

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 1월 9일 (09.01.2020)

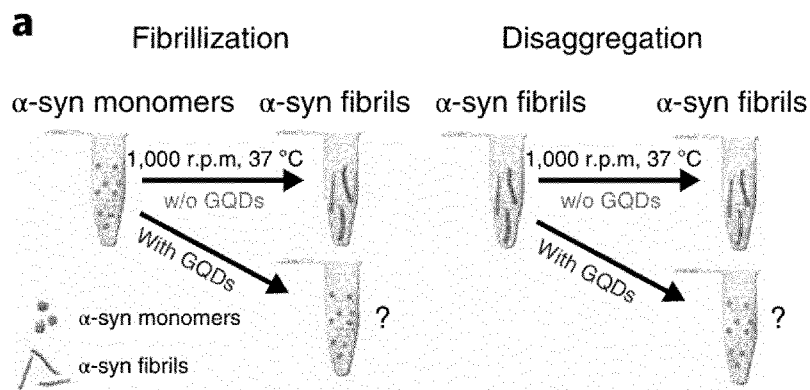


(10) 국제공개번호
WO 2020/009551 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 33/44* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/008359
 - (22) 국제출원일: 2019년 7월 8일 (08.07.2019)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보:
10-2018-0079034 2018년 7월 6일 (06.07.2018) KR
10-2019-0081945 2019년 7월 8일 (08.07.2019) KR
 - (71) 출원인: 바이오그래핀 주식회사 (BIOGRAPHENE INC.) [KR/KR]; 06362 서울시 강남구 광평로46길 4, 3층, Seoul (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
 - (72) 발명자: 홍병희 (HONG, Byung Hee); 16420 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 120동 1503호, Gyeonggi-do (KR). 유제민 (YOO, Je Min); 06272 서울시 강남구 도곡로28길 8, 102동 1901호, Seoul (KR).
 - (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, 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, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: GRAPHENE QUANTUM DOT AS THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASE ASSOCIATED WITH ABNORMAL FIBRILLATION OR AGGREGATION OF NEUROPROTEIN

(54) 발명의 명칭: 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환 치료제로서의 그래핀 양자점



(57) Abstract: The present invention provides a graphene quantum dot as a therapeutic agent for diseases associated with abnormal fibrillation or aggregation of neuroproteins. The graphene quantum dot according to the present invention suppresses α -syn fibrillation or disaggregates already formed α -syn fibrils, and shows the working effect of passing through the blood brain barrier (BBB). Therefore, the graphene quantum dot according to the present invention can be advantageously used as a therapeutic agent for diseases associated with abnormal fibrillation or aggregation of neuroproteins, such as neurodegenerative diseases, inflammatory diseases, and metabolic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 치료제로서의 그래핀 양자점을 제공한다. 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 α -syn 피브릴화를 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해하고, 혈뇌장벽(BBB)을 통과하는 작용효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 퇴행성 신경 질환, 염증성 질환, 대사성 질환 등의 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2020/009551 A1

명세서

발명의 명칭: 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환 치료제로서의 그래핀 양자점

기술분야

- [1] 본 발명은 그래핀 양자점 및 이의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 퇴행성 신경 질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환의 치료제로서의 그래핀 양자점 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 알파-시누클레인 (α -synuclein; α -syn)은 인간의 뇌에 풍부한 단백질로서, 신경 세포 (뉴런)의 말단에서 주로 발견되며, 이러한 구조 내에서 인지질 및 단백질과 상호 작용하는 것으로 알려져있다. α -syn은 비정상적으로 응집되게 되면 α -syn 피브릴 (α -syn fibrils; α -syn PFFs)을 형성하게 되고, 이러한 α -syn 피브릴에 의하여 시누클레인병증 (synucleinopathy), 즉, 퇴행성 신경 질환, 대사질환 등이 발생하는 것으로 알려져있다. 따라서, α -syn의 피브릴화를 억제하거나 이미 형성되어 있는 α -syn 피브릴을 분해함으로써 퇴행성 신경 질환, 대사질환 등을 치료할 수 있는 치료제에 대한 개발이 활발히 이루어지고 있다(한국공개특허 10-2018-0081465). 그러나 아직까지 시누클레인병증에 현저한 효과를 나타내는 실질적으로 사용가능한 치료제는 전무하며, 따라서 이에 대한 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [3] 한편, 그래핀 양자점은 지금까지 단순히 약물 전달체의 용도로만 사용되어 왔다. 그러나, 본 발명자들은 특정의 그래핀 양자점이 α -syn 피브릴화를 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해하는 작용효과를 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 치료 활성을 나타내는 그래핀 양자점을 제공하는 것이다.
- [5] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 용도를 제공하는 것이다.
- [6] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명은 표면이 음전하를 나타내고, 평균 직경이 0.5 내지 10 nm 이며 평균

높이가 0.1 내지 3 nm 이고, 탄소와 산소의 wt% 비율이 4.0 내지 6.5 : 3.0 내지 6.0의 비율로 구성된 것인 그래핀 양자점을 제공한다. 상기 평균 직경은 더욱 바람직하게는 1 내지 5 nm일 수 있으며, 상기 평균 높이는 0.5 내지 2.5 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [8] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 그래핀 양자점은 말단 작용기로 바람직하게는 카르복실기를 포함할 수 있으며, 상기 말단 작용기는 바람직하게는 FT-IR 스펙트럼에서 카르복실기의 $-C=O$ 피크 및 방향족 $-C=C-$ 피크의 흡광도 비율이 1:1 이상이며, 더욱 바람직하게는, 상기 흡광도 비율이 1:1 내지 2:1일 수 있다.
- [9] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 $-C=O$ 피크는 1700 내지 1750 cm^{-1} 에서 나타나고 상기 방향족 $-C=C-$ 피크는 1600 내지 1650 cm^{-1} 에서 나타날 수 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 그래핀 양자점은 α -syn 피브릴화를 억제하거나 또는 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해할 수 있으며, 혈뇌장벽을 통과할 수 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 상기 그래핀 양자점은 체내 독성이 없으며, 소변을 통하여 안정적으로 체외 배출될 수 있다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들은 퇴행성 신경 질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환이며, 상기 퇴행성 신경 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 치매, 뇌졸중, 아밀로이드증, 섬유증, 뇌병증, 다발성 경화증 등일 수 있으며, 상기 염증성 질환은 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guilian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 궤양성 대장염 등일 수 있으며, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 이상지질혈증, 비알코올성 지방간 등일 수 있으나, α -syn의 비정상적인 섬유화 또는 응집에 의하여 발생될 수 있는 질환이라면 이에 제한되지 않는다.
- [14] 또한, 본 발명은 상기 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 조성물의 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [16] 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 α -syn 피브릴의 형성을 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해할 수 있고, 혈뇌장벽을 통과하는 작용효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포 독성을 나타내지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 신경단백질의 비정상적인 섬유화 또는 응집과 관련된 퇴행성 신경 질환, 염증성 질환, 대사성 질환 등의 치료제로서 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1a 내지 1k는 α -syn 피브릴화 억제 및 이미 형성된 α -syn 피브릴의 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과에 대한 분석 결과이다.
- [18] 도 2a 내지 2h는 피브릴의 분해 과정 동안 그래핀 양자점과 이미 형성된 α -syn 피브릴 간의 상호 작용에 대한 상세한 분석 결과이다.
- [19] 도 3a 내지 3j는 시험관 내 (in vitro)에서 α -syn PFFs에 의한 신경 세포 사멸과 신경 세포간 α -syn 피브릴의 전파에 그래핀 양자점이 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [20] 도 4a 내지 4o는 생체 내 (in vivo)에서의 α -syn PFFs에 의해 유도된 병리 현상에 그래핀 양자점이 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- [21] 도 5는 파킨슨병 병인에 대한 그래핀 양자점의 치료 효과에 대한 개요를 나타낸 모식도이다.
- [22] 도 6a 내지 6g는 그래핀 양자점의 합성과 비오틴화 및 비오틴-그래핀 양자점과 α -syn 피브릴의 결합을 분석한 결과이다.
- [23] 도 7은 α -syn 피브릴의 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과를 나타낸 결과이다.
- [24] 도 8은 α -syn PFFs의 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과를 나타낸 결과이다.
- [25] 도 9는 합성된 그래핀 양자점의 ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼 분석 결과이다.
- [26] 도 10a 내지 10g는 α -syn PFFs로 유도된 신경 세포 사멸 및 제한된 신경돌기 성장에 대한 그래핀 양자점의 효과를 나타낸 결과이다.
- [27] 도 11a 내지 11j는 α -syn PFFs에 의해 유발된 미토콘드리아 기능 장애 및 활성 산소 유발에 대한 그래핀 양자점의 효과를 나타낸 결과이다.
- [28] 도 12a 내지 12h는 α -syn PFFs에 의해 유도된 여러 치료 시점에서의 1차 신경세포 독성 및 병리 현상 유발에 대한 그래핀 양자점의 효과 및 세포 라이브 이미징 관련 결과를 나타낸 결과이다.
- [29] 도 13a 내지 13n은 그래핀 양자점의 혈뇌장벽 투과성을 나타낸 결과이다.
- [30] 도 14는 중뇌 내부의 흑질 (Substantia nigra)에서 α -syn PFFs에 의해 유도된 신경교세포 활성화에 대한 그래핀 양자점의 영향을 나타낸 결과이다.
- [31] 도 15a 내지 15c는 hA53T α -syn 형질전환 마우스의 뇌간에서 신경교세포 활성화에 대한 그래핀 양자점의 효과를 나타낸 결과이다.
- [32] 도 16a 내지 16e는 그래핀 양자점의 장기간에 걸친 시험관 내 (in vitro) 및 생체 내 (in vivo) 독성 효과에 대한 결과이다.

[33] 도 17a 내지 17h는 α -syn PFFs에 대한 nano-GOs와 rGQDs의 비교 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 본 발명자들은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들에 치료 활성을 나타낼 수 있는 그래핀 양자점을 발견하고 본 발명을 완성하였다. 본 발명자들은 상기 그래핀 양자점이 평균 직경이 0.5 내지 10 nm이며, 평균 높이는 0.1 내지 3 nm이며, 탄소와 산소의 wt% 비율이 4.0 내지 6.5 : 3.0 내지 6.0의 비율로 구성된 구조를 나타내며, 표면이 음전하를 띠는 그래핀 양자점인 것을 확인하였다. 또한, 상기 그래핀 양자점이 세포 및 조직에 전혀 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라, 효과적으로 신경단백질, 즉, α -syn의 비정상적인 섬유화 또는 응집을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 상기 그래핀 양자점은 혈뇌장벽을 투과할 수 있기 때문에 α -syn의 비정상적인 섬유화 또는 응집에 의한 다양한 퇴행성 신경질환, 염증성 질환, 대사 질환 등에서 현저한 치료 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[35]

[36] 본원 명세서 전체에서, "그래핀"이라는 용어는 복수개의 탄소 원자들이 서로 공유 결합으로 연결되어 폴리시클릭 방향족 분자를 형성한 것을 의미하는 것으로서, 상기 공유 결합으로 연결된 탄소 원자들은 기본 반복 단위로서 6 원환을 형성하나, 5 원환 및/또는 7 원환을 더 포함하는 것도 가능하다.

[37] 본원 명세서 전체에서, "그래핀 양자점 (graphene quantum dots, GQDs)"이라는 용어는 나노-크기 단편을 가진 그래핀을 의미한다.

[38] 본원 명세서 전체에서, "환원 그래핀 양자점"이라는 용어는 환원 과정을 거쳐 산소 원자 비율이 줄어든 산화 그래핀을 의미하는 것으로서, "rGQDs"로 약칭될 수 있다.

[39] 본원 명세서 전체에서, "산화 그래핀"이라는 용어는 그래핀 옥사이드 (graphene oxides)라고도 불리우고, "GOs"로 약칭될 수 있다. 그래핀 상에 카르복실기, 히드록시기, 또는 에폭시기 등의 산소 원자를 함유하는 작용기가 결합된 구조를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[40] 본원 명세서 전체에서, "나노 산화 그래핀"이라는 용어는 평균 직경이 15 nm 이상이고 평균 높이가 5 nm 이상인 나노 스케일의 산화 그래핀으로서 "nano-GOs"로 약칭될 수 있다.

[41] 이하에서는 본 발명에 따른 그래핀 양자점 및 이의 용도에 대하여 자세히 설명한다.

[42]

[43] 그래핀 양자점

[44] 본 발명은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들에 치료 활성을 나타낼 수 있는 그래핀 양자점을 제공한다.

[45] 구체적으로, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 표면이 음전하를 나타내고, 평균

- 직경이 약 0.5 내지 약 10 nm 이며 평균 높이가 약 0.1 내지 약 3 nm 이다. 또한, 탄소와 산소의 wt% 비율이 4.0 내지 6.5 : 3.0 내지 6.0의 비율로 구성된 구조이다.
- [46] 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 표면에 음전하를 나타내므로, α -syn 피브릴의 말단에 결합할 수 있으며, 이에 따라 α -syn 피브릴의 형성을 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 단량체로 분해할 수 있다. 이러한 메커니즘을 통하여 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들, 예를 들어 파킨슨병, 루이소체 치매 등의 질환에 치료 활성을 나타낼 수 있다.
- [47] 본 발명에 따르면, 본 발명의 그래핀 양자점은 말단 작용기로 카르복실기, 케톤기, 알데하이드기, 히드록시기, 에폭시기 등의 산소 원자 함유 작용기를 포함할 수 있다. 특히, 음전하를 나타내는 카르복실기를 주요 작용기로 포함할 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 그래핀 양자점에 대한 FT-IR 스펙트럼에서, 상기 카르복실기의 -C=O 피크 및 방향족 -C=C- 피크의 흡광도 비율이 약 1:1 이상이다. 특히, 상기 흡광도 비율은 약 1:1 내지 약 30:1, 약 1:1 내지 약 20:1, 약 1:1 내지 약 1:15, 약 1:1 내지 약 1:10, 약 1:1 내지 약 1:7, 약 1:1 내지 약 1:5, 약 1:1 내지 약 1:3 또는 약 1:1 내지 약 2:1일 수 있다. 다만, 상기 흡광도 비율은 하한이 약 1:1인 점에 특징이 있는 것이며, 상기 흡광도 비율이 약 1:1 이상이면 무방하다.
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 -C=O 피크는 약 1700 내지 약 1750 cm^{-1} 에서 나타나는 피크를 의미하고, 상기 방향족 -C=C- 피크는 약 1600 내지 약 1650 cm^{-1} 에서 나타나는 피크를 의미한다.
- [50] 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 평균 직경 (lateral size)이 약 0.5 내지 약 10 nm 이며 평균 높이 (height)가 약 0.1 내지 약 3 nm로서, 나노 스케일의 작은 크기를 나타낸다.
- [51] 구체적으로, 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 평균 직경은 약 0.5 내지 약 10 nm, 약 0.7 내지 약 7 nm, 약 0.8 내지 약 6 nm 또는 약 1 내지 약 5 nm 일 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 평균 높이는 약 0.1 내지 약 3 nm, 약 0.2 내지 약 3 nm, 약 0.3 내지 약 3 nm, 약 0.5 내지 약 3 nm 또는 약 0.5 내지 약 2.5 nm 일 수 있다.
- [53] 위에서 언급한 본 발명의 그래핀 양자점은, 양자점 표면에 생성된 음전하를 이용하여 α -syn 단량체의 피브릴화를 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해할 수 있으며 체내 독성이 없다. 또한, 본 발명의 그래핀 양자점은 나노 스케일의 작은 크기를 나타냄으로써 혈뇌장벽 (BBB)을 쉽게 통과할 수 있다. 더불어, 본 발명의 그래핀 유도체는 체내에 축적되는 문제점도 발견되지 않았다.
- [54] 따라서, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [55]

[56] 그래핀 양자점의 용도

[57] 본 발명은 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 용도를 제공한다.

[58] 위에서 서술한 바와 같이, 본 발명의 그래핀 양자점은 혈뇌장벽을 통과하여 α -syn 피브릴화를 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 단량체로 분해할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[59] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[60] 본 발명에 있어서, 상기 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들은 퇴행성 신경 질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환이다.

[61] 구체적으로, 상기 퇴행성 신경 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 치매, 뇌졸중, 아밀로이드증, 섬유증, 뇌병증 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[62] 또한, 상기 염증성 질환은 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[63] 또한, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 이상지질혈증 및 비알코올성 지방간으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 다만, 이에 제한되지 않는다.

[64] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 본 발명에 따른 그래핀 양자점 외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 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 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 패치제, 액제, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 좌제 등일 수 있다. 이들 제제는 당 분야에서 제제화에 사용되는 통상의 방법 또는 Remington's Pharmaceutical Science (최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 에 개시되어 있는 방법으로 제조될 수 있으며 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 다양한 제제로 제제화될 수 있다.

[65] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구

투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 일일 투여량은 약 1 내지 1000 mg/kg 이고, 바람직하게는 5 내지 100 mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

- [66] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 따른 그래핀 양자점 외에 동일 또는 유사한 약효를 나타내는 유효성분을 1 종 이상 더 포함할 수 있다.
- [67] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [68] 본 발명에서 사용되는 "치료학적으로 유효한 양"이라는 용어는 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료에 유효한 상기 그래핀 양자점의 양을 나타낸다.
- [69] 본 발명의 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 방법은 상기 그래핀 양자점을 투여함으로써, 징후의 발현 전에 질병 그 자체를 다룰 뿐만 아니라, 이의 징후를 저해하거나 피하는 것을 또한 포함한다. 질환의 관리에 있어서, 특정 활성 성분의 예방적 또는 치료학적 용량은 질병 또는 상태의 본성(nature)과 심각도, 그리고 활성 성분이 투여되는 경로에 따라 다양할 것이다. 용량 및 용량의 빈도는 개별 환자의 연령, 체중 및 반응에 따라 다양할 것이다. 적합한 용량 용법은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 방법은 상기 그래핀 양자점과 함께 질환 치료에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 더 포함할 수 있으며, 추가적인 활성 제제는 상기 그래핀 양자점과 함께 시너지 효과 또는 보조적 효과를 나타낼 수 있다.
- [70] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 치료용 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 그래핀 양자점의 용도를 제공한다. 상기 약제의 제조를 위한 그래핀 양자점은 허용되는 보조제, 희석제, 담체 등을 혼합할 수 있으며, 기타 활성제제와 함께 복합 제제로 제조되어 활성 성분들의 상승 작용을 가질 수 있다.
- [71] 본 발명의 용도, 조성물, 치료 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.
- [72] 본 명세서에 있어서, "예방(prevention)"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [73] 본 명세서에 있어서, "치료(treatment)"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환의 증세가 호전되거나

이렇게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[74] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.

[75]

[76] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[77]

[78] **실시예 : 그래핀 양자점 (GQDs)의 제조**

[79] 카본파이버 (0.9 g)를 황산 (300 ml) 및 질산 (100 ml) 혼합 용액에 첨가한 후에 80 °C에서 24 시간 동안 가열하였다(thermo-oxidation process, 도 1 참조). 그리고 탈염수 (deionized water)로 희석한 후, 재생 니트로셀룰로오스 멤브레인 (Cat#: 06-680-2G; MWCO 1,000 달톤; Fisher Scientific)으로 투석하여 산과 과량의 카본 조각들을 완벽히 제거하였다. 그리고 GQD 용액을 다공성 무기 멤브레인 필터 (Cat#: 6809-5002; Whatman-Anodisc 47; GE Healthcare)로 진공-여과하여 큰 입자들을 제거하였다. 그 후, 용액을 회전증발시켜 파우더 형태의 그래핀 양자점 (GQDs)을 수득하였다. 획득된 그래핀 양자점은 Graphitic domain과 엣지 작용기(edge functional groups)를 모두 포함하여 주요 원소 성분인 질소 (N), 탄소 (C), 수소 (H), 황 (S), 및 산소 (O)의 원소분석(elemental analysis; EA)을 실시하였다. 원소분석은 Elemental analyzer Flash2000 (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 실시하였다. 그 결과는 표 1에 나타내었다.

[80] [표1]

그래핀 양자점	원소	N	C	H	S	O	합계
	mol	0.10	2.80	1.29	0.07	1.62	-
	wt%	2.12	52.21	2.00	3.31	40.36	100

[81] 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 그래핀 양자점은 핵심 원소인 탄소와 산소의 wt% 비율이 5.2±1 : 4.0±1의 비율로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[82]

[83] **비교예: nano-GOs 및 rGQDs의 제조**

[84] nano-GOs를 제조하기 위해, 종래 문헌에 따라 개선된 Hummer 방법에 의해 원시 (pristine) 그래핀 옥사이드 (GOs)를 합성하였다. 수득된 GO 분말을 탈염수에 10 mg/ml의 농도로 첨가하고 3 시간 동안 팁-초음파 처리하여 nano-GOs를 수득하였다.

[85] GQDs의 환원은 2 시간 동안 200 °C에서 오토클레이브 기반 수열법으로 수행하여 rGQDs를 제조하였다.

[86] 상기 생성물들은 FT-IR 분광기 및 AFM 분석으로 분석하였으며, rGQDs와 원시 GQDs는 AFM 결과에서 실제적으로 차이가 없었다.

[87]

[88] **실험 방법**

[89] **1. AFM 이미징**

[90] AFM 이미징을 위해서 각 시료 (10 $\mu\text{g/ml}$) 및 $\alpha\text{-syn}$ 피브릴 (10 $\mu\text{g/ml}$)을 1 cm^2 실리콘 산화물 기판 위에 떨어뜨려 상온에서 건조시켰다. XE-100 AFM (Park Systems)을 이용하여 비접촉모드 (스캔 크기: 25 μm^2 , 스캔 속도: 0.8 Hz)로 분석하였다. 이미지는 XE 데이터 수집 프로그램 (XEP 1.8.0)으로 획득하였다.

[91]

[92] **2. FT-IR 측정**

[93] 시료를 고진공 데시케이터에서 완전히 건조시키고, 통상적인 KBr 펠렛 방법으로 제조하였다. 그리고 Nicolet 6700 FT-IR 스펙트로미터 (Thermo Scientific)로 스캔 횟수 32회, 파수범위 4000 내지 400 cm^{-1} 조건에서 측정하였다.

[94]

[95] **3. ThT (thioflavin T) 형광 및 탁도 (Turbidity) 분석**

[96] ThT 분석을 위해, 각 시료 50 μl 를 16,000 x g에서 30 분간 원심 분리하였다. 그리고 펠렛을 10 mM 글리신 완충액 (pH 9.0)을 이용하여 용해시킨 25 μM ThT (Cat#: T3516; Sigma-Aldrich) 200 μl 에 재현탁시켰다. ThT 형광은 형광분광광도계를 사용하여 482 nm (440 nm에서 여기)에서 측정되었다.

[97] 탁도 분석을 위해, $\alpha\text{-syn}$ 피브릴을 인산염완충용액 (phosphate buffered saline; PBS)을 이용하여 1/10의 비율로 희석시켰다. 그리고 희석된 $\alpha\text{-syn}$ 피브릴을 Corning의 96-웰 플레이트로 옮기고, 마이크로 플레이트 다중 판독기를 이용하여 360 nm에서의 흡광도 세기를 측정하여 각 시료의 탁도를 평가하였다.

[98]

[99] **4. TEM 이미징**

[100] 시료를 2 분 동안 글로 방전된 400 메쉬 카본-코팅 구리 그리드 (EMS사 제품)에 흡착시켰다. 그리고 상기 그리드에 신속히 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액 세 방울을 떨어뜨려 세척한 다음, 각각 30 초 동안 0.75 % 우라닐 포르메이트를 연속적으로 두 방울씩 흘렸다. 얼룩은 #1 와트만 여과지를 사용하여 제거하였다. 시료는 측정 전에 충분히 건조하여 80 kV에서 작동하는 전자현미경 Phillips CM 120 TEM과 AMT의 ER-80 CCD (8 메가픽셀)를 사용하여 디지털화된 이미지를 획득하였다. 뉴런의 경우, 1차 배양한 대뇌 피질 유래 뉴런을 폴리-D-라이신으로 코팅된 35 mm 접시 위에 100,000 세포/웰의 밀도로 배양하였다. 뉴런은 DIV 10에 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 그래핀 양자점을 함유하거나 함유하지 않은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 PFFs를 처리하였다. 그리고 7일 후, 뉴런을 1 % 소듐 나이트라이트 (pH 7.4) 함유 PBS로 세척하고, 3 % (v/v) 파라포름알데히드(PFA), 1.5 % (v/v) 글루탈알데히드, 100 mM 카코딜레이트 및 2.5 % (v/v) 수크로오스(pH 7.4)로 이루어진 고정액을 사용하여

고정하고, 1 시간 동안 후고정시켰다. 이미지는 Soft Imaging System Megaview III 디지털 카메라가 장착된 Phillips EM 410 TEM에서 수집되었다.

[101]

[102] **5. Dot-blot 분석**

[103] Bio-Dot 미세여과장치 (Cat#: 170645; Bio-Rad)를 사용하여 시료를 미리 적신 니트로셀룰로오스 멤브레인 (공극 크기: 0.45 μm)에 로딩하고, 음압을 이용해 상기 멤브레인에 점착시켰다. 트리스 완충 식염수 (Tris-buffered saline)로 각 멤브레인을 세척한 후, 5 % 탈지 분유가 포함된 트윈-20 함유 트리스 완충 식염수로 멤브레인을 블로킹하였다. 시료를 형태-특이적 anti- α -syn 필라멘트 항체 (Cat#: ab209538; 1:1, abcam)로 4 °C에서 밤새 결합시키고, 이어서 토끼에서 추출한 HRP-접합 이차 항체 (GE Healthcare)와 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 그리고 멤브레인을 트리스 완충 식염수로 여러 번 세척하고 ECL 용액을 사용하여 이미지화하고, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[104]

[105] **6. BN-PAGE 및 SDS-PAGE**

[106] BN-PAGE의 경우, NativePAGETM 샘플 준비 키트 (Cat#: BN2008; Life technologies)를 사용하여 α -syn 피브릴 및 α -syn PFF를 준비하고, 200 V에서 90 분 동안 NativePAGETM Novex 4-16 % 비스-트리스 젤 (Cat#: BN1002Box; Life technologies)을 사용하여 전기영동 하였다. 캐소드(cathode) 완충 용액은 50 mM 트리신(tricine), 15 mM 비스-트리스 및 0.02 % 브릴리언트 블루 G (pH 7.0)을 함유하고, 애노드(anode) 완충 용액은 50 mM 비스-트리스 (pH 7.0)으로 구성된다. 젤은 SilverQuestTM 실버 염색 키트 (Cat#: LC6070; Life technologies)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 염색하였다.

[107] SDS-PAGE의 경우, 10 DIV 대뇌피질 유래 신경세포를 7 일 동안 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그래핀 양자점의 존재 또는 부재 하에서 α -syn PFF (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였다. 신경세포의 가용 단백질은 4 °C에서 PBS 용액 내 1 % TX-100과 단백질 분해효소(protease) 및 인산화 단백질 분해효소(phosphatase) 억제제의 각테일 (Cat#: PPC1010; Sigma-Aldrich)을 이용하여 준비되었다. 이후 용해물을 4 °C에서 12,000 x g으로 30 분 동안 초음파 처리하였다. 펠렛을 수차례 세척하고 불용성 단백질 조제를 위해 2 % SDS를 포함하는 PBS에 현탁시켰다. 2X Laemmli 샘플 버퍼 (Cat#: 1610737, Bio-rad)를 사용하여 상기 용해물을 희석시켰다. 이어서, 20 μg 의 단백질을 NovexTM 8-16 % 트리스-글라이신 젤 (Cat#: XP08160BOX, Life technologies)에 로딩하고, 130 V에서 85 분 동안 전기영동을 수행하였다. 그 다음, 단백질을 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮기고, 5 % 탈지 분유를 포함한 0.1 % 트윈-20 함유 트리스 포함 생리식염수로 1 시간 동안 블로킹하고, anti-pS129- α -syn (Cat#: ab59264, 1:1,000, abcam), SNAP25 (Cat#: 111-002, 1:2,000, Synaptic Systems) 또는 VAMP2 (Cat#: ab3347, 1:1,000, abcam) 항체를 4 °C에서 밤새 붙인 후, 토끼 또는 쥐로부터 분리한 HRP-접합 2차 항체 (GE Healthcare)로

상온에서 1시간 동안 배양하였다. 블랏은 ECL 용액으로 시각화하고 ImageJ 소프트웨어로 분석하였다.

[108]

[109] **7. 초음파 처리된 α -syn PFF의 제조**

[110] α -syn PFF는 Volpicelli-Daley et al (Nat Protoc 9, 2135-2146, doi: 10.1038/nprot.2014.143 (2014))에 의해 보고된 종래의 방법에 따라 준비되었다. 마우스 재조합 전장 α -syn을 암피실린-내성 박테리아 발현 벡터 pRK172에 클로닝하였다. 그 다음, 플라스미드를 BL21(DE3)RIL-competent E. coli (Cat#: 23045, Life technologies)에 도입시켜 사용하였다. 박테리아 배양 후, 상기 언급된 문헌을 따라 α -syn 단량체를 분리하여 음이온 교환, 투석 및 크기 배제 크로마토그래피를 포함하는 여러 정제 단계를 통해 순수하게 정제하였다. 시험관내 (in vitro) α -syn 피브릴은 에펜도르프(Eppendorf) 오비탈 믹서 (Cat#: 538400020)를 사용하여 37 °C, 1,000 rpm으로 7 일 동안 교반하면서 응집시켰다. α -syn 피브릴의 단편은 1/8" 프로브-소니피케이터를 가진 초음파 장치를 사용하여 20 % 강도로 총 60 번의 펄스 (각각 ~0.5 초)를 처리하여 만들었다. 상기 단편을 1차 배양된 신경세포와 37 °C에서 7 일 동안 배양한 후에, 상기 단편들이 신경세포 안에서 자연스럽게 성숙한 피브릴로 변환되었고, 세포에 대한 독성을 보임을 확인하였다.

[111]

[112] **8. 그래핀 양자점의 비오틴화 및 결합 분석**

[113] 기능화 (functionalisation)를 위해 그래핀 양자점에 카르복실기를 도입하기 위해, 50 mg의 그래핀 양자점을 접합 완충액 (conjugation buffer, pH 4.7)에 용해시켰다. 이어서, 12.5 mg의 EDC 시약 (N-(3(Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride, Cat#: 03449, Sigma-Aldrich)을 가하여 카르복실기를 그래핀 양자점에 카르복실기를 도입하였다. 1 시간 동안 교반시킨 후, EDC-활성화된 그래핀 양자점에 25 mg의 EZ-Link Amine-PEG3-Biotin (Cat#: 21347, Thermo Scientific)을 첨가하여 12 시간 동안 그래핀 양자점과 비오틴 사이에 아마이드 결합을 형성시켰다. 상기 용액을 재생 니트로셀룰로스 멤브레인 (Cat#: 06-680-2G, MWCO 1,000 Daltons, Fisher Scientific)으로 투석하여 미반응 비오틴 및 EDC 시약을 제거하였다. 그 다음, 상기 용액을 회전농축기를 사용하여 분말 형태의 최종 생성물을 수득하였다. 그래핀 양자점과 α -syn 피브릴 간의 결합 분석을 위해 5 mg/ml의 α -syn 피브릴을 5 mg/ml의 비오틴화된 그래핀 양자점 및 스트렙타비딘 결합 0.8 nm 금 나노입자 (Cat#: 800.099, Aurion)와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 그 후, 비오틴화-그래핀 양자점에 높은 친화성으로 결합된 스트렙타아바딘 결합 초소영 금 입자는 GoldEnhance™ EM Plus 용액 (Cat#: 2114, Nanoprobes)으로 5 분 동안 증강시켰다. 미반응 용액을 100 kDa MWCO 스핀 컬럼 (Cat#: UFC510024, Millipore-Sigma)으로 제거한 후, TEM 분석을 수행하였다.

[114]

[115] 9. ^{15}N -표지된 α -syn의 정제

[116] α -syn 과발현을 위해 pRK172 벡터에 클로닝된 α -syn 유전자를 E. coli BL21(DE3)으로 도입하였다. 동위원소-표지된 α -syn의 제조를 위해, 리터당 0.5 g의 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 및 1 g의 ^{13}C 글루코오스 (Cambridge Isotope Laboratory Inc., Andover, MA)를 함유하는 M9 배지에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 암피실린과 함께 37 °C에서 세포를 성장시켰다. 이소프로필 β -D-싸이오갈락토피라노사이드 (IPTG)로 유도한 후, 열처리된 세포 용해물을 DEAE-Sephacel 음이온 교환, Sephacryl S-200 크기 배제 및 S-Sepharose 양이온 크로마토 그래피를 사용하여 연속적으로 정제하였다. 상기 정제된 α -syn을 새로운 20 mM 2-(N-몰폴리노)에탄술폰산(MES) 완충액 (pH 6.5) 12 L로 3 번 투석하였고, -80 °C에서 1 mg/ml의 농도로 분주하여 보관하였다. 실험 직전에 4 °C에서 Nanosep 10 K 멤브레인 (Pall Gelman, 독일)을 사용하여 시료를 5 mg/ml로 농축하였다.

[117]

[118] **10. NMR 분광 분석**

[119] α -syn과 그래핀 양자점 사이의 상호 작용에 대한 상세한 NMR 연구는 cryo-genic probe가 장착된 950 MHz 분광계 (Bruker, 독일)를 사용하여 수행하였다. 균일하게 분류된 ^{15}N -표지 α -syn (5 mg/ml, 100 μl)을 GQD (5 mg/ml, 100 μl)와 37 °C에서 3 일 동안 1,000 rpm으로 교반하며 반응시켰다. ^1H - ^{15}N HSQC 측정을 위해, 10 % 함유 20 mM MES 완충액 (pH 6.5)을 사용하여 ^{15}N -표지 α -syn 시료를 제조하였다. α -syn 및 그래핀 양자점과 반응한 α -syn의 ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼은 37 °C에서 얻어졌다. 얻어진 데이터를 NMRPipe24로 처리하고 Sparky25로 분석하였다.

[120]

[121] **11. 시뮬레이션 세부사항**

[122] 분자 레벨에서 그래핀 양자점과 α -syn 피브릴간의 상호 작용을 조사하기 위해 Gromacs 5.1로 200 ns의 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 수행하였다. α -syn의 소수성 NAC 도메인 (잔기 71 내지 82)의 초기 구조는 CHARMM forcefield를 갖는 ssNMR 구조 (PDB ID: 2N0A)로부터 적용되었고, 그래핀 양자점의 구조는 <https://cgenff.paramchem.org>의 프로토콜에 의해 CGenFF로 설계되었다.

[123]

[124] **12. CD 측정**

[125] α -syn 피브릴 (5 mg/ml, 100 μl)을 그래핀 양자점 수용액 (5 mg/ml, 100 μl)과 혼합하고, 7 일 동안 37 °C, 1,000 rpm에서 진탕 배양 하에 해중합시켰다. far-UV CD 측정의 경우, 시료를 증류수로 희석(1/2)하였다. J-815 분광편광계 (Jasco, 일본)와 0.2 mm 길이의 석영 큐벳을 사용하여 190 nm 내지 260 nm의 CD 스펙트럼을 0.5 nm 간격으로 측정하였다. 완충 용액의 스펙트럼은 시료 스펙트럼에서 제외하였다. CD 신호는 평균 잔류 타원도 $[\theta]$ 에 대해 deg cm^2

/dmol의 단위로 정규화되었다. α -syn 피브릴과 해중합된 α -syn 피브릴의 분획 이차 구조 함량은 DichroWeb 온라인 서버의 CONTIN/LL 알고리즘을 사용하여 계산하였다. CONTIN/LL을 사용하여 계산할 때, DichroWeb의 참조 세트 7을 사용하였으며, 190 내지 240 nm의 파장 범위에 맞게 최적화되었다.

[126]

[127] **13. 1차 신경세포 배양**

[128] 마우스 대뇌피질 유래 1차 신경세포는 15 일된 C57BL/6 마우스 배아를 사용하여 준비하였다. 분리된 신경세포는 B27 보충인자 (Cat#: 17504044, Life technologies) 및 L-글루타민 (Cat#: 25030149, Life technologies)을 함유하는 Neurobasal Media (Cat#: 21103049, Life technologies)로 구성된 배양 배지에 준비하여 50 μ g/ml의 폴리-D-라이신 (Cat#: P6407, Sigma-Aldrich)으로 코팅된 배양접시에 플레이팅되었다. 배양액은 1 주일에 2 회 교환하여 37 °C, 7 % CO₂ 배양기에서 유지되었다. 배양된 지 5일 후에, 신경교세포 (glial cell)의 성장을 억제하기 위해 30 μ M의 5-플루오로-2'-데옥시우리딘 (Cat#: F0503, Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 마우스를 사용한 실험에 대한 모든 절차는 존스 홉킨스 대학 동물 관리 및 사용위원회의 지침에 따라 승인되었고 준수되었다.

[129]

[130] **14. 세포 생존 및 세포 독성 분석**

[131] 세포 생존 및 세포 독성 분석을 위해, 1차 대뇌피질 신경세포를 폴리-D-라이신 코팅 유리 커버슬립에 밀도 10,000 세포/cm²로 배양하고, 7 % CO₂ 배양기에서 1 주일에 2 회 배지를 교환하며 배양하였다. 1차 배양된 신경세포의 세포 독성은 그라핀 양자점 (1 μ g/ml)의 부재 또는 존재 하에 7 일 동안 10 DIV 마우스 대뇌피질 신경세포에 α -syn PFFs (1 μ g/ml)를 처리 한 후, LDH 세포 독성 분석 키트 (Cat#: 88954, Pierce)를 사용하여 측정하였다. 또한 TUNEL 분석 키트 (Cat#: 12156792910, Roche)를 사용하여 세포 사멸을 결정하였다. 1차 배양된 신경세포의 생존력을 alamarBlue 세포 생존능 분석 키트 (Cat#: DAL1025, Molecular Probes™) 및 신경돌기 파생물 염색 키트 (Cat#: A15001, Molecular Probes™)를 사용하여 측정하였다. 상기 신경돌기 파생물 염색 키트는 신경돌기 파생의 표지로서 세포 멤브레인 표면을 염색하는 오렌지색 염료, 및 세포내 에스테라아제에 의해 비형광 기질에서 녹색 형광 생성물로 전환되는 세포-투과성 염색을 포함한다.

[132]

[133] **15. 체외 (in vitro) 면역 형광**

[134] 폴리-D-라이신 코팅을 한 커버슬립에 20,000 세포/cm²의 밀도로 마우스 1차 대뇌피질 신경세포를 플레이팅하였다. 4 % PFA를 사용하여 신경세포를 고정 한 후, 5 % 정상 당나귀 혈청 (Cat#: 017-000-121, Jackson ImmunoResearch), 2 % 소 혈청 알부민 (Cat#: A7030, Sigma-Aldrich) 및 0.1 % Trion X-100 (Cat#: T8787, Sigma-Aldrich)으로 1 시간 동안 실온에서 블로킹하였다. anti-8-OHG (Cat#:

ab62623, 1:1,000, abcam), anti-pS129- α -syn (Cat#: ab59264, 1:1,000, abcam) 및 anti-MAP2 (Cat#: MAB3418, 1:1,000, Millipore) 항체들과 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. 시료들을 0.1 % Trion X-100가 함유되어 있는 PBS로 세척한 후, FITC-접합 2차 항체 (당나귀 항-마우스 FITC; Cat#: 715-095-151, 당나귀 항-토끼 FITC; Cat#: 711-095-152, Jackson ImmunoResearch) 및 Cy3-접합 2차 항체 (당나귀 항-마우스 FITC; Cat#: 715-165-151, 당나귀 항-토끼 CY3; Cat#: 711-165-1527, Jackson ImmunoResearch)의 혼합물을 커버슬립과 함께 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 형광 이미지는 Zeiss 공초점 현미경 (LSM 710, Zeiss Confocla)을 통해 획득하였다.

[135]

[136] **16. 복합체 I 활성 분석**

[137]

미토콘드리아 복합체 I 효소 활성은 복합체 I 효소 활성 마이크로 플레이트 분석 키트 (Cat#: ab109721, abcam)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 간략하게, 1차 대뇌피질 신경세포는 폴리-D-라이신으로 코팅된 6 cm 배양 접시 상에 1,000,000 세포/접시의 밀도로 플레이팅되었다. 신경세포는 체외에서 10 일째에 1 μ g/ml의 그라핀 양자점의 존재 또는 부재 하에 α -syn PFFs 1 μ g/ml로 처리되었다. 7 일간 처리 후, 1/10 부피의 디터전트가 포함된 PBS를 이용하여 1차 신경세포에서 단백질을 추출하고, 얼음 위에서 30 분 동안 배양하였다. 시료의 최종 단백질 농도를 5.5 mg/ml으로 조절한 후, 12,000 x g에서 20 분 동안 원심 분리하고, 상등액을 마이크로플레이트 웰에 올려 실온에서 3 시간 동안 배양하였다. 3 시간 후, 플레이트를 완충액으로 2 회 세척 후 분석 용액 200 μ l를 첨가하였다. 미토콘드리아 복합체 I 효소 활성은 OD450에서 약 1 분 간격으로 30 분 동안 측정하였다.

