



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002973
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 24일 (24.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0041232 2015년 3월 25일 (25.03.2015) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김정목 (KIM, Jeong Mok); 05711 서울시 송파구 송파대로 32길 8 6동 1402호, Seoul (KR). 김정희 (KIM, Jeong Hee); 06092 서울시 강남구 학동로 68길 30 102동 701호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한일국제특허사무소, 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.

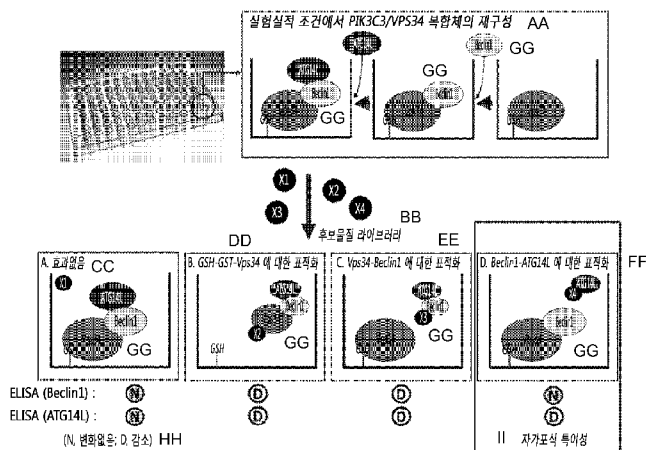
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: SCREENING METHOD FOR DISCOVERING AUTOPHAGY-SPECIFIC INHIBITOR

(54) 발명의 명칭 : 자가포식 특이적 억제제 발굴을 위한 스크리닝 방법



(57) Abstract: The present invention relates to: a method for screening for an autophagy-specific inhibitor, capable determining, in a manner suitable for high-throughput testing *in vitro*, whether the formation of a Vps34-Beclin1-ATG14L complex, which plays an important role in the early stage of an autophagy phenomenon, is inhibited, by processing a library of candidate substances, various compounds, peptides, aptamers, and the like, which are expected to be able to inhibit autophagy; a kit which can be used in the method; and a method for analyzing the binding force of a target protein capable of binding to Vps34 or a complex comprising Vps34. When the method for screening for an autophagy-specific inhibitor, provided in the present invention, is used, a preparation capable of specifically inhibiting an autophagy phenomenon can be discovered, and thus the method can be widely used in the development of a composition for treating various diseases through the inhibition of autophagy.

(57) 요약서: 본 발명은 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질 및 다양한 화합물, 펩타이드, aptamer 등의 라이브러리를 처리하고, 이에 의하여 자가포식 현상의 초기단계에 중요한 역할을 하는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 형성의 저해 여부를 *in vitro* 상에서 고처리량 검정에 적합하게 판별할 수 있는 자가포식 특이적 억제제의 스크리닝 방법, 상기 방법에 사용될 수 있는 키트 및 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에

관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제 스크리닝 방법을 이용하면, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 발굴할 수 있으므로, 자가포식의 억제를 통한 다양한 질환 치료용 조성물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 자가포식 특이적 억제제 발굴을 위한 스크리닝 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 자가포식 특이적 억제제 발굴을 위한 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질 및 다양한 화합물, 펩타이드, 압타머등의 라이브러리를 처리하고, 이에 의하여 자가포식 현상의 초기단계에 중요한 역할을 하는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 형성의 저해 여부를 *in vitro*상에서 고처리량 검정에 적합하게 판별할 수 있는 자가포식 특이적 억제제의 스크리닝 방법, 상기 방법에 사용될 수 있는 키트 및 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 자가포식(*autophagy*) 현상은 기아상태생존, 감염성 세균으로부터의 보호 및 신경붕괴조절과 같은 세포 기능을 조절하는데 중요한 역할을 하는데, 이는 진화적으로 보존된 과정으로, 이스트에서 포유류에 이르기까지 모든 진핵세포에서 나타난다. 초기에는, 세포질 및 세포 내 기관들은 오토파고솜(*autophagosome*)이라는 이중-막-결합 구조로 퇴화하고, 상기 퇴화된 오토파고솜은 리소솜(*lysosome*)과 융합하여 오토리소솜(*autolysosome*)을 형성하며, 상기 오토리소솜에 의해 퇴화된 물질이 가수분해되어 재사용된다. 그러나, 이러한 과정에 내재한 분자적 작용기작은 아직 밝혀지지 않았기 때문에 이를 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [4] 지금까지 알려진 바에 의하면, 효모, 초파리 등을 대상으로 수행된 다양한 유전학/생화학적 연구를 통하여 세포내에서 자가포식(*autophagy*) 현상을 일으키는데 필요한 단백질들이 발굴되었고, 이들의 상관관계를 분석하기 위한 연구가 수행되고 있다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면, 자가포식은 유도단계(*induction/nucleation*), 세포막 변형단계(*membrane elongation/closure*) 및 포식단계(*vesicle trafficking/maturation/fusion/degradation*)의 세 가지 단계로 크게 구분된다고 알려져 있다. 또한, 자가포식 경로는 Atg8PE(*phosphatidylethanolamine*) 또는 Atg12Atg5을 경유하는 두개의 독특한 유비퀴틴-유사 접합 시스템을 포함하는데, 상기 경로는 효모의 Vps34 동족체인 클라스 III PI3K(*phosphatidylinositol 3-kinase*)과 Beclin1(효모유래 Atg6의 오토로그)으로 구성된 복합체와 함께 오토파고솜 형성에 관련된다.
- [5] 많은 종류의 세포에서, 성장요소 및 사이토카인에 의한 class I PI3K/AKT 신호 경로의 자극은 자가포식을 억제하는 효과를 나타낸다. 상기 억제 효과는 아마도 오토파지를 하향 조절하는 라파마이신표적(*target of rapamycin(TOR)*)

키나아제의 class I PI3K/AKT-의존적 활성화 때문인 것으로 예상되고 있다. 예를 들어, PI 3-키나아제 억제제인 워트마닌(wortmannin) 및 3-메틸아테닌(3-MA)으로 처리한 세포에서는 오토파고좀 전구체가 발생하지 않는데, 이는 오토파고성 액포 형성 초기단계에서 PI3K-AKT-mTORC1 신호전달계의 활성화 억제의 중요성을 시사한다. 이러한 자가포식 현상의 억제 또는 활성화는 단순한 세포활성 뿐만 아니라, 상기 세포를 포함하는 생체내 생리학적 또는 병리학적 변화에 큰 영향을 미친다. 근래 다양한 동물모델 및 질병의 유전자 분석 연구를 통하여 자가포식과정이 당뇨, 고혈압등의 대사성 질환, 퇴행성 뇌질환, 감염성 질환, 그리고 암등의 매우 다양한 질환에서 중요한 역할을 하고 있음이 보고됨으로써 그 중요성이 부각되고 있다. 따라서 자가포식 (autophagy)를 조절하는 물질 발굴은 새로운 작용점을 타겟으로 하는 질병치료제 개발에 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대하고 있다.

[6] 특히, 암질환의 치료와 관련하여 자가포식 현상을 조절 할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이는 상당수의 암세포가 암세포 발생의 초기단계에서는 자가포식 현상을 억제하여 암세포의 성장을 유도하고, 또한 암세포가 형성된 이후에 활성화하여 영양, 산소결핍 및 항암제에 대한 저항성을 나타냄이 보고된바 있다. 따라서, 상기 자가포식 현상을 조절할 수 있는 물질은 암세포에서 항암효과를 나타낸다고 할 수 있으며, 이러한 자가포식 현상을 이용하여 암을 치료하는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2011-0100435호에는 자가포식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 그의 스크리닝방법이 개시되어 있다.

[7] 또한, 상기 자가포식 현상을 억제할 수 있는 물질은 자가포식 현상이 수반되는 염증성 창자병(inflammatory bowel disease), 제1형 당뇨병 등과 같은 질환의 치료에도 사용될 수 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2012-0088059호에는 인터루킨-10을 유효성분으로 함유하는 대식세포의 자가포식 억제제 및 인터루킨-10과 IL-10 수용체의 결합 저해제 또는 PI3 kinase I의 활성화 저해제를 유효성분으로 포함하는 대식세포의 자가포식 촉진제가 개시되어 있다.

[8] 그러나 현재까지 자가포식 과정만을 특이적으로 조절하는 물질의 부제로 자가포식을 억제하는 PI3K-AKT-mTORC1 신호전달계를 차단하는 물질을 이용하여 자가포식과정을 활성화하거나 자가포식의 최종분해 장소인 리소좀의 기능을 방해하는 물질을 이용하여 자가포식을 억제하는 방법이 이용되고 있다. 하지만 이들은 autophagy뿐만 아니라 다양한 세포내 생리활성을 조절함으로써 자가포식과정을 타겟으로 한 약물개발에 있어 많은 부작용이 예상된다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 자가포식과정만을 특이적으로 조절하는 물질을 효과적으로

발굴하기 위한 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 자가포식 현상에 특이적으로 관여하는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 형성을 고처리량 검정법(High-throughput format) 확인할 수 있는 시스템을 고안하였고 이를 이용하여 다양한 물질을 대상으로 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체 형성을 저해하는 물질을 스크리닝하여 자가포식 특이적 억제제를 발굴할 수 있는 프로토콜을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 이용한 자가포식 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 Vps34-Beclin1 복합체, ATG14L 및 이들의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[15]

발명의 효과

[16] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제 스크리닝 방법을 이용하면, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 발굴할 수 있으므로, 자가포식의 억제를 통한 다양한 질환 치료용 조성물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

[17]

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 이용하여, 자가포식 특이적인 억제제를 스크리닝하는 방법의 개요를 나타내는 개략도이다.

[19] 도 2는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 형성할 수 있는 각 단백질을 발현 및 정제하고, 이를 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

[20] 도 3a는 마이크로웰 플레이트와 Vps34 단백질의 결합에 있어서, GST와 GSH의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

[21] 도 3b는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.

