(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 6 월 17 일 (17.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/118123 A1

(51) 국제특허분류:
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/016994

(22) 국제출원일: 2020 년 11 월 26 일 (26.11.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0166845 2019 년 12 월 13 일 (13.12.2019) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 윤봉준 (**YOON, Bong June**); 03303 서울시 은평구 진관4로 77, 705동 801호, Seoul (KR). 이인범 (**LEE, In Bum**); 03764 서울시 서대문구 이화여대길 50-12, 106동 311호, Seoul (KR).

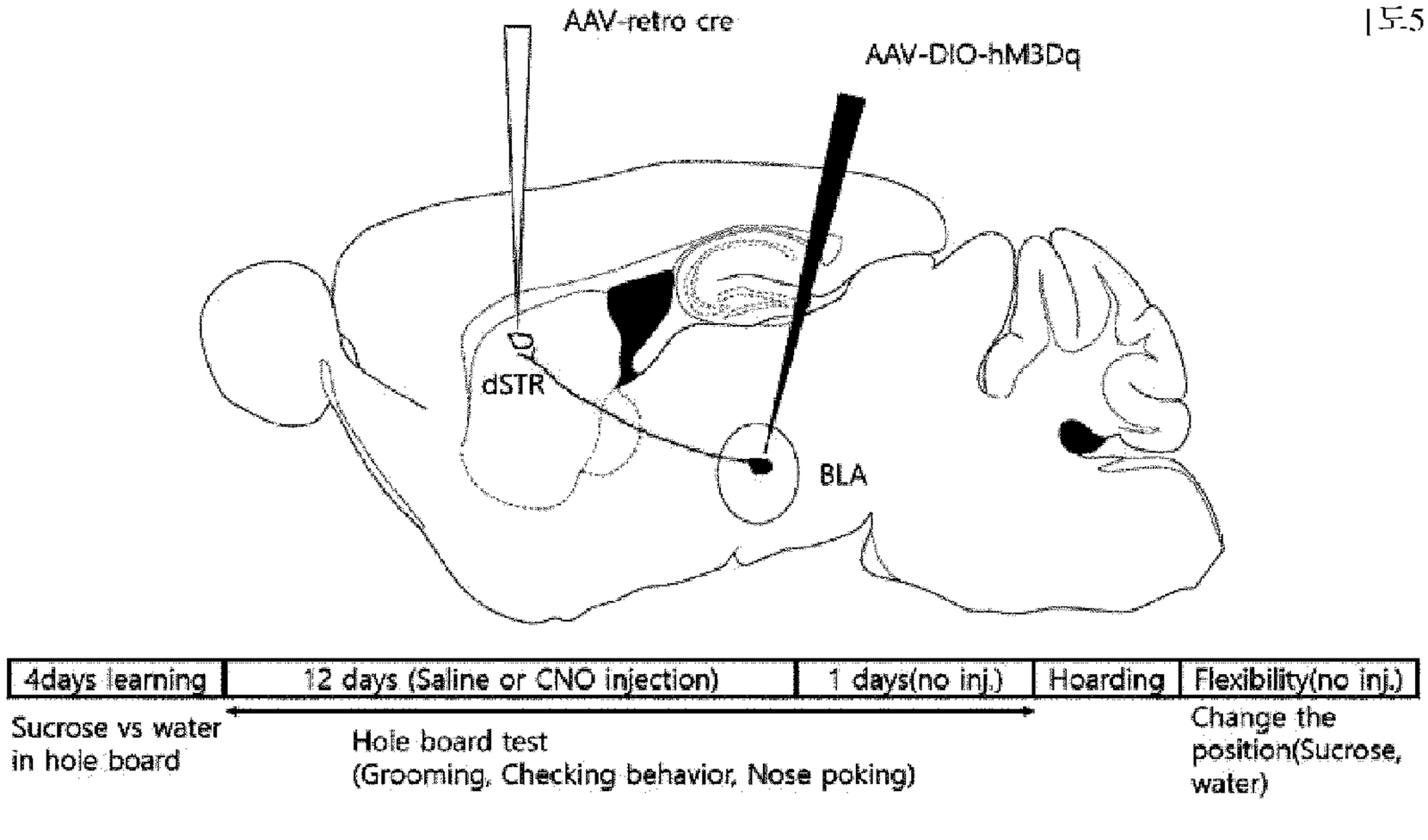
(74) 대리인: 특허법인 남앤남 (**NAM & NAM**); 04516 서울시 중구 서소문로 95, 3층, Seoul (KR).

(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, IT, 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, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** OBSESSIVE-COMPULSIVE DISORDER ANIMAL MODEL AND PRODUCTION METHOD THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법

[도5]



(57) **Abstract:** The present invention relates to an obsessive-compulsive disorder animal model and a production method thereof, and more specifically, to an obsessive-compulsive disorder animal model and a production method thereof, in which a neuronal circuit connecting the basolateral amygdala (BLA) and the dorsomedial striatum (DMS) is activated. In the present invention, it was confirmed that the BLA and DMS are connected to each other, and that when the BLA-DMS neuronal circuit is activated, there is a large increase in checking, repeating, cleaning, and collecting, which are compulsive behaviors representative of obsessive-compulsive disorder, and a decrease in cognitive flexibility. Therefore, animals in which the BLA-DMS neuronal circuit is activated may be useful as animal models for studying obsessive-compulsive disorder. In particular, the obsessive-compulsive disorder animal model according to the present invention can reproduce all of the compulsive behaviors (checking, repeating, cleaning, and collecting), and thus may become the first animal model to provide an understanding of the interactions between anxiety behaviors and compulsive behaviors, which

[다음 쪽 계속]

WO 2021/118123 A1

(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))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

existing animal models have not been able to provide.

(57) 요약서: 본 발명은 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로 연결되는 신경회로가 활성화된 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 기저측편도체(Basolateral amygdala, BLA)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum, DMS)가 서로 연결되어 있음을 확인하였으며, 상기 BLA-DMS 신경회로를 활성화시키는 경우 강박장애의 대표적인 강박행동에 해당하는 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동이 두드러지게 증대되며, 이와 더불어 인지적 유연성이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, BLA-DMS 신경회로를 활성화시킨 동물의 경우 강박장애를 연구할 수 있는 동물모델로 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 강박장애 동물모델은 포괄적인 강박행동(확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동)을 모두 재현할 수 있는바, 기존의 동물모델들이 제공하지 못한 불안행동과 강박행동의 상호작용에 대한 이해를 제공하는 최초의 동물모델이 될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로 연결되는 신경회로가 활성화된 강박장애 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 뇌에서 지금까지 알려진 강박장애(obsessive compulsive disorder, '이하 간략하게 'OCD'라 약칭함) 관련 부위는 안와전구피질(OFC)이다. 그 중에서도 내측 안와전구피질(mOFC) 부위의 활성은 OCD를 유발하는 것으로 알려져 있으며(Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. Science (New York, N.Y.), 340(6137), 1234-1239.(2013)) 외측 안와전구피질(lOFC) 부위의 활성은 OCD를 억제하는 것으로 알려져 있다(Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. Science (New York, N.Y.), 340(6137), 1243-1246.(2013)).

[3] OCD는 전세계적으로 2%-3%의 유병률을 보이는 발생률이 매우 높은 정신질환 중의 하나이다. OCD의 특징은 심한 강박 관념 (obsession)이 특정한 반복적 습관행동 (compulsion)과 함께 나타나는 것이다. 강박행동은 비단 OCD로 진단받는 환자뿐 아니라 투렛증후군(Tourette syndrome), 약물중독(drug addiction), 충동적인 섭식장애(compulsive eating disorder) 등에서 공통적으로 유사하게 일어나는 행동으로 다양한 정신질환에 관여하는 주요 증상이다. 하지만 불안행동과 OCD의 상호작용이 존재한다는 신경학적 근거는 제시되지 못하고 있는 실정이다. 치료법에 있어서도 대표적인 신경전달물질인 세로토닌 시스템에 작용하는 SSRI(selective serotonin reuptake inhibitor)계 약물치료에 의존하고 있는 것이 현실이다. 따라서 다양한 유관질병의 이해와 치료 기술 개발을 위해서는 강박행동의 분자적, 신경과학적 기전의 이해를 돕는 동시에 특정 강박행동(주로 Grooming) 외에 다른 OCD 패턴을 동시에 나타내는 새로운 동물모델의 개발이 필요하다.

[4] 상당수의 환자들이 현재 가용한 치료제(주로 SSRI계)에 저항성을 보이는 현실에 비추어 볼 때, 새로운 치료 기술의 개발은 매우 높은 파급효과를 기대할 수 있다. 따라서, OCD의 통합적 동물모델을 제공하는 경우 OCD 뿐만 아니라 강박적 행동을 특징으로 하는 여러 유관질병들(Tourette syndrome, addiction, compulsive eating disorder 등)의 기전에 대한 이해와 치료 진단 기술의 개발에 매우 유용할 것으로 기대된다.

[5] 한편, 기존의 OCD 관련 동물모델들은 주로 특정 유전자의 결실을 통해

만들어져 강박장애의 여러 가지 특성을 모두 재현하지 못한 단점이 있어 왔다.

[6] 반면, 본 발명에서 제안하는 모델은 기저핵 회로의 활성을 변화시킨 것으로, OCD의 기전에 대한 신경회로 관점에서의 이해를 제공할 것으로 기대한다. 특히 기존의 모델들이 제공하지 못한 불안행동과 강박행동의 상호작용에 대한 이해를 제공하는 최초의 동물모델이 될 것이다.

[7] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 OCD의 기전과 밀접하게 관련된 신경회로 영역을 밝히기 위하여 노력하였으며, 그 결과 기저측편도체(Basolateral amygdala, 이하 'BLA'라 약칭함)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum, 이하 'DMS'라 약칭함)가 서로 연결되어 있음을 확인하였고, 상기 BLA-DMS 신경회로를 활성화시키는 경우 확인행동, 반복행동, 청결행동 또는 수집행동과 같은 강박장애에 대표적인 강박행동이 일어나는 것을 실험을 통해 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 따라서 본 발명의 목적은 포괄적인 강박행동(확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동)을 모두 재현할 수 있는 강박장애 동물모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

[9] 본 발명의 다른 목적은, 상기 방법으로 제조된 포괄적인 강박행동을 재현하는 강박장애 동물모델을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 포괄적인 강박행동을 재현하는 강박장애 동물모델을 이용하여 강박장애를 예방 또는 치료하기 위한 후보약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[11] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[12] 본 발명은 인간을 제외한 동물의 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로 연결되는 신경회로를 활성화시키는 단계를 포함하는, 강박장애 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신경회로의 활성화는 물리적인 활성화 또는 화학적인 활성화일 수 있다.

[14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 물리적인 활성화는 기저측편도체(Basolateral amygdala) 부위에 채널로돕신(channel rhodopsin) 유전자를 포함하는 바이러스를 주입하고, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 광섬유를 설치한 후, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 빛을 조사함으로써 신경회로를 활성화시키는 것일 수 있다.

[15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화학적인 활성화는 기저측편도체(Basolateral amygdala) 부위에 DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame) 및 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein) 유전자를 포함하는

바이러스를 주입하고, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 Cre 재조합 효소 유전자를 포함하는 역행(retrograde) 바이러스를 주입한 후, 바이러스가 활성화될 때 약물을 처리함으로써 신경회로를 활성화시키는 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이러스는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)일 수 있다.

[17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)은 hM2Di, hM4Di, hM3Dq 및 hM5Dq 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약물은 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)을 활성화시키는 약물로서 클로자핀 N-옥사이드(Clozapine N-oxide), 클로자핀(clozapine), 컴파운드 21(compound 21) 및 페르라핀(Perlapine)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 강박장애 동물모델을 제공한다.

[20] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 강박장애 동물모델은 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동을 모두 보일 수 있다.

[21] 또한, 본 발명은 상기 강박장애 동물모델에 후보약물을 투여하는 단계; 및 강박장애로 인해 발생되는 확인행동, 반복행동, 청결행동 또는 수집행동이 감소되는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 강박장애를 예방 또는 치료하기 위한 후보약물 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[22] 본 발명에서는 기저측편도체(Basolateral amygdala, BLA)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum, DMS)가 서로 연결되어 있음을 확인하였으며, 상기 BLA-DMS 신경회로를 활성화시키는 경우 강박장애의 대표적인 강박행동에 해당하는 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동이 두드러지게 증대되며, 이와 더불어 인지적 유연성이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, BLA-DMS 신경회로를 활성화시킨 동물의 경우 강박장애를 연구할 수 있는 동물모델로 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 강박장애 동물모델은 포괄적인 강박행동(확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동)을 모두 재현할 수 있는바, 기존의 동물모델들이 제공하지 못한 불안행동과 강박행동의 상호작용에 대한 이해를 제공하는 최초의 동물모델이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 AAV-tdTomato를 사용한 순행염색법과 CTB(Choleratoxin subunit b)를 사용한 역행염색법을 통하여 마우스의 뇌 소영역 중 기저측편도체(BLA)로부터 등내측선조체(DMS) 부위가 서로 연결되어 있음을 확인한 것이다. 1a는 기저측편도체(BLA) 부위에 AAV-tdtomato를 주입하는 과정을 나타낸 모식도이다. 1b 및 1c는 기저측편도체(BLA) 부위에 AAV-tdtomato 주입에 따라 염색되는 선조체의 부위를 나타낸 것이다. 1d는 등내측선조체(DMS) 부위에

CTB를 주입하는 과정을 나타낸 모식도이다. 1e 및 1f는 등내측선조체(DMS) 부위에 CTB 주입에 따라 역방향으로 염색되는 기저측편도체(BLA)의 부위를 나타낸 것이다.

[24] 도 2는 마우스의 기저측편도체(BLA)부위에 AAV-ChR2 바이러스를 주입하고 등내측선조체(DMS) 부위에 광섬유를 설치하는 과정의 모식도를 나타낸 것이다.

[25] 도 3은 광유전학(Optogenetics) 기법을 통해 BLA-DMS 신경회로를 활성화시킨 후, 불안(anxiety) 정도를 평가하기 위하여 높은 십자 미로 실험(Elevated plus maze, EPM)을 진행한 결과를 나타낸 것이다. 좌측의 선형 그래프는 빛 조사 유무에 따른 그루밍(grooming) 지속시간을 나타낸 것이며, 우측의 막대 그래프는 빛 조사 유무에 따른 십자 미로에서 center, closed arm, open arm 각각의 위치에서 머무르는 시간을 나타낸 것이다.

[26] 도 4는 Hole board 실험을 위하여 고안된 9개의 구멍(지름 3cm)이 뚫린 가로×세로 30cm의 정사각 아크릴 판을 나타낸 것이다. 본 발명의 Hole board는 Home base를 기존 아크릴 판과 다른 재질로 설치 후 Home base 기준 오른쪽 끝에 물(water)을, 반대편에 10% 설탕(Sucrose)을 위치시켰다.

