

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2010/128717 A1

PCT

(43) 국제공개일
2010 년 11 월 11 일 (11.11.2010)

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/27 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/004583
- (22) 국제출원일: 2009 년 8 월 17 일 (17.08.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0039140 2009 년 5 월 6 일 (06.05.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 서울시 성북구 하월곡동 39-1, 136-792 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 신희섭 (SHIN, Hee-Sup) [KR/KR]; 경기도 의왕시 삼동 30, 437-812 Gyeonggi-do (KR). 신종한 (SHIN, Jonghan) [KR/KR]; 서울시 서대문구 홍제 3 동 295-23, 120-857 Seoul (KR). 강가다란기리쉬 (GANGADHARAN, Gireesh) [IN/KR]; 서울시 성북구 하월곡동 39-1 한국과학기술연구원 과학자아파트 C-301, 136-792 Seoul (KR). 김성욱 (KIM, Seong-Wook) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보정동 동아솔레시아아파트 117 동 502 호, 446-940 Gyeonggi-do (KR). 김덕수 (KIM, Duk-Soo)

[KR/KR]; 충청남도 천안시 동남구 다가동 353-4404 호, 330-110 Chungcheongnam-do (KR). 이수정 (LEE, Sukyung) [KR/KR]; 서울시 강남구 압구정동 현대아파트 84-303, 135-786 Seoul (KR). 김연수 (KIM, Yeon-Soo) [KR/KR]; 서울시 강남구 서초구 서초동 유원아파트 101-1607, 137-780 Seoul (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won-Hee); 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, 135-080 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

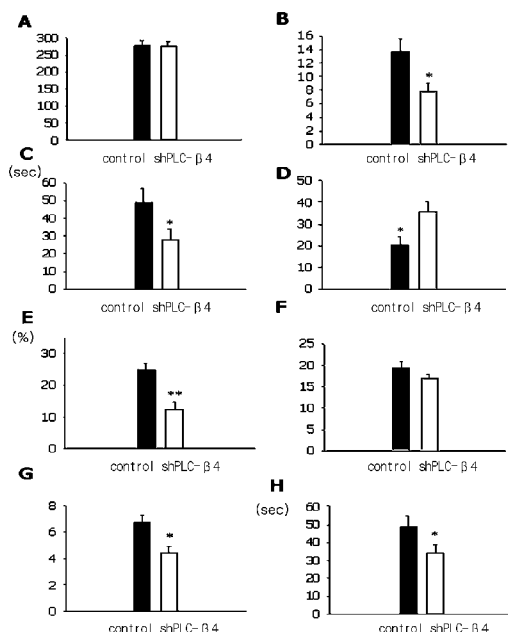
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DRUG SUITABILITY ASSESSMENT METHOD FOR PREVENTION OR TREATMENT OF ANXIETY DISORDERS USING CHOLINERGIC TYPE II THETA RHYTHM

(54) 발명의 명칭 : 콜린성 제 2 형 세타리듬을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법

[Fig. 4]



(57) Abstract: The present invention relates to a drug suitability assessment method for the prevention or treatment of anxiety disorders using the cholinergic type II theta rhythm, and, more specifically, to a method for detecting individuals suffering from anxiety disorders induced by an abnormality occurring in the cholinergic system using the type II theta rhythm profile which is based on findings that the cholinergic type II theta rhythm is lower than in normal subjects in an animal anxiety model and that cholinergic drug treatment induces the cholinergic type II theta rhythm to return to normal and reduces anxiety and thereby making it possible to determine if an individual can be appropriately administered with a cholinergic drug and to monitor progress after cholinergic drug treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 콜린성 제 2 형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 불안증 동물 모델에서 콜린성 제 2 형 세타리듬이 정상개체에 비해 감소하고, 콜린성 약물 처리에 의해 콜린성 제 2 형 세타리듬이 정상적으로 회복되고 불안증이 감소하는 것을 확인함으로써 콜린성 제 2 형 세타리듬 프로파일을 이용하여 콜린성 시스템에 이상이 생겨서 유발되는 불안장애 개체를 찾을 수 있으므로 콜린성 약물 투여가 적절한 개체를 판단할 수 있으며, 콜린성 약물 처리 후 경과를 모니터링하는데 사용할 수 있다.

WO 2010/128717 A1



NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

콜린성 제 2 형 세타리듬을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 불안(Anxiety)은 정상적인 감정 및 정신 의학적 장애 둘 모두를 의미한다. 불안장애(Anxiety disorder)는 고통을 받는자의 삶 뿐만 아니라 가족들의 삶을 현저하게 붕괴시킬 수 있는 충분한 고통과 장애를 야기하며, 특히 이런 불안장애가 기피 행동(avoidance behavior) 및 광장공포증(agoraphobia)과 관련될 때 그 고통과 장애는 보다 심각하다(Nutt, D.J., *CNS Spectr.* 10, 49-56, 2005).
- [4] 현재, 세로토닌성 효능을 증진시키는 약물이 일선의 불안장애 치료용 약물이다(Nutt, D.J., *CNS Spectr.* 10, 49-56, 2005). 놀랍게도, 최근 연구는 해마(hippocampus)에서 아세틸콜린 전달을 증진시키는 약물이 일부 환자에서 불안을 완화시킬 수 있음이 보고되었다(Cummings, J.L. et al., *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 6, S64-78, 1998; Levy, M.L., et al., *Gerontology.* 45, S15-22, 1999; Kennedy, D.O. et al., *Neuropsychopharmacology.* 31, 845-852, 2006). 이런 효과의 근거인 기작은 알려져 있지 않다.
- [5] 동물에서 두 가지 종류의 해마의 세타 리듬(theta rhythm)이 알려져 있다: 제 1형(type 1)은 비콜린성, 세로토닌-관련 세타 리듬이고; 제 2형(type 2)은 콜린성 세타 리듬이다(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 18165-18170, 2005). 흥미롭게도, 세타 리듬의 감쇠는 높은 수준의 불안을 가진 일부 개체의 대뇌피질에서 나타났다(Mizuki, Y. et al., *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 43, 619-626, 1989; Suetsugi, M. et al., *Neuropsychobiology.* 41, 108-112, 2000). 그러나, 불안장애에서 상기 세타 리듬 감쇠의 생리학적 의미 및 감쇠된 세타 리듬이 제 1형인 또는 제 2형인지를 확립한 연구는 없다.
- [6] 기저전뇌(basal forebrain)내 중격핵(septal nuclei)의 이형은 피질회로(cortical circuit)에서 비정상적인 정보처리와 관련되고, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)(Kesner, R.P., et al., *Brain Cogn.* 9, 289-300, 1989; Colom, L.V., *J. Neurochem.* 96, 609-623, 2006; Moon, W.J., et al., *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 29, 1308-1313, 2008), 루이바디병(Lewy body disease)(Fujishiro, H. et al., *Acta Neuropathol.* 111, 109-114, 2006), 이마관자엽 변성(frontotemporal dementia)(Moon, W.J., et al., *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 29, 1308-1313, 2008) 및 파킨슨병(Parkinson's disease dementia)(Dodel, R. et al., *J. Neurol.* 255, S39-S47,

2008)에서 보여지는 바와 같이 결과적으로 뇌 기능장애를 야기한다. 내측 중격핵(medial septal nuclei) 및 브로카의 대각선조(diagonal band of Broca)의 세로 날개(vertical limb)를 포함하는 내측 격막(medial septum)은 뇌궁/해마술 경로(fornix/fimbria pathway)를 통해 해마에 돌출되어 해마의 세타 진동을 발생시킨다(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Manseau F, *et al.*, *J. Neurosci.* 28, 4096-4107, 2008). 인간 뇌전도(electroencephalogram)에서 보여진 세타 리듬은, 해마의 세타 리듬에 의해 조절되는 피질 상호작용(corticolimbic interaction)으로부터 발생하는 것으로 생각되어진다(Miller, R., Springer-Verlag, Berlin, 1991; Basar, E., *et al.*, *Int. J. Psychophysiol.* 39, 197-212, 2001; Kahana, M.J., *et al.*, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 739-744, 2001; Cantero, J.L., *J. Neurosci.* 23, 10897-10903, 2003; Gordon, J.A., *et al.*, *J. Neurosci.* 25, 6509-6519, 2005; Tejada, S. *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 26, 199-206, 2007).

- [7] 포스포리파제 C(Phospholipase C; PLC)- β 는 구조 및 활성 기작을 근거로 PLC- γ 및 PLC- δ 와 구별된다. PLC- β 는 G 단백질(G protein)-의존적 경로를 통해 작용하며, 이는 7개의 막 통과 그룹 제 1형 대사성 글루타메이트 수용체(transmembrane-spanning group I metabotropic glutamate receptor)(mGluR1 및 mGluR5), 세로토닌성 수용체(serotonergic receptor)(5-HT₂)(Abe, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267, 13361-13368, 1992) 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor)(M1, M3 및 M5)(Gutkind, J.S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4703-4707, 1991)에 속하는 특이적 신경전달물질 수용체 아형의 활성화에 의해 작용된다. PLC- β 1, PLC- β 2, PLC- β 3 및 PLC- β 4로 표시되는 4개의 PLC- β 아형들은 각각 뇌에서 특이적인 분포 패턴을 가지고 있다(Kim, D. *et al.*, *Nature* 389, 290-293, 1997; Watanabe, M. *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 10, 2016-2025, 1998). PLC- β 4 발현은 불안 행동과 관련되는 것으로 알려진 3개의 뇌 부위(해마, 편도 및 격막)(Treit, D. & Menard, J., *Behav. Neurosci.* 111, 653-658, 1997; Gray, J.A. & McNaughton, N. *The neuropsychology of anxiety*, Ed 2. New York: Oxford UP, 2000) 중 하나인, 내측 격막에서 신경세포의 세포체(soma) 및 수지상 돌기(dendrite)에서 발현되어 있다(Watanabe, M. *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 10, 2016-2025, 1998; Nakamura, M. *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 20, 2929-2944, 2004). 또한, 상기 내측 격막은 해마의 세타 리듬의 발생과 관련된 결절점(nodal point)이다(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986). 이는 PLC- β 4가 불안 행동 및 세타 리듬 다양성과 매우 관련 있음을 제시하는 것이다.

- [8] 그러나, 지금까지 콜린성 약물, 세타 리듬 및 불안 행동 사이 관계는 알려져 있지 않고 있다.

[9]

- [10] 이에, 본 발명자들은 PLC- β 4-녹아웃(PLC- β 4^{-/-}) 마우스를 이용하여 불안증과 세타리듬 사이 관계를 연구한 결과, PLC- β 4의 전체 결실 또는 내측 격막 특이적 녹다운은 콜린성 제2형 세타리듬의 세기를 현저히 감소시키고 불안행동을

증가시키는 것을 확인하였고, 상기 PLC- $\beta 4$ -녹아웃 마우스에서 콜린성 증진제를 처리하는 경우, 콜린성 제2형 세타리듬 및 불안증 모두를 정상적으로 회복시키는 것을 확인함으로써, 콜린성 제2형 세타리듬의 측정을 이용하여 불안장애의 치료를 위한 효과적인 가이드라인을 제시할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm) 프로파일을 이용하여 불안장애 개체의 효과적인 치료제 스크리닝 방법, 및 콜린성 약물 처리 후 경과를 모니터링하는 방법을 제공하는 것이다.

[13]

기술적 해결방법

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 콜린성 인헨서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링 방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 불안장애의 진단 방법을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 불안장애 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정용 키트를 제공한다.

[19] 아울러, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 콜린성 인헨서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링용 키트를 제공한다.

[20]

[21] 이하, 본 발명에서 사용되는 용어를 정의한다.

[22]

[23] 본 발명에서 사용되는 용어 "콜린성 인헨서(cholinergic enhancer)"는, 알로스테릭 감각(allosteric sensitization), 콜린성 수용체의 직접적 활성화, 2차 전달자 캐스케이드(second messenger cascades)를 통한 관련된 세포간 경로(intracellular pathway)를 활성화, 또는 콜린에스테라아제(cholinesterases)의 억제에 의해 콜린성 신경전달을 증진 또는 조절하는 조성물을 의미한다. 상기 콜린에스테라아제의 억제는 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)의 시냅스 농도를 증가시켜, 무스카린 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor; mAChR) 및 니코틴 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor;

nAChR)에서 아세틸콜린의 활성을 증진 및 연장시킨다.

[24] 본 발명에서 사용되는 용어 "불안(anxiety)"은 특정한 대상을 가지고 있지 않은 두려운 감정 즉, 부정적인 결과가 나타날 수도 있는 위협적이고 위험한 상황에서 우리가 경험하게 되는 불쾌하고 고통스러운 정서적 반응을 의미한다.

