



- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005913
- (22) 국제출원일: 2014년 7월 2일 (02.07.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0054973 2014년 5월 8일 (08.05.2014) KR
- (71) 출원인: 한국식품연구원 (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) [KR/KR]; 463-746 경기도 성남시 분당구 안양관교로 1201 번길 62, Gyeonggi-do (KR). 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) [US/US]; 55455-2020 미네소타주 미네아폴리스 오크 스트리트, 에스이 200 맥나마라알럼니센터 600, Minnesota (US).
- (72) 발명자: 정창화 (JUNG, Chang Hwa); 137-040 서울시 서초구 신반포로 32 반포아파트 3 동 306 호, Seoul (KR). 하태열 (HA, Tae Youl); 135-270 서울시 강남구 남부순환로 365 길 16, 대림아파트 102 동 803 호, Seoul (KR). 안지윤 (AHN, Ji Yun); 463-060 경기도 성남시 분당구 양현로 138 이매촌진흥아파트 801 동 301 호, Gyeonggi-do (KR). 김도형 (KIM, Do Hyung); 55126 미네소타주 쇼어뷰 테니스 에비뉴 249, Minnesota (US).

박지만 (PARK, Ji Man); 55414 미네소타주 미네아폴리스 175B APT 사우스이스트 텔라웨어 스트리트 2508, Minnesota (US).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301 호, 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, 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, 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.

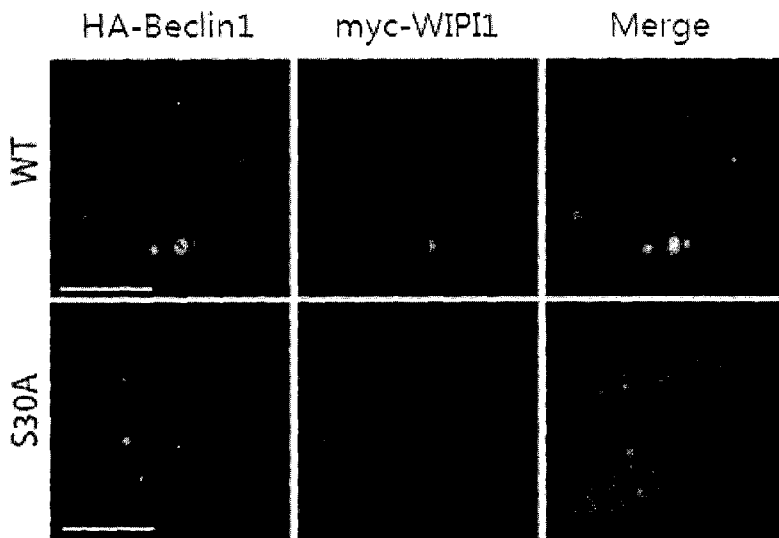
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,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

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING FOR AUTOPHAGY ACTIVATOR OR INHIBITOR

(54) 발명의 명칭: 자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법

Fig. 7



(57) Abstract: The present invention provides a method for screening for an autophagy activator or inhibitor comprising the steps of: (a) making a test material to be analyzed come into contact with cells containing Beclin1 protein; and (b) analyzing the degree of phosphorylation at the 30th serine amino acid residue of the Beclin1 protein. The test material is determined to be an autophagy activator when the phosphorylation of the Beclin1 protein is up-regulated, and the test material is determined to be an autophagy inhibitor when the phosphorylation of the Beclin1 protein is down-regulated. The present invention first establishes, by ULK1, the mechanism of phosphorylation at the 30th serine amino acid residue of Beclin1.

(57) 요약서: 본 발명은 (a) Beclin1 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation) 정도를 분석하는 단계를 포함하는 자가포식(autophagy) 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 상향-조절(up-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 활성화제(activator)로 판정하고, 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절(down-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 억제제(inhibitor)로 판정한다. 본 발명은 ULK1 이 Beclin1 의 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화하는 기작을 최초로 규명한다.

의 인산화가 상향-조절(up-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 활성화제(activator)로 판정하고, 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절(down-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 억제제(inhibitor)로 판정한다. 본 발명은 ULK1 이 Beclin1 의 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화하는 기작을 최초로 규명한다.



공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법

5 【기술 분야】

본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원 하에서 과제번호 E0131601에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국식품연구원, 연구사업명은 “한국식품연구원 주요사업”, 연구과제명은 “전통식품 phytochemicals의 체내동태 해석 연구”, 주관기관은 한국식품연구원, 연구기간은 2013. 01. 01 ~ 2013. 12. 31 이다.

본 특허출원은 2014년 05월 08일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2014-0054973 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 자가포식(autophagy) 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

【배경 기술】

자가포식(Autophagy)의 일반적인 기능은 세포내 영양분이 부족한 환경에서 세포가 자신의 불필요한 단백질, 노화된 소기관 등을 지질 2 중층으로 구성된 자식포(membrane vacuole, autophagosome)가 둘러싼 후 라이소좀과 합쳐져 둘러싸인 내부 물질을 분해하도록 유도함으로써 세포내 영양분을 재공급하는 시스템으로 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 이러한 자가포식이 세포성장, 분화, 신진대사 조절, 암, 뇌 질환, 면역 등 다양한 인간의 생리적 및 병리적 상태를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다는 사실이 속속 밝혀지고 있어 전 세계적으로 많은 관심을 갖고 있다.