[22] 도 3c는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

[23] 도 4a는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트와 Beclin1 단백질의 결합에 있어서, Vps34의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

[24] 도 4b는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.

- [25] 도 4c는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-Beclin1 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.
- [26] 도 5a는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, Beclin1의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [27] 도 5b는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.
- [28] 도 5c는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.
- [29] 도 6은 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, UVRAG의 경쟁억제 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

[30]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명자들은 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 보다 효과적으로 제공할 수 있는 방법을 개발하기 위하여, 자가포식 현상을 유발시키는 세포내 인자를 표적으로 하여, 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질이 상기 표적의 작용을 억제할 경우 상기 후보물질을 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 간주할 수 있을 것으로 가정하고, 이에 기초하여 다양한 연구를 수행하던 중, 자가포식 현상을 유발하는 유도단계(induction/nucleation)에 주목하게 되었다. 상기 자가포식 현상은 유도단계(induction/nucleation), 세포막 변형단계(membrane elongation/closure) 및 포식단계(vesicle trafficking/maturation/fusion/degradation)로 구분될 수 있는데, 이 중에서 세포막 변형단계 및 포식단계에 관여하는 다양한 인자들은 자가포식 현상 이외에도 세포내 다양한 물질이동 작용(endosome trafficking, phagocytosis 등)에도 필수적으로 관여하기 때문에, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하기 위한 표적으로는 적절하지 않기 때문이다.
- [32] 한편, 상기 유도단계에 관여하는 것으로 알려진 대표적인 인자는 ULK1(ATG1) 단백질 인산화효소 복합체와 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체인데, 이 중에서 ULK1(ATG1) 단백질 인산화효소 복합체는 세포내에 존재하는 다양한 단백질 인산화효소와의 상호작용을 모두 고려해야 하기 때문에, 상대적으로 고려해야 할 세포내 상호작용의 수가 적은 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체를 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하기 위한 표적으로 사용하고자 하였다. 그러나, 상기 복합체의 지질 인산화 활성은 자가포식 현상 이외에도 다양한 세포내 작용(phagocytosis, endosome trafficking/maturation 등)에 관여함이 알려져 있으므로, 상기 복합체의 지질

인산화 활성을 표적으로 사용하기 보다는 상기 복합체의 형성여부를 표적으로 사용하고자 하였다.

[33] PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체는 상기 복합체를 구성하는 구성요소에 따라 다양한 형태를 나타낼 수 있다. 이러한 다양한 형태의 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체 중에서 ATG14L 단백질을 구성요소로 포함하는 복합체(Vps34-Beclin1-ATG14L)는 자가포식 특이적 PIK3C3/VPS34 복합체(pro-autophagy complex)로 알려져 있고, 실제로 세포내에서 ATG14L 발현을 억제하면 PIK3C3/VPS34 복합체의 다양한 기능 중 자가포식 현상만이 특이적으로 억제되므로, 상기 복합체의 형성을 억제하는 물질은 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 사용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

[34] 또한, 상기 ATG14L 단백질을 구성요소로 포함하는 복합체(Vps34-Beclin1-ATG14L) 중에서 Vps34-Beclin1은 다양한 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체에서 공통적으로 발견되는 핵심부위이기 때문에, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하기 위하여, 상기 복합체(Vps34-Beclin1-ATG14L)에서 ATG14L의 결합여부를 실질적인 표적으로 사용하였다. 즉, PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체(Vps34-Beclin1-ATG14L)를 형성함에 있어서, ATG14L의 결합을 억제하는 물질이 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 사용될 수 있으므로, Vps34 및 Beclin1으로 구성된 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L를 동시에 또는 순차적으로 가하여 상기 복합체(Vps34-Beclin1-ATG14L)가 형성되는지의 여부를 확인함으로써, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝 할 수 있다.

[35] 한편, 상술한 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝하는 방법을 변형시켜서, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석할 수 있는데, 상기 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질을 다양한 농도로 처리하고, 상기 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 목적 단백질이 결합된 결합체의 농도를 정량한 다음, 상기 처리된 목적 단백질의 농도와 정량된 결합체의 농도를 이용하여 작성한 결합곡선을 이용하여 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석할 수 있다.

[36]

[37] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 Vps34, Beclin1 및 ATG14L를 이용하여 자가포식 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[38]

[39] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법의 첫 번째 방법으로서, (a) Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Vps34를 통해

Beclin1 및 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 후보물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 화합물, 천연물의 추출물, 펩타이드, 앵타머 등이 될 수 있다.

[40]

[41] 본 발명의 용어, "자가포식(autophagy or autophagocytosis)"이란, 리소좀을 사용하여 필요없거나 또는 이상기능을 나타내는 세포내 소기관의 분해에 관여하는 기본적인 이화작용기작을 의미하는데, 영양결핍과 같은 특수한 상황에서는 세포내 소기관을 파괴하여 세포내 에너지 수준을 유지함으로써 세포 생존성을 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다. 실질적인 자가포식 현상은 세포질 및 세포 내 기관들은 오토파고솜(autophagosome)이라는 이중-막-결합 구조로 퇴화하고, 상기 퇴화된 오토파고솜은 리소좀과 융합하여 오토리소좀(autolysosome)을 형성하며, 상기 오토리소좀에 의해 퇴화된 물질이 가수분해되어 재사용되는 과정에 의해 수행되는 것으로 알려져 있다.

[42] 본 발명에 있어서, 상기 자가포식은 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 형성에 의하여 유발되고, 상기 복합체에 포함된 ATG14L의 결합을 억제하는 물질에 의하여 억제될 수 있는 세포내 작용으로 해석될 수 있다.

[43]

[44] 본 발명의 용어, "Vps34(vacuolar protein sorting 34)"란, "PIK3C3(Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3)"라고도 호칭되고, 세포내 자가포식에 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 Vps34는 진핵세포에서 발현되는 Class III PI 3-인산화효소의 일종으로 구분되고, 포스파티딜이노시톨을 인산화시켜서 포스파티딜이노시톨 (3)-인산을 형성하는 효소활성을 나타낸다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_002647, NP_002638 등). 일례로서, 본 발명에서는 Vps34로서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.

[45]

[46] 본 발명의 용어, "Beclin1"이란, BECN1 유전자에 의하여 발현된 단백질로서 효모에서 발현된 Atg 6(autophagy-related gene 6)의 상동체(ortholog) 단백질을 의미한다. 상기 Beclin1은 자가포식에 관여할 뿐만 아니라, 발달, 암발생 및 신경퇴화에 중요한 역할을 수행한다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_003766, NP_003757 등). 일례로서, 본 발명에서는 Beclin1으로서 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.

[47]

[48] 본 발명의 용어, "ATG14L(autophagy related 14)"란, "Barkor(beclin 1-associated autophagy-related key regulator)"라고도 호칭되며, Beclin1과 결합하여 자가포식에 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_014924.4,

NP_055739.2 등). 일례로서, 본 발명에서는 ATG14L로서 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.

[49]

[50] 상기 방법은 자가포식 과정에서 특이적으로 형성되는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L를 특이적으로 제거할 수 있는 제제를 스크리닝하기 위하여 수행될 수 있는데, 상기 제제가 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L만을 특이적으로 제거할 경우에만, 상기 제제를 자가포식 억제제로서 판정할 수 있다. 예를 들어, 상기 (b) 단계에서 측정된 Beclin1의 수준은 후보물질과의 반응이전의 Beclin1의 수준보다 감소되지 않고, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이 후보물질과의 반응이전의 ATG14L의 수준보다 감소된 경우에만, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 방법을 사용할 수 있다.

[51] 이때, 상기 Beclin1 또는 ATG14L의 수준을 측정하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer), 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay) 등이 될 수 있다.

[52] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

[53] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 상기 반응물에서 측정하고자 하는 Vps34, Beclin1 또는 ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 각 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그의 일부가 될 수 있다.

[54]

[55] 아울러, 상기 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체는 특별히 고정되지 않은 상태로 사용될 수도 있고, 담체에 고정된 형태로 사용될 수도 있는데, 고정되지 않은 상태로 사용될 경우, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 등의 방법을

통하여 (b) 단계를 수행할 수 있고, 담체에 고정된 상태로 사용될 경우, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등의 방법을 통하여 (b) 단계를 수행할 수 있다.

[56] 상기 복합체가 담체에 고정된 형태로 사용될 경우, 상기 담체는 특별히 이에 제한되지 않으나 일례로서, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐 수지, 폴리스티렌 수지, 유리 등의 재질로 구성되는 담체가 될 수 있고, 다른 예로서, 막, 96웰 플레이트, 비드, 슬라이드 글라스 등의 형태를 갖는 담체가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐 수지, 폴리스티렌 수지 또는 유리재질의 막, 96웰 플레이트, 비드 또는 슬라이드 글라스 등이 될 수 있다. 특히, 상기 담체가 96웰 플레이트의 형태를 갖는 경우, 다수의 후보물질을 대상으로 동시에 스크리닝 방법을 수행할 수 있다.

[57] 한편, 상기 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체가 담체에 고정된 경우 상기 (b) 단계에서, 담체에 고정된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 포함된 Beclin1 및 ATG14L의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 Beclin1 및 ATG14L을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[58]

[59] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법의 두 번째 방법으로서, (a) Vps34-Beclin1 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Vps34-Beclin1 복합체에 결합된 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 Vps34-Beclin1 복합체 역시 담체에 고정된 형태가 될 수 있는데, 이 경우, 담체에 대하여는 상술한 바와 동일하고, (b) 단계에서, 담체에 고정된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 포함된 ATG14L의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 ATG14L을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 아울러, 상기 방법에 개시된 후보물질, Vps34, Beclin1, ATG14L, ATG14L의 수준을 확인하는 방법 등은 상술한 바와 동일하다.