[138]

[139] **17. 미토콘드리아 형태 평가**

[140]

대뇌피질 1차 신경세포는 폴리-D-라이신으로 코팅된 유리 커버슬립 상에 10,000 세포/cm²의 농도로 플레이팅되었다. 1차 배양된 대뇌피질 신경세포는 DIV 10에서 1 μ g/ml의 그라핀 양자점의 존재 또는 부재 하에 α -syn PFF 1 μ g/ml로 처리하였다. 7 일간 처리 후, 신경세포는 제조업체의 지침에 따라 MitoTracker[®] Orange CMTMRos 프로브 (Cat#: M7510, Life technologies)로 염색되었다. 간략하게, 1차 신경세포를 100 nM의 MitoTracker[®] Orange CMTMRos 프로브와 함께 30 분 동안 배양한 후, 세포 이미징 용액 (Cat#: A1429DJ, Life technologies)으로 세척하였다. 염색된 미토콘드리아는 Zeiss 공초점 현미경(LSM710)을 사용하여 영상화하였고, 길이 또는 종횡비 (AP, 미토콘드리아와 동등한 타원의 장축과 단축의 비)와 같은 미토콘드리아 형태학적 특징을 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[141]

[142] **18. 산소 소비율의 결정**

[143] 산소 소비율 (Oxygen Consumption Rate, OCR)은 Seahorse XF cell mito 스트레스 테스트 키트 (Cat#: 103015, Agilent)를 사용하여 제조사의 지침을 다음과 같이 수정하여 측정하였다. 간단히, 1차 배양한 대뇌피질 신경세포를 해마 XF24 세포 배양 플레이트 위에 500,000 세포/웰의 농도로 플레이팅하였다. 신경세포는 DIV 10에서 1 µg/ml 그래핀 양자점의 존재 또는 부재 하에 α-syn PFF 1 µg/ml로 처리되었다. 7 일간 처리 후, 뉴런을 따뜻한 PBS로 세척하고 해마 분석 배지에서 37 °C, 1 시간 동안 배양하였다. 그 후, 플레이트를 XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)에 넣고 산소 소비율을 측정하였다. 산소 소비율은 1 분 혼합, 1 분 대기 및 2 분 측정 프로토콜로 37 °C에서 측정한 후, CO₂가 없는 배양기에서 45 분 배양한 후 XF24 분석기로 분석하였다. 올리고마이신, 카보닐 카나이드 m-클로로페닐하이드라존 (CCCP) 및 로테논을 순차적으로 주입하여 기초 호흡, 호흡 사슬의 커플링 및 미토콘드리아 호흡 용량을 평가하였다. 측정된 산소 소비율은 각 웰의 단백질 농도를 사용하여 표준화되었다. 데이터는 대조군과 비교하여 그 변화를 백분율로 표시하였다.

[144]

[145] **19. 라이브 이미징**

[146] 저속 공초점 라이브 이미징을 위해 1차 대뇌피질 신경세포는 폴리-D-라이신으로 코팅된 유리 바닥 접시 (Cat#: 150682, Nunc™) 위에 10,000의 세포를 플레이팅하고, 37 °C, 7 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. DIV 7에서, 1차 배양된 신경세포를 FITC 표지된 α-syn PFFs, 1 µg/ml GQDs-비오틴 및 스트렙타비딘 Qdot 복합체 및 세포 이미징 솔루션을 함유하는 100 nM LysoTracker™ Blue DND-22 (Cat#: L7525, Life technologies)와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 배양 접시를 온도 조절된 CO₂ 배양 시스템이 장착된 Zeiss 공초점 현미경 (LSM710)에 장착한 다음, 488 nm 및 561 nm 레이저 여기(excitation)에서 지정된 간격으로 저속 이미지를 캡처하였다.

[147]

[148] **20. 미세유체 챔버**

[149] 트리플-구획 미세유체 장치 (Triple-compartment microfluidic device)는 Xona Microfluidic (Cat#: TCND1000)을 사용하였다. 유리 커버 슬립은 미세유체 장치에 부착되기 폴리-D-라이신으로 코팅하였다. 챔버당 약 100,000개의 신경세포를 플레이팅하고, DIV 7에 0.5 µg의 GQDs를 챔버1 (C1) 또는 챔버 2 (C2)에 전처리 한 후 챔버 1 (C1)에 0.5 µg의 α-syn PFF를 처리하였다. 제 1 챔버에서 α-syn PFF의 처리는 모든 시험 그룹에서 수행되어 다음 챔버에 적절한 전송 조건을 생성하였다. 유체 흐름의 방향을 조절하기 위해 3 개의 구획 사이에는 배지 부피의 50 µl-차이가 유지되었다. 신경세포는 α-syn PFFs 처리 후 14 일에 4 % PFA를 포함한 PBS를 사용하여 고정하였다. 챔버 안의 고정된 신경세포는 5 % 정상 당나귀 혈청, 2 % 소혈청 알부민, 0.1 % 트리톤 X-100를 함유하는 블로킹 용액을 사용하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 신경세포는 4 °C에서 밤새

anti-pS129- α -syn (Cat#: ab59264, 1:1,000, abcam) 및 anti-MAP2 (Cat#: MAB3418, 1:1,000, Millipore) 항체로 배양하였고, 챔버를 0.1 % Triton X-100를 포함한 PBS를 사용하여 세척 후, 상온에서 FITC-접합 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch) 및 Cy3-접합 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch)의 혼합물로 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 형광 이미지는 Zeiss 공초점 현미경을 통하여 취득하였다.

[150]

[151] **21. 동물**

[152] 존스홉킨스 의학 연구소 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 얻은 국립 동물 건강 관리 연구소의 동물 관리 및 사용 가이드 지침에 따라 모든 실험 절차를 수행하였다. 인간의 α -syn-A53T 형질 전환 마우스 (B6.Cg-Tg, Prnp-SNCA* A53T; 23 Mkle/J, stock#: 006823)은 Jackson Lab에서 구입하였다.

[153]

[154] **22. 그래핀 양자점의 체외 (in vivo) 혈뇌장벽 투과성**

[155] 체외 혈뇌장벽 (Blood-Brain-Barrier, BBB) 투과 실험을 위한 1차 배양한 마우스 성상세포 (astrocyte)는 C58BL/6 마우스 10 마리를 이용하여 준비하였다. 간단히, 1차 배양된 혼합된 신경교세포는 (neuroglia)는 1-d-old C57BL/6 마우스를 이용하여 준비했다. 격리된 대뇌 피질에서 수막 (meninges)을 제거하고, 19-게이지, 0.5-인치 니들을 부착한 30 ml 주사기로 대뇌 피질을 파쇄하였다. 이어서, 세포를 10 % FBS, 1 mM HEPES, 2 mM 글루타민 및 항생제/항균제 (Life technologies)가 보충된 DMEM으로 75 cm² T-플라스크에 플레이팅하였다. 혼합된 신경교세포는 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 유지되었고, 배양액은 주 2회 교체되었다. 2 주 후, 성상세포 격리 키트 (Cat#: 130-096-053, Miltenyl Biotec)를 사용하여 순수한 성상세포를 분리하였다. C57BL/6 마우스의 1차 뇌 미세 혈관 내피 세포 (BMEC)는 Cell Biologics사에서 구입하였다. 고순도 (>95 %) 성상세포와 BMEC는 세포 특이 마커 GFAP (성상세포용)와 CD31 (BMEC용, Cat#: ab28364, 1: 500, abcam) 마커를 염색하여 모니터링하였다. 체외 혈뇌장벽 제작을 위해, 콜라겐-코팅된 0.4 μ m의 transwell inserts (Cat#: CLS3491, Sigma-Aldrich)의 아랫면에 10⁶ 세포/ml의 성상세포를 첨가하고, 37 °C, 5 % CO₂ 조건 하에서 48 시간 동안 배양하였다. 이어서, 10⁷ 세포/ml의 BMEC가 인서트 위에 플레이팅된 6-웰 플레이트 위에 챔버를 조심스럽게 위치시켰다. 체외 BBB의 구조적 완전성을 확인하기 위해, BMEC 씨딩 후 0, 2, 4, 6 및 8 일에 상피 볼트/옴 (TEER) 측정기 (Cat#: 300523, EVOM2, world precision instruments)를 사용하여 상피 전기 저항을 측정하였다. 완전성을 확인하기 위해, 트랜스 웰의 내부 (혈액 측)에 혈뇌장벽 투과성 3 kDa 덱스트란-플루오레세인 (Cat#: D3306, Life technologies)을 로딩하고, 형광 분광 광도계 (덱스트란-플루오레세인에 대하여 Ex = 494 nm / Em = 521 nm, 혈뇌장벽 불투과성 덱스트란 로다민에 대하여 Ex = 555 nm / Em = 580 nm)로 비율을 측정하였다. 내부 (혈중 측) 및 외부

(세포막)의 FluoroBrite™ DMEM 배지 (Cat#: A1896701, Life technologies)를 사용하여 520 nm (Ex = 310 nm)에서 남아 있는 그래핀 양자점, 비오틴-그래핀 양자점, nano-GO 및 rGQDs의 농도를 측정하였다.

[156]

[157] **23. 엑소좀 분리**

[158] 방출된 엑소좀에서 그래핀 양자점-비오틴의 농도를 측정하기 위해, BMEC 또는 정상세포를 6 cm 배양접시에 깔고, 5 µg의 그래핀 양자점-비오틴을 12 시간 동안 처리하였다. 12 시간 후, 배양 배지를 교환한 다음 24 시간 및 48 시간 후에 엑소좀 분리 시약 (Cat#: 4478359, ThermoFisher)을 사용하여 엑소좀을 분리하였다.

[159]

[160] **24. 그래핀 양자점의 생체 내 (In vivo) 혈뇌장벽 투과성**

[161] 그래핀 양자점-비오틴의 생체 내 면역 염색을 위해, 8 주령 C57BL/6 마우스에 2 mg/kg 그래핀 양자점-비오틴을 복강 주사하였다. 뇌를 분리하고, 4 % PFA로 6 시간 동안 고정시킨 후, 48 시간 동안 30 % 수크로오스에 탈수화 과정을 하고 면역 조직 화학 분석을 수행하였다. 후각 구 (olfactory bulb), 신피질 (neocortex), 중뇌 (midbrain) 및 소뇌 (cerebellum)의 그래핀 양자점-비오틴 신호를 DAB 키트를 사용하여 시각화하였다. 위 언급한 영역의 세포에서의 그래핀 양자점-비오틴 양성 신호는 제조사의 지침에 따라 GoldEnhance™ MEM Plus 용액을 사용하여 20 분간 배양한 후, 면역 EM 염색으로 확인하였다. 생체 내 혈뇌장벽 실험에서, 8 주령 C57BL/6 마우스는 비오틴(2 mg/kg) 또는 비히클을 복강 또는 정맥 주사하였다. 7 일 및 14 일에, 뇌 및 혈액을 수득하였고, 뇌를 1 % TX-100을 포함하는 PBS로 균질화시켰다. 상온에서 30 분간 방치하여 전혈을 응고시키고, 응고물을 2,000 x g에서 10 분간 원심 분리하여 제거하였다. 그래핀 양자점-비오틴의 농도는 QuantTag 비오틴 정량 키트 (Cat#: BDK-2000, Vector Laboratories)를 사용하여 측정하였다. 그래핀 양자점-비오틴의 뇌/혈장 농도 비율은 뇌/혈장 비율에 대해 계산하였다.

[162]

[163] **25. 도파민 신경세포 사멸의 입체학적 평가**

[164] 모든 실험 절차는 존스 홉킨스 의학 연구소 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 얻은 국립 동물 건강 관리 연구소의 동물 관리 및 사용 가이드 지침에 따라 수행되었다. 8 내지 10 주령 수컷 C57BL6 마우스를 Jackson 실험실에서 구입하였다. 마우스를 펜토바르비탈 (60 mg/kg)로 마취시키고 stereotaxic instrument (Cat#: Model 900; David KOPF instruments)를 이용하여 2 µl의 PBS 또는 PFFs (5 µg/2 µl)를 선조체(striatum)의 한쪽 반구에 주사하였다. 실험군에는 50 µl의 GQD (마우스 당 50 µg)를 6 개월 동안 격주로 복강 주사하였다. 주사 6 개월 후, 마우스를 PBS에 이어 4% PFA로 관류하였다. 12 시간 동안 4% PFA로 고정한 후, 뇌를 30% 수크로오스로 탈수하고, 면역 조직 화학법으로 분석하였다.

중뇌 흑질 (SN, substantia nigra)을 포함한 뇌 전체를 50 μm 의 관상 절편으로 자르고, 매 4번째 절편을 사멸 세포 수 분석에 사용하였다. 토끼 다클론 anti-TH (Cat#: NB300-19; 1:1,000; Novus Biologicals), 토끼 다클론 anti-pS129- α -syn (Cat#: ab59264; 1:1,000; abcam)을 블로킹 용액과 함께 배양하였다. DAB 키트 (Cat#: SK-4100; Vector Laboratories)를 사용하여 시각화한 후, 비오틴화된 2차 항체 및 스트렙타비딘-접합 호스레디쉬 퍼옥시다아제 (HRP) (Cat#: PK-6101; Vector Laboratories)로 배양하였다. 염색된 조직 절편을 슬라이드 위에 올린 후, 싸이오닌을 사용하여 Nissl 바디를 염색하였다. SN에서 TH 및 Nissl 양성 신경세포의 총 수를 Stereo Investigator 소프트웨어 (MBF Bioscience)의 Optical Fractionator 프로브 프로그램을 사용하여 측정하였다.

[165]

[166] **26. 생체 내 (in vivo) 신경교세포 면역조직화학**

[167] 동물의 뇌를 PBS 및 4% PFA로 관류하였다. 사후 고정 후 동결 시킨 다음 절편을 만들어 anti-Iba-1 항체 (Cat#: 019-19741; 1:1,000; Wako) 또는 anti-GFAP 항체 (Cat#: Z0334; 1:2,000; Dak)와 함께 배양하였다. 배양한 조직은 다시 비오틴-접합된 anti-토끼 항체 및 ABC 시약 (Cat#: PK-6101; Vector Laboratories)과 함께 배양한 후, DAB 퍼옥시다아제 기질 (Cat#: SK-4100; Vector Laboratories)을 사용하여 각 절편을 염색하였다. SN에서의 신경교세포의 수 및 밀도는 ImageJ 소프트웨어 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH)로 측정하였다. 주요 기관 병리 조직 검사를 위해 8-10 주령의 수컷 C57BL/6 마우스에게 그래핀 양자점 50 μg 을 6 주간 격주로 복강 주사하였다. 6개월의 주사 후, 동물을 PBS와 4% PFA를 사용하여 관류 및 고정하였다. 간, 신장 및 비장을 분리하고, H&E 염색 키트 (Cat#: H-3502; Vector Laboratories)로 염색하였다.

[168]

[169] **27. α -syn 응집 형성 분석**

[170] HEK293T 세포를 유리 슬라이드 상에 플레이팅하고, A53T 변이가 있는 myc-표지 α -syn 변이체 (pCMV5-myc-SNCA-A53T, kindly gifted by Dr. Thomas C. Sudof)를 갖는 pCMV5 벡터로 트랜스펙션한 다음, PBS (pH 7.4) 또는 그래핀 양자점 (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하였다. 처리 48 시간 후, HEK293T 세포를 PBS로 3회 세척하고, 4% PFA를 함유하는 PBS를 사용하여 20분 동안 실온에서 고정하였다. 그리고 PBS로 3회 세척한 후, 고정된 세포를 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich)가 함유된 PBS를 이용하여 4분간 세척하였다. 이 후, 세포를 PBS로 3회 더 세척하고 5% 당나귀 혈청이 함유된 PBS로 20분간 블로킹시켰다. α -syn 발현은 α -syn 항체 (Cat#: 610787; 1:1,000; BD Biosciences)를 사용하여 모니터링하였다. 레이저 스캐닝 공초점 현미경에서 550 nm 및 570 nm에서 나타나는 신호를 이미지화하였다. 필드 당 면역 양성 응집체의 수를 측정 한 후 ImageJ 소프트웨어 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH)를 사용하여 정량하고, DAPI로 염색된 세포의 수를 이용하여 표준화하였다.

[171]

[172] **28. 행동 분석**[173] **(1) 실린더 테스트 (cylinder test)**

[174] 비대칭적인 앞다리의 사용을 테스트에 이용하였다. 20 cm의 투명 플라스틱 실린더에 실험동물을 넣고 실린더 벽에 앞발이 접촉하는 횟수를 측정하였다. 동물 당 20~30 회 정도 (접촉에 대하여 전방/후방 및 정반대로 완전히 실행된 경우)의 벽 접촉을 측정하였다. 손상된 대뇌에 상응하는 앞다리 접촉의 횟수는 총 앞다리 접촉의 횟수로 나뉘 백분율로 표현되었다. 서로 다른 그룹에 대해 맹검된 조사관이 모든 분석을 수행하였다.

[175]

[176] **(2) 막대 테스트 (pole test)**

[177] 모든 동물은 행동 실험에 앞서 30 분 동안 순응시켰다. 행동 실험용 막대는 붕대 거즈로 감싸인 직경 9 mm의 75 cm 금속 막대를 사용하여 만들었다. 마우스를 기둥의 꼭대기에서 (극의 꼭대기에서 7.5 cm) 머리 위로 향하게 놓고, 전주 기둥에 도달하는 데 걸린 총 시간을 기록하였다. 실제 실험에 앞서 모든 마우스를 2 일 간 연속 훈련시켰다. 각 훈련 세션은 3 회의 개별적인 훈련으로 구성하였으며, 시험 당일에 모든 마우스를 3 회의 세션으로 평가하고 총 시간을 기록하였다. 테스트 및 녹화를 중단하는 최대 차단 시간은 60 초였다. 턴 다운, 내리막, 총 시간 (초)에 대한 결과를 기록하였다.

[178]

[179] **(3) 움켜잡 테스트 (clasp test)**

[180] hA53T α -syn 마우스의 경우, 뒷다리 움켜잡이 테스트되었다. 꼬리를 잡아든 동물의 뒷다리 움켜잡을 10초 동안 관찰하였으며, 각 테스트에 대한 점수는 아래의 기준으로 결정되었다.

[181] 1) 점수 0: 뒷다리가 바깥쪽으로 지속적으로 퍼져 복부에서 떨어질 경우.

[182] 2) 점수 1: 한 개의 뒷다리가 복부쪽으로 5 초 이상 후퇴한 경우.

[183] 3) 점수 2: 두 개의 뒷다리가 부분적으로 복부쪽으로 5 초 이상 후퇴한 경우.

[184] 4) 점수 3: 양쪽 뒷다리가 완전히 후퇴하여 5 초 이상 복부에 닿은 경우.

[185]

[186] **29. 통계**

[187] 데이터는 적어도 3 번의 독립적인 실험으로부터 평균 \pm 표준편차로 측정되었다. 통계적 유의성을 평가하기 위해 Prism6 소프트웨어 (GraphPad)를 사용하여 Bonferroni 사후 분석과 함께 Student t 테스트나 ANOVA 테스트를 수행하였다. $p < 0.05$ 인 평가는 유의한 것으로 간주되었다.

[188]

[189] **실험결과**[190] **1. α -syn 피브릴화 및 피브릴 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과**[191] 도 1a는 본 발명에 따라 제작된 그래핀 양자점의 유무에 따른 α -syn 피브릴화 및

피브릴 분해 효과에 대한 모식도이다.

- [192] 도 1b는 ThT 형광 결과를 이용하여 α -syn 피브릴화 정도를 정량화한 그래프이다. 도 1b에 나타난 바와 같이, α -syn만 존재하는 경우에는 α -syn 피브릴화가 급격히 증가되어 형광값이 증가되나, 그래핀 양자점을 함께 반응시킨 경우에는 150 시간 이후에도 α -syn 피브릴이 형성되지 않아 형광값의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [193] 도 1c는 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 72 및 168 시간의 각 반응 시점에서 탁도 분석 결과($n = 4$, **** $P < 0.001$, post-hoc Bonferroni 테스트를 통한 투-웨이 ANOVA, 오차 막대는 표준 편차)를 나타낸 그래프이다. 도 1c에 나타난 바와 같이, α -syn만 존재하는 경우에는 α -syn 피브릴화가 급격히 증가되어 탁도가 증가되나, 그래핀 양자점을 함께 반응시킨 경우에는 α -syn 피브릴이 형성되지 않아 탁도가 증가되지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [194] 도 1d는 그래핀 양자점의 존재 (우측) 및 부재 (좌측) 하에서 피브릴화시킨 후 TEM으로 확인한 이미지이다. 도 1d에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점이 없는 경우 α -syn 피브릴화가 진행되었지만, 그래핀 양자점을 함께 반응시킨 경우 7 일 결과 후에도 α -syn 피브릴이 형성되지 않은 것을 확인할 수 있었다.
- [195] 도 1e는 ThT 형광에 의하여 모니터링된 반응의 표본을 사용하여 그래핀 양자점과 함께 배양 후 이미 형성된 α -syn 피브릴의 분해 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1e에 나타난 바와 같이, α -syn 피브릴과 그래핀 양자점을 함께 반응시킨 경우, α -syn 피브릴이 분해되어 ThT 형광값이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [196] 도 1f는 여러 반응 시점 (0, 1, 3, 12, 24, 72 및 168 시간, 각 시점에서 $n = 4$, **** $P < 0.001$, post-hoc Bonferroni 테스트를 통한 투-웨이 ANOVA, 오차 막대는 표준 편차)에 따른 탁도 분석 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1f에 나타난 바와 같이, α -syn 피브릴과 그래핀 양자점을 함께 반응시킨 경우, α -syn 피브릴이 분해되어 탁도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [197] 도 1g는 그래핀 양자점의 α -syn 피브릴 분해 효과에 대해 종단길이 (end-to-end length, 각 시점에서 $n = 50$ 피브릴) 및 피브릴 수 (각 시점에서 $n = 4$)를 나타낸 그래프이다. 도 1g에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점과 α -syn 피브릴을 6 시간 반응시킨 후에는 α -syn 피브릴의 길이가 현저히 감소되었으며, 24 시간 이후에는 α -syn 피브릴의 수 또한 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [198] 도 1h는 그래핀 양자점의 존재 하에 같은 시점 (0, 6, 12, 24 및 72 시간)에서 잔류하는 α -syn 피브릴의 양을 α -syn 피브릴의 종단길기와 α -syn 피브릴 수의 곱으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1h에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점에 의하여 α -syn 피브릴의 양이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [199] 도 1i는 그래핀 양자점의 부재 (상단) 또는 존재 (하단) 하에서 여러 반응 시점 (6 시간, 12 시간, 1 일, 3 일 및 7 일) 후에 α -syn 피브릴의 TEM 이미지이다. 도 1i에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점의 존재 하에서 α -syn 피브릴의 길이가

감소되며, 형성되어 있던 α -syn 피브릴이 효과적으로 분해되는 것을 직접적으로 확인할 수 있었다.

[200] 도 1j는 α -syn 필라멘트 특이적 항체를 이용하여 다양한 반응 시점 (0 시간, 12 시간, 1 일, 3 일 및 7 일)에서 dot-blot 분석에 의한 α -syn 피브릴의 측정 결과를 나타낸 것이다. 도 1j에 나타난 바와 같이, 반응 시간이 증가될수록 α -syn 피브릴의 양은 현저히 감소되었으며, 7일 차에는 α -syn 피브릴이 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[201] 도 1k는 다양한 반응 시점 (0 시간, 3 시간, 6 시간, 12 시간, 1 일, 3 일 및 7 일) 후에 반응의 표본으로 준비된 α -syn의 BN-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 1k에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점과 반응 7일 차에는 α -syn 피브릴이 모두 분해되어 단량체 (monomer) 상태로 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[202]

[203] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점이 α -syn의 피브릴화를 억제시킬 수 있을 뿐만 아니라, 이미 형성되어 있는 α -syn 피브릴을 효과적으로 분해할 수 있다는 것을 확인하였다.

[204]

[205] **2. 분해 과정 동안 그래핀 양자점과 이미 형성된 α -syn 피브릴간의 상호 작용에 대한 분석**

[206] 도 2a는 비오틴화된 그래핀 양자점과 α -syn 피브릴간의 결합을 TEM을 사용하여 저배율 및 고배율에서 확인한 결과이다. 삼각형 모양의 화살표는 초소형 금-스트렙타비딘 나노 입자와 결합한 비오틴화된 그래핀 양자점을 나타낸다. 도 2a에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점과 α -syn 피브릴과 결합되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[207] 도 2b는 배양 1 시간 후 분해 과정에서 α -syn 피브릴의 평균 폭의 길이 변화 (각 그룹마다 $n = 20$, $*P < 0.05$, Student's t 테스트, 오차 막대는 표준 편차)를 나타낸 그래프이다. 도 2b에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점이 α -syn 피브릴과 결합되어 평균 폭이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[208] 도 2c는 ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼으로부터 얻은 NMR 화학적 이동 차이를 나타낸 그래프이다. 그래핀 양자점과 결합한 이후 각 잔류물에 대한 NMR의 화학적 이동의 감소된 강도 비를 확인할 수 있다. 도 2c에 나타난 바와 같이, α -syn 피브릴의 NAC와 C-말단 부분에 그래핀 양자점이 결합한 것을 확인할 수 있었다.

[209] 도 2d는 시간 경과 시뮬레이션 동역학을 이용하여 그래핀 양자점과 이미 형성된 α -syn 피브릴 사이의 상호 작용과 65 ns까지의 스냅샷 이미지이다. 도 2d에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점이 α -syn 피브릴에 결합하여 α -syn 피브릴의 구조를 변경시키는 것을 예측할 수 있었다.

[210] 도 2e는 원자 위치의 RMSD에 대한 시간-의존성 플랏, α -syn 피브릴 그룹 (흑색) 및 α -syn 피브릴과 그래핀 양자점 그룹 (적색)에 대한 SASA, 총 포텐셜 에너지

(ΔU_{tot}), 정전기 에너지 ($\Delta Elec$) 및 α -syn 피브릴 및 그래핀 양자점 그룹에 대한 반데르발스 에너지 ($\Delta Evan$)를 나타낸 결과이다.

[211] 도 2f는 DSSP 알고리즘에 의해 계산된 시간-의존성 플랏을 나타낸 것이다. 도 2f에 나타난 바와 같이, 베타-sheet가 감소되며, 알파-helix가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[212] 도 2g는 7 일 동안 배양한 후 그래핀 양자점의 부재 및 존재 하에 α -syn 단량체와 α -syn 피브릴의 CD 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

[213] 도 2h는 CONTIN/LL의 알고리즘을 사용하여 계산된 그래핀 양자점에 의한 α -syn 피브릴 및 분해된 α -syn 피브릴의 부분 2차 구조의 함유 비율을 나타낸 그래프이다. 도 2h에 나타난 바와 같이, β -sheet가 감소되며, α -helix가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[214]

[215] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 α -syn 피브릴에 직접적으로 결합하여 α -syn 피브릴의 구조를 변형시킴으로써 α -syn 피브릴의 분해를 촉진시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[216]

[217] **3. 시험관 내 (in vitro)에서 α -syn PFFs에 의한 신경세포의 사멸 및 병리 현상, 전이에 미치는 그래핀 양자점의 영향**

[218] 도 3a-c는 10 DIV 마우스 유래 대뇌피질 신경세포에서 7 일 동안 ($n = 4$) 그래핀 양자점 ($1 \mu\text{g/ml}$)의 부재 및 존재 하에 α -syn PFFs ($1 \mu\text{g/ml}$)를 처리하고, TUNEL에 의해 평가된 신경세포의 사멸 (도 3a), alamar Blue (도 3b) 및 LDH 분석 (도 3c) 결과를 나타낸 그래프이다. 도 3a-c에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점은 세포에 독성을 나타내지 않으며, α -syn PFFs에 의해 나타나는 세포 독성을 유의성 있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[219] 도 3d는 p- α -syn 항체를 이용하여 면역 블랏 (immunoblot)을 수행한 결과를 보여주는 이미지이고, 도 3e는 β -액틴으로 표준화된 SDS 불용성 분획의 p- α -syn의 양을 정량화한 그래프이다 ($n = 3$). 도 3d 및 3e에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 함께 처리한 경우에는 α -syn PFFs가 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[220] 도 3f는 신경세포에서의 p- α -syn 및 p- α -syn 항체 면역 현미경 이미지이고, 도 3g는 PBS 대조군 ($n = 3$)으로 표준화된 p- α -syn 면역 형광 강도의 정도를 정량한 그래프이다. 도 3f 및 3g에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs를 처리한 실험군에서는 적색 형광이 현저히 증가되었으나, 그래핀 양자점과 함께 처리한 경우에는 α -syn PFFs이 분해되어 적색 형광 값이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[221] 도 3h는 병리학 적 α -syn 전이를 확인하기 위한 3개의 챔버로 구성된 미세유체 장치의 모식도이다.

[222] 도 3i는 α -syn PFFs를 추가하고 14 일 후, 미세유체 장치에서 관찰된 p- α -syn 면역 염색된 신경세포의 대표적인 이미지이다. 그리고 도 3j는 p- α -syn 면역 형광

강도를 정량화하여 나타낸 그래프이다. p- α -syn에 의해 점유된 영역을 각 챔버에서 측정하였다 (n = 3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, NS, post-hoc Bonferroni 테스트를 통한 투-웨이 ANOVA, 오차 막대는 표준 편차). 도 3i 및 3j에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs을 첫번째 컬럼에 처리한 대조군의 경우에는 모든 컬럼에서 적색 형광(α -syn 피브릴)이 높게 관찰된 반면, 그래핀 양자점과 α -syn PFFs를 함께 첫번째 컬럼 (C1)에 처리한 실험군과 α -syn PFFs는 첫번째 컬럼에, 그래핀 양자점을 두번째 컬럼 (C2)에 처리한 실험군 모두 α -syn PFFs의 양이 현저히 감소되어 적색 형광이 거의 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[223]

[224]

상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 신경세포 내에서 α -syn PFFs에 의한 α -syn 피브릴화를 현저하게 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, α -syn PFFs이 신경세포 내에서 전이됨에 따라 그래핀 양자점 또한 함께 전이된 α -syn PFFs에 의한 피브릴화를 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점을 이용하여 α -syn 피브릴화에 의한 신경 세포간 질병 전이 억제 및 치료하는데 효과적으로 사용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[225]

[226]

4. 생체 내 (in vivo)에서 α -syn이 유도된 병리학에서의 그래핀 양자점의 효과

[227]

도 4a는 C57BL/6 마우스의 선조체에 α -syn PFFs (5 μ g)을 주입한 좌표를 나타낸 모식도이다. 50 μ g의 그래핀 양자점 또는 PBS를 격주로 6 개월 동안 복강 주사하였다.

[228]

도 4b는 그래핀 양자점의 부재 (상단) 또는 존재 (하단) 하에 α -syn PFFs 주입된 반구 SN의 대표적인 TH 면역 조직 화학 염색에 대한 이미지이다. 도 4b에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs 만을 주입한 실험군에서는 신경세포가 사멸되어 음영이 감소된 반면, 그래핀 양자점을 함께 투여한 실험군에서는 α -syn PFFs에 의한 신경세포 사멸이 억제되어 음영 정도가 정상 대조군과 유사하게 회복된 것을 확인할 수 있었다.

[229]

도 4c는 그래핀 양자점의 주입이 있는 그룹과 없는 그룹 (각 그룹당 n = 6)에 6 개월간의 α -syn PFF 주사 후 입체분석을 통해서 SN에서 TH- 및 Nissl-양성 신경세포의 수를 입체학적으로 계산한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 4c에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs와 그래핀을 함께 투여한 실험군에서는 α -syn PFFs에 의한 신경세포 사멸이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[230]

도 4d는 α -syn PFFs가 주입된 반구의 선조체에서의 대표적인 TH-면역 조직 화학 염색 이미지이며, 도 4e는 선조체에서 TH-면역 양성 섬유의 밀도를 정량화한 결과를 나타낸 그래프이다 (각 그룹당 n = 5 내지 6). 도 4d 및 4e에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs와 그래핀 양자점을 함께 투여한 실험군에서는 α -syn PFFs에 의한 TH-면역 양성 섬유의 밀도 감소가 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

- [231] 도 4f는 마우스의 앞발의 사용으로 측정된 행동적 결손평가 중 실린더 테스트 결과를 나타내는 그래프이다 (각 그룹당 n = 5 내지 6). 또한, 도 4g는 마우스의 행동적 결손평가 중 장대를 잡고 파악할 수 있는 능력인 폴 테스트 결과를 나타내는 그래프이다 (각 그룹당 n = 5 내지 6). 도 4f 및 4g에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs의 투여에 의한 비정상적인 마우스의 행동이 그래핀 양자점을 함께 투여하는 경우에는 정상 마우스 대조군과 유사한 행동 유형을 보이는 것으로 확인할 수 있었다.
- [232] 도 4h는 선조체 및 α -syn PFFs가 주입된 반구의 SN에서 대표적인 p- α -syn의 면역염색 이미지를 나타내는 이미지이며, 도 4i는 선조체 및 SN (n = 5)에서 p- α -syn의 면역 반응성 신경세포의 정량화 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4h 및 4i에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 함께 투여한 실험군에서는 α -syn PFFs 양성 신경세포의 수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [233] 도 4j는 α -syn PFFs가 주입된 반구 (p- α -syn 양성 뉴런: 적색 점, p- α -syn 양성 신경돌: 적색 선)의 CNS에서의 LB/LN 유사 병리의 분포를 나타내는 모식도이다. 도 4j에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 함께 투여한 실험군에서는 병리 분포 정도가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [234] 도 4k는 hA53T α -syn Tg 모델의 관측 영역에 대한 모식도이다. 50 μ g의 그래핀 양자점 또는 PBS를 4 개월 동안 격주로 복강 주사하였다.
- [235] 도 4l은 dot-blot 분석에 의한 p- α -syn 및 α -syn 피브릴을 측정된 이미지이다. 도 4l에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 투여한 실험군의 경우에는 뇌간 (brainstem)에서 p- α -syn 및 α -syn 피브릴이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [236] 도 4m은 hA53T α -syn Tg의 피질, 복부 중뇌 및 뇌간에서의 대표적인 α -syn 면역염색 이미지 (각 그룹당 n = 5)이다. 도 4m에 나타난 바와 같이, hA53T α -syn Tg 마우스의 피질 (cortex), 복부 중뇌 (ventral midbrain), 및 뇌간에서 모두 α -syn가 응집되어 있는 구조가 관찰되는 반면, 그래핀 양자점을 투여한 실험군의 경우에는 α -syn가 응집된 구조가 거의 관찰되지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [237] 도 4n은 hA53T 피질 (Ctx), 복부 중뇌 (VM) 및 뇌간 (BS)에서 p- α -syn 면역 반응성 신경세포의 정량화 (각 그룹당 5개) 결과를 나타낸 그래프이다. 도 4n에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 투여한 실험군의 경우에는 p- α -syn 면역 반응성 신경세포의 수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [238] 도 4o는 마우스의 행동적 결손평가 중 움겨칩 테스트 결과를 나타내는 그래프 (좌측) 와, 마우스의 행동적 결손평가 중 폴 (pole) 실험 결과를 나타내는 그래프 (우측) 이다 (각 그룹당 n = 5). 도 4o에 나타난 바와 같이, hA53T α -syn Tg 마우스는 결손 행동이 증가되었으나, 그래핀 양자점을 투여한 실험군의 경우에는 결손 행동이 회복되는 것을 확인할 수 있었다.
- [239]
- [240] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 *in vivo*에서도 효과적으로 α -syn의 비정상적인 섬유화 또는 응집을 효과적으로 억제하거나, 형성된 α -syn

응집체를 효과적으로 분해하여, α -syn의 비정상적인 섬유화 또는 응집에 의하여 나타나는 병적 증상들을 치료할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[241]

[242] **5. 시누클레인병증의 병인에 대한 그래핀 양자점의 치료 효과**

[243] 도 5는 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 병리학적 α -syn 응집현상의 전이 및 증식에 의해 유발된 병인에 대한 그래핀 양자점의 항응집 효능에 대한 모식도이다. 그래핀 양자점이 없을 경우, 병리학적 α -syn 단량체는 자발적 섬유화를 거쳐 섬유상 응집체를 형성하고, 결국 도파민성 뉴런, LB/LN 유사체 구성 및 행동 이상을 유도한다. 반면에, 그래핀 양자점은 α -syn의 피브릴화를 억제하고 형성된 피브릴을 단량체로 분해하여 도파민성 신경세포의 손실, 비정상적인 α -syn 피브릴로 유발되는 LB/LN 유사체 및 행동 장애를 예방 및 치료할 수 있다.

[244]

[245] **6. 그래핀 양자점의 합성과 비오틴화 및 그래핀 양자점-비오틴과 α -syn 피브릴의 결합 분석**

[246] 도 6a는 카본 파이버에서 열산화 절단으로 합성되는 그래핀 양자점을 나타낸 모식도이다.

[247] 도 6b는 합성된 그래핀 양자점의 AFM 이미지이며, 도 6c는 그래핀 양자점의 두께 분포를 나타낸 그래프이다. 도 6b 및 6c에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점의 평균 높이는 0.1 내지 3 nm인 것을 확인할 수 있었다.

[248] 도 6d는 그래핀 양자점을 비오틴화 시키는 합성 절차의 모식도이다.

[249] 도 6e는 그래핀 양자점 (흑색선) 및 비오틴화된 그래핀 양자점 (적색선)의 FT-IR 스펙트럼이다. 도 6e에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점을 비오틴화시키는 경우 작용기에 변화가 있는 것을 확인할 수 있었다.

[250] 도 6f는 비오틴화된 그래핀 양자점과 나노골드-스트렙타비딘 사이의 결합 친화도를 위한 제조 단계를 나타내는 모식도이고, 도 6g는 그래핀 양자점-비오틴-나노골드-스트렙타비딘 복합체 (좌측)와 나노골드-스트렙타비딘 복합체 (우측)의 존재 하에서 7일 후에 이미 형성된 α -syn 피브릴의 TEM 이미지이다. 도 6g에 나타난 바와 같이, 비오틴화된 그래핀 양자점 또한 α -syn 피브릴에 결합하여, α -syn 피브릴을 분해하는 것을 확인할 수 있었다.

[251]

[252] **7. α -syn 피브릴의 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과**

[253] 도 7a는 다양한 반응 시점 (0, 6, 12, 24 및 72 시간, 각 시점에서 $n = 50$ 피브릴)에서 α -syn 피브릴 길이의 분포를 나타낸 그래프이다. 도 7a에 나타난 바와 같이, 반응 전에는 600 nm 이상의 긴 α -syn 피브릴이 관찰되었으나, 반응 시간이 길어질수록 단량체 형태의 α -syn가 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

[254] 도 7b는 다양한 반응 시점 (0, 24 및 48 시간) 후에 α -syn 피브릴의 AFM 이미지를 나타내고, 지정된 영역의 대표적인 라인 프로파일 (그래핀 양자점: 청색선, α -syn 피브릴: 적색선)을 나타낸 것이다. 도 7b에 나타난 바와 같이, α -syn

피브릴과 그래핀 양자점을 반응시킨 후에도 높이에 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[255]

[256] **8. α -syn PFFs의 분해에 대한 그래핀 양자점의 효과**

[257] 도 8a는 그래핀 양자점 (5 mg/ml)의 부재 (상단) 및 존재 (하단) 하에 1 시간 동안 반응시킨 섬유화 α -syn PFFs (5 mg/ml)의 대표적인 TEM 이미지이고, 도 8b는 1 시간 동안 반응시킨 후, α -syn PFFs의 종단 간 길이 ($n = 286$; PFFs, $n = 249$; PFFs+GQDs, $***P < 0.001$; Student's t-테스트, 오차 막대는 표준 편차)를 나타낸 그래프이다. 도 8a 및 8b에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점이 섬유화 α -syn PFFs를 분해하여 종단 간 길이가 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[258] 도 8c는 다양한 반응 시간 이후에 잔존하는 α -syn PFFs와 분해된 α -syn PFFs의 양을 BN-PAGE에 의해 평가된 결과를 나타낸 이미지이다. 도 8c에 나타난 바와 같이, 반응 시간이 길어질수록 α -syn PFFs가 분해되어 단량체 형태로 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[259]

[260] **9. ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼 분석**

[261] 도 9a는 ^{15}N -표지 α -syn 단량체 (흑색) 만 배양된 경우와 그래핀 양자점과 함께 배양된 α -syn (적색)의 ^1H - ^{15}N HSQC 스펙트럼이 완전히 중첩됨을 나타낸다. 할당된 잔기는 ^{15}N -표지 α -syn 단량체 그룹에서만 나타났다. 도 9b는 그래핀 양자점과 함께 배양된 ^{15}N -표지 α -syn 단량체들의 완전한 HSQC 스펙트럼을 나타낸다. ^{15}N -표지 α -syn 단량체 그룹의 피크 강도에 기초하여, 피크 강도에서의 비감소 또는 최소 감소를 갖는 잔류물 (적색), 피크 강도에서의 현저한 감소를 갖는 잔류물 (청색) 및 사라진 잔류물 (흑색)은 눈에 띄게 나타난다. 이를 통해 그래핀 양자점이 α -syn를 구성하는 아미노산의 N-말단 또는 양전하를 띠는 잔기와 결합한다는 것을 확인하였다.

