

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 1 월 28 일 (28.01.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/013900 A1

- (51) 국제특허분류:
A01K 67/027 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007714
- (22) 국제출원일: 2015 년 7 월 24 일 (24.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0094806 2014 년 7 월 25 일 (25.07.2014) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이정수 (LEE, Jeong-Soo); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 유권 (YU, Kweon); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 조현주 (CHO, Hyun Ju); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 양세열 (YANG, Sel Yeol); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

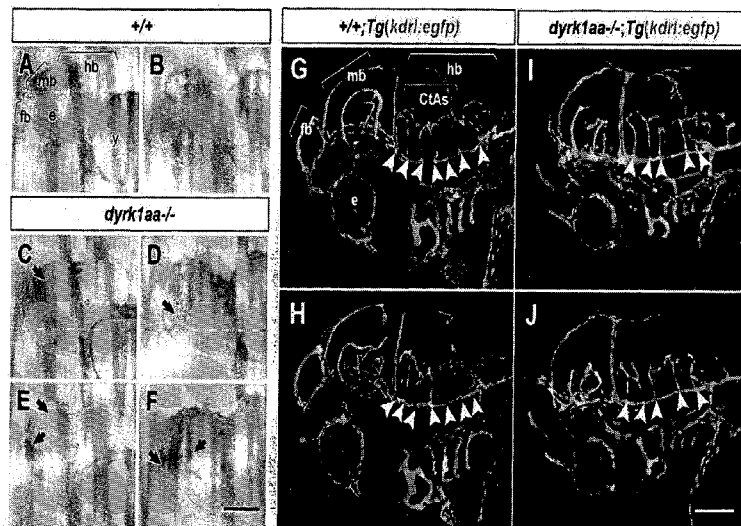
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DYRK1AA GENE-DELETED ZEBRAFISH MODEL, AND METHOD FOR PREVENTING ANGIOGENESIS DEFECTS AND SCREENING FOR THERAPEUTIC AGENT BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : DYRK1AA 유전자 결실된 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한 혈관 발생 결함 예방 및 치료제 스크리닝 방법

[도 7]



(57) Abstract: The present invention relates to a dyrk1aa gene-deleted zebrafish model and a method for preventing angiogenesis defects and screening for a therapeutic agent by using the same. It has been confirmed from the mutant zebrafish of the present invention that the dyrk1aa gene plays an essential role in angiogenesis and in blood vessel maintenance, and an analysis of the mutant zebrafish can be utilized in research on the mechanisms of angiogenesis and blood vessel maintenance by the dyrk1aa gene and in screening for a small molecule.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/013900 A1

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 Dyrkla 유전자가 결실된 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한 혈관 발생 결함 예방 및 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 돌연변이 제브라피쉬로부터 dyrklaa 유전자는 혈관의 발생 및 유지에서 필수적인 역할을 하는 것을 확인하였으며, 상기 돌연변이 제브라피쉬의 분석은 dyrklaa 유전자에 의한 혈관 발생 및 유지 기작 연구와 저분자 물질 스크리닝에 활용할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

Dyrklaa 유전자가 결실된 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한 혈관 발생 결함 예방 및 치료제 스크리닝 방법

5

【기술분야】

본 발명은 Dyrklaa 유전자가 결실된 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한 혈관 발생 결함 예방 및 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

10 【배경기술】

제브라피쉬(zebrafish)는 작은 크기의 열대성 민물 물고기로서, 초기발생의 진행이 빠르고 다량의 배아를 얻을 수 있어 세포 및 유전학 연구에 용이하다. 초기 발생중의 배아(embryo)가 투명하므로 형광마커를 이용하여 발생과정 중 혈관과 같은 내부 조직의 발생 과정 등을 세포수준에서
15 실시시간으로 관찰할 수 있다. 또한 미세주입을 통한 모르폴리노(morpholino) 주입, RNA 과발현 또는 형질전환체 제작을 통한 유전자조작이 상대적으로 쉬운 장점이 있으며, 특히 제브라피쉬 배아의 작은 크기와 약물의 침투가 잘 이루어지는 특성을 이용하여 저분자 물질 스크리닝을 수행하여 특정 활성을 보이는 물질을 탐색할 수 있다.

20 혈관형성에 대한 연구에 있어서 제브라피쉬의 혈관시스템은 포유동물을 포함하는 다른 척추동물과 비교했을 때 구조적, 기능적, 발생학적으로 매우 유사하여(Isogai et al., 2001) 이를 이용한 기초 발생학적 연구와 질병 원인 유전자의 기작연구 등에 매우 활발히 활용되고 있다(Wilson et al., Science 2006; Petente et al., Genes and Dev. 2007; Hogan et al., Human Mol. Genetics
25 2008; Guarani et al., Nature 2011).

DYRK1A(Dual regulated tYrosinephosphorylation-Regulated K_{in}ase 1A)는 세린-트레오닌 인산화효소(Serine-Threonine kinase)의 일종인 Dual regulated

tyrosinephosphorylation-Regulated Kinase family에 속하는 단백질로서(그림 1A), 이를 암호화하는 유전자 DYRK1A는 다운증후군의 직접적인 원인으로 알려져 있는 공통 삼염색체성(trisomy) 부위인 Down Syndrome Critical Region(DSCR)에 위치하여 다운증후군을 유발시키는데 결정적인 유전자 중 하나로서 여겨지고 있다. DYRK1A 유전자는 발생시 또는 성체에서 신경계와 혈관계 등을 포함하는 여러 조직들에 발현하며, 신경계에서 DYRK1A는 신경세포의 분화시점, 축색성장(axon outgrowth), 수지상 조직(dendrite) 형성, 시냅스 가소성(synaptic plasticity) 등을 조절한다고 알려져 있다.

다운증후군 환자들은 고형암의 발생 빈도가 줄어들며 동맥경화나 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy)과 같은 혈관관련 질환들이 감소한다는 보고들 (Hasle et al., Lancet, 2000)이 있으며, 다운증후군을 일으키는 주요 병인(病因)으로서의 DYRK1A 유전자의 중요성을 고려해 보았을 때, DYRK1A와 혈관형성 및 유지, 또한 이와 관련된 고형암 및 뇌졸중 등과의 관련성을 추론해 볼 수 있다. 실제로 DYRK1A는 혈관에서 발현이 관찰되며, 신경 발생 과정 중 DYRK1A에 의한 인산화에 의해 활성이 조절된다고 보고된 SIRT1과 NOTCH1(Guarani et al., Nature, 2011; Fernandez-Martinez et al., J. Cell Sci., 2009)은 신생 혈관 형성에 필수적인 유전자들로 알려져 있다. 더불어 면역반응과 혈관형성에 필수적이면서 다운증후군에 중요한 신호 중 하나로 알려진 NFAT(nuclear factor of activated T cells)의 경우 DYRK1A의 직접적인 기질(substrate)로서 DYRK1A에 의해 기능이 저해됨이 알려져 있다(Arron et al., Nature, 2006). 최근의 연구에서는 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)에 의한 혈관 형성시 DSCR의 유전자인 DSCR1/RCAN1의 혈관형성 억제기능을 DYRK1A가 향상시킬 수 있음이 보고되었다(Baek et al., Nature, 2009). 따라서 DYRK1A가 혈관 발생 및 유지에 중요한 역할을 하며 고형암 및 뇌졸중과 같은 혈관발생 관련 질환에 기능할 가능성이 매우 높으나 그 기능에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

