

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 6월 22일 (22.06.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/104967 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/85 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/012298
- (22) 국제출원일: 2016년 10월 28일 (28.10.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0179383 2015년 12월 15일 (15.12.2015) KR
- (71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로 55길 48, Seoul (KR). 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교내, Gyeonggi-do (KR). 공주대학교 산학협력단 (KONGJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 32588 충청남도 공주시 공주대학로 56, Chungcheongnam-do (KR).
- (72) 발명자: 이지은 (LEE, Ji Eun); 04593 서울시 중구 동호로 10길 30, 108동 504호, Seoul (KR). 최병옥 (CHOL, Byung Ok); 06291 서울시 강남구 삼성로 151, 6동 104

호, Seoul (KR). 정기화 (CHUNG, Ki Wha); 02715 서울시 성북구 길음로 13길 39 길음뉴타운 두산위브 702-1704, Seoul (KR). 기수미 (KI, Soo Mi); 48530 부산시 남구 신선로 515-1, Busan (KR).

(74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

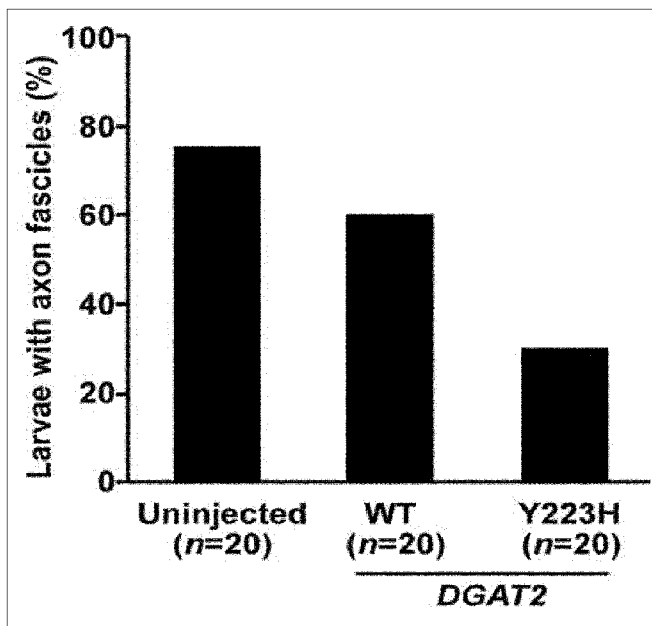
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ZEBRAFISH MODEL HAVING DGAT2 MUTANT GENE INTRODUCED THEREINTO AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : D G A T 2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬 모델 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a recombinant plasmid comprising a human DGAT2 mutant gene, a zebrafish transformed with the plasmid, and a method for screening a therapeutic agent for a peripheral nervous system disease using the same. The use of a zebrafish model of the present invention can effectively screen a therapeutic agent for a peripheral nervous system disease, which has favorable efficacy and few side effects, and can easily and quickly test whether or not a drug candidate causes an *in vivo* side effect due to the toxicity thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드, 상기 플라스미드로 형질전환된 제브라피쉬 및 이를 이용한 말초신경계 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 제브라피쉬 모델을 이용하면, 부작용이 적으면서도 효능이 좋은 말초신경계 질환 치료제를 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 약물 후보물질의 독성에 따른 생체 내 부작용 유발 유무를 쉽고 신속하게 테스트할 수 있다.

WO 2017/104967 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: D G A T 2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬 모델 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원 하에서 과제번호 2013R1A1A1059056에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “일반연구자지원사업”, 연구과제명은 “비운동성 섬모의 기능 규명을 통한 암 병리 기전 연구”, 주관기관은 성균관대학교(자연과학캠퍼스), 연구기간은 2015.11.01-2016.10.31이다.
- [2] 본 발명은 대한민국 보건복지부의 지원 하에서 과제번호 HI14C3484에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국보건산업진흥원, 연구사업명은 “연구중심병원사업”, 연구과제명은 “중개연구를 통한 줄기세포의 신경재생치료법 개발”, 주관기관은 삼성서울병원, 연구기간은 2015.7.11-2016.1.10이다.
- [3] 본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원 하에서 과제번호 2014R1A2A2A01004240에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “중견연구자지원사업”, 연구과제명은 “유전운동감각신경병에서 유전체기반 세포/동물모델을 활용한 발병기전 및 치료제 탐색”, 주관기관은 성균관대학교, 연구기간은 2015.5.1-2016.4.30이다.
- [4] 본 특허출원은 2015년 12월 15일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2015-0179383호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [5] 본 발명은 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬 모델 및 이의 용도에 관한 것이다.

[6]

배경기술

- [7] 제브라피쉬(zebrafish)는 열대성 어류의 한 종류로 실험 동물모델로 널리 이용되고 있다. 제브라피쉬는 척추동물로 쥐, 랫트와 같은 동물모델을 대체할 수 있음은 물론 이들 동물에 비해 발생 시간이 짧으며 배아가 투명하여 관찰이 용이하다는 장점이 있다.
- [8] 특히, 샤르코-마리-투스병과 같은 그 병리 기전이 잘 밝혀져 있지 않은 희귀 질환 치료 물질을 스크리닝하기 위해서는 동물 사육 및 관리비와 분석 비용이 많이 들고 시간이 많이 소요되는 동물들 보다는 경제적, 시간적 효용성이 좋은 제브라피쉬가 훨씬 유리하다. 따라서 생체 내 기능을 모사할 수 있으며 대용량

스케일의 스크리닝이 가능한 질환 동물 모델 제작 및 스크리닝 방법은 개발할 필요성이 있다.