[25] 본 발명에서 사용되는 용어 "불안장애(anxiety disorders)"는 이유 없이 불안을 느끼거나 불안의 정도가 지나친 정신장애를 의미한다. 즉, 병적인 불안으로 인하여 과도한 심리적 고통을 느끼거나 현실적인 적응에 심각한 어려움을 겪는 경우를 의미한다.

[26] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 불안장애의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[27] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 불안장애의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[28] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[29] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 불안장애의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[30] 본 발명에서 사용되는 용어 "유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[31]

[32] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[33]

[34] 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 이용한 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법을 제공한다.

[35] 구체적으로, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[36] 1) 불안장애에 걸린 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 측정하는 단계;

[37] 2) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체에 비해 감소하는 개체를 선별하는 단계; 및

[38] 3) 상기 개체가 불안장애 치료제로서 콜린성 인핸서(cholinergic enhancer)의 처리가 필요한 개체로 판정하는 단계.

[39] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 불안장애는 공황 장애(Panic Disorder), 공포증(Phobia), 강박 행동장애(Obsessive-Compulsive Disorder), 외상 후 스트레스 장애(Posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 장애(Acute stress disorder),

일반화된 불안장애(Generalized anxiety disorder), 및 분리불안장애(Separation anxiety disorder)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [40] 상기 공황 장애는 이유 없이 갑자기 공포심이 극도로 심해져 숨이 막히거나 심장이 터질 것 같은 극단적인 불안 증세를 의미한다. 즉, 공황발작(Panic attack)을 반복적으로 경험하는 장애로서 흔히 피곤, 흥분, 성행위, 정서적 충격 등을 경험한 후에 나타나는 경향이 있으나 대부분의 경우 예측하기가 어렵고 갑작스럽게 나타난다.
- [41] 상기 공포증은 특수한 상황이나 대상에 대해서 심한 불안과 공포를 느끼게 되어 이러한 상황이나 대상을 회피하게 되는 불안장애를 의미한다. 1) 특수 공포증(Specific Phobia)은 특정한 대상이나 상황에 대한 비합리적 두려움과 회피 행동을 지속적으로 나타내는 장애를 의미한다. 2) 대인 공포증(Social Phobia)은 다른 사람들과 상호작용하는 사회적 상황을 두려워하여 회피 행동을 지속적으로 나타내는 장애를 의미한다. 3) 광장 공포증(agoraphobia)은 특정한 장소나 상황에 대한 공포를 나타내는 경우를 의미한다.
- [42] 상기 강박 행동장애는 원하지 않는 생각, 즉 강박사고(Obsessions)와 행동을 반복하게 되는 불안장애를 의미한다.
- [43] 상기 외상 후 스트레스 장애는 충격적인 사건을 경험하고 난 후에 불안상태가 지속되는 불안장애를 의미한다.
- [44] 상기 급성 스트레스 장애는 외상 후 스트레스 장애와 매우 유사한 증상을 나타내는 장애로서 외상적 사건 경험 후 해리성 증상이 단기간 동안 나타나는 불안장애를 의미한다.
- [45] 상기 일반화된 불안장애는 다양한 상황에서 만성적 불안과 과도한 걱정을 나타내는 불안장애를 의미한다.
- [46] 상기 분리불안장애는 애착을 갖고 있는 대상과 떨어지는 것을 심하게 불안해하는 증상을 의미한다. 격리불안이 정상적인 범위를 넘어서 정상적인 사회생활에 지장이 될 정도가 되면 이를 병적인 상태라 할 수 있으며 이러한 분리불안이 극심하여 정상적인 활동이 장애를 받는 경우를 의미한다.
- [47] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 콜린성 제2형 세타리듬은 뇌전도(electroencephalogram, EEG)를 이용하여 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [48] 콜린성 제2형 세타 리듬은 일반적으로 우레탄 마취(urethane anesthesia), 경계성 부동(alert immobility) 및 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 발생하는(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 18165-18170, 2005) 반면에, 제 1형 세타 리듬은 예를 들어 걸거나 달리는 것과 같은 이동하는 활동 동안 발생(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. & Talnov, A., *Brain Res.* 897, 217-221, 2001)하는 것을 이용하는 것이다.

- [49] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 콜린성 인헨서는 뇌의 해마와 내측 격막에서의 아세틸콜린 신경전달물질의 양을 증가시키는 작용을 하는 조성물인 것이 바람직하고, 신경말단에서 분비된 아세틸콜린의 분해효소를 억제시킴으로써 아세틸콜린 신경 신호 전달을 증가시키는 약물인 아세틸콜린 분해효소 억제제(acetylcholinesterase inhibitor)인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 아세틸콜린 분해효소 억제제 외에도 알로스테릭 감작, 콜린성 수용체의 직접적 활성화, 또는 2차 전달자 캐스케이드(second messenger cascades)를 통한 관련된 세포간 경로(intracellular pathway)를 활성화 또는 조절하는 콜린성 인헨서 성분도 포함된다.
- [50] 상기 아세틸콜린 분해효소 억제제는 리바스티그민(Rivastigmine), 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine), 타크린(Tacrine), 메트리포네이트(Metrifonate), 피소스티그민(Physostigmine), 네오스티그민(Neostigmine), 피리도스티그민(Pyridostigmine), 암베노늄(Ambenonium), 디마카리늄(Demarcarium), 에드로포늄(Edrophonium), 후퍼진 A(Huperzine A) 및 온키달(Onchidal)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [51] 상기 아세틸콜린 분해효소 억제제는 리바스티그민(Rivastigmine), 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine) 및 타크린(Tacrine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 더욱 바람직하고, 리바스티그민을 사용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다(Van Dam, D., et al., *Psychopharmacology* 180, 177-190, 2005; Cerbai, F. et al., *Eur. J. Pharmacol.* 572, 142-150, 2007; Kosasa, T., et al., *Eur. J. Pharmacol.* 380, 101-107, 1999; Scali, C. et al., *J. Neural. Transm.* 109, 1067-1080, 2002; Liang, Y.Q. et al., *Acta. Pharmacol. Sin.* 27, 1127-1136, 2006; Enz, A. et al., *Prog. Brain Res.* 98, 431-438, 1993; Weinstock, M. et al., *J. Neural Transm. Suppl.* 43, 219-225, 1994).
- [52]
- [53] 본 발명에서는 세타리듬 및 불안행동 사이 관계를 알아보기 위해, 불안행동 동물 모델인 PLC- $\beta 4$ 녹아웃(PLC- $\beta 4^{-/-}$) 마우스(대한민국 특허출원 제10-2008-0007202호 참조) 및 야생형 마우스에서 각각 해마의 뇌전도(Hippocampal electroencephalogram, EEG)를 검사하여 세타리듬 프로파일을 분석하여 비교하였다. 그 결과, 비콜린성 제1형 세타 리듬은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에서 유의적인 차이가 없었으나, 콜린성 제2형 세타리듬은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 세타 세기가 야생형 마우스의 세타 세기에 비해 유의적으로 감소하였다(도 2 참조). 따라서, 콜린성 제2형 세타리듬이 불안 유발과 관련되어 있음을 알 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명에서는 내측 격막에서의 PLC- $\beta 4$ 와 상기 콜린성 제2형 세타리듬 사이 관계를 알아보기 위해, PLC- $\beta 4$ -특이적 shRNA(shPLC- $\beta 4$) 및 대조군 shRNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector)를 야생형 마우스의 내측

격막에 주사한 후, 불안 행동 및 EEG를 조사하였다. 그 결과, shPLC- $\beta 4$ 를 발현하는 렌티바이러스로 감염된 야생형 마우스가 대조군 shRNA로 감염된 야생형 마우스에 비해 콜린성 제2형 세타리듬의 세기가 유의적으로 감소하였으며(도 3 참조), 유의적으로 높은 불안 행동을 나타내었다(도 4 참조). 따라서, 내측 격막의 PLC- $\beta 4$ 가 콜린성 제2형 세타리듬을 조절하고, 상기 콜린성 제2형 세타리듬 세기의 감소가 불안 행동을 야기시키는 것을 알 수 있다.

[55] 또한, 본 발명에서는 콜린성 인헨서를 이용하여 콜린성 제2형 세타리듬의 세기를 증가시킴으로써 불안행동을 정상화시킬 수 있는지를 알아보기 위해, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에 각각 리바스티그민(Rivastigmine) 및 식염수를 각각 투여한 후, 불안행동 및 EEG를 조사하였다. 그 결과, 리바스티그민 처리는 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 정상적인 콜린성 제2형 세타리듬과 정상적인 불안행동으로 회복시켰다(도 5 및 도 6 참조). 따라서, 콜린성 인헨서가 콜린성 제2형 세타리듬의 회복 및 불안행동을 정상화시킬 수 있음을 알 수 있다.

[56] 현재까지, 불안증에 효과가 있는 약물로서 세로토닌성 약물, GABA성 약물, 콜린성 약물들이 효과가 있다는 것이 알려져 있다. 그러나 불안증 개체의 다양성으로 인하여 어떤 개체에게 어떤 종류의 약을 처방해야하는지에 도움이되는 생물학적 마커(biological marker)가 없는 실정이다. 따라서 시행착오법으로 여러 종류의 약을 다 먹어보고 가장 효과가 좋은 약을 선택할 수 밖에 없는 현실이다.

[57] 이에, 본 발명을 통하여 콜린성 제2형 세타리듬의 특성을 측정함으로써 어떤 불안증 개체에게 콜린성 약물을 사용하는 것이 좋을지를 판단할 수 있으므로, 개체에 맞는 약물 적합성 판정에 유용하게 이용될 수 있다.

[58]

[59] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 콜린성 인헨서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링 방법을 제공한다.

[60] 구체적으로, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[61] 1) 유효한 양의 콜린성 인헨서를 불안장애에 걸린 개체에게 투여하는 단계;

[62] 2) 상기 개체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및

[63] 3) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체와 비교하여 회복되는 정도를 불안장애 회복 정도로 판정하는 단계.

[64] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 콜린성 인헨서는 뇌의 해마와 내측 격막에서의 아세틸콜린 신경전달물질의 양을 증가시키는 작용을 하는 조성물인 것이 바람직하고, 신경말단에서 분비된 아세틸콜린의 분해효소를 억제시킴으로써 아세틸콜린 신경 신호 전달을 증가시키는 약물인 아세틸콜린 분해효소 억제제(acetylcholinesterase inhibitor)인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 아세틸콜린 분해효소 억제제 외에도 알로스테릭 감각, 콜린성 수용체의 직접적 활성화, 또는 2차 전달자 캐스케이드(second messenger cascades)를

통한 관련된 세포간 경로(intracellular pathway)를 활성화 또는 조절하는 콜린성 인핸서 성분도 포함된다.

- [65] 상기 아세틸콜린 분해효소 억제제는 리바스티그민(Rivastigmine), 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine), 타크린(Tacrine), 메트리포네이트(Metrifonate), 피소스티그민(Physostigmine), 네오스티그민(Neostigmine), 피리도스티그민(Pyridostigmine), 암베노늄(Ambenonium), 디마카리늄(Demarcarium), 에드로포늄(Edrophonium), 후퍼진 A(Huperzine A) 및 온키달(Onchidal)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [66] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 불안장애는 공황 장애(Panic Disorder), 공포증(Phobia), 강박 행동장애(Obsessive-Compulsive Disorder), 외상 후 스트레스 장애(Posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 장애(Acute stress disorder), 일반화된 불안장애(Generalized anxiety disorder), 및 분리불안장애(Separation anxiety disorder)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [67] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 콜린성 제 2형 세타 리듬은 우레탄 마취(urethane anesthesia), 경계성 부동(alert immobility) 또는 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 해마의 뇌전도(Hippocampal electroencephalogram, EEG)를 분석하여 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [68] 본 발명에서는 불안증 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬이 정상개체에 비해 감소하고, 콜린성 약물 처리에 의해 콜린성 제2형 세타리듬이 정상적으로 회복하면서 불안증이 회복하는 것을 확인하여, 콜린성 제2형 세타리듬, 콜린성 약물 및 불안증의 관계를 확인함으로써, 콜린성 제2형 세타리듬의 특성을 측정하여 불안증 개체에게 콜린성 약물 투여후 경과를 모니터링할 수 있음을 알 수 있다.
- [69]
- [70] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 불안장애의 진단 방법을 제공한다.
- [71] 구체적으로, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [72] 1) 피검체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및
- [73] 2) 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체와 비교하여 낮은 개체를 불안장애에 걸릴 위험성이 있는 개체로 판정하는 단계.
- [74] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 콜린성 제2형 세타리듬은 우레탄 마취(urethane anesthesia), 경계성 부동(alert immobility) 또는 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 해마의 뇌전도(Hippocampal electroencephalogram, EEG)를 분석하여 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [75] 본 발명에서는 불안증 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬이 정상개체에 비해

감소하고, 콜린성 약물 처리에 의해 콜린성 제2형 세타리듬이 정상적으로 회복하면서 불안증이 회복하는 것을 확인하여, 콜린성 제2형 세타리듬, 콜린성 약물 및 불안증의 관계를 확인함으로써, 콜린성 제2형 세타리듬의 특성을 측정하여 정상개체에 비해 낮은 개체를 선별함으로써 불안증 개체인지를 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[76]

[77] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용한 불안장애 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[78] 구체적으로, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[79] 1) 피검물질을 불안장애에 걸린 개체에 투여하는 단계;

[80] 2) 상기 개체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및

[81] 3) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭을 정상 개체와 비교하여 회복시키는 피검물질을 선별하는 단계.