최근에 개발된 게놈 조작법인 TALEN(Transcription activator-like

effector nuclease) 기술을 적용하면 동물모델에서 특정 유전자가 제거된(Knockout) 돌연변이체를 고효율로 제작할 수 있다(Kim et al., Nature Biotech., 2013). TALEN은 표적 염기서열과 결합하는 Tale effector와 DNA를 자르는 FokI nuclease를 포함하는 서로 독립적인 두 도메인으로 이루어진 단백질 쌍으로 이루어져 있으며, Tale effector는 DNA 염기서열 특이적인 RVD(repeat variable diresidue)를 포함하는 34개의 아미노산 서열이 반복되는 조합을 통해 DNA의 표적 염기서열에 결합하게 된다. 이에 따라 FokI nuclease가 타겟 DNA를 절단하여 이중가닥의 절단이 일어나면 주로 비상동 말단결합 회복 시스템(non-homologous end-joining repair system)을 통해 다양한 삽입(insertion) 또는 결손(deletion) 기능 저해 돌연변이가 유도될 수 있다(Hisano et al. Dev. Growth Diff., 2013).

이에, 본 발명자들은 DYRK1A 유전자의 혈관 발생 및 유지에 미치는 기능 연구를 위하여 TALEN 기술을 이용하여 제작된 제브라피쉬 *dyrk1aa* 유전자 녹아웃 돌연변이체를 제작하였으며, 돌연변이체 분석을 통하여 혈관 발생 및 유지에서의 *dyrk1aa* 유전자의 기능을 분석하고, 이를 기반으로 하여 암 또는 뇌혈관 질환과 같은 혈관 발생(angiogenesis) 관련 질환의 예방 또는 치료제 발굴을 위한 스크리닝 시스템 구축에 활용하고자 한다.

20 【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 *dyrk1aa* 유전자가 녹아웃된 제브라피쉬 모델 제작과 확립 및 이를 이용한 혈관 발생 관련 질환의 예방 또는 치료제 발굴을 위한 스크리닝 시스템을 제공하는 것이다.

25

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *dyrk1aa* 유전자가 결실된

돌연변이 제브라피쉬 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 돌연변이 제브라피쉬를 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 돌연변이 제브라피쉬를 이용한 혈관 발생 결함
5 및 암 예방 및 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 *dyrk1aa* 유전자가 결실된 제브라피쉬 모델 및 이를 이용한
혈관 발생 결함 예방 및 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의
10 돌연변이 제브라피쉬로부터 *dyrk1aa* 유전자는 혈관의 발생 및 유지에서
필수적인 역할을 하는 것을 확인하였으며, 상기 돌연변이 제브라피쉬의 분석은
dyrk1aa 유전자에 의한 혈관 발생 및 유지 기작 연구와 저분자 물질
스크리닝에 활용할 수 있다.

15 【도면의 간단한 설명】

도 1은, 세린-트레오닌 인산화효소(serine/threonine kinase)의 5' 말단
부분인 *dyrk1aa* exon 5에 작용하는 TALEN construct의 구조 모식도를 나타낸
도이다.

도 2는, 제작된 *dyrk1aa* TALEN RNA를 제브라피쉬 제 1 세포기 배아에
20 미세주입한 후 DNA의 T7 엔도뉴클라아제(endonuclease) I 또는 제한효소
StuI을 이용하여 절단한 것을 나타낸 도이다.

도 3은, 야생형 및 *dyrk1aa* 돌연변이 제브라피쉬 발생 배에서 *dyrk1aa*
TALEN RNA의 활성을 T7E1 절단에 의해 확인한 도이다.

도 4는, 각각 *dyrk1aa* TALEN RNA가 미세주입된 제브라피쉬로부터
25 발생배를 얻어 각각을 StuI으로 확인한 결과, 총 65마리의 제브라피쉬에서
3마리의 *dyrk1aa* founder를 얻은 결과를 나타낸 도이다.

도 5는, 제브라피쉬 *dyrk1aa* 돌연변이체의 각각 7 및 10 bp

결손(deletion) 또는 2 bps 삽입(insertion)된 결과를 나타낸 도이다.

도 6은, 제브라피쉬 *dyrk1aa* 돌연변이에 의해 대부분의 아미노산이 결손된 결과를 나타낸 도이다.

도 7은, 야생형 및 *dyrk1aa* 돌연변이 제브라피쉬의 뇌출혈 및 뇌혈관
5 관찰 결과를 나타낸 도이다:

A 및 F: 야생형 제브라피쉬;

C 및 D: 돌연변이 제브라피쉬의 중뇌;

E 및 F: 돌연변이 제브라피쉬의 전뇌;

G 및 H: 야생형 제브라피쉬의 형광 표지된 혈관특이적 형질전환체를
10 이용한 뇌혈관 발생 관찰 결과;

I 및 J: 돌연변이 제브라피쉬의 형광 표지된 혈관특이적 형질전환체를
이용한 뇌혈관 발생 관찰 결과;

e: 눈(eye);

fb: 전뇌(forebrain);

15 mb: 중뇌(midbrain);

hb: 후뇌(hindbrain);

y: yolk; 및

CtAs: central arteries.

20 【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은,

1) 제브라피쉬 배아에 *dtrk1aa* 유전자의 염기서열에 결합하는 테일
25 이펙터(tale effector) 및 상기 염기서열을 자르는 Fok I
뉴클라아제(nuclease)를 각각 암호화하는 염기서열을 포함하는 정방향 및
역방향 DNA 쌍을 상기 배아에 삽입하여 *dyrk1aa* +/- 유전자 형을 갖는
이형접합체(heterozygote) 제브라피쉬를 수득하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 이형접합체 제브라피쉬를 교배시키는 단계를 포함하는 *dyrklaa* ^{-/-} 유전자형을 갖는 동형접합체(homozygote) 돌연변이 제브라피쉬 제조 방법을 제공한다.

상기 단계 1)의 *dyrklaa* 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하며, 인간 DYRK1A 유전자의 상동 유전자인 것이 바람직하고, 상기 인간 DYRK1A 유전자(서열번호 6)는 다운증후군의 직접적인 원인으로 알려져 있는 공통 삼염색체성 부위인 Down Syndrome Critical Region(DSCR)에 위치한 것이 바람직하다.

상기 제브라피쉬 배아는 제 1 세포기인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 단계 1)의 DNA 쌍은 *dyrklaa* 유전자 다섯번째 엑손(exon)의 세린/트레오닌 인산화단백질 도메인(serine/threonine kinase domain)에 작용하는 것이 바람직하며, 상기 도메인 5' 말단 부분의 오른쪽 및 왼쪽 방향으로 작용하는 DNA 쌍인 것이 바람직하다.

