(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 9 월 12 일 (12.09.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/133643 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/001847

(22) 국제출원일: 2013 년 3 월 7 일 (07.03.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0023638 2012 년 3 월 7 일 (07.03.2012) KR

(71) 출원인: **한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 대학로 291(구성동), Daejeon (KR).

(72) 발명자: **허원도 (HEO, Won Do)**; 305-701 대전시 유성구 구성동 한국과학기술원 생명과학과, Daejeon (KR). **장기영 (CHANG, Ki Young)**; 305-701 대전시 유성구 구성동 한국과학기술원 생명과학과 4214 호, Daejeon (KR). **우도연 (WOO, Do Yeon)**; 305-701 대전시 유성구 구성동 한국과학기술원 케이아이빌딩 에이 419 호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **한윤호 (HAN, Yun-Ho)** 등; 137-873 서울시 서초구 서초동 1551-5 석천빌딩 4 층 율민국제특허법률사무소, Seoul (KR).

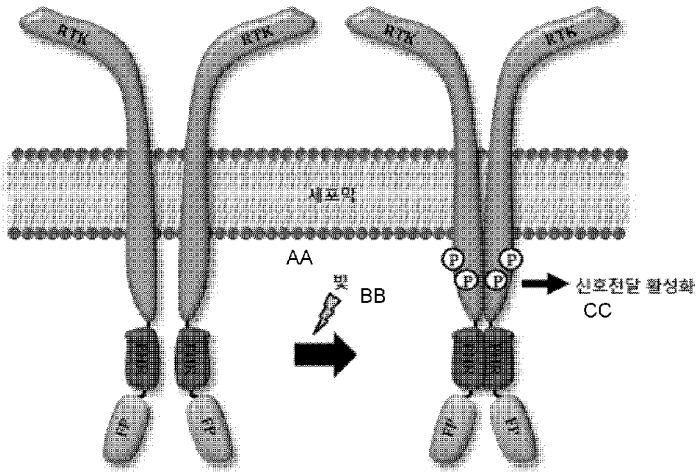
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: FUSION PROTEIN FOR ACTIVATING RTK SIGNAL TRANSMISSION BY MEANS OF LIGHT, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 빛에 의해 RTK 신호전달을 활성화하는 융합단백질 및 그의 용도



DD RTK: 수용체 타이로신 인산화효소

EE PHR: Cryptochrome 2의 N-말단 (동형 이합체 형성 단백질)

FF FP: 형광단백질

AA ... Cell membrane
BB ... Light
CC ... Signal transmission activation
DD ... RTK: Receptor tyrosine kinase
EE ... PHR: N-terminal of cryptochrome 2 (homodimer forming protein)
FF ... FP: Fluorescent protein

(57) **Abstract**: The present invention relates to a fusion protein for reversibly activating RTK signal transmission by means of light and relates to a use thereof, and the invention provides a fusion protein in which a light induced dimer forming protein is coupled to the C-terminal of a receptor tyrosine kinase (RTK) protein or a modified RTK protein which has been modified so as to eliminate a ligand binding site of the RTK protein or ensure that the ligand does not bind.

(57) **요약서**: 본 발명은 빛에 의해 RTK 신호전달을 가역적으로 활성화하는 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것으로서, 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 제공한다.

WO 2013/133643 A1

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(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))

명세서

발명의 명칭: 빛에 의해 RTK 신호전달을 활성화하는 융합단백질 및 그의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 빛에 의해 RTK 신호전달을 활성화하는 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 수용체 타이로신 인산화효소(RTK, Receptor Tyrosine Kinase)는 성장인자(Growth Factor), 사이토카인(Cytokine), 및 호르몬(Hormone) 등과 같은 다양한 펩티드와 결합하는 세포 표면의 수용체이다. RTK의 세포외 도메인(extracellular domain)에 상술한 펩티드가 결합하면 인접한 RTK와 이합체(dimerization)의 형성이 일어나며, 이후 세포내 도메인(intracellular domain)에 존재하는 티로신(Tyrosine)기의 자동적 인산화 과정이 일어난다(수용체의 활성화). 그 결과, 여러 신호전달과정을 거쳐 정상 세포의 DNA 합성, 세포의 성장, 증식, 전이, 혈관형성, 세포사멸의 억제뿐만 아니라 다양한 암의 진행 및 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이에, RTK 신호전달을 표적으로 하는 다양한 암 치료제 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 예를 들어, 한국 공개특허 제10-2006-0132965호 및 한국 공개특허 제 10-1996-7002442호는 특정 화합물의 타이로신 인산화효소 활성 저해효과를 통하여 고형 종양 및 혈관신생과 관련된 질병을 치료할 수 있는 방법을 개시하고 있다. 또한, RTK 신호전달을 억제에 의한 비소세포암(nonsmall cell lung cancer) 치료 효과(Niels *et al., International Journal of Cancer*, 119(4), 727?734, 2006), RTK 하부 신호전달 과정인 MAPK, PI3K 신호전달의 억제에 의한 난소암 및 암 치료 효과가 공개되어 있다(Helen *et al., Biochemical Pharmacology*, 72(8), 941-948, 2006; Jeffrey *et al., Nature Reviews Cancer*, 9, 550-562, 2009).

[3] 화합물 유도체에 의한 이합체 형성(chemical inducers of dimerization, CID)은 낮은 분자량의 유기 분자를 이용하여 세포의 단백질 활성을 연구하는 방법을 말한다. FK506, 사이클로스포린(Cyclosporin) 및 라파마이신(Rapamycin)등의 자연 산물 및 이들의 합성 파생물이 FKBP12(FK506-binding protein 12)의 이뮤노필린(immunophilin) 도메인, 사이클로필린(cyclophilin) 및 FKBP-라파마이신 연관 단백질(FKBP?rapamycin associated protein, FRAP)의 FKBP12-라파마이신-결합(FKBP12-rapamycin-binding, FRB) 도메인과 결합하는 특성을 이용하여(Crabtree *et al., Trends. Biochem. Sci.*, 21:418-422, 1996), 연구 대상이 되는 단백질에 이뮤노필린 도메인 등을 융합시킨 후, 라파마이신과 같은 화합물을 처리하여 연구 대상 단백질의 이합체 형성을 유도시켜 상기 단백질이 매개하는 신호전달 기작을 연구하였다. 이러한 CID의 특성을 이용하여 T-세포

수용체(Spencer *et al., Science*, 262:1019-1024, 1993; Pruschy *et al., Chem. Biol.*, 1:163-172, 1994), Fas(Belshaw *et al., Chem. Biol.*, 3:731-738, 1996; Spence et al., Curr. Biol., 6:839-847, 1996), 카드헤린(Cadherin)(Yap *et al., Curr. Biol.*, 7:308-315, 1997), 및 에리스로포이에틴(erythropoietin) 수용체(Blau *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 94:3076-3081, 1997) 매개의 신호 전달과정이 연구된 바 있으며, 세포 내 단백질인 Src(Spencer *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 92:9805-9809, 1995), Sos(Holsinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 92:9810-9814, 1995), Raf(Luo *et al., Nature*, 383:181-185, 1996), 및 Zap(Graef *et al., EMBO J.*, 16:5618-5628, 1997)의 신호전달 기전이 연구된 바 있다. 그러나 현재 알려진 CID로 이용할 수 있는 화합물 및 이와 결합하는 단백질의 종류가 매우 적으며, 화합물에 의한 이합체 형성과 인산화 효소 활성 수준을 조절하는데 어려움이 있으며, 세포 내 또는 생체 내에서 화학 리간드가 이합체형성 뿐만 아니라 세포 혹은 생체 내의 다양한 신호전달 과정에 관여할 수 있으므로 활용에 한계가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 그러나, 종래 방법들은 시험관 내(*in vitro*) 수준에서 RTK 및 이의 하부단계 신호 전달 기작의 규명 및 상기 신호전달 활성을 특이적으로 저해할 수 있는 저해제 탐색을 이용하고 있어, 비용 및 연구 개발 시간의 측면에서 산업상 이용가능성이 낮으며, 시험관내 조건에서만 사용될 수 있고, 비가역적인 반응을 유발한다는 단점을 가지고 있다.

[5] 본 발명은 상기 문제점을 포함한 다양한 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 시험관내 조건은 물론 생체 내(*in vivo*) 조건에서도 사용가능하고, 빛에 의하여 선택적이면서 가역적으로 RTK 신호전달을 활성화시킬 수 있는 융합단백질 및 그의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 더 나아가, 생체 내 RTK 신호전달의 기작, 이를 이용한 암을 포함한 다양한 질병의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명의 일 관점에 따르면, 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질이 제공된다.