[60] 상기 두 번째 방법은 첫 번째로 제공한 방법과는 다른 특성을 지닌 자가포식 억제제를 스크리닝할 수 있다. 구체적으로, 첫 번째로 제공한 방법은 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L를 특이적으로 제거할 수 있는 물질을 자가포식 억제제로서 스크리닝 하는 방법임에 반하여, 두 번째로 제공하는 방법은 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L이 결합하는 것을 억제할 수 있는 물질을 자가포식 억제제로서 스크리닝 하는 방법이므로, 결과적으로는 다른 특성을 갖는 자가포식 억제제를 각각 스크리닝할 수 있다.

[61] 따라서, 상기 두 번째 방법은 자가포식 과정에서 특이적으로 형성되는 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L의 결합을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 스크리닝하기 위하여 수행될 수 있는데, 상기 제제가 Vps34-Beclin1 복합체에

대한 ATG14L의 결합을 억제할 경우에, 상기 제제를 자가포식 억제제로서 판정할 수 있다. 예를 들어, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이, 상기 후보물질을 처리하지 않고 ATG14L 만을 가하여 반응시켜서 확인된 ATG14L의 수준에 비하여 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 방법을 사용할 수 있다.

[62]

[63] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법을 도면을 통해 설명하면 다음과 같다.

[64] 일례로서, 도 1에 개시된 자가포식 특이적 억제제 발굴법이 될 수 있다.

[65] GST-Vps34 단백질은 GSH 코팅된 마이크로웰 플레이트에 일정한 방향으로 고정된다. 상기 플레이트에 Beclin1과 ATG14L 단백질을 순차적으로 가하여, 필수적인 자가포식 촉진용 PIK3C3/VPS34 복합체인 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 재구성하였다. 각 단백질의 결합은 각 단백질에 대한 ELISA 반응으로 확인하였다. 자가포식 특이적 억제제를 스크리닝하기 위하여, 화합물, 펩타이드, 앵타머 라이브러리나 같은 목적물질의 라이브러리를 상기 제작된 분석용 플레이트에 가한 다음, 상기 플레이트에 잔류하는 Beclin1과 ATG14L의 수준을 측정하여, 가하여진 물질이 억제효과를 나타내는지의 여부를 확인하였다. 예를 들어, 상기 물질이 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 영향을 주지 않는다면 Beclin1 및 ATG14L 단백질에 대한 ELISA 검출결과가 변화지 않을 것이다(A). 만일, 상기 물질이 플레이트로부터 GST-Vps34 단백질의 방출원인이 되거나(B) 또는 Vps34-Beclin1 반응을 저해한다면(C), Beclin1 및 ATG14L 단백질에 대한 ELISA 검출신호가 감소될 것이다. Vps34-Beclin1 반응을 억제하는(C) 물질은 자가포식 특이적 억제제가 될 수 있는데, 이는 Vps34-Beclin1 반응이 비자가포식적 PIK3C3/VPS34 복합체에서도 관찰되기 때문이다. 이에 비하여, 상기 물질이 Vps34-Beclin1 복합체에 대한 ATG14L의 결합을 억제한다면, Beclin1이 아닌 ATG14L에 대한 ELISA 검출신호가 감소될 것이다

[66]

[67] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 Vps34-Beclin1 복합체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트를 제공한다.

[68]

[69] 상술한 바와 같이, Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L을 처리하여, Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 형성한 다음, 상기 형성된 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하거나 또는 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L과 상기 후보물질을 동시에 처리할 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제로 판정할 수 있는지의 여부를 확인할 수 있으므로, 상기 Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는

제제를 포함하는 키트는 자가포식 억제제 스크리닝을 위하여 사용될 수 있다. 이때, 상기 Vps34-Beclin1 복합체는 특별히 고정되지 않은 상태로 포함될 수도 있고, 담체에 고정된 상태로 포함될 수도 있는데, 상기 담체에 대하여는 상술한 바와 동일하다.

[70]

[71] 본 발명의 용어 "Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제"란, 본 발명에서 제공하는 스크리닝 방법을 수행함에 있어서, 담체에 결합된 복합체로부터 Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 수단을 의미하는데, 일례로서, Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있으며, 상기 항체는 상기에서 정의한 바와 동일하다.

[72]

[73] 본 발명의 용어 "ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제"란, 본 발명에서 제공하는 스크리닝 방법을 수행함에 있어서, 담체에 결합된 복합체로부터 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 수단을 의미하는데, 일례로서, ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있으며, 상기 항체는 상기에서 정의한 바와 동일하다.

[74]

[75] 한편, 본 발명에서 제공하는 키트는 상술한 구성요소(Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제) 이외에도 상기 스크리닝 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.

[76]

일례로서, 본 발명의 키트는 Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질을 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트가 될 수 있다. 이때, 상기 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 상기 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC(Fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine B-isothiocyanate) 등이 될 수 있으며, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), OPD(o-phenylenediamine), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 등이 될 수 있다.

[77]

[78] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 (a) Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체에 상기 Vps34 또는 복합체와의 결합력을 측정하고자 하는 목적 단백질을 농도별로 처리하여 각각의 결합체를 수득하는 단계; 및, (b) 상기 목적 단백질의 처리 농도에 따른 결합체 농도를 측정하여, 상기 Vps34 또는 복합체에 대한 목적 단백질의 결합력을 측정하는 단계를 포함하는, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법을 제공한다.

이때, 상기 Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체는 담체에 고정된 형태가 될 수 있고, 이때 사용된 담체는 상술한 바와 동일하며, 상기 (b) 단계에서, 담체에 고정된 결합체의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 목적 단백질을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[79]

[80] 본 발명에서 제공하는 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 복합체는 Vps34를 포함하는 복합체(Vps34-Beclin1 복합체)가 될 수 있고; 상기 (a) 단계의 목적 단백질은 Beclin1 또는 ATG14L가 될 수 있다.

[81] 또한, (b) 단계의 결합력 측정은, (a) 단계에서 처리된 목적 단백질의 농도와 (b) 단계에서 측정된 결합체의 농도를 이용하여 작성된 결합곡선(binding curve)을 이용하여 수행할 수 있는데, 상기 결합체의 농도를 측정하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer), 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay) 등이 될 수 있다.

[82]

발명의 실시를 위한 형태

[83] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[84]

[85] 실시예 1: 자가포식 촉진용 복합체를 구성하는 단백질의 제조

[86]

[87] 먼저, Vps34의 N-말단에 GST 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, Beclin1의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 ATG14L의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 제작하고, 이들을 포유동물세포 발현벡터에 도입하여 각각의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제작하였다.

[88]

이어, 상기 각 발현벡터를 글루코스(25 mM), 10% FBS 및 50 / 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양된 HEK293 세포에 각각 도입하여 각각의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 형질전환체를 제작하였다.

- [89] 이어, 상기 각 형질전환체를 배양한 다음, 이들 각각을 차가운 세포용해 완충액(10 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ 및 단백질분해효소 억제제, pH7.5)에서 용해시켜서 세포파쇄물을 수득하고, 상기 세포파쇄물을 원심분리(14,000 rpm 및 10분)하여 상층액을 수득하였다. 상기 상층액을 상기 세포용해 완충액으로 평형화시킨 GSH-세파로스 비드(GST-Vps34) 또는 Flag-M2 아가로스 비드(Flag-Beclin1 또는 Flag-ATG14L)에 가하고, 회전배양기를 사용하여 4에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 원심분리(1,000 rpm 및 2분)하여 침전된 비드를 회수한 다음, 고농도의 NaCl(0.5 내지 1M)을 포함하는 세포용해 완충액으로 세척하였다. 상기 세척된 비드를 세포용해 완충액으로 최종 세척한 다음, GSH 용출완충액(20 mM GSH 및 50 mM Tris, pH8.0) 또는 3XFlag 용출완충액(200 ng/ 3XFlag 펩타이드를 포함하는 세포용해 완충액)을 사용하여 상기 비드로부터 단백질을 회수하였다. 상기 회수된 단백질을 투석액(10% glycerol 및 20 mM Tris, pH8.0)으로 4에서 하룻밤 동안 투석하여 목적하는 각각의 융합단백질을 제조하였다(도 2).
- [90] 도 2는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 형성할 수 있는 각 단백질을 발현 및 정제하고, 이를 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다. 도 2에서 보듯이, 자가포식을 촉진할 수 있는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 구성하는 각 단백질이 융합단백질(GST-Vps34, Flag-Beclin1 또는 Flag-ATG14L)의 형태로 제조됨을 확인하였다.

[91]

[92] 실시예 2: GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 제작

[93]

[94] 상기 실시예 1에서 제조된 융합단백질 중에서 GST-Vps34가 결합될 수 있는 마이크로웰 플레이트를 제작하였다.

[95] 구체적으로, 96웰 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 100 mM GSH (pH8.0)를 포함하는 PBS를 가하고, 4에서 하룻밤동안 반응시키거나 또는 60에서 하룻밤동안 완전히 건조시켰다. 이어, 상기 마이크로웰 플레이트를 TBST 완충액(150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 및 10 mM Tris, pH8.0)으로 세척하여 결합되지 않은 GSH를 제거하고 5% 탈지분유를 포함하는 PBS를 처리하여 블로킹하여, 표면에서 비특이적 결합이 유발되지 않고, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작하였다.

[96]

[97] 실시예 3: GST-Vps34 융합단백질과 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석

[98]

[99] 실시예 3-1: ELISA 분석

[100]

[101] 상기 실시예 1에서 제조된 GST-Vps34 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨

용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 2에서 제작된 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 천천히 흔들면서 4에서 하룻밤 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 GSH가 결합되지 않은 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시키거나 또는 GST-Vps34 융합단백질 대신에 Vps34 단백질을 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 각 마이크로웰 플레이트의 각 웰을 0.5% NP-40를 포함하는 TBST 완충액(TBST-P5 완충액)으로 세척하고, TBST 완충액에 희석된(1:500) Vps34에 대한 일차항체를 각 웰에 50 썸 분주하였으며, 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 각 웰을 TBST 완충액으로 세척하고, HRP가 결합된 2차 항체를 가한 다음 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 기질로서 TMB 용액을 사용하여 발색반응을 유도하고, 발색수준은 450 nm에서 측정함으로써, 각 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 3a).

