

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 5월 18일 (18.05.2017)

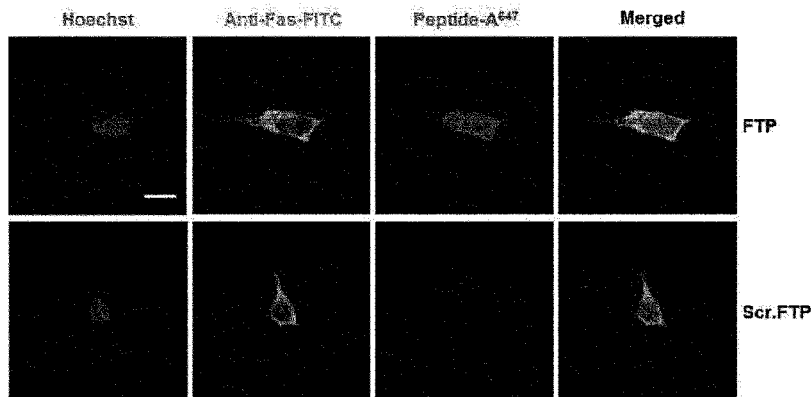


(10) 국제공개번호
WO 2017/082707 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 38/08* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/013075
 - (22) 국제출원일: 2016년 11월 14일 (14.11.2016)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보: 10-2015-0159982 2015년 11월 13일 (13.11.2015) KR
 - (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
 - (72) 발명자: 이상경 (LEE, Sang-Kyung); 05572 서울시 송파구 올림픽로 4길 15, 8동 302호 (잠실동, 아시아선 수촌아파트), Seoul (KR). 울라이르판 (ULLAH, Irfan); 04763 서울시 성동구 왕십리로 222, IT/BT 관 911호 (사근동), Seoul (KR). 정건호 (CHUNG, Kun Ho); 05003 서울시 광진구 광나루로 361, 102동 701호 (군자동, 광진 동양파라곤 2단지), Seoul (KR). 오정주 (OH, Jung Ju); 12251 경기도 남양주시 도농로 34, 401동 1903호 (도농동, 부영그린타운), Gyeonggi-do (KR). 이민형 (LEE, Min Hyung); 13836 경기도 과천시 별양로 111, 507동 702호 (별양동, 주공아파트), Gyeonggi-do (KR). 쿠마프리티 (KUMAR, Priti); 06437 코네티컷주 길포드, 넷플레이스가 600, Connecticut (US).
 - (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, 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, 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 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), 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))
 - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

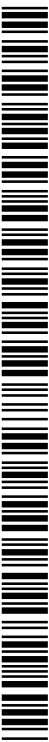
(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING APOPLEXY THROUGH NASAL ADMINISTRATION

(54) 발명의 명칭 : 비강 투여를 통한 뇌졸중 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a nasal administration composition for preventing or treating ischemic cerebrovascular diseases, containing a Fas targeting peptide (FTP). When using the pharmaceutical composition or kit of the present invention, a drug can be effectively delivered to brain tissue and the ischemic cerebrovascular disease of a subject can be effectively prevented or treated.

(57) 요약서: 본 발명은 FTP(Fas Targeting Peptide)를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강투여용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약제학적 조성물 또는 키트를 이용하면 약물의 효과적인 뇌조직 전달이 가능하고, 대상체의 허혈성 뇌혈관질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.



WO 2017/082707 A1

명세서

발명의 명칭: 비강 투여를 통한 뇌졸중 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 FTP(Fas Targeting Peptide)를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강투여용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 흔히 뇌졸중이라고 불리는 뇌혈관 질환은 악성 종양, 심장 질환과 함께 인류 3대 사망원인의 하나이며 특히 우리나라 인구의 고령화 시대에 접어드는 속도가 빨라질수록 중요한 질환의 하나로 자리 잡고 있다. 뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터짐으로써, 뇌의 국소적인 부분이 손상되어 나타나는 질환으로, 흔히 '중풍'으로 알려져 있다. 증상으로는 반신마비, 감각장애, 언어장애, 발음장애, 시력 및 시야장애, 복시, 두통, 어지럼증, 의식장애, 식물인간 상태 및 치매 등이 있다. 뇌졸중은 뇌의 혈관이 완전히 막히거나 심하게 좁아져 조직 내 혈류가 공급되지 못하여 발생하는 허혈성 뇌졸중(80~85%)과 출혈에 의해 뇌세포의 기능이 손상되는 증상인 출혈성 뇌졸중(15~20%)으로 나뉜다. 뇌졸중은 우리나라 사망률의 2위, 전 세계적 사망률의 3위를 차지하고 있으며 뇌졸중에서 살아남은 환자도 약 50% 이상에서 여러 가지 장애가 남아 환자뿐 아니라 환자를 돌보아야 하는 사람들에게 사회적 부담을 주고 있다.
- [3] 허혈성 뇌졸중이 출혈성 뇌졸중에 비해 압도적으로 많은 비중으로 발병되며, 뇌에 혈류를 공급하는 뇌혈관에 여러 가지 형태의 병리학적 이상이 발생하여 뇌의 일정한 부위에 뇌혈행장애를 일으켜 뇌기능이 떨어지거나 아니면 뇌가 궁극적으로 허혈성 경색이 발생하게 된다. 허혈(Ischemia)이란 신체기관, 조직 또는 부위의 혈류 공급 감소 상태를 말하며, 궁극적으로 비가역적인 손상인 세포 및 조직의 괴사(necrosis)로 이어지게 된다. 특히, 뇌나 심장은 혈류 부족에 가장 민감한 신체 기관으로서, 예를 들어, 뇌졸중 또는 두부 손상 등으로 조직에 허혈이 발생하면 허혈폭포반응(ischemic cascade)이라고 불리는 과정들이 촉발되어 뇌 조직이 영구적으로 손상된다. 다만, 그 주위 조직은 회복될 수 있는 반 음영 영역(Penumbra zone)이 있어서 이 부위가 의학적 치료의 대상이 된다.
- [4] 전체 뇌졸중의 대부분을 차지하고 있는 허혈성 뇌졸중은 급성기(7일 이내) 혹은 아급성기(4주 이내) 임상 경과에 따라 향후 환자의 예후가 결정되는 경우가 많다. 이러한 허혈성 뇌졸중에서 급성기 치료의 생리적 표적인 뇌-허혈반음영(ischemic penumbra)의 뇌조직이 다시 기능을 하도록 혈류를 재공급시키기 위해서 재개통치료가 수행된다. 하지만, 현재까지 정맥제 투여방법으로는 증상발현 4.5시간 이내까지 또는 동맥 내 방법으로는 6시간 이내에 재개통이 되어야 환자의 예후를 호전시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

하지만, 우리나라를 포함하여 세계적으로도 뇌졸중 환자가 시간 내에 발견되어 적절한 응급실에서 재개통 치료를 받을 수 있는 비율은 극히 낮은 수준이다. 따라서 대부분의 급성 허혈성 뇌졸중 환자들이 적절한 치료를 받지 못하고 있는 실정이기 때문에 급성기 환자에서 안전하고 효과적인 새로운 치료법은 너무도 절실하다.

- [5] 한편, 세포 사멸 신호 전달과 관련하여 Fas/FasL 상호 작용의 캐스케이드(cascade) 촉발이 알려져 있다. 이와 관련하여 Fas 모방체(mimetics)로서 종래 고리형 Fas 타겟팅 펩타이드가 보고된 바 있으며(Hasegawa et al, 2004. Fas-disabling small exocyclic peptide mimetics limit apoptosis by an unexpected mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 101:6599-6604 및 US 2012-0245081, 2012.09.27), 이에 의해 Fas-관련 질병을 치료하고자 하는 시도가 있었다.
- [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 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료를 위해 뇌세포로 즉각 전달되어 뇌세포 사멸을 억제할 수 있는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 FTP(Fas Targeting Peptide)를 비강내 투여를 이용하여 뇌조직으로 전달하는 경우, 효과적으로 허혈성 뇌혈관질환에 의한 뇌세포 사멸을 억제할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 조성물을 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 키트를 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO. 1의 아미노산 서열로 이루어진 FTP(Fas Targeting Peptide)를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 제고한다.
- [13] 본 발명은 또한 상기 비강 투여용 조성물; 및
- [14] 상기 조성물의 비강 투여를 위한 주입 장치를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환

예방 또는 치료를 위한 키트를 제공한다.

- [15] 본 발명은 또한 상기 비강 투여용 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [17] (a) 본 발명은 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [18] (b) 본 발명은 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 키트를 제공한다.
- [19] (c) 본 발명의 약제학적 조성물 또는 키트를 이용하면 약물의 효과적인 뇌조직 전달이 가능하다.
- [20] (d) 본 발명의 약제학적 조성물 또는 키트를 이용하면 대상체의 허혈성 뇌혈관질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1a는 저산소증 Neuro2a 세포에서 Fas의 발현을 보여준다. 대표적인 히스토그램은 저산소증의 유도 후 Fas의 발현을 보여준다(왼쪽 패널). % Fas 발현을 보여주는 누적 데이터(중간 패널) 및 MFI(오른쪽 패널)를 보여준다. 채워진 히스토그램은 이소타입 이뮤노글로불린 G(isoIgG) 처리된 세포를 나타내고, 점선 및 실선 히스토그램은 각각 정상 및 저산소증 세포에서의 Fas 발현을 나타낸다.
- [22] 도 1b는 저산소증 Neuro2a 세포에의 FTP의 결합을 보여준다. 대표적인 히스토그램은 Fas를 발현하는 Neuro2a 세포에서 FTP의 결합을 보여준다(왼쪽 패널). % Fas 발현을 나타내는 누적 데이터(중간 패널) 및 alexa 488이 결합된 Scr-FTP 또는 FTP로부터 얻은 MFI(오른쪽 패널)를 보여준다. 채워진 히스토그램은 isoIgG 처리된 저산소증 세포를 나타내며, 점선 및 실선 히스토그램은 각각 저산소증 세포에의 Scr-FTP 및 FTP의 결합을 나타낸다.
- [23] 도 1c는 Fas 항체 및 FTP 간의 경쟁적 분석 결과를 보여준다. 대표적인 히스토그램은 FTP 처리 후 저산소증 세포에 대한 Fas 항체의 결합을 보여준다. 데이터는 3반복 실험의 평균 \pm SD로 나타낸다. $**P<0.01$, $***P<0.001$. 정상 산소증은 정상 배양 조건에서 유지된 세포를 나타내고, 저산소증은 OGD 배지에서 24시간 배양한 다음, 혈청-함유 DMEM 배지에서 24시간 동안 다시 산소를 제공한 세포를 나타낸다. FTP: Fas targeting peptide, Scr-FTP: scrambled peptide.
- [24] 도 2a는 Fas를 발현하는 저산소증 Neuro2a 세포에 FTP가 특이적으로 결합하는 것을 보여주며, 대표적인 공초점 현미경 사진도는 Hoechst 염색된 핵(파란색), Fas 발현(녹색), Fas 발현 세포에 결합하는 FTP 펩타이드(적색) 및 Fas 및 FTP 펩타이드의 코-로칼라이제이션(노란색)을 보여준다.

- [25] 도 2b는 Neuro2a 세포에서 아팍토시스의 유세포 분석 결과와, % annexin V, 7-AAD 양성 세포와 annexin V 및 7-AAD 둘 다에 대해 이중 양성 세포를 보여주는 대표적인 점도표(상단 패널) 및 누적 데이터(하단 패널)를 보여준다.
- [26] 도 2c는 cleaved caspase-8 및 caspase-3 단백질을 보여주는 대표적인 웨스턴 블랏 결과(왼쪽 패널)와 imageJ 소프트웨어를 이용하여 베타-액틴에 대해 표준화된 단백질의 상대 수준을 보여주는 막대 그래프이다(오른쪽 패널). 데이터는 평균±SD로 표시한다.** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s.- 유의적이지 않음. 정상 산소증은 정상 배양 조건 하에서 유지된 세포를 나타내며, 저산소증은 OGD 배지에서 24시간 동안 유지된 다음 혈청-함유 DMEM 배지에서 24시간 동안 다시 산소를 제공한 세포를 나타낸다. 모든 경우에서, 누적 데이터는 3반복 실험으로부터 나타낸다. FTP-A⁴⁸⁸: Alexa⁴⁸⁸ 표지된 FTP, ScrFTP: scrambled-FTP peptide, OGD: Oxygen glucose deprivation.
- [27] 도 3은 전장 및 cleaved caspase-8 및 caspase-3을 보여주는 대표적인 웨스턴 블랏 사진도이다. 정상 산소증은 정상 배양 조건에서 유지된 세포를 나타내고, 저산소증은 OGD 배지에서 24시간 동안 유지된 다음 혈청-함유 DMEM 배지에서 24시간 동안 다시 산소가 제공된 세포를 나타낸다. FTP: Fas targeting peptide, Scr-FTP: scrambled peptide.
- [28] 도 4a는 MCAO 수술에 노출된 뇌에서 Fas의 발현을 보여주는 사진도이다. 대표적인 현미경 사진도는 일정 시간 재관류 후 뇌의 정상 및 허혈성 코어에서 Fas 발현을 보여준다. 스케일 바는 주요 도면 및 삽입도에서 각각 x 100 및 x400를 나타낸다.
- [29] 도 4b는 단일세포 현탁을 일정 시간 재관류 후 정상 및 MCAO 랫트 뇌(n=3)의 좌반구 및 우반구에서 제조하며, Fas의 발현은 FACS로 측정하였다. 대표적인 히스토그램은 상단 패널에 나타내며, %FAS 발현을 보여주는 누적 데이터(하단 왼쪽 패널) 및 평균 형광 강도 MFI(하단 오른쪽 패널)를 보여준다. 채워진 히스토그램은 정상 랫트 뇌를 나타내나 점과 실선 히스토그램은 MCAO 수술을 받은 랫트 뇌의 각각 대측형 및 동측형 코어를 나타낸다.
- [30] 도 4c는 MCAO 모델(3마리)에서 비강 접종된 FTP의 체내-분포도를 보여준다. 뇌(상면도 및 관상면도)는 접종 후 일정 시간에 alexa⁴⁸⁸ 표지된 FTP(FTP-A⁴⁸⁸)의 존재에 대해 시험하였다. PBS, alexa⁴⁸⁸로 표지된 스크램블드 펩타이드(Scr-A⁴⁸⁸) 또는 alexa⁴⁸⁸로 표지된 FTP(FTP-A⁴⁸⁸)를 보여준다. 대표적인 사진도(왼쪽 패널) 및 상면도(오른쪽 상단 패널) 및 관상면도(오른쪽 하단 패널)에서 상대 형광 강도를 보여주는 누적 데이터는 특정 테스트 코히트±표준 오차로부터 각 분리된 기관에 대해 임의의 픽셀 값에서 측정된다.
- [31] 도 4d는 뇌세포의 유세포 분석 결과이다. 각 표시된 그룹(그룹당 3마리)의 동측형 코어 유래의 단일세포 현탁은 접종 후 일정 시간 후에 제조되었다. MCAO 랫트에서 유래된 PBS, Scr-A⁴⁸⁸ 또는 FTP-A⁴⁸⁸를 보여준다. 대표적인 히스토그램(상단 패널) 및 동측형 영역(하단 왼쪽 패널)에서 % FTP-Alexa⁴⁸⁸ 양성

세포를 나타내는 누적 데이터 및 MFI를 보여준다(하단 오른쪽 패널). 채워진 히스토그램은 PBS 처리된 랫트에 해당한다. 점 또는 오픈 히스토그램은 각각 Scr-FTP 또는 FTP 처리된 랫트를 나타낸다.

