

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 7월 8일 (08.07.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/137366 A1

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

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/007701

(22) 국제출원일: 2020년 6월 15일 (15.06.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0178233 2019년 12월 30일 (30.12.2019) KR

(71) 출원인: 경상국립대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 김명옥 (KIM, Myeong Ok); 52819 경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호, Gyeongsangnam-do (KR).

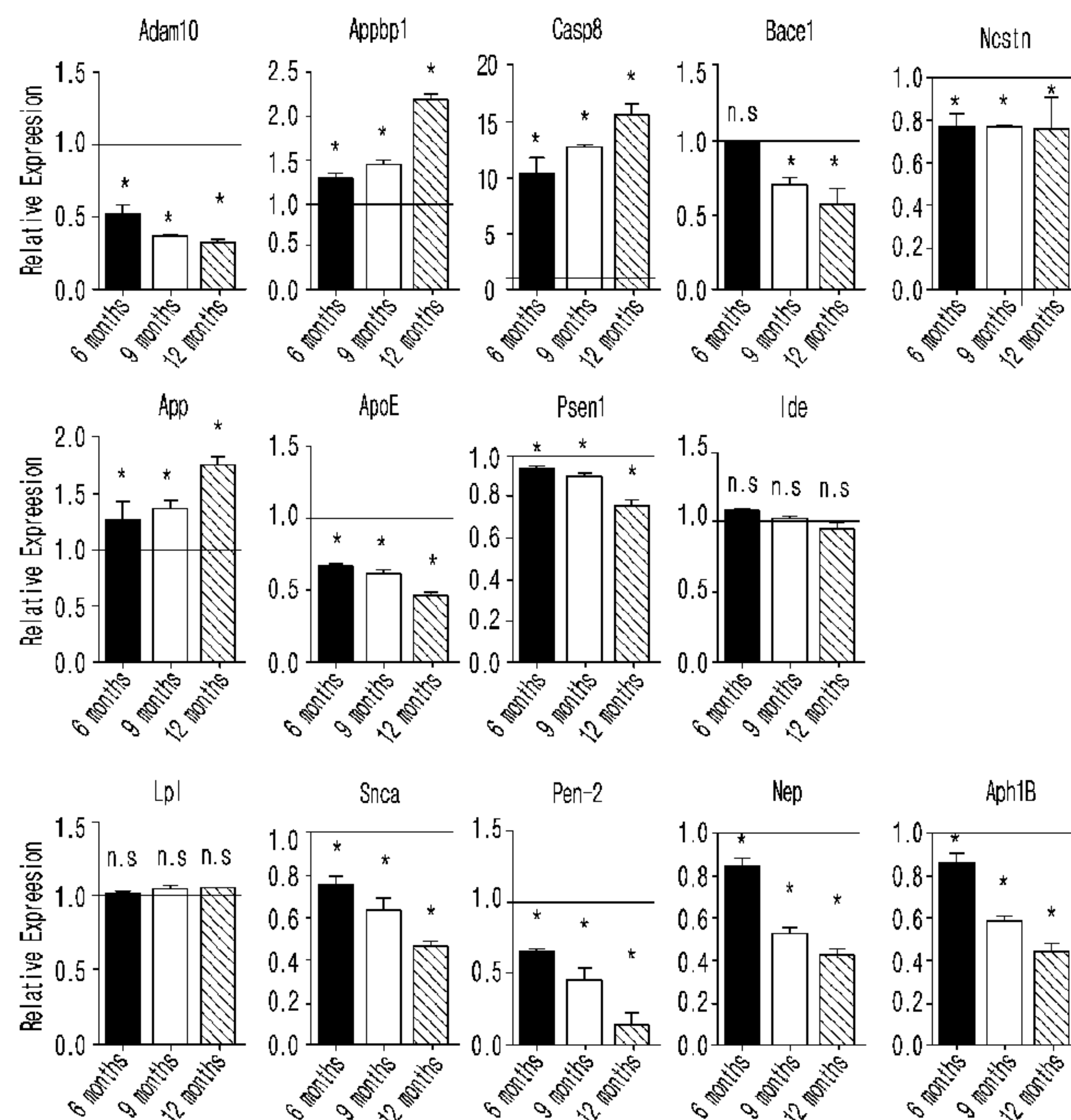
(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

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

(54) Title: COMPOSITION FOR PREDICTING STAGE OF ALZHEIMER'S DISEASE, AND PREDICTION KIT USING COMPOSITION

(54) 발명의 명칭: 알츠하이머 병기 예측용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 예측 키트

[도1a]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for prognosis prediction of Alzheimer's disease, a kit, and a method for providing prognosis prediction information, the composition comprising a detection reagent specifically binding to any one or more genes selected from the group consisting of nitric oxide synthase 1 (Nos1), anterior pharynx defective 1 homolog B (Aph1B), ryanodine receptor 3 (Ryr3), activating transcriptional factor 6 (Atf6), inositol trisphosphate receptor (Ip3r), neprilysin (Nep), cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) and amyloid beta-binding alcohol dehydrogenase (Abad), and can rapidly and accurately predict the prognosis of Alzheimer's disease, and determine the prognosis for a drug by comparing the expression levels before/after drug administration, thereby enabling an appropriate treatment plan according to the predicted prognosis to be determined. Therefore, the present invention can

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

greatly contribute to a reduction in the fatality rate from Alzheimer's disease.

(57) 요약서: 본 발명의 Nos1(Nitric oxide synthase 1), Aph1B(Anterior pharynx defective 1 homolog B), Ryr3(Ryanodine receptor 3), Atf6(Activating transcriptional factor 6), Ip3r(Inositol trisphosphate receptor), Nep(Neprilysin), Cdk5(cyclin dependent kinase 5) 및 Abad(Amyloid beta-binding alcohol dehydrogenase) 로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 검출시약을 포함하는 알츠하이머의 예후 예측용 조성물, 키트 및 예후 예측의 정보를 제공하는 방법은 알츠하이머의 예후를 신속하고 정확하게 예측하고, 약물 투여 전후의 발현 수준을 비교하여 약물에 대한 예후를 판정할 수 있으므로 예측된 예후에 따른 적절한 치료방향을 결정할 수 있다. 따라서 알츠하이머로 인한 사망률의 감소에 크게 기여할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 알츠하이머 병기 예측용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 예측 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 알츠하이머 질환에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소 되는 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 병기 예측용 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease, AD)은 노화에 관련된 대표적인 신경 퇴행성 질환이다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 전두엽 및 측두엽에서 시작하여 뇌의 다른 부위로 점차적으로 퍼지며 병이 진행된다. 알츠하이머 질환의 주요한 병리학적 특징은 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 인한 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 미세소관(microtubule)에 관련된 타우 단백질(tau protein)이 신경세포에서 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)을 형성하는 것이다. 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)의 형성은 신경퇴행, 시냅스 기능 장애 및 치매(dementia)로 이어진다.
- [3] 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)는 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)에 의해 생성된다. 아밀로이드 전구체 단백질은 신경 세포의 세포막을 관통하는 막전이 단백질로, 신경 세포의 성장, 생존 및 손상 후 복구에 매우 중요하다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)이 γ -세크레타아제(secretase) 및 β -세크레타아제(secretase) 효소에 의해 분해, 절단되면서 39~43개의 아미노산으로 이루어진 아밀로이드 베타(amyloid beta)가 생성되고, 이는 신경 세포의 외부에 고밀도로 축적된 덩어리인 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)를 형성한다.
- [4] 또한, 알츠하이머가 발병한 환자에게서 타우 단백질의 이상 응집이 관찰된다. 타우 단백질(tau protein)은 신경세포에서 세포 물질을 수송하는 튜브 형태의 구조물인 미세소관에 관련된 단백질이다. 인산화된 타우 단백질은 미세소관을 결합시키고 붕괴를 막아 신경세포를 안정화시키는 작용을 한다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 타우 단백질은 과인산화(hyper phosphorylation)되어 미세소관에서 타우 단백질이 떨어져 나가고 이에 미세소관은 구조적 안정성이 저하되어 신경세포에서 신호전달이 제대로 이루어지지 않는다. 미세소관에서 떨어져 나간 과인산화된 타우 단백질은 응집되어 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)을 형성한다.
- [5] 아밀로이드 플라크(amyloid plaque) 및 신경섬유다발(neurofibrillary tangle,

NFT)의 형성은 알츠하이머 발병의 주된 원인이며, 현재 알츠하이머를 진단하기 위해 침착된 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 과인산화된 타우 단백질(tau protein)을 진단 마커로 사용하고 있다. 아밀로이드 베타를 타겟으로 하는 뇌영상법으로 아밀로이드-PET(positron emission tomography)가 개발되었으나, 이는 인지기능이 정상인 노인에게서도 아밀로이드 플라크가 관찰될 수 있어, 약 35%의 환자가 잘못 진단되고 있다. 또한, 비교적 최근 타우-PET가 도입되기 시작하였으나, 아직까지 널리 사용되지는 못하고 있으며, 현재까지 사후 부검을 통한 검증만이 알츠하이머를 확정적으로 진단할 수 있는 수단으로 여겨지고 있다.

- [6] 알츠하이머 질환에서는 초기 전구증상이 나타나는 시기 뿐 아니라 치매(dementia) 단계에서 질환을 진단하는 것이 중요하다. 알츠하이머와 같은 연령에 관련된 질환은 질병을 명확하게 진단하기 더욱 어려운 특성이 있어 질병의 경과 수준에 따른 생물학적 진단도구가 절실하게 요구되고 있다. 최근 알츠하이머에서 특이적으로 발현되는 유전자 마커의 발현수준을 측정함으로써 알츠하이머를 진단하려는 연구가 이루어지고 있으나, 알츠하이머 환자의 예후를 예측하기 위한 유전자 마커에 대한 연구는 상대적으로 덜 이루어지고 있다. 그러나 같은 병기로 진단된 알츠하이머라도 그 예후는 환자마다 차이가 있으므로, 알츠하이머의 효과적인 치료를 위해서는 알츠하이머의 예후를 정확하게 예측하는 것이 무엇보다 중요하다. 알츠하이머와 같은 여러 유전자가 관련된 다인성 질병을 정확하게 진단하기 위해서는 유전자 발현 분석이 가장 적절한 도구이다.
- [7] 이에 본 발명자들은 알츠하이머 질환 동물 모델을 이용하여 여러 유전자들의 발현을 분석한 결과 특징적으로 발현이 증가 또는 감소하는 유전자를 선별하고, 이를 이용하여 알츠하이머 병기를 예측할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdccc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 dk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 키트를 제공한다.
- [18]

발명의 효과

- [19] 본 발명의 알츠하이머 질환에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소 되는 유전자 조합은 알츠하이머 질환 마우스 모델에서 정상 대조군에 비해 발현이 유의하게 증가 또는 감소하기 때문에, 상기 유전자 조합의 발현 수준을 측정하면 알츠하이머 질환의 병기를 정확하게 진단 또는 예측할 수 있으며 발병 유무를 빠르게 진단하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 APP 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.
- [22] 도 1b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log₂값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 APP 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [23] 도 1c는 알츠하이머 발병 월령별로 APP 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.
- [24] 도 2a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한

타우 단백질 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

- [25] 도 2b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 $\log_2$ 값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 타우 단백질 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [26] 도 2c 알츠하이머 발병 월령별로 타우 단백질 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.
- [27] 도 3a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 소포체 스트레스 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.
- [28] 도 3b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 $\log_2$ 값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 소포체 스트레스 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [29] 도 3c는 알츠하이머 발병 월령별로 소포체 스트레스 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.
- [30] 도 4a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.
- [31] 도 4b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 $\log_2$ 값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [32] 도 4c는 알츠하이머 발병 월령별로 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.
- [33] 도 5a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.
- [34] 도 5b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 $\log_2$ 값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [35] 도 5c는 알츠하이머 발병 월령별로 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.
- [36] 도 6a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 염증반응과 세포사멸 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.
- [37] 도 6b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 $\log_2$ 값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 염증반응과 세포사멸 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.
- [38] 도 6c는 알츠하이머 발병 월령별로 염증반응과 세포사멸 관련 유전자의

발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[41]

[42]

본 발명은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdccc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[43]

본 발명에서 사용된 용어 '병기(disease stage)'란 질병의 경과를 그 특징에 따라 구분한 시기를 의미한다. 알츠하이머의 병기는 불용성 과인산화 타우 단백질의 세포 내 엉킴 및 뉴런 사이의 아밀로이드 베타(A β) 펩타이드로 구성된 비정상 단백질 침착물의 축적 정도로 표시된다. 이러한 타우 단백질의 세포 내 엉킴과 아밀로이드 베타 플라크의 생성은 기억 상실과 학습 장애 증상이 나타나기 전에도 알츠하이머 초기 단계에서부터 나타난다. 알츠하이머가 진행됨에 따라 뇌의 더 넓은 영역이 이러한 엉킴과 플라크에 의해 영향을 받을 때 기억 상실과 학습 결손이 증가한다. 말기 알츠하이머는 광범위한 뇌의 부위에서 신경 변성, 신경 사멸 및 뇌 수축이 나타난다.

[44]

알츠하이머의 병기는 초기 알츠하이머, 중기 알츠하이머 및 말기 알츠하이머로 구분할 수 있다. 아밀로이드 베타 플라크가 뇌의 isocortex에서만 보이거나, 선조체(striatum)와 entorhinal cortex에서 보이며, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 경내후각 피질(transentorhinal)에서 관찰되면 초기 알츠하이머로, 아밀로이드 베타 플라크가 선조체(striatum)와 간뇌(diencephalon)에서 보이고, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 대뇌변연계(limbic)에서 관찰되면 중기 알츠하이머로, 아밀로이드 베타 플라크가 다양한 뇌간(brainstem)의 신경핵에서 보이거나, 소뇌에서 보이며, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 대뇌피질(subcortical)에 넓게 분포한 경우 말기 알츠하이머로 진단할 수 있다.

[45]

상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.

[46]

상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 중기 또는 말기로 진단할 수 있다.

[47]

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[48]

상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay),

노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[49]

[50] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[51]

[52] 또한, 본 발명은 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[53]

상기 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.

[54]

상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것일 수 있다.

[55]

상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[56]

상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[57]

상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함하는 것일 수 있다.

