

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 2월 2일 (02.02.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/018735 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/008024
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 22일 (22.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0105259 2015년 7월 24일 (24.07.2015) KR
10-2015-0105261 2015년 7월 24일 (24.07.2015) KR
10-2015-0105253 2015년 7월 24일 (24.07.2015) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 한국원자력의학원 (KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES) [KR/KR]; 01812 서울시 노원구 노원로 75, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박중진 (PARK, Joong-Jean); 04076 서울시 마포구 독막로 20 나길 22, 101 동 1205 호, Seoul (KR). 이견호 (LEE, Geon Ho); 01031 서울시 강북구 인수봉로 80 길 18, 305 호, Seoul (KR). 이기호 (LEE, Kee-Ho);

01374 서울시 도봉구 시루봉로 71, 106 동 405 호, Seoul (KR). 박은란 (PARK, Eun-Ran); 01813 서울시 노원구 공릉로 46 길 19, 103 동 408 호, Seoul (KR). 김양현 (KIM, Yang Hyun); 01851 서울시 노원구 섭발로 156, 204 동 708 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베델회관 8층, Seoul (KR).

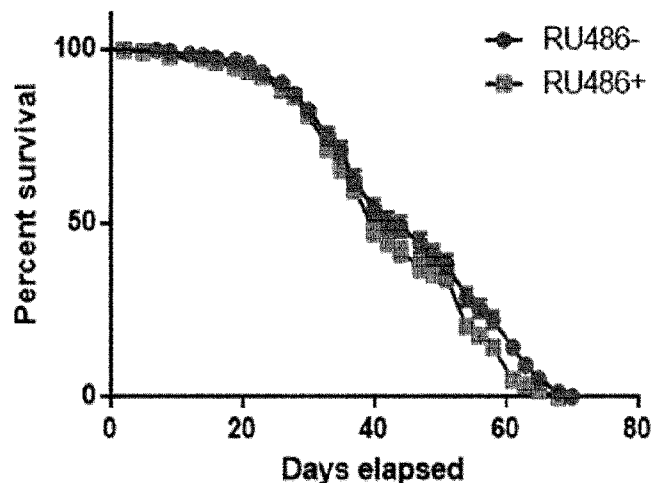
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOMARKER FOR DETERMINING AGING, DETERMINING OBESITY, AND DIAGNOSING CANCER AND DIAGNOSING KIT USING SAME

(54) 발명의 명칭: 노화 판별용, 비만 판별용, 암 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 진단키트



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker capable of rapid, accurate and simple diagnosis of the progression of aging, obesity and cancer by identifying type III alcohol dehydrogenase (T3dh, CG3425), fructose-1m6-bisphosphatase (fbp, CG31692), and amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase (AGL, CG9485), which are involved in the induction and occurrence of aging, obesity and cancer, and using same. By using the biomarkers, the progression of aging in humans, non-human mammals or insects, the occurrence of cancer and the occurrence of obesity can be individually or collectively analyzed or diagnosed.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2017/018735 A1



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 노화, 비만 및 암의 유발 및 발생에 관여하는 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425), fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 및 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485) 유전자를 발견하고, 이를 이용하여 노화 진행 여부, 비만 여부 및 암 진단을 신속하고 정확하게 하면서 간단히 할 수 있는 바이오 마커에 관한 것으로, 이러한 바이오 마커를 이용하여 인간, 인간 외의 포유류 또는 곤충의 노화 진행 여부, 암 발생 여부 및 비만 발생 여부를 각각 또는 종합적으로 분석하거나 진단할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 노화 판별용, 비만 판별용, 암 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 진단키트

기술분야

- [1] 본 발명은 노화, 비만 및 암에 공통적으로 관련되는 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425), fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 및 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485) 유전자를 포함하는 바이오마커에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 상기 바이오마커를 이용한 진단키트 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 노화 조절 유전자 관련 연구는 1990년 초반에 시작하여 현재 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 밝혀진 노화 조절 유전자들을 기능별로 분류하면 활성 산소제거 시스템(catalase, superoxide dismutase 등), 인슐린/IGF-1 신호전달계(인슐린, InR, PI3K, Akt, 그리고 Foxo 등을 포함), 유전자 발현 억제 시스템(sirtuins 등), 암 억제 시스템(p53 등), 물질운반 시스템(sodium dicarboxylate cotransporter 등), 텔로미어(telomere) 조절 시스템 등인데, 이런 시스템에 속한 유전자가 노화 조절에 긴밀히 관여하고 있다.
- [3] 한편, 노화가 진행되면 암 발생도 증가하는데, 흥미롭게도 p53과 같은 암 억제 유전자는 동시에 노화를 조절하기도 한다. 암화에 관련된 것으로 알려진 유전자는 GTPase 활성을 가진 Ras 계열의 유전자(Ras, Rac, Rap1, Rala, Rhoa 등), Serine/Threonine 키나제 활성을 가진 Akt 관련 유전자(Akt/PKB, PKC, PKA, RAF 등), hedgehog 관련 유전자, 그리고 protooncogene들인 c-Myc, 등이 있으며, 또한 암을 억제하는 유전자로서 p53와 NFkB 등이 알려져 있다. 특히 HGF와 그 수용체인 HGFR(c-met)은 주로 간암과 관련되어 있다. 또한 암 억제 유전자인 PTEN은 PI3K의 활성을 억제하며 PTEN을 과발현시키면 인슐린/IGF-1 신호전달계의 활성이 줄어들고 수명은 증가하기도 한다. 또한 이들 유전자들은 모두 효모, 선충, 초파리와 생쥐 등의 모델 생물에서 발견된 것이고, 지금까지 암과 노화를 공통적으로 조절하는 기능을 가진 인간의 유전자에 대한 연구는 아직 많이 부족한 실정이다.
- [4] 또한 노화가 진행되면 비만이 발생하는 경향이 커진다. 노화와 관련된 비만의 원인으로는 운동부족, 성장호르몬(GH) 및 갑상샘호르몬 분비 저하 등을 들 수 있으며, GH의 분비가 감소하면 탄수화물, 지방, 단백질 등을 분해하는 GH의 대사효과도 감소하여 근육 생성은 줄어들고 지방 축적이 유발된다. GH는 간에서 IGF-1의 분비를 증가시키고 따라서 노화에 따른 GH 분비 감소는 인슐린/IGF-1 신호전달계의 활성에 변화를 일으키며 수명 조절에 관여할 것이다. 예를 들어, 지방 세포에서 인슐린 수용체를 제거한 생쥐(FIRKO mice)의 경우, 과식을

하여도 지방 축적이 나타나지 않는 경우가 있으며 노화 연구 동물 모델인 초파리의 경우도 노화가 진행되면 체내 지방함량이 증가한다. 따라서 비만과 노화도 긴밀하게 연관된 기전임에도 불구하고, 노화와 비만을 공통적으로 조절하는 기능을 가진 인간의 유전자에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다.

- [5] 결국, 이러한 노화, 암 및 비만을 공통적으로 조절하는 유전자를 발견하고, 이 유전자들의 발현을 확인하여 노화, 암 및 비만을 공통적으로 진단하는 것이 가능한 바이오마커, 진단키트 및 스크리닝 방법 등을 개발하기 위한 연구는 현재 많이 부족하다는 문제점이 있다.

- [6] 한편, 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-2012-0021401호(특허문헌 1)이 개시되어 있으며, 이러한 특허문헌 1에는 Atg5 유전자를 과발현하여 향상된 기저 자식작용에 의해 수명이 연장된 형질전환 동물, 및 이의 제조방법에 관한 내용만이 개시되어 있을 뿐 노화, 암 및 비만을 공통적으로 조절하는 유전자를 이용한 바이오마커, 진단키트 및 스크리닝 방법 등에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 신속하고 정확하게 하면서 간단히 할 수 있는 바이오 마커를 제공하는 것이다.
- [8] 또한 본 발명은 이를 이용한 키트 및 판별 또는 진단방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 노화 진행 판별용 바이오 마커를 제공한다.
- [10] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 비만 판별용 바이오 마커를 제공한다.
- [11] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 암 진단용 바이오 마커를 제공한다.
- [12] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는, 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 바이오 마커를 제공한다.
- [13] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 노화 진행 판별용 키트를 제공한다.

- [14] 상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기관 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 노화 진행 판별용 키트인 것을 특징으로 한다.
- [15] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 비만 판별용 키트를 제공한다.
- [16] 상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기관 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 노화 진행 판별용 키트인 것을 특징으로 한다.
- [17] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [18] 상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기관 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 노화 진행 판별용 키트인 것을 특징으로 한다.
- [19] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 복합 진단용 키트를 제공한다.
- [20] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계; II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 노화 진행 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및 III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 노화 진행 판별방법을 제공한다.
- [21] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계; II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 비만 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및 III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 비만 판별방법을 제공한다.
- [22] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계; II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 암 진단용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및 III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 암 진단방법을 제공한다.
- [23] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계; II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 복합 진단용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및 III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 노화의 진행 정도 판별, 비만 증가 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [24] 본 발명은 노화, 비만 및 암의 유발 및 발생에 관여하는 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425), fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 및 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485) 유전자를 발견하고, 이를 이용하여 노화 진행 여부, 비만 여부 및 암 진단을 신속하고 정확하게 판단할 수 있는 바이오 마커에 관한 것으로, 이러한 바이오 마커를 이용하여 인간, 인간 외의 포유류 또는 곤충의 노화 진행 여부, 암 발생 여부 및 비만 발생 여부를 각각 또는 종합적으로 분석하거나 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 RU486 처리에 대한 Actin-GS-Gal4/+W1118 수명 곡선을 나타낸 그래프이다.
- [26] 도 2는 Actin-GS-Gal4와 UAS-T3dh RNAi를 이용하여 T3dh의 발현을 억제시켰을 때 T3dh mRNA 양이 감소함을 보여주는 결과이다.
- [27] 도 3은 RU486 처리에 대한 Actin-GS-Gal4/+W1118 수명 곡선을 나타낸 그래프이다.
- [28] 도 4는 Actin-GS-Gal4와 UAS-fbp RNAi를 이용하여 AGL의 발현을 억제시켰을 때 AGL mRNA 양이 감소함을 보여주는 결과이다.
- [29] 도 5는 RU486 처리에 대한 Actin-GS-Gal4/+W1118 수명 곡선을 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 6은 Actin-GS-Gal4와 UAS-AGL RNAi를 이용하여 AGL의 발현을 억제시켰을 때 AGL mRNA 양이 감소함을 보여주는 결과이다.
- [31] 도 7은 T3dh의 발현이 감소하면 수명이 감소한 것으로 확인된 결과를 보여주는 그래프이다.
- [32] 도 8은 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 나타낸 결과이다.
- [33] 도 9는 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/+; UAS-T3dh RNAi/+ 초파리의 중성지방함량변화를 나타낸 결과이다.
- [34] 도 10은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-nls.GFP 초파리의 지방체 조직의 공초점 현미경 사진이다.
- [35] 도 11은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-T3dh RNAi 초파리의 지방체 조직의 지방을 나일레드(Nile red) 염색한 후 찍은 공초점 현미경 사진이다.
- [36] 도 12는 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)의 날개 길이를 비교한 결과이다.
- [37] 도 13은 T3dh 유전자 발현을 억제한 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K/+; c765-Gal4/UAS-T3dh RNAi)의 날개의 길이를 비교한 결과이다.
- [38] 도 14는 T3dh 유전자 발현을 억제한 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K/+; c765-Gal4/UAS-T3dh RNAi)의 날개의 면적을 비교한 결과이다.

- [39] 도 15는 fbp의 발현이 감소하면 수명이 감소한 것으로 확인된 결과를 보여주는 그래프이다.
 - [40] 도 16은 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 나타낸 결과이다.
 - [41] 도 17은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/+; UAS-fbp RNAi/+ 초파리의 중성지방함량변화를 나타낸 결과이다.
 - [42] 도 18은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-nls.GFP 초파리의 지방체 조직의 공초점 현미경 사진이다.
 - [43] 도 19는 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-fbp RNAi 초파리의 지방체 조직의 지방을 나일레드(Nile red) 염색한 후 찍은 공초점 현미경 사진이다.
 - [44] 도 20은 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 날개 길이의 비교 결과이다.
 - [45] 도 21은 fbp 유전자 발현을 억제한 암 성장 모델 초파리(UAS-Ras85D/+; c765-Gal4/UAS-fbp RNAi)의 날개 길이의 비교 결과이다.
 - [46] 도 22는 fbp 유전자 발현을 억제한 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D/+;c765-Gal4/UAS-fbp RNAi)의 날개 면적의 비교 결과이다.
 - [47] 도 23은 AGL의 발현이 감소하면 수명이 감소한 것으로 확인된 결과를 보여주는 그래프이다.
 - [48] 도 24는 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 나타낸 결과이다.
 - [49] 도 25는 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/+; UAS-AGL RNAi/+ 초파리의 중성지방 함량변화를 나타낸 결과이다.
 - [50] 도 26은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-nls.GFP 초파리의 지방체 조직의 공초점 현미경 사진이다.
 - [51] 도 27은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-AGL RNAi 초파리의 지방체 조직의 지방을 나일레드(Nile red) 염색한 후 찍은 공초점 현미경 사진이다.
 - [52] 도 28은 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)와 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 날개 길이의 비교 결과이다.
 - [53] 도 29는 AGL 유전자 발현을 억제한 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K/+; c765-Gal4/UAS-AGL RNAi)의 날개 길이의 비교 결과이다.
 - [54] 도 30은 AGL 유전자 발현을 억제한 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K/+; c765-Gal4/UAS-AGL RNAi)의 날개 면적의 비교 결과이다.
 - [55] 도 31은 AGL 유전자 발현을 억제한 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D/+;c765-Gal4/UAS-AGL RNAi)의 날개 길이의 비교이다.
 - [56] 도 32는 AGL 유전자 발현을 억제한 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D/+;c765-Gal4/UAS-AGL RNAi)의 날개 면적의 비교이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**

- [57] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다.
- [58]
- [59] 본 발명은 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 노화의 진행을 신속하면서 간단히 판별할 수 있는 바이오마커를 제공하려는 데 목적이 있다.
- [60] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 노화 진행 판별용 바이오 마커에 관한 것이다.
- [61] 본 명세서에서 노화 진행 판별용 바이오마커란 노화의 진행 여부를 정성적으로 판별할 수 있는 바이오마커를 의미하는 것으로, 앞서 설명한 바와 같이 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열의 발현이 감소함에 따라 수명 즉 노화의 표현형이 감소하는 것을 근거로 하여, 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 노화 진행 여부를 판별할 수 있도록 하는 것을 말한다.
- [62] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 인간 또는 인간을 제외한 포유류 동물 또는 곤충은 서로 간에 유전적 차이를 가지고 있어, 평균 노화 진행 정도가 전혀 상이하다. 허나 본 발명에서의 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 노화 진행 판별용 바이오 마커로 제공함으로써, 개개의 종에 대해 신속하면서도 정확하고 간단히 진단 개체의 노화 진행을 판별할 수 있다.
- [63] 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열은 통상적으로 UASUASL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체로부터 추출된 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 서열번호 1은 초파리의 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425) 유전자이고, 상기 서열번호 2 내지 5는 초파리의 fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 유전자이며, 상기 서열번호 6 내지 11은 초파리의 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485)이다.
- [64] 본 발명에서 초파리를 이용하여 후보 유전자들의 기능을 평가하는데 있어서, 구체적으로 유도성 유전자 스위치(Gene Switch, GS) GAL/UAS 발현 시스템을 이용하였다. GAL4는 원래 효모의 단백질이며 이것을 초파리에 도입하여 발현시킨 GAL4는 RU486(mifepristone)이라는 약물이 존재할 때 Upstream Activating Sequences(UAS)라는 DNA sequence 위치에 결합하여 UAS 뒤에 존재하는 특정 유전자의 전사를 활성화시키게 되고, RU486이 존재하지 않으면 특정 유전자의 전사는 불활성화 된다. 이를 이용하여 T3dh RNAi 또는 fbp RNAi 또는 AGL RNAi 활성을 조절하여 T3dh 또는 fbp 또는 AGL 유전자 발현을 제어하고, 이의 기능을 확인하였다.
- [65] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의

mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 특이적으로 발현이 감소하면 초파리의 노화가 촉진된다.