[7] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질은 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, RTK 클래스 I), 인슐린 수용체(Insulin Receptor, RTK 클래스 II), 혈소판 유래 성장인자 수용체(Platelet-derived growth factor receptor, RTK 클래스 III), 섬유아세포증식인자 수용체(Fibroblast growth factor receptor, RTK 클래스 IV),

혈관내피세포성장인자 수용체(Vascular endothelial cell growth factor receptor, RTK 클래스 V), 간세포 성장인자 수용체(Hepatocyte growth factor receptor, RTK 클래스 VI), TRK 수용체(Tropomyosin-receptor-kinase receptor, RTK 클래스 VII), EPH 수용체(RTK 클래스 VIII), AXL 수용체(RTK 클래스 IX), LKT 수용체(RTK 클래스 X), TIER 수용체(RTK 클래스 XI), 수용체 타이로신 인산화 효소-유사 오펀 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RTK 클래스 XII), 디스코이딘 도메인 수용체(Discoidin domain receptor, RTK 클래스 XIII), RET 수용체(RTK 클래스 XIV), KLG 수용체(RTK 클래스 XV), RYK 수용체(related to receptor tyrosine kinase, RTK 클래스 XVI), 및 MuSK 수용체(Muscle-Specific Kinase Receptor, RTK 클래스 XVII)일 수 있다.

[8] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 광유도 이합체 형성 단백질은 광유도 이형이합체 형성 단백질 및/또는 광유도 동형이합체 형성단백질일 수 있다. 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), Phy(phytochrome), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1), GIGANTEA, CRY(chryptochrome) 또는 PHR(phytolyase homolgous region)일 수 있고, 상기 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR일 수 있다. 종래에는 CRY 또는 PHR은 광조사와 무관하게 동형이합체를 형성하는 것으로 알려졌으나, 본 발명자에 의해 광조사에 의해 동형이합체를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, CRY 또는 PHR은 광조사에 의해 이형이합체를 형성할 뿐만 아니라 동형이합체도 형성할 수 있는 단백질이다.

[9] 아울러, 상기 융합단백질에 있어서, 형광단백질이 추가로 연결될 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 RTK 단백질 또는 상기 RTK 변이체 단백질과 연결된 상기 광유도 이합체 형성 단백질의 C-말단에 연결될 수 있다. 상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)일 수 있다. 여기서, 상기 녹색형광단백질은 EGFP(enhanced green fluorescent protein), Emerald(Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509-544, 1998), Superfolder(Pedelacq *et al.*, *Nat. Biotech.*, 24: 79-88, 2006), GFP(Prendergast *et al.*, *Biochem.*, 17(17): 3448-3453, 1978), Azami Green(Karasawa, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278: 34167-34171, 2003), TagGFP(Evrogen, Russia), TurboGFP(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), ZsGreen(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999) 또는 T-Sapphire(Zapata-Hommer *et al.*, *BMC Biotechnol.*, 3:5, 2003)일 수 있고, 상기 황색형광단백질은 EYFP(enhanced yellow fluorescent protein, Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509-544, 1998), Topaz(Hat *et al.*,

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1: 627-633, 2002), Venus(Nagai *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 20(1): 87-90, 2002), mCitrine(Griesbeck *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 29188-29194, 2001), Ypet(Nguyet and Daugherty, *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 355-360, 2005), TagYFP(Evrogen, Russia), PhiYFP(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), ZsYellow1(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999) 또는 mBanana(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004)일 수 있으며, 상기 적색형광단백질은 mRuby(Kredel *et al.*, *PLoS ONE*, 4(2):e4391, 2009), mApple(Shaner *et al.*, *Nat. Methods*, 5(6): 545-551, 2008), mStrawberry(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), AsRed2(Shanner *et al.*, *Nat. Biotehcnol.*, 22: 1567-1572, 2004) 또는 mRFP(Campbell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(12): 7877-7882, 2002)일 수 있고, 상기 주황형광단백질은 Kusabira Orange(Karawawa *et al.*, *Biochem. J.*, 381(Pt 1): 307-312, 2004), Kusabira Orange2(MBL International Corp., Japan), mOrange(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), mOrange2(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dTomato(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dTomato-Tandem(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), TagRFP(Merzlyak *et al.*, *Nat. Methods*, 4(7): 555-557, 2007), TagRFP-T(Shaner *et al.*, *Nat. Methods*, 5(6): 545-551, 2008), DsRed(Baird *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11984-11989, 1999) DsRed2(Clontech, USA), DsRed-Express(Clontech, USA), DsRed-Monomer(Clontech, USA) 또는 mTangerine(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004)일 수 있으며, 상기 청록색형광단백질은 ECFP(enhanced cyan fluorescent protein, Cubitt *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 20: 448-455, 1995), mECFP(Ai *et al.*, *Biochem. J.*, 400(3): 531-540, 2006), mCerulean(Koushik *et al.*, *Biophys. J.*, 91(12): L99-L101, 2006), CyPet(Nguyet and Daugherty, *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 355-360, 2005), AmCyan1(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999), Midori-Ishi Cyan(Karawawa *et al.*, *Biochem. J.*, 381(Pt 1): 307-312, 2004), TagCFP(Evrogen, Russia) 또는 mTFP1(Ai *et al.*, *Biochem. J.*, 400(3): 531-540, 2006)일 수 있고, 상기 청색형광단백질은 EBFP(enhanced blue fluorescent protein, Clontech, USA), EBFP2(Ai *et al.*, *Biochemistry*, 46(20): 5904-5910, 2007), Azurite(Mena *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24: 1569-1571, 2006) 또는 mTagBFP(Subach *et al.*, *Chem. Biol.*, 15(10: 1116-1124, 2008)일 수 있고, 상기 원적색형광단백질은 mPlum(Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 16745-16749, 2004), mCherry(Shanner *et al.*, *Nat. Biotehcnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dKeima-Tandem(Kogure *et al.*, Methods, 45(3): 223-226, 2008), JRed(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), mRaspberry(Shanner *et al.*, *Nat. Biotehcnol.*, 22: 1567-1572, 2004), HcRed1(Fradkov *et al.*, *Biochem. J.*, 368(Pt 1): 17-21, 2002), HcRed-Tandem(Fradkov *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22(3): 289-296, 2004) 또는 AQ143(Shkrob *et al.*, *Biochem. J.*, 392: 649-654, 2005)일 수 있으며, 상기

테트라시스테인 모티프는 Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys(서열번호 1)의 서열을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 Xaa는 시스테인을 제외한 아미노산일 수 있다.

[10] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[11] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 상기 벡터는 상기 융합단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현벡터일 수 있다.

[12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 숙주 세포를 형질전환시킨 형질전환 숙주세포가 제공된다. 상기 형질전환 숙주세포는 상기 융합단백질을 세포질 내에 발현할 수 있다.

[13] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 비인간 형질전환 동물이 제공된다.

[14] 상기 비인간 형질전환 동물은 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물일 수 있고 상기 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 곤충류는 초파리(*Drosophila*)일 수 있고, 상기 선형동물은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)일 수 있으며, 상기 어류는 지브라피쉬(zebrafish)일 수 있고, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있고, 상기 설치목은 래트 또는 마우스일 수 있다.

[15] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 형질전환 식물이 제공된다. 상기 형질전환 식물은 겉씨식물 또는 속씨식물일 수 있고, 상기 속씨식물은 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물일 수 있으며, 상기 외떡잎 식물은 벼과, 나리과 또는 난초과일 수 있고, 상기 쌍떡잎 식물은 콩과, 박과, 국화과, 가지과, 장미과 또는 십자화과일 수 있으며, 상기 콩과는 대두, 녹두, 완두, 또는 팥일 수 있고, 상기 박과는 박, 수박, 호박, 오이, 멜론 또는 참외일 수 있으며, 상기 국화과는 국화, 상추, 민들레, 쑥갓 또는 쑥일 수 있고, 상기 가지과는 담배, 고추, 가지, 토마토일 수 있으며, 상기 장미과는 사과, 배, 복숭아, 장미 또는 딸기일 수 있고, 상기 십자화과는 무우, 배추, 유채, 갓, 고추냉이(horseradish) 또는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)일 수 있다.

[16] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 형질전환 숙주세포 준비단계; 및 상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는

파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 RTK를 가역적으로 활성화시키는 방법이 제공된다.

[17] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물을 준비하는 형질전환 동물 준비단계; 및 상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는 조직에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 RTK를 가역적으로 활성화시키는 방법이 제공된다.

