



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0128282  
(43) 공개일자 2015년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 5/0786* (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)

*C12Q 1/02* (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0055390

(22) 출원일자 2014년05월09일

심사청구일자 2014년05월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

전태훈

서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아파트 236동 1802호

한지혜

서울특별시 서대문구 독립문공원길 13, 106동 1404호 (현저동, 독립문극동아파트)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 13 항

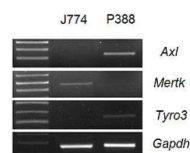
(54) 발명의 명칭 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 리간드 또는 활성화제를 포함하는 대식세포의 자식작용 유도용 조성물 및 그의 이용

### (57) 요약

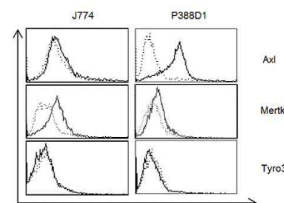
본 발명은 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Axl, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 자식작용 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화를 이용한 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Axl, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제는 대식세포의 자식작용 (autophagy)을 유도하여, 자식작용 (autophagy)이 관여하는 암, 염증성질환, 면역질환 또는 신경계 질환 등의 질환에 효과적인 치료제로 작용할 수 있다.

### 대표도 - 도1

(가)



(나)



가: 실험, isotype control; 양은 실험, 양 Axl, MerTK, Tyro3 수용체 항체

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008089

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 동물유전체육종사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 이유후전신소모성증후군(PWVS) 발병 방지를 위한 면역 조절 기전 규명 및 이를 이용한 질병 저항성 활용 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Axl, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 티로신 인산화 효소 수용체는 Axl 인 것을 특징으로 하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 리간드는 Gas6 (Growth arrest-specific 6)인 것인, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 활성화제는 상기 수용체와 결합할 수 있는 단백질, 성장인자, 사이토카인, 호르몬, 나노입자 또는 화합물인 것인, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 자식작용 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 자식작용 관련 질환은 암, 염증성질환, 면역질환 및 신경계 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 궤양염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 거대 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 헤노흐-셴라인자반병, 중심성 세망조각구종, 혈색소병증, 가족성 지중해열, 베체트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 채귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 것으로부터 선택된 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

(1) 대식세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(2) 상기 대식세포에서 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화를 확인하는 단계;를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도제의 스크리닝 방법.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체는 Ax1인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

#### 청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화는 mRNA 수준 또는 단백질 수준의 증가 여부를 확인하는 것에 의한 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

#### 청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 mRNA 수준은

상기 TAM 패밀리가 Tyro3인 경우, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;

상기 TAM 패밀리가 Ax1인 경우, 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트; 및

상기 TAM 패밀리가 Mer인 경우, 서열번호 5 및 6의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

#### 청구항 12

청구항 8에 있어서, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화 확인은 Atg5 (Autophagy protein 5), LC3B (light chain-3B) 또는 Beclin-1의 발현여부를 확인하는 것에 의한 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 Atg5 (Autophagy protein 5)의 발현여부는 서열번호 9 및 10의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;

상기 LC3B (light chain-3B)의 발현여부는 서열번호 11 및 12의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트; 및

상기 Beclin-1의 발현여부는 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;를 이용하여 mRNA의 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Ax1, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물에 관한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 자식작용 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 상기를 이용한 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

- [0004] 자식작용은 오토파고솜(autophagosome)을 형성하여, 기아(starvation)와 같은 스트레스 상황에서 오래된 단백질이나, 기능을 잃은 기관(organ) 또는 세포질안의 구성물들을 제거하고, 병원체 감염 시에는 병원체를 제거하는 등 세포의 항상성을 유지하는 중요한 라이소솜 분해 작용이다.
- [0005] 자식작용은 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)와 virus와 같은 병원체 감염기간 동안 내재면역(innate immunity) 기능을 수행하며, MHC class II를 통한 항원 제시와 같은 적응면역 기능 또한 수행한다. 자식작용은 주로 자식작용 관련 유전자(autophagy related gene; atg)의 산물이나 사이토카인 등에 의해 조절된다. 한 예로 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 는 자식작용의 양성 조절자이며, IL-4와 IL-13은 자식작용을 억제한다.
- [0006] Ax1은 티로신 인산화 효소 수용체(Receptor tyrosine kinase)의 한 종류로 구조와 아미노산서열의 유사성을 바탕으로 Mertk, Tyro3 티로신 인산화 효소 수용체와 함께 TAM RTK (Tyro-3, Ax1, Mertk receptor tyrosine kinase) family를 이룬다. Ax1은 여러 종류의 세포에서 발현되며 자신의 리간드인 Gas6와 결합하여 활성화 되면 phosphatidylinositol 3-kinase-Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, P38 MAP kinases,

JNK, nuclear factor (NF)-kB 등과 같은 다양한 신호전달체계를 조절하여 세포의 생존, 증식 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 그러나, Ax1 티로신 인산화 효소 수용체와 자식작용은 둘 다 내재 면역반응에서나 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나, 대식세포의 자식작용에서 Ax1이 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 아직 연구되어지지 않았다.

[0008] 이에 본 발명자는 Ax1를 포함하는 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체와 대식세포에서의 자식작용이 상호 관련성을 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 일 양상은 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Ax1, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는 자식작용 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 양상은 대식세포에서 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화를 확인하여 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양상은 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Ax1, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도용 조성물을 제공한다.

[0013] 이하 본 발명을 자세히 설명한다.