상기 DNA 쌍의 삽입은 미세주입법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation), PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법, 트랜스펙션 시약(예를 들어, GeneJamer 또는 GenePORTER)을 이용한 직접 전달법(direct delivery)(Sussman, R. Direct DNA delivery into zebrafish embryos employing tissue culture techniques. *Genesis*. 2001 Sep;31(1):1-5), 판트록픽 레트로바이러스 벡터(pantropic retroviral vector)를 이용한 피부를 통한 유전자 전달법(Paul, et al, Reporter gene expression in fish following cutaneous infection with pantropic retroviral vectors. *Mar Biotechnol* (NY). 2001 Jun;3(Supplement1):S81-7) 등을 사용할 수 있으나 미세주입법(microinjection)인 것이 더욱 바람직하다.

상기 돌연변이 제브라피쉬는 혈관 발생 및 유지와 관련된 표현형 분석용인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 제브라피쉬의 *dyrk1aa* 유전자를 녹아웃시키기 위해 생명공학기업인 툴젠(Toolgen; <http://www.toolgen.com>)으로부터 공급받은 TALEN construct DNA를 기반으로 *dyrk1aa* 특이적인 TALEN RNA를 합성하였고, 이를 야생형 제브라피쉬 배아에
5 미세주입하였다(도 2 참조).

또한, 본 발명자들은 *dyrk1aa* TALEN RNA를 제 1 세포기의 야생형 제브라피쉬 배아에 삽입하고 발생 후 약 24시간 뒤 T7E1 assay 또는 *StuI* 제한효소에 의한 절단 여부를 아가로스 젤(agarose gel) 상에서 확인하여 *dyrk1aa* TALEN RNA의 활성을 확인하였으며 그 결과, *dyrk1aa* TALEN RNA가 주입된
10 돌연변이 제브라피쉬의 경우 T7E1에 의해 PCR DNA가 절단된 것을 확인함으로써 *dyrk1aa* TALEN RNA의 활성을 확인하였다(도 3 참조).

또한, *dyrk1aa*의 돌연변이를 지나는 배아 전달(germline transmission) 확인을 위해 *dyrk1aa* TALEN RNA 활성이 확인된 제브라피쉬 배아를 키운 founder 제브라피쉬(G0)와 야생형 제브라피쉬(WT)의 교배를 통해 얻은 발생 배(F1)의
15 지노믹(genomic) DNA를 얻어 PCR을 수행한 후 *StuI* 제한효소 처리를 하였으며, 26번, 21번, 30번 founder 제브라피쉬(G0) 개체에서 돌연변이에 의해 절단되지 않은 337 bp 밴드와 절단된 266 bp 밴드가 나타나는 것을 확인하였다(도 4 참조).

또한, *dyrk1aa* TALEN RNA의 배아 전달(germ line transmission) 확률은
20 4.61%(3마리의 heterozygotes/genotyping을 수행한 총 65마리 개체)였으며, 각 돌연변이를 배아(germ-line)에 가지는 founder 제브라피쉬(G0) F1 발생 배에서의 돌연변이율은 4.16~12.5%(F1 클러치에서 이형접합체(heterozygote) 개체의 빈도: 26번은 1, 21번은 2, 30번은 3마리/각각 총 24마리의 genotyping에 사용된 F1 발생 배)임을 확인하였다(표 3 참조).

25 또한, 확인된 이형접합체(heterozygote) 개체의 상호교배를 통해 다음 세대에서 동형접합체(homozygote) 돌연변이체를 동일한 방법으로 찾아내었고(도 4 참조), 최종적으로 염기서열을 확인한 결과 각각 7 및 10 bp의 결손(deletion) 또는 2 bps의 삽입(insertion)으로 인한

프레임시프트(frameshift)를 유발함으로써(도 5 참조), 대부분의 아미노산 서열이 손실되어 기능이 없어진 *Dyrklaa* 단백질을 가지게 되는 것으로 예상하였다(도 6 참조).

상기 돌연변이 제브라피쉬의 *dyrklaa* 돌연변이체에서
 5 뇌출혈(hemorrhage) 및 혈관 형성 결손을 확인하였으며 그 결과, 제브라피쉬 *dyrklaa* 돌연변이체에서는 야생형 제브라피쉬에서는 거의 관찰되지 않는 뇌출혈이 실체현미경 하에서 약 20% 이상의 개체에서 관찰되었으며 중뇌나 전뇌, 그 밖에 눈이나 후뇌에서도 확인되었다. 또한, 형광 표지된 혈관 특이적인 형광형질전환체(*Tg(kdr1:egfp)*)를 이용한 공초점 이미지(confocal
 10 imaging)에 의한 관찰결과, 야생형에 비해 *dyrklaa* 돌연변이체의 경우 매우 정형화된 뇌혈관의 발생(특히 central arteries)이 불규칙적이며 종종 뇌혈관의 소실된 것을 확인하였다(도 7 참조).

따라서, *dyrklaa* 유전자는 혈관의 발생 및 유지에서 필수적인 역할을 하는 것을 확인하였으며, *dyrklaa* 유전자 돌연변이 제브라피쉬의 분석은
 15 *dyrklaa* 유전자에 의한 혈관 발생 및 유지 기작 연구와 저분자 물질 스크리닝에 활용할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 돌연변이 제브라피쉬를 제공한다.

20 또한, 본 발명은

- 1) 실험군으로 상기 돌연변이 제브라피쉬에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 무처리 대조군과 비교하여 혈관 질환의 표현형을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 혈관 질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

25 상기 혈관 질환은 뇌혈관, 뇌졸중 및 뇌경색으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

또한, 본 발명은

1) 실험군으로 상기 돌연변이 제브라피쉬에 피검물질을 처리하는 단계;
및

2) 무처리 대조군과 비교하여 암을 예방 또는 치료하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

5 상기 암은 췌장암, 담도암, 신경내분비종양, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 위암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

10 따라서, *dyrk1aa* 유전자는 혈관의 발생 및 유지에서 필수적인 역할을 하는 것을 확인하였으며, *dyrk1aa* 유전자 돌연변이 제브라피쉬의 분석은 *dyrk1aa* 유전자에 의한 혈관 발생 및 유지 기작 연구와 저분자 물질 스크리닝에 활용할 수 있다.

15 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 제브라피쉬의 사육 및 *dyrk1aa* 유전자의 제거(knockout)

20 <1-1> 제브라피쉬의 사육 및 발생 배의 준비

소형 열대어인 제브라피쉬는 적정 생육 온도인 28.5℃의 수온을 유지한 어항에서 사육하였으며 먹이는 브라인 쉬림프(Brine Shrimp)를 부화시켜 사용하였다. 제브라피쉬의 산란과 수정은 빛에 의해 유도되므로 낮 14시간, 밤 10시간의 명암을 조절하였다.

25 제브라피쉬 발생 배를 준비하기 위해, 전날 오후에 암, 수 1쌍을 전용 메이팅 케이지(mating cage)에 넣고 다음날 아침에 빛으로 자극을 주었으며 수컷과 암컷 사이에 교미를 통해 수백 개의 수정란을 산란시켰다. 수집된 수정란을 E3 egg water(5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.33 mM

MgSO₄ · 7H₂O)로 씻어 페트리디쉬에 옮기고 28.5℃의 배양기에서 5일 동안 발생시켰다. 5일 이후부터는 28.5℃를 유지하는 어항에서 발생시켰다.

