

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 6월 11일 (11.06.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/083871 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011873
- (22) 국제출원일: 2013년 12월 19일 (19.12.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0149123 2013년 12월 3일 (03.12.2013) KR
- (71) 출원인: 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김명옥 (KIM, Myeong Ok); 660-788 경상남도 진주시 가로호 44 번길 7 102 동 303 호 (호탄동, 대동아 파트), Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won-Hee); 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, 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.

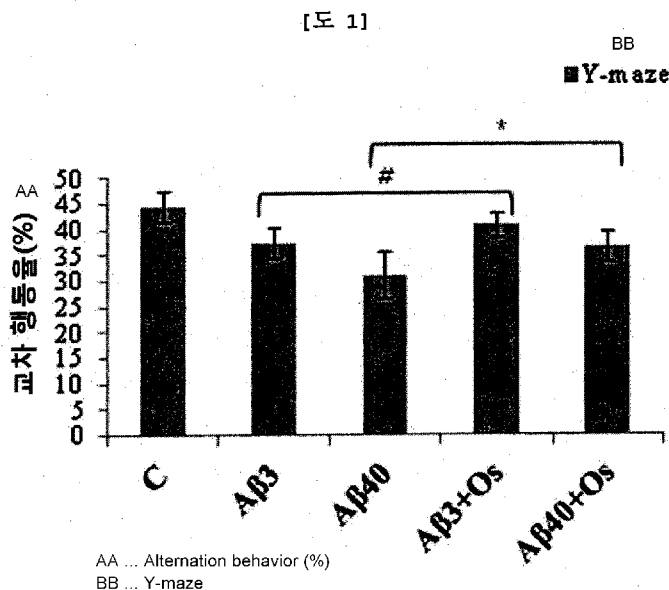
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, 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))

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING OSMOTIN AS ACTIVE INGREDIENT FOR IMPROVING COGNITIVE FUNCTION

(54) 발명의 명칭: 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 개선용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing osmotin as an active ingredient for improving cognitive function. More specifically, in an Aβ-induced neurodegenerative mouse model administered with osmotin, Aβ-induced memory impairment and synapse toxicity are improved; Aβ accumulation, BACE-1 overexpression and tau hyperphosphorylation are suppressed; and Aβ-induced apoptosis and neurodegeneration are mitigated, and thus osmotin can be favorably used as an active ingredient of the composition for improving cognitive function.

(57) 요약서: 본 발명은 오스모틴(osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 오스모틴을 투여한 Aβ 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 Aβ에 의한 기억 손상 및 시냅스독성이 개선되고, Aβ의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제되며, Aβ에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화되므로, 상기 오스모틴을 인지 기능 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 개선용 조성물

5 【기술분야】

본 발명은 오스모틴(Osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

10 생명과학 및 의학의 급속한 발전으로 인간의 평균 수명이 늘어나며, 장노년 인구의 비중이 점차 늘어남에 따라 새로운 사회적 문제들이 부각되고 있다. 특히 노인성 신경계 질환들, 특히, 뇌졸중 (stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD)은 치명적인 신경계의 기능장애로 나타나는데, 이를 막을 수 있는 효과적인 방법이 없는 현 실정에서는 삶의 질저하 및 막
15 대한 의료비의 지출 등으로 주변 가족에게 상당한 정신적인 부담을 주고 있다.

뇌신경 질환인 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease: 이하 "AD"라 칭함)은 점진적인 신경세포의 퇴화로 인해 인지능력 상실을 가져오는 치매의 50에서 70%를 차지하는 가장 일반적인 질병이다. AD는 뇌에 존재하는 판단, 기억, 언어기능을
20 담당하는 부분에 손상이 생겨서 기억력이 없어지고, 의식의 불분명해지며, 사고력, 계산력, 판단력, 상식 등의 대뇌기능이 장애를 나타내기 때문에 직업 및 일상 사회 생활을 하기 어려워지게 된다.

AD로 사망한 환자의 두뇌에서는 노인성 플라그(senile plaque)와 신경원섬유의 엉킴(neurofibrillary tangles)이 병리학적 특성으로 나타난다. 노인성 플라그는 세포 외부에 단백질과 죽은 세포 등이 축적되어 형성되는 것으로, 주 구성 성분은 β -아밀로이드(β -amyloid)라는 펩티드이다. $A\beta$ (amyloid β , β -amyloid) 펩티드는 β -세크레타제(β -secretase) 및 γ -세크레타제(γ -secretase) 효소에 의해 막관통 당단백질(transmembrane glycoprotein) 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)이 절단된 형태이다. $A\beta$ 플라그 형성은 주된 AD 환자의
30 뇌에서 나타나는 형태학적 특징이며, 이로 인해 기억 및 인지 장애가 나타난다. A

β 는 시냅스독성(synaptotoxicity) 및 신경퇴행(neurodegeneration)을 유도하는 생화학적 캐스케이드를 개시하는 신경독(neurotoxic)이다. $A\beta$ 의 축적과 함께, tau 과인산화(hyperphosphorylation)도 AD의 중요한 형태학적 마커이다. 인산화된 tau 단백질 축적의 증가는 미세소관(microtubule) 결함을 억제하고, 따라서 축삭 수송 장애(axonal transport dysfunction) 및 신경세포 소실(neuronal loss)을 유발한다. 한편, $A\beta$ 축적, tau 인산화, 시냅스 소실 및 신경퇴행과 관련된 분자적 기전 및 이를 조절하는 물질에 대해 잘 알려져 있지 않다.

식물에서 유래된 오스모틴은 지방산 산화 조절, 글루코오스 수득, 인산화 (AMP 키나아제) 및 신호 변환 경로에 관여한다. 오스모틴(24 kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 오스모틴은 열, 산성 및 효소에 저항성을 가지며, 따라서 소화에 의해 분쇄될 필요 없이 신체를 순환할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 오스모틴은 동물에 존재하는 아디포넥틴과 상동체로 알려져 있는데, 아디포넥틴의 경우 일부 항-염증, 항-당뇨, 항-죽상경화 능력을 가질 가능성이 있다고 밝혀진 바 있다. 그러나 오스모틴과 관련하여서는 주로 비만이나 당뇨병과 관련된 효과가 연구되었을 뿐, 그 외의 효과에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

이에, 본 발명자들은 AD에 의한 신경 퇴행 및 인지 기능 장애를 완화할 수 있는 물질을 찾기 위해 노력한 결과, 오스모틴을 투여한 $A\beta$ 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 $A\beta$ 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성이 개선되고, $A\beta$ 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제되며, $A\beta$ 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화되는 것을 확인함으로써, 상기 오스모틴을 인지기능 장애 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 오스모틴(osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능

장애, 또는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 인지기능 장애 예방 및 치료방법을 제공하기 위한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품을 제공하기 위한 것이다.

- 5 본 발명의 또 다른 목적은 인지기능 장애 또는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공하기 위한 것이다.

【기술적 해결방법】

- 10 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 오스모틴(osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- 15 또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 예방방법을 제공한다.

- 20 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 치료 방법.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 관련 질환 예방방법을 제공한다.

- 25 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애 관련 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 관련 질환 치료방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

5 아울러, 본 발명은 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

【유리한 효과】

10 본 발명의 오스모틴은 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 인지기능 예방, 치료 또는 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

15 도 1은 아밀로이드 β (A β) 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴(osmotin)에 의한 자발적 교차 행동율(spontaneous alteration behavior) 변화를 나타낸 도이다:

C: 대조군;

A β 3: A β 투여 후 3일 된 마우스 그룹;

20 A β 40: A β 투여 후 40일 된 마우스 그룹;

A β 3+0s: A β 투여 3 일 후 오스모틴 처리 마우스 그룹;

A β 40+0s: A β 투여 40 일 후 오스모틴 처리 마우스 그룹;

#p<0.05; 및

*p<0.05.

25 도 2a는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴에 의한 A β 유도 시냅스독성(synaptotoxicity) 변화를 나타낸 도이다:

#p<0.05; 및

**p<0.01.

도 2b는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴에 의한 A β 유도 시냅토파이신(synaptophysin)의 발현 양상을 나타낸 도이다.

도 3은 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴에 의한 A β 및 BACE-1 발현 변화를 나타낸 도이다:

5 ***p<0.001;
 **p<0.01;
 ###p<0.001; 및
 ##p<0.01.

도 4a는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴에 의한 Akt, GSK3 β
 10 및 Tau의 인산화 변화를 나타낸 도이다:

 ###p<0.001;
 ##p<0.01;
 ***p<0.001;
 **p<0.01; 및
 15 *p<0.05.

도 4b는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델의 해마 CA3 부위에서 오스모틴에 의한 A β 의 발현 및 tau의 인산화 양상을 나타낸 도이다.

도 4c는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델의 해마 DG 부위에서 오스모틴에 의한 A β 의 발현 및 tau의 인산화 양상을 나타낸 도이다.

20 도 5a는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델에서 오스모틴에 의한 p53, 카스파제-9(caspase-9), 카스파제-3 및 PARP-1의 발현 변화를 나타낸 도이다:

 ***p<0.001;
 **p<0.01;
 *p<0.05;
 25 ###p<0.001;
 ##p<0.01; 및
 #p<0.05.

도 5b는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델의 해마 DG 부위 및 CA3 부위에서 오스모틴에 의한 카스파제-3의 발현 양상을 나타낸 도이다.

도 5c는 A β 유도 신경퇴행 마우스 모델의 해마 DG 부위, CA1 부위 및 CA3 부위에서 오스모틴에 의한 신경세포사멸 양상을 나타낸 도이다.

도 6a는 신경 HT22 세포에서 오스모틴에 의한 세포 생존능(viability), 독성(cytotoxicity) 및 카스파제-3의 활성 변화를 나타낸 도이다:

5 C: 대조군;

A β : 20 μ mol A β ₂₅₋₃₅ 처리;

A β +Os1: 20 μ mol A β ₂₅₋₃₅+ 0.2 μ M 오스모틴 처리;

A β +Os2: 20 μ mol A β ₂₅₋₃₅+ 0.4 μ M 오스모틴 처리; 및

A β +Os3: 20 μ mol A β ₂₅₋₃₅+ 0.8 μ M 오스모틴 처리.

10 도 6b는 해마신경세포(hippocampal neuron)에서 오스모틴에 의한 세포 생존능, 독성 및 카스파제-3의 활성 변화를 나타낸 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

15

본 발명은 오스모틴(osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에서 용어, “오스모틴(osmotin)”은 포도 등 숙성한 과일에 다량으로 함유되어 있는 단백질로서, 30여년 전 처음 발견되었다. 오스모틴은 개체에 따라 약 150개 내지 250개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 식물의 종류에 따라 그 이하 또는 그 이상의 아미노산으로 구성되어 있기도 하다. 이러한 오스모틴은 식물체의 숙성한 과일에 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면 *Nicotiana tabacum*, *Citrus sinensis*, *Rosa roxburghii*, *Solanum tuberosum*, *Piper colubrinum*, *Solanum tuberosum*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana* 등에 존재하는 것으로 알려져 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용되는 오스모틴의 종류가 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 오스모틴은 그 기원에 제한이 없으며, 상기와 같은 다양한 식물체로부터 유래된 오스모틴이 사용될 수 있고, 공지된 유전 공학적 방법에 따라 인위적으로 합성되어 사용될 수도 있다.

