(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 11 월 28 일 (28.11.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/176503 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/004537

(22) 국제출원일: 2013 년 5 월 23 일 (23.05.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0055163 2012 년 5 월 24 일 (24.05.2012) KR

(71) 출원인: **서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR).

(72) 발명자: **정용근 (JUNG, Yong Keun)**; 151-055 서울시 관악구 성현동 관악드림타운 128-702 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: **한윤호 (HAN, Yun-Ho)** 등; 137-873 서울시 서초구 서초동 1551-5 석천빌딩 4 층 율민국제특허법률사무소, Seoul (KR).

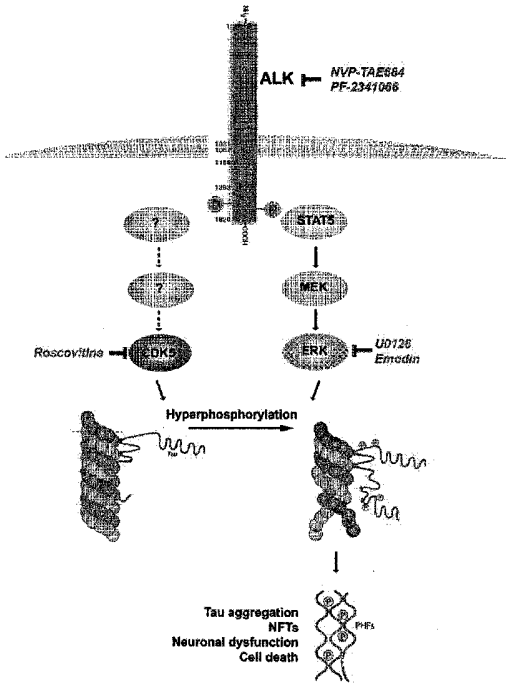
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,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

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

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

(54) **Title**: TAU PROTEIN MEDIATED NEURODEGENERATIVE DISEASE THERAPEUTIC AGENT

(54) **발명의 명칭** : 타우 단백질 매개 신경 퇴행성 질환 치료제



(57) **Abstract**: The present invention relates to a neurodegenerative disease therapeutic agent, and, more specifically, provides a composition containing, as an active ingredient, an ALK (anaplastic lymphoma kinase) activity or expression inhibiting substance in order to treat a degenerative brain disease caused by the phosphorylation or coagulation of tau proteins.

(57) **요약서**: 본 발명은 신경 퇴행성 질환 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 타우 단백질의 인산화 또는 응집으로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환을 치료하기 위하여 ALK(anaplastic lymphoma kinase)의 활성 또는 발현 저해물질을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공한다.

WO 2013/176503 A1

명세서

발명의 명칭: 타우 단백질 매개 신경 퇴행성 질환 치료제

기술분야

[1] 본 발명은 신경 퇴행성 질환 치료제에 관한 것으로서, 더 상세하게는 타우 단백질을 매개로 발생되는 신경 퇴행성 질환 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[2] Tau는 N-말단 돌출 부분, 프롤린(proline) 응집 도메인, 미세소기관 결합 도메인 및 C-말단의 4부분으로 구성되어 있으며(Mandelkow *et al.*, *Acta. Neuropathol.,* 103, 26-35, 1996), 중추신경계의 신경세포 속에서 Tau가 비정상적으로 과인산화되거나 변형되는 경우 tauopathy와 같은 퇴행성 뇌질환을 유발한다고 알려져 있다. 알츠하이머 치매(Alzheimers disease), 픽병(Picks disease), 17번 염색체연관 파킨슨병 수반 전두측 두엽성 치매(FTDP-17) 등이 대표적인 Tauopathy에 속한다(Lee *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.,* 24, 1121-1159, 2001; Bergeron *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 56, 726-734, 1997; Bugiani *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 58, 667-677, 1999; Delacourte *et al.*, *Ann. Neurol.,* 43, 193-204, 1998; Ittner and Gotz, *Nat. Rev. Neurosci.,* 12, 65-72, 2011).

[3] 예를 들어, 대한민국 공개특허 2009-0043251호에는 표적 유전자의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료제에를 개시하고 있으며, US 1999-267971에는 비-인슐린의존형 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM), 알츠하이머 질병을 포함하는 GSK3 활성에 의하여 매개되는 질병을 치료하기 위한 GSK3 특이적인 억제제를 제공하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 그러나 종래 신경 퇴행성 질환 치료제에 있어서 타우 단백질을 표적으로 한 뇌질환 치료제는 많이 개발되지 않고 있으며, tau 매개의 신경 퇴행성 질환이 유발되는 정확한 기작 또한 밝혀지지 않고 있다.

[5] 본 발명은 tau 단백질에 의하여 매개되는 신경 퇴행성 질환의 치료제를 제공하기 위하여, tau 단백질의 인산화, 응집화 및 신경독성을 매개하는 구체적인 신호전달 기전을 규명함으로써, 신경 퇴행성 질환 치료의 새로운 표적을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 더 나아가, 이러한 tau 매개의 신경 퇴행성 질환의 신호전달 기전을 이용하여 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명의 일 관점에 따르면, ALK(anaplastic lymphoma kinase)의 이량체형성, 활성 또는 발현 저해물질을 유효성분으로 함유하는 타우 단백질의 인산화 또는

응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료용 조성물이 제공된다.

[7] 상기 조성물에 있어서, 상기 ALK의 이량체 형성, 활성 또는 발현 저해물질은 ALK에 대한 길항 항체(antagonizing antibody) 또는 그의 단편, ALK 특이적 저해 화합물, ALK 유전자에 대한 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, shRNA 또는 miRNA일 수 있다.

[8] 상기 조성물에 있어서, 상기 ALK의 활성 저해물질은 ALK 키나아제(kinase) 활성 억제제일 수 있다. 예를 들어, NVP-TAE684, PF-2341066, Crizotinib (trade name Xalkori), AP26113, 또는 LDK378 일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[9] 상기 조성물에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[10] 이때, 본 발명의 일실시예 따른 조성물은 바람직하게는 조성물 총 중량에 대하여 상기 ALK 활성 또는 발현 저해물질을 0.1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 ALK 활성 또는 발현 저해물질과 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다. ALK 특이적 저해 화합물로는 대한민국 등록특허 제0904570호에 개시된 2,4-피리미딘 유도체, 대한민국 등록특허 제1083421호에 개시된 피라졸로이미다졸계 화합물, 대한민국 등록특허 제1116756호에 개시된 1,6-치환된 인돌 화합물, 대한민국 등록특허 제1094446호에 개시된 2,4,7-치환된 티에노[3,2-d]피리미딘 화합물, 대한민국 공개특허 제2011-0088960호에 개시된 비시클릭 헤테로아릴 유도체, 대한민국 공개특허 제2011-0014971호에 개시된 퓨로[3,2-c]피리딘 및 티에노[3,2-c]피리딘 화합물, WO2006/021881A2에 개시된 피라졸-치환 아미노헤테로아릴 화합물 등과 같은 ALK의 활성을 저해한다고 알려진 화합물을 이용할 수 있다.

[11] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[12] 본 발명의 일실시예에 따른 각각의 경구용 조성물은 제약상 허용되는 담체를 비롯한 불활성 성분을 추가로 포함한다. 본 명세서에서 사용된 "제약상 허용된 담체"란 조성물, 구체적으로 의약 조성물의 활성 물질을 제외한 성분을 지칭하는 용어이다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 결합제, 붕해제, 희석제, 충진제, 활택제, 가용화제 또는 유화제 및 염이 포함된다.

[13] 실제 사용에 있어서, 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 통상적인 제약 조제 기술에 따른 제약 담체와 조합될 수 있다. 담체는, 예를 들어 경구 또는 (정맥내 투여를 비롯한) 비경구 투여에 바람직한 제조에 따라 광범위하게 다양한 형태를 지닐 수 있다.

[14] 아울러, 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로

투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.

[15] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 약제학적으로 유효한 양의 본 발명의 일실시예에 따른 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 타우 단백질의 인산화 또는 응집으로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환의 치료방법이 제공된다.

[16] 상기 치료방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[17] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK, ATP 및 ALK의 기질이 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 상기 ALK의 기질의 인산화 정도의 변화를 측정하는 인산화 측정단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK의 기질의 인산화를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[18] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[19] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK의 기질은 Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK3/STAT3 신호전달 단백질 일 수 있다.

[20] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK, ALK의 기질 및 타우 단백질을 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 상기 피검 화합물을 처리한 세포 내의 상기 ALK의 기질 또는 상기 타우 단백질의 인산화, 또는 상기 타우 단백질의 응집 여부를 확인하는 확인단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK의 기질 또는 상기 타우 단백질의 인산화, 또는 상기 타우 단백질의 응집을 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[21] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[22] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK의 기질은 Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK3/STAT3 신호전달 단백질 일 수 있다.

[23] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK, ATP 및 ALK의 기질이 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 ALK 기질사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[24] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽

변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[25] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK의 기질은 Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK3/STAT3 신호전달 단백질 일 수 있다.

[26] 상기 스크리닝 방법에 있어서, ALK와 기질 또는 리간드 사이의 상호작용은 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 방법, 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 시스템, 면역형광염색법, 면역침전(Immunoprecipitation, IPP), GST-Pull down, 효모단백질 잡종법(yeast two-hybrid system, Y2H), 이분자 형광 상보(bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 기법, TAP-태그(Tandem affinity purification) 방법 등을 이용하여 확인할 수 있다.

[27] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK 및 ALK의 기질을 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 상기 ALK의 기질사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[28] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[29] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK의 기질은 Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK3/STAT3 신호전달 단백질 일 수 있다.

[30] 상기 스크리닝 방법에 있어서, ALK와 기질 또는 리간드 사이의 상호작용은 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 방법, 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 시스템, 면역형광염색법, 면역침전(Immunoprecipitation, IPP), GST-Pull down, 효모단백질 잡종법(yeast two-hybrid system, Y2H), 이분자 형광 상보(bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 기법, TAP-태그(Tandem affinity purification) 방법 등을 이용하여 확인할 수 있다.

[31] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK 및 ALK의 리간드가 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 ALK 리간드 사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[32] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[33] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK 리간드는 플레이오트로핀(Pleiotrophin, PTN), 미드카인(midkine, MK) 또는 젤리 벨리(Jelly belly, Jeb)일 수 있다.

[34] 상기 스크리닝 방법에 있어서, ALK와 기질 또는 리간드 사이의 상호작용은 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 방법, 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 시스템, 면역형광염색법, 면역침전(Immunoprecipitation, IPP), GST-Pull down, 효모단백질 잡종법(yeast two-hybrid system, Y2H), 이분자 형광 상보(bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 기법, TAP-태그(Tandem affinity purification) 방법 등을 이용하여 확인할 수 있다.

[35] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK를 발현하는 세포에 피검 화합물 및 ALK의 리간드를 처리하는 피검 화합물 및 ALK의 기질 처리단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 상기 ALK 리간드 사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[36] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[37] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK의 기질은 Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, JAK3/STAT3 신호전달 단백질 일 수 있다.

[38] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ALK 리간드는 플레이오트로핀(Pleiotrophin, PTN), 미드카인(midkine, MK) 또는 젤리 벨리(Jelly belly, Jeb)일 수 있다.

[39] 상기 스크리닝 방법에 있어서, ALK와 기질 또는 리간드 사이의 상호작용은 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 방법, 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 시스템, 면역형광염색법, 면역침전(Immunoprecipitation, IPP), GST-Pull down, 효모단백질 잡종법(yeast two-hybrid system, Y2H), 이분자 형광 상보(bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 기법, TAP-태그(Tandem affinity purification) 방법 등을 이용하여 확인할 수 있다.

[40] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK를 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 상기 피검 화합물을 처리한 세포 내의 상기 CDK5(cyclin-dependent kinase-5) 또는 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화 정도의 변화를 측정하는 인산화 측정 단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 CDK5 또는 ERK의 인산화를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[41] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[42] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK(anaplastic lymphoma kinase)와 tau를 발현하는 형질전환 초파리에(Tau / dALK) 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 상기 피검 화합물을 처리한 형질전환 초파리에서 낱눈의 형태 또는 망막의 두께의 변화를 측정하는 눈의 표현형 또는 신경퇴행 관찰 단계; 및 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 낱눈의 형태의 변화 또는 망막의 붕괴를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[43] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

[44] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, ALK(anaplastic lymphoma kinase) 단백질에 피검화합물을 처리하는 단계; 상기 ALK 단백질의 이량체 형성 여부를 관찰하는 단계; 및 ALK 단백질의 이량체 형성을 억제한 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

[45] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)일 수 있다.

발명의 효과

[46] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, ALK(anaplastic lymphoma kinase)에 의하여 tau 매개의 퇴행성 신경질환에서 관찰되는 tau 단백질의 인산화, 응집화 및 세포사멸이 조절될 수 있다. 물론 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[47] 도 1은 pGFP-tau와 pcDNA, pGSK3 CA, 및 pmALK 중 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 응집된 HT22 세포를 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(A), 도 2A에서 관찰한 세포에서 pmALK 처리량 증가에 따라 tau 인산화가 증가하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(B), pGFP-tau와 pmALK를 공형질도입한 후 에모딘을 처리하였을 때 응집된 HT22 세포가 감소하는 것을 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(C), 및 도 2C에서 관찰한 세포에서 에모딘 처리량 증가에 따라 tau 인산화가 감소하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(D)이다.

[48] 도 2는 pGFP-tau와 pALK의 공형질도입에 의하여 HT22 세포의 인산화가 증가하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(A), pGFP-tau와 pALK를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 pALK 도입량 증가에 따라 응집된 HT22 세포가 증가한 것을 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(B), 및 pHA-Tau와 pALK의 공형질도입에 의하여 HT22 세포의 인산화와 응집화가 증가하는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(C)이다.

[49] 도 3은 인간 야생형 ALK와 ALK 변이체 컨스트럭트를 개략적으로 도시한 그림(A), pGFP-tau와 ALK 컨스트럭트(pALK, pALK KD, pALK.Fc, pALK.Fc KD) 가운데 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 ALK의 인산화효소가 비활성화됨에 따라 응집된 HT22 세포가 감소한 것을 형광현미경을 통해서 확인한 그래프(B), 및 웨스턴 블랏 결과(C)이다.

[50] 도 4는 ALK에 의하여 AKT 및 ERK가 활성화되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 그림(A), ALK 매개 tau 인산화가 인산화효소 억제제인 로스코비틴roscovitine, Ros)(B), U0126(C), 및 LiCl(D)에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진이다.

[51] 도 5는 안정적으로 tau를 발현하는 Tau 형질전환 HT22 세포주에서 독시사이클린 처리에 의하여 tau의 발현이 유도되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), pALK.Fc 컨스트럭트를 HT22/Tau #1 세포주로 형질도입하였을 때 tau의 인산화가 증가된다는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B), 및 CDK5 우성 음성 변이체에 의한 ALK 매개의 tau 인산화의 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(C)이다.

[52] 도 6은 P1 마우스의 뇌 조직에서 ALK가 발현수준을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), P1 마우스 일차배양 신경세포에서 ALK의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B), ALK 작용 및 길항 작용을 갖는 mAb46, mAb30의 ALK 특이성을 확인한 웨스턴 블랏 사진(C), 및 마우스 일차배양 신경세포에서 mAb46에 의하여 tau의 인산화가 증가되며 mAb30에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(D)이다.

[53] 도 7은 HT22 세포의 막 분획물에서 ALK의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), HT22 세포에서 mAb46에 의하여 tau의 인산화가 증가되며 mAb30에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B)과 tau 응집화 수준을 형광현미경을 통해서 확인한 결과 그래프(C)이다.

[54] 도 8은 ALK에 의해서 tau 매개의 신경세포 사멸이 증가하는 것을 나타내는 그래프(A), ALK 매개의 tau 세포독성이 ERK 및 CDK5에 의존적이라는 것을 나타내는 그래프(B), ALK/tau 매개의 세포사멸이 CDK4 또는 MEK1 우성 음성 변이체에 의하여 억제되는 것을 나타내는 그래프(C), CDK5 shRNA에 의하여 ALK/tau 세포독성이 억제되는 것을 나타내는 그래프(D), 비신경성 세포에서 ALK/tau 독성이 나타나지 않는 것을 나타내는 그래프(E)와 웨스턴 블랏 결과 사진(F)이다.

[55] 도 9는 HT22 세포에서 ALK와 tau의 발현에 의해서 신경돌기가 손상된 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(A), 및 Tau 형질전환 HT22 세포주에서 세포 사멸과 신경돌기 성장 손상이 CKDK5 억제제 로스코비틴(roscovitine)에 의하여 회복된다는 것을 나타내는 그래프이다(B).

[56] 도 10은 ALK 특이적인 억제제가 ALK 매개의 tau 신경독성을 억제하는 효과를 나타내는 그래프(A), 및 웨스턴 블랏 결과(B)이다.

[57] 도 11은 tau 형질전환 초파리에서 구조적으로 활성을 나타내는 초파리 ALK가 함께 발현되었을 때, 울퉁불퉁한 눈 표현형과 불규칙한 낱눈 형태가 증가되는 것을 현미경으로 촬영한 사진(A), 초파리의 내부 신경퇴행이 악화되는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(B), 및 도13B에서 관찰한 신경퇴행 수준을 수치화한 그래프(C), 및 $dALK^{ACT}$ 및 $dALK^{DN}$에 의해서 tau 형질전환 초파리의 tau 인산화 수준이 조절되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 결과 사진(D)이다.

[58] 도 12는 ALK가 CDK5 및 ERK 활성을 통하여 tau의 인산화 및 신경세포의 사멸을 유도한다는 것을 개략적으로 도시한 개요도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[59] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.

[60] 본 문서에서 사용되는 Tau는 미세소관 연관 단백질(Microtubule-associated protein)로서, 신경세포에서 tau의 비정상적인 과인산화와 응집화에 의해서 퇴행성 뇌질환이 발병된다는 것이 알려져 있다(Lee *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.,* 24, 1121-1159, 2001; Bergeron *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 56, 726-734, 1997; Bugiani *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.,* 58, 667-677, 1999; Delacourte *et al* ., *Ann. Neurol.,* 43, 193-204, 1998; Ittner and Gotz, *Nat. Rev. Neurosci.,* 12, 65-72, 2011).

[61] 본 문서에서 사용되는 PHF-1, 12E8, AT8, AT100은 타우 단백질의 인산화를 인지하는 항체들로서, PHF-1은 pSer396/404, 12E8은 pSer262/356, AT8은 pSer202/pThr205, AT100은 pThr212/pSer214 위치의 인산화를 인지한다. 타우 단백질의 인산화 위치는 퇴행성 뇌질환의 병증과 신경섬유의 다발성 병변(neurofibrillary tangle, NFT)의 형태와 관련이 있다.

[62] 본 문서에서 사용되는 ALK는 역형성 림프종 인산화 효소(anaplastic lymphoma kinase)를 의미하며, 비정상적인 ALK의 활성은 감염성 근섬유세포 암, 광범위큰 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 및 행성 대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphoma)에서 융합 단백질의 형태로 암을 유발하거나, ALK 단백질의 변이로 인하여 가족력으로 나타나는 신경아세포종(familial neuroblastoma)이 발생한다는 것이 알려져 있다(Iwahara *et al.*, *Oncogene,* 14, 439-449, 1997; Morris *et al.*, *Oncogene,* 14, 2175-2188, 1997; Chen *et al.*, *Nature* 455, 971-974, 2008; George *et al.*, *PLoS One* 2, e255, 2007; Morris *et al.*, *Science,* 263, 1281-1284, 1994). 이의 하위 단계 신호전달 기작으로서, Ras/MEK/ERK, PI3K/AKT, 및 JAK3/STAT3 가 알려져 있다.

[63] 본 문서에서 사용되는 CDK5는 사이클린 의존성 인산화 효소5(cyclin-dependent kinase5, CDK5)를 의미하며, 시냅스 가소성, 신경돌기 성장 및 신경 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Nikolic *et al.*, 1996; Paglini *et al.*, 1998). CDK5의 비정상적인 활성은 tau의 과인산화를 유발하여 tau가 미세소관과 결합하는 능력은 감소시키고, 그 결과 NFT 형성을 유발시킨다는 것이 알려져

있다(Wen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1772(4): 473-83, 2007).

[64] 본 문서에서 사용되는 형질전환 식물 또는 형질전환 동물은 외래 유전자를 게놈 내에 도입하여 상기 외래 유전자를 발현하거나 또는 특정 유전자가 발현되지 않도록 결손시킨 유전자 조작된 식물 또는 동물을 의미한다. 형질전환 동물의 경우 통상의 경우 생식세포를 유전자 조작하여 제조될 수 있으나, 체세포에 대한 유전자 조작 이후 핵치환에 의한 복제동물 제조방법으로 제조될 수 있고, 형질전환 식물의 경우 더 간단하게, 체세포를 외래 유전자를 포함하는 아그로박테리아로 감염시킨 후 탈분화 및 재분화의 과정을 거쳐서 제조될 수 있다. 상기 형질전환 동물 및 형질전환 식물의 제조방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Jaenisch, R and B. Mintz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(4): 1250-1254, 1974; Cho *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 42: 19.11.1-19.11.22, 2009; Johnston, S. A. and D. C. Tang, *Meth. Cell Biol.*, 43 Pt A: 353-365, 1994; Sasaki *et al.*, *Nature* 459(7246): 523-527, 2009; Vaek *et al.*, *Nature*, 328(6125): 33-37, 1987).

