(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 5 월 1 일 (01.05.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/065606 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009512

(22) 국제출원일: 2013 년 10 월 24 일 (24.10.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0118934 2012 년 10 월 25 일 (25.10.2012) KR

(71) 출원인: **경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: **김명옥 (KIM, Myeong Ok)**; 660-788 경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102-303, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **한윤호 (HAN, Yun-Ho)** 등; 137-876 서울시 서초구 사임당로 28 나이스빌딩 2 층 율민국제특허법률사무소, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

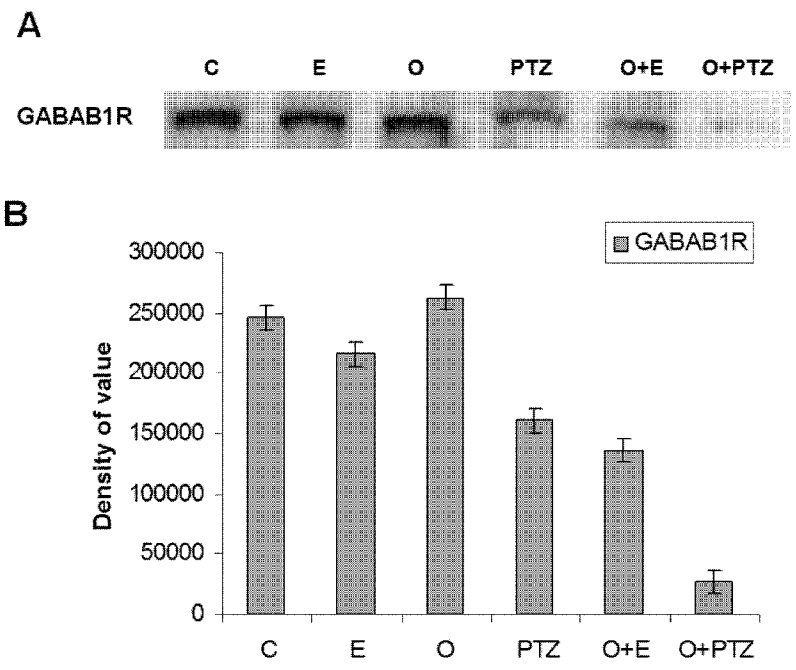
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: AGENT FOR TREATING NERVE DISEASE, COMPRISING OSMOTIN COMPOSITION AND INHIBITOR FOR INHIBITING EXPRESSION OR ACTIVITY OF GABA B RECEPTOR PROTEINS

(54) 발명의 명칭 : 오스모틴 조성물 및 ＧＡＢＡ Ｂ 수용체 단백질 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 신경질환 치료제



(57) **Abstract**: The present invention provides a composition for preventing and treating nerve disease, comprising osmotin and an inhibitor for inhibiting activity or expression of gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor proteins so as to provide the effects of preventing and treating nerve disease that is caused by the over-expression of GABA B receptor proteins.

(57) **요약서**: 본 발명은 GABA(gamma-aminobutyric acid) B 수용체 단백질의 과발현에 의하여 유발되는 신경질환의 예방 및 치료효과를 제공하기 위하여, 오스모틴(osmotin)과 GABA B 수용체 단백질 활성 또는 발현 억제제를 함유하는, 신경질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

WO 2014/065606 A1

명세서

발명의 명칭: 오스모틴 조성물 및 GABA B 수용체 단백질 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 신경질환 치료제

기술분야

[1] 본 발명은 신경질환 치료제에 관한 것으로서, 더 상세하게는 GABA B 수용체 단백질 발현 또는 활성 억제제와 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 신경질환 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[2] GABA(gamma-aminobutyric acid) B 수용체는 중추신경계 내에 폭 넓게 분포하면서 신경 활동을 조절하며, 특히 퇴행성 뇌 질환 및 병태생리학적 장애와 밀접한 관련이 있다. 예를 들어, GABA B 수용체의 과발현은 다운 증후군(Tyler K. *et al., J. Neurophysiol.*, 97:892-900, 2007), 비정형 결신발작(Stewart LS, *et al., Epilepsy Behav.*, 14(4):577-81, 2009), 알츠하이머(Palop JJ, *et al., Neuron,* 55: 697-711, 2007; Williams C., *et al., PLoS One.*, 4(3):e4936, 2009), 우울증(Slattery DA., *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312(1):290-6, 2004) 등에 관련된다는 것이 알려져 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[3] 그러나 상술한 신경질환에 있어서, GABA B 수용체와 관련한 분자생물학적인 기작은 밝혀진 바가 없다. 본 발명은 GABA B 수용체와 관련된 분자생물학적인 기작을 규명함으로써, GABA B 수용체 이상 발현에 의하여 유발되는 다양한 신경질환 예방 및 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

[4] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오스모틴(osmotin)과 GABA(gamma-aminobutyric acid) B 수용체 단백질 활성 또는 발현 억제제를 함유하는, 신경질환의 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.

