

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 12월 7일 (07.12.2017) **WIPO | PCT**

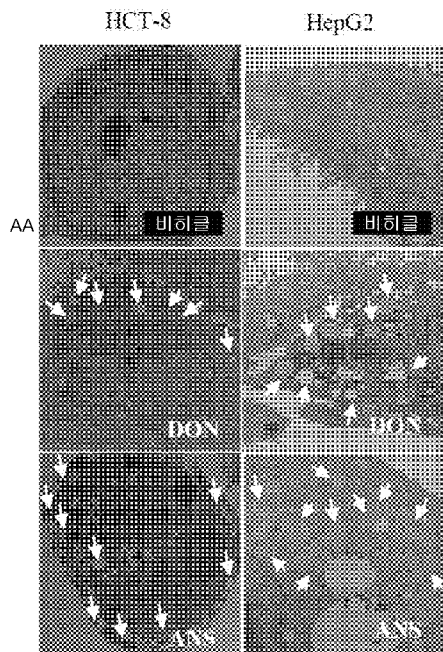


(10) 국제공개번호
WO 2017/209542 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/40* (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/005743
- (22) 국제출원일: 2017년 6월 1일 (01.06.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0068306 2016년 6월 1일 (01.06.2016) KR
- (71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRYUNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학로 63번길 2 (부산대학교), Busan (KR).
- (72) 발명자: 문유석 (MOON, Yu Seok); 50612 경상남도 양산시 물금읍 부산대학로 49 부산대학교 의학전문대학원 704호, Gyeongsangnam-do (KR). 김주일 (KIM, Ju Il); 50612 경상남도 양산시 물금읍 부산대학로 49 부산대학교 의학전문대학원 704호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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 국내 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), OAPI

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING LDL CHOLESTEROL-RELATED DISEASES, CONTAINING RIBOSOME-BINDING PREPARATION

(54) 발명의 명칭: 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



AA ... Vehicle

(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition for preventing or treating LDL cholesterol-related diseases, containing a ribosome-binding preparation; a food composition; and a method for preventing or treating LDL cholesterol-related diseases by using the composition. According to the present invention, the ribosome-binding preparation selectively increases the expression of an LDL receptor in intestinal epithelial cells so as to promote LDL absorption in blood and tissue, such that LDL level in the blood can be reduced, thereby being useful for preventing or treating various LDL cholesterol-related diseases including LDL hypercholesterolemia, hyperlipidemia, hypertension and apoplexy.

(57) 요약서: 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 상기 조성물을 이용한 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 리보솜 결합제제는 장상피 세포에서 LDL 수용체의 발현을 선택적으로 증가시킴으로써 혈액 및 조직의 LDL 흡수를 촉진하여 혈액 내 LDL의 수준을 저감시킬 수 있으므로 고LDL 콜레스테롤증, 고지혈증, 고혈압, 뇌졸중을 포함하는 각종 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 포유류 세포는 두 가지 종류의 기원으로부터 콜레스테롤을 얻는다. 첫 번째는 리포단백질 입자이고 나머지는 자유 콜레스테롤이다. 리포단백질과 자유 콜레스테롤의 흡수는 항상성을 유지하기 위하여 조절되며, 주요한 콜레스테롤 수송 비히클인, 저밀도리포단백질(LDL) 입자는 고농도의 콜레스테롤을 포함한다. 한편, 인간의 소장은 콜레스테롤 균형을 유지하는 데 있어 중요한 역할을 한다. 세포막 내에서 콜레스테롤의 축적은 독성을 가지므로, 콜레스테롤의 합성을 조절하기 위해서 흡수와 저장이 조절된다.
- [4] LDL 수용체(low density lipoprotein receptor: LDLR)는 막통과 당단백질(glycoprotein)로, 순환하는 콜레스테롤의 제거 과정에서 주요한 역할을 하며, 이의 활성은 세포 내 콜레스테롤 수준에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. LDL 수용체는 필수 지방산 및 콜레스테롤을 세포로 흡수하는 역할을 한다.
- [5] 한편, 동맥경화증, 뇌출혈, 뇌졸중, 뇌경색 등의 뇌혈관 질환 및 심장질환 등의 혈관질환은 사망원인 1, 2위를 차지하고 있는 성인병이다. 이러한 성인병은 현대사회로 발전하면서 식생활 양식의 변화 및 내외부적인 환경 스트레스로 인해 중장년층에서 빈번하게 발생하고 있다. 이들 질환의 주요 발병원인은 혈전으로 알려져 있으며, 혈전은 과잉 혈소판 응집에 의해 매개되는 병리현상으로 인식되고 있다. 혈소판은 혈관 손상시 콜라겐, 트롬빈, ADP 등과 같은 각종 작용물질의 자극에 의해 활성화되어 점착반응, 방출반응 및 응집반응을 일으킨다. 이러한 반응들은 지혈에 관련되어 있지만, 혈전 등을 포함하는 혈관 질환의 발병에 중요한 역할을 수행한다.
- [6] 전 세계적인 생활 양식의 변화로 인하여 LDL과 관련된 각종 성인병 및 혈관 질환이 점점 증가하고 있는 추세이나, LDL 수용체를 조절하여 이러한 질환을 치료할 수 있는 근본적 치료제에 대하여는 아직 밝혀진 바가 없어 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 이에 본 발명자들은 리보솜 결합제제를 통한 연구를 수행한 결과 리보솜 비활성화에 의하여 LDL 수용체의 발현 증가로 LDL의 흡수가 촉진됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [9] 본 발명의 목적은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 리보솜 결합제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[16]

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따른 리보솜 결합제제는 장상피 세포에서 LDL 수용체의 발현을 선택적으로 증가시킴으로써 혈액 및 조직의 LDL 흡수를 촉진하여 혈액 내 LDL의 수준을 저감시킬 수 있으므로 고LDL 콜레스테롤증, 고지혈증, 고혈압, 뇌졸중을 포함하는 각종 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[18]

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1a는 ANS를 섭취한 마우스의 장세포에서 지질방울을 Oil Red O 염색으로 확인한 결과를 보여주고, 도 1b는 DON 또는 ANS의 처리 후 혈청 내 총 콜레스테롤의 수준을 측정한 결과를 보여주며, 도 1c는 DON 또는 ANS의 처리 후 혈청 내 LDL-C의 수준을 측정한 결과를 보여준다.
- [20] 도 2는 HCT-8 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 지질방울을 Oil Red O 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 3은 HepG2 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 지질방울을 Oil Red O 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 4는 HCT-8 세포 및 HepG2 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른

콜레스테롤을 filipin으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[23] 도 5는 HCT-8 세포 및 HepG2 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 변화를 TEM으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[24] 도 6은 HCT-8 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 LDL 흡수를 LDL-Dylight™ 550 염색을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[25] 도 7은 HCT-8 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 LDL 수용체 발현을 시각화하기 위하여 DyLight™-488-접합된 LDLR 염색을 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[26] 도 8은 HCT-8 세포에서 DON의 처리에 따른 LDL 수용체의 mRNA 수준을 real-time RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[27] 도 9는 HCT-8 세포에서 DON의 처리에 따른 LDL 수용체의 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[28] 도 10은 HCT-8 세포에서 다양한 용량의 DON 및 ANS의 처리에 따른 LDL 수용체의 mRNA 수준을 real-time RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[29] 도 11은 HepG2 세포에서 다양한 용량의 DON 및 ANS의 처리에 따른 LDL 수용체의 mRNA 수준을 real-time RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[30] 도 12는 DON을 섭취한 마우스의 회장 및 공장에서 LDL 수용체에 대한 면역조직화학법 확인 결과를 나타낸 도이다.