[0014] 본 발명에서 상기 티로신 인산화 효소 수용체 (Receptor tyrosine kinase 또는 tyrosine kinase receptor)는 다양한 폴리펩티드 성장인자, 사이토카인, 또는 호르몬과 고친화성을 나타내는 세포 표면에 존재하는 수용체이다. 이 중 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Ax1, Mer family receptor tyrosine kinases)는 특정한 구조 및 아미노산 서열의 유사성을 바탕으로 Tyro3, Ax1, Mer를 포함하는 패밀리아이다. 상기 TAM 패밀리의 티로신 인산화 효소 수용체는 특히, Ax1일 수 있다. Ax1은 vitamin K-dependent protein family에 속하는 Growth-arrest specific gene 6 (Gas6)에 의해 활성화되어지는 receptor tyrosine kinase이다.

[0015] 본 발명에서 상기 리간드는 표적 수용체 또는 단백질에 결합할 수 있는 물질을 지칭한다. 상기 리간드는 수용체의 다양한 다른 부위 또는 특정 부위에 결합할 수 있으며, 다른 리간드와 수용체에 결합하기 위하여 경쟁할 수 있다. 상기 리간드는 약제 또는 약제 후보물질, 또는 천연적으로 발생하는 결합 파트너, 생리학적 기질 등일 수 있다. 따라서 리간드는 표적 수용체와 결합하여 더욱 큰 복합체를 형성할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 리간드는 Gas6 (Growth arrest-specific 6)일 수 있다.

[0016] 본 발명에 상기 활성화제란 상기 수용체에 결합하여 수용체의 신호 전달을 활성화할 수 있는 물질을 의미하며, 예를 들어 단백질, 성장인자, 사이토카인, 호르몬, 나노입자 또는 화합물일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 상기 대식세포란 동물체 내에서 거의 모든조직에 분포하고 이물이나 노폐세포 등을 포식하여 소화하는 기능을 갖는 대형의 아메바상 세포를 의미한다. 면역담당세포의 일종으로 유주성 대식세포: 혈액단구(혈류 중의 단구), 폐포대식세포, 복강대식세포, 염증부위육아종대식세포 등, 정착성 대식세포: 쿠퍼세포, 중추신경계의 소교세포, 피하 그 외의 결합조직에서 볼 수 있는 조직구, 비장·골수·림프절등에서의 세망내피 및 림프구 간극에 돌기를 뻗고 있는 수지상 대식세포, 혈관외막세포 등이 그 예이다. 하등동물에서 고등동물에까지 존재하며 생체면역기능 유지에 관여한다.

[0018] 또한 본 발명에서 상기 자식작용 (autophagy)은 자가 소화 작용 또는 자기소모 작용으로도 지칭하며, 세포가 영양소 결핍에 반응하여 자신의 단백질을 분해하거나, 세포의 재구축 등의 과정에서 불필요한 세포 성분 또는

소기관 등을 제거하는 작용을 의미한다.

- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 자식작용 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 자식작용 관련 질환은 암, 염증성질환, 면역질환 또는 신경계 질환일 수 있다.
- [0021] 상기 암은 예를 들면, 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁 경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0022] 상기 염증성 질환은 예를 들면 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절 병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성 근육통, 거대 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 헤노흐-셴라인자반 병, 중심성 세망조직구종, 혈액소병증, 가족성 지중해열, 베체트 병, 진신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 또는 염증성 피부질환일 수 있다.
- [0023] 상기 면역질환은 예를 들면 자가면역질환, 이식거부, 관절염, 이식편대숙주병, 세균감염 등 일 수 있다. 상기 자가면역질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 진신성 경피증, 천식 및 궤양성 대장염일 수 있다.
- [0024] 상기 신경계 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, HIV 치매, 간질, 정신분열증, 우울증, 조울증, 신경발생장애, 자폐증, 뇌졸중, 루게릭, 헌팅턴병 및 다발성경화증 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 0.001 내지 100mg/kg/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은

[0030] (1) 대식세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[0031] (2) 상기 대식세포에서 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화를 확인하는 단계;를 포함하는, 대식세포의 자식작용 (autophagy) 유도제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0032] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체는 Axl일 수 있다. 또한, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화는 mRNA 수준 또는 단백질 수준의 증가 여부를 확인하는 것에 의할 수 있다. 바람직하게, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 mRNA 수준은

[0033] 상기 TAM 패밀리가 Tyro3인 경우, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;

[0034] 상기 TAM 패밀리가 Axl인 경우, 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트; 및

[0035] 상기 TAM 패밀리가 Mer인 경우, 서열번호 5 및 6의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;를 이용하여 측정할 수 있다.

[0036] 상기 프라이머 세트의 서열정보는 하기와 같다.

| Gene name | GenBank Accession No. | Primer  | Sequence (5'-3')          | 서열번호 | Size (bp) |
|-----------|-----------------------|---------|---------------------------|------|-----------|
| Axl       | NM_009465             | Forward | TGGCCTTGGTGGTATGTACTG     | 1    | 331bp     |
|           |                       | Reverse | CCTGATTGAGCTGACCTTCC      | 2    |           |
| Mertk     | NM_008587             | Forward | AACACAGCCTTCAACCTCACCTGC  | 3    | 562bp     |
|           |                       | Reverse | CTCATTCCGACAGGACACAGCGA   | 4    |           |
| Tyro3     | NM_019392             | Forward | CCAGTGAAGATGACCGTGTCTCAGG | 5    | 570bp     |
|           |                       | Reverse | GCTGGAGATCGTTGTTACTGTGGTG | 6    |           |
| GAPDH*    | NM_001289726          | Forward | ATGACCACAGTCCATGCCATC     | 7    | 271bp     |
|           |                       | Reverse | CCTGCTTCACCACTTCTTG       | 8    |           |

[0037]

[0038] 또한, 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화 확인은 Atg5 (Autophagy protein 5), LC3B (light chain-3B) 또는 Beclin-1의 발현을 확인하는 것에 의할 수 있다.