[58]

상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[59]

[60] 또한, 본 발명은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

- [61] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것일 수 있다.
- [62] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것일 수 있다.
- [63] 상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [64] 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함하는 것일 수 있다.
- [65] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [66]
- [67] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 병기 예측용 키트를 제공한다.
- [68] 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.
- [69]
- [70] 또한, 본 발명은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdccc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측 방법을 제공한다.
- [71] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.
- [72] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 중기 또는 말기로 진단할 수 있다.
- [73]
- [74] 또한, 본 발명은 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측 방법을 제공한다.

- [75] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.
- [76] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단할 수 있다.
- [77]
- [78] 또한, 본 발명은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측 방법을 제공한다.
- [79] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.
- [80] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단할 수 있다.
- [81] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [82] 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함할 수 있다.
- [83]
- [84] 따라서, 본 발명의 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdccc(voltage-dependent calcium channel) 유전자의 조합은 알츠하이머 질환 환자에서 정상 대조군에 비해 초기에는 발현이 유의하게 감소하나 중기 또는 말기에는 발현이 유의하게 증가하고, Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1) 유전자 조합은 알츠하이머 질환 환자에서 정상 대조군에 비해 초기에는 발현이 유의하게 증가하나, 말기에는 발현이 유의하게 감소하므로 본 발명의 조성물 및 키트를 이용할 경우 알츠하이머 질환의 병기를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[85]

발명의 실시를 위한 형태

- [86] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [87] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [88]
- [89] <실시예 1> 알츠하이머 질환 마우스 모델의 준비
- [90] 알츠하이머 질환 마우스 모델(AD)은 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입한 B6.Cg-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax 이중 형질전환 마우스(double transgenic mouse)를 사용하였다. 이 마우스는 중추신경계의 신경세포에서 Swedish mutation(Mo/HuAPP695swe) 및 돌연변이 인간 presenilin 1

단백질(PS1-dE9)을 갖는 chimeric mouse-human amyloid precursor protein(APP)을 발현한다. 정상 대조군 마우스(wild type, WT)는 C57BL/6J 마우스로 샘타코 코리아(SAMTAKO Korea, 대한민국)에서 구입하여 25°C에서 12 시간 명암주기 및 임의 섭식 조건으로 사육하였다. 모든 실험 과정은 경상대학교 동물 윤리 위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[91]

[92] <실험예 1> 정상 대조군 마우스와 알츠하이머 발병 마우스의 유전자 발현 비교

[93] <1-1> APP 단백질에 관련된 유전자 발현 비교

[94] 신경퇴행의 가장 큰 특징 중 하나인 아밀로이드 베타 단백질의 축적은 APP로부터 유발되므로, Adam10, App, Lpl, ApoE, Appbp1, Snca, Casp8, Psen1, Pen-2, Ide, Nep, Base1, Ncstn, Aph1b 유전자의 발현을 정상 대조군(WT)과 알츠하이머 발병 마우스(AD)에서 비교하였다(도 1a 및 도 1b).

[95] 6, 9, 및 12개월령의 알츠하이머 질환 마우스 모델과 정상 대조군 마우스에서 TRIzol 시약(Thermofisher)를 사용하여 마우스 뇌 해마 부위에서 RNA를 분리하였다. 뇌 조직을 균질화(Homogenization)시키기 전에 TRIzol 시약 100 μ l를 첨가하여 실온에서 5분간 배양하였다. 그 후 20 μ l의 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후 실온에서 2분간 추가 배양하였다. 혼합물을 4°C 13000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리 하고, 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 250 μ g의 무수 이소프로판올(absolute isopropanol)을 첨가하고 실온에서 10분간 배양하였다. 그 후 혼합물을 4°C 13000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻은 RNA 펠렛(pellet)을 75% 에탄올 250 μ g을 사용하여 세척하였다. 세척 후 RNA 펠렛(pellet)을 실온에서 건조 시키고 RNase 없는 물 50 μ l에 현탁하였다. 분리된 총 RNA 중 2 μ g의 RNA를 cDNA 합성에 이용하였다. 반응 튜브에서 RNA를 65°C, 10분간 변성시킨 후, 얼음에서 급속 냉각하였다. 반응 튜브에 4 μ l, 5 × 250mM의 Tris-HCl에 375mM의 KCl과 15mM의 MgCl₂를 첨가한 pH 8.3의 PCR 완충액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 μ l의 100mM dithiothreitol(DTT)(Invitrogen)을 첨가하고 실온에서 2분간 배양한 후, 200 유닛(unit)의 SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)을 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켜 최종적으로 cDNA를 획득하였다. dNTP가 포함된 PCR mixture가 사용되었지만, 일반적으로 200nM의 농도로 사용된다. 프라이머농도는 0.1 μ M로 사용되었다.

[96] 획득한 cDNA 5 μ l, 각 유전자 특이 프라이머 0.1 μ M(표 1, 서열번호 1 내지 102), 및 Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 최종부피가 25 μ l가 되도록 증류수를 첨가하여 PCR 반응용액을 조성한 다음, 상기 PCR 반응 용액을 94°C에서 최초 5분간 열변성(denaturation) 후, 94°C에서 45초간 열변성(denaturation), 55°C에서 30초간 어닐링(annealing), 72°C에서 45초간 중합반응(extension)을 총 25 사이클을 반복하고, 최종 중합반응으로서 72°C에서 7분의 조건으로 수행하였다(표 2).

[97] 증폭된 PCR 생성물 20 μ l를 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr)가

함유된 1.5% TAE 젤에서 전기영동을 수행한 후, Gel Doc XR+ Molecular Imager System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) densitometry를 사용하여 GADPH 유전자의 발현량과 상대적 비교를 통해 정량화하였다.

- [98] 그 결과, App, Appbp1, Casp8은 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Adam10, ApoE, Psen1, Pen-2, Nep, Bace1, Aph1b, Snca는 발현이 유의하게 감소하였으며 Ide는 발현의 차이가 없었다(도 1a 및 도 1b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nep 및 Aph1b 유전자를 선별하였다.

[99]

[표 1]

유전자 이름	역방향 프라이머(5'→3')	정방향 프라이머(5'→3')
Adam10	atcgaatcctgccatttcac	agccagagttgtgcgttttt
Abad	gacttccagcgggttatcaa	cagtgtcatgcccactatgc
Aph1B	gctgttcaggctcgcatatt	aatcaccatgaatgcccact
Apo-E	gtgctgttggtcacattgct	cagtgccgtcagttcttgtg
App	ggccctcgagaattacatca	gttcatgcgctcgtagatca
Atf6	ggccagactgttttgccttc	cccatacttctggtggcact
Serca1	tggccgatgataacttctcc	gagcccatcagtcaccaagt
Bace1	tttgtggagatggtggacaa	tacacacccttctggaggtc
Bad	gggatggaggaggagcttag	cccaccaggactggataatg
Bid	tcacagacctgctggtgttc	gtctggcaatgttgtggatg
Vdcc	cgttctcatcctgctcaaca	tatgctcccaatgacgatga
Calm1	actgggtcagaaccaacag	gttctgccgcactgatgtaa
Caln	cagagggtgttcgattctc	aaggcccacaaatacagcac
Casp12	ttccagggaacagctgagtt	tcacgtggacaaagcttcag
Casp3	tgtcatctcgctctggtacg	tcccataaatgacccttca
Casp7	tttgcttactccacggttcc	cacgggatctgcttcttctc
Casp8	ggcctccatctatgacctga	gcagaaagtctgcctcatcc
Casp9	aagaccatggctttgagggtg	aagtccctttcgcagaaaca
Cdk5	gtccatcgacatgtggtcag	acgacgttcaccaaggatgt
P25	cgtccactagtgagctgctg	cccacctcagaggagatgac
Cxi	ctctccccagttaccctcgac	gggagtgggcctgaaattag
Cxii	cctttgggaaccacagctaa	tcaaagttccagggaagcag
Cxiii	gttcgcagtcatagccacag	tagggccgcgataataaatg
Cxiv	gtgtccccactgatgaggag	cagccaaaaccagatgacag
Cxv	gaaactggaccaggtggaga	gataccctgggtgttgcccta
Cycs	gggaggcaagcataagactg	tctgccctttctcccttctt
Perk	tgggtgactgctatggaccaa	gttccatctgggtgctgaat
Fadd	acaatgtggggagagactgg	aggtcagccaccagattcag
Fas	ttgcaagacatgtcggaaag	cctgcatggcagttacacac

Appbp1	gcagccaggggaagataactca	tcttctccgctgaccagatt
Gapdh	aagggctcatgaccacagtc	acacattgggggtaggaaca
Gq	cacgetcaagatcccataca	ggctacacgggtccaagtc
Nmdar	cagcaggactggtcacagaa	tttgttccccaagagtttgc
Gsk3b	gaggagagcccaatgtttca	aatttgctcccttggttggtg
Ide	gaggcgttccaaaaacacat	gacagccaacatttcctggt
Il1b	gaccttcaggatgaggaca	tccattgaggtggagagctt
Ip3r	gaatttccttcgttgccaaa	cgatgcagttctggttctca
Irela	cccaaattgatccgctact	agaatgttggtggggcttcag
Lpl	tttctgggactgaggatgg	gtcaggccagctgaagtagg
Lrp1	gacagcaaacgaggcctaag	acaggggttggtcacttcag
Erk	tccttttgagcaccagacct	agcagatgtggtcattgctg
Mapt	gtggccagggtggaagtaaaa	gtggagatgtgtccccagac
Nestn	ctgaccactctggctccttc	gctgctgaagttggttcctc
Nep	aggcggacaacctctactca	cgaggctgggtcaaaatgaat
Nos1	agcacctaccagctcaagga	atagtgatggccgacctgag
Plcb1	catccaggaggtggttcagt	ccctttcatggcttcctgta
Psen1	cctcatggccctggtattta	tcagccatattcaccaacca
Pen-2	cgggtatccaatgaggagaa	gcgagaatgatcaccagaa
Ryr3	gtgcagcctctactcccttg	atgtcctccaccttgctctgg
Snca	ggagtgacaacagtggctga	caggcatgtcttcaggatt
Tnf	cgtcagccgatttgctatct	cggactccgcaaagtctaag

[100]

[101] [표2]

온도(°C)	시간	사이클 수
94	5분	1
94	45초	25
55	30초	25
72	45초	25
72	7분	1

[102]

[103] **<1-2> 타우 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[104] 타우 단백질은 미세소관의 안정화에 관련된 단백질로, 알츠하이머가 발병하면 타우 단백질의 과인산화는 미세소관의 구조적 안정성을 저해한다. 이는 신경세포에서 신호전달과 기억력을 감퇴시키므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[105] 구체적으로, 타우 단백질의 과인산화에 관련된 Caln, Nos1, Gsk3b, Mapt/tau, P25, Cdk5 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[106] 그 결과, Nos1, Gsk3b, Mapk/tau, Cdk5는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Caln은 발현이 유의하게 감소하였으며 P25는 발현의 차이가 없었다(도 2a 및 도 2b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 및 Cdk5 유전자를 선별하였다.

[107]

[108] **<1-3> 소포체 스트레스에 관련된 유전자 발현 비교**

[109] 소포체 스트레스로 인한 소포체 기능장애는 알츠하이머 질환의 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, presenilin 1 및 presenilin 2 단백질의 돌연변이, 아밀로이드 베타의 생성, 타우 단백질의 과인산화 및 세포사멸에 관련이 있다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[110] 구체적으로, 소포체 스트레스에 관련된 Ryr3, Ip3r, Psen1, Serca1, Perk, Ire1a, Atf6, Gq, Plcb1 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

[111] 그 결과, Ryr3, Ip3R, Ire1a, Plcb1는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Perk, Psen1, Serca1, Atf6는 발현이 유의하게 감소하였으며 Gq는 발현의 차이가 없었다(도 3a 및 도 3b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Atf6, Ip3R 및 Ryr3 유전자를 선별하였다.

[112]

[113] **<1-4> 칼슘 신호 붕괴에 관련된 유전자 발현 비교**

[114] 아밀로이드 베타 단백질에 의한 칼슘 신호의 붕괴는 기억 장애와 연관되는데, 이는 칼슘 수준의 지속적인 증가는 신경전달과 장기기억의 강화를 일으키기 때문이다. 따라서 칼슘 신호전달과 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[115] 구체적으로, 칼슘 신호에 관련된 Nmdar, Vdccc, Ryr3, Ip3r, Calm1, Erk/Mapk2, Bad 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[116] 그 결과, Nmdar, Ryr3, Ip3r, Erk/Mapk2는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병

마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Calm1, Snca는 발현이 유의하게 감소하였으며, Vdccc, Bad는 발현의 차이가 없었다(도 4a 및 도 4b).

[117]

[118] **<1-5> 미토콘드리아 기능 장애에 관련된 유전자 발현 비교**

[119] 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서는 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 미토콘드리아의 기능에 장애가 생긴다. 이는 신경 퇴행과 세포사멸을 일으키는 활성산소(ROS)와 염증을 생성한다. 따라서 미토콘드리아 기능장애와 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[120] 구체적으로, 미토콘드리아 기능에 관련된 Abad, Nmdar, Cx 1-5, Cycts의 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 5a 및 도 5b에 나타내었다.

[121] 그 결과, Abad와 Nmdar, Cycts는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Cx3, Cx4 및 Cx5는 발현이 유의하게 감소하였으며 Cx1 및 Cx2는 발현의 차이가 없었다(도 5a 및 도 5b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Abad 유전자를 선별하였다.

[122]

[123] **<1-6> 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자 발현 비교**

[124] 염증 반응과 세포사멸은 알츠하이머 질환의 발병 후 가장 마지막에 나타나는 증상이다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[125] 구체적으로, 염증 반응에 관련된 Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycts, Nos1, Bid의 유전자의 발현을 상기 실험예 1의 방법으로 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

[126] 그 결과, Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycts, Nos1, Bid 모두 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였다(도 6a 및 도 6b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 유전자를 선별하였다.

[127]

[128] **<실험예 2> 알츠하이머 발병 마우스의 월령별(6개월, 9개월 및 12개월) 유전자 발현 비교**

[129] **<2-1> APP 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[130] 신경퇴행의 가장 큰 특징중 하나인 아밀로이드 베타 단백질의 축적은 APP로부터 유발되므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[131] 구체적으로, APP 단백질에 관련된 Adam10, App, Lpl, ApoE, Appbp1, Snca, Casp8, Psen1, Pen-2, Ide, Nep, Bace1, Ncstn, Aph1b 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 1a 및 도 1c에 나타내었다.