[5] 상기 신경질환은 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유발될 수 있으며, 비정형 결신발작, 알츠하이머, 우울증, 또는 퇴행성 뇌질환일 수 있다.

[6] 상기 GABA B 수용체 단백질 활성 억제제는 GABA B 수용체 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머 또는 항체일 수 있다.

[7] 상기 GABA B 수용체 단백질에 상보적으로 결합하여 길항작용을 하는 화합물은 펜틸렌테트라졸(pentylenetetrazole), 파클로펜(phaclofen), 2-하이드록시사클로펜(2-Hydroxysaclofen), 사클로펜(saclofen), SCH-50911(CAS# 160415-07-6,

2-[(2S)-5,5-디메틸몰폴린-2-일]아세트산(2-[(2S)-5,5-dimethylmorpholin-2-yl]acetic acid)), CGP-35348(CAS# 123690-79-9,
3-아미노프로필(디에톡시메틸)포스핀산(3-aminopropyl(diethoxymethyl)phosphinic acid)), CGP-52432(CAS# 139667-74-6,
3-([(3,4-디클로로페닐)메틸]아미노]프로필)
디에톡시메틸)포스핀산(3-([(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl)
diethoxymethyl)phosphinic acid)), CGP-55845(CAS# 149184-22-5, 또는
(2S)-3-([(1S)-1-(3,4-디클로로페닐)에틸]아미노-2-하이드록시프로필)(페닐메틸)
포스핀산((2S)-3-([(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl)(phenyl
methyl)phosphinic acid))일 수 있다.

[8] 상기 GABA B 수용체 단백질 발현 억제제는 GABA B 수용체 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴크렐오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)일 수 있다.

[9] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 바람직하게는 오스모틴과 GABA B 수용체 단백질의 발현 또는 활성억제제를 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[10] 또한, 추가로 GABA B 수용체 단백질의 발현 또는 활성 억제 물질과 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.

[11] 상기 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 비경구 투여시 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 조사 또는 흉부내 주사에 의해 투여되 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[12] 본 발명의 일 실시예에 따른 각각의 경구용 조성물은 제약상 허용되는 담체를 비롯한 불활성 성분을 추가로 포함한다.

[13] 실제 사용에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 통상적인 제약 조제 기술에 따른 제약 담체와 조합될 수 있다. 담체는, 예를 들어 경구 또는 (정맥내 투여를 비롯한) 비경구 투여에 바람직한 제조에 따라 광범위하게 다양한 형태를 지닐 수 있다.

[14] 아울러, 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[15] 아울러, 본 발명의 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 오스모틴 및 GABA B 수용체 단백질의 발현 또는 활성억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경질환의 치료방법이 제공된다.

[16] 상기 치료방법에 있어서, 상기 신경질환은 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유발될 수 있으며, 비정형 결신발작, 알츠하이머, 우울증, 또는 퇴행성 뇌질환일

수 있다.

발명의 효과

[17] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, GABA B 수용체의 과발현에 의하여 유발되는 신경질환의 예방 및 치료효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 1A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 1B)이다.

[19] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체의 하위 신호전달 단계인 PKA 단백질의 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 2A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 2B)이다.

[20] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체의 하위 신호전달 단계인 p-CREB 단백질의 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 3A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 3B)이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.

[22] 본 문서에서 사용되는 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다(Rothenberg *et al., J. Natl. Cancer Inst.*, 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.

[23] 본 문서에서 사용되는 "펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)"는 GABA B 수용체 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드로서 GABA B 수용체 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β-턴 디펩티드 코어(Nagai *et al. Tetrahedron. Lett.*, 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson *et al. J. Med. Chem.*, 29:295, 1986; 및 Ewenson *et al.*, in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman *et al.* in Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden,

Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger *et al.* in Peptides; Chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β-아미노알콜(Gordon *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey *et al. in* Peptides: Chemistry and Biology, G.R. Marshell ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.