[0039] 상기 Atg5 (Autophagy protein 5)의 발현은 서열번호 9 및 10의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;

[0040] 상기 LC3B (light chain-3B)의 발현은 서열번호 11 및 12의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트; 및

[0041] 상기 Beclin-1의 발현은 서열번호 13 및 14의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트;를 이용하여 mRNA의 수준을

측정할 수 있다.

[0042] 상기 프라이머의 서열 정보는 하기와 같다.

| <i>Gene name</i> | <i>GenBank Accession No.</i> | <i>Primer</i> | <i>Sequence (5'-3')</i> | 서열번호 | <i>Size (bp)</i> |
|------------------|------------------------------|---------------|-------------------------|------|------------------|
| Atg5             | NM_053069                    | Forward       | ATGGACAGCTGCACACACTT    | 9    | 86bp             |
|                  |                              | Reverse       | CTGGCTCCTCTTCTCTCCAT    | 10   |                  |
| LC3B             | NM_026160                    | Forward       | GCTTGCAGCTCAATGCTAAC    | 11   | 117bp            |
|                  |                              | Reverse       | GGAAGCCGTCTTCATCTCTC    | 12   |                  |
| Beclin-1         | NM_019584                    | Forward       | TGACCATGCAATGGTAGCTT    | 13   | 105bp            |
|                  |                              | Reverse       | TTCTCCACGTCCATCCTGTA    | 14   |                  |
| GAPDH*           | NM_001289726                 | Forward       | TGTGTCCGTCGTGGATCTGA    | 15   | 77bp             |
|                  |                              | Reverse       | CCTGCTTCACCACCTTCTTGA   | 16   |                  |

[0043]

[0044]

본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA), shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA), miRNA, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 화학물질은 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), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

[0045]

또한, 화학물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예컨대, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고체상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0046]

시험물질이 처리된 대식 세포에서 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 활성화 여부를 측정한다. 상기 활성화 여부 측정은 상기 수용체에 결합 여부의 측정에 의할 수 있으며, 하기 기재한 바와 같이 통상적인 방법을 통해 실시하며, 상기 시험물질이 상기 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체에 결합하여, 신호전달이 활성화 되었는지 여부를 확인한다.

[0047]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 단계에서 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 활성화는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체의 양의 변화 및 결합 여부는 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블롯팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 통해 검출될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048]

상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0049]

예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C14, I125, P32 및 S35)로 표지된 항체가 본 발명의 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 활성화를 검출하는 데 이용될 수 있다.

- [0050] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 용해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 타겟(예컨대, 본 발명의 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체)에 대한 항체와 상기 세포 용해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0051] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0052] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제,  $\beta$ -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 타겟(예컨대, 본 발명의 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체)에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 용해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 본 발명의 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체에 특이적으로 반응하는 검출 항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0054] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P450), 방사능 물질((예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0055] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0056] 본 발명에 따른 TAM 패밀리 티로신 인산화 효소 수용체 (Tyro3, Axl, Mer family receptor tyrosine kinases)의 리간드 또는 활성화제는 대식세포의 자식작용 (autophagy)을 유도하여, 자식작용 (autophagy)이 관여하는 암, 염증성질환, 면역질환 또는 신경계 질환 등의 질환에 효과적인 치료제로 작용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 RT-PCR과 유세포 분석기에 의한 대식세포(P388D1, J774)에서 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체(Receptor tyrosine kinase) 발현을 확인한 결과이다.
- 도 2는 Gas6 처리에 의해 활성화된 Ax1-Gas6 신호전달체계에 의한 대식세포의 자식작용 유도를 나타낸 도이다.
- 도 3은 Ax1-Gas6신호 전달체계 활성화에 의한 Atg5, Beclin-1, LC3B 전사체 발현 증가를 나타낸 도이다.
- 도 4는 RT-PCR과 유세포 분석기에 의한 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체(Receptor tyrosine kinase) 발현을 확인한 도이다.
- 도 5는 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Gas6 처리에 따른 자식작용 유도 정도 비교한 도이다.
- 도 6은 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Gas6 처리에 따른 Atg5, Beclin-1, LC3B 전사체 발현 정도 비교를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 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.

- [0059] 실시예 1: RT-PCR과 유세포 분석법에 의한 대식세포 세포주(P388D1, J774) 세포주에서 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체(Receptor tyrosine kinase) 발현 확인

- [0060] J774 (cat # TIB-67), P388D1 (cat # CCL-46)은 생쥐 대식 세포주로서 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 세포 배양 하였다. 그 후, 두 종류의 세포에서 RT-PCR과 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체 발현을 확인하였다. 우선 RT-PCR을 수행하기 위해, 대식세포를 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200 ul의 chloroform (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 추출한 1 ug의 mRNA를 주형으로 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 복제한 후, 표 1과 같은 프라이머를 제작하여 연쇄증합반응을 실시하였다. 이 때 사용한 역전사 효소는 Superscript III (Invitrogen) 이고, 증합효소는 Tag polymerase (Gene craft)이다.

