(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 8 월 8 일 (08.08.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/115508 A1

(51) 국제특허분류:
A01K 67/033 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/000329

(22) 국제출원일: 2013 년 1 월 16 일 (16.01.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0008991 2012 년 1 월 30 일 (30.01.2012) KR

(71) 출원인: **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)** [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **유권 (YU, Kweon)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이규선 (LEE, Kyu-Sun)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **김애경 (KIM, Ae Kyung)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 135-080 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

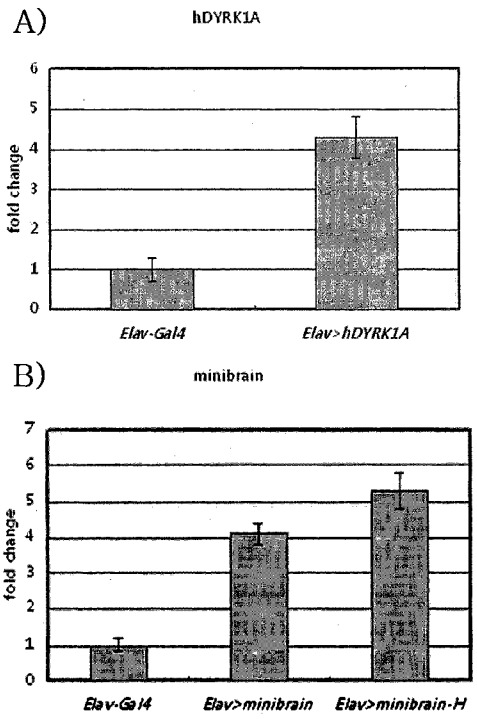
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,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

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

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: METHOD FOR SCREENING THERAPEUTIC AGENT USING TRANSGENIC DROSOPHILA EXPRESSING HUMAN DYRK1A GENE

(54) **발명의 명칭** : 인간 ＤＹＲＫ１Ａ 유전자 형질전환 초파리를 이용한 치료제 스크리닝 방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to a human dual-specificity tyrosine (Y) regulated kinase 1A (DYRK1A) transgenic Drosophila or a minibrain gene transgenic Drosophila, wherein the DYRK1A is a human Down syndrome gene and the minibrain gene is a Drosophila homologous gene of DYRK1A, to a method for producing same, and to a method for screening a Down syndrome-related phenotypic drug by using the transgenic Drosophila. More particularly, a Drosophila having a transgene of the human dual-specificity tyrosine (Y) regulated kinase 1A (DYRK1A) or minibrain, according to the present invention, nervous system-specifically overexpresses hDYRK1A or minibrain, thereby expressing shorter lifespan, reduced motor ability, and abnormalities in nervous system development, is simpler to manipulate compared to existing rat models, is very economical, and displays a phenotype allowing easy observation of Down syndrome symptoms, and thus can be useful in effectively screening the Down syndrome-related phenotypic drug.

(57) **요약서**: 본 발명은 인간 다운증후군 유전자 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 DYRK1A 의 초파리 상동 유전자인 minibrain 유전자 형질전환 초파리, 이의 제조 방법, 및 상기 형질전환 초파리를 이용한 다운증후군 관련 표현형 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 인간 다운증후군 유전자(DYRK1A) 또는 minibrain 가 형질전환된 초파리는 신경계 특이적으로 hDYRK1A 또는 minibrain 을 과다발현하여 수명 단축, 운동능력 감소, 및 신경계 발달 이상 현상을 나타내고, 기존의 생쥐 모델과 비교하여 조작이 용이하고, 경제성이 우수하며 다운증후군 증상을 쉽게 관찰할 수 있는 표현형을 나타내므로 효과적으로 다운증후군 관련 표현형 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2013/115508 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

인간 ＤＹＲＫ１Ａ 유전자 형질전환 초파리를 이용한 치료제 스크리닝 방법

【기술분야】

본 발명은 인간 다운증후군 유전자 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 DYRK1A 의 초파리 상동 유전자인 minibrain 유전자 형질전환 초파리, 이의 제조 방법 및 상기 형질전환 초파리를 이용한 다.

【배경기술】

다운증후군(Down Syndrome)이란 인간 21번 염색체의 삼배체(trisomy)에 의해 발생하는 염색체 이상 질환으로 정신지체, 학습장애 및 기억감퇴, 알츠하이머 병의 조기 발병, 그리고 두개 안면 장애 등의 증상이 나타난다. 특히, 인간 염색체 21번의 '다운증후군 임계역(Down syndrome critical region, DSCR)'으로 명명된 특정부위에 존재하는 유전자들의 발현량 변화가 다운증후군 발병을 초래하는 것으로 추정된다. 이 가운데 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A)는 신경중추의 발달 및 기능에 중요한 역할을 수행하는 유전자로 다양한 단백질의 인산화에 관여하는 효소이다. 특히, 학습장애와 기억감퇴, 시냅스의 유연성 변화, 비정상적 세포주기 및 알츠하이머성 치매와 유사한 신경병리학적 증세에 관여하는 유전자로 이 단백질이 가진 생화학적, 기능적, 분자생물학적 효과를 이해하는 것은 다운증후군에 관련된 질환의 병인을 규명하고 다운증후군에 관련된 신경 결함 치료제 개발에 필수적이다.

특히, 다운 증후군의 경우, 신생아 700명에 한 명 정도로 발생하는 가장 빈번한 염색체 이상 증후군이다. 인종, 환경, 사회 경제적 차이에

관계없이 일정한 비율로 발생하며 산모의 나이가 35세 이상이 되면 그 발생빈도가 높아지며, 40세 이상의 산모가 출산을 할 경우, 100 명당 1명 출생 빈도를 갖는다. 현대의학으로 이러한 유전적 이상을 예방하는 방법은 존재하지 않으며 단지 출생 전에 유전자 검사를 통하여 태아의 다운증후군 여부를 확인할 수 있을 뿐이다.

다운증후군 환자의 질환 예후로 다음과 같은 공통된 신체적 특징을 가지고 있다. 모든 신체에 증상들이 나타나며 이로 인해 다운증후군 아동의 경우, 뇌기능 저하에 따른 행동 발달지체를 보인다. 환자의 30~40%는 심장판막 이상 같은 선천성 심장질환(congenital heart disease) 병을 가지고 태어나며 면역력 저하에 따른 폐렴 및 백혈병, 장 폐쇄, 장염 등의 빈도도 높은 것으로 나타난다. 의료기술의 발달로 대부분의 증상이 치료 또는 예방이 가능하게 되어 다운증후군의 평균 수명이 50세까지 늘어나고 있는 추세이다. 그러나 현재까지 뇌신경계 기능저하 및 신경퇴행성 증상에 대한 치료제 개발 성과는 전무하며, 인지능력을 향상시킨다는 Piracetam의 효과도 다운증후군 아동에게서는 효과가 나타나지 않는 것으로 확인되었다(Lobaugh, N. J. et al. (2001). "Piracetam therapy does not enhance cognitive functioning in children with down syndrome." Arch Pediatr Adolesc Med 155: 442-448). 따라서 다운증후군 환자의 뇌신경계 이상의 근본적인 원인 기작의 규명을 통해 치료제 개발이 시급한 것으로 사료된다.

이를 위해서 다운증후군의 원인으로 생각되는 인간염색체 21번 전체가 아닌 21번 염색체 내의 주요 유전자에 각각에 대한 분자생물학적 병인학적 연구가 요구되며, 증상에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 부분을 연구한 결과 Down Syndrome Critical Region(DSCR)이라 불리는 4~5 Mb 영역에 위치한 유전자들이 뇌기능저하를 비롯한 여러 증상에 관여할 가능성이 높은 것으로

알려져 이곳에 위치한 유전자에 대한 연구가 요구된다. 다운증후군의 뇌기능저하에 대한 기존 연구를 살펴보면, 2000년 염색체 21번의 염기서열이 해독되어 적어도 225개의 유전자가 존재함을 밝혔다(Hattori, M. et al. (2000). "The DNA sequence of human chromosome 21." Nature 405: 311-319). 특히, 과다 발현에 의해서 뇌기능저하의 원인으로 예상되는 후보 유전자가 시공간적인 발현양상 및 신경계(뇌)에서의 역할 등을 근거로 다수 발굴되었다(Benavides-Piccione, R. et al. (2004). "On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn." Prog Neurobiol 74: 111-126; Altafaj, X. et al. (2001). "Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome." Hum Mol Genet 10: 1915-1923; Epstein, C.J. et al. (1987). "Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A 84: 8044-8048; Lamb, B.T. et al. (1993). "Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice." Nat Genet 5: 22-30.; Chrast, R. et al. (2000). "Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (Sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome." Hum Mol Genet 9: 1853-1864).