[82] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 불안장애는 공황 장애(Panic Disorder), 공포증(Phobia), 강박 행동장애(Obsessive-Compulsive Disorder), 외상 후 스트레스 장애(Posttraumatic stress disorder), 급성 스트레스 장애(Acute stress disorder), 일반화된 불안장애(Generalized anxiety disorder), 및 분리불안장애(Separation anxiety disorder)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[83] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 콜린성 제 2형 세타 리듬은 우레탄 마취(urethane anesthesia), 경계성 부동(alert immobility) 또는 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 해마의 뇌전도(Hippocampal electroencephalogram, EEG)를 분석하여 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[84] 본 발명에서는 불안증 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬이 정상개체에 비해 감소하고, 콜린성 약물 처리에 의해 콜린성 제2형 세타리듬이 정상적으로 회복하면서 불안증이 회복하는 것을 확인하여, 콜린성 제2형 세타리듬, 콜린성 약물 및 불안증의 관계를 확인함으로써, 약물을 투여한 불안장애 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하여 상기 리듬을 정상으로 회복시키는 효과적인 약물을 스크리닝할 수 있음을 알 수 있다.

[85]

[86] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정용 키트를 제공한다.

[87] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 콜린성 인핸서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링용 키트를 제공한다.

[88] 또한, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 불안장애 진단용 키트를 제공한다.

[89] 아울러, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는,

불안장애 예방 또는 치료제 스크리닝용 키트를 제공한다.

- [90] 본 발명에서는 불안증 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬이 정상개체에 비해 감소하고, 콜린성 약물 처리에 의해 콜린성 제2형 세타리듬이 정상적으로 회복하면서 불안증이 회복하는 것을 확인하여, 콜린성 제2형 세타리듬, 콜린성 약물 및 불안증의 관계를 확인함으로써, 뇌전도 측정기를 이용하여 콜린성 제2형 세타리듬 분석함으로써 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정, 콜린성 인헨서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링, 불안장애 진단, 및 불안장애 예방 또는 치료제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[91]

유리한 효과

- [92] 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬이 불안증과 관련되어 있음을 밝힘으로써 콜린성 약물, 제2형 세타리듬 및 불안증 간의 작용 기작 연구에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 그동안 불안증에 효과가 있는 약물인 세로토닌성 약물, GABA성 약물, 콜린성 약물이 불안증 개체의 다양성으로 인하여 어떤 개체에게 어떤 종류의 약을 처방해야하는지에 도움이되는 생물학적 마커가 없는 실정이어서 시행착오법으로 여러 종류의 약을 다 먹어보고 가장 좋은 약을 선택할 수 밖에 없었으나, 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬의 특성을 이용하여 어떤 불안증 개체에게 콜린성 약물을 사용하는 것이 좋을지를 판단할 수 있으며, 콜린성 제2형 세타리듬의 특성을 이용하여 콜린성 약물 투여 후 경과를 모니터링할 수 있다.

[93]

도면의 간단한 설명

- [94] 도 1은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가 불안 행동을 보이는지 확인하기 위해, 야생형 마우스(WT)와 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)를 대상으로 개방장소(open field), 고가플러스 미로(elevated plus-maze) 및 명암 변화(light-dark transition)인 3가지 불안 행동 테스트를 실시한 결과를 나타내는 그래프이다:
- [95] (A) 개방장소에서 운동 활동(Locomotor activity);
- [96] (B) 개방장소에서 중앙 통과 수(Number of central cross);
- [97] (C) 개방장소의 중앙 부위에서 머무른 시간(Time in the central sector);
- [98] (D) 주축성(Thigmotaxis);
- [99] (E) 고가플러스 미로의 개방 분지내로 들어가는 퍼센트(Percent entries into the open arms);
- [100] (F) 고가플러스 미로에서 총 들어가는 수(Total number of entries);
- [101] (G) 밝은 구획 또는 어두운 구획에 존재하는 수(Light/dark transition number); 및
- [102] (H) 밝은 구획에 머무르는 시간(Total time in the light compartment).
- [103] 도 2는 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 세타 리듬(theta rhythm) 상태를 알아보기 위해, 야생형 마우스(WT)와 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)를 대상으로 EEG를 분석하여

비콜린성 제 1형 세타 리듬과 콜린성 제 2형 세타 리듬을 나타낸 그림이다:

- [104] (A) 야생형 마우스 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가 걷는 동안의 EEG 파형;
- [105] (B) 야생형 마우스 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가 걷는 동안의 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼;
- [106] (C) 야생형 마우스 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 우레탄 마취 동안의 EEG 파형; 및
- [107] (D) 야생형 마우스 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 우레탄 마취 동안의 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼.
- [108] 도 3은 내측 격막 선택적 PLC- $\beta 4$ 녹다운이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 이질적인 세타 리듬 표현형과 유사하게 나타내는지 알아보기 위해, shPLC- $\beta 4$ 및 대조군 shRNA를 발현하는 렌티바이러스를 야생형 마우스의 내측 격막에 주입한 후, EEG를 분석한 결과를 나타낸 그림이다:
- [109] (A) 대조군 shRNA 마우스 및 shPLC- $\beta 4$ 마우스가 걷는 동안의 EEG 파형;
- [110] (B) 대조군 shRNA 마우스 및 shPLC- $\beta 4$ 마우스가 걷는 동안 기록된 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼;
- [111] (C) 대조군 shRNA 마우스 및 shPLC- $\beta 4$ 마우스의 우레탄 마취 동안의 EEG 파형; 및
- [112] (D) 대조군 shRNA 마우스 및 shPLC- $\beta 4$ 마우스의 우레탄 마취 동안의 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼.
- [113] 도 4는 내측 격막 선택적 PLC- $\beta 4$ 녹다운이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 불안 행동을 나타내는지 알아보기 위해, shPLC- $\beta 4$ 및 대조군 shRNA를 발현하는 렌티바이러스를 야생형 마우스를 대상으로 개방장소(open field), 고가플러스 미로(elevated plus-maze) 및 명암 변화(light-dark transition)인 3가지 불안 행동 테스트를 실시한 결과를 나타내는 그래프이다:
- [114] (A) 개방장소에서 운동 활동(Locomotor activity);
- [115] (B) 개방장소에서 중앙 통과 수(Number of central cross);
- [116] (C) 개방장소의 중앙 부위에서 머무른 시간(Time in the central sector);
- [117] (D) 주축성(Thigmotaxis);
- [118] (E) 고가플러스 미로의 개방 분지대로 들어가는 퍼센트(Percent entries into the open arms);
- [119] (F) 고가플러스 미로에서 총 들어가는 수(Total number of entries);
- [120] (G) 밝은 구획 또는 어두운 구획에 존재하는 수(Light/dark transition number); 및
- [121] (H) 밝은 구획에 머무르는 시간(Total time in the light compartment).
- [122] 도 5는 리바스티그민(Rivastigmine)이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 이질적인 세타 리듬 표현형을 정상화시키는지 알아보기 위해, 야생형 마우스와 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에 리바스티그민 또는 식염수를 복강 주사한 후, EEG를 분석한 결과를 나타낸 그림이다(WT-sham: 식염수를 주사한 야생형 마우스; KO-sham: 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스; 및 KO-rivastigmine: 리바스티그민을 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스):
- [123] (A) WT-sham, KO-sham 및 KO-rivastigmine의 각 마우스가 걷는 동안의 EEG

파형;

[124] (B) WT-sham, KO-sham 및 KO-rivastigmine의 각 마우스가 걷는 동안의 기록된 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼;

[125] (C) WT-sham, KO-sham 및 KO-rivastigmine의 각 마우스가 경계성 부동(alert-immobility)인 동안의 EEG 파형;

[126] (D) WT-sham, KO-sham 및 KO-rivastigmine의 각 마우스가 경계성 부동인 동안의 기록된 EEG 파형의 평균 세기 스펙트럼.

[127] 도 6은 리바스티그민이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 증가된 불안 행동을 회복시키는지 알아보기 위해, 야생형 마우스와 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에 리바스티그민 또는 식염수를 복강 주사한 후, 개방장소, 고가플러스 미로 및 명암 변화인 3가지 불안 행동 테스트를 실시한 결과를 나타내는 그래프이다(WT-sham: 식염수를 주사한 야생형 마우스; KO-sham: 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스; 및 KO-rivastigmine: 리바스티그민을 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스);

[128] (A) 고가플러스 미로의 개방 분지내로 들어가는 퍼센트(Percent entries into the open arms);

[129] (B) 고가플러스 미로에서 총 들어가는 수(Total number of entries);

[130] (C) 밝은 구획 또는 어두운 구획에 존재하는 수(Light/dark transition number); 및

[131] (D) 밝은 구획에 머무르는 시간(Total time in the light compartment).

[132] 도 7은 경계성 부동(alert immobility) 및 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 콜린성 제 2형 세타 리듬 상태를 알아보기 위해, 야생형 마우스(WT)와 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)를 대상으로 경계성 부동 및 피동적인 전신 회전 동안 EEG를 분석하여 콜린성 제 2형 세타 리듬을 나타낸 그림이다:

[133] (A) 야생형 마우스(WT) 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)가 경계성 부동인 동안의 EEG 파형;

[134] (B) 야생형 마우스(WT) 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)가 경계성 부동인 동안의 EEG 파형의 평균적인 세기 스펙트럼;

[135] (C) 야생형 마우스(WT) 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)가 피동적인 전신 회전 동안의 EEG 파형; 및

[136] (D) 야생형 마우스(WT) 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스(KO)가 피동적인 전신 회전 동안의 EEG 파형의 평균적인 세기 스펙트럼.

[137]

발명의 실시를 위한 형태

[138] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[139] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 이에 한정되지 않는다.

[140]

[141] <실시예 1> PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 불안 행동 분석

- [142] 본 발명자들은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가 증가된 불안 행동을 보이는지 알아보기 위해, 8 ~ 16주령의 어덜트(adult) 마우스를 이용하여 오전 9시 ~ 오후 5시 사이에 개방장소 주축성(open field thigmotaxis), 고가플러스 미로(elevated plus-maze) 및 명암 변화(light-dark transition)인 3가지 불안 행동 분석을 수행하였다.
- [143] 통계적 분석을 위해, 군들 간의 차이는 데이터 세트가 정상적으로 분포되어 있음을 확인한 후, 학생 t -테스트(Student's t -test)를 이용하여 비교하였다. PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에 대한 행동 데이터는 군들 간의 차이를 결정하기 위해 ANOVA에 의해 분석한 후 Tukey's post-hoc test를 수행하였다.
- [144]
- [145] <1-1> PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 제조
- [146] 대한민국 특허출원 제10-2008-0007202호에 기재된 바와 같이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스를 제조하였다. 구체적으로, C57BL/6J(N8)PLC- $\beta 4^{+/+}$ 와 129S4/SvJae(N8)PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스를 교배하여 F1 단계에서 PLC $\beta 4^{+/+}$ 및 PLC $\beta 4^{-/-}$ 마우스를 획득하였다. 이전 문헌에 보고된 바와 같이 PCR 분석을 이용하여 유전자형을 결정하였다(Kim, D. *et al.*, *Nature* 389, 290-293, 1997). 동물의 보호 및 취급 절차는 규격화된 안내에 따라 수행하였다(KIST, 한국). 상기 마우스들은 12 시간 밝은 조명, 12 시간 어두운 조명 일주기하에서 물과 사료가 자유롭게 주어졌으며, 온도 22°C, 습도 55%가 유지되는 SPF(specific pathogen free) 환경에서 사육하였다.
- [147]
- [148] <1-2> 불안 행동 테스트
- [149] 개방장소 주축성은 흐린 조명하에서 개방장소 기구(40 x 40 x 40 cm)의 중앙에 마우스를 놓아 수행하였다. 10분 관찰 기간 동안, 움직임 활동, 개방 장소의 중앙을 통과한 횟수, 및 개방 장소의 중앙 부분에서 소비한 시간을 기록한 후, PC를 이용한 비디오 행동 분석 시스템(PC-based video behavior analysis system)(TSE, Bad Homburg, Germany)를 이용하여 분석하였다. 상기 주축성 매개변수는 테스트 장소의 중앙 부분을 통과한 횟수에 대한 움직임 활동의 비율로 산출하였다. 상기 주축성의 지표는 각각의 마우스에 개별적으로 산출한 후, 주어진 실험군에 대해 평균과 표준 편차를 산출하는데 이용하였다(Treit, D. & Fundytus, M., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 959-962, 1988; Sienkiewicz-Jarosz, H. *et al.*, *J Neural Transm.* 107, 1403-1412, 2000).
- [150] 상기 개방 장소 분석 결과, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 야생형 마우스에 비해 개방 장소에서 감소된 운동력을 나타내었다(도 1a; $P < 0.05$, Student's t -test). 상기 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 야생형 마우스에 비해 개방 장소의 중앙을 적게 통과하였고(도 1b; $P < 0.05$, Student's t -test), 개방 장소의 중앙 부분에 더 적은 시간 머물렀다(도 1c; $P < 0.05$, Student's t -test). 따라서, 새로운 환경 주변에서 머무르려는 본능적인 경향인 주축성(Treit, D. & Fundytus, M., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 959-962, 1988)이 야생형 마우스에 비해 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가

높은 것을 알 수 있었다(도 1d; $P < 0.001$, Student's t -test).