[31] 도 13은 LDL 수용체에 대한 shRNA로 형질감염된 HCT-8 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 지질방울을 Oil Red O 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[32] 도 14는 LDL 수용체에 대한 shRNA로 형질감염된 HepG2 세포에서 DON 및 ANS의 처리에 따른 지질방울을 Oil Red O 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[33]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[35] 본 발명은 리보솜 결합제제(ribosome-binding agent)를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 상술한 리보솜 결합제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[37] 상기 개체는 LDL 콜레스테롤 관련 질환이 이미 발병되었거나, 발병될 가능성이 높다고 판단된 개체를 의미한다.

[38] 본 발명에서 "리보솜 결합제제(ribosome-binding agent)"는 리보솜에 결합하여 리보솜을 비활성화시키는 물질을 지칭하는 것으로, 세포 내에서 리보솜 비활성화로 인한 스트레스를 유도할 수 있는 것을 제한 없이 포함할 수 있다.

- [39] 상기 리보솜 결합제제는 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 아니소마이신(Anisomycin, ANS), 15-아세틸 디옥시니발레놀(15-acetyl deoxynivalenol, 15AcDON), 니발레놀(Nivalenol, NIV), T-2 독신(T-2 Toxin), 트리코테센(trichothecenes)류, 시가독소(shiga toxin), 시가유사독소(shiga-like toxins), 팔리독신(palytoxin), 예소독신(Yessotoxin), 리친(ricin), 푸로마이신(puromycin), 사이클로헥시미드(cycloheximide), 에메틴(emetine), 고우게로틴(gougerotin), RCA60, a-사르친(sarcin), 슈도모나스 엑소독신(Pseudomonas exotoxin) A 및 디프테리아 독신(diphtheria toxin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직한 예로서 본 발명의 리보솜 결합제제는 디옥시니발레놀 또는 아니소마이신일 수 있다.
- [40] 상기 리보솜 결합제제를 투여하는 경우, 장 상피 세포에서 LDL 수용체의 발현을 선택적으로 증가시킴으로써 혈액 및 조직의 LDL 흡수를 촉진하고, 혈액 내 LDL의 수준을 감소시킴으로써 각종 LDL 콜레스테롤 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [41] 본 발명의 약학적 조성물은, 리보솜 결합제제 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유할 수 있다.
- [42] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [43] 예를 들어 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [44] 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 에어로졸 제형, 주사용 제형이 있을 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다.
- [45] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효 성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [46] 경구투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [47] 본 발명의 약학적 조성물의 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 체중에 따라

달라질 수 있으나 0.0001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여될 수 있다.

- [48] 본 발명의 조성물은 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 화학적 치료, 방사 치료, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [49] 본 발명에서 LDL 콜레스테롤 관련 질환이란, 혈중 LDL 콜레스테롤의 농도 증가에 의하여 발생하는 질환을 지칭하며, 여기에는 대사성 질환 예컨대 비만, 지방간, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 고콜레스테롤증, 고LDL 콜레스테롤증, 심혈관질환 및 동맥경화증 등, 및 관상동맥 질환이 포함된다. 본 발명의 심혈관질환 또는 관상동맥 질환은 혈중 LDL 콜레스테롤의 수준 증가가 원인이 되어 발생한 질환을 지칭한다.
- [50] 따라서 본 발명의 리보솜 결합제에 의하여 치료 가능한 LDL 콜레스테롤 관련 질환은 비만, 지방간, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 고콜레스테롤증, 고LDL 콜레스테롤증, 심혈관질환, 동맥경화증 및 관상동맥 질환, 지방대사성 질환, 생활습관성 질환으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 고LDL 콜레스테롤증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 LDL 콜레스테롤 관련 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [52] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 LDL 콜레스테롤 관련 질환이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [53]
- [54] 또한, 본 발명은 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [55] 본 발명의 리보솜 결합제제는 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제로 사용될 수 있다.
- [56] 본 발명의 리보솜 결합제제를 식품 첨가제로 사용할 경우, 상기 리보솜 결합제제를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [57] 또한 상기 유효성분인 리보솜 결합제제의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 리보솜 결합제제는 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1 내지 80중량%로 포함된다. 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 리보솜 결합제제는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다.
- [58] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나 본 발명의 리보솜 결합제제를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프,

음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [59] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린 등의 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 0.01 내지 0.1중량%로 포함된다.
- [60] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [61] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에, 장기간 복용이 가능하다.
- [62] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [63]
- [64] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [65]
- [66] 실시예 1: 화학적 리보솜 비활성화 결합 제제에 의한 세포 내 콜레스테롤 축적 확인
- [67] 본 발명자들은 지방 축적에 대한 리보솜 비활성화의 효과를 인 비보 및 인 비트로 상에서 확인하고자 하였다.
- [68]
- [69] 1-1. 인 비보
- [70] 지방 축적에 대한 리보솜 비활성화의 효과를 확인하는 실험에 이용하기 위해서, 6주령의 수컷 B6C3F1 마우스(C57B1/6JxC3H/HeJ)를 Samtako Bio Korea (Osan, South Korea)에서 구입하였으며, 실험동물윤리위원회(PNU-2010-0291)에서 승인된 바에 따른 동물 실험 방법에 의하여 동물 실험을 수행하였다.
- [71] 마우스에 경구 섭식을 통하여 비히클, 25 mg/kg 아니소마이신(ANS) 또는

디옥시니발레놀(DON)을 투여하였다. 24시간 후, 마우스 장세포에서의 지질, 총콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 수준을 측정하기 위해서 면역조직화학법(IHC)을 수행하였다.

[72] 마우스 소장 세포를 Oil Red O 염색으로 세포내 지질 방울을 염색하고 400X 배율 현미경으로 이를 관찰하였다.

[73] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 실험군에서 장조직내 지방축적이 증가하였으며(도 1a), 반면 혈청 내 총 콜레스테롤(도 1b)과 LDL 콜레스테롤(도 1c)이 감소하였다.

[74]

[75] 1-2. 인 비트로

[76] 지방 축적에 대한 리보솜 비활성화의 효과를 확인하기 위해서, 리보솜 결합제제를 이용하여 리보솜 비활성화 스트레스에 노출시킨 장세포(enterocyte) 및 간세포(hepatocyte)를 Oil Red O로 염색하였다.

[77] 구체적으로, HCT-8 세포 및 HepG2 세포를 American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD, USA)에서 제공받았으며, 비히클, 1000 mg/ml 디옥시니발레놀(DON), 또는 2 μ M 아니소마이신(ANS)으로 24시간 동안 처리하였다. 세포 내 지질방울(lipid droplet)을 Oil Red O로 염색하고 X200 배율 현미경으로 관찰하였으며, HCT-8 염색 결과를 도 2에, HepG2 세포 염색 결과를 도 3에 나타내었다.

