

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 4 월 30 일 (30.04.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/085673 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/7088 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/012970

(22) 국제출원일: 2019 년 10 월 2 일 (02.10.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0128184 2018 년 10 월 25 일 (25.10.2018) KR

(71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

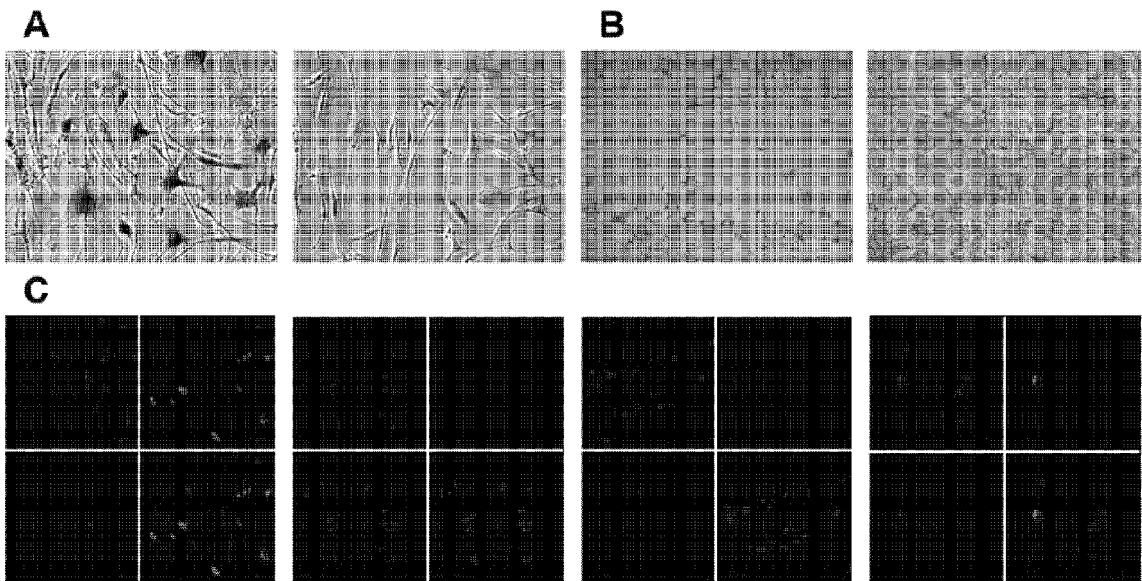
[KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 조광현 (CHO, Kwang Hyun); 34141 대전시 유성구 대학로 291, E16-1003호, Daejeon (KR). 이수범 (LEE, Soo Beom); 34141 경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 912동 302호, Gyeonggi-do (KR). 안수균 (AN, Su Gyun); 35225 대전시 서구 월평로34번길 25, 301호, Daejeon (KR). 강준수 (KANG, Jun Soo); 02598 서울시 동대문구 답십리로 130, 308동 1002호, Seoul (KR). 조시영 (CHO, Si Young); 02598 경기도 용인시 기흥구 새천년로 40, 401동 1403호, Gyeonggi-do (KR). 김형수 (KIM, Hyung Su); 16960 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, Seoul (KR).

(54) Title: COMPOSITION FOR INDUCING AGE-REVERSING, CONTAINING PDK1 INHIBITOR

(54) 발명의 명칭: PDK1 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a method for inducing age-reversing in which aged cells are reversed to a young cell state by using a specific molecular target, and, more specifically, to a composition for inducing age-reversing, containing a phosphoinositide-dependent kinase-I (PDK1) inhibitor or to a method for inducing age-reversing, comprising a step of performing treatment with a PDK1 inhibitor. According to the present invention, PDK1 is a protein simultaneously regulating MTOR and NF- κ B, from among major signaling proteins involved in cell aging, and is a key protein determining the growth, division and aging-associated secretion phenotypes of cells, and it has been ascertained that when PDK1 is temporarily inhibited, some aged cells are effectively reversed to normal young cells, and in these cells, no more aged-cell phenotypes are observed. Therefore, PDK1 presents a novel possibility to current aging treatment strategies focused on strategies of inducing aged-cell death, and can be effectively used in the development of anti-aging substances and agents for treating aging-associated diseases.

(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))

(57) 요약서: 본 발명은 특정 분자 타겟을 이용하여 노화된 세포를 젊은 세포 상태로 되돌리는 역노화 유도 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물 또는 PDK1 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PDK1 은 세포노화에 관여하는 주요 신호전달 단백질 중 MTOR 과 NF- κ B 를 동시에 조절하는 단백질로서 세포의 성장, 분열 및 노화 관련 분비표현형을 결정하는 핵심 단백질이며, PDK1 을 일시적으로 억제 시 노화된 세포 중 일부가 효과적으로 정상 젊은 세포로 가역화되며, 이러한 세포들에서는 더 이상 노화된 세포의 표현형이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 따라서, PDK1 은 노화된 세포를 사멸 유도하는 전략에 치중되어 있는 현재의 노화치료전략에 새로운 가능성을 제시하고, 항노화 물질 및 노화 관련 질환 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: PDK1 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 특정 분자 타겟을 이용하여 노화된 세포를 젊은 세포 상태로 되돌리는 역노화 유도 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물 또는 PDK1 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 세포 노화는 환경적 스트레스로 인해 손상을 입은 세포가 암화되기 전에 영구히 세포 주기를 멈추는 비가역적 생명 현상으로 알려져 있다. 세포 노화는 영구적인 세포분열의 중단과 더불어, 노화관련 분비표현형(Senescence Associated Secretory Phenotype, SASP)을 갖는다고 알려져 있다. 최근 노화된 세포가 분비하는 물질들로 인하여 주변 세포의 노화의 가속화뿐 아니라 암을 포함한 여러 질병이 발생할 수 있음이 잇따라 발표되면서 노화된 세포를 조절하려는 시도들 또한 함께 이뤄지고 있다. 하지만 대부분의 시도들은 노화된 세포들을 특징적으로 사멸시키는 전략에 집중되어 있으며, 현재까지 노화된 세포를 다시 정상 세포로 가역화하여 노화된 세포의 부수적 결과들을 방지할 수 있는지는 확인되지 않고 있다. 상기 연구들은 분자생물학적인 조작을 통하여 노화된 세포가 세포 노화 현상으로부터 벗어날 수 있다는 것을 간접적으로 보여준다. 그러나 이러한 연구들은 노화 현상의 메커니즘에 대한 이해의 부족으로 인해 노화된 세포를 가역화 시키는데 필요한 미세 컨트롤이 불가능하다는 한계를 지니고 있으며, 현재까지 효과적으로 노화된 세포를 정상 젊은 세포로 가역화시킬 수 있는 분자 타겟은 제시되어 있지 않다.
- [4] 또한, 세포 노화는 세포 내부의 축적된 DNA 데미지의 축적과 세포 외부의 다양한 전달물질에 의해 일어나는 현상으로 현재까지 세포 노화를 일으키는 세 가지 주요 신호전달경로는 세포의 성장과 분열을 담당하는 IGF1-PI3K-mTOR 신호전달경로와, DNA damage -P53-RB 신호전달경로, 그리고 SASP를 주관하는 NF- κ B 신호전달경로가 있다고 알려져 있다. 이처럼 여러 신호전달시스템이 종합적으로 관여하는 세포 노화를 이해하기 위해서는 네트워크적 접근을 필요로 한다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 이에 본 발명자들은 노화현상에 대한 이해를 바탕으로 시스템생물학적 접근을

통해 노화네트워크 모델을 구축하고, 최적의 노화제어 타겟을 제시하였다. 보다 구체적으로, 기존 문헌 정보를 바탕으로 세 가지 중심 신호전달경로를 종합한 후, 대규모 단백질 분석 결과를 이용하여 네트워크의 파라미터를 추정하고, 완성된 네트워크 모델을 이용하여 PDK1이 노화된 세포 상태를 젊은 세포 상태로 가역화시킬 수 있는 최적 분자 타겟임을 확인하고, PDK1을 억제하였을 때 인간 유래의 세포 노화 현상을 가역화시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [7] 본 발명의 목적은 PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또다른 목적은 PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 생체 외(*In vitro*)에서 PDK1 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 PDK1 저해제를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 PDK1 저해제에 관한 것이다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 생체 외(*In vitro*)에서 PDK1 저해제를 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 노화 관련 질환의 예방 또는 치료 제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 PDK1 저해제를 제공한다.

