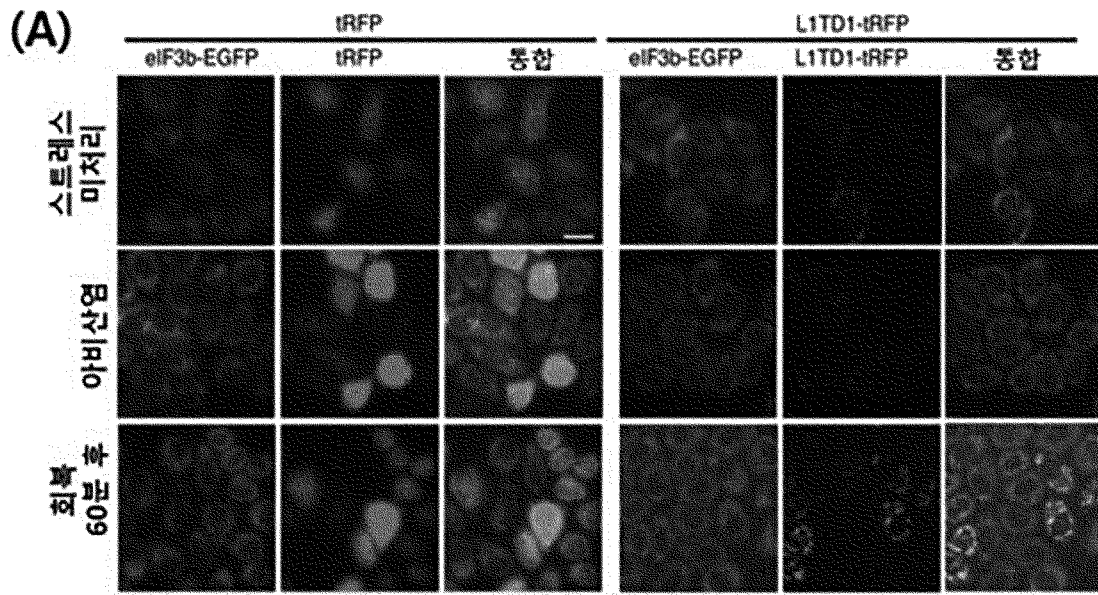
[도1]

**B**

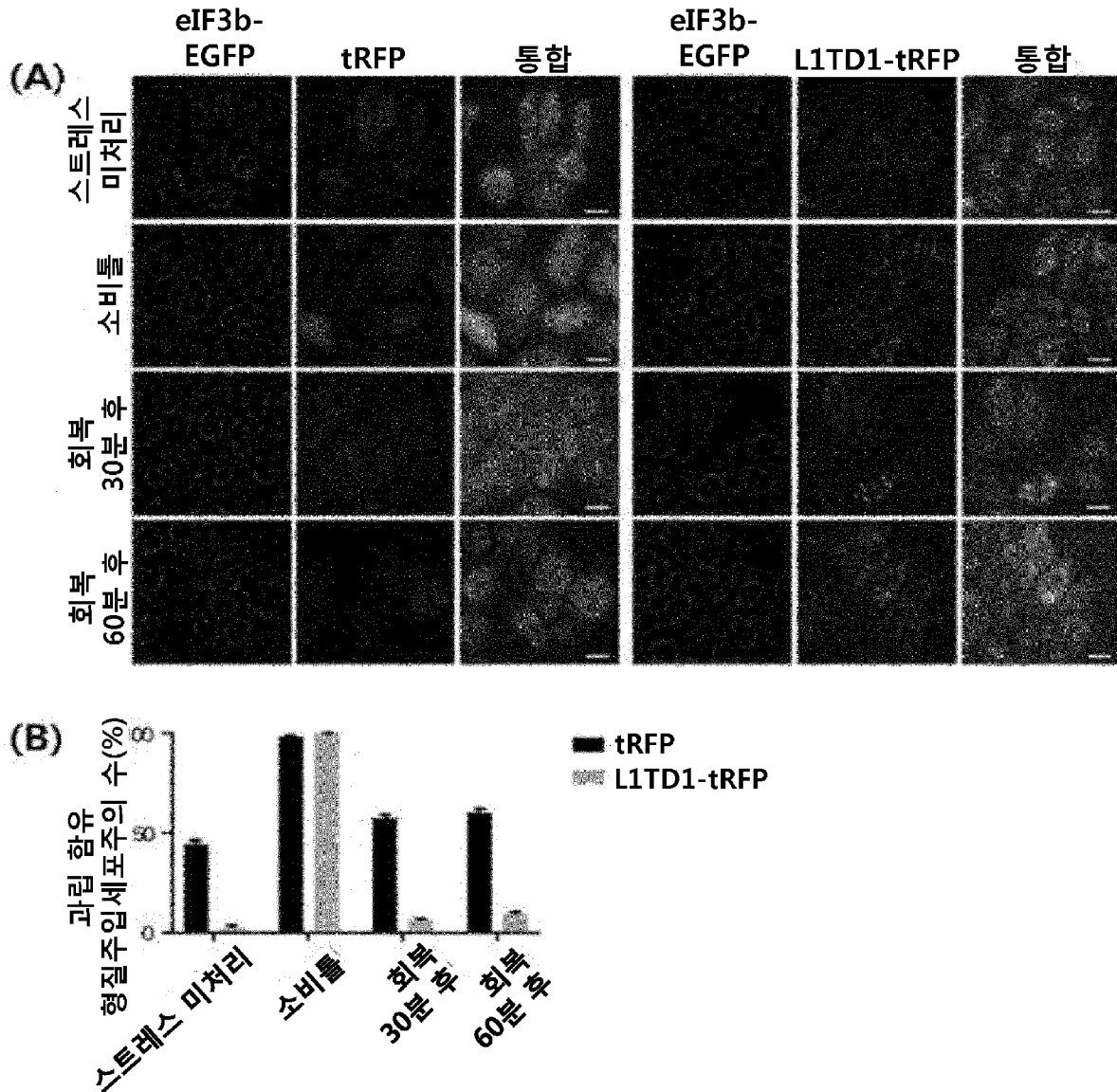
[도2]