[24] 본 문서에서 사용되는 "siRNA 분자"는 센스 RNA와 안티센스 RNA가 이중가닥 RNA 분자를 형성하고, 이때 센스 RNA가 GABA B 수용체 mRNA 중 일부의 연속 뉴클레오티드의 표적 서열과 동일한 핵산 서열을 포함하는 siRNA 분자인 것이 바람직하다. 상기 siRNA 분자는 GABA B 수용체 유전자의 염기서열 내에서 선택되는 10개 내지 30개의 염기로 구성되는 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, GABA B 수용체 유전자의 염기서열을 대상으로 상보적으로 결합할 수 있는 센스 서열을 가진 이중가닥 RNA 분자라면 모두 사용 가능하다. 상기 안티센스 서열은 센스 서열과 상보적인 서열을 가지는 것이 가장 바람직하다.

[25] 본 문서에서 사용되는 "항체"는 항-GABA B 수용체의 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 다클론 항체는 상기 GABA B 수용체를 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있다. 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G *etal., Nature,* 256: 495-497, 1975; Kozbor D *etal., J. Immunol. Methods,* 81: 31-42, 1985; Cote RJ *etal., Proc. Natl. Acad. Sci.,* 80: 2026-2030, 1983; 및 Cole SP *etal., Mol. Cell. Biol.,* 62: 109-120, 1984). 또한, 상기 GABA B 수용체에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')2 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')2 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD *et al., Science* 254: 1275-1281, 1989). 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌,

폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

[26] 본 문서에서 사용되는 "앱타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 압타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 압타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., *Nature* 346: 818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앱타머들이 계속해서 발굴되어 왔다. 앱타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 자주 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체항체로서의 높은 가능성이 있다.

[27] 본 명세서에서 사용된 "제약상 허용된 담체"란 조성물, 구체적으로 의약 조성물의 활성 물질을 제외한 성분을 지칭하는 용어이다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 결합제, 붕해제, 희석제, 충진제, 활택제, 가용화제 또는 유화제 및 염이 포함된다.

[28] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 도면에 도시된 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 도면에 도시된 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[29] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 1A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 1B)이다. GABA B 수용체 단백질의 과발현은 다양한 신경질환을 매개한다는 것이 알려져 있으나, 그 정확한 기작에 대하여 밝혀진 바가 없다. 이에, 본 발명자는 GABA B 수용체 과발현과 관련된 기작 및 이를 억제할 수 있는 조성물을 통하여 GABA B 수용체 단백질의 과발현에 매개된 질환의 예방 및 치료 효과를 구현하고자 하였다. SD 랫트의 대뇌 피질 및 해마 조직으로부터 수득한 조직을 1차 배양한 후, 무처리군(C), 에탄올 처리군(E), 오스모틴 처리군(O), 펜틸렌테트라졸(P), 오스모틴+에탄올 처리군(O+E), 및 오스모틴+펜틸렌테트라졸 처리군(O+PTZ)으로 각 군에 따른 약물을 처리한 후, GABA B 수용체 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 그 결과, GABA B 수용체 단백질의 발현이 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 각각 처리하였을 때에 비하여, 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 함께 처리하였을 때 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 오스모틴의 경우 본 발명자의 종래 연구를 통하여 신경 세포 사멸억제 효과가 알려져 있으나(대한민국 공개특허 2011-0085260), GABA B 수용체 과발현 억제 효과는 알려져 있지 않다. 펜틸렌테트라졸의 경우, 일반적인 간질 유발물질로 GABA A 수용체 발현 감소를 특징으로 하는 간질 동물 모델을 제조하는데 이용된다는 것이 알려져

있으나(O.Carter Snead III,*etal.*, *J. Neurosci.*, 20(16): 6218-6224, 2000), GABA B 수용체 단백질의 발현 억제와 관련되어서는 그 효과가 알려져 있지 않다. 즉, 상기 결과는 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 포함하는 조성물을 GABA B 수용체 단백질 과발현에 의하여 유발된 신경질환의 예방 및 치료에 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 오스모틴과 펜틸렌테트라졸 각각을 개별적으로 처리한 경우보다 두 화합물을 병용처리할 경우 상승효과가 있음을 최초로 입증한 것이다.