[65] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 도면에 도시된 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 도면에 도시된 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[66] 도 1은 pGFP-tau와 pcDNA, pGSK3β CA, 및 pmALK 중 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 응집된 HT22 세포를 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(A), 도 2A에서 관찰한 세포에서 pmALK 처리량 증가에 따라 tau 인산화가 증가하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(B), pGFP-tau와 pmALK를 공형질도입한 후 에모딘을 처리하였을 때 응집된 HT22 세포가 감소하는 것을 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(C), 및 도 2C에서 관찰한 세포에서 에모딘 처리량 증가에 따라 tau 인산화가 감소하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(D)이다. 본 발명의 일실시예를 통하여 그 효용성이 확인된 pGFP-tau를 이용한 세포 기반의 기능성 스크리닝 방법을 이용하여, tau의 인산화를 조절인자로 선별된 마우스 ALK의 효과를 확인하였다. pmALK 컨스트럭트가 pGFP-tau 컨스트럭트와 HT22 세포로 공형질도입되었을 때, GSK3β CA와 공형질도입되었을 때에 비하여 tau 응집이 유의하게 증가하였다(도 1A). 이는 상기 관찰한 세포를 추출하여 수행한 웨스턴 블랏 결과에서 PHF-1의 증가를 통하여 재확되었다(도 1B). 또한, PHF 응집 및 ERK 활성화 억제제인 에모딘을 pGFP-tau 컨스트럭트와 pmALK 컨스트럭트를 공형질도입한 후 처리하였을 때, tau의 응집화 및 인산화 수준이 감소하였다(도 1C). tau의 인산화 수준은 인산화를 확인할 수 있는 PHF-1 항체와 비인산화 상태의 tau를 인지하는 Tau-1 항체를 이용하였는데, 에모딘 처리량이 증가할수록 PHF-1 발현 감소와 Tau-1 발현 증가를 통해서 확인되었다(도 1D).

[67] 도 2는 pGFP-tau와 pALK의 공형질도입에 의하여 HT22 세포의 인산화가 증가하는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진(A), pGFP-tau와 pALK를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 pALK 도입량 증가에 따라 응집된 HT22 세포가 증가한 것을 형광현미경을 통해서 계수한 그래프(B), 및 pHA-Tau와 pALK의 공형질도입에 의하여 HT22 세포의 인산화와 응집화가 증가하는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(C)이다. 인간 ALK 유전자가 tau의 인산화 및 응집화를 마우스 ALK와 같이 촉진시킬 수 있는지 확인하기 위하여, pALK 컨스트럭트와 pGFP-tau 컨스트럭트를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때, 웨스턴 블랏을 통하여 PHF-1, 12E8의 발현이 증가하였다. 이는 tau의 Ser396/404(PHF-1), Ser262/356(12E8)이 인산화되는 것을 의미하는 것이다. 또한, 이를 형광현미경을 통하여 관찰하였을 때 tau 응집화가 증가하였으며, pALK의 양이 증가할수록 더욱 응집화가 증가하였다. 또한, 이러한 인간 ALK의 GSK3β보다 tau를 더욱 응집화시켰으며, 이러한 결과는 pALK와 pGFP-tau가 공형질도입된 세포의 면역염색결과를 통해서 다시 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 인간 ALK가 tau의 응집화 및 인산화를 촉진할 수 있음을 입증한 것이다.

[68] 도 3은 인간 야생형 ALK와 ALK 변이체 컨스트럭트를 개략적으로 도시한 그림(A), pGFP-tau와 ALK 컨스트럭트(pALK, pALK KD, pALK.Fc, pALK.Fc KD) 가운데 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였을 때 ALK의 인산화효소가 비활성화됨에 따라 응집된 HT22 세포가 감소한 것을 형광현미경을 통해서 확인한 그래프(B), 및 웨스턴 블랏 결과(C)이다. 인간 ALK의 인산화 효소를 비활성화시킨 pALK KD와 pALK.Fc KD 컨스트럭트는 pGFP-tau와 HT22 세포로 공형질도입되었을 때, 형광현미경을 통해서 관찰한 결과 세포의 응집이 감소하였으며, 웨스턴 블랏을 통해서 관찰한 결과 PHF-1, CP13, 12E8과 같은 tau의 인산화를 나타내는 단백질의 발현이 감소하고 ALK의 인산화가 감소하였다. 이러한 결과는 인간 ALK의 인산화 효소 활성이 tau 응집과 인산화에 중요한 기능을 한다는 것을 입증한 것이다.

[69] 도 4는 ALK에 의하여 AKT 및 ERK가 활성화되는 것을 웨스턴 블랏으로 확인한 그림(A), ALK 매개 tau 인산화가 인산화효소 억제제인 로스코비틴(roscovitine, Ros, B), U0126(C), 및 LiCl(D)에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진이다. pGFP-tau와 pALK.Fc를 HT22 세포로 공형질도입한 후, 암 세포에서 ALK의 하위단계 인산화효소로 알려진 AKT, ERK 단백질의 인산화 수준이 증가하였다. 또한, CDK5 억제제인 로스코비틴, ERK 억제제인 U0126 처리량 의존적으로 tau의 인산화가 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 ALK가 ERK와 CDK의 활성화를 통하여 인산화를 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[70] 도 5는 안정적으로 tau를 발현하는 Tau 형질전환 HT22 세포주에서 독시사이클린 처리에 의하여 tau의 발현이 유도되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), pALK.Fc 컨스트럭트를 HT22/Tau #1 세포주로 형질도입하였을 때 tau의

인산화가 증가된다는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B), 및 CDK5 우성 음성 변이체에 의한 ALK 매개의 tau 인산화의 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(C)이다. tau를 안정적으로 발현하는 HT22 신경세포주를 이용하여 tau의 인산화가 ALK에 의하여 증가한다는 것을 다시 확인한 결과로, HT22/tau 형질전환 세포가 정상적으로 tau 단백질을 발현함을 확인한 후, 상기 pALK.Fc 컨스트럭트를 HT22/Tau #1 세포주로 형질도입하고 독시사이클린을 처리하였을 때 tau의 인산화가 증가된다는 것을 확인하였다. 또한, HT22/Tau #1 세포주에 pALK.Fc와 pCDK5 DN(D144N)를 공형질도입하였을 때 ALK가 CDK5를 매개하여 tau의 인산화를 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 실험예 2, 3에서 관찰된 결과와 일치하는 것이다.

[71] 도 6은 P1 마우스의 뇌 조직에서 ALK가 발현수준을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), P1 마우스 일차배양 신경세포에서 ALK의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B), ALK 작용 및 길항 작용을 갖는 mAb46, mAb30의 ALK 특이성을 확인한 웨스턴 블랏 사진(C), 및 마우스 일차배양 신경세포에서 mAb46에 의하여 tau의 인산화가 증가되며 mAb30에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(D)이다. 내인성 ALK가 tau 인산화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 생후 1일 째(P1), 마우스의 뇌조직 및 이로부터 분리하여 배양한 일차배양 세포에서 ALK의 발현을 확인하였다. 그 후, ALK 특이적인 mAb46, mAb30 항체를 일차배양 세포에 처리하였으며, 그 결과 mAb46 처리에 의하여 tau의 인산화가 증가하고, mAb30을 처리한 후 mAb46을 처리한 군에서는 tau 인산화 효과가 상쇄되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 내인성 ALK가 tau 인산화 증가에 관련되어 있음을 입증하는 것이다.

[72] 도 7은 HT22 세포의 막 분획물에서 ALK의 발현을 확인한 웨스턴 블랏 사진(A), HT22 세포에서 mAb46에 의하여 tau의 인산화가 증가되며 mAb30에 의해서 억제되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진(B)과 tau 응집화 수준을 형광현미경을 통해서 확인한 결과 그래프(C)이다. HT22 세포의 막 분획물에서 ALK의 발현을 확인한 후, mAb46 또는 mAb30을 세포에 처리하여 tau의 인산화 수준을 웨스턴 블랏으로 확인하였으며, 형광현미경을 통해서 tau의 응집화 수준을 확인하였다. 그 결과, 작용효과를 갖는 mAb46에 의해서 tau의 인산화 및 응집화가 증가하는 것이 관찰되었으며, 이는 P1 마우스 일차배양 세포에서 관찰된 결과와 동일하였다.

[73] 도 8은 ALK에 의해서 tau 매개의 신경세포 사멸이 증가하는 것을 나타내는 그래프(A), ALK 매개의 tau 세포독성이 ERK 및 CDK5에 의존적이라는 것을 나타내는 그래프(B), ALK/tau 매개의 세포사멸이 CDK4 또는 MEK1 우성 음성 변이체에 의하여 억제되는 것을 나타내는 그래프(C), CDK5 shRNA에 의하여 ALK/tau 세포독성이 억제되는 것을 나타내는 그래프(D), 비신경성 세포에서 ALK/tau 독성이 나타나지 않는 것을 나타내는 그래프(E)와 웨스턴 블랏 결과 사진(F)이다. HT22 세포에서 pALK.Fc와 pGFP-tau를 공형질도입하였을 때,

신경세포의 사멸이 증가하였으며, 이러한 세포사멸이 ERK와 CDK5에 의존적이라는 것을 인산화 효소 억제제, 우성-음성 변이체 컨스트럭트 및 CDK5 shRNA를 이용하여 확인하였다. 또한, 이러한 ALK/Tau 세포사멸이 신경세포 특이적으로 유도되는 것을 인간 유방암 세포주인 MCF7 세포주에서 pALK.Fc와 pGFP-tau를 공형질도입에 의해서 세포사멸이 유도되지 않는 것을 통해서 확인하였다. 이러한 결과는 앞선 실험에에서 관찰된 결과와 일치하는 것이며, 나아가 ALK 매개의 tau 인산화 및 세포사멸이 신경세포 특이적으로 발생한다는 것을 입증한 것이다.

[74] 도 9는 HT22 세포에서 ALK와 tau의 발현에 의해서 신경돌기가 손상된 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(A), 및 Tau 형질전환 HT22 세포주에서 세포사멸과 신경돌기 성장 손상이 CKDK5 억제제 로스코비틴(roscovitine)에 의하여 회복된다는 것을 나타내는 그래프이다(B). AKL는 신경세포 및 초파리 모델에서 신경돌기 성장을 회복시킨다고 알려져 있으나(Motegi *et al.*, *J. Cell. Sci.*, *117*, 3319-3329m 2004), tau와 함께 발현되었을 때에는 신경돌기 성장 촉진이 관찰되지 않았다. 또한, Tau 형질전환 HT22 세포주에 ALK.Fc를 발현시키고 CDK5 억제제인 로스코비틴을 처리하였을 때, ALK/Tau에 의한 신경돌기 성장효과가 회복되었으며, 이러한 결과는 CDK5가 ALK 매개의 신경돌기 성장 및 신경독성에 관련되어 있음을 입증하는 것이다.

[75] 도 10은 ALK 특이적인 억제제가 ALK 매개의 tau 신경독성을 억제하는 효과를 나타내는 그래프(A), 및 웨스턴 블랏 결과(B)이다. HT22/Tau #1 세포에 pALK.Fc를 형질도입시킨 후, 독시사이클린에 의하여 tau의 발현을 유도시킨 세포에 ALK 특이적 억제제를 처리하고 이를 형광현미경으로 관찰한 후, 세포를 추출하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, ALK/Tau에 의하여 유도된 세포사멸이 ALK 억제제 처리에 의하여 감소하였으며, ALK 처리량에 의존적으로 세포사멸이 억제되었다. 이러한 결과는 ALK 인산화효소 활성이 tau 인산화와 tau-매개 신경독성에 모두 필요하다는 것을 입증하는 것이다.

[76] 도 11은 tau 형질전환 초파리에서 구조적으로 활성을 나타내는 초파리 ALK가 함께 발현되었을 때, 울퉁불퉁한 눈 표현형과 불규칙한 낱눈 형태가 증가되는 것을 현미경으로 촬영한 사진(A), 초파리의 내부 신경퇴행이 악화되는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(B), 및 도 13B에서 관찰한 신경퇴행 수준을 수치화한 그래프(C), 및 $dALK^{ACT}$ 및 $dALK^{DN}$에 의해서 tau 형질전환 초파리의 tau 인산화 수준이 조절되는 것을 확인한 웨스턴 블랏 결과 사진(D)이다. 본 발명자는 앞서 시험관 내(*in vitro*)에서 확인한 ALK 매개의 tau 인산화, 응집화 및 신경세포 특이적인 세포 사멸 효과를 tau 초파리 모델을 이용하여 생체 내(*in vivo*)에서 관찰하였다. 그 결과, ALK의 인산화 효소 활성을 보유하고 있는 $dALK^{ACT}$를 이용하여 제조한 tau 형질전환 초파리는 눈의 크기가 감소하고 울퉁불퉁한 형태의 표현형을 나타냈다. 또한, 눈의 망막에서 신경퇴행이 관찰되면서 동시에 tau의 인산화가 증가하였다. 이러한 결과는 시험관 내에서 확인한 ALK 의

인산화 효소 활성 기능이 생체 내에서도 tau 인산화, 응집화 및 신경독성에 중요한 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다.

[77] 도 12는 ALK가 CDK5 및 ERK 활성을 통하여 tau의 인산화 및 신경세포의 사멸을 유도한다는 것을 개략적으로 도시한 개요도이다. 본 발명의 일실시예를 통해 입증된 바를 정리한 것으로, ALK 활성은 CDK5 및 ERK를 활성화시키며, tau의 인산화 및 응집을 증가시키며, 이에 따라 신경 세포의 사멸을 유도한다는 것을 나타내고 있다.

[78] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[79] 실시예 1: 세포 배양방법

[80] 1-1: HT22 세포 및 HeLa 세포

[81] 마우스 해마 HT22 및 HeLa 세포를 10%(v/v) FBS(fetal bovine serumm, Invitrogen)가 포함된 DMEM(Dulbeccos Modified Eagles Medium, Invitrogen) 배지에서 배양하였다.

[82] 1-2: Tau 형질전환 HT22 세포주(stable cell line)

[83] pBIG2i-tau 컨스트럭트를 HT22 세포로 형질도입하고, 1일이 경과한 후 200 g/ml 하이그로마이신 B(Hygromycin B, Clontech)가 포함된 배지에서 2주 동안 배양하면서, HT22/Tau 혼합 세포군을 생성하게 하였다. 단일 클론인 HT22/Tau #1과 #3을 HT22/Tau 혼합 세포군에서 분리하였으며, 독시사이클린(doxycycline, Dox, Sigma, USA) 1 μg/ml 을 세포에 처리하여 Tau를 발현시켰다.

[84] 1-3: 일차배양 신경세포(Primary neuronal culture)

[85] 생후 1일(postnatal day 1, P1)되는 마우스의 뇌를 분리하여, 일차배양 마우스 해마 신경세포를 배양하였다. 간략하게 설명하면, 분리한 마우스 뇌의 해마(hippocampi) 조직에 트립신을 처리한 후, Optiprep 방법에 따른 신경 세포를 농도 구배 방법을 통하여 일차배양 신경세포를 수득하였다(Brewer and Torricelli, Nat Protoc 2, 1490-1498, 2007). 그 후, 세포를 B27 혈청 첨가제(Invitrogen)를 포함하는 신경기본배지로 이동한 후, 12웰 조직 배양 플레이트에 웰당 2 x 10^6의 수의 조건으로 배양하였다.

[86] 실시예 2: 형질전환 초파리의 제조

[87] 2-1: gl-Tau2.1 초파리 라인

[88] pExpress-gl이 변형된 GMR 발현 벡터에서 야생형 타입의 인간 tau4R 유전자를 발현하고, 3번째 염색체에 보통의 표현형을 나타내는 gl-Tau2.1 라인의 초파리는 Dr. Daniel Geschwind(University of California-Los Angeles, CA)로부터 제공받았다(Jackson *et al.*, *Neuron*, 34, 509-519, 2002).

[89] 2-2: UAS-Tau 초파리 라인(UAS-dALK^{FL}, UAS-dALK^{ACT} 및 UAS-dALK^{DN})

[90] elav-tau를 생성하기 위하여 이용한 UAS-Tau 초파리 라인은 Dr. Mel Feany 로부터 제공받았다(Wittmann *et al.*, *Science,* 293, 711-714, 2001). 야생형 전체-길이 초파리 ALK 라인인 초파리(UAS-dALK^{FL})와 초파리 ALK 변형체 라인(UAS-dALK^{ACT} 및 UAS-dALK^{DN})은 각각 Dr. Ruth Palmer(The Salk Institute, CA)와 Manfred Frasch(Mount Sinai School of Medicine, NY)로부터 제공받았다(Lee *et al.*, *Nature,* 425, 507-512, 2003; Loren *et al.*, *EMBO Rep,* 4, 781-786, 2003; Loren *et al.*, *Genes Cells*, 6, 531-544, 2001). 간략히 설명하면, 상기 구조적으로 활성을 나타내는 ALK(UAS-dALK^{ACT})는 인간 뉴클레오포스민(nucleophosmin, NPM)(Genebank 등록번호:P06748)의 1~117번째 코돈과 초파리 ALK의 1129~1801 코돈이 융합된 컨스트럭트를 코딩한다. 상기 우성 음성 ALK 컨스트럭트(UAS-dALK^{DN})는 세포외 도메인, 막통과 도메인 및 초파리 ALK의 세포내 도메인의 짧은 tail 부분을 암호화한다. 초파리들은 25℃에서 표준 옥수수식이-기반의 초파리 배지에서 배양되었다. 성체 초파리는 탈피 후 5일 동안 분석에 이용되었다.

[91] <u>실시예 3: 벡터의 제작</u>

[92] <u>3-1: pHA-tau, pGFP-tau, pGFP-tau$_{D421}$ 및 pBIG2i-tau 컨스트럭트의 제조</u>

[93] 인간의 가장 긴 형태의 Tau(2N4R)(Genebank 등록번호:NM_005910)를 발현하는 포유류 발현 pCI 벡터는 Dr. Akihiko Takashima(RIKEN, Japan)로부터 제공받았다.

[94] 상기 제공받은 벡터를 이용하여 Tau cDNA를 수득한 후, 삽입된 유전자의 발현을 조절할 수 있는 테트라사이클린(tetracycline)-조절 프로모터와 HA를 생성하는 하이그로마이신(hygromycin B) 또는 GFP 융합 단백질과 같은 선별 마커(selection marker)를 포함하고 있는 pcDNA3-HA(Invitrogen), pGFP(Clontech), 및 pBIG2i 벡터로 Tau cDNA를 서브 클로닝 하였다(Krishnamurthy *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279, 7893-7900, 2004). 그 결과, pHA-tau, pGFP-tau, 및 pBIG2i-tau 컨스트럭트를 생성하였다.

[95] 또한, pGFP-tau$_{D421}$은 Tau의 케스페이즈 부분이 절단된 형태로, 인간 Tau(2N4R)(GenBank 등록번호:NM_005910)의 422~ 441번째 아미노산에 상응하는 폴리뉴클레오티드가 코딩되지 않도록 클로닝하여 제조하였다.

[96] <u>3-2: 마우스 pmALK 컨스트럭트의 제조</u>

[97] 마우스 ALK(GenBank 등록번호:D83002)를 발현하는 포유류 pME18S-FL3 벡터는 도쿄 대학의 Dr. Tadashi Yamamoto로부터 제공받았다(Iwahara *et al.,* *Oncogene* 14, 439-449, 1997).

[98] <u>3-3: 인간 pALK^{FL}, pALK KD 컨스트럭트의 제조</u>

[99] 인간 pALK^{FL}과 pALK KD 컨스트럭트는 워싱턴, 조지타운 대학의 Dr. Anton Wellstein으로부터 제공받았다(Kuo *et al.*, *Oncogene* 26, 859-869, 2007). 인간 pALK^{FL} 컨스트럭트는 전체-길이의 인간 ALK(GenBank 등록번호: U62540)를 pcDNA3.1/Myc-His 벡터에 서브클로닝하여 제조되었으며, 인간 pALK KD 컨스트럭트는 인산화효소가 비활성화된 변이체(ALK kinase-dead, 이하 ALK

KD라 약칭함)로 ATP 결합 부위에 위치하는 변하지 않는 라이신(lysine) 잔기(K1150)가 알라닌(alanine)으로 변환되어 pcDNA3.1/Myc-His 벡터에 서브클로닝하여 제조된 것이다.

[100] 3-4: 인간 pALK.Fc, pALK.Fc KD 컨스트럭트의 제조

[101] 인간 pALK.Fc와 pALK.Fc KD 컨스트럭트는 Dr. Mel Vigny로부터 제공받았다(INSERM U440, Paris)(Souttou *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 9526-9531, 2001). 상기 인간 pALK.Fc 컨스트럭트는 pcDNA3.1 플라스미드 내의 수용체 세포외 도메인 대신 마우스 IgG 2b Fc를 포함하고 있으며, 인간 ALK.Fc KD 컨스트럭트는 상기 pALK.Fc 컨스트럭트에서 ALK 인산화효소가 비활성된 형태이다.

[102] 상기 pALK.Fc 및 pALK.Fc KD는 pCSII-EF-MCS-IRES2-Venus 렌티바이러스 벡터로 서브클로닝 되어, 렌티바이러스를 생산하는데 이용하였으며, 이들은 각각 pLenti-ALK.Fc 및 pLenti-ALK.Fc KD로 명칭하였다.