- [32] 도 4e는 FTP 처리 후 뇌 경색의 측정 결과이다. 대표적인 TTC 염색 데이터는 재관류 후 일정 시간에 각 그룹(3마리)에서 뇌 경색(왼쪽) 및 경색 부피의 비율(%)(오른쪽)을 보여준다.
- [33] 도 4f는 정상 또는 재관류 후 일정 시간에 PBS, Scr-FTP 또는 FTP 처리된 랫트로부터 MCAO 처리된 뇌에서 얻은 H&E 염색된 파라핀 고정된 절편을 이용한 뇌의 대표적인 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 보여준다.
- [34] 도 4g는 재관류 후 일정 시간에 시험 랫트에서 얻은 MCAO 랫트에서의 아팍토시스를 측정한 뇌의 TUNEL 염색 결과를 보여준다. 뇌 절편(g. 상단 패널)의 대표적인 사진도는 정상 또는 PBS, scr-FTP 또는 FTP이 접종된 MCAO 유도된 랫트의 동측형 코어에서 TUNEL 양성 세포(적색) 및 DAPI 염색된 핵(파란색)을 보여준다. TUNEL 양성 세포는 랫트의 그룹(그룹당 3마리)으로부터 보인다(하단 패널). 수치는 TUNEL 양성 세포 \pm SD로 표현된다.
- [35] 도 4h는 재관류 후 일정 시간에서 Kaplan-Meier 생존 곡선을 보여준다. 데이터는 각 그룹(20마리)으로부터 취합하였고 %생존율을 계산하였다.
- [36] 도 4i는 시험 랫트의 신경 점수를 보여준다. 신경 점수는 일정 시간에 등급을 측정하여 각 시험 그룹(n=3)으로부터 계산하였다. 데이터는 3반복 실험의 평균 \pm SD로 나타낸다. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 및 n.s 유의적이지 않음.
- [37] 도 5는 정상 랫트(그룹 당 3마리)에서 비강 접종된 alexa-488 표지된 FTP (FTP-A⁴⁸⁸)의 세포 내-분포를 보여준다. 비강 투여 후 12시간 및 48시간에 형광의 존재에 대해 뇌에서 시험하였다. PBS 또는 alexa-488 표지된 스크램블드 펩타이드(Scr-A⁴⁸⁸) 및 FTP-A⁴⁸⁸ 는 일정 시점에서 관찰하였다.
- [38] 도 6은 FTP-A⁴⁸⁸이 비강으로 접종된 랫트에서 좌반구에서 얻은 단일세포의 유세포 분석 결과이다. 각 대표 그룹(n=3)의 대측성 코어 유래의 단일세포 현탁은 MCAO 랫트에 PBS, Scr-A⁴⁸⁸ 또는 FTP-A⁴⁸⁸의 접종 후 일정 시간 후 분석하였다. 대표적인 히스토그램(상단 패널) 및 %FTP-Alexa⁴⁸⁸ 결합된 세포를 나타내는 누적 데이터(하단 왼쪽 패널) 및 MFI(하단 오른쪽 패널)을 보여준다. 채워진 히스토그램은 PBS 처리된 랫트에 해당하며, 점 또는 오픈 히스토그램은 각각 Scr-FTP 또는 FTP 결합된 세포를 나타낸다.
- [39] 도 7은 접종 후 일정 시간에 MCAO 랫트 모델에서(n=3) 비강 접종된 alexa⁴⁸⁸ 표지된 FTP의 세포 내-분포를 보여준다. PBS, Scr-FTP-Alexa⁴⁸⁸ 또는 FTP-Alexa⁴⁸⁸ 접종된 랫트의 부비동, 폐, 간, 비장 및 신장에서 실험하였다. 특정 기관의 대표 사진도(상단 패널) 및 특정 시험 코허트 \pm 표준오차로부터 각 분리된 기관에 대한 임의의 픽셀값에서 측정된 평균 형광 강도를 나타내는 3마리 랫트에서 얻은 누적 데이터(하단 패널).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 SEQ ID NO. 1로 이루어진 FTP(Fas Targeting Peptide)를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [41] 본 발명자들은 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료를 위해 뇌세포로 즉각 전달되어 뇌세포 사멸을 억제할 수 있는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 FTP(Fas Targeting Peptide)를 비강내 투여를 이용하여 체내로 전달하는 경우, 효과적으로 허혈성 뇌혈관질환에 의한 뇌세포 사멸을 억제할 수 있음을 규명하였다.
- [42] 본 명세서 상의 용어 "허혈성 뇌혈관질환"은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관에 여러 가지 형태의 병리학적 이상이 발생되어 정상적 뇌혈류의 장애를 초래하게 되는 질환을 의미하고, "허혈성 뇌졸중" 또는 "뇌경색"의 용어와 혼용하여 기재할 수 있다.
- [43] 본 발명인 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 조성물의 유효 성분인 FTP(Fas Targeting Peptide)는 Fas와 이의 리간드인 FasL 간의 상호작용을 억제하기 위한 펩타이드 시퀀스로서 알려져 왔다. Fas 및 이의 특이적 리간드인 FasL은 각각 TNF 수용체 및 TNF 리간드 수퍼패밀리(TNF ligand superfamily, TNFSF)에 속하는 단백질의 구성원이다. Fas와 FasL 간의 상호작용은 Fas-발현 타겟에서 세포 사멸을 초래하는 세포내 이벤트들의 캐스캐이드(cascade)를 촉발시킨다. Fas는 뇌세포를 비롯한 다양한 조직 세포에서 발현되는 막 단백질이고, FasL은 림프기관 및 면역-관련 조직들에서 주로 발현되는데, 허혈에 의한 뇌손상시 Fas의 발현이 증가함이 보고된 바 있다(Expression of Fas and Fas Ligand After Experimental Traumatic Brain Injury in the Rat, *J Cereb Blood Flow Metab.* Vol. 20, No. 4, 2000).
- [44] 본 발명의 FTP는 Fas 펩타이드 모방체(mimetics)로서, Fas 활성화, 특히 Fas-매개된 시그널링을 억제한다. 다만, 본 발명의 조성물을 정맥 투여 또는 경구 투여 하는 경우, 유효물질이 BBB(Blood-Brain Barrier)를 쉽게 통과하지 못하고 뇌로의 전달 효율이 현저히 떨어지게 된다.
- [45] 이에 본 발명자들은 FTP를 포함하는 약제학적 조성물을 비강 경로로 투여하는 경우, BBB 통과에 문제없이 뇌 조직으로 효과적으로 전달되어 뇌 경색을 비롯한 허혈성 뇌혈관질환에 의한 뇌세포 사멸을 예방 또는 치료할 수 있음을 규명하였다.
- [46] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 허혈성 뇌세포 사멸을 억제한다. 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통하여, 허혈성 동물 모델의 뇌의 허혈 부위의 면적이 본 발명인 조성물의 비강 경로 투여에 의해 현저히 감소한다는 것을 보였다.
- [47] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 허혈성 뇌세포 사멸 억제는 FTP의

수용체로서의 Fas와의 결합을 통한 Fas 신호전달(signaling) 억제에 의한 것이다. Fas와 FasL 간의 상호작용이 Fas-발현 타겟에서 세포 사멸을 초래하는 세포내 이벤트들의 캐스케이드(cascade)를 촉발시키는데, 허혈에 의한 뇌손상시 Fas의 발현이 증가된다는 것에 대해 상술하였다. 비강 경로로 투여된 본 발명의 조성물은 뇌 조직으로 효과적으로 전달되어, 뇌 허혈에 의해 발현이 증가된 Fas에 의한 세포 사멸을 초래하는 캐스케이드 촉발을 억제시킨다. 본 발명자들은 본 발명의 조성물의 비강투여시 뇌조직에 약물의 수용체가 존재하는 경우, 약물이 전달되어 뇌세포 사멸을 억제하는 효과를 발휘하는 것을 확인하였다. 정상적인 뇌조직의 경우 약물에 대한 수용체가 발현되지 않을 시에는 약물이 결합하지 못함을 확인하였다. 결론적으로 본 발명의 조성물을 비강 내로 투여하는 경우 약물의 뇌조직 전달을 위해서는 수용체가 필요함을 확인하였으며, 이로 인해 오직 손상된 뇌세포에만 약물이 전달됨을 확인하였다.

[48] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 대상체(subject)의 수면(sleeping), 마취(anesthesia), 또는 무의식(unconscious) 상태에서 비강 내로 주입하기 위한 것이다. 본 발명자들은 본 발명의 조성물을 비강 내로 투여하는 경우, 투여 대상체의 의식이상(subject)의 수면, 마취 또는 무의식 상태에서 비강 내로 주입하는 경우, 조성물의 뇌 조직으로의 전달 효율이 유의하게 증가한다는 것을 규명하였다.

[49] 본 발명의 용어 "무의식(unconscious)"은 지각 작용과 기억 작용이 없고, 외부 환경 자극에 대한 반응이 없는 의식 장애의 상태를 의미한다. 허혈성 뇌졸중이 발병하는 경우, 환자는 무의식(unconscious) 상태에 놓이게 되며, 이 경우 외과적 수술 전까지의 시간 동안 본 발명의 조성물을 비강 투여함으로써, 효과적으로 허혈성 뇌세포 사멸을 억제시킬 수 있다. 환자의 무의식 상태에서는 약제학적 조성물의 경구 투여가 용이하지 않고, 경구 투여 혹은 정맥을 통한 전신성 투여를 하는 경우에 뇌 조직으로의 약물의 전달이 용이하지 않은 것에 반하여, 본 발명의 비강투여용 조성물을 이용하는 경우, 대상체의 뇌 조직으로 약물이 효과적으로 전달될 수 있다.

[50] 본 발명의 비강 투여용 조성물은 허혈성 뇌세포 사멸을 억제함으로써 예방 또는 치료될 수 있는 질병에 대해서라면 제한없이 이용 가능하다.

[51] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 허혈성 뇌혈관질환은 뇌혈전증, 뇌색전증, 또는 열공성 뇌경색이다. 본 발명에서 용어 "뇌혈전증"은 뇌혈관의 어느 부분이 동맥경화에 의한 동맥내강협착이나 혈전 때문에 혈류의 통과장애가 생겨 발생하는 질환을 의미한다. 본 발명에서 용어 "뇌색전증"은 심장에서 생긴 혈전으로 인하여 뇌혈관이 막힘으로써 발생하는 질환을 의미한다. 본 발명에서 용어 "열공성 뇌경색"은 소관통 동맥(small penetrating artery)에 혈전이 발생하여 혈관이 막힘으로써 발생하는 질환을 의미한다. 상술한 뇌혈관질환들은 모두 뇌 조직의 허혈을 동반한다. 본 명세서 상의 용어 "허혈"은 혈액의 공급이 차단되어 부족한 상태로서, 해당 조직 부위에 괴사를 초래하는

상태를 의미한다. 본 발명의 조성물을 이용하면 뇌허혈 부위의 손상을 회복시킬 수 있고, 상술한 질병들을 치료하는 것이 가능하다.

- [52] 한편 본 발명의 FTP는 SEQ ID NO. 1에 나타낸 바와 같이 8개 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드 서열이며, 반드시 종래 알려진 바와 같이(US 13/210,117, 2011. 8. 15 출원) 고리형 구조(cyclic form)를 형성할 필요가 없으며, 선형의 펩타이드 상태로 제공될 수 있다. 본 발명의 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 예를 들어 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54(1963); Stewart, et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성 기술(US 등록특허 제5,516,891호)에 따라 제조될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩타이드 모방체(peptidomimetics)"는 펩타이드의 활성을 모방(mimic)하는 분자(예를 들어, 펩타이드)로, 종래의 펩타이드의 변형 또는 펩토이드(peptoids; 펩타이드 백본 상의 질소 원자에 사이드 체인이 부가된 형태) 또는 β -펩타이드 같이 펩타이드를 모방하도록 고안된 유사 시스템을 디자인함으로써 제조될 수 있다. 통상적으로, 펩타이드 모방체는 변형된 화학 구조를 통해 안정성 또는 생물학적 활성이 증가되도록 디자인될 수 있다.
- [53] 본 발명에 따르면, 본 발명의 펩타이드 모방체(peptidomimetics)는 'Fas 모방체(mimetic)'이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fas 모방체(Fas mimetics)"는 Fas 펩타이드로부터 유래된 펩타이드를 의미하고 Fas 활성(특히, Fas-매개된 시그널링)을 억제한다.
- [54] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 FTP는 선형(linear)의 펩타이드이다. 선형의 펩타이드 분자의 경우 고리형의 구조에 비해 합성 과정이 단순하며, 특별한 제어가 필요치 않다는 장점을 갖는다.
- [55] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's *Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [56] 본 발명의 약제학적 조성물은 비강 투여에 의해 뇌 조직으로 전달될 수 있다.
- [57] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 환자의 연령, 체중, 성, 병적

상태, 음식, 투여 시간, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.01-1000 mg/kg(체중)이다.

- [58] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [59] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 사이토카인-관련 펩타이드의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [60] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상술한 비강 투여용 조성물 및 (b) 상기 조성물의 비강 투여를 위한 주입 장치를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 키트를 제공한다.
- [61] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 주입 장치는 상기 비강 투여용 조성물을 담지할 수 있는 담지부를 포함한다. 본 발명의 조성물을 담지할 수 있는 공간인 담지부는 그 형태나 재질에 특별한 제한은 없다.
- [62] 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 키트는 주사기 형태의 주입 장치를 포함하거나, 스프레이 분사 장치 형태의 주입 장치를 포함하거나, 튜브 형태의 주입 장치를 포함할 수 있고, 이를 통해 비강 내로 약물을 주입할 수 있으며, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 주사기 형태의 주입 장치를 포함하는 경우, 주사기 바늘에 상응하는 배출부를 대상체의 비강 내로 삽입한 후, 주사기의 피스톤에 해당하는 배출압 인가부를 작동시켜 액상 형태로 본 발명의 조성물을 비강 투여할 수 있다. 이때 주입 장치의 형상은 종래 주사기 형태에 제한되지 않는다. 스프레이 분사 장치 형태의 주입 장치를 포함하는 경우, 주사기 형태를 주입 장치를 이용하는 경우와 마찬가지로 배출부를 비강의 입구인 비공 또는 비강 내에 위치시킨 후, 분사압력을 인가시켜 스프레이 형태로 본 발명의 조성물을 비강 투여할 수 있다. 튜브 형태의 주입장치를 포함하는 경우 역시 상술한 바와 같이 배출부를 대상체의 비강 내로 삽입한 후, 튜브에 압력을 가하는 방식을 통해 비강 내로 본 발명의 조성물을 액상 형태로 주입할 수 있다.
- [63] 상술한 주입 장치의 형태는 구체적인 예를 든 것에 불과하며, 본 발명의 조성물을 비강 내로 주입할 수 있는 장치라면 특별한 제한없이 모두 이용이 가능하다.
- [64] 본 발명은 또한 상술한 비강 투여용 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [65] 상기 비강 투여용 조성물은 조성물을 담지할 수 있는 담지부가 구비된 주입

장치에 담지하여 비강 투여될 수 있다.

- [66] 상기 비강 투여는 대상체의 수면, 마취 또는 무의식 상태에서 수행될 수 있다.
 [67] 상기 허혈성 뇌혈관질환은 뇌혈전증, 뇌색전증, 또는 열공성 뇌경색일 수 있다.
 [68] 상기 대상체는 개, 고양이, 랫트, 마우스, 인간 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

- [69] 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.
- [70] **실시예 1: Fas 타겟팅 펩타이드의 비강 투여를 통한 허혈성 뇌혈관질환의 치료**
 [71] **(실험 방법)**
 [72] **1. 펩타이드**
 [73] 펩트론 사(Pepton)를 통해 본 발명의 실시예에서 이용된 펩타이드를 제작하였다. Fas 타겟팅 펩타이드의 서열은 YCDEHFCY 였고, 스크램블 펩타이드의 서열은 YCNSTVCY 였다.
- [74] **2. 인 비트로 허혈성 모델**
 [75] 마우스 신경아세포종(Neuro2a, N2a) 세포를 ATCC 사로부터 얻었고, 10% FBS, 페니실린(100 IU/mL) 및 스트렙토마이신 (100 µg/mL)를 함유하는 DMEM 배지에서 배양시켰다. 허혈성/재관류 환경을 인 비트로에서 재현하기 위해, Neuro-2a 세포를 6-웰 플레이트에서 배양하였고, 24 시간 동안 OGD(oxygen glucose deprivation media)(life technologies)의 저산소 조건(94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂)에서 유지시켰다. 그 후 세포들을 24 시간 동안 10% FBS 보충된 DMEM(5% CO₂, 20% O₂, 37°C) 내의 정상 산소 조건으로 돌려놓았다.
- [76] **3. 인 비트로 Fas 발현 및 FTP 결합**
 [77] FTP 및 Fas 수용체의 코-로컬라이제이션(co-localization)을 확인하기 위해, Neuro2a 세포를 커버슬립에 씨드하고, 저산소 조건의 OGD 배지에서 24시간 동안 유지하였다. 24시간 배양 후, 1% BSA 및 0.05% Tween 20을 함유한 PBS를 세포에 처리하여 37°C에서 2시간 동안 블로킹하고, 항-Fas 항체(Abcam) 및 Alexa647-결합된 FTP로 4°C에서 2시간 동안 염색하였다. 2시간 배양 후, 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 세포를 3회 세척하고, 2차 항체(Abcam)으로 4°C에서 암 조건에서 2시간 동안 염색하였다. 세포의 핵에 대해 Hoechst 33342로 대비염색하였고, 수용성 고정 용액(Abcam)으로 고정하였다. 세포의 형광 신호는 TSP-SP5 공초점 현미경(Leika, Germany)에서 얻었다.
- [78] **4. 인 비트로 Fas 매개 아팍토시스의 억제**
 [79] FTP의 억제 효과를 확인하기 위해, 저산소증이 유도된 Neuro2a 세포에 1000µM 농도의 FTP를 처리하였다. 24시간 배양 후, PE Annexin V 아팍토시스 검출

키트(BD Pharmingen™)를 사용하여 제조업체의 설명서에 따라 세포를 염색하였다.

