

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 2월 19일 (19.02.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/023054 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/13 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005531
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 23일 (23.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0096951 2013년 8월 14일 (14.08.2013) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR). 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김규원 (KIM, Kyu-Won); 138-891 서울시 송파구 잠실로 62, 343-202 (잠실동, 트리지움), Seoul (KR). 리호양 (LE, Hoang); 151-015 서울시 관악구 관악로 1, 서울대학교 기숙사 900 동 609A, Seoul (KR). 안범주 (AHN, Bum Ju); 151-050 서울시 관악구 행운 4길 12-4

(부천동), Seoul (KR). 오구택 (OH, Goo Taeg); 137-907 서울시 서초구 잠원로 136, 344 동 406 호 (잠원동, 신반포아파트), Seoul (KR). 전세진 (JEON, Sejin); 152-894 서울시 구로구 구로로 경인로 20 나길 30, 826 호 (오류동), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW FIRM); 135-851 서울시 강남구 역삼로 601 (대치동, 보성빌딩 5층), Seoul (KR).

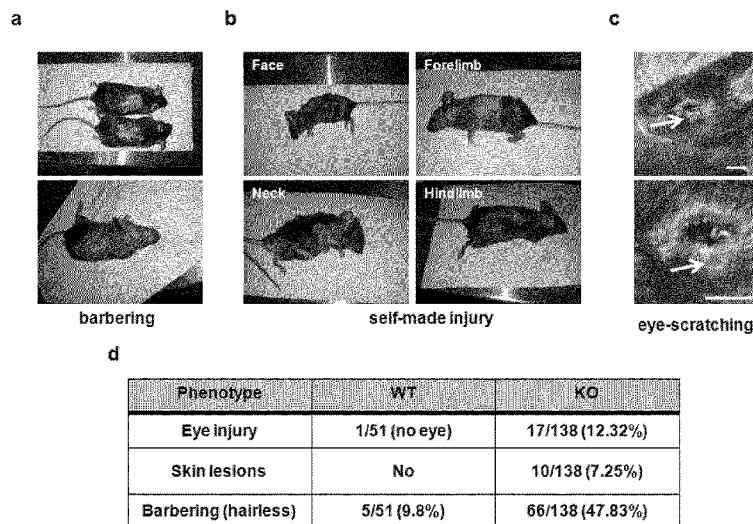
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ANIMAL MODEL WITH OBSESSIVE COMPULSIVE DISORDER USING NINJURIN 1 DEFICIENCY

(54) 발명의 명칭: Ninjurin1 결핍을 이용한 강박증 동물모델



(57) Abstract: The present invention relates to an animal model with obsessive compulsive disorder, manufactured by deficiency of Ninjurin 1, and a method for searching candidate drugs for preventing or treating obsessive compulsive disorder using the same. According to the present invention, a Ninjurin 1 KO mouse can be provided as a new model for researching obsessive compulsive disorder, and memantine or a salt thereof, which is an NMDA receptor antagonist, can be provided as a new use for treating obsessive compulsive disorder

(57) 요약서: 본 발명은 닌주린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델, 및 이를 이용하여 강박증을 예방 또는 치료하기 위한 후보약물을 탐색하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 강박증 연구를 위한 새로운 모델로서의 Ninjurin 1 KO 마우스를 제공할 수 있으며, NMDA 수용체 길항제인 메만틴 또는 이의 염을 강박증 치료라는 신규용도로 제공할 수 있다.



WO 2015/023054 A1



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, **공개:**

TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: N i n j u r i n 1 결핍을 이용한 강박증 동물모델

기술분야

- [1] 본 발명은 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델, 및 이를 이용하여 강박증을 예방 또는 치료하기 위한 후보약물을 탐색하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] Ninjurin은 1996년 Toshiyuki Araki 등에 의해 처음으로 보고된 것으로, 좌골 신경(sciatic nerve)의 원위부를 절단(transection)하거나 압착(crush)하여 손상을 일으킨 후 신경 섬유초 세포(Schwann cell)에서 발현이 증가하는 유전자(gene)를 찾는 과정에서 발견되었다.
- [3] GenBank에 알려져 있는 단백질 정보를 이용하여 Ninjurin과 상동성(homology)을 가지는 단백질을 찾아 계통수(phylogenetic tree)가 보고되었다. 척추동물에서는 Ninjurin 1과 Ninjurin 2라는 두 가지의 단백질이 알려져 있다. 상기 Ninjurin 1과 Ninjurin 2는 인간, 마우스 및 랫트 등의 척추 동물에서 발견된 바 있다.
- [4] 인간 Ninjurin 1은 염색체 9q22에 위치하고 있으며 152개의 아미노산으로 구성되어 있다. 마우스 Ninjurin 1의 경우는 염색체 13에 위치하고 있으며 152개의 아미노산으로 구성되어 있다. Ninjurin 1의 아미노산 서열에서 2곳의 막 통과 영역(transmembrane domain)을 예측할 수 있으며, 실험을 통하여 Ninjurin 1이 세포막에 위치한 단백질임이 알려져 있다.
- [5] Ninjurin 1은 다양한 조직에서 발현되고 있다. 예를 들어, RNA 단계에서는 심장(heart), 뇌(brain), 태반(placenta), 폐(lung), 간(liver), 골격근(sk.Muscle), 콩팥(kidney), 이자(pancreas), 비장(spleen), 흉선(thymus), 전립선(prostate), 고환(testis), 난소(ovary), 소장(sm.int.), 대장(colon), 혈액(blood), 부신(adrenal gland) 및 후근절(Dorsal Root Ganglia, DRG)에서 발현되고, 단백질 단계에서는 간, 콩팥, 흉선, 자궁(uterus), 부신, 망막(retina) 및 후근절에서 발현되는 것이 보고된 바 있다.
- [6] 또한, 지금까지 알려진 Ninjurin 1의 기능으로는 세포 결합(cell adhesion), 신경 증식(neurite outgrowth), 세포 노화(cellular senescence) 및 암과 관련성이 있다.
- [7] 한편, 강박증(Obsessive-Compulsive Spectrum Disorder; OCD)은 비자발적이고 지속적으로 불안감(anxiety)을 느끼는 질병으로, 이를 해소하기 위해 충동적이고 반복적인 행동이 그 주요 현상으로 나타나게 된다. 강박증은 환자가 병적인 것으로 인식하거나 내면에서 강하게 저항하고 있는 반복적인 생각, 환상(강박) 및 반복적인 충동 또는 행동(강제)의 존재를 특징으로 하는 신경증이다.