[103] 3-5: GSK3β CA(S9A), MEK1 DN(K97R), AKT1 DN(K179M), 및 CDK5 DN(D144N) 돌연변이체의 제조

[104] GSK3β(GenBank 등록번호: NM_002093)의 9번째 아미노산인 세린이 알라닌으로 치환된 GSK3β CA(S9A), MEK1(GenBank 등록번호: NM_002755)의 97번째 아미노산인 라이신이 아르기닌으로 치환된 MEK1 DN(K97R), AKT1(GenBank 등록번호: NM_001014432)의 179번째 아미노산인라이신이 메티오닌으로 치환된 AKT1 DN(K179M), 및 CDK5(GenBank 등록번호: NM_004935)의 144번째 아미노산인 아스파르트산이 아스파라긴으로 치환된 CDK5 DN(D144N)은 각각의 변이체를 제조할 수 있는 합성된 올리고뉴클레오티드와 Quickchange Site-Directed Mutagenesis 키트(Stratagene)을 이용하여 제조하였으며, 모든 변이체들은 DNA 서열 분석을 통하여 확인하였다.

[105] 실시예 4: 렌티바이러스의 제조

[106] 렌티 바이러스 벡터의 스탁(stock)은 HEK 293FT 세포에서 인산칼슘(calcium phosphate)을 이용하여 변형된 전이 벡터(transfer vector)와 패킹 벡터인 pMDLg/pRRE와 pCMV-VSV-G-RSV-Rev를 도입시켜 제조하였다. 48 내지 60시간이 경과한 후 HEK 293FT 세포의 상층액을 수득하였으며, 4℃, 50,000*g* 조건에서 2시간동안 초원심분리를 통하여 농축시켰다. 바이러스 농도는 HEK 293FT 세포에 상기 농축된 바이러스 스탁을 단계 희석(serial dilution)을 하고, 세포에 감염시킨 후 측정하였다.

[107] 실험예 1: 마우스 ALK에 의한 tau 응집화 및 인산화의 증가 확인

[108] tau 응집화 및 인산화를 조절하는 신규한 유전자를 스크리닝하기 위하여, 기능 획득(gain of function) 스크리닝 방법을 이용하여 약 630개의 상호보완적인 인산화효소 DNA 클론과 tau_{D421}를 공동 발현시킨 결과, 마우스 ALK(anaplastic lymphoma kinase)가 tau의 응집화 및 인산화를 조절하는 신규한 유전자로 동정되었다.

[109] 1-1: 마우스 ALK 처리량 증가에 따른 tau 응집화 및 인산화의 증가 확인

[110] 마우스 ALK가 tau의 응집화 및 인산화를 증가시키는지 확인하기 위하여, 상기 실험예 1을 통해서 효용성을 확인한 pGFP-tau 기반의 기능적 스크리닝 방법을 이용하였다. 구체적으로 pGFP-tau와 pcDNA(대조군; 음성 대조군), pGSK3β CA(양성 대조군), 또는 pmALK 중 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였다. 이때, 공형질도입되는 pcDNA, pGSK3β CA, 및 pmALK 컨스트럭트의 양을 100, 200, 및 400 ng으로 증가시키며 형질도입시켰다. 형질도입 후 24시간이 경과한 후 형광현미경을 통해서 응집된 것으로 보이는 GFP 양성 세포 수를 통하여 tau의 응집화를 확인하였으며, 그 이후 상기 세포를 추출하여 PHF-1 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 분석함으로써 tau의 인산화를 확인하였다.

[111] 형광현미경을 통해서 상기 공형질도입된 세포들을 관찰한 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이 pGFP-tau 컨스트럭트와 pcDNA를 공형질도입한 군에 비하여, pGSK3β CA 또는 pmALK 컨스트럭트를 공형질도입한 군에서 tau의 응집화가 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다. 또한, tau 응집화는 구조적으로 활성을 지속적으로 나타내는 pGSK3β CA에 비하여 pmALK 컨스트럭트를 공형질도입하였을 때 더욱 현저하였다(도 2A). 이때, 통계학적 분석은 SigmaPlot 프로그램을 이용하여 수행하였으며, 3회 반복 실험한 평균±S.D 값이며, P 값은 대조군에 대한 값이며, t-검정 방법을 이용하여 계산하였다(#$P<0.001$; *$P<0.01$;** $P<0.05$).

[112] 또한, 상기 도 1A에서 형광현미경을 통하여 관찰한 세포를 추출하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, 공형질도입한되는 mALK의 양이 0, 0.1, 0.2, 0.4 μg으로 증가할수록 tau의 인산화를 확인할 수 있는 PHF-1의 발현이 증가하였다.

[113] 1-2: 에모딘에 의한 ALK-매개 tau 인산화 및 응집화의 증가 확인

[114] 이어, 본 발명자는 상기 실험예 1-1에서 관찰된 마우스 tau와 마우스 ALK의 공동발현에 의한 tau 응집 및 인산화 효과를 PHF 응집 및 ERK 활성화 억제제 처리를 통해 확인하였다. 구체적으로 pmALK과 pGFP-tau 컨스트럭트를 HT22 세포로 공형질도입한 후, PHF 응집 및 ERK 활성화 억제제인 에모딘(emodin)의 처리 유무에 따른 세포의 응축을 계수하고, 그 후 상기 세포를 추출하여 PHF-1 항체, Tau-1 항체를 이용하여 tau 단백질의 인산화 정도를 확인하였다.

[115] 형광현미경을 통해서 상기 공형질도입된 세포들을 관찰한 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이 ALK에 의한 tau의 응집화 현상은 에모딘(IC_{50} 값, 1~5 μM) 처리에 의하여 억제되었다(도 2C, Mijatovic *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.*, 62, 1275-1282, 2005; Pickhardt *et al.*, *J. Biol. Chem.,* 280, 3628-3635, 2005).

[116] 더욱이, 에모딘 처리는 Tau-1의 발현을 증가키는 반면, PHF-1의 발현을 감소시켰으며, 형질감염된 tau의 전체양은 항-Tau12 항체를 이용하여 확인한 결과 상대적으로 일정하였다. 따라서, 이러한 결과는 마우스 ALK가 Ser^{396}/Ser^{404} (PHF-1) 위치의 인산화를 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[117] 실험예 2: 인간 ALK에 의한 tau 인산화 및 응집화의 증가 확인

[118] 본 발명자는 마우스 ALK와 같이, 인간 ALK가 tau 변형에 있어서 동일한 역할을 수행할 수 있는지를 확인하기 위하여, 신경 세포에서 인간 ALK가 tau 인산화와 응집에 미치는 영향을 관찰하였다.

[119] 2-1: 인간 ALK에 의한 tau 응집 및 인산화 증가 확인

[120] pGFP-tau 와 pALK를 HT22로 공형질도입하였으며, pALK의 tau 인산화와 응집에 미치는 영향을 확인하기 위하여 형질도입하는 pALK의 양을 증가시키며 형질도입하였다. 24시간이 경과한 후 세포 추출물을 수득한 후, tau의 비정상적인 인산화 수준과 ALK 활성 정도를 웨스턴 블랏을 통해서 확인하였다. 이때 사용한 항체는 하기와 같다: PHF-1(p-Ser396/404; Davies), 12E8(p-Ser262/356; 엘란 제약회사(Elan Pharmaceuticals)의 Dr. Peter Seubert로부터 제공받음), Tau-5(total Tau; Biosource, AHB0042), p-ALK(p-Tyr1604; Cell signaling, #3341), p-ERK(Cell signaling, #9101), ERK(Cell signaling, #9102), 및 p-GSK3β(p-Ser9; Cell signaling, #9323).

[121] 그 결과, PHF-1과 12E8의 발현이 증가하였으며, ALK, ERK 및 GSK3β의 인산화가 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 인간 ALK에 의하여 tau의 다양한 에피토프가 인산화되며, 마우스 ALK와 마찬가지로 인간 ALK가 tau의 인산화를 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다(도 2A).

[122] 이어, 인간 ALK의 tau 인산화와 응집에 미치는 영향을 GSK3β와 비교하였다. pGFP-tau와 pALK 또는 pGSK3β CA를 HT22로 공형질도입한 후, 형광현미경을 통하여 세포가 뭉친 것처럼 보이는 GFP-양성 세포의 수를 계수하여 tau의 응집을 측정하였다. 그 결과, pGFP-tau 와 pALK로 공형질도입된 세포에서 pGSK3β CA이 공형질도입된 세포에 비하여 tau의 응집이 증가하였으며, 이러한 효과는 pALK의 도입양이(증가함에 따라 더욱 현저하였다(도 2B). 도 2B 그래프에 나타난 수치는 평균±S.D 값이며(n=4), P 값은 t-검정 방법을 이용하여 계산하였다.

[123] 또한, 인간 ALK의 tau 단백질의 인산화 및 응집을 촉진시킨다는 것을 면역염색 방법을 통하여 재확인하였다. pcDNA 단일 컨스트럭트, pHA-Tau 단일 컨스트럭트, 또는 pHA-Tau와 pALK 컨스트럭트를 HT22 세포로 형질감염한 후, tau 단백질의 인산화와 응집화를 확인하기 위하여 PHF-1 항체와 티오플라빈-S 항체를 이용하여 세포를 염색하였다. 상기 세포의 형광이미지 사진은 형광 현미경을 이용하여 수득된 후, 각 항체의 염색 결과 이미지를 겹쳐서 중첩(overlay) 이미지를 만들었다. 그 결과, pALK와 pHA-Tau 컨스트럭트가 공형질도입된 세포에서 티오플라빈-S와 PHF-1의 신호가 증가하였다(도 2C). 이는 인간 ALK가 tau의 응집화와 인산화를 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[124] 2-2: 인간 ALK의 인산화효소의 활성에 따른 tau 응집화 및 인산화의 변화

[125] ALK 인산화효소의 활성이 tau 조절에 필요한지의 여부를 확인하고자, 본 발명자는 야생형 타입의 ALK, 인산화효소-비활성화된 ALK(ALK KD), 구조적으로 활성화된 ALK(ALK.Fc), 및 인산화효소가 비활성화된

ALK-Fc(ALK.Fc KD)와 같은 다양한 ALK 컨스트럭트를 이용하였다(도 3A). 구조적으로 활성화된 변이체인 ALK.Fc는 세포외 도메인이 마우스 IgG 2b Fc 도메인으로 대체된 키메라 단백질이다. 상기 Fc 도메인은 상기 수용체 단백질의 이합체화 반응(dimerization) 및 올리고머화(oligomerization) 반응을 유도하여, 수용체의 자기인산화 및 활성화를 이끌어낸다. ALK KD 및 ALK.Fc KD 단백질은 각각 ALK와 ALK.Fc의 인산화효소 활성이 비활성화된 형태로서, 촉매 도메인의 ATP-결합 포켓(pocket)에 위치하는 변하지 않는 라이신 잔기가 알라닌(alanine)으로 변환된 것이다.

[126] pGFP-tau 컨스트럭트는 도 3A에 개시된 ALK 컨스트럭트들(야생형 ALK(pALK), 구조적으로 활성을 나타내는 변이체(pALK.Fc), 및 인산화효소가 비활성화된 변이체(pALK KD 및 pALK.Fc KD)] 가운데 하나와 HT22 세포로 24시간 동안 공형질도입되었다. 세포가 뭉친 것처럼 보이는 GFP-양성 세포의 수를 계수하여 tau의 응집을 측정하였다. 그 결과, 인산화 활성을 나타내는 pALK, pALK.Fc가 도입된 HT22 세포에서는 tau의 응집현상이 증가한 반면, 인산화효소가 비활성화된 pALK KD 및 pALK.Fc KD가 도입된 HT22 세포에는 pcDNA가 도입된 대조군과 유사한 수치를 나타냈다(도 3B). 그래프에 나타난 수치는 평균±S.D 값이며(n=4), P 값은 t-검정 방법을 이용하여 계산하였다. 이러한 결과는 ALK의 인산화 활성이 tau 응집화에 필수적이라는 것을 입증한 것이다.

[127] 그 뒤, 상기 세포 추출물을 환원 및 비환원 조건에서 웨스턴 블랏을 통해서 분석하였다. 이때 사용한 항체는 하기와 같다: PHF-1(p-Ser396/404; Davies), 항-ALK 단클론 항체(Dr. Mark Vigny로부터 제공받음; Souttou *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 9526-9531, 2001), CP13(p-S202; Davies), 12E8(p-Ser262/356; 엘란 제약회사(Elan Pharmaceuticals)의 Dr. Peter Seubert로부터 제공받음), p-ALK(p-Tyr1604; Cell signaling, #3341), 및 -tubulin(Sigma, T5168). 그 결과, 구조적으로 활성화된 ALK.Fc는 항-인산-ALK, CP12, 12E8, 및 PHF-1의 발현을 야생형 ALK에 비하여 증가시킨 반면, 인산화효소가 비활성된 ALK KD 및 ALK.Fc KD 변이체는 아무런 영향을 미치지 못하였다(도 3C). 또한, 비환원조건에서는 ALK.Fc는 올리고머로 검출되었으나[이량체(dimer), 240 kD; 삼량체(trimer), ~360 kD], 야생형 타입의 ALK는 단량체(monomer)의 형태로 검출되었다(~200 kD). 그럼에도 불구하고, 상기 ALK와 ALK.Fc 단백질의 자기 인산화가 항-인산-ALK 항체에 의하여 검출되었다. 비록 야생형 타입의 ALK가 구조적으로 활성화된 변이체인 ALK.Fc에 비하여 덜 활성화되었으며, 이는 ALK.Fc의 Fc 도메인에 의하여 ALK 이합체화 반응(dimerization) 및 올리고머화(oligomerization) 반응이 촉진됨에 따라, 인산화효소의 활성이 증가하였기 때문이다(Moog-Lutz *et al.*, *J. Biol. Chem.,* 280, 26039-26048, 2005). 이러한 결과는 tau의 조절에 있어서 ALK의 인산화 활성이 중요한 역할을 한다는 것을 입증하는 것이다.

[128] 실험예 3: ERK와 CDK를 통한 ALK 매개의 tau 변형 확인

[129] 3-1: HT22 세포에서의 ERK와 CDK를 통한 ALK의 tau 인산화 증가 확인

[130] 본 발명자들은 ALK에 의해 유도되는 tau 변형에 있어서 어떠한 인산화효소가 하위 단계 조절자로서 역할을 수행하는지 파악하기 위하여, GFP-tau와 ALK 또는 ALK 변이체를 함께 발현시킨 후 tau 인산화효소의 활성을 확인하였다. 구체적으로, pGFP-tau와 ALK 컨스트럭트(pALK, pALK KD, pALK.Fc, pALK.Fc KD) 가운데 하나를 HT22 세포로 공형질도입하였다. 이에 대한 대조군으로는 pGFP-tau 단일 컨스트럭트만을 도입한 군과 pGFP-tau와 pcDNA를 공형질도입한 군을 이용하였다. 형질도입이 후 24시간이 경과한 후, 암 세포에서 ALK의 하위단계 인산화효소로 알려진 AKT, GSK3β 및 ERK 단백질 및 상기 단백질의 인산화수준을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 이때 사용한 항체는 하기와 같다: AKT(Cell signaling, #9272), p-AKT(Cell signaling, #9271), GSK3β(BD Biosciences, 610201), p-GSK3β(p-Ser9; Cell signaling, #9323), ERK(Cell signaling, #9102), p-ERK(Cell signaling, #9101), 및 -tubulin(Sigma, T5168). 그 결과, 인산화효소의 활성을 나타내는 pALK.Fc 컨스트럭트와 pGFP-tau가 공형질도입된 군에서만 AKT와 ERK 인산화의 증가가 관찰되었으나, GSK3β는 변화가 없었다(도 4A).

[131] 아울러, tau 인산화효소-특이적 저해체가 ALK-유도 tau 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. AKT와 ERK 인산화 수준에 변화를 준 pALK.Fc 컨스트럭트를 선택하여 pGFP-tau 컨스트럭트와 HT22 세포로 공형질도입한 후, CDK5 억제제인 로스코비틴(roscovitine, Ros), ERK 억제제인 U0126, 또는 GSK3β 억제제인 LiCl을 24시간 동안 처리하고 상기 세포 추출물을 이용하여 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 이때 사용한 항체는 하기와 같다: PHF-1(p-Ser396/404; Davies), CP13(p-S202; Davies), MC-1(conformational change; Davies), P35/25(Cell signaling, #2680), TG5(220-240; generously provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine,NY), -actin(Sigma, A2668), ERK(Cell signaling, #9102), p-ERK(Cell signaling, #9101), GSK3β(BD Biosciences, 610201), 및 p-GSK3β(p-Ser9; Cell signaling, #9323).

[132] 그 결과 로스코비틴과 U0126는 처리량 의존적으로 ALK-매개의 tau 인산화를 현저히 감소시켰다(도 4B 및 4C). 특히, 로스코비틴은 매우 우수한 억제 효과를 나타냈으며, U0126에 비하여 더욱 우수한 효과를 나타냈다. 특이적으로 LiCl의 경우, pGFP-tau 단일 또는 pGFP-tau와 pALK.Fc를 동시에 발현하는 세포에서 모두 tau의 인산화를 억제하였으며, 그 억제의 정도는 매우 유사하였다(도 4D). 이러한 결과는 ALK가 ERK와 CDK의 활성화를 통하여 tau의 인산화를 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[133] 3-2: Tau 형질전환 HT22 세포주에서 ALK에 의한 tau 인산화 증가 확인

[134] 대부분의 신경세포주에서 tau가 거의 발현되지 않기 때문에, 본 발명자는 상기 실시예 1-2에서 제조한 안정적으로 tau를 발현하는 Tau 형질전환 HT22 세포주를

이용하여 ALK의 tau 응집 및 인산화에 미치는 효과를 다시 검증하였다.

[135] HT22/Tau 형질전환 세포주인 HT22/Tau #1과 #3 클론을 1 μg/ml 독시사이클린(Doxycycline, Dox) 처리/무처리 조건에서 24시간 동안 배양되었으며, 상기 배양된 세포를 추출하여 웨스턴 블랏을 이용하여 tau 단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 일실시예에서 제조된 HT22/Tau 혼합 세포 및 상기 혼합 세포에서 분리한 단일클론 #1, #3에서 독시사이클린 처리에 의하여 tau의 발현을 유도하였을 때 tau의 발현이 유도되었다. 또한, HT22/Tau #1 세포의 tau 발현 수준이 HT22/Tau #3 세포보다 낮은 것이 관찰되었다(도 5A). 이때 대조군으로는 pBig2i-tau(tet-on)를 형질도입하여 제조한 HT22/Hph 세포를 이용하였다.

[136] 이어, 본 발명자는 HT22/Tau #1 형질전환 세포주를 pcDNA(대조군), pALK KD, 또는 pALK.Fc로 형질감염시킨 후, 1 μg/ml 독시사이클린(Doxycycline, Dox) 처리/무처리 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 세포 추출물은 웨스턴 블랏을 이용하여 분석하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이, ALK KD가 아닌 활성화 상태의 ALK가 tau 인산화를 증가시켰으며, 이러한 결과는 상기 실험예 2, 3의 HT22 세포에 ALK.Fc를 일시적으로 과발현시켰을 때 수득된 결과와 일치하였다.

[137] 이어, 본 발명자는 pALK.Fc와 pcDNA(대조군) 또는 pCDK5 DN(CDK5 우성 음성 변이체; D144N)를 HT22/Tau #1 형질전환 세포주로 형질도입한 후, 1 μg/ml 독시사이클린(Doxycycline, Dox) 처리/무처리 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 세포를 추출하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, CDK5 우성음성(CDK5 dominant negative, CDK5 DN) 변이체에 의한 내인성 CDK5의 활성 억제가 ALK-유도 tau 인산화를 감소시켰다(도 5C). 이는 CDK5 활성이 ALK가 tau를 조절에 필요하다는 것을 입증하는 것이며, 안정적으로 tau를 발현하는 Tau 형질전환 HT22 세포주 또한 상기 실험예 1, 2에서 관찰된 바와 동일한 결과를 나타냈음을 확인할 수 있었다.

[138] <u>실험예 4:ALK에 의한 tau 인산화 증가 확인</u>

[139] <u>4-1: 마우스 일차배양 세포에서의 ALK 작용항체에 의한 tau의 인산화 증가</u>

[140] 확실한 ALK의 자연 리간드가 알려져 있지 않기 때문에, 본 발명자는 상기 실험예에서 ALK 활성이 tau의 인산화 및 응집화를 증가시킨다는 것을 확인하기 위하여, 과발현 분석을 이용하였다. 이번에는 내인성 ALK의 활성이 tau에 유사한 효과를 나타내는지의 여부를 확인하기 위해서, 본 발명자는 ALK에 대한 작용(agonist) 및 길항(antagonist) 효과를 나타내는 항체를 이용하여 마우스 뇌 조직의 신경세포를 직접 배양한 일차배양 세포에서 실험을 수행하였다.

[141] 우선, 마우스 뇌에서 ALK 발현 수준을 확인하였다. 마우스의 뇌 조직은 부분별로 절단한 후, 뇌 조직을 TBS 버퍼[20 mM Tris-Cl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 및 1 μg/ml의 아프로티닌, 류펩틴 및 펩스타틴 A]를 이용하여 균질화하였다. 상기 균질화물(homogenate)을

15,000*g*에서 30분 동안 원심분리를 수행하였으며, 그 후 수득된 상층액의 단백질 농도를 브래드포드 분석(Bradford assay, Bio-Rad) 방법을 이용하여 측정하였다. 웨스턴 블랏 분석을 통해서, 출생후 1일째 되는 날(P1)의 소뇌피질, 해마, 선조체(striatum) 및 뇌간 등과 같은 마우스 뇌의 다양한 부분에서 ALK가 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 6A). ALK의 발현은 소뇌피질에서 상대적으로 높았다.