표 1

| Gene name | GenBank Accession No. | Primer  | Sequence (5'-3')          | 서열번호 | Size (bp) |
|-----------|-----------------------|---------|---------------------------|------|-----------|
| Ax1       | NM_009465             | Forward | TGGCCTTGGTGGTATGTACTG     | 1    | 331bp     |
|           |                       | Reverse | CCTGATTGAGCTGACCTTCC      | 2    |           |
| Mertk     | NM_008587             | Forward | AACACAGCCTTCAACCTCACCTGC  | 3    | 562bp     |
|           |                       | Reverse | CTCATTCGACAGGACACAGCGA    | 4    |           |
| Tyro3     | NM_019392             | Forward | CCAGTGAAGATGACCGTGTCTCAGG | 5    | 570bp     |
|           |                       | Reverse | GCTGGAGATCGTTGTTACTGTGGTG | 6    |           |
| GAPDH*    | NM_001289726          | Forward | ATGACCACAGTCCATGCCATC     | 7    | 271bp     |
|           |                       | Reverse | CCTGCTTCACCACCTTCTTG      | 8    |           |

- [0061]
- [0062] RT-PCR 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0063] 도 1의 (가)에 나타난 바와 같이, 331bp의 생쥐 Ax1 수용체의 mRNA transcript 산물이 P388D1 세포에서 발견됐다. 또한 Ax1과 함께 티로신 인산화 효소 수용체 family를 이루는 Mertk 수용체의 mRNA transcript 산물은 J774 생쥐대식세포에서 발견되었고, Tyro3 티로신 인산화 수용체는 P388D1 세포주에서 소량 발현되는 것을 확인하였다. 내적 대조구인 GAPDH 산물(271 bp)은 P388D1과 J774 세포 모두에서 발견되었다.
- [0064] 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 대식세포(P388D1)에서 Ax1 수용체 발현을 확인하기 위하여 대식세포

(P388D1)에 항 Ax1 수용체 항체(R&D systems)를 처리하고, 유세포 분석기를 이용해 형광강도를 측정하였다. 이 때 사용된 isotype control은 PE-conjugated ratIgG1κ로 BDpharmingen에서 구입하였다. 그 결과를 도 1의 (나)에 나타내었다.

[0065] 도 1의 (나)에 나타난 바와 같이, 대식세포(P388D1)에서 Ax1 수용체 발현을 확인하였다.

[0066] **실시예 2: Gas6 처리에 의해 활성화된 Ax1-Gas6 신호전달체계에 의한 대식세포의 자식작용 유도**

[0067] 대식세포 (P388D1)에서 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체가 리간드인 Gas6와 결합하여 활성화되어 자식작용을 유발하는지 알아보기 위해 Gas6 재조합 단백질을 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에 농도 별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 western blot을 통해 자식작용 유발 정도를 분석하였다. 먼저 Gas6를 처리하여 24시간 동안 배양한 대식세포 (P388D1)를 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)이 포함된 cell lysis solution (50 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 200 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)에 lysis 시킨 후, 12% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 시켜, Immobilon P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)에 transfer 하였다. 그 후 정제된 항 LC3B (Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA, USA)를 membrane에 처리한 후, ECL system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에서 발색 시켜, LC3B band를 확인하였다.

[0068] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0069] 도 2의 (가)에 나타난 바와 같이, Gas6 재조합 단백질을 고농도로 처리할수록 자식작용 표지자인 LC3B I band 감소와 LC3B II band가 증가하는 것으로 보아 자식작용이 증가하였다는 것을 알 수 있었다. 이 때 사용된 내적 대조구는 항  $\beta$ -actin 항체에 의한  $\beta$ -actin의 발현량으로, 모든 샘플에서 동일한  $\beta$ -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 전기영동 한 것을 알 수 있었다. 이 결과들로 미루어 보아 대식세포 (P388D1)에서 Gas6에 의해 활성화된 Ax1이 자식작용을 유발한다는 것을 알 수 있었다.

[0070] 그 다음, Ax1이 자식작용을 유발하는 것을 확인하기 위해 자식작용 표지자로 쓰이는 rat LC3B와 GFP fusion 단백질 cDNA가 삽입되어 있는 pLNCX2 vector (Invitrogen)를 이용하여 레트로바이러스에 의한 형질전환시스템을 통하여 P388D1 세포주에 GFP.LC3B fusion 단백질을 과발현 시켰다. 우선 293GPG 세포를 6 well 조직 배양 플레이트에 well 당  $1 \times 10^5$  세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70-80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 혈청이 없는 DMEM 배지에서 1-2  $\mu$ g의 재조합 GFP.LC3B fusion 단백질 유전자 발현 벡터 DNA를 6-8  $\mu$ g의 Lipofectamine plus (Invitrogen)를 사용하여 293GPG 세포에 도입시켰다. 그 후 발현 벡터가 도입된 293GPG 세포를 24시간 배양하여 virus (retrovirus)를 포함하는 배양 상층액으로 이용 숙주세포(P388D1 세포)를 4-5 시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 24시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 숙주세포(P388D1 세포)는 형질 도입된 세포를 얻기 위해 G418 항생제 1.5 mg/ml를 처리하여 유전자가 발현되는 세포를 얻었다. 그 후, 공초점현미경(confocal microscopy)으로 재조합 GFP.LC3B fusion 단백질이 발현되는 P388D1 세포주에서 Gas6 재조합 단백질을 농도 별로 처리 한 후 autophagosome으로 볼 수 있는 1  $\mu$ m 크기 이상의 LC3.EGFP 점(dot)을 confocal microscopy로 확인하였고, 이 점을 정량화하여 그래프로 나타내었다

[0071] 그 결과를 도 2 (나)에 나타내었다.

[0072] 도 2의 나에 나타난 바와 같이, Gas6 재조합 단백질을 고농도로 처리할수록, 아무것도 처리하지 않은 대조구보다 autophagosome으로 볼 수 있는 1 $\mu$ m 크기 이상의 LC3.EGFP 점(dot)이 증가한 것을 볼 수 있었다.

[0073] 또한 Ax1-Gas6에 의해 유도되는 자식작용이 활성화된 Ax1-Gas6 신호전달체계 하부의 특이적인 반응인지 확인하기 위하여 GFP.LC3B fusion 단백질이 발현되는 P388D1 세포주에 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체를 중화시킬 수 있는 Ax1-인간 면역글로불린 Fc fusion 재조합 단백질을 Gas6와 함께 처리해 24시간 배양한 후 autophagosome으로 볼 수 있는 1  $\mu$ m 크기 이상의 LC3.EGFP 점(dot)을 confocal microscopy로 확인하였다.