- [8] 과거 강박장애의 원인은 심리학적 요인에 근거하여 설명하려는 노력이 많았으나 최근의 약물 연구 및 뇌 영상 연구의 결과들은 생물학적 요인이 강박장애 발생과 연관성이 깊음을 보여주고 있다. 대표적인 예를 들면, 뇌의 대표적인 신경 전달물질인 세로토닌 시스템과의 연관성이다. 임상 약물 실험 상 세로토닌 시스템에 작용하는 약물들이 강박장애 치료에 뚜렷한 효과가 있고, 다른 임상 연구 결과도 세로토닌 및 세로토닌 연관 물질과 강박장애 간의 연관성이 있음을 보여주고 있다. 또한 많은 뇌 영상 연구가 강박장애에서 특정 신경회로 영역에 문제가 있음을 보여주고 있고, 약물치료 내지는 행동요법치료 후 이러한 영역의 문제가 정상화 됨을 보여주는 연구 결과도 있다.
- [9] 최근들어 강박증, 우울증, 자폐증 등의 각종 정신질환들에 대한 연구와 치료제 개발 요구가 증가하고 있지만, 아직까지 구체적인 연구모델과 방법이 정립되어 있지 않을 뿐 아니라 이들 정신질환을 일으키는 분자적 기전도 잘 알려져 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에, 본 발명자는 강박증과 Ninjurin 1과의 관련성을 최초로 밝혀, 강박증 연구를 위한 새로운 모델로서의 Ninjurin 1 KO 마우스의 이용 가능성과, 강박증 치료를 위한 타겟 단백질을 제시하고자 한다.
- [11] 구체적으로, 본 발명은 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명은 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델을 이용하여 강박증을 예방 또는 치료하기 위한 후보약물을 탐색하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [13] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은, 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일 구현예로, 상기 동물은 인간을 제외한 것임을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 닌쥬린 1 결핍은 닌쥬린 1 유전자의 녹아웃(Knock-out)에 의한 것임을 특징으로 한다.
- [17] 또한, 본 발명은, 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델을 이용하여 강박증을 예방 또는 치료하기 위한 후보약물을 탐색하는 방법을 제공한다.
- [18] 본 발명의 일 구현예로, 상기 탐색방법은 동물모델에 후보약물을 투여한 후 NMDA 수용체(N-Methyl-D-aspartate receptor)가 저해되는지를 측정하는 단계를

포함하는 것을 특징으로 한다.

[19] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 후보약물은 NMDA 수용체 길항제인 것을 특징으로 한다.

[20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 NMDA 수용체 길항제는 메만틴(Memantine)인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[21] 본 발명에 의하면, 강박증 연구를 위한 새로운 모델로서의 Ninjurin 1 KO 마우스를 제공할 수 있다.

[22] 또한, 본 발명에 의하면 강박증 치료를 위한 신규 타겟 단백질을 제공할 수 있다.

[23] 또한, 본 발명에 의하면 강박증 치료제 후보약물을 탐색하는 방법을 제공할 수 있다.

[24] 또한, 본 발명에 의하면 강박증 치료제 후보약물을 제공할 수 있다.

[25] 또한, 본 발명에 의하면 NMDA 수용체 길항제의 신규용도로서 강박증 치료용도를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은, Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사행동인 자해(Self-made injury)를 관찰한 결과이다.

[27] 도 2는, Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사행동인 불안감(anxiety) 및 반복행동을 Marble-burying 테스트를 통해 확인한 결과이다.

[28] 도 3은, Ninjurin1 KO 마우스의 불안감(anxiety) 정도를 Elevated-plus-maze를 이용하여 확인한 결과이다.

[29] 도 4는, Ninjurin1 KO 마우스와 자폐증(autism)과의 연관성을 Three-chamber 테스트를 이용하여 확인한 결과이다.

[30] 도 5는, Ninjurin1 KO 마우스의 Cortical-striatum 회로 형성 장애를 골지 염색법을 이용하여 확인한 결과이다.

[31] 도 6은, 뇌 발생 과정 중 Ninjurin1의 발현 패턴 변화를 웨스턴블랏팅을 이용하여 확인한 결과이다.

[32] 도 7은, Puncta 구조의 시냅소솜(synaptosome)에서 Ninjurin1의 발현을 면역세포화학 분석법을 이용하여 확인한 결과이다.

[33] 도 8은, Pre-synapse와 post-synapse에서 Ninjurin1의 발현을 이중 면역염색법으로 확인한 결과이다.

[34] 도 9는, Ninjurin1 KO 마우스의 Neural 활동성 증가를 Fos B의 발현정도를 비교함으로써 확인한 결과이다.

[35] 도 10은, Ninjurin 1 KO 마우스에서 NMDAR의 발현과 Src의 발현 증가를 웨스턴블랏팅을 이용하여 확인한 결과이다.

[36] 도 11은, 메만틴의 Ninjurin1 KO 마우스 강박증 저해효과를 Marble-burying

테스트를 통해 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 본 발명자들은, 강박증과 Ninjurin 1이 서로 관련되어 있을 것으로 예상하고 연구를 진행한 결과, Ninjurin 1을 제거한 마우스(Ninjurin 1 KO 마우스)에서 self-made injury, 반복적인 행동, 불안감 증가와 같은 강박증 유사행동을 관찰하였으며, 해부학적 분석을 통해 cortical-striatal 회로의 형성에 이상이 있음을 확인하였다.
- [38] 나아가, Ninjurin 1 결핍 마우스에서 NMDA 수용체의 발현과 Src의 활성이 증가됨을 확인하고, 메만틴(Memantine)을 처리하여 NMDA 수용체의 활성을 저해하였을 때 Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사행동이 회복됨을 밝혔다. 즉, 강박증의 분자적 기전으로서, Ninjurin 1이 결핍되면 cortical-striatal 회로 형성에 이상이 생겨 NMDA 수용체 활성을 유도하고, 그 결과 강박증 유사행동이 일어남을 최초로 규명하였다.
- [39] 이와 동시에, 이러한 기작에 의해 유발되는 강박증을 치료할 수 있는 후보 약물을 탐색하는 방법과, 그 결과 얻어진 후보약물을 제시하고자 한다.
- [40] NMDA 수용체는, 세포의 사멸과 정상세포 간의 신호전달을 조절하는 것으로 알려진 신경수용체이다. 도파민 D1 수용체와 직접적인 상호작용을 하여 세포의 사멸을 조절하거나 정상적인 세포 간의 통신을 유도한다. NMDA 수용체가 D1 수용체와 상호작용할 때는 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 조절기능이 서로 다른 기작을 통해 독립적으로 진행된다. 종래, 뇌졸중, 골다공증, 간질, 치매 등 각종 질환을 치료하기 위한 일환으로 NMDA 수용체에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다.
- [41] NMDA 수용체 길항제는 NMDA 수용체의 기능을 저해하는 물질로서, (1) 글루탐산이나 NMDA 등의 촉진제와의 결합부위에 길항적으로 결합하는 것(예: D-2-아미노-5-포스포노길초산), (2) NMDA 수용체의 촉진제에 의한 활성화에 필수적인 글리신의 결합부위에 길항적으로 결합하는 것(예: 7-클로로퀴누렌산), (3) 활성화증강제인 폴리아민의 결합부위에 길항적으로 결합하는 것(예: 알카인), (4) 이온채널부위에 결합하여 이온의 흐름을 저지하는 것(예: MK-801, Mg²⁺) 등이 알려져 있다.
- [42] 이에, 본 발명은 NMDA 수용체 길항제로서 메만틴(Memantine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 강박증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [43] 메만틴(3,5-dimethyladamantan-1-amine)은 NMDA 수용체 길항제 중 하나로서, 뇌 속의 화학물질인 글루타민산염의 과잉분비를 억제한다. 글루타민산은 그 양이 정상일 때에는 기억이나 학습을 돕는 역할을 하지만, 만약 그 양이 과도할 경우에는 신경세포를 과자극하여 신경세포 파괴를 유도하기 때문에, 뇌졸중, 간질, 치매 등의 질환과의 관련성이 밝혀진 바 있다. 메만틴은 현재 가장 많이

사용되는 알츠하이머병(치매) 치료제 중 하나이나, 강박증 치료용도로 사용될 수 있음은 알려진 바 없다.