이들 유전자들 가운데 DYRK1A의 경우 형질전환 생쥐가 다운증후군에서 보이는 학습과 기억능력 저하를 보이는 주요 유전자의 하나로 알려져 있다(Smith, D.J. et al. (1997). "Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning

defects associated with Down syndrome." Nat Genet 16: 28-36; Altafaj, X. et al. (2001). "Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome." Hum Mol Genet 10: 1915-1923).

기존의 DYRK1A 형질전환 생쥐는 두 가지의 모델로 제시되었으며, 첫 번째로 DYRK1A를 인접 부위를 포함한 YAC(Yeast Artificial Chromosome) 벡터를 도입하여 제작한 생쥐이며(Smith, D. J. et al. (1997). "Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome." Nat Genet 16(1): 28-36), 두 번째는 DYRK1A의 cDNA만 도입된 형질전환 생쥐로 외래의 프로모터(promoter)를 이용하여 발현시킨 모델이다(Altafaj, X. et al. (2001). "Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome." Hum Mol Genet 10: 1915-1923). 그러나, 상기 YAC 벡터가 도입된 형질전환 생쥐는, YAC 벡터에 DYRK1A 이외의 다수의 유전자가 포함되어 있어 유전자 특이적인 효과 및 치료제 스크리닝에 타 유전자의 방해현상을 배제할 수 없는 문제점이 있으며, 외래 프로모터를 이용하여 DYRK1A cDNA 발현을 유도하는 형질전환 생쥐에서는 발현양상이 원래의 유전자와 동일하지 못하며, 형질전환 생쥐의 질환 특이적인 표현형이 약하여 약물 스크리닝에 이용하기에는 한계가 있는 것으로 사료된다. 최근 인간의 hDYRK1A의 YAC 벡터를 이용한 형질전환 생쥐가 개발되어 다운증후군 치료제 개발의 스크리닝 모델로 제시가 된바 있다(Ahn, KJ., et al. (2006). "DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects." Neurobiol Dis. 22(3):463-72). 그러나, 약물

스크리닝에 이용되는 생쥐 모델의 비용 및 시간상의 한계점이 있는 것으로 판단된다.

초파리 모델은 인간의 질병 유전자의 80% 이상이 잘 보존되어 있으며, 이전의 많은 연구결과들도 초파리가 인간의 질병에 대한 증상이 같고, 저렴한 비용으로 대량의 신약 스크리닝이 가능한 장점을 가지고 있어 신약개발에 대한 이용가치가 높음을 보고하고 있다(Giacomotto J et al.(2010) Br J Pharmacol. 160(2):204-16).

특히, 초파리의 minibrain 유전자는 DYRK1A의 초파리 상동 유전자로 신경발달에 관계가 있음이 최초로 보고된 DYRK1A군의 유전자로 배아단계에서부터 성체의 신경계에 다량 발현하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 초파리의 기억과 학습을 담당하는 버섯모양체(mushroom body)를 포함하여 다양한 신경조직에 발현되는 것으로 확인되었다. 또한, minibrain 돌연변이 초파리의 경우 정상 초파리에 비해 뇌조직의 크기가 유의적으로 감소하며, 행동장애를 보이는 것으로 확인되어 초파리의 DYRK1A인 minibrain 유전자가 뇌신경계 기능에 중요한 기능을 보유하는 것을 보고한 바 있다 (Tejedor, F., et al. (1995). "minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila." Neuron 14: 287-301).

이에, 본 발명자들은 다운증후군 증상 조절에 관한 근본적인 치료제 개발을 위해 노력한 결과, 본 발명자들은 인간 다운증후군 유전자 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 상기 DYRK1A의 초파리 상동 유전자인 minibrain 유전자가 형질전환된 초파리를 제조한 후, 상기 형질전환된 초파리가 신경계 특이적으로 hDYRK1A을 과다발현하여 수명 단축 및 운동능력 감소 현상을 나타내는 것을 확인함으로써, 상기 형질전환된

초파리를 다운증후군 관련 표현형을 치료하기 위한 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 1) 인간 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 minibrain 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 이용하여 다운증후군 관련 표현형을 치료하기 위한 조성물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 이용하여 다운증후군 관련 표현형 동물 모델을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 기억 및 학습기능 저하, 수명단축, 운동 능력 저하, 및 신경계 발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

1) 인간 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 minibrain 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는

다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 저하 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 초파리의 기억 및 학습기능을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 초파리의 기억 및 학습기능을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 초파리의 수명을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 수명을 연장시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 예방 및 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 운동능력을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 운동능력을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동능력 저하 예방 및 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 신경발달 수준을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 신경발달 수준을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 기억 및 학습기능 저하, 수명단축, 운동 능력 저하, 및 신경계 발달 장애 동물 모델 동물로 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

아울러, 본 발명은 기억 및 학습기능 저하, 수명단축, 운동 능력 저하, 및 신경계 발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명의 인간 다운증후군 유전자(DYRK1A) 또는 minibrain 유전자가 형질전환된 초파리는 신경계 특이적으로 hDYRK1A을 과다발현하여 수명 단축 및 운동능력 감소 현상을 나타내고, 기존의 생쥐모델과 비교하여 조작이 용이하고, 경제성이 우수하며 다운증후군 증상을 쉽게 관찰할 수 있는 표현형을 나타내므로 효과적으로 다운증후군 관련 표현형치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용

될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 발현 벡터를 제작하는 방법을 나타낸 도이다.

도 2는 minibrain E 발현 벡터를 제작하는 방법을 나타낸 도이다.

도 3은 minibrain H 발현 벡터를 제작하는 방법을 나타낸 도이다.

도 4는 hDYRK1A 및 minibrain 형질전환 초파리의 유전자 과발현 효과 확인한 도이다:

Elav-Gal4: *대조군* 초파리;

Elav>hDYRK1A: 인간다운증후군 hDYRK1A 형질전환 초파리;

Elav>minibrain: 초파리 minibrain 형질전환 초파리; 및

Elav>minibrain-H: 초파리 minibrain-H 형질전환 초파리.

도 5는 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 수명 단축효과를 확인한 도이다:

ElvaGS>hDYRK1A-RU: hDYRK1A 유전자의 발현을 유도하지 않은 대조군 초파리;

ElvaGS>hDYRK1A+RU: hDYRK1A 유전자 과발현 초파리;

ElvaGS>mnb-RU: minibrain 유전자의 발현을 유도하지 않은 대조군 초파리; 및

ElvaGS>mnb+RU: minibrain 유전자 과발현 초파리;

도 6은 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 운동 능력 변화를 확인한 도이다:

ElvaGS>hDYRK1A-RU: hDYRK1A 유전자의 발현을 유도하지 않은 대조군 초파리;

ElvaGS>hDYRK1A+RU: hDYRK1A 유전자 과발현 초파리;

ElvaGS>mnb-RU: minibrain 유전자의 발현을 유도하지 않은 대조군 초파리; 및

ElvaGS>mnb+RU: minibrain 유전자 과발현 초파리;

도 7은 minibrain 유전자 발현에 의한 초파리 신경계 발달양상을 분석한 도이다:

Elva>syt-GFP: 대조군 초파리;및

Elva>syt-GFP;minibrain: minibrain 유전자 형질전환 초파리.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은

1) 인간 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 minibrain 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법을 제공한다.

또한, 본 발명의 상기 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

상기 제조방법에 있어서, 상기 단계 1)의 DYRK1A 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 서열에서 하나 또는 둘 이상의 염기가 결실, 첨가 또는 치환된 서열로 구성될 수 있다.

