

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 3일 (03.08.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/131468 A1

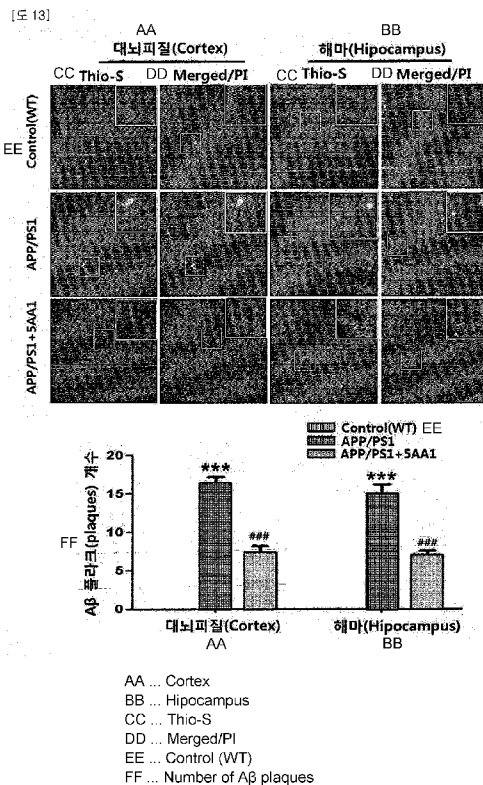
- (51) 국제특허분류:
A23L 33/18 (2016.01) A61K 38/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000957
- (22) 국제출원일: 2017년 1월 26일 (26.01.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0010090 2016년 1월 27일 (27.01.2016) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김명옥 (KIM, Myeong Ok); 52819 경상남도 진주시 가호로 44 번길 7, 102 동 303 호, Gyeongsangnam-do (KR).

- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING, ALLEVIATING OR TREATING NEUROLOGICAL DISORDERS, CONTAINING, AS ACTIVE INGREDIENT, NOVEL PEPTIDE ACTIVATING ADIPONECTIN RECEPTORS

(54) 발명의 명칭 : 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing, alleviating or treating neurological disorders, containing, as an active ingredient, a novel peptide activating adiponectin receptors. Specifically, the novel peptide is a peptide comprising five amino acids and is provided in a composition for preventing or treating neurological disorders since it was ascertained that, as a result of administering the composition to an Alzheimer model mouse and observing a behavioral change, memory and cognitive function remarkably increased, APP and amyloid beta (Aβ) protein remarkably decreased, there was no cytotoxicity, a neuron proliferation rate increased, and apoptosis was inhibited.

(57) 요약서: 본 발명은 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 함유하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 상기 신규 펩티드는 5개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이며, 알츠하이머 모델 마우스에 투여하여 행동학적 변화를 관찰한 결과, 기억, 인지능력이 현저하게 증가되고, APP와 아밀로이드 베타(Aβ) 단백질이 현저하게 줄어들고, 세포 독성은 없으며, 신경세포 증식율은 증가하였으며, 세포사멸을 억제하였음을 확인함으로써 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물로 제공하는 것이다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**

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).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 퇴행성 신경질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 운동 및 감각기능의 손상, 기억, 학습, 연산 처리 등의 기능이 저해되어 여러 가지 증상을 유발하는 질환이다. 퇴행성 신경질환은 신경계의 특정부위를 주로 침범하여 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위가 침범되어 복합적인 증상이 나타날 수도 있다. 환자가 보이는 임상 양상에 따라 진단을 하게 되는데, 이 경우 증상이 다양하고 서로 다른 질환들이 공통적인 임상 증상을 보이는 경우가 많아 진단이 어렵다(Soc. Sci. Med. Vol. 40. No. 6, pp. 847-858, 1995).
- [3] 퇴행성 신경질환 중의 하나인 치매(dementia)는 기억력 장애, 판단력 상실 등 전신기능의 전반적인 장애를 동반하는 질환이다. 50세 이전에는 증상이 거의 나타나지 않지만 60세 이후로는 발생 빈도가 점진적으로 증가하는 노인성 질환으로서, 의학기술의 발전 및 삶의 질 향상으로 인한 노인 인구의 증가에 따라 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 발병 인구가 급속히 증가하고 있는 질환이다. 2008년에 등록된 국내의 65세 이상 치매 환자 수는 421,000명으로 노인 전체 인구의 8.4%를 차지하고 있으며, 2030년에는 1,135,000명으로 전체 노인 인구의 9.6%를 넘어설 것으로 예측된 바 있다. 2008년 보건복지부의 치매 유병률 조사 결과, 치매의 발병 형태는 매우 다양한데, 국내 발병하는 치매의 약 70% 정도는 알츠하이머 형 치매(dementia of Alzheimer type)이며, 약 25% 정도는 혈관성 치매(dementia of Vascular type), 기타 알코올성 치매 및 파킨슨병 치매는 5% 이하로 집계되고 있다.
- [4] 치매의 가장 주요한 발병 형태인 알츠하이머병(Alzheimer disease, AD)은 두 가지 특징적인 병변을 보이게 되는데 하나는 뇌의 대뇌피질과 해마 부위의 신경세포에서 타우(tau) 단백질의 과인산화 및 응집에 의해 나타나는 세포 내의 신경섬유수초(Neurofibrillary tangle) 형성이고 다른 하나는 아밀로이드 β -1/42(amyloid β -1/42)의 응집에 의해 세포 외부에 형성되는 플라그(plaque)이다.
- [5] 알츠하이머병의 원인은 아직 확실하게 규명되어 있지 않으나, 응집에 관여되는 두 단백질의 응집된 형태인 tangle이나 플라그(plaque), 또는 전구체들이 뇌의 기억 및 인식을 담당하는 신경세포 부위에 침적되어 신경세포의 기능저하 및 사멸을 일으켜 알츠하이머를 일으킨다는 것이다.

- [6] 또한, 노인성 치매의 발병 요인으로서는 유전적 요소와 환경적 요소가 관여하는데, 유전학적 연관성은 치매를 앓고 있는 가족에서 확인된 β -아밀로이드 전구체 단백질(APP) 유전자, presenilin-1(PS1) 유전자 및 presenilin-2(PS2) 유전자의 돌연변이가 확인된다. APP, PS1, PS2 등은 플라그(plaque)에 침전되는 β -아밀로이드($A\beta$)의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 APP, PS1, PS2 등은 노인성 치매의 병리현상에서 중요한 역할을 담당하고 있어 현재 신약 개발에 주 대상이 되고 있다.
- [7] 한편, 한국공개특허 제2014-0042148호에 바이오활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물에 대하여 개시하고 있고, 일본등록특허 제5221633호에 알츠하이머 병과 다른 β -아밀로이드 단백질섬유 형성 장애의 치료를 위한 저 분자량 펩타이드가 개시되어 있으며, 미국공개특허 제2104-0271690호에 알츠하이머 타입의 치매 방지와 면역 요법을 위한 펩타이드 백신에 대하여 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 유효성분이 세포독성이 없으며, APP 및 $A\beta$ 단백질의 발현량을 감소시킬 뿐만 아니라 동물모델의 인지 또는 기억 기능을 향상시킨다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명은 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 유효성분으로 함유하는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은

알츠하이머 모델 마우스에 투여하여 행동학적 변화를 관찰한 결과, 기억, 인지기능이 현저하게 증가하고, APP와 아밀로이드 베타(A β) 단백질이 현저하게 줄어들고, 세포 독성은 없는 신경질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드는 5개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이므로 단백질 합성 등을 통한 생산성이 높아 산업적 이용가치가 매우 높다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 알츠하이머 마우스에 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 IP 투여 45일 후, 행동학적 변화를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 실험의 잠재기(latency)를 측정한 결과이다.
- [14] 도 2는 알츠하이머 마우스에 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 IP 투여 45일 후, 행동학적 변화를 확인하기 위하여 모리스 수중 미로 실험의 프로브 테스트에서 플랫폼 교차로를 통과한 횟수(A), 도파 잠재기(B) 및 타겟 사분면에서 머무르는 시간(C)를 측정한 결과이다.
- [15] 도 3은 알츠하이머 마우스에 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 IP 투여 45일 후, 행동학적 변화를 확인하기 위하여 Y-미로 테스트의 자발적 변경(Spontaneous Alteration(%))을 측정한 결과이다.
- [16] 도 4는 APP(β -amyloid precursor protein)가 형질전환된 SHS5Y 인간 신경세포에 0.5, 1, 5, 10 및 20 μ M의 5AA1, 5AA2, 5AA3 또는 5AA4 펩티드를 처리한 후, 상기 신경세포의 생존율을 분석한 결과이며, Control은 정상 SHS5Y 인간 신경세포이고, APP는 5AA1, 5AA2, 5AA3 또는 5AA4 펩티드를 처리하지 않은 APP가 형질전환된 SHS5Y 인간 신경세포이다.
- [17] 도 5는 APP가 형질전환된 HT-22 세포에 1, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리하였을 때, APP 및 A β 단백질이 현저하게 감소하는 것을 확인한 결과이다. ***는 APP 및 A β 단백질의 발현이 형질전환되지 않는 HT-22 세포 대비 APP 형질전환된 HT-22 세포에서 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, ###은 APP 형질전환된 HT-22 세포에서의 APP 및 A β 단백질의 발현 대비 5AA1을 처리한 APP 형질전환된 HT-22 세포에서의 APP 및 A β 단백질의 발현이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미한다.
- [18] 도 6은 APP가 형질전환된 HT-22 세포에 1, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리하였을 때, 아디포넥틴(adipoR1) 및 p-AMPK 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인한 결과이다. ***는 아디포넥틴(adipoR1) 및 p-AMPK 단백질의 발현이 형질전환되지 않는 HT-22 세포 대비 APP 형질전환된 HT-22 세포에서 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, ###은 APP 형질전환된 HT-22 세포에서의 아디포넥틴(adipoR1) 및 p-AMPK 단백질의 발현 대비 5AA1을 처리한 APP

형질전환된 HT-22 세포에서의 아디포넥틴(adipoR1) 및 p-AMPK 단백질의 발현이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미한다.

- [19] 도 7은 APP/PS1 마우스의 대뇌피질(cortex)에서 증가된 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)의 처리에 의해 감소한 것을 확인한 결과이다. ***는 정상군(Control) 대비 APP/PS1 마우스의 대뇌피질에서 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 통계적으로 유의미하게 증가하였음을 의미하며, ###은 5AA1 처리에 의해 APP/PS1 마우스의 대뇌피질에서 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 통계적으로 유의미하게 감소하였음을 의미한다.
- [20] 도 8은 APP/PS1 마우스 유도 9개월 후 및 12개월 후, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)의 처리에 따른 APP/PS1 마우스의 해마에서 증가된 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 감소한 것을 확인한 결과이다. ***는 정상군(Control) 대비 APP/PS1 마우스의 해마에서 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 통계적으로 유의미하게 증가하였음을 의미하며, ###은 5AA1 처리에 의해 APP/PS1 마우스의 해마에서 APP 및 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer)가 통계적으로 유의미하게 감소하였음을 의미한다.
- [21] 도 9는 APP/PS1 마우스에서 증가된 p-mTOR 및 p-ULK1 단백질의 발현량이 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1) 처리에 의해 발현량이 억제되는 것을 확인한 결과이다.
- [22] 도 10은 APP/PS1 마우스 유도 9개월 후, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)의 처리에 따른 APP/PS1 마우스 해마(hippocampus)에서 시냅스 기능(synaptic function)의 향상에 의해 발현되는 Synaptophysin, SNAP-25 및 SAP-102 발현량을 확인한 결과이다.
- [23] 도 11은 APP/PS1 마우스 유도 9개월 후, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)의 처리에 따른 APP/PS1 마우스의 해마(hippocampus)에서의 p-Tau(Ser413) 및 p-Tau(Ser404) 발현량 변화를 확인한 결과이다.
- [24] 도 12는 APP/PS1 마우스 유도 9개월 후 및 12개월 후, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)의 처리에 따른 APP/PS1 마우스의 해마에서 감소된 AdipoR1, p-AMPK 및 SIRT-1의 발현량이 증가한 것을 확인한 결과이다.
- [25] 도 13은 APP/PS1 마우스에 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리하여 대뇌피질(cortex) 및 해마(hippocampus)에서 생성된 아밀로이드 베타 올리고머(amyloid- β oligomer, A β oligomer) 플라그가 감소한 것을 확인한 결과이다.
- [26] 도 14는 마우스의 해마 신경세포를 배양하여 전기생리학적으로 LTP를 측정한 결과로, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 농도별로 처리한 군에서 mEPSC frequency(Hz)가 증진된 것을 확인한 것이다.