20

25

또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펬트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 대조 마우스 그룹(C, n=5), 아밀로이드 β ($A\beta$) 투여 후 3 일 된 마우스 그룹($A\beta$ 3, n=5), 아밀로이드 β 투여 후 40 일 된 마우스 그룹($A\beta$ 40, n=5), 아밀로이드 β 투여 3 일 후 오스모틴(osmotin) 처리 마우스 그룹($A\beta$ 3+Os, n=5) 및 아밀로이드 β 투여 40 일 후 오스모틴 처리 마우스 그룹($A\beta$ 40+Os, n=5), 5 그룹으로 퇴행성 뇌질환 동물 모델을 제작하였다.

또한, 본 발명자들은 오스모틴에 의한 $A\beta$ 유도 기억 손상 개선을 확인하기 위하여, 상기 퇴행성 뇌질환 마우스 그룹의 자발적인 교차 행동량(spontaneous alternation behavior)을 기록하여 단기 행동 기억 정도를 평가한 결과, $A\beta$ 만 투여한 마우스 그룹에 비해 오스모틴을 투여한 마우스 그룹의 경우 자발적인 행동 변화가 유의적으로 증가하는 것을 확인함으로써, 오스모틴이 $A\beta$ 유도 기억 손상을 개선함을 확인하였다(도 1 및 표 1 참조).

또한, 본 발명자들은 오스모틴에 의한 $A\beta$ 유도 시냅스독성(synaptotoxicity) 개선 효과를 확인하기 위하여, 상기 퇴행성 뇌질환 마우스 그룹의 뇌 조직을 이용해 웨스턴 블롯팅(western blotting) 및 면역형광분석법(immunofluorescence analysis)를 수행한 결과, 오스모틴 처리로 $A\beta$ 에 의해 시냅토파이신(synaptophysin) 단백질 발현 억제가 감소함을 확인함으로써, 오스모틴이 $A\beta$ 에 의한 시냅스 장애 및 시냅스독성이 개선됨을 확인하였다(도 2a 및 도 2b 참조).

또한, 본 발명자들은 오스모틴에 의한 $A\beta$ 축적 및 BACE-1 과발현 완화 효과를 확인하기 위하여, 상기 퇴행성 뇌질환 마우스 그룹의 뇌 조직을 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, $A\beta$ 만 투여한 마우스 그룹에 비해 오스모틴을 처리한 마우스 그룹에서 $A\beta$ 단백질량이 감소하고 BACE-1 발현이 현저하게

감소하는 것을 확인함으로써, 오스모틴이 A β 에 의해 활성화된 BACE-1 발현을 완화함을 확인하였다(도 3 참조).

또한, 본 발명자들은 오스모틴에 의한 A β 유도 tau 과인산화(hyperphosphorylation) 완화 효과를 확인하기 위하여, 상기 퇴행성
5 뇌질환 마우스 그룹의 뇌 조직을 이용해 웨스턴 블롯팅 및 면역형광분석법을 수행한 결과, A β 만 투여한 마우스 그룹에 비해 Akt 및 GSK3 β 의 인산화가 증가하고, tau 과인산화가 억제되며, 해마의 CA3 및 DG 부위에서 인산화된 tau 단백질이 감소하는 것을 확인함으로써, 알츠하이머병에 영향을 미치는 tau 과인산화를 완화하고 Akt/GSK3 β 신호를 조절함을 확인하였다(도 4a 내지 도 4c
10 참조).

또한, 본 발명자들은 오스모틴에 의한 A β 유도 세포사멸(apoptosis) 및 신경퇴행증(neurodegeneration) 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 퇴행성 뇌질환
마우스 그룹의 뇌 조직을 이용해 웨스턴 블롯팅, 면역조직화학염색법 및 Nissl
염색을 수행한 결과, A β 만 투여한 마우스 그룹에 비해 오스모틴을 함께 투여한
15 마우스 그룹에서 A β 에 의한 카스파제-9 발현 증가 및 활성화된 카스파제-3 발현 촉진
축진이 완화되고, 카스파제-3 활성을 통해 절단되는 PARP-1의 수준이 감소하며,
해마의 CA1, CA3 및 DG 부위에서 신경의 수가 현저하게 증가하는 것을
확인함으로써, 오스모틴에 의해 A β 유도 세포사멸 및 신경퇴행이 억제되고 세포
보호 효과가 나타남을 확인하였다(도 5a 내지 도 5c 참조).

20 따라서, 본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 인지기능 장애 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

25 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

상기 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은

아니다.

상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는

5 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통

10 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 혼합생약재에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한,

15 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가

20 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

25 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어

투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및
5 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루즈펠트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된
10 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 인지기능 장애 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 건강식품은 상기 오스모틴을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면,
20 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

본 발명에 따른 오스모틴은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될
25 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 오스모틴의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가

없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 오스모틴을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

- 5 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성
- 10 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

- 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을
- 15 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 오스모틴은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 오스모틴 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

20

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 예방방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 치료 방법을 제공한다.

- 25 상기 개체는 소, 말, 코끼리, 돼지, 쥐, 인간, 사슴, 다람쥐, 토끼, 호랑이, 사자, 늑대, 염소, 표범, 곰, 고래, 물개, 박쥐, 고양이, 참새, 제비, 꿩, 매, 독수리, 고니, 천둥오리, 펭귄, 비둘기, 타조, 앵무, 뱀, 도마뱀, 거북이, 악어, 개구리, 두꺼비, 도롱뇽, 붕어, 메기, 잉어, 가물치, 농어, 조기, 고등어, 꽂치, 갈치, 쏘가리, 광어, 우럭 또는 가오리 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 조성

물이 투여될 수 있는 개체가 제한 되는 것은 아니다.

본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 본 발명의 오스모틴을 인지기능 장애 예방 및 치료방
5 법에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 관련 질환 예방방법을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애 관련 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 관련 질환 치료방법을 제공한다.

상기 상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된
15 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 본 발명의 오스모틴을 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료방법에 유용하게 사용될 수 있다.

20

또한, 본 발명은 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

25 상기 상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸

및 신경퇴행이 완화시키므로, 본 발명의 오스모틴을 인지기능 장애 또는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약제적 조성물의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

아울러, 본 발명은 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도를 제공한다.

상기 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미하는 것이다.

상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펔트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 오스모틴은 A β 에 의한 기억 손상 및 시냅스독성을 개선시키고, A β 의 축적, BACE-1의 과발현 및 tau 과인산화가 억제하며, A β 에 의한 세포사멸 및 신경퇴행이 완화시키므로, 본 발명의 오스모틴을 인지기능 장애 또는 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 개선용 건강식품의 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 퇴행성 뇌질환 랫트의 제조

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, U.S.A)에서 구매한 수컷 C57BL/6J 마우스(25-30 g, 8 주)는 12시간씩 낮/밤 주기 (낮;08:00-20:00) 및 23℃ 온도, 60±10% 습도가 유지된 조건에서 물과 먹이는 자유롭게 섭취하도록 하여 적응시켰다. 상기 마우스는 각각 생리식염수를 투여한 대조 마우스 그룹(C, n=5), 아밀로이드 β (A β) 투여 후 3 일 된 마우스 그룹(A β 3, n=5), 아밀로이드 β 투여 후 40 일 된 마우스 그룹(A β 40, n=5), 아밀로이드 β 투여 3 일 후

오스모틴(osmotin) 처리 마우스 그룹($A\beta$ 3+0s, n=5) 및 아밀로이드 β 투여 40 일 후 오스모틴 처리 마우스 그룹($A\beta$ 40+0s, n=5), 5 그룹으로 퇴행성 뇌질환 동물 모델을 제작하였다.

구체적으로, β -아밀로이드(1-42)(β -amyloid, $A\beta$) 단백질(Sigma Chemical Co., MO))을 증류수에 녹여(1 mg/ml) 4일간 37°C에서 배양하여 응집하였다. 응집된 $A\beta$ 1-42 또는 소포체(vehicle)(3 μ l/5분/마우스) 주입 직전 동물들은 조리틸(Zolatil) 0.1 ml/100 g체중과 럼퐁(Rompun) 0.05 ml/100 g체중을 사용하여 마취시킨 후, Stereotoxic instrument에 부착된 해밀턴 실린저를 사용하여 실험 마우스 그룹에는 브레그마(bregma) 부위(AP(anteroposterior) = -0.2 mm; ML(mediolateral) = 1 mm, DV(dorsoventral) = -2.4 mm)에 ICV(intracerebroventricular) 주입하였다. 또한, 오스모틴을 염제 적응(salt-adapted) 배양된 타바코 세포(tobacco cell)에서 정제하고 Singh, N. et al.에 기재된 방법으로 변형한 후, 오스모틴 투여 실험 마우스 그룹에 투여하였다. $A\beta$ 3+0s 및 $A\beta$ 40+0s 마우스 그룹 각각 β -아밀로이드를 투여하고 3 일 및 40 일 후, 상기 생리식염수로 녹인 상기 오스모틴 15 μ g/g체중의 양으로 4 내지 12 시간 복강내 투여하였다. 대조 마우스 그룹(C)는 생리식염수를 투여하였다.

<실시예 2> 오스모틴에 의한 $A\beta$ -유도 기억 손상 개선 확인

$A\beta$ 투여의 의해 유도된 기억 손상에 있어서 오스모틴의 영향을 확인하기 위하여, 단기 행동 기억 정도를 Y-maze에서의 자발적인 교차 행동량(spontaneous alternation behavior)을 기록함으로써 평가하였다.

구체적으로, Y자형 미로 측정 장치는 검은 색으로 칠해진 목재로, 3개의 통로(arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며, 각 가지는 길이 50 cm, 높이 20 cm, 폭 10 cm이고 동일한 각도로 위치한다. 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 5 그룹의 마우스는 기구의 중앙에 놓았고, 세 차례 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 하였다. 동물의 움직임은 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것(arm entry)으로 본다. 동물의 움직임을 교차횟수(alternation)로 나타내는데, 교차횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의된다. 자발적인 교차 행동량은 실제

교차횟수와 최대 가능한 교차횟수(즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분비이다. 높은 자발적 교차 행동량은 행동의 상승으로 간주된다. 각 군당 5 마리의 평균치와 표준평균오차(Mean±SEM)를 구하였다. 상기 5 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다.

그 결과, 도 1 및 표 1에 나타난 바와 같이, 대조 마우스 그룹(C)과 비교하여 A β 를 투여한 마우스 그룹의 경우, 3 일(A β 3) 및 40 일(A β 40) 후 자발적 교차 행동량이 감소하는 것을 확인함으로써, A β 에 의해 기억력 장애가 유도됨을 확인하였다. 반면, 오스모틴을 투여한 마우스 그룹의 경우, A β 를 처리한 마우스 그룹에 비해 자발적 교차 행동량이 증가하는 것을 확인함으로써, 자발적인 행동 변화가 유의적으로 증가하는 것을 확인함으로써, 오스모틴이 A β 유도 기억 손상을 개선함을 확인하였다(도 1 및 표 1).