- [9] 세포 내에서 여분의 에너지 저장은 트리글리세라이드(triglycerides, TG) 형태로 이루어지고, 트리글리세라이드를 만들기 위한 과정 중에서 마지막 단계에 작용하는 효소로 DGAT(diacylglycerol acyltransferase)가 있다. 포유류에서는 서로 다른 유전자에서 발현되는 두 종류의 DGAT가 존재한다. DGAT1과 DGAT2가 있는데 두 단백질 모두 대부분의 장기에 분포하지만, DGAT1은 소장에서, DGAT2는 간과 지방 조직에서 발현이 높다.
- [10] 그 중 DGAT2(Diacylglycerol O-acyltransferase 2)는 DGAT2 유전자에 의해 만들어지는 단백질로, 350-400개의 아미노산으로 구성되어 있고 200-360번째의 아미노산이 촉매 활성을 가지고 있다. 이 단백질은 세포 내에서는 소포체(endoplasmic reticulum)의 막에 존재하여 에스테르 결합(ester linkage)을 통해 디아실글리세롤(diacylglycerols)과 fatty acyl CoA를 트리글리세라이드로 합성하는 역할을 한다. 대부분의 DGAT2 단백질은 소포체의 막에 존재하지만, 중성지방과 결합할 수 있는 매우 보존된 염기 서열을 가지고 있으므로 지방세포에서 지방 방울(lipid droplet)을 확장을 위해 지방 방울에 위치하는 것을 관찰할 수 있다.
- [11] 동물 모델을 통해 DGAT2의 생물학적 중요성을 알 수 있는데, DGAT2 녹아웃 쥐(DGAT2 knockout mice)는 에너지 대사에 필요한 기질의 감소와 간과 혈장에서 트리글리세라이드의 양이 정상 쥐에 비해 90% 이상 줄어들었으므로 태어난 후 몇 시간 내에 죽게 된다. 또한, 피부 조직에서 지질 아실세라마이드(lipid acylceramide)의 감소에 의해 불균형의 피부 삼투성으로 피부 탄성이 감소되고, 수분의 표피 배출이 증가하여 급격한 탈수를 보인다. 하지만, DGAT1 녹아웃 쥐(DGAT1 knockout mice)는 정상 쥐에 비해 50% 정도 감소된 지방 축적이 보일 뿐 생존에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보아 트리글리세라이드 합성과 대사과정에서의 중요도는 DGAT2의 기능이 더 높은 것으로 관찰된다.
- [12]
- [13] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [14]
- 발명의 상세한 설명**
- 기술적 과제**
- [15] 본 발명자들은 환자 샘플을 이용하여 샤르코-마리-투스병 원인 유전자 분석을 실시하였고 그 결과 DGAT2 유전자의 돌연변이를 발견하였다. 이를 기초로 인간 DGAT2 돌연변이 형태 유전자를 발현함으로써 말초신경계 질환 증상을

모사하는 제브라피쉬를 개발하였고, 이를 이용하면 관련 질환 타겟 치료 물질을 신속하고 효과적으로 스크리닝 할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [16] 본 발명의 목적은 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 제공하는데 있다.
- [17] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 플라스미드가 도입된 제브라피쉬의 수정란을 제공하는데 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 플라스미드로 형질전환된 제브라피쉬를 제공하는데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 말초신경계 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [20]
- [21] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.
- [22]

과제 해결 수단

- [23] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하고, 상기 유전자가 제브라피쉬에서 발현되도록 하는 재조합 플라스미드를 제공한다.
- [24]
- [25] 본 발명자들은 환자 샘플을 이용하여 샤르코-마리-투스병 원인 유전자 분석을 실시하였고 그 결과 DGAT2 유전자의 돌연변이를 발견하였다. 이를 기초로 인간 DGAT2 돌연변이 형태 유전자를 발현함으로써 말초신경계 질환 증상을 모사하는 제브라피쉬를 개발하였고, 이를 이용하면 관련 질환 타겟 치료 물질을 신속하고 효과적으로 스크리닝 할 수 있음을 규명하였다.
- [26] 본 발명의 재조합 플라스미드는 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함한다.
- [27] 본 발명에 있어서, 상기 플라스미드는 상기 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 제브라피쉬 내에서 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 플라스미드도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 도 1에 도시된 pCS2+ 벡터이다.
- [28] 본 발명의 재조합 플라스미드는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제브라피쉬 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 미세주입법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation), PEG(Polyethylenglycol)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 all, Reporter gene expression in fish following cutaneous infection with pantropic retroviral vectors. *Mar Biotechnol* (NY). 2001 Jun;3(Supplement 1):S81-7) 등을 사용할 수 있다.

- [29] 본 발명의 일 실시예에서는 재조합 플라스미드를 미세주입법에 의해 단일세포(single cell) 상태의 제브라피쉬의 수정란에 mRNA 형태로 도입하였다(실시예 2 참조).
- [30]
- [31] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드가 도입된 제브라피쉬의 수정란을 제공한다.
- [32] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 플라스미드가 도입되어 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 발현하는 형질전환된 제브라피쉬를 제공한다.
- [33] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 플라스미드가 도입된 제브라피쉬는 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 유전자 도입에 의한 외형적 결함은 나타나지 않으나, 말단 운동신경 세포가 비정상적으로 발생되고 말단 운동신경세포 축색돌기에서 생성되는 가지(branch) 수가 감소되는 특징을 나타낸다.
- [34] 본 발명의 제브라피쉬는 말단 운동신경세포의 비정상적 발생 및 말단 운동신경세포 축색 돌기 결함에 따른 신경세포 발생 결함을 나타내며, 이러한 특징에 따라 말초신경계 질환 모델로 이용가능하다.
- [35] 상기 말초신경계 질환으로는, 말단 신경 손상 및 장애로 인한 신경 질환과 근육 세포 이상으로 인한 근질환 등을 모두 포함한다.
- [36]
- [37] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 재조합 플라스미드가 도입된 제브라피쉬에 시험물질을 처리하고 제브라피쉬의 말초신경계 발달정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 말초신경계 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [38] 상세하게는, 본 발명의 스크리닝 방법은 (a) 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 제브라피쉬에 말초신경계 질환 치료제 시험물질을 투여하는 단계; (b) 단계 (a)의 말초신경계 질환 치료제 시험물질이 투여된 제브라피쉬의 말초신경계 발달정도를 확인하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질을 투여하지 않은 대조군 제브라피쉬와 비교하여 말초신경계 발달 정도를 유의하게 회복시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함한다.
- [39] 본 발명에서 분석하고자 하는 시험물질은 다양한 물질을 포함한다. 예를 들어, 상기 시험물질은 화학물질, 단백질, 펩타이드, 항체, 핵산 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해

