

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 5월 22일 (22.05.2020) WIPO | PCT

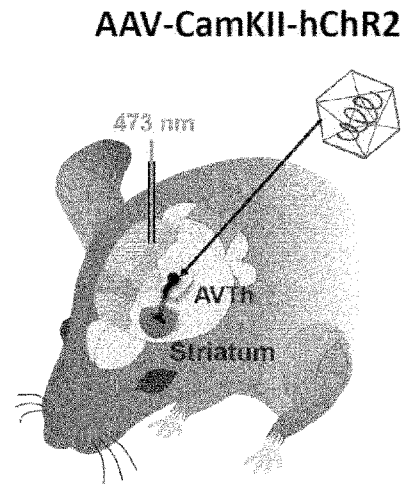
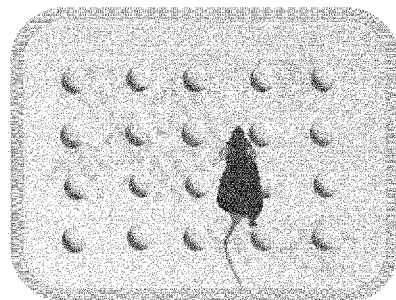


(10) 국제공개번호
WO 2020/101352 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/015454
- (22) 국제출원일: 2019년 11월 13일 (13.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0138603 2018년 11월 13일 (13.11.2018) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김정진 (KIM, Jeongjin); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 김혜진 (KIM, Hea-jin); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 스텐체코올리아 (STESHENKO, Yuliia); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 전세진 (JEON, Sejin); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 박현수 (PARK, Hyunsoo); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR). 신우연 (SHIN, Wooyeon); 02792 서울시 성북구 화랑로 14길 5, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김영호 (KIM, Young Ho); 06142 서울시 강남구 테헤란로 37길 7, 3층, 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: METHOD FOR TREATMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDER, MOUSE FOR MONITORING AUTISM SPECTRUM DISORDER, AND METHOD FOR SCREENING CANDIDATE MATERIAL FOR PREVENTION OR TREATMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDER

(54) 발명의 명칭: 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스, 및 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법



Light stimulation (473nm)

(57) Abstract: The present invention relates to a method for treatment of autism spectrum disorder, a mouse for monitoring autism spectrum disorder, and a method for screening a candidate material for prevention or treatment of autism spectrum disorder. Specifically, after being introduced into neurons of the ventrolateral thalamus (VL), the laterodorsal thalamus (LD), or the striatum, halorhodopsin protein is induced to undergo hyperpolarization by exposure to light, thereby suppressing output signals (or collective excitement) of the ventrolateral thalamus (VL), the laterodorsal thalamus (LD), or the striatum neurons, with the resultant prophylactic or therapeutic effect on autism.

(57) 요약서: 본 발명은 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스, 및 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법에 대한 것으로, 구체적으로는 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 할로로돕신 단백질을 도입한 후, 광을 조사해서 상기 할로로돕신 단백질의 과분극을 유도함으로써, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 신경 세포의 출력 신호(또는 집단성 흥분)를 억제할 수 있는 바, 자폐증을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/101352 A1



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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스, 및 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 자폐 스펙트럼 장애를 치료하는 방법, 자폐 스펙트럼 장애를 모니터링하기 위한 마우스, 및 자폐 스펙트럼 장애의 예방 또는 치료용 후보물질을 스크리닝하는 방법에 대한 것으로, 그 중에서도 복외측 시상(ventrolateral thalamus, VL), 측배측 시상(laterodorsal thalamus, LD) 또는 선조체(striatum) 신경 세포의 집단 출력 신호를 억제함으로써 자폐증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자폐스펙트럼장애(Autism Spectrum Disorder; ASD)라고도 불리우는 자폐증(autism)은 전반적인 발달장애(Pervasive Developmental Disorder; PDD)로서 사회적 상호작용의 장애, 의사소통의 장애, 반복적이고 상동증적인 행동을 보이는 신경발달장애이다.
- [3] 자폐증은 다양한 형태로 나타나고 개인에 따라 심각한 정도가 다르며, 자폐증(autistic disorder), 레트장애(Rett's disorder), 소아기 붕괴장애(childhood disintegrative disorder), 아스퍼거 증후군(Asperger's syndrome), 강박증(obsession disorder), 강박장애(obsessive compulsive disorder), 특정불능의 전반적 발달장애(Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified; PDD-NOS)를 포함한다. 상기 PDD-NOS란 자폐증에 가깝지만 미국정신의학회 진단기준인 정신장애 진단 및 통계편람(Diagnostic and Statistical Manual of Mental DisorderIV; DSM-IV)의 진단기준에는 적합하지 않는 장애를 말하는 것으로, 자폐증이 가지는 세가지 주된 증상이 모두 나타나지 않고 일부가 나타나는 경우를 말하는 것이며, WHO가 작성한 국제질병분류(International Classification of Disease; ICD)에서는 비정형 자폐증(Atypical Autism disorder)으로 정의된다.
- [4] 자폐증의 대부분은 소아기 자폐로 10,000 명당 2~5 명의 유병률을 보이고, 아스퍼거 증후군 등 전반적 발달장애를 포함하는 경우 10,000명당 20~50 명까지 보이며, 남녀 성비는 약 4:1로서 여자보다 남자에서 발생 빈도가 높게 나타난다.
- [5] 자폐증은 그 병인이 정확히 밝혀져 있지 않고, 대다수의 연구들이 유전체 검사를 통한 관련된 유전자군들을 보고 하는데 집중되어 있다. 하지만, 치료법으로 직접 연결될 수 있는 신경 회로 수준의 연구는 미흡하다.
- [6] 일부 환자의 이미징 연구들을 통해, 뇌의 기저핵(basal ganglia), 대뇌(cortex) 및 그와 연결된 구조들이 관련 뇌부위로 거론되고 있으나, 기능이 명확하지 않다. 일부 연구들에서는 이들 뇌부위에서 생성되는 글루타메이트(Glutamate),

가바(GABA), 도파민(Dopamine), 세로토닌(Serotonin) 및 옥시토신(Oxytocin) 신경 전달 물질들의 조절이 자폐증과 관련되어 있다고 보고 되고 있지만, 이들에 의한 신경 회로 및 행동 조절에 관한 연구가 부족하다.