- [151] 고가플러스 미로는 15 cm 높이의 벽을 가지는 동일한 크기(45 x 5 cm)의 2개의 개방된 분지 및 2개의 폐쇄된 분지로 구성된 기구를 사용하였다. 상기 분지는 검은색 아크릴로 제조되어 있고, 십자형 기호를 형성하는 중앙 플랫폼(5 x 5 cm)으로부터 뻗어 있다. 상기 전체 기구는 바닥층 위 30 cm 높이로 올려져 있다. 각 마우스를 개방된 분지 중 하나에 직면하는 중앙 플랫폼에 놓아 두었다. 그런 다음, 개방 및 폐쇄된 분지로 들어가는 수, 및 개방 및 폐쇄된 분지에 대한 소비 시간을 5분 테스트 기간 동안 기록하였다(Parks, C.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10734-10739; 1998; Ramboz, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14476-14481, 1998; Gross, C. *et al.*, *Nature* 416, 396-400, 2002).
- [152] 상기 고가플러스 미로 분석 결과, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 야생형 마우스에 비해 개방된 분지로 들어가는 수가 적었으며(도 1e; $P < 0.001$, Student's t -test), 들어간 총 수는 두 군 사이 차이가 없었다(도 1f; $P < 0.001$, Student's t -test).
- [153] 명암 변화 테스트는 마우스가 한 구획에서 다른 구획으로 이동할 수 있는 작은 통로가 있으며 검은색 칸막이에 의해 두 구획으로 분리되어 있는 우리(cage)(25 x 40 x 20 cm)로 구성된 기구를 사용하였다. 표면 부위의 2/3를 포함하는 한 구획은 흰색 플라스틱으로 제조되었고 조명으로 밝게 하였다; 접해 있는 옆 구획은 검고 어둡게 하였다. 마우스를 어두운 구획에 놓아둔 후 5분 동안 두 챔버 사이 자유롭게 움직이도록 하였다. 그런 다음, 두 구획 사이 이동수, 각 챔버에서의 소비 시간, 및 첫번째 변화에 대한 잠복을 기록하였다(Welch, J.M. *et al.*, *Nature* 448, 894-900, 2007).
- [154] 상기 명암 변화 분석 결과, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 야생형 마우스에 비해 어두운 구획에서 밝은 구획으로 이동하는 수가 적었다. 또한, 밝은 챔버에 머무르는 시간이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스가 야생형 마우스에 비해 유의적으로 짧았다(도 1H; $P < 0.001$, Student's t -test).
- [155]
- [156] <실시예 2> PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 세타 리듬의 프로파일 분석
- [157] 본 발명자들은 세타 리듬 프로파일이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 변하는지, 및 상기 변화가 비콜린성 세로토닌 관련 제 1형 또는 콜린성 제 2형 세타 리듬에 기인하는 것인지를 결정하기 위해, 공지된 프로토콜(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 18165-18170, 2005)을 이용하여 10 내지 14주령 수컷 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에서 해마의 뇌전도(Hippocampal electroencephalogram, EEG)를 검사하였다.
- [158] 통계적 분석을 위해, 군들 간의 차이는 데이터 세트가 정상적으로 분포되어 있음을 확인한 후, 학생 t -테스트(Student's t -test)를 이용하여 비교하였다. PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에 대한 행동 데이터는 군들 간의 차이를 결정하기 위해 ANOVA에 의해 분석한 후 Tukey's post-hoc test를 수행하였다.
- [159]

[160] <2-1> 생체내 국소 부위 전위 기록

[161] 전극 주입을 위해, 마우스들을 펜토바르비탈(pentobarbital)(50 ml/kg, i.p.)로 마취시킨 후 동일한 수평면에 있는 브레그마(bregma)와 람다(lambda)를 입체정위 기구(stereotaxic apparatus)로 열었다. 해마 EEG 기록은 소뇌 위를 접지로 갖는 해마 열(hippocampalfissure)에 주입하는 테플론으로 코팅된 텅스텐 전극(Teflon-coatedtungsten electrode)(150 μ m)을 이용하여 수행하였다[브레그마(Bregma)로부터, 2.0 mm 전후축방향(anteroposterior), 1.2 mm 중측방향(mediolateral), 및 1.8 mm 복배방향(dorsoventral)]. 전극의 위치는 프로토콜에 따라 Nissl로 염색된 절편으로 광학현미경에 의해 검증하였다. 전위 부위를 증폭시키고($\times 1,000$), 밴드패스로 여과시킨 후(bandpass-filtered)(0.1-100 Hz), 1-kHz 샘플로 연속적으로 12 비트(bit) 해상도로 계수화한 다음, 퍼스널 컴퓨터로 기록하였다.

[162]

[163] <2-2> 해마의 전극 활성 데이터의 분석

[164] 상기 EEG 데이터를 4-s 단편 및 고속 푸리에 변환(fast fourier transform, FFT)으로 수집하였다. 상기 데이터를 움직임 구조(movement artifact)에 대해 연속적으로 모니터하였고, 동물의 유전자형을 가린채 각 단편의 기록을 실험자에 의해 상호 검증하였다. 모든 단편은 마우스 움직임 동안 수집되었고, 상기 단편에 대해 최대 $\pm 1.25V$ 를 초과하는 증폭된 EEG 신호의 진폭을 버렸다. 해마 전극 활동의 EEG 스펙트럼 특성을 비교하기 위해, 각 4-s 에폭(epoch)의 고속 푸리에 변환(FFT)(Hamming window)을 이용하여 1-Hz 빈스(bins)에서 EEG 스펙트럼 세기를 산출하였다. 분석은 각 군으로부터 100번의 시행에서 각각격으로부터 기록을 수행하였다. 0- 내지 30-Hz 범위내 세기는 각 행동 상태에 걸쳐서 군에서 평균을 산출하였고, 평균 값은 1-Hz 빈스로 구성하였다. 세기 스펙트럼에 대한 평균을 내는 과정은 2개의 비교 상태에 대한 EEG 원시 데이터의 표준 편차를 합한 후 나누는 표준화 과정을 적용하였다(예를 들어, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스). 생체내 세타 리듬은 델타- 및 감마-밴드 활동과 같은 다른 생체내 EEG 리듬과 구별되는 명확하고 선명한 피크 진동을 가지고, 상기 피크 세기는 세타 세타 진동 범위내 총 세기 보다 정확한 정보를 제공하기 때문에 비교 목적을 위해 서로 다른 조건하에서의 피크 세기를 이용하였다.

[165]

[166] <2-3> 비콜린성 제 1형 세타 및 콜린성 제 2형 세타 리듬의 분류

[167] 서로 다른 행동과 관련된 비콜린성 제 1형 및 콜린성 제 2형 세타 리듬을 기록하였다. 비콜린성, 세로토닌 관련 제 1형 세타 리듬은 무스카린성 길항제(muscarinic antagonist)[예를 들어, 아트로핀(atropine) 또는 스코폴아민(scopolamine)]를 이용하여 콜린성 제 2형 세타 리듬으로부터 구별할 수 있으며, 이는 상기 무스카린 길항제를 동물내로 주입하는 경우에 콜린성 제

2형 세타 리듬이 파괴되거나 상대적으로 영향을 받지 않는 비콜린성 제 1형 세타 리듬은 유지되기 것을 이용하였다. 또한, 세타 리듬을 유도하는 다른 행동을 통해 비콜린성, 세포토닌 관련 제 1형 세타 리듬과 콜린성 제 2형 세타 리듬 사이 구별하는 것이다. 콜린성 제 2형 세타 리듬은 일반적으로 우레탄 마취(urethane anesthesia), 경계성 부동(alert immobility) 및 피동적인 전신 회전(passive whole-body rotation) 동안 발생하는(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 18165-18170, 2005) 반면에, 제 1형 세타 리듬은 예를 들어 걷거나 달리는 것과 같은 이동하는 활동 동안 발생한다(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986; Shin, J. & Talnov, A., *Brain Res.* 897, 217-221, 2001). 야생형 및 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스, 및 내측 격막에 의해 유도된 shRNA 매개 PLC- $\beta 4$ 녹다운 마우스로부터 콜린성 제 2형 세타 리듬을 기록하기 위해 우레탄 마취, 경계성 부동 및 피동적인 전신 회전을 이용하였다. 오픈 챔버(open chamber) 또는 바퀴에서 달리는 마우스로부터 비콜린성 제 1형 세타 리듬을 기록하였다. 동일한 마우스를 각 세팅에서 분석하였다.

[168]

[169] <2-4> PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 세타 리듬의 분석

[170] 우선, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 운동 동안 비콜린성 제 1형 세타 리듬을 조사하기 위해, 마우스가 걷는 동안 해마의 전극 활동을 기록하였다. 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 운동 동안에 기록된 리듬은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스 및 야생형 마우스에서 유사하였다. 또한, 4 ~ 12 Hz의 세타 밴드에서 최대 EEG 세기는 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스와 야생형 마우스 간에 유의적인 차이가 없었다($P > 0.1$, Student's t-test)(도 2b).

[171] 또한, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 생체내에서 콜린성 제 2형 세타 리듬을 특정하기 위해, 우레탄(1 g/kg, i.p.)으로 마취시킨 마우스의 해마 EEG 기록을 수행하였다. 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스와 야생형 마우스에서의 우레탄은 무처리 마우스에서 수집된 해마 열창 기록(hippocampal fissure recording)을 명확하게 나타내는 간헐성 세타 리듬을 유도하였다(도 2c). 그러나, 세기 스펙트럼 분석은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 세타 세기가 야생형 마우스의 세타 세기에 비해 약 ~30% 감소하였다(도 2d; $P < 0.05$, Student's *t* test). 아울러, 경계성 부동 또는 피동적인 전신 회전 동안, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 발생된 콜린성 제 2형 세타 리듬도 역시, 야생형 마우스에서 발생된 콜린성 제 2형 세타 리듬에 비해 감소하였다(도 7).

[172]

[173] <실시에 3> 내측 격막 내 PLC- $\beta 4$ 결손과 불안 행동 및 콜린성 세타 리듬의 관계 분석

[174] 본 발명자들은 내측 격막이 세타 리듬을 조절하고(Bland, B.H., *Prog. Neurobiol.* 26, 1-54, 1986), 내측 격막에서 현저한 PLC- $\beta 4$ 가 발현(Watanabe, M. et al., *Eur. J. Neurosci.* 10, 2016-2025, 1998)한다는 문헌을 통해, 내측 격막에서 PLC- $\beta 4$ 의

결손이 불안 행동을 증가시키고, PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 콜린성 세타 리듬이 감소시키는지 조사하였다.