[30] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체의 하위 신호전달 단계인 PKA 단백질의 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 2A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 2B)이다. 본 발명자는 GABA B 수용체 단백질 과발현에 의하여 유발되는 질환의 분자생물학적 기작을 규명하기 위하여, GABA B 수용체의 하위 단계로 알려진 PKA 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과, PKA 단백질의 발현은 오스모틴(O), 오스모틴+펜틸렌테트라졸(O+PTZ), 및 펜틸렌테트라졸(PTZ)의 순서로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[31] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물의 GABA B 수용체의 하위 신호전달 단계인 p-CREB 단백질의 발현 억제 효과를 웨스턴 블랏을 통하여 확인한 그림(도 3A) 및 웨스턴 블랏 밴드의 밀도를 계산한 그래프(도 3B)이다. 상기 도 2의 실험에 이어, 본 발명자는 GABA B 수용체의 하위 단계로 알려진 p-CREB 단백질의 발현을 관찰하였으나, 오스모틴(O), 펜틸렌테트라졸(PTZ) 및 오스모틴+펜틸렌테트라졸(O+PTZ) 군 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

[32] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[33] **실시예 1: 동물사육**

[34] 암컷(n=20) 스프래그 다우리(Sparague-Dawley) 랫트(250 g, 경상대학교, 신경생물학 실험실)는 온도가 조절되며, 명주기(6:00-20:00), 자유식이 조건에서 사육하였다. 수정된 날을 임신 0.5일로 계산하고, 임신 후 17.5일(GD 17.5일)째에 정맥으로 펜토바르비탈 나트륨(pentobarbital sodium)을 3 mg/100 g 체중의 비율로 투여한 후, 머리를 절단(decapitation)하여 희생시켰다.

[35] **실시예 2: 대뇌 피질 세포의 1차 배양(primary cell culture)**

[36] 상기 실시예 1에서 희생시킨 임신 암컷 스프래그 다우리 랫트로부터 얻은 GD 17.5일 된 배아의 대뇌 피질 및 해마 조직을 분리하였다. 상기 분리된 대뇌 피질 및 해마 조직은 0.25% 트립신 EDTA를 20분 동안 처리하고, 차가운 칼슘과 마그네슘이 포함되지 않은 pH 7.4의 행크 버퍼(Hank's buffer)에서 파이펫팅을 통하여 물리적으로 조직을 세포 단위로 분리시킨 후, 원심분리를 수행하였다. 원심분리를 통해서 펠렛화된 세포를 0.02 g/l 폴리-라이신(poly-lysine)을

이용하여 코팅된 플레이트(plate)와 챔버 슬라이드(chamber slide)에 1x106 세포/ml의 비율로 심었다.

[37] 이때, 배지는 열처리로 불활성시킨 10% FBS(fetal bovine serum), 1 mM 피루베이트(pyruvate), 4.2 mM 탄화수소나트륨(sodium bicarbonate), 20 mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 0.3 g/l 소혈청알부민(bovine serum albumin), 50 U/ml 페니실린(penicillin), 및 50 mg/l 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)을 이용하였다. 세포는 5% CO2 조건의 습기가 있는 37℃ 조건에서 배양되었다. 신경아교세포(Neuroglia)가 배양되지 못하도록, 100 μM 시토신 β-D-아라비노 퓨라노사이드 (cytosine β-D-Arabino Furanoside)(Sigma, USA)를 첨가한 배지에 12시간 동안 배양하였다. 12시간이 경과한 후, 상술한 배지로 교환하였다. 4일이 경과한 후, 대뇌피질 및 해마 신경세포는 100 mM 에탄올 처리군(E, 음성대조군), 오스모틴 0.08 μM 처리군(O, 양성대조군), 20 mM 펜틸렌테트라졸 처리군(PTZ, 실험군 1), 0.08 μM 오스모틴 + 20 mM 펜틸렌테트라졸 처리군(O+PTZ, 실험군 2), 0.08 μM 오스모틴 + 100 mM 에탄올 처리군(O+E, 비교군 1)으로 나누어 약물을 처리하였다(표 1 참조). 모든 약물은 공통적으로 세포 배양시 24시간 동안 처리하였다.

[38] 표 1

[Table 1]

약물처리에 따른 실험군

	처리 약물 및 처리량
대조군	무처리군 (C)
음성대조군	에탄올 100 mM 처리군(E)
양성대조군	오스모틴 0.08 M 처리군 (O)
실험군 1	펜틸렌테트라졸 20 mM 처리군(PTZ)
실험군 2	오스모틴 0.08 M + 펜틸렌테트라졸 20 mM 처리군(O+PTZ)
비교군 1	오스모틴 0.08 M + 에탄올 100 mM 처리군(O+E)

[39] **실시예 3: 오스모틴의 정제**

[40] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 함유되는 오스모틴은 salt-adapted된 담배배양세포(Nicotiana tabacum L. var. Wisconsin 38)로부터 99%이상의 순도로 분리하였다(Yun *etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(13): 7082-7, 1997; Yun DJ, *et al, Mol. Cell.*, 1(6): 807-17, 1998).