- [7] 자폐증은 뚜렷한 치료제가 없고, 대중적인 요법이 주로 사용된다. 그 중 가장 보편적으로 사용되는 약물은 Risperidone 등이 있다. 하지만, 이 약물에 의한 환자 반응성이 다양하고, 증가하는 부작용 때문에, 치료제 개발이 시급하다. 심각한 반복행동 및 사회성 결핍을 치료하기 위해서 일부 뇌심부 자극술(DBS)를 사용하는 시도가 증가하고 있으나, 타겟 뇌회로를 정의하기 어려운 문제가 있다.
- [8] 이에 따라, 자폐증에 대한 효과적인 치료 개발을 위해서는 치료법으로 직접 연결될 수 있는 신경 회로 수준의 연구와 타겟 뇌회로에 대한 연구가 필요한 실정이지만, 이에 대한 연구는 찾아보기가 힘들다.
- [9] 한편, 광유전학(optogenetics)은 광학과 유전학을 결합한 기술로 빛으로 생체 조직의 세포들을 조절할 수 있는 생물학적 기술이다. 신경 세포를 유전적으로 조작하여 빛에 반응하는 이온 채널을 발현시킨 것이 대표적 사례이다.
- [10] 광유전학을 이용하면 생체 조직, 심지어 자유롭게 움직이는 동물에서 개별 신경 세포들의 활동을 조절하고 관찰할 수 있으며, 신경 활동의 조절이 어떠한 효과를 유발하는지 실시간으로 확인할 수 있다. 신경 활동의 조절을 위해서 빛에 반응하는 단백질인 채널로돕신(channelrhodopsin), 할로로돕신(halorhodopsin), 알키로돕신(archaerhodopsin)등을 사용하고 있고, 신경활동을 광시각적으로 기록하기 위해서 칼슘 농도 변화를 감지하는 GCaMP, 신경 소포체의 분비를 감지하는 synaptopHluorin, 신경전전달물질을 감지하는 GluSnFRs, 세포막전위를 감지하는 ArcLightning(ASAP1)과 같은 광유전학적 센서가 사용되고 있다.
- [11] 광유전학을 이용한 신경 세포 활동의 조절이 가능해짐에 따라 신경 질환의 메커니즘 파악 또는 신경 질환의 치료법 개발에 적용되고 있다.
- [12] 따라서, 본 발명자들은 자폐증의 행동 증상을 조절할 수 있는 뇌부위를 정의하고, 이를 진단 및 치료에 활용할 수 있음을 제안하고자 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 상기한 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 뇌의 특정 뉴런에 대한 집단 출력 신호를 억제하는, 자폐 스펙트럼 장애의 치료 방법, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스, 및 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 일 실시형태는, 복외측 시상(ventrolateral thalamus, VL), 측배측 시상(laterodorsal thalamus, LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하는 단계를 포함하는 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법이다.
- [15] 본 발명의 다른 실시형태는, 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는

선조체(Striatum)의 뉴런에, 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 도입되어 발현된, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스이다.

- [16] 본 발명의 또 다른 실시형태는, 상기한 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스에 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질을 주입하는 단계; 상기 후보물질이 주입된 마우스에 적색 광 영역의 빛을 조사하는 단계; 및 상기 빛이 조사된 마우스의 행동을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법이다.

발명의 효과

- [17] 상기한 본 발명에 의하면 뇌의 특정 부위인 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 신경 세포의 집단 출력 신호를 억제함으로써, 자폐증을 치료하는 방법을 제공할 수 있다.
- [18] 구체적으로, 본 발명은 자폐증을 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 할로로돕신 단백질을 도입한 후, 광을 조사해서 상기 할로로돕신 단백질의 과분극을 유도함으로써, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 신경 세포의 출력 신호(또는 집단성 흥분)를 억제할 수 있는바, 자폐증을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라, 정상 생쥐에서 복외측 시상(VL)-선조체 시냅스(VL-Striatum synapses)의 광자극(photostimulation) 실험예를 설명하기 위한 모식도이다. 도 1의 좌측은 자폐증 증상 검증을 위한 반복행동 검증 실험을 나타내고, 도 1의 우측은 VAL (혹은 AV) 부위에 채널로돕신2(hChR2)를 발현시킨 후, 473nm의 청색(blue) 빛을 선조체(Striatum) 부위에 조사한 것을 나타내고 있다.
- [20] 도 2는 도 1의 실험예에 따라 정상 생쥐에서 복외측 시상(VL) 부위에 빛을 전달하였을 때, 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 증가된 것으로 나타난 그래프이고(Blue rectangles: 10 Hz, 5 ms pulse width), 이를 통하여 자폐증 증상이 생긴 것을 확인할 수 있다.
- [21] 도 3은 도 1의 실험예에 따라 정상 생쥐에서 측배측 시상(LD) 부위에 빛을 전달하였을 때, 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 증가된 것으로 나타난 그래프이고(Blue rectangles: 10 Hz, 5 ms pulse width), 이를 통하여 자폐증 증상이 생긴 것을 확인할 수 있다.
- [22] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따라, 자폐증 생쥐에서 복외측 시상(VL)-선조체 시냅스(VL-Striatum synapses)의 광자극(photostimulation) 실험예를 설명하기 위한 모식도이다. 도 4의 좌측은 자폐증 증상 극복을 위한 반복행동 검증 실험 그림이고, 도 4의 우측은 VAL (혹은 AV) 부위에

할로로돕신(halorhodopsin)을 발현시킨 후, 630nm의 적색(red) 빛을 선조체(Striatum) 부위에 조사한 것을 나타내고 있다.

- [23] 도 5는 도 4의 실험예에 따라 자폐증 생쥐에서 VAL (혹은 AV) 부위에 빛을 전달하였을 때, 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 감소된 것으로 나타난 그래프이고(Red rectangles: continuous light), 이를 통하여 자폐증 증상이 억제되는 것을 확인할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [24] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시 예를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [25] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [26] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.
- [27] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 단계가 다른 단계와 “상에” 또는 “전에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 단계가 다른 단계와 직접적 시계열적인 관계에 있는 경우뿐만 아니라, 각 단계 후의 혼합하는 단계와 같이 두 단계의 순서에 시계열적 순서가 바뀔 수 있는 간접적 시계열적 관계에 있는 경우와 동일한 권리를 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [29] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [30] 본 발명은 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의

출력 신호를 억제하는 단계를 포함하는, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법을 제공한다.

- [31] 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 출력 신호는 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 개별 또는 집단 출력 신호일 수 있고, 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 신경 세포의 집단 흥분과 관련되거나 집단 흥분을 일으키는 신호인 것도 가능하다. 또한, 상기 출력 신호는 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 부위의 집단 활성화(population neuronal activity)을 포함하는 의미이다. 즉, 본 발명은 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 부위에 존재하는 수십 혹은 수백 개의 신경 세포가 가지는 집단 활성을 억제하는 단계를 포함할 수도 있다.
- [32] 복외측 시상(VL) 뉴런 및/또는 측배측 시상(LD) 뉴런에서 발생하는 출력 신호는 선조체(Striatum)로 전달된 입력에 의해 유도될 수 있는데, 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 및/또는 선조체(Striatum)의 뉴런을 광역제하여 출력 신호를 억제할 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 빛을 선조체에 조사하면, 복외측 시상(VL) 및/또는 측배측 시상(LD)에서 선조체로 가는 신호가 차단(할로로돕신을 사용한 경우)되거나, 강화되거나 혹은 활성화(채널로돕신을 사용한 경우)될 것이라 추측하였고, 상기한 신호의 연결을 제어하여 자폐 행동을 조절할 수 있음을 확인하였다.
- [33] 상기 복외측 시상(VL) 및 측배측 시상(LD)은 복부 전외측 시상(VAL: ventral anterolateral thalamus)에 포함되는 것으로, 본 발명자들은 크게 복부측(ventral) 부위인 VL과 등쪽(dorsal) 부위인 LD로 구분해서 실험을 하였고, 뇌의 특정 부위인 복외측 시상(VL) 및 측배측 시상(LD) 신경 세포의 집단 출력 신호를 억제하는 경우, 자폐증을 치료할 수 있다는 것을 확인한 후, 본 발명을 완성하였다. 본 명세서에서 상기 복부 전외측 시상(VAL)은 전배측 시상(AV: anteroventral thalamus) 및 전배측 시상(AVTh: anteroventral thalamic)과 동일하거나 유사한 의미로 사용된다.
- [34] 본 발명에서는 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제할 수 있는 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 상기 출력 신호를 억제하기 위해 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제할 수 있는 약물을 주입하거나, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런에 전기 자극을 제공하는 것이 가능하다.
- [35] 또한, 상기 출력 신호를 억제하기 위해 신경 활성을 억제하는 물질을 주입하거나, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런과 관련된 분자기전을 조절하거나, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런에 과분극을 일으키거나, Ca^{2+} 채널(Ca^{2+} channel) 차단제를 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD)

또는 선조체(striatum) 뉴런에 처리하거나, 약물을 통한 선택적인 수용기 활성화(DREADD : designer receptors exclusively activated by designer drugs) 방법을 이용하는 것일 수 있다. 상기 신경 활성을 억제하는 물질은 Jaws, Arch, ArchT, NpHR, iC₊₊ SwiChR₊₊ 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호는 Ca²⁺ 채널 활성화에 의해 매개되므로 Ca²⁺ 채널을 억제하여 상기 출력 신호를 억제할 수 있다. 또한, 상기 분자기전을 제어하거나 과분극을 일으키는 단백질을 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 뉴런에 도입하는 것도 가능하다.