[27] 도 5는 강박장애 동물모델의 제작 과정을 시계열적으로 보여주는 모식도이다.

[28] 도 6은 강박장애 동물모델을 이용하여 Hole board 실험한 결과 시간경과에 따른 확인행동(checking behavior)의 빈도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다. Sucrose SAL: Saline 투여 그룹으로 10% sucrose 쪽으로 확인한 빈도, Sucrose CNO: Clozapine n-oxide 투여 그룹으로 10% sucrose 쪽으로 확인한 빈도, Water SAL: Saline 투여 그룹으로 물(water) 쪽으로 확인한 빈도, Water CNO: Clozapine n-oxide 투여그룹으로 물(water) 쪽으로 확인한 빈도를 나타냄.

[29] 도 7은 강박장애 동물모델을 이용하여 Hole board 실험한 결과 시간경과에 따른 구멍에 코를 반복적으로 들이미는 행동(Nose poking)의 빈도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다(SAL: Saline 투여 그룹, CNO: Clozapine n-oxide 투여 그룹).

[30] 도 8은 강박장애 동물모델에서 시간경과에 따른 그루밍(Greeming)의 지속시간 및 빈도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다(SAL: Saline 투여 그룹, CNO: Clozapine n-oxide 투여 그룹).

[31] 도 9는 강박장애 동물모델에서 시간경과에 따른 총 마신 음료의 양을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다. Sucrose SAL: Saline 투여 그룹으로 10% sucrose 음수량, Sucrose CNO: Clozapine n-oxide 투여 그룹으로 10% sucrose 음수량, Water SAL: Saline 투여 그룹으로 물(water) 음수량, Water CNO: Clozapine n-oxide 투여그룹으로 물(water) 음수량을 나타냄.

[32] 도 10은 강박장애 동물모델에서 인지적 유연성(Flexibility) 검사 결과를 나타낸 것이다(SAL: Saline 투여 그룹, CNO: Clozapine n-oxide 투여 그룹).

[33] 도 11은 강박장애 동물모델을 이용 저장장애(Hoarding) 패턴을 확인하기 위하여 고안된 툴(tool)을 보여주는 사진이다. 두 개의 케이지(Cage)를 가운데

통로를 두고 이어붙이고, 한쪽을 Home cage로 인식하도록 하루동안 반대쪽으로 가는 통로를 막아 두고(Day 12), 다음 날(Day 13) 저녁 반대쪽에 먹이와 장난감들을 위치시키고 막아놓은 통로를 열어둠.

[34] 도 12는 강박장애 동물모델에서 CNO(Clozapine n-oxide)을 투여한 그룹의 저장장애(Hoarding) 패턴을 확인한 것이다.

[35] 도 13은 강박장애 동물모델에서 SAL(Saline)을 투여한 그룹의 저장장애(Hoarding) 패턴을 확인한 것이다.

[36] 도 14는 강박장애 동물모델에서 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹과 SAL(Saline)을 투여 그룹 간 먹이(Food) 및 장남감(Toy)의 저장장애(Hoarding) 패턴을 확인하여 수치화한 것이다.

[37] 도 15는 강박장애 동물모델에서 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹과 SAL(Saline)을 투여 그룹의 마우스 입주변의 털을 확인한 사진이다. 마지막 실험일로부터 20일 경과 후 과도한 그루밍(Grooming)의 유지로 인하여 CNO 투여 그룹 마우스에서 입주변의 털이 사라진 것을 확인할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[38] 본 발명은 강박장애 동물모델의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 동물의 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로 연결되는 신경회로를 활성화시키는 단계를 포함하는, 강박장애 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

[39] 본 발명에서, "강박장애(obsessive compulsive disorder, OCD)"란 원하지 않는 생각과 행동을 반복하게 되는 불안 장애의 하위 유형으로, 반복적으로 의식에 침투하는 고통스러운 생각, 충동 또는 이미지인 강박사고(obsession)와 불안을 감소시키기 위해 반복적으로 나타내는 강박행동(compulsion)이 주된 증상으로 알려져 있다. 강박행동은 청결행동, 확인행동, 반복행동, 정돈행동, 지연행동 등의 형태로 나타나며, 스스로 부적절하고 지나치다는 것을 알면서도 강박사고로 인한 불안감으로부터 회복되기 위해 반복적으로 하게 된다.

[40] 본 발명에서, "편도체(amygdala)"는 뇌의 변연계(limbic system)에 속하는 구조의 일부로서 동기, 학습, 감정과 관련된 정보를 처리하는 데 중요한 역할을 하며, 10개 이상의 핵으로 이루어진 기관이다. 크게 세 부분으로 기저외측핵(basolateral nuclei), 피질내측핵(corticomedial nuclei), 중심핵(central nuclei)으로 나누어지며, 다양한 영역에서 정보를 받는다. 먼저 몸의 감각 기관을 통해 들어온 정보들이 편도체의 기저외측핵으로 보내지고 이는 대뇌피질로 전달되어 감정적 경험을 만들어 낸다. 감각 신호 중 후각 신호는 편도체의 피질내측핵으로 들어온다. 편도체로 들어온 감각 신호는 중심핵으로 연결되어 자율신경계로 다시 신호를 보내는데, 이 신호는 시상하부로 가서 스트레스 호르몬 분비나 각성과 같은 생리적 반응이 나타나게 한다.

[41] 본 발명에서, "기저측편도체(Basolateral amygdala, BLA)"라 함은 편도체의

기저외측(기저측)에 위치한 부위를 의미한다.

[42] 본 발명에서, "선조체(striatum)"는 뇌 기저핵(Basal ganglia)의 한 영역으로 대뇌피질(Cerebral cortex) 및 시상(Thalamus)과의 신경망 연결을 통해 자발적인 움직임의 선택과 시작(Selection and initiation of willed movement)에 중요한 역할을 하는 영역이다. 영장류에서, 선조체는 복측선조체(ventral striatum)와 등측선조체(dorsal striatum)로 나뉘며, 기능과 연결을 기반으로 세분된다. 복측선조체(ventral striatum)는 중격의지핵(nucleus accumbens, NAc)과 후결절(olfactory tubercle)로 구성되며, 등측선조체(dorsal striatum)는 미상핵(caudate nucleus)과 조가비핵(putamen)으로 구성된다.

[43] 본 발명에서, "등내측선조체(Dorsomedial striatum, DMS)"라 함은 선조체의 등쪽내측에 위치한 부위를 의미하며, 영장류의 미상핵에 해당하는 부위이다.

[44] 본 발명에서는 기저측편도체(BLA)로부터 등내측선조체(DMS) 부위가 서로 연결되어 있음을 발견하였으며, 상기 BLA-DMS 신경회로를 활성화시키는 경우 확인행동, 반복행동, 청결행동 또는 수집행동과 같은 강박장애에 대표적인 강박행동이 일어나는 것을 실험을 통해 확인하였다.

[45] 먼저, 본 발명에서는 기저측편도체(BLA)로부터 등내측선조체(DMS) 부위가 서로 연결되어 있는 신경회로를 확인하였다.

[46] 자세하게는, 기저측편도체(BLA) 부위에 AAV-tdtomato를 주입 시 정방향으로 붉은색 염색이 되었으며, 그 위치에 CPu(caudate-putamen)로 표현된 선조체(Striatum) 부위, 그 중에서도 등내측선조체(DMS) 부위와 복측선조체(NAc) 부위가 염색되어 있음을 확인하였다. 그 중 등내측(DMS) 부위를 타겟으로 삼아 CTB(Choleratoxin subunit b)를 주입 후 기저측편도체(BLA)로의 역방향 염색을 확인함으로써, BLA로부터 DMS로의 회로가 존재함을 밝혔다(도 1 참조).

[47] 상기와 같은, BLA-DMS 신경회로는 종래 연구에서 알려지지 않은 신경회로에 해당한다.

[48] 이에, 본 발명에서는 BLA-DMS 신경회로의 역할을 확인하기 위하여 광유전학(Optogenetics) 실험을 수행하였으며, 상기 BLA-DMS 신경회로를 활성화하는 경우 강박증상의 대표적인 행동인 그루밍(Grooming)이 증대되는 것을 규명하였다. 마우스의 그루밍(Grooming)은 강박장애의 대표적 증상으로 알려진 과도한 손세척과 대응하는 행동이다.

[49] 자세하게는, 기저측편도체(BLA) 부위에 AAV-ChR2를 주입하고 등내측선조체(DMS) 부위에 광섬유를 설치한 후, 등내측선조체(DMS)에 푸른빛(473nm)를 조사하여 BLA-DMS 신경회로를 특이적으로 활성화시키면서 EPM(elevated plus-maze) 실험을 수행하였다(도 2 참조). 기저측편도체(BLA) 부위에 AAV-ChR2를 주입하는 경우, 기저측편도체(BLA)로부터 뻗어나가는 엑손말단들은 채널로돕신(ChR2)를 발현하게 된다. 채널로돕신(ChR2)은 세포막에 작용하여 470nm 파장의 푸른 빛을 받게 되면 Na+ 이온을 세포 내로

유입시키며 뉴런을 활성화시키게 되는데, 등내측선조체(DMS) 부위에 설치된 광섬유에 특이적으로 푸른빛(473nm)를 조사함으로써 BLA-DMS 신경회로를 활성화시켰다. 이러한, BLA-DMS 신경회로의 활성화 결과, 불안(Anxiety)을 증가시키고 더 나아가 강박장애를 유발할 수 있음을 확인하였다(도 3 참조).

[50] 또한, 본 발명에서는 BLA-DMS 회로를 일시적이 아닌 장기적으로 활성화시키기 위하여 AAV 바이러스 및 화학유전학 기법인 드레드(DREADD, designer receptor exclusively activated by designer drug) 시스템을 이용하여 강박장애 동물모델을 제작하였으며, 상기 BLA-DMS 신경회로를 장기적으로 활성화시킨 마우스에서 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동과 같은 강박장애에 대표적인 강박행동이 나타나는 것을 확인하였다.

[51] 자세하게는, 등내측선조체(DMS) 부위에 Cre 재조합 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 역행(retrograde) AAV를 주입하고 기저측편도체(BLA) 부위에 cre 특이적으로 발현을 시키는 AAV-DIO-hM3Dq 바이러스를 주입한 후, 도입된 바이러스가 활성화될 때, 특정 약물을 투여함으로써 BLA-DMS 신경회로를 특이적으로 활성화시켰다. 참고로, 등내측선조체(DMS)로부터 역행(retrograde) 바이러스가 기저측편도체(BLA)의 신경세포체(soma)에 cre를 발현시키면 AAV-DIO-hM3Dq 바이러스가 DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame)를 통해 cre의 존재 하에서만 목적 유전자(hM3Dq)의 발현을 유도하는 원리이다. 한편, hM3Dq는 GPCR(G-protein-coupled receptors)이라는 막단백질로써 특정 약물에 의하여 뉴런을 활성화킬 수 있으며, 이를 통해 BLA-DMS 신경회로의 특이적 활성이 가능해진다. 이렇게, BLA-DMS 신경회로를 장기적으로 활성화시킨 마우스의 경우, 강박장애의 대표적인 강박행동에 해당하는 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동이 두드러지게 증대되며, 이와 더불어 인지적 유연성이 감소되는 것을 확인하였다(도 5 내지 15 참조).

[52] 본 발명에서, "아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)"는 파보바이러스(parvovirus)의 일종으로서, 심각한 면역반응을 유발하지 않는 비병원성 바이러스이고, 감염 숙주세포의 범위가 넓으며, 성장중인 세포 뿐만 아니라, 성장이 정지된 세포에도 감염이 되며, 숙주세포 내에서 유전자 부체(episome)의 형태로 존재할 뿐 만 아니라, 숙주세포의 염색체 내에 바이러스의 게놈(genome)을 삽입시킬 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에, 유전자요법(gene therapy)을 위한 유전자 운반체(vector)로의 사용가능성으로 최근 주목받고 있다. 특히, 상기 바이러스는 인간 세포에 감염되었을 때, 바이러스의 게놈이 인간 염색체 19번의 특정 위치로 삽입되는 경향이 있는데, 상기 위치는 특별한 기능을 담당하는 유전자가 존재하지 않는 지역으로 알려져 있어서, 삽입 변이(insertional mutagenesis)에 의한 원암유전자의 활성화 가능성이 매우 낮아, 유전자요법에 더욱 유리하다. 게다가, 재조합 형태의 아데노-연관 바이러스는 염색체 삽입이 거의 일어나지 않는다고 하며, 아직 그 이유는

명확하게 밝혀지지 않고 있다.

[53] 상기와 같은 장점 때문에, 아데노-연관 바이러스(AAV)는 치료에 필요한 외래유전자를 치료대상 개체에 도입할 수 있는 유전자 운반체(vector)로 사용이 고려되어 왔으며, 실제 다양한 질환에서 치료 효과를 얻는 데 중요한 전달체로 사용될 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다.

[54] 그러나, 아데노-연관 바이러스(AAV)는 독자적인 자기복제 능력이 없기 때문에, 치료에 필요한 정도의 재조합 AAV(rAAV)를 효과적으로 만들어 내기가 쉽지 않다. 상기 단점으로 인하여, 재조합 AAV가 유전자 치료 연구의 초기 생성 과정에서부터 널리 사용되지는 않았지만, 바이러스의 생활사에 대한 꾸준한 연구의 결과, 헬퍼바이러스-유리 생산 시스템, 하이브리드 헬퍼 바이러스 시스템, 또는 필수 아데노바이러스 및/또는 AAV 유전자로 형질 전환된 패키징 세포주와 같은 재조합 AAV(rAAV) 생산을 위한 효과적인 방법들이 고안되었다.

[55] 상기 방법 중, 재조합 AAV(rAAV)를 생산하기 위해 가장 광범위하게 사용되고 있는 방법은 목적-유전자를 코딩하는 재조합 AAV(rAAV) 발현벡터와 AAV rep-cap 유전자 발현벡터(예를 들어, pAAV-RC) 및 감염성 입자 형성에 필요한 아데노 바이러스 기원 유전자의 발현벡터(예를 들어, pHelper)를 모두 포괄하는 헬퍼플라스미드(AAV rep-cap 유전자 및 아데노-연관 바이러스 감염성 입자 형성에 필요한 상기 아데노 바이러스 기원 유전자를 동시에 포함하는 플라스미드, 예를 들어 pDG)를 HEK 293 세포와 같이, 아데노 바이러스의 E1 유전자로 형질전환된 포장용 세포주(packaging cell line)에 이중 또는 삼중 형질도입시키는 방법이다.