[44] 상기 본 발명의 조성물은 기존 치료 활성 성분, 기타 보조제, 약제학적으로 허용가능한 담체 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 및 에탄올 등을 포함한다.

[45] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효량의 NMDA 수용체 길항제를 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하여 강박증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[46] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다. 또한 본 발명에서 "약제학적 유효량"은 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[47] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 투여방법에는 제한이 없다. 예를 들면, 경구 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강 내 투여, 경기관지 투여 또는 근육 내 투여 등이 포함된다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

[48]

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

발명의 실시를 위한 형태

[50] **실시예 1. Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사 행동 : Self-made injury**

[51] 야생형(wt)과 Ninjurin1 KO 마우스(5-7개월령)의 외형적 차이를 관찰하고 행동패턴의 변화를 비교하였다. 실험에 사용한 Ninjurin1 KO 마우스(C57BL/6)는 이화여대에서 분양받아 서울대학교 약학대학 동물실의 무균상태로 유지하였으며, 모든 실험은 서울대학교 실험동물 관리 위원회의 승인을 얻어 수행되었다(SNU-090316-9).

[52] 그 결과, 야생형과는 달리 Ninjurin1 KO 마우스에서 barbering(도 1a), self-made injury(도 1b), eye-scratching(도 1c)와 같은 손상이 관찰되었으며, 그 빈도는 barbering(47, 83%), self-made injury(7.25%), eye-scratching (12,32%)로 야생형에 비해 현저히 증가되어 있었다(도 1d). 이러한 표현형(phenotype)은 과도한 우울(gloom) 행동에 의한 유발되는 자해(Self-made injury)로 예상되며, 인간의

강박증(OCD)과 유사한 행동 패턴임을 확인하였다.

[53]

[54] 실시예 2. Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사 행동 : Marble-burying 테스트

[55] Ninjurin1 KO 마우스(C57BL/6)와 OCD의 연관성을 확인하기 위해, 반복적인 행동(repetitive behavior), 불안감(anxiety-related behaviors)의 정도를 조사할 수 있는 marble-burying 테스트를 다음과 같이 수행하였다.

[56] 3-5개월령의 마우스를 20개의 marble(크기 : 15mm)이 규칙적으로 배열(5 x 4)되어 있는 케이지(25 x 20 x 20cm)에 넣은 후, 마우스 행동 패턴을 동영상으로 기록하였다. 30분 후 숨겨진 marble의 개수를 분석하고, 적어도 2/3 이상 숨겨진 것을 의미있는 것으로 간주하였다(도 2a 및 도 2c). **** : $p < 0.0001$; Ninjurin1 WT (도 2b) 또는 Hetero(도 2d) 마우스에 대한 Ninjurin1 KO 마우스의 비교, unpaired student's t-test.

[57] 실험 결과, Ninjurin1 KO 마우스는 야생형(WT)과 Hetero 마우스에 비해 증가된 marble-burying 행동 패턴을 보였다. 따라서, Ninjurin1 KO 마우스는 정상 마우스보다 더 반복적인 행동을 가지고, 불안감을 많이 느낀다는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 Marble burying 테스트와 상기 실시예 1의 self-made injury 테스트를 함께 고려해 볼 때, Ninjurin1 KO 마우스는 OCD와 유사한 행동을 나타냄을 알 수 있다.

[58]

[59] 실시예 3. Ninjurin1 KO 마우스의 불안감(anxiety) 정도 비교 : Elevated-plus-maze 테스트

[60] 상기 실시예 2의 marble burying 테스트를 통해 Ninjurin1 KO 마우스에서 불안감이 증가되어 있다는 것을 확인하였다. 이를 좀더 확인하기 위해, 불안감의 정도를 측정할 수 있는 elevated-plus-maze 테스트를 다음과 같이 수행하였다.

[61] Ninjurin1 WT과 KO 마우스(2개월령)를 실험 1시간 전 이동시켜 환경에 적응시키고, 두 개의 open arm(25 x 5 x 0.5 cm)과 수직방향으로 두개의 close arm(25 x 5 x 16 cm)을 가진 50cm 높이의 미로(maze)를 제작하였다. Open arm은 마우스가 떨어지지 않도록 낮은 벽(0.5 cm)을 가지고, close arm는 높은 투명한 플라스틱 벽 (16cm)을 가지고 있다(도 3a). 테스트는 주위 소음이 없고 100ux 정도의 조명이 있는 방에서 이루어 졌으며, 8분 동안 미로내에서의 이동성을 동영상으로 기록하고, open arm과 close arm에 머무르고 있는 시간을 비교 분석하였다.

[62] 그 결과를 도 3b 및 도 3c에 나타내었으며, 각각의 arm에 머무는 시간(도 3b)과 들어가는 횟수(도 3c)는 불안감의 정도를 비교할 수 있는 지표가 된다. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (WT과 KO의 비교) unpaired student's T-test, s.e.m

[63]

[64] 실시예 4. Ninjurin1 KO 마우스의 자폐증(autism)과의 연관성: Three-chamber 테스트

- [65] Ninjurin1 KO 마우스의 자폐증과의 관련성을 조사하기 위해 자폐증의 주요 특징인 social communication의 정도를 다음과 같이 three-chamber 테스트를 통해 야행형과 비교하였다.
- [66] 타겟 대상(stranger 1, stranger 2, 6-8 weeks) 야생형(WT) 마우스는 실험을 시작하기 3일전 케이지에 넣고, 테스트할 마우스는 1시간 전에 넣어 적응시켰다. Three chamber는 투명하고 제거 가능한 세 개의 방을 가진 챔버로 제작되었다. 전체 크기는 60 cm x 45 cm x 25 cm로 구성되어 각 챔버는 20 cm x 45 cm x 25 cm로 이루어져 있다. 각 챔버는 하나의 구멍(5cm x 5cm)으로 연결되어 쉽게 열고 닫을 수 있다. Stranger 마우스를 넣는 케이지는 steel cylindrical (높이; 12cm, 밑지름 9cm)로 제작되었다. 테스트 중인 마우스가 케이지 위로 올라가는 것을 막기 위해 투명한 물컵을 함께 넣어 주었다(도 4a).
- [67] 마우스를 5분 동안 three chamber내에서 자유롭게 움직이게 한 후, 5분 동안 stranger 1 마우스와 접촉하게 하였다. 그리고 새로운 마우스(stranger 2)를 비어있는 케이지에 넣은 후, 5분 동안 동영상으로 기록하였다. 각 챔버에 머무는 시간(도 4c 및 도 4f), 마우스와 직접 접촉하고 있는 시간(도 4d 및 도 4g), heat maps(도 4b 및 4e)을 Noldus Ethovision XT8.5 프로그램을 이용하여 분석하였다. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$ (WT과 Ninjurin1 KO 마우스의 비교), s.e.m
- [68] 실험 결과, three chamber 테스트를 통해 Ninjurin1 KO 마우스의 social communication을 조사하였을 때, Ninjurin1 KO 마우스는 각 챔버에 머무는 시간과 새로운 마우스와 직접 접촉하는 시간에 있어서 WT 마우스와 유사한 패턴을 나타내는 것으로 보아, 정상적 social interaction을 나타내었다. 따라서 Ninjurin1 KO 마우스는 자폐증과는 다른 행동을 보인다는 것을 확인하였다.
- [69]
- [70] **실시예 5. Ninjurin1 KO 마우스의 Cortical-striatum 회로 형성 장애 : 골지염색법**
- [71] 뇌에서 피질선조(Cortico-striatal) 회로의 이상이 강박증의 발병과 연관되어 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 다음과 같이 골지(Golgi) 염색 방법을 통해 Ninjurin1 KO 마우스의 대뇌피질(cortex), 선조체(striatum) 구조의 해부학적인 분석을 수행하였다.
- [72] FD Rapid GolgiStain Kit(Neurodigitech)를 이용한 standard Golgi-Cox impregnation 방법을 사용하여 Golgi 염색을 수행하였다. WT과 Ninjurin 1 KO 마우스(8주령 수컷) 뇌조직을 분리 후 고정하고, Gogi-Cox 용액을 25°C에서 18일동안 관류하였다. 마이크로톰(Microtome)(HM 525, Thermo Scientific)을 이용하여 피질선조 부분을 150um 두께로 절단하고 광학 현미경(Leica, CTR 5000)을 이용하여 관찰하였다. Scale bar=100um (도 5a 및 도 5c), 50um (도 5b).
- [73] 그 결과, Ninjurin1 KO 마우스에서 선조체(striatum)(도 5a), 중형 돌기 뉴런(Medium Spiny Neurons; MSN)(도 5b), 피질선조(cortical-striatum) 신경세포(도 5c)에서, 수지상 분지 복잡성(dendritic arbor complexity)과 수지상