[80] **5. 실험동물 및 연구 계획**

[81] 실험을 위해 280-320 g인 SD(Sprague-Dawley) 래트(rat)를 Orient Bio로부터 구입하였고, 무 병원성 실험실(pathogenic free laboratory)에 두었다. 모든 실험은 한양대학교 동물실험 윤리위원회에 의해 승인된 준수 가이드라인 및 프로토콜에 따라 수행하였다. 동물들은 12 시간 빛/어둠 사이클, 조절된 온도 및 습도 조건 하에서 물 및 음식을 자유롭게 허용한 채 활동하도록 하였다. 성별이 뇌 손상에 다른 영향을 주는 것을 배제하기 위해, 오직 수컷 SD 래트 만을 이용하였다. 새로운 환경에 노출시킨지 2주 후, 동물들은 4 그룹으로 나누었다. 제1 그룹 동물들은 수술시키지 않았고, 대조군으로 삼았다. 나머지 그룹들은 중대뇌동맥폐색(middle artery cerebral occlusion, MCAO)을 유발시켰다. 수술 한 시간 뒤, 허혈이 유도되지 않은 동물들 및 행동의 차이를 보이지 않는 동물들은 실험에서 제외시켰고, 남아있는 동물들은 처치를 위한 각각의 그룹으로 무작위로 나누었다. 적어도 4마리가 각 그룹에 포함되도록 하였다.

[82] **6. MCAO(Middle Cerebral Artery Occlusion) 실험 모델**

[83] 대뇌 허혈 상태의 유도를 위해, 종래 알려진 MCAO 절차에 따라 동물들을 처리하였다. 요컨대, 동물들을 이소플루레인(isoflurane) 5%로 마취시켰다. 그런 뒤, 수술 동안 동일한 가스 조건의 2% 이소플루레인으로 마취를 유지시켰다. 수술 동안 37±5°C 사이의 체온을 유지시키는데 히팅 패드를 이용하였다. 래트의 목을 약 2.0 cm의 피부 정중선 절개를 위해 면도하였다. 미주신경을 조심스럽게 보존하면서 외경동맥(external carotid artery, ECA)을 노출시켰고, 견사(silk artery)로 결찰하였다. 총경동맥(common carotid artery, CCA) 및 내경동맥(internal carotid artery, ICA)에 대해서도 동일한 처리를 하였고, 결찰은 하지 않았다. ECA를 통해 준비된 3.5 cm 봉합사(suture)(4-0 나일론 봉합사)를 ICA로 삽입하는 것에 의해 중뇌동맥(middle cerebral artery, MCA)을 폐색시켰고, MCA까지 봉합사를 밀어넣었다. 그런 뒤, 클립을 이용하여 CCA를 완전히 폐색시켰다. 폐색 1시간 후, 봉합사를 당김으로써 재관류되도록 하였다.

[84] **7. FTP 펩타이드의 비강 투여**

[85] 펩타이드의 비강 투여는 POD(pressurized olfactory devise)(Impel Neuropharma)를 이용하여 수행하였다. 간단히 말해서, 랫트를 5% 이소플루레인을 함유한 이소플루레인 챔버내에서 3분간 유지하였다. 동물들이 깊게 마취된 후, 약물 주입을 위해 동물들을 등을 대고 누운 자세(supine position)로 두었다. POD 팁(Impel Neuropharma)을 조심스럽게 비공(nostril)으로 삽입한 뒤, 25 μ l 부피 용량으로 미리 채워진 카테터 튜브를 대략 2 cm 내부로 천천히 삽입하였다. 그런 뒤 펩타이드 용액(PBS)(15 μ l PBS와 펩타이드 500 nM)을 천천히 주입하였다. 총 700 μ g의 FTP 펩타이드를 MCAO 12시간 후 비강으로 주입하였다. 비강 주입 후, 동물들을 그들의 지정된 케이지로 다시

옮기기 전에 5분간 등을 대고 누운 자세(supine position)를 유지시켰다.

[86] **8. 알렉사 표지된 FTP 펩타이드의 세포 내 분포(bio-distribution)**

[87] 제조업체(Molecular probes, life technologies)의 가이드라인에 따라 총 500 μg 의 FTP를 알렉사-488에 컨쥬게이션 시켰다. 알렉사-488 컨쥬게이션 된 짧은 펩타이드를 MCAO 12시간 후 POD 디바이스를 이용하여 각각의 비공(nostril)으로 25 μl 의 최종 부피로 비강 주입하였다. 소정의 시간 후, 동물들을 희생시켰고, 조직들을 적출하였다. 조직들을 저온 PBS로 세척하고, 자동-형광(auto-fluoresce)을 방지하기 위해 표면 수막(meninges)을 제거하였다. Image station(Kodak)으로 형광 신호를 검출하기 위해 뇌를 관찰하였다. 전달율(%)을 평가하기 위해 40 μm 셀 스트레이너(cell strainer)(BD Falcon)를 이용하여 뇌 조각들로부터 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 유세포 분석(flow cytometry; BD FACS Calibur™)을 통해 FTP-Alexa488이 결합된 세포를 수득하고, Flowjo software를 이용하여 분석하였다.

[88] **9. TTC 염색 및 경색 부피(Infract volume) 측정**

[89] 소정의 시간 동안의 처치 후, 뇌를 즉시 제거하였다. 뇌의 예상 손상 영역을 뇌 기질(brain matrix)을 포함하는 3 조각으로 나누었고(2 mm 두께), 2% 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로라이드(TTC, Sigma)에서 37°C 조건으로, 10분간 배양시켰다. 그 후, 뇌 조각들을 4% 파라포름알데히드에서 고정시켰고, 4°C에서 24시간 동안 이미지화하고 사진 촬영 전까지 보존시켰다. 경색 부피를 미국 국립보건원(National Institute of Health, NIH)에 의해 개발된 Image J를 이용하여 측정하였고, 종래 알려진 대로 계산하였다^[2].

[90] **10. 웨스턴 블랏**

[91] Neuro-2a 세포를 RIPA 용해 버퍼를 이용하여 1 μM PMSF, 프로테아제 억제자의 존재하에 용해시켰다. 총 50 μg 의 단백질을 12% SDS-PAGE 내에 로딩하였고, 니트로셀룰로오스 이동 막(Whatman) 상으로 이동시켰다. 블랏들을 TBST 내에서 5% 탈지유로 2시간 동안 상온에서 블로킹시켰고, 프라이머리 항체(Abcam)로 4°C에서 배양하였다. 소정의 시간 후, 블랏을 TBST로 세척하고, 2시간 동안 HRP와 커플링된 제2 폴리클로날 항체로 배양하였다. 블랏을 TBST로 3회 세척 후, ECL 웨스턴 블랏팅 기재(Promega)를 이용하여 진행하였다.

[92] **11. 조직학 및 면역조직화학**

[93] 파라핀에 고정된 뇌 절편에 대해 파라핀을 제거하고, 다시 수화하고 나서 표준 프로토콜에 따라 H&E 염색을 수행하였다. H&E 염색한 절편을 커버슬립으로 덮고 광학현미경으로 대략적으로 분석하였다.

[94] 면역조직화학을 위해, 절편을 예열된 항원 회수 버퍼(10 mM 소듐 시트레이트, 0.05% Tween 20(w/v), pH6.0)로 95°C에서 25분 동안 열처리하여 불활성화하고, 실온에서 냉각하였다. 다음으로, 1% BSA 및 10% 염소 혈청을 함유한 TBST로 37°C에서 1시간 동안 절편을 블로킹하고, Fas 1차 항체(Abcam)로 4°C에서 오버나이트동안 배양하였다. 일정 시간 후, TBST로 절편을 세척하고, HRP가

결합된 2차 다클론 항체를 2시간 동안 처리하였다. TBST로 5회 세척한 절편에 대해 DAB 기질(GE healthcare)를 사용하여 현상하였다.

[95] **12. TUNEL 분석**

[96] 파라핀을 제거하고, 다시 수화시킨 뇌 절편에서 In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Germany)를 이용하여 제조업체의 설명서에 따라 TUNEL 분석을 통해 아팍토시스의 정도를 분석하였다.

[97] **13. 신경학상 평가(neurological evaluation)**

[98] 펩타이드 처리를 하였거나 하지 않은 각 그룹 랫트의 신경학적 후유증을 종래 알려진 방법에 의해 평가하였다^[2]. 요컨대, 가시적인 신경학적 후유증을 보이지 않는 랫트들은 0 등급으로 분류하였다. 동물들이 앞다리를 구부림(forelimb flexion)을 보이면 1 등급을 부여했다. 다음으로 동물들을 흡수패드(absorbent pad)위에 위치시키고, 동물들의 움켜쥐는 힘을 보기 위해 꼬리를 당겼다. 움켜쥐는 힘이 약한 동물들에게만 2 등급을 부여했다. 동물들을 충분히 넓은 공간에 위치시키고, 자유롭게 움직일 수 있게 하였다. 꼬리를 당겼을 때, 동물들이 마비된 쪽으로 원을 그리며 움직이는 경우, 3등급을 부여하였다. 자유로운 환경에서 동물들이 지속적으로 원을 그리며 움직이는 경우 4등급을 부여했다.

[99] **14. 생존 곡선**

[100] 각 그룹의 동물들의 생존율을 종래 기술된 방법으로 평가하였다^[3].

[101] **15. 통계 분석**

[102] 본 발명의 데이터는 Graphpad Prism 5 소프트웨어를 이용하여 두 그룹 간의 평균값의 차이를 분석하기 위한 Mann-Whitney test와 두 그룹 이상의 그룹 간 평균값의 차이를 분석하기 위한 one-way ANOVA를 통해 통계적으로 분석하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[103]

[104] **(실험 결과)**

[105] **1. 인 비트로에서 Fas의 차단은 저산소증에 의해 유발된 아팍토시스를 회복시킨다**

[106] 인 비트로 허혈성 모델에서 Fas-차단의 효과를 조사하기 위해, Neuro2a 세포를 저산소 조건에서 OGD 배지에서 24시간 동안 배양하여 Fas 발현을 유도하였다. 저산소 조건은 50% 이상의 Fas를 발현하는 저산소증 세포를 유도하였다(도 1a).

[107] 그리고 나서, 형광 표지된 Fas-타겟팅 펩타이드(FTP) 또는 대조군 펩타이드인 스크램블드-FTP(ScrFTP)를 저산소증 세포에 처리하였다. FTP만 Fas를 발현하는 저산소증 세포에 결합하고, 정상세포에는 결합하지 않으며, 대조군 펩타이드인 ScrFTP는 저산소증 세포에 결합하지 않았다(도 1b). 공초점 현미경 사진도에는 FTP가 Fas-발현 세포에 강하게 내포되어 있음을 보여준다(도 2a). FTP 및 α -Fas 항체 간의 경쟁 분석 결과, FTP 및 α -Fas 항체는 Fas 분자의 다른 영역에 결합하였다(도 1c).

- [108] 저산소 조건에서 Fas의 발현 증가는 인 비트로 허혈성 모델에서 아폽토시스를 증가시킨다. 따라서, annexin V 및 7-AAD 양성 세포는 정상 산소 환경에서 유지된 세포에 비해 저산소증 세포에서 각각 ~60% 및 ~30% 정도 현저하게 상승되었다(도 2b, 상단 패널). 그러나, 산소를 제거하기 전에 FTP를 처리한 저산소증 세포는 저산소증에 의해 유발된 세포 죽음에 대해 Neuro2a 세포를 보호하였다. FTP 처리는 annexin V 및 annexin V/7-AAD에 대해 둘 다 양성인 세포를 ~50%까지 유의적으로 감소시켰다(도 2b, 하단 패널). 그러나, FTP 처리 후 7-AAD 양성 세포에서 어떠한 유의적인 감소는 관찰되지 않았다.
- [109] FTP는 아폽토시스의 Fas에 의해 매개된 외인성 경로만을 차단하기 때문에, Fas에 의해 매개된 아폽토시스에 관련된 활성화 캐스캐이드 분자들을 평가하였다. Fas 증가는 cleaved caspase-8 및 caspase-3 등의 외인성 아폽토시스 신호전달 분자를 촉발한다. 저산소증 세포에서 FTP 처리가 Fas에 의해 매개된 외인성 아폽토시스 경로에 관련된 caspase-8 및 caspase-3의 활성화를 차단할 수 있는지를 조사하기 위해, 저산소증 세포에 FTP를 농도별로 처리하여 caspase-8 및 caspase-3의 활성화를 평가하였다. ScrFTP 처리된 세포는 cleaved caspase 8를 감소하지 않으나 FTP 처리는 caspase-8 및 caspase-3의 조절을 유의적으로 감소하였다(도 2c). FTP 처리 후 cleaved caspase-8 및 caspase-3를 각각 ~50% 및 40% 감소시켰다. 활성화된 cleaved caspase-8 및 caspase-3 둘 다의 발현이 전장 길이의 효소 수준에서의 극적인 변화 없이 용량 의존적 방식으로 감소하였다(도 3).
- [110] 전체적으로, 이 결과는 FTP가 Fas 발현 세포에 효과적으로 결합하고 Fas에 의해 매개된 아폽토시스로부터 치료적으로 세포를 구조함을 시사한다.
- [111] **2. Fas 타겟팅 펩타이드의 비강 투여는 Fas-매개 아폽토시스를 경감시킨다.**
- [112] 뇌 허혈증은 MCAO 몇 시간 후 뇌에서 Fas 발현을 상승시키나, 정상 조건에서 Fas의 발현은 미미하다. 뇌의 우뇌에서 허혈증을 유도하는 우측 MCAO 시 뇌 조직의 면역조직화학에 의해 재관류 48시간 후 우반구 피킹(도 4a) 또는 뇌 세포의 단일세포 현탁의 유세포 분석 시(도 4b) 선택적으로 Fas 발현이 시간 의존적으로 증가함을 발견하였다. MCAO 후 12, 24 및 48시간에서 Fas 발현 세포의 각각 20%, 60% 및 70%가 발견되었고, 평균 형광 강도(MFIs)는 각 시간대 별로 ~4, 12 및 18배 더 높아졌다. 우반구와 비교하여, 좌반구에서는 MCAO 후 48시간을 제외한 시간대에서 Fas 발현의 수준은 미미한 것으로 관찰되어, 우반구는 좌측 MCAO 과정 후 아폽토시스에 훨씬 더 민감하게 됨을 시사한다(도 4b, 하단 패널).
- [113] 인 비보에서 Fas를 타겟팅하기 위해, 비강 경로를 이용하여 Impel Neuropharma에서 개발된 POD 장치를 이용하여 FTP를 뇌로 직접 전달하였다⁴⁴. FTP-Alexa⁴⁸⁸의 비강 접종 결과 12시간에 MCAO-유도된 랫트 뿐만 아니라 정상 랫트에서 표지된 펩타이드의 국소화가 일어났다(도 4c 및 도 5). 흥미롭게도, 접종 후 약 48시간에, MCAO-처리된 랫트의 뇌에서 및 동측성 뇌 영역에서도

FTP-A⁴⁸⁸이 유지되어 Fas 발현은 손상된 영역에 대한 펩타이드의 친화성을 가리킨다. 스크램블드 펩타이드(Scr-A⁴⁸⁸)가 12시간에서 강력한 국소화에도 불구하고 접종 후 48시간에 MCAO-유도된 랫트에서 유지되지 않는다는 사실로부터 FTP-Fas 상호작용의 특이도가 강화되었다(도 4c). 추가로, 동측성 뇌 영역 유래의 단일세포 현탁의 유세포 분석 결과, FTP-A⁴⁸⁸는 MCAO 랫트, 즉, Scr-A⁴⁸⁸ 군으로 접종 후 12, 24 및 48시간에서 FTP 양성 세포의 ~19%, 61% 및 73%가 있는 우측 허혈성 반구 또는 손상이 없는 대측성 뇌 영역의 영향을 받은 영역에서 우세하게 세포에 결합함을 나타내었다(도 4d 및 도 6)

[114] 다음으로, FTP의 뇌 타겟팅이 뇌 특이적인지 또는 다른 비-타겟팅 기관이 훨씬 더 노출되는지를 측정하기 위해 분포에 대해 말초 조직을 조사하였다.

[115] 그 결과, Scr-A⁴⁸⁸ 및 FTP-A⁴⁸⁸ 둘 다 접종한 후 초기 12시간에 폐에서 약간의 형광 신호가 발견되었으나, 다른 기관에서는 그렇지 않아 이는 기관을 통한 폐로의 제한된 펩타이드의 배수를 시사한다(도 7). 그러나, 접종 후 24시간이 지나면 FTP-A⁴⁸⁸ 그룹보다는 Scr-A⁴⁸⁸ 그룹에서 간 및 신장에서 훨씬 많이 형광 노출이 보여, 뇌에서 주변부름새로 비-타겟팅 펩타이드의 전신 배수를 가리킨다(도 7). 이 결과는 MCAO 랫트 뇌의 허혈성 지역에서 FTP의 보존이 이들 지역에서 Fas 발현의 결합으로 인한 것임을 나타낸다.