- [27] 도 15는 *In vivo* LTP를 측정된 결과로, 정상군, APP/PS1 마우스 모델군, 및 APP/PS1 마우스 모델군에 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리한 군에서의 EPSC 증강 정도를 확인한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 상기 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 아디포넥틴 수용체 활성화 펩티드로서, 생물정보학적 분석을 통하여 디자인한 서열을 의미하며, 상기 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 펩티드 합성법으로 합성하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [29] 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성 경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 알츠하이머병이지만 이에 한정하지 않는다. 상기 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100중량% 함유되는 것이 바람직하다.
- [30] 상기 조성물은 뇌의 해마와 대뇌피질에서의 A β 올리고머 또는 APP(β -amyloid precursor protein) 단백질의 발현량을 감소시키고, 아디포넥틴 수용체 1(AdipoR1) 또는 p-AMPK 단백질의 발현량을 증가시키는 특징이 있다.
- [31] 상기 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 식품으로 제조하거나, 다른 식품 또는 식품의 성분에 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [32] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함 한다.
- [33] 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있고, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드; 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨,

에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[34] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[35] 본 발명의 일 구현 예에 따른 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.

[36] 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[37] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다. 상기 개체는 바람직하게는 동물 또는 인간을 제외한 동물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[38]

[39] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들

실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[40]

[41] [재료 및 방법]

[42] 1. 신규 펩티드

[43] 본 발명의 10종 펩티드 5AA1(RGPCG; 서열번호 1), 5AA2(GPWGP; 서열번호 2), 5AA3(GPCYP; 서열번호 3), 5AA4(GPCWP; 서열번호 4), 5AA5(GLCGP; 서열번호 5), 5AA6(GWCGP; 서열번호 6), 5AA7(GPRGP; 서열번호 7), 5AA8(GPCFP; 서열번호 8), 5AA9(GPCGQ; 서열번호 9) 및 5AA10(GPCGF; 서열번호 10)은 펩트론(한국)에 의뢰하여 합성하였으며, 역상 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 99%의 순도임을 확인하였다.

[44]

[45] 2. 모델 동물의 분류 및 약물 처리

[46] 수컷 C57BL/6J 야생형 마우스와 이중형질전환(double transgenic) B6.Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN^{dE9})85Dbo/Mmjax (APP/PS1) AD-모델 마우스를 찍슨 실험실(Bar Harbor, ME, USA)로부터 구입하였다. 이중 형질전환 마우스는 뇌에 스웨디쉬 돌연변이 (Swedish mutation)를 포함하는 마우스-인간 융합 아밀로이드 전구체 단백질 (chimeric mouse-human amyloid precursor protein, Mo/HuAPP695^{swe})뿐만 아니라 돌연변이체 인간 프레세닐린 1 단백질 (mutant human presenilin 1 protein, PS1-dE9)도 발현한다. 상기 마우스는 12h/12h 명암주기로 23°C, 60±10%의 상대 습도 조건 하에서 대학의 동물 사육장에서 음식과 물을 무제한으로 공급하여 사육하였다. 상기 마우스가 10개월령에 도달했을 때, 순화를 위해 1주일 동안 주사 및 행동관찰실로 옮겨졌으며, 마우스 유지 관리 및 처리는 한국 경상대학교 생물학과 응용 생명과학부에서 발행된 동물윤리위원회(IACUC)의 지침에 따라 수행하였다. 본 발명의 실시예에서는 한국경상대학교 생물학과 응용생명과학부의 동물윤리위원회(IACUC)에서 승인한 지침(승인 ID: 125)에 따라 마우스 실험을 수행하였다.

[47] 본 발명의 실시예에서 동물은 하기와 같이 그룹화되었다.

[48] 1) 정상군: 야생형(WT) 군(group)으로 본 발명의 신규 펩티드를 처리하지 않은 군

[49] 2) APP/PS1 형질전환된 군으로 본 발명의 신규 펩티드를 처리하지 않은 군

[50] 3) APP/PS1가 형질전환된 군에 본 발명의 유효성분인 신규 펩티드(5AA1~5AA4)를 처리한 군 및

[51] 4) 야생형 군에 본 발명의 유효성분인 신규 펩티드(5AA1~5AA4)를 처리한 군

[52]

[53] 본 발명의 신규 펩티드는 이중 탈이온 증류수(bi-deionised distilled water)에 용해시켰고, 최종적으로 생리식염수에 제조하여 투여하였다. 본 발명의 신규

펩티드는 체중에 따라 APP/PS1 및 야생형(WT) 마우스에 5mg/kg/일의 용량을 2.5일 간격으로 30일~45일 동안 복강 내(i.p.) 투여하였다. 야생형 마우스 및 APP/PS1 형질전환된 마우스는 동일한 부피의 생리식염수가 처리되었으며, 행동분석 후, 상기 실험 동물들은 추가의 생화학적 및 면역조직화학적 분석을 위해 희생되었다.

[54]

[55] 3. SH-SY5Y 세포의 *in vitro* 형질전환

[56] 1) 플라스미드 및 세포주

[57] pCAX 포유류 발현 벡터에 연결된 SV40 프로모터/인핸서의 전사 조절 하의 인간 APP_{swe}/ind 유전자는 addgene에서 획득하였다; Dennis Solkoe에 의해 APP 저장소에 기탁되었다(플라스미드 30145). 플라스미드는 50 μ g/ml의 앰피실린이 포함된 LB 배지에서 DH5alpha 균주에 의해 증폭되었다. 플라스미드는 퀴아젠(Qiagen) 플라스미드 미니 키트(Cat # 12143)를 이용하여 정제하였고, *Eco* RV 제한효소로 절단하여 확인하였다. 본 *in vitro* 연구에 사용된 인간 신경모세포종(neuroblastoma) 세포주 SHSY5Y는 10% 우태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 항생제 (각 10,000U 및 10,000 μ g/ml의 저장용액(stock solution) 농도))가 포함된 DMEM 배지에서 배양되었다.

[58]

[59] 2) APP_{swe}/ind 형질전환

[60] SH-SY5Y 세포 및 HT-22 세포는 상기 배지가 담긴 배양 플라스크에 접종되었고, 70-75%의 컨플루언시(confluency)에 도달할 때까지 배양되었다. APP_{swe}/ind 유전자를 갖는 pCAX 벡터는 제조사의 지시에 따라 Lipofectamine 3000(Life technologies)을 사용하여 48시간 동안 형질전환되었다.

[61] 신규 펩티드 처리는 APP_{swe}/ind 형질전환 SH-SY5Y 세포에 4시간 동안 수행되었고, 이후 MTT 분석 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[62]

[63] 실시예 1. 행동분석

[64] 행동 분석(Behavioral study)은 그룹당 13마리의 마우스를 이용하여 모리스 수중미로(Morris water maze; MWM) 시험 및 Y-미로 시험을 이용하여 수행하였다.

[65]

[66] 1) 모리스 수중 미로 시험

[67] 모리스 수중 미로 시험 장치는 흰색 잉크를 첨가하여 불투명해진 15.5cm 깊이의 물(수온 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)이 담긴 직경 100cm, 높이 40cm의 원형수조로 구성하였다. 투명한 탈출 플랫폼(직경 10cm, 높이 20cm)은 수면 1cm 아래에 숨겨져 있고, 사분면 중 하나의 중앙에 위치하도록 하였다. 각 마우스는 회전하며 시작하는 세 사분면(three quadrants of rotational starting)과 한 사분면에 숨겨진 하나의 플랫폼을 이용하여 5일 동안 연속적으로 매일 훈련 받았다. 수중

미로로부터 탈출하는 지연시간(숨겨진 탈출 플랫폼을 찾는 시간)은 매 시도마다 계산되었다. 5일째의 24시간 후에, 기억 강화 평가를 위해 프로브(probe) 실험을 수행하였다. 프로브 실험은 플랫폼을 제거하고, 각 마우스가 60초 동안 자유롭게 수영하도록 허용하였으며, 목표 사분면에서 마우스가 소모한 시간 및 지나친 플랫폼 위치(숨겨진 플랫폼 훈련 동안 플랫폼이 위치했던 곳)의 수를 측정하였다. 목표 사분면에서 소모한 시간은 기억 강화의 정도를 나타내는 것으로 기준하였다. 모든 데이터는 비디오-추적 소프트웨어(SMART, Panlab Harward Apparatus, Bioscience Company, Holliston, MA, USA)를 사용하여 기록하였다.

[68] 결과는 도 1에 개시한 바와 같이, 수중 미로로부터 탈출하는 지연시간(숨겨진 탈출 플랫폼을 찾는 시간)인 잠재기(Latency)가 정상 마우스에서는 10초 이내이지만, APP/PS1 모델 마우스에서는 약 30초 정도로 증가한 것을 확인할 수 있으며, 5일 동안의 훈련에 의해 약간 감소하는 경향은 있으나, 오차범위 내의 감소 정도를 보였다. 하지만, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)이 처리된 APP/PS1 모델 마우스에서는 잠재기 시간이 25~20초까지 감소한 것을 확인할 수 있고, 정상 마우스에 처리한 경우에는 잠재기 시간이 10초 미만으로 확인되었다.

[69] 또한, 프로브 실험결과는 도 2에 개시한 바와 같이, 정상 마우스에 비해 APP/PS1 모델 마우스에서 플랫폼이 위치했던 곳에 머무르는 시간이 현저하게 감소하는 경향을 확인하였고, 상기 APP/PS1 모델 마우스에 5AA1을 처리한 경우, 플랫폼이 위치했던 곳에 머무르는 시간이 APP/PS1 모델 마우스에 비해 증가함을 확인할 수 있었다.

[70]

[71] **2) Y-미로 시험**

[72] Y-미로는 검은색 페인트칠 된 나무로 제작하였고, 상기 Y-미로의 각 가지(arm)는 50cm의 길이, 20cm의 높이 및 10cm의 바닥과 상단의 폭으로 이루어진 것이다. 각 마우스는 미로 장치의 중앙에 위치시켰고, 3회 8분 회기동안 미로를 자유롭게 이동할 수 있도록 하였다. 미로 가지로의 연속적 입장(series of arm entries)을 육안으로 관찰하였다. 자발적 변경(Spontaneous alteration)은 중복적 3중 세트(overlapping triplet sets)에서 3개의 다른 가지에 마우스가 차례로 들어간 경우로 정의하였다.

[73] 변경 행동 비율(%)은 [중복적인 3중 세트(3개의 다른 가지에 연속적으로 입장한 경우)/총 입장-2] × 100으로 계산하였다. 높은 자발적 변경 행동 비율은 기억 기능이 향상된 것으로 간주하였다.

[74] Y-미로 실험결과, 도 3에 개시한 바와 같이 정상 마우스에 비해 APP/PS1 모델 마우스에서 자발적 변경(spontaneous alteration)이 줄어들고, 5AA1의 처리에 의해 회복됨을 확인할 수 있었다.

[75] APP 모델 마우스의 행동분석으로부터 본 발명의 신규펩티드의 처리가 인지

또는 기억 등을 향상시키는 것으로 판단하였다.

[76]

[77] 실시예 2. 펩티드(5AA1~5AA4)의 처리에 따른 세포 생존율의 변화 분석

[78] 다양한 농도의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)가 처리된 세포의 생존율을 측정하기 위해 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석을 수행하였다. 상기 세포는 200 μ l의 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지가 담긴 96웰 플레이트에 1 $\times$ 10⁵ 세포/웰으로 접종되었다. 70%의 세포 컨플루언스 (confluence) 이후, SH-SY5Y 세포에 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M 및 20 μ M의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 처리 마지막에, MTT(PBS 중 5mg/ml)가 각 웰에 첨가되었고, 플레이트는 37°C에서 4시간 동안 배양되었다. DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해된 포마잔(formazan)이 웰에 첨가되었고 플레이트는 교반기에서 10~20분 동안 교반되었다. 이후, 스캐닝 마이크로플레이트 리더를 이용하여 550~570nm(L1) 및 620~650nm(L2)의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[79] 상기 L2 흡광도는 세포 잔여물 및 웰 결함(well imperfections)을 측정하는 것이며, 각 웰의 보정된 흡광도 (Abs. = L1 - L2)는 100 $\times$ 처리된 웰의 흡광도/대조구 웰의 흡광도로, 세포 생존율을 계산하기 위해 사용되었다.

[80] 도 4에 개시한 바와 같이, 본 발명의 신규펩티드 5AA1 및 5AA2를 처리한 경우, APP가 형질전환된 세포에서 감소한 세포생존율이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 5AA3 및 5AA4를 처리한 경우, 농도 의존적이지는 않지만, APP 군에 비해 세포생존율이 증진되었음을 확인함으로써, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1~5AA4)가 세포독성이 없다는 것을 알 수 있었다.

[81]

[82] 실시예 3. 웨스턴 블랏 분석

[83] 단백질 농도는 BioRad 단백질 분석 키트(BioRad Laboratories, CA, 및 USA)로 측정되었다. 동량의 단백질(15~25 μ g)이 4-12% 블랏™ 미니 젤 및 MES SDS 전기영동 버퍼(running buffer) 1 $\times$ (Novex, Life Technologies, Kiryat Shmona, Israel)를 사용한 동일한 실험 조건 하에서 전기영동 되었고, 염색된 광범위 단백질 마커(broad range prestained protein marker, GangNam stain™, Intron Biotechnology)가 분자 크기 대조구로 사용되었다. 사용된 멤브레인은 비특이적 결합을 감소시키기 위해 5%(w/v) 탈지유로 블로킹되었고, 1:1000으로 희석된 1차 항체와 함께 4°C에서 밤새 반응시켰다. 이후 HRP(horseradish peroxidase)-결합 이차항체와 적절하게 반응시킨 후, 단백질은 제조사의 지시에 따라 ECL 검출 시약(Amersham Pharmecia Biotech, Uppsala, Sweden)을 사용하여 검출되었다. X-선 필름이 스캐닝 되었고, 밴드의 광학 밀도가 컴퓨터 기반 Sigma Gel 프로그램, 버전 1.0(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하는 밀도계(densitometry)를 이용하여 분석되었다.

