



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0129023  
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 33/15* (2006.01) *A61K 38/43* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0047026  
 (22) 출원일자 2011년05월18일  
 심사청구일자 2011년05월18일

(71) 출원인  
**주식회사 프로바이온**  
 서울특별시 구로구 디지털로 306, 1005호 (구로동, 대륭포스트타워2)  
**학교법인 건국대학교**  
 서울특별시 광진구 화양동1  
 (72) 발명자  
**박형순**  
 서울특별시 서초구 서운로 197, 101동 1003호 (서초동, 롯데캐슬클래식)  
**강금용**  
 서울특별시 광진구 아차산로 263, 생명환경과학대학 520호 (화양동, 건국대학교)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**구현서**

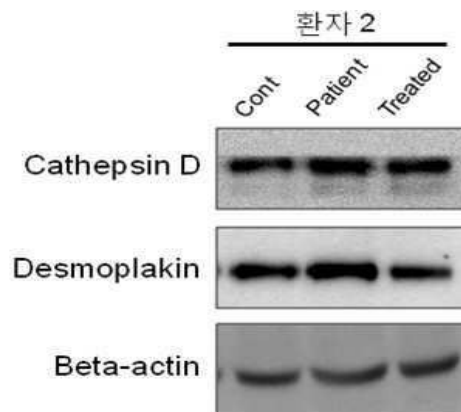
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **노년 황반변성의 진단 및 치료를 위한 단백질 바이오마커**

**(57) 요약**

본 발명은 노년 황반변성의 진단 및 치료를 위한 단백질 바이오마커에 관한 것이다.

**대표도** - 도3



(72) 발명자

**방주용**

경기도 광명시 철산로 57, 1324동 1107호 (철산동, 주공아파트)

**정혜원**

서울특별시 강남구 개포로 303, 현대1차아파트 103동 1101호 (개포동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 산기연 08-1-004

부처명 중소기업청

연구사업명 산학협력 기업부설연구소 설치 지원사업

연구과제명 다제간 연구 시스템 구축을 통한 생물학적 간염 치료제 개발 및 진단 기술 개발 : 유전자 치료제와 약제 내성 및 치료효과 예측 시스템 구축

주관기관 (주)프로바이온

연구기간 2008.06.01 ~ 2011.05.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

유전자 정보 번호(GI No.) 4557894의 라이조자임 전구체(lysozyme precursor),  
 222144229의 오토파지 관련 단백질 7 아이조폼(autophagy-related protein 7 isoform) c,  
 4503143의 카텡신(cathepsin) D 프리프로프로테인(preproprotein),  
 208973244의 14-3-3 단백질 제타(protein zeta)/델타(delta),  
 4504919의 케라틴(keratin), 타입 II 사이토스케레탈 (cytoskeletal) 8,  
 55956899의 케라틴, 타입 I 사이토스케레탈 9,  
 24430190의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 15,  
 88853069의 비트로벡틴 전구체, 24234699의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 19,  
 58530842의 데스모프라킨(desmoplakin) 이소폼 II,  
 119392081의 보체 인자(complement factor) I 프리프로테인,  
 118442839의 보체 인자 H-관련 단백질 1 전구체,  
 25777600의 프로테아좀 26S 비(non)-ATPase 소단위체(subunit) 1,  
 11386161의 콜라겐 알파-2(IX) 체인 전구체,  
 190341024의 SPARC-유사(like) 단백질 1 전구체,  
 4507149의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제,  
 4504517의 열 충격(heat shock) 단백질 베타-1,  
 124256496의 열 충격 70 kDa 단백질 1-유사체,  
 109255234의 290 kDa의 중심체 단백질(centrosomal protein), 및  
 7669492의 글리셀알데히드-3인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 구성된 균으로부터  
 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 노년 황반변성 진단용 조성물

**청구항 2**

유전자 정보 번호(GI No.) 4557894의 라이조자임 전구체(lysozyme precursor),  
 222144229의 오토파지 관련 단백질 7 아이조폼(autophagy-related protein 7 isoform) c,  
 4503143의 카텡신(cathepsin) D 프리프로프로테인(preproprotein),  
 208973244의 14-3-3 단백질 제타(protein zeta)/델타(delta),  
 4504919의 케라틴(keratin), 타입 II 사이토스케레탈 (cytoskeletal) 8,  
 55956899의 케라틴, 타입 I 사이토스케레탈 9,  
 24430190의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 15,  
 88853069의 비트로벡틴 전구체, 24234699의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 19,  
 58530842의 데스모프라킨(desmoplakin) 이소폼 II,  
 119392081의 보체 인자(complement factor) I 프리프로테인,  
 118442839의 보체 인자 H-관련 단백질 1 전구체,

25777600의 프로테아좀 26S 비(non)-ATPase 소단위체(subunit) 1,  
 11386161의 콜라겐 알파-2(IX) 체인 전구체,  
 190341024의 SPARC-유사(like) 단백질 1 전구체,  
 4507149의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제,  
 4504517의 열 충격(heat shock) 단백질 베타-1,  
 124256496의 열 충격 70 kDa 단백질 1-유사체,  
 109255234의 290 kDa의 중심체 단백질(centrosomal protein), 및  
 7669492의 글리셀알데히드-3인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 구성된 균으로부터  
 선택된 하나 이상의 단백질

**청구항 3**

대상(subject)에서 노년 황반변성에 대한 정보를 얻기 위한 방법으로서,  
 (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 측정하는 단계로서, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 상기 제1항에 기재된 조성물 중에서 선택되는 단계; 및  
 (b) 측정치 또는 측정치들을 정상인과 비교하여 그 측정치가 정상인보다 높은 경우에 노년 황반변성과 상호관련시키는 단계를 포함하는 노년 황반변성에 대한 정보를 얻기 위한 방법.