[78] 도 2에 나타난 바와 같이, 디옥시니발레놀(DON) 및 아니소마이신(ANS)과 같은 장병원성 리보솜 스트레스 시약은 HCT-8 세포에서 세포내 지방 축적을 용량 의존적으로 증가시킴을 확인하였다. 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 콜레스테롤을 조절하는 또 다른 기관인 인간의 간에서 유래한 HepG2 간세포에서 화학적 리보솜 비활성화에 대한 반응의 결과로 지방 축적을 확인하였으며, 이는 용량 의존적으로 축적됨을 확인하였다.

[79] 또한, HCT-8 및 HepG2 세포를 화학적 리보솜 비활성제(inactivator)인 DON 및 ANS로 24시간 동안 처리한 후, filipin으로 처리하여 세포 내 콜레스테롤을 특이적으로 염색한 결과를 도 4에 나타내었다.

[80] 도 4에 나타난 바와 같이, 리보솜 결합제제의 처리에 따른 리보솜 비활성화에 따라 장세포 및 간세포 내의 콜레스테롤 축적이 유의적으로 증가함을 확인하였으므로, 리보솜 비활성화 스트레스에 대한 반응으로 세포 내 지방 축적이 유발됨을 추가적으로 확인하였다.

[81] 또한, HCT-8 및 HepG2 세포를 비히클, 1000 ng/ml DON, 또는 2 μ M ANS로 48시간 동안 처리한 후, 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 X10,000배율로 확인한 결과를 도 5에 나타내었다.

[82] 도 5에 나타난 바와 같이, 화살표는 각 세포 내의 지질방울이며, 리보솜 비활성화가 세포 내에서 지질 방울의 수를 증가시켰으므로, 리보솜 비활성화가 지방독성(lipotoxicity)과 연관된 병리학의 발생과 연관되어 있음을 확인하였다.

- [83] 따라서, 리보솜 비활성화 스트레스가 세포 내로 콜레스테롤의 흡수를 향상시킴을 확인하였다.
- [84]
- [85] 실시예 2: 콜레스테롤의 흡수가 세포 LDL 수용체에 의하여 매개됨을 확인
- [86] 본 발명자들은 세포 내 콜레스테롤 축적을 확인하기 위해서, 장세포 내 LDLR (LDL 수용체)을 통한 LDL-콜레스테롤의 흡수를 측정하였다. HCT-8 세포를 비히클, 1000 ng/ml DON, 또는 2 μ M ANS로 24시간 동안 처리한 후, LDL 흡수를 시각화하기 위하여 LDL-Dylight™ 550(적색)으로 염색한 결과를 도 6에 나타내었으며, LDLR 발현을 시각화하기 위하여 DyLight™-488-접합된 LDLR(녹색)으로 염색한 결과를 도 7에 나타내었다.
- [87] 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 리보솜 비활성화에 의하여 표지된 외인성 LDL이 장세포로 흡수되는 것이 증가함을 확인하였고, LDLR 발현 또한 유의적으로 상향 조절됨을 확인하였다.
- [88] 따라서, 리보솜 결합제제의 처리에 따른 리보솜 비활성화 스트레스가 세포 내에서 LDL 흡수를 향상시키고, LDLR의 발현을 향상시킴을 알 수 있다.
- [89] 또한, HCT-8 세포를 비히클 또는 1000 ng/ml DON으로 표시된 시간 동안 처리하고, real-time RT-PCR을 이용하여 LDLR의 mRNA 수준을 측정하였다. 구체적으로, RiboEX(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 이용해서 RNA를 추출한 후, 각 시료로부터 RNA(100 ng)를 Prime Moloneymurine leukemia virus reverse transcriptase (Genethbio, Nonsan, South Korea)를 이용해서 cDNA로 전사하였다. n-Taq DNA polymerase (Enzynomics, Seoul, South Korea)를 이용하여 cDNA를 증폭한 후, 95°C에서 2분 처리한 후 각각 다른 사이클로 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초를 처리하였다. 상기와 같은 처리에 의하여 cDNA를 증폭한 후 전기영동으로 증폭을 확인하였다. FAM을 형광 레포터 염색약으로 사용하였고 FAM을 증폭된 cDNA의 산물의 5' 말단에 접합시켜 iCycler thermal cycler (Bio-Rad)로 real-time RT-PCR을 수행하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [90] 또한, HCT-8 세포를 비히클 또는 1000 ng/ml DON으로 표시된 시간 동안 처리하고, 전체 세포의 용해물을 사용하여 웨스턴 블롯으로 LDLR의 단백질 수준을 측정하였다. 구체적으로, 세포를 인산염 완충액으로 세척한 후, 용해 완충액(1% [w/v] SDS, 1.0 mM sodium orthovanadate, 및 10 mM Tris [pH 7.4])에 용해시킨 후, 5초 동안 초음파 처리하였다. 용해물을 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 이후 면역 블롯팅을 실시하여 단백질의 수준을 확인하였고 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [91] 추가적으로, LDLR 발현에 대하여 다른 용량의 화학적 리보솜 비활성제(DON, ANS)가 미치는 영향을 확인하기 위해서, 비히클, 0, 100, 500, 1000 ng/ml의 DON 또는 0, 500, 1000, 2000 nM의 ANS를 HCT-8 세포에 2시간 동안 처리하였다. 상기 세포에서 real-time RT-PCR을 이용하여 LDLR의 mRNA 수준을 측정하고 그

결과를 도 10에 나타내었으며, HepG2 세포도 마찬가지로 0, 100, 500, 1000 ng/ml의 DON 또는 0, 500, 1000, 2000 nM의 ANS를 1시간 동안 처리한 후, LDLR의 mRNA 수준을 측정하여 도 11에 나타내었다.

[92] 도 10 내지 도 11에 나타낸 바와 같이, 리보솜 결합제제인 DON과 ANS의 처리는 LDLR의 mRNA 수준 및 단백질 수준을 증가시킴을 확인하였으며, 이러한 증가는 DON과 ANS의 용량 의존적임을 확인하였다.

[93] 또한, 소장에서 리보솜-비활성화 스트레스가 LDLR 발현을 증가시키는지 확인하기 위하여, 추가적인 동물 실험을 수행하였다. 6주령의 수컷 B6C3F1 마우스(C57B1/6J×C3H/HeJ)를 Samtako Bio Korea (Osan, South Korea)에서 구입하였으며, 실험동물운영위원회(PNU-2010-0291)에서 승인된 바에 따른 동물 실험 방법에 의하여 동물 실험을 수행하였다. 마우스에 경구 섭식을 통하여 비히클 또는 25 mg/kg DON(25 mg/kg)을 투여하였다. 24시간 후, LDLR 발현 수준을 측정하기 위해서 회장(Ileum) 및 공장(jejunum)에 대하여 면역조직화학법(IHC)을 수행하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[94] 도 12에 나타낸 바와 같이, 경구 섭식을 통한 리보솜 결합제제인 DON의 투여에 의하여 마우스 소장에서 LDLR 발현의 증가가 확인되었으며, 특히 회장 및 공장의 용모 상피에서 LDLR의 발현이 증가함을 확인하였다.