[262]

[263] **10. α -syn PFFs로 유도된 신경세포 사멸 및 제한된 신경돌기 생성에 대한 그래핀 양자점의 효과**

[264] 도 10a는 대표적인 TUNEL-양성 신경세포의 이미지이다. DIV 10 1차 대뇌피질 신경세포에 그래핀 양자점 (1 $\mu\text{g/ml}$)의 부재 및 존재 하에서 α -syn PFFs (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. TUNEL 분석은 7 일 동안 배양한 후에 수행되었다. 도 10a에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs 만을 처리한 실험군의 경우에는 적색 형광이 다수 관찰되는 반면, α -syn PFFs와 그래핀 양자점을 함께 처리한 실험군의 경우에는 적색 형광이 감소되어, α -syn PFFs에 의한 세포 사멸이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[265] 도 10b는 외부 세포막 (적색) 및 세포-투과성 생존율 지표 (녹색)에 의해 염색된 신경돌기의 성장 정도 및 세포 생존능 검정의 대표적인 현미경 이미지이고, 도 10c 및 도 10d는 신경돌기 성장 및 신경세포 생존 능력을 정량화한 결과를

나타내는 그래프이다. 도 10b 내지 10d에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs를 단독으로 처리한 실험군에서는 신경돌기의 성장도 감소되고, 세포 생존률도 감소된 반면, α -syn PFFs와 그래핀 양자점을 함께 처리한 실험군의 경우에는 대조군과 유사한 신경돌기 성장률을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, α -syn PFFs에 의한 세포 사멸이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[266] 도 10e는 SNAP25 및 VAMP2 단백질 수준의 면역 블롯 분석 결과를 나타낸 그래프이다. 10 DIV 1차 대뇌피질 신경세포에 그래핀 양자점 (5 μ g/ml)의 부재 및 존재 하에서 α -syn PFFs (5 μ g/ml)를 처리하고 7일간 배양하고, 면역 블롯을 실시하였다. 도 10f는 SNAP25의 발현 수준을 베타-액틴 발현 수준으로 표준화한 후 정량화 (n = 3)하여 나타낸 그래프이고, 도 10g는 VAMP2 발현 수준을 베타-액틴 발현 수준으로 표준화한 후 정량화한 (n = 3) 결과를 나타내는 그래프이다. 도 10e 내지 10g에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs를 단독으로 처리한 실험군에서는 SNAP25 및 VAMP2 단백질의 발현이 유의성있게 감소되었으나, α -syn PFFs와 그래핀 양자점을 함께 처리한 실험군의 경우에는 대조군과 유사한 수준으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[267]

[268] **11. α -syn PFFs에 의해 유발된 미토콘드리아 기능 장애 및 산화 스트레스 유발에 대한 그래핀 양자점의 효과**

[269] 도 11a는 그래핀 양자점 (1 μ g/ml)의 부재 및 존재 하에서 α -syn PFFs (1 μ g/ml)을 처리하고 7일 동안 배양한 주요 대뇌피질 신경세포의 대표적인 8-OHG (8-hydroxyguanine) 면역 염색 이미지이고 (각 그룹당 n = 4), 도 11b는 8-OHG의 양을 면역 형광 수준으로 정량화한 그래프이다. 도 11a 및 11b에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs를 단독으로 처리한 경우에는 산화 스트레스가 증가되나, α -syn PFFs와 그래핀 양자점을 함께 처리한 경우에는 α -syn PFFs에 의한 산화 스트레스가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[270] 도 11c는 α -syn PFFs (1 μ g/ml)과 그래핀 양자점 (1 μ g/ml)을 처리하고 7일 동안 배양한 후, 미토콘드리아 복합체의 활성을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다. 도 11c에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs에 의한 미토콘드리아 복합체 활성 억제가 그래핀 양자점에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[271] 도 11d는 대표적인 MitoTracker 양성 현미경 이미지이다. 10 DIV의 1차 대뇌피질 신경세포에 그래핀 양자점 (1 μ g/ml)의 부재 및 존재 하에서 α -syn PFFs (1 μ g/ml)를 처리하였다. 7일간 배양한 후, 미토콘드리아를 MitoTracker® Orange CMTMRos (적색)으로 표지하였다. 도 11e는 염색된 미토콘드리아의 길이를 정량화한 결과를 나타내는 그래프이고 (각 그룹당 n = 50), 도 11f는 염색된 미토콘드리아의 중횡비를 나타내는 그래프이다 (각 그룹당 n = 50). 그리고 도 11g는 염색된 미토콘드리아의 저배율 및 고배율의 대표적인 TEM 이미지이다. 도 11d 내지 11g에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs에 의한 미토콘드리아의 길이 및 중횡비의 감소가 그래핀 양자점에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[272] 도 11h는 뉴런에 대한 마이크로-플레이트 기반의 호흡측정 수치를 나타내는 그래프이다. 산소 소비율은 24 시간 동안 그래핀 양자점 (1 $\mu\text{g/ml}$)의 부재 및 존재 하에서 $\alpha\text{-syn PFFs}$ (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 1차 피질 뉴런을 이용하여 XF 24 Seahorse 분석기로 측정하였다 (각 그룹당 $n = 4$). 도 11i는 호흡측정 결과의 기저 호흡율을 정상화한 그래프이고, 도 11j는 호흡측정 결과의 최대 호흡율을 정상화한 그래프이다. 도 11h 내지 11j에 나타난 바와 같이, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 에 의한 호흡율 감소가 그래핀 양자점에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[273]

[274] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 $\alpha\text{-syn}$ 의 비정상적인 섬유화 또는 응집에 의한 산화 스트레스, 미토콘드리아의 형태 이상, 기능 부전에 대하여 완화 또는 치료 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[275]

[276] **12. 그래핀 양자점의 여러 처리 시점에서 $\alpha\text{-syn PFFs}$ 에 의해 유도된 1차 신경세포의 독성 및 병리적 현상에 대한 그래핀 양자점의 효과 및 세포 라이브 이미징**

[277] 10 DIV 마우스의 대뇌피질 신경세포에 3 일전 ($n = 4$, Before), 동시 ($n = 4$, Simul) 및 그래핀 양자점 처리 (1 $\mu\text{g/ml}$) 후 배양 3 일째 ($n = 4$, After)에 $\alpha\text{-syn PFFs}$ (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다.

[278] 도 12a는 alamarBlue 형광 분석 결과를 나타낸 결과이다. 도 12a에 나타난 바와 같이, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 에 의한 세포 사멸이 그래핀 양자점에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 그래핀 양자점 처리 3 일전에 $\alpha\text{-syn PFFs}$ 를 처리한 경우, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 와 그래핀 양자점을 동시에 처리한 경우, 그래핀 양자점을 처리하고 3 일 후에 $\alpha\text{-syn PFFs}$ 를 처리한 경우 모두 세포 사멸이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[279] 도 12b는 LDH 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 도 12b에 나타난 바와 같이, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 에 의한 LDH 분비가 그래핀 양자점에 의하여 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 $\alpha\text{-syn PFFs}$ 에 의한 세포 사멸이 그래핀 양자점의 처리에 의하여 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[280] 도 12c는 dot-blot 분석에 의한 p- $\alpha\text{-syn}$ 의 대표적인 이미지이고, 도 12d는 PBS 대조군 (각 그룹당 $n = 4$)으로 표준화된 정상화된 결과를 나타내는 그래프이다. 도 12c 및 12d에 나타난 바와 같이, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 가 그래핀 양자점에 의하여 효과적으로 분해되는 것을 확인할 수 있었다.

[281] 도 12e는 7 일 동안 배양한 후 p- $\alpha\text{-syn}$ 항체에 의한 대표적인 p- $\alpha\text{-syn}$ 면역 염색 형광 현미경 이미지이고, 도 12f는 PBS 대조군으로 표준화된 p- $\alpha\text{-syn}$ 의 면역 형광 강도를 정상화하여 나타내는 그래프이다 (각 그룹당 $n = 4$). 도 12e 및 12f에 나타난 바와 같이, $\alpha\text{-syn PFFs}$ 가 그래핀 양자점에 의하여 효과적으로 분해되는 것을 확인할 수 있었다.

[282] 도 12g는 그래핀 양자점과 $\alpha\text{-syn PFFs}$ 가 신경세포의 리소솜에 함께 위치하는

것을 라이브 영상으로 확인한 것이다. LysoTracker (청색), 그라핀 양자점-비오틴-스트렙타비딘 Qdot 복합체 (적색) 및 FITC-표지 α -syn PFFs (녹색)를 사용하였다.

[283] 도 12h는 그라핀 양자점에 의한 α -syn PFFs의 분해 과정은 라이브 이미징을 이용하여 저속 형광 신호를 모니터링한 것을 나타낸다.

[284]

[285] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그라핀 양자점은 α -syn PFFs의 형성 전에, 동시에, 또는 형성 후에 처리하였을 때 모두 효과적으로 α -syn PFFs를 분해하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, 본 발명의 그라핀 양자점은 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환의 예방 및 치료 용도로 모두 사용될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[286]

[287] **13. 그라핀 양자점의 혈뇌장벽 투과성**

[288] 도 13a는 혈뇌장벽 투과성 체외 실험의 모식도이다.

[289] 도 13b는 뇌 미세혈관 내피세포 (BMEC) 및 성상세포 (astrocytes)의 합류 단일층 형성을 각각 CD31 (내피세포 마커) 또는 GFAP (성상세포 마커) 항체로 면역형광염색에 의해 확인한 결과를 나타낸다.

[290] 도 13c는 상피 전기 저항 (TEER)을 다양한 시점 (0, 2, 4, 6 및 8 일, 각 그룹당 $n = 4$, *** $P < 0.001$, post-hoc Bonferroni 테스트에서 일원 ANOVA, 오차 막대는 표준 편차)에서 측정된 결과를 나타낸다.

[291] 도 13d는 내피세포 단일층 및 성상세포의 투과성을 텍스트란플루오레신 (3 kDa) 및 텍스트란-로다민 (2,000 kDa)을 사용하여 혈액 측과 뇌 측간 내의 비율을 측정함으로써 관찰한 결과를 나타낸다.

[292] 도 13e는 시간 경과에 따른 그라핀 양자점 및 그라핀 양자점-비오틴의 투과성을 정량화한 그래프이다. 도 13e에 나타난 바와 같이, 그라핀 양자점 및 비오틴화된 그라핀 양자점 모두 높은 세포 투과성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[293] 도 13f는 그라핀 양자점과 그라핀 양자점-비오틴의 α -syn 피브릴 분해 능력을 dot-blot으로 관찰한 결과를 나타내는 이미지이다. 도 13f에 나타난 바와 같이, 그라핀 양자점 및 비오틴화된 그라핀 양자점 모두 내피세포 단일층 및 성상세포 층을 모두 투과하여 α -syn 피브릴을 효과적으로 분해하는 것을 확인할 수 있었다.

[294] 도 13g는 ThT 및 탁도 분석 결과를 나타낸 그래프이다 (각 그룹당 $n = 4$, *** $P < 0.001$, post-hoc Bonferroni 테스트에서 일원 ANOVA, 오차 막대는 표준 편차). 도 13g에 나타난 바와 같이, 그라핀 양자점 및 비오틴화된 그라핀 양자점 모두 내피세포 단일층 및 성상세포 층을 모두 투과하여 α -syn 피브릴을 효과적으로 분해하여 탁도가 효과적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[295] 도 13h는 그라핀 양자점-비오틴으로 1 시간 배양 후 1차 배양된 BMEC 및

정상세포의 공초점 레이저 스캐닝 현미경의 이미지이다. 그래핀 양자점-비오틴은 Qdot™streptavidin으로, 리소솜은 LysoTracker 오렌지로 표시되어 있다. 도 13h에 나타난 바와 같이, 내피세포 및 정상세포의 리소솜에 비오틴화된 그래핀 양자점이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

- [296] 도 13i는 BMEC 또는 정상세포에서 추출한 엑소솜 내의 그래핀 양자점-비오틴을 정량화한 그래프이다. 세포사멸 후 24 및 48 시간에 분리된 엑소솜을 이용하여 그래핀 양자점-비오틴의 양을 측정하였다 (각 그룹당, n = 3). 도 13i에 나타난 바와 같이, 반응 시간이 증가될수록 내피세포 및 정상세포 내에 포함되어 있는 비오틴화된 그래핀 양자점의 양은 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [297] 도 13j는 그래핀 양자점-비오틴 (2 mg/kg)을 마우스에 복강 주사한 후, 소뇌, 중뇌, 후구 (olfactory bulb), 및 신피질 (neocortex)에 존재하는 비오틴화된 그래핀 양자점을 아비딘-비오틴 복합체 검출 방법 또는 면역골드 (immunogold) 방법으로 염색하여 면역조직화학으로 확인한 결과를 나타내는 이미지이다. DAB 양성 염색 신호는 비히클 주입 대조군에 비해 그래핀 양자점-비오틴이 주사된 마우스에서 높게 검출되었다. 면역골드 (immunogold) 양성 신호는 뉴런 내부 (적색 삼각형) 또는 뉴런 외부 (청색 삼각형)에서 모두 관찰되었다. 도 13j에 나타난 바와 같이, 비오틴화된 그래핀 양자점이 *in vivo*에서도 BBB 층을 모두 통과한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [298] 도 13k는 그래핀 양자점-비오틴의 복강 내 주입 (i.p.; 적색 바)와 정맥 내 주입 (i.v.; 청색 바)의 차이를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 두 가지 주입 방법 모두 결과는 실질적으로 차이가 없는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여, 그래핀 양자점의 주입 방법에 따른 효과 차이는 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [299] 도 13l은 격주로 그래핀 양자점-비오틴을 주사한 후 비오틴 정량 키트를 사용하여 1 내지 8 주, 3 개월 및 6 개월 (각 그룹당, n = 4)의 그래핀 양자점-비오틴 농도를 측정하였다. 도 13l에 나타난 바와 같이, 비오틴화된 그래핀 양자점의 주사 횟수가 증가될수록 체내에 남아있는 그래핀 양자점 또한 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [300] 도 13m은 그래핀 양자점-비오틴 2 mg/kg을 1 회 복강 주사한 후 1 시간, 7 일, 14 일 후에 (각 그룹당, n = 4) 뇌 (녹색 바)와 혈장 (청색 바)에서의 농도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 또한, 도 13n은 격주로 다회 주사한 후 3 개월 및 6 개월 후 뇌 (녹색 바)와 혈장 (청색 바)에서의 농도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 13m 및 13n에 나타난 바와 같이, 1회 주사한 경우에도 14일 동안 체내에 그래핀 양자점이 남아있는 것을 확인할 수 있었으며, 다회 접종한 경우에는 6 개월까지도 그래핀 양자점이 남아있는 것을 확인할 수 있었다.
- [301]
- [302] 상기 결과를 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 모두 혈뇌장벽을 효과적으로 투과할 수 있을 뿐만 아니라, 체내에 장기간 남아있는

것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점을 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환에 대한 높은 치료 효과를 나타낼 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[303]

[304] **14. 흑질 (SN)에서 α -syn PFFs-유도된 신경교세포 활성화에 대한 그래핀 양자점의 영향**

[305] 도 14a는 저배율 및 고배율의 SN에서 Iba-1에 대한 대표적인 면역조직화학 염색을 실시한 이미지이다. α -syn PFFs가 주입된 SN 반구에 속하는 마이크로글리아를 특이적 마커인 Iba-1 (이온화 칼슘 결합 단백질, 마이크로글리아/매크로파지의 특이적 마커)으로 염색하였다. 그리고 도 14b는 염색된 Iba-1-양성 마이크로글리아를 정량화한 그래프이다 (n = 5). 도 14a 및 14b에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs에 의하여 증가된 Iba-1-양성 마이크로글리아가 그래핀 양자점에 의하여 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[306]

도 14c는 저배율 및 고배율의 SN에서 GFAP에 대한 대표적인 면역조직화학을 검사한 이미지이다. α -syn PFFs가 주입된 반구의 SN에서 정상세포를 GFAP (glial fibrillary acidic protein; 정상세포의 특이적 마커) 항체로 염색하였다. 그리고 도 14d는 염색된 GFAP 강도를 정량화한 그래프이다. GFAP 강도는 PBS 주입 대조군 (각 그룹당 n = 5)에 대하여 표준화되었다 (* P < 0.05; NS, 유의하지 않음; post-hoc Bonferroni 테스트를 사용하는 2-way ANOVA, 에러 막대는 표준 편차). 도 14c 및 14d에 나타난 바와 같이, α -syn PFFs에 의하여 증가된 정상세포가 그래핀 양자점에 의하여 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[307]

[308] 상기 결과들을 통하여, α -syn PFFs에 의하여 증가되는 신경 염증세포가 그래핀 양자점에 의하여 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[309]

[310] **15. hA53T α -syn 형질전환 마우스의 뇌간에서 교질세포 활성화에 대한 그래핀 양자점의 효과**

[311] 본 발명의 그래핀 양자점이 뇌간에서 교질세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, hA53T α -syn Tg 마우스의 뇌간의 청반 (locus coeruleus; LC)을 이용하여 실험을 진행하였다.

[312]

도 15a는 저배율 및 고배율의 뇌간의 LC에서 마이크로글리아의 면역조직화학법으로 염색한 이미지와 염색된 Iba-1-양성 마이크로글리아를 정량화한 그래프이다 (각 그룹은 n = 5, *P < 0.05; **P < 0.01; NS는 유의하지 않음, post-hoc Bonferroni 테스트를 사용하는 2-way ANOVA, 에러 막대는 표준 편차). nTg 또는 hA53T α -syn Tg의 뇌간에서의 마이크로글리아는 Iba-1로 염색되었다. 도 15a에 나타난 바와 같이, hA53T α -syn Tg 마우스에서 증가된 Iba-1-양성 마이크로글리아가 그래핀 양자점을 투여함으로써 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

- [313] 도 15b는 저배율 및 고배율의 뇌간에서 GFAP를 면역조직화학법으로 염색한 이미지와 염색된 GFAP를 정량화한 그래프이다. 상대 GFAP 강도는 PBS 주입 대조군 (n = 5, 각 그룹)에 대하여 표준화하였다. 도 15b에 나타난 바와 같이, hA53T α -syn Tg 마우스에서 증가된 GFAP가 그래핀 양자점을 투여함으로써 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [314] 도 15c는 hA53T α -syn 과발현을 갖는 HEK293 세포에서 α -syn 응집체 형성에 대한 GQDs의 효과를 확인한 이미지와 필드당 면역 양성 응집체의 수를 정량화하고 표준화 (n = 7, **P<0.01, 에러 막대는 표준 편차)한 그래프이다. HEK293T 세포에 pCMV5-myc-A53T α -syn을 도입하고 시험군에 그래핀 양자점 (0.1 μ g/ml)을 처리하였다. 그래핀 양자점을 처리하고 48 시간 후에, 세포를 α -syn 항체로 면역염색하였다. 백색 화살표는 α -syn 응집체를 의미한다. 도 15c에 나타난 바와 같이, α -syn 응집체의 형성이 그래핀 양자점에 의하여 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [315]
- [316] **16. 그래핀 양자점의 장기간 시험관 내 (in vitro) 및 생체 내 (in vivo) 독성 검사**
- [317] 도 16a는 alamarBlue 및 LDH 분석법으로 7 일간 배양한 DIV 10 대뇌피질 신경세포에서 그래핀 양자점의 세포 독성을 측정된 그래프이다 (n = 4, 각 시점, NS는 유의하지 않음, post-hoc Bonferroni 테스트를 사용하는 1-way ANOVA, 에러 막대는 표준 편차). 도 16a에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점은 장기간 배양 시에도 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [318] 도 16b는 그래핀 양자점이 주입된 생쥐의 생존 곡선을 나타낸 그래프이다. 50 μ g의 그래핀 양자점 또는 비히클을 C57BL/6 마우스에 6 개월간 복강 주사하고 그래핀 양자점의 생체 내 독성을 모니터링하였다 (각 그룹당 n = 20). 통계적으로 8 개월 후에 그래핀 양자점과 비히클 주입 대조군 간에 유의한 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [319] 도 16c는 주요 기관을 haematoxylin 및 eosin (H&E)으로 염색한 이미지이다. 도 16c에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점이 주요 기관에 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [320] 도 16d는 그래핀 양자점-비오틴의 생체 내 추적을 위한 주입 및 샘플링 방법의 계획 모식도이고, 도 16e는 뇌 (적색) 또는 소변 (청색)에서 시간에 따른 그래핀 양자점-비오틴의 농도를 측정된 그래프이다. 50 μ g의 그래핀 양자점-비오틴을 C57BL/6 마우스에 복강 주사하고, 다양한 시점 (1, 3, 7 및 14 일)에서 측정하였다. 도 16e에 나타난 바와 같이, 비오틴화된 그래핀 양자점이 소변을 통하여 배출되어, 체내에서의 농도가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [321]
- [322] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 그래핀 양자점은 체내에서 독성을 나타내지 않으며, 주사한 후 시간이 흐르면 소변을 통하여 안정적으로 배출되는 것을 확인할 수 있었다.

[323]

[324] **17. α -syn PFFs에 대한 nano-GOs와 rGQDs의 비교**

[325] 도 17a는 기능적 그룹에 대한 지정된 피크를 갖는 원시 그래핀 양자점 (흑색), nano-GOs (나노 그래핀 옥사이드, 녹색) 및 환원 GQDs (rGQDs, 자색)의 FT-IR 스펙트럼을 나타내는 그래프이다. 그리고 도 17b는 대표적인 라인 프로파일을 갖는 nano-GOs 및 그래핀 양자점의 AFM 이미지이다. 도 17b에 나타난 바와 같이, nano-GOs는 평균 5 nm 정도의 높이를 나타내나, 그래핀 양자점의 경우에는 0.1 내지 3 nm의 높이를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[326] 도 17c는 각각의 물질 20 μ g/ml을 세포에 처리하고, 72 시간 동안 배양한 후 세포 독성을 정량화한 그래프이다 (각 그룹당 n = 3, **P<0.01, Student 's t-test, 오차 막대는 표준 편차). 도 17c에 나타난 바와 같이, 환원 그래핀 양자점과 nano-GOs의 경우에는 세포 독성을 나타내나, 그래핀 양자점의 경우에는 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[327] 도 17d는 각각의 물질 (1, 10 및 20 μ g/ml)을 다양한 농도로 처리한 후, 12, 24 및 72 시간에 alarmerBlue 분석을 사용하여 SH-SY5Y 세포에서의 세포 독성을 모니터링한 그래프이다. 도 17d에 나타난 바와 같이, 환원 그래핀 양자점과 nano-GOs의 경우에는 세포 독성을 나타내나, 그래핀 양자점의 경우에는 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[328] 도 17e는 dot blot으로 평가한 그래핀 양자점, nano-GOs 및 rGQDs의 α -syn PFFs분해 효과를 비교한 이미지이다. 도 17e에 나타난 바와 같이, 환원 그래핀 양자점과 nano-GOs의 경우에는 α -syn PFFs를 분해하는 효과가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

[329] 그리고 도 17f는 ThT 및 탁도 분석을 나타낸 그래프이다 (각 그룹당 n = 4, ***P <0.001; NS, 유의하지 않음, post-hoc Bonferroni 테스트에서 1-way ANOVA, 오차 막대는 표준 편차). 도 17f에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점의 경우에는 α -syn PFFs를 효과적으로 분해하여 탁도 및 형광값이 감소되나, 환원 그래핀 양자점과 nano-GOs의 경우에는 α -syn PFFs를 분해하지 못하는 것을 확인할 수 있었다.

[330] 도 17g는 각각의 물질 5 mg/ml을 α -syn PFFs과 함께 처리하고, 7일 동안 반응시킨 후에 획득된 TEM 이미지이다. 도 17g에 나타난 바와 같이, 환원 그래핀 양자점과 nano-GOs의 경우에는 α -syn PFFs를 분해하지 못하는 것을 확인할 수 있었다.

[331] 도 17h는 혈뇌장벽 투과성 체외 실험을 통하여 그래핀 양자점, nano-GOs 및 rGQDs의 체외 혈뇌장벽 투과성을 측정된 그래프이다. 도 17h에 나타난 바와 같이, 그래핀 양자점과 환원 그래핀 양자점의 경우에는 혈뇌장벽을 통과하나, nano-GOs의 경우에는 통과율이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[332]

[333] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지

않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

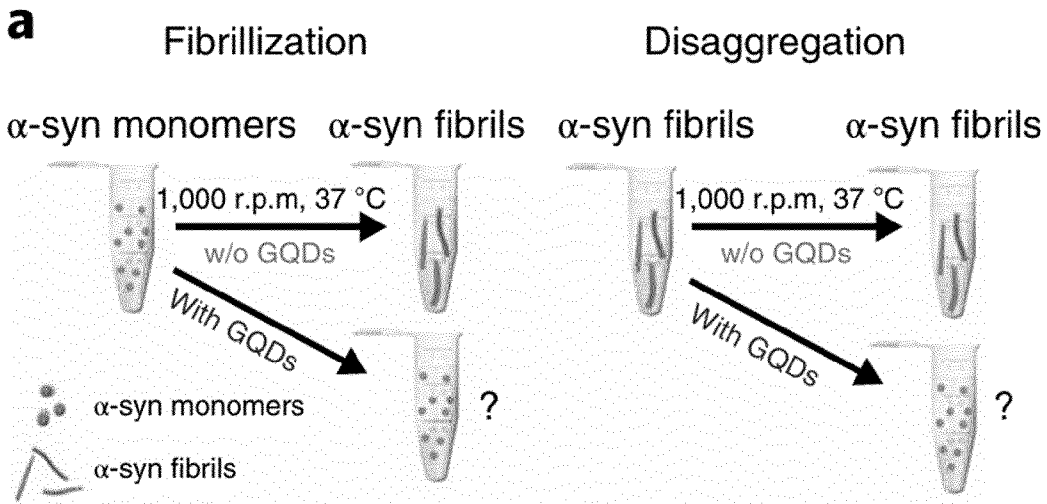
- [334] 본 발명의 그래핀 양자점은 세포 독성이 없으며, α -syn 피브릴 형성을 억제하거나 이미 형성된 α -syn 피브릴을 분해할 수 있고 혈뇌장벽을 통과하는 작용 효과를 나타내므로, 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 다양한 질환의 치료제로서 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

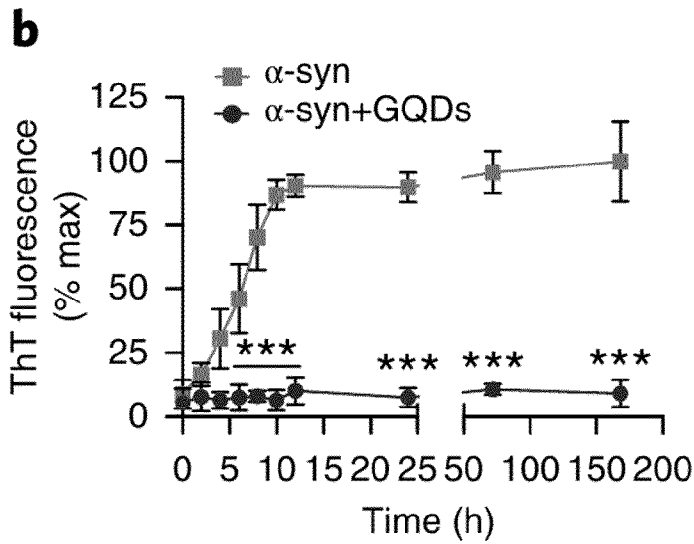
- [청구항 1] 표면이 음전하를 나타내고,
평균 직경이 0.5 내지 10 nm 이며 평균 높이가 0.1 내지 3 nm 이고,
탄소와 산소의 wt% 비율이 4.0 내지 6.5 : 3.0 내지 6.0의 비율로 구성된
것인, 그래핀 양자점.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 그래핀 양자점은 말단 작용기로 카르복실기를 포함하는 것인,
그래핀 양자점.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 말단 작용기는 FT-IR 스펙트럼에서 카르복실기의 -C=O 피크 및
방향족 -C=C- 피크의 흡광도 비율이 1:1 이상인, 그래핀 양자점.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 흡광도 비율이 1:1 내지 2:1 인, 그래핀 양자점.
- [청구항 5] 제 3 항에 있어서,
상기 -C=O 피크는 1700 내지 1750 cm^{-1} 에서 나타나고 상기 방향족 -C=C-
피크는 1600 내지 1650 cm^{-1} 에서 나타나는 것인, 그래핀 양자점.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 평균 직경이 1 내지 5 nm 인, 그래핀 양자점.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 평균 높이가 0.5 내지 2.5 nm 인, 그래핀 양자점.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 그래핀 양자점은 α -syn 피브릴화를 억제하거나 또는 α -syn 피브릴을
분해하는 것인, 그래핀 양자점.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 그래핀 양자점은 혈뇌장벽(BBB)을 통과하는 것인, 그래핀 양자점.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 그래핀 양자점은 체내 독성이 없는 것인, 그래핀 양자점.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 항에 따른 그래핀 양자점을
유효성분으로 포함하는, 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과
관련된 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환은 퇴행성
신경 질환, 염증성 질환 또는 대사성 질환인, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 퇴행성 신경 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병,
치매, 뇌졸중, 아밀로이드증, 섬유증, 뇌병증 및 다발성 경화증으로
이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

- [청구항 14] 제 12 항에 있어서,
 상기 염증성 질환은 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨병, 제1형 당뇨, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guilian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제 12 항에 있어서,
 상기 대사성 질환은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 이상지질혈증 및 비알코올성 지방간으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 항에 따른 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 17] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 항에 따른 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 조성물의 신경단백질의 비정상적 섬유화 또는 응집과 관련된 질환들의 예방 또는 치료 용도.

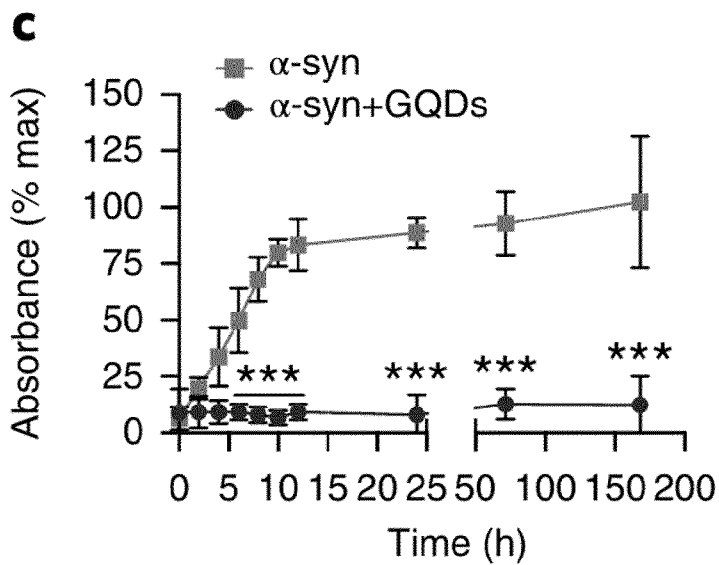
[도 1a]



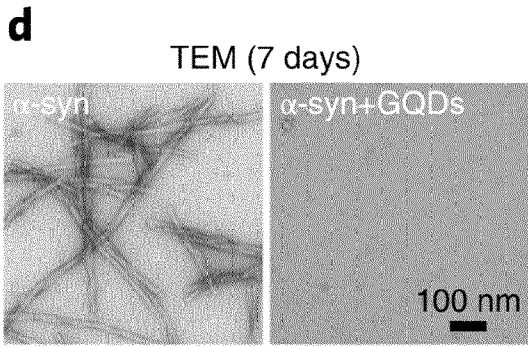
[도 1b]



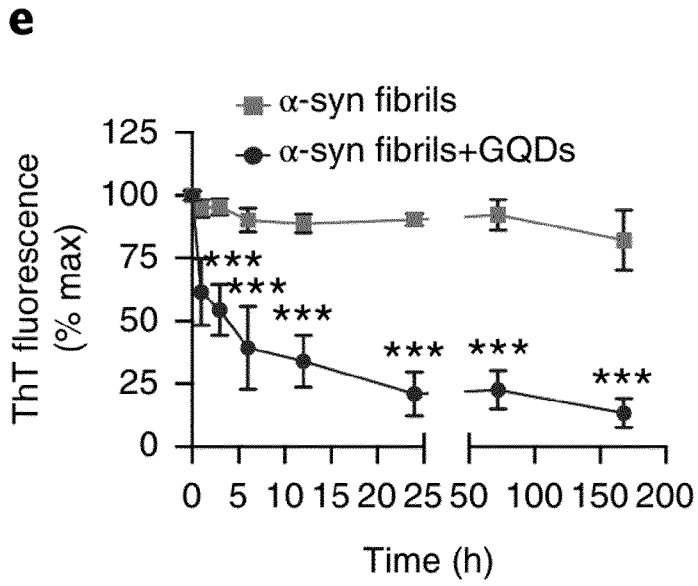
[도 1c]



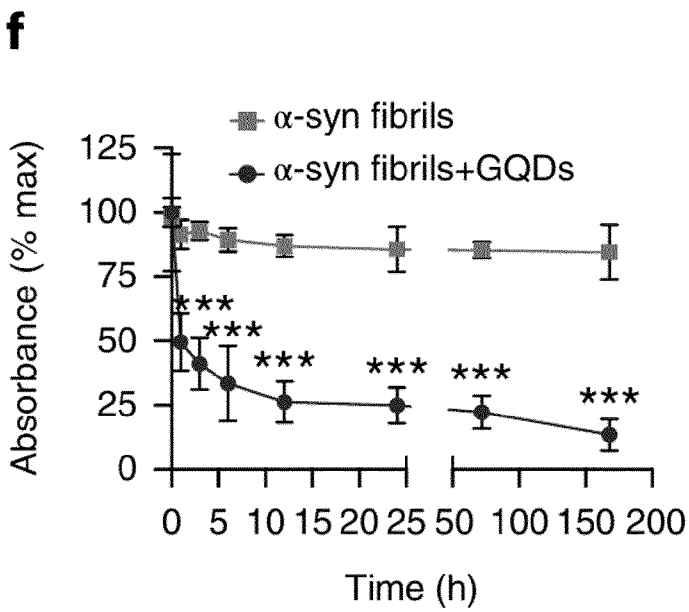
[도 1d]



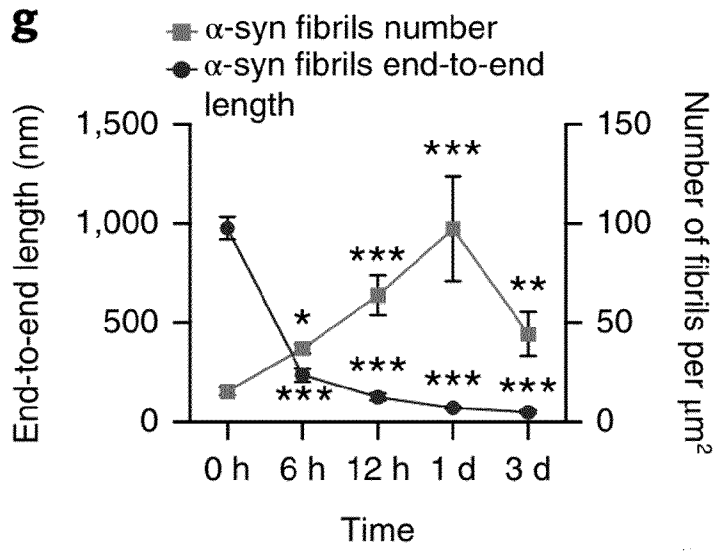
[도 1e]



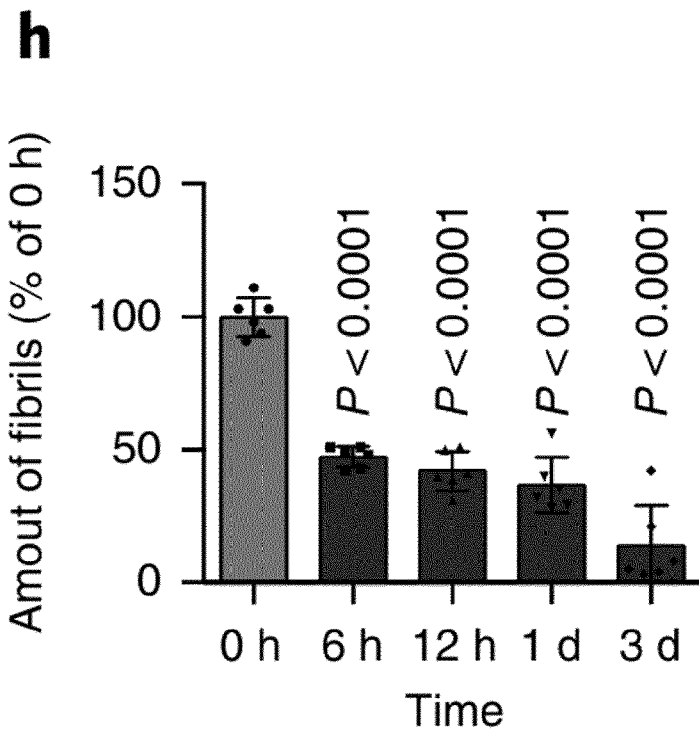
[도 1f]



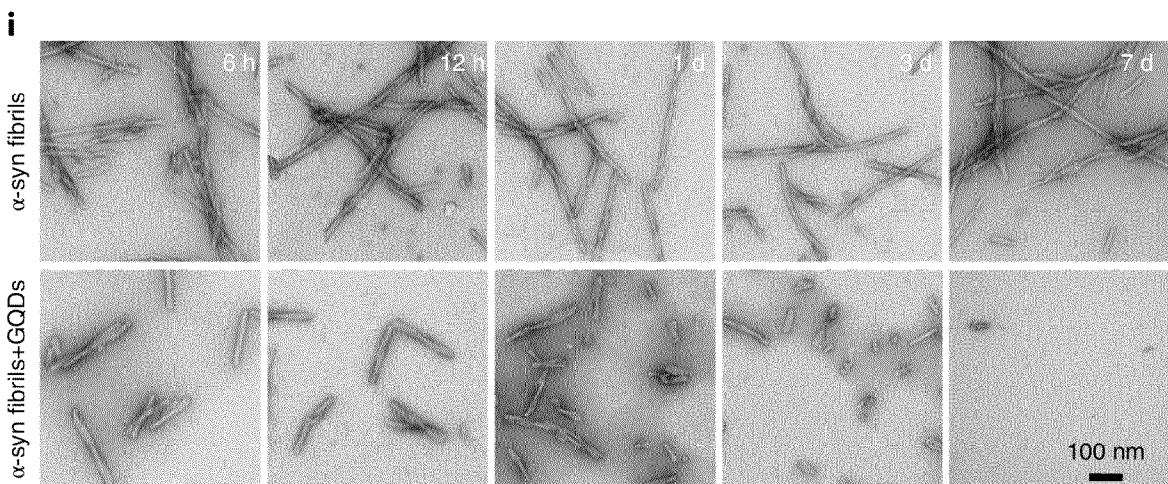
[도 1g]



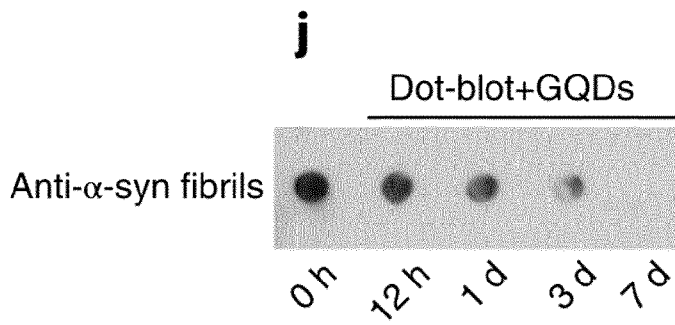
[도 1h]



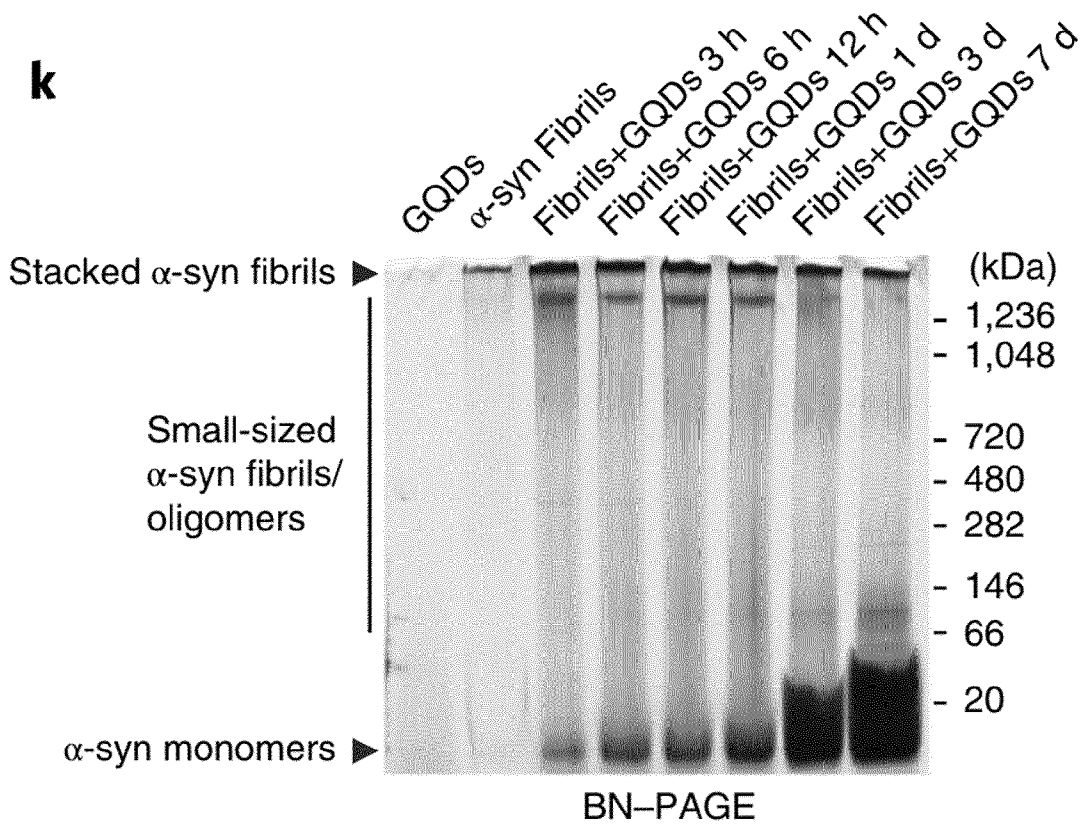
[도 1i]



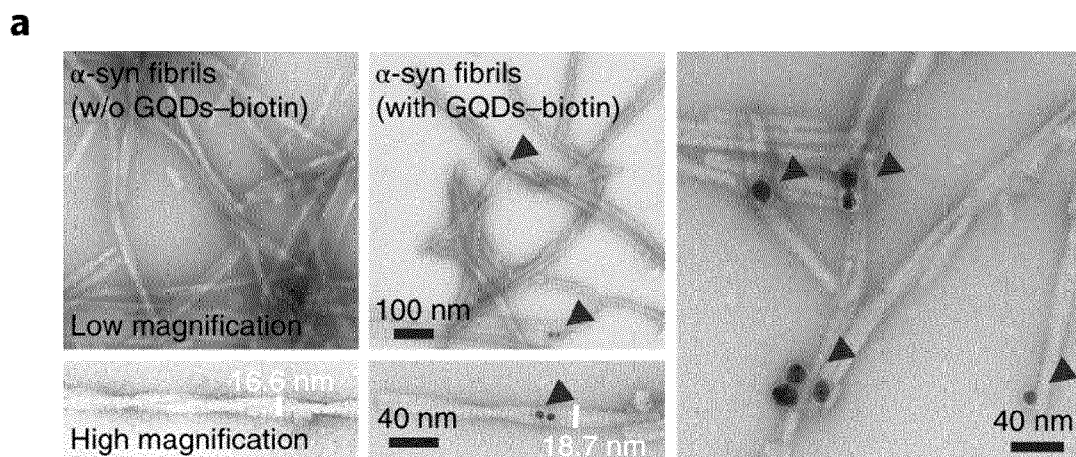
[도 1j]