[18] 상기 방법에 있어서, 상기 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질은 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, RTK 클래스 I), 인슐린 수용체(Insulin Receptor, RTK 클래스 II), 혈소판 유래 성장인자 수용체(Platelet-derived growth factor receptor, RTK 클래스 III), 섬유아세포증식인자 수용체(Fibroblast growth factor receptor, RTK 클래스 IV), 혈관내피세포성장인자 수용체(Vascular endothelial cell growth factor receptor, RTK 클래스 V), 간세포 성장인자 수용체(Hepatocyte growth factor receptor, RTK 클래스 VI), TRK 수용체(Tropomyosin-receptor-kinase receptor, RTK 클래스 VII), EPH 수용체(RTK 클래스 VIII), AXL 수용체(RTK 클래스 IX), LKT 수용체(RTK 클래스 X), TIER 수용체(RTK 클래스 XI), 수용체 타이로신 인산화 효소-유사 오펀 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RTK 클래스 XII), 디스코이딘 도메인 수용체(Discoidin domain receptor, RTK 클래스 XIII), RET 수용체(RTK 클래스 XIV), KLG 수용체(RTK 클래스 XV), RYK 수용체(related to receptor tyrosine kinase, RTK 클래스 XVI), 및 MuSK 수용체(Muscle-Specific Kinase Receptor, RTK 클래스 XVII)일 수 있다.

[19] 상기 방법에 있어서, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR일 수 있다.

[20] 상기 방법에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포일 수 있고, 상기 동물세포는 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물 유래의 것일 수 있고, 상기 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 곤충류는 초파리(*Drosophila melanogaster*)일 수 있고, 상기 선형동물은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)일 수 있으며, 상기 어류는 지브라피쉬(zebrafish)일 수 있고, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있고, 상기 설치목은 래트 또는 마우스일 수 있다.

[21] 상기 방법에 있어서, 상기 융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 RTK 단백질 또는 상기 RTK 변이체 단백질과 연결된 상기 광유도 이합체 형성 단백질의 C-말단에 연결될 수 있다. 상기 형광단백질은 상술한 바와 같다.

[22] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 형질전환 숙주세포 준비단계; 상기 배양중인 형질전환 숙주세포의 배지에 후보물질을 처리하는 후보물질 처리단계; 상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계; 및 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 광조사에 의하여 RTK 신호전달을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 RTK 신호전달 억제제 후보물질 스크리닝 방법이 제공된다.

[23] 상기 방법에 있어서, 상기 후보물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 또는 혈장일 수 있다.

[24] 상기 방법에 있어서, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR일 수 있다.

[25] 상기 방법에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포일 수 있고, 상기 동물세포는 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물 유래의 것일 수 있고, 상기 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 곤충류는 초파리(*Drosophila melanogaster*)일 수 있고, 상기 선형동물은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)일 수 있으며, 상기 어류는 지브라피쉬(zebrafish)일 수 있고, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있고, 상기 설치목은 래트 또는 마우스일 수 있다.

[26] 상기 방법에 있어서, 상기 융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 RTK 단백질 또는 상기 RTK 변이체 단백질과 연결된 상기 광유도 이합체 형성 단백질의 C-말단에 연결될 수 있다. 상기 형광단백질은 상술한 바와 같다.

발명의 효과

[27] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 동물 또는 식물의 세포 내에서 RTK 신호전달 과정을 특이적으로 그리고 가역적으로 조절할 수

있다. 물론 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 빛에 의해 RTK 신호전달을 활성화하는 융합단백질의 기전을 개략적으로 도시한 개요도이다:

[29] RTK: 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase);

[30] PHR:크립토크롬(chryptochrome) 단백질의 N-말단 부위로서, 파이토라이아제 상동성 지역(phytolyase homologous region)을 의미함; 및

[31] FP: 형광 단백질(fluorescent protein).

[32] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 MAPK 신호전달이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진(a) 및 광유도 시간에 따른 핵/세포질의 형광 세기 비율의 변화량을 나타낸 그래프(b)이다.

[33] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 PI3K 신호전달이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진(a) 및 광유도 시간에 따른 세포질의 형광 세기 변화량을 나타낸 그래프(b)이다.

[34] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 칼슘신호전달이 가역적으로 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다.

[35] 도 5는 상기 도 4에서 관찰한 칼슘신호전달 활성화를 광조사 시간에 따른 형광 세기 변화량으로 수치화한 그래프이다.

[36] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후, TrkB 특이적 저해제를 처리하였을 때, 광조사에 의하여 칼슘신호전달이 활성화되지 않는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다.

[37] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 발현하는 세포(TrkB-PHR-YFP, R-GECO)와 이를 발현하지 않는 세포(R-GECO)를 혼합 배양하였을 때, 광조사에 의하여 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 발현하는 세포에서만 선택적으로 칼슘 신호전달과정이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[38] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.

[39] 본 문서에서 사용되는 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)는 성장인자(Growth Factor), 사이토카인(Cytokine), 및 호르몬(Hormone) 등과 같은 다양한 펩티드와 결합하는 세포 표면의 수용체를 의미한다.

[40] 본 문서에서 사용되는 "광유도 이합체 형성 단백질(light-induced heterodimerized protein)"은 특정 파장의 빛을 조사할 경우 동형 이합체를 형성하거나 짝 단백질 이형이합체(heterodimer)를 형성하는 단백질을 의미한다.

[41] 본 문서에서 사용되는 "짝 단백질(partner protein)"은 특정 파장의 빛을 조사할 경우 광유도 이형이합체 형성 단백질과 상호작용하여 이형이합체를 형성하는 대상 단백질을 의미한다.

[42] 본 문서에서 사용되는 "이형이합체(heterodimer)"는 서로 다른 두 가지 단백질이 상호작용에 의해 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.

[43] 본 문서에서 사용되는 "동형이합체(homodimer)"는 같은 단백질이 서로 두 개가 상호작용하여 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.

[44] 본 문서에서 사용되는 "광유도 이합체 형성 단백질(light-induced heterodimerized protein)"은 특정 파장의 빛을 조사할 경우 동형 이합체를 형성하거나 짝 단백질 이형이합체(heterodimer)를 형성하는 단백질을 의미한다.

[45] 본 문서에서 사용되는 "이형이합체(heterodimer)"는 서로 다른 두 가지 단백질이 상호작용에 의해 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.

[46] 본 문서에서 사용되는 "동형이합체(homodimer)"는 같은 단백질이 서로 두 개가 상호작용하여 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.

[47] 본 문서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된(operably linked to)"은 특정 폴리뉴클레오티드가 그 기능을 발휘할 수 있게 다른 폴리뉴클레오티드에 연결된 것을 의미한다. 즉, 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되었다는 것은 당해 프로모터의 작용에 의해 mRNA로 전사되고 당해 단백질로 번역까지 될 수 있게 연결되었다는 것을 의미하고, 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 다른 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되었다는 것은 당해 특정 단백질이 다른 단백질과 융합단백질의 형태로 발현될 수 있게 연결되었다는 것을 의미한다.

[48] 본 문서에서 사용되는 "CIB"는 크립토크롬-상호작용 염기성 헬릭스-루프-헬릭스 단백질(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein)을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 CIB1(GenBank No.: NM_119618)가 있다.

[49] 본 문서에서 사용되는 "CIBN"은 상기 CIB의 N-말단으로서 광조사시 크립토크롬(cryptochrome, CRY)와 상호작용하는 부위를 의미한다.

[50] 본 문서에서 사용되는 "CRY"는 크립토크롬(chryptochrome) 단백질을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 CRY2(GenBank No.: NM_100320)가 있다.

[51] 본 문서에서 사용되는 "PHR"은 상기 CRY의 N-말단 부위로서 파이토라이아제 상동성 지역(phytolyase homologous region)을 의미하며, 광조사시 상기 CIB 또는 CIBN과 상호작용한다(Kennedy *et al.*, *Nat. Methods*, 7(12): 973-975, 2010).

[52] 본 문서에서 사용되는 "Phy"는 파이토크롬(phytochrome) 단백질을 의미하고, 대표적으로 애기장대의 PhyA(GenBank No.: NM_001123784), PhyB(GenBank No.: NM_127435) 등이 있으며, PIF(phytochrome interacting factor)와 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Min *et al.*, *Nature,* 400: 781-784, 1999)

[53] 본 문서에서 사용되는 "PIF"는 파이토크롬 상호작용 인자(phytochrome interacting factor)을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 PIF1(GenBank No.: NM_001202630), PIF3(GenBank No.: NM_179295), PIF4(GenBank No.: NM_180050), PIF5(GenBank No.: NM_180690), PIF6(GenBank No.: NM_001203231) 또는 PIF7(GenBank No.: NM_125520)이 있다.