- [66] 구체적으로 UAS-GAL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체를 RU486에 노출시킨 후, 특정 유전자의 발현이 2 배 이상 감소함에 따라 나타나는 효과를 반복실험을 통해 확인하였고, 그 결과 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 유전자의 발현이 2 배 이상 감소할 때, 노화가 더 진행되는 것을 확인하였는 바, 상술한 유전자는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 노화를 판별하는 바이오마커로 사용될 수 있다.
- [67] 더군다나 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 사람의 ADHFE1(alcohol dehydrogenase, iron containing, 1, NP_653251.2 467 aa) 유전자와 상동(homologue) 관계를 가지고 있기 때문에, 본 발명에 따른 바이오마커를 이용하여 곤충뿐만 아니라 사람의 노화 진행 여부도 판별할 수 있다.
- [68] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 인트론이 존재하지 않는 cDNA이고, 이러한 cDNA는 게놈 DNA로부터 전사과정을 거쳐 생성된 mRNA를 이용하여 이에 상보적인 DNA로 제조된 것이다.
- [69] 즉 상기 바이오마커를 이용하면 인간, 인간을 제외한 포유류 및 곤충의 노화 진행을 판별할 수 있으므로, 이를 이용하면 진단개체의 노화 진행을 판별하여 대응하는데 유용할 것으로 기대된다.
- [70]
- [71] 본 발명은 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 비만 판별을 신속하면서 간단히 할 수 있도록 하는 바이오마커를 제공하려는 데 목적이 있다.
- [72] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 비만 판별용 바이오 마커에 관한 것이다.
- [73] 본 명세서에서 비만 판별용 바이오마커란 비만의 증가 여부(구체적으로 중성지방 함량 증가와 지방체 조직에서 지방구의 크기 및 밀도 증가 여부)를 정성적으로 판별할 수 있는 바이오마커를 의미하는 것으로, 앞서 설명한 바와 같이 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열의 발현이 감소함에 따라 체내 지방 함량 및 지방체 조직에서의 지방구 크기와 밀도가 증가하는 것을 근거로 하여, 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 비만 증가 여부를 판별할 수 있도록 하는 것을 말한다.

- [74] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 인간 또는 인간을 제외한 포유류 동물 또는 곤충은 서로 간에 유전적 차이를 가지고 있기 때문에, 비만에 있어서도 차이가 있다 할 것이다. 하나 본 발명에서의 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 비만 판별용 바이오 마커로 제공함으로써, 개개의 종에 대해 신속하면서도 정확하고 간단히 각 진단개체의 비만 여부를 판별할 수 있다.
- [75] 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열은 통상적으로 UAS-GAL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체로부터 추출된 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 서열번호 1은 초파리의 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425) 유전자이고, 상기 서열번호 2 내지 5는 초파리의 fbp(Fructose-1,6-bisphosphatase, CG31692) 유전자이며, 상기 서열번호 6 내지 11은 초파리의 AGL(amylo- α -1,6-glucosidase, 4- α -glucanotransferase, CG9485)이다.
- [76] 본 발명에서 초파리를 이용하여 후보 유전자들의 기능을 평가하는데 있어서, 구체적으로 유도성 유전자 스위치(Gene Switch, GS) GAL/UAS 발현 시스템을 이용하였다. GAL4는 원래 효모의 단백질이며 이것을 초파리에 도입하여 발현시킨 GAL4는 RU486(mifepristone)이라는 약물이 존재할 때 Upstream Activating Sequences(UAS)라는 DNA sequence 위치에 결합하여 UAS 뒤에 존재하는 특정 유전자의 전사를 활성화시키게 되고, RU486이 존재하지 않으면 특정 유전자의 전사는 불활성화 된다. 이를 이용하여 T3dh RNAi 또는 fbp RNAi 또는 AGL RNAi 활성을 조절하여 T3dh 또는 fbp 또는 AGL 유전자 발현을 제어하고, 이의 기능을 확인하였다.
- [77] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 초파리의 중성지방 함량과 지방체 조직에서 지방구의 크기 및 밀도가 크게 증가됨에 따라 특이적으로 발현이 감소한다.
- [78] 구체적으로 UAS-GAL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체를 RU486에 노출시킨 후, 특정 유전자의 발현이 2 배 이상 감소함에 따라 나타나는 효과를 수 많은 반복실험을 통해 확인하였고, 그 결과 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 유전자의 발현이 2 배 이상 감소할 때, 비만이 증가되는 것을 확인하였는 바, 상술한 유전자는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 비만을 판별하는 바이오마커로 사용될 수 있다.
- [79] 더군다나 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 사람의 ADHFE1(alcohol dehydrogenase, iron containing, 1, NP_653251.2 467 aa)

유전자와 상동(homologue) 관계를 가지고 있기 때문에, 본 발명에 따른 바이오마커를 이용하여 곤충뿐만 아니라 사람의 비만 여부도 판별할 수 있다..

[80] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 인트론이 존재하지 않는 cDNA이고, 이러한 cDNA는 게놈 DNA로부터 전사과정을 거쳐 생성된 mRNA를 이용하여 이에 상보적인 DNA로 제조된 것이다.

[81] 즉 상기 바이오마커를 이용하면 인간, 인간을 제외한 포유류 및 곤충의 비만의 증가를 판별할 수 있으므로, 이를 이용하면 진단개체의 비만 증가를 판별하여 대응하는데 유용할 것으로 기대된다.

[82]

[83] 본 발명은 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 암 진단을 신속하면서 간단히 할 수 있도록 하는 바이오마커를 제공하려는 데 목적이 있다.

[84] 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 암 진단용 바이오 마커에 관한 것이다.

[85] 본 명세서에서 암 진단용 바이오마커란 암 세포 및 조직의 증식 또는 성장 여부를 정성적으로 판별할 수 있는 바이오마커를 의미하는 것으로, 앞서 설명한 바와 같이 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열의 발현이 감소함에 따라 암 성장 모델 초파리(또는 암 증식 검정 초파리 모델)의 표현형이 감소하는 것을 근거로 하여, 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 암 발생 또는 증식 여부를 판별할 수 있도록 하는 것을 말한다.

[86] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 인간 또는 인간을 제외한 포유류 동물 또는 곤충은 서로 간에 유전적 차이를 가지고 있기 때문에, 암 발생도 전혀 상이하다. 허나 본 발명에서의 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 암 진단용 바이오 마커로 제공함으로써, 개개의 종에 대해 신속하면서도 정확하고 간단히 각 진단개체의 암 발생 또는 진단 여부를 판별할 수 있다.

[87] 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열은 통상적으로 UAS-GAL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체로부터 추출된 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 서열번호 1은 초파리의 T3dh(알코올탈수소효소 3형, Type III alcohol dehydrogenase, CG3425) 유전자이고, 상기 서열번호 2 내지 5는 초파리의 fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 유전자이며, 상기 서열번호 6 내지 11은 초파리의 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485)이다.

[88] 본 발명에서 초파리를 이용하여 후보 유전자들의 기능을 평가하는데 있어서,

구체적으로 유도성 유전자 스위치(Gene Switch, GS) GAL/UAS 발현 시스템을 이용하였다. GAL4는 원래 효모의 단백질이며 이것을 초파리에 도입하여 발현시킨 GAL4는 RU486(mifepristone)이라는 약물이 존재할 때 Upstream Activating Sequences(UAS)라는 DNA sequence 위치에 결합하여 UAS 뒤에 존재하는 특정 유전자의 전사를 활성화시키게 되고, RU486이 존재하지 않으면 특정 유전자의 전사는 불활성화 된다. 이를 이용하여 T3dh RNAi 또는 fbp RNAi 또는 AGL RNAi 활성을 조절하여 T3dh 또는 fbp 또는 AGL 유전자 발현을 제어하고, 이의 기능을 확인하였다.

- [89] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 암 성장 모델 초파리(또는 암 증식 검정 초파리 모델)에서의 날개표현형이 크게 감소됨에 따라 특이적으로 발현이 감소한다.
- [90] 구체적으로 UAS-GAL4 시스템에 의하여 특정 유전자의 발현을 제어한 초파리 돌연변이체를 RU486에 노출시킨 후, 특정 유전자의 발현이 2 배 이상 감소함에 따라 나타나는 효과(암과 관련된 PI3K 발현 억제를 통해 날개 길이와 면적 감소)를 수 많은 반복실험을 통해 확인하였고, 그 결과 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 유전자의 발현이 2 배 이상 감소할 때, 암 성장 초파리 모델의 날개표현형이 증가되는 것을 확인하였는 바, 상술한 유전자는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 암 발생 여부를 진단하는 바이오마커로 사용될 수 있다.
- [91] 더군다나 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 사람의 ADHFE1(alcohol dehydrogenase, iron containing, 1, NP_653251.2 467 aa) 유전자와 상동(homologue) 관계를 가지고 있기 때문에, 본 발명에 따른 바이오마커를 이용하여 곤충뿐만 아니라 사람의 암 발생 또는 증식 여부도 진단할 수 있다.
- [92] 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 인트론이 존재하지 않는 cDNA이고, 이러한 cDNA는 게놈 DNA로부터 전사과정을 거쳐 생성된 mRNA를 이용하여 이에 상보적인 DNA로 제조된 것이다.
- [93] 즉 상기 바이오마커를 이용하면 인간, 인간을 제외한 포유류 및 곤충의 암 발생 및 증식 여부를 판별할 수 있으므로, 이를 이용하면 각 진단개체의 암 여부를 진단하여 대응하는데 유용할 것으로 기대된다.
- [94]
- [95] 아울러, 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 바이오마커는 전술한 바와 같이 노화 판별, 비만 판별 및

암 진단을 각각 검출할 수 있지만, 동시에 노화 진행 여부, 비만 증가 여부 및 암 발생 여부를 검출할 수도 있다.

- [96] 앞서 설명한 바와 같이 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열의 발현이 감소함에 따라 UAS-GAI4 시스템을 이용해 특정 유전자 발현을 줄인 초파리 돌연변이체의 노화가 더 진행되고, 중성지방과 지방체 조직에서의 지방구 밀도 및 크기가 증가하며, 암 발생이 감소하는 것을 근거로 하여, 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 노화 진행 여부, 비만 증가 여부 및 암 발생 여부를 동시에 검출할 수도 있는 것을 특징으로 한다.

[97]

- [98] 또한, 본 발명에서 상기 바이오마커로는 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열의 mRNA뿐만 아니라, 이로 표시되는 염기서열로 코딩되는 어느 하나 이상의 단백질일 수도 있는데, 상기 단백질은 아미노산 서열 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상 일 수 있다.

- [99] 상기 아미노산 서열 12 내지 22로 이루어진 단백질 역시, 정상 대조군(진단개체와 동일한 종의 표준 발현량)과 비교하여 단백질 양의 증가 또는 감소로 노화, 비만 및 암 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 판별 및 진단할 수 있다.

- [100] 상기 단백질을 이용한 키트는 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)용 키트를 포함할 수 있고, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 진단개체의 세포조직, 세포, 뇨, 혈액, 혈청 및 혈장 중에서 선택되는 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 통해, 항원-항체 복합체를 정량 검출할 수 있다.

- [101] 상기 검출 결과를 진단개체에서의 표준 단백질 발현량과 비교하여 상기 진단개체의 노화, 비만 및 암 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 판별 및 진단할 수 있다.

- [102] 단백질 발현량을 측정하는 분석방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오크텔로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전분석(Immunoprecipitation), 보체고정분석(Complement fixation assay), FACS, 단백질 칩 등이 있으며, 기재된 방법으로 제한되는 것은 아니다.

- [103] 위와 같은 분석방법을 통하여 진단개체와 동일한 종에서의 표준 항원-항체 복합체의 형성량과 진단개체의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 상기 아미노산 서열 12 내지 22 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 유의한 발현량 증가 여부를 판단하여 노화 진행, 비만 증가 및 암 발생 중에서 어느 하나 이상을 판별 또는 진단할 수 있다.

[104]

- [105] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 바이오마커 및 혼성화 용액을 포함하는 노화진행 판별용 키트에 관한 것이다.
- [106] 상기 바이오마커는 전술한 바와 같고, 용액 상에 보관되어 있거나, 기판 상에 상기 바이오마커가 높은 밀도로 고정화되어 있을 수 있다. 다시 말해 상기 바이오마커는 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [107] 상기 키트는 용액 상에 분산되어 있거나, 상기 기판 상에 고정된 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA를 혼성화함으로써, 동일한 서열의 mRNA 또는 cDNA가 발현되고 있는지를 확인할 수 있다.
- [108] 따라서 상기 키트에 사용되는 바이오마커는 이의 염기서열에서 한 가닥을 떼어내는 과정이 필요하다.
- [109] 상기 바이오마커가 기판상에 고정된 마이크로어레이 형태일 경우, 상기 기판은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에서 바이오마커가 커플링될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다.
- [110] 막에 적용 또는 고정 전에, 상기 바이오마커를 변형시켜 고정화하거나 혼성화 효율을 개선할 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [111] 이때 “혼성화”란 핵산의 2 개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자(혼성체)를 형성하는 과정을 의미하는 것이다.
- [112] 상기 혼성화 용액은 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA가 혼성화할 수 있게 하는 완충액으로서, 당업계에 공지된 용액을 이용할 수 있다.
- [113] 상기 키트에는 상기 바이오마커와 혼성화한 진단개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 검출기는 스캐너, 분광광도계(spectrophotometer), 액체섬광계수기(liquid scintillation counter) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [114] 상기 키트는 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 노화 진행 여부를 정성적으로 검출할 수 있는데, 구체적으로 상기 키트를 통해 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단개체에서 측정된 바이오마커 발현량을 비교하였을 때, 상기 진단개체에서의 발현량이 감소하였다면, 상기 진단개체는 동일 종에서의 평균 노화보다 노화가 더 진행된 상태임을 정확하고 신속하게 판별할 수 있다.
- [115]

- [116] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 바이오마커 및 혼성화 용액을 포함하는 비만 판별용 키트에 관한 것이다.
- [117] 상기 바이오마커는 전술한 바와 같고, 용액 상에 보관되어 있거나, 기판 상에 상기 바이오마커가 높은 밀도로 고정화되어 있을 수 있다. 다시 말해 상기 바이오마커는 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [118] 상기 키트는 용액 상에 분산되어 있거나, 상기 기판 상에 고정된 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA를 혼성화함으로써, 동일한 서열의 mRNA 또는 cDNA가 발현되고 있는지를 확인할 수 있다.
- [119] 따라서 상기 키트에 사용되는 바이오마커는 이의 염기서열에서 한 가닥을 떼어내는 과정이 필요하다.
- [120] 상기 바이오마커가 기판상에 고정된 마이크로어레이 형태일 경우, 상기 기판은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에서 바이오마커가 커플링될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다.
- [121] 막에 적용 또는 고정 전에, 상기 바이오마커를 변형시켜 고정화하거나 혼성화 효율을 개선할 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [122] 이때 “혼성화”란 핵산의 2 개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자(혼성체)를 형성하는 과정을 의미하는 것이다.
- [123] 상기 혼성화 용액은 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA가 혼성화할 수 있게 하는 완충액으로서, 당업계에 공지된 용액을 이용할 수 있다.
- [124] 상기 키트에는 상기 바이오마커와 혼성화한 진단개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 검출기는 스캐너, 분광광도계(spectrophotometer), 액체섬광계수기(liquid scintillation counter) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [125] 상기 키트는 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 비만 여부를 정성적으로 검출할 수 있는데, 구체적으로 상기 키트를 통해 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단개체에서 측정된 바이오마커 발현량을 비교하였을 때, 상기 진단개체에서의 발현량이 감소하였다면, 상기 진단개체는 동일 종에서의 평균 중성지방 함량 및 지방구 크기와 밀도 보다 증가한 상태를 정확하고 신속하게 판별할 수 있다.
- [126]

- [127] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 바이오마커 및 혼성화 용액을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [128] 상기 바이오마커는 전술한 바와 같고, 용액 상에 보관되어 있거나, 기판 상에 상기 바이오마커가 높은 밀도로 고정화되어 있을 수 있다. 다시 말해 상기 바이오마커는 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [129] 상기 키트는 용액 상에 분산되어 있거나, 상기 기판 상에 고정된 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA를 혼성화함으로써, 동일한 서열의 mRNA 또는 cDNA가 발현되고 있는지를 확인할 수 있다.
- [130] 따라서 상기 키트에 사용되는 바이오마커는 이의 염기서열에서 한 가닥을 떼어내는 과정이 필요하다.
- [131] 상기 바이오마커가 기판상에 고정된 마이크로어레이 형태일 경우, 상기 기판은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에서 바이오마커가 커플링될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다.
- [132] 막에 적용 또는 고정 전에, 상기 바이오마커를 변형시켜 고정화하거나 혼성화 효율을 개선할 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [133] 이때 “혼성화”란 핵산의 2 개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자(혼성체)를 형성하는 과정을 의미하는 것이다.
- [134] 상기 혼성화 용액은 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA가 혼성화할 수 있게 하는 완충액으로서, 당업계에 공지된 용액을 이용할 수 있다.
- [135] 상기 키트에는 상기 바이오마커와 혼성화한 진단개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 검출기는 스캐너, 분광광도계(spectrophotometer), 액체섬광계수기(liquid scintillation counter) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [136] 상기 키트는 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 비만 여부를 정성적으로 검출할 수 있는데, 구체적으로 상기 키트를 통해 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단개체에서 측정된 바이오마커 발현량을 비교하였을 때, 상기 진단개체에서의 발현량이 감소하였다면, 상기 진단개체는 동일 종과는 달리 암이 발생 또는 성장하였음을 정확하고 신속하게 진단할 수 있다.
- [137]
- [138] 아울러, 본 발명에 따른 키트는 전술한 바와 같이 노화 판별, 비만 판별 및 암

진단에 각각 이용할 수 있지만, 노화 진행 여부, 비만 증가 여부 및 암 발생 여부를 동시에 검출하는 복합 진단용 키트로도 사용할 수 있다.