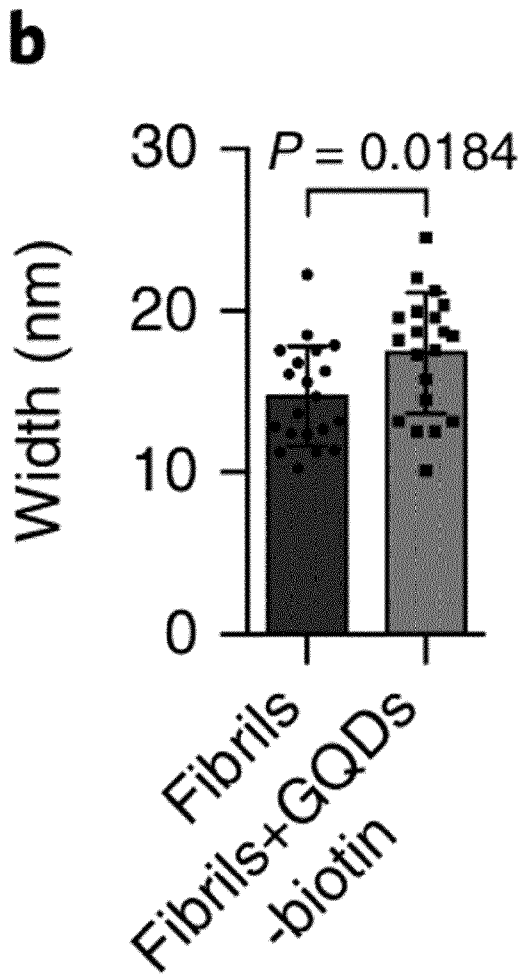
[도 1k]



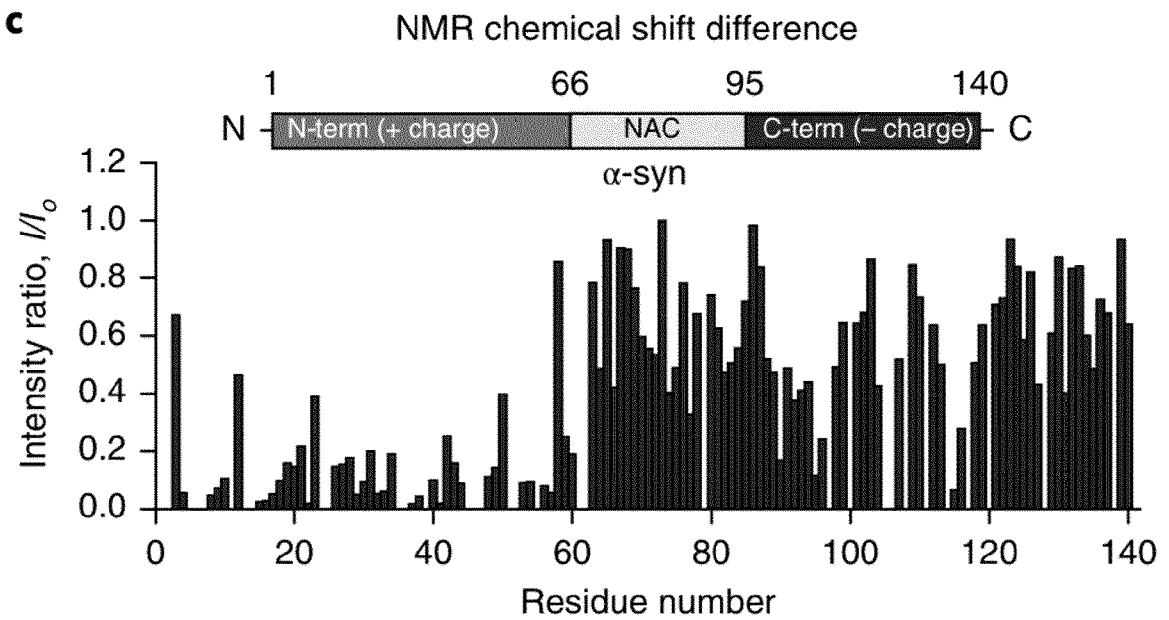
[도 2a]



[도2b]

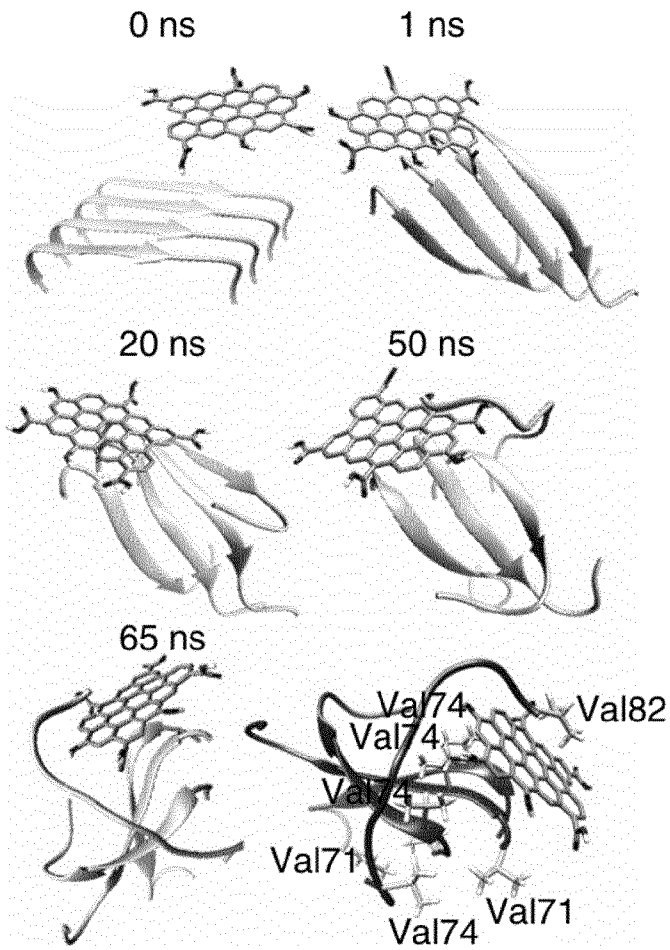


[도2c]

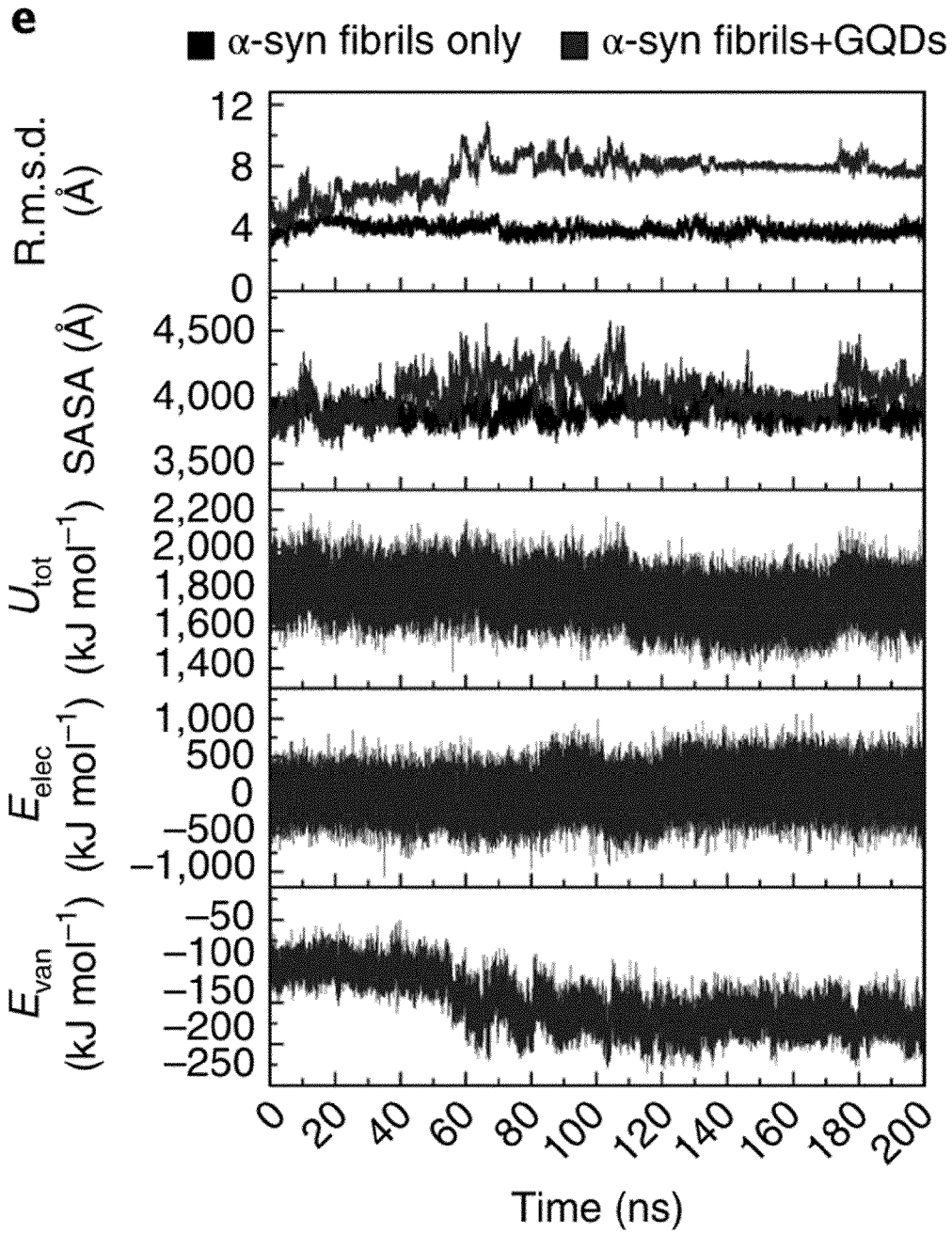


[도2d]

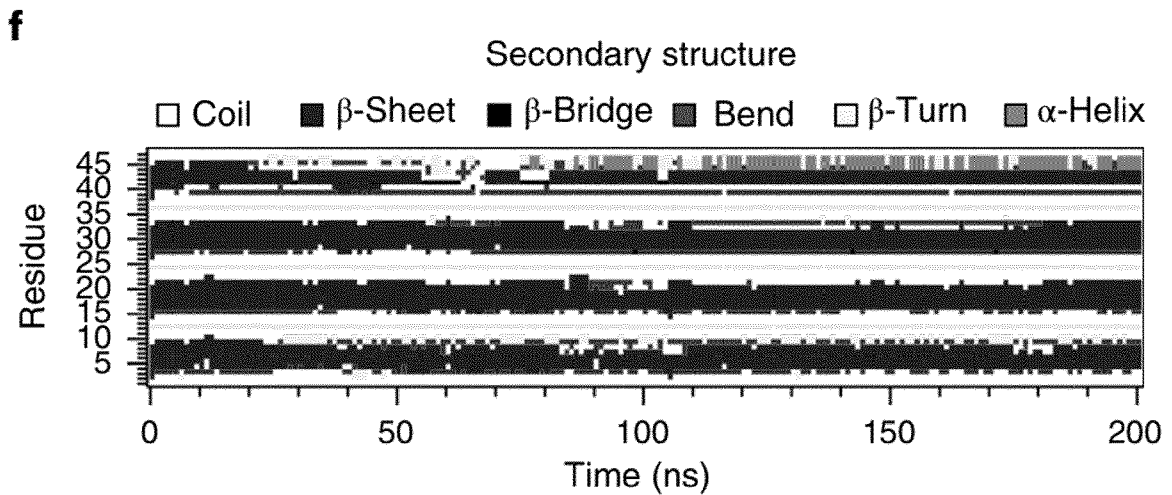
d



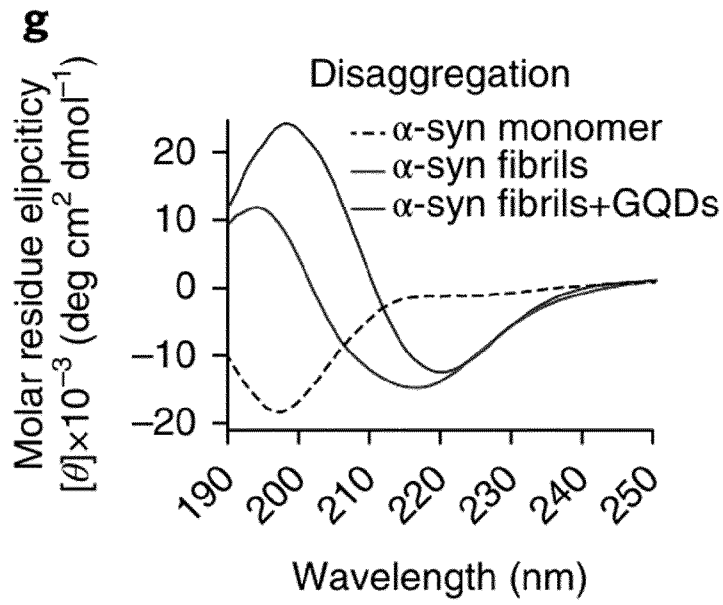
[도2e]



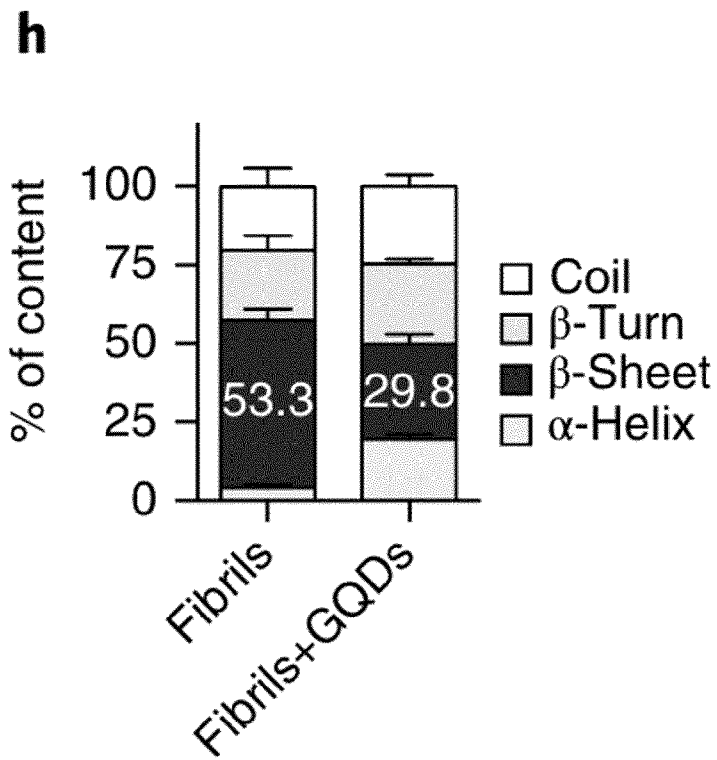
[도2f]



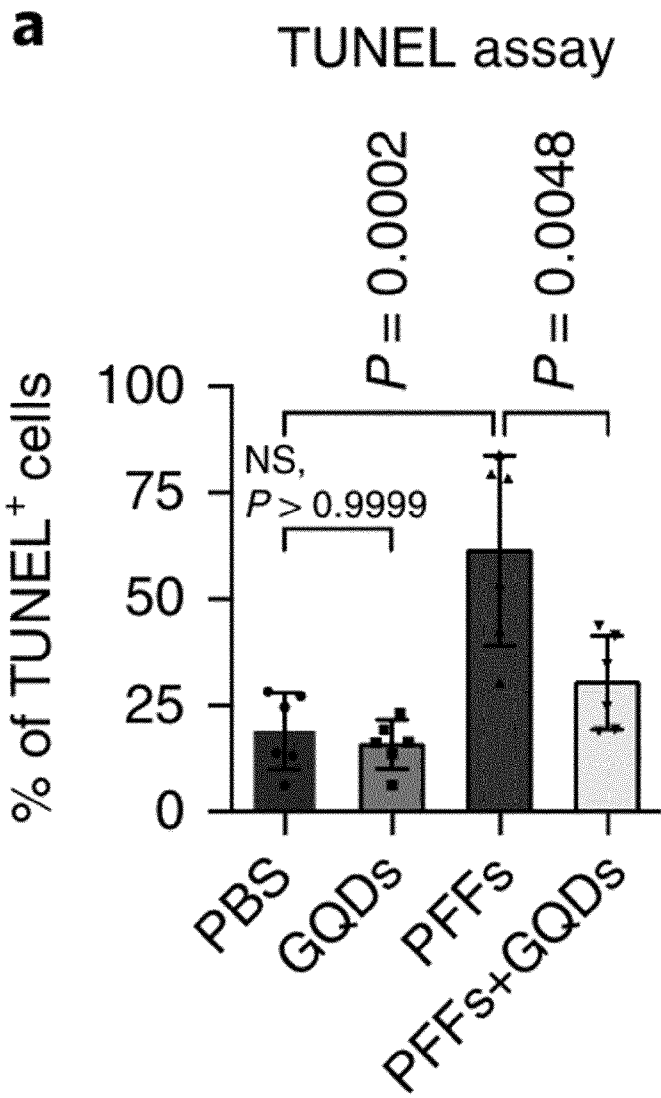
[도2g]



[도2h]



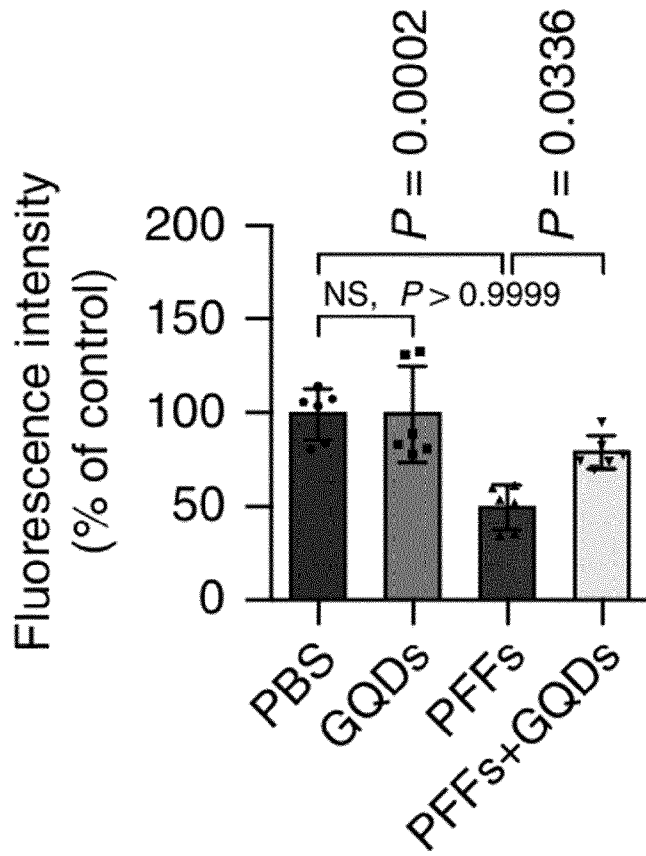
[도3a]



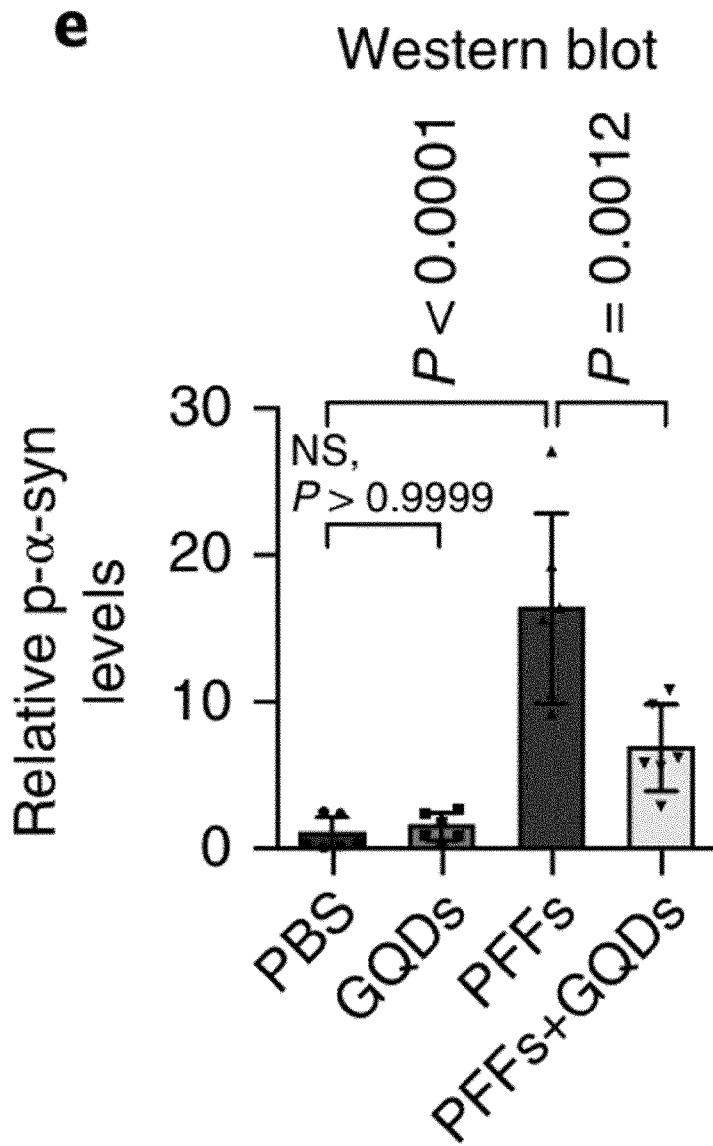
[도3b]

b

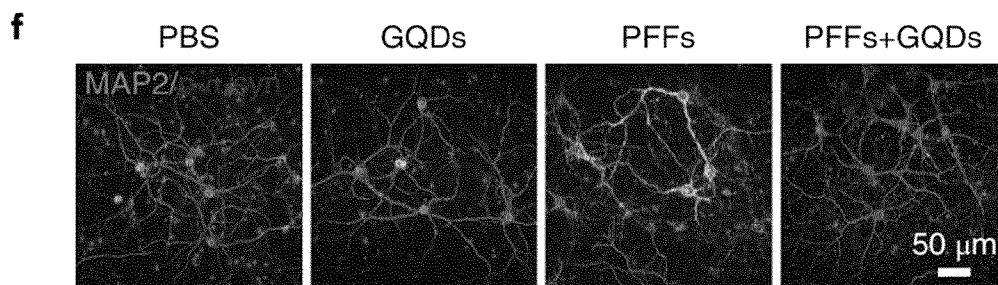
AlamarBlue assay



[도3e]



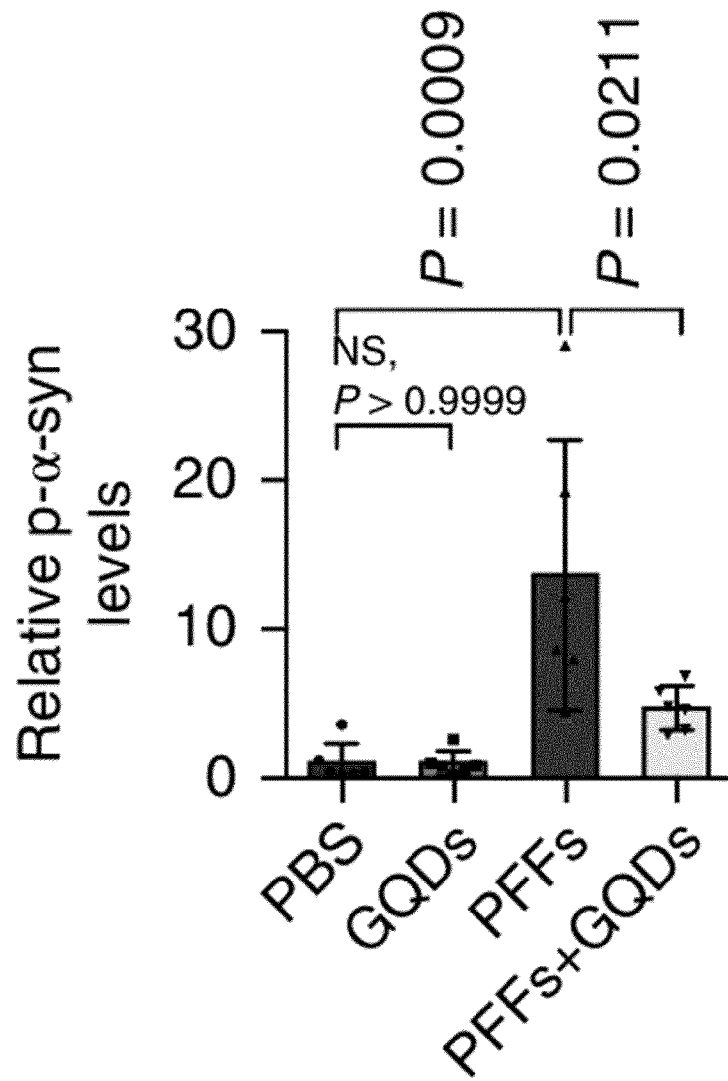
[도3f]



[도3g]

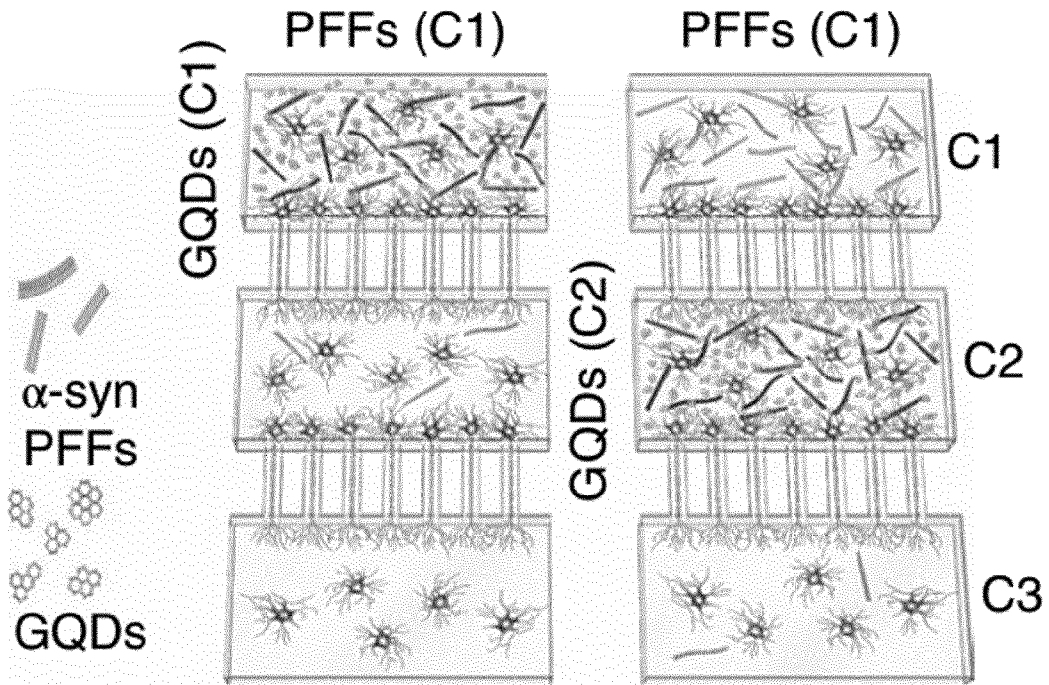
gg

Immunostaining



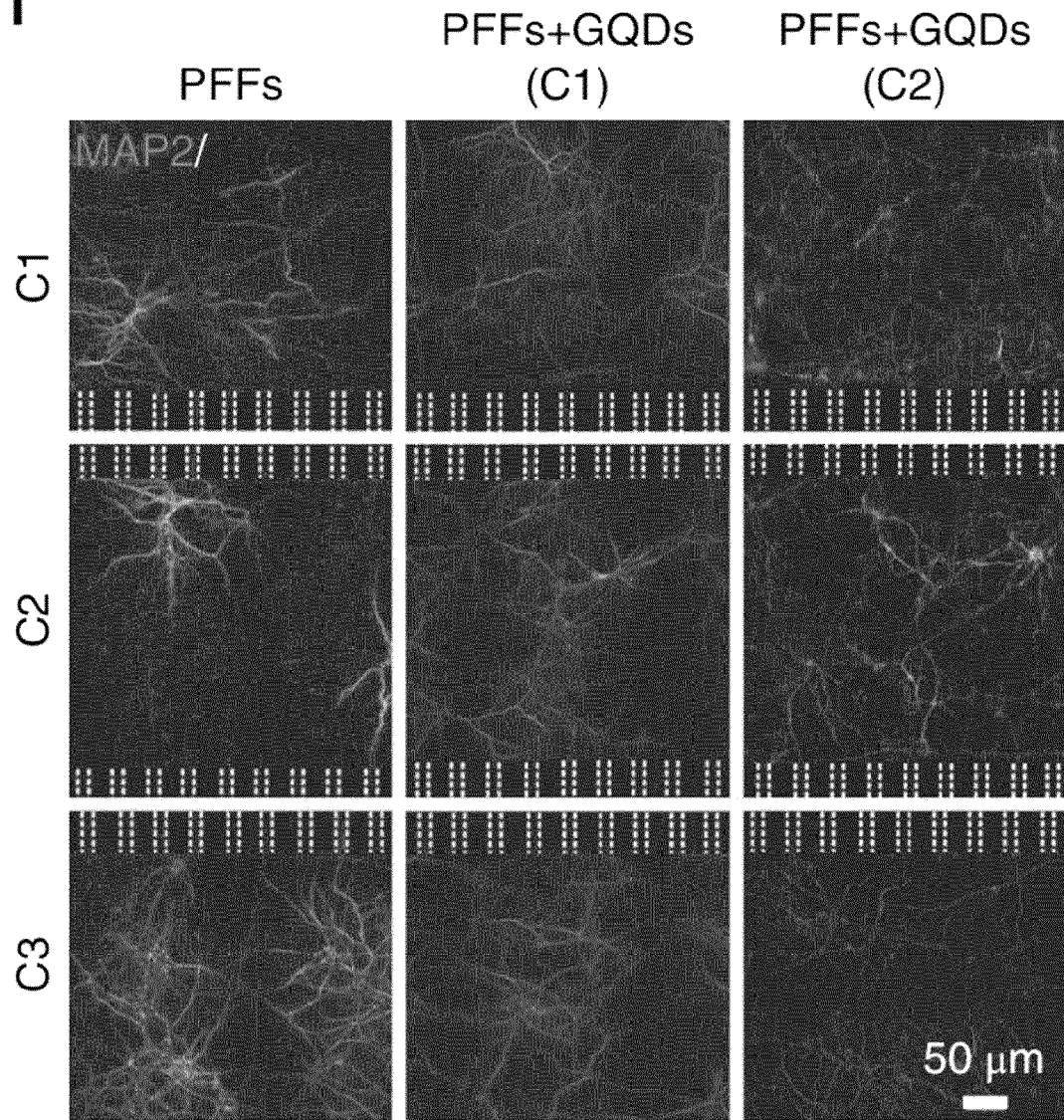
[도3h]

h



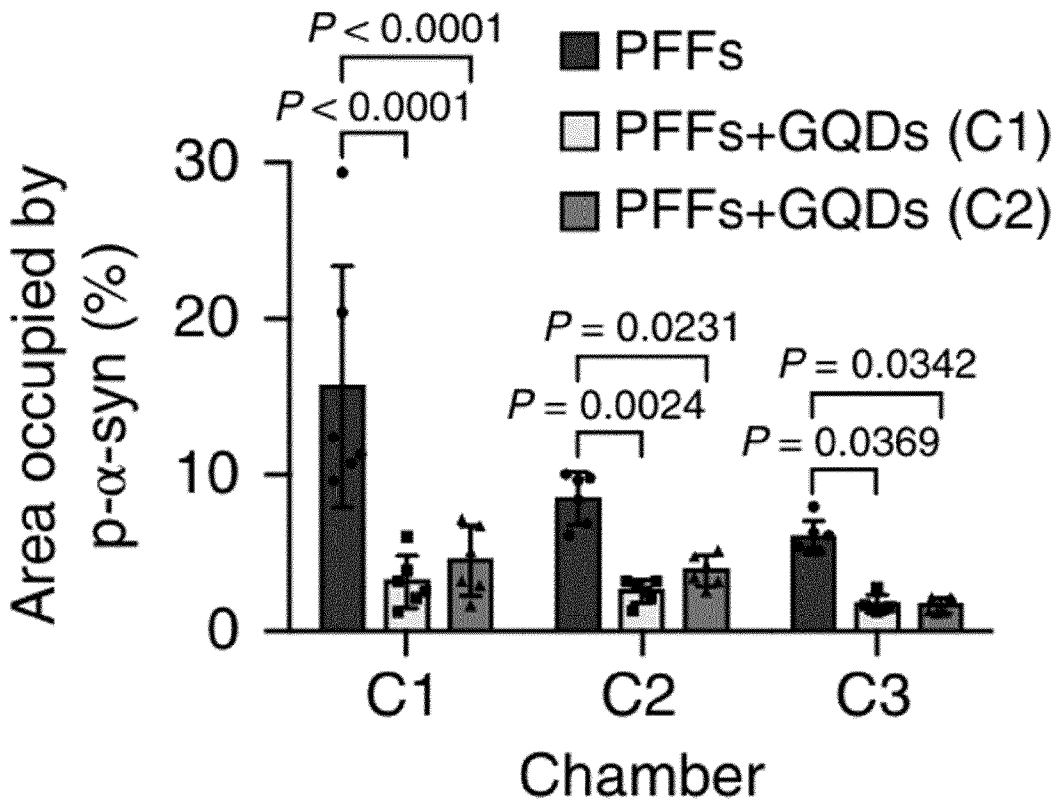
[도3i]

i



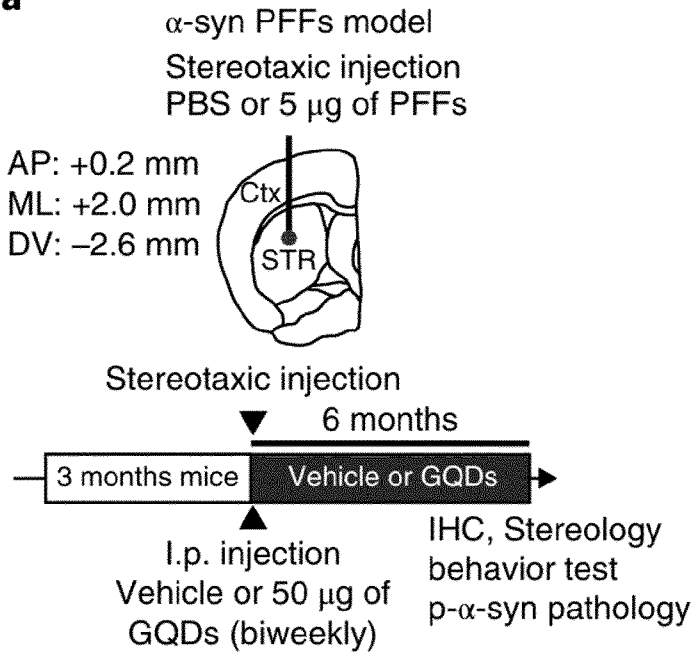
[도3j]

j



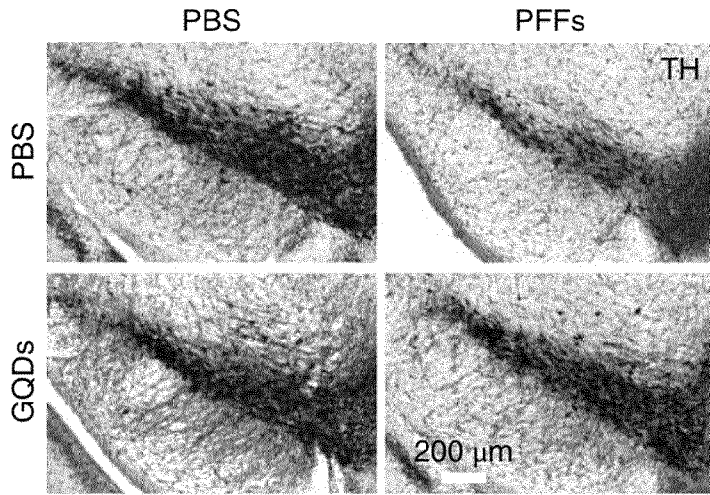
[도4a]

a



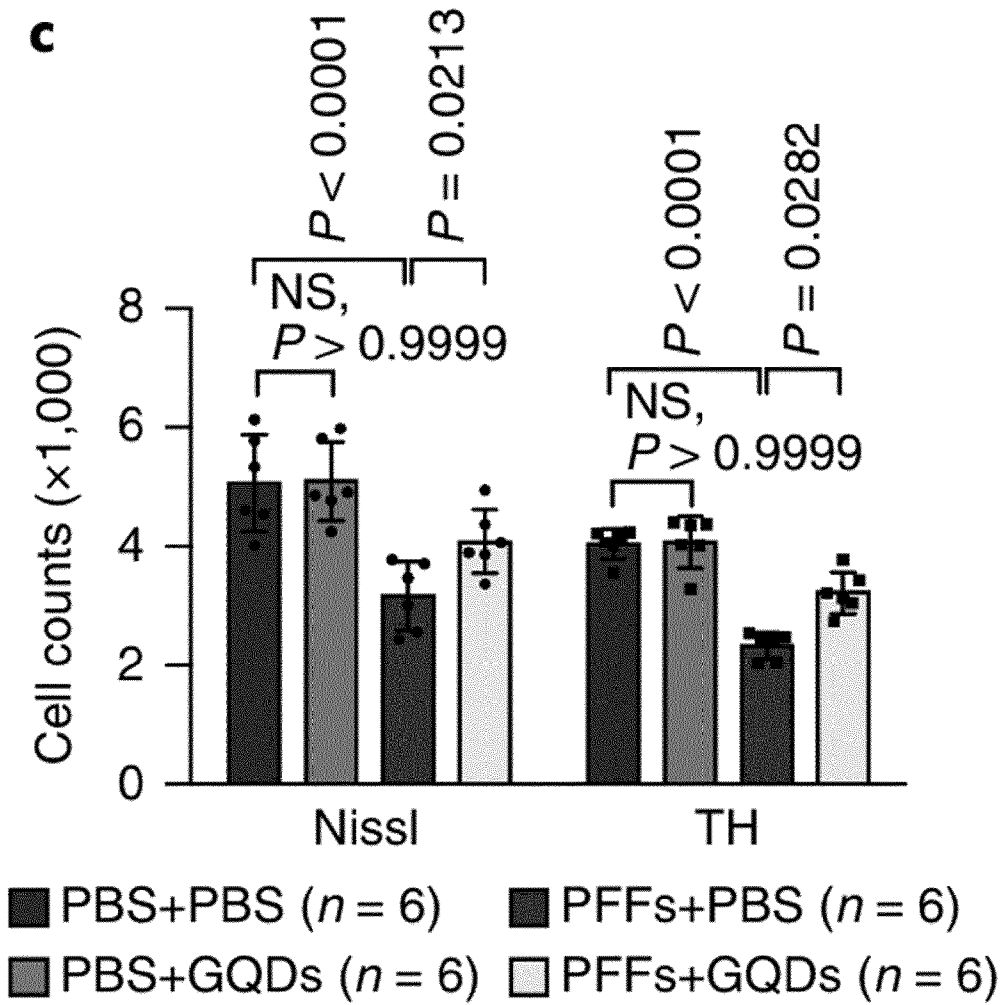
[도4b]

b



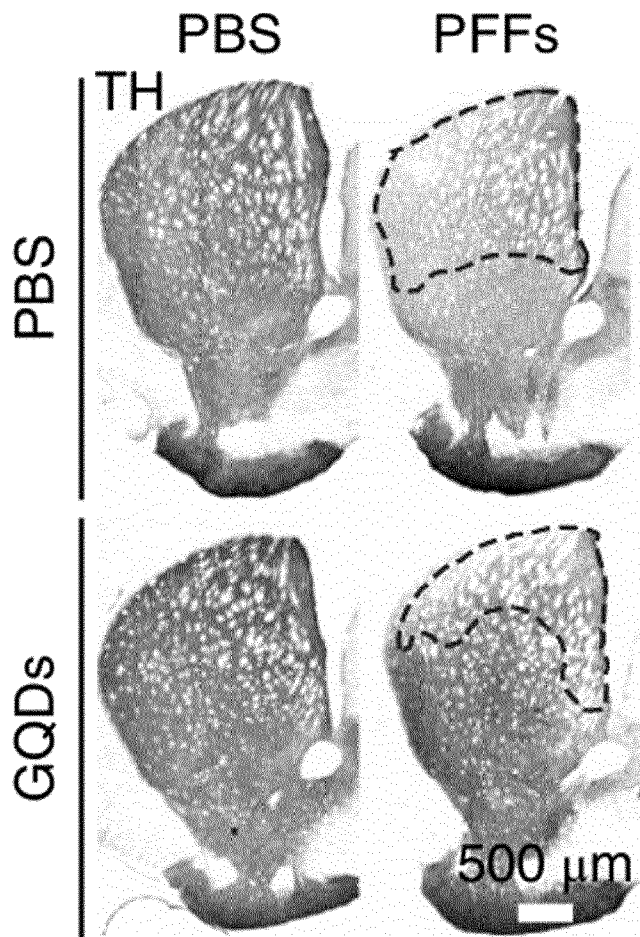
[도4c]

c

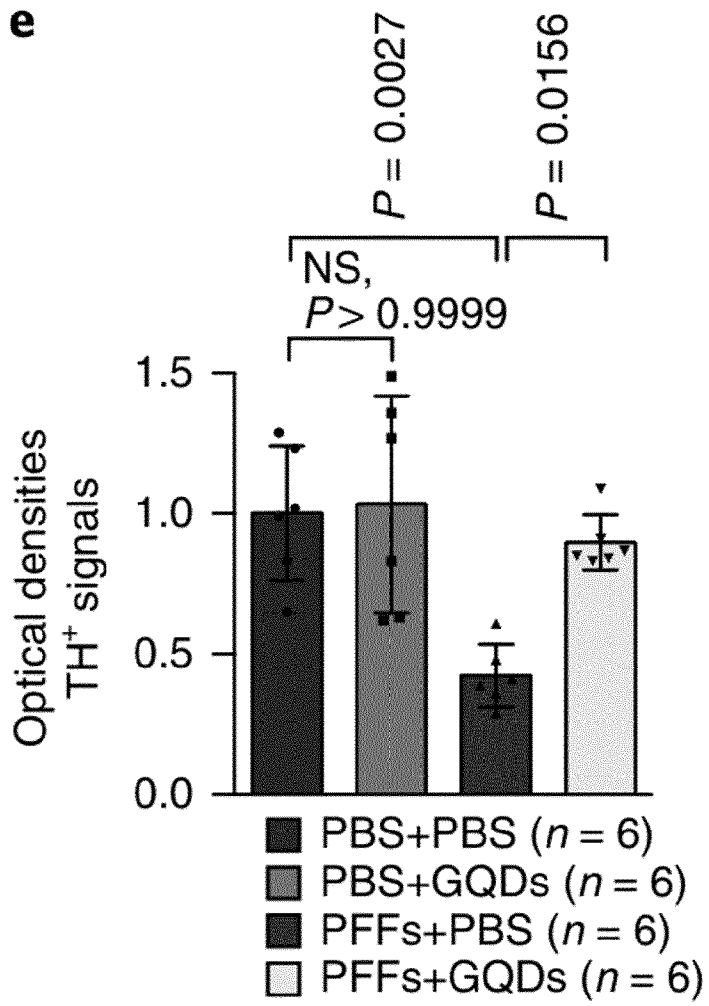


[도4d]

d

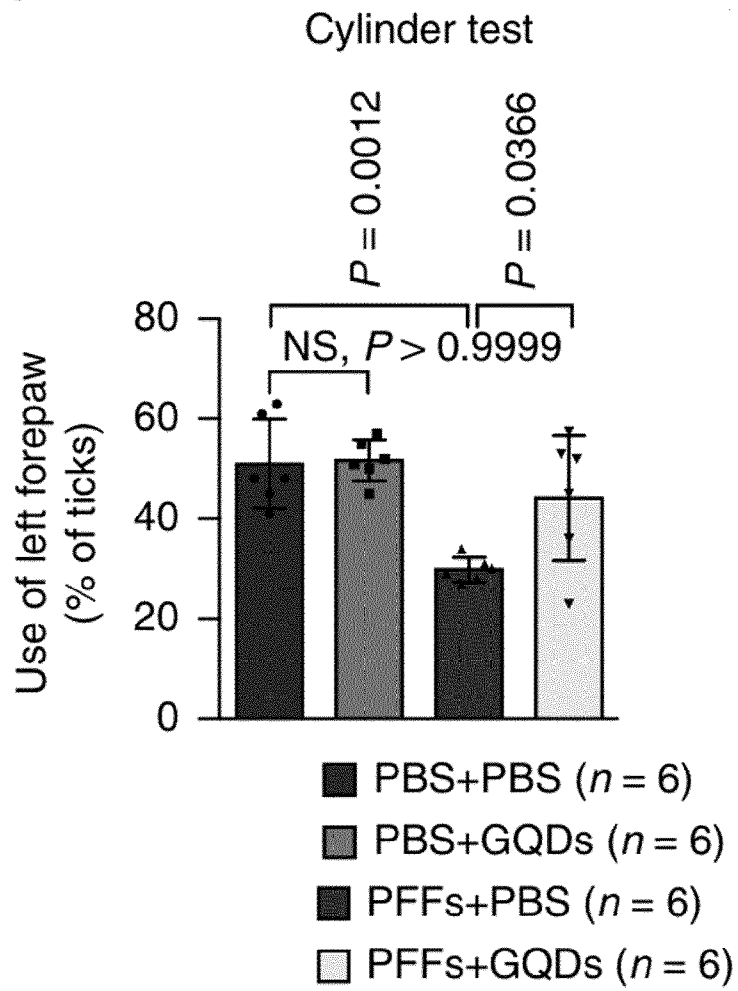


[도4e]