상기 단계 1)의 minibrain 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 서열에서 하나 또는 둘 이상의 염기가 결실, 첨가 또는 치환된 서열로 구성될 수 있다.

상기 단계 1)의 벡터는 인간 DYRK1A 유전자 또는 minibrain 유전자를 포함하는 것이 바람직하나, DYRK 유전자의 서브타입(subtype)인 DYRK1B, DYRK2 또는 DYRK4 유전자를 포함할 수도 있다.

상기 단계 2)의 벡터는 UAS 벡터인 것이 바람직하고, 인간 DYRK1A 또는 minibrain 유전자를 포함하는 UAS 벡터는 P-인자 매개 생식세포 형질전환방법(P-element-mediated germ line transformation)을 이용하여 초파리에 도입되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 단계 2)의 초파리는 노랑초파리(*drosophila melanogaster*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 다운증후군 발병 유전자로 알려진 인간 DYRK1A 유전자 또는 이의 초파리 상동 유전자인 minibrain 유전자를 포함하는 형질전환 초파리를 제조하기 위하여, DYRK1A 및 minibrain 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조한 다음, P-인자 매개 생식세포 형질전환(P-element-mediated germ line transformation)을 통해 UAS-hDYRK1A와 UAS-minibrain 발현 벡터로 형질전환된 초파리를 제조하였다(도 1 내지 도 3 참조).

또한, 본 발명자들은 hDYRK1A 형질전환 초파리 및 minibrain 형질전환 초파리가 각각 hDYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자가 형질전환된 초파리는 hDYRK1A 유전자(도 4A 참조) 및 minibrain 유전자(도 4b 참조)가 대조군에 비해 약 4-5배 이상 유의적으로 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4 참조).

또한, 본 발명자들은 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 수명 단축효과를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현이 유도된 형질전환초파리는 대조군과 비교하여 인간 다운 증후군 환자와 같은 수명 단축 효과가 있는 것이 확인하였다(도 5 참조).

또한, 본 발명자들은 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 운동능력 변화를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현이 유도된 형질전환초파리는 대조군과 비교하여 운동 능력 감소가 현저하게 증가되는 것을 확인하였다(도 6 참조).

아울러, 본 발명자들은 minibrain 유전자 발현에 의한 초파리 신경계 발달을 측정하기 위하여, GFP 형광물질을 이용하여 측정한 결과, minibrain 유전자가 과발현된 경우, 다양한 신경 발생 이상이 확인되어 인간 다운증후군의 뇌신경계 이상과 minibrain 유전자 과발현에 의한 신경계 이상이 연관이 있음을 확인하였다(도 7 참조).

따라서, 본 발명의 다운증후군 유전자(DYRK1A 또는 minibrain)가 형질전환된 초파리는 신경계 특이적으로 hDYRK1A 또는 minibrain을 과다발현하여 수명 단축 및 운동능력 감소 현상을 나타내고, 기존의 생쥐모델과 비교하여 조작이 용이하고, 경제성이 우수하며 다운증후군 증상을 쉽게 관찰할 수 있는 표현형을 나타내므로 효과적으로 다운증후군 관련 표현형 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은,

1) 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 저하 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 초파리의 기억 및 학습기능을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 초파리의 기억 및 학습기능을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화는 DNA 칩, 웨스턴 블랏 (western blot), 면역조직화학법, 효소결합면역흡착검사(ELISA), 방사성 동위원소면역측정법(RIA), 중합효소증폭법(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 hDYRK1A 형질전환 초파리 및 minibrain 형질전환 초파리가 각각 hDYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자가 형질전환된 초파리는 hDYRK1A 유전자(도 4A 참조) 및 minibrain 유전자(도 4b 참조)가 대조군에 비해 약 4-5배 이상 유의적으로 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4 참조).

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 초파리의 수명을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 수명을 연장시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 예방 및 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화는 DNA 칩, 웨스턴 블랏 (western blot), 면역조직화학법, 효소결합면역흡착검사(ELISA), 방사성 동위원소면역측정법(RIA), 중합효소증폭법(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 hDYRK1 및 minibrain

유전자에 의한 초파리 수명 단축효과를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현이 유도된 형질전환초파리는 대조군과 비교하여 인간 다운 증후군 환자와 같은 수명 단축 효과가 있는 것이 확인하였다(도 5 참조).

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 본 발명의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 상기 형질전환 초파리에서 운동능력을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 운동능력을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동능력 저하 예방 및 개선용 조성물 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화는 DNA 칩, 웨스턴 블랏 (western blot), 면역조직화학법, 효소결합면역흡착검사(ELISA), 방사성 동위원소면역측정법(RIA), 중합효소증폭법(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-

Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 운동능력 변화를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현이 유도된 형질전환초파리는 대조군과 비교하여 운동능력 감소가 현저하게 증가되는 것을 확인하였다(도 6 참조).

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은,

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 본 발명의 제조방법으로 제조된 형질전환 초파리에서 신경발달 수준을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 신경발달 수준을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 스크리닝 방법에 있어서, hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화는 DNA 칩, 웨스턴 블랏 (western blot), 면역조직화학법, 효소결합면역흡착검사(ELISA), 방사성 동위원소면역측정법(RIA),

중합효소증폭법(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 신경 발달 양상를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템을 이용하여 DYRK1A 및 minibrain 유전자를 각각 과발현시킨 결과, DYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현이 유도된 형질전환초파리는 대조군과 비교하여 신경발달에 발생이상이 생기는 것을 확인하였다(도 7 참조).

따라서, 본 발명의 다운증후군 유전자(DYRK1A 또는 minibrain)가 형질전환된 초파리는 신경계 특이적으로 hDYRK1A 또는 minibrain을 과다발현하여 수명 단축 및 운동능력 감소 현상을 나타내고, 기존의 생쥐모델과 비교하여 조작이 용이하고, 경제성이 우수하며 다운증후군 증상을 쉽게 관찰할 수 있는 표현형을 나타내므로 효과적으로 다운증후군 관련 표현형 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 기억 및 학습기능 저하 동물 모델 동물로 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 수명단축 모델 동물로 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 운동능력 저하 모델 동물로 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 신경계 발달 장애 모델 동물로 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 기억 및 학습기능 저하 예방 및 개선용 조성물의

스크리닝에 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 수명단축 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

또한, 본 발명은 운동기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

아울러, 본 발명은 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 제 본 발명의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리를 제공한다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 초파리 준비 및 사육

초파리는 25℃를 유지한 상태에서 사육하였고, 대조군으로 사용한 Elav-Gal4 및 Elav-GeneSwitch-Gal4 형질전환 초파리는 Lee, ks., et al 등이 발표한 내용에 기재되어 있다(Lee, KS., et al., (2009), J. Biol. Chem 284(43):29454-61). 또한, UAS-hDYRK1A와 UAS-minibrain 형질전환 초파리는 하기 <실시예 2>에 기재한 방법에 따라 제작하여 사용하였다.

<실시예 2> UAS-hDYRK1A 및 UAS-minibrain 형질전환 초파리의 제조

<2-1> DYRK1A 발현 벡터의 클로닝

인간의 다운증후군 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 유전자를 가지는 형질전환 초파리를 제작하기 위하여 pENTR223.1 vector (Invitrogen, 미국)에 인간의 DYRK1A 유전자(Genebank number: BC156309; 서열번호 1)가 들어있는 cDNA clone(Openbiosystem, 미국)을 구입한 후, 게이트웨이 시스템(Gateway system)을 이용하여 하기와 같은 방법으로 클로닝을 수행하였다.

구체적으로, pENTR223.1-DYRK1A 벡터 150 ng과 UAS 벡터 150 ng을 섞어 TE 버퍼(buffer)로 8㎕까지 채운 후, LR Clonase II 효소(Invitrogen, 미국)를 2㎕ 넣어 25℃에서 1시간 동안 반응시킴으로써 UAS-DYRK1A 벡터를 제작하였다(도 1).

<2-2> minibrain E 발현 벡터의 클로닝

DYRK1A 유전자의 초파리 상동 유전자인 *Drosophila* minibrain E를 가지는 형질전환 초파리를 제작하기 위하여, mnb E(Genebank number:NM_167581.2; 서열번호 2) 염기서열을 토대로 하기와 같이 클로닝을 수행하였다.