[20]

발명의 효과

- [21] 본 발명에 따른 PDK1은 세포노화에 관여하는 주요 신호전달 단백질 중

mTOR과 NF- κ B를 동시에 조절하는 단백질로서 세포의 성장, 분열 및 노화 관련 분비표현형을 결정하는 핵심 단백질이며, PDK1을 일시적으로 억제 시 노화된 세포 중 일부가 효과적으로 정상 젊은 세포로 가역화되며, 이러한 세포들에서는 더 이상 노화된 세포의 표현형이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 따라서, PDK1은 노화된 세포를 사멸 유도하는 전략에 치중되어 있는 현재의 노화치료전략에 새로운 가능성을 제시하고, 항노화 물질 및 노화 관련 질환 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 기존 문헌 정보를 기반으로 구축한 41개의 노드로 구성된 노화 네트워크 모델을 나타낸 도이다. 초록색 화살표는 활성화 링크, 빨간색 T자 화살표는 저해 링크를 의미한다. 노드의 종류는 총 3가지로, 보라색은 입력 노드(총 3개), 초록색 타원은 출력 노드(총 6개) 및 파란색 사각형은 내부노드(총 32개)를 각각 의미한다.

[24] 도 2는 섬유아세포에 대하여 대규모 단백질 분석 실험을 수행한 결과를 히트맵으로 나타낸 도이다. 히트맵의 각 열은 세포주기 상태(일시적 중단 상태, 영구적 중단 상태 또는 분열 상태)를 나타내고, 각 행은 유전자 심볼을 나타낸다. 도 2의 A는 각 유전자에 대응하는 시계열 RPPA(Reverse Phase Protein Assay) 데이터의 커브의 아래 면적을 나타낸 것이고, 도 2의 B는 커브 아래 면적 값을 0과 1로 이분화한 결과를 나타낸 것이다.

[25] 도 3은 진화 알고리즘을 통하여 2000개의 네트워크 모델들을 학습시키고, 이를 본 발명에서 구축한 노화 네트워크 모델에 적용하여 대규모 시뮬레이션한 결과를 나타낸 도이다. y축은 저해 타겟의 유전자 심볼을, x축은 2000개의 모델 중 저해 시뮬레이션 결과를 나타낸 모델의 개수를 나타낸다.

[26] 도 4는 PDK1 저해제(BX-795; Selleckchem)를 노화된 섬유아세포에 처리한 세포 실험 결과를 나타낸 도이다. 도 4의 A는 SA β -gal activity assay 결과, 도 4의 B는 Wound healing assay 결과, 도 4의 C는 ki-67 형광염색을 수행한 결과로, 왼쪽에서부터 순서대로 정상 젊은 세포, 노화 세포, mTOR 저해제를 처리한 노화세포 및 PDK1 저해제를 처리한 노화 세포를 나타낸다.

[27] 도 5는 PDK1 저해제(PDK1 inhibitor 7)를 노화된 섬유아세포에 처리한 세포 실험 결과를 나타낸 것으로, 도 5의 A 및 B는 SA β -gal activity assay 결과, 도 5의 C 및 D는 ki-67 형광염색을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

[28]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[30] 본 발명은 PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물을 제공한다.

- [31] 본 발명에서, “역노화”란 노화를 예방 및 치료하는 개념의 항노화와 달리 노화를 유도하는 유전인자의 발현을 원천적으로 조절하여 노화 상태를 이전으로 되돌리는 것을 의미한다.
- [32] 항노화 및 노화 관련 질병 연구가 활발히 이루어지고 있음에도, 현재 항노화 및 노화 관련 질병 치료전략은 안 좋은 화학물질을 분비하여 주변 세포들에게 나쁜 영향을 주는 노화 세포를 사멸시키는 것에 집중되어 있어 실질적으로 거의 모든 항노화 요법들이 임상시험에서 확고한 효과와 안정성을 입증하지 못하고 있는 실정이다. 이에, 본 발명자들은 무분별한 세포 성장상태를 배제시키면서 노화된 세포를 일시적으로 세포주기 중단 상태로 되돌릴 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.
- [33]
- [34] 먼저, 본 발명의 일 구현예에서 노화된 세포 상태를 젊은 세포 상태로 가역화시키는 최적 분자 타겟을 규명하기 위해 노화 네트워크 모델을 구축하였다. 그 후, 섬유아세포의 대규모 단백질 분석 실험을 수행하고, 진화 알고리즘을 통하여 학습된 2000개의 네트워크 모델들을 본 발명에 따른 노화 네트워크 모델에 적용하여 PDK1이 최적의 분자 타겟임을 확인하였다. 마지막으로, 상기 PDK1 저해제를 노화된 섬유아세포에 처리하였을 때 세포의 노화 상태가 줄어들고, 정상 조건의 배지 처리 시 세포들이 다시 성장 및 분열하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명자들은 본 발명의 PDK1 저해제가 역노화 유도용 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 PDK1 저해제는 PDK1 유전자의 발현 억제제 또는 PDK1 단백질의 활성 억제제일 수 있다. 상기 PDK1 유전자의 발현 억제제는 PDK1 유전자 또는 PDK1의 발현을 촉진하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA) 및 miRNA(microRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 PDK1 단백질의 활성 억제제는 PDK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 항원 결합 단편, 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 아타머(aptamer)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 PDK1 단백질의 활성 억제제는 PDK1 단백질에 직접/간접적으로 결합하여 이의 활성을 억제하는 화합물을 포함할 수 있다. 상기 화합물로는 BX-795, BX-912, PHT-427, GSK2334470, OSU-03012, PDK1 inhibitor 7 등이 있을 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 일 실시예에서는 PDK1 활성을 억제하는 화합물로 PDK1 저해제인 BX-795 및 PDK1 inhibitor 7($C_{28}H_{22}F_2N_4O_4$, CAS No. 1001409-50-2)을 사용하였다.
- [36] 본 발명에서 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을

저해하는 작용을 한다. 상기 안티센스 서열은 상기 유전자의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, 상기 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

- [37] 또한, 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다. 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 상기 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오펜, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다.

- [38] 본 발명에서 "siRNA"란 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

- [39] 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(본 발명의 일 구현예에 따르면, 타겟 유전자인 PDK1 유전자의 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(상기 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 또한, siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두

가능하다. siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유래의 siRNA 발현 카세트 등을 세포 안으로 형질전환 또는 감염(infection)시키는 방법이 있다.

[40] 본 발명에서 “shRNA”란 small hairpin RNA 혹은 short hairpin RNA으로 불리며, RNA 간섭으로 유전자를 침묵시킬 수 있는 용도로 사용되는 것이다. 보통 벡터를 이용하여 목적 세포로 도입한다. 이러한 shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 다른 물질에 의하여 절단되어 siRNA가 되기도 한다.

