

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2018/236079 A1

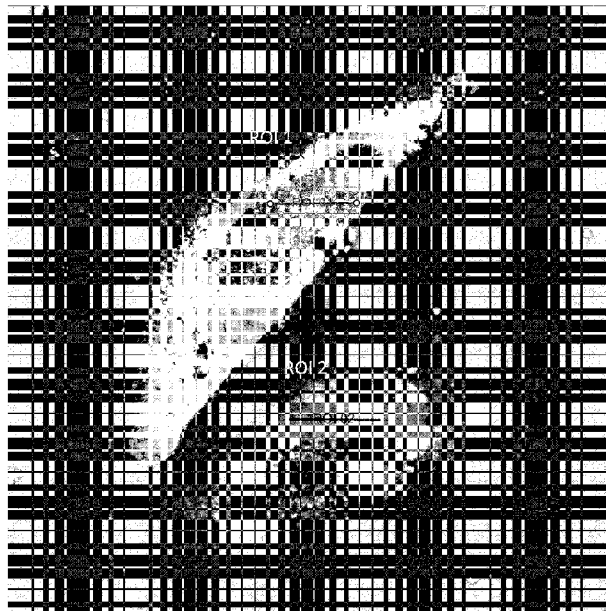
2018 년 12 월 27 일 (27.12.2018) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12N 15/85* (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *C07K 14/72* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *A01K 67/027* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/006451
- (22) 국제출원일: 2018 년 6 월 7 일 (07.06.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0077215 2017 년 6 월 19 일 (19.06.2017) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 중로구 대학로 101 (연건동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이은주 (LEE, Eun Ju); 02719 서울시 성북구 정릉로 305, 101동 1406호, Seoul (KR). 김효수 (KIM, Hyo-Soo); 04419 서울시 용산구 독서당로 111, 105동 T-202호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: LIVER FIBROSIS INDUCING VECTOR AND METHOD FOR ESTABLISHING ANIMAL MODEL, USING SAME

(54) 발명의 명칭: 간 섬유화 유도 벡터 및 이를 이용한 동물모델 제조방법

[도7]



(57) Abstract: The present invention relates to a liver fibrosis inducing vector and a method for establishing an animal model, using the same. According to the present invention, treatment with tamoxifen at a specific time point allows a Cas9-ERT2 protein complex to translocate from the cytosol into the nucleus. As such, the protein complex that has translocated into the nucleus can more elaborately modify a specific DNA in a desired part at a desired time point with the aid of guide RNA (gRNA). Particularly, application of tamoxifen to a Cas9-ERT2 complex in which a gRNA of the liver fibrosis regulator gene TIF1 γ is fused to a hepatic stellate cell-specific promoter knocks out the TIF1 γ gene to cause liver fibrosis. TIF1 γ is a very important factor in the prevention and treatment of liver fibrosis or liver cirrhosis. Therefore, the present invention can be utilized for developing a technology for analysis of liver fibrosis disease and

[다음 쪽 계속]



WO 2018/236079 A1

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

further is useful for clinical studies such as screening of candidate drugs for treatment of liver fibrosis, with the expectation of finding applications to identifying novel proteins that may be targets of new drug development.

(57) 요약서: 본 발명은 간 섬유화 유도 벡터 및 이를 이용한 동물모델 제조방법에 관한 것에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면, 특정시점에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 Cas9-ERT2 단백질 복합체를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있는데, 이처럼 핵 내로 이동한 상기 단백질 복합체는 guide RNA (gRNA)를 통해 원하는 시점에 원하는 부분에서 보다 정교하게 특정 DNA를 변형시킬 수 있다. 특히, 간 섬유화 억제 유전자인 TIF1 γ 의 gRNA 및 간성상세포 특이적 프로모터와 융합된 Cas9-ERT2 복합체에 타목시펜을 처리하면, 상기 TIF1 γ 유전자를 녹아웃시켜 간 섬유화를 유발시킬 수 있다. TIF1 γ 는 간 섬유화 또는 간경화 예방 및 치료에 있어서 매우 중요한 인자인바, 따라서 본 발명은 간 섬유화 질환을 분석하는 기술을 개발하는데 이용될 수 있으며, 나아가 간 섬유화 치료를 위한 후보약물 스크리닝 등의 임상적 연구에 있어서도 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 신약개발의 표적이 될 수 있는 신규한 단백질들을 동정하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 간 섬유화 유도 벡터 및 이를 이용한 동물모델 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 간 섬유화 유도 벡터 및 이를 이용한 동물모델 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 특정한 시기에, 원하는 부분에서 원하는 DNA를 변형 (modification) 시키기 위하여 현재 Cre-Lox 재조합 (Cre-Lox recombination), TET시스템 (TET system) 등에 조직 특이적 프로모터를 이용하는 방법이 존재한다.

- [4] 이 중 TET시스템 (TET system)은 대장균의 전이인자 (transposon) Tn10에 있는 테트라사이클린 (Tc) 내성발현조절계를 사용한 포유류배양세포, 동물 개체에서의 유전자발현유도시스템을 말하며, 2개의 요소로 구성되어 있다. 첫째는 tTA (tetracyclin-controlled transactivator) 인데, 이는 Tc억제인자(tetR)에 단순헤르페스바이러스 VP16인 전사활성화 영역을 결합한 단백질이고, 둘째는 tetR와 결합할 수 있는 작동유전자 (operator) (tetO)와 사람세포거대바이러스 (CMV) 촉진체의 하류에 목적유전자를 배치한 것이다. 상기 Tc존재 하에서는 그와 결합한 tTA는 tetO와 결합하지 못하지만, Tc를 제거하면 tTA가 tetO와 결합하여 표적유전자의 발현을 유도하게 된다(TET-OFF시스템). 역으로 tetO와 결합하여 표적유전자의 발현유도를 하는 rtTA (reverse tetracyclin- controlled ransactivator)를 사용한 TET-ON시스템의 구축을 위한 연구도 계속 되고 있다.

- [5] 다만, 현재 DNA 변형 방법들은 그 절차가 복잡하고, 과정에 긴 시간이 소요되며, 이를 통하여 제조된 동물모델에서 원하는 부분의 DNA 변형을 위하여 약물을 처리한 경우, 정밀한 작업이 이루어지지 않아, 그 결과를 신뢰할 수 없는 경우가 많다는 점에서 한계가 있으며, 그 중, Cas9 system은 상대적으로 짧은 시간에 저비용으로 동물모델을 제조할 수 있고, DNA상에서 정교한 작업이 용이하다는 장점이 있지만, 특정 시기에 원하는 부분에서의 DNA 변형을 유도하기 위하기에는 아직 미흡한 상황이다.

- [6] 한편, 간 섬유화(liver fibrosis)는 만성염증상태에 있는 간 조직이 손상과 재생을 반복하여, 조직 중에 콜라겐 등과 같은 결합조직이 과도하게 축적됨으로써, 간 조직에 흉터(scar)가 생기는 질환으로서, 간경화와는 달리 가역적(reversible)이고, 얇은 원섬유 (thin fibril)로 구성되며, 결절(nodule)형성이 없는 바, 간 손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있다. 그러나 이러한 간 섬유화 기작이 반복적으로 지속되면, 결합조직 간의 교차결합(crosslinking)이 증가하여 두꺼운 원섬유(thick fibril)가 축적되며, 간소엽의 정상구조를 상실하여 결절을 형성하는

것을 특징으로 하는 비가역적인(irreversible) 간경화로 진행된다.

- [7] 최근의 간 섬유화 치료 연구는 간 섬유화를 줄이거나 간 기능을 회복하여 간 이식에 대한 수요를 감소시킬 수 있도록 세포 및 분자 메커니즘에 관한 정보를 제공함으로써, 간세포 치료를 위한 유망한 접근법을 제공하려는 노력이 진행되고 있으며, 높은 증식능력을 갖는 줄기세포에서 분화시킨 간세포를 간 이식 대신 사용할 수 있을 것이라고 기대되고 있지만, 이 또한 생체 내에서의 생존율이 낮고 면역거부반응을 일으킬 수 있는 위험이 있어서 아직까지는 큰 치료효과를 기대하기 어렵다.

- [8] 현재 유의성 있는 간 섬유화 진단을 위한 분석방법(한국 특허등록번호 10-1018960)에 대해서는 알려져 있으나, 간 섬유화의 메커니즘 및 치료법 연구를 위해 생체 시료를 개발하기에 적합한 동물모델이 필수적인데도 불구하고, 아직 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자는 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여, Cas9을 이용해 원하는 시기에 원하는 특정 부분에서 DNA 변형(modification)을 유도할 수 있는 방법에 관하여 예의 연구한 결과, Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 특정시점에 상기 Cas9-ERT2를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있으며, 이처럼 핵 내로 이동된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 guide RNA를 통해 특정 DNA를 변형(modification)시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [11] 이에, 본 발명은 TIF1 γ (transcriptional intermediary factor 1 gamma)의 gRNA (guide RNA) 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조용 벡터(vector)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [12] 또한, 본 발명은 간 섬유화 동물 모델의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 간 섬유화 동물 모델을 제공하는 것을 또 다른 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.