분지(dendritic branching)의 수가 현저히 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, Ninjurin1에 의해 신경세포의 수지 복합성이 유도되며, Ninjurin1이 없을 경우 피질선조 회로의 형성에 이상이 발생함을 확인하였다.

[74]

[75] **실시예 6. 뇌 발생 과정 중 Ninjurin1의 발현 패턴 변화**

[76] Ninjurin1이 신경세포의 네트워크 형성에 영향을 미치기 때문에, 웨스턴블롯팅(Western blotting)을 통해 발생 중 뇌에서 Ninjurin1의 발현을 조사하였다.

[77]

[78] **실시예 6-1. 샘플 준비**

[79] 마우스 뇌의 각 부분에서 Ninjurin1의 발현을 조사하기 위해, 2주령(도 6a), 8주령(도 6b)의 숫컷을 PBS를 사용하여 관류(perfusion)한 후 뇌를 적출하였다. PBS를 통해 2번 세정한 후, olfactory bulb (OB), cerebral cortex (Ctx), cerebellum (CB), medulla oblongata (MO), spinal cord (SC)를 분리하였다. 분리된 각 부분을 용해 완충액을 사용하여 단백질을 추출하였다. 발생 단계별로 Ninjurin1의 발현을 조사하기 위해, 2, 4, 6, 8, 10, 14일령 마우스의 뇌를 적출하였다(도 6c). 또한 마우스 피질신경세포(cortical neuron)를 1차 배양하여 분화 시기별 (3, 5, 7, 12, 16일)로 세포를 준비한 후 단백질을 추출하였다(도 6d).

[80]

[81] **실시예 6-2. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

[82] 추출된 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후, 각 1차 항체를 4°C에서 밤새 배양하였다. 다음날 2차 항체로서 HRP-표지 항-마우스 IgG를 실온에서 1시간 처리한 후, PBST(PBS, 1% Tween-20)로 세정한 후 ECL 용액(Intron, Westzol)을 이용하여 검출하였다. 이때 사용한 1차 항체는 PSD-95(Millipore, mouse)와 Synaptophysin (Millipore, mouse)이며, 두 항체 모두 신경연접형성(synaptogenesis) 표지인자로 사용되었다. 대조군으로서 β -actin (sigma, rabbit)과 α -tubulin (sigma, mouse)을 사용하였다.

[83]

실험 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 마우스 뇌에서 발생이 진행되면서 Ninjurin1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 즉, Ninjurin1의 발현은 뇌의 각 부분에서 골고루 발현되며, 발생 단계 중 신경연접형성이 일어나는 시기와 유사하게 그 발현이 증가하는 것을 관찰하였다.

[84]

[85] **실시예 7. Puncta 구조의 synaptosome에서의 Ninjurin1 분포 확인**

[86] Ninjurin1의 세포 내 발현을 조사하기 위해, 마우스의 시냅토솜(synaptosome)을 다음과 같이 분리하였다.

[87]

[88] **실시예 7-1. 샘플 준비**

[89] 8주령 암컷 마우스의 뇌를 적출하여 가위로 분쇄한 후, 차가운

HEPES-수크로스 완충액에서 분쇄하였다(Hom, homogenate). 분쇄물을 원심분리(1000g, 5min)하여 펠렛(P1, nuclear fraction)을 얻었고, 상층액(S1, synaptosome)을 다시 원심분리 (10000g, 15min)하여 펠렛(P2, crude synaptosomal fraction)과 상층액(S2, light membrane & cytosolic fraction)을 얻었다. 다음 P2를 차가운 HEPES 완충액으로 재현탁한 후, 다시 원심분리(10000g, 15min)하여 펠렛(P2', washed synaptosomal fraction)을 얻었다. P2 펠렛을 9배 부피의 차가운 증류수를 이용한 저-삼투성 쇼크(hypo-osmotic shock)로 용해한 후, 4mM HEPES를 넣고 다시 원심분리(21000g, 20min)하여 펠렛 (P3, lysed synaptosomal membrane fraction)을 얻었다. 이후, 상층액(S3, crude synaptic vesicle fraction)을 다시 원심분리(55000 rpm)하여 펠렛(S3', synaptic vesicle fraction)을 얻었다(도 7a).

- [90] 16일 동안 배양한 1차 cortical 신경세포(DIV 16)에서, Syn-PER 시냅스 단백질을 추출 시약(Pierce, Thermo scientific)을 사용하여 핵 분획(nuclear fraction), 분쇄물(homogenate), 시냅토솜(synaptosome), 세포질 분획(cytosolic fraction)을 얻었다. 1차 cortical 신경세포(DIV 16)를 Syn-PER 완충액으로 용해한 후 원심분리(1000g, 10min)하여 핵 분획과 상층액을 얻고, 상층액을 다시 원심분리(10000g, 20min)하여 시냅토솜과 세포질 분획을 얻었다. 이들을 기존의 웨스턴 블롯팅 방법을 사용하여 단백질 분석하였다(도 7b).

[91]

[92] **실시예 7-2. 면역세포화학분석(Immunocytochemistry)**

- [93] Ninjurin1의 세포 내 발현 분포를 좀 더 확인하기 위해 면역세포화학분석을 수행하였다. 각각 4일 및 8일 동안 배양한 1차 cortical 신경세포인 DIV4와 DIV8에 GFP-Ninj1과 Flag-mNinj1을 트랜스펙션(Lipofectamine 2000, Invitrogen)하였다. 24시간 후, PFA(4%, 10min)를 사용하여 고정하고 보관하였다(PBS, 4°C). 면역세포화학분석을 위해 차가운 PBS로 2회 세정한 후, 20mM 글리신/PBS로 PFA의 반응을 저해하였다. Triton X-100 1%를 사용하여 permeabilization한 후, 블락킹 용액(1% BSA(w/v), 5% FBS(v/v))를 통해 비특이적 결합을 저해하였다. 4°C에서 밤새 각 1차 항체를 처리하였다. PBS로 2회 세정한 후, 실온에서 1시간동안 2차 항체(Alexa 488/546-conjugated donkey anti-rabbit/mouse IgG)를 처리한 후 공초점 현미경(confocal microscopy)(LSM 700, Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였다(도 7c). 사용한 1차 항체는 Anti-Flag(sigma), anti-GFP(Abcam), Ninjurin1(custom-made, Ab1-15)이다. Scale bar : 50um.