[175]

[176] <3-1> shRNA 발현 및 PLC- $\beta 4$ 의 shRNA 녹다운의 검증

[177] PLC- $\beta 4$ -특이적 shRNA 및 대조군(control) shRNA를 pLKO 퓨로마이신 저항성 벡터(MISSION TRC shRNA Target Set; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 발현시켰다. NIH3T3 세포[ATCC(<http://www.atcc.org/>) CRL-1658]에서 PLC- $\beta 4$ 발현을 녹다운시키기 위해, PLC- $\beta 4$ -특이적 shRNA 발현 카세트를 암호화하는 5개의 다른 pLKO 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector)를 시험하였다. pLKO-대조군(SHC002)은 비-표적 shRNA로서 제공하였다. shRNA의 효능을 조사하기 위해, shRNA 발현 렌티바이러스 벡터 컨스트럭트를 NIH3T3 세포에 형질감염시킨 다음, 래빗 항-PLC- $\beta 4$ (1:200; Santa Cruz Biotechnology)를 이용한 웨스턴 블랏 분석(western blot analysis)에 의해 PLC- $\beta 4$ 발현 수준을 결정하였다. 상기 선별 실험에서 PLC- $\beta 4$ 발현 수준을 증가시키기 위해, PLC- $\beta 4$ 발현 플라스미드인 pFLAG-CMV2-PLC- $\beta 4$ 로 NIH3T3 세포를 형질감염시켰다. 발현 수준은 형질감염 효율로 표준화하였으며, 이는 루시퍼라제 플라스미드로 함께 형질감염(co-transfection)시킴으로써 결정하였다. PLC- $\beta 4$ -표적화 shRNA, shPLC- $\beta 4$ -1[TRCN0000076919: 5'-GCCTCTTCAA AGTAGATGAA T-3'(서열번호: 1)] 및 shPLC- $\beta 4$ -3[TRCN0000076921: 5'-CCGTCTCCTA ATGACCTCAA A-3'(서열번호: 2)] 중 두개는 렌티바이러스 발현 벡터로 함께 형질전환시킨 세포에서 PLC- $\beta 4$ 발현 수준을 감소시켰다. shPLC- $\beta 4$ -1을 다음의 생체내(*in vivo*) 실험에 이용하였다.

[178]

[179] <3-2> 렌티바이러스 벡터의 제조

[180] HEK293T 세포[ATCC(<http://www.atcc.org/>) CRL-1573]를 하기 3개의 플라스미드로 함께 형질감염시킴으로써 제조하였다: (1) 이중의 외피 단백질 VSN-G를 발현하는 컨스트럭트; (2) *gag-pol* 유전자를 발현하는 패키징-결핍 헬퍼(packaging-defective helper) 컨스트럭트; 및 (3) PLC- $\beta 4$ -특이적인 shRNA 서열을 포함하는 전달 벡터(transfer vector). 제조사(Invitrogen)에 의해 기재된 바와 같이 리포펙타민 플러스(Lipofectamine Plus)를 이용하여 세포를 형질감염시켰다. 상기 형질감염시킨 후 48시간이 지난 다음, 렌티바이러스(lentivirus)를 포함하는 배양 상청액을 채취한 후, 0.45-mm 막 필터(Nalgene, USA)를 통해 정화시킨 다음, 즉시 -70°C에서 저장하였다. 적정 농도는 p24 ELISA(Perkin-Elmer Life Science)를 이용하거나 AIDS Research and Reference Reagent Program을 통해 획득된 단클론 항-p24 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석에 의해 결정하였다. 상기 적정 농도는 일반적으로 농축 이전에 $\sim 10^6$ - 10^7 형질도입 유닛(transduction unit; TU)/ml이었다. 4°C에서 20% 슈크로즈 쿠션(sucrose cushion)을 이용한 초원심분리(ultracentrifugation)(50,000 × 2h)를

이용하여 감염성 렌티바이러스 입자를 농축하였다.

[181]

[182] <3-3> 생체내 내측 격막에서 PLC-β4의 렌티바이러스-매개 녹다운

[183] 고-적정 농도로 농축된 shPLC-β4-1 또는 대조군 shRNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector)를 정위 방법의 주사(stereotaxic injection)에 의해 10주령 야생형 마우스의 내측 격막에 주입시켰다. 13마리의 대조군 shRNA로 주입된 마우스 및 16마리의 shPLC-β4-1로 주입된 마우스를 각각 사용하였다. 주사한지 4주 후에, 3가지의 불안 테스트를 이용하여 테스트한 다음, 하기 기재된 바와 같이 해마 EEG를 기록하였다. 행동 테스트 및 EEG 기록을 수행한 후, 마우스를 희생시켰으며, 내측 격막에서 내생의 PLC-β4 발현의 감소를 평가하기 위해 면역조직화학적 분석을 수행하였다.

[184] 그 결과, shPLC-β4-1로 감염된 내측 격막의 신경 세포에서 염색된 PLC-β4가 대체로 감소시킨 반면에, 대조군 shRNA 마우스 유래 신경세포는 정상적인 PLC-β4 발현을 나타내었다. 따라서 내측 격막 신경세포에서 shPLC-β4-1를 발현하는 렌티바이러스가 내생의 PLC-β4 발현을 대체로 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[185]

[186] <3-4> PLC-β4 녹다운 검출을 위한 조직 처리 및 면역형광 염색

[187] 문헌에 보고된 바와 같이 조직을 처리한 후 면역염색을 수행하였다(Kim, D.S. *et al.*, *J. Comp. Neurol.* 511, 581-598, 2008). 구체적으로, 동물을 우레탄 무감각증(urethane anesthesia) 하에 인산완충식염수(phosphate-buffered saline; PBS)와 0.1 M 인산완충용액(PB, pH 7.4)에서 4% 파라포름알데하이드를 차례로 심장관류(transcardial perfusion)로 희생시켰다. 뇌를 제거한 후, 4시간 동안 동일한 고정액으로 고정시켰다. 상기 뇌 조직을 밤새 30% 자당으로 침윤시킴으로써 냉동보존시켰다. 그 후, 전체 내측 격막 부위를 냉동 박편기(cryostat)로 냉동시킨 후 30-um 조각으로 절편시킨 다음, 상기 절편을 PBS를 포함하는 6 웰 플레이트에 놓았다. 선별된 동물들 유래 각 전체 내측 격막 부위에서 각각의 6번째 절편을 면역형광 분석용으로 사용하였다. 야생형 및 PLC-β4^{-/-} 마우스에서 PLC-β4 발현의 존재 및 부존재 각각, 및 내측 격막 부위의 PLC-β4-양성 신경세포에서 shPLC-β4에 의해 유도된 형태학상 변화는 마우스 항-신경세포 핵 IgG(mouse anti-Neuronal Nuclei(NeuN) IgG)(1:100; Chemicon, CA, USA) 및 래빗 항-PLC β4 IgG(rabbit anti-PLC β4 IgG)(1:100; Chemicon, CA, USA)를 이중 면역형광 염색함으로써 평가하였다. 뇌조직을 항혈청 혼합물에서 실온으로 밤새 배양하였다. PBS로 세번 세척한 후(각 10분), 각 절편을 Cys2-결합 염소 항-마우스 IgG(Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG)(1:200; Amersham, PA, USA) 및 Cys3-결합 염소 항-래빗 IgG(Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG)(1:200; Amersham, PA, USA)를 모두 포함하는 혼합물에서 실온으로 1시간 동안 배양하였다. 상기 각 절편을 DAPI(Vector, USA)가 존재하거나 부존재하는

Vectashield 고정 배지(mounting media)에 고정시켰다. Olympus DP50 디지털 카메라 및 Viewfinder Life Version 1.0 software, 또는 Olympus FluoView™ FV1000 Confocal Microscope System를 이용하여 이미지를 포착 및 분석하였다. Adobe Photoshop 7.0(San Jose, CA)를 이용하여 형상을 만들었다. 이미지 미세 조종은 경계에 의해 한정하였고, 명암 조절은 전체 이미지로 적용하였다.

[188]

[189] <3-5> PLC-β4 결손과 불안 행동 및 콜린성 세타 리듬 관계 분석

[190] PLC-β4를 표적화하는 shRNA(shPLC-β4) 또는 대조군 shRNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 10주령 야생형 마우스의 내측 격막에 운반시켰다.

[191] 그 결과, 뇌의 사후 검사에서, shPLC-β4 렌티바이러스로 감염시킨 마우스의 내측 격막의 신경세포에서 염색된 PLC-β4는 대조군 렌티바이러스로 감염시킨 마우스에 비해 감소하는 것으로 나타났다.

[192] 또한, 렌티바이러스-매개 PLC-β4 선택적 녹다운이 콜린성 세타 리듬이 감소하거나 불안 수준이 증가하여, PLC-β4^{-/-} 마우스의 표현형을 재생하는 것인지 조사하였다.

[193] 그 결과, 우레탄 마취 동안 기록된 콜린성 세타 리듬은 shPLC-β4를 암호화하는 렌티바이러스로 감염된 야생형 마우스가 대조군 shRNA로 감염된 야생형 마우스에 비해 감소한 반면에(도 3c 및 도 3d), 움직임 동안 관찰된 비콜린성 세타 리듬은 동일하게 나타났다(도 3a 및 도 3b).

[194] 또한, shPLC-β4 마우스 및 대조군 shRNA 마우스로 3가지 불안 행동 분석을 수행하였다. 개방 장소 분석에서, shPLC-β4 마우스는 대조군 shRNA 마우스에 비해 개방 장소에서의 운동 활동의 총량에서 유의적인 차이가 없음을 나타내었다(도 4a; $P > 0.05$, Student's *t*-test). 그러나, 개방 장소의 중앙을 가로지르는 shPLC-β4 마우스가 대조군 shRNA 마우스 보다 더 낮았다(도 4b; $P > 0.05$, Student's *t*-test). 따라서, 마우스의 중앙 통과에 대한 움직임 활동의 비율은 shPLC-β4 마우스가 대조군 shRNA 마우스 보다 높았다(도 4d; $P < 0.001$, Student's *t*-test).

[195] 또한, 고플러스 미로 테스트에서, shRNA 마우스는 대조군 shRNA 마우스에 비해 개방 분지내로 들어가는 수가 적었다(도 4e; $P < 0.001$, Student's *t*-test); 개방 및 폐쇄 분지로 들어가는 총 수는 두 군 사이 차이가 없었다(도 4f; $P = 0.128$, Student's *t*-test).

[196] 또한, 명암 반응 테스트에서, shPLC-β4 마우스가 대조군 shRNA 마우스에 비해 어두운 구획에서 밝은 구획으로 이동하는 수는 거의 없었다(도 4g; $P = 0.01$, Student's *t*-test). shPLC-β4 마우스가 대조군 shRNA 마우스에 비해 밝은 챔버에서 유의적으로 짧은 시간 동안 머물렀다(도 4h; $P = 0.047$, Student's *t*-test). 이런 결과는 PLC-β4^{-/-} 마우스의 표현형인 콜린성 세타 리듬의 감소와 불안 행동의 증가가 내측 격막 유래 PLC-β4 단백질의 제거에 의해 야기되는 것을 알 수 있었다.

[197]

[198] <실시예 4> 리바스티그민에 의한 PLC-β4^{-/-} 콜린성 세타 리듬 및 불안의 회복

[199] 본 발명자들은 PLC-β4^{-/-} 마우스가 콜린성 제 2형 세타 리듬을 감소시키는 반면에 비콜린성, 세로토닌 관련 제 1형 세타 리듬을 그대로 유지시키는 결과를 통해, PLC-β4^{-/-} 마우스의 증가된 불안이 콜린성 제 2형 세타 리듬의 감소로부터 야기되는지 조사하였다. 이를 테스트하는 방법으로, PLC-β4^{-/-} 마우스에서 아세틸콜린 수준의 증가가 콜린성 세타 리듬의 감소된 진폭을 회복시켜 불안 행동을 정상화시킬 수 있는지를 알아보았다. 이에, 해마에서 아세틸콜린의 수준을 증가시키는 것으로 알려진 콜린성 증진제(cholinergic-enhancing drug)이며 아세틸콜린에스테라제 억제제(acetylcholinesterase inhibitor)인 리바스티그민(Rivastigmine)(Van Dam, D. *et al.*, *Psychopharmacology* 180, 177-190, 2005; Cerbai, F. *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 572, 142-150, 2007)을 각각 PLC-β4^{-/-} 마우스에 투여하였다.

[200] 통계적 분석을 위해, 군들 간의 차이는 데이터 세트가 정상적으로 분포되어 있음을 확인한 후, 학생 *t*-테스트(Student's *t*-test)를 이용하여 비교하였다. PLC-β4^{-/-} 마우스, 야생형 마우스, 및 리바스티그민 투여 PLC-β4^{-/-} 마우스에 대한 행동 데이터는 군들 간의 차이를 결정하기 위해 ANOVA에 의해 분석한 후 Tukey's post-hoc test를 수행하였다.