[142] 이어, 마우스 뇌 조직을 분리하여 배양한 마우스 일차배양 신경세포에서 ALK의 발현을 확인하였다. P1 마우스의 해마에서 희돌기교세포(oligodendrocyte)와 신경세포를 Optiprep 농도구배를 통해서 분리한 후, 항-ALK 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 통하여 마우스 ALK의 발현을 관찰하였다. 또한, 신경 세포에서 ALK의 발현이 확인되었다(도 6B).

[143] 4-2: 마우스 일차배양 세포에서 ALK 작용항체에 의한 tau 인산화의 증가 확인

[144] 또한, 내인성 ALK를 자극하기 위하여 작용(agonist) 효과를 갖는 mAb46과 ALK의 세포외 도메인에 대하여 길항(antagonist) 효과를 갖는 mAb30 단일 클론 항체의 특이성을 확인하였다. pcDNA(대조군) 또는 pALK 컨스트럭트로 HT22 세포를 공형질도입한 후, 24시간 동안 배양하여 세포 추출물을 수득하였다. 상기 세포 추출물을 작용(agonist) 효과를 나타내는 mAb46과 길항(antagonist) 효과를 나타내는 mAb30을 각각 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 상기 mAb46와 mAb30 항체는 Dr. Mark Vigny로부터 제공받았다(Souttou *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276, 9526-9531, 2001). 그 결과, 상기 단일 클론 항체가 ALK 비특이적 단백질과 반응하지 않음을 확인하였다(도 6C).

[145] 이후, 마우스 일차배양 세포에 mAb46와 mAb30 항체를 처리하여 작용 및 길항효과를 확인하였다. 6 nM mAb30 항체로 1시간 동안 전처리한 후 mAb46 처리(mAb30 -> mAb46), 6 nM Ab46를 각각 처리하였으며, 이때 음성 대조군으로는 IgG 만을 처리한 세포를 이용하였으며, 양성 대조군으로는 1 μg 소혈청 알부민(BSA, Bovine serum albumin)을 이용하였다. 상기 이용한 단일클론 항체의 양은 쿠마씨 블루 염색(Coomassie blue staining)을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블랏은 PHF-1과 항-tau 항체를 이용하여 수행하였으며, PHF-1과 Tau-5 신호의 상대적인 비율(PHF-1/Tau5)은 하단 패널에 숫자로 표시하였다. 그 결과, 일차배양 대뇌 피질 신경세포에 작용효과를 갖는 mAb46을 처리하였을 때, PHF의 발현이 증가하면서 tau의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 6D 하단). 반면, 길항 효과를 갖는 mAb30과 반응시킨 후 작용 효과를 갖는 mAb46을 처리하였을 때에는 mAb46-매개 tau 인산화가 억제되는 것이 관찰되었다(도 6D 하단). 이러한 결과는 mAb46과 mAb30 항체가 ALK에 대한 작용 및 길항 작용을 효과적으로 나타내며, ALK의 tau의 인산화를 증가시키는 효과를 입증하는 것이다.

[146] 4-3: HT22 세포에서 mAb46 항체에 의한 tau 인산화 증가 확인

[147] 우선, HT22 세포의 막 분획물에서 내인성 ALK의 발현을 확인하였다. HT22

세포는 균질화(homogenization) 버퍼[10 mM HEPES(pH 7.4), 250 mM 슈크로오스(sucrose), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 μg/ml 아프로티닌(aprotinin), 1 μg/ml 류펩틴 및 1 μg/ml 펩스타틴 A(pepstatin A)]와 반응시킨 후, 미세 주사기 바늘에서 반복적으로 업다운 시킴으로써 용해시켰다. 손상되지 않은 세포와 핵은 4℃, 1500g 조건에서 10분 동안 원심분리를 통하여 분리하였으며, 그 상층액은 4℃, 100,000g 조건에서 2시간 동안 원심분리를 다시 수행하였다. 그 결과 수득된 펠렛(pellet)은 막 분획물을 포함하고 있는 반면, 상기 상층액은 세포질 분획물을 포함하였다. 그 후, 상기 분획물을 항-ALK 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 통하여 분석하였다. 그 결과 HT22 세포막 분획물에서 ALK가 발현되는 것이 확인되었다(도 7A).

[148] 또한, 본 발명자는 HT22 신경세포에서 mAb46의 tau 인산화에 미치는 영향을 확인하였다. HT22 세포는 pGFP-tau 컨스트럭트로 형질감염되고, 항-ALK 항체를 처리하였다. tau 인산화 정도는 웨스턴 블랏을 통해서 확인하였으며, tau 응집화는 형광 현광현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과, 상기 마우스 뇌에서 직접 분리하여 배양한 일차배양 신경세포에서 관찰된 결과와 동일하게, mAB46 처리는 HT22/tau 세포의 인산화 및 응집화를 증가시킨 반면, 길항 효과를 갖는 mAb30은 tau 인산화를 촉진하는 mAb46 효과를 감소시켰다(도 7B 및 7C). 이러한 결과는 내인성 ALK를 자극 또는 활성이 세포내 tau 인산화를 유도한다는 것을 입증하는 것이다.

[149] <u>실험예 5: ALK에 tau 매개의 신경독성 증가 확인</u>

[150] <u>5-1: 신경세포에서 ALK/Tau 세포독성에 의한 신경세포 특이적 세포사멸 증가 확인</u>

[151] ALK에 의하여 과인산화 및 응집된 tau를 많이 함유하고 있는 신경세포의 세포사멸 수준을 확인하였다. pALK.Fc 또는 pALK.Fc KD 컨스트럭트와 pGFP 또는 pGFP-tau 컨스트럭트를 HT22 세포로 공형질도입한 후, 24시간 내지 96시간 동안 배양하였다. 세포 사멸은 EtHD(ethidium homodimer)를 이용하여 염색한 후, 응축되고 조각난 핵을 나타내는 GFP-양성세포를 계수함으로써 측정하였다. 그 결과, HT22 세포에서 tau의 이소성 발현은 신경세포에 독성을 유발하였으며 높은 수준으로 세포사멸을 유발한 반면, ALK.Fc는 세포사멸을 tau에 비하여 낮은 수준 유발하였다(도 8A). 주목할 만한 점은, 구조적으로 활성을 나타내는 ALK.Fc의 이소성 발현이 tau 발현 신경세포에서 세포 사멸을 증가시켰으나, 인산화효소가 비활성화된 ALK.Fc KD는 세포 사멸에 영향을 미치지 않았다(도 8A). 이러한 결과는 ALK 활성이 신경세포에서tau의 독성을 강화시킨다는 것을 나타내는 것이다.

[152] <u>5-2: 신경세포에서 ALK/Tau 세포독성에 있어서 하위단계의 인산화 효소 확인</u>

[153] 본 발명자는 ALK-매개 tau 신경독성의 하위단계 인산화효소를 확인하기 위하여, 인산화효소 억제제를 이용하였다. pALK.Fc와 pGFP-tau 컨스트럭트를 HT22 세포로 공형질도입한 후, 무처리(Mock), 25 μM 로스코비틴(Ros), 1 μM

U0126 U0126), 또는 10 mM LiCl을 24시간 동안 처리한 후, 세포 사멸을 측정하였다. 이에 대한 음성 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 무처리군(Mock)을 이용하였다. 그 결과, ALK.Fc/Tau 매개의 신경독성은 로스코비틴 처리에 의해서 현저하게 감소하였으며, U0126 처리에 의해서는 일부 감소하는 효과가 관찰되었다(도 8B).

[154] 이어, 본 발명자는 ALK-매개 tau 신경독성의 하위단계 인산화효소를 확인하기 위하여, 인산화효소 우성-음성(dominant-negative) 변이체를 이용하였다. pcDNA, pMEK1 DN, pAKT1 DN, pp38 DN, pJNK DN, 또는 pCDK5 DN 컨스트럭트 중 하나의 컨스트럭트를 pGFP-tau, pALK.Fc와 함께 HT22 세포로 공형질도입되었다. 상기 형질도입 48시간 경과 후, 세포 사멸을 측정하였다. 그 결과, pMEK1 DN와 pCDK5 DN 컨스트럭트가 공형질도입된 HT22 세포에서 세포사멸이 억제되었다. 이는 CDK5 또는 ERK의 우성-음성 변이체의 발현에 의해서 ALK.Fc/Tau 매개의 세포 사멸이 억제됨을 의미한다(도 8C).

[155] 또한, 본 발명자는 CDK5 shRNA를 이용하여 ALK/Tau의 신경독성을 관찰하였다. pGFP-tau와 pALK.Fc 컨스트럭트는 pCDK5 shRNA #1 또는 #2 가운데 하나와 HT22 세포로 함께 형질도입되었다. 상기 형질도입 48시간 경과 후, LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity kit(Molecular Probes)를 이용하여 세포 사멸을 측정하였다. 상기 실험결과와 일치하게, shRNA를 이용하여 내인성 CDK5의 발현을 억제하였을 때, ALK/Tau에 의하여 유도되는 세포 사멸이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(도 8D). 이때, 사용한 pCDK5 shRNA #1은 서열번호 1(536- TGACCAAGCTGCCAGACTA-554)로 기재되는 폴리뉴클레오티드를 갖는 것을 특징으로 하며, pCDK5 shRNA #2 는 서열번호 2 (689-ACTCCACGTCCATCGACAT-707)로 기재되는 폴리뉴클레오티드를 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 결과는 CDK5와 ERK가 신경세포에서 ALK-유도 tau 독성에 필요하다는 것을 입증하는 것이다. 도 8A 내지 8D의 결과는 3회 반복 실험으로부터 수득된 평균±S.D의 값이다.

[156] <u>5-3: 비신경세포에서 ALK/Tau 세포독성 확인</u>

[157] 본 발명자는 ALK 활성/Tau가 비신경세포에서도 세포사멸을 유발하는지 확인하기 위하여, pALK, pALK KD, pALK.Fc, 또는 pCaspase-8(양성 대조군) 중 하나의 컨스트럭트를 pGFP-tau와 함께 MCF7 세포로 함께 형질도입하였다. 상기 형질도입 48시간 경과 후, EtHD 염색을 통하여 세포 사멸이 측정되었으며, 세포 추출물은 웨스턴 블랏을 통해서 분석되었다. 그 결과, ALK와 ERK의 인산화가 관찰되었음에도 불구하고 세포 사멸이 증가되지 않았다(도 8D 및 8E). 이러한 결과는 ALK가 신경세포 특이적으로 세포독성을 나타내는 역할을 수행한다는 것을 입증하는 것이다.

[158] <u>5-4: CDK5 억제제 처리에 의한 ALK/Tau 세포사멸 억제 확인</u>

[159] pALK.Fc 또는 pALK.Fc KD와 pGFP 또는 pGFPtau를 HT22 세포로 공형질도입한 후, 24시간이 경과하고 세포 이미지를 형광 현미경을 통해서

수득하였다. 그 결과, Motegi 등의 ALK 활성이 신경 세포 및 초파리 모델에서 신경돌기 성장을 활성화시킨다는 연구결과와 반대로(Motegi *et al.*, *J. Cell Sci.,* 117, 3319-3329m, 2004), 본 발명자는 ALK.Fc에 의하여 유도되는 신경돌기 성장 촉진이 pALK.Fc와 pGFP-tau를 함께 발현시켰을 때 관찰되지 않았다(도 9A).

[160] 또한, HT22/Tau #1 형질전환 세포주에 25 μM 로스코비틴 전처리 후, pGFP와 pcDNA 또는 pALK를 공형질도입하였다. 그 후, 독시사이클린(Doxycyclien, Dox) 처리/무처리 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 신경돌기 성장 및 세포 생존율은 형광 현미경을 통하여 분석하였다. 신경돌기의 상대적인 비율은 신경 돌기의 길이에 대한 신경세포의 수에 의하여 측정되었다. 그 결과, ALK와 tau에 의한 신경돌기 성장효과의 감소 및 세포 사멸의 증가는 tau와 ALK.Fc 발현하는 신경세포에서 CDK5 억제제인 로스코비틴 처리에 의해서 회복되었다(도 9B). 이러한 결과는 CDK5가 ALK-매개 신경돌기 성장 및 신경독성에 있어서 중요한 역할을 수행한다는 것을 의미한다.

[161] <u>실험예 6: ALK 특이적 억제제 처리에 의한 tau의 세포독성 및 과인산화 억제 확인</u>

[162] 본 발명자는 ALK-특이적 억제제가 활성상태의 ALK에 의해서 유도되는 tau 인산화 및 tau 세포독성 촉진 효과를 직접적으로 억제할 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다. 2 종류의 ALK 억제제인 NVP-TAE684(Novartis)와 PF-2341066(Pfizer)를 이용하였으며, 상기 ALK 억제제들은 ALK에 대하여 우수한 특이성을 나타낸다는 것이 알려져 있다(Galkin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 270-275, 2007; Zou *et al.*, *Cancer Res.,* 67, 4408-4417, 2007). 구체적으로 HT22/Tau #1 세포에 pGFP와 pcDNA 또는 pALK.Fc를 함께 형질도입시킨 후, 1 μg/ml 독시사이클린(Doxycycline, Dox) 처리/무처리 조건에서 ALK 억제제(NVP-TAE684, PF-2341066)의 처리 농도를 증가시키며 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포사멸은 형광 현미경으로 세포 형태를 근거로 판단하였다. 그 후, 세포를 추출한 후 tau, ERK, CDK5 및 ALK의 인산화를 각각의 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석을 통해서 확인하였다. 그래프의 오차 막대는 평균±S.D.(n=4)를 의미한다.

[163] 그 결과, HT22/Tau #1 세포에 ALK.Fc를 형질도입한 후, ALK 억제제를 처리하였을 때, 세포 사멸이 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다. 구체적으로 20 nM NVP-TAE684 처리에 의해서 세포사멸이 42%에서 10%로 감소하였으며, 100 nM PF-2341066 처리에 의해서 세포사멸이 42%에서 15%로 감소하였다(도 10A). 또한 형광현미경으로 세포를 관찰한 후 추출한 세포를 이용한 웨스턴 블랏 실험 결과, ALK 타이로신 인산화가 NVP-TAE684에 의해서 완벽하게 억제되며, PF-2341066에 의해서 일부 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(도 10B). 또한, ALK-매개 ERK 활성 및 tau 인산화가 모두 ALK 억제제 처리량 의존적으로 억제되는 것이 관찰되었다(도 10B). 이러한 결과는 ALK 인산화효소 활성이 tau 인산화와 tau-매개 신경독성에 모두 필요하다는 것을 입증하는 것이다.

[164] 실험예 7: Tau 초파리 모델에서 ALK 활성증가에 의한 tau 매개의 신경퇴행 증가 확인

[165] 7-1: Tau 초파리 모델에 있어서 ALK 활성증가에 의한 눈 표현형 변화 관찰

[166] ALK의 tau 인산화 및 독성을 조절하는 효과를 생체 내(*in vivo*)에서 측정하기 위하여, 본 발명자는 tauopathy 초파리 동물 모델로 잘 알려진 인간 tau 형질전환 파리(gl-tau2.1 라인)을 이용하였다. gl-tau2.1 라인 초파리에 있어서, 인간 tau는 광수용체 신경세포에서 발현된다. 야생형 타입의 대조군 초파리에 비하여 gl-tau 초파리는 신경퇴행과 낱눈(ommatidia)과 털 이상과 함께 망막의 경미한 붕괴를 나타냈다. 이식 유전자는 이진 GAL4/UAS 시스템을 이용하여 발현되었으며(Brand and Perrimon, 1993), 상기 시스템을 이용함으로써 tau 발현 세포의 주위의 세포군에 이식 유전자(transgene)들이 발현 가능하게 하였다.

[167] 도 11의 A는 tau 형질전환 초파리에서 구조적으로 활성을 나타내는 초파리 ALK가 함께 발현되었을 때, 울퉁불퉁한 눈 표현형과 불규칙한 낱눈 형태가 증가되는 것을 현미경으로 촬영한 사진이며, 이 때의 실험군은 대조군(GMR-GAL4/+), dALKACT(GMR-GAL4/+; UAS-dALKACT/+), dALKDN(GMR-GAL4/+;UAS-dALKDN/+), gl-Tau(GMRGAL4/+; gl-Tau2.1/+), gl-Tau / dALKACT(GMR-GAL4/+; gl-Tau2.1/+; UASdALKACT/+), 및 gl-Tau / dALKDN(GMR-GAL4/+; gl-Tau2.1/+; UAS-dALKDN/+)이다.

[168] 그 결과, tau와 구조적으로 활성을 나타내는 초파리 ALK를 동시에 발현하는 형질전환 초파리(Tau / $dALK^{ACT}$)는 타우 단일 유전자만을 발현하는 초파리에 비하여 크기가 감소하였으며, 더욱 울퉁불퉁한 형태를 나타냈다. 반면, gl-tau 형질전환 초파리가 우성음성 초파리 ALK 초파리(Tau / $dALK^{DN}$)와 교배하였을 때, 울퉁불퉁한 눈의 표현형이 현저하게 감소하였다(도 11A). GMR-GAL4 드라이버를 이용하여 관찰되는 정상-눈의 표현형은 활성 형태의 초파리 ALK($dALK^{ACT}$)이 눈에서 과발현됨에 따라 저해되었다(도 11A).

[169] 7-2: Tau 초파리 모델에 있어서 ALK 활성증가에 따른 초파리의 내부 신경퇴행 확인

[170] 이어, tau 형질전환 초파리에 ALK를 함께 발현시켰을 때, 초파리의 내부 신경퇴행 변화를 형광현미경으로 촬영하였다. 5일째 되는 초파리 내부 망막을 핵 Hoechst 33342를 이용하여 면역염색한 후 형광현미경을 이용하여 촬영하였으며, 도 13의 B에 나타난 스케일 바는 10 μm를 의미한다. 그리고 촬영된 사진을 기반으로 망막의 두께를 수치화하였다. 그 결과, Tau / $dALK^{ACT}$ 형질전환 초파리는 망막 두께가 현저히 감소되고 신경이 극심히 손상되면서 내부 망막 구조가 붕괴되는 것이 관찰되었다(도 11B, 11C). 도 11C 그래프에 나타난 오차막대는 평균±S.E.M(n = 3)을 의미한다.

[171] 또한, tau 독성이 tau의 인산화되는 경향에 의존하기 때문에, 상기 형질전환 tau 초파리의 tau 인산화 수준이 $dALK^{ACT}$ 및 $dALK^{DN}$에 의해서 조절되는 것을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 형질전환 초파리 머리 조직은 균질화 버퍼[50 mM

Tris-Cl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% sucrose, 1 mM Na_3VO4, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, 및 1 μg/ml의 아프로티닌, 류펩틴 및 펩스타틴 A]를 이용하여 균질화하였다. 상기 균질화물(homogenates)을 15,000*g*에서 30분 동안 원심분리를 수행하였으며, 그 후 수득된 상층액의 단백질 농도를 브래드포드 어세이(Bradford assay, Bio-Rad) 방법을 이용하여 측정하였다. 이렇게 수득된 샘플을 웨스턴 블랏 실험에 이용하였다. 그 결과, 도 11의 D에 나타난 바와 같이, tau 단일 유전자를 과발현시킨 초파리에 비하여, 구조적으로 활성을 나타내는 초파리 ALK와 tau를 함께 과발현시켰을 때 PHF-1 염색이 강해지는 것이 관찰되었다. 이와 반대로, 우성-음성 초파리 ALK와 tau가 과발현된 초파리에서는 PHF-1의 염색이 거의 관찰되지 않았다(11의 D). 종합해보면, 이러한 결과들은 tau 형질전환 초파리에서 ALK의 활성이 신경독성을 생체 내(*in vivo*)에서 증가시킨다는 것을 입증하는 것이다.

[172] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

서열목록 Free Text

[173] 서열번호 1은 pCDK5 shRNA #1을 나타낸다.

[174] 서열번호 2는 pCDK5 shRNA #2를 나타낸다.

청구범위

[청구항 1] ALK(anaplastic lymphoma kinase)의 이량체형성, 활성 또는 발현 저해물질을 유효성분으로 함유하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 ALK의 이량체 형성, 활성 또는 발현 저해물질은 ALK에 대한 길항 항체(antagonizing antibody) 또는 그의 단편, ALK 특이적 저해 화합물, ALK 유전자에 대한 안티센스 뉴클레오티드, siRNA, shRNA 또는 miRNA인, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 ALK의 활성 저해물질은 ALK 키나아제(kinase) 활성 억제제인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)인, 조성물.

[청구항 5] ALK, ATP 및 ALK의 기질이 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계;
상기 ALK의 기질의 인산화 정도의 변화를 측정하는 인산화 측정단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK의 기질의 인산화를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 6] ALK, ALK의 기질 및 타우 단백질을 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계;
상기 피검 화합물을 처리한 세포 내의 상기 ALK의 기질 또는 상기 타우 단백질의 인산화, 또는 상기 타우 단백질의 응집 여부를 확인하는 확인단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK의 기질 또는 상기 타우 단백질의 인산화, 또는 상기 타우 단백질의 응집을 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 7] ALK, ATP 및 ALK의 기질이 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및

피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 ALK 기질사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 8] ALK 및 ALK의 기질을 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 상기 ALK의 기질사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 9] ALK 및 ALK의 리간드가 포함된 반응 용액에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 ALK 리간드 사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 10] ALK를 발현하는 세포에 피검 화합물 및 ALK의 리간드를 처리하는 피검 화합물 및 ALK의 기질 처리단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 ALK와 상기 ALK 리간드 사이의 상호작용을 저해한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 11] 제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)인, 방법.