【표 1】

실험 그룹	실제 교차횟수의 평균/그룹	최대 가능한 교차 횟수	교차 행동량(%)/그룹
대조	36	82	45%
A β 3	28	80	35.89%
A β 40	18	59	31.57%
A β 3+Os	33	84	40.24%
A β 40+Os	24	64	37.5%

<실시예 3> 오스모틴에 의한 A β -유도 시냅스독성(synaptotoxicity) 개선 확인

A β 처리 후 시냅스 보전(synaptic integrity)을 평가하기 위하여, 웨스턴 블롯팅(western blotting) 및 면역형광분석법(immunofluorescence analysis)을 수행하였다.

구체적으로, 시냅스전 소포막단백질(presynaptic vesicle membrane protein)의 발현을 확인하기 위하여 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 5 그룹의 마우스로부터 뇌 조직을 적출하고, 상기 적출한 뇌 조직을 프로티아제

억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail)이 포함된 0.2 M PBS로 균질화하였다. 그 다음, BioRad protein assay kit(BioRad Laboratories, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하고, 25 μ g 단백질을 4-12% Bolt™ 미니 겔(Novex, Life Technologies)을 이용하여 전기영동한 후, Immobilon-P Transfer Membrane(Millipore Corporation, Billerica, MA)으로 전달시켰다. 그 다음, 5% 탈지분유(skim milk)로 30분간 블라킹(blocking)한 후, 1차 항체를 1:1000으로 희석하여 4°C에서 하루 동안 처리하였다. 상기 막에 붙은 일차 항체(primary antibody)에 HRP가 접합된 이차 항체(HRP-conjugated secondary antibody)를 붙이고, 이를 ECL을 이용하여 확인하였다(도 2a, 위). 일차 항체로 시냅토파이신(synaptophysin) 및 β -actin를 사용하였다. 또한, X-레이 필름에 투영하고 Sigma Gel 프로그램, 버전 1.0(SPSS, Chicago, IL, USA) 기반 밀도계(densitometry)를 이용하여 투영된 밴드의 밀도를 정량화하였다. 각 군당 5-6 마리의 평균치와 표준평균오차(Mean $\pm$ SEM)를 구하였다. 상기 5 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다(도 2a, 아래).

또한, 조직 분석(n=5/그룹)을 위하여 상기 <실시에 1>와 같이 A β 를 처리한 마우스, A β 및 오스모틴을 처리한 마우스 및 대조군 마우스의 뇌를 적출하였다. 그 다음, 상기 적출한 뇌를 4% 차가운 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 침투하고 4% 파라포름알데히드로 72시간 동안 고정한 후 20% 수크로오스(sucrose)로 72 시간 이동시켰다. 뇌는 O.C.T 화합물(A.O, USA)로 동결하고, CM 3050Cryostat(Leica, Germany)를 이용하여 14 μ m 관상(coronal) 섹션화 하였다. 상기 섹션은 probe-on plus charged slides(Fisher, USA)에 올려놓았다. 상기 슬라이드는 0.01 M PBS로 15 분 동안 2 번 세척한 후, 프로티나제-K(proteinase-k)를 첨가하여 37°C, 5 분 동안 배양하였다. 그 다음, 30% 과산화수소가 포함된 메탄올 용액으로 10 분 동안 담금질하고 5% 정상 고트 혈청(normal goat serum) 및 PBS로 용해한 0.3% Triton X-100이 포함된 차단 용액으로 1 시간 동안 배양하였다. 차단 후, 상기 슬라이드에 레빗(rabbit) 항-시냅토파이신(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)을 차단 용액 1:100으로 희석하여 하루 동안 처리하였다. 그 다음 상기 슬라이드를 고트-항 레빗 TRITC-

표지된 항체(Santa Cruz Biotechnology, 1:50, 빨강)로 1.5 시간 동안 배양하였다. 또한, A β 발현을 확인하기 위하여, 상기와 같이 일차 항체로 마우스-항-A β (1:100) 및 이차 항체로 레빗 항-마우스 FITC-표지된 항체(Santa Cruz Biotechnology, 초록)로 반응시켰다. 그 다음, Prolong Antifade Reagent (Molecular Probe, Eugene, OR, USA)을 처리하고 공초점 레이저 현미경(Fluoview FV 1000)을 이용하여 시각화하고(배율 40x, 스케일바(scale bar)= 50 μ m)(도 2b, 왼쪽), 각 섹션당 양성 세포의 수를 그래프화하였다(도 2b, 오른쪽). 상기 3 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다($p < 0.001$).

그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, A β 를 처리한 마우스 그룹에서 3 일 후 시냅토파이신 단백질 발현이 감소하고, 40 일 후 시냅토파이신 단백질 발현이 현저하게 감소하는 반면, 오스모틴을 처리한 경우 A β 만 처리한 마우스와 비교하여 3 일 및 40 일에 시냅토파이신 단백질 발현 억제가 감소하고 시냅토파이신 발현이 증가함을 확인함으로써, A β 에 의해 시냅스 장애가 유도되고, 오스모틴에 의해 시냅스 장애가 개선됨을 확인하였다(도 2a).

또한, 도 2b에 나타난 바와 같이, A β 투여로 시냅토파이신-양성 과립(granules)(빨강, TRITC-표지)의 수가 감소하고, 해마(hippocampus)의 CA3 부위에서 A β 의 축척(녹색 FITC-표지)이 증가하는 반면, 오스모틴을 처리한 경우 축척되는 A β 수가 감소하고, 시냅토파이신 과립의 수를 현저하게 증가시키는 것을 확인하였다(도 2b). 따라서, 상기 결과를 통해 오스모틴이 A β 유도 시냅스독성을 개선함을 확인하였다.

<실시예 4> 오스모틴에 의한 A β 축적 및 BACE-1 과발현 완화 확인

A β 투여가 A β 축적을 촉진하는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 획득한 5 그룹의 뇌를 적출한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 일차 항체로 항-A β , β -부위 APP 절단 효소인 BACE-1을 확인하기 위한 항-BACE1 및 β -actin를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, 정량화하였다. 각 군당 5-6 마리의 평균치와

표준평균오차(Mean±SEM)를 구하였다. 상기 5 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인간의 차이를 검증하였다.

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 A β 처리한 마우스에서 3 일(A β 3) 및 40(A β 40) 일 후, A β 의 수준이 증가하고, 특히, A β 3 그룹보다 A β 40 그룹의 A β 수준이 현저하게 증가하는 반면 오스모틴을 투여한 두 그룹, A β 3+0s 및 A β 40+0S 그룹 모두 A β 의 단백질량이 감소하는 것을 확인함으로써, 오스모틴 처리는 A β 의 영향을 개선하고, A β 의 축적을 억제함을 확인하였다. 또한, 대조군에 비해 A β 3 및 A β 40 그룹 모두 A β 투여한 경우, A β 의 발현 양상과 유사하게 BACE-1 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 흥미롭게도, A β 3 그룹의 BACE-1 발현이 A β 40 그룹의 BACE-1 발현보다 증가하는 것을 확인함으로써, 피드백 기전이 잠재적으로 포함됨을 확인하였다. 한편, 오스모틴을 투여한 마우스 그룹의 경우, A β 만 투여한 마우스 그룹에 비해 활성화된 BACE-1 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인함으로써, A β 에 의해 활성화된 BACE-1 발현이 오스모틴에 의한 완화됨을 확인하였다(도 3).

<실시에 5> 오스모틴에 의한 A β 유도 tau 과인산화(hyperphosphorylation) 완화 확인

tau 과인산화(hyperphosphorylation)에 영향을 미치는 Akt/GSK3 β 신호 기전의 잘못된 조절은 알츠하이머병(alzheimer disease, AD)에서 나타난다. 따라서, 오스모틴이 A β 유도에 의한 tau 과인산화(hyperphosphorylation)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅 및 면역형광분석법을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시에 1>에 기재된 방법으로 획득한 5 그룹의 뇌를 적출한 후, 상기 <실시에 3>과 같이 일차 항체로 항-pAkt(ser473), 항-pGSK3 β (Ser9), 항-p-Tau 및 항- β -actin을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, 정량화하였다. 각 군당 5-6 마리의 평균치와 표준평균오차(Mean±SEM)를 구하였다. 상기 5 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인간의 차이를 검증하였다(도 4a).

또한, 조직 분석(n=5/그룹)을 위하여 상기 <실시에 1>와 같이 A β 를 처리한

마우스, A β 및 오스모틴을 처리한 마우스 및 대조군 마우스의 뇌를 적출하였다. 그 다음, 상기 <실시에 3>과 같이 일차 항체로 마우스-항-A β (1:100) 또는 레빗 항-p-Tau(1:100)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로 반응시키고, 이차 항체로 레빗 항-마우스 FITC-표지된 항체(Santa Cruz Biotechnology, 초록) 또는
 5 고트-항 레빗 TRITC 표지된 항체(빨강)로 반응시킨 후, Prolong Antifade Reagent (Molecular Probe, Eugene, OR, USA)을 처리하고 공초점 레이저 현미경(Flouview FV 1000)을 이용하여 시각화하여 해마의 CA3 부위(도 4b) 및 DG 부위(도 4c)의 p-Tau를 확인하였다. 상기 3 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를
 10 검증하였다(배율 40x, 스케일바= 50 μ m, 항-p-tau $p < 0.05$, 항-A β $p < 0.001$).

그 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 A β 3 및 A β 40 마우스 그룹에서 Akt 473 번 세린(serine) 및 GSK3 β 9 번 세린의 인산화가 감소하고, tau의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다. 특히, A β 3 그룹보다 A β 40 그룹에서 Akt 및 GSK3 β 의 인산화가 더욱 감소하고, tau의 인산화가 더욱 증가하는 것을
 15 확인하였다. 반면, 오스모틴을 투여한 그룹의 경우, A β 만 투여한 마우스 그룹과 반대로 Akt 및 GSK3 β 의 인산화가 증가하고, tau의 인산화가 감소하는 것을 확인함으로써, A β 에 의해 Akt/GSK3 β 의 인산화가 억제되고 tau의 인산화가 촉진되며, 오스모틴에 의해 A β 유도 tau 과인산화가 완화됨을 확인하였다(도 4a).

또한, 도 4b 및 도 4c에 나타낸 바와 같이, 웨스턴 블롯팅 결과와 유사하게
 20 A β 를 투여한 마우스에서 A β 및 p-tau가 해마의 CA3 부위(도 4b) 및 DG 부위(도 4c)에서 증가하는 반면, 오스모틴을 투여한 마우스에서 A β 및 p-tau 발현이 감소하는 것을 확인함으로써, 오스모틴에 의해 A β 유도 tau 과인산화를 억제함을 확인하였다.

25 <실시에 6> 오스모틴에 의한 A β 유도 세포사멸(apoptosis) 및 신경퇴행증(neurodegeneration) 억제 확인

A β ₁₋₄₂는 세포사멸 유발(pro-apoptotic) p53 단백질의 발현을 활성화하여, 해마 신경(hippocampal neurons)에 있는 카스파제(caspases)의 활성화를 증대한다(Culmsee, C. et al., *J. Neurochem*, 2001, 77, 220-228). 따라서,

오스모틴이 A β 를 처리한 마우스의 해마에서 p53 중개 카스파제 세포사멸 신호를 통해 신경 세포사멸을 억제하는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅, 면역조직화학염색법(immunohistochemistry) 및 Nissl 염색을 수행하였다.