[94]

- [95] 실험결과, Ninjurin1은 시냅토솜 분획(P2, P2', P3)에 주로 존재하지만, 시냅스 베시클 분획(S3, S3')에는 존재하지 않았으며(도 7a), 1차 배양한 cortical 신경세포에서도 시냅토솜에 존재하는 것을 확인하였다(도 7b). 또한, 면역세포화학 분석 결과, 외생적으로 과발현한 Ninjurin1이 puncta-유사 구조체에서 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 7c).

[96]

[97] 실시예 8. pre-synapse 와 post-synapse에서 Ninjurin1의 발현 확인

[98] Ninjurin1이 puncta 구조를 가진 시냅소솜 부분에서 발현되기 때문에, 여러 시냅스 표지인자와 이중 면역염색을 통해 시냅스 내에서의 Ninjurin1 발현 분포를 좀더 상세히 조사하였다.

[99] 이중 면역염색에 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

[100] Pre-synapse 표지인자 : Synaptophysin(Millipore, mouse), vGlut1(Abcam, sheep),

[101] Post-synapse 표지인자 : Homer1 (Synaptic systems, mouse)

[102] 실험 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, Ninjurin1은 각 표지인자들과 부분적으로 함께 발현되는 것을 확인하였다. 하지만 Presynapse 표지인자인 Synaptophysin과 vGlut1와는 여러 부분에서 overlay되지만 Postsynapse 표지인자인 Homer1과는 상대적으로 적은 부분이 overlay되는 것을 관찰하였다. 따라서, Ninjurin1은 Pre-synapse와 Post-synapse 모두에서 발현되지만, Post-synapse 보다는 Pre-synapse에 많이 존재함을 알 수 있다.

[103]

[104] 실시예 9. Ninjurin1 KO 마우스의 Neural 활동성 증가 확인

[105] 실시예 1 내지 8에서 Ninjurin1 KO 마우스가 강박증 유사행동을 보이며 Ninjurin1이 시냅스에서 발현됨이 확인되었으므로, 다음과 같이 Fos B를 면역염색하여 발현 정도를 비교함으로써 신경 활성을 비교하였다.

[106] 야생형(WT)과 Ninjurin1 KO 마우스(3개월령 숫컷)에서 뇌 조직과 용해물(lysate)을 준비하고, 웨스턴 블랏팅(40ug, 12% gel)을 통해 Fos B (Santa cruz)의 발현 정도를 비교하였다. 면역조직화학 분석(Immunohistochemistry)의 경우, 마우스를 PBS로 관류하고 4°C에서 밤새 4% PFA로 고정하였다. 10%, 20%, 30% 수크로스를 사용하여 탈수한 후, OCT 블록을 만들었다. 마이크로톰(HM 525, Thermo Scientific)을 이용하여 20um로 자른 후 free-floating 용액에 넣어 사용 전까지 -70°C에 보관하였다. 자른 뇌조직을 PBS로 세정한 후(5min, 3회) 블락킹 용액(0.03% Triton X-100, 10% BSA, 5% FBS)으로 블락킹하고, 4°C에서 밤새 Fos B 항체(Santa Cruz)를 조직에 처리하였다. 다음 날, PBS로 10분간 3회 세정한 후, 2차 항체를 실온에서 1시간 처리하였다. Hechst33442(Molecular probe, Invitrogen)로 핵을 염색한 후, 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

[107] 도 9a의 면역조직화학염색 결과 및 도 9b의 웨스턴 블롯 결과, Fos B의 발현이 Ninjurin1 KO 마우스 뇌에서 증가되어 있음을 확인하였다. 따라서, Ninjurin1 KO 마우스에서 신경 활성이 항진되어 있음을 알 수 있다.

[108]

[109] 실시예 10. Ninjurin1 KO 마우스에서 NMDAR의 발현과 Src의 발현 증가 확인

[110] 웨스턴 블랏팅을 이용하여, Ninjurin1 KO 마우스의 뇌와 대뇌피질(cortex)에서 NMDA 수용체의 발현을 조사하였다. 조직으로 brain, cortex, synaptosome을 각각 준비한 후 웨스턴 블랏팅을 실시하였으며, 이때 사용한 1차 항체는 다음과 같다.

- [111] 1) Millipore : NMDAR2A (Rabbit), NMDAR2B (Rabbit), NMDAR1 (Rabbit), PSD-95 (Mouse), Synaptophysin (Mouse), Synapsin (Mouse), GABAR_A (Mouse)
- [112] 2) Cell signaling : Src, p-Src (Y416)
- [113] 3) Sigma : β -actin, α -tubulin

[114]

- [115] 실험 결과, Ninjurin1 KO 마우스에서 글루타메이트 서브유닛들(NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR1)의 발현은 증가되어 있었지만, 시냅스 형성을 조절하는 인자인 synapsin과 synaptophysin에는 변화가 관찰되지 않았다(도 10a, 도 10b). 또한 인산화된 Src의 양이 Ninjurin1 KO 마우스 시냅토솜에서 증가되어 있었다(도 10c). 따라서, Src의 활성화를 통한 글루타메이트 경로에 의해, Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사 행동이 조절될 것으로 예상된다.

[116]

- [117] 실시예 11. Memantine의 Ninjurin1 KO 마우스 강박증 저해 효과 확인

- [118] Ninjurin1 KO 마우스의 강박증 유사행동이 NMDAR의 증가와 관련있음을 확인하였기 때문에, NMDAR의 길항제(antagonist)로서 알츠하이머 질환 치료제인 메만틴염산염(Memantine hydrochloride)에 대하여 강박증 저해효과를 조사하였다.

[119]

- [120] 실시예 11-1. Barbering과 피부 손상 비교

- [121] Barbering과 피부 손상을 보이는 Ninjurin1 KO 마우스(5개월령)에 메만틴염산염(sigma, 5mg/kg)을 10일 동안 매일 복강 주입하였다. 2주 후, Barbering과 피부손상의 정도를 약물 주입하기 전과 비교하였다(도 11a).

[122]

- [123] 실시예 11-2. Marble-burying 테스트

- [124] Ninjurin1 KO 마우스에 5mg/kg의 메만틴염산염을 복강 주입하였다. 1시간 후, 실시예 2의 방법과 동일하게 Marble-burying 테스트를 실시하였다(도 11d).

- [125] 실험 결과, 메만틴염산염을 주입하였을 경우 Ninjurin1 KO 마우스의 barbering(도 11b), self-made injury(도 11c), Marble-burying(도 11d)과 같은 강박증 유사행동이 현저히 감소하였다. 결론적으로, NMDAR는 Ninjurin1 KO 마우스의 OCD 유사행동을 매개하며, 이의 활성을 저해하는 메만틴염산염은 OCD 행동을 치료하기 위한 가능한 후보로 기대된다.