[102] 도 3a는 마이크로웰 플레이트와 Vps34 단백질의 결합에 있어서, GST와 GSH의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 보듯이, GST-Vps34 융합단백질을 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[103]

[104] 실시예 3-2: 결합포화곡선 분석

[105]

[106] GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 3b).

[107] 도 3b는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 3b에서 보듯이, GST-Vps34 융합단백질을 150 내지 200nM 수준으로 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[108]

[109] 실시예 3-3: 면역블롯 분석

[110]

[111] 면역블롯 분석을 수행하여, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 처리농도별 결합활성을 비교하였다. 즉, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(42.5, 85, 170 또는 340nM)의 GST-Vps34 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 GST-Vps34

융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 GST-Vps34 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-Vps34 항체를 사용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 3c).

- [112] 도 3c는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3c에서 보듯이, 170nM 이상의 농도로 GST-Vps34 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 GST-Vps34 융합단백질의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 3b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[113]

- [114] 실시예 4: Flag-Beclin1 융합단백질과 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석

[115]

- [116] 실시예 4-1: ELISA 분석

[117]

- [118] 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-Beclin1 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 3-1에서 제작된 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 아무것도 결합되지 않은 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, TBST 완충액에 희석된(1:100) Beclin1에 대한 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 Beclin1 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 4a).

- [119] 도 4a는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트와 Beclin1 단백질의 결합에 있어서, Vps34의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4a에서 보듯이, Flag-Beclin1 융합단백질을 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34-Beclin1이 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[120]

- [121] 실시예 4-2: 결합포화곡선 분석

[122]

- [123] Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 Flag-Beclin1 융합단백질을 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 4b).

- [124] 도 4b는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 4b에서 보듯이, Flag-Beclin1

융합단백질을 1.5 M 이상의 수준으로 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[125]

[126] 실시예 4-3: 면역블롯 분석

[127]

[128] 면역블롯 분석을 수행하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 처리농도별 결합 활성을 비교하였다. 즉, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(40.18, 0.36, 0.73 또는 1.46 M)의 Flag-Beclin1 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 Flag-Beclin1 융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 Flag-Beclin1 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-Beclin1 항체를 사용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 4c).

[129] 도 4c는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-Beclin1 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 4c에서 보듯이, 1.46M 이상의 농도로 Flag-Beclin1 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34-Beclin1 복합체의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 4b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[130]

[131] 실시예 5: Flag-ATG14L 융합단백질과 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석

[132]

[133] 실시예 5-1: ELISA 분석

[134]

[135] 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-ATG14L 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 4-1에서 제작된 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, TBST 완충액에 희석된(1:500) ATG14L에 대한 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 TG14L 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 5a).

[136] 도 5a는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, Beclin1의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5a에서 보듯이, Flag-ATG14L 융합단백질을 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34-Beclin1-ATG14L

복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[137]

[138] 실시예 5-2: 결합포화곡선 분석

[139]

[140] Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 5b).

[141] 도 5b는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 5b에서 보듯이, Flag-ATG14L 융합단백질을 12 nM 이상의 수준으로 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[142]

[143] 실시예 5-3: 면역블롯 분석

[144]

[145] 면역블롯 분석을 수행하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 처리농도별 결합활성을 비교하였다. 즉, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(0.78, 1.56, 3.12, 6.25 또는 12.5 nM)의 Flag-ATG14L 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 Flag-ATG14L 융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 Flag-ATG14L 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-ATG14L 항체를 사용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 5c).

[146] 도 5c는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 5c에서 보듯이, 12.5 nM 이상의 농도로 Flag-ATG14L 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 5b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[147]

[148] 실시예 6: Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 이용한 자가포식 특이적 억제제 스크리닝 방법의 유용성 검증

[149]

[150] 상기 실시예 5-1에서 제작된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 Beclin1과 ATG14L의 결합을 억제하는 물질은 자가포식 특이적 억제제로 간주할 수 있으므로, Beclin1에 대한 결합에 있어서 ATG14L과 경쟁할 수 있는 단백질로

알려진 UVRAG을 사용하여 상기 복합체의 유용성을 검증하고자 하였다.

[151] 먼저, UVRAG의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1의 방법을 수행하여 Flag-UVRAG 융합단백질을 제조하였다.

[152] 다음으로, 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-ATG14L 융합단백질 또는 상기 제조된 Flag-UVRAG 융합단백질을 TBST 완충액에 다양한 농도로 용해시킨 각각의 용액을 동시에 상기 실시예 4-1에서 제작된 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음, TBST 완충액에 희석된(1:500) ATG14L 또는 UVRAG에 대한 각각의 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 6).

[153] 도 6은 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, UVRAG의 경쟁억제 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 보듯이, UVRAG이 처리되지 않은 경우에는, 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질이 높은 수준으로 검출되었으나, UVRAG의 처리수준이 증가할수록 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질의 수준이 감소함을 확인하였다.

[154]

[155] 따라서, 자가포식을 특이적으로 억제할 것으로 예상되는 Beclin1과 ATG14L의 결합을 억제하는 물질은 상기 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 통해 스크리닝할 수 있음을 알 수 있었다.

[156]

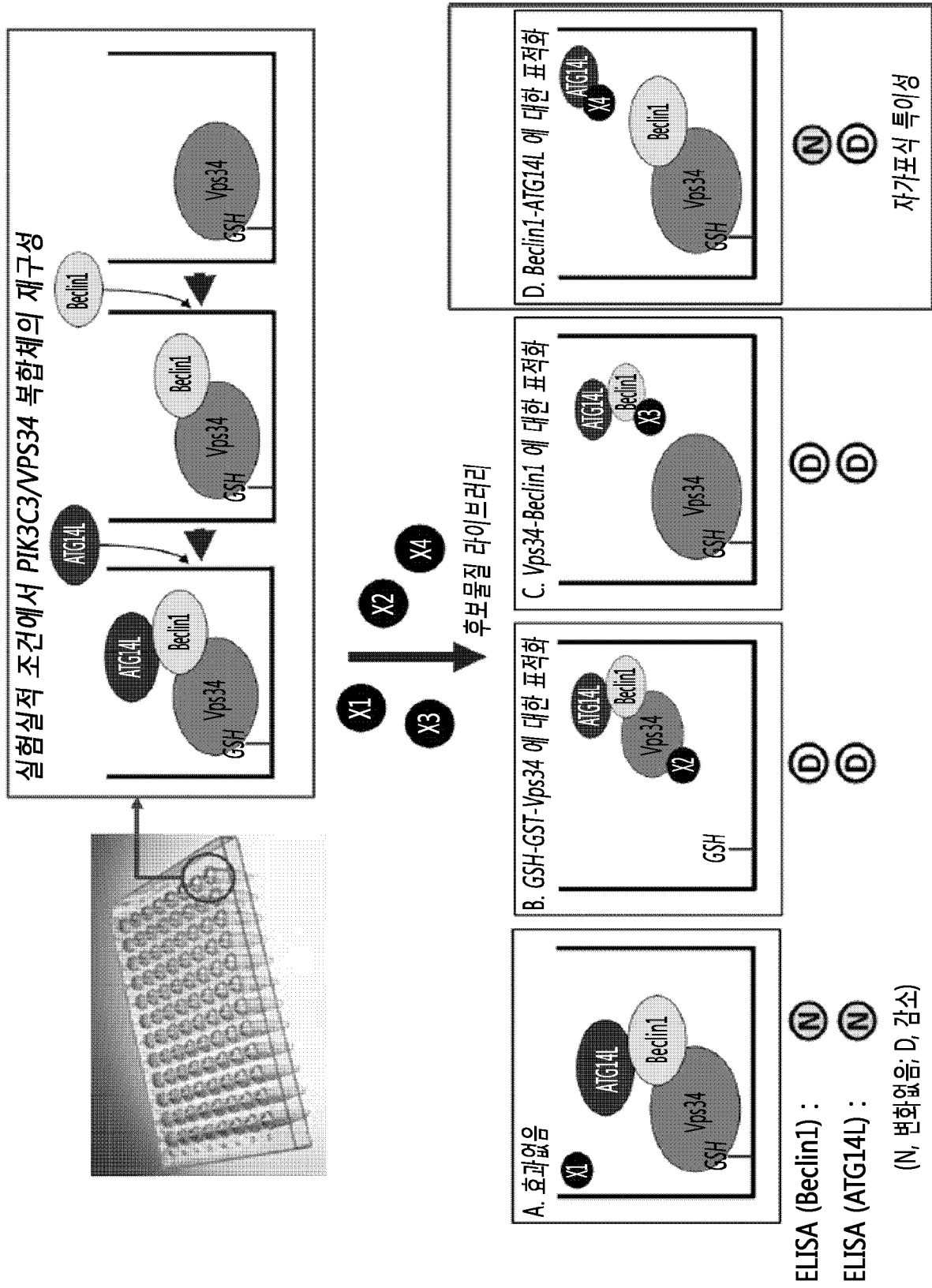
[157]