[14]

과제 해결 수단

- [15] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TIF1 γ (transcriptional intermediary factor 1 gamma)의 gRNA (guide RNA) 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질

복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터(vector)를 제공한다.

[16] 본 발명의 일구현예로, 상기 재조합 벡터는 U6 프로모터 및 간성상세포 특이적 프로모터를 각 암호화하는 서열번호 13 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 유전자를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[17] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단백질 복합체는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9 (CRISPR associated protein 9)의 N-말단 및 C-말단에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 것 일 수 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 TIF1 γ 는 간 섬유화 억제 유전자일 수 있다.

[19] 또한, 본 발명은 a) Cas9-ERT2 단백질 복합체, TIF1 γ gRNA, U6 프로모터, 및 LRAT (Lecithin retinol acyltransferase) 프로모터를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터(vector)를 제조하는 단계; b) 상기 재조합 벡터를 대리모 동물의 배아에 미세주입 하는 단계; 및 c) 상기 배아를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함하는, 간 섬유화 동물 모델의 제조방법 및 이를 통해서 제조된 간 섬유화 동물 모델을 제공한다.

[20] 본 발명의 일구현예로, 상기 Cas9-ERT2 단백질 복합체는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9 (CRISPR associated protein 9)의 N-말단 및 C-말단에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 발명에 따르면, 특정시점에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 Cas9-ERT2 단백질 복합체를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있는데, 이처럼 핵 내로 이동한 상기 단백질 복합체는 guide RNA (gRNA)를 통해 원하는 시점에 원하는 부분에서 보다 정교하게 특정 DNA를 변형시킬 수 있다. 특히, 간 섬유화 억제 유전자인 TIF1 γ 의 gRNA 및 간성상세포 특이적 프로모터와 융합된 Cas9-ERT2 복합체에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리하면, 상기 복합체가 핵 내로 이동하여, TIF1 γ 유전자를 녹아웃 시켜 간 섬유화를 유발시킬 수 있다. TIF1 γ 는 간 섬유화 또는 간경화 예방 및 치료에 있어서 매우 중요한 인자인바, 따라서 본 발명은 간 섬유화 질환을 분석하는 기술을 개발하는데 이용될 수 있으며, 나아가 간 섬유화 치료를 위한 후보약물 스크리닝 등의 임상적 연구에 있어서도 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 신약개발의 표적이 될 수 있는 신규한 단백질들을 동정하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 세포질에 존재하는 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜 (Tamoxifen; TMX)을 처리함으로써 상기 단백질 복합체가 핵 내로 이동하는 과정을 나타낸

모식도이다.

- [25] 도 2a는 nuclear localization signal (NLS)이 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 ERT2를 융합시킨 Cas9-ERT2 단백질 복합체 구조를 나타낸 것이고, 도 2b는 간섭유화 억제 유전자 (TIF1 γ)의 gRNA (guide RNA), U6 프로모터, 간성상세포 특이적 프로모터 (LRAT 프로모터), 및 Cas9-ERT2를 연결한 구조를 나타낸 것이다.
- [26] 도 3a는 본 발명의 단백질 복합체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 맵을 나타낸 것이고, 도 3b는 본 발명의 재조합 벡터를 제조하기 위한 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- [27] 도 4는 본 발명의 재조합 벡터를 배아에 미세주입하기 위하여 제작된 미세주입 (microinjection) 용 DNA를 나타낸 것이다.
- [28] 도 5는 TIF1 γ 유전자의 녹아웃을 유발할 수 있도록 형질전환(transgenic; TG)된 생쥐에 타목시펜을 주입한 다음 간 조직을 회수하여, TIF1 γ 유전자의 발현 여부를 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 6a는 타목시펜(Tamoxifen; TMX)을 처리하지 않았을 때, Cas9-ERT2 단백질 복합체의 발현양상을 확인한 것이고, 도 6b는 TMX를 처리하였을 때, Cas9-ERT2 단백질 복합체의 발현양상을 확인한 것이다.
- [30] 도 7은 ROI 1 (up cell)과 벡터의 transfection이 이루어지지 않은 세포인 ROI 2 (down cell)을 비교하여 나타낸 것이다.
- [31] 도 8은 타목시펜을 처리하였을 때, ROI 1과 ROI 2의 발현양상을 Intensity에 따라 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 본 발명자는 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜(Tamoxifen)을 처리함으로써 특정시점에 상기 Cas9-ERT2를 세포질에서 핵 내로 이동시킬 수 있으며, 이처럼 핵 내로 이동된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 guide RNA를 인지하여 DNA를 변형 (modification) 시킬 수 있다는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [34]
- [35] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [36]
- [37] 본 발명은 TIF1 γ (transcriptional intermediary factor 1 gamma)의 gRNA (guide RNA) 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터(vector)를 제공한다.
- [38] 본 발명에서 "Cas9"는 "CRISPR associated protein 9"의 약자로, "CRISPR-CAS9"을 지칭하는데, CRISPR-CAS9는 3세대 유전자가위로서,

이용하고자 하는 특정 염기서열을 인식하여 절단하고 편집하며, 게놈의 목적 장소에 특정 유전자를 삽입하거나 특정 유전자의 활동을 정지시키는 조작을 간단하고 신속하고 효율성 있게 실시하는데 유용하다.

[39] 본 발명에서 "ERT2"는 "Estrogen receptor 2"의 약자로, 에스트로겐 수용체를 지칭하는데, 에스트로겐 수용체는 표적유전자 촉진자에 존재하는 에스트로겐응답 증폭자배열(공통배열: 5'-AGGTCANNNTGACCT-3')에 호모이합체로서 결합하여 호르몬 의존적으로 전사를 촉진하는 전사조절인자로서 작용한다.

[40] 본 발명에서 "gRNA"는 "guide RNA"의 약자로, RNA를 편집할 때 수식반응의 주형이 되는 염기순서정보를 갖는 45~70 뉴클레오티드 가량의 작은 RNA를 지칭하는데, gRNA의 5'측 영역은 RNA 편집되는 mRNA의 일부와 상보적 순서로 되어 있고, 이 영역을 매개로 하여 mRNA에 결합되며, 3'측 영역에는 편집 후의 최종적 mRNA의 순서에 상보적 염기순서가 존재하고, 그 순서정보에 따라 우리딘 (uridine) 염기의 삽입이나 결실이라는 RNA수식반응이 일어난다.

[41] 본 발명의 일 실시예에서는, Cas9을 이용하여 원하는 시기에 특정 부분에서 DNA 변형 (modification)을 유도할 수 있는 단백질 복합체를 제조하기 위하여, Cas9과 ERT2를 연결하는 구조를 구상하였다(실시예 1 참조).

[42] 본 발명의 다른 실시예에서는, TIF1 γ 유전자 녹아웃(knockout)을 위한 벡터를 제조하였으며(실시예 2 참조), 상기 벡터를 이용해 형질전환된 생쥐 배아를 생성하여, TIF1 γ 유전자의 녹아웃을 유발할 수 있는 생쥐를 생산하였다(실시예 3 참조).

[43] 이에, 본 발명은 간 섬유화 동물 모델의 제조방법 및 이를 통해서 제조된 간 섬유화 동물 모델을 제공한다.

[44] 보다 구체적으로 상기 제조방법은 a) Cas9-ERT2 단백질 복합체, TIF1 γ gRNA, U6 프로모터, 및 LRAT 프로모터를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터(vector)를 제조하는 단계; b) 상기 재조합 벡터를 대리모 동물의 배아에 미세주입 하는 단계; 및 c) 상기 배아를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[45] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 TIF1 γ 유전자 녹아웃 생쥐를 간 섬유화의 치료 및 연구에 유용하게 이용할 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).

[46] 본 발명에서 "TIF1 γ (transcriptional intermediary factor 1 gamma)"는 세포의 분화(cell differentiation) 및 발달(development)에 관여하는 전사 인자로, Tripartite motif-containing 33(TRIM33)으로도 알려진 유전자로서, 간성상세포(hepatic stellate cell; HSC)의 활성을 억제하고, 평활근 액틴(α -smooth muscle actin; α -SMA) 단백질의 발현 또는 collagen Type I의 분비를 감소시킴으로써, 궁극적으로 간 섬유화 예방 또는 치료에 영향을 미친다.