[132] 그 결과, Adam10, Bace1, ApoE, Psen1, Snca, Pen-2, Nep, Aph1B는 질환이 진행될

수록 점점 발현이 감소했고, Appbp1, Casp8. App는 발현이 점점 증가했다. Lpl과 Ide는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 1a). 또한 APP 단백질에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 감소하는 추세를 확인할 수 있었다(도 1c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nep 및 Aph1b 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[133]

[134] **<2-2> 타우 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[135] 타우 단백질은 미세소관의 안정화에 관련된 단백질로, 알츠하이머가 발병하면 타우 단백질의 과인산화는 미세소관의 구조적 안정성을 저해한다. 이는 신경세포에서 신호전달과 기억력을 감퇴시키므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[136] 구체적으로, 타우 단백질의 과인산화에 관련된 Caln, Nos1, Gsk3b, Mapt/tau, P25, Cdk5 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 2a 및 도 2c에 나타내었다.

[137] 그 결과, Nos1, Gsk3b, Mapk/tau, Cdk5는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Caln은 발현이 점점 감소하였다. P25는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 2a). 또한 타우 단백질에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세를 확인할 수 있었다(도 2c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 및 Cdk5 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[138]

[139] **<2-3> 소포체 스트레스에 관련된 유전자 발현 비교**

[140] 소포체 스트레스로 인한 소포체 기능장애는 알츠하이머 질환의 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, presenilin 1 및 presenilin 2 단백질의 돌연변이, 아밀로이드 베타의 생성, 타우 단백질의 과인산화 및 세포사멸에 관련이 있다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[141] 구체적으로, 소포체 스트레스에 관련된 Ryr3, Ip3r, Psen1, Serca1, Perk, Ire1a, Atf6, Gq, Plcb1 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 3a 및 도 3c에 나타내었다.

[142] 그 결과, Ryr3, Ip3R, Ire1a, Plcb1, Perk, Plcb1는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Psen1, Serca1, Atf6는 발현이 점점 감소하였다. Gq는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 3a). 또한 소포체 스트레스에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세를 확인할 수 있었다(도 3c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Ryr3, Ip3R 및 Atf6 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[143]

[144] **<2-4> 칼슘 신호 붕괴에 관련된 유전자 발현 비교**

[145] 아밀로이드 베타 단백질에 의한 칼슘 신호의 붕괴는 기억 장애와 연관되는데, 이는 칼슘 수준의 지속적인 증가는 신경전달과 장기기억의 강화를 일으키기 때문이다. 따라서 칼슘 신호전달과 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[146] 구체적으로, 칼슘 신호에 관련된 Nmdar, Vdca, Ryr3, Ip3r, Calm1, Erk/Mapk2, Bad 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 4a 및 도 4c에 나타내었다.

[147]

[148] *그 결과, Nmdar, Ryr3, Ip3r, Erk는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Calm1, Snca는 발현이 점점 감소하였으며, Vdca, Bad는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 4a).

[149]

[150] <2-5> 미토콘드리아 기능 장애에 관련된 유전자 발현 비교

[151] 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서는 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 미토콘드리아의 기능에 장애가 생긴다. 이는 신경 퇴행과 세포사멸을 일으키는 활성산소(ROS)와 염증을 생성한다. 따라서 미토콘드리아 기능장애와 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[152] 구체적으로, 미토콘드리아 기능에 관련된 Abad, Nmdar, Cx 1-5, Cyts의 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 5a 및 도 5c에 나타내었다.

[153] 그 결과, Abad와 Nmdar는 질환이 진행됨에 따라 발현이 점점 증가하였고, Cx3, Cx4 및 Cx5는 발현이 점점 감소하였다. Cx1 및 Cx2는 발현의 변화가 없는 것으로 나타났다(도 5a). 또한 미토콘드리아 기능에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 감소하는 추세를 확인할 수 있었다(도 5c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Abad 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[154]

[155] <2-6> 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자 발현 비교

[156] 염증반응과 세포사멸은 알츠하이머 질환의 발병 후 가장 마지막에 나타나는 증상이다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[157] 구체적으로, 염증 반응 및 세포사멸에 관련된 Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cyts, Nos1, Bid의 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 6a 및 도 6c에 나타내었다.

[158] 그 결과, Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cyts, Nos1, Bid는 질환이 진행됨에 따라 발현이 점점 증가하였다(도 6a). 또한 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세를 확인할 수 있었다(도 6c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게

변화된 Nos1 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

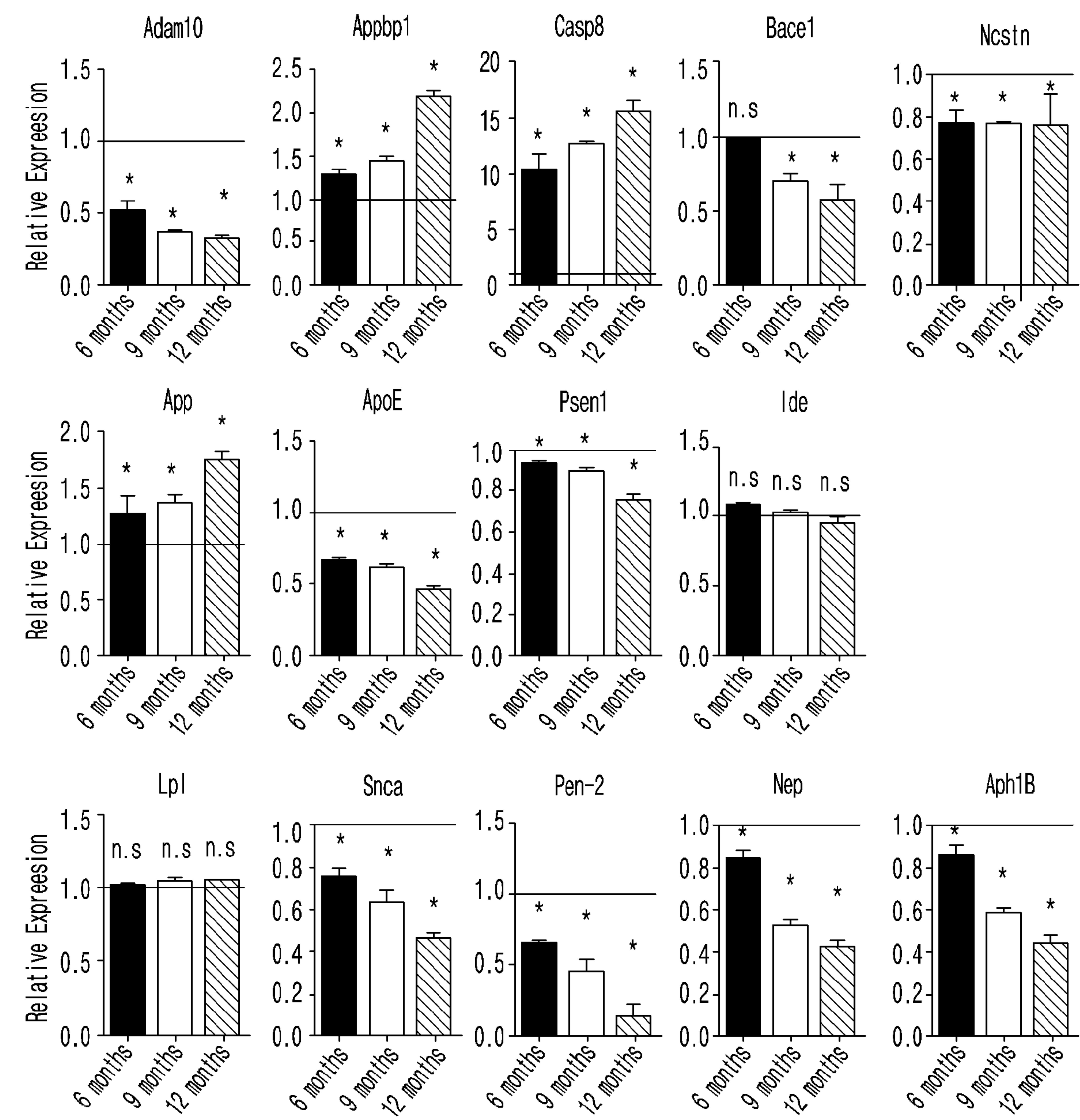
청구범위

- [청구항 1] Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdccc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 중기 또는 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 4] Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 7] Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 10] 제 1항, 제 4항 또는 제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 11] 제 1항, 제 4항 또는 제 7항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앵타머를 포함하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.
- [청구항 12] 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머의

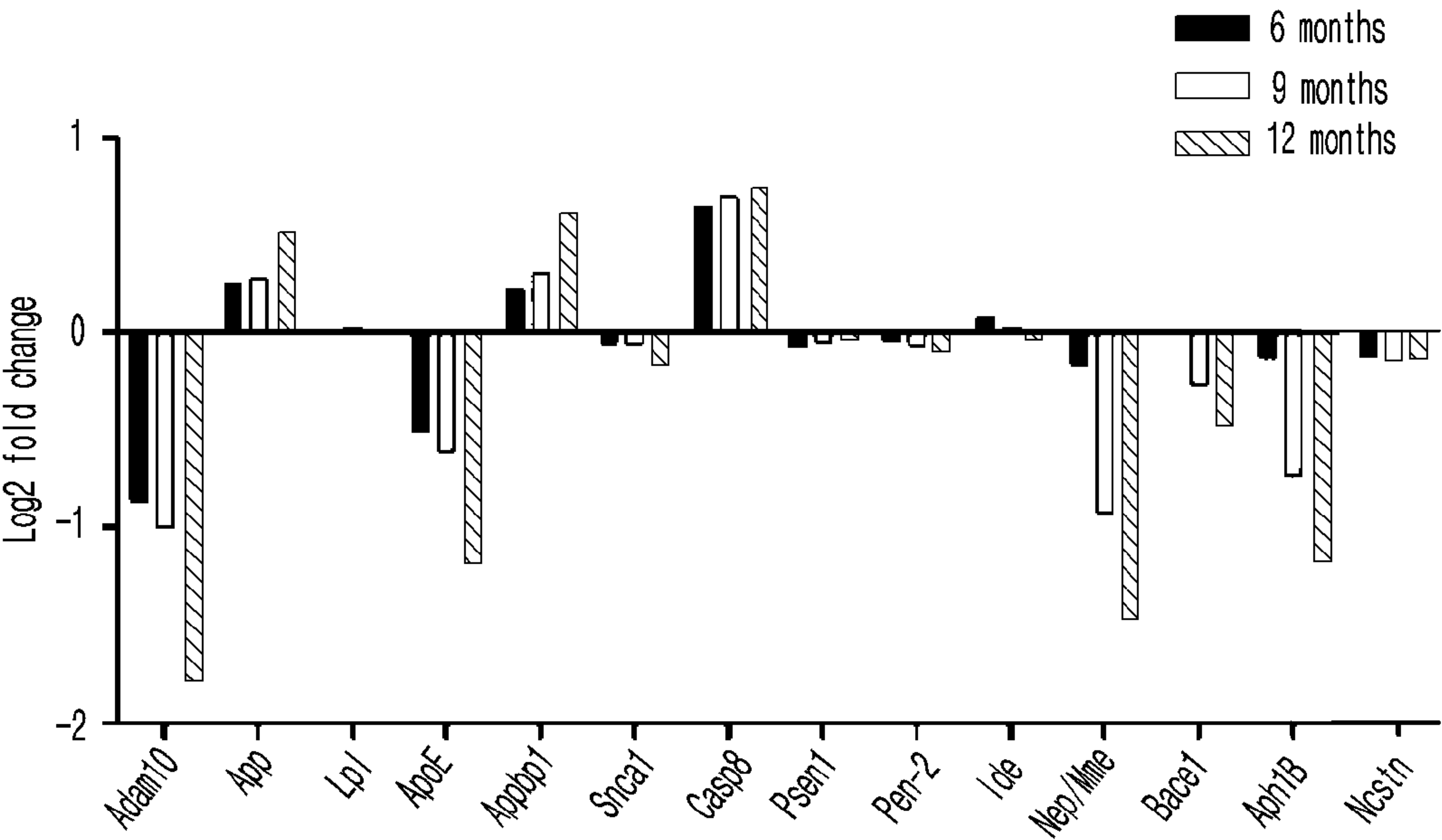
병기 예측용 키트.

- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 키트.