**청구항 4**

유전자 정보 번호(GI No.) 4557894의 라이조자임 전구체(lysozyme precursor),  
 222144229의 오토파지 관련 단백질 7 아이조폼(autophagy-related protein 7 isoform) c,  
 4503143의 카텡신(cathepsin) D 프리프로프로테인(preproprotein),  
 208973244의 14-3-3 단백질 제타(protein zeta)/델타(delta),  
 4504919의 케라틴(keratin), 타입 II 사이토스케레탈 (cytoskeletal) 8,  
 55956899의 케라틴, 타입 I 사이토스케레탈 9,  
 24430190의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 15,  
 88853069의 비트로벡틴 전구체, 24234699의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 19,  
 58530842의 데스모프라킨(desmoplakin) 이소폼 II,  
 119392081의 보체 인자(complement factor) I 프리프로테인,  
 118442839의 보체 인자 H-관련 단백질 1 전구체,  
 25777600의 프로테아좀 26S 비(non)-ATPase 소단위체(subunit) 1,  
 11386161의 콜라겐 알파-2(IX) 체인 전구체,  
 190341024의 SPARC-유사(like) 단백질 1 전구체,  
 4507149의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제,  
 4504517의 열 충격(heat shock) 단백질 베타-1,  
 124256496의 열 충격 70 kDa 단백질 1-유사체,  
 109255234의 290 kDa의 중심체 단백질(centrosomal protein), 및  
 7669492의 글리셀알데히드-3인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 구성된 균으로부터

선택된 하나 이상의 단백질을 유효성분으로 포함하는 노년 황반변성 질환의 치료 및 예방용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 노년 황반변성의 진단 및 치료를 위한 단백질 바이오마커에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 이미 우리나라뿐만 아니라 세계인들의 평균 수명은 80세를 넘어선 고령화 시대에 살고 있다. 우리나라의 경우 특히 급격한 평균수명의 증가와 출산율의 저하 등으로 인하여 세계에서 가장 빠른 속도로 고령화가 진행 중이다. 평균 수명이 늘어난 만큼 건강한 삶을 지속하기 위해서는 노화와 외부환경에 의해 발생하는 질병의 치료가 매우 중요하다. 노령화에 의한 가장 흔하면서 대표적 질환이 눈과 관련된 질환이다. 노화에 의한 질환이라 여겨졌던 안과 질환은 변화된 환경적 요인에 의해 발병 연령이 낮아지고 있고 발병률 또한 높아지고 있다. 이미 서구에서 50세 이상 성인의 실명 원인 질환 중 1위인 노년 황반변성은 우리나라에서도 급속히 발생율이 증가하고 있으며, 유병율이 높다.

[0003] 노년 황반변성 (age-related macular degeneration, AMD)은 50대 이상의 성인에서, 망막과 망막색소상피, 맥락막혈관 (choriocapillaris)이 진행성, 다인자성으로 변성 (degeneration), 위축 (atrophy) 되는 질환이다. AMD는 이미 서구에서는 당뇨망막병증, 녹내장을 제치고 50세 이상 어른의 실명 원인 질환 중 1위를 차지할 만큼 중요한 병이다. 미국에서는 현재 8백만 명 이상이 이 질병의 보다 흔한 형태인 비혈관성 또는 위축성 노년황반변성 (dry AMD)을 가진 것으로 보고 되었고, 매년 3백만 명 이상이 이 질병으로 시력을 잃고 있다. 우리나라에서도 식생활의 서구화와 환경요인, 평균수명의 연장에 따라 급속히 발생율이 증가하고 있다. 현재 65세 이상 인구 약 5백만 명의 5%인 25만명이 노년 황반변성을 앓고 있는 것으로 추정된다. 이러한 노인성 질환은 의료비 부담이라는 경제적 문제 뿐만 아니라, “삶의 질”의 저하라는 커다란 사회적 문제로 부각될 가능성이 있다. 그러므로, 노년황반변성의 조기진단 및 효율적 치료를 위한 연구가 절실히 필요하다.

[0004] 그러나, AMD의 발생기전은 다인자성이고, 부분적으로만 밝혀져 있다. 유전적 소인 이외에, 환경오염, (과도한) 광선 노출, 산화 스트레스 등 유해 환경이 축적되어가는 것과의 연관성이 보고되었으나, 구체적인 메커니즘은 아직 완전히 알려지지 않았다.

[0005] 현재 노년 황반변성 환자의 치료 현황은 다음과 같다.

[0006] 습성 노년 황반 변성인 맥락막 신생혈관 (choroidal neovascularization, CNV)의 치료는 크게 destructive therapy (레이저광응고술, 광역학요법, 외과적수술)와 pathway-based therapy (항혈관내피세포성장인자억제제, anti-vascular endothelial growth factor)로 나뉘어진다.

[0007] 그러나, 현재까지 상기의 어떤 방법도 심각한 시력 손실을 늦추거나 다소의 시력 개선을 가져올 뿐, 근본적인 치료가 되지는 못하고 있다. 특히, 이러한 치료들은 혈관 신생성 노년 황반변성 (습성 노년황반변성, wet AMD, or neovascular AMD) 치료에 국한되고 있으며, AMD 환자의 70-80 %를 차지하는 비혈관 신생성 노년 황반변성인 위축성 변성 (건성 노년 황반변성, dry AMD, geographic atrophy)의 치료는 거의 전무한 실정이다.

[0008] 현재 습성 노년 황반변성의 치료로 제한적인 시력 호전 효과가 입증된 것은 anti-VEGF의 반복적 유리체강내 주사가 유일하다. 이는 습성 노년 황반변성의 맥락막 신생혈관 (choroidal neovascularization, CNV)의 혈관 생성 사이토키닌인 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)를 타겟팅하는 치료이다. 그러나, anti-VEGF 치료를 받은 환자의 1/3에서만 제한적인 시력 호전이 입증되었고, 치료받은 환자의 1/6은 법적 실명상태로 진행한다. 또한, 정상성인 망막에 존재하는 VEGF를 지속적으로 억제함으로써 올 수 있는 망막 독성 등의 안전성 문제도 제기되고 있다. 이 치료는 유리체강내 약물의 짧은 반감기로 인하여 자주 반복 주사해야하고, 반복주사함에 따라 유리체출혈, 망막박리, 안내염 같은 합병증 발생 가능성이 증가한다. VEGF는 강력한 혈관확장제 역할을 하기 때문에 심장의 관상동맥의 이완과 혈액 순환을 유지시키는 역할을 한다. AMD 환자들이 고령이기 때문에 심혈관 질환의 위험이 높은 군들이므로 심각한 부작용 위험성도 있다. 따라서 VEGF 이외에 AMD 특이 분자 또는 단백질 마커를 찾아내고 이를 타겟팅하는 물질의 개발이 필요하다.