[47] 본 발명에서 사용되는 용어, "녹아웃(knockout)"은 유전자의 부분적, 실질적, 완전한 결실, 침묵(silencing), 비활성화 또는 하향조절(down-regulation)을

의미하는바, 타목시펜 처리에 의해서 TIF1 γ 유전자가 녹아아웃된 돌연변이체는 헤테로 돌연변이체(+/-) 역시 포함하며, 이를 통하여 간 섬유화를 유발할 수 있는 동물모델을 제공한다.

- [48] 또한, 본 발명의 방법에 의해 유발되는 질병인 "간 섬유화(liver fibrosis)"는 만성염증상태에 있는 간 조직이 손상과 재생을 반복하여, 조직 중에 콜라겐 등과 같은 결합조직이 과도하게 축적됨으로써, 간 조직에 흉터(scar)가 생기는 질환을 의미한다. 일반적으로 간 섬유화는 간경화와는 달리 가역적(reversible)이고, 얇은 원섬유(thin fibril)로 구성되며, 결절(nodule)형성이 없다. 또한, 간 손상의 원인이 소실되면 정상회복이 가능할 수 있다. 그러나 이러한 간 섬유화 기작이 반복적으로 지속되면, 결합조직 간의 교차결합(crosslinking)이 증가하여 두꺼운 원섬유(thick fibril)가 축적되며, 간소엽의 정상구조를 상실하여 결절을 형성하는 것을 특징으로 하는 비가역적인(irreversible) 간경화로 진행된다.

- [49] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 단백질 복합체의 발현양상을 확인하기 위하여 면역염색법을 수행하였다(실시예 5 참조).

[50]

발명의 실시를 위한 형태

- [51] 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.

[52]

[53] 실시예 1. DNA 변형 유도 단백질 복합체의 제조

- [54] 본 발명자는, DNA 변형 유도 단백질 복합체를 제조하기 위하여, 도 1에 나타낸 바와 같이, 발현 시에 핵 내로 이동하는 Cas9을 보다 정교하게 조절하고자, Cas9의 nuclear localization signal (NLS)을 제거하여 세포질 (cytoplasm)에 존재하도록 하였고, 상기 NLS가 제거된 Cas9의 N-말단 및 C-말단에 ERT2를 융합시켜 제조한 Cas9-ERT2 단백질 복합체에 타목시펜 (tamoxifen; TMX)을 처리하여 특정시점에 핵 (nucleus) 내로 이동시킬 수 있는 Cas9-ERT2 단백질 복합체(ERT2-Cas9-ERT2)의 구조를 구상하였다(도 2a 참조).

- [55] 특히, 원하는 시점에 특정한 유전자를 변형시킬 수 있도록 DNA 변형 유도 단백질 복합체를 설계하고, 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ)의 gRNA (guide RNA), U6 프로모터, 간성상세포 특이적 프로모터 (LRAT 프로모터), 및 Cas9-ERT2를 연결한 구조를 구상하였다(도 2b 참조).

[56]

[57] 실시예 2. 재조합 벡터의 제조

- [58] 본 발명의 일 실시예로, 본 발명의 단백질 복합체를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다(도 3a 및 도 3b 참조). 구체적으로, Addgene으로부터 pCAG-ERT2CreERT2 (#13777)와

pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (#42230) 플라스미드를 구매하였고, Santa Cruz로부터 mouse TIF1 γ CRISPR/Cas9 knockout (KO) 플라스미드 (sc-430111)를 구매하였다. mouse LRAT (Lecithin retinol acyltransferase) 프로모터 시퀀스 (promoter sequence)는 promoter prediction (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>)를 사용해 높은 활성이 예측되는 시퀀스 (-5,500 to + 72 bps)를 선택하였고, 보통의 mouse DNA (C57BL/6N)를 사용하여 하기 표 1과 같은 특이적 프라이머와 함께 PCR을 수행해 LRAT 프로모터를 획득하였다.

[59]

[60] [표1]

Primer sequence (5'-3')	
Forward	GACATTGATTATTGACTAGTCCTTAAAGAGAGGCATCCGGGGTC
Reverse	GTTCTTCTCCTTTGCTAGCCATGACGCTCACGCTAAAGAGCTTGAAG

[61]

[62] 상기 LRAT 프로모터에 의존적이면서, 타목시펜으로 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ) 발현 조절이 유발되는 플라스미드를 생성하기 위해, CAG 프로모터와 pCAG-ERT2CreERT2의 Cre는 LRAT 프로모터와 SpCas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9)으로 각각 대체하였다.

[63] 그 다음, U6 프로모터를 갖는 하기 표 2의 TIF1 γ gRNA 3개를 상기 플라스미드에 삽입하였다.

[64]

[65] [표2]

gRNA sequence (5'-3')	
gRNA 1	GGTGCGGCTGGGCCCCGACGA
gRNA 2	CTACATTCTTGACGACATAC
gRNA 3	GAAGATAATGCAAGTGCAAGT

[66]

[67] 이렇게 제조된 pLrat-ERT2Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA 플라스미드는 생어 염기서열 분석 (Sanger Sequencing)에 의하여 확인되었다.

[68]

[69] 실시예 3. 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ) 발현 조절 형질전환 생쥐의 생산

[70] 특정시점에, 타목시펜으로 TIF1 γ 유전자의 녹아웃(knockout)이 유발되어 유전자의 발현이 조절되는 형질전환(transgenic; TG) 생쥐를 생산하기 위하여, 5

내지 8주령의 C57BL/6N 암컷 생쥐에 임마혈청성 생식샘자극호르몬(pregnant mare serum gonadotrophin; PMSG) (7.5IU) 및 인간융모막성 생식샘자극호르몬(human chorionic gonadotropin; hCG) (5IU) 을 각 48시간 간격으로 복강내(Intraperitoneal; IP) 주사하여 과배란을 유발시켰으며, hCG을 주사한 후, 상기 암컷 생쥐를 C57BL/6N 번식용 수컷 생쥐와 교배시켰다. vaginal plug를 통해 암컷 생쥐의 임신여부를 확인하고, 암컷 생쥐로부터 수정된 배아를 수확하였다.

- [71] 상기 배아에, 도 4에 나타낸 바와 같이, 타목시펜을 통한 TIF1 γ 유전자의 녹아웃을 유발하는 DNA (pLrat-ERT2Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA) 3개를 AvrII/PvuI으로 이중 절단(double cut)하여 선형화 해 미세주입(microinjection)용으로 준비하였고, 1-세포기 배아(one cell staged embryo)에 상기 DNA 3개를 같은 농도로 미세 주입하였다. 이와 같은 형질전환 생쥐의 생산에 표준 미세주입 절차가 사용되었다(마크로젠, 서울, 대한민국).
- [72] 상기 3개의 DNA 혼합물 총 4ng/ μ l을 접합자(zygote)의 전핵(pronucleus)에 미세조작기(micromanipulator)를 사용하여 직접적으로 주입하였고, 이처럼 DNA 혼합물을 미세주입 한 배아를 37°C에서 1-2시간 동안 배양하였다. 상기 배아 중 14 내지 16개를 가상 임신한 대리모(pseudo-pregnant recipient) 생쥐(ICR)의 난관에 외과적 방법을 사용하여 이식하였다.
- [73] 이와 같은 방법으로 생산되는 형질전환 생쥐는 (주)마크로젠(서울, 대한민국)에서 병원체가 없는 조건 하에 교배되었으며, 모든 조작은 (주)마크로젠의 실험동물운영위원회의 승인을 받아 수행되었다.

[74]

[75] 실시예 4. 간 섬유화 억제 유전자 (TIF1 γ) 발현 조절 형질전환 생쥐의 분석[76] 4-1. PCR 분석(PCR analysis)

[77] 실시예 3의 방법으로 생산된 TIF1 γ 유전자 발현 조절 형질전환 생쥐의 pLrat-Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA를 확인하기 위하여 DNA 게놈 꼬리(genomic tail)에서 PCR 분석을 수행하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[78]

[79] [표3]

Primer sequence (5'-3')		
Cas9-ERT2	Forward	TGCTACAGAACAGTTGCAGCC
	Reverse	ACCTTGTA CTCTCGTCGGTGATC
TIF1 γ gRNA	U6-F	GTCGACGAGGGCCTATTTCCCATGATT
	gRNA1-R	TCGTCGGGCCCAGCCGCACC
	gRNA2-R	GTATGTCGTCAAGAATGTAG
	gRNA3-R	ACTGCACTTGCATTATCTTC

[80]

[81] 4-2. 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay)

[82] 실시예 3의 방법으로 생산된 TIF1 γ 유전자 발현 조절 형질전환(transgenic; TG) 생쥐의 타목시펜(Tamoxifen; TMX) 처리에 따른 TIF1 γ 발현 조절 여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 상기 형질전환 생쥐에 타목시펜을 주입하여 간 섬유화 억제 유전자인 TIF1 γ 를 in vivo에서 녹아웃 시킨 다음, 간 조직을 회수해 TIF1 γ 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 평활근 액틴(α -smooth muscle actin; α -SMA)은 일반적으로 활성화된 간성상세포에서 유발되는 간 섬유화 표지자로서, 상기 α -SMA 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯으로 분석해 간 섬유화 정도를 평가하였다. 글리세르알데하이드-3-인산 수소 이탈 효소(GAPDH)는 유전자 발현에 있어 상대적인 변화를 계산하기 위해 내부 대조군(internal control)으로 사용되었다.

