

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 10월 27일 (27.10.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/171448 A1

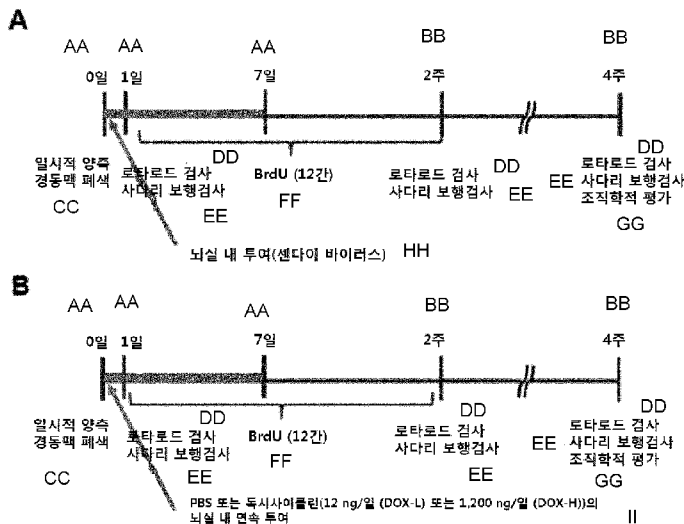
- (51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004068
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 19일 (19.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0055225 2015년 4월 20일 (20.04.2015) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 1층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조성래 (CHO, Sung Rae); 03722 서울시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 재활병원, Seoul (KR). 김형범 (KIM, Hyong Bum); 04751 서울시 성동구 왕십리로 280 삼부아파트 106동 703호, Seoul (KR). 서정화 (SEO, Jung Hwa); 03722 서울시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 예비수의생명연구센터 226호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CRANIAL NERVE DISEASES

(54) 발명의 명칭: 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition for preventing or treating cranial nerve diseases, comprising a nucleic acid molecule encoding four kinds of pluripotent factors (Oct-4, Sox2, c-Myc, and Klf4) as an active ingredient, and being used for *in vivo* gene therapy. According to the present invention, the four kinds of pluripotent factors are expressed in the brain tissue and induce proliferation of astrocytes and neural progenitor cells and angiogenesis, and thereby a damaged brain function is restored.

(57) 요약서: 본 발명은 4종의 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)를 암호화하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 상기 4종의 다능성 인자는 뇌 조직에서 발현되어 신생혈관생성 및 성상교세포와 신경전구세포의 증식을 유도함으로써, 손상된 뇌기능을 회복시킨다.

WO 2016/171448 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, —
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 4종의 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)를 암호화하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 인 비보(in vivo) 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 손상된 조직의 복원 또는 재생은 손상이나 질병에서 기능 회복에 중요하다. 포유동물의 뇌는 다른 기관 및 조직에 비해 재생능력이 현저히 떨어진다. 그러므로, 뇌 조직 손상은 종종 반영구적인 기능 장애로 이어진다.
- [3] 뇌 재생에 필요한 세포 유형이 내재된 세포 소스(endogenous cell sources)에 의해 충분히 제공되지 않기 때문에, 다른 종류의 세포의 보충이 회복에 도움이 된다. 예를 들어, 골수 단핵세포(bone marrow mononuclear cells)(Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. *Brain Res.* 2004;1007:1-9), 골수 기질세포(bone marrow stromal cells)(Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. *J Neurol Sci.* 2001;189:49-57) 및 신경줄기세포(neural stem cells)(Park KI, Teng YD, Snyder EY. *Nat Biotechnol.* 2002;20:1111-7)와 같은 외인성 세포(exogenous cells)의 이식을 통하여 뇌 조직 재생을 향상시킬 수 있음이 보고된바 있다. 그러나, 이식된 세포의 생착이 제한적이고(Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP, Montero-Menei CN. *Biomaterials.* 2010;31:2105-20), 이식된 세포에서 신경계통(neural lineage) 세포의 생성이 기능적 회복을 유도하기에는 충분하지 않은 문제점이 있었다(Roitberg B. Transplantation for stroke. *Neurol Res.* 2004;26:256-64). 또한, 뇌로의 동종 또는 이종 세포의 이식은 세포주입 이후에 면역 시스템에 의해 거부되거나, 종양 생성(Fong SP, Tsang KS, Chan AB, et al. *J Neurosci Res.* 2007;85:1851-62)을 유도할 수 있는 역효과를 가져올 수 있다.
- [4] 포유동물의 뇌는 손상이나 질병에 의해 동원되는 내인성 신경줄기세포(endogenous neural stem cells) 및 전구 세포(progenitor cells)를 가지고 있다(Goldman SA. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82:453-60). 이러한 세포의 동원 및 활성화를 표피성장인자(EGF)와 뇌유래 신경영양인자(BDNF)와 같은 외생 전달 체액성 인자(exogenously delivered humoral factors)를 이용하여 증대시킬 수 있다(Cho SR, Benraiss A, Chmielnicki E, Samdani A, Economides A, Goldman SA. *J Clin Invest.* 2007;117:2889-902). 아테노바이러스 벡터 또는 삼투압 펌프에 의한 BDNF, noggin 또는 EGF의 뇌실 내로의 전달(intraventricular delivery)은 만성 저산소성 허혈성 뇌손상(Im SH, Yu JH, Park ES, et al. *Neuroscience.* 2010;169:259-68)과 헌팅턴병(Huntington's disease)(Benraiss A, Toner MJ, Xu Q, et al. *Cell Stem Cell.* 2013;12:787-99)을 가진 마우스 모델에서 선조체

재생 및 기능적 향상을 이끄는 뇌실하 부위(subventricular zone)에 있는 내인성 신경줄기/전구세포를 활성화하는 것으로 보고된바 있다. 그러나, 이러한 체액성 인자에 의해 직접 영향을 받을 수 있는 내인성 세포는 체액성 인자에 대한 수용체를 가진 세포로 제한되고, 이는 뇌기능 회복을 제한하는 요인으로 작용한다. 따라서, 손상된 뇌기능을 회복시킬 수 있는 보다 효과적인 치료법이 요구된다.

[5]

[6] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 뇌손상으로 인한 뇌기능 저하를 치료할 수 있는 새로운 치료법을 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 허혈성 뇌손상 동물모델에서 4종의 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)의 뇌 조직에서의 일시적 인 시투(in situ) 발현이 뇌손상으로 인한 기능 저하를 회복시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8] 따라서, 본 발명의 목적은 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[9] 본 발명의 다른 목적은 뇌신경 질환의 치료방법을 제공하는 데 있다.

[10] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

[11] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Oct-4(Octamer-binding transcription factor 4), Sox2(SRY-box containing gene 2), c-Myc(c-myelocytomatosis oncogene) 및 Klf4(Kruppel-like factor 4)인 4종의 다능성 인자를 암호화하는 단일의 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내(in vivo) 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

[12] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 4종의 다능성 인자를 별도로 암호화하는 복수개의 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 4종의 다능성 인자를 암호화하는 단일의 핵산 분자를 포함하는 억제학적 조성물을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 생체 내 유전자 치료를 통한 뇌신경 질환의 치료방법을 제공한다.

[14] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 4종의 다능성 인자를

별도로 암호화하는 복수개의 핵산 분자를 포함하는 억제학적 조성물을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 생체 내 유전자 치료를 통한 뇌신경 질환의 치료방법을 제공한다.

- [15] 본 발명자들은 뇌손상으로 인한 뇌기능 저하를 치료할 수 있는 새로운 치료법을 개발하기 위하여 연구 노력하였다. 그 결과, 허혈성 뇌손상 동물모델에서 4종의 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)의 뇌 조직에서의 일시적 *in situ* 발현이 뇌손상으로 인한 기능 저하를 회복시킬 수 있음을 규명하였다.
- [16] 유전자 치료는 유전자 전달 방법에 따라 생체 밖(*ex-vivo*) 유전자 치료와 생체 내(*in-vivo*) 유전자 치료로 구분되며, 생체 밖 유전자 치료는 몸 밖에서 배양한 세포를 다시 주입하여 치료하는 방법이고, 생체 내 유전자 치료는 환자로부터 세포를 추출할 필요 없이 직접 환자에게 유전자를 주입하는 방법이다.
- [17] 본 발명의 억제학적 조성물은 뇌신경 질환에 대한 생체 내 유전자 치료제로서, 본 발명을 이용한 유전자 치료에는 상기 4종의 다능성 인자를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자가 이용된다. 상기 핵산 분자는 4종의 다능성 인자를 함께 암호화하는 단일의 폴리뉴클레오타이드이거나, 또는 4종의 다능성 인자를 별도로 암호화하는 복수개의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [18] 상기 4종의 다능성 인자를 별도로 암호화하는 복수개의 폴리뉴클레오타이드는, (i) 각각의 다능성 인자를 암호화하는 4종의 폴리뉴클레오타이드이거나, 또는 (ii) 4종의 다능성 인자 중 1종의 다능성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 2 내지 3종의 다능성 인자를 함께 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 조합일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다능성 인자의 염기서열은 미국 국립생물정보센터(NCBI) 웹사이트 등에 공개되어 있으므로, 통상의 기술자는 이와 같이 공지된 염기서열을 토대로 본 발명의 핵산 분자를 용이하게 제작할 수 있다.
- [20] 본 명세서에서 사용된 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 뇌신경 질환의 발병을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 뇌신경 질환의 발진의 억제, 뇌신경 질환의 증상 완화, 또는 손상된 뇌기능의 회복을 의미한다.
- [21] 예를 들어, 본 발명의 조성물은 뇌신경 질환의 증상인 인지기능 저하를 회복시킴으로써 뇌신경 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 뇌신경 질환의 다른 증상인 운동기능 저하를 회복시킴으로써 뇌신경 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [22] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 뇌 조직에서 신생혈관생성(*angiogenesis*)을 유도하거나, 또는 성상교세포 또는 신경전구세포의 증식을 유도함으로써 뇌신경 질환에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [23] 본 발명은 다양한 뇌신경 질환의 예방 및 치료에 적용될 수 있다. 본 발명이

적용 가능한 뇌신경 질환의 예로는, 뇌졸중, 뇌성마비, 허혈성 뇌손상, 외상성 뇌손상, 섬망 및 퇴행성 뇌신경 질환 등이 있다.