[41] 본 발명에서 “항체”란 생체의 면역계에서 혈액이나 림프를 순환하면서 외부 물질인 항원이 침입한 경우 이에 반응하는 물질을 말하며, 림프조직에서 형성되는 글로불린계 단백질로 면역글로불린이라고도 불린다. 항체는 B 세포가 생산해서 체액으로 흘러보내는 단백질로 항원과 특이적으로 결합하며, 하나의 항체 분자에는 두 개의 중사슬 (heavy chain)과 두 개의 경사슬 (light chain)이 있으며, 각각의 중사슬과 경사슬은 그의 N-터미널 말단에 가변영역을 갖고 있다. 각각의 가변영역은 3 개의 상보성 결정부위 (Complementarity determining region: CDR)와 4 개의 구조 형성부위 (framework regions: FRs)로 구성되는데, 상보성 결정 부위들은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, 가변영역의 구조형성 부위들로 유지되는 비교적 짧은 펩티드 서열로 존재한다. 본 발명의 목적상 상기 항체는 PDK1과 결합하여 PDK1의 활성을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[42] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 PDK1 저해제는 mTOR(mammalian Target Of Rapamycin) 및 NF-κB(Nuclear Factor Kappa B)의 전사활성을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 따른 PDK1 저해제는 따라서 mTOR 및 NF-Kb를 동시에 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[43] 본 발명에 따른 역분화 유도용 조성물은 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*) 처리가 모두 가능하며, 예를 들어 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물, 화장품 조성물, 배지 첨가용 조성물, 시약 조성물 등의 다양한 형태로 이용될 수 있다.

[44] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[45] 본 발명에서 “노화”란 시간이 지남에 따라 일어나는 신체의 모든 생리적 변화를 통칭하는 것으로 개체에 따라 수많은 요인에 의해 매우 다양하게 일어나는 생명 현상을 의미한다. 노화 현상을 구체적으로 살펴보면 각 구성 기관 및 조직의 기능 변화가 일어나는 것으로, 개체의 노화는 결국 그 개체를 구성하는 세포들의 노화에 기인한다.

[46] 본 발명에 있어서, 상기 노화 관련 질환은 탈모, 주름, 골사동, 골다공증, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 천식(Asthma), 피부염(Dermatitis), 건선(Psoriasis), 낭성유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus),

쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diseases), 자가면역성 당뇨(Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergies), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암(Cancer), 소동맥 질환 및 이식편대숙주질환(graft-versus-host disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 류마티스 관절염, 피부염, 낭섬유증, 폐섬유증, 염증성장질환, 죽상경화증, 관상동맥질환협심증 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [47] 본 발명에 있어서 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [48] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [49] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [50] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 상기 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골 내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [51] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 사용된 특정 유효성분의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1~10000 μ g/체중kg/day, 더욱더 바람직하게는 10~1000mg/체중kg/day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [52] 본 발명에 따른 세포 노화는 섬유아세포, 혈관내피세포, 근섬유육모세포, 조골세포, 연골세포, 심근세포, 조혈모세포, 간세포, 췌장세포, 생식세포 및 각질세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 노화일 수 있으며, 바람직하게는 섬유아세포 또는 혈관내피세포의 노화일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [53] 본 발명에 따른 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 추가적으로 다른 노화 관련 질환의 약제와 병용투여할 수 있다. 또한, 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [55] 본 발명에 따른 건강기능식품은 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [56] 본 발명에서 "건강기능식품"이란 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [57] 본 발명에 따른 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

- [58] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초 추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [59] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 PDK1의 저해제를 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [60] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 PDK1의 저해제를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 유효성분인 PDK1의 저해제를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [61] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 PDK1의 저해제와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [62] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 PDK1의 저해제와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [63] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [64] 또한, 본 발명은 생체 외(*In vitro*)에서 PDK1 저해제를 노화된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법을 제공한다.
- [65] 또한, 본 발명은 (a) 분리된 노화된 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보물질이 처리된 노화된 세포에서 PDK1 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 PDK1 발현 또는 활성 수준이 후보물질이 처리되지 않은 분리된 노화된 세포에 비해 낮은 경우, 상기 후보물질을 노화 관련 질환의 치료 제제로 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계; 를 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료 제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [66] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 먼저 분리된 노화된 세포에 분석하고자 하는 후보물질을 접촉시킬 수 있다. 상기 후보물질은 PDK1의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성에 영향을 미치는지의 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA, shRNA, miRNA, 상기

단백질에 특이적인 항체 또는 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[67] 이후, 후보물질이 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 감소되는 것이 측정되면 상기 후보물질은 노화 관련 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 제제로 사용할 수 있을 것으로 판정할 수 있다.

[68] 본 발명에 있어서, 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 공지 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다. 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 노 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[69] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우 생물학적 시료 내의 상기 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨 (detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[71] 또한, 본 발명은 PDK1 저해제를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[72] 본 발명에 있어서, 상기 대상(subject)은 세포 노화 또는 노화 관련 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상인 것을 특징으로 한다.

[73] 또한, 본 발명은 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 PDK1 저해제를 제공한다.

[74]

[75] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[76]

발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78]

[79] **실시예 1. 노화 네트워크 모델 구축**

[80] 기존 문헌 정보를 기반으로 41개의 노드로 구성된 노화 네트워크 모델을 구축하고 이를 도 1에 나타내었다.

[81] 네트워크는 세포 노화를 일으키는 세 가지 주요 신호전달경로인 세포의 성장과 분열을 담당하는 IGF1-PI3K-mTOR 신호전달경로와, DNA damage-P53-RB 신호전달경로 및 SASP를 주관하는 NF- κ B 신호전달경로를 종합하여 구축하였으며, 네트워크에 포함된 77개 링크의 기존 문헌정보는 하기 표 1과 같다.

[82] [표 1]

[83]

From	Regulation type	To	Mechanism	PMID
AKT1	-	CDKN1A	phosphorylation	11463845
AKT1	-	FOXO3	phosphorylation	12517744
AKT1	+	IKBKB	phosphorylation	11259436
AKT1	+	MDM2	phosphorylation	11923280
AKT1	+	MTOR	phosphorylation	16027121
AKT1	-	PTEN	ubiquitination	26183061
AKT1	-	TSC2	phosphorylation	12172553
AMPK	+	FOXO3	phosphorylation	22186033
AMPK	-	MTOR	phosphorylation	22186033
AMPK	+	NAD	metabolism	19262508
AMPK	+	PPARGC1A	transcription	23963743
AMPK	+	TP53	phosphorylation	22186033
AMPK	+	TSC2	phosphorylation	22186033
AMPK	+	ULK1	phosphorylation	22186033
ATM/ATR	+	TP53	phosphorylation	9925639
CDK2/4/6	-	RB1	phosphorylation	24089445
CDKN1A	-	CDK2/4/6	binding	24089445
CDKN2A	-	CDK2/4/6	binding	24089445
CDKN2A	-	MDM2	binding	9724636
DNADamage	+	ATM/ATR		
DNADamage	+	MAP2K3/MAP2K6		
DNADamage	+	ROS		
FOXO3	+	ATM/ATR	phosphorylation	22893124
FOXO3	+	CDKN1A	transcription	28808415
FOXO3	+	SOD2	transcription	26184557
IGF1	+	IGF1R		
IGF1R	+	IRS1	phosphorylation	26474286
IGF1R	+	KRAS	GTP-GDP conversion	23658296
IKBKB	-	IRS1	phosphorylation	22982470
IKBKB	-	NFKBIE	phosphorylation	10602459
IKBKB	-	PTEN	transcription	14729949