분석되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(영국), Comgenex(미국), Brandon Associates(미국), Microsource(미국) 및 Sigma-Aldrich(미국)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(미국) 및 MycoSearch(미국)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

- [40] 상기 단계 (b)의 제브라피쉬의 말초신경계 발달 정도를 확인하는 단계는 현미경을 통한 형태 관찰 및 말초신경계 신경세포 활성을 확인할 수 있는 다양한 마커 분석 등 각종 어세이를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[41]

발명의 효과

- [42] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- [43] (a) 본 발명은 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드, 상기 플라스미드로 형질전환된 제브라피쉬 및 이를 이용한 말초신경계 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [44] (b) 본 발명의 제브라피쉬 모델을 이용하면, 부작용이 적으면서도 효능이 좋은 말초신경계 질환 치료제를 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 약물 후보물질의 독성에 따른 생체 내 부작용 유발 유무를 쉽고 신속하게 테스트할 수 있다.

[45]

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 환자에서 찾은 DGAT2의 돌연변이 형태 유전자가 제브라피쉬에서 발현될 수 있게 재조합된 플라스미드의 개열지도이다.

- [47] 도 2는 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 3일이 지난 제브라피쉬의 발생정도를 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.

- [48] A: 제브라피쉬의 머리쪽, P: 제브라피쉬의 꼬리쪽

- [49] 도 3은 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 3일이 지난 제브라피쉬의 운동신경세포의 변화를 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.
- [50] D: 제브라피쉬의 등쪽, V: 제브라피쉬의 배쪽
- [51] 도 4는 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 3일이 지난 제브라피쉬의 운동신경세포의 축색돌기(axon)의 변화 정도를 수치화한 그래프이다.
- [52] 도 5는 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 15일이 지난 제브라피쉬의 발생 정도를 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.
- [53] A: 제브라피쉬의 머리쪽, P: 제브라피쉬의 꼬리쪽
- [54] 도 6은 제브라피쉬에서 말초신경계 세포 변화를 관찰하기 위한 부위를 도식화한 그림이다.
- [55] 도 7은 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 15일이 지난 제브라피쉬의 운동신경세포의 변화를 관찰한 결과를 나타내는 그림이다.
- [56] 도 8은 상기 재조합된 DGAT2 플라스미드가 도입된 후 15일이 지난 제브라피쉬의 운동신경세포의 축색돌기(axon)의 변화 정도를 수치화한 그래프이다.

[57]

발명의 실시를 위한 형태

- [58] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[59]

[60] 실시예

[61] 실시예 1: 제브라피쉬의 사육 및 발생배의 준비

- [62] 일반형(wild type) 제브라피쉬들은 조건[온도: 28-28.5°C, 명암: 오전 9시에서 오후 8시까지 점등 그 외 시간 소등, 먹이: 브라인 슈림프(brine shrimp)]하에서 사육되었다. 발생배는 교미를 시키기 전날 제브라피쉬 암컷과 수컷을 각각 칸막이로 나눠둔 뒤 다음 날 아침에 밝게 해주면서 암컷과 수컷 사이의 칸막이를 없애 교미를 시켰다. 교미를 통해 얻은 제브라피쉬의 알을 아가 젤(agar gel)로 만든 틀에 옮겼다.

[63]

[64] 실시예 2: 인간 DGAT2 유전자 발현 제브라피쉬 모델 제조

- [65] 정상 및 돌연변이 형태 인간 DGAT2 유전자를 pCMV-Myc 벡터에서 EcoRI 제한효소로 자른 후 pCS2+ 벡터로 옮겨서 제브라피쉬에서 발현될 수 있는 새로운 재조합 플라스미드를 제작하였다(도 1).

- [66] 상기와 같은 방법으로 제작된 재조합 플라스미드를 단일 세포 상태의

제브라피쉬 수정란에 mRNA 형태로 미세 주입하였다. mRNA는 mMESSAGE mMACHINE SP6 키트(Ambion Inc., Austin, TX, USA)를 이용하여 시험관 내(in vitro)에서 합성하였다. 제브라피쉬의 수정란을 아가로스 젤로 만든 틀에 옮겨 합성된 mRNA를 미세주입기(micromanipulator, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA)에 장착된 마이크로피펫으로 미세주사하였다.

[67]

[68] 실시예 3: 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 후 3일 지난 제브라피쉬의 발생학적 결합 조사

[69] 본 발명자들은 <실시예 2>에서 제조한 인간 DGAT2 돌연변이 및 정상 유전자가 도입된 제브라피쉬 모델의 표현형(phenotype)을 태어난지 3일 후에 관찰하였다.

[70] mRNA가 미세 주사되지 않은 대조군과 정상의 인간 DGAT2 유전자 mRNA가 도입된 제브라피쉬의 경우 꼬리가 곧고 일자형으로 움직임이 정상적이었는데, 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 유전자 mRNA가 도입된 제브라피쉬의 경우 역시 꼬리가 곧고 일자형이었으며 움직임 역시 큰 변화가 없음을 보였다(도 2).

[71]

[72] 실시예 4: 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬의 말초신경계 결합 조사

[73] 본 발명자들은 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬의 배아를 이용해 말초신경계 운동 신경세포의 활성화를 확인할 수 있는 SV2와 BTX를 마커로 결정하고 형광 염색을 실시하였다. 이 후 운동 신경세포의 활성화 정도를 관찰하기 위해 몸통의 특정 지역을 선정하였고, 공초점현미경(confocal microscope)을 통해 신경세포의 축색돌기를 관찰하였다.

[74] 그 결과, mRNA를 주사하지 않은 정상적인 제브라피쉬와 정상의 인간 DGAT2 유전자가 도입된 제브라피쉬의 경우 두 마커 모두 정상 발현되어 말단 운동신경세포의 활성화를 보인 반면, 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 mRNA가 미량주사된 제브라피쉬의 경우는 이들 마커 단백질의 발현 패턴이 비정상적으로 나타나면서 말단 운동신경 세포들이 비정상적으로 발생되었음을 관찰할 수 있었다(도 3, 도 4).