[0009] 본 발명은 위에서 언급한 노년 황반변성의 조기진단 및 효율적 치료를 프로테오믹스 기법을 도입하여 바이오 마커를 발굴하는 시스템이다.

[0010] 몇몇 안내 질환, 특히 전안부의 염증질환에서 방수의 단백질, 사이토카인 성분의 변화를 보고하였으나, 습성 노년 황반변성 환자들의 전체 방수 단백질의 변화는 이전에 조사된 적이 없다. 이전 치료의 기용력이 없는 습성 노년 황반변성 환자와 이들과 나이, 성별이 일치하는 백내장 수술 환자들 방수의 전체 단백질을 프로테오믹스 기법으로 분석한다.

[0011] 특히 여기에는 망막과 망막 색소상피가 산화 스트레스를 포함한 스트레스 조건하에서 일종의 '적응' 및 내인성 신경보호 기전으로 발달시켰을 가능성이 있는 물질들을 프로테오믹스 기법을 통해 발굴하여, 현재까지 치료가능한 거의 전무한 건성 노년 황반변성의 표적치료와 치료반응 모니터링에서 유용하게 이용하고자 함이 본 발명에서 구현하고자 하는 핵심적인 기술이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 노년 황반변성의 진단 및 치료를 위한 단백질 바이오마커를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유전자 정보 번호(GI No.) 4557894의 라이조자임 전구체(lysozyme precursor), 222144229의 오토파지 관련 단백질 7 아이조폼(autophagy-related protein 7 isoform) c, 4503143의 카텡신(cathepsin) D 프리프로테인(preproprotein), 208973244의 14-3-3 단백질 제타(protein zeta)/델타(delta), 4504919의 케라틴(keratin), 타입 II 사이토스케레탈 (cytoskeletal) 8,55956899의 케라틴, 타입 I 사이토스케레탈 9,24430190의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 15,88853069의 비트로넥틴 전구체, 24234699의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 19,58530842의 데스모프라킨(desmoplakin) 이소폼 II, 119392081의 보체 인자(complement factor) I 프리프로테인, 118442839의 보체 인자 H-관련 단백질 1 전구체, 25777600의 프로테아좀 26S 비(non)-ATPase 소단위체(subunit) 1, 11386161의 콜라겐 알파-2(IX) 체인 전구체, 190341024의 SPARC-유사(like) 단백질 1 전구체, 4507149의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 4504517의 열 충격(heat shock) 단백질 베타-1, 124256496의 열 충격 70 kDa 단백질 1-유사체, 109255234의 290 kDa의 중심체 단백질(centrosomal protein), 및 7669492의 글리셀알데히드-3인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함하는 노년 황반변성 진단용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 유전자 정보 번호(GI No.) 4557894의 라이조자임 전구체(lysozyme precursor), 222144229의 오토파지 관련 단백질 7 아이조폼(autophagy-related protein 7 isoform) c, 4503143의 카텡신(cathepsin) D 프리프로테인(preproprotein), 208973244의 14-3-3 단백질 제타(protein zeta)/델타(delta), 4504919의 케라틴(keratin), 타입 II 사이토스케레탈 (cytoskeletal) 8,55956899의 케라틴, 타입 I 사이토스케레탈 9,24430190의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 15,88853069의 비트로넥틴 전구체, 24234699의 케라틴 타입 I 사이토스케레탈 19,58530842의 데스모프라킨(desmoplakin) 이소폼 II, 119392081의 보체 인자(complement factor) I 프리프로테인, 118442839의 보체 인자 H-관련 단백질 1 전구체, 25777600의 프로테아좀 26S 비(non)-ATPase 소단위체(subunit) 1, 11386161의 콜라겐 알파-2(IX) 체인 전구체, 190341024의 SPARC-유사(like) 단백질 1 전구체, 4507149의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 4504517의 열 충격(heat shock) 단백질 베타-1, 124256496의 열 충격 70 kDa 단백질 1-유사체, 109255234의 290 kDa의 중심체 단백질(centrosomal protein), 및 7669492의 글리셀알데히드-3인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질에 대한 항체를 포함하는 노년 황반변성 진단제를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 대상(subject)에서 노년 황반변성에 대한 정보를 얻기 위한 방법으로서,

[0016] (a) 대상으로부터의 생물학적 샘플에서 하나 이상의 바이오마커를 측정하는 단계로서, 여기서 하나 이상의 바이오마커는 본 발명의 청구항 제1항에 기재된 조성물 중에서 선택되는 단계; 및

[0017] (b) 측정치 또는 측정치들을 정상인과 비교하여 그 측정치가 정상인보다 높은 경우에 노년 황반변성과 상호관련시키는 단계를 포함하는 노년 황반변성에 대한 정보를 얻기 위한 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 개체(subject)란 노년 황반변성 환자이며, 면역원성 단편이란 본 발명의 바이오 마커 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프(epitope)를 가지고 있는 바이오마커 단백질의 단편을 의

미한다.