[201]

[202] <4-1> 리바스티그민의 투여

[203] 콜린성 증진제인 리바스티그민(Novartis Pharma, Basel, Switzerland)을 식염수에 용해하였다. 불안 행동 테스트를 시작하기 60분 전에 0.5 mg/kg 리바스티그민으로 동물에 복강주사(i.p.)하였다(총 부피, 5 ml/kg). 0.5 mg/kg의 리바스티그민이 해마 아세틸콜린 농도를 ~100%까지 증가시킨다는 것을 보여주는 문헌인 미세투석 연구(Kosasa, T., *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 380, 101-107, 1999; Scali, C. *et al.*, *J. Neural. Transm.* 109, 1067-1080, 2002; Liang, Y.Q. & Tang, X.C., *Acta. Pharmacol. Sin.* 27, 1127-1136, 2006), 및 콜린유사약물에 대한 역 U자형의 투여량에 따른 반응 곡선(U-shaped dose-response curve)(Van Dam, D. *et al.*, *Psychopharmacology* 180, 177-190, 2005)을 통해 보다 높은 투여량이 유용한 효과를 미치지 않는다는 내용을 근거로 하여, 상기 리바스티그민의 투여량을 선택하였다. PLC-β4^{+/+}(WT) 및 PLC-β4^{-/-}(KO) 마우스들을 다음과 같은 세가지 처리군 중 하나에 무작위로 분배하였다: (1) WT-sham(식염수를 복강 주사한 야생형 마우스; n = 10), (2) KO-sham(식염수를 복강 주사한 PLC-β4^{-/-} 마우스; n = 10), 및 (3) KO-rivastigmine(리바스티그민을 복강 주사한 PLC-β4^{-/-} 마우스; n = 10). 리바스티그민은 2세대 카르바미산염 기초 역 비경쟁적 AChE 및 부티릴(butyryl)ChE(BuChE) 억제제이다. 상기 억제제는 억제 효과가 장기간 지속되고 뇌 특이적이며(Enz, A. *et al.*, *Prog. Brain Res.* 98, 431-438, 1993), 해마 및 피질에서 선택적으로 콜린 활성을 증가시키기 때문에 이를 선택하여

사용하였다(Weinstock, M., et al., *J. Neural Transm. Suppl.* 43, 219-225, 1994).

[204]

[205] <4-2> 리바스티그민 투여에 의한 콜린성 세타 리듬 회복 분석

[206] 콜린성 세타 리듬과 불안 사이 관계를 실험적으로 조사하기 위해, 하기 세개의 마우스 군을 새로운 환경에 놓은 후 EEG를 기록하였다: (1) 리바스티그민을 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스, (2) 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스, 및 (3) 식염수를 주사한 야생형 마우스. 콜린성 세타 리듬을 발생하는 것으로 알려진 여러 조건(예를 들어, 우레탄 마취, 경계적 부동 및 피동적인 회전) 중 최적의 조건으로 고려된 경계적 부동 상태를 유도하고 불안을 야기하는 새로운 환경 모델을 선택하였다.

[207] 그 결과, 새로운 개방 장소에서 이동(즉, 걸음) 동안 기록된 비콜린성 제 1형 세타 리듬은 상기 세 군 사이 유의적인 차이가 없었다(도 5a 및 도 5b). 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서, 콜린성 세타 리듬은 식염수를 주사한 야생형 마우스에 비해 감소하였다(도 5c 및 도 5d). 또한, 리바스티그민으로 주사(0.5 mg/kg, i.p.)한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 콜린성 리듬의 세기는 식염수를 주사한 야생형 마우스와 유사한 수준으로 회복하였다(도 5c 및 도 5d). 따라서 해마에서 아세틸콜린 수준을 증가시키는 것이 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 감소한 콜린성 세타 리듬을 회복시키는 것을 알 수 있었다.

[208]

[209] <4-3> 리바스티그민 투여에 의한 불안 행동 회복 분석

[210] PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 증가된 불안 표현형을 회복시키는 리바스티그민 투여가 감소된 콜린성 세타 리듬의 회복과 관련이 있는지 조사하기 위해, 리바스티그민(0.5 mg/kg, i.p.)을 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에 주사한 다음, 60분 후에 상기 리바스티그민 처리군을 세가지 불안 행동 분석을 테스트하였다. 세가지 불안 테스트에서, 리바스티그민 처리군은 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 증가된 불안 표현형을 회복하였다(도 6).

[211] 개방 장소 테스트에서, 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 움직임이 전체적으로 감소하였고(도 6a; ANOVA, $F_{2,45} = 6.96$, $P = 0.0023$) 식염수를 주사한 야생형 마우스(도 6b; ANOVA, $F_{2,45} = 4.34$, $P = 0.019$) 보다 개방 장소의 중앙으로 덜 움직였다. 그러나, 리바스티그민을 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 개방 장소의 중앙으로의 움직임 뿐만 아니라 총 움직임 수준에서 야생형 수준으로 나타났다(도 6a 및 도 6b). 또한, 리바스티그민 투여는 식염수를 주사한 야생형 마우스에 비교하여 개방 장소의 중앙 부분에서의 소비 시간의 양을 회복시켰다(도 6c; ANOVA, $F_{2,45} = 5.46$, $P < 0.01$). 또한, 리바스티그민 투여는 식염수를 주사한 야생형 마우스에 비교하여 동일한 수준으로 주축성을 감소시켰다(도 6d; ANOVA, $F_{2,45} = 7.46$, $P < 0.001$).

[212] 고평러스 미로에서, 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 개방 분지로 들어가는 수가 적은 반면에, 리바스티그민 처리군의 행동은 식염수를 주사한 야생형

마우스와 구별되었다(도 6e; ANOVA, $F_{2,45} = 4.2$, $P = 0.021$). 폐쇄 및 개방된 분지내로 들어가는 총수는 상기 세가지 군이 다르지 않다(도 6f; ANOVA, $F_{2,45} = 0.43$, $P = 0.44$).

[213] 명암 반응 테스트에서, 식염수를 주사한 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스는 밝은 구획과 어두운 구획 사이 이동이 거의 없었고(도 6g; ANOVA, $F_{2,21} = 4.5$, $P = 0.024$), 밝은 챔버에서 유의성이 없는 시간을 보냈다(도 6h; ANOVA, $F_{2,21} = 4.8$, $P = 0.019$). 두 가지 경우에서, 리바스티그민 처리 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스의 행동은 식염수를 주사한 야생형 마우스의 행동과 다르지 않았다.

[214] 따라서, 리바스티그민 처리는 PLC- $\beta 4^{-/-}$ 마우스에서 정상적인 콜린성 세타 리듬과 정상적인 불안 행동을 회복시키며, 상기 콜린성 세타 리듬이 불안을 억제하는 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

[215]

산업상 이용가능성

[216] 본 발명은 콜린성 제2형 세타리듬을 이용하여 콜린성 약물 투여에 적합한 불안증 개체를 스크리닝하는데 이용될 수 있으며, 불안증 개체에게 콜린성 약물 투여 후 예후를 모니터링하는데 유용하게 사용될 수 있다.

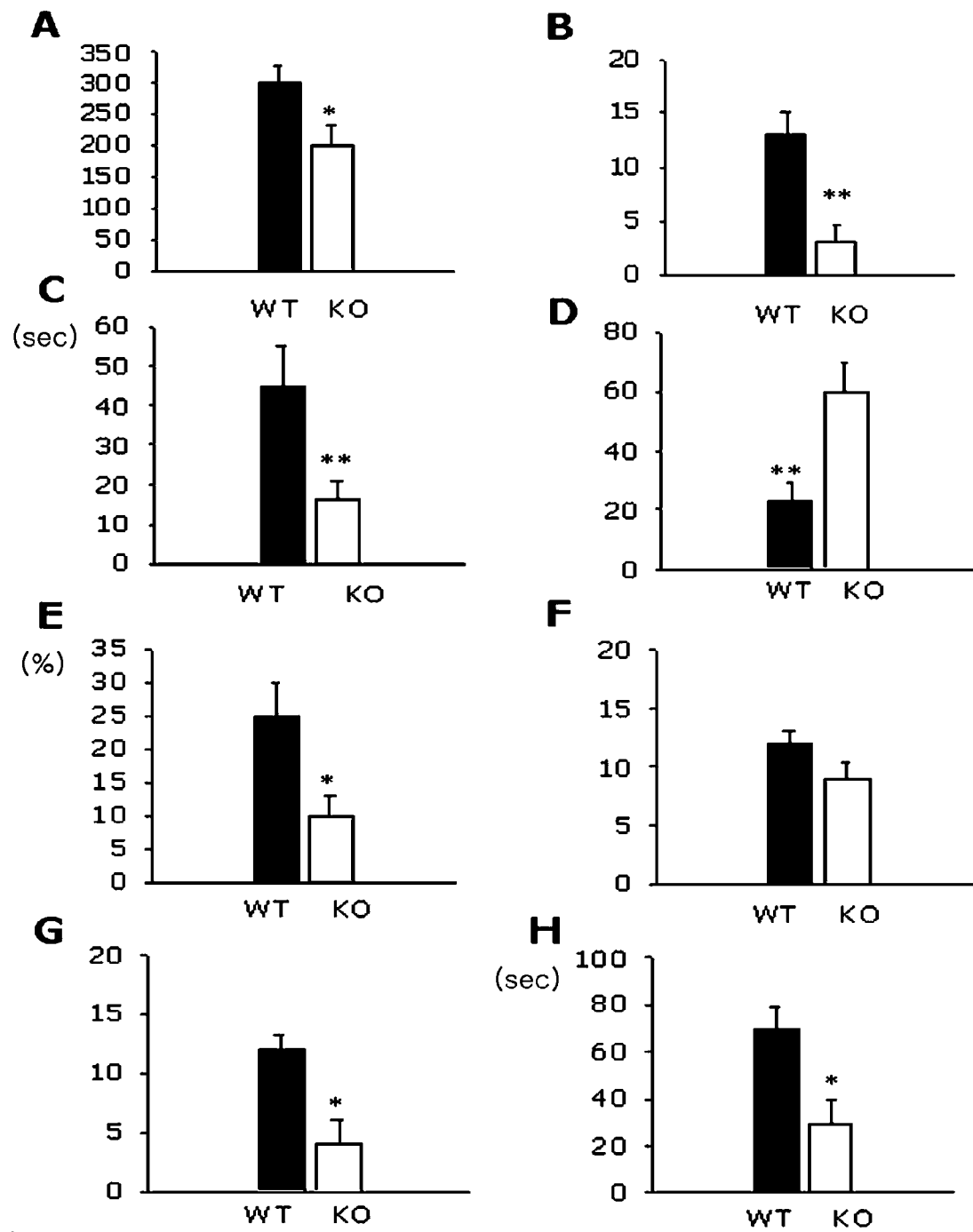
[217]