[95] 또한, 리보솜 비활성화에 의하여 유도되는 지방의 축적이 LDLR에 의해 매개되는 콜레스테롤 흡수에 의존하는 것인지를 추가적으로 확인하기 위해서, LDLR에 대한 shRNA를 사용하였다. shRNA는 pSilencer 4.1-CMVneo 벡터 (Ambion, Austin, TX, USA)에 shRNA 주형(template)을 삽입하여 제조하였다. LDLR에 대한 shRNA를 갖는 플라스미드를 shLDLR로 표시하였다. LDLR shRNA는 5'-GGA CAG ATA TCA TCA ACG A-3'(서열번호 1) 서열을 타겟으로 한다. 인간 LDLR 프로모터(+94 내지 +30)를 포함하는 플라스미드(pLDLR 234-CRE-mutant)를 Dr. JingwenLiu (Department of Veterans Affairs Palo Alto Health Care System, Livermore, CA, USA)로부터 제공받았다. 제조업자의 프로토콜에 따라서 jetPRIME transfection reagent (Polyplus-transfection, New York, NY, USA)를 사용하여 플라스미드의 혼합물로 HCT-8 세포 및 HepG2 세포를 처리하였다. 형질감염의 효율을 pMX-GFP 벡터에서 발현시켜봄으로써 확인하였다. 형질감염하고 4시간 후, 배지를 교체하였고 세포를 또 다시 48시간 동안 배양하였다.

[96] 상기와 같이 빈 벡터 또는 LDLR에 대한 shLDLR로 형질감염시킨 HCT-8 세포 및 HepG2 세포를 비히클, 1000 ng/ml DON, 또는 2 μ M ANS로 처리하였다. 상기 세포에 대해 Oil Red O 염색으로 세포내 지질 방울을 염색하고 200X 배율 현미경으로 이를 관찰하였다. HCT-8 세포에 대한 결과를 도 13에, HepG2 세포에 대한 결과를 도 14에 나타내었다.

[97] 도 13 및 도 14에 나타낸 바와 같이, LDLR에 대한 shRNA에 의해서 LDLR의 발현이 억제됨을 확인하였고, LDLR 발현의 억제로 인하여 장세포 및

간세포에서 지질 축적이 유의적으로 감소함을 확인하였다.

- [98] 따라서, 리보솜 비활성화는 콜레스테롤의 세포 내 흡수를 향상시키고, 이는 LDLR에 의하여 매개되므로, 결과적으로 인간 장세포 및 간세포에서 LDLR의 발현에 의해서 지질의 축적이 증가함을 확인하였다.

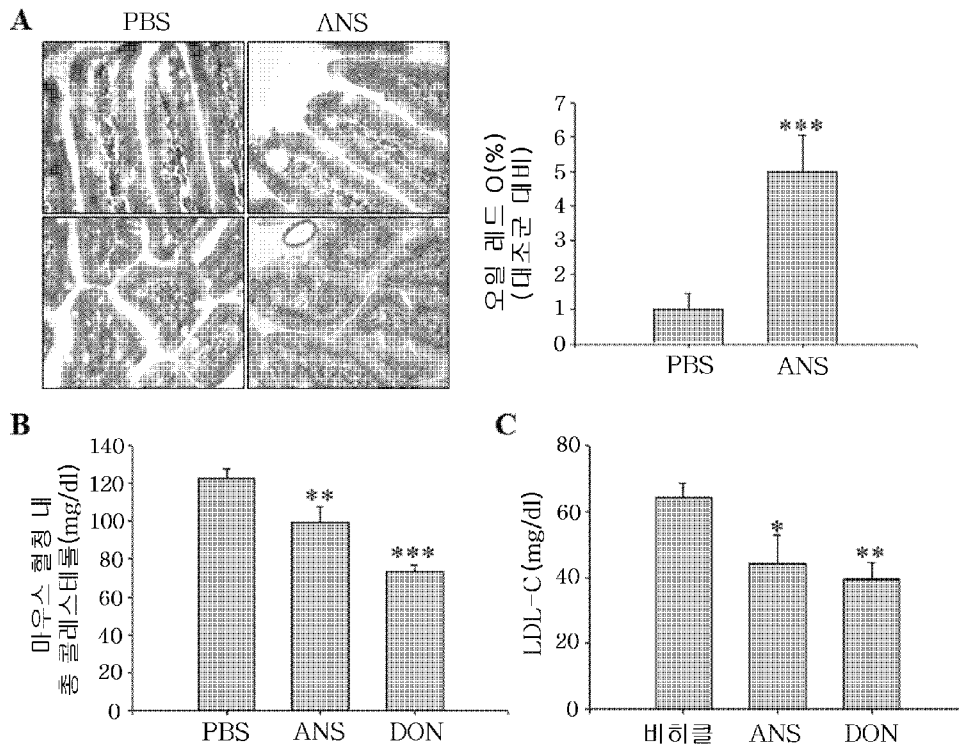
[99]