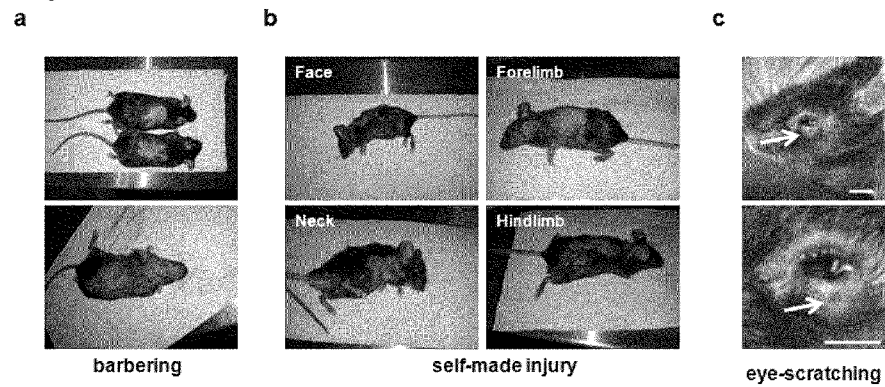
[126]

- [127] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

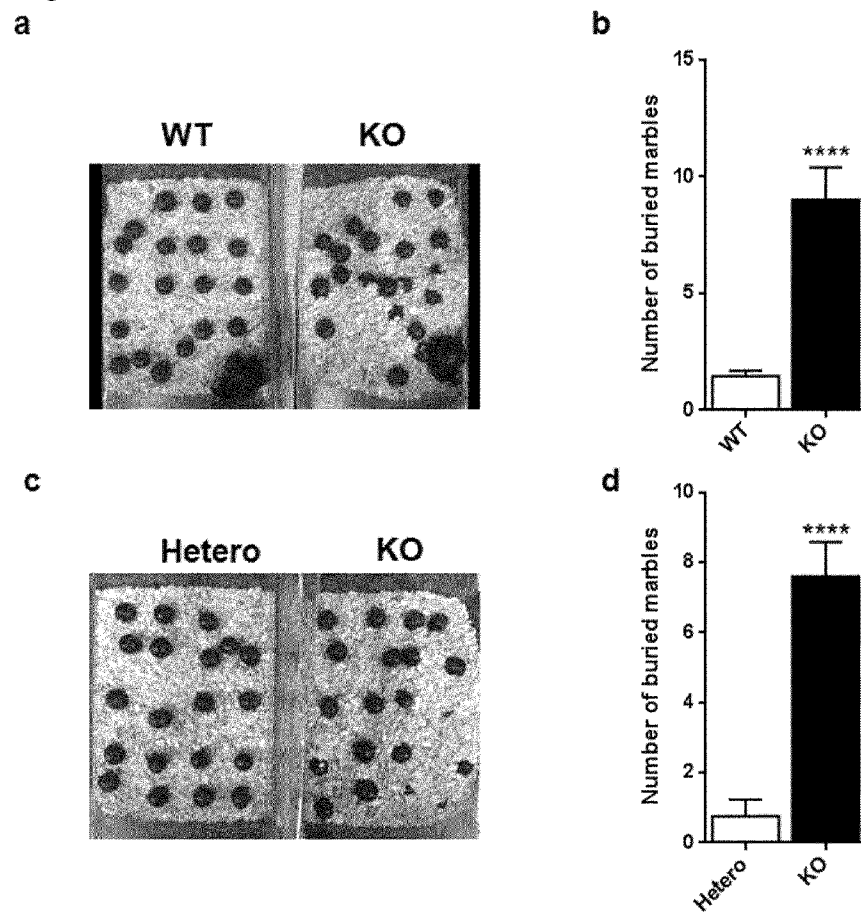
- [청구항 1] 닌쥬린 1(Ninjurin 1)을 결핍시켜 제조된 강박증 동물모델.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 동물은 인간을 제외한 것을 특징으로 하는 동물모델.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 닌쥬린 1 결핍은 닌쥬린 1 유전자의 녹아웃(Knock-out)에 의한 것임을 특징으로 하는 동물모델.
- [청구항 4] 제 1 항의 동물모델을 이용하여 강박증을 예방 또는 치료하기 위한 후보약물 탐색방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 탐색방법은 동물모델에 후보약물을 투여한 후 NMDA 수용체(N-Methyl-D-aspartate receptor)가 저해되는지를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 탐색방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 후보약물은 NMDA 수용체 길항제인 것을 특징으로 하는 탐색방법.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 NMDA 수용체 길항제는 메만틴(Memantine)인 것을 특징으로 하는 탐색방법.

[Fig. 1]

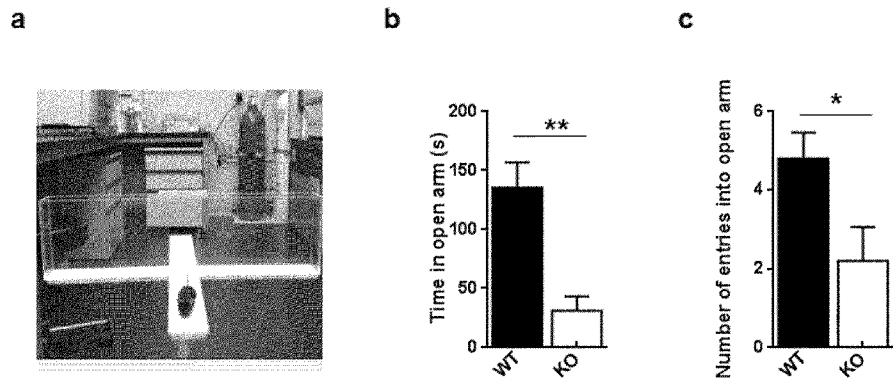
**d**

Phenotype	WT	KO
Eye injury	1/51 (no eye)	17/138 (12.32%)
Skin lesions	No	10/138 (7.25%)
Barbering (hairless)	5/51 (9.8%)	66/138 (47.83%)

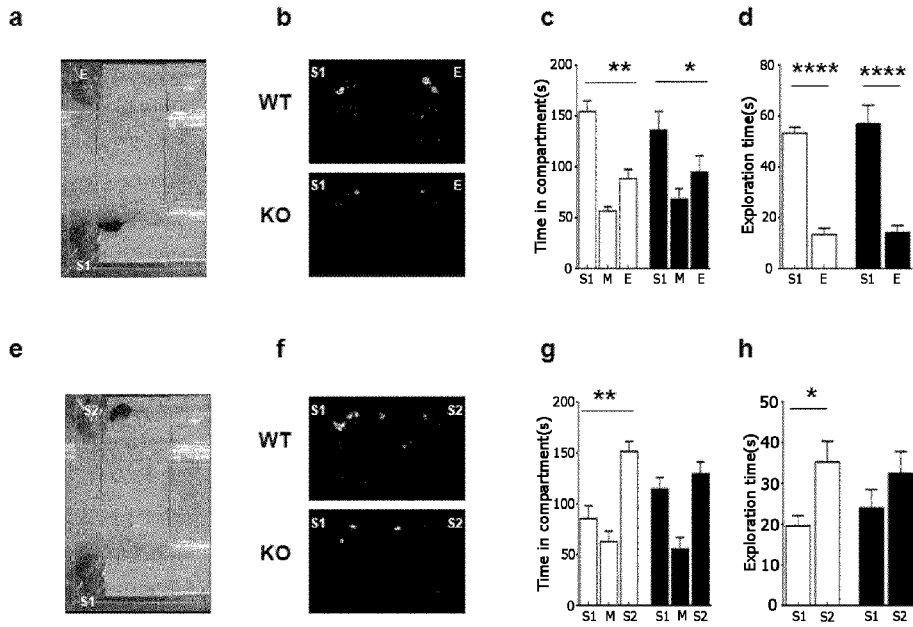
[Fig. 2]