- [36] 그 중에서도, 본 발명에서는 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하기 위해, 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 도입할 수 있다.
- [37] 상기 할로로돕신 단백질은 광에 반응하여 염소 이온(chloride)을 세포 안으로 유입시켜 과분극을 일으키는 이온 펌프를 의미하며, 상기 할로로돕신 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.
- [38] 상기 할로로돕신 단백질은 빛에 반응하여 chloride ion(Cl⁻)을 세포 안으로 유입시키고 과분극을 일으켜 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 집단 출력 신호를 억제시키는 것이 바람직하다. 빛에 반응하여 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 집단 출력 신호를 억제시킬 수 있는 단백질이라면, 제한없이 사용될 수 있다. 구체적으로 이들 단백질은 iC₊₊ 또는 ArchT 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [39] 상기 할로로돕신 단백질은 염소 이온 펌프의 활성을 가지는 단백질 야생형(wild type) 뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 염소 이온 펌프의 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명에서 용어 "상동성"이란 야생형 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 할로로돕신 단백질은 서열번호 1의 서열로 정의되는 야생형 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [41] 상기 할로로돕신 단백질은 염소 이온 펌프의 활성을 보유하는 한 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.
- [42] 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는

물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 단백질을 포함한다. 바람직하게는 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알칼리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다 또한 아미노산 서열상의 변이로 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

- [43] 상기 할로로돕신 단백질은 생물체로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 생물체로부터 직접 분리하여 제조하는 경우, 세포에 함유된 상기 할로로돕신 단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다. 화학적으로 합성할 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 유전자 재조합 기술로 제조할 경우, 상기 할로로돕신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 상기 할로로돕신 단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.
- [44] 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것일 수 있으나, 활성을 나타내는 할로로돕신 단백질을 암호화 할 수 있는 한 하나 이상의 염기서열이 치환, 결실 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드일 수 있다 상기 하나 이상의 염기서열이 치환, 결실 또는 삽입된 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가질 수 있다.
- [45] 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것일 수 있으며, 상기 벡터는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 제작물일 수 있다.
- [46] 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 선형 DNA 벡터, 플라스미드 DNA 벡터 및 재조합 바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 재조합 바이러스 벡터는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-연관 바이러스(adenovirus) 및

렌티바이러스(lentivirus)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 본 발명의 실시예에 의하면, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [47] 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 형질주입(transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 미세주입(microinjection) 및 총알식 도입(ballistic introduction)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 한 방법을 사용하여 상기 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 도입될 수 있다 본 발명의 실시예에 의하면 형질주입(transfection)을 사용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [48] 본 발명의 일 구현예는, 상기 할로로돕신 단백질을, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 도입된 개체에 적색 광 영역의 빛을 조사하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [49] 상기 적색 광 영역의 빛은 580 내지 670 nm의 파장일 수 있고, 바람직하게는 600 내지 650 nm의 파장일 수 있다 본 발명의 실시예에 의하면, 상기 적색광 영역의 빛은 630 nm의 파장일 수 있다.
- [50] 상기 빛을 조사하는 단계는 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 및/또는 선조체(Striatum) 뉴런에 조사하는 것일 수 있다. 빛을 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 및 선조체(Striatum) 뉴런에 공통적으로 한번에 또는 동시에 조사할 수도 있고, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런 중 하나를 선별해서 선택적으로 조사하는 것도 가능하다. 조사하는 빛의 양을 조절해서 선택적으로 조사할 수 있다. 그 중에서도, 본 발명자들은 후술하는 실험예에서 빛을 선조체(Striatum)에만 선택적으로 조사하였는데, 이는 VAL(혹은 AV)의 광유전학 단백질을 발현하는 신경 세포의 엑손(axon)이 뻗어나간 선조체(striatum) 부위에만 빛을 줌으로써, VAL과 연결된 다른 뇌부위의 관련성을 배제할 수 있는 장점이 있다.
- [51] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명자들은 먼저 자폐증을 갖지 않은 정상 생쥐의 시상(thalamus)에 채널로돕신-2(channelrhodopsin-2, hChR2) 유전자를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV) 벡터를 감염시키고, 선조체(Striatum) 뉴런에 청색 광을 조사한 결과, 파묻는 행동의 빈도수(Digging frequenc)와 시간 (Digging time)이 현저히 증가되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조).
- [52] 이어서, 본 발명의 구체적인 다른 실시예에서, 본 발명자들은 자폐증을 갖는 생쥐의 시상(thalamus)에 할로로돕신(halorhodopsin) 유전자를 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터를 감염시키고, 선조체(Striatum) 뉴런에 적색 광을 조사한 결과, 파묻는 행동의 빈도수(Digging frequenc)와 시간 (Digging time)이 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조).
- [53] 따라서, 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD)

또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 투여한 후, 빛을 조사하여 상기 할로로돕신을 발현시키면 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 집단 출력 신호를 억제할 수 있으며, 이를 통해 자폐 스펙트럼 장애를 치료 또는 예방할 수 있다.

[54] 본 명세서에서, 자폐 스펙트럼 장애(ASD)는 자폐증(autism), 자폐장애(autistic disorder), 전반적인 발달장애(Pervasive Developmental Disorder; PDD), 사회적 상호작용의 장애, 의사소통의 장애, 반복적 상동증, 레트장애(Rett's disorder), 소아기 붕괴장애(childhood disintegrative disorder), 아스퍼거 증후군(Asperger's syndrome), 강박증(obsession disorder), 강박장애(obsessive compulsive disorder), 및 특정불능의 전반적 발달장애(Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified; PDD-NOS)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환을 포함하는 의미이다.

[55] 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제는 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 유효 성분을 생체내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed, Merck & Co Inc 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[56] 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[57] 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제는 경구 또는 비경구 투여 모두 가능하며, 비경구 투여는 두개강 내 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등을 포함한다.

[58] 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적

상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 병용되는 약물, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제의 투여량은 1일 당 00001 ng/kg(체중) 내지 200 mg/kg(체중)이다.

- [59] 본 발명의 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 Ca^{2+} 채널 차단제는 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 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 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 다른 실시형태는, 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에, 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 도입되어 발현된, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스이다.
- [61] 일 구현예에서, 상기 할로로돕신 단백질이 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에서 발현되고, 상기 발현된 할로로돕신 단백질은 적색 광 영역의 빛 조사에 의해 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하는 것이 가능하다.
- [62] 본 발명의 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스는 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.
- [63] 본 발명의 또 다른 실시형태는, 상기한 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스에 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질을 주입하는 단계; 상기 후보물질이 주입된 마우스에 적색 광 영역의 빛을 조사하는 단계; 및 상기 빛이 조사된 마우스의 행동을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법이다.
- [64] 또한, 상기 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [65] 또한, 상기 후보물질을 주입하는 방법은 예를 들어 마우스에 경구투여 하거나 주사제로 주입해서 투여할 수 있다.
- [66] 또한, 상기 빛이 조사된 마우스의 행동을 대조군과 비교하는 방법은, 예를 들어 후보물질을 주입한 마우스와 주입하지 않은 마우스의 파문은 행동의 빈도수 또는 시간을 계산해서 비교할 수 있다. 예를 들어서, 후보물질을 주입한 마우스의 빈도수 또는 시간이 주입하지 않은 마우스의 빈도수 또는 시간보다

줄어들었다면, 상기 후보물질은 자폐증에 유용한 것으로 선별하는 것이 가능하다.