[청구항 12] 제9항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 ALK의 리간드는 플레이오트로핀(Pleiotrophin, PTN), 미드카인(midkine, MK), 또는 젤리 벨리(Jelly belly, Jeb)인, 방법.

[청구항 13] ALK를 발현하는 세포에 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계;
상기 피검 화합물을 처리한 세포 내의 상기 CDK5(cyclin-dependent kinase-5) 또는 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화

정도의 변화를 측정하는 인산화 측정 단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 CDK5 또는 ERK의 인산화를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

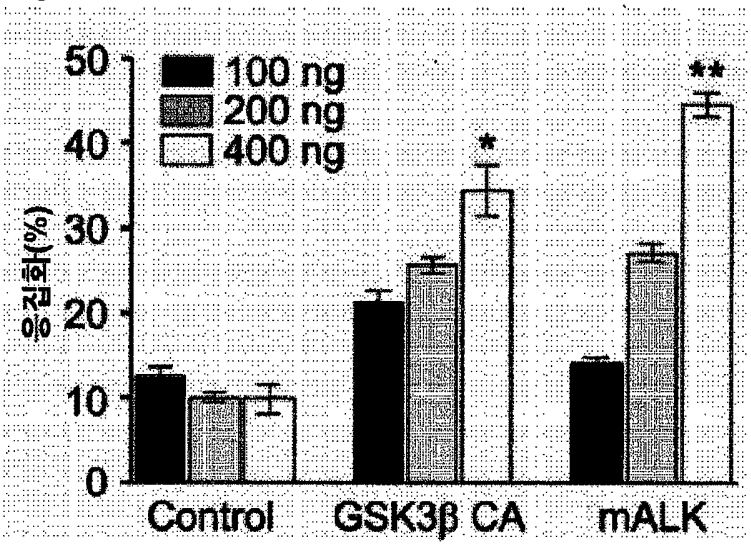
[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)인, 방법.

[청구항 15] ALK(anaplastic lymphoma kinase)와 tau를 발현하는 형질전환 초파리에(Tau / dALK) 피검 화합물을 처리하는 피검 화합물 처리단계;
상기 피검 화합물을 처리한 형질전환 초파리에서 낱눈의 형태 또는 망막의 두께의 변화를 측정하는 눈의 표현형 또는 신경퇴행 관찰 단계; 및
피검 화합물을 처리하지 않은 음성 대조군과 비교하여 상기 낱눈의 형태의 변화 또는 망막의 붕괴를 유의하게 억제한 피검 화합물을 선별하는 선별단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집, 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

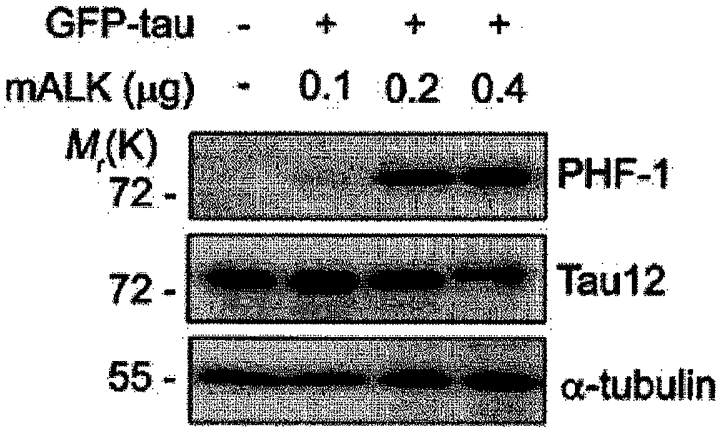
[청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머, 측두엽 변성증, 피질기조퇴행, 퇴행성 핵상 마비 또는 픽병(Pick's disease)인, 방법.

[청구항 17] ALK(anaplastic lymphoma kinase) 단백질에 피검화합물을 처리하는 단계;
상기 ALK 단백질의 이량체 형성 여부를 관찰하는 단계; 및
ALK 단백질의 이량체 형성을 억제한 피검화합물을 선별하는 단계를 포함하는, 타우 단백질의 인산화 또는 응집 또는 신경세포 사멸로 인해 발생하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

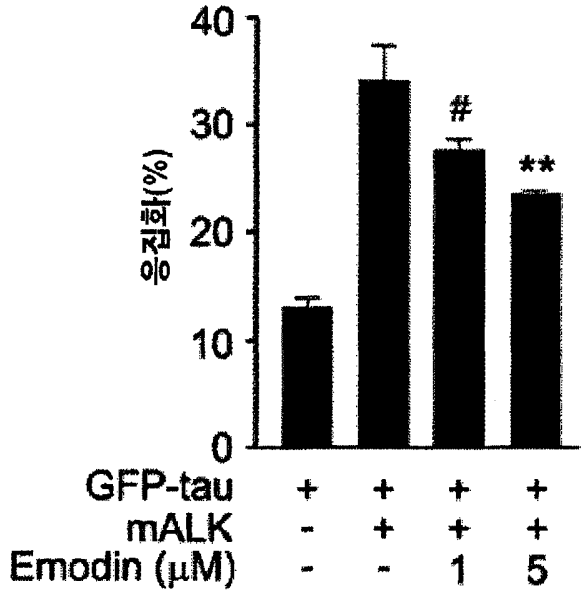
[Fig. 1a]


50
40
30
20
10
0
응집화(%)
100 ng
200 ng
400 ng
*
**
Control
GSK3β CA
mALK

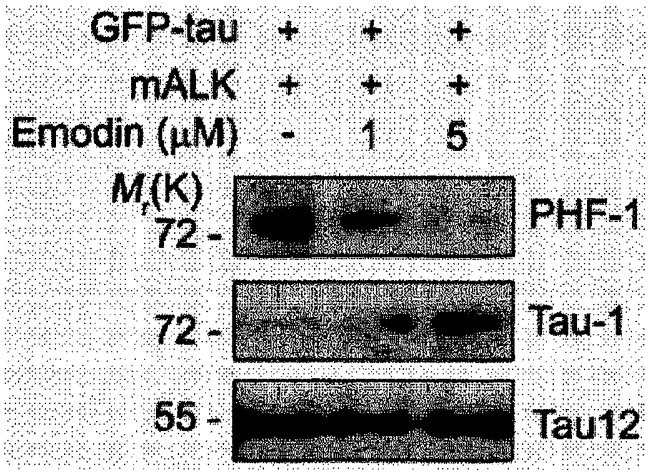
[Fig. 1b]


GFP-tau - + + +
mALK (μg) - 0.1 0.2 0.4
Mr(K)
72 -
PHF-1
72 -
Tau12
55 -
α-tubulin

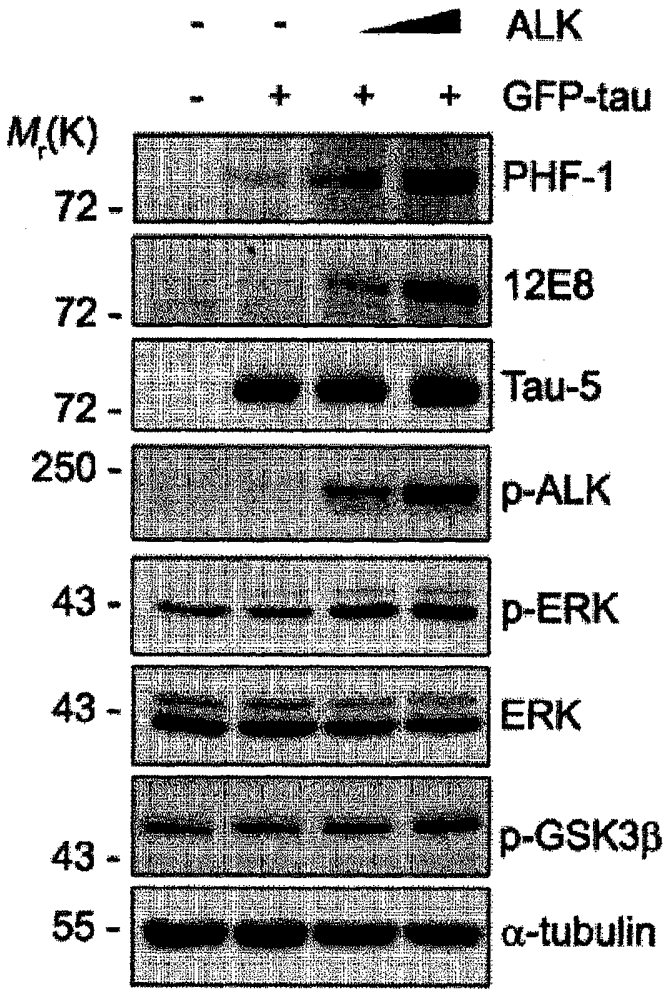
[Fig. 1c]


40
30
20
10
0
응집화(%)
#
**
GFP-tau + + + +
mALK - + + +
Emodin (μM) - - 1 5

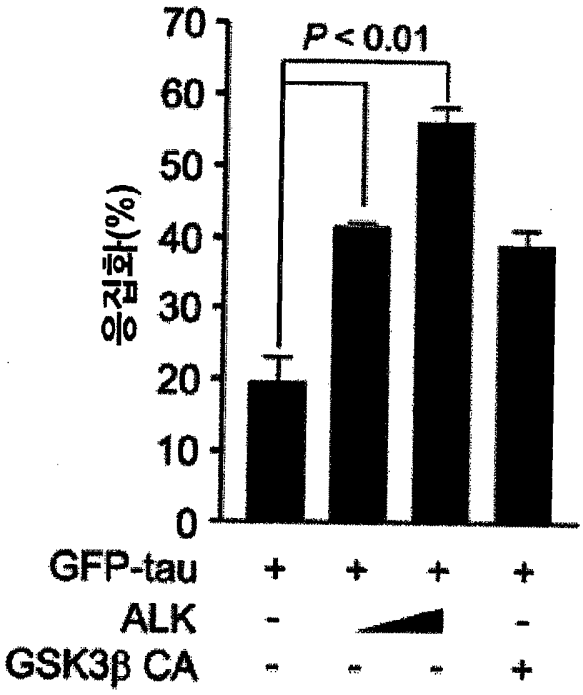
[Fig. 1d]


GFP-tau + + +
mALK + + +
Emodin (μM) - 1 5
M_r(K)
72 -
PHF-1
72 -
Tau-1
55 -
Tau12

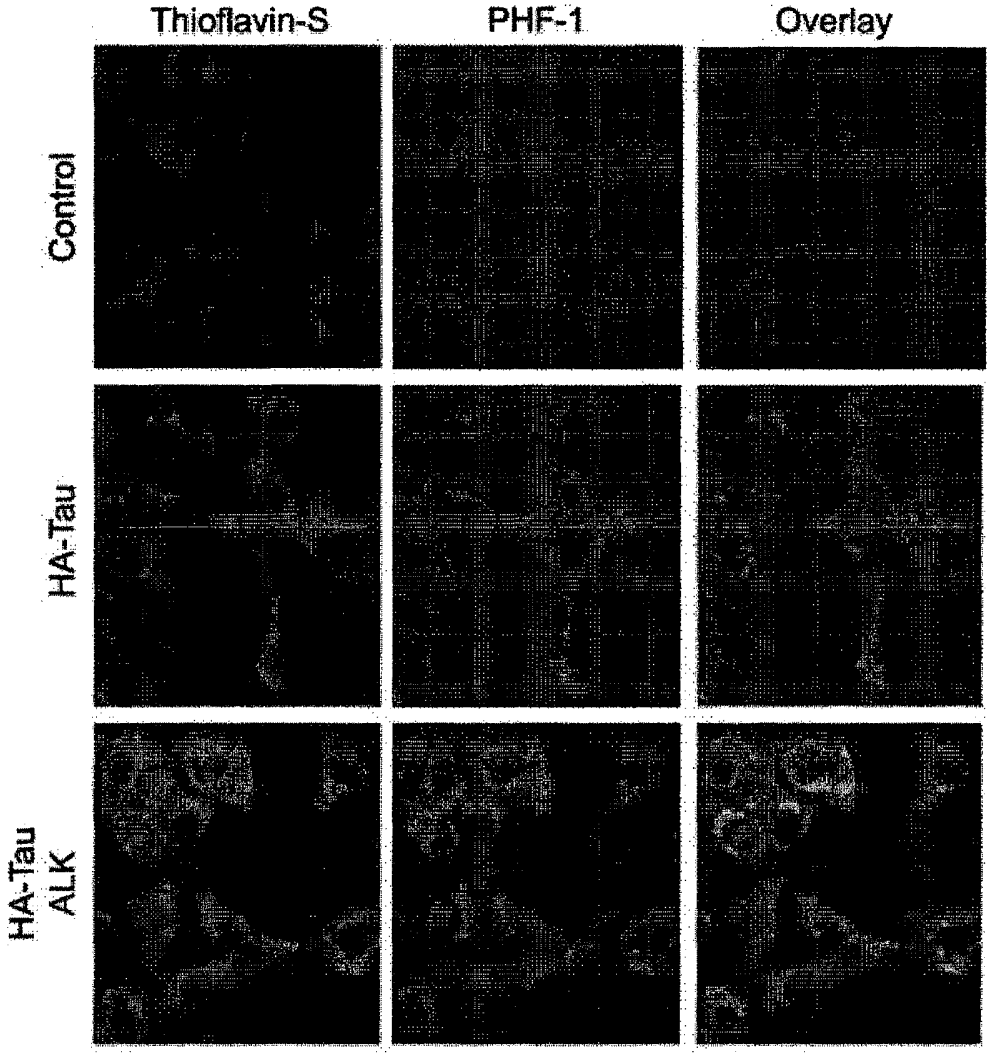
[Fig. 2a]


ALK
GFP-tau
M_r(K)
72
PHF-1
72
12E8
72
Tau-5
250
p-ALK
43
p-ERK
43
ERK
43
p-GSK3β
55
α-tubulin

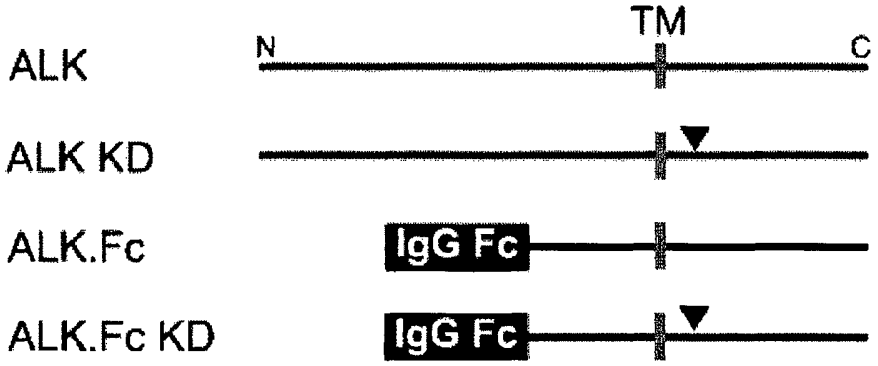
[Fig. 2b]



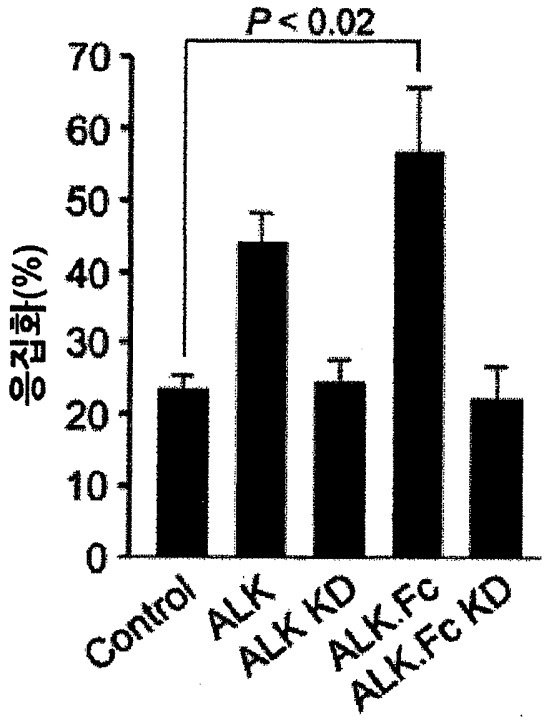
[Fig. 2c]


Thioflavin-S
PHF-1
Overlay
Control
HA-Tau
HA-Tau
ALK

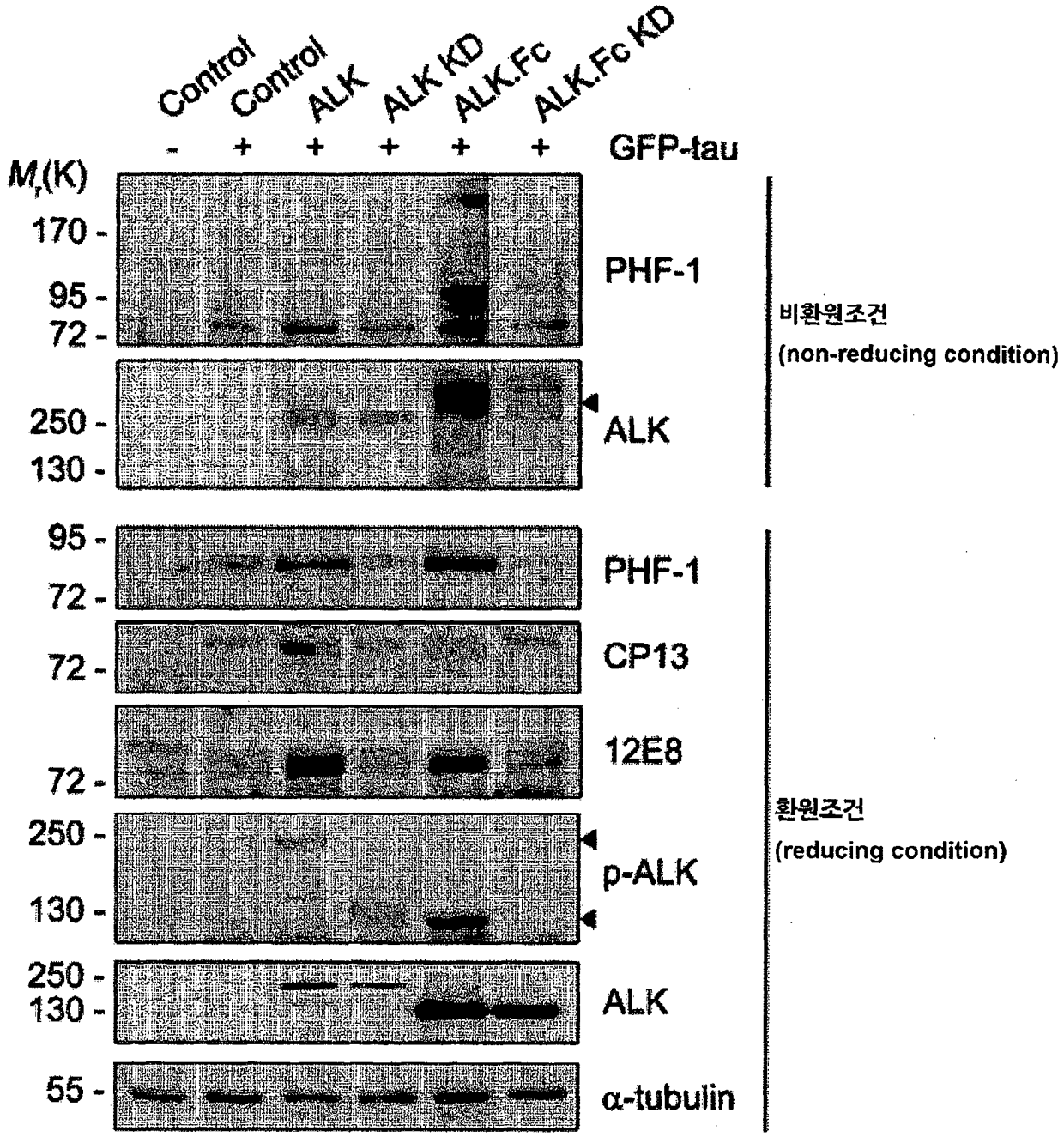
[Fig. 3a]