[83] 구체적으로, 배양한 세포 또는 조직 샘플은 protein lysis buffer(50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 1% NP40 및 protease inhibitor cocktail [Roche, Indianapolis, IN, USA]가 포함된 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS])에 용해시켰다. 전체 단백질 추출물 (2530 μ g)을 5분 동안 95°C에서 끓인 후, SDS-PAGE로 분리한 후, BioRad transfer unit(BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 polyvinylidene fluoride membranes(PVDF; Millipore, Darmstadt, Germany)으로 옮겼다. PVDF는 0.1% Tween-20를 포함하는 Tris-buffered saline (TBS)으로 희석한 5% skim milk로 차단하고, 1차 항체로 α -SMA(1:3000, Abcam) 또는 TIF1 γ 항체(1:1000, Abcam)를 사용하여 배양하였으며, anti- α -tubulin antibody (1:5000, Sigma-Aldrich) 또는 anti-GAPDH antibody (1:30,000, Sigma-Aldrich)를 내부 대조군으로 사용하였다. 이후 PVDF를 세척한 후 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies로 배양하였고, 세척한 다음 면역 반응을 확인하여 TINA 2.0 (RayTest) 또는 ImageJ (National Institutes of Health) 프로그램을 이용하여 정량화하였다.

[84] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, pLrat-ERT2Cas9ERT2-TIF1 γ gRNA 형질전환 생쥐의 경우, TIF1 γ 유전자가 녹아웃 되었고, α -SMA 단백질이 발현되어 간 섬유화가 유도되었음을 관찰 할 수 있었다. 이는 상기 형질전환 생쥐를 간 섬유화의 치료 및 연구에 유용하게 사용할 수 있음을 시사한다.

[85]

[86] 실시예 5. DNA 변형 유도 단백질 복합체의 발현 분석

[87] 실시예 2의 방법으로 제조된 DNA 변형 유도 단백질 복합체의 발현양상을 확인하기 위하여 면역염색법을 수행하였다. 이를 위하여, LX2 Cell (Human hepatic stellate cell lines)에 transfection 후, 타목시펜(Tamoxifen; TMX) 1nM을 처리한 다음, 4시간 후 상기 TMX의 처리 유무에 따른 Target 유전자 (TIF1 gamma; TIF1 γ)의 감소와 반대적 유전자(alpha SMA; α -SMA)의 증가 양상을 확인하였다.

- [88] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, TMX를 처리하지 않았을 때, 세포질 (cytosol)에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체의 핵 내로 이동이 억제되었고, α -SMA는 낮았으며, TIF1 γ 는 핵 내에 높게 발현되었다(도 6a 참조). 반면, TMX 처리 시 세포질에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 핵 내 이동함을 확인할 수 있었으며, α -SMA는 높았고, TIF1 γ 는 핵 내 발현이 감소되었다(도 6b 참조).
- [89] 또한, 소프트웨어를 이용하여 Intensity에 따라 분석한 결과, 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이, ROI 1 (up cell)과 벡터의 transfection이 이루어지지 않은 세포인 ROI 2 (down cell)을 비교하였을 때(도 7 참조), 세포질에 발현된 Cas9-ERT2 단백질 복합체가 TMX 처리로 핵 내 이동함을 확인할 수 있었고, ROI 1이 ROI 2보다 핵 내의 Cas9이 높았으며, 세포질에서 α -SMA이 높고, 핵 내 TIF1 γ 발현이 감소하였다(도 8 참조).
- [90]
- [91] 참고로, 본 발명의 서열목록 리스트는 하기 표4와 같다.
- [92]
- [93] [표4]

서열목록 1	Forward Primer
서열목록 2	Reverse Primer
서열목록 3	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 1
서열목록 4	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 2
서열목록 5	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA 3
서열목록 6	Cas9-ERT2 Forward Primer
서열목록 7	Cas9-ERT2 Reverse Primer
서열목록 8	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA U6-F
서열목록 9	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA1-R
서열목록 10	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA2-R
서열목록 11	transcriptional intermediary factor 1 gamma gRNA gRNA3-R
서열목록 12	ERT2-Cas9-ERT2
서열목록 13	RNA polymerase III promoter for human U6 snRNA
서열목록 14	LRAT promoter
서열목록 15	Cas9 (Csn1) endonuclease from the Streptococcus pyogenes Type II CRISPR/Cas system

- [94]
- [95] 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.

[96]

산업상 이용가능성

[97]

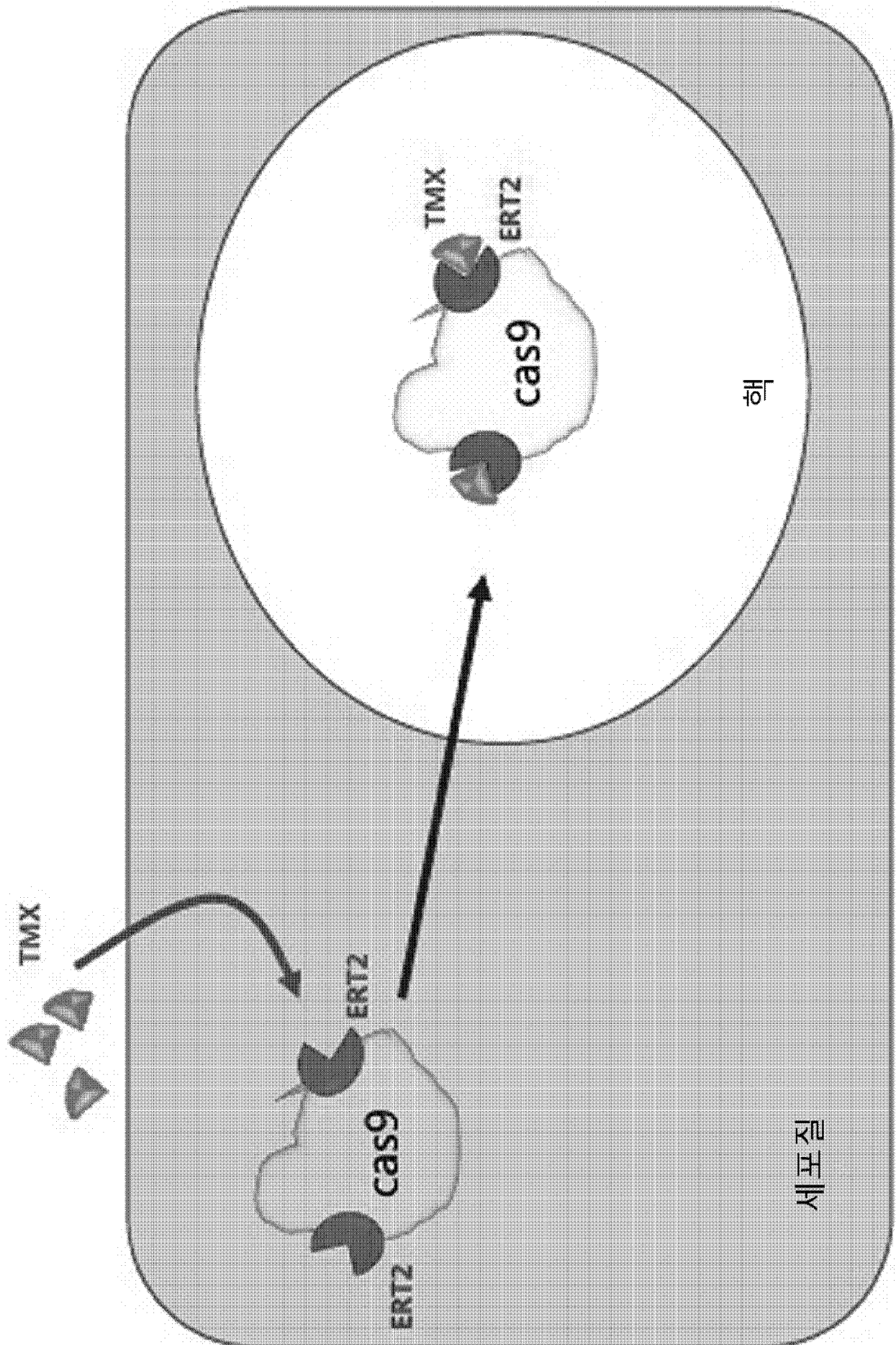
본 발명은 간 섬유화 질환을 분석하는 기술을 개발하는데 이용될 수 있으며, 나아가 간 섬유화 치료를 위한 후보약물 스크리닝 등의 임상적 연구에 있어서도 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라 신약개발의 표적이 될 수 있는 신규한 단백질들을 동정하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[98]