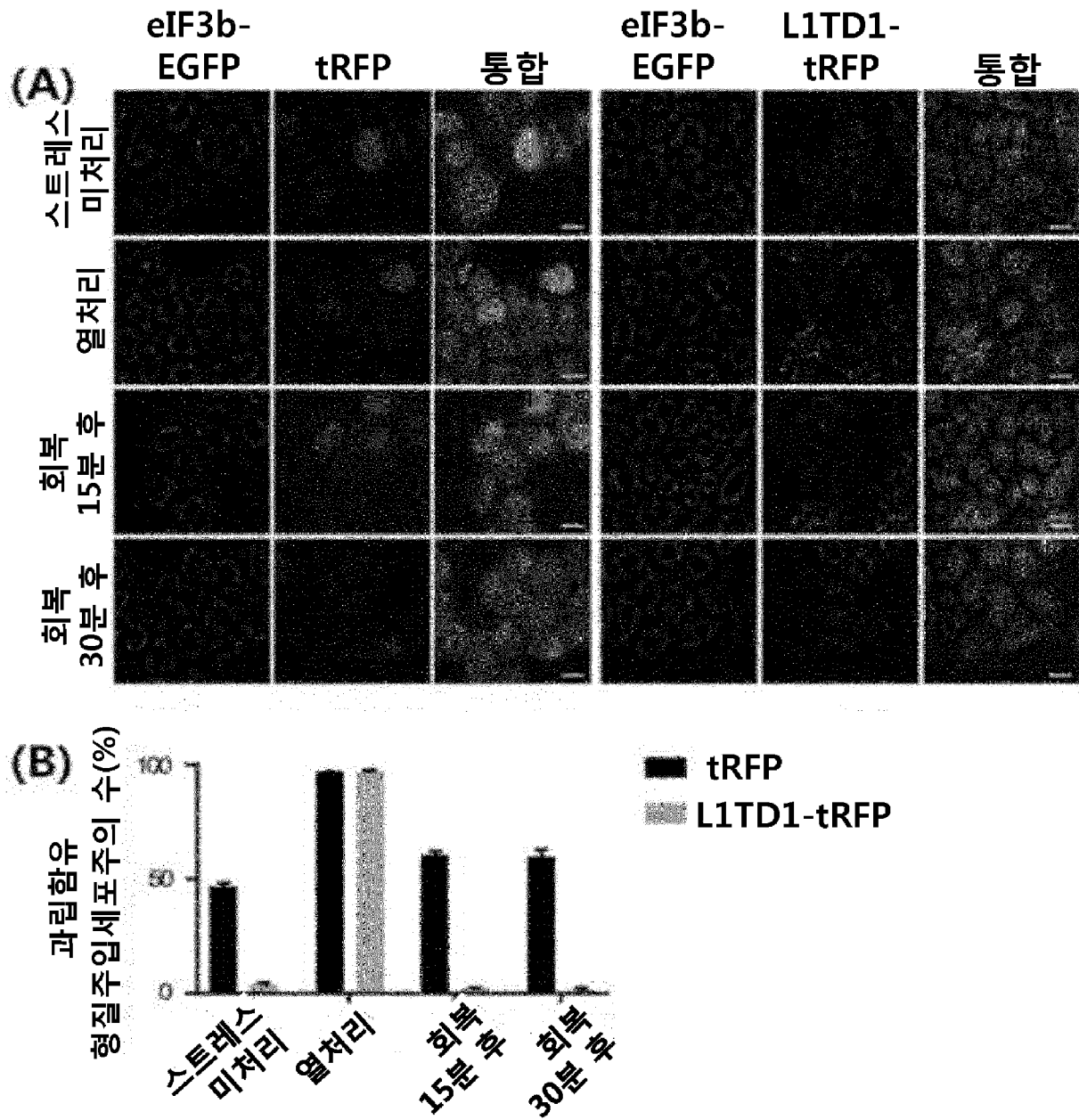
[도3]



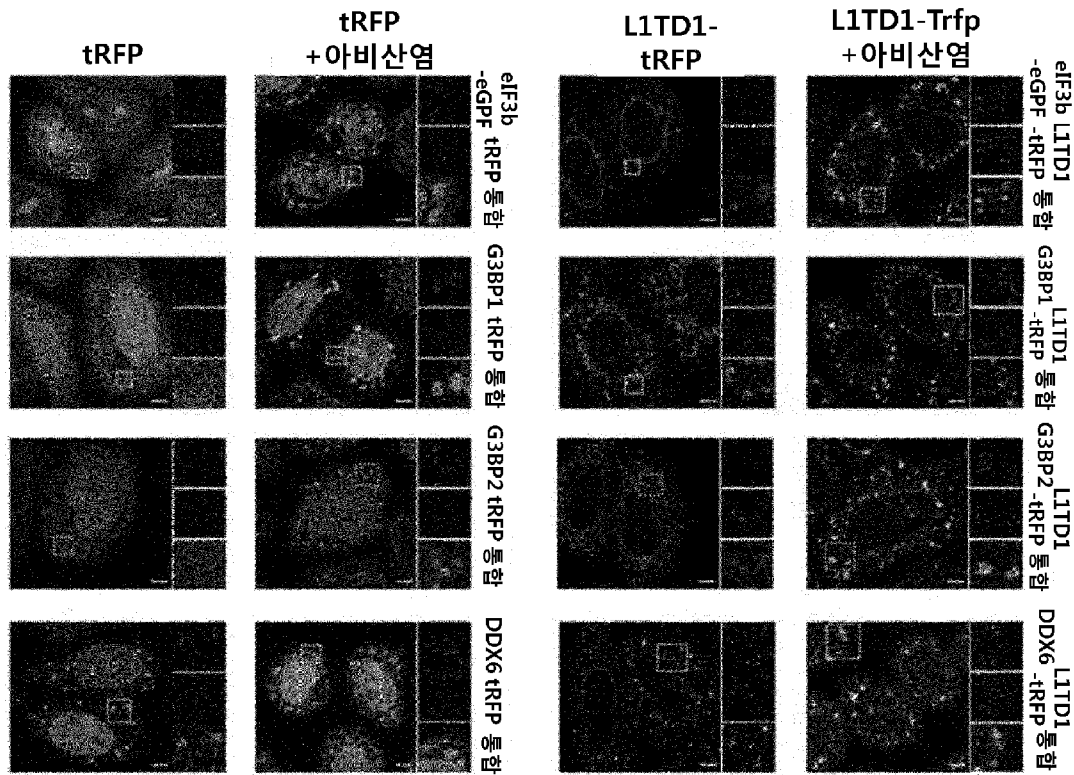
[도4]