[116] 랫트 모델에서 급성 뇌 허혈증 상태는 몇몇 아팍토시스 분자를 조절하여 눈에 띄는 뇌 손상을 유발한다. 랫트에 대해 2,3,5-TTC로 염색하여 매일 재관류 후 1-5일 동안 분석된 MCAO 랫트로부터 1시간 MCAO 뇌 조직 슬라이스를 얻은 결과, 백색 TTC-음성 지역에 의해 증언된 바와 같이 MCAO 후 빠르면 12시간(0일, 도 4e)에서 유의적인 경색 크기를 입증하였다. 경색 크기는 MCAO 후 24시간(1일)까지 뇌의 거의 전체 우반구에서 우세하게 증가하여 1시간 MCAO는 아팍토시스를 유도하기에 충분함을 시사한다. 예상한대로, 정상 랫트 관상 뇌 절편과 MCAO 동물의 대측성 뇌 영역은 경색 사인을 보이지 않았다(도 4e, 왼쪽 패널).

[117] 뇌 경색에 대한 FTP 투여의 효과를 평가하기 위해, 재관류 후 12시간에 I.N.로 15mmol를 투여하였다. Mock (PBS)- 또는 Scr-FTP-처리와 비교하여, FTP는 MCAO 후 1일에 빠르게 경색 지역의 크기를 유의적으로 감소시키고, 재관류 후 5일에 발생한 경색으로부터 거의 완전히 회복하였다. FTP가 접종된 그룹에서 경색 부피의 감소는 1, 2, 3 및 5일 후 각각 26%, 29%, 18% 및 7% 관찰되었다. 식염수 처리된 그룹에서, 재관류 후 24시간에 32%의 심각한 뇌경색을 발견하였으나, 경색 부피는 2일 및 3일에서 37%, 35% 증가하였고 5일까지 23%였다. 면역조직화학 분석 결과, 재관류 후 1일에 증가하는 강도를 가지며, 재관류 후 12시간에 빠르게 뇌의 우측 허혈성 영역에서 유의적인 구조적 뇌 손상이 나타났다(도 4f). TTC 염색 결과와는 대조적으로, FTP 접종된 그룹에서 사이질부종 및 농축핵이 시작되어 재관류 후 1일에 감소하고 5일에 경감된다. TUNEL 양성 세포의 수는 재관류 후 12시간에 빠르게 모든 그룹에서 약 15%

이다가 재관류 후 1일 및 5일에 PBS 접종된 그룹에서 각각 54% 및 32%로 증가하였다. FTP 처리는 재관류 후 1일 및 5일에 아팍토시스 세포의 수를 각각 26% 및 9%로 유의적으로 감소시켰다(도 4g). 추가로, MCAO의 대측성 영역에서 TUNEL 양성 세포의 부재는 아팍토시스가 단지 허혈성 뇌 영역에서만 특이적임을 나타낸다(미도시됨).

- [118] MCAO 과정이 수행된 동물은 수술 후 수일 내에 사망할 높은 위험을 가지고 있다. 따라서, PBS, Scr-FTP 및 FTP 접종된 그룹에서 동물 생존에서의 변화를 관찰하였다. 재관류 후 1일 내지 5일까지 FTP의 생존 영향을 조사하기 위해 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 생존율을 계산하였다. 그룹 당 18마리의 랫트 중에서, 식염수 처리된 그룹에서 12마리의 랫트, Scr-FTP 펩타이드 처리된 그룹에서 11마리의 랫트 및 FTP 펩타이드 처리된 그룹에서 2마리가 시간대 별로 사망하였다(도 4h). 평가 결과, 재관류 후 1일 내지 5일에 PBS 접종된 동물에서 동물의 65%, 15% 및 5%가 생존하였다. FTP의 비강 전달은 PBS 처리된 그룹과 비교하여 1일 내지 5일에 각각 90%, 80% 및 80%까지 동물 생존을 지켰다. MCAO 과정이 수행된 동물은 재관류 후 몇 시간 이내에 신경-기능 스케일 면에서 이상을 나타낸다. 본 실시예에서는 MCAO 후 12시간 이내에 거동에 대해 점진적 효과를 보여주었으며, PBS 및 Scr-FTP 접종된 그룹 둘 다에서는 1일 내지 5일에 더 나빠지게 되었다. 모든 동물들은 재관류 후 12시간 이내에 꼬리를 잡아당기면 마비된 쪽으로 원을 그리며 움직였고(3 등급), MCAO 후 1 내지 3일에는 자발적 움직임이 심각하게 되었다(4 등급)(도 4g). 신경 결함 점수(neurological deficits score)는 식염수 처리된 그룹에 비해 FTP 처리된 그룹에서 개선되었다(도 4i). FTP 처리된 그룹에서 신경 기능은 재관류 후 1일 내지 5일에 각각 평균 3.3, 2.3, 2.3 및 1.3으로 등급을 매겼다. 또한, 이 결과는 FTP에 의한 아팍토시스 Fas 신호전달 캐스케이드의 차단이 아팍토시스를 감소할 뿐만 아니라 뇌 허혈증을 겪는 동물에서 생존과 신경 결함을 개선함을 입증한 것이다.

[119]

[120] (참고문헌)

- [121] 1. Chelluboina, B., Klopfenstein, J.D., Gujrati, M., Rao, J.S. & Veeravalli, K.K. Temporal regulation of apoptotic and anti-apoptotic molecules after middle cerebral artery occlusion followed by reperfusion. *Molecular neurobiology* 49, 50-65 (2014).
- [122] 2. Yin, D. et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23, 855-864 (2003).
- [123] 3. Kumar, P. et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43 (2007).
- [124] 4. Brown, V. & Liu, F. Intranasal delivery of a peptide with antidepressant-like effect. *Neuropsychopharmacology* 39, 2131-2141 (2014).

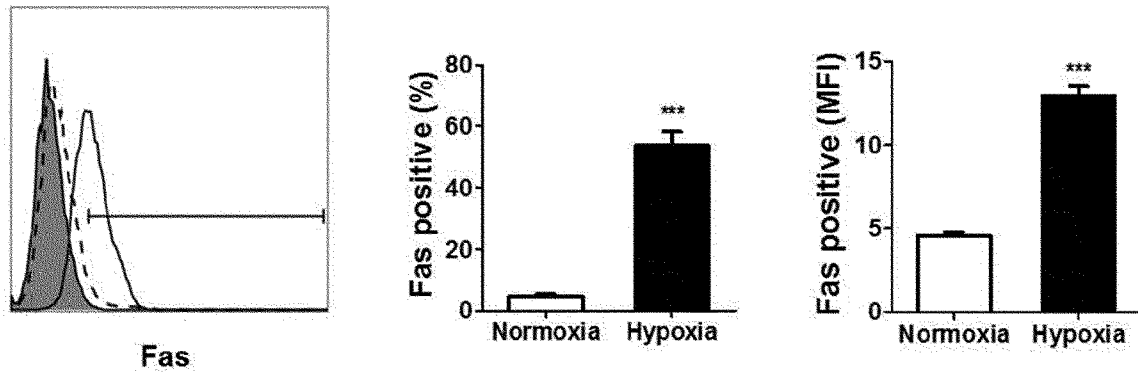
산업상 이용가능성

[125] 본 발명은 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 분야에서 사용할 수 있다.

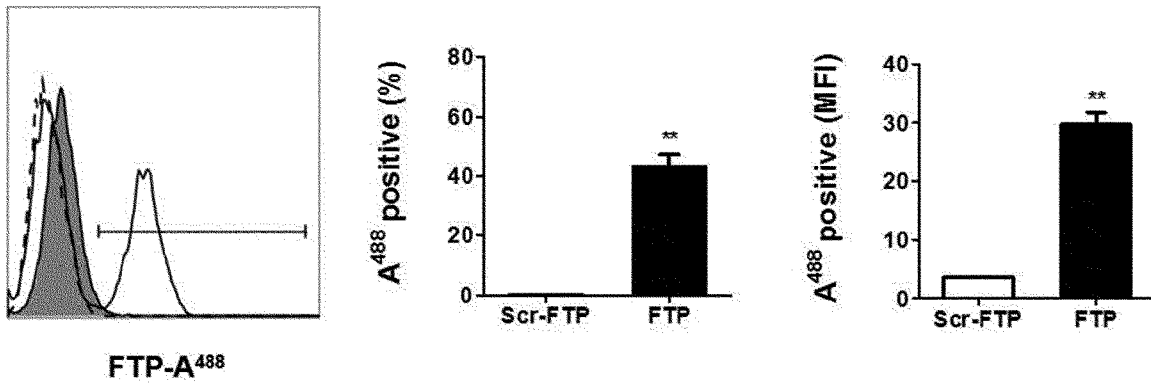
청구범위

- [청구항 1] SEQ ID NO. 1의 아미노산 서열로 이루어진 FTP(Fas Targeting Peptide)를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 비강 투여용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 허혈성 뇌세포 사멸을 억제하는 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 허혈성 뇌세포 사멸 억제는 FTP의 수용체로서의 Fas와의 결합을 통한 Fas 신호전달(signaling) 억제에 의한 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 대상체(subject)의 수면(sleeping), 마취(anesthesia), 또는 무의식(unconscious) 상태에서 비강 내로 주입하기 위한 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 허혈성 뇌혈관질환은 뇌혈전증, 뇌색전증, 또는 열공성 뇌경색인, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 FTP는 선형(linear)의 펩타이드인, 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따르는 비강 투여용 조성물; 및
상기 조성물의 비강 투여를 위한 주입 장치를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환 예방 또는 치료를 위한 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 주입 장치는 상기 비강 투여용 조성물을 담지할 수 있는 담지부를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 9] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따르는 비강 투여용 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에 비강 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 조성물은 비강 투여용 조성물을 담지할 수 있는 담지부가 구비된 주입 장치에 담지하여 비강 투여되는 것인, 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
비강 투여는 대상체의 수면, 마취 또는 무의식 상태에서 수행하는 것인, 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 허혈성 뇌혈관질환은 뇌혈전증, 뇌색전증, 또는 열공성 뇌경색인, 허혈성 뇌혈관질환의 예방 또는 치료 방법.

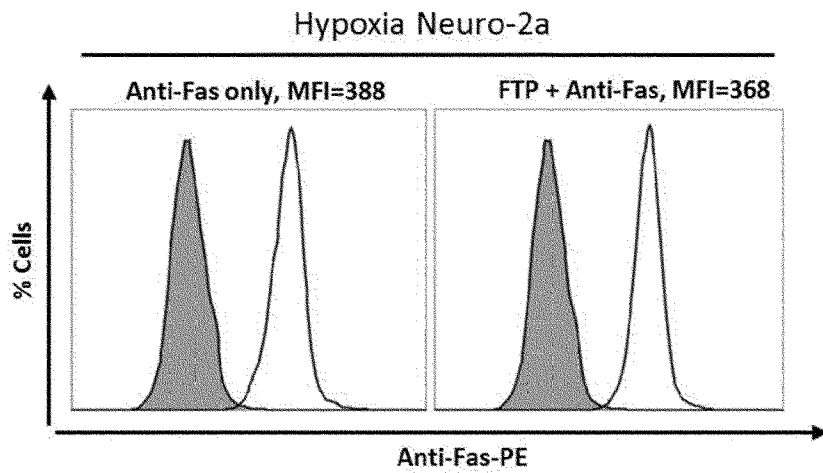
[도 1a]



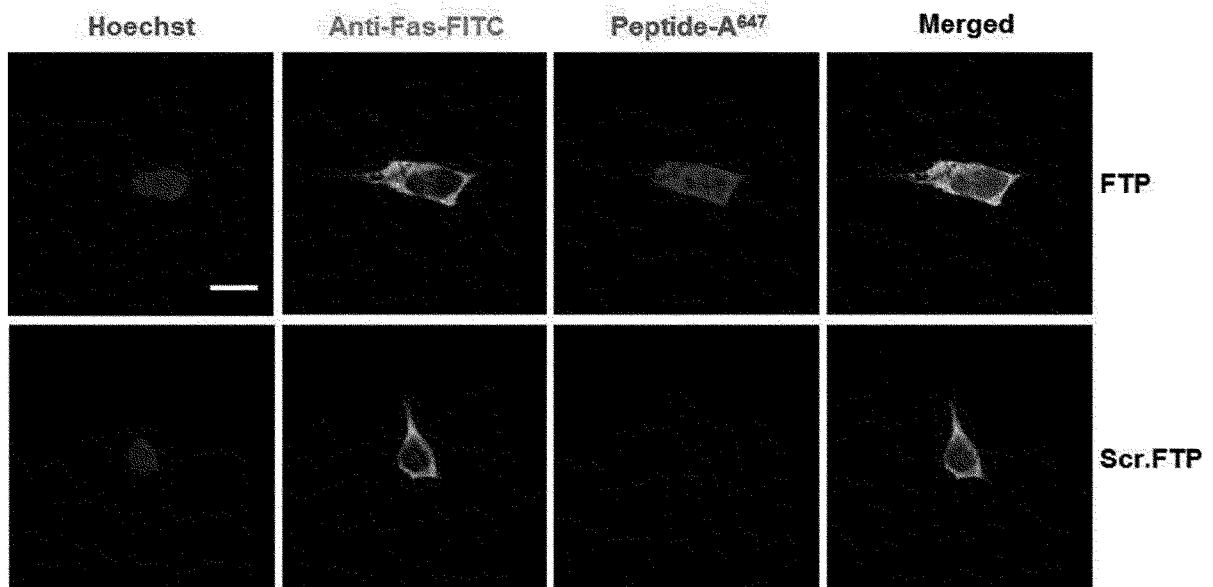
[도 1b]



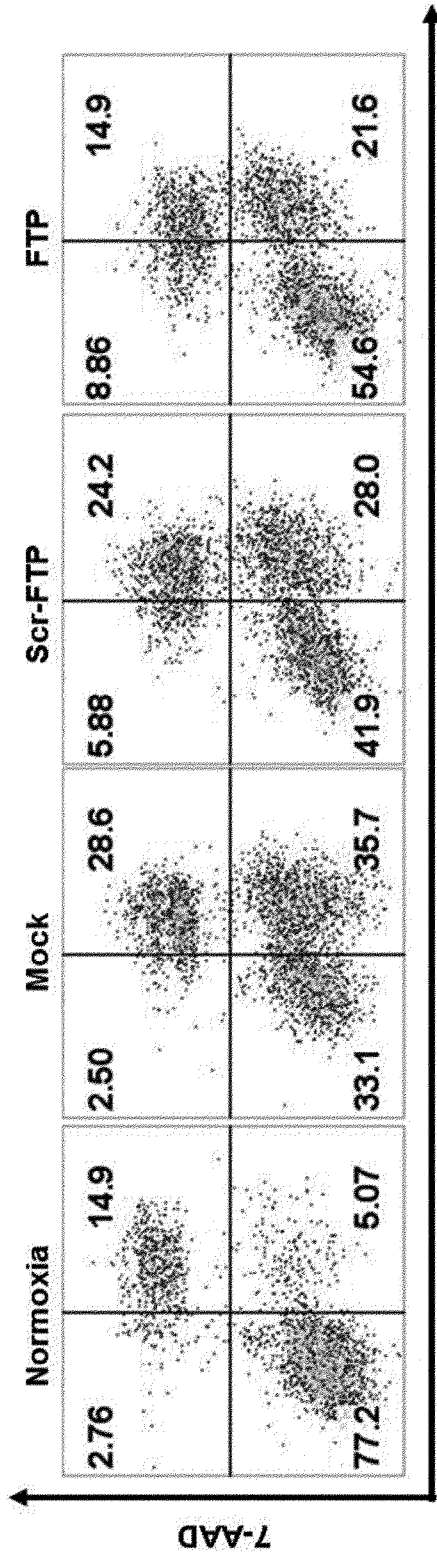
[도 1c]



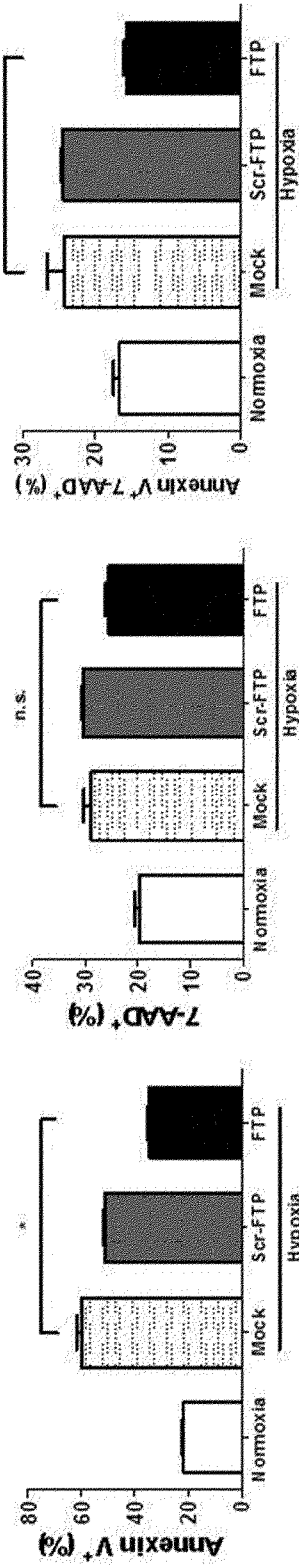
[도2a]