청구범위

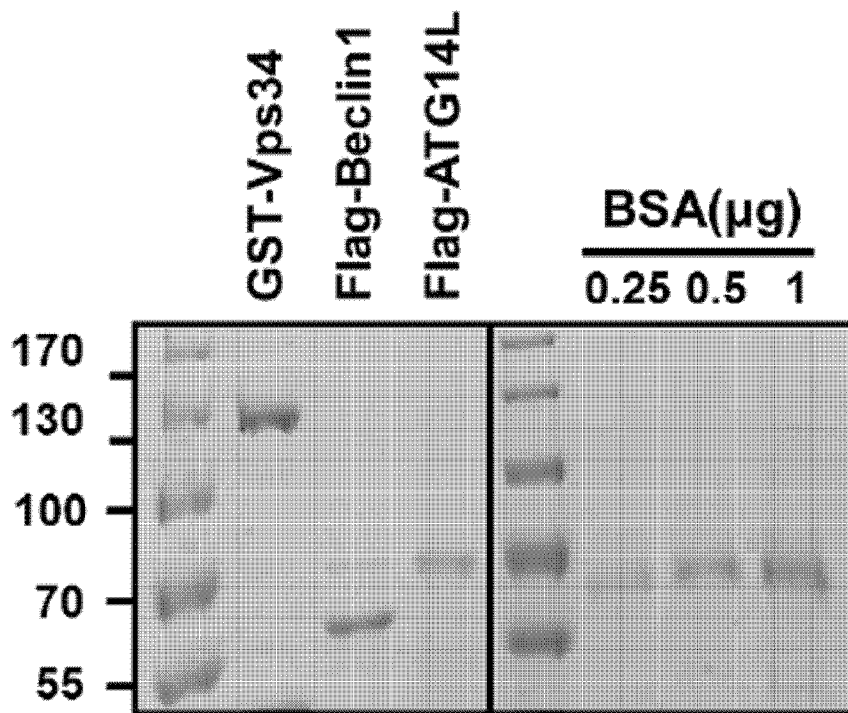
- [청구항 1] (a) Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1-ATG14L(autophagy related 14) 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및
(b) 상기 Vps34를 통해 Beclin1 및 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 자가포식 억제제의 스크리닝 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1-ATG14L(autophagy related 14) 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 (b) 단계에서 측정된 Beclin1의 수준은 후보물질과의 반응이전의 Beclin1의 수준보다 감소되지 않고, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이 후보물질과의 반응이전의 ATG14L의 수준보다 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 것인 방법.
- [청구항 4] (a) Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L(autophagy related 14)을 처리하는 단계; 및
(b) 상기 Vps34-Beclin1 복합체에 결합된 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 자가포식 억제제의 스크리닝 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이, 상기 후보물질을 처리하지 않고 ATG14L 만을 가하여 반응시켜서 확인된 ATG14L의 수준에 비하여 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 것인 방법.
- [청구항 7] Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체, ATG14L(autophagy related 14), Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 Vps34-Beclin1 복합체는 담체에 고정된 것인 키트.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제는 Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체인 것인 키트.
- [청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제는 ATG14L에 특이적으로

- 결합할 수 있는 항체인 것인 키트.
- [청구항 11] 제7항에 있어서,
Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체가 고정된 96웰 플레이트, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것인 키트.
- [청구항 12] (a) Vps34(vacuolar protein sorting 34) 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체에 상기 Vps34 또는 복합체와의 결합력을 측정하고자 하는 목적 단백질을 농도별로 처리하여 각각의 결합체를 수득하는 단계; 및,
(b) 상기 목적 단백질의 처리 농도에 따른 결합체 농도를 측정하여, 상기 Vps34 또는 복합체에 대한 목적 단백질의 결합력을 측정하는 단계를 포함하는, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
상기 (a) 단계의 복합체는 Vps34-Beclin1 복합체인 것인 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서,
상기 (a) 단계의 목적 단백질은 Beclin1 또는 ATG14L(autophagy related 14)인 것인 방법.
- [청구항 16] 제12항에 있어서,
상기 (b) 단계의 결합력 측정은, (a) 단계에서 처리된 목적 단백질의 농도와 (b) 단계에서 측정된 결합체의 농도를 이용하여 작성된 결합곡선(binding curve)을 이용하여 수행되는 것인 방법.

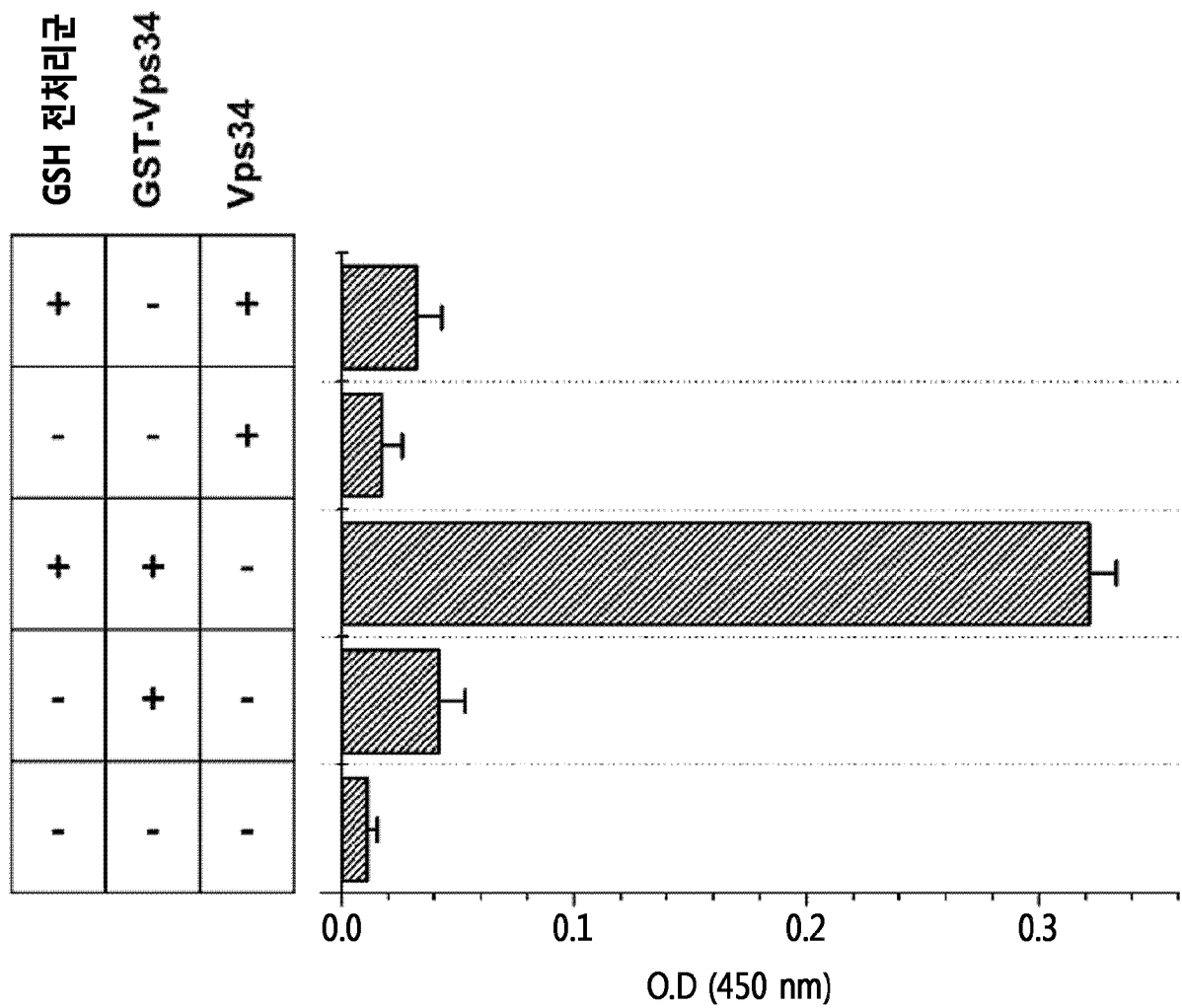
[도 1]



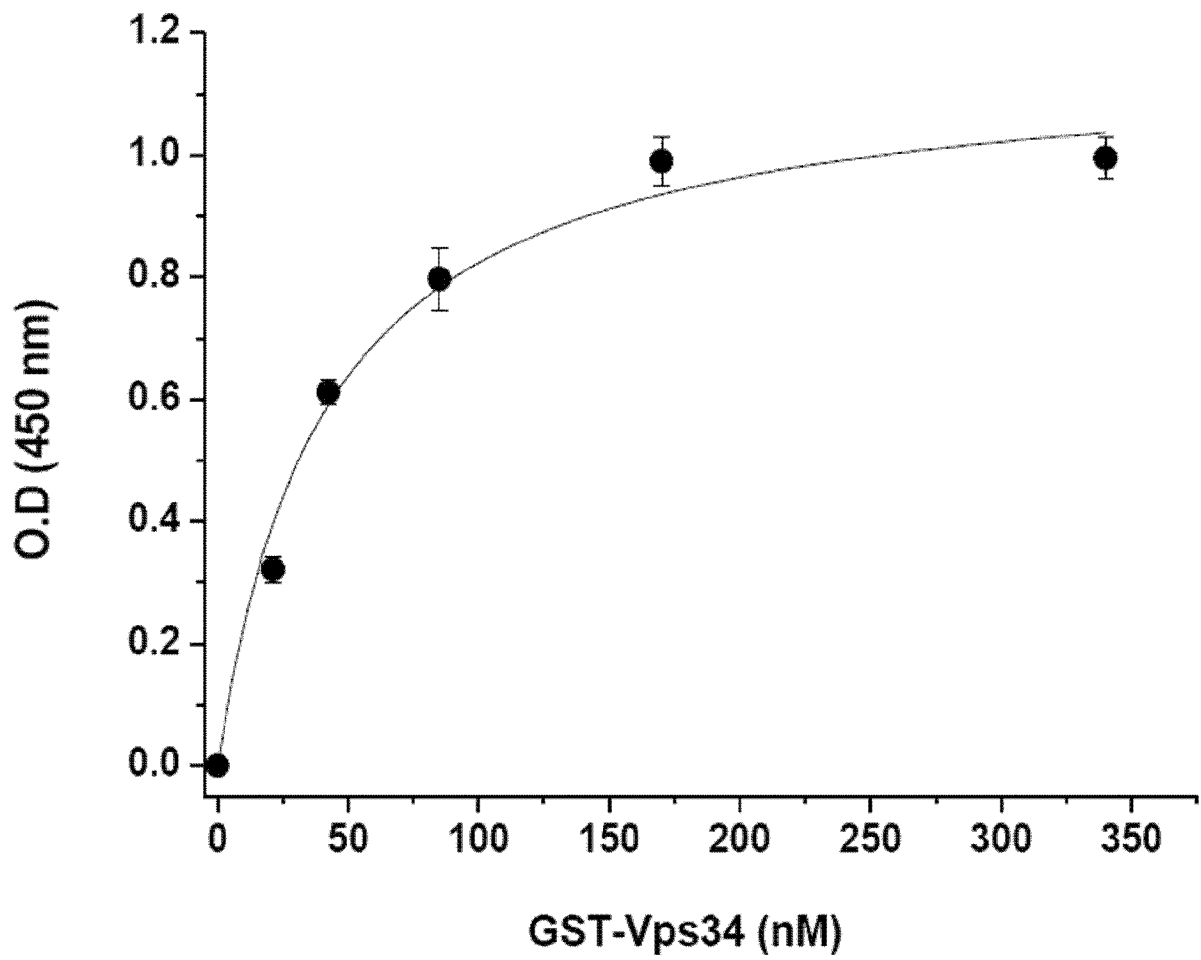
[도2]