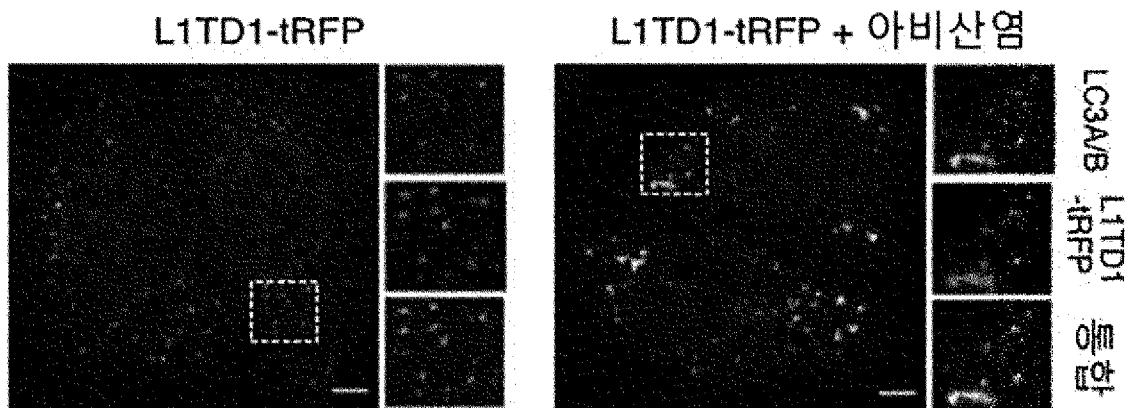
[도5]



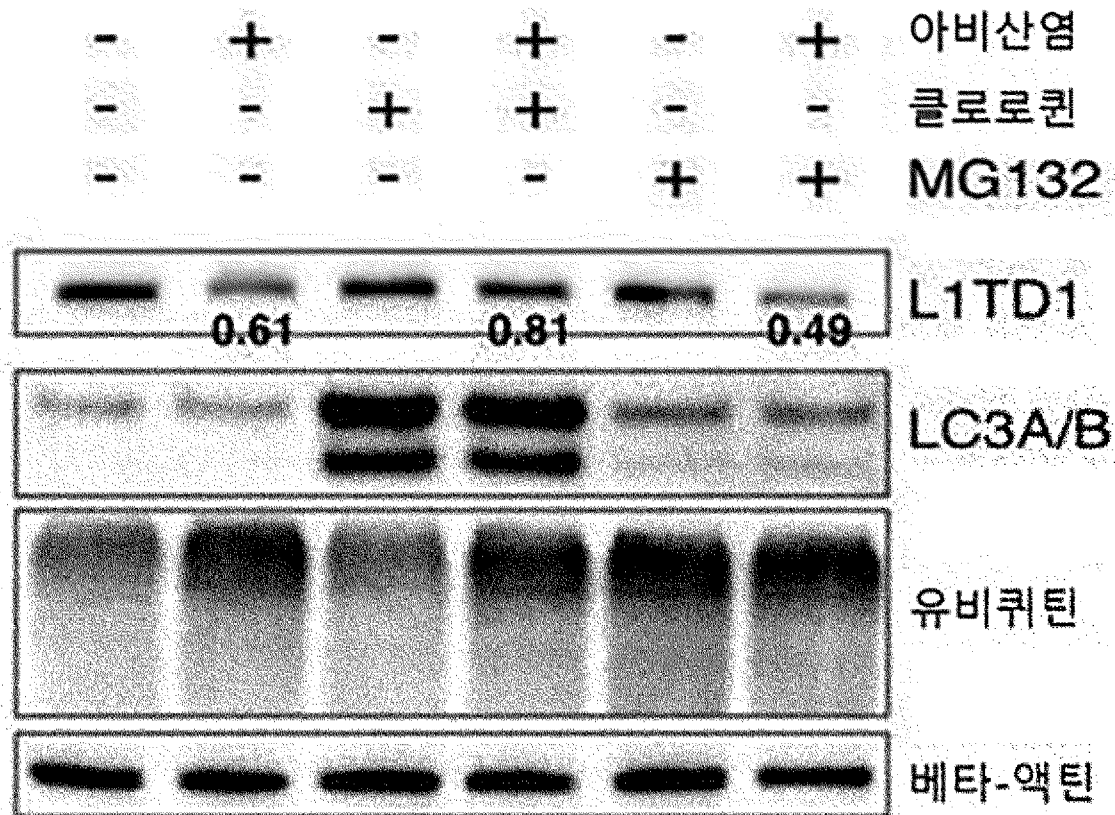
[도6]