[54] 본 문서에서 사용되는 "FKF"는 플라빈-결합, 켈치 반복, F-박스(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box) 단백질을 의미하고, 대표적으로 애기장대의 FKF1(GenBank No.: NM_105475)이 있으며, 광조사시 GIGANTEA 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Sawa *et al.*, *Science*, 318(5848): 261-265, 2007).

[55] 본 문서에서 사용되는 "GIGANTEA"는 파이토크롬 신호전달에 관련되어 있고, 꽃의 개화시기를 조절하는 단백질로 알려져 있다.

[56] 본 문서에서 사용되는 "테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)"는 Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys(서열번호 1)의 서열을 포함하는 폴리펩티드로서, Xaa는 시스테인을 제외한 아미노산으로서, 상기 Xaa의 종류와 폴리펩티드의 길이에 따라, 형광패턴이 달라진다(Adams *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 6063-6077, 2002).

[57] 본 문서에서 사용되는 "GECO"는 "Genetically Encoded Calcium indicators for Optical imaging(광학 영상화를 위해 유전학적으로 암호화된 칼슘 지시제)"의 약자로서, 칼모듈린의 칼슘 결합 도메인과 형광단백질의 융합단백질의 일종인 GCaMP3를 로저 캠벨(Roger Campbell) 박사 연구실에서 무작위 돌연변이를 통해 개발한 칼슘 센싱 단백질이며, "R-GECO"은 적색 형광단백질 기반의 칼슘 센싱 단백질로 칼슘 결합시 적색 형광이 약 16배 정도 증가하는 것으로 알려져 있다(Zhao *et al.*, *Science,* 333(6051): 1888-1891, 2011).

[58] 본 문서에서 사용되는 형질전환 식물 또는 형질전환 동물은 외래 유전자를 게놈 내에 도입하여 상기 외래 유전자를 발현하거나 또는 특정 유전자가 발현되지 않도록 결손시킨 유전자 조작된 식물 또는 동물을 의미한다. 형질전환 동물의 경우 통상의 경우 생식세포를 유전자 조작하여 제조될 수 있으나, 체세포에 대한 유전자 조작 이후 핵치환에 의한 복제동물 제조방법으로 제조될 수 있고, 형질전환 식물의 경우 더 간단하게, 체세포를 외래 유전자를 포함하는 아그로박테리아로 감염시킨 후 탈분화 및 재분화의 과정을 거쳐서 제조될 수 있다. 상기 형질전환 동물 및 형질전환 식물의 제조방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Jaenisch, R and B. Mintz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(4): 1250-1254, 1974; Cho *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 42: 19.11.1-19.11.22, 2009; Johnston, S. A. and D. C. Tang, *Meth. Cell Biol.*, 43 Pt A: 353-365, 1994; Sasaki *et al.*, *Nature* 459(7246): 523-527, 2009; Vaek *et al.*, *Nature*, 328(6125): 33-37, 1987).

[59] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 도면에 도시된 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 도면에서

도시된 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[60] 도 1은 빛에 의해 RTK 신호전달을 활성화하는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질의 기전을 개략적으로 도시한 개요도이다. 일반적으로 RTK의 세포외 도메인에 리간드가 결합하면 수용체끼리 이합체를 형성하고 인산화되어 세포 내 다양한 신호 전달과정을 활성화시킨다. 본 발명에서는 빛에 반응하여 동형 이합체를 형성할 수 있는 식물 빛 수용 단백질의 PHR을 RTK에 결합하여, 빛 자극의 유무에 따라 RTK의 이합체화를 조절함으로써 결과적으로 RTK 신호전달을 빛으로 조절할 수 있다.

[61] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 MAPK 신호전달이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진(a) 및 광유도 시간에 따른 핵/세포질의 형광 세기 비율의 변화량을 나타낸 그래프(b)이다. 광조사에 의하여 RTK가 활성화되어, 이의 하부 단계인 MAPK 신호전달이 정상적으로 활성화되는지를 확인하기 위하여, TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 ERK-mCherry 컨스트럭트를 제조하였다. 상기 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질전환한 후, 광조사를 한 결과 핵/세포질 형광 세기 비율이 광조사 후부터 시간에 따라 점진적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 MAPK 신호전달이 활성화될 때 세포질에 존재하던 ERK가 핵 내부로 이동함에 따라 관찰되는 현상으로, 광조사에 의하여 TrkB-MAPK 신호전달이 활성화되었음을 입증하는 것이다.

[62] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 PI3K 신호전달이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진(a) 및 시간에 따른 세포질의 형광 세기 비율 변화량을 나타낸 그래프(b)이다. 광조사에 의하여 RTK가 활성화되어, 이의 하부 단계인 PI3K 신호전달이 정상적으로 활성화되는지를 확인하기 위하여, TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 mCherry-PH_{akt} 컨스트럭트를 제조하였다. 상기 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질전환한 후, 광조사를 한 결과 세포질 형광 세기 비율이 광조사 후부터 시간에 따라 점진적으로 감소하고, 형광이 세포막으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 PI3K 신호전달이 활성화될 때 Akt의 PH 도메인이 세포막으로 이동하여 PIP3와 직접 접촉하여 관찰되는 현상으로, TrkB-PI3K 신호전달 과정이 활성화되었음을 입증하는 것이다.

[63] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 칼슘신호전달이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다. 광조사에 의하여 RTK가 활성화되어, 이의 하부 단계인 칼슘 신호전달이 정상적으로 활성화되는지를 확인하기 위하여, TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트를 제조하고 R-GECO 컨스트럭트를 구입하였다. 상기 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 세포를 형질전환한 후, 광조사를 한 결과, 광조사에 의하여

세포질 전반적으로 형광의 세기가 급격히 증가하며, 세포 내 칼슘의 유입이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 광조사를 중단하였을 때에는 형광의 세기가 감소되는 것이 관찰되었는데, 이러한 결과는 광조사에 의하여 칼슘신호전달의 활성이 가역적으로 조절될 수 있음을 입증한 것이다.

[64] 도 5는 도 4에서 관찰한 칼슘신호전달 활성화를 시간에 따른 형광 세기 변화로 수치화한 그래프이다. 도 4에서 공초점현미경 사진으로 관찰된 칼슘 유입정도를 빛이 조사되지 않을 때를 기준("1")값으로 하여 형광의 세기를 임의의 수치로 나타낸 것이다.

[65] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후, TrkB 특이적 저해제를 처리하였을 때, 광조사에 의하여 칼슘신호전달이 활성화되지 않는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다. 광조사에 의하여 RTK 신호전달만이 특이적으로 활성화된다는 것을 입증하기 위하여, TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 R-GECO 컨스트럭트를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포에 TrkB 특이적인 저해제를 처리한 후, 광조사를 하였다. 그 결과, TrkB 특이적 저해제인 K252a를 처리한 군에서는 광조사 전후의 칼슘 신호전달에 변화가 없는 것이 관찰되었다. 반면, K252a를 처리하지 않은 대조군에서는 광조사 유무에 따라 칼슘 신호전달에 변화가 관찰되었다. 이는 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질이 RTK 특이적인 신호전달 과정만을 활성화시킨다는 것을 입증한 것이다.

[66] 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 발현하는 세포(TrkB-PHR-YFP, R-GECO)와 이를 발현하지 않는 세포(R-GECO)를 혼합 배양하였을 때, 광조사에 의하여 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 발현하는 세포에서만 선택적으로 칼슘 신호전달과정이 활성화되는 것을 공초점현미경으로 촬영한 사진이다. 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질을 시험관 내(*in vitro*)에서 뿐만이 아니라, 조직 수준 또는 동물모델과 같은 생체 내(*in vivo*)에서 적용 가능성을 입증하고자, 상술한 바와 같이 2종류의 세포를 혼합배양한 후, 광조사하였다. 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이 TrkB-PHR-YFP를 발현하는 세포에서만 특이적으로 칼슘 신호전달이 활성화되는 것을 관찰할 수 있었다.

[67] 따라서, 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질이 조직, 동물 모델에 적용하여, RTK 관련 신호전달 기작, 세포의 발생, 성장 및 분화과정 및 동물 모델의 행동 실험 등에 유용하게 적용할 수 있음을 알 수 있다.

[68] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[69] **실시예 1: 벡터의 제작**

[70] **1-1: TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트의 제작**

[71] CRY2(GenBank 등록번호: NM_100320) PHR 부분(1-498)을 TrkB(GenBank 등록번호: NM_001163168)의 C-말단에 연결한 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제조한 후, 이를 EGFP-N1을 바탕으로 제조한 mCitrine-N1 벡터의 mCitrine N-말단에 상응하는 부위에 삽입하여, TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트를 제작하였다.