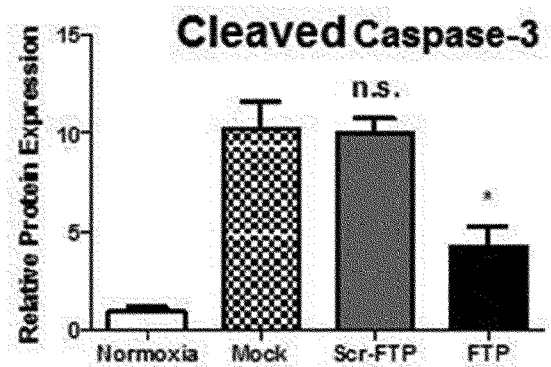
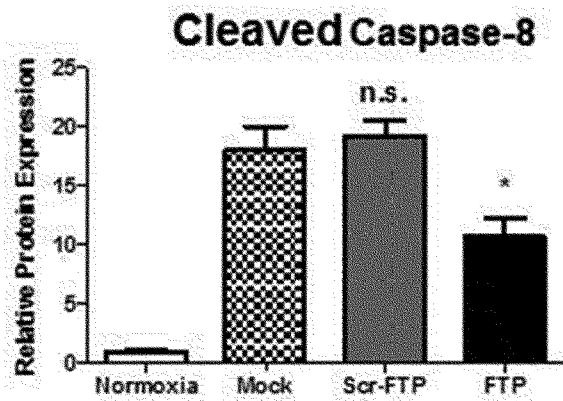
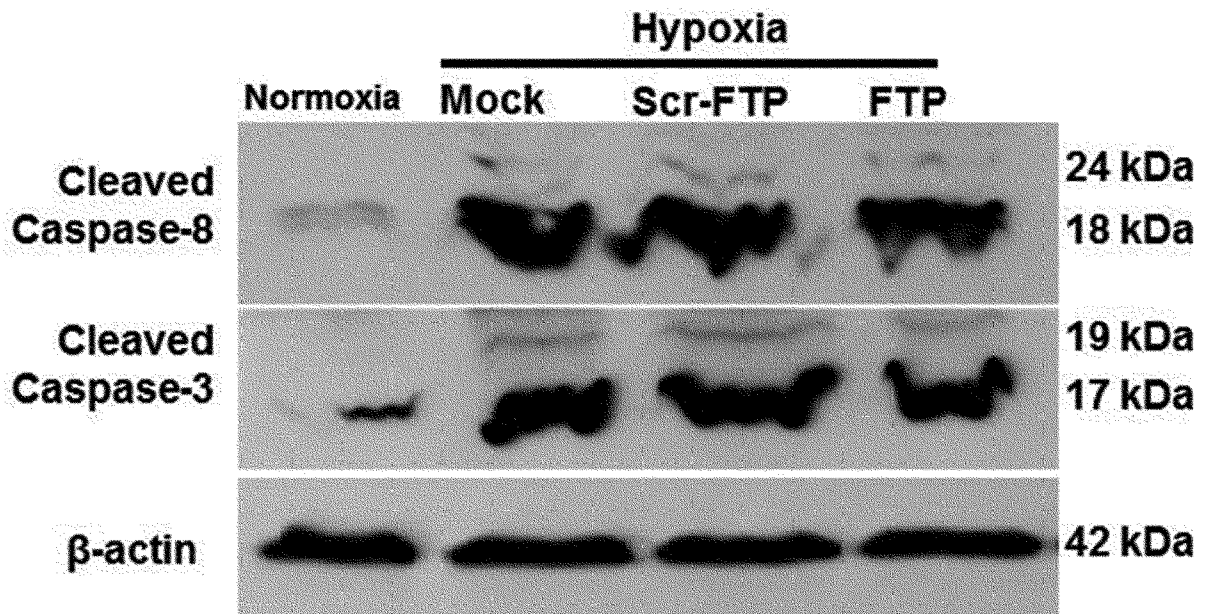
[도2b]



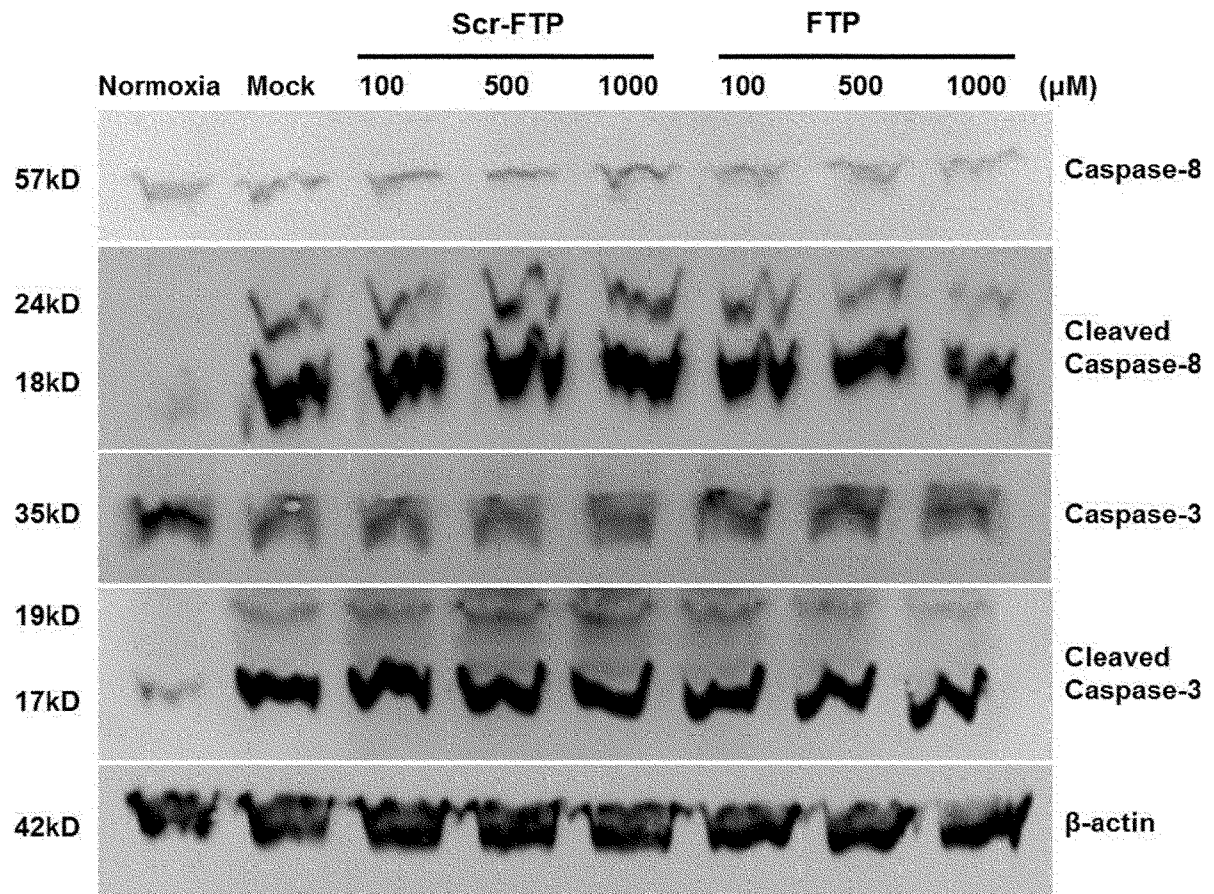
PE Annexin V



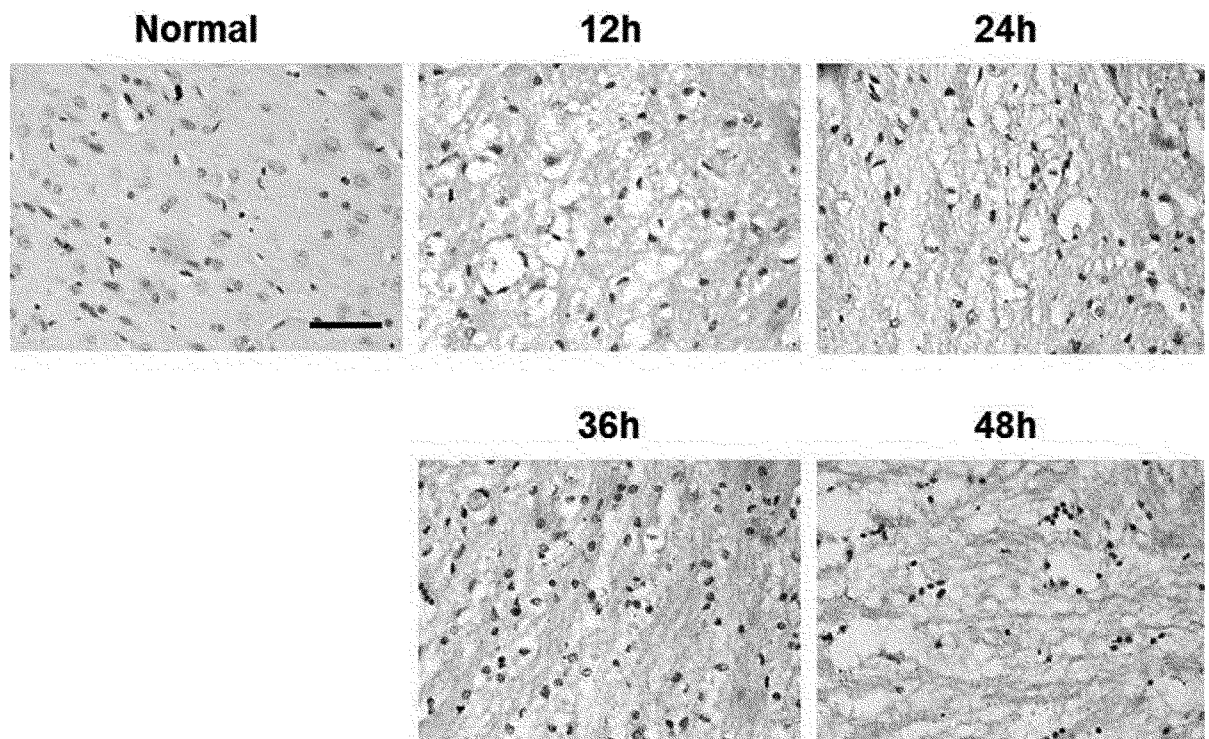
[도2c]



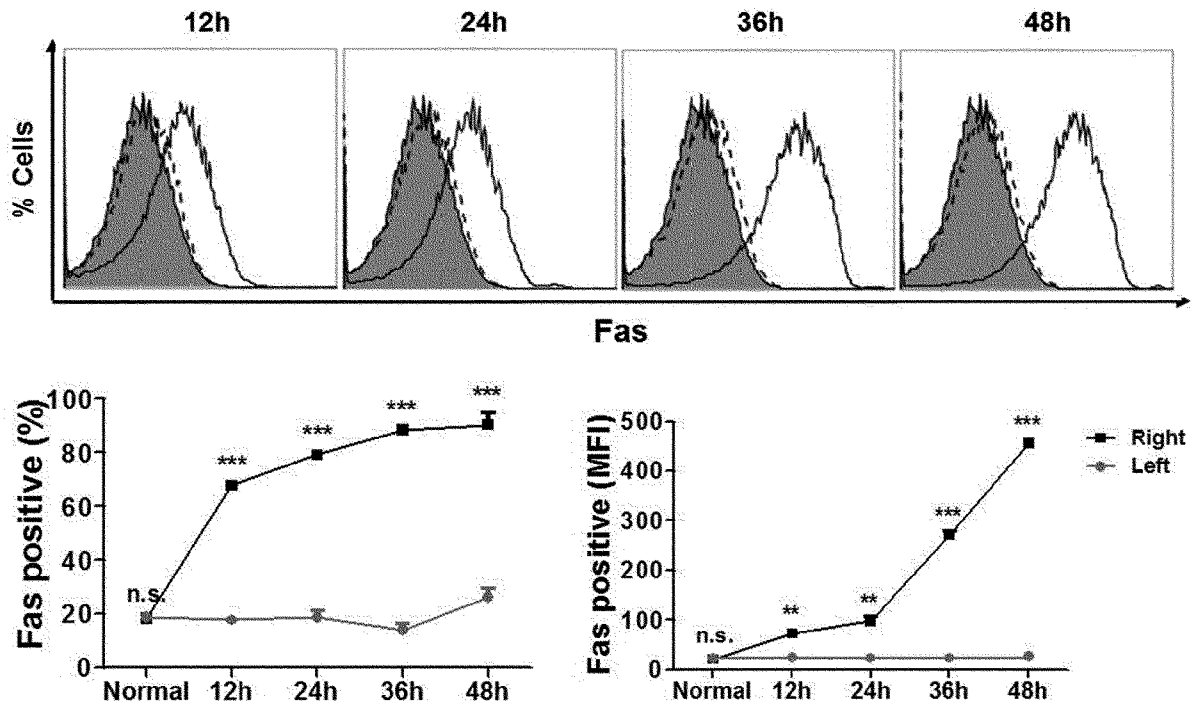
[도3]



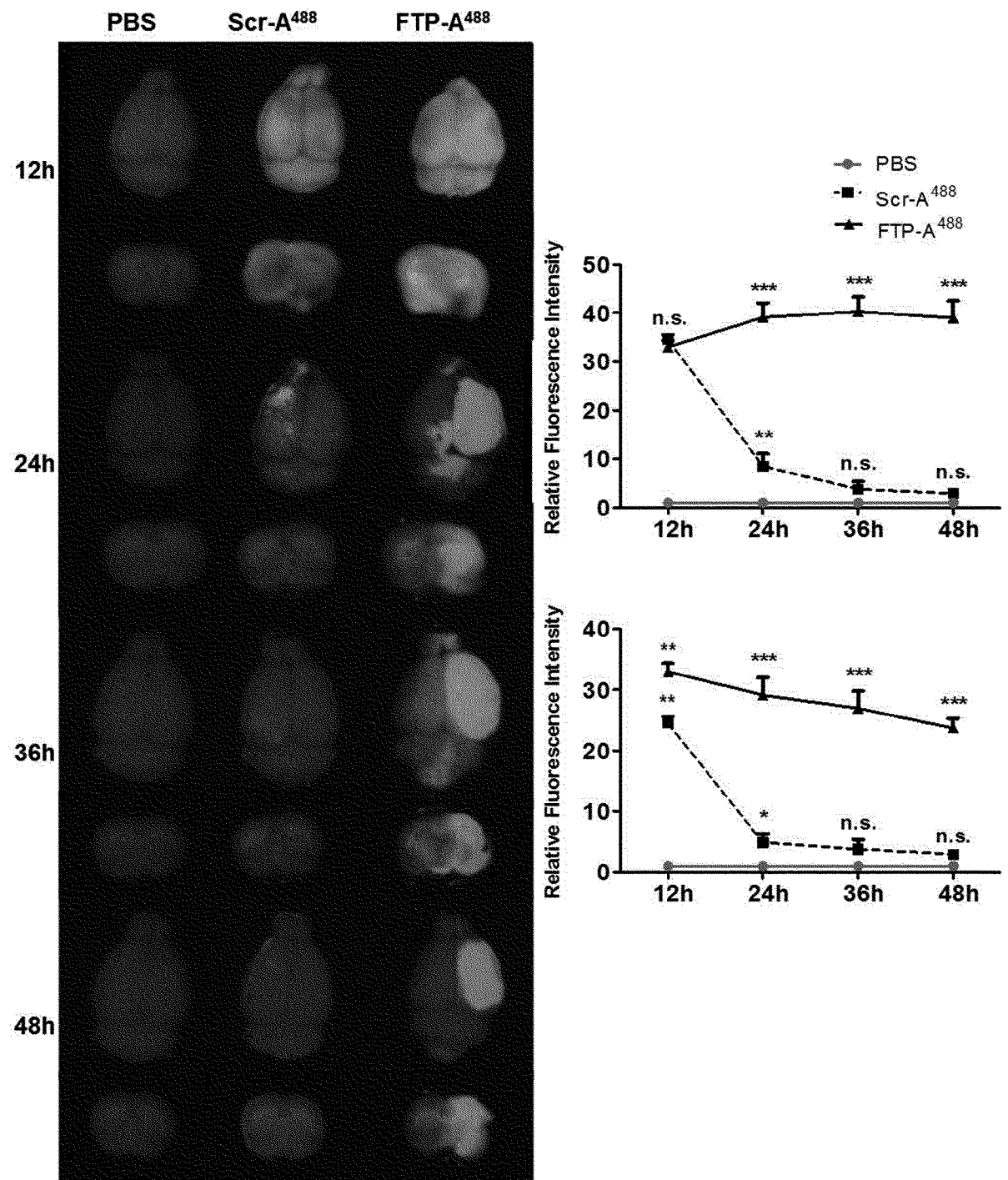
[도4a]