- [139] 앞서 설명한 바와 같이 상기 복합 진단용 키트는 상기 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 바이오마커와 혼성화용액을 포함하고, 상기 바이오마커의 발현이 감소함에 따라 UAS-GAL4 시스템을 이용해 특정 유전자 발현을 제어한 초파리 돌연변이체의 노화가 더 진행되고, 중성지방과 지방체 조직에서의 지방구 밀도 및 크기가 증가하며, 암 발생이 감소하는 것을 근거로 하여, 진단개체와 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 노화 진행 여부, 비만 증가 여부 및 암 발생 여부를 동시에 검출할 수 있는, 복합 진단용 키트로 사용이 가능하다는 장점을 갖는다.

[140]

- [141] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 노화 진행 판별방법에 관한 것이다.

- [142] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

- [143] II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 노화 진행 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

- [144] III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함한다.

- [145] 상기 진단개체로부터 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 주지된 방법을 이용할 수 있다. 구체적으로 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하는 단계일 수 있다.

- [146] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 cDNA는, 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 합성된 제1 가닥 cDNA를 사용할 수도 있다. 상기 제1 가닥 cDNA를 합성하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면 역전사효소, RNase 블록 리보뉴클레아제 저해제 등을 이용하여 합성할 수 있다. 역전사 효소의 예는 다양한 소스로부터 기원한 역전사 효소, 예를 들면, 조류 골수아세포증바이러스-유래역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소(murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사효소 (Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase)를 포함한다.

- [147] 바람직하게는, 상기 cDNA는 검출가능한 표지물질로 표지될 수 있다. 상기 표지물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy5 또는 Cy3 이다. 제1가닥 cDNA 합성시 프라이머의 5'-말단에 Cy5 또는 Cy3를 표지하여 합성을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을

이용한 표지는 제1가닥 cDNA 합성시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 반응액에 첨가하면 합성 산물이 합성되면서 방사성이 합성 산물에 혼입되어 합성 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.

[148] 상기 혼성화 정도를 검출하는 단계는 모세관 전기영동, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다.

[149] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 상기 노화 진행 판별방법은 상기 검출 결과를 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 노화 진행 여부를 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[150]

[151] 다른 한편으로 상기 노화 진행 판별 방법은 상기 진단개체의 노화 진행 판별에 필요한 정보를 제공하기 위한 것으로, 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하고, 여기에 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열의 발현을 검출할 수 있는 프로브 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 발현을 검출할 수 있는 항체를 첨가함으로써, 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 유전자 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[152] 상기 과정을 통해 검출된 유전자와 단백질 발현량을 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 노화 진행 여부를 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[153] 상기 진단개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충인 것일 수 있다.

[154]

[155] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 비만 판별방법에 관한 것이다.

[156] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

[157] II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 비만 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

[158] III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함한다.

[159] 상기 진단개체로부터 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 주지된 방법을 이용할 수 있다. 구체적으로 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하는 단계일 수 있다.

[160] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 cDNA는, 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 합성된 제1 가닥 cDNA를 사용할 수도 있다. 상기 제1 가닥 cDNA를 합성하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면 역전사효소, RNase 블록 리보뉴클레아제 저해제 등을 이용하여 합성할 수 있다. 역전사 효소의 예는 다양한 소스로부터 기원한 역전사 효소, 예를 들면,

조류 골수아세포증바이러스-유래역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소(murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사효소 (Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase)를 포함한다.

- [161] 바람직하게는, 상기 cDNA는 검출가능한 표지물질로 표지될 수 있다. 상기 표지물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy5 또는 Cy3 이다. 제1가닥 cDNA 합성시 프라이머의 5'-말단에 Cy5 또는 Cy3를 표지하여 합성을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 제1가닥 cDNA 합성시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 반응액에 첨가하면 합성 산물이 합성되면서 방사성이 합성 산물에 혼입되어 합성 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.
- [162] 상기 혼성화 정도를 검출하는 단계는 모세관 전기영동, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다.
- [163] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 상기 비만 판별방법은 상기 검출 결과를 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 중성지방 함량의 증가, 지방체 조직에서의 지방구 크기 및 밀도 증가 여부를 통해 비만을 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [164]
- [165] 다른 한편으로 상기 비만 판별 방법은 상기 진단개체의 비만 판별에 필요한 정보를 제공하기 위한 것으로, 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하고, 여기에 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열의 발현을 검출할 수 있는 프로브 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 발현을 검출할 수 있는 항체를 첨가함으로써, 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 유전자 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 것일 수 있다.
- [166] 상기 과정을 통해 검출된 유전자와 단백질 발현량을 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 비만 증가(중성지방 함량 증가와 지방체 조직에서 지방구의 크기 및 밀도 증가 여부) 여부를 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [167] 상기 진단개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충인 것일 수 있다.
- [168]
- [169] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 암 진단방법에 관한 것이다.
- [170] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;
- [171] II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 암 진단용 키트를

- 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및
- [172] III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함한다.
- [173] 상기 진단개체로부터 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 주지된 방법을 이용할 수 있다. 구체적으로 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하는 단계일 수 있다.
- [174] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 cDNA는, 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 합성된 제1 가닥 cDNA를 사용할 수도 있다. 상기 제1 가닥 cDNA를 합성하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면 역전사효소, RNase 블록 리보뉴클레아제 저해제 등을 이용하여 합성할 수 있다. 역전사 효소의 예는 다양한 소스로부터 기원한 역전사 효소, 예를 들면, 조류 골수아세포증바이러스-유래역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소(murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사효소 (Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase)를 포함한다.
- [175] 바람직하게는, 상기 cDNA는 검출가능한 표지물질로 표지될 수 있다. 상기 표지물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy5 또는 Cy3 이다. 제1가닥 cDNA 합성시 프라이머의 5'-말단에 Cy5 또는 Cy3를 표지하여 합성을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 제1가닥 cDNA 합성시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 반응액에 첨가하면 합성 산물이 합성되면서 방사성이 합성 산물에 혼입되어 합성 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.
- [176] 상기 혼성화 정도를 검출하는 단계는 모세관 전기영동, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다.
- [177] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 상기 암 진단방법은 상기 검출 결과를 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 암 발생 또는 성장 여부를 통해 암을 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [178]
- [179] 다른 한편으로 상기 암 진단 방법은 상기 진단개체의 암 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 것으로, 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하고, 여기에 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열의 발현을 검출할 수 있는 프로브 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열의 발현을 검출할 수 있는 항체를 첨가함으로써, 상기 서열번호 1 내지 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열을 포함하는 유전자 또는 서열번호 12 내지 22로 이루어진

군으로부터 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[180] 상기 과정을 통해 검출된 유전자와 단백질 발현량을 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 암 발생 및 성장 여부를 진단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[181] 상기 진단개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충인 것일 수 있다.

[182]

[183] 아울러, 상기 각각의 키트를 이용하여 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 각각 수행할 수 있으나, 본 발명에서는 상기 복합 진단용 키트를 이용함으로써 노화 진행 여부, 비만 증가 여부 및 암 발생 여부를 동시에 검출할 수도 있다.

[184] 앞서 설명한 바와 같이 상기 복합 진단용 키트를 상술한 각각의 키트를 이용한 판별방법과 동일한 과정으로 수행한다.

[185] 다만 검출 결과를 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 노화, 비만, 암 발생 또는 성장 여부를 판별 및 진단할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[186] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[187]

[188] 실시예 1. T3dh 유전자 발현을 제어한 초파리 돌연변이체 제조.

[189] <준비 과정>

[190] 노화의 진행을 측정하는 것에 대한 연구를 위하여 우선 Actin-GS-Gal4 초파리와 야생형(w1118)의 초파리를 교배하여 RU486이 수명에 영향을 미치는지 알아보았으며, 그 결과 RU486이 수명에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(하기 '도 1' 참조).

[191] Actin-GS-Gal4는 RU486이 있을 때 초파리 온 몸에서 발현되며, UAS-T3dh RNAi는 Gal4가 만들어지면 T3dh(Type III alcohol dehydrogenase, CG3425)의 전사가 RNAi 작용으로 인하여 T3dh의 발현이 낮아진다. 이렇게 Actin-GS-Gal4와 UAS-T3dh RNAi 초파리를 교배하여 얻은 자손(F1) 초파리에서 T3dh의 발현이 낮아지는지 확인하기 위하여 T3dh mRNA 양을 RT-PCR로 확인한 결과 RU486을 먹었을 때 T3dh의 mRNA 양이 RU486을 먹이지 않았을 때 보다 현저하게 줄어든 것을 확인하였다. 이 결과는 Actin-GS-Gal4와 UAS-T3dh-RNAi가 정상적으로 작동한다는 것을 증명하는 것이다(하기 '도 2' 참조).

[192]

[193] 실시예 2. fbp 유전자 발현을 제어한 초파리 돌연변이체 제조.

[194] <준비 과정>

- [195] 노화의 진행을 측정하는 것에 대한 연구를 위하여 우선 Actin-GS-Gal4 초파리와 야생형(w1118)의 초파리를 교배하여 RU486이 수명에 영향을 미치는지 알아보았으며, 그 결과 RU486이 수명에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(하기 '도 3' 참조).
- [196] Actin-GS-Gal4는 RU486이 있을 때 초파리 온 몸에서 발현되며, UAS-fbp RNAi는 Gal4가 만들어지면 fbp(Fructose-1,6-bisphosphatase, CG31692)의 전사가 RNAi 작용으로 인하여 fbp의 발현이 낮아진다. 이렇게 Actin-GS-Gal4와 UAS-fbp RNAi 초파리를 교배하여 얻은 자손(F1) 초파리에서 fbp의 발현이 낮아지는지 확인하기 위하여 fbp mRNA 양을 RT-PCR로 확인한 결과 RU486을 먹었을 때 fbp의 mRNA 양이 RU486을 먹이지 않았을 때 보다 현저하게 줄어든 것을 확인하였다. 이 결과는 Actin-GS-Gal4와 UAS-fbp RNAi가 정상적으로 작동한다는 것을 증명하는 것이다(하기 '도 4' 참조).
- [197]
- [198] 실시예 3. AGL 유전자 발현을 제어한 초파리 돌연변이체 제조.
- [199] <준비 과정>
- [200] 노화의 진행을 측정하는 것에 대한 연구를 위하여 우선 Actin-GS-Gal4 초파리와 야생형(w1118)의 초파리를 교배하여 RU486이 수명에 영향을 미치는지 알아보았으며, 그 결과 RU486이 수명에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(하기 '도 5' 참조).
- [201] Actin-GS-Gal4는 RU486이 있을 때 초파리 온 몸에서 발현되며, UAS-AGL RNAi는 Gal4가 만들어지면 AGL의 전사가 RNAi 작용으로 인하여 AGL의 발현이 낮아진다. 이렇게 Actin-GS-Gal4와 UAS-AGL RNAi 초파리를 교배하여 얻은 자손(F1) 초파리에서 AGL의 발현이 낮아지는지 확인하기 위하여 AGL mRNA 양을 RT-PCR로 확인한 결과 RU486을 먹었을 때 AGL의 mRNA 양이 RU486을 먹이지 않았을 때 보다 현저하게 줄어든 것을 확인하였다. 이 결과는 Actin-GS-Gal4와 UAS-AGL RNAi가 정상적으로 작동한다는 것을 증명하는 것이다(하기 '도 6' 참조).
- [202]
- [203] <T3dh 유전자와 노화, 비만, 암과의 관련성 실험>
- [204] 실험예 1: Actin-GS-Gal4>UAS-T3dh RNAi의 RT-PCR
- [205] UAS-T3dh RNAi 초파리가 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해서 Actin-GS-Gal4초파리 암컷과 UAS-T3dh RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486 (150 μ M)이 들어간 배지(설탕 2.5 %, 포도당 5 %, 한천 0.7 %, 옥수수가루 6.1 %, 효모 2.6 %, 10 % Tegosept 1.6 %, 물 80.7 %)와 RU486이 들어가지 않은 배지에 10일 동안 키운 후 T3dh의 mRNA 양을 측정하기 위하여 역전사효소 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase mediated PCR, RT-PCR)을 수행하였다. 그 결과 UAS-T3dh RNAi가 작동하여 RU486이 들어가 있는 배지에서 키운 초파리의 T3dh의 mRNA양이 대조구에 비하여 통계적으로

유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

[206]

[207] 실험예 2: RU486을 먹인 **Actin-GS-Gal4>UAS-T3dh RNAi** 초파리의 수명 측정

[208] **Actin-GS-Gal4** 초파리 암컷과 **UAS-T3dh RNAi** 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 120 마리를 넣고 최종 6 마리가 남을 때까지 온도 25 °C, 상대습도 50 %, 12:12 시간 일광주기 조건으로 키우면서 수명을 측정하였다. 수명을 측정한 실험은 3 회 반복했다. 하기 도 7의 결과에서 나타난 것처럼 T3dh의 발현이 줄어들면 수명이 감소하는 즉, 노화가 더 진행되는 것을 확인 할 수 있다(하기 ‘도 7’ 참조).

[209]

[210] 실험예 3: RU486을 먹인 **Actin-GS-Gal4; UAS-T3dh RNAi** 초파리의 중성지방측정

[211] **Actin-GS-Gal4** 초파리 암컷과 **UAS-T3dh RNAi** 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486 (150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 약 100 마리 이상의 초파리를 넣어 10 일 간 키운 후 박층크로마토그래피법(TLC)를 이용하여 중성지방을 측정하였다(한편, 하기 ‘도 8’은 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 측정한 결과임). 각 실험군 당 초파리 10마리를 에펜돌프 튜브에 넣고 추출용매(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 % TritonX-100), 100 μ l를 넣고 5 분 간 분쇄한 다음 원심분리를 하여 상층액 5 μ l를 TLC 판에 점적하였다. 중성지방을 분리를 위한 TLC 전개용매 조성은 hexane; diethylether; acetic acid(70: 30: 1) 이었으며, 중성지방 표준물질은 참기름(sesame oil, Sigma-Aldrich S3547-250ML)이었다. TLC 판에 전개한 후, TLC 판을 건조시키고, 요오드 포화 상자에 넣어서 TLC 판을 염색한 후 사진을 찍어서 Image J 프로그램을 이용하여 중성지방 밴드를 정량했다. 그 결과, RU486을 먹인 초파리에서 즉, T3dh 발현이 억제된 그룹에서 중성지방 함량이 유의하게 증가함을 확인 할 수 있었다(하기 ‘도 9’ 참조).

[212]

[213] 실험예 4: RU486을 먹인 **Actin-GS-Gal4>UAS-T3dh RNAi** 초파리의 지방체 공초점 현미경 분석

[214] 지방구 크기를 관찰하기 위하여 **Actin-GS-Gal4** 초파리 암컷과 **UAS-T3dh RNAi** 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 각각 10 일 간 키운 후 나일레드(Nile red)로 염색했다. 초파리를 해부하여 지방체 조직을 PBS에 녹인 4 % 파라폼알데히드 용액에 30 분간 상온에서 고정한 다음, PBS로 세척하고 0.5 mg/ml 나일레드(Sigma) 용액을 1:2,500으로 희석하여 상온에서 30 분간 염색한 후 증류수로 2 번 세척한다. 이어 염색된 샘플을 슬라이드 글라스에 올려서 80% 글리세롤 용액에 넣고 공초점 현미경으로 측정하였다(한편, 하기 ‘도 10’은

RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UAS-nls.GFP 초파리의 지방체 조직에 대한 공초점 현미경 사진). 그 결과 지방구의 크기 및 밀도가 증가한 것을 확인할 수 있었다(하기 ‘도 11’ 참조).

[215]

[216] 실험예 5: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)의 제작

[217] 암과 관련한 연구를 수행하기 위하여, c765-Gal4 초파리와 UAS-PI3K 초파리를 교배하여 암 성장 모델 초파리를 제작하였다.

[218]

[219] 실험예 6: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)의 표현형 분석

[220] 제작된 UAS-PI3K; c765-Gal4 암 증식 검정 초파리 모델의 표현형을 분석하기 위하여 야생형 초파리(CS10)와 c765-Gal4와 CS10을 교배한 c765-Gal4/+CS10, UASPI3K/+CS10 와 UAS-PI3K/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이를 비교한 결과 UASPI3K/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이가 3가지 대조구에 비하여 날개 길이가 길어진 것을 확인하였다. 날개 길이 비교는 초파리 각 개체마다의 차이를 보정하기 위하여 흉곽의 길이 대비 날개 길이를 측정하였다. 즉 암 증식 검정 모델로서 충분히 이용할 수 있음을 확인하였다(하기 ‘도 12’ 참조).

[221]

[222] 실험예 7: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)에서 T3dh 유전자 발현 억제가 표현형에 미치는 영향

[223] T3dh 유전자 발현 억제가 암 성장에 미치는 영향을 추정하기 위하여 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)와 UAS-T3dh RNAi 초파리를 교배하여 얻은 F1 세대의 날개 표현형을 조사하였다. 그 결과, PI3K 과발현으로 인해 증가한 날개 길이와 면적이 T3dh의 발현이 억제되면 유의하게 감소하는 것이 확인되었다(하기 ‘도 13’ 및 ‘도 14’ 참조).