- [24] 본 발명이 적용 가능한 상기 퇴행성 뇌신경 질환의 예로는, 치매, 파킨슨병 및 헌팅턴병 등이 있다. 상기 치매에는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매 및 물질로 유발된 치매가 포함되나, 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [25] 본 발명의 조성물은 유전자 치료 분야에서 통상적으로 공지된 다양한 운반 방법을 통하여 생체 내에 적용될 수 있다.
- [26] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 핵산 분자는 유전자 전달체에 포함되어 있거나, 또는 네이키드 DNA(naked DNA)이다. 상기 다능성 인자를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체를 유효성분으로 이용하는 경우, 다능성 인자-코딩 핵산 분자는 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다.
- [27] 본 명세서에서 사용된, 용어 "유전자 전달"은 유전자가 세포 내로 운반되는 것을 의미하며, 유전자의 세포 내 침투(transduction)와 동일한 의미를 가진다. 조직 수준에서, 상기 용어 유전자 전달은 유전자의 확산(spread)과 동일한 의미를 가진다.
- [28] 상기 발현 컨스트럭트에서, 다능성 인자-코딩 핵산 분자는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 상기 용어, "작동적으로 연결된"은 핵산 발현조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [29] 본 발명에 있어서, 다능성 인자-코딩 핵산 분자에 결합된 프로모터는, 동물세포(예컨대, 포유동물 세포)에서 작동하여 다능성 인자-코딩 핵산 분자의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노 바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명에서 이용되는 발현 컨스트럭트는 폴리 아데닐화 서열을 포함할 수 있다(예컨대, 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열).
- [31] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 다능성 인자-코딩 핵산 분자는 "프로모터 - 다능성 인자-코딩 핵산 분자 - 폴리 아데닐화 서열"의 구조를 갖는다.

- [32] 본 발명의 핵산 분자는 다양한 형태로 제작할 수 있으며, 예를 들어 (i) 플라스미드를 전달체로 이용한 네이키드(naked) 재조합 DNA 분자, (ii) 바이러스 벡터, (iii) 리포솜 또는 니오솜, (iv) 지질-유전자 결합체(Lipid-DNA complex) 또는 (v) 폴리머-유전자 결합체(Polymer-DNA complex) 등의 형태로 제작할 수 있다.
- [33] 다능성 인자-코딩 핵산 분자는 통상적인 유전자 치료에 이용되는 모든 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있으며, 예컨대 플라스미드, 아데노 바이러스(Lockett LJ, et al., *Clin. Cancer Res.* 3:2075-2080(1997)), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viruses: AAV, Lashford LS., et al., *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 레트로 바이러스(Gunzburg WH, et al., *Retroviral vectors. Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations* Ed. A. Meager, 1999), 렌티 바이러스(Wang G. et al., *J. Clin. Invest.* 104(11):R55-62(1999)), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Chamber R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:1411-1415(1995)), 배시니아 바이러스(Puhlmann M. et al., *Human Gene Therapy* 10:649-657(1999)), 리포솜(*Methods in Molecular Biology*, Vol 199, S.C. Basu and M. Basu (Eds.), Humana Press 2002) 또는 니오솜에 적용될 수 있다.
- [34] 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 유전자 전달체는 바이러스 벡터로 구현될 수 있다.
- [35] 상술한 본 발명의 유전자 전달 시스템을 세포 내로 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다.
- [36] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 유효성분 외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 용어, "약제학적 유효량"은 상술한 유효성분의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [37] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 뇌 조직으로 투여되고, 4종의 다능성 인자는 뇌 조직에서 발현된다.
- [38] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [39] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나, 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [40] 본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 개체는 인간을 포함하는 포유동물이다.
- 발명의 효과**

[41] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[42] (i) 본 발명은 4종의 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)를 암호화하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[43] (ii) 본 발명에 따르면, 상기 4종의 다능성 인자는 뇌 조직에서 발현되어 신생혈관생성 및 성상교세포와 신경전구세포의 증식을 유도함으로써, 손상된 뇌기능을 회복시킨다.

도면의 간단한 설명

[44] 도 1은 본 발명의 실험 과정을 도식화하여 보여준다. A는 유전자가 이식되지 않은(non-transgenic) 마우스를 이용한 실험과정이고, B는 유전자가 이식된(transgenic) 마우스에서의 실험과정이다.

[45] 도 2a-2b는 센다이 바이러스로 다능성 인자를 발현시킨 뇌 허혈 마우스에서 인 시투 다능성 인자의 발현에 의한 운동기능 회복을 보여준다. 도 2에서, □는 센다이 바이러스(GFP) 투여군을 나타내며, ■는 센다이 바이러스(다능성 인자+GFP) 투여군을 나타낸다.

[46] 도 3a-3b는 다능성 인자 유전자-이식 뇌 허혈 마우스에서 인 시투 다능성 인자의 발현에 의한 운동기능 회복을 보여준다.

[47] 도 4는 면역조직화학염색을 이용해 센다이 바이러스에 의한 다능성 인자 발현을 확인한 결과이다(A-C = 200 μ m).

[48] 도 5는 다능성 인자 유전자-이식 뇌 허혈 마우스에서 인 시투 다능성 인자의 발현에 의한 이형성(dysplasia)이 나타나지 않음을 보여준다(A-C = 200 μ m).

[49] 도 6a-6c는 다능성 인자 유전자 이식-뇌 허혈 마우스의 뇌실하 부위에서의 세포 증식(BrdU⁺ 세포) 및 신경줄기세포(Nestin⁺ 세포)와 성상세포(GFAP⁺ 세포)로의 우세한 분화를 보여주는 면역조직화학염색 결과이다.

[50] 도 7a-7d는 다능성 인자 유전자 이식-뇌 허혈 마우스의 선조체에서의 세포 증식(BrdU⁺ 세포) 및 성상세포(GFAP⁺ 세포)로의 우세한 분화 및 신경아교세포반흔(CS-56⁺ 세포)이 형성되지 않음을 보여주는 면역조직화학염색 결과이다.

[51] 도 8a-8b는 성상세포와 뉴런세포에서 혈관생성인자의 발현 정도를 보여주는 면역분석 결과이다. 대조군에 비하여 다능성 인자가 발현된 마우스에서 혈관이 증가된 것을 수량화하여 그래프로 나타내었다.

[52] 도 9a-9c는 다능성 인자 유전자 이식-뇌 허혈 마우스의 선조체에서 혈관생성(CD31⁺ 세포)이 증가하였음을 보여주는 면역조직화학염색 결과이다(A-C = 100 μ m, E-M = 25 μ m).

발명의 실시를 위한 형태

[53] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에

따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[54]

[55] 실시예

[56] 실험재료 및 실험방법

[57] 뇌 허혈 마우스 모델(*2-vessel occlusion mouse model*)

[58] 마우스의 양측 총경동맥(bilateral common carotid artery)을 일시적으로 결찰하고, 20분 후 풀어주어 허혈성 뇌손상(ischemic brain injury)을 유도하였다.

[59]

[60] 다능성 인자 유도 - 바이러스 벡터 이용

[61] 상술한 뇌 허혈 마우스에 허혈 뇌손상 후 즉시 양측 측뇌실(lateral ventricle)로 다능성 인자(Oct-4, Sox2, c-Myc 및 Klf4)를 발현하는 센다이 바이러스(CytoTune™-IPS Sendai Reprogramming Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA)를 주입하였다. 대조군은 초록색 형광 리포터만을 발현하는 센다이 바이러스(CytoTune™-EmGFP Sendai Fluorescence Reporter, Life Technologies, Carlsbad, CA)를 이용하였다. 상기 실험 과정을 도 1의 A에 나타내었다.

[62]

[63] 다능성 인자 유도 - 독시사이클린 삼투압 펌프 이용

[64] 독시사이클린 투여 시 이식된 다능성 인자 유전자를 발현하도록 제조된 트랜스제닉 마우스(reprogrammable mice; Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA^{*}M2)}Jae Colla1^{tm3(tetO-Pou5f1,-Sox2,-Klf4,-Myc)}Jae/J)에서 허혈 뇌손상 후 즉시 오른쪽 측 뇌실(lateral ventricle)로 독시사이클린이 들어있는 삼투압 펌프를 이식하여 약 7일간 다능성 인자를 발현하도록 하였다. 이때 독시사이클린 농도에 따른 효과를 비교하기 위하여 두 가지 농도(1 $\mu\text{g/ml}$ (낮은 농도군)과 100 $\mu\text{g/ml}$ (높은 농도군))로 진행하였고, 대조군에는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline)가 들어간 삼투압 펌프를 이식하였다. 모든 마우스는 새로 생성된 세포를 표지하기 위하여 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine, 50 mg/kg)를 허혈 뇌손상 후 다음날부터 약 2주간 복강 내 주사해 주었다. 상기 실험 과정을 도 1의 B에 나타내었다.

[65]

[66] 운동 기능 테스트(*behavioral assessment*)

[67] 운동협조(motor coordination) 기능을 평가하기 위하여, 로타로드(Cat. No. 47600, UGO Basile, VA, Italy)를 이용하여 2주 간격으로 로타로드(rotarod) 시험을 진행하였다. 구체적으로, 48 rpm의 고정 속력과 4-80 rpm까지의 가속력 방법으로 5분간 시행하는 동안, 대상 동물이 로드에서 떨어지는 시간을 측정하였다. 평가를 2차례 진행하였고, 평균 지속시간(mean latency)을 분석하였다.