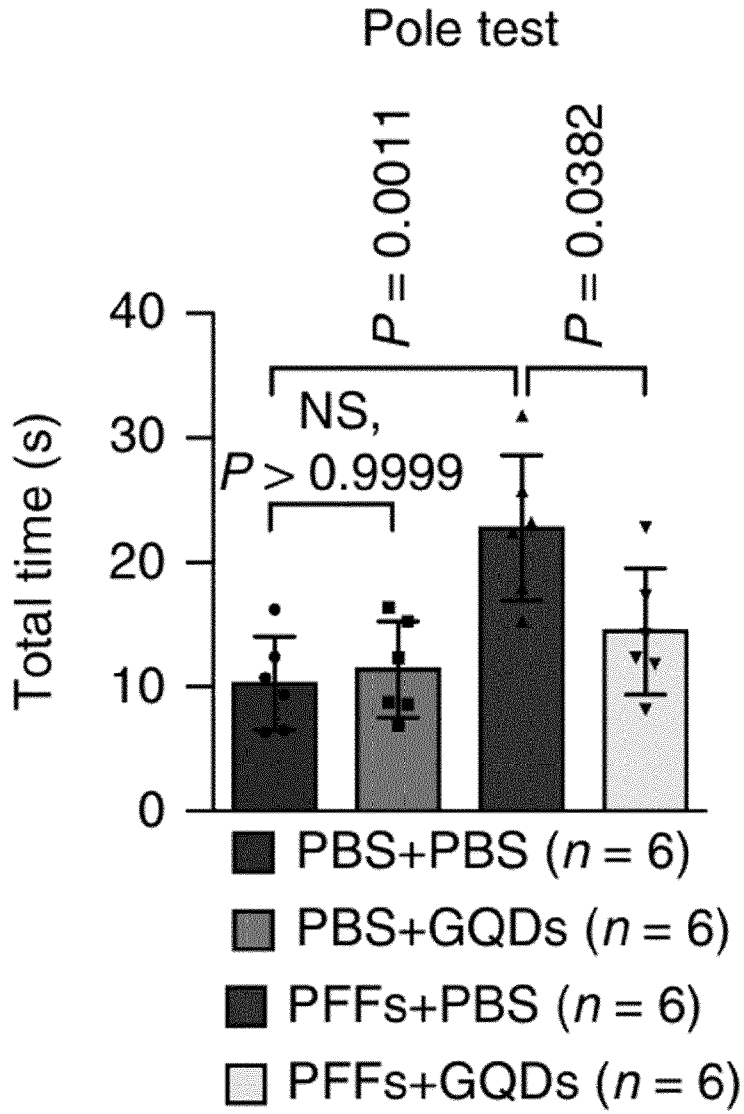
[도4f]

f



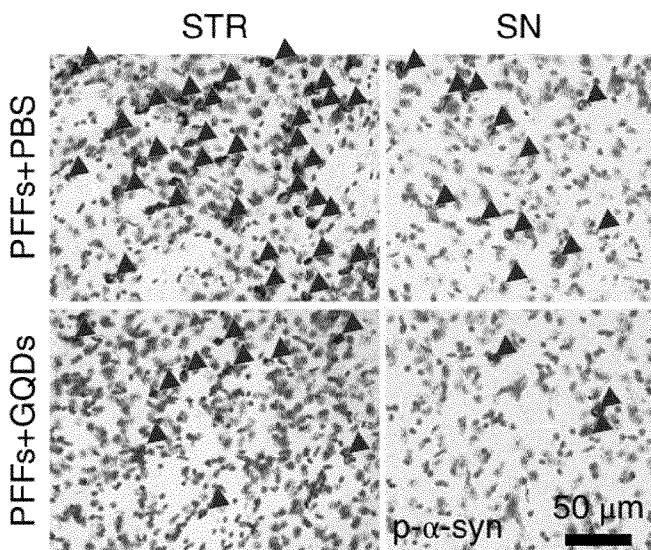
[도4g]

g

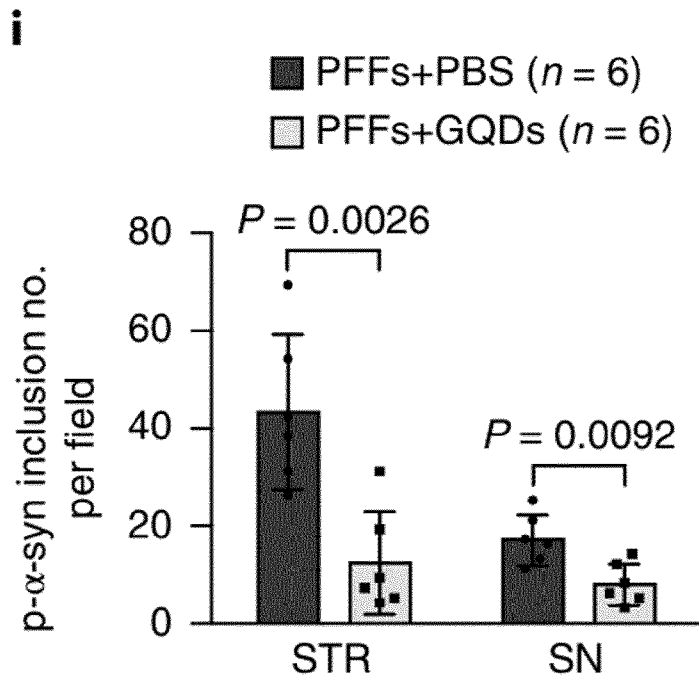


[도4h]

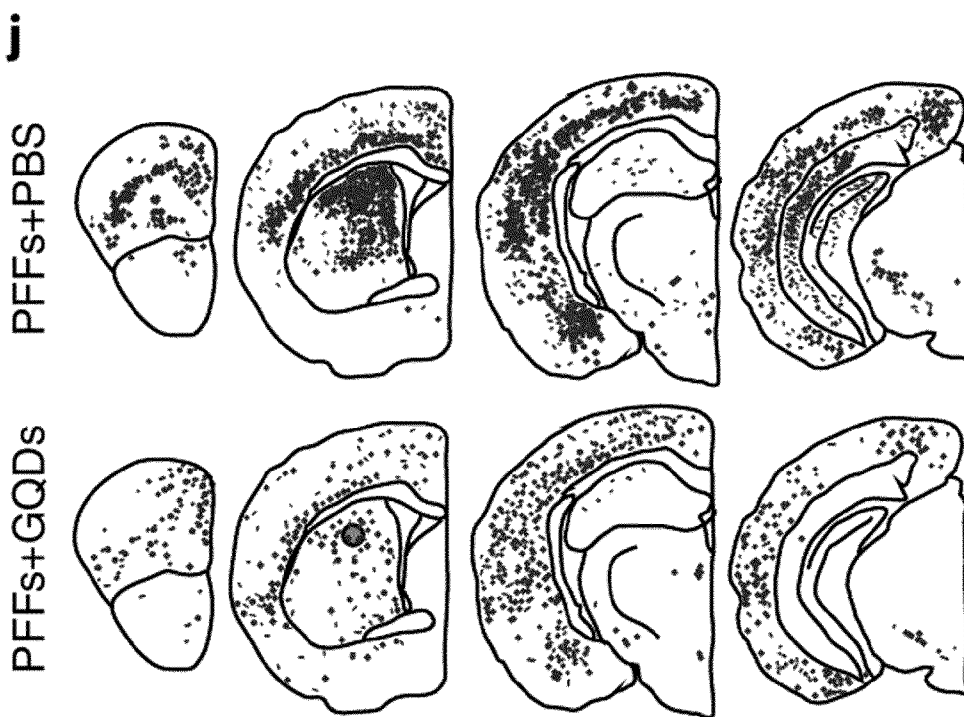
h



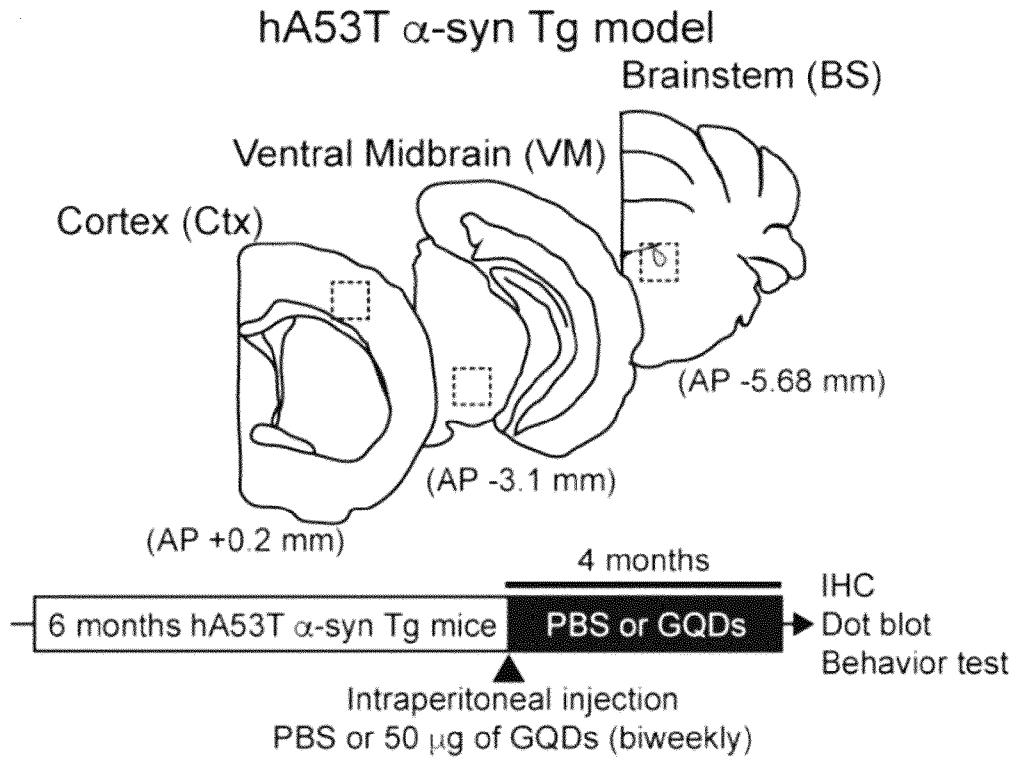
[도4i]



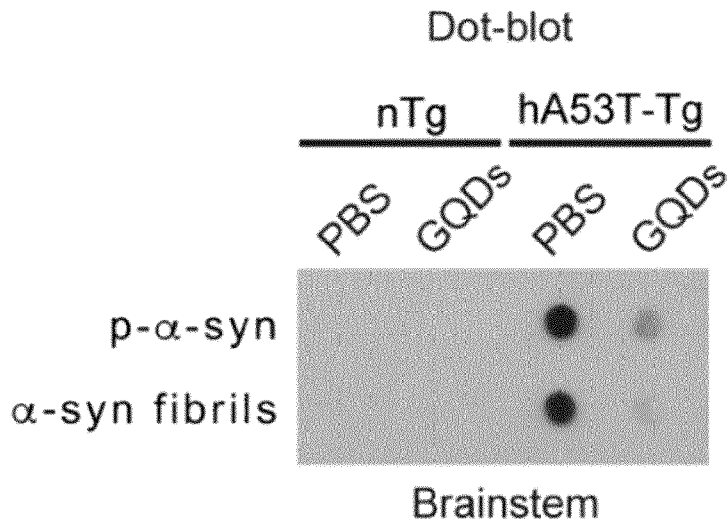
[도4j]



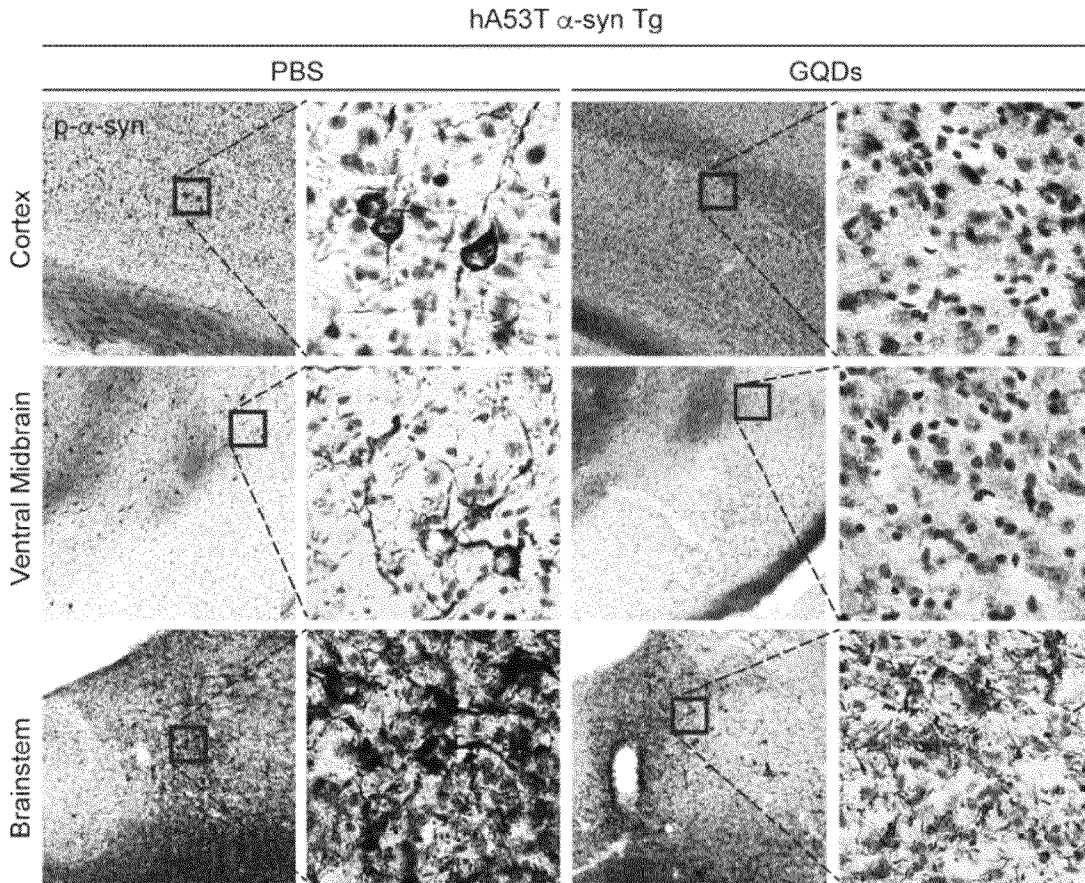
[도4k]



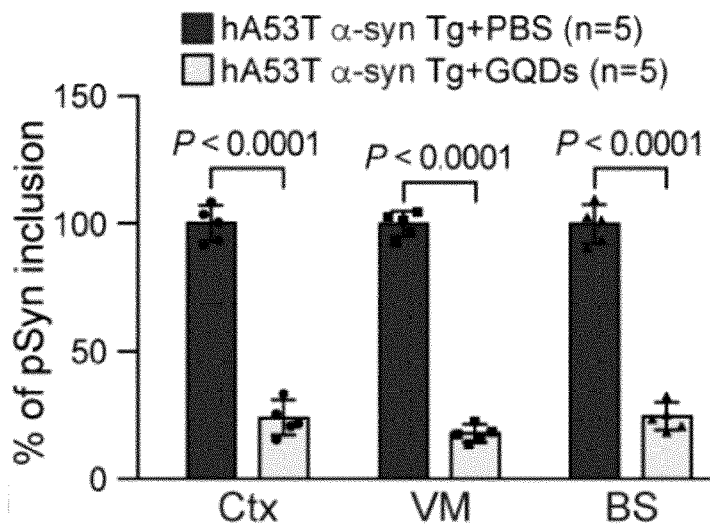
[도4l]



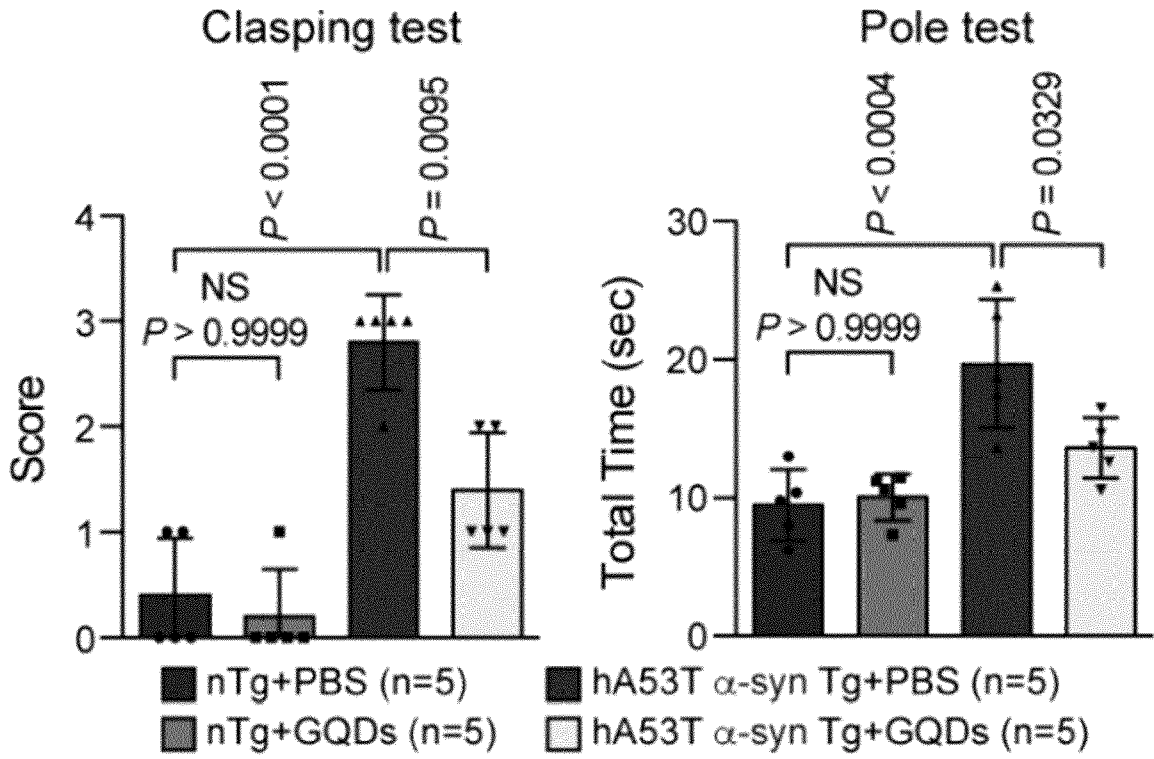
[도4m]



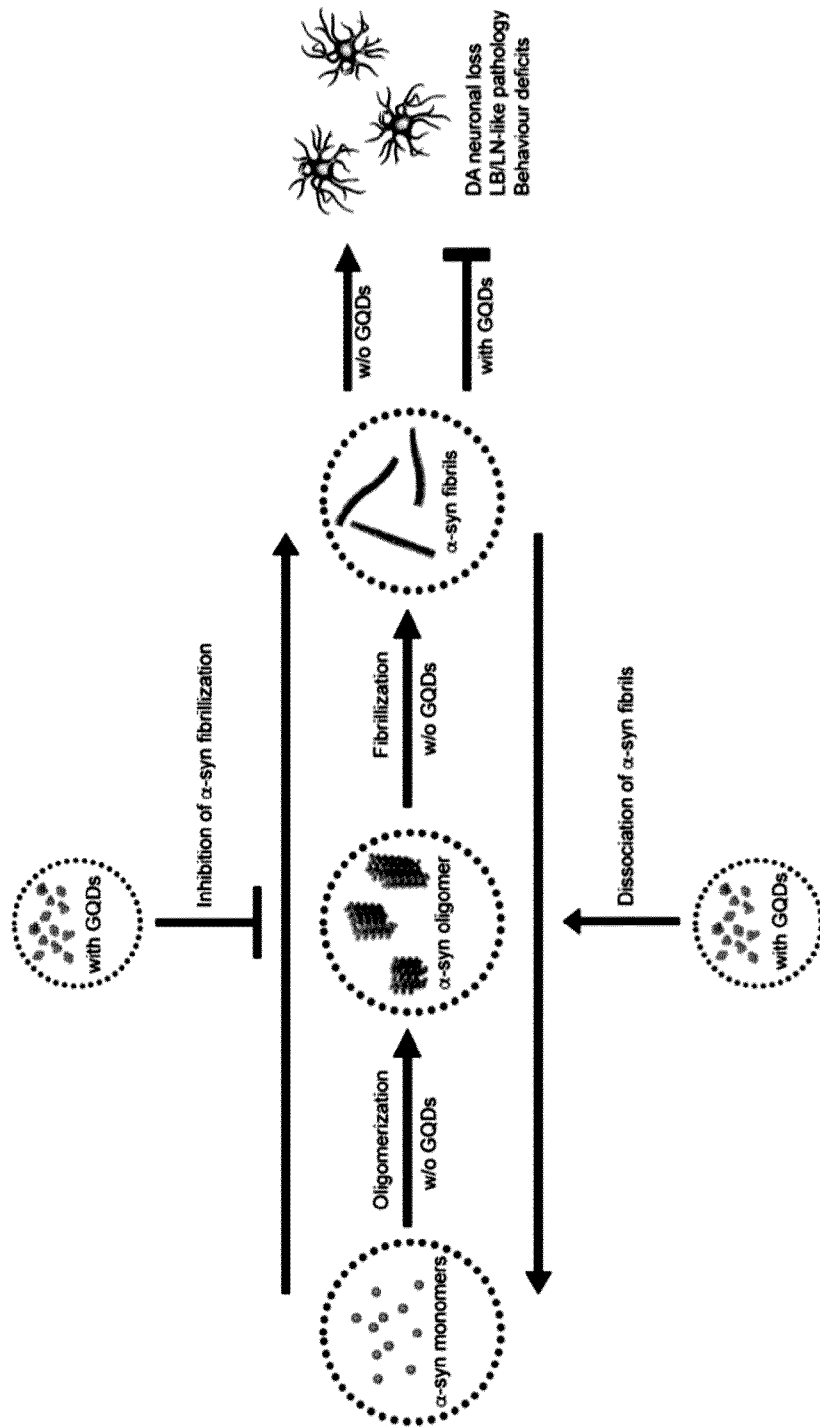
[도4n]



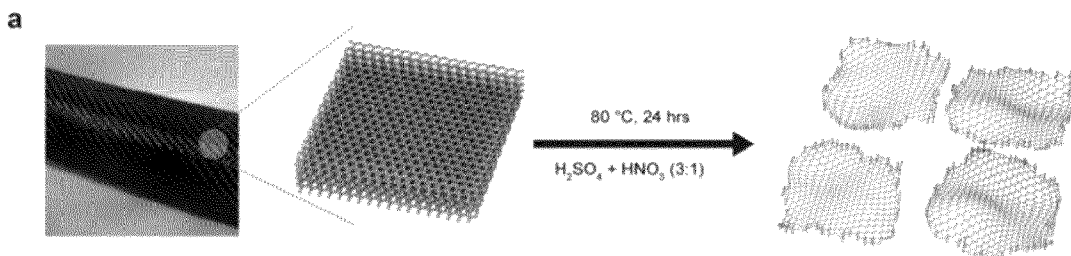
[도46]



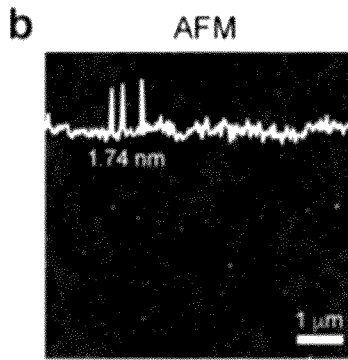
[도5]



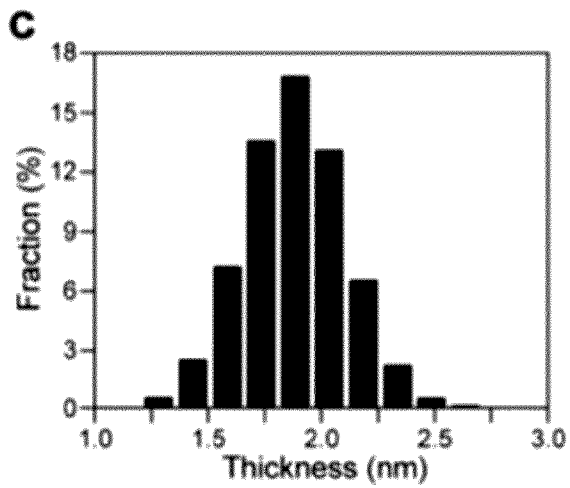
[도6a]



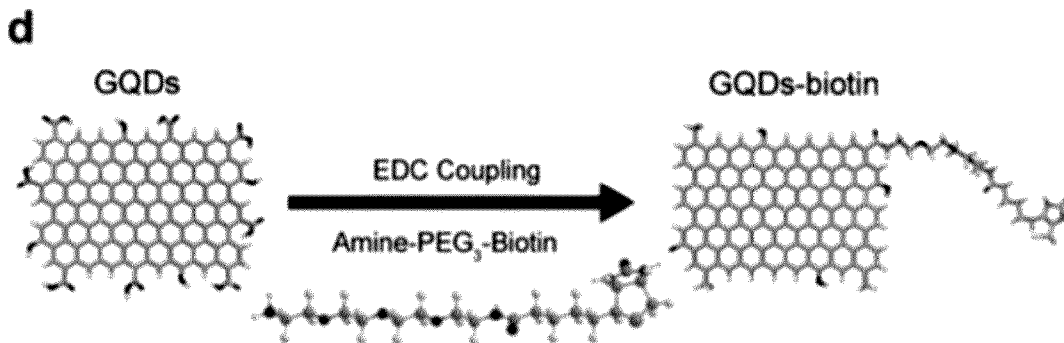
[도6b]



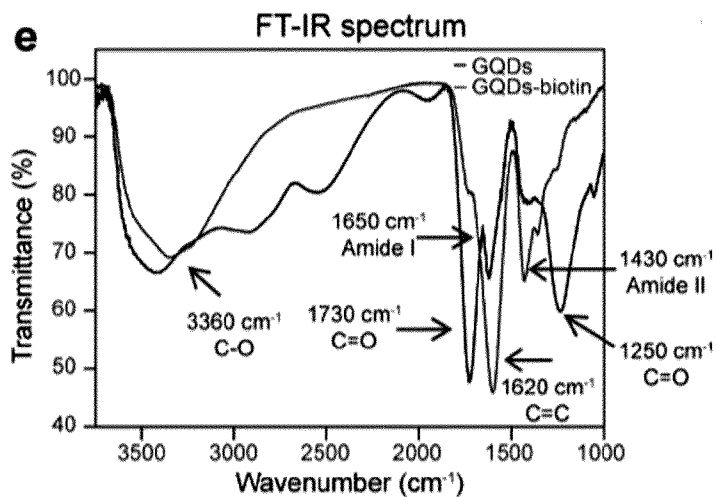
[도6c]



[도6d]

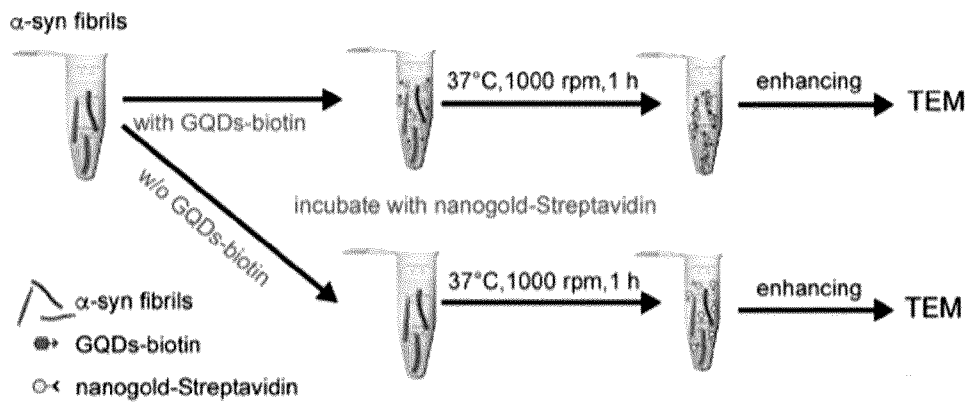


[도6e]



[도6f]

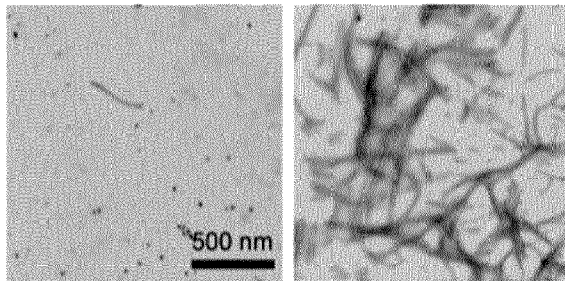
f



[도6g]

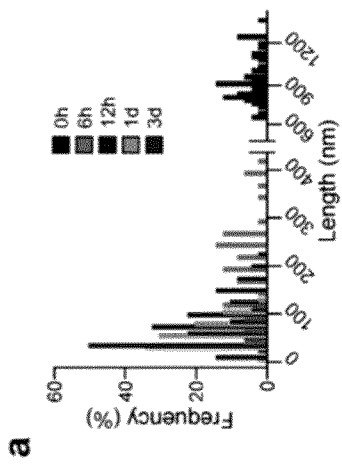
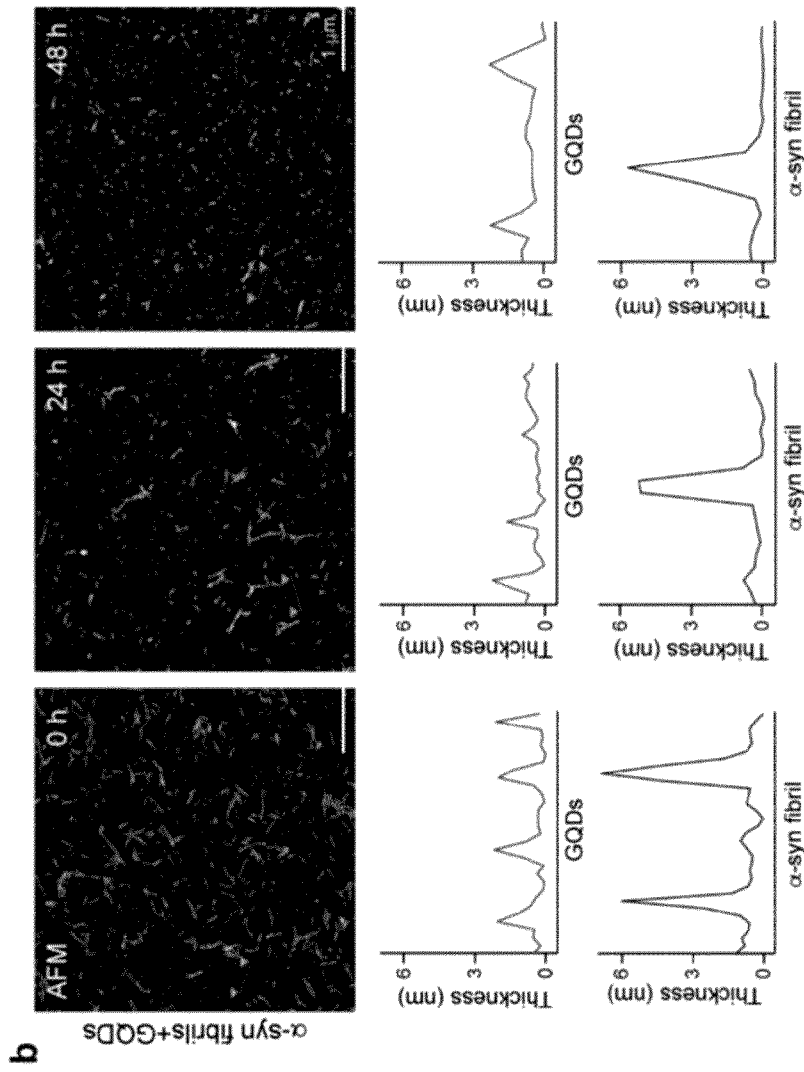
g

TEM (7 days)

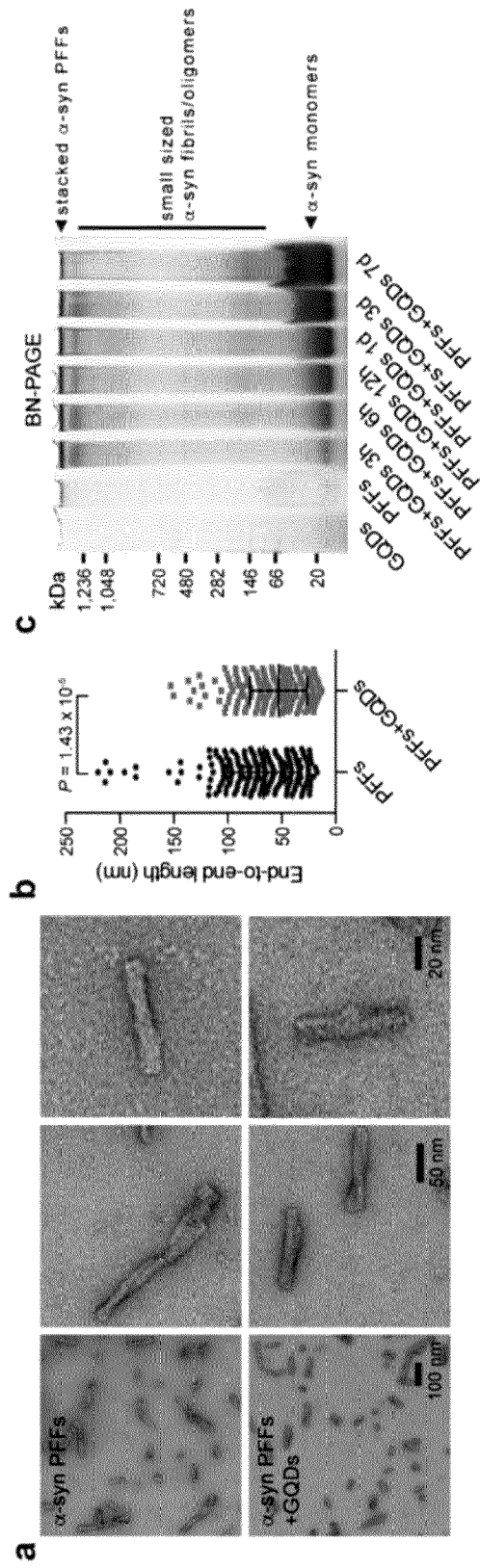


α-syn fibrils	+	+
GQDs-biotin	+	-
nanogold-Streptavidin	+	+

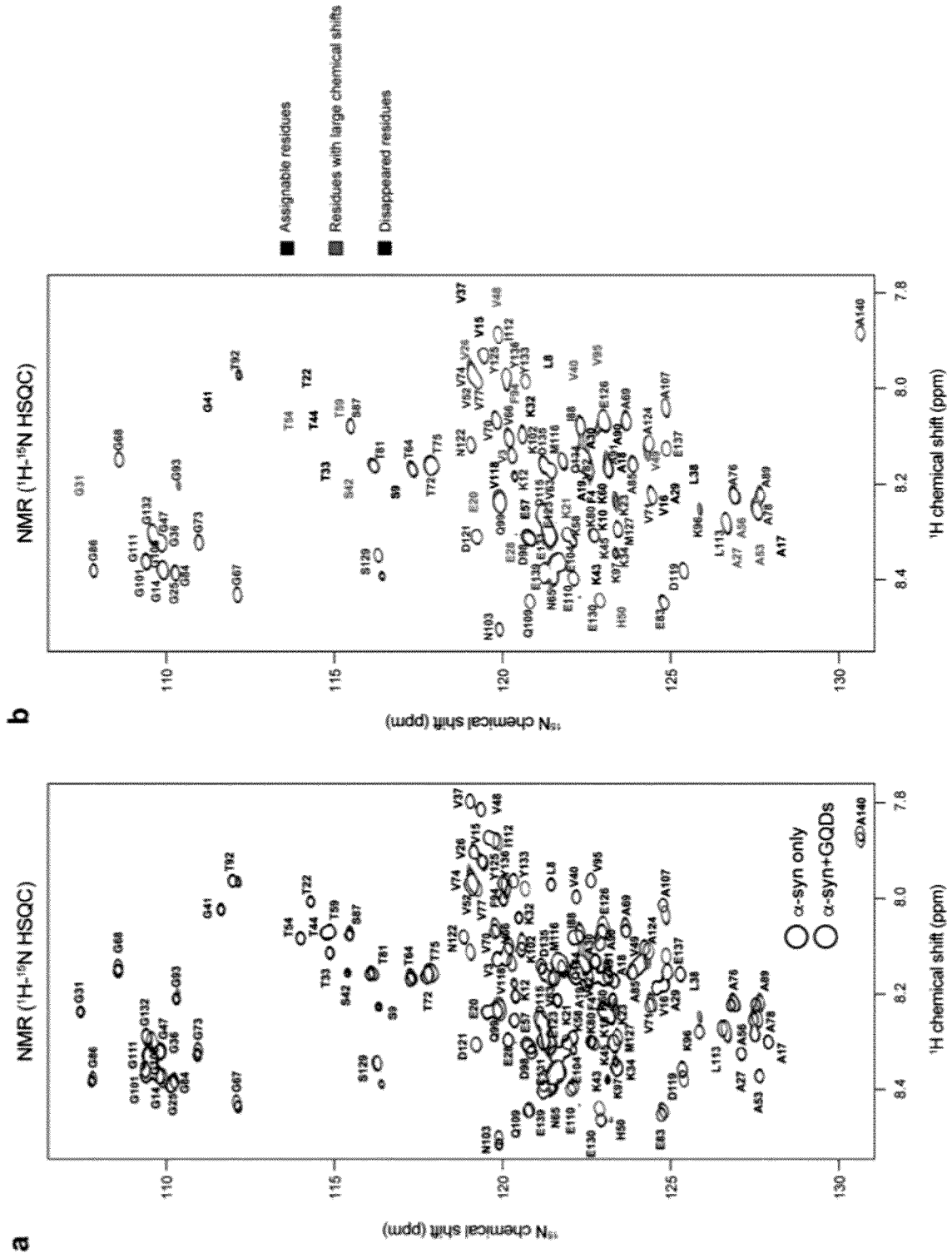
[도7]