[0074] 그 결과를 도 2의 (다)에 나타내었다. 도 2의 (다)에 나타난 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 음성 대조구와 비교하여 Gas6를 처리한 경우 LC3.EGFP 점(dot)의 수가 증가 한 반면, Gas6와 Ax1-인간 면역글로불린 Fc fusion 재조합 단백질을 동시에 처리한 경우 LC3.EGFP 점(dot)의 개수가 감소한 것을 볼 수 있었다. 이 결과로

보아 Gas6 처리 시 유도되는 자식작용이 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체 신호 전달 체계 하부의 특이적인 반응이라는 것을 알 수 있었다.

### 실시예 3: Ax1-Gas6신호 전달체계 활성화에 의한 Atg5, Beclin-1, LC3B 전사체 발현 증가

활성화된 Ax1-Gas6 신호전달 체계에 의해 유도되는 자식작용이 어떠한 메커니즘에 의해 일어나는지 알아보기 위하여 자식작용 유도에 중요한 역할을 하고 있는 물질로 알려진 Atg5, LC3B, Beclin-1의 mRNA 발현 정도를 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)을 이용하여 알아보았다. Ax1의 신호를 활성화시키기 위하여 P388D1 대식세포 세포주에 Gas6를 시간 별로 처리한 후, 상기 실시 예 1에 나타난 것과 같이 트리졸 (Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200  $\mu$ l의 클로로포름 (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 1  $\mu$ g의 mRNA를 주형으로 Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 데이터베이스에서 얻은 염기서열에 따라 하기 표 2와 같은 프라이머를 제작한 후, 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(Quantitative real-time PCR)을 이용하여 각각의 유전자를 얻었다.

표 2

| Gene name | GenBank Accession No. | Primer  | Sequence (5'-3')      | 서열번호 | Size (bp) |
|-----------|-----------------------|---------|-----------------------|------|-----------|
| Atg5      | NM_053069             | Forward | ATGGACAGCTGCACACACTT  | 9    | 86bp      |
|           |                       | Reverse | CTGGCTCCTCTTCTCTCCAT  | 10   |           |
| LC3B      | NM_026160             | Forward | GCTTGCAGCTCAATGCTAAC  | 11   | 117bp     |
|           |                       | Reverse | GGAAGCCGTCTTCATCTCTC  | 12   |           |
| Beclin-1  | NM_019584             | Forward | TGACCATGCAATGGTAGCTT  | 13   | 105bp     |
|           |                       | Reverse | TTCTCCACGTCCATCCTGTA  | 14   |           |
| GAPDH*    | NM_001289726          | Forward | TGTGTCCGTCGTGGATCTGA  | 15   | 77bp      |
|           |                       | Reverse | CCTGCTTCACCACCTTCTTGA | 16   |           |

정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)의 프라이머 세트

\*housekeeping gene

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

연쇄중합반응에서는 2X Sybr Green qPCR Master Mix (Cellsafe) 를 사용하였다. 상기 사이토카인 발현 전사 결과는 도 3에 나타내었다.

도 3에 나타난 것과 같이, 시간 별로 Gas6를 처리한 경우 P388D1 세포주에서 Beclin-1 및 LC3B의 전사량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 GAPDH는 세포내에서 발현량이 세포의 조건에 따라 잘 변하지 않는 유전자로써, 본 발명의 P388D1 세포주의 사이토카인 발현량 조사에서 세포내 기준으로 사용하였다.

### 실시예 4: RT-PCR과 유세포 분석기에 의한 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체 (Receptor tyrosine kinase) 발현 확인

정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포를 분리하여 RT-PCR과 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체 발현을 확인하였다. 8주령 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐에 3% Thioglycollate 용액을 복강 주사하여 생쥐 복강 내의 대식세포 증식을 유도한 후, 주입 후 3일차에 복강 내의 대식세포를 분리하여 실시 예 1에 나타난 것과 같이 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200  $\mu$ l의 클로로포름

(sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 1  $\mu$ g의 mRNA를 주형으로 Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 데이터베이스에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, 실시 예 1과 동일한 프라이머 Ax1(가)와 GAPDH(나)를 이용하여 연쇄증합반응을 실시하였다.

[0085] RT-PCR 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4 (가)에 나타난 바와 같이, 331bp의 생쥐 Ax1 수용체의 mRNA transcript 산물은 정상 생쥐의 복강 내 대식세포에서 발견되는 반면 Ax1 유전자 적중 생쥐에서는 발견되지 않았다. 내적 대조구인 GAPDH 산물(271 bp)은 정상생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐 대식세포 모두에서 발견되었다.

[0086] 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 대식세포에서 Ax1 수용체 발현을 확인하기 위하여 대식세포에 항 Ax1 수용체 항체(R&D systems)를 처리하고, 유세포 분석기를 이용해 형광강도를 측정하였다. 이 때 사용된 isotype control은 PE-conjugated ratIgG1k로 BDpharmingen에서 구입하였다.

[0087] 그 결과를 도 4의 (나)에 나타내었다. 도 4의 (나)에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐의 대식세포에서 Ax1 수용체 발현을 확인하였다.