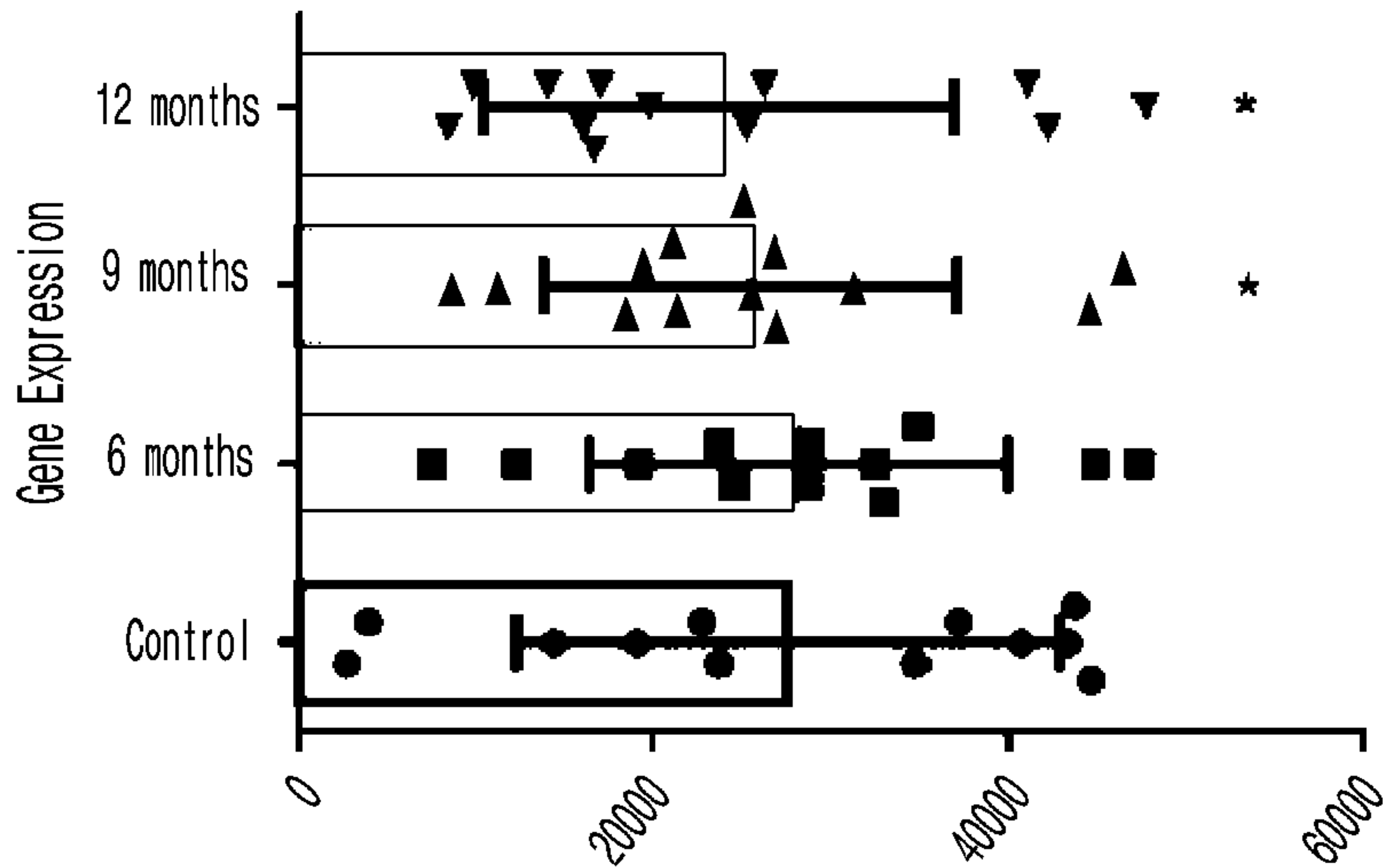
[도 1a]



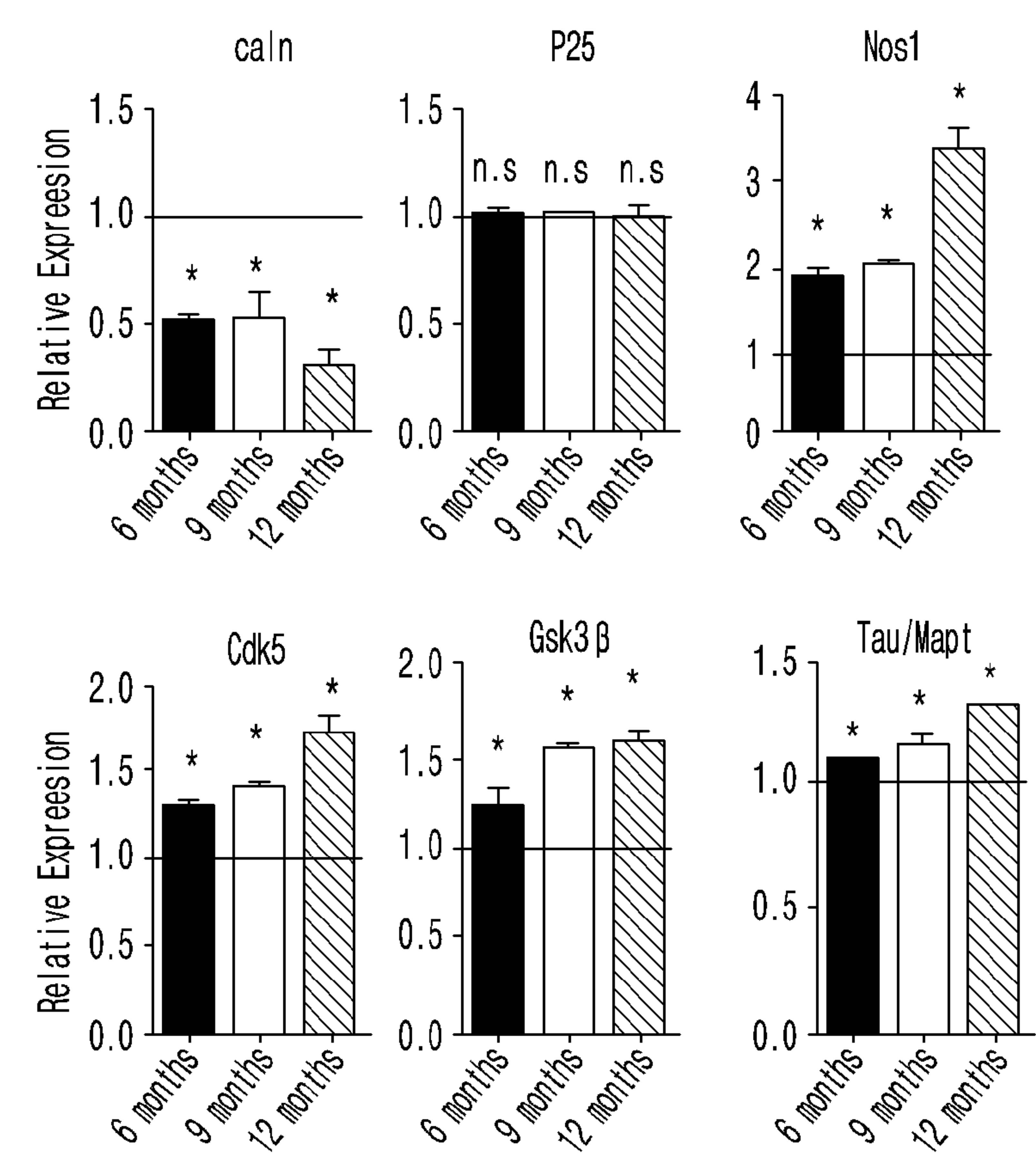
[도 1b]



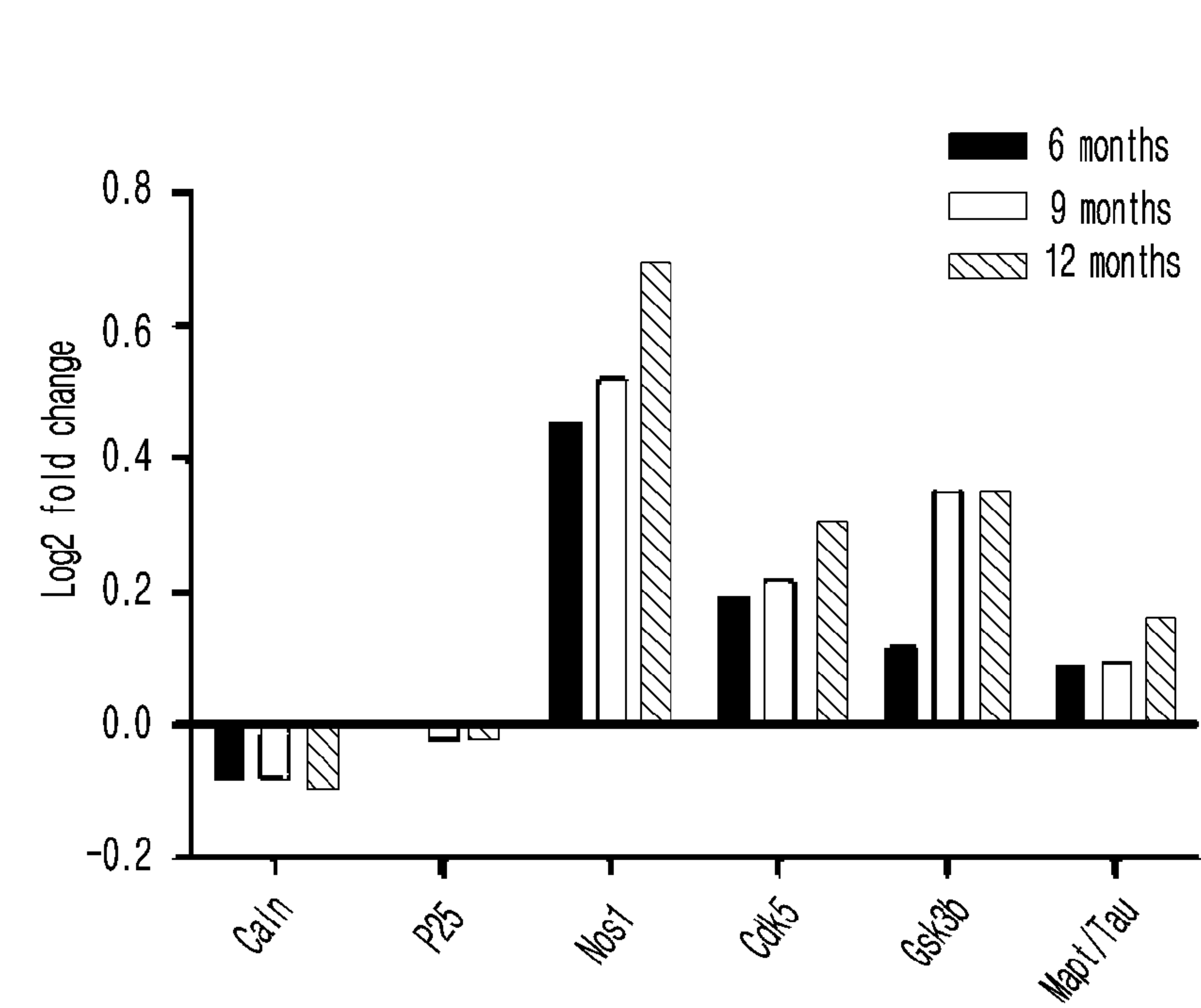
[도 1c]



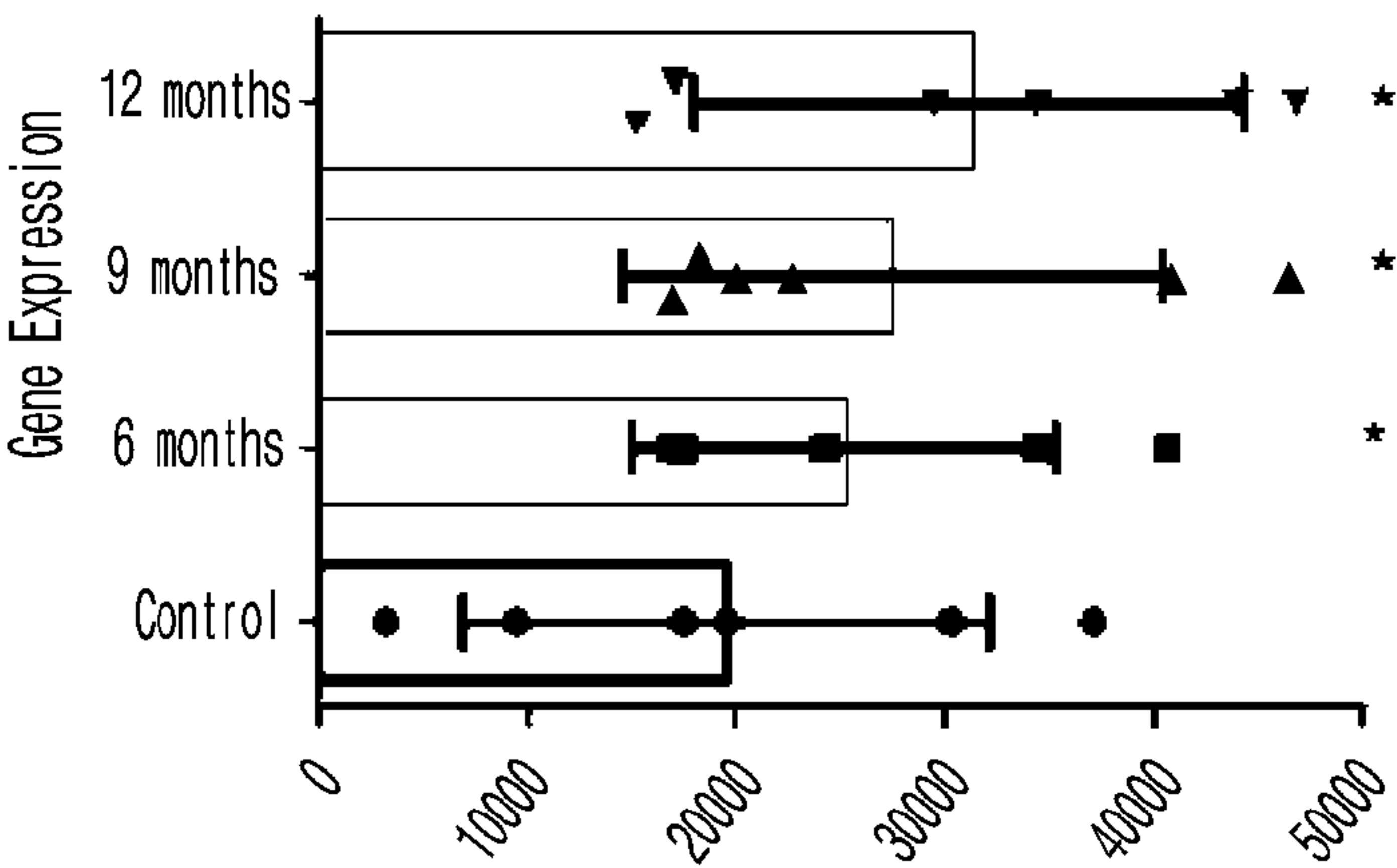
[도2a]