[75]

[76] 실시예 5: 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 후 15일 지난 제브라피쉬의 발생학적 결합 조사

[77] 본 발명자들은 <실시예 2>에서 제조한 인간 DGAT2 돌연변이 및 정상 유전자가 도입된 제브라피쉬 모델의 표현형(phenotype)을 태어난지 15일 후에 관찰하였다.

[78] mRNA가 미세 주사되지 않은 대조군과 정상의 인간 DGAT2 유전자 mRNA가 도입된 제브라피쉬의 경우 꼬리가 곧고 일자형으로 움직임이 정상적이었는데, 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 유전자 mRNA가 도입된 제브라피쉬의 경우 역시

꼬리가 곧고 일자형이었으며 움직임 역시 큰 변화가 없음을 보였다(도 5).

- [79] 이에, 본 발명자들은 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬의 배아를 이용해 말초신경계 운동 신경세포의 활성화를 확인할 수 있는 SV2와 BTX를 마커로 결정하고 형광 염색을 실시하였다. 이 후 운동 신경세포의 활성화 정도를 관찰하기 위해 몸통의 특정 지역을 선정하였고, 공초점현미경(confocal microscope)을 통해 운동 신경세포의 축색돌기 fascicle과 branch 형태를 나누어서 관찰하였다(도 6).

[80]

- [81] 실시예 6: 인간 DGAT2 돌연변이 유전자가 도입된 제브라피쉬의 말초신경계 결합 조사

- [82] 본 발명자들은 mRNA를 주사하지 않은 정상적인 제브라피쉬 및 정상의 인간 DGAT2 유전자가 도입된 제브라피쉬의 경우와 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 mRNA가 미량주사된 제브라피쉬의 경우에서 <실시예 5>에서 정의한 운동 신경세포의 축색돌기 중 fascicle과 branch 부분을 비교 분석하였다.

- [83] 그 결과, mRNA를 주사하지 않은 정상적인 제브라피쉬와 정상의 인간 DGAT2 유전자가 도입된 제브라피쉬의 경우에는 말단 운동 신경세포 축색돌기의 하나의 fascicle당 약 25개 이상의 branch가 생성된 반면, 돌연변이 형태의 인간 DGAT2 mRNA가 미량주사된 제브라피쉬의 경우에는 이들 branch 수가 15개미만으로 감소하였음을 관찰할 수 있었다(도 7, 도 8).

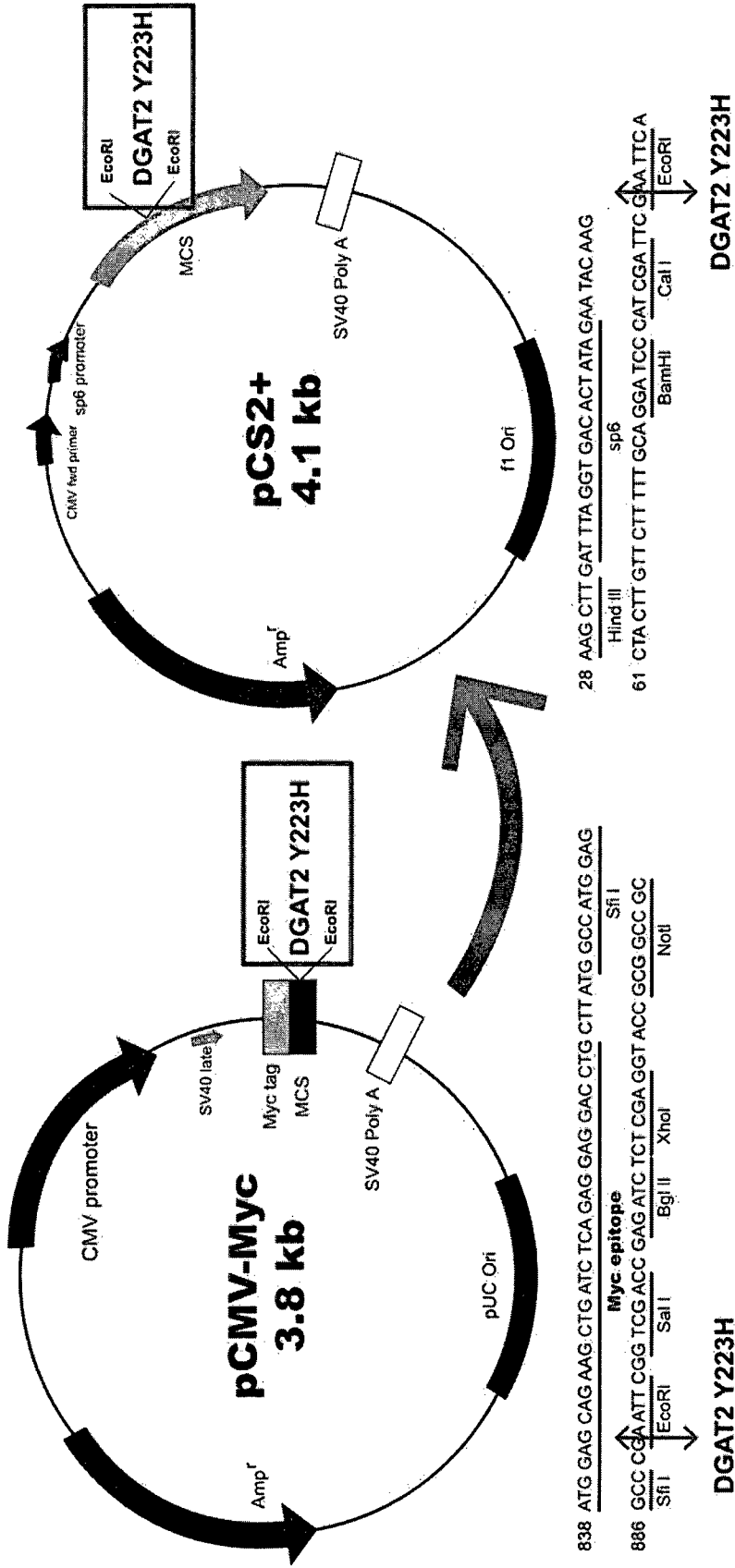
[84]