[72] **1-2: ERK-mCherry 컨스트럭트의 제작**

[73] ERK(GenBank 등록번호: NM_011952)의 full length에 상응하는 폴리뉴클레오티드를 pmCherry-N1 벡터(Clontech, USA)의 다중클로닝 부위에 프레임에 맞도록 삽입하여, ERK-mCherry 컨스트럭트를 제작하였다.

[74] **1-3: mCherry-PH_{Akt} 컨스트럭트의 제작**

[75] Akt(GenBank 등록번호:NM_001014431)의 PH 도메인(aa 2-147)에 상응하는 폴리뉴클레오티드를 pmCherry-C1 벡터(Clontech, USA)의 다중클로닝 부위에 프레임에 맞도록 삽입하여, mCherry-PH_{Akt} 컨스트럭트를 제작하였다.

[76] **실험예 1: 광유도에 의한 TrkB 하위단계 신호전달의 활성화 확인**

[77] 광유도에 의하여 본 발명의 융합단백질들의 TrkB 하위 단계의 신호전달을 활성화할 수 있는지를 확인하기 위하여, MAPK, PI3K, 및 칼슘 신호전달의 활성화 여부를 관찰하였다.

[78] 우선, MAPK 신호전달이 활성화되는지 확인하기 위하여 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 각각 제조한 TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 ERK-mCherry 컨스트럭트로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지에서 37, 10% CO_2 조건에서 배양하다가, 파장 488 nm의 빛의 조사 전후로 공초점현미경 이미지를 수득하는 한편(도 2a), 시간에 따른 핵과 세포질의 형광 세기 변화를 각각 측정한 후, 핵/세포질 형광세기 비율의 변화량의 비를 구하였다(도 2b). 그 결과, 광조사에 따라 핵에서의 형광세기가 강해지는 것이 관찰되었는데, 이는 활성화된 ERK가 핵 내부로 이동하기 때문이다. 이러한 결과는 TrkB의 하위 단계인 MAPK 신호전달이 광조사에 의하여 활성화되었음을 의미한다.

[79] 이어, 본 발명자들은 광조사에 의하여 본 발명의 융합단백질이 TrkB 하위 신호전달 과정을 활성화시킬 수 있는지 입증하기 위하여, TrkB의 대표적인 하부 단계 신호전달인 PI3K의 활성 여부를 관찰하였다. 상기 실시예 1-1 및 1-3에서 각각 제조한 TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 mCherry-PH_{Akt} 컨스트럭트로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지에서 37, 10% CO_2 조건에서 배양하다가, 파장 488 nm의 빛의 조사 전후로 공초점현미경 이미지를 수득하는 한편(도 3a), 시간에 따른 세포질에서의 형광세기 변화를 측정하였다(도 3b). 그 결과, 광조사 이후 mCherry-PH_{Akt} 컨스트럭트의 형광이 세포막으로 점진적으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 PI3K 신호전달이 활성화될 때 Akt의 PH 도메인이 세포막으로 이동하여 PIP3와 직접 접촉하여 관찰되는 현상으로, TrkB-PI3K 신호전달 과정이 활성화되었음을

의미한다.

[80] 아울러, 본 발명자들은 광조사에 의하여 본 발명의 융합단백질이 TrkB의 대표적인 하부 단계 신호전달인 칼슘 신호전달의 활성 여부를 관찰하였다. 상기 실시예 1-14에서 제조한 TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 R-GECO 컨스트럭트(Addgene, plasmid 32444: CMV-R-GECO1)로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지에서 37, 10% CO_2 조건에서 배양하다가, 파장 488 nm의 빛의 조사 전후로 공초점현미경 이미지를 수득하는 한편(도 4), 세포질에서의 R-GECO 형광세기를 측정하였다(도 5). 상기 R-GECO는 TrkB 하부 신호전달과정인 칼슘 신호전달 과정을 모니터링 할 수 있는 바이오센서로서, R-GECO가 발현하는 형광 세기를 광조사 유무에 따른 세포 내 칼슘 양의 증감을 확인하는데 이용하였다. 그 결과, 광조사에 의하여 R-GECO의 형광이 세포질 내에 전반적으로 증가하였으나 광조사를 제거하였을 때에는 감소하는 것이 관찰되었다. 또한, 도 5에 나타난 바와 같이 반복적으로 광조사를 하였을 때, 다시 세포질 전반에 R-GECO의 형광이 강하게 발현되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 광조사에 의하여 가역적으로 TrkB의 활성이 유도될 수 있음을 의미한다.

[81] 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 광조사에 의하여 활성화되며, RTK의 한 종류 TrkB 하부 단계의 신호 전달이 활성화됨을 최초로 규명한 것이다. 이는 다양한 RTK 중 TrkB를 예시적으로 선별한 결과이며, TrkB 이외의 다양한 RTK에 적용하여, RTK 관련 신호전달 기작, 세포의 발생, 성장 및 분화과정 및 동물 모델의 행동 실험 등에 유용하게 적용할 수 있음을 알 수 있다.

[82] **<u>실험예 2: 광유도에 의한 TrkB 특이적인 신호전달 활성화 확인</u>**

[83] 본 발명자들은 광조사에 의하여 RTK 특이적인 신호전달 과정만이 활성화되어, 이의 하부 단계에만 영향을 미친다는 것을 확인하기 위하여, RTK 특이적인 저해제를 전처리한 후, 광유도에 의한 하부 단계의 신호 활성화를 관찰하였다.

[84] 본 발명자들은 RTK 신호전달 활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 제조한 TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트를 예시적으로 사용하였다. 또한, RTK 하부 신호전달 과정 중 칼슘 신호전달의 활성 여부를 관찰하기 위하여, R-GECO 컨스트럭트(Addgene, plasmid 32444: CMV-R-GECO1)를 이용하였다. 구체적으로 상기 실시예 1-1에서 제조한 TrkB-PHR-YFP 컨스트럭트와 R-GECO 컨스트럭트로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지에서 37, 10% CO_2 조건에서 배양하다가, TrkB의 특이적 저해제로 알려진 K252a를(100 nM)을 30분 동안 처리한 후, 파장 488 nm의 빛의 조사 전후로 공초점현미경 이미지를 수득하였다. 이에 대한 대조군으로는 DMSO를 동일한 시간동안 처리한 후, 파장 488 nm의 빛의 조사 전후로 공초점현미경 이미지를 수득하여 비교하였다(도 6). 그 결과, 대조군과 TrkB 특이적 저해제인 K252a 처리군에서 TrkB-PHR-YFP의 발현이 정상적으로 관찰되었으나, K252a를

전처리한 세포에서는 광조사 전후의 R-GECO의 형광의 세기에 변화가 없었다. 그러나, K252a를 전처리하지 않은 대조군에서는 광조사의 유무에 따라 R-GECO 형광 세기에 변화가 관찰되었다. 이러한 결과는 본 발명의 융합단백질이 RTK 신호전달만을 특이적으로 활성화시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[85] 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 광조사에 의하여 활성이 유도되는 융합단백질을 조직 수준에 적용할 수 있는지 확인하고자, 실시예 1-1의 컨스트럭트와 R-GECO 컨스트럭트(Addgene, plasmid 32444: CMV-R-GECO1)를 동시에 발현하는 세포와, R-GECO 컨스트럭트컨스트럭트만을 발현하는 세포를 2:1의 비율로 혼합 배양하였다. 상기 실시예 1-1와 R-GECO 컨스트럭트를 (1:1)의 비율(각각 300 ng)로 혼합한 후 형질전환된 HeLa 세포에 파장 488 nm의 빛의 조사 전후, 공초점현미경 이미지를 수득하였다(도 7). 그 결과, TrkB-PHR-YFP와 R-GECO가 동시에 발현되는 세포(도 7의 화살표)에서만 광조사에 의하여 R-GECO의 형광 세기가 변화되었다. 이는 다양한 종류의 세포들이 섞여 있는 조직 수준에 본 시스템을 적용할 경우, 광조사에 의하여 TrkB-PHR-YFP를 발현하는 세포에서만 선택적이고 가역적으로 신호전달과정을 활성화시킬 수 있음을 입증하는 것이다.

[86] 따라서, 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질이 조직, 동물 모델에 적용하여, RTK 관련 신호전달 기작, 세포의 발생, 성장 및 분화과정 및 동물 모델의 행동 실험 등에 유용하게 적용할 수 있음을 알 수 있다.

[87] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

서열목록 Free Text

[88] 서열번호 1은 테르라시스테인 모티프를 의미한다.