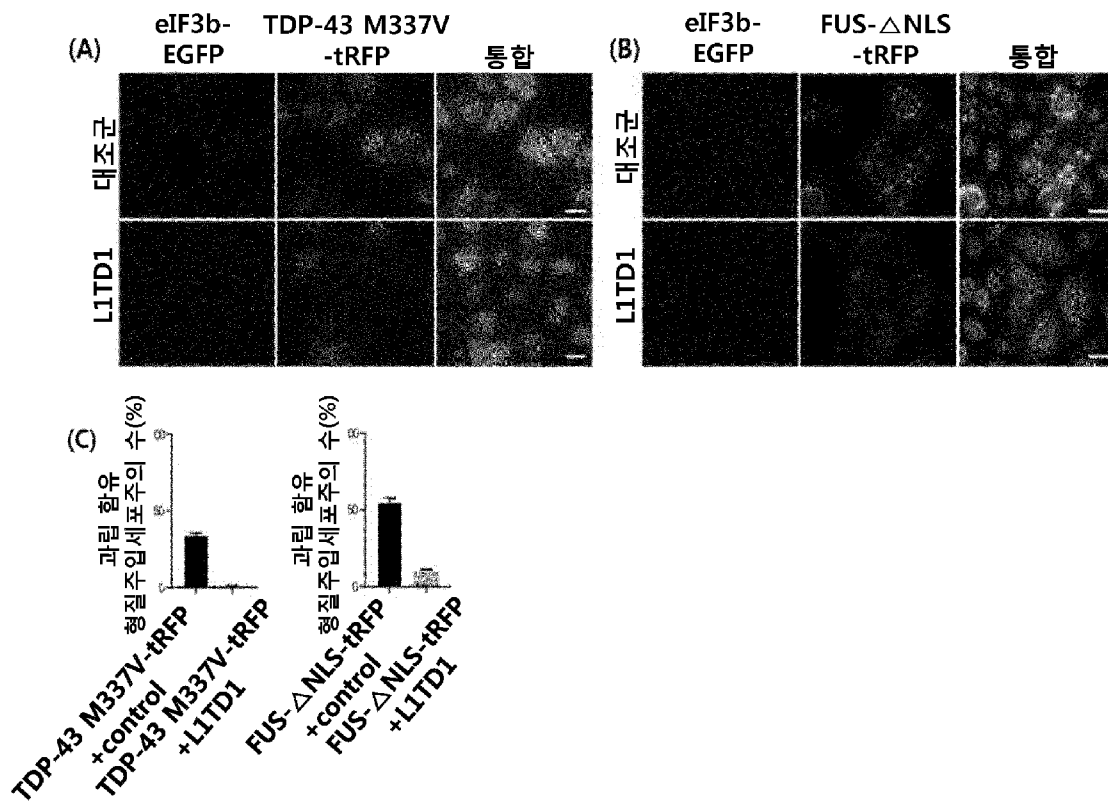
[도7]



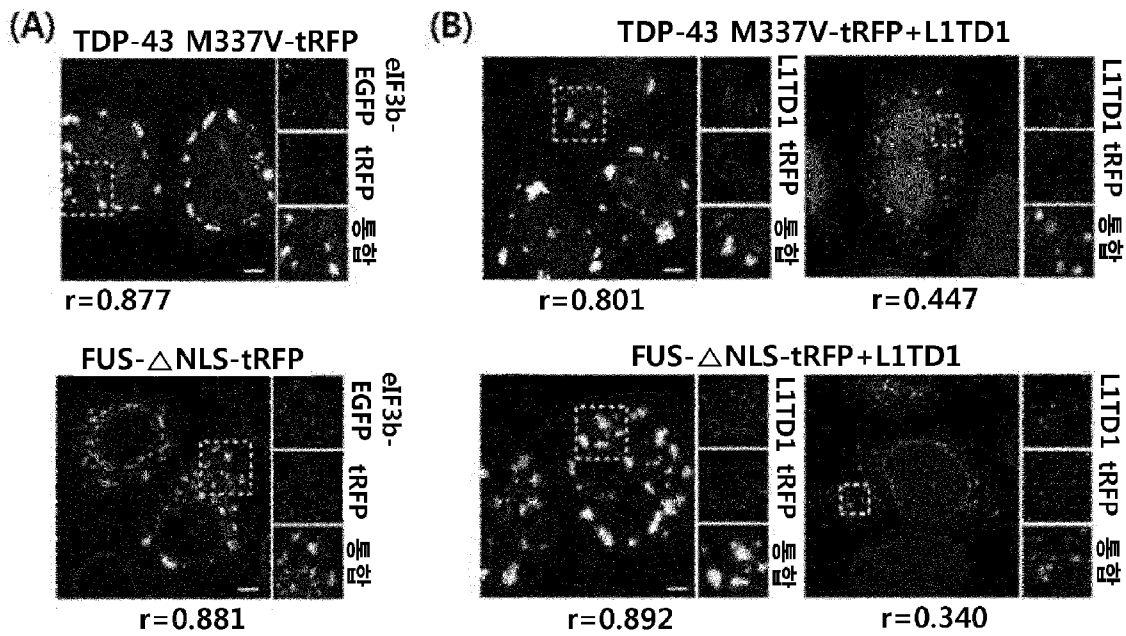
[도8]