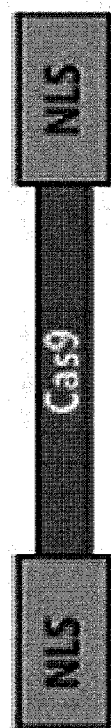
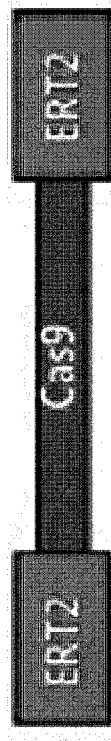
청구범위

- [청구항 1] TIF1 γ (transcriptional intermediary factor 1 gamma)의 gRNA (guide RNA) 및 Cas9 (CRISPR associated protein 9)에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 단백질 복합체를 암호화하는 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터(vector).
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 재조합 벡터는 U6 프로모터 및 간성상세포 특이적 프로모터를 각 암호화하는 서열번호 13 및 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단백질 복합체는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9 (CRISPR associated protein 9)의 N-말단 및 C-말단에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 TIF1 γ 는 간 섬유화 억제 유전자인 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.
- [청구항 5] 하기의 단계를 포함하는 간 섬유화 동물 모델의 제조방법:
a) Cas9-ERT2 단백질 복합체, TIF1 γ gRNA, U6 프로모터, 및 LRAT (Lecithin retinol acyltransferase) 프로모터를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터(vector)를 제조하는 단계;
b) 상기 재조합 벡터를 대리모 동물의 배아에 미세주입 하는 단계; 및
c) 상기 배아를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 Cas9-ERT2 단백질 복합체는 NLS (nuclear localization sequence)가 제거된 Cas9 (CRISPR associated protein 9)의 N-말단 및 C-말단에 ERT2 (Estrogen receptor 2)가 융합된 것을 특징으로 하는, 제조방법.
- [청구항 7] 상기 제5항 또는 제6항의 방법으로 제조된 간 섬유화 동물 모델.

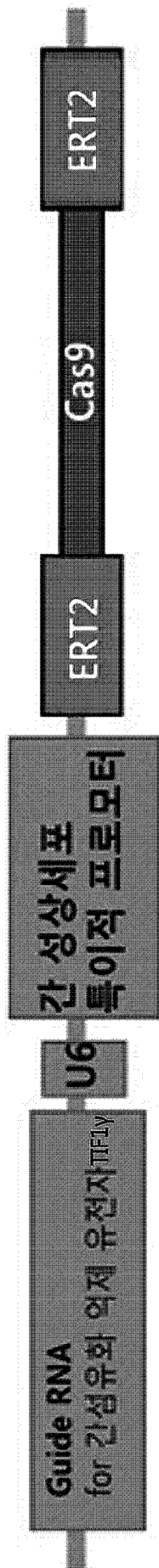
[도1]



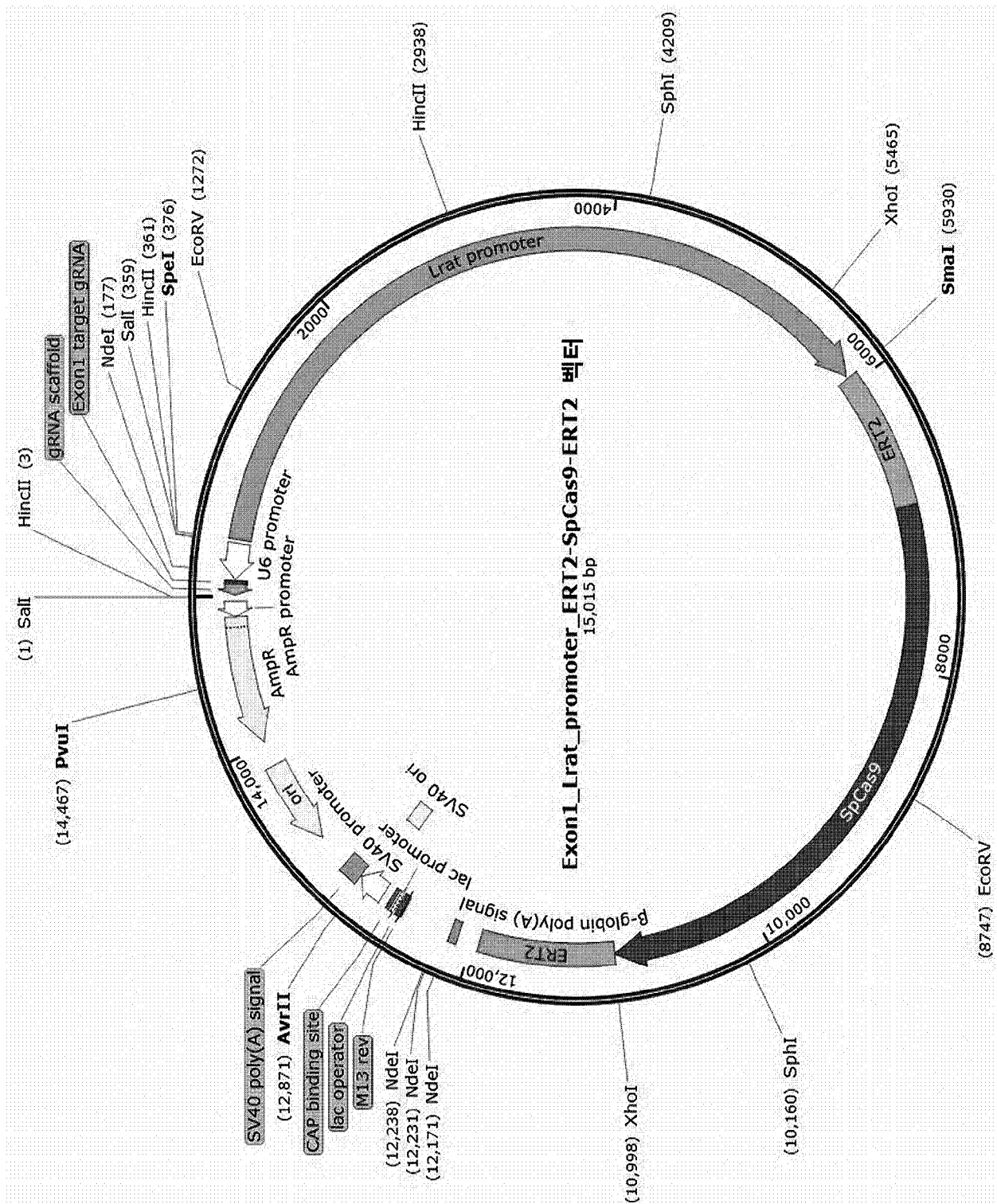
[도2a]