청구범위

[청구항 1] 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질은 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, RTK 클래스 I), 인슐린 수용체(Insulin Receptor, RTK 클래스 II), 혈소판 유래 성장인자 수용체(Platelet-derived growth factor receptor, RTK 클래스 III), 섬유아세포증식인자 수용체(Fibroblast growth factor receptor, RTK 클래스 IV), 혈관내피세포성장인자 수용체(Vascular endothelial cell growth factor receptor, RTK 클래스 V), 간세포 성장인자 수용체(Hepatocyte growth factor receptor, RTK 클래스 VI), TRK 수용체(Tropomyosin-receptor-kinase receptor, RTK 클래스 VII), EPH 수용체(RTK 클래스 VIII), AXL 수용체(RTK 클래스 IX), LKT 수용체(RTK 클래스 X), TIER 수용체(RTK 클래스 XI), 수용체 타이로신 인산화 효소-유사 오펀 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RTK 클래스 XII), 디스코이딘 도메인 수용체(Discoidin domain receptor, RTK 클래스 XIII), RET 수용체(RTK 클래스 XIV), KLG 수용체(RTK 클래스 XV), RYK 수용체(related to receptor tyrosine kinase, RTK 클래스 XVI), 및 MuSK 수용체(Muscle-Specific Kinase Receptor, RTK 클래스 XVII)인, 융합단백질.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 광유도 이합체 형성 단백질은 광유도 이형이합체 형성 단백질 또는 광유도 동형이합체 형성단백질인, 융합단백질.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), Phy(phytochrome), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1), GIGANTEA, CRY(chryptochrome) 또는 PHR(phytolyase homolgous region)인, 융합단백질.

[청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY(chryptochrome) 또는 PHR(phytolyase homolgous region)인, 융합단백질.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
형광단백질을 추가적으로 포함하는, 융합단백질.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP),
황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP),
적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP),
주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP),
청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP),
청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP),
원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인
모티프(tetracystein motif)인, 융합단백질.

[청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 융합단백질을 암호화하는
폴리뉴클레오티드.

[청구항 9] 제8항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

[청구항 10] 제9항의 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨 형질전환 숙주세포.

[청구항 11] 제9항의 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현할 수 있는
비인간 형질전환 동물.

[청구항 12] 제9항의 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현할 수 있는
형질전환 식물.

[청구항 13] 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)
단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나
상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질
C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을
암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게
연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를
형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 형질전환
숙주세포 준비단계; 및
상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성
단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을
조사하는 광조사단계를 포함하는 RTK를 가역적으로
활성화시키는 방법.

[청구항 14] 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)
단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나
상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질
C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을
암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게
연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 형질전환되어
상기 융합단백질을 발현하는 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환

동물을 준비하는 형질전환 동물 준비단계; 및
상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는 조직에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 RTK를 가역적으로 활성화시키는 방법.

[청구항 15] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질은 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, RTK 클래스 I), 인슐린 수용체(Insulin Receptor, RTK 클래스 II), 혈소판 유래 성장인자 수용체(Platelet-derived growth factor receptor, RTK 클래스 III), 섬유아세포증식인자 수용체(Fibroblast growth factor receptor, RTK 클래스 IV), 혈관내피세포성장인자 수용체(Vascular endothelial cell growth factor receptor, RTK 클래스 V), 간세포 성장인자 수용체(Hepatocyte growth factor receptor, RTK 클래스 VI), TRK 수용체(Tropomyosin-receptor-kinase receptor, RTK 클래스 VII), EPH 수용체(RTK 클래스 VIII), AXL 수용체(RTK 클래스 IX), LKT 수용체(RTK 클래스 X), TIER 수용체(RTK 클래스 XI), 수용체 타이로신 인산화 효소-유사 오펀 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RTK 클래스 XII), 디스코이딘 도메인 수용체(Discoidin domain receptor, RTK 클래스 XIII), RET 수용체(RTK 클래스 XIV), KLG 수용체(RTK 클래스 XV), RYK 수용체(related to receptor tyrosine kinase, RTK 클래스 XVI), 및 MuSK 수용체(Muscle-Specific Kinase Receptor, RTK 클래스 XVII)인, 방법.

[청구항 16] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR인, 방법.

[청구항 17] 제13항에 있어서,
상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포인, 방법.

[청구항 18] 제13항 또는 제14항에 있어서,
상기 융합단백질은 형광단백질을 추가로 포함하는, 방법.

[청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP),
황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP),
적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP),
주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP),
청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP),
청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP),

원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)인, 방법.

[청구항 20] 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질 또는 상기 RTK 단백질의 리간드 결합 부위가 제거되거나 상기 리간드가 결합하지 않도록 변이된 RTK 변이체 단백질 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 형질전환 숙주세포 준비단계; 상기 배양중인 형질전환 숙주세포의 배지에 후보물질을 처리하는 후보물질 처리단계;
상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계; 및
후보물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 광조사에 의하여 RTK 신호전달을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 RTK 신호전달 억제제 후보물질 스크리닝 방법.

[청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 수용체 타이로신 인산화효소(Receptor Tyrosine Kinase, RTK) 단백질은 표피성장인자 수용체(Epidermal growth factor receptor, RTK 클래스 I), 인슐린 수용체(Insulin Receptor, RTK 클래스 II), 혈소판 유래 성장인자 수용체(Platelet-derived growth factor receptor, RTK 클래스 III), 섬유아세포증식인자 수용체(Fibroblast growth factor receptor, RTK 클래스 IV), 혈관내피세포성장인자 수용체(Vascular endothelial cell growth factor receptor, RTK 클래스 V), 간세포 성장인자 수용체(Hepatocyte growth factor receptor, RTK 클래스 VI), TRK 수용체(Tropomyosin-receptor-kinase receptor, RTK 클래스 VII), EPH 수용체(RTK 클래스 VIII), AXL 수용체(RTK 클래스 IX), LKT 수용체(RTK 클래스 X), TIER 수용체(RTK 클래스 XI), 수용체 타이로신 인산화 효소-유사 오펀 수용체(receptor tyrosine kinase-like orphan receptors, RTK 클래스 XII), 디스코이딘 도메인 수용체(Discoidin domain receptor, RTK 클래스 XIII), RET 수용체(RTK 클래스 XIV), KLG 수용체(RTK 클래스 XV), RYK 수용체(related to receptor tyrosine kinase, RTK 클래스 XVI), 및 MuSK 수용체(Muscle-Specific Kinase Receptor, RTK 클래스 XVII)인, 방법.

[청구항 22] 제20항에 있어서,
상기 후보물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물,

발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 또는 혈장인, 방법.

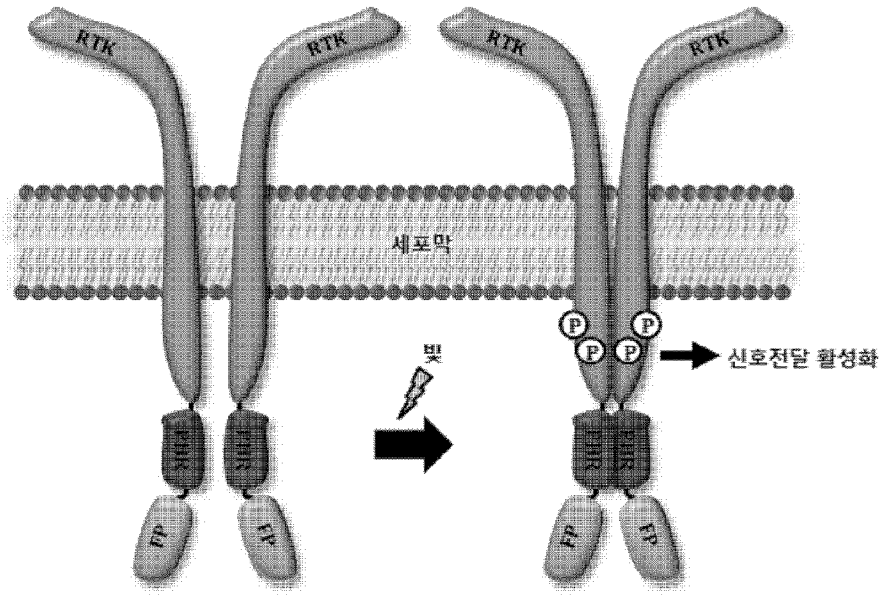
[청구항 23] 제20항에 있어서,
상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR인, 방법.

[청구항 24] 제20항에 있어서,
상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포인, 방법.

[청구항 25] 제20항에 있어서,
상기 융합단백질은 형광단백질을 추가로 포함하는, 방법.

[청구항 26] 제20항에 있어서,
상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP),
황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP),
적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP),
주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP),
청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP),
청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP),
원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)인, 방법.