[56] 대부분의 경우에 있어서, 형질도입은 인간 배아 신장 293 세포(HEK 293)와 같이 아데노바이러스의 E1 유전자를 보충할 수 있는 포장용 세포주를 부착(adherent) 배양한 상태에서 수행하는 것이 일반적이다.

[57] 본 발명에서, "역행(retrograde) 바이러스"는 투사 뉴런(Projection neuron)에 대한 역행 접근을 매개하는 재조합 AAV(rAAV) 변이체로서, 신경회로에서 축삭(Axon)으로부터 그의 세포체 쪽으로 역행 수송이 가능한 바이러스를 의미한다.

[58] 본 발명에서는 강박장애 동물모델 제조를 위하여, AAV Helper-Free system을 이용하였다. 자세하게는, Retrograding cre virus 제조를 위하여 AAV:ITR-U6-sgRNA(backbone)-pCBh-Cre-WPRE-hGHpA-ITR(Addgene, cat#60229), pHelper, rAAV2-retro helper(addgene, cat#81070) 세 가지 플라스미드를 이용하였으며; AAV-ChR2 virus 제조를 위하여 pAAV-hChR2(H134R)-EYFP, pHelper, pAAV-RC 세 가지 플라스미드를 이용하였고; AAV-DIO-hM3Dq 제조를 위하여 AAV-DIO-hM3D(Gq)-mcherry(Addgene, cat#44361), pHelper, pAAV-RC 세 가지 플라스미드 이용하였다. 상기 세 가지 플라스미드는 AAV-293 세포주(packaging cell line)에 형질도입하여 배양함으로써 목적하는 바이러스를 제조하였다.

[59] 따라서, 본 발명의 강박장애 동물모델의 제조방법은 동물의 기저측편도체(Basolateral amygdala, BLA)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum, DMS)로 연결되는 신경회로를 활성화시키는 단계를 통해 이루어질 수 있다.

[60] 본 발명에 있어서, 상기 신경회로의 활성화는 물리적인 활성화 또는 화학적인 활성화일 수 있다.

[61] 상기 물리적인 활성화는 기저측편도체(BLA) 부위에 채널로돕신(channel rhodopsin) 유전자를 포함하는 바이러스를 주입하고, 등내측선조체(DMS) 부위에 광섬유를 설치한 후, 등내측선조체(DMS) 부위에 빛을 조사함으로써 이루어질 수 있다.

[62] 상기 화학적인 활성화는 기저측편도체(BLA) 부위에 DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame) 및 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein) 유전자를 포함하는 바이러스를 주입하고, 등내측선조체(DMS) 부위에 Cre 재조합 효소 유전자를 포함하는 역행(retrograde) 바이러스를 주입한 후, 바이러스가 활성화될 때 약물을 처리함으로써 이루어질 수 있다.

[63] 본 발명에서, "화학유전학(chemogenetics)"이란 화학생물학 또는 화학유전체학으로도 불리며 알려지지 않은 저분자 합성물질에 반응하는 단백질을 적용해 세포의 활성을 조절하는 생리학적 기능의 이해를 돕는 응용기술이다. 인산화효소(kinase), 비인산화효소(non-kinase enzyme), GPCR(G-protein-coupled receptors) 및 리간드의존성 이온통로(ligand-gated ion channel) 등의 단백질들이 화학유전학적으로 만들어졌다. 화학유전학적으로 설계된 다양한 단백질들 중 야행성 무스카린성 수용체(wild type muscarinic receptor)를 일부 돌연변이시켜 아세틸콜린(acetylcholin)과의 반응성을 낮추고 새로운 합성물질(예를 들면, clozapine-N-oxide)에 반응성을 높인 DREADDs(designer receptors exclusively activated by designer drugs)가 가장 많이 사용되고 있다.

[64] 본 발명에서, "화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)"이란 화학유전학(chemogenetics)적으로 설계된 단백질로서, 특정 약물에 의해 배타적으로(독점적으로) 활성화될 수 있도록 디자인된 수용체 단백질을 의미한다.

[65] 본 발명에서, 상기 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)은 hM2Di, hM4Di, hM3Dq 및 hM5Dq 등을 예시할 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.

[66] 본 발명에서, 상기 hM3Dq 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 hM4Di 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어질 수 있다.

[67] 본 발명에서, 상기 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)을 활성화시키는 약물은 클로자핀 N-옥사이드(Clozapine N-oxide, CNO), 클로자핀(clozapine),

컴파운드 21(compound 21) 및 페르라핀(Perlapine) 등을 예시할 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.

[68] 본 발명의 하기 실시예에서는, 화학유전학적 단백질로 hM3Dq를 사용하였으며, 이를 활성화시키는 약물로 클로자핀 N-옥사이드(Clozapine N-oxide, CNO)를 사용하였다.

[69] 본 발명에서 "DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame)"란 LoxP 사이트 기반 유전자 스위치로 작용할 수 있는 오픈 리딩 프레임으로, Cre 재조합 효소 존재 하에서 유전자 발현을 turn off에서 turn on 상태로 변화시킬 수 있다.

[70] 상기 DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame)는 Cre 재조합 효소가 인식하는 부위인, 한 쌍의 LoxP 부위 및 한 쌍의 Lox2722 부위를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 DIO는 서열번호 3의 LoxP 서열과 서열번호 4의 LoxP 역방향 서열; 서열번호 5의 Lox2722 서열과 서열번호 6의 Lox2722 역방향 서열을 포함할 수 있다.

[71] 상기 Cre 재조합 효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어질 수 있다.

[72] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 강박장애 동물모델을 제공한다.

[73] 본 발명의 강박장애 동물모델은 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동과 같은 강박행동을 모두 보이며, 이와 더불어 인지적 유연성(Flexibility)이 감소되는 특징을 보인다.

[74] 본 발명의 하기 실시예에서는, 마우스를 이용 BLA-DMS 신경회로를 활성화시켜 강박장애 동물모델을 제조하였으며, 그 결과 확인행동(Checking behavior), 코를 반복적으로 들이미는 반복행동(Repetitive nose poking), 과도한 그루밍(세척행동) 및 먹이와 장난감을 저장하는 행동(수집행동)이 두드러지게 증가하며, 이와 더불어 인지적 유연성(Flexibility)이 감소하는 것을 확인하였다.

[75] 또한, 본 발명은 상기 강박장애 동물모델에 후보약물을 투여하는 단계; 및 강박장애로 인해 발생되는 확인행동, 반복행동, 청결행동 또는 수집행동이 감소되는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 강박장애를 예방 또는 치료하기 위한 후보약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[76] 본 발명에서, "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 강박장애 동물모델에게 후보약물을 도입하는 것을 의미하며, 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있다.

[77]

[78] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[79] <실시예>

[80]

[81] **1.** 실험방법

[82]

[83] <u>실험동물</u>

[84] 수컷(BL/6N) 마우스는 Orient Bio(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 12시간 낮/밤 주기하에 자유로이 사료 및 식수를 급이하면서 사육하였다. 모든 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리의원회(IACUC)의 승인을 받아 가이드라인에 따라 진행하였다.

[85]

[86] <u>바이러스 제작</u>

[87] 바이러스 제작을 위해 AAV Helper-Free system(Agilent, cat#240071) 을 이용하였다. AAV-293 세포를 7개의 10-cm 조직 배양용 플레이트(tissue culture plate)에 뿌려주고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 약 2~3일 후, 세포가 70-80%의 confluency를 보일 때 transfection 하였다. 'Retrograding cre virus'의 경우 AAV:ITR-U6-sgRNA(backbone)-pCBh-Cre-WPRE-hGHpA-ITR(Addgene, cat#60229), pHelper, rAAV2-retro helper(addgene, cat#81070) 세 가지 플라스미드를 1ug/ul의 농도로 TE buffer, PH 7.5 에 준비하여 동시에 세포에 transfection 하였다. 'AAV-ChR2 virus'의 경우 pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-EYFP(Addgene cat#20298)에 Cre recombinase를 처리하여 double floxed가 사라진 형태의 pAAV-hChR2(H134R)-EYFP, pHelper, pAAV-RC 이렇게 세 종류의 플라스미드를 사용하였으며, 'AAV-DIO-hM3Dq' 바이러스의 경우 pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mcherry(Addgene, cat#44361), pHelper, pAAV-RC 이렇게 세 종류의 플라스미드를 사용하였다.

[88] 상기 각각의 세 종류 플라스미드를 10ul씩 15ml 튜브(cornical tube)에 넣어주고, 1ml의 0.3M $CaCl_2$를 추가해 조심스럽게 섞어주었다. 섞어준 용액을 2XHBS(Hepes Buffered Saline, pH7.1) 1ml에 한 방울 씩 떨어뜨려 준 후 조심스럽게 섞는다. 상기 용액 2.03ml을 2~3일 동안 길러준 상기 세포에 한 방울씩 떨어뜨려 추가한 다음 37℃ 배양기에 다시 넣었다. 6시간이 지난 후, 배양액을 교체하였다. 그 후, 66 ~ 72시간 동안 37℃ 배양기에서 추가 배양하여 바이러스가 생성되게 하였다. 다음으로, 37℃ water bath와 dry ice-ethanol bath를 준비하고, transfection시킨 세포의 배양액과 세포를 50ml 코니칼 튜브에 넣고 밀봉하였다. 상기 튜브를 dry ice-ethanol bath에 약10분간 넣어주어 내부의 세포와 배양액을 얼려준다. 그 후, 완전히 언 튜브를 water bath에 넣어주고 10분간 녹여주는데, 10분 이내로 녹지 않으면 완전히 녹을 때까지 기다리고, 완전히 녹은 튜브를 가볍게 진탕 해준다. 상기 과정을 총 4번 반복해 세포를

분해해서 내부의 바이러스를 추출하고, 상기 과정 후 나오는 세포 잔여물들을 상온, 10,000g, 10분간 원심분리하여 침전시켰다. 위에 남은 용액들은 40% PEG(polyethylene glycol) 용액과 섞어 10% PEG용액을 만들어주었다. 즉, 40% PEG 1: 바이러스용액 3의 비율로 섞고, 이를 2일간 4℃에서 보관하였다. 2일 후 생성된 바이러스의 농축을 위하여 3,000 rpm으로 30분간 4℃에서 원심분리 한 후 상층액은 제거하였다. 가라 앉은 침전물들을 ice-cold PBS 10ml에 녹인 후 다시 29,000rpm에서 2시간동안 4℃ 에서 원심분리하였다. 그 후, 상층액은 제거해주고 아래 남은 침전물을 ice-cold PBS 1ml에 resuspension 시켰다.

[89]

[90] **<u>바이러스 뇌 주입을 위한 뇌정위술 (stereotaxic injection)</u>**

[91] 뇌정위술에는 8-9주령 이상 마우스를 사용하였다. 마우스는 케타민(100 mg/kg, 유한양행)+럼푼(xylazine, 10 mg/kg, Bayer korea)을 이용하여 마취시켰다. 마취된 쥐의 머리를 stereotaxic apparatus(David kopf instrument, Tujunga, CA, USA)에 고정시켰다. 그 후에 좌표를 잡고 전동드릴을 이용해 구멍을 뚫은 후 glass micropipette을 삽입한 후 Nanoliter 2000(World precision instrument, Sarasota, FL, USA) 인젝터를 이용해 바이러스를 주입하였다. (BLA 좌표 : 브레그마로부터 AP -1.5, ML ±3.1 DV -4.8 DMS 좌표 : 브레그마로부터 AP +1.1, ML ±1.1, DV -3.0) 각 바이러스는 9.2nl씩 총 15번씩 천천히 주입하였다(23 nl/sec).

[92] Optic cannula는 Ferrule(precision fiber products, MM-FER2007-304-2300)과 Fiber(Thorlabs, FT200UMT)를 사용하였으며 DMS 영역의 깊이에 맞도록(3mm) 잘라서 삽입 후 치과용 시멘트(Poly-F)를 이용하여 고정시켰다. 그 후 3주간 바이러스가 퍼지는 시간을 갖고 그 이후부터 행동실험을 진행하였다.

[93]

[94] **<u>약물 처리(Drug treatment)</u>**

[95] Clozapine N-oxide(CNO; Tocris, Bristol, United Kingdom)는 Saline에 녹인 후 마우스의 복강에 주사하였다. 그 후 약물이 작용하기까지 걸리는 시간을 감안하여 약 30분 후 실험을 시작하였다. 용량은 1mg/kg을 사용하였으며, 매일 같은 시간 약물을 주입하고 실험을 진행하였다.

[96] CNO의 대조군으로는 Saline을 사용하였다. Saline 역시 같은 방법으로 같은 볼륨을 복강주사 하고 CNO 그룹과 같은 환경에서 실험을 진행하였다.

[97]

[98] **<u>행동실험(behavior test)</u>**

[99] [광유전학 활성화를 동반한 EPM(Elevated pluz maze) test]

[100] EPM은 두개의 Open arm(68cm x 7cm x 0.5cm)과 두개의 Closed arm(68cm x 7cm x 17cm)로 구성되었다. Closed arm은 17cm의 벽으로 둘러싸여 있으며 EPM의 높이는 지면으로부터 57cm 떨어져 있다. 마우스는 십자미로의 가운데에 놓여지며 실험을 시작하였다. 실험시간은 총 15분이며, 3분간격으로 OFF phase와 ON phase를 반복하였다. 사용되는 광원은 Blue light(473nm, 20Hz, 10mW,

CNI laser, MBL-FN-473-150mW)이며 광원의 조절은 Pulse generator(BNC model 575)를 사용하였다. 분석은 EthoVision XT 11.5 (Noldus, Wageningen, Netherlands)를 사용하였다.

[101] [Hole board test]

[102] 9개의 구멍(지름 3cm)이 뚫린 가로×세로 30cm의 정사각 아크릴 판을 제작하였다. 그리고 Home base를 기존 아크릴 판과 다른 재질로 설치 후 Home base 기준 오른쪽 끝에 물을, 반대편에 10% Sucrose를 위치시켰다. 그 후에 쥐를 Home base에 넣고 1시간동안 촬영하였다. 실험이 끝난 후 Sucrose와 Water의 잔량을 확인하고 기록하였다.

[103] 본 발명에서 그룹은 Saline 투여 그룹과 CNO 투여 그룹 2개의 그룹으로 나누었으며, 18일동안 매일 같은 시간 수행하였다. 4일간의 learning 기간을 거치고 마지막 4일째를 기준점(Base)로 삼았다. 이 기간동안 마우스들은 Hole board에서 물과 10% Sucrose의 위치를 파악한다. 5일째부터 16일째까지 총 12일동안 Saline과 CNO를 각각의 그룹에 투여하기 시작하였다. 그리고 17일째에는 Saline과 CNO의 투여가 없음에도 OCD 현상이 유지되는지를 관찰하였다. 마지막으로 18일째에는 Water와 10% sucrose의 위치를 서로 바꾼 후 마우스의 인지적 유연성(Flexibility)을 측정하였다. 그리고 Base~18일째 사이(Base~Day 14)의 동영상을 분석하였다. 분석항목으로는 Checking behavior(반복적인 확인), Repetitive nose poking(구멍에 코를 반복적으로 들이미는 행동), Excessive grooming(과도한 세척-털다듬기), Flexibility(인지적 유연성)이 있다.