- [85] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

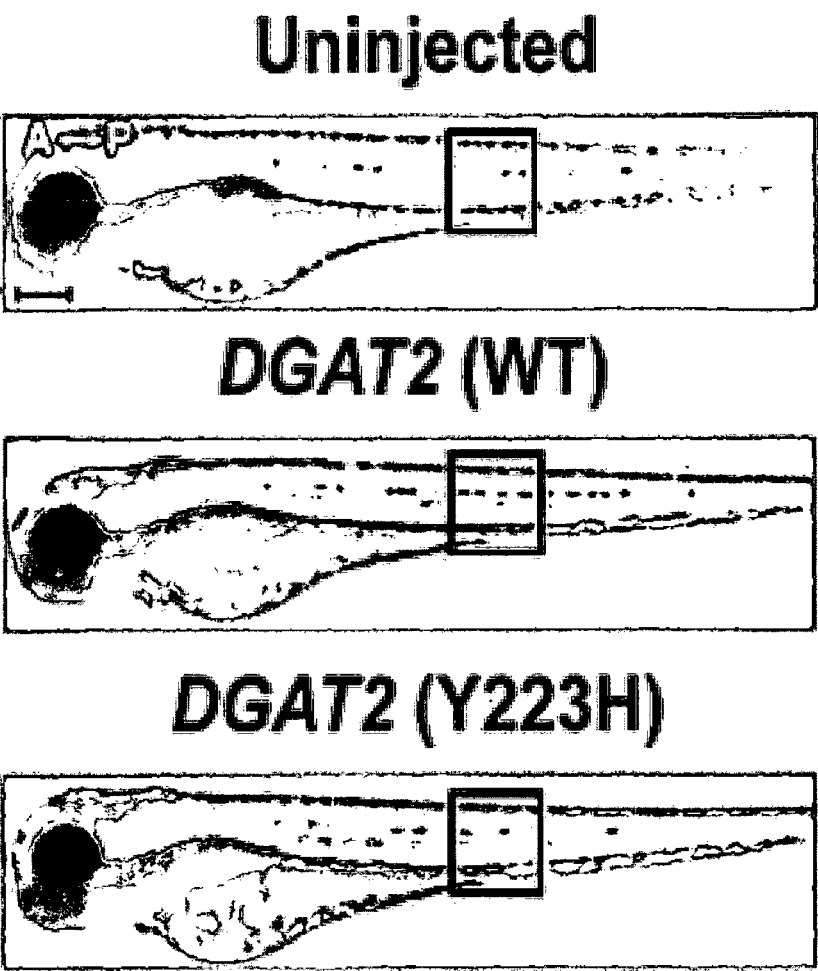
청구범위

- [청구항 1] 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하고, 상기 유전자가 제브라피쉬에서 발현되도록 하는 재조합 플라스미드.
- [청구항 2] 제 1 항의 재조합 플라스미드가 도입된 제브라피쉬의 수정란.
- [청구항 3] 제 1 항의 재조합 플라스미드가 도입되어 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 발현하는 형질전환된 제브라피쉬.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 제브라피쉬는 신경세포 발생 결함을 갖는 것을 특징으로 하는 제브라피쉬.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 신경세포 발생 결함은 말단 운동신경세포의 비정상적 발생 또는 말단 운동신경세포 축색 돌기 결함인 것을 특징으로 하는 제브라피쉬.
- [청구항 6] 다음 단계를 포함하는 말초신경계 질환 치료제의 스크리닝 방법:
 (a) 서열목록 제1서열로 표시되는 인간 DGAT2 돌연변이 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 제브라피쉬에 말초신경계 질환 치료제 시험물질을 투여하는 단계;
 (b) 단계 (a)의 말초신경계 질환 치료제 시험물질이 투여된 제브라피쉬의 말초신경계 발달 정도를 확인하는 단계; 및
 (c) 상기 시험물질을 투여하지 않은 대조군 제브라피쉬와 비교하여 말초신경계 발달 정도를 유의하게 회복시킨 시험물질을 선별하는 단계.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 시험물질은 화학물질, 단백질, 펩타이드, 항체, 핵산 및 천연 추출물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