[67] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[68] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[69] 본 명세서에서 사용된 용어 및 약어들은 하기와 같은 의미를 갖는다. 약어가 정의되지 않은 경우, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미로 해석될 수 있다.

[70] AAV: 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus)

[71] ASD: 자폐 스펙트럼 장애(Autistic Spectrum Disorders)

[72] hChR2: 채널로돕신-2(channelrhodopsin-2)

[73] VL: 복외측 시상(ventrolateral thalamus)

[74] LD: 측배측 시상(laterodorsal thalamus)

[75] WT: 야생형(wild type)

[76] VAL: 복부 전외측 시상(ventral anterolateral thalamus)

[77] AV: 전배측 시상(anteroventral thalamus)

[78] AVTh: 전배측 시상(anteroventral thalamic)

[79] <실시예>

[80] <실시예 1> 채널로돕신(hChR2)이 발현된 WT 마우스 제작

[81] 5주 이상된 마우스 WT (C57BL/6J)을 사용하였다. Animal care and handling은 한국과학기술원(KIST, Korea) 동물 관리 및 사용위원회의 지침에 따라 수행하였다. 다음으로, 마우스의 복외측 시상(ventrolateral thalamus, VL) 신경 또는 측배측 시상(laterodorsal thalamus, LD) 뉴런에 CamKII 프로모터의 제어 하에 channelrhodopsin-2(hChR2) 유전자를 보유한 adeno-associated virus(AAV) 벡터(vector)를 이용하여 감염시켰다(도 1).

[82] 상기 hChR2는 light-activated cation channel에 관여한다. 상기 AAV 벡터는 AAV-CamKII-Cre 바이러스와

AAV2/1-EF1 α -DIO-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE; titer: 5.36 $\times$ 10¹² gc/ml; Vector Core Facility at the University of Pennsylvanic, USA)를 1:1로 섞어 이용하였다.

상기 바이러스 주입을 위해, 모든 마우스를 avertin(20 mg/ml of tribromoethanol, 20 mg/g 복강주사(injection peritoneal, i.p.))으로 마취시키고 정위 장치(Sterotaxic apparatus; David Kopf Instruments, USA)에 넣었다. 상기 모든 바이러스 주입은 0.1 ml/min의 속도로 전달하였다. 바이러스 혼합물 1.0 ml를 복외측 시상(VL; 1.0 mm anteroposterior[AP]; 1.0 mm mediolateral[ML]; 3.4 mm dorsoventral[DV]) 또는 측배측 시상(LD; 1.22 mm anteroposterior[AP]; 1.25 mm mediolateral[ML]; 2.6 mm dorsoventral[DV])에 주입하였다. VL 또는 LD에서 옵신의 발현을 위해, 표적 부위의 크기에 따라 동일한 용량으로 준비한 바이러스를 각각 0.6 microliter, 0.5 microliter의 용량으로 달리 사용하였다.

- [83] 상기 바이러스 혼합물을 주사한 뒤에, external metal ferrule(200 mm diameter, 0.39 NA; Doric Lenses Inc., Canada)이 달린 광섬유 탐침(fiberoptic probe)을 선조체(striatum) 시상에 삽입하고, Super-Bond(Sun Medical Co., Japan)로 두개골(skull)에 고정시켰다.
- [84] <실시예 2> ASD 마우스 제작
- [85] 본 발명의 ASD(자폐 스펙트럼 장애) 마우스는 Poliak S. et al., 2003 에 기재된 방법에 따라 제작된 CNTNAP2라는 자폐 동물 모델을 사용하였다. 본 연구팀은 heterozygote mice 교배해서 만든 CNTNAP2 ASD 마우스를 사용하였다.
- [86] <실시예 3> 할로로돕신(NpHR3.0)이 발현된 ASD 마우스 제작
- [87] 실시예 2에서 제작한 CNTNAP2 ASD 마우스에 광 의존적 염소 펌프(light-dependent chloride pump)인 할로로돕신(halorhodopsin; NpHR3.0)을 발현하는 바이러스를 VL 주입하여, 할로로돕신이 발현된 ASD 마우스를 제작하였다. 즉, CamKII 프로모터 제어 하에 NpHR3.0 유전자를 보유한 adeno-associated virus(AAV)를 본 발명의 실시예2에 따른 ASD 마우스의 VL 부위에 감염시켰다.
- [88] 상기 할로로돕신을 주입하기 위해 사용된 바이러스는 AAV-CamKII-CRE , AAV-DIO-NpHR3.0-EYFP; Vector Core Facility at the University of Pennsylvania, USA)이다. 상기 바이러스 주입을 위해, 모든 생쥐는 avertin으로 마취시키고 정위 장치(Sterotaxic apparatus; David Kopf Instruments, USA)에 두었다. 상기 모든 바이러스 주입은 0.1 ml/min의 속도로 전달하였다. 제한된 표적 영역에서 옵신(Opsins)의 발현을 위해, 총 0.8 ml의 바이러스 혼합물을 VL에 주입하였다. VL 시상의 좌표(coordinates)는 1.0 mm AP, 1.1 ML, 3.4 DV 이다.
- [89] 상기 바이러스 혼합물을 주입한 뒤에, external metal ferrule(200 mm diameter, 0.39 NA; Doric Lenses Inc., Canada)이 달린 광섬유 탐침(fiberoptic probe)을 선조체(striatum)에 삽입하고, Super-Bond(Sun Medical Co., Japan)로 두개골(skull)에 고정시켰다.
- [90] <실험예>
- [91] <실험예 1> 선조체에 청색광 자극을 통한 WT 마우스로부터 자폐 동물 모델 유도 확인
- [92] 본 발명의 실시예 1에 따른 채널로돕신이 발현된 WT 마우스에 대하여 광자극을 통한 자폐 동물모델 유도를 확인하고자 하였다.
- [93] 상기 채널로돕신이 발현된 마우스의 선조체(Striatum) 핵심 영역에 473 nm의 청색 광을 조사하여 VL 및 LD 신경 각각의 축삭을 광자극하였다. Optogenetic 자극 실험을 위해 473 nm 빛은 pulse generator(Agilent, USA)에 의해 제어되는 diode-pumped solid-state laser(Crystalaser, USA) 기기를 이용하였다. 청색 광 자극 후에, 마우스의 파묻는 행동에 대한 빈도수(Digging frequency) 및 시간(Digging time)을 계산하였고, 그 결과는 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같다.
- [94] 도 2에 나타낸 바와 같이, 도 1의 실험예에 따라 채널로돕신이 발현된 WT