자가포식은 작동기작과 기능에 따라 거대 자가포식(macroautophagy), 미세 자가포식(microautophagy) 및 샤페론 매개 자가포식(Chaperone Mediated Autophagy; CMA)로 나누어 지는데, 이들 세 종류의 자가포식은 세포내에 공존하면서 개별적인 형태로 서로 다르게 유도된다. 예를 들면, 정상세포 조건에서도 자가포식은 일어나고 있지만, 영양소 결핍 같은 조건에서는 거대 자가포식이 빠르게 유도되고 6-8 시간

스트레스가 유지되면 거대 자가포식은 점차적으로 줄어들며 12-24 시간에서는 CMA 유도가 이루어진다. 자가포식은 분해되는 카고(cargo) 타입에 따라 다양하게 분류되는데, 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 제거함으로써 세포의 손상을 보호하는 미토파지(mitophagy)가 있고, 리보솜(ribosomes), 소포체(endoplasmic reticulum) 및 퍼옥시좀(peroxisomes)을 분해하는 과정에 따라 리보파지(ribophagy), 레티큘파지(reticulphagy) 및 퍼옥소파지(pexophagy)로 각각 분류된다. 또한 최근 거대 자가포식이 지방산에 의해 생성되는 세포내 지방구(lipid droplet)의 직접적인 분해에도 관여하는 거대지질 자가포식(macrolipophagy)를 소개하고 있다. 비록 다양한 질환 모델에서 자가포식의 기능이 밝혀지고 있으며 많은 관심을 갖고 있음에도 불구하고 아직까지 정확한 메커니즘과 관여하는 분자의 기능에 대해서 많이 알려져 있지는 않다.

한편, 자가포식 메커니즘에 관여하는 Beclin1 관련 특허로, EP 2383294 는 Beclin1 의 Thr119 인산화 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 신경퇴행성 질환을 치료 또는 진단하는 기술을 개시하고 있고, US 6432914 는 Beclin1 자체를 단백질 의약품으로 이용하여 암을 치료하는 기술을 개시하고 있으며, US 5858669 는 Beclin1 의 돌연변이를 이용하여 암을 진단하는 기술에 대하여 개시하고 있다.

20

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

25

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 자가포식(autophagy)을 조절할 수 있는 자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation)

30

정도를 분석하여 자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝 할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 자가포식 활성화제를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 데 있다.

5 본 발명의 다른 목적은 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

10

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 자가포식(autophagy) 활성화제 또는 억제제를 스크리닝 하는 방법을 제공한다:

15 (a) Beclin1 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation) 정도를 분석하는 단계; 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 상향-조절(up-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식
20 활성화제(activator)로 판정하고, 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절(down-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 억제제(inhibitor)로 판정한다.

본 발명자들은 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는
25 자가포식(autophagy)을 조절할 수 있는 자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation) 정도를 분석하여 자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝 할 수 있음을 규명하였다.

30

본 발명의 상기 자가포식은 세포내 영양분이 부족한 환경에서 세포가 자신의 불필요한 단백질, 노화된 소기관 등을 지질 이중층으로 구성된 자식포로 둘러싼 후 라이소좀과 합쳐져 둘러싸인 내부 물질을 분해하도록 유도함으로써 세포내 영양분을 재공급하는 시스템이다.

5 본 발명의 자가포식 활성제를 스크리닝하는 방법을 단계별로 상세히 설명한다

단계 (a): 시험 물질의 접촉

10 먼저, Beclin1 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉한다.

상기 Beclin1 단백질을 포함하는 세포는 당업계의 어떠한 동물 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 293T 세포, HEK293T 세포, MEF(Mouse Embryonic Fibroblasts) 또는 HeLa 세포를 이용할 수 있다.

15 상기 동물세포를 배양하기 위해 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, Eagle's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., *Nat. New Biol.* 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., *J. Exp. Med.* 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 20 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)), F12 (Ham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. *Exp. Cell Res.* 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., *Virology* 8:396(1959)), DMEM 과 F12 의 혼합물 (Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 25 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., *In Vitro* 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다.

30 본 발명의 방법에 따르면, 우선 Beclin1 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험 물질”은 Beclin1 단백질의 30 번째

세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation)에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험 물질은 화합물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험

5 물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA),

10 Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러렐 고상 또는 액상

15 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909,

20 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

25

단계 (b): 인산화(phosphorylation) 정도의 분석

다음, 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화 정도를 분석한다. 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 상향-조절(up-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 활성화제(activator)로

30 판정하고, 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절(down-

regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 억제제(inhibitor)로 판정한다.

상기 자가포식 활성제는 암 또는 신경퇴행성 질환을 진단 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물로 이용될 수 있다(참조; EP 2383294).

5 본 명세서에서 사용되는 용어 “상향-조절”은 자가포식 신호전달이 활성화되지 않은 때[예컨대, 동물 세포의 정상(normal) 상태]를 기준으로 Beclin1 단백질의 30 번째 세린 아미노산 잔기의 인산화 정도가 시험 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 증가된 양상을 나타내는 경우에, 이를 Beclin1 단백질의 인산화가 상향-조절되었다고 판단한다.

10 본 명세서에서 사용되는 용어 “하향-조절”은 공지된 자가포식-유도 활성제인 아미다론 히드로클로라이드(Amiodarone hydrochloride), 프리펠딘 A(Brefeldin A), 카르바마제핀(Carbamazepine), 덱사메타손(Dexamethasone), 돌소몰핀 다이히드로클로라이드(Dorsomorphin dihydrochloride), EB 1089(비타민 D 수용체 아고니스트), GF 109203X(프로테인 키나아제 C 15 억제제), L-690,330(이노시톨모노포스페이트 억제제), NF 449(P2X1 안타고니스트), 니클로사마이드(Niclosamide), 니모디핀(Nimodipine), 니트리디핀(Nitrendipine), PI 103 히드로클로라이드(PI 3-키나아제, mTOR 및 DNA-PK 의 억제제), 피피스린-α 히드로브로마이드(Pifithrin-α hydrobromide), 라파마이신(Rapamycin), 로트렐린(Rottlerin), SMER 28, 20 테모졸로마이드(Temozolomide), 탐시가르긴(Thapsigargin), 토린(Torin), 투니카마이신(Tunicamycin), 발포산(Valproic acid) 및 베라파밀 히드로클로라이드(Verapamil hydrochloride)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성제를 처리하는 경우에 시험 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 Beclin1 단백질의 30 번째 세린 아미노산 잔기의 인산화 25 정도가 감소된 양상을 나타내는 경우에, 이를 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절되었다고 판단한다.