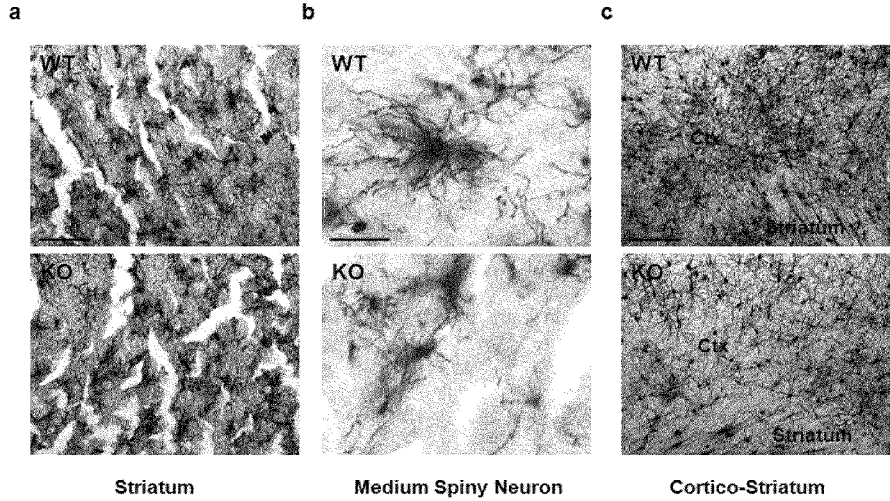
[Fig. 3]



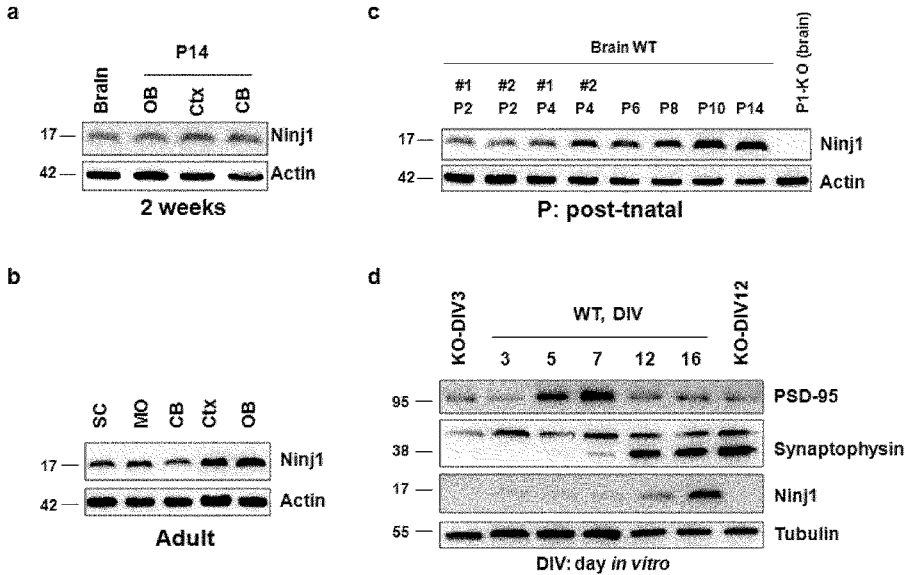
[Fig. 4]



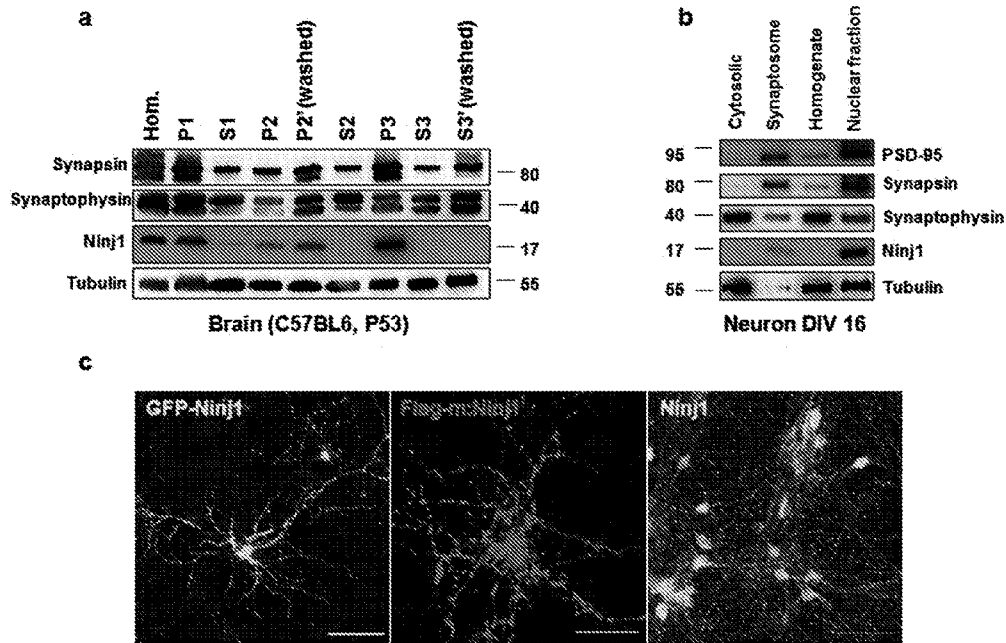
[Fig. 5]



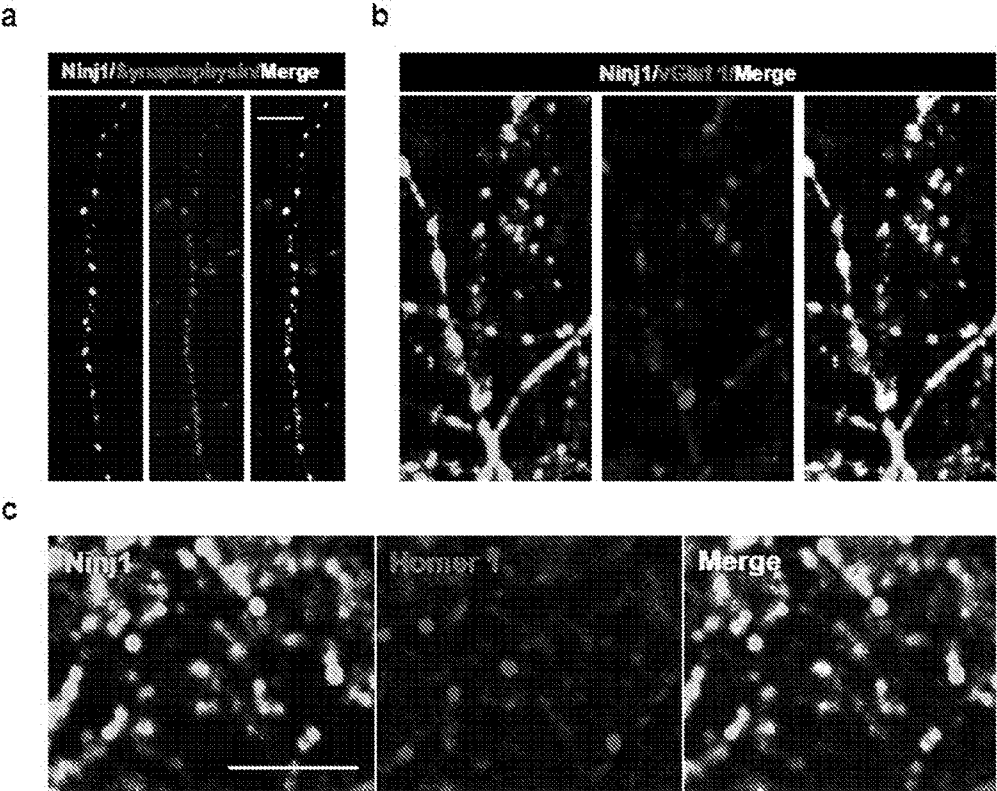
[Fig. 6]