구체적으로, 상기 <실시에 1>에 기재된 방법으로 획득한 5 그룹의 뇌를 적출한 후, 상기 <실시에 3>과 같이 일차 항체로 항-p53, 항-카스파제-9, 항-카스파제-3, 항 PARP-1 및 항- β -actin을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, 정량화하였다. 각 군당 5-6 마리의 평균치와 표준평균오차(Mean $\pm$ SEM)를 구하였다. 상기 5 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다(도 5a).

또한, 조직 분석(n=5/그룹)을 위하여 상기 <실시에 1>와 같이 A β 를 처리한 마우스, A β 및 오스모틴을 처리한 마우스 및 대조군 마우스의 뇌를 적출하였다. 상기 적출한 뇌를 상기 <실시에 3>과 같이 섹션화하였다. 상기 섹션은 probe-on plus charged slides(Fisher, USA)에 올려놓았다. 상기 슬라이드를 0.01 M PBS로 15 분 동안 2 번 세척하고 프로티나제-K를 첨가하여 37°C, 5 분 동안 배양하였다. 그 다음, 30% 과산화수소가 포함된 메탄올 용액으로 10 분 동안 담금질하고 5% 정상 고트 혈청(normal goat serum) 및 PBS로 용해한 0.3% Triton X-100이 포함된 차단 용액으로 1 시간 동안 배양하였다. 차단 후, 상기 슬라이드에 항-카스파제-3 항체(Cell Signaling Technology, Beverly MA)를 차단 용액 1:100으로 희석하여 반응시켰다. 그 다음, 바이오틴화된 고트 항-레빗 이차항체를 PBS 1:500으로 희석하여 1 시간 동안 반응시키고, ABC reagents (Standard Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)으로 암실에서 상온으로 1 시간 동안 반응을 종결하였다. 상기 슬라이드를 PBS로 2 번 세척하고, DAB(3, 3'-Diaminobenzidine tetra hydrochloride)에서 반응시킨 후, 헤마톡실린(hematoxylin)으로 카운터스테이닝(counterstaining)하였다. 그 다음, 멸균수로 세척하고, 에탄올(70%, 95% 및 100%)로 탈수하고, 자일렌(xylene)을 처리한 후, 마운팅(mounting) 용액을 이용하여 커버슬라이드를 덮었다. 그 다음, 컴퓨터화된 이미지 분석을 이용하여 해마의 CA3 및 DG 부위에서 활성화된 카스파제-3-양성 세포의 수를 측정하였다(스케일바= 20 μ m). 상기 3 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후,

Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다(도 5b).

또한, 세포사멸 범위를 평가하기 위하여 Nissl 염색을 수행하였다. 상기와 같이 색션화한 슬라이드를 0.01 M PBS로 15 분 동안 2 번 세척하고 소량의 빙초산을 포함한 0.5% 크레실 바이올렛(cresyl violet) 용액으로 10 내지 15 분 동안 염색하였다. 그 다음, 멸균수로 세척하고 에탄올(70%, 95% 및 100%)로 탈수하고, 자일렌을 처리한 후, 마운팅 용액을 이용하여 커버슬라이드를 덮었다. 그 다음, 컴퓨터화된 이미지 분석을 이용하여 해마의 CA1, CA3 및 DG 부위에서 세포의 수를 측정하였다(스케일바= 20 μ m). 상기 3 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다(도 5c).

그 결과, 도 5a에 나타낸 바와 같이, A β 를 투여한 그룹, A β 3 및 A β 40 그룹은 대조군 그룹보다 p53의 수준이 증가하는 반면, A β 를 투여한 마우스에 오스모틴을 처리한 경우 A β 만 투여한 그룹에 비해 p53의 수준이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 한편, 카스파제는 세포사멸의 개시 및 수행에 관여하는 세린-아스파틸 프로테아제(serine-aspartyl protease)이다. 카스파제-9(caspase-9)는 개시 카스파제이다. 카스파제-3은 다양한 다른 카스파제, 예를 들어 카스파제-9의 다운스트림(downstream)으로 활동하는 수행 카스파제이다. 웨스턴 블롯팅 결과, A β 를 투여한 마우스 그룹이 대조 그룹에 비해 3 일(A β 3) 및 40(A β 40) 일 후에 카스파제-9의 활성이 증가하는 반면, 오스모틴을 투여한 경우 A β 만 투여한 마우스 그룹에 비해 3 일(A β 3+Os) 및 40 일(A β 40+Os) 후 해마에서 A β 에 의해 유도되는 카스파제-9의 활성이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 상기와 유사하게 대조군에 비해 A β 3 및 A β 40 마우스 그룹에서 활성화된 카스파제-3의 수준이 증가하는 반면, 오스모틴을 투여한 경우 A β 에 의해 유도되는 활성 카스파제-3의 발현이 완화되고, A β 만 투여한 마우스 그룹에 비해 3 일 및 40 일 후 카스파제-3의 수준이 감소함을 확인함으로써, 오스모틴이 A β 에 의한 카스파제-9 발현 증가 및 활성화된 카스파제-3 발현 축진을 완화함을 확인하였다(도 5a).

폴리(ADP-리보오스) 폴리머라아제-1(poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1)은 DNA 손상에 관여하고, 흥분독성 손상(excitotoxic insults)에 의한 PARP-1의

과발현은 신경퇴행증을 유발한다(Berger, N. A., *Radiat. Res*, 1985, 101, 4-15). A β 펩타이드(peptide)는 성인 쥐의 해마에서 PARP-1의 활성화를 촉진하고, PARP-1은 카스파제-3의 활성을 통해 절단되며, 그 후, 세포사멸 및 신경세포 죽음이 발생한다(Sairanen, T. et al., *Acta Neuropatho*, 2009, 118, 541-552). 웨스턴

5 블롯팅 결과, 절단된 PARP-1의 수준은 대조군 그룹에 비해 A β 3 및 A β 40 마우스 그룹에서 증가하는 반면, 오스모틴을 처리한 경우 A β 만 처리한 그룹에 비해 해마에서 PARP-1 절단이 감소함을 확인하였다. 따라서, 상기 결과를 통해 A β 를 투여한 마우스의 해마에서 PARP-1 절단이 증가한 카스파제-3 활성을 반영하고, 이로 인해 세포사멸 및 신경퇴행증이 발생함을 확인하였다(도 5a).

10 또한, 도 5b에 나타낸 바와 같이, A β 를 투여한 마우스에서 해마의 CA3 및 DG(dentate gyrus) 부위에 강하게 활성화된 카스파제-3 면역반응력(immunoreactivity)를 가진 손상되고 죽은 신경(카스파제-3 양성 세포)이 포함되어 있음을 확인하였다. 반면, A β 만 투여한 마우스의 CA3 및 DG 부위에 비해 오스모틴 투여 후, 활성화된 카스파제-3 양성 세포의 수가 현저하게

15 감소하는 것을 확인하였다(도 5b).

또한, 도 5c에 나타낸 바와 같이, DG, CA3 및 CA1 부위에서 신경의 수는 대조군 그룹에 비해 A β 투여한 마우스에서 감소하는 반면, A β 만 처리한 마우스 그룹에 비해 오스모틴을 투여한 그룹은 신경의 수가 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 오스모틴에 의해 A β 에 의해 유도되는 신경세포 사멸이 억제되고,

20 해마에서 오스모틴 투여에 의한 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다(도 5c).

<실시예 7> 생체외(*in vitro*) A β_{25-35} 에 의해 유도된 신경 독성에 대한 오스모틴의 효과 확인

오스모틴이 A β 에 의해 유도된 신경세포 독성, 세포 생존능 및 카스파제-3의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Apo-Tox Glo™ 분석을 수행하였다.

25

구체적으로, 신경 HT22 세포(도 6a) 및 임신(GD) 17.5일 흰쥐로부터 준비된 초대배양 해마신경세포(primary hippocampal neuron)(도 6b) 1x10⁴을 96 웰 분석 플레이트에서 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 포함된 100 μ l DMEM 배지로 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24 시간 후,

대조군을 제외한 나머지 웰에 20 μmol $\text{A}\beta_{25-35}$ 를 처리하였다. 그 다음, 24 시간 후 오스모틴 0.2, 0.4 및 0.8 μmol 을 24 시간 동안 처리하였다. 그 후, 상기 모든 웰에 GF-AFC 기질 및 bis-AAF-R110 기질을 포함한 viability/cytotoxicity reagent 20 μl 를 첨가하고 500 rpm으로 30 초간 오비탈 셰이킹(orbital shaking)을 이용해 혼합한 후 1 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 두 파장 400_{Ex}/505_{Em}(viability) 및 485_{Ex}/520_{Em}(cytotoxicity)으로 흡광광도계를 이용하여 형광을 측정하였다. GF-AFC(glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin) 기질은 형광을 띄는 세포 침투성 펩타이드 기질로서, 살아있는 세포에 들어가 세포 내 프로테아제에 의해 절단되어 AFC로 분리되므로 살아있는 세포의 프로테아제 활성 측정을 위해 사용되었다.

10 bis-AAF-R110(bis-alanylalanyl-phenylalanyl-rhodamine 110) 기질은 형광을 띄는 세포 손상 펩타이드 기질로서, 살아있는 세포에 들어가지 못하고, 죽은 세포의 프로테아제에 의해 절단되어 R110으로 분리되므로 죽은 세포의 프로테아제 활성을 측정을 위해 사용되었다. 또한, 카스파제 활성을 측정하기 위하여, 테트라펩타이드(tetrapeptide) 서열 DEVE가 포함된 루미노제닉(luminogenic)

15 카스파제-3 기질을 이용하여 카스파제 활성을 측정하였다. 상기와 같이 웰에 100 μl Caspase-Glo3/7 시약을 첨가하고 500 rpm으로 30 초간 혼합한 후 1 시간 동안 상온에서 배양하였다. 그 다음, 발광분석기로 발광(luminescence)을 측정하였다. 상기 각 군간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행한 후, Student's *t*-test로 변인 간의 차이를 검증하였다($p < 0.05$).

20 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, HT22 세포(도 6a) 및 초대배양 해마신경세포(도 6b) 모두 대조군에 비해 $\text{A}\beta$ 를 처리한 경우, 세포 생존능이 감소하고, 세포 독성 및 카스파제-3의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, 세 가지 서로 다른 농도(0.2, 0.4, 및 0.8 μmol)로 오스모틴을 처리한 경우, 세포 생존능은 상승하고 세포독성 및 카스파제-3 활성이 감소하는 것을

25 확인함으로써, 오스모틴이 $\text{A}\beta$ 유도 신경 독성을 완화함을 확인하였다(도 6a 및 도 6b).