[224]

[225] <fbp 유전자와 노화, 비만, 암과의 관련성 실험>

[226] 실험예 8: Actin-GS-Gal4>UAS- fbp RNAi의 RT-PCR

[227] UAS-fbp RNAi 초파리가 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해서 Actin-GS-Gal4초파리 암컷과 UAS- fbp RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지(설탕 2.5%, 포도당 5%, 한천 0.7%, 옥수수가루 6.1 %, 효모 2.6 %, 10 % Tegosept 1.6 %, 물 80.7 %)와 RU486이 들어가지 않은 배지에 10 일 동안 키운 후 fbp의 mRNA 양을 측정하기 위하여 역전사효소 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase mediated PCR, RT-PCR)를 수행하였다. 그 결과 UAS-fbp RNAi가 작동하여 RU486이 들어가 있는 배지에서 키운 초파리의 fbp의 mRNA양이 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

[228]

[229] 실험예 9: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4>UAS-<0082> fbp RNAi 초파리의 수명

측정

- [230] Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS-fbp RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 120 마리를 넣고 최종 6 마리가 남을 때까지 온도 25 °C, 상대습도 50 %, 12:12 시간 일광주기 조건으로 키우면서 수명을 측정하였다. 이 수명을 측정한 실험은 3 회 반복했다. 하기 도 3의 결과에서 나타난 것처럼 fbp의 발현이 줄어들면 수명이 감소하는 것을, 즉 노화가 더 진행되는 것을 확인 할 수 있다(하기 ‘도 15’ 참조).
- [231]
- [232] 실험예 10: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4; UAS- fbp RNAi 초파리의 중성지방 측정
- [233] Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS- fbp RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 약 100 마리 이상의 초파리를 넣어 10 일 간 키운 후 박층크로마토그래피법(TLC)를 이용하여 중성지방을 측정하였다(한편, 하기 ‘도 16’은 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 측정한 결과임). 각 실험군 당 초파리 10마리를 에펜돌프 튜브에 넣고 추출용매(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 % TritonX-100), 100 μ l를 넣고 5 분 간 분쇄한 다음 원심분리를 하여 상층액 5 μ l를 TLC 판에 점적하였다. 중성지방을 분리를 위한 TLC 전개용매 조성은 hexane; diethylether; acetic acid(70: 30: 1)이었으며, 중성지방 표준물질은 참기름(sesame oil, Sigma-Aldrich S3547-250ML)이었다. TLC 판에 전개한 후, TLC 판을 건조시키고, 요오드 포화 상자에 넣어서 TLC 판을 염색한 후 사진을 찍어서 Image J 프로그램을 이용하여 중성지방 밴드를 정량했다. 그 결과, RU486을 먹인 초파리에서 즉, fbp 발현이 억제된 그룹에서 중성지방 함량이 유의하게 증가함을 확인 할 수 있었다(하기 ‘도 17’ 참조).
- [234]
- [235] 실험예 11: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4>UAS-fbp RNAi 초파리의 지방체 공초점 현미경 분석
- [236] 지방구 크기를 관찰하기 위하여 Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS-AGL RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 각각 10 일 간 키운 후 나일레드(Nile red)로 염색했다. 초파리를 해부하여 지방체 조직을 PBS에 녹인 4 % 파라폼알데히드 용액에 30 분간 상온에서 고정한 다음, PBS로 세척하고 0.5 mg/ml 나일레드(Sigma) 용액을 1:2,500으로 희석하여 상온에서 30 분간 염색한 후 증류수로 2번 세척한다. 이어 염색된 샘플을 슬라이드 글라스에 올려서 80 % 글리세롤 용액에 넣고 공초점 현미경으로 측정하였다(한편, 하기 ‘도 18’은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UASnls. GFP 초파리의 지방체 조직에 대한 공초점 현미경 사진). 그 결과 지방구의 크기 및 밀도가 증가한 것을 확인할 수

있었다(하기 ‘도 19’ 참조).

[237]

[238] 실험예 12: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 제작

[239] 암과 관련한 연구를 수행하기 위하여, c765-Gal4 초파리와 UAS-Ras85D 초파리를 교배하여 암 증식 모델 초파리를 제작하였다.

[240]

[241] 실험예 13: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 표현형 분석

[242] 제작된 UAS-Ras85D; c765-Gal4 암 증식 검정 초파리 모델의 표현형을 분석하기 위하여 야생형 초파리(CS10)와 c765-Gal4와 CS10을 교배한 c765-Gal4/+CS10, UAS-Ras85D/+CS10 와 UAS-Ras85D/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이를 비교한 결과 UAS-Ras85D/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이가 3가지 대조구에 비하여 날개 길이가 길어진 것을 확인하였다. 날개 길이 비교는 초파리 각 개체마다의 차이를 보정하기 위하여 흉곽의 길이 대비 날개 길이를 측정하였다. 즉 암 증식 검정 모델로서 충분히 이용할 수 있음을 확인하였다. (하기 ‘도 20’ 참조)

[243]

[244] 실험예 14: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)에서 fbp 유전자 발현 억제가 표현형에 미치는 영향

[245] fbp 유전자 발현 억제가 암 성장에 미치는 영향을 추정하기 위하여 암 증식모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)와 UAS-fbp RNAi 초파리를 교배하여 얻은 F1 세대의 날개 표현형을 조사하였다. 그 결과, Ras85D 과발현으로 인해 증가한 날개 길이와 면적이 fbp의 발현이 억제되면 유의하게 감소하는 것이 확인되었다(하기도 21 및 도 22’ 참조).

[246]

[247] <AGL 유전자와 노화, 비만, 암과의 관련성 실험>

[248] 실험예 15: Actin-GS-Gal4>UAS- AGL RNAi의 RT-PCR

[249] UAS-AGL RNAi 초파리가 정상적으로 작동하는지 확인하기 위해서 Actin-GS-Gal4초파리 암컷과 UAS-AGL RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150μM)이 들어간 배지(설탕 2.5%, 포도당 5%, 한천 0.7%, 옥수수가루 6.1 %, 효모 2.6 %, 10 % Tegosept 1.6 %, 물 80.7 %)와 RU486이 들어가지 않은 배지에 10 일 동안 키운 후 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485)의 mRNA 양을 측정하기 위하여 역전사효소 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase mediated PCR, RT-PCR)를 수행하였다. 그 결과 UAS-AGL RNAi가 작동하여 RU486이 들어가 있는 배지에서 키운 초파리의 AGL의 mRNA 양이 대조구에 비하여 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

[250]

[251] 실험예 16: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4>UAS-AGL RNAi 초파리의 수명 측정

- [252] Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS-AGL RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 120 마리를 넣고 최종 6 마리가 남을 때까지 온도 25 °C, 상대습도 50 %, 12:12 시간 일광주기 조건으로 키우면서 수명을 측정하였다. 이 수명을 측정한 실험은 3 회 반복했다. 하기 도 23의 결과에서 나타난 것처럼 AGL의 발현이 줄어들면 노화가 더 진행되는 것을 확인 할 수 있다(하기 ‘도 23’ 참조).
- [253]
- [254] 실험예 17: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4; UAS-AGL RNAi 초파리의 중성지방 측정
- [255] Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS-AGL RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 약 100 마리 이상의 초파리를 넣어 10 일 간 키운 후 박층크로마토그래피법(TLC)를 이용하여 중성지방을 측정하였다(한편, 하기 ‘도 24’는 RU486을 먹인 야생형 초파리의 중성지방 함량 변화를 측정한 결과임). 각 실험군 당 초파리 10 마리를 에펜돌프 튜브에 넣고 추출용매(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 % TritonX-100), 100 μ l를 넣고 5 분 간 분쇄한 다음 원심분리를 하여 상층액 5 μ l를 TLC 판에 점적하였다. 중성지방을 분리를 위한 TLC 전개용매 조성은 hexane; diethylether; acetic acid(70: 30: 1) 이었으며, 중성지방 표준물질은 참기름(sesame oil, Sigma-Aldrich S3547-250ML)이었다. TLC 판에 전개한 후, TLC 판을 건조시키고, 요오드 포화 상자에 넣어서 TLC 판을 염색한 후 사진을 찍어서 Image J 프로그램을 이용하여 중성지방 밴드를 정량했다. 그 결과, RU486을 먹인 초파리에서 즉, AGL 발현이 억제된 그룹에서 중성지방 함량이 유의하게 감소함을 확인 할 수 있었다(하기 ‘도 25’ 참조).
- [256]
- [257] 실험예 18: RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4>UAS-AGL RNAi 초파리의 지방체 공초점 현미경 분석
- [258] 지방구 크기를 관찰하기 위하여 Actin-GS-Gal4 초파리 암컷과 UAS-AGL RNAi 초파리 수컷을 교배하여 F1 세대의 수컷을 모아서 RU486(150 μ M)이 들어간 배지와 RU486이 들어가지 않은 배지에 각각 10 일 간 키운 후 나일레드(Nile red)로 염색했다. 초파리를 해부하여 지방체 조직을 PBS에 녹인 4 % 파라폼알데히드 용액에 30 분간 상온에서 고정한 다음, PBS로 세척하고 0.5 mg/ml 나일레드(Sigma) 용액을 1:2,500으로 희석하여 상온에서 30 분간 염색한 후 증류수로 2번 세척한다. 이어 염색된 샘플을 슬라이드 글라스에 올려서 80 % 글리세롤 용액에 넣고 공초점 현미경으로 측정하였다(한편, 하기 ‘도 26’은 RU486을 먹인 Actin-GS-Gal4/UASnls. GFP 초파리의 지방체 조직에 대한 공초점 현미경 사진). 그 결과 지방구의 크기 및 밀도가 감소한 것을 확인할 수 있었다(하기 ‘도 27’ 참조).
- [259]

- [260] 실험예 19: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)의 제작
- [261] 암과 관련한 연구를 수행하기 위하여, c765-Gal4 초파리와 UAS-PI3K 초파리를 교배하여 암 성장 모델 초파리를 제작하였다.
- [262]
- [263] 실험예 20: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 제작
- [264] 암과 관련한 연구를 수행하기 위하여, c765-Gal4 초파리와 UAS-Ras85D 초파리를 교배하여 암 증식 모델 초파리를 제작하였다.
- [265]
- [266] 실시예 21: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)의 표현형 분석
- [267] 제작된 UAS-PI3K; c765-Gal4 암 증식 검정 초파리 모델의 표현형을 분석하기 위하여 야생형 초파리(CS10)와 c765-Gal4와 CS10을 교배한 c765-Gal4/+CS10, UASPI3K/+CS10 와 UAS-PI3K/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이를 비교한 결과 UASPI3K/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이가 3 가지 대조구에 비하여 날개 길이가 길어진 것을 확인하였다. 날개 길이 비교는 초파리 각 개체마다의 차이를 보정하기 위하여 흉곽의 길이 대비 날개 길이를 측정하였다. 즉 암 증식 검정 모델로서 충분히 이용할 수 있음을 확인하였다(하기 ‘도 28’ 참조).
- [268]
- [269] 실험예 22: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)의 표현형 분석
- [270] 제작된 UAS-Ras85D; c765-Gal4 암 증식 검정 초파리 모델의 표현형을 분석하기 위하여 야생형 초파리(CS10)와 c765-gal4와 CS10을 교배한 c765-Gal4/+CS10, UAS-Ras85D/+CS10 와 UAS-Ras85D/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이를 비교한 결과 UAS-Ras85D/+CS10; c765-Gal4/+CS10 의 날개 길이가 3가지 대조구에 비하여 날개 길이가 길어진 것을 확인하였다. 날개 길이 비교는 초파리 각 개체마다의 차이를 보정하기 위하여 흉곽의 길이 대비 날개 길이를 측정하였다. 즉 암 증식 검정 모델로서 충분히 이용할 수 있음을 확인하였다(하기 ‘도 28’ 참조)
- [271]
- [272] 실험예 23: 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)에서 AGL 유전자 발현 억제가 표현형에 미치는 영향
- [273] AGL 유전자 발현 억제가 암 성장에 미치는 영향을 추정하기 위하여 암 성장 모델 초파리(UAS-PI3K; c765-Gal4)와 UAS-AGL RNAi 초파리를 교배하여 얻은 F1 세대의 날개 표현형을 조사하였다. 그 결과, PI3K 과발현으로 인해 증가한 날개 길이와 면적이 AGL의 발현이 억제되면 유의하게 감소하는 것이 확인되었다(하기 ‘도 29’ 및 하기 ‘도 30’ 참조).
- [274]
- [275] 실험예 24: 암 증식 모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)에서 AGL 유전자 발현 억제가 표현형에 미치는 영향
- [276] AGL 유전자 발현 억제가 암 성장에 미치는 영향을 추정하기 위하여 암 성장

모델 초파리(UAS-Ras85D; c765-Gal4)와 UAS-AGL RNAi 초파리를 교배하여 얻은 F1세대의 날개 표현형을 조사하였다. 그 결과, Ras85D 과발현으로 인해 증가한 날개 길이와 면적이 AGL의 발현이 억제되면 유의하게 감소하는 것이 확인 되었다(하기 ‘도 31’ 및 ‘도 32’ 참조).

[277]

[278] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

산업상 이용가능성

[279] 본 발명의 바이오마커는 인간, 인간 외의 포유류 또는 곤충의 노화 진행, 암 발생 및 비만 여부를 신속하고 정확하게 판별할 수 있으므로, 다양한 종에 대해 신약 개발 및 맞춤의학에 있어 중요한 지표를 제공하고, 바이오의학 개발에 경제적 비용 및 시간을 감소시킬 수 있다.

[280]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 노화 진행 판별용 바이오 마커.
- [청구항 2] 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 비만 판별용 바이오 마커.
- [청구항 3] 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 암 진단용 바이오 마커.
- [청구항 4] 서열번호 1 내지 11의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는, 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 바이오 마커.
- [청구항 5] 상기 제1항에 따른 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 노화 진행 판별용 키트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기판 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 노화 진행 판별용 키트.
- [청구항 7] 상기 제2항에 따른 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 비만 판별용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기판 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 비만 판별용 키트.
- [청구항 9] 상기 제3항에 따른 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 암 진단용 키트.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기판 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것을 특징으로 하는 암 진단용 키트.
- [청구항 11] 상기 제4항에 따른 바이오마커; 및 혼성화 용액;을 포함하는 노화 진행 판별, 비만 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 복합 진단용 키트.
- [청구항 12] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;
II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 제4항에 따른 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는

단계; 및

III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 노화 진행 판별방법.

[청구항 13] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 제4항에 따른 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 비만 판별방법.

[청구항 14] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 제4항에 따른 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

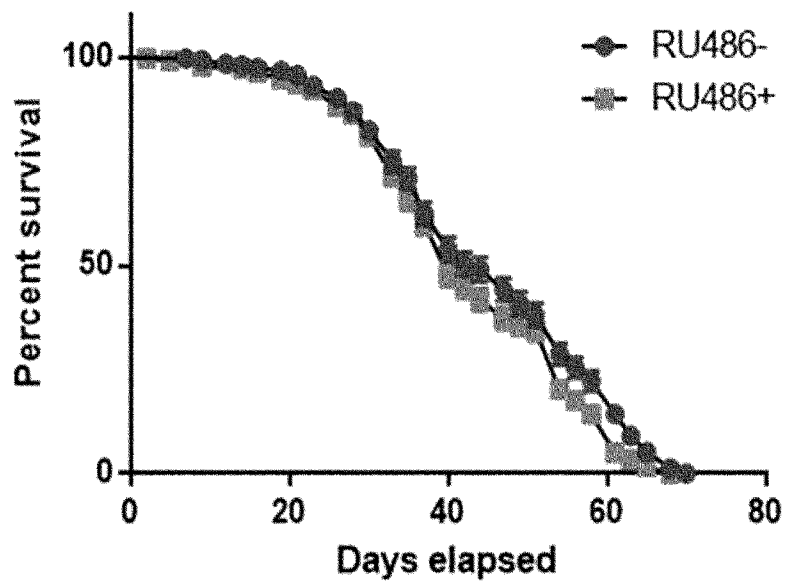
III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 암 진단방법.