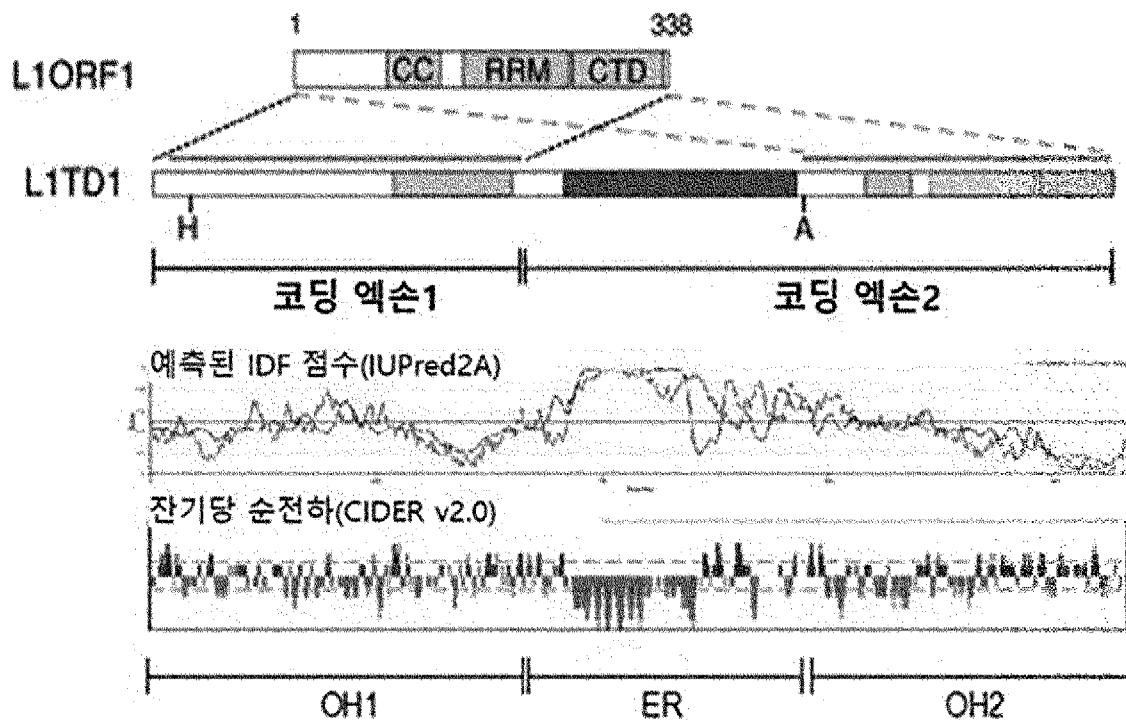
[도9]



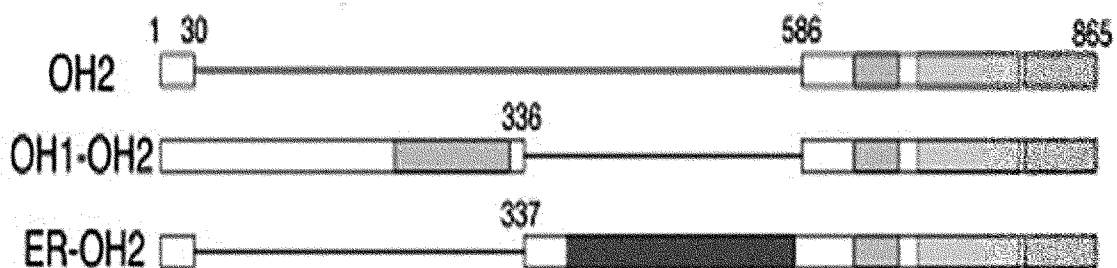
[도10]



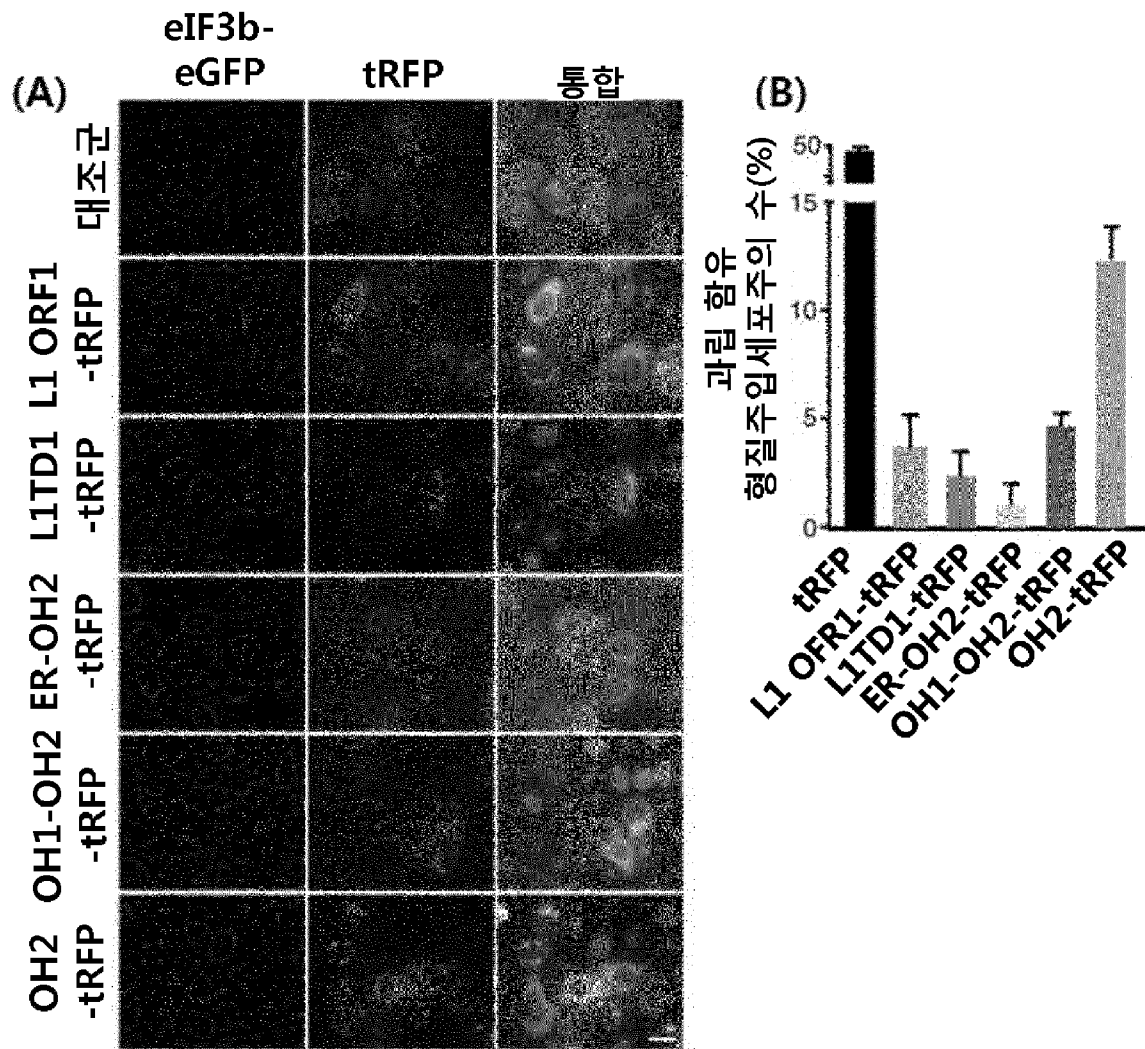
[도11]