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

<제조예 1> 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조**<1-1> 산제의 제조**

본 발명의 오스모틴 2 g

유당 1 g

5 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<1-2> 정제의 제조

본 발명의 오스모틴 100 mg

옥수수전분 100 mg

10 유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

15 <1-3> 캡슐제의 제조

본 발명의 오스모틴 100 mg

옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

20 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<1-4> 환의 제조

본 발명의 오스모틴 1 g

25 유당 1.5 g

글리세린 1 g

자일리톨 0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

<1-5> 과립의 제조

본 발명의 오스모틴	150 mg
대두 추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

10. <제조예 2> 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조

본 발명의 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<2-1> 밀가루 식품의 제조

본 발명의 오스모틴의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 오스모틴의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 오스모틴의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<2-4> 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 오스모틴의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<2-5> 선식의 제조

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

- 5 본 발명의 오스모틴을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 누에 체액을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

- 10 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
 본 발명의 누에 체액(3 중량부),
 영지(0.5 중량부),
 지황(0.5 중량부)

15 <제조예 3> 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조

<3-1> 건강음료의 제조

 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 오스모틴 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

20

<3-2> 야채 주스의 제조

 본 발명의 오스모틴 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

25 <3-3> 과일 주스의 제조

 본 발명의 오스모틴 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

오스모틴(osmotin)을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 2항에 있어서, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펔트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

15

【청구항 4】

오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 5】

20 오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 6】

25 제 5항에 있어서, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펔트-야콥병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 7】

약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지 기능 장애 예방방법.

【청구항 8】

5 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 치료 방법.

【청구항 9】

10 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지 기능 장애 관련 질환 예방방법.

【청구항 10】

 약학적으로 유효한 양의 오스모틴을 인지기능 장애 관련 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인지기능 장애 관련 질환 치료방법.

15

【청구항 11】

 제9항 및 제10항에 있어서, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 알츠하이머성 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루즈펠트-야곱병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것을 특징으로
20 하는 인지기능 장애 관련 질환 치료방법.

【청구항 12】

 인지기능 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도.

25

【청구항 13】

 인지기능 장애 관련 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 오스모틴의 용도.

【청구항 14】

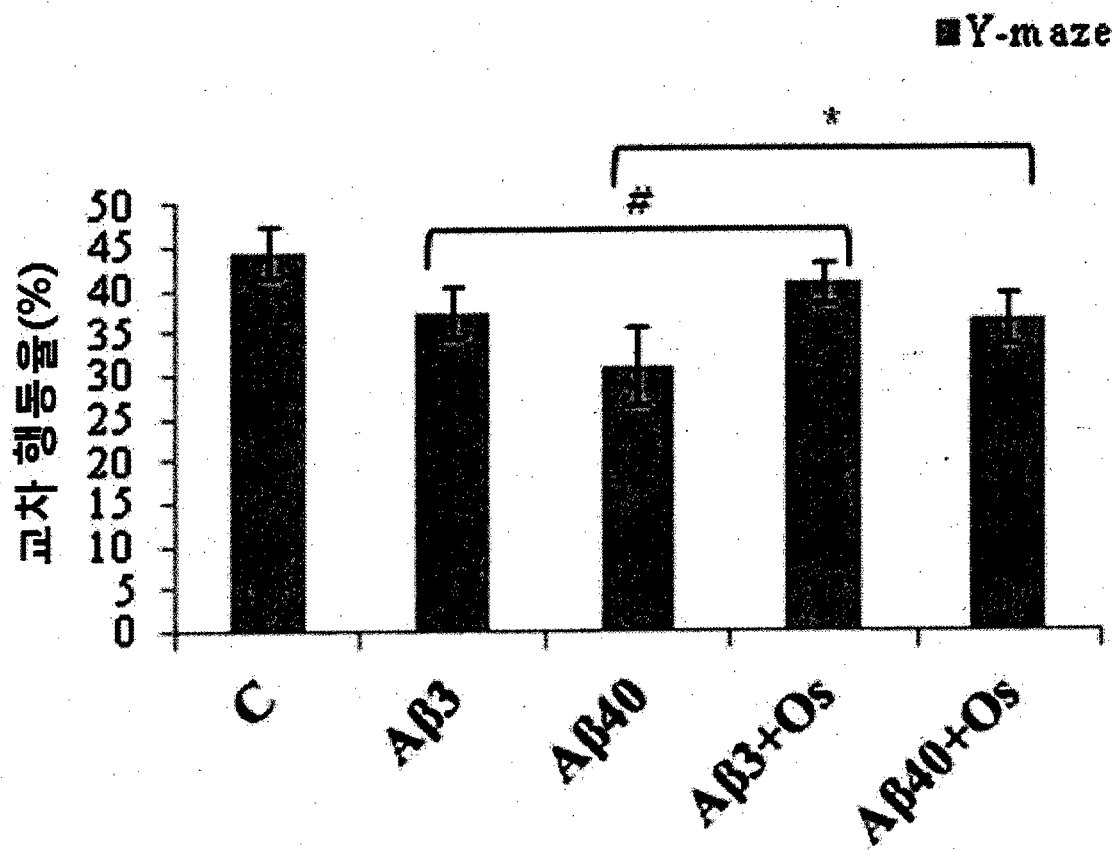
인지기능 장애 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도.

5 【청구항 15】

인지기능 장애 관련 질환 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 오스모틴의 용도.

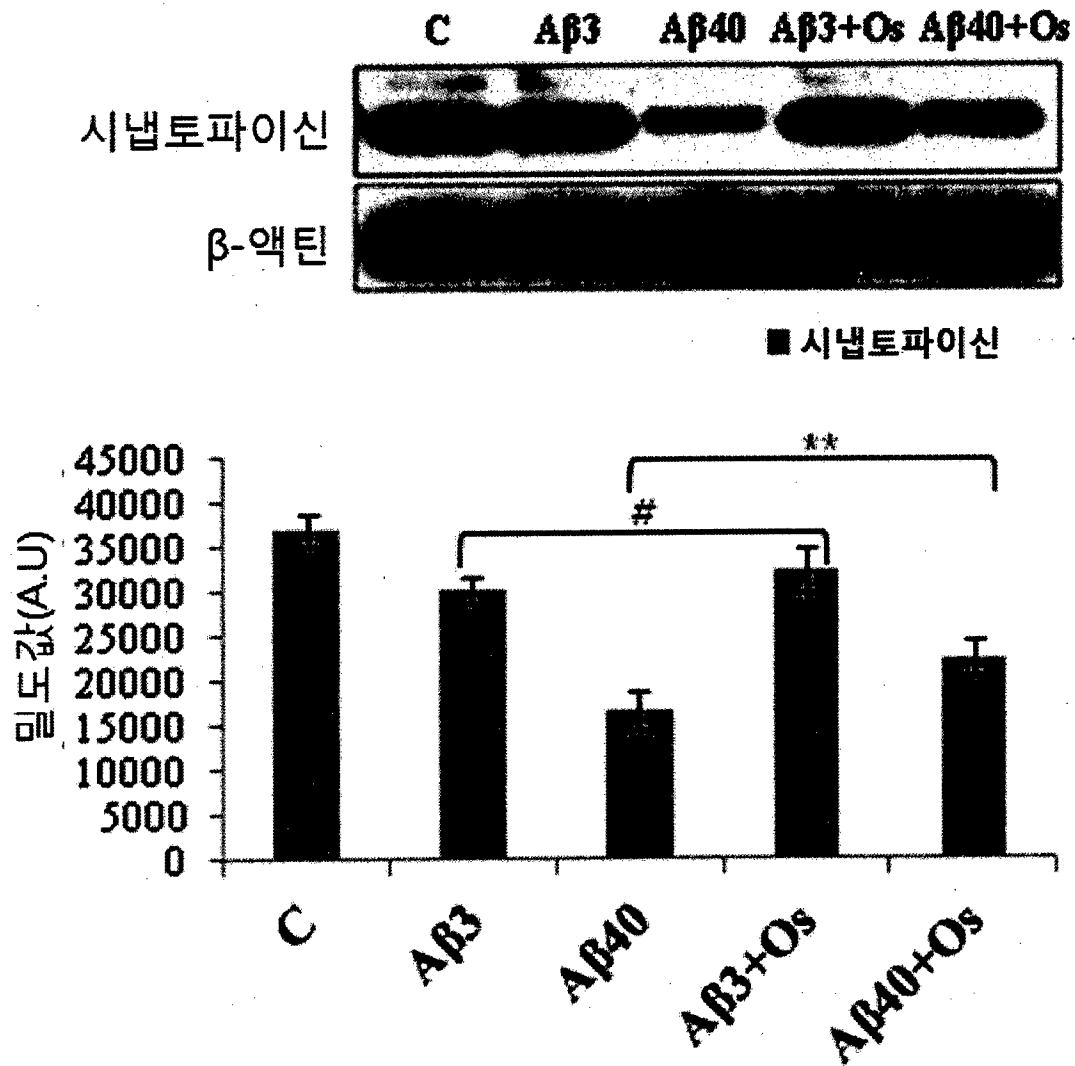
1/12

[도 1]



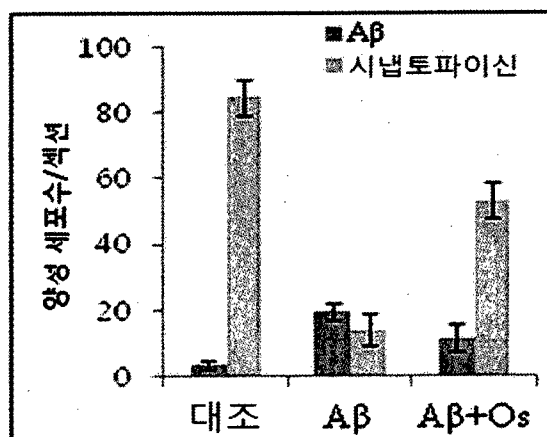
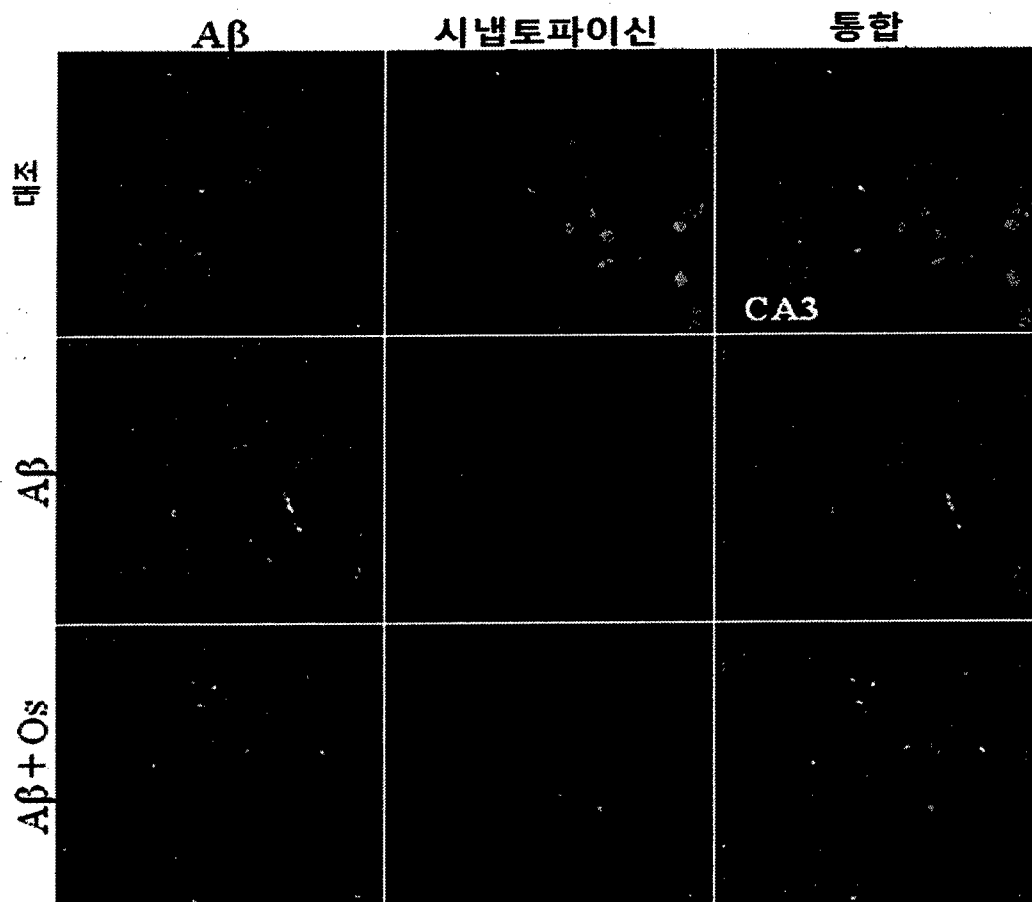
2/12