- 마우스에서 복외측 시상(VL) 부위에 빛을 전달하였을 때, 마우스의 앞다리(Forelimb) 및 뒷다리(Hindlimb) 모두 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 유의하게 증가된 것을 확인하였다.
- [95] 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, 도 1의 실험예에 따라 채널로돕신이 발현된 WT 마우스에서 측배측 시상(LD) 부위에 빛을 전달하였을 때, 마우스의 앞다리(Forelimb) 및 뒷다리(Hindlimb) 모두 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 유의하게 증가된 것을 확인하였다.
- [96] 상기한 결과에 따라, AV에서 선조체로 가는 신호를 강화 혹은 활성화 시키는 채널로돕신을 적용시킨 WT 마우스에 청색 광 조사를 통하여 자폐증 증상이 유도된 것을 확인하였다.
- [97] <실험예 2> 선조체에 적색광 자극을 통한 자폐 동물 모델의 자폐 증상 완화 확인
- [98] 본 실험예에서는 상기 실시예2를 통하여 할로로돕신(NpHR3.0)이 발현된 마우스의 선조체(Striatum) 부위에 적색 광(630 nm)을 이용한 빛을 사용하여, VL 및 LD 입력을 광억제하고 자폐증 증상이 억제되는지 확인하였다. 마우스의 파묻는 행동에 대한 빈도수(Digging frequency) 및 시간(Digging time)을 계산하여 그 효과를 판단하였다(도 4).
- [99] 상기 할로로돕신이 발현된 ASD 마우스의 선조체(Striatum) 핵심 영역을 630 nm의 적색 광을 조사하여 VL 및 LD 신경의 축삭(axon)을 광자극하였다. Optogenetic 자극 실험을 위해 630 nm 빛은 pulse generator(Agilent, USA)에 의해 제어되는 diode-pumped solid-state laser(CrystaLaser, USA) 기기를 이용하였다. 적색 광 자극 후에, 마우스의 파묻는 행동에 대한 빈도수(Digging frequency) 및 시간(Digging time)을 계산하였고, 그 결과는 도 5에 나타낸 바와 같다.
- [100] 도 5에 나타낸 바와 같이, 도 4의 실험예에 따라 자폐증 생쥐에서 VAL (혹은 AV) 부위에 빛을 전달하였을 때, 마우스의 앞다리(Forelimb) 및 뒷다리(Hindlimb) 모두 파묻는 행동의 빈도수 (Digging frequency)와 시간 (Digging time)이 유의하게 감소된 것을 확인하였다.
- [101] 따라서, 상기한 결과로부터 AV에서 선조체로 가는 신호를 차단시키는 할로로돕신을 적용시킨 ASD 마우스에 적색 광 조사를 통하여 자폐증 증상이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.
- [102] 상기에서는 본 발명을 특정의 바람직한 실시예에 관련하여 도시하고 설명하였지만, 이하의 특허청구범위에 의해 마련되는 본 발명의 기술적 특징이나 분야를 이탈하지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개조 및 변화될 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 것이다.
- [103]

청구범위

- [청구항 1] 복외측 시상(ventrolateral thalamus, VL), 측배측 시상(laterodorsal thalamus, LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하는 단계를 포함하는 자폐 스펙트럼 장애(Autism Spectrum Disorder; ASD)의 치료방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하기 위해,
상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제할 수 있는 약물을 주입하거나, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런에 전기 자극을 제공하는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런의 출력 신호를 억제하기 위해,
신경 활성을 억제하는 물질을 주입하거나, 상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런과 관련된 분자기전을 조절하거나,
상기 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런에 과분극을 일으키거나, Ca^{2+} 채널(Ca^{2+} channel) 차단제를 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(striatum) 뉴런에 처리하거나, 약물을 통한 선택적인 수용기 활성화(DREADD : designer receptors exclusively activated by designer drugs) 방법을 이용하는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 복외측 시상(VL) 뉴런 또는 측배측 시상(LD) 뉴런의 출력 신호를 억제하기 위해, 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 자폐 스펙트럼 장애를 가진 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 도입되는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 할로로돕신 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 구성되는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.
- [청구항 7] 제 4 항에 있어서,
상기 벡터는 선형 DNA 벡터, 플라스미드 DNA 벡터 및 재조합 바이러스

벡터로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 재조합 바이러스 벡터는 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 및 렌티바이러스(lentivirus)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

[청구항 9] 제 4 항에 있어서,
상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 형질주입(transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transfection), 미세주입(microinjection) 및 총알식 도입(ballistic introduction)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 한 방법을 사용하여 상기 개체의 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에 도입되는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

[청구항 10] 제 4 항에 있어서,
상기 할로로돕신 단백질, 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 도입된 개체에 적색 광 영역의 빛을 조사하는 단계를 더 포함하는, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

[청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 빛을 조사하는 단계는 복외측 시상(VL), 측배측 시상 또는 선조체 뉴런에 조사하는 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

[청구항 12] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 자폐 스펙트럼 장애(ASD)는 자폐증(autism), 자폐장애(autistic disorder), 전반적인 발달장애(Pervasive Developmental Disorder; PDD), 사회적 상호작용의 장애, 의사소통의 장애, 반복적 상동증, 레트장애(Rett's disorder), 소아기 붕괴장애(childhood disintegrative disorder), 아스퍼거 증후군(Asperger's syndrome), 강박증(obsession disorder), 강박장애(obsessive compulsive disorder), 및 특정불능의 전반적 발달장애(Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified; PDD-NOS)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환인 것인, 자폐 스펙트럼 장애의 치료방법.

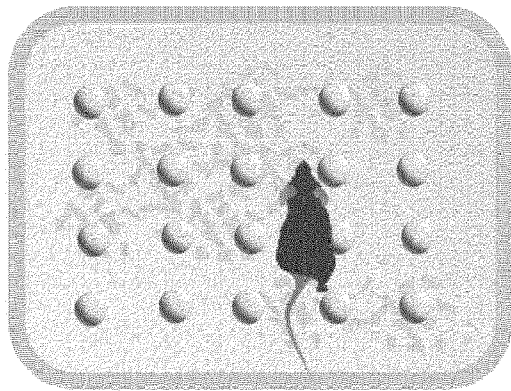
[청구항 13] 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는 선조체(Striatum)의 뉴런에, 할로로돕신 단백질, 상기 할로로돕신 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 도입되어 발현된, 자폐 스펙트럼 장애 모니터링용 마우스.

[청구항 14] 제 13 항에 있어서,
상기 할로로돕신 단백질이 복외측 시상(VL), 측배측 시상(LD) 또는

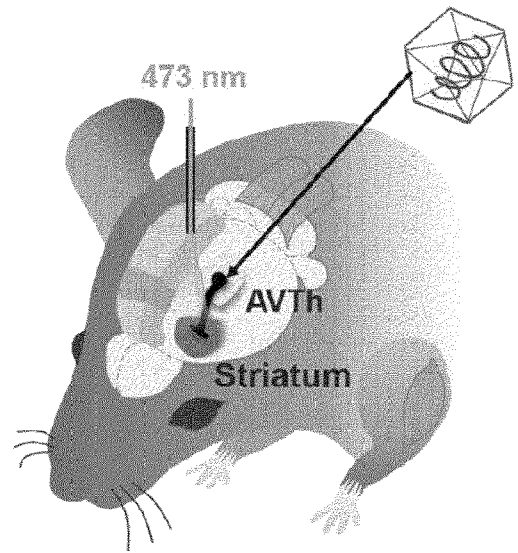
선조체(Striatum)의 뉴런에서 발현되고,
상기 발현된 할로로돕신 단백질은 적색 광 영역의 빛 조사에 의해 복외측
시상(VL) 또는 측배측 시상(LD) 뉴런의 출력 신호를 억제하는, 자폐
스펙트럼 장애 모니터링용 마우스.