[Fig. 1]



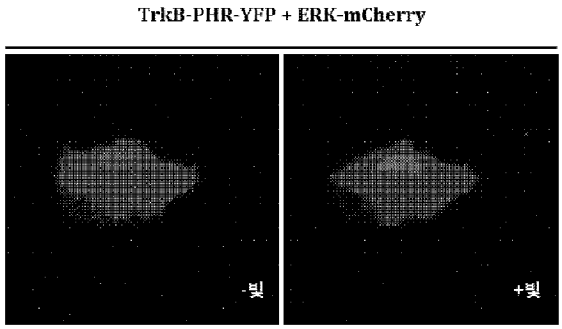
RTK: 수용체 타이로신 인산화효소

PHR: Cryptochrome 2의 N-말단 (동형 이합체 형성 단백질)

FP: 형광단백질

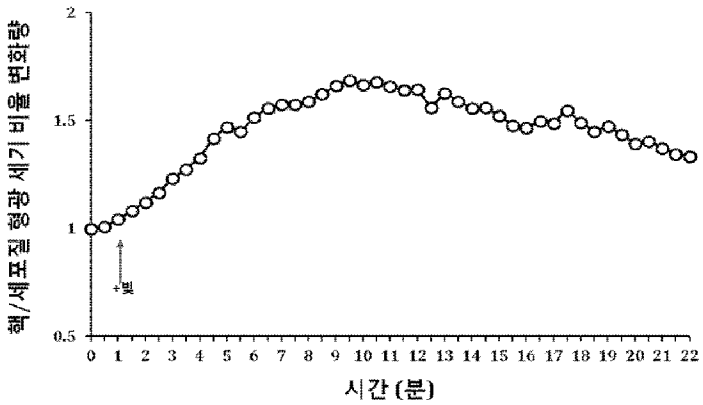
[Fig. 2]

a.

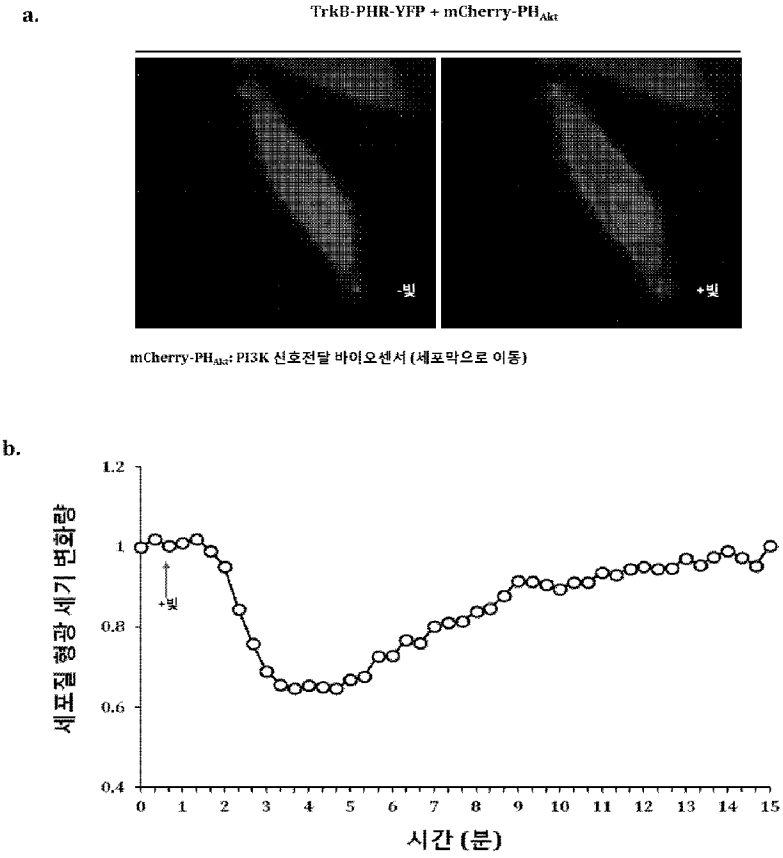


ERK-mCherry: MAPK 신호전달 바이오센서 (핵으로 이동)

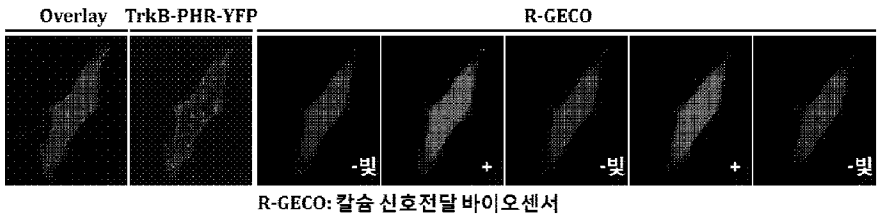
b.



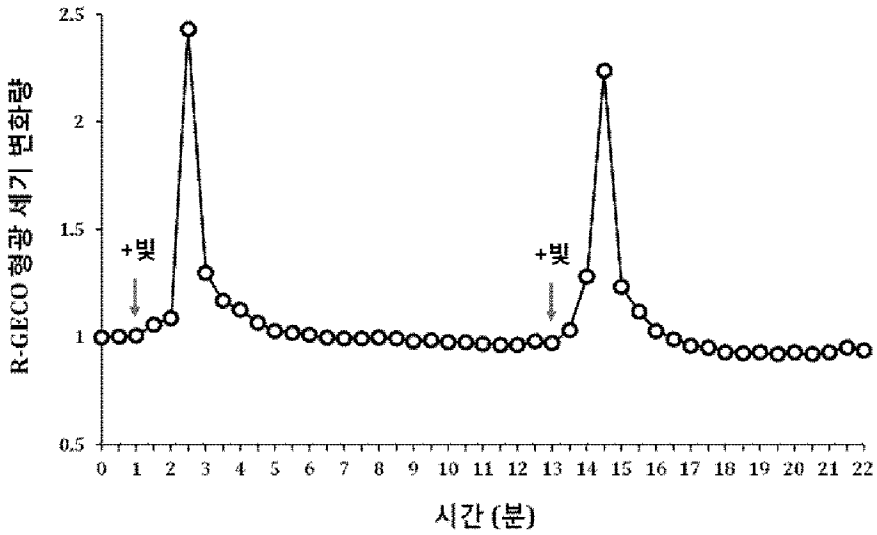
[Fig. 3]



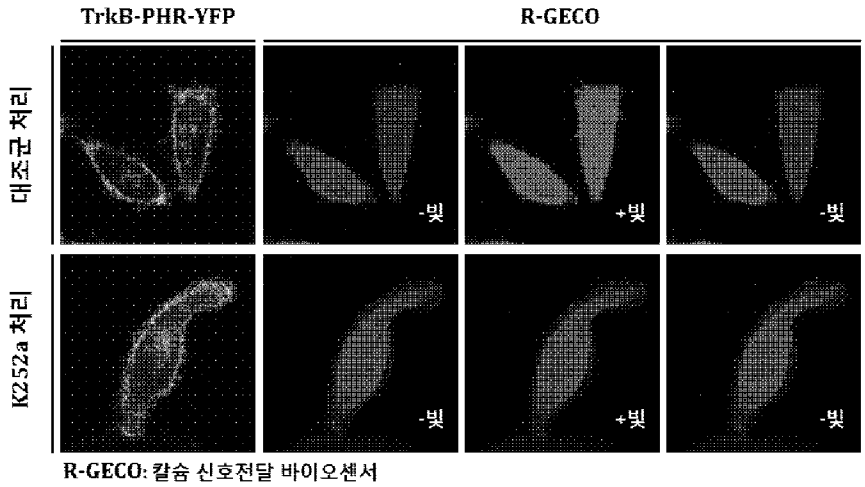
[Fig. 4]



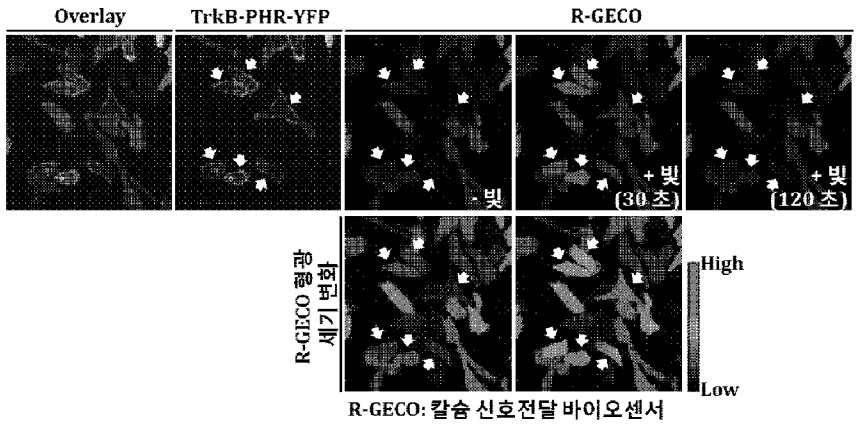
[Fig. 5]