- [84] 1차 항체는 anti-아밀로이드 베타(A β), anti-APP, anti-AdipoR1(Adiponectin receptor 1), anti-phospho-AMPK, anti-SNAP-25(Synaptosomal-Associated Protein 25), anti-SAP-102, anti-Synaptophysin, phospho-Tau(Ser 413), anti-p-mTOR, anti-p-ULK1, anti- β -actin을 사용하였다.
- [85] HT-22 세포로부터 분리한 단백질의 웨스턴 블랏 분석 결과, 도 5에 개시한 바와 같이, 아밀로이드 β (A β) 및 APP(β -amyloid precursor protein) 단백질의 발현량이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 도 5(B)는 도 5(A)의 결과를 β -actin으로 정규화하여 정량화 값을 나타낸 것으로, 정상세포에서는 아밀로이드 β (A β) 및 APP(β -amyloid precursor protein) 단백질이 거의 발현되지 않았으며, APP가 형질전환된 세포에서는 APP(β -amyloid precursor protein) 단백질의 발현이 현저하게 증가하였고, 이를 본 발명의 신규펩티드(5AA1) 처리에 의해 감소함을 확인하였다. APP가 형질전환된 세포에서 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리하여 AdipoR1과 p-AMPK 단백질의 발현이 증가한 것을 확인하였다(도 6).
- [86] 또한, APP/PS1 모델 마우스의 대뇌 피질(Cortex)과 해마(Hippocampus)로부터 분리한 AAP 및 A β 의 발현량이 현저하게 증가하였으나, 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리에 의해 발현량의 증가가 억제되는 것을 확인하였다. 특히 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리 9개월 후 및 12개월 후, 해마에서의 AAP 및 A β 의 발현량이 여전히 감소된 것을 확인하였다(도 7 및 8).
- [87] APP/PS1 모델 마우스로부터 분리한 p-mTOR 및 p-ULK1 단백질 발현이 감소한 것을 확인하였다(도 9). 이와 같은 발현량의 변화로부터 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드가 신경세포 내 신호전달을 조절한다는 것을 알 수 있었다.
- [88] 또한, 해마에서의 시냅스 기능을 향상시키는 단백질인 SNAP-25, SAP-102 및 Synaptophysin 단백질의 발현량이 APP/PS1 형질전환 세포에서 감소된 것을 확인하였으며, 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리 9개월 후 및 12개월 후에도 여전히 현저하게 증가된 상태를 유지하였고(도 10), p-Tau(Ser413) 및 p-Tau(Ser404) 단백질의 발현량도 현저하게 감소된 상태를 유지하였으며(도 11), AdipoR1, pAMPK 및 SIRT-1의 발현량도 현저하게 증가된 상태를 유지하였다(도 12).
- [89]
- [90] 실시예 4. 동물모델을 이용하여 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드의 복강주사 및 꼬리정맥주사 후, 뇌의 면역형광 분석
- [91] 10주령 APP/PS1 마우스의 복강(IP)에 2.5일마다 1회씩 45일 동안 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리한 후, 슬라이드 섹션을 제작하기 위하여, 마우스의 뇌를 빙냉 4% 파라포름알데하이드의 경심관류(transcardial perfusion)를 이용하여 고정하였다. 상기 뇌는 4% 파라포름알데하이드에서

72시간 동안 후 고정되었고, 이어서 20% 수크로스로 옮겨져 4°C에서 72시간 동안 유지되었다. 뇌를 최적 절단 온도(Optimal Cutting Temperature, OCT) 화합물(A.O, USA)에 넣고, 액체질소에서 얼린 후 CM 3050C cryostat(Leica, Germany)에서 관상면으로 절편화되었다(14μm). 조직 절편은 ProbeOn Plus charged slides (Fisher, USA) 상에서 촬영되었다.

- [92] 면역형광 분석은 선행 연구(Shah *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2015)에 기술된 방법을 약간 변형하여 수행되었다. 조직 절편을 포함하는 슬라이드는 0.01M PBS 용액으로 15분 동안 2회 세척되었다. 단백질을 분해 효소 K(proteinase K)를 절편에 첨가한 뒤, 슬라이드를 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 이어서 조직 절편을 블로킹 용액 [5% 정상 염소 혈청, 0.3% 트리톤 X-100, PBS]에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기 슬라이드는 일차항체(상기 '웨스턴 블랏 분석'에 사용된 것과 동일한 항체)와 함께 밤새 반응시킨 후, 이차 TRITC- 또는 FITC-결합 항체(PBS에 1:50으로 희석; Santa Cruz)와 함께 상온에서 90분 동안 반응시켰다. 상기 슬라이드는 Prolong Antifade 시약(Molecular Probe, Eugene, OR, USA)에 침지하여 염색하였다. 모든 염색된 슬라이드는 공초점 레이저 주사 현미경(Fluoview FV 1000)으로 분석되었다. 아밀로이드 플라그(Amyloid plaques)는 Thioflavin S 염색 후 뇌 절편에서 가시화되었다. 뇌 절편은 0.01M PBS에서 10분 동안 2회 세척된 후, 상온에서 신선한 1% Thioflavin S 용액에 10분 동안 침지되었다. 이어서 절편은 70% 에탄올에 5분 동안 침지한 다음 물로 2회 세척하였고, 요오드화 프로피듐(propidium iodide, PI)으로 대조염색 (counterstain)한 후 커버글라스로 덮었다.
- [93] 형태학적 분석 및 신호는 이미지 J 소프트웨어(미국 NIH에서 제공하는 공개 소프트웨어(open source software))로 분석되었고, 분석 결과는 IOD(Integral Optical Density)로 표현되었다. 제시된 영역 중 아밀로이드 침전 부위의 비율 또한 Image-J 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다.
- [94] 결과는 도 13에 개시한 바와 같이, 뇌의 대뇌피질(Cortex) 및 해마(Hippocampus) 부위에서 생성된 아밀로이드 베타 플라그가 본 발명의 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1) 처리에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.
- [95]
- [96] 실시예 5. *In vitro* 전기생리학 분석(LTP; Long Term Potentiation)
- [97] E19 Sprague-Dawley 쥐(Rat)로부터 분리한 일차 해마 뉴런은 150 세포/mm²의 밀도까지 배양되었다. AMPA 수용기(AMPA)가 매개된 소형 흥분성 시냅스 후전류(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs)는 기존의 전세포 기술(whole-cell techniques)을 사용하여 기록되었다. 내부용액(internal solution)으로 채워졌을 때, 전극 저항은 3~5 MΩ까지 다양했다.
- [98] 본 발명자들은 Axopatch 200A 패치-클램프 증폭기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 전류 측정을 수행했다.
- [99] 막전압과 전류의 전압, 코맨드 및 디지털화가 IBM-호환 컴퓨터 상의 pClamp

소프트웨어 패키지의 Clampex 9.2(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)와 접속된 Digidata 1322A를 이용하여 조절되었다. 본 발명자는 Clampfit(Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)을 이용하여 데이터를 분석하였다. 증폭기의 4극 베셀 필터(four-pole Bessel filter)를 이용하여 2kHz에서 전류를 저역(low-pass) 필터링하였다.

- [100] AMPAR-mEPSCs는 1mM의 테트로도톡신을 첨가하고, 본 발명의 내부 및 외부 용액 배치에서 Cl^- 평형 전위(equilibrium potential)인 막 전위 -70mV를 유지하여 전기 생리학적으로 분리하였다. 세포 내 기록 용액(패치 전극)은 125mM의 Cs 메탄술포네이트, 8mM NaCl, 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, 4mM Mg-ATP, 0.3mM Na-GTP 및 5mM QX-315 Cl (pH 7.25, CsOH로 적정, 285mosmol⁻¹)을 포함하였다. 세포 외 기록 용액은 134mM NaCl, 5.4mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 10mM D-글루코오스 및 10mM HEPES(pH 7.4, NaOH로 적정)을 포함하였다. 각 세포에 대해, 데이터는 2kHz에서 필터링되었고, Clampfit 9.0 소프트웨어(Molecular Devices, Union City, CA)에서 시행된 주형-기반 소형 시냅스 전류 검출 알고리즘(template-based miniature synaptic current detection algorithms)을 사용하여 분석되었다. 소프트웨어로 검출된 각각의 추정 mEPSC는 시각적으로 이의 일반적인 형태가 시냅스 현상에 대해 예상된 것과 같은지 여부를 기반으로 받아들여지거나 거절되었다. 상승 시간 기준 (rise time criteria)에 맞는 300개의 연속적인 mEPSC가 각 세포에서 분석되었다. AMPAR 매개 EPSC 진폭(amplitude)은 -70mV에서 전류의 정점에서 측정되었다(도 14).

- [101] mEPSCs의 누적 확률 커브(cumulative probability curves)는 Clampfit 9.0 소프트웨어 및 Prism 4.0(GraphPad, San Diego, CA)으로 계산되었다. 도 14에 개시한 바와 같이, 본 실시예 5에서의 Aβ군은 정상군(Vehicle)에 비해 frequency(Hz)가 현저하게 감소하였으며, 감소된 frequency(Hz)가 5AA1의 처리에 의해 증진된 효과가 통계적으로 유의하게 나타났다. 본 발명자는 두 그룹의 비교를 위해 Student's *t*-검정을 사용하였다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[102]

- [103] 실시예 6. *In vivo* 전기생리학 및 LTP(Long Term Potentiation) 분석

- [104] 해마 절편(400μM 두께)에서 횡단 새퍼 겐가지(schaffer collateral, SC)

입력(input)으로부터 CA1 회로를 조사하기 위해, 해마 절편을 성체 마우스로부터 준비하였다. 간단하게는, 마우스를 아이소플루레인(isoflurane)으로 마취한 후, 뇌를 빙냉 수크로스-인공 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)을 이용한 경심관류(transcardiac perfusion)로 신속하게 냉각시켰다. 상기 뇌를 제거한 후, 빙냉 수크로스-인공 CSF에 보관하였다. 관상(coronal) 절편을 35°C의 인공 CSF에서 30분 동안 배양하고, 기록 챔버로 옮겨지기 전에 1~4시간 동안 상온(23~25°C)의 인공 CSF에서 배양하였다. 상기 표준 인공 CSF는 95% O₂ 및 5% CO₂로 포화된 119mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.3mM MgSO₄, 1.0mM NaH₂

PO₄, 26.2mM NaH₂CO₃, 11mM 글루코오스, 1mM Na 피루빈산, 0.4mM Na 아스코르브산을 포함하는 것이고, 수크로스-인공 CSF는 95% O₂ 및 5% CO₂로 포화된 198mM 수크로스, 2.5mM KCl, 1mM NaH₂PO₄, 26.2mM NaHCO₃, 11mM 글루코오스, 1mM Na 피루빈산, 0.4mM Na 아스코르브산을 포함하는 것이다.

- [105] LTP 실험은 27~29°C에서 수행되었다. 전기생리학적 실험을 위해, 3~6MΩ 피펫 저항성을 갖는 전극이 사용되었고, 전세포 기록(whole-cell recordings)은 적외선 (IR)-차등 간섭 대비(differential interference contrast, DIC) 광학 지침을 이용하여 시각적 지도 하에서 뉴런으로부터 획득되었다. CA3 및 DG 영역은 CA1 병변을 분리하기 위하여 LTP(장기 강화현상, long-term potentiation) 실험을 시작하기 직전에 절단되었다. 자극은 기록된 세포의 소마(soma)로부터 100~200mM에 위치한 집중 양극성 전극(concentric bipolar electrode)을 사용한 새퍼-결가지(SC) 경로에 적용되었다. 전세포 기록 용액은 하기와 같다: 135mM Cs 메탄술포네이트, 8mM NaCl, 10mM HEPES, 0.5mM EGTA, 4mM Mg-ATP, 0.3mM Na-GTP 및 5mM QX-315 Cl(pH 7.25, CsOH로 조정, 285 mOsm). 달리 표시되지 않는 한 세포는 기록하는 동안 -70 mV에서 유지되었다. 기록은 10kHz에서 디지털화되고, 2kHz에서 필터링되는 multiclamp 700B(Molecular devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 만들어졌다. 입력 저항 및 직렬 저항(series resistance)은 기록하는 동안 계속 관찰되었다. 모든 EPSC 실험의 시험 자극은 0.1Hz로 설정되었고, 0.2ms의 지속시간 및 이의 강도 (100~900μA)는 -70mV의 유지 전위로 50~100pA까지 EPSC(excitatory postsynaptic current) 진폭을 유도하기 위해 조정되었다. LTP 실험에서는 접합 자극(pairing stimuli, 2Hz, 2분 자극 및 0mV까지 시냅스 후 탈분극)을 적용하기 전 기준선(baseline) EPSCs가 3분 동안 측정되었다. 접합 자극(2Hz, 2분 자극 및 0mV까지 시냅스 후 탈분극) 후, EPSCs는 30분 동안 매 10분마다 수집되었다.
- [106] 결과는, 도 15에 개시한 바와 같이 정상(Normal) 군에서는 접합 자극의 입력에 의해 시냅스 전달이 장기적으로 증강되지만, APP/PS1 모델군에서는 EPSC 증강이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 이에 대비하여 APP/PS1 모델군에 아디포넥틴 수용체 활성화 신규 펩티드(5AA1)를 처리한 실험군에서는 정상군과 비교하여 거의 동일한 수준으로 EPSC 증강을 확인하였다.