구체적으로, 먼저 초파리로부터 easy-BLUE RNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, 한국)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 후, 전체 RNA 3 ㎍과 Oligo-dT 1 ㎕(Invitrogen, 미국)에 증류수를 13 ㎕까지 채운 후, SuperScript First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 미국)을 이용하여 반응시켰다. 그런 다음, 65℃에서 5분, 4℃에서 2분, 50℃에서 60 분, 70℃에서 15 분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 1 ㎕을 주형으로 하여, mnb E (N-term)의 분리를 위해 서열번호 4(5'-CCATGTATAGATTAGAGGATACGAATAG-3') 및 서열번호 5(5'-ACCGCCTGTTTCCACTCCGAGGATG-3')의 프라이머 쌍과 mnb E (C-

term)의 분리를 위하여 서열번호 6(5'-AGTATCTGCTCGACCAGGCGCACAAG-3') 및 서열번호 7(5'-GTGGAGGCGTTGGTTGGCGGTGCAAT-3')의 프라이머 쌍을 각각 PCR mastermix(iNtRON Biotechnology, 한국)를 이용하여 95℃에서 5 분 동안 변성해 주고, 95℃ 30 초, 58℃ 30 초, 72℃ 1 분 30 초의 조건으로 30 회전을 돌린 후, 72℃에서 5 분 동안 신장시켜준 뒤, 4℃에서 냉각의 순서로 PCR을 수행하였다. 이렇게 얻어진 DNA 단편을 pGEMEasy vector system(Promega, 미국)을 이용하여 각각 pGEMEasy-mnb E(N-term)과 pGEMEasy-mnb E(C-term) 벡터를 제작하였다. mnb E의 full-length ORF를 가지는 벡터 제작을 위하여 1281bp 위치에 존재하는 HindIII 제한효소를 이용하였다. pGEMEasy-mnb E (N-term)을 HindIII 제한효소로 잘라 준비하고, pGEMEasy-mnb E(C-term)을 HindIII와 SpeI(Roche, 미국)으로 잘라 mnb E(C- term) 부분을 준비하였다. 각각 준비된 단편들은 DNA ligase(Bioneer, 한국)를 이용하여 연결함으로써 pGEMEasy-mnb E(full-length) 벡터를 제작하였다.

또한, mnb E(full-length)를 가지는 형질전환초파리를 만들기 위하여 하기와 같은 방법으로 UAS-mnb E(full-length)를 제작하였다.

구체적으로, pGEMEasy-mnb E(full-length) 벡터와 UAS 벡터를 제한효소 EcoRI(Roche, 미국)으로 잘라 mnb E(full-length) 단편과 선형화된 UAS 벡터를 DNA ligase(Bioneer, 한국)를 사용하여 UAS-mnb E(full-length) 벡터를 제작하였다(도 2).

<2-3> minibrain H 발현 벡터의 클로닝

DYRK1A 유전자의 초파리 상동 유전자인 *Drosophila* minibrain H를 가지는 형질전환 초파리를 제작하기 위하여, mnb H(Genebank number: NM_170659.2; 서열번호 3) 염기서열을 바탕으로 클로닝을 수행하였다. mnb H (N-term) 분리를 위하여 상기 초파리 cDNA 1 ㎕을 주형으로 하여, 서열번호

8(5'-GCGATTCCGATTGCCAGTGATATGT-3') 및 서열번호 9(5'-ACCGCCTGTTTCCACTCCGAGGATG-3') 프라이머 쌍을 PCR mastermix(iNtRON Biotechnology, 한국)를 이용하여 95℃에서 5 분 동안 변성해 주고, 95℃ 30 초, 58℃ 30 초, 72℃ 1 분 30 초의 조건으로 30 회전을 돌린 후, 72℃에서 5 분 동안 신장시켜준 뒤, 4℃에서 냉각의 순서로 PCR을 수행하였다. 이 PCR 단편을 pGEMEasy vector system(Promega, 미국)을 사용하여 pGEMEasy-mnb H(N-term) 벡터를 제작하였다. mnb H의 C-term 부분은 mnb E(C-term)과 같은 염기서열로 이루어져 있으므로 mnb H(C-term) 을 분리하는 대신 mnb E(C-term) 을 사용하였다. mnb H(full-length)는 mnb H의 1717bp 부분에 존재하는 HindIII 제한효소를 이용하여 하기와 같이 제작하였다. pGEMEasy-mnb H (N-term)을 HindIII 제한효소로 잘라 준비하고, pGEMEasy-mnb E (C-term)을 HindIII와 SpeI (Roche, 미국)으로 잘라 mnb E (C-term)부분을 준비한 후, 각각의 단편들을 DNA ligase (Bioneer, 한국)를 이용하여 pGEMEasy-mnb H (full-length) 벡터를 제작하였다.

또한, mnb H (full-length)를 가지는 형질전환 초파리를 제작하기 위하여 pGEMEasy-mnb H(full-length) 벡터와 UAS 벡터를 제한효소 EcoRI (Roche, 미국)으로 잘라 mnb H(full-length) 단편과 선형화된 UAS 벡터를 DNA ligase (Bioneer, 한국)를 이용하여 연결함으로써 UAS-mnb H (full-length) 벡터를 제작하였다(도 3).

<2-4> hDYRK1A 및 minibrain 발현 벡터의 초파리 형질 전환

상기 실시예 <2-2> 및 <2-3>에서 제조된 hDYRK1A 및 minibrain 발현 벡터를 초파리에 형질전환하기 위하여, 공지의 방법인 P-인자 매개 생식세포 형질전환(P-element-mediated germ line transformation)을 통해 UAS-hDYRK1A와 UAS-minibrain 발현 벡터로 형질전환된 초파리를 수득하였다[Rubin

GM *et al.*(1982) Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. 357 Science 218: 348-353].

<2-5> hDYRK1A 및 minibrain 형질전환 초파리의 유전자 과발현 효과 확인

상기 실시예 <2-4>에서 제조된 hDYRK1A 형질전환 초파리 및 minibrain 형질전환 초파리가 각각 hDYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여 초파리의 Gal4/UAS 시스템을 이용하여 신경계 특이적인 Elav-Gal4에 각각 UAS-hDYRK1A 형질전환 초파리와 UAS-minibrain 형질전환 초파리를 교배한 후 얻어진 Elav>hDYRK1A, Elav>minibrain과 대조군인 Elav-Gal4 초파리의 머리를 분리하여 cDNA를 합성한 후 hDYRK1A 프라이머 및 minibrain 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

구체적으로, cDNA의 합성은 easy-BLUE RNA extraction kit를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1 ㎍과 Oligo-dT 1 ㎕(Invitrogen, 미국)에 증류수를 13 ㎕까지 채운 후, SuperScript First-Strand Synthesis System(Invitrogen, 미국)에 넣어 반응시켰다. 65℃에서 5분, 4℃에서 2분, 50℃에서 60 분, 70℃에서 15 분, 4℃에서 5 분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 1 ㎕을 주형으로 하여, 서열번호 10(5'-TGATTGCACCAACAGGTCCAGA-3')과 서열번호 11(5'-TTCTCCCAATTCAACCGCTCA-3')의 hDYRK1A 프라이머 쌍 및 서열번호 12(5'-CGTGACTTCAATTGGATAAATAGCT-3')와 서열번호 13(5'-GCTGAAATTGACCCTCAGGTCC-3') minibrain 프라이머 쌍 및 PCR Premix(Bioneer, 한국)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 95℃에서 5 분 동안 변성해 주고, 95℃ 30 초, 60℃ 30 초, 72℃ 30 초의 조건으로 30 회전을 돌린 후, 72℃에서 5 분 동안 신장시켜준 뒤, 4℃에서 냉각의 순서로 수행하였다.

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, hDYRK1A 유전자(도 4A) 및

minibrain 유전자(도 4b)는 대조군에 비해 약 4-5배 이상 유의적으로 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4).