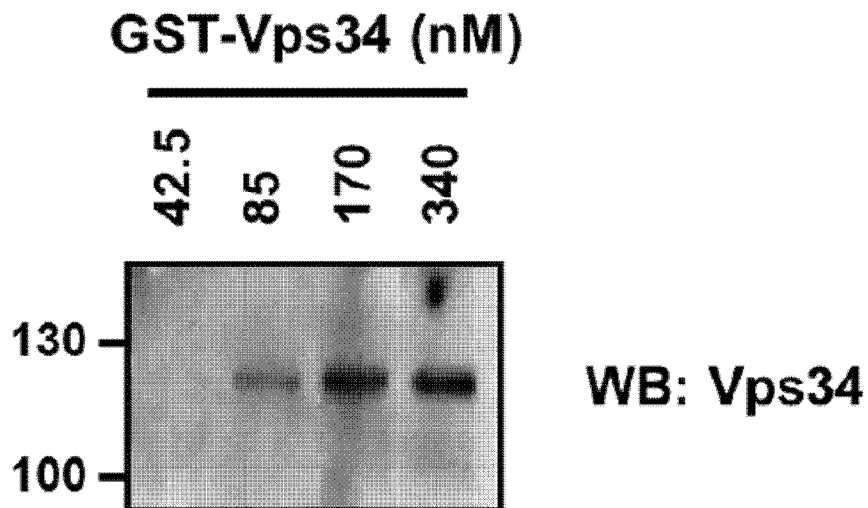
[도3a]



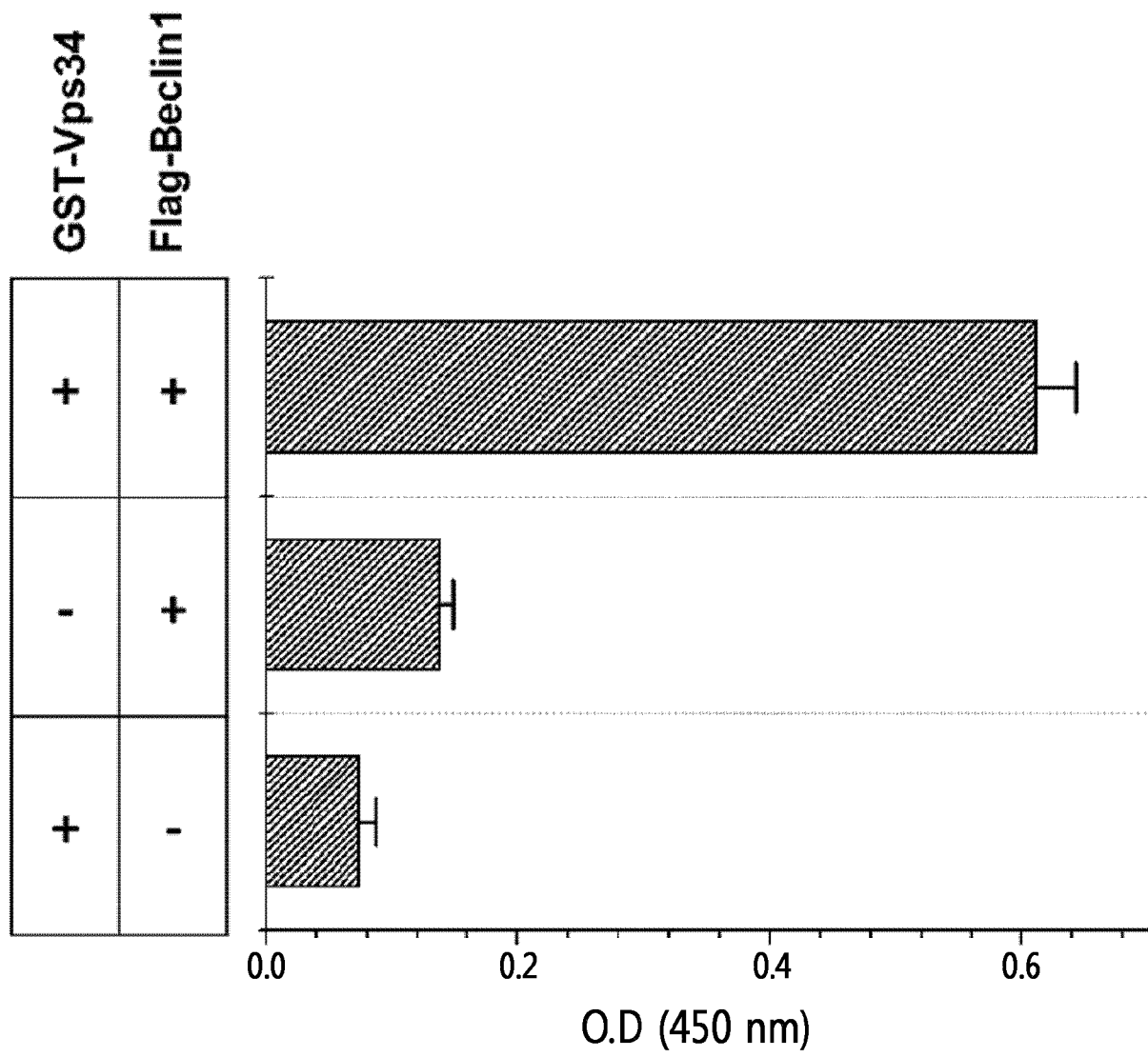
[도3b]



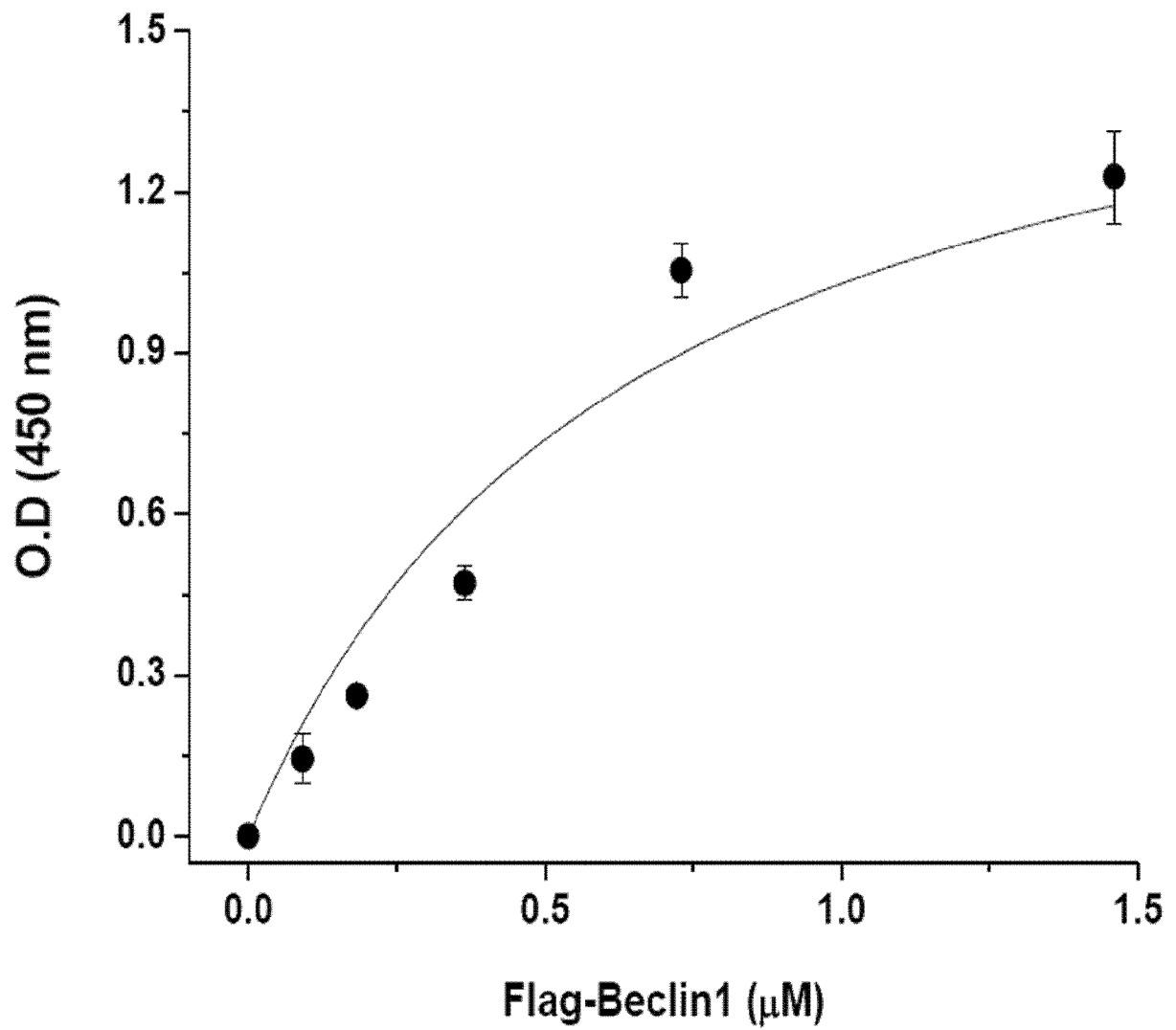
[도3c]