INSR	+	IRS1	binding	20966354
INSR	+	KRAS	GTP-GDP conversion	20966354
IRS1	+	PIK3CA	binding	20966354
KRAS	+	MAPK1	phosphorylation	11942415
KRAS	+	PIK3CA	binding	21779497
lowNutrition	+	AMPK		
lowNutrition	-	INSR		
MAP2K3/MAP2K6	+	MAPK14	phosphorylation	11942415
MAPK1	-	FOXO3	phosphorylation	18204439
MAPK14	+	CDKN2A	transcription	19619499
MAPK14	+	FOXO3	phosphorylation	22128155
MAPK14	+	TP53	phosphorylation	17481747
MDM2	-	FOXO3	ubiquitination	21238503
MDM2	-	RB1	ubiquitination	15577944
MDM2	-	TP53	ubiquitination	23885265
MTOR	-	EIF4EBP1	phosphorylation	12080086
MTOR	+	PPARGC1A	transcription	18046414
MTOR	+	S6K1	phosphorylation	12080086
MTOR	-	ULK1	phosphorylation	21258367
NAD+	+	SIRT1	chemical reaction	22106091
NFKB1	+	IL1B	transcription	22182507
NFKB1	+	IL6	transcription	22182507
NFKB1	+	MAPK1	indirect	16644866
NFKBIE	-	NFKB1	binding	10602459
PDK1	+	AKT1	phosphorylation	25295225
PDK1	+	IKBKB	indirect	15802604
PDK1	+	SGK1	phosphorylation	28236975
PIK3CA	+	PDK1	binding	25295225
PTEN	-	PDK1	indirect	25295225
RB1	-	E2F1	transcription	24089445
RHEB	+	MTOR	binding	15854902
ROS	+	MAP2K3/MAP2K6	indirect	20112989
SGK1	-	FOXO3	phosphorylation	11154281

SIRT1	+	FOXO3	deacetylation	14976264
SIRT1	-	NFKB1	deacetylation	23029496
SIRT1	+	PPARGC1A	deacetylation	21396404
SIRT1	-	TP53	deacetylation	12220851
SIRT1	+	TSC2	deacetylation	20169165
SOD2	-	ROS	chemical reaction	22302046
TP53	+	CDKN1A	transcription	24089445
TP53	-	IGF1R	indirect	29273484
TP53	+	MDM2	transcription	14707283
TP53	+	PTEN	transcription	11545734
TSC2	-	RHEB	binding	12842888
E2F1	-	IKBKB	binding	27185527
TP53	+	AMPK	indirect	27454290

[86]

[87]

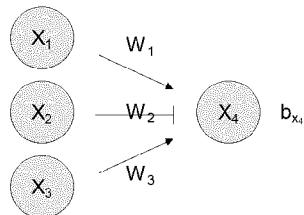
[88]

실시예 2. 대규모 단백질 분석 실험을 통한 세포주기 상태 분석

섬유아세포에 대하여 대규모 단백질 분석 실험을 수행하여 그 결과를 히트맵으로 나타내고 이를 도 2에 나타내었다. 구체적으로, 도 2의 A는 유전자 심볼 및 세포주기 상태 별로 각 유전자에 대응하는 시계열 RPPA(Reverse Phase Protein Assay) 데이터의 커브의 아래 면적을 나타낸 것이고, 세포주기 상태는 일시적 중단 상태(Quiescence), 영구적 중단 상태(Senescence) 또는 분열 상태(Proliferation)로 구분하였다. 도 2의 B는 커브 아래 면적 값을 0과 1로 이분화한 결과를 나타낸 것으로, 이를 위해서는 가중합 불리언 로직(weighted sum Boolean logic) 모델을 사용하였다. 상기 모델은 각 링크가 실수의 값을 가지고 각 노드가 기저 활성도를 가지고 있어 이를 통하여 노드의 상태가 0 또는 1로 정해지는 모델을 의미하며, 예를 들어 하기 그림에서 x_4 의 상태는

$w_1 * x_1 - w_2 * x_2 + w_3 * x_3 + B_{x_4}$ 가 0보다 크면 1, 0보다 작거나 같으면 0이 된다.

[89]



[90]

[91]

따라서 네트워크에 포함된 노드의 상태(0 또는 1)는 다른 노드들의 상태(0 또는 1)에 따라서 변하게 된다. 위의 방법을 이용하여 네트워크 전체의 노드들의

상태를 N번 갱신하였을 때의 모든 노드들의 상태가 (N+1)번 갱신하였을 때의 모든 노드들의 상태와 같다면 고정 끌개에 도달하였다고 하며, N번 갱신하였을 때의 모든 노드들의 상태가 (N-M)번 갱신하였을 때의 모든 노드들의 상태와 같다면 크기가 M인 순환 끌개에 도달하였다고 표현한다(단, $1 < M < N$).

[92]

[93] 실시예 3. 노화 네트워크 모델 시뮬레이션을 통한 최적 분자 타겟 발굴

[94] 진화 알고리즘을 통하여 2000개의 네트워크 모델들을 학습시키고, 이를 상기 실시예 1에서 구축한 노화 네트워크 모델에 적용하여 대규모 시뮬레이션하고 노화된 세포 상태를 젊은 세포 상태로 가역화시킬 수 있는 최적 분자 타겟을 발굴하였다. 이 때, 상기 진화알고리즘은 생물의 진화과정을 모방하여 개발된 최적화 기법으로 불리언 피팅과 같은 불연속적인 문제를 해결하는데 적절한 알고리즘이며, 본 실시예에서는 하기 비용 함수를 사용하였다.

[95]
$$cost = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (H(x_{ij}) - y_{ij})^2$$

[96] 여기서, i는 각 상태(세포주기 일시적 중단 상태, 영구적 중단 상태, 분열 상태)를 의미하고 j는 각 41개의 노드 번호를 의미한다. x_{ij} 는 i번째 상태에서의 j번째 노드의 값(0 또는 1)을 의미하고, $H(x_{ij})$ 는 그러한 입력들로부터 계산된 끌개에서 i번째 상태에서의 j번째 노드의 값(0 또는 1)을 의미한다. y_{ij} 는 목적하는 끌개에서 i번째 상태에서의 j번째 노드의 값(0 또는 1)을 의미하고, 위에서 이분화한 RPPA 데이터 값을 의미한다. 결과적으로, 네트워크는 하기 표 2의 세가지 상태에 대응하는 입력 노드 조합을 넣어주었을 때 도달하는 끌개가 이분화한 RPPA 데이터와 일치되도록 학습된다.

[97] [표2]

입력 노드	DNADamage	lowNutrition	IGF1
Proliferation	0	0	1
Quiescence	1	1	0
Senescence	1	0	1

[98]

[99] 상기 진화 알고리즘을 통하여 학습된 2000개의 모델 네트워크에 대하여, 입력 노드 조합을 영구적 중단 상태(노화 상태)로 주어서 노화 끌개 상태로 보낸 다음, 입력 노드 조합을 유지한 상태에서 모든 노드의 단일 저해 시뮬레이션과 2개의 노드 조합의 저해 시뮬레이션을 진행하고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 저해 타겟의 유전자 심볼 중 PDK1이 노화된 세포 상태를 젊은 세포 상태로 가역화시킬 수 있는 최적 분자 타겟이 될 수 있음을 확인하였다.