<실험예 1> hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 수명 단축효과 확인

hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 수명 단축효과를 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템 및 유도성 유전자 발현(inducible gene expression) 시스템인 유전자 스위치(GeneSwitch)를 이용하여 성체의 신경계 특이적으로 hDYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현을 유도하기 위해 ElavGeneSwitch-Gal4(ElavGS-Gal4)와 UAS-hDYRK1A를 교배하여 알을 받은 후 번데기에서 깨어난 2일 이내의 형질전환 초파리 성체 100마리를 이용하여 초파리 수명을 측정하였다. 수명 측정은 유전자 스위치(GeneSwitch)를 활성화시키는 RU486이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 대조군 배지를 이용하였으며 3일 단위로 배양기 내에 사체를 개수하여 수명 측정을 실시하였다.

그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 유전자 발현을 유도하지 않은 대조군 (ElavGS>hDYRK1A-RU, Maxiam lifespan=57, Midian Lifespan=34)에 비해서 hDYRK1A 유전자 과발현(ElavGS>hDYRK1A+RU, Maxiam lifespan=45, Midian Lifespan=22)에 의해 유의적으로 수명이 단축되는 것을 확인하였다(도 5A). 또한, minibrain 과발현 (ElavGS>minibrain+RU, Maxiam lifespan=36, Midian Lifespan=19)에 의해서도 유의적으로 수명이 단축되는 것으로 확인되어(도 5B), 초파리에서 hDYRK1A 및 minibrain의 과발현에 의해서 인간 다운 증후군 환자와 같은 수명 단축 효과가 있는 것이 확인하였다.

<실험예 2> hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 운동 능력 변화 확인

hDYRK1 및 minibrain 유전자에 의한 초파리 운동 능력 변화 확인하기 위하여, Gal4/UAS 시스템 및 유도성 유전자 발현(inducible gene expression)

시스템인 유전자 스위치(GeneSwitch)를 이용하여 성체의 신경계 특이적으로 hDYRK1A 및 minibrain 유전자의 발현을 유도하기 위해 ElavGeneSwitch-Gal4 (ElavGS-Gal4)와 UAS-hDYRK1A를 교배하여 알을 받은 후 번데기에서 깨어난 2일 이내의 형질전환 초파리 성체를 유전자 스위치(GeneSwitch)를 활성화시키는 RU486이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 대조군 배지를 이용하여 30일까지 배양한 후 30일이 된 성체를 이용하여 입구가 막힌 10ml 피펫에 초파리를 1마리씩 위치시킨 후 단위시간(30초) 내의 초파리의 이동거리를 측정하여 hDYRK1A 및 minibrain의 과발현에 따른 운동 능력 (locomotion activity) 변화를 측정하였다.

그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 hDYRK1A 및 minibrain 과발현에 따라 노화에 따른 운동 능력 감소가 현저하게 증가되는 것을 확인하였다(도 6).

<실험예 3> minibrain 유전자 발현에 의한 초파리 신경계 발달 분석

minibrain 유전자 발현에 의한 초파리 신경계 발달을 분석하기 위하여, 초파리의 Gal4/UAS 시스템을 이용하여 신경계 특이적으로 형광단백질이 발현되는 driver인 Elav-Gal4;UAS-GFP를 이용하여 UAS-minibrain 형질전환 초파리를 교배한 후 얻어진 Elav>GFP:minibrain과 대조군인 Elav>GFP 초파리의 배아를 24시간 동안 수집한 후 난각을 탈각시킨 후 고정액에 고정하여 GFP 발현을 통해 신경계 발달 양상을 분석하였다.

그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 정상형(Elav>sytGFP)의 초파리의 중추신경계(Central nerve system)와 부신경계(peripheral nerve system)의 발달 및 신경계 망구조 형성이 잘 이루어진 반면(도 7A), minibrain 과발현의 경우, 시엽(Optic lobe) 및 복식경색(ventral nerve cord)의 발달 이상(도 7B 및 도 7C), 중추-부신경계간 신경망 형성 이상(도 7D) 등 다양한 신경 발생 이상이 확인되어 인간 다운증후군의 뇌신경계 이상과 minibrain 과발현에 의한

신경계 발생이상의 표현형이 연관이 있음을 확인하였다(도 7).

【청구의 범위】

【청구항 1】

1) 인간 DYRK1A(Dual-specific tyrosine(Y) Regulated Kinase 1A) 또는 minibrain 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 벡터를 초파리에 형질전환시키는 단계를 포함하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 DYRK1A 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 minibrain 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 벡터는 UAS 벡터인 것을 특징으로 하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 벡터는 P-인자 매개 생식세포 형질전환방법(P-element-mediated germ line transformation)을 이용하여 도입되는 것을 특징으로 하는 다운증후군 유전자 형질전환 초파리 제조방법.

【청구항 6】

제 1항의 제조방법으로 제조된 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 7】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 저하 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 8】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 초파리의 기억 및 학습기능을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 초파리의 기억 및 학습기능을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 기억 및 학습기능 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 9】

제 7항에 있어서, 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화는 DNA 칩, 웨스턴 블랏 (western blot), 면역조직화학법, 효소결합면역흡착검사(ELISA), 방사성 동위원소면역측정법(RIA), 중합효소증폭법(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-

Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법으로 측정하는 것을 특징으로 하는 기억 및 학습기능 저하 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 10】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 11】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 초파리의 수명을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 수명을 연장시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 수명단축 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 12】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain

유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 13】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 운동능력 수준을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 운동능력 수준을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 운동능력 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 14】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현변화를 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)의 hDYRK1A 또는 minibrain 유전자 발현을 감소시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 15】

1) 실험군으로 제 6항의 형질전환 초파리에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 제 6항의 형질전환 초파리에서 신경발달 수준을 측정하는 단계; 및

3) 무처리 대조군과 비교하여 상기 단계 2)에서 측정한 초파리의 신경발달 수준을 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경발달

장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝 방법.