<1-2> *dyrk1aa* 유전자의 제거(knockout)

- 5 DYRK1A는 Serine-Threonine kinase의 일종인 Dual regulated tyrosinephosphorylation-Regulated Kinase family에 속하는 단백질로서 이를 암호화하는 유전자 *DYRK1A*는 다운증후군의 직접적인 원인으로 알려져 있는 공통 삼염색체성 부위인 Down Syndrome Critical Region(DSCR)에 위치하여 다운증후군을 유발시키는데 결정적인 유전자 중 하나로서 여겨지고 있다(도 1).
- 10 본 발명에서는 제브라피쉬의 *dyrk1aa* 유전자를 녹아웃시키기 위해 생명공학기업인 툴젠(Toolgen; <http://www.toolgen.com>)으로부터 공급받은 TALEN construct DNA를 기반으로 *dyrk1aa* 특이적인 TALEN RNA를 합성하였고, 이를 야생형 제브라피쉬 배아에 미세주입하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.
- 15 구체적으로, *dyrk1aa* 염기서열을 확인하기 위해 genome data base search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ensembl.org>)를 통해 제브라피쉬의 *dyrk1aa*의 염기서열정보를 확인하였고 *dyrk1aa* mRNA 서열의 serine/threonine kinase domain의 5'말단 부분에 TALEN이 작용하도록 원하는 염기서열 왼쪽에 결합하는 *dyrk1aa* TALEN plasmid DNA left construct와
- 20 오른쪽에 결합하는 *dyrk1aa* TALEN plasmid DNA right construct를 툴젠 회사를 통하여 제작하였다. 상기 제작한 TALEN construct DNA 쌍 1μg을 주형 DNA로 하여 mRNA synthesis kit(Ambion)의 SP6 RNA polymerase 및 capped RNA mix을 섞은 후 37℃에서 약 2시간의 배양을 통해 미세주입용 *dyrk1aa* TALEN mRNA left/right를 합성하였다. 합성된 *dyrk1aa* TALEN RNA를
- 25 미세주입기(microinjector, World Precision Instruments)를 이용하여 *dyrk1aa* TALEN RNA L 100ng/ul, *dyrk1aa* TALEN RNA R 100ng/ul의 농도를 가진 용액을 1~2 nl의 부피로 200~300개의 야생형 제브라피쉬 제 1 내지 2 세포기의 발생 배를 1.2% 한천 페트리디쉬 플레이트에 정렬한 후 미세주입하였다(도 2).

<실시예 2> 제브라피쉬 발생 배에서 삽입된 *dyrklaa* TALEN RNA의 활성 확인

dyrklaa TALEN RNA를 제 1 세포기의 야생형 제브라피쉬 배아에 삽입하고 발생 후 약 24시간 뒤 *dyrklaa* TALEN RNA의 활성을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

구체적으로, 삽입된 *dyrklaa* TALEN RNA의 T7E1 assay 또는 *StuI* 제한효소에 의한 절단 여부를 아가로스 젤(agarose gel) 상에서 확인하여 *dyrklaa* TALEN RNA의 활성을 확인하였다. 먼저, 발생 후 24시간 배아의 지노믹(genomic) DNA를 direct PCR kit(NanoHelix)를 이용하여 분리하고 두 차례의 PCR을 각각 F 프라이머(5' -CCA GCA ACA AGA AGG AGA GG-3' ; 서열번호 2), R 프라이머(5' -AGC CCT GAT CTT TCC AG GTT-3' ; 서열번호 3), 두 번째 F 프라이머(5' -TTA CAA CGA CGG CTA TGA CG-3' ; 서열번호 4)와 R 프라이머(5' -TTC ATC TCG GTG TCG TGC T-3' ; 서열번호 5)를 이용하여 표 1의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR에 의해서 증폭된 DNA는 *StuI* 제한 효소를 이용하거나 표 2에 나타낸 조건을 수행한 후 T7 엔도뉴클라아제(endonuclease) I(T7E1)을 이용하여 DNA 절단을 수행하였다. 일치되지 않은 염기서열에 의한 이형이중가닥(heteroduplex)를 형성하였고 이를 인식하여 절단하는 T7 엔도뉴클라아제 I을 30분 동안 처리하여 확인하였다. *StuI* 제한 효소의 경우, 야생형 DNA는 모두 절단되지만 돌연변이 DNA는 일부 절단되지 않은 밴드를 확인할 수 있다(도 2). 즉, TALEN RNA에 의해 돌연변이가 유도되면 *StuI*에 의해 절단이 되지 않거나 T7E1에 의해서 절단이 될 것으로 예상하였다

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 *dyrklaa* TALEN RNA가 주입된 돌연변이 제브라피쉬의 경우 T7E1에 의해 PCR DNA가 절단되었으며 이로써 상기 돌연변이 제브라피쉬 발생 배에서 *dyrklaa* TALEN RNA의 활성을 확인하였다(도 3).

【표 1】

제브라피쉬(zebrafish) *dyrklaa* 유전자의 유전자형(genotyping) 분석을 위한

PCR 조건

	첫번째 PCR 조건			두번째 PCR 조건		
초기 변성	95℃	2 분		95℃	2 분	
변성	95℃	20 초	x35	95℃	20 초	x25
혼성화	59℃	40 초		55℃	40 초	
합성	72℃	1 분		72℃	30 초	
후기 합성	72℃	5 분		72℃	5 분	

5

【표 2】

변성/혼성화 조건	
95℃	2 분
95℃ → 85℃	-2℃/s
85℃ → 25℃	-0.1℃/s
16℃로 유지	

<실시예 3> 교배를 통한 제브라피쉬 *dyrk1aa* 돌연변이체 라인의 확립

제브라피쉬의 *dyrk1aa* 유전자 돌연변이체 라인을 확립하기 위해 상기 <실시예 2>에서 *dyrk1aa* TALEN RNA의 활성이 확인된 제브라피쉬 배아를
 10 성체(founder 제브라피쉬; G0)까지 키운 후 야생형 제브라피쉬와 교배하여 *dyrk1aa*의 돌연변이를 지니는 배아 전달(germline transmission) 확인을 위해 하기와 같이 실험하였다.

구체적으로, *dyrk1aa* TALEN RNA를 미세주입한 발생 배를 28.5℃ 배양기에 5일을 두었고, 5일 후부터 28.5℃를 유지하는 어항에 넣어 성체가 될 때까지
 15 2~3개월 동안 사육하였다. 상기 성체가 된 제브라피쉬(founder 제브라피쉬; G0)들을 야생형 제브라피쉬들과 교배시켜 발생 배를 얻었고 총 24개의 발생 배에서 각각 지놈 DNA를 추출한 후 상기 <실시예 2>의 표 1과 같이 PCR을 수행하였다. PCR 산물의 *Stu I* 제한효소에 의한 절단 여부를 통해 특정 염기서열 부분의 돌연변이 유무를 확인하였다.