[41] **실험예 1: GABAB1R 단백질 발현 억제 효과**

[42] 본 발명의 일 실시예에 따른 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 함유하는 조성물의

GABAB 수용체의 과발현으로 인하여 유발되는 이상간질, 인지관련 장애 치료 및 예방 효과를 입증하기 위하여, 상기 실시예 1, 2를 통하여 수득된 랫트의 대뇌 및 해마 세포를 배양한 후, 상기 표 1에 기재된 약물을 24시간 동안 처리하였다. 그 후, GABA1B 수용체의 발현을 웨스턴 블랏을 통하여 확인하였다.

[43] 우선, 상기 실시예 2에서 1차 배양된 대뇌 피질 및 해마 세포를 프로테아제 억제제인 PMSF 100 mM이 포함된 세포 용해 버퍼(Cell signaling #9803)를 이용하여 균질화하였다. 단백질 시료는 아이스 위에서 20분 동안 놓았다가, 4분 동안 초음파 처리(15초 on/10초 off 주기)하였다. 그 후, 12,000g에서 10분 동안 원심분리를 수행하였으며, 이를 2회 반복한 후, 단백질을 포함하는 상층액만을 수득하였다.

[44] 단백질의 농도는 바이오-래드(Hercules, CA) 단백질 분석시료를 이용하여 측정하였으며, 30 μg 단백질/레인(lane)의 비율로 넣은 후, 595 nm에서 분광광도법(spectrophotometry)으로 측정되었다.

[45] 그 후, 용해성 분획물(30 μg)을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 젤[30% 아크릴아마이드(Acrylamide), 1% 비스(Bis), 1 M 트리스(Tris), 10% SDS, 10% APS 및 TEMED]에서 분리시켰으며, 이때 젤 2개에 반복하여 분리시켰다. 상기 단백질이 분리된 젤 하나는 코마시 블루(Comassie Blue)를 이용하여 염색하였으며, 나머지 젤은 나이트로 셀룰로오스(nitrocellulose) 멤브레인에 분리된 단백질을 트랜스퍼 버퍼[48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% MeOH and 0.037% SDS]를 이용하여 1시간 동안 90V constant의 조건에서 이동시켰다. 그 후, 상기 나이트로 셀룰로오스 멤브레인은 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 블로킹 용액[0.1% (v/v) 트윈 20과 6%(w/v) 탈지분유가 함유된 TBS(Tris-buffered saline) 버퍼]과 반응시켰다. 상기 블로킹된 멤브레인은 래빗-다중클론성 IgG GABAB1, 또는 래빗-유래 안티-래빗 GABAB1R 항체(1:1000, Abcam Limited, UK)를 이용하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켜 면역반응을 유발하였다. 항체를 제거한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 염소 항-마우스와 염소 항-래빗 IgG HRP(1:10000, Bio-Rad)과 상기 나이트로셀룰로오스 멤브레인을 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, ECL 검출 시약(Amersham Pharmacia Biotech, Western blotting detection reagents)을 이용한 화학발광방법에 의하여 단백질을 검출하였으며, ECL 검출은 Amersham에 기재된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[46] 그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이, GABAB1R 단백질 발현이 오스모틴과 펜틸렌테트라졸의 단일 성분을 처리할 때에 비하여, 상기 두 약물을 함께 처리하였을 때 현저하게 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[47] 이어, 본 발명자는 웨스턴 블랏 결과 관찰되는 밴드의 진하기 정도는 컴퓨터 기반의 시그마 겔 시스템(SPSS Inc. Chicago, USA)을 이용하여 밀도계로 분석하였으며, 밴드의 진하기 정도는 평균 ± 표준오차(SEM)의 수치로 나타냈다. 실험군 사이의 유의성을 분석하기 위하여, Tukey-Kramer 다중 비교 테스트에

따른 One-way ANOVA 분석을 수행하였다. 모든 실험에서, $P<0.05$ 이하일 때 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

[48] 그 결과, 오스모틴과 펜틸렌테트라졸 단일 성분을 처리하였을 때 관찰되는 GABA1BR 단백질의 발현은 대조군(C)에 비하여 감소하였으나, 상기 실험군 사이의 발현정도는 유사하였으며, 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 함께 처리한 군은 단일 약물을 처리한 군에 비하여 약 7~8배 발현수준이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[49] 이러한 결과는 GABABR 의 과발현에 의하여 유발될 수 있는 비정형 결신발작(absence seizure)와 같은 간질에 있어서 본 발명의 일 실시예에 따른 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 포함하는 조성물이 유용한 치료 효과를 나타낼 수 있음을 입증하는 것이다.