【청구항 16】

기억 및 학습기능 저하 동물 모델로 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 17】

수명단축 모델 동물로 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 18】

운동능력 저하 모델 동물로 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 19】

신경계 발달 장애 모델 동물로 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 20】

기억 및 학습기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

【청구항 21】

수명단축 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

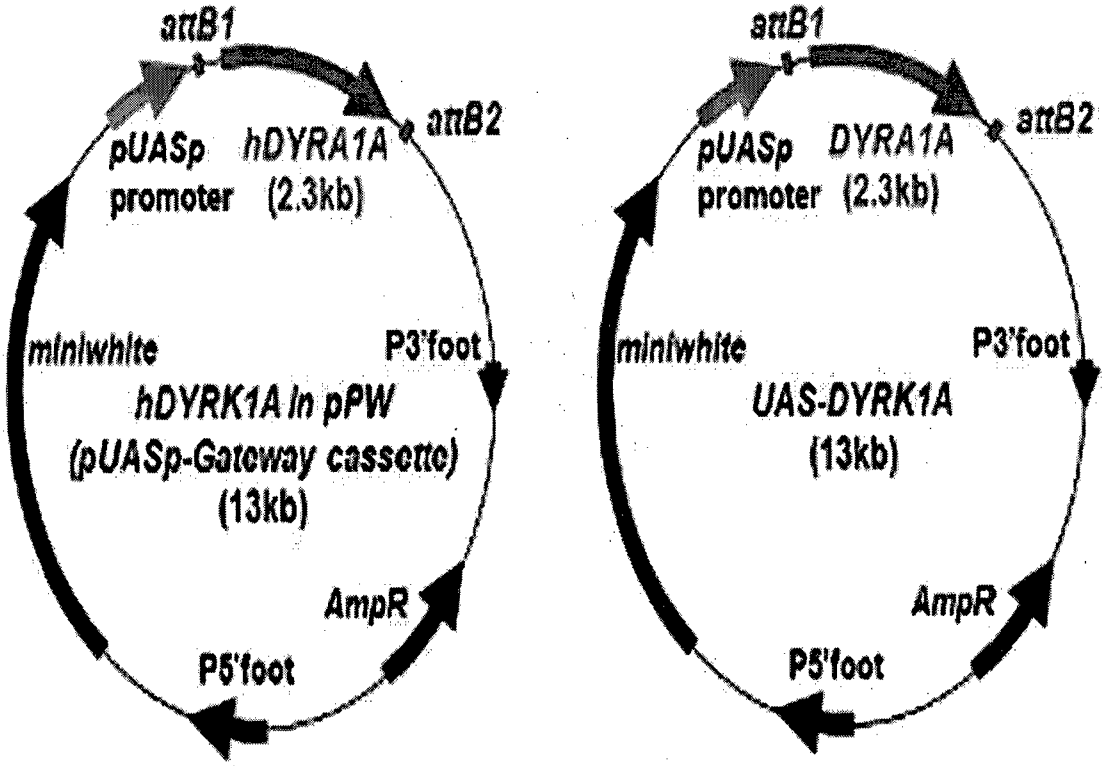
【청구항 22】

운동기능 저하 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

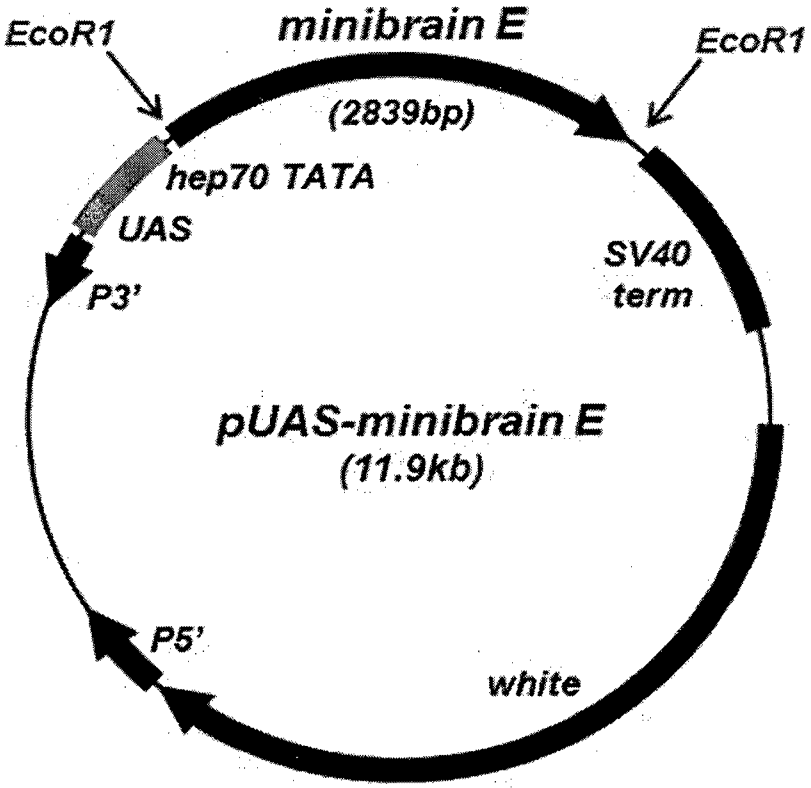
【청구항 23】

신경발달 장애 예방 및 개선용 조성물의 스크리닝에 사용하기 위한 제 6항의 다운증후군 유전자 형질전환 초파리.

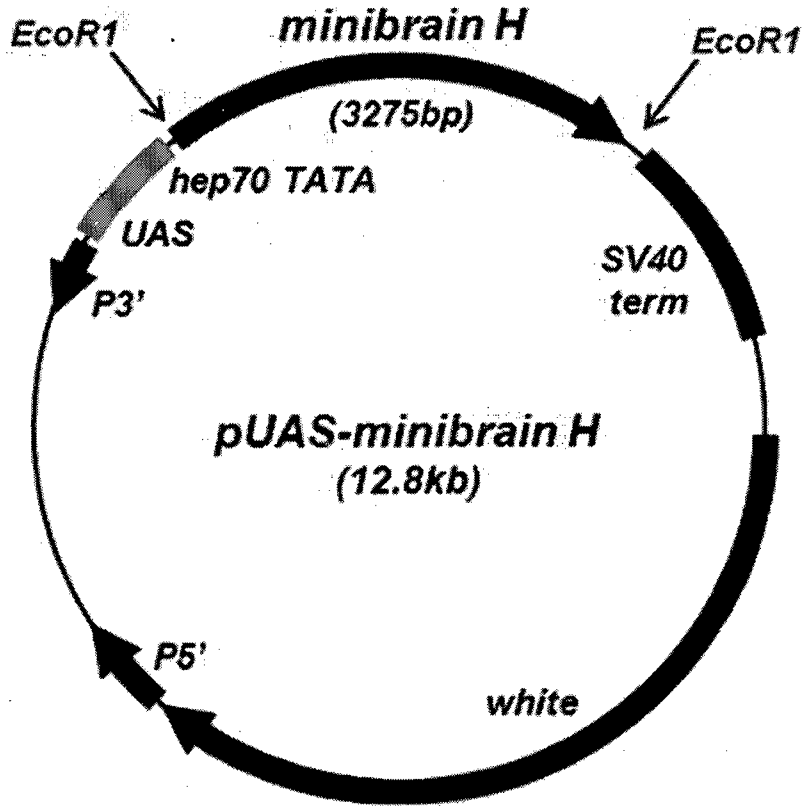
[도 1]


attB1
attB2
pUASp promoter
hDYRA1A (2.3kb)
miniwhite
P3'foot
hDYRK1A In pPW
(pUASp-Gateway cassette)
(13kb)
AmpR
P5'foot
attB1
attB2
pUASp promoter
DYRA1A (2.3kb)
miniwhite
P3'foot
UAS-DYRK1A
(13kb)
AmpR
P5'foot

[도 2]

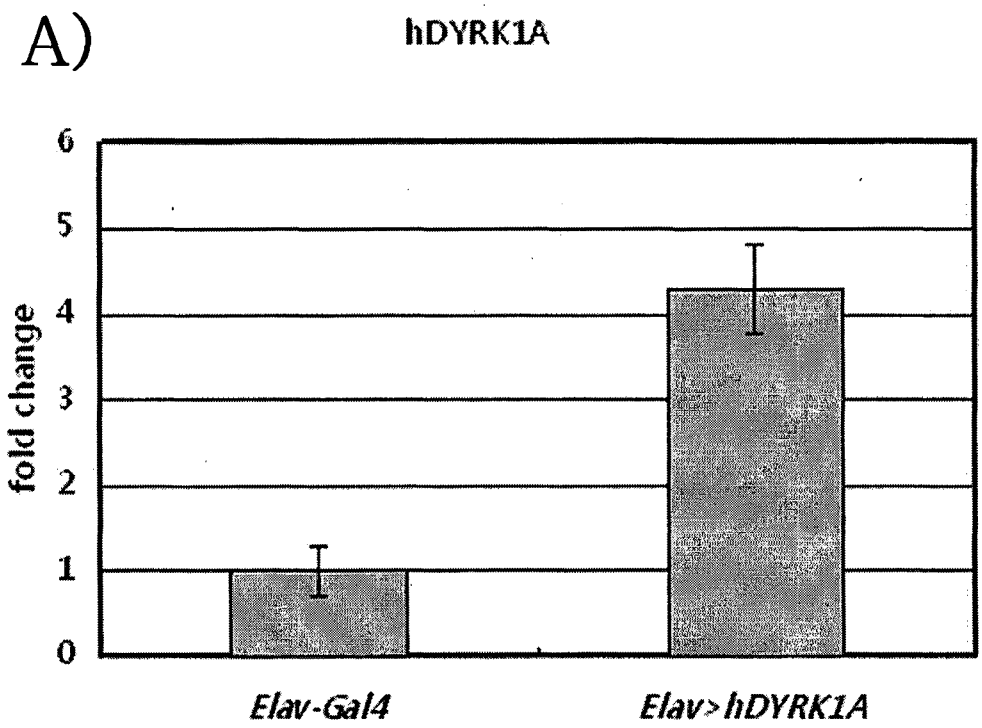

minibrain E
EcoR1
EcoR1
(2839bp)
hep70 TATA
UAS
P3'
SV40
term
pUAS-minibrain E
(11.9kb)
P5'
white

[도 3]