[0088] **실시예 5: 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Gas6 처리에 따른 자식작용 유도 정도 비교**

[0089] 생쥐 대식세포 세포주(P388D1)에서와 마찬가지로, 생쥐 복강 내 대식세포에서도 Ax1 티로신 인산화 효소 수용체가 리간드인 Gas6와 결합하여 활성화되어 Ax1 특이적인 자식작용을 유발하는지 알아보기 위해 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포의 증식을 유도 및 분리한 후, Gas6 재조합 단백질 (100ng/ml)과 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에 12시간과 24시간 동안 배양한 후 western blot을 통해 자식작용 유발 정도를 분석하였다. 먼저 Gas6를 12시간과 24시간 동안 배양한 대식세포를 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)이 포함된 cell lysis solution (50 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 200 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)에 lysis 시킨 후, 12% SDS polyacrylamide gel에 전기영동 시켜, Immobilon P membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)에 transfer 하였다. 그 후 정제된 항 LC3B (Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA, USA)를 membrane에 처리 한 후, ECL system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)에서 발색 시켜, LC3B band를 확인 하였다.

[0090] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0091] 도 5의 (가)에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐의 대식세포의 경우 Gas6 재조합 단백질을 12시간과 24시간 처리하였을 경우 자식작용 표지자인 LC3B I band 감소와 LC3B II band가 증가하는 것으로 보아 자식작용이 증가하였다는 것을 알 수 있었다.

[0092] 하지만 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포의 경우 Gas6를 처리하여도 자식작용이 유도되는 정도에 차이가 없음을 알 수 있었고, 이를 정량화 하기 위해 LC3B I과 LC3B II band의 감도를 ImageJ를 이용하여 그래프로 나타내었다. 그 결과를 도 5의 (나)에 나타내었다. 이 때 사용된 내적 대조구는 항  $\beta$ -actin 항체에 의한  $\beta$ -actin의 발현량으로, 모든 샘플에서 동일한  $\beta$ -actin이 검출되어 동일한 양의 단백질을 전기영동 한 것을 알 수 있었다.

[0093] 이 결과로 미루어 보아 P388D1 세포주와 마찬가지로 생쥐의 초대 대식세포 (primary macrophage cell)에서도 Gas6에 의해 활성화된 Ax1이 자식작용을 유발한다는 것을 알 수 있었다.

[0094] **실시예 6: 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Gas6 처리에 따른 Atg5, Beclin-1, LC3B 전사체 발현 정도 비교**

[0095] 생쥐의 초대 대식세포 (primary macrophage cell)에서 P388D1 세포주와 마찬가지로 활성화된 Ax1-Gas6 신호전달 체계에 의해 Atg5, LC3B, Beclin-1의 mRNA 발현 증가가 유도되는 것을 정량적 실시간 증합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)을 이용하여 알아보았다. 상기 실시 예 5와 같이 정상 생쥐와 Ax1 유전자 적중 생쥐의 복강 내 대식세포 증식을 유도 및 분리하여 Gas6 재조합 단백질 (100ng/ml)과 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에 12시간과 24시간 동안 배양한 후 상기 실시 예 1에 나타난 것과 같이 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1 ml 당 200  $\mu$ l의 클로로포름 (sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이때 추출한 1  $\mu$ g의 mRNA를 주형으로

Superscript III (Invitrogen) 역전사 효소를 이용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 표 2과 동일한 프라이머를 사용하여, 정량적 실시간 증합효소 연쇄반응 (Quantitative real-time PCR)을 이용하여 각각의 유전자를 얻었다.

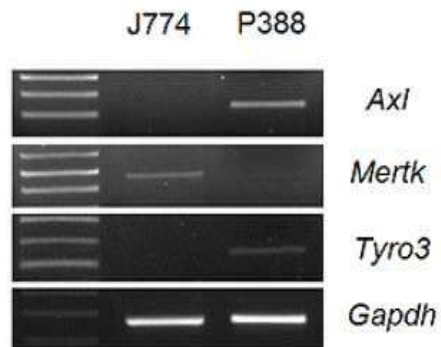
실시간 증합효소 연쇄증합반응에서는 2X Sybr Green qPCR Master Mix (Cellsafe) 를 사용하였다. 상기 사이토 카인 발현 전사 결과는 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 것과 같이, 시간 별로 Gas6를 처리한 경우 정상 생쥐의 복강 내 대식세포에서 Becln-1, LC3B 및 Atg5의 전사량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 GAPDH는 세포내에서 발현량이 세포의 조건에 따라 잘 변하지 않는 유전자로써, 본 발명의 대식세포의 사이토카인 발현량 조사에서 세포내 기준으로 사용하였다.

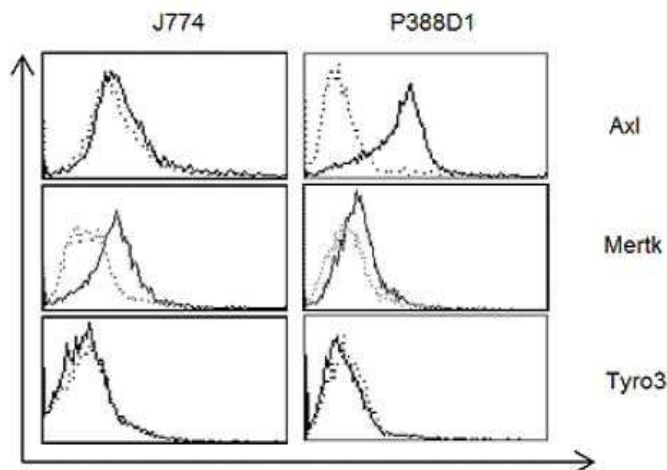
## 도면

### 도면1

(가)