청구범위

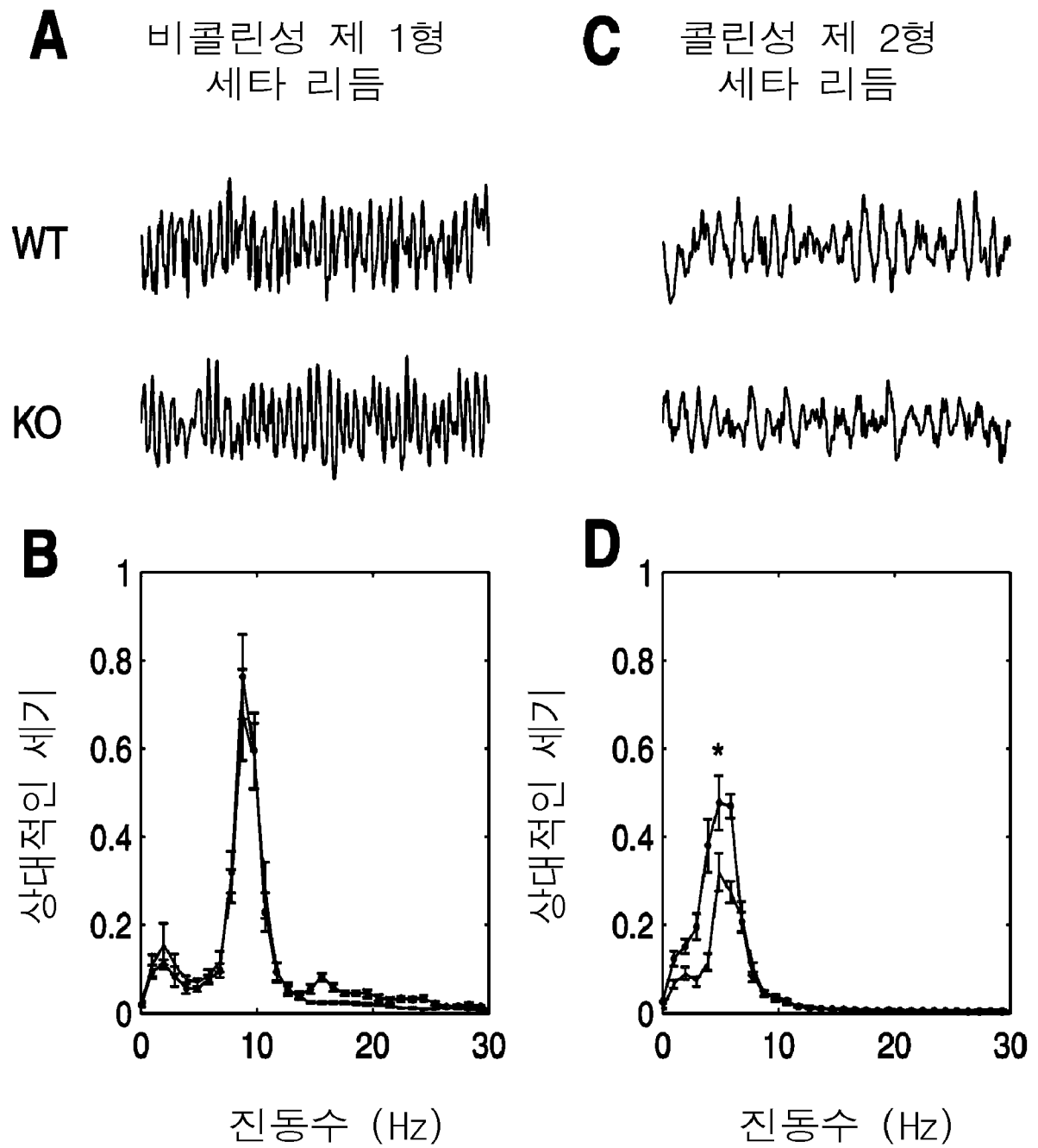
- [1] 1) 불안장애에 걸린 개체에서 콜린성 제2형 세타리듬(cholinergic type II theta rhythm)을 측정하는 단계;
2) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체에 비해 감소하는 개체를 선별하는 단계; 및
3) 상기 개체가 불안장애 치료제로서 콜린성 인핸서(cholinergic enhancer)의 처리가 필요한 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정 방법.
- [2] 제 1항에 있어서, 단계 1)의 콜린성 제2형 세타리듬은 뇌전도(electroencephalogram, EEG)를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [3] 제 1항에 있어서, 단계 3)의 콜린성 인핸서는 알로스테릭 감작제, 콜린성 수용체 활성제, 2차 전달자 캐스케이드를 통한 신경세포간 경로 활성제, 및 아세틸콜린 분해 효소 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [4] 제 1항에 있어서, 단계 3)의 콜린성 인핸서는 리바스티그민(Rivastigmine), 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine), 타크린(Tacrine), 메트리포네이트(Metrifonate), 피소스티그민(Physostigmine), 네오스티그민(Neostigmine), 피리도스티그민(Pyridostigmine), 암베노늄(Ambenonium), 디마카리늄(Demarcarium), 에드로포늄(Edrophonium), 후퍼진 A(Huperzine A) 및 온키달(Onchidal)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [5] 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 불안장애 예방 또는 치료를 위한 약물 적합성 판정용 키트.
- [6] 1) 유효한 양의 콜린성 인핸서를 불안장애에 걸린 개체에게 투여하는 단계;
2) 상기 개체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및
3) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체와 비교하여 회복되는 정도를 불안장애 회복 정도로 판정하는 단계를 포함하는, 콜린성 인핸서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링 방법.
- [7] 콜린성 제2형 세타리듬 분석용 뇌전도 측정기를 포함하는, 콜린성 인핸서 투여 후 불안장애의 예후 모니터링용 키트.
- [8] 1) 피검체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및
2) 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭이 정상 개체와 비교하여 낮은 개체를 불안장애에 걸릴 위험성이 있는 개체로 판정하는 단계를 포함하는, 불안장애의 진단 방법;
- [9] 1) 피검물질을 불안장애에 걸린 개체에 투여하는 단계;
2) 상기 개체의 콜린성 제2형 세타리듬을 측정하는 단계; 및

3) 상기 콜린성 제2형 세타리듬의 진폭을 정상 개체와 비교하여 회복시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 불안장애 예방 또는 치료제 후보물질 스크리닝 방법.

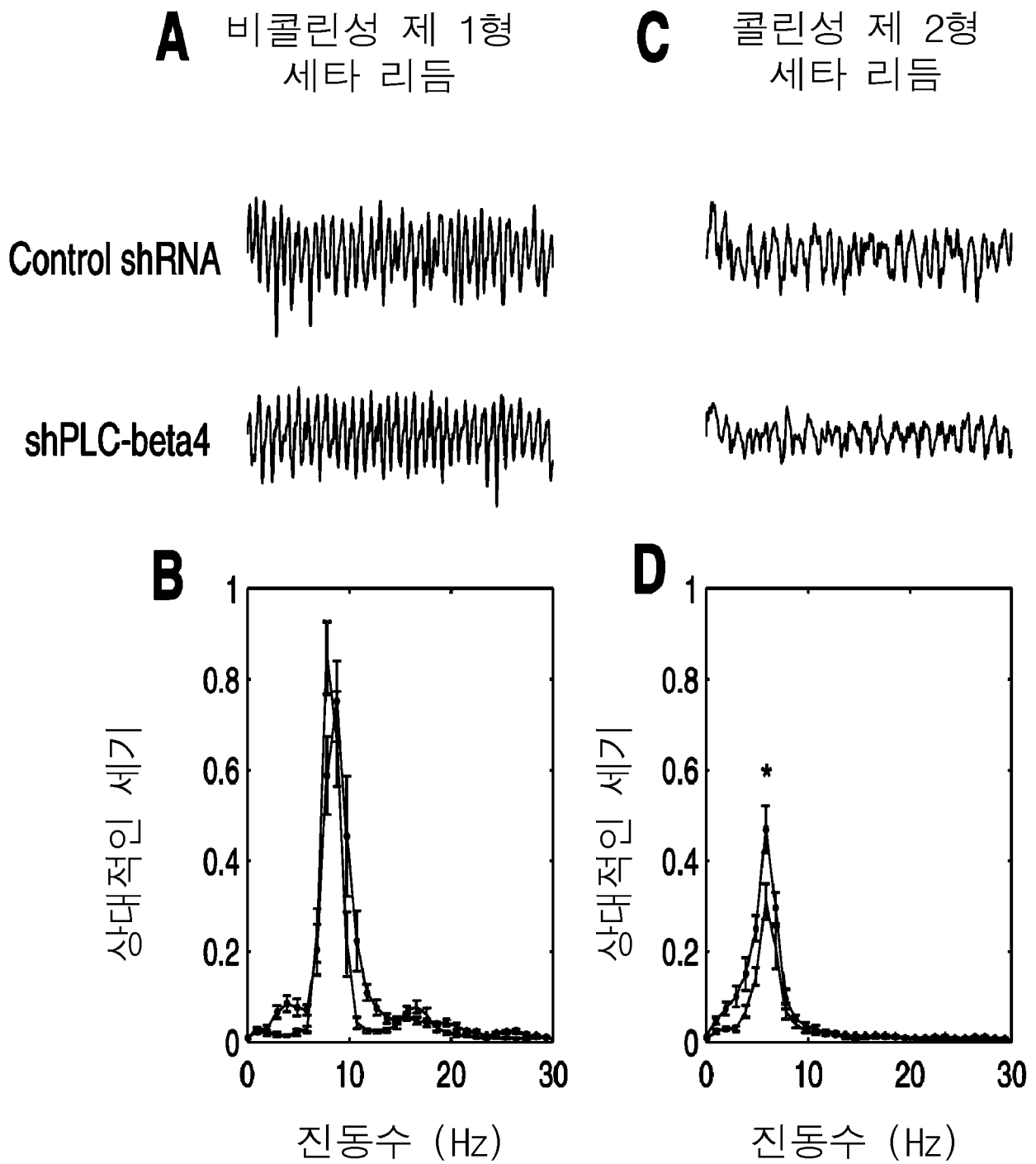
[Fig. 1]



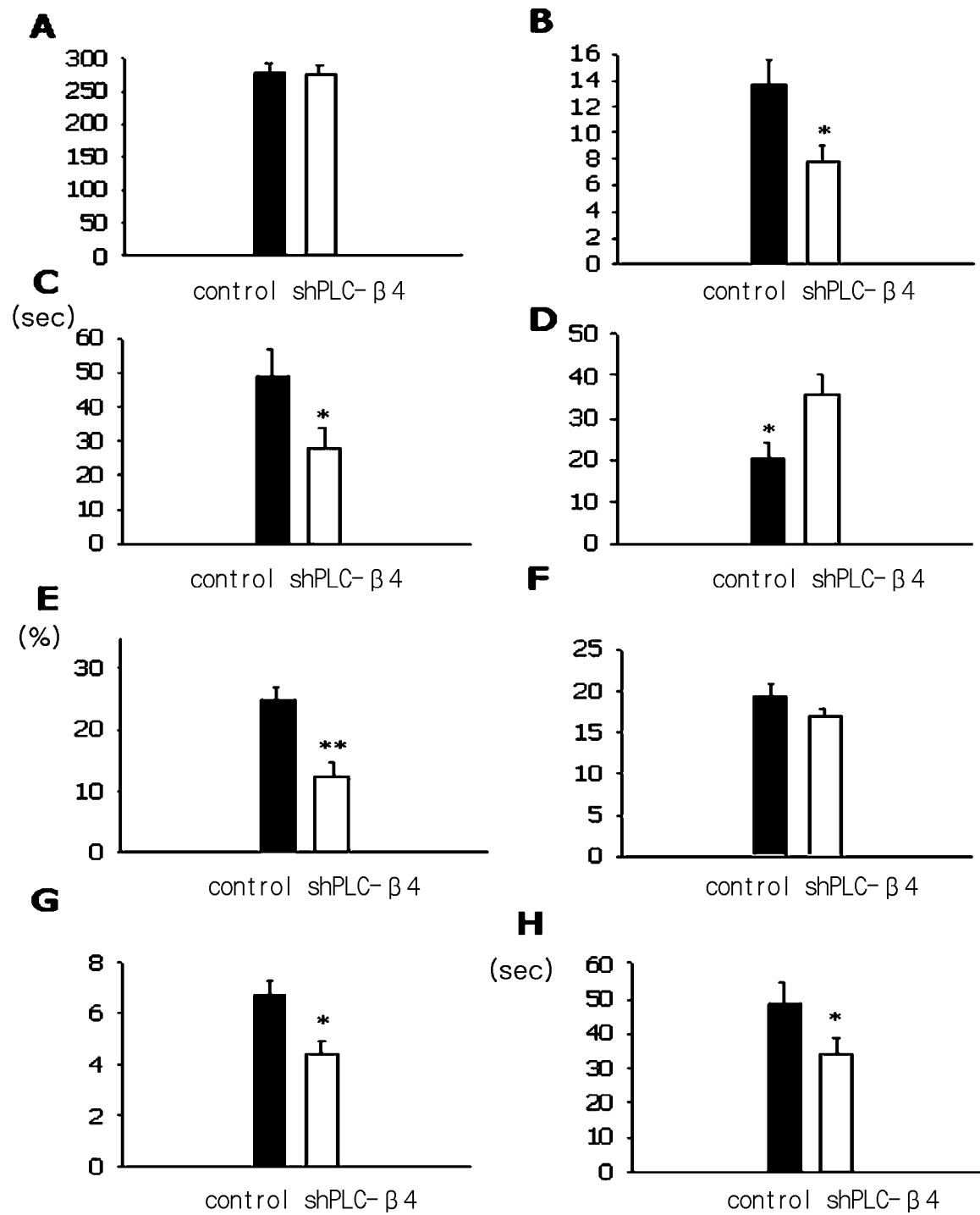
[Fig. 2]