[50] **실험예 2: GABAB1R 하위 단계 단백질 발현 억제 효과**

[51] 본 발명의 일 실시예에 따른 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 포함하는 조성물이 GABA 수용체 과발현에 의하여 유발되는 비정형 결신발작 치료 및 예방에 유용한지 확인하기 위하여, GABAB1R 단백질 발현 억제에 이어, 이의 하위 단계인 PKA 단백질 및 pCREB 단백질의 발현 억제 여부를 관찰하였다.

[52] 상기 실험예 1과 동일한 조건으로 세포를 배양하고 약물을 처리한 후, 웨스턴 블랏을 통하여 PKA 단백질의 발현 수준을 확인하였다. 웨스턴 블랏 실험 조건을 상기 실험예 1과 동일하며, 항체로 p-CREB 및 PKA-α 항체(1:1000, Santa Cruz, Cell signaling)를 이용하였다는 점만 상이하였다.

[53] 그 결과, 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 함께 처리한 군에서 GABA B 수용체 단백질의 발현 억제 효과와 달리, PKA 및 p-CREB 단백질의 발현은 단일 약물에 비하여 현저히 억제되는 경향을 나타내지 않았다. PKA의 경우, 오스모틴(O), 오스모틴+펜틸렌테트라졸(O+PTZ), 및 펜틸렌테트라졸(PTZ)의 순서로 발현이 감소하였으며, p-CREB의 경우 상술한 3개의 실험군 사이에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 오스모틴과 펜틸렌테트라졸을 포함하는 조성물에 의한 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유도되는 신경질환의 치료에 매개되는 분자생물학적 기작에 대하여 연구가 더 요구됨을 의미한다.

[54] 본 발명은 상기 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[55]

청구범위

[청구항 1] 오스모틴(osmotin)과 GABA(gamma-aminobutyric acid) B 수용체 단백질 활성 또는 발현 억제제를 함유하는, 신경질환의 예방 및 치료용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 신경질환은 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유발되는, 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유발되는 신경질환은 비정형 결신발작, 알츠하이머, 우울증, 또는 퇴행성 뇌질환인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 GABA B 수용체 단백질 활성 억제제는 GABA B 수용체 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앱타머 또는 항체인, 조성물.

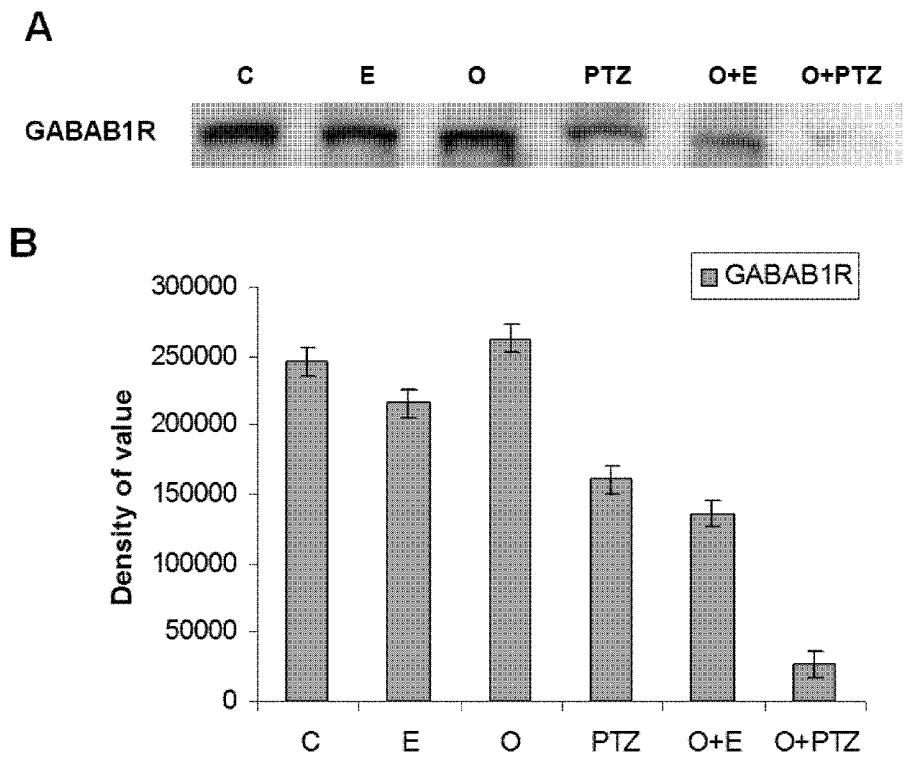
[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 GABA B 수용체 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물은 펜틸렌테트라졸(pentylenetetrazole), 파클로펜(phaclofen), 2-하이드록시사클로펜(2-Hydroxysaclofen), 사클로펜(saclofen), SCH-50911(CAS# 160415-07-6), CGP-35348(CAS# 123690-79-9), CGP-52432(CAS# 139667-74-6), 또는 CGP-55845(CAS# 149184-22-5)인, 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 GABA B 수용체 단백질 발현 억제제는 GABA B 수용체 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴크렐오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA)인, 조성물.