[68] 사다리 보행 검사로서, 다양한 거리로 철심 가로단(rung)이 놓여 있는 1 m 거리의 수평 사다리에서 대상 쥐를 4차례 보행하도록 한 후, 사다리 가로단 사이로 미끄러져 떨어지는 횟수(number of slips)를 비디오 분석을 통해

측정하였다.

[69] 실험결과 는 도 2a-2b 및 3a-3b에 나타내었다.

[70]

[71] **면역화학염색(Immunohistochemistry; IHC)**

[72] 면역화학염색을 실시하기 위하여, 일단 환경과 부유 환경에서 사육 8주 후, 대상 동물의 뇌 조직을 적출한 후 16 μ m 간격으로 절단하고, 마이크로 글라스 슬라이드 상에 뇌 조직 절편(section)을 부착시켰다. 다능성 인자의 발현 확인을 위하여, 센다이 바이러스 이식 후 3일째 되는 마우스의 뇌 조직에서 Oct4 항체를 이용하여 면역화학염색 후 공초점 현미경으로 관찰하였다. 실험결과 는 도 4에 나타내었다.

[73] in situ 다능성 인자 발현에 의한 이형성(Dysplasia)을 확인하기 위하여 hematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 실험결과 는 도 5에 나타내었다.

[74] in situ 다능성 인자 발현에 의한 세포 증식(BrdU 항체)과 신경줄기세포(Nestin 항체) 및 성상세포(GFAP 항체) 등을 표지하는 항체를 이용하여 면역화학염색 후 공초점 현미경으로 확인하였다. 또한, 증식된 성상세포의 반흔 형성 여부를 확인하기 위하여 신경아교세포반흔(CS-56 항체)을 확인하였다. 실험결과 는 도 6a-6c 및 7a-7d에 나타내었다.

[75] in situ 다능성 인자 발현에 의한 혈관 생성을 확인하기 위하여, 혈관내피세포 표지 항체인 CD31을 이용하여 면역화학염색 후 공초점 현미경으로 확인하였다. 실험결과 는 도 8a-8b에 나타내었다.

[76]

[77] **세포 배양**

[78] 어떤 세포에서 혈관생성인자가 발현되는지 확인하기 위하여, 마우스 성상세포 세포주(C8-D1A; Astrocyte Type 1 clone, ATCC, CRL-2541)와 신경 모세포주(N1E-115, ATCC, CRL-2263)를 무혈청(serum free) 배양액에서 이틀간 배양한 후, 세포를 거두어 실험에 사용하였다.

[79]

[80] **면역분석**

[81] 면역분석을 위하여, 얻은 세포로부터 용해 용액을 이용하여 추출한 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하여 분획한 다음, 영동된 분획의 위치를 그대로 여과지에 옮겼다. 여과지에 옮겨진 단백질은, 혈관생성인자들인 ANGPT1 (angiopoietin-1), VEGFA (vascular endothelial growth factor-A), FGF2 (fibroblast growth factor-2) 항체와 항존 유전자 단백질인 GAPDH 항체를 이용하여 방사선 면역검정법(radioimmunoassay)으로 검출하였다. 실험결과 는 도 9a-9c에 나타내었다.

[82]

[83] **실험결과**

[84] 운동 기능 테스트 결과

[85] 뇌 허혈 마우스에서 인 시투 다능성 인자 발현에 의한 운동 기능 변화를 확인하기 위하여, 로타로드와 사다리 보행 검사로 행동검사를 시행하였다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 센다이 바이러스를 투여한 뇌 허혈 마우스에서, 로타로드의 가속(4-80 rpm) 속도에서 다능성 인자 발현된 마우스들이 대조군에 비해 2주 후 지속시간이 유의하게 증가하였다(오른쪽 그래프). 사다리 보행검사 결과, 대조군에 비해 다능성 인자 발현시킨 마우스에서 앞다리의 미끄러짐 정도가 4주에 감소하는 양상을 보였다(도 2b).

[86] 또한, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 다능성 인자 유전자가 이식된 뇌 허혈 마우스에서 독시사이클린 투여로 다능성 인자 발현을 유도하였을 때, 독시사이클린의 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)에서 로타로드의 가고정(48 rpm) 속도에서는 대조군 및 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 2주부터 유의하게 지속시간이 증가하기 시작했고, 4주까지 이러한 양상이 유지되었다(왼쪽 그래프). 로타로드의 가속(4-80 rpm) 속도에서도 독시사이클린의 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)이 2주에 대조군 및 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$)에 비해 유의하게 증가하기 시작했고, 4주에서는 대조군에 비해서만 유의하게 지속시간이 증가하였다(오른쪽 그래프). 사다리 보행 검사 결과, 대조군에 비해 독시사이클린 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$) 및 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$) 마우스에서 앞다리의 미끄러짐 정도가 2주에서 감소하는 양상을 보였고, 4주에서는 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)에서만 유의하게 감소함을 보였다(도 3b).

[87]

[88] 면역화학염색 결과

[89] in situ 다능성 인자 발현의 확인을 위해 센다이 바이러스 이식 후 3일째 되는 마우스의 뇌 조직에서 면역화학 염색 후 공초점형 현미경에서 확인하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 뇌실로 센다이 바이러스 이식 후 3일째 되었을 때 마우스 뇌 조직에서의 Oct4 항체를 이용하여 면역조직화학 염색법을 이용하여 확인한 결과, 패널 A에서와 같이 대조군에서는 염색이 되지 않았고, 패널 B에서 센다이 바이러스에 의한 Oct4 발현이 나타났으며, 패널 C에서는 초록색 형광 리포터만을 발현하는 센다이 바이러스에 의한 초록색 형광 발현이 나타났다.

[90] in situ 다능성 인자 발현에 의한 이형성(dysplasia) 확인을 위하여, hematoxylin-eosin 염색법을 이용하여 염색 후 현미경에서 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 손상된 뇌에서의 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$) 및 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)의 독시사이클린에 의한 다능성 인자 발현은 이형성(dysplasia)을 하지 않는 것을 확인하였다. 패널 A의 대조군과 패널 B의 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$) 및 패널 C의 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)에서 모두 이형성(dysplasia)이 되지 않음을 확인하였다.

[91] 다능성 인자 유전자-이식 뇌 허혈 마우스의 뇌 조직에서의 세포 증식과 분화를 면역조직화학염색으로 확인하였다. 그 결과, 도 6a-6b에 나타낸 바와 같이,

뇌실하대에서의 세포 증식(BrdU⁺ 세포)을 확인하였다(패널 A). 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$) 및 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)의 독시사이클린에 의한 다능성 인자 발현은 대조군에 비하여 새로운 세포의 생성을 증가시키고, 마찬가지로 신경줄기세포(Nestin⁺ 세포)로의 분화를 유도할 뿐 아니라(패널 B), 성상세포(GFAP⁺ 세포)로의 분화를 증가시킨다(패널 C). 반면에 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)의 염색을 통해 새로 생성된 세포가 신경세포로의 분화가 유도되지 않음을 보였다(패널 D). 도 6c의 패널 E, H 및 K는 대조군에서의 신경줄기세포(Nestin⁺ 세포), 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타내었다. 패널 F, I 및 J는 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)군에서의 신경줄기세포(Nestin⁺ 세포), 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타내고, 패널 K, L 및 M은 뇌 허혈 손상 마우스의 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$)군에서의 신경줄기세포(Nestin⁺ 세포), 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타낸다(E-M = 25 μm).

- [92] 또한, 도 7a-7b에 나타난 바와 같이, 선조체에서 새로운 세포의 세포 증식(BrdU⁺ 세포)이 일어났다(패널 A). 손상된 뇌에서의 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$) 및 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)의 독시사이클린에 의한 다능성 인자 발현은 대조군에 비하여 새로운 세포의 생성을 증가시키고, 마찬가지로 성상세포(GFAP⁺ 세포)로의 분화를 증가시켰다(패널 B). 반면에 새로 생성된 세포가 신경세포로의 분화가 유도되지 않음을 보였다(패널 C). 도 7c-7d의 패널 E 및 H는 대조군에서의 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타낸다. 패널 F 및 I는 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)군에서의 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타내고, 패널 G 및 J는 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$)군에서의 성상세포(GFAP⁺ 세포) 및 어린신경세포(Tuj-1⁺ 세포)를 나타낸다(E-J = 25 μm). 또한, 새롭게 생성된 성상세포가 신경아교세포반흔(CS-56⁺ 세포)을 형성하였는지 확인한 결과, 그룹 간에 차이가 없음을 확인하였다(K-P = 50 μm).

- [93] 도 8a에 나타난 바와 같이, 손상된 뇌에서의 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$)의 독시사이클린에 의한 다능성 인자 발현은 선조체(striatum)에서의 혈관 증식(CD31⁺ 세포)을 나타내었다. 패널 A는 대조군, 패널 B는 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$), 패널 C는 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)을 나타내며, 독시사이클린 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)에서 유의하게 혈관 증식(CD31⁺ 세포)이 나타났다(패널 D). 도 8b의 패널 E-M은 대조군, 낮은 농도군(1 $\mu\text{g/ml}$) 및 높은 농도군(100 $\mu\text{g/ml}$)에서의 성상세포(GFAP⁺ 세포)와 혈관(CD31⁺ 세포)와의 상호관계를 나타낸다(E-M = 25 μm).

[94]

[95] **면역분석 결과**

- [96] 어떤 세포에서 혈관생성인자가 발현되는지 확인하기 위하여, 마우스 성상세포 세포주(C8-D1A)와 신경 모세포주(N1E-115)를 무혈청 배양액에서 이틀간 배양한 후, 세포를 거두어 단백질을 추출하여 혈관생성인자들인 ANGPT1

(angiopoietin-1), VEGFA (vascular endothelial growth factor-A) 및 FGF2 (fibroblast growth factor-2) 항체와 항존 유전자 단백질인 GAPDH 항체로 면역분석을 실시하였다.