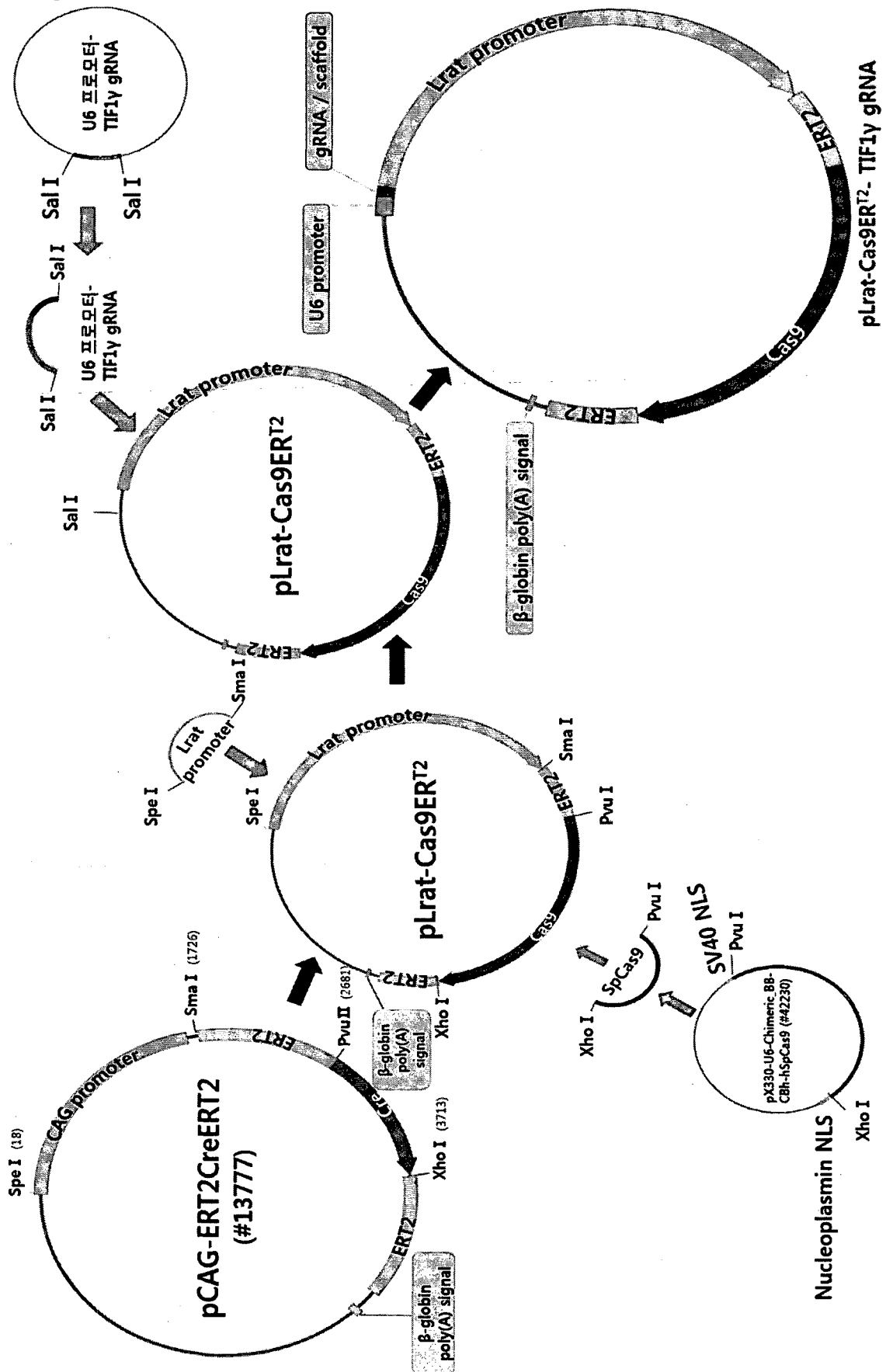
[도2b]



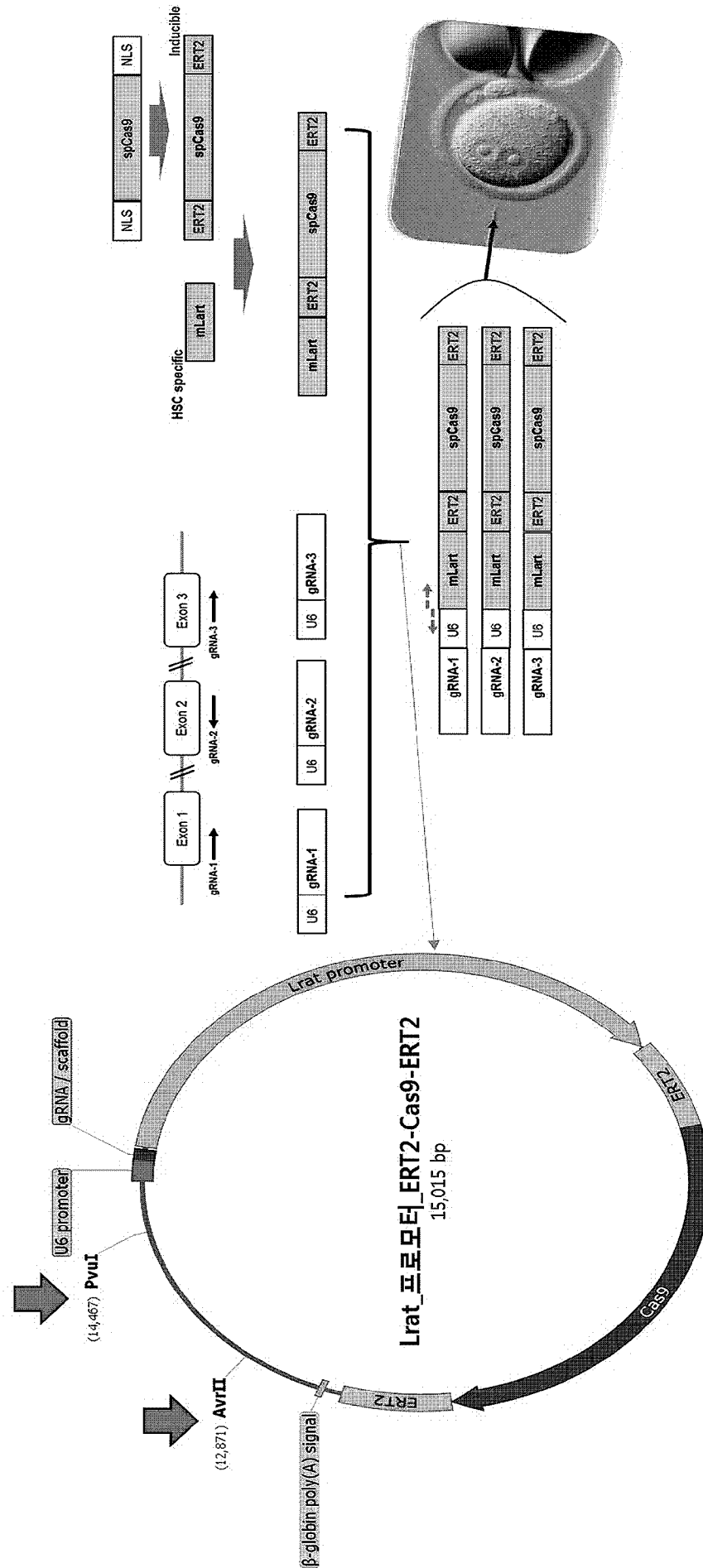
[도3a]



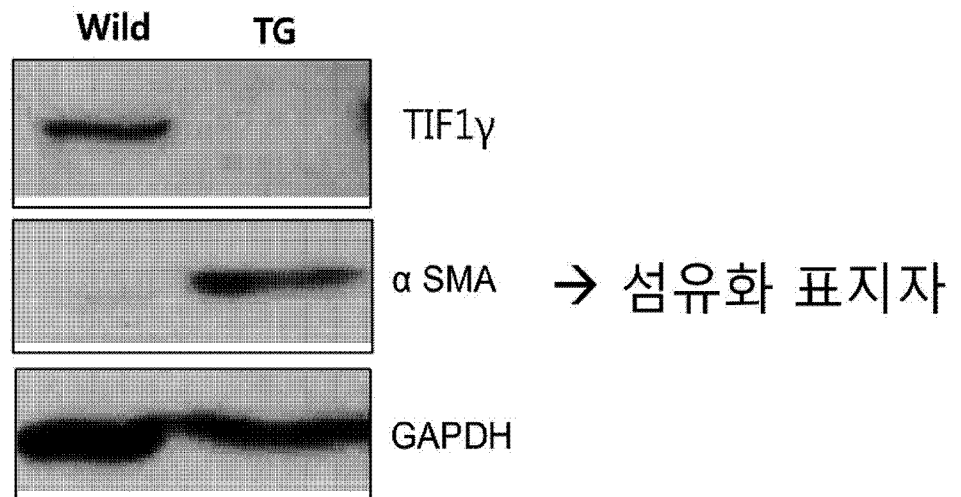
[도3b]



[도4]