- [0019] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 노년 황반변성 질환의 진단제를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 항체는 폴리클로날 항체일 수도 있으나, 모노클로날 항체인 것이 바람직하다.
- [0021] 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 면역원인 바이오마커 단백질 또는 그 단편을 외부숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근대, 복강내 또는 피하주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 항상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리 정제한다.
- [0022] 모노클로날 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술[Koehler and Milstein 1975, Nature, 256:495]에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20  $\mu$ g을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, 엘라이저(ELISA)방법을 사용하여 원하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 모노클로날 항체를 분리 정제한다.
- [0023] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 개체의 체액에서 본 발명의 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 개체의 노년 황반변성에 대한 정보를 얻는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 방법에서, 인간 혈액인 것을 특징으로 하며, 상기 검출 단계는 개체의 간의 혈액 용액으로부터 2차원 (2-D) 전기영동으로 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편의 존재를 직접 검출하거나, 혈액을 본 발명의 항체와 접촉시켜 항원항체반응을 통해 바이오마커 단백질 또는 그 면역원성 단편의 존재를 간접적으로 확인
- [0025] 하는 것을 포함한다.
- [0026] 항원항체반응으로서 현재 널리 알려진 immunoassay 법은 효소면역측정법(ELISA, Coated tube), 항체결합 magnetic particle을 tube에 결합시킨 다음 antigen-tracer와 난분해성 오염물질을 서로 경쟁적으로 반응시켜 효소반응을 유발시켜 정량하는 magnetic particle법, 항체결합 latex particle을 이용한 latex particle법 등이 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 본 발명의 바이오 마커 단백질 또는 그 면역원성 단편에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 노년 황반변성의 진단 키트를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 진단키트는 당업자에 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조되며, 전형적으로 동결건조형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함한다. 상기 항체는 방사종, 형광원, 효소 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 단일클론항체는 immunoassay 키트(ELISA, antibody coated tube test, lateral-flow test, potable biosensor)에 다양하게 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 높은 특이도와 민감도를 나타내는 항체의 개발을 통한 다양한 노년 황반변성 검출 스펙트럼을 갖는 단백질칩 개발에도 이용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 노년 황반변성 환자의 방수 (Aqueous humor)에 증감하는 군에서 선택된 단백질을 유효성분으로 포함하는 노년 황반변성 질환의 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 주사제 등의 제형으로 제조되어 정맥주사 등으로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 질환의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준으로 1일 0.001~100 mg의 단백질을 투여할 수 있다.
- [0032] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0033] 본 발명은 프로테오믹스 기법을 이용하여, 노년황반변성 환자의 방수(aqueous humor)시료로부터 바이오마커를 발굴하기 위함이다.
- [0034] 따라서 치료전 환자군 2명, 동일환자에 대한 치료 후 환자군 2명, 정상군 2명을 대상으로 그룹간 단백질의 변화

양상을 분석하였다. 실험의 재현성을 위해 동일한 시료로 3회 반복 실험을 진행하였고, 그중 2회 이상 검출된 단백질 리스트를 선별하였다. 그 결과 치료 전 환자 시료 1, 2에서 각각 131개, 161개의 단백질이 검출되었고, 동일환자에 대한 치료 후 환자군 1, 2에서 264, 183개의 단백질이 검출되었다. 정상시료 1, 2에서는 161, 144개의 단백질이 검출되었다(도 2).

[0035] 환자군과 정상군의 그룹간 단백질의 질량적 변화를 확인하기 위하여 label-free quantification 방법을 도입하여 정상군에 비해 치료 전 환자군에서 1.5배 이상 증가한 단백질을 각각 92, 75개 선별하였고 (표 1-2), 치료 후 감소하는 단백질 67, 64개를 선별하였다 (표 3-4). 이중 노년 황반변성 환자의 바이오마커 후보로 의미를 갖는다고 예상되는 대표적인 cathepsin D, desmoplakin의 단백질을 대상으로 western blot을 수행하여 (도 3) 이들 단백질의 질량적인 변화양상을 확인하였다.

[0036] 표 1-2는 정상군에 비해 환자군에서 1.5배 이상 증가한 단백질 리스트를 나타낸다.

**표 1**

A. 환자 1에서 1.5배 이상 증가한 단백질 리스트

[0037]

No.	GI No.	MW	Reference
1	4502101	38690	annexin A1
2	109255249	63871.45	keratin, type II cytoskeletal 4
3	213688375	41981.82	actin, aortic smooth muscle
4	4504517	22768.49	heat shock protein beta-1
5	45439327	204552.8	periplakin
6	44890059	68437.3	involucrin
7	4503475	50438.36	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
8	31543169	52080.16	histone-lysine N-methyltransferase SUV420H2
9	5454052	27756.7	14-3-3 protein sigma
10	4506773	13233.5	protein S100-A9
11	4501887	41765.8	actin, cytoplasmic 2
12	77539758	11360.38	histone H4
13	291045225	3710441	titin isoform N2-A
14	27436948	70618.16	lamin-A/C isoform 3
15	4504183	23341.02	glutathione S-transferase P
16	214010185	59114.2	amyloid-like protein 2 isoform 4
17	94536793	102933.8	tubulin polyglutamylase TLL7
18	167466177	92553.75	cell division cycle protein 27 isoform 1
19	186659512	177860.6	calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1
20	61743954	628705.2	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1
21	4504253	15135.42	histone H2A.x
22	157653329	47942.04	procollagen C-endopeptidase enhancer 1
23	109255234	290205.6	centrosomal protein of 290 kDa
24	57864582	282225.7	hornerin
25	41327708	154080.4	crumbs homolog 1 precursor
26	124028519	160892.4	hypothetical protein LOC158401 isoform 2
27	226246665	51091.87	keratin, type II cytoskeletal 72 isoform 2
28	73858564	45095.96	corticosteroid-binding globulin precursor
29	212549782	222518.8	caspase 8 associated protein 2
30	115511024	64831.51	lipase maturation factor 1
31	53729346	82807.91	plakophilin-1 isoform 1b
32	208973244	27727.73	14-3-3 protein zeta/delta
33	47607492	518156.3	plectin isoform 1c
34	32455266	22096.28	peroxiredoxin-1
35	28173554	13899.54	histone H2B type 3-B
36	4505821	16561.8	prolactin-induced protein precursor
37	195947389	101902.1	ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 2 isoform 3 preproprotein