- [100] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

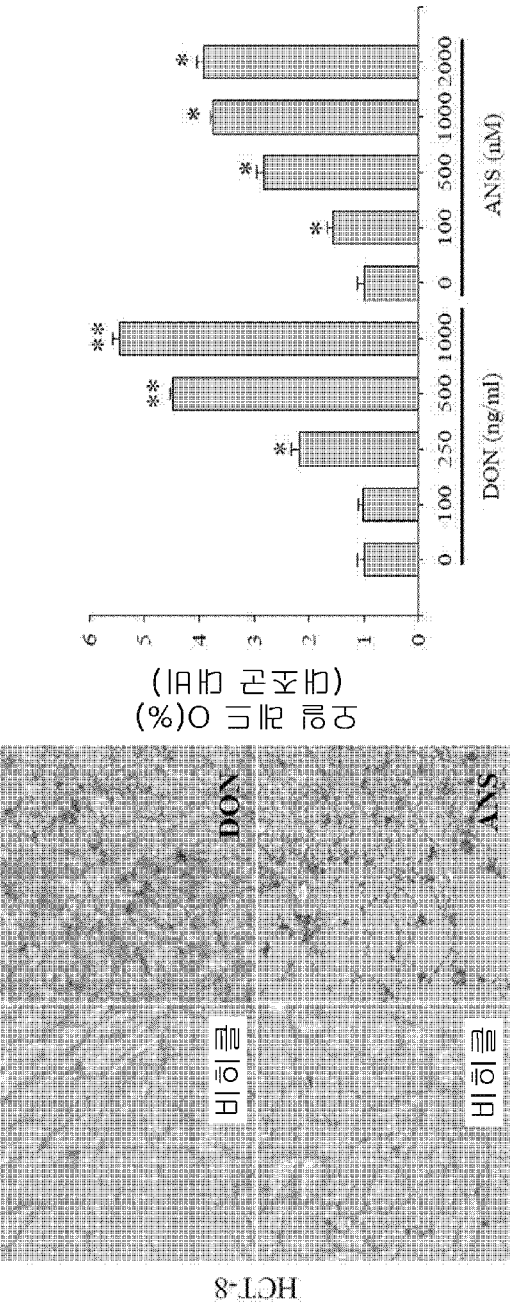
청구범위

- [청구항 1] 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL(low density lipoprotein) 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여용인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 리보솜 결합제제는 디옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 아니소마이신(Anisomycin, ANS), 15-아세틸 디옥시니발레놀(15-acetyl deoxynivalenol, 15AcDON), 니발레놀(Nivalenol, NIV), T-2 독신(T-2 Toxin), 트리코테센(trichothecenes)류, 시가독소(shiga toxin), 시가유사독소(shiga-like toxins), 팔리톡신(palytoxin), 예소톡신(Yessotoxin), 리친(ricin), 푸로마이신(puromycin), 사이클로헥시미드(cycloheximide), 에메틴(emetine), 고우게로틴(gougerotin), RCA60, a-사르친(sarcin), 슈도모나스 엑소톡신(Pseudomonas exotoxin) A 및 디프테리아 독신(diphtheria toxin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 리보솜 결합제제는 아니소마이신 또는 디옥시니발레놀인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 리보솜 결합제제는 LDL 수용체(low density lipoprotein receptor)의 발현을 증가시키는 것인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LDL 콜레스테롤 관련 질환은 비만, 지방간, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압, 고콜레스테롤증, 고LDL 콜레스테롤증, 심혈관질환, 및 동맥경화증으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LDL 콜레스테롤 관련 질환은 관상동맥 질환인, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 리보솜 결합제제를 포함하는 LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 리보솜 결합제제를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, LDL 콜레스테롤 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.

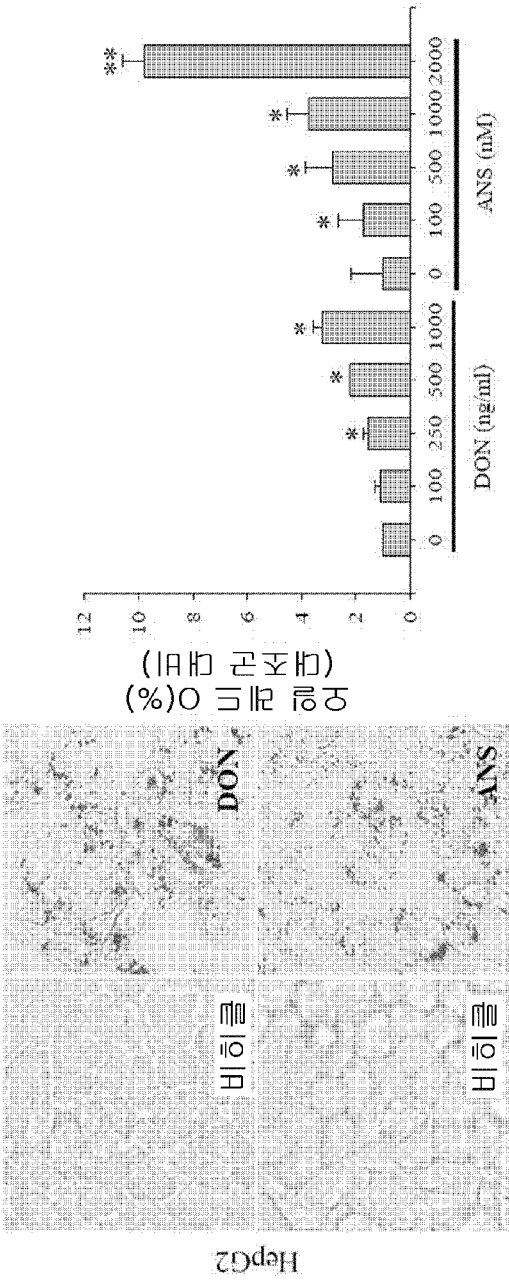
[도1]



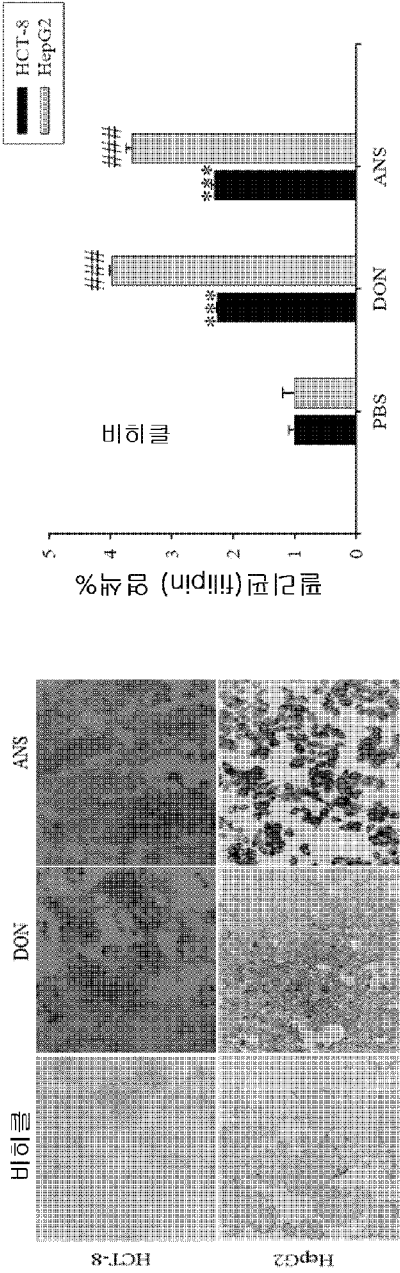
[도2]



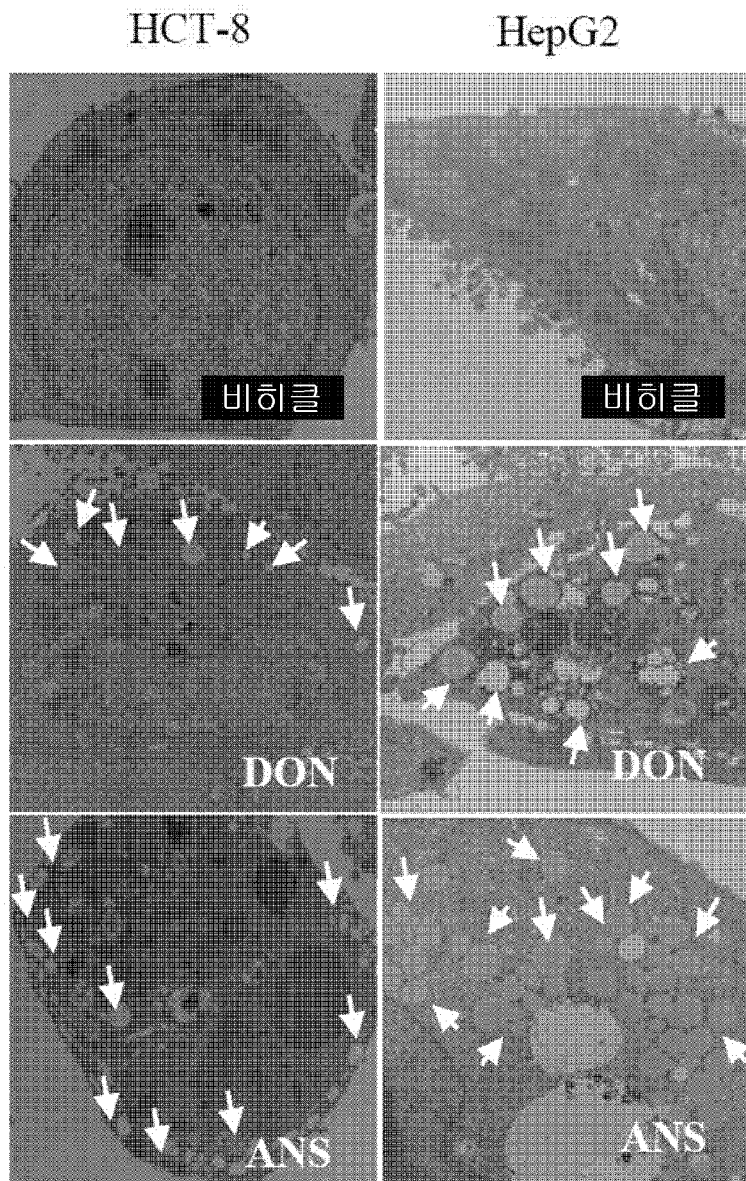
[도3]