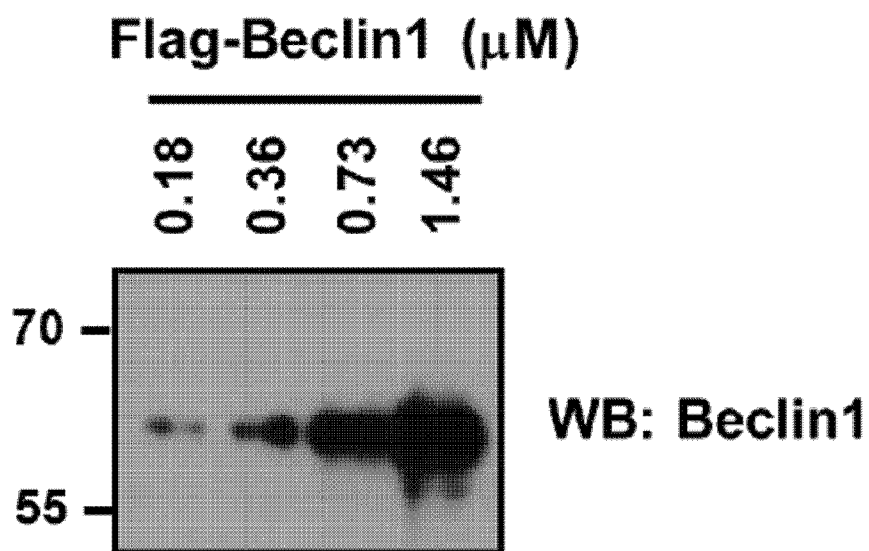
[도4a]



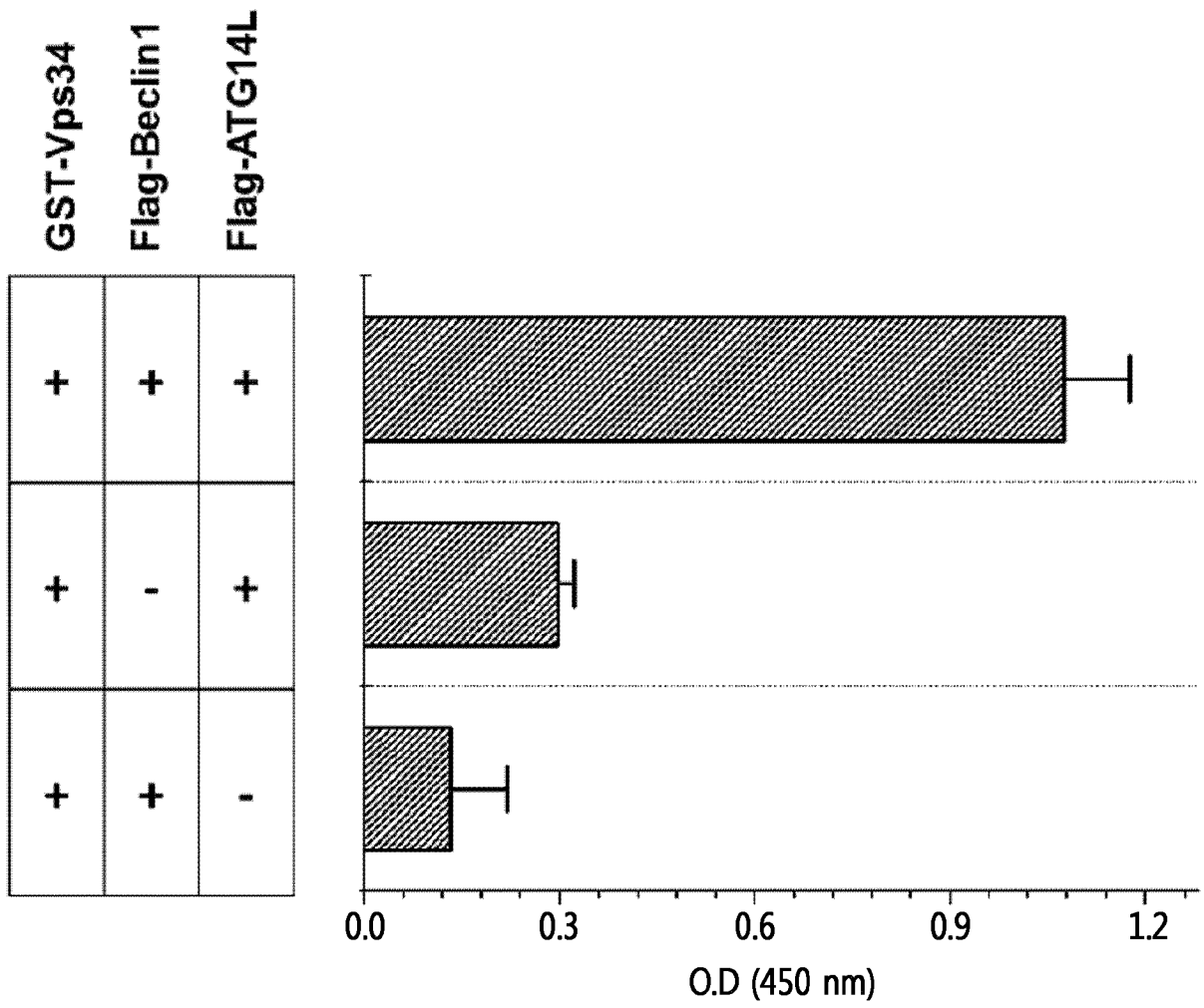
[도4b]



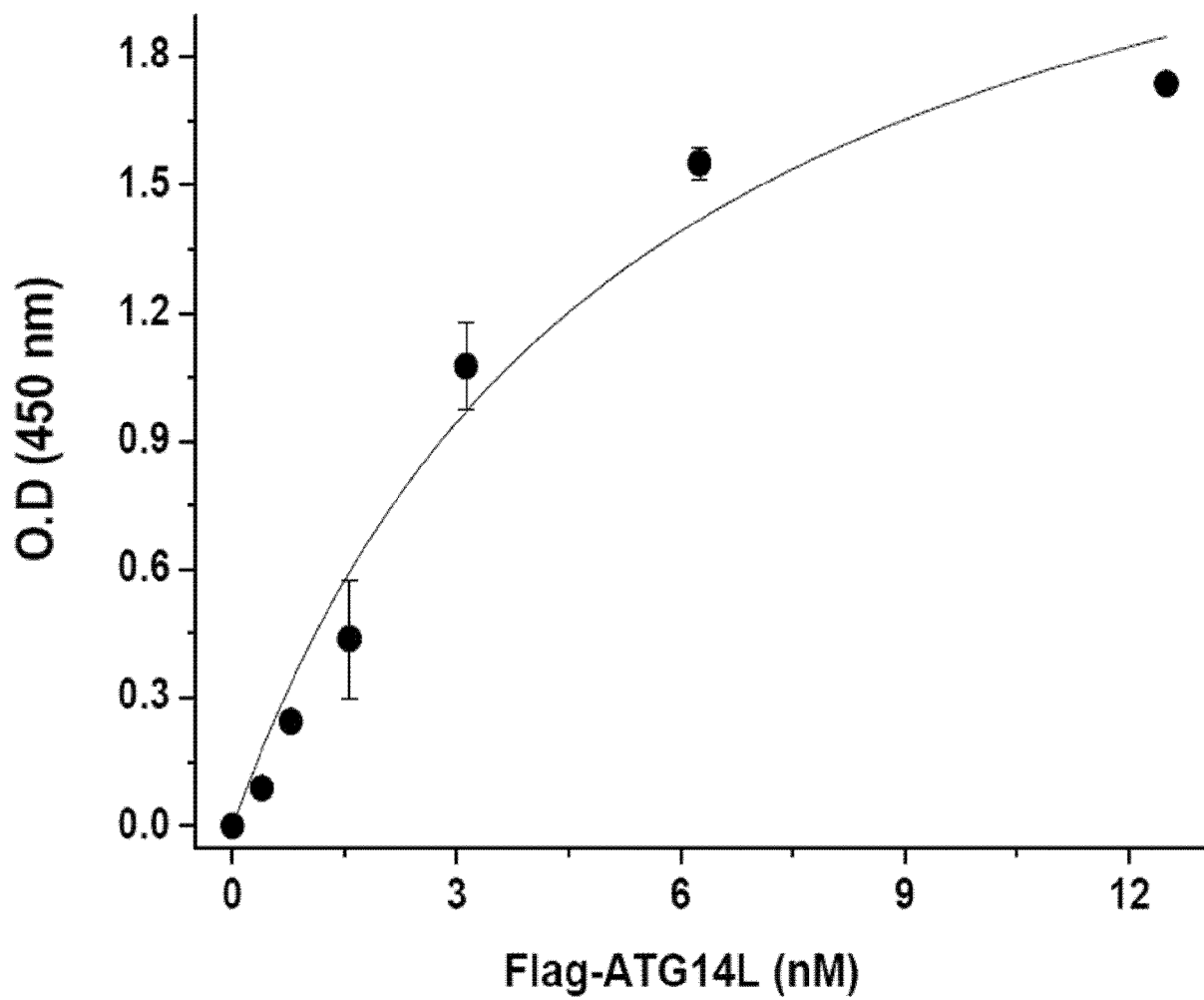
[도4c]