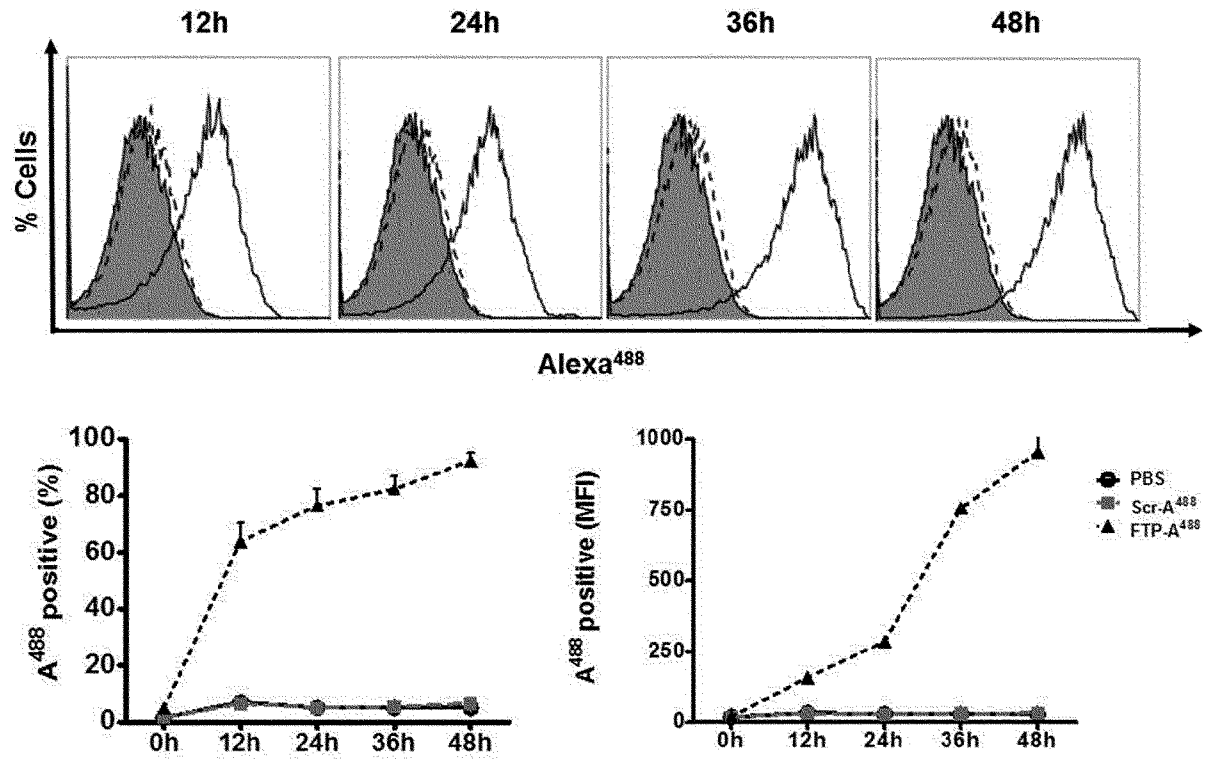
[도4b]



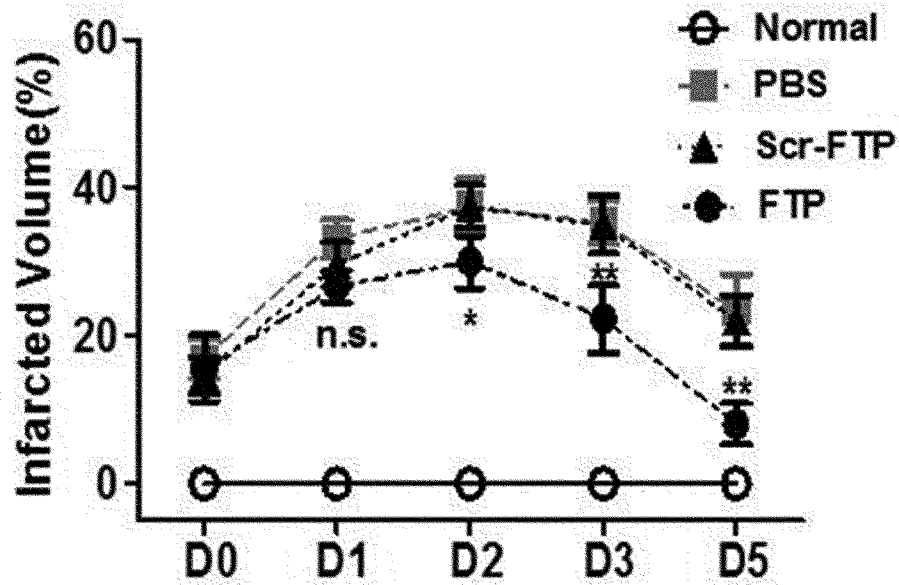
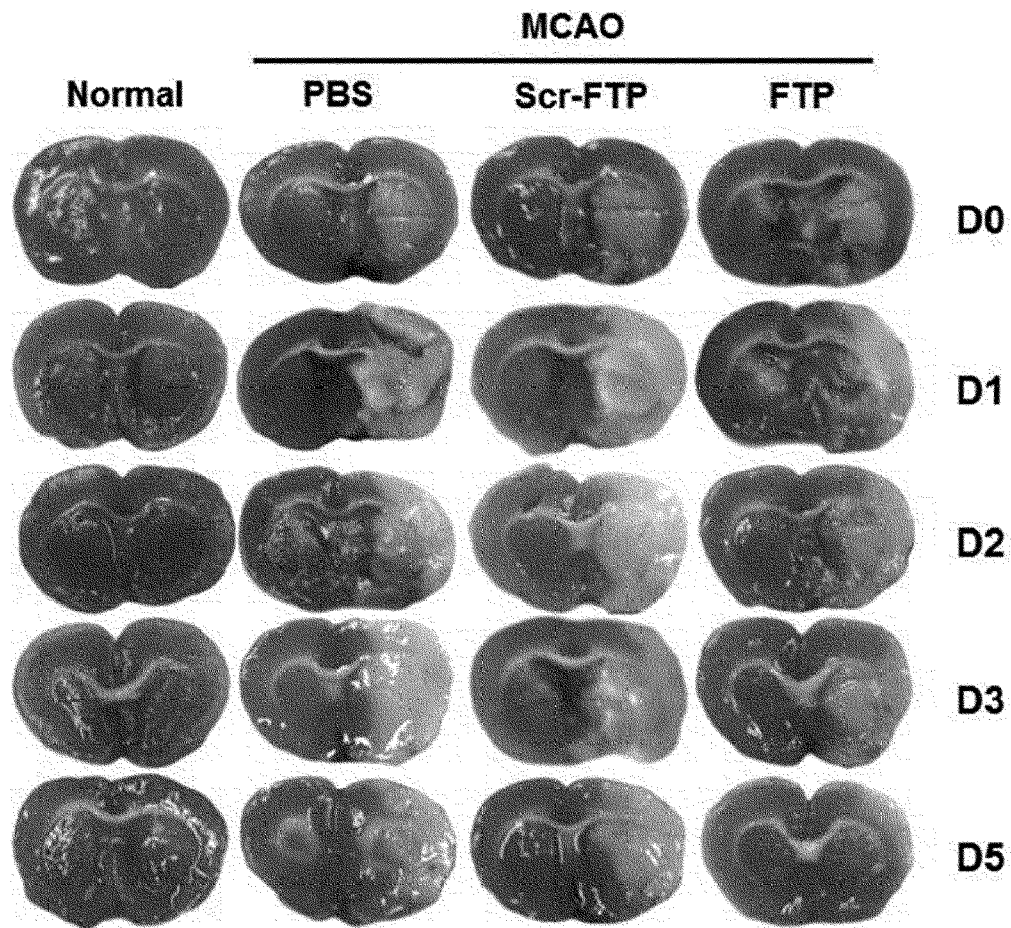
[도4c]



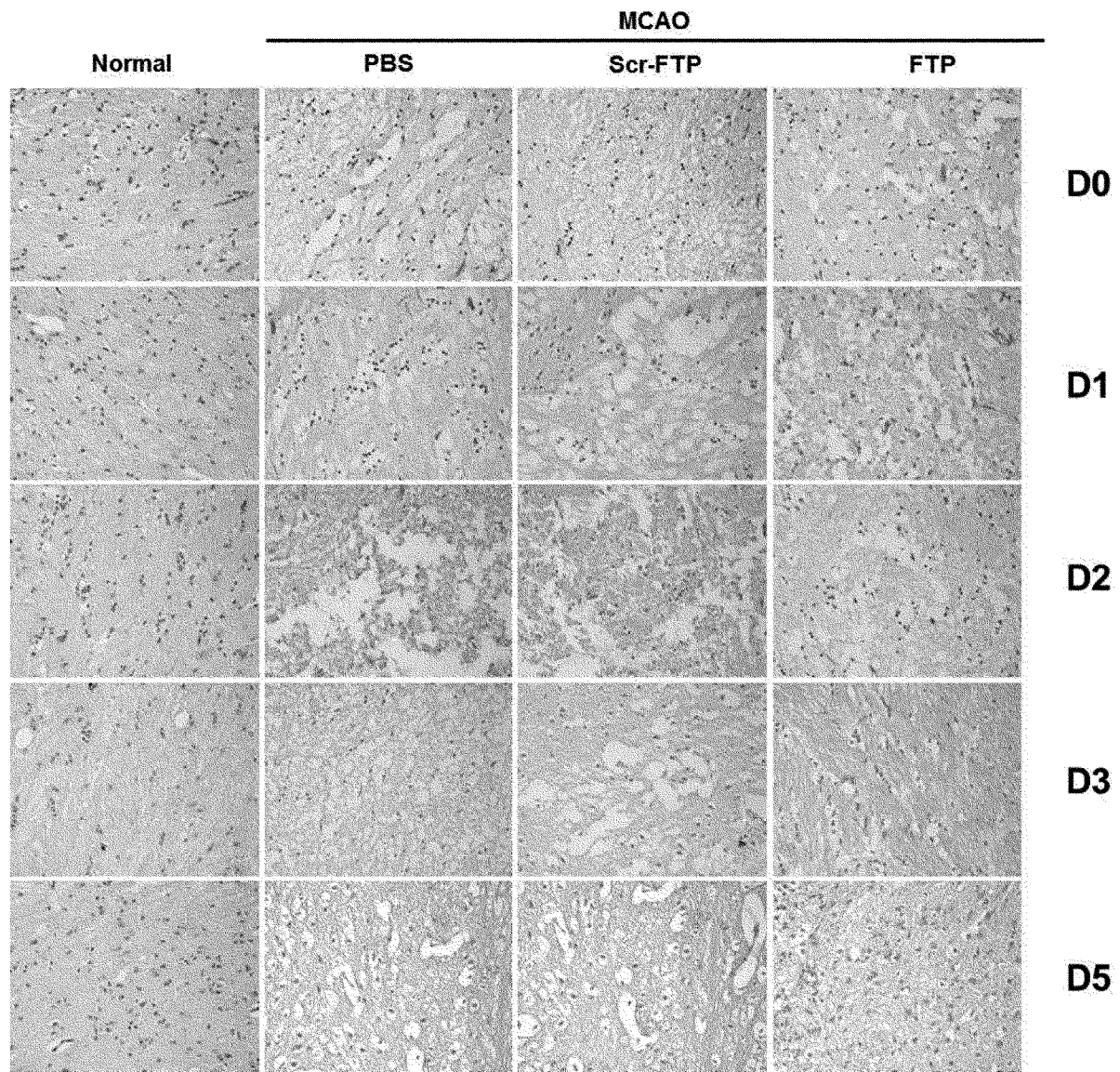
[도4d]



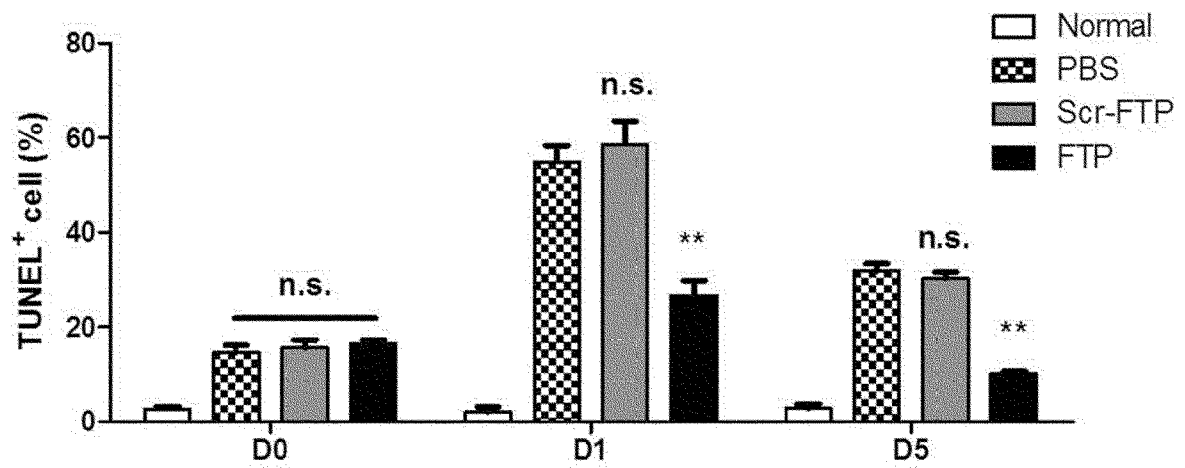
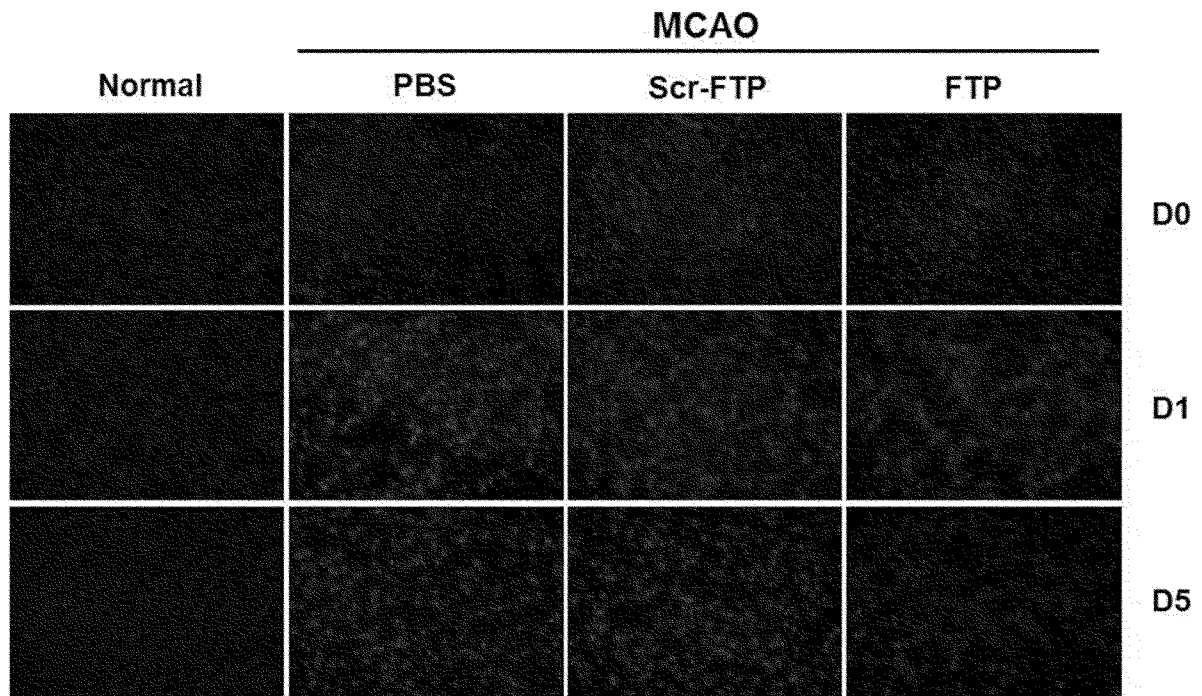
[도4e]