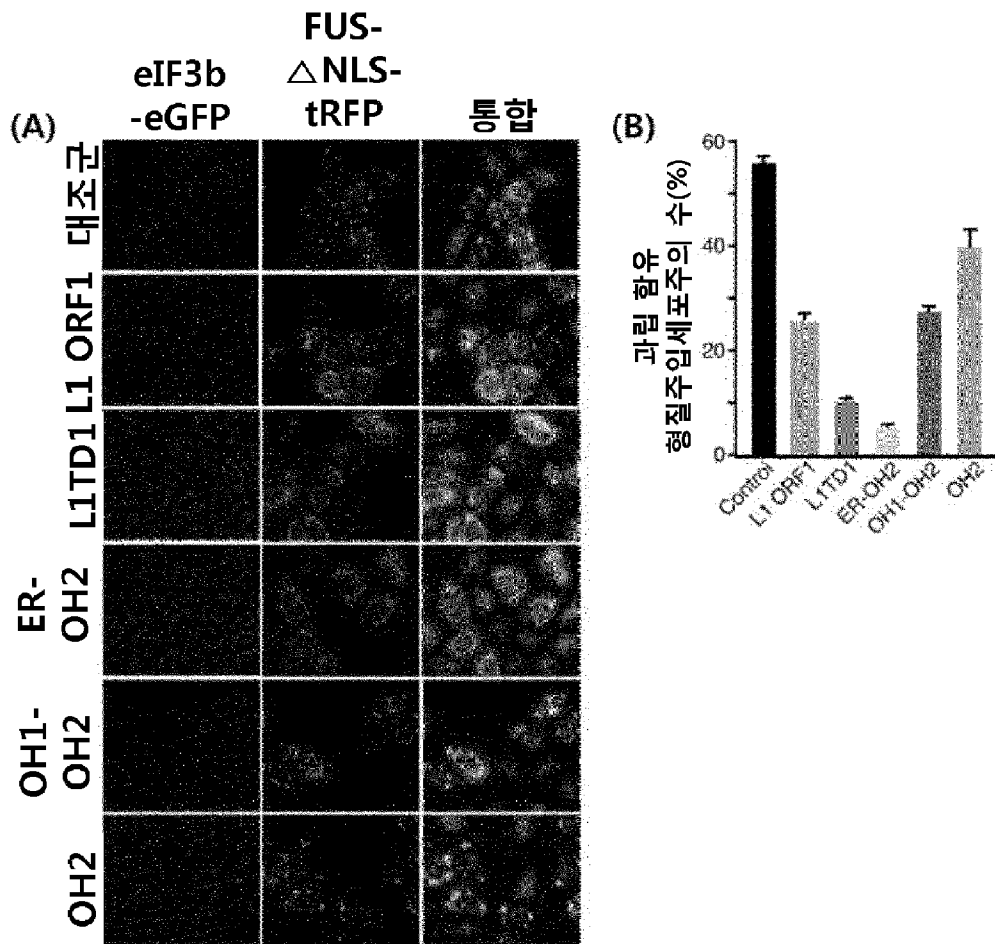
[도12]



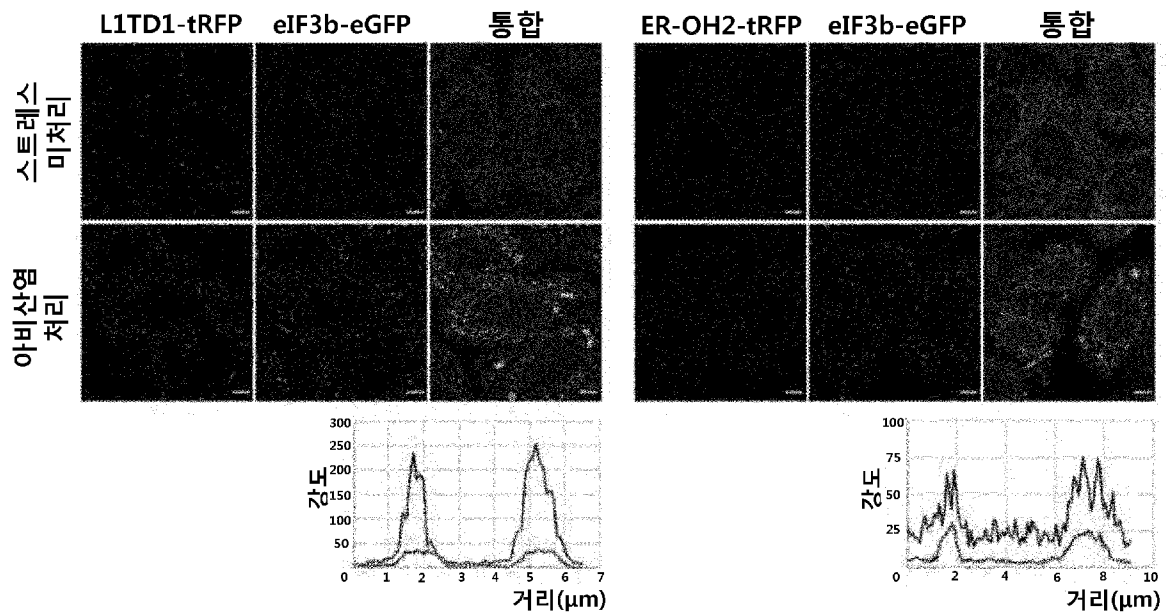
[도13]