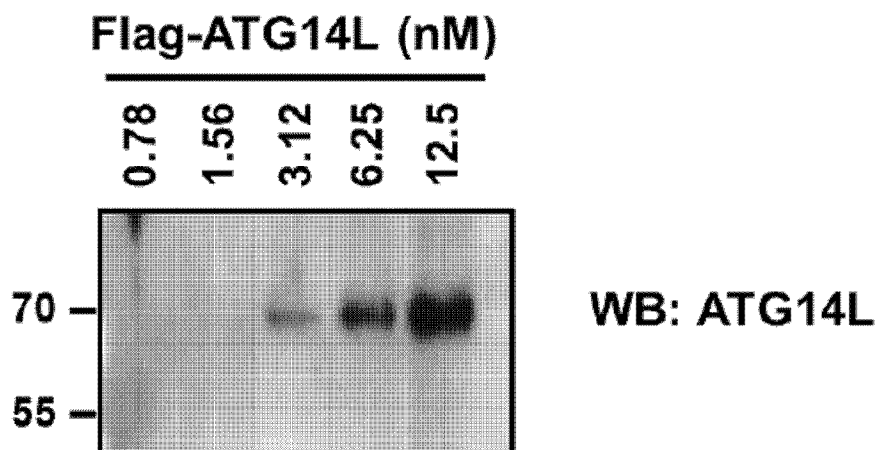
[도5a]



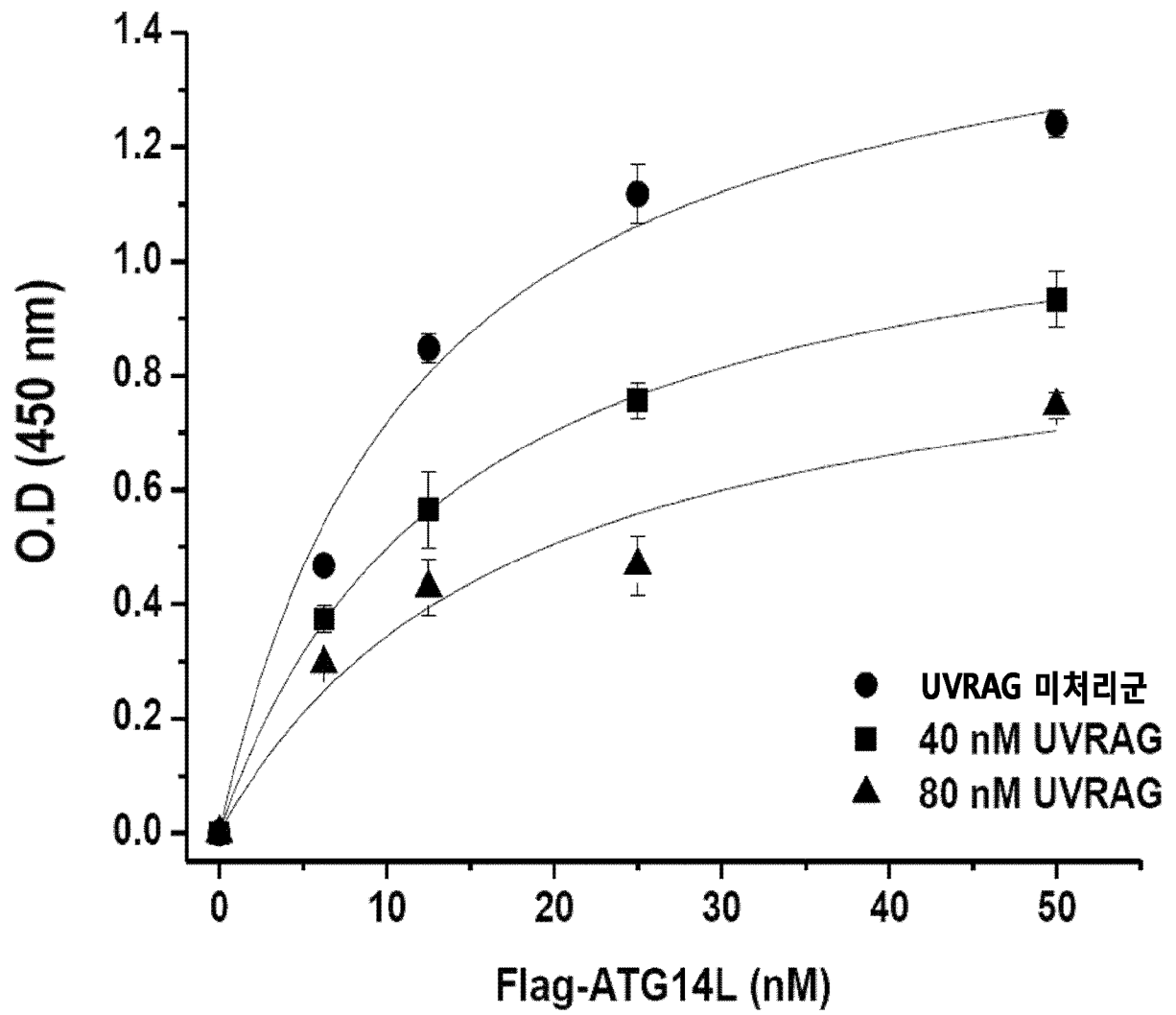
[도5b]



[도5c]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/50(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 31/422; A61K 31/00; C07K 16/18; G01N 33/53; A61K 31/519; G01N 33/50

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: Vps34, Beclin1, ATG14L, autophagy inhibitor, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM et al., "Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy" Cell, vol. 152, pages 290-303 (17 January 2013) See abstract and pages 291-293.	1-16
A	DAI et al., "Drug Screening for Autophagy Inhibitors based on the Dissociation of Beclin1-Bcl2 Complex Using BiFC Technique and Mechanism of Eugenol on Anti-influenza A Virus Activity" Plos One, vol. 8, no. 4, no. e61026, inner pages 1-16 (16 April 2013) See abstract and pages 2-4.	1-16
A	MA et al., "Dapper1 promotes Autophagy by Enhancing the Beclin1-Vps34-Atg14L Complex Formation" Cell Research, vol. 24, pages 912-924 (01 July 2014) See abstract.	1-16
A	KR 10-2011-0100435 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 14 September 2011 See claim 6 and the examples.	1-16
A	US 2010-0233730 A1 (WHITE et al.) 16 September 2010 See claims 2, 5 and example 8.	1-16



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

27 JUNE 2016 (27.06.2016)

Date of mailing of the international search report

27 JUNE 2016 (27.06.2016)

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/KR2016/002973

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011-041584 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 07 April 2011 See claims 1-8 and tables 2, 4, 6.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/002973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0100435 A	14/09/2011	KR 10-1168054 B1	27/07/2012
US 2010-0233730 A1	16/09/2010	US 2012-0202707 A1	09/08/2012
		US 2013-0178382 A1	11/07/2013
		US 2014-0134661 A1	15/05/2014
		US 8187802 B2	29/05/2012
WO 2011-041584 A2	07/04/2011	AU 2010-300531 A1	24/05/2012
		BR 112012007137 A2	15/09/2015
		CA 2774998 A1	07/04/2011
		CA 2774999 A1	07/04/2011
		CN 102639700 A	15/08/2012
		CN 102869775 A	09/01/2013
		EP 2483406 A2	08/08/2012
		EP 2483407 A2	08/08/2012
		JP 2013-506686 A	28/02/2013
		JP 2013-506687 A	28/02/2013
		JP 2016-040297 A	24/03/2016
		KR 10-2012-0082906 A	24/07/2012
		MX 2012003770 A	03/08/2012
		RU 2012117230 A	10/11/2013
		US 2012-0301463 A1	29/11/2012
		US 2012-0315244 A1	13/12/2012
		US 2014-0004108 A1	02/01/2014
		WO 2011-041582 A2	07/04/2011
		WO 2011-041582 A3	29/09/2011
		WO 2011-041584 A3	26/05/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 31/422; A61K 31/00; C07K 16/18; G01N 33/53; A61K 31/519; G01N 33/50

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: Vps34, Beclin1, ATG14L, 자가포식 억제제, 스크리닝

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM 등, "differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy" Cell, 152권, 290-303 페이지 (2013.01.17) 초록 및 291-293 페이지 참조.	1-16
A	DAI 등, "Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity" Plos One, 8권, 4호, 번호 e61026, 내부 페이지 1-16 (2013.04.16) 초록 및 2-4 페이지 참조.	1-16
A	MA 등, "Dapper1 promotes autophagy by enhancing the Beclin1-Vps34-Atg14L complex formation" Cell Research, 24권, 912-924 페이지 (2014.07.01) 초록 참조.	1-16
A	KR 10-2011-0100435 A (연세대학교 산학협력단) 2011.09.14 청구항 6 및 실시예 참조.	1-16
A	US 2010-0233730 A1 (WHITE 등) 2010.09.16 청구항 2, 5 및 실시예 8 참조.	1-16

☒ 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 06월 27일 (27.06.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 27일 (27.06.2016)

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	WO 2011-041584 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2011.04.07 청구항 1-8 및 표 2, 4, 6 참조.	1-16

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

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

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

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

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0100435 A	2011/09/14	KR 10-1168054 B1	2012/07/27
US 2010-0233730 A1	2010/09/16	US 2012-0202707 A1	2012/08/09
		US 2013-0178382 A1	2013/07/11
		US 2014-0134661 A1	2014/05/15
		US 8187802 B2	2012/05/29
WO 2011-041584 A2	2011/04/07	AU 2010-300531 A1	2012/05/24
		BR 112012007137 A2	2015/09/15
		CA 2774998 A1	2011/04/07
		CA 2774999 A1	2011/04/07
		CN 102639700 A	2012/08/15
		CN 102869775 A	2013/01/09
		EP 2483406 A2	2012/08/08
		EP 2483407 A2	2012/08/08
		JP 2013-506686 A	2013/02/28
		JP 2013-506687 A	2013/02/28
		JP 2016-040297 A	2016/03/24
		KR 10-2012-0082906 A	2012/07/24
		MX 2012003770 A	2012/08/03
		RU 2012117230 A	2013/11/10
		US 2012-0301463 A1	2012/11/29
		US 2012-0315244 A1	2012/12/13
		US 2014-0004108 A1	2014/01/02
		WO 2011-041582 A2	2011/04/07
		WO 2011-041582 A3	2011/09/29
		WO 2011-041584 A3	2011/05/26