[100]

[101] 실시예 4. PDK1 억제에 따른 노화된 세포에서의 세포주기 변화 확인

- [102] PDK1 억제에 따라 노화된 세포가 정상 젊은 세포로 가역화되는지 여부를 확인하기 위하여, 노화된 섬유아세포에 PDK1 저해제인 BX-795(Selleckchem)를 처리하고 SA β -gal activity assay(senescence-associated β kit), Wound healing assay 및 형광염색실험을 수행하여 세포주기 변화 양상을 확인하였다.
- [103] 구체적으로, IGF1 100ng/ml, 독소루비신(doxorubicin) 100ng/ml, 10% FBS, 글루코스(glucose) 4.5g/L을 포함하는 세포의 노화를 일으키는 배양 조건에 세포를 7일간 노출시켜 세포의 노화를 일으켰다. 이 때 대부분의 세포는 노화되며, 이후 동일한 배양 조건에서 7일간 PDK1 저해제를 처리하였다. 총 14일간의 처리가 종료되면 IGF1, 독소루비신, PDK1 저해제를 포함하지 않은 성장조건 배양액을 처리하고, 그로부터 하루가 지난 시점에 SA β -gal activity assay를 수행하고 그 결과를 도 4의 A에 나타내었다. 같은 조건으로 wound healing assay를 수행하였으며 성장 조건 배양액을 총 7일간 처리한 후 그 결과를 도 4의 B에 나타내었다. 세포의 분열 활성을 평가하기 위하여 ki-67 발현을 분석하고 그 결과를 도 4의 C에 나타내었다.
- [104] 도 4의 A에 나타낸 바와 같이, BX-795를 노화된 섬유아세포에 처리하였을 때 노화세포의 지표인 SA β -gal가 현저히 줄어들음을 확인하였다. 나아가, 도 4의 B로부터 노화된 섬유아세포에 BX-795를 처리하였을 때, 노화세포의 세포 재생 능력이 정상화됨을 확인하였다. 도 4의 C에서는 ki-67 염색을 통하여 약물 처리 7일 경과 후 성장 조건의 배양액을 처리하였을 때 세포 중 일부가 분열하고 있음을 확인하였으며, 이를 통해 정상 조건의 배지 처리시 세포들이 다시 성장 및 분열함을 확인하였다.
- [105]
- [106] 다른 PDK1 저해제 사용 시에도 동일한 결과가 나타나는지 확인하기 위하여, PDK1 inhibitor 7을 사용하여 동일한 방법으로 SA β -gal activity assay를 수행하고, 노화된 세포는 SA β -gal를 발현하여 푸른 색을 나타내므로 광학현미경으로 SA β -gal activity assay 양성인 푸르게 염색된 노화된 세포수와 전체 세포수를 세어서 노화된 세포의 정도를 백분율로 표시하였다. 아울러, 세포증식 마커인 ki-67의 발현을 확인하는 형광염색실험을 수행하였다. 상기 결과를 도 5에 나타내었다.
- [107] 도 5의 A 및 B에 나타낸 바와 같이, PDK1 inhibitor 7을 노화된 섬유아세포에 처리하면 PDK1 저해제 미처리군에 비해 염색된 세포가 약 40% 이상 통계적으로 유의하게 감소되어 세포의 노화상태가 현저히 줄어들음을 확인하였다. 또한, 도 5의 C 및 D에 나타낸 바와 같이, ki-67 염색을 통한 형광염색실험 결과 PDK1 inhibitor 7 처리에 따라 ki-67 양성 세포의 수가 20% 이상 현저히 증가함을 통해 세포들이 다시 성장 및 분열함을 확인하여, 노화된 세포에서 역노화가 효과적으로 유도되었음을 확인하였다.
- [108]
- [109] 상기 결과를 통하여, 본 발명에 따른 PDK1은 세포노화에 관여하는 주요 신호전달 단백질 중 mTOR과 NF- κ B를 동시에 조절하는 단백질로서 세포의

성장, 분열 및 노화 관련 분비표현형을 결정하는 핵심 단백질이며, 이를 억제 시 노화된 세포 중 일부가 효과적으로 정상 젊은 세포로 가역화되며, 이러한 세포들에서는 더 이상 노화된 세포의 표현형이 관찰되지 않는 것을 확인하였다. 따라서, PDK1은 노화된 세포를 사멸 유도하는 전략에 치중되어 있는 현재의 노화치료전략에 새로운 가능성을 제시하고, 항노화 물질 및 노화 관련 질환 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있어 관련 산업 분야에 큰 파급효과를 가져올 것으로 기대된다.

[110]

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

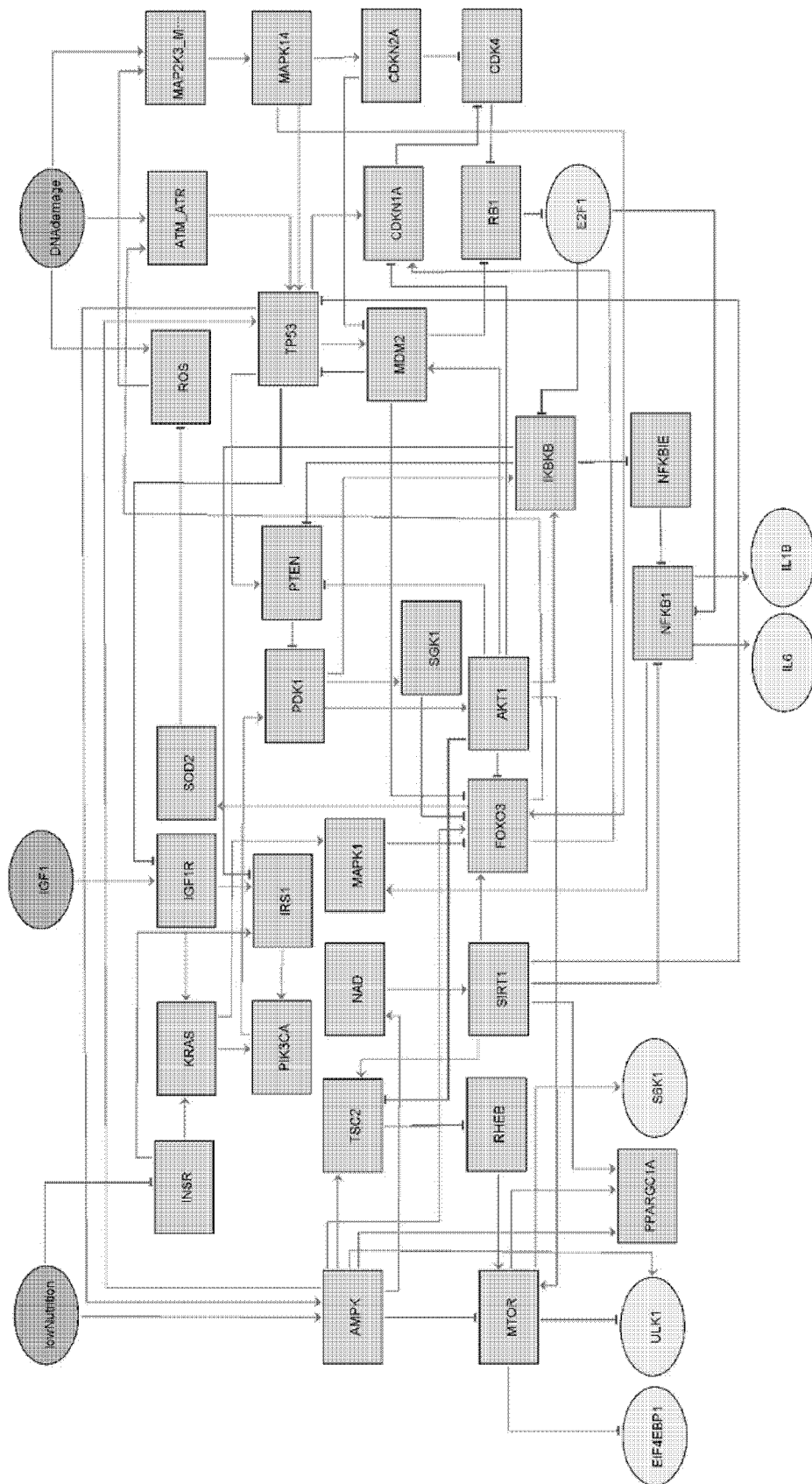
청구범위

- [청구항 1] PDK1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) 저해제를 포함하는 역노화 유도용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 PDK1 저해제는 PDK1 유전자의 발현 억제제 또는 PDK1 단백질의 활성 억제제인 것을 특징으로 하는, 역노화 유도용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 PDK1 유전자의 발현 억제제는 PDK1 유전자 또는 PDK1의 발현을 촉진하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA(small interfering RNA), shRNA(small hairpin RNA) 및 miRNA(microRNA)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 역노화 유도용 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 PDK1 단백질의 활성 억제제는 PDK1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 이의 항원 결합 단편, 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스 및 압타머(aptamer)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 역노화 유도용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 PDK1 저해제는 mTOR(mammalian Target Of Rapamycin) 및 NF-κB(Nuclear Factor Kappa B)의 전사활성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 역노화 유도용 조성물.
- [청구항 6] PDK1 저해제를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 노화 관련 질환은 탈모, 주름, 굽사등, 골다공증, 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 천식(Asthma), 피부염(Dermatitis), 건선(Psoriasis), 낭섬유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis), 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diseases), 자가면역성 당뇨(Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergies), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암(Cancer), 소동맥 질환 및