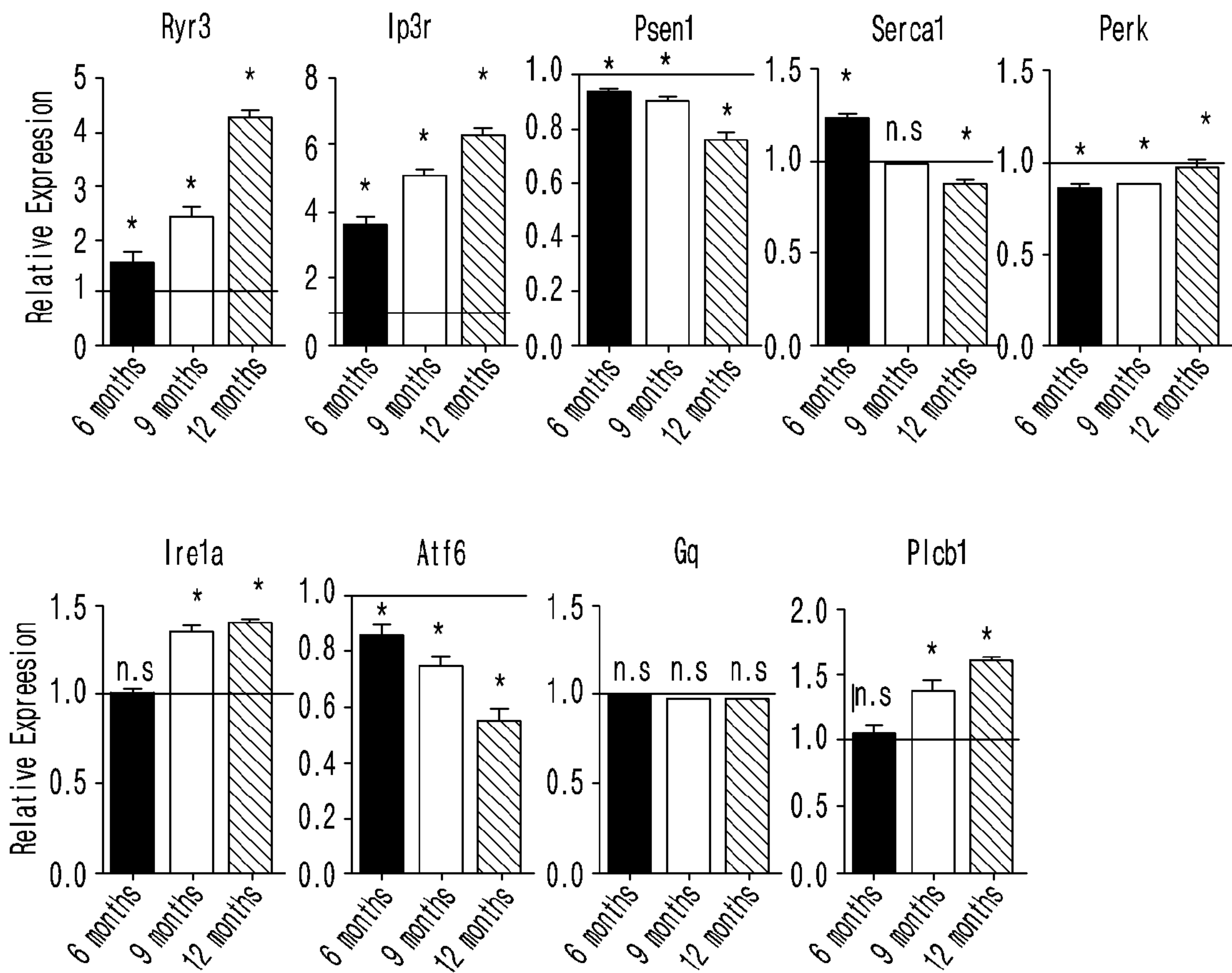
[도2b]



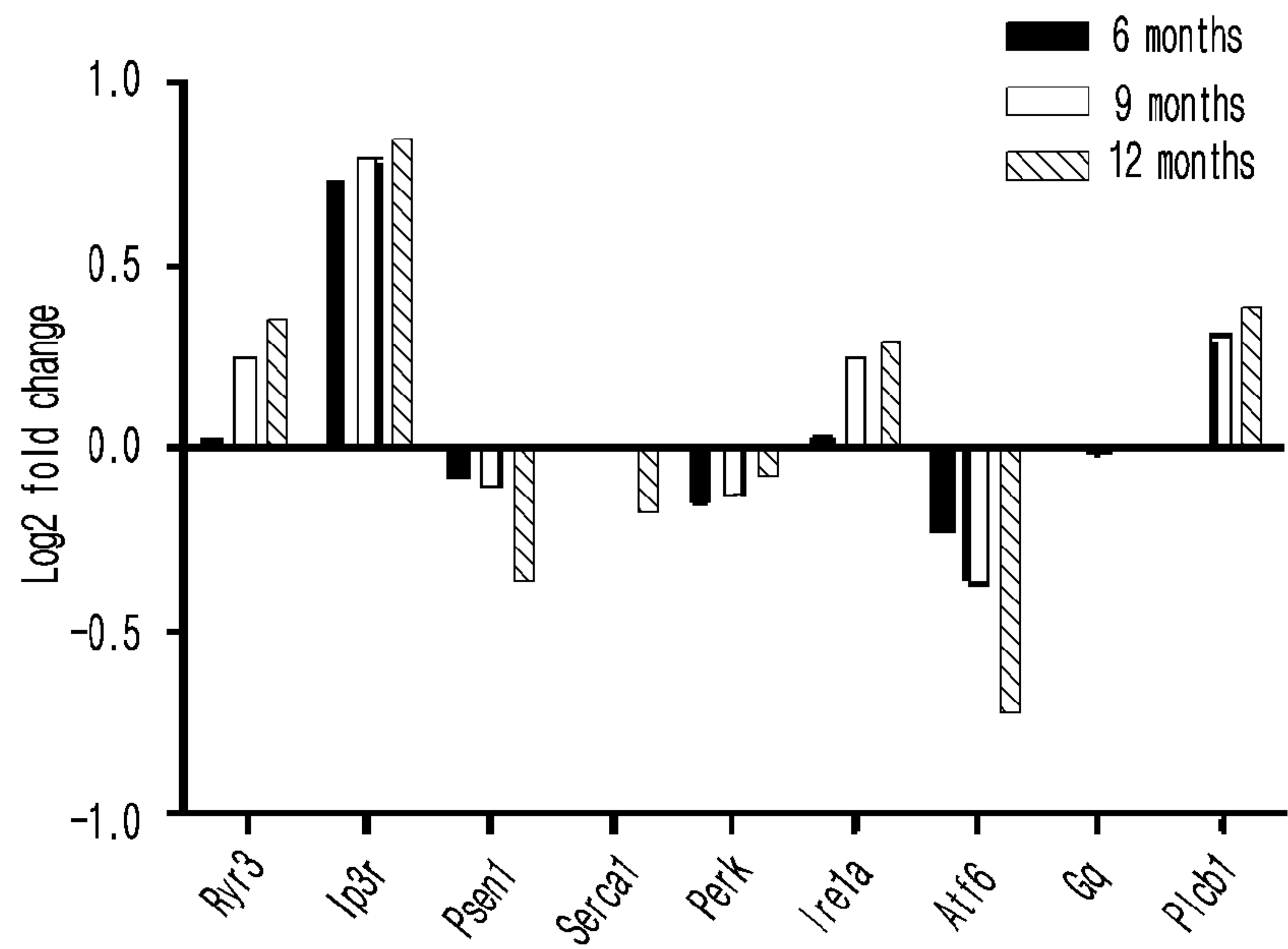
[도2c]



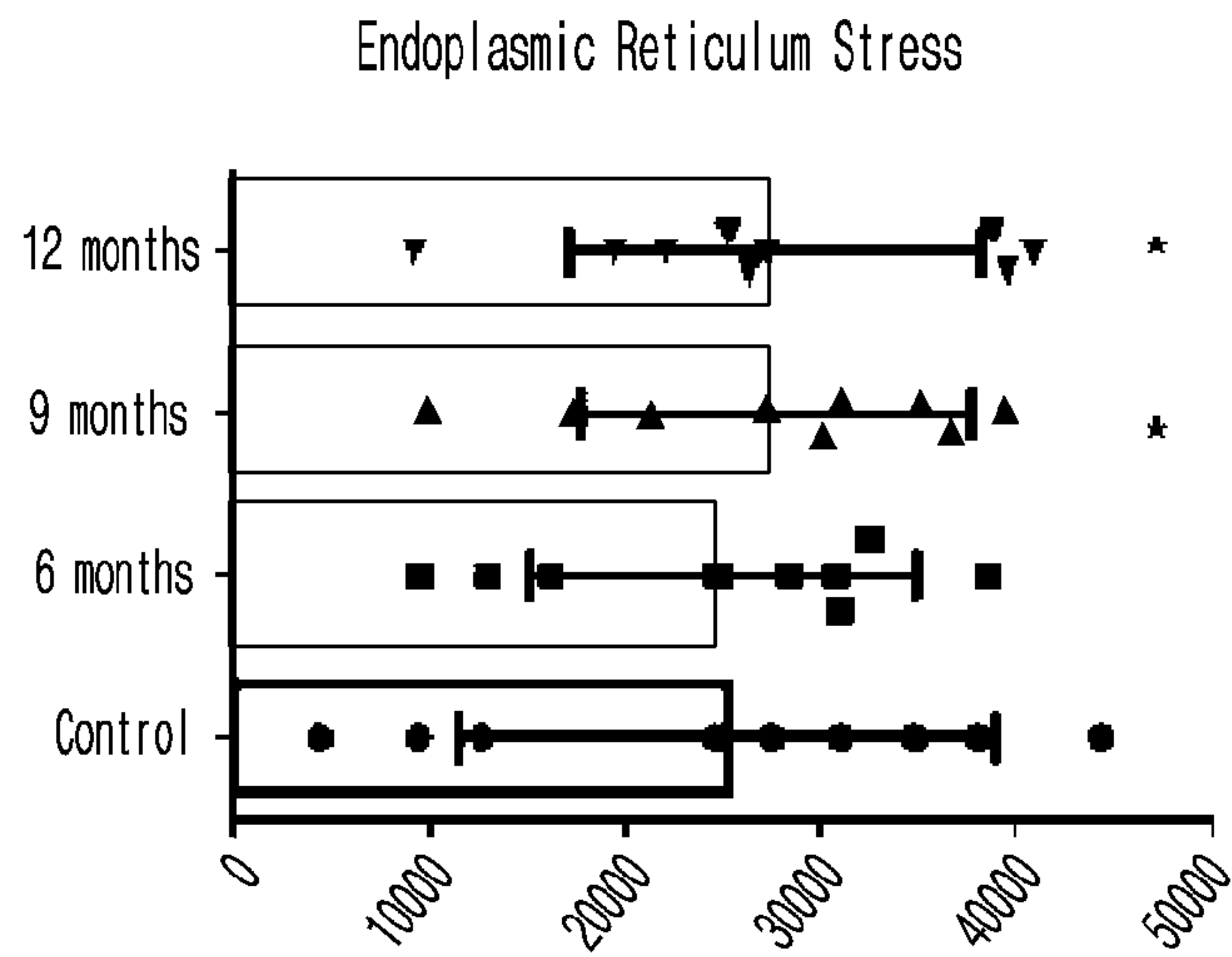
[도3a]



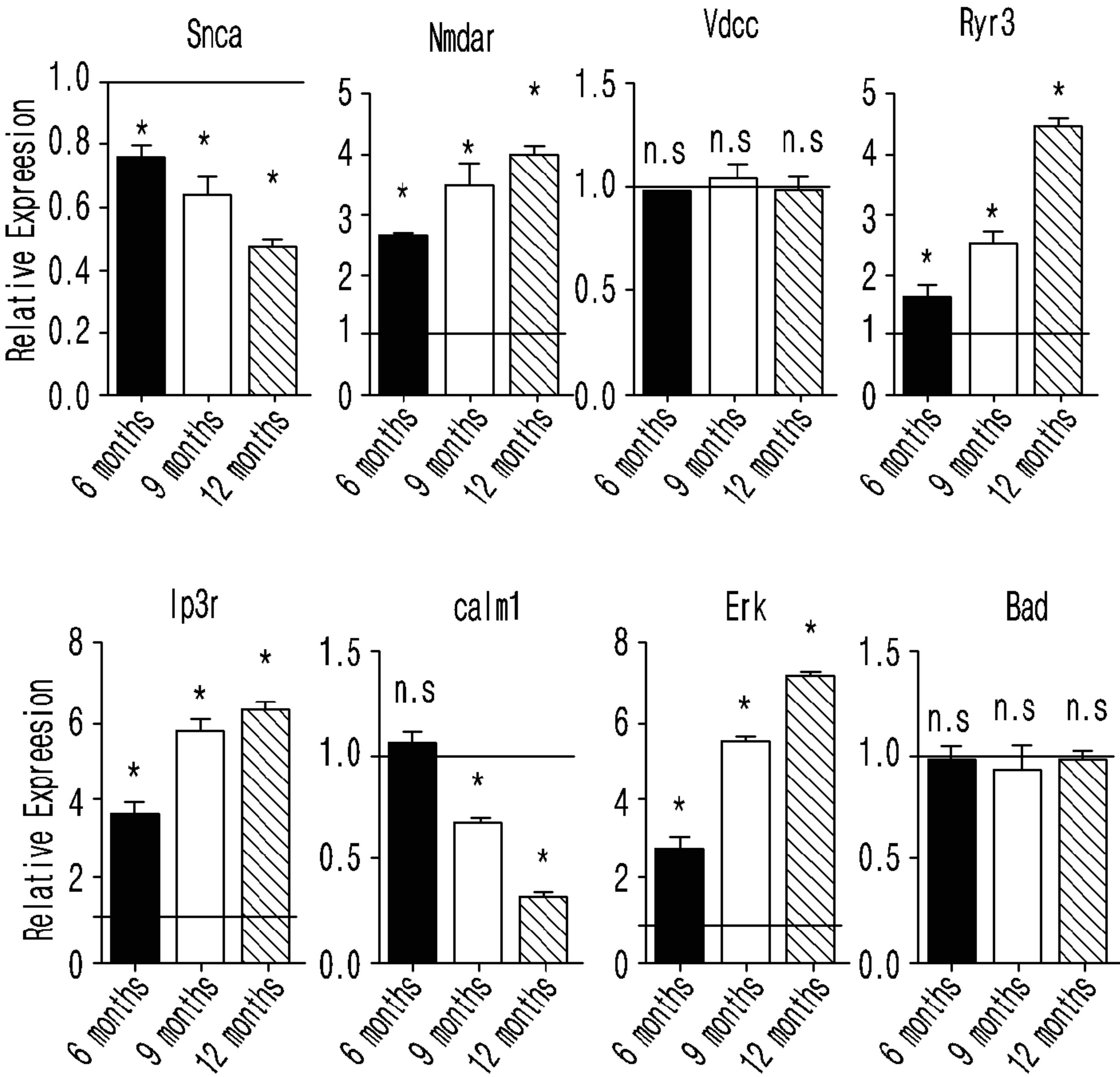
[도3b]