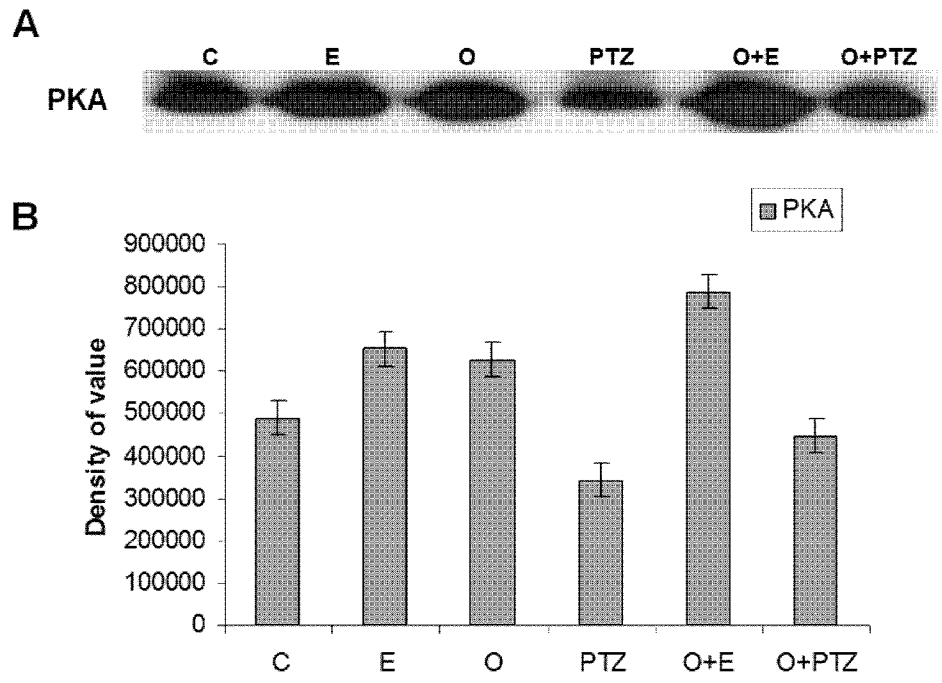
[청구항 7] 치료적으로 유효한 양의 오스모틴 및 GABA B 수용체 단백질의 발현 또는 활성억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경질환의 치료방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 신경질환은 GABA B 수용체 과발현에 의하여 유발될 수 있으며, 비정형 결신발작, 알츠하이머, 우울증, 또는 퇴행성 뇌질환인, 치료방법.

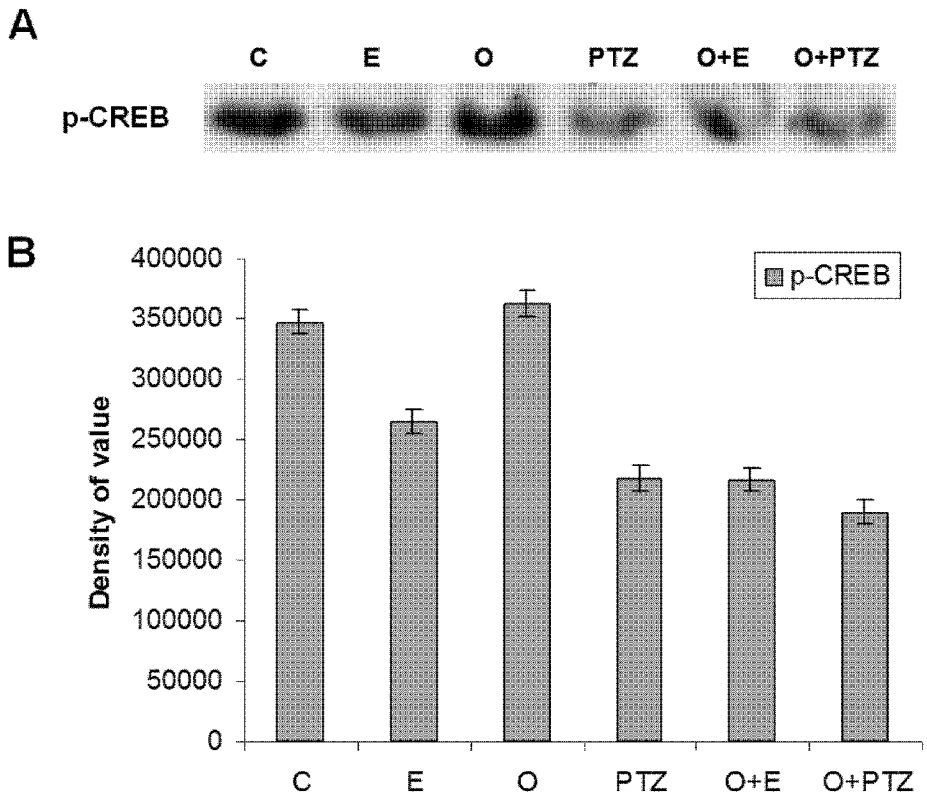
[Fig. 1]