TM
N
C
ALK
ALK KD
ALK.Fc
IgG Fc
ALK.Fc KD
IgG Fc

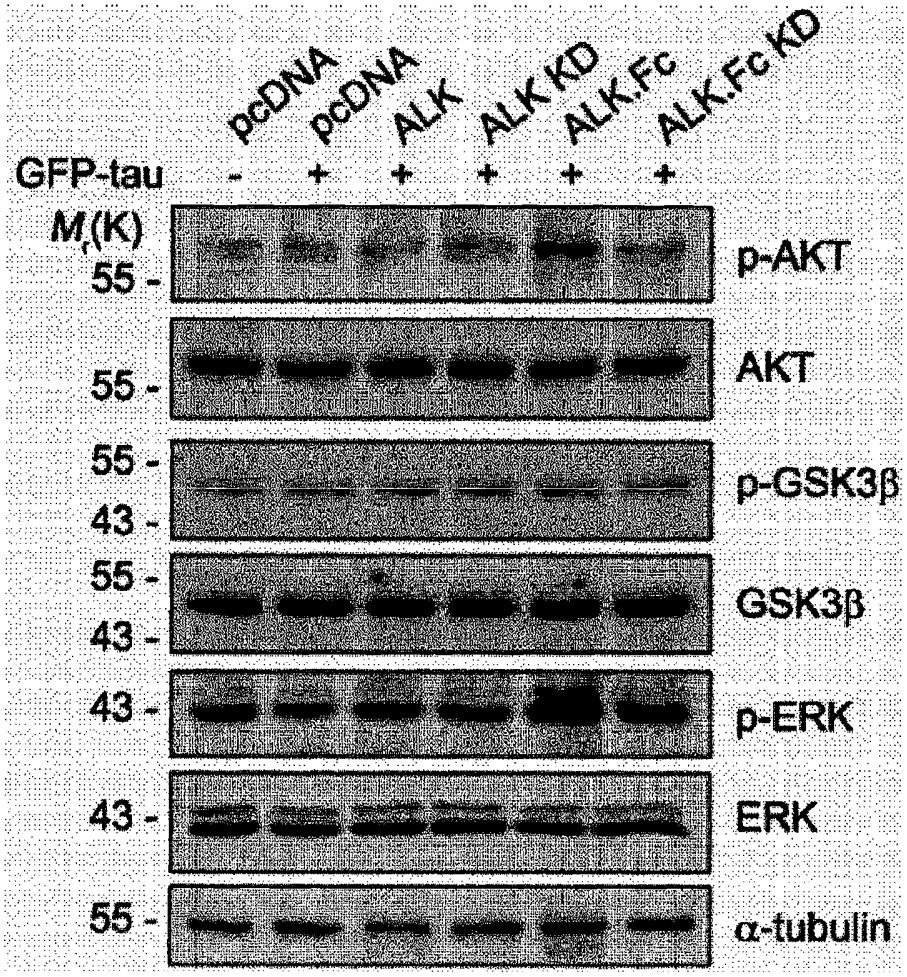
[Fig. 3b]



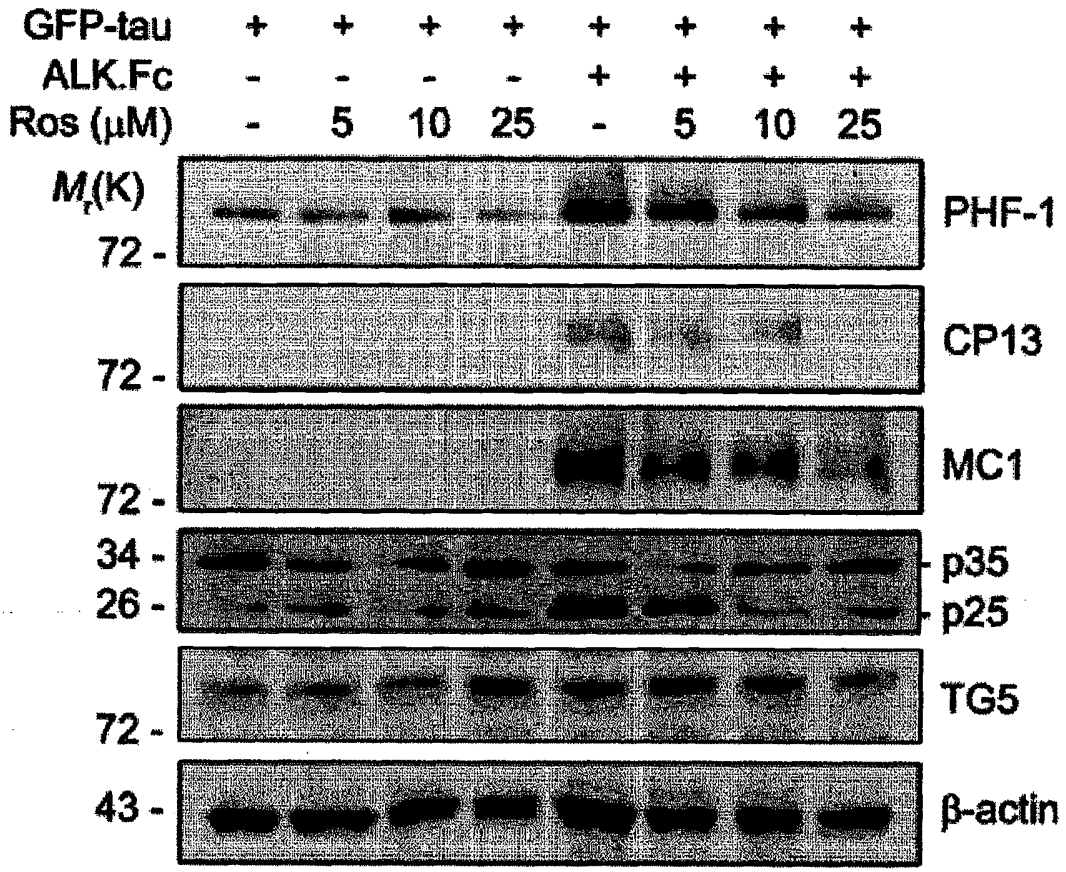
[Fig. 3c]


Control
Control
ALK
ALK KD
ALK.Fc
ALK.Fc KD
- + + + + +
GFP-tau
M_r(K)
170 -
95 -
72 -
PHF-1
250 -
130 -
ALK
비환원조건
(non-reducing condition)
95 -
72 -
PHF-1
72 -
CP13
72 -
12E8
250 -
130 -
p-ALK
250 -
130 -
ALK
55 -
α-tubulin
환원조건
(reducing condition)

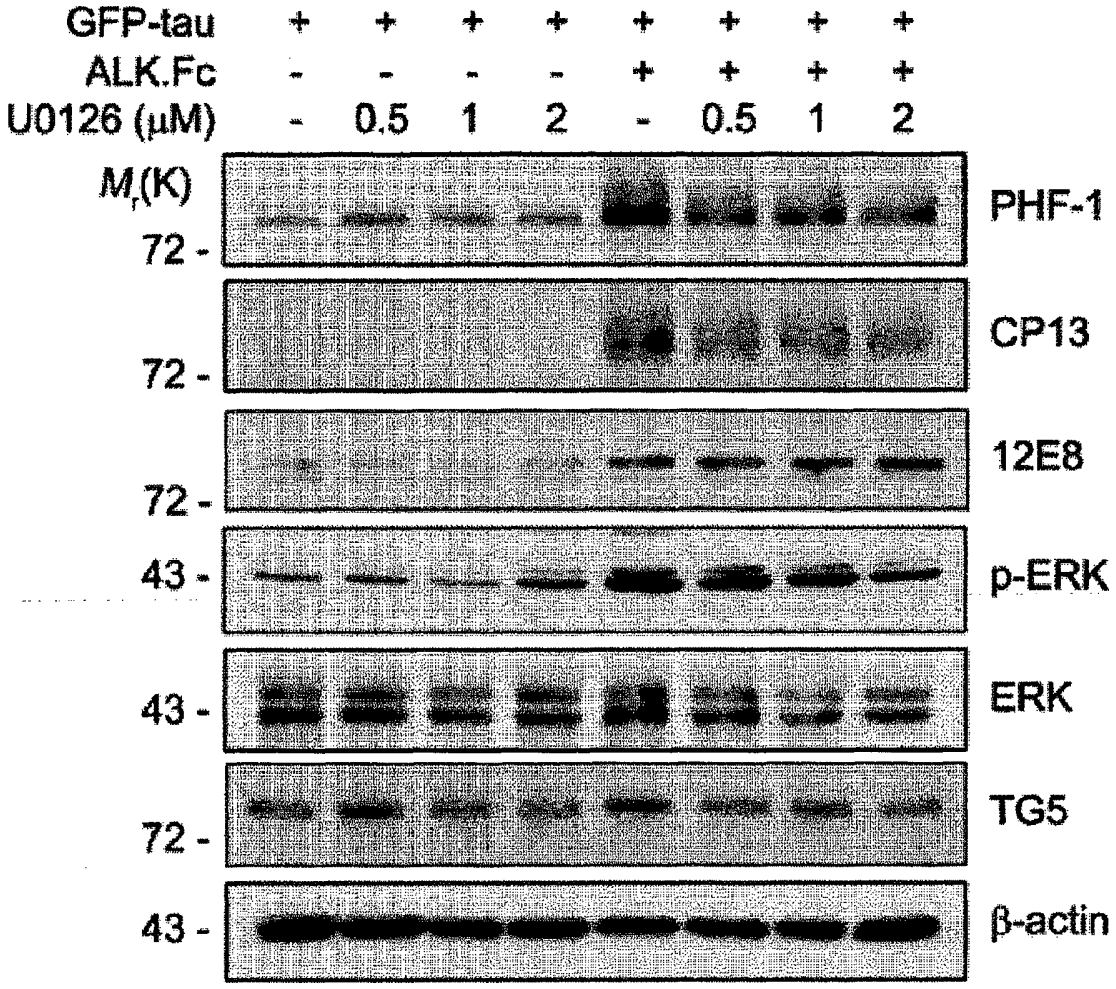
[Fig. 4a]


pcDNA
pcDNA
ALK
ALK KD
ALK.Fc
ALK.Fc KD
GFP-tau
- + + + + +
M_r(K)
55 -
p-AKT
55 -
AKT
55 -
43 -
p-GSK3β
55 -
43 -
GSK3β
43 -
p-ERK
43 -
ERK
55 -
α-tubulin

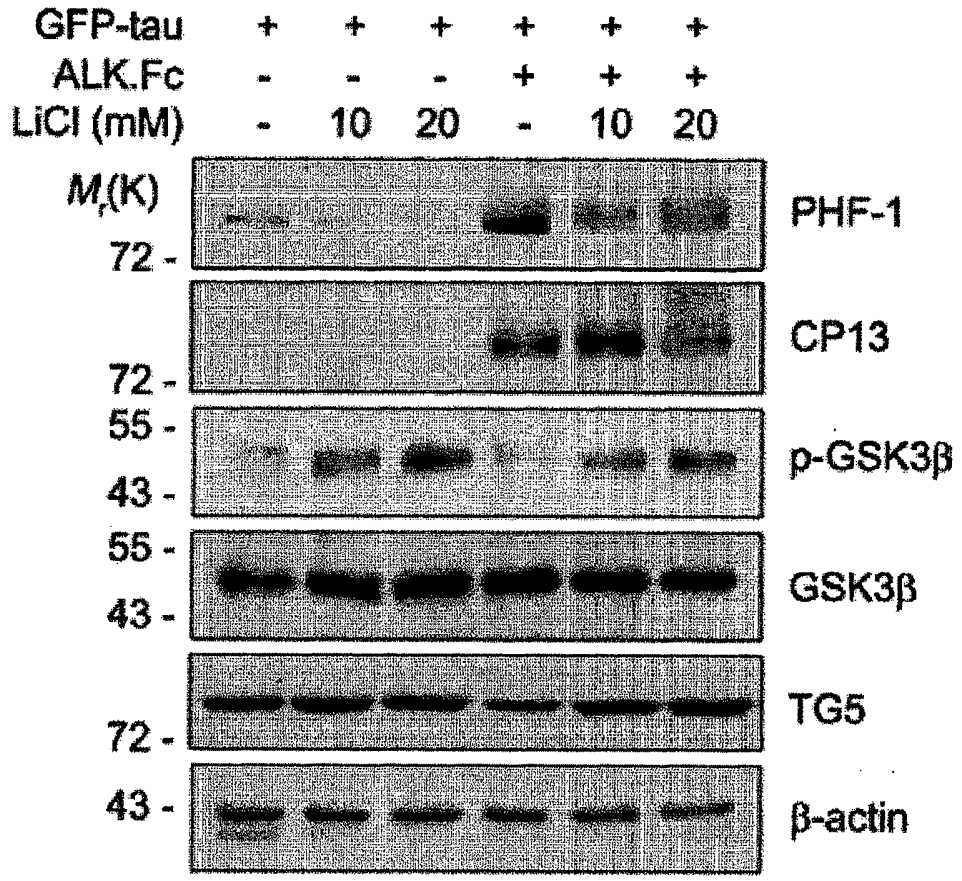
[Fig. 4b]


GFP-tau + + + + + + + +
ALK.Fc - - - - + + + +
Ros (μM) - 5 10 25 - 5 10 25
M_r(K)
72 -
PHF-1
72 -
CP13
72 -
MC1
34 -
26 -
p35
p25
72 -
TG5
43 -
β-actin

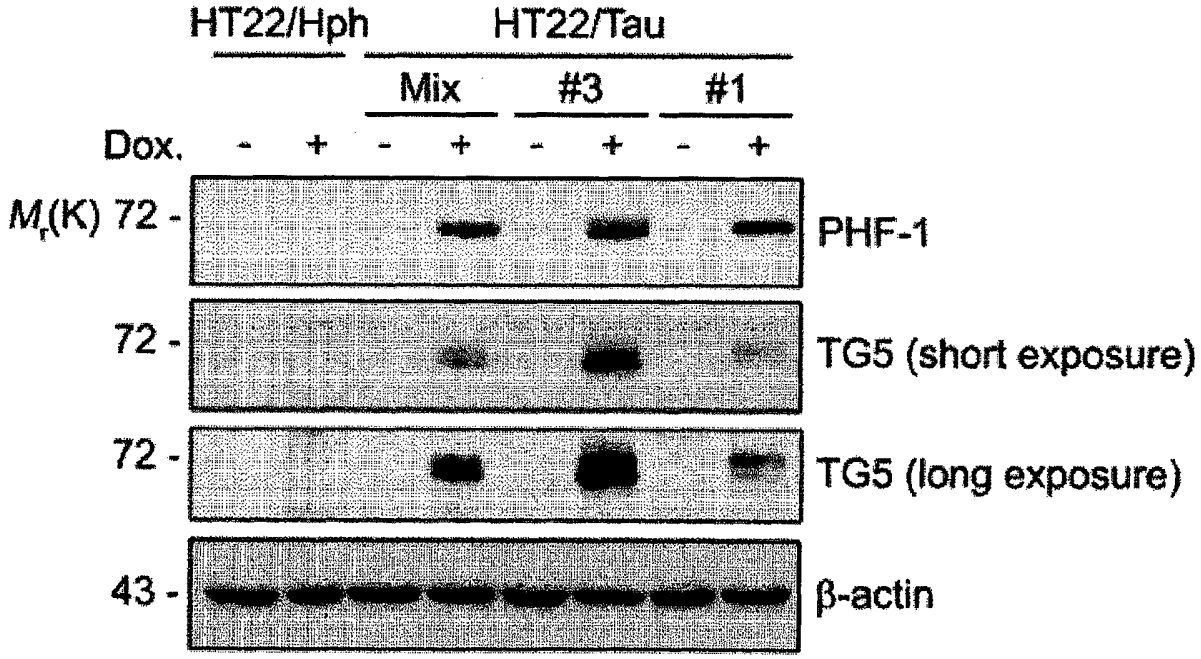
[Fig. 4c]


GFP-tau + + + + + + + +
ALK.Fc - - - - + + + +
U0126 (μM) - 0.5 1 2 - 0.5 1 2
M_r(K)
72 -
PHF-1
72 -
CP13
72 -
12E8
43 -
p-ERK
43 -
ERK
72 -
TG5
43 -
β-actin

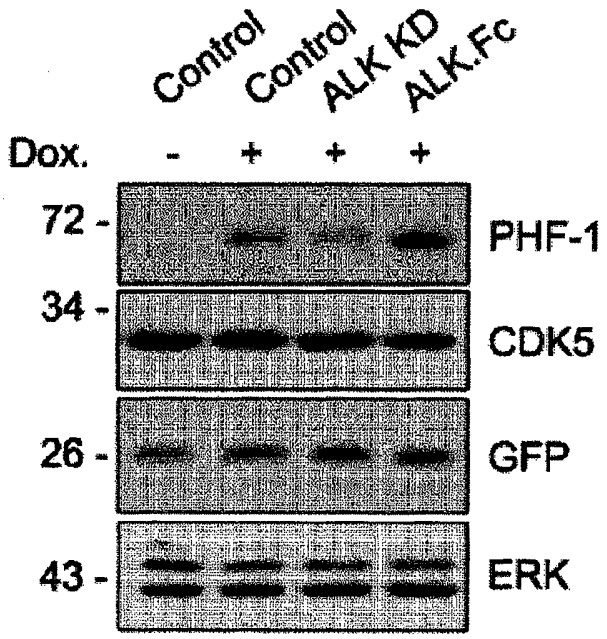
[Fig. 4d]


GFP-tau + + + + + +
ALK.Fc - - - + + +
LiCl (mM) - 10 20 - 10 20
M_r(K)
72 -
PHF-1
72 -
CP13
55 -
43 -
p-GSK3β
55 -
43 -
GSK3β
72 -
TG5
43 -
β-actin

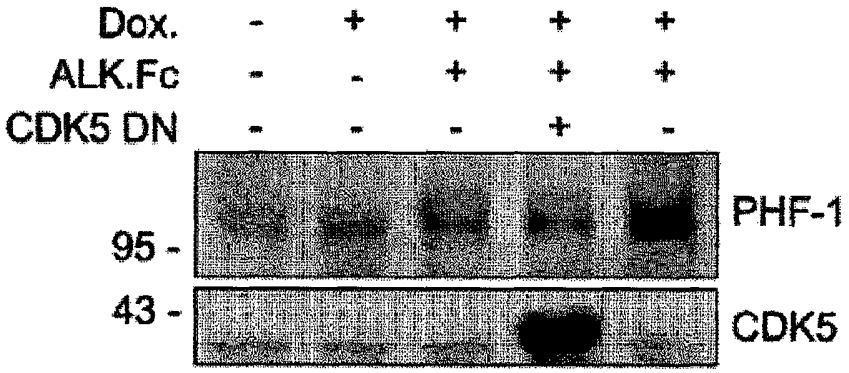
[Fig. 5a]


HT22/Hph
HT22/Tau
Mix
#3
#1
Dox. - + - + - + - +
M_r(K) 72 -
PHF-1
72 -
TG5 (short exposure)
72 -
TG5 (long exposure)
43 -
β-actin

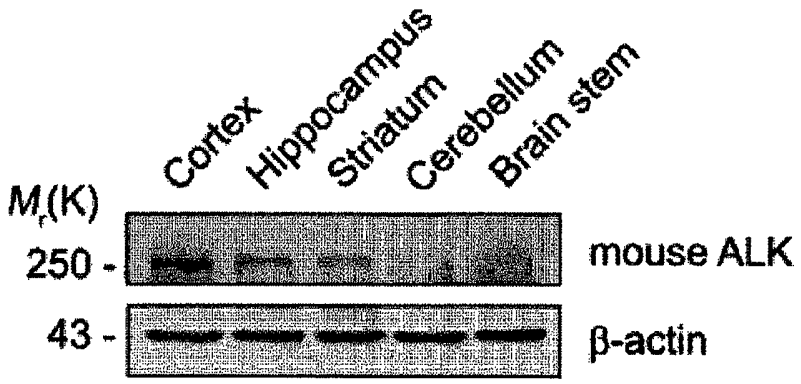
[Fig. 5b]


Control
Control
ALK KD
ALK.Fc
Dox.
- + + +
72 -
PHF-1
34 -
CDK5
26 -
GFP
43 -
ERK

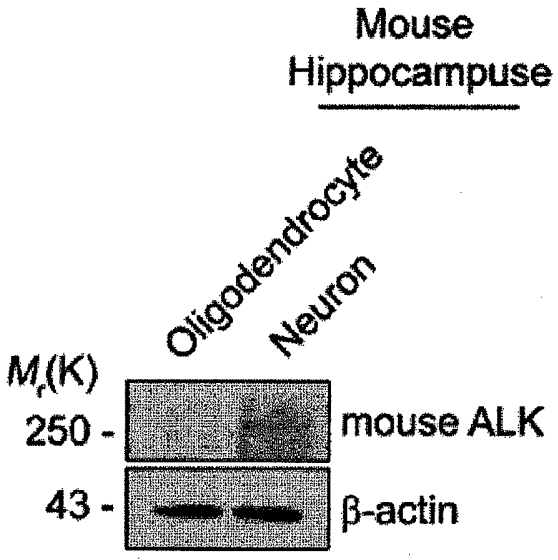
[Fig. 5c]