[104] 분석 방법은 동영상을 Blind test를 통하여 눈으로 분석하였다. Blind test를 통해 실험자가 Saline 투여 군과 CNO 투여 군에 대해 알지 못하게 함으로써 실험의 객관성을 확보하였다. 측정항목은 Checking behavior(반복확인)의 경우 Water와 Sucrose로 가는 빈도를 측정하였으며, Repetitive Nose poking(구멍에 코를 반복적으로 들이미는 현상)의 경우 각 구멍(Hole)에 코를 집어넣는 행위의 숫자를 측정하였으며, Excessive grooming(과도한 세척-털다듬기)의 경우 Grooming을 하는 총 시간(Duration)과 Grooming 행위의 시작과 그 끝을 1회로 한 총 횟수(Frequency)를 측정하였다. Flexibility(인지적 유연성)의 항목은 18일째(Day 14)의 서로 위치가 뒤바뀐 Water와 Sucrose로 가는 횟수를 측정하였다.

[105] 그리고 17일(Day 13) 째 실험이 끝난 직후부터 18일(Day14) 오전까지 총 16시간동안 Saline과 CNO의 투여가 없는 상황에서 Hoarding(저장장애) 여부를 관찰하였다.

[106] [Hoarding test]

[107] 두 개의 케이지(Cage)를 가운데 통로를 두고 이어 붙인 기구를 제작하였다. 제작에 사용된 케이지는 가로 25cm X 세로 20cm X 높이 12cm(정도비앤피), 통로는 직경 5cm 길이 19cm 의 PVC 재질의 원통을 사용하였다. 각 케이지의 밑바닥으로부터 1cm 위에 직경 5cm의 구멍을 뚫고 PVC 원통을 끼워 넣었을 때

통로의 길이가 9.5cm가 되도록 PVC 위에 턱을 설치하였다. 그리고 마우스를 케이지 당 한 마리씩 위치시켰다. 마우스가 한쪽을 Home cage로 인식하도록 한쪽에만 깔집을 깔아주고 반대편은 기본상태로 두며, 하루동안 Home cage 반대쪽으로 가는 통로를 막아 두었다. 그리고 다음 날 저녁 Home cage 쪽의 먹이를 제거하고, 반대쪽에 먹이와 장난감들을 위치시킨 후 막아놓은 통로를 열어주었다. 이 때, 물은 Home cage 쪽으로 위치시켰다. 그리고 실험의 마지막 날 아침 먹이 펠렛(pellet)과 장난감들을 Home cage 쪽으로 얼마나 가져왔는지에 대한 그룹간의 차이를 비교하였다. 먹이는 가져온 중량을 수치화 시키며, 장난감은 가져온 개수를 수치화 시켰다. 사용된 장난감은 직경 약 0.5cm, 무게 약 0.2g인 하트모양 플라스틱 재질과 가로 0.5cm X 세로 0.5cm X 높이 0.1cm, 무게 약 0.9g인 정사각형 모양의 타일을 섞어서 사용하였다.

[108]

[109] **2. 실험결과**

[110]

[111] **기저측편도체(Basolateral amygdala, BLA)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum, DMS)로 연결되는 신경회로를 확인함**

[112] AAV-tdTomato를 사용한 순행염색법과 CTB(Choleratoxin subunit b)를 사용한 역행염색법을 통하여 뇌의 소영역 중 기저측편도체(Basolateral amygdala)와 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위가 서로 연결이 되어있음을 확인하였다.

[113] 도 1에서 나타낸 바와 같이, 기저측편도체 부위에 AAV-tdtomato를 주입 시 정방향으로 붉은색 염색이 되는 것을 확인하였으며, 그 위치에 CPu(caudate putamen)로 표현된 선조체(Striatum) 부위, 그 중에서도 등내측 부위(Dorsomedial striatum: DMS)와 복측 부위 선조체(nucleus accumbens: NAc)가 염색되어 있음을 관찰하였다.

[114] 상기 염색 부위 중 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위를 타겟으로 삼아 CTB를 주입 후 기저측편도체(Basolateral amygdala)로의 역방향 염색을 확인하였으며, 그 결과 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로의 회로가 존재함을 확인하였다.

[115]

[116] **BLA-DMS 회로가 어떤 역할을 수행하는지 광유전학(Optogenetics) 실험을 통해 규명함**

[117] BLA부위에 AAV-ChR2 바이러스를 주입하고 DMS부위에 광섬유를 설치하였다(도 2 참조). BLA로부터 뻗어나가는 엑손말단들은 채널로돕신(ChR2)를 발현하게 된다. ChR2는 세포막에 작용하여 470nm 파장의 푸른 빛을 받게 되면 Na+ 이온을 세포 내로 유입시키며 뉴런을 활성화시켰다. 이 기법(Optogenetics)을 이용, BLA로부터 신호를 받는 영역 중 DMS에 특이적으로 푸른빛(473nm)를 조사함으로써 BLA-DMS 회로를 특이적으로 활성화 시키면서 Elevated plus maze(EPM) 실험을 수행하였다.

[118] EPM은 주로 쥐의 불안(anxiety)을 측정하는 실험이며, Open arm에 머무는 시간이 많을수록 불안(anxiety)이 낮고 Closed arm에 머무는 시간이 많을수록 불안(anxiety)이 높다고 해석된다. 쥐(BL6/N)의 행동 변화를 관찰한 결과 빛을 받고 난 직후 강박증상 중 대표적인 Grooming(털다듬기) 행동이 급격히 증가하는 모습을 관찰하였다. 동시에 빛을 받는동안 EPM의 Open arm duration 비율이 낮아짐을 볼 수 있었다(도 3 참조). 이는, BLA-DMS 회로의 활성이 불안(anxiety)을 증가시키고 더 나아가 강박증상을 유발할 수 있음을 암시하는 것이다.

[119]

[120] <u>강박장애 동물모델 제작</u>

[121] 먼저, BLA-DMS 회로를 이용하여 강박장애 동물모델을 제작하고 강박장애 현상의 발현 확인을 용이하게 하고자 Hole board 실험을 고안하였다. 9개의 구멍(지름 3cm)이 뚫린 가로X세로 30cm의 정사각 아크릴 판을 제작하였다. 그리고 Home base를 기존 아크릴 판과 다른 재질로 설치 후 Home base 기준 오른쪽 끝에 물을, 반대편에 10% Sucrose를 위치시켰다(도 4 참조).

[122] 그리고 쥐의 BLA-DMS 회로를 일시적이 아닌 장기적으로 활성화시키는 방법을 고안함으로써 강박장애 동물모델을 제작하였다(도 5 참조).

[123] DMS에 역행으로 감염을 시킬 수 있는 AAV-retro cre 바이러스를 주입하고 BLA에 cre 특이적으로 발현을 시키는 AAV-DIO-hM3Dq를 주입하였다. 즉, DMS로부터 온 retro cre 바이러스가 BLA의 신경세포체(soma)에 cre를 발현시키면 거기에 cre의 존재 하에서만 발현이 되는 DIO 바이러스가 hM3Dq가 발현될 수 있도록 하는 원리를 이용하였다. hM3Dq는 G-단백질 결합 수용체(GPCR)라는 막단백질로써 CNO(Clozapine n-oxide)라는 약물에 의하여 뉴런을 활성화시킨다. 이를 통해 BLA-DMS 회로 특이적 활성이 가능해진다. 이렇게 두 영역에 각기 다른 바이러스를 주입한 후 바이러스가 활성을 보이기까지 4주이상이 필요하다.

[124] 4주가 지난 후 초반 4일동안 CNO(Clozapine n-oxide)의 주입 없이 hole board 상에서 learning 과정을 거쳤다. 이 과정동안 쥐는 물과 10% sucrose의 위치를 확인하고 기억한다. 그리고 마지막 4일째의 행동 측정치를 기준으로 삼고 12일 동안 CNO(1mg/kg)를 매일 같은 시각 주입함으로써 BLA-DMS 회로를 지속적으로 활성화 시켰다. CNO(Clozapine n-oxide)의 대조군으로는 같은 과정(같은 바이러스 주입)을 거친 쥐에 생리식염수(saline)를 투여하였다. 이 기간동안 Hole board test를 진행하며 Saline 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서의 쥐의 강박행동변화(1. Checking behavior(반복적인 확인), 2. Repetitive nose poking(구멍에 코를 반복적으로 들이미는 행동), 3. Excessive grooming(과도한 세척-털다듬기), 4. Flexibility(인지적 유연성))를 관찰하였다. 그리고 하루 후 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 없이도 강박행동이 유지되는지 관찰하고, 그 다음날 Hoarding(저장장애) 패턴이 나타나는지 관찰하였다. 이어서

물과 10% sucrose의 위치를 바꾸고 Saline 투여 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹 간의 인지적 유연성(Flexibility)에 차이가 있는지를 관찰하였다. 이러한 인지적 유연성의 부족은 강박장애의 주요 특징이다.

[125] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, Saline 투여 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 모두 물쪽으로의 빈도는 차이가 없었지만 10% sucrose로 향하는 빈도에서는 그룹 간 차이가 유의하게 나타났다(Repeated 1-way ANOVA). 특히, 대조군 대비 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 10% sucrose로 향하는 Checking 빈도가 유의하게 크게 늘어난 것을 확인할 수 있었다.

[126] 또한, 도 7에서 나타낸 바와 같이, Repetitive nose poking(구멍에 코를 반복적으로 들이미는 행동) 역시 Saline 투여 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹 간 유의한 차이를 보임(Reapeated 1-way ANOVA)을 확인하였다. CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 Nose poking 빈도가 크게 늘어난 것을 확인하였다.

[127] 또한, 도 8에서 나타낸 바와 같이, Grooming 시간과 빈도 모두 Saline 투여 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹 간 유의미한 차이가 나타났다(Repeated 1-way ANOVA). 시간과 빈도 모두 Saline 투여 그룹에 비해 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 크게 증가한 것을 확인하였다. 참고로, 본 실험에서 분석한 Grooming은 강박장애의 대표적 증상으로 알려진 과도한 손세척과 대응하는 행동이다.

[128] 이 중에서도 Checking과 Nose poking의 경우 Saline과 CNO(Clozapine n-oxide)를 투여하지 않은 Day 13에서도 강박장애가 유지되고 있음을 보여준다.

[129] 반면에, 도 9에서 나타낸 바와 같이, Checking 빈도수의 유의미한 차이에도 불구하고 마신 10% sucrose의 양에는 Saline 투여 그룹과 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹 간 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 지금까지의 결과들이 Reward(보상)에 의한 차이가 아니라 강박장애로 인한 반복행동임을 증명하는 것이다.

[130] 또한, 실험의 마지막 날(Day 14) 행한 인지적 유연성(Flexibility) 검사 결과는 도 10에서 나타낸 바와 같이, Saline 투여 그룹에 비해 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 유연성이 더 유의하게 낮음을 확인하였다(Student t-test). 유연성 항목은 18일 째(Day 14)의 서로 위치가 뒤바뀐 Water와 Sucrose로 가는 횟수를 측정하여 분석하였다.

[131] 한편, 저장장애(Hoarding) 패턴을 확인하기 위하여 본 발명자들은 두 개의 케이지를 가운데 통로를 두고 이어붙여(도 11 참조), 한쪽을 Home cage로 인식하도록 하루동안 반대쪽으로 가는 통로를 막아 두었으며(Day 12). 그리고 다음 날(Day 13) 저녁 반대쪽에 먹이와 장난감들을 위치시키고 막아놓은 통로를 열어주었다. 이 때, 물은 Home cage 쪽으로 위치시켰다. 그리고 실험의 마지막 날(Day 14) 아침 먹이 펠렛과 장난감들을 Home cage로 얼마나 가져왔는지에 대한 Saline 투여 그룹과 CNO 투여 그룹에서의 차이를 관찰하였다.

[132] 그 결과 도 12 내지 14에서 나타낸 바와 같이, Saline 투여 그룹에 비해 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 먹이 펠렛과 장난감의 Hoarding이 모두 유의미하게 증가했음을 관찰하였다. 이 중, 장난감의 경우 불필요함에도 불구하고 CNO(Clozapine n-oxide) 투여 그룹에서 유의미하게 많은 양을 저장했다는 측면에서 강박장애의 저장장애(Hoarding)를 구현한 것으로 볼 수 있다.

[133] 추가적으로, 마지막 날로부터 20일이 지난 후 Saline 투여한 마우스에 비해 CNO(Clozapine n-oxide) 투여한 마우스의 입 주변 털들이 빠져있는 것을 관찰하였으며, 이는 과도한 Grooming에 의한 표현형을 나타내는 것이다(도 15 참조).