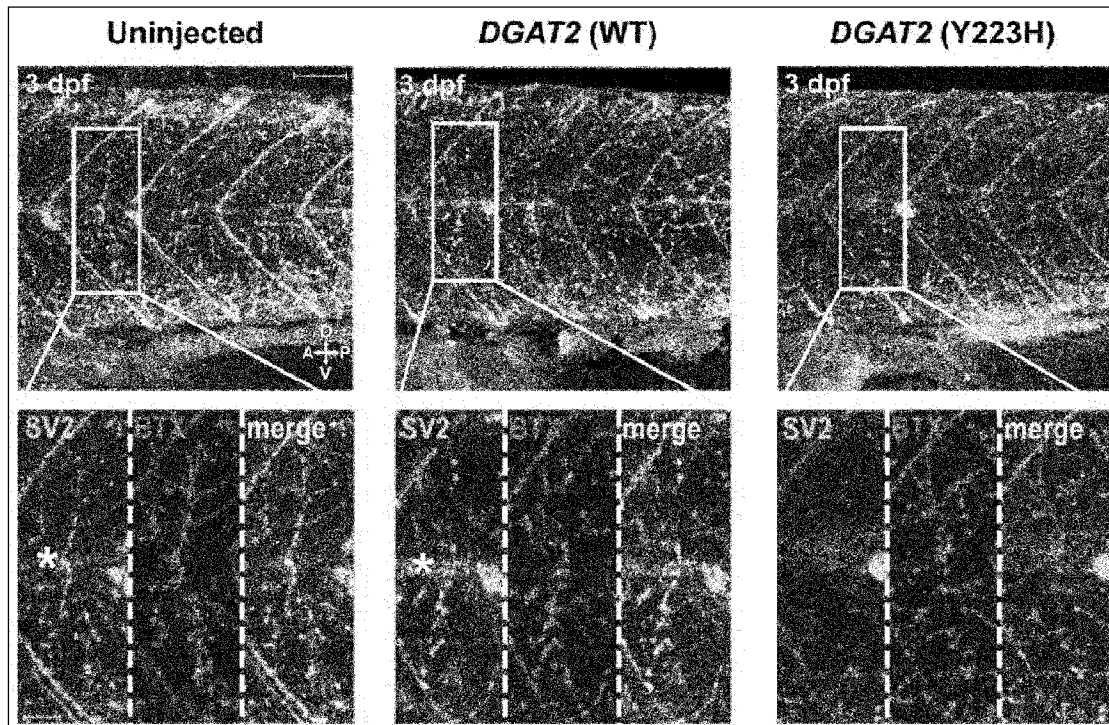
【도 1】



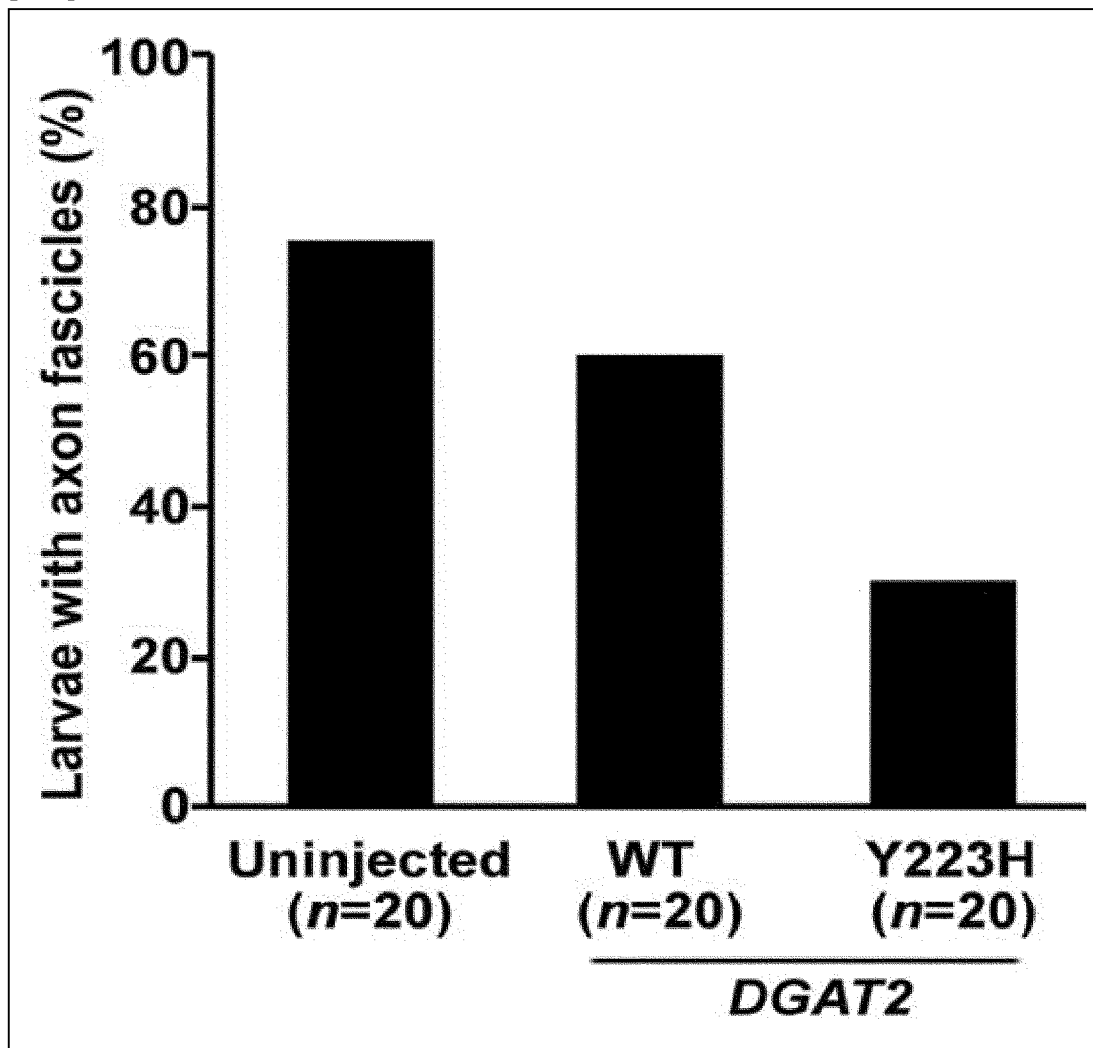
【도 2】



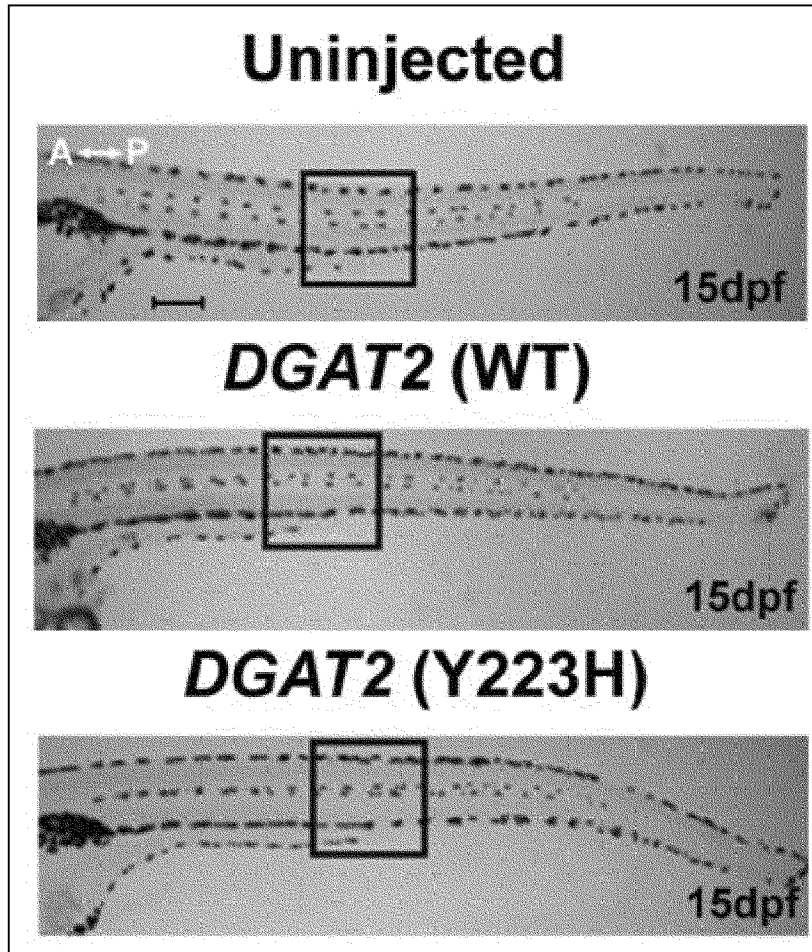
[도3]