Dox. - + + + +
ALK.Fc - - + + +
CDK5 DN - - - + -
95 -
PHF-1
43 -
CDK5

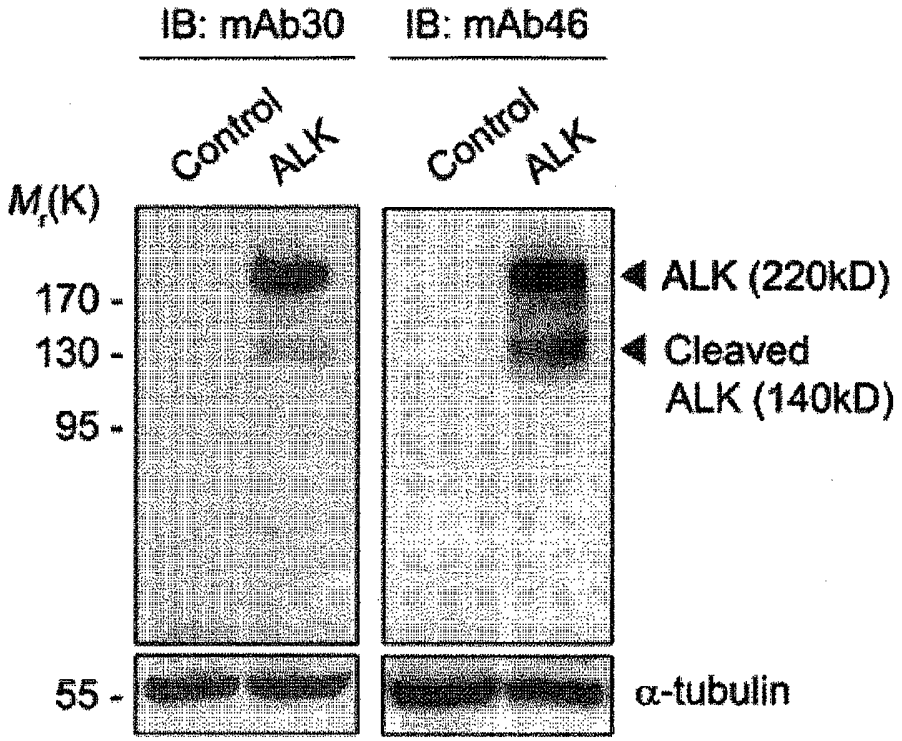
[Fig. 6a]


Cortex
Hippocampus
Striatum
Cerebellum
Brain stem
M_r(K)
250 -
43 -
mouse ALK
β-actin

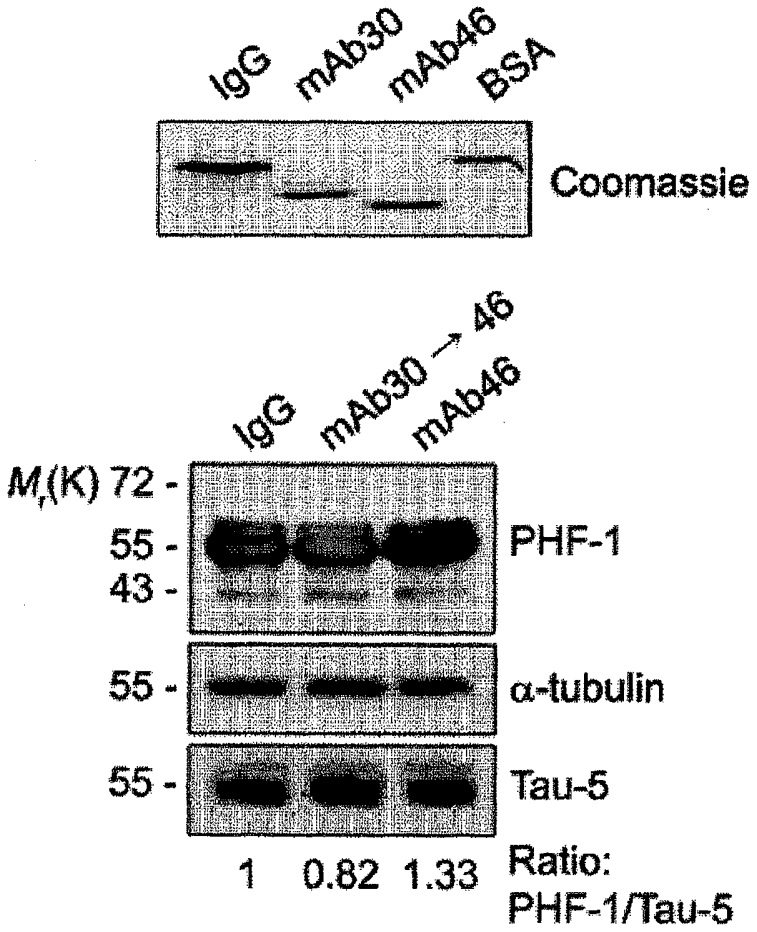
[Fig. 6b]


Mouse
Hippocampuse
Oligodendrocyte
Neuron
M_r(K)
250 -
43 -
mouse ALK
β-actin

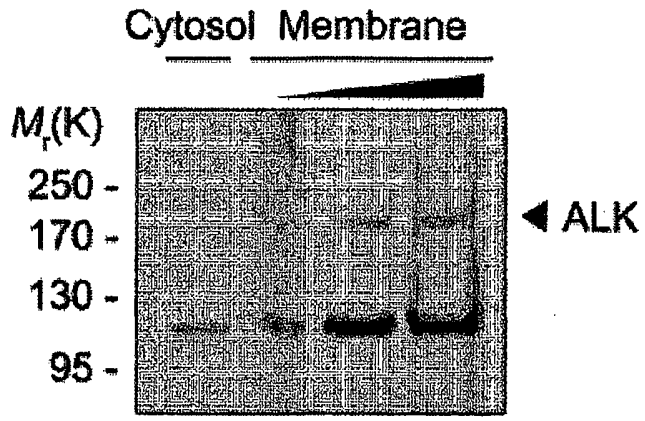
[Fig. 6c]


IB: mAb30
IB: mAb46
Control
ALK
Control
ALK
M_r(K)
170 -
130 -
95 -
55 -
ALK (220kD)
Cleaved ALK (140kD)
α-tubulin

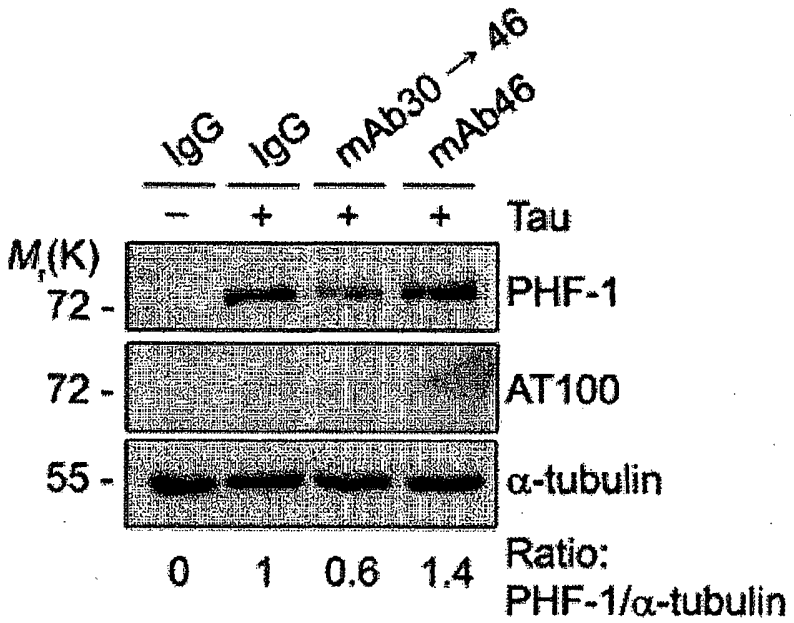
[Fig. 6d]


IgG
mAb30
mAb46
BSA
Coomassie
IgG
mAb30 → 46
mAb46
M_r(K) 72 -
55 -
43 -
PHF-1
55 -
α-tubulin
55 -
Tau-5
1
0.82
1.33
Ratio:
PHF-1/Tau-5

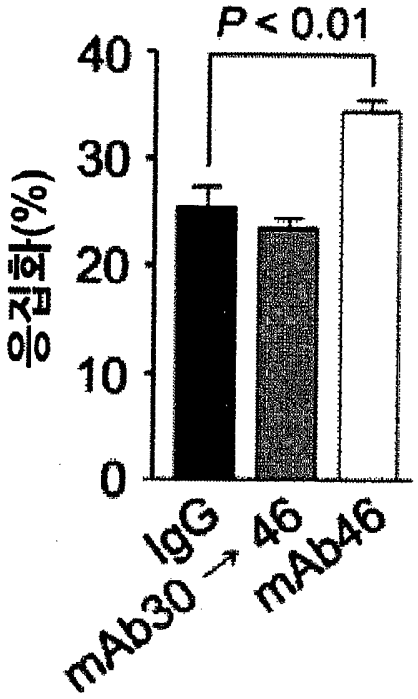
[Fig. 7a]


Cytosol
Membrane
M_r(K)
250 -
170 -
130 -
95 -
ALK

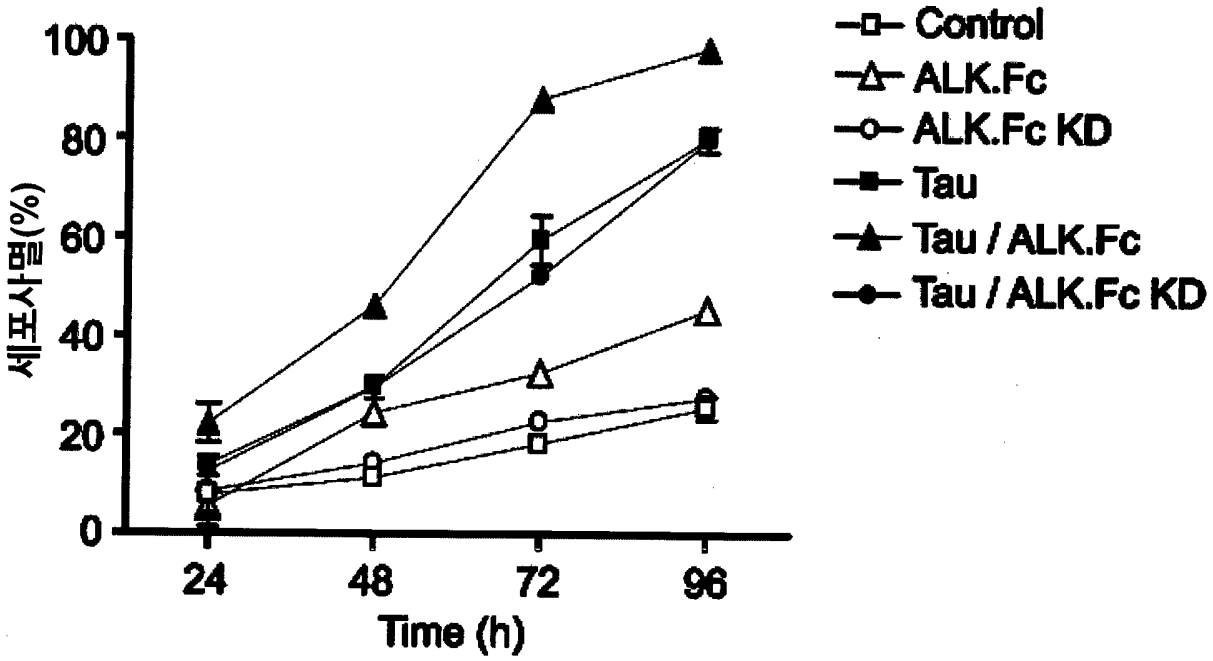
[Fig. 7b]


IgG
IgG
mAb30 → 46
mAb46
−
+
+
+
Tau
M_r(K)
72 -
PHF-1
72 -
AT100
55 -
α-tubulin
0
1
0.6
1.4
Ratio:
PHF-1/α-tubulin

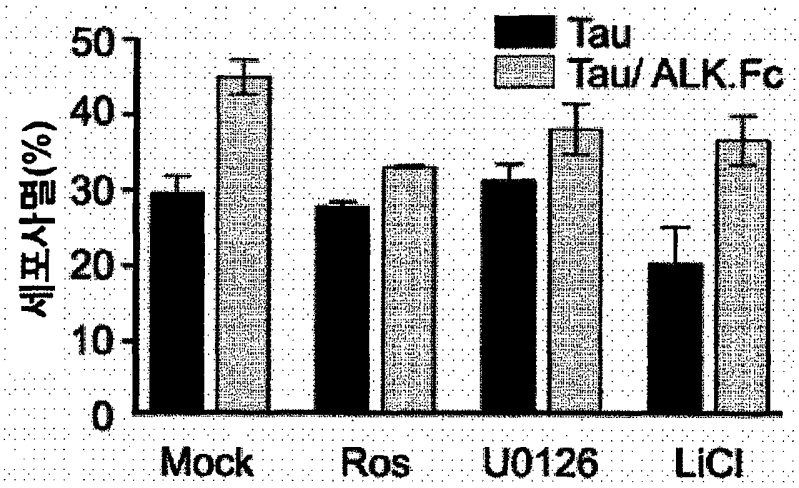
[Fig. 7c]


P < 0.01
응집화(%)
40
30
20
10
0
IgG
mAb30 → 46
mAb46

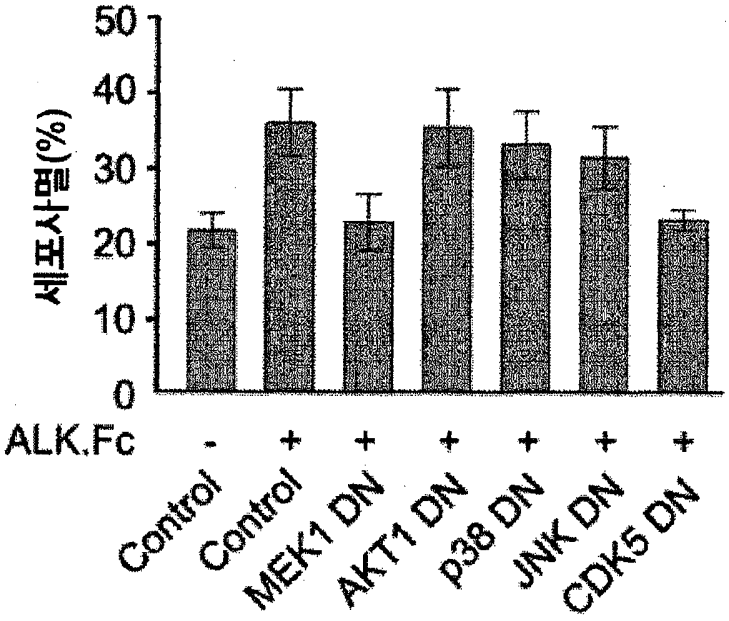
[Fig. 8a]


세포사멸(%)
100
80
60
40
20
0
24
48
72
96
Time (h)
Control
ALK.Fc
ALK.Fc KD
Tau
Tau / ALK.Fc
Tau / ALK.Fc KD

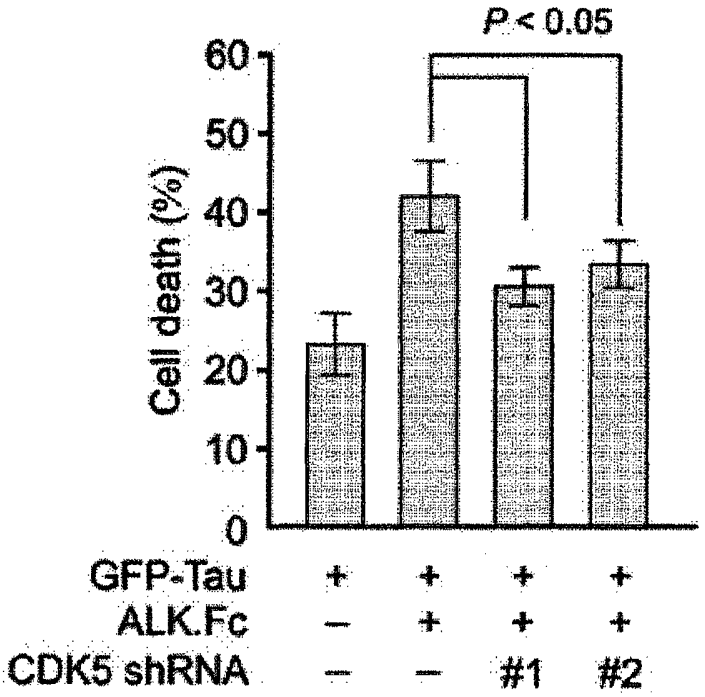
[Fig. 8b]


Tau
Tau/ ALK.Fc
세포사멸(%)
50
40
30
20
10
0
Mock
Ros
U0126
LiCl

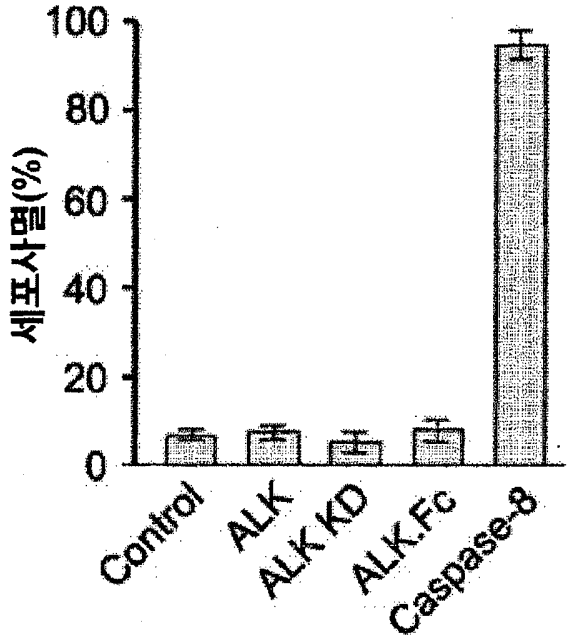
[Fig. 8c]


세포사멸(%)
50
40
30
20
10
0
ALK.Fc
- + + + + + +
Control
Control
MEK1 DN
AKT1 DN
p38 DN
JNK DN
CDK5 DN

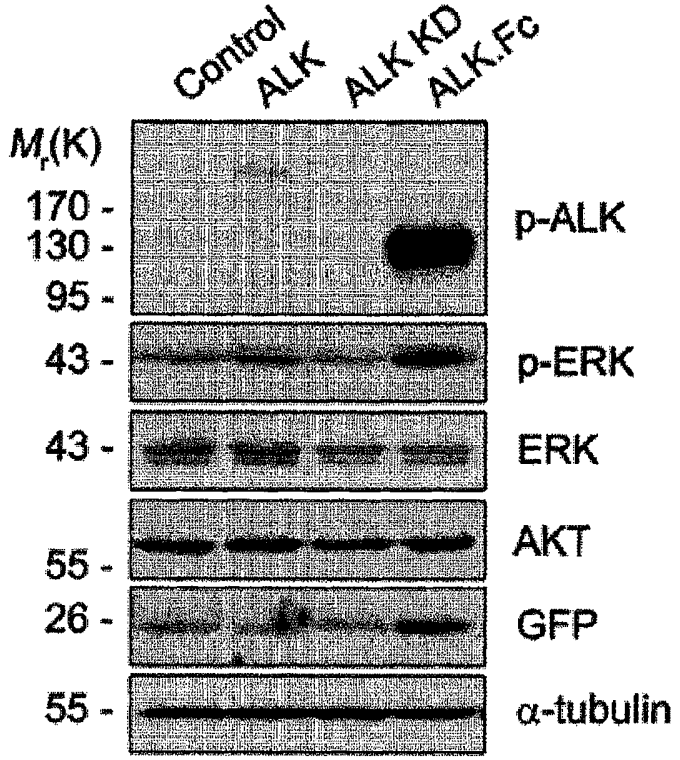
[Fig. 8d]


P < 0.05
Cell death (%)
60
50
40
30
20
10
0
GFP-Tau + + + +
ALK.Fc − + + +
CDK5 shRNA − − #1 #2

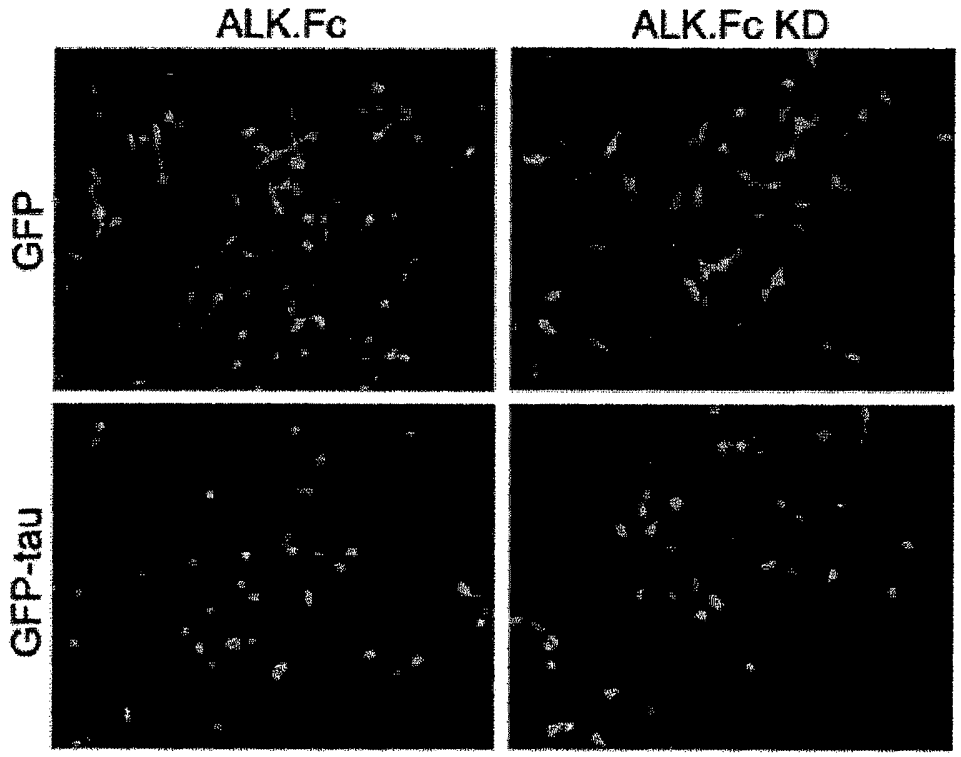
[Fig. 8e]