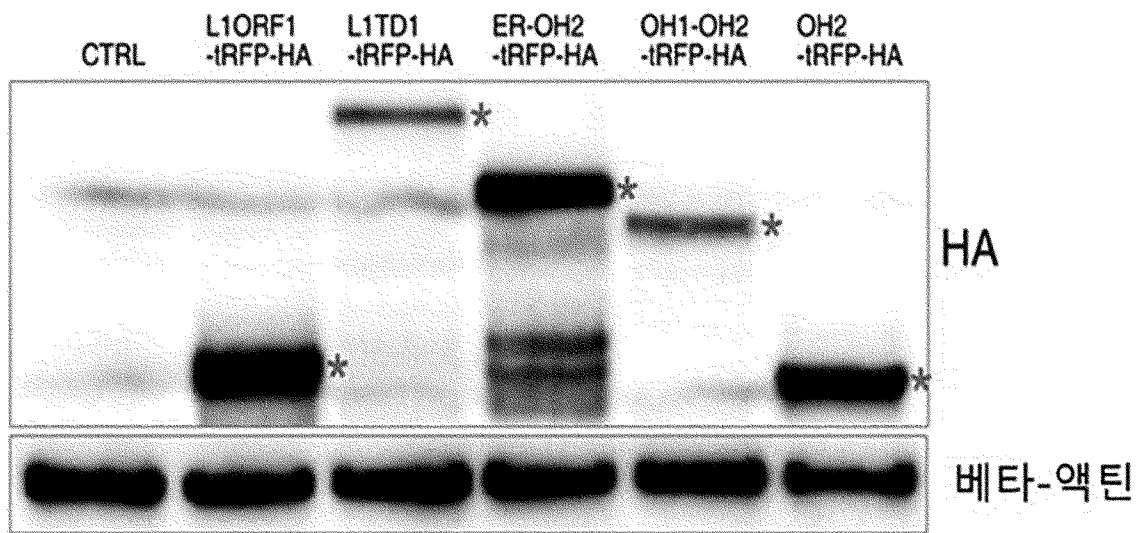
[도14]



[도15]



[도16]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/003028

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 38/17(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A23L 33/17(2016.01)i; A23K 20/147(2016.01)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)

A61K 38/17(2006.01); A61K 35/30(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01)

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) &amp; keywords: L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1), 도메인(domain), 유전자(gene), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                       | Relevant to claim No.                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X<br>A    | US 2019-0024176 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 24 January 2019 (2019-01-24)<br>See claims 21-26; and paragraph [0030]. | 1,7-8,10,12,14,17-18<br>2-6,9,11,13,15 |
| A         | KR 10-2021-0016362 A (TURUN YLIOPISTO) 15 February 2021 (2021-02-15)<br>See entire document.                             | 1-15,17-18                             |
| A         | KR 10-2011-0110030 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 06 October 2011 (2011-10-06)<br>See entire document.    | 1-15,17-18                             |
| A         | KR 10-2020-0070367 A (STOKE THERAPEUTICS, INC.) 17 June 2020 (2020-06-17)<br>See entire document.                        | 1-15,17-18                             |



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

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2024

Date of mailing of the international search report

19 June 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | NARVA, E. et al. RNA-Binding Protein L1TD1 Interacts with LIN28 via RNA and is Required for Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Cancer Cell Proliferation. Stem Cells. 2012, vol. 30, pp. 452-460.<br>See entire document.                                                                                                                          | 1-15,17-18            |
| PX        | JIN, S. W. et al. Dissolution of ribonucleoprotein condensates by the embryonic stem cell protein L1TD1. Nucleic Acids Research. electronic publication 02 January 2024, vol. 52, pp. 3310-3326.<br>See entire document.<br>* This document is a known document declaring 'non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty' by the applicant. | 1-15,17-18            |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2024/003028**

## 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

International application No.

**PCT/KR2024/003028**

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

International application No.