20

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 *dyrk1aa* TALEN RNA 활성이 확인된

제브라피쉬 배아를 키운 founder 제브라피쉬(G0)와 야생형 제브라피쉬(WT)의 교배를 통해 얻은 발생 배(F1)의 지노믹(genomic) DNA를 얻어 PCR을 수행한 후 StuI 제한효소 처리를 하였으며, 26번, 21번, 30번 founder 제브라피쉬(G0) 개체에서 돌연변이에 의해 절단되지 않은 337 bp 밴드와 절단된 266 bp 밴드가 나타나는 것을 확인하였다(도 4).

또한, 표 3에 나타낸 바와 같이 *dyrklaa* TALEN RNA의 배아 전달(germ line transmission) 확률은 4.61%(3마리의 heterozygotes/genotyping을 수행한 총 65마리 개체)였으며, 각 돌연변이를 배아(germ-line)에 가지는 founder 제브라피쉬(G0) F1 발생 배에서의 돌연변이율은 4.16~12.5%(F1 클러치에서 이형접합체(heterozygote) 개체의 빈도: 26번은 1, 21번은 2, 30번은 3마리/각각 총 24마리의 genotyping에 사용된 F1 발생 배)임을 확인하였다(표 3).

또한, 확인된 이형접합체(heterozygote) 개체의 상호교배를 통해 다음 세대에서 동형접합체(homozygote) 돌연변이체를 동일한 방법으로 찾아내었고(도 4), 최종적으로 염기서열을 확인한 결과 각각 7 및 10 bp의 결손(deletion) 또는 2 bps의 삽입(insertion)으로 인한 프레임시프트(frameshift)를 유발함으로써(도 5), 대부분의 아미노산 서열이 손실되어 기능이 없어진 *Dyrklaa* 단백질을 가지게 되는 것을 확인하였다(도 6).

【표 3】

20. *dyrklaa* TALEN RNA의 배아 전달(germline transmission) 확률과 돌연변이율

주입된 mRNA : <i>dyrklaa</i> left TALEN 2 및 <i>dyrklaa</i> right TALEN 2 주입 부피 : 각 100 ng, 총 200 ng	
<i>dyrklaa</i> TALEN RNA의 배아 전달(germ line transmission) 확률 (<i>dyrklaa</i> TALEN RNA활성을 보이는 F1/출 G0)	4.61% (3/65)
돌연변이율 (F1 클러치에서 돌연변이된 배아)	4.16 ~ 12.5%

<실시에 3> 출혈 및 혈관형성 결손 표현형 기초분석

상기 제브라피쉬의 *dyrk1aa* 돌연변이체에서 뇌출혈(hemorrhage) 및 혈관 형성 결손을 확인하기 위해 하기와 같이 실험하였다.

구체적으로, 살아있는 제브라피쉬 배아에서 혈관을 형광으로 관찰하기 위하여 2005년 Stainier 연구실에서 개발된 형광형질 전환체 *Tg(kdr1:egfp)*를 5 사용하였다. 간단히, 혈관 특이적으로 발현하는 제브라피쉬 *kdr1* 유전자의 상위 약 6.5 kb 염기서열을 클로닝하고 GFP를 발현할 수 있는 벡터에 옮긴 후, 제 1 세포기의 발생배에 주입하고 키운 후 성체의 상호 교배를 통하여 형질전환체를 확립하였다(Jin et al., Development 2005, "Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish). 10 확립된 형질전환체에서 얻어진 배아는 키워서 유지되거나 실험에 사용되었다.

그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 제브라피쉬 *dyrk1aa* 돌연변이체에서는 야생형 제브라피쉬(도 7의 A 및 B)에서는 거의 관찰되지 않는 뇌출혈이 실체현미경 하에서 약 20% 이상의 개체에서 관찰되었으며 중뇌(도 7의 C 및 D)나 전뇌(도 7의 E 및 F), 그 밖에 눈이나 후뇌에서도 확인되었다(도 7). 15 이는 *dyrk1aa*의 기능결손에 의한 것으로 사료된다.

또한, 형광 표지된 혈관 특이적인 형광형질전환체(*Tg(kdr1:egfp)*)를 이용한 공초점 이미지(confocal imaging)에 의한 관찰결과, 야생형(도 7의 G 및 H)에 비해 *dyrk1aa* 돌연변이체의 경우 매우 정형화된 뇌혈관의 발생(특히 central arteries)이 불규칙적이며 종종 뇌혈관의 소실된 것을 확인하였다(도 20 7의 I 및 J).

【청구의 범위】

【청구항 1】

1) 제브라피쉬 배아에 *dtrklaa* 유전자의 염기서열에 결합하는 테일
 이펙터(tale effector) 및 상기 염기서열을 자르는 Fok I
 5 뉴클라아제(nuclease)를 각각 암호화하는 염기서열을 포함하는 정방향 및
 역방향 DNA 쌍을 상기 배아에 삽입하여 *dtrklaa* +/- 유전자 형을 갖는
 이형접합체(heterozygote) 제브라피쉬를 수득하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 이형접합체 제브라피쉬를 교배시키는 단계를
 포함하는 *dtrklaa* -/- 유전자형을 갖는 동형접합체(homozygote) 돌연변이
 10 제브라피쉬 제조 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 *dtrklaa* 유전자는 서열번호 1로
 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 돌연변이 제브라피쉬 제조방법.
 15

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 *dtrklaa* 유전자는 인간 *DYRK1A*
 유전자의 상동 유전자인 것을 특징으로 하는 돌연변이 제브라피쉬 제조방법.

20 【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 DNA 쌍은 *dtrklaa* 유전자 다섯번째
 엑손(exon)의 세린/트레오닌 인산화단백질 도메인(serine/threonine kinase
 domain)에 작용하는 것을 특징으로 하는 돌연변이 제브라피쉬 제조방법.

25 【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 돌연변이 제브라피쉬는 혈관 발생 및 유지와
 관련된 표현형 분석용인 것을 특징으로 하는 돌연변이 제브라피쉬 제조방법.

【청구항 6】

제 1항의 제조방법으로 제조된 돌연변이 제브라피쉬.

5 【청구항 7】

1) 실험군으로 제 6항의 돌연변이 제브라피쉬에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 무처리 대조군과 비교하여 혈관 질환의 표현형을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 혈관 질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법.

10 【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 혈관 질환은 뇌혈관, 뇌졸중 및 뇌경색으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법.

15 【청구항 9】

1) 실험군으로 제 6항의 돌연변이 제브라피쉬에 피검물질을 처리하는 단계; 및

2) 무처리 대조군과 비교하여 암을 예방 또는 치료하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료제 스크리닝 방법.

20 【청구항 10】

제 9항에 있어서, 상기 암은 췌장암, 담도암, 신경내분비종양, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 위암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료제 스크리닝 방법.

【청구항 11】

유효한 양의 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌질환 예방 방법.