[97] 그 결과, 도 9a-9c에 나타낸 바와 같이, 결과적으로 신경세포보다는 정상세포에서 혈관생성인자가 더 많이 발현되었음을 확인하였다. 패널 A는 ANGPT1, 패널 B는 VEGFA, 패널 C는 FGF2가 정상세포에서 증가되었음을 보여준다.

[98]

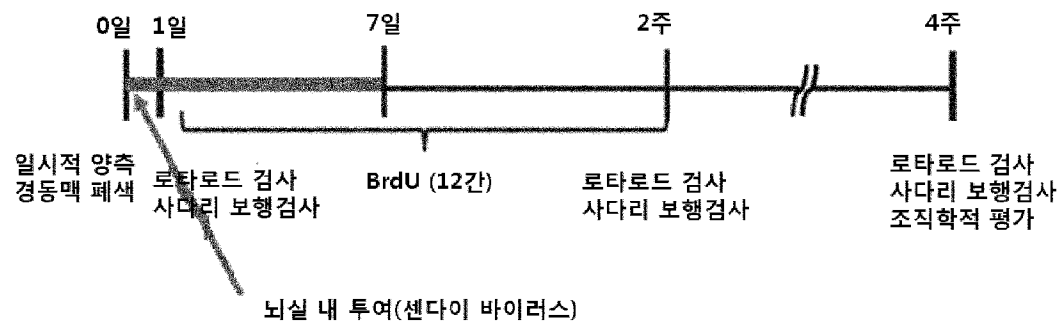
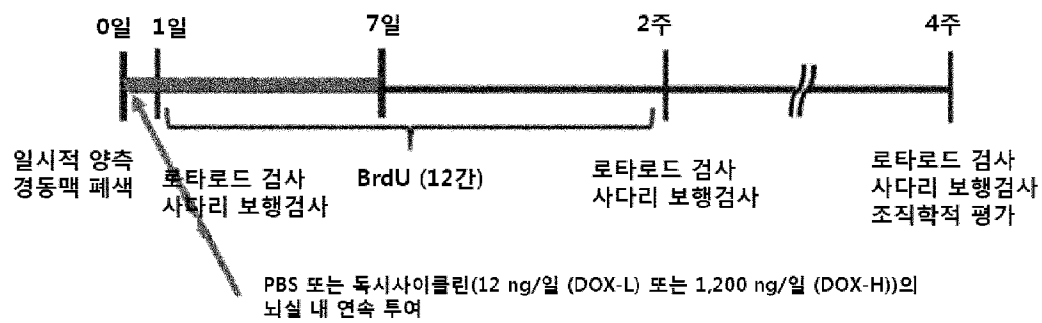
[99] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

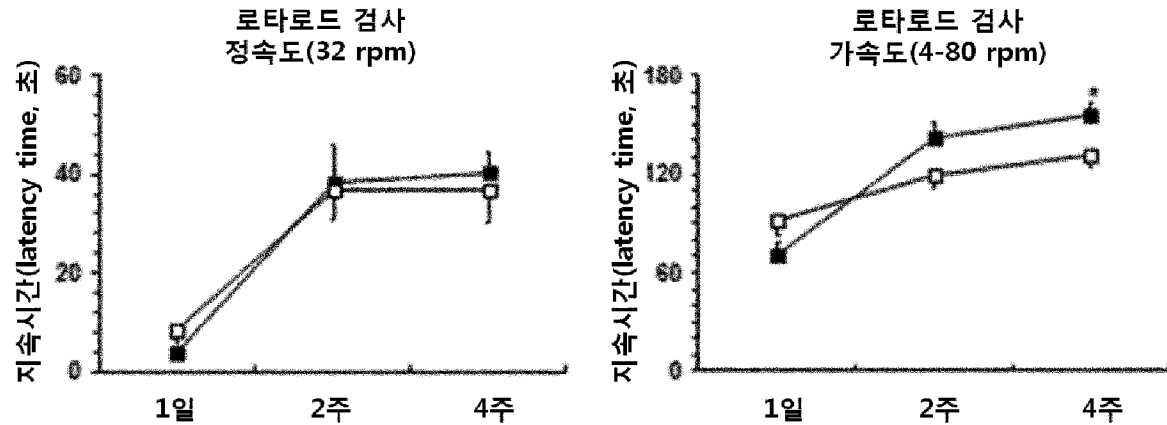
- [청구항 1] Oct-4(Octamer-binding transcription factor 4), Sox2(SRY-box containing gene 2), c-Myc(c-myelocytomatosis oncogene) 및 Klf4(Kruppel-like factor 4)인 4종의 다능성 인자를 암호화하는 단일의 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내(in vivo) 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] Oct-4(Octamer-binding transcription factor 4), Sox2(SRY-box containing gene 2), c-Myc(c-myelocytomatosis oncogene) 및 Klf4(Kruppel-like factor 4)인 4종의 다능성 인자를 별도로 암호화하는 복수개의 핵산 분자를 유효성분으로 포함하고, 생체 내(in vivo) 유전자 치료에 이용되는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 뇌신경 질환은 뇌졸중, 뇌성마비, 허혈성 뇌손상, 외상성 뇌손상, 섬망 및 퇴행성 뇌신경 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌신경 질환은 치매, 파킨슨병 또는 헌팅턴병인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 뇌신경 질환의 증상인 인지기능 저하를 회복시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 뇌신경 질환의 증상인 운동기능 저하를 회복시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 뇌 조직에서 신생혈관생성(angiogenesis)을 유도하거나, 또는 성상교세포 또는 신경전구세포의 증식을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 뇌 조직으로 투여되고, 4종의 다능성 인자는 뇌 조직에서 발현되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 유전자 전달체에 포함되어 있거나, 또는 네이키드 DNA(naked DNA)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 유전자 전달체는 바이러스 벡터, 플라스미드, 리포솜, 니오솜, 지질-유전자 결합체(Lipid-DNA complex) 또는 폴리머-유전자 결합체(Polymer-DNA complex)인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] Oct-4(Octamer-binding transcription factor 4), Sox2(SRY-box containing gene 2), c-Myc(c-myelocytomatosis oncogene) 및 Klf4(Kruppel-like factor 4)인 4종의 다능성 인자를 암호화하는 단일의 핵산 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 생체 내(in vivo) 유전자 치료를 통한 뇌신경 질환의 치료방법.

- [청구항 12] Oct-4(Octamer-binding transcription factor 4), Sox2(SRY-box containing gene 2), c-Myc(c-myelocytomatosis oncogene) 및 Klf4(Kruppel-like factor 4)인 4종의 다능성 인자를 별도로 암호화하는 복수개의 핵산 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 치료가 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 생체 내(in vivo) 유전자 치료를 통한 뇌신경 질환의 치료방법.

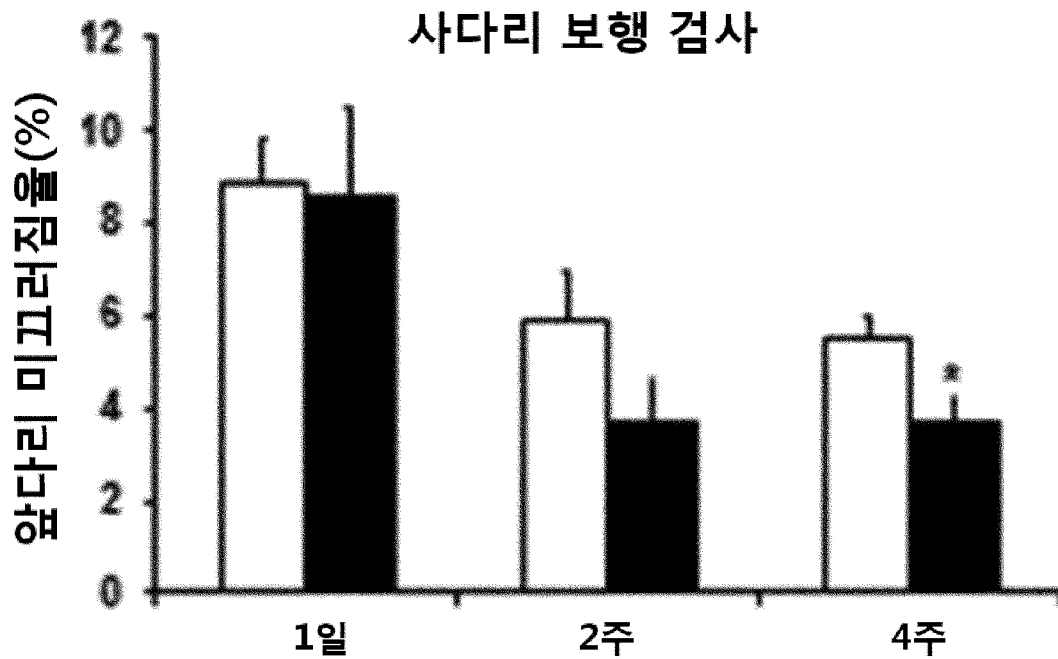
[도1]