[107]

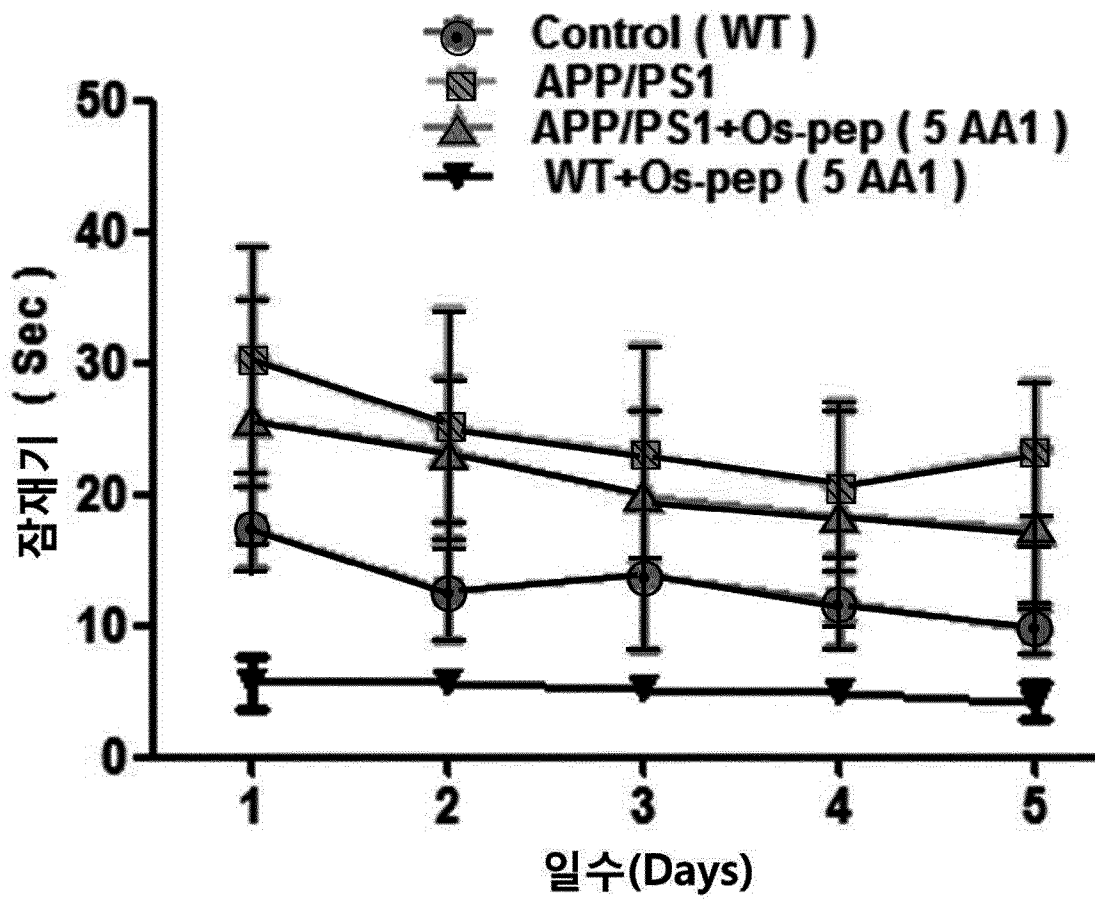
[108]

청구범위

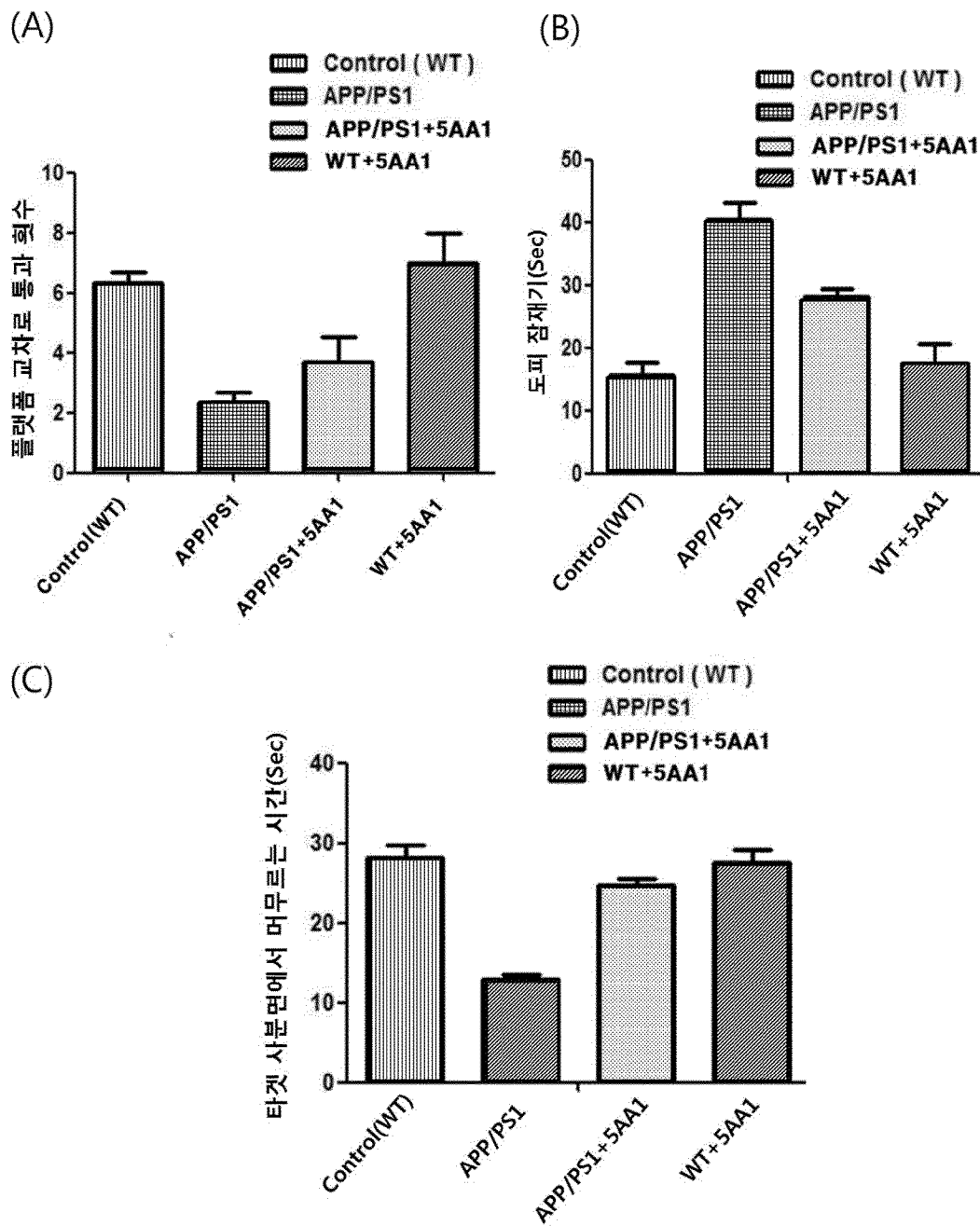
- [청구항 1] 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증 중에서 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 건강기능 식품 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여, 0.1 내지 100 중량%로 함유하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 펩티드는 뇌의 해마와 대뇌피질에서의 아밀로이드 β (A β) 올리고머 또는 APP(β -amyloid precursor protein) 단백질의 발현량을 감소시키고, 아디포넥틴 수용체 1(AdipoR1) 또는 p-AMPK 단백질의 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 6] 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된 하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 펩티드는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 100 중량% 함유되는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한
항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제,
감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의
보조제를 더 함유하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용
약학 조성물.
- [청구항 11] 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드 중에서 선택된
하나 이상의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에게
투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는
치료방법.

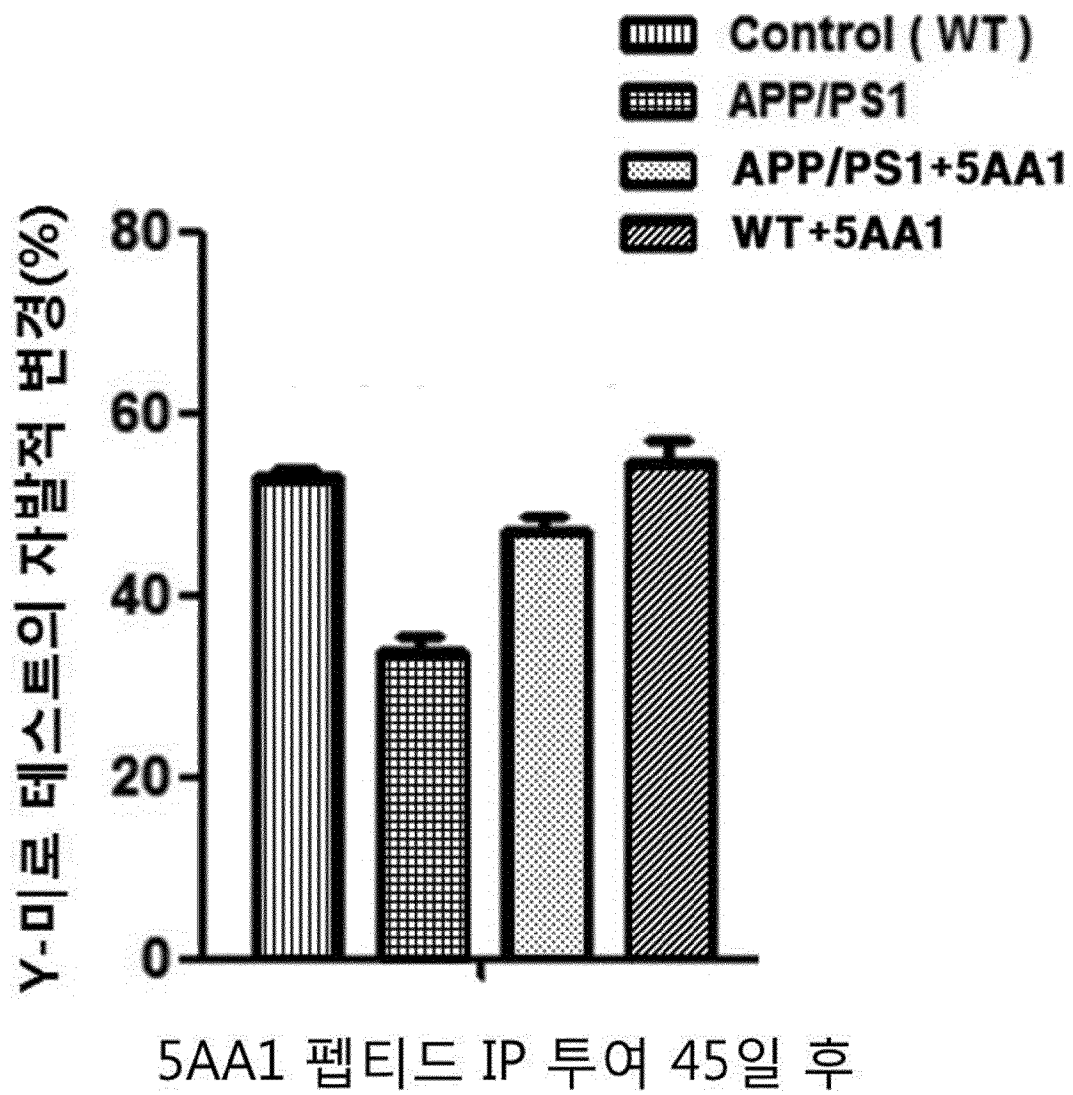
[도1]