[134]

[135] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[136] 본 발명의 BLA-DMS 신경회로를 활성화시킨 동물의 경우 강박장애를 연구할 수 있는 동물모델로 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 인간을 제외한 동물의 기저측편도체(Basolateral amygdala)로부터 등내측선조체(Dorsomedial striatum)로 연결되는 신경회로를 활성화시키는 단계를 포함하는, 강박장애 동물모델의 제조방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 신경회로의 활성화는 물리적인 활성화 또는 화학적인 활성화인 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 물리적인 활성화는 기저측편도체(Basolateral amygdala) 부위에 채널로돕신(channel rhodopsin) 유전자를 포함하는 바이러스를 주입하고, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 광섬유를 설치한 후, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 빛을 조사함으로써 신경회로를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 화학적인 활성화는 기저측편도체(Basolateral amygdala) 부위에 DIO(Double-Floxed Inverted Open reading frame) 및 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein) 유전자를 포함하는 바이러스를 주입하고, 등내측선조체(Dorsomedial striatum) 부위에 Cre 재조합 효소 유전자를 포함하는 역행(retrograde) 바이러스를 주입한 후, 바이러스가 활성화될 때 약물을 처리함으로써 신경회로를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 5] 제3항 또는 제4항에 있어서,
상기 바이러스는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

[청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)은 hM2Di, hM4Di, hM3Dq 및 hM5Dq 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

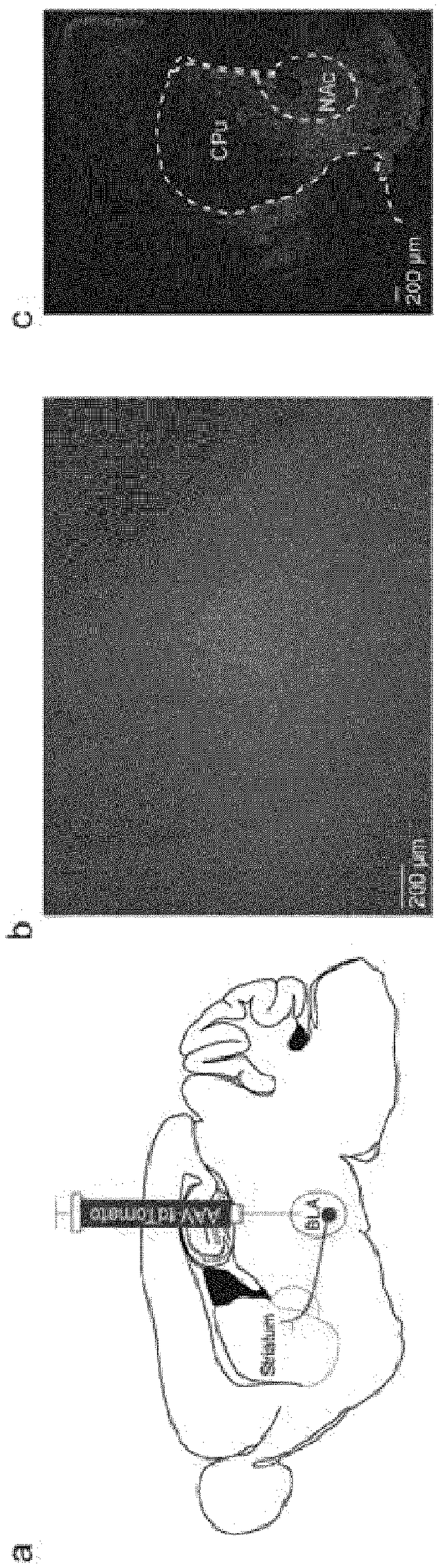
[청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 약물은 화학유전학적 단백질(chemogenetic protein)을 활성화시키는 약물로서 클로자핀 N-옥사이드(Clozapine N-oxide), 클로자핀(clozapine), 컴파운드 21(compound 21) 및 페르라핀(Perlapine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

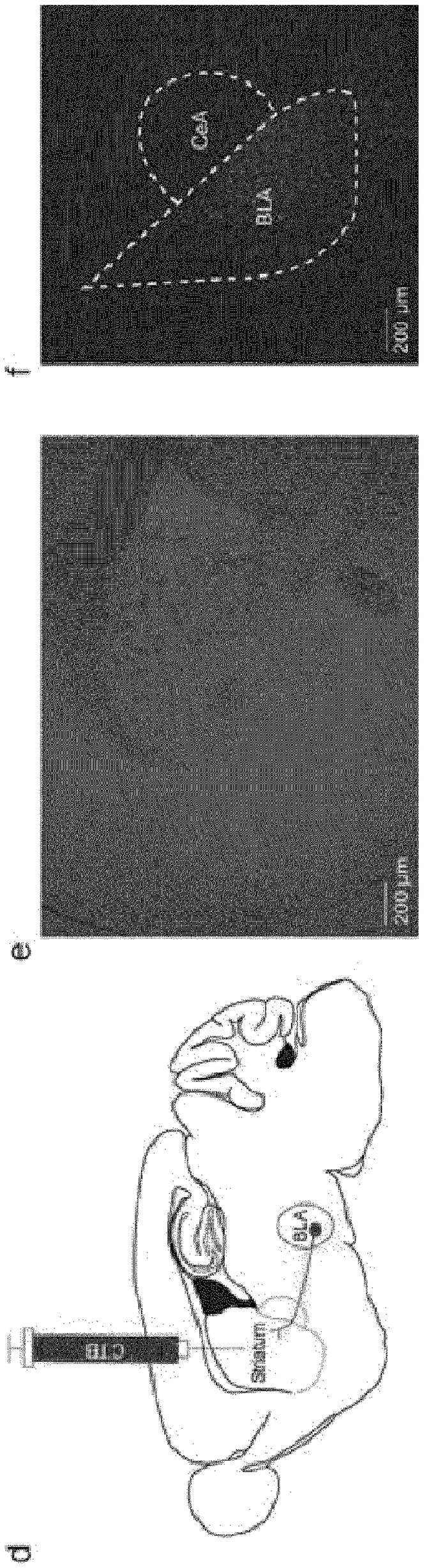
[청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 강박장애 동물모델.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 강박장애 동물모델은 확인행동, 반복행동, 청결행동 및 수집행동을 모두 보이는 것을 특징으로 하는 강박장애 동물모델.

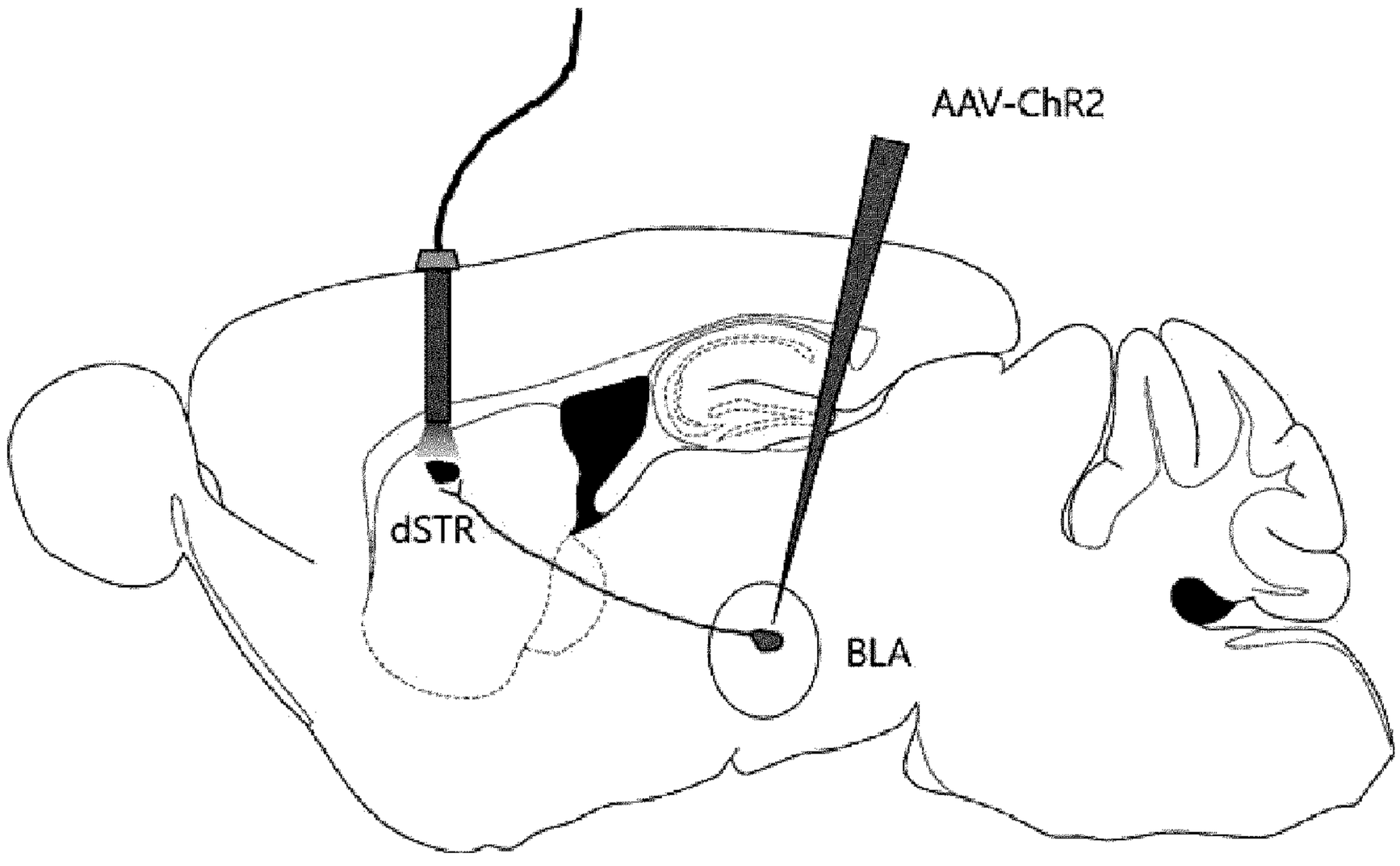
[청구항 10] 제8항의 강박장애 동물모델에 후보약물을 투여하는 단계; 및
강박장애로 인해 발생되는 확인행동, 반복행동, 청결행동 또는
수집행동이 감소되는지 여부를 측정하는 단계를 포함하는, 강박장애를
예방 또는 치료하기 위한 후보약물 스크리닝 방법.

[도1]

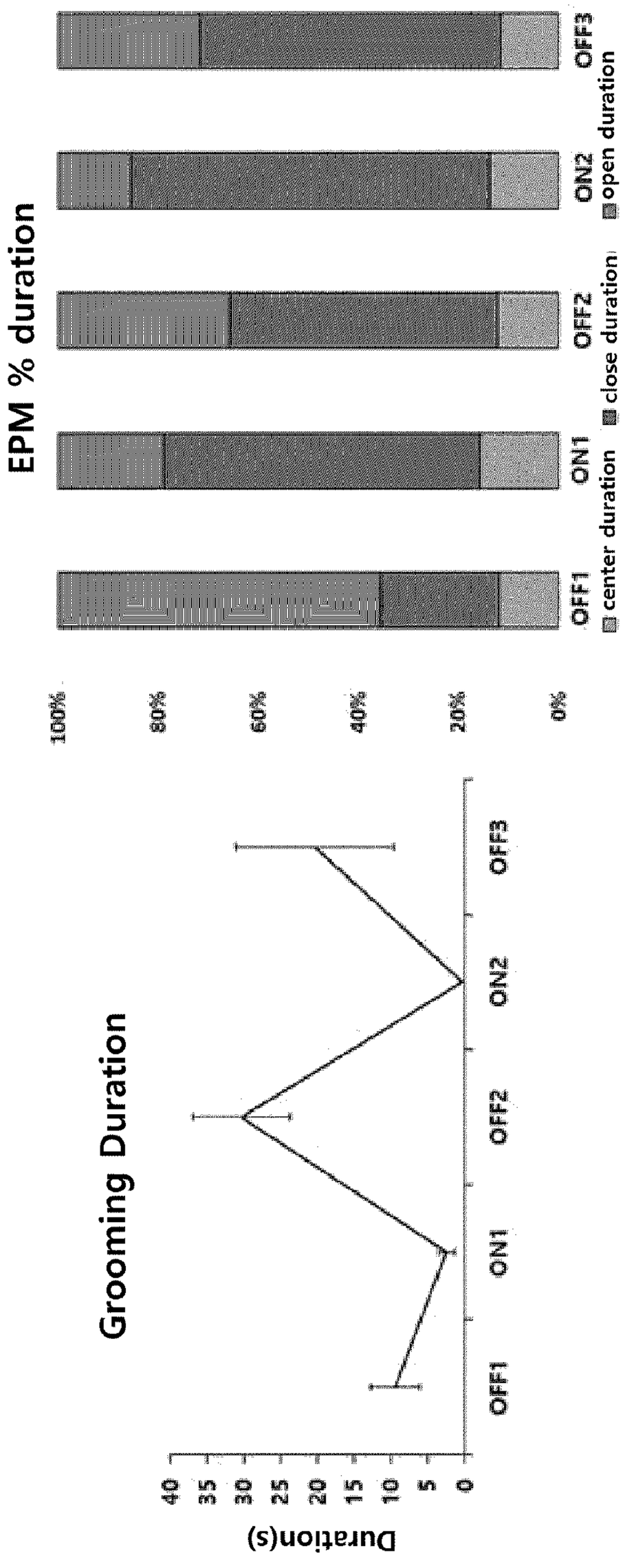

c
CPu
NAcc
200 μm
b
200 μm
a
AAV-hSyn-hM3Dq
BLA
Amygdala


CeA
BLA
200 μm
d
200 μm
c
CTB
BLA
Amygdala

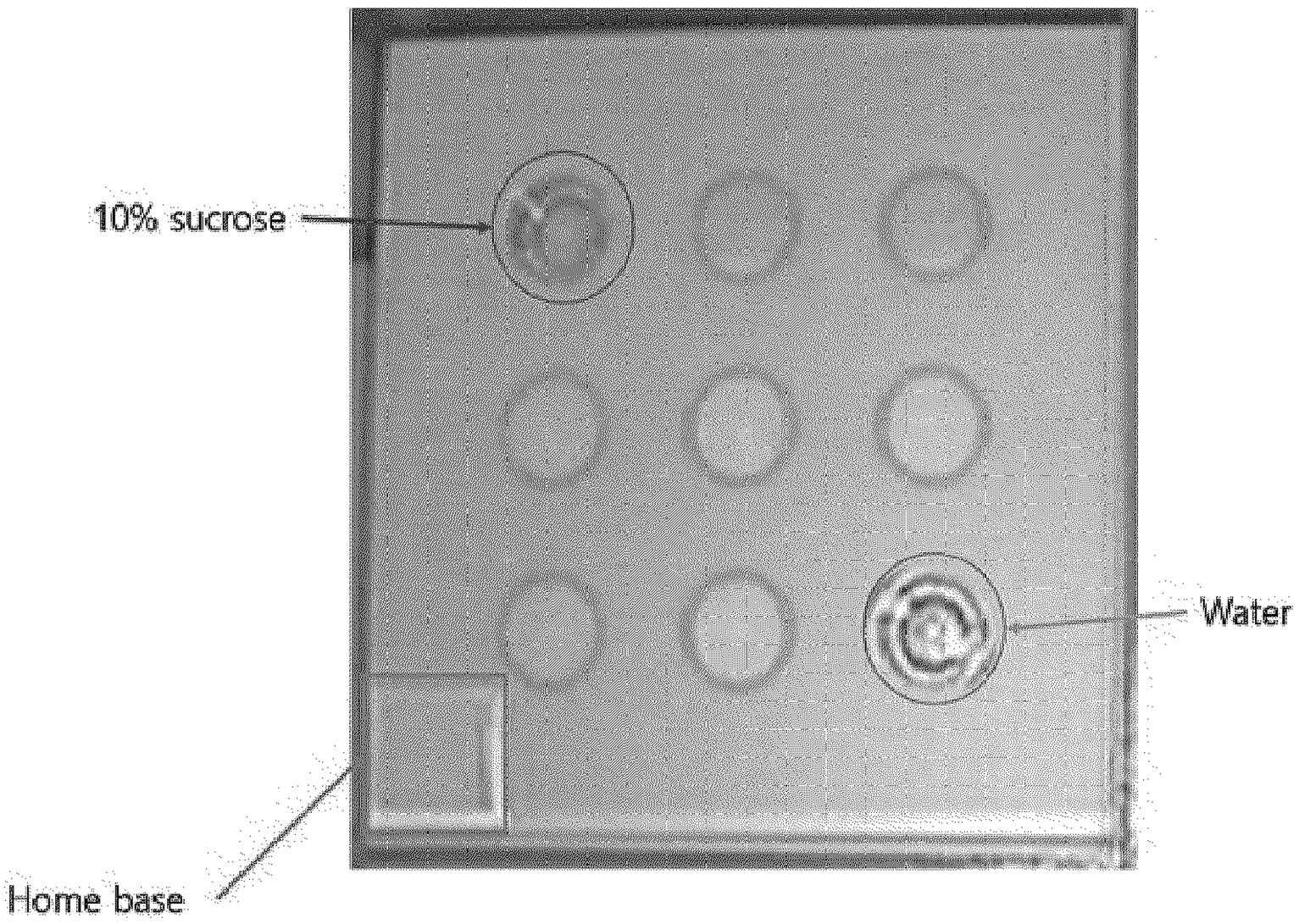
[도2]