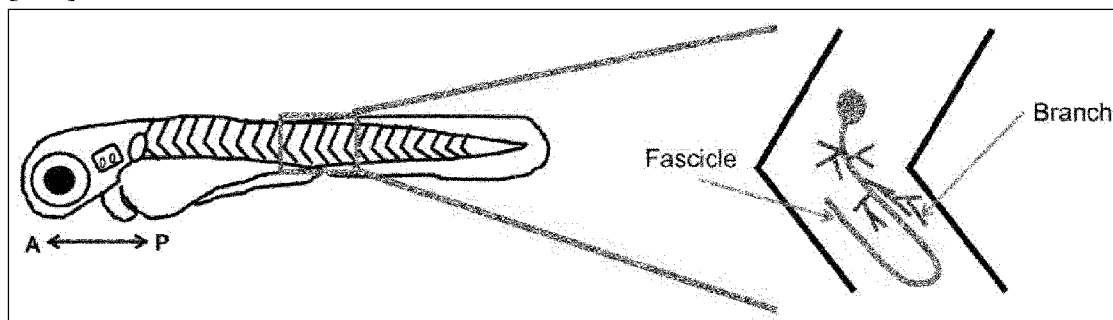
[도4]



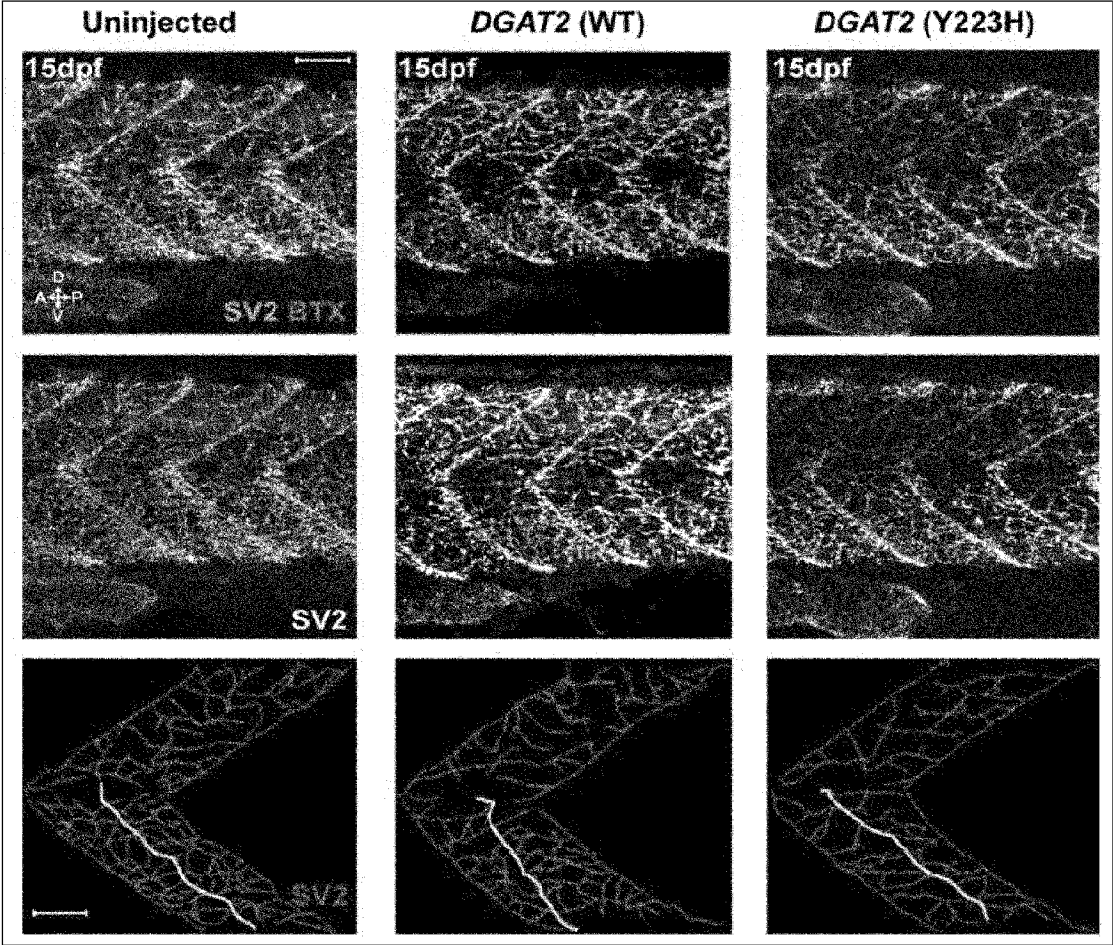
[도5]