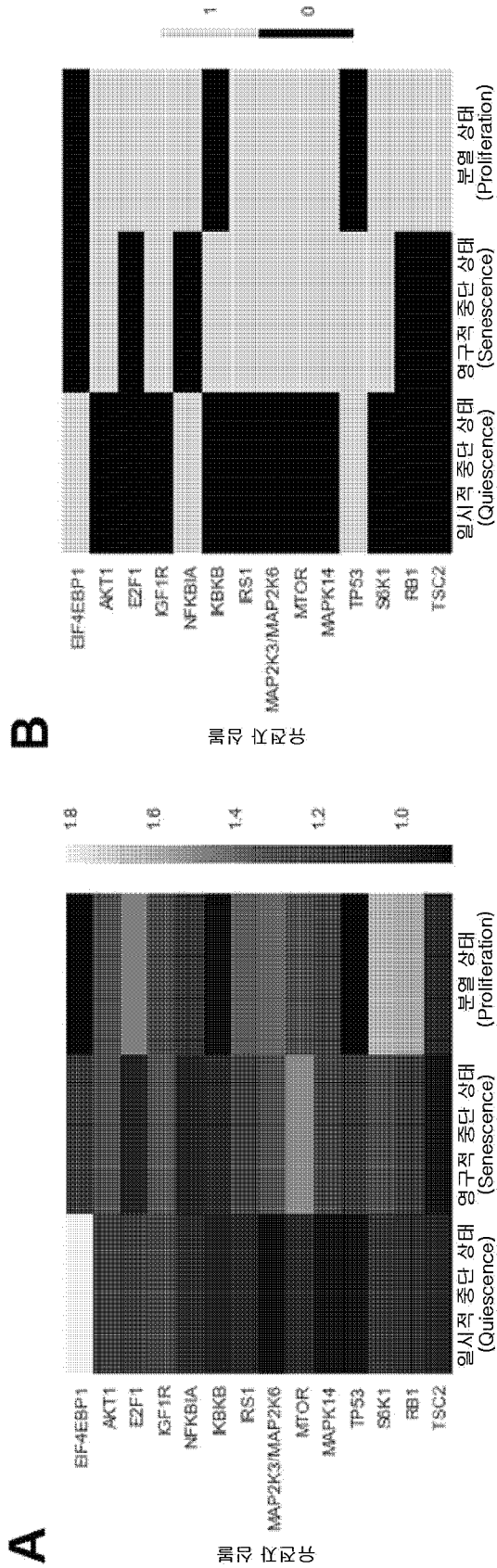
이식편대숙주질환(graft-versus-host disease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 세포 노화는 섬유아세포 또는 혈관내피세포의 노화인 것을 특징으로 하는, 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 노화 관련 약제의 병용투여제로 사용하는 것을 특징으로 하는, 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 생체 외(*In vitro*)에서 PDK1 저해제를 노화된 세포에 처리하는 단계를 포함하는 역노화 유도 방법.
- [청구항 11] (a) 분리된 노화된 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 상기 후보물질이 처리된 노화된 세포에서 PDK1 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및
 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 PDK1 발현 또는 활성 수준이 후보물질이 처리되지 않은 분리된 노화된 세포에 비해 낮은 경우, 상기 후보물질을 노화 관련 질환의 치료 제제로 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계; 를 포함하는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료 제제의 스크리닝 방법.
- [청구항 12] PDK1 저해제를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 대상은 세포 노화 또는 노화 관련 질환을 갖거나 가질 위험이 있는 대상인 것을 특징으로 하는, 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 14] 세포 노화 또는 노화 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 PDK1 저해제.

[도 1]

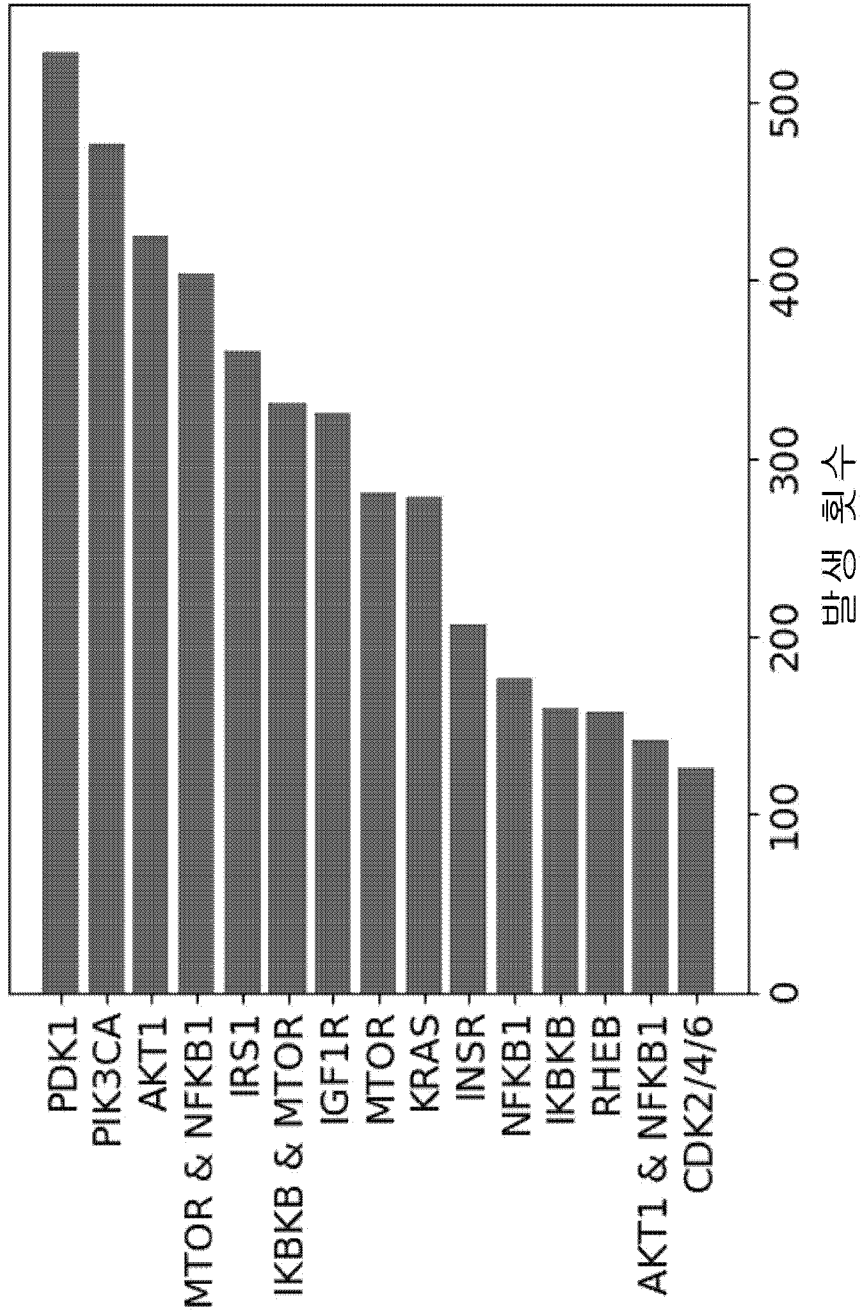


[도2]