상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화 정도를 분석하기 위해서는 당업계의 어떠한 인산화 분석 방법도 이용할 수 있으며, 예컨대, 웨스턴 블롯(Burnette WN. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and 30

radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry* 112 (2): 195-203), ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 (12): 2415-8) 및 세포내 유동 세포분석법(Intracellular Flow Cytometry, <http://www.abcam.com/?pageconfig=resource&rid=12060>)을 이용할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린 아미노산 잔기의 인산화 정도의 분석은 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 실시한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 서열목록 제 1 서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 에피토프에 결합하는 항체이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 시료에 접촉하는 단계를 포함하는 자가포식(autophagy) 활성 측정하는 방법을 제공한다.

본 명세서에서, 용어 “시료”는 배양된 세포(cultured cell), 동물 또는 인간의 뇌(brain), 눈(eye), 심장(heart), 장(intestine), 신장(kidney), 간(liver), 허파(lung), 근육(muscle), 비장(spleen), 또는 정소(testis)로부터 얻은 조직(tissue), 혈액(blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 뇨액(urine), 타액(saliva), 땀(sweat), 정액(semen) 또는 점액(mucus) 등의 체액(body fluid)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 자가포식-관련 질환(autophagy-related disease)의 진단 키트를 제공한다.

상기 자가포식-관련 질환은 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 대사 질환, 과오종 증후군, 유전성 근육 질환, 근 질환 또는 암이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

본 명세서에서, 용어 “항체(antibody)”는 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 대한 특이 항체로서, 완전한 항체
5 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다.

완전한 항체는 2 개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마 1($\gamma 1$), 감마 2($\gamma 2$),
10 감마 3($\gamma 3$), 감마 4($\gamma 4$), 알파 1($\alpha 1$) 및 알파 2($\alpha 2$)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다(Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, sinauer Associates,
15 Inc., Sunderland, MA (1984)).

본 명세서에서, 용어 “항원 결합 단편”은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1 개의 항원 결합
20 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합
25 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서
30 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수

있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab 를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

본 발명에서 항체는 바람직하게는 Fab 형태이거나 완전한 항체 형태이다. 또한, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 불변영역은 감마 1(IgG1), 감마 3(IgG3) 및 감마 4(IgG4)이이고, 가장 바람직하게는 감마 1(IgG1) 이소타입이다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 형일 수 있으며, 바람직하게는 카파형이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 항체는 카파(κ) 경쇄와 감마 1(γ 1) 중쇄를 가지는 Fab 형태 또는 IgG1 형태이다.

본 명세서에서, 용어 “중쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3 개의 불변 영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3 를 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한 본 명세서에서 용어 “경쇄”는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변 영역 도메인 CL 을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.

본 발명의 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질을 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서 첨부한 서열목록에 기재된 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다.

이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한

고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신 (+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 쓰레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).

단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제 4,554,101 호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스파르테이트(+3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트 (+3.0 $\pm$ 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 쓰레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).

친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 항체 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx 와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST 는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html 에서 확인할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항체는 서열목록 제 1 서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 에피토프에 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 항체이다.

5 본 발명의 자가포식 활성제를 유효성분으로 포함하는 자가포식-관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 자가포식 활성제의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본
10 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 자가포식 활성제의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에
15 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은
20 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며,
25 바람직하게는 경구 비투여 방식으로 적용된다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-100
30 mg/kg 범위 내이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물로 예방 또는 치료할 수 있는 자가포식-관련 질환은 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 대사 질환, 과오종 증후군, 유전성 근육 질환, 근 질환 또는 암이다.

상기 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 헌팅턴 질환(Huntington's disease) 및 근위축성 측색 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 신경퇴행성 질환이다.

상기 자가면역 질환은 알로페시아 그레아타(alopecia greata), 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 아디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 복강 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역이상 증후군, 만성염증성 탈수초 다발성 신경병증, Churg-Strauss 증후군, 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한냉 응집소 질환, 크론씨병, 원관성 낭창, 북태성복합한냉글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 사구체신염, 그레이브스 질환, 켈레인 바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, IgA 신경염, 연소자성 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병, 혼합성 연결 조직 질환, 다발성 경화증, 타입 I 또는 면역-매개 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결정성 다발동맥염, 다발연골염, 자가면역성 다선 증후군, 류마티스 다발성근통, 다발성 근염과 피부근염, 일차성 무감마글로불린혈증, 일차성 담증성 간경변, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 공피증, 강직인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 다가야스 동맥염, 일시적 동맥염, 거대세포 동맥염, 케양성

대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증으로 구성된 군으로부터 선택되는 자가면역질환이다.

상기 심혈관질환은 광동맥성심장병, 심근증, 고혈압성심장질환, 심부전, 폐성심, 심울동장애, 심장 내막염, 염증성 심비대증, 심근염, 심장판막증, 뇌혈관장애, 하지동맥질환, 선천성 심질환 및 심장 류머티즘으로 구성된 군으로부터 선택되는 심혈관질환이다.

상기 대사질환은 비만, 당뇨, 이상지방혈증, 지방간, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 및 고인슐린혈증으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환이다.

상기 암은 뇌하수체선종, 신경교종, 뇌종양, 상인두암, 후두암, 흉선종, 중피종, 유방암, 폐암, 위암, 식도암, 대장암, 간암, 췌장암, 췌내분비종양, 담낭암, 음경암, 요관암, 신세포암, 전립선암, 방광암, 비호지킨성림프종, 골수이형성증후군, 다발성골수종, 형질세포성종양, 백혈병, 소아암, 피부암, 난소암, 및 자궁경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암이다.

【효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 자가포식(autophagy) 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

(b) 본 발명은 ULK1 이 Beclin1 의 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화하는 기작을 최초로 규명한다.

(c) 본 발명은 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1a 및 도 1b 는 ULK1 에 의한 Beclin1 의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2 는 ULK1 에 의한 Beclin1 의 직접 인산화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3 은 ULK1 에 의한 Beclin1 의 Ser30 인산화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4 는 기아 상태(starvation)에서 Beclin1 의 Ser30 인산화를 확인한 결과는 나타낸다.

5 도 5 는 라파마이신(rapamycin)을 처리하여 Beclin1 의 Ser30 인산화를 확인한 결과는 나타낸다.