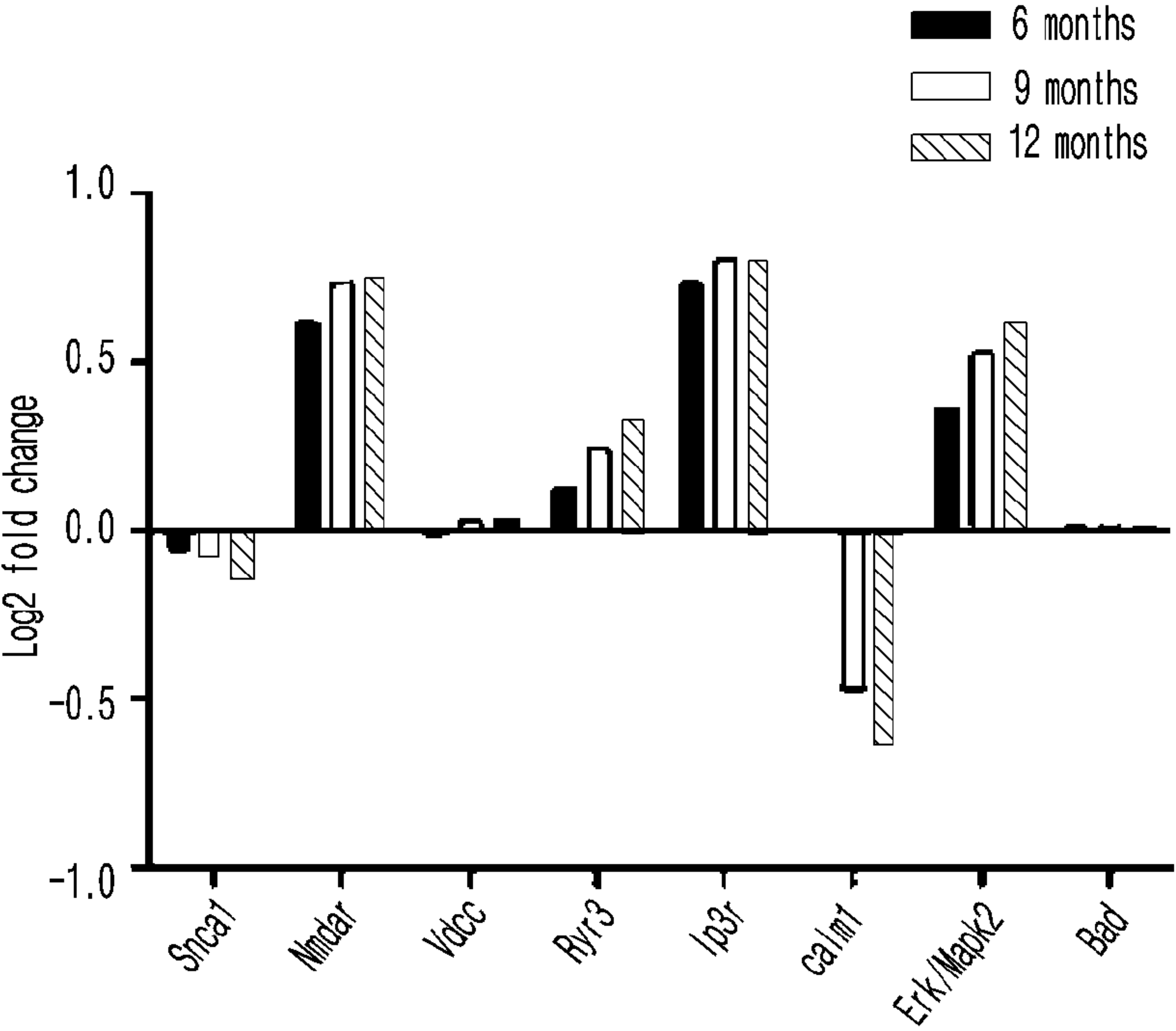
[도3c]

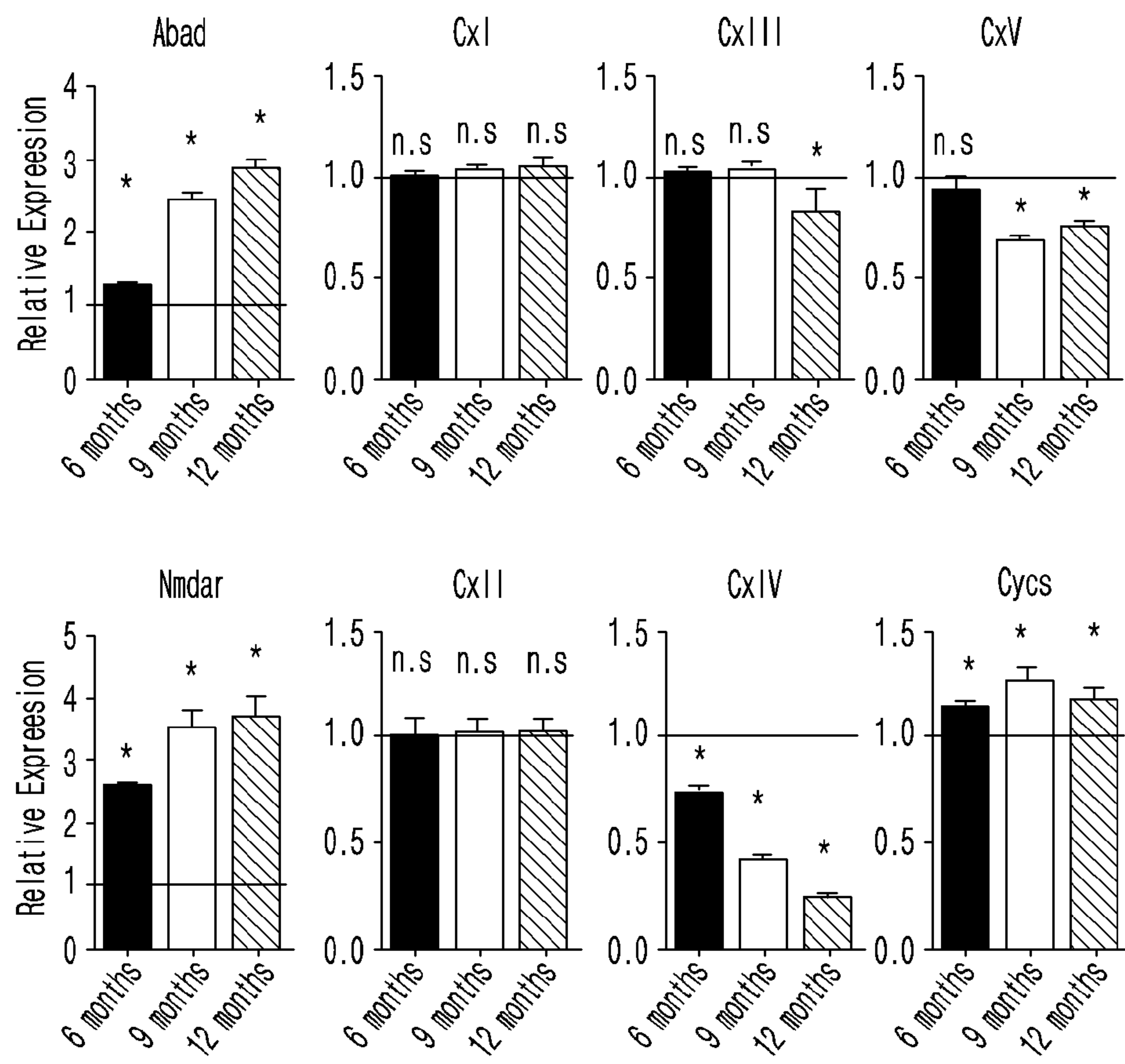
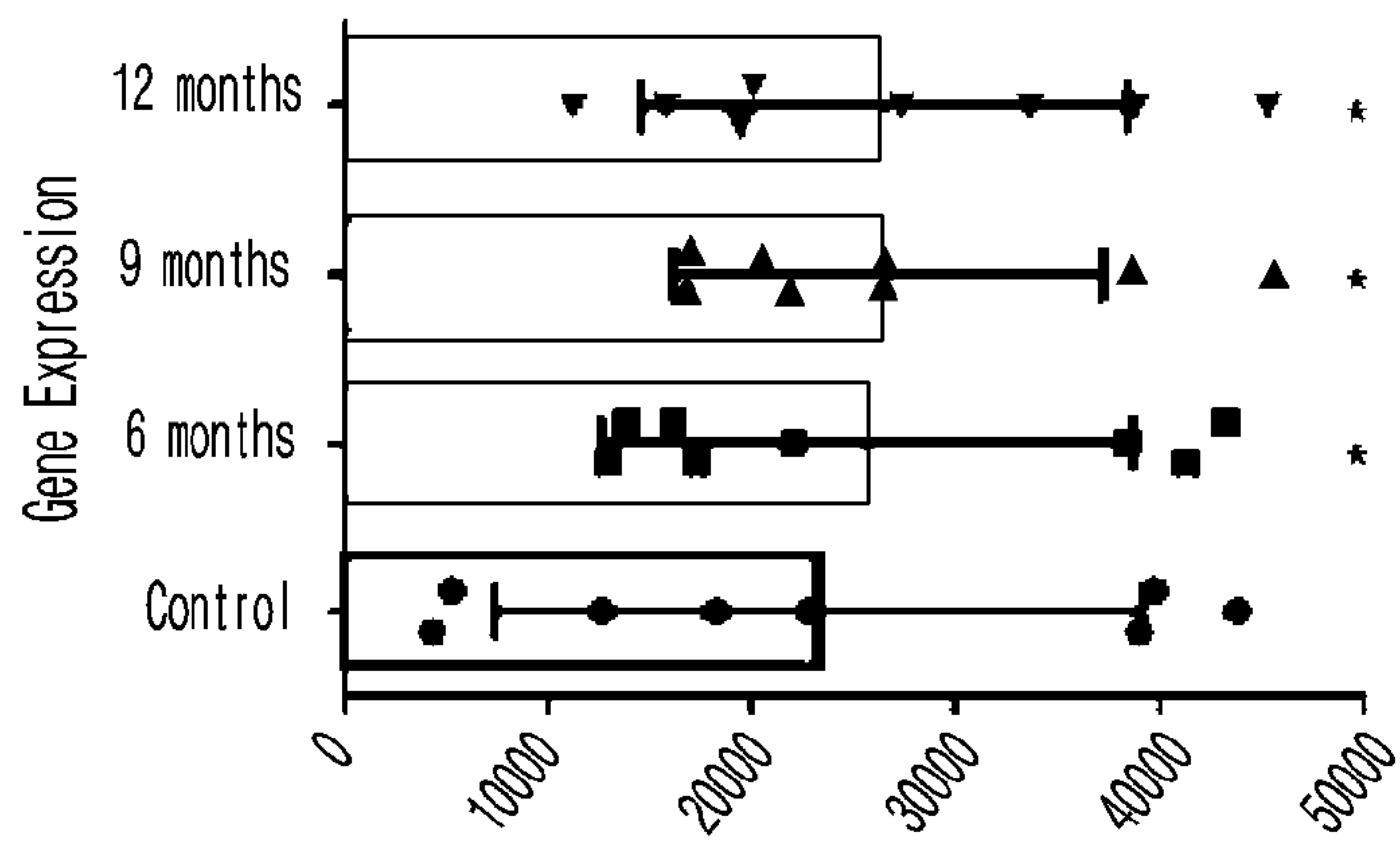


[도4a]

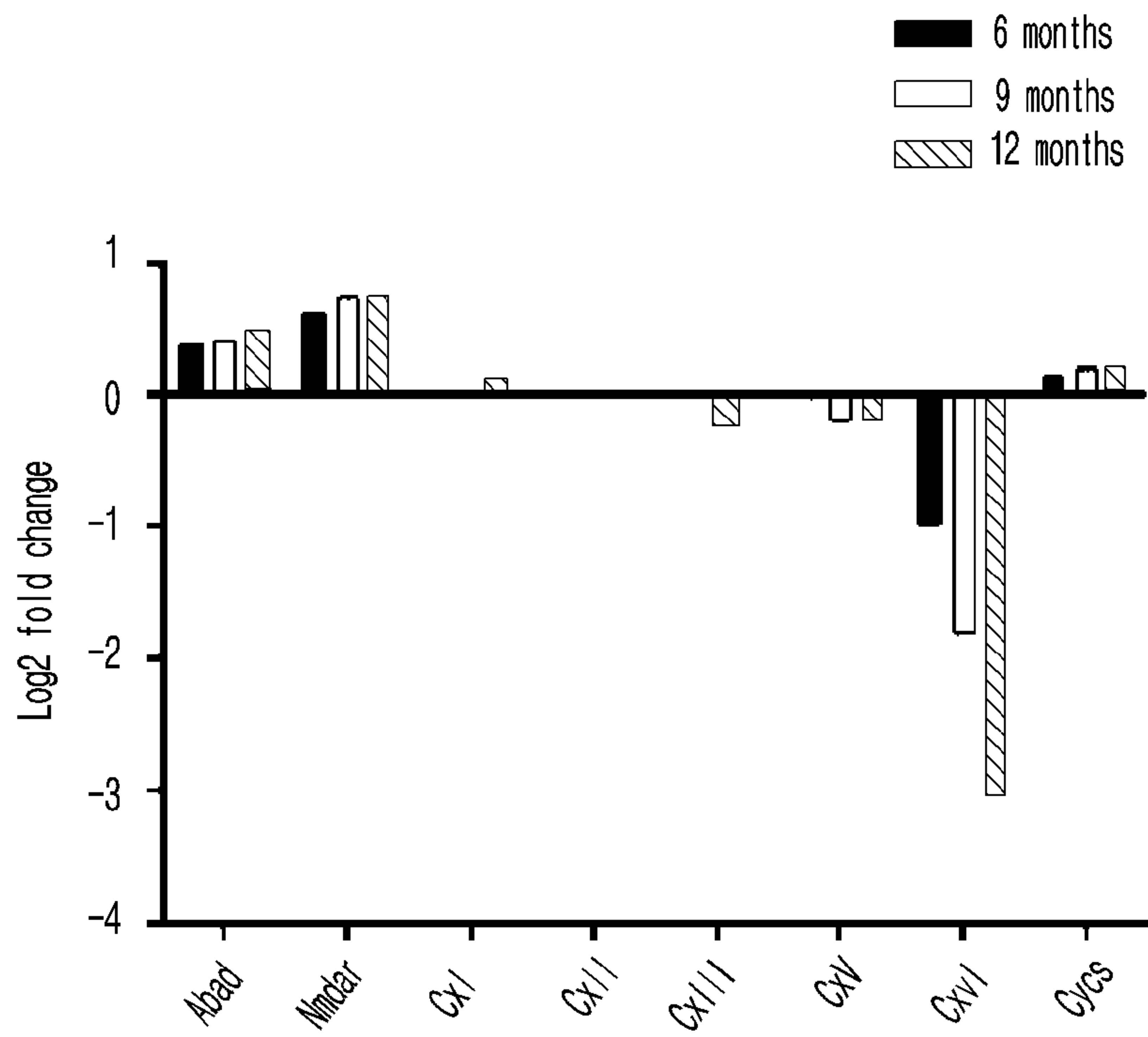


[도4b]