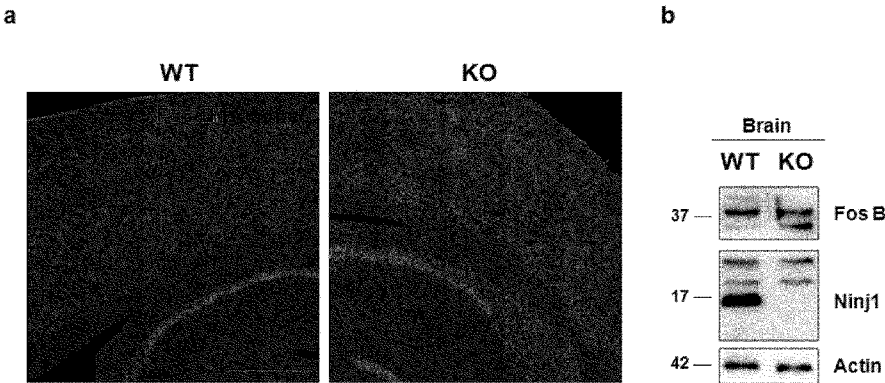
[Fig. 7]



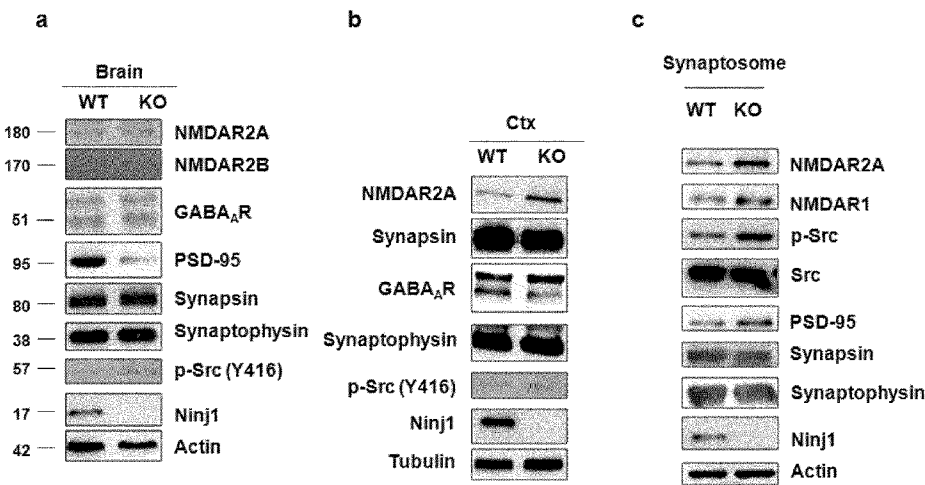
[Fig. 8]



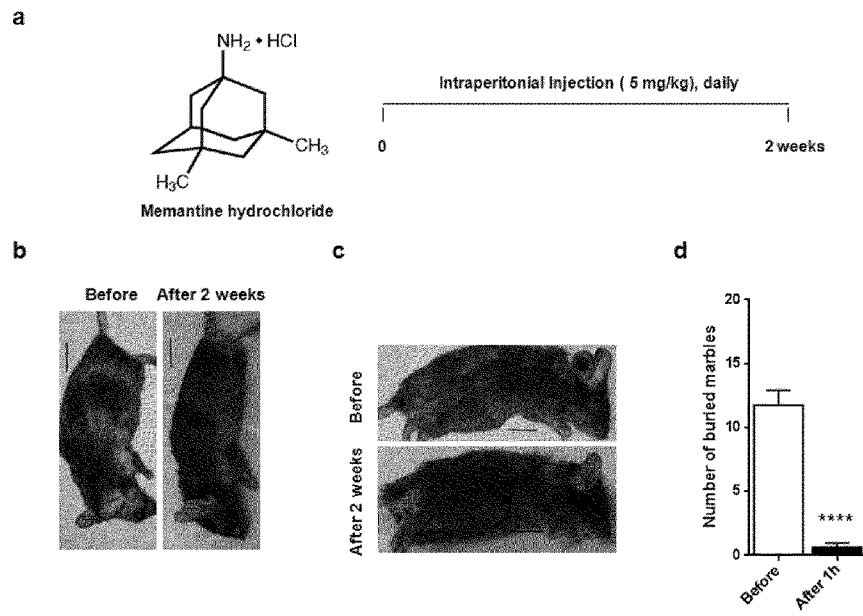
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005531**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/13(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/13; A61P 25/24; A61K 31/401; A61P 25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google & Keywords: ninjurin 1, lack, knock out, animal model, ninjurin 1, knock out, mouse

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEONG-JUN CHO et al., Ninjurin1, a target of p53, regulates p53 expression and p53-dependent cell survival, senescence, and radiation-induced mortality. Proc Natl Acad Sci U S A. 04 June 2013, 110(23), pp. 9362-9367 See abstract, materials and methods part	1-3
A	KR 10-2009-0029200 A (VANDA PHARMACEUTICALS, INC.) 20 March 2009 See the entire document	1-3



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

27 OCTOBER 2014 (27.10.2014)

Date of mailing of the international search report

27 OCTOBER 2014 (27.10.2014)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005531

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.: 4-7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4-7 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, or to a diagnostic method, and thus pertain 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/KR2014/005531

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0029200 A	20/03/2009	AU 2007-253684 A1	29/11/2007
		CA 2652416 A1	29/11/2007
		EP 2029136 A1	04/03/2009
		JP 2009-538331A	05/11/2009
		US 2009-0306137 A1	10/12/2009
		WO 2007-137227 A1	29/11/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/13(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/13; A61P 25/24; A61K 31/401; A61P 25/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(KIPO internal), PubMed, NCBI, Esp@snet, PAJ, USPTO, Google & 키워드: ninjurin 1,결핍,넉아웃,동물모델,ninjurin 1,knock out, mouse		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SEONG-JUN CHO 외 7명, Ninjurin1, a target of p53, regulates p53 expression and p53-dependent cell survival, senescence, and radiation-induced mortality. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013.06.04., 110(23), 9362-9367쪽 요약, Materials and Methods 부분 참조	1-3
A	KR 10-2009-0029200 A (반다 파마슈티칼즈, 인코퍼레이티드) 2009.03.20. 문헌 전체 참조	1-3
☐ 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 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 10월 27일 (27.10.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 10월 27일 (27.10.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김범수 전화번호 +82-42-481-5412 

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: 제4항 내지 제7항
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제4항 내지 제7항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0029200 A	2009/03/20	AU 2007-253684 A1	2007/11/29
		CA 2652416 A1	2007/11/29
		EP 2029136 A1	2009/03/04
		JP 2009-538331A	2009/11/05
		US 2009-0306137 A1	2009/12/10
		WO 2007-137227 A1	2007/11/29