도 6 은 토린(torin)을 처리하여 Beclin1 의 Ser30 인산화를 확인한 결과는 나타낸다.

10 도 7 은 자가포식(autophagy) 활성화에 대한 Beclin1 의 Ser30 인산화의 중요성을 보여준다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 15 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

20 시약 및 항체

항-ULK1(sc-10900) 및 Beclin 1(sc-11427 및 sc-10086) 항체는 Santa Cruz Biotech 로부터 구매하였다. 항-Atg14L 항체 는 MBL(PD026) 및 Abgent(AP1832a)로부터 구하였다. 항-myc 9E10 은 EMD Biosciences(OP10)로부터 구매하였고, 항-HA 항체 HA.11 은 Covance(AFC- 25 101P)로부터 구매하였다.

플라스미드 제조 및 돌연변이 유발

인간 ULK1 및 Atg13 cDNA 클론을 Katzusa 연구소로부터 얻었다. ULK1 및 M92A 의 키나아제-데드(kinase-dead) 돌연변이를 부위-특이적 30 돌연변이 유발 키트(Stratagene, 미국)를 이용하여 제조하였다. 인간 Beclin1 에 대한 cDNA 는 Open Biosystems 으로부터 구매하였다.

세포 배양 및 트랜스펙션

HEK293T, HeLa 및 MEF 세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Invitrogen, 미국)에서
 5 37°C/5% CO₂ 조건 하에 배양하였다. 일시적 발현을 위해, FuGENETM(Rochediagnostics)를 이용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 세포를 재조합 DNA 로 트랜스펙션하였다. 동시-면역침전법을 실시하기 위해, 트랜스펙션 후 2 일 후에 세포를 수득하였다.

10 동시-면역침전법 및 웨스턴블롯

동시-면역침전법을 실시하기 위해, 40 mM HEPES, pH 7.4, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 10 mM Mb-글리세로포스페이트, 1% 트리톤 X-100 및 프로테아제 억제제(Roche)를 포함하는 완충액에 세포
 15 추출물을 준비하였다. 면역침전된 단백질을 용해 완충액을 사용하여 4 차례 세척하고, 8% 트리스-글라이신 겔에 로딩하였다. 이를 PVDF(Polyvinylidene difluoride) 막(Bio-Rad, 미국)에 전송하여 웨스턴 블롯 검출 시약(Perkin-Elmer, 미국)으로 검출하였다.

렌티바이러스 준비

Atg14L 또는 스크램블 서열을 표적하는 shRNA 를 코딩하는
 20 렌티바이러스 벡터 pLKO.1 를 렌티바이러스 팩키징 벡터 pHR'8.2△R 및 pCMV-VSV-G 와 함께 FuGENE 6 를 사용하여 HEK293T 에 도입하였다. 트랜스펙션 60 시간 후에 바이러스를 수득하고, 폴리브린(polybrene) 처리 하에 수득한 바이러스를 HeLa 에 감염시켰다. 퓨로마이신(puromycin)을
 25 처리하여 트랜스펙션된 세포를 선별하였다. Atg14L shRNA 에 대한 표적 서열은 5'-CCATAGAACTTGGTCATGTTT-3' 및 5'-CCACTTTCTTTCTATGGGATT-3'이며, 이는 3'-UTR 에 위치한다. 이러한 shRNA 는 3'-UTR 이 결실된 재조합 Atg14L 은 표적하지 않는다.

30 면역염색법

HeLa 또는 MEF 세포를 4% 포름알데이드(in PBS)로 15 분 동안 고정하고 0.3% 트리톤 X-100 으로 30 분 동안 실온에서 처리하여 투과성을 주었다. 투과성 세포를 1% BSA(Bovine Serum Albumin)을 포함하는 PBS 에서 30 분 동안 항온반응한 후, 4℃에서 밤새 항체반응하였다. 항-LC 5 항체(Novus, cat# NB100-2220 및 Nanotools, cat# 5F10) 및 항-Atg14L 항체(MBL, PD026)을 이용하여 내인성 LC3 및 Atg14L 를 염색하였다. 재조합 myc 및 HA-태깅된 단백질을 Alexa647 형광 염료(Cell Signaling, cat# 2233)가 컨쥬게이션된 항-myc 항체 및 항-HA 항체(Covance, AFC-101P)를 사용하여 모니터링하였다. 1 차 항체 결합 후에, 세포를 Alexa 10 Flour 488-컨쥬게이션된 항-마우스 IgG(Invitrogen, A-11001) 및/또는 Alexa Flour 647-컨쥬게이션된 항-래빗 IgG(Invitrogen, A-21443)과 항온반응하였다. DAPI(4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, D-1306)으로 핵 염색하였다. Deltavision PersonalDV 현미경(Applied Precision)을 이용하여 염색된 세포의 이미지를 얻었다. WIPI-1 또는 15 LC3 의 Atg14 야생형 또는 S419A 돌연변이와 같이 위치하는 것은 SigmaPlot 10.0 소프트웨어(Systat Software, 미국)을 이용한 스튜던트 t-test 로 통계학적으로 분석하였다.

인비보(*in vivo*) 라벨링

20 살아있는 세포에서 Beclin1 의 인산화를 결정하기 위해, myc-태깅된 ULK1 야생형 및 키나아제-데드 돌연변이를 HEK293T 세포에서 일시적으로 발현하였다. 트랜스펙션 2 일 후에, 0.1 mCi[32P] 오르쏘포스페이트(orthophosphate, MPBiomedicals)를 첨가하여 1 시간동안 반응하기 전에 10% 희석된 FBS 를 포함하는 포스페이트-프리 배지에서 25 4 시간 동안 반응하였다. 면역침전법을 위해, myc-태깅된 ULK1 은 항-myc 항체를 이용하여 분리하였다. 분리한 단백질을 SDS-PAGE 를 실시하여 PVDF 에 전송하고 오토라디오그램(autoradiogram)을 구하였다.