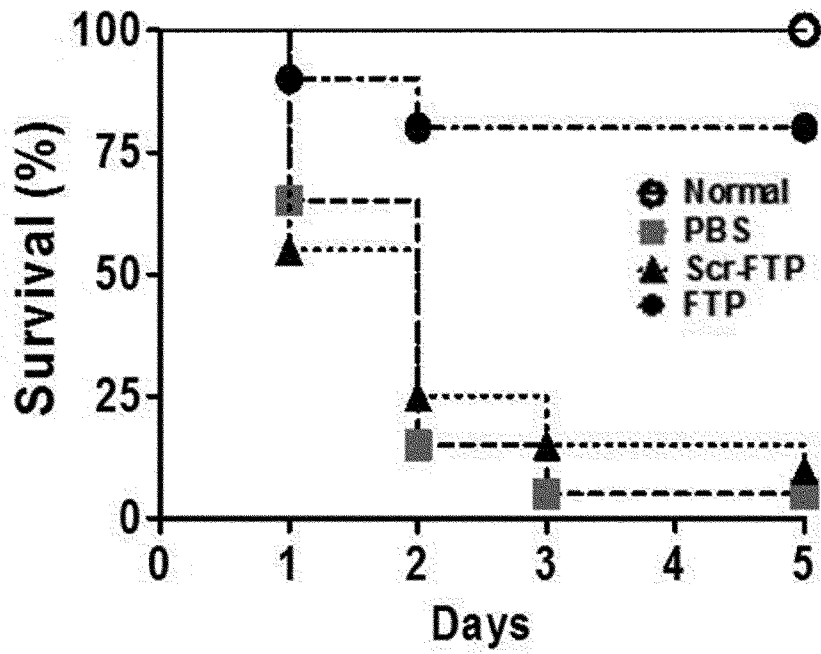
[도4f]



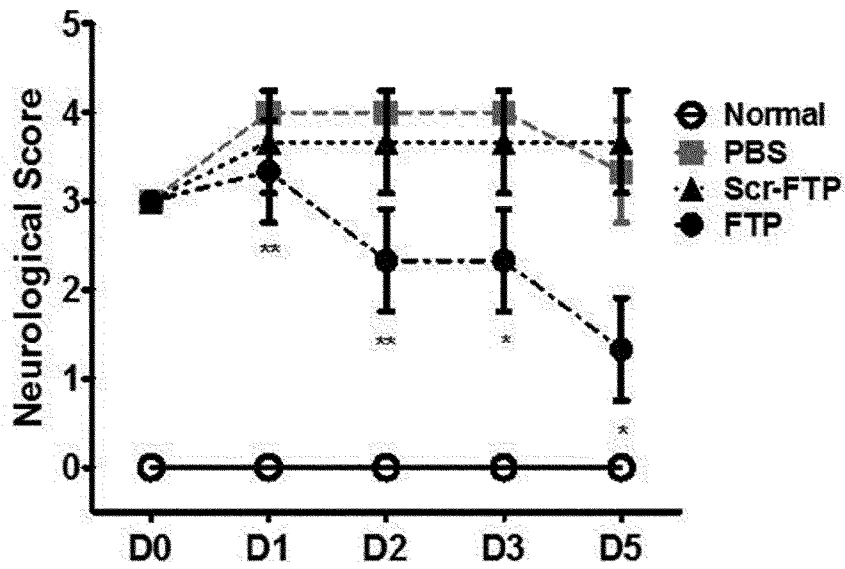
[도4g]



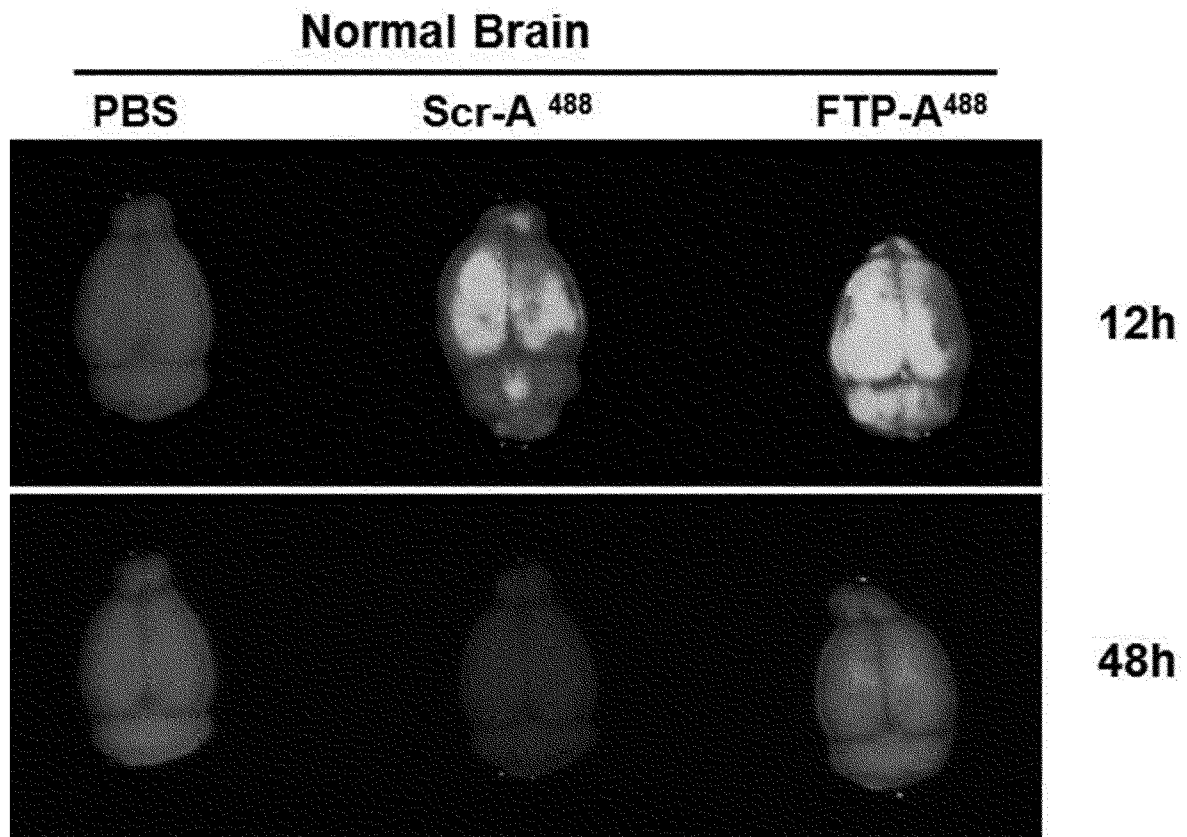
[도4h]



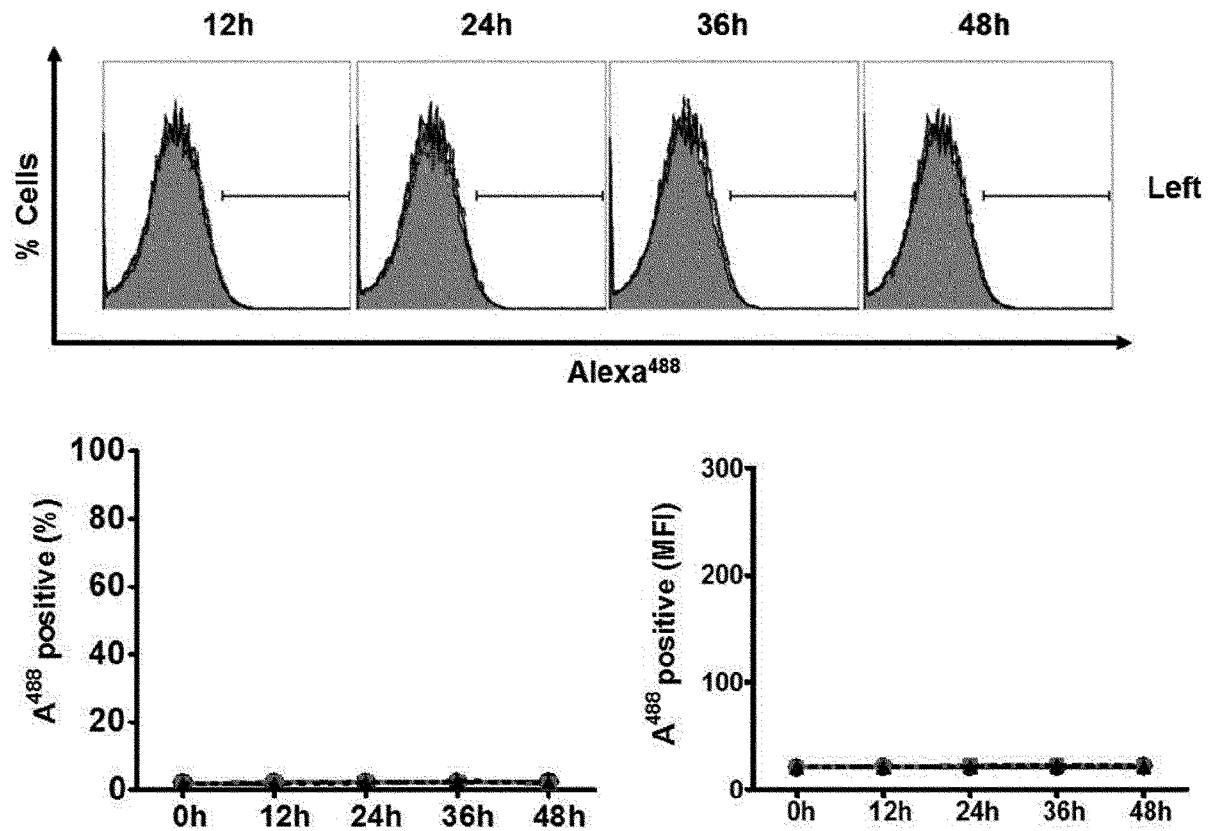
[도4i]



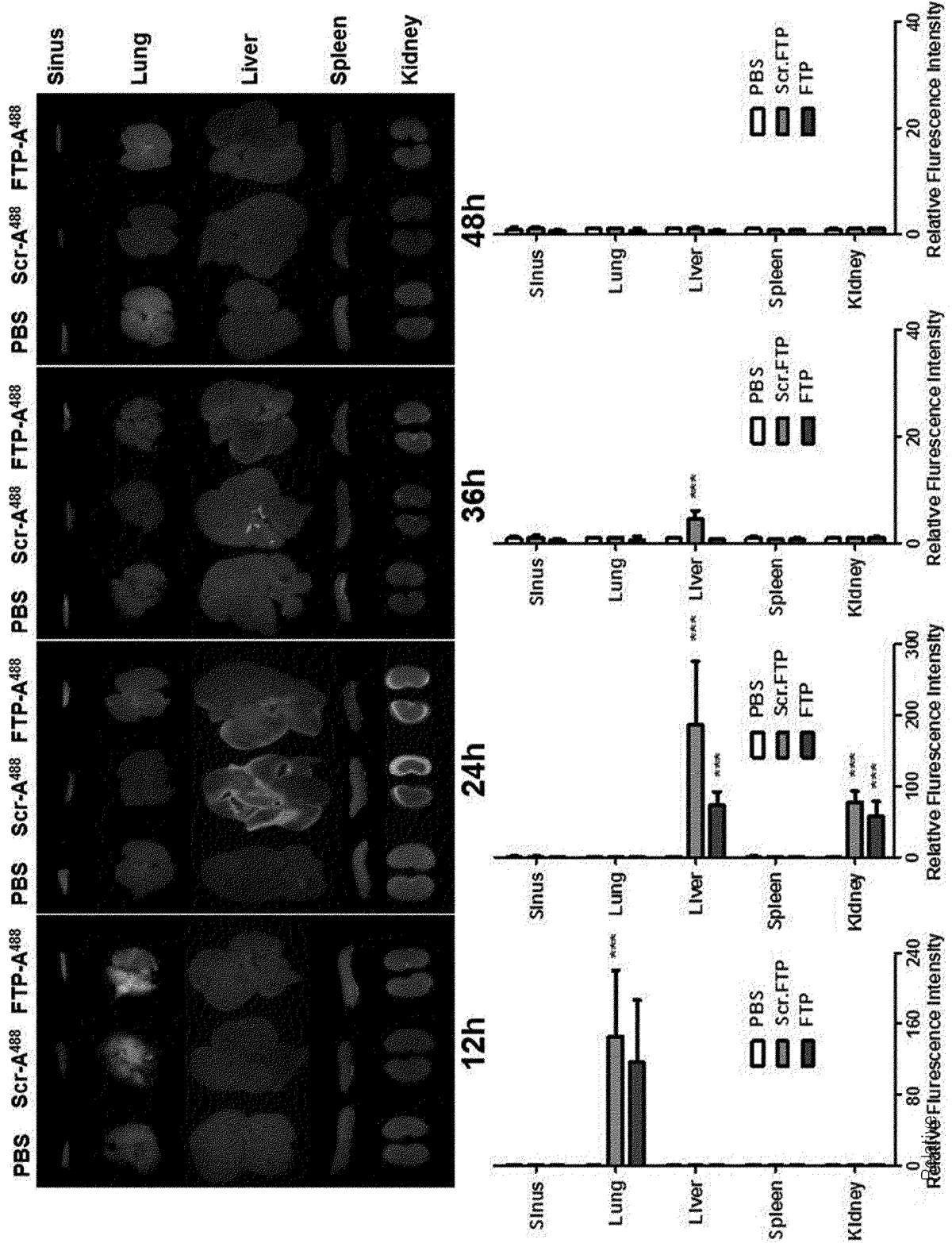
[도5]



[도6]



[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/013075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/08(2006.01)i, A61K 9/00(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 38/08; A61K 38/00; C12N 15/09; A61K 31/7088; A61K 38/16; A61K 38/17; A61K 9/00

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: Fas Targeting peptide, ischemic cerebral disease, nasal administration, pharmaceutical composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 8680047 B2 (GREENE et al.) 25 March 2014 See abstract; claims 12-16; and columns 5, 13.	1-8
Y	YUAN, "Neuroprotective Strategies Targeting Apoptotic and Necrotic Cell Death for Stroke", Apoptosis, vol. 14, issue 4, pp. 469-477 (2009) See abstract; and page 474.	1-8
A	JP 2004-290196 A (MOHIDA PHARMACEUT CO., LTD. et al.) 21 October 2004 See abstract; and claims 1-15.	1-8
A	JP 2002-540812 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 03 December 2002 See the entire document.	1-8
A	KR 10-2010-0059862 A (MONDOBIOTECH LABORATORIES AG.) 04 June 2010 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