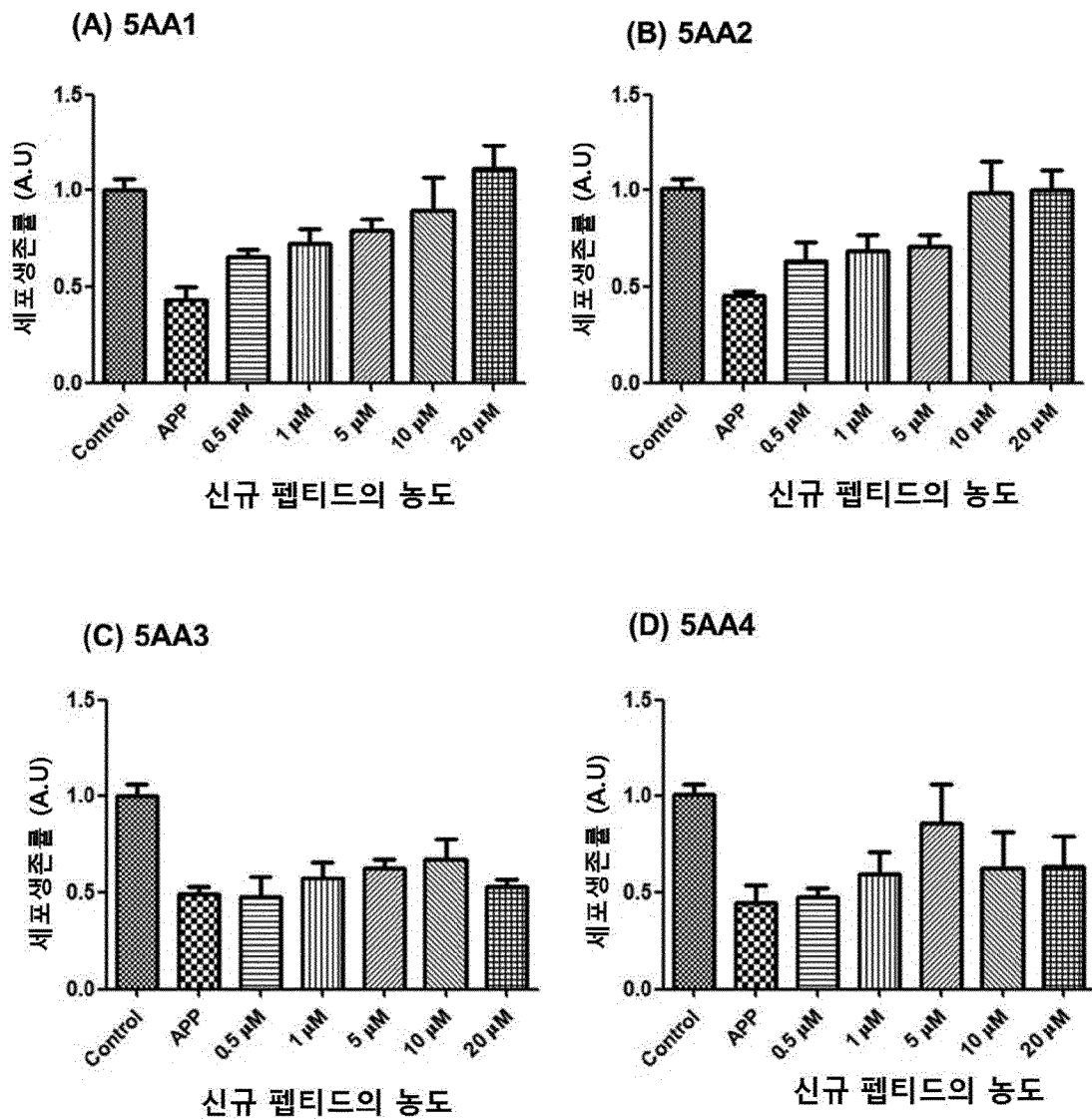
[도2]



[도3]

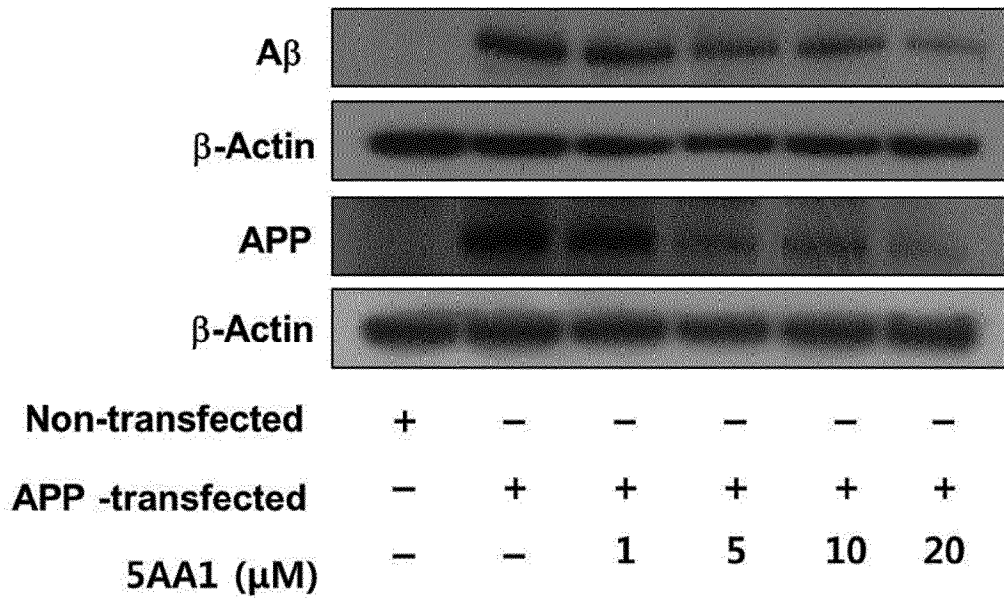


[도4]

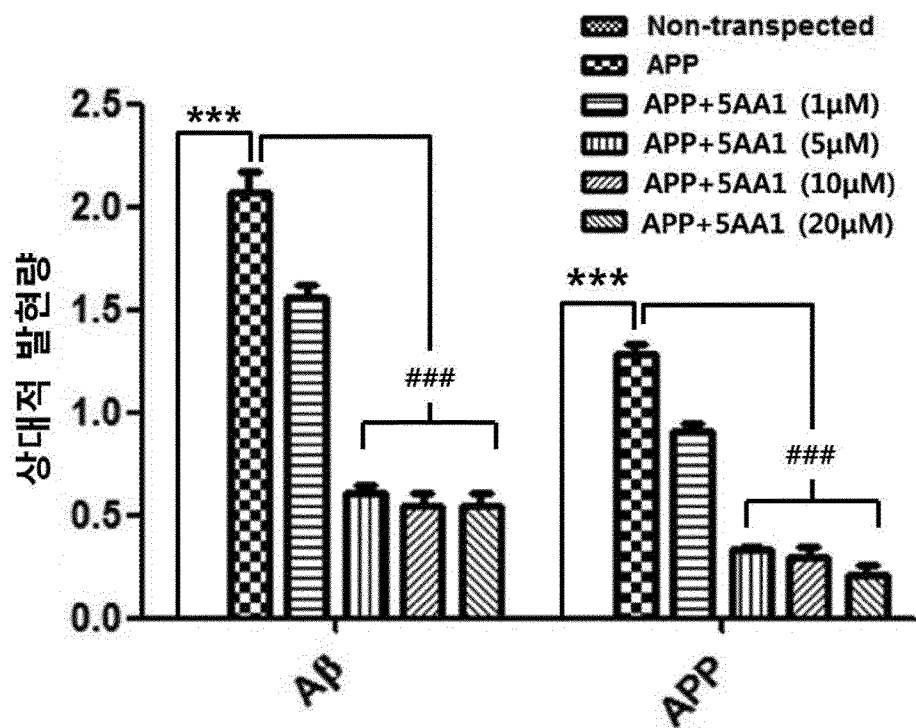


[도5]

(A)

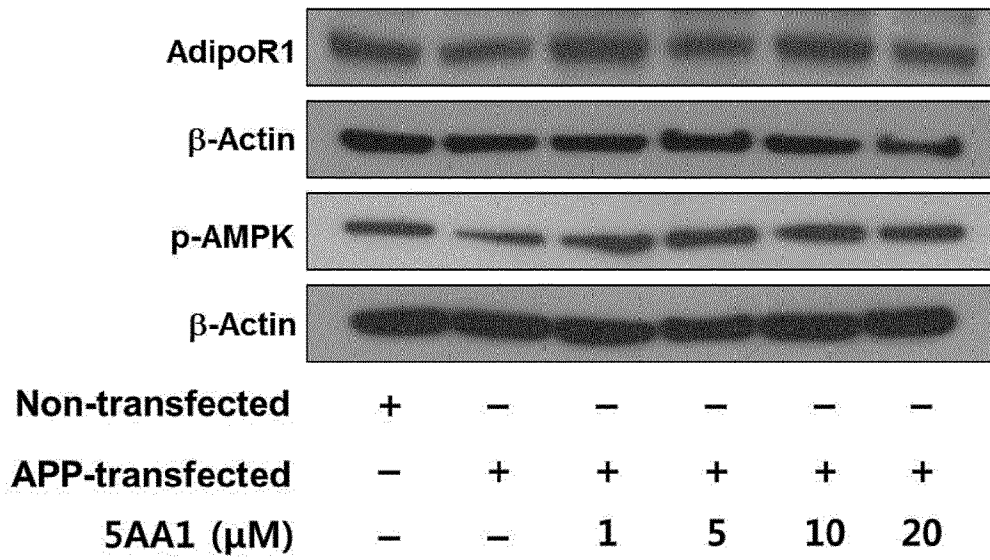


(B)

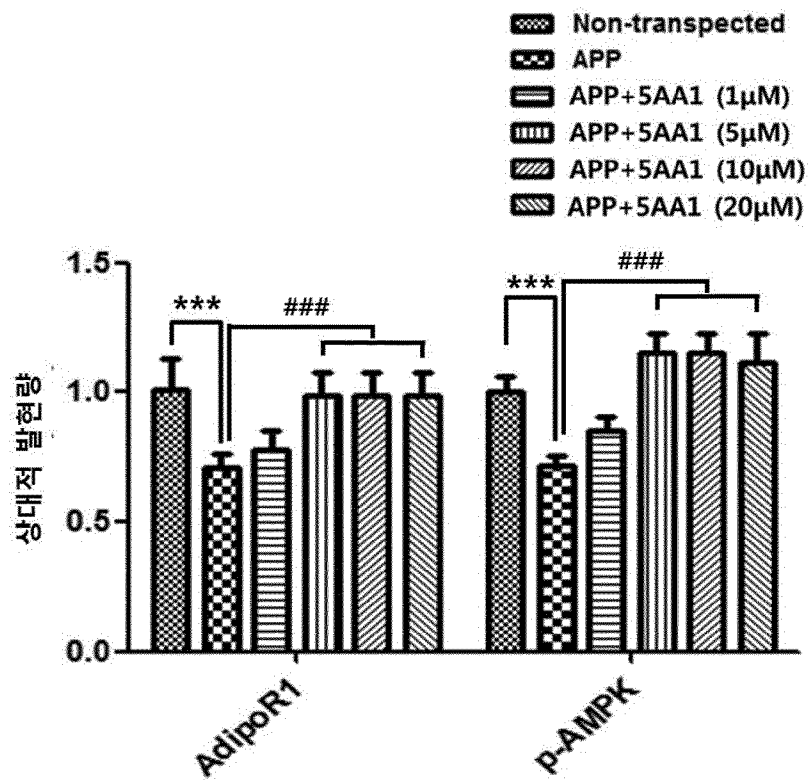


[도6]