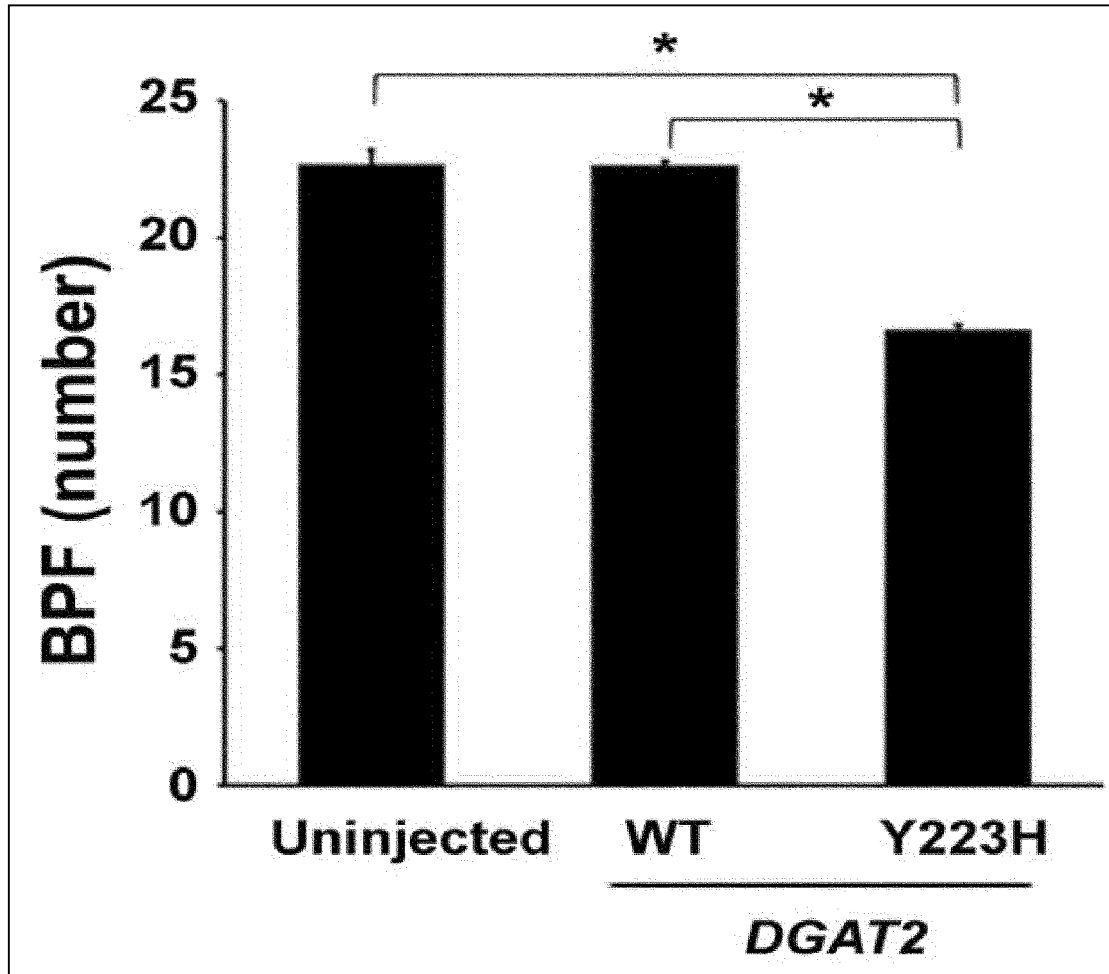
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/012298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85; C12N 15/64; C12N 5/10; C12N 15/12; C12N 15/09; G01N 33/53; C12Q 1/68; C12N 15/52; G01N 33/50; A01K 67/027

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: DGAT2 mutant gene, zebrafish, neuron, motor nerve, peripheral nerve

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM, Ji Young, "Histopathologic Features and Molecular Genetics of Charcot-Marie-Tooth Patients of Korean Origin", Graduate School of Ewha Women University 2014 Doctorate Thesis (27 January 2015) See pages 6-7, 32, 43; table 2.	1-7
Y	KR 10-2009-0022231 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 04 March 2009 See abstract; claims 1-8.	1-7
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NM_032564.4 See the entire document.	1-7
A	GALLARDO et al., "Phenotype-driven Chemical Screening in Zebrafish for Compounds that Inhibit Collective Cell Migration Identifies Multiple Pathways Potentially Involved in Metastatic Invasion", Disease Models and Mechanisms, vol. 8, pages 565-576 (June 2015) See the entire document.	1-7
A	KR 10-2012-0131256 A (HANBAT NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 05 December 2012 See the entire document.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 FEBRUARY 2017 (09.02.2017)

Date of mailing of the international search report

09 FEBRUARY 2017 (09.02.2017)

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/KR2016/012298

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HONG et al., "DGAT2 Mutation in a Family with Autosomal-dominant Early-onset Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease", Human Mutation, vol. 37, pages 473-480 (E.pub. 20 January 2016) See the entire document.	1-7
PX	KR 10-2016-0110600 A (KONGJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION et al.) 22 September 2016 See claims 1-13; figure 4; paragraphs [0069]-[0076].	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/012298

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0022231 A	04/03/2009	KR 10-0984643 B1	01/10/2010
KR 10-2012-0131256 A	05/12/2012	NONE	
KR 10-2016-0110600 A	22/09/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85; C12N 15/64; C12N 5/10; C12N 15/12; C12N 15/09; G01N 33/53; C12Q 1/68; C12N 15/52; G01N 33/50; A01K 67/027

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: DGAT2 돌연변이 유전자, 제브라피쉬, 신경세포, 운동신경, 말초신경

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	김지영, 'Histopathologic features and molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth patients of Korean origin' 이화여자대학교 대학원 2014학년도 박사학위 청구논문 (2015.01.27) 페이지 6-7, 32, 43; 표 2 참조.	1-7
Y	KR 10-2009-0022231 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2009.03.04 요약; 청구항 1-8 참조.	1-7
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NM_032564.4 전체 문헌 참조.	1-7
A	GALLARDO 등, 'Phenotype-driven chemical screening in zebrafish for compounds that inhibit collective cell migration identifies multiple pathways potentially involved in metastatic invasion' Disease Models and Mechanisms, Vol.8, pages 565-576 (2015.06) 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2012-0131256 A (한밭대학교 산학협력단 등) 2012.12.05 전체 문헌 참조.	1-7

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 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

2017년 02월 09일 (09.02.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 02월 09일 (09.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	HONG 등, 'DGAT2 mutation in a family with autosomal-dominant early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease' Human Mutation, Vol.37, pages 473-480 (E.pub. 2016.01.20) 전체 문헌 참조.	1-7
PX	KR 10-2016-0110600 A (공주대학교 산학협력단 등) 2016.09.22 청구항 1-13; 도면 4; 단락 [0069]-[0076] 참조.	1-7

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0022231 A	2009/03/04	KR 10-0984643 B1	2010/10/01
KR 10-2012-0131256 A	2012/12/05	없음	
KR 10-2016-0110600 A	2016/09/22	없음	