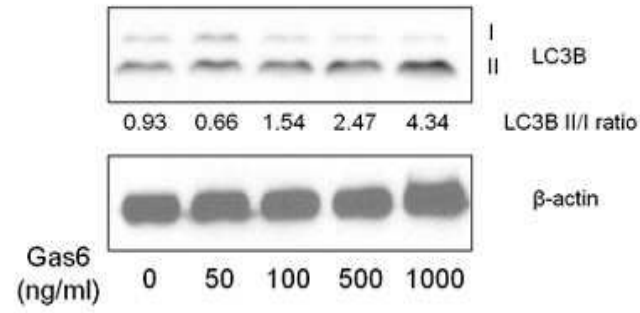
(나)



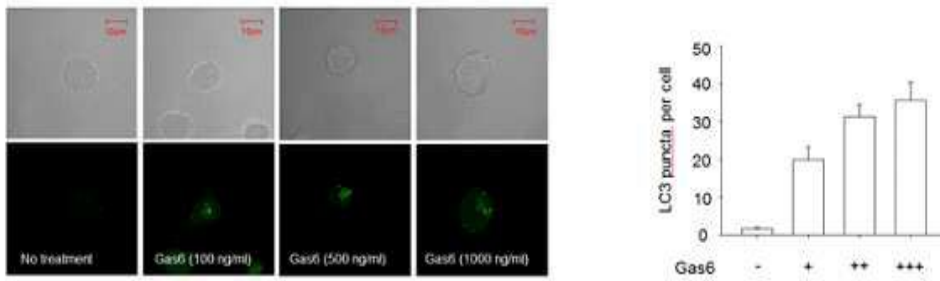
가른 실선, isotype control; 짧은 실선, 항 Axl, Mertk, Tyro3 수용체 항체

도면2

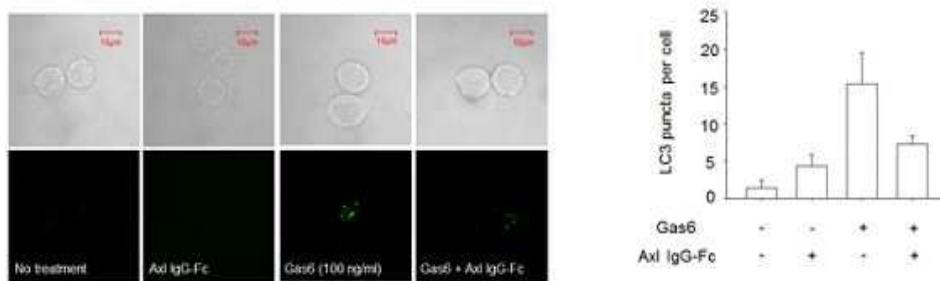
(가)



(나)

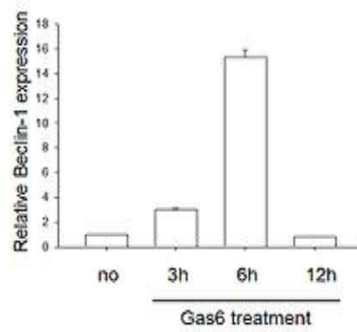


(다)

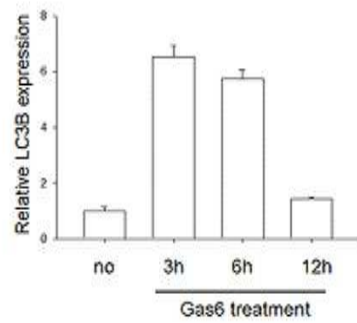


도면3

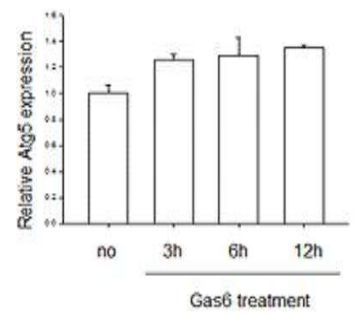
(가)



(나)

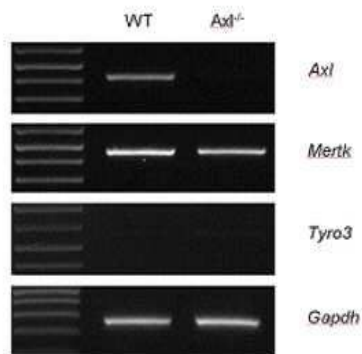


(다)

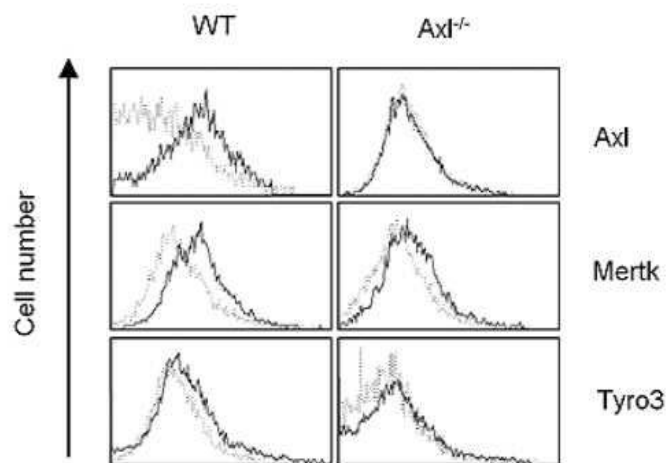


도면4

(가)

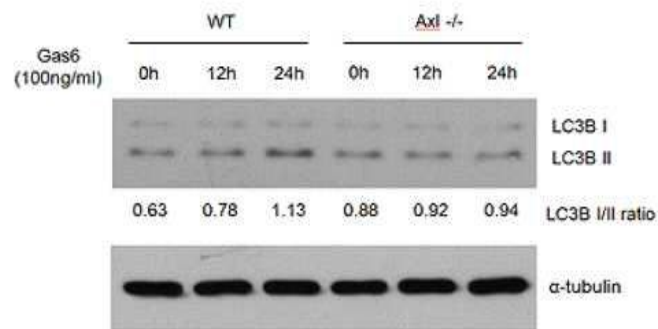


(나)