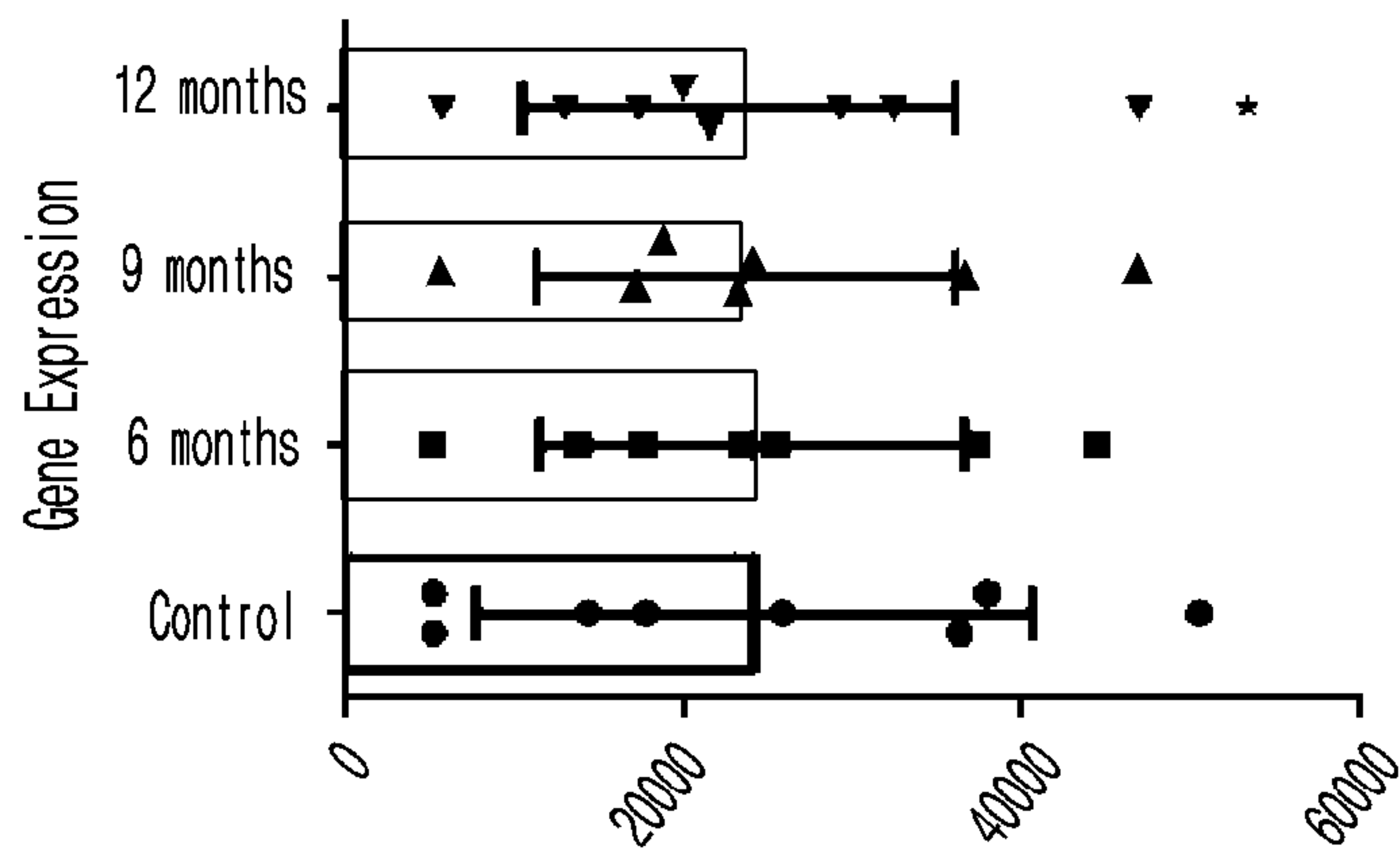




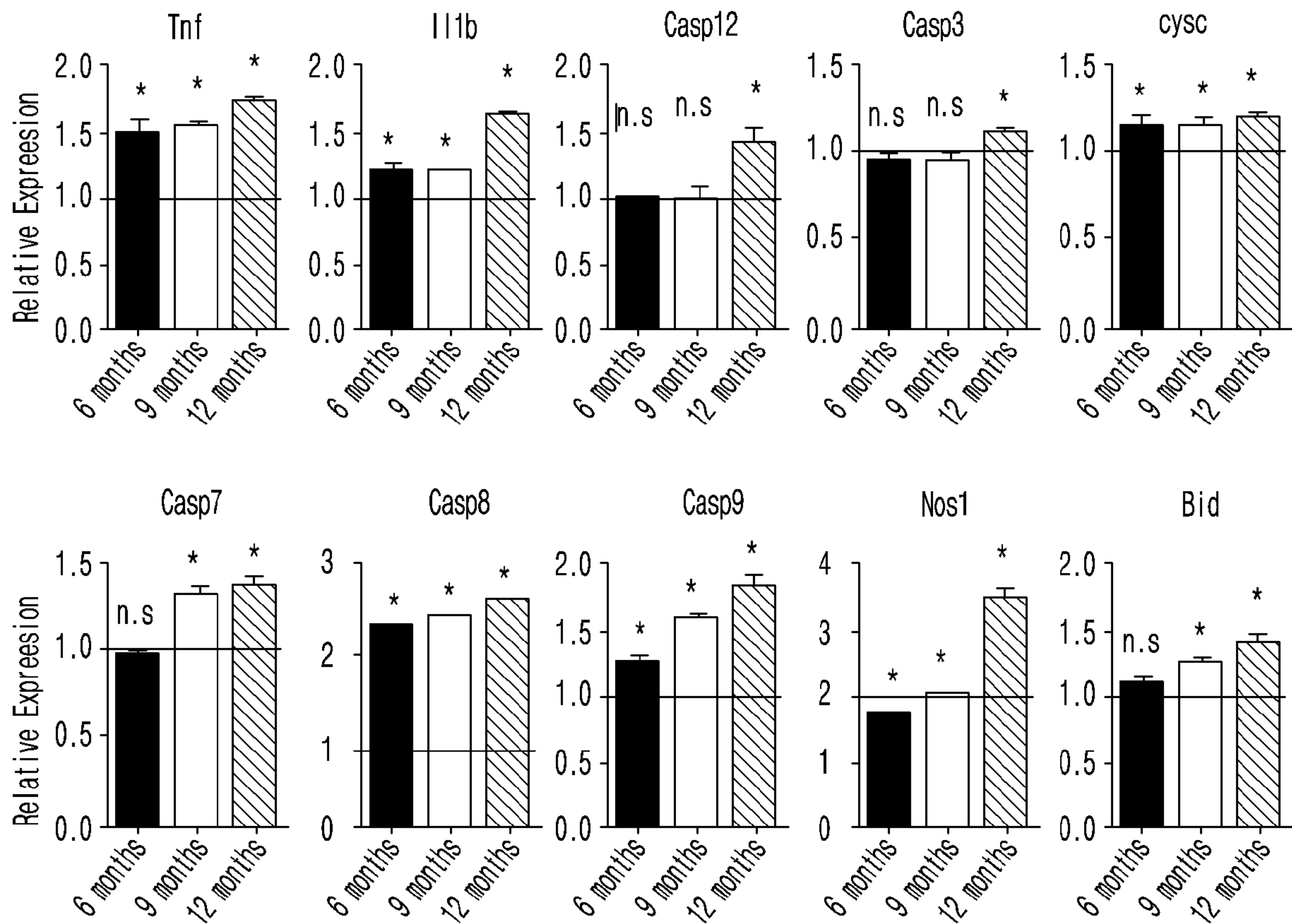
[도5b]



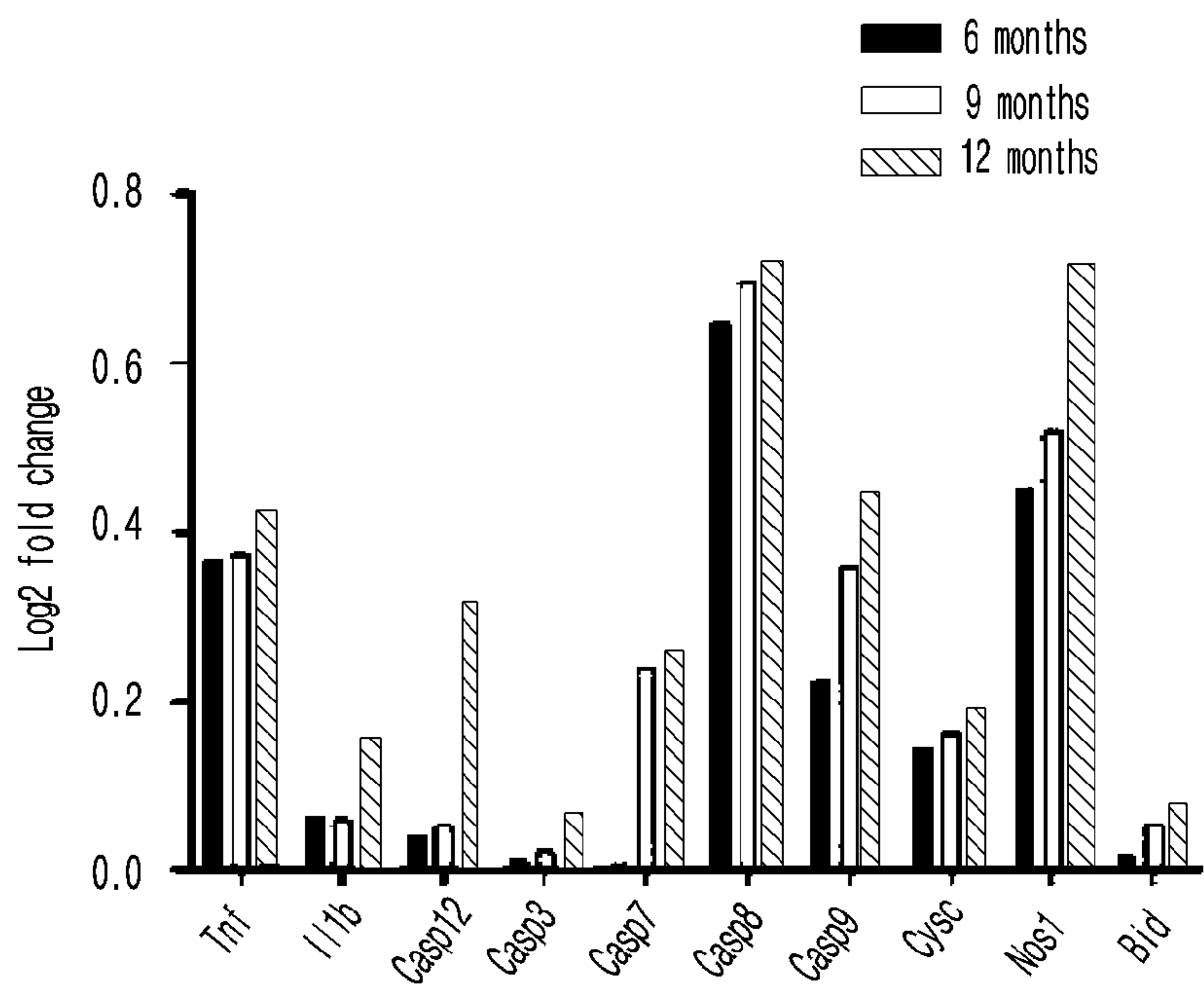
[도5c]