[도 2a]



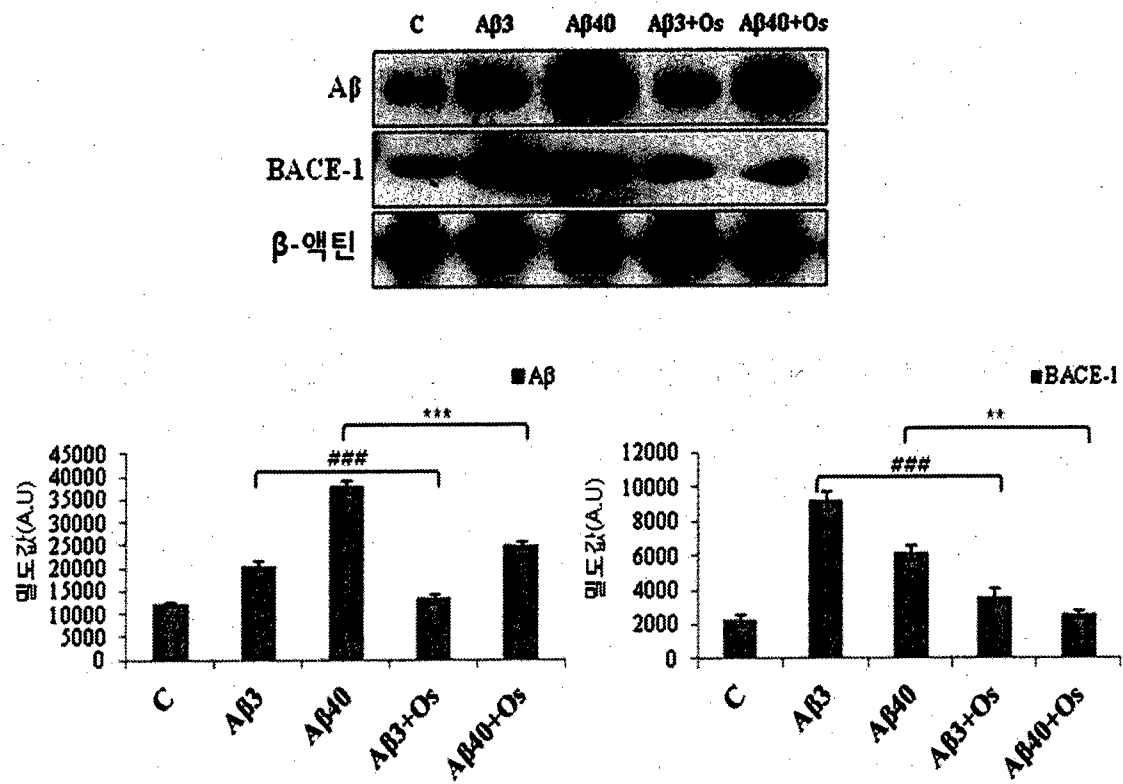
3/12

[도 2b]



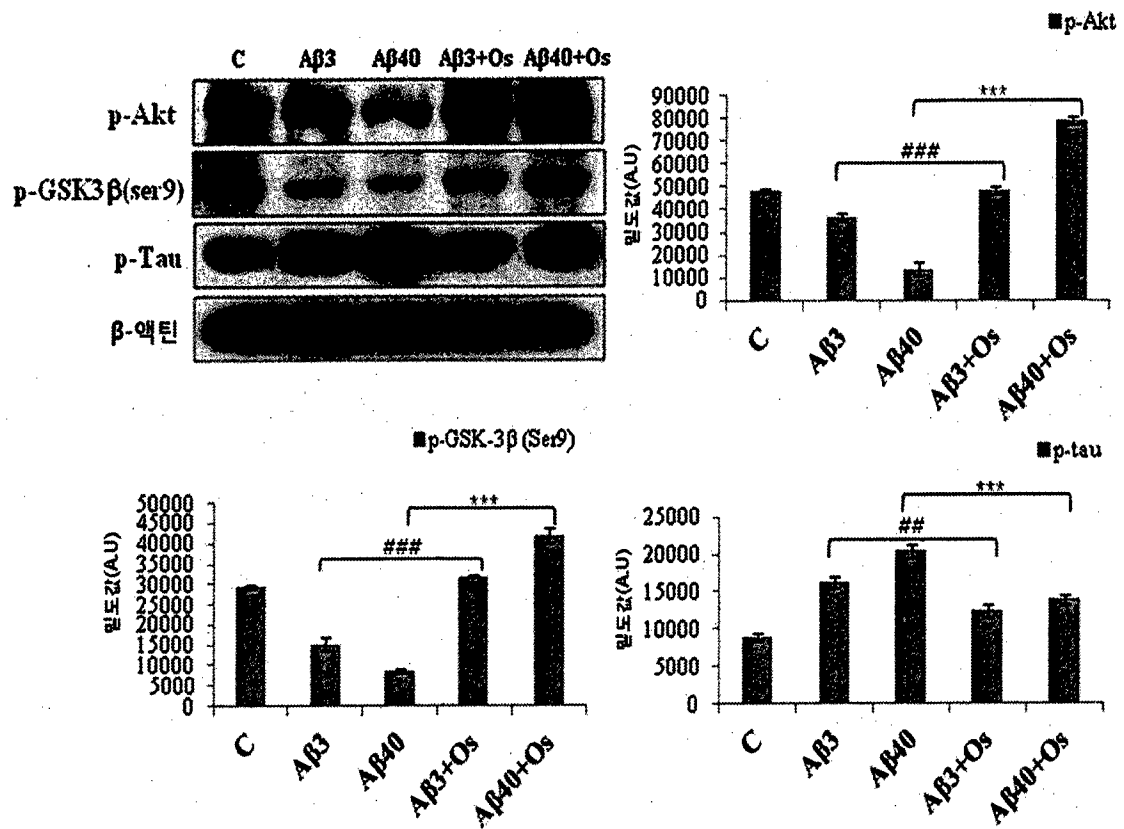
4/12

[도 3]



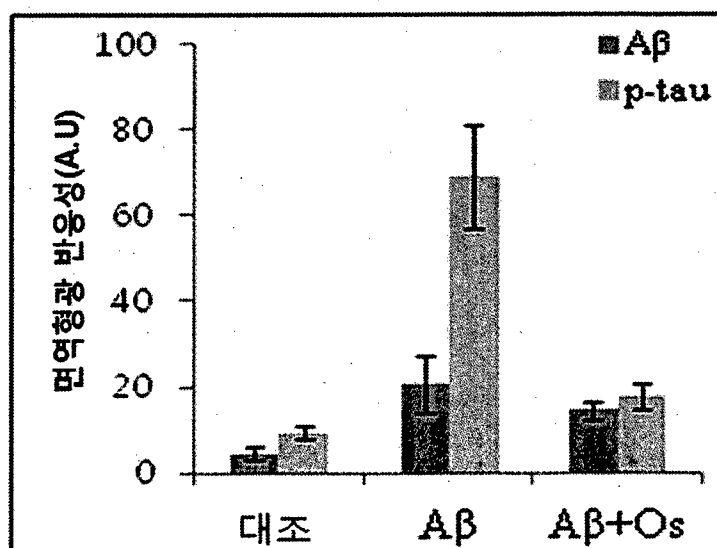
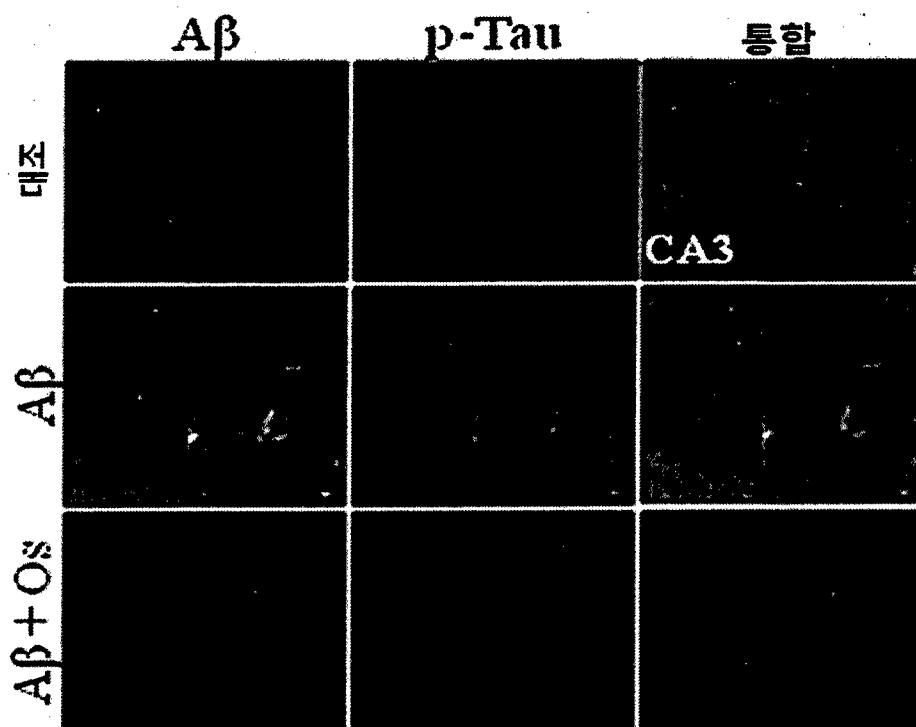
5/12

[도 4a]