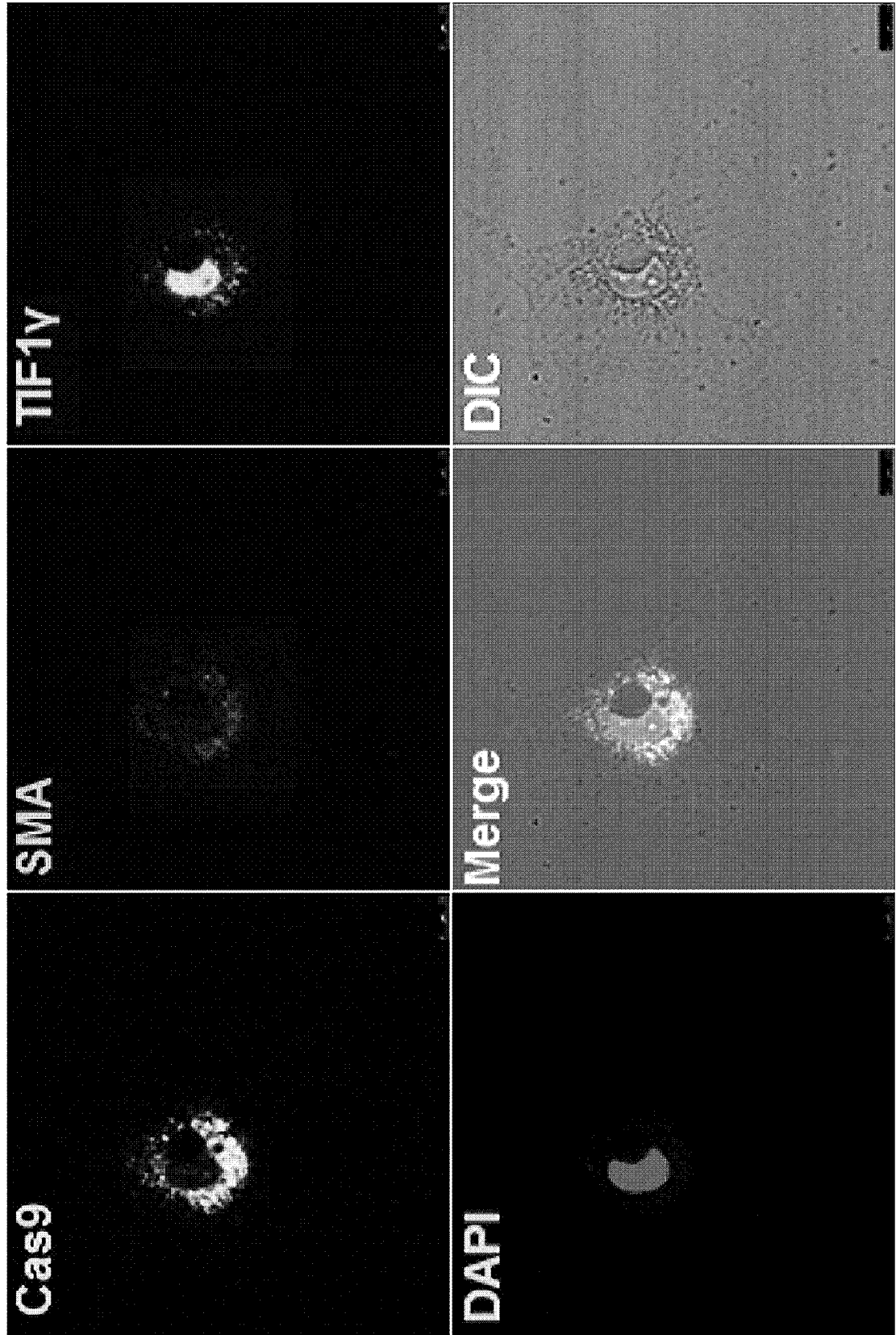


[도5]

Western blot

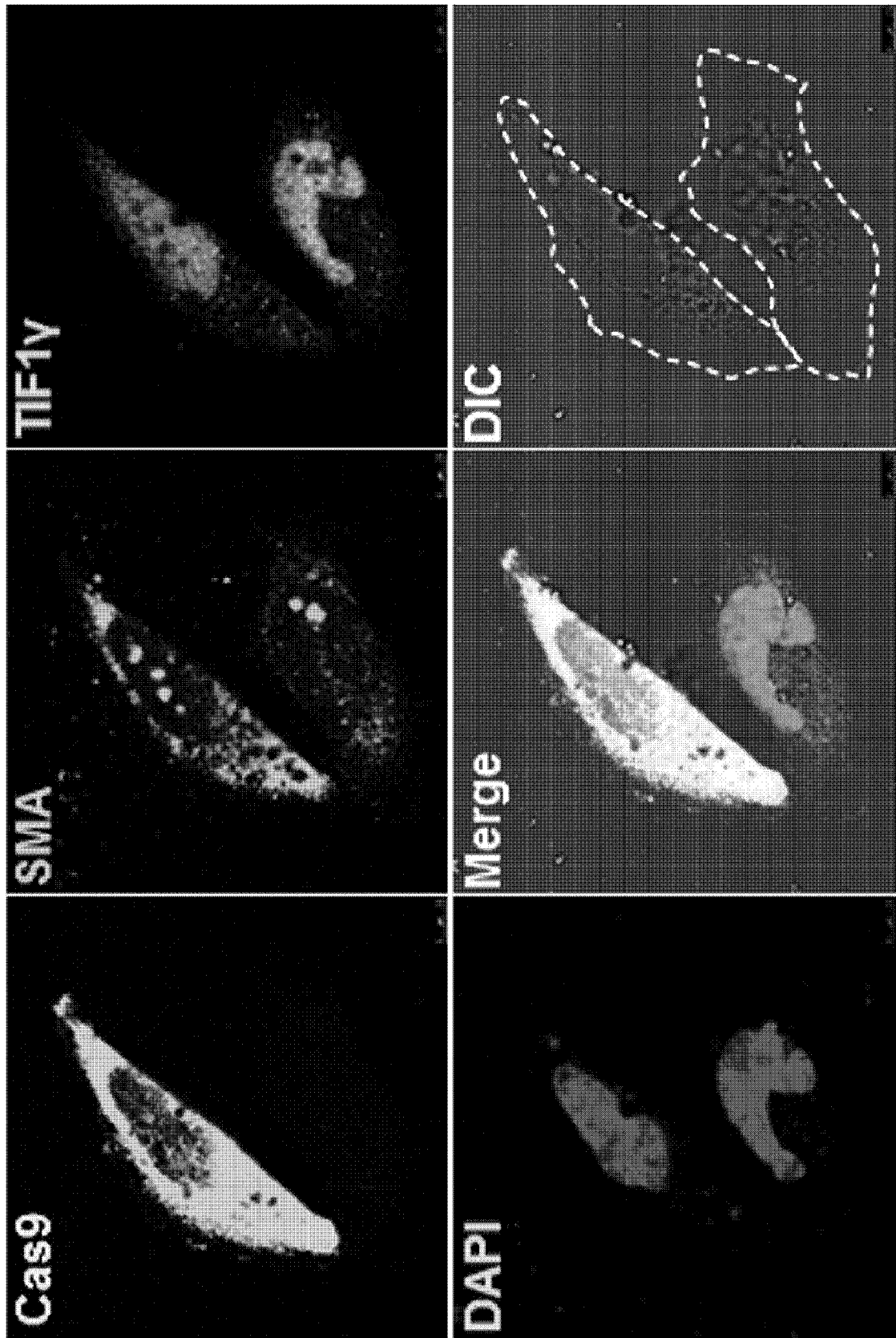
[도6a]