[청구항 15] I) 진단 개체로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

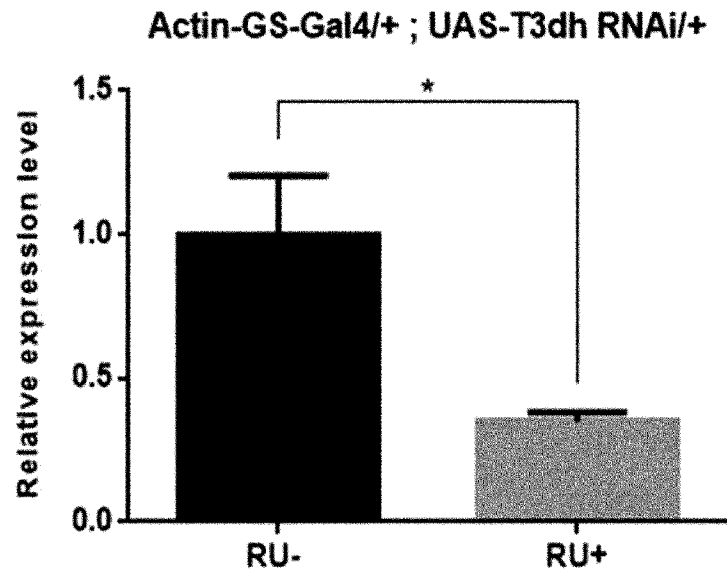
II) 상기 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 제4항에 따른 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 노화 진행 판별, 비만 증가 판별 및 암 진단을 동시에 검출하는 방법.

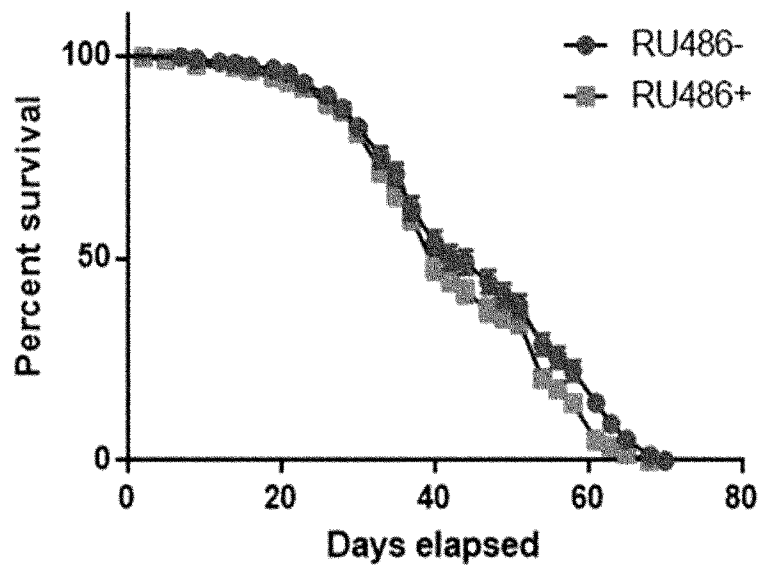
[도1]



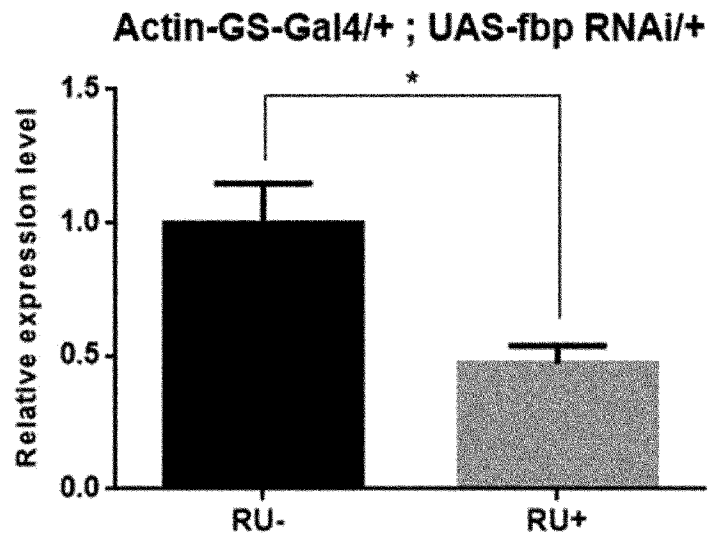
[도2]



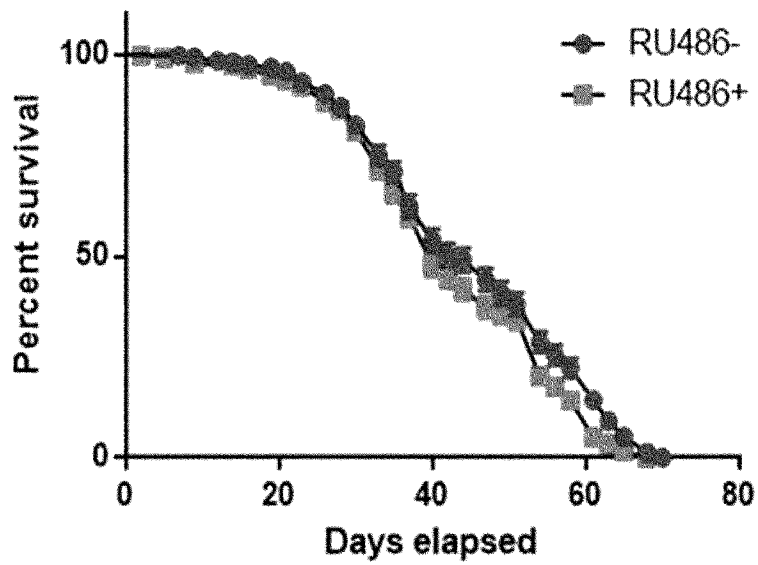
[도3]



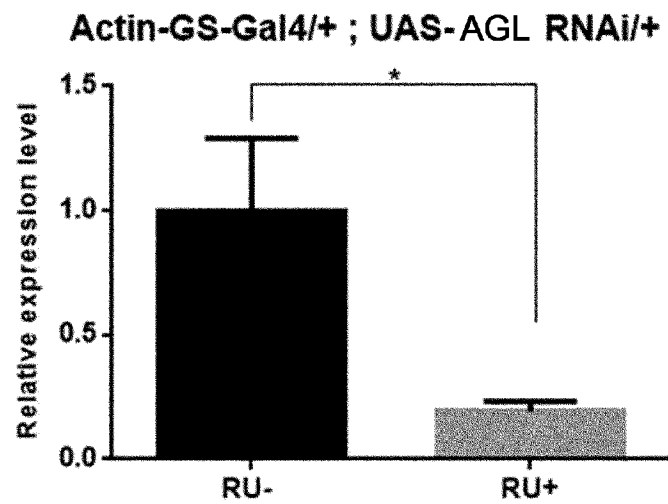
[도4]



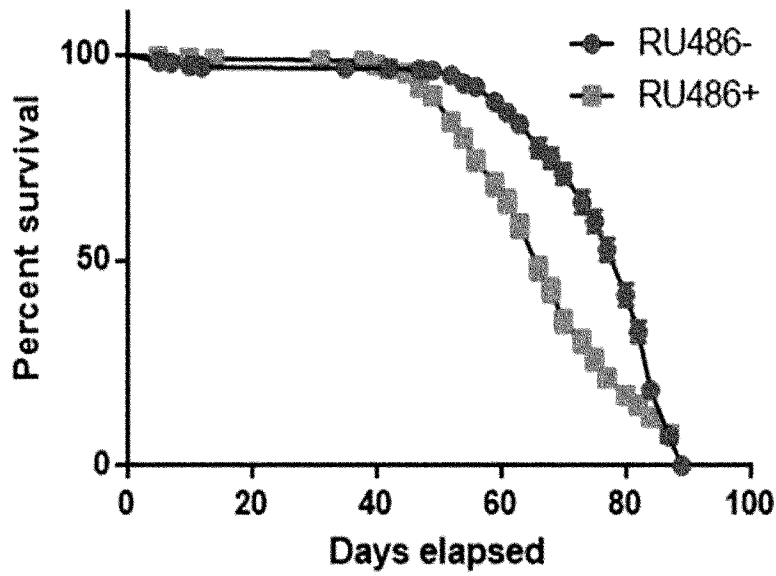
[도5]



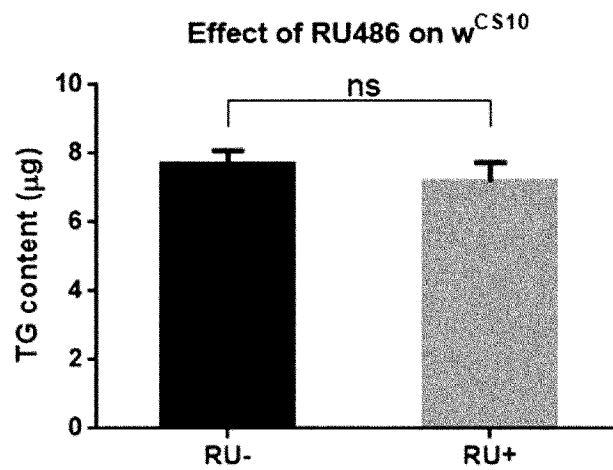
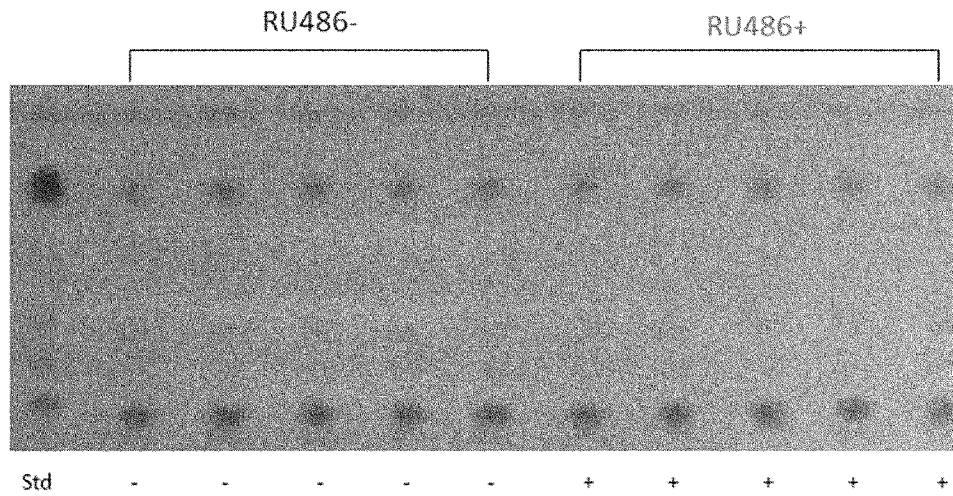
[도6]



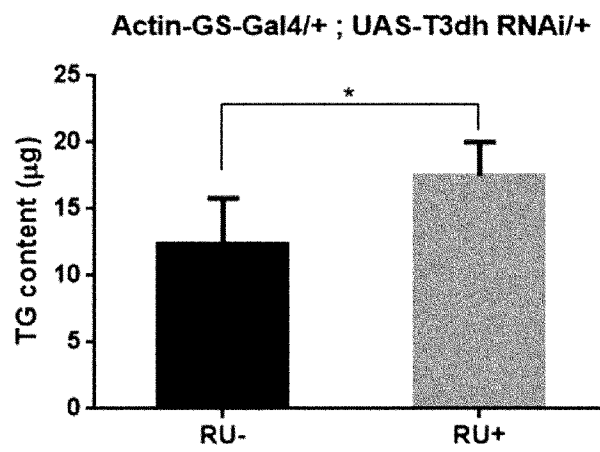
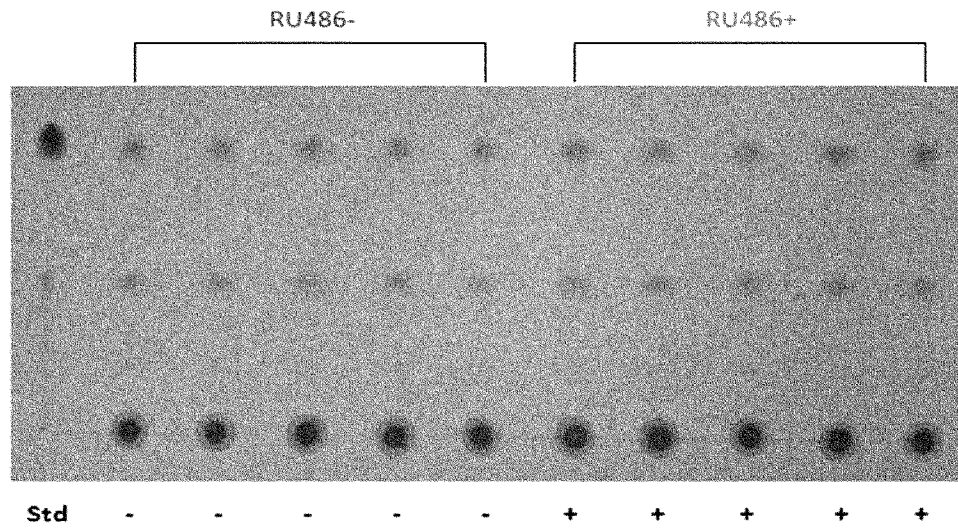
[도7]



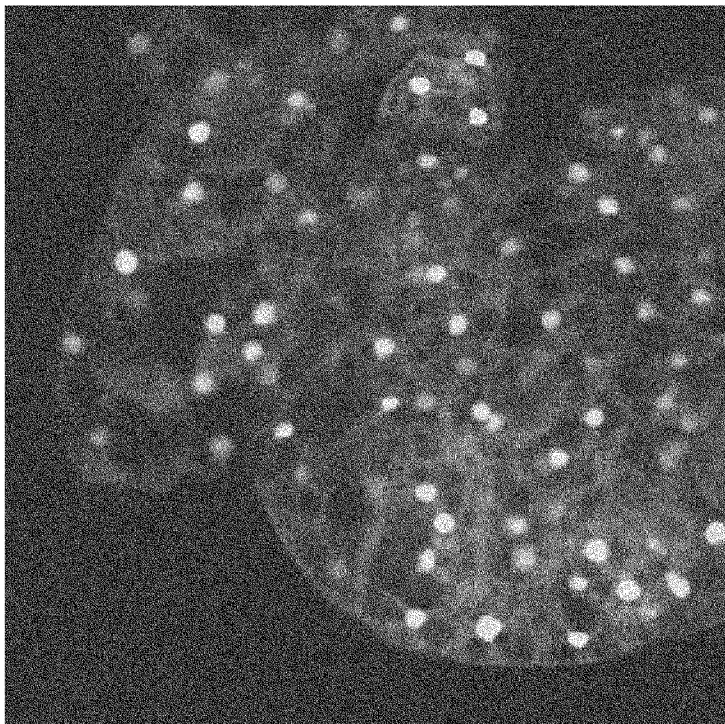
[도8]



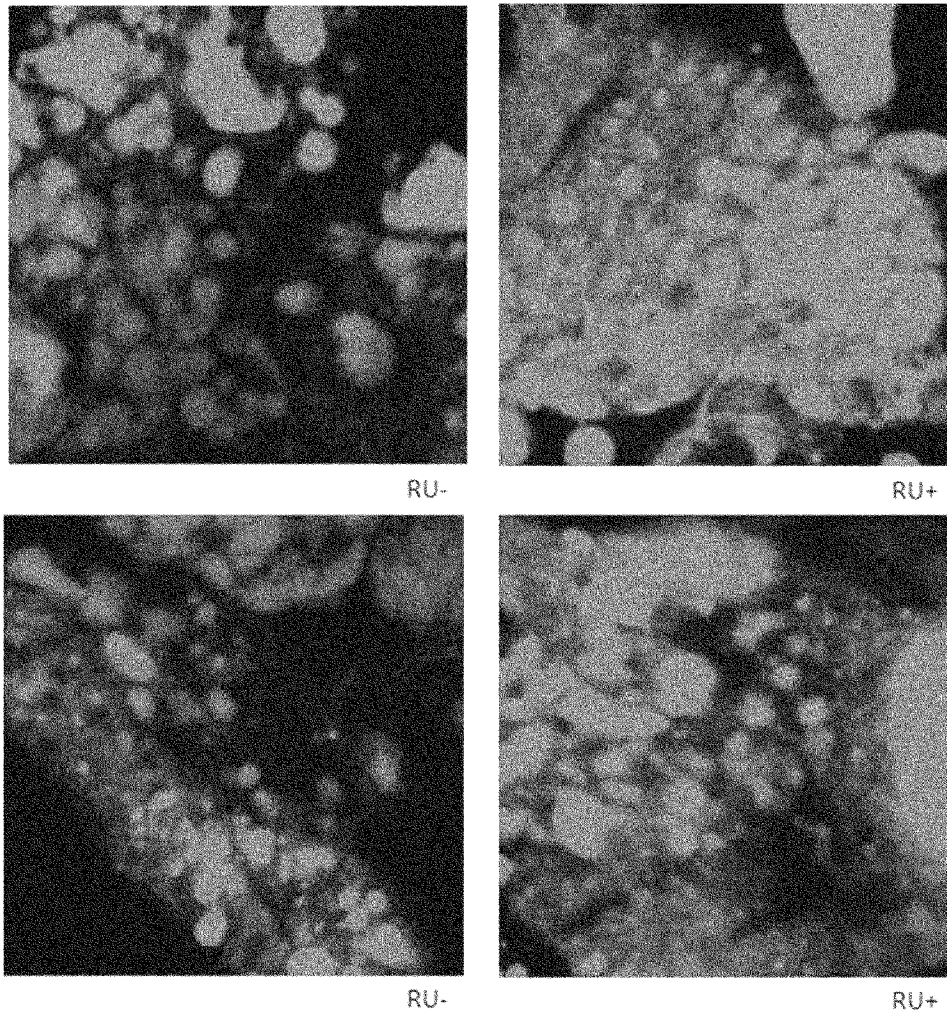
[도9]