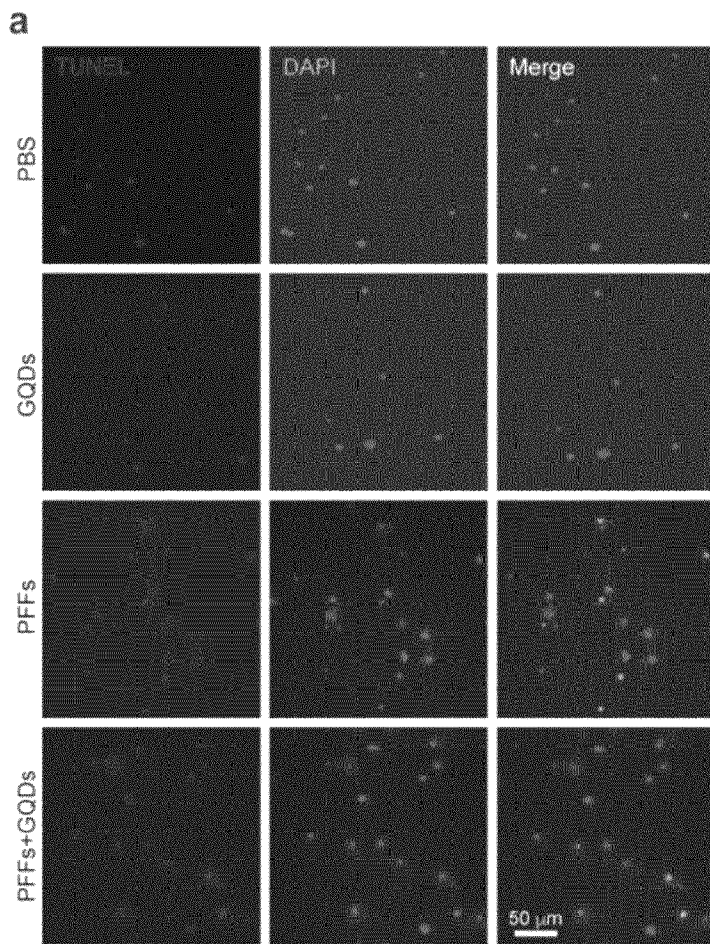
[Figure 8]



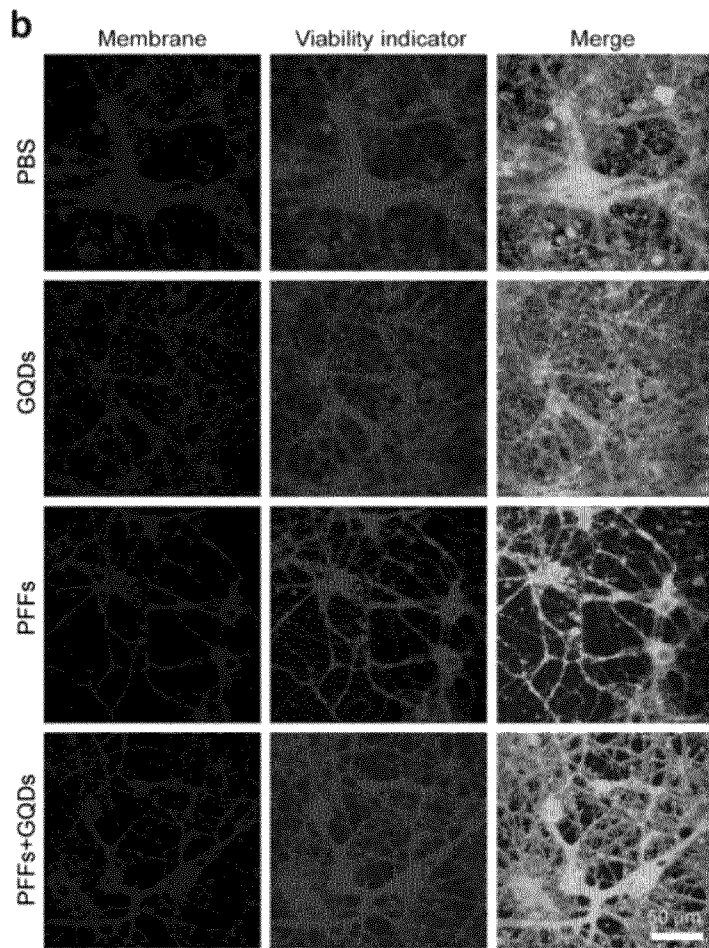
[도9]



[도 10a]

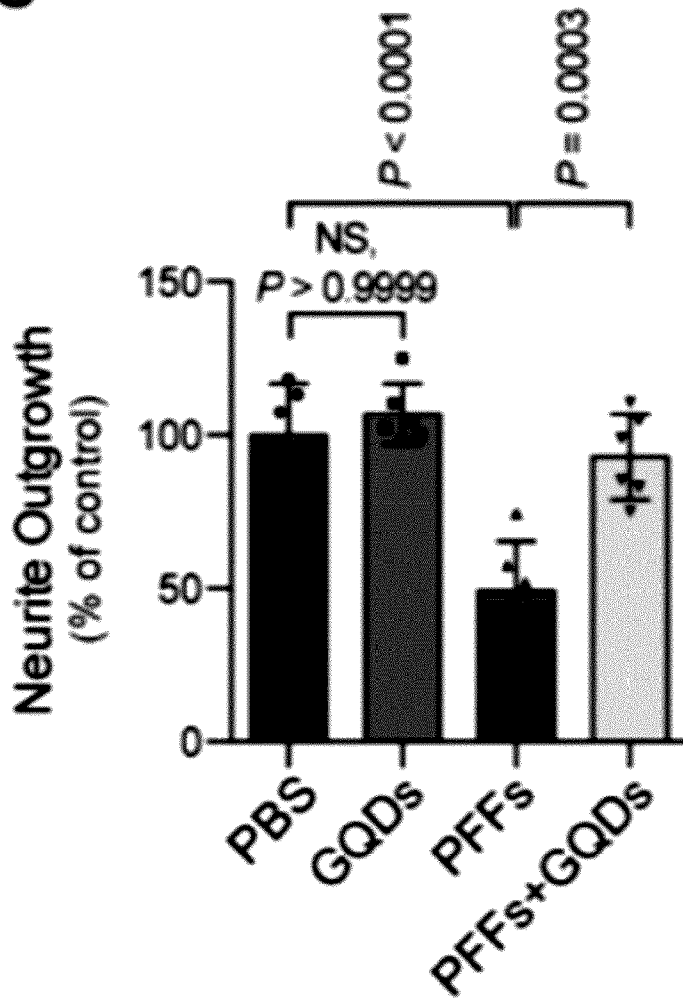


[도 10b]



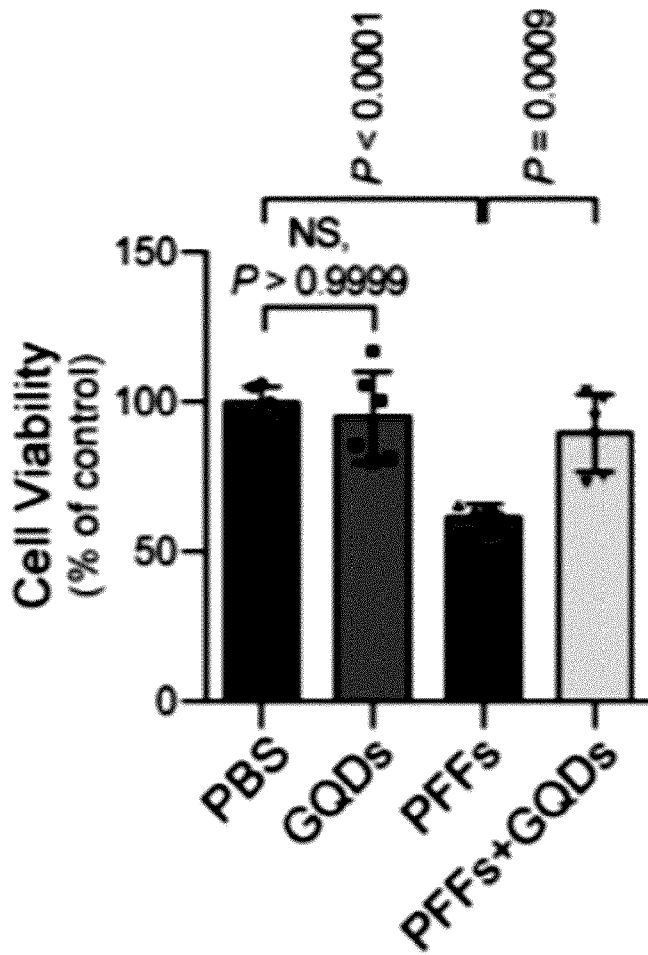
[도10c]

C



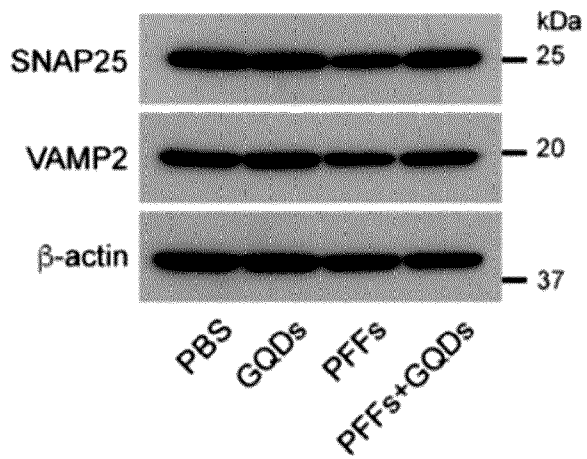
[도10d]

d

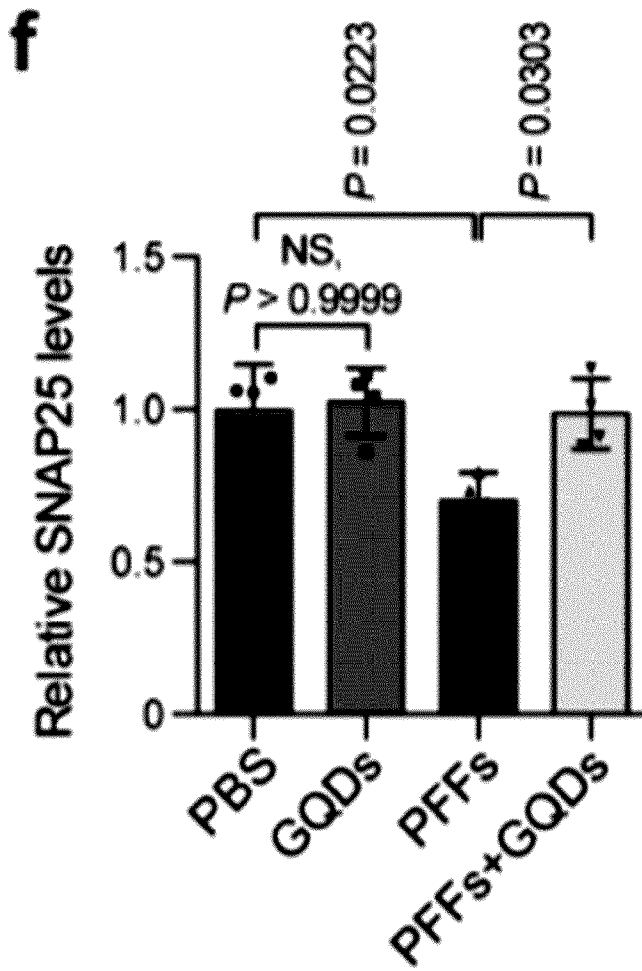


[도10e]

e

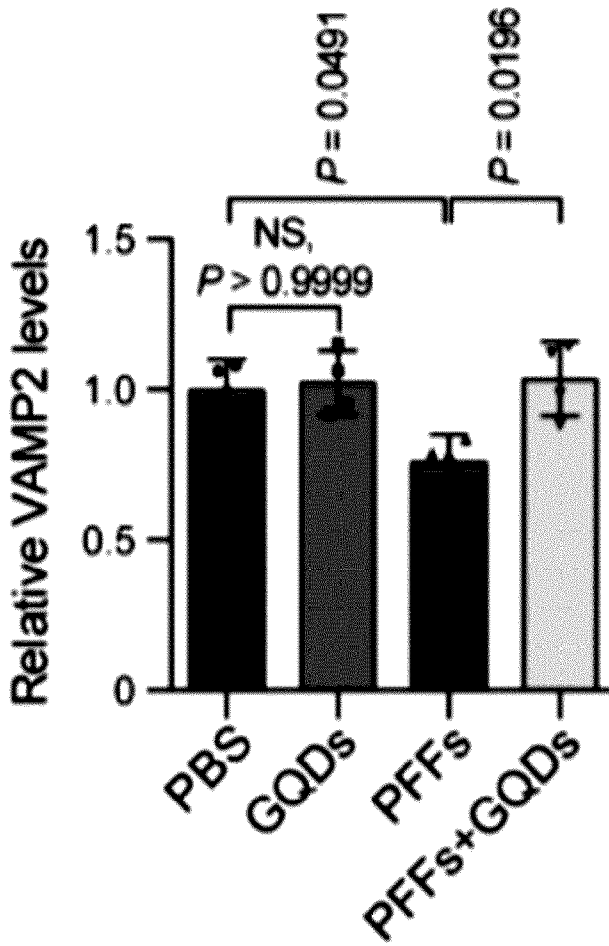


[도10f]



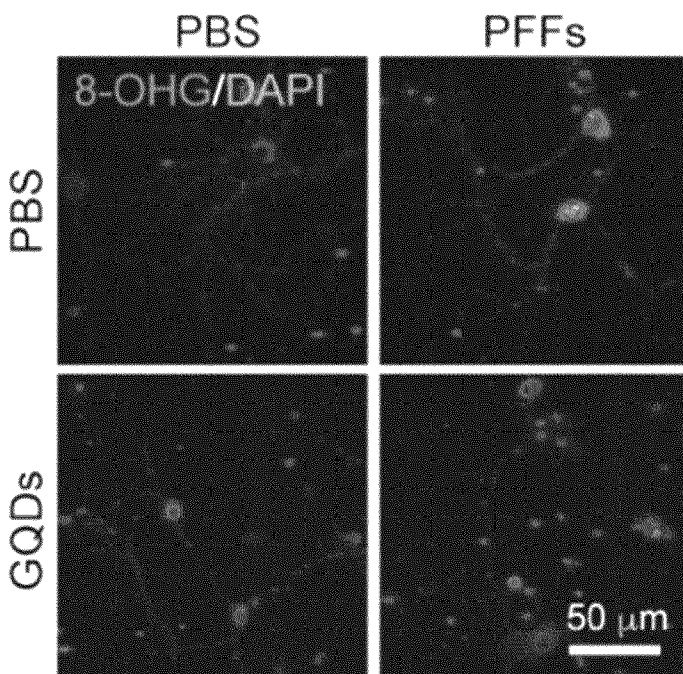
[도10g]

g

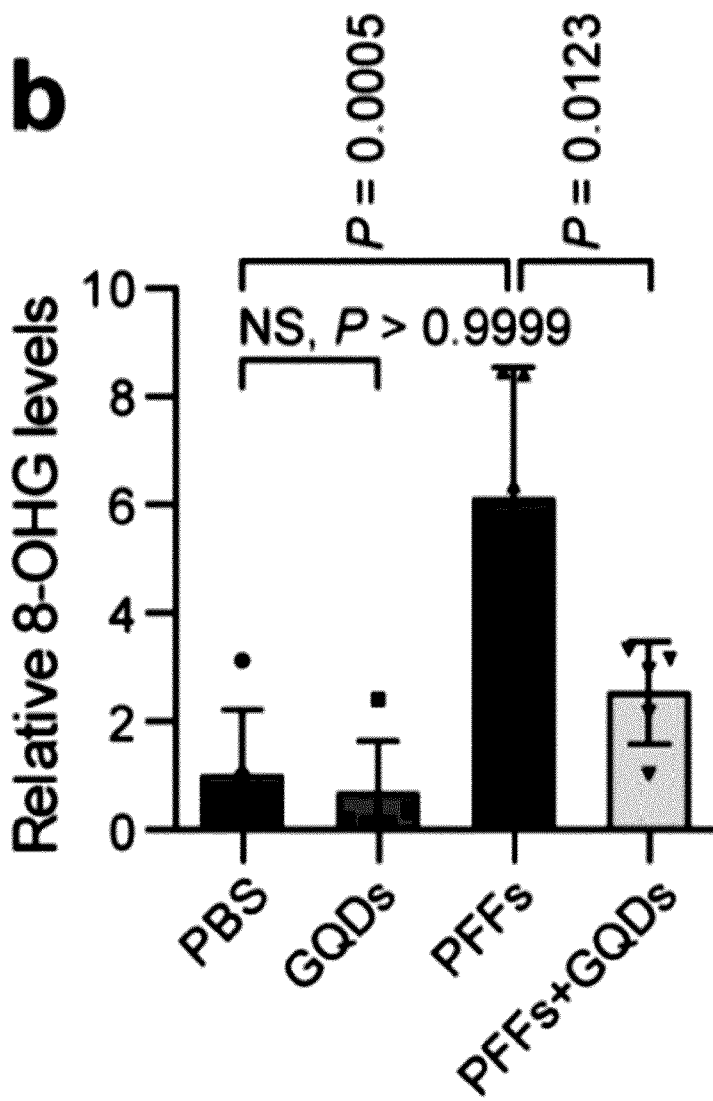


[도11a]

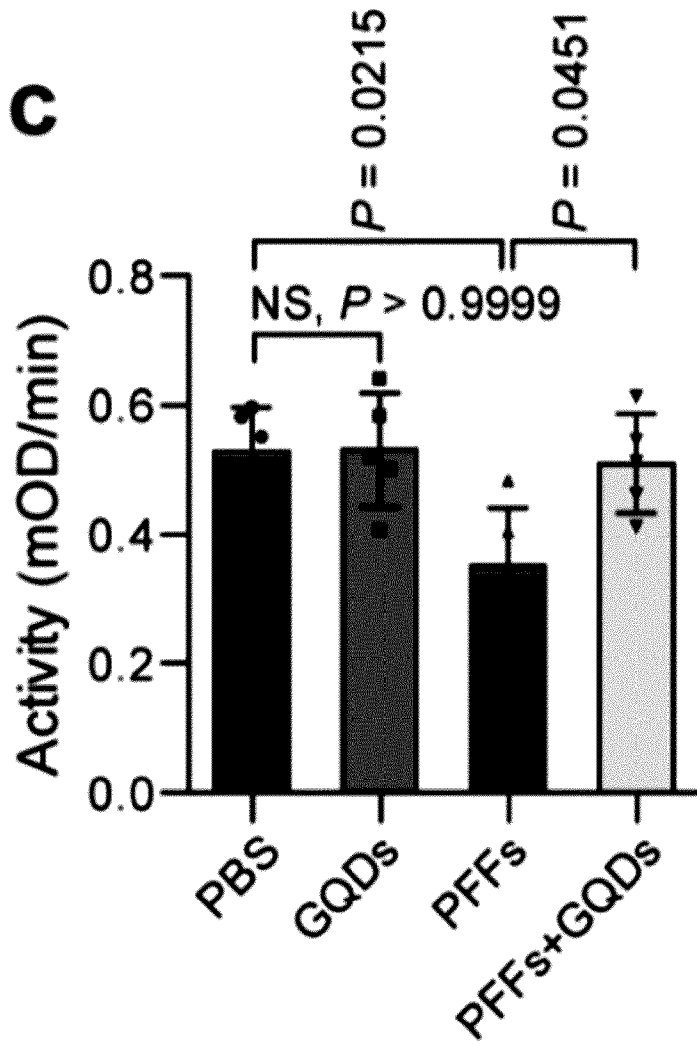
a



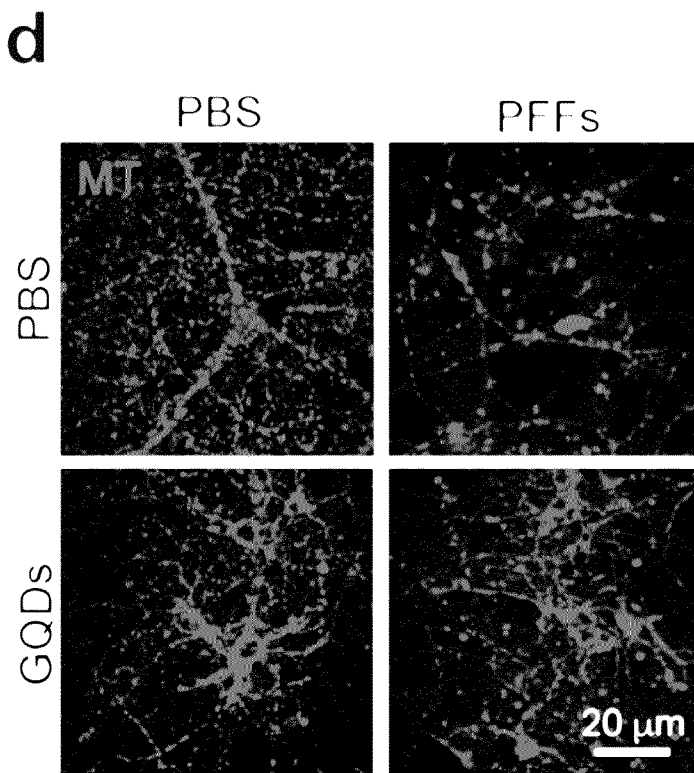
[도 11b]



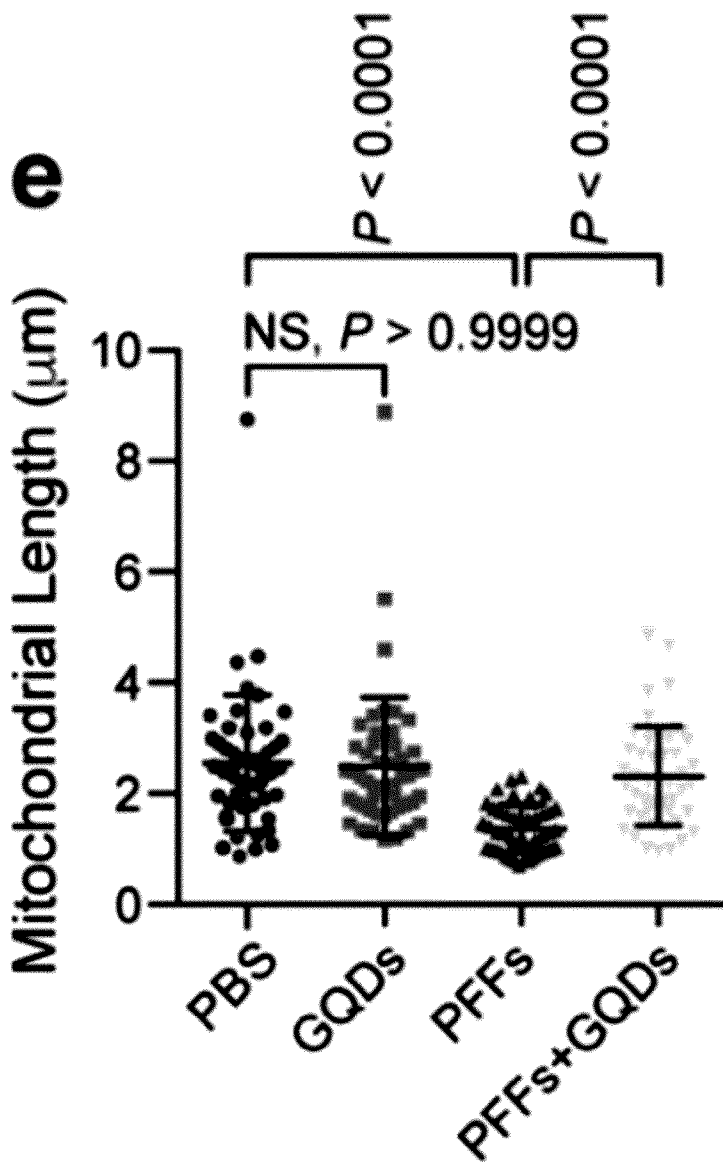
[도11c]



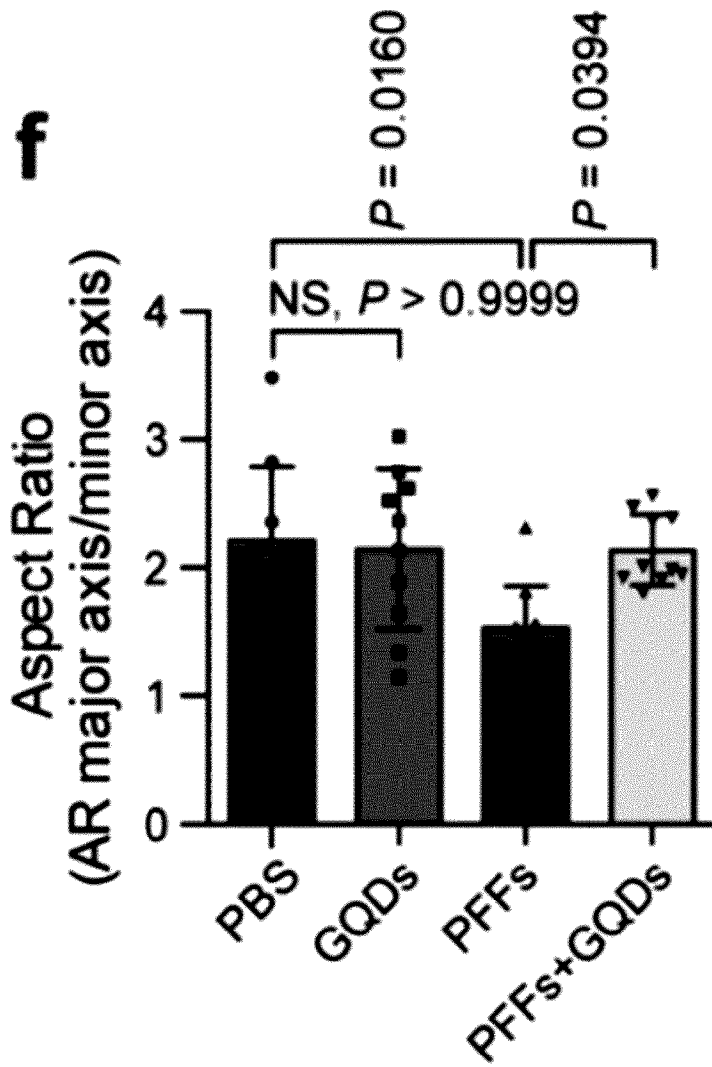
[도11d]



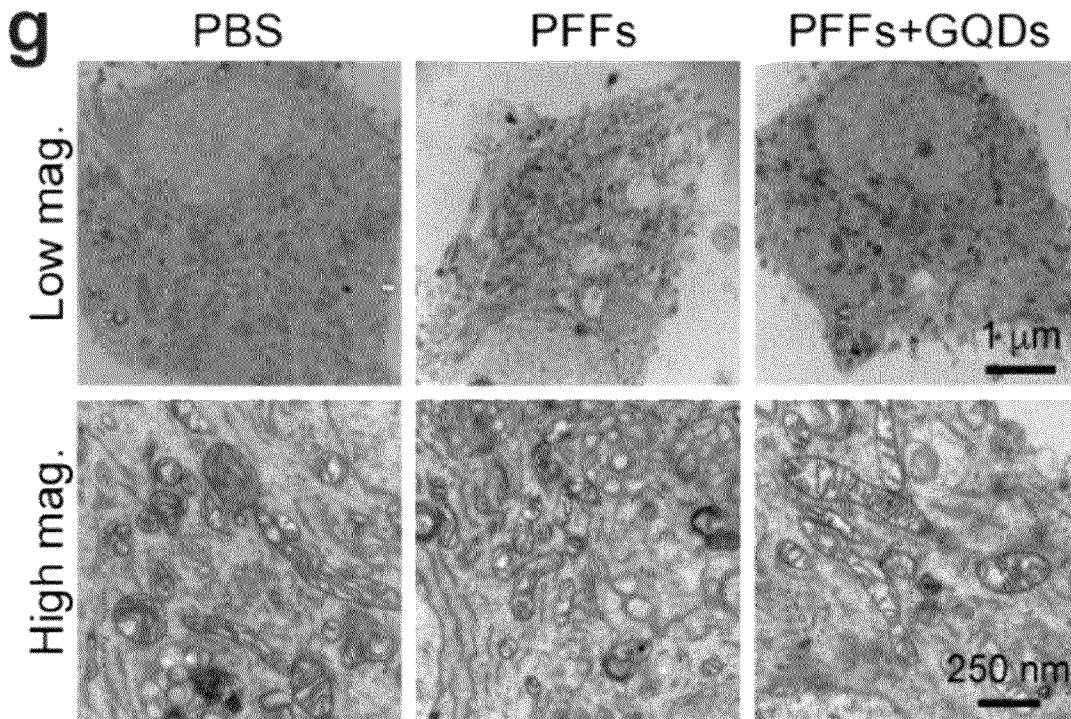
[도11e]



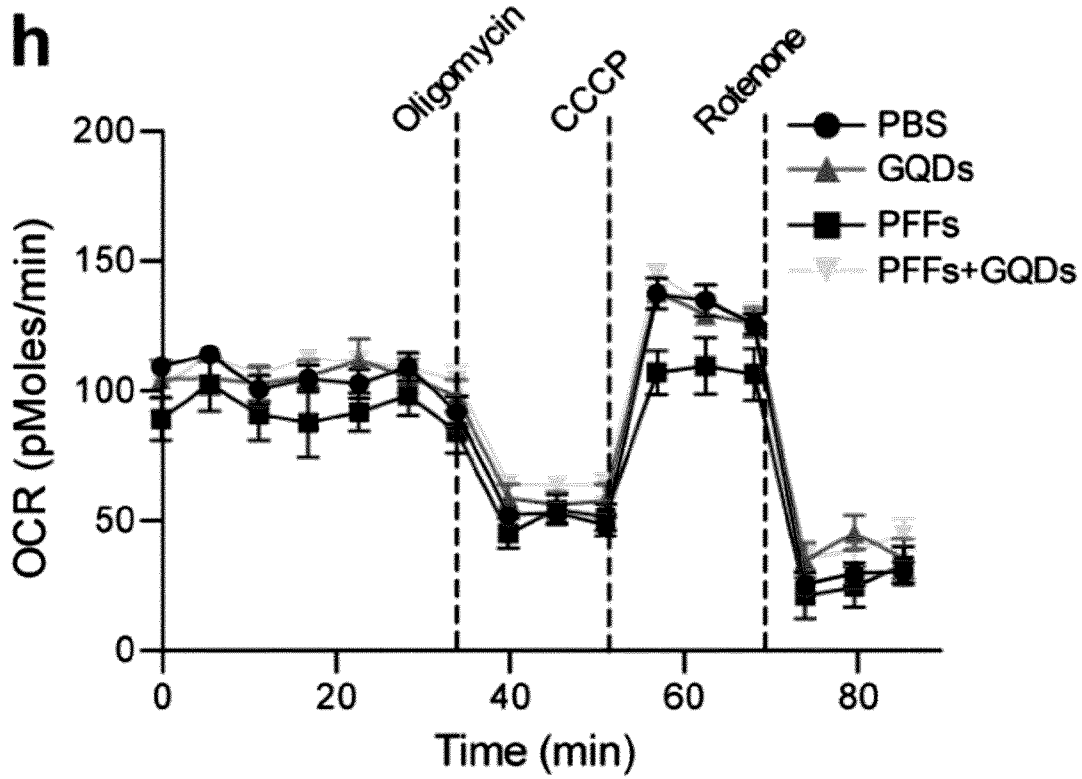
[도11f]



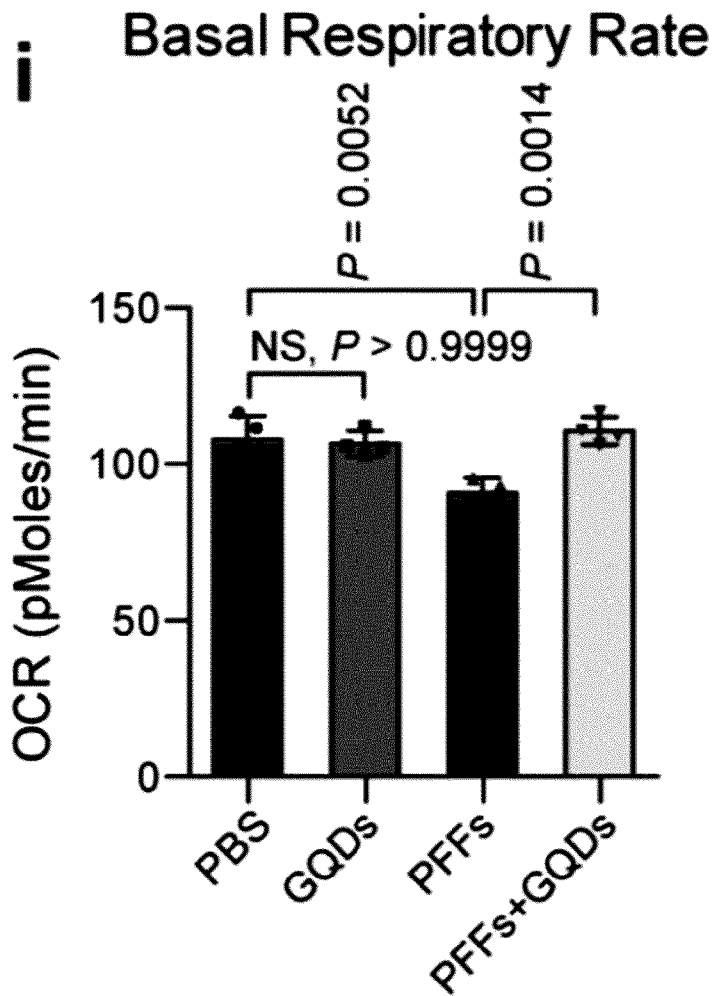
[도11g]



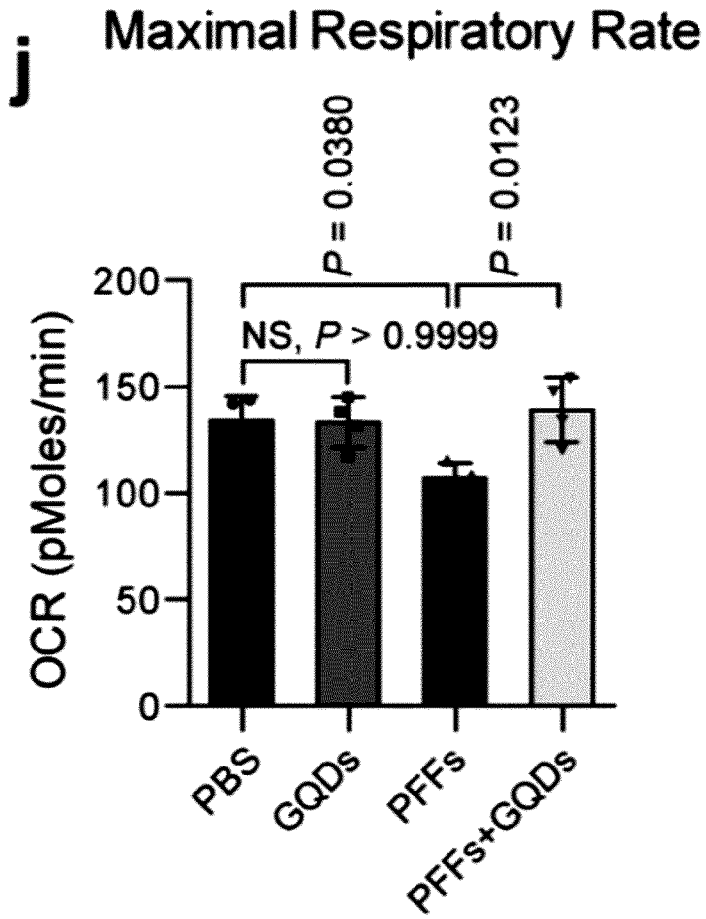
[도11h]



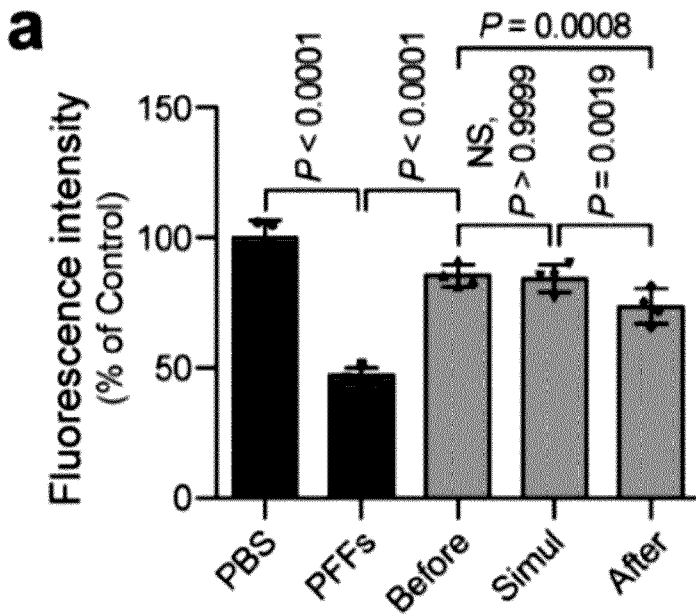
[도11i]



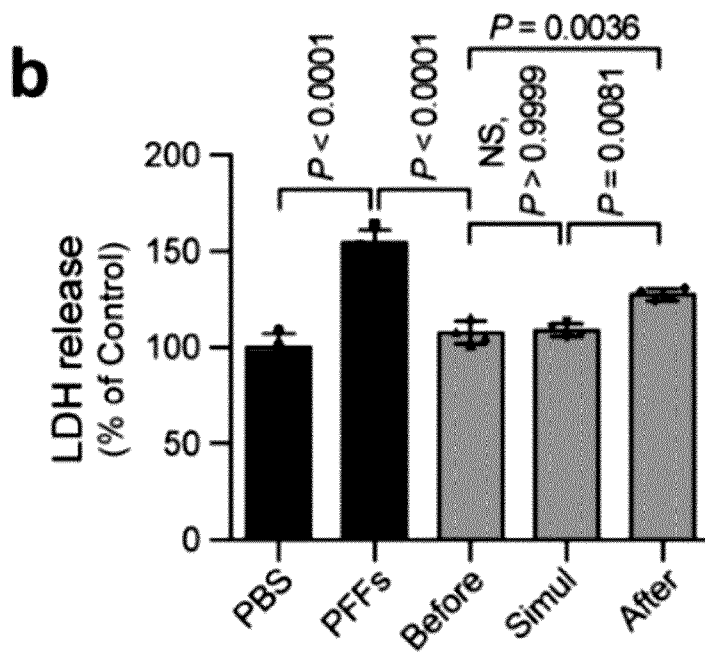
[도11j]



[도12a]



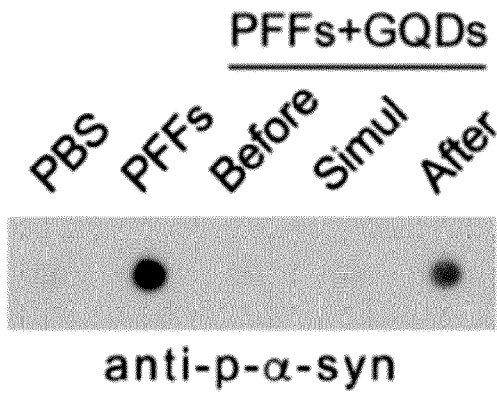
[도 12b]