TMX를 처리하지 않았을 때

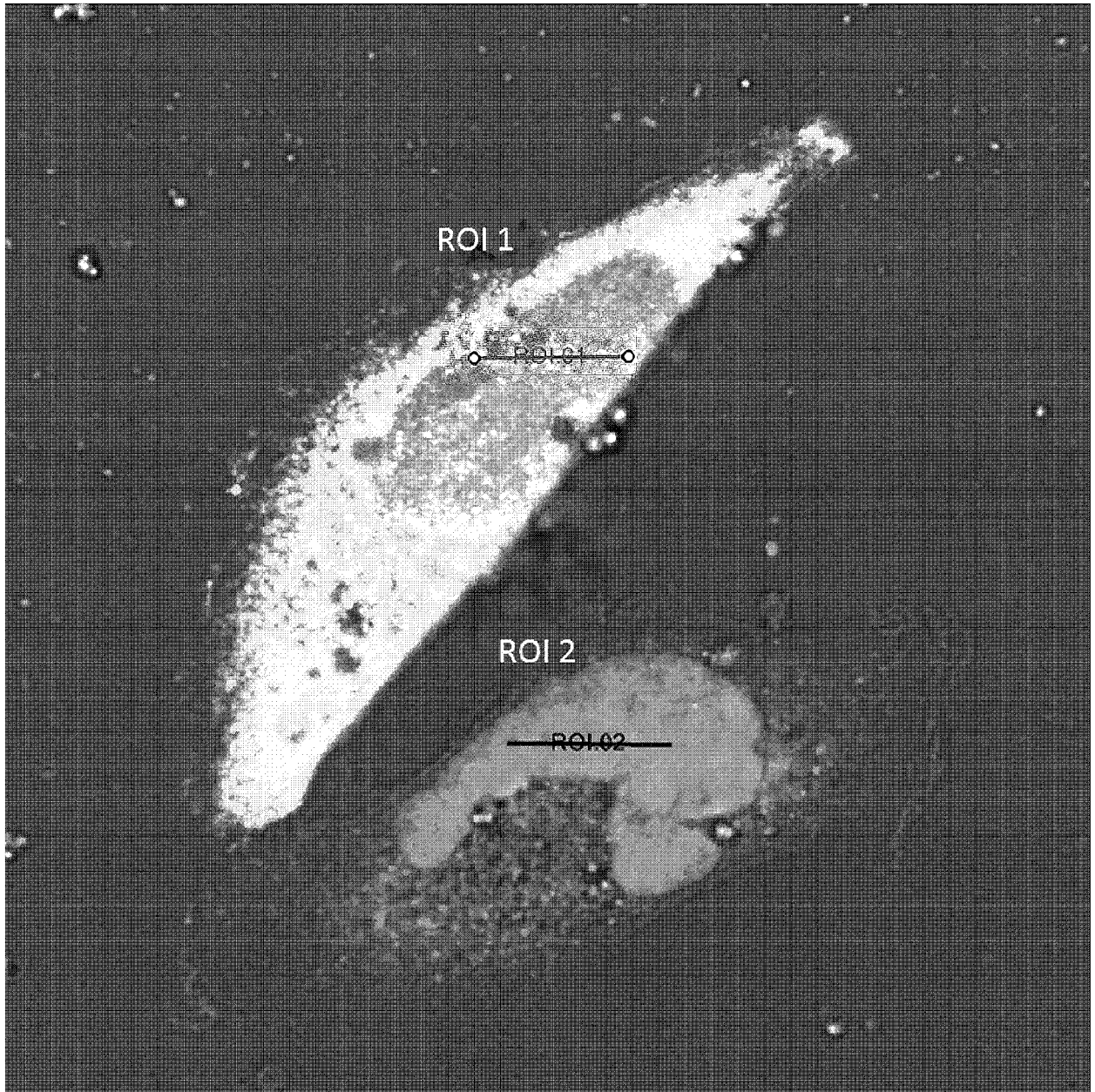


[도6b]

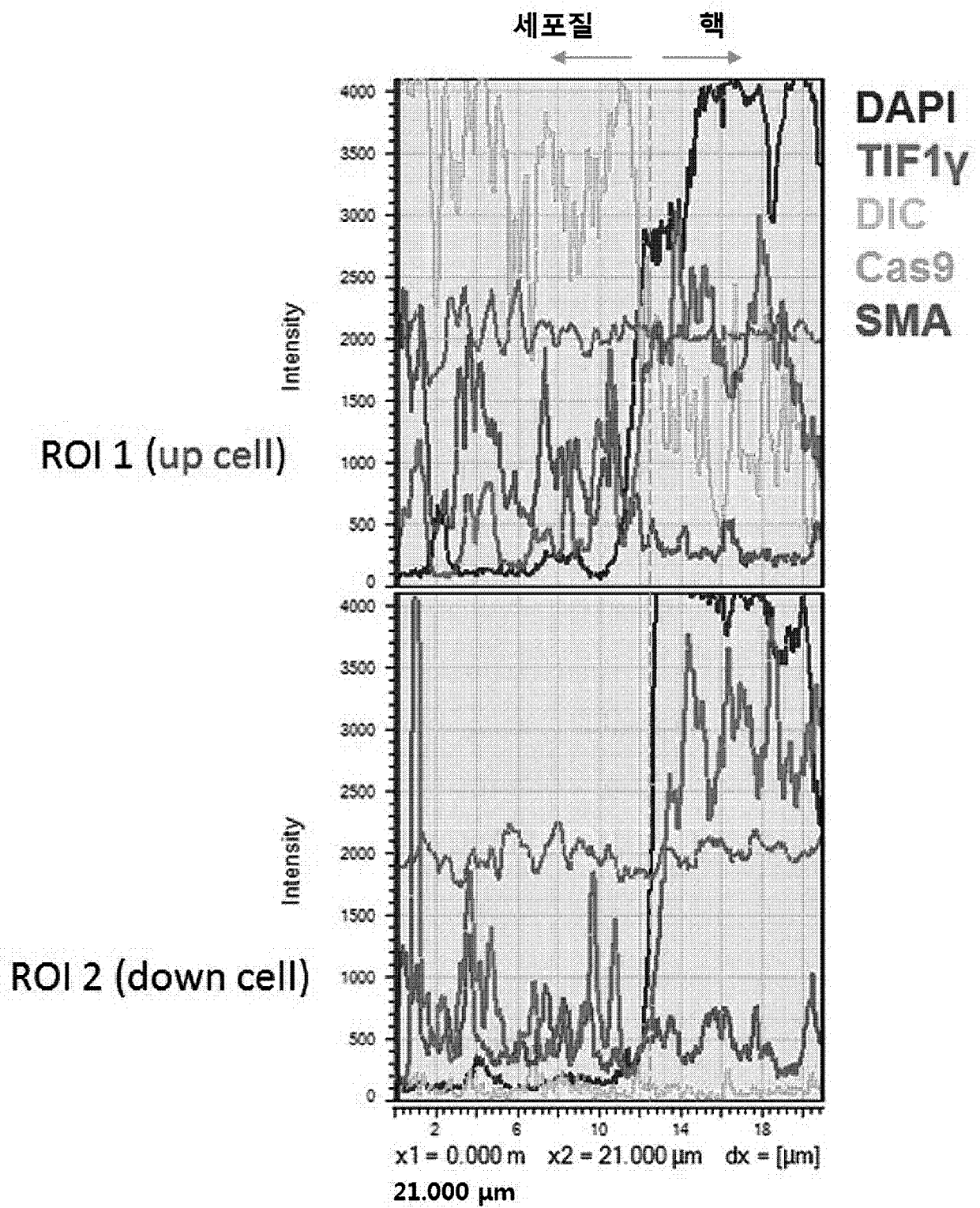
TMX를 처리하였을 때



[도7]



[58]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/006451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C07K 14/72(2006.01)i, A01K 67/027(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)

C12N 15/85; C40B 40/08; C40B 50/06; C12N 15/10; C12N 15/113; C12N 9/22; C07K 14/72; A01K 67/027

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: TIF1r, gRNA, Cas9, ERT2, U6, LRAT, hepatic fibrosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Addgene: pPB-US-ECasE, 07 December 2016, inner pages 1-4 Retrieved from the Internet (URL: https://www.addgene.org/83961/) See pages 1, 3, 4.	1-7
Y	HERQUEL, B. et al., "Transcription Cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 Associate to Form Regulatory Complexes that Suppress Murine Hepatocellular Carcinoma", PNAS, 2011, vol. 108, no. 20, pages 8212-8217 See abstract.	1-7
Y	GREENHALGH, S. N. et al., "Cre-activity in the Liver: Transgenic Approaches to Targeting Hepatic Nonparenchymal Cells", Hepatology, 2015, vol. 61, no. 6, pages 2091-2099 See pages 2094-2095.	2,5-7
A	NCBI, Genbank accession no.: KJ1175229.1 (07 April 2014) See the entire document.	1-7
A	WO 2015-100929 A1 (PEKING UNIVERSITY) 09 July 2015 See the entire document.	1-7



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

15 OCTOBER 2018 (15.10.2018)

Date of mailing of the international search report

15 OCTOBER 2018 (15.10.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/006451

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-100929 A1	09/07/2015	CN 103668472 A	26/03/2014
		CN 103668472 B	24/12/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C07K 14/72(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85; C40B 40/08; C40B 50/06; C12N 15/10; C12N 15/113; C12N 9/22; C07K 14/72; A01K 67/027

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: TIF1r, gRNA, Cas9, ERT2, U6, LRAT, 간염유화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	Addgene: pPB-US-ECasE, 2016.12.07, 내부페이지 1-4 인터넷 입수 (URL: https://www.addgene.org/83961/) 페이지 1, 3, 4 참조.	1-7
Y	HERQUEL, B. 등, 'Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma' PNAS, 2011년, 108권, 20호, 페이지 8212-8217 초록 참조.	1-7
Y	Greenhalgh, S. N. 등, 'Cre-activity in the liver: transgenic approaches to targeting hepatic nonparenchymal cells' Hepatology, 2015년, 61권, 6호, 페이지 2091-2099 페이지 2094-2095.	2,5-7
A	NCBI, Genbank accession no. : KJ175229.1 (2014.04.07) 전체 문헌 참조.	1-7
A	WO 2015-100929 A1 (PEKING UNIVERSITY) 2015.07.09 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 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 이후
에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신
규성 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 발명
은 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

2018년 10월 15일 (15.10.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 10월 15일 (15.10.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



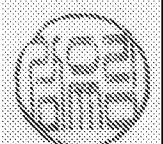
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2015-100929 A1

2015/07/09

CN 103668472 A

2014/03/26

CN 103668472 B

2014/12/24