[Fig. 6]


TrkB-PHR-YFP
R-GECO
대조군 처리
K252a 처리
-빛
+빛
-빛
-빛
+빛
-빛
R-GECO: 칼슘 신호전달 바이오센서

[Fig. 7]


Overlay
TrkB-PHR-YFP
R-GECO
- 빛
+ 빛 (30 초)
+ 빛 (120 초)
R-GECO 형광 세기 변화
High
Low
R-GECO: 칼슘 신호전달 바이오센서

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/001847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/82(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)

C07K 19/00; C12Q 1/02; C12N 5/00; C12N 5/02; C12N 1/19; C12N 15/62; C12N 15/85; C12N 15/82

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: receptor tyrosine kinase, fusion protein, dimer, photoreceptor, activation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MUTHSWAMY, S. K. et al., "Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers", Mol. Cell. Biol., October 1999, vol. 19, no. 10, pp. 6845-6857. See abstract and figure 1.	1-26
Y	KENNEDY, M. J. et al., "Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells", Nat. Methods, December 2010, vol. 7, no. 12, pp. 973-975. See abstract and figures 1-3.	1-26
A	US 7655463 B2 (SAH, D. W. Y. et al.) 02 February 2010 See abstract and claim 1.	1-26
A	US 7566528 B2 (GUNDE, T. et al.) 28 July 2009 See abstract and claim 1.	1-26

☐ 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	Date of mailing of the international search report
25 JULY 2013 (25.07.2013)	**26 JULY 2013 (26.07.2013)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

International application No.
PCT/KR2013/001847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7655463 B2	02/02/2010	AU 1999-47693 A1	24/01/2000
		AU 1999-47693 B2	05/12/2002
		AU 2002-240943 A2	24/09/2002
		AU 2002-240943 B2	10/05/2007
		CA 2336218 A1	13/01/2000
		CA 2440767 A1	19/09/2002
		CN 101113449 C0	30/01/2008
		CN 101113450 C0	30/01/2008
		CN 1311818 A0	05/09/2001
		CN 1509333 A	30/06/2004
		CN 1509333 C0	09/08/2006
		EP 1095140 A2	02/05/2001
		EP 1095140 B1	31/08/2011
		EP 1373503 A2	02/01/2004
		EP 1373503 B1	14/11/2007
		EP 1930439 A1	11/06/2008
		EP 1930439 B1	11/05/2011
		EP 2290079 A2	02/03/2011
		EP 2290079 A3	07/09/2011
		JP 03-738008 B2	25/01/2006
		JP 2002-519061 A	02/07/2002
		JP 2004-531242 A	14/10/2004
		JP 2005-198656 A	28/07/2005
		JP 2005-341968 A	15/12/2005
		JP 2006-122053 A	18/05/2006
		JP 2007-252381 A	04/10/2007
		JP 2008-133282 A	12/06/2008
		KR 10-0743376 B1	30/07/2007
		US 2002-0055467 A1	09/05/2002
		US 2004-0142418 A1	22/07/2004
		US 2004-0230043 A1	18/11/2004
		US 2007-0099270 A1	03/05/2007
		US 2008-0227703 A1	18/09/2008
		US 2008-0233647 A1	25/09/2008
		US 2010-0234293 A1	16/09/2010
		US 2010-0292142 A1	18/11/2010
		US 2012-0252726 A1	04/10/2012
		US 2013-109624 A1	02/05/2013
		US 6593133 B1	15/07/2003
		US 6734284 B1	11/05/2004
		US 7276580 B2	02/10/2007
		US 7358228 B2	15/04/2008
		US 8217146 B2	10/07/2012
		WO 00-01815 A2	13/01/2000
		WO 00-01815 A3	17/02/2000
		WO 02-072826 A2	19/09/2002
		WO 02-072826 A3	10/04/2003
US 7566528 B2	28/07/2009	AT 411395 T	15/10/2008

International application No.
PCT/KR2013/001847

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 2003-271489 A1	11/05/2005
		AU 2003-271489 B2	19/02/2009
		CA 2544074 A1	06/05/2005
		DE 60324207 D1	27/11/2008
		DK 1675961 T3	23/02/2009
		EP 1675961 A1	05/07/2006
		EP 1675961 B1	15/10/2008
		IL 175097 D0	20/08/2006
		JP 2007-508801 A	12/04/2007
		NZ 547398 A	31/10/2008
		US 2005-0239049 A1	27/10/2005
		WO 2005-040413 A1	06/05/2005

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/001847

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 19/00; C12Q 1/02; C12N 5/00; C12N 5/02; C12N 1/19; C12N 15/62; C12N 15/85; C12N 15/82

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: receptor tyrosine kinase, fusion protein, dimer, photoreceptor, activation

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MUTHSWAMY, S. K. et al., "Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers", Mol. Cell. Biol., 1999.10., Vol. 19, No. 10, pp. 6845-6857. 초록 및 도 1 참조.	1-26
Y	KENNEDY, M. J. et al., "Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells", Nat. Methods, 2010.12., Vol. 7, No. 12, pp. 973-975. 초록 및 도 1-3 참조.	1-26
A	US 7655463 B2 (SAH, D. W. Y. 외 2명) 2010.02.02 요약 및 청구항 1 참조.	1-26
A	US 7566528 B2 (GUNDE, T. 외 2명) 2009.07.28 요약 및 청구항 1 참조.	1-26

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2013년 07월 25일 (25.07.2013)	2013년 07월 26일 (26.07.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
박정민
전화번호 +82-42-481-5568

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/001847

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7655463 B2	2010/02/02	AU 1999-47693 A1	2000/01/24
		AU 1999-47693 B2	2002/12/05
		AU 2002-240943 A2	2002/09/24
		AU 2002-240943 B2	2007/05/10
		CA 2336218 A1	2000/01/13
		CA 2440767 A1	2002/09/19
		CN 101113449 C0	2008/01/30
		CN 101113450 C0	2008/01/30
		CN 1311818 A0	2001/09/05
		CN 1509333 A	2004/06/30
		CN 1509333 C0	2006/08/09
		EP 1095140 A2	2001/05/02
		EP 1095140 B1	2011/08/31
		EP 1373503 A2	2004/01/02
		EP 1373503 B1	2007/11/14
		EP 1930439 A1	2008/06/11
		EP 1930439 B1	2011/05/11
		EP 2290079 A2	2011/03/02
		EP 2290079 A3	2011/09/07
		JP 03-738008 B2	2006/01/25
		JP 2002-519061 A	2002/07/02
		JP 2004-531242 A	2004/10/14
		JP 2005-198656 A	2005/07/28
		JP 2005-341968 A	2005/12/15
		JP 2006-122053 A	2006/05/18
		JP 2007-252381 A	2007/10/04
		JP 2008-133282 A	2008/06/12
		KR 10-0743376 B1	2007/07/30
		US 2002-0055467 A1	2002/05/09
		US 2004-0142418 A1	2004/07/22
		US 2004-0230043 A1	2004/11/18
		US 2007-0099270 A1	2007/05/03
		US 2008-0227703 A1	2008/09/18
		US 2008-0233647 A1	2008/09/25
		US 2010-0234293 A1	2010/09/16
		US 2010-0292142 A1	2010/11/18
		US 2012-0252726 A1	2012/10/04
		US 2013-109624 A1	2013/05/02
		US 6593133 B1	2003/07/15
		US 6734284 B1	2004/05/11
		US 7276580 B2	2007/10/02
		US 7358228 B2	2008/04/15
		US 8217146 B2	2012/07/10
		WO 00-01815 A2	2000/01/13
		WO 00-01815 A3	2000/02/17
		WO 02-072826 A2	2002/09/19
		WO 02-072826 A3	2003/04/10
US 7566528 B2	2009/07/28	AT 411395 T	2008/10/15

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/001847

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		AU 2003-271489 A1	2005/05/11
		AU 2003-271489 B2	2009/02/19
		CA 2544074 A1	2005/05/06
		DE 60324207 D1	2008/11/27
		DK 1675961 T3	2009/02/23
		EP 1675961 A1	2006/07/05
		EP 1675961 B1	2008/10/15
		IL 175097 D0	2006/08/20
		JP 2007-508801 A	2007/04/12
		NZ 547398 A	2008/10/31
		US 2005-0239049 A1	2005/10/27
		WO 2005-040413 A1	2005/05/06