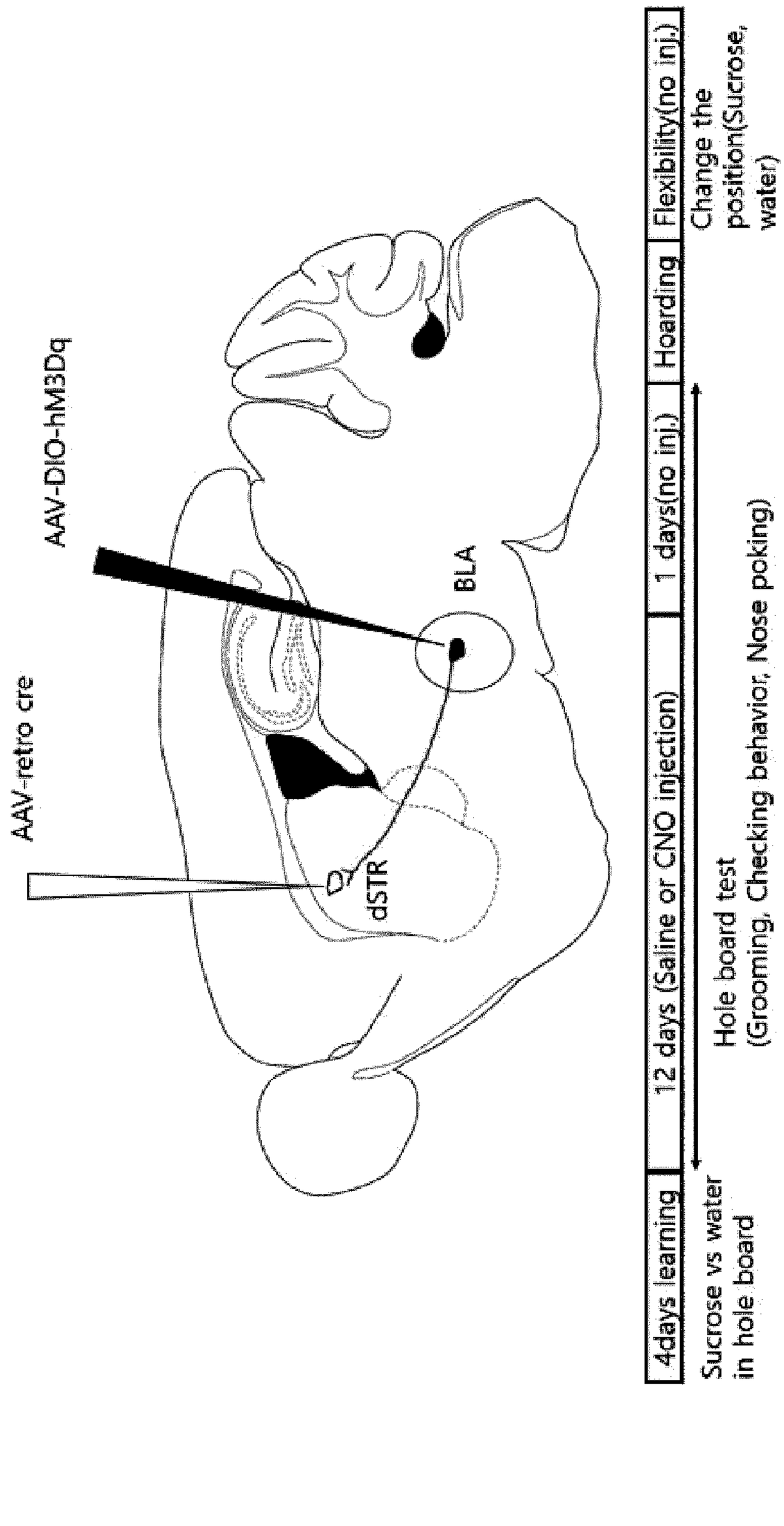
[도3]


EPM % duration
OFF3
ON2
OFF2
ON1
OFF1
open duration
closed duration
center duration
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Grooming Duration
Duration(s)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
OFF1
ON1
OFF2
ON2
OFF3

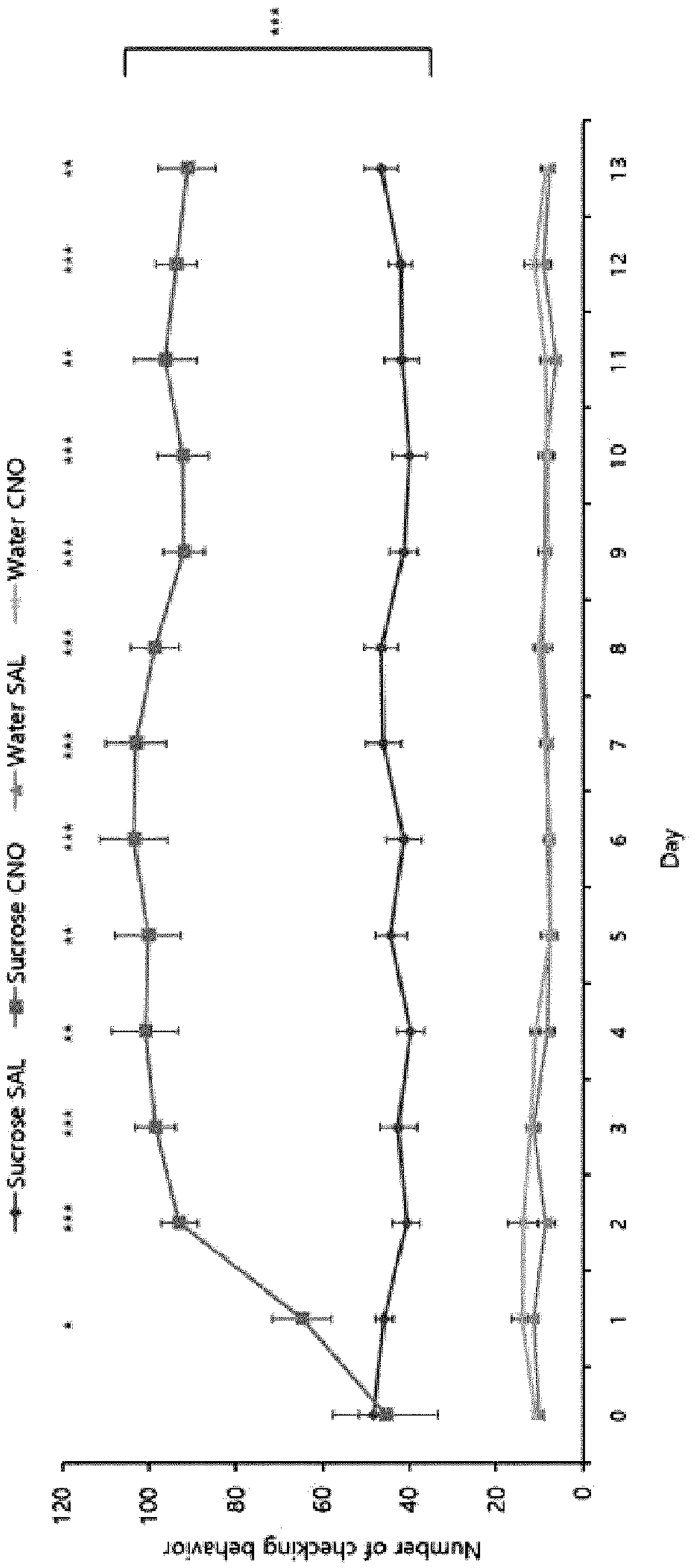
[도4]



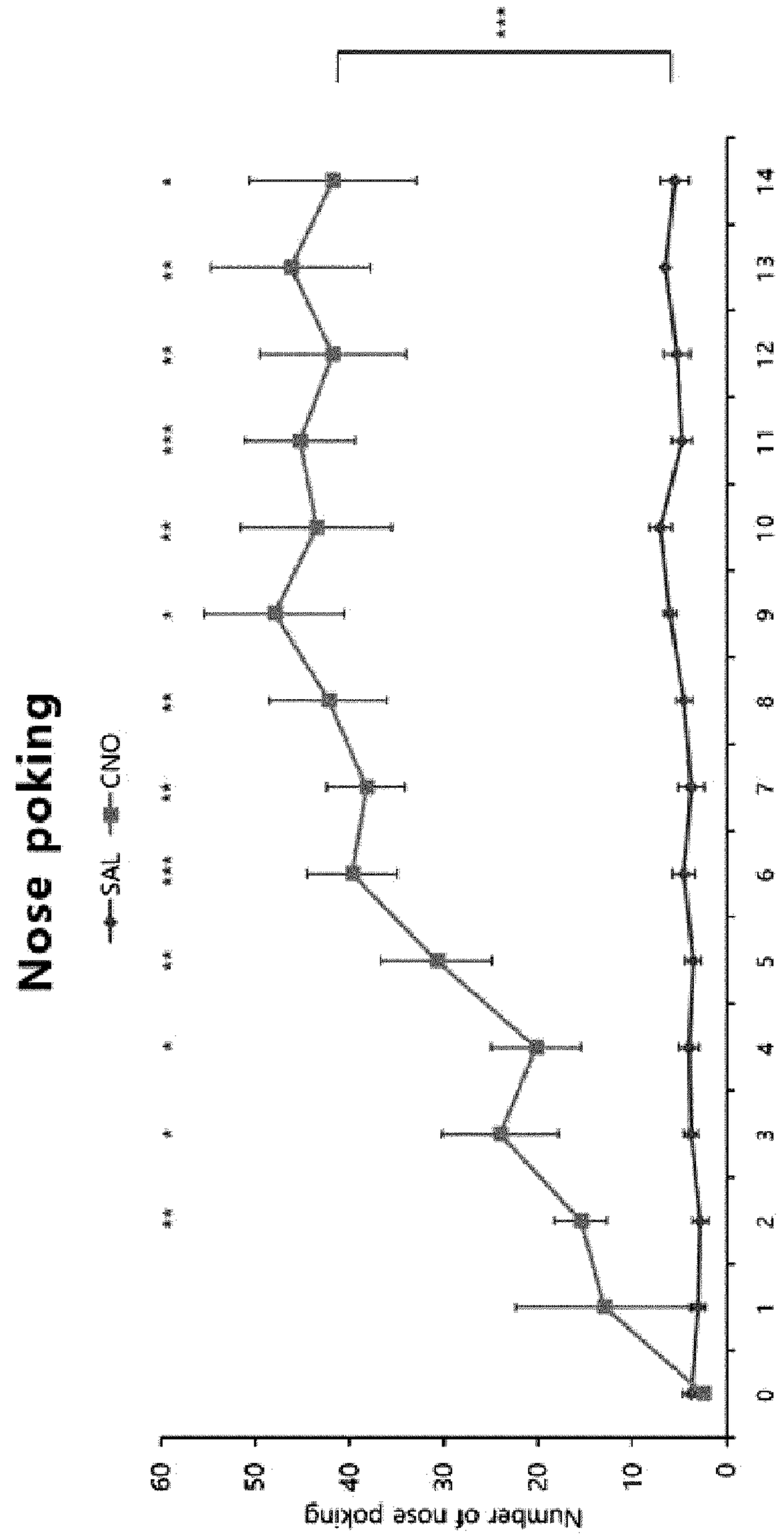
[도5]


AAV-retro cre
AAV-DIO-hM3Dq
dSTR
BLA
4days learning
12 days (Saline or CNO injection)
1 days(no inj.)
Hoarding
Flexibility(no inj.)
Sucrose vs water in hole board
Hole board test (Grooming, Checking behavior, Nose poking)
Change the position(Sucrose, water)

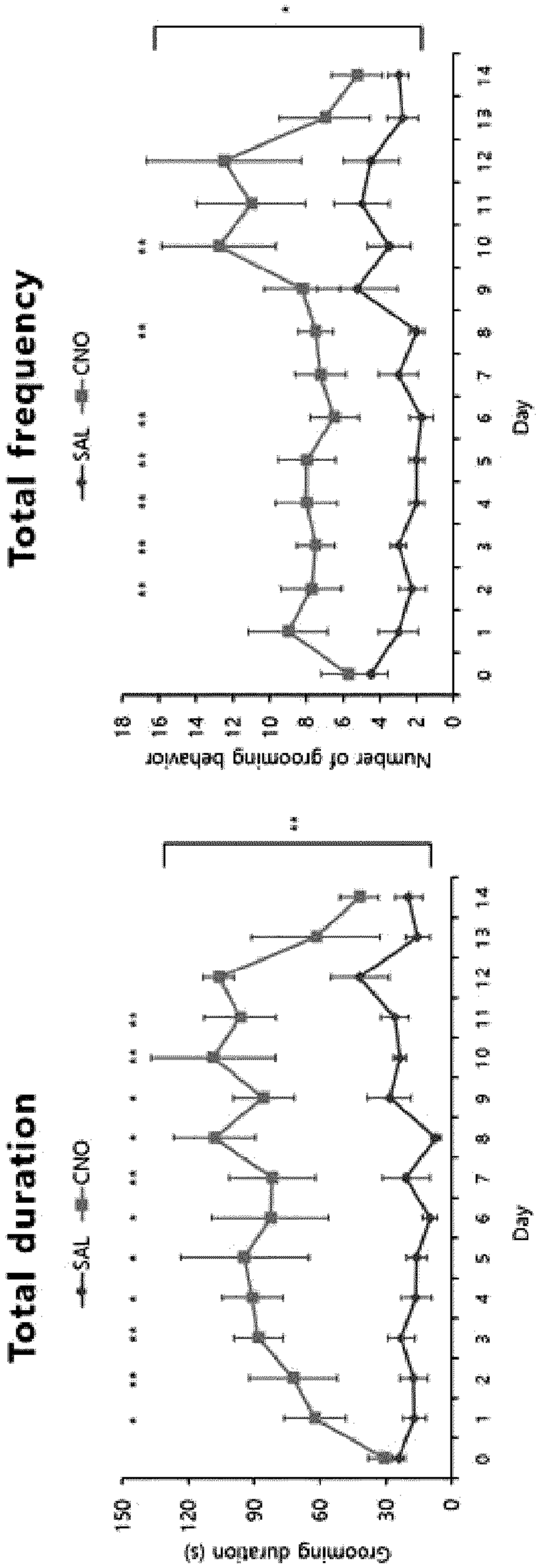
[도6]