A**B**

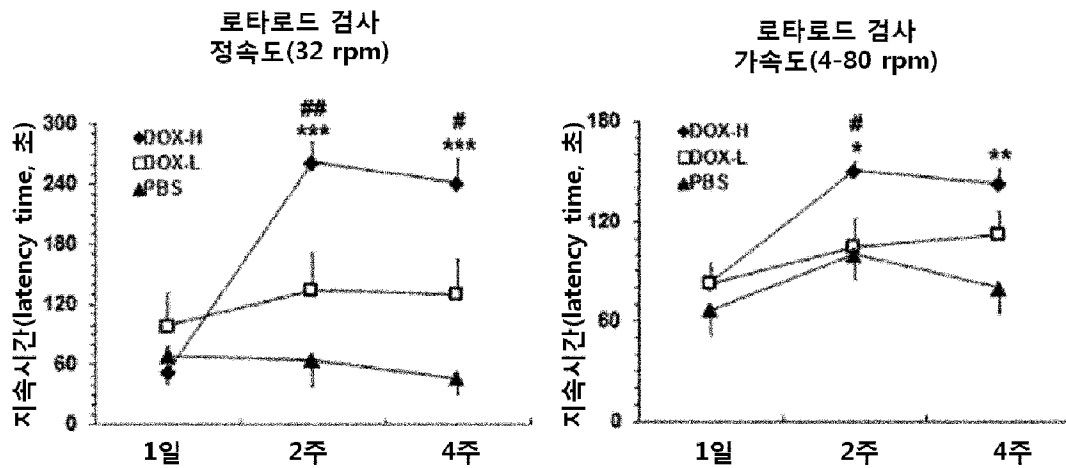
[도2a]



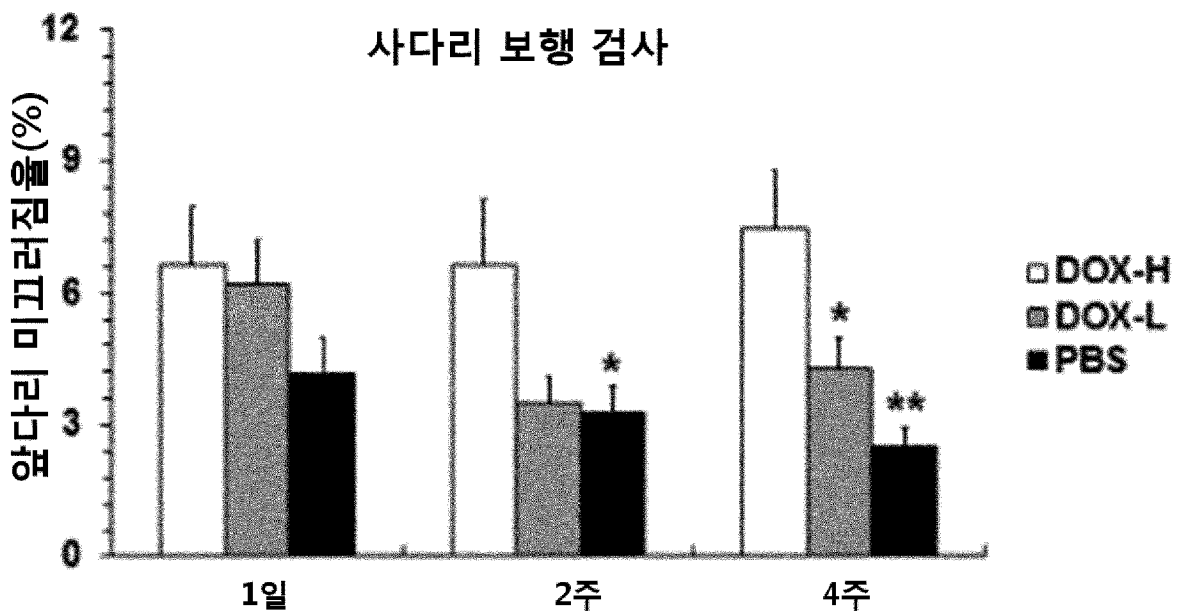
[도2b]



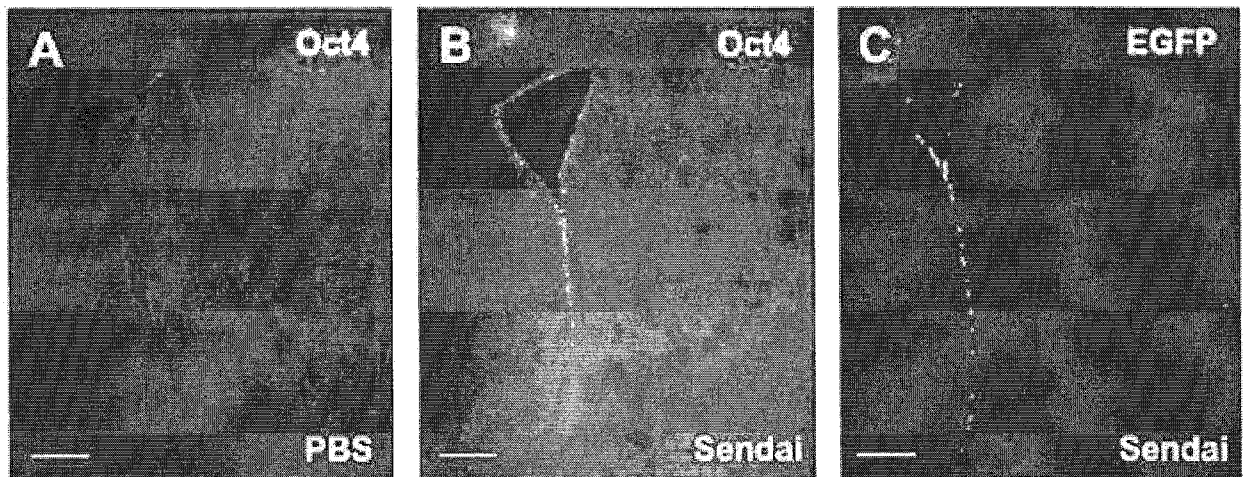
[도3a]



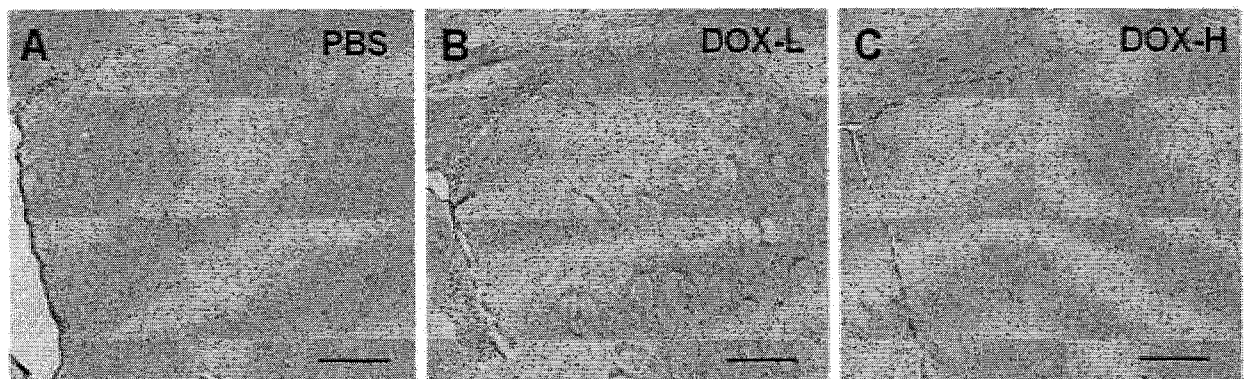
[도3b]



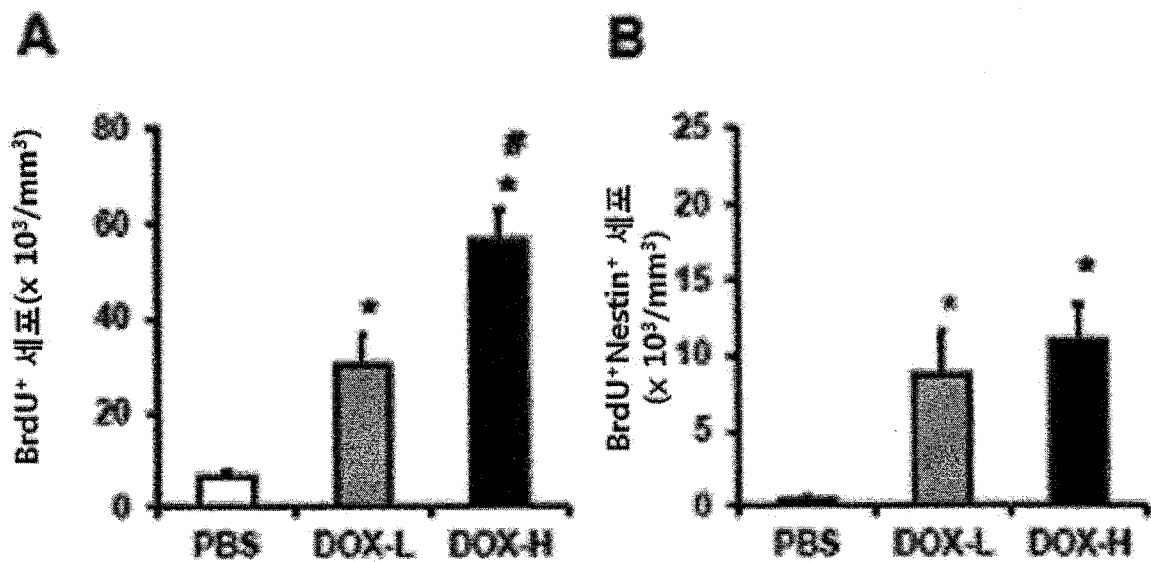
[도4]