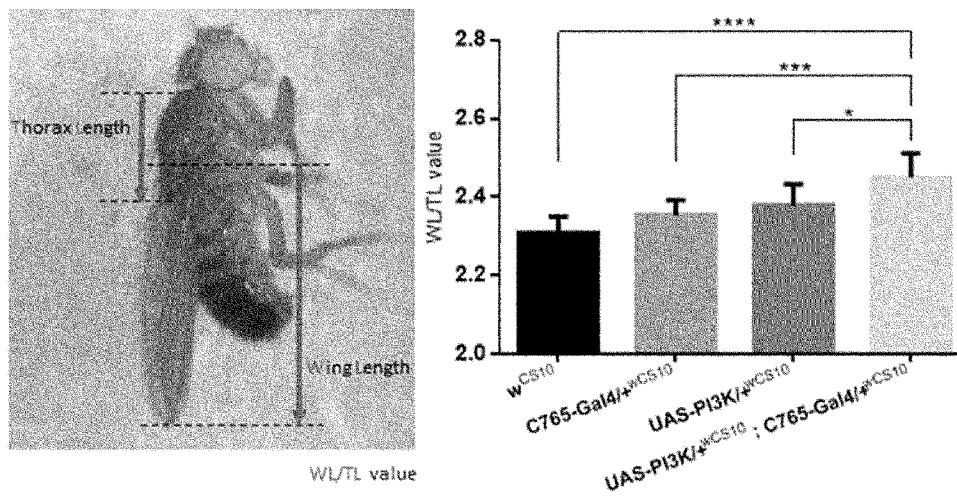
[도10]



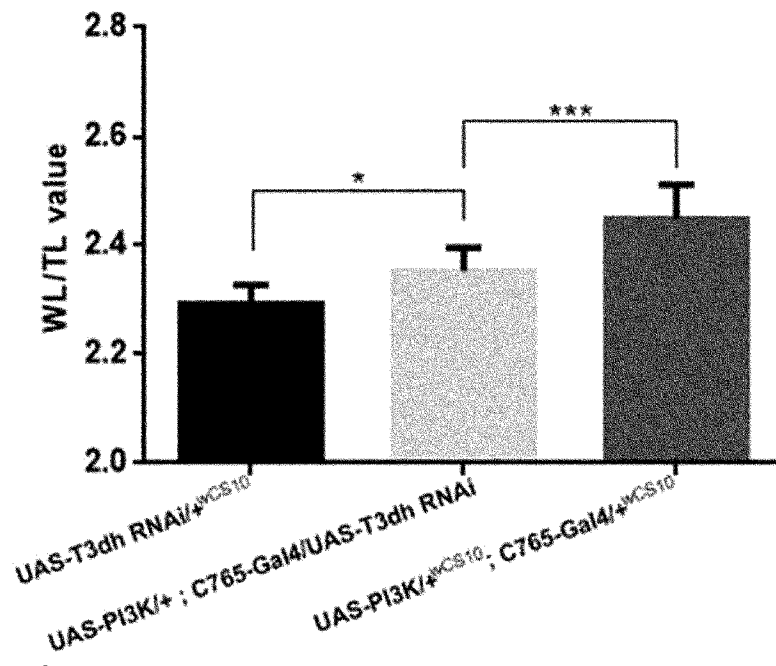
[도11]



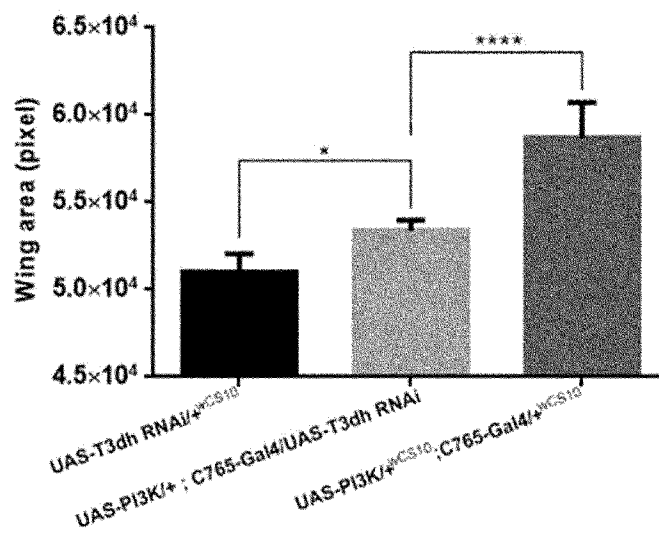
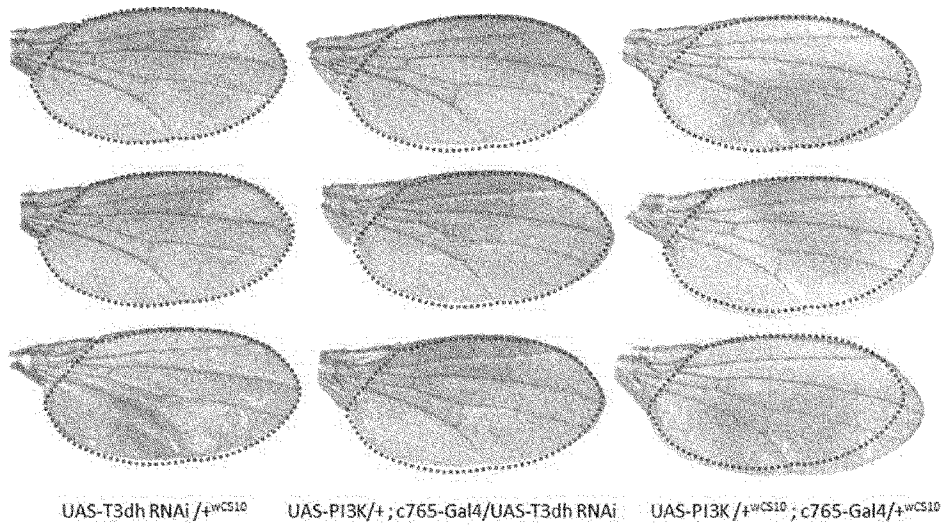
[도12]



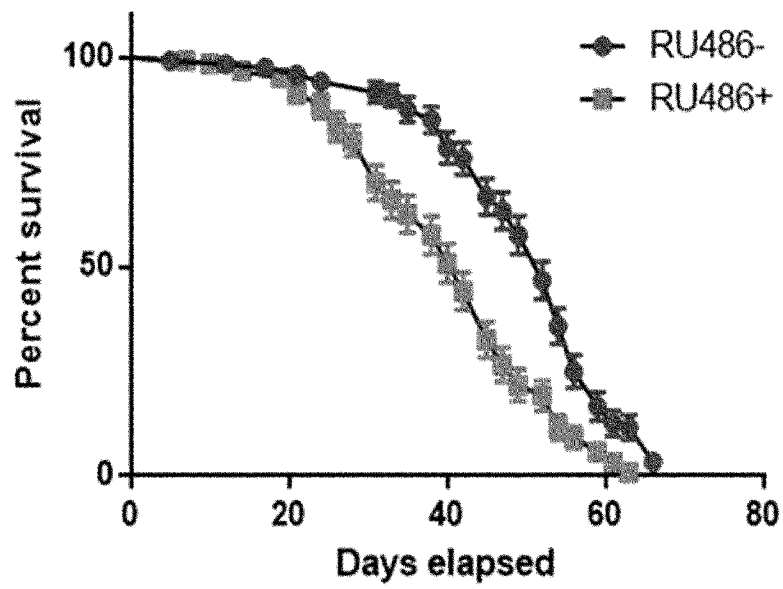
[도13]



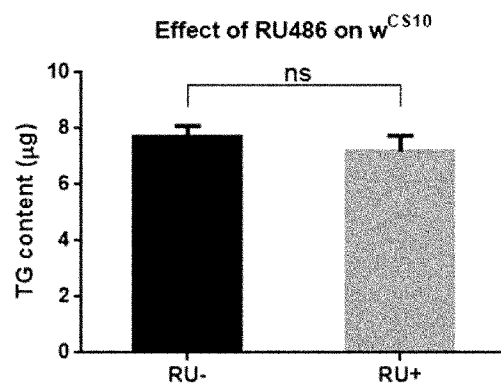
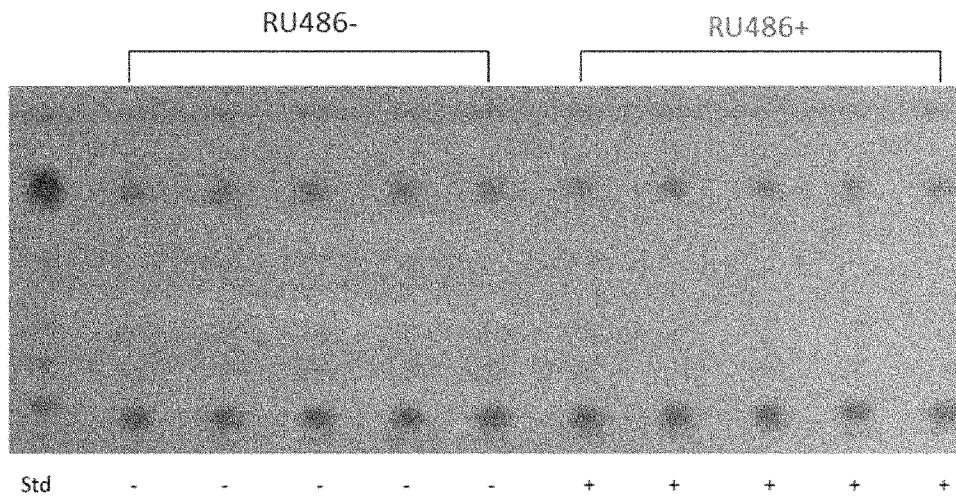
[도14]



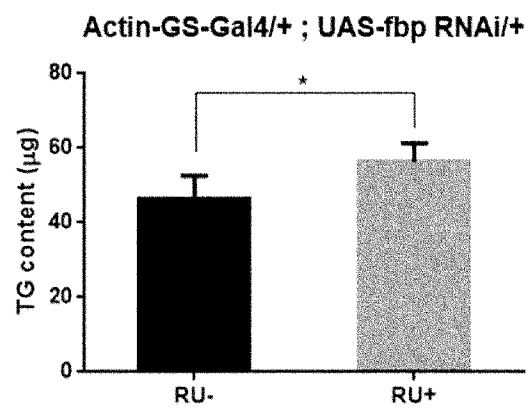
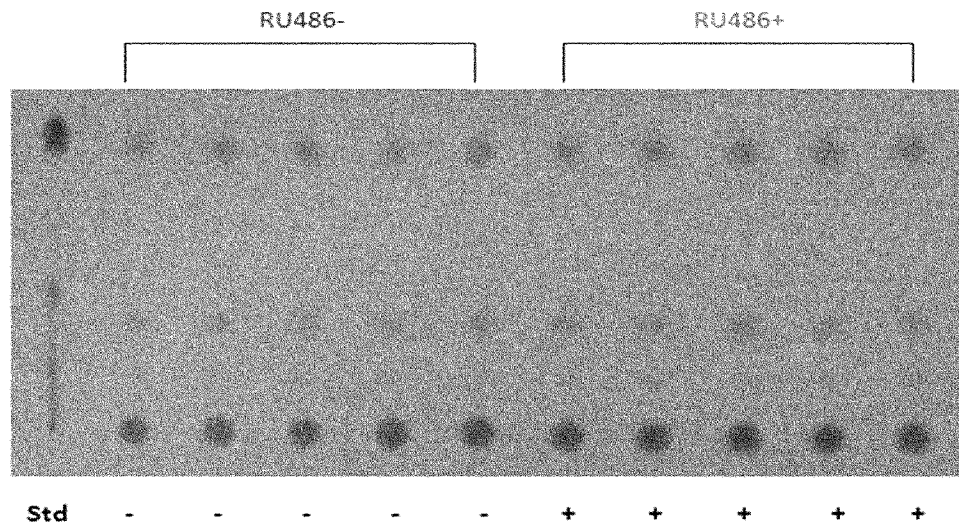
[도15]



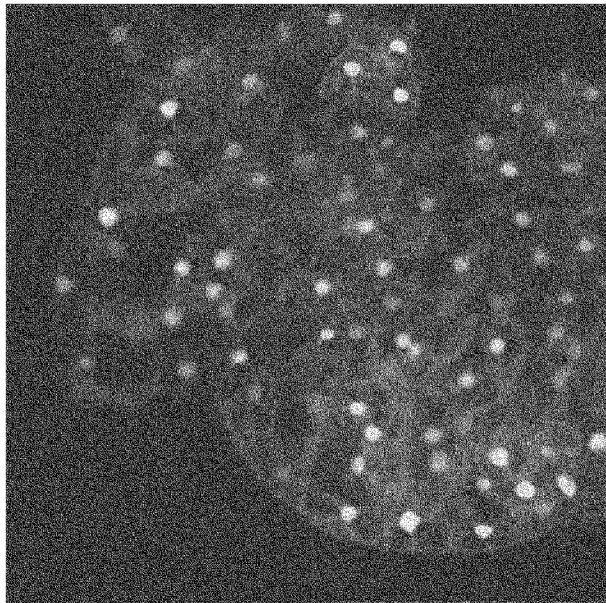
[도16]



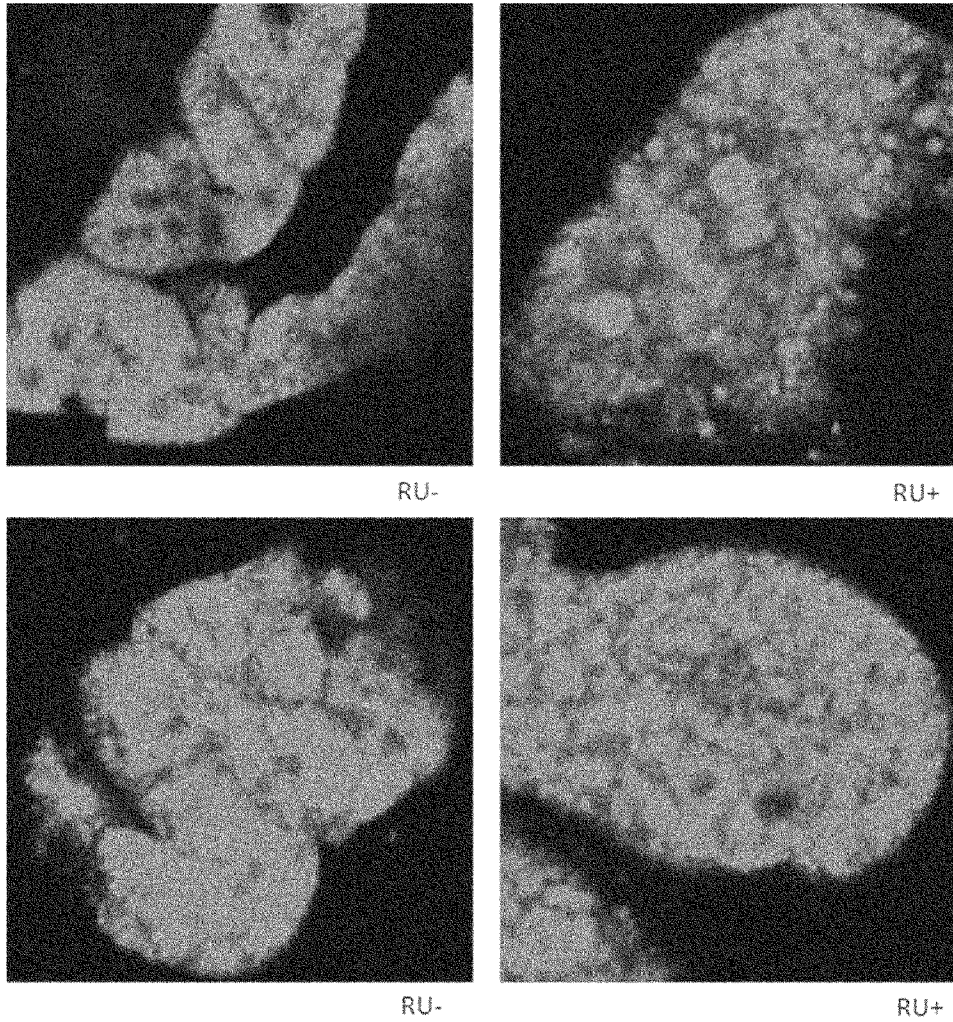
[도17]