Checking behavior
Sucrose SAL
Sucrose CNO
Water SAL
Water CNO
Number of checking behavior
Day
0
20
40
60
80
100
120
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13

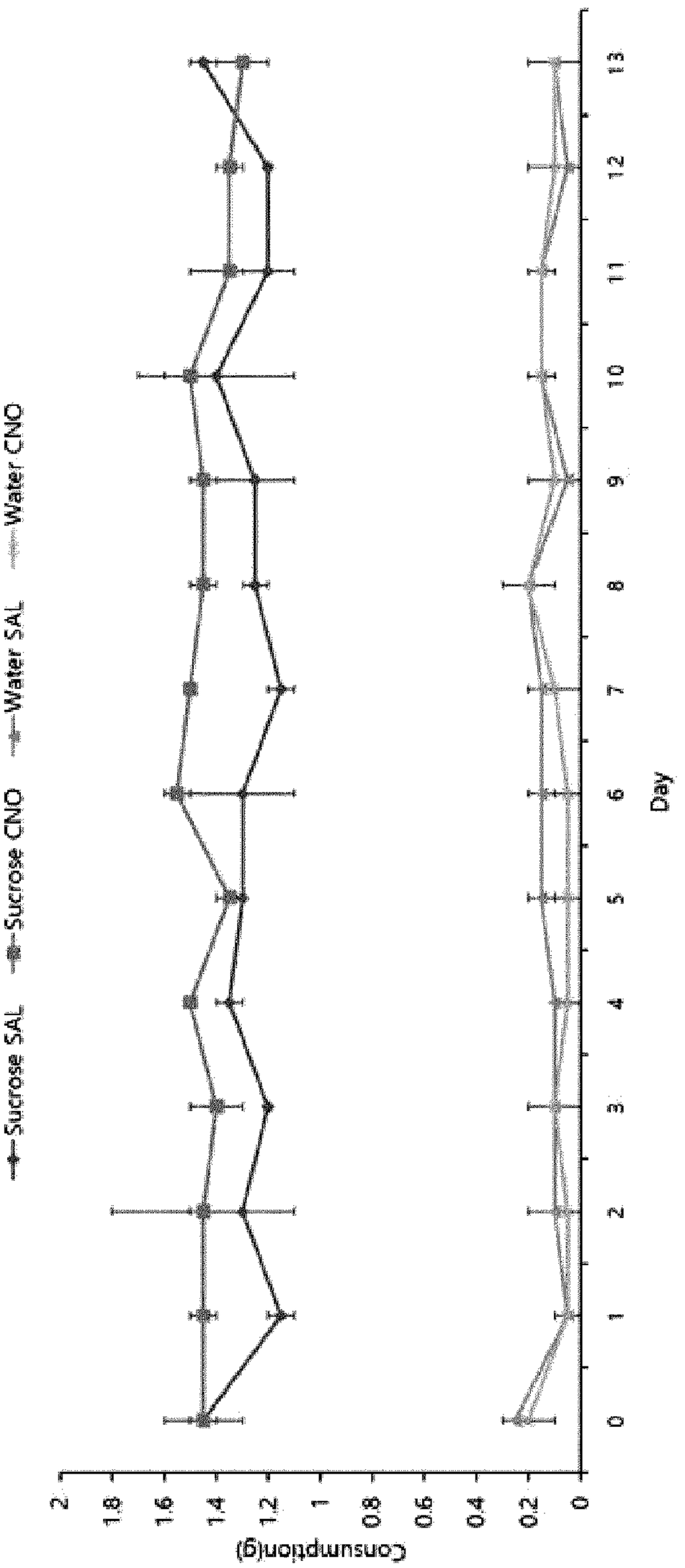
[도7]


Nose poking
SAL
CNO
Number of nose poking
Day
0
10
20
30
40
50
60
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
*
**
***

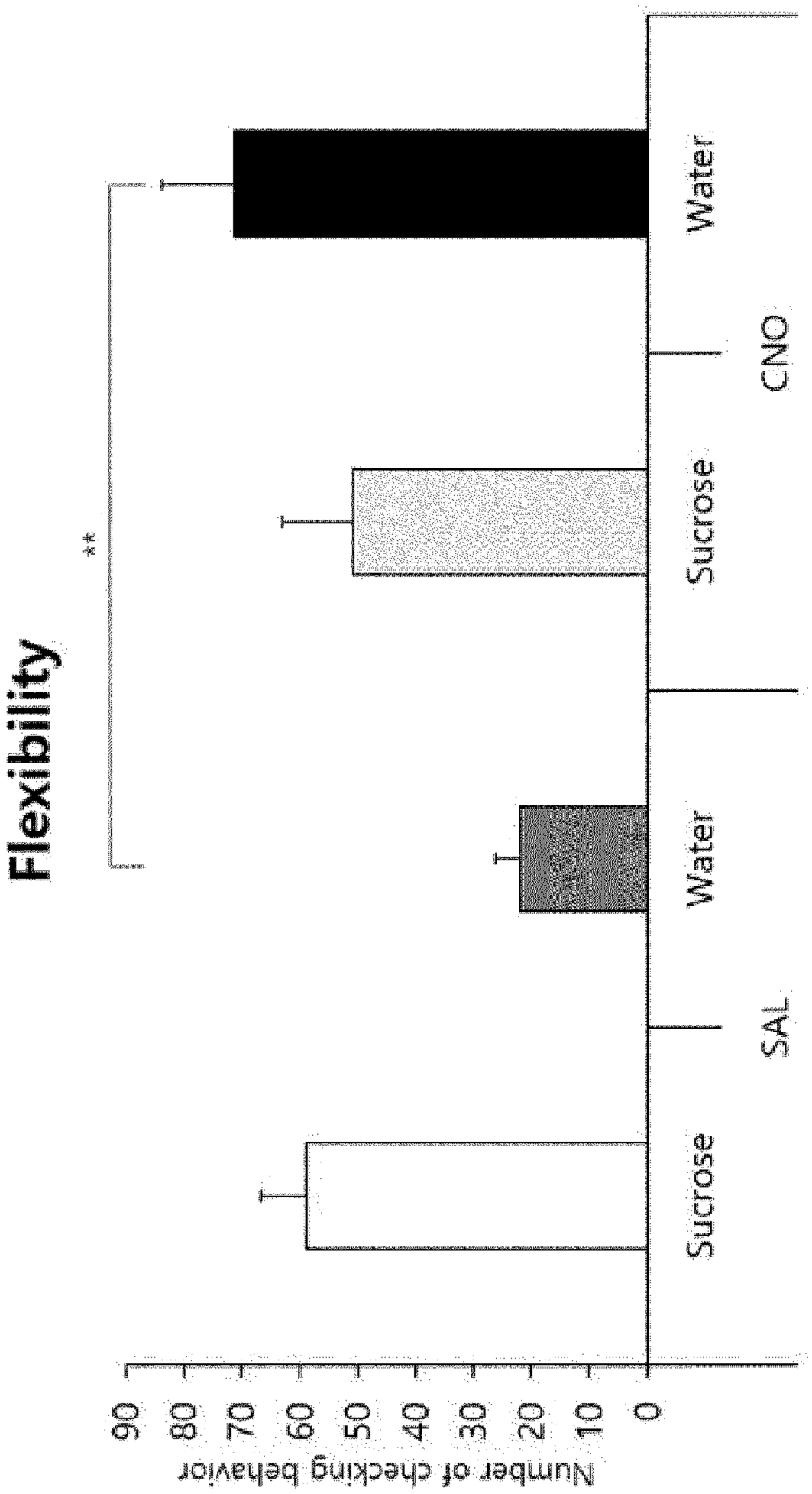
[도8]


Total frequency
SAL
CNO
Number of grooming behavior
Day
Total duration
SAL
CNO
Day
Grooming duration (s)

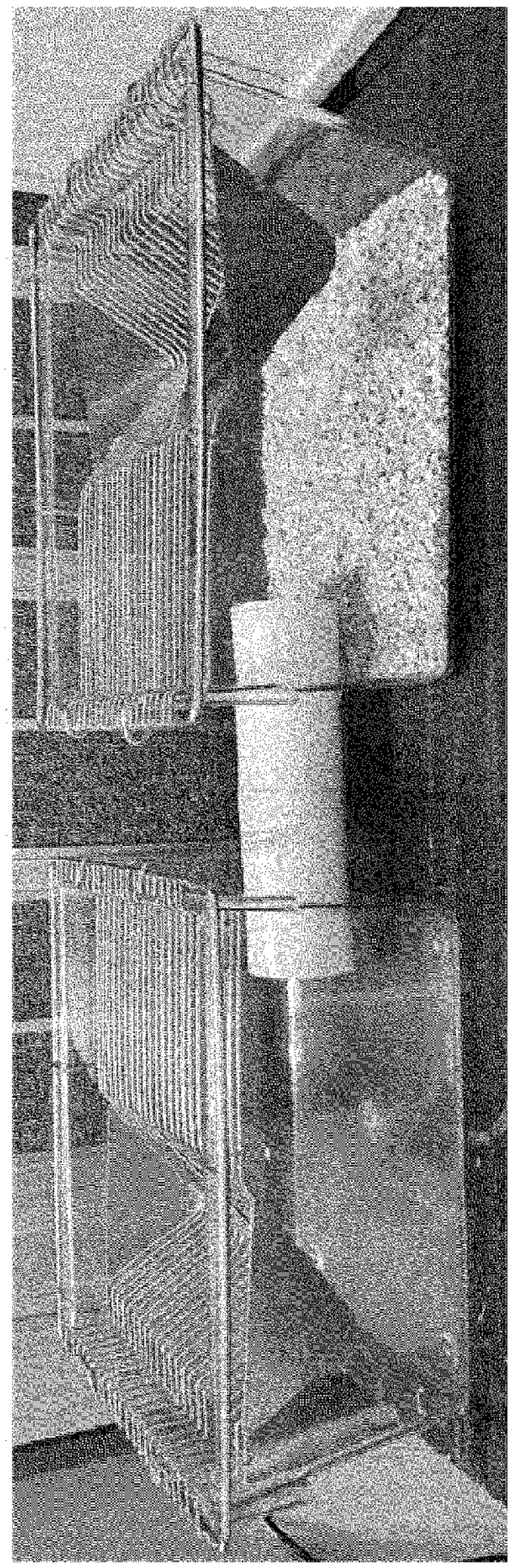
[도9]


Total drinking
Sucrose CNO
Water SAL
Water CNO
Sucrose SAL
Consumption(g)
Day

[도10]

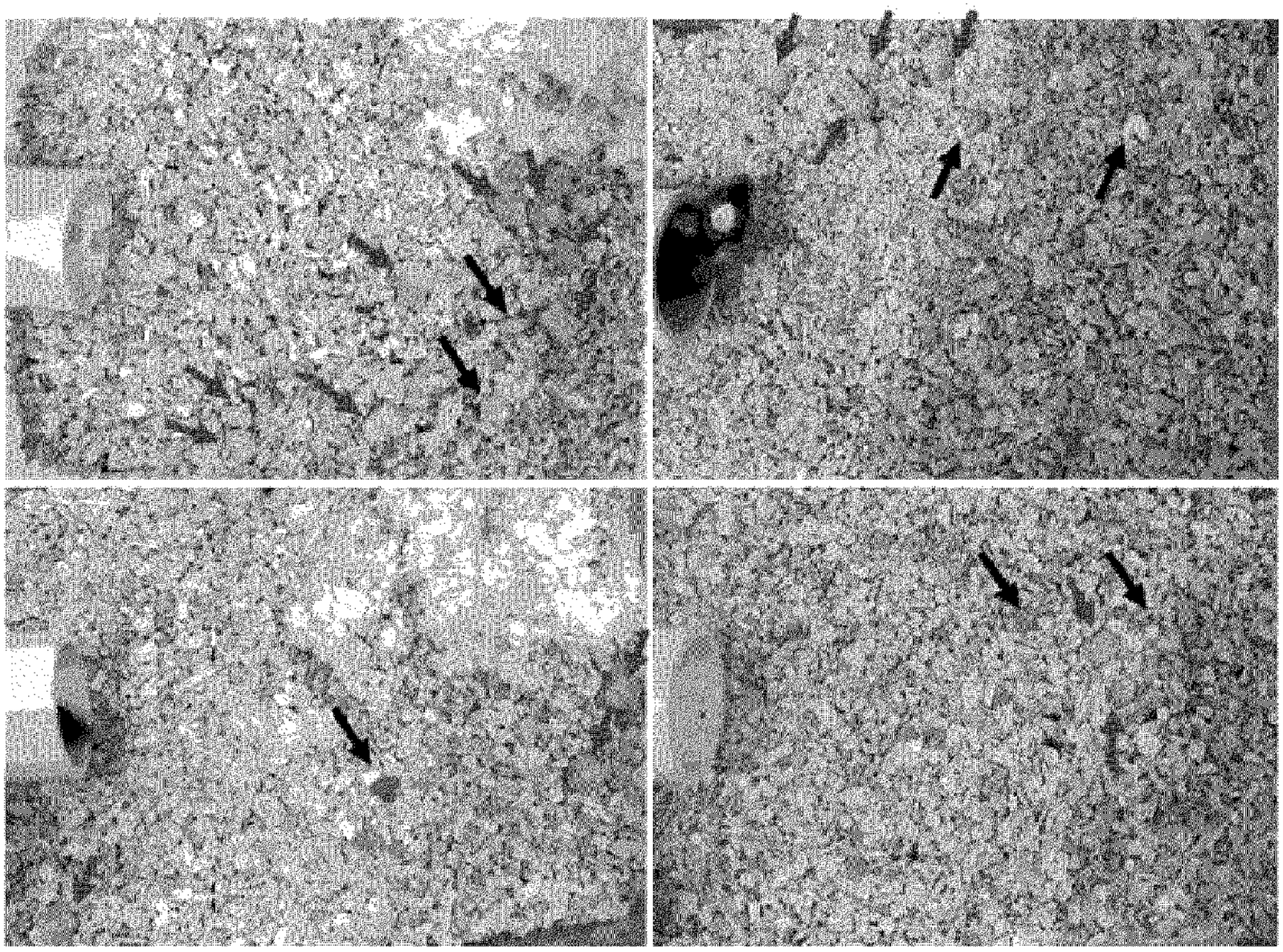

Flexibility
**
Water
CNO
Sucrose
Water
SAL
Sucrose
Number of checking behavior
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