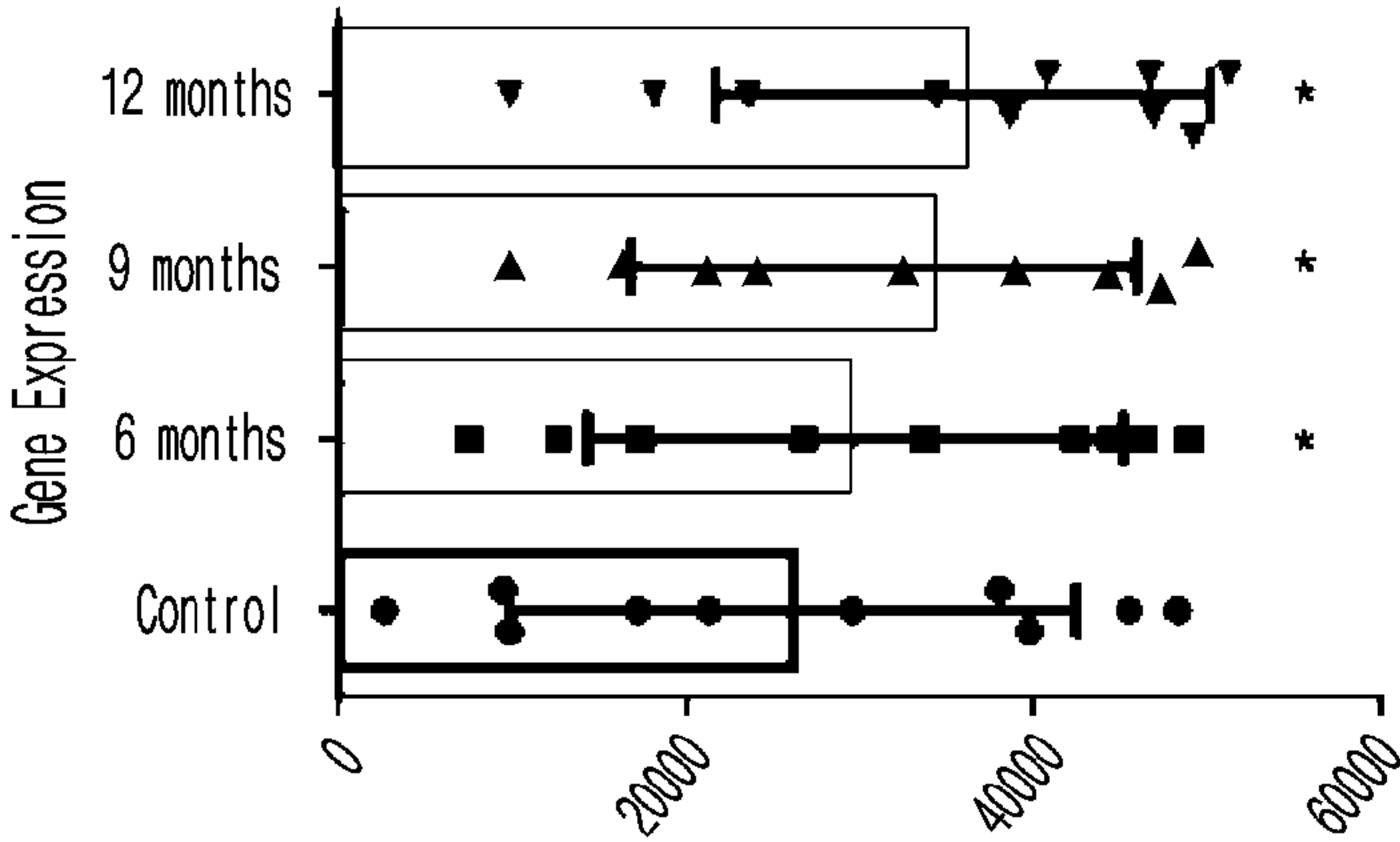
[도6a]



[도6b]



[도6c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/007701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6883; A61K 45/00; C12Q 1/48; C12Q 1/68; G01N 33/68

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

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

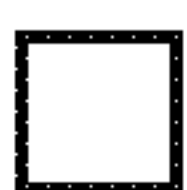
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Erk(extracellular signal related kinase), MapK(mitogen activated protein kinase), Ide (insulin degrading enzyme), Ilb(interleukin beta), vdcc(voltage dependent calcium channel), cdk(cyclin dependent kinase), sercal (sarco/endoplasmic reticulum Ca 2+), Alzheimer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ABID, Noman Bin et al. Comparative Gene-Expression Analysis of Alzheimer's Disease Progression with Aging in Transgenic Mouse Model. International Journal of Molecular Sciences. 11 March 2019, vol. 20, 1219 (internal pp. 1-14) See abstract, pages 3-8, and figures 1-6.	1-11
A	US 2011-0008780 A1 (LIEW, Choong-Chin) 13 January 2011 See claim 1.	1-11
A	JP 2009-148247 A (BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES INST) 09 July 2009 See claims 1-57.	1-11
A	KR 10-2012-0041821 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 03 May 2012 See claim 1.	1-11
A	KR 10-2018-0130060 A (GACHON UNIVERSITY OF INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 06 December 2018 See claim 1.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 SEPTEMBER 2020 (24.09.2020)

Date of mailing of the international search report

24 SEPTEMBER 2020 (24.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/007701

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 13
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:

Claim 13 refers to claim 12 which violates the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)), and thus is unclear.
3. ☒ Claims Nos.: 12
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0008780 A1	13/01/2011	AU 1853600 A	24/07/2000
		AU 2000-18536 A1	24/07/2000
		AU 2002-237124 B2	06/03/2008
		AU 2004-240623 B2	15/07/2010
		AU 2004-249318 A1	29/12/2004
		AU 2008-200903 A1	03/04/2008
		BR 0207657 A	26/10/2004
		CA 2359816 C	03/08/2010
		CA 2439504 A1	12/09/2002
		CA 2525831 A1	02/12/2004
		CA 2530191 A1	29/12/2004
		CA 2588072 A1	26/05/2006
		CA 2702148 C	04/03/2014
		CA 2832266 A1	13/07/2000
		CN 101415836 A	22/04/2009
		CN 1823169 A	23/08/2006
		CN 1871675 B	03/11/2010
		DE 10338277 A1	17/03/2005
		EP 1404868 A2	07/04/2004
		EP 1623038 A2	08/02/2006
		EP 1643893 A2	12/04/2006
		EP 1656683 B1	21/11/2007
		EP 1815020 A2	08/08/2007
		ES 2297453 T3	01/05/2008
		IL 172652 D0	10/04/2006
		JP 2004-536575 A	09/12/2004
		JP 2007-503216 A	22/02/2007
		JP 2007-528704 A	18/10/2007
		JP 2008-295459 A	11/12/2008
		KR 10-2004-0055733 A	26/06/2004
		SG 141418 A1	28/04/2008
		US 7132398 B2	07/11/2006
		US 7279309 B2	09/10/2007
		US 7329640 B2	12/02/2008
		US 7432049 B2	07/10/2008
		US 7473528 B2	06/01/2009
		US 7598031 B2	06/10/2009
		US 7662558 B2	16/02/2010
		US 7713702 B2	11/05/2010
		US 7906278 B2	15/03/2011
		US 8067173 B2	29/11/2011
		US 8101358 B2	24/01/2012
		US 8110358 B2	07/02/2012
		US 8114597 B2	14/02/2012
		US 8133674 B2	13/03/2012
		US 8133675 B2	13/03/2012
		US 8148072 B2	03/04/2012
		US 8257922 B2	04/09/2012
		US 8258284 B2	04/09/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/007701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2009-148247 A	09/07/2009	US 8669058 B2	11/03/2014
		WO 00-40749 A2	13/07/2000
		WO 02-070737 A2	12/09/2002
		WO 2004-100878 A2	25/11/2004
		WO 2004-103292 A2	02/12/2004
		WO 2004-112589 A2	29/12/2004
		WO 2005-020257 A2	03/03/2005
		WO 2006-055524 A2	26/05/2006
KR 10-2012-0041821 A	03/05/2012	AT 394115 T	15/05/2008
		AU 2002-254029 A1	12/09/2002
		CN 1549721 A	24/11/2004
		DE 08002964 T1	03/09/2009
		EP 1385531 B1	07/05/2008
		EP 1925315 A2	28/05/2008
		ES 2305234 T3	01/11/2008
		ES 2325350 T1	02/09/2009
		JP 2004-533218 A	04/11/2004
		JP 2013-078330 A	02/05/2013
		JP 4246495 B2	02/04/2009
		JP 5253971 B2	31/07/2013
		KR 10-0941597 B1	11/02/2010
		KR 10-0960256 B1	01/06/2010
		KR 10-2004-0086145 A	08/10/2004
		KR 10-2009-0038922 A	21/04/2009
		US 2005-0059092 A1	17/03/2005
		US 2010-0278803 A1	04/11/2010
		US 2016-0305961 A1	20/10/2016
		US 7682807 B2	23/03/2010
		US 9188595 B2	17/11/2015
		WO 02-067764 A2	06/09/2002
KR 10-2018-0130060 A	06/12/2018	None	
KR 10-2018-0130060 A	06/12/2018	KR 10-2040364 B1	05/11/2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

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

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6883; A61K 45/00; C12Q 1/48; C12Q 1/68; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Erk(extracellular signal related kinase), MapK(mitogen activated protein kinase), Ide(insulin degrading enzyme), Ilb(interleukin beta), vdcc(voltage dependent calcium channel), cdk(cyclin dependent kinase), sercal(sarco/endoplasmic reticulum Ca 2+), 알츠하이머(Alzheimer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ABID, NOMAN BIN 등, Comparative Gene-Expression Analysis of Alzheimer' s Disease Progression with Aging in Transgenic Mouse Model, International Journal of Molecular Sciences, 2019.03.11, 20권, 1219 (internal pages 1-14) 요약, 페이지 3-8, Fig. 1-6	1-11
A	US 2011-0008780 A1 (LIEW, CHOONG-CHIN) 2011.01.13 청구항 1	1-11
A	JP 2009-148247 A (BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES INST) 2009.07.09 청구항 1-57	1-11
A	KR 10-2012-0041821 A (고려대학교 산학협력단) 2012.05.03 청구항 1	1-11
A	KR 10-2018-0130060 A (가천대학교 산학협력단 등) 2018.12.06 청구항 1	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 09월 24일 (24.09.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 09월 24일 (24.09.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



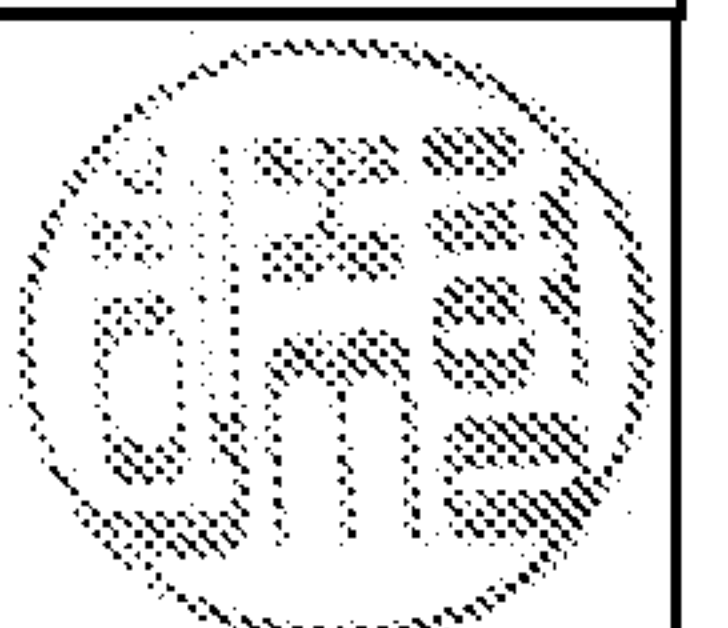
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



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

- PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.
1.

☐

청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2.

☒

청구항: 13
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 13은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항 12를 인용하고 있어 불명료합니다(PCT 제6조).
3.

☒

청구항: 12
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

- 본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.
1.

☐

출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2.

☐

추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3.

☐

출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4.

☐

출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.
- 이의신청에
관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0008780 A1	2011/01/13	AU 1853600 A	2000/07/24
		AU 2000-18536 A1	2000/07/24
		AU 2002-237124 B2	2008/03/06
		AU 2004-240623 B2	2010/07/15
		AU 2004-249318 A1	2004/12/29
		AU 2008-200903 A1	2008/04/03
		BR 0207657 A	2004/10/26
		CA 2359816 C	2010/08/03
		CA 2439504 A1	2002/09/12
		CA 2525831 A1	2004/12/02
		CA 2530191 A1	2004/12/29
		CA 2588072 A1	2006/05/26
		CA 2702148 C	2014/03/04
		CA 2832266 A1	2000/07/13
		CN 101415836 A	2009/04/22
		CN 1823169 A	2006/08/23
		CN 1871675 B	2010/11/03
		DE 10338277 A1	2005/03/17
		EP 1404868 A2	2004/04/07
		EP 1623038 A2	2006/02/08
		EP 1643893 A2	2006/04/12
		EP 1656683 B1	2007/11/21
		EP 1815020 A2	2007/08/08
		ES 2297453 T3	2008/05/01
		IL 172652 D0	2006/04/10
		JP 2004-536575 A	2004/12/09
		JP 2007-503216 A	2007/02/22
		JP 2007-528704 A	2007/10/18
		JP 2008-295459 A	2008/12/11
		KR 10-2004-0055733 A	2004/06/26
		SG 141418 A1	2008/04/28
		US 7132398 B2	2006/11/07
		US 7279309 B2	2007/10/09
		US 7329640 B2	2008/02/12
		US 7432049 B2	2008/10/07
		US 7473528 B2	2009/01/06
		US 7598031 B2	2009/10/06
		US 7662558 B2	2010/02/16
		US 7713702 B2	2010/05/11
		US 7906278 B2	2011/03/15
		US 8067173 B2	2011/11/29
		US 8101358 B2	2012/01/24
		US 8110358 B2	2012/02/07
		US 8114597 B2	2012/02/14
		US 8133674 B2	2012/03/13
		US 8133675 B2	2012/03/13
		US 8148072 B2	2012/04/03
		US 8257922 B2	2012/09/04
		US 8258284 B2	2012/09/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 8669058 B2	2014/03/11
		WO 00-40749 A2	2000/07/13
		WO 02-070737 A2	2002/09/12
		WO 2004-100878 A2	2004/11/25
		WO 2004-103292 A2	2004/12/02
		WO 2004-112589 A2	2004/12/29
		WO 2005-020257 A2	2005/03/03
		WO 2006-055524 A2	2006/05/26
JP 2009-148247 A	2009/07/09	AT 394115 T	2008/05/15
		AU 2002-254029 A1	2002/09/12
		CN 1549721 A	2004/11/24
		DE 08002964 T1	2009/09/03
		EP 1385531 B1	2008/05/07
		EP 1925315 A2	2008/05/28
		ES 2305234 T3	2008/11/01
		ES 2325350 T1	2009/09/02
		JP 2004-533218 A	2004/11/04
		JP 2013-078330 A	2013/05/02
		JP 4246495 B2	2009/04/02
		JP 5253971 B2	2013/07/31
		KR 10-0941597 B1	2010/02/11
		KR 10-0960256 B1	2010/06/01
		KR 10-2004-0086145 A	2004/10/08
		KR 10-2009-0038922 A	2009/04/21
		US 2005-0059092 A1	2005/03/17
		US 2010-0278803 A1	2010/11/04
		US 2016-0305961 A1	2016/10/20
		US 7682807 B2	2010/03/23
		US 9188595 B2	2015/11/17
		WO 02-067764 A2	2002/09/06
KR 10-2012-0041821 A	2012/05/03	없음	
KR 10-2018-0130060 A	2018/12/06	KR 10-2040364 B1	2019/11/05