38	178557739	192629.6	complement C4-B preproprotein
39	5031863	65289.4	galectin-3-binding protein
40	94536788	103344.8	THAP domain-containing protein 9
41	5031579	76061.17	A-kinase anchor protein 8
42	222144229	68573.8	autophagy-related protein 7 isoform c
43	262359929	253301.3	protein ELYS
44	163659918	520794.2	sacsin
45	154146262	571640.9	igGfC-binding protein precursor
46	206597522	106915.3	arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 isoform b
47	124256496	70331.45	heat shock 70 kDa protein 1-like
48	169211906	22688.56	PREDICTED: hypothetical protein
49	166795236	35686.62	tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor
50	12667788	226390.6	myosin-9
51	57013276	50119.64	tubulin alpha-1B chain
52	29788768	49920.98	tubulin beta-2B chain
53	5902072	44536.6	serpin B3
54	60097902	434921.4	filaggrin
55	194248072	70009.18	heat shock 70 kDa protein 1A/1B
56	16507237	72288.52	78 kDa glucose-regulated protein
57	10190712	11654.76	S100 calcium binding protein A14
58	21614499	69369.84	ezrin
59	5803227	27746.77	14-3-3 protein theta
60	27894339	48101.24	keratin 23
61	5032161	12465	transcription elongation factor B polypeptide 1
62	109148552	64377.6	keratin, type II cytoskeletal 3
63	34734068	61538.3	fibulin-1 isoform A precursor
64	21071030	54219.66	alpha 1B-glycoprotein precursor
65	5031839	60008.32	keratin, type II cytoskeletal 6A
66	189083782	81890.13	gelsolin isoform c
67	58530842	259954.2	desmoplakin isoform II
68	239753016	13156.05	PREDICTED: similar to hCG2042913
69	239752583	15863.81	PREDICTED: hypothetical protein XP_002348171
70	209915573	80782.38	amyloid beta A4 protein isoform f precursor
71	239753442	194818.7	PREDICTED: HEAT repeat containing 7B1
72	4557373	61093.34	biotinidase precursor
73	154277116	1010419	nesprin-1 isoform 1
74	169207532	24015.14	PREDICTED: similar to hCG2042717
75	37588869	148420	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123
76	24430190	49167.11	keratin, type I cytoskeletal 15
77	50592994	11729.74	thioredoxin
78	116295258	129214.8	integrin alpha-2 precursor
79	5902010	45749.07	transcription termination factor, mitochondrial precursor
80	155969697	59988.35	keratin, type II cytoskeletal 6C
81	24430192	51236.25	keratin, type I cytoskeletal 16
82	12056468	81692.87	junction plakoglobin
83	33620759	39754.96	LRP2-binding protein
84	119703753	60030.33	keratin, type II cytoskeletal 6B
85	7669492	36030.4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
86	260436922	60504.64	suprabasin isoform 1 precursor
87	4503143	44523.66	cathepsin D preproprotein
88	192807292	55053.49	keratin 24
89	4504489	59540.94	histidine-rich glycoprotein precursor
90	4507725	15877.05	transthyretin precursor
91	116734860	174651.4	amylase-1,6-glycosidase, 4-alpha-glucanotransferase isoform 1
92	25777600	105768.7	proteasome 26S non-ATPase subunit 1

표 2

B. 환자 2에서 1.5배 이상 증가한 단백질 리스트

No.	GI No.	MW	Reference
1	206597441	50362.9	aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring
2	4504935	55766.54	keratin, type II cuticular Hb5
3	4557287	53120.61	angiotensinogen preproprotein
4	4503571	47139.37	alpha-enolase
5	5902010	45749.07	transcription termination factor, mitochondrial precursor
6	25777600	105768.7	proteasome 26S non-ATPase subunit 1
7	118442839	37625.96	complement factor H-related protein 1 precursor
8	55743122	22995.26	retinol-binding protein 4 precursor
9	213688375	41981.82	actin, aortic smooth muscle
10	261278368	76506.45	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4 isoform 2
11	115527097	194191.4	serine/threonine-protein kinase MRCK beta
12	4505529	23587.64	alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor
13	190341024	75161.32	SPARC-like protein 1 precursor
14	222144229	68573.8	autophagy-related protein 7 isoform c
15	58530840	331567.8	desmoplakin isoform I
16	11386161	65090.96	collagen alpha-2(IX) chain precursor
17	33620759	39754.96	LRP2-binding protein
18	109255234	290205.6	centrosomal protein of 290 kDa
19	75677365	507374.4	dynein heavy chain 2, axonemal
20	134031945	547136.1	SCO-spondin precursor
21	4507509	23155.55	metalloproteinase inhibitor 1 precursor
22	34787409	166691.8	ral GTPase-activating protein beta subunit
23	74271828	44385.62	mTERF domain-containing protein 3, mitochondrial precursor
24	4501887	41765.8	actin, cytoplasmic 2
25	4557373	61093.34	biotinidase precursor
26	4506145	26541.09	trypsin-1 preproprotein
27	156627579	22522.28	tetranectin precursor
28	4507149	15925.91	superoxide dismutase
29	4505047	38404.8	lumican precursor
30	33413418	42232.73	signal peptide peptidase-like 3
31	4504489	59540.94	histidine-rich glycoprotein precursor
32	162809334	163759.1	pregnancy-zone protein precursor
33	4826762	45176.59	haptoglobin isoform 1 preproprotein
34	144226251	42598.43	chitinase 3-like 1 precursor
35	119392081	65676.66	complement factor I preproprotein
36	4502149	11167.9	apolipoprotein A-II preproprotein
37	4503143	44523.66	cathepsin D preproprotein
38	58530842	259954.2	desmoplakin isoform II
39	89357932	56830.53	keratin, type II cytoskeletal 78
40	62122917	247926.3	filaggrin family member 2
41	209862791	69012.77	zinc finger protein 90
42	77539758	11360.38	histone H4
43	156104891	58205.11	general transcription factor IIF subunit 1
44	4502067	38973.99	protein AMBP preproprotein
45	42734397	43628.38	ubiquitin-conjugating enzyme E2C binding protein
46	117320537	147775.9	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
47	61743957	28173.1	C->U-editing enzyme APOBEC-1
48	239755764	128617.5	PREDICTED: hypothetical protein
49	22538442	33846.23	cathepsin Z preproprotein
50	4505821	16561.8	prolactin-induced protein precursor
51	239757666	14577.9	PREDICTED: similar to hCG2040021