[도11]



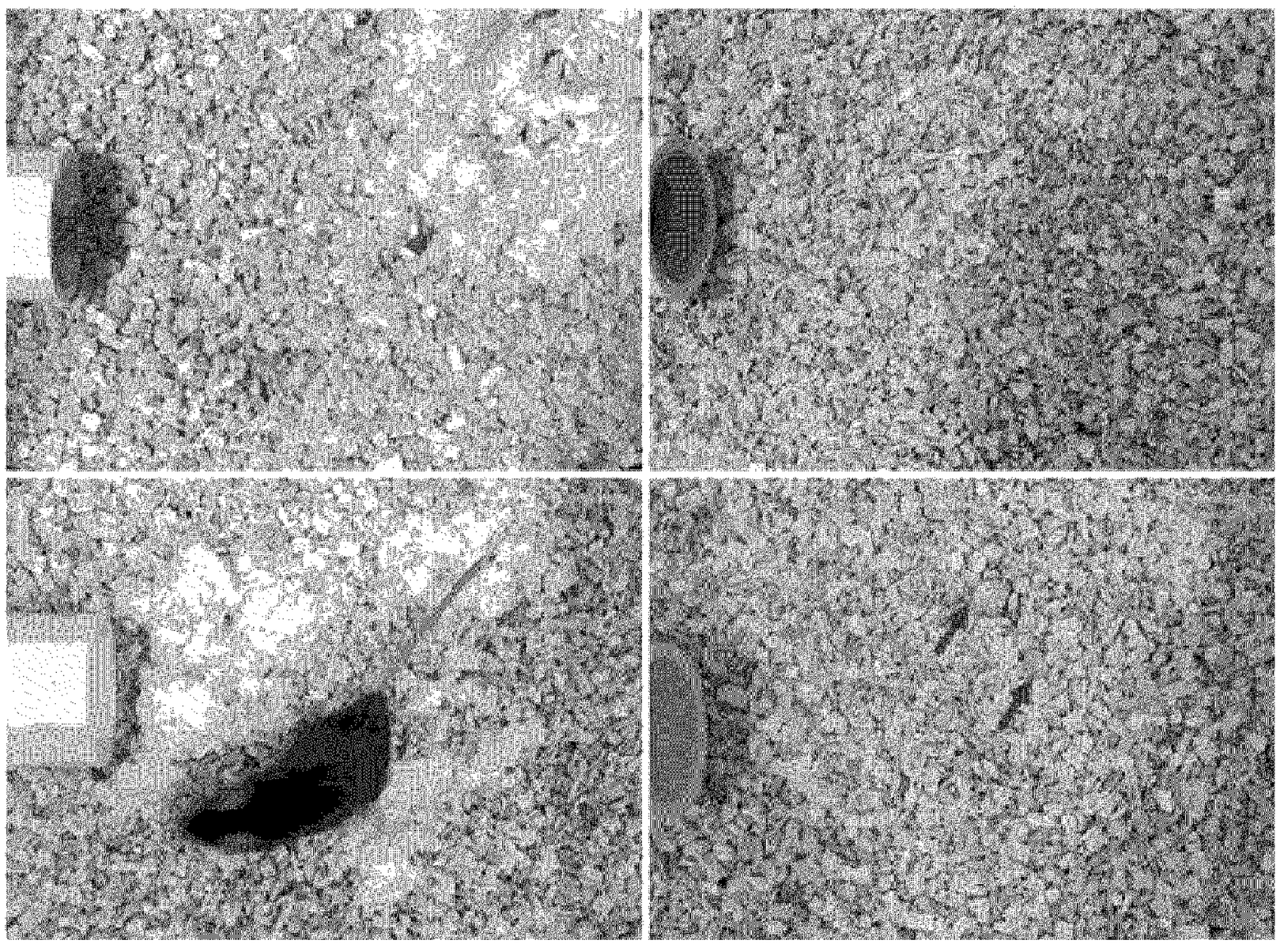
[도12]

Hoarding (CNO)

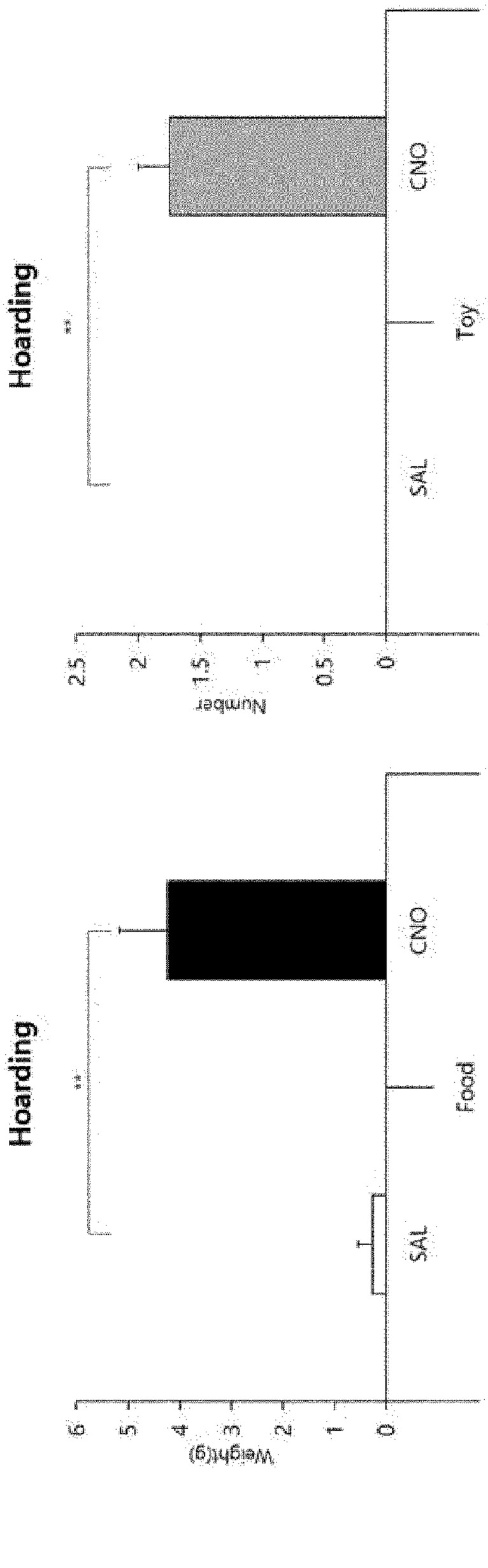


[도13]

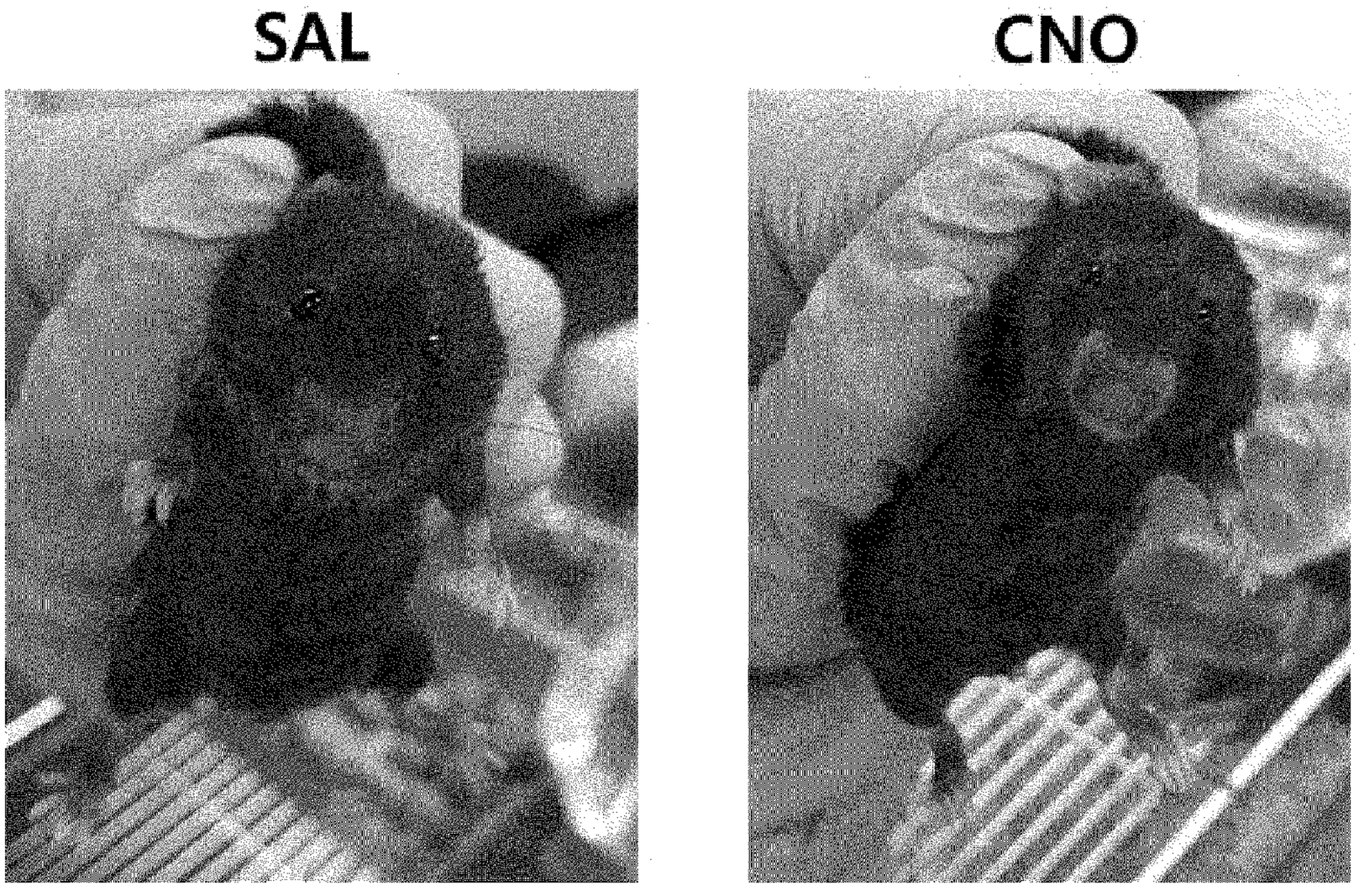
Hoarding (SAL)



[도14]


Hoarding
**
CNO
SAL
Toy
Number
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Hoarding
**
CNO
SAL
Food
Weight(g)
6
5
4
3
2
1
0

[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/016994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027(2006.01)i; **C12N 15/85**(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)

A01K 67/027(2006.01); G01N 33/50(2006.01)

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: 강박장애 (obsessive compulsive disorder), 기저측편도체 (Basolateral amygdala), 등내측선조체 (dorsomedial striatum), 동물모델 (animal model)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2018-0037082 A (DAEGU GYEONGBUK INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 11 April 2018 (2018-04-11) See abstract; and claims 1 and 7.	1-7
Y	SIMMLER, L. D. et al. Neural circuits in goal-directed and habitual behavior: Implications for circuit dysfunction in obsessive-compulsive disorder. Neurochemistry international. 2019[electronic publication 10 May 2019], vol. 129, thesis no. 104464, pp. 1-9. See abstract; figure 2; and pages 4-5.	1-7
Y	SUN, T. et al. Basolateral amygdala input to the medial prefrontal cortex controls obsessive-compulsive disorder-like checking behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019[electronic publication 11 February 2019], vol. 116, no. 9, pp. 3799-3804. See abstract; and pages 3800 and 3803.	3-7
A	CORBIT, L. H. et al. The role of the amygdala-striatal pathway in the acquisition and performance of goal-directed instrumental actions. The Journal of Neuroscience. 2013, vol. 33, no. 45, pp. 17682-17690. See 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
23 March 2021	**23 March 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/016994

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WOOD, J. et al. A framework for understanding the emerging role of corticolimbic-ventral striatal networks in OCD-associated repetitive behaviors. Frontiers in systems neuroscience. 2015, vol. 9, thesis no. 171, pp. 1-22. See entire document.	1-7
A	YIN, H. H. et al. The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. European Journal of Neuroscience. 2005, vol. 22, pp. 513-523. See entire document.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/016994

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☑ Claims Nos.: **9,10**
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:

Claims 9-10 refer to claim 8 which violates the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)), and thus are unclear.

3. ☑ Claims Nos.: **8**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/016994

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0037082 A	11 April 2018	KR 10-1881650 B1	24 July 2018

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2020/016994

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/027(2006.01)i; **C12N 15/85**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01K 67/027(2006.01); G01N 33/50(2006.01)

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: 강박장애 (obsessive compulsive disorder), 기저측편도체 (Basolateral amygdala), 등내측선조체 (dorsomedial striatum), 동물모델 (animal model)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2018-0037082 A (재단법인대구경북과학기술원 등) 2018.04.11 요약; 청구항 1, 7	1-7
Y	SIMMLER, L. D. 등, 'Neural circuits in goal-directed and habitual behavior: Implications for circuit dysfunction in obsessive-compulsive disorder', Neurochemistry international, 2019[전자공개 2019.05.10], 129권, 논문번호 104464, 페이지 1-9 초록; 도면 2; 페이지 4-5	1-7
Y	SUN, T. 등, 'Basolateral amygdala input to the medial prefrontal cortex controls obsessive-compulsive disorder-like checking behavior', Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019[전자공개 2019.02.11], 116권, 9호, 페이지 3799-3804 초록; 페이지 3800, 3803	3-7
A	CORBIT, L. H. 등, 'The role of the amygdala-striatal pathway in the acquisition and performance of goal-directed instrumental actions', The Journal of Neuroscience, 2013, 33권, 45호, 페이지 17682-17690 전체 문헌	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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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
2021년03월23일(23.03.2021)	**2021년03월23일(23.03.2021)**
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 **대한민국 특허청** **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)** 팩스 번호 **+82-42-481-8578**	심사관 정다원 전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/016994

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WOOD, J. 등, 'A framework for understanding the emerging role of corticolimbic-ventral striatal networks in OCD-associated repetitive behaviors', Frontiers in systems neuroscience, 2015, 9권, 논문번호 171, 페이지 1-22 전체 문헌	1-7
A	YIN, H. H. 등, 'The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning', European Journal of Neuroscience, 2005, 22권, 페이지 513-523 전체 문헌	1-7

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/016994

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:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☑ 청구항: **9,10**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

청구항 9-10은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항 8을 인용하고 있어 불명료 합니다.

3. ☑ 청구항: **8**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/016994

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0037082 A	2018/04/11	KR 10-1881650 B1	2018/07/24