실험 결과

30 *ULK1* 의 *Beclin1* 인산화 유도

293T 세포에서 myc-태깅된 Beclin1 을 HA-태깅된 ULK1 야생형 또는 M92A KD(kinase dead) 돌연변이와 동시발현하였다. Myc-Beclin1 및 HA-ULK1 을 항-HA 항체를 이용하여 면역침전(immunoprecipitation; IP)하여 분리하고, SDS-PAGE 상의 이동 양상을 웨스턴 블롯하여 분석하였다.

5 Beclin1 과 ULK1 또는 M92A KD 돌연변이가 결합하는 것을 확인하였다(도 1a). ULK1 야생형과 동시발현 한 Beclin1 이 밴드 이동 양상을 보인 반면, ULK1 M92A KD 를 동시 발현한 Beclin1 은 밴드 이동 양상을 보이지 않았다. 이러한 결과는 ULK1 야생형이 Beclin1 의 인산화 가능성을 보여주고 있다. myc-태깅된 Beclin1 을 HA-태깅된 ULK1 야생형 또는 M92A KD(kinase dead)

10 돌연변이와 동시발현하는 293T 에서 람다 포스파타제(lambda phosphatase) 처리/비처리 후 면역침전하여 분리한 후에 항-HA 항체를 이용하여 Co-IP 를 수행하고 SDS-PAGE 상의 이동 양상을 웨스턴 블롯하여 분석하였다. ULK1 에 의해 shift-up 된 Beclin1 의 인산화가 포스파타제에 의해 유리됨을 보여줌으로써, ULK1 이 Beclin1 을 인산화 시키는 결정적 단서를 보여주고

15 있다(도 1b).

Beclin1 의 인산화

항-myc 항체를 이용하여 HEK293T 세포로부터 과발현된 myc-태깅된 ULK1 야생형 및 KD(M92) 돌연변이를 면역침전(immunoprecipitation; IP)하여 분리하였다. E.coli 균주에서 재조합 Beclin1 을 분리하여 기질로 사용하였다. ³²P-ATP 존재 하에 37°C에서 Beclin1 과 면역침전법으로 분리한 ULK1 야생형 또는 KD 돌연변이와 항온반응하였다. ³²P 가 Beclin1 및 ULK1 으로 통합되는 것을 오토라디오그램으로 분석하였다. Myc-ULK1 및 Beclin1 의 수준도 웨스턴 블롯으로 분석하였다(도 2). ULK1 야생형이

20 Beclin1 을 인산화시키는 반면, KD 돌연변이가 첨가된 Beclin1 인 경우는 인산화가 이루어지지 않았다. 즉, ULK1 의 키나아제 활성이 Beclin1 의 인산화에 중요하다는 결과를 보여주고 있다.

Beclin1 Ser30 에피토프

30 HA-태깅된 Beclin1 과 myc-태깅된 ULK1 야생형 또는 KD 돌연변이를 발현시켜 HA 항체를 이용하여 면역침전법을 실시하였다. SDS-PAGE 상에서

나오는 밴드를 각각 추출하여 LC-MS 분석을 통하여 ULK1 이 인산화시키는 사이트를 분석하였다. 분석결과 Beclin1 의 Ser30 이 가능성 높은 사이트로 분석되었다. 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 개발하기 위해 아래와 같이 항체의 에피토프를 합성하였다. 하기 합성 펩타이드는 5 번째 아미노산인 세린이 인산화된 형태이다.

C-KLDTS FKILDR (26-36, aa) 12-mer

N-말단의 시스테인(cys)은 운반 단백질(carrier protein)에 결합(conjugation)하기 위해 임의로 첨가하였다. 상기 에피토프를 합성하여 Beclin1 의 Ser30 인산화에 대한 항체를 제작하였다(Abfrontier 의뢰, 대한민국; <http://www.abfrontier.com/cs/antibodyPoly.do>).

Beclin1 Ser30 인산화

HBSS 배지에서 2 시간 동안 ULK1+/+ MEF 및 ULK1-/- MEF 를 배양하였다. 내인성 Beclin1 을 면역침전법으로 분리하였다. 발명자들이 개발한 항체를 이용하여 Ser30 의 인산화를 분석하였다(도 3). ULK1 은 HBSS 배지에서 키나아제 활성이 증가하게 되며, 이때 활성화된 ULK1 이 Beclin1 세린 잔기 30 번째를 인산화 시킬 것으로 예상하였다. 실험 결과, 자체 개발한 Beclin1 Ser30 항체가 ULK1 에 의해 인산화된 Beclin1 의 인산화 사이트에 선택적으로 반응을 하였다.

기아상태(starvation)에서의 Beclin1 Ser30 인산화

MEF 를 HBSS 에서 지정 시간(0, 2, 4 및 6 시간) 동안 배양하였다. 내인성 Beclin1 을 면역침전법으로 분리하였다. 본 발명에서 개발한 래빗 항체로 Ser30 의 인산화를 분석하였다. 기아상태에서 Beclin1 의 ser30 이 인산화되는 것을 확인하였다(도 4).

라파마이신(rapamycin)에 의한 Beclin1 Ser30 인산화

HEK293T 세포에 지정 시간(0, 15, 30, 60 및 120 분) 동안 라파마이신을 처리하였다. 내인성 Beclin1 을 면역침전법으로 분리하였다. 본 발명에서 개발한 래빗 항체로 Ser30 의 인산화를 분석하였다.

라파마이신 처리에 의해 Beclin1 의 ser30 이 인산화되는 것을 확인하였다(도 5). 라파마이신은 ULK1 의 활성을 증가시킨다.

토린(*torin*)에 의한 *Beclin1 Ser30* 인산화

- 5 HEK293T 세포에 지정 시간(0, 15, 30, 60 및 120 분) 동안 토린을 처리하였다. 내인성 Beclin1 을 면역침전법으로 분리하였다. 본 발명에서 개발한 래빗 항체로 Ser30 의 인산화를 분석하였다. 토린 처리에 의해 Beclin1 의 ser30 이 인산화되는 것을 확인하였다(도 6).