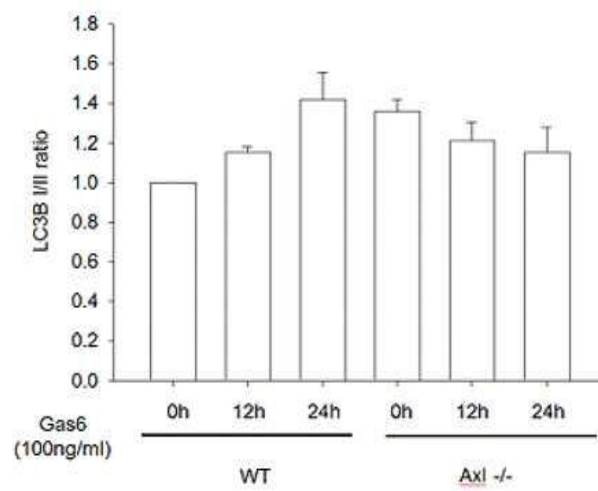


도면5

(가)

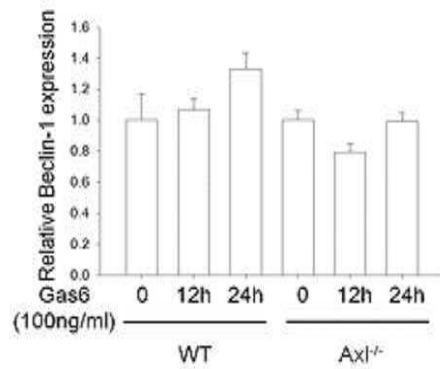


(나)

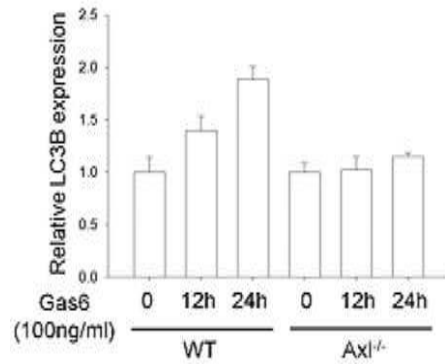


도면6

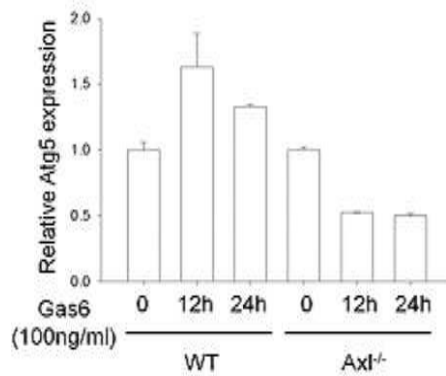
(가)



(나)



(다)



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for induction autophagy in macrophage comprising  
ligand or activator of TAM family receptor tyrosine kinases and  
use of the same
- <130> 1-38p
- <160> 16

|            |                            |    |
|------------|----------------------------|----|
| <170>      | KopatentIn 2.0             |    |
| <210>      | 1                          |    |
| <211>      | 21                         |    |
| <212>      | DNA                        |    |
| <213>      | Artificial Sequence        |    |
| <220><223> | Axl Forward primer         |    |
| <400>      | 1                          |    |
|            | tggccttggt ggtatgtact g    | 21 |
| <210>      | 2                          |    |
| <211>      | 20                         |    |
| <212>      | DNA                        |    |
| <213>      | Artificial Sequence        |    |
| <220><223> | Axl Reverse primer         |    |
| <400>      | 2                          |    |
|            | cctgattgag ctgaccttcc      | 20 |
| <210>      | 3                          |    |
| <211>      | 24                         |    |
| <212>      | DNA                        |    |
| <213>      | Artificial Sequence        |    |
| <220><223> | Mertk Forward primer       |    |
| <400>      | 3                          |    |
|            | aacacagcct tcaacctcac ctgc | 24 |
| <210>      | 4                          |    |
| <211>      | 23                         |    |
| <212>      | DNA                        |    |
| <213>      | Artificial Sequence        |    |
| <220><223> | Mertk Reverse primer       |    |
| <400>      | 4                          |    |
|            | ctcattccga caggacacag cga  | 23 |
| <210>      | 5                          |    |
| <211>      | 25                         |    |
| <212>      | DNA                        |    |
| <213>      | Artificial Sequence        |    |

<220><223> Tyro3 Forward primer

<400> 5

ccagtgaaga tgaccgtgtc tcagg

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tyro3 Reverse primer

<400> 6

gctggagatc gttgttactg tgggtg

25

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH Forward primer

<400> 7

atgaccacag tccatgccat c

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH Reverse primer

<400> 8

cctgcttcac caccttcttg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atg5 Forward primer

<400> 9

atggacagct gcacacactt

20

<210> 10

<211>

> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Atg5 Reverse primer  
 <400> 10  
 ctggctcctc ttctctccat 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LC3B Forward primer  
 <400> 11  
 gcttgcagct caatgctaac 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LC3B Reverse primer  
 <400> 12  
 ggaagccgtc ttcattctctc 20  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Beclin-1 Forward primer  
 <400> 13  
 tgaccatgca atggtagctt 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Beclin-1 Reverse primer  
 <400> 14  
 ttctccacgt ccatcctgta 20  
 <210> 15

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAPDH\* Forward primer

<400> 15  
 tgtgtccgtc gtggatctga 20

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GAPDH\* Reverse primer

<400> 16  
 cctgcttcac caccttcttg a 21