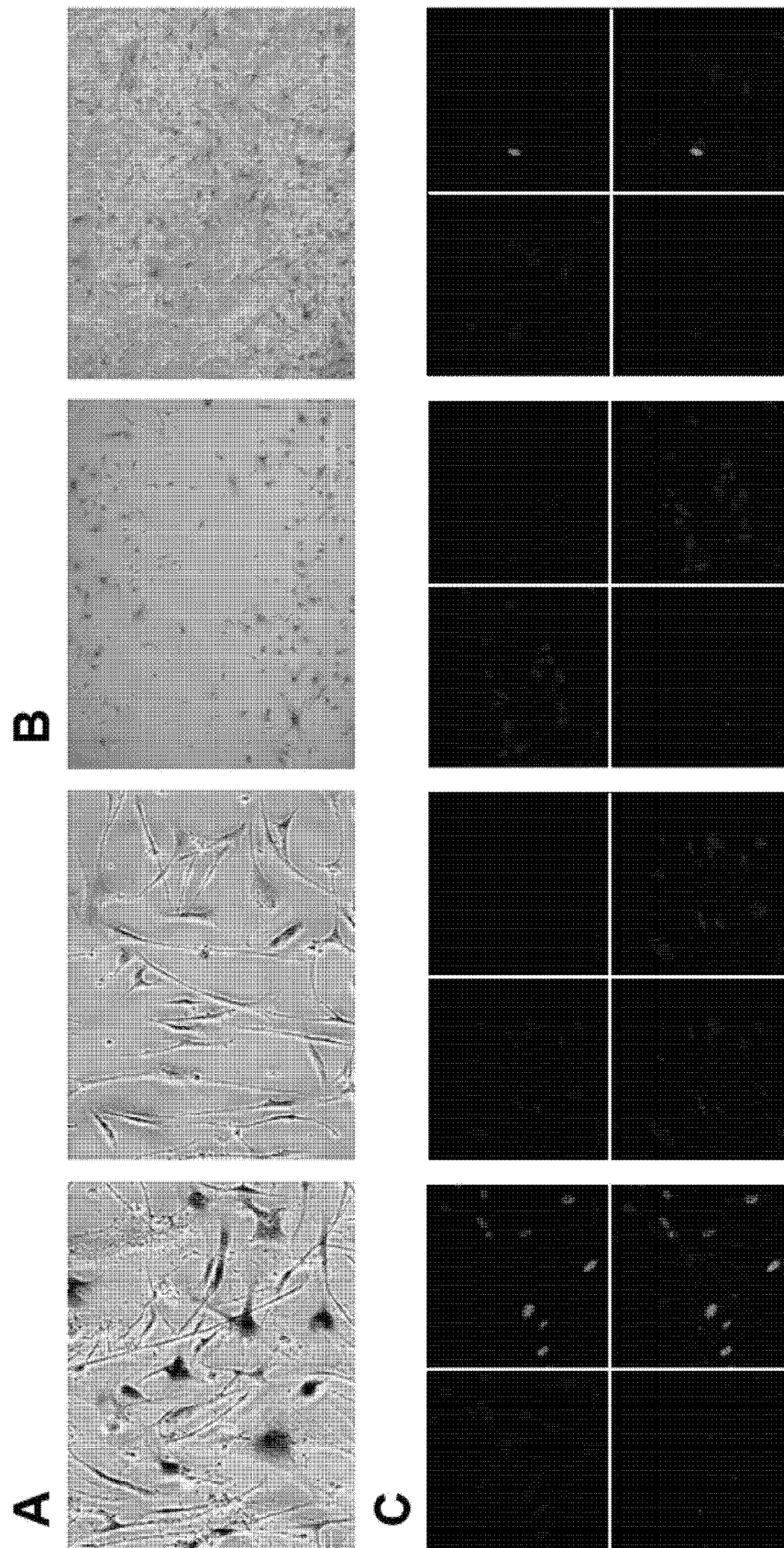


[도3]

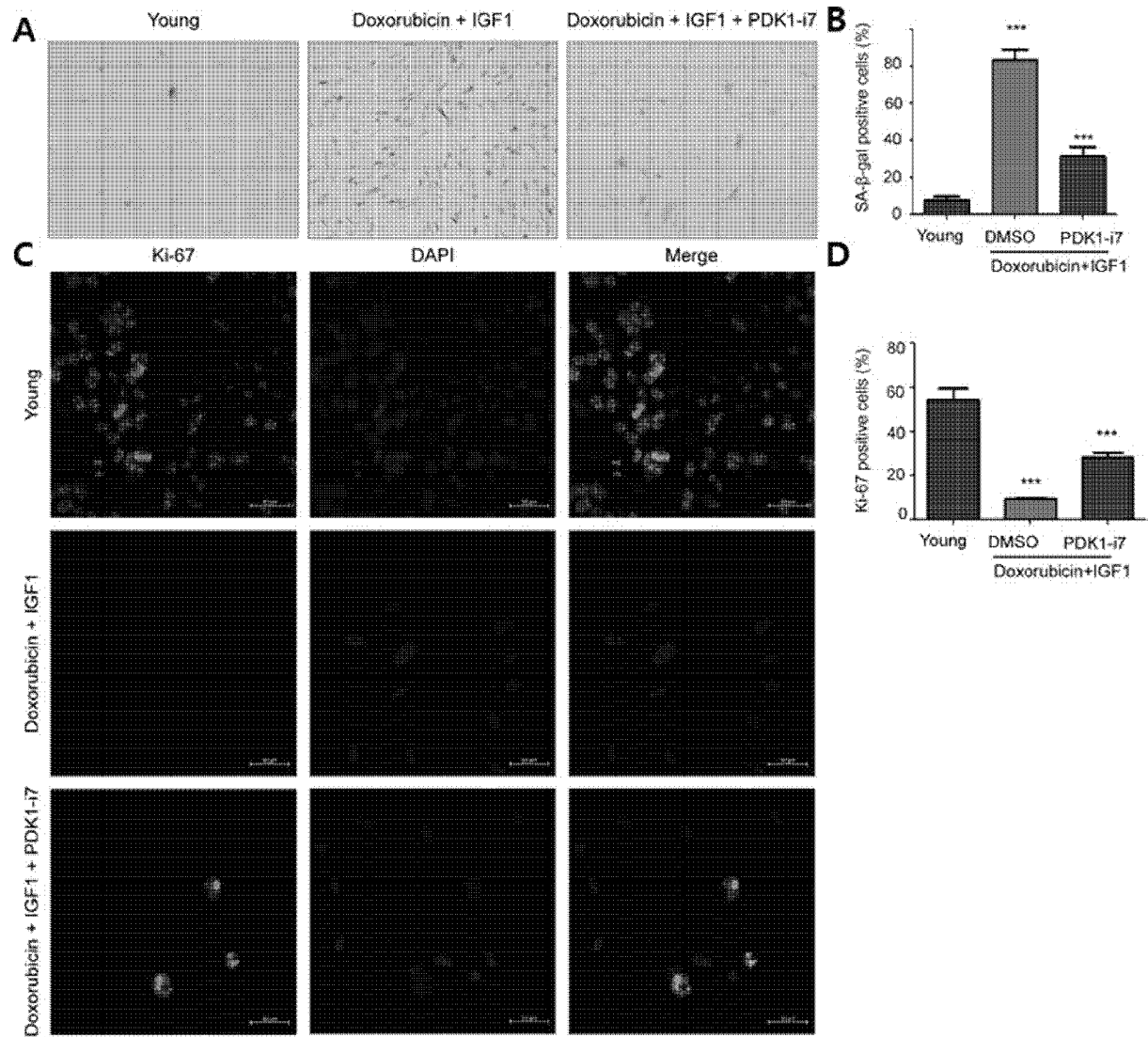
노화된 세포 상태를 젊은 세포 상태로 가역화시킬 수 있는 분자 타겟 발굴(2000개 네트워크 모델)