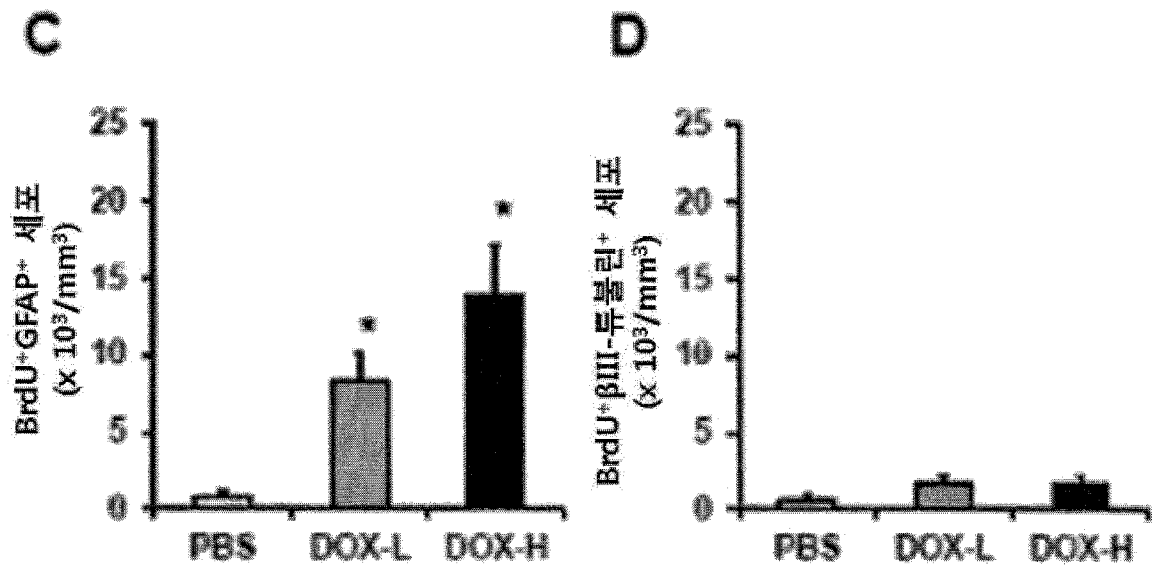
[도5]



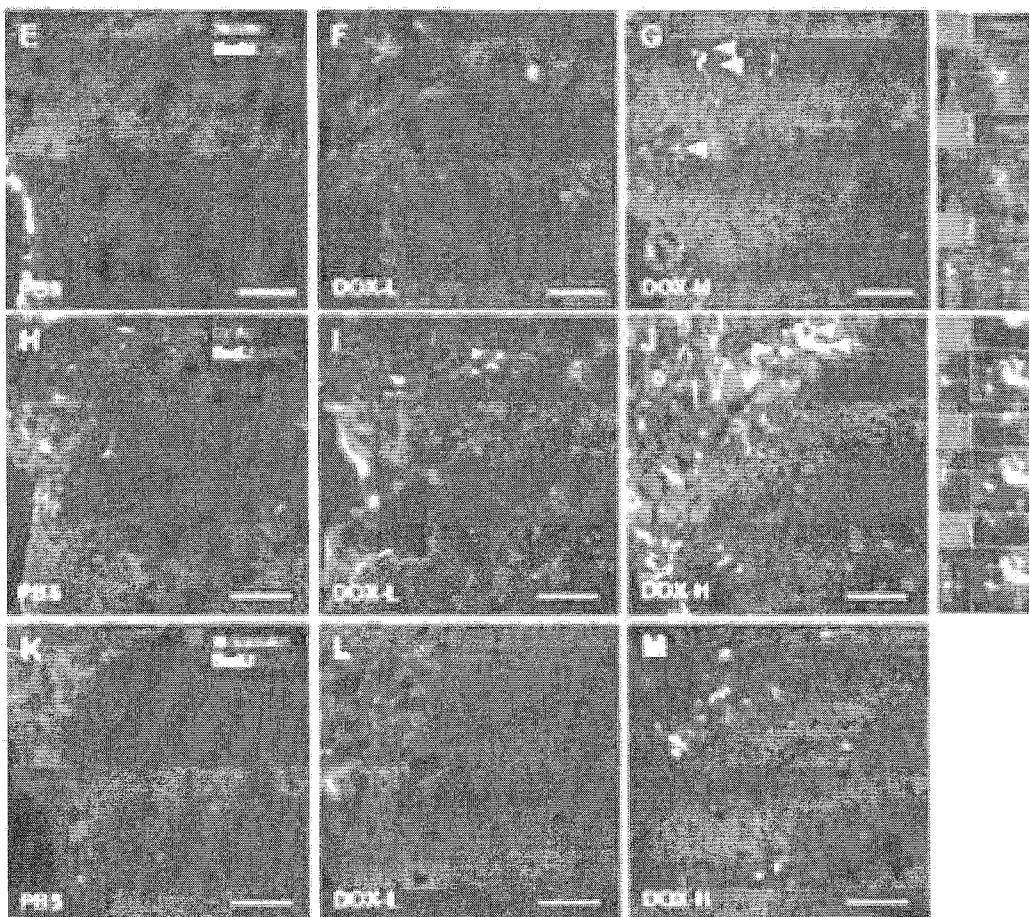
[도6a] Right Right Right



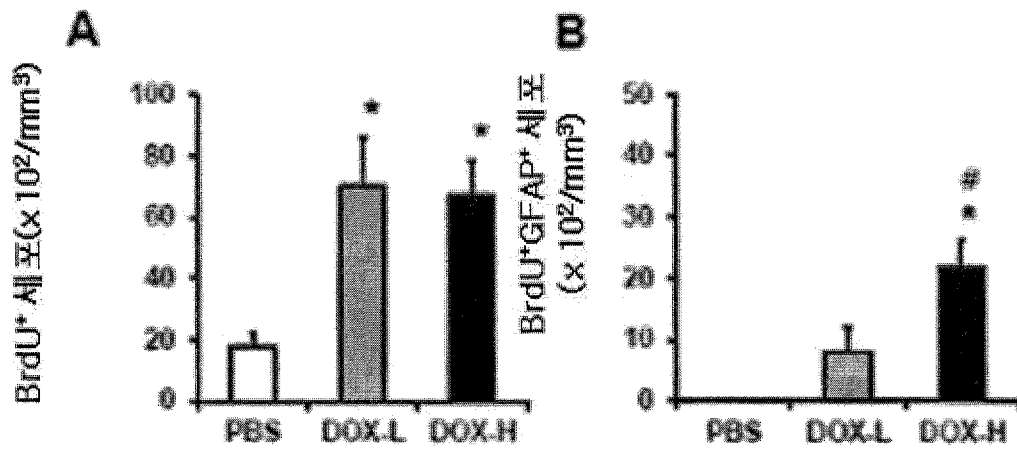
[도6b]



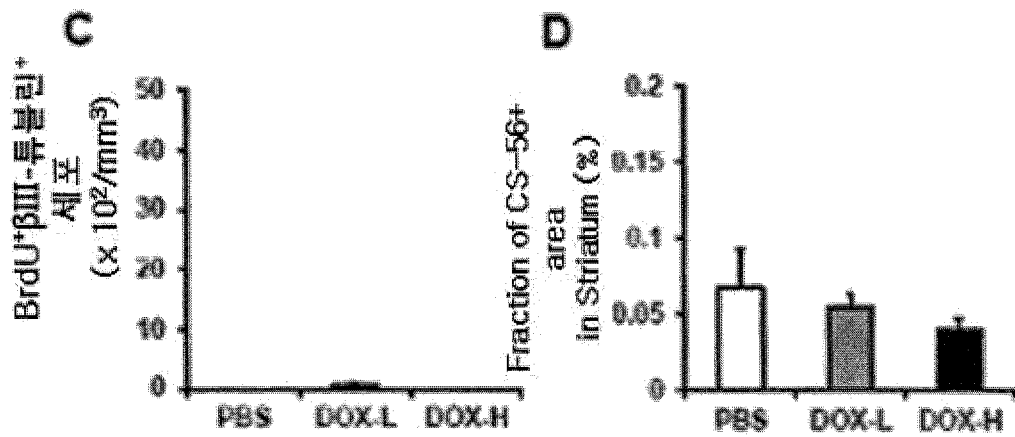
[도 6c]



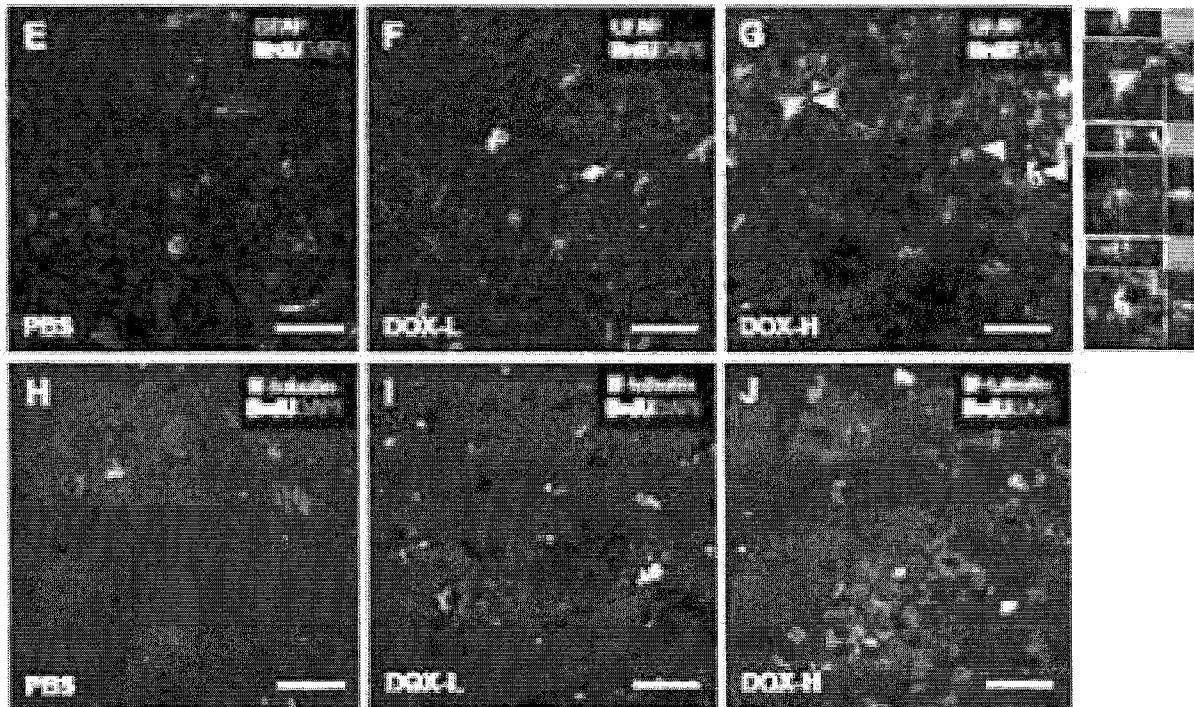
[도7a]