A
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ
GABAB1R
B
GABAB1R
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Density of value
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ

[Fig. 2]


A
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ
PKA
B
PKA
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Density of value
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ

[Fig. 3]


A
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ
p-CREB
B
p-CREB
Density of value
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
C
E
O
PTZ
O+E
O+PTZ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/009512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i, A61P 25/00(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)

A61K 48/00; A61P 25/00; G01N 33/15; A61K 38/00; A61P 25/32; A61P 25/28; A61K 31/045; A61K 38/16; G01N 33/68; A61K 39/395

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: osmotin, GABA B receptor, nervous disorder, depression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0085260 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 27 July 2011 See abstract, claims 1 to 2	1-6
Y	KR 10-2010-0054622 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 25 May 2010 See abstract, claims 1 to 7, paragraphs [0001] to [0005] and [0013] to [0014]	1-6
A	KR 10-2009-0040951 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 28 April 2009 See the entire document	1-6
A	KR 10-2011-0127506 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 25 November 2011 See the entire document	1-6

☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 FEBRUARY 2014 (27.02.2014)	**28 FEBRUARY 2014 (28.02.2014)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/009512

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.: **7-8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7-8 pertain to a method for treatment of the human by therapy, and thus pertain to 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).

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 application No.
PCT/KR2013/009512

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0085260 A	27/07/2011	US 2013-0210738 A1	15/08/2013
		WO 2011-090270 A2	28/07/2011
		WO 2011-090270 A3	01/12/2011
KR 10-2010-0054622 A	25/05/2010	WO 2010-055977 A1	20/05/2010
KR 10-2009-0040951 A	28/04/2009	NONE	
KR 10-2011-0127506 A	25/11/2011	WO 2011-145905 A2	24/11/2011
		WO 2011-145905 A3	03/05/2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/009512

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 48/00; A61P 25/00; G01N 33/15; A61K 38/00; A61P 25/32; A61P 25/28; A61K 31/045; A61K 38/16; G01N 33/68; A61K 39/395

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: 오스모틴, GABA B 수용체, 신경질환, 우울증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0085260 A (경상대학교산학협력단) 2011.07.27 요약, 청구항 1 내지 2 참조	1-6
Y	KR 10-2010-0054622 A (경상대학교산학협력단) 2010.05.25 요약, 청구항 1 내지 7, 단락번호 [0001] 내지 [0005] 및 [0013] 내지 [0014] 참조	1-6
A	KR 10-2009-0040951 A (경상대학교산학협력단) 2009.04.28 전문 참조	1-6
A	KR 10-2011-0127506 A (경상대학교산학협력단) 2011.11.25 전문 참조	1-6

☐ 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

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 02월 27일 (27.02.2014)	2014년 02월 28일 (28.02.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
정의준
전화번호 +82-42-481-8148

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/009512

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: 7-8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 7 및 8은 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
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.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/009512

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0085260 A	2011/07/27	US 2013-0210738 A1	2013/08/15
		WO 2011-090270 A2	2011/07/28
		WO 2011-090270 A3	2011/12/01
KR 10-2010-0054622 A	2010/05/25	WO 2010-055977 A1	2010/05/20
KR 10-2009-0040951 A	2009/04/28	없음	
KR 10-2011-0127506 A	2011/11/25	WO 2011-145905 A2	2011/11/24
		WO 2011-145905 A3	2012/05/03