20 FEBRUARY 2017 (20.02.2017)

Date of mailing of the international search report

20 FEBRUARY 2017 (20.02.2017)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/013075

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.: 9-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9-12 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/KR2016/013075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date		
US 8680047 B2	25/03/2014	AU 2003-233662 A1	12/12/2003		
		AU 2003-233662 B2	01/04/2010		
		CA 2490542 A1	04/12/2003		
		EP 1513543 A2	16/03/2005		
		EP 1513543 A4	31/05/2006		
		EP 1513543 B1	06/10/2010		
		JP 2005-534641 A	17/11/2005		
		JP 4405916 B2	27/01/2010		
		US 2004-0132641 A1	08/07/2004		
		US 2008-0153742 A1	26/06/2008		
		US 2012-0245081 A1	27/09/2012		
		US 7288519 B2	30/10/2007		
		US 8022176 B2	20/09/2011		
		WO 03-099845 A2	04/12/2003		
		WO 2003-099845 A3	15/04/2004		
		JP 2004-290196 A	21/10/2004	AU 1563295 A	01/08/1995
				AU 705484 B2	20/05/1999
CA 2179909 A1	13/07/1995				
CA 2179909 C	27/04/2010				
DE 69535719 T2	19/03/2009				
EP 0739350 A1	30/10/1996				
EP 0739350 A4	23/09/1998				
EP 0739350 B1	27/02/2008				
JP 09-508009 A	19/08/1997				
NZ 279108 A	24/06/1997				
WO 95-18819 A1	13/07/1995				
JP 2002-540812 A	03/12/2002	AU 4337400 A	14/11/2000		
		EP 1176965 A1	06/02/2002		
		EP 1176965 A4	26/01/2005		
		US 6204055 B1	20/03/2001		
		US 6653133 B1	25/11/2003		
		WO 00-61150 A1	19/10/2000		
KR 10-2010-0059862 A	04/06/2010	AU 2008-297542 A1	19/03/2009		
		AU 2008-297566 A1	19/03/2009		
		AU 2008-297874 A1	19/03/2009		
		AU 2008-297888 A1	19/03/2009		
		AU 2008-297896 A1	19/03/2009		
		AU 2008-297930 A1	19/03/2009		
		AU 2008-303812 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303869 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303893 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303896 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303919 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303932 A1	02/04/2009		
		AU 2008-303956 A1	02/04/2009		
		AU 2008-306272 A1	09/04/2009		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CA 2698673 A1	02/04/2009
		CA 2698745 A1	19/03/2009
		CA 2698751 A1	02/04/2009
		CA 2698770 A1	19/03/2009
		CA 2698772 A1	02/04/2009
		CA 2698789 A1	19/03/2009
		CA 2698976 A1	19/03/2009
		CA 2699008 A1	19/03/2009
		CA 2699039 A1	02/04/2009
		CA 2699052 A1	02/04/2009
		CA 2699069 A1	02/04/2009
		CA 2699109 A1	09/04/2009
		CA 2699153 A1	02/04/2009
		CA 2699167 A1	19/03/2009
		EP 2185179 A1	19/05/2010
		EP 2185240 A2	19/05/2010
		EP 2187909 A1	26/05/2010
		EP 2187913 A2	26/05/2010
		EP 2187913 B1	11/07/2012
		EP 2187929 A2	26/05/2010
		EP 2187939 A1	26/05/2010
		EP 2187940 A1	26/05/2010
		EP 2187940 B1	30/01/2013
		EP 2187947 A2	26/05/2010
		EP 2187948 A2	26/05/2010
		EP 2188016 A2	26/05/2010
		EP 2188016 B1	01/08/2012
		EP 2190465 A2	02/06/2010
		EP 2190533 A2	02/06/2010
		EP 2195012 A2	16/06/2010
		EP 2197465 A2	23/06/2010
		EP 2197467 A2	23/06/2010
		JP 2010-538978 A	16/12/2010
		JP 2010-538980 A	16/12/2010
		JP 2010-538990 A	16/12/2010
		JP 2010-539001 A	16/12/2010
		JP 2010-539003 A	16/12/2010
		JP 2010-539007 A	16/12/2010
		JP 2010-539012 A	16/12/2010
		JP 2010-539014 A	16/12/2010
		JP 2010-539021 A	16/12/2010
		JP 2010-539035 A	16/12/2010
		JP 2010-539041 A	16/12/2010
		JP 2010-539047 A	16/12/2010
		JP 2010-539052 A	16/12/2010
		JP 5385277 B2	08/01/2014
		JP 5385280 B2	08/01/2014
		JP 5385281 B2	08/01/2014
		JP 5385283 B2	08/01/2014
		KR 10-2010-0056513 A	27/05/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		KR 10-2010-0056514 A	27/05/2010
		KR 10-2010-0056518 A	27/05/2010
		KR 10-2010-0057047 A	28/05/2010
		KR 10-2010-0057051 A	28/05/2010
		KR 10-2010-0057060 A	28/05/2010
		KR 10-2010-0058548 A	03/06/2010
		KR 10-2010-0058552 A	03/06/2010
		KR 10-2010-0058555 A	03/06/2010
		KR 10-2010-0061478 A	07/06/2010
		KR 10-2010-0061479 A	07/06/2010
		KR 10-2010-0061484 A	07/06/2010
		US 2010-0184674 A1	22/07/2010
		US 2010-0184676 A1	22/07/2010
		US 2010-0197586 A1	05/08/2010
		US 2010-0197587 A1	05/08/2010
		US 2010-0197588 A1	05/08/2010
		US 2010-0197599 A1	05/08/2010
		US 2010-0197604 A1	05/08/2010
		US 2010-0204116 A1	12/08/2010
		US 2010-0204131 A1	12/08/2010
		US 2010-0204141 A1	12/08/2010
		US 2010-0204149 A1	12/08/2010
		US 2010-0204154 A1	12/08/2010
		US 2010-0210533 A1	19/08/2010
		US 2010-0256043 A1	07/10/2010
		US 2011-0065630 A1	17/03/2011
		US 8338380 B2	25/12/2012
		US 8541364 B2	24/09/2013
		WO 2009-033660 A2	19/03/2009
		WO 2009-033660 A3	28/05/2009
		WO 2009-033700 A1	19/03/2009
		WO 2009-033714 A2	19/03/2009
		WO 2009-033714 A3	03/09/2009
		WO 2009-033722 A2	19/03/2009
		WO 2009-033722 A3	11/06/2009
		WO 2009-033745 A2	19/03/2009
		WO 2009-033745 A3	07/05/2009
		WO 2009-033746 A2	19/03/2009
		WO 2009-033746 A3	25/06/2009
		WO 2009-033748 A2	19/03/2009
		WO 2009-033748 A3	09/07/2009
		WO 2009-033767 A2	19/03/2009
		WO 2009-033767 A3	12/11/2009
		WO 2009-033786 A2	19/03/2009
		WO 2009-033786 A3	11/06/2009
		WO 2009-033787 A2	19/03/2009
		WO 2009-033787 A3	11/06/2009
		WO 2009-033788 A2	19/03/2009
		WO 2009-033788 A3	08/10/2009
		WO 2009-033790 A2	19/03/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2009-033790 A3	15/10/2009
		WO 2009-033791 A2	19/03/2009
		WO 2009-033791 A3	01/10/2009
		WO 2009-033794 A2	19/03/2009
		WO 2009-033794 A3	06/08/2009
		WO 2009-033816 A2	19/03/2009
		WO 2009-033818 A2	19/03/2009
		WO 2009-033818 A3	11/06/2009
		WO 2009-039957 A2	02/04/2009
		WO 2009-039957 A3	17/12/2009
		WO 2009-039968 A2	02/04/2009
		WO 2009-039968 A3	17/12/2009
		WO 2009-039970 A1	02/04/2009
		WO 2009-039991 A2	02/04/2009
		WO 2009-039991 A3	13/08/2009
		WO 2009-039994 A1	02/04/2009
		WO 2009-039996 A2	02/04/2009
		WO 2009-039996 A3	29/10/2009
		WO 2009-040005 A2	02/04/2009
		WO 2009-040005 A3	28/05/2009
		WO 2009-040017 A2	02/04/2009
		WO 2009-040017 A3	03/09/2009
		WO 2009-040023 A2	02/04/2009
		WO 2009-040023 A3	28/05/2009
		WO 2009-040027 A1	02/04/2009
		WO 2009-040029 A2	02/04/2009
		WO 2009-040029 A3	17/12/2009
		WO 2009-040032 A2	02/04/2009
		WO 2009-040032 A3	22/05/2009
		WO 2009-040050 A2	02/04/2009
		WO 2009-040050 A3	22/10/2009
		WO 2009-040051 A2	02/04/2009
		WO 2009-040051 A3	28/05/2009
		WO 2009-040072 A2	02/04/2009
		WO 2009-040072 A3	17/12/2009
		WO 2009-040073 A2	02/04/2009
		WO 2009-040073 A3	22/05/2009
		WO 2009-043447 A2	09/04/2009
		WO 2009-043447 A3	30/07/2009
		WO 2009-043449 A2	09/04/2009
		WO 2009-043449 A3	30/07/2009
		WO 2009-043456 A2	09/04/2009
		WO 2009-043456 A3	28/05/2009
		WO 2009-043467 A1	09/04/2009
		WO 2009-043481 A2	09/04/2009
		WO 2009-043481 A3	17/12/2009
		WO 2009-043521 A2	09/04/2009
		WO 2009-043521 A3	28/05/2009
		WO 2009-046822 A2	16/04/2009
		WO 2009-046822 A3	28/05/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/013075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2009-046860 A2	16/04/2009
		WO 2009-046860 A3	16/07/2009
		WO 2009-046876 A2	16/04/2009
		WO 2009-046876 A3	05/11/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/08(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/08; A61K 38/00; C12N 15/09; A61K 31/7088; A61K 38/16; A61K 38/17; A61K 9/00 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: Fas Targeting peptide, 허혈성 뇌혈관질환, 비강 투여, 약학 조성물		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 8680047 B2 (GREENE 등) 2014.03.25 요약; 청구항 12-16; 및 컬럼 5, 13; 참조.	1-8
Y	YUAN, 'Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke' Apoptosis, Vol.14, Issue 4, pp.469-477 (2009) 요약; 및 페이지 474 참조.	1-8
A	JP 2004-290196 A (MOCHIDA PHARMACEUT CO., LTD. 등) 2004.10.21 요약; 및 청구항 1-15 참조.	1-8
A	JP 2002-540812 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 2002.12.03 전체 문헌 참조.	1-8
A	KR 10-2010-0059862 A (문도바이오테크 레보레토리즈 아게) 2010.06.04 전체 문헌 참조.	1-8
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2017년 02월 20일 (20.02.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 02월 20일 (20.02.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371	

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: 9-12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 9-12는 인체의 치료방법에 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
US 8680047 B2	2014/03/25	AU 2003-233662 A1	2003/12/12		
		AU 2003-233662 B2	2010/04/01		
		CA 2490542 A1	2003/12/04		
		EP 1513543 A2	2005/03/16		
		EP 1513543 A4	2006/05/31		
		EP 1513543 B1	2010/10/06		
		JP 2005-534641 A	2005/11/17		
		JP 4405916 B2	2010/01/27		
		US 2004-0132641 A1	2004/07/08		
		US 2008-0153742 A1	2008/06/26		
		US 2012-0245081 A1	2012/09/27		
		US 7288519 B2	2007/10/30		
		US 8022176 B2	2011/09/20		
		WO 03-099845 A2	2003/12/04		
		WO 2003-099845 A3	2004/04/15		
		JP 2004-290196 A	2004/10/21	AU 1563295 A	1995/08/01
				AU 705484 B2	1999/05/20
CA 2179909 A1	1995/07/13				
CA 2179909 C	2010/04/27				
DE 69535719 T2	2009/03/19				
EP 0739350 A1	1996/10/30				
EP 0739350 A4	1998/09/23				
EP 0739350 B1	2008/02/27				
JP 09-508009 A	1997/08/19				
NZ 279108 A	1997/06/24				
WO 95-18819 A1	1995/07/13				
JP 2002-540812 A	2002/12/03			AU 4337400 A	2000/11/14
				EP 1176965 A1	2002/02/06
		EP 1176965 A4	2005/01/26		
		US 6204055 B1	2001/03/20		
		US 6653133 B1	2003/11/25		
		WO 00-61150 A1	2000/10/19		
KR 10-2010-0059862 A	2010/06/04	AU 2008-297542 A1	2009/03/19		
		AU 2008-297566 A1	2009/03/19		
		AU 2008-297874 A1	2009/03/19		
		AU 2008-297888 A1	2009/03/19		
		AU 2008-297896 A1	2009/03/19		
		AU 2008-297930 A1	2009/03/19		
		AU 2008-303812 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303869 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303893 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303896 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303919 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303932 A1	2009/04/02		
		AU 2008-303956 A1	2009/04/02		
		AU 2008-306272 A1	2009/04/09		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		CA 2698673 A1	2009/04/02
		CA 2698745 A1	2009/03/19
		CA 2698751 A1	2009/04/02
		CA 2698770 A1	2009/03/19
		CA 2698772 A1	2009/04/02
		CA 2698789 A1	2009/03/19
		CA 2698976 A1	2009/03/19
		CA 2699008 A1	2009/03/19
		CA 2699039 A1	2009/04/02
		CA 2699052 A1	2009/04/02
		CA 2699069 A1	2009/04/02
		CA 2699109 A1	2009/04/09
		CA 2699153 A1	2009/04/02
		CA 2699167 A1	2009/03/19
		EP 2185179 A1	2010/05/19
		EP 2185240 A2	2010/05/19
		EP 2187909 A1	2010/05/26
		EP 2187913 A2	2010/05/26
		EP 2187913 B1	2012/07/11
		EP 2187929 A2	2010/05/26
		EP 2187939 A1	2010/05/26
		EP 2187940 A1	2010/05/26
		EP 2187940 B1	2013/01/30
		EP 2187947 A2	2010/05/26
		EP 2187948 A2	2010/05/26
		EP 2188016 A2	2010/05/26
		EP 2188016 B1	2012/08/01
		EP 2190465 A2	2010/06/02
		EP 2190533 A2	2010/06/02
		EP 2195012 A2	2010/06/16
		EP 2197465 A2	2010/06/23
		EP 2197467 A2	2010/06/23
		JP 2010-538978 A	2010/12/16
		JP 2010-538980 A	2010/12/16
		JP 2010-538990 A	2010/12/16
		JP 2010-539001 A	2010/12/16
		JP 2010-539003 A	2010/12/16
		JP 2010-539007 A	2010/12/16
		JP 2010-539012 A	2010/12/16
		JP 2010-539014 A	2010/12/16
		JP 2010-539021 A	2010/12/16
		JP 2010-539035 A	2010/12/16
		JP 2010-539041 A	2010/12/16
		JP 2010-539047 A	2010/12/16
		JP 2010-539052 A	2010/12/16
		JP 5385277 B2	2014/01/08
		JP 5385280 B2	2014/01/08
		JP 5385281 B2	2014/01/08
		JP 5385283 B2	2014/01/08
		KR 10-2010-0056513 A	2010/05/27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2010-0056514 A	2010/05/27
		KR 10-2010-0056518 A	2010/05/27
		KR 10-2010-0057047 A	2010/05/28
		KR 10-2010-0057051 A	2010/05/28
		KR 10-2010-0057060 A	2010/05/28
		KR 10-2010-0058548 A	2010/06/03
		KR 10-2010-0058552 A	2010/06/03
		KR 10-2010-0058555 A	2010/06/03
		KR 10-2010-0061478 A	2010/06/07
		KR 10-2010-0061479 A	2010/06/07
		KR 10-2010-0061484 A	2010/06/07
		US 2010-0184674 A1	2010/07/22
		US 2010-0184676 A1	2010/07/22
		US 2010-0197586 A1	2010/08/05
		US 2010-0197587 A1	2010/08/05
		US 2010-0197588 A1	2010/08/05
		US 2010-0197599 A1	2010/08/05
		US 2010-0197604 A1	2010/08/05
		US 2010-0204116 A1	2010/08/12
		US 2010-0204131 A1	2010/08/12
		US 2010-0204141 A1	2010/08/12
		US 2010-0204149 A1	2010/08/12
		US 2010-0204154 A1	2010/08/12
		US 2010-0210533 A1	2010/08/19
		US 2010-0256043 A1	2010/10/07
		US 2011-0065630 A1	2011/03/17
		US 8338380 B2	2012/12/25
		US 8541364 B2	2013/09/24
		WO 2009-033660 A2	2009/03/19
		WO 2009-033660 A3	2009/05/28
		WO 2009-033700 A1	2009/03/19
		WO 2009-033714 A2	2009/03/19
		WO 2009-033714 A3	2009/09/03
		WO 2009-033722 A2	2009/03/19
		WO 2009-033722 A3	2009/06/11
		WO 2009-033745 A2	2009/03/19
		WO 2009-033745 A3	2009/05/07
		WO 2009-033746 A2	2009/03/19
		WO 2009-033746 A3	2009/06/25
		WO 2009-033748 A2	2009/03/19
		WO 2009-033748 A3	2009/07/09
		WO 2009-033767 A2	2009/03/19
		WO 2009-033767 A3	2009/11/12
		WO 2009-033786 A2	2009/03/19
		WO 2009-033786 A3	2009/06/11
		WO 2009-033787 A2	2009/03/19
		WO 2009-033787 A3	2009/06/11
		WO 2009-033788 A2	2009/03/19
		WO 2009-033788 A3	2009/10/08
		WO 2009-033790 A2	2009/03/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2009-033790 A3	2009/10/15
		WO 2009-033791 A2	2009/03/19
		WO 2009-033791 A3	2009/10/01
		WO 2009-033794 A2	2009/03/19
		WO 2009-033794 A3	2009/08/06
		WO 2009-033816 A2	2009/03/19
		WO 2009-033818 A2	2009/03/19
		WO 2009-033818 A3	2009/06/11
		WO 2009-039957 A2	2009/04/02
		WO 2009-039957 A3	2009/12/17
		WO 2009-039968 A2	2009/04/02
		WO 2009-039968 A3	2009/12/17
		WO 2009-039970 A1	2009/04/02
		WO 2009-039991 A2	2009/04/02
		WO 2009-039991 A3	2009/08/13
		WO 2009-039994 A1	2009/04/02
		WO 2009-039996 A2	2009/04/02
		WO 2009-039996 A3	2009/10/29
		WO 2009-040005 A2	2009/04/02
		WO 2009-040005 A3	2009/05/28
		WO 2009-040017 A2	2009/04/02
		WO 2009-040017 A3	2009/09/03
		WO 2009-040023 A2	2009/04/02
		WO 2009-040023 A3	2009/05/28
		WO 2009-040027 A1	2009/04/02
		WO 2009-040029 A2	2009/04/02
		WO 2009-040029 A3	2009/12/17
		WO 2009-040032 A2	2009/04/02
		WO 2009-040032 A3	2009/05/22
		WO 2009-040050 A2	2009/04/02
		WO 2009-040050 A3	2009/10/22
		WO 2009-040051 A2	2009/04/02
		WO 2009-040051 A3	2009/05/28
		WO 2009-040072 A2	2009/04/02
		WO 2009-040072 A3	2009/12/17
		WO 2009-040073 A2	2009/04/02
		WO 2009-040073 A3	2009/05/22
		WO 2009-043447 A2	2009/04/09
		WO 2009-043447 A3	2009/07/30
		WO 2009-043449 A2	2009/04/09
		WO 2009-043449 A3	2009/07/30
		WO 2009-043456 A2	2009/04/09
		WO 2009-043456 A3	2009/05/28
		WO 2009-043467 A1	2009/04/09
		WO 2009-043481 A2	2009/04/09
		WO 2009-043481 A3	2009/12/17
		WO 2009-043521 A2	2009/04/09
		WO 2009-043521 A3	2009/05/28
		WO 2009-046822 A2	2009/04/16
		WO 2009-046822 A3	2009/05/28

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2009-046860 A2	2009/04/16
		WO 2009-046860 A3	2009/07/16
		WO 2009-046876 A2	2009/04/16
		WO 2009-046876 A3	2009/11/05