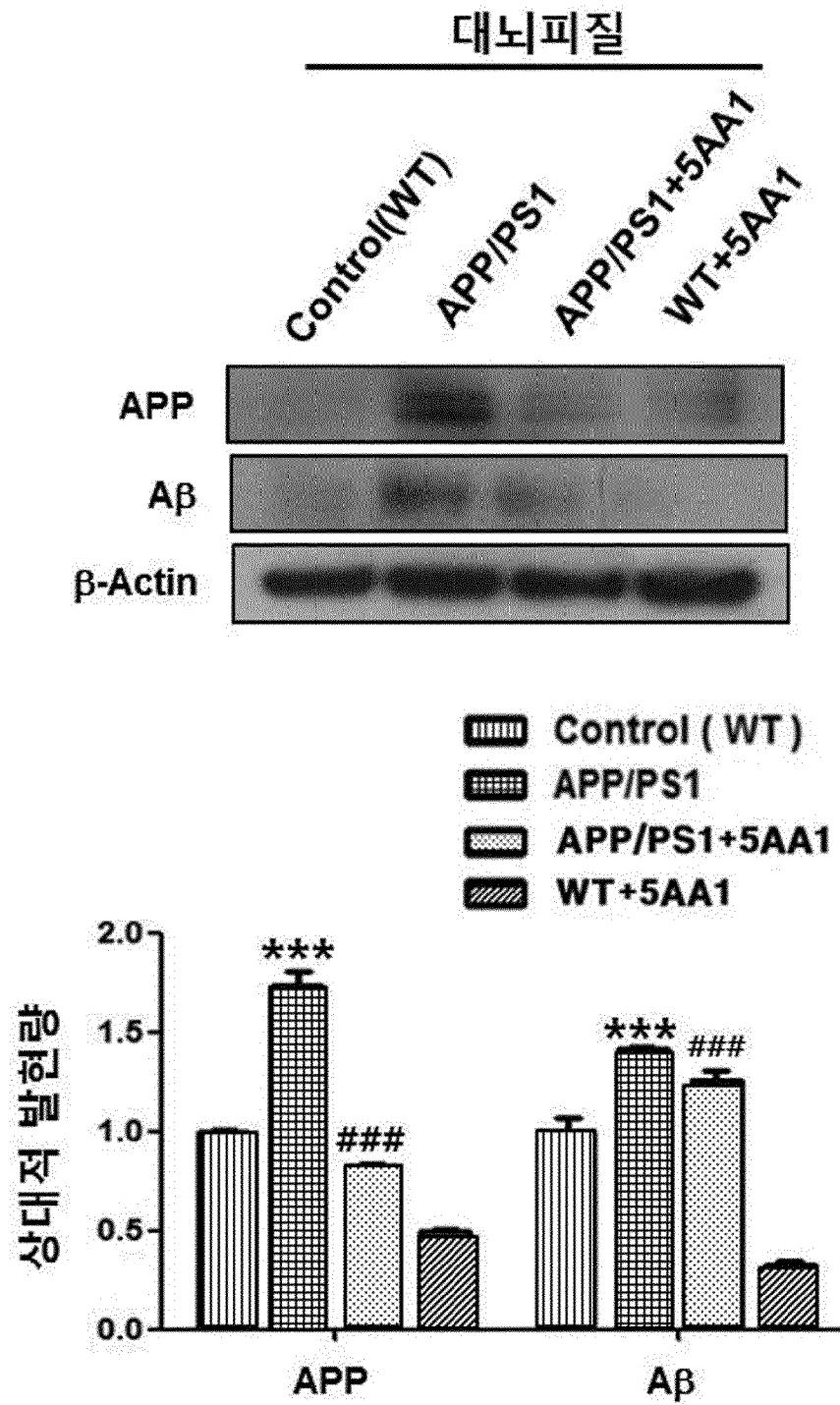
(A)



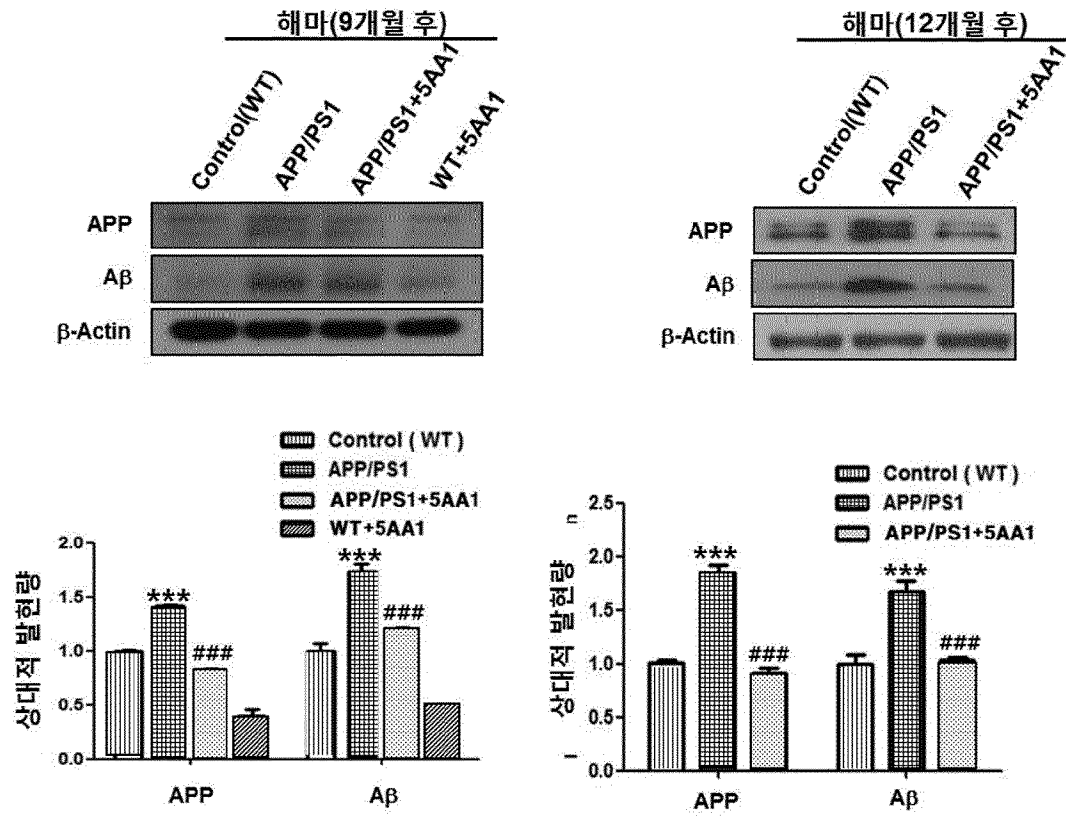
(B)



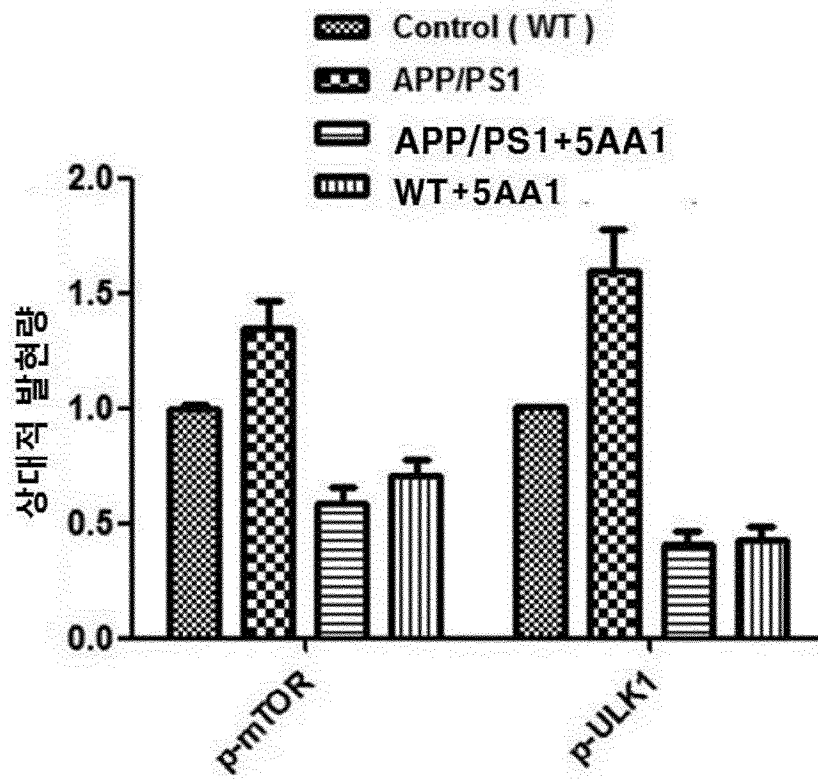
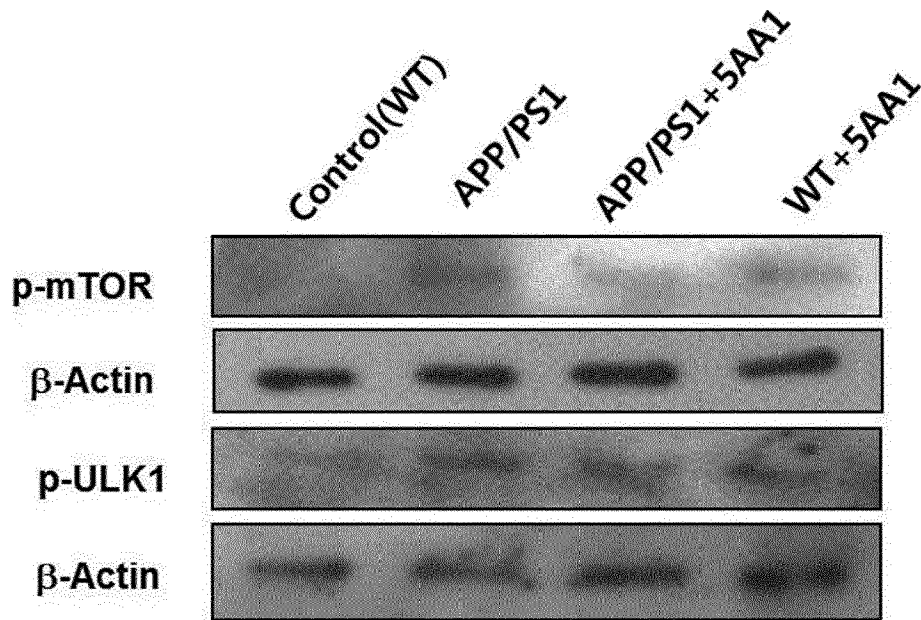
[도7]



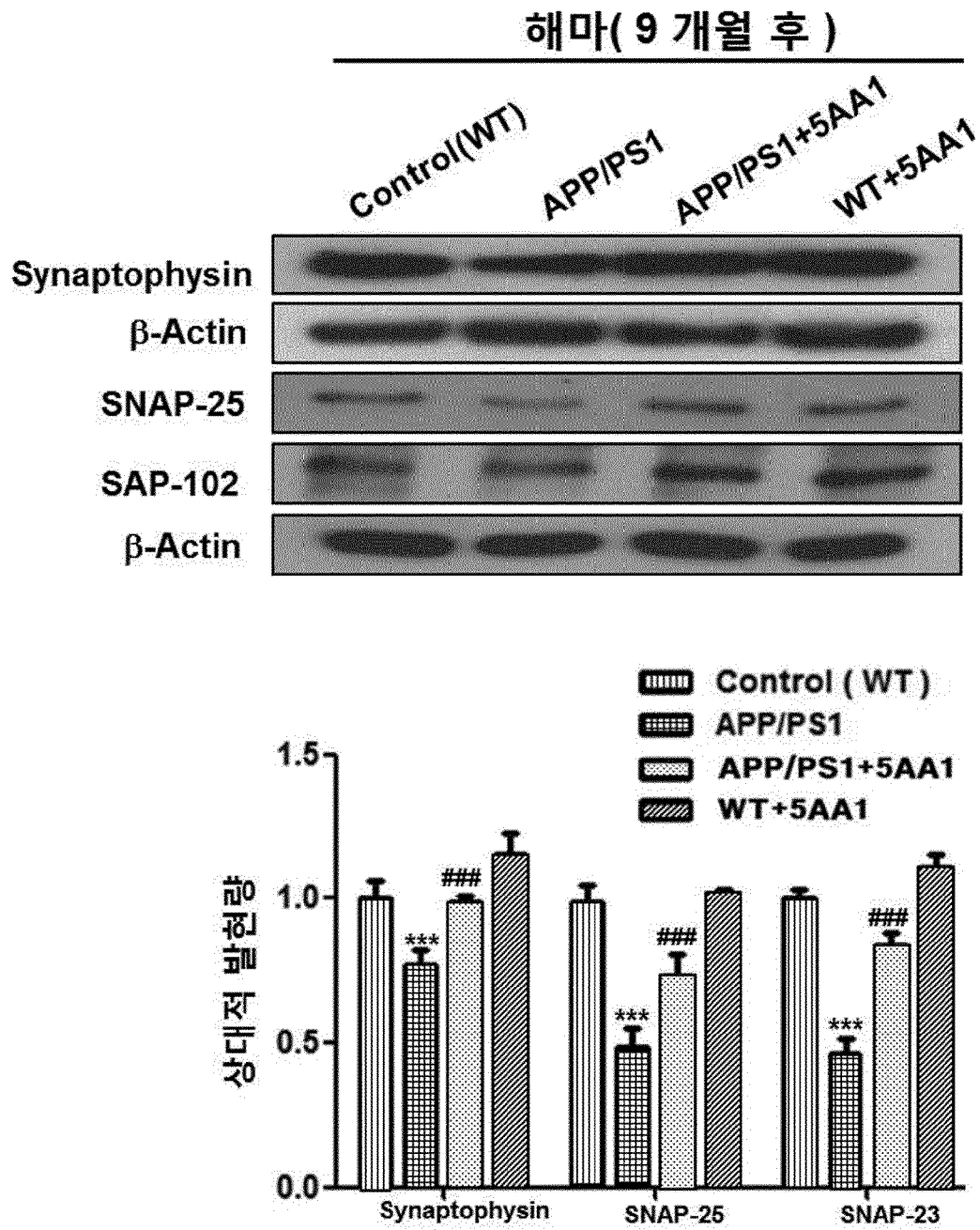
[도8]