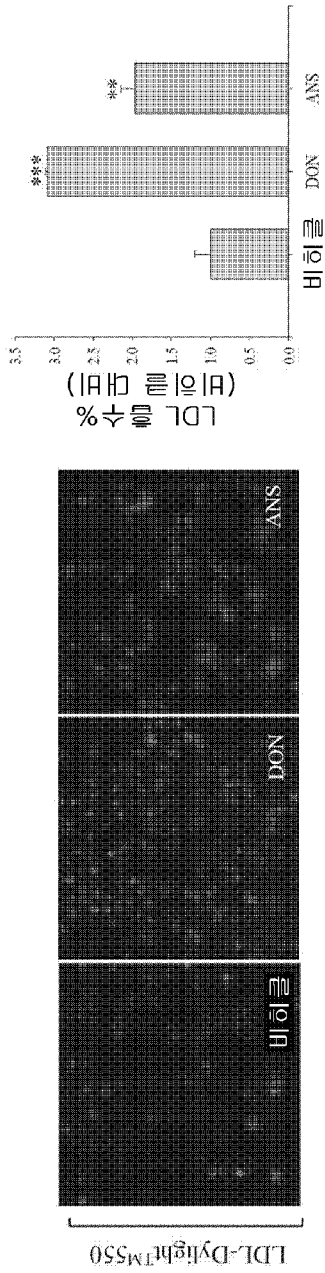
[도4]



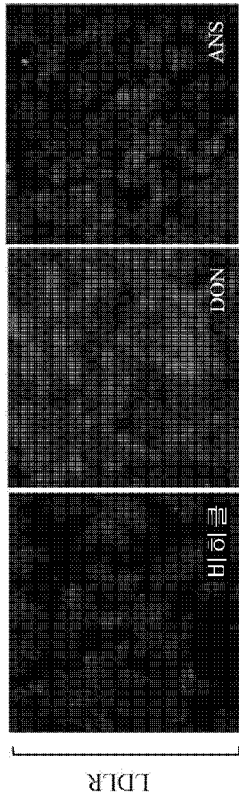
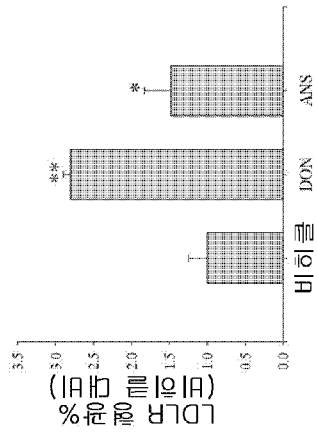
[도5]



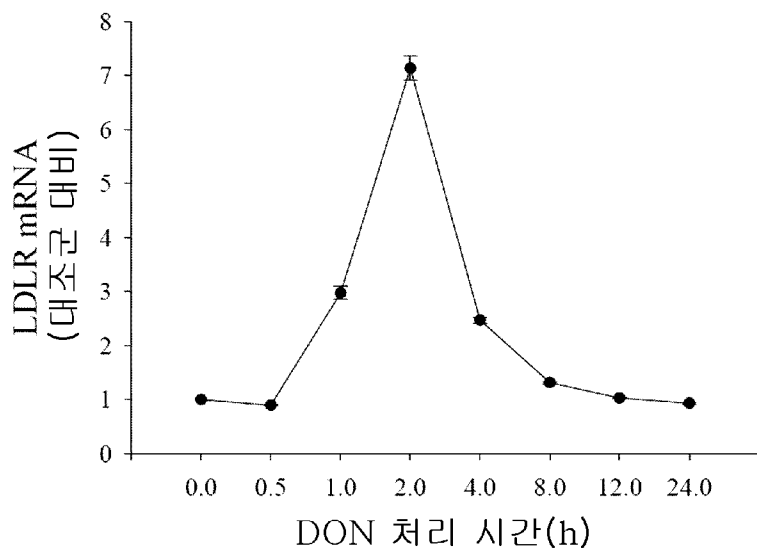
[도6]



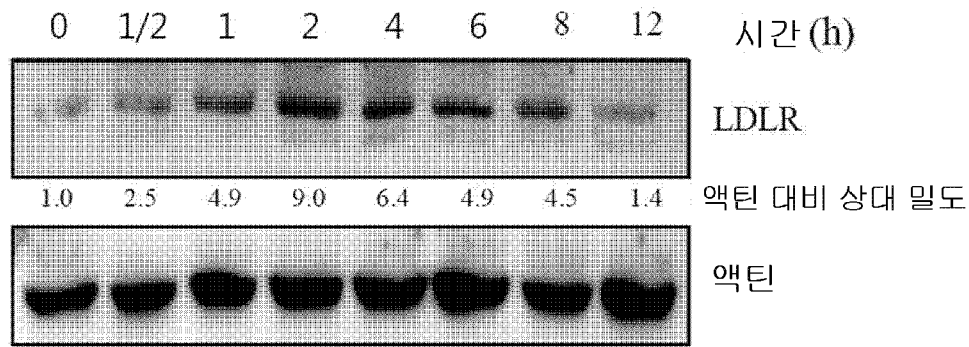
[도7]



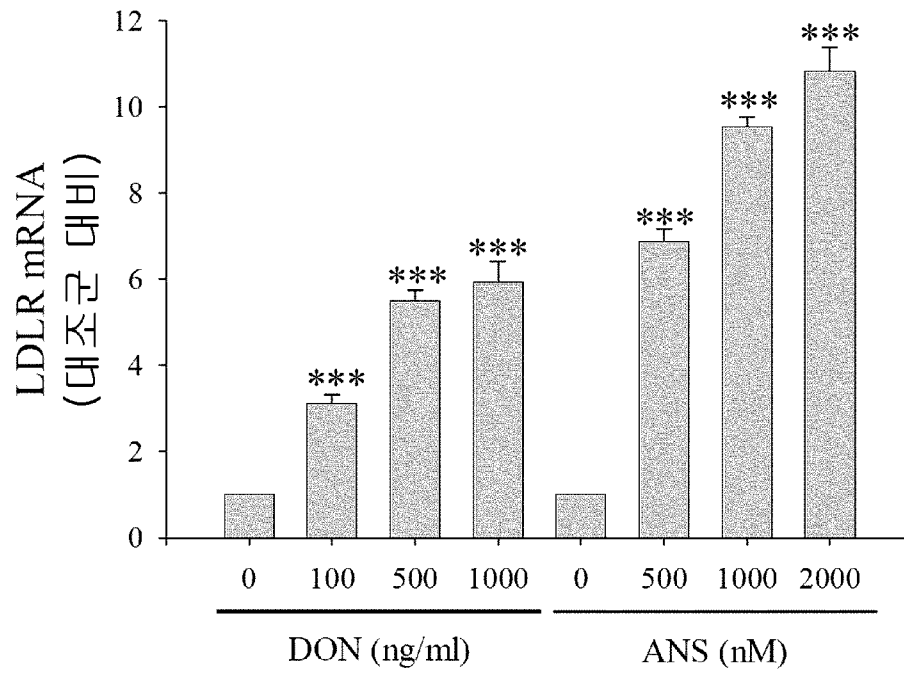
[도8]