52	148276990	134171.8	zinc finger and BTB domain-containing protein 38
53	57529737	119521	PDZ domain containing ring finger 3
54	62526026	19104.11	protein CutA isoform 3
55	5729770	61209.71	tripeptidyl-peptidase 1 preproprotein
56	111125011	41499.8	WNT inhibitory factor 1 precursor
57	239758153	23120.24	PREDICTED: similar to Ig heavy chain
58	153791670	65800.08	keratin, type II cytoskeletal 2 oral
59	190684677	163715.5	mitogen-activated protein kinase-binding protein 1 isoform b
60	57863250	184587.1	terminal uridylyltransferase 4 isoform c
61	4507467	74634.1	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 precursor
62	4503009	53117.17	carboxypeptidase E preproprotein
63	222446620	124963	hypothetical protein LOC342346
64	115298678	187029.3	complement C3 precursor
65	50659080	47620.63	alpha-1-antichymotrypsin precursor
66	4504619	29111.45	insulin-like growth factor binding protein 7
67	4502261	52568.98	antithrombin-III precursor
68	21071030	54219.66	alpha 1B-glycoprotein precursor
69	4557894	16526.29	lysozyme precursor
70	7669492	36030.4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
71	239752583	15863.81	PREDICTED: hypothetical protein XP_002348171
72	169207532	24015.14	PREDICTED: similar to hCG2042717
73	239756207	13240.43	PREDICTED: similar to pre-B lymphocyte gene 2
74	110347423	90913.51	spondin-1 precursor
75	205277441	46294.67	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 7 precursor

[0039] 하기 표 3-4는 정상군에 비해 환자군에서 1.5배이상 증가했다가 치료 1달후 감소한 단백질 리스트이다.

**표 3**

[0040] A. 환자 1에서 치료 후 감소하는 단백질 리스트

No.	GI No.	MW	Protein name
1	192807292	55053.49	keratin 24
2	31543169	52080.16	histone-lysine N-methyltransferase SUV420H2
3	41327708	154080.4	crumbs homolog 1 precursor
4	109255249	63871.45	keratin, type II cytoskeletal 4
5	94536793	102933.8	tubulin polyglutamylase TTL7
6	167466177	92553.75	cell division cycle protein 27 isoform 1
7	186659512	177860.6	calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1
8	178557739	192629.6	complement C4-B preproprotein
9	5031863	65289.4	galactin-3-binding protein
10	109148552	64377.6	keratin, type II cytoskeletal 3
11	4502101	38690	annexin A1
12	239753016	13156.05	PREDICTED: similar to hCG2042913
13	212549782	222518.8	caspase 8 associated protein 2
14	115511024	64831.51	lipase maturation factor 1
15	4557373	61093.34	biotinidase precursor
16	37588869	148420	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123
17	291045225	3710441	titin isoform N2-A
18	214010185	59114.2	amyloid-like protein 2 isoform 4
19	94536788	103344.8	THAP domain-containing protein 9
20	33620759	39754.96	LRP2-binding protein
21	222144229	68573.8	autophagy-related protein 7 isoform c
22	262359929	253301.3	protein ELYS
23	163659918	520794.2	sacsin
24	154146262	571640.9	igGfc-binding protein precursor

25	206597522	106915.3	arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 isoform b
26	169211906	22688.56	PREDICTED: hypothetical protein
27	166795236	35686.62	tumor-associated calcium signal transducer 2 precursor
28	116734860	174651.4	amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase isoform 1
29	124028519	160892.4	hypothetical protein LOC158401 isoform 2
30	226246665	51091.87	keratin, type II cytoskeletal 72 isoform 2
31	73858564	45095.96	corticosteroid-binding globulin precursor
32	239752583	15863.81	PREDICTED: hypothetical protein XP_002348171
33	209915573	80782.38	amyloid beta A4 protein isoform f precursor
34	239753442	194818.7	PREDICTED: HEAT repeat containing 7B1
35	154277116	1010419	nesprin-1 isoform 1
36	109255234	290205.6	centrosomal protein of 290 kDa
37	34734068	61538.3	fibulin-1 isoform A precursor
38	189083782	81890.13	gelsolin isoform c
39	195947389	101902.1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 isoform 3 preproprotein
40	4504183	23341.02	glutathione S-transferase P
41	169207532	24015.14	PREDICTED: similar to hCG2042717
42	116295258	129214.8	integrin alpha-2 precursor
43	5031579	76061.17	A-kinase anchor protein 8
44	25777600	105768.7	proteasome 26S non-ATPase subunit 1
45	157653329	47942.04	procollagen C-endopeptidase enhancer 1
46	44890059	68437.3	involucrin
47	4503143	44523.66	cathepsin D preproprotein
48	4504517	22768.49	heat shock protein beta-1
49	4504489	59540.94	histidine-rich glycoprotein precursor
50	4505821	16561.8	prolactin-induced protein precursor
51	4503475	50438.36	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
52	4501887	41765.8	actin, cytoplasmic 2
53	5902010	45749.07	transcription termination factor, mitochondrial precursor
54	45439327	204552.8	periplakin
55	4507725	15877.05	transthyretin precursor
56	21071030	54219.66	alpha 1B-glycoprotein precursor
57	61743954	628705.2	neuroblast differentiation-associated protein AHNAK isoform 1
58	4504253	15135.42	histone H2A.x
59	32455266	22096.28	peroxiredoxin-1
60	50592994	11729.74	thioredoxin
61	10190712	11654.76	S100 calcium binding protein A14
62	21614499	69369.84	ezrin
63	213688375	41981.82	actin, aortic smooth muscle
64	47607492	518156.3	plectin isoform lc
65	24430190	49167.11	keratin, type I cytoskeletal 15
66	4506773	13233.5	protein S100-A9
67	208973244	27727.73	14-3-3 protein zeta/delta