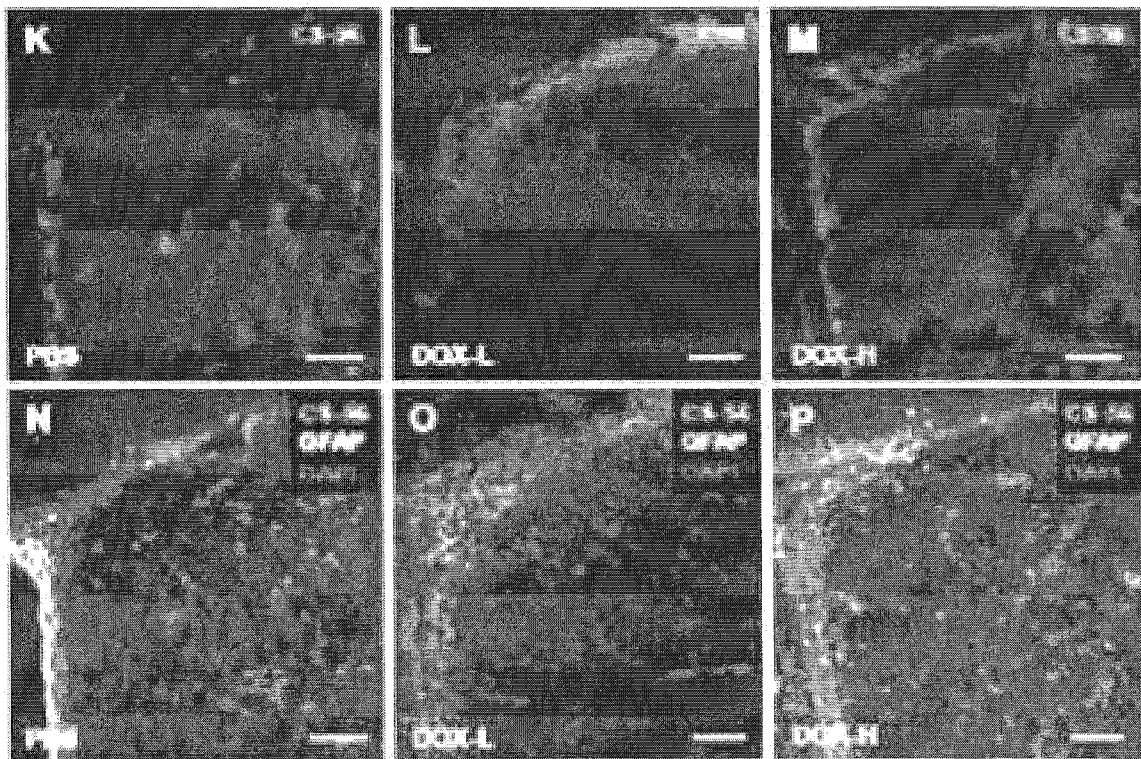
[도7b]



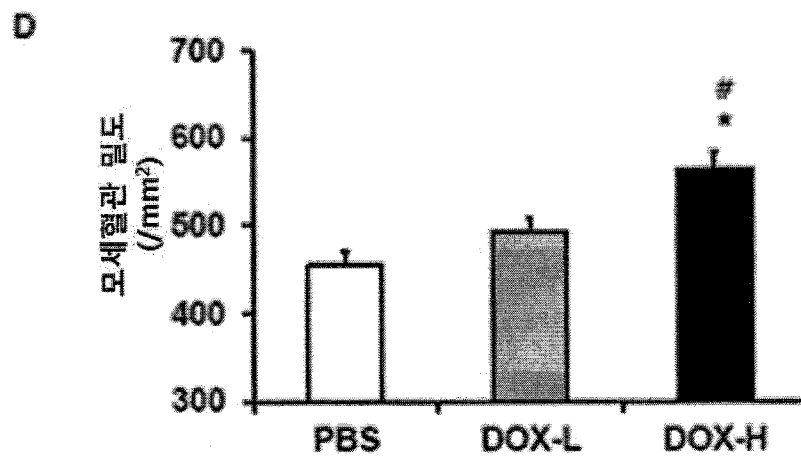
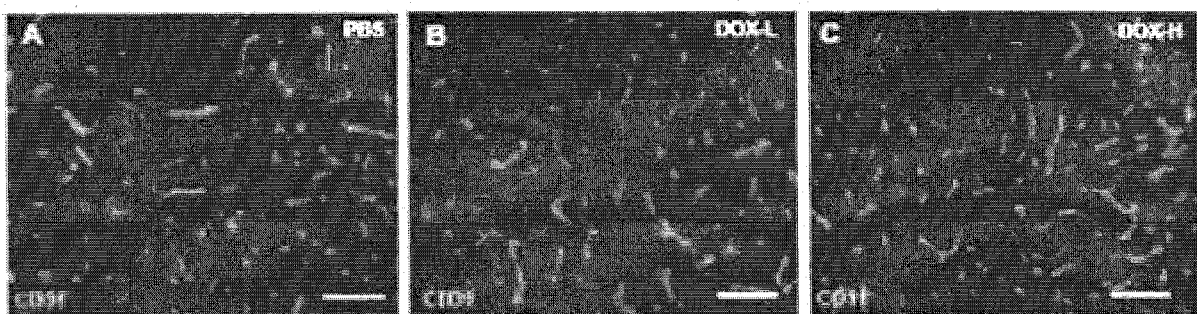
[도7c]



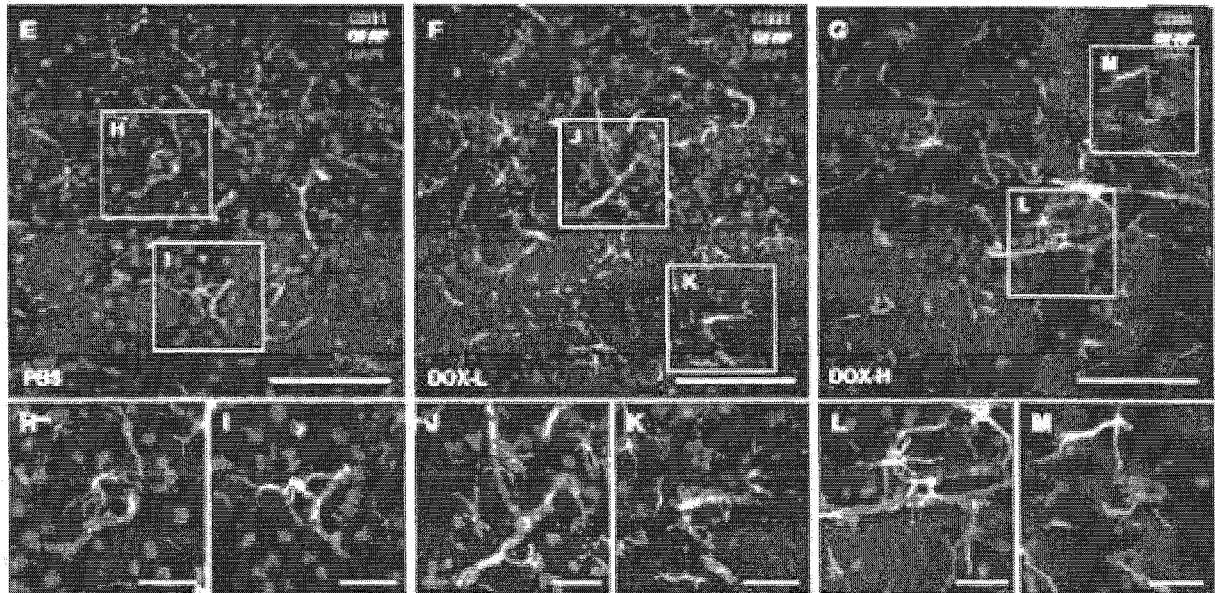
[도7d]



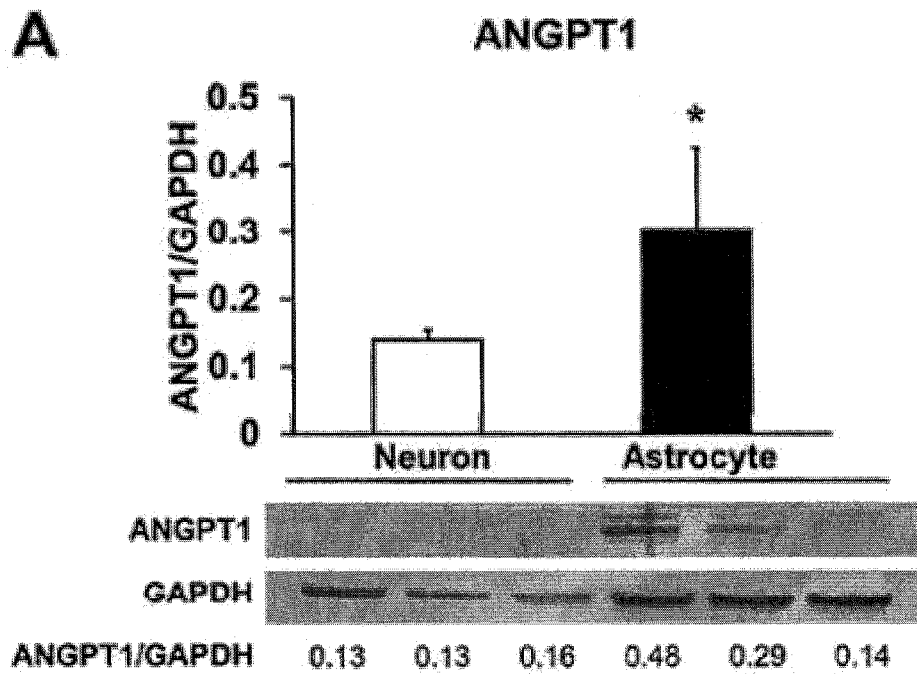
[도8a]