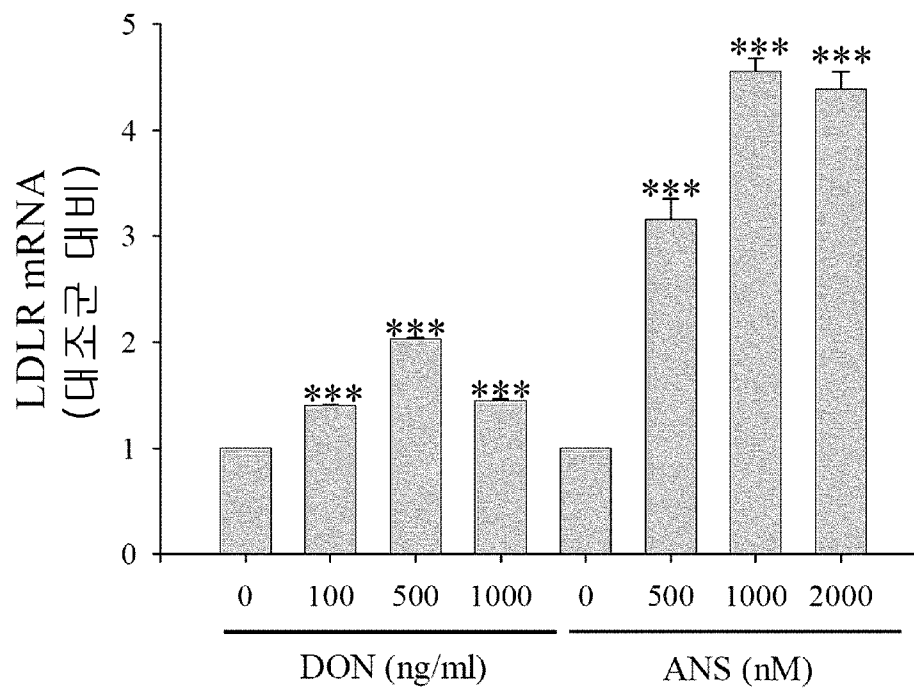
[도9]



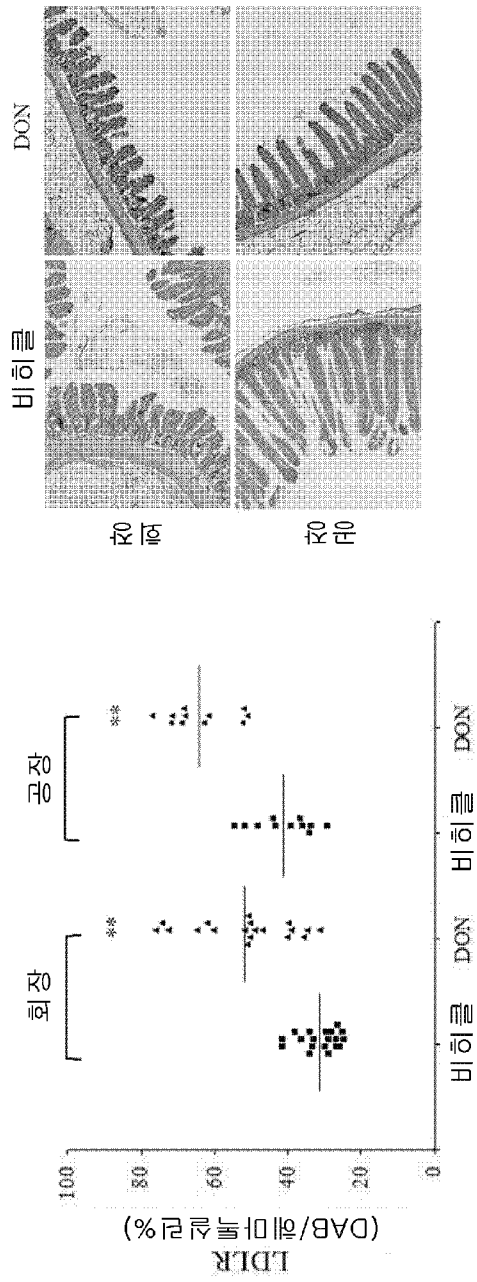
[도10]



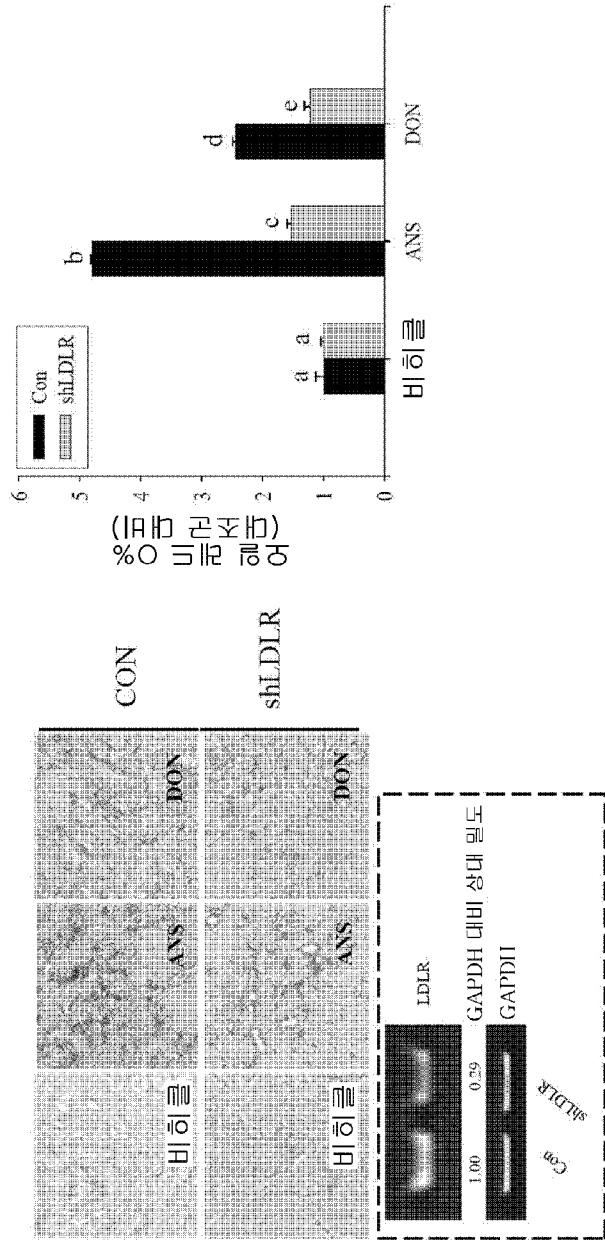
[도11]