10 자가포식 활성화

- Beclin1-침묵 HeLa 세포에 myc-태깅된 WIPI-1 과 함께 HA-태깅된 Beclin1 야생형 또는 S30A 돌연변이를 일시적으로 발현하였다. 라파마이신을 1 시간 동안 처리한 후에 HA-Beclin1(녹색) 및 myc-WIPI1(적색)에 대한 면역염색을 실시하였다. DAPI 로 핵(청색)을 염색하였다.
- 15 Beclin1 부점(puncta) 및 WIPI-1 동시위치하는 것을 분석하였다(도 7). Beclin1 의 세린잔기 30 번째가 돌연변이가 되면 자가포식 활성화가 감소하는 것을 확인하였다.

- 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- 20

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 단계를 포함하는 자가포식(autophagy) 활성제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법:

- 5 (a) Beclin1 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린(serine) 아미노산 잔기의 인산화(phosphorylation) 정도를 분석하는 단계; 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 상향-조절(up-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식
- 10 활성제(activator)로 판정하고, 상기 Beclin1 단백질의 인산화가 하향-조절(down-regulation)되는 경우에, 상기 시험물질은 자가포식 억제제(inhibitor)로 판정한다.

【청구항 2】

- 15 제 1 항에 있어서, 상기 Beclin1 단백질의 30 번째 세린 아미노산 잔기의 인산화 정도의 분석은 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

20 【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 서열목록 제 1 서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 에피토프에 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

25

【청구항 4】

상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 시료에 접촉하는 단계를 포함하는 자가포식(autophagy) 활성 측정하는 방법.

30

【청구항 5】

상기 30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 자가포식-관련 질환(autophagy-related disease)의 진단 키트.

5 **【청구항 6】**

30 번째 세린 아미노산 잔기가 인산화된 Beclin1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체.

【청구항 7】

10 제 5 항에 있어서, 상기 항체는 서열목록 제 1 서열에 기재된 아미노산 서열로 구성된 에피토프에 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