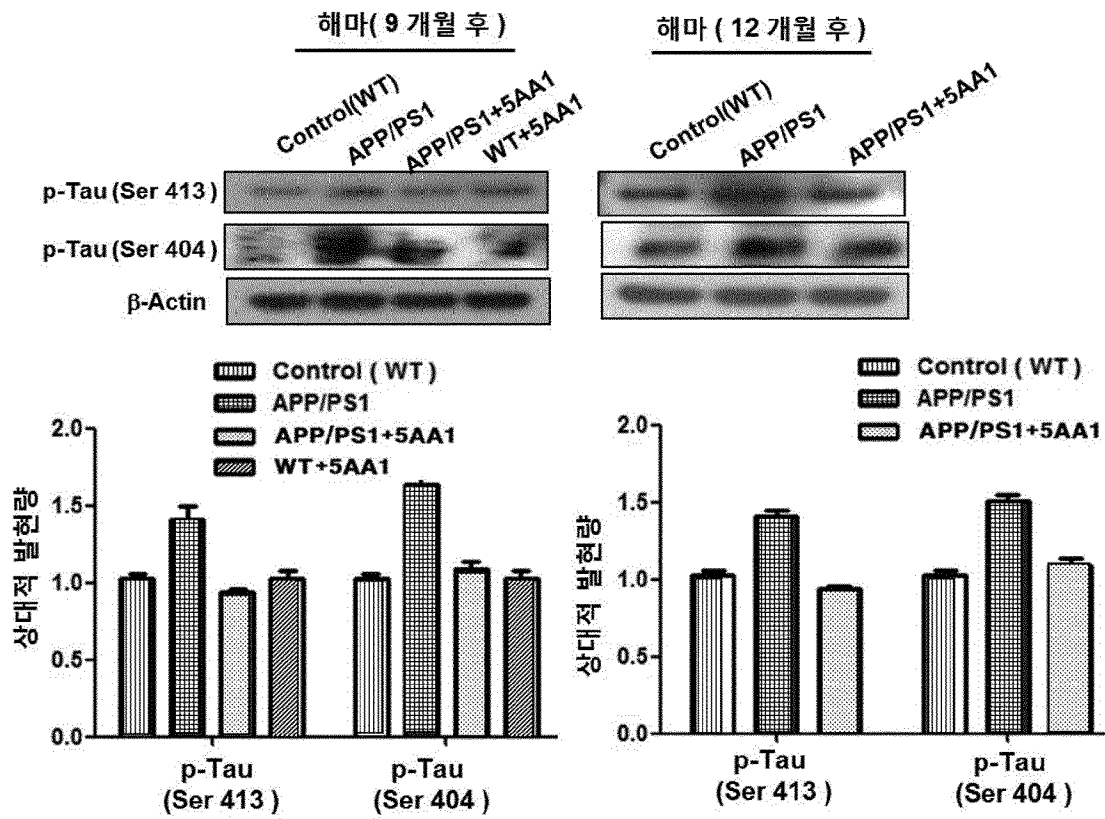
[도9]



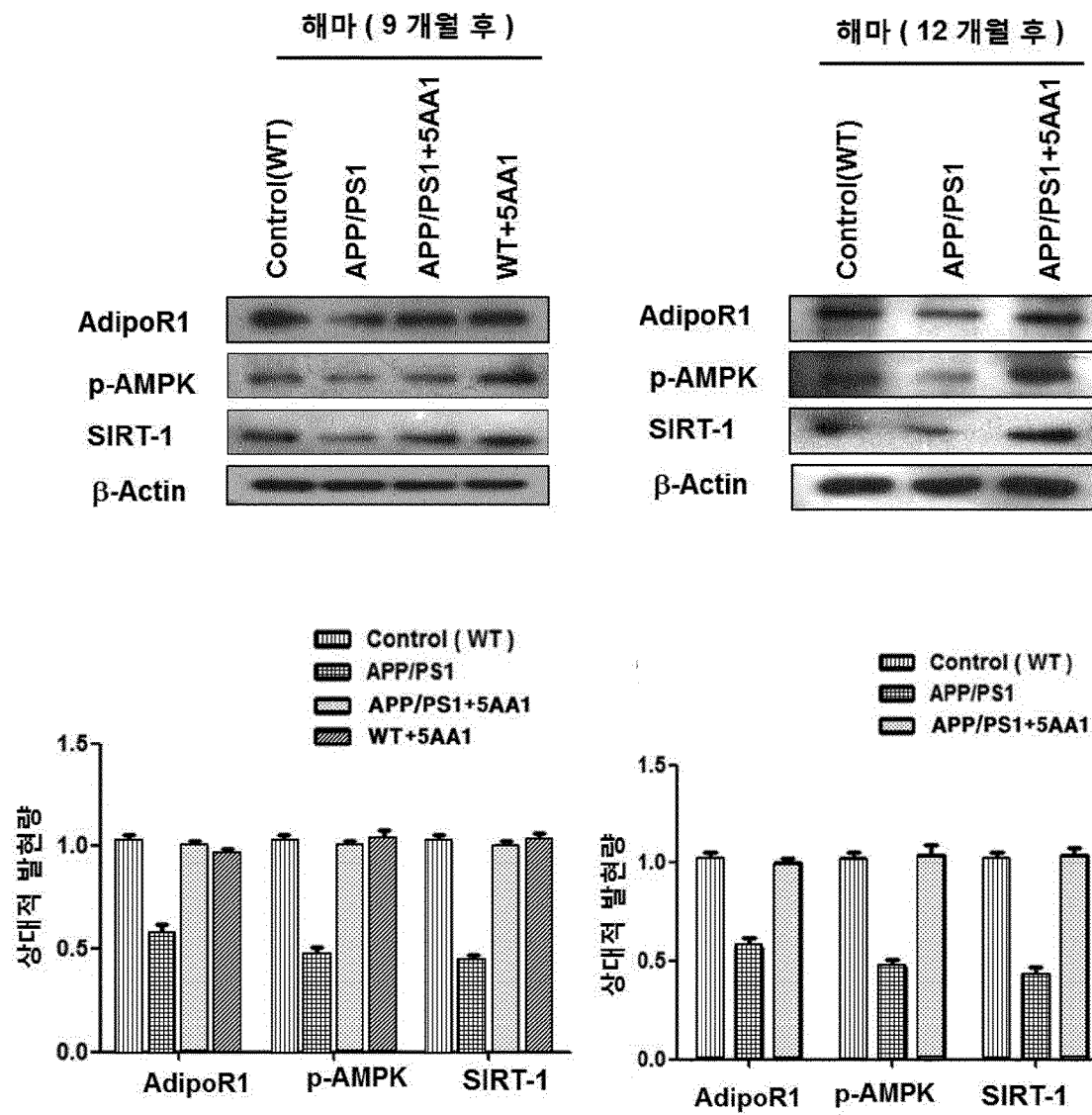
[도10]



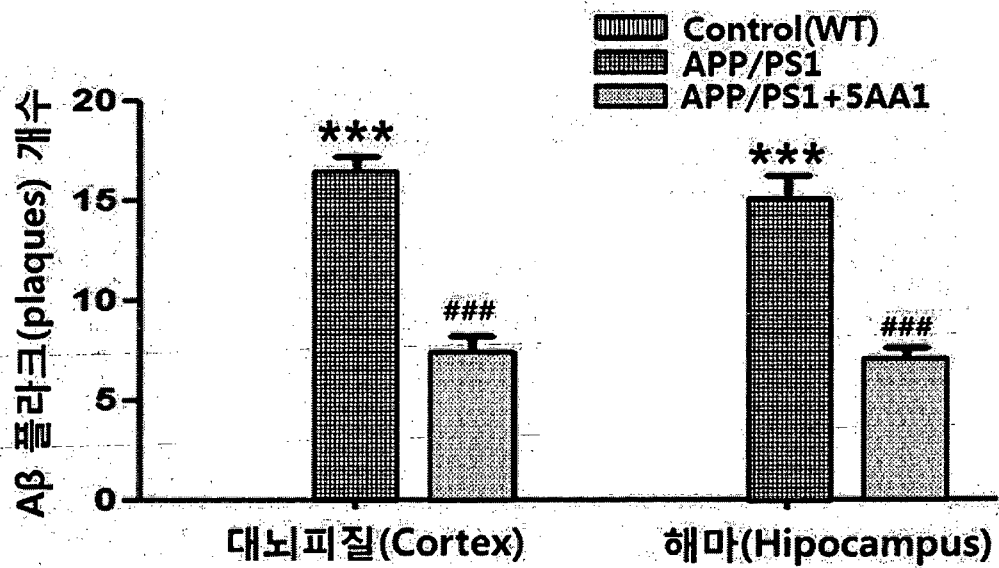
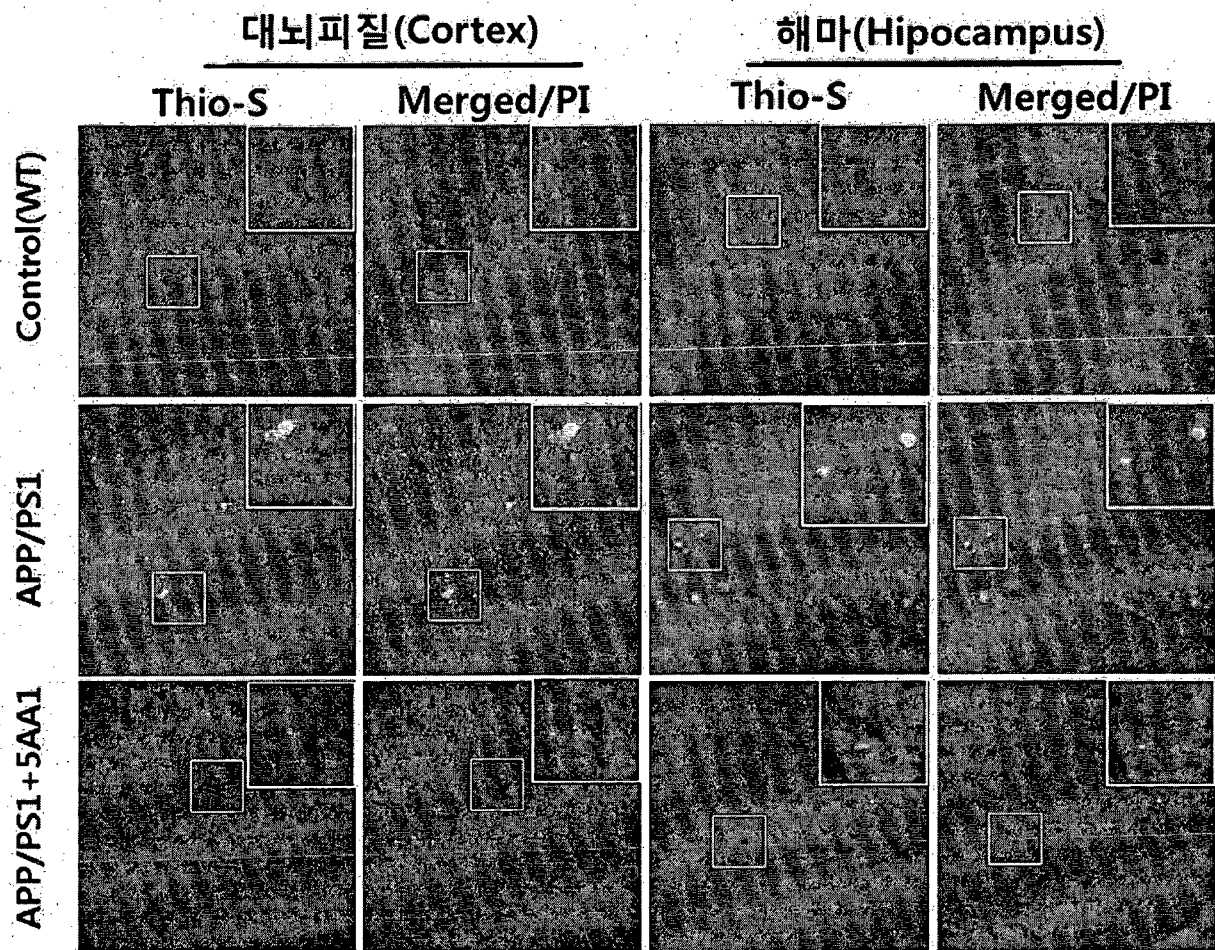
[도11]



[도12]

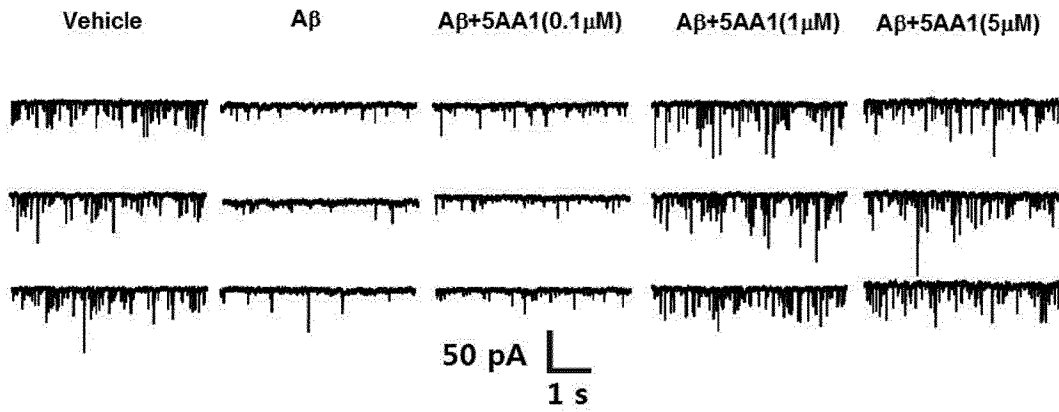


[도 13]