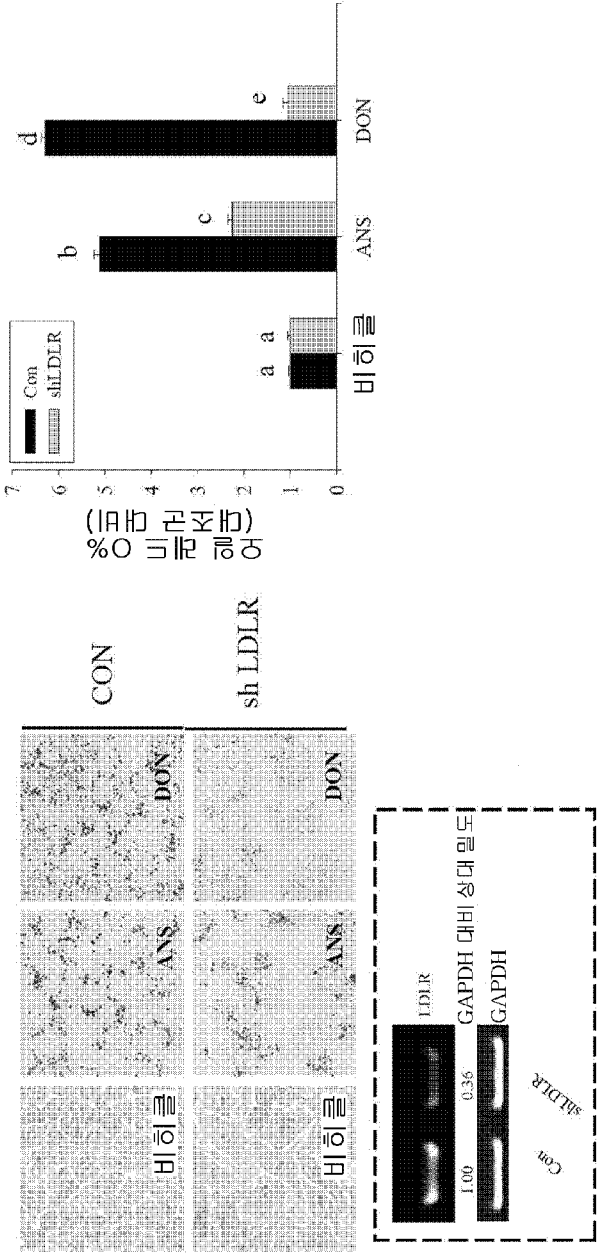
[도12]



[도13]



[도14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/005743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/336(2006.01)i, A61K 31/40(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)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 31/352; A61K 31/00; C12Q 1/48; A61K 31/138; A61K 31/445; A61K 31/454; A01N 25/00; A61K 31/336; A61K 31/40; A23L 33/10

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: ribosome coupling agent, anisomycin, deoxynivalenol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CROONS, V. et al., "The Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin Induces Macrophage Apoptosis in Rabbit Atherosclerotic Plaques Through p38 Mitogen-activated Protein Kinase", The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, vol. 329, no. 3, pages 856-864 See abstract; and pages 858-859.	1-8
Y	LIU, J. et al., "Reduced Macrophage Apoptosis is Associated with Accelerated at Herosclerosis in Low-density Lipoprotein Receptor-null Mice" Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005, vol. 25, pages 174-179 See abstract; and page 178.	1-8
A	WO 2016-042318 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 24 March 2016 See the entire document.	1-8
A	US 6756410 B2 (MEHTA, K. D.) 29 June 2004 See the entire document.	1-8
A	US 2004-0147557 A1 (BOUILLOT, A. et al.) 29 July 2004 See the entire document.	1-8



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

08 SEPTEMBER 2017 (08.09.2017)

Date of mailing of the international search report

08 SEPTEMBER 2017 (08.09.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/005743

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.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 9 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains 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/KR2017/005743

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2016-042318 A1	24/03/2016	NONE	
US 6756410 B2	29/06/2004	US 2002-0082192 A1 WO 02-18654 A1	27/06/2002 07/03/2002
US 2004-0147557 A1	29/07/2004	EP 1351937 A1 JP 2004-520348 A WO 02-055497 A1	15/10/2003 08/07/2004 18/07/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/352(2006.01)i, A61K 31/336(2006.01)i, A61K 31/40(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/352; A61K 31/00; C12Q 1/48; A61K 31/138; A61K 31/445; A61K 31/454; A01N 25/00; A61K 31/336; A61K 31/40; A23L 33/10 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: 리보솜 결합제제, 아니소마이신, 디옥시니발레놀																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CROONS, V. 등, 'The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase' The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009년, 329권, 3호, 페이지 856-864 초록; 및 페이지 858-859 참조.</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LIU, J. 등, 'Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice' Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005년, 25권, 페이지 174-179 초록; 및 페이지 178 참조.</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2016-042318 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2016.03.24 전체 문헌 참조.</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6756410 B2 (MEHTA, K. D.) 2004.06.29 전체 문헌 참조.</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004-0147557 A1 (BOUILLOT, A. 등) 2004.07.29 전체 문헌 참조.</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	CROONS, V. 등, 'The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase' The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009년, 329권, 3호, 페이지 856-864 초록; 및 페이지 858-859 참조.	1-8	Y	LIU, J. 등, 'Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice' Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005년, 25권, 페이지 174-179 초록; 및 페이지 178 참조.	1-8	A	WO 2016-042318 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2016.03.24 전체 문헌 참조.	1-8	A	US 6756410 B2 (MEHTA, K. D.) 2004.06.29 전체 문헌 참조.	1-8	A	US 2004-0147557 A1 (BOUILLOT, A. 등) 2004.07.29 전체 문헌 참조.	1-8
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	CROONS, V. 등, 'The protein synthesis inhibitor anisomycin induces macrophage apoptosis in rabbit atherosclerotic plaques through p38 mitogen-activated protein kinase' The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009년, 329권, 3호, 페이지 856-864 초록; 및 페이지 858-859 참조.	1-8																		
Y	LIU, J. 등, 'Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice' Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005년, 25권, 페이지 174-179 초록; 및 페이지 178 참조.	1-8																		
A	WO 2016-042318 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2016.03.24 전체 문헌 참조.	1-8																		
A	US 6756410 B2 (MEHTA, K. D.) 2004.06.29 전체 문헌 참조.	1-8																		
A	US 2004-0147557 A1 (BOUILLOT, A. 등) 2004.07.29 전체 문헌 참조.	1-8																		
☐ 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 신구성 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 2017년 09월 08일 (08.09.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 09월 08일 (08.09.2017)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 이경철 전화번호 +82-42-481-8611 																		

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: 9
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제9항은 치료에 의한 인체의 처치 방법에 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 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/KR2017/005743

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2016-042318 A1	2016/03/24	없음	
US 6756410 B2	2004/06/29	US 2002-0082192 A1 WO 02-18654 A1	2002/06/27 2002/03/07
US 2004-0147557 A1	2004/07/29	EP 1351937 A1 JP 2004-520348 A WO 02-055497 A1	2003/10/15 2004/07/08 2002/07/18