**PCT/KR2024/003028**

| Patent document<br>cited in search report |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |              |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|-------------------------|--------------|----|--------------------------------------|
| US                                        | 2019-0024176    | A1 | 24 January 2019                      | US                      | 11359242     | B2 | 14 June 2022                         |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2017-120443  | A1 | 13 July 2017                         |
| KR                                        | 10-2021-0016362 | A  | 15 February 2021                     | AU                      | 2019-276749  | A1 | 03 December 2020                     |
|                                           |                 |    |                                      | CA                      | 3099639      | A1 | 05 December 2019                     |
|                                           |                 |    |                                      | CN                      | 112639132    | A  | 09 April 2021                        |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 3802883      | A1 | 14 April 2021                        |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2021-533731  | A  | 09 December 2021                     |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2021-0285053 | A1 | 16 September 2021                    |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2019-229302  | A1 | 05 December 2019                     |
| KR                                        | 10-2011-0110030 | A  | 06 October 2011                      | KR                      | 10-1346955   | B1 | 02 January 2014                      |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2011-122859  | A2 | 06 October 2011                      |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2011-122859  | A3 | 18 May 2012                          |
| KR                                        | 10-2020-0070367 | A  | 17 June 2020                         | AU                      | 2018-355237  | A1 | 21 May 2020                          |
|                                           |                 |    |                                      | BR                      | 112020007881 | A2 | 22 December 2020                     |
|                                           |                 |    |                                      | CA                      | 3079729      | A1 | 02 May 2019                          |
|                                           |                 |    |                                      | CN                      | 111936163    | A  | 13 November 2020                     |
|                                           |                 |    |                                      | EP                      | 3700570      | A1 | 02 September 2020                    |
|                                           |                 |    |                                      | GB                      | 2584204      | A  | 25 November 2020                     |
|                                           |                 |    |                                      | GB                      | 2584204      | B  | 28 June 2023                         |
|                                           |                 |    |                                      | GB                      | 2610100      | A  | 22 February 2023                     |
|                                           |                 |    |                                      | GB                      | 2610100      | B  | 16 August 2023                       |
|                                           |                 |    |                                      | IL                      | 274023       | A  | 30 June 2020                         |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2021-500041  | A  | 07 January 2021                      |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 2024-056778  | A  | 23 April 2024                        |
|                                           |                 |    |                                      | JP                      | 7475272      | B2 | 26 April 2024                        |
|                                           |                 |    |                                      | SG                      | 11202003692  | A  | 28 May 2020                          |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2021-0268667 | A1 | 02 September 2021                    |
|                                           |                 |    |                                      | US                      | 2024-0033378 | A1 | 01 February 2024                     |
|                                           |                 |    |                                      | WO                      | 2019-084050  | A1 | 02 May 2019                          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     |                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br>A61K 38/17(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A23L 33/17(2016.01)i; A23K 20/147(2016.01)i                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                     |                                        |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br>A61K 38/17(2006.01); A61K 35/30(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/113(2010.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6883(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01)<br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: L1TD1(LINE1 type transposase domain containing 1), 도메인(domain), 유전자(gene), 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 파킨슨병(parkinson's disease)                      |                                                                                     |                                        |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                     |                                        |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                          | 관련 청구항                                 |
| X<br>A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | US 2019-0024176 A1 (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER) 2019.01.24<br>청구항 21-26; 단락 [0030] | 1,7-8,10,12,14,17-18<br>2-6,9,11,13,15 |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | KR 10-2021-0016362 A (투분 일리오피스토) 2021.02.15<br>전체 문헌                                | 1-15,17-18                             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | KR 10-2011-0110030 A (서울대학교산학협력단) 2011.10.06<br>전체 문헌                               | 1-15,17-18                             |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | KR 10-2020-0070367 A (스톡 테라퓨틱스, 인크.) 2020.06.17<br>전체 문헌                            | 1-15,17-18                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                     |                                        |
| <b>* 인용된 문헌의 특별 카테고리:</b><br>“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌<br>“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 |                                                                                     |                                        |
| 국제조사의 실제 완료일<br>2024년06월17일(17.06.2024)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                     | 국제조사보고서 발송일<br>2024년06월19일(19.06.2024) |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                     | 심사관<br>허주형<br>전화번호 +82-42-481-5373     |

| C. 관련 문헌 |                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 카테고리*    | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                              | 관련 청구항     |
| A        | NARVA, E. 등, "RNA-Binding Protein L1TD1 Interacts with LIN28 via RNA and is Required for Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Cancer Cell Proliferation", Stem Cells, 2012, 30권, 페이지 452-460<br>전체 문헌                             | 1-15,17-18 |
| PX       | JIN, S. W. 등, "Dissolution of ribonucleoprotein condensates by the embryonic stem cell protein L1TD1", Nucleic Acids Research, 전자공개 2024.01.02, 52권, 페이지 3310-3326<br>전체 문헌<br>※ 위 문헌은 출원인이 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외`를 선언한 공지문헌임 | 1-15,17-18 |

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:

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

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

- ☒ 청구항: **16**  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 16은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여  
국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과  
관련됩니다. 구체적으로는,
- ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌             | 공개일        |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| US 2019-0024176 A1    | 2019/01/24 | US 11359242 B2     | 2022/06/14 |
|                       |            | WO 2017-120443 A1  | 2017/07/13 |
| KR 10-2021-0016362 A  | 2021/02/15 | AU 2019-276749 A1  | 2020/12/03 |
|                       |            | CA 3099639 A1      | 2019/12/05 |
|                       |            | CN 112639132 A     | 2021/04/09 |
|                       |            | EP 3802883 A1      | 2021/04/14 |
|                       |            | JP 2021-533731 A   | 2021/12/09 |
|                       |            | US 2021-0285053 A1 | 2021/09/16 |
|                       |            | WO 2019-229302 A1  | 2019/12/05 |
| KR 10-2011-0110030 A  | 2011/10/06 | KR 10-1346955 B1   | 2014/01/02 |
|                       |            | WO 2011-122859 A2  | 2011/10/06 |
|                       |            | WO 2011-122859 A3  | 2012/05/18 |
| KR 10-2020-0070367 A  | 2020/06/17 | AU 2018-355237 A1  | 2020/05/21 |
|                       |            | BR 112020007881 A2 | 2020/12/22 |
|                       |            | CA 3079729 A1      | 2019/05/02 |
|                       |            | CN 111936163 A     | 2020/11/13 |
|                       |            | EP 3700570 A1      | 2020/09/02 |
|                       |            | GB 2584204 A       | 2020/11/25 |
|                       |            | GB 2584204 B       | 2023/06/28 |
|                       |            | GB 2610100 A       | 2023/02/22 |
|                       |            | GB 2610100 B       | 2023/08/16 |
|                       |            | IL 274023 A        | 2020/06/30 |
|                       |            | JP 2021-500041 A   | 2021/01/07 |
|                       |            | JP 2024-056778 A   | 2024/04/23 |
|                       |            | JP 7475272 B2      | 2024/04/26 |
|                       |            | SG 11202003692 A   | 2020/05/28 |
|                       |            | US 2021-0268667 A1 | 2021/09/02 |
|                       |            | US 2024-0033378 A1 | 2024/02/01 |
|                       |            | WO 2019-084050 A1  | 2019/05/02 |