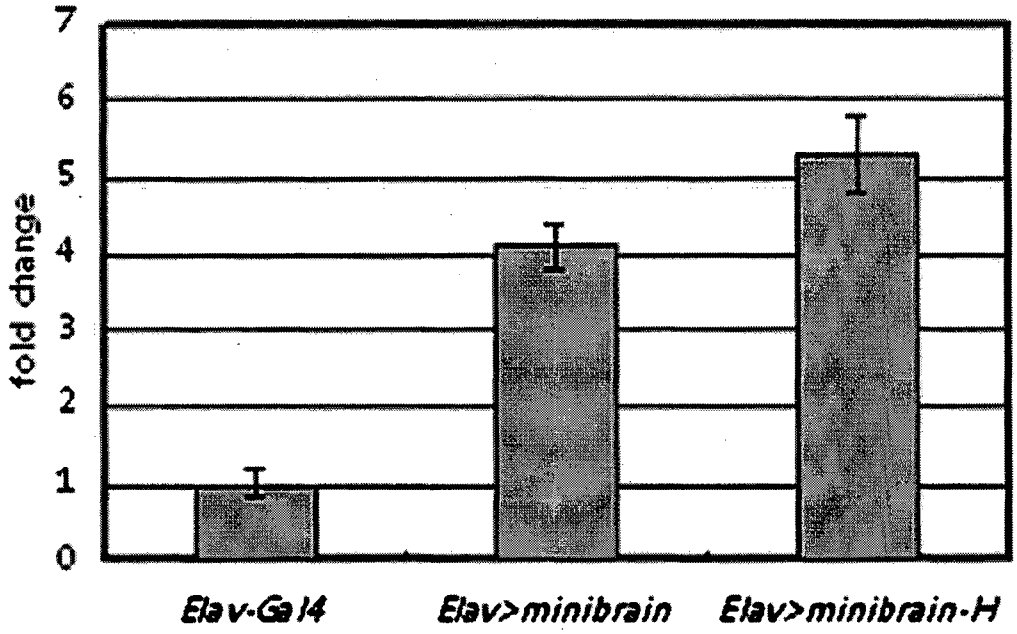

minibrain H
EcoR1
EcoR1
(3275bp)
hep70 TATA
UAS
P3'
SV40
term
pUAS-minibrain H
(12.8kb)
P5'
white

[도 4]

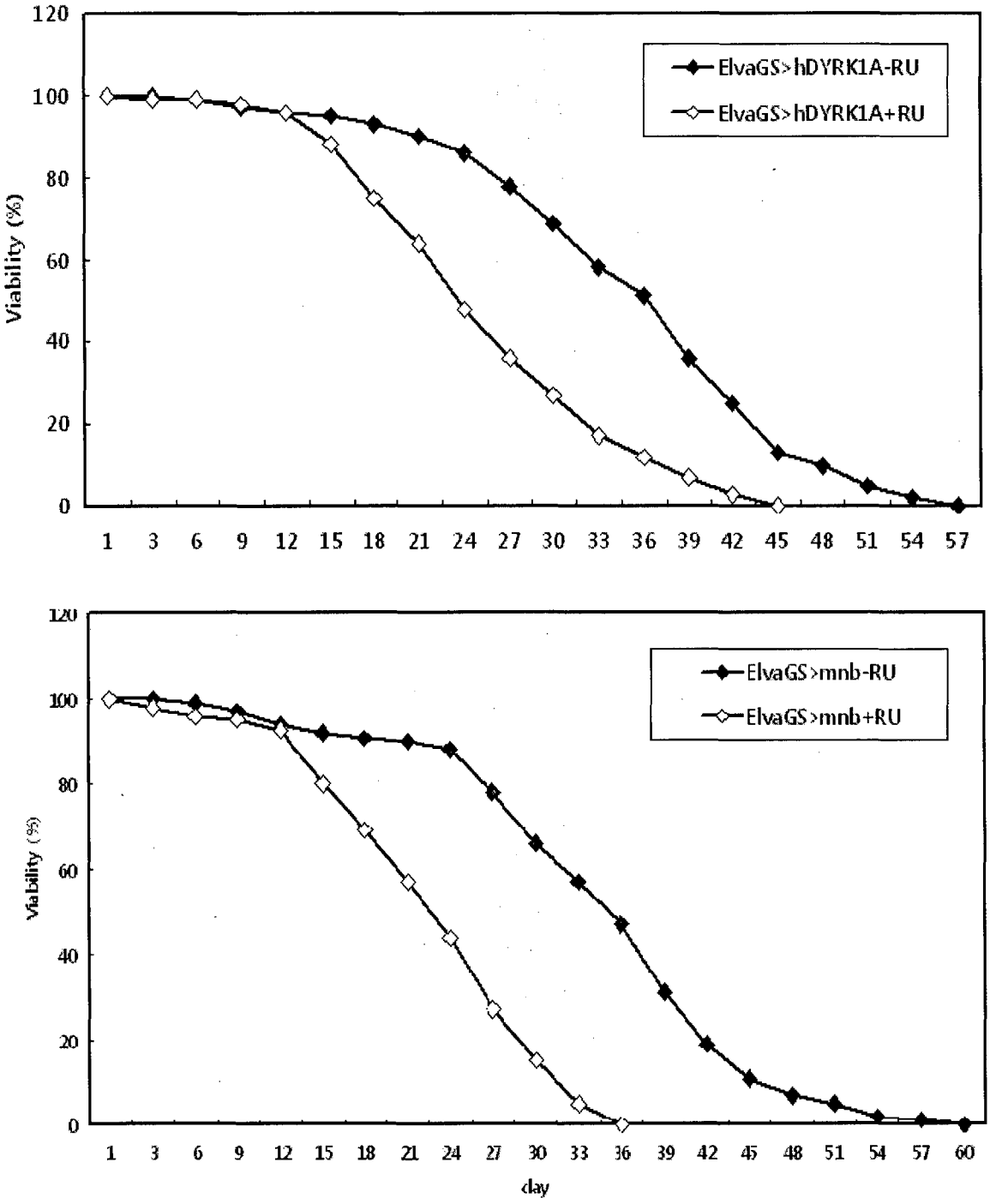
A)


hDYRK1A
fold change
0
1
2
3
4
5
6
Elav-Gal4
Elav>hDYRK1A

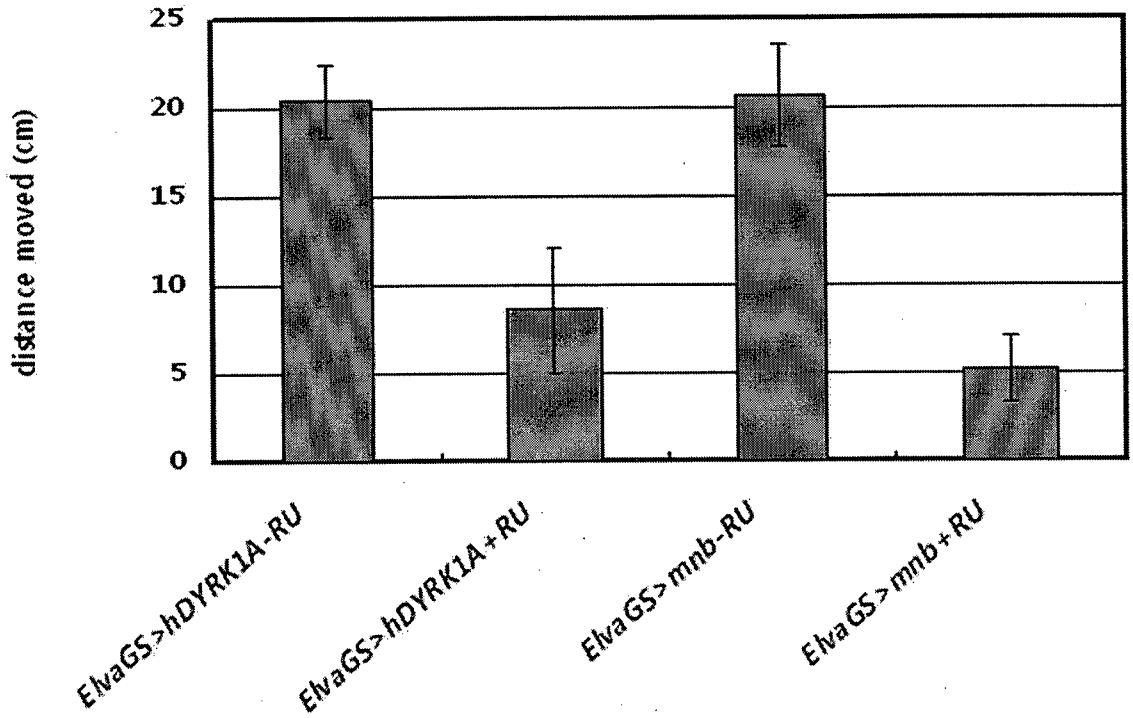
B)