표 4

B. 환자2에서 치료후 감소하는 단백질 리스트

No.	GI No.	MW	Reference
1	4504935	55766.54	keratin, type II cuticular Hb5
2	25777600	105768.7	proteasome 26S non-ATPase subunit 1
3	115527097	194191.4	serine/threonine-protein kinase MRCK beta
4	5902010	45749.07	transcription termination factor, mitochondrial precursor
5	55743122	22995.26	retinol-binding protein 4 precursor
6	261278368	76506.45	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4 isoform 2

7	190341024	75161.32	SPARC-like protein 1 precursor
8	222144229	68573.8	autophagy-related protein 7 isoform c
9	134031945	547136.1	SCO-spondin precursor
10	34787409	166691.8	ral GTPase-activating protein beta subunit
11	74271828	44385.62	mTERF domain-containing protein 3, mitochondrial precursor
12	4501887	41765.8	actin, cytoplasmic 2
13	4507149	15925.91	superoxide dismutase
14	205277441	46294.67	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 7 precursor
15	4502149	11167.9	apolipoprotein A-II preproprotein
16	209862791	69012.77	zinc finger protein 90
17	77539758	11360.38	histone H4
18	156104891	58205.11	general transcription factor IIF subunit 1
19	4502067	38973.99	protein AMBP preproprotein
20	42734397	43628.38	ubiquitin-conjugating enzyme E2C binding protein
21	61743957	28173.1	C->U-editing enzyme APOBEC-1
22	239755764	128617.5	PREDICTED: hypothetical protein
23	22538442	33846.23	cathepsin Z preproprotein
24	4505821	16561.8	prolactin-induced protein precursor
25	109255234	290205.6	centrosomal protein of 290 kDa
26	57863250	184587.1	terminal uridylyltransferase 4 isoform c
27	4503571	47139.37	alpha-enolase
28	206597441	50362.9	aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring
29	4507467	74634.1	transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 precursor
30	222446620	124963	hypothetical protein LOC342346
31	239752583	15863.81	PREDICTED: hypothetical protein XP_002348171
32	162809334	163759.1	pregnancy-zone protein precursor
33	4505529	23587.64	alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor
34	58530840	331567.8	desmoplakin isoform I
35	4503009	53117.17	carboxypeptidase E preproprotein
36	118442839	37625.96	complement factor H-related protein 1 precursor
37	239758153	23120.24	PREDICTED: similar to Ig heavy chain
38	4503143	44523.66	cathepsin D preproprotein
39	213688375	41981.82	actin, aortic smooth muscle
40	89357932	56830.53	keratin, type II cytoskeletal 78
41	117320537	147775.9	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
42	148276990	134171.8	zinc finger and BTB domain-containing protein 38
43	4557894	16526.29	lysozyme precursor
44	4504619	29111.45	insulin-like growth factor binding protein 7
45	4502261	52568.98	antithrombin-III precursor
46	75677365	507374.4	dynein heavy chain 2, axonemal
47	4507509	23155.55	metalloproteinase inhibitor 1 precursor
48	4506145	26541.09	trypsin-1 preproprotein
49	156627579	22522.28	tetranectin precursor
50	4505047	38404.8	lumican precursor
51	239756207	13240.43	PREDICTED: similar to pre-B lymphocyte gene 2
52	11386161	65090.96	collagen alpha-2(IX) chain precursor
53	4557287	53120.61	angiotensinogen preproprotein
54	50659080	47620.63	alpha-1-antichymotrypsin precursor
55	4826762	45176.59	haptoglobin isoform 1 preproprotein
56	119392081	65676.66	complement factor I preproprotein
57	190684677	163715.5	mitogen-activated protein kinase-binding protein 1 isoform b
58	4557373	61093.34	biotinidase precursor
59	33413418	42232.73	signal peptide peptidase-like 3
60	62122917	247926.3	filaggrin family member 2
61	239757666	14577.9	PREDICTED: similar to hCG2040021

62	57529737	119521	PDZ domain containing ring finger 3
63	62526026	19104.11	protein CutA isoform 3
64	5729770	61209.71	tripeptidyl-peptidase 1 preproprotein

**발명의 효과**

[0042] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명에서 동정된 단백질을 이용하여 노년 황반 변성의 진단에 활용 할 수 있을 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0043] 도 1은 1차원 전기영동을 통해 얻은 노년황반변성 환자의 방수단백질 시료를 나타낸 그림이고,  
 도 2는 동정된 단백질을 그룹별로 분석하여 나타낸 히스토그램을 나타낸 그림이며,  
 도 3은 Cathepsin D 와 Desmoplakin의 western blot 결과를 나타낸 그림이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0044] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0045] 실시예 1: 1차원 전기영동과 coomassie blue 염색

[0046] 노년황반변성 환자들의 방수 (Aqueous humor) 를 50ug씩 취하여 1차원 전기영동 (120V, 1 hr 30min) 하고 아래에 기재된 방법으로 젤을 염색하였다.

[0047] 1차원 전기영동으로 단백질을 분리한 후, 3차 증류수를 이용하여 15분씩 3회 워싱해주고, Gel code blue staining solution 으로 1시간 동안 염색해 주었다.(도 2)

[0048] 실시예 2: 단백질의 펩타이드화 단계(아래의 단계를 순차적으로 수행)

[0049] 상기 염색된 젤을 구획에 따라 6등분하여 탈염색시약 (50mM ammonium bicarbonate in 50% Acetonitrile) 을 이용하여 완전히 탈염색해주고, 100% Acetonitrile 을 이용하여 탈수해 주었다.

[0050] 탈수시킨 샘플을 speed-vacuum을 이용하여 10분간 완전히 건조시켰다.

[0051] 건조시킨 젤 안의 단백질은 이황화 결합들로 연결되어있기 때문에, 최종 농도가 10mM 이 되도록 하여 다이티오 쓰레이톨 (dithiothreitol, DTT)을 넣어주고 56℃에서 45분간 반응시켰다.

[0052] 앞선 반응에 의해 끊어진 -SH 기가 다시 서로 붙지 못하게 하기 위해 55mM 아이오도아세트아마이드 (iodoacetamide)를 어둠 속에서 30분씩 반응시켜 -SH 잔기에 알킬레이션을 하였다.