- [청구항 15] 제 13 항 또는 제 14 항의 마우스에 자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용
후보물질을 주입하는 단계;
상기 후보물질이 주입된 마우스에 적색 광 영역의 빛을 조사하는 단계; 및
상기 빛이 조사된 마우스의 행동을 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는
자폐 스펙트럼 장애 예방 또는 치료용 후보물질의 스크리닝 방법.

[도1]

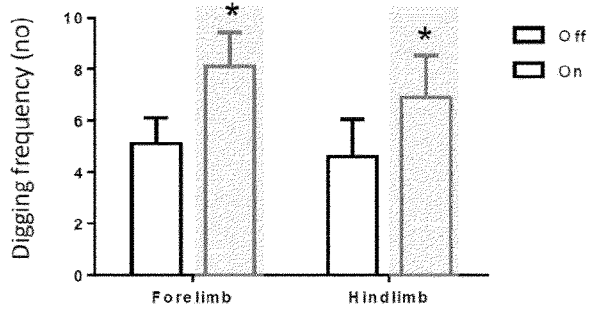
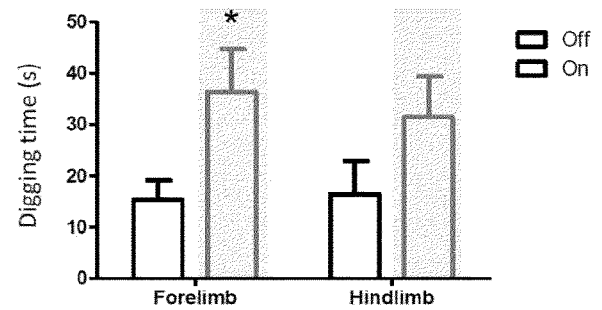


AAV-CamKII-hChR2

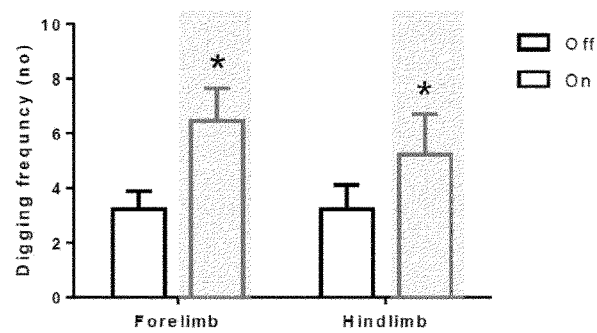
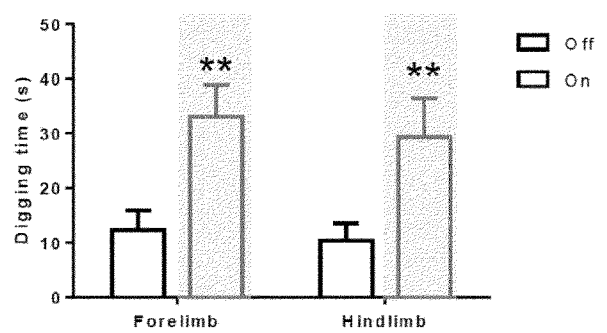


Light stimulation (473nm)

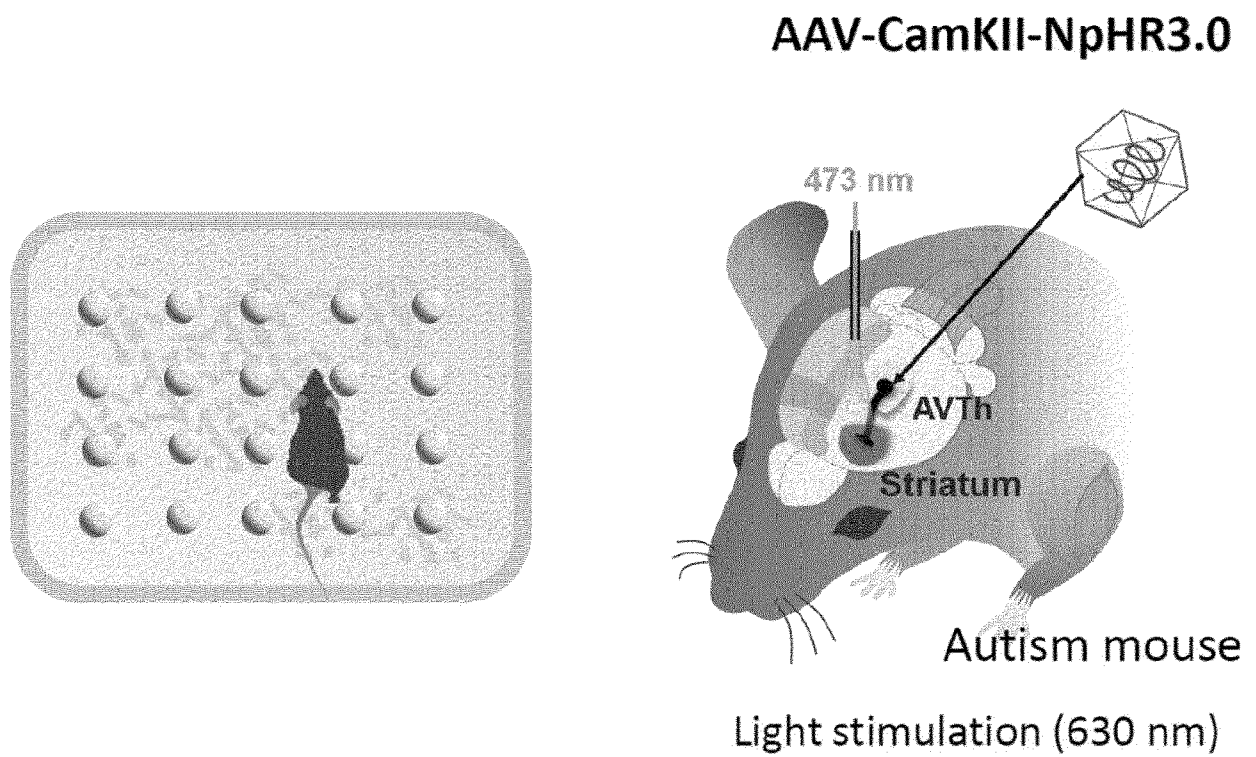
[도2]

A**B**

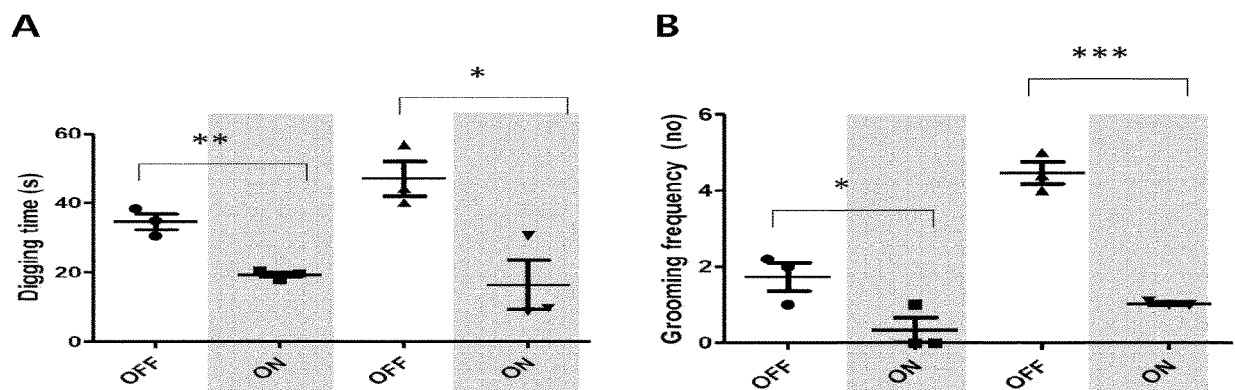
[도3]