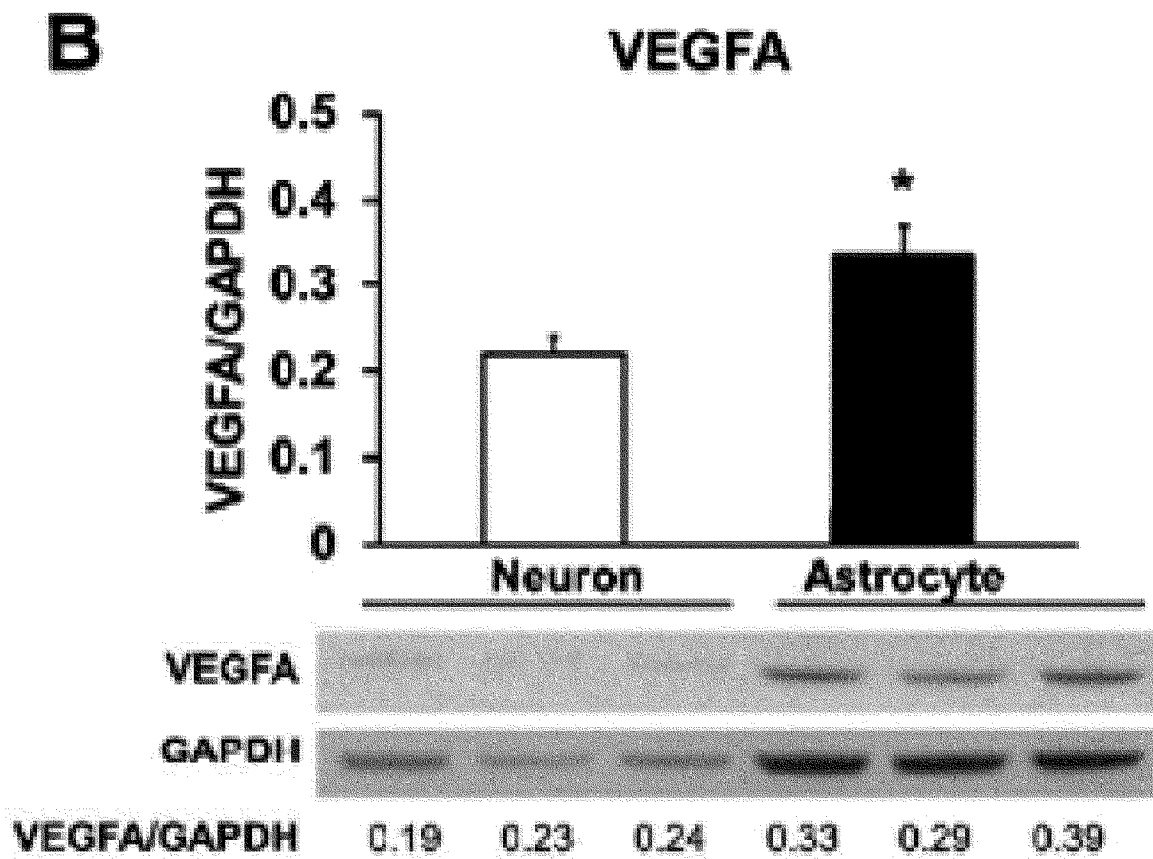
[도8b]



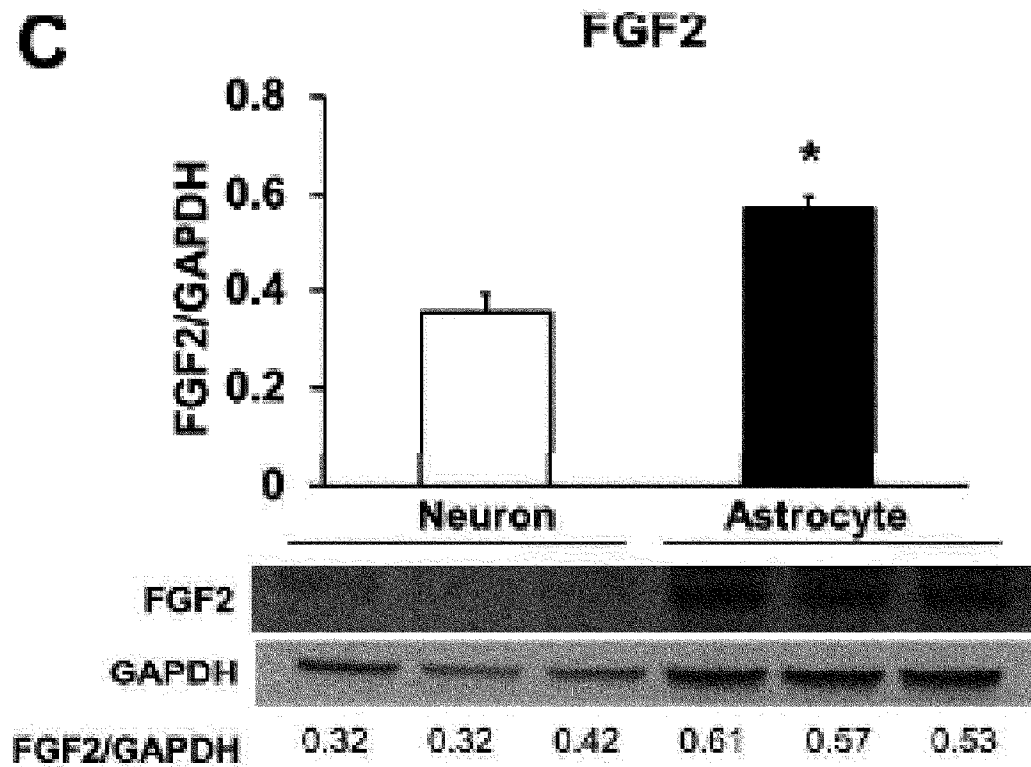
[도9a]



[도9b]



[도9c]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004068**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 48/00(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; C12N 5/071; A61K 38/43; G01N 21/76; C12N 5/074; A61K 38/19; A61K 38/16

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: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, nervous disorder, cranial nerve

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2011-0134939 A (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION) 15 December 2011 See claims 1-3, 47 and 52-57.	1-10
A	KR 10-2013-0133598 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 09 December 2013 See the entire document.	1-10
A	US 2012-0301446 A1 (ZHU, Y. et al.) 29 November 2012 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2014-0059093 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 15 May 2014 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2004-0108321 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 23 December 2004 See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 AUGUST 2016 (24.08.2016)

Date of mailing of the international search report

24 AUGUST 2016 (24.08.2016)

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/KR2016/004068

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.: **11-12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 and 12 pertain to a method for treatment of the human body 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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004068

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0134939 A	15/12/2011	EP 2414510 A2 US 2012-0128655 A1 WO 2010-115052 A2 WO 2010-115052 A3	08/02/2012 24/05/2012 07/10/2010 04/08/2011
KR 10-2013-0133598 A	09/12/2013	KR 10-1535253 B1	08/07/2015
US 2012-0301446 A1	29/11/2012	CN 102753690 A EP 2531599 A2 EP 2531599 A4 JP 2013-518587A WO 2011-097181 A2 WO 2011-097181 A3	24/10/2012 12/12/2012 08/01/2014 23/05/2013 11/08/2011 23/02/2012
KR 10-2014-0059093 A	15/05/2014	NONE	
KR 10-2004-0108321 A	23/12/2004	KR 10-0601361 B1 WO 2004-110476 A1	13/07/2006 23/12/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61P 25/00; C12N 5/071; A61K 38/43; G01N 21/76; C12N 5/074; A61K 38/19; A61K 38/16

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: Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, 신경질환, 뇌신경

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0134939 A (더 맥클린 하스피털 코퍼레이션) 2011.12.15 청구항 1-3, 47 및 52-57 참조.	1-10
A	KR 10-2013-0133598 A (차의과학대학교 산학협력단) 2013.12.09 문헌 전체 참조.	1-10
A	US 2012-0301446 A1 (ZHU, Y. 등) 2012.11.29 문헌 전체 참조.	1-10
A	KR 10-2014-0059093 A (연세대학교 산학협력단) 2014.05.15 문헌 전체 참조.	1-10
A	KR 10-2004-0108321 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2004.12.23 문헌 전체 참조.	1-10

☐ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 08월 24일 (24.08.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 08월 24일 (24.08.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



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: 11-12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11-12은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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 10-2011-0134939 A	2011/12/15	EP 2414510 A2 US 2012-0128655 A1 WO 2010-115052 A2 WO 2010-115052 A3	2012/02/08 2012/05/24 2010/10/07 2011/08/04
KR 10-2013-0133598 A	2013/12/09	KR 10-1535253 B1	2015/07/08
US 2012-0301446 A1	2012/11/29	CN 102753690 A EP 2531599 A2 EP 2531599 A4 JP 2013-518587A WO 2011-097181 A2 WO 2011-097181 A3	2012/10/24 2012/12/12 2014/01/08 2013/05/23 2011/08/11 2012/02/23
KR 10-2014-0059093 A	2014/05/15	없음	
KR 10-2004-0108321 A	2004/12/23	KR 10-0601361 B1 WO 2004-110476 A1	2006/07/13 2004/12/23