[0053] 단백질을 가수분해하기 위해 트립신을 단백질과 1:20의 비율로 넣어주고 37℃ 에서 overnight 반응시켰다.

[0054] Overnight 반응 후, 시료를 500uL 튜브에 옮겨 담고, extraction solution (5% formic acid, 50% acetonitrile)을 첨가하여 overnight 해준 튜브에 50uL를 넣어주고, 상온에서 20분간 반응시켰다. (위의 과정을 2회 반복)

[0055] 위의 과정으로 얻은 시료를 speed-vacuum을 이용하여 solution이 전부 날아갈 때까지 말려주었다.

[0056] 실시예 3: LC-ESI-MS/MS 및 데이터 분석

[0057] LTQ 이온트랩 질량분석기를 이용하여 위의 과정에서 얻어진 샘플을 분석하였다.

[0058] C18 microcapillary 컬럼 (12cm x 75um) 을 질량분석기에 연결하였고, 샘플을 컬럼에 주입하여 RP-HPLC를 이용하여 질량분석기에서 분석하였다.

[0059] 이동상은 solvent A (3차 증류수 / 0.1% formic acid) 와 solvent B ( acetonitrile / 0.1% formic acid) 를 5-45분 동안 gradient (3-40% solvent B)로 흘려주었다. (표 3)

[0060] 컬럼의 flow rate 는 250nL/min이며, MS에서 intensity가 가장 큰 5개의 피크를 MS/MS 하도록 한다. MS/MS는

data-dependent scan mode를 사용하고, electrospray voltage는 1.95kV, CE (Collision energy)는 35%로 적용하였고,

[0061] 얻어진 MS/MS데이터는 휴먼 데이터베이스를 기반으로, SEQUEST를 통하여 단백질을 동정하였다.

표 5

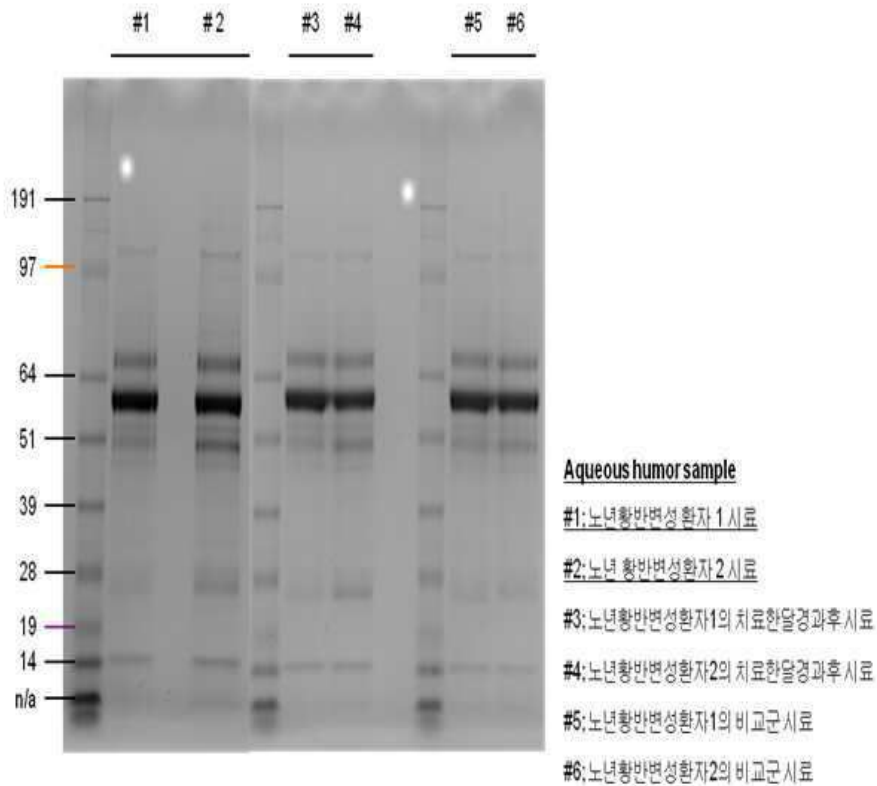
[0062]

Time	Flow (uL/min)	Solvent A	Solvent B
0	0.2	97	3
5	0.2	97	3
45	0.2	60	40
50	0.2	10	90
60	0.2	10	90
65	0.2	97	3
85	0.2	97	3

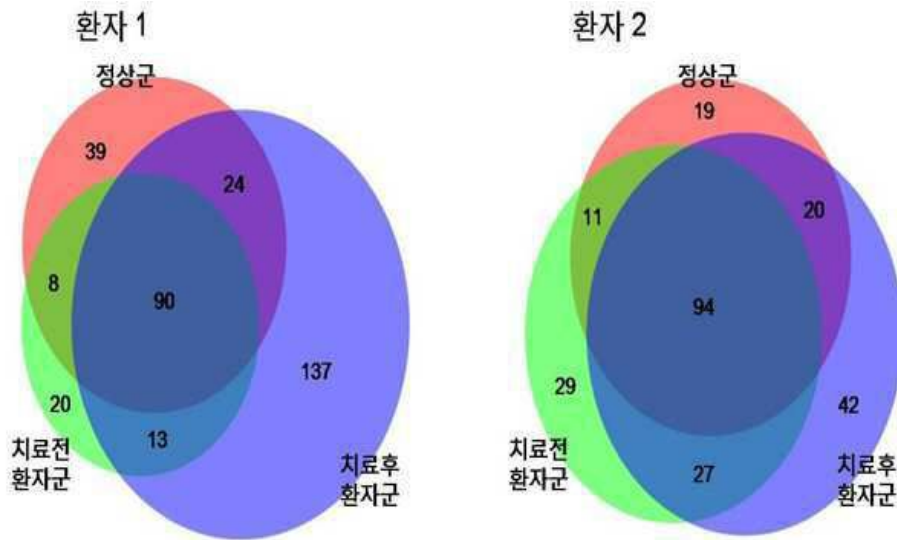
[0063] 표 3은 방수시료분석에 사용된 LC 구배 조건을 나타낸 표이다.

도면

도면1



도면2



도면3