1/4

Fig. 1a

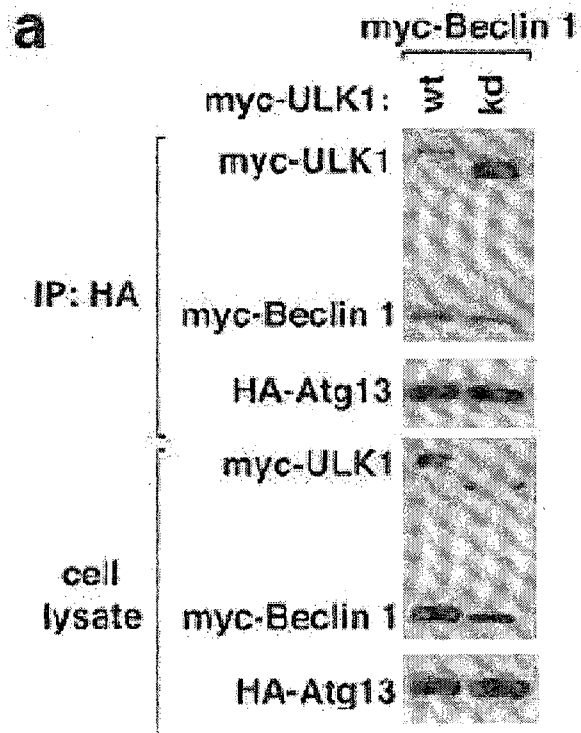


Fig. 1b

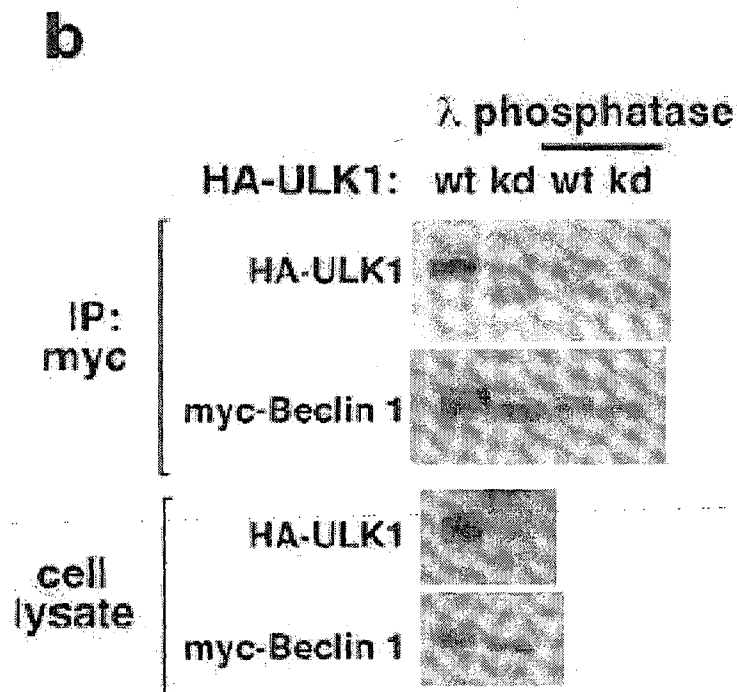


Fig. 2

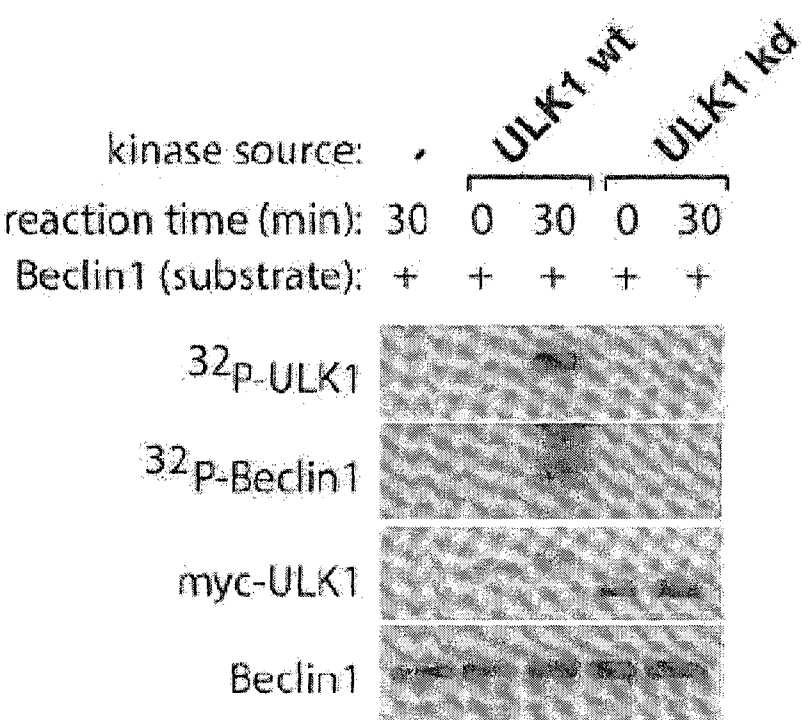


Fig. 3

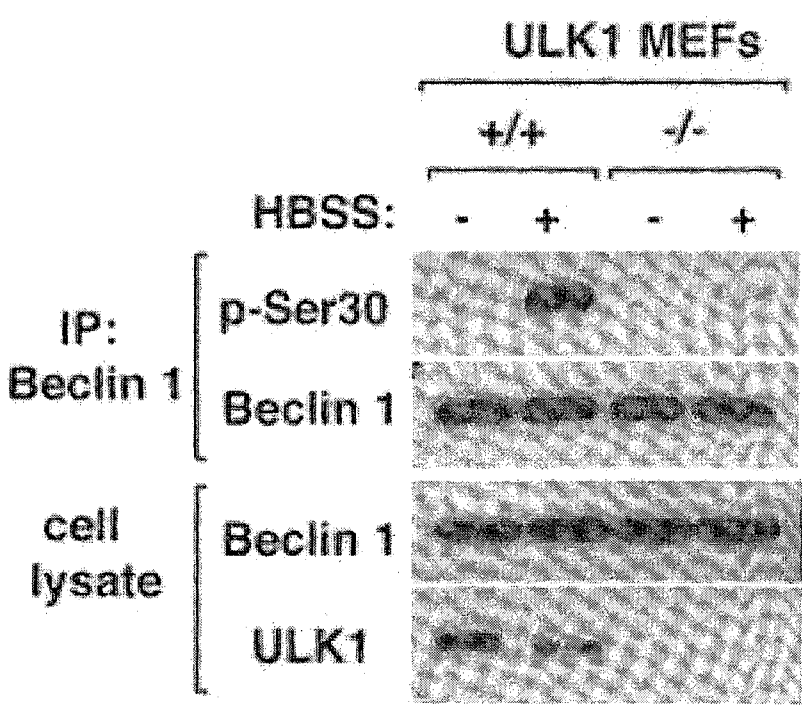


Fig. 4

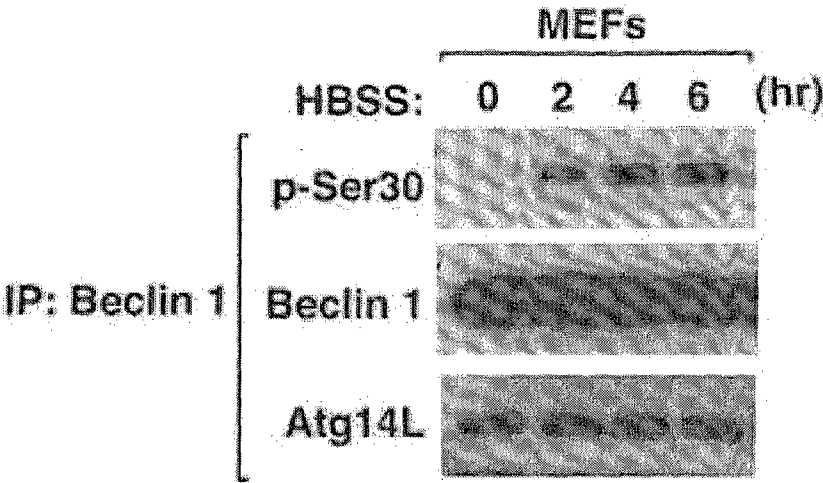


Fig. 5

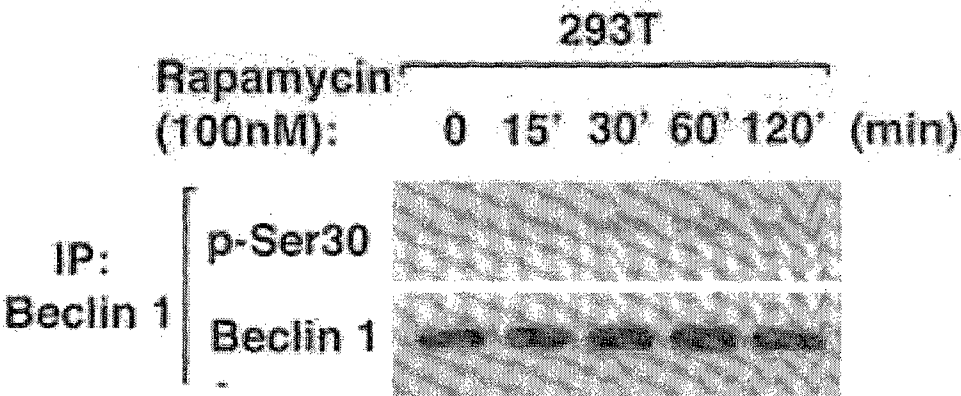


Fig. 6

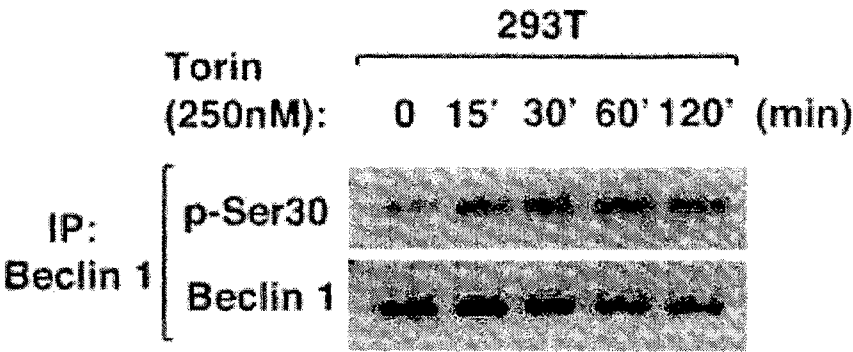
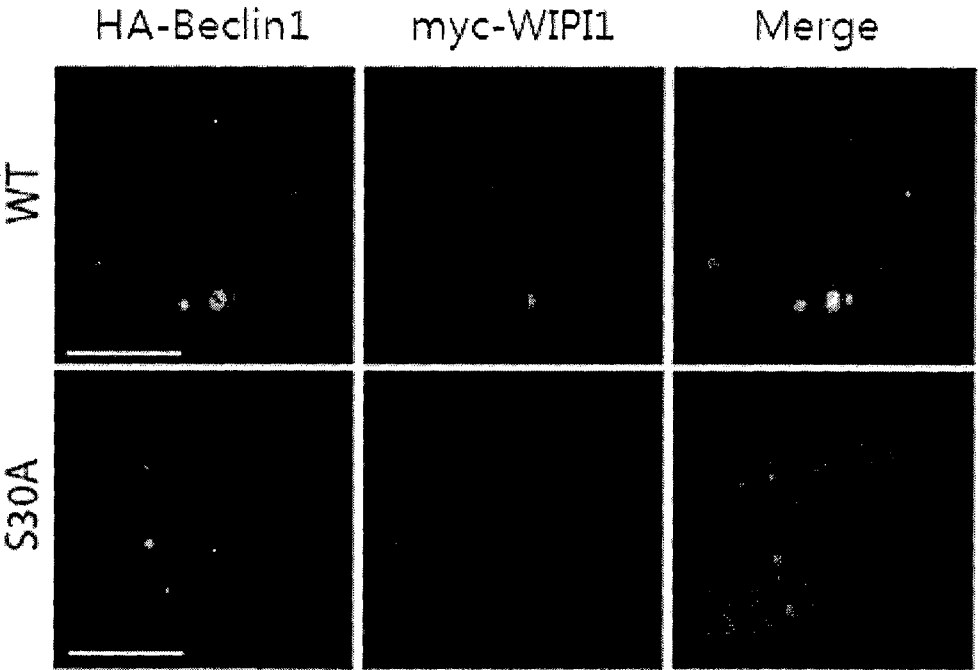


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005913**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/53(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)

G01N 33/53; A61K 39/395; G01N 33/566; C07K 16/08; C07K 16/18; A61K 38/17; C07K 16/44; 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: autophagy, Beclin 1, phosphorylation, S30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OPPERMANN, F. S. et al., "Large-scale proteomics analysis of the human kinome" <i>Molecular & Cellular Proteomics</i> , vol. 8, no. 7, pages 1751-1764 (2009) See supplemental tables.	6-7
A		1-5
A	KANG, R. et al., "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis" <i>Cell Death and Differentiation</i> , vol. 18, no. 4, pages 571-580 (2011) See abstract and pages 573-574.	1-7
A	US 2012-0258550 A1 (WU et al.) 11 October 2012 See abstract; paragraphs [0109]-[0120]; claims 1-7; and tables 1-4.	6-7
A	EP 2383294 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.) 02 November 2011 See abstract and claims 1-7.	1-7
A	WANG, R. C. et al., "Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation", <i>Science</i> , vol. 338, no. 6109, pages 956-959 (2012) See the entire document.	1-7
A	KR 10-2012-0121754 A (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) 06 November 2012 See abstract and claims 1-14.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"I" 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

30 JANUARY 2015 (30.01.2015)

Date of mailing of the international search report