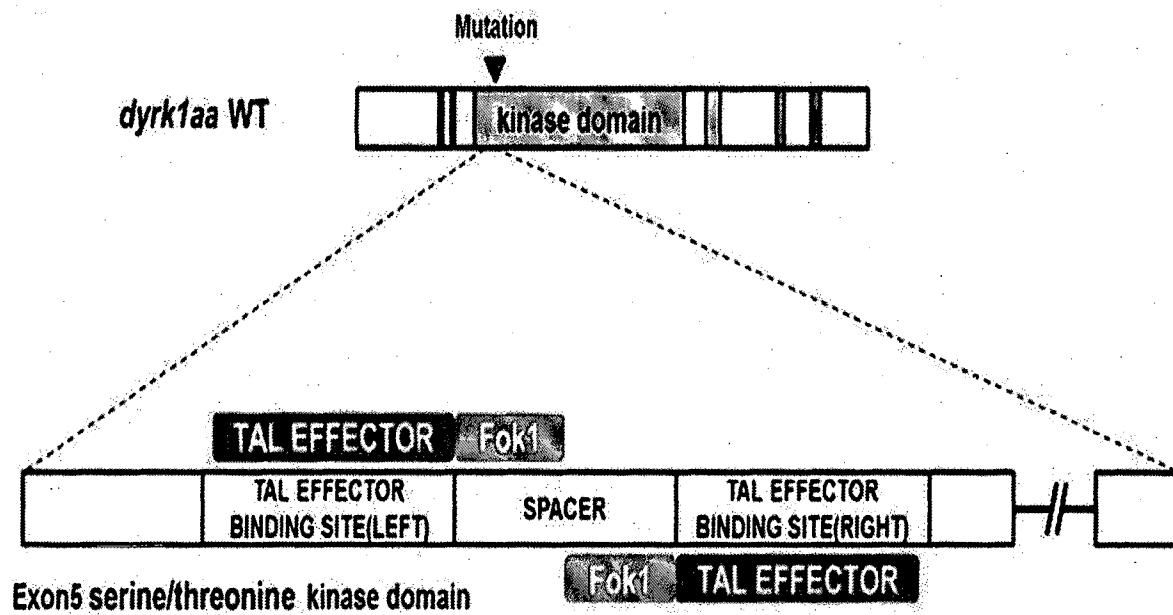
5 【청구항 12】

퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물.

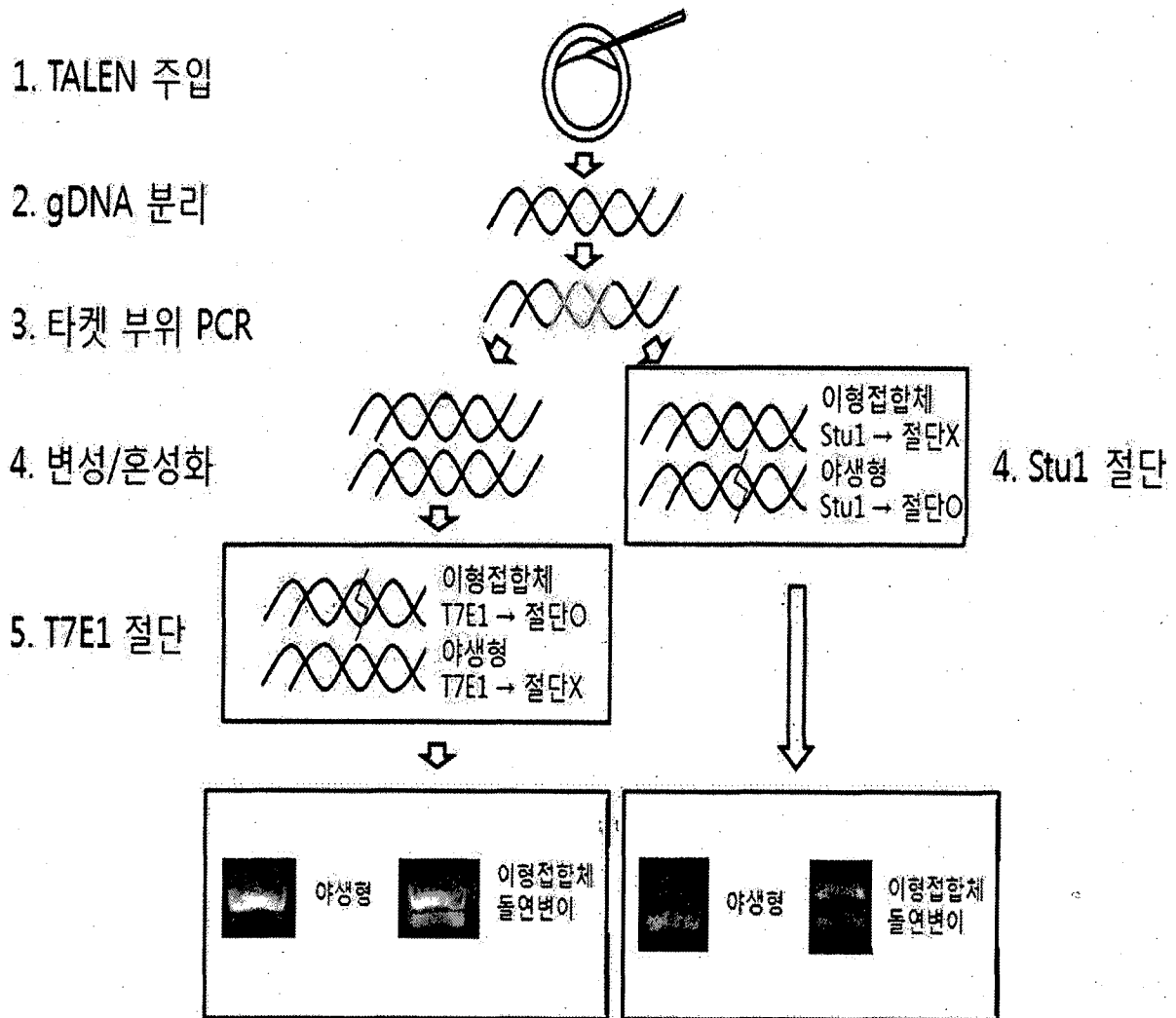
【청구항 13】

10 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강 식품의 용도로 사용하기 위한 항산화 폴리페놀 고함유 쌀 추출물.

[도 1]



[도 2]

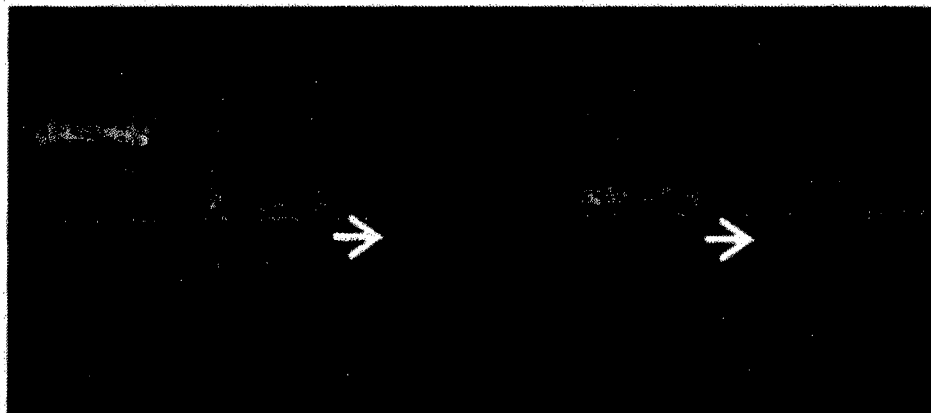


[도 3]