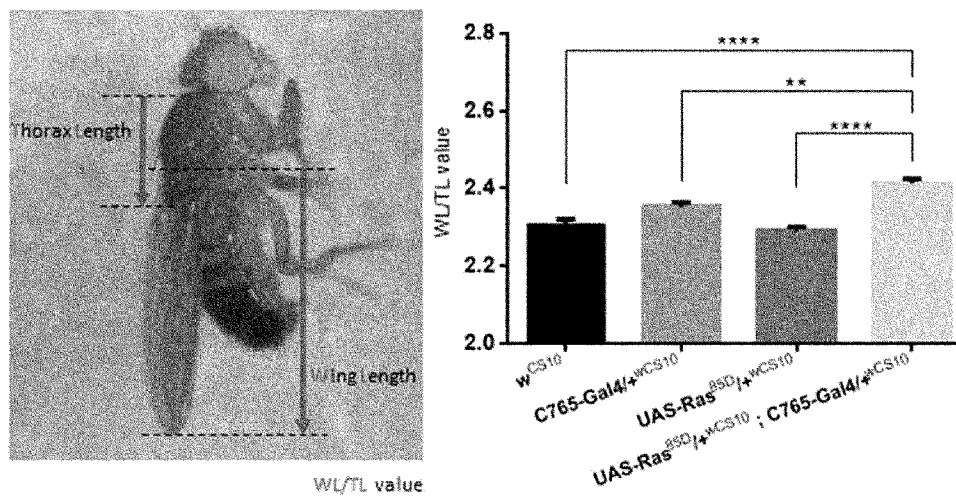
[도18]



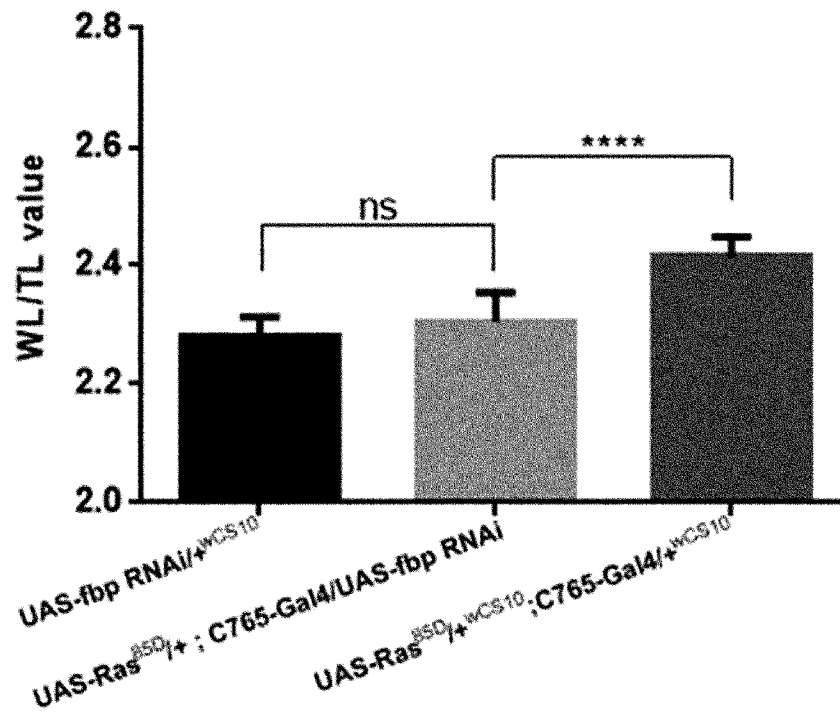
[도19]



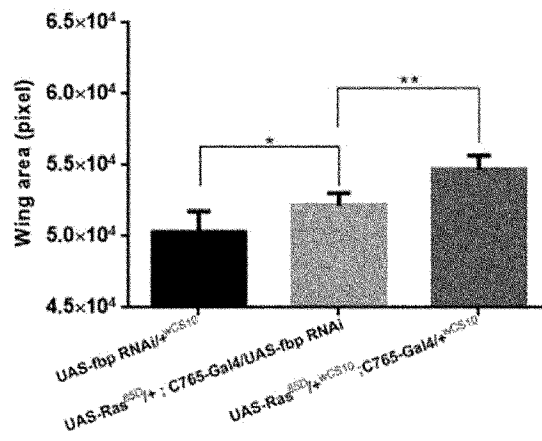
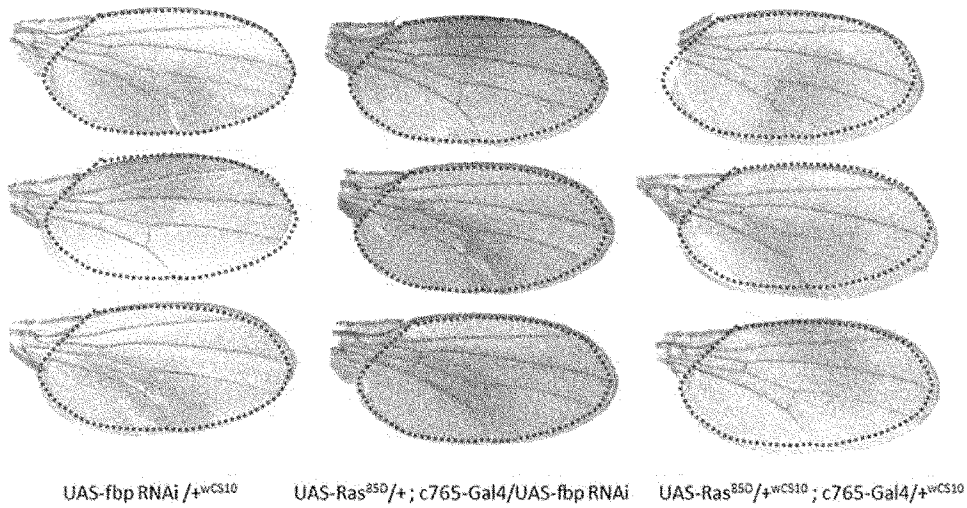
[도20]



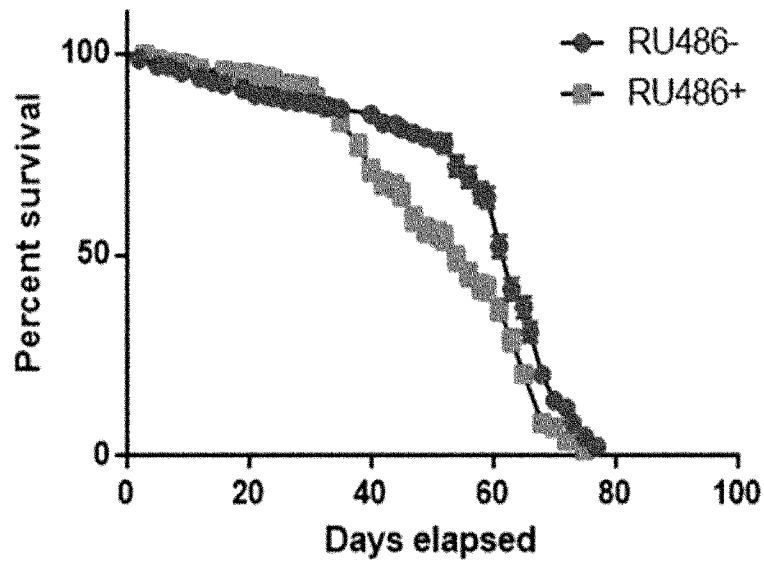
[도21]



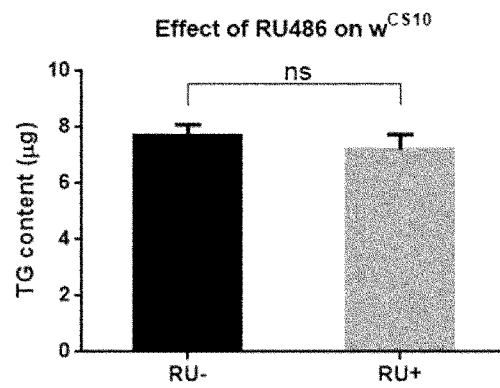
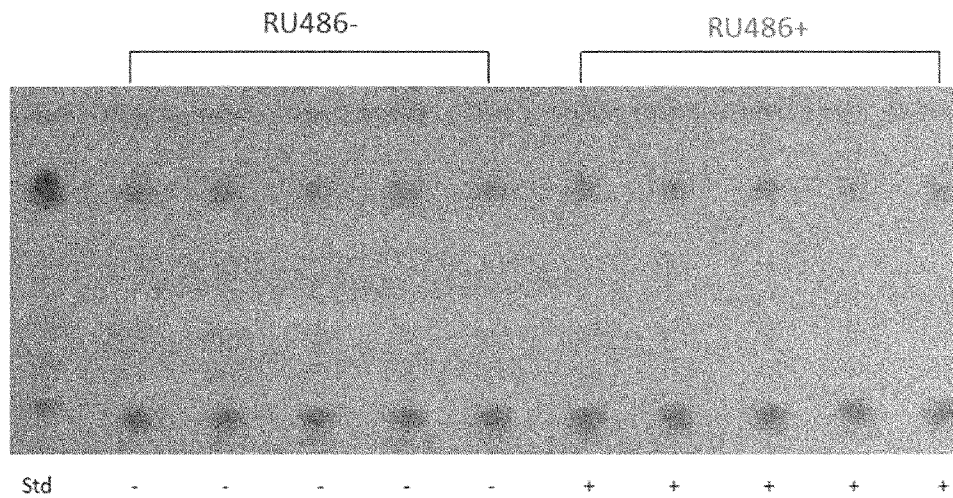
[도22]



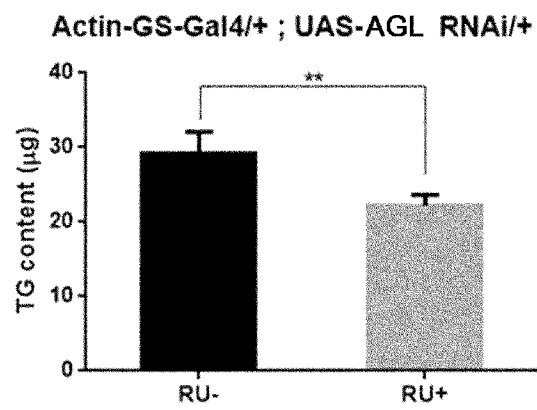
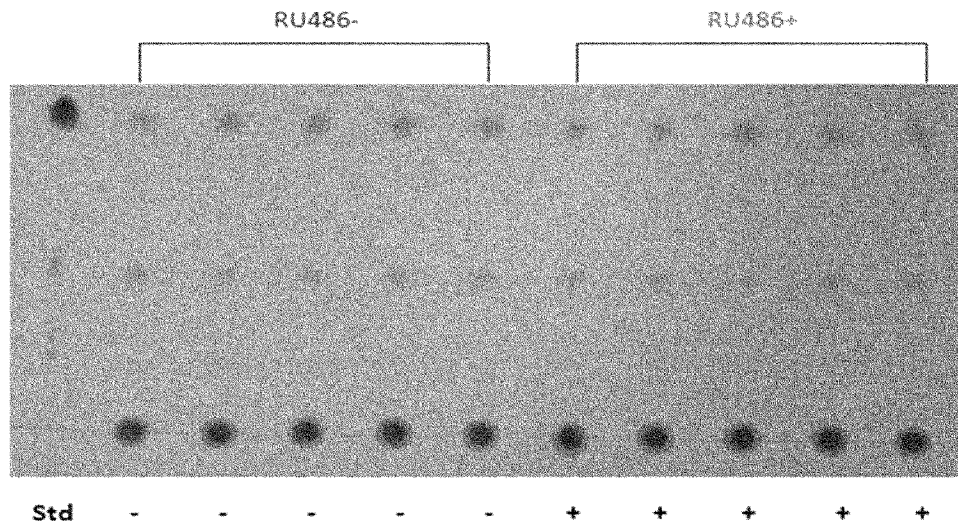
[도23]



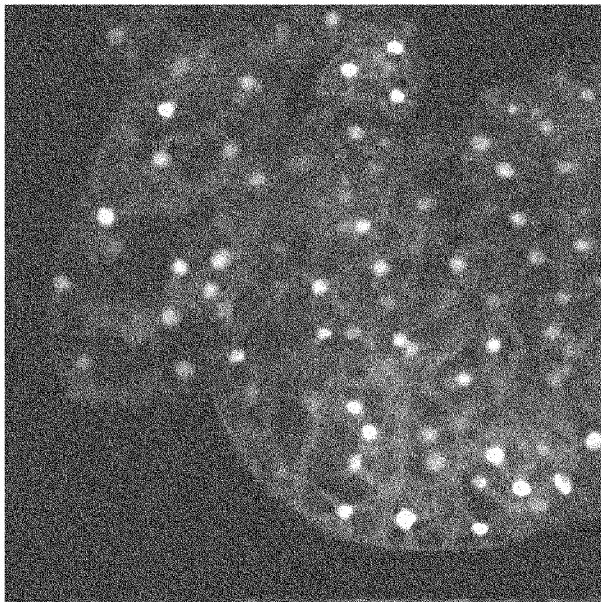
[도24]



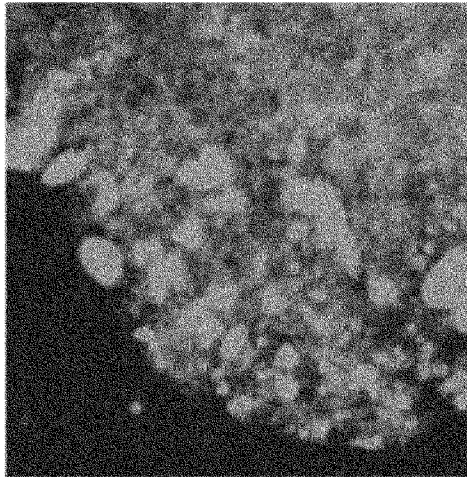
[도25]



[도26]



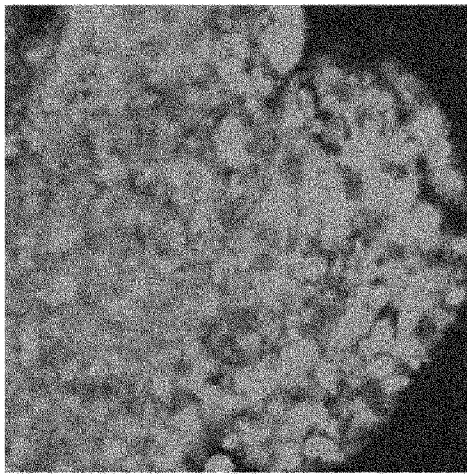
[도27]