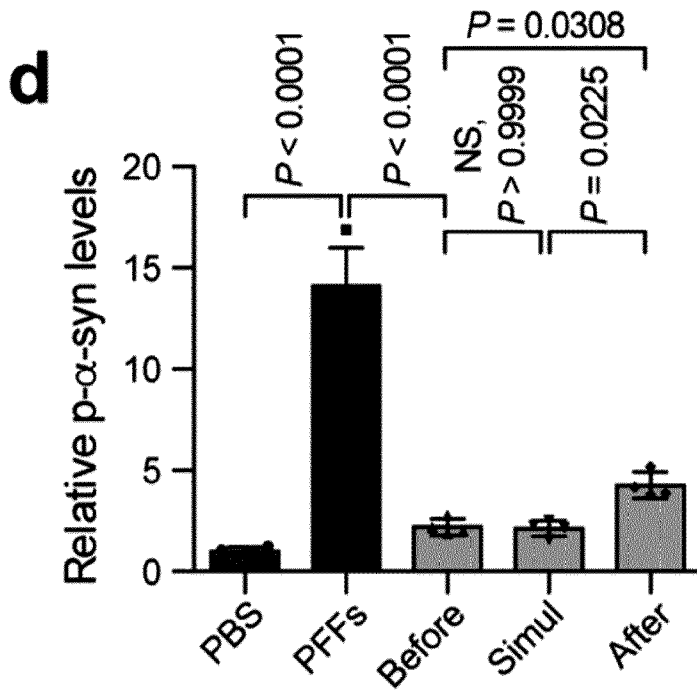
[도 12c]

c

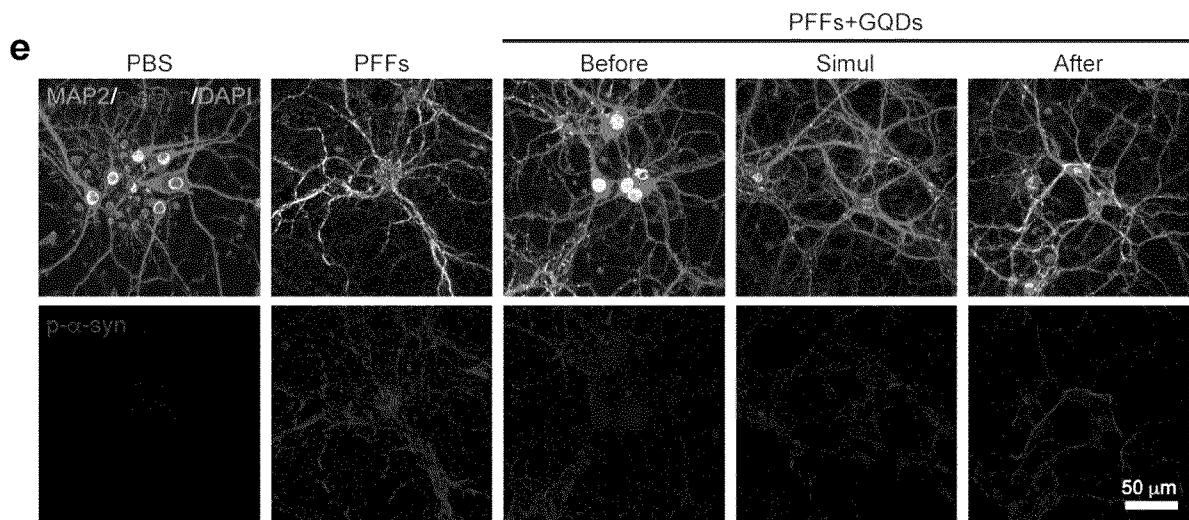
Dot-blot



[도 12d]

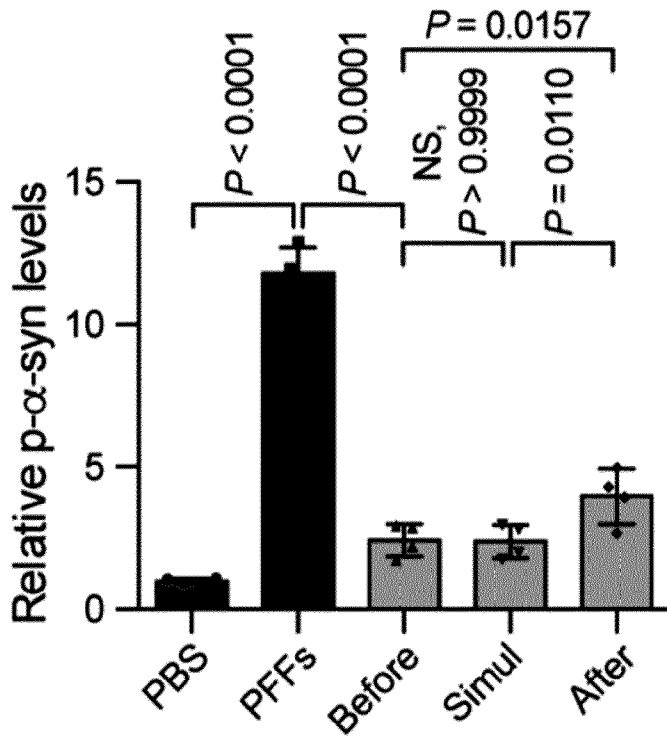


[도 12e]



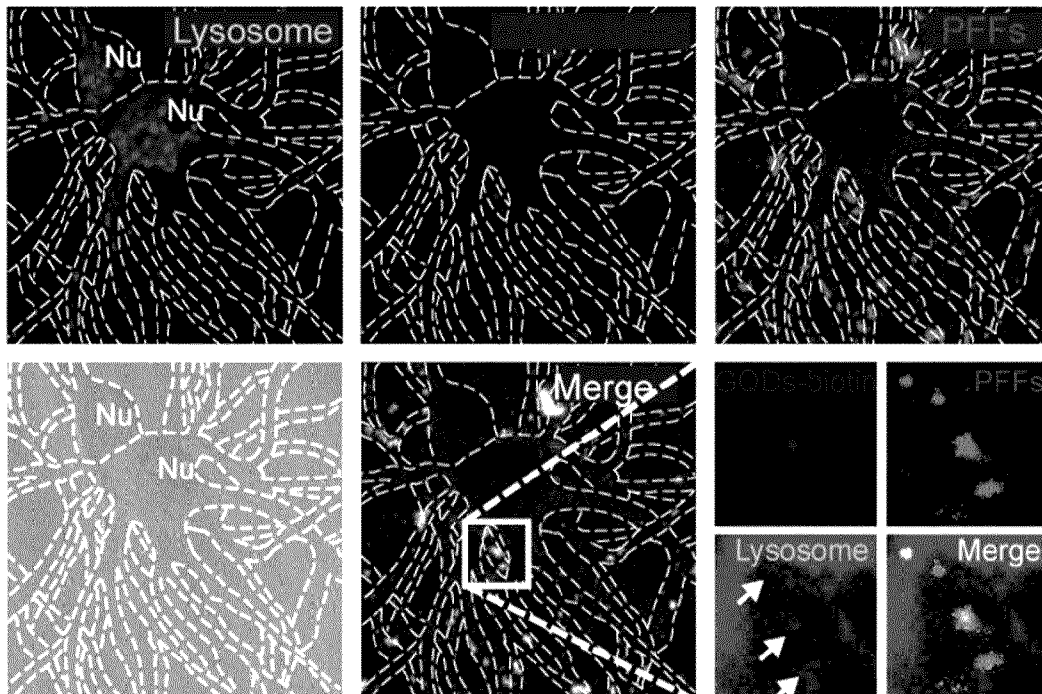
[도12f]

f

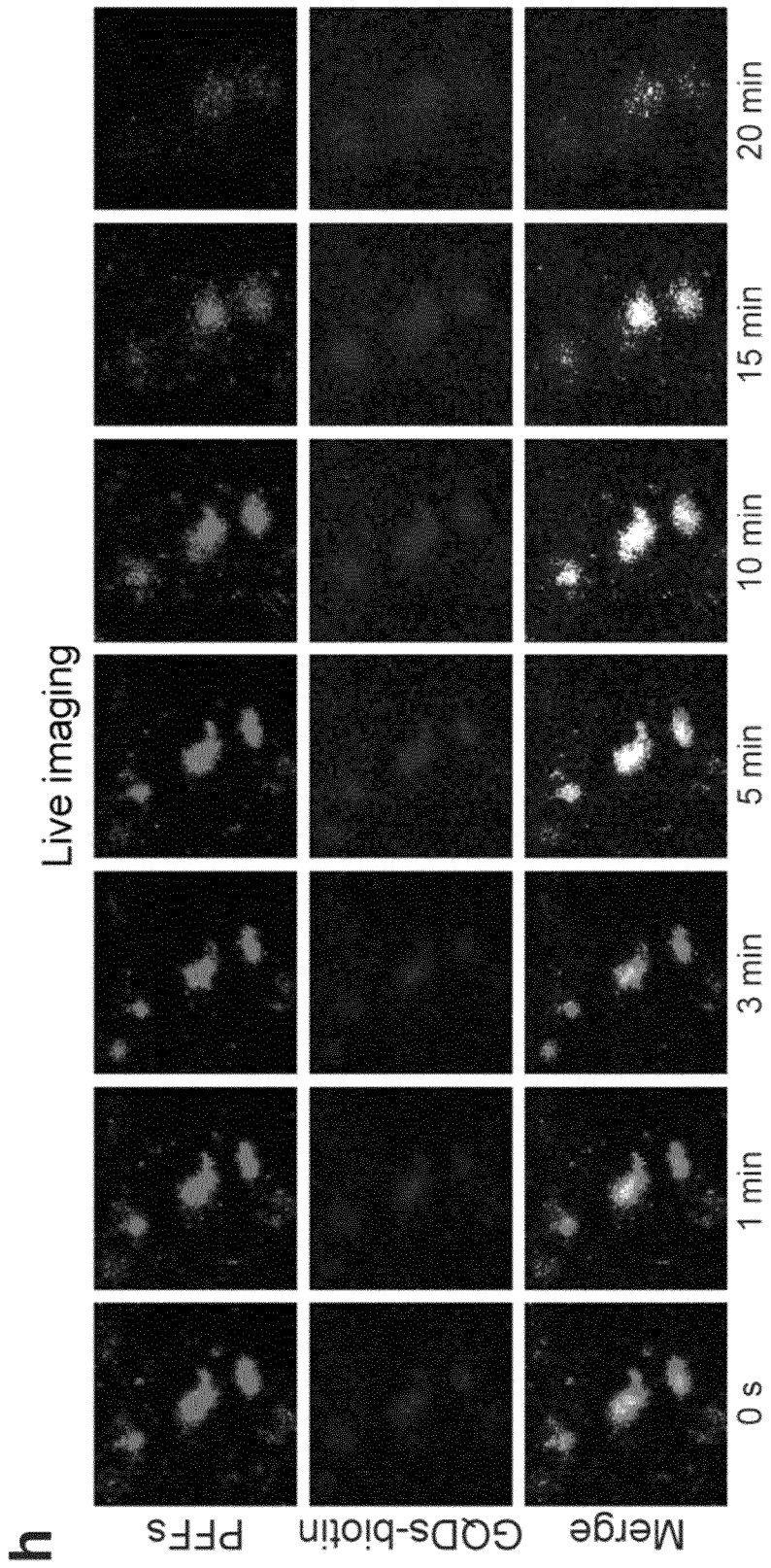


[도12g]

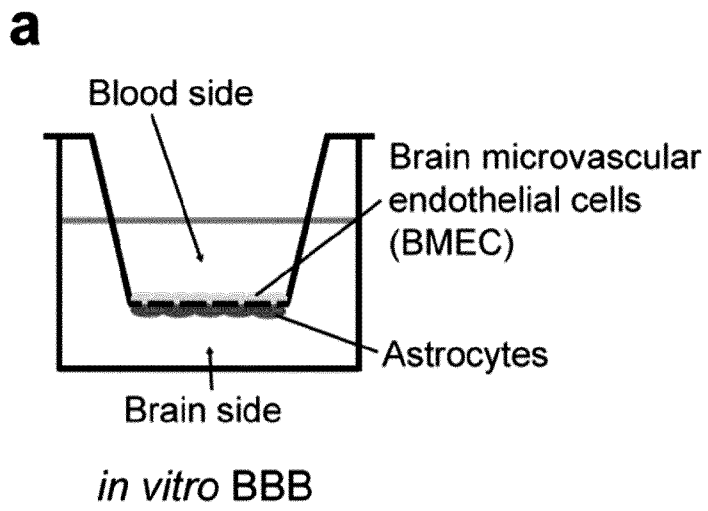
g



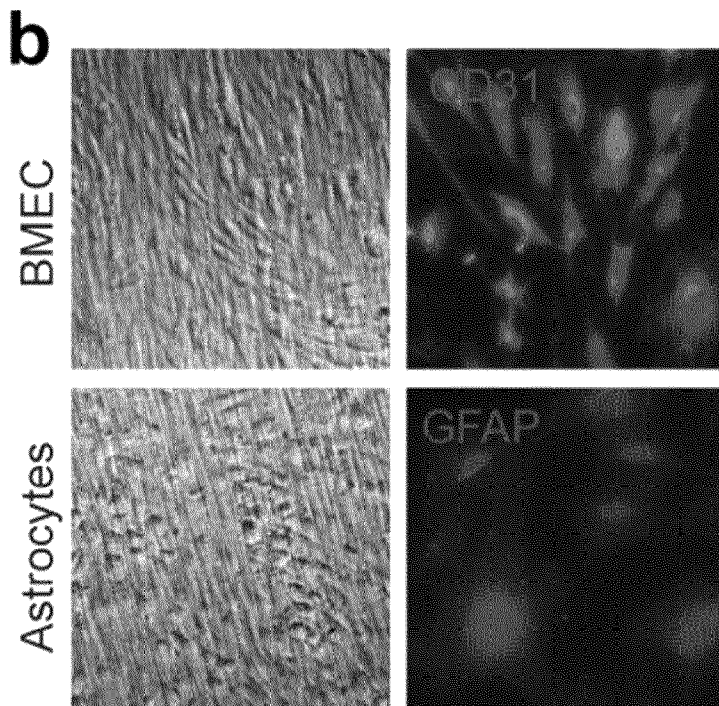
[도 12h]



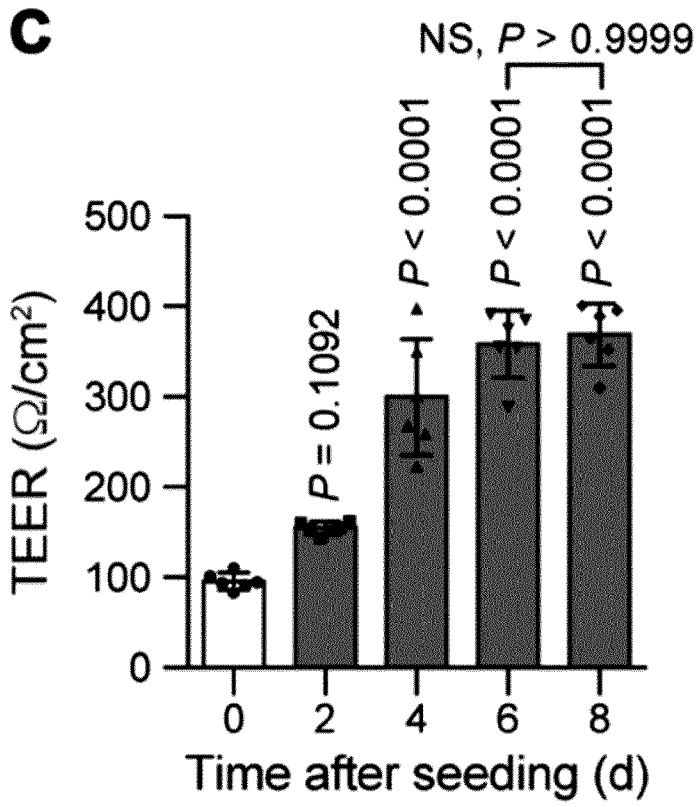
[도 13a]



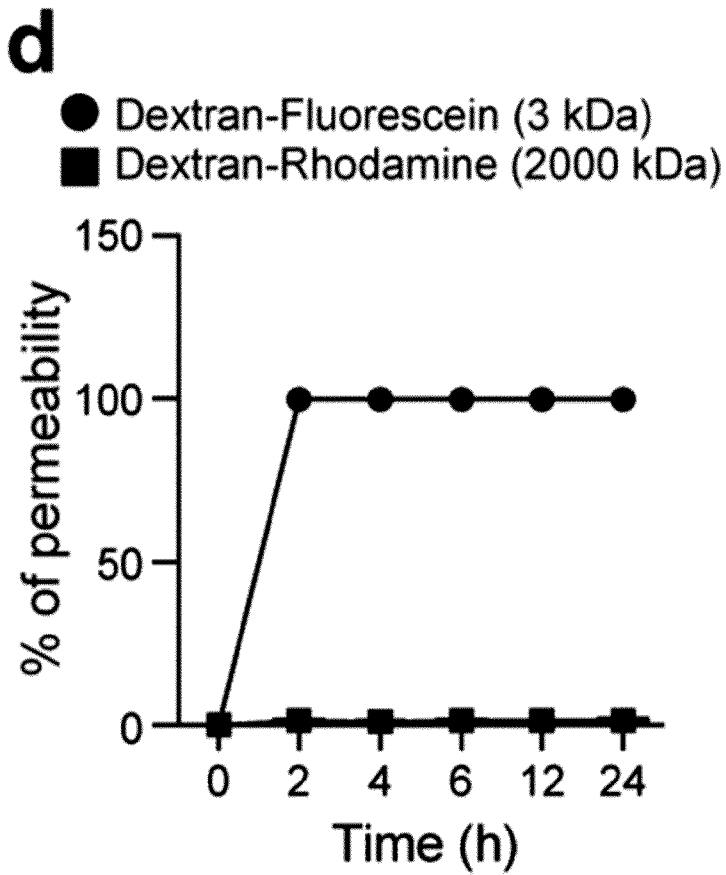
[도 13b]



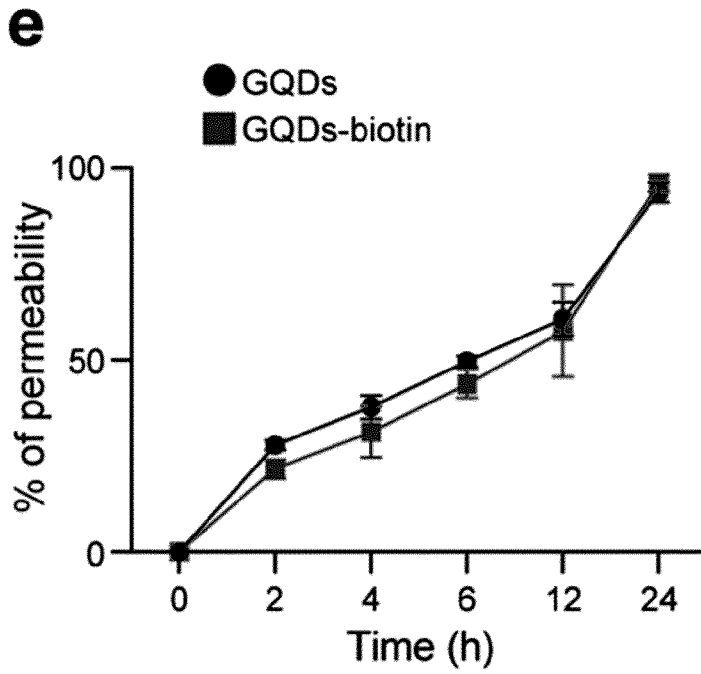
[도 13c]



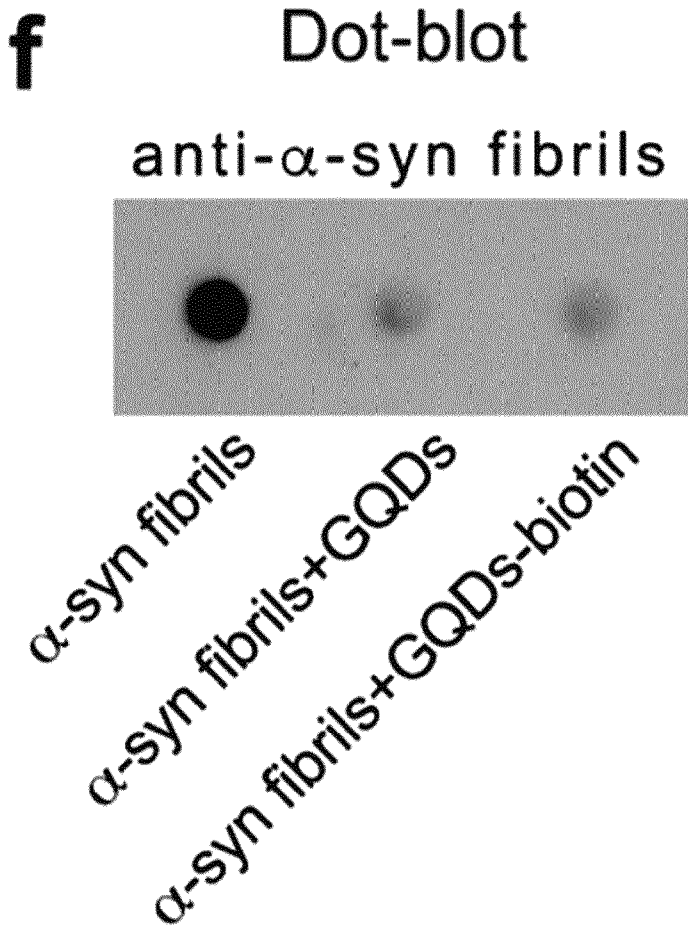
[도 13d]



[도 13e]

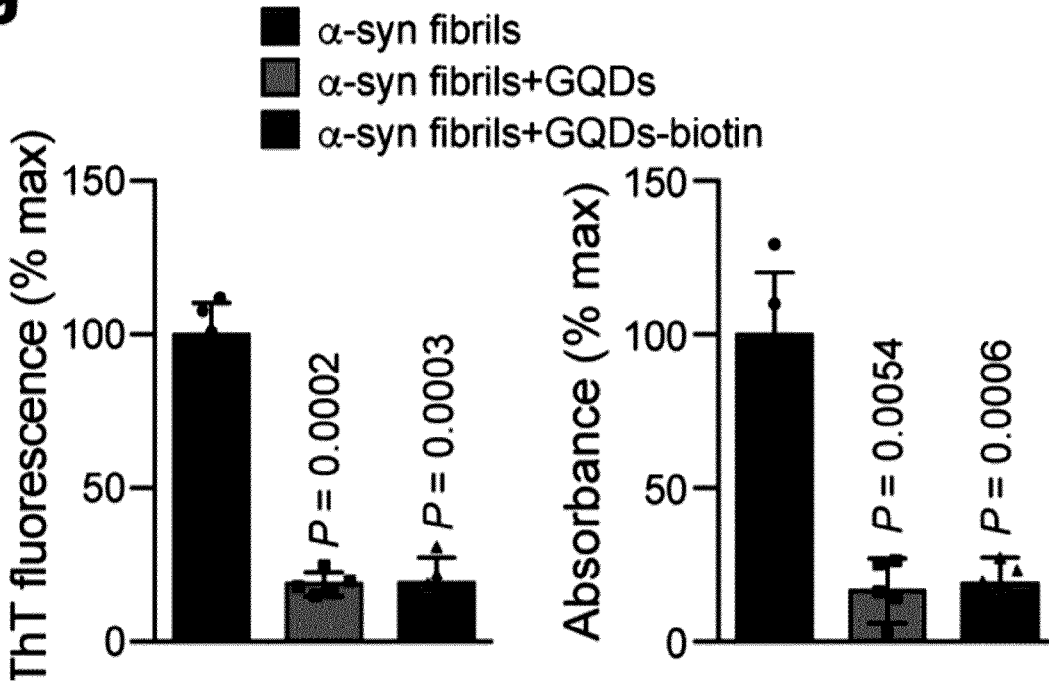


[도 13f]



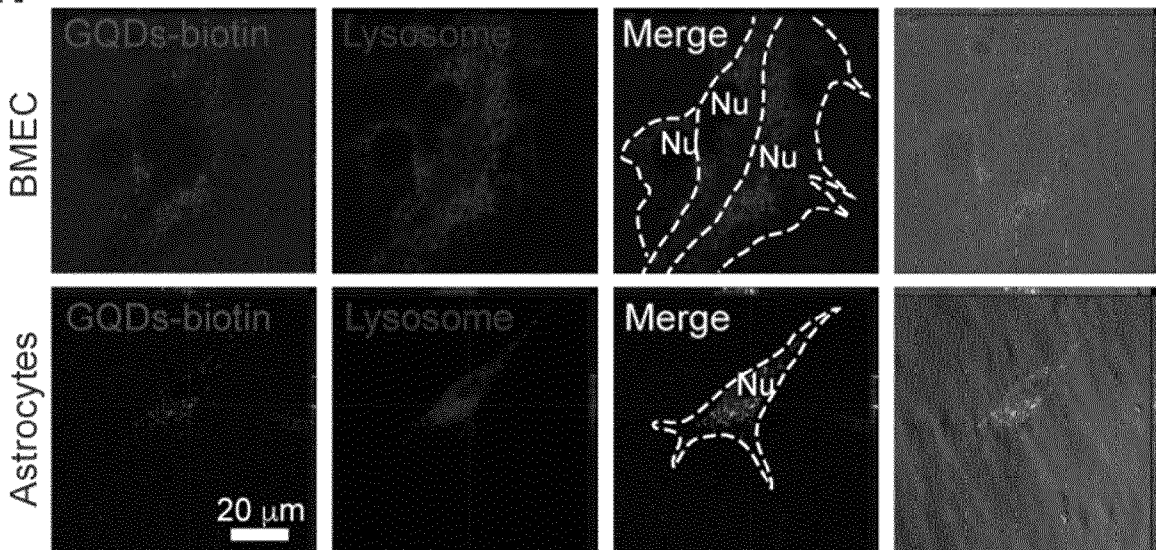
[도 13g]

g



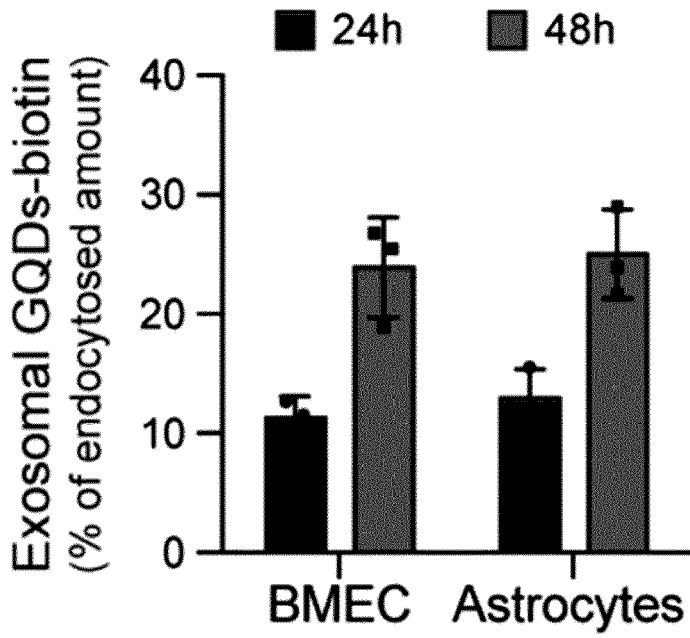
[도 13h]

h

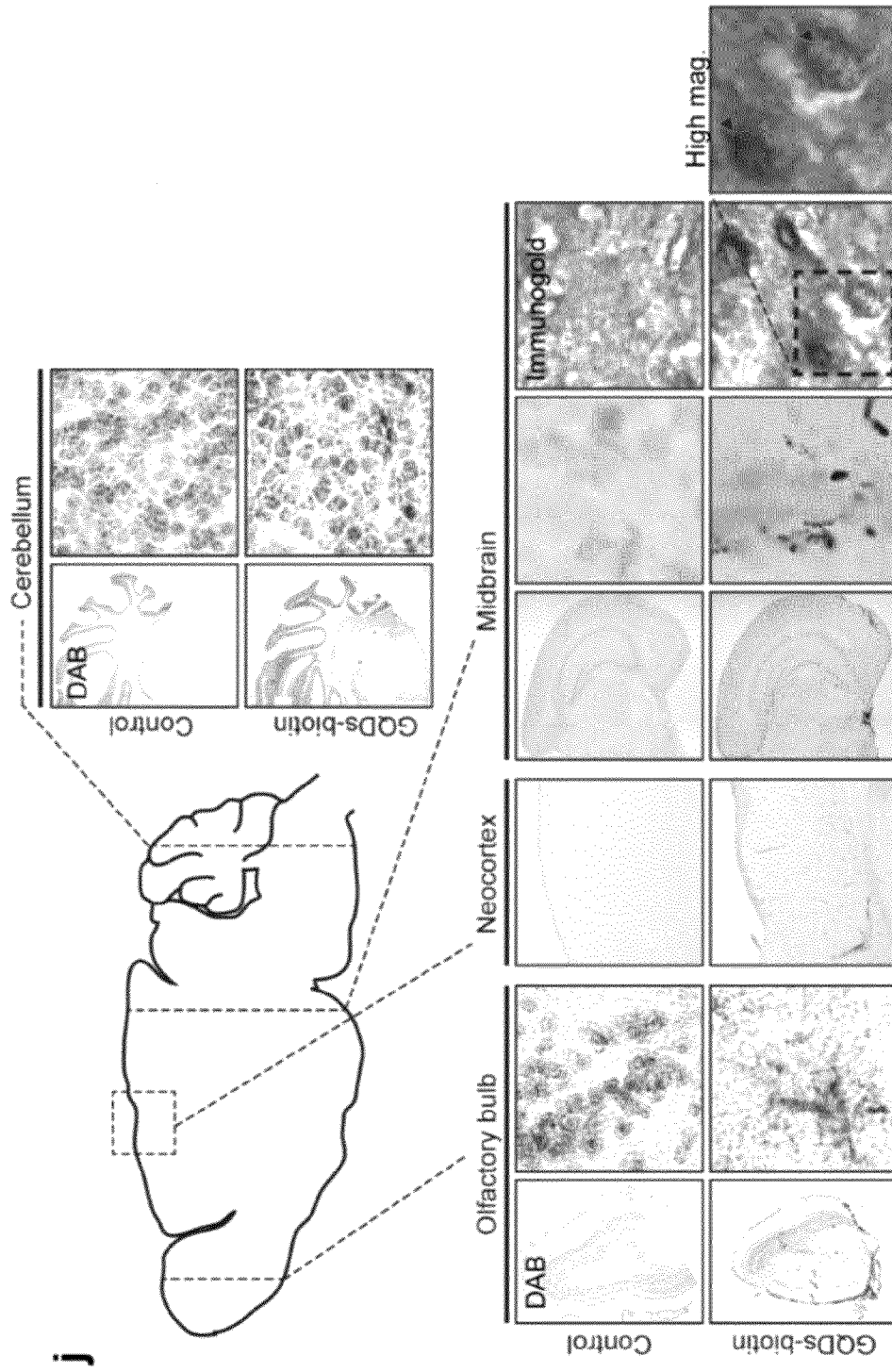


[도 13i]

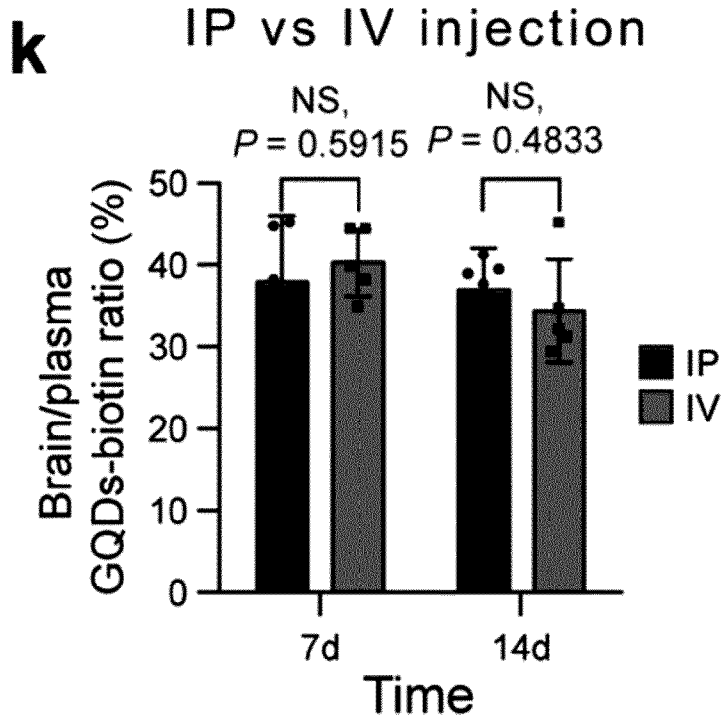
i



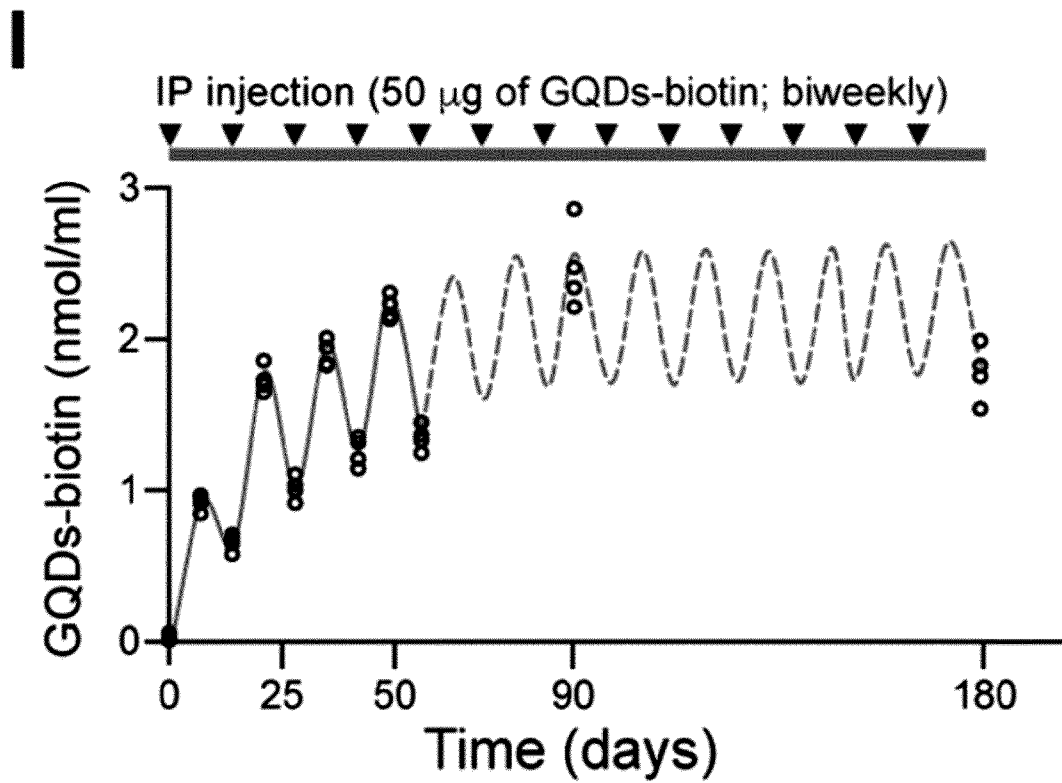
[도 13j]



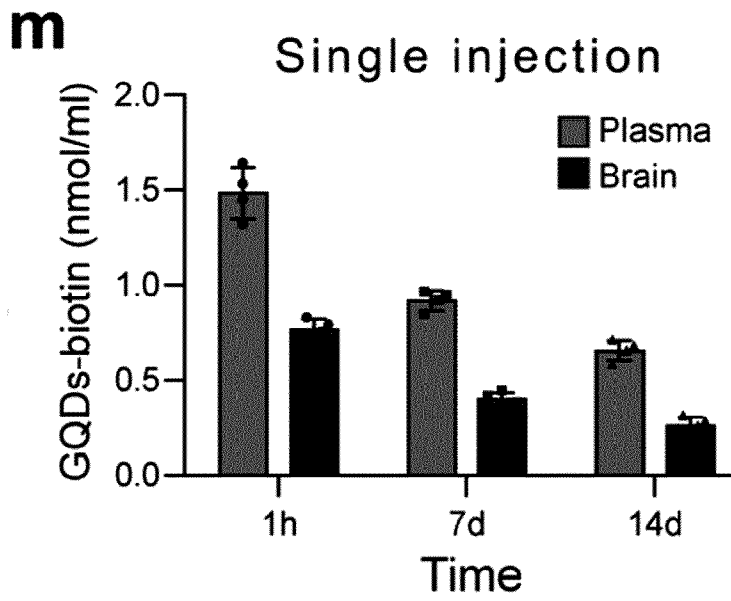
[도13k]



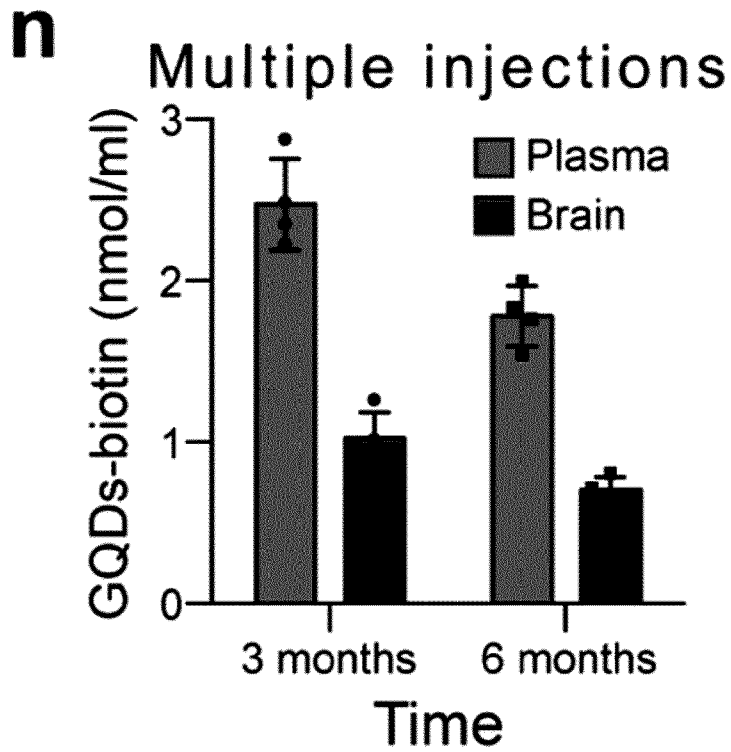
[도13l]



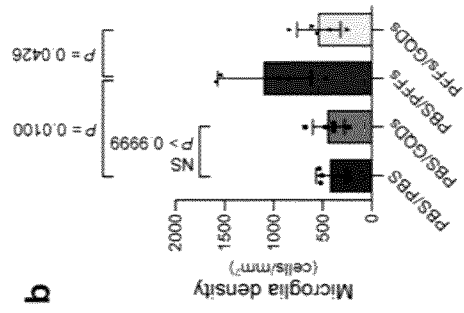
[도13m]



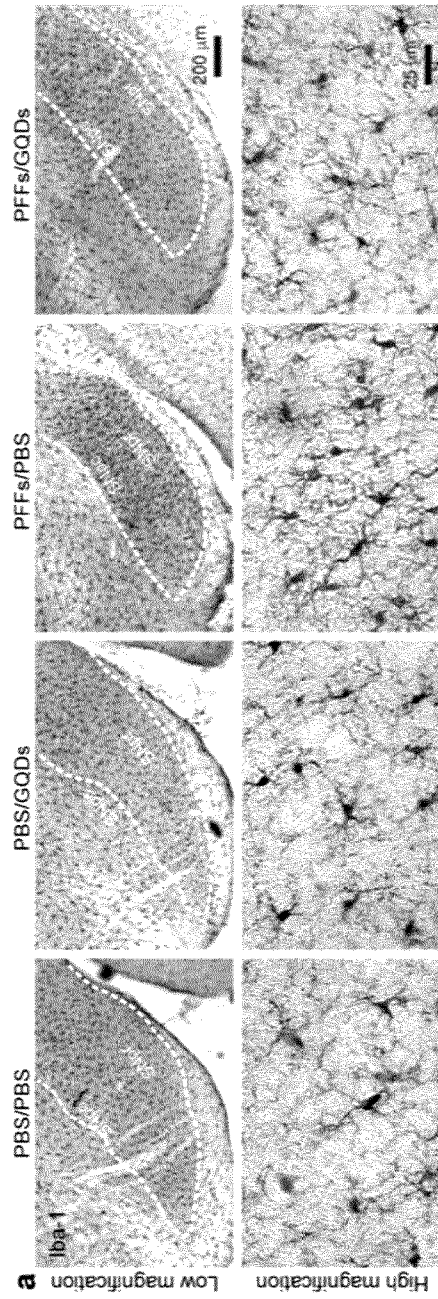
[도13n]



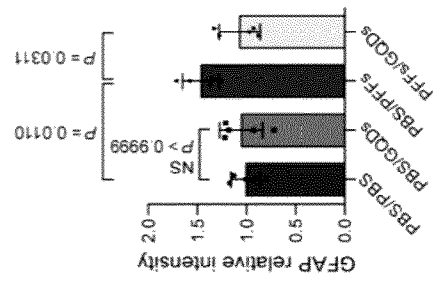
[14]