02 FEBRUARY 2015 (02.02.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0258550 A1	11/10/2012	US 2010-086541 A1 US 2010-092458 A1 US 8148088 B2	08/04/2010 15/04/2010 03/04/2012
EP 2383294 A1	02/11/2011	EP 2358752 A1 EP 2385071 A1 EP 2385071 A9 US 2011-0229905 A1 US 2014-178899 A1 WO 2010-064250 A1	24/08/2011 09/11/2011 28/12/2011 22/09/2011 26/06/2014 10/06/2010
KR 10-2012-0121754 A	06/11/2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/53; A61K 39/395; G01N 33/566; C07K 16/08; C07K 16/18; A61K 38/17; C07K 16/44; 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: 자카포식, Beclin 1, 인산화, S30

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	OPPERMANN, F. S. 외, 'Large-scale proteomics analysis of the human kinome' Molecular & Cellular Proteomics, 8권, 7호, 페이지 1751-1764 (2009) Supplemental tables 참조.	6-7
A		1-5
A	KANG, R. 외, 'The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis' Cell Death and Differentiation, 18권, 4호, 페이지 571-580 (2011) 요약 및 페이지 573-574 참조.	1-7
A	US 2012-0258550 A1 (WU 외) 2012.10.11. 요약; 단락 [0109]-[120]; 청구항 1-7; 및 테이블 1-4 참조.	6-7
A	EP 2383294 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.) 2011.11.02. 요약 및 청구항 1-7 참조.	1-7
A	WANG, R. C. 외, 'Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation', Science, 338권, 6109호, 페이지 956-959 (2012) 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-2012-0121754 A (사회복지법인 삼성생명공익재단) 2012.11.06. 요약 및 청구항 1-14 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 01월 30일 (30.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 02월 02일 (02.02.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0258550 A1	2012/10/11	US 2010-086541 A1 US 2010-092458 A1 US 8148088 B2	2010/04/08 2010/04/15 2012/04/03
EP 2383294 A1	2011/11/02	EP 2358752 A1 EP 2385071 A1 EP 2385071 A9 US 2011-0229905 A1 US 2014-178899 A1 WO 2010-064250 A1	2011/08/24 2011/11/09 2011/12/28 2011/09/22 2014/06/26 2010/06/10
KR 10-2012-0121754 A	2012/11/06	없음	