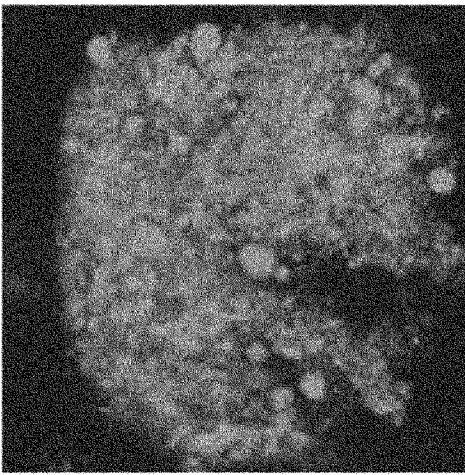
RU-



RU+

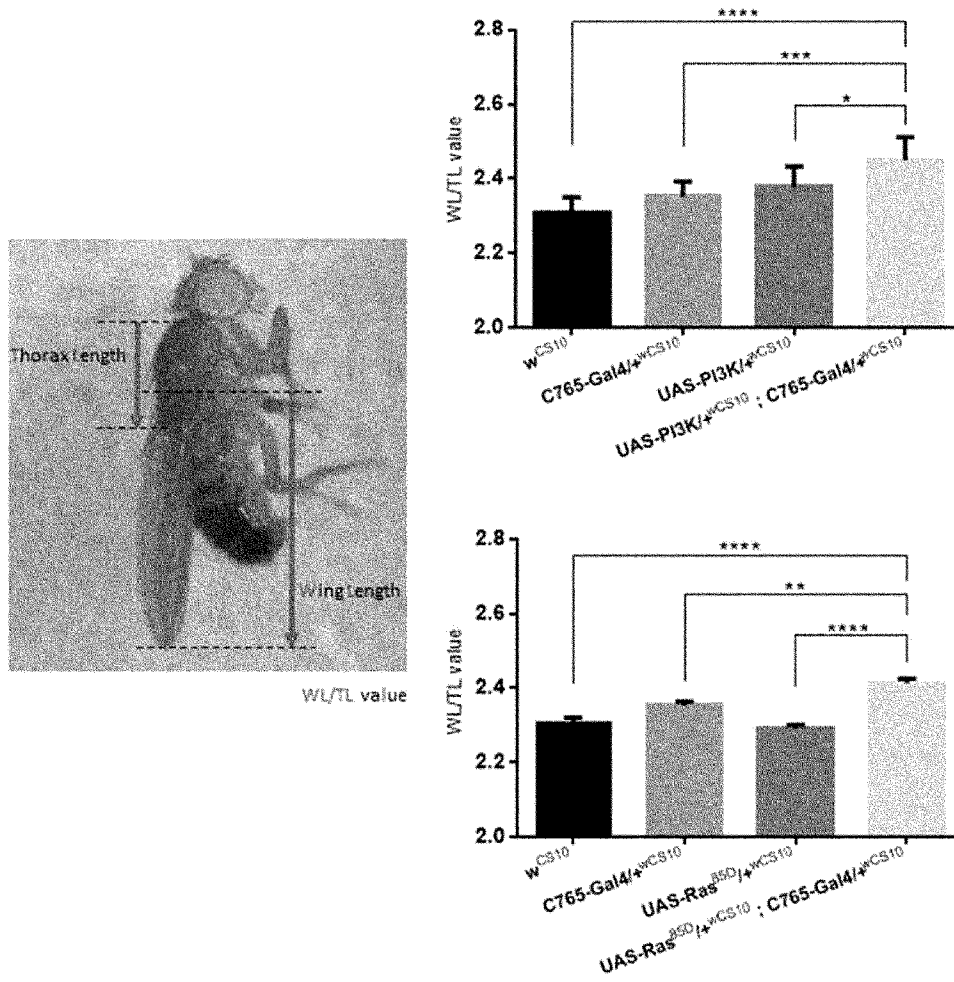


RU-

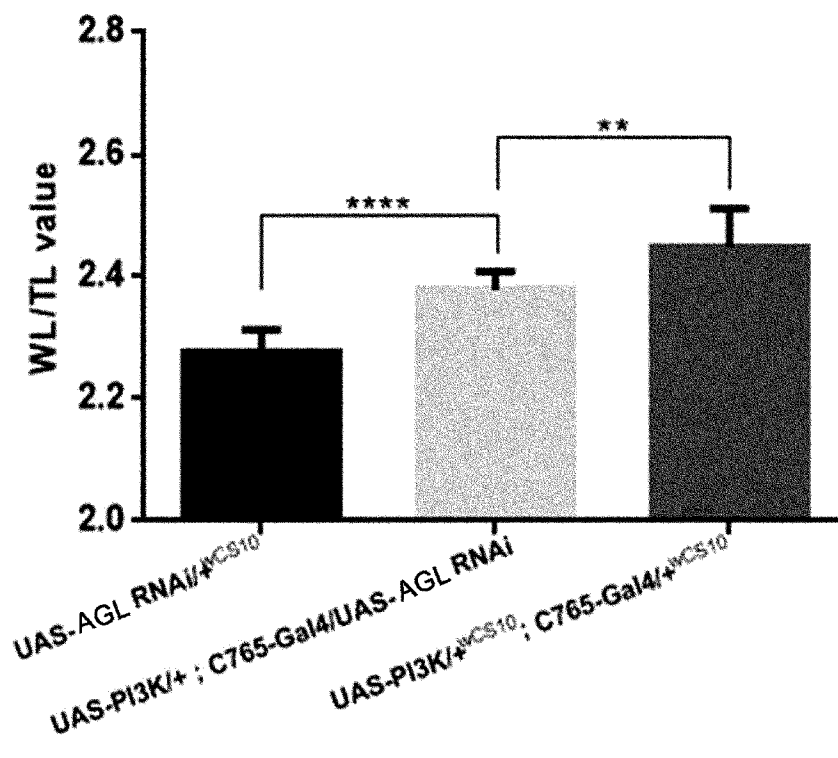


RU+

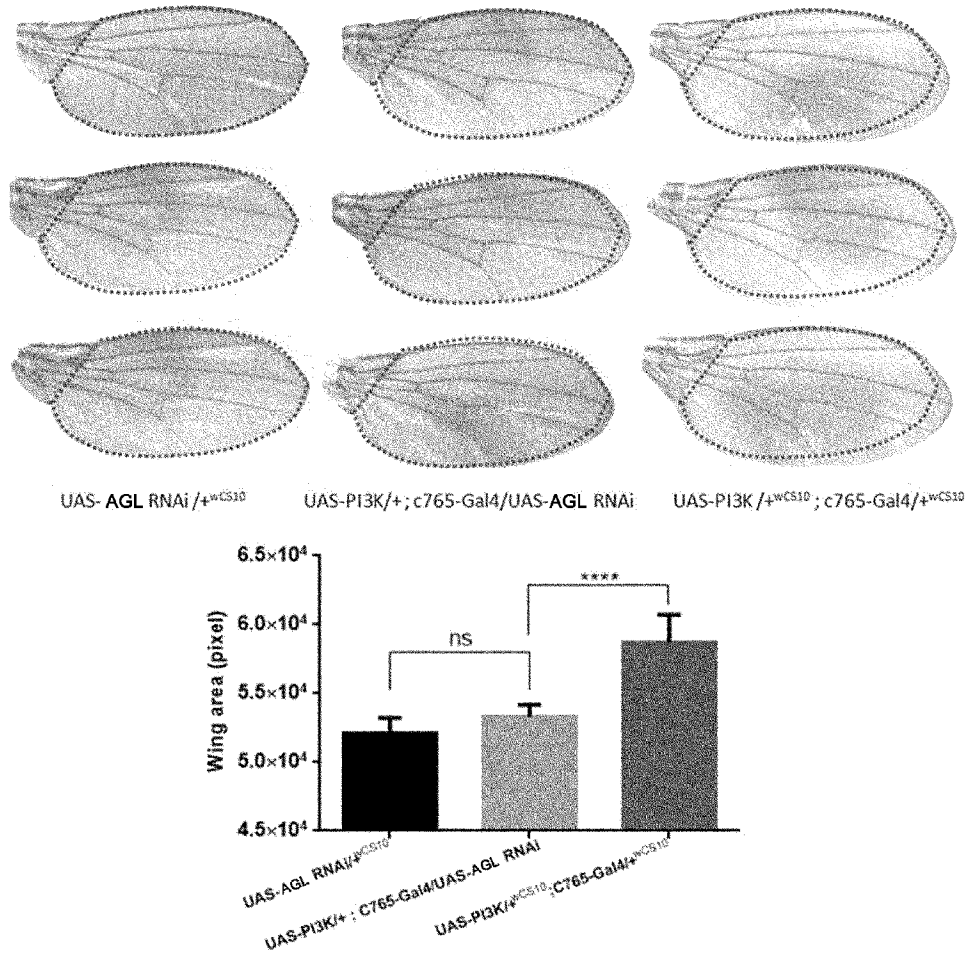
[도28]



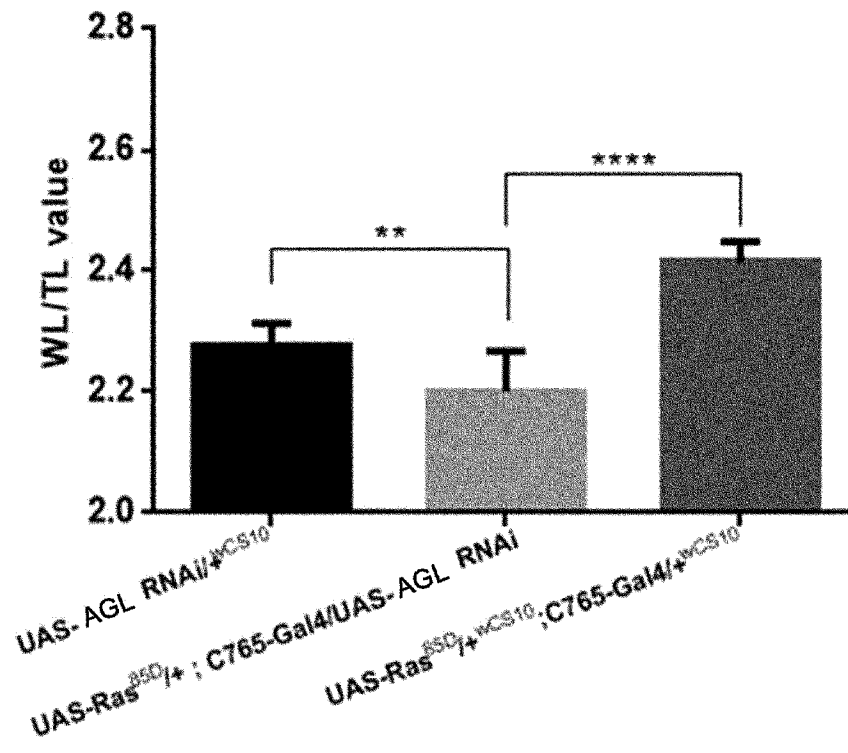
[도29]



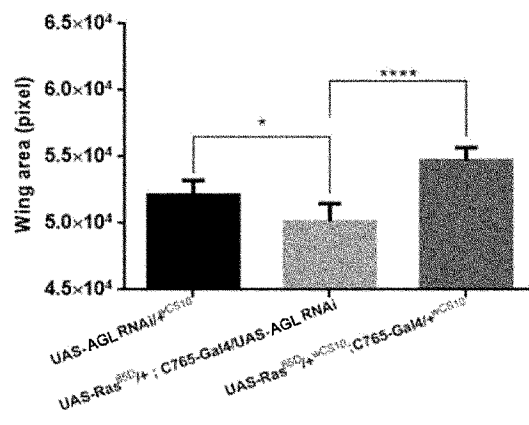
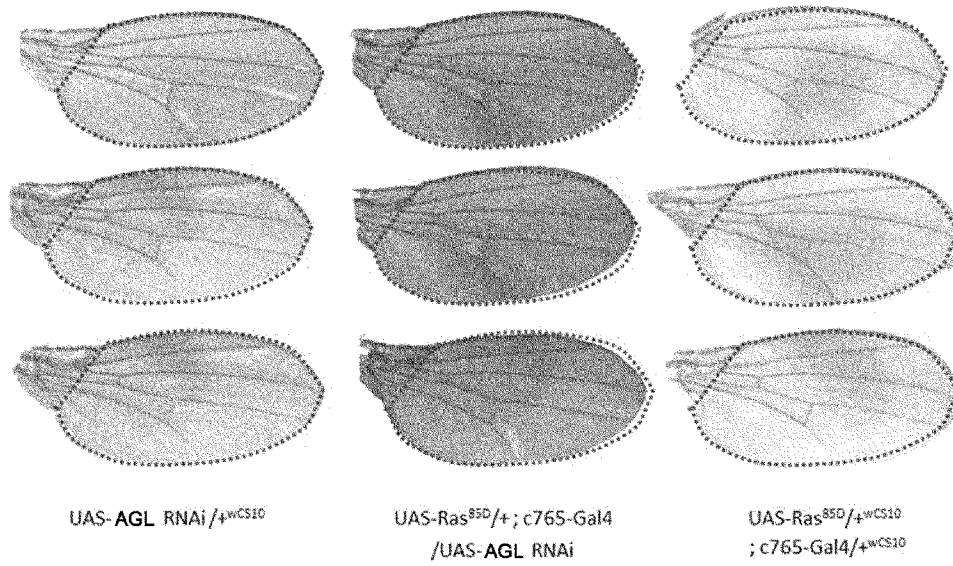
[도30]



[도31]



[도32]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/008024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(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)

C12Q 1/68; A61K 31/496; C07K 19/00; C12N 15/62; A61P 3/04; G01N 33/53; G01N 33/574; G01N 33/68

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: aging, obesity, cancer, determination, diagnosis, biomarker, kit, base sequence, complex diagnosis, T3dh

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	POSPISILIK et al., "Drosophila Genome-wide Obesity Screen Reveals Hedgehog as a Determinant of Brown Versus White Adipose Cell Fate", Cell, vol. 140, pages 148-160 (08 January 2010) See abstract and page 151, left column, paragraph [2]-page 152, left column, paragraph [1].	2,7,8,13
A		1,3-6,9-12,14,15
Y	NCBI, GenBank accession no. AY094924.1 (15 April 2002) See the entire document.	2,7,8,13
Y	US 2013-0030007 A1 (PENNINGER et al.) 31 January 2013 See abstract and paragraph [0129].	2,7,8,13
A	LEE et al., "Over-expression of Human Cluster in Increases Stress Resistance and Extends Lifespan in Drosophila Melanogaster", Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 420, pages 851-856 (2012) See the entire document.	1-15
A	KR 10-2007-0113586 A (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) 29 November 2007 See abstract and claims 1-6.	1-15



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

21 NOVEMBER 2016 (21.11.2016)

Date of mailing of the international search report

21 NOVEMBER 2016 (21.11.2016)

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/KR2016/008024

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 10-2014-0033618 A (MACROGEN INC. et al.) 19 March 2014 See abstract and claims 1-13.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/008024

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
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:

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:

- Group 1 (a part of each of claims 1-15):

The invention relating to a Type III alcohol dehydrogenase (T3dh, CG3425) gene of SEQ ID NO: 1

- Group 2 (a part of each of claims 1-15):

The invention relating to Fructose-1m6-bisphosphatase (fbp, CG31692) genes of SEQ ID NOs: 2-5

- Group 3 (a part of each of claims 1-15):

The invention relating to amylo-alpha-1,6-glucoside, 4-alpha-glucanotransferase genes (AGL, CG9485) of SEQ ID NOs: 6-11

Said genes do not have a technical relationship having the same or corresponding technical feature under PCT Rule 13.2. Therefore, the inventions of the present international application lack unity of invention.

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.:
Part of claims 1-5 (first group)

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/KR2016/008024

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0030007 A1	31/01/2013	CA 2786777 A1	14/07/2011
		EP 2521594 A2	14/11/2012
		EP 2633884 A1	04/09/2013
		JP 2013-516442 A	13/05/2013
		WO 2011-083150 A2	14/07/2011
		WO 2011-083150 A3	26/07/2012
KR 10-2007-0113586 A	29/11/2007	KR 10-0785391 B1	13/12/2007
KR 10-2014-0033618 A	19/03/2014	KR 10-2014-0033285 A	18/03/2014
		KR 10-2014-0033286 A	18/03/2014
		KR 10-2014-0033617 A	19/03/2014
		KR 10-2014-0033619 A	19/03/2014
		KR 10-2014-0033620 A	19/03/2014
		KR 10-2014-0033621 A	19/03/2014
		KR 10-2014-0033622 A	19/03/2014
		KR 10-2014-0033623 A	19/03/2014
		WO 2014-038884 A1	13/03/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 31/496; C07K 19/00; C12N 15/62; A61P 3/04; G01N 33/53; G01N 33/574; G01N 33/68

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: 노화, 비만, 암, 판별, 진단, 바이오마커, 키트, 염기서열, 복합 진단, T3dh

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	POSPISILIK 등, 'Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate', Cell, 140권, 페이지 148-160 (2010.01.08)	2,7,8,13
A	초록 및 페이지 151, 왼쪽 컬럼, 문단 2-페이지 152, 왼쪽 컬럼, 문단 1 참조.	1,3-6,9-12,14,15
Y	NCBI, GenBank accession no. AY094924.1 (2002.04.15)	2,7,8,13
Y	전체 문헌 참조.	
Y	US 2013-0030007 A1 (PENNINGER 등) 2013.01.31	2,7,8,13
Y	초록 및 문단 [0129] 참조.	
A	LEE 등, 'Over-expression of human clusterin increases stress resistance and extends lifespan in Drosophila melanogaster', Biochemical and Biophysical Research Communications, 420권, 페이지 851-856 (2012)	1-15
A	전체 문헌 참조.	
A	KR 10-2007-0113586 A (한국 한의학 연구원) 2007.11.29	1-15
A	요약 및 청구항 1-6 참조.	

☒ 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

2016년 11월 21일 (21.11.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 11월 21일 (21.11.2016)

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
A	KR 10-2014-0033618 A (주식회사 마크로젠 등) 2014.03.19 요약 및 청구항 1-13 참조.	1-15

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

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

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
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.

- 제1그룹(청구항 1-15의 각 항 일부) :
서열번호 1의 T3dh(Type III alcohol dehydrogenase, CG3425) 유전자에 대한 발명
- 제2그룹(청구항 1-15의 각 항 일부) :
서열번호 2 내지 5의 fbp(Fructose-1m6-bisphosphatase, CG31692) 유전자에 대한 발명
- 제3그룹(청구항 1-15의 각 항 일부) :
서열번호 6 내지 11의 AGL(amylo-alpha-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase, CG9485) 유전자에 대한 발명

상기 유전자들은 PCT 규칙 13.2에서 규정하는 동일하거나 상응하는 기술적 특징을 포함하는 기술적 관계가 없습니다. 따라서, 이 국제출원의 발명 사이에는 단일성이 없습니다.

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.
1-15의 일부(제1그룹)

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
US 2013-0030007 A1	2013/01/31	CA 2786777 A1 EP 2521594 A2 EP 2633884 A1 JP 2013-516442 A WO 2011-083150 A2 WO 2011-083150 A3	2011/07/14 2012/11/14 2013/09/04 2013/05/13 2011/07/14 2012/07/26
KR 10-2007-0113586 A	2007/11/29	KR 10-0785391 B1	2007/12/13
KR 10-2014-0033618 A	2014/03/19	KR 10-2014-0033285 A KR 10-2014-0033286 A KR 10-2014-0033617 A KR 10-2014-0033619 A KR 10-2014-0033620 A KR 10-2014-0033621 A KR 10-2014-0033622 A KR 10-2014-0033623 A WO 2014-038884 A1	2014/03/18 2014/03/18 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/19 2014/03/13