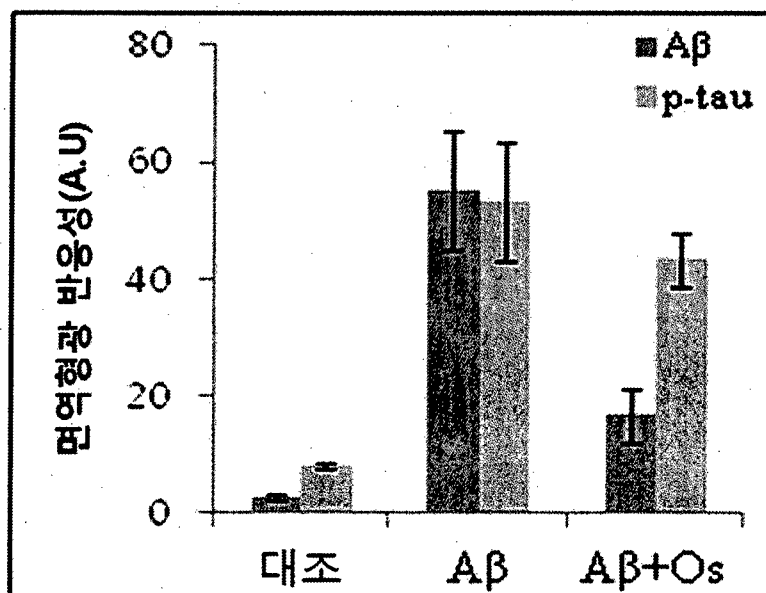
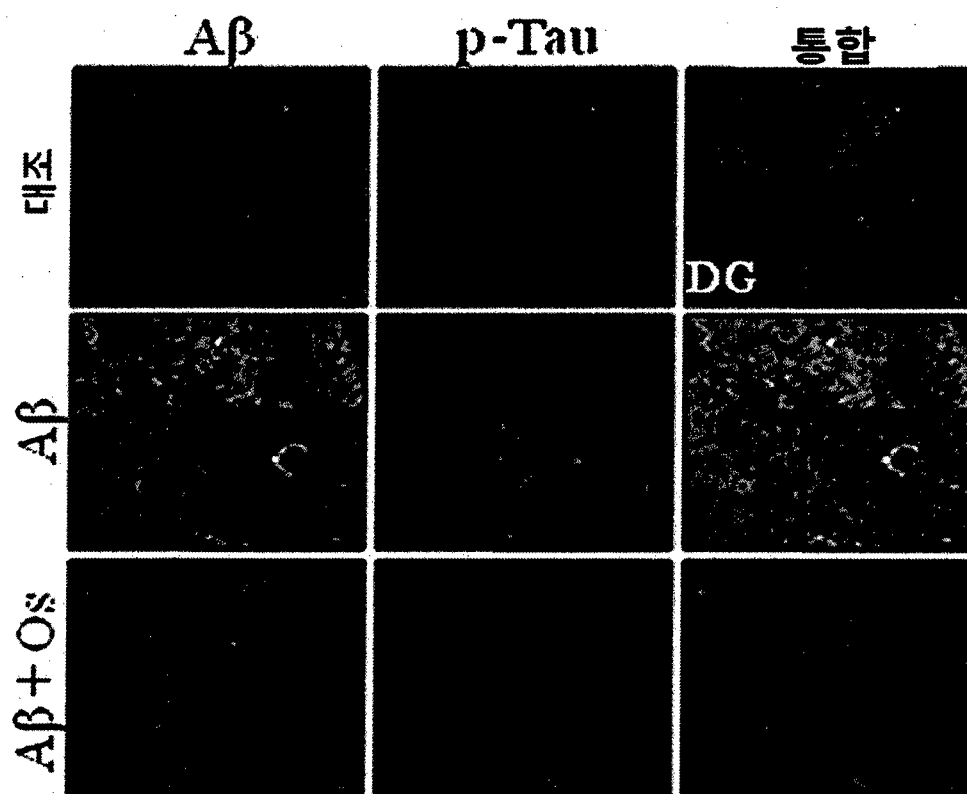
6/12

[도 4b]



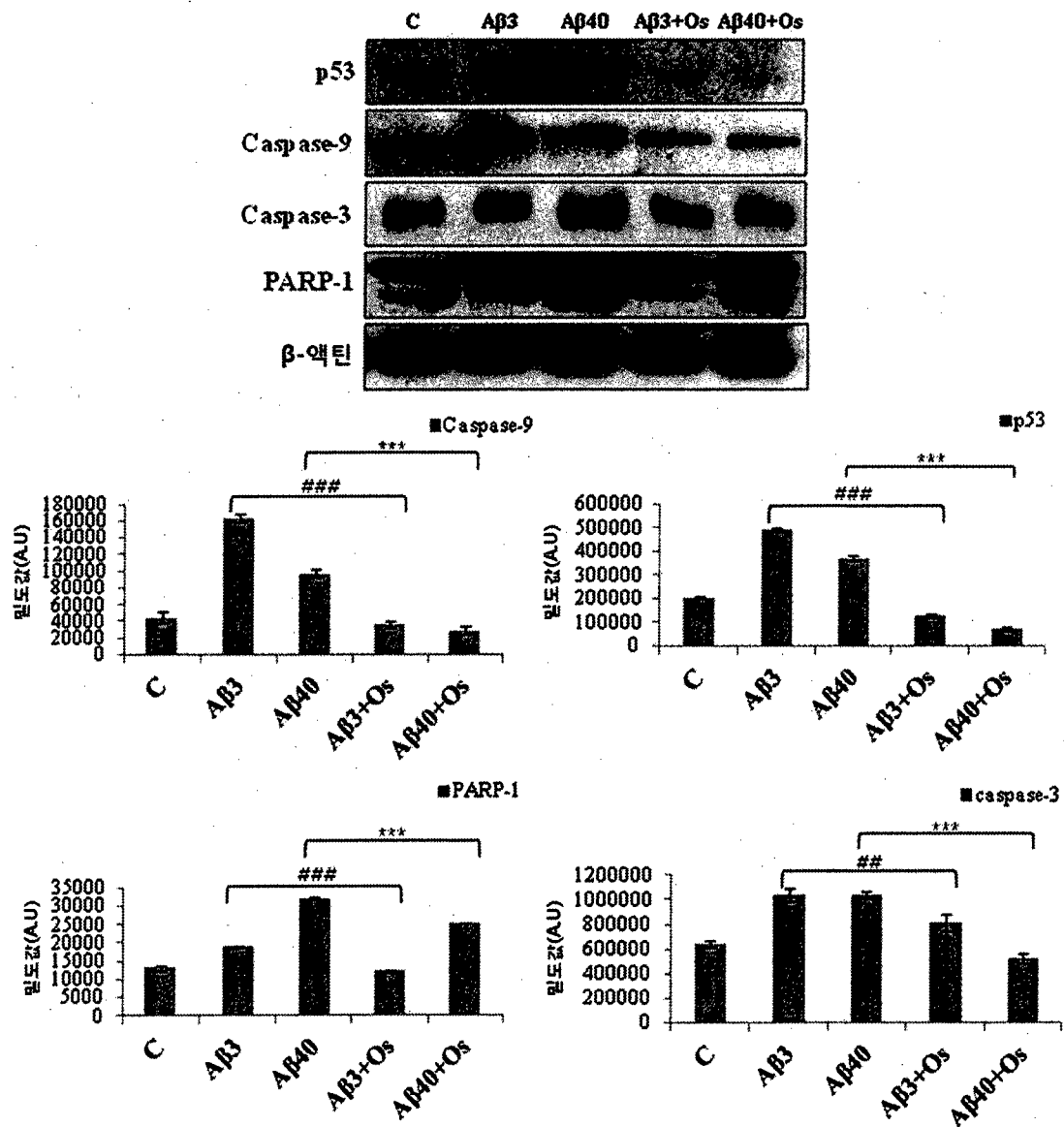
7/12

[도 4c]



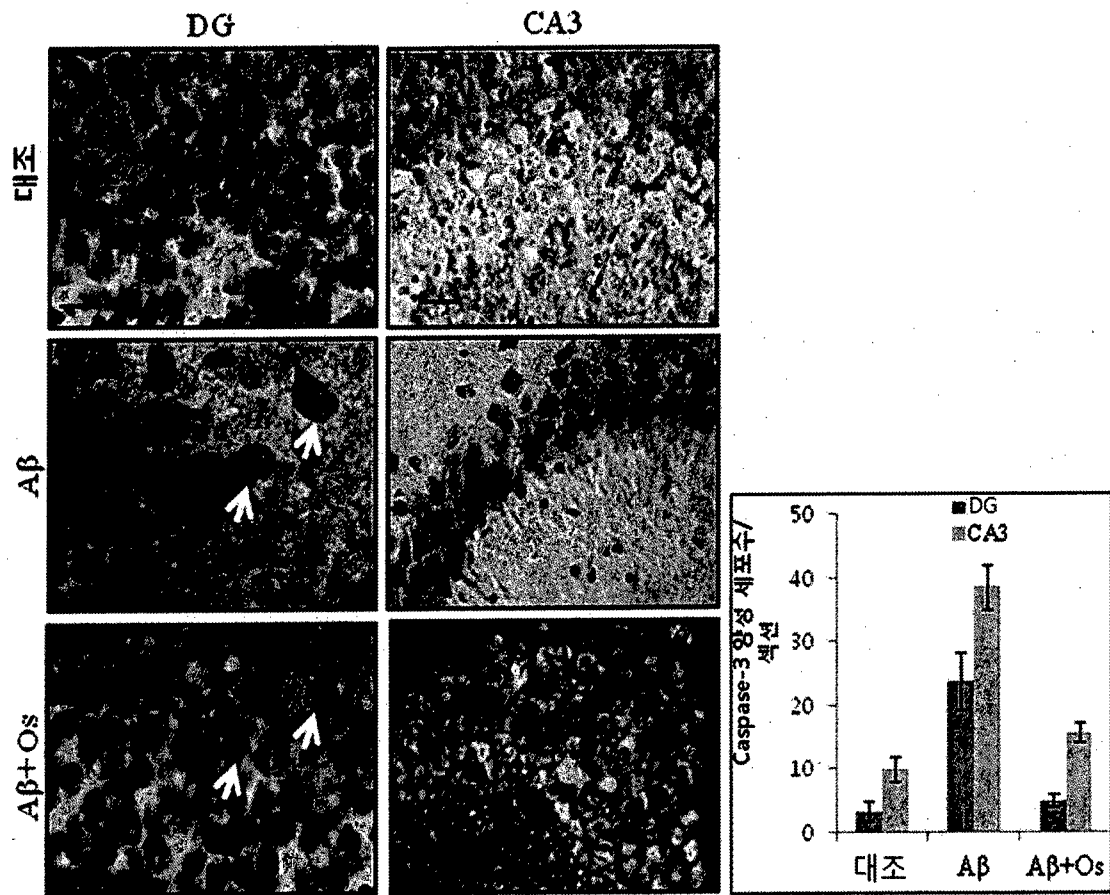
8/12

[도 5a]