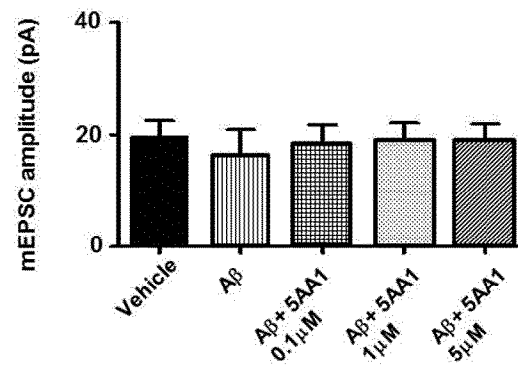


[도14]

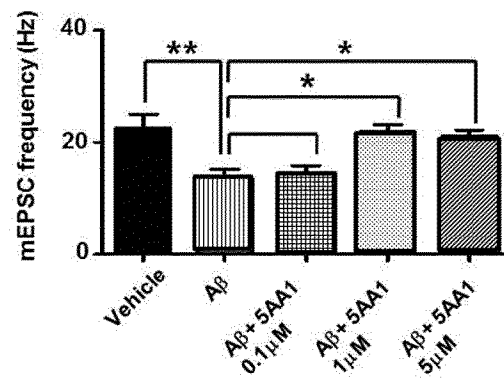
(A)



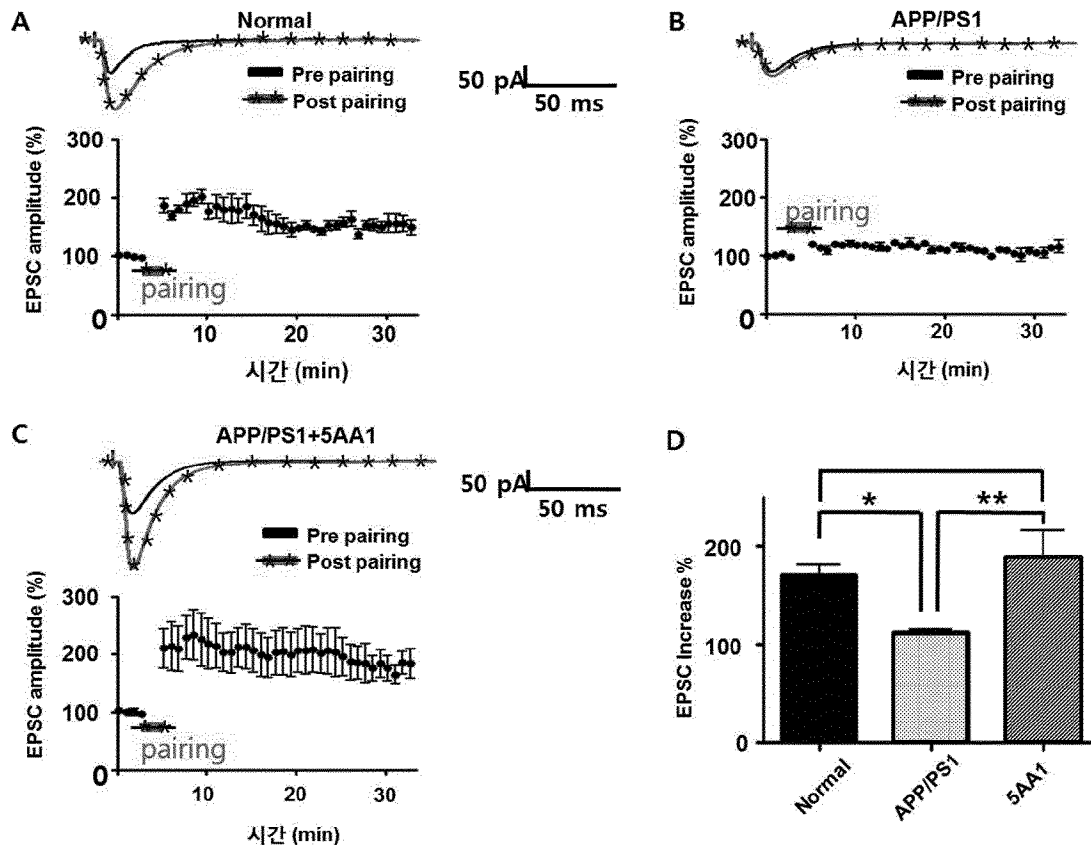
(B)



(C)



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000957**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/08(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)

A23L 33/18; C07K 14/47; A23L 1/00; A61K 38/46; A23L 1/305; C12N 15/113; A61K 31/7088; A61K 48/00; A61P 25/28; A61K 38/17; A61K 38/08

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: Adiponectin, peptide, nervous disorder

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0042148 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 07 April 2014 See abstract.	1-10
A	KR 10-2012-0046767 A (OPKO CURNA, LLC.) 10 May 2012 See claim 1.	1-10
A	US 2004-0023854 A1 (COOPER, Garth J. S. et al.) 05 February 2004 See claim 281.	1-10
A	WO 2011-019815 A2 (CURNA, INC.) 17 February 2011 See claim 1.	1-10
A	LIN, Zhuofeng et al., "Fibroblast Ggrowth Factor 21 Prevents Atherosclerosis by Suppression of Hepatic Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 and Induction of Adiponectin in Mice", Circulation, [E-pub.] 20 March 2015, vol. 131, no. 21, pages 1861-1871 See abstract.	1-10
PX	WO 2016-140527 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 09 September 2016 See paragraph [26].	1-10



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

26 APRIL 2017 (26.04.2017)

Date of mailing of the international search report

27 APRIL 2017 (27.04.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000957

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.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body by a drug, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

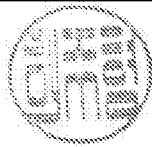
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000957

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0042148 A	07/04/2014	US 2014-0094414 A1	03/04/2014
KR 10-2012-0046767 A	10/05/2012	CA 2770104 A1	17/02/2011
		CN 102625841 A	01/08/2012
		CN 104313027 A	28/01/2015
		EP 2464731 A2	20/06/2012
		EP 2464731 A4	15/05/2013
		EP 2464731 B1	05/10/2016
		JP 2013-501524 A	17/01/2013
		US 2012-0129917 A1	24/05/2012
		US 2015-0225724 A1	13/08/2015
		US 2016-0168568 A1	16/06/2016
		US 9044493 B2	02/06/2015
		US 9290766 B2	22/03/2016
		WO 2011-019815 A2	17/02/2011
		WO 2011-019815 A3	06/10/2011
US 2004-0023854 A1	05/02/2004	AU 2003-285686 A1	14/07/2004
		AU 2009-217457 A1	15/10/2009
		CA 2473781 A1	31/07/2003
		CN 1886423 A	27/12/2006
		EP 1474445 A1	10/11/2004
		EP 1474445 A4	21/02/2007
		JP 2005-535561 A	24/11/2005
		NZ 534699 A	24/12/2008
		US 2010-0016216 A1	21/01/2010
		US 7365170 B2	29/04/2008
		US 8044182 B2	25/10/2011
		WO 03-062275 A1	31/07/2003
		WO 2004-056861 A2	08/07/2004
		WO 2004-056861 A3	30/09/2004
WO 2011-019815 A2	17/02/2011	CA 2770104 A1	17/02/2011
		CN 102625841 A	01/08/2012
		CN 104313027 A	28/01/2015
		EP 2464731 A2	20/06/2012
		EP 2464731 A4	15/05/2013
		EP 2464731 B1	05/10/2016
		JP 2013-501524 A	17/01/2013
		KR 10-2012-0046767 A	10/05/2012
		US 2012-0129917 A1	24/05/2012
		US 2015-0225724 A1	13/08/2015
		US 2016-0168568 A1	16/06/2016
		US 9044493 B2	02/06/2015
		US 9290766 B2	22/03/2016
		WO 2011-019815 A3	06/10/2011
WO 2016-140527 A1	09/09/2016	KR 10-2016-0108191 A	19/09/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A23L 33/18(2016.01)i, A61K 38/08(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A23L 33/18; C07K 14/47; A23L 1/00; A61K 38/46; A23L 1/305; C12N 15/113; A61K 31/7088; A61K 48/00; A61P 25/28; A61K 38/17; A61K 38/08 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: 아디포넥틴 수용체, 펩티드, 신경질환																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2014-0042148 A (부경대학교 산학협력단) 2014.04.07 요약 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0046767 A (오피케이오 큐알엔에이, 엘엘씨) 2012.05.10 청구항 1 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004-0023854 A1 (COOPER, GARTH J.S. 등) 2004.02.05 청구항 281 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011-019815 A2 (CURNA, INC.) 2011.02.17 청구항 1 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LIN, ZHUOFENG 등, 'Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice', Circulation, [E-pub] 2015.03.20, 131권, 21호, 페이지 1861-1871 초록 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2016-140527 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 2016.09.09 단락 26 참조.</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2014-0042148 A (부경대학교 산학협력단) 2014.04.07 요약 참조.	1-10	A	KR 10-2012-0046767 A (오피케이오 큐알엔에이, 엘엘씨) 2012.05.10 청구항 1 참조.	1-10	A	US 2004-0023854 A1 (COOPER, GARTH J.S. 등) 2004.02.05 청구항 281 참조.	1-10	A	WO 2011-019815 A2 (CURNA, INC.) 2011.02.17 청구항 1 참조.	1-10	A	LIN, ZHUOFENG 등, 'Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice', Circulation, [E-pub] 2015.03.20, 131권, 21호, 페이지 1861-1871 초록 참조.	1-10	PX	WO 2016-140527 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 2016.09.09 단락 26 참조.	1-10
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
A	KR 10-2014-0042148 A (부경대학교 산학협력단) 2014.04.07 요약 참조.	1-10																					
A	KR 10-2012-0046767 A (오피케이오 큐알엔에이, 엘엘씨) 2012.05.10 청구항 1 참조.	1-10																					
A	US 2004-0023854 A1 (COOPER, GARTH J.S. 등) 2004.02.05 청구항 281 참조.	1-10																					
A	WO 2011-019815 A2 (CURNA, INC.) 2011.02.17 청구항 1 참조.	1-10																					
A	LIN, ZHUOFENG 등, 'Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice', Circulation, [E-pub] 2015.03.20, 131권, 21호, 페이지 1861-1871 초록 참조.	1-10																					
PX	WO 2016-140527 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 2016.09.09 단락 26 참조.	1-10																					
☐ 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 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2017년 04월 26일 (26.04.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 04월 27일 (27.04.2017)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																					

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

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

1. ☒ 청구항: 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11은 약물에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0042148 A	2014/04/07	US 2014-0094414 A1	2014/04/03
KR 10-2012-0046767 A	2012/05/10	CA 2770104 A1	2011/02/17
		CN 102625841 A	2012/08/01
		CN 104313027 A	2015/01/28
		EP 2464731 A2	2012/06/20
		EP 2464731 A4	2013/05/15
		EP 2464731 B1	2016/10/05
		JP 2013-501524 A	2013/01/17
		US 2012-0129917 A1	2012/05/24
		US 2015-0225724 A1	2015/08/13
		US 2016-0168568 A1	2016/06/16
		US 9044493 B2	2015/06/02
		US 9290766 B2	2016/03/22
		WO 2011-019815 A2	2011/02/17
		WO 2011-019815 A3	2011/10/06
US 2004-0023854 A1	2004/02/05	AU 2003-285686 A1	2004/07/14
		AU 2009-217457 A1	2009/10/15
		CA 2473781 A1	2003/07/31
		CN 1886423 A	2006/12/27
		EP 1474445 A1	2004/11/10
		EP 1474445 A4	2007/02/21
		JP 2005-535561 A	2005/11/24
		NZ 534699 A	2008/12/24
		US 2010-0016216 A1	2010/01/21
		US 7365170 B2	2008/04/29
		US 8044182 B2	2011/10/25
		WO 03-062275 A1	2003/07/31
		WO 2004-056861 A2	2004/07/08
		WO 2004-056861 A3	2004/09/30
WO 2011-019815 A2	2011/02/17	CA 2770104 A1	2011/02/17
		CN 102625841 A	2012/08/01
		CN 104313027 A	2015/01/28
		EP 2464731 A2	2012/06/20
		EP 2464731 A4	2013/05/15
		EP 2464731 B1	2016/10/05
		JP 2013-501524 A	2013/01/17
		KR 10-2012-0046767 A	2012/05/10
		US 2012-0129917 A1	2012/05/24
		US 2015-0225724 A1	2015/08/13
		US 2016-0168568 A1	2016/06/16
		US 9044493 B2	2015/06/02
		US 9290766 B2	2016/03/22
		WO 2011-019815 A3	2011/10/06
WO 2016-140527 A1	2016/09/09	KR 10-2016-0108191 A	2016/09/19