A**B**

[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/18(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61B 5/00(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 38/16; A61K 49/00; A61N 1/04; A61N 1/36; C12N 15/09; C12N 15/31; C12N 15/85; A61K 31/7088; A61K 48/00; A61P 25/18; A01K 67/027; A61B 5/00

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: Autism Spectrum Disorder, neuron, Halorhodopsin, ventrolateral thalamus, laterodorsal thalamus, striatum, mouse, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OWEN, S.F. et al. Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning. Cell. 08 February 2018, vol. 172, pages 683-695, e1-e8 See page 684, paragraph [1], lines 31-37, page e7, lines 5-7, figure 1.	13-15
A	US 2015-0040249 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 05 February 2015 See claims 1-7, 11.	13-15
A	JP 2018-500001 A (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 11 January 2018 See claim 1.	13-15
A	US 2012-0121542 A1 (CHUONG, A. et al.) 17 May 2012 See abstract, claim 1.	13-15
A	KR 10-2013-0020669 A (RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 27 February 2013 See abstract, claim 1.	13-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 MARCH 2020 (04.03.2020)

Date of mailing of the international search report

04 MARCH 2020 (04.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015454

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.: **1-12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-12 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a 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/KR2019/015454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2015-0040249 A1	05/02/2015	AU 2013-235517 A1	02/10/2014
		AU 2013-235517 B2	08/11/2018
		AU 2019-200310 A1	07/02/2019
		CA 2867567 A1	26/09/2013
		CN 104270942 A	07/01/2015
		CN 104270942 B	02/02/2018
		EP 2827707 A1	28/01/2015
		EP 2827707 A4	21/10/2015
		JP 2015-512516 A	27/04/2015
		JP 2019-032328 A	28/02/2019
		JP 6396883 B2	26/09/2018
		WO 2013-142196 A1	26/09/2013
JP 2018-500001 A	11/01/2018	AU 2015-298618 A1	08/12/2016
		AU 2016-278053 A1	04/01/2018
		AU 2016-318775 A1	12/04/2018
		AU 2016-318780 A1	12/04/2018
		AU 2016-318785 A1	12/04/2018
		AU 2016-318786 A1	12/04/2018
		CA 2989326 A1	22/12/2016
		CA 2997187 A1	16/03/2017
		CA 2997188 A1	16/03/2017
		CA 2997189 A1	16/03/2017
		CA 2997191 A1	16/03/2017
		CN 108348517 A	31/07/2018
		CN 108348518 A	31/07/2018
		CN 108474036 A	31/08/2018
		CN 108495630 A	04/09/2018
		CN 108601776 A	28/09/2018
		EP 3149211 A1	05/04/2017
		EP 3307913 A1	18/04/2018
		EP 3307913 A4	27/03/2019
		EP 3347013 A1	18/07/2018
		EP 3347014 A1	18/07/2018
		EP 3347015 A1	18/07/2018
		EP 3347016 A1	18/07/2018
		JP 2018-526394 A	13/09/2018
		JP 2018-526395 A	13/09/2018
		JP 2018-526396 A	13/09/2018
		JP 2018-526398 A	13/09/2018
		SG 11201609832 A	29/12/2016
		US 2014-0303243 A1	09/10/2014
		US 2014-0315992 A1	23/10/2014
		US 2016-0244831 A9	25/08/2016
		US 2017-0083664 A1	23/03/2017
		US 2017-0087139 A1	30/03/2017
		US 2017-0087140 A1	30/03/2017
		US 2017-0087141 A1	30/03/2017
		US 2017-0105985 A1	20/04/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2018-0110767 A1	26/04/2018
		US 9884057 B2	06/02/2018
		WO 2013-006857 A1	10/01/2013
		WO 2016-022324 A1	11/02/2016
		WO 2016-205348 A1	22/12/2016
		WO 2017-044491 A1	16/03/2017
		WO 2017-044497 A1	16/03/2017
		WO 2017-044502 A1	16/03/2017
		WO 2017-044503 A1	16/03/2017
US 2012-0121542 A1	17/05/2012	US 10106584 B2	23/10/2018
		US 2008-0306576 A1	11/12/2008
		US 2009-0210039 A1	20/08/2009
		US 2011-0087311 A1	14/04/2011
		US 2011-0165681 A1	07/07/2011
		US 2012-0089205 A1	12/04/2012
		US 2012-0123508 A1	17/05/2012
		US 2012-0214188 A1	23/08/2012
		US 2014-0324138 A1	30/10/2014
		US 2015-0192567 A1	09/07/2015
		US 2017-0044219 A1	16/02/2017
		US 8545543 B2	01/10/2013
		US 8910638 B2	16/12/2014
		US 8957028 B2	17/02/2015
		US 9500641 B2	22/11/2016
KR 10-2013-0020669 A	27/02/2013	AU 2014-225466 A1	29/10/2015
		AU 2014-225466 B2	15/03/2018
		BR 112015021387 A2	18/07/2017
		CA 2829189 A1	29/09/2011
		CA 2924954 A1	12/09/2014
		CN 102905757 A	30/01/2013
		CN 102905757 B	17/02/2016
		CN 105377358 A	02/03/2016
		CN 105377358 B	03/10/2017
		CN 105477782 A	13/04/2016
		CN 105477782 B	04/01/2019
		DK 2964315 T3	02/01/2019
		EP 2550060 A2	30/01/2013
		EP 2550060 B1	13/03/2019
		EP 2964315 A1	13/01/2016
		EP 2964315 B1	29/08/2018
		ES 2699442 T3	11/02/2019
		IL 222033 A	30/07/2015
		JP 2013-521979 A	13/06/2013
		JP 2015-123376 A	06/07/2015
		JP 2016-512454 A	28/04/2016
		JP 2018-192298 A	06/12/2018
		JP 5726285 B2	27/05/2015
		JP 6062990 B2	18/01/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 6393283 B2	19/09/2018
		KR 10-1866252 B1	11/06/2018
		KR 10-2016-0025490 A	08/03/2016
		MX 2012010841 A	29/01/2013
		MX 2015011717 A	06/07/2016
		MX 350331 B	04/09/2017
		MX 350386 B	05/09/2017
		PL 2964315 T3	29/03/2019
		PT 2964315 T	04/12/2018
		SG 11201506902 A	29/09/2015
		US 10004898 B2	26/06/2018
		US 2013-0035745 A1	07/02/2013
		US 2013-0053922 A1	28/02/2013
		US 2014-0135858 A1	15/05/2014
		US 2014-0200387 A1	17/07/2014
		US 2014-0257016 A1	11/09/2014
		US 2015-0190633 A1	09/07/2015
		US 2016-0263381 A1	15/09/2016
		US 2017-0028192 A1	02/02/2017
		US 2017-0036035 A1	09/02/2017
		US 2018-0289953 A1	11/10/2018
		US 9008781 B2	14/04/2015
		US 9011310 B2	21/04/2015
		US 9381350 B2	05/07/2016
		US 9789329 B2	17/10/2017
		US 9821157 B2	21/11/2017
		US 9974951 B2	22/05/2018
		WO 2011-050255 A2	28/04/2011
		WO 2011-050255 A3	01/09/2011
		WO 2011-050255 A4	20/10/2011
		WO 2011-119251 A2	29/09/2011
		WO 2011-119251 A3	22/12/2011
		WO 2014-138620 A1	12/09/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/18(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61B 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; A61K 49/00; A61N 1/04; A61N 1/36; C12N 15/09; C12N 15/31; C12N 15/85; A61K 31/7088; A61K 48/00; A61P 25/18; A01K 67/027; A61B 5/00