각 100 ng
야생형각 100 ng
돌연변이

절단X 절단 | 절단X 절단

500bp ➡

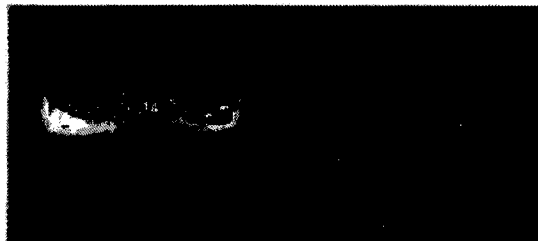


[도 4]

***dyrk1aa* F1 embryo 26-2**

절단X

절단



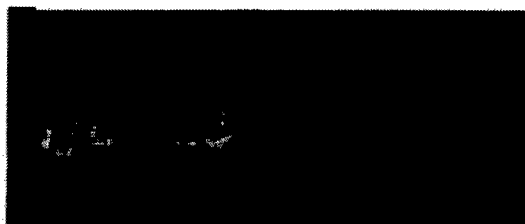
337 bp

264 bp

***dyrk1aa* F1 embryo 21-11**

절단X

절단



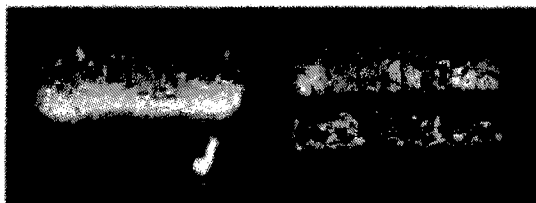
337 bp

264 bp

***dyrk1aa* F1 embryo 30-18**

절단X

절단



337 bp

264 bp

[도 5]

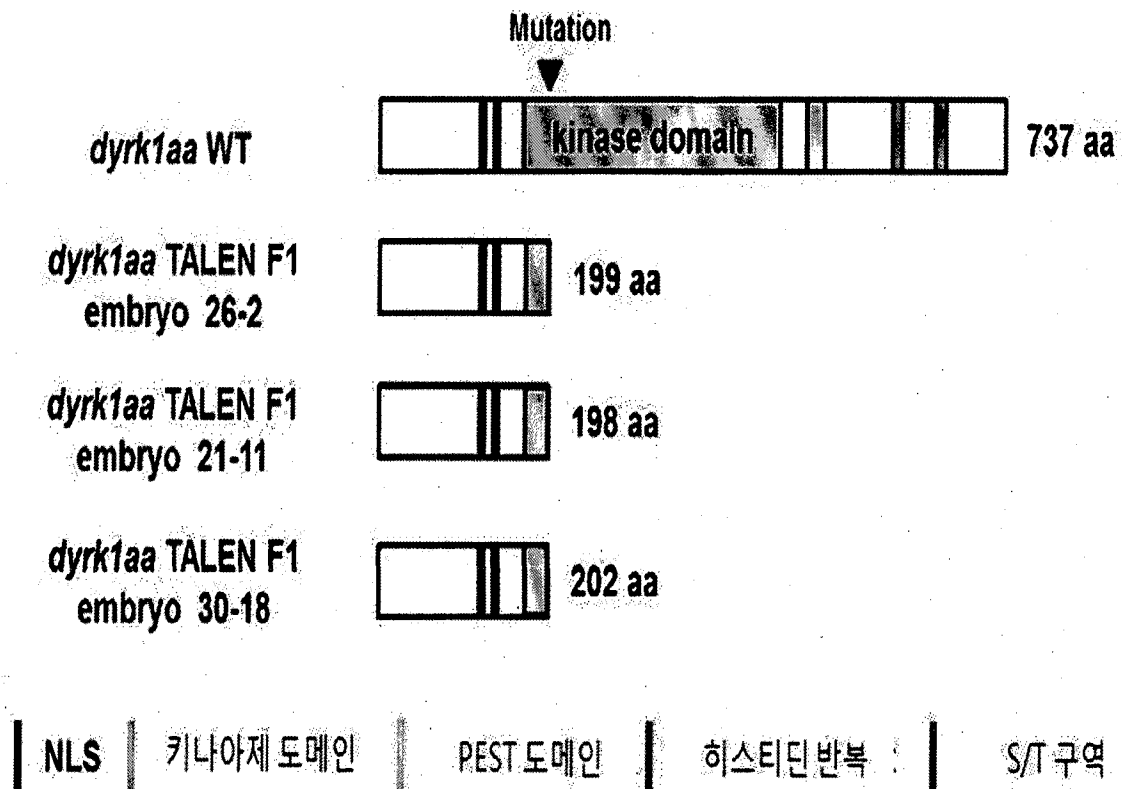
<i>dyrk1aa</i> WT	TGGGTCGCCATCAAGATCATAAAGAATAAAAAGGCCTTCCTGAATCAGGCTCA
<i>dyrk1aa</i> F1 embryo 26-2	TGGGTCGCCATCAAGATCATAA-----AGAGACCTTCCTGAATCAGGCTCA (-7)
<i>dyrk1aa</i> F1 embryo 21-11	TGGGTCGCCATCAAGATCAA-----AAGGCTTTCCTGAATCAGGCTCA (-10)
<i>dyrk1aa</i> F1 embryo 30-18	TGGGTCGCCATCAAGATCATCAAGAATAAAAAGGCCTTTCCTGAATCAGGCTCA (+2)