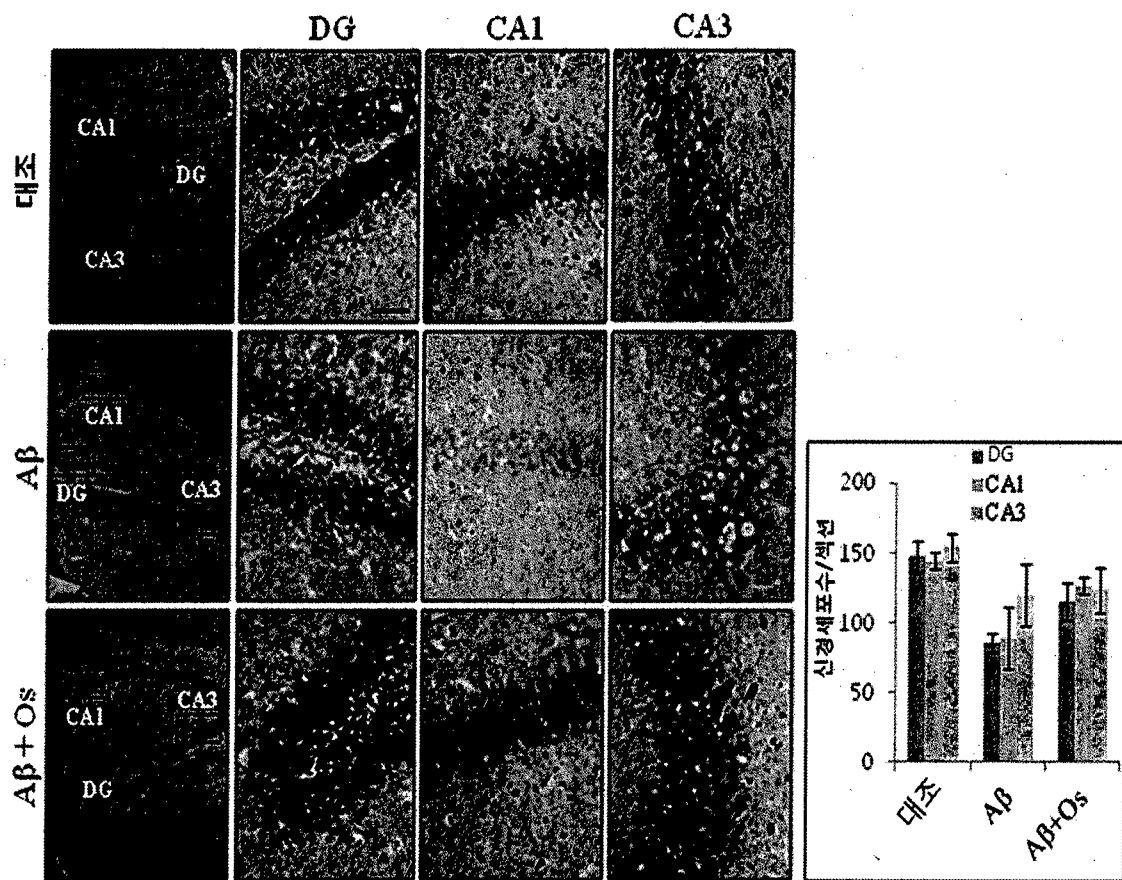
9/12

[도 5b]



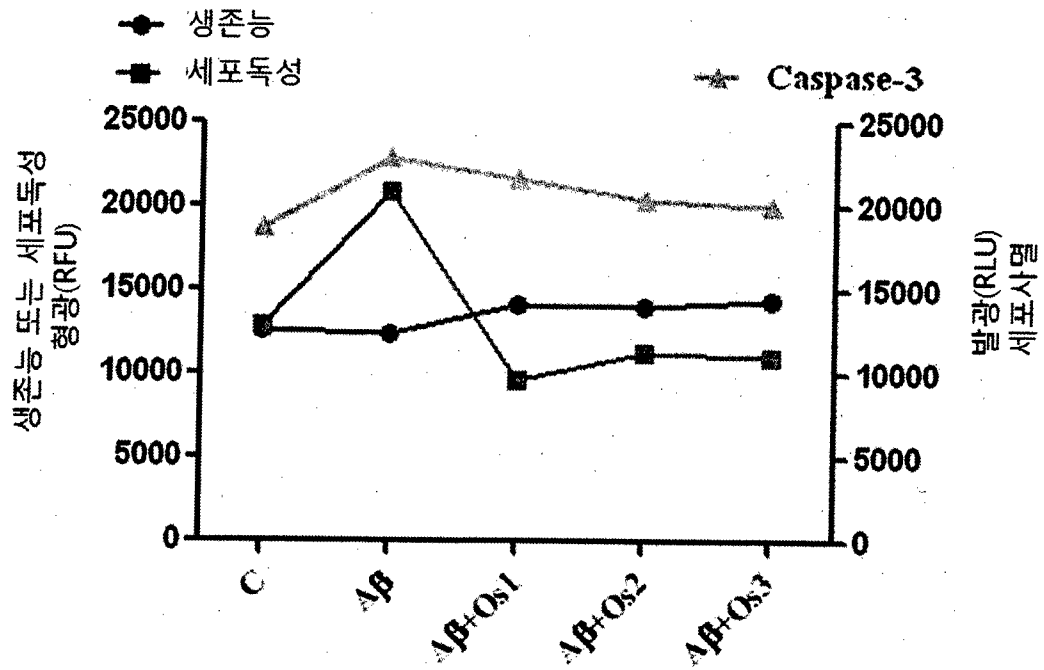
10/12

[도 5c]



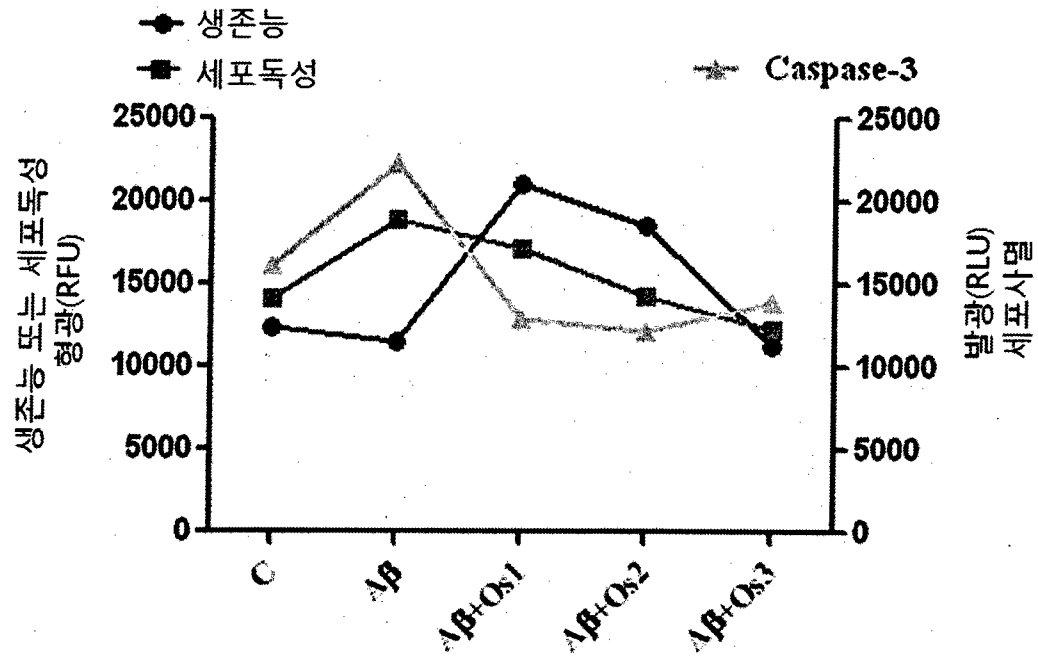
11/12

[도 6a]



12/12

[도 6b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/011873**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/00(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(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 38/00; A61K 31/497; C12N 15/11; A61K 38/44; A61P 25/28; C12Q 1/68; A61K 31/7076; A61K 31/425; A61P 25/16

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, cognitive dysfunctions, alzheimer's disease, dementia, parkinson

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0085260 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 27 July 2011 See abstract and claims 1, 2 and 8.	1-6,12-15
A	KR 10-2013-0031464 A (UNIVERSITY OF SEOUL INDUSTRY COOPERATION FOUNDATION et al.) 29 March 2013 See abstract and claim 1.	1-6,12-15
A	KR 10-2010-0126326 A (GNOSIS S.P.A.) 01 December 2010 See abstract and claim 1.	1-6,12-15
A	MAZAN, M. et al., "Phenotype Analysis of Saccharomyces Cerevisiae Mutants with Deletions in Pir Cell Wall Glycoproteins" Antonie van Leeuwenhoek, vol. 94, no. 2, pages 335-342 (2008) See abstract and page 339.	1-6,12-15
A	KR 10-2013-0015932 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 14 February 2013 See abstract and claim 1.	1-6,12-15



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

26 AUGUST 2014 (26.08.2014)

Date of mailing of the international search report

02 SEPTEMBER 2014 (02.09.2014)

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/KR2013/011873

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.: 7-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 7-11 pertain to a method for treatment of the human body, 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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/011873

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0085260 A	27/07/2011	KR 10-1308232 B1 US 2013-0210738 A1 WO 2011-090270 A2 WO 2011-090270 A3	06/11/2013 15/08/2013 28/07/2011 01/12/2011
KR 10-2013-0031464 A	29/03/2013	KR 10-1331005 B1	20/11/2013
KR 10-2010-0126326 A	01/12/2010	AU 2009-218723 A1 CA 2716893 A1 CN 101965197 A EP 2095828 A1 EP 2249868 A1 JP 2011-513257 A KR 10-1297763 B1 US 2011-0020301 A1 WO 2009-106302 A1	03/09/2009 03/09/2009 02/02/2011 02/09/2009 17/11/2010 28/04/2011 20/08/2013 27/01/2011 03/09/2009
KR 10-2013-0015932 A	14/02/2013	KR 10-2014-0031354 A WO 2013-022139 A1	12/03/2014 14/02/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/00(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, A61P 25/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/00; A61K 31/497; C12N 15/11; A61K 38/44; A61P 25/28; C12Q 1/68; A61K 31/7076; A61K 31/425; A61P 25/16 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, 인지기능 장애, 알츠하이머, 치매, 파킨슨		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0085260 A (경상대학교산학협력단) 2011.07.27. 요약 및 청구항 1, 2 및 8 참조.	1-6,12-15
A	KR 10-2013-0031464 A (서울시립대학교 산학협력단 외) 2013.03.29. 요약 및 청구항 1 참조.	1-6,12-15
A	KR 10-2010-0126326 A (그노시스 에스.피.에이.) 2010.12.01. 요약 및 청구항 1 참조.	1-6,12-15
A	MAZAN, M. 외 2명, 'Phenotype analysis of Saccharomyces cerevisiae mutants with deletions in Pir cell wall glycoproteins' Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 94, No. 2, pages 335-342 (2008) 요약 및 페이지 339 참조.	1-6,12-15
A	KR 10-2013-0015932 A (연세대학교 산학협력단) 2013.02.14. 요약 및 청구항 1 참조.	1-6,12-15
☐ 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 2014년 08월 26일 (26.08.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 09월 02일 (02.09.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

제2기제란 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: 7-11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제7항 내지 제11항은 사람의 치료방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
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.

제3기제란 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
KR 10-2011-0085260 A	2011/07/27	KR 10-1308232 B1 US 2013-0210738 A1 WO 2011-090270 A2 WO 2011-090270 A3	2013/11/06 2013/08/15 2011/07/28 2011/12/01
KR 10-2013-0031464 A	2013/03/29	KR 10-1331005 B1	2013/11/20
KR 10-2010-0126326 A	2010/12/01	AU 2009-218723 A1 CA 2716893 A1 CN 101965197 A EP 2095828 A1 EP 2249868 A1 JP 2011-513257 A KR 10-1297763 B1 US 2011-0020301 A1 WO 2009-106302 A1	2009/09/03 2009/09/03 2011/02/02 2009/09/02 2010/11/17 2011/04/28 2013/08/20 2011/01/27 2009/09/03
KR 10-2013-0015932 A	2013/02/14	KR 10-2014-0031354 A WO 2013-022139 A1	2014/03/12 2013/02/14