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: 자폐 스펙트럼 장애 (Autism Spectrum Disorder), 뉴런 (neuron), 할로로돕신 (Halorhodopsin), 복외측 시상 (ventrolateral thalamus), 측배측 시상 (laterodorsal thalamus), 선조체 (striatum), 마우스 (mouse), 스크리닝 (screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	OWEN S.F. 등, 'Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning', Cell, 2018.02.08, 172권, 페이지 683-695, e1-e8 페이지 684, 단락 1, 라인 31-37, 페이지 e7, 라인 5-7, 그림 1	13-15
A	US 2015-0040249 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2015.02.05 청구항 1-7, 11	13-15
A	JP 2018-500001 A (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 2018.01.11 청구항 1	13-15
A	US 2012-0121542 A1 (CHUONG A. 등) 2012.05.17 요약, 청구항 1	13-15
A	KR 10-2013-0020669 A (리서치 파운데이션 오브 더 시티 유니버시티 오브 뉴욕) 2013.02.27 요약, 청구항 1	13-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

- “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
- “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
- “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “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 “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
- “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 03월 04일 (04.03.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 03월 04일 (04.03.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



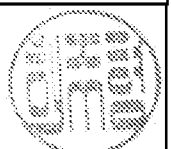
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



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: 1-12
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 1-12는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2015-0040249 A1	2015/02/05	AU 2013-235517 A1 AU 2013-235517 B2 AU 2019-200310 A1 CA 2867567 A1 CN 104270942 A CN 104270942 B EP 2827707 A1 EP 2827707 A4 JP 2015-512516 A JP 2019-032328 A JP 6396883 B2 WO 2013-142196 A1	2014/10/02 2018/11/08 2019/02/07 2013/09/26 2015/01/07 2018/02/02 2015/01/28 2015/10/21 2015/04/27 2019/02/28 2018/09/26 2013/09/26
JP 2018-500001 A	2018/01/11	AU 2015-298618 A1 AU 2016-278053 A1 AU 2016-318775 A1 AU 2016-318780 A1 AU 2016-318785 A1 AU 2016-318786 A1 CA 2989326 A1 CA 2997187 A1 CA 2997188 A1 CA 2997189 A1 CA 2997191 A1 CN 108348517 A CN 108348518 A CN 108474036 A CN 108495630 A CN 108601776 A EP 3149211 A1 EP 3307913 A1 EP 3307913 A4 EP 3347013 A1 EP 3347014 A1 EP 3347015 A1 EP 3347016 A1 JP 2018-526394 A JP 2018-526395 A JP 2018-526396 A JP 2018-526398 A SG 11201609832 A US 2014-0303243 A1 US 2014-0315992 A1 US 2016-0244831 A9 US 2017-0083664 A1 US 2017-0087139 A1 US 2017-0087140 A1 US 2017-0087141 A1 US 2017-0105985 A1	2016/12/08 2018/01/04 2018/04/12 2018/04/12 2018/04/12 2018/04/12 2016/12/22 2017/03/16 2017/03/16 2017/03/16 2017/03/16 2018/07/31 2018/07/31 2018/08/31 2018/09/04 2018/09/28 2017/04/05 2018/04/18 2019/03/27 2018/07/18 2018/07/18 2018/07/18 2018/07/18 2018/09/13 2018/09/13 2018/09/13 2018/09/13 2016/12/29 2014/10/09 2014/10/23 2016/08/25 2017/03/23 2017/03/30 2017/03/30 2017/03/30 2017/04/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2018-0110767 A1	2018/04/26
		US 9884057 B2	2018/02/06
		WO 2013-006857 A1	2013/01/10
		WO 2016-022324 A1	2016/02/11
		WO 2016-205348 A1	2016/12/22
		WO 2017-044491 A1	2017/03/16
		WO 2017-044497 A1	2017/03/16
		WO 2017-044502 A1	2017/03/16
		WO 2017-044503 A1	2017/03/16
US 2012-0121542 A1	2012/05/17	US 10106584 B2	2018/10/23
		US 2008-0306576 A1	2008/12/11
		US 2009-0210039 A1	2009/08/20
		US 2011-0087311 A1	2011/04/14
		US 2011-0165681 A1	2011/07/07
		US 2012-0089205 A1	2012/04/12
		US 2012-0123508 A1	2012/05/17
		US 2012-0214188 A1	2012/08/23
		US 2014-0324138 A1	2014/10/30
		US 2015-0192567 A1	2015/07/09
		US 2017-0044219 A1	2017/02/16
		US 8545543 B2	2013/10/01
		US 8910638 B2	2014/12/16
		US 8957028 B2	2015/02/17
		US 9500641 B2	2016/11/22
KR 10-2013-0020669 A	2013/02/27	AU 2014-225466 A1	2015/10/29
		AU 2014-225466 B2	2018/03/15
		BR 112015021387 A2	2017/07/18
		CA 2829189 A1	2011/09/29
		CA 2924954 A1	2014/09/12
		CN 102905757 A	2013/01/30
		CN 102905757 B	2016/02/17
		CN 105377358 A	2016/03/02
		CN 105377358 B	2017/10/03
		CN 105477782 A	2016/04/13
		CN 105477782 B	2019/01/04
		DK 2964315 T3	2019/01/02
		EP 2550060 A2	2013/01/30
		EP 2550060 B1	2019/03/13
		EP 2964315 A1	2016/01/13
		EP 2964315 B1	2018/08/29
		ES 2699442 T3	2019/02/11
		IL 222033 A	2015/07/30
		JP 2013-521979 A	2013/06/13
		JP 2015-123376 A	2015/07/06
		JP 2016-512454 A	2016/04/28
		JP 2018-192298 A	2018/12/06
		JP 5726285 B2	2015/05/27
		JP 6062990 B2	2017/01/18

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

JP 6393283 B2	2018/09/19
KR 10-1866252 B1	2018/06/11
KR 10-2016-0025490 A	2016/03/08
MX 2012010841 A	2013/01/29
MX 2015011717 A	2016/07/06
MX 350331 B	2017/09/04
MX 350386 B	2017/09/05
PL 2964315 T3	2019/03/29
PT 2964315 T	2018/12/04
SG 11201506902 A	2015/09/29
US 10004898 B2	2018/06/26
US 2013-0035745 A1	2013/02/07
US 2013-0053922 A1	2013/02/28
US 2014-0135858 A1	2014/05/15
US 2014-0200387 A1	2014/07/17
US 2014-0257016 A1	2014/09/11
US 2015-0190633 A1	2015/07/09
US 2016-0263381 A1	2016/09/15
US 2017-0028192 A1	2017/02/02
US 2017-0036035 A1	2017/02/09
US 2018-0289953 A1	2018/10/11
US 9008781 B2	2015/04/14
US 9011310 B2	2015/04/21
US 9381350 B2	2016/07/05
US 9789329 B2	2017/10/17
US 9821157 B2	2017/11/21
US 9974951 B2	2018/05/22
WO 2011-050255 A2	2011/04/28
WO 2011-050255 A3	2011/09/01
WO 2011-050255 A4	2011/10/20
WO 2011-119251 A2	2011/09/29
WO 2011-119251 A3	2011/12/22
WO 2014-138620 A1	2014/09/12