TALEN 결합 사이트

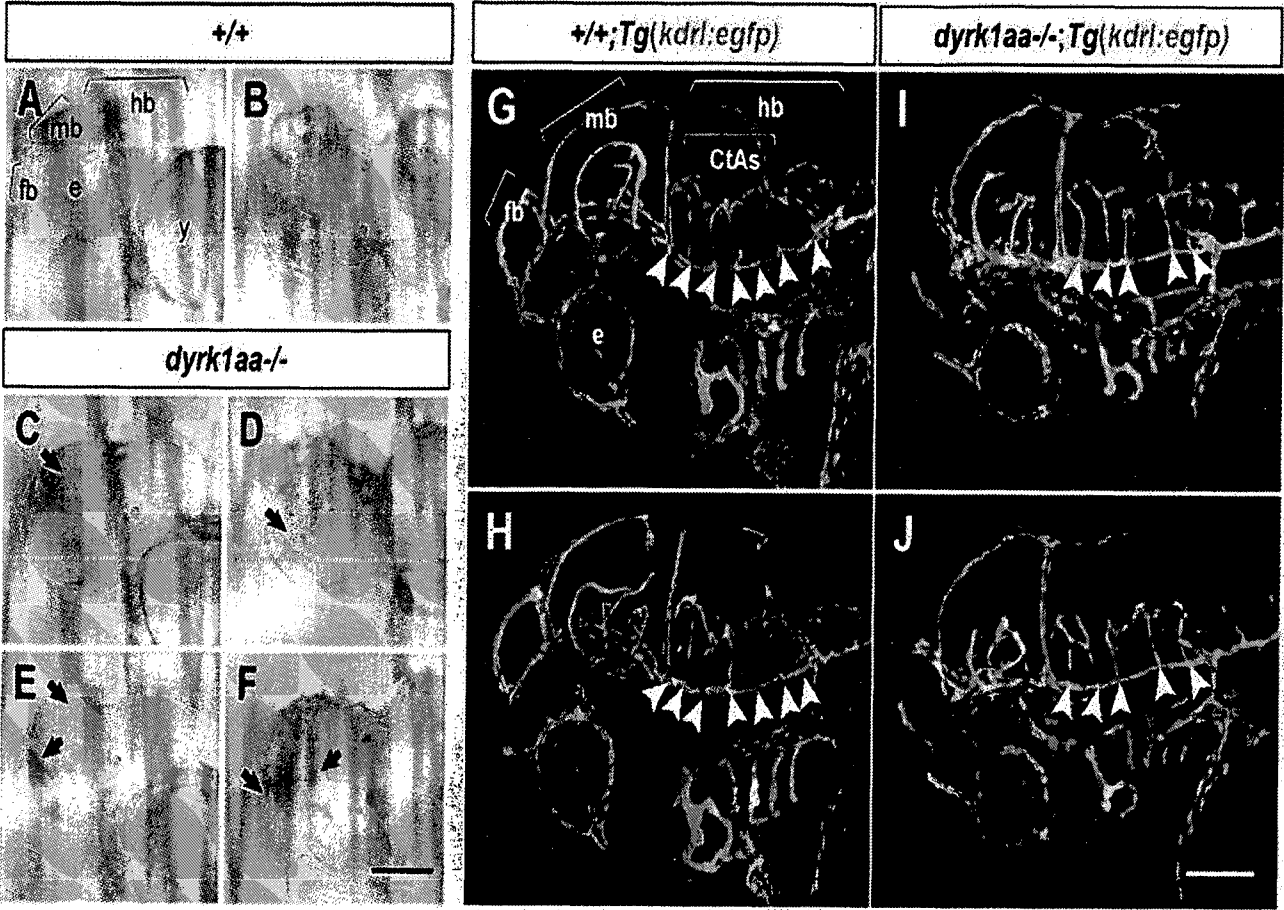

TT

TALEN 결합 사이트

[도 6]



[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007714**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/09(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 33/15(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; A01K 67/033; C12N 15/113; C12N 15/11; C12N 15/09; C12Q 1/02; G01N 33/15

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: zebrafish, dyrk1aa, TALEN, tale effector, FokI nuclease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG, SE-YEOL et al., "Generating zebrafish knockout mutants for the developing cerebral vasculature using TALEN", In: 2013 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, COEX, Seoul, 01 October-11 October 2013 page 91, Poster No. D-5 See the entire document.	1-10
Y	LEE, LING, "Master's Thesis : Targeted knock-out using transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in zebrafish", Graduate School of Chungnam National University, department of biological science, 2013, chapters i-iv and pages 1-35. See pages 21-22; figure 8.	1-10
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001080689.1 (18 April 2013) See the entire document.	2
Y	WO 2010-005273 A2 (SNU. R&DB FOUNDATION et al.) 14 January 2010 See abstract; paragraph [0033].	1-10
A	MOORE, FINOLA E. et al., "Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs)", PLoS ONE, 24 May 2012, vol. 7, no. 5, e37877 (pages 1-9). See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 OCTOBER 2015 (29.10.2015)

Date of mailing of the international search report

30 OCTOBER 2015 (30.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007714

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2013-0087812 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 07 August 2013 See abstract; claims 1, 7 and 9-10.	1-10
A	KR 10-2002-0016986 A (HUH, Tae - Lin et al.) 07 March 2002 See abstract; claims 5-6 and 10-11.	1-10
PX	YANG, Se Yeol, "Master's Thesis : Identification of Zebrafish Orthologs of Human DYRK1A and Generation of The Knockout Mutants using TALEN", 2014, University of Science and Technology, FunctionalGenomics, chapters i-vii and pages 1-48. See the entire document [Publication date(Display date of Library)is unclear, so it is regarded as PX document in 2014]	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007714**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body by medication, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: **11-13**
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 11-13 are not supported by the description, and thus claims 11-13 do not meet the requirement of PCT Article 6.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2010-005273 A2	14/01/2010	KR 10-2010-0007241 A WO 2010-005273 A3	22/01/2010 25/03/2010
KR 10-2013-0087812 A	07/08/2013	KR 10-1447560 B1 WO 2013-115508 A1	10/10/2014 08/08/2013
KR 10-2002-0016986 A	07/03/2002	AU 2002-282201 A KR 10-0429397 B1 US 2004-0093630 A1 WO 02-18594 A1	13/03/2002 28/04/2004 13/05/2004 07/03/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/09(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01K 67/027; A01K 67/033; C12N 15/113; C12N 15/11; C12N 15/09; C12Q 1/02; G01N 33/15

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: 제브라피쉬, dyrk1aa, TALEN, tale effector, FokI 뉴클라아제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	YANG, SE-YEOL 등, 'Generating zebrafish knockout mutants for the developing cerebral vasculature using TALEN', In: 2013 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, COEX, Seoul, 2013.10.01-10.11. 91 페이지, Poster No. D-5 전체 문헌 참조.	1-10
Y	LEE, LING, '학위논문 : Targeted knock-out using transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in zebrafish', 충남대학교 대학원, 생명과학과, 2013, i-iv 장 및 1-35 페이지. 페이지 21-22; 도면 8 참조.	1-10
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001080689.1 (2013.04.18.) 전체 문헌 참조.	2
Y	WO 2010-005273 A2 (서울대학교산학협력단 등) 2010.01.14 요약; 단락 [33] 참조.	1-10
A	MOORE, FINOLA E. 등, 'Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs)', PLoS ONE, 2012.5.24, 제7권, 제5호, e37877 (1-9 페이지). 전체 문헌 참조.	1-10

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 29일 (29.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 30일 (30.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



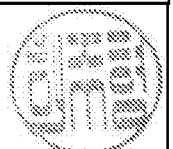
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2013-0087812 A (한국생명공학연구원) 2013.08.07 요약; 청구항 1, 7 및 9-10 참조.	1-10
A	KR 10-2002-0016986 A (허태린 등) 2002.03.07 요약; 청구항 5-6 및 10-11 참조.	1-10
PX	양세열, ‘학위논문 : 인간 DYRK1A의 zebrafish ortholog의 동정 및 TALEN을 이용한 knockout 돌연변이체 제작’, 2014, 과학기술연합대학원대학교, 기능유전체학, i-vii 장 및 1-48 페이지. 전체 문헌 참조 [공개일(도서관입고일)이 불명확하여, 2014년 기준 PX문헌으로 간주]	1-10

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

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

1. ☒ 청구항: 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11은 약물에 의한 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: 11-13
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 11-13은 명세서에 의하여 뒷받침되고 있지 않아, PCT 제6조의 요건을 충족시키고 있지 않습니다.
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2010-005273 A2	2010/01/14	KR 10-2010-0007241 A WO 2010-005273 A3	2010/01/22 2010/03/25
KR 10-2013-0087812 A	2013/08/07	KR 10-1447560 B1 WO 2013-115508 A1	2014/10/10 2013/08/08
KR 10-2002-0016986 A	2002/03/07	AU 2002-282201 A KR 10-0429397 B1 US 2004-0093630 A1 WO 02-18594 A1	2002/03/13 2004/04/28 2004/05/13 2002/03/07