minibrain
fold change
0
1
2
3
4
5
6
7
Elav-Gal4
Elav>minibrain
Elav>minibrain-H

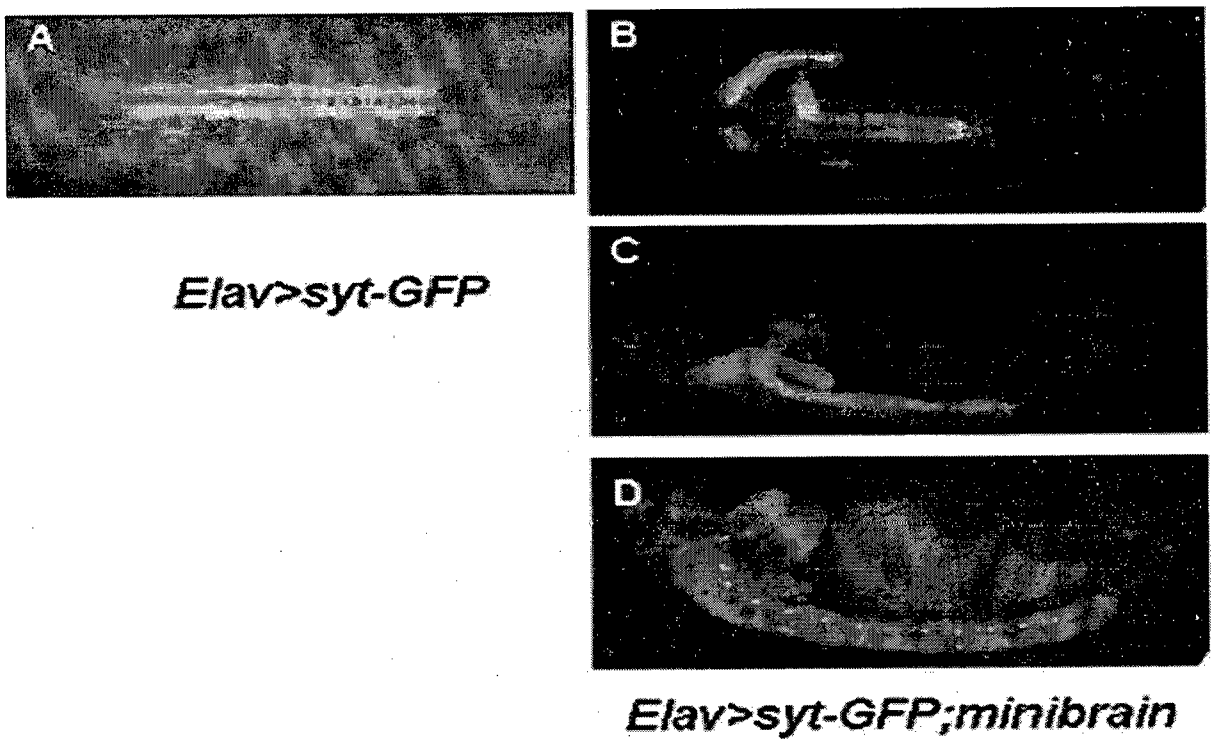
[도 5]


ElvaGS>hDYRK1A-RU
ElvaGS>hDYRK1A+RU
Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
1 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57
ElvaGS>mnb-RU
ElvaGS>mnb+RU
Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
1 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45 48 51 54 57 60
day

[도 6]


distance moved (cm)
25
20
15
10
5
0
ElvaGS>hDYRK1A-RU
ElvaGS>hDYRK1A+RU
ElvaGS>mnb-RU
ElvaGS>mnb+RU

[도 7]


A
B
C
D
Elav>syt-GFP
Elav>syt-GFP;minibrain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/000329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/033(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12N 15/63(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 67/033; A01K 67/00; A61K 35/12; C12N 15/09; C12N 5/08; C07H 21/00; 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: down syndrome, DYRK1, Dual-specific tyrosine Regulated Kinase1A, minibrain, Transgenic Drosophila melanogaster, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OGAWA, Yasushi et al., "Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A", Nature Communications, 05 October 2010, vol. 1, no. 86, pages 1-9. See page 7.	1-23
A	KR 10-2011-0027944 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 17 March 2011 See claim 1.	1-23
A	GUIMERA, Jordi et al., "Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in down syndrome", Genomics, 01 May 1999, vol. 57, no. 3, pages 407-418. See abstract.	1-23
A	US 2006-0168667 A1 (EULENBERG, Karsten et al.) 27 July 2006 See claim 1.	1-23
A	US 2011-0110902 A1 (DE WINDT, Leon Johannes et al.) 12 May 2011 See claims 1 and 11.	1-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 APRIL 2013 (22.04.2013)	**23 APRIL 2013 (23.04.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/000329

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0027944 A	17.03.2011	KR 10-1180696 B1	07.09.2012
US 2006-0168667 A1	27.07.2006	AU 2003-258699 A1	29.03.2004
		EP 1534322 A1	01.06.2005
		JP 2005-537794 A	15.12.2005
		WO 2004-022089 A1	18.03.2004
US 2011-0110902 A1	12.05.2011	AU 2009-270005 A1	14.01.2010
		CA 2728069 A1	14.01.2010
		EP 2288703 A1	02.03.2011
		EP 2288703 B1	15.08.2012
		JP 2011-525110 A	15.09.2011
		US 8383603 B2	26.02.2013
		WO 2010-005295 A1	14.01.2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/000329

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/033(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01K 67/033; A01K 67/00; A61K 35/12; C12N 15/09; C12N 5/08; C07H 21/00; 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:인간다운증후군, DYRK1, Dual-specific tyrosine Regulated Kinase1A, minibrain, 유전자 형질전환 초파리, 스크리닝

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	OGAWA, YASUSHI 외 12명, `Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A`, Nature Communications, 2010.10.05., 1권, 86호, 1-9페이지. 페이지 7 참조.	1-23
A	KR 10-2011-0027944 A (한국생명공학연구원) 2011.03.17 청구항 1 참조.	1-23
A	GUIMERA, JORDI 외 3명, 'Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in down syndrome', Genomics, 1999.05.01., 57권, 3호, 407-418 페이지. 요약 참조.	1-23
A	US 2006-0168667 A1 (EULENBERG, KARSTEN 외 1명) 2006.07.27 청구항 1 참조.	1-23
A	US 2011-0110902 A1 (DE WINDT, LEON JOHANNES 외 2명) 2011.05.12 청구항 1 및 11 참조.	1-23

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 04월 22일 (22.04.2013)	**2013년 04월 23일 (23.04.2013)**

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

심사관
허주형
전화번호 82-42-481-8150

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/000329

제**1**기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열**(**첫 번째 용지의 **1.c**의 계속**)**

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/000329

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0027944 A	2011.03.17	KR 10-1180696 B1	2012.09.07
US 2006-0168667 A1	2006.07.27	AU 2003-258699 A1	2004.03.29
		EP 1534322 A1	2005.06.01
		JP 2005-537794 A	2005.12.15
		WO 2004-022089 A1	2004.03.18
US 2011-0110902 A1	2011.05.12	AU 2009-270005 A1	2010.01.14
		CA 2728069 A1	2010.01.14
		EP 2288703 A1	2011.03.02
		EP 2288703 B1	2012.08.15
		JP 2011-525110 A	2011.09.15
		US 8383603 B2	2013.02.26
		WO 2010-005295 A1	2010.01.14