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/012970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 31/713(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 43/00(2006.01)i, A23L 33/13(2016.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(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 31/7088; A61K 31/155; A61K 31/713; A61K 38/28; A61P 35/00; C07K 16/40; C12N 5/07; G01N 33/574; A61K 39/395; A61P 43/00; A23L 33/13; G01N 33/50; G01N 33/68

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: PDK1(phosphoinositide dependent protein kinase-1), inhibit, aging, antiaging

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Li, L. et al. P16INK4a upregulation mediated by TBK1 induces retinal ganglion cell senescence in ischemic injury. Cell. Death. Dis. April 2017, vol. 8, no. 4, thesis no. e2752, pages 1-12 See abstract; figure 1.	1-11,14
X	KR 10-2012-0061081 A (QI, Haiyan) 12 June 2012 See paragraphs [0306], [0311]; example 16; claims 4, 5, 8, 13, 14, 55, 66.	1-11,14
A	US 2009-0029904 A1 (OLDHAM, Sean) 29 January 2009 See the entire document.	1-11,14
A	WALTERS, H. E. et al. mTORC Inhibitors as Broad-Spectrum Therapeutics for Age-Related Diseases. Int. J. Mol. Sci. 08 August 2018, vol. 19, thesis no. 2325, pages 1-33 See the entire document.	1-11,14
A	US 2018-0147232 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 31 May 2018 See the entire document.	1-11,14
A	US 2016-0319035 A1 (DESSAIN, Scott Kendall et al.) 03 November 2016 See the entire document.	1-11,14



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

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

Date of mailing of the international search report

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/012970

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.: **12, 13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 12 and 13 pertain to a method for treatment of the human body, including a step for direct treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/012970

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0061081 A	12/06/2012	AU 2010-233073 A1	01/12/2011
		AU 2010-233073 A1	14/10/2010
		AU 2010-233073 B2	31/07/2014
		AU 2013-204219 A1	09/05/2013
		AU 2013-204219 B2	07/05/2015
		BR PI 1010655 A2	03/09/2019
		CN 102612564 A	25/07/2012
		CN 102612564 B	26/08/2015
		CN 104997774 A	28/10/2015
		EA 023244 B1	31/05/2016
		EA 201101488 A1	30/07/2012
		EP 2416792 A2	15/02/2012
		EP 2965763 A1	13/01/2016
		EP 2965763 A9	02/03/2016
		EP 2965763 B1	06/06/2018
		EP 2965763 B8	15/08/2018
		ES 2685947 T3	15/10/2018
		JP 2012-523239 A	04/10/2012
		JP 2015-091237 A	14/05/2015
		JP 5852557 B2	03/02/2016
		JP 5931164 B2	08/06/2016
		KR 10-2013-0128018 A	25/11/2013
		US 2010-0260733 A1	14/10/2010
		US 2012-0071349 A1	22/03/2012
		US 2017-0027914 A1	02/02/2017
		US 8492110 B2	23/07/2013
		US 9360471 B2	07/06/2016
		WO 2010-118419 A2	14/10/2010
		WO 2010-118419 A3	17/02/2011
		WO 2010-118419 A4	14/10/2010
US 2009-0029904 A1	29/01/2009	None	
US 2018-0147232 A1	31/05/2018	CA 2992945 A1	26/01/2017
		EP 3325100 A1	30/05/2018
		EP 3325100 A4	20/02/2019
		WO 2017-015152 A1	26/01/2017
US 2016-0319035 A1	03/11/2016	WO 2016-090365 A1	09/06/2016
		WO 2016-090365 A4	09/06/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7088(2006.01)i, A61K 31/713(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 43/00(2006.01)i, A23L 33/13(2016.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7088; A61K 31/155; A61K 31/713; A61K 38/28; A61P 35/00; C07K 16/40; C12N 5/07; G01N 33/574; A61K 39/395; A61P 43/00; A23L 33/13; G01N 33/50; G01N 33/68

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: PDK1(phosphoinositide dependent protein kinase-1), 저해(inhibit), 노화(aging), 항노화(antiaging)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Li, L. 등, "P16INK4a upregulation mediated by TBK1 induces retinal ganglion cell senescence in ischemic injury", Cell. Death. Dis., 2017.04., 8권, 4호, 논문번호 e2752, 페이지 1-12 요약; 그림 1	1-11, 14
X	KR 10-2012-0061081 A (치, 하이얀) 2012.06.12 단락 [0306], [0311]; 실시예 16; 청구항 4, 5, 8, 13, 14, 55, 66	1-11, 14
A	US 2009-0029904 A1 (SEAN OLDHAM) 2009.01.29 전체 문헌	1-11, 14
A	WALTERS, H. E. 등, "mTORC Inhibitors as Broad-Spectrum Therapeutics for Age-Related Diseases", Int. J. Mol. Sci., 2018.08.08, 19권, 논문번호 2325, 페이지 1-33 전체 문헌	1-11, 14
A	US 2018-0147232 A1 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 2018.05.31 전체 문헌	1-11, 14
A	US 2016-0319035 A1 (SCOTT KENDALL DESSAIN 등) 2016.11.03 전체 문헌	1-11, 14

☐ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



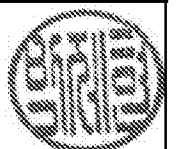
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박제현

전화번호 +82-42-481-3349



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: 12, 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12, 13은 인체에 대한 직접적인 처치 단계를 포함하는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 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 10-2012-0061081 A	2012/06/12	AU 2010-233073 A1 AU 2010-233073 A1 AU 2010-233073 B2 AU 2013-204219 A1 AU 2013-204219 B2 BR PI1010655 A2 CN 102612564 A CN 102612564 B CN 104997774 A EA 023244 B1 EA 201101488 A1 EP 2416792 A2 EP 2965763 A1 EP 2965763 A9 EP 2965763 B1 EP 2965763 B8 ES 2685947 T3 JP 2012-523239 A JP 2015-091237 A JP 5852557 B2 JP 5931164 B2 KR 10-2013-0128018 A US 2010-0260733 A1 US 2012-0071349 A1 US 2017-0027914 A1 US 8492110 B2 US 9360471 B2 WO 2010-118419 A2 WO 2010-118419 A3 WO 2010-118419 A4	2011/12/01 2010/10/14 2014/07/31 2013/05/09 2015/05/07 2019/09/03 2012/07/25 2015/08/26 2015/10/28 2016/05/31 2012/07/30 2012/02/15 2016/01/13 2016/03/02 2018/06/06 2018/08/15 2018/10/15 2012/10/04 2015/05/14 2016/02/03 2016/06/08 2013/11/25 2010/10/14 2012/03/22 2017/02/02 2013/07/23 2016/06/07 2010/10/14 2011/02/17 2010/10/14
US 2009-0029904 A1	2009/01/29	없음	
US 2018-0147232 A1	2018/05/31	CA 2992945 A1 EP 3325100 A1 EP 3325100 A4 WO 2017-015152 A1	2017/01/26 2018/05/30 2019/02/20 2017/01/26
US 2016-0319035 A1	2016/11/03	WO 2016-090365 A1 WO 2016-090365 A4	2016/06/09 2016/06/09