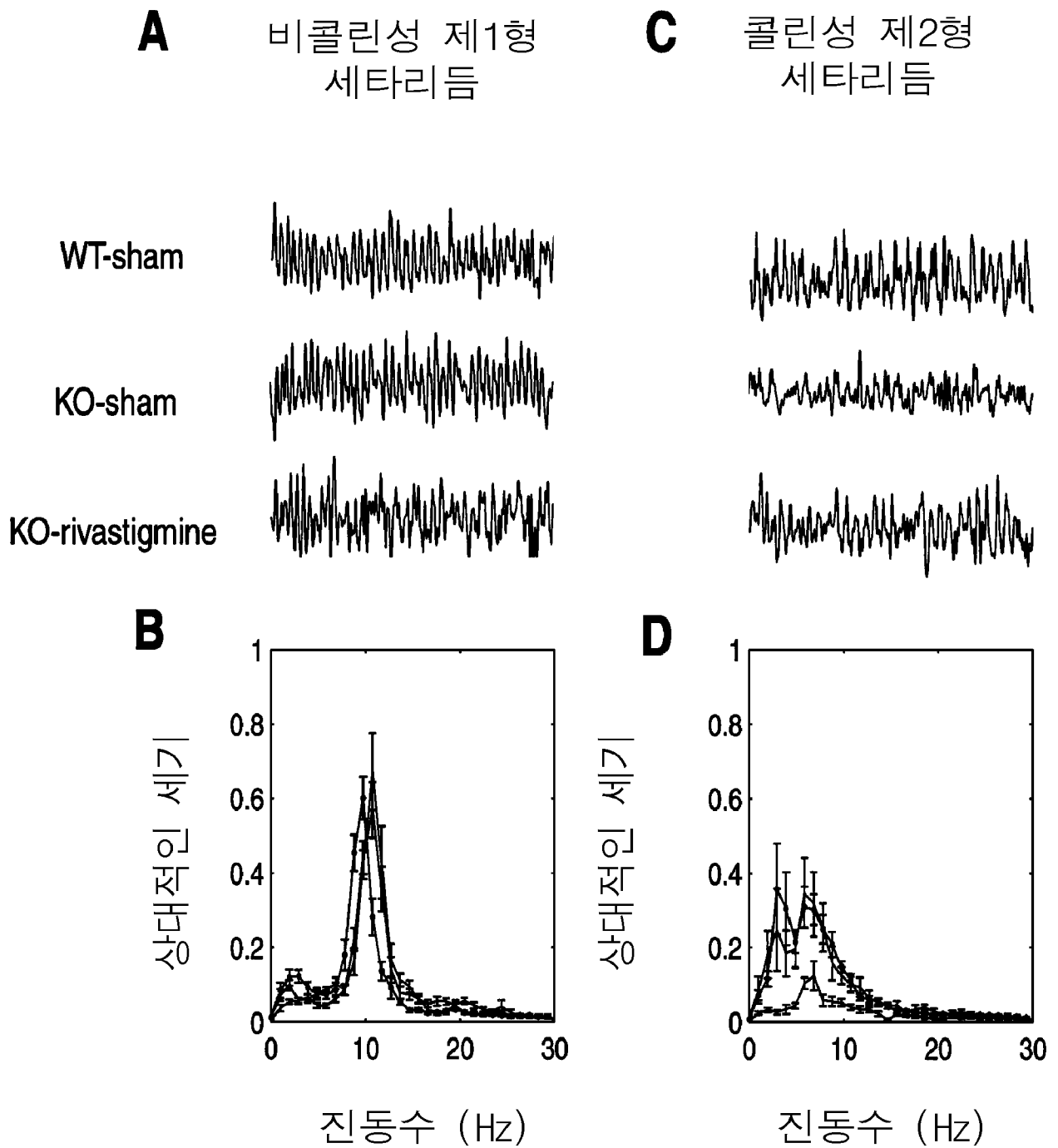
[Fig. 3]



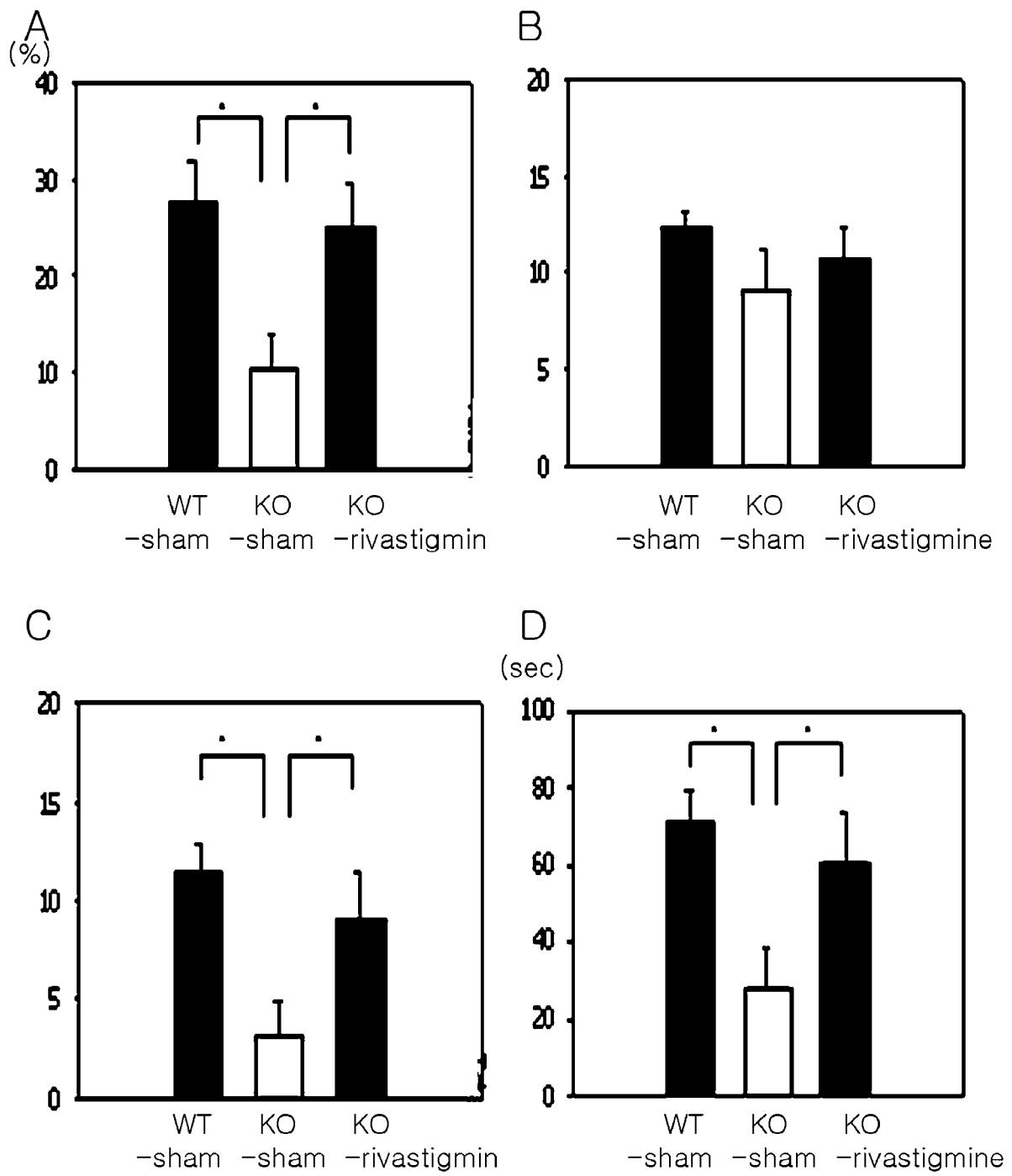
[Fig. 4]



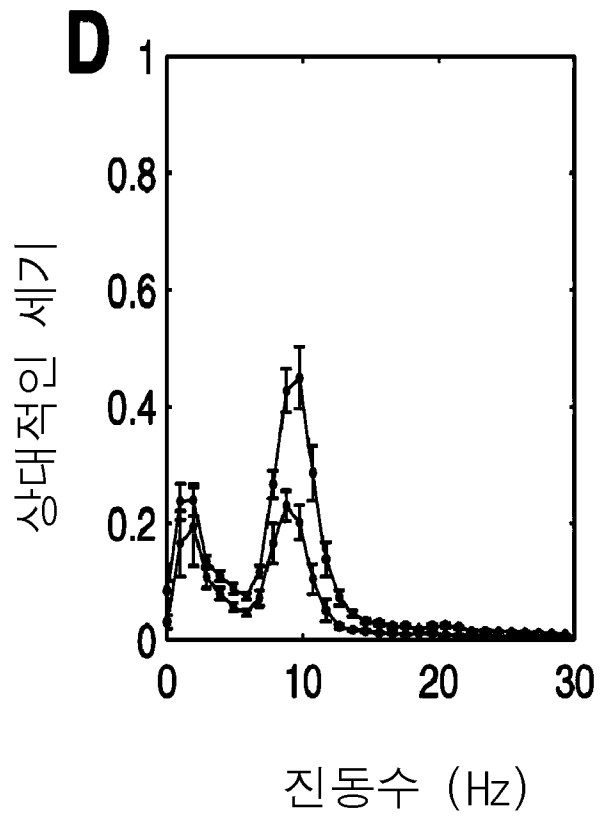
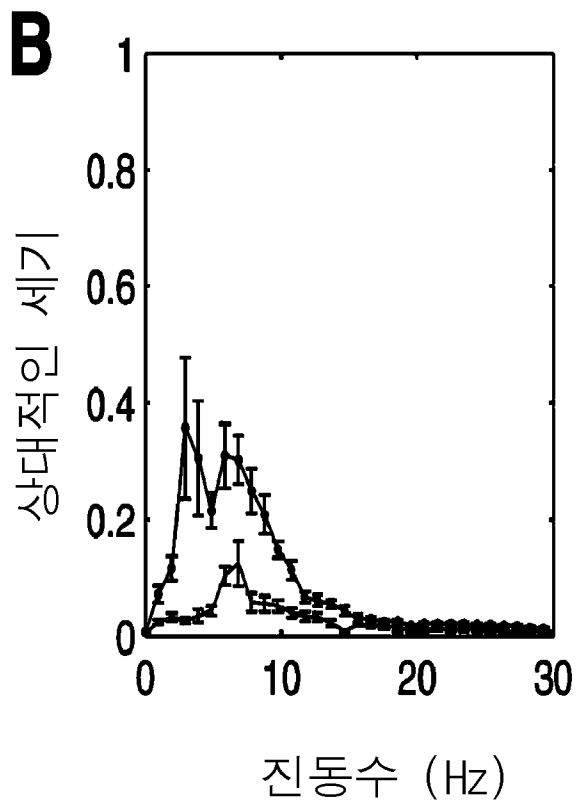
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

A 경계성 부동**C** 피동적인 회전

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/004583**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 31/27(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 31/27

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), Google & Keywords: thera rhythm, anxiety

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MASATOMO SUETSUGI et al., 'Appearance of frontal midline theta activity in patients with generalized anxiety disorder', Neuropsychobiology, 2000, 41(2), pp. 108-112 See pages 111-112, Discussion	5,7,9
A	DAMON J. MITCHELL et al., 'Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal "theta"', Progress in Neurobiology, 2008, 86, pp. 156-185 See the entire document	5,7,9
A	MCNAUGHTON, NEIL et al., 'Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function?', Behavioural Pharmacology, September 2007, 18(5-6), pp. 329-346 See abstract	5,7,9
A	NOAH A. RUSSELL et al., 'Lesions of vestibular system disrupt hippocampal thetarhythm in the rat', Journal of Neurophysiology, 2006, 96, pp. 4-14 See the entire document	5,7,9



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

"I" 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

05 JULY 2010 (05.07.2010)

Date of mailing of the international search report

06 JULY 2010 (06.07.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/004583

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **1-4, 6, 8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Since claims 1-4, 6 and 8 relate to a diagnostic method, they relate to subject matter for which the International Searching Authority is not required to carry out a search under Article 17(2)(a)(i) and 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/KR2009/004583

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/27(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/27

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), 구글 & 키워드: 세타리듬, 불안,

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MASATOMO SUETSUGI 등, 'Appearance of frontal midline theta activity in patients with generalized anxiety disorder', Neuropsychobiology, 2000, 41(2), pp. 108-112 페이지 111-112, Discussion 참조	5,7,9
A	DAMON J. MITCHELL 등, 'Frontal-midline theta from the perspective of hippocampal "theta"', Progress in Neurobiology, 2008, 86, pp. 156-185 문헌 전체 참조	5,7,9
A	MCNAUGHTON, NEIL 등, 'Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function?', Behavioural Pharmacology, September 2007, 18(5-6), pp. 329-346 초록 참조	5,7,9
A	NOAH A. RUSSELL 등, 'Lesions of vestibular system disrupt hippocampal theta rhythm in the rat', Journal of Neurophysiology, 2006, 96, pp. 4-14 문헌 전체 참조	5,7,9

☐ 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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“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 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2010년 07월 05일 (05.07.2010)

국제조사보고서 발송일

2010년 07월 06일 (06.07.2010)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김용

전화번호 82-42-481-8164



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 1-4, 6, 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제1항 내지 제4항, 제6항 및 제8항은 실질적으로 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 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

없음