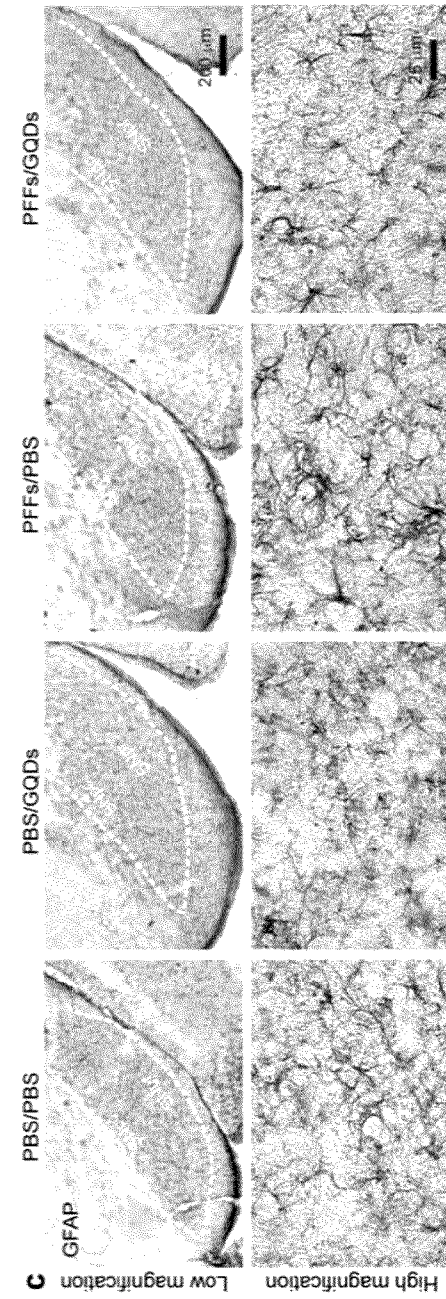
b



c

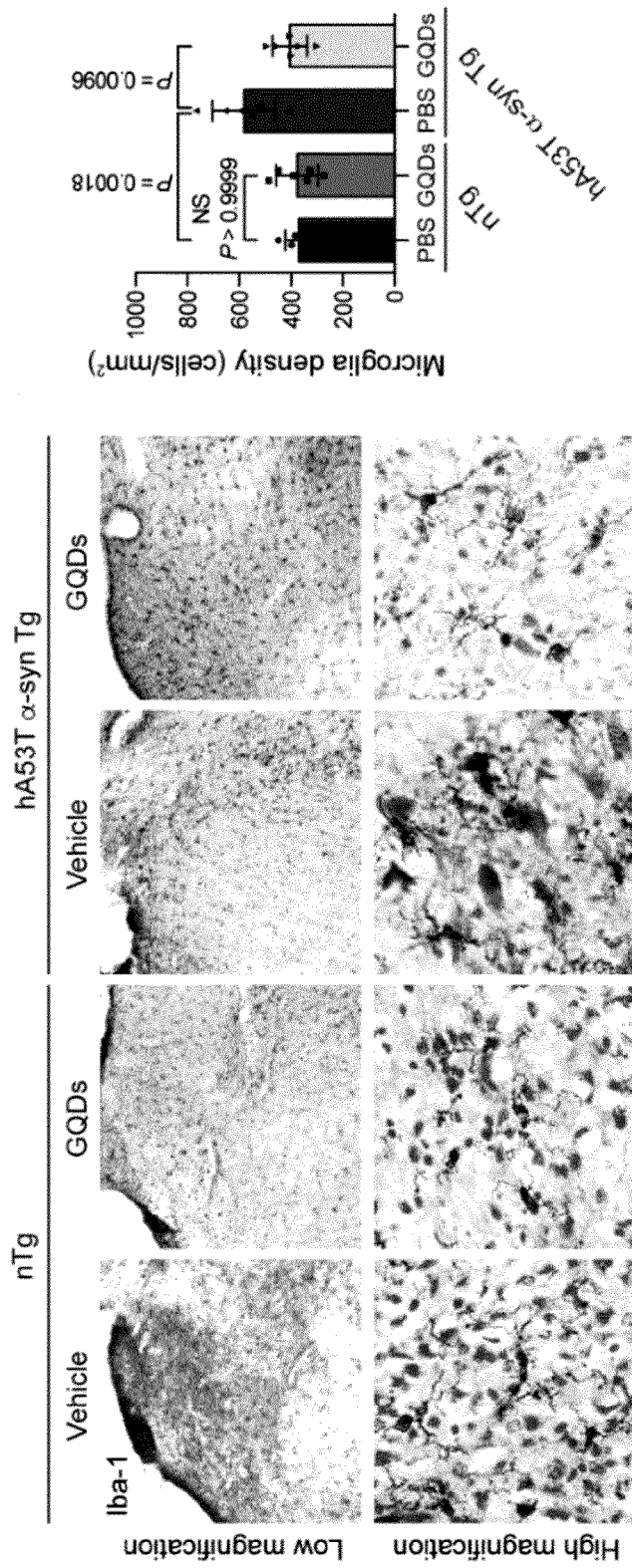


d

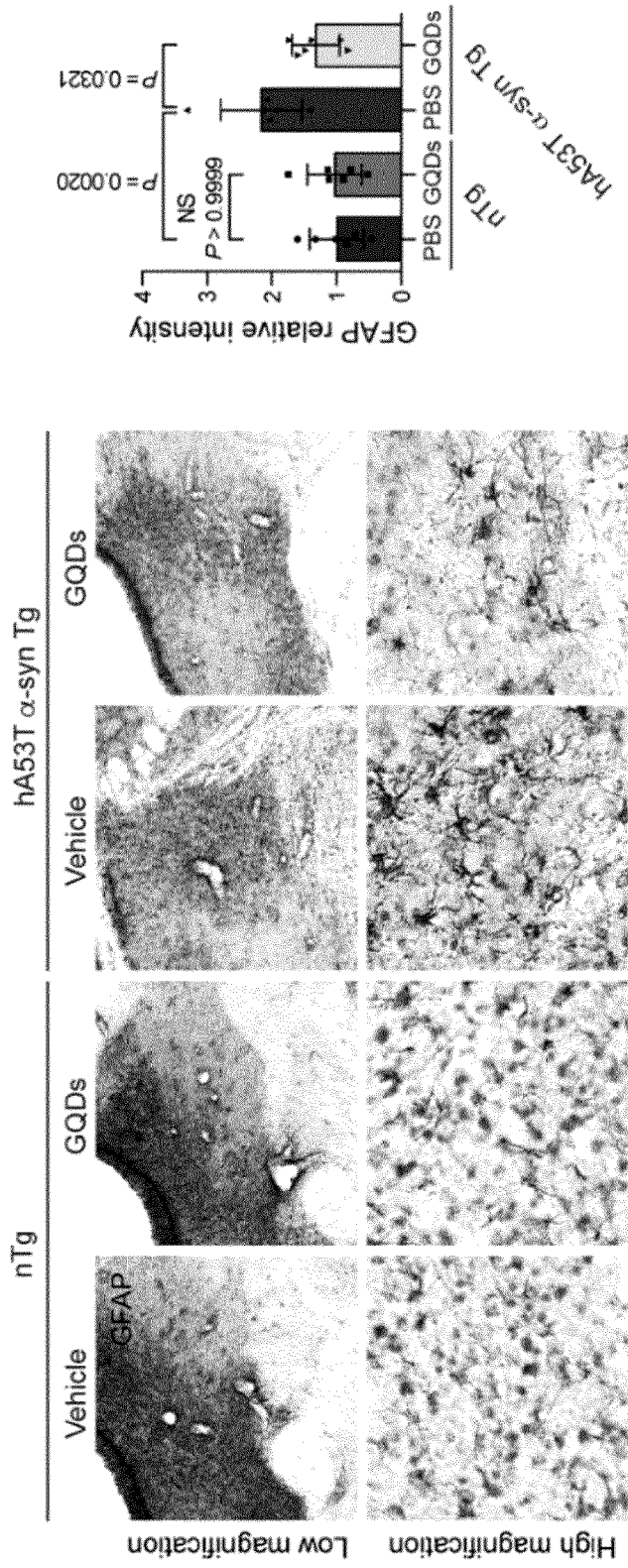


c

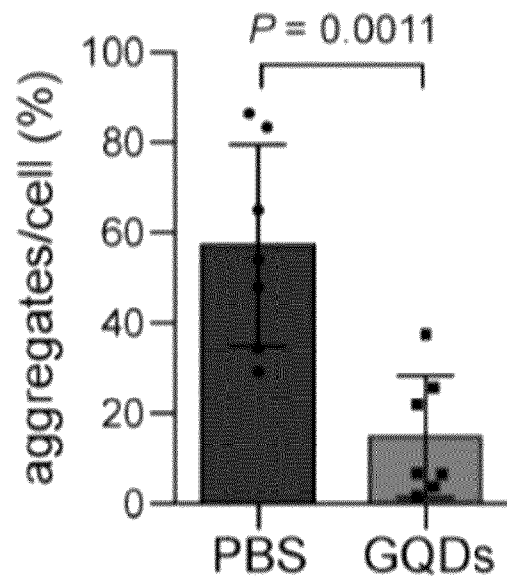
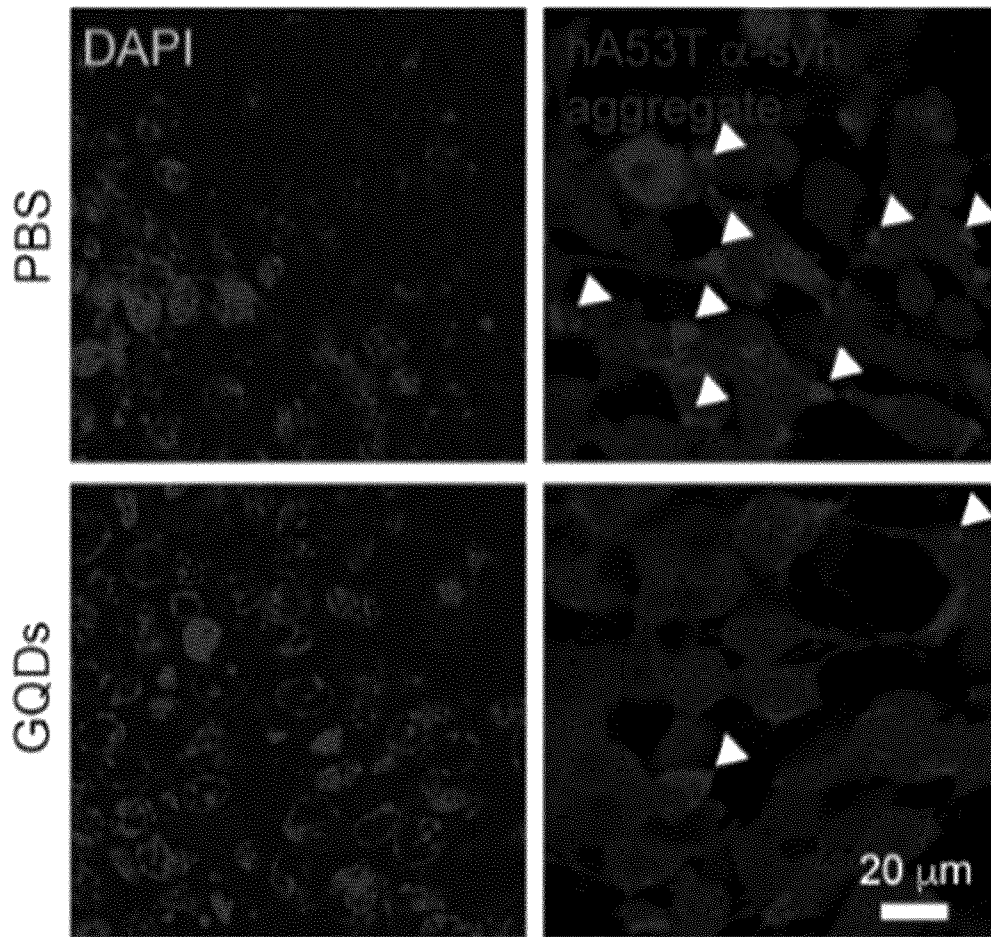
[도 15a]



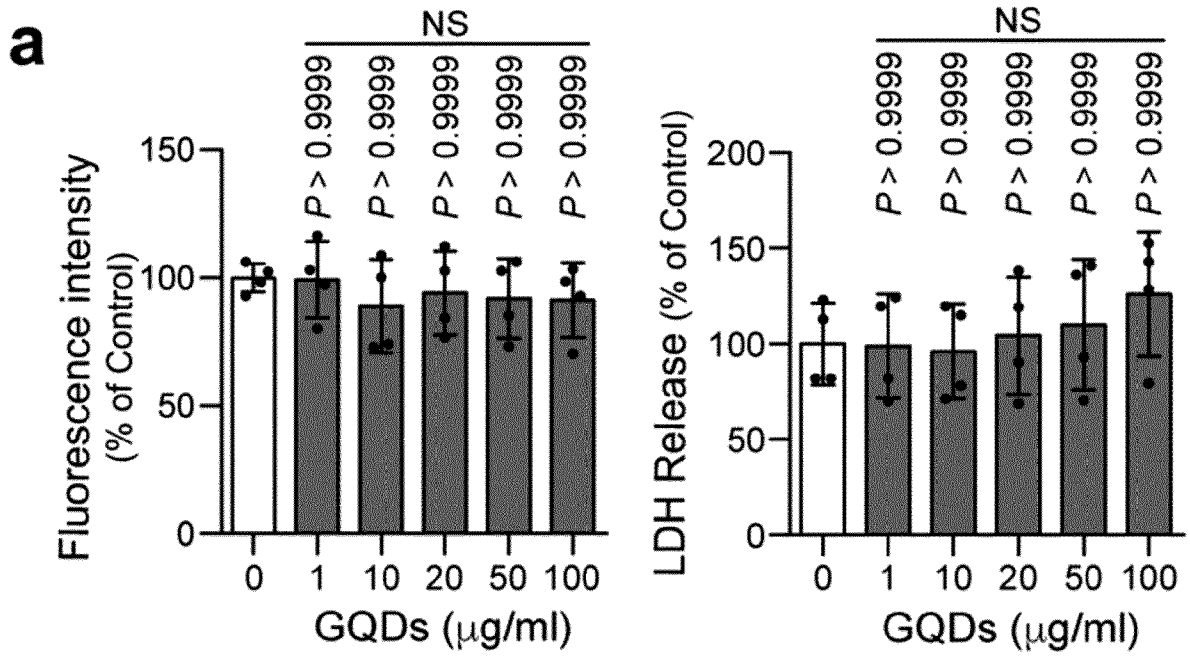
[도 15b]



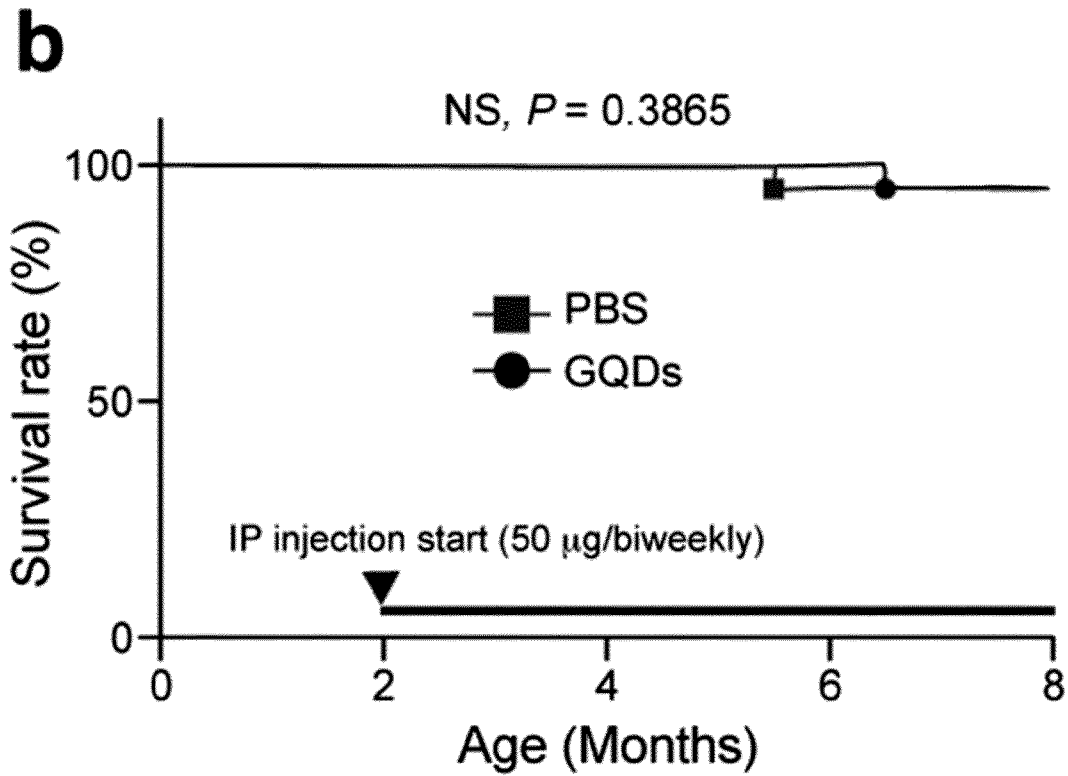
[도 15c]



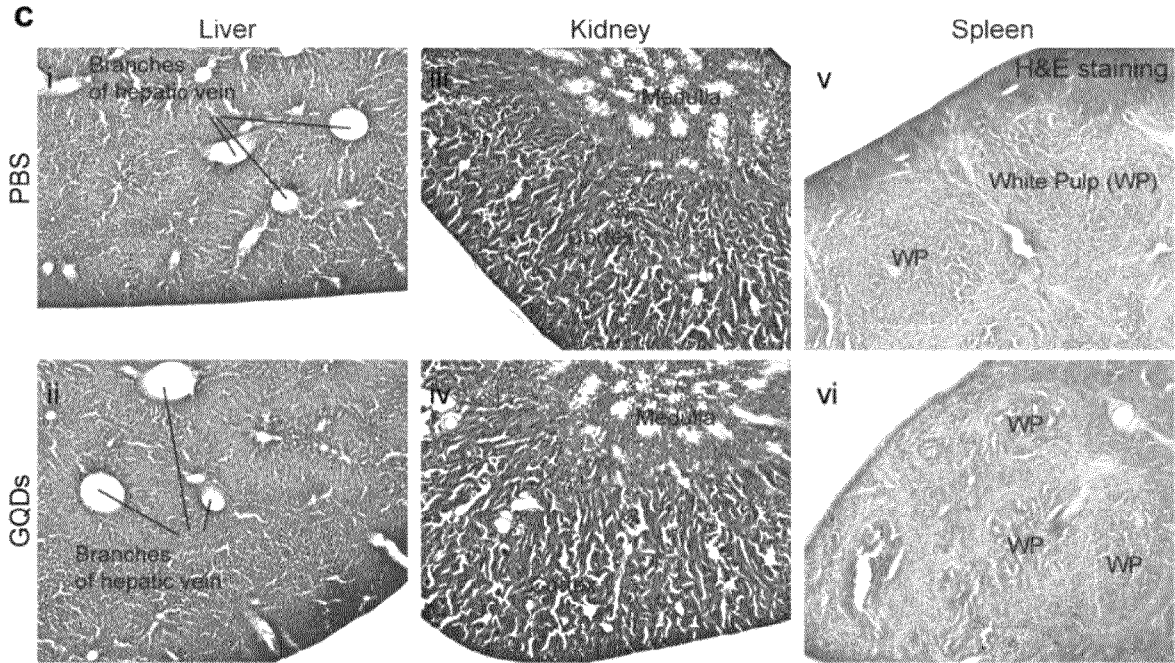
[도16a]



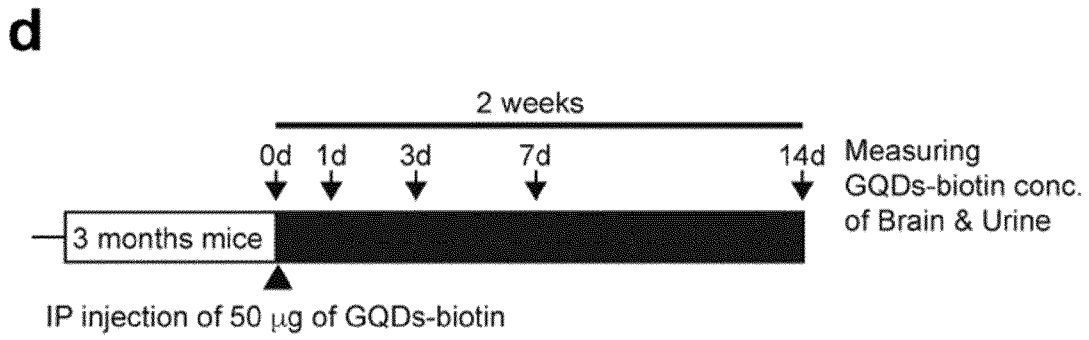
[도16b]



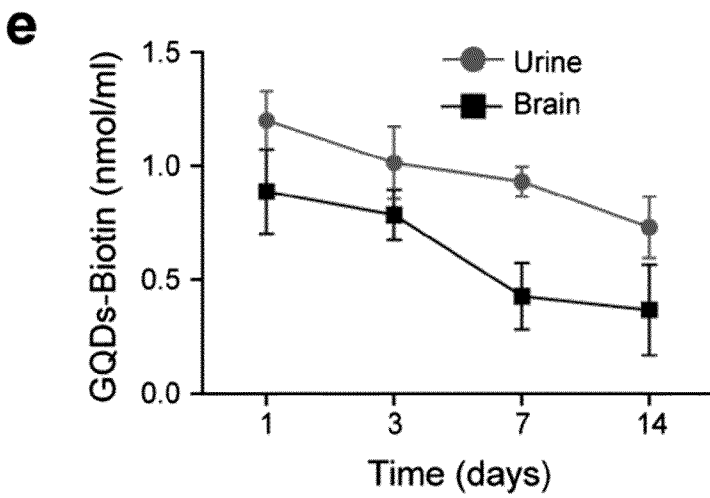
[도 16c]



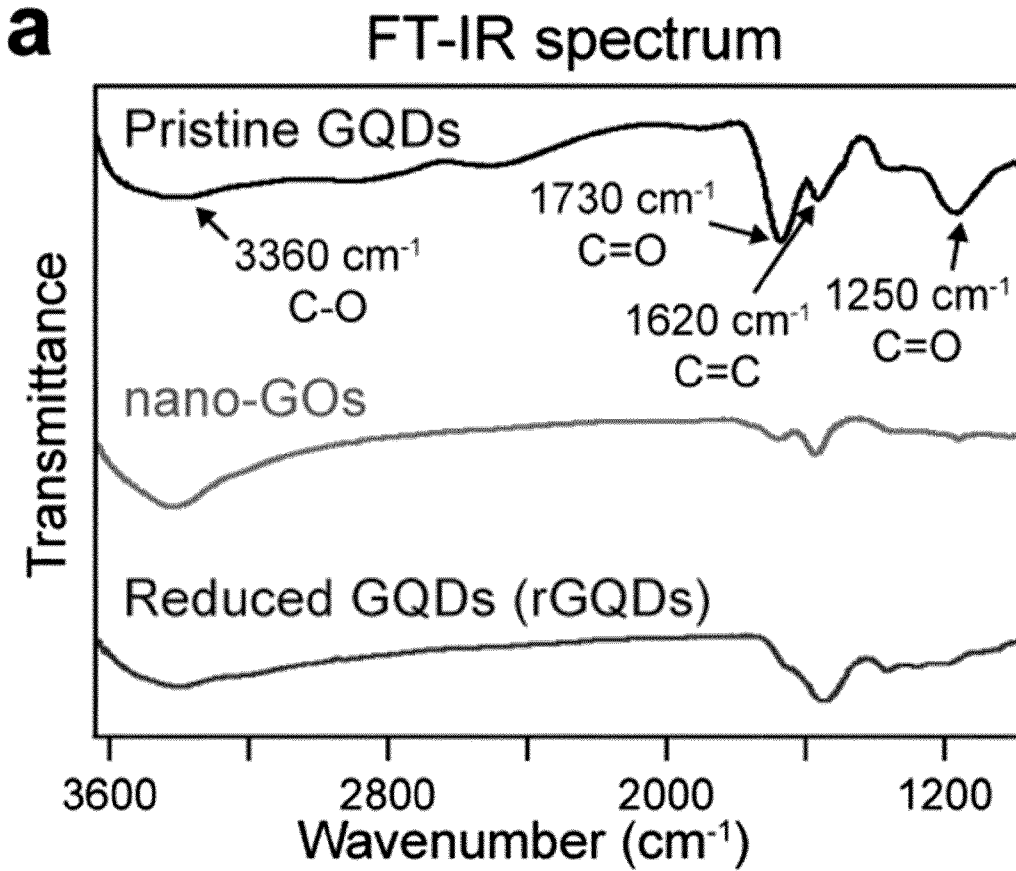
[도 16d]



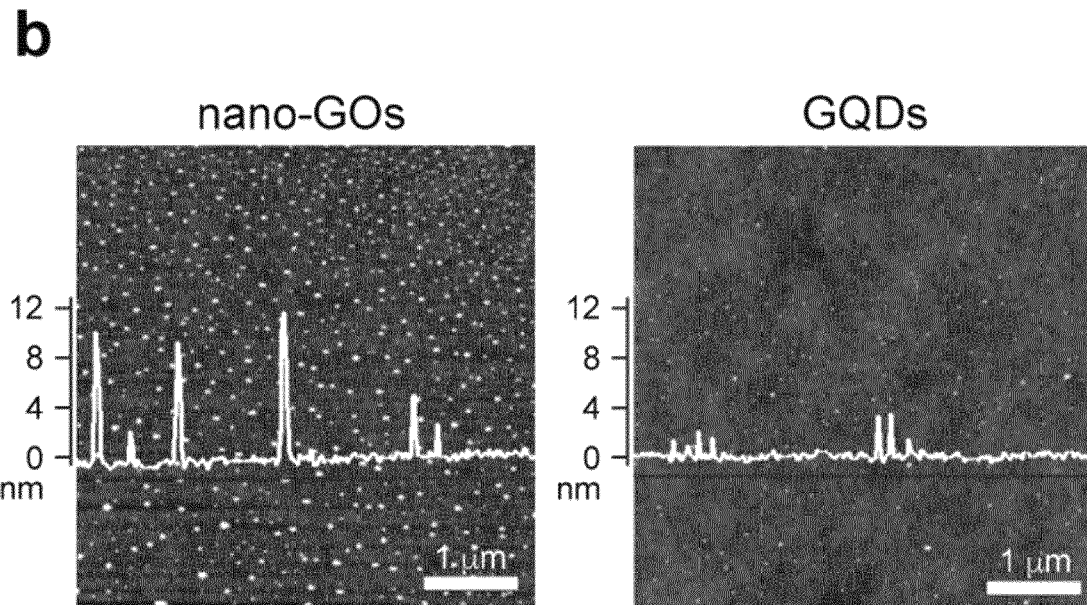
[도 16e]



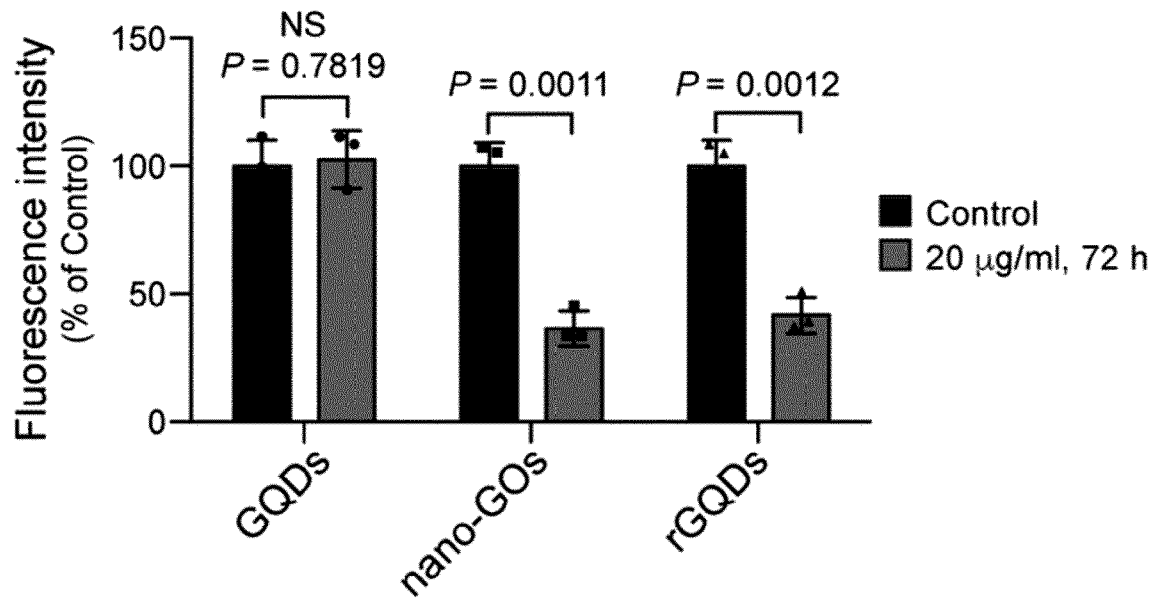
[도17a]



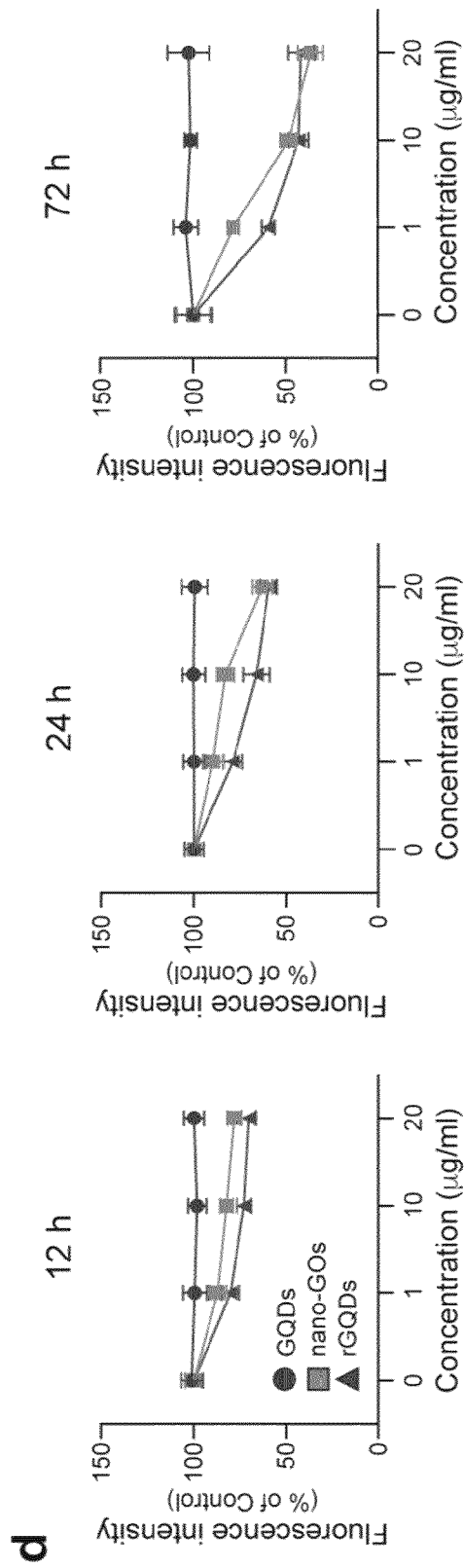
[도17b]



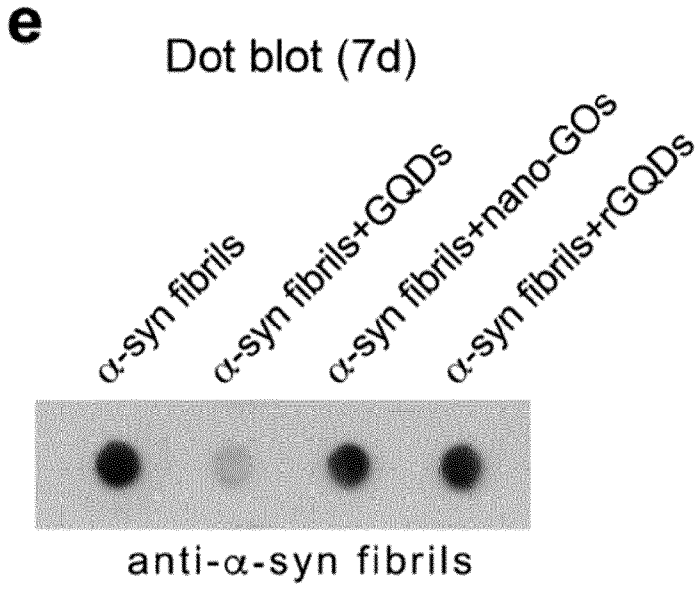
[도17c]

C

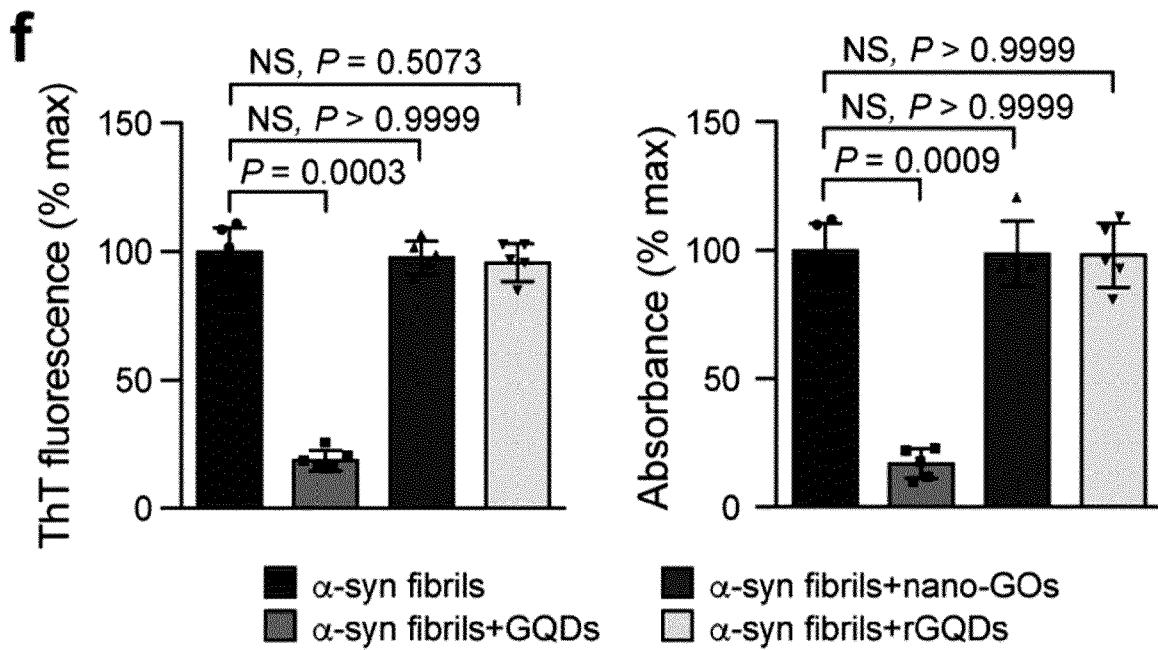
[도 17d]



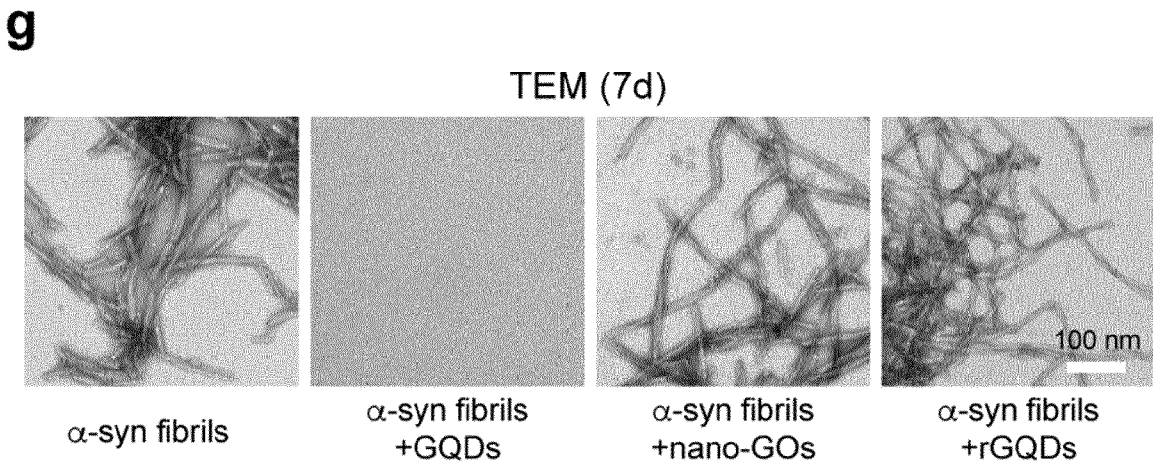
[도17e]



[도17f]

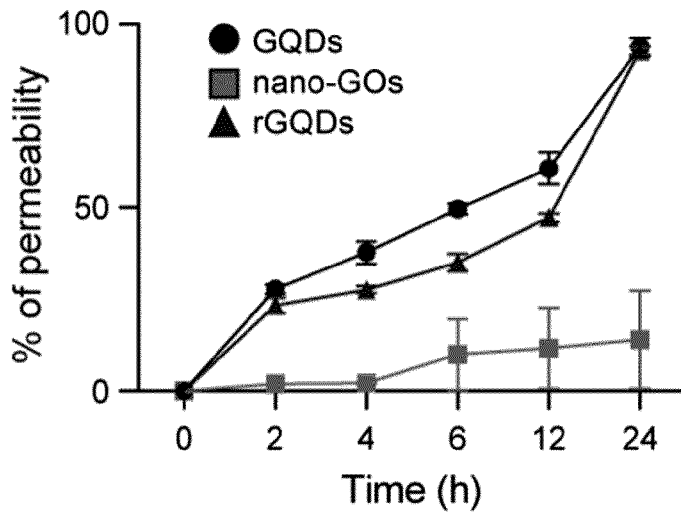


[도17g]



[도 17h]

h



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/008359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/44(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 3/00(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 33/44; A23K 20/20; A23L 33/10; A61K 41/00; A61K 47/06; A61K 47/48; A61K 49/06; A61N 5/06; A61P 25/00; A61P 29/00; A61P 3/00

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: graphene quantum dots, α -synucleinopathy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0115671 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 14 October 2015 See paragraphs [0003], [0016], [0025], [0037], [0042], [0045]; claims 1, 3, 5; and figures 1-3.	1-15,17
X	KR 10-1533036 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 01 July 2015 See paragraphs [0076], [0080], [0085], [0088], [0099]; and figures 2, 7.	1-7,10
X	NURUNNABI, Md et al. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphenequantumdots. <i>Acs Nano</i> . 2013, vol. 7, no. 8, pages 6858-6867 See abstract; and figure 1.	1,2,6,7,10
A	US 2014-0336514 A1 (PEYMAN, Gholam A.) 13 November 2014 See the entire document.	1-15,17
PX	KR 10-2019-0060492 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 03 June 2019 See paragraphs [0068], [0072], [0149]; claims 1, 3, 4; and figure 1.	1,2,6,7,10-12,14,17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 OCTOBER 2019 (24.10.2019)

Date of mailing of the international search report

24 OCTOBER 2019 (24.10.2019)

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/KR2019/008359

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 16 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method, and thus pertains 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/KR2019/008359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0115671 A	14/10/2015	CN 106470706 A	01/03/2017
		EP 3130353 A1	15/02/2017
		EP 3130353 A4	15/11/2017
		JP 2017-510650 A	13/04/2017
		KR 10-1747147 B1	14/06/2017
		US 2017-0189359 A1	06/07/2017
		US 2018-0289646 A1	11/10/2018
		WO 2015-152688 A1	08/10/2015
		KR 10-1533036 B1	01/07/2015
US 2014-0336514 A1	13/11/2014	US 10022457 B2	17/07/2018
		US 2007-0028928 A1	08/02/2007
		US 2011-0201994 A1	18/08/2011
		US 2012-0136296 A1	31/05/2012
		US 2013-0165846 A1	27/06/2013
		US 2013-0309278 A1	21/11/2013
		US 2014-0056815 A1	27/02/2014
		US 2014-0135680 A1	15/05/2014
		US 2015-0032044 A9	29/01/2015
		US 2015-0119794 A1	30/04/2015
		US 2015-0182756 A1	02/07/2015
		US 2015-0283265 A1	08/10/2015
		US 8388668 B2	05/03/2013
		US 8409263 B2	02/04/2013
		US 8460351 B2	11/06/2013
		US 8562660 B2	22/10/2013
US 9956425 B2	01/05/2018		
US 9962558 B2	08/05/2018		
KR 10-2019-0060492 A	03/06/2019	KR 10-2019-0060491 A	03/06/2019
		WO 2019-103541 A1	31/05/2019

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
A61K 33/44(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 33/44; A23K 20/20; A23L 33/10; A61K 41/00; A61K 47/06; A61K 47/48; A61K 49/06; A61N 5/06; A61P 25/00; A61P 29/00; A61P 3/00

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: 그래핀 양자점(graphene quantum dots), 알파-시누클레인병증(α -synucleinopathy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0115671 A (서울대학교산학협력단 등) 2015.10.14 단락 [0003], [0016], [0025], [0037], [0042], [0045]; 청구항 1, 3, 5; 및 도면 1-3 참조.	1-15, 17
X	KR 10-1533036 B1 (성균관대학교산학협력단) 2015.07.01 단락 [0076], [0080], [0085], [0088], [0099]; 및 도면 2, 7 참조.	1-7, 10
X	NURUNNABI, MD 등, "In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphenequantumdots." Acs Nano, 2013, 7권, 8호, 페이지 6858-6867 요약; 및 도면 1 참조.	1, 2, 6, 7, 10
A	US 2014-0336514 A1 (PEYMAN, GHOLAM A.) 2014.11.13 전체 문헌 참조.	1-15, 17
PX	KR 10-2019-0060492 A (서울대학교산학협력단 등) 2019.06.03 단락 [0068], [0072], [0149]; 청구항 1, 3, 4; 및 도면 1 참조.	1, 2, 6, 7, 10-12, 14, 17

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 2019년 10월 24일 (24.10.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 10월 24일 (24.10.2019)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353
---	------------------------------------

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: 16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 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
KR 10-2015-0115671 A	2015/10/14	CN 106470706 A EP 3130353 A1 EP 3130353 A4 JP 2017-510650 A KR 10-1747147 B1 US 2017-0189359 A1 US 2018-0289646 A1 WO 2015-152688 A1	2017/03/01 2017/02/15 2017/11/15 2017/04/13 2017/06/14 2017/07/06 2018/10/11 2015/10/08
KR 10-1533036 B1	2015/07/01	US 2015-0283239 A1	2015/10/08
US 2014-0336514 A1	2014/11/13	US 10022457 B2 US 2007-0028928 A1 US 2011-0201994 A1 US 2012-0136296 A1 US 2013-0165846 A1 US 2013-0309278 A1 US 2014-0056815 A1 US 2014-0135680 A1 US 2015-0032044 A9 US 2015-0119794 A1 US 2015-0182756 A1 US 2015-0283265 A1 US 8388668 B2 US 8409263 B2 US 8460351 B2 US 8562660 B2 US 9956425 B2 US 9962558 B2	2018/07/17 2007/02/08 2011/08/18 2012/05/31 2013/06/27 2013/11/21 2014/02/27 2014/05/15 2015/01/29 2015/04/30 2015/07/02 2015/10/08 2013/03/05 2013/04/02 2013/06/11 2013/10/22 2018/05/01 2018/05/08
KR 10-2019-0060492 A	2019/06/03	KR 10-2019-0060491 A WO 2019-103541 A1	2019/06/03 2019/05/31