세포사멸(%)
100
80
60
40
20
0
Control
ALK
ALK KD
ALK.Fc
Caspase-8

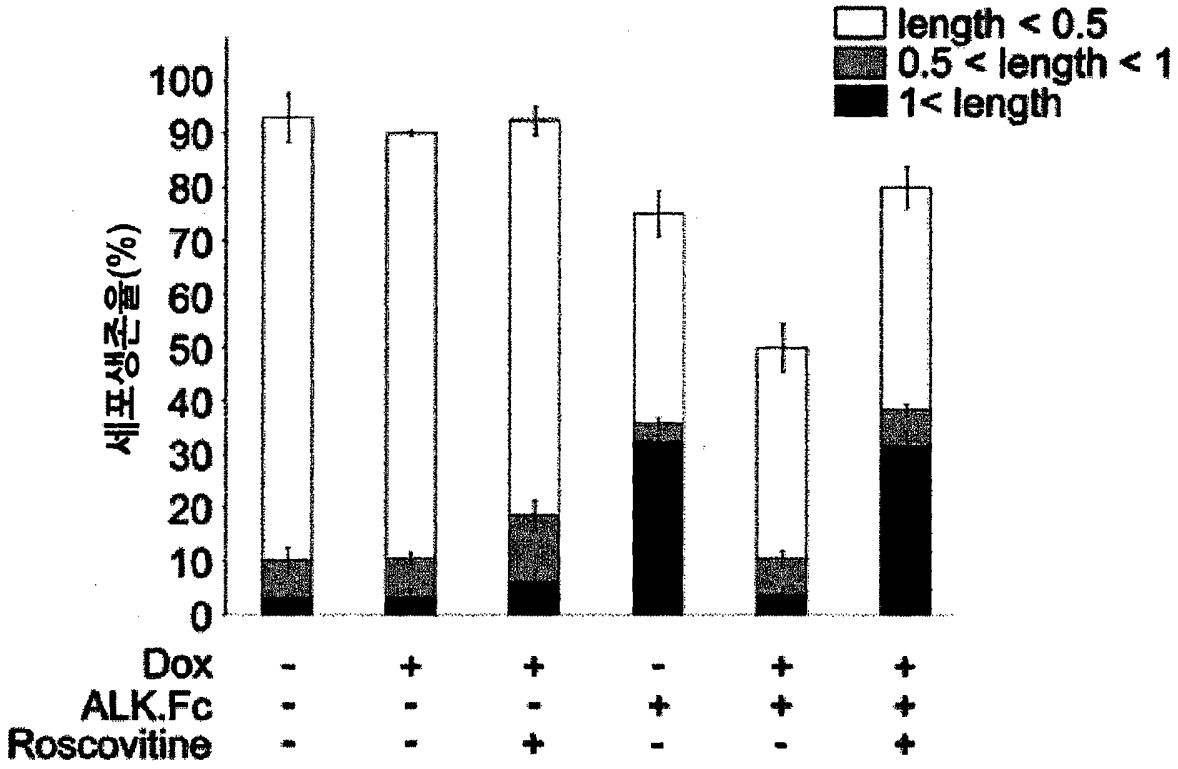
[Fig. 8f]


Control
ALK
ALK KD
ALK.Fc
M_r(K)
170 -
130 -
95 -
43 -
43 -
55 -
26 -
55 -
p-ALK
p-ERK
ERK
AKT
GFP
α-tubulin

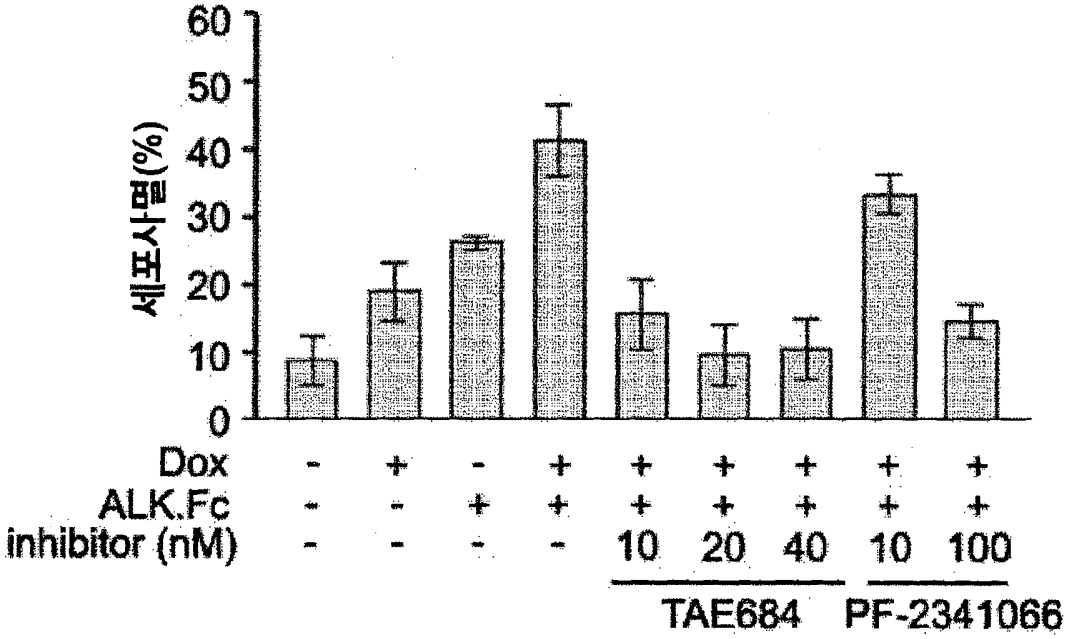
[Fig. 9a]


ALK.Fc
ALK.Fc KD
GFP
GFP-tau

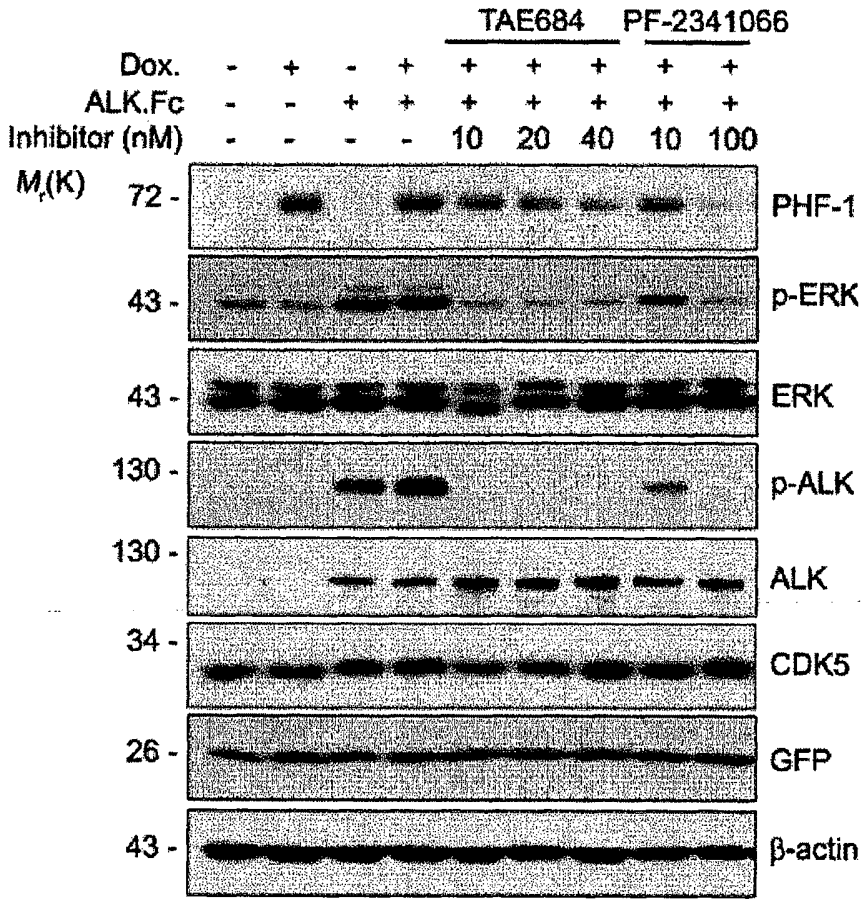
[Fig. 9b]



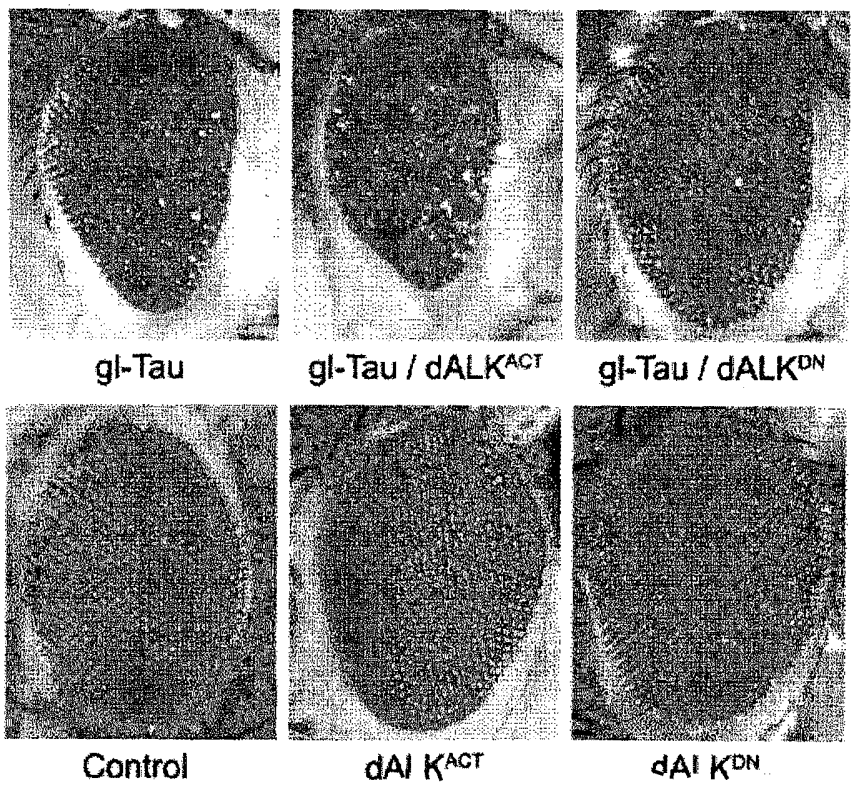
[Fig. 10a]



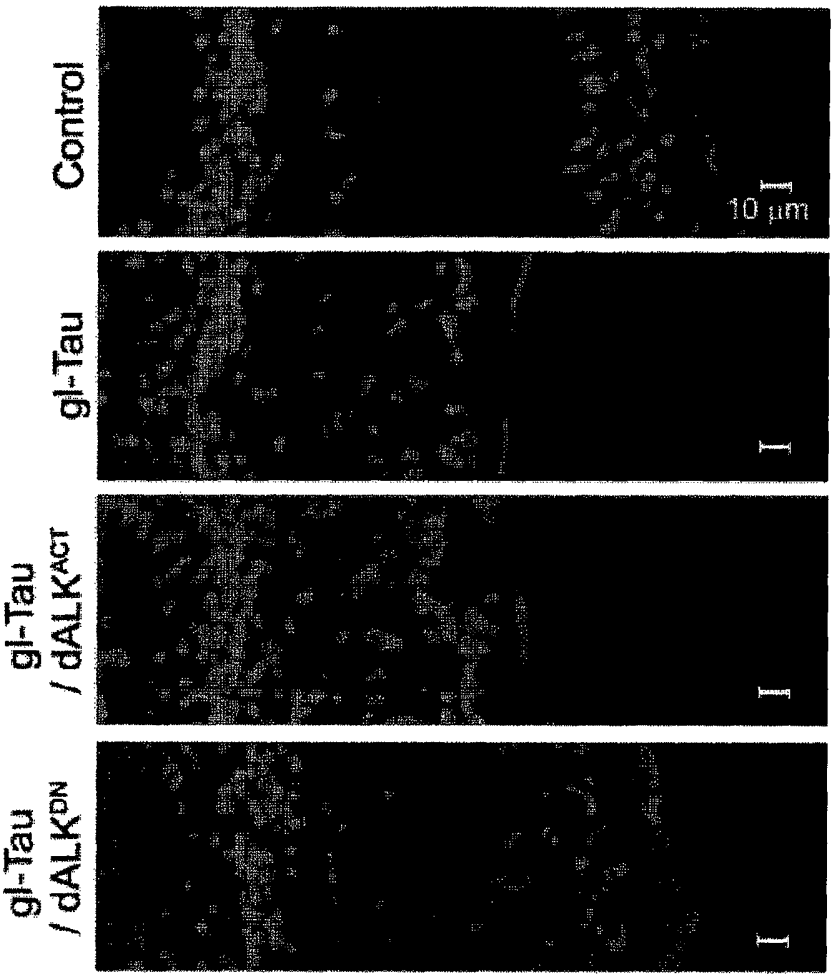
[Fig. 10b]



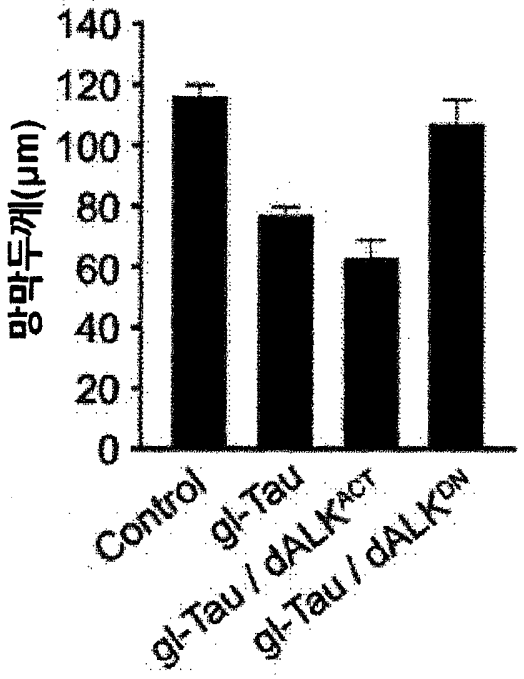
[Fig. 11a]



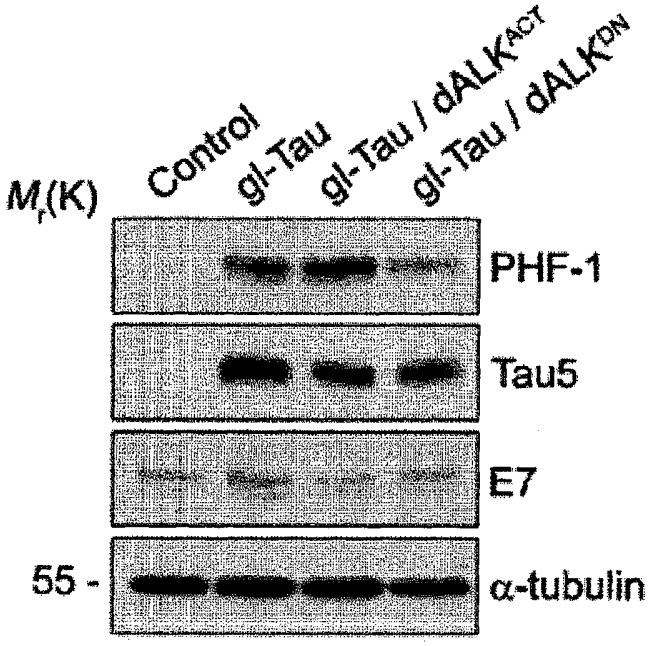
[Fig. 11b]



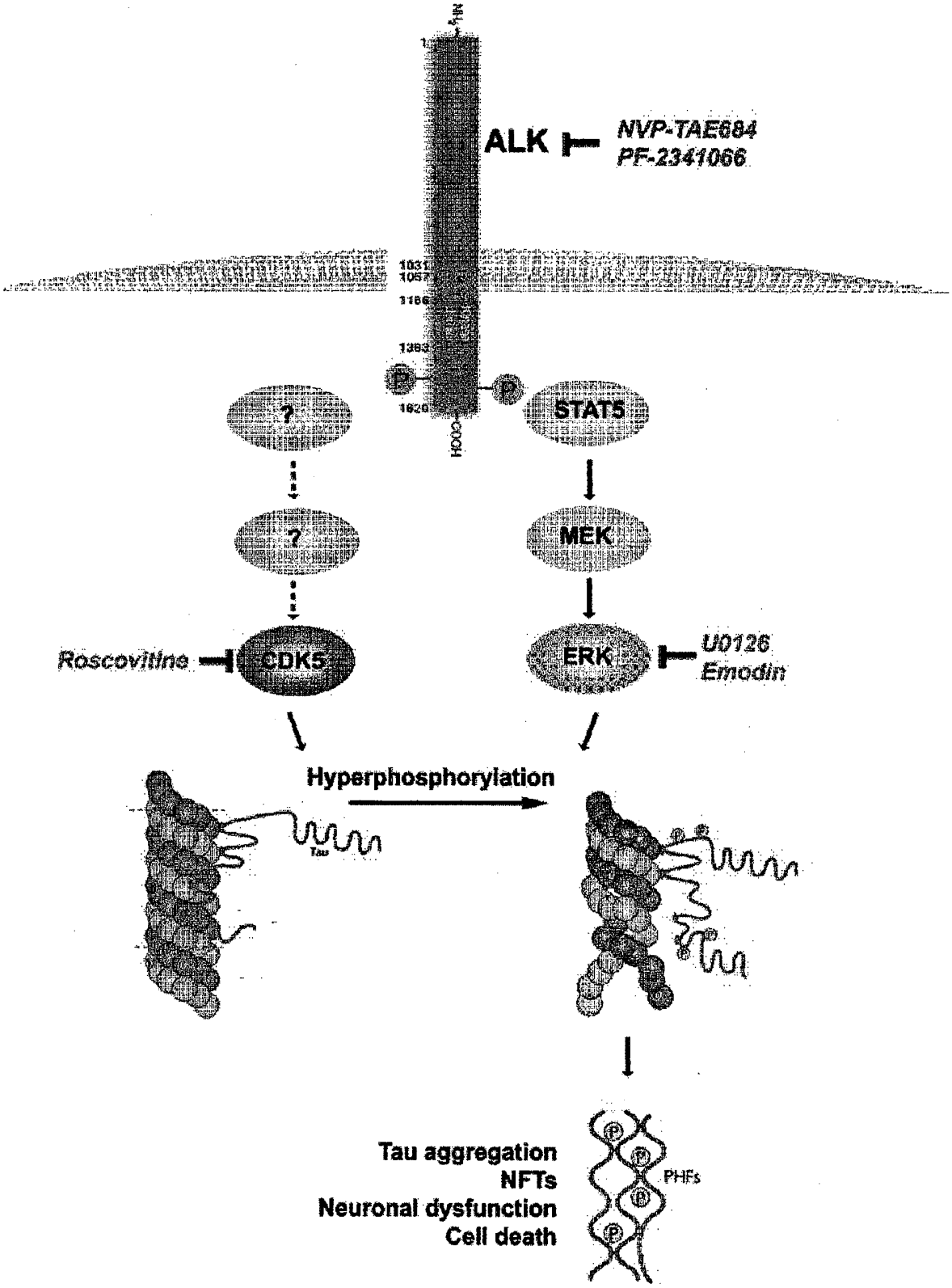
[Fig. 11c]



[Fig. 11d]



[Fig. 12]


ALK
NVP-TAE684
PF-2341066
STAT5
?
?
MEK
Roscovitine
CDK5
ERK
U0126
Emodin
Hyperphosphorylation
Tau
Tau aggregation
NFTs
Neuronal dysfunction
Cell death
PHFs

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/004537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61P 25/28(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)

A61K 39/395; A61K 48/00; A61K 31/7105; A61P 25/28

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: , ,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEISS et al. "Anaplastic Lymphoma Kinase and Leukocyte Tyrosine Kinase: Functions and genetic interactions in learning, memory and adult neurogenesis", Pharmacology, Biochemistry and Behavior 100 (2012) 566-574 See whole document	1-17
A	BILSLAND et al. "Behavioral and Neurochemical Alterations in Mice Deficient in Anaplastic Lymphoma Kinase Suggest Therapeutic Potential for Psychiatric Indications" Neuropsychopharmacology (2008) 33, 685-700 See whole document	1-17

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 SEPTEMBER 2013 (05.09.2013)	**06 SEPTEMBER 2013 (06.09.2013)**
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/KR2013/004537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2013/004537

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 39/395(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/7105(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 39/395; A61K 48/00; A61K 31/7105; A61P 25/28

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: , ,

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Weiss et al. `Anaplastic Lymphoma Kinase and Leukocyte Tyrosine Kinase: Functions and genetic interactions in learning, memory and adult neurogenesis` , Pharmacology, Biochemistry and Behavior 100 (2012) 566-574 see whole document	1-17
A	Bilsland et al. `Behavioral and Neurochemical Alterations in Mice Deficient in Anaplastic Lymphoma Kinase Suggest Therapeutic Potential for Psychiatric Indications' Neuropsychopharmacology (2008) 33, 685-700 See whole document	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 09월 05일 (05.09.2013)	2013년 09월 06일 (06.09.2013)

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

심사관
임혜준
전화번호 +82-42-481-8395

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/004537

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
없음			